

自然科學研究機構

生理學研究所年報

第27卷



2006

はじめに

生理学研究所年報第 27 巻を刊行する運びとなりました。本年報は平成 17 年度、すなわち、平成 17 年 4 月 1 日より平成 18 年 3 月 31 日にわたる生理学研究所の事業活動、特にその研究活動の報告を目的としております。

生理学研究所は岡崎国立共同研究機構の一研究機関として昭和 52 年（1977 年）5 月 2 日に創設されましたが、平成 16 年（2004 年）4 月 1 日より、いわゆる“国立大学法人化”の流れの中で、大学共同利用機関法人自然科学研究機構の一研究機関を形成することになりました。したがって、本年報は法人化後第二冊目のそれとなるわけです。

法人化後の生理研においても、「わが国の基礎科学の基盤研究所として、基礎科学を推進する」という生理研本来の使命は毫も揺るがないのでありますが、法人化により新たに加わった法人運営上の業務や事務的な負荷に対処するために、また、法人化後の生理研に対する生理学関連領域の研究 community からの要請応えるために、生理研の組織には既にこれまでも幾つかの改変が加えられてきました。これらの要請の中でも、「大学共同利用機関としての機能の拡充」は法人化当初より最重要課題の一つと目され、これに対してさまざまな方策が模索され、その一部は既に実行されております。特に平成 17 年度においては「行動解析センターの立ち上げ」と「動物飼育室の一部 SPF 化」を実現することができました。生理研の自己努力によって達成されたこれらの成果は、厳しい運営経費節減の渦中にあってもなお揺るぎない所員ひとりひとりの献身的な協力によるものと自負するところであります。

とは申すものの、法人化後に付加された業務の中には「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・教育活動に悪影響を及ぼすことが常に懸念されるのでありますが、平成 17 年度の生理研の研究活動は、本年報の報告からも明らかなように、例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。

われわれ所員一同、今後とも心を一つに、生理研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 18 年 7 月 17 日

生理学研究所所長 水野 昇

生理学研究所年報

〔 目 次 〕

職 員 (2005 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	25
統合生理研究系	31
大脳皮質機能研究系	38
発達生理学研究系	47
脳機能計測センター	54
行動・代謝分子解析センター	57
統合バイオサイエンスセンター	59
動物実験センター	71
計算科学研究センター	72
技 術 課	74
研究発表	
発 表 論 文	87
学 会 発 表	103
一般共同研究報告	125
計画共同研究報告	149
磁気共鳴装置共同利用実験報告	171
超高压電子顕微鏡共同利用実験報告	181
生体磁気計測装置共同利用実験報告	193
研究会報告	201
各種シンポジウム	
トロポニン発見 40 周年記念国際シンポジウム	471
総合研究大学院大学・生理学研究所 国際シンポジウム	472
名古屋大学環境医学研究所・生理学研究所合同シンポジウム	474
日本学術振興会・二国間交流事業・韓国とのセミナー	475
トレーニングコース	
生理科学実験技術トレーニングコース	479
セミナー報告	481
その他のセミナー	501
大学院特別講義	507

職員 (2005 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

総研大院博士 長 友 克 広
(2005.4.1~)

助 教 授 立 山 充 博

助 手 中 條 浩 一
(2005.4.1~)" 岩 井 博 正
(~2005.5.31)日本学術振興会特別研究員 藤 原 祐 一 郎
(~2006.3.31)総研大院修士 石 井 裕
(2005.4.1~)

分子神経生理研究部門

教 授 池 中 一 裕

特別協力研究員 田 中 久 貴
(~2006.3.31)

助 教 授 小 野 勝 彦

特別共同利用研究員 政 平 訓 貴
(~2005.3.31)

" 等 誠 司

助 手 竹 林 浩 秀

大学院生 鳥 居 知 宏

" 田 中 謙 二

日本学術振興会外国人特別研究員 丁 雷

非常勤研究員 (生理研) 石 井 章 寛
(~2005.8.3)特別協力研究員 中 島 弘 文
(~2006.3.31)非常勤研究員 (科研費) 小 川 泰 弘
(~2005.3.31)研究員 馬 堅 妹
(2005.4.6~2005.12.12)大学院生 古 性 美 記
(~2005.3.31)大学院生 村 岡 大 輔
(2005.4.1~2006.3.31)

" 成 瀬 雅 衣

特別共同利用研究員 市 原 有 美
(2005.4.1~2006.3.31)

" 渡 辺 啓 介

" 池 田 和 代
(2005.4.1~)

" 東 幹 人

細胞内代謝研究部門

客員教授 曾我部 正 博

助 手 毛 利 達 磨

助 手 久 野 みゆき

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
(~2005.10.31)大学院学生 野 口 潤
(~2005.3.31)教授 (兼任) 河 西 春 郎
(2005.11.1~2006.3.31)博士研究員 野 口 潤
(2005.4.1~2005.10.31)助 手 根 本 知 己
(~2005.12.31)" 田 中 淳 一
(2005.4.1~2005.10.31)" 高 橋 倫 子
(~2005.12.31)" 宮 崎 崇 史
(2005.4.1~2005.10.31)" 松 崎 政 紀
(~2005.9.30)非常勤研究員 兒 島 辰 哉
(~2005.3.31)

特別共同利用研究員	早川泰之 (~2005.3.31)	大学院学生 日本学術振興会特別研究員	本蔵直樹 (2006.3.31 卒業)
"	大嶋章裕 (~2005.3.31)	大学院学生	島山裕康 (2006.3.31 卒業)
"	安松信明 (~2005.12.31)	特別共同利用研究員	堀池由浩 (2005.4.1~2005.12.31)
"	緒方 衝 (~2005.3.31)	"	萩原輝記 (2005.4.1~2005.12.31)

機能協関研究部門

教授	岡田泰伸	研究員(科学研究)	浦本裕美
助教授	SABIROV, Ravshan (~2005.11.10)	非常勤研究員 特任助手	井上 華
助手	清水貴浩	学振外国人特別研究員	DUTTA, Amal Kumar
"	高橋信之	大学院生 非常勤研究員	Lee, Elbert Lan
"	檜原康博		
非常勤研究員	眞鍋健一 (~2005.10.31)	大学院生	LIU, Hongtao
		"	沼田朋大
外国人研究職員	SUN, Xin (~2006.1.6)	"	温井美帆
		"	TOYCHIEV, Abduqodir

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	安田正治
助教授	伊藤南	"	横井 功
助手	小川正	"	松茂良岳広
"	郷田直一	"	原田卓弥 (2005.4.1~)
研究員	鯉田孝和	"	坂野 拓 (2005.10.1~)
"	松本正幸 (2005.4.1~2005.6.30)		

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

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

教授	柿木隆介	非常勤研究員	三木研作 (2004.4.1~2006.3.31)
助教授	金桶吉起		
助手	乾 幸二	研究員	和坂俊昭 (2004.4.1~2006.3.31)
"	金田昌子		
非常勤研究員	木田哲夫 (2005.4.1~2006.3.31)	"	橋本章子 (2003.4.1~2006.3.31)

日本学術振興会特別研究員	野口 泰基 (2005.10.1～2006.3.31)	大学院生	鯨井 加代子 (2005.4.1～2010.3.31)
日本学術振興会外国人特別研究員	王 暁 宏 (2004.10.1～2006.9.30)	"	坂本 貴和子 (2005.4.1～2008.3.31)
大学院生	Nguyen Thi Binh (2002.10.1～2005.9.30)	"	浦川 智和 (2005.4.1～2010.3.31)
"	中田 大貴 (2003.10.1～2006.9.30)	特別共同利用研究員	宮成 愛 (2002.4.1～2006.3.31)
"	赤塚 康介 (2003.4.1～2007.3.31)	"	辻 健史 (2004.4.1～2007.3.31)
"	本多 結城子 (2003.4.1～2007.3.31)	"	中村 舞子 (2004.4.1～2006.3.31)
"	田中 絵実 (2003.4.1～2007.3.31)		

生体システム研究部門

教授	南部 篤	特別訪問研究員	喜多 均
助手	畑中 伸彦	"	知見 聡美
"	橋 吉寿	大学院生	高良 沙幸
外国人研究員	田 風 (2006.1～2006.7)	特別共同利用研究員	岩室 宏一

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

教授	重本 隆一	研究員	篠原 良章
助教授	舩山 俊彦	"	馬杉 美和子 (～2005.9.30)
助手	深澤 有吾	日本学術振興会外国人特別研究員	LÖRINCZ, Andrea
"	松井 広 (2006.2.1～)	"	SÜMEGI, Mate

大脳神経回路論研究部門

教授	川口 泰雄	大学院生	牛丸 弥香
助教授	窪田 芳之	日本学術振興会外国人特別研究員	PUIG, Maria Victoria (～2005.11)
助手	大塚 岳	"	GULLEDGE, Allan Thomas (2005.6～)
大学院生	森島 美絵子		
"	関川 明生		
"	平井 康治		

心理生理学研究部門

教授	定藤 規弘	研究員	豊田 浩士
助教授	本田 学 (～2005.8)	"	荒牧 勇
助手	神作 憲司	"	原田 宗子 (2005.4～)
"	田邊 宏樹	"	田中 悟志 (2005.4～2006.2)
研究員	齋藤 大輔		

大学院生	中 下 悟	大学院生	間 野 陽 子 (2005.4~)
"	村 瀬 未 花	特別共同利用研究員	大 塩 立 華
"	内 山 祐 司	"	内 山 仁 志 (2005.4~)
"	牧 陽 子 (2005.4~)	大学院生	進 藤 誠 吾 (2005.4~2005.11)
"	森 戸 勇 介 (2005.4~)		
"	酒 井 朋 子 (2005.4~)		

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
助 手	関 和 彦
"	遠 藤 利 朗 (~2005.8.31)
"	吉 田 正 俊
"	金 田 勝 幸 (2005.9.1~)
科学技術振興機構研究員	西 村 幸 男
"	池 田 琢 朗 (2005.7.1~)
"	加 藤 利 佳 子 (2005.9.1~)

非常勤研究員	坂 谷 智 也 (~2005.6.30)
"	高 橋 雅 人 (2005.7.1~)
大学院生	坪 井 史 治 (2005.4.1~)
"	Penphimon Phongphanp (2005.10.1~)
特別共同利用研究員	武 井 智 彦
産学官連携研究員	宮 地 ま り
"	山 根 到 (~2006.3.30)

生体恒常機能発達機構研究部門

教 授	鍋 倉 淳 一
助 教 授	張 一 成 (~2005.8.31)
助 手	前 島 隆 司
非常勤研究員	渡 部 美 穂
"	溝 口 義 人 (~2006.3.31)
研究員 (CREST)	北 村 明 彦

特別共同利用研究員	和 氣 弘 明
大学院学生	西 卷 拓 也
"	堀 部 尚 子
"	稻 田 浩 之
技術推進員	杉 浦 未 記
"	大 場 多 津 子 (2005.10.16~)

生殖・内分泌系発達機構研究部門

教 授	箕 越 靖 彦
助 手	岡 本 士 毅
"	志 内 哲 也
特任助手	鈴 木 敦 (2005.7.1~)

研 究 員	李 順 姫 (2005.4.1~)
-------	----------------------

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 達 本 徹

生体情報解析室

助 教 授 根 本 知 己
(2006.1～)

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室

助 教 授 平 林 真 澄
(2002.4.1～)技術支援員(短時間契約職員) 大 西 皆 子
(2004.4.1～)日本学術振興会特別研究員 伊 藤 潤 哉
(2004.4.1～2006.3.31)研究員(短時間契約職員) 近 藤 人 志
(2005.4.1～2006.3.20)研究員(特定契約職員) 加 藤 めぐみ
(2004.4.1～)

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 大 河 内 善 史

助 教 授 東 島 眞 一

" 黒 川 竜 紀

助 手 久 木 田 文 夫

大 学 院 生 佐 々 木 真 理
(2003.4～2006.3)

" 岩 崎 広 英

" 齋 藤 恵 亮

非常勤研究員 村 田 喜 理

" 齋 藤 恵 亮

" 中 山(鹿本)希世美

" 齋 藤 恵 亮

" 西 野 敦 雄

" 佐 藤 千 恵

" 木 村 有 希 子

" 佐 藤 千 恵
(2005.4～)

戦略的方法論研究領域

教 授 永 山 國 昭

専門研究職員 早 坂 孝 宏

客員教授 Tachev Krasimir
(～2005.3)

" 重 松 秀 樹

" 新 間 秀 一

助 教 授 村 上 政 隆

" 新 間 秀 一

" 瀬 藤 光 利

大 学 院 生 新 間 秀 一
(2005.4～)

助 手 大 橋 正 人

" 片 岡 正 典

専門研究職員 安 田 浩 史

専門研究職員 杉 谷 正 三
(～2006.3)共同研究員 木 下(尾田)千草
(～2006.3)

" Danev, S. Radostin

大 学 院 生 Hossain, Israil

" 内 田 仁
(～2006.3)特別訪問研究員 魏 陸 新
(2005.7～2005.9)

専門研究職員 喜多山 篤
(2005.4~2006.3)

大学院生 Loukanov, Alexandre
(2005.10~)

非常勤研究員 新田 浩二
(2005.4~)

共同研究員 花市 敬正
(2005.4~2006.3)

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

助教授 木村 透
(2005.6~)

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

細胞器官研究系技術係

係長 小原 正裕

係員 高橋 直樹

係員 神谷 絵美

生体情報研究系技術係

係長 伊藤 嘉邦

係員 野村 博美

主任 戸川 森雄

” 飯田 陶子

係員 福田 直美

(2005.7.23~2005.10.31)

” 三寶 誠

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)

(神谷絵美)

(伊藤嘉邦)

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 吉 村 伸 明係 員 村 田 安 永
" 佐 藤 茂 基

動物実験技術係

主 任 佐 治 俊 幸
係 員 廣 江 猛
" 窪 田 美 津 子係 員 小 池 崇 子
(2005.10.1~)

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
" 土 屋 勝 代
" 松 永 知 子
" 山 澤 美 緒
" 宮 本 香 奈
" 小 林 麻 澄
" 畑 田 小 百 合
" 岩 瀬 恵
" 小 波 蔵 知 子
(~2005.5.31)
" 水 野 み どり
(2005.6.1~)" 高 田 和 子
(2005.6.16~)
" 鈴 木 登 貴 子
" 戸 塚 昌 子
(~2005.6.30)
" 益 子 靖 毅
(~2006.3.14)
" 澤 栄 恵
" 大 西 皆 子
" 伊 藤 俊 幸
" 浅 井 友 理 子事務支援員 松 澤 敬 子
" 向 和 子
" 浅 井 明 代
" 杉 浦 友 美
" 浦 川 裕 乃" 和 田 百 加
" 坂 本 愛
" 小 林 裕 子
" 吉 田 千 菜 美
" 岡 本 友 紀

【 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

ATP 受容体チャネル P2X₂ のレコンビナント蛋白の精製と単粒子構造解析

(久保義弘, 山本友美, 三尾和弘, 小椋利彦, 佐藤主税)

代謝型グルタミン酸受容体 E238 点変異を持つ遺伝子改変マウスの作成

(久保義弘, 山本友美, 饗場篤)

代謝型グルタミン酸受容体の多様な機能を制御する機構の解明

(立山充博, 久保義弘)

KCNQ チャネルの C 末端コイルドコイルドメインの機能的意義

(中條浩一, 久保義弘)

内向き整流性 K⁺チャネル (Kir2.1) の細胞内側ポアに存在する電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的役割

(藤原祐一郎, 久保義弘)

RGS8 による受容体選択的な Gq 応答抑制の分子機構

(長友克広, 久保義弘, 伊藤政之, 齊藤修)

代謝型アデノシン受容体 (A₁R) と代謝型 ATP 受容体 (P₂Y₁R) の機能的ヘテロ多量体形成

(石井 裕, 久保義弘, 中田裕康)

高分子量 G タンパク質 mOPA1 により引き起こされるミトコンドリア断片化機構の解明

(三坂巧, 村手源英, 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, 池田和代, 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, 池中一裕)

神経幹細胞の発生の分子機構の解明

(村岡大輔, 等誠司, 池中一裕)

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, 池中一裕)

Alexander 病モデルマウスの解析

(田中謙二, 池中一裕)

脳の発生と糖鎖
(石井章寛, 等誠司, 鳥居知宏, 池中一裕)

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, 池中一裕)

細胞内代謝研究部門..... 18

概要

伸展刺激に対する細胞移動機構の研究
(毛利達磨, 曾我部正博)

力学環境に対する接着構造の応答の分子機構
(平田宏聡, 曾我部正博)

神経ステロイドによる海馬シナプス長期増強の誘導機構
(曾我部 正博)

細胞器官研究系

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, 島山 裕康)

大脳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, 堀池由浩, 萩原輝記)

機能協関研究部門..... 22

概要

大脳皮質神経細胞における容積感受性クロライドチャンネル: その性質と容積調節への関与
(井上 華, 岡田泰伸)

ヒト上皮培養細胞の容積調節性水流入における水チャンネルの役割
(木田 肇, 高橋信之, 清水貴浩, 森島 繁, 岡田泰伸)

心筋細胞アポトーシスにおける VSOR アニオンチャンネルの役割
(Wang Xiaoming, 高橋信之, 田辺 秀, 浦本裕美, 岡田泰伸)

アポトーシス死の達成には細胞内 ATP レベルの正常以上の上昇が必要である
(Zamaraeva Maria, Sabirov Ravshan, 岡田泰伸)

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門..... 25

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情報表現
(安田正治, 小松英彦)

色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動
(鯉田孝和, 小松英彦)

多次元視覚探索課題における後頭頂葉ニューロンの活動特性
(小川 正, 小松英彦)

サル視覚野活動の機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) による計測
(郷田直一, 伊藤南, 小川正, 小松英彦, 豊田浩士, 定藤規弘)

神経シグナル研究部門..... 27

概要

視床投射細胞の異種興奮性シナプスの解析

(宮田 麻理子, 井本 敬二)

成熟ニューロンにおける cdk5 の生理的役割の検索: シナプス種依存的機能の可能性

(佐竹伸一郎, 井本敬二)

視床ハイブリッド神経回路を用いた同期的神経発火の解析

(井上 剛, 井本 敬二)

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の神経機能に対する役割 - 不活性型ノックインマウスによる検討

(山肩葉子, 畑中伸彦, 阪上洋行, 高雄啓三, 宮川 剛, 小幡邦彦, 柳川右千夫, 井本敬二)

持続性けいれん時における Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の不活性化のメカニズムに関する検討

(山肩葉子, 小幡邦彦, 井本敬二)

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)

Cav2.1 変異マウス rocker における小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプス機能異常の解析

(児玉貴史, 井本敬二, 重本隆一, 深澤有吾, 森泰生)

小脳皮質における登上線維伸展範囲の定量的解析

(加勢大輔, 児玉貴史, 井本敬二)

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門..... 31

概要

ヒト感覚-運動抑制過程の脳波, 脳磁図研究

(中田大貴, 乾幸二, 和坂俊昭, 田村洋平, 木田哲夫, 柿木隆介)

体性感覚 Go/NoGo 電位への刺激間隔及び刺激確率の影響

(中田大貴, 乾幸二, 和坂俊昭, 赤塚康介, 柿木隆介)

運動準備期の第一次, 第二次体性感覚野への異なる影響

(和坂俊昭, 中田大貴, 赤塚康介, 木田哲夫, 乾幸二, 柿木隆介)

筋収縮力依存性の, 体性感覚誘発電位に対する遠心性 gate 効果の変化

(和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介)

足底自発運動準備期にみられる, 反対側同一筋収縮による SEP への gate 効果

(和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介)

ヒト第二次体性感覚野での顔の体部位再現

(Nguyen TB, 乾幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介)

Rolandic oscillation と運動野興奮性の機能的関連-脳磁図研究

(田村洋平, 宝珠山稔, 中田大貴, 廣江総雄, 乾幸二, 金桶吉起, 井上聖啓, 柿木隆介)

音再現における時間の圧縮

(矢部博興, 松岡貴志, 佐藤靖, 晝間臣治, 小山幸子, 軍司敦子, 柿木隆介, 兼子直)

二次の視覚性運動処理に関わる脳部位の探索

(野口泰基, 金桶吉起, 柿木隆介, 田邊 宏樹, 定藤 規弘)

ヒト視覚腹側路における逆行性マスキング効果の時間的動態

(野口泰基, 柿木隆介)

脳磁図と脳波を用いた母国語および外国語の脳内処理の研究

(尾島司郎, 中田大貴, 柿木隆介)

『目の動き』を見たときの後頭側頭部の活動に対する顔輪郭とパーツ情報の影響

(三木 研作, 渡辺 昌子, 本多 結城子, 中村 舞子, 柿木 隆介)

倒立顔情報処理に関わる左右半球間差：事象関連電位を用いた検討
(本多 結城子, 渡辺 昌子, 三木 研作, 中村 舞子, 柿木 隆介)

生体システム研究部門..... 35

概要

淡蒼球への GABA 作動性入力について
(南部 篤, 橘 吉寿, 知見聡美, 喜多 均)

上肢到達運動課題実行中の線条体介在ニューロンの役割
(畑中伸彦, 高良沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤)

上肢到達運動課題実行中の線条体投射ニューロンの活動様式
(畑中伸彦, 高良沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤)

パーキンソン病モデル動物における異常な淡蒼球ニューロン活動
(橘 吉寿, 岩室宏一, 南部 篤)

ジストニアの病態に関する研究—ジストニアモデル動物におけるニューロン活動の記録
(知見聡美, 田 風, 南部 篤, 高田昌彦)

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門..... 38

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, 重本隆一)

小脳運動学習の記憶痕跡
(中舘和彦, 馬杉一 時田美和子, 王文, Andrea Lörincz, 深澤有吾, 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, 川上良介, 重本隆一)

タグ導入による GABA_A 受容体の電子顕微鏡的定量法
(Mate Sümegi, 深澤有吾, 重本隆一)

GABA_B 受容体とカリウムチャネルの棘突起特異的共存
(Akos Kulik, 深澤有吾, 重本隆一)

前脳基底核と黒質—線条体ドーパミン系の電気生理学および形態学的解析
(靱山俊彦)

大脳神経回路論研究部門..... 41

概要

皮質棘突起への抑制性と興奮性入力の二重支配
(窪田芳之, 畑田小百合, 川口泰雄)

大脳皮質錐体細胞の発火特性の多様性
(大塚岳, 森島美絵子, 川口泰雄)

皮質介在ニューロンサブタイプにおけるスパイン形態分化
(苅部冬紀, 窪田芳之, 川口泰雄)

前頭皮質 5 層における錐体細胞サブタイプとシナプス結合
(森島美絵子, 川口泰雄)

parvalbumin 陽性細胞, calretinin 陽性細胞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)

脳皮質 GABA 細胞蛍光標識ラットの作成とその免疫組織化学的解析
 (平井康治, 川口泰雄, 平林真澄, 上松正和, 柳川右千夫)

心理生理学研究部門..... 43

概要

長期の訓練による, 触覚弁別における神経基盤の可塑的な変化
 (齋藤大輔, 定藤 規弘)

対連合学習を成立させるための神経基盤の解析
 (田邊 宏樹, 定藤 規弘)

一次体性感覚野における口腔領域の表象
 (宮本順, 定藤 規弘)

空間情報の脳内操作における運動前野と頭頂葉の機能分担
 (大塩りつ, 田中悟志, 本田 学)

カウンティングの神経基盤
 (神作 憲司, Marie-Laure Grillon, 酒井朋子, 定藤 規弘, Ari Johnson, Mark Hallett)

両手鏡像運動時の右一次運動野の活動低下
 (荒牧勇, 本田学, 定藤規弘)

皮肉課題に関する fMRI 研究
 (内山仁志, 小枝達也, 定藤規弘)

左下前頭回における文法処理機能の分離
 (内山祐司, 豊田浩士, 本田学, 吉田晴世, 河内山隆紀, 江部和俊, 定藤規弘)

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門..... 47

概要

随意運動の制御におけるシナプス前抑制の役割
 (関 和彦, 武井 智彦)

第一次視覚野損傷サルの残存視覚機能
 (吉田 正俊, 伊佐 正)

上丘中間層への抑制性入力
 (金田勝幸, 伊佐かおる, 伊佐正)

サル頸髄レベル皮質脊髄路損傷後の手指巧緻性回復について~C2 および C5 レベル損傷後回復の比較~
 (Bror Alstemark, Lars-Gunnar Pettersson, 西村幸男, 高橋雅人, 坪井史治, 伊佐正)

把握運動に関与する脊髄ニューロンの役割
 (武井 智彦, 関 和彦)

Spread of activity in the local circuit of superior colliculus
 (Penphimon Phongphanphanee, Tadashi Isa)

生体恒常機能発達機構研究部門..... 49

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, 西巻 卓也)

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, 渡部美穂, 和気弘明, 堀部尚子)

カンナビイドによる海馬抑制性伝達調節
 (前島隆司, 稲田浩之)

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, 和気弘明, 堀部尚子, 八尾博史)

In Vivo 多光子顕微鏡を用いた大脳皮質神経細胞の微細構造の可視化と長期可塑性の変化

(鍋倉淳一, 和気弘明)

生殖・内分泌系発達機構研究部門..... 51

概要

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

(箕越 靖彦, 岡本 士毅, 志内 哲也, 田中 智洋, 益崎 裕章)

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の解明

(箕越 靖彦, 岡本 士毅, 李 順姫, 嶋 雄一, 諸橋 憲一郎)

脂肪酸酸化を促進するレプチン・シグナル伝達機構の解明

(箕越 靖彦, 鈴木 敦)

脳機能計測センター

形態情報解析室..... 54

概要

小脳生後発達過程におけるパーグマングリア細胞の解析

(古家園子, 山口 登, 有井達夫)

機能情報解析室..... 55

概要

意志に関する脳活動の研究

(遠本 徹)

生体情報解析室..... 55

概要

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室..... 57

概要

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影響を及ぼす要因

(平林 真澄, 加藤 めぐみ, 金子 涼輔)

凍結乾燥したラット精子の顕微授精による産仔の獲得

(平林 真澄, 加藤 めぐみ, 保地 眞一)

ラット卵子の p34^{cdc2} 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

(平林 真澄, 伊藤 潤哉, 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

電位感受性ホスファターゼ Ci-VSP の分子作動原理の解析

(村田喜理, 岩崎広英, Mohamed Israil Hossain, 黒川竜紀, 木村有希子, 東島眞一, 岡村康司)

電位依存性プロトンチャネル分子の同定と分子機能の解析

(佐々木真理, 大河内善史, 黒川竜紀, 高木正浩, 岡村康司)

細胞膜裏打ち蛋白アンキリンによる電位依存性ナトリウムチャネル Nav1.6 の性質の制御

(白幡恵美, 早坂 清, 岩崎広英, 高木正浩, 岡村康司)

ゼブラフィッシュを用いた、脊髄神経回路網の解析 (木村有希子, 佐藤千恵, 東島眞一)	
尾索動物オタマジャクシ型幼生の運動機能に関わるイオンチャネル関連分子の総括的解析 (西野敦雄, 御園生裕明, 岡村康司)	
脊髄内歩行リズム神経回路網の発生機構の解析 (中山希世美, 岡村康司)	
イオンチャネルのゲート機構に関する膜-水界面の水環境の影響 (久木田文夫)	
戦略的方法論研究領域.....	62
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 (喜多山 篤, 高橋佳子, 大河原 浩, 永山國昭, 片岡正典)	
膜タンパク質の単粒子解析 (重松秀樹, Radostin Danev, 永山國昭, 清中茂樹, 原 雄二, 森 泰生)	
種々の漢方薬の灌流ラット顎下腺に対する水分分泌促進作用 (村上政隆, 大河原浩, 魏 睦新, Ding Wei)	
浸透圧センサー (AQP) による傍細胞輸送調節機構 (村上政隆, 大河原浩, 細井和雄, KwartariniMurdiastuti, Bruria Sachar-Hill, Adrian E. Hill)	
傍細胞輸送調節の形態学的基盤 (村上政隆, 前橋 寛, 橋本貞充, Alessandro Riva, Felice Loffredo, Francesca Testa-Riva)	
顕微質量分析装置の開発 (瀬藤光利, 新聞秀一)	
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.....	67
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)	
表皮 TRPV4 の結合蛋白質の解析 (東智広, 富永知子, 富永真琴)	
TRPV4 の体温制御機構への関与の解析 (稲田仁, 柴崎貢志, 鈴木誠, 富永知子, 富永真琴)	
表皮ケラチンサイトから感覚神経への温度情報伝達のメカニズムの解析 (Sravan Mandadi, 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)	
海馬における TRPV4 の発現と機能解析 (柴崎貢志, 鈴木誠, 富永真琴)	
発達期脊髄領域における温度感受性 TRP チャネルの発現と機能 (村山奈美恵, 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..... 71

概要

計算科学研究センター..... 72

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)

酸-アゾール複合体を活性化剤とするホスホロチオエート型人工核酸の立体選択的合成法の開拓

(片岡正典)

技術課..... 74

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) 生体情報解析室

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

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

ATP 受容体チャネル P2X_2 のレコンビナント蛋白の精製と単粒子構造解析

久保義弘, 山本友美

三尾和弘, 小椋利彦, 佐藤主税 (産総研, 脳神経情報)

ATP 受容体チャネル P2X_2 の構造とその状況依存的変化を知るというゴールに向けて, P2X_2 蛋白の精製と単粒子構造解析を行った。

まず, P2X_2 の N-末端に FLAG tag を付加したコンストラクトを作成し, バキュロウイルスベクターに組み込み, 昆虫細胞 Sf9 に感染させた。膜画分を回収し, FLAG 抗体によるアフィニティ精製と, ゲル濾過による精製を行った。その精製産物を用い, グルタルアルデヒドで架橋

後, non-denature ゲルにて電気泳動したところ, 主たるバンドのサイズから P2X_2 蛋白が 3 量体であることが示された。精製産物のピーク分画を用い, 酢酸ウランにより負染色して電顕撮影したところ, 単一蛋白粒子像が観察された。単粒子構造解析の手法により, P2X_2 蛋白が 3 量体であることが確認され, また, 大きな細胞外領域を持つ逆ピラミッド状の構造をしていることが明らかになった。

代謝型グルタミン酸受容体 E238 点変異を持つ遺伝子改変マウスの作成

久保義弘, 山本友美

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+} 感受性の個体における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で

いる。昨年度、相同組み換え陽性の 129 マウス由来の ES 細胞株を得、これをマウス初期胚に注入し、♂のキメラマウス 2 匹を得た。今年度、キメラマウスと B6 マウスとの交配により、遺伝子改変ヘテロのマウスを得、さら

に、その交配により、遺伝子改変ホモのマウスを得た。現在、予備的な行動解析実験を開始するとともに、遺伝的背景を B6 マウスに置き換えるための交配を進めている。

代謝型グルタミン酸受容体の多様な機能を制御する機構の解明

立山充博, 久保義弘

代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) は、記憶や学習に関する「神経回路の可塑性」に重要な役割を担い、複数の G 蛋白質 (Gs, Gq, Gi) と共役して多様な細胞応答をもたらす受容体であることが知られている。一方、mGluR1 を介して見られる細胞応答は発現細胞により異なるため、多様な機能が制御されている可能性が示唆されていた。そこで、mGluR1 が個々の細胞において複数種類の G 蛋白質を活性化する過程を、特異的レポーター

分子を用いて識別的に可視化し、多様な機能を制御する機構について検討した。その結果、多様な機能を制御する機構の一つとして、mGluR1 の活性型構造の差異を見出した。これは、リガンドの種類により mGluR1 の活性型構造が異なるため、共役する G 蛋白質の種類が異なるということを示すものである。さらに、細胞内領域における蛋白質相互作用により、mGluR1 の多様な機能が制御される可能性について検討を進めている。

KCNQ チャネルの C 末端コイルドコイルドメインの機能的意義

中條浩一, 久保義弘

KCNQ チャネルは、細胞内 C 末端領域に 2 つのコイルドコイルドメインを持つ。これらはチャネル分子が 4 量体を構成するために必要であると考えられているが、2 つのドメインの機能の違いについてはよくわかっていない。そこで我々は、KCNQ2 におけるそれぞれのドメインの機能を 2 本刺し膜電位固定法で解析した。1 つめのドメインを欠失させた変異体はチャネルとして機能しなかったが、2 つめのドメインを欠失させた変異体は野生

型の KCNQ2 とほぼ同じ電流量、性質を持つ電流が生じた。しかし野生型 KCNQ2 は KCNQ3 と共発現させると電流が 10 倍増加するのに対し、2 つめのドメインを欠失した変異体は KCNQ3 と共発現させても電流量の増加はみられなかった。2 つめのドメインはチャネルの機能に必須ではないが、KCNQ3 とのヘテロ 4 量体の電流を増加させるために何らかの役割を果たしていると考えられた。

内向き整流性 K⁺チャネル (Kir2.1) の細胞内側ポアに存在する電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的役割

藤原祐一郎, 久保義弘

内向き整流性 K⁺チャネル Kir2.1 の細胞内領域ポアの内側表面に負電荷や正電荷を持ったアミノ酸が存在する。我々は、その機能的役割を探ることを目的として、これらのアミノ酸残基の変異体を系統的に作成し、変異体の機能変化を網羅的に解析した。その結果、細胞内領域ポ

アの電荷を帯びたアミノ酸残基群が、全体として負電荷を帯びた環境を構成し、この負電荷をおびた環境が、K⁺イオンとスペルミン等の細胞内ブロッカーの両方の、局所濃度を高めることに寄与していることを明らかにした。この効果が、K⁺イオンのブロッカー非存在下での外向き

電流を促進すると共に、この外向き流の細胞内ブロッカーによるブロックに対する感受性を高め、結果として内向き整流性 K^+ チャンネルに特有な、メリハリの効いた膜電

位依存的な外向き電流のブロックを可能にしていると推察された。

RGS8 による受容体選択的な Gq 応答抑制の分子機構

長友克広, 久保義弘

伊藤政之, 齊藤修 (長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部)

我々は、G 蛋白質共役受容体系の制御因子として、 $G\alpha_i$ ファミリーに選択性の高い RGS8、さらにその N 端部 9 残基のみが異なるスプライズバリエーション RGS8S を対象としてその機能解析を行ってきた。RGS8、RGS8S 共に、 $G\alpha_q$ との結合能は低い、RGS8 は、Gq 系の M1 ムスカリニック受容体のシグナルを抑制すること、一方、RGS8S は RGS8 に比べてその抑制効果が弱いことが観察された。この効果は、RGS と G 蛋白質との結合では説明できないため、RGS と受容体との結合を解析したところ、RGS8

が M1 の第 3 三細胞内ループ (i3) に直接結合すること、また N 端の 8 番目と 9 番目のアルギニンをアラニンに置換 (R8A/R9A) すると、結合能が減弱することが判明した。電気生理学的な解析により、M1 受容体応答の RGS8 による抑制能は、R8A/R9A 変異体で減少することが観察された。以上の結果から、RGS8 の N 端と M1 の i3 の直接的な結合によって M1 受容体体系の応答が抑制されることが明らかとなった。

代謝型アデノシン受容体 (A_1R) と代謝型 ATP 受容体 (P_2Y_1R) の機能的ヘテロ多量体形成

石井 裕, 久保義弘

中田裕康 (東京都神経科学総合研究所・生体機能分子)

アデノシン受容体 $A_1(A_1R)$ は $G_{i/o}$ タンパク質に結合し、ATP 受容体 $P_2Y_1(P_2Y_1R)$ は $G_{q/11}$ タンパク質に結合することが知られている。最近、 A_1R と P_2Y_1R はいくつかの中樞神経系で共局在し、ヘテロ多量体を形成することが免疫共沈降実験により明らかにされた。我々は、アフリカツメガエルの卵母細胞を発現系として用いて、 A_1R と P_2Y_1R が機能的なヘテロ多量体を形成していることを電気生理学的に確認する実験を行った。 A_1R と P_2Y_1R を共

発現させたところ、非加水分解性の ATP アナログ添加により $G_{i/o}$ 反応が見られた。この結果はユニークな表現系をもつ機能的なヘテロ多量体が形成されていることを示している。また、そのヘテロ多量体は、ATP アナログによって $G_{q/11}$ 系が活性化され、アデノシンアナログによって $G_{i/o}$ 系が活性化されるという、それぞれのサブユニットの持つ本来の性質が保たれていることも確認された。

高分子量 G タンパク質 mOPA1 により引き起こされるミトコンドリア断片化機構の解明

三坂巧 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

村手源英 (理化学研究所)

久保義弘

高分子量 GTP 結合タンパク質 mOPA1 は、遺伝子導入

した COS-7 細胞においてミトコンドリアの断片化を引

き起こす。断片化されたミトコンドリアを mOPA1 の局在と共に観察したところ、小さなリング状になったマトリックスの一端に mOPA1 および膜間部分が Vesicle 状の局在を示している様子が観察された。すなわち mOPA1 の遺伝子導入によりミトコンドリアが単に断片化するだけでなく、ミトコンドリア内部で膜間部分が凝集して片寄った分布を示すような機能を持つことが推察された。

また mOPA1 の GTP 結合ドメインに点変異を導入した K301A 変異体を発現させた場合には、ミトコンドリアは依然として断片化するものの、膜間部分とマトリックスはともにリング状に観察された。すなわちミトコンドリア断片化に伴う膜間部分の凝集には mOPA1 の GTP 結合能が強く関与することが示唆された。

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, 池田一裕

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, 池田和代, 池中一裕

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 細胞は前脳基底部でもコリナージックニューロンに分化することが明かとなった。Olig2 欠損マウスでは, 前脳基底部における 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。

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

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, 池前一裕

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^+ チャネル, K^+ チャ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無かった。唯一の有意な変化はパ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, 池前一裕

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, 池前一裕

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

村岡大輔, 等誠司, 池中一裕

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、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, 池中一裕

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。

Alexander 病モデルマウスの解析

田中謙二, 池中一裕

Alexander 病の原因遺伝子である変異 GFAP を発現するトランスジェニックマウスを作成した。Alexander 病の病理の特徴である GFAP 凝集体は、変異 GFAP がわずか 30%過剰発現するだけで形成されることが明らかになった。GFAP 凝集体の存在は、内在 GFAP の発現を増加させ、別の中間径フィラメントであるネスチンを誘導したが、正常な中間径フィラメントを形成することなく、凝集体にとり込まれていた。モデルマウスのアストロサイ

トは中間径フィラメントによる細胞骨格が破壊されていたが、アストロサイトの微細形態は保たれていた。一方で、海馬 CA1 の LTP が形成されやすいこと、カイニン酸全身投与でけいれんを起こしやすいことなどの神経回路異常を示唆するデータを得た。細胞骨格の異常が神経回路異常にどのように関与するのか、これが Alexander 病の病態生理にどのように関与する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, 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を示すこと, (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性を明らかにできる。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にシ

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て機能解析を行い, 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】

細胞が刺激に対し適切に応答する細胞シグナリング機構の解明は命の謎と進化を解く鍵である。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目指している。特に細胞の機械刺激受容/応答機構(細胞

力覚機構)の解明を中心課題に設定して, 細胞運動における機械シグナリングの役割, あるいは機械刺激に対する細胞骨格や接着斑の応答機構を調べている。また, 受精機構について Ca^{2+} 動態を中心に解析している。さらに, シナプス可塑性に対する神経ステロイドの調節作用の分子機序についても研究を始めている。

伸展刺激に対する細胞移動機構の研究

毛利達磨
曾我部正博

伸展可能なシリコンフィルム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における細胞の移動過程を研究した。定常的に伸展した場合の創傷部位への細胞の移動をタイムラプスのビデオ顕微鏡で観察記録した。個々の細胞の時空間的解析から細胞の移動速度は定常的伸展時には、伸展方向に対して増加することを確認した。伸展時には細胞内のエネルギーセンサー (AMPK) が活性化しておりそのシグナルを統合する仕組みがあるという仮説をたてた。この仮説を証明すべく

研究を展開している。まず、AMPK が活性化しているかどうかみるために、ウェスタンブロット法で AMPK のリン酸化の増加 (活性化) を調べたところその増加を確認した。また、逆に、AMPK を活性化する試薬 AICAR を投与し、その存在下の細胞移動速度を調べた。移動速度はコントロールに比べて、有意に増加していた。同時に細胞接着斑、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開始した。

力学環境に対する接着構造の応答の分子機構

平田宏聡
曾我部正博

接着性細胞における細胞外基質との接着構造(接着斑)は、加わる力に応じてその大きさが変化する。しかし、その分子機序は謎のままである。接着斑ではアクチンの重合が盛んであり、また接着斑の構成要素の多くはアクチン結合タンパク質である。そこで我々は、力の負荷が、アクチン重合の局所的な調節を介して、アクチン結合タンパク質を含む接着斑の大きさを変化させるという仮説をたてた。この仮説に基づき、アクチン重合調節タンパ

ク質であり接着斑に局在する zyxin について、力学刺激に対する応答を調べた。ミオシン II の阻害により細胞の収縮力発生を抑制すると、zyxin は他の接着斑タンパク質に先立って接着斑から消失した。また、収縮力の発生を抑制し接着斑を完全に消失させた細胞を人為的に伸長させると、zyxin の集積が現れた。これらの結果から、zyxin は力学刺激に対する応答性の高い接着斑タンパク質であることが明らかとなった。

神経ステロイドによる海馬シナプス長期増強の誘導機構

曾我部 正博

最近になって、エストロゲン (estrogen) を始め、PREGS (pregnenolone-sulfate) や DHEAS (dehydroepiandrosterone-sulfate) に代表される多くのステロイドは、脳内で合成、分泌され、脳の高次機能を修飾する内因性生理活性物質であることが明確になり、神経ステロイドと総称されている。神経ステロイドの投与は学習記憶を促進し、逆にアルツハイマー病や老化による学習記憶の低下と神経ステロイドの脳内濃度の低下に強い相関が認められている。

我々は、これらの背後にある分子機構を探る目的で、ラット海馬スライスに対する神経ステロイドの作用を電位感受性色素を用いた高速イメージングで詳細に解析した。上述の PREGS は、投与直後に海馬歯状回の貫通線維-顆粒細胞シナプスに LTP を誘起した。この LTP は貫通線維終末の $\alpha 7nAChR$ の促進に起因する STP と顆粒細胞の NMDA 受容体機能の増強による LTP の独立した 2 要素からなることが分かった (Chen&Sokabe,2005)。つまり PREGS はこ

れら 2 種類の受容体機能を同時並行的に nongenomic に促進することが判明した。PREGS は $\alpha 7nAChR$ に直接作用するが、NMDA に対しては直接作用に加えて Src の活性化を介したチロシンリン酸化促進の 2 重作用があるらしく、複雑である。一方で、我々はアルツハイマー病の原因である β アミロイドが顆粒細胞の $\alpha 7nAChR$ 機能を阻害して LTP 誘導を障害することを見いだしているのです (Chen, et

al.,2005), PREGS が β アミロイドの LTP 障害作用を軽減する可能性があり、現在調査中である。また、神経ステロイドは急性にスパインの形態を変化させてシナプスの伝達効率を促進し、その背後には、アクチン細胞骨格や接着分子を含む細胞シグナリングの関与が示唆されており、近い将来細胞力覚との接点が見いだせるのではないかと期待している。

細胞器研究系

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きた。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たときのカルシウムシグナルを調べた。また、これまでの2光子励起法による開口放出測定を体系化して、分泌小胞の大きさを顕微鏡の空間解像と無関係にナノメートルスケールで求める方法を確立した。これにより、シナプス様小胞

と大型有芯小胞の開口放出様式の違いを明確にできるようになった。なお、教授の河西春郎は11月1日付けで東京大学大学院医学系に転出し、これに伴い松崎政紀助手が10月1日、高橋倫子助手が平成18年1月1日に東京大学に転出した。また、根本知己助手は生理学研究所脳機能計測センター助教授に平成18年1月1日に異動した。引越は12月末より始まり、平成18年1月に完了した。平成18年3月末までに、動物施設の利用も終了し、河西も兼任解除となった。

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

カルシウム依存性開口放出は神経・分泌細胞の機能の基本であるが、その分子細胞機構の解明は難航を極めている。関係する分子がわかってきても事態は改善されていない。その理由の一つは、開口放出過程は基本的に多数の分子や細胞構造を巻き込む形態過程であり、そのサブミクロンからナノの形態過程を直接的動的に観測する手法が乏しいことによる。我々はこの様な状況の打開に向けて2光子励起法の運用を試みている。本年度は2光子励起法の同時多重染色性を利用した、開口放出小胞直径のナノメートル測定法を開発し、TEPIQ(Two-photon Extracellular Polar-tracer Imaging-based Quantification)法と

命名した。この方法によって、直径が55 nm, 100 nm, 220 nm, 350 nmの小胞の大きさを推定し、これらが電子顕微鏡的な大きさとほぼ対応することを確認した。この方法論を用いて、分泌細胞における開口放出では小胞の事前のドッキングは必要でないこと、事前のドッキングは開口放出の準備状態というより、逐次開口放出の準備状態と考えられることを明らかにし、Kasai H et al. (2005) J. Physiol. 568: 891-903, Kishimoto T et al., (2005) J. Physiol. 568: 905-915, Liu T-T. et al. (2005) J. Physiol. 568: 917-929の三連報に報告した。

大脳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, 堀池由浩, 萩原輝記

大脳神経細胞の樹状突起のスパインは頭も首もきわめて多様で、同じ形のスパインを見出すことは困難な程である。これまで、筆者らのグループはスパイン頭部の大

きさはシナプス結合強度を決め、その大きさは結合強度の変化に伴って速く変わること明らかにしてきた。今回、2光子励起法でケイジドグルタミン酸を活性化して

単一スパインを刺激しながら、スパインのカルシウム上昇を測定することにより、スパインの首の多様性がグルタミン酸受容体を通して流入したカルシウムの動態に強く影響することを明らかにした。小さなスパインの首は細い傾向があるので、単一スパインに限局した高いカルシウム濃度上昇が作りやすく、このため独立した長期増強 (LTP)、即ち、頭部増大の好発部位となる。一方、大きなスパインは首が太い傾向があるので、カルシウムは

樹状突起に広がりやすく、濃度上昇は小さい。このことが、大きなスパインが長期増強を起こし難く、形態安定であることを説明するかもしれない。この様にスパインの頭と首は、それぞれ、シナプスの結合強度とその安定性を決める重要な因子と考えられる。これらの結果をまとめて Noguchi, J. et. al. (2005) *Neuron* 46: 609-622 に報告した。

機能協関研究部門

【概要】

細胞機能のすべては、細胞膜のチャネルやトランスポータ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、チャネル、トランスポータ、センサーなどの機能分子の働きとして細胞生理学的に解明し、それらの異常と疾病や細胞死との関係についても調べている。

(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の働きが関与している。これらの容積調節性膜機能分子、特に容積感受性クロライドチャネルやそのシグナルの分子同定を行い、その活性メカニズムと生理学的役割

を解明する。

(2)「アポトーシス、ネクローシス及び虚血性細胞死の誘導メカニズム」：容積調節能の破綻は細胞死にも深く関与する。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)「バイオ分子センサーチャネルの分子メカニズムの解明」：イオンチャネルはイオン輸送や電気信号発生のみならず、環境因子に対するバイオ分子センサーとしての機能を果たす。アニオンチャネルや ATP チャネルの容積センサー機能およびストレスセンサー機能の分子メカニズムを解明する。

大脳皮質神経細胞における容積感受性クロライドチャネル：その性質と容積調節への関与

井上 華, 岡田泰伸

容積感受性外向整流性 (VSOR) アニオンチャネルはほとんど全ての動物細胞に発現し、細胞容積調節に関与しているが、これまでに大脳皮質神経細胞におけるこの発現は不明であった。ホールセルパッチクランプ下で初代培養大脳皮質神経細胞を低浸透圧によって膨脹させるとアニオン電流が活性化した。その電気生理学的性質は、外向整流性、低フィールドアニオン選択性、高陽電位での不活性化、中間型シングルチャネルコンダクタンスで、

その薬理的性質も含めて VSOR チャネルとよく一致した。このように、皮質神経細胞にも VSOR チャネルが発現していることが明らかになり、図 1 のように浸透圧性膨脹後の皮質神経細胞の容積調節に本チャネルが関与していることが明らかになった。これらの結果は次論文に報告：Inoue, Mori, Morishima & Okada 2005 *Eur J Neurosci* 21:1648-1658.

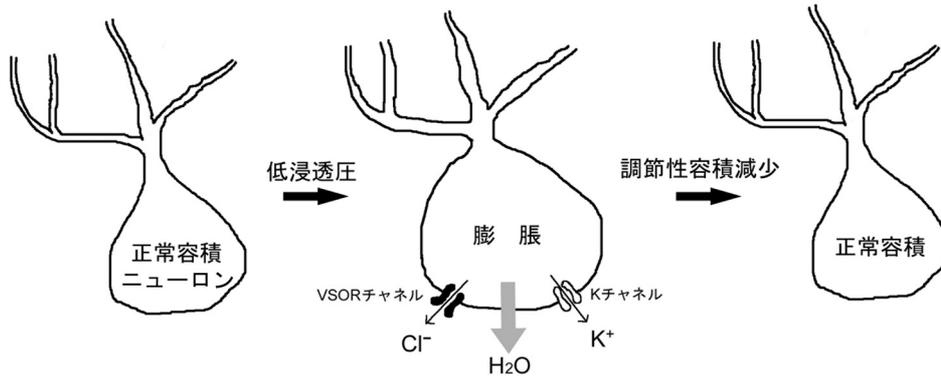


図1：大脳皮質神経細胞の調節性容積減少。膨張した神経細胞では VSOR チャンネルと K チャンネルの並列的活性化により KCl が流出することで水の流出が起こり容積が減少する。

ヒト上皮培養細胞の容積調節性水流入における水チャネルの役割

木田 肇, 高橋信之, 清水貴浩, 森島 繁 (福井大学), 岡田泰伸

ヒト上皮 Intestine 407 細胞において浸透圧性細胞膨張後に起こる調節性容積減少 (RVD) 時の水輸送経路について検討した。水の透過係数の計測から水チャネル (アクアポリン) の関与が推定された。事実, 水チャネル阻害剤が RVD を抑制した。さらに RT-PCR 法と免疫染色法から本細胞にはアクアポリン 3 (AQP3) の発現が明らかとなった。そこで, アンチセンスオリゴヌクレオチド

処理により AQP3 の発現を抑制したところ, RVD が有意に阻害された。それ故, 本細胞の容積調節性水輸送経路として AQP3 が, 図2のように本質的な役割を果たすものと結論された。本研究結果は次論文に発表: Kida, Miyoshi, Manabe, Takahashi, Konno, Ueda, Chiba, Shimizu, Okada & Morishima 2005 J Memb Biol 208: 55-64.

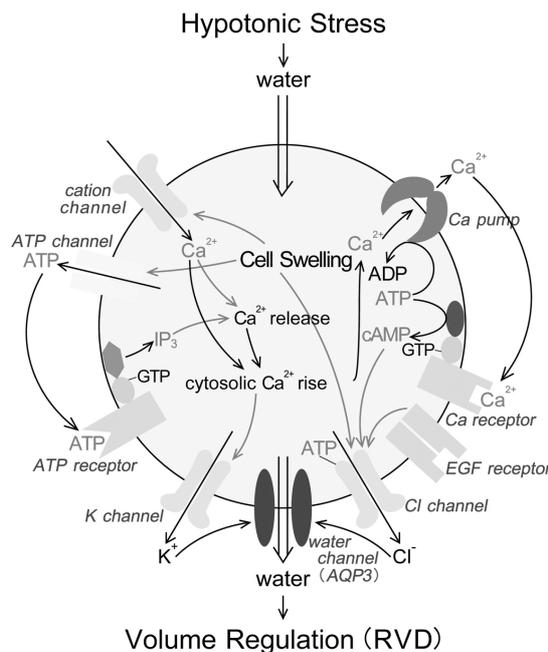


図2：調節性容積減少メカニズムにおけるアクアポリンの役割

心筋細胞アポトーシスにおける VSOR アニオンチャネルの役割

Wang Xiaoming, 高橋信之, 田辺 秀, 浦本裕美, 岡田泰伸

添加された容積感受性外向整流性アニオンチャネル (VSOR) ブロッカーはミトコンドリア仲介性アポトーシス誘導剤によるラット心筋初代培養細胞アポトーシスを有意に抑制した。さらに VSOR ブロッカーは、虚血・再灌流によって引き起こされるアポトーシスも抑制した。この抑制作用は活性酸素種 (ROS) の産生が急増する再灌流時に添加された場合のみに認められた。このように心

筋細胞のアポトーシスには VSOR の活性化が必要であり、虚血・再灌流では再灌流時に産生される ROS が VSOR 活性化に関与する (図 3)。これらの成果は次論文に掲載: Tanabe et al 2005 FEBS Lett 579,517-522; Takahashi et al 2005 Cell Physiol Biochem 15,263-270; Wang et al 2005 Cell Physiol Biochem 16,147-154.

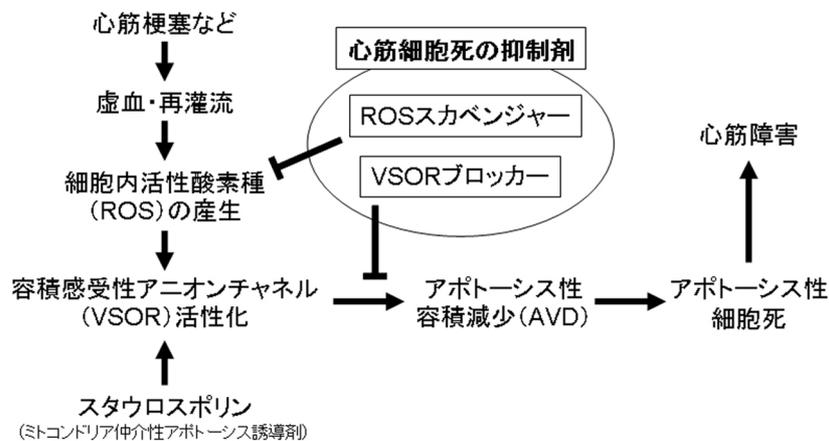


図 3 : 心筋細胞アポトーシスの誘導と VSOR 活性化抑制によるその阻害

アポトーシス死の達成には細胞内 ATP レベルの正常以上の上昇が必要である

Zamaraeva Maria, Sabirov Ravshan, 岡田泰伸

アポトーシス時の細胞内 ATP 濃度 ($[ATP]_i$) 変化のリアルタイム測定を、種々の細胞の細胞質にルシフェラーゼを強制発現させて行った。ミトコンドリア刺激、デスレセプター刺激、核クロマチン刺激のいずれのアポトーシス誘導によっても、 $[ATP]_i$ は 1.25 mM から数 mM に上昇し、この高 $[ATP]_i$ はカスパーゼ 3 活性化時や DNA ラダー形成時にも維持された。この ATP 増は解糖反応を停止

させると消失し、この時には $[ATP]_i$ は正常レベルに保たれているにもかかわらず、カスパーゼ活性化も DNA ラダー形成も阻止された。このように、アポトーシス細胞では $[ATP]_i$ の上昇が見られ、これがアポトーシス死実行に不可欠であることが結論された。これらの結果は次論文に報告: Zamaraeva, Sabirov, Okada et al 2005 Cell Death Different 12: 1390-1397

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) 色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動, (4) 大脳皮質における視覚的注意のメカニズム, (5) サル大脳視覚野活動の fMRI による計測法の開発, 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

我々は物体の形状を認識する過程を明らかにするために、注視課題を遂行中に第二次視覚野より単一細胞記録を行い、図形の輪郭に含まれる折れ曲がり初期視覚野でどのように検出されているのかを調べてきた。これまでに輪郭線の折れ曲がりに対して選択的な反応を示すニューロンが第二次視覚野に多数存在すること、そうした選択性が折れ曲がり刺激に含まれる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

することを示した。本年度は、第二次視覚野の主要入力源である第一次視覚野で記録し、折れ曲がり刺激に対する選択性を比較した。受容野よりも大きな刺激を含む同じ刺激セットを用いたところ、第一次視覚野のニューロンの反応選択性は直線ないしは直角の表現に限定されていた。これらの結果は第二次視覚野が方位選択的な線情報の組み合わせにより輪郭線の折れ曲がりや分岐を検出する最初のステップであることを示唆する。

下側頭皮質における色情報表現

安田正治, 小松英彦

下側頭皮質は破壊によって色弁別が重篤に障害されることが知られており、これまでの我々の研究により下側頭皮質前部の前中側頭溝 (AMTS) 近傍の皮質に、強い色選択性を持ち形選択性を持たないニューロンが集中して存在することが明らかになった。一方サルのイメージングによる研究は下側頭皮質後部の TEO 野にも色刺激による活動を報告している。そこで注視課題を行っているサルの後中側頭溝 (PMTS) 付近の TEO 野と考えられる部

位からニューロン活動の記録を行った。実験前に撮影した MRI 画像と、各電極の刺入位置の比較により記録部位の同定を行った。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、鋭い色選

択性を持つニューロンが後中側頭溝 (PMTS) 付近の領域に集中して存在することが分かった。色選択性のみを持つニューロンと色選択性と形選択性の両方をもつニューロンは混在していた。また受容野マッピングの結果、こ

の領域はおおまかな視野表現を持ち、その内容は過去に報告されている TEO 野の詳しい視野表現に関する研究と一致していた。これらの結果から TEO 野が色情報の処理に関わっているものと考えられる。

色カテゴリー識別時の視覚野ニューロン活動

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。同じ色刺激を見ても、細かい色の識別を行わないといけない状況と、細かい色の差は無視してカテゴリー判断を行わないといけない状況では動物が表出する反応は異なる。このように同じ色刺激に対して状況によって異なる反応を行う時に、下側頭皮質の色選択ニューロンの活動にどのような差が見られるかを調べるために、色弁別課題と色カテゴリー課題と注視課題の3つの異なる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 GO 反応または NOGO 反応を選択することが要求される。注視課題では刺激は報酬に無関係でサルは注視を続ける。下側頭皮質前部に存在する色選択ニューロンにおいて、課題に応じて応答強度が有意に変化するニューロンが多く見出された。しかし、課題間で色選択性そのものは非常に類似していた。またカテゴリー課題でニューロンの応答がよりカテゴリー的になる傾向は見られなかった。これらの結果は、現在行っている課題のルールを表す信号によって、下側頭皮質で色情報を表現しているニューロンの活動がコントロールされていることを示している。

多次元視覚探索課題における後頭頂葉ニューロンの活動特性

小川 正, 小松英彦

視覚探索においては、周囲と異なるポップアウト刺激によって受動的に引き起こされるボトムアップ型注意と、知識や意志によって能動的に起動されるトップダウン型注意が重要な役割を果たしている。脳内における 2 つの注意過程の神経メカニズムを明らかにするため、多次元視覚探索課題を行っているサルの頭頂間溝外側部 (LIP, 7a) からニューロン活動を記録した。課題では 2 種類の色と形から構成される 6 個の刺激が呈示され、その中には色と形次元で目立つ刺激が一つずつ含まれる (例えば $\circ \times 1$, $\blacksquare \times 1$, $\square \times 4$)。サルは目立つ刺

激に向かってサッカド眼球運動を行うと報酬が貰えるが、どちらの次元で目立つ刺激を目標とするかは試行ブロックごとに切り替えられる。実験の結果、後頭頂葉には特定の特徴次元で探索する場合にのみ目標刺激に対する活動を増強させるニューロン群が存在することがわかった。この結果は、2 つの注意機構が特定の状態で組み合わせられた場合にのみニューロン活動に変化が生じることを意味し、両者の相互作用が後頭頂葉において生じていることが示唆された。

サル視覚野活動の機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) による計測

郷田直一, 伊藤南, 小川正, 小松英彦 (感覚認知情報)
豊田浩士, 定藤規弘 (心理生理学)

視覚の神経機構を明らかにするためには, ある刺激に対してどのような領域の細胞がどのように活動するかを調べる必要がある。これまで感覚認知情報研究室では視覚刺激によってサル大脳視覚野に生じる活動を単一ニューロン活動記録法により調べてきた。しかし fMRI は一度に大脳皮質の広い領域の活動を計測できる特長があり, 単一ニューロン活動記録法と併用することにより, 相互の利点を活かして視覚の神経機構に多面的にアプ

ローチすることが可能になると考えられる。サルを用いて fMRI 計測を行うため, 本年度は fMRI 装置内で使用可能なサル頭部・身体固定システム, 及び視覚課題と眼球・頭部・身体運動の制御を行うサル fMRI 実験システムの開発を行った。またサル 2 頭について fMRI 装置を模倣した環境下で訓練を行った。内 1 頭については注視課題遂行中の視覚応答を計測する fMRI 実験を行い, V1-V4 を含む初期視覚野の活動が計測できることを確認した。

神経シグナル研究部門

【概要】

従来われわれのグループでは, 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, 最近スタッフのほとんど全員が入れ替わったのを契機に, 研究テーマをよりシステム側に設定し, 脳スライスを用い

た電気生理学的測定により局所神経回路機能の解析することを主な研究対象としている。研究は比較的順調に進捗し, 予想を上回る興味ある実験結果も得ているが, 大部分の論文発表は 2006 年度となった。

視床投射細胞の異種興奮性シナプスの解析

宮田 麻理子, 井本 敬二

視床投射神経細胞には, 末梢からの感覚情報を受け取る上向性 (内側毛帯) シナプスと大脳皮質からの feedback シナプス (皮質視床シナプス) の二つの主な興奮性シナプスが存在する。我々は, それぞれのシナプスのグルタミン酸受容体成分に着目し, その機能的意義について検討した。標的細胞を同じとするマウス VPL 投射細胞において, 皮質視床シナプスの EPSC はわずかながらカイニン酸受容体成分が存在するが, 内側毛帯シナプスには存在しないことを見出した。また, 皮質視床シナプス EPSC

では NMDA 受容体成分が AMPA 受容体成分に比べて極めて有意に多く存在する一方で, 内側毛帯シナプスでは AMPA 受容体成分が NMDA 受容体に比べて有意に多かった。皮質視床線維を連続刺激すると, EPSP は加算され投射細胞は漸次的に活動電位を発生する late-persistent 発火を示し, それは, NMDA 受容体依存的であった。一方, 内側毛帯シナプスでは始めの 1, 2 回目の刺激で活動電位を出すその後消失する onset-transient 発火を示し, AMPA 受容体依存的であった。

成熟ニューロンにおける cdk5 の生理的役割の検索：シナプス種依存的機能の可能性

佐竹伸一郎, 井本敬二

サイクリン依存性キナーゼ (cdk) は、細胞分化・増殖の制御に関わるタンパク質リン酸化酵素として広く知られている。Cdk ファミリーの一つ cdk5 は、成熟ニューロンの軸索や細胞体に強く発現することから、細胞周期制御とは別の機能も担うと推定される。しかし、cdk5 ノックアウトマウスが周産期致死のため、成熟ニューロンにおける cdk5 の生理的役割は現在も明らかでない。これまでの機能検索から、cdk5 特異的阻害薬 roscovitine が①小脳平行線維 (顆粒細胞) - プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達を顕著に増強すること、しかし②登上線維 - プルキンエ細胞間興奮性シナプス伝達には無効であること

等を見出してきた。Cdk5 のシナプス種依存的機能を検討する過程で、顆粒細胞-籠細胞間シナプスにおいて、roscovitine が興奮性シナプス後電流 EPSC の振幅のみならず減衰時定数を増大させることを発見した (一方、顆粒細胞-プルキンエ細胞 EPSC の減衰時定数は有意に変化しない)。この減衰時定数増大がグルタミン酸受容体低親和性競合阻害薬 γ -D-glutamylglycine によって減弱したことから、この現象に受容体飽和 (後シナプス性要因) や伝達物質拡散、不均一性多重小胞放出 (前シナプス性要因) が関与すると推定できる。こうした作業仮説に基づき、引き続き分子基盤の検討を進めている。

視床ハイブリッド神経回路を用いた同期的神経発火の解析

井上 剛, 井本 敬二

視床は、感覚信号を大脳皮質へ転送する領域である。視床において顕著に観察される神経回路現象として、神経細胞群の同期的神経発火が知られている。欠伸でんかん発作時には、異常な同期的神経発火が生じることも知られている。これらの同期的神経発火は、視床神経細胞間のシナプス相互作用で発生することが推定されるが、視床神経回路内のそれぞれのシナプス配線が同期的神経発火の発生にどのように寄与しているかについて十分に

は分かっていない。この問題に取り組むため、今年度我々は視床ハイブリッド神経回路の構築を行った。この視床ハイブリッド神経回路では、複数の視床神経細胞からの同時パッチクランプ記録と、ダイナミッククランプ法を用いた人工的シナプス電流を組み合わせた。シナプス配線を任意に操作することができるというこの手法の利点を用い、同期的神経発火の発生とシナプス配線との関連に関し検討した。

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の神経機能に対する役割

- 不活性型ノックインマウスによる検討

山肩葉子, 畑中伸彦, 阪上洋行 (東北大学), 高雄啓三 (京都大学), 宮川 剛 (京都大学), 小幡邦彦 (理化学研究所), 柳川右千夫 (群馬大学), 井本敬二

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と考えられている Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) が脳機能に果たす役割を解明するために、前脳における主要なサブユニットである α を不活性型に置換した不活性型ノ

ックインマウスを用いた解析を行っている。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おり、シナプス可塑性との関連が示唆される mRNA の樹状突起への局在も保たれていた。このマウスの出生率は正常

で、繁殖能力にも問題がなかったが、生後 10～20 週での死亡率が高く、また、一部のマウスに自然発症のけいれんが認められ、薬剤誘発けいれんに対する感受性も高かったことから、神経活動の調節に異常を来している可能性が高いと考えられた。また、マウスの行動解析を行ったところ、多動を初めとする多彩な異常所見が認められ

た。チトクロームオキシダーゼ活性染色により、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とと合わせ考え、行動に関してさらに詳しい解析を行い、その病態の把握に努めているところである。

持続性けいれん時における Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の不活性化のメカニズムに関する検討

山肩葉子, 小幡邦彦 (理化学研究所), 井本敬二

Ca^{2+} /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蛋白質リン酸化酵素として、神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関与することが知られている。一方、これまでに、種々の持続性のけいれんモデルにおいて、CaMKII の不活性化が報告されているが、そのメカニズムについては不明であった。そこで、ラットのカイニン酸誘発けいれんモデルを用いて、その不活性化メカニズムの検討を行った。けいれん中の脳ホモジネートにおいては、CaMKII の不活性化と共に、沈降する画分への細胞内移行が起こり、その画分では、CaMKII の Thr-286(α)/287(β) の自己リン酸化が大きく上昇する一方で、キナーゼ活性が大きく低

下するという現象が観察された。可溶性画分に残存した CaMKII にはこのような現象は認められなかった。また、けいれんから十分回復させた後には、このような自己リン酸化・不活性化・沈降型の CaMKII はもはや検出されなかった。このことから、けいれん中の CaMKII の不活性化は、単なる変性や分解によるものではなく、自己リン酸化・不活性化・沈降型 CaMKII が新たに形成されるためと考えられる。このような CaMKII は、細胞内への過剰な Ca^{2+} 流入時に、 Ca^{2+} で活性化された大量のカルモジュリンをトラップすると共に、CaMKII の過剰活性化を防ぐ役割を果たしているのかもしれない。

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る。しかし、その発症メカニズムは現在不明な点が多く存在している。

本研究では、自然発症てんかんモデルマウスを用い、視床-大脳皮質投射における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った。その結果、て

んかんモデルマウスの大脳皮質 4 層細胞において、自発的に連続したシナプス入力を多く受けている事を明らかにした。大脳皮質 4 層細胞は、視床からの入力層として知られており、おそらくてんかんモデルマウスでは、自発発火条件において視床回路が同期的に働き、大脳皮質 4 層細胞で連続したシナプス入力を受けているのではないかと考えられる。

Ca_v2.1 変異マウス rocker における小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプス機能異常の解析

児玉貴史, 井本敬二 (神経シグナル部門), 重本隆一, 深澤有吾 (脳形態解析部門)
森泰生 (京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻)

rocker マウスは Ca_v2.1 変異マウス的一种であるが, 呈する神経疾患症状 (運動失調等) が Ca_v2.1 変異マウスの中でも最も軽度であるという特徴を持っている。このことから我々は rocker マウスが Ca_v2.1 機能異常の基本的な病態を解析するのに最適なモデルであると考え, rocker マウスにおいて運動失調に深く関わりがあるあると考えられる小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプスの解析を行った。その結果, このシナプスにおける情報伝達が

rocker マウスにおいて著しく障害されており, これがシナプス後部の AMPA 受容体の数の減少に由来していることを明らかにした。また, rocker マウスにおいてプルキンエ細胞の樹状突起伸展が有意に悪化していることも明らかになった。以上の結果より, 平行線維-プルキンエ細胞シナプスの機能がプルキンエ細胞上の Ca_v2.1 に特に強く依存していることが示唆された。

小脳皮質における登上線維伸展範囲の定量的解析

加勢大輔, 児玉貴史, 井本敬二

蛍光染色法は共焦点顕微鏡との併用により酵素反応を利用した染色法に対し, 抗原ごとに選択的な画像が得られる, シグナル強度が蛍光強度に反映される, 高い空間解像度を持つ等の利点を持つ。しかし得られた染色画像に対し多くの場合は定性的な差の記述にとどまり, 染色法の持つ利点を利用した定量的なデータの解析による評価は行われていない。

本研究では染色画像の定量的解析の試みとして, 小脳

皮質分子層における登上線維の伸展範囲を蛍光色素により可視化し, 画像データの解析を行い, 週齢ごと及び野生型マウスと Ca_v2.1 カルシウムチャネル変異マウスとの間で比較を行った。比較の結果, 登上線維伸展範囲の週齢ごとの変化を検出することができた。一方, 野生型マウスと遺伝子変異マウスの間では違いが見られなかった。

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

2005年度は3名の総合研究大学院大学生（5年一貫制2名、後期3年過程1名）と1名の博士研究員（木田哲夫君）が新たに仲間に加わった。逆に、博士研究員として2年間共に研究を続けてきた井原綾さんが情報通信研究機構に、尾島司郎君が首都大学東京に、大学院生の秋云海君が学位を取得後に中国に帰国した。野口泰基君は在学中の業績が顕著であるため、生理学研究所では初めて早期卒業が認められ、9月に学位を取得後10月から学振の特別研究員となった。現在、留学しているのは、藤岡孝子さん（カナダ・トロントのRotman Institute）、田村洋平君と和坂俊昭君（米国NIH）、岡本英彦君（ドイツ、ミュンスター大学）、中田大貴君と坂本貴和子さん（イタリアのキエッティ大学）の6名である。このように人事はかなり変動しているが、常に20名近くの研究者が共に研究にいそんでいる。医学（神経内科、精神科、小児科など）、歯学、工学、心理学、言語学、スポーツ科学など多様な分野の研究者が、体性感覚、痛覚、視覚、

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

現在、日本宇宙フォーラム（テーマ：様々な環境における脳活動の研究）と科学技術振興機構「社会技術研究：脳科学と教育」（テーマ：顔認知機構）より1000万円以上の研究費をいただいております。他に文部省科研費、厚生労働省、環境省などからの研究費を含めて、競争的外部資金獲得額は総額で約5000万円に達した。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ます。

ヒト感覚—運動抑制過程の脳波、脳磁図研究

中田大貴、乾幸二、和坂俊昭、田村洋平、木田哲夫、柿木隆介

Go/NoGo課題を用いた事象関連電位は、反応抑制過程を知る上で有用である。通常 NoGo 課題では刺激後140-300 ミリ秒付近に特異的な電位がみられ、nogo potential と呼ばれる。本研究では Go/NoGo 課題における事象関連電位で観察される所謂 NoGo 電位の起源を脳磁図脳波同時記録により検討した。刺激には手指の電気刺激を用い、ボタン押し課題を行った。脳波、脳磁図両者

で、刺激後約160ミリ秒で頂点となる NoGo 特異的活動が記録された。脳磁図データでの信号源推定を行ったところ、この NoGo 関連活動の起源は下前頭回後部付近に推定された。従って、160 ミリ秒付近にみられる NoGo 関連活動の起源は前頭前野であることが明らかとなった。

(Nakata et al. Eur J Neurosci 22: 1784-1792, 2005)

体性感覚 Go/NoGo 電位への刺激間隔及び刺激確率の影響

中田大貴、乾幸二、和坂俊昭、赤塚康介、柿木隆介

体性感覚 Go/NoGo 課題を用いた事象関連電位の特性を検討した。実験1では刺激頻度 (ISI) を、実験2では刺

激確率を変化させ、効果を調べた。実験1では、反応の振幅は変化しなかったが、頂点潜時は ISI の増加に伴っ

て長くなった。反対に実験 2 では、潜時に変化はなかったが、振幅は NoGo 刺激確率の低下とともに増大した。このように ISI と刺激確率は異なる効果を持つことから

我々は、ISI は刺激の評価の潜時に影響し、刺激確率は反応の強さに関連するのではないかと考えた。

(Nakata et al. Exp Brain Res 162:293-299, 2005)

運動準備期の第一次、第二次体性感覚野への異なる影響

和坂俊昭, 中田大貴, 赤塚康介, 木田哲夫, 乾幸二, 柿木隆介

手指運動時の体性感覚野への影響を脳磁図を用いて調べた。被験者が第 2 指を自己ペースで進展させる間に、運動とは関係なく右正中神経に電気刺激を与えた。運動開始(筋電図)を起点として、運動準備期を 5 区間に分け、それぞれの区間に呈示した正中神経刺激をそれぞれ加算した。正中神経刺激により誘発される 20 ミリ秒の成分は運動準備により変化しなかったが、30 ミリ秒の成分

は、-500-0 ミリ秒の区間で有意に減弱した。これらは第一次体性感覚野 (SI) 由来の活動である。第二次体性感覚野 (SII) は、刺激同側の活動は影響を受けなかったが、対側の活動は-500-0 ミリ秒の区間で有意に増強した。SI と SII での反対の挙動は、感覚運動調節におけるこれらの部位の異なる役割を示唆する。

(Wasaka et al. Eur J Neurosci 22: 1239-1247, 2005)

筋収縮力依存性の、体性感覚誘発電位に対する遠心性 gate 効果の変化

和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介

体性感覚誘発電位 (SEP) に対する遠心性 gate 効果のメカニズムを知るために、自発運動中の SEP の変化を検討した。被験者は自己ペースで足関節を背屈するよう指示され、運動強度は最大自発収縮 (MCV) の 20% および 50% の二種類に設定した。運動とは無関係に頸骨神経を刺激し、SEP を記録した。運動準備期間は、運動準備電位に従って 2 区間に分類した (NS および BP 区間)。NS 区

間では、50%MCV の P30 と、両条件の N40 が静止条件と比べて有意に減弱し、かつ 50% の N40 は 20% のそれと比べて有意に減弱していた。BP 区間では、50%MCV の P30 と N40 が、静止条件と比べて有意に減弱した。以上の結果より、SEP に対する遠心性 gate 効果の程度は、運動関連領野の活動に依存すると考えられた。

(Wasaka et al., Exp Brain Res 166: 118-125, 2005)

足底自発運動準備期にみられる、反対側同一筋収縮による SEP への gate 効果

和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介

反対側同一神経支配領域の筋収縮による、体性感覚誘発電位 (SEP) への gate 効果を研究するために、足関節背屈運動準備中の SEP を記録した。左足の運動を自己ペースで 5-7 秒おきに行い、それとは無関係に右頸骨神経を刺激した。運動準備電位に従って、運動準備期は 4 区間に区分した (NS, BP-1, BP-2, Pre-Bp)。NS 区間では、N40

が有意に減弱した。P53 と N70 も、他の区間と比べて NS 区間で低振幅であった。運動準備期間には求心性の効果はないため、これらの結果は非運動側の体性感覚情報が遠心性に運動野からの修飾を受けることを示唆する。

(Wasaka et al., Brain Res Cogn Brain Res 23: 354-360, 2005)

ヒト第二次体性感覚野での顔の体部位再現

Nguyen TB, 乾幸二, 宝珠山稔, 柿木隆介

ヒト第二次体性感覚野 (SII) での顔面皮膚領域の再現を脳磁図を用いて検討した。刺激は足、口唇および顔面 3 カ所 (前額、頬、下顎) に行い、SII での再現を比較した。SII には明瞭な配列が認められた。即ち、口唇が最も外側で、足が最も内側、顔面がその中間にあった。しか

しながら、顔面の 3 領域では有意な差はなかった。SII での顔面の占める領域は小さく、有意な配列の差を検出できなかったためと考えられる。

(Nguyen et al. Clin Neurophysiol 116: 1247-1253, 2005)

Rolandic oscillation と運動野興奮性の機能的関連－脳磁図研究

田村洋平, 宝珠山稔, 中田大貴, 廣江総雄, 乾幸二, 金桶吉起, 井上聖啓, 柿木隆介

脳神経活動の同期、脱同期は運動や意識的認知に重要な役割を果たしている。これまでの研究では、中心前回の 20Hz リズムは運動機能と密接に関連しているが、一方中心後回の 10Hz リズムは感覚機能に関与しているとされている。本研究では、rolandic oscillation が運動野の興奮性と関連しているか否かを知るために、左運動野への 1Hz の連続的経頭蓋磁気刺激 (rTMS) の効果を検討し

た。右第二指の進展運動の際の脳磁図を記録し、rTMS 群とコントロール群で比較した。その結果、rTMS は有意に 20Hz リズムの運動後リバウンドを減弱させることが判明した。即ち、20Hz リズムが運動機能と密接に関連することが確認された。

(Tamura et al., Eur J Neurosci 21: 2555-2562, 2005)

音再現における時間の圧縮

矢部博興, 松岡貴志, 佐藤靖, 晝間臣治, 小山幸子, 軍司敦子, 柿木隆介, 兼子直

感覚情報の自動的判別システムの基礎となる感覚記憶は、ミスマッチ陰性電位 (MMN) に反映される。先行する音の時間的イメージは、160 から 170 ミリ秒のエポックとして感覚記憶に統合される。我々は MMN と、複雑な音の中に組み込まれた省略セグメントに対する反応時

間を測定した。主な結果は、省略セグメントに対する時間は実際のものよりも早い、というもので、音の再現では時間が圧縮されることを示唆する。

(Yabe et al., Neuroreport 16: 95-98, 2005)

二次の視覚性運動処理に関わる脳部位の探索

野口泰基, 金桶吉起, 柿木隆介, 田邊 宏樹, 定藤 規弘

人が物体の運動を知覚する手掛りには少なくとも 2 種類のものがあることが知られている。1 つは物体と背景の明るさの違いであり、この違いに基づいた運動知覚を一次運動処理という。だが一方で物体と背景の明るさが

等しい時にも人は運動を知覚できることが知られており、これを二次運動処理という。本研究では機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) を用いて一次と二次の運動刺激に対する脳の活動を比較した。その結果、一次運動の知覚時には

MT 野・中心前回など従来から視覚運動処理に関係が深いとされてきた部位における脳活動が見られたのに対し、二次運動の知覚時にはこれらに加えて頭頂葉上部・上側頭領域の2箇所有意な脳活動が見られた。これらの結

果は、二次運動の知覚には後頭葉視覚野を中心とする大脳皮質領域間の広いネットワークが関わっていることを示す (Noguchi et al. Cereb Cortex 15:1592-1601, 2005)。

ヒト視覚腹側路における逆行性マスキング効果の時間的動態

野口泰基, 柿木隆介

ある視覚刺激の直後に2つ目の視覚刺激を提示したとき、1番目の刺激(target)は単独で提示された時よりも識別されにくくなる。Backward masking (BM) と呼ばれるこの現象は target への視覚反応を弱めることが知られているが、従来の研究は機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI) が中心であったため、その変化の詳しい時間的動態については殆ど知られていなかった。今回脳磁計 (MEG) を用いて

ヒトの視覚腹側野の活動を調べたところ、BM における target への視覚性誘発反応は、通常時に比べ有意なピーク振幅の減少・ピーク潜時の短縮という2つの変化を示すことが明らかになった。これらの結果は BM が従来報告されてきた反応強度の低下に加え、時間的な変化をも視覚腹側野の神経活動に引き起こしていることを示す (Noguchi and Kakigi. Neuroimage 27:178-187, 2005)。

脳磁図と脳波を用いた母国語および外国語の脳内処理の研究

尾島司郎, 中田大貴, 柿木隆介

言葉の完全な獲得が幼少期を過ぎると不可能になるという「臨界期仮説」は、思春期後の第二言語の獲得が、思春期前の母語の獲得と質的に異なると予測する。本研究では、この仮説を事象関連脳電位 (ERP) を用いて検討した。

思春期頃に英語の習得を開始し、中級または上級の習熟度を示す日本人の2グループ、および英語母語話者が、英語の文を黙読したときの脳電位を計測した。その結果、

日本人でも英語母語話者に見られる特徴的な脳反応 (N400, LAN) が惹起でき、習熟度が中級から上級に上がるにつれて、より母語話者に脳反応が近づいていくことが示された。観察された発達パターンは、先行研究で報告されている子供の母語獲得のそれと酷似している。

これらの結果は、思春期後の第二言語獲得が思春期前の母語獲得と質的に異なるという、臨界期仮説の予測に相容れない。(Ojima et al., J Cogn Neurosci 17:1212-1278, 2005)

『目の動き』を見たときの後頭側頭部の活動に対する顔輪郭とパーツ情報の影響

三木 研作, 渡辺 昌子, 本多 結城子, 中村 舞子 (東京慈恵医科大学神経内科), 柿木 隆介

これまで「顔の部分の動き」に対するヒトの運動視中枢 (MT/V5 野) の活動について調べてきた。今回「目の動き」が「点の動き」と区別されるための要因と考えられる顔の輪郭とパーツ情報の影響を検討した。仮現運動現象を利用した4種類の刺激を用いた。CDL: 模式的な顔の絵 (circle, dots, line) の中で目の部分 (dot) が動く刺激。

CD: 輪郭 (circle) と目 (dot) のみ。DL: 目 (circle) と口 (line) のみの。D: 目 (dot) のみ。

各動きに対する誘発磁場の活動源は後頭側頭部、MT/V5 野付近に位置推定された。潜時及び推定位置に各条件で違いはなかったが、活動の大きさは右半球で CDL 条件が他の3条件よりも、左半球で CDL 条件が DL, D 条件

よりも有意に大きかった。

動きそのものは違いがないにも関わらず条件によって活動の大きさに差がみられたことから、ヒトの MT/V5 野

で「目の動き」に対する特異的な活動が起こり、その際顔の輪郭とパーツの情報が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

倒立顔情報処理に関わる左右半球間差：事象関連電位を用いた検討

本多 結城子, 渡辺 昌子, 三木 研作, 中村 舞子 (東京慈恵医科大学神経内科), 柿木 隆介

一般に正立顔の情報処理は右半球が優位であるとされているが倒立顔に関して左右半球の機能差は明らかでない。顔刺激（正立顔，倒立顔）を左右半視野呈示した際の事象関連電位を記録し顔認知特異的成分 (N170) の左右半球間差を検討した。

その結果，すべての被験者において刺激呈示後 150-250ms に側頭部から後頭部で大きな陰性成分 (N170) が記録された。振幅は両半球とも正立顔と比較し倒立顔で増大していた。右半球では，正立顔と比較し倒立顔で

潜時が延長していたが，左半球では明瞭な延長はみられなかった。半球間伝達時間は，左半視野に倒立顔刺激が呈示された際のみ短縮がみられた。右半球は正立顔の全体的な情報処理を速やかに行い，倒立顔に対する部分的な情報処理は別に行われていることが示唆された。一方，左半球では倒立顔刺激に対し潜時の延長はないことから，正立顔，倒立顔双方に対し部分的な情報処理を行っていることが示唆された。

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。逆にこれらの領域に異常があると，随意運動が著しく障害される。本研究部門においては，このような随意運動の脳内メカニズムおよびそれらが障害された際の病態を調べることを目的としている。

これまで主に霊長類を用いて研究を行ってきたが，今

年度より新たにげっ歯類を用いた研究プロジェクトが立ち上がった。マウスには，ミュータント，ノックアウトなど様々な機能異常や疾患モデルが存在するので，新たな研究の展開が期待される。霊長類を用いた実験に関しても，研究部門内に実験動物飼育設備が完成したことで，より効率的に遂行出来るようになった。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 17 年 6 月～7 月，平成 18 年 1 月～3 月まで滞在し，精力的に共同研究を行った。

淡蒼球への GABA 作動性入力について

南部 篤, 橘 吉寿, 知見聡美
喜多 均 (テネシー大学医学部)

淡蒼球外節と内節は，大脳基底核の入力部である線条体から GABA 作動性入力を受けている。また，淡蒼球外

節も，淡蒼球内節と軸索側枝を介して淡蒼球外節に GABA 作動性投射をしている。これら 2 種類の GABA 作

動性入力によって、淡蒼球の活動性がコントロールされていると考えられる。今回、覚醒下の霊長類を用いて、これらの GABA 作動性入力による制御様式を、細胞外記録法と局所薬物注入により検討した。主要な興奮性入力源である視床下核をブロックすると、線条体単発刺激で淡蒼球外節には長い抑制と、淡蒼球内節には短い抑制が惹起され、どちらも GABA_A 受容体拮抗薬で消失した。

線条体の連続刺激では、GABA_B 作動性の反応が記録されたが、これは線条体由来ではなく、淡蒼球外節由来であると考えられた。GABA_A 受容体拮抗薬、GABA_B 受容体拮抗薬何れでも淡蒼球外節/内節の自発発射頻度が上昇した。以上の結果は、淡蒼球外節から淡蒼球外節/内節への GABA 作動性投射が、GABA_B 受容体を介して働き、これらの活動性をコントロールしていることを示唆する。

上肢到達運動課題実行中の線条体介在ニューロンの役割

畑中伸彦, 高良沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤

線条体は大脳皮質運動野から生じた運動情報を受ける大脳基底核の主な入力核である。淡蒼球に投射する GABA 作動性の投射細胞がそのほとんどを占めるが、線条体内部でシナプスし投射細胞へ影響を与える介在細胞が存在している。これら介在細胞は GABA 作動性細胞とコリン作動性細胞に大別できるが、実際の運動中にそれぞれがどのような役割を担っているのか、いまだ未解明のままである。今回われわれは単一ニューロン記録と薬

物の微量注入を併用し、線条体投射細胞への介在細胞からの GABA 性入力を神経薬理的に遮断し、投射細胞の実際の運動中の活動がどのように変化するか観察した。その結果、線条体投射細胞は GABA 性入力によって空間的、時間的な活動の調節を受けていることが示唆された。今後はコリン作動性介在細胞からの入力を遮断し、その役割について検討してゆく予定である。

上肢到達運動課題実行中の線条体投射ニューロンの活動様式

畑中伸彦, 高良沙幸, 橘 吉寿, 南部 篤

大脳基底核は大脳皮質-基底核連関の一部として、運動の遂行、企図、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) からの入力が内外側に分離し、中央部で一部重なり合うことが示されている。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の細胞と両者から入力を受けている細胞ではどのような活動の差があるのか確認

したデータは未だ報告されていない。本年度は上肢の遅延期間付き到達課題を学習した霊長類の 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投射細胞の活動特性と、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た。その結果、MI から入力を受ける線条体の投射細胞は運動そのものに強く関連し、SMA から入力を受ける細胞は運動前の遅延期間からその活動を開始していることが解った。また、両者から入力を受ける細胞は、運動前、運動中に活動を示し、両者からの入力が線条体の投射細胞で再現されていることが解った。

パーキンソン病モデル動物における異常な淡蒼球ニューロン活動

橘 吉寿, 岩室宏一, 南部 篤

従来, パーキンソン病 (PD) の病態生理として, 淡蒼球外節における過度の発射頻度の減少, 内節での増加が考えられてきた。しかしながら, ニホンザルの PD モデルを用いた我々の研究において, これまで報告されてきたような淡蒼球での顕著な発射頻度の変化は認められなかった。今回, 新たにタイワンザルを用いて, PD モデルサルを複製し, 淡蒼球の発射活動を記録・解析した結果, 正常サルでは観察されない β 帯域の oscillatory burst discharge といった異常な活動パターンが観察された。また, 淡蒼球外節・内節に主要な興奮性入力を送る視床下核においても, 同

様の β 帯域の oscillatory burst discharge が観察された。独自に開発した局所薬物注入法により, 淡蒼球ニューロンから記録を行いながら, 局所にグルタミン酸受容体拮抗薬を作用させ, 視床下核から淡蒼球への興奮性入力を遮断したところ, 淡蒼球ニューロンの oscillatory burst discharge は消失した。これらの結果は, 淡蒼球ニューロンでの oscillatory burst discharge が視床下核からのグルタミン酸作動性入力により生成されている可能性を示唆し, 今後のパーキンソン病治療の生理学的基盤になると考えられる。

ジストニアの病態に関する研究—ジストニアモデル動物におけるニューロン活動の記録

知見聡美, 田 風, 南部 篤

高田昌彦 (東京都神経科学総合研究所)

ジストニアは, 作動筋と拮抗筋に同時に起こる筋収縮により, 体幹, 四肢の異常運動を示す疾患である。臨床例から, 大脳基底核出力核の活動性が減少していると考えられているが, 病態の解析を行うための適当なモデル動物が存在しなかったことから, 正確な病態については未だ明らかにされていない。マウスには, 突然変異体や遺伝子改変動物が豊富に存在し, 近年, 数種類のマウスがジストニアのモデルとして提唱されている。本研究は, これらのマウスにおいて, 運動制御の高次中枢である大脳基底核および小脳のニューロン活動を覚醒条件下で記録することにより, ジストニアの病態を解明することを目指している。本年度は, 全身性にジストニア症状を示すミュータントマウスである Wriggle Mouse Sagami にお

ける解析を行った。大脳基底核の出力核である脚内核および黒質網様部ニューロンについては, 自発発火頻度と様式, および大脳皮質の刺激に対する応答様式において, 正常マウスと比較して有意な差は見られなかった。これに対し, 小脳皮質プルキンエ細胞の平均発火頻度は, 正常マウスに比べて著しく低いことがわかった。このことから, 少なくともこのモデル動物においては, プルキンエ細胞の発火頻度の低下がジストニア症状出現に関与していることが示唆された。今後, 小脳の出力部である小脳核ニューロンの活動記録や, 小脳皮質への薬物投与によってプルキンエ細胞の活動性を増大させたときに症状の改善が見られるかどうかの検討などを行い, ジストニア症状出現の小脳機構を明らかにする予定である。

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

具体的な研究テーマとしては、1) グルタミン酸受容体および GABA 受容体と各種チャネル分子の脳における電子顕微鏡的局在を定量的に解析し、脳機能との関係を明

らかにする。2) これらの分子の発達過程や記憶、学習の基礎となる可塑的变化に伴う動きを可視化し、その制御メカニズムと機能的意義を探る。3) 脳の NMDA 受容体局在の左右差とその生理的意義を探る。4) 前脳基底核、黒質-線条体ドーパミン系等の情動行動に関与する脳内部位のシナプス伝達機構および生理活性物質によるその修飾機構を電気生理学的手法を用いて解析し、それらの分子的基盤を明らかにする。5) 大脳基底核関連疾患の治療法の確立のため、神経幹細胞移植による細胞の分化、シナプス再構築や神経回路の再建に関する形態学および電気生理学の解析を行なっている。

グルタミン酸受容体の定量的解析

田中淳一, 足澤悦子, 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凍結切断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約 1000 個の金粒子標識を達成し、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ることによって、機能的な AMPA 受容体チャネル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。

小脳運動学習の記憶痕跡

中舘和彦, 馬杉一時田美和子, 王文, Andrea Lörincz, 深澤有吾, 重本隆一

ある種の運動の学習が行われる過程で小脳における、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象が関与することが知られている。しかし、実際に学習した動物において、このシナプスに存在する AMPA 受容体数やシナプスの構造にどのような変化が起こるのかは知られていなかった。我々は、マウスの水平性視機性眼球運動

をモデルとして一時間の学習で引き起こされる短期適応が、小脳片葉の平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおける AMPA 受容体密度の減少を伴っていることを、凍結切断レプリカ標識法によって明らかにした。また、5 日間連続の一日一時間の学習によって引き起こされる長期適応は、AMPA 受容体ではなく平行線維-プルキンエ細胞

シナプス自体の減少を伴っていることを明らかにした。これらの結果は、脳内に短期的に刻まれる記憶の痕跡が、長期的に安定化されるに従って、構造的な変化へと変換

されることを示している。さらにこの変換に関わる分子メカニズムを解明することを目指している。

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。我々は凍結割断レプリカ免疫電子顕微鏡法を用いることによって、これらの分子の放出部位における異なる局在パターンを明らかにした。tSNARE 蛋白質は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が明らかにな

った。一方、CAST などの CAZ 蛋白質は放出部位 (active zone) に特異的に集積していた。また小胞性グルタミン酸トランスポーターや小胞性 GABA トランスポーターが、それぞれの神経終末から放出される伝達物質を同定するために、非常に有用なマーカーとして使え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

脊椎動物の中樞神経系には、樹状突起スパインと呼ばれる突起状の構造にシナプスを形成する神経細胞が多く見られ、このスパインはアクチン細胞骨格に富む点で特徴的である。既にこのスパイン上に形成されるシナプスと、学習・記憶 (神経可塑性)、或いは神経疾患との機能的関連性を示す知見が多く得られているが、その分子機構は明らかにされていない。そこで私は、このスパイン内アクチン細胞骨格と、実際にシナプス伝達や神経細胞の興奮性の調節機能を担う細胞膜上機能分子の局在を明らかにし、さらにこれらがシナプス機能の変化に伴ってどの様に変化するのかを明らかにすることで、シナプス可塑性のメカニズムを解明しようと研究を行っている。

この樹状突起スパインは長さ1ミクロンほどの構造物

であり、その内部構造や細胞膜表面の分子分布を明らかにするには電子顕微鏡レベルの定量的な分子局在解析技術が必要である。そこで故藤本和教授 (福井県立大学) により開発された凍結割断レプリカ免疫標識法 (SDS-digested freeze-fracture replica labeling) を応用し、シナプス可塑性誘導前後の神経伝達物質受容体、イオンチャンネル、開口放出関連タンパク質等の分子局在を解析している。

これらの解析を通して、生物が進化の過程で獲得した高次脳機能が、どの様に達成されているのかを理解し、学習・記憶障害などの病理や治療法の開発へと繋がることを期待している。

海馬 NMDA 受容体局在の左右差

Wu Yue, 篠原良章, 川上良介, 重本隆一

脳の機能的な左右差はヒトでよく知られているが、その分子基盤はほとんど知られていない。我々は九州大学

の伊藤功助教授らとの共同研究により、マウスの海馬 NMDA 受容体サブユニット NR2B が左右の海馬の対応す

るシナプスで非対称に配置されていることを発見した。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特異的な 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、シナプス後部の神経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。この NMDA 受容体量の左右差に対応して、CA1 放射状層での Schaffer collateral シナプスにおける長期増強現象は、右よりも左で強く起こることが明らかになった。さらにこの非対称性の生理的意義を解明することを目指す。

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。この NMDA 受容体量の左右差に対応して、CA1 放射状層での Schaffer collateral シナプスにおける長期増強現象は、右よりも左で強く起こることが明らかになった。さらにこの非対称性の生理的意義を解明することを目指す。

タグ導入による GABA_A 受容体の電子顕微鏡的定量法

Mate Sümegi, 深澤有吾, 重本隆一

脳内における機能分子の局在を電子顕微鏡レベルで可視化し正確に定量する方法論の開発のために、電子顕微鏡用タグの開発を行っている。さまざまなタグを付加した GABA_A 受容体 $\gamma 2$ サブユニットを培養神経細胞や脳に発現させ、タグ付受容体の機能と局在を電気生理学的方法と形態学的方法で調べる。 $\gamma 2$ サブユニットを欠損する遺伝子改変マウスから作成した培養神経細胞においては、GABA_A 受容体がシナプスに集積せず、樹状突起上に散在していた。これにレンチウイルスを用いて $\gamma 2$ サブユニットを導入したところ、正常な GABA_A 受容体クラスターの形成が認められた。このシステムを使ってタグ付受容体の機能を調べている。また小脳プルキンエ細胞に発現する GABA_A 受容体チャンネルには一個の $\gamma 2$ サブユニットが含まれていることから、 $\gamma 2$ の数を計測することによってチャンネル数を定量することを試みる。小脳での発現にもレンチウイルスによるタグ付 $\gamma 2$ サブユニットの遺伝子導入を使用している。

トを導入したところ、正常な GABA_A 受容体クラスターの形成が認められた。このシステムを使ってタグ付受容体の機能を調べている。また小脳プルキンエ細胞に発現する GABA_A 受容体チャンネルには一個の $\gamma 2$ サブユニットが含まれていることから、 $\gamma 2$ の数を計測することによってチャンネル数を定量することを試みる。小脳での発現にもレンチウイルスによるタグ付 $\gamma 2$ サブユニットの遺伝子導入を使用している。

GABA_B 受容体とカリウムチャンネルの棘突起特異的共存

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

脳内における主要な抑制性伝達物質である GABA には、イオンチャンネル型の GABA_A 受容体と G 蛋白共役型の GABA_B 受容体が存在する。我々は、免疫電子顕微鏡法を用いて小脳、視床、海馬における GABA_B 受容体の異なる局在を報告してきた。GABA_B 受容体は海馬錐体細胞の樹状突起においてカリウムチャンネルと共役し、ゆっくりとした過分極をおこすことが知られていたが、今

回我々は、GABA_BR1 と GIRK2 サブユニットが、海馬錐体細胞の棘突起シナプス周辺で特異的な共局在を示すことを明らかにした。このような共局在は樹状突起のシャフトにおいては認められず、2 つの蛋白質は別々のクラスターに分かれて分布していた。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。

前脳基底核と黒質一線条体ドーパミン系の電気生理学および形態学的解析

荻山俊彦

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、電気生理学的解析、形態学的解析を行なっている。

黒質－線条体ドーパミン系は随意運動調節に関与し、この系の障害とパーキンソン病等の大脳基底核関連疾患とが関係していることが示唆されている。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および電気生理学的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と考えている。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のかを明らかにすることを目標にしている。

皮質棘突起への抑制性と興奮性入力之二重支配

窪田芳之, 畑田小百合, 川口泰雄

非錐体細胞のターゲットは、細胞体や樹状突起近傍部であると思いがちであるが、実際には樹状突起末端部分にも多い。FS バスケット細胞他、非錐体細胞 9 個のターゲットを電子顕微鏡 3 次元再構築法で検討した結果、全ての細胞で、ターゲットの 25-50% が棘突起である事を突き止めた。さらに、その 60-95% 程度の棘突起は、もう一つのシナプス入力（非対称性）を受けていた（DI 棘突起）。次に、この DI 棘突起を神経支配している興奮

性入力、錐体細胞由来なのか、視床からの入力なのかを明らかにした。皮質では、VGLUT1 は、錐体細胞の神経終末に、一方で VGLUT2 は視床由来の神経終末に発現している。これを利用して、DI 棘突起に、どの VGLUT 陽性神経終末が入力するかを検討した。全ての層から 700 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% で抑制性入力を受ける事がわかった。

大脳皮質錐体細胞の発火特性の多様性

大塚岳, 森島美絵子, 川口泰雄

大脳皮質錐体細胞の発火特性は多様であると考えられているが, 大脳皮質が情報を出力する皮質下構造との関係は余り知られていない。そこで今回, 逆行性蛍光トレーサーを対側線条体と橋核に注入することによって, それぞれの脳領域に投射する前頭皮質 5 層錐体細胞サブタイプを同定し, スライス標本においてホールセル記録を行い, 錐体細胞サブタイプの電気生理学的特性の解析を行った。その結果, 対側線条体に投射する細胞の殆どは

定常電流通電に対して通電した最初の期間しか活動電位が発生しなかった。一方, 橋核に投射する錐体細胞サブタイプでは記録した全ての細胞で, 定常電流注入に対して持続的に活動電位が発生した。また, 橋核に投射する一部の細胞では通電による発火の開始においてバースト発火を示す細胞も記録された。これらのことから, 5 層錐体細胞は投射先に依存して機能的に分化していると考えられる。

皮質介在ニューロンサブタイプにおけるスパイン形態分化

荻部冬紀, 窪田芳之, 川口泰雄

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・シナプスブトン分布, 樹状突起分枝・スパイン分布の定量的解析を終えたので, 今年度はスパイン形態を定量的に調べた。樹状突起の光顕・電顕像を対応させてスパインを同定すると, 光顕ではおよそ半数のものを数えていることがわかった。介在ニューロンの主要タイプである, FS バスケット細胞, マルティノッティ細胞, ダブルブーケ細胞のスパインを形態比較すると,

その密度だけでなく長さや形も異なることがわかった。マルティノッティ細胞のスパインは長く, マッシュルームタイプの割合が高い。複数のヘッドをもつスパインもマルティノッティ細胞で多くみられた。FS バスケット細胞では逆に長く, マッシュルームタイプは少なく, 複数のヘッドを持つものはみられなかった。スパイン密度・形態と樹状突起分枝パターンが関連することから, サブタイプごとに特有の入力様式があると考えられる。

前頭皮質 5 層における錐体細胞サブタイプとシナプス結合

森島美絵子, 川口泰雄

前頭皮質から線条体へ投射する細胞の機能分化を知るために, その形態と皮質外投射パターンとの相関を明らかにしてきた。今年度は, 二種類の 5 層錐体細胞間のシナプス結合を電気生理学的に調べた。橋核に投射する錐体細胞 (CPn 細胞) と, 対側線条体に投射する錐体細胞 (CCS 細胞) を逆行性標識で同定した。CCS 細胞から CCS または CPn 細胞への結合は約 1 割の確率でみられたのに対して, CPn 細胞から CCS 細胞への結合は殆どみられな

かった。CCS 細胞間の相互結合も同じような確率でみられた。染色した細胞を再構築すると, 軸索・樹状突起コンタクトはシナプス結合していたもの間でしかみられず, その数は電流量と相関し, 変動係数とは逆相関していた。CPn 細胞軸索は CCS 細胞樹状突起に十分近接している場合もみられたが, コンタクトは観察されなかった。前頭皮質 5 層錐体細胞の神経結合には投射サブタイプ間で階層性があると考えられる。

parvalbumin 陽性細胞, calretinin 陽性細胞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のサブタイプである parvalbumin (PV) 陽性細胞, calretinin (CR) 陽性細胞にシナプス入力する興奮性と抑制性の神経終末の割合を求めた。ラット前脳の前切片を, PV 陽性構造と CR 陽性構造を 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超薄切片を作製し, 包埋後免疫組織化学法で GABA 染色を施した。電子顕微鏡観察の結果, PV 陽性細胞にシナプス入力している GABA 陽性神経終末は全体の 1 割

程度で, 残りは, 非対称性の興奮性と思われる神経終末であった。しかし, GABA シナプス入力の大半は細胞体を神経支配していた。一部は樹状突起にシナプス入力していたが細くなるにつれ少なくなる事もわかった。一方, CR 陽性細胞にシナプス入力している GABA 陽性神経終末は, 全体の 1/3 程度であった。また, 樹状突起の太さにより, 比率には大きな差はなかった。

大脳皮質 GABA 細胞蛍光標識ラットの作成とその免疫組織化学的解析

平井康治, 川口泰雄

平林真澄 (遺伝子改変動物作製室)

上松正和 (豊橋技術科学大学)

柳川右千夫 (群馬大学)

多様な大脳皮質介在ニューロンの解析を進めるために, それらを蛍光標識したラットの作成を目指した。本年度は, vesicular GABA transporter (VGAT) 遺伝子を含む BAC を用意し, これをもとに Venus 標識ラット作成を試みた。Venus を発現する二系統のトランスジェニックラット (A, B 系統) が得られた。Venus 及び GABA 発現を免疫組織化学で調べたところ, 脳領域によって, 両系統とも GABA 細胞に選択的に Venus を発現している領域, 片方の系統

だけが, 選択的に陽性で, もう一方が非 GABA 性細胞にも出ている領域があった。大脳皮質では A 系統で GABA 陽性細胞と Venus 陽性細胞がほぼ完全に一致しており, B 系統では, GABA 細胞のほぼ 95% 近くが Venus 陽性であった。海馬では A 系統で非錐体細胞が選択的に標識されているのに対して, B 系統ではそれらに加えて CA1 錐体細胞が陽性であった。

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, 言語・数処理, 両手共著運動, 対連合学習など認知機能全般にわたる幅広い研究を行った。

長期の訓練による、触覚弁別における神経基盤の可塑的な変化

齋藤大輔, 定藤 規弘

盲人が点字を読む際に、一次視覚野において神経の可塑的な変化をおこすことが知られている。この変化が、視覚の剥奪でのみおこるのか、それとも長期の触覚訓練によるものかは明らかにされていない。そこで、触覚の長期トレーニングを行った健常被験者において、可塑的な変化が起こるかを調べた。訓練を行った麻雀の牌と、訓練を行っていない点字を用い、触覚での形状照合課題

を行った。その結果、訓練を行った刺激を用いた際に、一次視覚野に有意な脳活動が観察されたが、訓練を行っていない刺激では見られなかった。対照群では、どちらの刺激の場合も、視覚野の活動は見られなかった。可塑的な脳活動の変化は、視覚の剥奪や異種感覚間の対連合学習といったものではなく、長期にわたる訓練により起こることが示唆された。

対連合学習を成立させるための神経基盤の解析

田邊 宏樹, 定藤 規弘

連合学習を成立させる神経基盤について検討するため、遅延型対連合学習 (PA) 課題と対照条件として遅延見本合わせ (DMS) 課題を遂行中の脳活動を機能的 MRI により計測した。イメージング解析の結果、上側頭溝前方部の活動は、PA 課題では学習の初期に活動が高く学習が進むにつれて減衰するのに対し、DMS 課題では最初から活動がないことが明らかとなった。また、難しい PA 課題では学習がなかなか進まないが、それに呼応するように上側頭溝前方部の活動も高いまま維持されることが観察

された。これらのことから上側頭溝前方部の活動が対連合の形成 (building associates) に重要な役割を果たすことが示唆された。また、PA 課題遂行中の遅延期間において前頭前野と頭頂間溝の活動がみられ、この活動の強さは学習中に変化しないことを見いだした。DMS 課題ではこのような活動がみられないことから、この前頭前野-頭頂間溝ネットワークが学習に必要な情報の保持とその構えを表象していることが示唆され、連合学習における上側頭溝前方部との役割の違いも明らかとなった。

一次体性感覚野における口腔領域の表象

宮本順 (東京医科歯科大), 定藤 規弘

歯、唇、舌の、一次体性感覚野における体性局在 (somatotopy) を機能的 MRI を用いて検討した。中心後回頭側においては、歯は舌の上 (medial)、唇の下 (lateral) に位置し、Penfield の結果に適合した。一方中心後回尾

側に向かうにつれ体性局在は減少した。このことは、口腔からの感覚入力是一次体性感覚野において階層的に集約されていくという理論を支持する。

空間情報の脳内操作における運動前野と頭頂葉の機能分担

大塩りつ, 田中悟志, 本田 学

空間情報の脳内操作時に強い活動が観察される運動前野および頭頂葉の機能分担は明らかでない。本研究では、

情報を静的に保持する過程には後部頭頂皮質が、保持した情報を動的に操作する過程には頭頂葉に加えて運動前

野が寄与するという仮説に基づき、機能的磁気共鳴画像法を用いた検討を行った。わが国に古くから伝わる「あみだクジ」を応用した視空間情報操作課題を開発した。被験者は、第1刺激として1秒間呈示されたあみだクジパターンを15秒間保持し、第2刺激として呈示されたクジの起点と記憶されたクジの空間パターンを使って、終点にたどりつく。さらに15秒後に第3刺激として呈示されたクジの終点が、実際にあみだクジを行った終点と一致しているかどうかを判断し、選択ボタン押し反応を行った。

後部頭頂皮質の有意な活動は、あみだクジパターンを保持している第1刺激後と、あみだクジを実際に行う第2刺激後の両者で観察されたが、背外側運動前野の有意な活動は第2刺激後にのみ観察された。これらの結果は、後部頭頂皮質は空間情報の静的な記憶・保持と記憶した空間情報にもとづいて行う動的操作の両者に関与するのに対して、外側運動前野は、記憶情報の動的操作により特異的な役割を果たすことを示唆していると考えられる。

カウンティングの神経基盤

神作 憲司, Marie-Laure Grillon, 酒井朋子, 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。我々は、ヒト脳におけるカウンティングの神経基盤を明らかとする研究を行ってきている。2005年はまず、連続した刺激を明示的にカウンティングして知覚する場合と明示的なカウンティングせずに知覚する場合とを比較した。新規被験者を集め、異なる感覚モダリティからなる連続刺激を用意して、直前に呈示された刺激を構成する感覚モダリティを答えさせ、次に同じ刺激を呈示して被験者に明示的なカウンティングを行わせた。こ

の結果、明示的にカウンティングする際の運動前野の活動が、カウンティングせずに入力モダリティを判別しながら知覚する場合に比べ有意に強くなることを示した。さらに、カウンティング中の運動前野の活動が連続刺激のリズムによらないことや、その運動前野の活動が、数字を唱えるだけでは認められないことも示した。現在は、従来数的な情報処理を行うと考えられてきた頭頂葉や前頭前野と、運動前野との役割分担やそれら相互の関係を明らかにするために、連続刺激をカウンティング（積算量1）する場合と、積算量を変えて知覚する場合とを比較する実験を行っている。

両手鏡像運動時の右一次運動野の活動低下

荒牧勇（科学技術振興機構）、本田学、定藤規弘

両手協調運動において、同名筋を同時に動かす運動パターン（鏡像運動）は他のパターンに比べて極めて安定である。この理由として、鏡像運動では優位半球による同側性運動指令が寄与している可能性が考えられる。本研究はこの仮説を検証するために、fMRIを用いて両手鏡像運動と非利き手による片手運動の脳活動を比較した。被験者は3Hzのガイド音にあわせて、両手鏡像運動、両手非鏡像運動、右手運動、左手運動の4つの条件で指タッ

ピングを行なった。その結果、右一次運動野の活動が、両手鏡像運動条件において左片手運動条件よりも有意に低いことが観察された。両手非鏡像運動条件ではこのような低下は観察されなかった。こうした結果は、左手の制御に関して左一次運動野からの同側性運動指令の寄与が高くなることを示唆しており、このことが鏡像運動パターンの安定性の強さに関与していると考えられる。

皮肉課題に関する fMRI 研究

内山仁志 (鳥取大学), 小枝達也 (鳥取大学), 定藤規弘

皮肉の理解には話者の意図を認識するための複雑な心的処理を必要とする。自閉症児では他者の心的状態を付度する能力 (mentalizing) と皮肉を理解する能力に障害が見られ、両者には明確な関係があるといわれている。これは mentalizing が、皮肉のような語用論的・非字義的言語理解において重要であることを示唆している。今回我々は皮肉の検出に関わる神経基盤を機能的核磁気共鳴画像法を用いて検討した。被験者は状況文とそれに続く登場人物のコメントの2文で構成される文章を読み、そのコメントの意味内容が文脈によって皮肉なのか皮肉で

ないかの判断を行なった。その結果、皮肉検出の神経基盤として左側頭極、左上側頭溝、前頭前野内側部、および下前頭回 (Brodmann's Area (BA) 47) の賦活が観察された。これらの領域はそれぞれ mentalizing と言語処理に関わる神経基盤としても知られており、皮肉の検出にはこれらの神経基盤が関与しているものと思われる。特に左の BA47 は状況文提示時よりもコメント提示時でより顕著に賦活しており、この領域が皮肉検出時における mentalizing と言語処理の相互作用のある領域であることも示唆された。

左下前頭回における文法処理機能の分離

内山祐司, 豊田浩士, 本田学 (大阪教育大学), 吉田晴世 (大阪教育大学),
河内山隆紀 (香川大学), 江部和俊 (豊田中央研究所), 定藤規弘

文法処理に特異的な神経基盤を fMRI を用いて同定した。文章理解に関わる神経基盤を同定するために文法判定課題と短期記憶課題の脳活動を比較した。またガーデンパス文と同じ単語で構成されるが異なる並びからなるガーデンパスでない文を使って文法的処理負荷に応じて変化する神経活動を評価し文法処理に関する神経基盤を同定した。ガーデンパス文は構文分析の過程で誤った分析を起こすことで文法的処理負荷を増加できる。

短期記憶課題では両側の頭頂-前頭領域と皮質下構造で非常に広い活動が観察された。これに対して文章理解は左ブロードマンエリア (BA) 45 と 47 を含む下前頭回と

左上側頭回から縁上回にかけての領域が活動した。ガーデンパス文を使って抽出した文法的な処理領域は、左 BA45, BA46, 前補足運動野と右小脳であった。

左下前頭回において背側 BA45 を含む背側下前頭回は短期記憶課題で、より高く活動したのに対し腹側の前部下前頭回 (BA47) は意味的処理でより高く活動しており、背側-腹側間の機能勾配を形成していた。文法的処理に特異的な領域の腹側 BA45 は、これらの領域の間に位置していた。このことは、左腹側 BA45 が短期的言語記憶と他の言語的プロセスをつなぐノードである可能性を示唆する。

発達生理学研究室

認知行動発達機構研究部門

【概要】

2005年度は人の動きの多い年だった。

博士研究員だった坂谷智也君が7月より英国オックスフォード大学に留学，8月末より助手の遠藤利朗君がスウェーデンのカロリンスカ医科大学に留学した。新しく参加したメンバーとしては4月より坪井史治君が総研大博士課程に入学，高田和子と林愛さんが研究補助員として採用され，7月より高橋雅人君が杏林大学の整形外科から博士研究員に，池田琢朗君が玉川大学からCREST研究員に，9月より金田勝幸君が米国テネシー大学より助手に，加藤利佳子さんがフランスのコレージュ・ド・フランスよりCREST研究員に，10月より Penphimon Phongphananee さんがタイ国チュラロンコン大学より

国費留学生として総研大博士課程に入学した。研究としては2年目に入った戦略的創造研究推進事業 (CREST) に関係したサルを用いた皮質脊髄路の損傷後の手指の機能代償に関する研究，そして大脳皮質一次視覚野損傷後のサケード運動の機能代償に関する研究が本格的に加速してきた。さらにカナダ国クイーンズ大学の Munoz 教授，オランダ国アムステルダム自由大学の Jan Theeuwes 教授，米国南カリフォルニア大学の Laurent Itti 博士と共同で受賞した Human Frontier Science Program の共同研究グラントによる「空間的注意の脳内機構」に関する共同研究が開始した。

随意運動の制御におけるシナプス前抑制の役割

関 和彦，武井 智彦

末梢神経への電気刺激によって脊髄一次感覚神経末端に対するシナプス前抑制が引き起こされる事が知られている。自然刺激のような非同期的な刺激においても同様な抑制が誘発されるかについて軽麻酔下のサル頸髄において検討した。まず手背部及び手掌部からの求心神経末端が存在する脊髄内部位を同定した後，同定部位に対して微小電流刺激を行い，それらによって誘発される逆行性電位を皮膚神経に装着したカフ電極において記録し

た。その後，閾値電流で脊髄微小刺激を連続的にを行いながら実験者の一人が手掌部や手背部をブラシで継続に刺激した。そしてブラシ刺激によって逆行性電位の振幅がどのように変化するかを観察した。その結果，手掌部や手背部へのブラシ刺激中に記録された逆行性電位のサイズはその前後のコントロールと比較して有意に大きかった。自然刺激によってサルの皮膚神経末端部にシナプス前抑制が誘発される事が初めて明らかになった。

第一次視覚野損傷サルの残存視覚機能

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。損傷半視野で弁別できる標的刺激の

閾値は正常半視野と比べて高くなっていた。また，急速眼球運動の終始位置は損傷半視野においてより大きくばらついており，急速眼球運動が不正確になっていることが明らかになった。(2) 時間的ギャップを(1)の課題に加えることで express saccade と同等の潜時を持つ急速眼

球運動が起こることを見いだした。(3) 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。(4) Central-cue 型の注意課題において、損傷半視野での残

存視覚情報処理が注意によって促進される証拠を得た。これらのことは残存視覚を処理する経路が認知処理にも関与しうることを示している。

上丘中間層への抑制性入力

金田勝幸, 伊佐かおる, 伊佐正

上丘中間層 (SGI) ニューロンのバースト発火生成には GABA 作動性抑制性入力からの脱抑制が重要である。これまでに SGI のグルタミン酸作動性投射ニューロンには黒質網様部 (SNr) からの GABA 性投射があることが明らかにされている。しかし, SGI には様々のタイプの GABA ニューロンも存在しており, それらのニューロンにも抑制性入力があるのかどうかは不明であった。そこで本研究では, GABA ニューロンが GFP を発現している

GAD67-GFP ノックインマウスを用いてこの点を明らかにすることを試みた。ホールセル記録を GFP 陰性および陽性ニューロンから行い, SNr からの投射線維の電気刺激に対する応答を調べたところ, GABA_A 受容体を介する IPSCs がいずれのニューロンタイプにおいても観察された。さらに記録後の形態観察の結果から, 様々なタイプの SGI の GABA ニューロンが SNr 由来の抑制性入力を受けていることが明らかとなった。

サル頸髄レベル皮質脊髄路損傷後の手指巧緻性回復について ~C2 および C5 レベル損傷後回復の比較~

Bror Alstemark (スウェーデン, ウメオ大学), Lars-Gunnar Pettersson (スウェーデン, イェテボリ大学)
西村幸男, 高橋雅人, 坪井史治, 伊佐正 (認知行動発達機構)

我々は皮質脊髄路 (CST) から脊髄運動ニューロンへ結合する経路の1つとされる C3-C4 に細胞体を持つ脊髄固有ニューロン (C3-C4PN) を介する間接経路が手指巧緻性に関与している可能性について検討した。C4/C5 レベルで CST を切断 (C3-C4PN を介する間接経路を残す) したサルと C1/C2 レベルで CST を切断 (C3-C4PN を介する間接経路を遮断) したサルとの手指巧緻性の回復過程を比較した。

母指と第二指を対立させた精密把持動作について, C4/C5 で CST を切断したサルは切断後2ヶ月以内で切断前の動作に戻った。一方 C1/C2 で CST を切断したサルは切断後4ヶ月でも切断前の動作に戻らなかった。特に, C1/C2 レベルで CST を切断したサルは個々の指の独立した運動が消失した。この結果は, C3-C4PN を介する間接経路が手指の巧緻性に関与している可能性を示唆している。

把握運動に関与する脊髄ニューロンの役割

武井 智彦, 関 和彦

手を用いた把握運動の制御において脊髄神経機構がどのような役割を担っているのか調べるため, 把握運動中のサルから脊髄ニューロン活動を慢性的に記録し, その活動パターンを検討した。サルに, 母指と第二指によっ

てレバーを把握する課題 (精密把握) を行わせ, その際下位頸髄に金属微小電極を刺入して, 単一脊髄ニューロンの活動を記録した。その結果, 多数のニューロンが課題に関連した活動変化を示し, その活動の変化が把握運

動開始以前に始まる例も一部のニューロンにおいて認められた。さらに、記録されたニューロンの上肢筋群への出力を spike-triggered averaging 法を用いて調べた結果、一部のニューロンは運動ニューロンへの直接投射を持つ

ことが明らかになった。これらの結果から、脊髄ニューロンが把握運動における運動実行や運動準備の過程に関わっていることが示唆された。

Spread of activity in the local circuit of superior colliculus

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

(¹Department of Developmental Physiology, National Institute for Physiological Sciences

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

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

To study how the visual signal is processed in the local circuit of superior colliculus (SC) from the superficial layers (sSC) to the deeper layers (dSC), we analyzed the propagation of excitation following the electrical stimulation of the sSC by using 64 channel-field potential recording system (planar electrode, 8 x 8 pattern with interelectrode spacing of 150-300 μm) in SC slices preparations obtained from 16- to 24-d-old mice. Electrical stimulation at sSC induced negative field potential with short latency mainly at the recording sites in sSC adjacent to the stimulating site. After application of bath containing 10 μM Bicuculline (Bic), the same stimulus induced a large negative field response with long duration that spreads first laterally in sSC and then ventrally to dSC. These Bic-induced responses disappeared after application of 50 μM

APV. The electrically evoked responses in individual neurons from sSC and dSC have also been investigated by whole-cell patch-clamp recording simultaneously with the multichannel field potential recordings. Bursting spike responses could be induced in both the sSC and the dSC after application of Bic, the duration of which roughly corresponds to the long lasting field potential. The results from the two recording systems suggest that when GABA_A receptor-mediated inhibition is reduced, visual signal in the sSC propagates to the dSC by induction of burst discharge shown as large response with long duration in field potential recording system and NMDA type glutamate receptors contribute to spatial propagation of the response.

生体恒常機能発達機構研究部門

【概要】

当部門は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2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。

本年度から神経回路の可塑的变化を生体で観察するため、多光子励起法を利用して、マウス大脳皮質細胞の全層にわたる可視化技術を確立した。この技術を利用して、現在神経回路の微細構造の長期変化の観察を試みている。

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, 西巻 卓也

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, 渡部美穂, 和気弘明, 堀部尚子

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。

カンナビイドによる海馬抑制性伝達調節

前島隆司, 稲田浩之

未熟期海馬においては, リズム活動があり, 海馬回路形成・発達を制御している。このリズム活動は CA3 領域に存在するリズムジェネレーターによって海馬全体に伝播する。このリズム発生の一因として GABA の脱分極作用が関与している。CA3 領域における GABA 回路の制御

機構について, シナプス工細胞の代謝型グルタミン酸作動性受容体の活性化によって逆行性に内因性カンナビノイドが抑制性神経終末に作用し, GABA 放出を抑制していることを明らかにした。

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, 和気弘明, 堀部尚子

八尾博史 (国立肥前療養所)

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蓋骨を駆け

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。

In Vivo 多光子顕微鏡を用いた大脳皮質神経細胞の微細構造の可視化と長期可塑性の変化

鍋倉淳一, 和気弘明

神経回路の発達および脳障害の回復期における神経回路の可塑性の研究を遂行するにあたり、究極的に生体での観察が不可欠である。そのため、生体における神経回路の可視化のため、長波長短パルスレーザーを利用して生体深部の微細構造を観察可能な多光子励起法を種々の神経細胞に蛍光蛋白が発現している遺伝子改変動物に適用し、大脳皮質回路の可視化する方法の立ち上げを行った。光路の開発・調節、頭蓋骨に適用する特殊アダプタ

の開発などを行い、マウスにおいて、大脳皮質表面から1ミリの深部まで観察可能な技術を行った。その結果、大脳皮質錐体細胞を全層にわたり、樹状突起、棘突起、軸索などのその微細構造を観察することが可能であり、また、同じ微細構造を数日間にわたり連続観察可能となった。さらに、同レーザーを利用して、生体において微細構造の局所障害をおこす技術の開発に成功している。

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う。しかし、近年、この調節機構の異常が肥満、糖尿病、高血圧など、生活習慣病の発症と密接に関連することが明らかとなってきた。当部門では、視床下部における生体エネルギー代謝の調節機構を分子レベルで解明し、その分子

機構を通して生活習慣病など様々な疾患の原因・治療法を明らかにしたいと考えている。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。4) 脂肪酸酸化を促進するレプチン・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の解明

箕越 靖彦

岡本 士毅

志内 哲也

田中 智洋（京都大学大学院医学研究科）

益崎 裕章（京都大学大学院医学研究科）

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 キナーゼが摂食行動を制御することを明らかにしている (Nature 2002,

2004)。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にレンチウイルスを用いて発現させ、摂食行動に及ぼす影響を調べた。そ

の結果、マウス視床下部室傍核に活性型 AMP キナーゼを発現させるとマウスの摂食量が増加、肥満することを発見した。さらに我々は、レプチンによる AMP キナー

ゼの活性制御機構が高脂肪食によって障害されることを、レプチントランスジェニックマウスを用いて明らかにした (Tanaka T et al. Diabetes, 2005)。

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、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。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。オレキシンは、睡眠覚醒レベルの調

節、報酬系の調節などに関与する。このことからオレキシンは、覚醒レベルを高めると同時に、骨格筋での代謝を亢進させるなど、食餌獲得行動など行動発現の調節に関与すると考えられる。さらに近年、肥満・糖尿病など生活習慣病と睡眠障害との関連が指摘されており、オレキシンニューロンの異常と生活習慣病との関連についても調べている。

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の解明

箕越 靖彦
岡本 士毅
李 順姫
嶋 雄一 (基礎生物学研究所)
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 SF-1 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。

脂肪酸酸化を促進するレプチン・シグナル伝達機構の解明

箕越 靖彦
鈴木 敦

本研究では、筋芽細胞株であるC2C12細胞を用いて脂肪酸酸化を促進するレプチンのシグナル伝達機構を調べている。その結果、レプチンが、ATM並びにCaMKKβ

を介してAMPキナーゼを活性化することを見いだした。活性化したAMPキナーゼは、acetyl-CoA carboxylase (ACC)をリン酸化してその活性を抑制し、その結果、ACC

の産物である malonyl-CoA 量を低下させる。malonyl-CoA は脂肪酸をミトコンドリアに取り込む酵素, CPT1 の強いアロステリック阻害剤であるので, malonyl-CoA 量が低下することで CPT1 活性が上昇し, 脂肪酸酸化が促進す

る。さらに我々は, 活性化した AMP キナーゼが核内に移行し, 脂肪酸酸化関連遺伝子の発現に関わる転写調節因子 PPAR α の発現を促進することを見いだした。

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17年度は共同利用実験計画が24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17年度は最終的に10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116日、修理調整等64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6,946枚、フィラメン点灯時間は430.5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。

小脳生後発達過程におけるパーグマングリア細胞の解析

古家園子, 山口 登, 有井達夫

プルキンエ細胞の樹状突起のスパインと平行線維間のシナプスを覆っているパーグマングリアは、発生の過程においてはプルキンエ細胞の分化や機能発現に深く関与していることが考えられている。エンドセリン(ET)は血管平滑筋を持続的に収縮させるだけでなく、種々の細胞の増殖や分化に関与しているが、小脳において、パーグマングリアにETB受容体のmRNAが豊富に存在する。我々は、ETB受容体の一部欠損を持つAR系統(sI劣性

遺伝子を持つ)の野生型とsI/sIラットを用いて、小脳のゴルジ染色標本を作製し、3-4 μ mの厚切り切片を超高圧電顕で観察し、3次元構築を行った。パーグマングリアがプルキンエ細胞のスパインと平行線維間のシナプスを包んでいる部位と、非シナプス部位に分け、単位体積あたりのパーグマングリアの膜表面積の値を出すことによって、生後発生過程におけるパーグマングリアの分化過程とエンドセリン受容体の役割を明らかにする。

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。

意志に関係する脳活動の研究

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。さらに一步進めて、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。

生体情報解析室

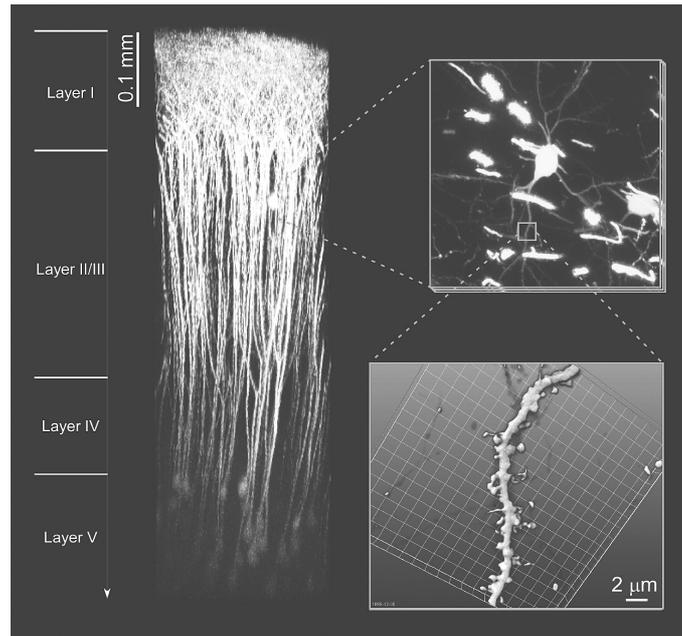
【概要】

2006年1月1日より5年間、根本知己が細胞器官系生体膜研究部門助手から当室助教授に昇任し、当室を担当することとなった。当室は、共通の2光子顕微鏡室と、生体情報解析用コンピュータシステム、所内情報ネットワークの維持管理を担当することが任務である。

2光子顕微鏡室は共通棟地下の電子顕微鏡施設から本棟5F511号室に移動させ、室温湿度制御系や陽圧系などを設営するなど大幅な整備を実施し、近赤外超短光パルスレーザーを用いたシステムに適したクリーンルームとした。さらにバイオ分子センサープロジェクトの支援を受け、広帯域高出力型の超短光パルスレーザーシステム Maitai HP (米国 Spectra Physics 社) を導入し、生体恒常機能発達機構研究部門と共同してオリンパス BX 共焦点

顕微鏡システムの改造し、個体 *in vivo* イメージング用正立型2光子顕微鏡システムを構築した。本システムでは麻酔下のマウス大脳新皮質の表面から0.9mm以上深部においても断層像を得ることが可能であり、世界でトップクラスのスペックを実現することに成功した。また現在、機能協同研究部門の倒立型2光子顕微鏡システムも Maitai HP のレーザー光を導入できるように改良を加え、カルシウムイメージングや、光活性化、長波長蛍光タンパク質の利用といった様々な2光子励起法を活用した細胞機能アッセイが可能となりつつある。

また、生理学研究所、基礎生物学研究所、分子科学研究所を横断した若手研究者の参加を募り定期的なバイオイメージング・セミナーを主催している。



麻酔下のマウスの大脳皮質の GFP 発現神経細胞群の 3 次元再構築。2 光子顕微鏡の優れた深部到達性は、生体深部の微小細胞形態や活動を観察することを可能とする。新たに構築した“in vivo” 2 光子顕微鏡は、大脳表面から 0.9mm 以上の深部を観察することが可能であり、マウス個体を生かしたまま大脳皮質全体を可視化し得る世界トップクラスの顕微鏡である。(鍋倉淳一教授との共同研究)。

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室

【概要】

2005年11月、脳機能計測センター 脳機能分子解析室は行動・代謝分子解析センター 遺伝子改変動物作製室に改組された。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分子生物学的技術と発生工学的技術を駆使して作製する遺伝子転換動物は必要不可欠で、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切望されている。遺伝子改変動物作製室では遺伝子改変動物（マウス、ラット）の作製技術を提供しつつ、遺伝

子ターゲティングによってノックアウトラットを作製することを目指している。これまでに ES 細胞や精原細胞の株樹立を試みるとともに、核移植や顕微授精など、ラットにおける発生工学的技術の高度化に取り組んできた。研究課題のうち下記の3題について具体的に示す。(1) 顕微授精 (ICSI) 技術を応用したラットへの外来遺伝子の導入、(2) 凍結乾燥したラット精子の ICSI による産仔発生能の証明。(3) ラットの卵子成熟促進因子と体細胞核注入時の早期染色体凝集との関係。

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影響を及ぼす要因

平林 真澄, 加藤 めぐみ, 金子 涼輔 (大阪大)

精子に外来 DNA を付着させ、卵細胞質内精子注入法 (ICSI) によって作製した胚を移植すればトランスジェニック (Tg) マウスが作製できると報告され、我々はその技術の応用範囲がラットにまで拡大できると確認した。本実験の目的は ICSI を介した Tg ラットの作製効率を改善することで、結果として、超音波による精子膜破壊処理

と凍結融解処理が有効なこと、精子と共培養する DNA 溶液の濃度はマウスで用いられている濃度の 1/50 が適していること、DNA の種類 (プラスミド, BAC) は ICSI を介した Tg ラットの作製効率に影響しないこと、およびクローズドコロニー系における Tg ラット作製効率が比較的高いこと、を明らかにした。

凍結乾燥したラット精子の顕微授精による産仔の獲得

平林 真澄, 加藤 めぐみ, 保地 眞一 (信州大)

精子を凍結乾燥できれば室温あるいは冷蔵庫内で保存することが可能になるので、精子の維持や輸送に関わるコストを大幅に削減できる。本実験では凍結乾燥したラット精子が ICSI によって産仔発生に寄与できることを証明しようとした。精巣上部尾部から調製したラット精子に超音波による精子膜破壊処理を施した後、液体窒素

中に浸漬し、続いて凍結乾燥機で完全に水分を除去した。2日後に蒸留水で溶かし、ICSI後に胚移植した結果、外見的に正常な複数の産仔が誕生した。精子の超音波処理の有無によって産仔率に差が認められたので、精子膜をあらかじめ破壊しておけば核の脱凝縮が速やかに起こり、胚発生能が向上すると示唆された。

ラット卵子の p34^{cdc2} 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

平林 真澄, 伊藤 潤哉, 加藤 めぐみ, 保地 眞一 (信州大)

クローンマウスを作製するには除核卵子に顕微注入した体細胞核に早期染色体凝集 (PCC) が誘起されていることが重要である。しかしラットでは PCC 誘起が非常に困難なことから, 本実験では卵子の加齢化や除核操作が細胞周期維持に及ぼす影響を調べ, p34^{cdc2} kinase の活性値と PCC 誘起能との関係を検討した。マウス卵子の活性は

ラット卵子と比較して約 2 倍高く, ラット卵子の値は体外摘出後の時間増加につれて急減することがわかった。除核によっていずれでも活性低下は認められたが, マウスでは注入核に PCC が起こるのに対し, ラットではまったく起こらなくなった。ラットに特徴的なこれらのことが顕微注入核の PCC 誘起を阻害している要因であろう。

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】

研究室発足後4年目となり、蛋白研との膜蛋白連携研究による連携フェロー1名、総研大生1名、科研費による非常勤研究員1名が加わり、研究体制が強化された。前年の成果を土台として、イオンチャネル関連分子の解析と、運動機能に関わる神経回路機能の解析を、分子生物学、電気生理学、動物種横断的なアプローチにより進めた。従来電位センサーはイオンチャネル固有の構造で膜電位シグナルは細胞膜を介するイオンの出入りを基盤とすると考えられてきた。ホヤのゲノムの網羅的解析から電位センサーとホスファターゼを一分子内に併せ持つ新規分子(Ci-VSP)を同定し、膜電位シグナルが従来知られてきた以上に幅広い現象に関わる可能性を示唆した。また脊椎動物の生理機能の進化との関係を明らかにするため多様な生物種から相同遺伝子を同定した。また阪大蛋白研との膜蛋白連携研究と連携し電位センサードメイン蛋白について、タンパク質構造解析に関する共同実験を始めた。研究室発足以来行ってきた電位依存性Naチャネルの制御についての解析も進み、チャネル不活性化機構におけるアンキリンとの相互作用の役割を明らかにした。運動機能の神経回路の解析としては、ホヤオタマ

ジャクシ幼生の運動機能をビデオ解析および電気生理学的に解析することに成功しゲノム情報から網羅的なイオンチャネル遺伝子の発現様式を明らかにした。GABAやグリシンを介した発生途上の興奮が歩行運動や脊髄反射などを司る脊髄神経回路の形成にどのような寄与をするかを明らかにするため、 K^+ -Cl⁻ cotransporter isoform 2 (KCC2)を発達過程のマウス脊髄に強制発現させ神経回路形成過程で伝達物質応答を脱分極から過分極に変更することに成功した(日本神経科学会ポスター発表)。東島助教授らは転写因子Chx10ホモログの遺伝子発現により特徴づけられるニューロンを生きた状態で可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュを作製することに成功しin vivoパッチクランプを適用することにより逃避行動と遊泳行動に異なる種類の介在ニューロンが駆動されることを見出すとともに哺乳類脊髄介在ニューロンの基本デザインに関する示唆を得ることに成功した。伊根実験室を活用し、脊椎動物に類縁である尾索動物の運動パターンを理解する、ビデオを用いた画像解析と電気生理学解析を行った。

電位感受性ホスファターゼ Ci-VSP の分子作動原理の解析

村田喜理

岩崎広英

Mohamed Israil Hossain

黒川竜紀

木村有希子

東島眞一

岡村康司

ホヤのゲノムから、電位依存性チャネルの電位センサーをもちながらイオンの通過部位(ポア領域)をもたず、かわりにC末側にホスファターゼドメインをもつ分子を同定した。VSPと命名されたこの分子は、イノシトールリン脂質を脱リン酸化する酵素活性を示し、生理学的な膜

電位の範囲内で、酵素活性を変化させる。イオンの移動なしに細胞膜の膜電位変化を細胞内の化学的情報に転換する、膜電位の信号伝達の新しい経路である。これらの分子の存在は、膜電位シグナルが従来考えられてきたように活動電位などの形成に限定されるのではなく、様々

な生物現象に関わる可能性を示唆している。現在、VSP での 1 分子内の電位センサーの動作がどのように酵素活性の変化をもたらすのか、また VSP がどのような生物現

象における膜電位変化に対応して機能しているのか、哺乳類に固有の生理機能の進化とどのような関係があるか、などを明らかにする研究を遂行している。

電位依存性プロトンチャネル分子の同定と分子機能の解析

佐々木真理
大河内善史
黒川竜紀
高木正浩
岡村康司

VSP 以外に電位センサードメインをもつ蛋白が他にもあるのではと考え、WuBlast2 を用いてデータベースを検索したところ、脊椎動物のゲノム情報および Est の情報から、電位センサーをもつ別の分子を同定した。この分子は電位センサードメインのみを有しポア領域をもたないが (VSOP=voltage sensor-only protein1)、驚くべきことに電位依存性プロトンチャネル活性をもつことが明らかになった。VSOP1 はマクロファージなど免疫系の細胞に多く発現し、膜電位を介する活性酸素の産生や細胞内環境の制御に関わっていると考えられる。VSOP は、今後

感染防御機構や膠原病、アレルギー、神経疾患などにおける細胞内 pH や膜電位シグナルの役割を解析する上で重要なターゲット分子と考えられる。更に VSOP のシンプルな構造と機能のユニークさから、この分子動作原理の解析は、今後イオンチャネルの動作原理一般や、様々な生命現象に関わるプロトンの透過機構などを理解する上で、重要な視点を提供すると期待される。

現在、どのような分子機構により膜電位を感知しプロトンの輸送を制御するのかを明らかにしようとしている。また VSOP1 のノックアウトマウスの作成を行っている。

細胞膜裏打ち蛋白アンキリンによる電位依存性ナトリウムチャネル Nav1.6 の性質の制御

白幡恵美 (山形大学小児科学教室)
早坂 清 (山形大学小児科学教室)
岩崎広英
高木正浩
岡村康司

細胞膜での膜電位信号が細胞内の化学情報に変換される分子機構を担うイオンチャネル分子複合体の構成と制御を明らかにすることを目的とし、軸索に局在し興奮の伝搬に関わるイオンチャネル分子である電位依存性 Nav チャネル Nav1.6 の制御機構を解析した。電位依存性 Nav チャネルは、軸索 node of Ranvier に集積するがこの集積には Ankyrin-G 蛋白による細胞内側からの裏打ちが必須であることが知られてきた。Ankyrin-G は様々な膜蛋白を集積させることで、生理的文脈に必要な機能的細胞膜ドメインを形成する役割があると考えられてきた。しか

し、その一方 Ankyrin が直接相互作用する膜蛋白の分子機能を制御するかどうかは明らかでなかった。tsA201 細胞を用いて強制発現実験を行い、Nav1.6 電流を whole cell patch recording により計測し、Nav1.6 に特徴的な持続性電流を定量した。Ankyrin は膜蛋白相互作用ドメインを介して、Nav1.6 の持続性電流を有意に減少させることを見出した。この知見は、これまでもっぱら膜蛋白分子の集積に関わるとされてきた Ankyrin 分子が、膜蛋白機能を直接制御することが示された初めての例である。

ゼブラフィッシュを用いた、脊髓神経回路網の解析

木村有希子
佐藤千恵
東島眞一

近年の脊髓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、まだ未解明な点が多い。われわれは、ゼブラフィッシュを用いてこの課題を追求している。いくつかの転写因子に関して解析を進めているが、本年度は特に、Chx10 遺伝子について、詳しい解析を行った。Chx10 に関して、その陽性細胞がどのような神経細胞へ分化していくかを、トランスジェニックフィッシュを作製して解析した。その結果、Chx10 陽性細胞はすべて同側下行性神経細胞であり、また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。Chx10 陽性細胞は、そ

の活動パターンからおおまかに2種類に分けられ、逃避行動等の強い動きで発火するものと、通常の遊泳行動でフェージックに発火するものが存在した。ついで、運動ニューロンとの2細胞同時記録を行い、どちらのタイプも運動ニューロンに直接シナプス結合していることを示した。すなわち、Chx10 陽性細胞は、逃避行動、遊泳行動において、運動ニューロンの活動を制御する神経細胞であることが強く示唆された。また、転写因子以外に、グリシン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカー遺伝子（それぞれ、glycine transporter2 と vesicular glutamate transporter）に関してトランスジェニックフィッシュを作製することにも成功した。その結果、掛け合わせのみで神経伝達物質を調べることができる系を確立した。

尾索動物オタマジャクシ型幼生の運動機能に関わるイオンチャネル関連分子の総括的解析

西野敦雄（日本学術振興会特別研究員）
御園生裕明 (UC Davis)
岡村康司

カタユウレイボヤのオタマジャクシ幼生は、神経細胞数が100個程度、筋細胞が40個程度しかないにもかかわらず、洗練された遊泳運動を示す。カタユウレイボヤの幼生の遊泳運動を可能にする神経/筋肉の生理機構の理解を目指して、分子生物学、運動力学、電気生理学的な研究を行っている。これまで、①遊泳中、様々な強さの屈曲が10-20Hzで連続すること、②神経入力に応じて筋肉の興奮度が変化することを示し、さらにその筋肉のgradedな生理機能の主な素因がアセチルコリン受容体(nAChR)の特性にあると考え、③幼生尾部筋肉に発現するサブユニットを定めた。④nAChRの主要なサブユニットの発現が背側筋肉細胞に限局し、さらに、⑤そのタンパク質が神経筋結合部に局在することを示した。よって

機能的なnAChRからの入力には背側筋肉細胞に限られ、腹側の筋肉細胞の収縮は背側細胞からのギャップ結合を介した活動の伝播に依存することが予想された。このような活動の伝播に依存した筋肉帯の収縮機構は、ホヤ幼生の遊泳機能に本質的な意味を担っていると考えられる。また、カタユウレイボヤゲノムに予想されたイオンチャネル遺伝子の中で特に幼生の遊泳行動に関与していると期待されるものについて順次遺伝子の同定と、発現細胞の同定を行っている。特に、GABA(A)受容体、グリシン受容体の発現細胞は、運動神経節中のごく少数の細胞に発現が認められた。それらの発現細胞の遊泳運動に対する本質的な関与が期待され、検討を進めている。

脊髄内歩行リズム神経回路網の発生機構の解析

中山希世美 (日本学術振興会特別研究員)

岡村康司

歩行運動様リズムを形成する脊髄内神経回路網に関して、GABA およびグリシンを介した興奮性のシナプス入力とその発達期に一過性に見られる。このような胎生期の脊髄における GABA およびグリシンの興奮性は、細胞内 Cl⁻ イオンを細胞外に汲み出す K⁺-Cl⁻ cotransporter isoform 2 (KCC2) の発現が発生初期の細胞では少ないために起こることが知られている。本研究では、発達期の GABA およびグリシンによる興奮性を抑え、神経回路の形成におけるこれら興奮性応答の役割を明らかにすることを目的に、分子生物学的手法を用いて脊髄内ニューロンにおける KCC2 の発現レベルを変更し、発達期の神経ニューロンにおける影響を調べた。歩行運動の神経回路網が形成される時期のマウス胎児の脊髄中心管に、KCC2 遺伝子を組み込んだ GFP 発現プラスミドベクターを子宮外から微量ガラス管を用いて注入し、エレクトロポレーションによって、分裂過程にある脊髄ニューロンに KCC2 遺伝子を導入した。遺伝子導入の 2 日後に脊髄を摘出し、免疫染色を行ったところ、GFP を発現してい

る細胞で KCC2 の発現も同時に見られた。さらに、このように KCC2 を強制発現させたニューロンにおいて、グラミシジン穿孔パッチクランプレコーディングを行ったところ、KCC2 を強制発現させたニューロンでは、GFP のみを発現させたニューロンに比べて、GABA 投与時の反転電位が 30mV 過分極側にシフトしていた。しかしながら、これらの KCC2 を強制的に発現させたニューロンと GFP のみを発現させたニューロンについて、細胞体の大きさ、細胞体から出ている神経突起の数および長さを比較したところ、いずれの値にも有意な差は見られなかった。そこで、運動ニューロン特異的な転写因子である Hb9 の下流に KCC2 を配置するプラスミドベクターの作成を行った。このプラスミドベクターを用いることにより、様々な脊髄ニューロンの中から運動ニューロンという特定の種類の細胞にのみ KCC2 を発現させることができ、形態変化などのより詳細な検討ができると考えられる。

イオンチャネルのゲート機構に関する膜-水界面の水環境の影響

久木田文夫

膜タンパク質であるイオンチャネルの機能に膜-水界面の水環境が与える影響については不明な点が多い。この研究では、イカ巨大軸索が高濃度イオンや非電解質の作用を定量的に調べることが出来る点で、現時点での最

良の実験系である。差し当たって粘性と浸透圧を水溶液の性質を規定する物理的パラメータとして解析しているが、Na チャネルと K チャネルで影響の現れ方が質的に異なる。この点に着目し、その構造基盤を検討中である。

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 DNA 1 分子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研究、無染色細胞の *in vivo* 高分解能形態観察を行った。

物質輸送に関する研究が主眼である村上グループは、南京医科大学と共同研究で漢方薬の唾液分泌促進効果について、摘出ラット唾液腺を用い調査を開始した。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は灌流顎下腺を用い分泌唾液

のペプチド/蛋白質の質量分析を開始した。

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 顕微鏡による大脳質内神経細胞のイメージングを行った。

大橋グループ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

位相差電子顕微鏡の改良、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的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。また位相板の材料炭素膜の性能向上のためのプラズマ重合膜と蒸着膜とのハイブリッド膜製法を開発した。

DNA/RNA 塩基配列の電子顕微鏡 1 分子計測法の開発

喜多山 篤, 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)

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, iv) 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

コントラスト測定のため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。また金11個を含

むクラスター undecagold を用い、ラベル化塩基の電子顕微鏡識別を200kV電顕のSTEMモードを行い良好な結果を得た。

膜タンパク質の単粒子解析

重松秀樹, Radostin Danev, 永山國昭

清中茂樹, 原 雄二, 森 泰生 (京都大学大学院工学研究科)

位相差電子顕微鏡を用いた蛋白質の単粒子解析を実施し、モデル蛋白質 (GroEL) の立体構造の決定を行った。現在論文執筆中。構造解析ターゲットとして3種類 (TRPM2, TRPV4 など) の膜蛋白質の組み換え発言系の構築に成功した。それぞれ界面活性剤可溶化状態での標

品の取得に成功し、発現量などの点から1種類のイオンチャンネルについて絞り込んで単粒子解析に取り組んでいる。先のモデル蛋白質の結果をふまえて、早期の構造決定が期待される。

種々の漢方薬の灌流ラット顎下腺に対する水分分泌促進作用

村上政隆, 大河原浩

魏 睦新, Ding Wei (南京医科大学第一附属医院 中医内科)

唾液分泌低下に対して治療効果のある漢方薬が多く知られているが、これらの薬物が直接唾液腺に作用するかどうか？ また直接作用があるとするならば、唾液を誘発するのがあるいは唾液水分分泌速度を増強するのかを摘出ラット顎下腺の血管灌流標本を用い、水分分泌速度を測定し検討した。

雄性成体ラットから顎下腺を摘出、血管灌流標本を製作。分泌導管にカニューレを施し、これを電子天秤上のカップに導き、分泌された唾液重量を時間微分して分泌速度を求めた。漢方薬は、玄参、地黄、沙参、天花粉、葛根など10種類を用いた。薬物は灌流液中に推定治療血液濃度で添加、遠沈後上清を0.45ミクロンフィルターを通したものを使用した。唾液分泌刺激の対照としてカルバコール0.2μMを用いた。最初5分間対照刺激をおこなうと、分泌が誘発され初期30秒にピークをもつ初期相とその後緩やかに増加し持続期に入る持続相に分かれた。薬物を灌流系より5分間洗い流し、漢方薬単独を加えたがいずれの漢方薬も単独使用では唾液分泌を誘発しな

かった。漢方薬添加後5分でこれにカルバコールを重畳すると、10種類の漢方薬のうち5種類で唾液分泌の増強が観察された。いずれも初期相には影響がなく、分泌持続相の分泌速度を増強させた。唾液腺に直接作用をもたらした5種の薬物に対する反応は3つのパターンに分けることができた。1)持続期全般を緩やかに増強する。(プラトー値が高い) 2)持続期にはいり継続して分泌が増加し5-10分で最大値になった後急速に低下し、対照刺激のプラトー値より低レベルで分泌が持続する。3)持続期にはいり継続して分泌が増加し5-10分で最大値になった後緩やかに減少する。これらのパターンは漢方薬の3種類の薬効機序 (養陰剤, 補気剤, 活血剤) に対応した。増強効果のない5種の薬物がヒトで分泌増加を起こすのは神経活動の変化によるものと推定された。今後 西洋医学的手法と中国医学の経験を結びつけ 漢方薬の細胞内信号伝達に及ぼす影響などを調べることにより唾液分泌機序の新しい視点が生まれる可能性がある。

浸透圧センサー (AQP) による傍細胞輸送調節機構

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)

瀬川らの共焦点レーザー顕微鏡観察で collagenase 処理唾液腺腺房標本では、管腔（細胞間分泌細管）への蛍光色素の侵入が灌流耳下腺より多いことを測定していた。その後 collagenase 製剤に含まれる enterotoxin が claudin と反応し傍細胞輸送経路を開くことによると理解された。collagenase 処理標本で細胞内 Ca 濃度を上昇させ細胞内からの水分分泌を刺激すると、管腔の蛍光色素を希釈し水の動きを陰画として可視化定量できた。この値を血管灌流耳下腺の全水分分泌差し引き、傍細胞輸送による水分分泌を推定した (2003-2004)。刺激初期には閉鎖している傍細胞経路が 30 秒後開き、1 分には傍細胞経路を通過する水分量が直接管腔に分泌される水分量を凌駕した。すなわち細胞間隙通路の調節が行なわれていた。灌流顎下腺 (SMG) carbachol 刺激時の水分分泌速度を電子天秤にて測定、sucrose 添加により灌流液浸透圧を上昇させ水分分泌減少

程度を測定。浸透圧差のみにより水分分泌が駆動されるモデルの予測値より分泌速度減少度は大きかった。一方、AQP5 を非常に低発現させた SMG では浸透圧差により駆動されるとした場合の予測値と一致した。この SMG は基底側膜 AQP5 を欠き、浸透圧センシングができないことで傍細胞輸送の調節が失われたと考えられた。Hg を導管から逆行性に注入し管腔膜のみの AQP5 を破壊すると Hg 濃度に依存して水分分泌は阻害されたものの、高浸透圧による水分分泌現象は浸透圧差で予測される変化は正常ラットと同様であった。以上 AQP5 と傍細胞輸送を含むフィードバック制御回路の存在が支持された。

次の問題は、傍細胞経路をバルクで溶液を輸送するための駆動力である。浸透圧、静水圧以外の駆動力をモデルとして検討しなければならない。細胞間接着装置の動的変化を微小形態学的に検討することとした。

傍細胞輸送調節の形態学的基盤

村上政隆, 前橋 寛

橋本貞充 (東京歯科大学, 病理学)

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

灌流顎下腺のタイト結合と腺腔側膜直下の細胞骨格の超微構造変化を計測し検討した。血管灌流ラット顎下腺を液体ヘリウムにて急速凍結固定し、フリーズフラクチャー法を施した後、ディープエッチングを行ない、炭素白金の蒸着によりレプリカを得た。レプリカを透過型電子顕微鏡で観察し、得られた写真の計測により、接着部および管腔膜直下の細胞骨格の変化を検討した。その結果、1) タイト結合を構成する膜内粒子は短小な微細線維

を介し深部のアクチン線維束と直接結合していた。2) CCh/IPR 混合刺激では、タイト結合の粒子配列は変化し基底側方向に伸長した。3) CCh/IPR 混合刺激では、タイト結合部および腺腔側膜直下のアクチン線維束はより密となった。これらの観察より、傍細胞輸送経路の透過性が亢進する際、腺腔側細胞膜直下のアクチン細胞骨格の動的な構造変化に伴いタイト結合の膜貫通蛋白の局在が変化する可能性が示された。

顕微質量分析装置の開発

瀬藤光利, 新聞秀一

本開発は(株)島津製作所, 癌研究会, 大阪大学, 理化学研究所の参画機関とともに, 5年計画で2004年より始まった。顕微質量分析装置の原理は, 顕微鏡下の生物試料にレーザーを照射し, イオン化された物質を全て吸引し, 高感度質量分析装置で測定を行う。測定試料上をレーザーで2次元走査し得られた質量スペクトル群から, 分子の生体内分布の可視化と同時に, 多段階質量分析を用いた物質同定も可能である。開発すべき要素技術は5つである。レーザー照準技術と2次元試料走査・環境制御技術, これにより2次元の解像度が決まる。高収率イ

オン搬送技術と高感度質量分析技術, これにより感度を向上させることが可能となる。そして, 得られた情報を処理し, 画像として再構成するIT技術である。我々は特に生体試料より高効率でイオン化を実現するための試料前処理技術の開発を行っており, 既に様々な前処理手法を開発し報告している。現在, 顕微質量分析装置の実験機が完成し稼動しており, 我々が開発した試料前処理技術を実際の臨床試料へ応用し解析を行っているところである。

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はない。我々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タジェネシスによる変異体マウス解析とイーストハイブリッド法スクリーニング解析を行うことにより補酵素であるPGs1を同定し, PGs1が α チュブリンのグルタミン酸付加にのみ必

要であることを明らかにした。

生きたマウス脳内の神経細胞観察を可能とする蛍光顕微鏡, Stick顕微鏡はオリンパス社との共同で開発を終了しており, 大脳皮質内で神経細胞をイメージングする方法を確立した。現在, この手法を用いてすでに作成してある新規酵素群のノックアウトマウスにおけるグルタミン酸付加を始めとする単アミノ酸側鎖付加と細胞内物質輸送についての解析を行っている。

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を解析し, これまでに, 脂肪滴表層ドメインがコレステロール代謝系とエンドサイトーシス経路での細胞シグナル分子選別機能を結びつける制御プ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。この仮説を基に, 細胞シグナル入力機構について検討し, コレステロール合成の異常によって, 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(Shh)の受容体Ptc1と変換

器Smoの膜系での動態・選別輸送が影響をうけることを示すデータを得た。また, コレステロール生合成の膜系と運動性エンドソーム膜系の直接相互作用を示唆するデータを得た。Shhシグナルの細胞受容に, 正常なコレステロール合成系が必要であることは以前より示唆されており, これらシグナル変換分子の細胞内生合成コレステロールに依存した細胞内膜系での正常な動態が, Shhシグナル変換に重要である可能性がある。

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。

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される。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、PKCε 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。この抗体の特異性を、吸収試験、TRPV1 のリン酸化されるセリン残基を置換した変異体等で確認した。この抗体を用いた解析によって、正常状態において TRPV1 がリン酸化されていることが明らかとなった。PKC を活性化させたときのリン酸化 TRPV1 量の増加は、異所性発現系、ラット感覚神経細胞とともに増加することが観察され、この抗体が痛み研究、炎症研究に非常に有用であることが明らかになった。

表皮 TRPV4 の結合蛋白質の解析

東智広, 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。両蛋白質の結合に重要なドメインを明らかにした。両蛋白質を HEK293 細胞に共発現させるこ

とによって、TRPV4 活性に変化がみられ、この結合が TRPV4 機能に影響を及ぼしていることが推測された。

TRPV4 の体温制御機構への関与の解析

稲田仁, 柴崎貢志, 鈴木誠 (自治医科大学), 富永知子, 富永真琴

温度感受性 TRP チャンネルの 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。特異的抗体を用いて、視床下部神経での TRPV4 の発現を確認した。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。視床下部での TRPV4 活性の制御機構の解明を目的として 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。両蛋白質の結合に必要なドメインを明らかにした。この結合によって TRPV4 機能が制御され、体温調節能が変化していることを想定して実験を進めている。

表皮ケラチノサイトから感覚神経への温度情報伝達のメカニズムの解析

Sravan Mandadi, 鈴木誠 (自治医科大学), 富永真琴

温度感受性 TRP チャンネルの TRPV4, TRPV3 は表皮ケラチノサイトに強く発現しており、感覚神経にはほとんど発現していない。この事実は、温かい温度が表皮ケラチノサイトで受容され、その情報が感覚神経へ伝達される可能性を示唆する。ケラチノサイトは刺激に反応して種々の化学物質を放出することが知られている。そこで、温度刺激によってケラチノサイトから物質が放出され、表皮層に伸びた感覚神経終末に発現するその物質の受容体によって温度情報が伝達される、という仮説を立て、

その検証と関与する物質の同定を試みた。ケラチノサイトと感覚神経の共培養系において、温度刺激に対する応答に時間差があり、先ずケラチノサイトで反応がみられることを観察した。次に、知られたイオンチャンネル型神経伝達物質受容体を HEK293 細胞に発現させ、ケラチノサイトと共培養して、パッチクランプ法を適用してイオンチャンネル型神経伝達物質受容体をバイオ分子センサーとして用いて、伝達物質の同定を進めている。

新規温度感受性 TRP チャンネルの探索

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 8 つの温度感受性 TRP チャン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 チャンネルの探索を目的として、既知の TRP チャン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, Ca^{2+} -imaging 法を用いて進めた結果、TRPM2 が約 35 度で熱によって直接活性化されることが明らかとなった。また、既知の TRPM2 の活性化物質 $\beta\text{-NAD}^+$, ADP-ribose による電流を大きく増大させることが判明した。さらに、

体温下では cyclic ADP-ribose が TRPM2 のリガンドとして働くことも見いだした。TRPM2 は膵臓ではランゲル

ハンス島に特異的に発現しており、インスリン分泌に強く関わっていることが明らかとなった。

海馬における TRPV4 の発現と機能解析

柴崎貢志, 鈴木誠 (自治医科大学), 富永真琴

温度感受性 TRP チャンネルは、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 チャンネルの発現を検討したところ、海馬で TRPV4 が強く発現していることを見いだした。海馬錐体細胞に TRPV4 は発現しており、温度刺激のみならず TRPV4 の有効刺激である低浸透圧刺激や 4 α -PDD によって活性化することが分かった。野生型マウスと TRPV4 欠損マウスで海馬神経

細胞の形態やシナプス機能を解析したが、有意な差は認められなかった。しかし、静止膜電位を解析したところ、25 度では約 -61 mV で差は認められなかったが、37 度では、野生型マウスの海馬神経細胞は約 5 mV 有意に脱分極しており、電流注入による活動電位の発生も野生型マウスの海馬神経細胞で有意に多かった。これらの事実は、海馬神経細胞において TRPV4 が体温下で恒常的に活性化して静止膜電位の形成を介して神経興奮性に重要な役割を担っていることを示している。

発達期脊髄領域における温度感受性 TRP チャンネルの発現と機能

村山奈美恵, 柴崎貢志, 富永真琴

温度感受性 TRP チャンネルは、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。しかしながら、後根神経節 (DRG) 神経細胞の発達過程において温度受容を全く必要としない胎生期においても発現が認められる。このことは、温度感受性 TRP チャンネルが成体における温度受容とは全く異なる、発達期特異的な役割を有していることを強く示唆している。この仮説を検証するために、発達期マウスの脊髄領域における TRPV1, TRPV2, TRPM8, TRPA1 の発現様式を解析し、これらのチャンネルの発現時期、パターンを同定し

た。これらの TRP チャンネルは発達期において、形成直後の DRG 神経細胞や一部の脊髄神経細胞においてのみ発現が確認された。また、カルシウムイメージング法を用い、この発現パターンに一致した機能的チャンネルの存在を確認した。これらの結果より、TRP チャンネルが細胞増殖や細胞移動などのような発生過程に特異的な生理現象に密接に関わっている可能性が強く示唆された。現在、dominant-negative 変異体チャンネルを用いた実験を行い、成体とは異なる発達過程特異的なチャンネル機能の解明を目指している。

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されれば, Rho ファミリ

一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, 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】

2005年6月より、前任の尾崎 毅先生から動物実験センターの運営管理を引き継ぐことになった。この数年間、職員の異動や退職が相次ぎ、センター長および専任教官のご苦勞は大変なものであったと伝え聞いている。実験動物の日常管理だけで、精一杯の状況が続いていたようである。この一年間で、スタッフの補充およびマンパワーの適正化を図ることに努め、センターのサービス業務は質・量ともに向上したものと判断している。徐々にではあるが、技術職員、推進員および飼育委託外部職員にも“ゆとり”が現れ、**研究機関本来の研究および技術開発**へと力を入れ始めている。

当センターの運営資金は厳しく、施設の工事や機器の修理で四苦八苦している。予算委員長よりご高配を賜り、特別配分費などでかろうじて乗り切っているが、経済面でも“ゆとり”がほしいものである。

＜明大寺地区の本館地下 SPF 化＞

2005年度より3か年計画で、明大寺地区の本館地下SPF化に着手した。今次のSPF化案の特徴は、個別換気システムを導入することである。普通環境の実験動物と同じ建物の中でSPF動物を飼育維持するために個別換気システムを採用し、微生物汚染事故をできるだけ未然に防ぐことを心懸けた。もうひとつの特徴は、飼育室に実験室を隣接させ、細かい実験操作をSPF状態で行えることである。第一期工事：B-16, B-17の改修工事および飼育ラック、ケージ交換ステーション、クリーンベンチの導入、第二期工事：B-9, B-10の改修工事および焼却炉の撤去、第三期工事：B-14, B-15の改修工事および飼育ラックの導入を順次実施する予定である。このSPF化には、生理学研究所、基礎生物学研究所の資金が投入さ

れるが、動物実験センターの資金も一部含まれる。

＜研究・技術開発＞

実験動物の皮膚科学・形成外科学領域の研究および伴侶動物の病態研究

当センターでは、下記の研究を進めているところである。2006年の年明けとともに、学会発表と論文投稿を定期的に行い、施設としてのactivityを高める所存である。

1. 皮膚科学および形成外科学領域を中心とした病態モデルの作出：ヘアレス動物およびニホンザルの皮膚を用いて、表皮あるいは真皮に存在するメラノサイトの機能を調べている。さらに、創傷治癒の転帰を形態学的に検索してヒトへの外挿を目指している。
2. 伴侶動物の腫瘍細胞バンクの創設：動物細胞利用実用化として伴侶動物の腫瘍細胞を生体培養し、機能性腫瘍の特徴を調べている。確立できた腫瘍細胞株は凍結保存し、伴侶動物の腫瘍細胞バンクの創設を試みている。
3. 伴侶動物の肥満症の病態研究：イヌおよびネコの肥満症を臨床病理学的に調べ、治療法の確立を目指している。
4. モルモットを用いた妊娠中毒症の研究：モルモットの妊娠中毒症を臨床病理学および病理組織学的に検査し、この病態解明を実施している。
5. 実験動物飼育管理技術の開発：麻酔方法、エンリッチメントの評価、給水システムの改善、ストレスの評価と軽減などを検討している。

この他、共同研究を2課題スタートさせ、研究テーマの種蒔きを施している。

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て天然型核酸塩基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て、種々の配列の天然型の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の相違が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合成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反応性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、今回安全性とコストに注目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を示した。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代わるものとして期待される。

酸-アゾール複合体を活性化剤とするホスホロチオエート型人工核酸の立体選択的合成法の開発

片岡正典

ホスホロチオエート型人工核酸はアンチセンス分子として期待される人工核酸であるが、リン酸のリン原子上に不斉中心を有し、既存の合成法では鎖長に応じた多数のジアステレオマーの混合物として得られ、詳細な実験データを得ることはできない。報告者は光学的に純粋なモノマーを調製し、独自に開発した酸-アゾール複合体を活

性化剤とする鎖長伸張反応によって立体選択的にホスホロチオエート型人工核酸を合成する手法を開拓した。本手法によって、多数のジアステレオマーの中からただ一つのものを選択的に合成することが可能となり、ホスホロチオエート型人工核酸を用いるアンチセンス化学研究の進展に大きく寄与すると期待される。

技術課

大庭明生

1. 概要

今年度の人事は、平成17年7月に生体情報研究系技術係・福田直美技術係員の育児休業があり、それに伴い契約代替技術職員として飯田陶子を採用した(7月23日-10月31日)。10月には、動物実験技術係に小池崇子が技術係員として東京工業大学より転入した。

課の研究活動への貢献を一層進めるため下記の事業を実施した。

①技術課研修セミナーの開催

研究所の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ことを目的に第7回技術課セミナーを井本敬二教授、立山充博、初山俊彦、木村透、小野勝彦助教授、根本知己助手、核融合科学研究所山内健治技術部長を講師に行った。

②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。

③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6課題の採択を得た。

- (1) 永田治：脳高次機能研究でMEG計測を行うための技術サポートデータベースの構築
- (2) 村田安永：セキュアなファイル転送のためのプロトコル変換式暗号化ソフトウェアの開発
- (3) 高橋直樹：2光子励起顕微鏡によるin vivo観察のための固定具の開発
- (4) 高木正浩：ポストゲノム膜タンパク質機能解析法の教育用デジタルコンテンツの製作
- (5) 斉藤久美子：非放射性化合物を用いたin vivo脂肪

酸利用速度測定法の開発

- (6) 大河原浩：位相差電子顕微鏡用位相板の材質を変えて性能の向上を計る

④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2回の報告会を15演題で行った。この報告は『生理学技術研究会報告(第28号)』にまとめた。

⑤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。今回山本友美技術係員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、採択された。

⑥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『技術者倫理』と『問題解決の発想と表現』を選び、4名が受講した。

⑦生理学技術研究会の開催

全国の大学等の技術職員の技術連携と交流を目的に第28回生理学技術研究会を基礎生物学研究所・技術課と合同で開催した(平成18年2月16日-17日)。会では、口演発表が22題、ポスター発表が41題あり、研修講演として『生物学情報データベースの構築とその利用』(上野直人、基礎生物学研究所)を行った。これらの報告は『生理学技術研究会報告(第28号)』にまとめた。

⑧東海北陸地区等の技術職員研修

東海北陸地区の大学等の技術職員の技術交流と向上を目的に毎年当番校による技術研修が行われているが、今年度は物理・化学コース(三重大学)、電気・電子コース(静岡大学)、生物・生命コース(岐阜大学)を受講した。また厚生労働省輸入サルの飼育施設指定に関する説明会、文部科学省遺伝子組換え生物等に使用に関する規制による生物の多様性の確保に関する法律等に関する説明会、実験動物の遺伝検査技術講習、高エネルギー加速器研究機構技術職員シンポジウム、神経科学学会、日本顕微鏡学会、日本生理学会、日本生物物理学会に参加し、業務の研究支援力の強化を図った。

⑨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（1名）、(2) 酸素欠乏硫化水素危険作業主任者（2名）

また、大学等環境安全協議会技術分科会（徳島大学）、大学等環境安全協議会研修会（名古屋大学）、安全衛生

に関する情報交換会（核融合科学研究所）に参加し、安全衛生に関する知見を深めた。

⑩岡崎3機関技術課長会と機構技術会議の開催

各研究所の動向の意見交換を毎月1回開催している。今回は、特に、自然科学研究機構の技術職員の第1回技術研究会の立ち上げについて議論した。

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。ただし、センサデュワーの真空断熱層において真空度の劣化によると思われる液体ヘリウム蒸発量の増加（通常 4.5 ㍈/day が 6.5 ㍈/day 程度まで増加）が見られた。そのため安全性を考慮し12月期点検時にハードサイクルを実施して、真空層の再真空引きをおこない定常状態に復帰した。そのため通常は2日の定期点検であるが5日を要している。また、液体ヘリウム充填時のトラブルとして、トランスファチューブの共鳴振動による急激な蒸発量増加が2件発生した。具体的な発生原因は明らかになっていないため、現状では安全対策として充填圧力を下げることによって液体ヘリウム流量を減少さ

せ急激な内圧変動を起こさないようにしているが、障害発生後の対応はデュワー側のサイフォンチューブを取り外し、振動を減衰させる以外に方法がないと思われる。

解析システムにおいてはデータ記録用磁気光ディスクに動作不良が数件発生している。現状ではデータの喪失など重大な障害は発生していないが、信頼性の確保とメディア単価が高価であるため、今後は安価な DVD-RW に順次更新していく予定である。その他、MRI 画像解析装置を含めてシステム自体に重大な問題は発生していないが、現在ワークステーションで処理している MRI 画像の三次元再構成等の処理についてランニングコストを考慮し順次 PC 上に移植していく予定である。

平成17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
2005年04月	30	10	0	13	65%		
05月	31	12	2	16	94%	1	
06月	30	8	0	22	100%	1	
07月	31	11	2	17	94%	2	
08月	31	8	0	17	89%	1	トレーニングコース使用4日（2～5日）
09月	30	11	2	17	100%	2	
10月	31	11	0	19	95%	1	
11月	30	10	2	18	100%	2	
12月	31	12	5	14	100%	1	メンテナンス（ハードサイクル）5日
2006年01月	31	12	2	15	88%	1	
02月	28	8	0	15	83%		
03月	31	9	2	20	100%	4	
04月	30	10	0	18	90%		

* 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 10 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、メイン蛍光板駆動部の修理、サイドエントリーホルダーゴニオ部のクリーニング、真空排気用ホースの交換作業、トランスのオイル交換作業などが行われた。

2005 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
2005 年 4 月	30	10	8	12	5	1	6	50%	空調工事
5 月	31	12	4	15	6	1	7	47%	
6 月	30	8	4	18	7	2	9	50%	
7 月	31	11	4	16	4	4	8	50%	
8 月	31	8	3	20	3	13	16	80%	
9 月	30	10	4	16	9	0	9	56%	
10 月	31	11	5	15	4	3	7	47%	
11 月	30	10	11	9	2	1	3	33%	修理 6 日
12 月	31	12	3	16	8	5	13	81%	
2006 年 1 月	31	12	3	16	4	9	13	81%	
2 月	28	8	11	9	0	9	9	100%	修理 11 日
3 月	31	9	4	18	7	9	16	89%	修理 1 日
計	365	121	64	180	59	57	116	64%	

フィラメント点灯時間 430.5 時間
 使用フィルム枚数 6,946 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。今年度は、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。

8 月に RF アンブレ用電源ユニットと装置用冷却 FAN が故障した為、電源ユニットと冷却 FAN を交換し修理を行

った。

12 月と 1 月にリアルタイム装置操作室とマグネット室にある空調機がそれぞれ故障した為、その修理を行った。

平成 17 年度の MR 装置利用実績を別表に記す。

【機器利用率】

平成 17 年度リアルタイム装置月別稼働率

年月	総日数	保守	使用可能 日数	所内利用 日数	所外利用 日数	計	利用率	備考
2005 年 4 月	30	1	29	0	5	5	17%	
5 月	31	1	30	0	3	3	10%	
6 月	30	1	29	0	6	6	21%	
7 月	31	1	30	0	7	7	23%	
8 月	31	2	29	0	6	6	21%	アンプ電源、冷却 FAN 修理
9 月	30	1	29	0	5	5	17%	
10 月	31	3	28	0	5	5	18%	停電
11 月	30	1	29	0	4	4	14%	
12 月	31	1	30	0	6	6	20%	空調機修理
2006 年 1 月	31	1	30	0	6	6	20%	空調機修理
2 月	28	1	27	0	3	3	11%	
3 月	31	2	29	0	5	5	17%	定期点検
計	365	16	349	0	61	61	17%	

*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 97 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 413 名。WWW 登録者が 56 名。LAN の端末数が 1476 台。所外からのメール受信数は 21,000 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 180 通/週。

WWW は 4,400 台/週の端末から 52,000 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 23 回/週、3 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、昨年度同様に、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。

JEM-1010の利用者から CCD カメラ記録の要望が高いため、脳形態解析部門から提供があった CCD カメラシステム (Soft Imaging System 社, MegaView II) を設置した。なお、取り込みおよび解析用として、PC 互換機 (デル社, Dimension 9150) を新たに 1 台購入した。

保守契約のしていない電子顕微鏡および周辺機器等の修理が 9 件あり例年より修理が多かった。特に凍結ウルトラマイクロトームではセンサーの不良によりチャンパーが過熱し、メーカーによる点検修理となり、時間および費用がかかった。さらに、液体窒素補充用のポンプが経年

劣化のため、補充用ポンプのモータが不良となり、新しいものと交換した。

【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 41 件であった。機構内では 29 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、オーストリア、イギリス、ハンガリーの研究者による利用が 7 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	機能協同	・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	・ラット小脳皮質における AMPA 型グルタミン酸受容体の検索 ・神経疾患モデルマウスを対象とした小脳皮質シナプスの形態観察
	分子神経生理	・脊髄後角に発現するネトリン-1 による一次求心繊維の回路網形成の制御の解析 ・脱髄病変モデルマウスの脊髄における髄鞘形態の解析
	大脳神経回路論	・大脳皮質非錐体細胞の樹状突起への入力解析 ・特定の神経細胞で蛍光を発するように設計したトランスジェニックラットの免疫組織化学的解析
	脳形態解析	・AMPA 型受容体の発現解析の為、SDS-FRL および超薄切片の電顕観察 ・Rat P3 小脳プルキンエ細胞の連続超薄切片による立体再構築 ・SDS-FRL 法によるシナプス内グルタミン酸受容体局在の解析 ・SDS-FRL 法による海馬錐体細胞上 GABA _A 受容体サブユニットの局在解析 ・iv マウス海馬神経回路の非対称性消失の解剖学的解析
	統合バイオサイエンスセンター ナノ形態生理	・タンパク質及び金属クラスターの TEM 観察 ・超分子表面へ導入した電顕マーカーの観察 ・電子顕微鏡位相板の開発と薄膜観察 ・位相差電子顕微鏡用の凍結超薄切片作製 ・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	・小脳発達過程における消化管におけるエンターセリン受容体の局在に関する形態的研究
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・凍結切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
	基生研	高次細胞機構
生物進化		・植物細胞の細胞骨格の構築機構、植物細胞の極性の分子機構の解析 ・コケ植物の免疫組織染色 ・閉鎖花における収斂進化の分子機構の解明
統合バイオサイエンスセンター 植物発生遺伝学		・イネの葉の極性決定機構の解析 ・陽葉・陰葉の発生制御過程と葉肉細胞の軸性の解析
分子細胞生物		・酵母オートファージの形態学的研究
形態形成		・細胞極性制御因子改変マウスの表現型の観察
統合神経生物学		・遺伝子改変動物由来の生体組織の電子顕微鏡解析

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	生殖腺組織構造過程における体細胞性分化の3次元解析
大阪府立大学	加藤 幹男	DNA 繰り返し配列が形成する特殊高次構造および特殊 DNA 電子顕微鏡観察
東京歯科大学	橋本 貞光	唾液腺傍細胞輸送経路の検討
花市電子顕微鏡技術 研究所	花市 敬正	凍結薄切法による細胞内生体分子の直接観察の研究
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 受容体とその下流のイオンチャネルマウス海馬および小脳における局在
ドイツ Freiburg 大学	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
オーストリア インスブルック大学	Francesco Ferraguti	グルタミン酸レセプター (mGluR ₁ , mGluR ₇) の電子顕微鏡レベルの SDS-FRL の小脳観察と扁桃体観察
イギリス オックスフォード大学	Peter Somogyi	GABA 作動性シナプスの電子顕微鏡的解析およびレプリカ免疫標識を用いた GABA _A 受容体の定量的解析
イギリス オックスフォード大学	Jojanneke Huck	GABA _A 受容体の脳内局在
ハンガリー Department of Comparative Physiology University of Szeged, Faculty of Science	LÓRINCZ, Andrea	海馬における NMDA と AMPA 受容体の分布の解析

(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、2006年度は、2005年度同様、汎用工作機械の使用方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、簡易型一軸式マニプレータ、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12名、基生研7名で、初級コースは半日を1回、応用コースはガイダンスの後、マンツーマンで3~4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、2005年4月に工作室を開設し、利用者のための安全及び利用講習会を、毎年機器研究試作室が依頼を受けて実施している。

なお、機器研究試作室の平成17年度の利用状況は、次頁の通りである。

機器研究試作室利用機器表 (件数)

月	フライス盤	ボール盤	コンターマシン	横切盤	旋盤	切断機	グラインダー	NCフライス盤	その他	計
4	24	21	11	12	4	4	1	0	25	102
5	17	13	10	5	10	4	3	0	21	83
6	19	24	15	20	20	8	4	0	22	132
7	21	17	14	11	8	12	7	0	20	110
8	10	5	6	3	2	2	1	0	7	36
9	25	15	24	11	10	3	8	0	18	114
10	26	12	20	8	8	4	9	4	18	109
11	14	9	8	7	6	5	3	4	17	73
12	18	12	7	7	6	5	1	2	20	78
1	1	5	4	3	3	2	4	0	11	33
2	15	17	13	8	8	1	8	0	16	86
3	4	5	7	4	5	3	4	0	9	41
合計	194	155	139	99	90	53	53	10	204	997

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	48	3	0	51	91
5	36	1	0	37	100
6	55	5	0	60	111
7	37	5	0	42	90
8	19	3	0	22	47
9	48	0	0	48	80
10	39	5	0	44	103
11	31	6	0	37	60
12	32	1	0	33	52
1	16	3	0	19	35
2	24	11	0	35	88
3	34	3	0	38	44
合計	419	46	0	465	901

機器研究試作室部門別利用状況

感覚認知情報	86名	認知行動発達機構	65名	心理生理学	48名
生体膜	32名	ナノ形態生理	19名	動物実験センター	18名
形態情報解析室	17名	機能情報解析室	9名	生体システム	9名
感覚運動調節	7名	神経機能素子	7名	生体恒常機能発達機構	7名
神経分化	5名	大脳神経回路論	5名	神経シグナル	4名
電子顕微鏡室	4名	技術課	3名	機能協関	2名

植物発生遺伝学	11名	分子細胞生物学	4名	光情報	3名
統合神経生物学	2名	脳生物学	2名	高次細胞機構	1名
生物進化	1名	細胞器官培養室	1名	RI実験センター	1名
人工気象室	1名	大型スペクトログラフ室	1名	分析室	1名

分子研その他	0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, 窪田美津子, 小池崇子

【概要】

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化改修計画の立案と予算要求を行ってきたが, 実現の可能性が低いため, 3年計画で地下部分のSPF化を行うこととした。予算的には, 各年あたり生理学研究所から特別予算として1,000万円及びセンターの自助努力で300万円が計上された。本年度は, 2室のSPF化(1室は飼育室, 他の1室は実験室)と個別換気方式の飼育ラック, ケージ交換ステーション等を準備した。この個別換気ラック及び交換ステーションを使用することで, 飼育室のクリーン度をさほど上げずにSPF環境を維持できる。同様な改装を次年度も実施する予定である。

念願であった運営費交付金以外からの飼育費等の負担金の徴収規定が確定し, 次年度より開始されることとなった。これにより, 外部資金を用いた動物実験を行う際の飼育費等の支払いが容易になる。

感染症予防法の改正により輸入動物(ほ乳類(検疫対象動物を除く。))及び鳥類)等を輸入する者は, 当該動物の種類, 数量その他の事項を厚生労働大臣(検疫所)に届け出なければならず, またその際には, 動物毎に定められた感染症にかかっていない旨等を記載した輸出国政府機関発行の証明書の添付が必要となった。当初は, 若干の混乱もあったが, 研究者及び輸入代行業者の努力もあり大きな問題にならず輸入が出来ることとなった。

また, 外来生物法の制定及び感染症予防法の改正からアカゲザル, カニクイザル, タイワンザルを飼育するための許可が必要となった。このため, 環境省及び厚生労働省へ申請書を提出し許可を受けた。さらに, ニホンザルに関しては, 動物愛護法の改正により飼育許可が必要となるため, 近日中に申請を行う予定である。

【受精卵凍結・クリーンアップ事業】

山手SPF施設移行のためのマウス受精卵凍結, クリーンアップは一昨年度までに終了したため, 凍結件数は減少するものと考えられたが, 主に山手SPF施設内での飼

育動物の事故やトラブルに対するバックアップのためか, 昨年と同等の受精卵凍結依頼があった。また昨年に引き続き, 動物施設間のマウス授受のためのクリーンアップも行った。

実施件数としては, 受精卵凍結保存がのべ35件, クリーンアップが1件, クリーンアップ兼受精卵凍結保存がのべ7件であった。

また過去に当センターで受精卵凍結した系統の融解・移植の依頼があり, のべ3件行った。

【明大寺地区 陸生動物室】

平成17年度の飼育室利用部門数は, 27研究部門(生理研17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。飼育費等の負担金徴収のために, 飼育数を抑える傾向があるのだろうか。しかし, 新しい部門の実験開始により, 飼育数増加の計画も見られる

【山手地区 動物実験センター分室】

平成17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5部門)であった。

利用者講習会を毎月開催するとともに, 陸生動物利用者には実務講習会を実施している。各受講者はそれぞれ44名, 39名であった。

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17年度の水生動物室利用状況は, 生理研・基生研両研究所あわせて6部門・施設の利用があった。

加熱冷却ユニットの動作不良が3件あり, 順次修理を行った。

本年までは, 水生動物室の使用料は徴収していなかったが, 来年度より徴収が決まった。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数 (平成17年度)

部門	動物種	明大寺地区					山手地区		
		マウス	ラット	ウサギ	ネコ	イヌ	サル	マウス	ラット
神経機能素子		13	10	0	0	0	0	0	0
細胞内代謝		18	0	0	0	0	0	0	0
生体膜		0	0	0	0	0	0	224	203
機能協関		453	139	0	0	0	0	0	0
機能協関 (椋原)		0	30	0	0	0	0	0	0
分子神経生理		173	0	0	0	0	0	1,681	0
神経シグナル		0	0	0	0	0	0	2,013	40
高次神経機構		0	0	0	0	0	0	177	0
感覚認知情報		0	0	0	0	0	2	0	0
生体システム		24	4	0	0	0	1	1	0
認知行動発達機構		115	50	0	0	0	5	0	0
脳形態解析		233	0	0	0	0	0	1,593	129
大脳神経回路論		0	0	0	0	0	0	0	605
形態情報解析室		0	9	0	0	0	0	0	0
機能情報解析室		0	0	0	0	0	1	0	0
生殖内分泌系		756	42	0	0	0	0	5	0
生体恒常機能		128	135	0	0	0	0	0	0
動物実験センター		42	0	0	5	11	1	804	0
高次細胞機構		0	0	2	0	0	0	0	
性差生物学		0	0	0	0	0	0	18	0
統合神経生物学		11	4	0	0	0	0	371	1
行動生物学		0	40	0	0	0	0	0	0
脳生物学		81	94	4	0	0	1	0	0
細胞器官培養		2	0	0	0	0	0	0	0
バイオイメージング		5	0	0	0	0	0	0	0
分子発生		165	0	0	0	0	0	964	0
神経分化		0	0	0	0	0	0	373	0
ナノ形態生理		75	76	0	0	0	0	37	43
分子環境生物学		0	0	0	0	0	0	244	0
細胞生理		105	0	0	0	0	0	798	77
遺伝子改変動物作製室		0	0	0	0	0	0	219	827
合計		2,399	633	6	5	11	11	9,522	1,925

水生動物 月別・動物種別搬入数（平成 17 年度）

種 \ 月	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			500				500	500	500	500		1,000	3,500
ティラピア			51					8	4			30	93
ベラ	30										56		86
ウナギ			30			20							50
ヒトデ		50			32	160							242
ウニ		40						23	100				
ホヤ			100					800			50		950
ナマコ					2								2
海水(t)			12		8			8	8		8		44

【 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.....	92
神経シグナル研究部門.....	92
感覚運動調節研究部門.....	93
生体システム研究部門.....	95
脳形態解析研究部門.....	95
大脳神経回路論研究部門.....	96
心理生理学研究部門.....	96
認知行動発達機構研究部門.....	97
生体恒常機能発達機構研究部門.....	97
生殖・内分泌系発達機構研究部門.....	98
形態情報解析室.....	98
生体情報解析室.....	98
遺伝子改変動物作製室.....	99
時系列生命現象研究領域 神経分化.....	99
戦略的方法論研究領域 ナノ形態生理.....	100
生命環境研究領域 細胞生理.....	101
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. Nakajo K & Kubo Y (2005) Protein kinase C shifts the voltage-dependence of KCNQ/M channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 569:59-74.
 2. Mio K, Kubo Y, Ogura T, Yamamoto T & Sato C (2005) Visualization of the trimeric P2X₂ receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochem Biophys Res Commu*, 337:998-1005.
 3. Ju WK, Misaka T, Kushnareva Y, Nakagomi S, Agarwal N, Kubo Y, Lipton SA & Bossy-Wetzel E (2005) OPA1 expression in the normal rat retina and optic nerve. *J Comp Neurol*, 488:1-10.
 4. Itoh M, Nagatomo K, Kubo Y, Sugimoto M & Saitoh O (2005) Molecular cloning and characterization of a new RGS protein of Medaka. *Gene*, 345:165-171.
 5. Masuho I, Tateyama M & Saitoh O (2005) Characterization of bitter taste responses of intestinal STC-1 cells. *Chem Senses*, 30:281-290.
- 2) その他
1. Kubo Y & Tateyama M (2005) Towards a view of functioning dimeric metabotropic receptors. *Curr Opin*

Neurobiol, 15:289-295.

2. Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S & Vandenberg CA (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of Kir channels. *Pharmacol Rev*, 57:509-526.
3. 久保義弘 (2005) 神経科学を拓き、支えている先導的研究手法。“脳神経科学集中マスター”(真鍋俊也編), 羊土社, 東京, pp 20-22.
4. 久保義弘, 藤原祐一郎 (2005) 内向き整流性 K⁺チャンネルIRK1の構造機能連関とその遺伝子異常による疾患。“別冊医学のあゆみ「イオンチャンネル最前線 update」”(倉智嘉久編), 医歯薬出版, 東京, pp 88-93.
5. 立山充博, 久保義弘 (2005) リガンド結合による代謝型グルタミン酸受容体の構造変化。 *Clinical Neuroscience*, 23:1323.
6. 久保義弘, 立山充博 (2005) 代謝型グルタミン酸受容体の構造と機能調節機構。 *Clinical Neuroscience*, 24:149-152.

《分子神経生理研究部門》

1) 英文原著論文

1. Tsuchiya N, Yamanaka R, Yajima N, Homma J, Sano M, Komata T, Ikeda T, Fujimoto I, Takahashi H, Tanaka R & Ikenaka K (2005) Isolation and characterization of an N-linked oligosaccharide that is increased in glioblastoma tissue and cell lines. *Int J Oncol*, 27:1231-1239.
2. Ding L, Takebayashi H, Watanabe K, Ohtsuki T, Tanaka KF, Nabeshima Y, Chisaka O, Ikenaka K & Ono K (2005) Short-term lineage analysis of dorsally derived Olig3 cells in the developing spinal cord. *Dev Dyn*, 234:622-632.
3. Eiraku M, Tohgo A, Ono K, Kaneko M, Fujishima K, Hirano T & Kengaku M (2005) DNER acts as a

neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci*, 8:873-880.

4. Ogawa Y, Takebayashi H, Takahashi M, Osumi N, Iwasaki Y & Ikenaka K (2005) Glial cells show heterogeneity in the developing mouse spinal cord. *Dev Neurosci*, 27:364-377.
5. Tao H, Shimizu M, Kusumoto R, Ono K, Noji S & Ohuchi H (2005) A dual role of Fgf10 in proliferation and coordinated migration of epithelial leading edge during mouse eyelid development. *Development*, 132:3217-3230.
6. Nakakita S, Natsuka S, Okamoto J, Ikenaka K & Hase S (2005) Alteration of brain type N-glycans in neurological

- mutant mouse brain. *J Biochem (Tokyo)*, 138:277-283.
7. Ohuchi H, Yasue A, Ono K, Sasaoka S, Tomonar S, Takagi A, Itakura M, Moriyama K, Noji S & Nohno T (2005) Identification of cis-element regulating expression of the mouse *Fgf10* gene during inner ear development. *Dev Dyn*, 233:177-187.
 8. Shimizu T, Kagawa T, Wada T, Muroyama Y, Takada S & Ikenaka K (2005) Wnt signaling controls the timing of oligodendrocyte development in the spinal cord. *Dev Biol*, 282:397-410.
 9. Menon KN, Ikeda T, Fujimoto I, Narimatsu H, Nakakita S, Hase S & Ikenaka K (2005) Changes in N-linked sugar chain patterns induced by moderate-to-high expression of the galactosyltransferase I gene in a brain-derived cell Line, CG4. *J Neurosci Res*, 80:29-36.
 10. Kato T, Ohtani-Kaneko R, Ono K, Okada N & Shiga T (2005) Developmental regulation of activated ERK expression in the spinal cord and dorsal root ganglion of the chick embryo. *Neurosci Res*, 52:11-19.
 11. Shoji H, Ikenaka K, Nakakita S, Hayama K, Hirabayashi J, Arata I, Kasai K, Nishi N & Nakamura T (2005) *Xenopus* galectin-VIIa binds N-glycans of members of the cortical granule lectin family (xCG1 and xCG2). *Glycobiology*, 15:709-720.
 12. Masahira N, Ding L, Takebayashi H, Shimizu K, Ikenaka K & Ono K (2005) Improved preservation of X-gal reaction product for electron microscopy using hydroxypropyl methacrylate. *Neurosci Lett*, 374:17-20.
- 2) その他
1. Le Bras B, Chatzopoulou E, Heydon K, Martinez S, Ikenaka K, Prestoz L, Spassky N, Zalc B & Thomas J-L (2005) Oligodendrocyte development in the embryonic brain: the contribution of the plp lineage. *Int J Dev Biol*, 49:209-220.
 2. Masahira N, Shimizu K & Ikenaka K (2005) Gene therapy of gliomas. *New Perspectives in Cancer Research and Therapy*, 325-335.
 3. 東幹人, 等誠司, 池中一裕 (2005) 脱髄モデルマウスにおける幹細胞移植。 *Clinical Neuroscience*, 23:191-193.
 4. 小川泰弘, 池中一裕 (2005) グリアの特性と細胞系譜。 *Clinical Neuroscience*, 23:134-137.
 5. 小野勝彦, 丁雷, 政平訓貴 (2005) X-gal組織化学のエポキシ樹脂包埋による電子顕微鏡観察。 *細胞工学*, 24:612-615.
 6. 田中謙二 (2005) 精神疾患の病態をグリア細胞の機能異常で説明する試み。 *神経化学*, 44:5-13.

《細胞内代謝研究部門》

1) 英文原著論文

1. Hirata H, Ohki K, Miyata H (2005) Mobility of integrin $\alpha 5 \beta 1$ measured on the isolated ventral membranes of human skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1723: 100-105.
2. Mohri T, Yoshida S (2005) Estrogen and bisphenol A disrupt spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse oocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 326:166-173.
3. Ando, H., Kuno, M., Shimizu, H., Muramatsu, I. and Oiki, S. (2005) Coupled K^+ -water flux through the HERG potassium channel measured by an osmotic pulse method. *J. Gen. Physiol.* 126:529-538.
4. Qi Z, Chi S, Su X, Naruse K & Sokabe M (2005) Mechanosensitive BK Channel Activated by Membrane Stress Created by Amphipaths. *Mol Membr Biol*, 22:519-527.
5. Ozeki-Miyawaki C, Moriya Y, Tatsumi H, Iida H, Sokabe M (2005) Identification of functional domains of Mid1, a stretch-activated channel component, necessary for localization to the plasma membrane and Ca^{2+} permeation. *Exp Cell Res*, 311(1):84-95.
6. Anuma H, Naruse K, Ishiguro N, Sokabe M (2005) Involvement of reactive oxygen species in cyclic stretch induced NF- κ B activation in human fibroblast cells. *Br J Pharmacol* 145(3):364-73.
7. Sasamoto A, Nagino M, Kobayashi S, Naruse K, Nimura Y & Sokabe M (2005) Mechanotransduction at integrin

- is essential for interleukin-6 secretion from human umbilical vein endothelial cells in response to uni-axial continuous stretch. *Am J Physiol:Cell Physiol*, 288:C1012-1022.
8. Wang JG, Sokabe M & Naruse K (2005) Stretch-induced cell proliferation is mediated by FAK-MAPK pathway. *Life Sci*, 76:2817-2825.
 9. Chen L & Sokabe M (2005) Pregnenolone sulfate enhances presynaptic glutamate releases in rat hippocampal slices as studied by optical recordings. *J Neurophysiol*, 94:4131-4144.
 10. Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima N, Pawson T, Sakai R, Mori N. (2005) Hippocampal Synaptic Modulation for Learning and Memory by the Phosphotyrosine Adapter Protein ShcC/N-Shc via Interaction with the NMDA Receptor. *J Neurosci*. 25(7):1826-35.
 11. Furuya K, Sokabe M, Furuya S (2005) Characteristics of Subepithelial Fibroblasts as a Mechano-Sensor in the Intestine: Cell-Shape Dependent ATP Release and P2Y1 Signaling. *J Cell Sci*: 118(15): 3289-3304 (2005).
 12. 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(1):103-119.
- 2) その他
1. 久野みゆき, 安藤啓司, 杉原泉, 秋田恵一。(2005) 「カラー図解:人体の正常構造と機能:IX 神経系(2)」日本医事新報社。
 2. Tanaka K, Naruse K & Sokabe M (2005) Effects of mechanical stresses on the migrating behavior of endothelial cells. "Biomechanics at Micro- and Nano-scale Levels, Volume I" (Ed. Wada H), World Scientific Publishing, New Jersey, pp 75-87.
 3. Sokabe M (2005) Analysis of micro- and nano-mechanisms in the activation of cell mechanosensors. "Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels: Introduction of The Project" (Ed. Wada H), Sanko Printing, Tokyo, pp 29-34.
 4. 岸上明生, 曾我部正博 (2005) 機械刺激を感知するイオンチャネル: TRP チャネルを中心に。"別冊医学のあゆみ「イオンチャネル最前線 update」"(倉智嘉久 編), 医歯薬出版, 東京, pp 162-167.

《生体膜研究部門》

- 1) 英文原著論文
1. Oshima A, Kojima T, Dejima K, Hisa I, Kasai H & Nemoto T (2005) Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands. *Cell Calcium*, 37:349-357.
2. Hayakawa Y, Nemoto T, Iino M & Kasai H (2005) Rapid Ca^{2+} -dependent increase in oxygen consumption by mitochondria in single mammalian central neurons. *Cell Calcium*, 37:359-370.
3. Kasai K, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, Mizutani S, Zhao S, Kikuta T, Kasai H, Nagamatsu S, Gomi H & Izumi T (2005) Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J Clin Invest*, 115:388-396.
4. Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR & Kasai H (2005) Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca^{2+} signaling in dendrites. *Neuron*, 46:609-622.
5. Kasai H, Hatakeyama H, Kishimoto T, Liu T-T, Nemoto T & Takahashi N (2005) A new quantitative (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification (TEPIQ)) analysis for diameters of exocytic vesicles and its application to pancreatic islets. *J Physiol*, 568:891-903.
6. Kishimoto T, Liu T-T, Hatakeyama H, Nemoto T, Takahashi N & Kasai H (2005) Sequential compound exocytosis of large dense-core vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis. *J Physiol*, 568:905-915.
7. Liu T-T, Kishimoto T, Hatakeyama H, Nemoto T, Takahashi N & Kasai H (2005) Exocytosis and endocytosis

- of small vesicle in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis. *J Physiol*, 568:917-929.
8. Zhang Y, Marselli L, Nammo T, Yoneda K, Onishi M, Higashiyama S, Matsuzawa Y, Gonzalez FJ, Weir GC, Kasai H, Shimomura I, Miyagawa J, Wollheim CB & Yamagata K (2005) The HNF-1 target Collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab*, 2:373-384.
- 2) その他
1. 河西春郎 (2005) 大脳皮質シナプス可塑性の2光子励起解析。“ブレインサイエンスレビュー2005”, クバプロ, 東京, pp 105-130.
 2. 河西春郎 (2005) 学習・記憶過程を見る。脳を知る・創る・守る・育む (クバプロ), 7:45-72.
 3. 高橋倫子, 河西春郎 (2005) インスリン分泌の分子機構。“先端医療シリーズ 32 糖尿病”, 先端医療技術研究所, 東京, pp 72-76.
 4. 高橋倫子, 畠山裕康, 河西春郎 (2005) インスリン顆粒の可視化。“分子糖尿病学の進歩 2005”, 金原出版社, 東京, pp 15-19.
 5. 根本知己 (2005) 分泌腺細胞の開口放出の分子機構—多光子励起過程を用いた可視化解析によりみえてきたもの。蛋白質核酸酵素, 50:949-957.

《機能協関研究部門》

- 1) 英文原著論文
 1. Wang X, Takahashi N, Uramoto H & Okada Y (2005) Chloride channel inhibition prevents ROS-dependent apoptosis induced by ischemia-reperfusion in mouse cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*, 16:147-154.
 2. Zamaraeva MV, Sabirov RZ, Maeno E, Ando-Akatsuka Y, Bessonova SV & Okada Y (2005) Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: A bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ*, 12:1390-1397.
 3. Inoue H, Mori S, Morishima S & Okada Y (2005) Volume-sensitive chloride channels in mouse cortical neurons: characterization and role in volume regulation. *Eur J Neurosci*, 21:1648-1658.
 4. Takahashi N, Wang X-M, Tanabe S, Uramoto H, Jishage K, Uchida S, Sasaki S & Okada Y (2005) ClC-3-independent sensitivity of apoptosis to Cl⁻ channel blockers in mouse cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*, 15:263-270.
 5. Tanabe S, Wang X-M, Takahashi N, Uramoto H & Okada Y (2005) HCO₃⁻-independent rescue from apoptosis by stilbene derivatives in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett*, 579:517-522.
 6. Wang J, Xu H, Morishima S, Tanabe S, Jishage K, Uchida S, Sasaki S, Okada Y & Shimizu T (2005) Single-channel properties of volume-sensitive Cl⁻ channel in ClC-3-deficient cardiomyocytes. *Jpn J Physiol*, 55: 379-383.
 7. Ise T, Shimizu T, Lee EL, Inoue H, Kohno K & Okada Y (2005) Roles of volume-sensitive Cl⁻ channel in cisplatin-induced apoptosis in human epidermoid cancer cells. *J Membr Biol*, 205:139-145.
 8. Kida H, Miyoshi T, Manabe K, Takahashi N, Konno T, Ueda S, Chiba T, Shimizu T, Okada Y & Morishima S (2005) Roles of aquaporin-3 water channels in volume-regulatory water flow in a human epithelial cell line. *J Membr Biol*, 208:55-64.
- 2) その他
 1. Okada Y, Maeno E, Nabekura T & Mori S (2005) Essential role of anion channel in induction of apoptotic and necrotic cell death. “Ion Channels in the Pulmonary Vasculature” (Ed. Yuan J X-J), Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp 527-544.
 2. 清水貴浩, 岡田泰伸 (2005) アポトーシス誘導に関わる ROS センサーアニオンチャネル。生物物理, 45:297-301.
 3. 真鍋健一, 岡田泰伸 (2005) マクラデンサ細胞と TGF シグナル。腎と透析, 59:804-810.
 4. 岡田泰伸 (2005) 細胞死の誘導と救済に関わるアニオンチャネル。ファルマシア, 41:105-110.
 5. 岡田泰伸, 高橋信之, 浦本裕美 (2005) 嚢胞性線維症に関わる CFTR-チャネルおよびレギュレータとし

- てのABCタンパク質一。“ABC蛋白質”(植田和光編), 学会出版センター, 東京, pp 101-133.
- 香川靖雄, 岡田泰伸 (2005) 細胞の微細構造と機能。“標準生理学”第6版(本郷利憲, 広重力, 豊田順一監修), 医学書院, 東京, pp 8-28.
 - 岡田泰伸 (2005) 細胞とその環境。“標準生理学”第6版(本郷利憲, 広重力, 豊田順一監修), 医学書院, 東京, pp 29-48.
 - Sabirov RZ & Okada Y (2005) ATP release via anion channels. *Purinergic Signalling*, 1:311-328.

《感覚認知情報研究部門》

- 英文原著論文
 - Matsumoto M & Komatsu H (2005) Neural responses in the macaque V1 to bar stimuli with various lengths presented on the blind spot. *J Neurophysiol*, 93:2374-2387.
 - Yamagishi N, Goda N, Callan DE, Anderson SJ, Yoshida Y & Kawato M (2005) Attentional shifts towards an expected visual target alter the level of alpha-band oscillatory activity in the human calcarine cortex. *Brain Res Cogn Brain Res*, 25:799-809.
 - Saito A, Kawamura S, Mikami A, Ueno Y, Hiramatsu C, Koida K, Fujita K, Kuroshima H & Hasegawa T (2005) Demonstration of genotype-phenotype correlation in polymorphic color vision of a non-callitrichine New World monkey, capuchin *Cebus apella*. *Am J Primatol*, 67:471-485.
- その他
 - Ito M (2005) How the early visual system extract angles and junctions embedded within contour stimuli? "Proceedings of the 3rd International Symposium on Autonomous Minirobots for Research and Edutainment (AMiRE 2005)" (Eds. by Murase K, Sekiyama K, Kubota N, Naniwa T & Sitte J), Springer-Verlag, Berlin, pp 167-174.

《神経シグナル研究部門》

- 英文原著論文
 - Kodama T, Imai H, Doi T, Chisaka O, Shichida Y & Fujiyoshi Y (2005) Expression and localization of an exogenous G protein-coupled receptor fused with the rhodopsin C-terminal sequence in the retinal rod cells of knockin mice. *Exp Eye Res*, 80:859-869.
 - Itoh H, Shimizu M, Mabuchi H & Imoto K (2005) Clinical and electrophysiological characteristics of Brugada syndrome caused by a missense mutation in the S5-pore site of SCN5A. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 16:378-383.
 - Itoh H, Shimizu M, Tanaka S, Mabuchi H & Imoto K (2005) A novel missense mutation in the SCN5A gene associated with Brugada syndrome bidirectionally affecting blocking actions of antiarrhythmic drugs. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 16:486-493.
 - Ohkura M, Matsuzaki M, Kasai H, Imoto K & Nakai J (2005) Genetically encoded bright Ca^{2+} probe applicable for dynamic Ca^{2+} imaging of dendritic spines. *Anal Chem*, 77:5861-5869.
- その他
 - 伊藤英樹, 井本敬二 (2005) Na^{2+} チャネル異常による不整脈疾患 -いかに分子異常を病態と結びつけるか-. *生体の科学*, 56:230-234.
 - 井本敬二 (2005) イオンチャネルと神経情報伝達。“脳・神経科学集中マスター”(真鍋俊也編) 羊土社, 東京, pp 62-69.
 - 井本敬二, 佐々木幸恵 (2005) イオンチャネルと神経疾患. *日本神経精神薬理学雑誌*, 25:189-196.
 - 井本敬二, 伊藤英樹 (2005) SCN5A タンパク(SCNA5A). *生体の科学*, 56:444-445.
 - 宮田麻理子 (2005) 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”, クバプロ, 東京, pp 236-250.
 - 宮田麻理子 (2005) 炎症性疼痛と代謝型グルタミン酸受容体. *Clinical Neuroscience*, 24:180-184.

《感覚運動調節研究部門》

1) 英文原著論文

1. Nakata H, Inui K, Wasaka T, Akatsuka K, Kakigi R (2005) Somato-motor inhibitory processing in humans: a study with MEG and ERP. *Eur J Neurosci* 22(7): 1784-1792.
2. Akatsuka K, Wasaka T, Nakata H, Inui K, Hoshiyama M, Kakigi R (2005) Mismatch responses related to temporal discrimination of somatosensory stimulation. *Clin Neurophysiol* 116(8): 1930-1937.
3. Wasaka T, Nakata H, Akatsuka K, Kida T, Inui K, Kakigi R (2005) Differential modulation in human primary and secondary somatosensory cortices during the preparatory period of self-initiated finger movement. *Eur J Neurosci* 22(5): 1239-1247.
4. Noguchi Y, Kakigi R (2005) Neural mechanisms of visual backward masking revealed by high temporal resolution imaging of human brain. *Neuroimage* 27(1): 178-187.
5. Okamoto H, Kakigi R, Gunji A, Kubo T, Pantev C (2005) The dependence of auditory evoked N1m decrement on the bandwidth of preceding notch-filtered noise. *Eur J Neurosci* 21(7): 1957-1961.
6. Tamura Y, Hoshiyama M, Nakata H, Hiroe N, Inui K, Kaneoke Y, Inoue K, Kakigi R (2005) Functional relationship between human rolandic oscillations and motor cortical excitability: an MEG study. *Eur J Neurosci* 21(9): 2555-2562.
7. Wasaka T, Nakata H, Kida T, Kakigi R (2005) Changes in the centrifugal gating effect on somatosensory evoked potentials depending on the level of contractile force. *Exp Brain Res* 166(1): 118-125.
8. Kakigi R, Nakata H, Inui K, Hiroe N, Nagata O, Honda M, Tanaka S, Sadato N, Kawakami M (2005) Intracerebral pain processing in a Yoga Master who claims not to feel pain during meditation. *Eur J Pain* 9(5): 581-589.
9. Fujioka T, Trainor LJ, Ross B, Kakigi R, Pantev C (2005) Automatic encoding of polyphonic melodies in musicians and non-musicians. *J Cogn Neurosci* 17(10): 1578-1592.
10. Nguyen TB, Inui K, Hoshiyama M, Kakigi R (2005) Face representation in the human secondary somatosensory cortex. *Clin Neurophysiol* 116(6): 1247-1253.
11. Noguchi Y, Kaneoke Y, Kakigi R, Tanabe HC, Sadato N (2005) Role of the superior temporal region in human visual motion perception. *Cereb Cortex* 15(10): 1592-1601.
12. Ojima S, Nakata H, Kakigi R (2005) An ERP study of second language learning after childhood: effects of proficiency. *J Cogn Neurosci* 17(8): 1212-1228.
13. Nakata H, Inui K, Wasaka T, Tamura Y, Kida T, Kakigi R (2005) Effects of ISI and stimulus probability on event-related go/nogo potentials after somatosensory stimulation. *Exp Brain Res* 162(3): 293-299.
14. Wasaka T, Nakata H, Kida T, Kakigi R (2005) Gating of SEPs by contraction of the contralateral homologous muscle during the preparatory period of self-initiated plantar flexion. *Brain Res Cogn Brain Res* 23 (2-3): 354-360.
15. Yabe H, Matsuoka T, Sato Y, Hiruma T, Sutoh T, Koyama S, Gunji A, Kakigi R, Kaneko S (2005) Time may be compressed in sound representation as replicated in sensory memory. *Neuroreport* 16(2): 95-98.

2) その他

1. Hashimoto I, Kakigi R, Nagamine T, Nakasato N, Shiraishi H, Watanabe Y (2005) Guideline for clinical application of magnetoencephalography. *Jpn J Clin Neurophysiol* 33(4): 231-252.
2. Kakigi R, Inui K, Tamura Y (2005) Electrophysiological studies on human pain perception. *Clin Neurophysiol* 116(4): 743-763.
3. Watanabe S, Miki K, Kakigi R (2005) Mechanisms face of perception in humans: A magneto- and electro-encephalographic study. *Neuropathology* 25(1): 8-20.
4. Kaneoke Y, Watanabe S, Kakigi R (2005) Human visual processings as revealed by magnetoencephalography. *Int Rev Neurobiol* 68: 197-222.
5. Kakigi R, Tamura Y, Hoshiyama M (2005) Underlying mechanisms for two-point discrimination in humans.

- Proceedings of NIMD Forum 2005. (Eds. Yasutake A, Hachiya N), National Institute for Minamata Disease, Minamata, Japan, 10-15.
6. Hoshiyama M, Kakigi R (2005) Functional changes of cortical components of somatosensory evoked responses by stimulus repetition. Clin Neurophysiol Supplement 58 (in press).
 7. Okamoto H, B Ross, Kakigi R, Kubo T, Pantev C (2005) The time course of N1m decline caused by exposure to noise with strong spectral contrasts. "International congress series 1278. Unveiling the mystery of the brain: Neurophysiological investigation of the brain function"(Eds. Kakigi R, Tobimatsu S, Tsuji S, Uozumi T & Akamatsu N), Elsevier, Amsterdam, 23-26.
 8. Nguyen BT, Tran TD, Hoshiyama M, Inui K, Kakigi R (2005) Magnetoencephalographic study for face representation in the human primary somatosensory cortex. "International congress series 1278. Unveiling the mystery of the brain: Neurophysiological investigation of the brain function"(Eds. Tsuji S, Tobimatsu S, Kakigi R, Uozumi T & Akamatsu N), Elsevier, Amsterdam, 83-86.
 9. Miki K, Watanabe S, Kakigi R (2005) Interaction between auditory and visual stimulus relating to the vowel sounds in the auditory cortex in humans: a magnetoencephalographic study. "International congress series 1278. Unveiling the mystery of the brain: Neurophysiological investigation of the brain function"(Eds. Tsuji S, Tobimatsu S, Kakigi R, Uozumi T & Akamatsu N), Elsevier, Amsterdam, 177-180.
 10. Qiu Y, Inui K, Tran TD, Wang X, Kakigi R (2005) EEG and MEG responses following stimulation of unmyelinated C fibers. "International congress series 1278. Unveiling the mystery of the brain: Neurophysiological investigation of the brain function"(Eds. Tsuji S, Tobimatsu S, Kakigi R, Uozumi T & Akamatsu N), Elsevier, Amsterdam, 185-188.
 11. Noguchi Y, Inui K, Kakigi R (2005) Temporal dynamics of neural adaptation effect in the human visual ventral stream. "International congress series 1278. Unveiling the mystery of the brain: Neurophysiological investigation of the brain function"(Eds. Tsuji S, Tobimatsu S, Kakigi R, Uozumi T & Akamatsu N), Elsevier, Amsterdam, 203-206.
 12. Wang X, Inui K, Qiu Y, Kakigi R (2005) Effects of sleep on cortical responses to noxious stimuli. "International congress series 1278. Unveiling the mystery of the brain: Neurophysiological investigation of the brain function"(Eds. Tsuji S, Tobimatsu S, Kakigi R, Uozumi T & Akamatsu N), Elsevier, Amsterdam, 359-362.
 13. 寶珠山稔, 柿木隆介 (2005) 磁気刺激法による神経生理学的分析法, - 随意運動との関連 -, 「磁気刺激法の基礎と応用」(編集: 辻貞俊, 眞野行生), 医歯薬出版株式会社, 108-112.
 14. 柿木隆介, 乾幸二 (2005) MEG(脳磁図)による痛みの解析, 「麻酔科の新しい流れ」, (編集: 後藤丈夫, 並木昭義, 島田康弘), 先端医療技術研究所, 331-334.
 15. 柿木隆介 (2005) 乳児期初期における顔認知の発達と運動情報の効果に対する脳機能画像研究者の立場からみた本論文へのコメント ベビーサイエンス, 日本赤ちゃん学会編 5: 13-14.
 16. 柿木隆介, 渡邊昌子, 三木研作 (2005) 画像情報・波形情報の解析法, 脳磁図 (MEG) 臨床検査 増刊号 49 (12): 1557-1562.
 17. 橋本勲, 柿木隆介, 白石秀明, 中里信和, 長峯隆, 渡辺裕貴 (2005) 臨床脳磁図検査解析指針, 臨床神経生理学 33(2): 69-86.
 18. 三木研作, 渡邊昌子, 寶珠山稔, 柿木隆介 (2005) 誘発電位研究の進歩-脳波・脳磁図によるヒトの顔認識機能の解析, 神経内科 63(1): 13-22.
 19. 金桶吉起 (2005) 特集 誘発電位研究の進歩-運動を検出するヒトの視覚機能: 脳磁図による解析, 神経内科 63(1): 39-46.
 20. 柿木隆介 (2005) 特集 認知障害-解析への新たな挑戦-認知障害とは, 分子精神医学 5(3): 249-253.
 21. 柿木隆介 (2005) 体性感覚認知 1) 触覚を感じる (MEG による体性局在), Clinical Neuroscience, 23(10): 1094-1097.
 22. 柿木隆介 (2005) ヒトの高次痛覚情報系, -脳磁図を用いたヒトの痛覚認知のメカニズムの研究-, 医学のあゆみ 212(10): 961-965.
 23. 寶珠山稔, 柿木隆介 (2005) 微小磁場計測装置を用いた末梢神経活動磁場の計測, 臨床脳波, 47 (4): 215-220.

24. 岡本秀彦, 軍司敦子, 柿木隆介, 久保武, Ross B, Pantev C (2005) 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, 臨床脳波, 47(3): 173-178.

《生体システム研究部門》

- 1) 英文原著論文
1. Kita H, Tachibana Y, Nambu A & Chiken S (2005) Balance of monosynaptic excitatory and disynaptic inhibitory responses of the globus pallidus induced after stimulation of the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurosci*, 25:8611-8619.
 2. Kaneda K, Tachibana Y, Imanishi M, Kita H, Shigemoto R, Nambu A & Takada M (2005) Downregulation of metabotropic glutamate receptor 1a in globus pallidus and substantia nigra of parkinsonian monkeys. *Eur J Neurosci* 22:3241-3254.
 3. Miyachi S, Lu X, Inoue S, Iwasaki T, Koike S, Nambu A & Takada M (2005) Organization of multisynaptic inputs from prefrontal cortex to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of rabies virus. *J Neurosci*, 25:2547-2556.
 4. Hatanaka N, Tokuno H, Nambu A, Inoue T & Takada M (2005) Input-output organization of jaw movement-related areas in monkey frontal cortex. *J Comp Neurol*, 492:401-425.
- 2) その他
1. Nambu A (2005) A new approach to understand the pathophysiology of Parkinson's disease. *J Neurol*, 252 [Suppl 4]:1-4.
 2. Nambu A, Tachibana Y, Kaneda K, Tokuno H & Takada M (2005) Dynamic model of basal ganglia functions and Parkinson's disease. *The Basal Ganglia VIII*. Eds Bolam JP, Ingham CA, Magill PJ, Springer, pp307-312.
 3. Takada M, Kaneda K, Tachibana Y, Imanishi M, Kita H, Shigemoto R & Nambu A (2005) Downregulation of a metabotropic glutamate receptor in the parkinsonian basal ganglia. *The Basal Ganglia VIII*. Eds Bolam JP, Ingham CA, Magill PJ, Springer, pp255-263.
 4. Kita H, Tachibana Y & Nambu A (2005) Glutamatergic and GABAergic control of pallidal activity in monkeys. *The Basal Ganglia VIII*. Eds Bolam JP, Ingham CA, Magill PJ, Springer, pp545-554.
 5. 南部篤 (2005) 大脳皮質と大脳基底核。“標準生理学”第6版(本郷利憲, 広重力, 豊田順一 監修), 医学書院, 東京, pp 359-386.
 6. 南部篤 (2005) 定位脳手術のための生理学。“定位脳手術入門”, 医学書院, 東京, pp19-33.

《脳形態解析研究部門》

- 1) 英文原著論文
1. 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.
 2. Lujan R, Albasanz JL, Shigemoto R, Juiz JM (2005) Preferential localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel subunit HCN1 in basket cell terminals of the rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 21:2073-2082.
 3. Kanbara K, Okamoto K, Nomura S, Kaneko T, Shigemoto R, Azuma H, Katsuoka Y, Watanabe M (2005) Cellular Localization of GABA and GABA_B Receptor Subunit Proteins During Spermiogenesis in Rat Testis. *J Androl* 26:485-493.
 4. Nyiri G, Szabadits E, Cserep C, Mackie K, Shigemoto R, Freund TF (2005) GABA_B and CB¹ cannabinoid receptor expression identifies two types of septal cholinergic neurons. *Eur J Neurosci* 21:3034-3042.
 5. Hagiwara A, Fukazawa Y, Deguchi-Tawarada M,

- Ohtsuka T, Shigemoto R (2005) Differential distribution of release-related proteins in the hippocampal CA3 area as revealed by freeze-fracture replica labeling. *J Comp Neurol* 489:195-216.
6. Price CJ, Cauli B, Kovacs ER, Kulik A, Lambolez B, Shigemoto R, Capogna M (2005) Neurogliaform neurons form a novel inhibitory network in the hippocampal CA1 area. *J Neurosci* 25:6775-6786.
7. Wu Y, Kawakami R, Shinohara Y, Fukaya M, Sakimura K, Mishina M, Watanabe M, Ito I, Shigemoto R (2005) Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in schaffer collateral synapses in epsilon1/NR2A knock-out mice. *J Neurosci* 25:9213-9226.
8. Ferraguti F, Klausberger T, Cobden P, Baude A, Roberts JDB, Szucs P, Kinoshita A, Shigemoto R, Somogyi P, Dalezios Y (2005) Metabotropic glutamate receptor 8-expressing nerve terminals target subsets of GABAergic neurons in the hippocampus. *J Neurosci* 25:10520-10536.
9. Uchida K, Momiyama T, Okano H, Yuzaki M, Mine Y, Kawase T (2005) Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin. *Neurosci Res* 52:276-286.
10. Inoue K, Fukazawa Y, Ogura A, Inokuchi K (2005) Two-dimensional neural activity mapping of the entire population of hippocampal CA1 pyramidal cells responding to fear conditioning. *Neurosci Res* 51:417-425.
- 2) その他
1. Lujan R, Shigemoto R, Lopez BG (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130:567-80.
2. 重本隆一 (2005) 膜分子を見る: 凍結切断レプリカ免疫標識法。“組織細胞化学 2005”(日本組織細胞化学会 編) pp 67-72.

《大脳神経回路論研究部門》

- 1) 英文原著論文
1. Kawaguchi Y, Karube F, Kubota Y (2005) Dendritic branch typing and spine expression patterns in cortical nonpyramidal cells. *Cereb Cortex* (in press).

《心理生理学研究部門》

- 1) 英文原著論文
1. Hosaka K, Ishii K, Sakamoto S, Sadato N, Fukuda H, Kato T, Sugimura K & Senda M (2005) Validation of anatomical standardization of FDG PET images of normal brain: comparison of SPM and NEUROSTAT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 32:92-97.
2. Iidaka T, Ozaki N, Matsumoto A, Nogawa J, Kinoshita Y, Suzuki T, Iwata N, Yamamoto Y, Okada T & Sadato N (2005) A variant C178T in the regulatory region of the serotonin receptor gene HTR3A modulates neural activation in the human amygdala. *J Neurosci*, 25:6460-6466.
3. Kitada R, Hashimoto T, Kochiyama T, Kito T, Okada T, Matsumura M, Lederman SJ & Sadato N (2005) Tactile estimation of the roughness of gratings yields a graded response in the human brain: an fMRI study. *Neuroimage*, 25:90-100.
4. Kochiyama T, Morita T, Okada T, Yonekura Y, Matsumura M & Sadato N (2005) Removing the effects of task-related motion using independent-component analysis. *Neuroimage*, 25:802-814.
5. Matsumoto A, Iidaka T, Haneda K, Okada T & Sadato N (2005) Linking semantic priming effect in functional MRI and event-related potentials. *Neuroimage*, 24:624-634.
6. Nakamura K, Oga T, Okada T, Sadato N, Takayama Y, Wydell T, Yonekura Y & Fukuyama H (2005) Hemispheric asymmetry emerges at distinct parts of the

- occipitotemporal cortex for objects, logograms and phonograms: A functional MRI study. *Neuroimage*, 28:521-528.
7. Okada T, Yamada H, Ito H, Yonekura Y & Sadato N (2005) Magnetic field strength increase yields significantly greater contrast-to-noise ratio increase: Measured using BOLD contrast in the primary visual area. *Acad Radiol*, 12:142-147.
 8. Sadato N, Okada T, Honda M, Matsuki K, Yoshida M, Kashikura K, Takei W, Sato T, Kochiyama T & Yonekura Y (2005) Cross-modal integration and plastic changes revealed by lip movement, random-dot motion and sign languages in the hearing and deaf. *Cereb Cortex*, 15:1113-1122.
 9. Saito DN, Yoshimura K, Kochiyama T, Okada T, Honda M & Sadato N (2005) Cross-modal binding and activated attentional networks during audio-visual speech integration: a functional MRI study. *Cereb Cortex*, 15:1750-1760.
 10. Tanabe HC, Honda M & Sadato N (2005) Functionally segregated neural substrates for arbitrary audiovisual paired-association learning. *J Neurosci*, 25:6409-6418.
 11. Tanaka S, Honda M & Sadato N (2005) Modality-specific cognitive function of medial and lateral human Brodmann area 6. *J Neurosci*, 25:496-501.
 12. Yamashita O, Sadato N, Okada T & Ozaki T (2005) Evaluating frequency-wise directed connectivity of BOLD signals applying relative power contribution with the linear multivariate time-series models. *Neuroimage*, 25:478-490.
- 2) その他
1. Sadato N (2005) How the Blind "See" Braille: Lessons From Functional Magnetic Resonance Imaging. *Neuroscientist*, 11:577-582.

《認知行動発達機構研究部門》

- 1) 英文原著論文
1. Endo T, Yanagawa Y, Obata K & Isa T (2005) Nicotinic acetylcholine receptor subtypes involved in facilitation of GABAergic inhibition in mouse superficial superior colliculus. *J Neurophysiol*, 94:3893-3902.
 2. Watanabe M, Kobayashi Y, Inoue Y & Isa T (2005) Effects of local nicotinic activation of the superior colliculus on saccades in monkeys. *J Neurophysiol*, 93:519-534.
 3. Saito Y & Isa T (2005) Organization of interlaminar interactions in the rat superior colliculus. *J Neurophysiol*, 93:2898-2907.
 4. Sooksawat T, Saito Y & Isa T (2005) Electrophysiological and morphological properties of identified crossed tecto-reticular neurons in the rat superior colliculus. *Neurosci Res*, 52:174-184.
- 2) その他
1. Isa T & Sparks D (2005) 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, Cambridge, MA, USA (in press).

《生体恒常機能発達機構研究部門》

- 1) 英文原著論文
1. Koga H, Ishibashi H, Shimada H, Jang I-S, Nakamura T, Nabekura J (2005) Activation of presynaptic GABA_A receptors increases spontaneous glutamate release onto noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Brain Res*, 1046:24-31.
- 2) その他
1. 鍋倉淳一, 石橋仁, 帳一成, 賀数康弘 (2005) 発達後期に生じるシナプス伝達物質のスイッチング。医学のあゆみ, 212:897-903.

《生殖・内分泌系発達機構研究部門》

1) 英文原著論文

1. Tanaka T, Hidaka S, Masuzaki H, Yasue S, Minokoshi Y, Ebihara K, Chusho H, Ogawa Y, Toyoda T, Sato K, Miyanaga F, Fujimoto M, Tomita T, Kusakabe T, Kobayashi N, Tanioka H, Hayashi T, Hosoda K, Yoshimatsu H, Sakata T & Nakao K (2005) Skeletal muscle AMPK phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. *Diabetes*, 54:2365-2374.
2. Shima Y, Zubair M, Ishihara S, Shinohara Y, Oka S, Kimura S, Okamoto S, Minokoshi Y, Suita S & Morohashi K (2005) Ventromedial Hypothalamic Nucleus-Specific Enhancer of Ad4BP/SF-1 Gene. *Mol Endocrinol*, 21:2812-2823.

2) その他

1. 箕越靖彦 (2005) 生体エネルギー代謝に及ぼすレプチンの作用機構：AMP キナーゼの働きを中心に。細胞工学, 24:466-470.
2. 箕越靖彦 (2005) 視床下部 AMP キナーゼと摂食行動。日本肥満学会誌「肥満研究」, 11:137-144.
3. 箕越靖彦 (2005) 最近の論文から学ぶ糖尿病関連事項。小児科診療, 68:1909-1917.
4. 箕越靖彦, 岡本土毅 (2005) 食欲の分子メカニズム 視床下部 AMP キナーゼによる摂食行動調節作用。「わかる実験医学シリーズ 生活習慣病がわかる」, 春日雅人編。羊土社, 東京, pp 98-104.
5. 箕越靖彦 (2005) AMP キナーゼ 末梢と中枢での作用。生活習慣病の最前線, *Molecular Medicine 臨時増刊号 Vol.42*, 中山書店, pp 134-140.

《形態情報解析室》

1) 英文原著論文

1. 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.
2. Furuya K, Sokabe M & Furuya S (2005) Characteristics of subepithelial fibroblasts as a mechano-sensor in the intestine: cell-shape dependent ATP release and P2Y1

signaling. *J Cell Sci*, 118:3289-3304

2) その他

1. 一海孝光, 有井達夫, 嶋田勝彦 (2005) タンパクやそのマイクロクリスタルに生じる構造変化のエキサイマー蛍光による観察。愛知県立芸術大学紀要 No.34, 33-42.
2. Kosodo Y, Toida K, Kiyokage E, Arii T, Huttner WB (2005) Analysis of neuroepithelial stem cell divisions: Molecular cell biological and ultrastructural approaches to mammalian neurogenesis, 顕微鏡, 40. Suppl.1: 7-10.

《生体情報解析室》

1) 英文原著論文

1. Oshima A, Kojima T, Dejima K, Hisa Y, Kasai H & Nemoto T (2005) Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands. *Cell Calcium*. 37:349-57.
2. Hayakawa Y, Nemoto T, Iino M & Kasai H (2005). Rapid Ca^{2+} -dependent increase in oxygen consumption

by mitochondria in single mammalian central neurons. *Cell Calcium*. 37:359-70.

3. Kasai H, Hatakeyama H, Kishimoto T, Liu TT, Nemoto T & Takahashi N (2005) A new quantitative (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification (TEPIQ)) analysis for diameters of exocytic vesicles and its application to mouse pancreatic

- islets. *J Physiol.* 568:891-903.
4. Kishimoto T, Liu TT, Hatakeyama H, Nemoto T, Takahashi N & Kasai H (2005) Sequential compound exocytosis of large dense-core vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis. *J Physiol.* 568:905-15.
 5. Liu TT, Kishimoto T, Hatakeyama H, Nemoto T, Takahashi N & Kasai H (2005) Exocytosis and endocytosis of small vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis. *J Physiol.* 568:917-29.
- 2) その他
1. 根本知己 (2005) 分泌腺細胞の開口放出の分子機構—多光子励起過程を用いた可視化解析によりみえてきたもの。蛋白質核酸酵素 50:949-957.

《遺伝子改変動物作製室》

- 1) 英文原著論文
1. Hirabayashi M, Kato M, Ishikawa A, Kaneko R, Yagi T & Hochi S (2005) Factors affecting production of transgenic rats by ICSI-mediated DNA transfer: effects of sonication and freeze-thawing of spermatozoa, rat strains for sperm and oocyte donors, and different constructs of exogenous DNA. *Mol Reprod Dev* 70:422-428.
 2. Ito J, Hirabayashi M, Kato M, Takeuchi A, Ito M, Shimada M & Hochi S (2005) Contribution of high p34^{cdc2} kinase activity to premature chromosome condensation of injected somatic cell nuclei in rat oocytes. *Reproduction* 129:171-180.
 3. Hirabayashi M, Kato M, Ito J & Hochi S (2005) Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote* 13:79-85.
- 2) その他
1. Hirabayashi M & Hochi S (2005) Cloning in the rat. "Health Consequences of Cloning / Progress in Pharmacology and Toxicology" (Ed. Inui A), Taylor & Francis Books Boca Raton pp 165-175.

《時系列生命現象研究領域》

- 1) 英文原著論文
1. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S (2005) Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *Journal of Cell Biology* 169(3):527-38.
 2. Katsuyama Y, Okada T, Matsumoto J, Ohtsuka Y, Terashima T, Okamura Y (2005) Early specification of ascidian larval motor neurons. *Developmental Biology* 278(2):310-22.
 3. Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, Okamura Y (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435:1239-1243.
 4. Okamura Y, Nishino A, Murata Y, Nakajo K, Iwasaki H, Ohtsuka Y, Tanaka-Kunishima, M Takahashi, N Hara, Y Yoshida, T Nishida, M Okado, H Watari, H Meinertzhagen IA, Satoh N, Takahashi K, Satou Y, Okada Y, Mori Y (2005) Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes. *Physiological Genomics* 22(3):269-82.
 5. Brown ER, Nishino A, Meinertzhagen IA, Bone Q, Okamura Y (2005) GABAergic synaptic transmission modulates swimming in the ascidian larva. *European Journal of Neuroscience* 10:2541-8.
 6. Li J, Mack JA, Souren M, Yaksi M, Higashijima S, Mione M, Fetcho JR, Friedrich RW (2005) Early development of functional spatial maps in the zebrafish olfactory bulb. *J Neuroscience* 22: 5784-5795.

7. Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, Okano H, Okamoto H (2005) Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isII* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Dev Biol* 278: 587-606.
- 2) その他
 1. 白幡恵美, 早坂 清, 岡村康司 (2005) Nav1.6 チャネルの持続性Na電流の制御機構 生体の科学 56(3): 216-220.
 2. 岡村康司 (2005) 電位依存性 Na⁺チャネル 別冊・医学のあゆみ イオンチャネル最前線 update (倉智嘉久 編):37-42.
 3. 岡村康司 (2005) イオンチャネルの発現制御機構標準生理学 第6版 (本郷利憲, 広重 力, 豊田順一 監修) 医学書院 東京:87-91.
 4. 岡村康司 (2005) イオンチャネル遺伝子から見た生理機能の進化 海洋 41: 61-70.
 5. 岩崎広英, 村田喜理, 佐々木真理, 岡村康司 (2005) イオンの出入りを介さず膜電位シグナルを伝えるタンパク質 Ci-VSP 実験医学 23 : 2942-2944.
 6. 東島眞一, 木村有希子 (2005) ゼブラフィッシュにおける蛍光イメージング実験 羊土社バイオテクノロジージャーナル 5: 603-608.
 7. Chahine M, Ziane R, Vijayaragavan K & Okamura Y (2005) Regulation of Nav channels in sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci*, 10:496-502.
 8. 西野敦雄 (2005) 尾索動物オタマジャクシの運動生理学的理解に向けて 海洋, 41:71-78.
 9. 久木田文夫 (2005) イオンチャネル研究 50年. 生物物理, 45:10-15.
 10. 久木田文夫 (2005) Na チャネルの電位センサー機構. 生体の科学, 56:175-180.

《戦略的方法論研究領域》

- 1) 英文原著論文
 1. Kaneko Y, Danev R, Nitta K. & Nagayama K (2005) *In vivo* subcellular ultrastructures recognized with Hilbert-differential-contrast transmission electron microscopy. *J Electr Microsc*, 54:79-85.
 2. Hosokawa F, Danev R, Arai Y & Nagayama K (2005) Transfer Doublet and an Elaborated Phase Plate Holder for 120kV Electron-Phase Microscope. *J Electr Microsc*, 54:317-324.
 3. Tero R, Urisu T, Okawara H & Nagayama K (2005) Deposition of lipid bilayers on OH-density-controlled silicon dioxide surfaces. *J Vac Sci Technol A*, 23:751-754.
 4. Tosaka M, Danev R & Nagayama K (2005) Application of Phase Contrast Transmission Microscopic Methods to Polymer Materials. *Macromolecules*, 19:7884-7886.
 5. Matsuki M, Hashimoto S, Shimono M, Murakami M, Yoshigaki J, Furuyama S & Sugiyama H (2005) Involvement of Aquaporin-5water channel in osmoregulation in parotid secretory granules. *J Membr Biol* 230:119-126.
- 2) その他
 1. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—複素観測 II—ゼルニケ位相差法を用いた実証, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 1月号, 94-97.
 2. 永山國昭 (2005) ソルボンヌの4月—国際純粋・応用生物物理学連合第50回理事会, 生物物理 (日本生物物理学会), 45 : 49.
 3. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—複素観測 III—ヒルベルト微分法を用いた実証, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 2月号, 211-214.
 4. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—複素観測 IV—シュリーレン法の拡張としてのフーコー微分法, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 3月号, 328-332.
 5. 永山國昭 (2005) 位相差電子顕微鏡の主題と変奏, 日本結晶学会誌, 47: 38-43.
 6. 永山國昭, 複素光学への道—複素観測 V—2次元 Schrödinger 方程式を用いた Teague の方法, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 4月号, 450-453.
 7. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—複素観測 VI—Teague の方法の実践, O plus E (新技術コミュニケーションズ)

- ーションズ) 5月号, 562-564.
8. 福田善之, 河野芳弘, 大場雅宏, 谷川慶寿, 高木博, 松本峰男, 永山國昭, 瀬藤光利 (2005) Stick 型対物レンズを用いた神経細胞の *in vivo* イメージングの試み, *Bionics*, 2(6):74-75.
 9. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—複素観測 VII—Zernike 対 Teague, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 6月号, 679-682.
 10. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—複素観測 VIII—情報伝達信頼度 (ITR), O plus E (新技術コミュニケーションズ) 7月号, 810-814.
 11. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—複素観測 IX—最強観測法, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 8月号, 936-939.
 12. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—究極の位相差法 I—位相差顕微鏡の歴史, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 9月号, 1064-1067.
 13. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—究極の位相差法 II—無帯電位相板の発明, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 10月号, 1193-1196.
 14. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—究極の位相差法 III—無損失位相板への挑戦, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 11月号, 1317-1320.
 15. Kuniaki Nagayama (2005) Phase Contrast Enhancement with Phase Plates in Electron Microscopy, *Ad. Imaging Electr. Phys.*, 138: 69-146.
 16. 永山國昭 (2005) 複素光学への道—究極の位相差法 IV—アハラノフーボーム効果の利用, O plus E (新技術コミュニケーションズ) 12月号, 1448-1451.
 17. 永山國昭 (2005) 学会紀行—第 15 回国際純粋・応用生物物理学連合大会 (IUPAB Congress) 報告 45:328-330.
 18. 加我君孝, 瀬藤光利, 落合敦, 都築俊寛, 石川文之進 (2005) 前庭知覚と傾斜知覚. *認知神経科学* 3月号.
 19. 新聞秀一, 吉田佳一, 瀬藤光利 (2005) 質量分析計から顕微質量分析装置へ. *バイオニクス* 4月号, 72-73.
 20. 新聞秀一, 瀬藤光利 (2005) イメージングマススペクトロメトリーの動向. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 53(4) : 230-238.

《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. *Mol Pain*, 1:3-12.
 2. Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M & Noguchi K (2005) TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*, 115:2393-2401.
- 2) その他
 1. Tominaga M (2005) Structural determinants of TRPV1 channel functionality. "Turning up the Heat on Pain: Vanilloid Receptors in Pain and Inflammation" (Ed. Blumberg A), Birkhauser Verlag, Basel, pp. 25-37.
 2. Tominaga M (2005) Molecular mechanisms of trigeminal nociception and sensation of pungency. *Chem Senses*, 30:i191-i192.
 3. Tominaga M & Tominaga T (2005) Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch*, 451:143-150.
 4. 富永真琴 (2005) カプサイシン受容体。“別冊・医学のあゆみイオンチャネル最前線 update” (倉智嘉久編), 医歯薬出版, 東京, pp 150-156.
 5. 富永真琴 (2005) TRP チャネルと痛み。ペインクリニック, 26:201-208.
 6. 富永真琴 (2005) 痛みの受容メカニズム。ファルマシア, 41:209-213.
 7. 富永真琴 (2005) カプサイシン受容体。治療学, 39:815-819.
 8. 富永真琴 (2005) 温度受容のメカニズム。醫事新報, 4241:26-30.
 9. 富永真琴 (2005) 知覚神経・TRPV1 の構造と機能を探る。G.I. Research, 13:339-345.

10. 富永真琴 (2005) TRP チャンネルと痛み 日本薬理学雑誌くすりとからだ 127:128-132.
11. 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. Kimura T, Koike T, Matsunaga T, Saji T, Hiroe T, Kobayashi M and Kubota M (2005) Immobilizing effects of a medetomidine-midazolam combination in Japanese monkeys. *J Comp Clin Med*, 13: 64-70.
- 2) その他
1. 木村 透 (2005) 絹フィブロインフィルムの創傷治癒効果, *Surgeon*, 9: 74-79.

《計算科学研究センター》

- 1) 英文原著論文
1. Hayakawa Y, Iwase T, Nurminen E J, Tsukamoto M, Kataoka M (2005) Carboxylic acids as promoters for internucleotide-bond formation via condensation of a nucleoside phosphoramidite and a nucleoside: relationship between the acidity and the activity of the promoter. *Tetrahedron* 61:2203-2209.
2. Kataoka M, Hirano T, Kuroda K, Hayakawa Y (2005) Pyrimido[4,5-d]pyrimidine-2,4,5,7-(1H, 3H, 6H, 8H)-tetraone as a novel universal base. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 49:121-122.
3. Kataoka M, Hirano T, Kuroda K, Hayakawa Y (2005) Synthesis of a peptide nucleic acid oligomer with pyrimido[4,5-d]pyrimidine-2,4,5,7-(1H,3H,6H,8H)-tetraone as a nucleobase. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 49:123-124.
4. Hyodo M, Ando H, Nishitani H, Hittri A, Hayakawa H, Kataoka M, Hayakawa Y, Utility of Azonium Triflates as Promoters for the Condensation of a Nucleoside Phosphoramidite and a Nucleoside in the Agrawal's Stereoselective Synthesis of Nucleoside Phosphorothioates *Eu. J. Org. Chem.*, 2005, 5216-5223.

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.....	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.....	112
大脳神経回路論研究部門.....	113
心理生理学研究部門.....	113
認知行動発達機構研究部門.....	114
生体恒常機能発達機構研究部門.....	115
生殖・内分泌系発達機構研究部門.....	116
形態情報解析室.....	117
生体情報解析室.....	117
遺伝子改変動物作製室.....	118
時系列生命現象研究領域 神経分化.....	118
戦略的方法論研究領域 ナノ形態生理.....	119
生命環境研究領域 細胞生理.....	122
計算科学研究センター.....	123

学 会 発 表

《神経機能素子研究部門》

1. 立山充博, 久保義弘 (2005.5) 代謝型グルタミン酸受容体情報伝達経路のリガンドタイプ依存性。第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
2. 三坂巧, 久保義弘 (2005.5) ミトコンドリアに局在する高分子量 G 蛋白質 mOPA1 の細胞内プロセシングの解析。第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
3. 中條浩一, 久保義弘 (2005.5) M 電流抑制における PIP2 と PKC の異なる役割。第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
4. 藤原祐一郎, 久保義弘 (2005.5) フォスファチジルイノシトールリン酸による P2X₂ 受容体の活性制御。第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
5. 長友克広, 久保義弘 (2005.5) PKC による G 蛋白質内向き整流性 K⁺ チャネル抑制の機構。第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
6. 山本友美, 久保義弘, 三尾和弘, 佐藤主税 (2005.5) Baculovirus 発現系を用いて精製した ATP 受容体 P2X₂ 蛋白の解析。第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
7. Koichi Nakajo, Yoshihiro Kubo (2005.6) PKC plays a functionally different role from PIP2 in the muscarinic inhibition of KCNQ/M channels. FASEB Summer Research Conference "Ion Channel Regulation" (Snowmass Village, CO, USA).
8. 久保義弘, 新石健二, 山本友美, 三坂巧, 中尾和貴, 岡戸晴生, 饗場篤 (2005.7) 代謝型グルタミン酸受容体の持つ Gd³⁺ 感受性の生理的意義の解明を目的としたノックインマウスの作成。第 28 回日本神経科学大会 (横浜)

《分子神経生理研究部門》

1. 鳥居知宏, 石井章寛, 池田武史, 等誠司, 池中一裕 (2005.5) マウス大脳発達における N- 結合型糖蛋白質の糖鎖構造解析。第 69 回日本生化学会中部支部例会 (名古屋)
2. 中島弘文, 小野勝彦, 奥村俊一郎, 白鳥康史, 池中一裕 (2005.5) GPR35b の高分化型胃癌発生における遺伝子発現形式の検討。第 69 回日本生化学会中部支部例会 (名古屋)
3. Hitoshi S, Maruta N, Ikenaka K (2005.6) Dynamics of neural stem cells under stress conditions. 8th World Congress of Biological Psychiatry 2005 (Vienna, Austria).
4. Hitoshi S. (2005.7) Neural stem cells in stress conditions. 第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
5. 田中久貴, 池中一裕, 伊佐正, 丁雷 (2005.7) PLP トランスジェニックマウスでの脱髄は juxtaparanode 側から始まる。第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
6. 辰巳晃子, 竹林浩秀, 眞部孝幸, 池中一裕, 和中明生 (2005.7) 凍結脳損傷後における Olig2 発現細胞の動態。第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
7. Ishii A, Hitoshi S, Pfeiffer ES., Ikenaka K (2005.8) N-glycan profiling of myelin protein. ISN (International Society for Neurochemistry). ESN (European Society for Neurochemistry) 20th Biennial Meeting (Innsbruck, Austria).
8. Tanaka K.F., Takebayashi H, Ikenaka K. (2005.8) Rosenthal fiber formation is dependent on both quality and quantity of GFAP. ISN (International Society for Neurochemistry). ESN (European Society for Neurochemistry) 20th Biennial Meeting (Innsbruck, Austria).
9. Naruse M, Bansal R, Miyata T, Hitoshi S, Ikenaka K, (2005.8) Induction of ectopic oligodendrocyte precursors in fetal cerebral cortex by intraventricular injection of FGF-2. ISN (International Society for Neurochemistry). ESN (European Society for Neurochemistry) 20th Biennial Meeting (Innsbruck, Austria).
10. 田中謙二, 竹林浩秀, 池中一裕 (2005.9) Alexander disease model mice. 第 48 回日本神経化学会 (福岡)
11. Hitoshi S. (2005.9) Molecular mechanisms underlying of the maintenance of neural stem cells in the adult brain.

- 第 48 回日本神経化学会 (福岡)
12. 成瀬雅衣, 宮田卓樹, 等誠司, 池中一裕, Bansal Rashmi (2005.9) Induction of ectopic oligodendrocyte precursors in fetal cerebral cortex by intraventricular injection of FGF-2. 第 48 回日本神経化学会 (福岡)
 13. 渡辺啓介, 玉巻伸章, 古田貴寛, Susan L. Ackerman, 池中一裕, 小野勝彦 (2005.9) Dorsally derived netrin-1 controls axonal patterning of primary sensory axons in the developing spinal cord. 第 48 回日本神経化学会 (福岡)
 14. 馬堅妹, 田中謙二, 池中一裕 (2005.9) Cystatin F mRNA expression in spontaneous chronic late-onset demyelination animal model. 第 48 回日本神経化学会 (福岡)
 15. 東幹人, 池中一裕, 等誠司 (2005.9) Mood stabilizing drugs enhance adult neurogenesis by Notch signaling activation in neural stem cells. 第 48 回日本神経化学会 (福岡)
 16. Watanabe K, Tamamaki N, Furuta T, Ackerman L. S, Ikenaka K, Ono K (2005.11) Dorsally-derived netrin-1 is appropriate guidance of primary sensory axons in the developing spinal cord. The 35th Annual Meeting, Society for Neuroscience (Washington D.C., U.S.A.).
 17. Ding L, Takebayashi H, Watanabe K, Ohtsuki T, Tanaka KF, Nabeshima Y, Chisaka O, Ikenaka K, Ono K (2005.11) Dorsally-derived Olig 3 lineage cells migrate ventrally and differentiate into commissural interneurons in the developing mouse spinal cord. The 35th Annual Meeting, Society for Neuroscience (Washington D.C., U.S.A.).
 18. Higashi M, Maruta N, Ikenaka K, Hitoshi S (2005.11) Mood stabilizing drugs enhance adult neurogenesis activated by Notch signaling in the neural stem cell. The 35th Annual Meeting, Society for Neuroscience (Washington D.C., U.S.A.).
 19. Tanaka K.F., Takebayashi H, Ono K, Ikenaka K. (2005.11) The process of Rosenthal fiber formation is dependent on both quality and quantity of GFAP. The 35th Annual Meeting, Society for Neuroscience (Washington D.C., U.S.A.).

《細胞内代謝研究部門》

1. Sokabe M (2005.3) Key Note Lecture : Cytoskeleton can work as a mechanosensor. 10th Membr Res Forum (Kyoto, Japan).
2. Furuya K, Sokabe M. (2005.11) Mechano-sensing in intestinal villi: Cell-shape dependent ATP signaling in subepithelial fibroblasts network. Special Symposium on "Biomechanics at micro- and nanoscale levels: Cell response to mechanical stimulation" The 2nd Asia-Pacific Congress on Biomechanics (Taipei, Taiwan).
3. Sokabe M. (2005.10) Nanobiology of cell-shape control: an integrated model for stretch induced shape remodeling in endothelial cells. Special Lecture 2 at Bioinformatics Inst/NUS (Singapore).
4. Sokabe M. (2005.10) Nanobiophysics of cell mechanotransduction: manipulation and visualization of mechanotransducing system. Special Lecture 1 at Bioinformatics Inst/NUS (Singapore).
5. Sokabe M (2005.9) A variety of cellular mechanotransduction. Symposium on "Regulation of membrane transport" 29th Ann Conf Australian Physiol Soc/ Ann Conf Aus Soc Biophys (Canberra, Australia).
6. Sokabe M, Hayakawa K, Tatsumi H (2005.9) Stretch-induced shape remodeling in endothelial cells: molecular mechanisms in the detection of force direction. The 2nd Japan-Swiss Workshop on Biomechanics (Kyoto, Japan).
7. Sokabe M, Hayakawa K, Tatsumi H (2005.5) Molecular mechanisms of force-direction sensing in endothelial cells during stretch-induced shape remodeling. Symposium on "Cell Response to Mechanical Stimuli" The 12nd International Congress of Biorheology (Chongqing, China).
8. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M (2005.4) Loss of mechanical tension causes cofilin mediated stress fiber disassembly in cultured endothelial cells. 6th Asia-Pacific Conference on Medical and Biological

- Engineering (APCMBE2005) (Tsukuba, Japan).
9. Sokabe M (2005.3) Structure-function of mechano-gated BK channels from heart. Symposium on "Structure-Function of Mechano-Gated Ion Channels" 35th Int Cong Physiol Sci (IUPS 2005) (San Diego, USA).
 10. Sakai, H., Mori, H., Morihata, H., Kawawaki, J., Kimura, M., Shioi, A. and Kuno, M. (2005.2) Membrane potential serves as a principal regulator of H⁺ secretion via the plasmalemmal, vacuolar-type H⁺-ATPase in osteoclasts. 49th Annual Meeting of Biophysical Society (Long Beach, California, USA).
 11. 曾我部正博 (2005.12) 細胞の力覚機構とバイオメカニクス 名古屋工業大学・公開講座「医工学特論」(名古屋)
 12. 曾我部正博 (2005.12) 超分子複合体によるメカノトランスダクションー細胞骨格の役割ーシンポジウム「生体膜を介した情報伝達：受容体複合体の構造と機能」日本生体エネルギー研究会・第 31 回討論会「情報とエネルギー」(名古屋)
 13. 曾我部正博 (2005.12) 細胞重力センサーの探索 JAXA.JSF シンポジウム「重力感知/応答におけるシグナリング機構の解明」(福岡)
 14. 曾我部正博 (2005.11) 機械受容チャネルの構造機能連関：活性化のメカニズム 第 27 回日本薬学会・生体膜と薬物の相互作用シンポジウム，特別企画「膜タンパク質の構造と機能発現・制御メカニズムの最前線」(京都)
 15. 曾我部正博 (2005.11) Biophysics of Eukaryotic MS Channels 第 43 回日本生物物理学会特別シンポジウム "Japan-Australia Joint Symposium on Biophysics" (札幌)
 16. 曾我部正博 (2005.11) 鳥の歌学習の神経機構とシナプス可塑性 JST 異分野融合ワークショップ「模倣と社会機能」(浜松)
 17. 曾我部正博 (2005.10) 細胞メカノセンシングの多様性：SA チャネル，細胞骨格，インテグリン 第 13 回日本血管生物医学会，シンポジウム「血管生物学における医工学の発展」(筑波)
 18. 曾我部正博 (2005.8) 細胞力覚の世界：力を感じる仕組み 第 43 回茅コンファレンス，(山梨県北杜市)
 19. 曾我部正博 (2005.5) Gating mechanisms in mechanosensitive channels. IUPS Symposium on "Receptor and channel dynamics and their role in cell function" 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
 20. 久野みゆき(2005.3) 膜電位依存性プロトンチャネルのユニークなプロトンシグナリング機構。日本顕微鏡学会生体構造解析分科会 (2004 年度研究会)「チャネルの構造と機能」。産業技術総合研究所臨海副都心センター。
 21. 酒井啓，森啓之，森畑宏一，川脇順子，塩井淳，久野みゆき(2005.6) 破骨細胞 V-ATPase の膜ドメイン (Vo) を過剰発現させた COS 細胞におけるプロトン電流の解析。第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
 22. 森畑宏一，森啓之，酒井啓，川脇順子，澤田誠，葛田強司，久野みゆき (2005.6) Activation of voltage-gated proton channels upon acute and prolonged cell acidosis in rat microglia. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
 23. Mohri T (2005.11) Changes in [Ca²⁺]_i during fertilization in echinoderm and mammalian eggs. International Symposium on Frontiers in Molecular Endocrinology (Hyderabad, India).
 24. 平田宏聡，辰巳仁史，曾我部正博 (2005.11) F アクチンメッシュからストレス線維が形成される自己組織機構の解析。第 43 回日本生物物理学会年会 (札幌)

《生体膜研究部門》

1. 河西春郎 (2005.3) 樹状突起スパインの機能と可塑性。第 78 回日本薬理学会シンポジウム (横浜)
2. 大嶋章裕，根本知己，児島辰哉，出島健司，河西春郎，久 育男 (2005.3) 二光子顕微鏡によるモルモット鼻腺細胞粘液分泌の解析。第 23 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (岡山)
3. 高橋倫子 (2005.3) インスリン開口放出の調節機構。第 2 回 東京インスリン分泌研究会 (東京)
4. 河西春郎，根本知己，児島辰哉，大嶋章裕 (2005.4) 2 光子励起法による上皮細胞の輸送機能の研究。特

- 定領域研究「上皮ベクトル輸送」終了シンポジウム (東京)
5. Kasai H (2005.4) Dendritic spine structures critical for spine functions and plasticity. Cold Spring Harbor Symposium on Learning and Memory. Cold Spring Harbor (NY, USA).
 6. 大嶋章裕, 根本知己, 兒島辰哉, 出島健司, 河西春郎, 久 育男 (2005.5) モルモット鼻腺細胞における粘液分泌の二光子顕微鏡による解析。第106回日本耳鼻咽喉科学会 (大阪)
 7. 根本知己, 河西春郎 (2005.5) 多光子励起過程を用いた開口放出・分泌現象の可視化解析。日本分析化学会第66回分析化学討論会 (北見)
 8. 根本知己, 岸本拓哉, 緒方衡, 兒島辰哉, 大嶋章裕, 河西春郎 (2005.7) 多光子励起過程を用いた開口放出・溶液輸送機構の解析。生理学研究所研究会 (岡崎)
 9. 河西春郎 (2005.8) 2光子励起法を用いたシナプス可塑性の研究。自然科学研究機構連携研究プロジェクト第1回シンポジウム“Imaging Science” (岡崎)
 10. Kasai H (2005.9) Stability and plasticity of dendritic spines. Gordon Research Conference on Excitatory Amino Acids. Auosir (France).
 11. 河西春郎 (2005.11) 2光子励起顕微鏡による開口放出の可視化。第51回日本病理学会 終期特別総会 (東京)
 12. 河西春郎 (2005.11) 2光子励起法を用いた脳機能と分泌現象の研究。疾患生命工学センター開設シンポジウム (東京)
 13. Nemoto T, Kishimoto T. and Kasai H (2005.12) Sequential exocytosis and vectorial transport in secretory gland cell studied by two-photon microscopy. 第7回北大電子研国際シンポジウム (札幌)

《機能協関研究部門》

1. Okada Y, Takahashi N, Subramanyam MVV, Zamaraeva MV, Bessonova SV, Sabirov RZ (2005.4) Roles of ATP and protein kinase cascades in apoptotic cell death. International Symposium: Mechanisms of Cell Death: Molecular Insights and Therapeutic Perspectives (Renaca, Chile).
2. Okada Y, Shimizu T, Inoue H, Takahashi N, Uramoto H, Numata T (2005.4) Roles of volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in apoptotic and necrotic cell death. International Symposium: Mechanisms of Cell Death: Molecular Insights and Therapeutic Perspectives (Renaca, Chile).
3. Dutta AK, Sabirov RZ, Uramoto H, Okada Y (2005.4) Activation of ATP-releasing maxi-anion channel in hypotonic, ischemic or hypoxic conditions in rat cardiomyocytes. Experimental Biology 2005 (San Diego, USA).
4. Okada Y, Shimizu T, Takahashi N, Numata T, Wehner F (2005.4) Roles of anion and cation channels in apoptosis cell death. Cell Volume-Activated Cation Channels (Wuppertal, Germany).
5. Shimizu T, Numata T, Okada Y (2005.4) Molecular identity and functional role of stretch-activated cation channel in human epithelial HeLa cells. Cell Volume-Activated Cation Channels (Wuppertal, Germany).
6. Wang X, Takahashi N, Uramoto H, Okada Y (2005.5) Ischemia/reperfusion-induced apoptosis of cardiomyocyte is rescued by a Cl⁻ channel blocker or a ROS scavenger. 第82回日本生理学会大会 (仙台)
7. Takahashi N, Wang X, Tanabe S, Uramoto H, Jishage K, Uchida S, Sasaki S, Okada Y (2005.5) Cl⁻ channel distinct from ClC-3 is a target of stilbene derivative for suppression of cardiomyocyte apoptosis. 第82回日本生理学会大会 (仙台)
8. Dutta AK, Korchev YE, Shevchuk A, Okada Y, Sabirov R (2005.5) Distribution of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels in cardiomyocytes studied by a “smart-patch” technique. 第82回日本生理学会大会 (仙台)
9. Numata T, Shimizu T, Okada Y (2005.5) TRPM7 channels are activated by cell swelling and involved in the cell volume regulation. 第82回日本生理学会大会 (仙台)

10. Ando-Akatsuka Y, Shimizu T, Okada Y (2005.5) ABCF2 regulates volume-sensitive Cl⁻ channel through the interaction with ACTN4. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
11. Uramoto H, Mori S, Okada Y (2005.5) Protection of ischemic injury by activation of CFTR Cl⁻ channel in heart in vivo. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
12. Inoue H, Ohtaki H, Shioda S, Okada Y (2005.5) Chloride channel blockers attenuate delayed neuronal cell death induced by transient forebrain ischemia. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
13. Okada Y, Dutta AK, Uramoto H, Korchev YE, Shevchuk A, Sabirov RZ (2005.7) Anion channel-mediated ATP release in ischemia and hypoxia. The Joint International Meeting of the Physiological Society and the Federation of European Physiological Societies (Bristol, UK).
14. Dutta AK, Sabirov RZ, Uramoto H, Korchev YE, Shevchuk A, Okada Y (2005.7) ATP-releasing role and spatial distribution of maxi-anion channels in cardiomyocyte. The Joint International Meeting of the Physiological Society and the Federation of European Physiological Societies (Bristol, UK).
15. 岡田泰伸, 前野恵美, 若林繁夫, 高橋信之 (2005.7) 細胞容積の変化がアポトーシスを引き起こすか? 第 14 回日本アポトーシス研究会学術集会 (倉敷)
16. Okada Y, Inoue H (2005.7) Roles of volume-sensor anion channel in neurons. 第 28 回日本神経科学学会 (横浜)
17. Inoue H, Y. Okada (2005.7) Two opposite roles of volume-sensitive chloride channel activity in excitotoxicity. 第 28 回日本神経科学学会 (横浜)
18. Okada Y, Shimizu T, Numata T, Wehner F, Maeno E, Takahashi N, Subramanyam M (2005.9) Prerequisite Roles of Disordered Volume Regulation in Apoptotic Cell Death. International Symposium: Cell Volume Control in Health and Disease (Copenhagen, Denmark).
19. Shimizu T, Numata T, Okada Y (2005.9) The role of volume-sensitive anion channels in apoptotic cell death. Cell Volume Control in Health and Disease (Copenhagen, Denmark).
20. Numata T, Shimizu T, Okada Y (2005.9) TRPM7 is involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells. Cell Volume Control in Health and Disease (Copenhagen, Denmark).
21. 温井美帆, 清水貴浩, 岡田泰伸 (2005.9) 細胞外 Na⁺ 除去によるアポトーシスの誘導とそのメカニズム。第 52 回中部日本生理学会 (名古屋)
22. Lee EL, Shimizu T, Takahashi N, Okada Y (2005.9) Alteration of gene expression in cisplatin-resistant cancer KB cells and effects on volume-sensitive chloride current. 第 52 回中部日本生理学会 (名古屋)

《感覚認知情報研究部門》

1. 天野薫, 大谷芳夫, 郷田直一, 西田眞也, 江島義道, 武田常広 (2005.1) Leaky integrator モデルを用いた MEG と RT の解析。日本視覚学会 2005 年冬季大会 (東京)
2. Amano K, Nishida S, Ohtani Y, Goda N, Ejima Y, Takeda T (2005.5) Predicting manual reaction time to visual motion by temporal integrator model of MEG Response. Vision Sciences Society Fifth Annual Meeting (Sarasota, Florida).
3. Yasuda M, Komatsu H (2005.7) Color selectivity of neurons in area TEO of the monkey. 第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
4. Ogawa T, Komatsu H (2005.7) Difference in storage of recent activity between V4 and FEF neurons. 第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
5. Goda N, Komatsu H (2005.7) Color representation in LGN. 第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
6. 天野薫, 大谷芳夫, 郷田直一, 西田眞也, 江島義道, 武田常広 (2005.7) MEG 応答と反応時間の対応-Integrator モデルによる検討-Relationship between MEG response and RT investigated by integrator model. 第 20 回日本生体磁気学会 (大阪)
7. 鯉田孝和, 小松英彦 (2005.8) サル下側頭皮質の「色応答領域」における神経活動の課題依存性。第 9 回

- 視覚フォーラム (弘前)
8. 伊藤 南 (2005.8) 初期視覚系における輪郭の折れ曲がりの表出。第9回視覚科学フォーラム (弘前)
 9. Ito M. (2005.9) How the early visual system extract angles and junctions embedded within contour stimuli? The 3rd International Symposium on Autonomous Minirobots for Research and Edutainment (Fukui).
 10. 伊藤 南 (2005.9) 第二次視覚野での輪郭の折れ曲がりの表出における線成分表出の寄与。第52回中部日本生理学会 (名古屋)
 11. Yokoi I, Komatsu H (2005.11) High frequency burst in monkey V1 evoked by electrical stimulation of LGN. 35th Society for Neuroscience Meeting (Washington DC, U.S.A.).
 12. Yasuda M, Komatsu H (2005.11) Color selectivity of neurons in area TEO of the monkey. 35th Society for Neuroscience Meeting (Washington DC, U.S.A.).
 13. Koida K, Komatsu H (2005.11) Effect of task demand on the responses of color selective TE neurons of the monkey. 35th Society for Neuroscience Meeting (Washington DC, U.S.A.).
 14. Ito M, Komatsu H (2005.11) Comparison of areas V1 and V2 of the monkey in representation of angle stimuli. 35th Society for Neuroscience Meeting (Washington DC, U.S.A.).
 15. Amano K, Ohtani Y, Goda N, Nishida S, Ejima Y, Takeda T (2005.11) Predicting manual reaction time to visual stimuli by integrator model of MEG. Society for Neuroscience (Washington DC, U.S.A.).

《神経シグナル研究部門》

1. Yamagata Y, Hatanaka N, Imoto K, Totsuka M, Yagi T, Obata K, Yanagawa Y (2005.7) Functional analyses of inactivated CaMKII α knock-in mouse. Neuroscience 2005 (第28回日本神経科学大会) (横浜)
2. 佐竹伸一郎, 井本敬二 (2005.7) Cdk5 活性阻害が小脳平行線維-籠細胞間の興奮性シナプス伝達におよぼす影響。Neuroscience 2005 (第28回日本神経科学大会) (横浜)
3. 井上剛, 井本敬二 (2005.7) リレー回路としての視床, 同期回路としての視床。Neuroscience 2005 (第28回日本神経科学大会) (横浜)
4. Yamagata Y (2005.9) The role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in neuronal activity and seizure. 第48回日本神経化学学会大会 (福岡)
5. 佐竹伸一郎, 井本敬二 (2005.10) Cdk5 阻害がラット小脳顆粒細胞-籠細胞間興奮性シナプス伝達におよぼす影響。日本動物学会第76回大会 (つくば)
6. Takagishi Y, Miyata M, Kishimoto Y, Hashimoto K, Imoto K, Kano M, Murata Y (2005.11) A point mutation Myo5a^{d-n} transports smooth endoplasmic reticulum in the spine of Purkinje cells: a possible rescue of cerebellar long-term depression and motor learning in dilute-neurological mice. 35th Annual meeting of the Society for Neuroscience (Washington DC, USA).
7. Miyata M, Kishimoto Y, Hashimoto K, Imoto K, Murata Y, Kano M, Takagishi Y (2005.11) Dynamic behavior of smooth endoplasmic reticulum in Purkinje cell spines is correlated with cerebellar long-term depression and motor learning in myosin Va mutant mice Myo 5a. 35th Annual meeting of the Society for Neuroscience (Washington DC, USA).

《感覚運動調節研究部門》

1. Tanaka E, Noguchi Y, Kakigi R, Kaneoke Y (2005.11) Magnetoencephalographic study on the neural processing of various second-order motions. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington D. C., USA).
2. Tsuji T, Inui K, Kujirai K, Kakigi R (2005.11) Multiple pathways for noxious information in the human spinal

- cord. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington D. C., USA).
3. Wasaka T, Nakata H, Kida T, Kakigi R (2005.11) Differential centrifugal modulation in human primary and secondary somatosensory cortices during the preparatory period of self-initiated finger movement. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington D. C., USA).
 4. Noguchi Y, Kakigi R (2005.11) Mechanisms in the brain for converting neural responses to visual stimuli into their time representations. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington D. C., USA).
 5. Kida T, Wasaka T, Nakata H, Kaneoke Y, Kakigi R (2005.11) Centrifugal regulation of task-relevant somatosensory signals to trigger a voluntary movement. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington D. C., USA).
 6. Nakamura M, Miki K, Watanabe S, Honda Y, Kurita A, Inoue K, Kakigi R (2005.10) Magnetoencephalographic findings in the occipitotemporal region obtained by viewing kinetic facial expressions. The 16th Meeting of the International Society for Brain Electromagnetic Topography (Bern, Switzerland).
 7. Miki K, Watanabe S, Honda Y, Nakamura M, Kakigi R (2005.10) Removing face configuration affects the occipitotemporal activity by viewing eyes movement. The 16th Meeting of the International Society for Brain Electromagnetic Topography (Bern, Switzerland).
 8. Akatsuka K, Wasaka T, Nakata H, Kida T, Kakigi R (2005.10) Automatic spatial detection processing of somatosensory two-point stimulation. The 16th Meeting of the International Society for Brain Electromagnetic Topography (Bern, Switzerland).
 9. Honda Y, Watanabe S, Miki K, Nakamura M, Kakigi R (2005.10) Interhemispheric differences on inverted face perception : an ERP study. The 16th Congress of the International Society for Brain Electromagnetic Topography (Bern, Switzerland).
 10. Kakigi R, Noguchi Y (2005.10) Brain processing of the signals ascending through unmyelinated CO fibers in humans: an event-related fMRI study. The 16th Congress of the International Society for Brain Electromagnetic Topography (Bern, Switzerland).
 11. Kakigi R (2005.6) The role of SII: MEG source localization and empirical findings. In Symposium "Genesis of pain perception in the human brain". 11th Annual Meeting of Organization for Human Brain Mapping (Toronto, Canada).
 12. Noguchi Y, Kakigi R (2005.6) Direct evidence of visual response attenuation and interruption induced by backward masking. 11th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Toronto, Canada).
 13. Nakata H, Kakigi R (2005.6) Nogo-related activity in somatosensory go/nogo tasks: a study with MEG and ERP. 11th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Toronto, Canada).
 14. Miyanari A, Kaneoke Y, Ihara A, Watanabe S, Osaki Y, Takeshi K, Kato A, Yoshimine T, Sagara Y, Kakigi R (2005.6) Neuromagnetic changes evoked by intravenous olfactory stimulation in humans. 11th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (Toronto, Canada).
 15. Nakamura M, Kurita A, Suzuki M, Kakigi R, Inoue K (2005.2) Face perception is specifically impaired in dementia with Lewy body compared with Alzheimer's disease. Asian and Oceanian Symposium on Clinical Neurophysiology (Chiang Mai, Thailand).
 16. Akatsuka K, Wasaka T, Nakata H, Kakigi R (2005.2) Mismatch responses related to temporal discrimination of somatosensory stimulation. Asian and Oceanian Symposium on Clinical Neurophysiology (Chiang Mai, Thailand).
 17. Nguyen BT, Inui K, Hoshiyama M, Nakata H, Kakigi R (2005.2) Magnetoencephalographic study for face representation in the human secondary somatosensory cortex. Asian and Oceanian Symposium on Clinical Neurophysiology (Chiang Mai, Thailand).
 18. Nakata H, Wasaka T, Akatsuka K, Kakigi R (2005.2) Higher muscle force required a stronger inhibition process in go/nogo tasks. Asian and Oceanian Symposium on Clinical Neurophysiology (Chiang Mai, Thailand).
 19. Wasaka T, Nakata H, Akatsuka K, Kakigi R (2005.2)

- Changes of centrifugal gating on the somatosensory evoked potentials dependent on the level of muscle force. Asian and Oceanian Symposium on Clinical Neurophysiology (Chiang Mai, Thailand).
20. Kakigi R (2005.2) Human face perception: Clinical neurophysiological studies. Asian and Oceanian Symposium on Clinical Neurophysiology (Chiang Mai, Thailand).
 21. 和坂俊昭, 木田哲夫, 中田大貴, 赤塚康介, 柿木隆介 (2005.11) 収縮強度に依存する体性感覚誘発電位の遠心性抑制 第35回日本臨床神経生理学学会(福岡)
 22. 木田哲夫, 和坂俊昭, 中田大貴, 柿木隆介 (2005.11) 随意運動を駆動する課題関連体性感覚入力の遠心性制御 第35回日本臨床神経生理学学会(福岡)
 23. 三木研作, 渡邊昌子, 本多結城子, 中村舞子, 柿木隆介 (2005.11) 『目の動き』に関わる顔輪郭情報の影響 第35回日本臨床神経生理学学会(福岡)
 24. 中村舞子, 三木研作, 渡邊昌子, 本多結城子, 栗田正, 井上聖啓, 柿木隆介 (2005.11) 表情の変化する顔刺激を用いた脳磁場反応の検討, 第35回日本臨床神経生理学学会(福岡)
 25. 本多結城子, 渡邊昌子, 三木研作, 中村舞子, 柿木隆介 (2005.11) 倒立顔情報処理の左右半球間差: 事象関連電位を用いた検討, 第35回日本臨床神経生理学学会(福岡)
 26. 田中絵実, 金桶吉起, 野口泰基, 柿木隆介 (2005.11) 第二次仮現運動に対するヒト脳磁場反応, 第35回日本臨床神経生理学学会(福岡)
 27. 赤塚康介, 和坂俊昭, 中田大貴, 木田哲夫, 柿木隆介 (2005.11) 体性感覚二点刺激時の自動的空間識別過程, 第35回日本臨床神経生理学学会(福岡)
 28. 野口泰基, 柿木隆介 (2005.11) ヒト視覚腹側路における Backward Masking 効果の時間的動態, 第35回日本臨床神経生理学学会(福岡)
 29. 柿木隆介 (2005.7) 人間における痛覚認知機構(特別講演)第1回神経外科夏季カンファレンス(千歳)
 30. 柿木隆介, 乾幸二 (2005.7) A-delta 線維 C 線維を刺激した場合の痛覚関連脳活動の相違: fMRI を用いた研究, 第27回日本疼痛学会(宇都宮)
 31. 柿木隆介, 乾幸二 (2005.7) 非侵襲的手法を用いたヒトの痛覚認知機構の解明シンポジウム(痛覚認知の中枢メカニズム: 分子からシステムまで), 第28回日本神経科学大会(横浜)
 32. 田中絵実, 金桶吉起, 野口泰基, 柿木隆介 (2005.7) 種々の第二次仮現運動に対するヒト脳の反応, 第28回日本神経科学大会(横浜)
 33. 野口泰基, 柿木隆介 (2005.7) 時間表象の形成に関する脳内メカニズム: 脳磁図による検討 第28回日本神経科学大会(横浜)
 34. 辻健史, 乾幸二, 柿木隆介 (2005.7) ヒト脊髄内痛覚伝導速度の検討, 第28回日本神経科学大会(横浜)
 35. 柿木隆介 (2005.7) 神経科学と脳磁図(教育講演), 第20回日本生体磁気学会(豊中)
 36. 和坂俊昭, 中田大貴, 柿木隆介 (2005.7) 自発運動の準備過程における一次および二次体性感覚野活動の変動, 第20回日本生体磁気学会(豊中)
 37. 田中絵実, 金桶吉起, 野口泰基, 柿木隆介 (2005.7) 種々の第二次仮現運動に対するヒト脳磁場反応の検討, 第20回日本生体磁気学会(豊中)
 38. 中田大貴, 和坂俊昭, 柿木隆介 (2005.7) 体性感覚刺激 Go/nogo 課題における反応抑制過程, 第20回日本生体磁気学会大会(豊中)
 39. 乾幸二, 柿木隆介 (2005.7) 痛み関連誘発脳磁場(シンポジウム)第20回日本生体磁気学会大会(豊中)
 40. 金桶吉起 (2005.6) 第二次運動知覚の神経機構: 脳磁図と機能的共鳴画像による研究(シンポジウム), 第22回日本脳電磁図トポグラフィ研究会(JSBET2005)(青森)
 41. 宮成愛, 金桶吉起, 井原綾, 渡邊昌子, 大崎康宏, 久保武, 加藤天美, 吉峰俊樹, 相良泰行, 柿木隆介 (2005.3) 静脈注射による嗅覚関連脳磁図の周波数解析, 第7回日本ヒト脳機能マッピング学会大会(東京)
 42. 柿木隆介 (2005.3) 脳磁図を用いた視覚性 masking 効果の解析(シンポジウムII 脳機能マッピングにおける最近の話題), 第7回日本ヒト脳機能マッピング学会大会(東京)
 43. 柿木隆介 (2005.1) 二点識別感覚の中枢機構, メチル水銀とカドミウムの生体影響に関する合同ワークショップ(水俣)

《生体システム研究部門》

1. 橋 吉寿, 畑中伸彦, 高田昌彦, 南部 篤 (2005.4) 線条体における GABA 作動性の神経伝達について - 覚醒サルでの検討 -. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
2. 高田昌彦, 宮地重弘, 陸 暁峰, 今西美知子, 澤田香織, 南部 篤 (2005.4) 一次運動野への入力様式から見た前頭前野の体部位再現. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
3. 南部 篤 (2005.4) Twelve things I do not know about the basal ganglia. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
4. 南部 篤, 橋 吉寿, 畑中伸彦, 高田昌彦 (2005.7) 線条体における GABA 作動性の神経回路. 第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
5. 宮地重弘, 陸 暁峰, 今西美知子, 澤田香織, 南部 篤, 高田昌彦 (2005.7) 前頭前野から一次運動野への体部位再現的多シナプス性入力. 第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
6. 湯本直杉, 陸 暁峰, 宮地重弘, 山根 到, 伊東由美, 岡本 洋, 南部 篤, 深井朋樹, 高田昌彦 (2005.7) 前頭皮質における時間情報のコーディング. 第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
7. 南部 篤, 橋 吉寿, 知見聡美, 喜多 均 (2005.7) サル視床下核への GABA agonist, GABA antagonist 注入による不随意運動. 第 20 回日本大脳基底核研究会 (豊橋)
8. 田中 賢, 小倉光博, 西林宏起, 板倉 徹, 橋 吉寿, 南部 篤, 喜多 均 (2005.7) Microelectrode recording (MER) と大脳皮質刺激を用いた神経核 (Vim, Gpi) 同定法の検討. 第 20 回日本大脳基底核研究会 (豊橋)
9. 南部 篤 (2005.7) ジストニアと被殻, 尾状核, 視床下核. ジストニアの疫学, 診断, 治療に関する総合研究班 平成 17 年度夏季ワークショップ (東京)
10. 南部 篤 (2005.8) 大脳基底核の脳深部刺激療法. 京都脳機能研究会 (京都)
11. Miyachi S, Lu X, Imanishi M, Sawada K, Nambu A, Takada M (2005.11) Somatotopic arrangement of multisynaptic prefrontomotor projections in macaques. Soc for Neurosci 35th Annual Meeting (Washington, DC, USA).
12. Yumoto Y, Lu X, Miyachi S, Nambu A, Fukai T, Takada M (2005.11) Role of monkey prefrontal cortex in time reproduction. Soc for Neurosci 35th Annual Meeting (Washington, DC, USA).

《脳形態解析研究部門》

1. 初山俊彦 (2005.3) ラット前脳基底核アセチルコリン性ニューロンへの興奮性シナプス伝達に関与するカルシウムチャンネルサブタイプの生後発達変化. 第 78 回日本薬理学会年会 (横浜市, 日本)
2. Ryuichi Shigemoto (2005.4) Synaptic domains and activity-dependent dynamics of glutamate receptors as revealed by replica immunolabeling. Joint congress of The Histochemical Society and the Society for Histochemistry (Noordwijkerhout, The Netherlands).
3. 重本隆一 (2005.5) Ih チェネルサブユニット HCN1-4 のラット脳内分布と電子顕微鏡的局在. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台市, 日本)
4. 初山俊彦 (2005.5) 前脳基底核アセチルコリン性ニューロンへの興奮性シナプス伝達に関与する N 型カルシウム生後発達に伴う減少. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台市, 日本)
5. 重本隆一 (2005.6) 加圧凍結装置を用いた未固定脳のレプリカ免疫標識. 日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば市, 日本)
6. 初山俊彦 (2005.7) ドーパミンとシナプス伝達制御. 第 20 回大脳基底核研究会シンポジウム (豊橋市, 日本)
7. 初山俊彦 (2005.7) ドーパミンによる線条体シナプス伝達修飾と神経上皮型幹細胞移植による線条体シナプス再構築. 第 28 回日本神経科学大会 (横浜市, 日本)
8. 深澤有吾, 板倉 誠, 高橋正身, モルナー エレック, 重本隆一 (2005.7) SDS-FRL 法による海馬シナプス

- 内グルタミン酸受容体配置の解析。第 28 回日本神経科学大会（横浜市，日本）
9. Yue Wu, 重本隆一 (2005.7) マウス扁桃体回路における mGluR7 の電子顕微鏡的局在。第 28 回日本神経科学大会（横浜市，日本）
10. 春日井雄, 深澤有吾, ピーター ショモジー, 重本隆一 (2005.7) SDS-FRL 法による海馬錐体細胞上 GABA_A 受容体サブユニットの定量的局所解析。第 28 回日本神経科学大会（横浜市，日本）
11. 足澤悦子, 深澤有吾, エレック モルナー, 重本隆一 (2005.7) ラット網膜および皮質-外側膝状体シナプス上に存在する AMPA および NMDA 受容体の SDS-FRL 法による定量解析。第 28 回日本神経科学大会（横浜市，日本）
12. Ryuichi Shigemoto (2005.9) Dynamics of glutamate receptors and synapses in cerebellar motor learning. 5th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors (Sicily, Italy).

《大脳神経回路論研究部門》

1. 窪田芳之, 荻部冬紀, 川口泰雄 (2005.5) 大脳皮質ニューロンの面白さ：非錐体細胞の樹状突起の形態的特性。第 82 回日本生理学会大会（仙台）
2. 森島美絵子, 川口泰雄 (2005.7) 大脳皮質 5 層の錐体細胞サブタイプ間のシナプス結合様式。第 28 回日本神経科学大会（横浜）
3. 関川明生, 窪田芳之, 川口泰雄 (2005.7) 大脳皮質非錐体細胞の樹状突起への興奮性・抑制性入力比。第 28 回日本神経科学大会（横浜）
4. 窪田芳之, 荻部冬紀, 畑田小百合, 川口泰雄 (2005.7) 大脳皮質非錐体細胞樹状突起の局所形態。第 28 回日本神経科学大会（横浜）
5. 平井康治, 上松正和, 海老原利枝, 阿部訓也, 吉田祥子, 加藤めぐみ, 平林真澄, 柳川右千夫, 川口泰雄 (2005.7) VGAT-Venus トランスジェニックラットの大脳皮質非錐体細胞での Venus 発現パターン。第 28 回日本神経科学大会（横浜）
6. Kubota Y, Karube F, Sekigawa A, Kawaguchi Y (2005.11) Dendritic local dimensions and spine morphologies are dependent on cortical nonpyramidal cell subtypes. Society For Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington D.C., USA).
7. Morishima M, Kawaguchi Y (2005.11) Pyramidal cell projection types are selectively connected in layer V of rat frontal cortex. Society For Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington D.C., USA).

《心理生理学研究部門》

1. Sadato N, Okada T, Tanaka M, Kuratsune H, Watanabe Y (2005.2) Mechanisms underlying fatigue. A voxel-based morphometric study of chronic fatigue syndrome. International Conference on Fatigue Science 2005 (Karuizawa, Nagano).
2. 本田 学 (2005.2) 思考する運動脳。異分野研究者交流促進事業「生物の学習と機械の学習から一般的「知能」の概念に迫る」(石川)
3. 本田 学 (2005.2) 若者の脳～脳科学の視点から問題を探る～。東京都立第五商業高等学校総合的学習の時間講演会（国立）
4. 神作憲司 (2005.5) カウンティングのヒト脳における神経基盤-fMRI と TMS によるアプローチ。玉川大・お茶大 COE 合同セミナー（東京）
5. 内山仁志, 関あゆみ, 景山博子, 定藤規弘, 小枝達也, 大野耕策 (2005.5) 皮肉課題に関する fMRI 研究。第 47 回日本小児神経学会総会（熊本）
6. 本田 学 (2005.5) 運動前野の認知機能：脳機能イメージングによる統合的アプローチ。第 82 回日本生理学会大会企画シンポジウム「運動制御・学習：機能イメージングによるアプローチ」(仙台)
7. Tanabe HC, Honda M, Sadato N (2005.6) Functionally

- segregated neural substrates for arbitrary audio-visual paired association learning: a functional MRI study. Human Brain Mapping 2005 Conference (Toronto, Canada).
8. 田邊宏樹, 本田学, 定藤規弘 (2005.9) 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. 第20回生体・生理工学シンポジウム (BPES2005) (東京)
 9. Aramaki Y, Honda M, Sadato N (2005.11) Bimanual symmetric finger movement activates the non-dominant motor cortex less than unimanual non-dominant finger movement. The 35th Annual Meeting Society for Neuroscience (Washington DC, USA).
 10. Kansaku K, Grillon, M.L., Johnson, A., Sadato N, Hallett, M (2005.11) Activation in the premotor cortex during perceiving successive stimuli with or without explicit counting. The 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington DC, USA).
 11. Iidaka T, Matsumoto A, Kansaku K, Sadato N (2005.11) Aging affects the fronto-parietal network involved in successful recognition of pictures. An event-related fMRI study. The 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington DC, USA).
 12. Murase M, Saito DN, Kochiyama T, Tanabe HC, Tanaka S, Aramaki Y, Honda M, Sadato N (2005.11) Involvement of the orbitofrontal cortex in the cross-modal integration during lipreading- functional MRI study. The 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington DC, USA).
 13. Uchiyama H, Seki A, Kageyama H, Saito DN, Koeda T, Ohno K, Sadato N (2005.11) Neural substrates of sarcasm: an fMRI study. The 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington DC, USA).
 14. Uchiyama Y, Toyoda H, Honda M, Yoshida H, Kochiyama T, Ebe K, Sadato N (2005.11) The role of interhemispheric control of Broca's area for syntactic processes. The 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington DC, USA).

《認知行動発達機構研究部門》

1. Isa T; (2005.7) Control of saccades and visual attention in the monkey with unilateral lesion of the primary visual cortex. University of Western Ontario. (カナダ)
2. Isa T; (2005.9) Role of extrageniculate visual system in regulation of saccades and top-down attention. Queens University Neuroscience Seminar Course. (カナダ)
3. Isa T; (2005.11) Local circuits of the superior colliculus; how to decide when and where to look. University of Wisconsin Neuroscience Seminar Course. (米国)
4. 伊佐正, 吉田正俊 (2005.11) Residual vision and saccadic eye movements in monkeys with unilateral lesion of primary visual cortex. 第35回北米神経科学学会 (米国)
5. 関和彦, Perlmutter SI, Fetz EE. (2005.5) 随意運動課題遂行中のサル脊髄におけるシナプス前抑制の機能, 第82回日本生理学会 (仙台)
6. 吉田正俊, 伊佐正 (2005.5) ニホンザル盲視モデルにおける急速眼球運動を指標とした視覚運動変換機能, 第82回日本生理学会大会 (仙台)
7. 吉田正俊, 伊佐正 (2005.7) ニホンザル盲視モデルにおける残存視覚能力と注意, 第28回日本神経科学学会 (横浜)
8. 吉田正俊, 伊佐正 (2005.9) マカクザル盲視モデルにおける残存視覚と認知機能, 第52回中部日本生理学会 (名古屋)
9. 吉田正俊, 伊佐正 (2005.11) Attentional modulation of visuomotor processing in monkeys with unilateral lesion of primary visual cortex. 第35回北米神経科学学会 (米国)
10. Yukio Nishimura, Onoe Hiroataka, Hideo Tukada, Tadashi Isa (2005.4) Increasing Activity of Bilateral Motor Cortical Areas after the Lesion of the Corticospinal Tract at Cervical Spinal Cord in Monkeys; a PET study., 15th Annual Meeting of the Neural Control of Movement Society, Key Biscayne, Florida (USA)

11. Yukio Nishimura, Onoe Hiroataka, Hideo Tukada, Tadashi Isa. (2005.5) Bilateral activation of sensorymotor cortex after corticospinal tract lesion in cervical spinal cord in monkeys. 第 82 回日本生理学会 (仙台)
12. Yukio Nishimura, Hiroataka Onoe, Sergei Perfiliev, Hideo Tukada, Tadashi Isa. (2005.7) Both contra- and ipsilateral motor cortices participate in recovery of the precision grip after the lesion of the corticospinal tract at cervical spinal cord., 第 28 回日本神経科学大会 (横浜)
13. 西村 幸男, 伊佐 正, パーフィリエフ・セルゲイ, 尾上 浩隆, 塚田秀夫 (2005.9) 両側の一次運動野が頸髄レベルでの皮質脊髄路損傷後の手指の機能回復に貢献する, 第 52 回中部生理学会 (名古屋)
14. J.Ushiba; M.Yoshihira; Y.Takahashi; Y.Nishimura; Y.Masakado; Y.Tomita: (2005.11) EFFECTS OF CORTICOMUSCULAR COUPLING ON FORCE FLUCTUATION. 第 35 回北米神経科学学会 (米国)
15. H.Onoe; Y.Nishimura; H.Tsukada; T.Isa: (2005.11) INCREASING ACTIVITY IN BILATERAL MOTOR CORTICAL AREAS AFTER THE LESION OF THE LATERAL CORTICOSPINAL TRACT AT CERVICAL SPINAL CORD IN MONKEYS: A PET STUDY. 第 35 回北米神経科学学会 (米国)
16. Y.Nishimura; S.Perfiliev; T.Isa (2005.11) BOTH CONTRALATERAL AND IPSILATERAL MOTOR CORTICES PARTICIPATE IN RECOVERY OF PRECISION GRIP AFTER THE LESION OF LATERAL CORTICOSPINAL TRACT AT CERVICAL SPINAL CORD IN MONKEY: A TRANSIENT INACTIVATION STUDY. 第 35 回北米神経科学学会 (米国)
17. T.Oishi1; N.Higo; Y.Murata; A.Yamashita; K.Matsuda; M.Hayashi; Y.Nishimura; K.Seki; T.Isa (2005.11) : EXPRESSION OF GAP-43 AND ITS mRNA IN THE MONKEY MOTOR CORTEX AND SPINAL CORD AFTER DORSOLATERAL LESION OF SPINAL CORD AT C4/C5 LEVEL. 第 35 回北米神経科学学会 (米国)
18. Yukio Nishimura, Hiroataka Onoe, Sergei Perfiliev, Tadashi Isa, (2006.3) Longitudinal study of the involvement of several motor cortical regions in functional recovery after the Lesion of the Corticospinal Tract at Cervical Spinal Cord in Monkeys. 第 83 回日本生理学会大会 (前橋)

《生体恒常機能発達機構研究部門》

1. Wake H, Watanabe M, Nabekura J (2005.11) Time course of the functional loss of KCC2 in neuronal damage. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington, DC, USA).
2. Watanabe M, Wake H, Nabekura J (2005.11) Phosphorylation by tyrosine kinase regulates the functional expression of neuron-specific K^+ -Cl⁻ cotransporter, KCC2. Society for neuroscience 35th Annual Meeting (Washington, DC, USA).
3. Yamada K, Wake H, Watanabe M, Takada K, Matsukawa N, Yamawaki T, Nabekura J, Ojika K (2005.11) Neuronal expressions of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein follo hippocampal neuronal wing the damage in vitro. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (Washington, DC, USA).
4. 鍋倉淳一 (2005.10) 発達期における神経回路の再編成機構。生理研一名古屋大学環境医学研究所合同セミナー (生理研)
5. 鍋倉淳一 (2005.11) 障害脳の回復は発達を繰り返す? 科学技術振興機構クレストシン「脳学習」第一回公開シンポジウム (東京)
6. 和気弘明, 渡部美穂, 鍋倉淳一 (2005.9) 神経特異的 KCC2 (K^+ -Cl⁻ cotransporter) のリン酸化と神経細胞障害時における GABA 作用の経時的変化。第 52 回中部日本生理学会 (名古屋)
7. 西巻拓也, 張 一成, 鍋倉淳一 (2005.5) GABA_B receptor-mediated presynaptic modulation of inhibitory synaptic transmission in developing rat LSO neurons. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
8. 鍋倉淳一, 西巻拓也, 張 一成(2005.7) Developmental Switch from GABA to Glycine in Single Synaptic

Terminals. 第28回日本神経科学大会 (横浜)

9. 西巻拓也, 張一成, 鍋倉淳一 (2005.9) 上オリブ

核に入力する抑制性シナプス前終末の GABA_B 受容体のはたらき. 第52回中部日本生理学会 (名古屋)

《生殖・内分泌系発達機構研究部門》

1. 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)
2. 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 (東京)
3. Minokoshi Y (2005.2) Hypothalamic control of glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. 2005 Seoul Symposium on Obesity and Diabetes (Seoul).
4. 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—AMP キナーゼの働きを中心に—. 神戸大学 COE 講演会 (神戸)
5. 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)
6. 箕越 靖彦 (2005.3) 摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼ調節作用. 第2回九州メタボリッククラブ (福岡)
7. 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)
8. Shiuchi T, Okamoto S, Saito K, Minokoshi Y (2005.5) Microinjection of orexin A into the medial hypothalamus enhances glucose uptake and insulin sensitivity in skeletal muscle. 第82回日本生理学会 (仙台)
9. Kubota N, Yano W, Terauchi Y, Kubota T, Okamoto M, Ueki K, Yamauchi T, Takamoto I, Tobe K, Ezaki O, Minokoshi Y, Kadowaki T (2005.6) 第65回アメリカ糖尿病学会 (San Diego)
10. 箕越靖彦, 志内哲也, 岡本土毅, 斉藤久美子 (2005.6) 摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用. 生理研研究会「バイオ分子センサー研究会」(岡崎)
11. 箕越 靖彦 (2005.7) AMP キナーゼと生体エネルギー代謝調節. MORE (Melbin Observational Research) study 報告会 (東京)
12. 箕越 靖彦 (2005.7) AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝調節作用. 第3回アディポサイトカイン研究会 (東京)
13. 箕越 靖彦 (2005.7) 摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼ調節作用. 第28回日本神経科学大会 (横浜)
14. 箕越 靖彦 (2005.7) 生体エネルギーバランスの恒常性維持に関わる分子・組織間ネットワーク. 連携サマースクール「自然科学における階層と全体」(湯河原)
15. 箕越 靖彦 (2005.8) AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝調節作用. 第2回九州先進糖尿病研究会 (福岡)
16. 箕越 靖彦 (2005.9) 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—. 生理学研究所講演会 (岡崎)
17. 箕越 靖彦 (2005.9) 骨格筋エネルギー代謝に及ぼす視床下部の調節作用. 体温調節, 温度受容研究会. 生理研研究会「体温調節, 温度受容研究会」(岡崎)
18. Minokoshi Y (2005.9) Hypothalamic regulation of body energy metabolism. 第26回日本肥満学会 (札幌)
19. 志内哲也, 岡本土毅, 李順姫, 斉藤久美子, 箕越靖彦 (2005.9) 骨格筋でのグルコース取り込みに及ぼす視床下部オレキシンの調節作用. 第26回日本肥満学会 (札幌)
20. Minokoshi Y (2005.10) Hypothalamic control of glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. 第78回日本生化学会 (神戸)
21. 箕越 靖彦 (2005.10) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用: レプチン作用を中心に. 京都府立医科大学特別講義 (京都)
22. 箕越 靖彦 (2005.10) 摂食と代謝を調節する視床下部の統御機能. 京都府立医科大学特別講義 (京都)
23. 箕越 靖彦 (2005.10) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用—レプチン作用を中心に—. 環境研・生理研合同シンポジウム (岡崎)
24. 箕越 靖彦 (2005.11) 生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用—レプチン作用を中心に—. 第6回インスリン抵抗性フォーラム (東京)

25. 箕越 靖彦 (2005.12) AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝調節作用。第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
26. 鈴木 敦, 岡本 士毅, 李 順姫, 斉藤 久美子,

志内 哲也, 箕越 靖彦 (2005.12) AMP-kinase を活性化するレプチンの細胞内情報伝達機構: 骨格筋細胞 C2C12 を用いた解析。第 4 回メタボリック症候群 (生活習慣病) 研究会 (東京)

《形態情報解析室》

1. Furuya K, Furuya S, Sokabe M(2005.4) Mechanosensor in the intestinal villi: Cell-shape dependent ATP signaling in subepithelial fibroblasts. 35th International Congress of Physiological Sciences (San Diego, USA).
2. Kosodo Y, Toida K, Kiyokage E, Arii T and Huttner WB (2005.5) Ultrastructural study of the basal process of mitotic neuroepithelial cells in the developing mouse brain, Cortical Development-Neural stem cells to neural circuits (Santorini, Greece).
3. 小澤一史, 有井達夫, 河田光博 (2005.6) 副腎皮質ステロイドホルモンの変化に伴う神経細胞構造の変化, 特に超高压電子顕微鏡的観察について。顕微鏡学会 (筑波)
4. Mun JY, Lee KE, Arii T, Hama K, HAN SS (2005.10) Cellular Tomography employing HVEM of the adult retinal cells in *Drosophila melanogaster*. The 5th

International Symposium on Electron Microscopy in Medicine (Shijiazhuang, China).

5. Kosodo Y, Toida K, Kiyokage E, Arii T, Huttner WB (2005.11) Analysis of neuroepithelial stem cell divisions: Molecular cell biological and ultrastructural approaches to mammalian neurogenesis. 顕微鏡学会第 50 回シンポジウム (福岡)
6. Furuya K, Furuya S, Sokabe M(2005.11) Mechano-sensing in intestinal villi: Cell-shape dependent ATP signaling in subepithelial fibroblasts network. The 2nd Asian-Pacific Conference on Biomechanics. (Taipei, Taiwan).
7. Mun JY, Kyung KE, Arii T, Hama K, Kwon HS, Studer D, HAN SS (2005.12) Coordination of Microtubule employing HVEM of the adult retinal cells in *Drosophila melanogaster*. Annual meeting The American Society for Cell Biology (San Francisco, USA).

《生体情報解析室》

1. 大嶋章裕, 根本知己, 児島辰哉, 出島健司, 河西春郎, 久 育男 (2005.3) 二光子顕微鏡によるモルモット鼻腺細胞粘液分泌の解析, 第 23 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (岡山, 日本)
2. 河西春郎, 根本知己, 児島辰哉, 大嶋章裕 (2005.4) 2 光子励起法による上皮細胞の輸送機能の研究, 「イオン・水・小分子のベクトル輸送の分子基盤とシグナル伝達に関する研究」公開シンポジウム (東京, 日本)
3. 大嶋章裕, 根本知己, 児島辰哉, 出島健司, 河西春郎, 久 育男 (2005.5) モルモット鼻腺細胞における粘液分泌の二光子顕微鏡による解析。第 106 回日本耳鼻咽喉科学会 (大阪, 日本)
4. 根本知己, 河西春郎 (2005.5) 多光子励起過程を用

いた開口放出・分泌現象の可視化解析, 日本分析化学会第 66 回分析化学討論会シンポジウム (北見, 日本)

5. 根本知己, 岸本拓哉, 緒方衡, 児島辰哉, 大嶋章裕, 河西春郎 (2005.7) 多光子励起過程を用いた開口放出・溶液輸送機構の解析。生理学研究所研究会 (岡崎, 日本)
6. 河西春郎, 根本知己, 岸本拓哉, 畠山裕康, 高橋倫子 (2005.11) 2 光子励起顕微鏡による開口放出の可視化, 第 51 回日本病理学会秋期特別総会シンポジウム (東京, 日本)
7. Nemoto T, Kishimoto T, Kasai H (2005.12) Sequential exocytosis and vectorial transport in secretory gland cell studied by two-photon microscopy. The next generation

in Bio-imaging, The 7th international RIES-Hokudai Symposium “Multi-Institutional International Symposium

on MEI” (Sapporo, Japan).

《遺伝子改変動物作製室》

1. Hirabayashi M, Kato M, Ito J, Hochi S (2005.1) Full-term development of rat oocytes microinseminated with freeze-dried spermatozoa. The 31st Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (Copenhagen, Denmark).
2. Kato M, Hochi S, Hirabayashi M (2005.1) Factors affecting production efficiency of transgenic rats by ICSI-mediated DNA transfer. The 31st Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (Copenhagen, Denmark).
3. Iwanami Y, Kobayashi T, Kato M, Hirabayashi M, Hochi S (2005.1) An attempt at inducing differentiation into round spermatids of rat spermatogonia by co-culturing with sertoli cells. The 31st Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (Copenhagen, Denmark).
4. 平林 真澄, 加藤 めぐみ, 金子 涼輔, 保地 眞一 (2005.5) リコンビナーゼで被覆した EGFP 遺伝子はラットゲノムに導入されやすいか? 第 52 回日本実験動物学会 (東京)
5. 伊藤 潤哉, 島田 昌之, 保地 眞一, 平林 真澄 (2005.5) ラット MII 卵子の減数分裂停止に関わる Mos/MEK/MAP kinase 系と p34^{cdc2} kinase の相補的な機能。第 46 回日本哺乳動物卵子学会 (八戸)
6. 上松 正和, 島 寿貴, 田中 真理子, 海老原 利枝, 平林 真澄, 加藤 めぐみ, 阿部 訓也, 柳川 右千夫, 吉田 祥子 (2005.7) VGAT-Venus トランスジェニックラットの発達期小脳皮質での Venus 発現パターン。第 28 回日本神経科学学会大会 (横浜)
7. 平井 康治, 上松 正和, 海老原 利枝, 阿部 訓也, 吉田 祥子, 加藤 めぐみ, 平林 真澄, 柳川 右千夫, 川口 泰雄 (2005.7) VGAT-Venus トランスジェニックラットの大脳皮質非錐体細胞での Venus 発現パターン。第 28 回日本神経科学学会大会 (横浜)
8. Ito J, Shimada M, Hochi S, Hirabayashi M (2005.7) Synergistic function of MAPK pathway and p34^{cdc2} kinase at meiotic arrest of rat matured oocytes. The 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (Quebec, Canada).
9. 伊藤 潤哉, 金子 涼輔, 平林 真澄 (2005.9) ラット卵子の自発的活性化時におけるカルモジュリン依存性キナーゼ (CaMKII) の動態。第 103 回日本畜産学会 (札幌)
10. 伊藤 潤哉, 加藤 めぐみ, 雨宮 和絵, 保地 眞一, 平林 真澄。(2005.9) ラット成熟卵子中の核およびその周辺部は MII 期の維持に必須である。第 98 回日本繁殖生物学会 (静岡)
11. Suzuki A, Nishiwaki-Yasuda K, Caverzasio J, Ono Y, Sekiguchi S, Nagao S, Takahashi H, Matsuyama M, Yan K, Kaneko R, Hirabayashi M, Oiso Y, Itoh M (2005.9) Overexpression of Type III Na-dependent Phosphate transporter in the rat induces the spontaneous cataract with nephritic syndrome. The 27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Nashville, USA)

《時系列生命現象研究領域》

1. 木村有希子, 東島眞一 (2005.6) ゼブラフィッシュ脊髄運動系神経回路形成機構の解析 第 38 回日本発生物学会 (仙台)
2. Kimura Y, Higashijima, S (2005.9) Specification and function of zebrafish interneurons. 1st Strategic Conference of Zebrafish Investigators (Maine, USA).
3. 木村有希子, 岡村康司, 東島眞一 (2005.10) ゼブラフィッシュ脊髄介在神経の発生と回路における機

- 能解析 第 76 回日本動物学会 (つくば)
4. 佐藤千恵, 木村有希子, 東島眞一 (2005.12) ゼブラフィッシュ脊髄神経細胞多様性形成機構の包括的解析 第 28 回日本分子生物学会 (福岡)
 5. Okamura Y (2005.3) Ion channel-like voltage sensor of a novel phosphatase tunes its enzymatic activity Molecular-based information transmission and reception - application of membrane protein biofunction MB-ITR2005 (Okazaki, Japan).
 6. 岡村康司, 村田喜理, 岩崎広英, 佐々木真理 (2005.3) 膜電位センサーをもつ酵素 生理学研究所研究会 (岡崎)
 7. 岡村康司 (2005.5) Voltage sensor in an enzyme 第 82 回日本生理学会シンポジウム センサー分子内の情報伝達機構 (仙台)
 8. 村田喜理, 岡村康司 (2005.5) Role of linker region in coupling between voltage sensor and phosphatase activity 第 82 回日本生理学会 (仙台)
 9. 西野敦雄, 東島眞一, 岡村康司 (2005.5) ホヤ幼生の遊泳運動機構の研究: 運動パターンと筋細胞の興奮・収縮の関係 第 82 回日本生理学会 (仙台)
 10. Israil Hossain, 東島眞一, 岩崎広英, 永山国昭, 岡村康司 (2005.5) Identification of teleost voltage-sensitive phosphatase (VSP) and its comparison with Ci-VSP 第 82 回日本生理学会 (仙台)
 11. 岡村康司, 西野敦雄, 小笠原道夫, 佐藤矩行, 岡戸晴生 (2005.7) カタユウレイボヤのイオンチャネル遺伝子データベースの作成 第 82 回日本生理学会 (仙台)
 12. 岡村康司 (2005.7) 新しい膜電依存性タンパクの構造と機能 シンポジウム バイオ分子センサー 脳神経機能研究の新潮流 第 28 回日本神経科学学会大会 (横浜)
 13. 岩崎広英, 東島眞一, 岡村康司 (2005.7) 電位センサータンパク質 VSOP2 の解析 第 28 回日本神経科学学会大会 (横浜)
 14. 中山希世美, 岡村康司 (2005.7) 胎生期マウス脊髄における GABA の興奮性作用への K^+ - Cl^- cotransporter 強発現の効果 第 28 回日本神経科学学会大会 (横浜)
 15. 岡村康司, 岩崎広英, 佐々木真理, 村田喜理, Israil Hossain, 東島眞一 (2005.9) 新規電位センサー蛋白から見た脊索動物の生理機能の進化 第 77 回日本遺伝学会大会 (東京)
 16. 藤山秋佐夫, 三谷啓志, 岡村康司, 隅山健太 (2005.9) 生命情報学によるゲノム進化の解析 第 77 回日本遺伝学会大会ミニシンポジウム (東京)
 17. 岩崎広英, 村田喜理, 佐々木真理, 稲葉一男, 岡村康司 (2005.10.6~8) ホヤゲノムから見つかった新規膜電位感受性酵素 Ci-VSP 第 76 回日本動物学会大会 (筑波)
 18. 木村有希子, 岡村康司, 東島眞一 (2005.10.6~8) ゼブラフィッシュ脊髄介在神経の発生と回路における機能解析 第 76 回日本動物学会 (筑波)
 19. 村田喜理, 佐々木真理, 岡村康司 (2005.9) 膜電位感受性酵素 Ci-VSP における, 酵素活性の膜電位による制御機構ドメイン間リンカー領域の役割 第 52 回中部動物学会支部会 (名古屋)

《戦略的方法論研究領域》

1. Murakami M, Segawa A, Shinozuka N, Hashimoto S (2005.1) Functional morphology of paracellular transport for salivary secretion. The Gordon Research Conference on Salivary Glands & Exocrine Secretion (Ventura, USA).
2. Matsuki M, Hashimoto S, Shimono M, Murakami M, Ogata Y, Furuyama S, Sugiyama H (2005.1) Jasplakinolide induced apoptosis in parotid acinar cells. Gordon Research Conference on Salivary Glands & Exocrine Secretion (Ventura, USA).
3. 永山國昭 (2005.2) 自然科学における映像。総研大 レクチャー「科学映像の制作に向けて」(葉山)
4. 橋本貞充, 村上政隆 (2005.2) 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。平成 16 年度生理研研究会「唾液分泌機構解明に向けての戦略的展開」(岡崎)
5. 村上政隆 (2005.2) 細胞間隙の唾液分泌への寄与。平成 16 年度生理研研究会「唾液分泌機構解明に向

- けての戦略的展開」(岡崎)
6. 橋本貞充, 村松 敬, 嶋 香織, 松木美和子, 太田一正, 下野正基, 村上政隆, 杉谷博士 (2005.2) 唾液腺—水と蛋白分泌の協調機構・形態/機能/遺伝子発現からの 3 次元的アプローチ。平成 16 年度東京歯科大学口腔科学研究センターワークショップ(千葉)
 7. Setou M. (2005.2) Personalized medicine in Japan. American Association of Advance of Science, Annual Meeting (Washington, USA).
 8. 永山國昭 (2005.3) 位相差電子顕微鏡が拓く post-genome 生物学。ナノテクノロジーバーチャルラボ領域横断企画 (神奈川)
 9. 永山國昭 (2005.3) 位相差電子顕微鏡の今昔。生理学研究所研究会「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」(岡崎)
 10. Radostin Danev, Kuniaki Nagayama (2005.3) Applicability of Phase Contrast TEM to Biological Specimens. 生理学研究所研究会「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」(岡崎)
 11. 新田浩二 (2005.3) 位相差電子顕微鏡による無染色生物試料の観察～高压凍結・凍結超薄切片法の試み～。「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」(岡崎)
 12. 瀬藤光利 (2005.3) 質量分析顕微鏡の開発。学振 141 委員会第 119 回研究会 (東京)
 13. 瀬藤光利 (2005.3) 日米ナノテクノロジー若手研究社交流プログラム (Chicago, USA)
 14. 永山國昭 (2005.5) 位相電子顕微鏡の開発と生物学への応用。核融合科学研究会平成 17 年度特別講演会 (名古屋)
 15. Seo Y, Takamata A, Ogino T, Morita H, Murakami M (2005.5) Lateral diffusion of Mn^{2+} ion in the brain determined by T_1 relaxation time measured by 1H magnetic resonance imaging. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
 16. M Murakami, N Shinozuka, N Kishimoto, T Sakurai, H Sugiyama, S Furuyama (2005.5) Relationship between salivary glucose and blood glucose: assessment using perfused salivary glands of rats/rabbits and application to human saliva. 第 82 回日本生理学会大会 (仙台)
 17. 瀬藤光利 (2005.5) 顕微質量分析装置の開発。第 53 回日本質量分析総合討論会 (さいたま市)
 18. 永山國昭 (2005.6) 位相差電子顕微鏡の温故知新。日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 19. 新井善博, 元木創平, 細川史生, 永山國昭, 大河原浩, DANEV Radostin (2005.6) 位相差電子顕微鏡法の装置上の特長。日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 20. 杉谷正三, 永山國昭 (2005.6) 位相差のデータ処理。日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 21. 由井宏治, 神谷昌子, DANEV Radostin, 永山國昭, 伊藤耕三, 清水敏美 (2005.6) 位相差電子顕微鏡法による脂質ナノチューブ形成過程の観測。日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 22. 田中雅嗣, 福典之, 西垣裕, 松本健司, 藤田泰典, 伊藤雅史, DANEV Radostin, 永山國昭 (2005.6) 位相差電子顕微鏡法のミトコンドリアへの応用。日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 23. 谷口孝喜, 白田信光, 厚沢季美江, DANEV Radostin, 永山國昭 (2005.6) 位相差法のウイルスへの応用。日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 24. 金子康子, DANEV Radostin, 新田浩二, 仲本準, 永山國昭 (2005.6) 位相差法のバクテリアへの応用。日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 25. 白田信光, 厚沢季美江, 中沢綾美, 水谷謙明, DANEV Radostin, 永山國昭 (2005.6) 電子位相顕微鏡による氷包埋を行った組織・細胞の観察。日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 26. DANEV Radostin, 永山國昭 (2005.6) Applicability of Phase Contrast Transmission Electron Microscopy Techniques to Observation of Biological Specimens. 日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 27. 登阪雅聡, 小川哲平, 辻正樹, DANEV Radostin, 永山國昭 (2005.6) 高配向高分子薄膜上へのナノスケールパターン形成。日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 (つくば)
 28. 永山國昭 (2005.6) 無染色で観る微生物のナノ形態。微生物顕微科学的解析研究部会 (東京)
 29. 永山國昭 (2005.6) 電子顕微鏡の原理と実践。2005 年度愛知県立一宮高等学校 SSH 生物授業 (一宮)
 30. Ohashi M.(2005.6) The behavior of Patched and Smoothed in a CHO cell mutant, LEX2, defective in cholesterol biosynthesis and endosomal sorting. 第 58

- 回日本細胞生物学会大会 (埼玉)
31. 永山國昭 (2005.7) 地球 6 億年の色—モルフォブリンの世界。(社)色材協会第 44 回色材工学夏期ゼミナール (岡崎)
 32. 永山國昭 (2005.7) 先人たちの見たミクロの世界。2005 年山梨県立甲府南高等学校 SSH 生物授業 (甲府)
 33. 永山國昭 (2005.7) 先人たちの見たミクロとナノの世界—SSH 生物授業の再演。知と技の探求教育特区「知と技の研究講座開校式」(名古屋)
 34. Setou M. (2005.7) Novel polyglutamylase regulates the traffic of K channel. 第 29 回日本神経科学学会大会 (横浜)
 35. Nagayama K, Danev R, Schroeder R, Cheng H, Hosokawa F, Arai Y (2005.8) Antistatic Phase Plates Opening Supramolecular Biology with Electron Microscopy. 15th IUPAB & EBSA International Biophysics Congress, (Montpellier, France).
 36. Nagayama K, Danev R, Usuda N, Kaneko Y, Nitta K, Nakazawa A, Atsuzawa K, Tanaka M, Setou M (2005.8) *in vivo* Subcellular Structures Recognized with Phase Contrast Transmission Electron Microscopy. 15th IUPAB & 5th EBSA International Biophysics Congress (Montpellier, France).
 37. 永山國昭 (2005.8) 高性能電子顕微鏡によるナノイメージング科学。連携プロジェクト「Imaging Science」第 1 回シンポジウム (岡崎)
 38. Danev R, Nagayama K (2005.8) Application of Thin Film Phase Plates in Biological Electron Microscopy. Keihanna Conference on Molecular Biophysics (KCMB 2005), Frontiers of biomedical micro-imaging (Kyoto, Japan).
 39. 早坂孝宏, 重松秀樹, 永山國昭 (2005.8) 透過型電子顕微鏡による蛋白質構造多型観察法の開発。特定領域研究「水と生体分子」平成 17 年度合同班会議 (白馬)
 40. 瀬藤光利 (2005.9) 文科省日英ナノテクノロジー若手研究者交流プログラム (Cambridge, England).
 41. 永山國昭 (2005.10) 生命科学—2 つの生物原理。金沢大学公開講座—親・子・教師向けサイエンストーク (金沢)
 42. 新田浩二, 花市敬正, 永山國昭 (2005.10) 位相差電子顕微鏡に適した生物試料作製法。第 46 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (京都)
 43. Nagayama K (2005.11) *In vivo* Subcellular Structures Revealed with Ultimate Electron Microscopy. International Frontier of Membrane Research Program of OIB Okazaki and IPR Osaka (Osaka).
 44. Nagayama K (2005.11) Enhancement of TEM Contrast with Phase Plates for Soft Materials. Asia-Pacific Advanced Microscopy Symposium, Hualien (China, Taiwan).
 45. Nagayama K (2005.11) Novel Bioimaging Opened up with Phase Contrast Electron Microscopy. The 43th JPN Biophysics Society Meeting, Japan-Australia Joint Symposium on Biophysics (Sapporo).
 46. 永山國昭 (2005.11) 位相差顕微鏡の拓く新しい生物イメージング。日本生物物理学会第 43 回年会 (札幌)
 47. Yao I., Ageta H., Takagi H., Kahyo T., Fukuda Y., Inokuchi K., Setou M (2005.11). Analysis of a novel F-box Protein That Regulates Neural Activity. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington, USA).
 48. Kuniaki Nagayama (2005.12) Life's Origin: Chance or Necessity. Hayashibara Forum 2005 (Okayama).
 49. 魏 睦新, 村上政隆 (2005.12) ラット灌流顎下腺水分分泌に及ぼす漢方薬の影響。第 50 回日本唾液腺学会 (東京)
 50. 橋本貞充, 村上政隆, 金関恵, 杉谷博士, 松木美和子, 下野正基 (2005.12) 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 50 回日本唾液腺学会 (東京)
 51. 松木美和子, 橋本貞充, 道家洋子, 村上政隆, 下野正基, 杉谷博士 (2005.12) ラット耳下腺における Aquaporin-6 の局在。第 50 回日本唾液腺学会 (東京)
 52. Yao I., Ageta H., Saitoh Y., Inokuchi K., Setou M. (2005.12) Identification and Characterization of a Novel Synapse Remodeling Factor Candidate by Bioinformatics. 43rd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (San Francisco, USA).
 53. Shimma S., Furuta M., Ichimura K., Yoshida Y., and Setou M. (2005.12) Direct MS/MS Analysis in Mammalian Tissue Sections Using MALDI-QIT-TOFMS and Chemical Inkjet Technology. 5th international conference of Atomic

Level Characterizations (Hawaii, USA).

54. Setou M. (2005.12) Development of MS microscope. 5th international conference of Atomic Level Characterizations (Hawaii, USA).
55. Shimma S. (2005.12) Direct MS/MS Analysis in

Mammalian Tissue Sections Using MALDI-QIT-TOFMS and Chemical Inkjet Technology. 5th international conference of Atomic Level Characterizations (Hawaii, USA).

《生命環境研究領域》

1. 富永真琴 (2005.3) 温度受容の分子機構。立命館大学・21世紀COE・放射光生命科学センター研究会(草津)
2. Tominaga M (2005.4) Temperature threshold change of TRPV1. The 35th International Congress of Physiological Sciences (San Diego, USA).
3. 富永真琴, Sravan Mandadi, 沼崎満子, 富永知子, Basil Roufogalis (2005.5) PMA-induced re-sensitization of TRPV1 activity occurs through PKCε-mediated phosphorylation of TRPV1 at S800. 第82回日本生理学会大会(札幌)
4. 富永真琴 (2005.6) 痛み刺激受容・温度受容の分子機構。日本麻酔科学会第52回学術集会(神戸)
5. 富永真琴 (2005.7) 温度センサーの発現と機能。第28回日本神経科学大会(横浜)
6. Sravan Mandadi, 村山奈美枝, 沼崎満子, 富永知子, Basil Roufogalis, 富永真琴 (2005.7) PKCεによるS800のリン酸化を介したTRPV1の再感作。第28回日本神経科学大会(横浜)
7. 富永真琴 (2005.7) 温度感受性TRPチャンネルの構造と機能。大阪大学蛋白質研究所セミナー(大阪)
8. 富永真琴 (2005.8) 私達は痛みや温度をどうやって感じるのだろうか? 核融合科学研究所オープンハウス 特別講演(岐阜)
9. Tominaga M (2005.8) Regulation of TRPV1 function through a PKC-dependent pathway. The 11th World Congress on Pain. (Sydney, Australia).
10. Mandadi S, Tominaga M, Numazaki M, Murayama N, Tominaga T, Armati PJ, Roufogalis BD. (2005.8) PMA-induced re-sensitization of desensitized TRPV1 by PKCε-mediated phosphorylation of TRPV1 at S800. The 11th World Congress on Pain. (Sydney, Australia).
11. Tominaga M, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S. (2005.8) Sensitization of TRPV1 by EP₁ and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. The 11th World Congress on Pain. (Sydney, Australia).
12. 富永真琴 (2005.9) TRPチャンネルと痛み。薬理学サマーセミナー2005(長崎)
13. 富永真琴 (2005.9) 痛みの解析の生理学的アプローチ。薬理学サマーセミナー2005(長崎)
14. Tominaga M (2005.9) Regulation mechanisms of temperature threshold in thermoTRPs. International Congress: TRP channels. (Leuven, Belgium).
15. Sravan Mandadi, 富永知子, 村山奈美枝, 飯田陶子, 沼崎満子, Basil D. Roufogalis, 富永真琴 (2005.9) PMAによる脱感作したTRPV1の再感作にはPKCεによるSer800のリン酸化が関与している。第52回中部日本生理学会(名古屋)
16. 東智広, 森山朋子, 富樫和也, 飯田陶子, 瀬木恵理, 杉本幸彦, 富永知子, 成宮周, 富永真琴 (2005.9) プロスタグランジンによるTRPV1機能制御機構。第52回中部日本生理学会(名古屋)
17. 富永真琴 (2005.9) TRP channels and nociception. 第48回日本神経化学学会大会(福岡)
18. Tominaga M, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S. (2005.10) Sensitization of TRPV1 by EP₁ and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. 第78回日本生化学会(神戸)
19. 富永真琴 (2005.12) 神経細胞膜におけるカプサイシン受容体チャンネルと代謝型受容体の機能的複合体の意義。日本生体エネルギー研究会第31回討論会(名古屋)

《計算科学研究センター》

1. 片岡正典, 平野泰亮, 黒田健治, 早川芳宏 (2005.9.16)
動的構造変化型ユニバーサル核酸塩基。第 20 回生
体機能関連化学シンポジウム若手フォーラム (岡崎,
日本)
2. 片岡正典, 平野泰亮, 黒田健治, 早川芳宏 (2005.9.20)
Synthesis of a peptide nucleic acid oligomer with
pyrimido[4,5-d]pyrimidine-2,4,5,7-(1H,3H,6H,8H)-tetra
one as a nucleobase. 第 4 回国際核酸化学シンポジウ
ム (博多, 日本)
3. 片岡正典, 平野泰亮, 黒田健治, 早川芳宏
(2005.9.21) Pyrimido[4,5-d]pyrimidine-2,4,5,7-(1H, 3H,
6H, 8H)-tetraone as a novel universal base. 第 4 回国際
核酸化学シンポジウム (博多, 日本)

【 一般共同研究報告 】

一般共同研究報告

〔 目 次 〕

1. G 蛋白質共役応答の調節に関する分子生物学的研究 (齊藤修ほか)	128
2. イオンチャネル・受容体の動的構造機能連関 (柳 (石原) 圭子ほか)	128
3. 癌における糖蛋白糖鎖異常の系統的解析 (和田洋巳ほか)	129
4. 神経細胞における電位依存性イオンチャネル局在化調節機構の解明 (馬場広子ほか)	129
5. 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.....	130
(清水恵司ほか)	
6. シナプス可塑性・安定性の 2 光子励起解析 (河西春郎ほか)	131
7. 虚血性神経細胞死と容積調節チャネルの機能連関 (塩田清二ほか)	131
8. 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	132
(酒井哲郎ほか)	
9. 小脳における細胞分子モーターミオシン Va の働きの解明 (高岸 芳子ほか)	133
10. mGluR1 レスキューマウスの電気生理学的解析 (饗場 篤ほか)	133
11. 大脳基底核を巡る線維連絡の研究 (高田昌彦ほか)	133
12. 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)	134
13. 凍結切断レプリカ多重標識法によるセプチン細胞骨格および関連分子の 細胞膜直下における高分解能局在解析 (木下 専ほか)	135
14. 線条体投射神経終末の分布領域および分子局在の解析 (横井峰人ほか)	135
15. 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.....	136
(伊 藤 功)	
16. 遺伝子改変動物を利用した大脳皮質抑制性ニューロンにおける神経活動の解明 (柳川右千夫ほか)	136
17. 大脳皮質における介在ニューロンと錐体細胞の神経結合解析 (根東 覚ほか)	137
18. 人での立体視機能、並列情報処理過程の解明 (宇賀 貴紀ほか)	137
19. 運動発現に関与する脊髄内神経回路の解析 (大木紫ほか)	138
20. マカクザルの中樞神経系の損傷からの運動機能回復に関する組織学的研究 (大石高生ほか)	138
21. 上肢到達運動制御の遂行, 学習に脚橋被蓋核が果たす役割の解析 (小林康ほか)	139
22. 軸策傷害後の三叉神経運動細胞への GABA 作動性終末の再編成 (林 弘之ほか)	141
23. 海馬歯状回における神経新生に対するニューロトロフィン GABA の相互作用機構 (島津 和弘ほか)	141
24. GABA シグナリングにおける新規分子 PRIP の役割解明 (平田雅人ほか)	142
25. 随意運動発現を司る神経機構の研究 (美馬達哉ほか)	142
26. 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)	143
27. 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)	143
28. 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)	144
29. 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)	144
30. 自律神経系中枢の MRI による研究 (瀬尾芳輝ほか)	145
31. 唾液腺における内因性タンパク質分泌と外因性タンパク質分泌の sorting 機構 (杉谷博士ほか)	145
32. 電位依存性 Ca チャネルの発現制御機構 (海老原達彦ほか)	146
33. エンハンサートラップ法によるゼブラフィッシュの神経発生および神経機能の解析 (武田 洋幸ほか)	147

1. G 蛋白質共役応答の調節に関する分子生物学的研究

齊藤修, 伊藤政之 (長浜バイオサイエンス大学, バイオサイエンス学部)

久保義弘

我々は, G 蛋白質共役応答の調節因子として G α GAP の作用をもつRGSタンパクファミリーに注目して, RGS8 と RGS8S (N 端部 9 残基のみが異なる)をクローニングして解析を行ってきた。そして, Gq 受容体シグナルの制御能を解析した結果, RGS8 が, G α q とは結合性が低いにもかかわらず, 各ムスカリン Gq 受容体に対して受容体選択的な Gq 抑制能を示し, M1 系は抑制するが, M3 系の抑制は弱いこと, さらに RGS8S はいずれの Gq 系にも制御能が弱いことなどが判明した。そこで, この RGS8 の受容体選択的な Gq 調節の機構として, RGS8 が直接特定の受容体に選択的に結合している可能性を検討した。

まず, 受容体との直接の反応性を組換え蛋白質を用いた共枕実験で解析した。すると, RGS8 が Gq 共役の M1 と M3 のムスカリン受容体の第三細胞内ループ (i3) に結合することが判明し, 特に M1 へは高い結合性が検出された。一方, Gi 共役の M2 受容体の i3 へは, RGS8 は全く結合しないことが明らかになった。また, RGS8S については, いずれの受容体への結合性も RGS8 に比べ弱く, それらの結合性は両 RGS8 分子の示す Gq 制御の選択性とよく一致することが判明した。そこで, 次にその RGS8 と受容体との直接の相互作用が実際の細胞内で起こって

いるのか, BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) 解析を行った。すると実際の細胞では, RGS8 は M1 に結合しているのに対して, RGS8S は殆ど結合していないことが明らかになった。次に, M1 の i3 のどの部位に RGS8 が結合性を示すのか, i3 を 3 パートに分け検討した。結果, RGS8 と 8S が共通に認識する領域が細胞内ループの N 端側に, RGS8 が特異的に結合する部位が C 端側 50 残基に存在することが示された。また, RGS8 の N 端側からの欠失変異体を作成して, RGS8 が受容体を認識する部位をサーチした。結果, RGS8 の N 端 6~9 残基のわずか 4 残基の配列「MPRR」が M1 受容体認識に必須な部位であることが判明した。そこで, この配列の特に連続した R 残基に注目してその両残基を A に置換した変異体を作成したところ, M1i3 への結合能が激減することが明らかになった。以上のように RGS8 の受容体選択的な Gq 調節の機構と考えられる特定の受容体への直接結合とその分子的基盤が明らかになってきた。

今後は生理学的解析によって, この RGS8 の受容体への直接結合が如何に受容体選択的な Gq 調節能に関わっているのか明らかにしていきたい。

2. イオンチャネル・受容体の動的構造機能連関

柳(石原)圭子, ^{イオンチャンネル} 鄺定紅 (佐賀大学医学部)

上原明, 中村友紀 (福岡大学医学部)

Batu KECELI (Hacettepe 大学医学部, トルコ)

久保義弘

イオンチャネルやイオン透過型受容体は膜電位変化やリガンド結合が引き金となり分子構造が変化することによって細胞膜のイオン透過性を変化させ, 様々な細胞機能の発現に関与する。内向き整流カリウムチャネルは神経や心筋細胞等の膜興奮性の調節をつかさどるイオンチャネルであり, 7 つのサブファミリーに属する多くの種類がある。私たちは内向き整流カリウムチャネルの分子

構造と機能の連関を探る目的で, 今年度は強い内向き整流性カリウムチャネルのイオン透過孔を形成するサブユニットである Kir2.1 (IRK1) と G 蛋白質制御内向き整流カリウムチャネルのイオン透過孔を形成するサブユニットである Kir3.4 (GIRK4) がヘテロ多量体を形成するかどうかについて着目し実験を行った。

まず HEK293 細胞に共発現させた IRK1 と GIRK4 の結

合の有無を FLAG あるいは myc タグを結合した IRK1 あるいは GIRK4 を用いて免疫共沈法で調べたところ、IRK1-FLAG と GIRK4-myc および GIRK4-FLAG と IRK1-myc のペアは共に陽性コントロールである IRK1-FLAG と IRK1-myc のペアと同程度に共沈するという結果を得た。そこでアフリカツメガエル卵母細胞を発現系として用いて電気生理学的検討を行ったところ、IRK1 と GIRK4 のヘテロ多量体がチャネルとして機能するという証拠は得られなかったが、IRK1 の dominant-negative 型変異体（ポア領域 GYG を AAA に変換）が GIRK4 と GIRK1 から成るチャネルを流れる電流を有意

に減少させるという結果を得たため、IRK1 と GIRK4（と GIRK1）がヘテロ多量体を形成することが示唆された。さらに CFP あるいは YFP を結合した IRK1 あるいは GIRK4 を作製し、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）解析を行ったところ、これらがヘテロ多量体を形成していることを示唆する結果を得た。以上の結果は異所性発現系において IRK1 と GIRK4 がヘテロ多量体を形成し得ることを示した (Journal of Physiological Sciences 56: S151, 2006)。今後は IRK1 と GIRK4 が共発現している心房筋細胞においてヘテロ多量体が存在しているかどうかを含め、さらにその詳細を明らかにしたい。

3. 癌における糖蛋白糖鎖異常の系統的解析

和田洋巳, 田中文啓, 片倉浩理, 佐久間圭一郎 (京都大学大学院医学研究科) 柳原一広 (京都大学病院)
長谷純宏, 長東俊治 (大阪大学大学院理学研究科), 中北慎一 (香川大学総合生命科学実験センター)
東海林博樹 (香川大学) 山中龍也, 土屋尚人 (新潟大学脳研究所)
辻崇一 (お茶の水大学大学院糖鎖科学研究センター) 鈴木邦彦 (東海大学未来科学技術共同研究センター)

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様々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癌、神経変性疾患などを対象に N-結合型糖鎖発現パターン解析を行い、糖鎖の多様な機能の解明を目指してきた。

シアリルルイス X 構造をはじめとして、糖鎖が癌転移に大きく関与することは既に明らかであるが、糖鎖に関して遺伝子やタンパク質のような網羅的発現パターン解析を行った研究は非常に少ないため、糖鎖機能の多くが未解明であることが予想される。我々は独自に樹立した定量的糖鎖パターン解析系を用いて、癌の肺転移において特に重要な糖鎖構造の特定を行った。

マウスにおいて 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 A2G2F 構造が肺転移に特に多いことを見出した。また、B16 の中で A2G2F 構造を多く持つ細胞集団は少ない集団に比べてより肺転移しやすいことを見出した。さらに、臨床剖検標本を用いて肺転移と肝転移の LCA (*Lens culinaris agglutinin*) 染色を行い、ヒトにおいても A2G2F 構造が肺転移を促進している可能性を示した。(Biochem Biophys Res Commun. 2006;340(3):829-35)

特定の糖鎖構造が臓器選択的転移に関与することを示した既報は無く、この研究によって癌転移機序の新たな一面が示される可能性があり、非常に興味深い結果といえる。

4. 神経細胞における電位依存性イオンチャネル局在化調節機構の解明

馬場広子, 山口宜秀, 林明子, 鈴木彩佳, 星登美子, 高橋ゆかり (東京薬科大学薬学部)
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)
村上志津子 (順天堂大学医学部) 清水健史 (熊本大学発生医学研究センター) 浜崎浩子 (東京医科歯科大学)

神経細胞の発生や機能分化に対しては、神経細胞自体

の内在性要因の他に、周囲の細胞や細胞外基質からのシ

グナルが重要な役割を果たしている。本研究では、神経細胞の興奮性の獲得に関わる細胞内外のシグナルの分子機構を明らかにすることを目的とし、下記の結果を得た。

1) パラノーダルジャンクション形成不全に伴う遺伝子発現変化の解析

スルファチド欠損マウスでは、軸索・ミエリン間のパラノーダルジャンクション (PJ) の形成不全を生じる。この結果、正常ではランビエ絞輪周辺に集積する電位依存性イオンチャネルの局在が加齢と共に変化し、それに伴ってふるえなどの神経症状を呈する。このマウスの脊髄では脱髄性変化はほとんど生じないにもかかわらず、軸索表面のチャネル変化と同じ時間的経過で著明なアストロサイトの活性化が生じる。そこで、明かな軸索変化を生じている週齢のマウス脊髄 mRNA を抽出し、マイクロアレイ法を用いて発現が変化する遺伝子の解析を行った。結果、スルファチド欠損で発現が上昇する遺伝子および低下する遺伝子が複数得られた。これらの遺伝子の発現細胞およびその機能と軸索変化に対する関連について現在検討を行っている。

2) 電位依存性 Na⁺チャネル発現ベクターの構築有髄神

経軸索では、ミエリン形成に伴って電位依存性 Na⁺チャネルのサブタイプの変換と局在部位の変化を生じる。無髄の状態では Nav1.2 が軸索に存在するが、ミエリン形成によってランビエ絞輪ができる頃に Nav1.2 から Nav1.6 へとサブタイプの変換がおこる。しかし、その変換の機構に関してはまだ不明である。PJ 形成不全マウスではこの変換が不完全であることから、PJ 形成がサブタイプ変換に対して何らかの影響を与えていると考えられる。そこで、Nav1.6 の軸索への輸送や局在化の機構を明らかにする目的で、マウス Nav1.6 の cDNA 全長を RT-PCR でクローニングした。現在発現ベクターを構築中である。

3) スルファチド欠損に伴う末梢神経系ランビエ絞輪の変化の解析

スルファチド欠損マウス末梢神経系におけるランビエ絞輪部の変化を調べた。免疫組織染色では大きな変化を認めなかったが、電子顕微鏡を用いた解析では、微絨毛および絞輪軸索部分の明らかな形態変化を認めた。スルファチド欠損あるいはそれに伴うミエリン異常とこの絞輪軸索の異常との関係を現在解析中である。

5. 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, 朴啓彰, 豊永晋一, 八幡俊男, 土屋孝弘, 政平訓貴, 中居永一 (高知大学医学部)
栗山茂樹, 峠哲男, 出口章広 (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)

悪性グリオーマは、放射線療法、化学療法および免疫療法の著しい開発をもってしても、ここ数十年來、治療成績の大きな向上が得られていない難治性悪性腫瘍である。その原因には、この腫瘍の高い浸潤能、各種療法に対する耐性能の獲得が挙げられる。それ故、この腫瘍を根治するためには、既存の治療法とは質の異なる革新的な新規治療法の開発が必要とされるのは明白である。

我々は、現在までに、この疾患に対するレトロウイルスベクターをもちいた自殺遺伝子療法を開発してきた。パッケージング細胞の遺伝的改変と遠心濃縮により $1 \times 10^{11-12}$ pfu/ml の高力価ウイルス溶液の調製を可能とした。さらに、自殺遺伝子 HSVtk の発現制御にミエリン塩基性蛋白遺伝子のプロモーターを導入し、脳特異的高力価レトロウイルスベクターを構築した。これを用いた

遺伝子治療にて、ガンシクロビル投与プロトコールの最適化をおこない、マウスグリオーマモデルを完治せしめた。

脳特異的高力価レトロウイルスベクターを臨床応用するために霊長類 (コモン・マーモセット) を用いた毒性・発ガン性試験を開始した。患者に一回あたり投与する予定量の 1×10^{11} pfu のレトロウイルスをコモン・マーモセットの脳実質に投与し、経過観察をおこなった。3ヶ月後の血液検査、8ヶ月後の MRI による撮像、血液検査及び解剖において異常所見は観察されなかった。各組織からのウイルスゲノムの検出を PCR 法にて DNA, RNA レベル共に実施した結果、残存ウイルスは検出されなかった。さらに、レトロウイルスベクターをもちいる際に問題となる RCR (Replication Competent Retroviruses) の有無の

試験をFDA（米国食料医薬品局）の検査基準でおこなえる外部機関に委託した結果、RCRの混入は陰性である証明を得た。今後は、安全性試験の検体数を増やし、臨床試験の準備に着手する予定である。

現在、我々は脳特異的高力価レトロウイルスベクターの前臨床段階試験に加え、安全性を考慮した治療用ベク

ターを構築中である。これらの開発により、悪性脳腫瘍に限局せず、他組織由来の悪性腫瘍、他の疾患に有用な安全で効果の期待できるウイルスベクターを提供すると共に悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療法の確立を目指している。

6. シナプス可塑性・安定性の2光子励起解析

河西春郎（生理研）

阿部輝雄（新潟大学脳研究所）

白尾智明（群馬大学医学部）

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化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、2光子活性化が可能なGFP (PAGFP) をアクチンに融合させたPAGFP-actinを用いて、単一スパインのアクチン構築を調べる手法を開発した。これにより、スパインのアクチン繊維が二つのプールに分かれて存在すること、アクチン繊維の安定性が大きなスパインの方が大きいことなどが明らかとなってきた。

7. 虚血性神経細胞死と容積調節チャネルの機能連関

塩田清二（昭和大学医学部・第一解剖学）

大滝博和（昭和大学医学部・第二解剖学）

土肥謙二（昭和大学医学部・救急医学科）

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性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、これまでに本共同研究により前脳虚血再灌流モデルにより誘導される虚血性神経細胞死誘導時の海馬CA1領域の神経細胞にも細胞容積の破綻によるアポトーシス性神経細胞死が認められることを明らかにした。本年度は脳虚血神経

細胞死に対しアニオンチャネルブロッカーが抑制作用を有するかどうかを機能形態学的に明らかにした。

前脳虚血モデルは、両総頸動脈を12分間血管クリップにより閉塞し、その除去により血流の再灌流をする両総頸動脈閉塞再灌流モデルを用いた(Matsunaga et al. 2003 Neurosci Res)。脳虚血直前(静脈内)および脳虚血後1, 2, 3日(腹腔内)にアニオンチャネルブロッカーであるDIDS およびプロテインチロシンキナーゼ阻害薬であるgenistein および vehicle を投与し、脳虚血後の神経細胞死を比較した。

脳虚血後4日目における神経細胞死をトルイジンブルー

(正常細胞の計測)とFluoro-Jade B染色(死細胞の計測)により比較したところ、DIDSとgenisteinの投与群はトルイジンブルーによる形態学的正常な細胞数の低下、およびFluoro-Jade B染色による死細胞の増加を抑制した。この結果はアニオンチャンネルブロッカーが神経細胞死抑制作用を示すことを示唆した。さらに、脳虚血後の海馬

を細胞分画し、ミトコンドリア画分と細胞質画分におけるチトクロームcの発現をイムノブロット法で調べたところ、DIDSおよびgenistein投与群はチトクロームcの細胞質画分における出現が抑制されており、本細胞死の抑制がアポトーシス性神経細胞死の抑制に起因している可能性を示唆した。

8. 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

本研究は、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である。本年度はその第二段階として、虚血のモデルとしての低浸透圧条件下における心房筋の電気的活動の変化を調べる実験をおこなった。

実験にはラットから摘出した右心房標本を平面的に展開した標本を用いた。この標本をメロシアン・ローダニン系膜電位感受性色素NK2761で染色し、光学顕微鏡のステージにマウントした。強化・安定化した光源から波長700nmの準単色光を標本に照射し、対物鏡と写真用接眼鏡により作られた実像面に16×16素子のフォトダイオードアレイを置き、膜電位変化を標本の最大256ヶ所から光学的に同時記録をおこなった。筋収縮にともなう光学的アーチファクトを抑制するため、筋収縮抑制剤としてサイトカラシンD(40μm)を作用させ、室温で測定をおこなった。

ラット心房標本をリンゲル液のNa⁺濃度を半分にした低張液中に置くと、図1Aに示すように光学的に測定された活動電位(optical action potential)の振幅が徐々に小さくなった。その時間経過はゆっくりしており、約50-60分後にほぼ30%減少して一定値となった。しかしながら、図1Bに示すように、興奮伝導速度を示す離れたpixel間の活動電位の立ち上がりのタイミングの遅れ(delay)には大きな変化は見られなかった。

ここで見られた現象の発現の機序はまだ不明であるが、活動電位の振幅の低下はゆっくりとした時間経過で発生しており、活動電位の立ち上がり相のNa-spikeへの影響とは異なる機序が示唆される。また、低張ストレスに際しては細胞内Ca²⁺の動員が知られているが、細胞内Ca²⁺に感受性をもつgap junctionのconductanceの影響を受けるとされる興奮伝導速度が大きな変化を示さない点も興味深い結果といえる。今後さらに実験を加えてその実体を追跡する必要がある。

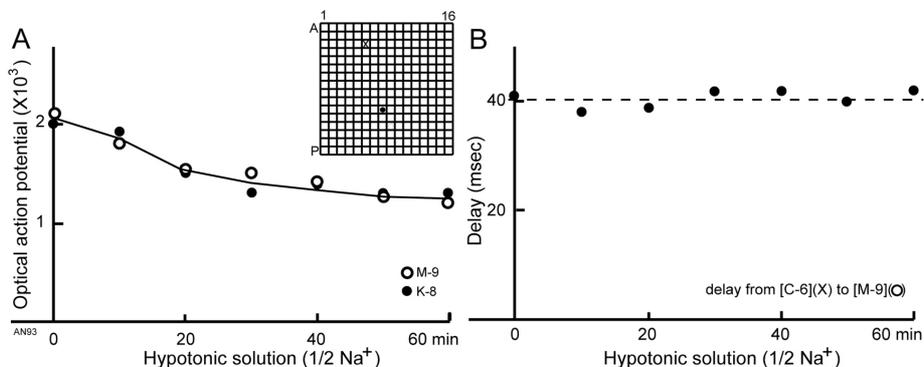


図1 ラット摘出心房でみられた低張液の作用。A. 光学的に測定された活動電位の振幅の時間経過。二つのpixelから得られたデータを示す。B. 興奮伝導時間の時間経過。縦軸は6.45 mm離れたpixel間の興奮伝導時間を示す。Aの右上にphotodiode array上のpixelの位置を示す。

9. 小脳における細胞分子モーターミオシン Va の働きの解明

高岸 芳子 (名古屋大学・環境医学研究所), 宮田 麻理子

ミオシン Va は神経細胞に多く発現し、アクチンフィラメントに沿ってオルガネラを輸送するモーター蛋白である。自然発症 mutant マウスである dilute-neurological mouse (dn/dn) はミオシン Va 蛋白の tail 部分の 14 アミノ酸が欠損しているマウスであり、このマウスは生後直後から 1 か月程度まで、極めて激しい運動失調、小脳失調と強直性痙攣発作を示すが、それ以降は、これらの症状が劇的に回復する特徴をもっている。我々は、これらの表現型の分子基盤、シナプス基盤を明らかにする目的で、小脳プルキンエ細胞に着目し、解剖学的、電気生理学的、行動学的解析を行った。基本的なシナプス伝達特性に異常はなかったが、生後 1 か月以内では小脳学習の一種である瞬目反射学習が獲得不能であり、またその分子基盤

とされる小脳長期抑圧現象 (LTD) も欠損していた。症状が回復した生後 2 か月のマウスでは上記小脳学習と LTD はともに回復していた。解剖学的には、小脳プルキンエ細胞のスパインの粗面小胞体 (ER) は生後 1 ヶ月まではスパイン内に入っておらず、樹状突起に留まるが、生後 1 か月以降になると、野生体と同様にスパイン内に存在することが明らかになった。小脳 LTD の誘発にはプルキンエ細胞スパイン内の ER からの細胞内カルシウム放出が必要とされており、本結果は、スパイン内に ER が回復することによって、LTD、小脳学習が回復すると考えられた。今後、ER の動態とミオシン Va の機能関連について更なる研究が必要である。

10. mGluR1 レスキューマウスの電気生理学的解析

饗場 篤 (神戸大学・大学院医学系研究科), 宮田 麻理子

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) のうち、mGluR1 は mGluR5 と共にグループ I を形成し、三量体 G 蛋白質 Gq と共役シプロテインキナーゼ C (PKC) 活性や細胞内カルシウム濃度を調節している。本研究では、mGluR1 サブタイプのうち、mGluR1a が持つ長い細胞内 C 末端ドメインを欠く mGluR1b サブタイプのみを発現するマウス小脳皮質でのシナプス伝達、シナプス可塑性等を測定

した。結果、通常のシナプス伝達には異常がなかったが、小脳長期抑圧現象 (LTD) は mGluR1a レスキューマウスでは回復するものの、mGluR1b レスキューマウスでは欠損しており、C 末端ドメイン-homer 蛋白以下のシグナルが LTD には必須であることが明らかになった。今後、脳の他の部位についても解析を進める予定である。

11. 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。その際、特に経シナプス的に情報がどのように伝達されるのかに注目することが重要であるが、従来の方

法では捉えることができなかった。狂犬病ウイルスがシナプスを超えて逆行性に感染することを利用して、これをトレーサーとして用い、大脳皮質間での線維連絡の解析を行った。なお、ウイルスの注入は東京都神経科学総

合研究所の感染実験室で行った。

一次運動野上肢領域に狂犬病ウイルスを注入し、経時的に観察した。注入後2日では高次運動野の尾側部、視床運動核などがラベルされた。3日目では、高次運動野の吻側部や弓状溝前方の8野などに広がった。また、淡蒼球内節や小脳核にもラベルが見つかった。4日目では、前頭前野全域、被殻、小脳皮質までラベルが広がった。ま

た、一次運動野上肢領域と下肢領域に狂犬病ウイルスを注入し、それぞれに投射する領域を調べたところ、上肢領域注入例では46野腹側部を中心に前頭前野に多くラベルが見られたが、下肢領域注入例ではあまり観察できなかった。これは、46野腹側部が上肢運動の制御に重要な役割を果たすことを示唆している。

12. 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, 中隣克己 (近畿大学医学部)

森 大志 (山口大学農学部)

南部 篤

脊椎動物の歩行運動において、姿勢および四肢のリズム運動を制御する基本的な神経機構は脳幹・脊髄に分散的に配置される。一方ヒトが歩行の速度を増加させる場合には、遊脚相時間を一定に保つ傍ら着地相時間を短縮させ、結果として歩行周期頻度を増加させる。このような速度増加に対する歩行パラメータの対応関係は、イヌやネコ或いはサルといった四足動物においても同様に認められる。これらのことは二足歩行制御において、四足動物と相同な脳幹・脊髄の基本的神経機構がヒトにおいても存在することを推察させる。

流れベルト上で二足歩行するサルは、歩行速度の増加に対して歩行パラメータをヒトと同様に変化させる。一方、大脳皮質運動領野は主として脳幹・脊髄に出力する。本課題では二足歩行制御および四足歩行制御との間における共通の神経基盤の存在を検証することを目的とした。そのために流れベルト上で四足歩行および二足歩行を交互に遂行することを学習したサルの一次運動野・下肢領域から神経細胞活動を導出記録して、四足歩行時における活動様式を二足歩行時のものと比較した。

四足歩行において、一次運動野・下肢領域から記録さ

れた神経細胞の殆んどは、歩行周期に伴って相動的にこれらの活動を修飾した。相動性に活動した神経細胞は1~2峰性の修飾様式を示した。これらの修飾活動は主に歩行周期における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。四足歩行において相動性の活動様式を示した神経細胞の殆んどは、二足歩行においても同様に相動性の活動様式を示した。歩行周期中における発射頻度のピークの時期は、四足歩行時のものとほぼ一致した。二足歩行時における平均発射頻度ならびに一歩行周期中における発射頻度のピーク値は、四足歩行時のそれらに比べて有意に高値を示した。四足歩行時或いは二足歩行時において選択的に活動する神経細胞も少数ながら記録された。

以上の結果は四足歩行時および二足歩行時において、歩行周期に同期した一次運動野からの出力を受ける共通の皮質下神経機構の存在を示唆しており、サルの一次運動野が、それらの皮質下神経機構に対する四足歩行時の出力様式を修飾し、さらには新たな皮質からの出力を動員することによって二足歩行運動を発動・制御することを示唆する。

13. 凍結切断レプリカ多重標識法によるセプチン細胞骨格および 関連分子の細胞膜直下における高分解能局在解析

木下 専 (京都大学大学院医学研究科)

萩原 明 (京都大学大学院医学研究科)

重本 隆一 (生理学研究所)

セプチンは酵母からヒトまで保存された重合性 GTP 結合蛋白質であり、細胞膜の裏打ちに集積してスカフォールドを形成する。出芽酵母のセプチンは分裂溝の細胞膜直下で環状構造体(セプチンリング)を形成し、これが分裂関連蛋白質の足場として、あるいは膜蛋白質などの拡散障壁として、細胞分裂に必須であることが確立している。一方、多細胞動物のセプチンは分裂後のニューロンやグリアにも多く発現しているが、その機能は不明である。我々は、ニューロンやグリアの形態形成やシナプス関連蛋白質の局在におけるセプチンの重要性を検証するため、セプチン及びセプチンと生化学的ないし機能的に相互作用する蛋白質の局在をマウス脳切片や培養系を用いて解析している。セプチン複合体は密な高次集合体を形成するため、従来の免疫電子顕微鏡法では十分な検出ができない可能性もある。そこで本共同研究では、蛋白質が密に集積している場合でも高感度の検出能を有す

る凍結切断レプリカ免疫標識法を、小脳や海馬に適用して局在解析を試みた。

従来の免疫電子顕微鏡法を用いた研究で、セプチン Sept5 が GABA ニューロンの前シナプス末端に集積することを報告したが、凍結切断レプリカ免疫標識法では海馬のシナプス後肥厚部 (PSD) において PSD-95 と共在していることが今回新たにわかった。すなわち、セプチンの一部は PSD において神経伝達物質受容体などの後シナプス蛋白質のスカフォールドとして機能する可能性が示唆された。しかしながら、小脳では従来の免疫電子顕微鏡で観察されていたリング状のセプチン (Sept4) クラスタが、レプリカ標識では散在性のシグナルとして検出され、2 種類の方法で観察される局在様式に相関性が乏しかった。したがって、ニューロンやグリアにおけるセプチンの分布様式を明らかにしていくためには、さらなる検証が必要である。

14. 線条体投射神経終末の分布領域および分子局在の解析

横井峰人 (京都大学医学研究科・先端領域融合医学研究機構・分子神経遺伝学グループ)

佐野裕美 (京都大学医学研究科・先端領域融合医学研究機構・分子神経遺伝学グループ)

線条体投射神経細胞は、黒質、淡蒼球へ投射するのみならず、外側視床下部領域への投射が存在することが示唆されている。当研究では、線条体複合体(被殻-尾状核、側坐核、嗅結節)の投射神経細胞に選択的に GFP あるいは synaptophluorin を発現するトランスジェニックマウスを作成し、そのマウスを用いて線条体投射神経回路の投射領域を可視化することを試みた。その結果、線条体投射神経細胞は、外側視床下部領域においてある限られた領域へ投射することが明らかとなった。さらに、この投射領域の性質を各種化学マーカー、トレーサーにより解析をすすめている。

また、線条体投射神経細胞に極めて豊富に存在する phosphodiesterase PDE10A の抗体を作成し、免疫電顕にて細胞内局在を検討した。その結果、PDE10A は細胞質に広く分布するのではなく、また、膜組織上にはないものの、樹状突起棘内においてシナプス近傍に多く分布するという特徴ある細胞内局在を示した。このことは、PDE10A が、細胞内情報伝達の重要な担い手の一つである cAMP の樹状突起棘内におけるシナプス近傍からの拡散を防ぎ、cAMP の細胞内局所濃度勾配に寄与する可能性が示唆された。

15. 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)

我々は成獣マウス海馬シナプスの NMDA 受容体応答および NMDA 受容体サブユニットのシナプス分布を解析することにより、海馬神経回路は左右の海馬および錐体細胞の上下に関して非対称であることを発見した。本共同研究ではこの発見をさらに発展させ、脳の左右差の形成時期とこれに関与する遺伝子の解明。脳の左右差の行動学的意義の解明。および左右非対称な神経回路の形成に関与する細胞外シグナルの解明、を目的として総合

的な検討を行った。本年度は、内臓に左右の逆位を示す iv マウスの海馬を用いた解析を行い、その結果、iv マウスでは左右の非対称性が消失し、神経細胞の上下の非対称性だけが正常であることが明かになった。我々の結果は、内臓等の内胚葉由来の組織と、脳のような外胚葉由来の組織では、左右差の形成機構が異なっていることを示唆している。

16. 遺伝子改変動物を利用した大脳皮質抑制性ニューロンにおける神経活動の解明

柳川右千夫, 柿崎利和, 白尾智明, 齊藤康彦 (群馬大学・大学院医学系研究科)

川口泰雄, 平林真澄 (生理学研究所)

大脳皮質におけるリズム的な神経活動、神経が同期して活動する現象、シナプス可塑性の形成には、抑制性ニューロンが行う神経情報処理が重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、抑制性ニューロンは、多様な形態をもち、*in vitro* および *in vivo* で正確に同定することは困難である。そこで、抑制性ニューロンを蛍光分子で標識したトランスジェニックラットを作成し、解析を行った。抑制性ニューロンに特異的に発現する小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) 遺伝子に蛍光蛋白分子をコードする Venus 遺伝子を挿入したコンストラクト (VGAT-Venus) を作成した。このコンストラクトをラット受精卵に導入することにより、トランスジェニックラット (VGAT-Venus ラット) を作成した。2 系統の VGAT-Venus ラットを繁殖させ、解析に用いた。VGAT-Venus ラット大脳皮質 GABA ニューロン全体に対する Venus 発現細胞の割合について、Venus の蛍光と抗 GABA 抗体による 2 重染色を用いて検討した。その結果、2 系統ともに殆どすべての GABA ニューロンで Venus 分

子の発現を観察した。また、大脳皮質の Venus 陽性細胞からホールセル記録を行った結果、GABA ニューロンに特徴的な fast-spiking 等の発火パターンを観察した。以上の結果は、大脳皮質の GABA ニューロンの組織学的解析や電気生理学的解析に VGAT-Venus ラットが有用であることを示唆する。また、Venus 遺伝子の代わりにカルシウムインディケーター遺伝子などを VGAT 遺伝子に挿入することで、抑制性ニューロンの機能解析用遺伝子改変動物の作成が可能となった。

大脳皮質抑制性ニューロンの形態学および電気生理学的特性を理解するには、他の領域における抑制性ニューロンに関する知見が重要である。そこで、VGAT-Venus ラット前庭神経核と舌下神経前位核に存在する抑制性ニューロンの組織学的解析を行った。また、抑制性ニューロンを EGFP で標識した GAD67-GFP マウスを利用して、扁桃体抑制性ニューロンへのドーパミンの作用など、様々な抑制性ニューロンの機能や形態について明らかにした。

17. 大脳皮質における介在ニューロンと錐体細胞の神経結合解析

根東 覚（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・細胞生物学分野）

川口泰雄（生理学研究所）

藤田一郎（大阪大学大学院・生命機能研究科）

狩野方伸（金沢大学・大学院医学系研究科）

前頭皮質は大脳基底核の入力部である線条体に強い出力繊維を送り、線条体の神経回路の活動を調節している。たとえば、線条体の GABA 作動性投射細胞は特徴的な 2 層性の膜電位遷移状態をとることが知られているが、このリズムは皮質の細胞の律動的活動と関係していることが分かってきている。一方皮質—線条体路をつかさどる細胞は、大脳皮質の主に第 5 層にある錐体細胞であることが既に知られているが、皮質内の回路に於いてその律動的な活動がどのように調節されているかはまだ未解明である。その機構の一つとして錐体細胞間に形成される反回性の興奮回路が考えられるが、それだけでは説明がつけられない。皮質内回路には興奮性の投射細胞以外に多種の介在性 GABA 細胞が存在し、回路の興奮性を微妙に調節している。今回私は、これらの介在細胞の中で、特に錐体細胞の発火の調節に重要と考えられる高頻度発火型介在神経細胞（FS 細胞）と線条体投射錐体細胞の神経結合を、ラット脳から調整した急性スライス標本を用いて逆行性標識と 2 細胞同時記録を行うことにより電気生理学と形態学的な解析から調べた。錐体細胞の細胞体からパッチクランプ法を用いて膜電位固定によりシナプ

ス電流を計測すると、その振幅の大きさから結合の強さにはペア間にばらつきがあることが分かった。また、シナプス前細胞の連続的な 2 回の発火に対してシナプス電流の大きさはいずれも 1 回目に対して 2 回目は減弱を示し、その比率はほぼ一定していた。

記録を行った細胞を細胞内染色法により可視化して 3 次元再構築を行うと、FS 細胞は、細胞体へのシナプス結合比率から所謂バスケット細胞と考えられたが、シナプス結合部位は錐体細胞の細胞体周辺だけでなく、比較的遠位の樹状突起にもあることが分かった。ただ、樹状突起上への結合は主として基底樹状突起に見られ、尖頭樹状突起には少なかった。シナプス電流の振幅とシナプス結合の細胞体からの距離について調べてみると、結合の数とは相関が見られなかったが、最も近い距離とは正の相関が見られた。FS 細胞の軸索と錐体細胞の樹状突起の近接点を調べ、シナプス結合部位との関係を調べると近接点のうち 10%程度においてシナプスが形成されており、近接点の分布とシナプス結合の分布にほとんどのペアにおいて優位な相関関係が見られた。

18. 人での立体視機能、並列情報処理過程の解明

宇賀 貴紀（順天堂大学医学部）

神作 憲司（生理学研究所大脳皮質機能研究系）

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。サル大脳皮質視覚野では、背側経路（空間視経路）で絶対視差（1 つの物体の注視点に対する両眼視差）の情報処理が、腹側経路（物体視経路）で相対視差（2 つの物体の絶対視差の差）の情報処理が行われていると考えられている。本研究では、これらサルでの知見を基に、人でも絶対視差・相対視差情報の並列処理が行われている

のか、それぞれの情報処理がどの脳部位で行われているのかを検証する。

本研究では、絶対視差・相対視差それぞれを弁別中に、脳内磁気刺激を用いて特定部位の脳活動を一時的に休ませ、絶対視差・相対視差に特異的な情報処理過程の欠落が見られるか検討する。絶対視差検出課題では、被験者は 1 つの物体が注視点の手前にあるのか、奥にあるのかを答える。相対視差検出課題では、被験者は 2 つの物

体のどちらが手前にあり、どちらが奥にあるのか、その相対関係を答える。被験者がこれらの課題を遂行中に、大脳皮質 MT 野を磁気刺激する。サルの MT 野は絶対視差のみを処理していることがわかっている。もし人でも

同様であれば、絶対視差の検出は障害されるが、相対視差の検出は障害されないと予想される。現在プログラムの作成中であり、まだデータを取得していない。今後は予備実験を施行後、本実験に移る予定である。

19. 運動発現に關与する脊髄内神経回路の解析

大木紫 (杏林大学医学部統合生理学教室), 小川潤 (杏林大学医学部整形外科学教室)
伊佐正, 西村幸男 (自然科学研究機構生理学研究所・科学技術振興機構研究員 (生理学研究所))

脳からの運動指令を運動ニューロンに伝える皮質脊髄路は、従来運動ニューロンに単シナプス性結合する直接的経路のみが重要視されてきた。しかし近年、脊髄内中継ニューロンを介する間接的経路が同等以上に機能することが明らかになった。特に脊髄で直接的経路が障害を受けた場合、間接的経路を用いて機能回復が起こる可能性が示唆されている。本研究では間接的経路の神経回路の性質について、麻酔下のサルにおいて電気生理学的手法を用いて解析を進めた。

行ったのは、ネコで間接的経路の中継ニューロンとして知られる、第 3-4 頸髄の脊髄固有ニューロン (PN) からの直接記録である。麻酔下サルの第 3-4 頸髄に記録電極を刺入し、177 個の脊髄介在ニューロンの細胞内、または細胞外の電位変化を記録した。記録中に皮質脊髄路を刺激して入力を観察、さらに下部頸髄を電気刺激して運動ニューロンへの投射の有無を確認した。細胞外記録した介在ニューロンのうち、皮質脊髄路の 3 連発刺激により活動する細胞は 21%しか存在しなかったが、ストリキニンで抑制性入力を遮断するとほとんどの細胞 (83%) で活動が観察されるようになった。運動ニューロンへ投射する PN ではストリキニン投与により初めて活動が確

認できるものが多く、投与前の細胞内記録により単シナプス性興奮性入力と直後に 2 シナプス性抑制性入力が発達することが確認された。次に PN の運動ニューロン以外への投射を見るため、延髄の外側網様核の電気刺激を行った。ネコの PN はほとんど (84%) が外側網様核にも投射することが知られているが、サルの PN では 30% の細胞しか投射が確認されなかった。

今回、皮質から運動ニューロンへの入力を中継する脊髄ニューロンが、霊長類では始めて直接的に確認された。直接的皮質脊髄路入力が発達した霊長類ではこの経路が退化したという報告が以前なされたが、これは抑制性入力が興奮性入力を打ち消していること、外側網様核への投射細胞が霊長類では少ないことを考慮しなかったためと考えられた。ストリキニンを投与しない麻酔下の動物では、PN を介した間接的経路はほとんど活動しない。しかし覚醒運動時の動物では活動する可能性もあり、確認する必要がある。また直接的経路障害時には PN を介した間接経路が活性化されることを我々がすでに報告しており、この経路の機能回復への関与も更に検討する必要がある。

20. マカクザルの中樞神経系の損傷からの運動機能回復に関する組織学的研究

大石高生 (京都大学霊長類研究所), 肥後範行, 村田弓 (産業技術総合研究所)
伊佐正 (自然科学研究機構生理学研究所)

ヒトをはじめとする霊長類は指を独立に動かすことにより、物体の操作などの器用な運動を行うことができる。

系統発生的に見て霊長類で非常に発達している皮質脊髄路がその神経基盤の一つである。Kuypers らの古典的な

研究では、皮質脊髓路を延髄レベルで切断すると指の器用な運動が永久に消滅した (Lawrence and Kuypers, 1968)。しかし、延髄での切断は他の運動経路の破壊も含むものであり、頸髄レベル (C4/5) で皮質脊髓路を切断すると、運動機能が回復することが近年の伊佐らによって示された (Sasaki et al., 2004)。われわれは神経回路の構造的変化による代償が運動機能回復の基盤になっているという仮説を検討するため、構造変化のマーカー分子の一つである GAP-43 の遺伝子発現とタンパク発現を皮質脊髓路損傷ザルで組織学的に検討した。

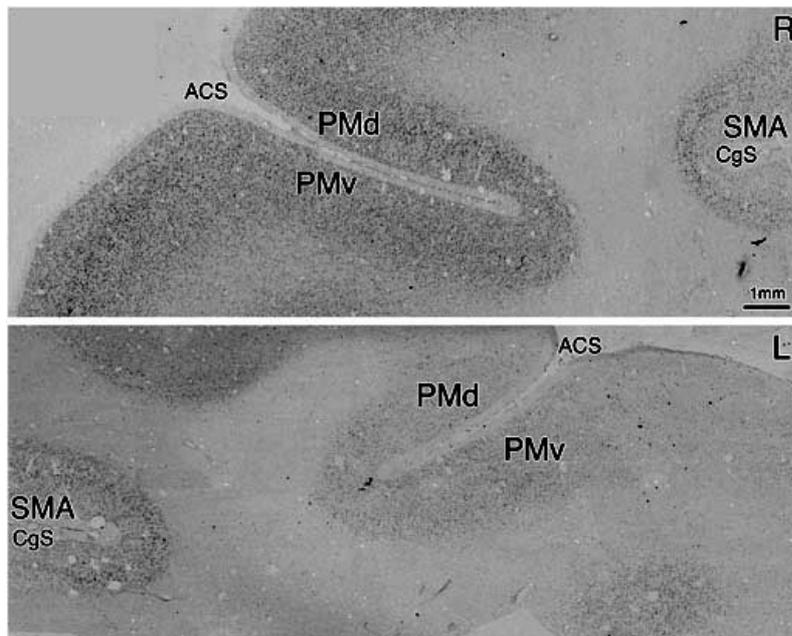
解析に用いたのは頸髄レベルで皮質脊髓路を切断した後、訓練により精密把握ができるように回復した二頭のニホンザルで、一頭は運動機能が回復して 3.5 ヶ月経った (損傷後 4 ヶ月) 個体 (C)、もう一頭は運動機能が回復して 1 ヶ月経った (損傷後 3 ヶ月) 個体 (G) であった。

大脳皮質運動関連領野で GAP-43 に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、個体 G では皮質脊髓路切断部と反対側の一次運動野の上肢領域、運動前野

腹側部、背側部で同側に対して GAP-43 遺伝子の発現が上昇していた。発現上昇は深層でも浅層でも起こっていた。補足運動野では発現上昇は見られなかった。運動機能回復後時間が経った個体 C ではいずれの運動関連領野でも切断部の反対側同側を問わず遺伝子発現の上昇が見られなかった。

脊髓で GAP-43 に対する免疫組織化学を行ったところ、個体 G では、損傷部位に近い髄節の外側皮質脊髓路、側索の前角近傍部、脊髓小脳路で、破壊側の方が反対側よりも GAP-43 を強く発現する構造が多く見られた。個体 C でも同様の傾向が見られた。

これらのことから、頸髄レベルの皮質脊髓路切断後の運動機能回復時には、少なくとも大脳皮質の複数の運動関連領野および脊髓で軸索伸長等の神経回路の構造変化が起こっていること、大脳皮質での変化は運動機能回復が完成して一定時間が経過すると停止することが推測される。



21. 上肢到達運動制御の遂行、学習に脚橋被蓋核が果たす役割の解析

小林康 (大阪大学大学院生命機能研究科)

伊佐正 (自然科学研究機構生理学研究所)

【研究計画】 中脳脚橋被蓋核 (PPTN) は脳幹のもっとも

大きなアセチルコリン性細胞の核であり、古くから睡眠

覚醒の調節, 運動制御, 注意や学習と関係が深いと考えられてきた。PPTN は眼球運動中枢や脳幹や脊髄の運動中枢に投射しており, 上行性には報酬に基づく学習(強化学習)に関係していると考えられている大脳基底核の黒質緻密部に強力に投射しており, さらに, PPTN が運動制御, 強化学習や動機付けと関係していることを示す破壊実験や生理実験が多く示されてきた。さらに, PPTN が外側膝状体, 青斑核, 縫線核と結合しているということを考えあわせると, PPTN を中心とした神経回路で注意のシステム, 動機付け, 運動系, 報酬系が密接に関係していると思われる。最近申請者はサルを用いた行動生理実験で PPTN がサッカード制御(運動準備, 運動実行, 誤差信号), 報酬情報の処理, さらに報酬量制御による動機付けの度合いの調節と関係していることを明らかにしている (Kobayashi et al, 2002, 2004)。本研究では, 腕の到達運動やサッカードの制御, 学習に脚橋被蓋核が果たす役割を解析することを目的とした。ところで, 中脳黒質, 腹側被蓋野ドーパミン細胞 (DAcell) は報酬で条件付けされた cue や報酬に対して phasic なバースト応答をすることによって大脳基底核などに報酬予測誤差を送り, 強化学習におけるシナプス可塑性を制御していると考えられている。DAcell において報酬予測誤差がどうやって計算されるかということは強化学習機構を解明する上で最も重要な問題の一つであると考えられている。PPTN は DAcell に強力に投射していることから PPTN からの興奮性入力, DAcell における報酬予測誤差信号の生成に重要な役割を果たしていることが示唆される。本研究でその問題にもアプローチした。

【研究結果】 ところで, 特に報酬に基づく強化学習においては脳皮質や大脳基底核等では学習される行動に特化したニューロン活動が表現され, むしろ中脳ドーパミン細胞 (DAcell) や PPTN では行う行動には無関係に報酬の価値が表現されている可能性がある。行う行動と無関係な報酬価値のみに関係するニューロン活動を記録するため, 頭部に固定具を装着した覚醒ニホンザルをモンキーチェアに座らせ, 頭部を固定し, コンピューターディスプレイ上に表示された光点の指示に従ってモンキーチェアに設置したボタン押し(上肢による)とサッカード

運動(眼球運動)を行わせた。上肢運動, 眼球運動といった異なる運動の学習に関係するニューロン活動を記録する前に本研究ではまず, サルに手がかり刺激で報酬量を予測させるような視覚誘導性サッカードを行わせ, その時の PPTN のニューロン活動を記録した。報酬予測サッカード課題中のサル PPTN ニューロンの活動を記録すると, 報酬予測の度合いによって大きさが変わる cue 呈示から短潜時で起きる持続的応答と, 報酬前から起こる持続的活動の減少, 報酬予測の度合いに無関係に常に一定の大きさの報酬反応等の結果が得られた。以上の結果は PPTN ニューロンがサッカード運動にかかわらず報酬予測, 報酬に関係した活動を示すことを表している。また, PPTN からの興奮性入力, DAcell における報酬予測誤差信号の生成に重要な役割を果たしていることを示唆している。今後, サルが上肢によるボタン押しや上肢の到達運動とサッカード運動を行っているときにニューロン活動を記録する予定である。

【研究業績】

Y.Kobayashi, et al. REWARD-PREDICTING ACTIVITY OF PEDUNCULOPONTINE TEGMENTAL NUCLEUS NEURONS DURING VISUALLY GUIDED SACCADE TASKS Soc.for Neurosci.Abst.35 890.5, 2005

M.Watanabe, et al. INFLUENCE OF INSTRUCTION AND STIMULUS POSITION OF THE PREVIOUS TRIAL ON REACTION TIMES OF PROSACCADES AND ANTISACCADES IN HUMANS Soc.for Neurosci.Abst. 35 859.12, 2005

Yasushi Kobayashi, et al. Reward predicting activity of Pedunculopontine Tegmental nucleus neurons during visually guided saccade tasks Neurosci. Res Suppl.28 O3F-06

Kenichi Okada, et al. Visual and oculomotor functions of monkey pedunculopontine tegmental nucleus Neurosci. Res Suppl.28 P2-152

小林悠一 他 登上線維入力が小脳プルキンエ細胞の活動に与える影響 電子情報通信学会技術研究報告 NC2005-39 pp.13-19, 2005

22. 軸索傷害後の三叉神経運動細胞への GABA 作動性終末の再編成

林 弘之 (神奈川歯科大学)

鍋倉 淳一, 和気 弘明, 堀部 尚子 (生理学研究所)

成熟後の神経再生期には伝達物質受容体や細胞内環境などにおいて一旦幼若期の特徴が再出現する。そこで、抑制性神経回路が障害脳において未熟期の特徴を再獲得する可能性について検討するために、本共同研究を行った。具体的には、未熟期において、三叉神経運動核への GABA およびグリシン作動性終末が一旦余剰に輸入し、発達とともに次第に GABA・グリシン終末が減少していくことの本研究の共同研究者である林らの報告を受けて、三叉神経運動細胞の軸索傷害後の軸索再生期に、同核における GABA およびグリシン入力の変化を免疫染色および電気生理学的手法を用いて検討した。まず、三叉神経運動細胞の軸索の同定、および障害細胞自体の核内分布を調べるため、軸索傷害後、中枢側に親脂質性蛍光色素 (DiI) を投与し、数日後に、同運動核内における DiI 陽性細胞の分布を検討した。次に、同部位における

GABA/グリシン入力の障害後における変化を GAD およびグリシンに対する抗体を用いて検討した。また、終末自体の変化を synaptophysin 抗体を用いて検討した。軸索傷害、1 週間後で、三叉運動神経核外側部における GABA 染色性の強い部分が観察された。しかしながら、その他の部位では GABA およびグリシン染色性の著明な変化は観察されなかった。また、synaptophysin 抗体の染色性は、やや増加傾向にあるものの著明な変化は確認できなかった。

電気生理学的には傷害 1 週間後には GABA 応答とグリシン応答の比として観察すると、GABA 優位であり、その後ややグリシン優位に変化する可能性が示唆される結果が得られた。しかし、いずれも著明な変化として定量的に解析可能か今後更に検討する必要がある。

23. 海馬歯状回における神経新生に対するニューロトロフィン GABA の相互作用機構

島津 和弘 (国立長寿医療センター)

鍋倉 淳一, 溝口義人 (生理学研究所)

幼若期においては GABA によって脳の多くの部位では神経細胞成熟や神経回路成熟が調節されていることが近年、報告されている。GABA の応答は主な細胞内 Cl 濃度調節因子である KCC2 (神経特異的 Cl しみ出し分子) と NKCC1 (Cl しみ入れ分子) に機能発現により制御されている。幼若期には、KCC2 の機能的未発達に起因する細胞内高 Cl 濃度のため、GABA は脱分極作用を示し、細胞内 Ca 濃度上昇などを引き起こす。しかし、この KCC2 の発現調節に関しては殆どわかっていない。一方、海馬歯状回では成熟期においても神経細胞新生が起こる。また、同部位では GABA 陽性の顆粒細胞が一定割合で存在する。そこで、GABA 陽性細胞と新生未熟神経細胞、

KCC2 発現、およびこれらを制御するニューロトロフィンの関連の検討を試みた。BrdU 陽性新生細胞における GAD の有無、および KCC2 発現を検討した。BrdU 陽性細胞と GAD 陽性細胞は一定割合で一致したが、明確な関連については BrdU 染色法による GAD 染色性の脆弱化のため、今後の共染色技術の改良が必要である。また、培養海馬細胞において、BDNF が時間単位で KCC2 を脱リン酸化し、その後蛋白自体の発現を著明に低下させることが判明した。新生神経細胞に対する BDNF の GABA 発現および KCC2 に対する作用を調べるため、現在スライス培養法による検討を試みている。

24. GABA シグナリングにおける新規分子 PRIP の役割解明

平田雅人, 兼松隆 (九州大学)

鍋倉淳一, 溝口義人 (生理学研究所)

PRIP とは, 我々が発見し遺伝子クローニングを行った, 新しいイノシトール 1,4,5,-三リン酸結合性タンパク質である。この分子は, PLC- $\delta 1$ と高い相同性を有するが, PLC 酵素活性を持たない。そこで, PLC-related but catalytically inactive protein (PRIP) と名付けた。最近, *PRIP-1* KO マウスを解析して, この分子が抑制性神経伝達の一角をなす GABA のシグナル伝達に重要な分子であることを突き止めた。そこで, 自然科学研究機構生理学研究所 鍋倉研究室の協力を得て「GABA シグナリングにおける新規分子 PRIP の役割解明研究」を遂行している。

我々は, PRIP-DKO マウス (PRIP-1 & -2 ダブルノックアウトマウス) を作製し, その初代神経培養細胞を用いて, BDNF (脳由来神経栄養因子) 刺激で誘導される GABA トランスミッションの反応性の違いを, 野生型と比較検討した。すると, PRIP-DKO マウス初代神経培養細胞では, GABA 反応が野生型と全く逆になることを突き止めた。そこで, BDNF で誘導される GABA シグナリングのどの過程に PRIP 分子が関与するか, その分子基盤の解明を目指して実験を行った。その成果を以下に列挙する。

1, PRIP 分子は, プロテインホスファターゼ (PP1・PP2A) に結合して GABA_A 受容体の β サブユニットの脱

リン酸化過程を修飾する。

2, PRIP 分子が欠損して GABA_A 受容体 β サブユニットの脱リン酸化反応が阻害されると, 受容体のエンドサイトーシスが抑制された。

3, PRIP 分子は, GABA_A 受容体の β サブユニットに結合するが, その結合を阻害するペプチドを用いると, 野生型神経細胞においてみられた BDNF で誘導される GABA-induced Cl⁻ 電流の減弱効果を完全に阻害することが出来た。

以上から以下のことが明らかとなった。

PRIP 分子は, GABA_A 受容体の β サブユニットに結合しプロテインホスファターゼを受容体にリクルートすることで, 受容体の脱リン酸化過程を調節する。その結果, PRIP により脱リン酸化された受容体のエンドサイトーシスが促進される。

この成果を右論文に発表した。Kanematsu et. al., (2006) J. Biol. Chem., in press.

いくつかのグループが, GABA_A 受容体のエンドサイトーシス過程はクラスリン/AP2 複合体によって誘導されると報告している。現在我々は, クラスリン/AP2 複合体により誘導される受容体のエンドサイトーシスに PRIP 分子がどの様に関わるかをさらに詳しく検討している。

25. 随意運動発現を司る神経機構の研究

美馬達哉 (京都大学大学院医学研究科)

達本徹

ヒトの脳波活動と上肢の筋電図活動の間には相関が認められる。この相関関係は大脳皮質運動野から筋肉への運動制御過程を反映している可能性がある。しかし, 一次運動野が近隣の運動関連領野と関係しながら筋収縮をコントロールしていることは一見当然とも考えられるにもかかわらず, その神経機構は十分には解明されていない。我々は, 動物実験を行うことによってこの仕組みを

神経回路レベルで解明できる可能性があると考え, サルの大脳皮質フィールド電位と上肢筋電図活動の記録及び解析を行った。その結果, 筋電図活動と相関を示す大脳皮質の部位を特定することができた。さらに運動の実行中にこの相関関係がどのように変化するかを明らかにして, 運動制御の動的な神経機構を研究する予定である。

26. 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 (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・遺伝子改変動物作製室)

【クロミンククジラ精子の中心体由来する星状体の形成とチューブリン繊維網の成長について】

げっ歯類を除く多くの哺乳動物では、受精時に精子によって持ち込まれ中心体から星状体ができ、そこから発達したチューブリン繊維網が雌雄前核卵子の中央部に移動させる。平成 17 年度では、ヒト精子中心体の機能解析に利用されるウシ卵子への異種顕微授精系において、南極海産クロミンククジラ精子がもつ微小管形成中心としての能力を評価した。

方法は -20°C で保存しておいたクロミンククジラ精子およびウシ精子を融解し、5 mM dithiothreitol で 5~20 分間処理後、ウシ体外成熟卵子に顕微注入 (ICSI) した。ICSI 後 4~6 時間目に微小管安定化バッファーとメタノールで卵子を固定し、免疫蛍光染色によって α -チューブリンを、DAPI によって核を染色して精子星状体の形成率を

求めた。また、クジラ精子注入卵の一部は 7% エタノール (5 分) と 2 mM 6-DMAP (4 時間) の併用処理により活性化誘起し、ICSI 後 4 時間目に星状体形成率とチューブリン繊維網の対卵子径比を調べた。

クジラ精子から星状体が形成された卵子の割合は 33% (10/30) で、ウシ精子由来の星状体形成率 (33%, 11/33) と同等であった。星状体形成卵のうち注入精子により活性化が起こっていたのは 6 例 (18%) であったのに対し、クジラでは 2 例 (7%) のみであった。活性化処理を行った場合、精子星状体形成率の増加 (35%, 11/31, 対照区: 26%, 8/30) は僅かだったが、チューブリン繊維網のサイズは 0.30 から 0.57 に改善された。

以上の結果から、クジラ精子では中心体を起点として星状体が形成され、そこからのチューブリン繊維網の成長には卵細胞質環境が影響することが示唆された。

27. 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 (信州大学大学院・工学系研究科)

平林 真澄 (生理学研究所・遺伝子改変動物作製室)

マウスでは顕微操作に依存しない外来遺伝子導入法として遺伝子溶液を注入した精巣にエレクトロポレーションをかける「精巣経由の遺伝子導入法」が報告されている。本研究では新生仔雄ラットの精巣に EGFP 遺伝子を打ち込んでエレクトロポレーションをかけ、生殖幹細胞ゲノムに直接 EGFP 遺伝子を導入することを試みた。2~3 週齢の Wister 系雄ラットの精巣網から、先端内径 10~20 μm のガラスピペットを用いて外来遺伝子溶液 (濃度 1 mg/ml, 5.5 kb pCX-EGFP プラスミドを *Sa*I で直鎖化し、0.04% トリパンブルー加 TE バッファーに溶解したもの) を注入した。そして精巣を接触部直径 5 mm のピンセット型電極で挟み、スクエア波形が出力できるエレクトロポレーターによって静電パルス (35~50 V, 50 msec, X 方向と Y 方向 各 4 回) を与えた。6 週間後に精巣を摘出して蛍光実体顕微鏡下で観察したところ、EGFP タンパ

ク質の長期発現部位のほとんどは精細管の基底膜付近で認められ、その細胞群の形態から体細胞系の細胞へ入ってしまったものと推測された。またそれらとは違う細胞群で蛍光を発した精細管も観察されたが、その割合は極めて少なかった。蛍光が認められた精細管から調製した精細胞 1,526 個のうち円形精子細胞で 4 個 (0.3%)、伸張精子細胞で 10 個 (0.7%) に EGFP 蛍光が認められた。これらには EGFP 遺伝子が導入されていたと示唆され、たぶんその起源となる精原細胞のゲノム上にも EGFP 遺伝子が乗っていたものと思われる。しかしこれらの蛍光精子細胞を顕微授精し、胚移植してみたが、産仔を得るには至らなかった。今後、この方法による外来遺伝子導入効率の改善に向け、エレクトロポレーション条件の見直しを図る。

28. 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, 中沢綾美, 谷口孝喜, 厚沢季美江 (藤田保健衛生大学・医学部)
金子康子, 仲本準 (埼玉大学・理学部)
小柳 義夫 (京都大学・ウイルス研究所)
前島一博 (理化学研究所)
登阪雅聡 (京都大学・化学研究所)
Rasmus Schroeder (マックスプランク研究所)
永山國昭 (岡崎統合バイオ)

高コントラストを特徴とする 2 つの電子顕微鏡法, ゼルニケ位相差法と微分干渉法 (ヒルバート微分法) を用いて応用研究を行った。高加速の 300kV 電顕を用いた位相差法では, 氷包埋を行った細胞や組織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。同様の観察はウイルスや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)。また, 対象物を染色剤や蛍光剤で組織化学的に標識して, 同一細胞を光学顕微鏡と位相差電子顕微鏡で観察する方法を試み, アクチンフィラメント, 微小管の光顕-電顕相関イメージを得た。

29. 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 (大阪府立大学・総合科学)
永山國昭, 片岡正典 (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が, 染色体構築と遺伝子機能制御におよぼす効果を明らかにすることを目的として, 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。

海水魚キチヌ *Acanthopagrus latus* ゲノムに存在する 30bp を単位鎖長とするミニサテライト配列 AL79 は, 近縁種のマダイ *Pagrus major* には存在せず, その一方で, キチヌゲノム内には多数散在していることがわかっている。すなわち, すくなくとも, これらの種が分岐後に AL79 配列が生成し, その後の進化的に短い時間内にキチヌゲノム内で分布を広げたことを示唆する。このような現象をもたらす DNA の特徴を明らかにするために, 生化学的構造解析とともに, 電子顕微鏡による構造解析を行った。AL79 領域を含む組換えプラスミド DNA pAL79 と, それを持たないプラスミド pUC19 を, 大腸菌 JM107 株を用いて調製し, その構造を比較した。電子顕微鏡観察

の結果, 負に超らせん化した pAL79 DNA においては, 複数の分子が集合した構造を示すものが観察されたが, pUC19 DNA においては, そのような凝集構造は見られなかった。クロロキンをを用いた二次元電気泳動の結果から, pAL79 における DNA-DNA 相互作用は, 負の超らせんの解消にともなって消失 (凝集構造の解離) することが示された。その結果, ミニサテライト DNA 領域においては, 負の超らせん環境下で DNA-DNA 相互作用を提供する何らかの高次構造形成が予測された。この構造の詳細を明らかにするために, DNA の塩基特異的修飾実験や, より高分解能の電子顕微鏡観察を進めている。

また, 我々はこれまでに, 分子内三重鎖構造等の DNA 特殊高次構造を, 単離した DNA 分子を用いて, 電子顕微鏡により可視化しているが, これらの特殊高次構造の存在を細胞核内クロマチン構造上で検出することについて, 種々の予備的実験を行っている。

30. 自律神経系中枢のMRIによる研究

瀬尾芳輝, 若松永憲 (獨協医科大学 医学部)

鷹股 亮 (奈良女子大学 生活環境学部)

荻野孝史 (国立精神・神経センター 神経研究所)

森田啓之 (岐阜大学 大学院医学研究科)

吉本寛司 (京都府立医科大学 大学院医学研究科)

村上政隆 (生理学研究所)

我々は、脳機能画像法 (fMRI) により、自律神経中枢の神経活動を空間的・経時的に測定し解析する事を目標として実験を行っている。2005年度は、高張のNaCl溶液を投与 (高浸透圧負荷) し、その結果引き起こされる視床・視床下部・延髄における体液や循環などの自律神経機能中枢の反応を経時的に追った。側脳室内に高張のNaCl溶液を投与すると、SFO, OVLT, LHA 領域に急速な反応が見られ、3分間遅れてPVNやSONに神経活動の増加に伴う反応が検出された。同条件下に腎交感神経活動を測定すると100秒程度で増加する速い神経活動の増加と9分程度必要とするゆっくりした神経活動の増加が見られた。この結果から、SFOやOVLT等の脳室周囲器官は、脳脊髄液の浸透圧増加を即座に検知しPVNやSONに伝達する(速い反応)と共に、おそらくPVNやSON自身も脳室から緩やかに伝わってきた高浸透圧を検知する(遅い反応)ものと考えられる。

さらに細かい神経活動を追うには、低侵襲にMnイオンを脳組織にローディングする必要がある。我々は、脳室内投与、脳実質内投与、血管内慢性投与、腹腔内投与

等の様々なプロトコルを検討した。脳室内投与は、脳室に比較的近い神経核における経時変化を捉えるに有利であり、複数回の刺激にも対応した神経活動の検出が可能である。しかし、深部の核の測定、あるいは脳室近くの核と遠い核との同時測定には、なかなかよい負荷条件を見いだせなかった。一方、腹腔内投与では、経時的な情報は追うことができないが、均一にMnイオンを負荷できるので、脳全体の広空間分解能三次元画像により、反応部位のスクリーニングを行うのに適していることがわかった。我々の実験結果では、一度Mnイオンで造影しても比較的短時間 (24-48時間) で、神経細胞外に排泄されるという結果がえられた。繰り返しの実験が可能となり好都合であるが、同様の方法を用いた研究報告では数日から1週間にわたり造影効果が持続したとあり、大きな差がある。おそらく、Mnイオンの投与法の違い、それによる神経毒性の軽減の結果、我々の場合短い造影時間が得られたものと思われる。

なお、神経ペプチドやホルモンなどの効果については、現在データを収集中である。

31. 唾液腺における内因性タンパク質分泌と外因性タンパク質分泌の sorting 機構

杉谷博士, 吉垣純子, 松木美和子 (日大松戸歯)

橋本貞充 (東京歯大) 細井和雄 (徳島大大院医歯)

林 知也 (明治鍼灸大柔道整復) 恵良聖一 (岐阜大学医分子生理学分野)

村上政隆 (統合バイオ生理研)

分泌腺からの最終分泌液に含まれる蛋白質は腺細胞が合成する内因性のものと血液より移行する外因性のものの混合物である。最近、唾液蛋白の分析が新しい質量分析器により進んだが、内因性と外因性を分離しての研究は未着手である。これには細胞接着を通過する傍細胞輸

送調節の理解が必要であった。本研究は、内因性蛋白の分泌調節に関わる実験系と外因性蛋白分泌をモニターする実験系を作成し、分泌顆粒放出機構と傍細胞輸送機構による蛋白 sorting について検討した。

1) 我々は以前、顎下腺におけるシグナル伝達として、

唾液分泌刺激となるムスカリン性受容体の活性化の下流シグナルとしての一酸化窒素 -cGMP 系の存在を明らかにした。今回は、ウサギ顎下腺における cGMP 分解調節について検討したところ、11 種類の cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) ファミリーのうち PDE1 および PDE2 がムスカリン性受容体刺激による cGMP 分解に関与することを明らかにした。

2) 現在のところ、開口放出機能を維持した唾液腺の培養細胞の存在は認められていない。そこで、ラット耳下腺腺房細胞の初代培養条件の検討を行った。Collagen-I でコートした培養皿にて分離耳下腺腺房細胞を培養したところ、形態的には変化したもの、48 時間目まで β - およびムスカリン性受容体刺激による開口放出が認められた。また、初代培養耳下腺腺房細胞においては、新規な分泌顆粒の合成や、遺伝子導入時には新規な開口放出関連タンパク質の発現も認められ、唾液腺における開口放出研究に有用な手段と考えられる。

3) 唾液腺における水チャンネルとしてアクアポリン 5 (AQP5) の腺腔側膜での発現は既に認められ得ているが、ラット耳下腺分泌顆粒における AQP5 の局在を検討したところ、分泌顆粒膜に AQP5 が発現していることを生化学的および形態学的に認めた。抗 AQP5 抗体で分泌顆粒

を処理すると、分泌顆粒の膨張と溶解が認められた。しかし、この抗 AQP5 抗体の効果は、分泌顆粒懸濁液の Cl⁻ の存在と分泌顆粒膜の透過性に依存していた。これらのことから、AQP5 は耳下腺分泌顆粒内浸透圧調節に関与することが示唆された。

4) 唾液腺にはヒトアルブミンの分泌機構が存在しないが、灌流液中タンパク濃度のおよそ 0.05 - 0.7% のアルブミンが唾液中に認められた。特徴的な結果として、一酸化窒素 (NO) が SH 基に結合した S-ニトロソアルブミンが唾液のみに、唾液中アルブミンのおよそ 10-30% の濃度で検出された。NO 合成酵素阻害剤である L-NAME を灌流液に加えたと、唾液分泌量はほとんど変化しないが、S-ニトロソアルブミンはほとんど検出されなかった。これらの結果は、a) 灌流液中のヒトアルブミンがラット顎下腺のタイトジャンクションのような傍細胞経路を通過して唾液中に分泌されたこと、b) このタンパク質がその傍細胞経路中で NO を中心とする活性酸素によって修飾を受けたことを示唆している。本実験系は巨大分子が傍細胞経路を通過する過程を示すものであり、さらにウシアルブミンを用い、唾液分泌速度とタンパク質の唾液中濃度との関係についても検討を開始した。

32. 電位依存性 Ca チャネルの発現制御機構

海老原達彦 (産業技術総合研究所)

岡本治正 (産業技術総合研究所)

亀山仁彦 (産業技術総合研究所)

白幡恵美 (山形大学医学部)

早坂 清 (山形大学医学部)

中山希世美 (日本学術振興会特別研究員)

岡村康司

Cav1.2 チャネルに関して、N末端側を欠いたサブユニットを強制発現させたトランスジェニックマウスを作製した。具体的には 2 種類のマウスを作成した。

1. 他の PSD タンパク同様に beta-actin promoter 下流に Δ Cav-GFP をつないだ DNA (抑制能は Xenopus で確認済み) を導入したトランスジェニックマウス。

2. constitutive に Δ Cav を発現すると致死的な恐れがあるため、loxP を用いて普段は "silent" で、Cre によって発

現が起こる DNA コンストラクトを導入したトランスジェニックマウスを作製した (Δ Cav-GFP/Venus)。現在、1 のマウスの line 化を完了して解析を行ったところ細胞内に凝集しているように見えるものの、バックグラウンドと明確に峻別することが出来ず、中断している。 Δ Cav-Venus については、別に作製中のトランスジェニックマウスで Venus が問題なく光る事を確認できたら作製を行う予定である。

以上から、一足飛びにトランスジェニックマウスを作ることが難しい状況であり、ひとまず *Xenopus oocyte* などの発現系に立ち返り、キメラによる活性化部位同定、

その結果に基づくより小さい抑制型のデザインを優先する予定である。

33. エンハンサートラップ法によるゼブラフィッシュの神経発生および神経機能の解析

武田 洋幸 (東京大学 大学院理学系研究科)

東島 眞一

ゼブラフィッシュの多数のエンハンサートラップラインをスクリーニングすることにより、神経系のきわめて少数の細胞で発現する転写因子、接着分子、チャネル分子を見付け出し、(i) 転写因子、接着分子に関しては解剖学的な解析により発生における機能を明らかにし、(ii) チャネル分子については、電気生理学的な解析により運動系ネットワーク中での生理的な機能を明らかにすることを目標として研究を進めている。今年度の研究では 50 系統を超える数のラインについてスクリーニングを行い、中枢神経系の少数の細胞で GFP の発現がみられ

るいくつかのラインを見いだした。とくにもっとも着目している 1 つのラインでは、後脳においてはマウスナー細胞特異的に発現がみられ、また、脊髄においては非常に少数 (各半体節あたりほぼ 1 つ) の交叉型介在ニューロンで発現が見られる。この交叉型介在ニューロンは、なにか他とは違う性質をもつニューロンである可能性が高いものと期待される。このラインの挿入近辺に存在する遺伝子のクローニングを進めるとともに、特異的な GFP の発現がみられる交叉型介在ニューロンについて、電気生理学的解析を行っていく予定である。

【 計畫共同研究報告 】

計画共同研究報告

〔 目 次 〕

1. 容積センサーTweety Homolog/Maxi Anion Channel の生理的意義の検討 (鈴木 誠ほか)	152
2. 容積感受性 Cl ⁻ チャンネルの候補蛋白質の機能解析 (赤塚結子ほか)	152
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)	153
4. Na ⁺ センサー蛋白質と生理機能 (檜山武史ほか)	154
5. 低浸透圧感受機構の解明 (富永 真琴ほか)	154
6. イノシトール三リン酸特異的蛍光プローブを用いた小脳プルキンエ細胞における PLC 活性化の時間的制御の解明 (森 泰生ほか)	155
7. GFP 一分子キャリブレーション法を利用したシナプス機能分子の絶対数の測定 (岡部繁男ほか)	155
8. 運動学習の短期記憶から長期記憶への固定化の神経機構 (永雄総一ほか)	156
9. スパイク生成を担う持続性ナトリウム電流の組織学的検索 (姜 英男ほか)	157
10. 神経回路の発達・再編におけるバイオ Cl ⁻ センサーとしての GABA/グリシン応答の解析 (福田 敦夫ほか)	157
11. 神経活動同期性センサー作用を有する NMDA 受容体機能の局所的抑制が神経回路形成におよぼす作用 (岡田 誠剛ほか)	158
12. 脊髄内感覚神経終末部に発現する熱受容体センサーの役割とその機能的意義に関する研究 (吉村 恵ほか)	159
13. 神経終末部における PLC および電位センサーチャンネルの役割とその発達変化に関する研究 (石橋 仁ほか)	159
14. アディポネクチンの中樞・末梢作用に及ぼす AMP キナーゼ (AMPK) の 調節機構とその生理的意義に関する研究 (門脇 孝ほか)	160
15. 糖脂質代謝におけるバイオセンサー分子としての APM キナーゼの生理的意義 (益崎 裕章ほか)	161
16. 摂食調節系の分子メカニズムに関する生理学的研究 (中里 雅光ほか)	161
17. 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)	162
18. CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子トランスジェニックマウスの作製と機能解析 (八木 健ほか)	163
19. 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)	163
20. 魚類脳の電位依存性チャンネルと行動 (岡 良隆ほか)	164
21. 電位依存性ホスファターゼの生殖生理機能における役割 (吉田 学ほか)	164
22. 脊椎動物の祖先型のイオンチャンネルのアミノ酸配列推定と、そのタンパク質の機能解析 (斎藤成也ほか)	165
23. ゲノム情報に基づく神経発生関連膜タンパク分子機能の解析 (高橋 弘樹ほか)	166
24. 次世代 cameleon を用いたカルシウムイメージングによる、 ゼブラフィッシュの発生過程および神経回路の解析 (宮脇 敦史ほか)	167
25. 赤外レーザー・赤外放射光の細胞・神経作用と温度受容機構の解明 (小田 紀子ほか)	167
26. 体液 Ca ²⁺ イオン濃度を感受する Ca ²⁺ チャンネルの解析 (伊村 明浩ほか)	168
27. 内耳前庭における TRP ファミリーを介する感覚受容 (久保 伸夫ほか)	168
28. 感覚神経における侵害刺激センサーとしての TRPA1 の役割 (野口 光一ほか)	169
29. シリコンベース膜タンパクバイオセンサー制作のためのタンパク質発現・精製・集積技術開発 (宇理須 恒雄ほか)	169

1. 容積センサー Tweety Homolog/Maxi Anion Channel の生理的意義の検討

鈴木 誠 (自治医科大学薬理学分子薬理学講座)

Sabirov Ravshan

Tweety(TTY) はショウジョウバエの遺伝子で、5-6回膜貫通蛋白質である。鈴木らはこの蛋白質がClチャンネルをコードしている可能性を示した。即ち、TTY3はChinese Hamster Ovary cellで発現すると、Ca-dependent Cl channelを観察する事ができた。linear I-V, 350 pSで μM レベルのCaを活性化に必要とした。Poの電位依存性は脱分極側にあり、非ベル型を示しており、一般的に認められるベル型を示すClチャンネルとは性質を異にしている。TTY1はD, E, Qなどのアミノ酸の繰り返し構造を欠いており、活性化の刺激がわからなかった。しかし、細胞容積を低浸透圧で、大きくすると活性化した。

TTY1は100-200 pSのチャンネルを発現するが、CHO細胞には内因400 pS Clチャンネルがあり、測定の障害になった。そこで今回、内因性ClチャンネルがないHEK-T細胞を用いた。HEK細胞にはTTY3がRT-PCRで検出でき、抗体で蛋白も確認できるが、HEK-T細胞にはTTY1, 2, 3

共にmRNAは検出できなかった。またHEK細胞には内因性の外向き整流性のClチャンネルが見つかるが、HEK-T細胞では見つからなかった。

TTY1の発現をHEK-T細胞で試みたが、発現は認められなかった。そこで、CHO細胞では明らかに発現が確認されたTTY3を用いたが、チャンネル発現が認められなかったため、分子自身が膜に移行しているのかどうか検討しなおすことにした。

添付図左上にあるようにTTY3をGFP蛋白とfusionさせた。図は、GFPに対する抗体を用いて、ウェスタンを行ったものである。Fusion蛋白ではバンドが上方にシフトしている。これらのベクターを用い、CHO細胞とHEK-T細胞で、発現を検討した。図右にあるようにGFP単独では蛍光は細胞に一様に広がっている。TTY3-GFPはCHO細胞では膜に発現するのに対し、HEK-T細胞では細胞質内にとどまっているのが明らかであった。

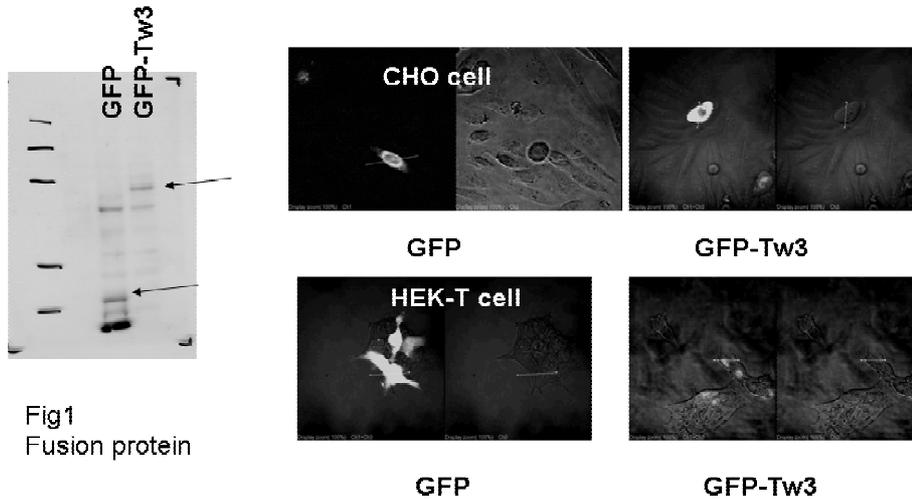


Fig1
Fusion protein

2. 容積感受性 Cl⁻チャンネルの候補蛋白質の機能解析

赤塚結子 (三重大学医学部生理学第一講座)

清水貴浩, 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ン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^- チャンネル (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 H_2O_2 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誘導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見出した。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、その結合には両者のアミノ末端側領域が必要であることを明らかにしており、アクチニン-4 には ABCF2 による VSOR の抑制を解除する働きがあることがわかった(投稿準備中)。さらに、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, 楠堂達也, 永井宏幸, 向井佐輝子, 浅野亘 (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。

昨年度までの共同研究において、脂肪滴をため込んだ分化脂肪細胞を使った細胞内カルシウムイメージングの実験系を確立し、脂肪細胞の分化に伴い発現が上昇する TRP チャンネルをモニター分子の候補として同定した。同定された TRP チャンネルはこれまでの研究より、温度、成長因子だけでなく、ストレッチなども活性化シグナルとすることが報告されており、容積センサーとしての条件を備えていると考えられる。今年度は昨年度構築したカ

ルシウムイオンイメージング及びパッチクランプでの測定系を用いた TRP チャンネルの特性評価および容積センサー分子としての機能の解析を試みている、まだ具体的な成果は得られていないが引き続き行っていく予定である。また、脂肪細胞が外界の脂肪酸等の化学的因子をシグナルとして受容している可能性も考えられる。本チャンネルを直接的あるいは間接的に活性化する生理的なリガンドはほとんど同定されていないが、同じサブファミリーに属する TRP チャンネルは脂肪酸など様々な化学的因子により活性化されることから、本チャンネルも脂肪酸類縁体によって活性化される可能性が高い。そこで、細胞内カルシウムイオン濃度に変化を与えるシグナル分子の効率的な探索を行うために、蛍光プレートリーダーを用いた TRP チャンネルのリガンド一次スクリーニング系を確立し現在スクリーニング中である。さらにスクリーニングで得られたリガンド候補物質の確認のため、カルシウムイオンイメージングセット及びパッチクランプセットによる測定法も確立した。今後はこれらの方法を用い、TRP

チャンネルのリガンド探索を進め、それが TRP チャンネルを介して脂肪細胞の容積制御および分化に関してどのよう

な役割を果たしているかということも、先の容積センサーとしての解析に加えて行っていく予定である。

4. Na センサ蛋白質と生理機能

檜山 武史 (自然科学研究機構 基礎生物学研究所)
岡田 泰伸, 井本 敬二

Nax チャンネルは細胞外の Na^+ 濃度の生理的範囲での上昇に応答して開口する Na レベルセンサーである。脳室周囲器官の一つである脳弓下器官において体液 Na レベル増加の検出に関与する。本研究では、中枢における Nax の発現を詳細に検討した。また、Nax が細胞生理機能において果たす役割を検討する手がかりの一つとして、細胞内領域に結合する分子を探索した。さらに、Nax の開口により細胞内へ流入した Na が Na/K-ATPase の機能制御に関与する可能性、細胞内液の浸透圧変化に伴って細胞容積が変化する可能性について検討した。

1) Nax の中枢における発現解析

免疫電子顕微鏡法により、Nax が脳室周囲器官の脳弓下器官と終板脈管器官において、上皮細胞と星状細胞から伸びたニューロン周囲の薄膜状突起に発現することが判明した。脳弓下器官から単離したグリア細胞において Na イメージングを行なったところ、細胞外 Na レベルの上昇に応じた Na 流入が確認された。

2) Nax の細胞内領域と結合する分子の探索

Nax の細胞内領域と相互作用する蛋白質を探索した。成体マウスの後根神経節から cDNA ライブラリーを作成し、酵母ツー・ハイブリッド法により結合分子を探索し、

Na/K-ATPase を含む複数の結合候補分子を見出した。

3) Nax による細胞代謝制御の可能性に関する検討

Na/K-ATPase と Nax の相互作用の存在が示唆されたことから、グルコース・イメージング法を用いて脳弓下器官より単離したグリア細胞のグルコース代謝を測定した。Nax 陽性細胞において Na 依存的にグルコース取り込みが増加することが明らかとなった。また、マウスの脳から作成した脳弓下器官の急性スライスにおいて、野生型マウス特異的に Na 依存的なグルコース取り込みが観察された。

4) Nax を介したイオン流入が細胞容積に影響する可能性についての検討

Nax チャンネルの開口によるイオン流入によってもたらされる細胞内浸透圧の増加が、水分子の流入と細胞容積の増加をもたらす可能性を検討した。C6 グリオーマ細胞に Nax を発現させ、細胞膜を PKH26 により染色して共焦点顕微鏡により細胞の形態を観察した。細胞外液のナトリウム濃度変化に伴って細胞体の大きさが顕著に変化することはなかった。今後、局所的かつ微細な形態変化を捉えられる実験系を構築し、さらに検討する予定である。

5. 低浸透圧感受機構の解明

富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)
柴崎 貢志 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)
東 智広 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)
岡田 泰伸 (生理学研究所)
清水 貴浩 (生理学研究所)

細胞外の低浸透圧状態を感知してさまざまな細胞応答が引き起こされる。低浸透圧で活性化するクロライドチ

ャネルの電気生理学的な解析はなされているが、いまだその分子実体は明らかでない。一方、低浸透圧刺激によ

って活性化する非選択性陽イオンチャネルTRPV4がクローニングされ、バイオ分子センサーとして浸透圧感受性に分子から迫ることが可能になった。そこで、まず、TRPV4の低浸透圧感受性をTRPV4を強制発現させた培養細胞で確認した後、TRPV4が発現していることが知られている表皮ケラチノサイトとマウス脳でTRPV4の遺伝子発現を検討し、十分量のmRNAの発現を観察した。次に、単離ケラチノサイト、単離海馬神経細胞で低浸透圧応答をCa²⁺イメージング法、パッチクランプ法を用いて検討した。その結果、両方法において、低浸透圧刺激に対する細胞内Ca²⁺濃度の増加、膜電流の活性化を観察

した。そこで、容積感受性クロライドチャネルがTRPV4と機能的のみならず物理的にカップルしていることを想定してYeast Two-Hybrid法を用いて、ケラチノサイトおよび脳のcDNAライブラリーからTRPV4のカルボキシル末端と結合する蛋白質を探索した。細胞骨格関連蛋白質は得られたもの、容積感受性クロライドチャネルの分子実体と思われる蛋白質を得ることはできなかった。TRPV4と結合する胞骨格関連蛋白質との結合蛋白質として容積感受性クロライドチャネルを得ることができるともかもしれない。

6. イノシトール三リン酸特異的蛍光プローブを用いた小脳プルキンエ細胞におけるPLC活性化の時間的制御の解明

森 泰生 (京都大学 大学院 工学研究科)

井本 敬二 (生理学研究所)

小脳プルキンエ細胞においては代謝型グルタミン酸受容体などホスホリパーゼC (PLC)と共役した受容体が、神経可塑性などの生理現象に重要な役割を果たしていることが知られている。しかしこれら受容体活性化の時空間的な動態とその制御機構については明らかになっていない。本研究ではPLCの活性化により産生されるイノシトール3リン酸に対する特異的蛍光プローブを用いて、PLC共役型受容体の活性化をリアルタイムで可視化すること目的とし技術的改良を行った。

これまでに我々は、PLCの活性化により産生されるイ

ノシトール3リン酸特異的蛍光プローブの作製に成功し、その有用性を報告した。本研究では急性単離した小脳プルキンエ細胞に蛍光プローブを取り込ませることを試みた。

PLCのPHに基づいたイノシトール三リン酸特異的蛍光プローブの、現在までの最大の問題点の一つが細胞内への導入法であった。今回、エレクトロポレーションにより導入効率が数倍上昇することが明らかとなった。また、このことにより様々の細胞に蛍光プローブの導入が可能となり、汎用性が格段に改善された。

7. GFP一分子キャリブレーション法を利用したシナプス機能分子の絶対数の測定

岡部繁男 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科)

培養神経細胞および脳スライスにおいてGFP融合シナプス蛋白を発現させ、これらの蛋白質のシナプス1個あたりの絶対数をGFPの蛍光量をもとに算出することが可能である。更に内在性の分子についてもGFP融合蛋白質との量比からその単一シナプスあたりの存在数を推定することが出来れば、機能的な分子数の測定が不可能な多様なシナプス分子についてのその局所に存在する分子数

を求めることが出来る。このような方法論の具体化を目的として以下の実験を行った。

シナプス後肥厚部とほぼ同じサイズの蛍光ビーズの蛍光量を測定し、全反射顕微鏡による観察から求められた単一GFP分子の蛍光量と比較を行った。その結果、単一GFP分子と直径200 nmの蛍光ビーズとの蛍光比は1:3700と求められた。このキャリブレーションされた蛍光ビー

ズを利用して、培養海馬神経細胞の単一シナプスに局在する GFP 融合足場蛋白質 4 種類 (PSD-95, GKAP, Shank, Homer) の分子数を算出した。更に GFP 融合足場蛋白質を過剰発現する細胞と、していない細胞での足場蛋白質の量比を蛍光抗体法で決定することにより、遺伝子導入操作を加えていない海馬神経細胞での内在性の分子数を決定した。内在性の分子については、PSD-95, GKAP, Shank, Homer の 4 種類の足場蛋白質全てについて、およそ 100-450 分子が 1 つのシナプスあたり存在することが明らかになった。4 種類の蛋白質の分子数に大きな隔たりが無いことから、足場蛋白質間の結合の stoichiometry は比較的単純であることが示唆された。更に培養神経細胞が分化する過程で、単一シナプスあたりの分子数は培養二週間目までは単調に増加するが、それ以降は平均値およびその分散に大きな変化は見られなかった。一旦成熟した神経細胞においては、単一シナプスでの足場蛋白質の分子数およびその分散を一定に保つ分子機構が存在すると考えられた。更にこれら 4 種類のシナプス足場蛋白質

の質量の総和は約 100 MDa となり、PSD 構造全体の質量のおよそ 10%を占めることになる。この結果は今回測定した 4 種類の足場蛋白質が形成する骨組が PSD 構造の維持に十分な役割を果たすことを示唆する。

上記のシナプス足場蛋白質の絶対数測定法の確立を基に、この手法を更にシナプスの微細構造および機能と結び付けるための実験手法の検討を行った。より内在性の蛋白質発現に近い状態での測定を可能にするため、GFP 融合シナプス後部蛋白質を発現するトランスジェニックマウス系統の作製を行い、これらのマウス系統由来の細胞で同様の分子数推定法を適用することが可能であることを確認した。更に海馬神経細胞の培養に用いる新規基質の検討を行った。新規の基質を利用することで、分子数の推定に必要な蛍光画像を取得後に、電子顕微鏡標本の作製を行い、同一のシナプスを同定することが可能になった。今後この方法を利用して、シナプスに局在する足場蛋白質の絶対数と、スパインおよび PSD の微細構造の関連を解析する予定である。

8. 運動学習の短期記憶から長期記憶への固定化の神経機構

永雄総一 (理化学研究所脳科学総合研究センター 運動学習制御研究チーム)

慢性マウス標本を用いて、運動学習の短期記憶から長期記憶への固定化の神経機構を実験的に検討した。マウスに、1 日 1 時間の視覚性眼球反応(HOKR) の訓練を 1 週間継続的に行うと、その動特性に短期適応と長期適応が生じる。先行研究により、短期と長期の記憶痕跡がそれぞれ小脳片葉と前庭核に形成されることと、前庭核の長期記憶痕跡の形成に、小脳片葉と小脳神経回路のシナプス可塑性の長期抑圧がともに必要であることが報告されている。本年度は、小脳皮質の遺伝子発現の変化が、短期記憶と長期記憶の痕跡の形成に関与している可能性を、遺伝子マイクロアレイ法を用いて検討した。1 日 1 時間の訓練を行った直後と、1 週間持続的に訓練を行った直後のマウスから小脳皮質を摘出し、片葉とその近傍の傍片葉を分離摘出した。摘出した組織より mRNA を抽出し、GeneChip 法 (Affymetrix) により 45,000 個以上の

遺伝子について、その発現パターンを比較検討した。その結果、長期適応が生じたマウスの片葉では、対照群のマウスの片葉と適応が生じたマウスの傍片葉に比べて、1,200 個程度の遺伝子に発現量の有意な変化が生じており、かつそのうちの 70%では発現量が減少していることを見出した。一方、短期適応が生じたマウスの片葉では、対照群のマウスの片葉と短期適応が生じたマウスの傍片葉に比べて、発現量の変化が見られた遺伝子数は 400 個程度で、そのうちの約 3 分の 2 には発現量の減少が見られた。片葉で、短期適応と長期適応にともに平行して発現の減少する遺伝子群がそれぞれ存在することは、運動学習によって小脳皮質の遺伝子発現にも長期抑圧が生じることを示唆する。これらの結果を 2005 年度の冬の日本分子生物学会に報告した。

9. スパイク生成を担う持続性ナトリウム電流の組織学的検索

姜 英男 (大阪大学大学院歯学研究科 高次脳口腔機能学講座 口腔生理学教室)

重本 隆一 (自然科学研究機構 生理学研究所 大脳皮質機能研究系 脳形態解析研究部門)

持続性 Na^+ 電流 (persistent Na^+ current) は、軸索における興奮性シナプス入力の統合や、三叉神経中脳路核ニューロンを含む様々なニューロンで既に報告がなされている様に、膜電位のオシレーションにおいて重要な役割を担っている。我々は本研究課題において、三叉神経中脳路核ニューロンの軸索小丘から幹軸索にわたる領域において、持続性 Na^+ 電流が活動電位の生成及び細胞体への侵入に対して果たす重要な役割を明らかにした。

軸索小丘からホールセル・パッチクランプを行なうと、膜電位のオシレーションが観察されたが、その閾値は、細胞体において記録されたオシレーションのものよりも 10 mV 低かった。4-アミノピリジンを投与すると、オシレーションは顕著に遅くなり、5~10 μM リルゾール及び 5~10 nM テトロドトキシンに感受性を持つランブ状あるいは持続性の脱分極が観察された。細胞体に 0.5 mM QX-314 を含んだ内液を充填したパッチ電極を、軸索小丘には QX-314 を含まない内液を充填したパッチ電極を用いてデュアル・ホールセル・パッチクランプを形成することにより、細胞体から軸索小丘にかけて QX-314

の濃度勾配が生じると想定され、この時、短い電流パルスを繰り返し与えると、電流パルスによって生じる遅い閾値下脱分極の持続時間のみならず、軸索小丘で記録される活動電位の振幅も、時間の経過とともに減少していった。一方、細胞体で記録される活動電位はほとんど変化しなかった。これらの所見から、持続性 Na^+ 電流は、軸索小丘部或いは、それを越えた幹軸索において生成されている可能性が示された。更に、軸索小丘部のパッチ電極を通じた電流パルス注入、及び、幹軸索の電気刺激を交互に繰り返して活動電位を発生させると、10~50 nM テトロドトキシン或いは 10 μM リルゾールの灌流投与によって、先ず幹軸索刺激による軸索活動電位の発生が抑制される。その際、電流パルスの注入によって活動電位を生成することはできるが、必要な電流強度は段階的に上昇していた。その後は、活動電位の逆伝播 (spike backpropagation) が観察されなかった。これらの所見から、持続性 Na^+ 電流は、軸索小丘から幹軸索にわたる領域に局在し、活動電位の生成及び侵入に直接的に関与していることが示唆された。

10. 神経回路の発達・再編におけるバイオ Cl^- センサーとしての GABA /グリシン応答の解析

福田 敦夫 (浜松医科大学)

鍋倉 淳一 (生理学研究所)

KCC2 は細胞内の Cl^- を細胞外に排出することにより $[\text{Cl}^-]_i$ を低く維持して、GABA の作用を過分極すなわち抑制性ならしめる蛋白であるが、細胞内での KCC2 の機能調節については今だ不明な点が多い。yeast two-hybrid 法、免疫沈降法を用いて、脳型のクレアチンキナーゼ (CKB) を KCC2 機能制御タンパク候補として同定した。機能的相互作用を見出すため、HEK293 細胞に KCC2 と Cl^- チャンネルであるグリシン受容体を共発現させた KCC2 活性の評価系を用いて、KCC2 の活性の指標である $[\text{Cl}^-]_i$ を推定できるグリシンの逆転電位 (E_{gly}) をグラミシジン

穿孔パッチクランプ法を用いて測定した。この系に dominant-negative CKB を導入すると KCC2 発現細胞においてのみ E_{gly} は脱分極側にシフトし、wild type 導入細胞より有意に $[\text{Cl}^-]_i$ が上昇した。また、ネイティブに KCC2 と CKB が発現しているマウス大脳皮質の初代培養細胞を用いて CKB の抑制実験を行った。CKB 阻害剤の DNFB を投与すると $[\text{Cl}^-]_i$ が有意に上昇した。これらのことから、CKB は KCC2 を活性化することが示唆された。

回路再編での Cl^- ホメオスタシスの役割をバイオ Cl^- センサーとしての GABA/グリシン応答を指標に解析する

目的で、まず回路形成過程での GABA/グリシン応答の役割を検討した。大脳皮質層構造構築に重要な役割をもつ辺縁帯の細胞間のクロストークにおける GABA/グリシン応答の役割を明らかにするため、辺縁帯における興奮の空間的伝播を膜電位イメージングで可視化した。活動電位は径シナプ斯的に放射状に伝播し、GABA_A受容体とグリシン受容体が関与していたがグルタミン酸受容体は関与していなかった。細胞内にCl⁻を取り込み [Cl⁻]_iを高

く維持してGABAの作用を脱分極すなわち興奮性ならしめる蛋白NKCC1の活性を阻害すると興奮伝播は抑制された。マイクロダイアライシス法を用いてアミノ酸を測定したところ、単発刺激で内因性のグリシン受容体アゴニストであるタウリンとGABAが放出されていた。すなわち、NKCC1によって高 [Cl⁻]_iを維持する辺縁帯の細胞では、タウリンとGABAが興奮性に働いて細胞間クロストークに寄与していた。

11. 神経活動同期性センサー作用を有する NMDA 受容体機能の局所的抑制が神経回路形成におよぼす作用

岡田 誠剛 (関西医科大学)

鍋倉 淳一 (生理学研究所)

神経活動は発達段階におけるシナプス形成・排除に影響を与え、周囲の神経細胞との活動性の差の重要性が近年の研究によって示されている。一方、神経活動の同期性は、中枢シナプス伝達の可塑的变化や、視床・大脳皮質間の情報伝達に対して重要な役割を果たすことが示されている。これまでの可塑性についての研究は、NMDA受容体が同期性センサーとして作用することを示しているが、同受容体の発現量は部位、時期によって大きく異なり、これ以外の分子も同期性センサーとして関与している可能性が推測される。内向き整流性 K⁺チャンネル (Kir)mRNA の発現は中枢神経系において広く認められるが、その作用は明らかではなく、Kirの内向き整流性およびシナプス後膜に存在する PSD95 への結合能から、同チャンネルがシナプス伝達に対して同期性センサーとしてはたっている事が推測される。そこで、本研究は内在性 Kir 発現が少ない (Prüss et al,2005) 海馬 CA1 領域の錐体細胞に、低毒性で長期間の発現が可能なレンチウイルスベクターを用いて、Kir を発現させ、神経活動への影

響を全細胞記録により検討した。Kir電流は、未感染細胞では 3.9±1.0 nS であったのに対し、ウイルスベクター感染細胞では 27.1±4.1 nS であった。静止膜電位は Kir 発現により、平均 8.8 mV 低下した。mEPSP による電位上昇は、Kir 発現により有意に低下した。さらに、電流注入による電位変化を検討すると、200 pA までは、Kir 発現は上昇を有意に抑制したにもかかわらず、300 pA 以上の電流注入では抑制は認められなかった。すなわち、Kir の内向き整流性が、興奮性入力に対して同期性センサーあるいはノイズ・フィルターとしての作用することが示唆された。また、予備的な実験では Kir 発現は、幼弱な海馬に特徴的に認められる Giant Depolarizing Potentials の頻度を減少させた。本研究により、Kirの同期性センサーとしての作用が示されたと共に、同発現ベクターによる神経活動の抑制作用は、神経活動およびその同期性が、神経系の発達や高次機能へ与える影響の今後の検討に有用である事が示唆された。

12. 脊髄内感覚神経終末部に発現する熱受容体センサーの役割と その機能的意義に関する研究

吉村 恵, 古江 秀昌 (九州大学)
鍋倉淳一 (生理学研究所)

唐辛子の主成分であるカプサイシン受容体 (TRPV1) が遺伝子クローニングされ、機能的発現実験からカプサイシンのみでなく、熱およびプロトンの変化を受容することが明らかになった。この受容体は神経末梢のみでなく脊髄内中枢端にも発現しており、何らかの役割を果たしていることが示唆されていた。そこで、脊髄スライスに後根を付した標本と *in vivo* の標本からパッチクランプ記録を行い、カプサイシンに対する作用、pH 変化に対する応答および *in vivo* 標本を用い皮膚に熱刺激を加えた時の応答の解析を行うことを目的にした。スライスパッチクランプ記録：成熟ラット脊髄の横断スライスに後根を付した標本を用い、後角第 II 層の膠様質細胞からパッチクランプ記録を行い、後根刺激によって誘起されるシナプス応答を対照に、カプサイシン、pH および熱変化に対する応答を記録解析した。

In vivo パッチクランプ記録：ラット腰部脊髄の椎弓切除を行い、脳脊髄固定装置にセットする。脊髄表面を Krebs 液で灌流し、薬液も同じラインから投与を行った。パッチ電極を膠様質に刺入し、皮膚刺激によって誘起されるシナプス応答を記録解析した。記録側の後肢に触お

よび機械的痛み刺激を加えると、EPSC の振幅および頻度の著明な増大が全ての細胞で観察された。しかしながら、熱刺激を加えても全ての細胞で何ら応答を得ることが出来なかった。ところが、カプサイシンを脊髄に直接投与するとほとんど全ての細胞で mEPSC の頻度の増加が観察され、膠様質細胞に入力する線維の中核側には TRPV1 受容体が発現されていることが示唆された。一般的な考えでは中枢側に発現している受容体は同じ線維の末梢側にも発現している、すなわち熱刺激にも応答することが予測されたが、結果は一般的な予測とは矛盾するものであった。さらに熱刺激を加えることによって膠様質細胞に C-Fos の発現が増える報告があり、そのこととも矛盾している。このことは C-Fos の発現には必ずしもシナプス伝達が必要ではないことを示唆している。次に、熱刺激情報が如何なる部位に運ばれているかを検討するため、深層の細胞から記録を行った。約 20% の III-IV 層の細胞では熱刺激によって著明な EPSC の頻度の増大が観察された。この応答は全て経過の早い EPSC、すなわちグルタミン酸によるものであり、ペプチドの関与はないものと判断された。

13. 神経終末部における PLC および電位センサーチャネルの役割と その発達変化に関する研究

石橋 仁 (九州大学)
張 一成, 鍋倉淳一 (生理学研究所)

活動電位がシナプス前神経終末部に到達すると、電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開口し、細胞外から Ca^{2+} が流入して神経伝達物質が放出される。従って、細胞外 Ca^{2+} 濃度が低下すると神経伝達物質の放出は減少すると考えられている。一方、シナプス周囲の細胞外スペースは非常に狭いため、シナプス伝達に伴うシナプス前終末部およびシナプス後細胞の細胞内への Ca^{2+} 流入によって、細胞外 Ca^{2+} 濃度は急速に減少すると考えられている。しかし、

これまで、細胞外の Ca^{2+} 濃度が低下した場合に神経終末部が受ける影響は十分には解明されていなかった。

我々は、細胞外に Ca^{2+} が存在しなくても高 K^+ 溶液による脱分極刺激によって神経伝達物質の放出が増強されることを最近発見し、予備実験の結果からホスホリパーゼ C (PLC) の関与が示唆されていた。本年度は、この現象の詳細なメカニズムを解明することを目的に研究を遂行した。ラット脊髄後角からシナプス前神経終末部が付

着した状態で急性単離した神経細胞に、ホールセルパッチクランプ法を適用してグリシン作動性の自発性抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録し、細胞外の K^+ 濃度をコントロールの 2.5mM から 30mM にすると IPSC の発生頻度が著明に増加した。この応答は、膜透過性 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM, Ca^{2+} ポンプ阻害剤 Thapsigargin および PLC 阻害剤 U-73122 によって抑制された。U-73122 の不活性化体である U-73343 は無効であった。従って、細胞外に Ca^{2+} が存在しなくても、神経終末部の脱分極自

体によって、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出が起こって神経伝達物質の放出が増強されることが明らかとなった。PLC は IP_3 の濃度上昇を介して Ca^{2+} 放出を誘発することが知られているが、膜透過性 IP_3 受容体拮抗薬と報告されている Xestospongin C および 2-APB は無効で、 Ca^{2+} 放出の機序は未解明のまま残った。今後、PLC 活性化や Ca^{2+} 放出の詳細なメカニズムを明らかにするとともに、生後発達による影響を検討することを予定している。

14. アディポネクチンの中枢・末梢作用に及ぼす AMP キナーゼ (AMPK) の調節機構とその生理的意義に関する研究

門脇 孝 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)
窪田 直人 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)
窪田 哲也 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)
岡本 昌之 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)
矢野 互 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)

箕越 靖彦

アディポネクチンは、レプチンとともに脂肪細胞から分泌されるアディポカインである。レプチンは中枢では生体内エネルギーセンサーである視床下部 AMPK 活性を低下させることにより摂食を抑制し、末梢では骨格筋における AMPK 活性を上昇させ脂肪酸酸化を促進させる。一方アディポネクチンも肝臓、骨格筋において AMPK 活性を上昇させ脂肪酸酸化を促進し、インスリン感受性ホルモンとして作用することが明らかとなっているが、中枢における役割はまだ不明である。

我々は、まずはじめに、視床下部におけるアディポネクチン受容体の発現について検討した。2つのアディポネクチン受容体、AdipoR1/AdipoR2 はいずれも視床下部においてその発現が認められ、その程度は肝臓における AdipoR1/AdipoR2 の発現量に匹敵する程であった。さらにその局在を *in situ hybridization* にて検討したところ、AdipoR1/AdipoR2 の発現はいずれもレプチン受容体が強発現している視床下部の特に弓状核に強く認められた。次に我々は、髄液中にアディポネクチンが存在するかどうかについて検討した。同じ個体の血清と髄液からそれ

ぞれサンプルを採取しその濃度を測定したところ、髄液中のアディポネクチン濃度は血中の約 1/2000 程度存在することが明らかとなった。さらに摂食とアディポネクチンの関連について検討したところ、血中のレプチン濃度とは逆に、血中のアディポネクチン濃度と視床下部における AdipoR1 の発現は絶食時に上昇し、逆に摂食後低下することが明らかとなった。一方 AdipoR2 の発現は絶食、摂食後で有意な変化は認められなかった。以上のことより、アディポネクチンは中枢、特に視床下部において摂食さらには個体のエネルギー調節に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

現在これらの結果を踏まえ、アディポネクチンの中枢作用をより詳細に検討するため、外来性にアディポネクチンを脳室内に投与し、摂食量やエネルギー代謝量、体重などにおける影響を検討中である。またアディポネクチンによって視床下部 AMPK 活性が変化するかどうか、もし変化が認められた場合にはレプチン、アディポネクチンの視床下部 AMPK 活性調節における相互作用についても検討していく方針である。

15. 糖脂質代謝におけるバイオセンサー分子としての AMP キナーゼの生理的意義

益崎 裕章 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 中所 英樹 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 田中 智洋 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 石井 崇子 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 泰江 慎太郎 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 箕越 靖彦

肥満者の多くにおいては、レプチンのエネルギー代謝亢進作用が充分発揮されずレプチン抵抗性の存在が示唆される。本研究で我々は、レプチン感受性と骨格筋 AMP キナーゼ (AMPK) の関連を解明する目的で、高レプチン血症を呈するレプチン過剰発現トランスジェニックマウス (LepTg) を用い、レプチン感受性の異なる条件下での代謝パラメーターと骨格筋 AMPK 活性を検討した。レプチンによる体脂肪量の減少、インスリン感受性の亢進を認め、レプチン感受性を示す標準食下 LepTg のヒラメ筋では、対照群と比べて AMP/ATP 比の上昇 (1.6 倍)、リン酸化 AMPK の増加 (1.5 倍)、AMPK の標的分子：アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) のリン酸化の亢進 (2.7 倍) が認められ、AMPK の持続的活性化が証明された。LepTg は 4 週間の高脂肪食負荷により、対照群と同程度の肥満とインスリン抵抗性を来したことからレプチン抵抗性の発症が示唆され、この時 LepTg のヒラメ筋における AMPK 活性亢進は消失した。更に LepTg を標準食に戻すと、対照群と比較し、より急速な体重減少とインスリン感受性亢進状態の回復を示し、レプチン感受性

の回復と共に、ヒラメ筋 AMPK 活性の亢進が認められた (Tanaka T et al. *Diabetes*, 54: 2365, 2005)。以上より、レプチン作用と骨格筋 AMPK 活性の密接な関連が示され、レプチン感受性の指標としての骨格筋 AMPK 活性の意義が明らかとなった。

次に我々は、長鎖脂肪酸の中樞投与が視床下部の Stat3 のリン酸化を惹起し摂食を抑制することを明らかにした。脂肪酸による Stat3 のリン酸化はレプチン受容体欠損 db/db マウスや内因性のメラノコルチン受容体拮抗物質：agouti 蛋白を視床下部に異所性に発現する KKA^y マウスにおいても認められることから、レプチン受容体シグナル系とは独立した経路を介していると考えられる (投稿準備中)。最近、短鎖脂肪酸である α リポ酸がレプチンと同様に視床下部 AMPK 活性の抑制を介して摂食を抑制することが報告され、脂肪酸によるエネルギー代謝制御における AMPK の意義が注目される。我々は現在、長鎖脂肪酸-G 蛋白共役型受容体システムによる食欲調節機構の解析を進めており、この経路における AMPK の生理的意義の解明が期待される。

16. 摂食調節系の分子メカニズムに関する生理学的研究

中里 雅光 (宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野)

グレリンは、胃で産生される消化管ペプチドで、末梢投与により摂食亢進に作用する。末梢産生物質が摂食調節に作用するためには、何らかの伝達経路を介し、その情報が中枢に到達する必要がある。我々は、グレリンの摂食亢進作用が、迷走神経遮断および中脳切断ラットにおいてキャンセルされること、末梢投与したグレリンは、迷走神経求心線維に存在するグレリン受容体に結合し、その電気活動を変化させることにより空腹情報を視床下

部へと伝達することを証明している。さらに、消化管ペプチド；peptide YY (PYY) の摂食抑制機構およびグレリンと cholecystokinin (CCK) の相互作用についての研究から、エネルギーバランス制御における迷走神経求心路の重要性を呈示してきた。グレリン、PYY、CCK の摂食調節に関するシグナルは、迷走神経経由で延髄孤束核に到達し、ニューロンを変換して視床下部へ伝達されると考えられる。延髄孤束核は、迷走神経をメディエーターとす

る末梢の物理・化学的刺激あるいはホルモンなどの液性因子情報の入力部位であり、視床下部に投射する多数のノルアドレナリン(NA)産生ニューロンを含んでいる。我々は、グレリン末梢投与による孤束核でのNA生合成および視床下部弓状核でのNA分泌を評価し、神経解剖学的知見と併せて、グレリンによる摂食行動とNA神経系との機能連関を検討した。

グレリン投与により視床下部弓状核でのノルアドレナリン放出が増加し、延髄孤束核でのDBH遺伝子発現も有意に増加することを見いだした。弓状核でのNAレベルの上昇は、中脳切断ラットでは認められなかった。 $\alpha 1$ および $\beta 2$ アドレナリン受容体拮抗薬の前投与により、グレリン投与による摂食亢進作用は減弱した。視床下部

弓状核に抗DBH抗体を conjugate した saporin 神経毒(DSAP)をマイクロインジェクションし、弓状核でのNAを選択的に枯渇させたラット(DSAPラット)では、孤束核NAニューロンの約60%が脱落しており、グレリンによる摂食亢進作用はキャンセルされた。グレリンはNPYニューロンを活性化し、その約50%がDBHの投射を受けていた。

以上の実験結果から、延髄孤束核に入力した末梢グレリンシグナルは、NA神経系に変換され、弓状核NPYニューロンを活性化することにより摂食亢進に機能することが明らかになった。胃内分泌細胞から分泌されるグレリンの視床下部への一次、二次神経を介する情報伝達経路の全貌が初めて明らかになった。

17. 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, 関口 佐保子, 小野 保長 (藤田保健衛生大学・内分泌代謝内科)

長尾 静子 (藤田保健衛生大学・疾患モデル教育研究センター)

平林 真澄, 加藤 めぐみ (生理学研究所・遺伝子改変動物作製室)

老化に伴う変化では骨組織より軟部組織へのカルシウムの移行がその一因と想定されている。石灰化の担い手はカルシウムとリンであるが、最近細胞膜Ⅲ型Na依存性リン酸輸送担体 Pit-1 の骨ならびに血管石灰化での重要性が注目されている。本研究で作成した Pit-1 過剰発現ラット (Pit/Tg) は、骨格の成長には影響を認めないものの、二重X線吸収法 (DEXA) 法による骨塩定量にては、雌雄ともに野生型 (WT) に比し骨密度の低下を認めた。また、生後8週目頃より巣状の糸球体障害が明らかとなり、低アルブミン血症、蛋白尿、高脂血症というネフローゼ症候群パターンをしめし、低栄養状態となって生後8ヶ月で死亡した。末期には低アルブミン血症に基づくと思われる骨軟化症へと進行するが、骨量の低下は低アルブミン血症発症前から認められることより、Pit-1 の過剰発現による細胞へのリン負荷は、骨石灰化に負に働くことが示唆された。また、今回のラットでは、過剰発現させる

細胞を条件付けせずにユビキタスに過剰発現を行ったため、リンの再吸収に関わる腎近位尿細管中でも発現が上昇することが考えられたが、免疫組織学的検討でも、尿細管細胞での Pit-1 蛋白の発現上昇が確認された。そのため尿細管での Pit-1 過剰発現により、血中のカルシウム・リン代謝に影響が有るかどうかについても検討した。末期まで血清カルシウム・クレアチニンの上昇は認めないままであったが、血清リン濃度は常に Pit/Tg で WT に比べ高値を示し、体液中のリン濃度の恒常的な上昇により細胞へのリン負荷が持続することが示唆された。

細胞外からの細胞へのリン供給はATP産生のために必須であるが、同時に細胞外リン濃度の上昇による過剰なリン負荷はアポトーシスを引き起こすことが知られている。今後は、Pit-1 過剰発現による細胞障害のメカニズムを解明するために、骨芽細胞ならびに腎糸球体上皮細胞の初代培養細胞を用いた検討を行う予定である。

18. CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子トランスジェニックマウスの作製と機能解析

八木 健, 平林 敬浩, 金子 涼輔 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

平林 真澄 (生理学研究所・遺伝子改変動物作製室)

CNR (Cadherin-related neuronal receptor) は、非受容体型チロシンリン酸化酵素 Fyn との結合活性によって単離された新規カドヘリン様細胞接着分子である。このCNRには14種のファミリー分子が存在し、いずれも中枢神経系で発現している。CNR 遺伝子は染色体上にタンデムに並んだ14個の可変領域エクソンと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可変領域エクソンと3つのエクソンからなる共通領域エクソンから転写されていることが明らかになった。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いることから、CNRは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可能性が考えられる。また、単一神経細胞におけるCNR各分子種の発現様式をRT-PCRを用いて染色体レベルで解析結果、一つの神経細胞ではCNRは複数の分子種を発現しており、その組み合わせは個々の神経細胞ごとに異なっていた。また、各分子種について染色体由来を調べると、片方の染色体のみに由来するものが多数であった。これらは中枢神経系における

新たな染色体遺伝子発現機構であり、神経細胞の多様性に寄与していると考えられる。そこで本研究ではCNRの特異な転写制御機構を明らかにするために種々のCNR 遺伝子トランスジェニック (Tg)マウスの作製を行った。なお、CNR 遺伝子は全長が200kb以上におよぶため、本研究でのTgマウスを作製は同遺伝子領域を含むBACを改変したものを導入遺伝子として用いた。

まず、CNR各分子種のエクソンに蛍光タンパク質の遺伝子を挿入し、CNRとの融合タンパク質として発現するように改変したBACを作製し、これを用いてTgマウスを作製した。また、ヒトおよびマウスのゲノム配列を比較したところ、CNR 遺伝子の上流に約5kbpにわたる領域が高度に保存されていることが明らかになった。この領域はCNR 遺伝子の発現制御に関わっていることが予想されるために、この領域を欠損したBACを作製し同様にTgマウスを作製した。

いずれのTgマウスも複数の系統が得られており、現在これらを用いて蛍光を指標にしたCNRの発現様式の解析を進めている。

19. 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 (生理学研究所遺伝子改変動物作製室)

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-1)を介するものとされている。血中IGF-1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-1ノックアウトラットであるdrに着目し、ヒトGH遺伝子を脂肪細胞に特異的に発現させ、その生物作用を検討した。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、drラット精子と混合して未受精卵子に顕微注入することにより3匹のLep-hGH-dr個体を作製した。

平成17年度は、成熟個体に達した♂ラットよりとdr♀とを交配し、F1、F2世代を作製し、遺伝子発現と分泌態を検討した(N=6)。RT-PCR解析の結果、Lep-hGH遺伝子は脂肪細胞とそれ以外に、♂では精巣、♀では卵巣に強く発現した。生後6ヶ月では♂♀とも、体重は対照drと比較して3-5倍を示し、体脂肪は同週齢のSD♂14-18%

に対して、dr⁺40-50%、Lep-hGH-dr 68-75%と著しい肥満を示した。20分毎8時間の血中hGH濃度は、対照マウスでは2.5~3.5時間毎の規則正しい脈動的分泌(0.3-100ng/ml)を示したが、Lep-hGH-drでは脈動的分泌は消失し、著しい持続的低値(0.03ng/ml)を示した。

以上の成績より、Lep-hGH-drは予想に反して肥満症の表現型を示した。肥満の機序として、半定量的RT-PCR

解析の結果、脂肪細胞におけるhGH発現量が精巣や卵巣組織の1/5と低値を示し、且つ、ごく低濃度の血中GHが摂食中枢を刺激し、肥満症を生じた可能性が考えられる。今後は、脂肪細胞のみに強発現するpromoter遺伝子を選択し、再度Tg作出を試み、GHのIGF-1非依存性の脂肪分解や脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討する必要があるものと結論した。

20. 魚類脳の電位依存性チャンネルと行動

岡 良隆 (東京大学大学院理学系研究科)

阿部 秀樹 (東京大学大学院理学系研究科)

赤染 康久 (東京大学大学院理学系研究科)

羽田 幸祐 (東京大学大学院理学系研究科博士課程)

岡村 康司

本計画の提案者らは、ペプチドGnRHを産生するニューロン群の示す神経修飾のメカニズムについて多角的に解析し、多くの業績を上げてきた。特に、GnRHニューロンの示すペースメーカー活動は神経修飾作用の基礎となつていると考えられ、これには新規Na⁺チャンネルの寄与がわかっている。一方、魚類の視床に存在する神経核のニューロンでは特殊な新規Na⁺チャンネルが神経核構成ニューロンの応答特性を決定していることがわかっている。しかしながら、それらのチャンネルの構造や機能の実態は明らかでない。そこで、統合バイオサイエンスセンターと東大が連携し、この新規イオンチャンネルの分子実態や生理機能について解析すると同時に行動の動機付けへの関与についても調べることを計画した。従来の研究で用いてきた熱帯魚ドワーフグラーミーの脳においてNa⁺チャンネル遺伝子のクローニングを行った結果、TTX耐性のNa⁺チャンネル遺伝子断片と思われるものが見出された。今後はこれがGnRHニューロンの示すペースメーカー活動に関与しているかどうかをHeterologous expression実験などで確認すると同時に配列情報を詳細に調べていく予定である。

21. 電位依存性ホスファターゼの生殖生理機能における役割

吉田 学 (東京大学理学系研究科大学院)

柴小菊 (東京大学理学系研究科大学院)

稲葉一男 (筑波大学下田臨海実験センター)

保住暁子 (筑波大学大学院生命環境科学研究科博士課程)

西野敦雄 (日本学術振興会特別研究員)

佐藤裕公 (筑波大学大学院生命環境科学研究科博士課程)

紺野 在 (筑波大学大学院生命環境科学研究科修士課程)

海津麻衣子 (筑波大学大学院生命環境科学研究科修士課程)

岡村康司

東大の吉田らは、これまで尾索動物カタユレイボヤ において卵放出性の精子誘引物質SAAFを同定するなど、

精子運動機能の発現やその制御に関する研究を推進してきた。一方、村田らが同定した Ci-VSP はカタユウレイボヤの精子に発現していることから、精子の運動や受精反応にこの分子が関わる可能性が考えられた。本研究の最終目標は、生殖機能、精子生理機能に関して優れた実験系であるカタユウレイボヤを用いて、Ci-VSP の生理機能を解明することである。この解析のためには、カタユウレイボヤ精子の鞭毛運動パターンを数理的に解析できる実験系を立ち上げることが必須である。そこで、ストロボ画像取得システムを用いて精子の運動の軌跡を解析することを行った。

まずは鞭毛運動解析装置の構築を行った。ストロボ装置として高速度 LED を用い、高速度ビデオカメラと同期を行うことで、200 フレーム/秒のレートで高解像度の画像を得ることに成功し、さらに自作の画像解析プログラムを開発することにより、運動中の精子の鞭毛運動を数理的に解析する手法を確立した。この手法を用い、SAAF が正常精子の鞭毛運動に与える影響の解析を行った。カ

タユウレイボヤ精子は通常は円運動をしているが、卵や SAAF の様な誘引源があると、誘引源に近づいている時には直進に近い軌跡を描き、遠ざかっている時には誘引源へ向かうように「turn」と呼ばれる急激な方向転換を起こすという運動変化を見せる。この際の鞭毛運動パターンの解析を行ったところ、turn の際に一過的にきわめて非対称的な鞭毛打を起し、その後対称的なパターンを示すことが明らかとなった。一方、運動中の精子に均一濃度となるように SAAF を添加すると、円運動を続けるものの、その運動軌跡の半径が増大していることが明らかとなった。この際、鞭毛運動パターンはより対称的になっていた。この結果は、精子走化性時に特徴的に見られる turn は SAAF の絶対濃度でコントロールされるのではなく、濃度変化によって引き起こされることを示唆する。

今後、Ci-VSP の変異体を発現させた精子を用いて、この解析法を用い、精子運動における Ci-VSP の解明を行いたい。

22. 脊椎動物の祖先型のイオンチャネルのアミノ酸配列推定と、そのタンパク質の機能解析

齋藤成也 (国立遺伝学研究所)

増山和花 (総合研究大学院大学生命科学研究科博士課程)

隅山健太 (国立遺伝学研究所)

西野敦雄 (日本学術振興会特別研究員)

岡村康司

電位センサータンパクが生物進化の過程でどのように変遷してきたかを明らかにするため、遺伝研側で、各生物からの ortholog 遺伝子のアミノ酸配列をもとに、分子系統樹を作成した。解析の対象となった生物種は、ヒト、チンパンジー、カニクイザル、イヌ、ウシ、チキン、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル (*Xenopus tropicalis*)、ミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*)、ホヤ、ウニ、オポッサム (*Monodelphis domestica*) と、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)、トラフグ (*Fugu rubripes*) であった。その結果、哺乳類の中では顕著に進化速度が速くなっていた。アミノ酸配列の比較により、電位センサードメインの S4 の陽性チャージの配列パターンが哺乳類とそれ以外で異なっていた。一方、岡崎側で、ヒト、マウス、ラット、

トリ、ゼノパス、ゼブラフィッシュの各 ortholog 分子を、ツメガエル卵母細胞に強制発現させ、電位センサー機能の電気生理学的計測を行った。その結果、ゼブラフィッシュ、ゼノパス、トリでは明確なゲート電流を示したが、哺乳類の VSP ではゲート電流を出さなかった。この結果は分子系統樹での結果と良くあっており、哺乳類進化の過程で、膜電位感知機能に変更され、生理的な役割も変化したことを示しているのかも知れない。今後は、1. 哺乳類とトリの間に位置する生物種の分子機能解析も行う、2. 酵素活性についても種差を明らかにする、3. 哺乳類の VSP においてアミノ酸配列を非哺乳類型に変更し、電位センサー機能が回復するかを調べる、4. ウニやそれ以外の無脊椎動物の VSP を同定し、その分子機能を解析する、5.

各動物種での組織発現パターンを比較する, などの解析を行い, 生物進化での変遷の意味を明らかにする予定である。

23. ゲノム情報に基づく神経発生関連膜タンパク分子機能の解析

高橋 弘樹 (基礎生物学研究所 形態形成研究部門)

山田 成宏 (基礎生物学研究所 形態形成研究部門)

堀田 耕司 (慶応義塾大学 理工学部生命情報学科)

小笠原 道生 (千葉大学 理学部生物学科)

岡戸 晴生 (東京都神経科学総合研究所 分子神経生理)

西野 敦雄 (日本学術振興会特別研究員)

岡村 康司

神経発生過程における細胞間相互作用には生物種間で高度に保存された膜タンパク群の分子機能が重要である。しかし, これら膜タンパク質群の分子機能は遺伝子の点と点の繋がりとしては解明されているがダイナミックな時系列としての理解には程遠い。本研究では, 近年ゲノム情報が整備されるとともに単一細胞レベルでの個体発生が記述された原索動物ホヤ胚やEST情報が整備されたアフリカツメガエル胚を用い, 神経発生関連膜タンパク質とくに Notch シグナルや膜電位センサー分子のダイナミックな分子機能を個体まるごとのシステムで時系列的に解析を進めることを目的とした。

1) 神経形成における脊索の役割

脊索動物の発生過程において, 脊索は体軸伸長において働くのみならず, 神経誘導や神経管形成過程においても重要な役割を果たしていると考えられているが, その分子メカニズムについては明らかにされていない点が多い。これまでに, 我々はホヤの Ci-Scale (Ci-Scabrous-like) の mRNA は脊索細胞のみに特異的に発現することを脊索動物で初めて明らかにしている。興味深いことに Ci-Scale タンパク質の局在を Ci-Scale 抗体を用いて調べたところ, 脊索細胞および脊索細胞外の表皮感覚細胞お

よび中枢神経細胞に沿った繊維状の構造に局在することが明らかになった。

2) Notch シグナルによる Scale の局在変化

ショウジョウバエの Scabrous は遺伝学的な解析から Notch と相互作用することが示唆されている。そこで, Ci-Notch と Ci-Scale の関係を解析するために Ci-Notch 活性化型の過剰発現あるいはガンマーセクレターゼ阻害剤による Notch シグナルを阻害したときの Ci-Scale の影響を調べた。その結果 Ci-Notch 活性化型を過剰発現させた場合は通常よりも多くの Ci-Scale が脊索外に局在するが, これとは逆に, Notch シグナルを阻害した場合は脊索外にほとんど局在しなかった。このことから, Notch シグナルによって Ci-Scale タンパク質の局在そのものが変化することが明らかになった。

3) Scale の神経形成における機能解析

Notch シグナルを阻害すると同時に Ci-Scale の変異体を発現させると幼生期では, 頭部において神経細胞の分化異常, 尾部において神経軸索の走行異常が観察された。このことから, Ci-Notch と Ci-Scale は, 神経細胞分化・形成において協調的に働いていることが示唆されており, さらに機能解析を進めている。

24. 次世代 *cameleon* を用いたカルシウムイメージングによる、ゼブラフィッシュの発生過程および神経回路の解析

宮脇 敦史 (独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター)

東島 真一

cameleon は遺伝学的にコードされたレシオメトリックカルシウム指示薬である。最近、われわれは、従来型よりもはるかに高感度にチューンされた次世代*cameleon*の開発に成功した。本研究では、イメージングに適した生物ゼブラフィッシュに次世代 *cameleon* をトランスジェニックゼブラフィッシュの手法により発現させて、様々な発生過程(たとえば体節形成)におけるカルシウムシグナルの関与、および、(ii) 遊泳行動、逃避行動などの行動中にどのような神経細胞が活動するか、をカルシウムイメージングによって調べることを長期的な目標とした。まず、次世代 *cameleon* の一種、YC3.60 を、すべての細胞で発現を促す *hs70b* プロモーターの下につないだコンストラクトを作製し、それに関してトランスジェニックフィッシュを作製した。得られたトランスジェニックフ

ィッシュでは、期待通りすべての細胞で YC3.60 が発現しており、また、母性効果のためトランスジェニックフィッシュの母から生まれた胚では、1細胞期から YC3.60 の発現が認められた。神経細胞で、その発火に伴うカルシウムシグナルが得られるかどうかを、感覚神経細胞である Rohan-Beard 細胞を用いて検討した。ブンガロ毒素によって不動化した幼魚の皮膚に電気刺激を与えてシグナルの変化を見たが、期待に反して、明確なシグナルは認められなかった。これは、YC3.60 は従来型の *cameleon* よりも高感度ではあるが、カルシウムとの親和性の低いタイプのものであることが原因として考えられる。今後、カルシウムと高親和性タイプの YC2.60 を用いて改めて検討を行う予定である。

25. 赤外レーザー・赤外放射光の細胞・神経作用と温度受容機構の解明

小田 紀子 (立命館大学 放射光生命科学研究センター)

山田 廣成 (立命館大学 放射光生命科学研究センター)

山田 久夫 (関西医科大学)

片岡 洋祐 (関西医科大学)

富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

恒温動物では体表温度は環境に依存して変動しているが、深部体温は常に 37°C 付近で保たれている。これは、体表の温度情報が神経を介して中枢の体温調節機構へフィードバックされているためである。近年、温度受容体タンパク質群 (TRPV1~TRPV4) がクローニングされ、この4つのサブタイプ TRPV1~TRPV4 がそれぞれ異なる温度に反応して開閉するイオンチャンネルであること、また TRPV1 は辛味成分カプサイシンにも応答することが明らかとなった。しかし、体温付近の数度の温度変化を感知し、タンパク質の構造が変化する仕組みは未だ明らかでない。そこで、TRPV の熱受容・体温調節機構への関与を検討するため、マウスに赤外線による熱刺激を

与えたときの深部体温変化を測定した。

熱刺激に用いた赤外線は波長 830nm、出力150mW の半導体レーザーで、皮膚温度が 55 度を超えないように照射範囲を調節しながら 5 分間照射した。通常のマウスでは、この熱刺激で深部体温は変化せず、一定に保たれた。TRPV1 に高濃度のカプサイシンを与えると脱感作が起こる。マウスに高濃度のカプサイシンを塗布し、TRPV1 を脱感作させた後、同様の赤外線による熱刺激を与えると、通常では起こらない体温上昇が計測された。この結果は、TRPV1 の体温調節機構への関与を示すものである。

今後、TRPV の赤外応答の波長特異性について、近赤外から遠赤外に亘って強い放射光を発生する小型放射光

装置「みらくる 20」からの放射光を分光照射して検討するとともに、数種類ある TRPV のうち特定のサブタイプ

の遺伝子欠損マウスを用いて、熱受容と体温調節における TRPV サブタイプの役割を検討したい。

26. 体液 Ca イオン濃度を感受する Ca チャネルの解析

伊村 明浩 (京都大学大学院医学研究科)

久保田 幸治 (京都大学大学院医学研究科)

富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

ヒト型老化疾患モデルマウスとして報告された *klotho(kl)* マウスをヒントにして、Klotho 分子の機能を解析してきた。Klotho 分子は一回膜貫通型の I 型膜タンパクであり、主として遠位尿細管、脈絡膜、上皮小体の細胞内の膜構造中に分布する。細胞膜表面に分布する量は少ないこと、また、膜貫通部位近傍で切断されて分泌され、体液中を循環することが判っていた。

脳脊髄液は中枢神経系を包み込んで灌流する体液であり、組成や圧力が厳密に制御されている。脈絡膜がその

大部分を産生することは知られているが、その成分管理システムは知られていない。脳脊髄液中の Ca 濃度を測定したところ、*kl-KO* マウスでは有意に低下していた。そこで、脳脊髄液を感知するシステムに該当すると思われるセンサー分子を調べたところ、TRPV4 が有力な候補の一つであると考えられるいくつかのデータを得た。Klotho 分子は TRPV4 シグナルに従って細胞膜イオン輸送体を細胞膜にリクルートするための分子装置であると推定して解析を進めている。

27. 内耳前庭における TRP ファミリーを介する感覚受容

久保 伸夫 (関西医科大学医学部)

沈 静 (関西医科大学医学部)

小西 将矢 (関西医科大学医学部)

濱田 聡子 (関西医科大学医学部)

富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

Ca²⁺ 透過性チャネルと考えられている浸透圧感受性受容体 (TRPV4) は、細胞内情報伝達機構において重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。内耳液のイオン環境及び透過性の変化による局所の浸透圧変化は、蝸牛の外有毛細胞の運動能及び細胞内 Ca²⁺ 濃度に影響を与え、結果聴覚機能になんらかの影響を与える可能性も考えられる。TRPV4 の遺伝子が、蝸牛の内有毛細胞、外有毛細胞、螺旋神経節細胞、血管条 margin 細胞に発現していることは既に報告されているがその機能は不明であった。そこで我々は、野生型及び TRPV4 knock-out マウスを用い、蝸牛の TRPV4 の発現、単離外有毛細胞における低浸透圧刺激による細胞内 Ca²⁺ 動態について比較検討を行った。

RT-PCR 方法によって、野生型のマウス蝸牛において TRPV4 遺伝子の発現が検出されたが、knock-out マウスの蝸牛では陰性であった。single-cell RT-PCR 解析により、TRPV4 遺伝子は野生型マウス蝸牛の螺旋神経節細胞、外有毛細胞、内毛細胞に発現していることが確認された。これらの細胞では TRPV4 免疫反応も陽性であったが、knock-out マウスにおいては、いずれの細胞でも陰性であった。また、低浸透圧刺激及び TRPV4 の agonist である 4 α -PDD に対して、野生型マウス外有毛細胞の [Ca²⁺]_i 上昇が認められた。この上昇は TRPV 受容体の antagonist である Ruthenium Red により抑制された。一方、TRPV4 knock-out マウス外有毛細胞では、低浸透圧刺激及び 4 α -PDD による [Ca²⁺]_i 上昇が認められなかった。

以上の結果から、TRPV4 受容体が外有毛細胞における細胞内情報伝達機構において重要な役割を演じている可

能性が考えられた。

28. 感覚神経における侵害刺激センサーとしての TRPA1 の役割

野口 光一（兵庫医科大学医学部）

戴 毅（兵庫医科大学医学部）

富永 真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

TRPA1 は 2003 年にクローニングされた新規チャンネルタンパクで、17 度以下の侵害性冷刺激によって活性化される。また、TRPA1 はマスタードやマリファナの成分により活性化されることが報告され、痛みの標的分子の新しいメンバーとして注目を浴びている。そこで、炎症疼痛モデル動物の疼痛過敏の発症メカニズムにおける TRPA1 の役割とその調節機構を明らかにすることを目的とする。TRPA1 遺伝子とタンパク質の発現を解析したところ、後根神経節細胞の約 30% に TRPA1 の発現を認

めた。また、TRPA1 は小径の TRPV1 陽性細胞に発現していた。さらに、TRPA1 が神経栄養因子受容体とも高率に共発現していたことから、神経栄養因子の TRPA1 活性化への影響を感覚神経細胞において Ca^{2+} イメージング法で検討したところ、神経栄養因子の投与は、リガンドによる TRPA1 を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を増強した。よって、神経栄養因子は TRPA1 機能を制御しているものと推測された。

29. シリコンベース膜タンパクバイオセンサー制作のための タンパク質発現・精製・集積技術開発

宇理須 恒雄（分子科学研究所）

岡村 康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

森垣 憲一（産業技術総合研究所）

内海 裕一（兵庫県立大学 高度産業科学技術研究所）

富永 真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

イオンチャンネルの電気生理学的研究において、ピペット利用のパッチクランプが果たした貢献は計り知れないものがあるが、最近、新しいタイプのパッチクランプ：プレーナータイプのパッチクランプの研究が、特に欧米各国で活発化している。これは、1) 高集積が可能で、スクリーニング応用が可能、2) 二次元面内の多点測定が可能、3) 熟練を要しない、4) 小型により、体内挿入が可能、5) 蛍光や、細胞の活動電位の時空間分布との同時測定が可能、などの、ピペットパッチクランプに無い数々の特色があり、将来、マイクロ流体回路と組み合わせるものに取って代わることすら予測されてもいる。本共同

研究では、シリコンを基板とするプレーナー型パッチクランプ素子の開発を、富永が開発した TRP チャンネル発現 HEK293 細胞を用いて進めている。素子開発における重要な技術的問題は、(1) 細胞あるいは、脂質二重膜を微細貫通孔に置いた時の孔のシール抵抗をギガオーム以上にすること(ギガオームシール)、および(2)電流雑音を低減し、岡村が研究を進めているプロトンチャンネルなどの微小電流チャンネルや高速応答計測を可能とすることである。本共同研究では Si 基板として SOI 構造基板を用い、グラミジンの系でシングルイオンチャンネルを計測し、雑音電流としてテフロン基板並みの低雑音を実現

した。従来 Si 基板は雑音電流が大きいのでパッチクランプの基板としては不適とされていた常識を変えるとことに成功した。

さらに微細貫通孔(径 0.5-100 μm)を形成した基板をマイクロ流体回路に組み込み細胞を貫通孔部に導入し、現在、ギガオームシールを形成する実験をすすめている。

今後、ギガオームシールの安定な形成をめざした微細孔周辺の化学修飾, カプサイシンなどのリガンドを導入し、ホールセルモードや、シングルチャンネルの動作確認を行い、さらに、より低雑音化, シール抵抗の安定高度化, マイクロ流体回路の高性能化などを進める。

【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)	174
2. 筋の痛みの脳内投射 (水村 和枝ほか)	174
3. 脳における時間順序判断メカニズムの解明 (北澤 茂)	175
4. 磁気共鳴画像診断用新規造影剤の開発 (阪原晴海ほか)	176
5. 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)	177
6. 「心の理論」の神経科学的研究 (板倉昭二ほか)	177
7. 視覚障害者視覚領野内における体性感覚情報処理の脳内再現地図の作成 (内藤栄一)	177
8. 非侵襲的脳機能検査による疲労・疲労感と学習意欲の評価法 (渡辺恭良ほか)	179
9. 人での立体視機能, 並列情報処理過程の解明 (宇賀 貴紀ほか)	180
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)	180

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)

Jorge Mario Andreau (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。

1頭のマカクザルの頭部MRI画像を撮影した。ネブ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, 中心溝の位置の確認, 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. 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)

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)

本研究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, 平成16年度の共同研究を継続・発展させたものである。

被験者として健常男性成人14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48mm, 直径0.05mm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1.5mm, 筋で20mmとした。刺激針より30mm離れた部位に直径8mmの皮膚表面電極を貼付して陽極とし, 両電極間に1ms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0, 5, 7の3種類(強度0: 痛みなし, 強度10: 想像し得る最大の痛み)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3種の強度の刺激をそれぞれ30回ランダムに与えた。

筋および皮膚への痛み刺激に共通に応答を示した脳部位は, 同側の小脳, 両側の視床下部, 島, 前帯状皮質, および対側の一次感覚皮質であった。これらの脳部位が痛み刺激に対し反応を示すことは一般に認められており, 特に島および前帯状皮質における脳活動は多数のイメージング研究による報告がある。このことから, 本研究で得られたデータは被験者の痛み刺激に対する脳活動を適切に捉えていると考えられる。

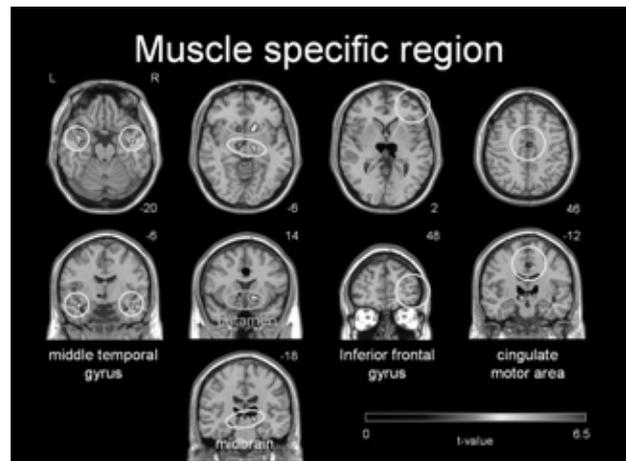
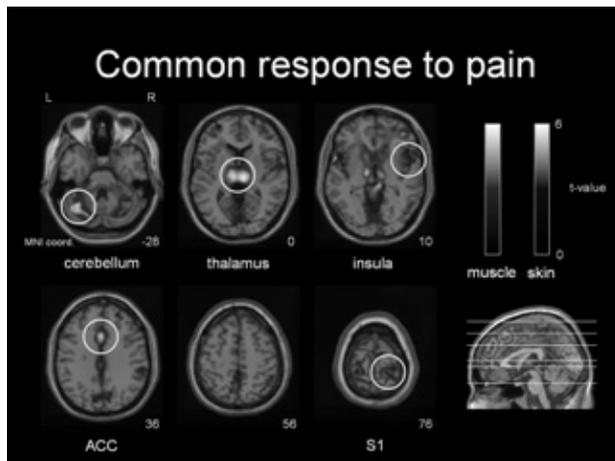
一方筋特異的に応答を示した脳部位は, 両側の中側頭回, 被殻, 中脳, 対側の下前頭回および帯状運動野であった。中側頭回における脳活動は群発性頭痛によって起こることが報告されている。被殻を含む大脳基底核群は運動の処理過程に重要な役割を担っていることが一般に知られているが, 体性感覚刺激の入力を受けることも分

かっている。また大脳基底核群は侵害性情報の調節に関わり、高次の運動野に対し運動計画の情報を伝達するという報告がある。下前頭回における脳活動は痛み特異性でないという報告があるが、詳細は不明である。

帯状運動野における脳活動は、手足の運動、運動のイメージや運動の知覚によって生じることが知られており、この反応は痛み刺激からの逃避要求に関わる反応だと考

えることができる。この部位における筋痛特異的な脳活動は最近の PAIN 誌の報告と一致し、これは我々の研究の妥当性を裏付けるものである。

我々は本研究の成果を日本生理学会で報告した。今後はデータ解析をさらに進め、学会誌に論文を投稿する予定である。



図：皮膚痛および筋痛に対し共通に活動が見られた脳部位（左）および筋痛特異的に活動が見られた脳部位（右）。

3. 脳における時間順序判断メカニズムの解明

北澤 茂（順天堂大学・医学部）

脳のニューロン間の信号の伝達には時間がかかり、しかも多数のループがあるので、信号の前後関係は逆転しやすい。しかし、信号の順序の誤りは生存を脅かす可能性があるから、脳の中には、時間を安定に表現するための何らかの原理が隠されているはずだ。脳の中の時間情報処理の基本原理に迫ることが本研究の目標である。

先行する心理物理学的研究と非侵襲脳活動計測の結果から、われわれは、2つの事象の時間順序は、空間内の2つの事象としての情報と、事象の情報を含まない動きの情報に一度分離され、その後統合されて再構成される、という時間順序判断の「動き投影仮説」を提案した。

本研究では、非侵襲脳活動計測の結果から、左右の縁上回が両者の統合に重要であるという仮説をたて、その仮説を検証するために経頭蓋磁気刺激装置を用いて外乱

を与え、時間順序判断にどのような変化が生じるかを精査した。研究には6名の被験者が参加した。右手と左手に加えた触覚刺激の時間順序判断を、該当部位の経頭蓋磁気刺激(0.9Hz, 10分間)の前後で比較した。その結果、一部の被験者では、刺激の前後で判断の正解率が最大50%程度変化した。ある被験者では、変化の方向が左側刺激と右側刺激で正反対となった。これらの結果は、左右の縁上回が右手と左手に加えた触覚刺激の時間順序判断に、重要な役割を果たしていることを示唆する。また、左右半球の機能分化があることも示唆された。しかし、効果の個人差が大きいので、次年度以降の研究ではMRIスキャナーを用いた非侵襲脳活動計測等を行い、個人差の原因を探る必要があるだろう。

4. 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】 現在臨床現場で使用されている造影剤は血管外漏出性の造影剤が主たるものであるが、血管内に滞留する造影剤を使用することにより、診断能の向上が期待できるのみならず、tumor angiogenesis 等の様々な付加的情報が期待できる。我々は血管内に一定時間停滞する性質を有する造影剤 dendrimers DTPA-D1Glu (OH) (分子量 1448.45D ; 以下デンドリマーと呼称) を使用して、従来の血管外漏出性造影剤である Gd-DTPA との比較において、その有用性を調査している。昨年度はこのデンドリマーを用いることにより、通常 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であることを示した。本年度は通常臨床機で使用される頻度の高い gradient-echo 法をベースにした高速撮像法においてもデンドリマーが Gd-DTPA よりも有意に高い腫瘍の信号増強効果を有するかどうかを評価する実験を施行した。

【方法】 F344 ラットに 100 ppm の diethylnitrosamine を混合した蒸留水を給水して 100~110 日間通常飼育下で化学発癌 (肝細胞癌) を誘導した 10 匹を対象に、Gd-DTPA (0.1mol/kg) による造影 T1 強調画像 (3DVIBE 法) の連続撮影を (直後, 30 分後, 1 時間後, 2 時間後の time table で) 2 時間後まで行った。Gd-DTPA による造影 MRI 終了後、5 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。MR 画像撮影終了後、肝臓を摘出し、連続切片を作製、H&E 染色を施し、MR 画像と比較した。

【結果】 現在、組織切片で癌巣を判定中であり、MRI 上それに対応する結節に関して、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) を計算する予定であるので、まだ断定はできないが、preliminary-data としては、デンドリマーでは Gd-DTPA と比較して明らかに高い信号強度で肝細胞癌を濃染させ、しかもその濃染が Gd-DTPA よりも長時間にわたり持続する傾向があるようである。



図 1

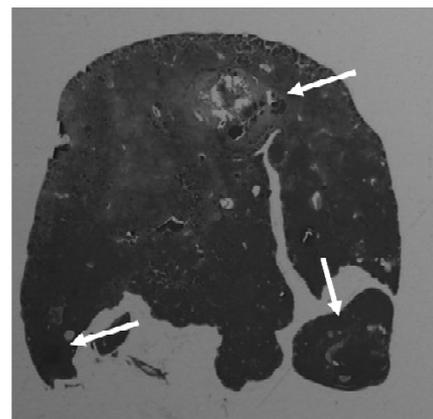


図 2

図 1 : デンドリマー0.05mmol/kg を急速注入後 3DVIBE にて撮影した T1 強調画像。背側から連続 2 断面の冠状断面を表示。矢印は濃染された肝細胞癌を示す。

図 2 : 同断面と同一のスライスの組織標本ルーペ像。H&E 染色。デンドリマーで濃染されている結節は N/C の高い低分化の肝細胞癌で、極めて富血性の結節である。

5. 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 大学院医学系研究科）

エピソード記憶の想起にかかわる脳内の活動が、健常若年成人と健常高齢者でどのように異なるか fMRI を用いて検討した。若年成人を用いた実験結果では、想起の成功に関する脳領域として頭頂間溝付近の領域が賦活されることが分かっている。またこの領域は記銘時の処理水準の深さによって活動が調節され、recollection に関する領域であると推測された。これらの研究結果は *Cerebral Cortex* 誌に発表予定である。

健常高齢被験者において、上と同じ実験を行った。高齢者では、ベースライン条件からの脳賦活という点では若年者と比較して前頭葉の活動が強くなっていた。しかし反応時間を共変量として加えると、この高齢者における前頭葉の賦活は少なくなった。従って課題の困難度などを考慮した解析を行う必要性があった。さらに想起の成功にかかわる前頭葉や海馬領域の活動は、高齢者で低下していた。

また近年注目されている default-mode network の活動

を若年者と高齢者で比較した。その結果は、若年者では前頭葉内側面と後部帯状回領域の課題遂行時の低活動が確認された。高齢者ではそれらの領域の低活動が有意に減少していた。課題成績との関係を見ると、後部帯状回の活動が年齢との相互作用を示した。これは後部帯状回が Papez の記憶回路の一部であることと関連すると考えられた。

今年度は以下の2本の論文を発表した。

1) **Iidaka T**, Matsumoto A, Haneda K, Okada T, Sadato N. Hemodynamic and electrophysiological relationship involved in human face processing. Evidence from a combined fMRI-ERP study. *Brain and Cognition* 60 (2) 176-186, 2006.

2) **Iidaka T**, Matsumoto A, Nogawa J, Yamamoto Y, Sadato N. Frontoparietal network involved in successful retrieval from episodic memory. Spatial and temporal analyses using fMRI and ERP. *Cerebral Cortex* (in press).

6. 「心の理論」の神経科学的研究

板倉昭二（京都大学 大学院文学研究科） 定藤規弘（生理学研究所）

他者と円滑に付き合う能力を社会能力と呼び、社会生活を営む上で必須の能力である。これは言語性・非言語性のコミュニケーション能力を基盤とした高次脳機能と捉えられる。その発達過程および神経基盤については不明の点が多い。生後9ヶ月ころに、他者の注意をモニターすることにより注意を共有できるようになるこ

と（共同注意の成立）が、社会能力の起源とみなされている。本研究は、共同注意の神経基盤をあきらかにすることを目的とする。本年度は、共同注意を機能的 MRI により検証するための課題の作成を行った。次年度より、実際の実験に入る予定である。

7. 視覚障害者視覚領野内における体性感覚情報処理の脳内再現地図の作成

内藤栄一（京都大学大学院人間・環境学研究科）

申請者らは、四肢の腱への振動刺激が運動感覚情報を脳に運ぶ Ia 求心性線維を動員するという技法を用いて、健常被験者の脳活動を測定してきた。この一連の研究に

より、運動関連領野および右半球前頭-頭頂葉の活動が、運動感覚情報を基に形成される動的な身体像の脳内表象に関与することが明らかになった (Naito 2004a,b; Naito

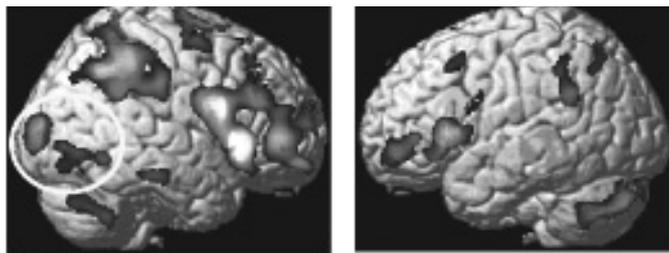
et al. 1999, 2002a,b, 2005; Naito & Ehrsson 2001; Ehrsson et al. 2005; Naito & Ehrsson 2006)。一方で、身体像形成には自分の身体に関する視覚情報も重要な貢献をする。ヒトの視覚有線外野外側部には身体に関する視覚情報処理に特化した領域(身体視覚領野)がある(Downing et al. 2001)。申請者らの先行研究(Hagura et al. 2005)は、脳が自分の四肢運動に関する視覚情報と運動感覚情報とを統合する場合に、左小脳外側部が上述の右半球頭頂葉およびこの身体視覚領野と連携を取りながら活動することを明らかにした。これは身体視覚領野が体性感覚システムと相補的關係をもちながら身体像の脳内再現形成に寄与することを示唆する。このように体性感覚と視覚は連携をとりながら、空間情報処理を行っている。申請者は、ある特定の機能に特化していた感覚領野が本来の感覚機能を果たす必要がなくなった場合、その領野は感覚の相違を超えて、機能的に関連のあった他の感覚情報処理に積極的に関与するようになると仮説する。もしそうならば、視覚障害者の身体視覚領野は、感覚の相違を超えて、本来補助していたと考えられる四肢運動感覚情報処理に関与し、視覚情報の欠如に伴う体性感覚情報処理の精度の向上に貢献しているに違いない。そこで、右利き視覚障害者 1 名(54 歳男性)の参加によるパイロット実験を行った。

右手、左手、右足のそれぞれにつき、(1) 伸展筋の腱への 80Hz での振動刺激(運動錯覚条件)、(2) 腱をはずした骨皮膚上への 80Hz での振動刺激(皮膚振動刺激・錯覚

なし条件)、(3) 安静条件を行った。運動錯覚経験中に賦活する脳部位の同定には、(1) 条件の脳活動を(2) 条件と比較した。

この視覚障害者が運動錯覚を経験すると、右半球視覚有線外野外側部[活動ピーク座標(52,-72,-7)および(47,-77,-3)](図 1 上段左黄色○)が四肢の相違に無関係に賦活した。しかも錯覚を生じない皮膚への単純な刺激ではこの領域は賦活しなかった。この領域は閉眼健常被験者群では賦活しない(下段)。視覚障害者でも運動錯覚を経験すると、健常被験者と同様に、四肢に対応した運動関連領野の体部位再現部位の活動(図略)と、四肢に共通の右半球前頭-頭頂葉の賦活(上下段左)が認められた。これらは、(1)視覚障害者が健常被験者とある程度同様の運動感覚情報処理を行っていること、(2) 視覚障害者では健常者の脳領域に加えて、右半球視覚野や前述の小脳外側部(視覚-運動感覚統合領域)(-30,-75,-35)(上段)などをさらに動員して付加的な情報処理を行っていることを示唆している。1 名のパイロット実験ではあるが、この結果は、失明以前には身体視覚情報処理に特化していたと推測される視覚有線外野外側部が、失明(約 30 年前)とともにその機能を果たす必要がなくなったため、おそらく本来身体像形成のために相補的關係をもっていた四肢運動感覚情報処理に関与するようになった可能性を示唆した。

視覚障害者1名の運動(右手, 左手, 右足共通) 錯覚経験中の脳活動



閉眼健常被験者群の運動錯覚経験中の四肢共通の脳活動

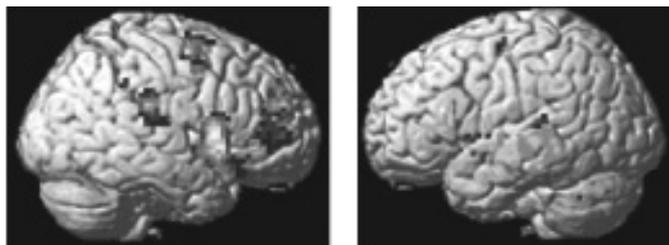


図 1

8. 非侵襲的脳機能検査による疲労・疲労感と学習意欲の評価法

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)

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)

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)

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)

定藤規弘 (岡崎生理研大脳皮質機能研究系心理生理学研究部門)

田邊宏樹 (岡崎生理研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)

学習意欲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 (fMRI) を用いて意欲賦活時の脳血流反応の変化を検討した。大学生 14 名 (22.4 ± 1.2 歳) を対象に、ワーキングメモリ課題(3-back テスト)を施行させた。3-back テストは、3 個前に呈示された数字と、今、呈示された数字が同じかどうかを判断するテストである。課題遂行中に、正解するとポイントが加算される金銭的報酬セッションと、「課題の正解率が被験者の知能レベルを示す」というインストラクションによる成績的報酬セッションを設け、それぞれのセッション時のパフォーマンス (正解率と反応時間) と脳神経活動を比較検討した。また、全ての被験者は、課題前に学習意欲に関する自己記入式質問票の記入を行った。金銭的報酬時と成績的報酬時における反応時間、正解率には差がみられなかった。ワーキングメモリと関連して賦活された脳部位は、先行研究とほぼ同様であった。金銭的報酬時には、大脳基底

核、頭頂葉の賦活がより顕著にみられた (Fig. 1)。また、成績的報酬時には、被験者全体のグループ解析では、有意に賦活する脳部位はみられなかった。次に質問票による学習意欲のスコアとの相関解析を行った結果、成績的報酬時にのみ、学習意欲が高い被験者ほど大脳基底核の賦活レベルが大きいことがわかった (Fig. 2)。以上のことから、金銭的報酬時には、先行研究の結果と同様に、大脳基底核の神経活動が亢進することで意欲が賦活されることを確認した。成績的報酬により意欲が賦活されるかどうかは、個人差があり、学習意欲度が、成績的報酬により意欲をより賦活させるかどうかを規定するパラメータの一つであることが示唆された。単なる金銭的報酬により賦活された意欲ではなく、脳科学と教育という視点から、成績や学習といった因子と関連のある、意欲の脳機能イメージング研究の第一歩として、大変重要な成果が得られた。

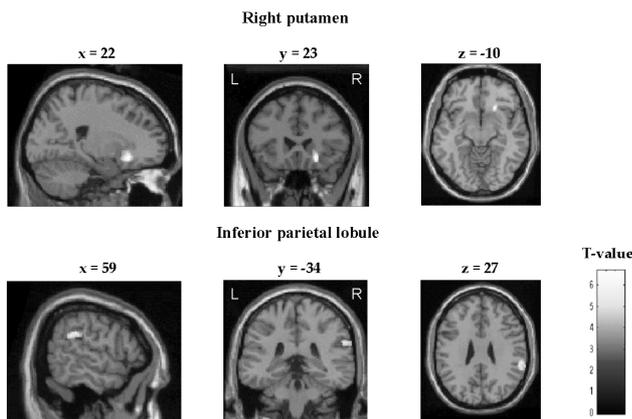


Fig.1

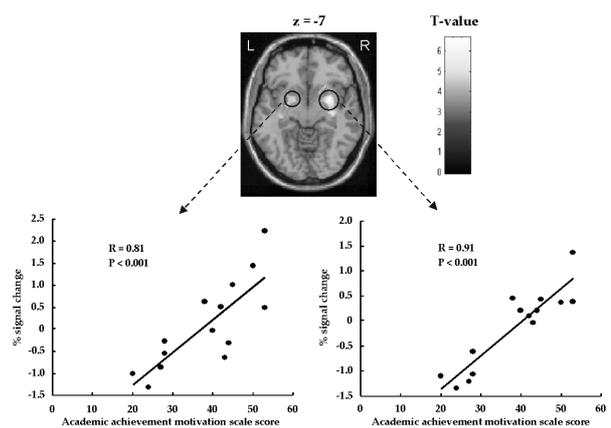


Fig.2

9. 人での立体視機能, 並列情報処理過程の解明

宇賀 貴紀 (順天堂大学医学部)

神作 憲司 (生理学研究所大脳皮質機能研究系)

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。サル大脳皮質視覚野では, 背側経路(空間視経路)で絶対視差(1つの物体の注視点に対する両眼視差)の情報処理が, 腹側経路(物体視経路)で相対視差(2つの物体の絶対視差の差)の情報処理が行われていると考えられている。本研究では, これらサルでの知見を基に, 人でも絶対視差・相対視差情報の並列処理が行われているのか, それぞれの情報処理がどの脳部位で行われているのかを検証する。

本研究では, 絶対視差・相対視差それぞれを弁別中に, fMRI を撮影し, 絶対視差・相対視差に特異的な脳の賦活が見られるか検討する。さらに, 脳内磁気刺激を用い

て特定部位の脳活動を一時的に休止させ, 絶対視差・相対視差に特異的な情報処理過程の欠落が見られるか検討する。絶対視差検出課題では, 被験者は1つの物体が注視点の手前にあるのか, 奥にあるのかを答える。相対視差検出課題では, 被験者は2つの物体のどちらが手前にあり, どちらが奥にあるのか, その相対関係を答える。サルの知見では, 大脳皮質 MT 野は絶対視差の検出をしているのに対し, V4 野は相対視差の検出をしていることが示されている。もし人でも同様であれば, 絶対視差検出課題では MT 野が, 相対視差検出課題では V4 野が賦活されると予想される。現在プログラムの作成中であり, まだデータを取得してない。今後は予備実験を施行後, 本実験に移る予定である。

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)

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。この方法を用いて, 今回我々は, 皮質脊髄路損傷後の手指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。昨年度に引き続き, 雄のアカゲザル(5-7才)から得られた良好な頭部画像を用い, 脳の部分の平均画像を作成し, 数回のデフォルメ処置を繰り返し, 標準脳 MRI を作成した。3頭のサルにおいて到達-把持運動遂行中に PET による脳賦活イメージングを行なった。上記のアカゲザルの標準脳をテンプレートとして用い, 3頭の個体の PET 脳画像を標準脳に合わせ込み, SPM にて群間比較を行った。切断1ヵ月後には両側の一次運動野 (M1)・感覚野 (S1) の活動増大が観られた。3ヵ月後には両側の M1/S1 にお

ける活動増大が残存し, 加えて両側の運動前野腹側部において活動の増大が残存した。そこで, 損傷後に活動の増大が見られた両側の M1 が precision grip の機能回復に貢献しているか検討するために, それぞれの領域に GABA agonist のムシモルを注入し, CST 切断前後において precision grip を観察した。その結果, 切断反対側の M1 への注入では, 切断前, 切断後2週間, 3ヵ月後に, precision grip の成功率の低下が観られた。しかしながら, 切断同側の M1 への注入では, 切断前および切断の3ヵ月後にはムシモルの効果は見られなかったが, 切断後2週間後では, 第一指と第二指の対立した把持ができなくなり, 成功率が低下した。以上の結果より, C4/C5 レベルでの CST 切断後の機能回復には, 切断の反対側の M1 のみならず, 切断前には precision grip には貢献していなかった同側の M1 も機能回復に貢献していることが示唆された。

【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 photic vesicle の立体構築.....	184
(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.....	184
(日高 聰)	
3. 神経系培養細胞における受容体などの3次元構造解析.....	185
(遠藤 泰久ほか)	
4. 中間径フィラメントとゴルジ装置との三次元的空間配置.....	186
(野田 亨)	
5. 嗅球神経系のニューロン及びグリアの三次元構造解析.....	186
(樋田一徳)	
6. スフィンゴリピドーシスモデルマウス(サボシン D 欠損マウス)を用いた 小脳プルキンエ細胞における parasagittal compartment の構造解析 (松田 純子ほか)	187
7. 哺乳類神経上皮細胞からの非対称分裂による神経細胞生成.....	188
(小曾戸陽一ほか)	
8. Approaches to synaptic plasticity with high voltage electron microscopy (HVEM)	189
(Kea Joo Lee ほか)	
9. 歯状回顆粒細胞樹状突起の三次元再構築.....	189
(濱 清ほか)	
10. 3-D Reconstruction of the Crystalline Bodies and the Rhabdomere Formation during Development (II) (InSun Kim ほか)	190

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 photic vesicle の立体構築

片桐 展子 (東京女子医科大学・総合研究所・研究部)

有井 達夫

photic vesicle (PV) は小胞体 (ER) の特殊形の一つで、軟体動物・腹足類の感杆型光受容細胞内に多量に含まれる。特異なロドプシン-レチノクロム系を構成するレチノクロムの局在部位である。PV は通常の固定切片では clear vesicle であるが、加温オスミウム染色によって ER やゴルジ層板と同様に黒染し、明瞭に識別できる。0.3 μ m の準薄切切片では一枚の切片内に完全な形の PV (径 80nm) が存在する。金コロイドのようなマーカーを付けていない、加温オスミウム染色後エポキシ包埋した切片を用いて、電顕トモグラフィーにより PV の形態、分布および ER やゴルジ層板との関連を観察、立体視することを試みた。材料と方法は「生理研年報 25, 26」を参照。

【結果と考察】

1) マーカーを付けない加温オスミウム染色した切片において、電顕トモグラフィが可能であった。

2) トモグラフィ解析ソフト IMOD による傾斜像の位置合わせは金コロイドのマーカーがなくても、原画像を立体構築ソフト DeltaViewer で予め位置合わせしたデータを用いて行うことができた。

3) IMOD 処理のデータを、再度 DeltaViewer に移して処理、三次元立体構築ができた。構築像は自由に回転可能であった。

データを 2 つのソフト間で移動させるには、コンピュータ処理の専門の知識が必要である。また、超高压電顕のすぐれた高解像度によって細胞基質の微細構造などが撮影される。それらは構築目的の構造と同じコンストラクトを持つことが多く構築像に組み込まれるため、そのままのデータではよりよい構築が難しかった。目的の構造を特定するため、周辺の微細な基質を photoshop などにより削除する補正処理が必要であろう。

撮影は構築する範囲を考慮して撮影倍率を決め、目的の構造と傾斜軸をフィルム面の中心に置き、撮影途中で電顕を停止、再始動をしない、一定の条件で、同一日内に行ったほうがよい。また、フィルムデータをスキャナーでとり込む際、目的の構造を含めて少し大きめに (画像のサイズ 1MB 以内) 切り取る。デジタル化したデータは DeltaViewer を利用し、photoshop などにより、明るさ、コントラストを全データが一様になるように調整・補正する。なお、DeltaViewer による位置合わせ後の保存は画像が低下するので、位置合わせは丁寧に何度も行い、保存は一度のみにする。

これらの補正・処理によって、DeltaViewer と IMOD の併用で目的の構造の電顕トモグラフィが可能である。

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)

最近、様々なニューロン間で電気シナプスが存在することが分かって来た。また、ニューロンで発現するコネクシン 36 が解明され、実験手法を組み合わせることが可能になった。まず、電気生理学的に電気シナプスの機能を解析したニューロンを細胞内標識する。次に、切片を作成して電気シナプスの形態を同定すると共に、5 μ m の厚さの切片を利用し、1,000kV の加速電圧の超高压電子顕微鏡下で解析することによって、電気シナプスを形成するニューロンの樹状突起の立体構造を解明する。

さらに、コネクシンの特異抗体を作成し、蛍光染色したニューロンに、抗コネクシン抗体を用いた免疫細胞化学法を適用し、共焦点レーザースキャン顕微鏡で解析することによって、樹状突起間の電気シナプスの部位を特定できるようになった。

主要な視覚系の興奮性ニューロンである網膜神経節細胞は、網膜内の視覚情報の処理結果を脳の視覚中枢に送っているが、細胞間の同期興奮にどのような視覚情報が含まれているかを明らかにするために、 α 型網膜神経節

細胞間のギャップ結合の機能形態解析を行なった。Dual whole-cell patch-clamp 法によって通電実験を行い、電気シナプスの形成度を判断した。二連の電圧固定法を適用して、細胞間電流を測定し、細胞間チャンネルのコンダクタンスを測定した（最大 2.45 nS）。実験した細胞ペアは同期して活動電位を発生した。細胞ペアを Lucifer yellow で標識し、抗コネキシン 36 抗体と反応させ、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡で観察した。樹状突起間の交叉して接触している所に、抗コネキシン 36 抗体の免疫反応の斑点を観察し、免疫反応はその接触部位だけにあることが分かった。免疫反応の斑点を解析した結果、樹状突起間の接触部位は平均 7 つであった ($n = 12$)。免疫反応の斑点は微細形態的にギャップ結合であった。一方、tracer coupling を示した標本から $5\mu\text{m}$ の厚さの切片を作成し、1,000kV の加速電圧の超高压電子顕微鏡で解析した。接触した樹状突起の様子を立体的に観察し、接触部位は

close membrane apposition の形態を呈することが分かった。超薄切片を作成し、接触部位を解析して、ギャップ結合を同定した。超高压電子顕微鏡の解析標本から、close membrane apposition 形態の接触領域を計測することによって、ギャップ結合斑の大きさを測定した(平均直径 $0.86\mu\text{m}$, $n = 14$)。以上のことから、隣り合う α 型網膜神経節細胞間で、接触した樹状突起の構造を微細形態学的に同定したが、抗コネキシン 36 抗体を用いた免疫細胞化学法による解析からその接触部位にはコネキシン 36 で構成されるギャップ結合が存在することがわかった。

文献

- 1) Hidaka, S., Akahori, Y., & Kurosawa, Y. (2004) Journal of Neuroscience, 24 (46): 10553 – 10567.
- 2) Hidaka, S., Kato, T., & Hashimoto, Y. (2005) Journal of Integrative Neuroscience, 4 (3): 313 – 340.

3. 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

遠藤 泰久・吉村 亮一・西田 倫希 (京都工芸繊維大学)

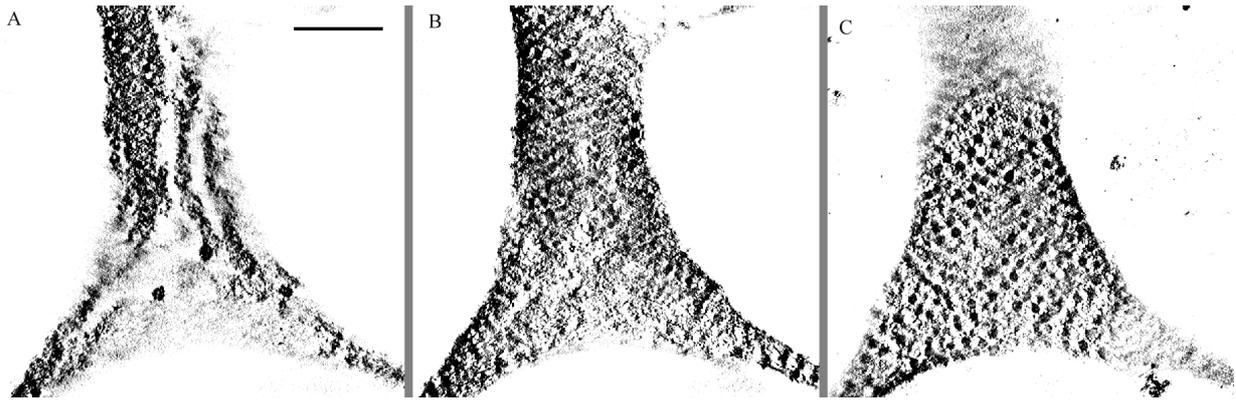
有井 達夫

神経細胞の突起の途中に形成される数珠状の膨大部、varicosity はシナプス形成に関わるだけでなく、脳内や末梢組織における非シナプス的情報伝達部位として機能している。我々のこれまでの培養細胞を用いた研究により、varicosity の形成頻度が標的細胞との混合培養によって増加すること、anterograde だけでなく retrograde にも移動すること、微小管形成阻害剤 taxol により動きが抑制されることなどが明らかとなっている。しかし、その形成機構はほとんど不明のままであり、超高压電子顕微鏡による 3 次元構造解析を試み、有芯小胞などの分布を観察した。

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、副腎髄質褐色細胞腫由来の細胞株 PC12 細胞を DMEM 培地に NGF(最終濃度 50nm) を添加し 4 日間培養した。細胞を 4%パラフォルムアルデヒド+0.1%グルタルアルデヒドで固定後、1% オスミウム酸で後固定した。エタノール系列で

脱水後、二酸化炭素一臨界点乾燥した。脱水の途中、酢酸ウランでブロック染色を施した。試料をカーボン蒸着後、超高压電子顕微鏡 (H-1250M 加速電圧 1000kV) により、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。

varicosity の大きさは数 μm の範囲で様々で、形は一般に紡錘形をしているものが多い。また、今回の観察に供した部位のように、三角錐形で神経突起の分岐点になっている場合もしばしば見られる。交感神経細胞様に分化する PC12 細胞の varicosity 内には多数の有芯顆粒が存在し、断層像を観察した結果、細胞膜に近い周縁部や、培養基質に近い下部に高密度に存在することがわかった。今後、細胞骨格や細胞小器官の分布の微細な 3 次元的解析を進めることにより、varicosity の形成機構を明らかにしていきたい。



図：PC12細胞の varicosity の断層像 A.上部, B.中部, C.下部。Bar=1 μm

4. 中間径フィラメントとゴルジ装置との三次元的空間配置

野田 亨 (藍野大学医療保健学部 理学療法学科)

細胞骨格の主要な構成要素は微小管, 中間径フィラメント, そしてアクチンフィラメントであり, 発見当初は細胞の骨組みを決定するものとして解釈されたが, その後, それぞれに多彩な機能が明らかになりつつある。しかしながら, まだ多くの未知なる機能が予想されている。

近年, 岩月らの報告によると, いくつかの上皮細胞においては中間径フィラメントであるケラチンフィラメントがゴルジ装置周辺で集中的に分布することが見いだされた。本研究ではこの指摘から細胞全体のケラチンフィラメントがゴルジ装置特有の形態の維持や分泌現象と関係するか否かという疑問に答えるべく, ケラチンフィラメントとゴルジ装置の三次元的空間配置を免疫細胞化学

的に標識した試料を超高圧電顕で捉えることを研究目的とした。

ラットの小腸組織を固定後, その凍結切片を作製し, 抗ケラチン抗体, および抗ゴルジ抗体を用いて酵素抗体法による免疫組織化学的標識を行い, 樹脂で包埋した。試料から1μm厚の切片を作成し, 生理学研究所の超高圧電子顕微鏡 (H-1250M)で観察を行った。しかし, 今回用いた酵素抗体法による検討ではゴルジ装置付近に明瞭な立体的構造を示す反応産物を確認することが困難であった。この実験系にはまださらなる継続的な研究が必要と考えられた。

5. 嗅球神経系のニューロン及びグリアの三次元構造解析

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)

嗅覚神経系は, 化学的性質と形態的特徴から基本的脳神経回路の研究対象として魅力的であり, 従来より嗅球ニューロンの三次元的な微細構造を超高圧電子顕微鏡 (電顕) によって解析を進めてきたが, 本年度はニューロンと共に神経回路構築に関わるグリアについて, ラット嗅球の外網状層と顆粒細胞層について解析を行った。

嗅球は異種複数の神経要素間の reciprocal synapse や

serial synapse が特徴的であるが, 近傍でシナプス結合を整然と構成するようにグリアが頻繁に観察される。免疫電顕の超薄連続切片による解析から, このグリアはアストロサイトで, 薄いシート状の構造がシナプス結合を形成する神経終末, 棘状突起, 樹状突起の周囲を断続的に覆っていることが推測されるが, その全貌を把握するのは困難であり, 超高圧電顕による厚い切片試料による立

体解析が最も有用と考える。

嗅球の外網状層は、投射ニューロンの二次樹状突起と各種介在ニューロン及び各種ニューロンによる遠心性及び回帰性入力相互にシナプス結合を形成している。この領域のアストロサイトは、ゴルジ染色による超高压電顕立体像では、細胞体から派生する一次突起及び一次突起より分枝する二次突起から薄いシート状の構造が観察され、これが径2-3 μm から0.5 μm の中空の筒状の構造を呈し(図1)、表層では径が比較的小さく深層では大きい傾向にある。これまでの解析から、この構造はグリアが取り巻く各種神経要素の存在の反映と考えられる。

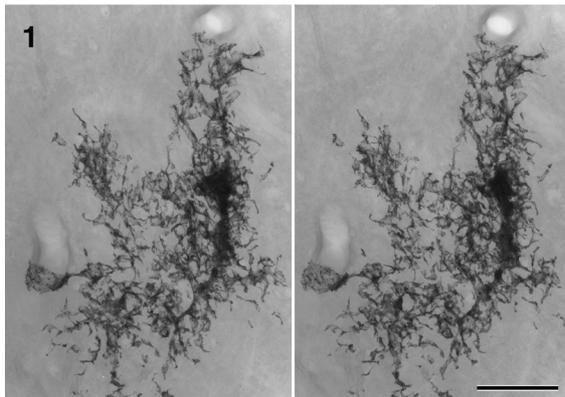


図1: 嗅球外網状層のアストログリアの5 μm 厚切片の立体像($\pm 8^\circ$)。Bar=10 μm

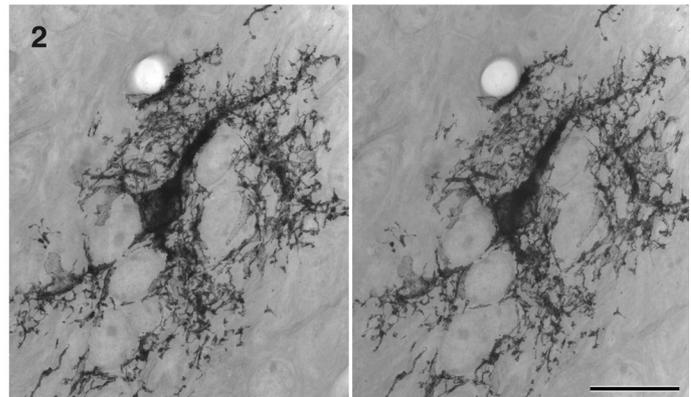


図2: 嗅球顆粒細胞層のアストログリアの5 μm 厚切片の立体像($\pm 8^\circ$)。複数の顆粒細胞を突起で取り囲んでいる。Bar=10 μm

6. スフィンゴリポドーシスモデルマウス(サポシンD欠損マウス)を用いた小脳プルキンエ細胞における parasagittal compartment の構造解析

松田 純子(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)

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形態情報医学分野)

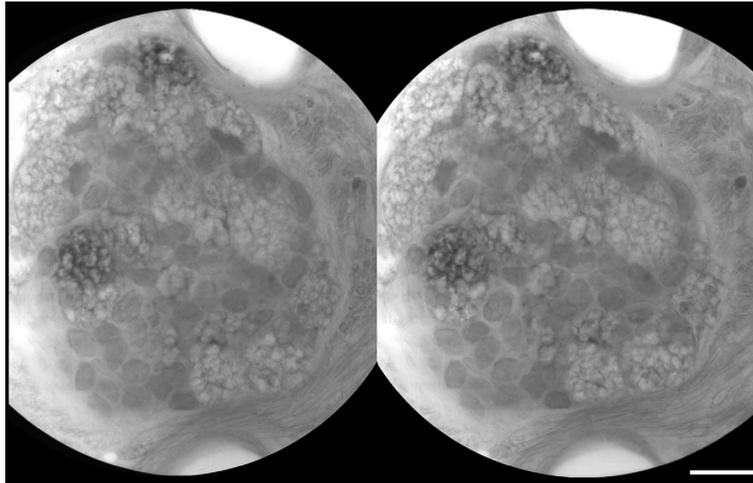
我々は最近、新たにセラミド代謝障害モデルマウスであるサポシンD欠損マウスを作製し、parasagittal stripeに一致した小脳プルキンエ細胞の選択的細胞死を見出した。小脳プルキンエ細胞では様々な分子が矢状方向にゼブラ状の発現パターンを示すことが知られているが、その生理的役割は明らかになっていない。セラミド代謝関連酵素である sphingosine kinase が小脳プルキンエ細胞において parasagittal stripe に一致した発現パターンを示すことなどから、スフィンゴ糖脂質代謝は、正常の小脳プルキンエ神経細胞回路において重要な生理的・病的役

割を果たしていると推定される。そこで、小脳プルキンエ細胞の情報処理と parasagittal compartment 神経回路機能に対するスフィンゴ糖脂質代謝の役割を解明する為に、超高压電子顕微鏡の高解像力を利用して、サポシンD欠損マウスの小脳の詳細な三次元微細構造解析を行なうのが当該実験の目的である。

最近我々は、独自に作成したサポシンDの前駆体タンパクであるプロサポシンに特異的なペプチド抗体を用いてサポシンD欠損マウス脳の免疫組織化学解析を行ったところ、サポシンD欠損マウス的小脳プルキンエ細胞に

はプロサポシンが強く発現し、更に小脳白質の血管周囲に認める多核マクロファージ様細胞がプロサポシン免疫強陽性であることを見出した。そこで超高压電子顕微鏡を用いてこの多核マクロファージ様細胞を立体的に観察したところ、大小様々な泡沫状の封入体（光顕ではPAS陽性）を多数含有するプロサポシン免疫陽性細胞が数十個単位で集塊状をなして、血管及び有髄線維束に近接して存在していることが明らかになった（付図）。

今後はプロサポシン抗体に加え、各種神経系細胞マーカーを用いた免疫細胞化学法、各種トレーサー生体内注入による細胞標識、及びゴルジ鍍銀法により、小脳の各種細胞を標識した超高压電子顕微鏡観察標本を作製し、野生型マウスを比較対照群として、サポシンD欠損マウスの小脳における神経回路構造変化と小脳プルキンエ細胞の構造変化・変性・消失過程について三次元構造解析を進めていく予定である。



サポシン D 欠損マウス小脳白質に認めるマクロファージ様細胞集塊の、抗プロサポシン抗体による超高压免疫電子顕微鏡立体像（±8°；6μm厚）。Bar=20μm。

7. 哺乳類神経上皮細胞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

神経上皮細胞は、中枢神経系の神経細胞、およびマクログリア細胞の前駆細胞である。神経上皮細胞は主に neuroepithelium の apical 表層で細胞分裂を行うが、脳発生の初期には細胞増殖のための対照的な分裂、その後神経細胞を生み出す非対称的分裂（一つの神経上皮細胞から、神経上皮細胞および神経細胞が生成する）がより多く見受けられる。近年の観察により、分裂期では細胞体と basal lamina のコンタクトは大変細長い形状（直径 1μm 以下、長さ 100μm 以上）となるものの、プロセス様の構造物 (basal process) として保持されていることが見受けられた。しかしながら、細胞分裂の際に basal process が

どのように娘細胞に引き継がれるかについては不明な点が多い。現在までの報告では、basal process はその極めて細長い構造上、細胞分裂の際には分裂することなく、どちらかの娘細胞に不均等に分配されると考えられてきた。その不均等な分配が娘細胞の非対称な運命決定（増殖的あるいは神経生成的）に働いているとの示唆もある。我々は、basal process の形態学的情報を得るためには電子顕微鏡観察が必要であると考え、厚い試料（～5μm）の観察が可能である生理学研究所の超高压電子顕微鏡 (HVEM, H-1250M) による basal process の観察を行った。マウス 10.5 日胚の神経上皮細胞の basal process の微細

構造を評価するため、電子顕微鏡を用いた観察手法の確立を行った。我々はゴルジ染色法と HVEM を組み合わせることにより basal process を可視化することを試みた。Basal process 内にはある頻度で瘤状構造物が存在するが、HVEM による立体解析で、この構造物が M 期様の細胞

では二つに分かれている様にみられ、またそのそれぞれが細胞体と basal process を介して結合している様子が観察された。この結果は M 期において、basal process が細胞体分裂より前の段階で分裂している可能性を示唆した。

8. Approaches to synaptic plasticity with high voltage electron microscopy (HVEM)

Kea Joo Lee, Im Joo Rhyu

(Department of Anatomy College of Medicine Korea University, Seoul Korea)

Synapses are specialized interneuronal junctions where signals are propagated from one to another. Most excitatory synapses consist of presynaptic axon terminals and postsynaptic dendritic spines in a mammalian central nervous system. Shapes and number of dendritic spines are dramatically changed under various physiological or pathological conditions such as development, environmental enrichment, learning, hormonal states, ataxia, and mental retardation. To analyze dendritic spines quantitatively or qualitatively, light microscopy (LM), laser confocal microscopy, transmission electron microscopy (TEM), and HVEM have been generally used. Because dendritic spines are numerous and small in size, standard LM may not adequately identify spine morphology. The profiles of dendritic spines appear to be fragmental in thin sections for TEM; thus, without an adequate 3-D reconstruction method, TEM is not suitable for quantifying structural dimensions and composition of spines. HVEM has been effectively applied to

quantitative studies of spines by using 3-5 μm thick sections and taking advantage of its high resolution and penetrating power.

We have analyzed the detailed morphology of the dendritic spines in hippocampal neurons and Purkinje cell in some physiologic and pathologic conditions with HVEM. The density, length and spine have been analyzed in the acrobat trained rat, P/Q type calcium channel mutant, and *fmr-1* knock out mice, which is an animal model of human fragile X syndrome. The density and length of Purkinje cell dendritic spine were increased in the acrobat trained rat cerebellum. But the density and length of the dendritic spine of Purkinje cell were decreased in the P/Q type calcium channel mutant. The increased spine density and length of *fmr-1* knock mice were observed in dentate granule cell of the hippocampus.

The HVEM provide a useful tool in synaptic plasticity studies and in extracting 3 dimensional information of the nervous system.

9. 歯状回顆粒細胞樹状突起の三次元再構築

濱 清 (生理学研究所)

Ellisman, M.H. (UCSD, NCMIR)

ラット歯状回顆粒細胞樹状突起の長さ、表面積、体積に関する定量的な報告を、ステレオ解析により行ってきた。これらは光学顕微鏡では解像できない微細な構造をとって機能を発揮しているので超高压電子顕微鏡による解析によってはじめて定量的な情報があきらかとなる。

これらの3次元的情報をより定量的に求めることを目的に、3~5 μm 厚のエボン包埋切片を用いて $\pm 60^\circ$ の範囲内で2度おきに連続傾斜像(61枚)を撮影し、これらの傾斜像を用いてコンピュータトモグラフィ(CT)手法により三次元再構築を行ってボクセルデータを得た。ボク

セルデータから表面積、体積などを求めている。このときに、直径が大きい樹状突起に近接するスパインでは、傾斜して撮影する方向によって、得られる三次元構造に

変化する場合があるので、三次元再構築手法と定量的な値を求める手法を再検討しているところである。

10. 3-D Reconstruction of the Crystalline Bodies and the Rhabdomere Formation during Development (II)

InSun Kim (Keimyung University)

Sung-Sik Han (Korea University)

Part 1

The crystalline bodies (Cr) were distinguished in early development of mesophyll etioplasts. The etioplasts contained prolamellar bodies, abundant starch grains, prominent Cr, few plastoglobuli, and thylakoid system. Arrays of Cr frequently occupied a large volume, roughly up to 40-50%, of the plastids, at times nearly extending throughout the stroma. The patterns of tubular elements exhibiting both paralleled and paracrystalline arrangements within one Cr were of particular interest. In a longitudinal section, paralleled tubular elements were well-demonstrated, sometimes reaching up to 6-7 μm in length. Hexagonal arrangement of the tubular elements within the Cr was clearly demonstrated in transverse sections of thin- and thick-sectioned specimens. In the paracrystalline Cr, the plane approximately at right angle to the long axis of the structure consisted of a network of tubular elements. Each tubular element appeared as a central hexagon with an internal diameter of 18 nm. The hexagons formed a star-like pattern where each side of the hexagon was joined by six equilateral triangles. Optical diffraction analysis performed on the paracrystalline Cr showed a strong hexagonal pattern.

Part 2

Rhabdomere formation - Photoreceptor morphogenesis demands a high level of performance by mechanisms mediating directed membrane traffic. However, rhabdomere biogenesis is a complicated process yet to be fully characterized. In *Drosophila*, the retina of early pupal stage at 48 ~ 72 hours exhibited an extensive growth of the photoreceptor apical domain that resulted in the rhabdomere formation by giving rise to stacks of membrane packed with a photopigment, rhodopsin. At least three types of vesicles, namely double- and single-membranous vesicles, and electron dense vesicles, were believed to be involved in the rhabdomere development. The double-membranous vesicles were closely associated with the rhabdomere that connected to their enfolded membranes. In addition, rhodopsin immuno-positive signal was detected in the single-membranous vesicles where they were fused with rhabdomeres. The electron-dense vesicles were also observed near the rhabdomeres, and their involvement has been also suggested during rhabdomere formation. Significant role of these vesicles were speculated for the rhabdomere biogenesis in *Drosophila*.

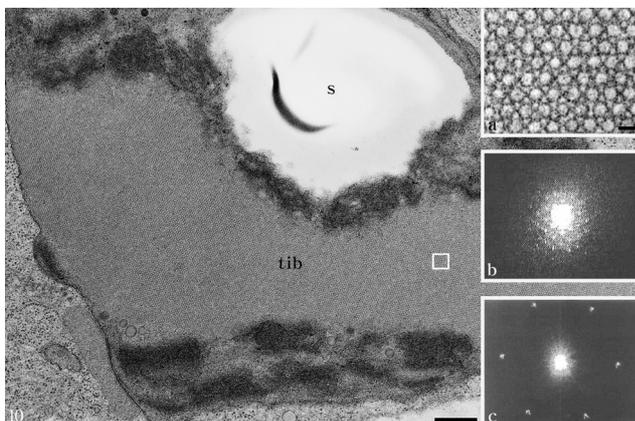


Fig 1. A section through the paracrystalline Cr of the etioplast. Bar = 0.5 μm . Inset a: Closeup of the boxed area showing central hexagon with six equilateral triangles. Bar=20nm. Inset b, c: Optical diffraction pattern of Inset a.

《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. 樋田一徳 (2005) 嗅球シナプス神経回路の三次元構造解析。顕微鏡 40, 20-26.
2. Hidaka, S, Kato, T, Hashimoto Y (2005) Structural and functional properties of homologous electrical synapses between retinal amacrine cells. J Integr. Neurosci. 4, 313-340.
3. Ozawa H (2005) Steroid hormones, their receptors and neuroendocrine system. J nippon Med Sch 72 (3) 316-325.
4. 一海孝光, 有井達夫, 嶋田勝彦 (2005) タンパクやそのマイクロクリスタルに生じる構造変化のエキサイマー蛍光による観察。愛知県立芸術大学紀要 No.34, 33-42.
5. Kosodo Y, Toida K, Kiyokage E, Arii T, and Huttner WB(2005) Analysis of neuroepithelial stem cell divisions: Molecular cell biological and ultrastructural approaches to mammalian neurogenesis. 顕微鏡 40 Suppl.1, 7-10.
6. 樋田一徳 (2005) 嗅球神経回路の三次元構造解析。顕微鏡 40 Suppl.1, 15-18.

学会報告

1. 樋田一徳 (2005.3) 共焦点レーザー顕微鏡及び超高压電子顕微鏡と立体画像。第110回日本解剖学会総会(シンポジウム)(富山)
2. 日高 聡 (2005.3) Structural and functional properties of homologous electrical synapses between retinal amacrine cells (網膜アマクリン細胞間電気シナプスの機能構造の特性) 第83回日本生理学会大会(前橋)
3. Kosodo Y, Toida K, Kiyokage E, Arii T, Huttner WB (2005.5) Ultrastructural study of the basal process of mitotic neuroepithelial cells in the developing mouse brain, Cortical Development-Neural stem cells to neural circuits (Santorini, Greece).
4. Kim IS (2005.5) Formation of chloroplast crystalline structures in C-4 plants using HVEM. The 36th Ann. Spring Meet. Korean Soc. Electron Microscopy (Gangneung, Korea).
5. 小澤一史, 有井達夫, 河田光博 (2005.6) 副腎皮質ステロイドホルモンの変化に伴う神経細胞構造の変化, 特に超高压電子顕微鏡的観察について。日本顕微鏡学会第61回学術講演会(筑波)
6. Kim IS (2005.8) Diffraction pattern of the tubular crystalline structures from Sedum rotundifolium. The 60th Annual Meet. Korean Assoc. Biol. Sci. (Daejeon, Korea).
7. Lee KE, Lim JY, Song KH, Lee TG, HAN SS (2005.8) Structural changes of mitochondria and their calcium distribution during cell death. Annual meeting of Microscopy & Microanalysis (Hawaii, USA).
8. Noda T (2005.9) Leupeptin-induced autophagy model in rat liver includes "heterophagy". 4th Asian-Pacific Intern. Cong. Anatomists (Kusadasi, Turkey).
9. Ozawa H (2005.10) A study on the ultrastructure of neurons of the rat brain under different corticosteroid conditions including aging revealed by high voltage electron microscopy. 4th World Congress of Cellular and Molecular Biology. (Poitiers, France).
10. Mun JY, Lee KE, Arii T, Hama K, HAN SS (2005.10) Cellular Tomography employing HVEM of the adult retinal cells in Drosophila melanogaster. The 5th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine (Shijiazhuang, China).
11. Kosodo Y, Toida K, Kiyokage E, Arii T, Huttner WB (2005.11) Analysis of neuroepithelial stem cell divisions: Molecular cell biological and ultrastructural approaches to mammalian neurogenesis. 日本顕微鏡学会第50回シンポジウム(福岡)
12. 樋田一徳 (2005.11) 嗅球神経回路の三次元構造解析。日本顕微鏡学会第50回シンポジウム(福岡)
13. Mun JY, Kyung KE, Arii T, Hama K, Kwon HS, Studer D, HAN SS (2005.12) Coordination of Microtubule employing HVEM of the adult retinal cells in Drosophila melanogaster. Annual meeting The American Society for Cell Biology (Sanfransisco, USA).

【 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. 咀嚼が判断・記憶・学習などに与える影響に関する高次脳機能メカニズムの解明 (佐藤 亨至ほか)	196
2. 脳磁計を用いたヒトの高次脳機能における感覚情報処理の研究 (寶珠山 稔)	196
3. 異言語話者による音声の脳内処理過程に関する検討 (大岩昌子ほか)	197
4. ウィリアムズ症候群における顔認知 (中村みほほか)	198
5. 前頭葉シータ波活動と脳高次機能 (佐々木和夫ほか)	198
6. 脳磁図を用いた声認知に関連するヒト脳機能の研究 (軍司敦子ほか)	199

1. 咀嚼が判断・記憶・学習などに与える影響に関する高次脳機能メカニズムの解明

佐藤 亨至 (東北大学歯学部附属病院 矯正歯科)

柿木隆介 (統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

すでに、Penfield らは一次運動野・感覚野の広い部分が舌や口唇など口腔に関与していることを報告している(1952)。最近、口腔の最も重要な機能である咀嚼が、高齢者では認知症の予防に関係し、若年者では判断・記憶・学習などに影響するのではないかと考えられるようになってきた。そこで、咀嚼がどのように高次脳機能メカニズムに影響を与えているかを解明することが必要である。

また、切歯、犬歯、小臼歯、大臼歯はそれぞれ形態の違いから与えられた咀嚼機能が異なっていることは明らかである。しかし、これらの皮質における SI での再現が異なることを示した研究はない。歯は、歯根膜を介して歯槽骨に植立されているが、人体で最も鋭敏な感覚受容器であり、わずか数 10 μ m の太さの髪の毛でさえも感じ取ることができる。したがって、矯正歯科治療をはじめとして咬合の再構成を図る場合は、これらの中枢における機能分担を明らかとする必要がある。まず本研究では、その基礎的情報を得るために、時間分解能の優れた脳磁

図を用いて歯に対する刺激方法の確立と、口腔の他の領域である舌、歯肉、口唇や顔面領域の刺激による再現部位と比較することを目的とした。

今年度は、Vectorview を用いてアーチファクトの少ないデータが得るための歯に対する効果的な刺激方法の確立を行うことから検討を開始した。刺激の加算は 1000 回程度行うため、苦痛を与えないように配慮する必要がある。したがって、痛みを伴う電気刺激ではなく、機械刺激を選択することとした。現在、バルーンを用いて歯を介して歯根膜への機械刺激を行うこととし、個々の歯に対する刺激装置の試作を行っている。試作された機械刺激装置を用いて実験を行い、切歯、犬歯、小臼歯、大臼歯によって皮質の再現部位について差異が得られるかどうかについて検討を行う。さらに舌、歯肉、口唇、顔面などに刺激によって推定された再現結果との比較を行う予定である。

2. 脳磁計を用いたヒトの高次脳機能における感覚情報処理の研究

寶珠山 稔 (名古屋大学医学部保健学科)

視覚情報は網膜から外側膝状体を経て、第一次視覚野および視覚関連野において大脳皮質における初期の処理が行われる。平成 17 年度に行われた本研究では、大脳皮質の視覚情報処理過程のうち形態識別に関連する反応について研究した。視覚的形態認知の研究では、刺激としての顔が生物学的に特異な反応を示すことが指摘されており、我々も Backward masking を用いた認識閾値以下の刺激と脳磁計計測を用いて顔の反応は有意に大きいことを報告してきた。本年度では、この顔の優位性を更に詳細に検討した。

顔の刺激処理が視覚情報処理のどの段階から優位性を持って処理されるかを明らかにするためには、刺激量を脳皮質での反応の閾値前後にすることで、その刺激の反応から多くの情報が得られると考え、2 色で描かれ、

色を反転させた 1 対の画像を高頻度で交互に提示する手法を考案した (Hoshiyama et al., Neurosci Lett, 2006)。この反転画像刺激を用い周波数をコントロールすることにより刺激の存在が意識できない (subliminal) 刺激を作成した。この subliminal 刺激中に顔を含むいくつかの画像を呈示した後、見える画像を再度呈示し、見える画像について事象関連脳磁場 (Event-related evoked magnetic field, ERF) を記録した。すなわち、subliminal 刺激の内容が一定時間後の ERF に影響を与えるのかについて検討した。

ERF 成分は先行する意識されない刺激により影響を受け、先行する刺激とその後に呈示された刺激が同じ場合には、ERF 成分は大きくなり、異なった場合には小さくなった。また、その影響程度は顔刺激が有意に大きいものであった。

本研究結果での ERF 変化は、認識できる刺激の繰り返しによって反応の減衰としてとらえられる priming とは異なるパターンを示した。情報処理のある段階で、先行する刺激量はその反応の閾値との関係により後続の反応への影響が異なると考えられることから、本研究での

subliminal 刺激は、形態認知のある過程で閾値以下となっていた可能性がある、と考えられた。更に、顔優位の反応はこのような subliminal 刺激でも保たれ、顔の優位性は皮質反応の早い段階でも生じている可能性が示唆された (Hoshiyama et al., Human Brain Mapping, in press)。

3. 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)

柿木隆介 (統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

本研究は音声言語の知覚、認知や生成に関わる運動企画、調節、感覚フィードバックについて異言語話者間で比較検討し、言語が保持する性質が母語話者の脳内処理過程に及ぼす影響を音響学および生理学的に検証することを目的とする。

言語の受容過程について、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した。なお本研究では、指標として mismatches field (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。日本語話者、フランス語話者ともに、長音を含む語音が逸脱刺激の際の MMNm (Long 条件)、単音を含む語音が逸脱刺激の際の MMNm (Short 条件) が左右大脳半球の側頭部に認められた。しかし、検出された MMNm は日本語話者、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

が異なることが明らかになった。フランス語にはリズム・グループといわれる、意味・構文上のまとまりをなす一続きの語群があり、グループの最終音節だけにリズム・アクセントが置かれ、それ以外の音節は等時性が保たれる。アクセントが置かれた音節は置かれぬ音節の約 2 倍の長さが音響的に認められている。従って、フランス語話者は等時性をもつ音節列から有意に長い音節を言語的に自動的に検出する性質を備えていることが示唆される。

音響分析としては日本語話者、フランス語話者の発話 (日本語、フランス語) を、Arcadia Acoustic Core 7 (アルカディア製) で取り込み行う。発話内容はインタビュー内容も含め現在検討中であるが、各言語の音響的特徴を反映するものとする。音の性質、すなわち高さ、強さ、音質だけでなく、特に外国語習得に重要と考えられる、各話者の音声に関する時間情報の制御および生成過程を音響的に捉える。母語および母語以外の音節構造を持つ音の生成が母語と外国語とでは異言語話者によりどのように異なるかを明らかにする。

4. ウィリアムズ症候群における顔認知

中村みほ (愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所)

稲垣真澄 (精神・神経センター 精神保健研究所)

三木研作 (統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

渡辺昌子 (統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

柿木隆介 (統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

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、その認知機能のばらつきが大変に大きいことが注目されている。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り、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ことから、我々は、本症候群患者の認知機能、とくに視覚認知のばらつきに着目し検討を続けている。

今年度は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。まず、これまでの我々の検討から、13歳の本症候群患者一名において、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おり、原著論文として報告した (Nakamura M et al. The MEG response to upright and inverted face stimuli in a patient with Williams syndrome *Pediatr Neurol*. 2006 May;34 (5) : 412-4.)。さらに、同様の所見が他の本症候群患児について、同年齢の定型発達児との比較においても認められるか否かを、新たな顔刺激を用いて、全頭型の脳磁計により計測を行った。

対象としてウィリアムズ症候群の典型的視覚認知所見を示す13歳女児ならびに同年齢の定型発達児2名の協力を得た。顔刺激として、日本人青年男女の顔写真を用い、正立顔、倒立顔、object 刺激 (やかん)、スクランブル画像、数を数えるためのターゲットとして車の画像をそれぞれ60回左半視野に提示し、Vecterview 全頭型脳磁計を用いて脳磁場反応を計測した。

最も反応の振幅の大きい、主として右後頭部に分布する12のセンサーについて解析を行った結果、いずれも成人と同様の顔認知特異成分と思われる脳磁場反応が認められ、同成分について正立顔と倒立顔の反応を比較した。定型発達児においては、正立顔に対する反応に比較して倒立顔に対する反応の潜時が遅延する、【倒立効果】を認める傾向があったのに対し、本症候群患児では両刺激に対する反応潜時に違いを認めなかった。上記結果は従来の我々の研究結果と合致するものであるが、定型発達児の被検者を増やして検討する必要があること、推定双極子部位についての解析方法を検討する必要があることなどの課題が残った。今後、これらの点の解決を目指すとともに、より多くのウィリアムズ症候群被検者について顔認知における倒立効果の有無を検討しうる研究手法の検討を進める予定である。

5. 前頭葉シータ波活動と脳高次機能

佐々木和夫 (自然科学研究機構)

南部 篤

遠本 徹

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。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。そのためには主観的内観を報告できるヒトを対象とした研究を行うのが有効であろう。このような観点から、我々は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。

6. 脳磁図を用いた声認知に関連するヒト脳機能の研究

軍司敦子 (国立精神・神経センター 精神保健研究所)

柿木隆介

連続した発声 (Singing, Speaking, Humming, Imagining) をおこなっているときの脳磁図の記録から、事象関連脱同期 (Event-related desynchronization: ERD)・同期 (Event-related synchronization, ERS) を解析し、喉頭調節、構音の企画・実行、呼吸コントロールやそれらのモニタリングに特異的な脳領域とその律動変化について検討した。

いずれの発声でも、アルファ波帯域 (8-15Hz) およびベータ波帯域 (15-30Hz) において、ERD が、左右大脳皮質の感覚運動野の発声関連部位で認められた。singing 条件に対する ERD は、右半球において speaking 条件や humming 条件に対する ERD よりも有意に大きいことから、喉頭調節の相違や構音の有無が反映されたと思われる。

すなわち、発声関連部位のコントロールは両側から支配を受けているものの、歌のような複雑な構音や調音をとまなう場合には半球間の優位性が生じるのかもしれない。

さらに、実際の発声をとまなわない *imagining* 条件では、左右大脳皮質の感覚運動野付近におけるアルファ・ベータ波帯域の ERD に加えて、高ガンマ波帯域 (60-120Hz) の ERD がブローカ領野で認められた。この結果から、実際の発声企画・実施と共用する脳活動とは別に、語想起に特異的に反映される処理過程が示唆された (Gunji et al., Neuroimage, in press)。

【 研 究 会 報 告 】

研究会報告

〔 目 次 〕

1. 細胞シグナリングの時空間統御機構解明への方略検索 (代表者: 曾我部 正博 2005年10月6日-10月7日)	205
2. 脳神経科学・精神医学の主要ツールとしての遺伝子改変マウスの表現型解析 (代表者: 宮川剛 2005年6月30日-7月1日)	214
3. 神経科学の新しい解析法とその応用 (代表者: 鹿川 哲史 2005年9月15日-9月17日)	221
4. 心臓血管系におけるイオンチャンネル学の新たな展開 (代表者: 鷹野 誠 2006年1月24日-1月25日)	229
5. 筋収縮の調節蛋白質-構造, 機能および疾患- (代表者: 栗原 敏 2005年10月25日-10月28日)	238
6. 細胞死の新たな生理機能と病態における意義 (代表者: 垣塚 彰 2005年10月17日-10月18日)	253
7. 宿主防御機構としての上皮膜機能の調節因子 (代表者: 中張隆司 2006年1月30日-1月31日)	265
8. 視知覚への多角的アプローチ-生理, 心理物理, 計算論2 (代表者: 塩入 諭 2005年6月23日-6月24日)	273
9. 生体膜輸送分子複合体の分子構築と生理機能 (代表者: 金井 好克 2005年7月19日-7月20日)	280
10. 生理機能制御および病態におけるプリン作動性シグナリングの役割とその分子機構 (代表者: 井上 和秀 2005年9月1日-9月2日)	289
11. 分子複合体と神経・シナプス機能 (代表者: 森 泰生 2005年6月23日-6月24日)	311
12. 脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング (代表者: 柿木 隆介 2005年11月2日-11月4日)	319
13. 高次脳機能研究の新展開 (代表者: 高田昌彦 2006年1月16日-1月17日)	339
14. シナプスの一生: 誕生・維持・除去過程の統合的理解に向けて (代表者: 柚崎通介 2005年12月1日-12月2日)	347
15. 大脳皮質機能単位の神経機構 (代表者: 姜 英男 2005年10月20日-10月21日)	353
16. シナプス伝達の細胞分子調節機構 (代表者: 岡部繁男 2005年12月8日-12月9日)	357
17. 超高压電子顕微鏡の医学生物学分野への応用 (代表者: 有井達夫 2006年2月4日-2月5日)	369
18. 位相差断層電子顕微鏡の医学的・生物学的応用 (代表者: 金子康子 2006年1月26日-1月27日)	380

19. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開 (代表者：鳥越秀峰 2005年11月17日-11月18日)	392
20. 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 2006年2月24日-2月25日)	400
21. 生物ロコモーションの統合的研究 (代表者：東島眞一 2005年11月24日-11月25日)	407
22. バイオ分子センサー研究会 (代表者：富永真琴 2006年6月9日-6月10日)	413
23. 体温調節, 温度受容研究会 (代表者：永島 計 2006年9月27日-9月28日)	421
24. 痛みの分子機構と治療戦略研究会 (代表者：仙波 恵美子 2005年12月15日-12月16日)	431
25. TRP チャネル研究会 (代表者：井上隆司 2006年7月13日-7月14日)	449
26. 神経科学の道具としての fMRI 研究会 (代表者：Kang Cheng 2005年11月24日-11月25日)	461

1. 細胞シグナリングの時空間統御機構解明への方略検索

2005年10月6日-10月7日

代表・世話人：曾我部 正博（名古屋大学 大学院医学系研究科）

所内対応者：久保 義弘（自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子）

- (1) ファゴサイトーシスにおける Rac サブタイプの局在と機能
齋藤 尚亮, 上山 健彦, 辰野 敏彦, 住本 英樹, Michelle Lennartz
(神戸大学バイオシグナル研究センター)
- (2) 腎マクラデンサ細胞一酸化窒素合成酵素 nNOS の発現と活性制御機構
川田 英明, 安岡 有紀子, 小久保 謙一, 小林 弘祐,
福田 英一, 広瀬 茂久, 河原 克雅 (北里大学医学部)
- (3) シナプス小胞へのグルタミン酸取り込み速度
金子 雅博, 堀 哲也, 高橋 智幸 (東京大学大学院医学系研究科)
- (4) 海馬シナプスにおける神経ステロイドによるメタ可塑性の調節：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)
- (5) NMDA 受容体 NR1 における部分アゴニストの作用機序
稲野辺 厚 (大阪大学大学院医学系研究科)
- (6) 中枢ニューロンにおける代謝型 GABA・グルタミン酸受容体の複合体化と機能的相互作用
田端 俊英, 狩野 方伸 (大阪大学大学院医学系研究科)
- (7) 樹状突起スパインの可塑性と安定性
河西 春郎, 本蔵 直樹, 安松 信明, 松崎 政紀, 野口 潤 (生理学研究所)
- (8) 破骨細胞における Vacuolar-type H⁺-ATPase の多様な酸分泌メカニズム
久野 みゆき, 酒井 啓, 川脇 順子, 森浦 芳枝,
森畑 宏一, 森 啓之 (大阪市立大学大学院医学研究科)
- (9) 脳脊髄液の pH 調節における脈絡叢の重炭酸イオン輸送機構
福田 英一, 河原 克雅, 広瀬 茂久 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)
- (10) 蛍光 1 分子イメージングによるシグナル伝達と核内輸送のダイナミクス
十川 久美子, 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)
- (11) KCNQ/M チャネルの抑制における PIP₂ と PKC の異なる役割
中條 浩一, 久保 義弘 (生理学研究所)
- (12) HERG カリウムチャネルの流動電位測定によるイオン透過機構の解析
老木 成稔, 安藤 博之, 清水 啓史, 岩本 真幸, 久野 みゆき (福井大学医学部)
- (13) 免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性 Ca²⁺ チャネル TRPM2 の活性化機構および生理的役割
山本 伸一郎, 原 雄二, 森 泰生 (京都大学大学院工学研究科)
- (14) マクロファージにおける TRPV2 チャネルの制御機構
長澤 雅裕, 小島 至 (群馬大学生体調節研究所)
- (15) PLC-zeta の分子構造と Ca²⁺ オシレーション誘発能および核移行能
宮崎 俊一, 伊藤 昌彦, 黒田 恵司 (東京女子医科大学医学部)
- (16) Ca²⁺ オシレーションの細胞分子機構
飯野 正光 (東京大学大学院医学系研究科)
- (17) プリズム式全反射蛍光顕微鏡を用いた細胞内タンパク輸送の可視化法の開発
最上 秀夫, 嘉副 裕, 佐藤 洋平 (浜松医科大学)

【参加者名】

小島 至, 長澤雅裕 (群馬大学生体調節研究所属), 齋藤尚亮, 柏木香保里, 高橋英之 (神戸大学バイオシグナル研究センター), 三畝宏一 (神戸大学自然科学研究科), 足立直子 (神戸大学医学系研究科), 田端俊英, 川上大輔 (大阪大学大学院医学系研究科細胞神経科学分野), 高橋智幸, 齋藤直人, 堀 哲也, 鈴木大介, 渡邊博康, 金子雅博, 山下慈郎, 松山恭子 (東京大学大学院医学系研究科神経生理学教室), 稲野辺厚 (大阪大学大学院医学系研究科薬理学), 久野みゆき (大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学), 川脇順子 (大阪市立大学大学院医学研究科中央研究室), 河原克雅, 川田英明 (北里大学医学部生理), 福田英一 (東京工業大学大学院生命理工学研究科), 最上秀夫 (浜松医科大学生理学), 飯野正光, 大久

保洋平, 関谷 敬, 船越大資 (東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学), 宮崎俊一, 伊藤昌彦 (東京女子医科大学医学部第二生理学), 森 泰生, 山本伸一郎 (京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻分子生物化学分野), 徳永万喜洋 (国立遺伝学研究所), 十川久美子 (理研 免疫・アレルギー科学総合研究センター), 曾我部正博 (名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物物理学), 老木成稔 (福井大学医学部形態機能医科学講座分子生理学), 河西春郎 (生理学研究所生体膜研究部門), 毛利達磨, 瀬藤光利, 北村明彦, 根本知己, 野口 潤, 沼田朋大, エルバート・リー, 温井美帆, 久保義弘, 立山充博, 中條浩一, 藤原祐一郎, 長友克広, 石井 裕 (生理学研究所)

【概要】

細胞が刺激に対して適切に応答することこそ“生きていること”の証である。このプロセスは、刺激の受容と変換→細胞内情報処理→細胞応答のステップからなり、これを細胞シグナリングと呼ぶ。これらのステップは受容体や情報伝達分子が細胞骨格や膜などの空間構造を持つ反応場において様々な時間スケールで相互作用することで実現される。その仕組みを知ることは、“命とはなにか”という謎に迫るだけではなく、医学・工学応用への大きな可能性を秘めた生命科学の中心課題である。しかしながら、その時間軸や空間軸での統御機構の大半は謎である。一方で、分子生物学とバイオイメージングの飛躍的発展によって、シグナリングを担う主要な分子の構造が次々に明らかになり、その構造機能連関や細胞内での動態が明らかになりつつある。このような現実を踏まえ、本研究会では、この分野に携わる様々な研究者の意見交換を通して細胞シグナリングの時間軸統御機構

(早い反応から遅い反応への展開機構)と空間軸統御機構(マイクロからマクロへの構造展開機構)の原理を探るための有効な研究方略を探ることを目的とした。

本年度は17題の講演と40名以上の参加者を得て、受容体・チャネルからオルガネラ・細胞・組織のシグナル伝達へ展開する質の高い発表と活発な討論が行われた。我が国における細胞内シグナリング研究は、生物物理学、生化学、生理学など広範な分野で世界をリードする活発な研究が行われているが、学会の壁などにより十分な意見交換が成されているとは言い難い。その意味で本研究会は、分野を超えた多様な研究者が適切なサイズで集まり、集中できる環境の中で未発表を含む最新の成果やアイデアを披瀝し、忌憚のない議論を戦わせることのできた楽しく貴重な集まりであった。この成果を元に、細胞シグナリングにおける時空間統御機構の理解に向けたより具体的な研究方略の構築を目指したい。

(1) ファゴサイトーシスにおける Rac サブタイプの局在と機能

齋藤尚亮 (神戸大学・バイオシグナル研究センター)

貪食細胞は、進入物の殺菌のために NADPH oxidase を用いて活性酸素を産生するが、その活性化には6つの成分による膜上での機能的複合体の形成が必須である。しかしながら、活性酸素産生に関わる Rac の分子種特異性

やその作用機序については不明である。今回我々は、GFP 標識 Rac (1, 2, 3) およびその変異体を用いて、マクロファージ細胞株での FcγR を介した貪食時の Rac の分子種特異的膜ターゲティング機構の解明を試みた。

その結果、食食時に、GFP 標識 Rac は Rac1 > Rac3 > Rac2 の順に強く食胞膜に集積し、その集積の強さ、活性酸素産生能は C 末端側の polybasic region (PB) の正電荷アミノ酸残基数に依存することがわかった。脂質結合能を protein lipid overlay assay を用いて行ったところ、Rac1 の PB は PIP, PIP3, PA に強く結合したが、Rac2 の PB は特異的結合を示さなかった。また、Rac2 の活性型変異体

の集積を観察すると、小胞体など細胞内器官の膜に局在し、食食時に線状に食胞膜へ癒合するのが観察された。これらのことから、Rac1 は食食時に PB の高い正電荷とその脂質結合能を利用し食胞膜に集積するが、Rac2 は、細胞内器官膜にターゲットし、この膜が食胞膜に融合することを利用した PB の正電荷に依存しない集積機構を持つことが示唆された。

(2) 腎マクラデンサ細胞一酸化窒素合成酵素 nNOS の発現と活性制御機構

川田英明 (北里大・医・生理)

腎マクラデンサ (MD) 細胞が産生する一酸化窒素 (NO) は、尿細管糸球体フィードバック (TGF) 機構を抑制する血管拡張因子である。MD 細胞は、管腔内液 NaCl 濃度 ($[NaCl]_i$) の変化を感知し、神経型 NO 合成酵素 (nNOS) の発現量を増減させているが、その細胞内調節因子は不明である。我々は、新規に樹立したマウス MD 細胞 (NE-MD) において、細胞外液 $[NaCl]$ 変化、furosemide ($Na^+ - K^+ - 2Cl^-$ 輸送体阻害薬) や amiloride (Na^+ / H^+ 逆輸送体阻害薬) 投与による、nNOS 発現量 (Western blotting)

と NO 産生 (NO 電極法) への影響を調べた。結果: nNOS 発現量と L-Arginine (1mM) 添加による NO 産生量は、furosemide 投与後時間依存性に増加した。この NO 産生は、BAPTA-AM (Ca^{2+} chelator) や 50 μ M 7-nitroindazole (nNOS 阻害薬) で完全に阻害された。nNOS 発現誘導後、細胞外液の $[Na^+]$ 低下による NO 産生量は小さかった。結論: MD 細胞の nNOS 発現量は、furosemide 投与や $[Cl^-]_i$ の低下で誘導され、NO 産生量は細胞内 Ca^{2+} と pH に影響されることがわかった。

(3) シナプス小胞へのグルタミン酸取り込み速度

金子 雅博 (東京大学大学院医学系研究科 神経生理学教室)

シナプス伝達は、シナプス小胞が伝達物質を開口放出後、再利用されることで維持される。この再利用過程において、シナプス小胞への伝達物質取り込みは必須のステップであり、これに要する時間は、シナプス小胞が再利用されるまでの時間を制限する。シナプス小胞は回収後、数十秒以内に再利用可能となるが、生化学的に単離したシナプス小胞への伝達物質の取り込み時間は数分-10 分におよんでいる。我々は脳幹スライスの calyx of Held シナプスにおいてこの問題を検討した。シナプス小胞内のグルタミン酸を枯渇させた後にシナプス前末端にケージドグルタミン酸を注入し、UV 照射で瞬間的にグルタミ

ン酸濃度を上昇させ、シナプス後細胞から同時記録される EPSC の振幅の時間経過を指標に、グルタミン酸の小胞への取り込み時間を測定した。UV 照射後、EPSC は直ちに増大し、その時定数は室温で 5.1 秒であった。この反応は、小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) ブロッカー Trypan blue, 及び VGLUT の駆動力である H^+ の電気化学ポテンシャルをつくる液胞型 $H^+ - ATPase$ (V-ATPase) のブロッカー bafilomycin A1 により完全に抑えられた。これらの結果から、シナプス小胞への VGLUT を介するグルタミン酸取り込み速度は従来の報告より 2 桁近く速いと結論された。

(4) 海馬シナプスにおける神経ステロイドによるメタ可塑性の調節：膜電位イメージングによる解析

曾我部正博 (名古屋大学大学院・医学系研究科・細胞生物物理)

神経ステロイドの一部は、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。代表的な神経ステロイドであ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が、そのシナプス機構も標的受容体も不明である。最近、我々は、ラット脳海馬スライスへの PREGS の急性投与が、歯状回のシナプス伝達に長期増強 (LTP) を誘導することを発見した。この長期増強は、短期と中長期の 2 段階からなり、前者はニコチン受容体を介した前終末

からのグルタミン酸放出の増強、後者は、シナプス後膜の NMDA 受容体チャネル活性の亢進と、引き続く細胞内シグナリングの活性化を必要とする。一方、海馬では条件刺激の周波数に依存して長期抑圧 (LTD) や長期増強 (LTP) が生じ、EPSP の振幅変化は、刺激周波数の対数に対して S 字状曲線を呈する。この周波数依存性は現在や過去の状況によって変化し、メタ可塑性と呼ばれている。PREGS は、この曲線を大きく左シフトさせることが分かった。即ち、PREGS はそれ自体がシナプス伝達を増強するだけでなく、活動度依存的なシナプス可塑性の周波数依存性を修飾するメタ可塑性調節因子であることが判明した。

(5) NMDA 受容体 NR1 における部分アゴニストの作用機序

稲野辺 厚 (大阪大学大学院医学系研究科薬理学講座)

リガンド開口型イオンチャネルはアゴニストの結合情報をチャネルの開閉に変換する膜蛋白質である。完全アゴニストはチャネルを最大に活性化し、部分アゴニストは不完全に活性化する。NMDA 受容体の NR1 サブユニットのグリシン結合部位における部分アゴニストの作用を検討するために、炭素環リングの異なる 3 つのグリシンホモログ (ACPC, ACBC, cycloleucine) を用いて、結晶学的、電気生理学的解析を行った。ACPC, ACBC は完全アゴニストであるグリシンと比して、NR1, NR2B からなる NMDA 受容体をそれぞれ約 80%, 42% 活性化し

た。しかし、それら部分アゴニストと NR1 のリガンド結合領域との複合体の結晶構造は、グリシンとの複合体と同程度のドメイン開閉を示した。一方、cycloleucine はアンタゴニストとして働き、リガンド結合領域の開状態を安定化していた。以上の知見は、NR1 のリガンド結合領域は完全、部分アゴニストに関らず、一つの閉状態として存在することを示しており、部分アゴニストの作用が、進化的に類似する AMPA 受容体の GluR2 と異なること示している。

(6) 中枢ニューロンにおける代謝型 GABA・グルタミン酸受容体の複合体化と機能的相互作用

田端俊英 (大阪大学大学院医学系研究科細胞神経科学)

1 型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) は中枢シナプス可塑性に関わる G タンパク共役性受容体 (GPCR) である。我々はマウス小脳プルキンエ細胞において、細胞外カルシウム (Ca^{2+}_o) が mGluR1 を活性化するとともに、

mGluR1 のグルタミン酸感受性を劇的に増強することを明らかにした。近年、プルキンエ細胞上で Ca^{2+}_o 感受性を有する B 型 GABA 受容体 ($GABA_B R$) が mGluR1 と近接して存在することが報告された。そこで Ca^{2+}_o の $GABA_B R$

に対する作用を薬理阻害した場合や GABA_BR を遺伝学的にノックアウトした場合について調べたところ、Ca²⁺ による mGluR1 のグルタミン酸感受性増強が起こらないことが判明した。これらの結果は GABA_BR が Ca²⁺ の効果を仲介していることを示しているが、従来の GABA_BR 介在反応と異なり G_{i/o} タンパクを必要としない。免疫共

沈でマウス小脳から GABA_BR-mGluR1 複合体が検出された事実を考え合わせると、GABA_BR と mGluR1 の直接相互作用が増強を起している可能性がある。以上の結果は、中枢ニューロンにおいて GPCR が他の GPCR の co-factor として働くことを示唆している。

(7) 樹状突起スパインの可塑性と安定性

河西春郎 (生理学研究所)

海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起スパインの性質をスライス培養標本を用いて調べている。ケイジドグルタミン酸の 2 光子アンケイジングにより、単一スパインに pairing 刺激を与えると著しいスパイン頭部増大が見られるが、これは頭部の形態依存性があり、大きなスパインではほとんど長期的な増大はない。同様な違いは、自発発火環境で数日に渡る観察でも見られ、大きなスパインは書

き込み禁止状態にあると考えられた。この原因の一つとして、大きなスパインのネックは太いことが多く、NMDA 受容体依存性カルシウムシグナルが小さいことがある(昨年報告済み)。更に、スパインの主たる細胞骨格である F-actin の構築を 2 光子光変換が可能な PA-GFP-actin を用いて調べた結果、大きなスパインと小さなスパインは F-actin の構築に重要な違いがあることがわかってきた。

(8) 破骨細胞における Vacuolar-type H⁺-ATPase の多様な酸分泌メカニズム

久野みゆき (大阪市立大学大学院医学研究科・分子細胞生理学・中央研究室)

破骨細胞は酸・蛋白分解酵素を分泌して骨吸収を行う。骨表面に接する破骨細胞の細胞膜は ruffled border と呼ばれるひだ状の構造を形成し、ここには酸分泌の主力と考えられている vacuolar-type H⁺-ATPase (V-ATPase) が高密度で存在している。V-ATPase は、H⁺ トランスポートを担う membrane sector (V₀) と ATPase 活性をもつ catalytic sector (V₁) から成り、更にそれぞれが複数のサブユニットの集合体である。私達は、破骨細胞から V-ATPase による H⁺ 電流を記録し、サブユニット構成に基づく酸分泌の制御機構を検討した。V₁ は actin に結合することが知ら

れている。サイトカラシンで前処理すると H⁺ 電流の ATP 依存性が失われ、actin filament との相互作用がポンプ機能の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。しかし、サイトカラシン処理あるいは細胞内 ATP 除去後もバフィロマイシン及び DCCD 感受性 H⁺ 電流が残存した。これらの結果は、破骨細胞では V-ATPase が holoenzyme として働くだけでなく、ATP の枯渇や V₀/V₁ diassembly などによってポンプ機能が阻害された際には V₀ の H⁺ トランスポート機構によって酸分泌機能が保たれることを示唆している。

(9) 脳脊髄液の pH 調節における脈絡叢の重炭酸イオン輸送機構

福田英一 (東工大・生命理工)

脳脊髄液は中枢神経系を衝撃から守るクッションの役割をするだけでなく、老廃物を排出し、神経伝達における環境を提供するなど重要な機能を担っている。この脳脊髄

液の大部分は脈絡叢と呼ばれる組織から分泌されることが知られており、その主要成分の輸送機構も大部分は分子レベルで同定されているが、pH 緩衝剤として重要な重炭

酸イオンについては明らかにされていない。我々は重炭酸イオン輸送体の有力な候補分子として、ラット脈絡叢より $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送体 4 の新規バリエーション (NBC4g) を単離し、それが脈絡叢上皮細胞の頂端膜に局在することを発見した。NBC4g は既報の NBC4c と異なり、cAMP 依存的な

電気生理的活性をもつことを示すと共に、ラット脈絡叢上皮の初代培養細胞において、RNA 干渉による NBC4 発現抑制を用い、NBC4 が頂端膜で重炭酸イオン輸送に関わっていることを明らかにした。

(10) 蛍光 1 分子イメージングによるシグナル伝達と核内輸送のダイナミクス

十川久美子 (理研・免疫センター)

lipid raft は、シグナル分子が集合し、外からの刺激を効率よく細胞内に伝達する細胞膜のマイクロドメインとして重要であると考えられている。種々のプローブを用いたイメージングにより存在は確認されているものの、その動態については、不明な点が多い。

我々は、理研免疫センターの山崎博士・斉藤博士との共同研究により、正常細胞における lipid raft の動態可視化のために、lipid raft 局在タンパク質と GFP との融合タンパク質 $\text{LAT}^{\Delta\text{CP}}/\text{GFP}$ を用いた。Transgenic マウス由来のマスト細胞を用いた全反射顕微鏡による蛍光イメージングにより、直径約 $1\mu\text{m}$ 範囲での速い動きをする、数～

数十分子の集合体として観察され、lipid raft の 1 クラスターの動きが示唆される。1 分子イメージングの解析から、 $\text{LAT}^{\Delta\text{CP}}/\text{GFP}$ 分子は、クラスターと同様に速い動きを示したが、M β CD による cholesterol 除去や、raft 局在シグナルを欠失した $\text{LAT}^{\Delta\text{CP}}$ 変異体では、動く範囲が大きく制限された。この結果は、lipid raft に局在することでタンパク質が広い範囲を動くことができることを示しており、シグナルタンパク質の移動の観点から lipid raft の重要な役割が示唆される。さらに、受容体刺激後の lipid raft と受容体との相互作用観察の解析結果も合わせて考察する。

(11) KCNQ/M チャネルの抑制における PIP_2 と PKC の異なる役割

中條浩一 (生理学研究所)

電位依存性カリウムチャネルの KCNQ/M チャネルは、神経細胞などに発現し細胞の興奮性を抑える役割を果たしている。 G_q カップルの受容体が活性化するとこのチャネルは抑制されることが知られているが、近年この抑制機構が主に PIP_2 の分解によるものであることが報告された。その一方で、PKC の活性化がチャネルの抑制に関わっていることも示唆されているが、PKC が PIP_2 減少による抑制の補助的な役割を担っているのか、あるいは PIP_2 とは異なった方法で KCNQ/M チャネルを抑制しているかは明らかではない。今回、我々は KCNQ チャネルと M1 受容体を共発現させることでアフリカツメガ

エル卵母細胞に M 電流を再構成した。 $10\mu\text{M}$ の oxo-M によって M1 受容体を活性化させると、KCNQ チャネルのコンダクタンス-電圧関係 (G-V カーブ) が脱分極側にシフトした。また PKC のアクチベーターである PMA を投与したところ、KCNQ2 チャネルの G-V カーブは約 20mV シフトした。一方、 $10\mu\text{M}$ の wortmannin によって PIP_2 を減少させても G-V カーブにはほとんど影響を与えなかった。M 電流抑制時において、 PIP_2 の減少がチャネルの最大電流量を減少させるのに対し、PKC はチャネルの電位依存性を変化させることでチャネルを抑制すると考えられる。

(12) HERG カリウムチャネルの流動電位測定によるイオン透過機構の解析

老木 成稔 (福井大学医学部・分子生理)

本研究では 1)イオン透過機構を解明するための新しいアプローチとして流動電位を基にした解析法を考案し, 2)流動電位の新しい測定法を開発し, 3)これを HERG チャネルに適用しその透過機構を検討した。流動電位とは, 浸透圧差によってポアを流れる水が透過イオンを押し流し, 透過イオンの平衡電位でもイオンが流れることにより生じる。“水で満たされたポア”内のイオンと水の相互作用を反映する。今回私たちは全細胞電流記録法による流動電位測定に成功し(浸透圧パルス法), HERG チャネル発現 HEK293 細胞に適用した。細胞内外 10 mM $[K^+]$ において, 浸透圧差 (500 mOsm~1500 mOsm)に對す

る流動電位値は線形変化を示し, その勾配から $-0.7 \text{ mV}/\Delta \text{Osm}$ を得た。この値から水-イオンカップル比 (n : 水流束/ K^+ 流束)が 1.6 と求められた。細胞内外 100 mM $[K^+]$ では n が 0.9 に減少した。透過イオン濃度増大による n 値の減少は, ポア内イオン占有確率の増大による水分子占有確率の減少を意味する。一方, 100 mM $[K^+]$ での n 値が約 1 ということはポア内イオンが最小の水和状態で透過することを示し, KcsA の透過モデル(シフト-透過モデル)の特徴的な透過様式に對する。これらの結果はシフト-透過モデルが HERG チャネルに適用できることを示した (Ando *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, *in press*)

(13) 免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性 Ca^{2+} チャネル TRPM2 の活性化機構および生理的役割

山本伸一郎 (京都大学大学院工学研究科)

TRPM2 は過酸化水素 (H_2O_2)などの酸化的ストレスにより活性化される Ca^{2+} 透過性チャネルである。しかし, 酸化的ストレスによる TRPM2 の活性化の詳細はまだ明らかにされていない。TRPM2 は単球, 好中球, およびリンパ球などの免疫応答細胞で高い発現が認められている。しかしこれらの細胞における TRPM2 の生理的役割は明らかにされていない。そこで本研究では酸化的ストレスによる TRPM2 の活性化機構の詳細および生理的役割を明らかにすることを目的とし検討を行った。TRPM2 活性化機構解明にあたり, 我々は extracellular

signal-regulated kinase が TRPM2 活性化に重要な役割を果たしていることをつきとめた。また生理的役割については TRPM2 発現が認められている単球細胞株 U937 を用いたところ H_2O_2 による IL-8 産生誘導に TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が関与することを明らかにした。また当研究室では TRPM2 KO マウスの作製に成功している。そこで, TRPM2 KO マウスを用いて免疫応答細胞における TRPM2 の生理的役割についても現在検討を行っているので報告する。

(14) マクロファージにおける TRPV2チャネルの制御機構

長澤雅裕 (群馬大学生体調節研究所)

マクロファージには TRPV2 チャネルが発現し, 非刺激時には主に細胞内に局在する。fMLP の投与により細胞膜への移行が促進される。パッチクランプ法により Cs^+ をチャージキャリアーとしたチャネル電流が観察され, ruthenium red, 変異型 TRPV2 遺伝子導入, siRNA の

投与により抑制される。この Cs^+ 電流は fMLP 投与によって増加する。また fMLP 投与により急速でかつ持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が惹起されるが, 細胞外液 Ca^{2+} の除去, ruthenium red 投与, 変異型 TRPV2 遺伝子導入, siRNA 投与などにより持続相の Ca^{2+} 上昇が消失する。

fMLP により惹起される TRPV2 の細胞膜への移行は PI-3 キナーゼを抑制するワートマニンや百日咳毒素によりブロックされる。fMLP により誘発されるマクロファージの遊走は ruthenium red 投与, 変異 TRPV2 遺伝子導入に

より抑制される。マクロファージにおいて, TRPV2 は主にポドゾームに局在している。ポドゾームは細胞の遊走に重要な構造で, TRPV2 はこのドメインへの Ca^{2+} 流入を制御して遊走に関与していると考えられる。

(15) PLC-zeta の分子構造と Ca^{2+} オシレーション誘発能および核移行能

宮崎俊一 (東京女子医大・医・第二生理)

phospholipase C-zeta (PLCz) は近年マウス精子に発現する PLC として発見され, 卵に Ca^{2+} オシレーションを誘発する卵活性化精子因子の有力候補である。PLCz-蛍光蛋白 Venus 連結蛋白の cRNA をマウス卵に注入して発現させると, 30 分後から Ca^{2+} オシレーションを誘発し卵は活性化された。発現した PLCz は, RNA 注入後約 5 時間で形成される前核に蓄積した。その後第 1 卵割直前の核膜崩壊時に核から細胞質に拡散し, 2 細胞期の核に再び集積した。PLCz の細胞質/核間移動が Ca^{2+} オシレーションの on/off に関係するかも知れない。

PLCz は N 端側の 4 つの EF-hand domain, 中央部の X と

Y の catalytic domain, C 端側の C2 domain から成る。X と Y 間には分子が折れ曲がる hinge portion が想定され, この付近に核移行配列候補がある。ここに point mutation を加えると核移行能を喪失した。他方 EF-hand domain の N 端から 10 個目のアミノ酸以降の部分削除しても, Ca^{2+} オシレーション誘発能も核移行能も喪失した (前核形成した受精卵に RNA を注入して発現させ核移行能を観察)。EF-hand domain 部分は, Ca^{2+} -binding site としてよりも機能的立体構造をとるために必須であると考えられる。

(16) Ca^{2+} オシレーションの細胞分子機構

飯野正光 (東京大・医学系研究科・細胞分子薬理)

アゴニスト刺激に伴って細胞内 Ca^{2+} 濃度が周期的に増減する Ca^{2+} オシレーションは, 多種の細胞で見られ, 細胞機能制御に深く関わっている。 Ca^{2+} オシレーション理論のエッセンスは, Ca^{2+} ストアに「 Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出機構」が存在し, Ca^{2+} ストアから放出された Ca^{2+} は一旦別のコンパートメントに移った後 Ca^{2+} ストアへ再び取り込まれる条件がそろふことである。実際, IP3 受容体の Ca^{2+} 感受性低下型変異体を発現する細胞では Ca^{2+} オシレーションが生じないことを我々は示した。オシレーションのペースメーカー機構を追究するため, 我々は, 小胞体内腔に局在させた分離型カメレオンを用い, Ca^{2+}

オシレーションに伴う Ca^{2+} ストア内 Ca^{2+} 濃度を経時的にモニターした。その結果, アゴニスト刺激開始後最初の Ca^{2+} 濃度上昇に際しては, ストアからの Ca^{2+} 放出と細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇がほぼ同期して起こるが, 2 回目以降の Ca^{2+} オシレーションでは, まず細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇し始めてから Ca^{2+} 放出が起こることが明らかになった。これは, 何らかの細胞内小器官からまずペースメーカー Ca^{2+} が供給され, それに引き続いて Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出が起きて Ca^{2+} オシレーションが形成されることを示している。このペースメーカー Ca^{2+} がミトコンドリアから由来することについて述べる。

(17) プリズム式全反射蛍光顕微鏡を用いた細胞内タンパク輸送の可視化法の開発

最上秀夫 (浜松医科大学生理学)

近年の遺伝子工学や光学技術の発展により、開口放出や酵素の活性化などの細胞膜近傍での生体反応を全反射型蛍光顕微鏡法 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: TIRFM) を用いてシグナル感度よく観察することが可能となってきた。本手法の最大の特徴は、蛍光観察の際に励起光源として、屈折率の異なる 2 物質界面での光の全反射に伴い発生するエバネッセント波を用いる点にある。エバネッセント波は全反射界面から数十～数百 nm 程度の領域に僅かに染み出す光である。高開口数対物レンズを用いて蛍光試料とスライドガラスの界面でエバネッセント波を発生させることで、試料の極一部即ち細胞膜近傍に限定した高 SN 比の蛍光観察が可能と

なる。しかしながら、これまでの TIRFM は対物レンズを通してエバネッセント波を作り出すために細胞膜近傍の高倍率観察に限られており、焦点距離を変えることなく同時に細胞膜近傍より深い核周辺の情報は得ることが出来なかった。そこで、我々はこの点を解決するため、スライドガラス型オープンチャンバーを用いた低倍率対物レンズプリズム式 TIRFM を開発することを試みた。多数の細胞の酵素やタンパク輸送など、タンパク局在変化の細胞内と細胞膜との現象を同時観察することにより蛋白質輸送メカニズムや蛋白質の局在変化の多角的検討が可能となった。

2. 脳神経科学・精神医学の主要ツールとしての遺伝子改変マウスの表現型解析

2005年6月30日-7月1日

代表・世話人：宮川剛（京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構）

所内対応者：池一中裕（分子神経生理部門）

(1) マウスリエゾンについて

饗場篤（神戸大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学講座 細胞生物学分野）

(2) 国際的な動向・背景と提案

宮川剛（京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構）

(3) ENU 誘発大規模マウス突然変異体開発プロジェクト：ラージスケールプロジェクトの利点と問題点

若菜 茂晴（理化学研究所ゲノム科学総合研究センター ゲノム機能情報研究グループ）

(4) 行動学的スクリーニングによって見いだされた、セブチン欠損マウスにおける

線条体ドーパミンニューロンの異常

木下専（京都大学大学院医学研究科 先端領域融合医学研究機構）

(5) エピジェネティクス研究と脳神経科学の接点

石野史敏（東京医科歯科大学 難治疾患研究所 エピジェネティクス分野）

(6) スパインの異常から精神行動異常へ

内匠透（(財)大阪バイオサイエンス研究所）

(7) drebrin 過剰発現と発現阻害の効果の解析 細胞レベルから個体レベルへ

児島伸彦（群馬大学大学院医学系研究科医科学専攻 高次細胞機能学教室）

(8) ビオプテリンによる脳内ドーパミン・セロトニン合成の調節機構

一瀬宏（東京工業大学大学院生命理工学研究科 分子生命科学専攻）

(9) DARPP-32 リン酸化を指標としたドーパミン情報伝達系の解析

西昭徳（久留米大学医学部 薬理学講座）

(10) 海馬・扁桃スライス標本を用いた電気生理学的表現型解析

真鍋俊也（東京大学 医科学研究所 基礎医科学部門 神経ネットワーク分野）

(11) 小脳電気生理解析のプロトコル標準化と問題点

平井宏和（金沢大学 学際科学実験センター 革新脳科学プロジェクト研究領域）

(12) マウスによる精神疾患の研究の問題点

功刀浩（国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第3部）

(13) 精神疾患脳バンクの現状と展望

池本桂子（福島県立医科大学神経精神医学講座）

(14) 動物モデルとヒトの研究から精神疾患創薬へ：遺伝子改変マウスへの期待

梶井靖（三菱ウエルファーマ）

【参加者名】

宮川剛（京都大大院）、太田達郎（京都大大院）、尾藤晴彦（東京大大院）、和田圭司（国立精神神経センター）、八木健（大阪大大院）、若菜茂晴（理研）、和田由美子（理研）、饗場篤（神戸大大院）、木下専（京都大大院）、萩原明（京都大大院）、萩原明（京都大大院）、猪原匠史（日

本学術振興会）、石野史敏（東京医科歯科大）、一瀬宏（東工大大院）、浦野扶美（東工大大院）、西昭徳（久留米大・医）、平井宏和（金沢大）、児島伸彦（群馬大大院）、真鍋俊也（東大・医科学研）、内匠透（大阪バイオサイエンス研究所）、功刀浩（国立精神神経センター）池本桂子

(福島県立医大), 和田明 (福島県立医大), 梶井靖 (三菱ウェルファーマ), 森寿 (富山医科薬科大), 糸原重美 (理研), 小林和人 (福島県立医科大), 小林克典 (日本医科大), 白尾智明 (群馬大大院), 福永浩司 (東北大大院), 森口茂樹 (東北大大院), 深海薫 (理研), 吉木淳 (理研), 崎村建司 (新潟大), 曾良一郎 (東北大大院), 岩田仲生 (藤田保健衛生大・医), 高橋正身 (北里大・医), 片岡正和 (信州大), 向井秀幸 (神戸大), 前田拓也 (神戸大), 林文彦 (三菱生命研), 井上直子 (三菱生命研), 上田洋司 (三菱生命研), 石田靖雅 (奈良先端科

学技術大), 瀬原淳子 (京都大), 一瀬千穂 (藤田保健衛生大), 瀬藤光利 (統合バイオ), 小山隆太 (東京大・薬), 渡辺肇 (基生研), 木村透 (生理研), 笹川快生 (群馬大大院), 江口淳一 (三菱ウェルファーマ) 大西哲生 (理研), 渡辺明子 (理研), 大羽尚子 (理研), 桐生幸歩 (京都大大院), 堀池由浩 (生理研), 佐治俊幸 (生理研), 美濃部さやか (三重大), 廣江猛 (生理研), 喜多山篤 (生理研), 山口良文 (統合バイオ), 根本知己 (生理研), 北村明彦 (生理研), 渡辺英治 (基生研), 笹岡俊邦 (基生研), 山肩葉子 (生理研)

【概要】

マウスの遺伝子の99%は人間でホモログが存在する。またマウスでは遺伝子を自在に操作することのできる遺伝子ターゲティング技術の適用が可能であり, 被験体を多数使用することが可能であるため, マウスはモデル動物としては極めて有用である。このため, 米国・欧州を中心としてマウスのすべての遺伝子をノックアウトするという大規模プロジェクトの構想が進んでいる。22,000程度あると言われる遺伝子の半分以上は脳で発現しており, 脳神経科学・精神医学研究においても, 次々と作成される遺伝子改変マウスの活用により研究が加速されると考えられる。本研究会では, 脳研究の異なるフィールドの研究者を集め, 今後利用可能になるであろう豊富な遺伝子改変マウスというリソースについて, どのような

研究戦略・活用の仕方があるのか, 各フィールドの研究者がどのように連携していくのが研究の推進に必要であるか, 大規模・系統的な連携 (例えば, 「ラージスケールのマウス表現型解析センター/コンソーシアム」のようなもの) は有用か, ヒト精神・神経疾患研究との融合には何が求められているのかなどについて意見交換を行い, 最後に参加者を交えて総合討論を行った。

特に, 標準化されたプロトコールに則った遺伝子改変マウスの表現型解析を行うことの必要性と重要性, および問題点について活発な討論が行われ, 遺伝子改変マウスの表現型解析手法に対する関心の高さと今後の方向性があらためて見直された有意義な研究会であった。

(1) マウスリエゾンについて

饗場篤 (神戸大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学講座 細胞生物学分野)

(2) 国際的な動向・背景と提案

宮川剛 (京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構)

(3) ENU 誘発大規模マウス突然変異体開発プロジェクト ーラージスケールプロジェクトの利点と問題点ー

若菜茂晴 ((独) 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター (GSC) ゲノム機能情報研究グループ)

理研 GSC 動物ゲノム機能情報研究グループでは, 個体レベルにおける大量の遺伝子の生物機能を効率的に解明するための ENU 誘発による体系的マウス突然変異の開

発 (マウス ENU ミュータジェネシスプロジェクト) を 1999 年にスタートした。

まず, 網羅的マウス表現型解析のプラットフォームの

確立を目指し、およそ400項目に及ぶ検査システムを整備した。これらの項目について基準系統となるC57BL/6J, DBA/2J, C3H/HeJの表現型解析を実施し、基準値の作成、はずれ値の範囲の選定をおこなった。スクリーニングで見いだされた突然変異マウスにおいては、ハイスループットマッピングシステムの確立、情報処理や知識ベースを活用する「*in silico* ポジショナルクローニングシステム」を情報チームと共同で開発し原因遺伝子の探索を行った。また、プロジェクトにおけるデータ全般を管理するコンピ

ュータネットワークを整備し、マウス育成管理ソフトウェア(動物搬入, 個体カード管理, 系統管理), ミュータジェネシス管理ソフトウェア(投与情報, 体重測定, G1 個体記録, テスト交配管理), 詳細表現型解析のソフトウェアなどの開発を行った。このようにラージスケールプロジェクトにおいては機能解析に直接もしくは間接にかかわる多くの基盤技術の整備が重要であり, さらにアウトプットを有機的に利用してもらうため多くの外部機関との連携が必要である。

(4) 行動学的スクリーニングによって見いだされた, セプチン欠損マウスにおけるドパミンニューロンの異常

猪原匡史, 萩原明, 木下専 (京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構生化学・細胞生物学グループ)

セプチンは酵母からヒトまで保存された細胞骨格系GTPaseファミリーであり, 細胞分裂に必須である。マウスのセプチン遺伝子ファミリー*Sept1-14*の全てが脳において固有の時間的・空間的パターンで発現する。細胞膜近傍の構造維持, 開口放出, 拡散障壁として膜蛋白の局在化などに関与するセプチン細胞骨格が破綻すると神経回路構築や高次脳機能にどのような異常が起こるだろうか? 細胞分裂への干渉を避けつつこの問いに答えるため, postnatal brain 特異的に発現する*Sept4* 遺伝子を破壊した。*Sept4*欠損マウスのBergmann gliaの構造はほぼ正常に保たれるが, 小脳皮質構築異常と運動学習障害を認めた。

*Sept4*は脳の他の領域でも発現するため, 小脳以外の異常を幅広く検索する必要がある。そこで宮川研究室の支援を受けて一連の行動学的スクリーニングを行ったところ, Prepulse Inhibitionのパラダイムにおいて特異的に増強が見られた。PPIの中核の1つである側坐核を組織化学的に検索すると, 腹側被蓋野A10に由来するドパミン神経終末の低形成が認められた。また, 野生型マウスにD1/D2受容体作動薬を低濃度投与して前シナプス終末からのドパミン放出を抑制するとPPIの増強が再現された。以上から, *Sept4*の欠損による前シナプス終末の構造異常ないしシナプス小胞放出機構の機能障害が示唆された。

(5) エピジェネティクス研究と脳神経科学の接点

石野史敏 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 エピジェネティクス分野)

インプリンティング遺伝子は, 染色体の十カ所程度のところにクラスターを成して存在しており, このような領域が片親性2倍体になると個体発生, 成長, 行動等, 様々な異常が見られることが知られています。このような表現型は, インプリンティング遺伝子クラスターに存在するある特定の遺伝子の発現欠失(または過剰発現)によることもありますし, 複数の遺伝子の発現欠失およ

び過剰発現が合わさった複合的な影響を見ていることもあります。ヒトにおいても相同領域では同様な機序でゲノムインプリンティング型遺伝病が発症するため, マウスに見られる表現型は, 実際のヒトの発症モデルとして有効です。

私達は以前, 父親性発現遺伝子である*Peg1/Mest*および*Peg3*のノックアウトマウスの解析から, この変異を父

親由来で持つ雌が子育てをしないという哺育行動異常を観察しました。しかし、このような研究をさらに進めようとした場合、そもそも哺乳動物の生殖の基本である妊娠、出産、子育てという一連の生命現象の基本的な理解が進んでいないことに気が付きます。私たちは、この哺

乳類特異的な現象・行動を司る遺伝子群に興味を持っていますが、その解析のためにはこれらの現象・行動についての本格的な研究体制と歩調を合わせる必要があると考えています。

(6) スパインの異常から精神行動異常へ

内匠透 (財) 大阪バイオサイエンス研究所

統合失調症の薬理学的モデルマウスの網羅的解析により「精神疾患はスパインの異常である」という仮説をえた。Reverse genetics アプローチとして、候補遺伝子の一つである RNA 結合蛋白 TLS の細胞生物学的解析を行った結果、TLS は、成熟期の海馬錐体神経細胞の細胞体のみならず樹状突起に局在していた。TLS は微小管のみならずアクチンフィラメントを介して樹状突起に移行する。成熟期の海馬錐体神経細胞において、TLS は mGluR5

の活性化により興奮性後シナプスのスパインに移行し、樹状突起の RNA 量が増加する。これらの *in vitro* 研究に一致して、TLS 欠損の海馬錐体神経細胞には異常なスパインの形態及びスパイン密度の低下が見られた。TLS ノックアウトマウスは、残念ながら生後まもなく死亡するが、そのコンディショナルノックアウトマウスの解析には、幅広い行動解析が必要となってくる。

(7) drebrin 発現過剰および発現阻害の効果・細胞レベルから個体レベルへ

児島伸彦, 白尾智明 (群馬大学大学院医学系研究科医科学専攻 高次細胞機能学教室)

スパインは樹状突起上の興奮性シナプス後部の特化した構造である。近年スパインの形態はダイナミックに変化している事がわかってきた。この変化の制御にはアクチン細胞骨格系が関係しているがその詳細な分子機構や機能的意義についてはまだあまり知られていない。神経特異的な drebrin アイソフォーム (drebrin A) は樹状突起に存在し、シナプス部ではシナプス後部に局在している。drebrin A を神経細胞に過剰発現させると長い異形スパインが増える。また、逆に drebrin A の発現量をアンチセンス RNA によって減少させるとスパインの形態形成

が抑制される。これら初代培養細胞系を使った研究から drebrin A の発現量の増減はスパインの形態形成に深く関わっている事がわかる。

われわれは drebrin A の発現量を増減させた効果を個体レベルで調べるために、トランスジェニックマウスとノックアウトマウスを作成した。現在これらのマウスの表現型を多角的に解析する研究を開始している。現時点で drebrin A の過剰発現あるいは欠失はシナプス可塑性や学習記憶に影響するとの preliminary な研究データを得ている。

(8) ビオプテリンによる脳内ドーパミン・セロトニンの調節機構

一瀬宏 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)

ドーパミン・ノルアドレナリン・セロトニンなどのモノアミン神経伝達物質は、情動、運動、睡眠、記憶など

の脳の高次機能に深く関わっていることが知られている。これらのモノアミン化合物は前駆体アミノ酸の芳香

環の水酸化と、引き続いて起こる脱炭酸反応により生合成される。テトラヒドロピオプテリン (BH4) は、ドーパミン・ノルアドレナリンの生合成を司るチロシン水酸化酵素 (TH), および、セロトニン・メラトニンの生合成を司るトリプトファン水酸化酵素 (TPH) の補酵素としてこれらのモノアミン神経伝達物質の合成に関与している。

我々は、BH4 生合成第2段階に働くピルボイルテトラヒドロピオプテリン合成酵素 (PTS) をノックアウトすることにより BH4 欠乏マウスを作成した。PTS 欠損マウスは生後まもなく全身性のモノアミン欠乏 (おそらく交感神経系の機能不全) により死亡した。新生児マウスの生化学

的解析を行ったところ、BH4 欠乏から予測されるドーパミン・セロトニンの低下ばかりでなく、TH 活性・タンパク質量が野生型に比べて10%以下に低下していることが判明した。また、PTS 欠損マウスに BH4 を腹腔内から投与すると、脳内セロトニン量は投与後1時間で野生型の約70%にまで回復したが、脳内ドーパミン量は vehicle 投与群に比べてわずかに増加したのみであった。これらの結果は、BH4 欠乏や BH4 の量的変動に対する応答性が、ドーパミン系とセロトニン系とで大きく異なっていること、BH4 が脳高次機能の調節に重要であることを示唆した。

(9) DARPP-32リン酸化を指標としたドーパミン情報伝達系の解析

西昭徳 (久留米大学 医学部 薬理学講座)

線条体の medium spiny neuron には、ドーパミンの効率的な情報伝達に必須なリン酸化蛋白 DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) が選択的に発現している。DARPP-32 リン酸化調節に関わるプロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼは様々な神経伝達物質受容体と共役した活性調節を受けており、多くの神経伝達物質作用は DARPP-32 リン酸化レベルの変化として反映される。このため DARPP-32 は線条体でのシグナル統合機構および細胞内情報伝達系の解析モデルとして極めて優れている。

DARPP-32 リン酸化を指標として、マウス線条体スライスでのニコチン作用、グルタミン酸作用を解析した。ニコチン作用の解析では、(1)高濃度ニコチン (100 μ M)

はドーパミン D1 シグナリングを増強すること、(2)低濃度ニコチン (1 μ M) はドーパミン D2 シグナリングを増強することを明らかにした。また、グルタミン酸作用の解析では、グルタミン酸は NMDA 受容体、AMPA 受容体、代謝型グルタミン酸受容体を介して複数の情報伝達系を活性化し、ドーパミン/DARPP-32 情報伝達系と複雑な相互作用を示すことを明らかにした。この研究をさらに発展し、神経細胞間の機能的ネットワークおよび細胞内情報伝達系を含む線条体領域ドーパミン情報伝達マップの作製を目指している。このドーパミン情報伝達マップを利用することにより、ドーパミン作用の異常が示唆される病態モデルや遺伝子改変マウスでのドーパミン情報伝達系の解析を効率的に行うことができる。

(10) 海馬・扁桃スライス標本を用いた電気生理学的表現型解析

真鍋俊也 (東京大学 医科学研究所 基礎医科学部門 神経ネットワーク分野)

遺伝子改変マウスの最大の利点は、分子レベルから、細胞・ネットワークレベル、さらには個体レベルでの解析が同時に進められることであろう。これまでの神経生理学的解析において、*in vitro* では、ニューロンの特性や、イオンチャネル、受容体、シナプス伝達やその可塑性などの分子機構が詳しく調べられ、多くの重要な知見が得られて

いる。一方、*in vivo* での解析では、高次脳機能の責任脳部位の同定や、薬理学的手法による高次脳機能における受容体の役割の解明などが行われてきたが、*in vitro* と *in vivo* の成果をつなげることがかなり難しかった。しかし、遺伝子改変マウスの導入により、そのギャップの一部が埋められつつある。これまでも脳スライス標本を用いた解析は盛

んに行われてきたが、遺伝子改変マウスの登場により、その成果を個体レベルでの行動実験の結果と比較することができるようになり、シナプスレベルでの異常が、個体でどのように反映されるかを直接的に検討できるようになった点は、きわめて大きな進歩であると言える。

私たちの最近の研究成果を例にして、海馬および扁桃体のスライス標本を用いた解析を中心にした遺伝子改変マ

ウスの総合的解析について説明し、脳スライス標本の有用性や解析法の実際について述べた。具体的には、NMDA受容体の NR2B (GluRε2) サブユニットのチロシン残基に点変異を導入したノックインマウスにおける扁桃体シナプス伝達の異常と扁桃体が関与する情動異常の解析結果について詳しく説明した。

(11) 小脳電気生理解析のプロトコル標準化と問題点

平井宏和 (金沢大学学際科学実験センター革新脳科学研究領域/PRESTO, JST)

小脳機能に障害がある場合、体幹の振るえや歩行異常などの運動失調として表れるため、目で見ただけで異常があることを見つけられることが多い。本発表ではまず、小脳機能異常が疑われるマウスを解析する場合に我々が標準的に行っているプロトコルを、実際の解析例を示しながら紹介した。

次にコアラボとして小脳機能解析を行う場合に起こり得る問題について、現時点で考えられることを述べた。小脳の電気生理学解析のプロトコルを一通り行うにはそのマウスに見られる運動障害が本当に小脳異常に起因し

ているのかを明らかにしてからでなければ効率が悪い。また運動障害が小脳性であった場合でも、形態的に小脳に大きな障害があればわざわざ詳細な電気生理解析が必要であるのかも疑問になってくる。このようなことから、理想的には小脳電気生理解析の前に運動障害の原因がどこにあるのかを解析するコアラボが必要で、小脳障害がある場合でも、どの程度の運動失調があり、どの程度の小脳の形態異常であれば電気生理解析を行う価値があるのかについて基準を作る必要があると思われる。

(12) マウスによる精神疾患の研究の問題点

功刀浩 (国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第三部)

多くの精神疾患は、複数のリスク遺伝子と環境要因との相加作用/相互作用によって発症すると想定されている。近年、精神疾患の遺伝子解析研究によって、種々のリスク遺伝子が報告されており、そうした遺伝子がどのようなメカニズムで病態発生に関与するか、遺伝子改変マウスを用いた解析結果が蓄積されつつある。

行動実験によって、マウスがヒトの精神疾患の症状を呈しているかどうかをみることができるかどうかという疑問は常につきまとう。例えば、統合失調症は幻覚、妄想などの精神病症状(陽性症状)に加えて、社会的機能の低下

や社会的行動の異常(自閉)、感情の鈍磨などの陰性症状、認知障害などが生じるが、そうした症状をどのような行動解析方法でみていくか、今後さらなる発展が必要である。例えば、プレパルス抑制テストの異常は、マウスにおいて統合失調症様症状の指標として最もよく使われるが、われわれのヒトにおける検討では、テスト条件の設定が難しいことや、テスト所見は統合失調症の症状のうち陽性症状と相関するものの、陰性症状とは相関しない、などの点が明らかになった。行動解析法を洗練させることは、マウスによる精神疾患の解明を行う上で鍵となろう。

(13) 精神疾患脳バンクの現状と展望

池本桂子¹, 和田明¹, 國井泰人², 楊巧会¹, 丹羽真一¹

(¹ 福島県立医大神経精神医学講座, ² 同病理学講座)

精神疾患の研究を進展させるためには死後脳研究は不可欠である。死後脳バンクの設立においては、厳しい倫理的基準をクリアすることに加え、当事者・家族が積極的に参加するという発想が大切であると考えられる。福島県立医大神経精神医学講座では、1997年から福島県立医大倫理委員会の承認を得て、精神疾患死後脳研究運営委員会を発足させ、統合失調症を中心とした本邦初の系統的な精神疾患死後脳バンクを構築してきた。福島脳バンクの特徴としては、当事者・家族の積極的参画による運営、任意団体(つばめ会)による支援、インフォームド・

コンセントによる当事者・健常者の生前登録、開かれた研究活動といった事柄が挙げられる。病理解剖は原則として、大学病理部において行なう。現時点では、剖検例は24例であり、左半側を凍結保存、右半側をホルマリン固定している。今後の課題としては、日本国内、さらにはアジア地域へ向けて、脳バンクのネットワークを構築することや、学内外の研究機関との共同研究の推進、当バンクの保存脳を用いて研究の推進に加え、不足しがちな健常脳を病理部の協力を得て確保すること、事務員、技術員、研究員などのスタッフの増員が挙げられる。

(14) 動物モデルとヒトの研究から精神疾患創薬へ：遺伝子改変マウスへの期待

梶井 靖 (三菱ウェルファーマ 創薬第一研究所)

精神疾患創薬研究において、病因論の展開と治療薬候補物質の高確度臨床予測を実現する動物モデルの確立は大きな課題である。近年様々な遺伝子改変動物の表現型解析が実施され、情動や作業記憶の異常など、精神疾患障害との関連が示唆される行動特性が報告されている。こうした遺伝子改変動物の行動特性を生理学的、薬理学的なデータと共に集積し、臨床症状の多様なスペクトルにより良く対応した動物モデルパネルを実現することができれば、従来とは異なる新しい切り口で精神疾患の病因論を展開し、創薬までつなげていくことも期待される。我々は、将来的にパネルを活用する方法論の1つとして、データベース化された GeneChip データを用いて遺伝子改変動物の特徴とヒトのデータを対応付ける試みを行っ

ている。長期持続的な行動変化に伴う脳内遺伝子発現レベルの変動は、小さな変動幅で多くの遺伝子が関与するという特徴を持つが、不安行動とその不安行動を指標とした場合の fluoxetine 応答性に特徴を持つ遺伝子改変マウスの海馬遺伝子発現を Affymetrix 社の GeneChip システムを用いて解析した結果、遺伝子操作と薬物処理という2つのパラメータを特徴付けるマウス・プローブセットが見出された。プローブセットは38ないし149個のプローブ群から構成されており、これらに対応するヒト・プローブセットに変換し、データベースシステムに登録されている166枚のヒト海馬 GeneChip データを解析した結果、生前の病歴や服薬履歴に特徴を持つクラスターの形成が確認された。

3. 神経科学の新しい解析法とその応用

2005年9月15日－9月17日

代表・世話人：鹿川 哲史（熊本大学 発生医学研究センター）

所内対応者：池中 一裕（生理学研究所 分子神経生理部門）

- (1) 神経幹細胞単層培養法を用いた細胞外来性因子によるシグナル伝達研究
清水 健史（熊本大学 発生医学研究センター 転写制御分野）
- (2) 電子顕微鏡を用いたシナプス関連たんぱく質の二次元的，三次元的分布観察
萩原 明（京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構）
- (3) 脱髄疾患治療法開発へ向けた髄鞘形成機構の解明
中原 仁（慶応義塾大学医学部解剖学教室）
- (4) ウイルス様ナノ分子を用いた遺伝子送達技術
山田 真久（理化学研究所脳科学総合研究センター山田研究ユニット）
- (5) アストロサイト機能不全マウスの作出と解析
田中 謙二（生理学研究所 分子神経生理部門）
- (6) 生体分子イメージングによる病態解明と創薬の飛躍的推進
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）
- (7) 背側由来 Netrin-1 による一次求心性繊維の軸索投射制御
渡辺 啓介（生理学研究所 分子神経生理部門）
- (8) 音源定位における両耳間同時検出機構の解析
久場 博司（京都大学大学院医学研究科 神経生物）
- (9) 加齢により低下する海馬錐体細胞の膜流動性
榊原 学（東海大学開発工学部生物工学科）
- (10) 嗅覚研究における多角的アプローチ：ものとりから機能解析まで
東原 和成（東京大学大学院新領域創成科学研究科）
- (11) 気分安定薬は，神経幹細胞の Notch シグナルを介して生体脳の神経新生を亢進させる
東 幹人（生理学研究所 分子神経生理部門）
- (12) 培養切片系と分散培養系の工夫による海馬歯状回顆粒細胞の研究
小山 隆太（東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室）
- (13) Krypton laser-Yag laser system による脳梗塞 - 再灌流モデルマウスの作製
和気 弘明（生理学研究所 恒常機能発達機構研究部門）
- (14) 開口分泌の時空的調節機構へのアプローチ
熊倉 鴻之助（上智大学生命科学研究所）
- (15) ベンゾジゼピンによる大脳皮質第V層の GABA 作動性シナプスにおける $\alpha 7$ ニコチン受容体の insertion とそのメカニズム
山本 純偉（浜松医科大学生理学第一講座）
- (16) 自発性 Ca^{2+} transient の消化が小脳顆粒細胞の移動の終了を惹起する
熊田 竜郎（浜松医科大学生理学第一講座）
- (17) TARPs (transmembrane AMPA receptor regulatory proteins) の多様性
板倉 誠（北里大学医学部）

【参加者名】

清水健史 (熊本大), 萩原明 (京都大), 東原和成 (東京大大院), 渡辺恭良 (大阪市大大院・医), 福田敦夫 (浜松医大・医), 熊田達郎 (浜松医大・医), 山本純偉 (浜松医大・医), 寺川進 (浜松医大・医), 熊倉鴻之助 (上智大・理工), 小山隆太 (東京大大院・薬), 高橋正身 (北里大・医), 板倉誠 (北里大・医), 榊原学 (東海大・開発工), 久場博司 (京都大大院・医), 中原仁 (慶応大大院・医), 東田陽博 (金沢大大院・医), 山田真久 (理化研), 中嶋一博 (京都大大院・理), 犬東歩 (京都大大院・

理), 鍋倉淳一 (生理研), 和気弘明 (生理研), 北村明彦 (生理研), 牧野佳用子 (生理研), 田中淳一 (生理研), 檜山武史 (基生研), 米原圭祐 (基生研), 鈴木亮子 (基生研), 石原俊明 (基生研), 藤川顕寛 (基生研), 早坂孝宏 (統合バイオ), 岸本拓哉 (生理研), 井上剛 (生理研), 西巻拓也 (生理研), 鯨井加代子 (生理研) 田中嘉人 (住友化学), 酒井朋子 (生理研), 渡辺美穂 (生理研), 堀部尚子 (生理研), 深沢有吾 (生理研)

【概要】

神経科学は、脳神経系が高次機能を実現するメカニズムを理解するために動物個体・細胞・分子レベルの研究が統合された研究領域である。近年の各レベルにおける技術開発の進歩は凄まじく、それぞれのレベルにおいて目覚ましい研究成果を上げる一方で、急速な研究技術革新は、領域の細分化や専門化に拍車をかけ、神経科学の基たる複合領域研究を一研究者や一研究室単位で実現することが困難となってきている。現在から将来的視野においては、各分野のエキスパートによる共同研究がその中核となる。そして、専門分野を異とする研究者が出会い、互いの技術や知識を交換する「場」が切望されてい

る。本研究会は、異なる解析レベルやシステムを専門とする研究者が集い、互いの技術や知識を交換し、統合的な神経科学の研究発展を図る「場」となった。特に、各研究発表に対し十分な討論時間を用意することができたため、今後の神経科学研究を担う若手研究者による発表に対し経験豊富な研究者を中心として活発な質問が出され積極的な意見交換がなされた。各発表は最新技術の紹介に留まらず、非常に高い成果が紹介され、神経科学研究の最前線の情報を研究者間で共有するに非常に有意義な研究会となった。

(1) 神経幹細胞単層培養法を用いた細胞外来性因子によるシグナル伝達研究

清水 健史 (熊本大学発生医学研究センター転写制御分野)

培養神経幹細胞や神経前駆細胞は、Wnt や FGF などの細胞増殖シグナルに応答して盛んに細胞分裂するが、培養液から増殖シグナルを除去すると分裂を停止し、ニューロンなどに分化することが知られている。すなわち、FGF や Wnt シグナルが細胞増殖促進と同時に細胞の未分化性維持にも寄与していることが予想された。そこで、我々は神経幹細胞/神経前駆細胞を *in vitro* で維持、拡張する方法として *neurosphere* 形成法と神経上皮細胞単層培養法を採用し、それぞれの培養法の長所を組み合わせることでシグナル伝達の分子機構を解析した。まず、神経上皮細胞単層培養系

に FGF2 を添加すると PI₃-kinase-Akt 経路を介して、Wnt シグナルの下流標的として知られている GSK3βの活性が抑制されることを見出した。その結果、神経上皮細胞の核内にβ-catenin が蓄積し、細胞周期制御因子である cyclin D1 の発現が促進され、細胞増殖が促進されることが分かった。我々はさらに、ニューロン分化を抑制し幹細胞の未分化性維持に関与する Notch シグナルが FGF2 シグナルとクロストークすることも見出した。この未分化性維持能の解析には *neurosphere* 形成法も用いたので合わせて報告する。

(2) 電子顕微鏡を用いたシナプス関連たんぱく質の二次元的、三次元的分布観察

萩原 明 (京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構)

シナプス周辺に分布するたんぱく質を透過型電子顕微鏡で観察する方法として、2種類の方法を紹介する。

凍結割断レプリカ免疫標識法 (SDS-FRL 法) は、細胞膜面のレプリカ像を観察する従来の方法に免疫標識を応用することにより、レプリカ膜上で物質の同定や分布状態を二次元的に観察できるようにした方法である (Fujimoto, K; 1995)。この方法ではたんぱく質が密に存在する場所でも受容体などが高感度に観察できたことから、シナプス前終末 AZ に存在する小胞分泌関連たんぱ

く質の分布解析を行った (Hagiwara A; 2005)。

一方、一般的な超薄切片を用いた免疫標識法 (preembedding 法) で行う三次元再構築は、膜面だけでなく細胞内の構成要素と合わせて分布を観察できるという点で非常に有効な手段である。この三次元再構築によって、小脳 Bergmann glia に発現する細胞骨格系たんぱく質 Sept4 がシナプス周辺に分布していることがわかってきた。

(3) 脱髄疾患治療法開発へ向けた髄鞘形成機構の解明

中原 仁 (慶応義塾大学医学部解剖学教室)

昨今の研究成果からこれまで想像していた以上に髄鞘の障害が関係する疾患が多いことが分かってきている。多発性硬化症のみならず、統合失調症や躁鬱病等の精神疾患までもに髄鞘障害が指摘されるようになっていく。

髄鞘の主たる役割は軸索の伝導において跳躍伝導を可能にする絶縁体としての機能にあると考えられ、従って原因の如何を問わず、脱髄によって引き起こされた障害は、軸索がある程度健全に維持されている前提であれば、髄鞘再生によって治癒しうると期待される。

その最も非侵襲的なアプローチとして考えられるのは、脱髄病変にも残存し得ると考えられる内因性オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の外来刺激による活性化を介した髄鞘再生である。これを可能にする為には髄鞘形成 (再生) 機構を解明し、その応用を目指す必要がある。我々らは 1998 年より上記に関する研究を開始し、2003 年に OPC の分化誘導機構を発見し報告した。本研究発表においては、それらを概観すると共に、更に多発性硬化症の死後脳解析結果を報告し今後の展望について議論させて頂きたい。

(4) ウイルス様ナノ分子を用いた遺伝子送達技術

山田 真久 (理化学研究所脳科学総合研究センター山田ユニット)

ウイルスベクターを用いた遺伝子送達技術は、毒性などが指摘され、より安全性の高い遺伝子送達技術が求められている。この様な従来の遺伝子送達技術の問題点を乗り越える技術として、我々が開発を行っているウイルス様ナノ粒子は、遺伝子とリポソームの複合体を人工脂質 2 重膜で包み、さらにその表面に膜透過性ペプチド Octaarginine を修飾した人工粒子である。現時点で、我々

は、アデノウイルスより低い毒性を示すこと、粒子内に挿入した遺伝子をマウス皮膚に塗抹することにより体毛で遺伝子発現させることに成功している。この技術は単に皮膚のみでなく多様な組織への遺伝子送達に役立つと考えている。現在、我々は神経損傷時に神経再生を促すグリア瘢痕形成阻害薬の開発を検討している。

(5) アストロサイト機能不全マウスの作出と解析

田中 謙二 (生理学研究所 分子神経生理部門)

アストロサイトは、神経伝達の調節、エネルギー代謝の調節、脳血管関門の形成などの脳恒常性維持に重要な役割を担う。このように多岐にわたる機能を有するアストロサイトであるが、その異常によってどのような高次脳機能障害が起こるのか殆ど分かっていない。発表者はアレキサンダー病というアストロサイト細胞内に凝集体を形成するアストロサイト特異的疾患の原因遺伝子をマウスアストロサイトで発現するマウスを作出した。作出

したモデルマウスは、Cre マウスとの交配によって脳内の関心領域のみでアレキサンダー病の病理を再現出来る。このマウスの病理・表現型を解析することによって、帰納的にアストロサイトの機能を明らかにすることを試みた。モデルマウスでは、カイニン酸投与に対するけいれん感受性が有意に高いこと、この結果は海馬を含む背側脳内の凝集体の有無に依存することが明らかになった。

(6) 生体分子イメージングによる病態解明と創薬の飛躍的推進

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)

ポジトロンエミッショントモグラフィー (PET)などの生体分子イメージングの手法を用いて、病態の分子医学的把握とその情報を有効に用いた薬効評価、また、血中のみならず標的細胞・分子への薬物動態を捉えることができる。“Seeing is believing”, “ヒトでの創薬”という当たり前のことを淡々と成していくことは、還元的手法に

重きを置いてきた 20 世紀後半からのライフサイエンスの流れを「真のライフサイエンス」へと孵化させる必然的過程である。先進的な分子イメージングの拠点構想、研究体制、世界的動向について、研究の実例とともに解説したい。

(7) 背側由来 Netrin-1による一次求心性線維の軸索投射制御

渡辺 啓介^{1,2}, 玉巻 伸章^{3,4}, 古田 貴寛⁴, Susan L. Ackerman⁵, 池田一裕^{1,2}, 小野 勝彦^{1,2}
(¹生理研・分子神経生理, ²総研大・生命科学, ³熊本大院・医薬・脳回路構造学,
⁴京都大院・医・高次脳形態学, ⁵The Jackson Lab., Bar Harbor, ME, USA)

背根神経節(DRG)に存在する神経細胞は軸索を皮膚などの末梢組織(末梢枝)と脊髄(中枢枝)両方に伸ばし、中枢へ感覚情報を中継する。発生初期において、DRG axon は脊髄侵入後、まず脊髄背側部に後索を形成する。その後、軸索側枝を外套層の標的細胞に伸ばす。この2つの過程の間には“waiting period”と呼ばれる時差があり、緻密な神経回路網の形成の一端を担ってい

ると考えられている。しかしながら、waiting period 形成の分子機構についての知見は乏しい。

Netrin-1 は神経管腹側由来の軸索誘導分子である。我々はこの分子に注目し、背側部で一過性に発現する Netrin-1 が DRG axon に対する waiting period をつくり出し、その軸索投射に深く関わることを明らかにした。本研究では、Netrin-1 の機能の新たな一面について紹介したい。

(8) 音源定位における両耳間同時検出機構の解析

久場 博司 (京都大学大学院医学研究科神経生物)

層状核 (NL) 神経細胞は両耳からのシナプス入力 of 同時検出器として働くことにより音源定位に関わる。今回、この NL 細胞の同時検出機構を、電気生理学的及び組織学的手法を用いて解析した。NL 細胞の同時検出精度は非常に高く、この高い精度は、低閾値で活性化する DTX 感受性 K 電流が EPSP の時間経過を加速することにより実現された。一方、NL 細胞は、特徴周波数 (CF) に応じてその機能と形態が異なる。特に、同時検出の精度は

mid-high CF 領域の細胞で高く、これはこの領域の細胞が K チャネル、特に Kv1.2 を多く発現することによった。さらに、mid-high CF 細胞では、軸索起始部がミエリンで覆われ、かつ細胞体は受動的であった。活動電位の発生部位が細胞体から電氣的に離れていることは、高頻度の入力を受ける mid-high CF 細胞が、正確に情報を統合、出力する上で重要であると考えられた。

(9) 海馬錐体細胞の膜流動性は加齢により低下する

榊原 学 (東海大学開発工学部生物工学科)

加齢に伴って、海馬神経細胞の受容体が減少し、細胞膜の粘性が増加するとの報告がある。この脳神経細胞の膜における変化は、老化に伴う学習・記憶能力の減退と関係付けられることが多い。本報告では若齢動物と老齢動物の海馬神経細胞の膜流動性を共焦点顕微鏡システムで蛍光退色回復法により検討した。海馬スライス標本を DiI-C で染色し、錐体細胞細胞体の一部を直径 1.2 μ m の小光点で退色させ、その後の蛍光強度の回復過程を解析

した。回復過程は、1 次の拡散過程で近似され、回復率、拡散係数、輸送係数、時定数などで特徴づけられる。加齢動物の海馬錐体細胞の膜流動性は、時定数において若齢動物に比較して有意に大きく、一方、拡散係数、回復率はいずれも有意に小さかった。これらの結果は、これまでの報告を裏付けるもので、加齢に伴って膜の流動性が低下することを示すとともに、水迷路試験で評価される動物の空間認知機能の減弱と平行している。

(10) 嗅覚研究における多角的アプローチ：ものとりから機能解析まで

東原 和成 (東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻分子認識化学分野)

網羅的解析が容易にできるゲノム時代において、現象を見据えた古典的・王道的戦略、例えば、活性天然物同定から受容体遺伝子決定と機能解析というアプローチは労力とリスク性ゆえに避けられがちだ。我々は、嗅覚受容体の機能解析を、単一匂い応答嗅神経細胞からの機能的クローニングという逆転の発想で成功させた。また、昆虫の性フェロモンの機能解析には、分子生物学的手法と電気生理学的手法を融合させて成功した。最近、マウスの性フェロモンを探索・精製していく課程で、ゲノム

に埋もれていた分泌タンパク質をコードする新規遺伝子ファミリーを発見した。これらすべての成果は、網羅的スクリーニングでは得られなく、様々な手法を融合させて現象と機能を見据えた多角的アプローチではじめて可能となったものである。本セミナーでは、匂いとフェロモンを感知する仕組みに迫るために我々のとった戦略の背景・意義を概説し、ポストゲノム時代における網羅的機能解析戦略に対峙する。

(11) 気分安定薬は、神経幹細胞の Notch シグナルを介して成体脳の神経新生を亢進させる。

東 幹人, 池中 一裕, 等 誠司 (総合研究大学院大学, 生理学研究所分子神経生理部門)

神経幹細胞は発生期だけでなく、成体脳にも限られた領域に存在し続け、生涯を通して神経新生を行っている。また成体脳に存在する神経幹細胞の数は正確に制御されている。しかし近年、ストレスなどの精神的要因によって成体脳で維持されている神経幹細胞の数が変化することが示唆され始めてきている。

我々は精神疾患の一つである双極性障害の治療に用いられている気分安定薬を用いて、気分安定薬の作用効果と神経幹細胞が成体脳で維持されているメカニズムを明らかにする事を試みている。

双極性障害は、躁状態とうつ状態を繰り返す精神疾患である。治療に用いられる気分安定薬としてはリチウムなどがある。これまでにリチウムの作用点を調べている研究は多く成されてきたが、気分安定薬としての共通のメカニズムはほとんど分かっていない。

In vivo と In vitro での神経幹細胞と気分安定薬を用いた実験結果から、我々は成体脳において気分安定薬の共通の薬理作用が、神経幹細胞の Notch シグナルを活性化させ神経幹細胞の自己複製能を亢進することにある事を明らかとした。

(12) 培養切片系と分散培養系の工夫による海馬歯状回顆粒細胞の研究

小山 隆太 (東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 博士課程3年)

海馬歯状回顆粒細胞は、嗅内野皮質からの入力を海馬内へと伝達する。同細胞は発火閾値が高く、バースト状発火も維持され難い為、歯状回は興奮性入力を最初に制御する関門となる。しかし、海馬を発作焦点とする側頭葉てんかん患者の歯状回では顆粒細胞の軸索である苔状繊維が異常発芽し、反回性興奮回路を再編成する為このシステムが乱され、発作の悪化に繋がる。

この異常発芽機構解明の為に、海馬切片の共培養系及び、切片上に顆粒細胞を分散培養する系を発案して、ま

ず正常時の苔状繊維の軸索誘導機構を検討した。その結果、異常発芽には歯状回門における何らかの因子の急峻な上昇が必要であるとの仮説に至り、側頭葉てんかんにおいて同部位で発現が上昇する BDNF に着目した。現在までに、同分子を含有した微小ビーズを海馬切片上に配置した培養系及び、顆粒細胞の分散培養系を用いて、BDNF が異常発芽を誘起し得る事を示した。また、現在は培養切片系を利用して、乳幼児期の海馬における細胞新生機構を検証している。

(13) Krypton laser - Yag laser system による脳梗塞—再灌流モデルマウスの作製

和気 弘明¹, 八尾 博史², 鍋倉 淳一¹ (¹生理研恒常機能発達機構研究部門 ²国立肥前療養所)

光感受性色素であるローズベンガル液に568nmの波長の Kr laser を照射することにより酸化作用を発生させることができる。血液中にローズベンガルを注入し、Kr laser を照射することにより血管内皮細胞に反応性に酸化障害を与え、血小板の凝集を引き起こし、血栓が形成される。さらに形成された血管閉塞部にパルスレーザーである Yag laser を照射することにより、閉塞部の再貫通さ

せることが可能である。

この方法を利用し、マウスでは開頭せずに任意の脳表面の血管を塞栓閉塞することができ、任意の時間後に再灌流させることが可能となった。この技術を利用すると、これまでの脳虚血モデル作成法では作成できなかった、脳虚血後の細胞生存/死の境界領域であるペナンプラ領域の非侵襲的作成が可能となり、各種解析に用いることができる。

(14) 開口分泌の時空的調節機構へのアプローチ

熊倉 鴻之助 (上智大学生命科学研究科)

神経細胞あるいは内分泌細胞からの開口分泌機構では、分泌部位への顆粒供給、あるいは細胞内形質膜直下の顆粒運動が複数の因子による時空的調節を受けていると思われる。我々は、形質膜直下への分泌顆粒の供給および局在の時空的調節を理解する目的で、クロマフィン細胞を用いて、蛍光標識をした分泌顆粒の細胞内運動のイメージ解析を行っている。細胞内の分泌顆粒の運動は、高速、中速、低速の3群に分類でき、静止時の単一細胞あたり、60%は速い速度で、30%は中速で運動し、残りの10%は低速もしくは停止状態にある。低速もしくは停

止顆粒の分布は、脱分極刺激下で60%に増加する一方、脱分極刺激を取り除くと再び10~15%に戻る。一方、脱分極刺激を取り除いた後に、中速で運動する顆粒成分は50%に増加する。これらの顆粒成分の特徴を解析した結果、我々の実験系で観察している顆粒動態は形質膜から90~900 nmの距離範囲の動態であることから、この空間での顆粒供給や動態の時空的調節が開口分泌に至る直前の重要な過程であり、PKCや運動蛋白系による調節の標的の一部であることが示唆された。

(15) ベンゾジアゼピンによる大脳皮質第V層のGABA作動性シナプスにおける $\alpha 7$ ニコチン受容体のinsertionとそのメカニズム

山本 純偉, 福田 敦夫 (浜松医科大学 生理学第一講座)

ベンゾジアゼピン (BZP) 系鎮静薬のミダゾラム (MDZ) の presynaptic GABAergic neuron への作用を生後2週のラットの脳スライス標本を用いて調べたところ大脳皮質体性感覚野第V層の錐体細胞の微小シナプス後電流 (mIPSC) の頻度を増加させることがわかった。他の BZP 系薬物では増加作用がなかったことから、GABA_A 受容体以外を介した機序であることが示唆された。我々は MDZ が GABA 作動性介在ニューロンの presynaptic $\alpha 7$ nAChR

受容体を介して mIPSC の頻度を増加させることにより抑制性シナプス伝達を増強していることを明らかにした。さらに、機械的急性単離した錐体細胞を用い光学的に MDZ がシナプスで 7nAChR 受容体の細胞膜表面への insertion を起こし、それには PKC が関与していることを明らかにした。また、この作用は第V層に特異的に観察された。

(16) 自発性 Ca^{2+} transient の消失が小脳顆粒細胞の移動の終了を惹起する熊田 竜郎^{1,2}, 小室 仁², 福田 敦夫¹ (¹浜松医科大学・生理学第一, ²Dept. of Neurosciences, The Cleveland Clinic)

外顆粒層で最終分裂を終えた小脳顆粒細胞は、皮質層特異的に細胞移動の速度や様式、細胞形態を変化させながら移動し、最終目的地である内顆粒層に到達する。今回、我々はこの皮質層特異的な細胞移動の制御に Ca^{2+} シグナリングが関与する可能性を検討するために、新生児期のマウス小脳スライス標本を用いて、移動中の顆粒細胞のリアルタイム観察と同時に細胞内 Ca^{2+} イメージング

を行った。その結果、1) 移動中の顆粒細胞は、各皮質層にある移動経路において特異的な自発性細胞内 Ca^{2+} レベルの変動を示す。2) Ca^{2+} transients の発生頻度は顆粒細胞の移動速度に正に相関する。3) 顆粒細胞が移動を終了する内顆粒層深部では、細胞移動の終了に先行して Ca^{2+} transient の消失が起こる。4) 薬理的に Ca^{2+} シグナリングを変化させることにより細胞移動の停止のタイミングを

変化させることができる, ことが明らかになった。以上の事から, 自発性 Ca^{2+} transient が小脳顆粒細胞の移動を

制御し, その消失により細胞移動の終了を惹起すること示唆された。

(17) TARPs(transmembrane AMPA receptor regulatory proteins)の多様性

板倉 誠, 高橋 正身 (北里大学 医学部)

AMPA receptor は中枢神経系において主要な神経伝達物質グルタミン酸の受容体である。近年, stargazin/ γ -2 が AMPA receptor のシナプスへの局在化やチャンネル機能制御に重要な働きをしていることが明らかになりつつある。Stargazin/ γ -2 には AMPA receptor に結合するファミリー分子(γ -3, γ -4, γ -8)が存在し, これらは TARPs

(transmembrane AMPA receptor regulatory proteins)と名づけられている。しかしながら, stargazin/ γ -2 以外の TARPs ファミリー分子についてはほとんど研究がなされていない。本発表では海馬に多く発現している γ -8 と stargazin/ γ -2 を比較することによって TARPs ファミリーの局在や機能の多様性を報告する。

4. 心臓血管系におけるイオンチャンネル学の新たな展開

2006年1月24日－1月25日

代表・世話人：鷹野 誠（自治医科大学医学部）

所内対応者：岡田 泰伸（生理学研究所）

- (1) KCNQ1 遺伝子スプライス異常により QT 延長症候群を発症する分子機序の解明
赤尾 昌治（京都大学大学院医学研究科）
- (2) Brugada 症候群関連遺伝子異常 (SCN5A, N406S) の不活性化に対するリドカインの効果
伊藤 英樹（生理学研究所）
- (3) HERG チャンネルにおける抗不整脈薬ニフェカランとの結合と facilitation 効果に関する検討
岩田 美紀（大阪大学大学院医学系研究科）
- (4) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体と心血管系疾患
岩本 隆宏（福岡大学医学部）
- (5) 交感神経機能と Ca^{2+} チャンネル β_3 サブユニット
尾野 恭一（秋田大学医学部）
- (6) リゾホスファチジルコリンによる $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 mRNA 量増加作用には低分子量 G タンパク RhoB の
ゲラニルゲラニル化が関与する
木村 純子（福島県立医科大学医学部）
- (7) HCN4 遺伝子の制御領域の解析
倉富 忍（自治医科大学医学部）
- (8) 心筋 I_{KS} チャンネルリン酸化による機能修飾に対する KCNA ファミリーの影響
黒川 洵子（東京医科歯科大学難治疾患研究所）
- (9) Na^+/K^+ pump 阻害時における心筋細胞容積変化のイオンメカニズムの解明～包括的心筋細胞モデルに
よるシュミレーション解析～
竹内 綾子（京都大学大学院医学研究科）
- (10) 平滑筋型 ATP 感受性 K^+ チャンネルにおけるチャンネルポア領域の分子薬理学的解析
寺本 憲功（九州大学大学院医学研究院）
- (11) KCNE1 ならびに KCNE2 による KCNQ1 チャンネルの相互的機能調節
豊田 太（滋賀医科大学医学部）
- (12) カルシウムプローブ (G-CaMP) を用いた平滑筋カルシウム動態の解析
中井 淳一（理化学研究所）
- (13) 遺伝性不整脈患者における心臓 Na チャンネル病の遺伝子解析
牧山 武（京都大学大学院医学研究科）
- (14) 心筋筋小胞体カルシウム ATPase 活性制御と心機能
南沢 享（横浜市立大学大学院医学研究科）
- (15) 心筋 L 型 Ca チャンネルの活性維持機構
藪部 悦子（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）
- (16) ES 細胞由来心筋細胞を用いた心臓伝導傷害修復の試み
李 鍾國（名古屋大学環境医学研究所）
- (17) モルモット心室筋細胞の膜電流に対する新規 NCX 阻害薬 SN-6 の特徴について
渡邊 泰秀（浜松医科大学医学部）

【参加者名】

尾野 恭一 (秋田大学医学部), 木村 純子 (福島県立医科大学医学部), 倉富 忍 (自治医科大学医学部), 鷹野誠 (自治医科大学医学部), 古川 哲史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 黒川 洵子 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 中井 淳一 (理化学研究所), 南沢 享 (横浜市立大学大学院医学研究科), 李 鍾國 (名古屋大学環境医学研究所), 渡邊 泰秀 (浜松医科大学医学部), 堀江 稔 (滋賀医科大学医学部), 伊藤 英樹 (生理学研究所), 豊田 太 (滋賀医科大学医学部), 松浦 博 (滋賀医科大学医学部), 赤尾 昌治 (京都大学大学院医

学研究科), 牧山 武 (京都大学大学院医学研究科), 松岡 達 (京都大学大学院医学研究科), 竹内 綾子 (京都大学大学院医学研究科), 倉智 嘉久 (大阪大学大学院医学系研究科), 岩田 美紀 (大阪大学大学院医学系研究科), 寺本 憲功 (九州大学大学院医学研究科), 朱海雷 (九州大学大学院医学研究科), 岩本 隆宏 (福岡大学医学部), 養部 悦子 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科), 韓 冬雲 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科), 亀山 正樹 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

(1) KCNQ1遺伝子スプライス異常により QT 延長症候群を発症する分子機序の解明

赤尾 昌治, 辻 啓子, 牧山 武, 大野 聖子, 土井 孝浩, 吉田 秀忠, 北 徹
(京都大学大学院医学研究科循環器内科)
石井 孝広 (京都大学大学院医学研究科神経生物学)
堀江 稔 (滋賀医科大学呼吸循環器内科)

【目的】 *KCNQ1* 遺伝子は心筋細胞において遅延整流性 K チャンネルをコードし, その遺伝子異常は QT 延長症候群 (LQTS) の原因となる。我々は, *KCNQ1* 遺伝子のエクソン 7 の最後の塩基が G から A に変化 (g1032a) していた LQTS の 3 家系を同定し, 詳細な検討を行った。この変異は以前にイントロン 7 のスプライス異常を来すことがすでに報告されている。

【方法と結果】リアルタイム RT-PCR を用いた定量的解析により, 遺伝子変異を有する人ではエクソン欠損 mRNA ($\Delta 7, \Delta 7-8, \Delta 8$) が著明に増加していた。アフリカツメガエル卵細胞にエクソンを欠かない全長 *KCNQ1* (FL) またはエクソン欠損ミュータント (MT) を発現させ, Voltage-Clamp 記録を行ったところ, いずれの MT も K 電流を認めず, ま

た FL と共発現させると, FL 電流に対し dominant-negative 効果を認めた。次に, 蛍光タンパクにより標識した FL, MT タンパクの局在を共焦点顕微鏡を用いて解析したところ, FL は細胞膜に発現するが, MT と共発現させると MT とともに細胞内に蓄積していた。最後に, FL と MT の直接相互作用を観察するため, 蛍光共鳴エネルギー転移法 (FRET) を用いると, いずれの MT も FL と細胞内にて結合していた。以上より, MT は細胞内で FL と結合して FL の細胞膜への移動を妨げ, これにより FL 電流に対し dominant-negative 効果を発揮していると考えられる。

【結論】 *KCNQ1* 遺伝子の変異により LQTS を発症する分子的機序を解明した。

(2) Brugada 症候群関連遺伝子異常 (SCN5A, N406S) の不活性化に対するリドカインの効果

伊藤英樹^{1,2}, 井本敬二¹, 堀江稔²
(自然科学研究機構 生理学研究所 神経シグナル研究部門¹
滋賀医科大学 呼吸循環器内科²)

【目的】心筋 Na⁺ チャンネル α サブユニット遺伝子の遺伝子異常による intermediate inactivation (IM) の亢進は Brugada

症候群の一因である。N406S 変異は 1795insD と同様に Brugada 症候群に見出された IM の亢進を認める遺伝子異常である。これらの Brugada 症候群に見出される IM の亢進を含めた Na チャネルの不活性化に対するリドカインの効果に関しては十分な報告はない。

【方法】HEK293 細胞に WT, 1795insD あるいは N406S をβ1 サブユニットと共発現させ、パッチクランプ法にてリドカインの変異 Na チャネルの不活性化に対する影響について検討した。

【成績】N406S のリドカイン 100μM 下での速い不活性化 (20ms pulse) からの回復は WT, 1795insD と類似していた。一方、リドカインは WT, 1795insD の IM (1000ms pulse)

からの回復を有意に遅延させるが、N406S の IM からの回復は逆に促進した (WT vs. WT+lido, 219±57 vs. 559±150ms; 1795insD vs. 1795insD +lido, 300±37 vs. 579±120ms; N406S vs. N406S+lido, 361±47 vs. 167±34ms)。またリドカイン投与下の 1Hz, 500ms の連続 pulse で、N406S の不活性化はむしろ抑制された (channel availability, WT vs. WT+lido, 82±4 vs. 71±2 %; 1795insD vs. 1795insD +lido, 67±27 vs. 60±20 %; N406S vs. N406S+lido, 55±5 vs. 81±4 %)。

【結論】リドカインは N406S 変異の IM の亢進を抑制した。N406S 変異を有する Brugada 症候群における薬物治療の可能性を示唆した。

(3) HERG チャネルにおける抗不整脈薬ニフェカランとの結合と facilitation 効果に関する検討

岩田 美紀¹ 保坂 幸男² 木下 賢吾³ 中村 春木⁴ 倉智 嘉久¹

(¹大阪大学大学院医学系研究科 薬理学 ²新潟市民病院・循環器科

³東京大学医科学研究所 ⁴大阪大学蛋白質研究所)

ヒト erg 関連遺伝子 HERG 遺伝子でコードされる心臓の I_{Kr} チャネルの阻害薬ニフェカランは、致死的心室不整脈薬として臨床使用されている。この阻害薬による HERG チャネルの作用機序の詳細を調べることによって、ニフェカランや他の抗不整脈薬による効果や副作用の予測が可能になると考え研究を行っている。アフリカツメガエル卵母細胞に HERG チャネルを発現させニフェカラン投与し 2 電極膜電位固定法を用いて透過イオンによる巨視的な電流を測定し解析した。その結果、HERG チャネルにプレパルスとして強い脱分極パルスを与えると、低電圧で電流が増加するファシリテーション効果が惹き起こされ

た。一方、E-4031, ドフェチリドではその効果はみられなかった。HERG チャネルの変異解析実験より、Y652 と F656 がニフェカランによるチャネル開口阻害に関与するアミノ酸残基であることが明らかになった。またホモロジーモデリングを利用したドッキングシミュレーションにより、HERG の S624 と S649 残基もニフェカランと相互作用している可能性が示唆され、続いてこの残基のさまざまなアミノ酸変異体のニフェカランによるブロックとファシリテーション効果を調べたところ、S649 残基がファシリテーションに関与していることが明らかになった。

(4) Na⁺/Ca²⁺交換体と心血管系疾患

岩本隆宏 (福岡大学医学部薬理学教室)

Na⁺/Ca²⁺交換体 (NCX) は、その名のごとく Na⁺と Ca²⁺を交換輸送する細胞膜イオントランスポーターである。この輸送体は、心筋、血管平滑筋、神経、腎尿管などに多く発現し、様々な細胞内 Ca²⁺シグナルに密接にかかわっている。この輸送体の機能異常は、様々な病態を引き起こす

ことが予測されるが、その実態については未だ明確ではない。我々は、NCX 阻害薬および NCX 遺伝子改変マウスを研究ツールに用い、種々疾患、特に心血管系疾患における NCX の役割を明らかにし、この輸送体を標的とした新たな治療法を確立したいと考えている。これまでに、血管平

滑筋に発現する NCX1 の Ca^{2+} 流入が食塩依存性高血圧の発症に重要な役割を果たすことを明らかにした。また最近、野生型 NCX1 および活性型変異体の心筋特異的なトランスジェニックマウスを作製したところ、それぞれ肥大型および拡張型の心筋症を呈することを見出した。近年、心筋 Ca^{2+} シグナルの異常が心筋症の発現に関連することが

想定されているが、心筋 NCX1 の関与については不明確である。今回作製した心筋症マウスは、NCX1 の機能異常と心筋症の関係を解析するための有用なモデル動物になると考えられる。本研究会では、これらの内容を中心に心血管系疾患における NCX1 の役割について議論したい。

(5) 交感神経機能と Ca^{2+} チャネル β_3 サブユニット

尾野恭一, 呉燦文, 藤沢進, 村上学, 飯島俊彦 (秋田大学医学部機能制御医学講座)

交感神経終末からのノルアドレナリン放出には N 型 Ca チャネルが重要な役割を果たしている。Ca チャネルの副サブユニットである β_3 サブユニットは α_{1B} サブユニットと共に N 型チャネルを構成することから、交感神経を介する心拍および収縮力調節に関与していることが推察される。本研究においては、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、*in vivo* での心拍スペクトル解析を行うと共に Field 刺激に対する摘出心の収縮変化を測定し、 β_3 サブユニットの機

能的役割について検討した。その結果、安静時心拍数および RR 間隔のばらつきは Tg マウスでは有意に増加しており、 $\beta_3^{-/-}$ で減少していた。 β アドレナリン受容体抑制薬はマウスの心拍数を減少させ、その抑制作用は Tg マウスにおいて顕著であった。Field 刺激に対する摘出心の収縮反応は $\beta_3^{-/-}$ 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。以上のことから、 β_3 サブユニットが交感神経終末からのノルアドレナリン放出に機能的役割を果たしていることが示唆された。

(6) リゾホスファチジルコリンによる $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 mRNA 量増加作用には低分子量 G タンパク RhoB のゲラニルゲラニル化が関与する

前田佐知子, 松岡功, 木村純子 (福島医大・医・薬理)

我々はこれまで、ラット心筋由来 H9c2 細胞で、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX1) の mRNA の発現が HMG-CoA 還元酵素阻害薬フルバスタチン (Flv) で抑制され、リゾホスファチジルコリン (LPC) で亢進することを見出し報告してきた (Mol Pharmacol. 2005)。また、その機序に、低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoB の抑制または活性化がそれぞれ関与することも明らかにした (Mol Pharmacol. 2005)。RhoB はコレステロール合成経路におけるメバロン酸の代謝産物であるファルネシルピロリン酸 (FPP) またはゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) によりイソプレニル化を受けて活性化されることが知られている。この性質は、ファルネシル化は受けず、ゲラニルゲラニル化のみで活性化される RhoA や RhoC と異なる。そこで今回我々は、LPC による NCX1 mRNA 増加作用に GGPP と FPP のうち

どちらが優勢に関与するかを調べた。

H9c2 細胞を Flv で 24 時間処理して NCX1 mRNA 量を減少させ、その後、Flv 存在下に LPC を添加しても NCX1 mRNA 量は減少したままだった。しかし、Flv 存在下で GGPP または FPP を作用させると、減少した NCX1 mRNA 量は、それぞれ Flv 処理をしないコントロールレベルまで回復した。一方、Flv 存在下で LPC+GGPP を作用させると、NCX1 mRNA 量はコントロールレベルよりもさらに有意に増加した。LPC+FPP の添加では有意な増加は見られなかった。これらの結果から、LPC による NCX1 mRNA 発現量の増加作用には、RhoB のゲラニルゲラニル化による活性化が関与しており、ファルネシル化は関与していないことが示唆された。

(7) HCN4遺伝子の制御領域の解析

倉富忍, 鷹野誠 (自治医科大学 医学部 生理学講座生物物理学部門)

心臓ペースメーカーチャンネル HCN4 は, 胎生期は心臓全体に発現しているが発生が進むと洞房結節など刺激伝導系に限局する。だが肥大心では心室筋に再発現し不整脈への関与が示唆されている。しかしその発現制御は不明である。

これまでの研究で抑制性転写因子 NRSF の変異体を心臓に発現する遺伝子改変マウスでは HCN4 の発現が上昇することがわかっている。またデータベース検索により HCN4 遺伝子のイントロンに NRSF の結合モチーフ(NRSE)の存在を見いだした。そこで本研究では, HCN4 遺伝子発現における転写制御領域の解析を行った。

まず, HCN4 遺伝子上流領域の様々な長さの DNA 配列

を単離し, 胎仔及び新生仔ラットの初代培養心筋を用いたルシフェラーゼレポーター解析を行った。結果, 上流 847 bp の領域が最小プロモーターであった。このプロモーターは新生仔より胎仔心筋で高い活性が見られ, 発生における発現様式を再現していた。しかし薬物による心肥大刺激には反応しなかった。そこでプロモーターに NRSE を含むイントロンをつなぎ同様の解析を行った結果, 心肥大刺激で NRSF による転写抑制が解除されることが判明した。以上より上流プロモーターとイントロンの双方の作用によって HCN4 の発現が再現されることがわかった。

(8) 心筋 I_{Ks} チャンネルリン酸化による機能修飾に対する KCNE ファミリーの影響

黒川洵子, 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学分野)

KCNQ1 と KCNE1 から構成される心筋 I_{Ks} チャンネルは, 交感神経刺激下において, プロテインキナーゼ A によりリン酸化されることにより, 外向きカリウム電流を増大させ, 心筋活動電位を短縮させる。この機能修飾機構には, A-キナーゼアンカー蛋白 (Yotiao) を含むチャンネル分子複合体が関与しており, β サブユニットである KCNE1 の共役も必要とされる。KCNE1 のカルボキシル(C)末端の変異体を用いた電気生理学的実験と分子生物学的実験により, 76 番目のアスパラギン酸とそれを含む C 末端上流部分と KCNQ1 との相互作用が機能修飾に必要である

ことを示した。さらに, 他の KCNE ファミリーのリン酸化による機能修飾への影響を調べたところ, KCNE3 ではなく KCNE2 のみが機能修飾に必要であることが機能解析から示された。KCNE ファミリーはサブタイプ間で C 末端の相同性が低いことから, KCNE ファミリーの C 末端が KCNQ1 のリン酸化による機能修飾に重要であると推測される。以上の結果より, 分子複合体を介した I_{Ks} チャンネルのリン酸化による機能修飾には, KCNE ファミリーの C 末端が KCNQ1 チャンネルと機能的に相互作用することが必要であることが示唆された。

(9) Na^+/K^+ pump 阻害時における心筋細胞容積変化のイオンメカニズムの解明 ～包括的心筋細胞モデルによるシミュレーション解析～

竹内綾子, 辰巳秀爾, 松岡達, 野間昭典
(京都大学大学院医学研究科 細胞機能制御学)

モルモット心筋細胞容積に対する Na^+/K^+ pump 阻害並びに各イオンコンダクタンス変化の影響を調べた。

ouabain によって Na^+/K^+ pump を完全に阻害したが, 細胞容積 (細胞幅を測定) は 3 時間経っても殆ど変化しな

かった(実験1)。この原因として細胞膜 Na^+ 及び Cl^- コンダクタンス ($P_{\text{Na}}, P_{\text{Cl}}$) が極めて小さいことが予想されたため、isoproterenol 処理によって P_{Cl} を増大させて Na^+/K^+ pump を阻害したところ、意外にも50分程度の遅れの後、急速に細胞膨化が観察された(実験2)。包括的心筋細胞モデル、Kyoto model で実験1を再現するためには、sarcolemmal Ca^{2+} pump (PMCA) をモデルに追加する必要があった。PMCA は ouabain 作用下 Ca^{2+} の蓄積を抑制し、それによって $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機転は Ca^{2+} 濃度勾配で駆動

され、 Na^+ を細胞外へ排出する。これによって細胞膨化が遅延する。実験2の遅延を伴った細胞膨化は、細胞膜の脱分極、 Ca^{2+} チャネルを介する Ca^{2+} 流入、 Ca^{2+} の蓄積による P_{Na} の上昇、 Cl^- イオンの蓄積が相補的に作用しあい、急速に細胞容積の増大をもたらすことがモデルから示された。複数の因子が関与する細胞容積調節を理解するには実験のみでなく、シミュレーションによる解析が不可欠である。

(10) 平滑筋型 ATP 感受性 K^+ チャネルにおけるチャネルポア領域の分子薬理的解析

寺本 憲功 (九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学)

近年の分子生物学的研究結果により ATP 感受性カリウムチャネル (K_{ATP} チャネル) は2つの独立した蛋白質、すなわちスルフォネルウレア受容体 (SUR) と内向き整流性 K^+ チャネル (Kir6.x) のサブユニットのそれぞれヘテロ構造になっていると考えられている。しかし血管平滑筋以外の平滑筋型 K_{ATP} チャネルについてはその分子構造の組み合わせが未だ不明のままである。本研究では下部尿路系平滑筋型 K_{ATP} チャネルの内向き整流性特性に関して特にチャネルポア領域についての分子生物学的構造の解析を行った。

ブタ尿道平滑筋細胞において140 mMの K^+ 濃度下(140 mM/140 mM K^+) では levcromakalim は濃度依存的に内向き電流を増強させ同様に脱分極側では内向き整流性を示した。また cell-attach 法でも同様に levcromakalim 投与により惹起された glibenclamide 感受性 K_{ATP} チャネルは脱分極側で内向き整流性を示した。inside-out 法では polyamine

投与で140 mMの K^+ 濃度下の脱分極側において UDP 活性化 K_{ATP} チャネルの電流の内向き整流性がさらに増強された。cell-attach 法下で PdBu 投与により K_{ATP} チャネルは活性化されたが phorbol エステルの不活性化体である $4\alpha\text{-PDD}$ 投与では活性化されなかった。またブタ尿道平滑筋を用いた RT-PCR 法で Kir6.1 と Kir6.2 の両 mRNA のフラグメントが観察された。また recombinant K_{ATP} チャネルの hetero-concatemeric の Kir6 チャネルを強制発現させた系においても cell-attach 法下で PdBu 投与によりチャネルは活性化されたが phorbol エステルの不活性化体である $4\alpha\text{-PDD}$ 投与では活性化されなかった。内向き整流性に関わるブタ尿道平滑筋 K_{ATP} チャネルのチャネルポア領域は分子薬理的に Kir6.1 と Kir6.2 のヘテロ構造を呈している可能性が示唆された。またヒト膀胱平滑筋型 K_{ATP} チャネルの内向き整流性特性に関しても最近の知見をご紹介します。

(11) KCNE1ならびに KCNE2による KCNQ1チャネルの相互的機能調節

豊田 太¹・上山久雄²・丁 維光¹・松浦 博¹
(滋賀医科大学¹細胞機能生理学,²分子病態生化学)

KCNQ1 は Shaker 型電位依存性 K^+ チャネルサブユニットであり、生理的には KCNE1 と会合することで心筋 I_{Ks} チャネルを構成すると考えられている。一方で、心臓には KCNE1 以外の KCNE 蛋白(すなわち KCNE2-KCNE5)

も発現しており、近年これらのいずれもが KCNQ1 と機能的に会合することも *in vitro* 発現系で示されてきている。本研究では KCNE2 による KCNQ1 チャネルの機能調節についてパッチクランプ法を用いて検討した。

KCNQ1 を KCNE2 と COS7 細胞に共発現させると E_K 付近で逆転する常時活性化型の時間非依存性電流が誘発された。一方, KCNQ1 を KCNE1 ならびに KCNE2 の両方と共発現させると心筋 I_{Ks} に類似した時間依存性電流のみが記録された。しかしながら, KCNQ1 と KCNE1 のみで構成される電流に比べ活性化の膜電位依存性が約 10 mV 脱分極側にシフトしており, また脱活性化キネティクス

も促進していた。さらに, メフェナム酸により脱活性化が遅延する程度も KCNQ1/KCNE1 チャネルに比べ有意に減弱しており, 心筋 I_{Ks} チャネルに近い感受性を示した。KCNE2 が KCNE1 と共に KCNQ1 チャネル機能を修飾し, 心筋 I_{Ks} の性質を制御する可能性について考察したい。

(12) カルシウムプローブ(G-CaMP)を用いた平滑筋カルシウム動態の解析

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)

G-CaMP は Green Fluorescent Protein(GFP)にカルモジュリンとミオシン軽鎖キナーゼの M13 配列を結合したカルシウム感受性蛋白質で, DNA によりコードされているので, 適当なプロモーターを用いることにより G-CaMP を組織特異的に発現させることが可能である。

我々は平滑筋特異的なミオシン重鎖プロモーターを用いて G-CaMP を平滑筋に特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し, そのカルシウム動態を解析した。平滑筋をアゴニストにより刺激することにより蛍光の増加が観察された。また膀胱平滑筋において末梢神経を刺激することにより flash と wave の2種類の細胞内カルシウム

増加現象が観察された。これらは1つの平滑筋細胞内で見られることがあり, flash は低頻度刺激で主に見られ, wave は高頻度刺激により主に見られた。さらに神経刺激を低頻度から高頻度を変えると, flash から wave へと Mode が変化する現象が観察された。

また, G-CaMP を Na ポンプと結合させることにより細胞内の局所のカルシウム動態の測定を試みた。その結果, 筋小胞体 (SR) 近傍でのカルシウム動態がその他の細胞質部位のカルシウム動態と異なることが明らかとなった。

(13) 遺伝性不整脈患者における心臓 Na チャネル病の遺伝子解析

牧山 武, 赤尾 昌治, 辻 啓子, 土井 孝浩, 大野 聖子, 春名 良純, 吉田 秀忠, 北 徹
(京都大学大学院医学研究科循環器内科)
蒔田 直昌 (北海道大学大学院循環器内科)
堀江 稔 (滋賀医科大学呼吸循環器内科)

【目的】 *SCN5A* 遺伝子は心臓 Na チャネルの α サブユニットをコードし, その遺伝子異常は様々な不整脈を引き起こす。我々は日本における遺伝性不整脈患者において心臓 Na チャネル病の分布・頻度を調べるために *SCN5A* の遺伝子解析を行った。

【方法】 194 人の遺伝性不整脈患者 (先天性 QT 延長症候群 123 人, ブルガダ症候群 62 人 (症候性は 34 人), 家族性洞不全症候群 8 人, 家族性心房細動 1 人) において末梢白血球細胞より DNA を抽出。高速液体クロマトグ

フィー (WAVE), DNA シークエンシングを用い *SCN5A* の遺伝子異常, 一塩基多型のスクリーニングを施行した。

【結果】 18 人の遺伝性不整脈患者において 15 の *SCN5A* 異常を検出した。(先天性 QT 延長症候群 11/123, 8.9%, ブルガダ症候群 症候性 4/34 11.8%, 無症候性 1/28 3.6%, 家族性洞不全症候群 2/8 25.0%) 8 つの遺伝子異常 (V113I, R179X, F532C, H1200T, A1746T, N1774D, K1859E, G1935D) は新規なものであった。また, *SCN5A* の一塩基多型, H558R は, modifier として知られ, Na

の電流密度を低下させると報告されている。我々は25人の患者においてヘテロなH558Rを検出した。その頻度(25/194, 12.9%)は、正常コントロール(13/110, 11.8%)と比べほぼ同じであった。しかしながら、ホモのH558Rを1例認め、失神発作のある徐脈患者であった。

【結論】日本における遺伝性不整脈患者において最も大きなSCN5Aの解析報告であり、SCN5Aは様々な不整脈において認められた。遺伝子異常と病態との関係については更なる機能解析による検討が必要である。

(14) 心筋筋小胞体カルシウムATPase 活性制御と心機能

南沢 享¹, 志村 美英², 竹島 浩³

¹横浜市立大学 大学院医学研究科 循環制御医学

²横浜市立大学 大学院医学研究科 病態制御内科学

³東北大学 大学院医学系研究科 医化学分野

【要旨】心筋細胞内Ca²⁺は心筋細胞が収縮弛緩を繰り返すために必須であるとともに、細胞内シグナル伝達系のセカンドメッセンジャーとして重要である。心筋細胞内では、Ca²⁺は筋小胞体に貯蔵されており、その放出においてはライアノジン受容体、再吸収においては、筋小胞体Ca²⁺ATPase(SERCA2a)による能動輸送が中心的な役割を果たす。心筋筋小胞体機能の低下、特にSERCA2a活性低下は、心疾患の発症・病態悪化に重要であり、SERCA2a活性を回復させることで、各種心疾患の治療が可能となる。従来、SERCA2a活性を制御する蛋白として、phospholambanの機能がよく調べられてきたが、われわれは新たなSERCA2aの機能制御因子として、1)phospholamban 相同性をもつ筋小胞体膜蛋白 sarcolipin, 2)筋小胞体内カル

シウム結合蛋白 sarcalumenin に注目し、遺伝子改変動物を利用して、SERCA2a 活性調節の役割を検討してきた。sarcolipin は心筋に過剰発現させると、phospholamban 同様に、心機能の低下を生じる。sarcolipin は心房筋に特異的に発現しており、心房筋におけるSERCA2a 活性調節の中心的働きをしている可能性がある。sarcalumenin 欠損マウスでは心機能、筋小胞体へのカルシウム再取り込みが低下しており、圧負荷により、より心機能が低下し、死亡率が有意に高くなる。sarcalumenin は筋小胞体内でSERCA2a と蛋白相互作用により、その活性と蛋白発現を制御している可能性がある。本研究ではこれらの分子を中心に、SERCA2a 活性調節機構について、発表する。

(15) 心筋 L 型 Ca チャネルの活性維持機構

養部悦子, 韓 冬雲, 王 午陽, Zahangir A. Saud, 聶 宏光, 徐 建軍, はお麗英, 亀山正樹

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経筋情報生理学分野)

L型Caチャネル(Cav1.2)の活性には細胞内因子が必要で、cell-freeパッチ等の条件下では開口しない(run-down現象)。このチャネル活性維持機構を解明する目的で、モルモット単離心室筋細胞を用いた実験を行い、心筋cytoplasm+ATP(3mM)、カルパスタチン(CS)+ATP、カルモジュリン(CaM)+ATPによりチャネル活性が維持されることを見出した。CSの効果はCaMより弱い、カルパイン阻害部位でないN末部のL-domainに対チャネル効果が限定され、特異的な作用であると考え。一

方、CaMはinside-outパッチ条件下で、生理的濃度(0.3~1μM)で強い対チャネル効果を示し、on-cellパッチ下と同レベルの開口確率(~100%)を生じさせる。更に、より高濃度(2-4μM)では、200-300%の効果を示す。これより、CaMは最も重要なチャネル活性維持因子であると結論される。更に、run-downの緩徐相にAキナーゼやCaMKIIにより阻止されるので、リン酸化もチャネル活性維持に関わることが示唆される。

(16) ES 細胞由来心筋細胞を用いた心臓伝導障害修復の試み

李 鍾国¹, 日高京子², 湯浅大祐¹, 三輪佳子¹, 角三和子¹, 安藤萌名美¹, 森崎隆幸², 児玉逸雄¹¹名古屋大学環境医学研究所循環器分野²国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部

胚性幹 (ES) 細胞由来心筋細胞を用いた細胞移植が, 完全房室ブロックなどの心臓伝導障害に対する新しい治療となりうるか—その可能性について調べた。マウス Nkx2.5-GFP ノックイン ES 細胞から分化した胚様体から, Fluorescence Activated Cell Sorter を用いて心筋細胞に分化した細胞 (ES cell derived cardiac myocyte:ESCM) を分離した。外科的手技により作成した完全房室ブロックマウスの房室結節部に ESCM を約 20 万個移植し, 心電図モニタリングを行った。10 日後に心臓を摘出し, 免疫組織染色により gap ジャンクション (connexin40, 43) の発現を調べた。そ

の結果, PBS を注入した Sham 群においては, 全経過中房室ブロックが持続したが, ESCM 移植群においては 5 例中 4 例で洞調律への変換が見られた。免疫組織染色では, Sham 群においては, 房室結節部に線維化が見られ, connexin43 発現の不連続性が見られた。一方, ESCM 移植群においては房室結節領域に ESCM が存在し, connexin40, connexin43 を発現して周囲の host 心筋細胞との間に gap 結合を形成していた。これは, ES 細胞由来心筋細胞移植が徐脈性調律異常に対する新しい治療的アプローチとなる可能性を示唆する。

(17) モルモット心室筋細胞の膜電流に対する新規 NCX 阻害薬 SN-6 の特徴について

渡邊泰秀¹, 岩本隆宏², 木村純子³¹浜松医科大学医学部基礎看護学講座疾病科学,²福岡大学医学部薬理学, ³福島医科大学医学部薬理学

我々は, モルモットの単離心筋細胞を用いてホールセルクランプ法により I_{NCX} とそれ以外の膜電流を記録し, それら電流に対する SN-6 の作用を検討したので報告する。両方向型 I_{NCX} , 片方向型外向き I_{NCX} , 片方向型内向き I_{NCX} はランプ波で記録した。それぞれの条件は細胞内液と細胞外液の組成を変えることによって整えた。SN-6 は濃度依存性に両方向型電流を抑制した。両方向型外向き電流と内向き電流に対する SN-6 の IC_{50} 値はそれぞれ $2.3\mu\text{M}$, $1.9\mu\text{M}$ であった。片方向型外向き電流の IC_{50} 値は $0.6\mu\text{M}$ であった。片方向型内向き電流に対する作用は $10\mu\text{M}$ の高濃度でも 22.4% の抑制を示すに過ぎなかった。また, 両方向型外向き電流に対して細胞内 Na^+ 濃度依存性に SN-6 の抑制は強くなった。ピペット内にトリプシンを投与すると, SN-6 の NCX 電流に対する抑制

作用は変化しなかった。このことは, SN-6 の NCX 電流に対する抑制作用は細胞内側からではないことが示唆される。以上から, SN-6 は, 同じ誘導体である KB-R7943 類似の NCX 抑制作用と抑制形式を示した。

さらに, 心室筋細胞で, 活動電位をカレントクランプ法, 電位依存性膜電流である Na 電流, Ca 電流, K 電流をホールセルクランプ法で記録し, それぞれに対する SN-6 の作用を調べた。 $10\mu\text{M}$ の SN-6 は Na 電流, Ca 電流, K 電流を抑制し, 活動電位幅を短縮させた。同じベンジルオキシフェニル誘導体と比較すると, SN-6 は, SEA0400 よりも I_{NCX} を抑制する濃度は高く選択性も低いが, KB-R7943 と同程度の効力を持つ NCX 抑制薬であることが示唆された。

5. 筋収縮の調節蛋白質—構造, 機能および疾患—

2005年10月25日—10月28日

代表・世話人：栗原 敏 (東京慈恵会医科大学生理学講座第2)

所内対応者：岡田泰伸 (生理学研究所)

- (1) トロポニンの構造と機能および疾患
大槻磐男 (東京慈恵会医科大学)
- (2) 筋収縮のカルシウム調節メカニズムの構造的基礎
前田雄一郎 (理化学研究所播磨 Spring-8 センター, ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト,
名古屋大学大学院理学研究科)
- (3) 筋収縮制御タンパク質トロポニンとアクチンの結合の構造基盤
若林健之 (帝京大学・理工系・バイオサイエンス)
- (4) 蛍光測定からみた再構成骨格筋細いフィラメントの構造変化
三木正雄 (福井大学工学部生物応用化学科)
- (5) スピンラベル EPR によるトロポニンのアクチンフィラメントにおけるカルシウム構造転移の研究
荒田俊昭 (大阪大学大学院理学研究科)
- (6) アカザラガイ閉殻筋トロポニン I ペプチドを結合したトロポニン C C 端ドメインの溶液構造
田之倉優 (東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻)
- (7) ウサギ骨格筋 α -トロポミオシンの結晶構造解析：柔軟な coiled-coil
似内 靖 (理化学研究所播磨 Spring-8 センター構造生物化学研究室・
ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト)
- (8) 線虫 C. エレガンスを用いたトロポニンの筋発生と動物行動の解析
香川弘昭 (岡山大学大学院自然科学研究科)
- (9) Δ K210 心筋トロポニン T 突然変異による拡張型心筋症マウス・ノックインモデル
森本幸生 (九州大学大学院医学研究院臨床薬理学分野)
- (10) 心筋トロポニン(cTn)の臨床応用について
豊岡照彦 (東北大学・先進医工学研究機構・生命機能分野)
- (11) フィザルムミオシンに見られるカルシウム阻害
小濱一弘 (群馬大学大学院医学系研究科 臓器病態薬理学)
- (12) 筋小胞体からのカルシウムによるカルシウム放出
遠藤 實 (埼玉医科大学)
- (13) リアノジン受容体 1 型(RyR1)の Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 CICR の増幅率調節異常
——悪性高体温症発症機序
小川靖男 (順天堂大学医学部薬理学教室)
- (14) Ca^{2+} オシレーションによる細胞機能制御
飯野正光 (東京大学大学院医学系研究科・細胞分子薬理学教室)
- (15) 筋小胞体カルシウム ATPase によるイオンポンピング
豊島 近 (東京大学分子細胞生物学研究所)
- (16) 筋収縮における細いアクチンフィラメントの構造変化の役割
若林克三 (大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学)

(17) 自励振動現象 (SPOC)におけるアクチン分子モーターの協同的機能

石渡信一 (早稲田大学理工学術院物理学科理工系大学院生命理工学専攻)

(18) アクチンフィラメントの動的多形

柳田敏雄 (大阪大学大学院・基礎工学研究科・システム人間系)

(19) 電子顕微鏡と X 線回折を用いた F アクチンの構造モデリング

小田俊郎 (理化学研究所 播磨研究所 放射光総合利用センター, 科学技術振興機構,
ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト)

(20) 二本足のリニア分子モーターが「歩く」仕組み

木下一彦 (早稲田大学理工学部物理学科)

(21) 急速凍結フリーズ・レプリカ電子顕微鏡法により明らかになった *in vitro* 滑り運動中の

ミオシンクロスブリッジの動き

片山栄作 (東京大学医科学研究所 分子構造解析分野)

【参加者名】

平田雅人 (九州大学大学院歯学研究院), 吉岡利忠 (弘前学院大学), 石崎泰樹 (群馬大学大学院医学系研究科分子細胞機能学), 丸山敬 (埼玉医科大学), 岡田拓也 (大阪大学大学院 基礎工学研究科 システム人間系), 山田章 (情報通信研究機構・関西先端研究センター), 前田佳代 (ERATO, 前田アクチンフィラメント動態プロジェクト), 木村澄子 (千葉大学理学部生物学科), 藤目杉江 (個人参加), 石川良樹 (群馬大学医学系研究科臓器病態薬理), 岡垣壮 (三重大学生物資源学部), 井上明男 (大阪大学大学院理学部), 田中悦子 (横浜国立大学保健管理センター), 西井清雅 (東京医科歯科大学大学院), 大塚由美子 (東京慈恵会医科大学), 渡辺賢 (東京医科大学・生理学第一講座), Liou Ying-Ming (National Chung-Hsing University, Department of Life Science), 呉林なごみ (順天堂大学医学部薬理学教室), 中村彰男 (群馬大学大学院医学系研究科分子細胞機能学), 植田啓介 (大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻), 相原朋樹 (大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻), 木邑智恵子 (福井大学工学部), 八木直人 (財団法人高輝度光科学研究センター), 村山尚 (順天堂大学医学部薬理学教室), 佐々木大輔 (早稲田大学大学院理工学研究科生命理工学専攻), 小澤鏝二郎 (国立精神神経センター神経研究所), 吉川武男 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 矢沢洋一 (北海道教育大学・旭川校 健康福祉コース), 尾島孝男 (北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学講座), 田中啓之 (北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学講座), 鈴木潜 (北海道大学大学院水産科学院), 浅井博 (早稲田大学理工学部総合研究所顧問研

究員), 北澤俊 (Boston Biomedical Research Institute), 杉本泰伸 (大阪大学大学院基礎工学研究科), 湯本史明 (東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻), 叶麗虹 (南開大学), 只野尚登 (全薬工業 (株) 中央研究所 薬理研究部), 大日方昂 (千葉大学理学部生物学科), 岡本洋 (室蘭工業大学), 本多元 (長岡技術科学大学・生物系), 水野裕昭 (長岡技術科学大学・生物系), 石島秋彦 (名古屋大学工学研究科応用物理学専攻), 佐藤治 (University of Massachusetts Medical School, Physiology), 中郡昭人 (順天堂大学医学部薬理学教室), 榎山拓 (順天堂大学医学部薬理学教室), 小西真人 (東京医科大学・生理学第一講座), 山田武範 (東京理科大学理学部物理学科), 石井由晴 (JST), 黒田正明 (島根大学生物資源科学部生物科学科), 本郷賢一 (東京慈恵会医科大学・循環器内科), 坂登光夫 (全薬工業 (株)), 谷口美恵子 (名古屋大学大学院工学部), 河田溥 (福岡大学医学部第二生理学), 山口真紀 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第1), 大野哲生 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第1), 木村郁夫 (東京慈恵会医科大学), 葛西道生 (大阪大学大学院), 北浦孝 (金沢大学保健管理センター), 山根明 (鶴見大学歯学部薬理学教室), 宮崎淳一 (山梨大学教育人間科学部), 江藤真澄 (Organization of Virginia School of Medicine), 豊田直二 (熊本学園大学 社会福祉学部福祉環境学科), 木村雅子 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第1), 御橋広真 (日本福祉大学情報社会科学部), 松岡由和 (大阪大学大学院理学研究科), 緒方道彦 (九州大学), 松尾龍人 (大阪大学大学院基礎工学研究科), 野々村禎昭 ((財)微生物化学研究会), 山下茂 (東邦大学医

学部生化学教室), 植木正二 (大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻), 盧群偉 (九州大学大学院医学研究臨床薬理学), 王媛媛 (九州大学大学院医学研究臨床薬理学), 草刈洋一郎 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2), 大内仁 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2), 森本智 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2), 福田紀男 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2), 宇高潤 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2), 須田憲男 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2), 松葉道知 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2), 栗原敏 (東京慈恵会医科大学・生理学講座第 2), 水野昇 (生理学研究所), 岡田泰伸 (生

理学研究所), 小幡邦彦 (理化学研究所), 江橋節郎 (生理学研究所), 大沢文夫 (愛知工業大学), 大塚正徳 (東京医科歯科大学大学院), Gergely, J. (Boston Biomedical Research Institute), Szent-Gyorgyi, A. G. (Brandeis 大学), Hitchcock-DeGregori, S. (Robert Wood Johnson 医科大学), Solaro, R. J. (Chicago 大学 Illinois 校), Moss, R. J. (Wisconsin 医科大学), Sykes, B. D. (Alberta 大学), Geeves, M.A. (Kent 大学), Mogensen, J. (Skejby 大学病院), Tobacman, L. S. (Chicago 大学 Illinois 校), Huxley H. E. (Brandeis 大学), Fletterick, R. (California 大学 San Francisco 校)

【概要】

生理的な筋収縮のカルシウム調節タンパク質トロポニンが, 我国で発見されてから丁度 40 年を迎える。これまで世界の各国でこの代表的な機能タンパク質の構造と機能の研究が進められてきたが, 最近, 我国において遺伝性障害の系統的な機能解析が行われて新たに医学につながる展望が開かれたところである。結晶構造解析の結果も報告されて構造生物学的な基盤が構築され, ポストゲノムの機能タンパク質研究の典型例となることが予想される状況になってきた。長い間不明のまま残されてきた医学的な側面についても, 心臓難病の各種遺伝性疾患を引き起こすトロポニン遺伝子異常が相次いで見出されて系統的な機能解析が行われ, 病因の鍵を握る調節機構の異常が明らかになってきた。その他の調節タンパク質についても最近では生理機能を指向した研究が盛んに行われている。本研究会ではこれらの筋収縮調節タンパク質

の構造, 機能および遺伝性障害について第一線の研究者が参集して多角的な討論を行い, 今後の発展の方向を探ることを目的としている。3 日間にわたって約 30 人が講演し, 一般参加者約 100 人を交えて討論を行った。主要な内容は, 1) トロポニン-トロポミオシン調節機構 (大槻, 前田, 若林 (健), 三木, 荒田, 田之倉, 似内, 香川), 2) 心筋収縮調節と疾患 (森本, 豊岡), 3) ミオシン連関調節機構 (小浜), 4) 興奮収縮連関と疾患 (遠藤, 小川, 飯野, 豊島), 5) 収縮蛋白質 (生筋 X 線回折) (若林 (克)), 6) モーター蛋白質 (石渡, 柳田, 小田, 木下, 片山), である。

なおこの研究会は, トロポニン発見 40 周年記念国際シンポジウムおよび第 33 回生理研カンファレンス (オーガナイザー; 大槻, 岡田: 講演者; 国外 11 人, 国内 21 人) と同時に行われた。

(1) トロポニンの構造と機能および疾患

大槻磐男 (東京慈恵会医科大学)

我国においてトロポニンが発見されてから今年でちょうど 40 年を迎える。トロポニンは生理的なカルシウム収縮調節のカルシウム受容タンパク質であり, 生きた筋肉内でアクチンフィラメント上に周期的に分布している。このタンパク質はトロポミオシンとともに働いて, 生理的な条件下でミオシンとアクチンの収縮反応にカルシウム感受性を付与する。1960 年代後半の一連の研究によりトロポニン-トロポミオシンによる横紋筋収縮弛緩の抑

制-脱抑制型調節機構が確立された。

トロポニンは, 現在では 3 つの異なる成分 (サブユニット; トロポニン C, I, T) から構成される複合タンパク質であることが確定している。トロポニン I による抑制をトロポニン C が脱抑制が制御のキーステップと考えられるが, この 2 成分だけでは脱抑制はカルシウムに依存せず, さらに第 3 の成分としてトロポニン T が加わってはじめてカルシウム感受性収縮調節能が発現する。トロ

ポニン T 分子はアクチンフィラメント軸に沿って配向する二つのドメイン (T1 および T2) から構成され、カルシウム感受作用は分子の C 端側を占める T2 ドメインに局在することが判明している。

トロポニンの医学における意義は長い間不明のまま残されてきたが、近年各種家族性心筋症の遺伝子解析が行われて、トロポニンを含むサルコメアタンパク質に起因することが明らかとなってきた。肥大型心筋症 (HCM) ではトロポニンの変異が他の変異と比べて経過が悪くな

ことも報告されているが、わが国でその網羅的な機能解析が行われカルシウム感受性増大が発症の鍵を握る機能変化であることが突き止められている。臨床的に肥大型とは対照的な拡張型心筋症 (DCM) を引き起こすトロポニン変異では逆にカルシウム感受性の低下が起こることも判明した。拘束型心筋症 (RCM) に関するトロポニン I 変異ではカルシウム感受性の大きな増加作用を示す結果が得られている。

(2) 筋収縮のカルシウム調節メカニズムの構造的基礎

前田雄一郎 (理化学研究所播磨 SPring-8 センター, ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト, 名大大学院理学研究科)

江橋らによるアクチンフィラメント複合体 (アクチン, トロポミオシン Tm, トロポニン Tn より成る) の分子模型は調節のカルシウム説の確立に際して重要な役割を果たした。これから調節のメカニズムを解明するためには、分子模型を原子構造に置き換える必要がある。1998 年に我々は TnC と TnI の N 端断片 (1-47) の小さな複合体の結晶構造を解明した。ここに含まれる蛋白質の相互作用の構造と科学的推論により、ここに含まれないもう一つの TnC-TnI 相互作用部位の構造を提案することができた。この第二の相互作用は、TnC へのカルシウム結合によって誘起されること、TnI とアクチンとの相互作用と拮抗するとの理由から、カルシウムによって駆動される分子スイッチの本体である。これは、低カルシウム濃度でアクチン・ミオシンの相互作用を阻害し、高カルシウム濃度でその阻害を解除する。

2003 年にはヒト心筋のコア・ドメイン (TnC-TnI-TnT₂) の結晶構造を解明した。これによって分子スイッチについての上記推論が正しかったことがはっきりした。また、Tn の全体の構造もわかったが、分子スイッチの情報だけでなく Tm とアクチンに伝搬されるかについては未解明である。

生理学によると、Tn-Tm の機能は、カルシウム濃度によってアクチン・ミオシンの相互作用が阻害—解除され

るというスイッチ・メカニズムと、Tn の存在そのものがアクチン・ミオシン相互作用を活性化するという 2 つの要素メカニズムに分解できることを示してきた。前者のスイッチ・メカニズムの輪郭はわかかってきたと思われるが、後者の活性化メカニズムの理解は今後の課題である。

これらメカニズムを理解するには分子の結晶構造だけでは不十分で、分子の動態を理解することが必要であろう。特に、心筋症を引き起こす Tn の変異とそれに起因する機能変調が解明されているので、これら変異蛋白質での動態の異常が発見されれば、アミノ酸変異—動態の異常—機能変調の相関を解明することができよう。

Tn コアドメインの骨格には TnI-TnT の間に形成される coiled-coil 構造がある。この中点付近に Glu-244-Asp (TnT) と Lys-247-Arg (TnI) の 2 つの心筋症発症変異が見つかっている。Coiled-coil のこの部分は曲がりやすくなっているが、他方 coiled-coil の TnI 側では第三のヘリックスが隣接して空間に余裕がない。Glu-244-Asp の変異はこの部分に隙間を生じ coiled-coil を更に曲がりやすくすると考えられる。

以上のような考察が妥当であるかどうか実験的に検証する必要がある。分子の動態を計測する方法が必要とされている。

(3) 筋収縮制御タンパク質トロポニンとアクチンの結合の構造基盤

若林健之 (帝京大学・理工系・バイオサイエンス)

筋収縮は細いフィラメントと太いフィラメントとの“滑り運動”によって生じている。骨格筋、心筋では、この“滑り運動”は細いフィラメントの構造変化によって制御されている。最も受け入れられている細いフィラメントの制御モデルは、カルシウムによってトロポニンが構造変化を起こし、トロポミオシンの位置をシフトさせるというものである。そしてシフトしたトロポミオシンはアクチン上のミオシン結合領域を覆い、ミオシン結合を阻害すると考えられている。現在、アクチン、トロポニン、トロポミオシンの個々の原子構造はほぼ解かれていますもの、お互いどのように相互作用し、“滑り運動”を制御しているかは不詳である。お互いの相互作用を明らかにするために、まず NMR 分光法によって分子量 52kDa のトロポニン T₂CI 複合体のなかに 6.1kDa のモバイルドメインがあることが分かりその原子構造を決定した。このモバイルドメインはクライオ電子顕微鏡で観察されていたトロポニンアームと大きさと外形が一致した。トロポニンアームはトロポニンのアクチン結合部位として同定されてきたが、その原子構造やアミノ酸残基は不明であったが、今回の NMR 分光によって、それらが明らかとなった。モバイルドメインのみを大腸菌で発現し、精製後アクチンフィラメントに結合させ、クライオ電子顕

微鏡解析によってアクチンフィラメント上での結合位置がトロポニンアームと同じであることを確認した。モバイルドメインとアクチンは 11 個の塩橋を介して静電的に結合しており、そのうち 6 残基の変異は家族性心筋症をもたらすことが知られている。これらの知見に基づいて、細いフィラメントの電子顕微鏡密度マップ (Narita et al., 2001) にトロポニン、トロポミオシンの原子構造をドッキングし、低 Ca 濃度での細いフィラメントの原子モデルを構築した。このモデルでは、TnI の C 端領域はアクチンの外側ドメインにカルシウム依存的に結合し、これに引っ張られたトロポニンのコイルドコイル領域は高 Ca 濃度でのトロポミオシンの位置とはクラッシュする。その結果、トロポミオシンを低 Ca 濃度での位置へと押すことが推測された。実際、低 Ca 濃度でのトロポミオシンとトロポニンのコイルドコイル領域は互いに接している。トロポニンコイルドコイル領域によって引き起こされたトロポミオシンシフトの結果として、7 分子のアクチンの内で少なくとも 4 分子のアクチンのミオシン結合部位を覆うことになる。この結果は低 Ca 濃度では 70% のアクチンのみが、ミオシンと結合できない状態になるという三状態モデルとも良く一致する。筋肉弛緩の分子機構を提唱した (Murakami et al., 2005)。

(4) 蛍光測定からみた再構成骨格筋細いフィラメントの構造変化

三木正雄 (福井大学工学部生物応用化学科)

アクチンフィラメント上のトロポミオシン-トロポニンは細胞内のカルシウム濃度によりアクチン-ミオシン相互作用を制御している。私達は骨格筋細い繊維は収縮と弛緩状態に応じてどのような構造変化をするのかを検出する目的で蛍光共鳴エネルギー移動法を用いて研究してきた。共鳴エネルギー移動供与体のプローブをトロポニン (Tn) サブユニットの TnI, TnT やトロポミオシンの特異的な部位に結合し、一方共鳴エネルギー受容体のプローブをアクチンの特異的な部位に結合させた。これらプローブ間の蛍光エネルギー移動測定は TnI や TnT が細い

繊維の 3 状態 (relaxed, closed, open states) に対応して、細い繊維上で位置を変えることを示した。プローブを Tm の全長にわたって、特異的な位置につけてアクチンにつけたプローブとの間の蛍光エネルギー移動を測定したが、カルシウム濃度変化による蛍光エネルギー移動効率の顕著な変化は検出できなかった。このことは、トロポミオシンが細い繊維上で位置を変えないことを示唆している。トロポミオシンは 7 つの相同領域をもつが、この 2-4 の領域を削除した D234Tm はカルシウムの有無によらずミオシンの ATP 加水分解活性を阻害することが知

られている。この機能的に障害のあるトロポミオシンを使って再構成した細い繊維上でトロポニンの位置変化は損なわれていることが分かった。このことは、トロポニンの動きが細い繊維の生理的機能状態に密接に関連していることを示唆している。ストップフロー法と組み合わせた TnI や TnT とアクチン間の蛍光エネルギー移動測定により、細い繊維の 3 状態間でのトロポニンのスイッチとしての動きの速度定数を決めた。TnI や TnT の動きの速度定数を測定は、トロポニン複合体に生じるカルシウムスイッチ機能として一連の構造変化は同期して生じることを示した。3 状態間のトロポニンの動きの速度は、

これら動きが筋収縮の制御に密接に関わっていることを示すに十分早いものであった。トロポミオシンが動くというのは、筋収縮制御の立体障害説においては不可欠の事象であるが、蛍光エネルギー移動はトロポミオシンのいかなる動きも示さなかった。そこで、私達はトロポミオシンはアクチン-ミオシン相互作用を立体障害することによってではなく、トロポミオシン-トロポニン複合体が、アクチン繊維の分子間や分子内の柔軟性を、細い繊維の 3 状態に対応して制御することにより筋収縮を制御しているのではないかという新しい制御モデルを提唱している。

(5) スピンラベル EPR によるトロポニンのアクチンフィラメントにおけるカルシウム構造転移の研究

荒田俊昭 (大阪大学大学院理学研究科)

部位特異的スピンラベル EPR によりトロポニン及びトロポミオシンの構造について研究している。心筋トロポニン(Tn)C の N-ドメイン G42C (B helix)と C84 (D helix) をスピンラベルしその間の距離を EPR スペクトルより計測したところ、18.4 Å (-Ca)であり、Q58C (C helix)と C84 (D helix)の距離は、18.3 Å であった。カルシウムにより~3 Å長くなり N-ドメインが closed-open 転移がおきることがわかった。TnI との複合体形成によっても、Q58C (C helix)と C84 (D helix)の距離は変化しないが、G42C (B helix)と C84(D helix)の距離は半分程度変化するので、B helix の動きが、カルシウム結合の親和性を上げることに寄与している可能性を示唆した。さらに、パルス ELDOR 法によって、スキンド筋肉内に交換導入した心筋 TnC の C35 と C84 のスピン間距離を測定した。カルシウム非存在下では、26.0 (TnC 単独)と 27.2 Å (筋肉)となった。カルシウム存在下では 筋肉では 23.2 Å に減少したが、TnC 単独では殆ど変化がなかった。

たんぱく質ドメインの回転動態や配向試料における角度を EPR で測定するためには 2 価性スピンラベルをたんぱく質表面へ固く結合させる必要がある。我々は光学異性体 C2 キラルの 2 価性 5 員環スピンラベル(S,S)-I と (R,R)-I を合成・精製し、骨格筋 TnC のダブルシステイン置換変異体 (セントラル・ヘリックス 94C と 101C)

と反応させた。スピンラベルした TnC をスキンド筋肉に交換により導入して再構成した。交換された筋肉の Ca 制御機能は維持されたままであった。硬直状態の筋肉標本を線維軸と磁場とを平行にセットしたときの EPR スペクトルは、ランダム試料のそれと殆ど同じであった。このことは、TnC のセントラル・ヘリックスはアクチンフィラメント軸に対して広い角度分布をとっている可能性を示唆した。

骨格筋 TnI の switch segment 付近の C133 にスピンラベルしたところ、TnC-I-T 複合体単独では、カルシウム除去によりラベルの運動性が増大し、C133 領域が TnC から解離したことを示唆した。再構成した細いフィラメントではカルシウム存在下のラベル運動性は TnC-I-T 複合体単独の場合と同じであるが、カルシウム除去により固定化がおこった。この固定化はスピンラベル TnI とアクチンだけで形成したフィラメントにおける運動性と同じであった。このことはカルシウム除去により TnC から解離した C133 領域がアクチンと結合することを示唆する。C133 と TnC の C44 のスピンラベル間距離をパルス ELDOR で測定したところ 30 ± 0.5 Å (+Ca)となり、結晶モデルに近い値となった。また小さい半値幅から C133 領域が TnC の N-ドメインにかたく固定されていることを示唆している。

(6) アカザラガイ閉殻筋トロポニン I ペプチドを結合したトロポニン C C 端ドメインの溶液構造

田之倉優 (東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻)

無脊椎動物トロポニン C は 4 つの EF ハンドモチーフをもつものの、脊椎動物トロポニン C よりも Ca^{2+} 結合数が少ない。無脊椎動物であるアカザラガイの閉殻筋トロポニン C は、4 つの EF ハンドモチーフの内、最も C 末端側の Site IV にのみ Ca^{2+} を結合する。このアカザラガイトロポニン C の構造変化と機能制御について明らかにするために、トロポニン I₁₂₉₋₁₈₃ を結合したトロポニン C の C 端ローブについて、多核多次元 NMR を用いた溶液構造解析を行った。TnI₁₂₉₋₁₈₃ は、脊椎動物骨格筋速筋トロ

ポニン I の N 末端領域に相当するペプチドであり、トロポニン C の C 端ローブに結合する。NOE および角度情報により決定されたトロポニン C の C 端ローブは、4 つの α -ヘリックスと 2 つの β -ストランドから成っていた。また、2 つの β -ストランドは、短い逆平行 β -シートを構成していた。この構造は、EF ハンド型 Ca^{2+} 結合タンパク質として開いたコンフォメーションをとっていた。このことから、アカザラガイトロポニン C の C 端ローブに始まる筋収縮制御シグナルが存在することが示唆された。

(7) ウサギ骨格筋 α -トロポミオシンの結晶構造解析：柔軟な coiled-coil

似内 靖 (理化学研究所播磨 SPring-8 センター構造生物化学研究室・ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト)

トロポミオシン(Tm)は、284 残基 400Å の長さの coiled-coil 蛋白質であり、骨格筋、および、心筋において、トロポニンとともにカルシウム濃度による筋肉の張力調節に関わっている。

全長 Tm の結晶構造解析に関しては、多くの試みにも関わらず 7Å 分解能の結果が登録されているのみである。これは、Tm 分子特有の柔軟性が良質の結晶成長の妨げになっているためであると考えられるが、他方、この柔軟性自体が Tm の本質的な機能、および、カルシウム調節に関与しているとも考えられる。

近年、断片化したトロポミオシンが良好な結晶を作り得ることがわかり、Tm の原子分解能結晶構造解析の糸

口が見つかったものの、Tm がトロポニンコアと相互作用すると言われている機能的に重要な部位、すなわち、Tm の Cys 190 周辺ははまだ解析されておらず、依然として詳細は不明であった。

本研究室では、N 末端側に GCN4 配列を付加したトロポミオシンの C 末端側断片を 6 種類作り、そのうち、176-284 残基を含む断片についての結晶構造解析に成功した。その結果、Heptad repeat が保たれている coiled-coil 構造が明確に曲がっており、また、局所的にみると coiled-coil 構造のパラメータが変化している等、構造的に興味深い点が多々存在するので、ここにその結果を紹介したい。

(8) 線虫 C. エレガンスを用いたトロポニンの筋発生と動物行動の解析

香川弘昭 (岡山大学大学院自然科学研究科)

線虫は 2002 年ノーベル賞生理学医学賞の S. Brenner, J. Sulston, R. H. Horvitz らが「器官発生と計画的細胞死の遺伝学的解析」の研究に用いた動物で今や人の研究にも欠かせないモデル生物である。遺伝子の全塩基配列と受精

卵から成虫に至るまで約千の全細胞系譜が明らかにされ、いろいろな性質に対するたくさんの変異線虫が単離されており、誰にでも利用出来るようなサービス網が確立されている。私はミオシン重鎖遺伝子の全塩基配列を

全生物で初めて決定した J. Karn のもとでパラミオシン遺伝子の構造決定をした後、しばらく筋肉形成過程の研究をしていたが、筋収縮で面白いカルシウム制御系の、トロポニンの遺伝子解析を手がけた。幸いにも動物で初めてトロポニン C 変異体の解析を行い論文に発表した。この解析が可能になったのは線虫では致死変異体 (m/m) もヘテロな状態 (m/+) で飼う事が出来るからであった。江橋先生に「トロポニン C の無い動物はどうなりますか」と尋ねたところ、帰ってきた返事は「死ぬでしょう」であった。今回この答えに対する科学的解析結果を報告する。

線虫のトロポニン C には他の無脊椎動物のようにカルシウム結合部位が 2 つあり、それぞれの部位に変異を起した遺伝子を持つ線虫を作成してその発生過程と虫の行動を調べた。サイト 2 に変異を持つ線虫は途中まで野生型と殆ど変わらないが成虫になると動きが遅くなり、排

卵や排泄が出来なくなった。おそらくサイト 2 へカルシウムが結合しない為に筋収縮の制御ができなくなったのだろう。興味あることに筋繊維の形態は野生型と変わらないのに周りの細胞の伸展異常も観察された。サイト 4 の変異したトロポニン C はカルシウム結合しないばかりかトロポニン I とも結合せず、筋繊維形成も起こらず線虫は致死になった。トロポニン C の末端のヘリックス部分はトロポニン I との結合に必須であるが、アミノ酸置換で末端ヘリックスの方向が変えると機能しなくなった。

線虫を使うとこれまでのような蛋白質レベルの分子間相互作用に加えて、試験管内の結果が動物でどのようになるかを解析出来る。人の蛋白質には幾つかのアイソフォームが存在して解析が困難であるが、線虫モデルを使うと形態から生理まで、何がどのように起こるかを動物の成長過程を通して観察出来る。科学実験が素晴らしいのは、結果を基に次の解析が誰にでも出来ることである。

(9) ΔK210 心筋トロポニン T 突然変異による拡張型心筋症マウス・ノックインモデル

森本幸生 (九州大学大学院医学研究院臨床薬理学分野)

拡張型心筋症を引き起こす心筋トロポニン T 遺伝子 ΔK210 突然変異を導入したノックインマウスを作製した。このマウスは同じ変異をもつヒトに非常に類似した病態を示し、両心室内腔の拡張とともに心臓の明らかな拡大を示した。ヘテロ接合体ミュータントマウスの半数が 7 ヶ月令までに突然死し、ホモ接合体ミュータントマウスではより顕著な心拡大と両心室内腔拡張を生じ、すべてのマウスが 6 ヶ月以内に心不全に陥ることなく突然死した。インビトロおよびインビボの解析から、この拡張型心筋症モデルマウスではカルシウム感受性の低下による心筋収縮力低下に対する代償機構として心拡大と心室内腔拡張が生じ、心臓ポンプ機能自体はそれによって

代償され正常に保たれていることが強く示唆された。心電図長期モニタリングにより、突然死は心室細動によるものであることが明らかになった。DNA マイクロアレイ解析により、このマウスの心臓ではホスホジエステラーゼ遺伝子発現量が有意に低下しており、それによる cAMP 増加を通して細胞内カルシウムトランジェント・アンプリチュード増加が生じていることが示唆された。以上の結果から、カルシウム感受性の低下による心筋収縮力低下に対する機能的代償機構として細胞内カルシウムの増加が生じているが、同時におそらく細胞内カルシウム過負荷による不整脈発生の危険性を高めることによって心室細動による突然死を導くと考えられる。

(10) 心筋トロポニン (cTn) の臨床応用について

豊岡照彦 (東北大学・先進医工学研究機構・生命機能分野)

急性心筋梗塞の生化学的診断として血中クレアチンキナーゼ活性が有用であることは、杉田、江橋と沖中によ

って報告された。クレアチンキナーゼ (CPK) の中でも心筋細胞内に選択的に含まれる MB 型は現在でも心筋細胞

膜が障害されて細胞内から、リンパ液として流出し、胸管から大循環に入り、最終的に循環血液中で検出される CPK 活性は、心筋障害を示す有力な証左となる。血中の経時変化として虚血発症 2 時間後から検出され始め、6 時間後にピークに達し、後は漸減して 48 時間後には検出されなくなる。従って、臨床的に発症後 3 日以上経過した症例では診断が困難になる欠点があった。最近では活性でなく、免疫学的に ELISA やラジオイムノアッセイとして CPK タンパクを検出する方法は感度が増すため、一部に用いられて来たが、特異性の点で脳内に存在する BB 型クレアチンキナーゼと交差反応を示す難点があった。

こうした隘路を越える手段として心筋細胞に特異的に存在する蛋白が血中に漏出したレベルにより心筋細胞膜障害の診断材料として、近年心筋のトロポニン-I(cTn-I)、またはトロポニン-T(cTn-T)が注目されている。cTn-I と cTn-T は心筋細胞内で 80-90%が thin filament 上のトロポミオシンと結合しているが、残りは細胞質内に浮遊して、前者と動的平衡状態に有ると考えられている。細胞膜の傷害により心筋虚血発症後、約 4 時間後から血中で検出され始め、18 時間後にピークに達した後、減少するが 24 時間後に再度増加して 2 相性を示す。前者は細胞質に浮遊していた成分を、後者は thin filament からの離脱を反映すると考えられる。実際、イヌの冠動脈結紮により心

筋梗塞モデルを作成して、虚血部から天然アクトミオシン (NAM) を作成して江橋らの方法で超沈殿測定を行うと、NAM の超沈殿現象は起こるが Ca^{2+} 感受性のみ低下する。これはミオシンとアクチンの機能は虚血部でも長時間保たれるが、収縮調節系のタンパクが選択的に失活して行くプロセスを示唆する。この現象は結紮 4 時間後に心内膜側から始まり、6 時間目には心内膜、心外膜両方で認められ、24-48 時間後には Ca^{2+} 感受性が完全に消失する。SDS ゲル電気泳動の結果、cTn-I と cTn-T が選択的に減少したことから説明される。

以前は抗体の特異性が低く、骨格筋由来のタンパクと識別できなかったため、骨格筋損傷も含む胸部外傷や腎機能低下状態では診断に支障を来たした。これは epitope を厳選して、高力価の抗体により解決された。また、cTn-I と cTn-T の間には検出感度に大差が無く、むしろ抗体の力価が有用性を決定すると思われ、世界的には両方が用いられている。

更に cTn の有用性は最近、大きな広がりを見せ、急性心筋梗塞、各種の心筋炎や心臓外傷の診断の他に、患者の予後判定にも用いられる事から、緊急手術適応から治療不要の症例に至るまで、患者の治療に際して層別化する際の有力な判断根拠として最も信頼される指標となっている。

(11) フィザルムミオシンに見られるカルシウム阻害

小濱一弘 (群馬大学大学院医学系研究科 臓器病態薬理学)

フィザルムミオシン II アイソフォームには特異的な性質があり、この Ca^{2+} 結合した場合、ATPase とモーター活性が阻害される。ミオシンの構造、機能そして制御をさらに解析するためミオシンの活性部位、即ちヘビーメロミオシン (HMM) を発現蛋白質化した。即ち、HMM 部分を作るミオシン重鎖、Ca 結合軽鎖及びリン酸化軽鎖の cDNA をすべてクローニングし、これらを組み込んだバキュロウィルスを作成した。Sf9 細胞を感染させ、HMM を発現蛋白質として得た。そして His-Tag を手がかりに HMM を精製した。同時に Ca 結合軽鎖については EF-ハンド Ca 結合ループを作る 3 種のアミノ酸をアラニンに換えて、 Ca^{2+} の結合性を完全に失わせたミュータントを

作り、HMM に組み込んだ。正常及びミュータント HMM は ATPase 活性を持ち、アクチンにより活性化された。カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼの cDNA を新たにフィザルムより得て、大腸菌で発現させた。このキナーゼによりリン酸化軽鎖リン酸化させるとこの ATPase 活性はさらに上昇した。HMM のモーター活性は、インビトロオーティリティー・アッセイにより検出した。リン酸化により、活性は上昇し、 Ca^{2+} を欠損する時に速く、 Ca^{2+} の存在する時に遅くなった。しかしミュータント HMM では Ca^{2+} の有無にかかわらず速いままにカルシウム阻害が見られなかった。

(12) 筋小胞体からのカルシウムによるカルシウム放出

遠藤 實 (埼玉医科大学)

我々は、低濃度のカフェインが骨格筋のスキンド・ファイバーに一過性の大きな収縮を起こし、さらにそれが数分以上に及ぶ間隔で自発的に反復して起きる事実を発見し、そのメカニズムを追及して、カルシウム・イオン (Ca^{2+}) 自身が筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を起こすことを見出した。この事実を我々は 1968 年の国際生理科学連合の会議で発表した。同会議で Ford と Podolsky もやや異なる実験事実から同じ結論を得て報告している。

その後、我々は Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出 (calcium-induced calcium release [CICR]) の諸性質を調べ、 Ca^{2+} 放出作用の Ca^{2+} 濃度依存性を明らかにし、高濃度の Ca^{2+} は逆に Ca^{2+} 放出に抑制的に働くこと、 Mg^{2+} は Ca^{2+} の Ca^{2+} 放出作用には競合的に拮抗するが、高濃度の抑制作用は共有すること、procaine は CICR の Ca^{2+} 感受性を変えずに Ca^{2+} を放出すること、caffeine は CICR の Ca^{2+} 感受性を高め、かつ最大 Ca^{2+} 放出速度を増大すること、adenine 化合物は CICR の Ca^{2+} 感受性を変えずに Ca^{2+} 放出を促進すること、等を次々に明らかにした。

1980 年代後半に、骨格筋小胞体の Ca^{2+} 放出チャネル蛋白が生化学者たちによって単離、精製され、その一時構造も決められた。その単離は ryanodine の特異的結合を利用して行われたので、得られたチャネル蛋白は ryanodine 受容体 (RyR) と呼ばれる。現在 RyR には骨格筋型 (RyR1)、心筋型 (RyR2)、脳型 (RyR3) の 3 種が知られている。これら RyR は、脂質 2 重膜に埋め込むとすべて CICR の性質を示すことが明らかにされている。

RyR1 をノックアウトすると興奮収縮連関が遮断されるので、RyR1 は生理的な Ca^{2+} 放出チャネルである。しかし、骨格筋の生理的 Ca^{2+} 放出は CICR を介するもので

はない。このことは、CICR の抑制薬が生理的 Ca^{2+} 放出を全く抑制しないことから明らかである。すなわち、RyR1 は生理的な刺激と Ca^{2+} による刺激に対してそれぞれ異なる開口モードで反応する。従来から知られている RyR1 開口物質は全て CICR モードで開口するものであったが、我々は最近 clofibric acid 等が生理的モード類似の開口を起こすことを明らかにした。

RyR1 の CICR モード開口の異常は、吸入麻酔時に稀に起きる悪性高熱を引き起こす。Halothane その他の吸入麻酔薬は全て CICR を促進するが、正常人ではそれによって何事も起こらない。しかし、悪性高熱患者はほぼ全ての骨格筋の CICR が亢進していて、その人たちの CICR が吸入麻酔によりさらに促進されると、 Ca^{2+} 放出が Ca^{2+} ポンプの取り込み能を上回ってしまい、高濃度のカフェインを投与した時と同様な状況になって筋収縮が起こり、その結果、異常熱産生による高熱を発するに至る。悪性高熱に著効を示す dantrolene は実際 CICR を抑制することも証明した。

一方、哺乳動物の心筋では、骨格筋と違って CICR が生理的興奮収縮連関のメカニズムであると考えられている。すなわち、興奮時に膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルを通じて細胞外から流入した Ca^{2+} が RyR2 を開口して Ca^{2+} 放出を起こし、心筋収縮を惹起する。その際、CICR の比較的低 Ca^{2+} 感受性と膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルおよび RyR2 の対向配置の結果、CICR の性質上起こりがちな all-or-none 的 Ca^{2+} 放出は起こらず、生理的要請に応じた Ca^{2+} 放出量、したがって収縮力の調節が可能になっている。

(13) リアノジン受容体1型 (RyR1) の Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 CICR の増幅率調節異常
——悪性高体温症発症機序

小川靖男 (順天堂大学医学部薬理学教室)

悪性高体温症 (MH) は吸入性全身麻酔薬使用時に生じる頻脈、呼吸性及び代謝性アシドーシス、急激な体温上

昇と持続的高体温、筋拘縮等の症状を伴う遺伝的疾患である。種々の遺伝子変異が報告されているが、主要なも

のは骨格筋 Ca^{2+} 遊離チャネルである RyR1 のミスセンス変異である。報告されている変異部位は region 1-3 の3つの部分に集中している。しかしなぜ CICR が亢進しているかについては未だ定説が無い。

我々は精製した RyR1 の活性は別のアイソフォームである RyR3 活性とほぼ同等であるが、筋小胞体(SR)での RyR1 は著しく活性が低い状態にあること、RyR 精製に用いる表面活性剤である CHAPS によりこの抑制が選択的に解除されることを見出した。

Ikemoto らは RyR1 の L2442-P2477 に対応する DP4 ペプチドが RyR1 の CICR 活性を選択的に促進するが、R2458C 変異に相当する DP4-mut ペプチドには作用が無いことを見出した。これらの結果を基に region 1 (RyR1 の 35-615 に相当する部分)と region 2 (RyR1 の 2000-3000 に相当する部分) とが相互作用することにより CICR 活性が低い状態にあるが、DP4 や region 2 の R2458C の変異はこの interdomain interaction を弱め CICR 活性を高め

ると結論し、interdomain interaction 仮説を提唱した。

我々は CHAPS の CICR 促進は DP4 の作用と共通な機序によることを示した。つぎにヒト MH の動物モデルとしてよく知られている RyR1 の R615C 変異を持つブタストレス症候群を示すブタ骨格筋の SR 小胞体を用いて検討した。正常型、変異型共に RyR1 の含有量、SDS-PAGE 上の移動度に差は無かった。正常型 RyR1 の活性は抑制されているのに対し、変異型 RyR1 の活性が 8-9 倍高かった。 Ca^{2+} 依存性、 Mg^{2+} 感受性、ATP 感受性、ダントロレン感受性、FKBP12 感受性に両者に差が無いこともわかった。大量の Pi 存在下に ATP で Ca^{2+} を取り込ませた SR 小胞体からのカフェインによる Ca^{2+} 遊離を調べたところ、変異型の方がカフェイン感受性が見かけ上 5 倍程度高い事がわかった。

以上のことは少なくとも region 1, 2 に変異を起こす MH では両 region 間の interdomain interaction が重要であることを支持する。

(14) Ca^{2+} オシレーションによる細胞機能制御

飯野正光 (東京大学大学院医学系研究科・細胞分子薬理学教室)

細胞内 Ca^{2+} 濃度が周期的に増減する Ca^{2+} オシレーションは、細胞機能制御に深く関わっている。我々は、 Ca^{2+} オシレーションの生理的意義と発生メカニズムについて研究を進めてきた。まず、 Ca^{2+} 依存性転写因子 NFAT の核移行と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の関係を解析して、 Ca^{2+} オシレーションの意義を追究した。その結果、NFAT は一過性の Ca^{2+} 濃度上昇を脱リン酸化状態として7分間程度記憶するため、記憶保持時間よりも短い間隔で Ca^{2+} オシレーションが起こると核移行が生じる。これによって Ca^{2+} オシレーションの頻度による核移行制御が行われる。また、持続して Ca^{2+} 濃度を上昇させる必要がないので、 Ca^{2+} オシレーシ

ョンにはシグナル伝達の効率を高める意義があることが明確になった。次いで、オシレーションの発生機構を解析した。まず、 Ca^{2+} 感受性ミュータント IP_3 受容体を用いた実験により、 IP_3 受容体の Ca^{2+} 感受性を介する自己再生産的 Ca^{2+} 放出が Ca^{2+} オシレーション形成に必要であることを明らかにした。さらに、周期性を決定するメカニズムを明らかにするため Ca^{2+} ストア内 Ca^{2+} 濃度を経時的にモニターした。その結果、小胞体とミトコンドリア間の Ca^{2+} のやり取りが周期を決定することが明らかになった。このような成果により、 Ca^{2+} オシレーションの意義と機構が明らかになってきた。

(15) 筋小胞体カルシウム ATPase によるイオンポンピング

豊島 近 (東京大学分子細胞生物学研究所)

骨格筋の筋小胞体カルシウム ATPase (SERCA1a) は P 型イオン輸送 ATPase を代表するカルシウムポンプであ

り、994 残基の単一ポリペプチド鎖からなる膜蛋白質である。3つの細胞質ドメインと10本の膜貫通ヘリックス

からなる。筋小胞体にあつては、筋収縮時に筋細胞中に放出されたカルシウムを筋小胞体中に取り込み、弛緩をもたらす。そのために ATP の化学エネルギーを利用する。我々はこのイオンポンプの X 線結晶構造解析とその結果に基づく分子動力学計算に取り組んできた。現在、反応サイクル全体をカバーする 6 つの中間状態の構造を決定することができ、能動輸送の分子機構の概略は理解

できたといつてよい。また、ATP や磷酸化が何をしているのか、100%近いエネルギー変換効率が何故可能なのか、一見無駄にしか見えないプロトンの対抗輸送の役割は何なのか、といった本質的疑問にも答えられるようになってきた。本講演では、詳細に踏み込める時間的余裕はとてもないが、カルシウム ATPase によるイオンの能動輸送機構を原子構造から概観する。

(16) 筋収縮における細いアクチンフィラメントの構造変化の役割

若林克三 (大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学)

筋収縮における力発生過程において、太いフィラメントから突き出たミオシクロスブリッジと細いフィラメントの F-アクチンが ATP 加水分解の自由エネルギーを使って相互作用するときコンフォメーションを変え、それが力発生に関係すると云われている。しかしながら、力発生と関係するコンフォメーションの変化についての研究の多くはミオシクロスブリッジに関するもので、それらはレバーアーム仮説をサポートするものである。力の発生はミオシンとアクチンフィラメントとの相互作用で起こるので、アクチンフィラメントはミオシンと等しく力発生のメカニズムに重要な役割を果たしているはずである。さらに、骨格筋の収縮はアクチンフィラメント上のトロポミオシンに結合したトロポニンへのカルシウムイオンの結合によってスイッチされ、アクトミオシン相互作用を調節することによって実現している。最近、細いアクチンフィラメントが収縮の全過程で構造変化を起しているという明確な実験結果が蓄積されている。本講演では我々の X 線回折の研究で明らかにしてきた骨格筋の筋収縮の制御過程や力発生過程で起きている細いアクチンフィラメントの構造変化を示し、アクチンフィラメントの構造変化が筋収縮の制御やミオシンとの相互作用による力発生のメカニズムに直接的に関与していることを議論する。

次に示す結果はこの議論に強く関係する実験事実である。(1)カルシウムイオンのトロポニンへの結合はアクチ

ンフィラメントの左巻きらせんを緩めて短縮させる。続く、ミオシンと相互作用して力を発生する過程ではアクチンフィラメントは左巻きらせんを捻って伸長する。この伸長量はサルコメアの弾性要素の伸びの 60%を占める。伸びの変化は張力発生と並行して起こる。(2)力発生中には細いフィラメントは、アクチンサブユニットのドメイン構造と制御タンパク TM の配置を変えることで 4 回回転対称性を強めるような構造変化を起している。(3)ミオシン頭部は ATP 加水分解中にレバーアームを大きく変化させる。この運動モードにはレバーアームのねじれと傾きの成分が主要なものとして含まれている。(4)ミオシンフィラメントもアクチンフィラメントと同様な捻れと伸びの変化を起している。筋収縮はこのような両フィラメントの弾性的な構造変化が共役することで実現されている。

また、制御タンパク由来の反射の時分割測定から制御タンパク質の構造変化が 2 段階過程で起こることが示された。最近明らかにされたトロポニン分子のコアドメインの細いフィラメント上での配置が X 線と FRET データを基に解析され、コアドメインの長軸がトロポミオシンストランドと直交していることが示された。さらにトロポニン T の構造を考慮した解析が進められると制御におけるトロポミオシンシフト説に関する疑問が解かれるかも知れない。

(17) 自励振動現象 (SPOC)におけるアクトミオシン分子モーターの協同的機能

石渡信一 (早稲田大学理工学術院物理学科理工系大学院生命理工学専攻)

1970年代初頭に行ったアクチンフィラメントの柔らかさの研究, とくにアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の柔らかさが Ca^{2+} 添加によって可逆的に上昇するという研究 (Fujime & Ishiwata, 1971-1974) を思い起こし, この研究が江橋先生 (文子先生) のもとでトロポニンの精製方法 (若林変法) を教えていただいたことによることを述べる。その後, アクチンの柔らかさと, その Ca^{2+} による制御やミオシンとの相互作用による変化が, 筋収縮・制御機構に深く関与していることを期待しつつ研究を続けてきたが, 決定打を出すまでに至っていない。今回は, 筋収縮系に見られる自励振動現象 (SPOC) のメカニズムと, この筋収縮系固有の性質が, 心拍機能

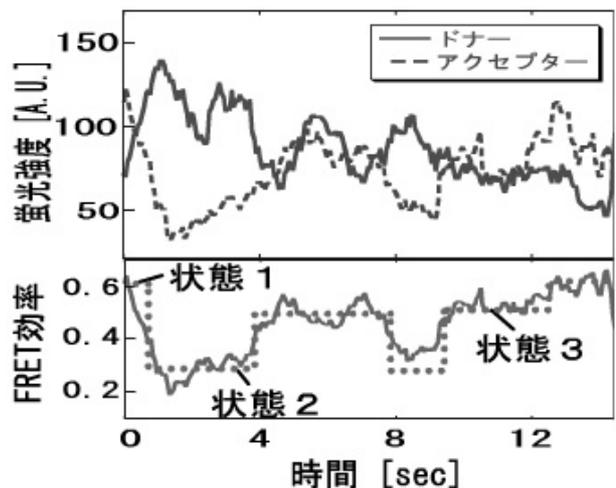
の基盤となっている可能性を述べる。すなわち我々は, ラット, ウサギ, (イヌ), ブタ, ウシの心臓から調製した細い心筋線維束が, ある濃度以上の Ca^{2+} 濃度という生理的な環境下で, 自発的に振動すること, しかもその振動周期が, それぞれの動物の静止心拍と直線関係にあることを見出したのである。発生力の振動は長続きしないが, 光学顕微鏡でみると筋節の振動は長時間にわたって持続する。この事実をもとに, ペースメーカー細胞に始まる, Ca^{2+} を仲立ちとする上位の制御機構は, この筋節固有の自励振動を同調させる役割を担っているという, 全く新しい概念を提出する。

(18) アクチンフィラメントの動的多形

柳田敏雄 (大阪大学大学院・基礎工学研究科・システム人間系, 科学技術振興機構・ソフトナノマシンプロジェクト, 大阪大学大学院・生命機能・ナノ生体)

タンパク質の構造は自由エネルギー最小値の近傍で安定化していると考えられている一方で, 準安定な構造を多数持ち, 熱エネルギーによってそれらの間をゆっくり揺らいでいるとも考えられている。近年, タンパク質内のヒステリシスの存在が実験的に示唆され (Lu 1998, Ishijima 1998), タンパク質の遅い構造揺らぎがタンパク質の機能に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。これまで我々は, アクチン分子は構造的な多状態を持ち, ミオシンとの相互作用によりその分布が変化する事を示してきた。我々は, 従来の1分子蛍光エネルギー移動 (FRET) 顕微鏡を改良し, これまでより長い時間 (~分) アクチン1分子内 FRET を計測することでアクチンには秒オーダーの遅い構造揺らぎがあることを見いだした (光学的なシャッターを用いてドナーとアクセプターを交互に励起し, 蛍光像をモニターすることでプリンキングと FRET を明確に区別した)。下図では, アクチンの構造が少なくとも3つの状態を秒オーダーの時間間隔で遷移していることを直接確認できる。FRET

効率の時系列解析からアクチンの構造揺らぎの時間特性も調べた。観察された構造ゆらぎは, F アクチンの回転に由来している可能性が高い。F アクチンの回転を考慮した筋収縮の分子メカニズムを提唱する。



(19) 電子顕微鏡と X 線回折を用いた F アクチンの構造モデリング

小田俊郎（理化学研究所 播磨研究所 放射光総合利用センター，
科学技術振興機構，ERATO アクチンフィラメント動態プロジェクト）

アクチン重合体の構造モデルは高い精度で明らかになっていない。最近，2 つの重要な結晶構造解析—formin-actin の複合体と crosslink2 量体—が行われた。これらの結晶中でアクチンは直線状重合体を形成していた。では，F-アクチンの螺旋構造形成に必要なものは何であろうか？ この問いに答えるために，F アクチンの構造モデル作成を行った。まず，F-アクチンゾルを調製し，X 線繊維回折パターンを記録した。次に，直線状重合体のサブユニットの向きにアクチンの結晶構造を置き，弾性体近似したアクチン分子の基準振動の方向に構造変化

させ回折パターンとあわせ，最後に，回折とモデルの残差をエネルギー項に入れた分子動力学シミュレーションを行った。得られた構造変化は，ヌクレオチド結合クレフトの底面を支点とした 2 つのドメインの交差運動である。これにより，長いピッチのストランド内の第 4 サブドメインと第 3 サブドメイン，また，ストランド間の第 4 ドメインと第 1 ドメイン，が相互作用できる。この 2 つの相互作用は螺旋形成に必須で，この第 4 ドメインがその key となっている。

(20) 二本足のリニア—分子モーターが「歩く」仕組み

木下一彦（早稲田大学理工学部物理学科）

ミオシンやキネシンなど，2 本足のリニア—モーターは，2 本の足に左右の区別がなく，しかも 2 本の脚（coiled-coil の分かれ目と motor domain の間の部分を脚と呼ぶことにする）の付け根は 2 回対称の形でより合わさっている。Processive な分子モーターがヒト並みに「歩く」とすると，2 つの爪先を両方前方に向けて着地する瞬間があるはずだが，そのためには脚がよほど捻れやすすくないといけない。実際，ミオシンの脚の付け根部分やキネシンの脚全体は，自在継ぎ手のように自由回転を許すように見える。

自在継ぎ手の存在を認めると，持ち上げた脚を積極的に前方に振り出す仕掛けは存在し得ないから，ブラウン運動に頼らざるを得ない。ブラウン運動自身は前後を区別しないから，前方への着地を保証する仕掛けが必要である。多くの研究者は，ミオシンでは着地した足首の曲げによる脚の前方への回転，キネシンなら脚(neck linker)

のドッキングにより，持ち上げた脚の付け根（ブラウン運動の支点）が前方に移動して，ブラウン運動が前方にバイアスされると考えている。

本当にこれでよいのか。胴体部分に（光ピンセットなどで）後ろ向きに力をかけたら，前方バイアスどころか支点が後ろに引き戻されかねない。ミオシン V ですら脚は堅くないし，キネシンのドッキングエネルギーは小さい。

前方着地を保証するには，ヒトと同様，持ち上げた足の爪先を下に下げればよい。こうすると，脚が前方に振り出されたときは足裏がちゃんとレールに向くが，後方だとそっぽを向いてしまう。爪先上下（持ち上げた足首の曲げ伸ばし）は，結晶構造からも示唆される。

後は，両足着地から後足を選択的に持ち上げる仕組み（石渡らが示した歪み依存の反応制御）を加えれば，2 足歩行が可能に思える。

(21) 急速凍結フリーズ・レプリカ電子顕微鏡法により明らかになった *in vitro* 滑り運動中の ミオシンクロスブリッジの動き

片山栄作 (東京大学医科学研究所 分子構造解析分野)

ミオシン頭部 S1 に ATP が結合するとレバーアーム部分が強く屈曲することが結晶回折により明らかになり、そのように屈曲したクロスブリッジがアクチンに結合したまま伸展して硬直複合体に移行することが滑り運動の張力発生の源であろうと想定する「レバーアーム首振り説」が提唱されている。われわれはその真偽を検証するために、空間分解能とコントラストの高い急速凍結フリーズ・レプリカ電子顕微鏡像を用いてアクトミオシンの *in vitro* 滑り運動に伴うミオシン頭部の構造変化を解析してきた。原子モデル表面の凹凸からコンピュータ・シミュレーションにより作成したレプリカ画像を実際の観察により得られた電子顕微鏡像と比較することにより、滑り運動中には、これまで結晶回折では報告されていない ATP 型とは逆向きに屈曲したクロスブリッジが大半を占め、その構造は、ADP 存在下、SH1 と SH2 を化学架橋したミオシン (pPDM 型) に酷似していることが判明した。この時、上位 50K 下位 50K サブドメインを含む面はアクチンにはほぼ平行であるが、硬直複合体では同じ面はアクチンに垂直に近く、その間に頭部の長軸周囲の回転が起きる可能性が推定された。実際、pPDM 型の構

造を有する頭部がアクチン上で回転して結合方向を変え、硬直複合体に至る直前であろうと思われる画像も検出されたことから、レバーアームの伸展は確かに起きるが、構造変化の様式は従来の説とは異なりわれわれの見出した構造こそが、首振り直前に実現することが示された。以上の解析の結果、アクチン結合ミオシンは、アクチン軸に沿った、「揺れ」と見られる運動と、首振りに対応する前記の伸展運動の 2 種類の動きを行う可能性が示唆された。後の過程がミオシン-V の「歩行」と称されるプロセッシブな運動に対応する可能性を推測し、歩行中のミオシン-V の電子顕微鏡像を解析した。結果は想像された通りであり、ミオシン-V の歩行運動においても、首振り直前の構造は ATP 結合型ではなく、われわれの見出した逆方向の屈曲構造を取る可能性が高い。柳田らは、ミオシンが 1 分子の ATP を加水分解によりアクチンの進む距離は負荷の大きさにより可変であるとする化学・力学エネルギーの「ルース・カプリング」の概念を提唱しているが、上記の「揺れ」と「首振り運動」とを適切に組み合わせれば、そのような概念を合理的に説明することも可能かも知れない。

6. 細胞死の新たな生理機能と病態における意義

2005年10月17日-10月18日

代表・世話人：垣塚 彰（京都大学大学院・生命科学研究科）

所内対応者：岡田 泰伸（自然科学研究機構・生理学研究所）

- (1) Fas/FADD/FLIP と細胞の増殖・分化
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）
- (2) M期染色体凝縮の異常によって、eEF1A1/EF-1 α の発現低下を介する新しい細胞死が誘導される
小林 洋平（京都大学大学院・生命科学研究科・高次遺伝情報学分野）
- (3) Fas リガンドによるアポトーシスと炎症とがん
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) 抗原による B リンパ球アポトーシス制御の機構と免疫応答
鏝田 武志（東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究部・高次生命制御部門・高次生体制御学）
- (5) Akt 経路による新たな細胞死抑制機構
後藤 由季子, 岩井 謙一（東京大学・分子細胞生物学研究所・情報伝達研究室）
- (6) ショウジョウバエ成虫脳における細胞死と神経傷害に依存的なグリア細胞の増殖
加藤健太郎^{1,2}, 栗崎 健^{1,3}, 伊藤 啓^{1,2}
(¹東京大学・分子細胞生物学研究所, ²科学技術振興機構・BIRD, ³科学技術振興機構・PRESTO)
- (7) 変態中に退縮している尾で発現している matrix metalloproteinase-9 遺伝子の解析
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）
- (8) 傷害ミトコンドリアの排除機構
柳 茂（東京薬科大学・生命科学部・分子生命科学科・分子生化学研究室）
- (9) ショウジョウバエ食細胞によるアポトーシス細胞の認識機構
中西 義信（金沢大学・医学系研究科, 薬学部・生体防御応答学分野）
- (10) マクロファージによるインフルエンザウイルス感染細胞のアポトーシス依存食食機構と意義
白土 明子（金沢大学大学院・医学系研究科, 薬学部・生体防御応答学分野）
- (11) フォスファチジルセリン依存の食食
長田 重一（大阪大学大学院・生命機能研究科・時空生物学講座・遺伝子研究室）
- (12) 小胞体ストレス応答の多様性
今泉 和則（宮崎大学・医学部・解剖学講座・分子細胞生物学分野）
- (13) ドーパミンニューロンの機能発現と病態における Pael 受容体/GPR37 の役割
高橋 良輔（京都大学大学院・医学研究科・脳病態生理学講座・臨床神経学）
- (14) 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・生命科学研究科・高次生体統御学分野）
- (15) VCP の活性調節機構の解析
野口 昌克（京都大学大学院・生命科学研究科・高次生体統御学分野）
- (16) NF- κ B による活性酸素産生の抑制のメカニズム
中野 裕康（順天堂大学・医学部・免疫学）
- (17) カスパーゼの生体機能：アポトーシス非依存的な役割
三浦 正幸, 嘉糠 洋陸, 倉永英里奈（東京大学大学院・薬学系研究科・遺伝学教室）

(18) 雄性外生殖器形成における細胞死シグナルの関与

倉永英里奈, 三浦 正幸 (東京大学大学院・薬学系研究科・遺伝学教室)

(19) 細胞縮小はアポトーシスに必要・十分条件か?

岡田 泰伸 (生理学研究所・機能協関部門)

(20) Bcl-2 による種々の細胞死機構の制御

辻本 賀英 (大阪大学大学院・医学系研究科・遺伝子学教室, 科学技術振興機構)

(21) 拮抗して細胞の運命を決定するストレス応答キナーゼ JNK, p38-MAPK

和田 悌司, 仁科 博史 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・発生再生生物学分野)

(22) DNA 損傷によって誘導される SAPK/JNK 活性化の分子機構性

仁科 博史¹, 北川 大樹², 浦 誠司², 根岸 崇大², 和田 悌司¹, 堅田 利明²

(¹東京医科歯科大学・難治疾患研究所・発生再生生物学分野,

²東京大学大学院・薬学系研究科・生理化学教室)

(23) ASK ファミリーによる細胞死とストレス応答の制御

一條 秀憲 (東京大学大学院・薬学系研究科・細胞情報学教室, CREST)

【参加者名】

垣塚 彰 (京都大学 大学院生命科学研究科), 安田 邦彦 (京都大学 大学院生命科学研究科), 野口 昌克 (京都大学 大学院生命科学研究科), 加藤 成芳 (京都大学 大学院生命科学研究科), 紺谷 千穂 (京都大学 大学院生命科学研究科), 福士 順平 (京都大学 大学院生命科学研究科), 中西 義信 (金沢大学 医学系研究科), 白土 明子 (金沢大学 医学系研究科), 渡邊 郁子 (金沢大学 医学系研究科), 橋本 優実 (金沢大学 自然科学研究科), 柳 茂 (東京薬科大学 生命科学部), 仁科 博史 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所), 和田 悌司 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所), 浦 誠司 (東京大学 大学院薬学系研究科), 根岸 崇大 (東京大学 大学院薬学系研究科), 長田 重一 (大阪大学 生命機能研究科), 鏑田 武志 (東京医科歯科大学 疾患生命科学研究部), 渡辺 幸造 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所), 三浦 正幸 (東京大学 大学院薬学系研究科), 嘉糠 洋陸 (東京大学 大学院薬学系研究科), 倉永 英里奈 (東京大学 大学院薬学系研究科), 栗崎 健 (東京大学 分子細胞生物学研究所), 加藤 健太郎 (東京大学 分子細胞生物学研究所), 米原 伸 (京都大学 大学院生命科学研究科), 大串 雅俊 (京都大学 大学院生命科学研究科), 小林 洋平 (京都大学 大学院生命科学研究科), 中津海 洋一 (京都大学 大学院生命科学研究科), 高橋 涼香 (京都大学 大学院生命科学研究科), 中野 裕康 (順天堂大学 医学部), 中島 章

人 (順天堂大学 医学部), 一條 秀憲 (東京大学 大学院薬学系研究科), 梅田 剛 (東京大学 大学院薬学系研究科), 河野 泰秀 (東京大学 大学院薬学系研究科), 関根 悠介 (東京大学 大学院薬学系研究科), 早河 輝幸 (東京大学 大学院薬学系研究科), 後藤 由季子 (東京大学 分子細胞生物学研究所), 岩井 謙一 (東京大学 分子細胞生物学研究所), 森永 光一郎 (東京大学 分子細胞生物学研究所), 長谷川 強 (東京大学 分子細胞生物学研究所), 清水 重臣 (大阪大学 大学院医学系研究科), 高橋 良輔 (京都大学 大学院医学研究科), 王 華芹 (京都大学 大学院医学研究科), 小林 芳人 (京都大学 大学院医学研究科), 矢尾板 芳郎 (広島大学 理学部), 今泉 和則 (宮崎大学 医学部), 須田 貴司 (金沢大学 分子標的薬剤開発センター), 川瀬 浩司 (金沢大学 大学院自然科学研究科), 松本 則彦 (金沢大学 大学院医学系研究科), 西頭 英起 (東京医科歯科大学), 岡田 泰伸 (生理学研究所 機能協関), 高橋 信之 (生理学研究所 機能協関), サビロブ ラヴシヤン (生理学研究所 機能協関), 井上 華 (生理学研究所 機能協関), 浦本 裕美 (生理学研究所 機能協関), エルバート リー (生理学研究所 機能協関), 沼田 朋大 (生理学研究所 機能協関), 赤塚 結子 (三重大学 医学部), 大滝 博和 (昭和大学 医学部), 養父 佐知子 (昭和大学 医学部), 中町 智哉 (昭和大学 医学部)

【概要】

細胞死の分子メカニズムが詳しく研究され、その素過程に関わる分子が徐々に明らかにされてきた。現在はそれぞれの分子がどのように生理機能に関わるかということに加え、ガンや神経変性疾患のような病態での役割が注目されるようになってきた。我が国の細胞死研究はその初期から高いレベルにあり、細胞死実行過程の研究では世界をリードする成果が多く出されてきた。一方、

神経変性疾患における細胞死の分子解析でも世界をリードする研究者を多数輩出するにいたっている。このような状況で、精力的に細胞死研究を行っている研究者が一同に会し、その分子機構と生理学的意義に関して研究交流の場をもつことは非常に意義のあることと考え、本研究会を行った。

(1) Fas/FADD/FLIP と細胞の増殖・分化

米原 伸 (京都大学大学・生命科学研究所・高次遺伝情報学分野)

Fas などの death receptor は、アダプター蛋白質 FADD を介して pro-caspase-8 と death-inducing signaling complex (DISC) と呼ばれる複合体を形成し、DISC の中で pro-caspase-8 が近接化による自己切断によって活性化し、アポトーシス誘導シグナルを発生させることが知られている。また、FLIP は caspase-8 と FADD の会合を阻害し、また caspase-8 の自己切断を阻害してアポトーシスの誘導を阻害する。一方、caspase-8 はアポトーシス誘導だけでなく、NF κ B 活性化等の多様なシグナルを誘導する。今回我々は、Fas や FADD が caspase-8 のプロテアーゼ活

性に依存せずに、これらの分子に存在する death domain を介して神経細胞の神経突起伸長を増強させることを見いだしたので、報告した。また、ウイルス由来 FLIP E8 が Wnt シグナルを β -catenin 安定化の下流で著しく増強することを見いだしていたが、この系を用いることにより、Wnt シグナルがヒト腫瘍由来細胞株 KB では細胞増殖の増強を、またマウス胎児由来繊維芽細胞株や 3T3 細胞等の正常に近い細胞株には細胞死や増殖抑制を誘導することを見いだしたので報告した。

(2) M 期染色体凝縮の異常によって、eEF1A1/EF-1 α の発現低下を介する新しい細胞死が誘導される

小林 洋平, 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)

M 期における染色体凝縮は正常な染色体分配に欠かせない過程であり、不完全な凝縮により生じた異常細胞は生体から除去される必要があると考えられる。しかし、その除去機構については明らかにされていない。我々は、CHO 細胞において CREB の活性化を強く誘導すると、CREB の転写活性非依存的に M 期の染色体凝縮異常が誘導されることを見だし、この系を用いて染色体凝縮異常に対する細胞応答を解析した。

染色体凝縮異常を誘導した細胞において Time-lapse imaging 解析を行ったところ、M 期において染色体分離を完了できないまま細胞は多核化し、その後細胞死が

誘導されて死滅する様子が観察された。この細胞死について詳細に解析した結果、この細胞死は caspase 非依存的な経路で主に誘導されており、この細胞死が誘導される際に eEF1A1/EF-1 α の発現量が mRNA の転写後調節によって劇的に減少していることが明らかとなった。さらに、外来性 eEF1A1 を発現させることによりこの細胞死が顕著に抑制されたことから、この細胞死には eEF1A1 の発現低下が深く関与していることが示された。以上の結果から、M 期染色体凝縮不全により生じた異常細胞は eEF1A1 の発現低下が深く関与する新しい細胞死経路を介して除去されることを我々は報告した。

(3) Fas リガンド (FasL)によるアポトーシスと炎症とがん

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)

FasL はデス因子として有名であるが、生体内では炎症誘導作用も示す。また、肝炎など種々の炎症性疾患の動物モデルでは、FasL を阻害すると治療効果が得られる。さらに、慢性肝炎から肝がんを発症する動物モデルでは、抗 FasL 抗体の投与で肝がんの発症も抑制された。抗 FasL 抗体のこれらの効果は、FasL の炎症誘導作用を抑制するためと考えられる。FasL 発現細胞をマウス腹腔に移植すると、激しい好中球の浸潤が誘導される。この時腹腔内には IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, IL-23 などが検出される。IL-1 β は FasL でアポトーシスを起した好中球等の炎症細

胞から分泌され、血管内皮細胞などに作用して KC や MIP-2 の産生を誘導し、炎症細胞の更なる浸潤を誘導する。IL-17 も KC 産生を誘導し、好中球浸潤に寄与するが、IL-17 は FasL の直接作用ではなく、IL-1 β と IL-23 の相乗作用で腹腔 T 細胞より産生される。これに対し、IL-23 は FasL の直接作用で樹状細胞から産生される。また、FasL はヒト胎児腎細胞株 HEK293 に NF- κ B 活性化を介して IL-8 の産生を誘導する。FasL はアポトーシスの場合と同様、FADD や caspase-8 を介して NF- κ B の活性化を誘導する。

(4) 抗原による B リンパ球アポトーシス制御の機構と免疫応答

渡辺 幸造, 佐藤 元彦, 小野寺大志, 外園 泰久, 若林 千里, 安達 貴弘, 鏑田 武志
(東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所・難治疾患研究所)

CD22 および CD72 分子は B リンパ球抗原受容体 (B cell antigen receptor; BCR) を介するシグナル伝達を負に制御することにより、B リンパ球のアポトーシスを制御する抑制性 BCR 共受容体である。我々は以前、CD22 による BCR シグナル制御が、BCR を構成する免疫グロブリンのクラスにより異なり、IgM-BCR や IgD-BCR を介するシグナル伝達は負に制御するが、IgG-BCR を介するシグナル伝達は制御しないことを示した。今回、我々は、CD22 が IgA-BCR を介するシグナル伝達を負に制御するが、IgE-BCR を介するシグナル伝達は制御しないことを明らかにした。これらの結果は、IgG-BCR および IgE-BCR を

介するシグナル伝達が、IgM-BCR や IgD-BCR を介するシグナル伝達に比べ亢進していることを示しているが、実際にそうであることを *in vitro* および *in vivo* で明らかにした。これらの結果は、IgG や IgE を産生する記憶 B 細胞が、IgM-BCR および IgD-BCR を発現するナイーブ B 細胞に比べ抗原刺激により活性化されやすいことを示している。このようなメカニズムが、記憶免疫応答における迅速で大量の抗体産生に関与することが強く示唆された。また、我々は、CD22 のシグナル制御解除に関わる IgG および IgE の領域の同定を行った。

(5) Akt 経路による新たな細胞死抑制機構

岩井 謙一, 後藤 由季子 (東京大学・分子細胞生物学研究所・情報伝達研究室)

約 40% のガン細胞において異常な活性化が見られる代表的な癌遺伝子のひとつである Akt は多くの系で細胞生存促進に中心的な役割を果たす。これまで Akt の細胞生存促進におけるターゲットのほとんどは、アポトーシス

シグナル経路におけるミトコンドリアの膜透過性の上昇 (シトクロム C などの放出) より上流の因子であった。しかしながら Akt 経路が活性化している細胞ではシトクロム C がミトコンドリアから放出された後の状態であっ

でも生存が維持されるという状況証拠が示されており、シトクロム C から下流の Akt のターゲットの存在が示唆されていた。ミトコンドリアから放出されたシトクロム C は Apaf-1 のコンフォーメーション変化を引き起こすことにより Apaf-1 と Caspase-9 の活性型複合体 Apoptosome

の形成を誘導し下流の Caspase カスケードを活性化する。本研究において我々は、Akt がシトクロム C による Apoptosome の活性化を阻害することを示し、また、Akt の直接のターゲットの候補を同定したのでこれについて報告した。

(6) ショウジョウバエ成虫脳における細胞死と神経傷害に依存的なグリア細胞の増殖

加藤健太郎¹, 栗崎 健², 伊藤 啓³

(¹東京大学分子細胞生物学研究所, ²科学技術振興機構・BIRD, ³科学技術振興機構・PRESTO)

神経回路形成の最後の段階では、過剰な神経細胞がプログラム細胞死を起こす。細胞死が引き起こされる要因については数多くの研究がある一方で、細胞死と周囲の組織との関わりに着目した研究はほとんどなされていない。我々はショウジョウバエ成虫脳を実験対象として、神経細胞のプログラム細胞死がグリア細胞の増殖を引き起こすこと、神経損傷に対してもグリア細胞が増殖すること、ほ乳類において炎症反応に深く関与することが知られている TNF α と同じファミリーの一員である Eiger がこの両方のグリア細胞の増殖に関わっていることを見

いだした。このことから回路形成の一過程である神経細胞のプログラム細胞死は、神経損傷と共通の機構によってグリア細胞の増殖を引き起こしていることが示唆される。また、Eiger 変異体では過剰な神経細胞の細胞死が観察され、発生の一過程であるプログラム細胞死が周囲の組織に二次的な細胞死を引き起こしうることが明らかになった。このことから Eiger あるいは増殖したグリア細胞がこのような二次的な影響を抑えることで適切な神経回路形成に貢献していると考えられる。

(7) 変態中に退縮している尾で発現している matrix metalloproteinase-9 遺伝子の解析

藤本 健太, 中島 圭介, 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)

無尾両生類の変態は、ほぼ全身の形態・機能変化をもたらすもので劇的である。特に尾の退縮は、体長の 2 倍以上の長さがあったものが数日のうちに無くなってしまふ。この両生類の変態は甲状腺ホルモン (TH) の血中増加によって引き起こされることが知られているが、その分子機構の多くは明らかになっていない。尾の退縮過程には、細胞外基質分解酵素 (Matrix metalloproteinases; MMPs) が増加し、構造破壊、足場を壊すことによる細胞死誘導に重要な役割を果たすと考えられている。我々は、differential hybridization により、従来報告されていた MMP-9 と異なる、退縮する尾で特異的に誘導される

MMP-9TH cDNA を同定した。*Xenopus tropicalis* のゲノム解析により、MMP-9 と MMP-9TH は直列に遺伝子重複していることが示された。MMP-9 は初期発生で発現しているが、MMP-9TH は退縮している尾、鰓、再構成している腸、神経系、TH 処理で細胞死を起こしている、尾由来の筋芽細胞株 (XLT-15) で mRNA が検出された。それらの発現にはプロモーターにある甲状腺応答配列が関係していた。MMP-9 の遺伝子重複は 6000 万年より以前に起きていたと予想され、これが *Xenopus* 属以外の無尾類全体に存在するのかどうかは興味深い。

(8) 傷害ミトコンドリアの排除機構

柳 茂 (東京薬科大学・生命科学部・分子生命科学科・分子生化学研究室)

ミトコンドリアはエネルギーを産生する重要な細胞内小器官であり、進化論的には好氣的バクテリア細胞が真核細胞に共生することによって獲得されたと考えられている。しかしながら、機能低下もしくは傷害を受けたミトコンドリアは活性酸素を漏出することにより細胞に障害を与えることが知られている。最近、私たちは傷害を受けたミトコンドリアの排除機構に関わる蛋白質(ミトコンドリアセプチン)を見いだした。ミトコンドリアセプチンは傷害ミトコンドリアを特異的に認識し、独特の封入体を形成し細胞外へと放出、あるいはリソソームと

の融合を促進する活性が認められた。現在、ミトコンドリアセプチン欠損マウスを解析中であるが、予備的な実験結果において、ある種の自己免疫疾患との類似性が示唆された。一方、ミトコンドリア側にも宿主の監視を免れようとするメカニズムに関与する新規のミトコンドリアユビキチンリガーゼが同定された。今後、ミトコンドリアをバクテリアの一種と捉えなおすことにより、新しいミトコンドリア生物学の展開が期待できるかもしれない。

(9) ショウジョウバエ食細胞によるアポトーシス細胞の認識機構

真中 純子, 倉石 貴透, 白土 明子, 東田 陽博, 中西 義信
(金沢大学大学院・医学系研究科)

Istvan Ando (Hungarian Academy of Sciences), Bok-Luel Lee (Pusan National University)

食細胞はアポトーシス細胞表面の目印分子を認識して貪食を行う。線虫の遺伝学的解析で、貪食を誘導する情報伝達経路が二通り存在することが示された。しかし、これら経路の最上流に位置するはずの2組の貪食受容体と目印分子のうち、見つかっているものはCED-1と呼ばれる受容体のみである。発表者らは、ショウジョウバエを使って残りの分子の同定をめざしている。昨年度の本集会では、CED-1のショウジョウバエホモログであるDraperが貪食受容体として働くことを報告した。今年度は、Draperが認識する目印分子及びDraper以外の受容体と目印分子の候補を得たことを紹介する。

貪食標的細胞の抽出液中に、Draper細胞外領域に結合

するタンパク質を見出した。この分子は、アポトーシスに依存して細胞表面に出現すると示唆された。また、体液細胞表面に結合するモノクローナル抗体群の中に、貪食反応を阻害するクローン#16が見つかった。#16抗原の阻害とDraperの阻害とは相加的であり、両者は独立した貪食受容体として機能すると推測された。さらに、哺乳類で貪食に関わるとされている小胞体分子シャペロンのカルレティキュリン(CRT)の関与を調べた。標的細胞について抗CRT抗体での前処理やCRTのRNAiを施すと、貪食程度が低下した。よって、CRTは貪食目印分子として働くと考えられた。

(10) マクロファージによるインフルエンザウイルス感染細胞のアポトーシス依存貪食機構と意義

白土 明子, 中西 義信 (金沢大学大学院・医学系研究科, 薬学部・生体防御応答学分野)

インフルエンザウイルスの感染により、細胞はアポトーシスを起こす。この現象は、感染細胞が死ぬことによ

りウイルス増殖を抑制するという、感染症から生体を守るための防御反応であると推測される。しかし、in vitro

の実験ではインフルエンザウイルスは感染細胞がアポトーシスによって機能を失う前に増殖してしまい、生体防御機構としての意義が示されていなかった。私たちの研究により、これは食細胞が共存していなかったためであることが判明した。

マクロファージを共存させると感染細胞は細胞内のウイルスごと貪食され、これによりウイルス増殖がほぼ完全に停止した。この貪食反応の選択性は、アポトーシスに伴って感染細胞表層に出現する膜リン脂質ホスファチジルセリンがマクロファージに認識されることで規定されていた。また、効率よく貪食されるためには、感染細胞

の表層に発現するインフルエンザウイルスのエンベロープタンパク質であるノイラミニダーゼの活性が必要とされた。ノイラミニダーゼはマクロファージ表層のシアル酸を切除することで、マクロファージの貪食活性を促進すると分かった。さらに、インフルエンザウイルスを感染させたマウスに貪食阻害剤を投与すると、肺での炎症の程度が大きくなり生存率が顕著に低下した。

以上の結果から、インフルエンザウイルス感染によるアポトーシスは感染細胞に貪食のための目印を付ける反応であり、ウイルス感染細胞の貪食除去はインフルエンザから生体を守るための機構だと考えられた。

(11) フォスファチジルセリン依存の貪食

長田 重一 (大阪大学大学院・生命機能研究科・時空生物学講座・遺伝子研究室)

私達は、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に関与する分子として、MFG-E8を同定した。MFG-E8はアポトーシスを引き起こした細胞に提示されるリン脂質 phosphatidylserine(PS)を認識し、死細胞をマクロファージへ橋渡しする。MFG-E8を欠損するマウスの脾臓・胚中心には貪食されない死細胞が残存し、マウスは自己抗体の産生を伴った自己免疫疾患を罹患する。一方、マクロファージに貪食された死細胞のDNAはリソソームに存在するDNase IIによってさらに分解される。DNase II遺伝子を欠損するマウスでは胎児肝臓をはじめとして、

種々の臓器に未分解のDNAを蓄積したマクロファージが認められる。ところで、マウスの胎児肝臓に存在するBlood islandのマクロファージは赤血球前駆細胞から脱核した核を貪食する。最近、私達は、赤血球前駆細胞から遊離した核の表面にPSが暴露され、マクロファージはこれを認識することにより核を貪食することを明らかにした。

発表論文: Yoshida H. *et al. Nat. Immunol.* 6: 49, 2005; Yoshida H. *et al. Nature* 437:754, 2005

(12) 小胞体ストレス応答の多様性

今泉 和則 (宮崎大学・医学部・解剖学講座・分子細胞生物学分野)

小胞体ストレスは神経変性疾患をはじめとする様々な疾患の発症に密接関わる。このような疾患の治療薬開発のためにも小胞体ストレス応答の全貌解明が望まれている。我々は小胞体ストレスに対し強い抵抗性を示すアストロサイトで特異的に発現する新規小胞体ストレスセンサーOASISの同定に成功した。OASISは、1)小胞体ストレスに反応して膜内切断を受ける、2)切断された断片は核内に移行する、3)CREおよびERSE配列に結合して分子シャペロンGRP78/BiPの転写を誘導する、4)小胞体ス

トレス誘導性細胞死を抑制することなどの機能を有することを明らかにした。

小胞体ストレスの際にプロテアゾームが活性化(ERAD)し、異常タンパク質の分解に寄与することは良く知られている。このERADに加え、異常タンパク質を分解するシステムとしてオートファジーが活性化している可能性を見出した。小胞体ストレスを負荷した細胞ではオートファゴゾームが細胞質内に多数観察され、オートファジーのマーカー分子も活性化していた。オートフ

アジーが起こらない ATG5 欠損細胞では、小胞体ストレス誘導性細胞死を増強したことから、オートファジーに

よるタンパク質分解系は小胞体ストレスから回避するために必須の役割を担っていることが示唆された。

(13) ドーパミンニューロンの機能発現と病態における Pael 受容体/GPR37の役割

高橋 良輔 (京都大学大学院・医学研究科・脳病態生理学講座・臨床神経学)

パーキンソン病 (PD) は黒質ドーパミンニューロンの比較的選択的な変性脱落によって、進行的で深刻な運動障害をきたす、高齢者に多い神経変性疾患である。PD は通常孤発性であるが、5-10%の症例で家族性発症をみる。常染色体劣性遺伝性パーキンソニズム (AR-JP) の病因遺伝子として同定されたパーキンはユビキチンプロテアソーム蛋白質分解系で重要な役割を果たすユビキチンリガーゼという酵素であり、蛋白質分解系の破綻が PD の発症に関わることを示す強い証拠を提供している。我々はパーキンの基質蛋白質として構造異常を起こしたパエル受容体を単離し、パーキンの変異によって分解されなく

なったパエル受容体が蓄積し、小胞体ストレスを引き起こして神経変性が生じるという仮説を提唱している。パエル受容体を脳で発現するショウジョウバエではドーパミンニューロンの選択的細胞死が起こるうえ、ウイルスベクターでパエル受容体を導入したラットの黒質は細胞死に陥り、この細胞死は小胞体ストレスによるものであるらしいことも明らかになっている。さらにパエル受容体を脳で過剰発現するトランスジェニックマウスで加齢とともにドーパミン神経の変性脱落が起こることもわかり、AR-JP のモデルになるかどうか解析中である。

(14) 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)

神経変性疾患は、疾患ごとに特定の中脳神経領域が障害を受け、その結果、特有の症状 (痴呆・運動失調・異常運動・筋力低下等) を示すため、多くの疾患に当てはまる統一的な発症機構を明らかにすることはできないと考えられてきた。しかし、近年になり、多くの神経変性疾患に共通して、異常蛋白質の蓄積と細胞質の空胞化を伴う神経細胞死が認められることが再認識されるようになり、神経が変性・消失する過程には、似通った分子機構が存在するという考えが広まってきた。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、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 の可能性を議論した。

(15) VCP の活性調節機構の解析

野口 昌克¹, 高田尚寛¹, 木村 洋子², 萬野 篤¹, 村上 克洋¹,
小池 雅昭¹, 大泉 宏¹, 堀 清次¹, 垣塚 彰¹

(¹京都大学大学院・生命科学研究科・高次生体統御学分野,

²東京都臨床医学総合研究所・腫瘍細胞研究部門)

活性酸素 (ROS) の過剰な発生は、様々な疾病を引き起こすと考えられている。VCP は、AAA ファミリーに属する蛋白質で、細胞周期、膜融合そして蛋白質分解など多様な細胞機能に関与している。これまで我々は、ATPase 活性を失った変異体 VCP が異常蛋白質の蓄積や空胞形成を誘導し、最終的に細胞死を引き起こすことを示してきた。しかしながら、VCP の ATPase 活性を制御する分子機構は明らかとされていなかった。今回我々は、ROS が VCP の ATPase 活性を低下させることを見いだした。さらに、ROS による ATPase 活性の制御に必須な 1 つのシステイン残基を特定し、別の酸化を受けないアミ

ノ酸に置換することで ROS 耐性型 VCP を得ることが出来た。また、ROS による VCP のレドックス制御が、蛋白質分解の制御機構に関与する可能性を示した。さらに、酵母を用いて、*in vivo* で細胞死の誘導に関与することを示した。以上の結果から、VCP が ROS の重要なターゲットの一つであり、ROS による VCP の ATPase 活性の低下が、細胞障害および死に関与していることが示唆された。過剰な ROS による VCP の機能障害が、神経変性疾患やがんなどの発症機構に関与していることが推測される。

(16) NF- κ B による活性酸素産生の抑制のメカニズム

中野 裕康 (順天堂大学・医学部・免疫学)

NF- κ B の活性化の障害された細胞では、活性酸素 (ROS) の蓄積が生じ、遷延化する c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が誘導されることを、我々はこれまでに明らかにしてきたが、その分子メカニズムの詳細は不明であった。今回、我々は NF- κ B 欠損細胞では、アポトーシス抑制タンパクである c-FLIP が TNF α 刺激により速やかに分解されることを見いだした。逆に c-FLIP を発現させることにより、NF- κ B 欠損細胞で生じる ROS 産生や JNK の活性化が抑制されることが明らかとなった。さらに興味深い事に、HeLa 細胞や HCT116 細胞で siRNA 法

により c-FLIP をノックダウンさせるだけで TNF α や抗 Fas 抗体刺激により遷延化する JNK の活性化および ROS 産生が誘導されることが初めて明らかとなった。この時生じる ROS や JNK の活性化はカスパーゼ阻害剤である z-VAD-fmk により完全に抑制されることより、c-FLIP が caspase 系の抑制を介してこれらを抑制していることが示された。以上より、NF- κ B は c-FLIP のタンパクレベルを維持することにより ROS 産生や JNK の活性化を抑制していることが示された。

(17) カスパーゼの生体機能：アポトーシス非依存的な役割

嘉糠 洋陸, 倉永 英里奈, 三浦 正幸 (東京大学大学院・薬学系研究科・遺伝学教室)

カスパーゼ活性が細胞死ではなく細胞分化過程に関わるとの知見が蓄積してきている。カスパーゼ活性化因子

Apaf-1(Dapaf-1) の変異体において、ショウジョウバエ背部剛毛 (外感覚器) の増加が観察され、この領域のカス

パーゼ活性が剛毛の発生に関与することが考えられた。剛毛前駆細胞でカスパーゼ活性化インジケーター SCAT3 を発現させたところ、羽成虫原基での Scabrous 陽性細胞クラスターで弱いながらカスパーゼの活性化が検出された。羽成虫原基における死細胞を TUNEL 法で観察すると Scabrous 陽性細胞クラスターには殆どシグナルが観察されず、Scabrous 陽性細胞クラスター内でのカスパーゼ活性化は細胞死以外の機能を持つことが予想された。遺伝学的なスクリーニングによって剛毛の増加に

Wg シグナルの関与が示唆され、ほ乳類 GSK3 β ホモログである Shaggy アイソフォーム Sgg46 がカスパーゼによって切断・活性化することにより、外感覚器前駆細胞の数の調節に関与することが示された。カスパーゼは基質特異性の高いエンドペプチダーゼであり、活性化の度合いによって細胞死以外のシグナルを伝える分子の活性調節を行うことで、様々な生理機能に関わることが考えられる。

(18) 雄性外生殖器形成における細胞死シグナルの関与

倉永英里奈, 三浦正幸 (東京大学大学院・薬学系研究科・遺伝学教室)

我々はショウジョウバエをモデルとして細胞死のシグナル経路を解析してきたが、我々を含む複数のグループによって細胞死実行プロテアーゼであるカスパーゼ活性と雄性外生殖器の形態形成との相関が見出されてきた。ショウジョウバエの雄性外生殖器は、雄の体内で観察される直腸を 360 度取り囲むように配置される射精管の形態から、その形成時に回転することが発生の重要なステップとされているが、カスパーゼ阻害による雄性外生殖器の形成不全はこの段階における回転が不完全となってしまうと考えられた。本研究において我々は、蛹期における雄性生殖器の回転を *en-GAL4/UAS-mCD8-GFP* 系

統のハエを観察することでイメージングすることに成功した。生殖器の回転は、カスパーゼ阻害剤の p35 を発現させた系統 (*en-GAL4/UAS-mCD8-GFP UAS-p35*) で途中停止したことから、細胞死シグナルが雄性生殖器と内部後腸の正常配置の制御に関与している可能性が考えられた。今回、FRET を利用して作製したカスパーゼ活性化のインディケーター (SCAT) を雄性外生殖器形成のライブイメージングに導入し、回転時またはその前後において「いつ、どこで」細胞死シグナルの関与が見られるかを解析したので報告したい。

(19) 細胞縮小はアポトーシスに必要・十分条件か？

前野 恵美¹, 温井 美帆¹, 高橋 信之¹, 清水 貴浩¹, 沼田 朋大¹, 若林 繁夫², 岡田 泰伸¹

(¹生理学研究所・機能協働部門, ²循環器病センター研究所・循環分子生理部)

アポトーシス性容積減少 AVD は、チトクローム c 放出やカスパーゼ活性化, DNA ラダー, アポトーシス小体形成などに先立って発生し, KCl 流出によってもたらされる。K⁺チャネルや Cl⁻チャネルのブロッカー投与によって AVD の発生を阻止すると, アポトーシス刺激を与えても, アポトーシス性諸反応が全く見られなくなる。ところで, 多くの細胞は高浸透圧細胞外液中に置かれて容積減少が物理的に強いながらも, やがて元の容積近くにまで戻っていくという容積調節能 RVI を持っている。RVI を示す細

胞においては高浸透圧負荷のみによってアポトーシスが誘導されることはないが, RVI 能を欠く細胞においては高浸透圧負荷のみによってアポトーシス死が誘導される。RVI に関与する Na⁺/H⁺アンチポータ NHE1 を欠く変異線維芽細胞は RVI 能を失っており, 高浸透圧負荷によってアポトーシスがもたらされた。しかしながらこの細胞に NHE1 を強制発現させて RVI 能を復活させると, 高浸透圧負荷によるアポトーシスは見られなくなった。細胞外を Na⁺-free 液や低 Cl⁻液にすると, 等浸透圧条件であるにも

かかわらず細胞縮小が持続的に認められ、これによってアポトーシスも誘導されることが明らかとなった。従って、

細胞容積の減少の持続がアポトーシス誘導の必要・十分条件であることが示唆された。

(20) Bcl-2による種々の細胞死機構の制御

清水 重臣, 辻本 賀英 (大阪大学大学院・医学系研究科・遺伝子学教室, 科学技術振興機構)

オートファジー様(type II)細胞死は、アポトーシス(type I 細胞死)とは異なる範疇のプログラム細胞死である。アポトーシス制御分子である Bcl-2 ファミリー蛋白質のうち、Bax/Bak はミトコンドリアを経由するアポトーシスに不可欠であることが、Bax/Bak ダブルノックアウト(DKO)マウスの解析より明らかにされている。我々は、この Bax/Bak DKO マウス由来の embryonic fibroblast(MEF)を用いて、①エトポシドなどのアポトーシス誘導薬を投与すると、アポトーシスが観察されない代わりに、オートファジー様細胞死が誘導されること、②この細胞死は

Bcl-x_Lにより制御されていること、を見いだした。

今回、我々はこの細胞死の分子機構の詳細を解析し、(1)DKO MEF にエトポシドを投与しオートファジー様細胞死を誘導した際には、JNK の活性化が観察されること、(2)JNK 阻害剤や JNK ドミナントネガティブ遺伝子の導入により、この細胞死が緩和されること、(3)アミノ酸飢餓など、通常のオートファジーの際には JNK の活性化は見られないこと、を見出した。これらの事実より、オートファジー様細胞死の誘導には JNK の活性化が重要な因子であると考えている。

(21) 拮抗して細胞の運命を決定するストレス応答キナーゼ JNK, p38- MAPK

和田 悌司, 仁科 博史 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・発生再生生物学分野)

細胞は目まぐるしく変遷する環境変化(ストレス)の中でバランスをとりあい、増殖、分化、再生など多様な生理現象に対応している。バランスの破綻はときに、がん化、過剰な細胞死、早期老化を導くきっかけとなりうる。我々はストレス応答キナーゼ JNK 経路が、アポトーシスとは独立した機能として、細胞増殖亢進、がん化、老化抑止に寄与し、ストレス存在下における細胞のバランスを制御している可能性を明らかにした。一方、p38MAPK 経路は、JNK 経路と同じファミリーメンバー、遺伝子進化系譜に属することから、JNK 経路と類似した機能を持つことが考えられた。しかし、意外にも、

p38MAPK 経路は、JNK 経路とバランスを取り合う相手として細胞増殖停止、がん化抑制、老化促進に働き、さらに、JNK 経路抑制において見られた表現系をレスキューすることが明らかとなった。このことから、新たなる知見として、起源を同じくするストレスキナーゼ JNK, p38-MAPK は進化の過程で拮抗する機能を獲得し、お互いにバランスを取り合い、細胞増殖、がん化、細胞老化などの細胞の「運命」を決定するようになったと考えられる。本セミナーではさらに両者のバランスのメカニズムについても論議する。

(22) DNA 損傷によって誘導される SAPK/JNK 活性化の分子機構

仁科 博史¹, 北川 大樹², 浦 誠司², 根岸 崇大², 和田 悌司¹, 堅田 利明²

(¹東京医科歯科大学・難治疾患研究所・発生再生生物学分野,
²東京大学大学院・薬学系研究科・生理化学教室)

SAPK/JNK シグナル伝達系は様々なストレスに応答し, 細胞死, 細胞増殖, 細胞老化などの細胞の運命を制御する。受容体刺激など細胞膜を介する SAPK/JNK 活性化の分子機構に比べて, DNA 損傷によって誘導される核からのシグナル経路については未だ不明の点が多い。本研究では, DNA 損傷によって誘導される HeLa 細胞の SAPK/JNK 活性化に Daxx と癌抑制遺伝子産物 Ras Ras association domain family 1C (RASSF1C) が関与することを見出したので報告する。1) Daxx は promyelocytic leukaemia-nuclear bodies (PML-NBs) に局在し, DNA 損傷

によってユビキチン化され分解された。2) RASSF1C は Daxx と結合し, PML-NBs に共局在していた。3) RASSF1C は Daxx 分解に依存して, 核から細胞質に移行した。4) 核から放出された RASSF1C は細胞質の微小管と結合し, SAPK/JNK 活性化誘導やアポトーシス誘導に関与した。すなわち, 核内 PML-NBs に存在する Daxx-RASSF1C 複合体が DNA 損傷のセンサーとして機能し, RASSF1C の細胞質への放出を介して, SAPK/JNK 活性化誘導するという興味深い分子機構を見出した。

(23) ASK ファミリーによる細胞死とストレス応答の制御

一條 秀憲 (東京大学大学院・薬学系研究科・細胞情報学教室, CREST)

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。本研究では, 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学的役割について報告する。

7. 宿主防御機構としての上皮膜機能の調節因子

2006年1月30日－1月31日

代表・世話人：中張隆司（大阪医科大学 生理学）

所内対応者：岡田泰伸（自然科学研究機構 生理学研究所 機能協関部門）

- (1) 蝸牛内直流電位の発生に対する Ca^{2+} の役割
森禎章¹, 二村吉継², 乾崇樹², 竹中洋², 窪田隆裕¹
(¹大阪医科大学生理学教室, ²同耳鼻咽喉科学教室)
- (2) 胃粘膜修復におけるイオントランスポーターの役割
中村英志^{1,2,3}, 林周作¹, 遠藤拓也¹, 久保儀和¹, Susan J Hagen³, 竹内孝治
(京都薬科大学薬物治療学教室¹, 横浜市大大学院医学研究科臓器再生医学²
Dept. of Surgery, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School³)
- (3) 顎下腺腺房細胞における振動性 Cl^- 分泌の律速過程を支配する NKCC 活性
杉田 誠, 広野 力, 柴 芳樹 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科・
創生医科学専攻・病態探究医科学講座 (口腔生理学))
- (4) 高浸透圧条件下における上皮細胞の調節性細胞容積増大機構の解析
高橋信之, M.V.V. Subramanyam, 岡田泰伸 (自然科学研究機構 生理学研究所 機能協関部門)
- (5) 熱ショック応答と上皮系感覚器の維持
高木栄一, 藤本充章, 林田直樹, 井上幸江, 中井 彰
(山口大学大学院医学系研究科生体シグナル解析医学講座)
- (6) 食塩感受性高血圧症とアルドステロンによる上皮型ナトリウムチャンネル発現の異常制御
新里直美, 青井渉, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院 生理機能制御学)
- (7) 腎尿細管上皮細胞管腔側における有機アニオントランスポーターOATs 機能発現の分子基盤：
PDZ タンパク質の役割
安西尚彦¹, 遠藤 仁^{1,2} (¹杏林大学医学部薬理学教室, ²榊富士バイオメディックス)
- (8) Proteinase-activated receptor-1 活性化ペプチドのマウス盲腸壁内神経活性化
鈴木裕一, 池原修 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)
- (9) *Helicobacter pylori* 菌体毒素 CagA による胃粘膜上皮内活性酸素産生
半田修¹, 内藤裕二², 石井剛志³, 高木智久¹, 古倉聡¹, 吉田憲正⁴, 吉川敏一³
(京都府立医科大学生体安全医学講座¹, 生体機能分析医学講座²,
京都府立医科大学大学院生体機能制御学³, 大学院消化器病態制御学⁴)
- (10) モルモット胃幽門腺粘膜における COX-1 と COX-2 の役割：プロスタグランジン E_2 (PGE_2) 放出
中張隆司 (大阪医科大学 生理学教室)
- (11) アラキドン酸カスケードの制御によるがん予防
西野輔翼 (京都府立医科大学大学院・医学研究科・分子生化学)
- (12) 炎症組織特異的な脱抱合酵素誘導について
大井直美, 橋本堂史, 後藤美保, 金沢和樹 (神戸大学大学院・自然科学研究科)
- (13) 骨シアラタンパク質遺伝子の発現に対するケルセチンの影響
金 東淳, 小方 頼昌 (日本大学松戸歯学部歯周治療学講座)
- (14) ヒト小腸 Caco-2 細胞への吸収代謝におけるフラボノイドの構造特異性
室田佳恵子, 吉田修治, 清水寿美恵, 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)

【参加者名】

岡田 泰伸 (生理学研究所 機能協関), 清水 貴浩 (生理学研究所 機能協関), 浦本 裕美 (生理学研究所 機能協関), 高橋 信之 (生理学研究所 機能協関), 井上華 (生理学研究所 機能協関), Dutta Amal Kumar (生理学研究所 機能協関), Elbert Lan Lee (生理学研究所 機能協関), 沼田 朋大 (生理学研究所 機能協関), 温井美帆 (生理学研究所 機能協関), Abduqodir Toychiev (生理学研究所 機能協関), 劉 洪涛 (生理学研究所 機能協関), 王 海燕 (生理学研究所 機能協関), 孫 新 (生理学研究所 機能協関), 丸中 良典 (京都府立医科大学), 新里 直美 (京都府立医科大学), 宮崎 裕明 (京都府立医科大学), 西野 輔翼 (京都府立医科大学), 半田 修 (京都府立医科大学), 金沢 和樹 (神戸大学 農

学部), 大井 直美 (神戸大学 大学院自然科学研究科), 後藤 美保 (神戸大学 大学院自然科学研究科), 中井彰 (山口大学医学部), 中村 英志 (横浜市大大学院医学研究科臓器再生医学), 小方 頼昌 (日本大学松戸歯学部歯周治療学), 金 東淳 (日本大学松戸歯学部歯周治療学), 杉田 誠 (広島大学医学部 口腔生理学), 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), 鈴木 裕一 (静岡県立大学), 林 久由 (静岡県立大学), 遠藤 仁 (杏林大学 医学部), 安西 尚彦 (杏林大学医学部), 窪田 隆裕 (大阪医科大学 医学部), 森禎章 (大阪医科大学 医学部), 中張 隆司 (大阪医科大学 医学部)

【概要】

上皮膜輸送と生理活性物質の研究者間の研究成果交換の場として, 平成18年1月30-31日に研究会「宿主防御機構としての上皮膜機能の調節因子」を開催した。最初のセッションで, 蝸牛内リンパ腔の電位(+80 mV)維持に Ca^{2+} channels 活性が関わること, 胃粘膜修復が monocarboxylate transporter (DIDS-sensitive)の活性により制御されていること, 顎下腺線房細胞における Cl^- 分泌の律速課程が NKCC の活性にあること, 高浸透圧下における調節性細胞容積増大機構の解析から細胞容積減少により Akt の活性化が明らかとなり, アポトシースと細胞容積の関係の解明につながるなどが明らかにされた。第二のセッションでは, 熱ショック応答に関わる転写因子(HSF1)の活性が鼻粘膜嗅覚上皮の維持に必須であること, アルドステロンによる ENaC の発現異常が食塩感受性高血圧症の発症原因の一つであること, 腎臓

尿細管における有機アニオントランスポーターの分子複合体が一つの機能ユニットとして働いていること等が明らかとなった。第三のセッションでは, 上皮膜機能に関わるプロテアーゼリセプター, ヘリコバクターピロリ菌の CagA, プロスタグランジン産生酵素 COX1, COX2 の役割などが議論された。最後のセッションでは天然イソフラボンの一種であるイソクイリチゲンの発ガン予防効果, 抗酸化能, 抗炎症活性を持つフラボノイドが炎症部位において特異的に活性化され抗酸化能, 抗炎症活性を発揮する可能性があること, ケルセチンが骨シアロタンパク質の発現を制御していること, フラボノイド吸収における構造特異性があること等が明らかにされた。生体防御の最前線に位置する上皮膜の機能とそれを制御する内因性, 外因性生理活性物質についての有意義な議論がなされた。

(1) 蝸牛内直流電位の発生に対する Ca^{2+} の役割

森 禎章¹, 二村吉継², 乾 崇樹², 竹中 洋², 窪田隆裕¹
(¹大阪医科大学生理学教室, ²同耳鼻咽喉科学教室)

【目的】蝸牛内リンパ腔の約+80mVの電位(EP)は血管条上皮細胞で作られており, 音の振動を電気変換する際に重要な役割を果たしている。本研究では Ca^{2+} キレート剤, Ca^{2+} チャネル阻害剤および賦活剤を用いて, EPの発生に

対する Ca^{2+} の役割を検討した。

【方法】動物はモルモットを使用した。イオン選択性電極と KCl 電極を用いて, 内リンパ腔または外リンパ腔に薬剤を投与した時の EP と内リンパ液 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}]_i$)を測

定した。

【結果】一過性の無呼吸負荷や CO₂-free 溶液の外リンパ灌流にて、EP 低下と([Ca]_i)の上昇が認められた。EGTA-AM(300 μM) 溶液や Ca²⁺チャネル阻害剤のニフェジピン (10 μg/ml) を内リンパ腔に投与すると EP は軽度上昇し、一過性無呼吸負荷による EP の低下は 40-60%抑制された。逆に、高濃度の EGTA-AM(~1 mM) 投与では EP は低下した。さらに、Ca²⁺

チャネル賦活剤の Bay K 8644 (10 μM) を内リンパ腔に投与すると緩やかに EP が低下した。一方、EGTA-AM やニフェジピンの外リンパ腔投与では、一過性無呼吸負荷による EP 低下は抑制されなかった。

【結論】EP の形成と維持には、内リンパ腔に面した細胞の細胞内 Ca²⁺濃度を適切に保つことが重要である。

(2) 胃粘膜修復におけるイオントランスポーターの役割

中村英志^{1,2,3}, 林 周作¹, 遠藤拓也¹, 久保儀和¹, Susan J Hagen³, 竹内孝治
(京都薬科大学薬物治療学教室¹
横浜市大大学院医学研究科臓器再生医学²
Dept. of Surgery, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School³)

【目的】胃粘膜傷害の修復過程において、上皮細胞の遊走は重要であるが、この遊走を制御するイオントランスポーターの詳細については不明である。そこで関与するイオントランスポーターについて薬理的に解析した。

【方法】ラット胃上皮細胞株 RGM1 をプレートにシードし、コンフルエントになった各 well の中央に円形の損傷を作製し、0, 4 および 8 時間後における損傷面積の変化を測定した。また、RT-PCR 法により、イオントランスポーターの mRNA 発現を検討した。

【結果】生理的バッファー条件下において、RGM1 に惹起した損傷面積は経時的に縮小した。Monocarboxylate transporter (MCT) の阻害薬である phloretin (30-100 μM)、並びに DIDS (10-300 μM) は損傷面積の縮小を濃度依存的に抑制した。RGM1 は MCT サブタイプの中でも MCT1 を強く発現していた。

【結論】損傷の修復過程における胃粘膜上皮細胞の遊走には MCT1 が大きく関与していることが示唆された。

(3) 顎下腺腺房細胞における振動性 Cl⁻分泌の律速過程を支配する NKCC 活性

杉田 誠, 広野 力, 柴 芳樹
(広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座)

顎下腺腺房細胞では副交感神経刺激により細胞内 Ca²⁺濃度が上昇し、水分分泌が引き起こされる。基底側方膜に存在する Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体や Cl⁻-HCO₃⁻交換体により、細胞内に輸送された Cl⁻が Ca²⁺依存性 Cl⁻チャネルを介して腺腔側に分泌されることがその水分分泌の引き金となる。しかし、Cl⁻分泌量を決定するのは腺腔側の Cl⁻チャネル活性であるのか、Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体や Cl⁻-HCO₃⁻交換体の活性であるか不明である。本研究ではグラミシジン穿孔パッチクランプ法を適用し、Ca²⁺依存性の Cl⁻分泌の律速過程を支配する分子活性を明らかにすることを目的とする。グラミシジン穿孔パッチクランプ法では、

細胞内の Cl⁻を含むアニオン濃度は、細胞膜に発現するチャネルおよび輸送体により調節され、生理的組成に近い状態で維持される。顎下腺腺房細胞において、グラミシジン穿孔パッチクランプ法により観察される Ca²⁺依存性の振動性 Cl⁻電流は、Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体の阻害剤である Bumetanide により顕著に抑制された。また Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体活性を増強する Genistein は Ca²⁺依存性 Cl⁻電流量を増大させた。顎下腺腺房細胞では、Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体活性が副交感神経性刺激による Ca²⁺依存性の振動性 Cl⁻分泌の律速過程を支配することが示唆された。

(4) 高浸透圧条件下における上皮細胞の調節性細胞容積増大機構の解析

高橋信之, M.V.V. Subramanyam, 岡田泰伸 (自然科学研究機構 生理学研究所 機能協関部門)

上皮細胞は、様々な細胞外高浸透圧ストレスにさらされている。それにも関わらず、それらは常にほぼ一定の細胞容積を維持している。これは、細胞外高浸透圧条件下での容積縮小後に、NaCl 取込とそれに伴う水の流入による調節性細胞容積増大 (regulatory volume increase: RVI) と呼ばれる容積調節能を上皮細胞が持っていることによる。そこで「細胞外高浸透圧刺激がどのようにして RVI が起こるのか」を明らかにする目的で次のような実験を行った。ヒト上皮 HeLa 細胞には様々なイオントランスポーターが発現しているが、高浸透圧条件下における RVI は、 Na^+/H^+ exchanger (NHE) の阻害剤および $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (anion exchanger: AE) の阻害剤によって阻害された。他のトランスポーター阻害剤では抑制が見られな

かったため、HeLa 細胞の RVI は NHE と AE が関与する NaCl の取込によるものと考えられた。Amiloride と DIDS の共添加で HeLa 細胞の RVI はほぼ完全に抑制され、その結果、細胞縮小が長時間持続されれば、さらにカスパーゼ 3 の活性化が検出され、アポトーシスが誘導された。RVI 誘導のシグナル伝達系を解析する目的で各種リン酸化酵素阻害剤を添加したところ、Akt (PKB) の阻害剤で RVI が抑制された。高浸透圧条件下で Akt はリン酸化されており、活性化されていることから、HeLa 細胞での RVI は、高浸透圧条件により活性化された Akt が NHE/AE を介した NaCl 取込を促進させて達成されることが示唆された。

(5) 熱ショック応答と上皮系感覚器の維持

高木栄一, 藤本充章, 林田直樹, 井上幸江, 中井 彰
(山口大学大学院医学系研究科生体シグナル解析医学講座)

熱ショック転写因子群 (HSFs) は、一群の熱ショック蛋白質の発現を制御する転写因子群である。動物細胞は HSF1, HSF2, そして HSF4 の少なくとも 3 つの HSF 遺伝子産物を発現している。これまでに、熱ショック応答に必須の HSF1, そして HSF2 がともに生殖臓器の形成や脳形成に必須であることが明らかにされているが、その分子機構がストレスと関連したものであるのかについてまったく明らかにされていない。我々は、HSF1 と HSF4 の遺伝子欠損マウスを作成し、それらの個体レベルでの生理機能を明らかにしてきた。HSF4 遺伝子欠損マウスの解析から、HSF4 はレンズの維持に必須であり、発生時期特異的に分子シャペロンの発現誘導と維持、ならびに

レンズ上皮細胞の増殖と分化を制御することが明らかになった。さらに、上皮系感覚臓器を調べたところ、HSF1 が嗅神経上皮の維持に必須であることがわかった。やはり、HSF1 は発生時期特異的に分子シャペロンの発現を誘導し、同時に細胞の増殖分化因子を制御していた。感覚器のなかでもレンズと嗅上皮は発生学的に密接に関連している。これらの研究により、熱ショック転写因子群が、上皮細胞から形成されるプラコードに由来する 2 つの感覚器の形成に関与していること、そしてそれらの器官の維持がストレスと関連したものであることが明らかとなった。

(6) 食塩感受性高血圧症とアルドステロンによる上皮型ナトリウムチャネル発現の異常制御

新里直美, 青井涉, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院 生理機能制御学)

正常人では、高食塩食を摂取してもアルドステロンの分泌を抑制してナトリウムを排泄し、高血圧症を引き起

こさないよう恒常性が維持されている。この恒常性維持には、腎臓の遠位尿細管/皮質集合管での上皮型ナトリウ

ムチャンネル(ENaC)を介するナトリウム再吸収が重要な役割を担っていることが知られている。しかし、食塩感受性高血圧症患者では、このような恒常性維持が破綻し、血圧が上昇すると考えられる。このメカニズムを解明するために、食塩感受性高血圧症モデル動物の Dahl salt-sensitive (DS)と Dahl salt-resistant (DR)ラットを用いてアルドステロンによる ENaC の発現制御について検討した。ラットは副腎を摘出した後に、アルドステロンを

腹腔内に注入し、6 時間後に腎臓を摘出して ENaC の発現やその発現制御に関わる因子の活性を測定した。その結果、DS ラットにおいて ENaC の alpha サブユニットはアルドステロンの増大に伴って発現が増大したが、beta と gamma サブユニットは発現が減少し、血漿アルドステロン濃度と逆相関した。以上のことから、アルドステロンによる ENaC の発現制御異常が食塩感受性高血圧症発症の一因であることが示唆された。

(7) 腎尿細管上皮細胞管腔側における有機アニオントランスポーター-OATs 機能発現の分子基盤： PDZ タンパク質の役割

安西尚彦¹, 遠藤 仁^{1,2} (¹杏林大学医学部薬理学教室, ²榎富士バイオメディックス)

SLC22 に分類される有機アニオントランスポーター OATs は主として腎尿細管に存在し、薬物や毒素などの生体異物の解毒・排泄に関与するだけでなく、ラジカルスカベンジャー作用を持つ尿酸などの内因性物質の再吸収等を介して生体の防御に重要な役割を果たしている。近年腎尿細管上皮細胞頂上膜(管腔側)に存在するトランスポーターは、その細胞内 C 末端の PDZ モチーフを介し、NHERF family と呼ばれるタンパク質と結合して、PDZ ネットワーク上に存在し、機能を発現させることが報告されている(Anzai et al., *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005)。我々の同定した OATs である尿酸トランスポータ

ーURAT1 及び有機アニオントランスポーターOAT4 も、酵母ツーハイブリッド法を用いた解析により、PDZ タンパク質と結合することが明らかになり、その結合が細胞膜上発現を安定化・増加させ、輸送活性の増加につながることを報告した(Anzai et al., *J Biol Chem*, 2004; Miyazaki et al., *J Am Soc Nephrol*, 2005)。その後有機アニオン輸送に関与する他の分子も PDZ タンパク質と結合することが明らかになり、PDZ ネットワークを介して形成された分子複合体が一機能ユニットとして腎臓における有機アニオン輸送に関与するという可能性が示唆された。

(8) Proteinase-activated receptor-1 活性化ペプチドのマウス盲腸壁内神経活性化

鈴木裕一, 池原修 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)

Proteinase-activated receptor(PAR)は生体に広く分布し、様々な protease により活性化され、炎症反応を始め多くの生体調節にかかわっている。PAR はタイプ 1 から 4 まで知られているが、本研究はタイプ 1 の PAR を活性化すペプチド、PAR1-AP を用い、マウス盲腸粘膜下神経に対する効果を検討した。Ussing chamber を用い短絡電流 (Isc)測定を行ったところ、PAR1-AP の漿膜側投与は TTX 感受性の Isc の上昇を引き起こした。この上昇に対する阻害剤の効果を検討した結果、粘膜下神経に PAR1 受容

体が存在し、その活性化により主として tachykinergic neuron を介した CI 分泌が引き起こされること、また cholinergic neuron も一部関与すること、さらに、ヒスタミン、アラキドン酸カスケードの活性化も起こすこと、が示唆された。PAR1 は thrombin で活性化されることが知られているので、この効果は腸組織の炎症反応(血漿成分の浸出)に伴う腸液分泌亢進反応に関与していると考えられる。

(9) *Helicobacter pylori* 菌体毒素 CagA による胃粘膜上皮内活性酸素産生

半田 修¹, 内藤裕二², 石井剛志³, 高木智久¹, 古倉 聡¹, 吉田憲正⁴, 吉川敏一³
(京都府立医科大学 生体安全医学講座¹, 生体機能分析医学講座²,
京都府立医科大学 大学院生体機能制御学³, 大学院消化器病態制御学⁴)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 特に CagA 陽性菌株の感染は萎縮性胃炎や胃癌の危険因子である。しかし CagA による胃粘膜上皮細胞応答に関しては未だ不明な点が多い。今回我々は CagA が胃上皮細胞の活性酸素産生に及ぼす影響について *in vitro* で検討をおこなった。ラット胃粘膜上皮由来の RGM1 細胞に *cagA* 遺伝子をテトラサイクリン制御下 (Tet-off system) に発現させ、細胞内 CagA 発現、活性酸素産生、NFκB 活性化などにつき検討を行

った。Non-transfected RGM1 と Mock では Tetracyclin の有無にかかわらず CagA 発現は認めず、活性酸素産生、NFκB 活性化も認めなかった。CagA transfected RGM1 では Tet-off により CagA 発現を認め、活性酸素産生、NFκB 活性化を認めた。蛍光色素を用いた検討では CagA の発現により主にミトコンドリアから活性酸素産生がおこっていることが推測された。

(10) モルモット胃幽門腺粘膜における COX-1 と COX-2 の役割：プロスタグランジン E₂ (PGE₂) 放出

中張隆司 (大阪医科大学 生理学教室)

モルモット胃幽門腺粘膜におけるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 放出について検討した。胃幽門腺粘膜は非刺激時に PGE₂ を放出していた (基礎放出)。Acetylcholine (ACh) はこの PGE₂ 放出を [Ca²⁺]_i の上昇を介して約3倍に増加させた (ACh 刺激性放出)。PGE₂ 放出はアラキドン酸により増加し、PLA₂ 阻害剤、COX 阻害剤 (aspirin and indomethacin) により抑制された。COX-1 阻害剤 (SC560, 100nM) は基礎 PGE₂ 放出は抑制しなかったが、ACh 刺激性 PGE₂ 放出は抑制した。反対に COX-2 阻害剤 (NS398, 20 μM) は基礎 PGE₂ 放出を抑制したが、ACh 刺激性 PGE₂

放出は抑制しなかった。さらに単離幽門上皮細胞では COX-1 阻害剤のみが PGE₂ 放出を阻害し、COX-2 阻害剤による抑制は認められなかった。これらの結果は基礎 PGE₂ 放出は間質細胞の COX-2 により維持されており、ACh 刺激性 PGE₂ 放出は粘膜上皮細胞の COX-1 により維持されていることを示している。本研究の結果から、胃幽門腺粘膜では、間質細胞の COX-2 により産生された PGE₂ により粘膜の恒常性が維持され、上皮細胞の COX-1 により産生された PGE₂ により粘膜分泌の autocrine mechanism が維持されていることが明らかになった。

(11) アラキドン酸カスケードの制御によるがん予防

西野輔翼 (京都府立医科大学 大学院・医学研究科・分子生化学)

宿主防御機構として上皮膜のリン脂質から供給されるアラキドン酸の代謝産物が重要な役割を果たしているが、その過剰産生は逆にがん等の疾患の原因となることが明らかとなっている。そこで、アラキドン酸カスケードを進行させるホスホリパーゼ A2 (PLaseA2), シクロオ

キシゲナーゼ (COX), リポキシゲナーゼ (LOX) 等の過剰亢進を抑制することによってがん予防を行う戦略が提案され、多彩な研究が進められてきた。

たとえば、大腸発がん過程においては、COX が重要な役割を果たしていることが知られている。そして COX

阻害作用を示すアスピリン投与によって大腸がんの発生が抑制されることを示唆する結果がヒトを対象とした研究によって得られたことをきっかけとして、実用化へ向けた試みが展開されるようになった。現時点では合成薬剤を用いた研究が先行しているが、天然化合物の応用も今後の課題である。そこで、甘草やラッキョウなどに含まれている天然フラボノイドの一種であるイソリクイリチゲニン（抗炎症作用を示し、皮膚発がんを抑制することが以前に報告されていることに加えて、最近になって

前立腺がんの増殖抑制効果を示すことも明らかとなっている）を取り上げて検討した。その結果、アゾキシメタン(AOM)で誘導される大腸前がん病変および大腸がんの発生が抑制され、また誘導型 COX(COX-2)の発現亢進が抑制されることも明らかとなった。

イソリクイリチゲニンは肺発がんを抑制することも確認しているため、がん予防に極めて有望な天然化合物と考えられる。

(12) 炎症組織特異的な脱抱合酵素誘導について

大井直美, 橋本堂史, 後藤美保, 金沢和樹 (神戸大学大学院・自然科学研究科)

フラボノイドは抗酸化能や抗炎症活性などを有すると報告されているが、生体内ではその水酸基の一部がグルクロン酸あるいは硫酸抱合された形態で血流を循環している。抱合体は体細胞内には取込まれず、タンパク質にも作用しないので、生理活性はない。しかし下位らの報告によると、リポポリサッカライドなどで炎症を誘発した場合に、脱抱合酵素のβ-グルクロナダーゼ活性が上昇する。したがって、生体異物であるフラボノイドは、生体が健全な場合は生理活性を示さない抱合体として循環して尿に排泄されるが、炎症組織が存在すると脱抱合されてその炎症修復に機能する可能性が高いと考えられる。本報告では、これを証明するために、ラットにジエチルニトロソアミンとフェノバルビタールで肝臓特異的に前がん病変を誘導し、β-グルクロナダーゼ活性と、フ

ラボノイドの脱抱合を測定した。β-グルクロナダーゼ活性は、前がん病変を誘導した肝臓で特異的に、対照群の 452.3 ± 31.7 nmol/mg protein/h から 624.3 ± 97.0 nmol に有意に上昇していた。この活性上昇は、腎、心、脾臓、胸腺、血漿など他の臓組織では観察されなかった。また、肝臓では、ケルセチンの抱合体量が減少し、アグリコン量が対照群の 69.9 ± 8.1 nmols/g から、前がん病変群 149.5 ± 60.5 nmols/g に有意に増加していた。一方、前がん病変誘導と同時にケルセチンを連続経口投与したときには、GST-P 陽性細胞巢の発生数が 75% に抑制された。前がん病変形成組織は特異的にβ-グルクロナダーゼ活性を上昇させ、血中のケルセチン抱合体を脱抱合して病変組織にアグリコンとして取込んでいると考えられた。

(13) 骨シアロタンパク質遺伝子の発現に対するケルセチンの影響

金 東淳, 小方 頼昌 (日本大学松戸歯学部歯周治療学講座)

骨シアロタンパク質(BSP)は石灰化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、初期の石灰化における役割が注目されている。ケルセチンはフラボノイドの 1 種で、骨代謝に対する効果が報告されているが、その機序は明らかではない。そこで今回我々は、BSP の転写に対するケルセチンの効果に関して検索を行った。

ラット骨芽細胞様細胞(ROS17/2. 8)に $5 \mu\text{M}$ のケルセチンを作用させ、BSP mRNA 発現に対する影響をノーザンブロット法にて検索を行った結果、12 時間刺激後に BSP mRNA 量は増加した。BSP プロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドを上記細胞に導入し、BSP の転写活性に対するケルセチンの効果を検索した結果、転写開始点よりも-116塩基対上流までの BSP プロモーター

配列を含むコンストラクトにおいて、転写活性の上昇が認められた。プロモーター配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した結果、cAMP 応答配列、FGF2 応答配列およびホメオボックス応答配列へ

の核内タンパク質の結合量がケルセチン刺激後に上昇した。以上の結果は、以前に我々が報告したイソフラボンの結果と異なることから、その差異に関して今後検討の予定である。

(14) ヒト小腸 Caco-2細胞への吸収代謝におけるフラボノイドの構造特異性

室田佳恵子, 吉田修治, 清水寿美恵, 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)

植物性食品中に広く存在するフラボノイドは主に小腸において吸収され、腸管細胞内で解毒代謝を受けグルクロン酸/硫酸抱合体として体内へと輸送される。本研究では、ヒト結腸ガン由来ながら小腸吸収細胞のモデルとして汎用されている Caco-2 細胞を用いて、異なる構造をもつフラボノイドの腸管吸収と代謝を比較し、その構造の違いによる特性について検討した。

代表的なフラボノール型フラボノイドであるケルセチンは、Caco-2 細胞内でグルクロン酸/硫酸抱合化やメチル化を受けた代謝物として刷子縁側から排出される一方で、基底膜側への輸送、すなわち吸収がおこる。この特徴はフラボン/フラボノール型の分子種に共通してみら

れたが、イソフラボノイドでは細胞内代謝を受けていないアグリコンが基底膜側へ輸送される割合が高かった。そこで、フラボノイド類とイソフラボノイド類を同時に細胞に添加し、吸収代謝に与える影響を調べたところ、フラボノイドの共存によりイソフラボノイドアグリコンの吸収量が増加した。またフラボノイド同士の同時添加は総吸収量を増加させる一方、イソフラボノイド同士の同時添加は代謝物生成を抑制しアグリコンの吸収量を増加させることが示唆された。

以上の結果より、Caco-2 細胞内の第二相解毒酵素群はイソフラボノイド型分子よりフラボノイド型分子を好んで代謝することが推定された。

8. 視知覚への多角的アプローチ—生理, 心理物理, 計算論 2

2005年6月23日—6月24日

代表・世話人：塩入 諭（東北大学）

所内対応者：小松 英彦（生理学研究所）

- (1) 視覚長期記憶の神経機構：大脳側頭葉における双方向情報処理
納家 勇治（東京大学医学系研究科）
- (2) 視覚野における網膜位置依存的表現と視覚的運動
蘆田 宏（京都大学大学院文学研究科）
- (3) サッカーによる対象の運動知覚
伊藤 裕之（九州大学大学院芸術工学研究院）
- (4) 色の恒常性の臨界期
杉田 陽一（産業技術総合研究所脳神経情報研究部門）
- (5) 周期的同期発火による視覚情報のコーディング
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）
- (6) 周辺視における色の見えとその応用
阿山 みよし（宇都宮大学大学院工学研究科）
- (7) テクスチャ知覚の心理物理学：弁別機構から質感知覚まで
本吉 勇（NTTコミュニケーション基礎研究所）
- (8) A conundrum of stereoscopic mechanism
藤田 一郎（大阪大学大学院生命機能研究科）
- (9) 知覚的フィリングインが示すさまざまな性質
阪口 豊（電気通信大学大学院情報システム学研究科）
- (10) 色カテゴリー課題と色弁別課題遂行中のサルTE野細胞の色応答比較
鯉田 孝和（生理学研究所感覚認知情報研究部門）
- (11) 脳損傷に伴う視覚選択のトップダウン・コントロールの障害
熊田 孝恒（産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門）
- (12) 初期視覚系における刺激特徴依存的な反応特性の変化：視床—皮質間結合の見直し
佐藤 宏道（大阪大学大学院医学系研究科認知行動科学）
- (13) 網膜疾患に起因する大脳視覚野の再構築は起こりうるか
仲泊 聡（神奈川県リハビリテーション病院・東京慈恵会医科大学眼科学講座）
- (14) 道順のコーディング：内側頭頂葉ニューロンの機能
泰羅 雅登（日本大学 大学院総合科学研究科・医学部先端医学）

【参加者名】

塩入 諭（東北大電気通信研究所），納家 勇治（東大医学系研究科），蘆田 宏（京大院），伊藤 裕之（九大院），杉田 陽一（産総研），立花 政夫（東大院），阿山 みよし（宇都宮大院），本吉 勇（NTT-CS研），藤田 一郎（阪大院），阪口 豊（電通大院），鯉田 孝和（生理研），熊田 孝恒（産総研），佐藤 宏道（阪大

院），仲泊 聡（神奈川県リハビリテーション病院・東京慈恵医大），泰羅 雅登（日大院），鶴飼 一彦（早稲田大），鄭 美紅（早稲田大），久世 淳子（日本福祉大），内川 恵二（東工大院），谷藤 学（理研），酒井 宏（筑波大院），松宮 一道（東北大），高橋 良香（千葉大），遠山 和也（東京工科大），則武（東京工科大），佐藤 雅

之(北九州市立大), 庄司 将章(東工大院), 永井 岳大(東工大院), 福屋 貴之(東京工業大学大学院), 河原 勇美(東工大院), 篠森 敬三(高知工科大), 平山 正治(高知工科大), 則武 厚(玉川大), 田中 靖人(情報通信研究機構), 尾崎 統(統計数理研究所), 石黒 真木夫(統数研), 福島 邦彦(東京工科大), 田村 義保(統数研), 天野 薫(東大院), 西田 真也(NTT-CS研), 秋光 淳生(東大院), 青山 俊弘(鈴鹿高専), 小泉 京平(豊橋技科大), 深田 斉秀(基生研), 田村 弘(阪大), 西村 悠(筑波大), 渡辺 辰巳(松下電器産業), 小竹 康代(阪大), 館 俊太(阪大), 中野 美和(阪大), 藤井 正樹(中京大院), 塚 浩之(理研-BSI), 大森 敏明(JST・理研), 竹松 慎之(中京大), 武田 二郎(東工大), 森井 政仁(東工大), 西澤 孝史(東工大), 池田 琢朗(玉川大), 伊佐 正(生理研), 野口 泰基(生理研), 橘 吉寿(生理研), 浦川 智和(生理研), 村越 一支(豊橋技科大), 鈴木 一隆(浜松ホトニクス), 観音 隆幸(豊橋技科大), 豊田 敏裕(豊橋技科大), 打尾 健太(豊橋技科大), 谷川 久(理研), 赤塚 浩二(本田技術研究所), 鈴木 亮子(基生研),

佐藤 俊治(東北福祉大), 藤澤 圭祐(宇都宮大院), 池添 貢司(阪大), ウーハオジャン(阪大), 鬢櫛 一夫(中京大), 高瀬 慎二(中京大院), 岡田 真人(東大), 高橋 伸子(愛知淑徳大), 瀬川 かおり(東工大), 鳴海 翔太(東工大), 吉田 正俊(生理研), 高平 小百合(玉川大), 宮崎 貴浩(群馬病院), 森戸 勇介(総研大), 田邊 宏樹(生理研), 稲垣 幸一郎(中部大), 吉川 明昌(中部大), 田中 絵実(生理研), 田内 雅規(岡山県立大), 木村 智斉(中京大), 神作 憲司(生理研), 鳥山 直幹(中部大), 吉山 顕次(国立長寿医療センター), 和坂 俊昭(生理研), 内山 仁志(生理研), 八木 哲也(阪大), 齋藤 大輔(生理研), 平山 幸人(中部大), 吉田 光平(中部大), 太田 顕広(中部大), 石垣 賢司(中部大), 稲熊 徳明(中部大), 犬飼 明恵(中京大), 一平 紀孝(理研), 本田 哲夫(生理研), 酒井 朋子(統数研), 小松 英彦(生理研), 伊藤 南(生理研), 小川 正(生理研), 郷田 直一(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), 原田 卓弥(生理研)

【概要】

生理学研究所研究会, 「視覚への多角的アプローチー生理, 心理物理, 計算論2」は, 平成17年6月23日, 24日に岡崎コンファレンスセンターにおいて開催された。参加者は前回は20名程度上回る120名近くに達したが, 前回より広い会場での実施であり, 参加者に不便をかける事なく進行することができた。参加者は多分野にわたる大学院生を含む若手の研究者が多く, 学際領域としての将来性が期待できる。23日には8件の講演と懇親

会, 24日は6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, 電気生理, 脳活動記録, 心理物理, 計算論などで複数の領域に関連するものが多く, 学際性の豊かなものがほとんどであった。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ことに疑いはない。

(1) 視覚長期記憶の神経機構：大脳側頭葉における双方向情報処理

納家 勇治 (東京大学医学系研究科)

視覚長期記憶の貯蔵庫と考えられるサル下部側頭葉皮質はTE野と傍嗅皮質の細胞構築学的に異なる2つの領域から構成されている。これらのうち, 視覚新皮質に属するTE野は物体視覚を処理する視覚腹側路の最終段階に位置し, 一方, 辺縁皮質に属する傍嗅皮質は内側側頭葉記憶システムの構成要素とされてきた。我々は対連合記憶課題遂行中のサル下部側頭葉からこれら2つのサブ

領域を区別して単一ニューロンの活動を記録し, 手がかり刺激に対する視覚応答と遅延期間活動について領域間での比較を行った。その結果, TE野から傍嗅皮質へ前向きにシグナルが伝達される際, 手がかり刺激の組み合わせに関する情報が急激に増大する一方, 傍嗅皮質からTE野への逆向きシグナル伝達は想起された情報の伝播に関与していることが示唆された。

(2) 視覚野における網膜位置依存的表現と視覚的運動

蘆田 宏 (京都大学大学院文学研究科)

一般に視覚対象は動きの方向にずれて見える。これは視覚情報処理などにおける時間的遅れを補うためかもしれない。ヒトの fMRI 実験では、一次視覚野において賦活位置が動きと逆方向にずれるという不可解な報告がある(Whitney et al, 2003, Science)が、この研究には実験デザインや間接的な解析などの問題があり、解釈に疑問が残る。本研究では、fMRI を用いて、動きを伴う視覚刺激の視覚野における表現を再検討した。ドリフトする同心円

状正弦波への応答を偏心度マップと重ねることにより、活動量を偏心度の関数として表現したところ、V3 まででは運動による位置のずれはほとんど見られず、後ろの縁で活動量が増す傾向のみが示された。つまり、Whitney らの測定結果は支持しうるが、逆方向へのずれという解釈は支持できない。なお、網膜位置マップが不明瞭な高次視覚野では他の方法が必要となる。現在、V5 で正方向へのずれを示唆する予備的な結果が得られている。

(3) サッカーによる対象の運動知覚

伊藤 裕之 (九州大学大学院芸術工学研究院)

サッカー時には網膜像が急速に移動するにもかかわらず、通常外界の運動は知覚されない。しかし、暗い場所で発光する対象などは、高コントラストでしかもサッカー後にマスクする像が欠如しており、容易にサッカーを対象の動きとして認識できる。今回は、逆に低輝度コントラストにおいて対象の動きが知覚される例を報告し、そのメカニズムを考察する。等輝度の色定義パターンは、サッカー時に動いて見えるが、輝度差があるパ

タンでは動きが見えない。輝度コントラストをもつ輪郭を同色相で重ねると色定義パタンの動きは見えなくなるが、無関連なパターンを重ねても色定義パタンの動きは見える。これらのことから、高速な色定義運動はサッカー時に抑制されずに知覚されるが、輝度と色でエッジの相関がある場合は、色の運動知覚まで抑制されることがわかる。

(4) 色の恒常性の臨界期

杉田 陽一 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門)

生後間もないサルを 1 年間単色光照明だけで飼育した後に、色彩感覚を検査した。単色光照明で育ったサルは、見本の色と同じ色の対象物を選ぶという見本合わせの課題では、長い訓練によって正常なサルと同じ成績が得られるようになったが、見本の色によく似た対象物を選ぶという類似性判断の課題では、正常なサルとは極めて異

なった結果が得られた。この結果は、単色光サルが、正常サルとは異質な方法で色を分類していることを示している。さらに、いくつかの色の中から一つの色を選択するという課題の結果は、照明条件によって大きく変化し、単色光サルに「色の恒常性」が備わっていないことが明らかになった。

(5) 周期的同期発火による視覚情報のコーディング

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)

光情報は、網膜内で緩電位によって処理された後、神経節細胞の軸索(視神経)を伝導するスパイクによって視覚中枢に運ばれる。しかし、スパイク列には発火頻度・発火数・発火のタイミング・同期的発火や周期的発火など様々なパラメータが考えられるため、どれが視覚情報を符号化するのに使われているのかは必ずしも明らかではない。私達は、拡大する黒スポット光刺激に対するカエルの逃避行動に着目し、眼球内に GABA 受容体の阻害

剤を注入したときの逃避行動の変化を調べると共に、これらの阻害剤が網膜神経節細胞のスパイク発火にどのような影響を与えるかについて剥離網膜標本にマルチ電極法を適用して検討した。その結果、オフ持続型神経節細胞(ディミング検出器)群の周期的同期発火が逃避行動に関連する視覚情報を視覚中枢に送っていることが明らかになった。

(6) 周辺視における色の見えとその応用

阿山 みよし (宇都宮大学大学院工学研究科)

視野全域における色の見えを10名の被験者において定量的に測定し、その結果をユニーク色(混じりけのない赤, 黄, 緑, 青という色知覚)の知覚的強さの等高線図(カラーゾーンマップ)で示した。

赤, 黄, 緑, 青のどの刺激においても、カラーゾーンマップは視野の右及び下方向に広い特性を示した。その水平及び垂直方向の非対称性の様相を、網膜視細胞, 神経節細胞, 空間解像度, 副尺視力の非対称性と比較したところ、

網膜の生理学的特性との方で高い整合性が得られた。

赤, 黄, 緑, 青の中では、青のカラーゾーンマップが最も広く中心での色み成分を100とした場合、50%を示す領域は緑が最も狭く、青が最も広い結果と成った。カラーゾーンマップと関係する応用研究として、視野広範囲でのLED刺激の色の見えや、走行画面上での有効視野など応用的研究の結果も青刺激が広い特性となり、基礎研究と応用の深い関連が示された。

(7) テクスチャ知覚の心理物理学: 弁別機構から質感知覚まで

本吉 勇 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

地面, 森, 食べ物の表面など, 自然の光景はテクスチャに満ちている。人間はこうしたテクスチャの違いを容易に弁別し, その情報を図地の分離や形状の復元, さらに質感の推定において有効に用いている。ヒトの視覚系はどのようにしてテクスチャを分析し, 高次の視覚課題において利用しているのだろうか? 本講演では, わ

れわれの心理物理学的研究を中心に, テクスチャ弁別の基礎過程に関する理論的・実験的知見を概観するとともに, 表面質感の知覚(明度, 光沢感, 透明感など)におけるテクスチャ情報のインパクトに関する最新の知見を紹介する。

(8) A conundrum of stereoscopic mechanism

藤田 一郎 (大阪大学大学院生命機能研究科)

両眼視差は V1 で検出される。しかし、V1 細胞の性質はいくつかの点で両眼奥行き知覚の性質と食い違っており、両眼奥行き知覚の成立には V1 以後の視覚領野の活動が必要と考えられる。では、どの視覚領野が両眼奥行き知覚の形成に関与しているのだろうか。choice probability 解析や電気刺激実験による強力な証拠がそろっている MT が最有力候補だが、別の実験は、MT 細胞が両眼対応点問題を解決していないことを示している。V4 や IT が両眼対応点問題を解決しているという証拠が

出るに伴い、MT 細胞のこのふるまいは大きな謎となってきた（「両眼対応点問題を解かずに両眼立体視に関与するということはあるのか?」）。われわれは最近、心理物理実験と拡張視差エネルギーモデルの解析から、V1 細胞による両眼視差エネルギー計算の出力が粗い奥行き知覚を担うものの、奥行き面の知覚を伴わないことを示唆する結果を得た。この結果に基づいて、多くの生理学的知見を統合的に説明する両眼立体視メカニズムに関するわれわれの仮説を紹介する。

(9) 知覚的フィリングインが示すさまざまな性質

阪口 豊 (電気通信大学大学院・情報システム学研究科)

知覚的フィリングイン(perceptual filling-in/fading)とは、視覚刺激を数秒間固視し続けると、周辺視野に提示された刺激があたかも消失するのよう感じられる錯視現象である。この現象は初期視覚における神経活動の適応や伝播によって引き起こされていると考えられているが、その詳細はいまだ明らかでない。演者は、フィリングイン現象のメカニズムを探りつつ、初期視覚における情報表現様式や相互作用の機序を知る手がかりが得られ

ることを期待して、この現象の性質を調べる心理実験を暗中模索的に行なってきた。本講演では、「差分効果」「図地非対称性」「視野の非一様性」「瞬時充填」「複数領域間の相互作用」など、これらの実験を通じて見いだされたさまざまな性質についてお話ししたい。これらの現象論的データに対して、生理学的視点、情報論的視点からご意見をいただくと幸いである。

(10) 色カテゴリー課題と色弁別課題遂行中のサル TE 野細胞の色応答比較

鯉田 孝和 (生理学研究所)

小松 英彦 (生理学研究所)

視覚刺激が同じであっても、われわれはタスクやルールに応じて異なる行動ができる。このとき視覚野の神経活動はタスクによって影響されるだろうか。色弁別タスクと色カテゴリータスクの両方をサルに訓練し、色覚の高次領野と考えられる下側頭皮質 (TE 野) からニューロン活動を記録した。色刺激は CIE-xy 色度図上で赤から緑に等間隔で並ぶ 11 色を用いた。カテゴリータスクではテスト色刺激が赤ければ固視を続け、緑であればサッケードを行う。弁別タスクではテスト色刺激の消失と同時に

呈示される 2 つの色刺激のうち、テスト色刺激と同じ色に向かってサッケードする。その結果、タスクにより活動の強さが変化した細胞が見つかった。極端なケースでは一方のタスク実行中に神経応答がほとんど消失した。ただし、活動が変化しても多くの場合色選択性は保たれていた。このことから、タスク間の差は神経応答のゲイン変化で説明でき、タスクを示すトップダウン信号による色信号のゲーティングが起こっていることを示唆している。

(11) 脳損傷に伴う視覚選択のトップダウン・コントロールの障害

熊田 孝恒 (産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門)

前頭葉損傷患者に視覚選択課題を実施した研究を報告する。第 1 の研究では、特徴探索課題を用い、特定の種類の標的にのみ反応をする条件と、あらゆる標的に反応をする条件を設けた。右前頭葉損傷者 (YW) は、特定の標的に反応をする条件のみで顕著な障害を示した。あらゆる標的に反応をする条件では障害が認められなかったことから、ボトムアップの情報処理過程は障害されておらず、特定の特徵に加重するトップダウン過程の障害と解釈された。第 2 の研究では、左前頭葉損傷者 (DS) に反

応すべき視覚属性選択を指示に従って切り替える課題 (例えば、色つきの文字を提示し、色に反応する課題と文字に反応する課題を切り替える) を課したところ、大きな切り替えコストを示した。この結果から、直前の視覚属性に対する重み付けを破棄して、新たな属性に重み付けをセットする過程に障害があると考えられた。これらのデータに基づき、前頭葉機能と視覚選択の関連について議論する。

(12) 初期視覚系における刺激特徴依存的な反応特性の変化：視床一皮質間結合の見直し

佐藤 宏道 (大阪大学大学院医学系研究科認知行動科学)

一次視覚野 (V1) ニューロンに見られる刺激特徴抽出性や、刺激文脈依存的反応修飾 (CRM) は、大脳皮質内の機能構築様式を解明するための格好のモデルとして研究されている。しかし我々がネコの LGN においてニューロン活動を記録して V1 と比較したところ、LGN や V1 の刺激特徴選択性が、刺激のサイズや空間周波数に依存して変化することを見出した。特に、1) LGN ニューロンにおいて受容野よりも大きな刺激を用いた場合には明瞭な方位チューニングが生じた。2) LGN ニューロンにおい

ても CRM に方位コントラスト依存性が見られた。3) 低空間周波数にチューニングし、CRM の見られない LGN ニューロンにおいて高空間周波数の刺激を用いた場合には、明瞭な CRM が観察された。4) V1 ニューロンの方位チューニングは刺激サイズが大きくなるとシャープになった。これらの結果は LGN レベルの方位選択性および CRM の方位コントラスト依存性が、V1 ニューロンのその根拠となっている可能性を示唆する。

(13) 網膜疾患に起因する大脳視覚野の再構築は起こりうるか

仲泊 聡 (神奈川県リハビリテーション病院・東京慈恵会医科大学)

北原 健二, 浅川 晋宏 (東京慈恵会医科大学)

Brian A. Wandell, Junjie Liu (スタンフォード大学)

視野の同一部位から入力を受ける左右眼の網膜ニューロンは、それぞれ大脳の V1 で隣接したコラムに投射することが知られる。この左右眼の網膜対応部位がともに傷害されると、両部位から投射を受ける V1 のニューロンの活性が不活化する。しかし、それは一時的であり、数ヶ月後には傷害部位の周囲網膜からの信号を受けるように

なることがネコを用いて示されている。ところが、サルを用いた同様の実験の追試では、この再構築がまったく生じていないと最近報告された。ヒトにおいても、両眼の対応部位に病巣を有する患者で同様の事が生じると予想される。このような患者における fMRI 実験が複数の施設で行なわれている。我々も若年性黄斑変性 1 名、加

齢性黄斑変性2名、網膜色素変性2名の視覚野マッピングをfMRIを用いて行ない、網膜疾患に起因する大脳視覚野の再構築の有無について検討したので報告する。

(14) 道順のコーディング：内側頭頂葉ニューロンの機能

泰羅 雅登（日本大学 大学院総合科学研究科・医学部先端医学講座）

佐藤 暢哉 (Department of Neurology, University of Rochester Medical Center)

近年、脳梁膨大部後部から内側頭頂葉に局限した損傷で「道順障害」と呼ばれる特異な見当識障害が生じることが報告されている。このような患者は、見ている風景や建物から、自分のいる場所がどこであるかということは認識できるが、特定の目的地に向かおうとすると、どちらの方向に進んでよいのかわからず、道に迷ってしまう。この症状のもとにある神経メカニズムを探るため、我々は、バーチャルリアリティによって、2階建てのビル

ディングを構築し、その内部をジョイスティック操作によって移動するナビゲーション課題をサルにトレーニングした。課題遂行中に、サルの内側頭頂葉から単一ニューロン活動を記録し解析したところ、この領域の神経細胞の多くが場所の情報と、行動の情報を統合しているデータを得た。この結果は、内側頭頂葉の神経細胞が、いわゆる「道順」を構成する事に関与している可能性を示唆している。

9. 生体膜輸送分子複合体の分子構築と生理機能

2005年7月19日-7月20日

代表・世話人：金井 好克 (杏林大学医学部)

所内対応者：井本 敬二 (神経シグナル)

- (1) グリア細胞の K^+ ・水輸送を担うチャネルの局在制御とその分子基盤
日比野浩, 石井優, 倉智嘉久
(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)
- (2) AQP2 水チャネル変異による優性遺伝形式腎性尿崩症モデルノックインマウスの作成とその解析
内田信一, 蘇原映誠, 頼建光, 桑原道雄, 佐々木成
(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 腎臓内科学)
- (3) ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターの局在を決定する因子
金井好克, 安西尚彦, 平田拓, Arthit Chairougdua (杏林大学医学部薬理学)
- (4) 無機リン酸トランスポートソームの機能制御とその破綻
宮本 賢一¹, 竹谷 豊², 伊藤 美紀子¹, 瀬川 博子¹
(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 分子栄養¹, 臨床栄養²)
- (5) 肝細胞胆管側膜上に発現される ABC トランスポーターの機能と局在変動
伊藤晃成, 鈴木洋史 (東京大学医学部附属病院薬剤部)
- (6) 脳内エネルギーと脂質恒常性における脳関門輸送関連蛋白の役割と連携
寺崎哲也, 大槻純男
(東北大学未来科学技術共同研究センター, 同大学院薬学研究科)
- (7) 免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性 Ca^{2+} チャネル TRPM2 の活性化機構および生理的役割
山本伸一郎, 原雄二, 森泰生
(京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 分子生物化学分野)
- (8) 一酸化窒素による心筋イオンチャネル制御機構
古川哲史, 白長喜, 黒川洵子 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)
- (9) 腎臓糸球体スリット膜を支える分子複合体の解析
平林 享, 神作 愛, 畑 裕 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科)
- (10) 新しい微小管結合蛋白質による細胞の機能と構造の制御
中西 宏之 (熊本大学大学院医学薬学研究部細胞情報薬理学)
- (11) IRSp53 の RCB ドメインによる細胞膜の変形機構
末次 志郎 (東京大学医科学研究所腫瘍分子医学研究分野)
- (12) 小胞輸送系に介在する低分子量 G 蛋白質 Rab5 とその制御因子 RIN ファミリー
梶保 博昭¹, 堅田 利明¹, 仁科 博史²
(¹東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室,
²東京医科歯科大学難治疾患研究所・発生再生生物学分野)
- (13) 多光子励起過程を用いた開口放出・溶液輸送機構の解析
根本知己¹, 岸本拓哉^{1,2}, 緒方衝^{1,3}, 兒島辰哉¹, 大嶋章裕¹, 河西春郎^{1,2}
(¹生理研・生体膜, ²東大院・医, ³防衛医大・病理)

(14) 1分子ナノバイオロジーが明らかにする細胞膜のデジタル式信号変換機構

楠見 明弘 (京都大学再生医科学研究所/工学研究科マイクロエンジニアリング専攻,
科学技術振興事業団 ICORP 膜機構プロジェクト)

(15) 表面形状と物性から見た蛋白質間相互作用様式の予測法の開発

木下 賢吾 (東大医科研・ヒトゲノム解析センター)

【参加者名】

金井 好克 (杏林大学医学部), 寺崎 哲也 (東北大学未来科学技術共同研究センター), 鈴木 洋史 (東京大学医学部附属病院), 井上 昌俊 (東京大学), 梶保 博昭 (東京大学大学院薬学系研究科), 末次 志郎, 木下 賢吾 (東京大学医科学研究所), 古川 哲史, 仁科 博史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所), 内田 信一, 平林 享, 畑 裕 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科), 安西 尚彦, 平田 拓, 上野 剛, 福富 俊之 (杏林大学医学部), 森 泰生, 若森 実, 片野 正展, 山本 伸一郎 (京都大学

大学院工学研究科), 楠見 明弘 (京都大学再生医科学研究所), 倉智 嘉久, 日比野 浩 (大阪大学大学院医学系研究科), 宮本 賢一, 竹谷 豊, 瀬川 博子, 伊藤 美紀子 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部), 中西 宏之 (熊本大学大学院医学薬学研究部), 檜山 武史 (基生研), 富樫 和也, 富永 知子, 西井 博子 (統合バイオ), 根本 知己, 藤原 祐一郎, 石井 裕, 加勢 大輔, 中条 浩一, 井本 敬二 (生理研)

(1) グリア細胞の K^+ ・水輸送を担うチャネルの局在制御とその分子基盤

日比野浩, 石井優, 倉智嘉久

(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)

個々の組織におけるイオン・水の極性輸送 (ベクトル輸送) は, 体液の適切なイオン環境の保持に不可欠である。脳アストロサイトなどのグリア細胞では, シナプスの活性化により放出された細胞外の過剰な K^+ を取込み, 血管の方向へ放出する機能を持つ。 K^+ -buffering 作用と呼ばれるこのベクトル輸送は, Cl^- を同時に運ぶため浸透圧勾配を生み, 水輸送を伴う。 K^+ ・水の輸送の共役は, 神経機能の恒常性維持に重要である。以前よりアストロサイトでは, 電気生理学的に豊富に観察される内向き整流性 K^+ (Kir) チャネルが K^+ -buffering 作用を担うと指摘されていた。最近, 我々はその Kir チャネルが, Kir4.1 と Kir5.1 で構成されること, 1 つの細胞に Kir4.1 ホモ複合体と Kir4.1/5.1 ヘテロ複合体の 2 種類のチャネルが存在し各々特定の膜ドメインに局在することを明らかにした。血管周囲突起には Kir4.1/5.1 ヘテロ複合体が発現しており K^+ の放出に関与し, 一方シナプス周囲ではヘテロ複合

体と共に Kir4.1 ホモ複合体が各々異なった突起に局在し K^+ の取り込みに携わると考えられた。ヘテロ複合体のチャネル活性は生理的範囲内の細胞内 pH で大きく制御されるため, アストロサイトでは K^+ の放出と部分的な K^+ の取込みが細胞内 pH により調節されていることが示唆された。また, 血管周囲突起における Kir チャネルの局在は, ディストロフィン関連蛋白群という複合体により, 少なくとも一部が決定されている可能性を見出した。これら 2 種類の Kir チャネルは, アストロサイトに唯一発現する水チャネルである AQP4 と同じ膜上で共存していた。更に生化学的解析によって, Kir4.1, Kir5.1 と AQP4 はグリア型 Cl^- チャネルなどの機能分子と“ラフト”と呼ばれる微小膜ドメインで集積していることが明らかとなった。アストロサイトにおける K^+ ・水のベクトル輸送の機能的共役に, この微小膜ドメインが重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

(2) AQP2水チャネル変異による優性遺伝形式腎性尿崩症モデルノックインマウスの作成とその解析

内田信一, 蘇原映誠, 頼建光, 桑原道雄, 佐々木成
(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 腎臓内科学)

常染色体優性遺伝形式の腎性尿崩症(Autosomal Dominant type Nephrogenic Diabetes Insipidus: ADNDI)の原因として, Aquaporin 2 (AQP2)水チャネルのC末端側のframe-shift変異が知られている。以前我々は, 10塩基のdeletion mutantであるmutant AQP2 (763-772 del)が, MDCK細胞においてapical membraneではなくbasolateral membraneへsortingされることを示した。このsorting異常が腎性尿崩症にどのような関わっているかを調べるために, wild-type mouse AQP2のC末端をdominant negative effectを有するhuman AQP2 (763-772 del)に組み替えたknock-in mouseを作成し, 解析を行った。

Heterozygous knock-in miceは自由飲水下で多尿(5.5 ± 1.8 vs. 0.85 ± 0.6 ml/day, $n=4$, $p<0.03$)と尿浸透圧低下 (240 ± 54 vs. 2470 ± 530 mOsm, $n=4$, $p<0.001$)を認めた。24時間の脱水による体重減少率も, heterozygous miceのほうが有意に高く ($24.2 \pm 2.4\%$ vs. $13.9 \pm 1.3\%$ $n=4$, $p<0.01$),

heterozygous knock-in miceは尿濃縮力障害が明らかであった。このADNDIの発症メカニズムを解明するため, 腎集合管でのwild AQP2とmutant AQP2の免疫2重染色を行った。Mutant AQP2の殆どはbasolateral membraneへsortingされ, apical membraneにはsortingを認めなかった。同様にwild AQP2もbasolateral membraneへsortingされ, これはdominant negative effectを有するmutant AQP2との4量体形成によっておこると考えられた。しかし, wild AQP2のみのapical membraneへのtargetingもわずかに認め, Wild AQP2のみの4量体は正常なsortingが阻害されないことが示唆された。この所見はADNDI患者の比較的mildな尿濃縮力障害の特徴を説明しうると考えられた。同時にこの尿崩症マウスモデルは腎性尿崩症の治療を試みるのに有用なモデルと考えられ, 現在検討を行っている。

(3) ヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーターの局在を決定する因子

金井好克, 安西尚彦, 平田拓, Arthit Chairoungdua
(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(アミノ酸トランスポーター)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 b0,+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, ヘテロ二量体を形成する。腎尿細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とrBATのキメラ解析により, 4F2hc, rBATによる12回膜貫通型トランスポーターの認識が膜貫通領域周辺により行われること, 及び管腔側/側基底側ソーティングが4F2hc, rBATの細胞内ドメインにより決定されることが示唆された。

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, 腎近位尿細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への糖付加が阻害され, 細胞膜移行が障害された。これは, ヘテロ二量体複合体の小胞体からゴルジ体への移行が障害されたためであることが明らかとなった。酵母ツーハイブリッド法により, この部位には多価の足場タンパク質RACK1が結合することが明らかとなり, ヘテロ二量体複合体の小胞体からゴルジ体への移行におけるRACK1の関与が示唆された。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と考えられる。

(4) 無機リン酸トランスポートソームの機能制御とその破綻

宮本 賢一¹, 竹谷 豊², 伊藤 美紀子¹, 瀬川 博子¹

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 分子栄養¹, 臨床栄養²)

腎近位尿細管におけるリン再吸収機構は、生体におけるリン代謝調節機構の中心的役割を担っている。近位尿細管上皮細胞刷子縁膜にはII型ナトリウム依存性リン酸トランスporter (NaPi-IIa および NaPi-IIc) がそれぞれ存在し、様々な因子により迅速な調節を受けている。とくに、副甲状腺ホルモン(PTH)は血中リン濃度調節の重要な因子であり、type IIa および type IIc のエンドサイトーシスを作用することで迅速に血中リン濃度を調節している。多くの遺伝性低リン血症では、それらのトランスporterの調節異常が見られる。

これまでに、我々はOK細胞を用い、NaPi-IIa が apical 膜の脂質マイクロドメインに局在すること、PTH 依存的にマイクロドメイン上でリン酸化される 80kDa の分子を見出し、この分子が ERM (ezrin-radixin-moesin) タンパクファミリーの一つである ezrin であることを明らかにした。次に PTH による NaPi-IIa のエンドサイトーシスにおける ezrin の役割について検討したところ、ezrin は、PKA および PKC のいずれにおいても PTH 依存的にリン酸化された。さらに、ezrin のドミナントネガティブ体 (N 末

端側半分) を発現させたところ、NaPi-IIa の膜への局在が減少した他、PTH による NaPi-IIa のエンドサイトーシスが消失した。Ezrin は、NHERF-1 を介して NaPi-IIa と結合する一方、細胞骨格 actin とも結合し、トランスporter分子複合体の形成に関与し、apical 膜へ局在化させるために重要と考えられた。よって、PTH は、ezrin のリン酸化を行い、トランスporter分子複合体を変化させ、NaPi-IIa のエンドサイトーシスを促進しているものと考えられた。

一方、遺伝性低リン血症(XLH,ADHR,HHRH)や腫瘍性骨軟化症などでは、血中 FGF-23 の濃度上昇により、リン再吸収機構の抑制が見られる。FGF-23 は NaPi-IIa および NaPi-IIc のエンドサイトーシスを促進することで、そのリン利尿作用を発揮するが、リントランスポートソームを構成するどの分子が標的なのか明らかではない。

本講演ではリントランスポートソームを構成する分子の役割と PTH による調節機構を概説するとともに、その破綻と病態についても考察する。

(5) 肝細胞胆管側膜上に発現される ABC トランスporterの機能と局在変動

伊藤晃成, 鈴木洋史 (東京大学医学部附属病院薬剤部)

肝細胞胆管側膜上には、種々の ABC トランスporterが発現され、細胞内から細胞外への物質輸送に関与している。そのうち、multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2) は、ビリルビングルクロン基質抱合体を基質とし、その欠損は高ビリルビン血症を特徴とする Dubin-Johnson 症候群の発症につながる。さらに、広範な有機アニオン系薬物をも基質とし、薬物体内動態に影響を与えることが知られていることから、演者らは、単層培養した MDCK II 細胞の basolateral 膜側に、取り込みに関与するトランスporter (Organic anion transporting polypeptides) を、また apical 側膜に MRP2 を発現させ、経細胞輸送を測定する実験系を確立してきた。この実験

系は、in vivo 胆汁排泄を予測する上で有用な系と考えられ、話題提供したい。一方、MRP2 を介した還元型グルタチオンの胆汁排泄は、胆汁生成に関与しており、MRP2 機能の変動により、胆汁流量の変動や胆汁うっ滞の一因となるものと考えられている。そこで、MRP2 の酸化的ストレス下での内在化に特に着目し、その機構について解析を開始した。ラット遊離肝細胞を3時間接着培養し、胆管様構造を形成させた後、GSH 枯渇剤としてエタクリン酸 (EA) を添加した。EA 添加直後より細胞内 GSH は低下し、これに伴い MRP2 の胆管局在率は低下した。一方、EA 添加によって細胞内 Ca^{2+} の上昇と NO 産生上昇が観察され、EGTA の事前添加により NO 産生および MRP2

の内在化が阻害された。また、MRP2 の内在化は cPKC/nPKC 阻害剤 (Gö6850) によって阻害されたが、cPKC 阻害剤 (Gö6976) によっては阻害されなかった。更に EA 添加によって、nPKC(PKCδ, PKCε) の活性化 (細胞質から膜分画への移行) が観察されたが、cPKC(PKCα) の局在に変化は見られなかった。これらの結果から、GSH

低下を引き金とする MRP2 内在化過程においては、細胞内 Ca^{2+} 上昇、NO 産生上昇、nPKC の膜への移行と活性化が起こっていることが示唆された。今後さらにトランスポートソームの構成成分との結合・解離という観点から、MRP2 内在化機構について解析を進めたい。

(6) 脳内エネルギーと脂質恒常性における脳関門輸送関連蛋白の役割と連携

寺崎哲也, 大槻純男

(東北大学未来科学技術共同研究センター, 同大学院薬学研究科)

血液脳関門と血液脳脊髄液関門は、脳と血液の物質交換を制御することで脳内恒常性維持に重要な役割を果しているが、その輸送機構は不明な点が多い。各関門を構成する脳毛細血管内皮細胞と脈絡叢上皮細胞における各種輸送担体の発現、局在、機能、調節、相互の連携を解明することは、生理的役割や病態の理解だけでなく、中枢作用薬の開発において重要である。脳内クレアチンは血液の 200 倍も高濃度であり、エネルギー緩衝系として役割を果し、主な供給は脳内酵素による合成であると言われてきた。しかし、血液脳関門に creatine transporter (CRT) が発現し、血液から脳内への輸送過程が主な供給経路であった。脳は全身の 25% の cholesterol (chol) を保持するが、chol の脳内合成と消失は非常に遅い。脳内 chol

の主代謝体 24S-hydroxycholesterol (24S-OH) は、血液脳関門に発現する organic anion transporting polypeptide (oatp2) によって半減期 100 分で脳から排出された。Sterol 輸送に関与する ATP-binding cassette (ABC) transporter family の ABCA1, ABCG1, 核内受容体 LXRα, LXRβ が、脈絡叢と条件的不死化脈絡叢上皮細胞株 (TR-CSFB) で発現していた。LXR ligand である 24S-OH 処理によって TR-CSFB 細胞の ABCA1, ABCG1 は誘導され、Apical 方向の chol 排出輸送に関して、ApoA1 依存的輸送は 2.55 倍、HDL 依存的輸送は 1.38 倍、ApoE3 依存的輸送は ApoE4 依存的輸送より 1.30 倍誘導された。神経変性疾患などで 24S-OH は変動することから、脳内 chol の恒常性維持におけるこれらの輸送関連蛋白の連携は重要である。

(7) 免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性 Ca^{2+} チャネル TRPM2 の活性化機構および生理的役割

山本伸一郎, 原雄二, 森泰生

(京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 分子生物化学分野)

TRPM2 は過酸化水素 (H_2O_2) などの酸化的ストレスにより活性化される Ca^{2+} 透過性チャネルである。酸化的ストレスによる TRPM2 の活性化は細胞内で産生された NAD^+ および ADP-ribose が TRPM2 の C 末端に存在する Nudix motif に作用して引き起こされていると考えられているが、その詳細はまだ明らかにされていない。TRPM2 は単球、好中球、およびリンパ球などで高い発現が認められている。しかしこれらの免疫細胞での生理的役割は明らかにされていない。そこで本研究では単球細胞株 U937 を用い

て酸化ストレスによる TRPM2 の活性化機構および生理的役割を明らかにすることを目的とし検討を行った。TRPM2 活性化機構解明にあたり様々なストレス応答シグナルに着目した。我々は extracellular signal-regulated kinase (ERK) が TRPM2 活性化に重要な役割を果たしていることをつきとめた。 H_2O_2 により惹起された $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は TRPM2 特異的 siRNA および ERK 経路の阻害剤 PD98059 を処置することで抑制された。さらに、ERK によるリン酸化サイト (S/T-P motif) に変異をもつ TRPM2 で

は H_2O_2 による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が著しく減弱したことから、 H_2O_2 による TRPM2 の活性化は ERK に制御されている可能性が示唆された。また、 H_2O_2 により細胞外 Ca^{2+} 依存的な ERK のリン酸化がみられ、この ERK のリン酸化は TRPM2 特異的 siRNA 適用により抑制された。よって、TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入は ERK シグナリングのポジティブフィードバックを形成していることが明らかとなった。

次に TRPM2 の生理的意義においてサイトカイン産生に着目した。U937 において H_2O_2 により ERK/NF- κ B を介した interleukin-8(IL-8) 発現誘導されることが報告され

ており、またその IL-8 発現誘導に Ca^{2+} が関与することが明らかにされているからである。 H_2O_2 による IL-8 産生誘導は TRPM2 特異的 siRNA, PD98059 および NF- κ B 阻害剤を処置することで抑制された。さらに、 H_2O_2 による NF- κ B の核内移行は TRPM2 特異的 siRNA や PD98059 処置によって抑制された。よって、TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入によって活性化された ERK は NF- κ B の核内移行を惹起し、IL-8 産生誘導を引き起こしていることが明らかになった。

(8) 一酸化窒素による心筋イオンチャネル制御機構

古川哲史, 白長喜, 黒川洵子 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)

【目的】心血管系では一酸化窒素 NO は、心筋保護・血管拡張・動脈効果予防などに働く重要なシグナル伝達分子である。本研究は、心筋細胞における NO のターゲットとなるイオンチャネルの同定、NO によるイオンチャネル制御の生理的意義、その分子メカニズムの解明を目的に行なった。

【方法】モルモット単離心室筋細胞を用いて、パッチクランプ法穿孔パッチモードによる電流記録、および免疫沈降法・Western blot 法などの分子生物学的実験を行なった。

【結果】(1) NO ドナー、SNP、により ICa,L は抑制され、IKs は活性化されたが、 $INa \cdot IKr$ には明らかな作用を認めなかった。 ICa,L 抑制は cGMP 依存性リン酸化により、IKs 活性化は cGMP 非依存性であり、タンパクニトロ化によることが示唆された。

(2) NO による心筋イオンチャネル制御は、少なくとも 2 つの心臓生理現象に関与する。1 つは Ca^{2+} によるイオンチャネル制御機構であり、もう 1 つは性ホルモンによる non-transcriptional なイオンチャネル調節である。前者は、calmodulin 依存性 NOS3 活性化により、後者は PI3-kinase/Akt 依存性 NOS3 活性化によりもたらされる。

(3) calmodulin 依存性 NOS3 活性化には caveolin-3・calmodulin・NOS3 分子間のダイナミックなタンパク間相互作用が関与し、PI3-kinase/Akt 依存性 NOS3 活性化には性ホルモン受容体・c-Src・PI3-kinase・Akt を含む複数分子のタンパク間相互作用が関与する。これらにはある種の足場タンパクの関与が示唆される。

【結論】心筋細胞での NO は動的タンパク間相互作用の変化により各種イオンチャネルを制御することが、心筋保護作用をもたらす。

(9) 腎臓糸球体スリット膜を支える分子複合体の解析能

平林 享, 神作 愛, 畑 裕 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科)

腎臓糸球体のポドサイト間にはスリット膜と呼ばれる特殊な細胞間結合が存在し蛋白漏出のバリアーとして機能している。遺伝性ネフローゼの原因遺伝子産物 nephrin がスリット膜を構成する接着分子であることが同定されたのに続き、スリット膜の周辺に存在する種々の分子の異常がネフローゼの原因となることが明らかにされてい

る。従って、スリット膜の分子構築の解析は、蛋白尿を呈する疾患の分子病態の理解に重要である。

スリット膜は上皮細胞のタイトジャンクション (TJ) に由来し分子構築の点でも共通点が多い。例えば、TJ の足場蛋白である ZO-1 はスリット膜にも存在する。同じく TJ の足場蛋白 MAGI-1 がスリット膜に存在することを、

私たちは順天堂大学の栗原らとの共同研究で明らかにした。MAGI-1 に結合する接着分子 JAM4 はスリット膜だけでなくポドサイトの頂端面にも分布し、その局在は MAGI-1 と完全には一致しない。そこで MAGI-1 の結合分子を更に探索し、nephrin が MAGI-1 に結合することを明らかにした。従来知られている nephrin 結合分子の多くは、puromycin aminonucleoside 処理による実験ネフローゼ腎で、スリット膜の頂端面方向へのシフトに伴い、nephrin から乖離するが、MAGI-1 はこの状態でも nephrin との結合を維持している。このことから nephrin・MAGI-1 の相互作用はスリット膜の基本的な枠組みを提供すると

推測される。JAM4 と nephrin はスリット膜で MAGI-1 を介して三者複合体を形成するが、JAM4 は常にスリット膜より頂端面側に留まり、スリット膜が TJ と同様に頂端面と基底側面の境を形成することも示唆される。

ポドサイトには nephrin・JAM4 の他にも Neph1・FAT・CAR・ポドカリキシンなどの PDZ 結合モチーフをもつ膜蛋白があり、ZO-1・MAGI-1 以外にも NHERF2・CASK・LNX1 などの PDZ 蛋白が存在する。これらの膜蛋白と足場蛋白の特異的組合せからなる分子複合体がポドサイトに機能的な細胞膜ドメインを形作ることが想定される。

(10) 新しい微小管結合蛋白質による細胞の機能と構造の制御

中西 宏之 (熊本大学大学院医学薬学研究部細胞情報薬理学)

微小管は、オルガネラ輸送、細胞運動、細胞極性などの細胞機能に必須の役割を果たすと共に、中心体、繊毛などの細胞構造の基本を構築している。微小管のオーガナイゼーションは種々の微小管結合蛋白質によって制御されている。私共は、微小管に関わる細胞の機能と構造の制御機構を解析するために、新しい微小管結合蛋白質の同定を試みた。まず私共は、微小管結合蛋白質を検出する新しいアッセイ法 (チュブリン・プロット・オーバーレイ法) を開発し、この方法によってラット脳組織より新しい分子 (p100 と一時的に命名) を同定した。この

p100 は Rac 低分子量 G 蛋白質が引き起こすラッフル膜に局在した。さらに新しい微小管結合蛋白質を同定するために、ラット脳組織から微小管と共沈する蛋白質群を収集し、それらを質量分析によって網羅的に解析して、これまで 30 以上の新しい分子を同定した。これらのうち、ある分子は微小管に沿って局在し、一方、ある分子は中心体や繊毛に局在した。本シンポジウムでは、これら新しい分子や微小管と生体膜輸送分子複合体との関連について議論したい。

(11) IRSp53 の RCB ドメインによる細胞膜の変形機構

末次 志郎 (東京大学医科学研究所腫瘍分子医学研究分野)

代謝過程に起こる細胞膜の変化と細胞骨格は密接に結びついている。エンドサイトーシスによる膜輸送では、まず amphiphysin, dynamin, clathrin など脂質結合タンパク質が誘導する細胞膜の内側に向かった変形により小胞が形成される。次に、N-WASP によって細胞骨格の再構成がおこって小胞の移動がおこる。これに対し、細胞の移動先端やファゴサイトーシス、マクロピノサイトーシスなどの他の輸送系では、細胞膜が大きく外側に変形し、仮足構造が作られる。仮足形成では膜結合タンパク質による細胞膜の変形は知られておらず、細胞骨格の再構成

が細胞膜の外側に向かった変形を誘導すると考えられてきた。私は、IRSp53 の構造解析の結果から、エンドサイトーシスに関わる amphiphysin の BAR ドメインと IRSp53 の RCB ドメインが類似の構造を持つことを見いだした。さらに IRSp53 の RCB ドメインは細胞膜を変形させることができることを見いだした。IRSp53 は仮足構造形成に関わるタンパク質であるので、膜結合タンパク質による細胞膜の変形が、エンドサイトーシスのみならず外側に向かった細胞膜変形を含むさまざまな過程に関わる普遍的なメカニズムであることを示唆している。

(12) 小胞輸送系に介在する低分子量G蛋白質 Rab5とその制御因子 RIN ファミリー

梶保 博昭¹, 堅田 利明¹, 仁科 博史²¹東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室,²東京医科歯科大学難治疾患研究所・発生再生生物学分野)

細胞はエンドサイトーシスやエキソサイトーシスを介して外界との物質交換を行っており、低分子量G蛋白質である Rab ファミリーがこれらを制御していることが明らかにされている。中でも Rab5 はエンドサイトーシスの初期段階（細胞表層から初期エンドソームまでの輸送経路）で必須の役割を果たしている。我々は Rab5 の新規相互作用因子として RIN2, RIN3 を単離・同定してきた。RIN2, RIN3 は H-Ras と相互作用することが知られている RIN1 と高い相同性を有し, SH2 ドメイン, Pro に富む SH3 ドメイン結合領域, Rab5 の GEF に保存された Vps9 ドメイン, Ras に結合し得るドメインなど様々なシグナル関連ドメインを有するユニークな蛋白質群である。我々は RIN ファミリーの機能解析を進め, その結果 1) RIN2, 3 が Rab5 に対する GEF 活性を有し, さらに通

常の Rab5-GEF と異なり GDP 型, GTP 型 Rab5 の両方に結合すること, 2) RIN2, 3 が HeLa 細胞内で小胞状の局在を示し, 各種 Rab ファミリーと共発現させたところ Rab5 特異的に共局在した点, 3) RIN3 が形成する小胞を蛍光トランスフェリンが通過していく様子が観察されたこと, 4) RIN ファミリー相互作用因子としてクラスリン被覆小胞の形成に関与するアンフィファイシン II を同定し C 末端の SH3 ドメインを介して RIN2, 3 のプロリンに富む領域と結合することを明らかにした。以上の結果より, RIN2, 3 が Rab5 の GEF かつ GTP 型を安定化する因子として機能し, アンフィファイシン II と相互作用して初期エンドサイトーシスの輸送過程を制御する因子であると考えられる。

(13) 多光子励起過程を用いた開口放出・溶液輸送機構の解析

根本知己¹, 岸本拓哉^{1,2}, 緒方衝^{1,3}, 兒島辰哉¹, 大嶋章裕¹, 河西春郎^{1,2}¹生理研・生体膜, ²東大院・医, ³防衛医大・病理)

多光子励起過程を用いた細胞機能の可視化解析 (2 光子顕微鏡) は, 中枢神経系を中心に様々な組織の細胞生理学的研究に広がってきた。ここでは本手法の特徴と今後の展開について, 膵臓外分泌腺細胞の開口放出, 溶液輸送現象を例に報告する。この 2 光子顕微鏡の近年の広がり, 励起光が近赤外領域であるため生体標本に対し低吸収低散乱性であること原因する組織的標本深部断層像の高い空間分解からもたらされている。この低吸収性は生体試料に対する侵襲性が低いことをも意味し, 長時間に渡って安定的なライブイメージングを可能たらしめている。さらに多光子励起の場合, 1 光子励起波長の離れた複数の蛍光色素も同時に励起できることが多い。これらの特徴を生かし, 我々は外分泌腺房の生理的な Ca^{2+} 濃度上昇の定量的測定と単一の融合細孔形成の可視化を初めて同時に可能とした。さらに我々は逐次開口放出という新しい様式が用いられていることを初めて見出した。この様式は様々な分泌

細胞で確認されつつあり, 我々も副腎髄質クロマフィン細胞, 膵臓β細胞でも使われていることを実証する共に, 膜融合の SNARE 仮説に基づくモデルを提出し検証している。さて, 実際の 2 光子顕微鏡で多光子励起が生じるのは, 焦点近傍の 1 フェムトリットル以下の領域である。この局所性をケージドカルシウムの活性化に用いれば, 任意のタイミングで人工的に細胞内に極微小な Ca^{2+} ドメインを出現させることが可能となる。これを用いて, 我々は膵臓外分泌腺細胞膜上の Ca^{2+} 依存性塩素チャネルの機能マッピングに成功し, 水・電解質輸送の push-pull モデルの実証を行った。また鼻粘膜上皮腺で輸送現象の断層イメージングに成功した。このように多光子励起過程は膜系の動態やイオンチャネル機能の生理的解析に有効な方法論であり, トランポソーム機能発現を支える分子機構の解明に有効であると考えられる。

(14) 1分子ナノバイオロジーが明らかにする細胞膜のデジタル式信号変換機構

楠見明弘 (京都大学再生医科学研究所/工学研究科マイクロエンジニアリング専攻,
科学技術振興事業団 ICORP 膜機構プロジェクト)

最近, さまざまなシグナル伝達分子の挙動や相互作用・活性化などを, 生きている細胞において1分子レベルで見ること成功しつつある。このために, 1 蛍光分子観察, 1 分子 FRET, 1 粒子追跡, 1 分子捕捉と操作などの方法を, 生細胞中で使えるように工夫してきた。1 分子ごとに見ると, 多数分子の平均の観察ではわからない機構や現象も見つかるであろう, と思いつつながら研究していたのであるが, 本当に面白いことが出るのかどうか不安でもあった。実際にやってみると, 予想以上に面白いことが次々とわかってきた。

最も重要な発見の一つは, 実に多くのシグナル伝達の素過程に, 活性化された分子とエフェクターとの結合を促進したり安定化させる *scaffolding protein* または, 足場として働くような細胞内のマイクロドメイン (例えば

ラフト) が関わっていることである。それらのタンパク質や足場ドメインが形成する短寿命シグナル複合体(1秒以下の寿命であることが多い) が, このようなシグナルの受け渡しの素過程を担っているように思われる。細胞全体としてみると分のオーダーのシグナル変換が見えていても, それらは, 1 分子のレベルではパルス状の活性化パターンをもっており, そのようなきわめて短時間のシグナル伝達の素過程の重ね合わせが, 分単位のアナログな変化の基礎をなしているようなのである。これは, シグナルシステムとしては, 1 分子のレベルでは, 分子は殆ど常に OFF の状態に保たれており, 1 瞬だけ ON になるという方式が進化の過程で選ばれたことを示している。

(15) 表面形状と物性から見た蛋白質間相互作用様式の予測法の開発

木下 賢吾 (東大医科研・ヒトゲノム解析センター)

近年さまざまな実験的手法により, どのタンパク質ペアが相互作用するかの情報は蓄積されてきた。それに伴い, それらがどのように相互作用するのかを予測する方法の開発が求められている。

そこで我々は(1)ホモオリゴマータンパク質の相互作用部位の網羅的な比較分類と解析から相互作用部の特徴抽出を行い, (2)アミノ酸配列の進化的保存度と分子表面の相補性に着目したドッキング法の開発を行った。

(1)に関しては, SCOP データベースを使って用意した重複のない 374 のホモオリゴマーを同定し, 比較分類を行った。まず大まかな分類として *dimer* 型, *cyclic-oligomer* 型, 巻き付き型の 3 種類に分類し, *dimer* 型に関してはさらに, *dimer* の対称軸方向への広がり具合から平行型, 垂直型, 均等型の 3 種類, 合計 5 種類の型への分類をおこなった。その結果, これらの分類と, 静電ポテンシャル及び疎水性度の分布の間に相関を見いだすことができ

た。また, この解析を利用して, 生物学的に意味のある相互作用と, 結晶学的な接触とを区別する手法の開発を行った。

(2)に関しては, 冗長性を取り除いた 265 のヘテロオリゴマーに関して, 相互作用の種類と機能で大まかに分類し, その分類毎に相互作用部位の進化的な保存度の解析を行った。その結果, シグナル伝達系での相互作用部位の高い保存度を確認することができた。この知見を利用して, 蛋白質相互作用部位の予測法を開発するために, 表面の形状の相補性と進化的な保存度を評価基準とした表面での複合体予測法の開発をおこなった。この方法をシグナル伝達系の複合体の構造 (7 複合体) に適用したところ, 1 例は複数の保存部位を持つタンパク質で必ずしもうまく行かなかったが, 残り 6 例で結晶構造とほぼ同一の解を得ることができた。

10. 生理機能制御および病態におけるプリン作動性シグナリングの役割とその分子機構

2005年9月1日－9月2日

代表・世話人：井上 和秀（九州大学 大学院 薬学研究院）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

(1) 発生期海馬神経回路形成と細胞外 ATP

加藤 総夫¹, 山岡 正慶^{1,2}, 川村 将仁^{1,3}

(¹慈恵医大・神経生理, ²同・医学部6年, ³現所属: 同・薬理第1)

(2) パーキンソン病治療薬としてのアデノシン A_{2A} アンタゴニスト

森 明久（協和発酵工業（株）・医薬研究開発本部）

(3) 脊髄痛覚伝導における血小板活性化因子 (PAF) の役割－ATP, グルタミン酸, cGMP の関与－

土肥 敏博, 森田 克也, 森岡 徳光, 北山 友也

（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歯科薬理学）

(4) 細胞外 ATP によるミクログリア遊走能の調節機構

大澤 圭子, 本田 静世, 佐々木 洋¹, 入野 康宏, 中村 泰子, 井上 和秀², 高坂 新一

（国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部）

¹Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine

²九州大学大学院 薬学研究院 薬効解析学分野

(5) Comparative analysis of physical dimensions of the pore of maxi-anion, VSOR and CFTR chloride channels as putative ATP-channels

Ravshan Sabirov^{1,2} and Yasunobu Okada²

(¹Dept. of Biophysics, National University of Uzbekistan, ²Dept. of Cell Physiology, NIPS)

(6) 毛髪生理におけるアデノシンの作用機構

岩淵 徳郎¹, 中沢 陽介¹, 飯野 雅人¹, 江浜 律子¹, 尾郷 正志¹, 田島 正裕¹, 荒瀬 誠治²

(¹資生堂リサーチセンター, ²徳島大医)

(7) マウス網膜 P2X プリン受容体を介する情報処理は ON 経路と OFF 経路で異なる

金田 誠, 石井 俊行*, 重松 康秀**, 細谷 俊彦*, 霜田 幸雄**

(慶應大・医・生理, 理研・脳センター・細谷研究ユニット*, 東京女子医大・総研**)

(8) 内皮細胞の ATP レセプター P2X₄ を介した血流センシング

山本 希美子, 曾我部 隆彰, 安藤 譲二

（東京大学 大学院 医学系研究科 医用生体工学講座 システム生理学）

(9) P2Y 受容体刺激による前駆脂肪細胞の adipogenic hormones に対する感受性増大

尾松 万里子, 松浦 博（滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門）

(10) 脳血管内皮細胞における ATP による新規 Ca²⁺増幅機構の解明

山崎 大樹¹, 大矢 進¹, 村木 克彦², 浅井 清文³, 今泉 祐治¹

(¹名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析,

²愛知学院大・薬・細胞薬効, ³名古屋市大院・医・分子神経生物)

(11) レチノイン酸による初代培養ミクログリアの P2X₄ 受容体発現増強

戸崎 秀俊^{1,2}, 津田 誠¹, 小泉 修一², 井上 和秀¹

(¹九州大学 大学院 薬学府, ²国立衛研薬理部)

(12) 後根神経節細胞における細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の ATP による活性化

長谷川 茂雄, 津田 誠, 井上 和秀（九州大学 大学院 薬学府 薬効解析学分野）

(P 1) 免疫担当細胞における P2X₇ 受容体機構の解析

月本 光俊, 原田 均, 五十里 彰, 高木 邦明, 出川 雅邦 (静岡県立大・薬)

(P 2) Bradykinin による ATP 放出への多剤耐性 MRP の関与の可能性

趙 玉梅, 佐藤 千江美, 右田 啓介, 桂木 猛 (福岡大・医・薬理)

(P 3) P2X 受容体反応に及ぼすパーキンソン病原因遺伝子 parkin および alpha-synuclein の影響

有村 由貴子¹, 佐藤 あゆみ¹, 西川 香里², 青木 公三子², 和田 恵津子²,
青木 俊介², 和田 圭司², 野田 百美¹ (¹九州大・院・薬・病態生理,
²国立精神・神経センター・神経研・疾病研究第4部)

(P 4) コレステロール代謝変動に起因するミトコンドリア機能障害と神経細胞変性過程

道川 誠 (国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部)

(P 5) Shear Stress Induced Ionic Current and FMI-43 Influx via P2X₄ ATP-receptor as a Mechano-transduction Pathway

Fernando Lopez-Redondo¹, Kimiko Yamamoto², Joji Ando², Kishio Furuya¹,
Kumi Akita¹, Keiji Naruse^{1,3}, Masahiro Sokabe^{1,3,4}

(¹Cell Mechanosensing, SORST, JST; ²Dept Biomed Engin, Grad Sch Med, Univ Tokyo;
³Dept Cell Biophysics, Grad Sch Med, Nagoya Univ; ⁴Dept Mol Physiol, Natl Inst Physiol Sci)

(P 6) マウス脳内のアデニン類含量およびアデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質

3'-AMP 産生酵素系に及ぼす加齢の影響

藤森 廣幸, 宮本 晃洋, 堀内 隆宏, 芳生 秀光 (摂南大・薬・衛生分析化学)

(P 7) アシドーシスによる新生ラット摘出脊髄反射電位の抑制作用におけるアデノシンの関与

乙黒 兼一, 山地 良彦, 伴 昌明, 太田 利男, 伊藤 茂男
(北海道大学 大学院獣医学研究科 薬理学教室)

(P 8) アストロサイトにおける酸化ストレスによる細胞死誘導シグナリングに対する P2Y₁ 受容体活性化の拮抗作用

篠崎 陽一¹, 小泉 修一¹, 井上 和秀² (¹国立衛研・薬, ²九州大・薬・薬効解析)

(P 9) 脊髄後角の興奮性シナプス伝達に及ぼすアデノシン作用におけるヌクレオシド輸送体の役割

柳 涛, 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)

(P 10) P2Y 受容体刺激による細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ の一過性の減少

藤居 祐介, 尾松 万里子, 松浦 博 (滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門)

(P 11) 感覚神経終末グリア網におけるカルシウム波伝播の二重様式とプリン受容体の関与について

岩永 ひろみ (北海道大学 大学院 医学研究科 組織・細胞学分野)

(P 12) アデノシン刺激による MDCK 細胞からの ATP 放出に対するシグナリングおよび放出部位の検討

右田 啓介, 趙 玉梅, 桂木 猛 (福岡大・医・薬理)

(P 13) 骨髄間質細胞の P2Y₂ 受容体を介したカルシウムシグナリングは細胞密度に依存して変化する

市川 純, 玄番 央恵 (関西医科大学・第2生理)

(P 14) 末梢神経損傷後における P2X 受容体の後根神経節での変化

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)

(P 15) 血管周皮細胞ペリサイトに発現する P2 受容体とその機能

藤下 加代子¹, 末石 浩二^{1,2}, 井上 和秀³, 小泉 修一¹

(¹国立衛研・薬理部, ²福岡大学・薬・薬学疾患管理, ³九州大学・院・薬・薬効解析)

(P16) アストロサイトの pinocytosis における P2Y₆ 受容体の関わり

多田 薫¹, 戸崎 秀俊¹, 井上 和秀², 小泉 修一¹

(¹ 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部, ² 九州大学 大学院 薬学研究院 薬効解析学分野)

(P17) Regulation of purinergic P2X₂ receptor activity by phosphoinositides

藤原 祐一郎, 久保 義弘 (生理研 神経機能素子)

(P18) ATP_γS によるアストロサイトでの MCP-1 産生誘導における MAP キナーゼカスケードの役割

片山 貴博, 南 雅文 (北大院・薬・薬理学分野)

【参加者名】

井上 和秀 (九州大学), 片山 貴博, 岩永 ひろみ, 乙黒 兼一 (北海道大学), 松岡 功 (福島県立医科大学), 山本 希美子 (東京大学), 霜田 幸雄 (東京女子医科大学), 繁富 英治, 安井 豊, 山本 清文, 池田 亮, 井村 泰子, 河野 優, 加藤 総夫, 川村 将仁 (東京慈恵会医科大学), 須藤 久美 (昭和大学), 大澤 圭子 (国立精神・神経センター 神経研究所), 末石 浩二, 大久保 聡子, 小泉 修一, 酒見 和枝, 篠崎 陽一, 多田 薫, 藤下 加代子 (国立医薬品食品衛生研究所), 山田 千晶 (共立薬科大学), 金田 誠 (慶應義塾大学), 森 明久 (協和発酵工業 (株)), 岩淵 徳郎 (資生堂リサーチセンター), 安田 昌弘 (エーザイ株式会社), 三原 拓真 (アステラス製薬株式会社), 平手 謙二, 今井 利安, 佐久間 詔悟 (日本ケミファ (株) 研究所), 月本 光俊 (静岡県立大学), 原田 均, 志内 伸光, 尾崎 紀之, 篠田 雅路, 杉浦 康夫 (名古屋大学), 古家 喜四夫 (科学技術振興機構), Lopez-Redondo

Fernando (科学技術振興機構), 道川 誠 (国立長寿医療センター研究所), 山崎 大樹 (名古屋市立大学), 山田 善也 (ファイザー), 尾松 万里子, 藤居 祐介 (滋賀医科大学), 山下 勝幸 (奈良県立医科大学), 藤森 廣幸, 堀内 隆宏, 宮本 晃洋 (摂南大学), 市川 純 (関西医科大学), 小林 希実子, 野口 光一 (兵庫医科大学), 土肥 敏博 (広島大学), 有村 由貴子, 上野 光, 津田 誠, 戸崎 秀俊, 豊満 笑加, 永田 健一郎, 中村 康次, 野田 百美, 長谷川 茂雄, 藤田 拓美, 山村 悠介 (九州大学), 趙 玉梅, 桂木 猛, 右田 啓介 (福岡大学), 熊本 栄一, 中塚 映政, 藤田 亜美, 柳 涛 (佐賀大学), 秋葉 光雄, 中村 宣司 (浅井ゲルマニウム研), Sabirov Ravshan (タシュケント大学 (ウズベキスタン)), 島 麻子 (統合バイオ), 岡田 泰伸, 久保 義弘, 藤原 祐一郎, 北村 明宏, Amal K.Dutta, Hongtao Liu, 曾我部 隆彰, 井本 敬二 (生理研)

(1) 発生期海馬神経回路形成と細胞外 ATP

加藤 総夫¹, 山岡 正慶^{1,2}, 川村 将仁^{1,3}

(¹ 慈恵医大・神経生理, ² 同・医学部 6 年, ³ 現所属: 同・薬理第 1)

中枢神経系の重要な機能原理は「自己組織化」である。特に、神経回路の形成過程において、適切なニューロン間の適切なシナプス結合の形成には、内因性に形成される自動的かつ自発的な神経活動によって活性化される諸分子群の相互作用が重要な役割を担うことが知られている。このような組織化された自発的な活動の存在は、発生期のみならず成熟後の動物の極めて広範な中枢神経系局所回路において報告されている。

海馬からは, theta-wave, delta-wave, ripple wave, sharp wave などのさまざまな種類の自発的周期的活動パター

ンが記録される。これらの組織化された活動はそれぞれ固有の機構によって発生し、独自の生理学役割を担うと考えられている。特に、胎生～周生期における CA3 領域の神経回路は、(1)興奮性主細胞間の反回性 (反響性) 興奮結合, および、(2)高細胞内 Cl⁻濃度に起因する GABA 作動性介在ニューロンを介した自己興奮性シナプス, の両機構によって、自発的かつ周期的に生じるニューロン群の同期的興奮性活動 (一般に giant depolarizing potential, GDP と呼ばれる周期的膜電位変動パターンとして観察される) を示す。この GDP は、興奮性活動として海馬全

域に伝播し、海馬のシナプス・ネットワークの形成において中核的役割を担う可能性が示されている (Nat Rev Neurosci 3:728-, 2002; J Physiol 559:129-, 2004)。

現在までに、中枢神経系の広範な領野において P2 受容体の発現が報告され、それらの多くにおいて、外因性の ATP の投与によって誘発される特異的な生理的応答が証明されてきた (例: J Physiol 530: 469-, 2001; J Neurosci 24: 3125-, 2004)。また、実験的な刺激や、薬物の投与によって生じる内因性 ATP の放出と、それによって誘発される P2 受容体活性化を介した生理的応答も報告されてきた (J Neurosci 23: 7426-, 2003)。しかし、native な脳組織の中で自発的かつ自動的に形成されるダイナミックな活動の形成に内因性の ATP とそれによる P2 受容体の活性化が関与している事実を証明した報告はほとんどない。

我々は、海馬 CA3 領域の GABA 作動性介在ニューロンが興奮性コンダクタンスと共役した P2Y1 受容体を発現し、外因性に投与した ATP もしくは ADP がこの受容体の活性化を介して抑制性ニューロンの興奮性を亢進さ

せ、その結果、錐体細胞への GABA 作動性入力が増加するという事実を、生後 7-15 日のラットおよびマウスを用いて報告した (J Neurosci 24: 10835-, 2004)。この事実に基づき、新生期海馬 CA3 ネットワークにおいて特異的に観察される GDP の形成に、内因性の ATP/ADP とそれらによる P2Y1 受容体の活性化が関与するという仮説を立て検証した。

2-8 日齢の Wistar rat の急性海馬スライス CA3 錐体細胞からパッチクランプ法ならびに共焦点顕微鏡による Fluo-4 蛍光 imaging 法を用いて、自発、および、苔状線維刺激誘発 GDP を記録した。一部の例では ATP biosensor を用いた局所的細胞外 ATP 濃度の測定を行った。特異的 P2Y1 受容体遮断薬、脱感差性 P2Y1 受容体作動薬、apyrase などの投与、および、灌流速度の変化などによる GDP の発生頻度および活動パターンの著明な変化から、自発的・周期的 GDP 活動の形成に内因性の ATP/ADP が関与すると結論した。

(2) パーキンソン病治療薬としてのアデノシン A_{2A} アンタゴニスト

森 明久 (協和発酵工業 (株) ・医薬研究開発本部)

これまでにアデノシン受容体には、A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ の 4 種類のサブタイプが存在することが報告されている。このうち、アデノシン A₁, A_{2B}, A₃ 受容体が脳全域に広範に分布するのに対し、アデノシン A_{2A} 受容体は脳基底核を中心として、線条体、淡蒼球、側坐核、嗅結節に高密度に局在することが明らかになってきた。このことから、脳基底核を介する機能、例えば運動や精神機能の調節に、アデノシン A_{2A} 受容体が重要な役割を果たすのではないかと考えられている。特に興味深いことは、アデノシン A_{2A} 受容体が、線条体からの出力路の一つ、線条体-淡蒼球経路 (間接路) を構成する GABA 作動性中型有棘神経細胞 (Medium spiny neuron(MSN)) に特異的に発現していることである¹。

本発表では、協和発酵工業株式会社にて創製された選択的アデノシン A_{2A} アンタゴニスト KW-6002 の抗パーキンソン病作用などの薬効薬理²を中心に、アデノシン A_{2A} アンタゴニストが、代表的な脳基底核疾患の一つであるパーキンソン病の治療薬になる可能性を紹介する。加

えて MSN におけるアデノシン A_{2A} 受容体の生理的役割と脳基底核回路を介した運動制御への寄与について、これまでに得られている電気生理学、神経化学的成績などを基に、アデノシン A_{2A} アンタゴニストの抗パーキンソン病作用の作用機序³についても紹介する。

1. Schiffmann SN, Jacobs O., Vanderhaeghen JJ. Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. J Neurochemistry 1991;57:1062-7.
2. Jenner P. A2a antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. Neurology 2003;61(11 Suppl 6):S32-8.
3. Mori A, Shindou T. Modulation of GABAergic transmission in the striatopallidal system by adenosine A2A receptors: a potential mechanism for the antiparkinsonian effects of A2A antagonists. Neurology 2003;61(11 Suppl 6):S44-8.

(3) 脊髄痛覚伝導における血小板活性化因子(PAF)の役割 —ATP, グルタミン酸, cGMP の関与—

土肥 敏博, 森田 克也, 森岡 徳光, 北山 友也

(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歯科薬理学)

血小板活性化因子(Platelet-Activating Factor: PAF)は、ウサギ好塩基球由来の血小板凝集因子および腎髄質由来の降圧物質として発見されたリン脂質である。現在まで、PAFは多くの組織で産生され、炎症・免疫系細胞の活性化、強い血管透過性亢進作用や気管支収縮作用を有し、さらに妊娠・分娩、循環、虚血等による組織障害への係わりなど、実に多彩な生理・病態生理のリン脂質性メディエーターであることが明らかにされてきている。

繰り返される疼痛刺激や神経損傷時に痛覚感作が生じる。これには、侵害刺激に対する痛覚の増大、すなわち、痛覚過敏 (hyperalgesia), と正常では非侵害性の機械的刺激に対して痛み反応を生じるアロディニア (メカニカル・アロディニア) がある。プロスタグランジン類 (PGs) は末梢における重要な炎症・疼痛反応のメディエーターである。一方、PAFは PGE₂ よりも強い浮腫を引き起こすのに対し、末梢組織における痛覚感作は極めて弱い。近年、PGE₂ は末梢のみならず、脊髄での痛覚過敏ならびにアロディニア発現において重要な役割をはたしていること、またそのメカニズムは末梢とは異なることが示されている。脊髄 PAF 濃度は脊髄損傷時に上昇し、脊髄炎症性二次障害のメディエーターではないかと推察されている。しかし、脊髄における痛覚伝導における PAF の役割は明らかではない。本研究では、脊髄における PAF の疼痛制御における役割について検討し、PAF は脊髄腔内投与によりアロディニアと熱刺激に対する痛覚過敏を引き起こす事を認めた。

α, β -methylene ATP の脊髄腔内投与はアロディニアを誘発した。PAF 誘発アロディニアは ATP 受容体拮抗薬

PPADS, TNP-ATP により抑制された。PAF は培養後根神経節細胞から ATP 遊離を促進した。各種阻害薬を用いた結果から、PAF 受容体刺激による ATP, グルタミン酸の遊離, NO 産生-cGMP-PKG カスケードがアロディニア発現に関与することが示された。PAF 誘発アロディニアや痛覚過敏にカプサイシン感受性神経が介在する可能性が示唆された。PAF の脊髄腔内投与により脊髄後角表層に活性化ミクログリアの集積が認められた。ミクログリアの抑制作用を有するミノサイクリンは PAF によるアロディニアの誘発を抑制した。siRNA によりグリシン受容体サブタイプ GlyR α 3 ノックダウンマウスにおいて PAF 誘発アロディニアの、特に持続相が抑制され、cGMP アナログ 8-p-CPT-cGMP の脊髄腔内投与によるアロディニアは初期から抑制されたことより、PAF 誘発アロディニアの持続相に cGMP/PKG によるグリシン受容体機能の抑制が関与する可能性が示唆された。グリシントランスポーター阻害作用を有する薬物に抗アロディニアならびに鎮痛作用が認められた。

以上のことより、PAF 誘発アロディニアに、PAF 受容体刺激による ATP, グルタミン酸の遊離, NO 産生-cGMP-PKG カスケードが関与し、cGMP はグリシン受容体機能を抑制して抑制系を脱抑制し、このことがアロディニア発現に関与する可能性が示唆された。また、この過程に活性化ミクログリアが重要な係わりを有することが示唆された。更に、グリシントランスポーター阻害作用を有する薬物に抗アロディニアならびに鎮痛作用が認められた。今後 ATP-グリシン系の解析、またグリシントランスポーター阻害薬の鎮痛薬としての有用性について更なる検討の予定である。

(4) 細胞外 ATP によるミクログリア遊走能の調節機構

大澤 圭子, 本田 静世, 佐々木 洋¹, 入野 康宏, 中村 泰子, 井上 和秀², 高坂 新一

(国立精神・神経センター 神経研究所 代謝研究部)

¹Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine

²九州大学大学院 薬学研究院 薬効解析学分野)

ミクログリアは神経変性疾患や神経損傷時に反応性に活性化され, 様々な生理活性物質の産生・放出や食食などを行うことから, 組織修復に積極的に関与する細胞であると考えられている。正常脳のミクログリアは長く多数に分岐した突起を持つラミファイド型であるが, 障害時に速やかに反応して形態変化し, 障害部位へ移動・集積する。従って, 形態変化や遊走能の制御機構を研究することは, ミクログリアの活性化機構を理解し脳内機能を明らかにするために極めて重要である。

近年, ATP 刺激によりミクログリアの様々な生理活性因子 (プラスミノゲン, IL-1 β , TNF- α , IL-6, NO など) の産生, 放出能が促進されることが報告され, ATP がミクログリアの機能を調節する分子であることが明らかにされつつある。我々は ATP がミクログリアの走化誘導因子になることを見出し, ATP によるミクログリア運動能の調節機構について研究してきた。本研究では, ATP がミクログリアに発現する ATP 受容体 P2Y12 を介して遊走能を亢進すること, また, ATP 刺激によるミクログリア遊走の調節に関わる細胞内情報伝達系を最近得られた知見とともに紹介したい。

ラット初代培養ミクログリアは, ATP や ADP の刺激により膜ラッフルを形成し, ダンチャンバー内で ATP 濃度勾配に依存した細胞遊走を示した。膜ラッフル形成と細胞遊走は百日咳毒素や P2Y12 特異的阻害剤 AR-C69931MX

により阻害された。これらの結果から, ATP は P2Y12 を介して遊走能を亢進することが明らかになった。そこで, ラット脳における P2Y12 の発現を *in-situ hybridization* で調べたところ, P2Y12 の発現は, ミクログリア特異的タンパク質である Iba1 発現細胞に認められ, 脳実質内ミクログリアに局在していた。一方, 三量体 G タンパク質(Gi/o) 共役型受容体の下流では, ホスホリパーゼ C(PLC)とホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)が活性化されることが知られている。そこで, ATP 刺激による膜ラッフル形成と細胞遊走に対する各シグナル分子特異的な阻害剤の影響を調べたところ, PLC 阻害剤は膜ラッフル形成及び細胞遊走の両者を抑制した。一方, PI3K 阻害剤は膜ラッフル形成を抑制しないが細胞遊走を阻害した。これらの結果から, ATP 刺激直後に生じる膜ラッフル形成とその後の細胞遊走を調節するシグナル経路が異なり, PI3K シグナル系は細胞移動の持続性や方向性の調節に関わると考えられる。さらに, PI3K シグナル系の活性化を Akt のリン酸化を指標として調べたところ, リン酸化 Akt の増加は細胞外カルシウムの除去により抑制された。ミクログリアにはイオンチャネル型 ATP 受容体 P2X サブタイプも発現していることから, P2Y12 に加え P2X が PI3K/Akt シグナル系を調節し細胞遊走に関与する可能性が示唆され, 現在, 検討中である。

(5) Comparative analysis of physical dimensions of the pore of maxi-anion, VSOR and CFTR chloride channels as putative ATP-channels

Ravshan Sabirov^{1,2} and Yasunobu Okada²

(¹Dept. of Biophysics, National University of Uzbekistan, ²Dept. of Cell Physiology, NIPS)

Maxi-anion channel, volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel have been suggested to

mediate an electrogenic transport of ATP by different groups. This function requires a pore wide enough for passing a bulky ATP molecule. In the present study, we attempted to evaluate the physical

dimensions of the pores of the three putative ATP-channels.

(1) Single maxi-anion channels were recorded from membrane patches excised from mouse mammary C127 cells. We first analyzed the permeability of the channel to a series of organic anions of different size. We found a linear relationship between relative permeability of organic anions of different size and their relative ionic mobility (measured as the ratio of ionic conductance) with a slope close to 1, suggesting that organic anions tested with radii up to 0.49 nm (lactobionate) move inside the channel by free diffusion. In the second approach, we tested the pore of maxi-anion channel by the nonelectrolyte exclusion method in single-channel patch-clamp experiments. The cut-off radii of PEG molecules that could access the channel from intracellular (~1.16 nm) and extracellular (~1.42 nm) sides indicated an asymmetry of the two entrances to the channel pore. Measurements by symmetrical two-sided application of PEG molecules yielded an average functional pore radius of ~1.3 nm.

(2) Single VSOR channels were recorded from the cell-attached patches of human epithelial Intestine 407 cells pre-swollen in hypotonic Hi-K⁺ solutions. PEG 200-300 ($R_h=0.27-0.53$ nm)

effectively suppressed the single-channel currents, whereas PEG 400-4000 ($R_h=0.62-1.91$ nm) had little or no effect. The cut-off radius of the VSOR channel pore was assessed to be 0.63 nm.

(3) Single CFTR channels were recorded from cell-attached and excised membrane patches from HEK293T cells transiently transfected with CFTR gene using a bi-cistronic vector with GFP gene as a reporter. The effect of polyethylene glycols on the single-channel CFTR currents was different depending on whether they were added from extracellular or intracellular side. The cut-off radius of PEG molecules that could access the channel from the intracellular side (~1.0 nm) was larger than that from the extracellular side (~0.6 nm) indicating an asymmetry of the two channel entrances.

The radius of ATP⁴⁻ and MgATP²⁻ (about 0.6-0.7 nm) is close to the limiting size of the VSOR channel pore and narrowest part of CFTR channel. The size of maxi-anion channel (~1.3 nm) is largest among these three channels, therefore we suggest that it is best suited to its function as an ATP channel and, where present, serves as the preferred pathway for the release of ATP⁴⁻ and/or MgATP²⁻.

(6) 毛髪生理におけるアデノシンの作用機構

岩淵 徳郎¹, 中沢 陽介¹, 飯野 雅人¹, 江浜 律子¹, 尾郷 正志¹, 田島 正裕¹, 荒瀬 誠治²
(¹資生堂リサーチセンター, ²徳島大医)

核酸関連生体物質であるアデノシンがヒトの毛成長を促進することが明らかとなり, アデノシンが持つ幅広い生理作用があらためて認識されつつある。今回はアデノシンの毛成長促進機構について概説したい。

育毛薬剤として良く知られているミノキシジルは毛包でミノキシジルサルフェートに変換され, アデノシン量を増加させることにより育毛効果を示すと考えられている⁽¹⁾。また, アデノシン配合製剤を用いた6か月間のヒト有効性試験でも育毛効果が確認され, 特に太毛化効果が見られた⁽²⁾。

ヒト毛乳頭細胞に対するアデノシンの影響をマイクロアレイ解析したところ, 毛成長促進因子である FGF-7 (KGF; keratinocyte growth factor) 発現を亢進することが明らかとなった。すなわち, アデノシンは毛乳頭細胞に直接作用し, FGF-7 発現を亢進することにより毛成長を促進すると考えられた。免疫染色の結果, ヒト毛乳頭では

type A2b のアデノシン受容体が発現していることが確認された。

アデノシンのアンタゴニスト併用実験より, ヒト毛乳頭細胞においてアデノシンは受容体 A2b に作用し, 細胞内 cAMP 濃度上昇を引き起こすことにより FGF-7 の発現を亢進すると考えられた。FGF-7 は毛幹を成す上皮系細胞の増殖・分化を促進し, ひいては毛成長を促進する因子である。また, 男性型脱毛由来の毛乳頭細胞では FGF-7 発現の低下が観察され, アデノシンが当該細胞において低下した FGF-7 発現を回復させることも明らかとなり, ヒト有効性試験で確認された効果の一端を説明できる結果が得られた。さらに, アデノシン類縁体であるグアノシンやイノシン等の影響についても言及したい。

(1) Li et al. (2001) J Invest Dermatol 117:1594-1600

(2) Tajima et al. (2004) Abstract of the 4th Intercontinental Meeting of Hair Research.

(7) マウス網膜 P2X プリン受容体を介する情報処理は ON 経路と OFF 経路で異なる

金田 誠, 石井 俊行*, 重松 康秀**, 細谷 俊彦*, 霜田 幸雄**

(慶應大・医・生理, 理研・脳センター・細谷研究ユニット*, 東京女子医大・総研**)

マウス網膜コリン作動性アムクリン細胞には ON 型と OFF 型の二種類が存在する。われわれは免疫組織化学的検討から, P2X2 受容体が OFF 型コリン作動性アムクリン細胞に選択的に発現していることを見出した。そこで GFP シグナルがコリン作動性アムクリン細胞のみに選択的に発現している transgenic mouse を用い, GFP シグナルをマーカーとしてコリン作動性アムクリン細胞にパッチクランプ法を適用し, ATP に対するコリン作動性アムクリン細胞応答について検討した。

ホールセルクランプ下に ATP をコリン作動性アム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 型コリン作動性アムクリン細胞と ON 型コリン作動性アムクリン細胞の ATP 応答の大きさを比較した。OFF 型コリン作動性アムクリン細胞で観察される ATP 応答は ON 型コリン作動性アム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。また ATP 応答は細胞外液への亜鉛添加で増強されたが, 細胞外液のカルシウムを増加させると抑制された。ATP のコリン作動

性アムクリン細胞への投与はシナプス前膜側からの GABA 放出も同時に増強した。GABA 放出の増強は ON 型と OFF 型の両方で観察された。GABA 放出の増強は α , β -methyleneATP では惹起されなかったが, PPADS 存在下で ATP を投与しても観察された。また benzoylbenzoylATP の投与でも惹起された。

以上の結果から, OFF 型コリン作動性アムクリン細胞はシナプス後膜側の P2X2 受容体による制御とシナプス前膜側の GABA 作動性神経終末による二重の制御を受けるが, ON 型コリン作動性アムクリン細胞はシナプス前膜側の GABA 作動性神経終末による制御のみを受けると考えられた。薬理的性質と免疫組織化学染色の結果から, シナプス前膜側に存在するプリン受容体は P2X4 と P2X7 の二つが可能性として考えられた。

以上の結果を元にマルチ電極法を用いて網膜神経節細胞の光応答を記録し, 光刺激で生じる網膜神経節細胞の光応答が ATP でどのように修飾されるか検討した。神経節細胞の光応答は ATP を投与すると ON 型 OFF 型ともに抑制された。ON 型と OFF 型で見られる光応答の抑制様式の相違については現在検討中である。

(8) 内皮細胞の ATP レセプター P2X₄ を介した血流センシング

山本 希美子, 曾我部 隆彰, 安藤 譲二

(東京大学 大学院 医学系研究科 医用生体工学講座 システム生理学)

【緒言】血管内面を覆う内皮細胞は血流と接することから, 血流に起因する力学的刺激である剪断応力を受けている。内皮細胞は血流の変化を剪断応力の変化として認識し, その情報を細胞内部に伝えることで形態や機能や遺伝子発現を変化させる能力を有している。血流に対する内皮細胞の反応は生体で起こる血流依存性の現象である血管新生やリモデリング, あるいは動脈瘤や粥状動脈硬化などの血管病の発生に深く関わっている。しかしながら, 内皮細胞が血流をどの様にセンシングしているのか, その分子機構は未だ明らかになっていない。そこで, 我々は細胞内情報伝達系の主要なセカンドメッセンジャ

ーとして働く Ca^{2+} の動態の面から, 内皮細胞の血流センシング機構を検討した。

【実験方法】ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) に Ca^{2+} 感受性色素 Indo-1 を取り込ませ, 平行平板型の流れ負荷装置により剪断応力 (1-20 dynes/cm²) を負荷した時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡で測定した。内皮細胞における ATP 作動性カチオンチャンネル P2X のサブタイプの遺伝子発現レベルを競合 PCR 法で比較した。HEK293 細胞に P2X₄ の cDNA を強発現させた細胞株を樹立した。また, P2X₄ KO マウスを作製し, 肺の微小血管から培養した内皮細胞の剪断応力に対する Ca^{2+} 反応を解析した。また, 内皮

細胞に NO 指示薬である DAF2 を取り込ませ、剪断応力による NO 産生の変化を評価した。さらに生体顕微鏡下にマウスの骨格筋の細動脈を観察し、血流増加に対する血管拡張反応を解析した。

【結果】HPAEC にハンス平衡塩類溶液の灌流による流れ刺激を与えると、剪断応力の強さに依存した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇反応が現れた。流れを止めると Ca^{2+} 濃度は初めのレベルに復帰した。EGTA で細胞外 Ca^{2+} をキレートすると流れによる反応が完全に消失したことから、 Ca^{2+} の動員経路は細胞外からの流入と考えられた。また、ATP を分解する *apyrase* を灌流液に加えると、流れによる Ca^{2+} 流入反応が完全に抑制された。このことから、ATP 作動性カチオンチャネルである P2X の関与が示唆された。HPAEC の P2X 発現を競合 PCR で解析したところサブタイプの P2X₄ が優勢的に発現していることが示された。P2X₄ のアンチセンスオリゴを細胞に導入し P2X₄ の発現を約 20% にまで低下させると流れ刺激による Ca^{2+} 流入反応がほとんど消失した。また、P2X₄ の遺伝子欠損マウスの肺微小血管内皮細胞においても流れ誘発性 Ca^{2+} 流入反応は起こらなかった。流れ刺激に対して Ca^{2+} 反応を示さない HEK293 に P2X₄ の遺伝子を発現する細胞株を樹立し、流れ刺激による Ca^{2+} 反応を測定したところ、コントロールの細胞では Ca^{2+} 応答は確認されなかったが、

P2X₄ を発現している細胞では剪断応力依存性の Ca^{2+} 濃度上昇反応が確認された。内皮細胞の流れ刺激による NO 産生反応を P2X₄ KO マウスと野生型 (WT) マウスと比較した。WT の肺の微小血管内皮細胞では剪断応力に依存した NO 産生が見られたが、KO マウスでは NO 産生が起こらなかった。骨格筋の微小血管観察により、WT マウスで見られた血流増加に対する細動脈の拡張反応が KO マウスで著明に抑制されていた。血圧も KO マウスでは WT マウスに比較して有意に上昇していた。

【考察】今回の検討により、内皮細胞において剪断応力の強さの情報が細胞外 Ca^{2+} の流入量に変換されることが示された。その機構として細胞膜に発現するイオンチャネルである P2X₄ が重要な役割を果たしていることが明らかになった。本来、流れ刺激に反応しない HEK 細胞に遺伝子導入で P2X₄ を発現させると流れ刺激に対して Ca^{2+} 反応を示すようになったことから P2X₄ が血流センサー分子として働く可能性が示された。実際、生体で P2X₄ を介する血流センシングがどのような生理的意義を有しているのかについて、P2X₄ の KO マウスで検討した。その結果、P2X₄ は血流刺激による血管の NO 産生に関わっていること、血流増加に対する細動脈の拡張反応や血管のトーン調節にも重要な役割を果たしていることが示された。

(9) P2Y 受容体刺激による前駆脂肪細胞の adipogenic hormones に対する感受性増大

尾松 万里子, 松浦 博 (滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門)

マウス胎児由来前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞は、成熟脂肪細胞に分化するためには細胞周期が G₀/G₁ で停止することが必要である。通常の培養実験では細胞をコンフルエントになるまで培養し、接触障害により細胞周期を停止した後、adipogenic hormones である dexamethasone, 1-methyl-3-isoxanthine 及び insulin を分化誘導因子として加えることによって成熟脂肪細胞に分化させる方法が最も標準的な手法として用いられている。また、細胞密度の低い増殖中の細胞に adipogenic hormones を加えても分化は起こらないことが古くから知られている。我々は、50%以下の低い細胞密度の前駆脂肪細胞に ATP を与えてインキュベーションした後に adipogenic hormones を加えると、増殖を続けながら成熟脂肪細胞に分化することを見いだした。これらの効果は P2 受容体阻害剤スラミン

及び phospholipase C 阻害剤である U-73122 によって阻害されたことから P2Y 受容体を介すると考えられた。ATP で前処理した後に adipogenic hormones を加えた細胞とコンフルエントに達してから adipogenic hormones を加えた細胞を比較すると、細胞の増殖や分化後の中性脂肪の量には差がなかった。しかし、成熟脂肪細胞のマーカー蛋白である adipose protein 2 の mRNA の発現量を調べてみると、ATP で前処理した細胞の方が通常の方法で処理した細胞よりも 3 日早く増大し、ピークに達していることがわかった。これらのことから、未分化細胞において P2Y 受容体刺激は adipogenic hormones に対する感受性を増大させ、増殖中にも関わらず脂肪細胞への分化が起こると考えられた。

(10) 脳血管内皮細胞における ATP による新規 Ca^{2+} 増幅機構の解明

山崎 大樹¹, 大矢 進¹, 村木 克彦², 浅井 清文³, 今泉 祐治¹

(¹名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析,

²愛知学院大・薬・細胞薬効, ³名古屋市大院・医・分子神経生物)

血液脳関門は脳内に広く分布し、一層の脳血管内皮細胞から成る。周囲はタイトジャンクションの形成に重要な役割を担うアストロサイトに覆われている。現在までに末梢血管内皮細胞においては各種イオンチャネルの発現分布とその機能解析が進展している。一方で、脳血管内皮細胞におけるイオンチャネル及び受容体に関しては不明な点が多い。ATP はアストロサイトや神経より遊離または漏出し脳血管内皮細胞に作用すると考えられるが、その作用機構の詳細は明らかでない。本研究では、ウシ脳血管内皮不死化細胞 (t-BBEC 117) を用いて、細胞外 ATP による脳血管内皮細胞におけるプリン作動性受容体及びイオンチャネル活性制御機構とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。

まず、RT-PCR により t-BBEC 117 において mRNA が高発現しているプリン作動性受容体サブタイプを解析した。また細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定において、小胞体の Ca^{2+} -ATPase 阻害薬であるタブシガルギン適用後には、ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は生じないことを見出した。これらの結果および薬理的解析から、ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には主に $P2Y_1$, $P2Y_2$ 受容体を介した Ca^{2+} 遊離が関与していると示唆された。一方、イオンチャネルとしては Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルである SK2, TRPC1/3, 内向き整流性 K^+ チャネルである $K_{ir2.x}$ などが機能的に発現していることが明らかとなった。

次に、これら受容体およびイオンチャネルの機能連関を検討した。ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は SK2 チャネルを

活性化させ、細胞を過分極させることにより TRPC1/3 を介した Ca^{2+} 流入を増幅させることを見出した。すなわち $[Ca^{2+}]_i$ 制御における正帰還機構の存在が示唆された。ATP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 制御の正帰還機構が細胞増殖に関与している可能性を検討した。MTT 法を用いて増殖に対する影響を検討したところ、100 μ M ATP γ S は 48 時間後において増殖を有意に促進させ、SK チャネル阻害薬である UCL1684 及び TRPC1/3 阻害薬である La^{3+} はそれぞれ ATP γ S による増殖促進を抑制した。以上より脳血管内皮細胞において細胞外 ATP は $[Ca^{2+}]_i$ 制御の正帰還機構を介して細胞増殖に寄与していることが示唆された。

さらに約 20% の t-BBEC 117 細胞において、ATP により K^+ の平衡電位付近までの過分極が生じることを見出した。これらの細胞では Ba^{2+} による反応から $K_{ir2.x}$ チャネルの発現量が高くなっていると推測され、ATP による SK2 チャネルの活性化が $K_{ir2.x}$ チャネルの活性化の起因となって、更なる過分極を起こすスイッチング機構の存在することが示唆された。このスイッチング機構動作は過大な Ca^{2+} 流入を生じさせ、細胞死の方向へ導くと考えられる。すなわち、 $K_{ir2.x}$ 発現量が細胞死を制御している可能性が推測された。

以上より ATP は脳血管内皮細胞において $[Ca^{2+}]_i$ 調節にかかわる SK2 および $K_{ir2.x}$ チャネルという 2 つの K^+ チャネルおよび TRPC1/3 チャネルの活性制御を介して、細胞増殖と細胞死という正反対の作用を示す可能性が示された。

(11) レチノイン酸による初代培養ミクログリアの $P2X_4$ 受容体発現増強

戸崎 秀俊^{1,2}, 津田 誠¹, 小泉 修一², 井上 和秀¹

(¹九州大学 大学院 薬学府, ²国立衛研薬理部)

細胞外 ATP は中枢において、ATP 受容体を介した情報伝達を担う重要なシグナル分子である。 $P2X_4$ 受容体はイオンチャネル型の ATP 受容体の一つで、本研究室は神経傷害時の疼痛モデルラットの脊髄内でミクログリアが活

性化し、その細胞膜表面での $P2X_4$ 受容体の発現増強が見られ、この受容体が直接疼痛に関わっていることを見出した。しかしミクログリアの $P2X_4$ 受容体の急激な発現調節については未だほとんどわかっていないのが現状であ

る。そこでラット P2X₄ 遺伝子上流領域約 2 kbp をクローニングし転写因子結合サイトを検索したところ、核内受容体の認識配列に相同性のある配列が見つかった。

レチノイン酸はビタミン A の誘導体であり, retinoic acid receptor (RAR), retinoid X receptor (RXR) といった核内受容体に結合し, 応答配列をもった遺伝子の転写活性を制御することができる。特に RXR は様々な核内受容体とヘテロダイマーを形成し標的遺伝子の転写活性を制御する重要な核内受容体である。クローニングした P2X₄ 遺伝子上流領域のプロモータ活性を dual luciferase assay を行い定量したところ, この配列内にレチノイン酸に応答するサイトの存在が示唆された。Quantitative RT-PCR 法を用いた解析から RXR, RAR のアゴニストである 9-cis retinoic acid (9-cisRA), RAR のアゴニストである all-trans retinoic acid (atRA) 処置により初代培養ミクログリアに発現している P2X₄ 受容体 mRNA は, 濃度, 時間依存的に

有意な mRNA 量の増加を示すことが観察された。同様の増大作用は RAR 及び RXR の合成アゴニスト処置によっても認められた。Western blotting 法を用いた解析により 9-cisRA 処置によって有意な P2X₄ 受容体タンパク量の増大が観察され, また細胞内 Ca²⁺ 応答を指標とした検討によりミクログリア P2X₄ 受容体の機能亢進も観察された。以上より, P2X₄ 遺伝子上流領域にレチノイン酸応答配列が存在していること, RAR および RXR アゴニスト処置により P2X₄ 受容体の mRNA, タンパクの発現量が増大すること, P2X₄ を介したミクログリアの機能が亢進することが確かめられた。脊髄や後根神経節では, 神経傷害時における組織内でのレチノイン酸合成酵素の発現量が急激に増大している。つまり, 脊髄ミクログリア P2X₄ の発現増大から引き起こされる神経因性疼痛にはレチノイン酸による転写調節が重要な発現経路の一つであることが示唆される。

(12) 後根神経節細胞における細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の ATP による活性化

長谷川 茂雄, 津田 誠, 井上 和秀 (九州大学 大学院 薬学府 薬効解析学分野)

ATP は末梢の一次求心性神経に存在する P2X₃, P2X_{2/3}, P2Y₁ および P2Y₂ 受容体を介して, 痛みの発生およびその調節機構に重要な役割を有している。しかし, その詳細なメカニズムについては依然未解決な部分が多い。一方で, プロスタグランジン類等の脂質メディエーターも, ATP と同様に痛覚過敏やアロディニアを誘発することから, ATP 受容体刺激後のシグナルとして何らかの関連性が予想される。プロスタグランジンやロイコトリエンなどの脂質メディエーターは, 細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cytosolic phospholipase A₂; cPLA₂) により膜脂質から切り出されたアラキドン酸によって生合成されることから, cPLA₂ の活性状態は痛覚伝達系の制御に重要な役割を演じている可能性がある。cPLA₂ の活性化には, C2 ドメインへの Ca²⁺ の結合及びセリン残基のリン酸化が必要であることが知られている。そこで本研究では, 一次求心性神経 (後根神経節細胞 dorsal root ganglion; DRG) における cPLA₂ の活性化に対する ATP の効果について検討した。

cPLA₂ の活性化は, 活性化型である Ser⁵⁰⁵ リン酸化型 cPLA₂ (Phosphorylated cPLA₂; p-cPLA₂) タンパク質を, その特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法により

検出し, その発現レベルから評価した。ラット初代培養 DRG ニューロンを ATP で処置すると, p-cPLA₂ 発現レベルは ATP 1μM から 10μM の範囲で濃度依存性に増加し, また, ATP 10μM 処置後 5 分でピークに達した。この ATP による p-cPLA₂ の発現増加は選択的 P2X₃ 及び P2X_{2/3} 受容体アンタゴニストである A-317491 の前処置により抑制された。また, P2X_{1, 3, 2/3} 受容体アゴニストである α, β-methylene ATP により p-cPLA₂ レベルが増加した。一方, P2Y₁ および P2Y₂ 受容体アゴニストである 2MeSADP および UTP の処置によっても, p-cPLA₂ タンパク質の発現増加が見られた。現在知られている 4 つの cPLA₂ サブタイプ (α, β, γ, δ) の中で, cPLA₂α はアラキドン酸を含むリン脂質に選択性を示す。そこで, 培養 DRG ニューロンに cPLA₂α inhibitor を前処置した結果, ATP による p-cPLA₂ タンパク質の発現増加は阻害剤で抑制された。

以上の結果は, 一次求心性感覚神経において, ATP が P2X₃, P2X_{2/3}, P2Y₁ および P2Y₂ 受容体を介して cPLA₂, 特に cPLA₂α を活性化することを示唆しており, この cPLA₂α の活性化が ATP による痛みの発生・調節機構に何らかの役割を有している可能性が考えられる。

(P1) 免疫担当細胞における P2X₇受容体機構の解析

月本 光俊, 原田 均, 五十里 彰, 高木 邦明, 出川 雅邦 (静岡県立大・薬)

【目的】P2X₇受容体は ATP との結合により活性化すると陽イオンの流入・分子量約 900 Da 程度までの分子を通す小孔の形成・サイトカインの放出・細胞死の誘導などを引き起こすことが報告されている。最近, 我々はこれらに加えて細胞外液中の Cl⁻に依存した細胞径の縮小(細胞縮小: アポトーシス初期の特徴)が誘導されることを見出している。今回はマウスリンパ球における P2X₇受容体活性化による細胞縮小について報告する。

【方法】4-6 週齢 Balb/c 系マウスの胸腺および脾臓から分離した細胞を用いて実験を行った。P2X₇受容体蛋白質の発現は特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析により, 細胞障害性は細胞外に漏出した乳酸脱水素酵素の活性を測定することにより調べた。細胞径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。また, 膜抗原の染色には蛍光標識抗マウス CD4, CD8 および B220 モノクローナル抗体を用いた。

【結果および考察】P2X₇受容体蛋白質の発現量は胸腺細胞に比べて脾臓細胞に多く, ATP 処置による細胞死の誘導は胸腺細胞に比べて脾臓細胞においてより早く検出された。細胞径の変化について解析した結果, 脾臓細胞においては ATP 処置後数分で速やかに縮小細胞の割合が

増加した。一方, 胸腺細胞では処置後 90 分まで緩やかに縮小細胞の割合が増加した。両細胞群とも P2X₇受容体アゴニストである 2'-&3-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP 処置でも細胞縮小の誘導が認められ, P2X₇受容体アンタゴニストである oxidized ATP 前処置により阻害されたことから, P2X₇受容体を介して細胞縮小が誘導されていると考えられた。

次いで T 細胞の分化状態との関係について検討した結果, 胸腺細胞中約 8 割を占める未分化な CD4⁺8⁺胸腺細胞は ATP にほとんど反応せず, CD4⁺8⁺胸腺細胞 < CD4⁺8⁻胸腺細胞 < CD8⁺脾臓細胞 < CD4⁺脾臓細胞の順に強い細胞縮小の誘導が認められた。このことは分化・成熟した T 細胞において細胞縮小活性が強いことを示している。一方, 脾臓中の B 細胞は細胞縮小が誘導されなかった。これまで P2X₇受容体誘導性細胞死は, 胸腺における T 細胞分化過程に関与しているとされてきた。しかしながら, 本研究により分化・成熟した T 細胞の方が高感度に細胞死が誘導されることが明らかとなり, 胸腺中での分化過程のみならず末梢での T 細胞機能においても P2X₇受容体が重要な役割を担っているものと考えられる。

(P2) Bradykinin による ATP 放出への多剤耐性 MRP の関与の可能性

趙 玉梅, 佐藤 千江美, 右田 啓介, 桂木 猛 (福岡大・医・薬理)

ATP はオートクリン/パラクリン分子として P2X および P2Y 受容体を介して, 広汎で多彩な細胞機能調節作用を示すことは良く知られているが, その細胞外への放出機構, また, どのような細胞内部位から放出されるかについてはほとんど不明のままである。本研究は, これらの点を明らかにする目的で, モルモット結腸紐の培養平滑筋細胞を用いて bradykinin による ATP 放出実験を行った。

その結果, bradykinin は B₂-受容体刺激により, 濃度依存性に ATP を放出した。この ATP 放出は phospholipase C

- Ins(1,4,5)P₃ シグナル系の一連の阻害薬 (U-73122 や thapsigargin など) や NEM, staurosporin により著しく抑制された。さらにこれは MK-571, benzbromarone などの MRP 阻害薬で拮抗されたが, CFTR-Cl⁻ channel ブロッカー (glybenclamide, Gd³⁺など) や hemi channel ブロッカー (gap23 など) ではほとんど影響されなかった。この ATP 放出はミトコンドリアの機能を阻害する oligomycin や CGP37157 などで, またゴルジ体からの小胞輸送を阻害する brefeldin A によっても抑制されなかった。ウエスタンブロットティングによる実験で, 同細胞には, MRP2 や MRP3

ではなく MRP1 の蛋白質の発現が認められた。

これらのことより, bradykinin は B₂-受容体刺激により Ins(1,4,5)P₃ シグナルを介して, 恐らく ER からの ATP 遊

離を引き起こし, この ATP が膜の多剤耐性蛋白質(MRP1) の nucleotide binding domain に結合し, これを活性化して ATP 自身が細胞外へ放出されるものと考えられる。

(P3) P2X 受容体反応に及ぼすパーキンソン病原因遺伝子 parkin および alpha-synuclein の影響

有村 由貴子¹, 佐藤 あゆみ¹, 西川 香里², 青木 公三子², 和田 恵津子²,
青木 俊介², 和田 圭司², 野田 百美¹ (¹九州大・院・薬・病態生理,
²国立精神・神経センター・神経研・疾病研究第4部)

parkin 遺伝子は, 若年性常染色体劣性遺伝型の家族性パーキンソン病(AR-JP)の原因遺伝子として 1998 年に発見された。その遺伝子産物である Parkin は, ユビキチンリガーゼの一種であると考えられ大脳黒質に豊富に存在することが知られている。さまざまな神経変性疾患では, ユビキチン・プロテアソーム系の破綻が提唱されており, 実際 AR-JP 患者の parkin 遺伝子が変異して, Parkin の活性が喪失していることが分かっている。また, Parkin の基質タンパクである alpha-synuclein の凝集体がパーキンソン病患者から多数見つかったことから, Parkin の機能異常による alpha-synuclein の蓄積がパーキンソン病に関与していることが示唆されている。その一方で, 神経回路機能における Parkin や alpha-synuclein の役割についてはいまだに解明されていない。

本研究では, 神経系に広く分布し, 様々な神経伝達物

質の放出に関与している ATP 受容体に着目し, Parkin や alpha-synuclein がその活性にどのように関与しているのかを電気生理学的に検討した。

その結果, Parkin は, PKA の活性化を介して ATP 誘発電流を増大させることが明らかになった。また, この PKA 活性の制御に DARPP-32 (dopamin and cAMP-regulated phosphoprotein with molecular weight of about 32000)が関与する可能性も示唆された。しかし一方で, ユビキチン水解酵素や Parkin と同様に lysine 63 を介してユビキチン鎖を形成することが報告されている alpha-synuclein は ATP 誘発電流に顕著な影響を及ぼさなかった。これらの結果より, Parkin は ATP 受容体に対して PKA, DARPP-32 を介して調節的な役割を果たしていることが考えられ, 今後, Parkin が P2X 受容体を介して神経伝達物質の放出に関与しているかについても明らかにしたい。

(P4) コレステロール代謝変動に起因するミトコンドリア機能障害と神経細胞変性過程

道川 誠 (国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部)

【目的】 *ApoE*, *ABCA1*, *CYP46* 等のコレステロール代謝関連遺伝子多型とアルツハイマー病発症との相関が指摘されている。しかし, 如何なる分子機構によってコレステロール代謝変動が神経細胞変性を誘導するかについてはよく解っていない。この分子機構の解明を目的に, コレステロール代謝障害に起因する神経変性疾患 (アルツハイマー病と極めて類似するタウオパチーを来たす) である Niemann-Pick C1 (NPC1) 病マウスをモデルに選び, その脳および神経細胞を生化学的に解析した。

【方法】 NPC1 マウス脳およびそれらから準備した培養神経系細胞 (神経細胞とグリア細胞) に対して, 電子顕微

鏡による観察およびミトコンドリア機能評価 (JC-1 染色によるミトコンドリア膜電位の評価), ATP 定量, ATP 合成酵素活性を定量した。更にミトコンドリアを精製し, ミトコンドリア膜における脂質解析, ミトコンドリア膜コレステロールの増減による ATP 合成酵素活性への影響を検討した。

【結果】(1) NPC1 型マウス脳のミトコンドリアは小さく内部構造に乱れが見られた。

(2) NPC1 型の神経細胞/アストロサイトにおけるミトコンドリア膜電位は低下していた。

(3) NPC1 型マウス脳の ATP 量は, 野生型に比し約 60-70%

程度に低下していた。

(4) NPC1 型マウス脳の ATP 合成酵素活性は, 野生型に比し約 60%程度に低下していた。

(5) NPC1 型ミトコンドリア膜コレステロール濃度は野生型に比し有意に高値であり, コレステロール濃度を薬剤により低下させると ATP 合成酵素活性は野生型と同程度まで回復した。

(6) 野生型ミトコンドリア膜コレステロール濃度は上昇しても低下しても ATP 合成酵素活性は低下した(ミトコンドリア膜コレステロール濃度には至適濃度がある)。

【考察】(1) コレステロール代謝変動がミトコンドリア膜のコレステロール濃度変化を介して神経細胞変性を郵送

する可能性が示された。(2) アルツハイマー病では, AB に起因する神経細胞内コレステロール代謝変動がタウ蛋白のリン酸化亢進を伴う神経細胞変性(タウオパチー)を誘導するが, NPC1 病では, NPC1 欠損に起因する神経細胞内コレステロール代謝変動がタウオパチーを誘導すると考えられる。興味深いことにアルツハイマー病脳でもミトコンドリア機能障害がみられることから, この両疾患では神経変性過程の一部を共有すると考えられる。(3) 両疾患とも apoE4 型では病理進展が増強することから, apoE-HDL によるコレステロール輸送・供給機構がこの神経変性過程に関与(修復・恒常性維持等)していると推測される。

(P5) Shear Stress Induced Ionic Current and FM1-43 Influx via P2X₄ ATP-receptor as a Mechano-transduction Pathway

Fernando Lopez-Redondo¹, Kimiko Yamamoto², Joji Ando², Kishio Furuya¹,
Kumi Akita¹, Keiji Naruse^{1,3}, Masahiro Sokabe^{1,3,4}

(¹Cell Mechanosensing, SORST, JST; ²Dept Biomed Engin, Grad Sch Med, Univ Tokyo;
³Dept Cell Biophysics, Grad Sch Med, Nagoya Univ; ⁴Dept Mol Physiol, Natl Inst Physiol Sci)

Endothelial cells (ECs) sense hemodynamic forces (pressure and shear stress) from the flowing blood. P2X₄ is constitutively expressed at a high level in ECs. Yamamoto et al found a shear stress-dependent Ca²⁺ influx mediated by the P2X₄ purinergic receptor as confirmed by sense and anti-sense oligonucleotide techniques. Human embryonic kidney (HEK293) cells that have no Ca²⁺ response to flow, were able to show a cytosolic Ca²⁺ increase when they transfected with P2X₄. In order to determine if P2X₄ can sense the shear force, we investigated whether direct mechanical stimulation of P2X₄-containing outside-out

patches were activated by flow. Patch-clamp recordings from HEK293 cells stably expressing P2X₄ showed single channel activity following the flow stimulation with Hank's solution. The permeation property of the styryl dye FM1-43 through mechano-transduction channels was also assessed in our case. Epifluorescence and confocal microscopy showed FM1-43 (5 μM) uptake in P2X₄-transfected HEK293 cells after ATP (10 μM) or flow stimulations. These findings indicate functional activities of P2X₄ and suggest that P2X₄ could likely be a primary shear-stress sensor in endothelial cells.

(P6) マウス脳内のアデニン類含量およびアデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質3'-AMP 産生酵素系に及ぼす加齢の影響

藤森 廣幸, 宮本 晃洋, 堀内 隆宏, 芳生 秀光 (摂南大・薬・衛生分析化学)

組織内のアデニン類のうち ATP, ADP, 5'-AMP および cAMP 等は高エネルギー担体やエネルギー代謝中間物質であり, 種々の酵素活性調節因子あるいは細胞内外の

情報伝達物質としての作用を有する物質である。また, アデニン類は RNA や DNA などの核酸の構成成分であり, 遺伝情報の保存あるいは伝達に寄与していることは

周知の事実である。RNA 中のアデニン残基は RNA 分解酵素により最終的には、5'-AMP あるいは adenosine (Ado) の 3'位の水酸基にリン酸が結合した 3'-AMP に分解代謝される。3'-AMP は薬理的にはアデニル酸シクラーゼの内因性阻害物質として分類されているが、3'-AMP および 3'-AMP 産生酵素の生体内意義は未だ不明である。

出生直後のマウス脳は増殖性を有しており、漸次分化し記憶・学習等の高次機能を有する脳を形成していく。増殖性の細胞は RNA 代謝能が亢進するので、脳内の 3'-AMP 含量および 3'-AMP 産生酵素活性が変動する可能性がある。また、脳の構成細胞の増殖・分化に伴って脳内のアデニン類の含量も変動することが推察される。

非常に素人的発想に基づき本研究では、マウス脳内のアデニン類含量および 3'-AMP 産生酵素活性系に及ぼす出生前後からの加齢の影響を検討した。

ICR 系マウス脳からアデニン類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。アデニン類は標識試薬の chloroacetaldehyde で蛍光化した後、HPLC 法により分離・定量した。

胎児全脳および出生 1, 3 日齢の総アデニン量(ATP+ADP+AMP)および ATP 含量は約 0.5 および 0.2 nmol/mg 湿重量で、ほぼ同程度であった。1 から 8 週齢の脳の ATP 含量はみかけ急激に減少した。これは、エーテル麻醉下で脳を摘出してアデニン類を抽出するまでに、脳内の ATP が急速に 5'-AMP へと分解されることが推察された。胎児全脳の 3'-AMP 含量は低値であったが、生後 1 週間後に最大となり 3 週齢まで持続した。一方、胎児全脳中の 3'-AMP 産生酵素活性は高く、その活性は生後 1 週齢まで徐々に減少したが 2 週齢で最大となった。1 週齢マウス的大脑、小脳および脳幹の 3'-AMP 産生酵素活性は同程度であった。しかし、2 週齢になると大脑の産生酵素活性は約 10 倍にも上昇したが、小脳および脳幹の活性は変動しなかった。以上の結果より、胎児期では総アデニン量および 3'-AMP 産生酵素系は各々ほぼ一定値を示したが、出生後 1-2 週齢を境に脳内の ATP 分解系および 3'-AMP 産生酵素系が変動し、特に、大脑の 3'-AMP 産生酵素活性は急激に上昇し、大脑の何らかの機能を調節している可能性が示唆された。

(P7) アシドーシスによる新生ラット摘出脊髄反射電位の抑制作用におけるアデノシンの関与

乙黒 兼一, 山地 良彦, 伴 昌明, 太田 利男, 伊藤 茂男
(北海道大学 大学院獣医学研究科 薬理学教室)

アシドーシスは中枢神経系に重篤な機能不全を引き起こすことが知られており、低酸素とともに虚血性疾患における重要な病態のひとつである。近年、アシドーシスによってアデノシンが放出され冠血流量を増加させることが摘出心標本を用いた実験で報告されたが、中枢神経系におけるアシドーシスの影響とそれに対するアデノシンの関与については明らかにされていない。そこで本研究では新生ラット (0-3日齢) から摘出した脊髄半裁標本を用いて、電気刺激によって生じる脊髄反射電位に対する高炭酸惹起アシドーシスの作用と、その作用におけるアデノシンの関与について検討した。摘出脊髄標本を人工脳脊髄液 (ACSF, 5% CO₂, pH 7.3) で灌流し、脊髄後根(L3-L5)を電気刺激し対応する前根から monosynaptic reflex potential (MSR)と slow ventral root potential (sVRP) を記録した。高炭酸低 pH ACSF(20% CO₂, pH 6.7)は、

MSR と sVRP を可逆的に抑制した。A₁ 受容体拮抗薬 CPT はこの抑制反応を部分的に回復させたが、A_{2A} 受容体拮抗薬 ZM241385 は影響を与えなかった。低 pH ACSF (5% CO₂, pH 6.7) 又は高炭酸 ACSF (20% CO₂, pH 7.3) によっても MSR と sVRP は抑制されたが、CPT は低 pH ACSF による抑制反応のみを部分的に回復させ、高炭酸 ACSF による抑制には影響を与えなかった。高炭酸低 pH ACSF による抑制効果は 5'-エクトヌクレオチダーゼ阻害剤 AOPCP の影響を受けなかった。アデノシンキナーゼ阻害剤 NH₂dAD は高炭酸低 pH ACSF と同様に MSR と sVRP を抑制し、この抑制効果は CPT で回復した。一方アデノシンデアミナーゼ阻害剤 EHNA は MSR には影響を与えず sVRP のみを抑制し、この抑制効果は CPT で回復しなかった。高炭酸低 pH ACSF は細胞外アデノシン量を増加させた。以上の結果から高炭酸惹起アシドーシスによる

pH の低下がアデノシン放出を引き起こし、A₁ 受容体を介して脊髄反射電位を抑制していると考えられる。アデ

ノシン放出にはアデノシンキナーゼ活性の抑制が関与していることが示唆された。

(P8) アストロサイトにおける酸化ストレスによる細胞死誘導シグナリングに対する P2Y₁受容体活性化の拮抗作用

篠崎 陽一¹, 小泉 修一¹, 井上 和秀² (¹国立衛研・薬, ²九州大・薬・薬効解析)

ATP は中枢神経系 (CNS)において ATP 受容体 (P2 受容体) を介してグリア間 (gliotransmission)及びグリア-神経間 (glia-neuron transmission)の情報伝達を行う最も重要な分子の一つである。私は前年の研究会において ATP が P2Y₁ 受容体を介してアストロサイトの H₂O₂ 誘導性細胞死に対して保護作用を發揮する事を報告した。本研究ではアストロサイトにおける H₂O₂ 誘導性細胞死を引き起こす細胞内シグナリングの同定とそれに対する ATP/P2Y₁ 受容体の作用メカニズムの解明を目的とした。過去の報告からアストロサイトでは H₂O₂ 刺激により mitogen-activated protein kinases (MAPK) が活性化する事が知られている。薬理的解析, ウェスタンブロッティング及び免疫組織化学による解析から extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) の強 活性化とリン酸化 ERK1/2 (P-ERK1/2) の持続的な核への集積が H₂O₂ 誘導性細胞死に関わると考えられた。MEK1/2 阻害剤及び ATP は H₂O₂ 誘導性 ERK1/2 活性化, P-ERK1/2 の核集積, 細胞死を抑制した。GeneChip による解析の結果, ATP は ERK1/2 など MAPK の不活性化に関わる MAPK phosphatase の発現増加は誘導しなかったものの,

protein tyrosine phosphatase (PTP) の発現増加が誘導されており, さらに酵素活性の増加も確認された。ATP による保護作用および ERK1/2 活性化抑制作用は PTP 阻害剤 Na₃VO₄ によって消失した事から, ATP による PTP の発現及び活性増強がその保護作用に関わると考えられた。一方, H₂O₂ によって種々の protein tyrosine kinase (PTK) が活性化する事から, PTK の H₂O₂ 誘導性細胞死への関与を調べた。H₂O₂ はタンパクチロシンリン酸化を引き起こし, ATP は H₂O₂ によるチロシンリン酸化を抑制した。更に, H₂O₂ 誘導性細胞死が src family 選択的阻害剤 PP1 によって濃度依存的 (10~250 nM) に抑制される事, PP1 が H₂O₂ 誘導性タンパクチロシンリン酸化を抑制する事から H₂O₂ によって PTK, 特に src family が活性化する事によって細胞死が引き起こされる事が明らかとなった。PP1 処置によって H₂O₂ 誘導性 ERK1/2 活性化が抑制された事から, アストロサイトにおける H₂O₂ 誘導性細胞死は src family とそれに続く ERK1/2 活性化によって引き起こされる事が明らかとなった。ATP は H₂O₂ によって活性化される細胞内シグナルを抑制する事によって細胞死からアストロサイトを保護すると考えられた。

(P9) 脊髄後角の興奮性シナプス伝達に及ぼすアデノシン作用におけるヌクレオシド輸送体の役割

柳 涛, 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)

皮膚末梢から脊髄後角に至る痛み情報は, 後角第 II 層 (膠様質) においてアデノシンを含む様々な内因性鎮痛物質の働きにより制御を受けることはよく知られている。昨年の生理学研究所研究会において, アデノシンが膠様質の A₁ 型アデノシン受容体を活性化することにより (1) 膜を過分極すること, (2) 神経終末から起こるグルタミン酸放

出を抑制することが, アデノシンの鎮痛作用に寄与することを報告した。脊髄後角シナプスにおけるアデノシンは, ニューロンやグリア細胞から放出されたアデノシンや ATP に由来すると考えられている。今回, (1) アデノシンを細胞内外に輸送する equilibrative nucleoside-transport (ENT), (2) アデノシンをイノシンとアンモニアに分解す

る adenosine deaminase (ADA), そして(3) アデノシンを 5'-AMP にリン酸化する adenosine kinase (AK) の働きに注目し, それらの阻害剤がアデノシンによる膠様質興奮性シナプス伝達修飾作用にどんな作用を及ぼすかを調べた。

実験は, 成熟ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンに通常のブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用して行った。保持電位 -70 mV でアデノシン (200 μM) の 2 分間灌流投与により誘起される外向き膜電流は, ENT 阻害剤 (S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine, NBTI; 1 μM) や ADA 阻

害剤 (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine, EHNA; 1 μM) により, その持続時間を延長された。一方, AK 阻害剤 (iodotubercidine, IOT; 1 μM) はその膜電流の下降相を緩徐にした。アデノシン (10 μM) による自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の抑制は, その程度や経時変化について NBTI (1 μM), EHNA (1 μM), そして IOT (1 μM) により顕著な影響を及ぼされなかった。以上より, アデノシンの輸送体や代謝の働きの変化はそのシナプス後性作用に効果を及ぼすことが明らかになった。アデノシンのシナプス前性作用については, 今後, 更に検討する必要がある。

(P10) P2Y 受容体刺激による細胞膜 PtdIns(4,5)P₂の一過性の減少

藤居 祐介, 尾松 万里子, 松浦 博 (滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門)

ホスホリパーゼ C (PLC) 連関型 P2Y 受容体は, リガンドが結合すると細胞膜リン脂質の一員であるホスファチジルイノシトール-4,5-ニリン酸 (PIP₂) を分解し, ホスファチジルイノシトール-三リン酸 (IP₃) 及びジアシルグリセロール (DAG) を生成すると考えられている。PIP₂ の動態は PIP₂ に対して高い親和性を持つプレクストリンホモロジー (PH) ドメインと融合させた蛍光タンパク GFP を培養細胞に発現させることによって観察されてきたが, 単離細胞において観察することは困難であった。今回, 我々は抗 PIP₂ 抗体を用いて受容体刺激による細胞膜 PIP₂ の減少を経時的に測定する方法を確立した。褐色脂

肪細胞を ATP で刺激して細胞膜 PIP₂ の変化を測定したところ, 細胞膜における減少のピークは ATP では刺激後 10 秒であり, その後は徐々に再合成され, 2 分後には刺激前と同レベルまで回復することがわかった。ホスファチジルイノシトール-4-キナーゼ阻害剤であるウオルトマンニン存在下では, ATP によって細胞膜 PIP₂ は分解されたが再合成は見られなかった。また, 別の Gq/PLC 連関型受容体である α 受容体をノルアドレナリンで刺激しても同様の結果が得られた。これらのことから, P2Y 受容体刺激による細胞膜 PIP₂ の一過性の減少について検討した。

(P11) 感覚神経終末グリア網におけるカルシウム波伝播の二重様式とプリン受容体の関与について

岩永 ひろみ (北海道大学 大学院 医学研究科 組織・細胞学分野)

毛の動き受容器, 槍型神経終末のグリア細胞は, 分岐する突起でつながり合い, 異なる軸索終末間を連絡する網をつくる。一般に, 受容体を介する細胞内 Ca²⁺ 濃度の一過性上昇は, 細胞網工や上皮シートに沿って波として伝わり, 協調的な細胞活動を惹き起こすことが知られる。この細胞境界を越えた Ca 波の伝播機構に関し, 今までに対立する 2 説が提出された。ひとつは, ATP などの生理活性物質の細胞外拡散に基づく考え, もうひとつは,

細胞内信号物質のギャップ結合を介した移動を重視する考えである。2 つの信号伝播因子の関与を検討する目的で, ラット洞毛周囲槍型終末を膜片標本として分離し, 微小ガラス針でグリア網局所に接触刺激を与えときにみられる Ca 信号の生成・伝播過程を, 共焦点顕微鏡で解析した。

ガラス針で一つの槍型終末に軽く触れると, 直後に, その終末を包むグリア突起の Ca²⁺ 濃度が単峰性に上昇

し、15-150秒で回復した。比較的持続時間の長いCa²⁺応答のあとには、刺激点付近の2-5本の槍型終末で、伴行するグリア突起のCa²⁺濃度が、遅れて上昇するのが観察された。この2次的Ca²⁺信号には、各グリア突起の決まった場所から独自に生成するものと、突起の近位部から外来性に入ってくるものが区別され、前者は、刺激後1-5秒の潜時をもって刺激点から25μm以内の槍型終末に次々と波及し、応答グリア細胞は、必ずしも機械刺激を受けたグリア細胞と突起のつながりをもたなかった。一方、後者の信号は、刺激点からの距離に関わりなく、

機械刺激されたグリア細胞の突起に観察され、その突起と直接結合する他の細胞の突起に伝播することもあった。このグリア応答の潜時は、刺激局所から細胞体を経てその突起に至るまでの細胞質の道程に依存して長くなり、ときに数十秒に達した。終末グリアATP受容体P2Y₂の遮断剤suraminは、前者のタイプの信号伝播だけを阻害した。槍型感覚終末間をつなぐグリア網のCa²⁺信号は、ATPの細胞外拡散に基づく比較的早い伝播と細胞内信号物質の移動による遅い伝播の2重様式を示し、両者はそれぞれ、異なる細胞活動の調節に役立つと推測される。

(P12) アデノシン刺激によるMDCK細胞からのATP放出に対するシグナリングおよび放出部位の検討

右田 啓介, 趙 玉梅, 桂木 猛 (福岡大・医・薬理)

【背景】ATPは様々な刺激により細胞外に放出される。我々はアデノシン刺激によりMDCK細胞からATPが放出されることを報告した。アデノシン刺激は、A₁受容体を介してホスホリパーゼCを活性化し、細胞内IP₃を介して細胞内カルシウム(Ca²⁺)ストアーからCa²⁺が放出され、細胞外にATPが放出される。しかしながら、細胞内Ca²⁺上昇後のメカニズムについては明らかではない。そこで、本研究ではアデノシン刺激による細胞内Ca²⁺上昇後のATP放出経路および放出部位について検討した。

【方法】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、ミトコンドリアCa²⁺指示薬のRhod2/AMおよびミトコンドリアマーカースのMitoTracker Green FMを用いて、ミトコンドリア内Ca²⁺変化を測定した。

【結果および考察】MDCK細胞への10μMアデノシン刺

激は、ATPの細胞外放出を引き起こした。この放出は、ミトコンドリアのADP/ATPトランスポーター拮抗薬(10μM carboxyatractyoside, 10μM bongkreikic acid, 50μM N-Ethylmaleimide), Na⁺/Ca²⁺交換輸送体拮抗薬(20μM CGP 37157)あるいは酸化的リン酸化拮抗薬(10μM CCCP, 10μM oligomycin)の前処置により強く抑制された。また、抗癌剤の細胞外放出に関与しているMultidrug resistant protein(MRP)の拮抗薬(5 μM MK571, 100μM glibenclamide, 10μM benzbromarone, 100μM probenecid, 10μM cyclosporine A)の前処置により、アデノシンによるATPの細胞外放出はほぼ完全に抑制された。これらの結果から、MDCK細胞へのアデノシン刺激は、A₁受容体を介し細胞内Ca²⁺上昇の後、ミトコンドリアにシグナルが伝えられ、細胞膜のMRPを介してATPが細胞外に放出されることが示唆された。

(P13) 骨髄間質細胞のP2Y₂受容体を介したカルシウムシグナリングは細胞密度に依存して変化する

市川 純, 玄番 央恵 (関西医科大学・第2生理)

【要旨】ラット骨髄間質細胞はP2Y₂受容体を発現し、UTPに反応して細胞内カルシウム上昇を起こす。F344雄ラット大腿骨骨髓より採取した骨髄間質細胞を培養し、Fura-2を用いて細胞内カルシウム濃度測定を行った結

果、細胞密度によってカルシウム応答の様子が異なることがわかった。細胞密度を低・中・高と3段階にわけて観察すると、高密度であるほどUTPに反応しやすい。一方、低密度ではUTPに対する反応は鈍いが、カルシウム

ストアの枯渇により起こる容量性のカルシウム流入は大きい。そしてその中間の密度では、UTP 投与によりカルシウムオシレーションがみられた。このオシレーションは細胞外カルシウム除去により減衰し、また外液 UTP を washout するとただちに消失した。オシレーションの頻度は容量性カルシウム流入チャンネルのブロッカーおよび

ギャップジャンクションのブロッカーにより変動した。この UTP によるカルシウムオシレーションは低密度および高密度の状態ではみられないことから、骨髄間質細胞が細胞間コミュニケーションを形成する際、一過性に起こる現象であると考えられる。

(P14) 末梢神経損傷後における P2X 受容体の後根神経節での変化

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)

ATP 受容体としてイオンチャンネル型受容体の P2X receptor (P2X1-7)と G タンパク共役型受容体の P2Y receptor が存在しており、これらの受容体が痛みに関与していることが近年報告されている。

我々は、これまでに P2X receptor, P2Y receptor の naive ラット後根神経節(DRG)における詳細な発現の解析を行い、各サブタイプ別の特異的な発現パターンを報告してきた。DRG neuron には P2X2-6 が発現しており、P2X2, P2X3 receptor は小型・中型 neuron に、P2X5, P2X6 receptor は中型・大型 neuron に、P2X4 receptor はほとんど全ての neuron に発現しており、さらに non-neuronal cell には P2X4, P2X6, P2X7 receptor の発現が見られた(Kobayashi et. al. J. Comp. Neurol. 2005)。

末梢神経損傷後の痛みに関与しているかを調べるために、坐骨神経切断モデルを用いて DRG における P2X receptor の発現の変化を in situ hybridization 法を用いて詳細に検討した。

その結果、末梢神経損傷後の DRG では P2X 受容体の

発現に変化が見られた。最も発現の多い P2X3 receptor は発現細胞数、シグナル強度がやや減少していた。中型・大型 neuron で発現している P2X5, P2X6 は減少していた。P2X4 は neuron での発現は減少していたが satellite cell において増加が見られた。P2X7 は坐骨神経切断後も neuron にはほとんど存在しないが satellite cell での発現がやや増加していた。P2X2 は坐骨神経切断後 1 日から増加し始め 7 日でピークに達し、60 日まで増加したままであった。また、P2X2 は健側では小型・中型に発現しているが、術側で発現の増加が見られた neuron は主に中型細胞であった。

以上のことから、末梢神経損傷後の DRG neuron においては主に P2X2, P2X3 receptor が存在していることが分かった。健側の DRG では P2X2 と P2X3 の共存は比較的少なく、一方術側においてこの 2 つのサブタイプが共存を示す可能性が示唆されたことで、神経損傷後のヘテロ受容体による痛覚過敏のメカニズムとして興味深い。

(P15) 血管周皮細胞ペリサイトに発現する P2 受容体とその機能

藤下 加代子¹, 末石 浩二^{1,2}, 井上 和秀³, 小泉 修一¹

(¹ 国立衛研・薬理部, ² 福岡大学・薬・薬学疾患管理, ³ 九州大学・院・薬・薬効解析)

脳内におけるアストロサイトの生理学的、かつダイナミックな役割に注目が集まっている。特にニューロンを取り巻くアストロサイトは三者間シナプスを形成し、シナプスから漏れ出た伝達物質を受け取るだけでなく、自らも液性因子を放出し、シナプス伝達を制御することが知られてき

ている。他方でアストロサイトは、その足 (endfoot) を血管系に伸ばし、血管壁の周りを取り巻くことが知られている。血管系のうち、毛細血管や微小血管の血管壁外周にはペリサイト (周皮細胞) と呼ばれる細胞が存在しているが、その脳内における機能や役割についてはまだ明

らかになっていない。

私達は今回、このアストロサイト-ペリサイト-血管系連関に注目し、ペリサイトにおける ATP/P2 受容体を介したシグナルの生理学的な役割及びアストロサイト-ペリサイト間における ATP/P2 受容体を介したコミュニケーションについて検討を行なった。

ラット初代培養ペリサイトを用いた薬理学的な検討から、ペリサイトには P2Y1, P2Y2, P2Y4 受容体が発現しており、中でも主として機能している P2 受容体は P2Y2 受容体であると考えられた。そこで、ペリサイトを種々のアゴニストで灌流刺激し、細胞の収縮/弛緩を測定したところ、UTP 及び 2MeSADP でペリサイトの収縮が観察された。続いて、収縮/弛緩の実験モデルとして、単一のペリサイトにガラスピペットを用いて機械刺激を与えたところ、まず被刺激細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇が起こり、それが周囲のペリサイトへ、 Ca^{2+} wave となって伝播した。この Ca^{2+} wave 伝播は、aprase 及び P2 受容体

アンタゴニストによりほぼ抑制された。また、luciferin-luciferase 法に基づくフォトンカウントを行なった結果、ペリサイトから、機械刺激に応じて ATP が放出されることが明らかとなった。

脳表の比較的太い血管と異なり、脳深部の微小血管・毛細血管はアストロサイトの強い支配を受けており、このアストロサイトも強い ATP 放出能を有する。従って、血管周囲のペリサイトは、自ら放出した ATP 及びその周囲を取り囲むアストロサイト由来 ATP を受容することによりその収縮・弛緩、さらに局所血流量を調節している可能性示唆された。また、アストロサイト-ペリサイト共培養系を用いた検討から、ペリサイトで発生した Ca^{2+} wave が細胞外 ATP 及び P2 受容体依存的に、近隣のアストロサイトへも伝播することを明らかとした。従って、血管系の収縮・弛緩といった物理的なシグナルが ATP の化学シグナルに変換されてアストロサイトへフィードバックされる可能性も示唆された。

(P16) アストロサイトの pinocytosis における P2Y₆受容体の関わり

多田 薫¹, 戸崎 秀俊¹, 井上 和秀², 小泉 修一¹

(¹国立医薬品食品衛生研究所 薬理部, ²九州大学 大学院 薬学研究院 薬効解析学分野)

Pinocytosis は、細胞外液やそこに溶解する分子を細胞膜により取り囲み、小胞として細胞内に取り込む作用であり、全ての細胞において無刺激状態でも絶えず行われている(恒常的 pinocytosis)。Pinocytosis の生理的役割として、栄養分子やイオンなどの取り込み、有害物質の除去、細胞膜面積の調整など多くの可能性が示唆されているが、その機構について詳細はまだ明らかになっていない。一方、P2Y₆受容体は UDP 選択的 pyrimidinoceptor であり、その発現は免疫系細胞、脳、肺、心臓、血管など多くの部位に認められ、アストロサイト上での発現も報告されているが、その生理的役割は未だによく解っていない。そこで今回我々は、アストロサイトの pinocytosis における P2Y₆受容体の関与について検討した。

ラット初代培養アストロサイトの細胞外に蛍光標識ビーズを添加すると、時間依存的に蛍光が細胞内へ取り込まれることが flow cytometry や蛍光顕微鏡により観察されたことから、アストロサイトにおいて恒常的 pinocytosis が起こっていることが明らかになった。一方、この反応は、

reactive blue-2 前処置により部分的に抑制されたことから、一部プリン受容体(特に P2Y)の作用を介している可能性が考えられた。そこで、pinocytosis に対する各種 P2 受容体アゴニストの作用を検討したところ、UDP によって pinocytosis の促進が観察されたことから、P2Y₆受容体が関与することが示唆された。実際、アストロサイトには機能的な P2Y₆受容体が発現することを Ca^{2+} レスポンス及び Western blotting により確認した。次に恒常的 pinocytosis に対する P2Y₆受容体の関与について、P2Y₆受容体に対するアンチセンスヌクレオチド及び P2Y₆受容体アンタゴニスト MRS2578 を用いて検討した。その結果、アストロサイトにおける恒常的 pinocytosis は、これらの処置により部分的ながら(20~25%)阻害された。一般的に、受容体はアゴニスト刺激により細胞内へ内在化を起こすことが知られている。そこで、UDP 刺激により生じる pinocytosis が P2Y₆受容体の内在化によるものか否かについて検討した。まず、N 末に FLAG 標識した FLAG-P2Y₆受容体をヒトアストロサイトーマ 1321N1 細

胞上に発現させ、UDP で刺激すると pinocytosis が促進した。次に、UDP 刺激後の FLAG-P2Y₆ 受容体の内在化について、抗 FLAG 抗体を用いた live-labelling 法で検討した結果、UDP 刺激で pinocytosis が促進されている 1321N1 細胞においても、FLAG-P2Y₆ 受容体の内在化の程度は無刺激の状態と殆ど変わらなかった。以上より、P2Y₆ 受容体を介する pinocytosis は P2Y₆ 受容体の内在化に起因す

るものではないことが明らかになった。

本研究により、アストロサイトにおいて恒常的な pinocytosis が起こっていること、更にこの反応には部分的ながら P2Y₆ 受容体が関与することが示唆された。これは、アストロサイトが自発的にヌクレオチドを放出する事実と合わせて考察すると興味深い。

(P17) Regulation of purinergic P2X₂ receptor activity by phosphoinositides

藤原 祐一郎, 久保 義弘 (生理研 神経機能素子)

Activity regulation by phosphoinositides (PIP_ns) are known for various ion channels. In this study we aimed to examine whether the ATP-gated P2X₂ receptor channel is also regulated by PIP_ns or not, and analyzed the electrophysiological properties of P2X₂ wild type expressed in *Xenopus* oocytes under two-electrode voltage clamp. We observed that the preincubation in wortmannin or LY294002, PI3K inhibitors, accelerated the channel desensitization, while the preincubation in PAO, a PI4K inhibitor, decelerated it. As all PIP_ns are anionic lipids, we focused as the structural determinant on the proximal region of the C-terminus cytoplasmic domain where positively charged amino acids are clustered. We analyzed properties of several mutant P2X₂ channels, and observed that K360Q, K365Q, K369Q, R371Q or K374Q mutation accelerated the desensitization, while K365R or K369R

mutation did not. These results suggest that these positively charged amino acid residues play critical roles in preventing the channel desensitization. As a next step we purified a GST-tagged recombinant protein from L353 to S377 expressed in *E. coli*, and analyzed their binding to anionic lipids using a PIP_ns-coated nitrocellulose membrane. We observed that the recombinant protein including the positively charged region was bound to PIPs and PIP₂s, and that the bindings were eliminated by the K365Q or K369Q mutation. We also confirmed that a fusion protein between EGFP and the proximal C-terminus cytoplasmic domain of P2X₂ closely associated with the plasma membrane using a fluorescence assay. Taken together, we speculate that an electrostatic binding of the membrane PIP₂ to the proximal C-terminus cytoplasmic domain plays a critical role in maintaining the open channel activity.

(P18) ATP γ S によるアストロサイトでの MCP-1 産生誘導における MAP キナーゼカスケードの役割

片山 貴博, 南 雅文 (北大院・薬・薬理学分野)

ケモカインは白血球に対して走化活性化作用を有する一群のサイトカインの総称であり、現在までに 50 種近くが同定されている。Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1, CCL2)は代表的なケモカインの 1 つであり、脳虚血や多発性硬化症、ウイルス感染など、様々な病的条件下の脳内で産生誘導され、脳細胞傷害増悪への関与が示唆されている。一方、脳切片培養系は細胞構築や個々の細胞の活性化状態が単離分散培養系や共培養系と比較してより

in vivo に近い状態にあるため、活性化状態の違いによって様々な挙動を示すグリア細胞の研究に有用であると考えられる。我々はこの脳切片培養系を用いて、ATP γ S 処置によりアストロサイトにおいて一過性に MCP-1 産生誘導が惹起されることを見いだしている。MCP-1 産生誘導に関する細胞内情報伝達については、MAP キナーゼの関与を示す多くの研究がなされているが、刺激および細胞種によって、その寄与の方向性や度合いは様々である。

そこで本研究では、ATP γ S による MCP-1 産生誘導における MAP キナーゼの関与について脳切片培養系を用いて検討を行った。

生後 2-3 日齢 Wistar/ST ラットより、大脳皮質-線条体領域からなる冠状切片 (300 μ m 厚) を作製し、10-11 日間培養後、実験に用いた。ATP γ S 処置 24 時間後の培地中への MCP-1 遊離量は、MEK 阻害薬 PD98059 および JNK 阻害薬 SP600125 により有意に減少し、逆に p38 MAP kinase 阻害薬 SB203580 によって増加した。一方、3 時間の ATP γ S 処置直後の mRNA 発現に関して検討したとこ

ろ、PD98059 および SP600125 は発現抑制効果を示したが、SB203580 は mRNA 発現に影響を与えなかった。そこで SB203580 の MCP-1 mRNA 発現およびタンパク産生に対する効果を経時的に検討したところ、ともに SB203580 存在下では非存在下に比べ、mRNA 発現やタンパク産生の持続時間が延長された。

以上の結果より、脳切片培養系において ATP γ S による MCP-1 産生誘導に関して、ERK および JNK は転写レベルで促進的に調節していると考えられた。また、p38 MAP キナーゼを介した抑制的な調節機構の存在も示された。

11. 分子複合体と神経・シナプス機能

2005年6月23日－6月24日

代表・世話人：森 泰生（京都大学大学院工学研究科）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

- (1) 足場蛋白 S-SCAM によるシナプス分子複合体の形成
飯田 純子, 川田 現, 佐藤 勇次, 畑 裕 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科)
- (2) 神経活動依存的シナプス蛋白 Arc と PSD 蛋白とのスパインにおける相互作用解析
奥野 浩行¹, 藤井 哉¹, 成瀬 紘也¹, Shoaib Chowdhury², Paul Worley², 尾藤 晴彦¹
(¹ 東京大学大学院 医学系研究科 神経生化学, ² Johns Hopkins University School of Medicine)
- (3) 調節性分泌におけるシナプトタグミンファミリーの機能と多様性
福田 光則 (独立行政法人理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット)
- (4) 水とイオンチャネルの構造と機能
藤吉 好則 (京都大学大学院理学研究科生物物理学教室)
- (5) 電顕画像の単粒子解析法の開発とイオンチャネルの構造
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)
- (6) タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析
夏目 徹 (産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター
機能ゲノムグループ・タンパク質ネットワーク解析チーム)
- (7) 膜蛋白複合体プロテアーゼγセクレターゼの解析
富田 泰輔 (東京大学 大学院薬学系研究科 臨床薬学教室)
- (8) 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
立山充博, 久保義弘 (生理学研究所 神経機能素子研究部門)
- (9) 内因性カンピノイドによる線条体シナプス伝達の調節
鳴島 円¹, 内ヶ島 基政², 松井 稔³, 真鍋 俊也³, 渡辺 雅彦², 狩野 方伸¹
(¹ 金沢大院・医・シナプス発達・機能学, ² 北海道大院・医・解剖発生,
³ 東京大・医科研・基礎医科学・神経ネットワーク分野)
- (10) シナプス前 Gi/o 共役型受容体を介する微小シナプス電流の調節
山崎 美和子, 橋本 浩一, 狩野 方伸 (金沢大学 医学系研究科 シナプス発達・機能学)
- (11) 電位依存性 Ca²⁺チャネルβサブユニットの生理機能的複合体生成
森 泰生 (京都大学大学院工学研究科)

【参加者名】

森 泰生 (京都大学工学研究科), 畑 裕, 飯田 純子 (東京医科歯科大学), 尾藤 晴彦, 奥野 浩行 (東京大学大学院医学系研究科), 富田 泰輔, 宮下 紘幸 (東京大学大学院薬学系研究科), 真鍋 俊也, 関野 祐子, 李 楽天, 三輪 秀樹 (東京大学医学研究所), 福田 光則 (理化学研究所), 佐藤 主税, 夏目 徹 (産業技術総合研究所), 高橋 正身, 板倉 誠 (北里大学医学部), 井ノ口 馨 (三菱化学生命科学研究所), 阿部 輝雄 (新潟大学脳研), 片岡 正和 (信州大学工学部), 若森 実, 原 雄二, 清中 茂樹, 三木 崇史, 瓜生 幸嗣, 加藤 賢太, 山崎 浩史 (京

都大学工学研究科), 藤吉 好則, 西澤 知宏, 野間 健太郎, 倉持 陽平 (京都大学理学研究科), 鳴島 円, 山崎 美和子 (金沢大学医学研究科), 葉山 成樹 (ファイザー), 富永 真琴, 柴崎 貢志, 飯田 陶子, 富永 知子, 早坂 孝宏, 岩崎 広英, 村田 喜理, 岡村 康司, 久木田 文夫, 島 麻子, 三村 明史, 村山 奈美枝 (統合バイオ), 野田 昌晴 (基生研), 久保 義弘, 立山 充博, 中條 浩一, 藤原 祐一郎, 長友 克広, 石井 裕, 大塚 岳, 本蔵 直樹, 井上 剛, 根本 知己, 岸本 拓哉, 佐竹 伸一郎, 加瀬 大, 井本 敬二 (生理研)

(1) 足場蛋白 S-SCAM によるシナプス分子複合体の形成

飯田 純子, 川田 現, 佐藤 勇次, 畑 裕 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科)

足場蛋白質 S-SCAM はシナプスにおいて、接着分子 neuroligin, Dasm1 と直接、cadherin と間接に結合している。また、NMDA 受容体サブユニットと結合し、activin 受容体や delta 2 グルタミン酸受容体とも結合するといわれている。また catenin, RapGEP, kalirin-7, PTEN などのシグナル伝達分子と相互作用し、接着構造の周辺に受容体とそのシグナル伝達系からなる分子複合体を集積する役割を担っていると考えられている。さらに、PSD-95, MAGUIN, GKAP/SAPAP, axin などの他の足場蛋白とも相互作用しているところから、樹状突起スパインを支える大きな蛋白ネットワークの一部を構成する可能性も想定されている。これらの知見から、S-SCAM のような複

数の蛋白相互作用領域をもつ足場蛋白は、分子同士の一対一の結合を通じて、分子複合体を細胞の特定の場所に集積し、分子複合体内でのクロストークによりシグナル伝達の効率化を図るという従来から提示されていた役割にとどまらず、分子複合体そのものが機能する場を調節する役割も担う可能性が高いことが示唆される。実際、私達は最近、ノックアウトマウスの解析を含むいくつかの実験から、S-SCAM が樹状突起スパイン全体の形態制御に関わることを見出し、その分子機構を解析している。本研究では、その結果を中心に S-SCAM に関する最近の知見を発表する。

(2) 神経活動依存的シナプス蛋白 Arc と PSD 蛋白とのスパインにおける相互作用解析

奥野 浩行¹, 藤井 哉¹, 成瀬 紘也¹, Shoaib Chowdhury², Paul Worley², 尾藤 晴彦¹
(¹東京大学大学院 医学系研究科 神経生化学, ²Johns Hopkins University School of Medicine)

神経特異的前初期遺伝子の一つ Arc 遺伝子は刺激に対して極めて高い発現誘導性を示し、シナプスの長期可塑性に重要な役割を果たしていることが示唆されている。また、近年、遺伝子改変マウスや遺伝子発現抑制法を用いた個体解析により、記憶・学習等の脳高次機能における Arc 遺伝子の関与を示唆する知見が蓄積されてきた。しかしながら、シナプス活動による Arc mRNA の発現誘導制御メカニズムや Arc 蛋白の樹状突起やスパインへの輸送メカニズム、そしてシナプスでの役割という本質的な点に関しては未だ不明である。

本研究においては、Arc の機能を生化学的・細胞生物学的手法を用いて解析することを目的とし、Yeast 2-hybrid assay 等を用いて Arc 結合蛋白の候補を検索し

た。その結果、Arc はさまざまなシナプス関連タンパクと結合する可能性が示唆された。このタンパク-タンパク相互作用の生物学的・生理学的意義を解析するため、我々は蛍光エネルギー転移 (FRET) を応用した生細胞における相互作用の可視化を試みた。本研究では、任意の結合蛋白ペアから GFP 由来蛋白でラベルされた FRET ペアを単離する新しい方法を開発した。スクリーニングの結果得られた FRET ペアを海馬神経細胞に導入したところ、FRET が樹状突起およびスパインで認められ、生きている神経細胞において Arc と PSD 蛋白の相互作用を可視化することに成功した。これらの結果を、神経活動依存的な Arc の細胞内局在変化とともに議論したい。

(3) 調節性分泌におけるシナプトタグミンファミリーの機能と多様性

福田 光則 (独立行政法人理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット)

神経伝達物質の放出やホルモンの分泌に代表される

「調節性分泌」は膜輸送の一形態で、細胞内を移動してき

た小胞が外界からの刺激依存的に細胞膜と融合し小胞の内容物を細胞外へと放出する現象である。分泌を起こすには2種類の膜の結合が不可欠なため、分泌の制御に関わる分子には細胞膜の構成成分であるリン脂質の結合モチーフ（C2ドメインなど）を持つものが多い。中でも、シナプトタグミンに代表される「カルボキシル末端©型タンデムC2タンパク質」は主に分泌小胞上に存在し、C末端側に存在する二つのC2ドメインを介してカルシウムイオンやリン脂質を結合することから、調節性分泌の際の「カルシウムセンサー」として機能するものと考えられている。本研究ではまず、シナプス小胞輸送におけるシナプトタグミンI分子の機能、特にシナプトタグミンI分子には何故2個のC2ドメインが必要なのか、また膜輸送の制御におけるそれらの機能的な差違とは一体何なのかに焦点を当てる。

シナプトタグミンは哺乳動物において15種類ものアイソフォーム(I~XV)が存在し、様々な調節性分泌の制御に関与するものと考えられている。内分泌細胞にはシナプス小胞よりもサイズの大きい有芯顆粒が存在し、ここからカルシウム依存的にホルモンなどが分泌される。副

腎髄質クロマフィン細胞由来のPC12細胞においては少なくとも4種類のシナプトタグミンアイソフォーム(I, IV, VII, IX)が発現することが報告されている。そこで次に、これらのアイソフォームのうちどのシナプトタグミンが有芯顆粒開口放出の際の主要なカルシウムセンサーとして機能するのかをRNA干渉法及び機能阻害抗体を用いて検討した。その結果、シナプトタグミンIXがシナプトタグミンIと共に有芯顆粒上に存在し（シナプトタグミンIVは主にゴルジ体に存在）、ホルモン分泌を制御することが明らかとなった。また、細胞膜上のカルシウムセンサーとして報告されたシナプトタグミンVIIは蛋白質レベルでは検出できず、外来性に遺伝子導入したシナプトタグミンVIIもPC12細胞の細胞膜ではなく主に有芯顆粒上に存在することが明らかとなった。
[参考文献]

1. J. Biol. Chem. (2004) 279, 52677-52684
2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101, 9441-9446
3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101, 17855-17860
4. 蛋白質 核酸 酵素, (2004) 49, 2186-2197

(4) 水とイオンチャネルの構造と機能

藤吉 好則（京都大学大学院理学研究科生物物理学教室）

地球上のほとんどすべての生命は脂質2重膜で包まれた細胞から出来ており、それは水で満たされている。また、神経細胞をはじめ多くの細胞の重要な情報伝達は、受容体やイオンチャネルが存在する膜を介して行われているが、最近イオンチャネルの機能を構造から議論できるような構造生理学とも言うべき研究分野が発展を見せている。水を60%も含む我々の身体や細胞にとって、イオンチャネルが機能を発揮するには、イオンやプロトンと水の透過を選択的に調節できる仕組みが必要である。水だけを透過させて、イオンや低分子化合物さらにはプロトンをも通さない様な機能を有するアクアポリン-1(AQP1)と名付けられた分子量28kDの膜タンパク質が実際に発見され¹⁾、それ以後いろいろな生物種から多様な水チャネルが同定された。我々の身体にも13種類もの水チャネルが存在する。しかも、これらは水だけを選択する単なる“穴”ではなくて、個性豊かな多様な機能を備えたチャネルで

あることが分かってきている。

電子顕微鏡を用いると、生体高分子やその複合体の立体構造を直接観察することができるが、実際には、電子の物質との強い相互作用のために電子照射による試料損傷という深刻な問題が存在する。また、試料を真空中に持ち込むので、乾燥して変性してしまう問題が存在するが、試料を薄い非晶質の氷の中に閉じこめて観察する急速凍結法が開発されている²⁾。どちらの問題を解決するにも低温ステージを持った電子顕微鏡が必要になる³⁾。我々が独自に開発した極低温電子顕微鏡⁴⁾を用いて、ヒト由来の膜タンパク質、AQP1の原子モデルが初めて明らかにされた⁵⁾。AQP4も構造解析が容易ではない2層膜からなる2次元結晶であったが構造解析に成功した。それゆえ、AQP1だけでなく脳に発現している水チャネル(AQP4)等の機能が構造学的視点から理解できるようになってきた。これらの水チャネルは、アセチルコリン

受容体等と比較すると興味深い特徴も明らかになってきた。

極低温電子顕微鏡を用いたアセチルコリン受容体の構造解析により、このイオンチャネルのゲーティング機構が解明された⁶⁾。アセチルコリン受容体は、アセチルコリン結合ドメインと膜貫通ドメインがあるが、前者のドメインは、 β -シートから出来ており、後者は 4 本の α -ヘリックスから出来ている。膜貫通部分で一番狭いところは、穴の径が 6Å であり非常に大きい。水チャネルでは穴径が 3Å と小さいにもかかわらず 20 億分子もの水を 1 秒間に透過するが、イオンが直径 8Å という水和の殻を形成するので、このチャネルの 6Å の径を透過できない。アセチルコリンがアセチルコリン結合ドメインに結合すると内側の β パレル構造が 10 度右に回転する。その動きが、膜貫通ヘリックスの中の M2 ヘリックスを 10 度右回転させる。結果として、チャネルの最も狭い部分が 9Å

に広がるので、イオンは水和したままで透過できるようになる。

水やイオンチャネルを極低温電子顕微鏡を用いて“みた”結果、自然が作り上げた巧妙な分子機構が解明されたので、これらについて簡単に解説したい。

文献

- 1) Preston, G.M., Carrol, T.P. Guggino, W.B., Agre, P.: Science 256, 385-387 (1992)
- 2) Adrian, M, Dubochet, J. Lepault, J. and McDowall, A. W.: Nature 308, 32-36 (1984)
- 3) Fujiyoshi Y.: Adv. Biophys. 35, 25-80 (1998)
- 4) Fujiyoshi, Y. et al.: Ultramicroscopy 38, 241-251 (1991)
- 5) Murata, K. et al.: Nature 407, 599-605 (2000)
- 6) Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. Unwin, N.: Nature 423, 949-955 (2003)

(5) 電顕画像の単粒子解析法の開発とイオンチャネルの構造

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)

一般に我々の神経細胞のイオンチャネルは制御タンパク質と分子複合体を形成して、制御されている。この複合体の構造解析を容易にする技術が電子顕微鏡画像による単粒子構造解析と考えている。本解析技術とその開発過程を下記のチャネルの解析を例に説明したい。

車の急ブレーキを踏むときなどは、我々は視覚情報に対して数ミリ秒単位の時間経過で反応することができる。この素早い反応を可能にしているのが、神経細胞に存在する電圧感受性 Na チャネルである。Na チャネルは隣接したチャネルが開くと自分自身も開く性質がある。電圧感受性チャネルは 6 回の膜貫通部位を有するドメインが 4 つ結合することで機能蛋白質を形成する。

神経細胞の小胞膜には IP3 受容体とよばれるイオンチャネルが存在する。その役割は小胞内に存在する Ca イオンの放出を制御することである。我々の細胞内では Ca イオン濃度は通常、厳密に低い濃度に抑えられており、この小胞から放出される Ca イオンは細胞の様々な活動を制御し、その影響は我々の高次機能にも及んでいる。そのため、IP3 受容体チャネルは生体の活動にと

って重要である。IP3 受容体も同じく 6 回膜貫通型のイオンチャネルであり、その細胞質側に IP3 と Ca 両方が結合すると、開いて Ca を通す。しかしながら、これらのは乳類の 6 回膜貫通型蛋白質は結晶を作成しないため、その構造と機構はこれまで謎であった。

我々は京大藤吉教授、東大御子柴教授等との共同研究により、He ステージクライオ電子顕微鏡による数万枚の粒子像を基にこれらの構造を解明した。これら 2 種類のチャネルは基本的に共通した 2 層よりなる構造をしていることがわかる。しかし、IP3 受容体の内層の中心には Na チャネルと異なり明確な長い孔が見られる。この内部パイプはイオンの通路と思われ、パイプの間にもイオンが放出される切れ目が存在していた。そのためパイプから放出された Ca イオンは気球構造表面の多くの穴から四方八方へ放出されると思われる。これは細胞膜直下で細胞膜と平行に向いたイオン放出孔が存在し、イオンを平行方向に流し出す Na チャネルの構造と対照的である。IP3 受容体は表面に多くの孔を持つ気球状である。これは Ca イオンを広く様々な方向に散らばらせる仕組みを持つと思われ、そのことにより細胞質の様々な部位に情報を伝

搬させるのに好都合なのであろう。

C. Sato, Y. Ueno, K. Asai, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel and Y. Fujiyoshi: *Nature*, 409, 1047-1051, (2001).

C. Sato, K. Hamada, T. Ogura, A. Miyazawa, K. Iwasaki, Y. Hiroaki, K. Tani, A. Terauchi, Y. Fujiyoshi, K. Mikoshiba : *J. Mol. Biol.*, 336, 155-164 (2004).

(6) タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析

夏目 徹 (産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター
機能ゲノムグループ・タンパク質ネットワーク解析チーム)

ポスト・シーケンス時代を迎え、プロテミクスによる大規模・包括的なタンパク質機能解析が急務とされている。しかし、その進捗はかばかしくない。その理由は、タンパク質が化学的に多様で不安定性だからであり、質量分析を代表とするハイテク機器を駆使しようとも、核酸のように大規模・システムティックに扱うことが本質的に困難だからである。我々は、ダイナミックレンジが広く、且つ微量なタンパク質サンプルの解析を可能とするため、測定前処理の生化学的プロセス全てを改革・全体最適化を行い、超ナノ LC をオンライン化したタンデム質量分析システムを独自に開発した。本システムは、サブ・フェムトモルレベルの感度で、150 以上のコンポーネントからなる複雑なタンパク質複合体を、電気泳動などすることなく、1 時間ほどで決定することを可能とする。この解析プラットフォームと、ヒト完全長 cDNA を用いたタンパク質相互作用解析の大規模解析が現在進行中である¹⁾。

本講演では、1,500cDNA を使った feasibility study の概

要と細胞内シグナル伝達に関わる分子の Whole pathway 解析(Wnt/beta-Catenin, Classical MAP kinase, TNF-alpha pathway)概要と、Ubiquitination/Proteasome 系の大規模解析から明らかとなった新規な蛋白質修飾・分解システムの発見について紹介する²⁻¹¹⁾。

- 1) 夏目徹.(2004). “完全長ヒト cDNA を用いた大規模蛋白質ネットワーク解析”(2004). 蛋白質 核酸 酵素 PNE 49(14): 2222-29
- 2) Yanagida, M (2004). *J Biol Chem* 279, 1607-1614.
- 3) Bannai, H., (2004). *J Biol Chem* 279, 53427-34.
- 4) Ishigaki, S., (2004). *J Biol Chem* 279, 51376-85.
- 5) Komatsu, M., (2004). *Embo J* 23, 1977-1986.
- 6) Nakayama, K., (2004). *Dev Cell* 6, 661-672.
- 7) Oyama, M., (2004). *Genome Res* 14, 2048-2052.
- 8) Higo, T., (2004). *Cell* 120, 85-98
- 9) Kojima, H., (2005). *PNAS* 102, 4524-4529.
- 10) Yoshida, K., (2005). *Nat Cell Biol* 7, 278-285.
- 11) Matsuda, N., (2005). *DNA Repair* in press.

(7) 膜蛋白複合体プロテアーゼ γ セクレターゼの解析

富田 泰輔 (東京大学 大学院薬学系研究科 臨床薬学教室)

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子としてプレセニリン(PS)遺伝子が同定されている。PS は、 β アミロイドペプチドの凝集性を決定する C 末端側を切断する γ セクレターゼ活性に必須な分子であることが明らかにされている。また γ セクレターゼによって Notch, ErbB4 など様々な膜蛋白がその膜内配列中で切断をうけることが示されており、PS 依存性膜内配列切断を介した新しいシグナル伝達経路が想定されている。PS は分子内切断を受け、さ

らに Nicastrin(Nct), Aph-1, Pen-2 と相互作用して 2 MDa 以上の巨大な複合体を形成しており、現在ではこの膜蛋白複合体が γ セクレターゼそのものであると考えられている。われわれはこの γ セクレターゼ複合体について、特にそれぞれの分子の機能を明らかにすることを目的に、培養細胞を用いた過剰発現ないし RNAi によるノックダウン法を用いて検討した。その結果、 γ セクレターゼ複合体形成過程において、Nct/Aph-1 は PS 複体の安定化因

子として機能していること、Pen-2 は安定化された高分子量複合体の活性化因子として働いていることを明らかにした。さらにバキュロウイルス系を用いた γ セクレターゼ複合体を再構成系と、低分子量化合物を分子プローブとしたアプローチにより、その特異な切断過程の分子レベルでの理解・各構成因子の構造活性相関を明らかにすることを目的に検討を進めている。AD に対し原因療法的に神経細胞の変性・脱落を阻止できる可能性のあるセクレターゼ阻害剤が治療に一刻も早く実用可能となるこ

とが望まれる。また γ セクレターゼは、「疎水性環境にあるペプチド鎖を加水分解する」という、これまでにない蛋白分解の概念を提示するとともに、「リガンド依存的な連続したタンパク分解」による新たなシグナル伝達経路の可能性、そして様々な「一回膜貫通型蛋白の膜内配列の分解」などの新たな研究分野を生み出しつつある。今後 γ セクレターゼによる切断機構の分子的解明により、AD 発症機構の理解、治療・予防薬の開発のみならず、新しい酵素学・生物学が開けていくものと確信している。

(8) 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

立山充博, 久保義弘 (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り、mGluR1 がホモ二量体として構成されていること、グルタミン酸結合により細胞外領域の構造が変化することが報告されている。その結果に基づき、G 蛋白質の活性化に直結する mGluR1 の細胞内領域においても、二量体サブユニット間の配置が変化することが推測されてきたが、未だ不明であった。そこで、細胞外領域の構造変化に伴って起こる細胞内領域の動的構造変化のリアルタイム解析を目指して研究を進めた。異色の蛍光物質間の距離が近いほどエネルギーの受け渡し(FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 効率)が大きくなることが知られているので、構造変化を、FRET 効率の変化として光生理学的に捉えることを計画し、mGluR1 の細胞内領域の様々な箇所にも 2 色の蛍光蛋白を付加した。この分子の遺伝子を培養細胞に導入し、細胞膜に発現している分子の蛍光のみを全反射照明下で測光し、グルタミン酸投与に伴う FRET 効率の変化を解析した。その結果、(1)サブユニットの内部では明らかな構造変化は起こらない。(2)二量体サブユニットの、細胞内ループ 1 が相互に遠ざかる。(3)二量体サブユニットの、細胞内ループ 2 が相互に近づく。という知見が得られた。

これらの結果から、リガンド投与により、mGluR1 の細胞内領域においては、個々のサブユニットはあまり顕著な構造変化を起こさず、2 つのサブユニット間の相対的配置が変化することが想定された。

ところで、我々は、mGluR1 が、グルタミン酸のみならず、細胞外の Ca^{2+} 、 Gd^{3+} 等の多価陽イオンによっても活性化されることを以前報告した。 Gd^{3+} については、結晶構造解析により、その結合部位が、グルタミン酸結合部位と異なる 2 つのサブユニット間の負電荷を持つアミノ酸に富む領域に同定された。グルタミン酸と Gd^{3+} の結合部位、すなわち作用様式が異なるため、それぞれの結合に伴って起こる細胞内領域の構造変化、ひいては、G 蛋白質とのリンクが異なるという可能性も考えられる。この仮説を検証するために現在進めている、Gq 系(細胞内 Ca^{2+} 濃度)と Gs 系(細胞内 cAMP 濃度)の応答の同時記録の結果についても紹介したい。

Tateyama M, Abe H, Nakata H, Saitoh O, Kubo Y
Ligand- induced rearrangement of the intracellular dimeric conformation of metabotropic glutamate receptor 1a. *Nature Struct Molec Biol* 11: 637-642, 2004.

(9) 内因性カンナビノイドによる線条体シナプス伝達の調節

鳴島 円¹, 内ヶ島 基政², 松井 稔³, 真鍋 俊也³, 渡辺 雅彦², 狩野 方伸¹(¹金沢大院・医・シナプス発達・機能学, ²北海道大院・医・解剖発生,³東京大・医科研・基礎医科学・神経ネットワーク分野)

内因性カンナビノイドは脳のさまざまな部位で逆行性の抑制性シグナル伝達物質として働いている。内因性カンナビノイドはシナプス後細胞の脱分極に伴う Ca^{2+} 流入および Gq/11 タンパク共役型代謝型受容体の活性化により合成・放出されることが知られている。本研究では、大脳基底核神経回路の入力核であり、カンナビノイド受容体 (CB1 受容体) が多く発現している線条体に注目し、内因性カンナビノイドによるシナプス伝達修飾機構について解析した。

線条体出力細胞である中型有棘ニューロン (MS ニューロン) から whole cell 記録を行い、興奮性および抑制性シナプス電流 (EPSC, IPSC) を観測すると、IPSC でのみ、シナプス後細胞の脱分極によるシナプス伝達の一過性の減少が観測された。この IPSC の抑制は、CB1 受容体の阻害薬 (SR141716) により消失したことから、内因性カンナビノイドによるシナプス伝達調節であると考えられる。次に、MS ニューロンへのシナプス入力のコリン作動性介在ニューロン由来のアセチルコリンにより修飾さ

れることが知られているため、ムスカリン受容体と内因性カンナビノイドの関係について解析した。ムスカリン受容体の賦活薬 (oxotremorine-M) を投与すると、EPSC・IPSC ともに振幅が減少したが、IPSC に対する効果のみ、SR141716 により阻害された。また、低濃度の oxotremorine-M 存在下では、弱い脱分極によっても内因性カンナビノイドによるシナプス伝達抑制が誘起されることも示された。これらの oxotremorine-M の効果は、細胞内の G タンパク阻害薬 (GDP β S) の投与、M1 受容体の特異的阻害薬である pirenzepine の投与、および M1 受容体ノックアウトマウスで消失したことから、MS ニューロン上の M1 受容体が関与していると考えられる。以上の結果より、MS ニューロンへの抑制性入力に対して、MS ニューロンの脱分極、MS ニューロン上の M1 ムスカリン受容体の活性化および弱い脱分極と弱い受容体活性化の組み合わせにより、内因性カンナビノイド系を介した逆行性シナプス伝達抑制が起こることが明らかとなった。

(10) シナプス前 Gi/o 共役型受容体を介する微小シナプス電流の調節

山崎 美和子, 橋本 浩一, 狩野 方伸 (金沢大学 医学系研究科 シナプス発達・機能学)

カンナビノイド受容体は Gi/o 共役型受容体の一つであり、中枢神経系においてはシナプス前終末に存在し、その活性化により神経伝達物質の放出が抑制される。小脳プルキンエ細胞では、興奮性および抑制性入力の両方のシナプス前終末に 1 型カンナビノイド受容体 (CB1 受容体) が存在する。興奮性および抑制性の入力線維の刺激によって誘発される活動電位依存的なシナプス伝達は CB1 受容体活性化によって抑制される。しかし、活動電位に依存しない微小シナプス後電流に関しては、CB1 受容体活性化の効果が異なる。即ち、微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) はカンナビノイド受容体アゴニスト (WIN55,212-2) により減弱するが、微小興奮性シナプ

ス後電流 (mEPSC) は影響されないことが知られている。この違いが何に起因するものなのかを明らかにする目的で、生後 2 週のマウス小脳急性スライスを用いて mIPSC/mEPSC 記録を行い、種々の細胞外カルシウム濃度における WIN55,212-2 の効果を調べた。従来の報告と同様、細胞外カルシウム濃度 2 mM (生理的標準濃度) では WIN55,212-2 投与により mIPSC のみが抑制され、mEPSC は抑制されなかった。細胞外カルシウム濃度を 2 mM から 0 mM に下げると mIPSC の頻度は減少し、WIN55,212-2 投与による頻度の減少が起らなくなった。一方細胞外カルシウム濃度を 0 mM に下げても mEPSC の頻度は変化しなかった。次に細胞外カルシウム

濃度を5 mMに上げると mEPSC の頻度は著しく増加し、WIN55,212-2 投与による抑制を受けるようになった。またカルシウムイオノフォア (A23187) 投与でも同様の現象が観察された。

以上の結果より、CB1 受容体活性化がカルシウム依存性の mIPSC/mEPSC を選択的に抑制する可能性が示唆された。細胞外カルシウム濃度 2 mM において、抑制性の終末内は恒常的にカルシウム濃度が高く、カルシウム依存性の mIPSC が生じているために WIN55,212-2 による抑制を受けやすいが、興奮性終末内はカルシウム濃度が低

いためにカルシウム依存性の mEPSC が殆ど生じておらず WIN55,212-2 による抑制を受けないという可能性が考えられた。さらには同じ Gi/o 共役型受容体である GABA_B 受容体やグループ III 代謝型グルタミン酸受容体の活性化も、mEPSC および mIPSC に対して CB1 受容体活性化と同様の効果を示すことが明らかになった。よって、プルキンエ細胞における、Gi/o 共役型受容体活性化を介する mIPSC/mEPSC の調節の程度は、カルシウム依存性の放出の程度に依存する可能性が示唆された。

(11) 電位依存性 Ca²⁺チャネルβサブユニットの生理機能的複合体生成

森 泰生 (京都大学大学院工学研究科)

神経系の電位依存性 Ca²⁺チャネルはα1, β, α2δ, γの4つのサブユニットから構成されている。α1 はチャネルポアを形成し、電位センサーの機能を担うなどチャネル形成に中心的な役割を担っているのに対し、β, α2δ, γ各副サブユニット群はα1 に結合してその発現・機能調節を行っており、これらを欠いたα1 単体では生理的なチャネルとして機能する事は出来ない。特にβサブユニットによる調節機能は重要であり、α1 を介した Ca²⁺電流はβの存在によって劇的に増大する。

神経前終末部からの神経伝達物質の放出は、電位依存性 Ca²⁺チャネルを介したカルシウム流入により惹起される。しかしその開口放出部近傍にどのように電位依存性カルシウムチャネル群がターゲットされるのか、など神

経終末部における Ca²⁺チャネル活性制御機構に関しては未だ不明な点が多い。我々はβサブユニットが電位依存性チャネルサブユニットとしての機能以外に、新たな役割を有する可能性があると考え、新規結合因子の単離を試みた。

酵母ツーハイブリッド法を用いたβ相互作用蛋白質探索の結果、いくつかのエキソサイトーシス関連分子を得、電位依存性 Ca²⁺チャネルのβサブユニットを介して、電気生理学的にチャネル特性を変化させる事が明らかとなった。

本研究は、神経伝達物質放出時における電位依存性 Ca²⁺チャネル活性調節機構解明につながるものと考えられる。

12. 脳磁場計測によるヒト脳機能マッピング

2005年11月2日－11月4日

代表・世話人：柿木 隆介（大学共同利用法人・自然科学研究機構・生理学研究所）

所内対応者：柿木 隆介（大学共同利用法人・自然科学研究機構・生理学研究所）

- (1) 脳磁図による視覚性運動検出機構の探索（オープニングレクチャー）
金桶吉起（生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門）
- (2) 『目の動き』に関わる顔輪郭情報の影響
三木研作^{1,2}，渡辺昌子²，本多結城子^{2,3}，中村舞子^{2,4}，柿木隆介^{2,3,5}
(¹日本宇宙フォーラム，²生理学研究所，³総合研究大学院大学生命科学研究科，
⁴東京慈恵医科大学神経内科，⁵科学技術振興財団社会技術研究システム)
- (3) 表情の変化する顔刺激を用いた脳磁場反応の検討
中村舞子^{1,2}，三木研作^{1,3}，渡辺昌子¹，本多結城子^{1,4}，井上聖啓²，柿木隆介^{1,4,5}
(¹自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門，
²東京慈恵会医科大学 神経内科，³日本宇宙フォーラム，
⁴総合研究大学院大学 生命科学研究科 生理科学専攻，
⁵科学技術振興財団 社会技術研究システム)
- (4) 顔認知における意識閾値以下の刺激の影響
寶珠山稔，柿木隆介
(名古屋大学医学部保健学科，生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)
- (5) 球面型生体磁気計測システムを用いた長潜時聴覚応答の記録
太田圭亮，高松亮介，小山幸子，栗城眞也
(北海道大学 電子科学研究所 量子計測研究分野)
- (6) 合成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，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)
- (7) 数字の循環読み上げ音声による聴覚ミスマッチ脳磁場
官振傑¹，湯本真人²，狩野章太郎¹，伊藤憲治³，尾形エリカ⁴，水落智美⁴，加我君孝^{1,4}
(¹東京大学医学部 耳鼻咽喉科，²検査部，³認知・言語医学，⁴感覚・運動神経科学)
- (8) ミスマッチ陰性成分は多モード内部モデルの予測誤差を反映する
湯本真人¹，伊藤憲治³，宇野彰⁶，狩野章太郎²，金子裕⁴，斎藤治⁵，加我君孝²，矢富裕¹
(¹東京大学医学部病態診断医学，²耳鼻咽喉科学，³認知・言語医学，
⁴国立精神・神経センター武蔵病院脳外科，⁵精神科，⁶筑波大学人間総合科学)
- (9) 疎性を用いた MEG の解析手法の提案
黒田俊道（早稲田大学大学院理工学研究科）
- (10) 深部にあるアルファ波と高周波リズムの発生源
川端啓介¹，内野勝郎²，村田和優³，外池光雄⁴，岩木直⁵
(¹前大阪府立大学先端研，²平成医療学園専門学校，³藍野学園短大，⁴千葉大工学部，⁵産総研関西支所)
- (11) MEG40Hz成分の位相同期の計測とそのモデル化の試み
田中慶太，川勝真喜，根本幾（東京電機大学）

(12) 随意運動後のβ帯域同期と性格傾向の相関

志々田一宏¹, 橋詰顕², 小野田慶一¹, 山下英尚¹, 岡本泰昌¹, 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)

(13) 運動準備過程における一次および二次体性感覚野活動の時系列的変動

和坂俊昭^{1, 2}, 柿木隆介¹
(¹ 自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門, ² 日本宇宙フォーラム)

(14) 刺激における不調和さの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討

原田暢善¹, 岩木直¹, 外池光雄²
(¹ 産業技術総合研究所関西センター 人間福祉医工学部門, ² 千葉大学工学部 メディカルシステム工学科)

(15) Random-dot motion からの 3 次元構造知覚に関連する脳内過程

岩木直¹, 外池光雄², John W. Belliveau³
(¹ 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門, ² 千葉大学工学部 メディカルシステム工学科,
³ Massachusetts General Hospital)

(16) 種々の第 2 次仮現運動に対するヒト脳反応

田中絵実, 野口泰基, 金桶吉起, 柿木隆介
(生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

(17) Prader-Willi 症候群の体性感覚誘発磁場所見— Angelman 症候群との相違について—

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 北海道大学大学院医学研究科小児科, ² 北海道大学病院臨床検査部)

(18) 聴覚性てんかん発作を有するてんかん患者の脳磁図

福島克之, 仲野久美子, 芳村勝城, 渡辺裕貴
(国立病院機構静岡てんかん神経医療センター)

(19) 短周期ペア刺激の聴覚誘発 M50 回復に反映される統合失調症の左半球機能異常

湯本真人¹, 斎藤治⁴, 宇野彰⁶, 伊藤憲治³, 宇川義一², 金子裕⁵, 矢富裕¹
(¹ 東京大学医学部病態診断医学, ² 神経内科学, ³ 認知・言語医学,
⁴ 国立精神・神経センター武蔵病院精神科, ⁵ 脳外科, ⁶ 筑波大学人間総合科学)

(20) 左痙性不全片麻痺の患者にみられた mirror movement について

久保田雅也, 木村育美, 広瀬宏之, 榊原洋一
(都立八王子小児病院小児内科, 成育医療センター, お茶の水女子大学)

(21) においの知覚に及ぼす認知的要因の効果—MEG および脳波の同時計測による検討

小林剛史^{1,2}, 小早川達³, 秋山幸子^{2,3}, 戸田英樹^{2,4}, 斉藤幸子^{2,5}
(¹ 文京学院大学, ² 産業技術総合研究所, ³ 日本体育大学, ⁴ 筑波大学, ⁵ 斉藤幸子味覚嗅覚研究所)

(22) 逃したくない被験者をなんとか計測する方法

小早川達¹, 小見山彩子², 池田稔², 戸田英樹¹
(¹ 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門, ² 日本大学医学部)

(23) 音楽の基本構造の認知に関わる神経的基盤の解明: MEG 計測による検討

大塚明香, 長谷川寿一, 栗城眞也
(東京大学 21 世紀 COE プログラム「心とことば-進化認知科学的展開」, 北海道大学 電子科学研究所)

(24) 調性音楽における和音の階層構造と脳磁場の関係

福田大輔, 大塚明香, 栗城眞也, 福田正人, 村田昇
(早稲田大学大学院 理工学研究科 電気情報生命専攻)

- (25) 音色のカテゴリ一知覚の聴性誘発 N100m 潜時への反映
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 東京大学医学部付属病院検査部,
³ 東京大学医学部付属病院耳鼻咽喉科, ⁴ 東京大学大学院医学系研究科認知・言語医学)
- (26) 体性感覚誘発磁場における素のインパルス応答への一考察
岸田邦治¹, 横田康成¹, 深井英和¹, 篠崎和弘², 石井良平³, 鶴飼聡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)
- (27) Statistical Parametric Mapping を用いた Minimum Current Estimation の電流源推定結果の標準脳化
橋詰顕, 栗栖薫, 飯田幸治, 白水洋史, 志々田一宏, 小野田慶一
(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)
- (28) 電流源の方向を大脳皮質表面に垂直に限定した脳内活動源推定法の開発
樋脇治¹, 樋口信司¹, 早見武人¹, 橋詰 顕², 栗栖 薫²
(¹ 広島市立大学情報科学部, ² 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)
- (29) 体性感覚二点刺激による MMNm 反応
赤塚康介, 柿木隆介
(生理学研究所 感覚運動調節研究部門, 総合研究大学院大学 生命科学研究所)
- (30) 痛覚関連体性感覚誘発脳磁場に対する睡眠の影響
王晓宏, 乾幸二, 柿木隆介 (生理学研究所 感覚運動調節研究部門)
- (31) 高頻度反復刺激による視覚誘発脳磁場反応: 健常若年成人と老年者での検討
後藤純信^{1,2}, 飛松省三^{1,2}
(¹ 国際医療福祉大学リハビリテーション学部作業療学科, ² 九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理)
- (32) 時間表象の形成に関する脳内メカニズム
野口泰基, 柿木隆介
(生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)
- (33) 日本語単語 (漢字) と英語単語の黙読時における左右側頭後頭葉の活動について
寺田さとみ¹, 中村仁洋², 原信子², 湯本真人³, 宇川義一¹
(¹ 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科,
² 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻音声・言語医学, ³ 東京大学医学部病態診断医学)
- (34) 音の中心周波数と帯域幅に関わる脳磁界反応
添田喜治, 中川誠司
(産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門)
- (35) 高周波可聴音の立ち上がり時間が聴覚誘発脳磁界に及ぼす影響
萬谷惇^{1,2}, 中川誠司¹, 小谷賢太郎³, 堀井健³
(¹ 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門, ² 関西大学大学院工学研究科,
³ 関西大学工学部システムマネジメント工学科)
- (36) 高周波可聴音および骨導超音波に対する聴覚誘発脳磁界の計測
中川誠司 (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)
- (37) ゆらぎを持つ光源に対する心理的プリファレンスと大脳活動との関係
岡本洋輔^{1,2}, 中川誠司², 矢野隆¹, 安藤四一¹
(¹ 熊本大学大学院自然科学研究科, ² 産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門)

(38) 視覚逆方向マスキングの有無による脳活動の変化案

川勝真喜, 阿部雅也, 田中慶太, 小谷誠 (東京電機大学)

(39) 脳磁図, 網膜電図同時記録による視覚野初期応答潜時の検討

乾幸二, 三木研作, 金桶吉起, 柿木隆介

(生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

(40) 漢字, ハングル文字呈示による言語優位半球の同定一周波数解析とフラクタル次元解析の比較

金子裕, 岡崎光俊, 湯本真人

(¹国立精神神経センター武蔵病院脳神経外科武蔵病院神経外科・臨床検査部,

²国立精神・神経センター武蔵病院精神科, ³東京大学医学部附属病院検査部)

(41) 日本語における母音無声化の脳内表現

船津誠也¹, 今泉敏¹, 橋詰顕², 栗栖薫²

(¹県立広島大学, ²広島大学医学部)

(42) 発話理解時における感情認知処理過程—MEGを用いた検討

矢倉晴子¹, 外池光雄^{2,3}, 中川誠司², 岩木直², 西原玲子¹, 荻野敏¹

(¹大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻博士後期過程統合保健看護科学分野,

²千葉大学工学部メディカルシステム工学科, ³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)

【参加者名】

赤塚 康介 (生理研・統合生理・感覚運動), 赤松裕介 (東大・医), 綾部 友亮 (慶應大大院・社会学), 荒木 一将 (愛学大・歯), 石津 智大 (早大・文学), 乾 幸二 (生理研・統合生理・感覚運動), 岩木 直 (産総研・人間福祉), 江川 潔 (北大大院・医), 王 暁宏 (生理研・統合生理・感覚運動), 太田 圭亮 (北大・電研), 大塚 明香 (東京大学 21COE), 岡 さち子 (東薬大・生命科学), 尾形 エリカ (東大大院・医), 緒方 克敏 (電通大大院・システム工学), 緒方 勝也 (九大大院・脳研臨床神経生理), 岡本 洋輔 (熊大大院・自然科学), 小川 真司 (日医大・千葉北総病院), 荻野 祐一 (群大大院・医), 加古 真祥 (早大・理工学), 葛西 裕介 (早大・理工学), 金子 裕 (国立精神神経センター・武蔵病院), 川勝 真喜 (東京電機大学), 川端 啓介 (前大阪府大・先端科学研), 官 振傑 (東大・医), 菅野 正光 (広大・保健学), 岸田 邦治 (岐阜大・工学部), 木村 育美 (国立成育医療センター), 木村 壮志 (早大学・理工学), 久保田 雅也 (都八王子小児病院), 栗城 眞也 (北大・電研), 黒田 俊道 (早大・理工学), 後藤 純信 (国際医療福祉大・リハビリ), 小早川 達 (産総研・人間福祉), 小林 剛史 (文京学院大・人間学), 志々田 一宏 (広大大院・医歯薬), 設楽 直也 (群大・耳鼻咽喉), 白井 健吾 (早大・理工学), 関口 貴裕 (東京学芸大・教育心理), 添田 喜治 (産総研・人間福祉), 高松 亮介 (北大・電研), 武

井 雄一 (群大大院・脳神経精神行動), 田代 研之 (九大大院・医), 田中 絵実 (生理研・統合生理・感覚運動), 田中 慶太 (東京電機大・先端工学), 辻 健史 (生理研・統合生理・感覚運動), 寺田 さとみ (東大大院・医), 飛松 省三 (九大・医), 中川 誠司 (産総研・人間福祉), 長崎 信一 (広大・医歯薬), 長峯 隆 (京大・医・高次脳機能研究センター), 中村 昭範 (国立長寿医療センター), 中村 仁洋 (東大大・医), 中村 祐 (早大・理工学), 中村 舞子 (生理研・統合生理・感覚運動), 野口 泰基 (生理研・統合生理・感覚運動), 橋詰 顕 (広大大院・医歯薬), 濱田 泰一 (金工大・生命情報学科), 原 信子 (東大大・医), 原田 暢善 (産総研・人間福祉), 樋脇 治 (広島市立大・情報科学), 福士 珠美 (科学技術振興機構・社会技術研究開発センター), 福島 克之 (国立病院機構・静岡てんかん・神経医療センター), 福田 大輔 (早大大院・理工学), 藤田 貴子 (九大・医・脳研臨床神経生理), 伏見 健志 (広大・医・保健学), 船津 誠也 (県立広大・学術情報センター), 寶珠山 稔 (名古屋大・医・保健), 前川 敏彦 (九大大院・医・脳研臨床神経生理), 前澤 仁志 (京大・医・高次脳機能研究センター), 萬谷 惇 (産総研・人間福祉), 水落 智美 (東大大院・医), 矢倉 晴子 (阪大大院・医・保健), 山崎 貴男 (九大大院・医・脳研臨床神経生理), 山田 由美 (北陸先端科学技術大学院大学・知識科学), 湯本 真人 (東大・医・病

態診断医学), 芳村 勝城 (国立病院機構・静岡てんかん・神経医療センター), 和坂 俊昭 (生理研・統合生理・感覚運動), 渡辺 究 (早大・理工学), 渡邊 昌子 (生理研・

統合生理・感覚運動), 渡辺 裕貴 (国立病院機構・静岡てんかん・神経医療センター)

【概要】

本年の研究会は, 参加者が約 90 名にのぼり, 42 演題が発表され, 極めて活発な議論が行われた。また, 約 40 名の大学院生が参加し, 3 日間にわたる研究会期間を通じて, 若い研究者達の熱心な討論は非常に印象深いものであった。

生理学研究所に日本で初めての大型脳磁計が導入されてから, 15 年が過ぎようとしている。その間に, 日本では脳磁図研究が著しく進み, 現在では, 日本は世界で最も脳磁図研究の盛んな国といっても過言ではない。現在は, 全国の主要大学の大学病院に脳磁計が設置され臨床応用の試みが盛んに行われている。それと平行して, 生理学研究所をはじめとする多くの研究機関にも脳磁計が設置され, ヒトの脳機能の解明を目指して研究が続けられている。

今回の研究会では, 演題は「視覚」, 「顔認知」, 「聴覚」,

「体性感覚」, 「嗅覚, 味覚」, 「運動」, 「言語」, 「臨床応用」, 「工学」といった幅広いジャンルから発表され, わが国における脳磁図研究の裾野の広がりを実感させられた。しかし, 脳磁図という共通の手法によって行われた研究ばかりであり, 例え自分の専門外であっても十分に理解可能であり, また勉強になる発表ばかりであった。

この 10 年間は機能的 MRI の熱狂的なブームが, 特に米国と英国においておこり, 日本でも近年, 研究者が著しく増加してきている。しかし, 脳磁図の持つ高い時間分解能による時間情報の詳細な検討は, 機能的 MRI では行えないものであり, 今後も脳磁図の長所を十分に生かした研究の発展をのぞんでやまない。

統合生理研究系 感覚運動調節部門・教授
柿木隆介

(1) 脳磁図による視覚性運動検出機構の探索 (オープニングレクチャー)

金桶吉起 (生理学研究所・統合生理研究系・感覚運動調節研究部門)

“運動がどのような神経機構のもとに視知覚されるか”という問題に, 多くの分野の研究者が 70 年以上も取り組んできた。そして脳磁図という手法がこの研究に使用され始めたのは, わずか 10 年前のことである。以来多くの脳磁図研究がこの分野の発展に貢献してきたが, それらはかならずしも他の分野 (神経生理学, 心理学など) の研究者に広く受け入れられているわけではない。その理

由のひとつには, 脳磁図という手法に対する懐疑心があると思われる。本講演では運動速度の検出機構, 運動の空間的統合の神経機構について, 我々の研究成果を最新の知見を含めて紹介しつつ, なぜ脳磁図研究が他の分野の研究者に認められにくいのか, またどのようにすれば分野を超えて広く認知されるようになるのかを議論したい。

(2) 『目の動き』に関わる顔輪郭情報の影響

三木研作^{1,2}, 渡辺昌子², 本多結城子^{2,3}, 中村舞子^{2,4}, 柿木隆介^{2,3,5}

¹日本宇宙フォーラム, ²生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門,

³総合研究大学院大学生命科学研究科, ⁴東京慈恵医科大学神経内科,

⁵科学技術振興財団社会技術研究システム)

我々はこれまで「顔の部分の動き」に対するヒトの運動視中枢 (MT/V5 野) の活動について脳磁図を用い調べ

てきた。今回, 「目の動き」が単なる「ドットの動き」と区別されるための要因を検討した。

仮現運動を利用した2条件の視覚刺激を用い誘発脳磁場を測定した。(1)EYES: 模式的な顔の絵(輪郭, 目, 口)の中で目の部分が動く刺激。(2)DOTS: EYESより輪郭を除いた刺激。単一等価電流双極子モデルを用い, 活動源を推定した。

全被験者で明瞭な誘発磁場が記録され, 活動源は後頭側頭部, MT/V5野付近に位置推定された。活動源の大き

さ, 頂点潜時, 推定位置に関し検討を行った。頂点潜時及び推定位置に両条件で有意な差はなかったが, 活動の大きさは, EYESの方がDOTSよりも有意に大きかった。

ヒトのMT/V5野で「目の動き」に対する特異的な活動が起こりその際顔の輪郭情報が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(3) 表情の変化する顔刺激を用いた脳磁場反応の検討

中村舞子^{1,2}, 三木研作^{1,3}, 渡辺昌子¹, 本多結城子^{1,4}, 井上聖啓², 柿木隆介^{1,4,5}

(¹自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門,

²東京慈恵会医科大学 神経内科, ³日本宇宙フォーラム,

⁴総合研究大学院大学 生命科学研究所 生理科学専攻, ⁵科学技術振興財団 社会技術研究システム)

【目的】表情認知に関する報告のほとんどは静止画を用いたもので, 表情の変化に着目したものは少ない。我々は仮現運動刺激を利用し中性顔から表情顔へ, あるいはその逆へ変化する際の脳活動につき検討した。

【方法】対象は右利き健常成人10名。刺激として中性顔(N), 表情顔(笑顔, H, および嫌悪顔, D), 表情を伴わない顔(歯を出す, T, および閉眼, C)の顔写真を用いた。第1刺激(S1)と第2刺激(S2)を連続して提示し, 全頭型脳磁計を用いて記録した。

【結果】被験者8例で後頭側頭部に刺激提示後140~200msに最大振幅を持つ反応が得られた。この反応の最大振幅および頂点潜時につき検討したところ, S1間には差を認めなかったが, S2(H, D)で得られた振幅は他のS2よりも大きかった。S2(N)の振幅には先行するS1による差はなかった。

【考察】特定の表情へと変化する動きは後頭側頭部で特異的に処理される可能性が示唆された。

(4) 顔認知における意識閾値以下の刺激の影響

寶珠山稔, 柿木隆介

(名古屋大学医学部保健学科, 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

【目的】これまでの研究から, ヒトでは視覚刺激としての顔が優位性をもって処理されていることが示されている。刺激はそれが意識にのぼるまでにすでに一定の情報処理がなされていると考えられるが, 本研究では刺激としての顔が意識閾値以下の刺激でも優位性をもって処理されていることを示す。

【方法】黒いチェッカー地に赤と緑で描かれた画像と, 赤と緑を反転させた同じ画像を高頻度(100Hz)で交互に呈示することでcolor-opponent flicker effectを用いた視覚閾値以

下(subliminal)の刺激を作成することができる。顔, 花, ランダムの画像をsubliminal刺激として与え, その後に顔あるいは花の画像を呈示し視覚誘発脳磁場(VEF)を記録した。

【結果】同じ画像がsubliminal刺激として与えられた場合にはVEF成分は大きくなり, その割合は顔刺激でより顕著であり, subliminalな視覚情報処理における顔の優位性を示すものであった。

(5) 球面型生体磁気計測システムを用いた長潜時聴覚応答の記録

太田圭亮, 高松亮介, 小山幸子, 栗城眞也
(北海道大学 電子科学研究所 量子計測研究分野)

聴覚誘発脳磁界のピークである P2m は, N1m に比べその特性が明らかになっていない。楽音 (ピアノ長三和音) を連続提示した場合, 2~5 音目の振幅の減衰は N1m に比べ P2m で小さい(Kanda et al., 2004)。本研究では, 繰り返しによる N1m, P2m 振幅の減衰が刺激音によって異なるかを調べるため, 楽音 (ピアノ単音 A3), 言語音 (日本語母音/a/, 男性話者), 純音 (楽音, 言語音に基本周波数・エンベロープを合わせたもの) に対する脳磁界を

計測した。刺激音はそれぞれ長さ 312.5ms とし 312.5ms の無音区間を挟み 3 音連続, HL+40dB で提示した。計測には北大脳科学研究教育センターの球面型生体磁気計測システムを用い記録した。N1m と P2m が認められる後方極大周辺の 12ch を選択し RMS 値を計算した。その結果, N1m, P2m の 2 音目以降の減衰率は刺激音により異なる傾向がみられた。

(6) 合成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, 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)

昨年本研究会で発表した母音の脳内局在と同様のパラダイムを用い, 合成母音刺激による誘発磁場を 204 チャネル全頭型脳磁計を用いて計測した。F0=130, F3=2500 で F1, F2 が a(700, 1200), e(600, 1500), i(500, 1800), o(600, 900), u(500, 1200)となる 5 母音(LowF2 条件)と, 同じ F0, F3 を持ち, F1, F2 が a(500, 1800), e(400, 2100), i(300, 2400), o(400, 1500), u(300, 1800)となる 5 母音

(HighF2 条件) を Klatt 合成にて作成した。これらを 1 名の被験者に対して条件毎に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 150 回以上加算した。同様の計測を 8 回施行し, e を除く各母音に対する誘発磁場 N1m の局在推定を行ったところ, 前後方向において母音局在の同様な乖離傾向が見られた。

(7) 数字の循環読み上げ音声による聴覚ミスマッチ脳磁場

官振傑¹, 湯本真人², 狩野章太郎¹, 伊藤憲治³, 尾形エリカ⁴, 水落智美⁴, 加我君孝^{1,4}
(¹東京大学医学部 耳鼻咽喉科, ²検査部, ³認知・言語医学, ⁴感覚・運動神経科学)

日本語の数字 4 の読みには shi (4s) と yon (4y) があり, 昇順では主に前者が用いられ, 降順では後者のみが用いられる。我々は 1 から 7 までの循環読み上げ音声において, 4 の読みの違いと順序間違いを低頻度を含む音韻列を用い, ミスマッチ陰性磁場の記録を試みた。計測は昇順と降順の 2 ブロックで構成され, 昇順ブロックは, 1→2→3→4s→5→6→7 の循環を標準(60%)とし, 読みの違い(1→2→3→4y→5→6→7)と順序間違い

(1→2→3→4s→5→4s→5→6→7)を擬似ランダムに各 20%含む音韻列を用いた。降順ブロックは, 7→6→5→4y→3→2→1 の循環を標準(60%)とし, 読みの違い (7→6→5→4s→3→2→1) と順序間違い (7→6→5→4y→3→4y→3→2→1)を擬似ランダムに各 20%含む音韻列を用いた。双方の逸脱刺激により記録されたミスマッチ陰性成分の異同と特徴に関して報告する。

(8) ミスマッチ陰性成分は多モード内部モデルの予測誤差を反映する

湯本真人¹, 伊藤憲治³, 宇野彰⁶, 狩野章太郎², 金子裕⁴, 斎藤治⁵, 加我君孝², 矢富裕¹

(¹ 東京大学医学部病態診断医学, ² 耳鼻咽喉科学, ³ 認知・言語医学,
⁴ 国立精神・神経センター武蔵病院脳外科, ⁵ 精神科, ⁶ 筑波大学人間総合科学)

ミスマッチ陰性成分 (MMN) は, その聴覚オドボール課題による記録様式から, 近過去と現在との聴覚環境の変化を検出 (バックワード比較) する神経機構を反映すると考えられてきた。我々は, ランダムな音節や音符系列を予告として視覚提示し, これとは不一致となる音を低頻度で含む聴覚刺激と照合する視聴覚間オドボール課題を用い, 視聴覚間逸脱音に対して MMN 相当成分が記録されることを報告した。この MMN は, 時間, 相互作用,

個人差要因等において従来の MMN とは特性が異なるが, 同一の神経基盤に基づく。MMN 記録における聴覚オドボール課題は感覚記憶の機能を評価する簡便で優れた計測手法であるが, MMN 生成の神経機構は, 環境変化の検出よりもむしろ, 多モード内部モデルにおける予測誤差検出 (フォワード比較) 機構として, 日々頻繁に機能している。注意下の知覚は予測を不可避免的に伴い, 多モード内部モデルの適応的更新, 即ち学習を伴う。

(9) 疎性を用いた MEG の解析手法の提案

黒田俊道 (早稲田大学大学院理工学研究科)

画像処理の手法の中に, Sparsecoding というものがある。これは対象の画像を限られた基底の中から更に少ない基底を用いて (使用する基底が疎らになるように) 再構成する手法である。本研究では, 測定によって得られた MEG をその発火位置が疎になるような解析手法を考えている。また, 正規分布のような波形の組合せで解を

求めることにより, 解析結果が滑らかに, 時間毎に飛び飛びにならないようにして, より信憑性のある解析手法の解析を目指している。本発表では, 手法についての簡単な説明と, この手法を用いての解析結果の報告を行なう予定である。

(10) 深部にあるアルファ波と高周波リズムの発生

川端啓介¹, 内野勝郎², 村田和優³, 外池光雄⁴, 岩木直⁵

(¹ 前大阪府立大学先端研, ² 平成医療学園専門学校, ³ 藍野学園短大,
⁴ 千葉大工学部, ⁵ 産総研関西支所)

昨年この研究会で, 閉眼で安静な状態にある被験者の MEG 信号に現れる後頭部の強いアルファを解析して, 左右の半球に 1 個ずつの活動源があり, そのダイナミクスは 90 度の位相差を持っていることを述べた。(これは 1 ケの源が交互に移動すると考えてもよい。) その後求めた dipole を MR 図に落としてみた。それによると, 右半球の発生源は脳の中心に近い, 非常に深いところであり, ある時刻ではどの方向の脳壁へも最大 50mm ぐら

いにある。この dipole は位置座標が浅い方へ周期的に動くのであるが, 奇妙なことには, fitting factor g は深いほう (80%以上にも達する) が浅い方よりも大きいのである。これは浅部にはさしたる局所的な活動源がなく, 深部での活動源の強度が非常に強いからとみてもよい。これらのデータの信頼性はリズムの周期により再現することからも補強される。さらに, 高周波 (40Hz まで) での解析を行うと, 求められた dipole 強度 Q が大きく g が相

対的に大きい時刻では視床や脳幹上部付近にあることを見出した。この原因としてはアルファ波リズムを誘起する速い Impulse (動物や in vitro の組織で電極を埋め込んだ実験で報告された) の低周波成分が観察されたのではないかと考えている。この様な深部での活動の全体像を

掴むことは重要なことである。この更なる発展の可能性についても御討論を乞いたい。因みに使用した産総研の MEG は 0.1-100Hz, 400Hz サンプリング, digital filter は 9-40Hz である。

(11) MEG40Hz 成分の位相同期の計測とそのモデル化の試み

田中慶太, 川勝真喜, 根本幾 (東京電機大学)

本研究では, 40/s で断続するチャープ音に対する脳磁界を計測し, 40Hz 成分の phase coherence を求めた。この 40Hz 成分には自発成分 (ガンマ波) と, 40/s の頻度の音刺激に対する定常応答が含まれると考えられるが, 簡単な考察により, 刺激による phase coherence の上昇は誘発反応のみでは説明できないことが分かる。そこで, 自発成分の位相が刺激に同期していると考えられるが, 自発成分と誘発成分を分離するのは困難である。ここでは分

離はひとまず置いて, 現象論的に位相の振る舞いを記述するため, 応答の 40Hz 成分を $a(t) \exp\{i(2\pi 40t + \phi(t))\}$ とした。 $a(t)$ の変化は位相 $\phi(t)$ の変化より十分遅いと仮定し, 位相に対する微分方程式モデルを構築した。このモデルによって計算される phase coherence とその実測値との比較などにより, モデルに含まれるパラメータの推定を行った。現在, 実験条件とパラメータの推定値との関係などを調べている。

(12) 随意運動後の β 帯域同期と性格傾向の相関

志々田一宏¹, 橋詰頭², 小野田慶一¹, 山下英尚¹, 岡本泰昌¹, 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】 随意運動後に中心溝周囲に生じる β 帯域の同期 (post-movement beta synchronization : PMBS) は, 皮質の抑制機能や皮質-皮質下回路の機能を反映すると考えられている。一方, 衝動性・損害回避傾向といった個人のもつ性格や気質も, 同様の脳機能の表現の一つとして捉えることができる。そのため今回, 質問紙を用いて評価した性格傾向と PMBS の関連を調べた。

【方法】 右利き健常者 35 名が自己ペースで右示指の随意

運動を行っている時の脳磁場を記録。EMG をトリガーとして β 帯域の周波数解析を行った。性格傾向の評価として Temperament and Character Inventory (TCI) を用いた。

【結果】 右半球の PMBS の magnitude は, TCI の新奇性追求尺度と負の相関を示した。右半球の PMBS ピーク潜時は TCI の新奇性追求尺度と正の相関を示した。

【考察】 運動抑制機能が新奇性追求の高さ (= 衝動性) などの性格傾向に関与している可能性が示唆された。

(13) 運動準備過程における一次および二次体性感覚野活動の時系列的変動

和坂俊昭^{1,2}, 柿木隆介¹

(¹自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門, ²日本宇宙フォーラム)

随意運動遂行に関連して一次体性感覚野(SI)の活動は減少するが(gating), 二次体性感覚野(SII)の活動については解明されていない。本研究では, 脳磁図を用いて自発的指伸展動作の準備過程における SI および SII 活動の時系列的変動を検討した。右手首に連続的に提示される電気刺激を無視しながら, 被験者には自発的な右第二指の伸展動作を行うよう指示した。準備過程は筋放電前 3000ms までを 5 区間に分割し, 各区分にお

ける SI と SII 活動を比較すると, 筋放電前 500ms では SI 活動(P30m)は有意な減少を示すのに対して, 運動と反対側の SII 活動は有意な増大を示した。準備過程にみられる SI と SII の変動は, 運動遂行に関与する運動関連領域からの遠心性投射が原因と考えられるが, この投射による影響は SI と SII では異なることから, 随意運動遂行における SI と SII の機能的役割が異なることが示唆された。

(14) 刺激における不調和さの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討

原田暢善¹, 岩木直¹, 外池光雄²

(¹産業技術総合研究所関西センター 人間福祉医工学部門, ²千葉大学工学部 メディカルシステム工学科)

刺激における不調和さの視覚誘発脳磁図反応に対する影響の検討を行った。動物の線画を用いて, 動物の首の挿げ替えにより, 視覚刺激の不調和さを, 低不調和(正常映像), 中不調和, 高不調和の三段階に変化させた映像を作成し, 線画刺激の不調和さ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。側頭領域のチャンネルの加算平均波形の約 170-300ms の成分において, 視覚刺激の不調和さの減少にともない反応強度が増大する傾向を示すことが明らかとなった。すなわち, 側頭領域

の約 170-300ms の活動の変化は, 実生活の経験で形成された, 視覚的なトレースの存在が活動の変化に反映したものであると考えられ, それが, 脳磁図反応を増加させる方向に作用したと考えられた。不調和さの低下にともない反応が増大する結果は, 先行する fMRI の研究の結果と丁度逆の結果であり, 血流量の増加減少では捕らえることの出来ない, 脳磁図反応において検出しえた結果であると考えられた。

(15) Random-dot motion からの3次元構造知覚に関連する脳内過程

岩木直¹, 外池光雄², John W. Belliveau³

(¹産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門,

²千葉大学工学部 メディカルシステム工学科, ³Massachusetts General Hospital)

透明の球面上に配置された多数のドットを中心軸周りに回転運動をさせ, それを二次元平面に投影したものを観察すると, 二次元平面のランダムドットの動きから, 奥行きのある三次元の球状構造が知覚される。我々は A) 三次元球の回転, B) 二次元円盤の回転, C) ランダムな運動

が知覚される 3 種類の視覚刺激を呈示し, 被験者の MEG 計測を行った。LCMV 型空間フィルタを用いて誘発 MEG データから脳内神経活動の時空間特性を可視化するとともに, Wavelet 変換を用いた時間-周波数解析により自発脳活動の刺激に同期した変化を定量的に評価した。この結果,

parietal, parieto-occipital, および occipito-temporal 領域で、三次元物体知覚条件(A)における誘発活動の有意な増大

(140-260ms)および α ・ β 帯域における自発活動の有意な減少(ERD)が同時に観測された。

(16) 種々の第2次仮現運動に対するヒト脳反応

田中絵実, 野口泰基, 金桶吉起, 柿木隆介

(生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

属性の異なる second-order motion を処理する共通メカニズムの存在を検討するために、3 種類の second-order (contrast, texture, flicker) と 1 種類の first-order の仮現運動に対する MEG 反応を比較検討した。Motion onset 反応の第 1 成分のピーク潜時・振幅には、各属性間で反応特性に違いが見られたが、その信号源は MT+付近に推定され

た。また、second-order に first-order を重ねた mixed motion に対しては、contrast が他の second-order とは大きく異なる反応特性を示した。よって、どの属性の motion も MT+ の活動を必要としているが、その活動様式は異なること、first-, second-order 間の相互作用も second-order の刺激属性によって異なることが示された。

(17) Prader-Willi 症候群の体性感覚誘発磁場所見—Angelman 症候群との相違について—

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北海道大学大学院医学研究科小児科, ²北海道大学病院臨床検査部)

【目的】 Prader-Willi 症候群(PWS), Angelman 症候群(AS) は 15q11-q13 上の父性, 母性発現遺伝子を各々原因とする遺伝性疾患である。両者とも多くは GABA_A 受容体関連遺伝子を含む広範な染色体ヘテロ欠失により発症し、その親由来のみを相違とする。また少数は欠失を伴わずに発症する。昨年 AS の体性感覚誘発磁場(SEF)において、N1m の著明な遅延を欠失例のみに認め GABA_A 受容体関連遺伝子が関与する可能性を報告した。今回 PWS の SEF

を検討した。

【方法】 PWS 欠失例 3 例, 非欠失例 2 例の正中神経刺激による SEF を全頭型脳磁計にて測定した。

【結果】 5 例の N1m 潜時は 18.0-21.2m (中央値 19.1ms) と正常であった。N1m, P1m 成分の多くは低反応であり、遺伝的機序による差異はなかった。PWS と AS 欠失例では GABA_A 受容体関連遺伝子欠失の関与は異なると考えられた。

(18) 聴覚性のでんかん発作を有するてんかん患者の脳磁図

福島克之, 仲野久美子, 芳村勝城, 渡辺裕貴

(国立病院機構静岡てんかん神経医療センター)

【目的】 聴覚発作の脳波・脳磁図所見の特徴について報告する。

【対象】 脳磁図検査を行ったてんかん 635 人から、聴覚発作を示す患者を抽出し、発作症状、脳波所見、脳磁図所見について検討した。

【結果】 本結果では典型的な聴覚発作の頻度は、部分発作を持つてんかん約 600 人中 3 人(0.5%)であった。大脳皮質の機能局在を反映する部分発作の中で、聴覚発作は、音が低く(高く)感じる、耳鳴りなどの症状で起し 10 数秒から 1-2 分持続し消失する。時にはこの聴覚症状に

引き続き意識が曇り、稀には全身のけいれん発作へ進展する。脳波では側頭部を中心に鋭い棘波が反復性に出現する傾向がみられた。脳磁図では dipole が Heschl 横回に顕著に集積する特徴がみられた。

【結論】聴覚発作は比較的稀な発作である。脳磁図 dipole が Heschl 横回に際立つ特徴から、Heschl 横回でのんかん性活動が聴覚発作と関連していることが示唆された。

(19) 短周期ペア刺激の聴覚誘発 M50回復に反映される統合失調症の左半球機能異常

湯本真人¹, 斎藤治⁴, 宇野彰⁶, 伊藤憲治³, 宇川義一², 金子裕⁵, 矢富裕¹
(¹東京大学医学部病態診断医学, ²神経内科学, ³認知・言語医学,
⁴国立精神・神経センター武蔵病院精神科, ⁵脳外科, ⁶筑波大学人間総合科学)

統合失調症患者, 健常者各 10 名を対象とし, 持続 10ms の 2kHz 純音による 8 種類のペア刺激 S1-S2 (間隔 50, 70, 100, 150, 200, 300, 500, 700ms) をペア間隔 1.4-1.6s で等確率ランダムに両耳提示し, 誘発脳磁場を各 100 回以上加算記録した。ペア間隔 700ms 時の S1 に対する誘発成分を S1 反応とし, S1-S2 誘発波形からこれを減算した残存 S2 誘発成分を S2 反応として, S1 の M50 推定電

源による両反応の電源強度波形を比較した。両波形の潜時 0-200ms 間の相互相関係数は, ペア間隔が短くなる程低下($p<0.01$)したが, 左半球で健常群に比し患者群が有意な低下(150, 500ms にて $p<0.05$)を示した。健常群の M50 回復率は両半球とも S 字曲線を示したが, 左半球で患者群が有意な低下(200, 300ms にて $p<0.05$)を示し, 統合失調症の左聴覚野機能異常が示唆された。

(20) 左瘻性不全片麻痺の患者にみられた mirror movement について

久保田雅也, 木村育美, 広瀬宏之, 榊原洋一
(都立八王子小児病院小児内科, 成育医療センター, お茶の水女子大学)

症例:27才男性。周生期の詳細不明だが7ヶ月より“左手を使わず握っている”ことに気付かれ, 左瘻性不全片麻痺と診断された。右上肢の使用時左上肢に mirror movement が出現した。今回, MEG, tractography, fMRI にて mirror movement の発症機序について検討した。MRI 上右脳室拡大を認めた。内包後脚を起点とした tractography では右錐体路線維は左と比較し, 細く粗であった。右正中神経刺激での体性感覚誘発磁場の計測で刺

激をトリガーに左手を握る課題を加えると左半球での中潜時成分のダイポールが中心溝より前方へ移動した。左手の運動での fMRI では右運動野での反応が大きかったが同側(左半球)の反応は検出されず。この mirror movement は左錐体路の同側支配が発達上強化されたものと思われるが MEG, tractography の結果はそれを示唆する所見であった。

(21) においの知覚に及ぼす認知的要因の効果—MEG および脳波の同時計測による検討

小林剛史^{1,2}, 小早川達², 秋山幸子^{2,3}, 戸田英樹^{2,4}, 斉藤幸子^{2,5}
(¹文京学院大学, ²産業技術総合研究所, ³日本体育大学, ⁴筑波大学, ⁵斉藤幸子味覚嗅覚研究所)

嗅覚系の知覚, 順応/慣化過程には, 生体内外の多様な変数が関与している。嗅覚刺激の濃度, 温度, 湿度, 持

続時間といった生体外の要因は, 嗅覚提示装置の発達によってかなり厳密な統制が可能になった。一方で, 生体

内の要因、即ち嗅覚刺激が受容体に結合する末梢レベルと、その信号がより高次に処理される中枢レベルの機能の分離検討は極めて困難である。しかし、我々は刺激提示条件の統制によって末梢レベルに及ぼす影響を相対的に減少させることで、中枢レベル特有の機能を特異的に検討する可能性を見いだした。具体的には、可能な限り

嗅覚刺激提示時間を減少させる条件を構築した上で、当該刺激に対して 2 種類の情報提示（ポジティブ情報 vs. リスク情報）を行った。その結果、情報の内容に依存して有意な感覚強度および順応/慣化過程の差が生じた。現在、この差に関わる脳内過程を検討するために、同条件で MEG および脳波の同時計測を行っている。

(22) 逃したくない被験者をなんとか計測する方法

小早川達¹，小見山彩子²，池田稔²，戸田英樹¹

(¹産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門，²日本大学医学部)

我々のグループは昨年発表において、両側の弧索神経が切断された被験者を用い、高濃度の食塩水が三叉神経に与える影響についての報告を行った。しかしこのような両側の弧索神経が切断された被験者の数は少ない上に、高齢者が多い（本実験に用いた被験者の平均年齢は 63.8 歳）。そのため歯の詰め物などによるアーチファクトが発生する可能性が高く、本実験においては 4 人中 2 人にアーチファクトが認められた。そこで本実験ではこの

ようなチャンネル間で相関が高い（同期している）信号に対して、小林らが提案した（小林 哲生，栗城 真也：多チャンネル誘発脳磁界計測における自発脳磁界成分低減の検討，信学技報 1996-06，pp7-12）主成分分析を用いてこれらのアーチファクトの除去を試みた。本発表ではこれらの手法を用いた場合のデータの質の改善の程度やその問題点について検討を行う。

(23) 音楽の基本構造の認知に関わる神経的基盤の解明：MEG 計測による検討

大塚明香，長谷川寿一，栗城真也

(東京大学 21 世紀 COE プログラム「心とことば—進化認知科学的展開」，
北海道大学 電子科学研究所)

本研究は、音楽における調性・韻律システムの脳神経活動への影響を調べる事を目的としている。音楽の理論的な基本構造である 4 及び 5 音の和音進行列をピアノ音で生成し、終結部を完全終止(PC)，進行の途中で係留する半終止(HC)，曖昧に終止する偽終止(MC)の 3 種類に変化させ、これを被験者に提示した時の MEG 信号を計測した。第 1 音目提示後、2 音目以降の和音により誘発された N1m/P2m 反応の強度は一旦減少したが、PC と MC

では終結部へむかって回復を示した。また、PC の最終和音である主和音は、MC の最終和音である関係短調和音よりも大きな反応を誘発した。更に、HC と MC の最終和音提示の 1 拍後の無音期間に、もう 1 音を期待した為に内的に誘発されたと思われる反応が観察された。これらの結果は、調性・韻律システムの影響を示すものと考えられ、更にトップダウンの認知処理の関与を示唆すると提案される。

(24) 調性音楽における和音の階層構造と脳磁場の関係

福田大輔, 大塚明香, 栗城真也, 福田正人, 村田昇
(早稲田大学大学院 理工学研究科 電気情報生命専攻)

本研究は、調性音楽における和音(chord)の階層構造と脳神経活動との関連を調べることを目的とする。刺激はKrumhanslの提案したprobe-tone methodに従って作成した。まずピアノ音による2オクターブの長調または短調の上昇音階(scale)により調性を確立させた後、主和音(tonic chord)または関係調和音(relative chord)を提示した。被験者には提示した上昇音階に対して、後に続く和音が

安定して感じられるか否かを判断してスイッチを押す、という課題を与え、MEG装置(エレクトラ)により脳磁図を計測した。長調音階の場合、和音のN1m反応の振幅は、主和音よりも関係調和音の方が大きくなるという傾向が見られた。さらに詳しく見るため、音階と和音の組み合わせによってN1m/P2m反応にどのような違いが現れるかを、分散分析を用いて解析している。

(25) 音色のカテゴリ—知覚の聴性誘発N100m潜時への反映

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)

スペクトル包絡は音色の定常的な要素を構成し、音の重要な情報を伝える。3つのカテゴリ(vocal, instrumental, linear)のスペクトル包絡と、2つの基本周波数(F0)以外は音響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、誘発されるN100mのカテゴリ—内での動態を潜時に注目して分析した。その結果、F0による有意差はvocalではみられずinstrumental及び

linear (nonvocal)で両半球にみられ、刺激音間での有意差はvocalでは両半球、nonvocalでは右半球のみでみられた。また、個々の音についての検定では、vocal全てとnonvocalの一部の音でF0非依存性が確認され、カテゴリ—ごとの特徴はみられなかった。以上より音色のカテゴリ—には、vocalとnonvocal、F0依存性と非依存性の2つが存在していることが示唆された。

(26) 体性感覚誘発磁場における素のインパルス応答への一考察

岸田邦治¹, 横田康成¹, 深井英和¹, 篠崎和弘², 石井良平³, 鶴飼聡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)

独立成分解析で処理後、フィードバックシステム論的手法を用いて体性感覚誘発磁場のSQUIDチャンネル間の伝達関数とそのインパルス応答をこれまで同定してきた。伝達関数は数理学上からは満足できるものであったが、左右半球にある活動部位間のそれらには生理学上から期待される時間遅れがほとんどみられなかった。この原因として、同定した伝達関数は期待する素の伝達関数でなく合成伝達関数である可能性があること、また、

SQUIDデータはlead fieldで異なる脳内活動部位の磁場が混合されたためであった。そこで、脳内活動部位の電流源データに変換するために優決定型問題として逆問題を解き、その後、素の伝達関数を得る確率を高めるために4成分のフィードバックモデルを用いて脳内電流源データを解析した。その結果、期待される時間遅れを持つインパルス応答がSIと反対側にあるSIIらしき部位間で見られた。

(27) Statistical Parametric Mapping を用いた Minimum Current Estimation の電流源推定結果の標準脳化

橋詰 顕, 栗栖 薫, 飯田 幸治, 白水 洋史, 志々田 一宏, 小野田 慶一
(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】fMRI や PET では被験者の脳活動部位を標準脳座標に変換する手段として Statistical Parametric Mapping (SPM) という MathWorks 社製行列演算ソフトウェア Matlab で動作するツールを用いている。脳磁図のデータも SPM を用いて標準脳化を行えるようにする。

【方法】Neuromag 社製脳磁計 Neuromag System で計測した脳磁図データを, L1 ノルム推定ソフトウェア Minimum

Current Estimation (MCE) で電流源推定を行った。被験者の MRI 画像を脳磁図の Head Position Indicator 座標上の解剖画像データに変換, MCE の推定結果を機能画像データとし, SPM 上に展開した。

【結果】MCE のデータの標準脳化に成功した。

【結論】本法により脳磁図のデータの被験者間における統計学的検討が可能となった。

(28) 電流源の方向を大脳皮質表面に垂直に限定した脳内活動源推定法の開発

樋脇 治¹, 樋口 信司¹, 早見 武人¹, 橋詰 顕², 栗栖 薫²
(¹ 広島市立大学情報科学部, ² 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)

大脳の神経活動に伴う脳磁界の主な発生源は、大脳皮質の表面に対して垂直に配列した錐体細胞であり、個々の錐体細胞の細胞内電流が加算的に生じたときに頭外で計測されるような大きさの磁界が発生すると考えられている。本研究では、このような考えに基づき、脳磁界の発生源を大脳皮質表面に垂直に配列した電流源に限定し脳内活動源の位置を推定する方法の開発を試みた。各被

験者の頭部 MR 画像を用いて大脳皮質表面に垂直な電流源を予め配置し、計測された脳磁界からそれぞれの電流源の大きさを L2 ノルム最小化法により推定することにより脳内活動源を求めるソフトウェアを構築した。この手法の妥当性を確認するために体性感覚誘発磁界について ECD 法で求めた電流源との比較検討を行なった。

(29) 体性感覚二点刺激による MMNm 反応

赤塚 康介, 柿木 隆介
(生理学研究所 感覚運動調節研究部門, 総合研究大学院大学 生命科学研究所)

聴覚刺激を用いたミスマッチ反応に関する研究は広く行われているが、体性感覚刺激を用いた研究は少ない。そこで、本研究においては体性感覚刺激を用いたときのミスマッチ反応について二点識別刺激を用いて検討した。はじめに二点識別閾(DT)を測定し、体性感覚二点刺激によるミスマッチタスクを行った。標準刺激として、二点間の距離を DT minus (DT×10%), 逸脱刺激として

DT minus (DT×20%), DT plus(DT×10%), DT plus (DT×100%) に設定し 3 条件を行った。逸脱刺激 DT minus(DT×20%)時に波形が 150-250 ms で有意に増大し, DT plus (DT×100%)時に波形が 30-70 ms, 150-250 ms で有意に増大した。今回の研究により、体性感覚刺激においてもミスマッチ反応が起こることが示唆された。

(30) 痛覚関連体性感覚誘発脳磁場に対する睡眠の影響

王晓宏, 乾幸二, 柿木隆介

(生理学研究所 感覚運動調節研究部門)

【目的】痛覚関連体性感覚誘発脳磁場に対する睡眠の影響について検討した。

【方法】10 名健常被験者の左手背に痛み刺激を与え, 37 チャンネル脳磁計二基(Bti)を用いて覚醒時と睡眠時脳磁場を記録した。記録脳磁場を多信号信号源解析法 BESA を用いて解析した。

【結果】覚醒時に, 刺激対側半球と同側半球では明瞭な磁場成分 1M と 1M(i)が記録された。平均頂点潜時は対側で 148ms, 同側 157ms であった。多信号信号源解析を行うと, 対側の第一次体性感覚野(SI), 両側の第二次体性感

覚野(SII)と島(Insula), 同側の内側部側頭葉(MT)及び帯状回(ACC)に活動源が認められた。対側の SI, SII, 島の頂点潜時は約 150ms で, 1M 成分に, 同側の SII と島の頂点潜時は約 160ms で, 1M(i)成分に相当すると考えられる。一方, MT と ACC の頂点潜時は約 190ms で, 1M より遅い磁場成分に MT と ACC からの活動が含まれると考えられる。すべての活動源の活動は, 睡眠時にほぼ消失した。

【考察】SI, SII, 島, ACC 及び MT の脳活動は全て, 痛覚認知に関連することと考えられる。

(31) 高頻度反復刺激による視覚誘発脳磁場反応：健常若年成人と老年者での検討

後藤純信^{1,2}, 飛松省三^{1,2}

(¹国際医療福祉大学リハビリテーション学部作業療法学科, ²九州大学大学院医学研究院脳研臨床神経生理)

【目的】高頻度反復刺激(HRS)で誘発される視覚誘発脳磁場(VEF)の反応特性を検討する。

【方法】対象は健常若年成人 10 名と老年者 6 名。半側視野に格子縞(格子 50 分, 刺激時間 1 秒, 刺激間隔 1.5 秒)を呈示し, 刺激頻度 4Hz (8 回反転/秒)で VEF を記録した。200 回加算平均し, 単一電流双極子(ECD)の発生源を推定した。

【結果】transient 型反応(TR)の P100m とそれに続く

steady-state 型反応(SS)を認めた。P100m 潜時は平均 130 ms で, SS をフーリエ分析すると刺激頻度に対応した反応を認めた。TR と SS の ECD はいずれも刺激視野対側後頭葉に推定され, SS の方が広く分布していた。この傾向は老年者でより明瞭であった。

【考察】HRS では, TR の潜時と振幅(時間情報)のみならず SS の位相と振幅(時間と周波数情報)を定量分析でき, 多面的に視覚機能変化を評価できる。

(32) 時間表象の形成に関する脳内メカニズム

野口泰基, 柿木隆介

(生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

目の前に視覚刺激が提示された時, 我々の脳はその刺激がどのぐらいの時間提示されていたかを感じることができる。このような感覚を時間感覚と言うが, その形成に関わる脳内のメカニズムは殆ど解明されていない。本実験では脳磁計を用いて視覚誘発脳磁場(VEF)を計測

し, その onset 反応と offset 反応の時間差から算出した刺激の「脳内時間」を, 同じ刺激に対して被験者が感じた主観的な時間の長さ(心理物理的手法で計測)と比較した。その結果, ①ある特定の状況下では両者の間に乖離が生じること, ②このような乖離状況においては,

onset-offset間の時間差よりもVEFの振幅の方が主観的な時間の長さとして深く関係していること、の2点が示された。以上の結果は、人における時間感覚が、視覚野の神経活

動における時間的な情報だけではなく、神経反応そのものの強さも加味して形成されていることを示唆する。

(33) 日本語単語（漢字）と英語単語の黙読時における左右側頭後頭葉の活動について

寺田さとみ¹，中村仁洋²，原信子²，湯本真人³，宇川義一¹

¹ 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科，

² 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻音声・言語医学，³ 東京大学医学部病態診断医学)

視覚呈示された言語に対する脳活動については、一次視覚野の活動に続いて側頭後頭葉に活動が観察されることが知られている。この経路については、英語と日本語で異なる経路が使われている可能性が、fMRIの研究などで示唆されている。今回は健常者を対象にして、英語と日本語（漢字）の単語を視覚呈示し、誘発脳磁場を各100回以上加算した。日本語はNTTデータベースシリ

ーズ、英語はMRC psycholinguistic databaseより、単語親密度が一定以上で、文字数が一定範囲内の語を選択し、呈示は0.5sec、ISIは3secとし、自然・非自然の判断をボタン押しをさせながら黙読させた。左右側頭後頭葉（紡錘状回）における活動について、言語間、半球間の検討を行った。

(34) 音の中心周波数と帯域幅に関わる脳磁界反応

添田喜治，中川誠司

(産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門)

音に関わる脳磁界反応において、純音やその複合音を用いてピッチ（音の高さ）との関連性、特にtonotopy（周波数局在機構）に関連する研究はよく行われている。しかし、等しい音圧レベルであっても音の高さ（周波数）が変われば、心理的な音の大きさ（ラウドネス）が変わることはよく知られているが、このことに関連する脳活動を調べた研究は少ない。本研究では、等音圧レベル下での周波数に対

応する脳活動、特に反応強度に注目し、1オクターブバンドノイズ、1/3オクターブバンドノイズ、帯域幅130Hzの音を用い、中心周波数を250Hz～8000Hzの間で変化させた時の脳磁界計測を行った。刺激は、継続時間0.5s、刺激間隔1.5s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。解析の結果、中心周波数1000Hz付近でN1m反応が大きくなる傾向が見られた。

(35) 高周波可聴音の立ち上がり時間が聴覚誘発脳磁界に及ぼす影響

萬谷惇^{1,2}，中川誠司¹，小谷賢太郎³，堀井健³

¹ 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門，² 関西大学大学院工学研究科，

³ 関西大学工学部システムマネジメント工学科)

ヒトの聴覚脳機能研究は、主に音声周波数領域（～5000Hz）の音の処理に関して行われてきた。5000Hz以上の高周波音は、音声知覚よりも音源定位などにおいて重

要な役割を果たすといわれており、聴覚皮質の活動にも低周波音との違いが表れる可能性がある。我々は16000Hzまでの高周波音の呈示が可能な刺激装置を開発

し、高周波音に対する聴覚誘発脳磁界の計測を行っている。今回は、刺激音の立ち上がり時間が聴覚誘発脳磁界に及ぼす影響を検討した。立ち上がり時間を変化させた刺激音に対する聴覚誘発脳磁界を計測し、高周波音と低周

波音との間で比較を行った。その結果、低周波音においては立ち上がり時間の増加に伴いN1mの振幅が減少し、潜伏時が増加する傾向が見られた。一方、高周波音においては一概にそのような傾向は見られなかった。

(36) 高周波可聴音および骨導超音波に対する聴覚誘発脳磁界の計測

中川誠司

(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)

骨導で呈示された周波数 20000 Hz 以上の高周波音(骨導超音波)は、聴覚健常者はもとより重度感音性難聴者にも知覚されるが、そのピッチは周波数にかかわらずほぼ一定で、10000~14000 Hz の気導音のピッチに相当する。一方、5000 Hz 以上の高周波可聴音に対する聴覚野の活動に関する報告は少なく、その機序については未解明な部分も残されている。本研究では、16000 Hz までの高周波気導可聴音および 30000 Hz 骨導超音波トーンバ

ーストに対する聴覚誘発脳磁界計測を行い、聴覚野の活動を検討した。500~12000 Hz の気導音に対しては聴覚野内でのトノトピシティが認められた。また、対側刺激と同側刺激ではトノトピシティの方向に差異が見られた。骨導超音波に対する活動部位は、ピッチおよびラウドネスのほぼ等しい高周波気導音と有意に異なっており、それぞれの知覚メカニズムの差異を示唆する結果となった。

(37) ゆらぎを持つ光源に対する心理的プリファレンスと大脳活動との関係

岡本洋輔^{1,2}, 中川誠司², 矢野隆¹, 安藤四一¹

(¹熊本大学大学院自然科学研究科, ²産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門)

ゆらぎを持つ光源に対する心理的好ましさと大脳活動との関係について検討を行なった。視覚刺激として輝度の時間的変動の様子が異なる5種類の刺激を用意した。まず心理実験を行い、それぞれの刺激に対する心理的好ましさの度合い(プリファレンス尺度値)を測定した。次に心理実験の結果を基に、被験者ごとにプリファレンス尺度値の最も高い刺激と低い刺激を選択し、それらの刺激を提示している間の大脳活動を全頭型脳磁計を用い

て計測した。計測された脳磁界のアルファ波帯域の自己相関関数を解析した結果、プリファレンスの低い刺激を提示した場合に比べて、プリファレンスの高い刺激を提示した場合に左後頭部付近で自己相関関数の有効継続時間が有意に長くなった。このことは、プリファレンスの高い刺激を提示したときに、左後頭部でのアルファ活動が時間的により安定していることを示している。

(38) 視覚逆方向マスクングの有無による脳活動の変化

川勝真喜, 阿部雅也, 田中慶太, 小谷誠(東京電機大学)

単独で呈示されれば認知可能である視覚情報の認知が、時間的に連続して後から入ってくる視覚情報によって影響・阻害される事があり、視覚逆方向マスクング現

象として知られている。本研究ではマスク効果有りともマスク効果なしの2種の刺激を用意した。この刺激を用いて単語・非単語弁別課題中の誘発脳磁界を計測し、認知

障害度の違う場合の脳磁界反応の差異を検討した。単語・非単語弁別には、少なくとも形態処理と意味処理が行われる。マスク効果がある場合には形態処理は行われるが意味処理は行われないと考える事ができる。つまり、

現れる差異は形態処理以降の文字に関する処理であると考えた。実験の結果、マスク効果の条件間の反応の差は主に潜時 200ms 近辺以降の左側頭部等にみられた。

(39) 脳磁図、網膜電図同時記録による視覚野初期応答潜時の検討

乾幸二, 三木研作, 金桶吉起, 柿木隆介

(生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

【背景, 目的】体性感覚や聴覚誘発皮質活動に比べ, 視覚領域では皮質初期反応の潜時について報告が一致していない。網膜電図と脳磁図を同時記録することにより, フラッシュ刺激に伴う信号が皮質に到達するタイミングを検討した。

【方法】フラッシュ刺激を右眼に与え, BTi 社製脳磁計 1 基を用いて後頭部より誘発磁場を記録した。網膜電図は, 右下眼瞼より記録した。両者とも 500 回の試行を加算し, 解析に用いた。

【結果】最初の誘発磁場成分(1M)は, 立ち上がり潜時が刺激後 26 ミリ秒, 頂点潜時が 37 ミリ秒であった。単一

双極子モデルによる解析では, 責任部位は第一次視覚野付近に推定された。網膜電図では, 19 ミリ秒で陰性頂点となる a 波と, 60 ミリ秒で陽性頂点となる b 波が記録された。a 波の頂点潜時と 1M の立ち上がり潜時には有意な相関が認められた($p=0.0013$)。

【考察, 結論】網膜電図で最初に記録される電位, photoreceptor current, は一定した陰性電位であり, 陽性へ向かう電位の出現 (a 波頂点) は, 信号が視細胞から網膜内側へ伝えられるタイミングをほぼ反映する。1M は a 波より 7 ミリ秒遅れて出現し, 網膜-皮質間の伝導時間を考慮すると, 皮質での最初の活動と考えられる。

(40) 漢字, ハングル文字呈示による言語優位半球の同定一周波数解析とフラクタル次元解析の比較一

金子裕, 岡崎光俊, 湯本真人

(¹ 国立精神神経センター武蔵病院脳神経外科武蔵病院神経外科・臨床検査部,

² 国立精神・神経センター武蔵病院精神科, ³ 東京大学医学部附属病院検査部)

漢字およびハングル文字を視覚呈示し, 漢字に対しては黙読する課題を行った。Neuromag 社製 VectorView を用いて MEG を測定し, raw data に対して数理解析を行った。周波数解析では, 短潜時 FFT 解析によって non-phase locked synchronization/desynchronization を求め, 漢字刺激とハングル文字刺激で統計的有意差の得られた潜時・周波数・チャンネルをマッピングした。フラクタル次元解

析では解析ウィンドウをずらしながらフラクタル次元の経時的変動を求め, 統計的有意差の得られた潜時・チャンネルをマッピングした。周波数解析には周波数の選択に恣意性があったが, フラクタル次元解析には恣意性がない。右利きの 16 名の健常者を被検者に実験を行い, その結果を報告する。

(41) 日本語における母音無声化の脳内表現

船津誠也¹, 今泉敏¹, 橋詰頭², 栗栖薫²

(¹ 県立広島大学, ² 広島大学医学部)

日本語における母音無声化においては、無声化した母音（無声化母音）と無声化していない母音（非無声化母音）は音韻論的には異音の関係にあるとされているが、両者は音響的にはかなり異なっている。このような音響的には全く異なる無声化母音と非無声化母音が脳内で如何に処理されるかについて、いまだ明らかになってはいない。本研究においては、無声化母音と非無声化母音が脳内で如何に処理されるか、異なる音素を処理する場合

とは異なるのかを明らかにするために脳磁図を用い mismatches 反応(MMF)を計測した。音素が異なる条件では、左半球の ECD モーメントが右半球より有意に大きかった。一方、無声化—非無声化条件では右半球が左半球より大きい傾向が見られたが有意差はなかった。この条件の場合には、音声学的識別を伴っていることから左半球もある程度賦活され、左右の半球差が小さくなったと解釈された。

(42) 発話理解時における感情認知処理過程—MEG を用いた検討

矢倉晴子¹, 外池光雄^{2,3}, 中川誠司², 岩木直², 西原玲子¹, 荻野敏¹

(¹ 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻博士後期過程統合保健看護科学分野,

² 千葉大学工学部メディカルシステム工学科,

³ 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)

情緒的プロソディ認知能力 (Emotional Prosody Recognition: EP)とは発話において「喜び」「悲しみ」といった感情を理解する能力のことである。この EP が関与する事象関連電位(ERP)について、オドボールパラダイムによる P300 成分の関与が多く報告されているが、EP 処理そのものに関する脳活動と詳細な場所情報について明らかにされていない。そこで我々は、時間と空間の両方の見地から解析

可能な脳磁界計測 (Magnetoencephalography: MEG)を用い、音声の感情的な特徴に注目する課題(E-task)と、語頭音に注目する課題(P-task)の脳活動を推定した。その結果、EP 処理に含まれる注意に関与した脳活動が、右側頭葉後部における刺激開始後 0.18s という非常に早い時間に生じること示唆した(E-task>P-task**, **, p<0.01)

13. 高次脳機能研究の新展開

2006年1月16日－1月17日

代表・世話人：高田昌彦（東京都神経科学総合研究所）

所内対応者：南部 篤（生体システム研究部門）

- (1) WGA トランスジーンによる甘味・苦味情報を伝導する脳内神経回路の可視化
杉田 誠, 柴 芳樹（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 創生医学専攻 病態探究医科学講座）
- (2) 到達運動の企画・実行過程における前頭皮質内の階層構造
星 英司（玉川大学 学術研究所 脳科学研究施設）
- (3) 代謝調節型グルタミン酸および GABA_B 受容体による淡蒼球ニューロンの活動制御とパーキンソン病モデルでの発現変化
金田勝幸（生理研 認知行動発達機構）
- (4) サル視覚皮質 V4 野における両眼立体視の奥行き表現
梅田和昌, 田辺誠司, 藤田一郎（大阪大学大学院 生命機能研究科 認知脳科学研究室）
- (5) Adaptation methods における fMRI と単一細胞活動記録の比較
澤村裕正（東京大学医学部 眼科視覚矯正科）
- (6) 前頭連合野における行動選択のコントロール
筒井健一郎（東北大学大学院 生命科学研究科 脳情報処理分野）
- (7) 霊長類前頭前皮質機能コラムとドーパミン修飾
平田快洋（北海道大学大学院 医学研究科 高次脳機能学分野）
- (8) 低周波および高周波ネットワーク・オシレーションを介した新皮質－海馬間相互作用
磯村宜和（理研 BSI 脳回路機能理論研究チーム, ラトガーズ大 CMBN）
- (9) 扁桃体と社会的コミュニケーション
堀 悦郎（富山大学大学院医学系研究科 システム情動科学, 科学技術振興機構 CREST）

【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）、小林和人（福島県立医科大学）、筒井健一郎（東北大学）、堀 悦郎（富山大学）、星 英司（玉川大学）、杉田 誠（広島大学）、澤村裕正（東京大学）、磯村宜和、石金浩史（理化学研究所）、平田快洋（北海道大学）、梅田和昌（大阪大学）、雁木美衣

（東京都神経科学研究所）、喜多 均（テネシー大学）、宮下英三（東京工業大学）、伊佐 正、吉田正俊、金田勝幸、池田琢朗、武井智彦、加藤利佳子、小川 正、鯉田孝和、原田卓也、坂野 拓、神作憲司、内山仁志、森戸勇介、李 順姫、南部 篤、畑中伸彦、橘 吉寿、知見聡美、高良沙幸、田 風（生理研）

【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の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合目的に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する忌憚のない意見を活発に交換したい。

(1) WGA トランスジーンによる甘味・苦味情報を伝導する脳内神経回路の可視化

杉田 誠, 柴 芳樹 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座)

口腔内の味細胞に発現する味覚受容体に、味物質が結合することにより惹起される味覚情報は、複数の神経細胞を介し、脳内の各種神経細胞に投射され、受容・識別されるとともに、行動的反射や情動的反応を惹起します。哺乳類の苦味、甘味、うま味の味覚受容体に関する最近の発見は、異なる味質が味細胞でいかに感知され、暗号化されるのかをさし示しました。しかし、味覚情報がどのように脳に伝達され、味覚の認識がされているかについては不明な点が多く存在します。本研究では、マウスにおいて苦味受容体(mT2R5)もしくは甘味/うま味受容体(mT1R3)を発現し、苦味もしくは甘味/うま味を感知する味細胞に、シナプス間を移動するトレーサータンパク

質(tWGA-DsRed)を選択的に発現させ、脳内でトレーサーに標識される神経細胞の位置を可視化することで、苦味および甘味情報を伝導する脳内神経回路を明らかにすることを試みました。延髄弧束核・橋結合腕傍核・視床後内側腹側核において、甘味受容味細胞から輸送されたtWGA-DsRedを受け取る神経細胞群は、苦味受容味細胞からの入力を受ける神経細胞群に比べ、より前方に配置していました。また大脳皮質味覚野と扁桃体においては、部分的重複と分離がみられました。観察された苦味と甘味の情報を伝導する脳内神経回路の差異は、味覚認識を可能にする神経基盤の一端を示していると考えられました。

(2) 到達運動の企画・実行過程における前頭皮質内の階層構造

星 英司 (玉川大学 学術研究所 脳科学研究施設)

随意運動の発現過程における大脳前頭皮質の役割を明らかにするために、行動課題を遂行している被験体から神経細胞活動を記録・解析するという手法を用いて研究を行ってきた。本発表では、2つの異なる行動課題のも

とで到達運動を企画・実行中の被験体の前頭前野、運動前野、一次運動野から記録した細胞活動の具体例を示しつつ、これらの領野間の機能的差異、機能的関係を議論する。

第一の行動課題では、記憶すべき見本刺激とそれに引き続いて提示された選択刺激を、行動のルールに基づいて統合し、到達運動の標的を選択することが要求された。この課題を遂行中の被験者の前頭前野から細胞活動を記録したところ、1)見本刺激を反映する細胞活動、2)選択刺激を反映する細胞活動、そして、3)選択された標的の位置を反映する細胞活動が見出された。さらに、これら3種類の細胞活動の時間経過を解析したところ、前頭前野の情報表現が、見本刺激から選択刺激へ、そして、選択刺激から標的の位置へ、と短時間で変遷することが明らかになった。これらの結果は、“見本刺激と選択刺激の情報を行動のルールに従って統合し、標的の位置という運動の情報を選択・生成する”という一連の過程が前頭前野で再現されていることを示唆した。一方で、同じ課題で、一次運動野から細胞活動を記録したところ、一次運動野はこのような過程を反映しておらず、到達運動の実行自体を反映することが明らかとなった。

第二の行動課題では、到達運動に使用する手の指示と、到達する標的の位置の指示が連続して与えられ、これら2つの異なる指示内容を統合して到達運動を企画することが要求された。なお、これらの2つの指示の順序は20試行毎に入れ替えられた。この課題を遂行中の被験体の運動前野から細胞活動を記録したところ、第一の指示が

与えられた後には、1)使用する手の指示を選択的に記憶する細胞活動、2)標的の位置を選択的に記憶する細胞が観察された。さらに、第二の指示が与えられた後には、3)これらの2つの情報を統合する細胞活動が見出された。これらの結果は、“使用する手、到達する標的の位置という異なる運動の情報を収集・統合して将来の運動を企画する”という過程において、運動前野が重要な役割を果たすことを示唆した。

以上の結果をまとめると、

1)前頭前野は複数の情報を統合して標的の選択に関与する。

2)運動前野は到達運動に使用する手の情報と標的の位置情報を収集し、これらを統合して到達運動の企画をする。

3)一次運動野は企画された運動を実行する。という前頭皮質内の機能的差異が明らかとなる。さらに、これを解剖学的ならびに生理学的研究から得られている知見と総合することにより、“前頭前野で行動に必要な多様な情報の生成がなされ、運動前野でこれらが統合されて運動情報として企画される。そして、運動前野と一次運動野が企画された運動の準備・実行に関与する。”という前頭皮質内の階層構造を提案したい。

(3) 代謝調節型グルタミン酸および GABA_B 受容体による淡蒼球ニューロンの活動制御とパーキンソン病モデルでの発現変化

金田 勝幸 (生理研・認知行動発達機構)

近年の研究から大脳基底核には様々なタイプの代謝調節型グルタミン酸および GABA_B 受容体がユニークな発現様式を示すことが明らかとなってきた。本研究では大脳基底核を構成する重要な核である淡蒼球におけるこれら受容体の機能に関する2つの話題を紹介したい。

(1)GABA_B 受容体および mGluR1 を介した淡蒼球ニューロンの活動制御

げっ歯類の淡蒼球（霊長類では淡蒼球外節）は、主として線条体と淡蒼球自身から GABA による抑制性入力を、また、視床下核からグルタミン酸作動性興奮性入力を受けている。一方、淡蒼球はその GABA 性投射を大脳基底核のほぼすべての核に送っている。したがって、大

脳基底核による運動制御機構を理解する上で淡蒼球ニューロンの活動制御機構を解明することはきわめて重要であると考えられる。これまでの報告から、淡蒼球ニューロンの活動はイオンチャンネル型グルタミン酸受容体および GABA_A 受容体を介して制御されていることが明らかとなっているが、代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluRs) や GABA_B 受容体の役割については不明の点が多い。そこでこれらの受容体が淡蒼球において実際に機能しているのかどうかをラット脳スライス標本を用いてホールセル記録法により検討した。淡蒼球内の連続電気刺激により、速い EPSPs/IPSPs に続いて遅い IPSP が誘発された。この遅い IPSP は GABA_B 受容体アンタゴニスト

により完全に抑制されたことから、シナプス後膜に存在する GABA_B 受容体を介して発現したと考えられた。一方、刺激により誘発される GABA_A 受容体を介する速い IPSCs は GABA_B アンタゴニストの投与により増大したことから、刺激により遊離された GABA がシナプス終末に存在する GABA_B 受容体を活性化し、GABA の遊離を抑制していることが示唆された。さらに、内包の連続刺激では速い EPSP/IPSP に続いて、遅く持続的な脱分極が誘発された。この脱分極は mGluR1 選択的アンタゴニストにより部分的に抑制された。以上の結果は、シナプス性に遊離された GABA およびグルタミン酸がそれぞれ GABA_B 受容体および mGluR1 を活性化することにより、淡蒼球ニューロンの活動制御において重要な役割を果たしている可能性を示している。

(2)パーキンソン病モデルサルにおける mGluR1a の発現減少

パーキンソン病時には視床下核の活動が異常に増大していることが注目を集めている。そこでこのような視床

下核の活動上昇が mGluRs の発現に与える影響をドパミン神経毒である MPTP を投与することにより作成したパーキンソン病モデルサルを用いて検討した。その結果、調べた7つの mGluRs サブタイプのうち、mGluR1a の発現のみが視床下核の主要な投射先である淡蒼球内節・外節および黒質網様部において特異的に減弱していることを見いだした。この発現減少の機能的意義を調べる目的で、正常サルの淡蒼球内節・外節ニューロン活動に対する mGluR1 アゴニストおよびアンタゴニストの局所投与の影響を調べたところ、アゴニスト投与により淡蒼球内節・外節ニューロンの発火頻度は上昇し、アンタゴニストでは減少することが分かった。さらに、パーキンソン病モデルサルでは、特に淡蒼球内節においてこれらのアゴニストやアンタゴニストの効果が正常サルの場合と比較して減弱する傾向が認められた。以上の結果は、mGluR1a の特異的な発現減少は視床下核の過剰な興奮に対する代償機構であることを示唆している。

(4) サル視覚皮質 V4野における両眼立体視の奥行き表現

梅田和昌, 田辺誠司, 藤田一郎 (大阪大学大学院 生命機能研究科 認知脳科学研究室)

ヒトを含む霊長類は、優れた両眼立体視能力をもつ。視覚系は、奥行きに伴って左右の網膜像に生じるわずかなズレ、両眼視差を奥行き知覚の手がかりとしている。両眼立体視は、(1)視差のある二枚の網膜像をどのように一つの視覚像にするのか、(2)二次元的な網膜像からどのように両眼視差を算出し奥行きの知覚へ結びつけるのか、という二つの大きな問題を含んでいる。我々はこれらの問題を解明するため、覚醒下のサル視覚皮質 V4 野から単細胞の電気活動記録した。

実験1: V4野において対応点問題は解決されているか?

二枚の網膜像から一つの奥行きを伴った視覚像を構築するためには、左右それぞれの網膜上で由来の等しい二点を対応付けしなければならない。この問題を対応点問題という。V4野において対応点問題が解決されているかを調べるため、通常のランダム・ドット・ステレオグラム(cRDS)と輝度反転 RDS(aRDS)を用いて、両眼視差感受性を調べた。aRDS は左右眼に投影するドットの輝度を反転させた RDS であり、両眼視差が存在しても奥行きを

伴った面構造を知覚させない。対応点問題がすでに解かれた段階にある神経細胞ならば、cRDS の両眼視差に回答を示しても、aRDS の両眼視差には回答を示さないと考えられる。実験の結果、V4野の神経細胞の多くで、aRDSの両眼視差に対する応答がV1野よりも減弱していた。この結果はV4野において対応点問題が解かれつつあることを示唆する。

実験2: V4野は相対視差をコードしているか?

両眼視差は、絶対視差と相対視差に分類される。絶対視差はある点と個体が固視している面との奥行きの差に依存し、相対視差はある点とその周囲との奥行き差に依存する。過去の心理物理研究から、奥行き知覚は相対視差に依存することが示されている。そこで、V4野において相対視差がコードされているかを調べた。RDSを中心領域と周辺領域に分割し、それぞれの両眼視差を調節することで、さまざまな奥行き面の組み合わせに対する神経活動を記録した。その結果、V4野の神経細胞のほとんどが中心領域と周辺領域の相対視差に対して感受性を示

した。このことは V4 野の神経細胞群が相対視差に基づく奥行き表現を行っていることを示唆する。

以上のように、V4 野が奥行き知覚と対応した神経活動

を示すことから、V4 野を含む腹側経路における両眼情報処理は立体視に貢献していると考えられる。

(5) adaptation methods における fMRI と単一細胞活動記録の比較

澤村 裕正 (東京大学医学部眼科視覚矯正科)

Functional magnetic resonance image (fMRI) が脳機能研究に用いられるようになって以来多数の知見が得られている。fMRI はヒトを被験者として用いることができる、一時に多数の脳領域の活動を記録することができるという利点を持つが、時間解像度・空間解像度は劣る。一方従来よく用いられていた単一細胞活動記録は時間・空間解像度に優れ、単一神経細胞の刺激選択性あるいは刺激へのチューニングを調べるのに非常に有用であるものの、侵襲度が高く、脳の全ての領域を一時に記録することは非常に困難であるという欠点をもつ。

近年 fMRI を用いて視覚野の神経細胞群の選択性を推測するのに adaptation methods がよく用いられている。その根幹をなす論理は以下である。単一の刺激が連続して提示された場合(A-A), A に応答する細胞群は 2 回目の A の刺激提示に対して減弱した応答を示す(adaptation)。異なる刺激が続けて提示された場合には(B-A), その減弱した応答の程度がその細胞群の選択性を反映している、というものである。例えば B-A と提示された場合の adaptation の程度が A-A と提示された場合と同程度であったなら、その細胞群は B 及び A には選択性がないと判断されるし、全く adaptation を示さなかった場合にはその細胞群は A に選択性があると判断される。一見この論理は正しいようであるがこの論理を用いるにはある前提

が存在する。それは「細胞群の選択性と adaptation の程度が相関する」、というものである。

そこで今回はこの前提が正しいか否かを fMRI と単一細胞活動記録を比較することにより調べることにした。ヒトの fMRI の知見からは物体を認知する領域(lateral occipital complex=LOC)が単一視覚刺激により adaptation 効果を示すことは既に知られているが、サル fMRI の知見はまだ得られていないためまず単一視覚刺激を与えた場合に adaptation 効果が起こるか否かを確認した。また、物体の大きさを変化させた場合に得られたヒト fMRI の知見 (LOC では size invariance を示した) とサル単一細胞活動記録の知見 (いくつかの細胞では size invariance を示した) が異なっていたため、種が異なっていたためか、実験手法が異なっていたためかを調べるために同一の刺激をサル及びヒトを被験者として用い、その際の脳活動を fMRI で調べた。その上で単一細胞活動記録を用いて adaptation methods の前提が正しいか否かを調べた。

今回の発表で、我々の実験結果からサルを用いた fMRI でも adaptation 効果が見られたこと、ヒトとサルとは同程度の size invariance を示したこと、そして adaptation methods で用いられていた前提と結果が完全には一致しないことを報告する。

(6) 前頭連合野における行動選択のコントロール

筒井 健一郎 (東北大学 大学院生命科学研究所 脳情報処理分野)

われわれは自由であるがゆえに、日ごろから様々な場面で行動の選択をせまられている。そのなかで、複数の行動の選択肢があり、それらの選択肢からどれを取れば最良の結果が得られるか (どの選択肢の価値が最も高い

か) が曖昧な場面においては、選択に時間と心理的負担を要する。そのような場面はとりわけ「意思決定状況」と呼ばれている。本研究では、そのような意思決定状況における行動選択をコントロールしている神経機構を明

らかにすることを目的とした。そのため、2 種類の自由選択課題（毎試行、刺激 A と刺激 B のいずれかを選択させる課題）をそれぞれ別の 2 頭のサルに訓練した後、課題を遂行させながら前頭連合野のニューロンの活動を記録した。

第一課題として、並立 VI（変動間隔）スケジュールを基にデザインした変動確率課題を用いた。この課題は、刺激 A と B のどちらを取ったほうがより報酬を得られやすいかを予想しながら反応させるもので、最も基本的な意思決定状況であるといえる。この課題をサルに行わせながら前頭連合野からニューロン活動を記録すると、多くのニューロンの活動が、サルが刺激 A を選ぶようとしているときと、刺激 B を選ぶようとしているときで異なる活動を示すことが見つかった。すなわち、これらのニューロンの活動を観察すると、サルが実際に刺激を選択する何秒も前から、その試行でサルがどちらの刺激を選ぶのかを予測することが出来た。これらのニューロンの活動は、これまでに運動関連領域にて記録されたことが報告されている「運動の準備」に関する活動とは、本質的に異なる。すなわち、運動の準備に関わる活動は、どの効果器を使って、どちらの方向に反応するか依存していたが、今回記録されたニューロンは、効果器を右方向に動かすか、左方向に動かすかに関わらず、ある特定の刺激をとろうとしているときに選択的に活動しているのである。これらの事実は、前頭連合野のニューロンが、意思決定の初期の段階、すなわち、具体的な運動の準備よりも抽象度の高い、行動の目的設定に重要な役割を果たしていることを示唆している。

第二課題としては、無報酬刺激 A を多数回選ぶと、それに応じて後に報酬刺激 B を選んだときの報酬量が増える「貯金課題」を考案した。このは、すぐ得られる少量

の報酬を我慢して、無報酬の反応を繰り返して将来の報酬が増やさないといけないため、刺激の価値を評価する能力のほかに、衝動的な行動を抑えて将来のために努力する「自己統制」の能力が必要となる、より高度な意思決定状況であると考えられる。この課題をサルに行わせながら前頭連合野からニューロン活動を記録すると、反応に先立って予期的に発火するニューロンが多数記録された。これらのニューロンのほとんどは、サルが無報酬刺激を選ぶときと、報酬刺激を選ぶときで異なる反応をしていた。すなわち、背外側部を中心とする前頭連合野外側部のニューロンの多くは、サルが無報酬刺激を選ぶときだけ予期的な発火をしていたが、前頭眼窩部のニューロンの多くは、サルが報酬刺激を選ぶときだけ予期的な発火をしていた。また、報酬そのものに対する反応も、背外側部では一部のニューロンでのみ認められたが、前頭眼窩部においては多くのニューロンで認められた。これらの結果は、「貯金課題」を遂行する上で、それらの領域が異なる働きをしていることを示唆している。すなわち、前頭連合野背外側部は、衝動的な反応を抑制しながら将来のより大きな報酬のための行動の発現に深く関わっているのに対して、眼窩部は、近い将来に得られそうな報酬の期待や、実際に得られた報酬の評価などに関わっていると考えられる。

これらの結果より、前頭連合野が、意思決定を実現する上で、非常に重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後の課題としては、前頭連合野に対する神経阻害物質注入による可逆的機能阻害や、物理的な破壊によって、どのようにサルの行動が変容するかを調べる必要がある。また、前頭連合野と、頭頂連合野や大脳基底核などのほかの領域の役割が、どのように異なるかも調べていく必要があるだろう。

(7) 霊長類前頭前皮質機能コラムとドーパミン修飾

平田快洋（北海道大学大学院 医学研究科 高次脳機能学分野）

霊長類前頭前皮質(PFC)は、ワーキングメモリなどの高次の認知機能を担っている。特にその背外側領域は、視床や他の皮質領域と入出力をもち、細胞体や軸索終末がコラム状の構造を形成している。また、皮質第 IV 層の電気刺激によりコラム活動が誘発されることが *in vitro*

で示されてきた。さらに、PFC は、ドーパミンとその受容体が豊富な脳領域として知られ、D1 受容体を介して認知機能が修飾されることが示されてきた。しかしながら、細胞構築学的コラム構造とコラム活動の関係、さらに、コラム活動に対するドーパミン修飾作用は全く明らかに

されていない。そこで本研究では、解剖学的手法と膜電位感受性色素を用いた光学測定法を組み合わせ、これらの問題にアプローチした。

まず、細胞構築学的コラム構造とコラム活動の関係を明らかにするために、実験開始前に麻酔下のサル前頭前皮質 9 野に逆行性蛍光トレーサーである Fast Blue(FB)を注入した。2 週間の生存期間後、麻酔下のサル前頭前皮質主溝周辺領域から組織ブロックを採取し、厚さ 400 μ m のスライスを作成した。実験開始直前に膜電位感受性色素 (RH482 あるいは RH155) によりスライスを染色し、皮質の主な入力層である第 IV 層を電気刺激することにより誘発された活動を、光学測定システム(SD1001)を用いて検出した。始めに、皮質第 IV 層を電気刺激すること、皮質に垂直に一定幅を持ったコラム活動が誘発された。その後、実験に用いた各々のスライスにおいてコラム構造を同定し、電極跡、皮質表面および白質との境界を目印としてコラム活動の画像と重ね合わせした。その結果、コラム活動内部に FB で逆行性に染色された遠心性ニューロン群がコラム状のクラスタを作って存在して

いることが分かった。これらの結果は、1)前頭連合野背側外側に実際に機能コラムが存在することと、2)コラム活動が他の皮質へ投射する遠心性ニューロン群を駆動することが出来ることを示唆している。

続いて、ドーパミン受容体活性化がコラム活動に及ぼす影響を、受容体アゴニストを用い光学的に調べた。コラム活動が観察された脳スライスにドーパミン D1 受容体アゴニスト(SKF38393, 20 μ M)を添加したところ、コラム幅に影響を与えることなく興奮性シナプス伝達のみを増強した。一方で、D2 受容体活性化は、コラム活動になんら影響を与えなかった。これらの結果は、コラム内部でのシナプス伝達を D1 受容体が隣接するコラムに影響を与えることなく増強することを示唆している。

これらのことから、前頭前皮質の機能コラムは、ドーパミン D1 受容体活性化により増強し、機能コラム内部で情報処理を行った後、強い出力を他の皮質領域へ送っているかもしれない。これらは、高次認知機能を担う前頭前皮質の基礎的、かつ、重要な神経メカニズムの一つであると考えられる。

(8) 低周波および高周波ネットワーク・オシレーションを介した新皮質-海馬間相互作用

磯村 宜和 (理研 BSI 脳回路機能理論研究チーム, ラトガーズ大 CMBN)

ノンレム睡眠中や特定の麻酔条件下では、脳波記録中に大脳新皮質では持続的に 1~数 Hz 周期の序波/低周波オシレーション slow oscillation が、海馬では間欠的に 80-250 Hz の高周波オシレーション fast oscillation (リップル) が観察される。近年、睡眠中に新皮質と海馬はこのような同期的オシレーション活動を介して神経情報の相互交換をおこなっている可能性が提唱され、さらに新皮質と海馬の相互作用を担う入出力インターフェースとして嗅内野や海馬台の神経細胞活動が注目されている。そこで我々は、ウレタン・ケタミン麻酔下の成熟ラットをもちいて、新皮質、嗅内野表深層、海馬台あるいは海馬各領域の単一神経細胞から細胞内記録法により膜電位変化を記録して形態を同定すると同時に、海馬領域から局所フィールド電位とマルチユニット活動を記録し、新皮質の低周波オシレーションと海馬の高周波オシレーションの領域間相互作用を解析した。その結果、1)嗅内野、

海馬台錐体細胞の膜電位はアップ状態、ダウン状態の 2 相性変化を示し、それぞれ新皮質領域の低周波オシレーションと同期していた、2)海馬 CA3, CA1 細胞はアップ・ダウン膜電位遷移をまったく示さなかった、3)歯状回細胞はアップ状態の嗅内野入力により直接駆動されるが、CA3, CA1 細胞は嗅内野アップ・ダウン状態に関わらず発火活動を示した。4)CA1 領域では高周波オシレーションもガンマ(30-80 Hz)・オシレーションも嗅内野アップ・ダウン状態に関わらず発生した、5)海馬の高周波オシレーションと新皮質の低周波オシレーションの発生は 1 秒程度の遅延をもって相関していた。このように、嗅内野と海馬台領域は新皮質領域に類似した低周波オシレーションの性質を示し、海馬は新皮質入力に依存せず自律的に高周波およびガンマ・オシレーションを発生する能力を有することを明らかにした。

(9) 扁桃体と社会的コミュニケーション

堀 悦郎 (富山大学大学院医学系研究科 システム情動科学, 科学技術振興機構 CREST)

我々は日常的に、顔表情、目線、ジェスチャーなどの非言語的なコミュニケーションを行っている。特に顔は社会的な意味を強く持っており、顔からの情報は固体の識別のみならず、他者の精神状態を理解するのに利用されている。他者の精神状態を理解することは、円滑なコミュニケーションに必要不可欠であり、これが欠如した精神科疾患として自閉症、躁うつ病、統合失調症、注意欠損多動性障害などが挙げられる。近年、これらのコミュニケーション障害を呈する疾患が社会的に注目を集めており、教育学的問題にもなっている。一方、これまでの神経心理学のおよび神経生理学的研究から、扁桃体は自己の情動発現のみならず、他者の精神状態を理解する役割も担っている可能性が示唆されている。扁桃体は他の大脳感覚領域と共に、様々な事象の認知や情動の処理に関与すると考えられている。ほ乳類においては、扁桃体が進化あるいは分化するに従って、それと共に情動のおよび社会的な行動も複雑に進化あるいは分化している。

本研究では、社会的コミュニケーションにおける扁桃体の役割に焦点を当て、演者らの研究結果を紹介したい。まず、社会的シグナルに対するサル扁桃体ニューロンの応答性についての神経生理学的な研究結果を紹介する。顔表情あるいは視線方向に関する遅延非見本合わせ課題を遂行中のサル扁桃体からニューロン活動を記録した。顔刺激としては、様々なヒトおよびサルの写真を用いた。単一ニューロン活動の記録にはガラス被覆タンゲ

ステン電極を用い、各刺激に対するニューロン応答を比較した。その結果、サル扁桃体にはヒトおよびサルの顔刺激に対して識別的に応答するニューロンが存在した。これらのニューロンには、特定の人物の特定の顔表情や特定の視線方向に応答するものがあった。さらに、サルと日常的に接している実験者の顔刺激に対しては、他の人物の顔刺激に比べてより識別的に反応することが明らかとなった。この結果は、扁桃体が社会的シグナルの学習に関与することを示している。

ついで、ヒトの共有注意機構に対する顔表情の影響についての心理学的研究結果を紹介する。共有注意とは、他者と同一の物に注意を向ける機構のことである。実験では、モニタ上に呈示されるターゲットの位置検出課題を行った。被験者は、ターゲットが呈示された位置に対応したキーを素早く押すことが要求された。ターゲットの呈示に先がけて、被験者に様々な顔表情および視線方向の顔写真を短時間呈示した。その結果、ターゲットの直前に呈示された顔刺激の視線方向とターゲットの出現位置が一致した場合には、被験者の反応時間が有意に短くなっていた。さらに、顔刺激が笑顔の場合には、他の顔表情に比べて被験者の反応時間が著しく短かった。この結果は、他者の顔表情が共有注意機構に影響を及ぼすことを示している。

これらの結果から、扁桃体を中心とした社会的コミュニケーションに関する神経機構について考察したい。

14. シナプスの一生：誕生・維持・除去過程の統合的理解に向けて

2005年12月1日-12月2日

代表・世話人：柚崎通介（慶應義塾大学 医学部 生理学）

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) Novel role of CaMKII in the maintenance and regulation of synaptic structure
林 康紀（理研-MIT Neuroscience Research Center）
- (2) Experience-driven synaptic delivery of AMPA receptors *in vivo*
高橋 琢哉（Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology）
- (3) リン酸化による NMDA 受容体局在調節とシナプス可塑性の制御
渡部 文子（東京大学医科学研究所 神経ネットワーク）
- (4) 後シナプスニューレキシンのシナプス形成における抑制的役割
谷口 弘樹（Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology）
- (5) NMDA 受容体細胞外ドメインの新たな役割
加藤 明彦（Eli Lilly）
- (6) シナプス形成におけるネクチンの役割
匂坂 敏朗（大阪大学大学院医学系研究科 分子生物学）
- (7) プレシナプスアクティブゾーンにおけるリン酸化プロテオーム
大塚 稔久（富山大学医学部 臨床分子病態学）
- (8) ショウジョウバエ嗅覚地図の構築における Notch コードの役割
遠藤 啓太（発生・再生科学総合研究センター 神経回路発生）
- (9) 神経伝達物質放出量の制御機構の一考察
高森 茂雄（東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 脳神経病態学）
- (10) NR2B リン酸化残基改変マウスの情動異常の解析
デラワリ ミナ（東大医科学研究所 癌細胞シグナル研究分野）
- (11) Rab3 GAP によるシナプス伝達と可塑性の制御
坂根亜由子（徳島大 ヘルスバイオサイエンス 分子病態学）
- (12) Translocation of drebrin and F-actin from dendritic spines to shafts was regulated by myosin II ATPase activity
水井利幸（群馬大学医学系研究科 高次細胞機能学）
- (13) ATP 受容体チャネル P2X2 の膜電位と ATP に依存した"ゲート"機構の解析
藤原祐一郎（自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子研究部門）
- (14) Quantitative analysis of GABAA receptor subunits expressed in hippocampal CA1 pyramidal cells by
SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)
春日井 雄（自然科学研究機構 生理学研究所 脳形態解析部門）
- (15) Quantitative analysis of AMPA and NMDA receptors in the retino- and cortico-geniculate synapses as revealed by
SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)
足澤悦子（自然科学研究機構 生理学研究所 脳形態解析部門）
- (16) 突起形態における樹状突起局在性転写コアクチベーターMAL の役割
田淵明子（富山大学薬学部・分子神経生物学研究室）
- (17) 新しい分泌性シナプス機能修飾因子セレブリンファミリーの解析
飯島崇利（慶應義塾大学 医学部 生理学）

【参加者名】

安部健太郎, 遠藤啓太 (理化学研究所・発生再生科学総合研究センター), 飯島崇利, 石田 綾, 掛川 渉, 亀川雄一, 幸田和久, 田川義晃, 松田恵子, 松田信爾, 柚崎通介 (慶應義塾大学 医学部), 飯田純子, 井上明宏, 岡部繁男, 高森茂雄, 畑 裕 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科) 石井 裕, 久保義弘, 重本隆一, 篠原良章, 立山充博, 中條浩一, 長友克広, 挾間雅章, 深澤有吾, 藤原祐一郎, 山肩葉子 (生理学研究所), 井上英二 (カン研究所), 大塚稔久, 田淵明子, 所 崇, 比嘉 進, 山口桂司 (富山大学医学部), 片岡正和 (信州大学工学部), 加藤明彦 (Eli Lilly), 狩野方伸, 橋本浩一 (大阪大学大学院医学系研究科), 小林静香, 関野祐子, デラワリ ミナ, 中澤敬信, 真鍋俊也, 渡部文子 (東京大学医科学研究所), 齊藤 実 (東京都医学研究機構

東京都神経科学総合研究所), 坂根亜由子, 佐々木卓也 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部), 匂坂敏朗 (大阪大学大学院医学系研究科) 崎村建司, 武井延之 (新潟大学脳研究所), 白尾智明, 水井利幸 (群馬大学大学院医学系研究科), 瀬藤光利 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 高雄啓三 (京都大学医学研究科), 高岸芳子 (名古屋大学環境医学研究所), 高橋琢哉, 谷口弘樹 (Cold Spring Harbor Laboratory), 竹居光太郎 (横浜市立大学医学部), 林 康紀 (RIKEN-MIT Neuroscience Research Center), 尾藤晴彦 (東京大学大学院医学系研究科), 平井宏和 (金沢大学学際科学実験センター), 本田知之 (三重大学大学院医学系研究科), 山田麻紀 (東京大学薬学系研究科)

【概要】

脳を構成する 1000 億個を超える神経細胞は, 特異的なシナプス結合によって情報を伝達すると同時に, シナプスにおいて記憶を蓄えると考えられている。個体の発達と共に誕生した新たなシナプスは, 環境要因や学習過程に応じて特定のシナプスのみが選択的に強化され, さまざまな分子が集合して成熟し, 一部のシナプスは除去されていく。近年, このようなシナプスの形成・維持・除去過程は, 発達段階の脳のみならず, 個体の一生を通じてダイナミックに起きる現象であることが明らかになってきた。このようなシナプスの形成・維持過程の分子基盤の解明は, 児童期・青年期における教育・学習効果に関する理論的知見を与え, 老化に伴う記憶の障害機構を理解するための重要な鍵を与えると期待される。この

一連の過程の分子機構を解明していくためには, 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の異なる分野の人材による学際的なアプローチとその統合が不可欠である。そこで, 本研究会では, 広く他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, 演題(1)-(9)では, 最先端で活躍中の演者を交えて一演題当たり一時間程度の十分な時間をかけて, 徹底的な討論を行った。また若手研究者の育成を図るために, 演題(10)-(17)は若手研究者がポスターを用いて, やはり十分な時間をかけて討論した。これらの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出すことができたと考えている。

(1) Novel role of CaMKII in the maintenance and regulation of synaptic structure

林 康紀 (理研-MIT Neuroscience Research Center)

The synapse is a highly organized cellular specialization that reorganizes its structure and composition according to input strength-both positively and negatively. The mechanisms orchestrating these changes remain largely elusive. We previously reported that activity dependent bidirectional regulation of actin at the synapse is involved in postsynaptic assembly-disassembly, and serves as a substrate for bidirectional synaptic plasticity. Tetanic stimulation rapidly and persistently shifts the F-actin/G-actin

equilibrium towards F-actin in dendritic spines. The molecular mechanism involving this regulation has not yet been discovered.

We have hypothesized that CaMKII, a serine/threonine protein kinase highly enriched in excitatory synapses, is involved in this regulation. Here we present experimental evidence suggesting that CaMKII has a structural role in stabilizing actin cytoskeleton in dendritic spines.

(2) Experience-dependent synaptic delivery of AMPA receptors in vivo

高橋 琢哉 (Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology)

The molecular modifications that occur in the intact vertebrate brain as a consequence of experience are still poorly understood. One crucial question is whether natural stimuli in vivo induce the synaptic delivery of GluR1.

To test this, I injected Sindbis virus carrying recombinant AMPA receptors into barrel cortex of rats with or without whiskers in vivo at P12, an age characterized by rapid experience-dependent development of barrel cortex circuitry. 2 days later, I cut acute slices and tested delivery of AMPA receptors to synapses from layer4 to layer2/3 pyramidal neurons with an electrophysiological

technique. I found that recombinant and endogenous GluR1 were delivered to synapses in the intact whisker rats but not in the deprived whisker rats. This showed that synaptic delivery of GluR1 is experience-dependent. In vitro experiments showed that synaptic delivery of GluR2 is activity-independent. Consistent with these in vitro results, recombinant and endogenous GluR2 were delivered to synapses both in the intact and deprived whisker rats. So the model, which was developed from in vitro experiments, applies to experience-dependent plasticity in vivo.

(3) リン酸化による NMDA 受容体局在調節とシナプス可塑性の制御

渡部 文子 (東京大学医科学研究所 神経ネットワーク)

神経伝達効率の長期増強(LTP)にはNMDA型グルタミン酸型受容体(NMDAR)が重要な役割を担うことが知られているが、生理的条件下でNMDAR機能がどのように調節されているのかに関しては不明な点が多い。LTP誘導刺激をはじめ、虚血やエタノール暴露など様々な系においてNMDARのリン酸化が報告されており、生理的に多様な機能を担っていることが示唆されている。

そこで我々はNR2Bの主要なリン酸化部位である1472番目チロシン残基に変異を導入したノックインマウス(YF)の詳細な解析を行うことにより生体内での役割を検討した。免疫電顕による解析で野生型マウス(WT)ではNMDARはシナプス後肥厚部の中心部分に偏って局在し

ているがYFでは均等に近く散在していた。またYFの扁桃体ではNR2Bと α -アクチニンとの結合が顕著に減弱していた。一方YFではNMDA/AMPA電流比、AMPA電流のmEPSCの大きさや頻度にも有意な差は無かったが、LAにおけるLTPは有意に減弱しており、また恐怖条件付け学習行動にも障害が見られた。LTP誘導刺激によるNMDA電流の加算に変化は見られなかったが、YFの扁桃体ではNR2BとCaMキナーゼIIとの結合が顕著に減弱していた。これらの結果からこのリン酸化は受容体の局在や下流シグナル系を制御することにより、シナプス可塑性の誘導や学習行動も制御している可能性が示唆された。

(4) 後シナプスニューレキシンのシナプス形成における抑制的役割

谷口 弘樹 (Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology)

シナプスは神経細胞同士の信号伝達を仲介する場所であり、その形態的、機能的変化は学習記憶の基盤メカニズムと考えられている。よってシナプス形成を制御するメカニズムを解明することは発生物学的見地からのみ

ならず、脳機能を理解する上でも重要かつ興味深い課題となっている。本研究では、シナプス形成を抑制する分子の同定、その機能解析を目的とした。NLGは培養海馬神経細胞に発現すると顕著な前シナプス誘導活性を示す

ので、スクリーニングの指標として有用であると考えた。そこで、NLG と候補分子を共発現し、NLG の活性を阻害する分子を目的のものとした。その結果、興味深いことに NLG の受容体である Nr1beta がそのような阻害活性を持つことがわかった。pan-Nrx 抗体を用いた、免疫細胞染色、免疫電子顕微鏡の解析から、Nrx は前シナプスばかりではなく、後シナプスにも存在することが明らかになった。

また、NLG とシスで共存する Nr1beta は、NLG-Nrx1beta 間のトランス相互作用を阻害することが明らかになった。さらに興味深いことに Nr1beta の培養海馬神経細胞における過剰発現は NLG タンパクの発現増加を誘導することもわかった。以上の結果をふまえ、後シナプス Nr1beta のシナプス形成における抑制的役割について議論したい。

(5) NMDA 受容体細胞外ドメインの新たな役割

加藤 明彦 (Eli Lilly)

NMDA 受容体はシナプス可塑性、過剰な興奮による神経細胞死に関わる最も重要なイオン透過性グルタミン酸受容体である。イオン透過性グルタミン酸受容体は細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインからなる。細胞外ドメインは、リガンド結合ドメインのほかに 400 アミノ酸からなる N-terminal domain (NTD) が存在する。NTD は最も大きなドメインであるにもかかわらず、機能解析は立ち遅れている。

私どもは NMDA 受容体の必須サブユニットである、NR1 の NTD と相互作用する分子を同定することを通して NTD の機能を探ることを試みた。Alkaline phosphatase と融合した NR1-NTD を哺乳動物細胞から分泌させ、これをプローブに用いて海馬の初代培養を染色したところ、神経細胞で強いシグナルが得られた。このことは海馬に NR1-NTD と結合する分子が存在することを示している。次いで、発現クローニングを用いて NR1-NTD と結合する分子の同定を行ったところ、ユビキチンリガー

の基質特異性を決定する F-box タンパクのひとつ、Fbx2 であることが分かった。Fbx2 は糖タンパクと結合してユビキチン化することが報告されている。実際、NR1 は Fbx2 と、high mannose タイプの糖鎖依存的に結合してユビキチン化されることを見出した。このことは、NR1 の NTD がいったん lumen 側ないし、細胞外に出た後、再度細胞質側に戻り、ユビキチン化されて分解されるという、「retro-translocation」を受けていることを示している。

さらに興味深いことに、Fbx2 の dominant negative を海馬神経細胞に導入すると、神経活動依存的に NR1 の免疫染色強度が増加することに加え、細胞表面の NMDA 受容体を介する電流が増加することを見出した。このことから、NR1 の細胞外ドメインを介した Fbx2 によるユビキチン化が、機能的な NMDA 受容体の数を減らす役割を果たしているのではないかと考えている。

(6) シナプス形成におけるネクチンの役割

匂坂 敏朗 (大阪大学大学院医学系研究科 生化学 分子生物学)

神経シナプスはニューロン間の特殊な細胞間接着であり、その特異性と可塑性は細胞間接着分子により制御されている。その形は、海馬 CA3 領域において、神経伝達場の場 (synaptic junction (SJ)) を中心に、その周りをシナプスの機械的な接着 (puncta adherentia junction (PAJ)) が取り囲むという同心円状の形をしている。PAJ は、上皮の

細胞間接着と同様に、前、後シナプス膜が対称的な形態を保っており、細胞間接着分子が集積している。この PAJ には、イムノグロブリン系細胞間接着分子であるネクチン-1 が前シナプス膜にネクチン-3 が後シナプス膜に非対称性に局在している。また、ネクチンの結合タンパク質であるアフアディンと N-カドヘリンは対称性に PAJ に

局在している。そこで、PAJにおけるネクチンの機能を調べるために、ネクチン-1とネクチン-3のノックアウトマウスを作成した。両方の変異マウスにおいて、PAJの数が減少していた。さらに、苔状線維の走行異常が認め

られた。これらの結果から、ネクチンはPAJの形成に関与しており、またそれにより苔状線維の走行を維持していることが考えられた。

(7) 神経シナプス・アクティブゾーンにおけるリン酸化プロテオーム

大塚 稔久 (富山大学医学部 臨床分子病態学講座)

神経伝達物質を含有したシナプス小胞は、活動電位による刺激によりカルシウムイオンが流入すると、プレシナプスの形質膜と融合し神経伝達物質をシナプス間隙に放出する。この一連のステップは、特異的な場であるアクティブゾーンにおいて厳密に制御されている。

アクティブゾーンを構成する蛋白質群としては Bassoon, Piccolo, RIM, Munc13-1, および私共が見いだした CAST および ELKS が知られている。なかでも、CAST/ELKS ファミリーは、他のアクティブゾーン蛋白質と相互作用することにより、アクティブゾーンにおいて 巨大な蛋白質複合

体を形成している。さらに、この複合体は静的なものではなく、非常にダイナミックで、神経伝達物質の放出においても重要な役割を担っている。

私共は、最近、神経終末においてユニークな局在を示すセリンスレオニンキナーゼを同定した (SAD キナーゼ)。本セッショントークでは、この SAD キナーゼの機能解析のデータを中心に紹介し、アクティブゾーン形成とその機能発現におけるリン酸化シグナル伝達機構の役割について議論したい。

(8) ショウジョウバエ嗅覚地図の構築における Notch コードの役割

遠藤 啓太 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 神経回路発生研究チーム)

キイロショウジョウバエの嗅覚神経系では、脊椎動物の嗅覚神経系同様、特定の嗅覚受容体を発現する嗅覚神経細胞が脳内の一次嗅覚中枢である嗅覚葉 (脊椎動物の嗅球に相当) の特定の糸球体へ軸索を投射している。我々は、この特異的な軸索投射に関わる遺伝子の同定を目的とし、嗅覚神経細胞の軸索投射に異常を示す突然変異のスクリーニングを行った結果、Notch タンパクが下流の遺伝子を活性化する際に必要な核内因子をコードする *mastermind* 遺伝子の変異を分離した。

この変異をもつ嗅覚神経細胞は一部の特定の糸球体へのみ軸索を投射し、反対に、Notch シグナルに対して抑制的に働く *numb* 遺伝子の変異をもつ嗅覚神経細胞は、これとは相補的な糸球体へのみ軸索を投射する。また、これらの変異をもつ嗅覚神経細胞は、それぞれ特定の、

かつ、相補的なセットの嗅覚受容体のみを発現する。したがって、嗅覚神経細胞の発生運命が Notch シグナルの ON/OFF によって大きく二分され、その運命に従って軸索投射の特異性が制御されていることが明らかになった。

Notch ON/OFF それぞれの発生運命をもつ嗅覚神経細胞が軸索を投射する領域は嗅覚葉内で大きく分かれている。また、それぞれの領域は投射する軸索の走行パターンに基づいて更に複数のドメインへと分けることができる。したがって、Notch ON/OFF に従った軸索投射機構が、嗅覚神経細胞のもつ他の遺伝情報と組合わさることによって嗅覚神経系全体の回路構築に寄与していることが示唆された。

(9) 神経伝達物質放出量の制御機構の一考察

高森 茂雄 (東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 脳神経病態学)

グルタミン酸は哺乳類神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。ニューロンがグルタミン酸を放出するためには、神経終末の細胞質に存在するグルタミン酸がシナプス小胞内に輸送される必要がある。この重要な過程を担う膜蛋白質が小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) である。2000 年の VGLUT1 の同定を契機に、現在までに、3 つの VGLUT イソ型が同定され、VGLUT を分子指標とした脳内のグルタミン酸神経回路が刻々と明らかになってきた。興味深いことに、哺乳類脳内では、VGLUT1 と VGLUT2 が相補的な分布を示す。また、VGLUT3 は、これまでグルタミン酸作動性ニューロンと

は考えられていなかったニューロンに発現しており、その生理学的な意味は謎である。更に最近になって、統合失調患者や虚血モデル動物などで、脳部位特異的な VGLUT イソ型発現量の変化が誘起されることが報告され、VGLUT 発現量に伴うシナプス伝達強度の変化の生理学的な意義や病態への関与などが示唆されている。今回は、VGLUT 分子同定の経緯を概説すると共に、VGLUT に着目したグルタミン酸神経回路の分子多様性・VGLUT のシナプス伝達強度への影響など、最近の知見を交えて総括的に紹介する。

(10) NR2B リン酸化残基改変マウスの情動異常の解析

デラワリ ミナ (東大医科学研究所 癌細胞シグナル研究分野)

(11) Rab3 GAP によるシナプス伝達と可塑性の制御

坂根亜由子 (徳島大 ヘルスバイオサイエンス 分子病態学)

(12) Translocation of drebrin and F-actin from dendritic spines to shafts was regulated by myosin II ATPase activity

水井利幸 (群馬大学医学系研究科 高次細胞機能学)

(13) ATP 受容体チャネル P2X2 の膜電位と ATP に依存した"ゲート"機構の解析

藤原祐一郎 (自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子研究部門)

(14) Quantitative analysis of GABAA receptor subunits expressed in hippocampal CA1 pyramidal cells by SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)

春日井 雄 (自然科学研究機構 生理学研究所 脳形態解析部門)

(15) Quantitative analysis of AMPA and NMDA receptors in the retino- and cortico-geniculate synapses as revealed by SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)

足澤悦子 (自然科学研究機構 生理学研究所 脳形態解析部門)

(16) 突起形態における樹状突起局在性転写コアクチベーター MAL の役割

田渕明子 (富山大学薬学部・分子神経生物学研究室)

(17) 新しい分泌性シナプス機能修飾因子セレブリンファミリーの解析

飯島崇利 (慶應義塾大学 医学部 生理学)

15. 大脳皮質機能単位の神経機構

2005年10月20日-10月21日

代表・世話人：姜 英男（大阪大学・大学院歯学研究科）

所内対応者：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

- (1) 大脳皮質の自発活動 — 常同性と活動予測性とグラフパターン —
池谷裕二（東京大学・大学院薬学系研究科）
- (2) 大脳皮質局所回路における層依存的同期特性
坪 泰宏（理化学研究所・脳科学総合研究センター・脳回路機能理論研究チーム）
- (3) 大脳皮質 GABA ニューロンが形成するギャップ結合性ネットワークの3次元的広がり
福田孝一（九州大学・大学院医学研究科・神経形態学）
- (4) 発達期海馬における、カンナビノイド受容体によるアンチ・ヘップシナプス
安田浩樹（大阪大学・大学院医学系研究科・神経生理学）
- (5) 神経オシレーションによる大脳皮質間機能連絡の強化
吉村 弘（金沢医科大学・顎口腔機能病態学）
- (6) 線条体の行動価値表現と大脳基底核の強化学習モデル
鮫島和行（玉川大学・学術研究所・脳科学研究施設）

【参加者名】

福田孝一（九州大学院・医）、姜 英男（大阪大学院・歯）、
安田浩樹（大阪大学院・医）、宋文杰（大阪大学院・工）、
金子武嗣、加藤伸郎、藤山文乃、日置寛之、大平耕司、
中村公一、倉本恵梨子、田中康代、田中琢真、越水義登、
雲財知、亀田浩司（京都大学院・医）、青柳富誌生、野
村真樹（京都大学院・情報）、北野勝則（立命館大学・
情報理工）、吉村弘（金沢医科大学）、吉村由美子（名古

屋大学・環境医学研）、福田敦夫（浜松医科大学・医）、
池谷裕二（東京大学院・薬）、森田賢治（東京大学・生
産技術研究所）、山下晶子（日本大学・医）、小島久幸（東
京医科歯科大）、鮫島和行（玉川大学・学術研究所）、端
川勉、深井朋樹、一戸紀孝、坪泰宏（理化学研究所）、
南部篤、伊藤南、川口泰雄、窪田芳之、大塚岳（生理学
研究所）

【概要】

平成17年10月20～21日に6人の演者による講演と議
論を行なった。「大脳皮質の自発活動—常同性と活動予測
性とグラフパターン—」池谷裕二氏は、カルシウムイメ
ージング法を用いて皮質切片標本から大規模な神経活動
記録を行い、自発活動の時空構造に特定の繰り返し配列
が多数含まれていることを明らかにし、その配列から神
経活動が予測できることを示した。「大脳皮質局所回路
における層依存的同期特性」坪泰宏氏は、錐体細胞にお
ける位相応答曲線を調べ、ラット運動野では2/3層と5
層錐体細胞では、それぞれ、二相性及び単相性の異なる
位相応答を示すことを明らかにし、さらに二相性応答を
示す細胞間に同期化が生じうる可能性をシミュレーショ
ンにより示した。「大脳皮質 GABA ニューロンが形成す

るギャップ結合性ネットワークの3次元的広がり」福田
孝一氏は、大脳皮質の parvalbumin 陽性非錐体細胞は、
他の60個もの同種の細胞とギャップ結合している事を
示した。「発達期海馬における、カンナビノイド受容体
によるアンチ・ヘップシナプス」安田浩樹氏は、幼若な
海馬で、興奮性入力に活動依存的に活動性の低い興奮性
シナプスを抑圧する異シナプス性長期抑圧に、カンナビ
ノイド受容体が関与する事を示した。「神経オシレーシ
ョンによる大脳皮質間機能連絡の強化」吉村 弘氏は、カ
フェイン投与により、スライス標本一次視覚野に発生し
たオシレーションが二次視覚野、脳梁膨大後野へと伝播
すると、同領域を発信源とする8-10Hzのオシレーション
が引き起こされ、その結果、入力信号の強化が生じるこ

とを明らかにし、オシレーションが機能的連絡を強化するという仮説を提唱した。「線条体の行動価値表現と大脳基底核の強化学習モデル」鮫島和行氏は、サルに選択肢課題をさせ、大脳皮質から線条体ではこれから選択する行動の価値を表現し、それに基づいた行動選択が大脳

基底核の出力核群において行われるという強化学習モデルを報告した。個々の講演において、白熱した討論が30分以上おこなわれ、学会等では出来ない深い議論が行なわれた。

(1) 大脳皮質の自発活動 — 常同性と活動予測性とグラフパターン —

池谷裕二 (東京大学・大学院薬学系研究科)

脳は外部情報が与えられなくても自発的に活動している。従来こうした外界から孤立した神経細胞の活動は無用なノイズとして解釈されてきたが、近年我々は、自発活動には偶発レベルを越えた秩序が潜んでいることを明らかにした。カルシウムイメージング法を用いて皮質切片標本から大規模な神経活動記録を行い、自発活動のパターンを数理解析したところ、その時空構造には特定の繰り返し配列(シーケンス)が多数含まれていることが判明した。幾多の方法でデータをシャッフルすると、いずれの場合もシーケンス数が有意に減少することから、シーケンスの存在は偶発的な帰結では説明できな

いと考えられる。シーケンスを形成する神経活動は、古典的なホップフィールド回路とマカロック・ピッツモデルを組み合わせると、高い正確性をもって予測できることがわかった。さらに、現在進行中の研究ではあるが、視床を刺激すると流動的だった自発活動が特定ノイズパターンに固定されることから、外部入力、皮質応答を誘発するのではなく、遷移する内部状態から特定の「相」を選択する役割を演じていると解釈される。つまり、静的な受動システムではなく、内発的に情報を生み出す「自発創生システム」として大脳皮質を捉えなおす必要がある。

(2) 大脳皮質局所回路における層依存的同期特性

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

大脳皮質には特徴的な層構造がみられ、各層を構成する神経細胞の投射先、形態、電気的性質などが層により異なることが様々な研究からわかってきた。さらにこの層構造をもつ局所回路がどのように機能しているのかを知るためには、構成要素である神経細胞の相互作用特性を調べる必要がある。そこで我々は、相互作用の基本的性質を表現する「位相応答」と呼ばれる性質を、大脳皮質の構成要素の大半である錐体細胞に対して調べた。位相応答を調べる方法は2通り知られている。発火

モデルを構築しこのモデルに対して位相縮約を用いる間接的方法と、神経細胞から実験により直接位相応答を記録する直接的方法である。本研究では、近年有効であることが実験的に示されてきている直接的方法を用いた。結果として、ラット運動野ではII/III層の錐体細胞の多くは同期傾向が強いが、V層の錐体細胞の多くは同期傾向が弱いことがわかった。この細胞特性が局所回路においてどのような機能的役割を果たすのかについても、少し言及したい。

(3) 大脳皮質 GABA ニューロンが形成するギャップ結合性ネットワークの3次元的広がり

福田孝一 (九州大学大学院・医学研究科・神経形態学)

大脳皮質の GABA ニューロンが相互にギャップ結合を形成していることが近年明らかにされた。しかし従来の電子顕微鏡的研究ではギャップ結合の存在を局所的に示すことしかできず、大脳皮質構築におけるその3次元的な分布を知ることは困難であった。最近私は技術的問題の改良により、ギャップ結合の空間的分布の検討を可能とした。ネコ視覚皮質において、一個のパーブルアルブミン(PV)陽性 GABA ニューロンが平均 60 個ものギャップ結合を他の PV ニューロンと形成し、樹状突起に沿っ

た結合部位の分布は生理学的な予想を大きく越えた広がりを示し(細胞体から 380 ミクロンまで)、ギャップ結合による連鎖は皮質内を側方にどこまでも続いていくと思われること、さらに PV ニューロンの大きな樹状突起野が、光学的に記録した方位選択性カラムには束縛されない大きな重なりを示すことを明らかにした。これらの事実は、リズムと同期性の実現に関連する構造が、大脳皮質の中に驚くほどの密度と広がりを持って初めから用意されていることを示唆する。

(4) 発達期海馬における、カンナビノイド受容体によるアンチ・ヘップシナプス

安田浩樹 (大阪大学・大学院医学系研究科・神経生理学)

活動に応じてシナプス伝達を強化するヘップシナプスは、海馬における学習・記憶の形成、活動依存的な神経回路の再構築に関与すると考えられている。ただ、幼若な神経組織においては抑制系の発達が乏しく、大きな興奮性増加を伴う可塑的变化は病的興奮を起す可能性がある。幼若海馬には成熟期とは異なり、PKA によって生じる、比較的小さな長期増強が生じることを報告した(Yasuda et al. 2003)。一方、幼若な海馬では、興奮性入力

が活動依存的に興奮性シナプス自身を抑圧するメカニズムが発達しており、長期増強に伴って、高頻度刺激を受けないシナプスに異シナプス性長期抑圧が生じた。活動の低いシナプスを抑圧して活動の高いシナプスを相対的に増強することにより、小さな長期増強を補完するメカニズムであると考えられる。この異シナプス性長期抑圧は①若いほど程度が大きく、②生後数週間にわたって観察され、発達とともに消失する。③カンナビノイド受容体が関与していて、④細胞内だけではなく、細胞間に広がっている可能性がある。

(5) 神経オシレーションによる大脳皮質間機能連絡の強化

吉村 弘 (金沢医科大学・顎口腔機能病態学)

大脳皮質における神経オシレーション活動の、皮質間信号伝播への影響を調べた。中枢神経賦活剤であるカフェインが、脳スライスに含まれる神経回路の機能を効果的に増幅することがわかってきた。このカフェインをラット視覚野スライスに適用し、光学的計測法を用いて、一次視覚野の白質刺激によって引き起こされる神経活動の振る舞いを動的に観察した。一次視覚野に発生した信号は、二次視覚野さらに脳梁膨大後野へと伝播し、二次視覚野浅層および脳梁膨大後野深層を発信源とする 8-10Hz

のオシレーションを引き起こした。それぞれの振動源から NMDA 受容体の活動に依存する振動性信号が配信され、この振動性活動は、一次視覚野から二次視覚野を経て脳梁膨大後野へと向かう non-NMDA 受容体依存性の入力信号を強化する役割を担っていた。これらの実験結果から、ある間隔で局在する振動装置が大脳新皮質—大脳辺縁系間における機能的連絡を強化する、という仮説が導き出された。

(6) 線条体の行動価値表現と大脳基底核の強化学習モデル

鮫島和行 (玉川大学・学術研究所・脳科学研究施設)

これからすることを決定するとき、その結果の良さを評価することは重要になる。大脳基底核は運動や報酬に関わることがこれまで示唆されてきたが、報酬の情報が意志決定にどのように関わるのかは、まだわかっていない。我々は意志決定時の大脳基底核の機能を調べるために、サルに各行動に割り付けられた報酬の確率に基づいて二つの選択肢から一つを選ぶ課題を訓練し、線条体から細胞外電気記録を行った。選択行動直前の線条体投射

細胞の活動のうち2/3がある1つの行動選択に対する報酬予測(行動価値)を表現し、より少ない細胞で相対的な価値、もしくは行動選択そのものを表現していた。この結果は、大脳皮質から大脳基底核の入力部である線条体ではこれから選択する行動の価値を表現し、それに基づいた行動選択が大脳基底核の出力核群において行われ、行動の結果得られる報酬によって行動価値が更新される、という強化学習モデルを示唆する。

16. シナプス伝達の細胞分子調節機構

2005年12月8日-12月9日

代表：岡部繁男（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科）

所内対応者：伊佐正（生理学研究所・認知行動発達機構）

- (1) トモシン-PKAによる神経伝達物質放出の制御
 匂坂敏朗¹, 持田澄子², 高井義美¹
 (大阪大学大学院・医学研究科・生化学分子生物学講座¹, 東京医科大学・生理学第一講座²)
- (2) 網膜リボンシナプスにおけるエクソサイトシスの時空間分布
 緑川光春, 立花政夫（東京大学大学院人文社会系研究科・心理学教室）
- (3) Calyx of Held シナプスにおける伝達効率飽和のメカニズム
 山下貴之, 上田壮志, 谷真紀, 高橋智幸（東京大学大学院医学系研究科・神経生理学研究室）
- (4) クラミドモナス光感受性チャネルを用いた神経細胞光刺激法の開発
 八尾寛, 石塚徹, 荒木力太（東北大学（院）生命科学研究所・脳機能解析分野）
- (5) 視覚野における興奮性および抑制性神経結合特異性の解析
 吉村由美子（名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学分野）
- (6) iv マウス海馬神経回路における左右差の消失
 川上良介^{1,2}, 伊藤功²（生理学研究所脳形態解析研究部門¹・九州大学理学研究院生物科学部門²）
- (7) 褐色脂肪細胞でのミトコンドリアと滑面小胞体間の両方向性 Ca²⁺ カップリングと Ca²⁺ 流入の
 多面性制御機構
 日暮陽子, 久場雅子, 須崎尚, 久場健司（名古屋学芸大学・管理栄養学部解剖生理）
- (8) 定量的単一細胞 RT マルチプレックス PCR 法による急性スライス標本のラット海馬神経細胞の解析
 都筑馨介, 塚田昌大, 小澤澗司（群馬大学大学院医学系研究科・神経生理分野）
- (9) 液体打撃実験モデルラット脳海馬 CA1 ニューロンにおける過興奮
 蓮尾博¹, 大場（古賀）さとみ^{1,2}, 村岡範裕², 赤須崇¹
 (久留米大学医学部生理学・統合自律機能部門¹, 脳神経外科学²)
- (10) 小脳長期抑圧におけるグルタミン酸受容体デルタ2サブユニットのはたらき
 矢和多智, 平野丈夫（京都大学大学院・理学研究科・生物物理学教室）
- (11) NMDA 受容体複合体のリン酸化による機能調節
 中澤敬信, 山本雅（東京大学医科学研究所・癌細胞シグナル研究分野）
- (12) シナプス後部蛋白質の絶対数の定量
 岡部繁男, 杉山佳子（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科）
- (13) 内因性カンナビノイドによる線条体抑制性シナプスの伝達調節
 鳴島円¹, 内ヶ島基政², 松井稔³, 真鍋俊也³, 渡辺雅彦², 狩野方伸^{1,4}
 (¹金沢大学大学院・医学研究科・シナプス発達・機能学,
²北海道大学大学院・医科学研究科・解剖発生学分野,
³東京大学・医科学研究所・基礎医科学・神経ネットワーク分野,
⁴大阪大学大学院・医科学研究科・細胞神経科学)
- (14) 代謝調節型受容体を介した淡蒼球ニューロン活動の制御機構

金田勝幸^{1,2}, 喜多均¹¹Department of Anatomy and Neurobiology, University of Tennessee, Memphis,²生理学研究所・認知行動発達機構研究部門

(15) 前脳基底核シナプス伝達の生後発達変化

初山俊彦 (生理学研究所・脳形態解析部門)

【参加者名】

都筑馨介, 齋藤康彦, 高鶴裕介 (群馬大・医), 平野丈夫, 田川義晃, 川口真也, 矢和多智, 大槻元, 関優子, 鶴野瞬, 北川雄一, 水野秀信, 宮脇寛行, 畔柳智明 (京大・理), 八尾寛 (東北院・生命科学), 持田澄子 (東京医科大), 岡部繁男, 栗生俊彦, 佐藤映美, 西田秀子, 申義庚, 川端いづみ, 中澤敬信 (東京医科歯科大), 小松由紀夫, 黒谷亨, 吉村由美子, 高田直樹, 稲垣壮, 任鳴, 稲葉三枝, 舟橋梨江 (名大・環境), 立花政夫, 緑川光春 (東大・院人社), 高橋智幸, 齋藤直人, 堀哲也, 鈴木大介, 中村行宏, 山下貴之, 渡邊博康, 金子雅博,

山下慈郎, 上田壮志, 大島知子, 松山恭子, コウ・アイディ (東大・医), 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, 日暮陽子 (名古屋学芸大), 神谷温之 (北大・医), 真鍋俊也, 関野祐子, 海津正賢 (東大・医科研), 伊藤功, 川上良介, (九州大・理), 蓮尾博 (久留米大・医), 早戸亮太郎 (九州工・生命体), 狩野方伸 (大阪大・医), 鳴島円 (金沢大・医), 重本隆一, 川口泰雄, 初山俊彦, 岸本卓哉, 前島隆司, 橘吉寿, 北村明彦, 西巻拓也, 畠山裕康, 和田浩之, 足澤悦子, 堀部尚子, 伊佐正, 金田勝幸 (生理研)

【概要】

平成17年12月8-9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、15の演題が発表された。プレシナプスにおける伝達物質放出機構, シナプス後部での情報伝達メカニズム, 大脳・海馬の局所神経回路構築, 大脳基底核のシナプス機能, 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, 網膜リボンシナプスでの開口放出の光学的測定, グルタミン酸伝達の飽和に関する発表があった。シナプス後部情報伝達については, NMDA受容体のチロシリン酸化と扁桃体でのシナプス可塑性の関連, 小脳デルタ2受容体に結合し長期抑圧を制御する分子の同定, 単一シナプス後部に存在する PSD 足場蛋白質の絶対数の定量に関する発表があった。また局所回路構築に関連して, クラミドモナス

光感受性チャネルを利用した新規の神経細胞活性化法, 内臓逆位マウスにおける海馬神経回路網の変化が報告された。また大脳基底核での内因性カンナビノイドの役割, 代謝型受容体による調節についての発表もあった。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, 様々な観点から活発な討論が交わされ, 今後の共同研究の良い契機となった。神経科学会や生理学会においては一般演題がほとんどポスターになり若手の講演の機会が減っているが, 本研究会においては若手研究者による発表が多く, かつその発表は良く準備されたものであった。また様々な側面からの質問に対しても的確な回答がなされ, この会に参加する若手研究者の高い能力と広い知識を頼もしく感じた。今後もこの研究会を継続し, 若手研究者育成の役割を果たす必要がある事を確認し, 来年度以降の計画を立案する事となった。

(1) トモシン-PKAによる神経伝達物質放出の制御

匂坂敏朗¹, 持田澄子², 高井義美¹

(¹ 阪大院・医・生化学・分子生物学講座, ² 東京医科大学・生理学第一講座)

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 (ターゲッティング)。シナプス小胞は, アク

テイブゾーンにおいて, 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、ターゲティングには 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、プライミングにおける PKA のリン酸化基質は、未だ同定されていない。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、シタキシン-1 との結合親和性が減弱した。この PKA によるトモシンのリン酸化により、培養ラット上頸交感神経におけるアセチルコリンの分泌が制御されていることが判明した。また、このトモシン- PKA 系は、ペプチドホルモンである下垂体アデニルシクラゼ活性化ポリペプチド(PACAP)によるアセチルコリンの分泌調節に関与していた。以上の結果から、トモシンは PKA により活性調節を受けることにより、SNARE 系を介して神経伝達物質放出を制御していると考えられた。

(2) 網膜リボンシナプスにおけるエクソサイトーシスの時空間分布

緑川光春, 立花政夫 (東大・院人社・心理)

キンギョ網膜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り、その周囲には多数のシナプス小胞が係留されている。シナプスリボン直下の細胞膜に Ca^{2+} チャンネルが局在し、エクソサイトーシスはこの部位に限局して生じると考えられている。双極細胞のエクソサイトーシスには、即時に放出されるプールサイズの小さな成分(RRP)と Ca^{2+} 緩衝剤の影響を受けて放出が遅れるプールサイズの大きな成分(RP)がある。本研究では、シナプスリボン・ Ca^{2+} 流入部位・開口放出部位の位置関係を特定し、2種類のエクソサイトーシスとの関連を調べた。

形態学的実験は、兵庫医科大学の塚本吉彦教授と共同研究を行い、キンギョ網膜の超薄連続切片を電子顕微鏡で観察して、Mb1型双極細胞の軸索終末部におけるシナプスリボンやシナプス小胞の分布を定量的に解析した。また、薬理的に RP を増加させる操作を行った場合に、シナプス小胞の分布がどのように変化するかを調べた。生理学的実験には、キンギョ網膜から単離した Mb1型双極細胞を用い、膜電位固定下で、蛍光ラベルしたシナプスリボンの位置、脱分極によって生じる Ca^{2+} スポットの位置、蛍光ラベルしたシナプス小胞の開口放出部位

を近接場光顕微鏡で観察した。

その結果、形態学的研究から、RRPを構成するシナプス小胞はシナプスリボン近傍の形質膜にドックされているが、RPを構成するシナプス小胞はシナプスリボンから離れた部位にドックされていることが示唆され、また、シナプスリボンが存在しないにもかかわらずシナプス小胞の集積した部位があり、その直下には PSD やシナプス後細胞の突起が存在することがわかった。近接場光顕微鏡を用いた電気生理的研究から、シナプスリボンの位置は Ca^{2+} 流入部位(Ca^{2+} スポットの中心)と一致していること、RRPを構成するシナプス小胞は Ca^{2+} 流入直後に大部分がシナプスリボン近傍で放出されるが、RPを構成するシナプス小胞は、EGTA(5 mM)存在下では Ca^{2+} 流入後数百 ms 遅れて、シナプスリボンから離れた部位で放出されることが明らかになった。

以上の結果から、キンギョ網膜の Mb1型双極細胞においてはドックしたシナプス小胞と Ca^{2+} チャンネルの集積部位(シナプスリボンの存在する形質膜近傍)との距離が2種類のエクソサイトーシスを生じさせる重要な要因であると考えられる。

(3) Calyx of Held シナプスにおける伝達効率飽和のメカニズム

山下貴之, 上田壮志, 谷真紀, 高橋智幸
(東京大学大学院医学系研究科神経生理学研究室)

中枢神経系のシナプスにおいて, 伝達物質放出量が増えても後シナプスの応答が増大しない場合がある。これは後シナプス受容体が伝達物質によって飽和していることが原因と考えられているが, メカニズムの詳細は明らかでない。そこで我々は, 受容体飽和のメカニズムを幼若(生後7-8日) calyx of Held シナプスを用いて検討した。この日齢のシナプスでは, 小胞の放出確率を上昇させても神経刺激によって誘発される AMPA 受容体を介する興奮性後シナプス応答(evoked EPSC)の振幅が増大しないことが知られている。

シナプス前末端と後細胞から同時ホールセル記録を行い, 前末端に高濃度のグルタミン酸を注入したところ, 自発性シナプス電流応答(quantal EPSC)の振幅が増大し, 後シナプス AMPA 受容体が単一小胞由来のグルタミン酸によって飽和しないことが示された。一方グルタミン酸注入によって evoked EPSC の振幅は増大しなかった。細胞外 Ca^{2+}/Mg^{2+} 濃度比を下げた後放出確率を減少させた後に同様の実験を行うと evoked EPSC の増大が観察された。これらの結果は複数の小胞に由来する伝達

物質の重複によって受容体が飽和に達することを示唆する。

しかし, この見かけ上の飽和には AMPA 受容体の脱感作が関与している可能性が考えられる。そこで cyclothiazide によって AMPA 受容体脱感作をブロックした後, 前末端に高濃度グルタミン酸を注入したところ, 正常細胞外液においても evoked EPSC の増大が観察され, 見かけ上の飽和は AMPA 受容体の脱感作によることが明らかになった。そこで outside-out patch への急速投与方法を用いて AMPA 受容体の脱感作に必要な最低グルタミン酸濃度を検討したところ, $1\mu M$ 以上のグルタミン酸の持続投与によって AMPA 受容体の脱感作が観察された。この濃度のグルタミン酸が定常的に存在するか否かをテストするために, $0\text{ mM } Mg^{2+}$ 液下で D-APV を投与すると後シナプス細胞から記録されるノイズレベルの低下が認められた。このノイズの振幅は, シナプス前末端のグルタミン酸を washout しても変化しないことから, シナプス外に由来すると結論された。常在グルタミン酸の濃度について現在検討中である。

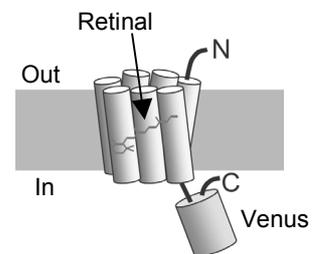
(4) クラミドモナス光感受性チャネルを用いた神経細胞光刺激法の開発

八尾寛, 石塚徹, 荒木力太
(東北大学(院)生命科学研究所・脳機能解析分野)

神経細胞ネットワークの機能は, 人為的な刺激入力と, それらの出力情報を解析することで研究されてきた。遺伝子工学的にニューロンに光感受性を導入することにより, 分子レベルで同定されたニューロンを高い解像度で刺激できることが期待される。緑藻類の一種のクラミドモナスの眼点に分布する古ロドプシンファミリータンパク質の一つチャンネルロドプシン 2(ChR2)は, 走光性行動における光受容を担っているが, 青色光に反応する陽イオン選択的なイオンチャネル, すなわち, 光受容体チャネルであると考えられている(図)。そこで, この分子を用いて神経細胞を光刺激するアイデアを持つに至った。

また, この分子を PC12 細胞に発現させた実験系を用いて, 光感受性のキネティクスを解析し, 光刺激の要件を求めた。

ChR2 のアポタンパク質の C 末 1~315 アミノ酸に蛍光タグ Venus を結合させた cDNA コンストラクトを作成し, PC12 細胞に導入した。パッチクランプホールセル膜電位固定下に, 青色発光ダイオード(LED)による光パルス刺激に対する電流応答を解析した。また,



この分子の遺伝情報を組み込んだシンドビスウィルスベクターを作成し、マウス脳定位固定化に *vivo* の海馬に接種した。海馬スライスを作成し、ChR 発現ニューロンにパッチクランプ法を適用し、電流固定下に青色 LED 光パルス刺激に対するニューロンの膜電位応答を解析した。

ChR2 を発現している PC12 において、膜電位 -60 mV 固定のとき、LED 光刺激によりピーク（不活性化成分）とプラトー（非不活性化成分）からなる内向き電流（光電流）が引き起こされた。光の強さに対し、不活性化成分は比例して増大したが、非不活性化成分は飽和する傾向を示した。活性化および不活性化の速度定数は光の強

さの 1 次関数に従った。活性化は、不活性化に比べ約 10 倍速く、LED の最大光の時定数が約 2ms だった。光電流は、LED 光をオフにすることで ms オーダーの時定数で回復した。不活性化、非不活性化それぞれの成分の反転電位はほぼ 0mV であり、Na 濃度に依存した。ChR2 を発現させた海馬ニューロンに対し膜電流固定下に LED 光刺激により強さ依存的に脱分極し、活動電位が引き起こされた。光応答の大きなダイナミックレンジ、オン・オフの速さ、繰り返して刺激できること、非特異的陽イオン透過性などの性質から、ChR2 光刺激が興奮性シナプス入力 of 代替手段になることが示唆された。

(5) 視覚野における興奮性および抑制性神経結合特異性の解析

吉村由美子（名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学分野）

大脳皮質一次視覚野では、視覚刺激の要素的特徴の抽出や、その要素情報の統合が行われ、ものを合目的的にみるための初期段階の情報処理がなされている。このような処理を可能にする神経回路の構造的・機能特性を調べるために、ラット視覚野の前額断切片標本を用い、ケージドグルタミン酸とレーザー光を用いた局所刺激法と 2 細胞からの同時ホールセル記録法を組み合わせる実験を行った。視覚野 2/3 層内、50 μ m 以内の近距離にあった 2 個の錐体細胞からペア記録を行った結果、単シナプス性興奮性結合は約 20% のペア間で観察され、残りの 80% ではみられなかった。では 20% の錐体細胞間にある興奮性結合はどのようなルールで形成されているのだろうか？ この問題を検討する目的で、切片標本上の約 500 μ m（水平方向）x 1350 μ m（垂直方向）の範囲内の数百ヵ所をグルタミン酸の脱ケージ化により個別に局所刺激し、それにより誘発される EPSC を 2 個の細胞から同時に記録した。この EPSC に相互相関解析を適用し、両ニューロンへの共通入力の割合を調べた。単シナプス性結合が見られた錐体細胞ペアでは、両細胞が 2/3 層内の別の細胞や 4 層から高い割合で興奮性共通入力を受けていたが、直接結合していないペアでは共通入力は稀であった。5 層からの興奮性共通入力、および 2/3 層・4 層からの抑制性共通入力の割合は、錐体細胞間の結合の有無に依存せず、前者が約一割、後者が約二割であった。

抑制性細胞には多数のサブタイプが存在するが、ケージドグルタミン酸による刺激法では、刺激している細胞

の種類を同定できない。そこで、抑制性細胞と錐体細胞からペア記録を行い、サブタイプを同定した細胞間で同様の解析を行った。2/3 層の錐体細胞と fast-spiking 細胞（FS 細胞）から同時記録を行い、両細胞間の神経結合を解析した結果、47% のペアでは FS 細胞が錐体細胞に抑制性入力を与えていたが、そのうち約 3 分の 2 は一方向性結合だった。錐体細胞が FS 細胞に興奮性入力を与えている確率はサンプル全体の 19% だったが、そのほとんどすべてが双方向性に結合しており、非常に高い結合特異性がみられた。この双方向性結合ペアでは、別の 2/3 層錐体細胞および 4 層からの興奮性入力を高い割合（約 20%）で共有していた。5 層からの興奮性入力は、細胞ペア間の結合の有無や種類に関係なく、約一割が共有されていた。一方、2/3 層錐体細胞と発火パターンに adaptation がみられる抑制性細胞（AD 細胞）から同時記録を行った結果、12% のペアでは抑制性結合のみが、9% のペアでは興奮性結合のみが同定され、全体の 4% のペアで双方向性結合が観察された。それぞれのペアにおける共通の興奮性入力は稀で、入力層ごとの解析結果も差がなかった。

以上の結果より、1) 2/3 層内および 4 層から 2/3 層への興奮性結合は、近傍の錐体細胞や FS 細胞からなる特定のニューロン群を選択的に結合することによって従来報告されている機能コラムよりもはるかにファインスケールのサブネットワークを形成し、おそらく特異性の高い情報処理計算を実行していること、また、2) 5 層から

の興奮性入力や AD 細胞由来の抑制性入力は複数のサブネットワークにまたがっており、非特異的あるいは統合的なコントロールをしていることが示唆された。視覚野内の層構造や機能コラムの中にさらに独立な計算単位

となるサブネットワークが埋め込まれており、皮質の局所神経回路がこれまで考えられてきたよりもはるかに精密な機能的ネットワークの組み合わせと、それを統合する回路によって構成されている可能性が考えられる。

(6) iv マウス海馬神経回路における左右差の消失

川上良介¹, 伊藤功² (¹生理学研究所脳形態解析研究部門, ²九州大学理学研究院生物科学部門)

脳の非対称性は、その高次機能や局在においてこれまで明らかにされてきているが、どのようにして脳の非対称性が形成されるのかについては明らかではない。これまで我々は、マウス海馬神経回路において NMDA 受容体 $\epsilon 2$ サブユニットが海馬の左右および錐体細胞の上下に非対称に分布していることを、 $\epsilon 2$ サブユニット選択的阻害剤である Ro25-6981 の感受性、シナプスにおける $\epsilon 2$ サブユニットのタンパク量、および NMDA 受容体によって誘導される LTP の生後発達を解析することにより明らかにした。

この発見はげっ歯類においても脳の神経回路は非対称であることを分子レベルから示した発見であった。しかしながら、このような脳の非対称性がいつどのように形成されるのかについては明らかでなかった。

そこで我々は、体軸の左右の非対称性に着目した。脊椎動物の体軸の非対称性形成に関しては、内臓の左右非対称性を指標とした研究があり、その発生初期段階で内臓の非対称性を形成する分子メカニズムについては明らかにされている。内臓の非対称性を決定する遺伝子に *lrd*(left-right dynin)があり、この遺伝子に異常をもつ iv マウスは内臓正位と逆位が等比率で生まれてくる系統である。今回この iv マウスの海馬神経回路はどのようにになっているのかを明らかにすることを目的とし、電気生理学

的手法を用いて Ro25-6981 の感受性および LTP の生後発達を指標として解析を行った。その結果、これまでの研究で示した海馬の NMDA EPSC に対する Ro の効果と同様に、control のマウス(iv(+/-))ではどのシナプスにおいても有為差はみられなかったが、海馬交連切断による同側入力シナプスの解析では非対称性が観られた。しかしながら、iv マウスの海馬は内臓の位置に関わりなく、頂上樹上突起と基底樹上突起の間で有為差がみられ、海馬交連切断マウスにおいても同様であった。これらの結果は、iv マウスにおいては脳の非対称性の形成が乱れており、またその乱れは内臓の位置とは無関係であることが示唆された。次に、iv マウスの海馬 LTP の生後発達を錐体細胞の上下で比較解析した。その結果、アダルトマウスの海馬では頂上樹上突起と基底樹上突起での LTP は十分な大きさで誘導され、またその大きさに差は観られなかった。しかしながら、低週齢の LTP はアダルトマウスと比べ、基底樹上突起では高く、頂上樹上突起では低く抑えられていることが明らかになった。

これまでの結果は、iv マウス海馬神経回路は、内臓位置とは関係なく海馬の左右非対称性が失われていることを示している。このことから、神経回路の非対称性形成機構は少なくとも内臓の非対称形成機構とは異なることが示唆される。

(7) 褐色脂肪細胞でのミトコンドリアと滑面小胞体間の両方向性 Ca^{2+} カップリングと Ca^{2+} 流入の多面性制御機構

日暮陽子, 久場雅子, 須崎尚, 久場健司
(名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理)

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_3 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、ミトコンドリアの膜電位の

減少を減少し、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。昨年度の研究会で、1) β_3 受容体の活性化によるミトコンドリアからの Ca^{2+} 遊離により滑面小胞体からの Ca^{2+} 遊離が起こり、これにより容量性 Ca^{2+} 流入が活性化されること、2)滑面小胞体からの Ca^{2+} 遊離によりミトコンドリアからの Ca^{2+} 遊離が起こること、3)更なる滑面小胞体からの Ca^{2+} 遊離刺激は容量性 Ca^{2+} 流入を抑制することを示した。今回は、このミトコンドリアと滑面小胞体間の両方向性 Ca^{2+} カップリングの特性とミトコンドリアによる新しい Ca^{2+} 流入の制御機構について報告する。

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。ミトコンドリアの脱共役剤である FCCP の投与により、3相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こり、第1相はミトコンドリアの膜電位減少を伴い、第2相と第3相は外液の Ca^{2+} 除去により消失し、外液のpHの上昇により顕著に促進されるが、 Na^+ 除去では影響されない。従って、第2相と第3相は細胞外からの Ca^{2+} 流入により発生し、この Ca^{2+} 流入による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞膜の Ca^{2+} ポンプの活動により処

理されることが解った。第3相は昨年報告したとおり容量性 Ca^{2+} 流入によるが、第2相はミトコンドリア膜電位変化と第3相の発生に密接に関係する。すなわち、第2相の立ち上がりはミトコンドリア膜電位の再分極相に一致し、第3相が発生するとその発生は抑制される。ミトコンドリアから滑面小胞体へのカップリングと滑面小胞体からミトコンドリアへのカップリングは、細胞によりかなり異なることが解った。FCCPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の第3相中の発生が、一群の細胞では発生しない。さらに、サブシガーゲンによる容量性 Ca^{2+} 流入の活性化中でのFCCPによる $[Ca^{2+}]_i$ の変化は、細胞により大きく異なり、サブシガーゲン投与前より $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が大きくなるもの、逆に小さくなるもの、あるいは、消失するものが見られた。

以上の結果は、ミトコンドリアと滑面小胞体が機能的に両方向性に連関し、2種の細胞膜での Ca^{2+} 流入機構を2面性に制御し、この制御機構が細胞の異なる条件下で、多様に変化し、ノルアドレナリンの α_1 作用と β_3 作用を介して、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ことが示唆される。

(8) 定量的単一細胞 RT-マルチプレックス PCR 法による急性スライス標本のラット海馬神経細胞の解析

都筑馨介, 塚田昌大, 小澤瀨司 (群馬大学大学院医学系研究科・神経生理分野)

中枢神経系では、機能分子が異なった目的に使われている。AMPA型グルタミン酸受容体のサブユニット GluR2 を例にとれば、そのノックアウトマウスは正常に誕生するが、空間学習の障害、パブロフ型刺激報酬学習障害といった記憶学習の障害が見られるばかりでなく、雄マウスの性行動の減少といった行動の異常が見られる。GluR2を構成要素に持つAMPA受容体に阻害作用を示すバルビタールの作用は、GluR2のノックアウトマウスでは弱いことが予想されたが、実際は逆で、麻酔にかかり易い。その理由は、抑制性ニューロンに対する抑制がおこりにくいことであると説明されている。このように、素子として働くひとつひとつの機能分子が様々なニューロンのネットワーク上の演算に影響を与えた結果として、個体レベルでの機能変化は生じる。したがって、ひとつひとつの機能分子の役割は、どの細胞において発現し、また、

その分子がどれだけの重みを持って働いているかという文脈の中で論じられなければならない。以前私たちは、ラット大脳皮質体性感覚野の急性スライス標本より、ホールセルパッチクランプ法によってその細胞の発火特性を調べたのち、細胞質 mRNA をパッチ電極内に回収し、逆転写反応後、マルチプレックス PCR を行って、mRNA の発現プロファイルを調べ報告した。錐体細胞は相互に類似性が高いのに対し、紡錘形をした介在ニューロンは多様性が高く、これを3つのグループに分類した。しかし、同一細胞種に属するニューロンの分子的多様性については明らかになっていない。本研究では細胞種の分類が詳細になされているラット海馬を用い、急性スライス標本において4種類の細胞(CA1錐体細胞, CA3錐体細胞, 歯状回顆粒細胞, 介在ニューロン)における32種類の遺伝子の発現プロファイルを調べた。

【方法】生後 15-20 日齢のラット海馬より急性スライス標本を作製し、電気生理学記録を行ったのち細胞質をパッチ電極内に回収し、直ちに 400 分子の AMPA 受容体サブユニット GluR2 に対する内部標準物質 RNA を加え、ランダムプライマーを用いて逆転写を行った。小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGluT1, VGluT2), グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65, GAD67), カルシウム結合タンパク質, 神経ペプチドなど, 32 種類の遺伝子を増幅するプライマーを混合したプライマーカクテルにより, 25 サイクルの PCR を行って第一段の増幅を行った後, 単一遺伝子を増幅する第二段の PCR を行い, 個々の遺伝子の発現を調べた。

【結果】パッチクランプ法によって細胞質を回収した 73 個の細胞において, 平均して 8.7 種類の遺伝子が検出された。検出された遺伝子の数は 4 種類の細胞間で有意差がなかった。細胞種に特徴的に検出される mRNA も存在

したが, 多くの mRNA は細胞種が違うことによって検出される確率が異なるという確率的分布パターンを示した。遺伝子の検出確率から χ^2 乗検定によって 4 種類の細胞の発現プロファイルの違いを調べたところ, CA1 ならびに CA3 錐体細胞と介在ニューロンの差異が最も大きく, 次いで歯状回顆粒細胞と介在ニューロン, CA1 錐体細胞ならびに CA3 介在ニューロンと顆粒細胞の順であった。CA1 錐体細胞と CA3 錐体細胞の差異は小さく, 調べたすべての遺伝子において同一細胞種内での検出確率のばらつきのレンジ内にあった。発現した遺伝子相互の相関は, GAD65 と GAD67 に高い相関が見られた。VGluT1 と GAD65 および GAD67 の間に高い逆相関が見られたが, VGluT1 と VGluT2 の間には相関性は見られなかった。一方, NMDA 受容体サブユニット NR2D と AMPA 受容体サブユニット GluR4 は GAD65 および GAD67 と高い相関を示した。

(9) 液体打撃実験モデルラット脳海馬 CA1ニューロンにおける過興奮

蓮尾博¹, 大場(古賀)さとみ^{1,2}, 村岡範裕², 赤須崇¹
(久留米大学医学部生理学・統合自律機能部門¹, 脳神経外科学²)

頭部外傷後の記憶, 認知障害, てんかんなどの機序の一つに海馬の損傷が想定されているが, それが引き起こされる機序についてはまだ不明の点が多い。今回我々は, 中等度の実験的頭部外傷後の海馬 CA1 領域の神経活動について膜電位感受性色素(RH482)を用いた光学的測定法(Fuji HR Deltaron 1700 system)と電気生理学的記録法を応用して検討した。頭部外傷は, 液体打撃装置(Dragonfly HPD-1700)を用いて, ペントバルビタール麻酔下に, 中等度圧(4.2 気圧)の打撃を左側頭頂骨に空けた直径約 3mm の開窓部を介して 1 回与えた。外傷後 1 週間の Wistar 系 rat(250-300 g)から海馬水平断スライス標本(厚さ 400 μ m)を作製し, CA1 領域で Schaffer 側枝の電気刺激(10, 20, 30, 40, 50 V の 5 段階の刺激強度)による光学的応答を記録した。光学的応答にはテトロドトキシンに感受性のある時間経過の早い応答(fast peak)と興奮性アミノ酸受容体アンタゴニストに感受性のある時間経過の遅い応答(slow peak)が認められた。これらの応答をコントロール群(Sham 群)と外傷群で比較した結果, 外傷群では Sham 群に比較して傷害側(左側)および反対側(右側)

を問わず光学的応答の増強を認めた。その増強の程度は 30V 刺激の場合 fast peak で約 60%, slow peak で約 100% の増強であった。次に外傷後過興奮を指標として, 外傷後比較的早期(早期投与群: 30 分と 90 分の 2 回)とそれより遅れて(遅延投与群: 240 分と 300 分の 2 回)ジアゼパム(10 mg/kg)を腹腔内投与したそれぞれの群における光学的応答を比較検討した。この時, ジアゼパム投与により引き起こされる体温下降による影響を少なくするためにヒートパッドをラット体下部に敷いて体温をコントロールした。この結果, ジアゼパム早期投与群では sham 群と同等の応答を, また遅延投与群では外傷群と同等の応答を示した。

以上の結果より, 外傷後 1 週間における海馬 CA1 領域の神経活動が促進されていること(外傷後過興奮)が確認された。また, この外傷後過興奮が早期に腹腔内投与されたジアゼパムにより抑制され, 外傷後遅延投与では抑制されないことからジアゼパムの過興奮抑制効果を得るには, 早期投与が必要なことが示唆された。外傷後の障害発生機序としては早期にグルタミン酸や GABA の

放出が数倍に増加することが報告されており、我々が作製した外傷モデルにおいても外傷7日後にみられるグルタミン酸作動性シナプスの過興奮がグルタミン酸過剰に

関与していること、また頭部外傷後早期のジアゼパム投与はグルタミン酸過剰による障害を軽減していることが示唆された。

(10) 小脳長期抑圧におけるグルタミン酸受容体デルタ2サブユニットのはたらき

矢和多智, 平野丈夫

(京都大学大学院 理学研究科 生物物理学教室)

イオントロピックグルタミン酸受容体デルタ2サブユニット(GluR δ 2)は、小脳プルキンエ細胞で特異的に発現しており、小脳長期抑圧発現に必須であることが知られている。しかしながら、GluR δ 2がどのようにして長期抑圧誘導に関わるのかは分かっていない。私たちは、GluR δ 2欠損マウスから調整した培養プルキンエ細胞に様々な変異を持ったGluR δ 2を発現させることにより、GluR δ 2の長期抑圧誘導に関わる部位を決定し、さらにGluR δ 2がどのように長期抑圧に関わっているかを明らかにすることをめざしている。GluR δ 2はC末端細胞内に151のアミノ酸を持つが、膜貫通部位から数えて約20アミノ酸を残したサブユニットを発現させた細胞では野生型サブユニットを発現させた細胞と同様に長期抑圧を

誘導できた。しかし細胞内C末端13アミノ酸のみを残したサブユニットでは長期抑圧を回復できなかった。また、C末細胞内領域の14から20番目のアミノ酸であるSKEDDKEを野生型に発現させることで長期抑圧を抑制することができた。この部位に結合する分子をyeast two hybrid法により探索したところ、PICK1 (Protein interacting with C Kinase 1)がSKEDDKE依存的にGluR δ 2に結合することが判明した。PICK1は小脳長期抑圧や海馬における可塑性において重要な役割を担っていることが知られている分子である。これらのことから、GluR δ 2はPICK1と結合することで長期抑圧に関与していると考えられる。

(11) NMDA 受容体複合体のリン酸化による機能調節

中澤敬信, 山本雅 (東京大学医科学研究所・癌細胞シグナル研究分野)

NMDA型グルタミン酸受容体(NMDA受容体)は興奮性シナプス伝達を担い、中枢神経系における神経細胞の発達・分化や記憶・学習といった脳高次機能、及び神経細胞死に必須な役割を果たしている。NMDA受容体複合体はPSD-95, Shank, Homerなどの足場タンパク質、CadherinやCateninなどの接着分子、Actin, α -actinin2, Spectrinなどの細胞骨格系分子、CaMKII, ERK, Fynなどのキナーゼ分子、及び様々な情報伝達系分子から構成されている。NMDA受容体機能の発現にはそれら分子の適切な時空間的調節が重要であると考えられる。

NMDA受容体自身もFynチロシンキナーゼが触媒するリン酸化によって迅速な制御を受けているという知見が蓄積されつつある。我々はNR2B上の主要なリン酸化残基

としてTyr-1252, Tyr-1336, Tyr-1472を同定し、それらがFynによってリン酸化されることを示してきた¹⁾。また、Tyr-1472をフェニルアラニンに置換したノックインマウス(YF/YFマウス)を作製し解析を行ったところ、YF/YFマウスは扁桃体依存的な脳高次機能に異常があり、NR2Bのシナプス上での局在にも異常が見られることが明らかになった。Tyr-1472には α -actinin2やエンドサイトーシス時のアダプターとして機能するAP-2がリン酸化依存的に会合することを見出しており、Tyr-1472のリン酸化はNMDA受容体とそれらの分子との会合を調節することによって扁桃体機能に必須な役割を果たしていることが示唆された²⁾。またTyr-1336にはPI-3 Kinaseのp85サブユニットがリン酸化依存的に会合することを見出した。虚血

誘導時に NR2B-p85 の会合が増強されることから、Tyr-1336 のリン酸化は虚血誘導時の NMDA 受容体を介したシグナル伝達調節に関与していることが示唆された。

我々は、さらに Fyn の基質の一つとして新規 RhoGAP 分子 p250GAP を同定した³⁾。p250GAP は NR2B と会合し、スパインに局在している。また p250GAP は NMDA 受容体の刺激に応じて脱リン酸化される。p250GAP を過剰発現することによって、スパインの形態異常が引き起こされることから p250GAP は NMDA 受容体の活性に応

じたスパインの形態形成に関与している可能性を考えている。

以上のデータから、Fyn は後シナプスにおいて様々な分子をリン酸化することによって脳高次機能を調節していることが明らかになった。

Reference

- 1) T. Nakazawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 693-699 (2001)
- 2) T. Nakazawa, A.M. Watabe, S. Komai *et al.*, *submitted*
- 3) T. Nakazawa *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 14: 2921-2934 (2003)

(12) シナプス後部蛋白質の絶対数の定量

岡部繁男, 杉山佳子 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科)

我々の研究室では海馬におけるグルタミン酸作動性シナプスの動的な性質を捉える為に、培養海馬神経細胞を利用してシナプス後部蛋白質の蛍光イメージングを行っている。グルタミン酸作動性シナプスのシナプス後部の形質膜直下にはシナプス後肥厚部(PSD)と呼ばれる構造が存在する。PSD は多種類の膜蛋白質・足場蛋白質・シグナル分子・細胞骨格蛋白質の複合体であるが、その分子組成および分子構築の原理については不明の点が多い。

今回 4 種類の代表的な PSD の足場蛋白質(PSD-95, GKAP, Shank, Homer)について、その単一シナプスあたりの分子数を推定した。まず全反射顕微鏡で測定した GFP1 分子の蛍光強度を基礎として、直径 40 nm および 100 nm の蛍光ビーズの蛍光強度が GFP 何分子に相当するのかを算定した。次に GFP 融合 PSD 蛋白質を発現させた培養海馬神経細胞において、既にキャリブレーションした蛍光ビーズとの蛍光量の比較を行う事で、単一シナプスに存在する、蛍光を発している GFP 分子の数を求めた。次に培養神経細胞における各 GFP 融合蛋白質の chromophore 形成効率を、大腸菌より精製した chromophore 形成効率が既知の GFP 標本と比較する事により推定し、単一シナプス

における GFP 融合 PSD 蛋白質の総数を求めた。最後に GFP 融合 PSD 蛋白質を発現する培養海馬神経細胞と、過剰発現を行っていない細胞との間での各足場蛋白質発現量の比率を求め、内在性の PSD 蛋白質の数を推定した。成熟した培養海馬神経細胞において、興奮性細胞のシナプス後部には、平均して 270 個の PSD-95 family 蛋白質, 170 個の GKAP family 蛋白質, 310 個の Shank family 蛋白質, 340 個の Homer family 蛋白質が存在する事が明らかとなった。また培養の経過と共に単一シナプスに存在する PSD 蛋白質の量は増加し、培養二週間目以降はその絶対数が安定化する事もわかった。

以上の結果は、4 種類の PSD 足場蛋白質全体の単一シナプスあたりの平均質量が約 100 MDa に相当することを意味している。T. Reese の研究室から最近発表されたデータによると、脳より精製された PSD の平均質量は 1000 MDa にあたる(PNAS 102(2005)11551-11556)。従って 4 種類の足場蛋白質の占める質量は PSD 全体の 10% に相当する事となり、PSD を維持する構造としてこれら 4 種類の蛋白質の形成する複合体が主要なコンポーネントである事が確認された。

(13) 内因性カンナビノイドによる線条体シナプスの伝達調節

鳴島円¹, 内ヶ島基政², 松井稔³, 真鍋俊也³, 渡辺雅彦², 狩野方伸^{1,4}(¹金沢大院・医・シナプス発達・機能学, ²北海道大院・医・解剖発生, ³東京大・医科研・基礎医科学・神経ネットワーク分野, ⁴大阪大院・医・細胞神経科学)

内因性カンナビノイドは脳のさまざまな部位で逆行性の抑制性シグナル伝達物質として働いている。内因性カンナビノイドはシナプス後細胞の脱分極に伴う Ca^{2+} 流入および $\text{G}_{\text{q/11}}$ タンパク共役型代謝型受容体の活性化により合成・放出されることが知られている。本研究では、大脳基底核神経回路の入力核であり、カンナビノイド受容体 (CB1 受容体) が多く発現している線条体に注目し、内因性カンナビノイドによるシナプス伝達修飾機構について解析した。

線条体出力細胞である中型有棘ニューロン (MS ニューロン) から whole cell 記録を行い、興奮性および抑制性シナプス応答 (EPSC, IPSC) を観測すると、IPSC でのみ、シナプス後細胞の脱分極によるシナプス伝達の一過性の減少が観測された。この IPSC の抑制は、CB1 受容体の阻害薬 (SR141716) により消失したことから、内因性カンナビノイドによるシナプス伝達調節であると考えられる。次に、MS ニューロンへのシナプス入力にコリン作動性介在ニューロン由来のアセチルコリンにより修飾さ

れることが知られているため、ムスカリン受容体と内因性カンナビノイドの関係について解析した。ムスカリン受容体の賦活薬 (oxotremorine-M) を投与すると、EPSC・IPSC ともに振幅が減少したが、IPSC に対する効果のみ、SR141716 により阻害された。また、低濃度の oxotremorine-M 存在下では、弱い脱分極によっても内因性カンナビノイドによるシナプス伝達抑制が誘起されることも示された。これらの oxotremorine-M の効果は、細胞内の G タンパク阻害薬 (GDP β S) の投与、 M_1 受容体の特異的阻害薬である pirenzepine の投与、および M_1 受容体ノックアウトマウスで消失したことから、MS ニューロン上の M_1 受容体が関与していると考えられる。以上の結果より、MS ニューロンへの抑制性入力に対して、MS ニューロンの脱分極、MS ニューロン上の M_1 ムスカリン受容体の活性化および弱い脱分極と弱い受容体活性化の組み合わせにより、内因性カンナビノイド系を介した逆行性シナプス伝達抑制が起こることが明らかとなった。

(14) 代謝調節型受容体を介した淡蒼球ニューロン活動の制御機構

金田勝幸^{1,2}, 喜多均¹(¹Department of Anatomy and Neurobiology, University of Tennessee, Memphis²生理学研究所 認知行動発達機構研究部門)

大脳基底核の主要な核の一つである淡蒼球は、GABA 作動性抑制性入力とグルタミン酸作動性興奮性入力を受けている。淡蒼球ニューロンの高頻度の自発発火は、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体および GABA_A 受容体を介して制御されていることが知られている。一方で、代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluRs) や GABA_B 受容体の淡蒼球での機能的な役割については、その豊富な発現にもかかわらず、不明の点が多い。そこで本研究では、これらの代謝調節型受容体がシナプス性に活性化されるかどうか、また、その活性化が淡蒼球ニューロン活動

に影響をあたえるのかをラット脳スライス標本を用いてホールセル記録法により検討した。淡蒼球あるいは内包の連続刺激 (50 Hz, 20 発) は、速い EPSPs/IPSPs, 遅い IPSP (slow IPSP, sIPSP), およびそれに続く遅い持続的な脱分極 (slow depolarization, sDEPO) からなる応答を誘発した。sIPSP は淡蒼球の、また、sDEPO は内包の刺激でそれぞれより頻繁に誘発された。NBQX, CPP, および gabazine (それぞれ AMPA/Kainate, NMDA, および GABA_A 受容体アンタゴニスト) のバス適用で速い EPSPs/IPSPs はブロックされた。 GABA_B 受容体アンタゴニストの

CGP55845 は sIPSP を抑制し, sDEPO を増大させた。sDEPO は mGluR1 選択的アンタゴニストにより部分的に抑制された。sIPSP と sDEPO はいずれも刺激のパルス数と頻度依存性を示した。セルアタッチ法により淡蒼球ニューロンの自発発火活動に対する連続刺激の効果を調べたところ, 淡蒼球の刺激では CGP55845 感受性の発火のポーズが観察され, 内包の刺激では mGluR1 アンタゴニストに部分的に感受性を示す発火頻度の上昇が観察された。一方, CGP55845 のバス適用は NBQX 感受性の EPSCs

のアンプリチュードには影響を与えなかったが, gabazine 感受性の IPSCs のアンプリチュードを有意に増大させた。この結果は, シナプス終末に存在する GABA_B 受容体の刺激が GABA の放出を抑制していることを示唆している。以上の結果は, 淡蒼球に発現する mGluR1 と GABA_B 受容体がシナプス性に放出されたグルタミン酸と GABA によりそれぞれ活性化されうることを示しており, 代謝調節型受容体が淡蒼球ニューロンの活動制御に関与していることを示唆している。

(15) 前脳基底核シナプス伝達の生後発達変化

初山俊彦 (生理学研究所・脳形態解析部門)

中枢神経系のシナプス伝達には複数種のカルシウムチャンネルが関与していることが知られている。げっ歯類の中枢スライス標本を用いた最近の電気生理学的研究によれば, いくつかのシナプスでは生後 2-3 週間で N 型カルシウムチャンネルの関与が消失して P/Q 型およびその他のカルシウムチャンネルにより伝達制御されるようになること, 別のいくつかのシナプスでは生後 50 日位まで N 型チャンネルの関与が変化なく持続することが報告されている。

大脳基底核あるいは前脳基底核では, 成熟動物脳のスライス標本からの記録が困難であったためにシナプス伝達の生後発達に関する情報が得られなかったが, 私は最近いくつかの技術的改良を試み, 生後数ヶ月までのラッ

ト脳のスライス標本からのホールセル記録法を確立して, 生後発達変化を解析した。これらの核の 3 つのシナプスで解析を行なった結果, いずれも, 上記の 2 つの生後発達パターンの中間の特性を示した。すなわち, 生後 40-60 日までに N 型チャンネルの関与が徐々に減少するが, 完全には消失しない, また, N 型チャンネル関与の減弱とともに, P/Q 型チャンネルの関与が増大する, というパターンであった。中枢シナプス伝達を制御するカルシウムチャンネルの生後発達変化は多様であることを示唆するデータと考えられる。このようなシナプス形成以後の変化は, 大脳基底核, 前脳基底核の生理的機能, 生理活性物質によるシナプス伝達修飾機構, さらに病態との関連からも興味深い。

17. 超高压電子顕微鏡の医学生物学分野への応用

2006年2月4日-2月5日

代表・世話人：有井達夫（生理学研究所）

- (1) 生理学研究所の医学生物学用超高压電子顕微鏡の特徴
有井達夫（生理学研究所）
- (2) 厚切り切片での立体構築について
片桐展子（東京女子医大・総合研）
- (3) Three dimensional reconstruction of Drosophila retinal cell ultrastructure employing HVEM
Sung Sik HAN, Ji Young MUN (Korea University, School of Biosciences & Biotechnology)
- (4) ラット腎糸球体メサンギウム細胞表面に存在する機能分子；Thy-1
追手 巍（新潟大学・医歯学総合研究科腎研究施設）
- (5) 超高压電顕をとおして見た細胞小器官の立体構造
野田 亨（藍野大学・医療保健学部）
- (6) 超高压電子顕微鏡によるシナプスの立体観察
五十嵐 広明（東邦大学・医学部）
- (7) 嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析
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）
- (8) Approaches to synaptic plasticity with HVEM
Im Joo RHYU (Korea University, College of Medicine)
- (9) 哺乳類神経前駆細胞の細胞分裂機構：形態学および分子生物学的アプローチ
小曾戸陽一（理化学研究所 CDB）
- (10) 赤核細胞樹状突起のシナプス形成とフィロポディア
村上富士夫（大阪大学・生命機能研究科）
- (11) 超高压電子顕微鏡による神経細胞およびグリア細胞の三次元解析
濱 清（生理学研究所）
- (12) 超高压電顕によるカサゴ鰓筋の横行小管-筋小胞体複合構造立体構築に関するステレオ観察
鈴木季直（神奈川大学・理学部）
- (13) 3-D reconstruction of plastid crystalline bodies during development
InSun KIM (Keimyung University, College of Natural Sciences)
- (14) Thymic nurse cells forming a dynamic microenvironment for thymocytes differentiation
江崎太一（東京女子医科大学・医学部）
- (15) ウイルス感染細胞の全裁標本による超高压電子顕微鏡観察
吉田まり子（岡山大学・医歯薬学総合研究科）
- (16) 神経系培養細胞における神経栄養因子受容体の分布
遠藤泰久（京都市芸繊維大学）
- (17) ステロイドホルモンによる神経細胞機能形態調節機構の解明
—超高压電子顕微鏡による解析アプローチ—
小澤一史（日本医科大学）
- (18) 網膜ニューロン間の電気シナプス
日高 聡（藤田保健衛生大学・医学部）

(19) 海馬歯状回 mossy cell の背腹方向での構造的, 化学的, 電気生理学的差異

小坂俊夫 (九州大学・医学部)

(20) 小脳生後発達過程におけるバグマングリア細胞の解析

古家園子, 山口 登, 有井達夫 (生理学研究所)

【参加者名】

Ji, Sang Yong, Kim, InSun (Keimyung University), Han, Sung Sik, Kim, Ji Hui, Kim, Kang Min, Lee, Kyung Eun, Mun, Ji Young, Rhyu, In Joo (Korea University), 野田亨 (藍野大学), 村上富士夫 (大阪大学), 吉田まり子 (岡山大学), 鈴木季直 (神奈川大学), 小坂俊夫 (九州大学), 遠藤泰久, 西田倫希, 吉村亮一 (京都工芸繊維大学) 江崎太一, 片桐展子 (東京女子医大), 五十嵐広明 (東邦

大学), 樋田一徳 (徳島大学), 中村栄男 (名古屋大学), 追手舘 (新潟大学), 小澤一史 (日本医大), 日高聰 (藤田保健衛生大), 小曾戸陽一 (理化学研究所), 喜多山篤, 新田浩二 (統合バイオ), 有井達夫, 大庭明生, 窪田芳之, 児玉貴史, 重本隆一, 濱 清, 古家園子, 水野 昇, 山口 登 (生理学研究所)

【概要】

生理学研究所の超高压電子顕微鏡は, 昭和 55 年 3 月の生理研研究会「医学生物学における超高压電子顕微鏡にかける夢」での全国からの研究者 (理工学分野の研究者を含む) による報告と討論, その後の機種選定委員会での議論を経て導入された日本で最初の全国共同利用の医学生物学用専用機種である。昭和 57 年 3 月に搬入され, 同年 9 月より全国に課題を公募して 11 月より使用が開始された。以来 23 年余が経過している。この間, 多くの関係者からの暖かいご支援もあり, 設置当初の機能をさらに充実させ, 現在も 10^6Pa 台のドライでクリーンな真空のもとに安定に稼働してきている。

23 年余のうちに, 380 件を超える全国 (外国を含む) からの課題が採択され, 積極的な応用研究が行なわれて, これまでに 160 編を超える英文和文の論文を生み出してきた。これらの成果は, 解剖学会, 生理学会を始めとする各種学会などおよび生理研研究会において個別にあるいは部分的に纏まった医学生物学領域への超高压電子顕

微鏡の応用研究として数多く報告されてきている。しかし超高压電子顕微鏡の医学生物学への応用分野だけに限った広範な生理研研究会はこれまで開かれていなかった。そこで今回, 超高压電子顕微鏡を利用してこれまで成果を挙げてきた研究者に参加を呼びかけ各自の医学生物学分野での成果を報告し今後の展望を諮るための研究会を行った。医学生物学分野での超高压電顕分野での主要な特徴である厚い試料の観察可能性を生かした脊椎動物脳内の神経細胞およびグリア細胞の超微細形態の三次元的な形態の解明を行った研究成果を中心に 20 課題の報告があり超高压電子顕微鏡の医学生物学領域への有効性を再確認した。平成 16 年 4 月の生理学研究所などの国立大学共同利用機関の法人化に伴い今後とも一層成果を期待される折から, これまでの超高压電子顕微鏡共同利用実験の利用に当たっての組織体制と運営を見直す良い機会ともなった。

(1) 生理学研究所の医学生物学用超高压電子顕微鏡の特徴

有井達夫 (生理学研究所)

生理学研究所の超高压電子顕微鏡 (H-1250M 型) は, 1981 年に開発された東京工業大学の超高压電子顕微鏡 (H-1250S 型) のドライでクリーンな真空系と高分解能光学系を基に, 医学生物学用に役立つために各種の工夫

をしている。医学生物学用としての超高压電子顕微鏡の重要な特徴は, 厚い試料の立体観察 ($\pm 6^\circ$ の傾斜像による) が可能なことである。このために, 超高压電子顕微鏡にローテーションフリーズーム機能を導入し, 全ての

倍率で傾斜軸をフィルムの長辺に平行となるように設定した。またサイドエントリー試料傾斜機構にはユーセントリック機能の傾斜 ($\pm 45^\circ$ まで) を可能としていた。試料の傾斜角度の校正を行って測定誤差をあきらかにした。また初めて機械的シャッターを中間レンズの下部に導入し試料に対して一様露光を可能としその照射量を確実に制御できるようにした。これらは立体写真の撮影に極めて重要でありその後の立体観察および解析が容易となった。

シャッター方式はその後、第二コンデンサーレンズ直

下にも導入された。この結果、生理学研究所独自のミニマムドーズシステムを開発することができ照射に弱い試料にも有効に応用できることが明らかとなっている。

1994年には試料位置で電子線をより平行に照射できるように対物レンズを新しく設計し導入した。1995年には、 -60° から $+60^\circ$ まで 1° から 2° 間隔で連続傾斜した像からトモグラフィ再構築を行えるようにサイドエントリー傾斜傾斜台を改良して全国の医学生物学分野の研究者により一層の便宜を図っている。

(2) 厚切り切片での立体構築

片桐展子 (東京女子医科大学 総合研究所 研究部)

イソアワモチ (海産の腹足類) の外套皮下組織にある眼外光受容 (皮膚光覚細胞, DP 細胞) の形態と軸索の走行を調べるために、加温オスミウム染色しエポキシ樹脂包埋した $0.2\sim 0.4\mu\text{m}$ 厚さの連続切片を超高圧電顕 ($\times 1,500\sim \times 30,000$) で観察した。三次元立体構築には、①DP 細胞と軸索をトレースした図を描き、最終的に 1 枚に重ね合わせる。立体構築ソフトとして②OZ95-VM32, ③DeltaViewer を用いた。

厚切り切片は加温オスミウム染色によって組織に高コントラストが得られ、通常の透過電顕と同様に観察できた。軸索は部位によって直径 $1\mu\text{m}$ 以下にもなるがその走

行を組織内で追跡できた。DP 細胞の軸索起始部は他の光受容細胞にはみられない特異な部位の微絨毛の密在する端部と細胞質の境界部から出る。また、幼動物にみられた未成熟の DP 細胞においても、成熟した DP 細胞と同様の起始部と走行を辿ることが明らかになった。軸索は OZ95-VM32 による三次元構築では表面の透過度を変えて、DP 細胞の軸索が小神経束に入る状態や細胞内の微絨毛や核を透視できた。また、DeltaViewer では立体構築像を任意の方向に回転できるので、DP 細胞と軸索の全体像を理解し易かった。

(3) Three dimensional reconstruction of Drosophila retinal cell ultrastructure employing HVEM.

Ji Young Mun, Sung Sik Han (School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University)

The study about structure of *Drosophila melanogaster*'s retinal cell using electron microscopy was carried in detail. But, these results can have limitation in function research because of two-dimensional structure and chemical fixation. High voltage electron microscopy (HVEM) has been a natural outgrowth of the desire to obtain 3-dimensional information due to problems related to interpretations of 3-dimensional images from 2-dimensional electron microscopes is numerous. Also, the fine-structure preservation of cells can be achieved by using fast-freezing

followed by freeze-substitution (FS) techniques. The fast freezing is so much better due to the speed of fixation, which freezing virtually means stopping all molecular movement. It is estimated that samples prepared by high pressure freezing are fixed in 20-50 msec, as compared to the seconds and/or minutes by chemical fixations. In this study, the adult retina of *Drosophila Melanogaster* was investigated employing HVEM, fixation by high pressure freezing followed FS, thick serial sections, and 3-dimensional reconstruction. From this investigation, the distribution of

microtubules, mitochondria, and nuclei was reconstructed as three-dimensional structure using IMOD program. The current data provide us more precise cellular information and better

understanding on the animal vision mechanism in new dimension.

(4) ラット腎糸球体メサンギウム細胞表面に存在する機能分子 : Thy-1

追手 巍 (新潟大学大学院医歯学総合研究科腎研究施設機能制御学分野)

有井 達夫 (自然科学研究機構生理学研究所形態情報解析室)

【はじめに】私どもはラット腎糸球体細胞に対する各種単クローン抗体を作製し、その中にメサンギウム細胞に存在する Thy-1.1 と特異的に反応する抗体(1-22-3)を見つけた。本研究では同じ Thy-1.1 分子に対する他の単クローン抗体(OX-7)と比較し、両分子の細胞局在を超微形態学的に検索、対応抗原エピトープの分子内局在、及びその分子の機能について検索した。

【方法と結果】1. 免疫組織学的検索 ; 培養ラットメサンギウム細胞を用い、2重染色すると 1-22-3 は細胞表面のみ、OX-7 は細胞表面及び細胞外基質の一部にも結合した。血管内皮細胞と混合培養したメサンギウム細胞に対する両抗体の結合を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。1-22-3 は両細胞の接触する部位に優位に局在した。2. 超微形態学的検索 ; メサンギウム細胞と内皮細胞を混合培養し、両抗体を1次抗体として培養液に加え反応させた。2次抗体として 6 nm colloidal gold, 30倍希釈 (Jackson Immunoresearch Lab.Inc)を同様に生細胞状態で反応させ、0.02% sodium azide 含有 PBS で洗浄後、2%グルタルアル

ルデヒドで固定し、通常のエポソ包埋による電顕試料を作成した。約 1 μ m の厚い切片を超高圧電子顕微鏡 (生理研 日立 H-1250M, 1000 kV) で観察した。1-22-3 は内皮細胞と接触する部位のメサンギウム細胞表面に結合し、OX-7 はメサンギウム細胞全周の細胞表面と細胞外成分とも結合することが明確となった。3. 1-22-3 対応抗原の Thy1-1 分子内局在 ; GST 融合蛋白法とペプチドマッピング法により、1-22-3 認識エピトープは Thy-1.1 分子 N 末端 15-23 アミノ酸配列上に存在した。4. 1-22-3, OX-7 の結合によるメサンギウム細胞の Ca⁺⁺シグナル ; メサンギウム細胞培養液中に両単クローン抗体を添加し、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化を測定した。1-22-3 刺激により細胞内 Ca⁺⁺濃度は急激に増加し、暫時低下するものの長く持続していた。

【結語】ラット腎糸球体メサンギウム細胞上に存在する Thy-1.1 分子は接着分子、細胞内シグナル伝達に関わる機能分子として存在することが明らかとなった。

(5) 超高圧電顕をとおして見た細胞小器官の立体構造

野田 亨 (藍野大学医療保健学部理学療法学科)

電子顕微鏡を含めて、顕微鏡で見る細胞はともすると平面的なものと捉えがちになるが、細胞は本来、立体であり、その中の核を始めとする細胞小器官もそれぞれの細胞内部で特有の立体的ひろがりを持っている。細胞小器官の立体的な構造を捉えようとする方法には走査型電子顕微鏡や通常の透過型電子顕微鏡を用いた連続超薄切片からの立体再構成などがあるが、細胞の厚切り切片を用いた超高圧電子顕微鏡による観察法はより直接的で、

情報量が多く、細胞小器官の立体像を捉えるための最も優れた観察法の一つとすることができる。しかしながら、この方法から形態的な情報を最大限に引き出すためには超高圧電子顕微鏡下で細胞小器官を特異的に、しかも明瞭に染め出しておくことが必要であり、そのための処理が最終的な超高圧電顕像の良し悪しを決定しているといえる。このステップは細胞化学、あるいは組織化学と呼ばれる方法であり、それらには銀やオスミウムなどを用

いた古典的染色法、酵素組織化学、免疫組織化学などの方法がある。講演ではこれまで演者が種々の細胞化学的染色を行って観察してきた細胞小器官の超高压電顕像を

紹介し、超薄切片からは直接得ることのできない細胞小器官本来の立体像の特徴を述べる。

(6) 超高压電子顕微鏡によるシナプスの立体観察

五十嵐広明（東邦大学医学部解剖学講座微細形態学分野）

シナプスを特異的に染色する方法として知られる ethanolic phosphotungstic acid (E-PTA) 染色法を超高压電子顕微鏡による厚切り切片の観察にも応用できるものと考え、E-PTA 染色を施したラット大脳前頭皮質の 0.5~2 μm の切片を作製して観察した。最小の 0.5 μm 厚の設定は、E-PTA 染色によるヒト等の大脳皮質のシナプスの直径が 0.24~0.42 μm と計測されていたことによる。すべての厚さでシナプスが観察できたが、比較的コントラストの強い 0.5 μm 切片を主として観察した。後シナプス側、鉛直方向から見たシナプスの全体像では、円形あるいは楕円形の細網状の少し電子密度の高い postsynaptic

density(PSD)が観察され、前シナプス側に電子密度の高い presynaptic dense projection(PDP)が六角形あるいは三角形の分布様式をとって presynaptic grid を構成しているのが観察された。なお、PDP は一定の分布様式をとらないものも多く存在した。比較的大きな PSD の中央付近には perforation(PR)が存在し、大きな PSD では PR が 3~4 個存在するものもあった。以上の観察結果は従来の報告とほぼ同じものであったが、切片に傾斜をかけて初めてシナプスの立体像を記載することが出来た上、切片に 90° の傾斜をかけることにより、同一のシナプスの正面像と側面像を初めて得ることができた。

(7) 嗅球ニューロン・グリアの三次元構造解析

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）

単純な層構造を示す嗅球は、近年の分子レベルの解析によって多様な嗅覚情報を精巧に処理することが判り、複雑な脳神経回路網の基本的構造の解明の為に重要な鍵が見出せるものと期待されている。我々はこれまでシナプス結合による脳構築モデルとして、電子顕微鏡連続切片によるラット嗅球神経回路の三次元構造解析を進めてきた。嗅球ニューロンのシナプスは径 0.2 μm 以下の突起に形成することも多く、このためシナプスを形成する突起の細部及び全体像の三次元的構造を正確に知るには共焦点レーザー顕微鏡の解像度では難しく、現状では超高压電子顕微鏡による立体構造解析以外に確実な方法はない。そこで嗅球ニューロンのうち糸球体内のシナプス結合を同定

した Calbindin, Tyrosine Hydroxylase, 及び Calretinin 免疫陽性ニューロンを超高压電子顕微鏡により解析を行ない、いずれも径 0.2 μm 以下の突起を識別・追跡でき、光学顕微鏡では不明であった糸球体内細部での突起の正確な分布と相互の近接構造が明らかとなった。これらの知見により、同定を行ったシナプス結合の神経回路内の存在意義がより明確となった。

本研究会ではこれまでの所見を紹介し、嗅球を中心とした脳神経回路解析における統合的な顕微鏡的解析の有用性を論じた。また超高压電子顕微鏡の今後の魅力的な解析の可能性について専門家との有意義な討論を行なった。

(8) Approaches to synaptic plasticity with high voltage electron microscopy (HVEM)

Kea Joo Lee, Im Joo Rhyu (Department of Anatomy College of Medicine, Korea University)

Synapses are specialized interneuronal junctions where signals are propagated from one to another. Most excitatory synapses consist of presynaptic axon terminals and postsynaptic dendritic spines in a mammalian central nervous system. Shapes and number of dendritic spines are dramatically changed under various physiological or pathological conditions such as development, environmental enrichment, learning, hormonal states, ataxia, and mental retardation. To analyze dendritic spines quantitatively or qualitatively, light microscopy (LM), laser confocal microscopy, transmission electron microscopy (TEM), and HVEM have been generally used. Because dendritic spines are numerous and small in size, standard LM may not adequately identify spine morphology. The profiles of dendritic spines appear to be fragmental in thin sections for TEM; thus, without an adequate 3-D reconstruction method, TEM is not suitable for quantifying structural dimensions and composition of spines. HVEM has been effectively applied to

quantitative studies of spines by using 3–5 μm thick sections and taking advantage of its high resolution and penetrating power.

We have analyzed the detailed morphology of the dendritic spines in hippocampal neurons and Purkinje cell in some physiologic and pathologic conditions with HVEM. The density, length and spine have been analyzed in the acrobat trained rat, P/Q type calcium channel mutant, and *fmr-1* knock out mice, which is an animal model of human fragile X syndrome. The density and length of Purkinje cell dendritic spine were increased in the acrobat trained rat cerebellum. But the density and length of the dendritic spine of Purkinje cell were decreased in the P/Q type calcium channel mutant. The increased spine density and length of *fmr-1* knock mice were observed in dentate granule cell of the hippocampus.

The HVEM provide a useful tool in synaptic plasticity studies and in extracting 3 dimensional information of the nervous system.

(9) 哺乳類神経前駆細胞の細胞分裂機構：形態学および分子生物学的アプローチ

小曾戸陽一（理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・非対称細胞分裂研究グループ）

脊椎動物の中樞神経系神経細胞の前駆細胞である神経上皮細胞が、細胞増殖的対称分裂および神経細胞生成的対称分裂を行う際に、apical 表層の細胞体と basal lamina とのコンタクトは大変細長い形状（直径 $1\mu\text{m}$ 以下、長さ $100\mu\text{m}$ 以上）となるものの、プロセス様の構造物(basal process)として保持されている。光学顕微鏡ではその微細構造の空間的情報の観察が困難であるため、細胞分裂の際に basal process がどのように娘細胞に引き継がれるかについては不明な点が多い。我々は超高压電子顕微鏡および免疫染色法による形態学的解析から、basal process が細胞分裂時にはその apical-basal 軸に沿って分

裂しうることを示した。細胞分裂期の basal process 内には細胞分裂溝の構成蛋白質である anillin が塊状の局在を示し、さらに anillin の局在と basal process の分裂点が一貫している場合があることが見いだされた。また、細胞分裂の進行に連れて塊状 anillin の局在は basal 側から apical 側に移動し、最終的に細胞体の分裂溝に引き継がれることがタイムラプス解析等により示された。我々の研究から少なくとも神経発生の初期段階において、神経上皮細胞の basal process は細胞体分裂に先立って分裂し、その結果娘細胞に引き継がれる場合があることが示された。

(10) 赤核脊髄路細胞樹状突起におけるフィロポディア状突起とシナプス形成

村上富士夫 (大阪大学大学院生命機能研究科)

The formation of synaptic contacts is a crucial event which is achieved by complex interactions between incoming axons and the neurons in the target. We have focused on spine-like dendritic protrusions (SLDPs), which are transient pleomorphic protrusive structures seen in developing brains. Accumulating in vitro evidence suggested that the SLDP plays an important role in synaptogenetic interactions with axons. To test this idea, we examined whether the SLDPs are the preferential sites of synapse formation. The ultrastructure of biocytin-labeled corticorubral (CR) terminals was examined in serial thin sections during the period of synaptogenesis in newborn cats. We found that a major proportion (86%) of the CR synapses was formed on SLDPs. The presynaptic terminals were often invaginated by fine processes extending from the tips of SLDPs. Presumptive CR synapses were also found on SLDPs of HRP-labeled rubrospinal cells,

suggesting that SLDPs postsynaptic to labeled CR terminals originate at least in part from rubrospinal cells. Thus, SLDPs may represent preferred sites of synapse formation and play a role in synaptogenetic interactions during brain development.

We also examined CR synapses in adult cats. Electron microscopic observation of serial thin sections of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin-labeled axons revealed that approximately 60% of CR terminals formed synapses on dendritic spines. CR axons terminated on dendritic spines originating from the intermediate or distal dendrites of rubrospinal cells (>200 μm apart from the soma), in contrast to kittens in which CR fibers terminate on SLDPs originating from the proximal dendrites (< 100 μm apart from the soma). Thus, CR synapses appear to undergo remarkable remodeling after initial termination on SLDP.

(11) 超高压電子顕微鏡による神経細胞及びグリア細胞突起の三次元定量解析

浜 清 (生理学研究所名誉教授)

超高压電子顕微鏡の高い電子線透過能を利用すると厚い生物試料の立体観察が可能である。生理学研究所の 1000 kV HVEM は生物試料の 3 次元立体計測のための特性 (ローテーションフリー, ズーム, 長焦点対物レンズ等の光学系の他, 0.1° の精度で $\pm 60^\circ$ ユウセントリック傾斜が可能なサイドエントリー試料ホルダー) を備えた世界で初めての生物専用機である。演者等は $\pm \theta^\circ$ 傾斜立体像を用いて 3 次元定量解析を行なう方法を開発し, 厚さ $3\mu\text{m}$ の横紋筋切片を用い横細管の 3 次元定量に成功した (Hama et al. 1985, Arii & Hama 1987)。

神経細胞やグリア細胞の複雑な突起の 3 次元定量解析には厚い切片を用いた HVEM 解析が特に有効である。

ラット歯状回顆粒細胞の Golgi 染色標本から $5\mu\text{m}$ の連続切片を作成し, 上記の HVEM ステレオ解析法によって樹状突起棘の形状, 長さ, 数量と密度, 表面積について 3 次元定量解析を行い興味ある所見を得た (Hama et al. 1994)。

星状グリア細胞の突起は脳内に極めて繊細, 複雑な網目を作っていて, その広範な三次元定量解析は光学顕微鏡, 連続超薄切片による再構築法, 及びステレオ解析などでは不可能である。我々は -60° から $+60^\circ$ まで 2° 間隔の連続傾斜像から星状グリア細胞突起のトモグラフィ再構築を行って, その体積と表面積を計測し, 星状グリア細胞の突起が極めて大きな表面積/体積比を持つ事を発見した (Hama et al. 2004)。此の事は神経細胞とグリア細胞間の緊密な機能的相関を考える上で重要な指標となる。

Hama, K., Arii, T., and Nakamura, S., *In situ Experiments with High Voltage Electron Microscopes*. H. Fujita ed, pp 455-460, 1985.

Arii, T. & Hama, K. *J. Electron Microsc.* 36: 177-199, 1987
Hama, K., Arii, T., and Kosaka, T., *Microsc. Res. Tech.* 29: 357-367, 1994.

Hama, K., Arii, T., Katayama, K., Martone, M., and Ellisman, H. J. *Neurocytol.* 33: 277-285, 2004.

(12) 超高压電顕によるカサゴ鰓筋の横行小管-筋小胞体複合構造立体構築に関するステレオ観察

鈴木 季直 (神奈川県立理学部生物科学科)

骨格筋(横紋筋)では、筋筋質膜から筋小胞体への興奮伝達のため、横行小管(T-管)とそれを両側から挟み込む2つの筋小胞体終末槽がtriadを形成している。筆者と共同研究者は、横紋筋であるカサゴ鰓筋の収縮-弛緩にともなう細胞内Ca²⁺動態を研究するためにまず筋線維の微細構造観察を行なったが、この筋では、同一筋線維内に規則的に分布するZ型とAI型の2種のtriadが含まれ、それらの分布境界領域には、triadの他に、2本のT-管と3つの筋小胞体終末槽からなるpentadと、3本のT-管と4つの筋小胞体終末槽からなるheptad(著者ら命名)が含まれていることを見出した(*J. Electron Microsc.* 52:337-347, 2003)。Triadより複雑なpentadやheptadの構築様式を明らかにするために、樹脂包埋試料から厚さ0.5 μmの切片を作製し、

生理学研究所の超高压電子顕微鏡(Hitachi H-1250M HVTEM)で観察し、ステレオ撮影した。その結果、筋節のZ帯部位にあるT-管が分枝し、両側に伸び、A帯とI帯の境界部位でZ帯と平行に走行し、それらを筋小胞体終末槽が取り囲むことでheptadが構築されることが明らかにされた。PentadはこのheptadのT-管3本のうち、A帯とI帯の境界部位にあるべき1本が欠けた変則的なheptadと考えられる。一般に、骨格筋は、筋種ごとに、2種のtriadのうちどちらか一方の型のみを含むが、本研究の結果は、AI型triadがZ型triadから分化する可能性と、AI型triadのみを含む骨格筋はZ型triadのみを含む骨格筋よりもさらに進化したレベルにあることを示唆した。

(13) 3-D reconstruction of plastid crystalline bodies during *Sedum rotundifolium* development

InSun Kim (Biology Department, Keimyung University)

Employing HVEM and tomography, the present study attempted to reconstruct the 3-D plastid crystalline inclusion bodies detected during *Sedum rotundifolium* development. The 3-D reconstruction has been based on data attained from the tilting, tomography, and diffractogram. The plastid inclusion body differentiated during CAM metabolism and revealed quite peculiar structural pattern. The inclusion bodies were intrathylakoidal and non-membrane bounded structures. Being irregular in shape and variable in size, their structural attributes considerably affected the

plastid morphology in early development. Fusion or branching was common between the inclusion bodies. The elements within the crystalline body exhibited either parallel or lattice arrangement depending on the section angle. The crystalline inclusions consisted of tubular elements exhibiting a hexagonal arrangement of the six substructures with a 17.9-18.6 nm periodicity between elements. Implications of such changes in the tubular inclusions in relation to CAM will be discussed.

(14) 胸腺ナース細胞は胸腺細胞分化のための動的微小環境を形成する
(Thymic nurse cells forming a dynamic microenvironment for thymocytes differentiation)

江崎太一 (東京女子医科大学医学部 解剖学・発生生物学講座)

胸腺ナース細胞(Thymic nurse cells: TNC)は、その胞体内に多数の細胞を抱き込み特異な細胞複合体を形成した胸腺上皮細胞の一つである。本研究では、リンパ球過形

成を伴った良性胸腺腫を自然発症する BUF/Mna 系ラットの胸腺を用いて、TNCのin situにおける形態学的特徴を免疫組織学的・超微形態学的に検索し、その細胞生物

学的意義を考察した。光顕および通常電顕の観察により、TNC 内はリンパ球のみならずマクロファージを含む極めて多様な細胞集団から成ること、増殖細胞が存在すること、また胸腺ホルモン FTS や細胞接着因子 ICAM-1 などの存在が確認された。さらに、厚さ 5 μ の連続切片を用いた超高压電顕での観察において、TNC 内では細胞同士がいくつかのコンパートメント毎に仕切られて包含され

ていること、さらには TNC 表層のコンパートメントから胸腺細胞が活発に出入りしていることが明らかとなった。以上より、TNC 内は包含された細胞に多様性と増殖性ならびに移動性があり、極めて動的な状態であることが示された。そのことは TNC が胸腺細胞の分化・成熟のために極めて重要な微小環境を提供している可能性が強く示唆された。

(15) ウイルス感染細胞の全載標本作製による超高压電子顕微鏡観察

吉田まり子 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・病原ウイルス学分野)

ウイルス感染細胞の細胞内部におけるウイルス粒子の存在様式を探るために、感染細胞の全載標本を作成して超高压電子顕微鏡(HVEM)観察することを試みた。全載標本の観察には、①細胞質周辺部は観察できるが、核を含む中心部は観察できない、②ウイルス感染細胞の形態変化によっては内部の観察が困難、③細胞表面上のウイルス粒子と内部のウイルス粒子の区別が困難などの問題点がある。そこで、解決策として、解析の目的をウイルス粒子とそれを取り囲む空胞構造の相互関係に絞り、表面上の粒子と細胞内部の粒子を区別するために、HVEMによるステレオ観察および HVEM と走査型電子顕微鏡(SEM)による同一部位観察を行った。単純ヘルペスウイルス 1 型感染細胞では、ゴルジ由来の細胞質内空胞に、

多数のウイルス粒子が集積した像を観察でき、細胞周辺部の粗面小胞体の内部にはウイルス粒子を認めなかった。サイトメガロウイルス感染細胞では、HVEM で核内封入体構造が明瞭に観察でき、dense body と呼ばれる異型粒子の構造が成熟粒子と同様に出芽によって空胞膜に包まれ、ヌクレオカプシドを含まないことが明瞭になった。ボックスウイルスでは、細胞外に放出された成熟粒子はゴルジ由来空胞膜または表面膜由来の外膜を被っていることが明白になった。このように、全載標本によるウイルス感染細胞の HVEM 観察は、立体的な空胞構造におけるウイルス粒子と膜との相互関係を探るのに非常に有用であった。

(16) 神経系培養細胞における神経栄養因子受容体の分布

遠藤泰久 (京都市芸繊維大学)

神経系培養細胞 PC12 を用い神経成長因子受容体(TrkA)が細胞膜陥入構造であるカベオラに関連するか否か、免疫電顕および超高压電顕による三次元立体再構築により検討した。電顕試料用メッシュ上に培養した細胞を TrkA、カベオリン-1 (カベオラ関連タンパク質)、クラスリン (飲込み小胞の被覆タンパク質) の抗体で免疫染色し臨界点乾燥を施し、超高压電顕により傾斜撮影を行ない 3 次元再構築ソフト (r-image 及び IMOD) で解析した。TrkA 免疫反応はカベオラとは形態の異なる細胞膜

直下の陥入構造が多数集まったクラスターやlysosomeに主に認められた。カベオリン-1 免疫反応はカベオラ構造を示さず、細胞質中に網目状に分布していた。クラスリン免疫反応は飲込み小胞や endosome に明瞭に認められた。恐らく TrkA は神経成長因子と結合した後、クラスリン依存的経路で細胞質中に取り込まれ、カベオリンは細胞質中の輸送系に何らかの関与をしていると考えられる。

(17) ステロイドホルモンによる神経細胞機能形態調節機構の解明 —超高压電子顕微鏡によるアプローチ—

小澤一史 (日本医科大学・大学院医学研究科・生体制御形態科学部門)

副腎皮質から分泌されるコルチコステロイドは脂溶性物質ホルモンであり、血液脳血管関門を容易に通過して、受容体を介することによっ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) が知られている。この2つの受容体は海馬領域において豊富に分布しており、血中コルチコステロンの変動に伴い両者の受容体の機能的調節がなされている。

血中コルチコステロンの変動によって、海馬の錐体細胞 (CA1, CA2 領域) や歯状回顆粒細胞において機能的な変動のみならず、樹状突起の棘の変化を中心とした、形態学的な変動もダイナミックに生じることが、超高压電子顕微鏡を用いた三次元観察によって明らかとなった。海馬は脳におけるストレス応答の中心として考えられて

おり、この反応性が視床下部-下垂体-副腎系といった実際のストレス応答軸に直接関わることが考えられている。従って、海馬領域におけるコルチコステロンへの反応性やその際の海馬神経細胞における形態変化の解析は、ストレス現象の解明に直接つながることと考えられる。血中のコルチコステロンの変動が、GRの発現調節や神経細胞の機能発現調節のみならず、神経細胞の構造、特にシナプス形成と密接な関係のある樹状突起棘の密度や形状とも密接に関係する可能性が見出されたことは、神経間の情報伝達システムを考える上で興味深い結果が得られたと考えている。特に、超高压電子顕微鏡によるステレオ観察が、このような解析に有用であることも興味深く、今後さらに超高压電子顕微鏡によるトモグラフィ観察を合わせたより詳細な観察の展開を考えている。

(18) 網膜ニューロン間の電気シナプス：ギャップ結合における開口チャネル割合の計測

日高 聡 (藤田保健衛生大学医学部)

ギャップ結合はニューロン間の電気シナプスを形成する。ニューロン間電気シナプスにおける細胞間チャネルの開口割合を計測した。視覚系の主要な興奮性ニューロン・ α 型網膜神経節細胞は同一型との間で電気シナプスを形成している。二連のホールセルパッチクランプ法で細胞間ギャップ結合のチャネルコンダクタンスは最大 2.45nS (平均 1.35nS, n=9) であった。2つの細胞間で樹状突起同士の接触回数は平均 7 回であった (n=12)。超高压電子顕微鏡を用いて 5 μ m の厚切り切片の標本で、樹状突起間の接触部位にギャップ結合を同定し、そのギャップ結合の大きさを測定した結果、平均 0.86 μ m の直径で

あった (n=14)。ギャップ結合蛋白サブユニット・コネクシン 36 が α 型網膜神経節細胞間のギャップ結合を構成している結果 (単一チャネルコンダクタンス, 15pS) と、ギャップ結合チャネル粒子・コネクソンの密度は 5,180 particles/ μ m² であることから、電気シナプスの細胞間チャネルの開口割合は 0.8% と計算された。電気シナプスが α 型網膜神経節細胞間で同期興奮を引き起こすために、この細胞間開口チャネルの機能が評価された。 α 型網膜神経節細胞間にあるギャップ結合の開口チャネルの割合は、電気シナプスの形成がよく知られている網膜アマクリン細胞間や水平細胞間のものに匹敵した。

(19) 海馬歯状回 mossy cell の背腹方向での構造的, 化学的, 電気生理学的差異

小坂俊夫 (九州大学大学院 医学研究院 基礎医学部門 神経形態学分野)

海馬歯状回 mossy cell は hilus に存在する大型多極性のグルタミン酸を神経伝達物質とする興奮性ニューロンであり, その樹状突起近位部 (及び種によっては細胞体そのもの) に顆粒細胞の mossy terminals からシナプスを受ける特徴的な大型の複雑な複合スパイン thorny excrescences を有している。マウスやハムスターではカルシウム結合蛋白 calretinin の含有, thorny excrescences の構造の面で背腹側の長軸方向で明確な差異がある。すなわち, 背側海馬の mossy cell は腹側海馬の mossy cell より複雑な thorny excrescences を有し, 一方 calretinin は背側海馬の mossy cell に陽性で背側海馬の mossy cell では陰性である。更に興味深いことに電気生理学的性質に

おいても大きな差異があることが明らかとなった。スライスパッチクランプ法で, マウス海馬歯状回 mossy cell の電気生理学的性質を検討したところ, 背側海馬の mossy cell は自発的な EPSP の頻度, 最大値が腹側海馬の mossy cell より大きかった。更に, シナプス結合を遮断すると膜電位が約 -50mV 程度に脱分極し, 背側海馬の mossy cell はスパイク発火がなくなったが, 腹側海馬の mossy cell はリズムのバースト発火を示した。この腹側海馬の mossy cell のリズム的発火に I_{NaP} が大きな役割を果たしていることが明らかになった。本研究は藤瀬昇 (熊本大), 劉陽 (九大), 村川亮 (九大), 神野尚三 (九大), 石塚智 (九工大) 氏との共同研究である。

(20) 小脳生後発達過程におけるバークマングリア細胞の解析

古家園子, 山口 登, 有井達夫 (生理学研究所)

エンドセリン(ET)は血管平滑筋を持続的に収縮させるだけでなく, 種々の細胞の増殖や分化に関与していることが明らかになっている。小脳において, バークマングリアに ETB 受容体の mRNA が豊富に存在することが *in situ hybridization* 法で報告されていた。そこで, ETB 受容体の一部欠損を持つ AR 系統 (sl 劣性遺伝子を持つ) の野生型と sl/sl ラットを用いて, 生後発生過程における ETA および ETB 受容体の発現を免疫電顕で観察した。その結果, 野生型においては, 生後 5 日から ETB 受容体が発現し, 生後 2 週齢までは細胞膜およびゴルジ装置に局在し, 3 週齢以降では, ゴルジ装置にのみ局在した。ETA 受容体は生後 7 日から 2 週齢まで細胞全体に存在し

た。一方, sl/sl ラットでは ETB 受容体は検出できず, 生後 5 日から 2 週齢まで ETA 受容体が発現していた。すなわち, sl/sl ラットでは ETB 受容体の代わりに ETA 受容体が生後 5 日に発現し, 代償的に機能していることが考えられる。次に, 野生型と sl/sl ラットの小脳のゴルジ染色標本を作製し, $3\text{-}4\mu\text{m}$ の厚切り切片を超高圧電顕で観察し, 3 次元構築を行った。現在, バークマングリアがブルキンエ細胞のスパインと平行線維間のシナプスを包んでいる部位と, 非シナプス部位に分け, 単位体積あたりのバークマングリアの膜表面積の値を, 野生型, sl/sl ラットの生後発生過程について解析している。

18. 位相差断層電子顕微鏡の医学的・生物学的応用

2006 年 1 月 26 日－1 月 27 日

代表・世話人：金子康子（埼玉大学・理学部）

所内対応者：永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター・ナノ形態生理）

(1) Single Particle Analysis of GroEl by Zernike Phase Contrast TEM

Radostin Danev, 永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(2) 位相差電子顕微鏡で観るシアノバクテリアの生活環

金子康子（埼玉大学理学部）

(3) 位相差電子顕微鏡による無染色生物試料の観察～高压凍結・凍結超薄切片法の試み～

新田浩二, 永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

花市敬正, 高瀬弘嗣（花市電子顕微鏡技術研究所）

(4) 蛍光タンパク質タグ法による *Mycoplasma pneumoniae* の細胞構造観察

見理 剛（国立感染症研究所細菌第二部）

(5) 位相差電子顕微鏡による氷包埋を行った原核・真核細胞の観察

臼田信光, 厚沢季美江, 中沢綾美（藤田保健衛生大学医学部解剖学 II）

Radostin Danev, 永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(6) 微小管の枝分かれ－進化における意義と構造解明へのアプローチ

村田 隆（基礎生物学研究所）

(7) 生きたシアノバクテリアにおけるフィコビリソームなどの超分子を見る

仲本 準（埼玉大学理学部）

(8) 投影型 X 線顕微鏡による生物観察

吉村英恭（明治大学理工学部）

(9) 蛋白質トモグラフィー

岩崎憲治（大阪大学蛋白質研究所）

(10) 試料に応じた電子線トモグラフィの適用－TEM・STEM・クライオトモグラフィー

青山一弘（日本エフイー・アイ株式会社）

(11) TEM における 3 次元情報の構築技法（トモグラフィー）

及川哲夫（日本電子株式会社）

(12) 氷包埋を行った培養細胞の位相差電子顕微鏡による観察

厚沢季美江, 臼田信光（藤田保健衛生大学医学部解剖学 II）

瀬藤光利, Radostin Danev, 永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(13) 位相差電子顕微鏡による脂質ナノチューブ形成過程の研究

由井宏治, 神谷昌子, 清水敏美（東京理科大学理学部化学科）

伊藤耕三（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

Radostin Danev, 永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

(14) TEM で観る線状高分子の結晶モルフォロジー

辻 正樹（京都大学化学研究所）

(15) 位相差 TEM の高分子材料への応用

登阪雅聡（京都大学化学研究所）

- (16) ブロックコポリマーの無染色 TEM 観察と電子線トモグラフィー
長谷川博一（京都大学大学院工学研究科）
- (17) エネルギーフィルターTEM による高分子の可視化
堀内 伸（産業技術総合研究所 ナノテクノロジー研究部門）
- (18) シリカ系ナノ細孔材料の TEM 観察
佐々木優吉（財団法人ファインセラミックスセンター）
- (19) 電子線ホログラフィーによるマイクロ～ナノ領域の電場・磁場の観察
平山 司（財団法人ファインセラミックスセンター）
- (20) 偏光と位相差による生体試料の可視化観察—光学顕微鏡でみる数十 nm の世界—
加藤 薫（産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門）
- (21) アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞観察への適用
大瀧達朗（株式会社ニコン）

【参加者名】

青山一弘（日本エフイー・アイ株式会社）、赤坂 哲（京都大学工学研究科）、明坂年隆（朝日大学歯学部）、秋元裕介（株式会社豊田中央研究所）、厚沢季美江（藤田保健衛生大学医学部）、新井善博（日本電子株式会社）、石塚和夫（HREM Research Inc.）、石本志高（独立行政法人理化学研究所）、岩崎憲治（大阪大学蛋白質研究所）、上田友彦（松下電工株式会社）、臼田信光（藤田保健衛生大学医学部）、及川哲夫（日本電子株式会社）、大石健太郎（浜松医科大学）、太田明雄（金沢大学大学院）、大瀧達朗（株式会社ニコン）、岡 渉（住友ベークライト株式会社）、海原敏裕（豊田通商株式会社）、加藤 薫（産業技術総合研究所）、金子康子（埼玉大学理学部）、木下圭介（トヨタ自動車株式会社）、見理 剛（国立感染症研究所）、近藤 裕（ヤマハ発動機株式会社）、佐々木優吉（財団法人ファインセラミックスセンター）、塩澤真人（株式会社豊田中央研究所）、塩野谷美和子（トヨタ自動車株式会社）、鈴木教友（株式会社豊田中央研究所）、田中雅嗣（東京都老人総合研究所）、辻 正樹（京都大学化学研究所）、登阪雅聡（京都大学化学研究所）、中浦

誠（株式会社三井化学分析センター）、仲本 準（埼玉大学理学部）、永山國昭（岡崎統合バイオ）、新田浩二（岡崎統合バイオ）、長谷川博一（京都大学工学研究科）、服部 亮（豊田通商株式会社）、平山 司（財団法人ファインセラミックスセンター）、堀内 伸（産業技術総合研究所）、本田敏和（日本電子株式会社）、松井 孝（磐田化学工業株式会社）、村田 隆（基礎生物学研究所）、元木創平（日本電子株式会社）、山田祐記子（京都大学大学院）、山羽宏行（日本メナード化粧品株式会社）、由井宏治（東京理科大学理学部）、吉村英恭（明治大学理工学部）、RAHMAN MD. MASUDUR（豊橋技術科学大学）、高瀬弘嗣（株式会社花市電子顕微鏡技術研究所）、丸山貴広（豊田通商株式会社）、喜多山 篤（統合バイオ）、花市敬正（株式会社花市電子顕微鏡技術研究所）、Radostin Danev（統合バイオ）、藤田 真（株式会社島津製作所）、木下千草（ヤマハ発動機株式会社）、高橋佳子（統合バイオ）、谷口美恵子（名古屋大学工学部）、磯田正二（京都大学化学研究所）、上野清昭（日本電子株式会社）、檜山武史（基生研）

【概要】

この研究会は、平成 12 年よりスタートした電子顕微鏡の研究会（“定量的高分解能電子顕微鏡法”，“電子位相顕微鏡の医学・生物学への応用”，“位相差断層電子顕微鏡の医学・生物学への応用”）の総決算とも呼ぶべきもので、過去の蓄積が多数の共同研究者の発表という形で反映されている。また顕微鏡学会関西支部と共催で講演会・研究会を持つ機会を得たため、関心を医学・生物

学の周辺にも向ける試みをした。顕微鏡学会に向けたタイトルは「ソフトマテリアルの無染色観察—見えないものを観る」であった。

岡崎で開発された位相差電子顕微鏡法は、特に伝統的な生物電顕において有効性を発揮し始めており、無染色電顕法という新しい分野を切り開きつつある。この新しい経験を生物電子顕微鏡関係者以外にも広く知ってもら

うため、研究会は、顕微鏡学会共催の形をとり、非生物分野をも包含するソフトマテリアル(有機物質, 高分子, ゲル, ゾル, ガラス) 一般を対象とすることとした。今まで電顕の対象となりにくかった材料の発表も含まれており、従来と一味違った研究会になった。具体的には 1 月 26 日の午後を共同研究で生まれた、位相差電顕の医学・生物学への応用成果の発表にあて、1 月 27 日の午前

を断層法(トモグラフィ)を含む生物応用の紹介にあて、午後前半を位相差電顕の一般材料への応用可能性の探究、そして午後後半を光学顕微鏡における位相差法の生物応用の紹介にあてた。見えないものを観る方法としての位相差顕微鏡法が、電顕、光顕一体となって進展していく将来の方向を予感させた。

(1) Single Particle Analysis of GroEl by Zernike Phase Contrast TEM

Radostin Danev, 永山國昭(岡崎統合バイオサイエンスセンター)

We discuss the application of Zernike Phase Contrast Transmission Electron Microscope (ZPC-TEM) to acquisition of image data for single particle analysis of biological samples.

The ZPC-TEM utilizes a Zernike phase plate [1-3] which consists of a thin film with a small hole in the center. It is positioned at the back-focal plane of the objective lens. This phase plate introduces half pi phase shift to the scattered electrons leaving the central beam of unscattered electrons intact. The resulting images exhibit much higher overall contrast due to the presence of low spatial frequencies which are strongly attenuated in images

acquired using a conventional TEM. The ZPC-TEM has overall “flat” frequency response compared to the “band-pass” filter characteristics of the conventional defocus phase contrast TEM.

Data and results of single particle analysis using ZPC-TEM images are presented. Theoretical and practical aspects in the application of ZPC-TEM are discussed.

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.

(2) 位相差電子顕微鏡で観るシアノバクテリアの生活環

金子康子(埼玉大学理学部)

ヒルベルト微分電子顕微鏡法により急速凍結したシアノバクテリアの微細構造をそのまま観察することが可能となった^(1,2)。この方法により、桿状のシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7942 の生活環における微細構造変化を、樹脂包埋超薄切片を用いた従来法とは異なる視点から観察することを試みた。*Synechococcus* sp. PCC 7942 は、光合成を行い分裂と細胞伸長を繰り返して増殖する原核単細胞生物である。主な細胞内構造として、光合成に関与するチラコイド膜やカルボキシソームなどが知られていたが、新たに巨大なポリリン酸体が各細胞に規則的に配置することが明らかになった。さらに細胞内における DNA の動態を可視化することを目指して BrdU を取り込ませた細胞の観察を行った。DNA の複製、転写、

タンパク質の合成、チラコイド膜の発達、細胞分裂過程など、生きている状態に極めて近い微細構造観察の試みを通して、ヒルベルト微分電子顕微鏡法の可能性について考察したい。

- (1) Kaneko Y., Danev R., Nitta K., and Nagayama K.: In vivo subcellular ultrastructures recognized with Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. J. Electron Microsc. 54, 79-84 (2005)
- (2) Kaneko Y., Danev R., Nagayama K., Nakamoto H.: Intact carboxysomes in a cyanobacterial cell visualized by Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. J. Bacteriol. 188, 805-808 (2006)

(3) 位相差電子顕微鏡による無染色生物試料の観察～高圧凍結・凍結超薄切片法の試み～

新田浩二, 永山國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

花市敬正, 高瀬弘嗣 (花市電子顕微鏡技術研究所)

最も生きた状態に近い透過型電子顕微鏡による生物試料観察を行う方法として、単細胞や高分子等の微細な試料の場合は氷包埋法、多細胞からなる試料の場合は凍結切片法がある。凍結切片法は弱く固定した後、ショ糖により氷晶形成を防止し凍結、切片化を行う方法が主流である。近年、多細胞からなる試料を高圧下で凍結することにより、氷晶形成を防止し、そのまま切片化し観察する高圧凍結・凍結超薄切片観察が行われはじめている。しかし、無染色凍結切片の観察は非常に低コントラストであり、深いデフォーカスをとる必要性によりコントラストを上げることによる分解能低下は避けられない。

近年開発された位相差電子顕微鏡は無固定、無染色の生物試料を正焦点で高コントラスト観察を可能にした。このことは、より生体に近い状態の高分解能観察が可能になると同時に、細胞形態とともに分子形態の新しい知見が期待できる。

本研究では高圧凍結・凍結切片観察が位相差電子顕微鏡に適した生物試料作製法の一方法と考え、今回は主に無処理ハムスターをエーテル麻酔し、肝臓、筋組織を切り出した後、高圧凍結、低温を保持したまま凍結切片作製、切片回収し、ヒルベルト位相差電子顕微鏡観察を行った結果を報告する。

(4) 蛍光タンパク質タグ法による *Mycoplasma pneumoniae* の細胞構造観察

見理 剛 (国立感染症研究所細菌第二部)

マイコプラズマ肺炎の原因菌 *M. pneumoniae* は細胞の一端に分化した接着器官を有している。この接着器官による細胞付着性と運動性が *M. pneumoniae* の病原性には必須な要素であると考えられている。接着器官は *M. pneumoniae* の細胞骨格様の構造によって内部からささえられて形成されていると考えられているが、その詳細な構造は不明である。今後、*M. pneumoniae* の病原性を詳しく理解するためにも、接着器官と細胞骨格の詳細な構造を調べていく必要がある。我々は接着器官と細胞骨格の構造を探る一つの手段として蛍光タンパク質を利用してこれらの構造を視覚化する検討を行っている。これまでに、接着器官を構成するタンパク質のうち数種を蛍

光タンパク質でラベルし、接着器官部位に局在している様子を生細胞で観察している。また、二種の蛍光タンパク質を用いた二重標識によって、それぞれのタンパク質の相対的な位置関係も比較できるようになっている。*M. pneumoniae* は自律増殖が可能な最小クラスの生物であり、ゲノムサイズは約800kb, 含まれるORFの数は689個しかない。現在、これらすべてのORF産物の細胞内局在パターンを蛍光タンパク質によって視覚化することを計画している。この解析から *M. pneumoniae* の接着器官と細胞骨格の未知の成分が網羅的に検索され、細胞構造に関する新たな知見が得られることを期待している。

(5) 位相差電子顕微鏡による氷包埋を行った原核・真核細胞の観察

白田信光, 厚沢季美江, 中沢綾美 (藤田保健衛生大学医学部解剖学 II)

Radostin Danev, 永山國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

【目的】位相差電子顕微鏡法は、細胞内構造が本来持っている物質の密度の差によって引き起こされる電子波の位

相の遅れを、位相コントラストとして可視化する。氷包埋を行った原核・真核細胞を広く観察し、医学研究への

応用を試みた。

【材料と方法】氷包埋標本：大腸菌，納豆菌，各種動物の精子，ヒト血小板をカーボン薄膜を張ったグリッド上に採取した。液体窒素で冷却した液体エタン中で浸漬急速凍結固定を行った。電子顕微鏡観察：電子顕微鏡の液体ヘリウム冷却試料室に標本を移して観察した。後焦点面に炭素薄膜からなる Hilbert 位相板や Zernike 位相板を装置した JEOL JEM-3100FFC 電子顕微鏡により加速電圧 300kV で無染色で観察した。

【結果と考察】細菌においては，凍結保存の状態から増殖

に至る過程の微細構造変化が観察された。精子においては，人工授精に適した凍結保存の状態の微細構造を観察するとともに，脊椎動物の種差を観察した。血小板においてはトロンビンによる凝集過程を観察した。以上の位相差電子顕微鏡観察から，種を問わず細胞内構造と変化を無染色の状態で観察できることがわかった。生物の有する真の構造とその動態を観察できるため，電子顕微鏡の新たな医学への応用が行える可能性が示された。

(6) 微小管の枝分かれ—進化における意義と構造解明へのアプローチ

村田 隆 (基礎生物学研究所)

微小管は α , β チューブリンヘテロダイマーが重合してできたチューブ状のポリマーで，細胞分裂における染色体の分配，細胞内輸送，細胞極性の形成・維持などに働く。細胞内の微小管重合核は γ チューブリン複合体である。動物細胞では γ チューブリン複合体は中心体に局在し，微小管は中心体から放射状に伸長する。一方，高等植物の細胞は中心体を持たず，微小管の形成機構はほとんど不明であった。

高等植物の細胞が細長く伸びる時には微小管が細胞膜に沿って並び (表層微小管列)，細胞の伸長方向を制御することが知られている。表層微小管列を構成する微小管の起源を調べたところ，微小管は既存の微小管上で重合開始し，既存の微小管に対して約 40°の枝状に伸び出すことがわかった。単離細胞表層を用いた無細胞系で γ チューブリンの役割を解析したところ，細胞質中に存在する γ チューブリン複合体が既存の微小管に結合し，微小管の枝分かれ

状形成を起こさせることがわかった(Murata et al. Nature Cell Biol. 7, 961-968, 2005)。

細胞が外側からくびれて分裂する動物細胞と異なり，高等植物の細胞は細胞内に細胞板を形成することにより分裂する。細胞板は隔膜形成体と呼ばれる微小管構造によりつくられる。隔膜形成体の発達に伴う微小管の挙動を GFP- α チューブリン発現細胞を用いて詳細に観察したところ，隔膜形成体の発達に伴い微小管の枝分かれによる形成が起こることが示唆された。これらの結果から，高等植物の細胞は微小管の枝分かれ形成機構を獲得したことにより多様な微小管構造を形成し，特徴的な様式の細胞伸長，細胞分裂が可能になったと推測された。現在，微小管の枝分かれに働く α チューブリン複合体タンパク質を探索するとともに，微小管枝分かれ部位の微細構造の解析を進めている。

(7) 生きたシアノバクテリアにおけるフィコビリソームなどの超分子を見る

仲本 準 (埼玉大学理学部)

シアノバクテリア (藍藻) は，光合成細菌とは異なり光化学系 I 及び II をもち，植物同様に酸素発生型の光合成を行なう原核生物で，葉緑体の起源と考えられている。光合成色素として，クロロフィル，カロテノイドの他に，フィコシアニンやアロフィコシアニンなどのフィコビリ

タンパク質をもつ。多数のフィコビリタンパク質が集合してフィコビリソームと呼ばれる巨大な(5~20 x 10⁶ Da) アンテナ色素複合体を形成する。フィコビリソームの構成ポリペプチドで，発色団をもたない数種類のリンカーポリペプチドは，高度に秩序正しく構築されたこの超分

子の骨格をなすと考えられている。細胞総タンパク質量の50%にも達するフィコビリソームは窒素の貯蔵形態の一つであるとも考えられていて、栄養条件に迅速に応答してダイナミックな量的・質的变化をする。そのサイズ、細胞内の蓄積量、チラコイド膜上における規則正しい配置などの理由からフィコビリソームは顕微鏡観察に適した超分子であると考えて、細胞におけるこの超分子の構造と、その構築・分解過程（中間体・前駆体構造）の解明を研究目的とした。フィコビリタンパク質の結晶は100年以上も前に報告され、1980年代にSchirmerとHuberらによって原子レベルで構造決定がなされた。しかし、リンカーポリペプチドの不安定性故か、その構造、従ってフィコビリソームの「骨組み」の構造は未解明である。

また、従来の透過電子顕微鏡による「成熟した」単離フィコビリソームの観察例はあるが、「未成熟の」ものについては解析はなされていない。

実験材料として、「最も単純な」フィコビリソームをもつシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7942 株を用いた。金子らは、この株が、永山らにより開発されたヒルベルト微分コントラスト(HDC)電子顕微鏡を用いた「生きた」細胞の微細構造観察に適したものであることを示したが、カルボキシソーム（多面体顆粒）中のリブローソーム-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ酵素のパラ結晶も高コントラストで観察可能であった(Kaneko et al., 2006)。HDC電子顕微鏡によるフィコビリソーム構造等の解析結果について報告する。

(8) 投影型 X 線顕微鏡による生物観察

吉村英恭（明治大学理工学部）

X線顕微鏡の開発は、可視光より波長が短く高い分解能が期待されることから20世紀の初頭から盛んに行われてきたが、X線の物質に対する屈折率がほとんど1であるので光学顕微鏡のような屈折を利用したレンズを作ることができず、長い間大きな進歩が見られなかった。近年、微細加工技術が発達したことにより、フレネルゾーンプレートとよばれる回折を利用した集光光学系ができるようになりX線顕微鏡の分解能も30nm程度に達するまでになった。しかしこの光学系は効率が悪いことから非常に明るい光源が要求され、放射光施設のような大規模な実験施設でなければ利用できない欠点がある。このことは条件を変えて多くの写真を撮る必要がある生物の研究には大きな障壁となっている。ここで紹介する投影型X線顕微鏡はレンズを使わない簡単な原理のX線顕微鏡である。小さなX線光源の直下に試料を置くおくこ

とで球面波として広がるX線により試料の拡大投影像を得る、つまり簡単に言えば「影絵顕微鏡」である。X線源は走査電子顕微鏡により収束させた電子線を走査せずに金属薄膜の1点に静止させ、そこから発生するX線を使うので、電子顕微鏡を使う程度の手軽さでX線顕微鏡像を得ることができる。分解能はX線光源の大きさで決まり、金のテストパターンを使った実験では約0.1 μ mが得られ光学顕微鏡よりややよい程度となっている。レンズを使っていないので厚さ数mmの試料でも全体に焦点が合うことを利用して、昆虫のマイクロCTを試みた。また、電子線を照射する薄膜の金属を変えることで異なった波長のX線を発生させることができるので、コントラストの違いから被写体の構成元素をある程度推測できる。ここでは生物体内にある鉄の粒子の存在を非破壊的に観察した例を紹介する。

(9) 蛋白質トモグラフィー

岩崎憲治（大阪大学蛋白質研究所）

単粒子トモグラフィーは、我々が開発している「電子線トモグラフィー」を応用して、単離精製されたタンパク質あるいは、細胞・組織の中の超分子構造を視覚化する

方法」である。その特徴として次の4つがあげられる。(1)トモグラフィーの原理に基づいているので、結果に対して信頼性がある。(2)わずか数個~数十個の粒子から三次

元構造を求めることができる。(3)計算量が少なく、一台のPCで二、三日以内に結果が得られる。(4)大きくコンフォメーションの異なる同種のタンパク質が混在している場合、一つ一つの粒子の三次元情報に基づいて粒子を分類、平均化することで、それらの構造を求めることができる。電子顕微鏡を使用したタンパク質の構造解析では、単粒子解析法が有名だが、その解析方法のため、結果として提示される三次元構造の正しさを保証する指標がない。誰しも経験する問題として、構造の収束が起らず、解析過程で出力されるどの構造を最終的な三次元構造として決定すればよいかわからないということがあ

る。本方法は、例え低分解能でも、すばやく信頼性のある三次元構造を出力し、さらに分解能を改善するため、引き続き単粒子解析を行う場合の適切な初期構造を提供してくれる。単粒子トモグラフィーの最終目標は、精製タンパク質ではなく、細胞におけるタンパク質の三次元視覚化であるが、現在の段階でも、強力な構造解析のツールとして我々の研究室でその成果をあげている。本講演では、実際にこの方法を用いて明らかになった、コラーゲン結合型インテグリンや、脳の層構造形成を司る細胞外シグナル分子リーリンの三次元構造を紹介する。

(10) 試料に応じた電子線トモグラフィーの適用—TEM・STEM・クライオトモグラフィー—

青山一弘 (日本エフイー・アイ株式会社)

透過型電子顕微鏡法を三次元に拡張するためのトモグラフィーの応用は、近年、大きな展開を見せている。既に装置開発の段階は過ぎ、具体的な成果の収穫期に入ったといえるだろう。電子顕微鏡法が元々の目的であった生物試料の観察に留まらず、様々な対象物に適用されるために色々なモディファイを加えられていったのと同様に、電子線トモグラフィーもまたそのバリエーションを増やしつつある。

TEM トモグラフィー 電子線トモグラフィーの基本である。通常、ほとんどのものに対して適用可能。

STEM トモグラフィー 基本的なトモグラフィー取得のシステムは通常のTEMモードと共通である。TEMモードと比較し2つの点において優れた特徴をもっている。HAADF法により試料の結晶性による回折波の影響を軽減できること、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。結晶性試料、半導体試料に好適。

クライオトモグラフィー FEIでは高傾斜ユーセントリック、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。これにより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ーが可能となった。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。

連続切片へのトモグラフィーの適用 電子線トモグラフィーは試料の立体構造を解析することを目的とするが、電子線の透過能の低さのため、一般に試料の厚さに非常に大きな制約がある。超高圧電子顕微鏡を用いれば細胞レベルの厚さの解析も可能であるが、それでもまだ厚さの限界は厳然と存在する。試料を連続切片化すれば原理的にこの制限を回避する事ができる。

(11) TEMにおける3次元情報の構築技法 (トモグラフィー)

及川哲夫 (日本電子株式会社)

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いる。TEMでは試料を透過した電子で形成される2次元の透過像を観察するため、その空間分解能

は0.1nm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 Tomograph)法の原理を応用したTEM-CT法¹⁾が最近一般化し、高分子

材料や生物試料などで応用が広まりつつある。

この技法では、多方向からの投影像を得るために試料を傾斜して観察方向を変ながら撮影を行う。図1は、試料を0度から90度まで傾斜した時のグリッド像の変化を示している。傾斜角が70度を越えると有効視野が著しく狭くなり、これが実用上の傾斜の限界となる。

一方、試料からの正確な情報を構築するためには、撮影する画像に正確な形態情報が記録されてなくてはならない。画像のコントラストやS/Nを改善することが基本的問題として表面化している。特に厚い試料においては非弾性散乱によるバックグラウンドの除去が不可欠であり、一方で、試料の包埋方法²⁾も課題となっている。

本講演では、これらの改善技法の例を中心にその応用例を紹介する。

- 1) H. Furukawa, M. Shimizu, Y. Suzuki and H. Nishioka.; JEOL News 36 (2001) 12.
- 2) A. Sato; Proc. 4th world Congress of Cellular and Molecular Biology (Poitiers) (2005) p15.

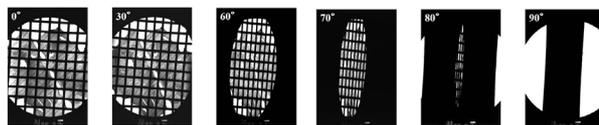


図1. 高傾斜リテイナーを用いた試料傾斜によるグリッド像の変化

(12) 氷包埋を行った培養細胞の位相差電子顕微鏡による観察

厚沢季美江, 白田信光 (藤田保健衛生大学医学部解剖学 II)

瀬藤光利, Radostin Danev, 永山國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

【目的】位相差電子顕微鏡観察では、生物材料を無染色で高コントラストに観察できる。この特徴をいかして、化学固定・脱水・樹脂包埋・染色という、人工的な作業を細胞に加えることなく、培養細胞の構造を直接観察することを試みた。

【材料と方法】PtK2 および HEK293 細胞は、10%FBS を添加した Dulbecco 変法 MEM で炭素薄膜を張ったプラチナメッシュ上に培養した。一部の細胞では微小管阻害剤 nocodazole を作用させ、細胞構造の変化を観察した。比較のために、ラット肝臓を材料として細胞分画法により得た細胞小器官と、ラット脳より得た微小管 (twice-cycled microtubule) を観察した。氷包埋：液体窒素中で冷却した液体エタン中で浸漬急速凍結固定を行った。電子顕微鏡観察：電子顕微鏡の液体ヘリウム冷却試料室

に標本を移して観察した。後焦点面に炭素薄膜からなる Hilbert 位相板を装置した JEOL JEM-3100FFC 電子顕微鏡により加速電圧 300kV で無染色で観察した。

【結果と考察】単離した細胞小器官と微小管は、まるで染色を行ったように高コントラストで観察できた。培養細胞においては、核周囲の厚い構造は観察できなかったが、辺縁部では、細胞骨格・細胞小器官が明瞭に観察された。nocodazole を細胞に作用させ蛍光抗体法で観察すると微小管が消失していたが、位相差電子顕微鏡観察によって構造変化が確認できた。つまり、氷包埋と位相差電子顕微鏡を組み合わせると、極めて生きている状態に近い細胞超微構造とその動態を直接観察できることが示された。

(13) 位相差電子顕微鏡による脂質ナノチューブ形成過程の研究

由井宏治, 神谷昌子, 清水敏美 (東京理科大学理学部化学科)

伊藤耕三 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)

Radostin Danev, 永山國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

【緒言】ある種の脂質分子は水中で自己集合し nm オーダーのチューブ状構造体「脂質ナノチューブ」を形成する。

カーボンナノチューブが疎水性であるのに対し、脂質ナノチューブは親水性であることが特徴で、タンパク質や

DNA等の生体高分子の包接や、ドラッグデリバリーのキャリア等の応用が期待されている。脂質分子の自己集合過程の理解は、物理化学的に興味深いだけでなく、内外径の制御といった応用の観点からも重要であるが、未解明な点が多い。そこで瞬間凍結法と位相差電子顕微鏡法とを組み合わせ、脂質ナノチューブの自己集合過程の直接観測を試みた。

【実験】糖脂質分子(N-(11-cis-octadecenoyl)- β -D-glucopyranosylamine)5mgを水100ml中に加熱分散させ、2.5度/分の速度で冷却した。自己集合の盛んな60度に達した際にサンプリングし急速凍結した。測定は液体ヘリウム温度(4K)でJEM-3100FFC(JEOL)を用い、ヘルベルト干渉法を用いてコントラストを上げた。

【結果と考察】本脂質ナノチューブの最終内径・外径はそれぞれ50nm, 200-300nmであるが、まず脂質2分子膜5-6層が、定まったピッチで順次巻いてチューブの芯となる構造(内径130nm, 外径180nm)が急速に形成されることが判明した。さらにこの芯チューブの内外に脂質2分子膜が順次積層し、最終形態に至ることが分った。これは脂質ナノチューブのごく初期の段階を直接追跡した初めての例として大変興味深い。これまで脂質ナノチューブの形成過程は、形成の早さ、サンプルの薄さ、適切な染色法のなさにより、一般に電子顕微鏡観測が困難であったが、位相差法と急速凍結法を用いることで直接観測が可能になり、本手法の有機自己集合体研究への有用性が明らかになったといえる。

(14) TEMで観る線状高分子の結晶モルフォロジー

辻 正樹 (京都大学化学研究所)

ポリエチレンやイソタクチック・ポリスチレンのように立体規則性の良い一次構造を有する屈曲性線状高分子は、通常、分子鎖が折りたたまれた結晶、言わば分子内結晶を作る。即ち、これらの高分子を熔融状態から、あるいは溶液から結晶化させると、薄板状の結晶、いわゆるラメラ晶を形成し、分子鎖はその板面にほぼ垂直に充填され、上面と下面で折りたたまれている。例えば、希薄溶液からは孤立した薄板状「単結晶」が生長し、また時には熔融状態からはラメラ晶から成る「球晶」が高次構造として形成されるが、それらの結晶成分の割合を表す「結晶化度」は100%とは成り得ず、必ず非晶成分が残る。

本講演では、熔融紡糸によって得られる合成繊維のモデル試料として、熔融状態から「ずり歪み」下で結晶化

させた一軸配向薄膜中における「シシカバブ構造」や、静置場で結晶化させた時に得られる固体構造のモデル試料として、2次元球晶構造を有する薄膜のモルフォロジーなどをTEM観察した例を紹介する。これらの結果から得られる情報は、繊維など結晶性高分子固体の力学物性等と固体構造との間の関係を考察するうえで、また、力学物性等の向上した高分子材料を創製するうえで重要であると考えられる。因みに、これらの試料の結晶モルフォロジーを調べる際には、制限視野電子回折や暗視野観察が主たる手法になるため、また場合によっては個々の微結晶の配向状態や格子欠陥等の知見を得るため高分解能観察も行うので、基本的には無染色観察を行っている。

(15) 位相差TEMの高分子材料への応用

登阪雅聡 (京都大学化学研究所)

透過型電子顕微鏡(TEM)は原子の大きさに迫る高い解像力を持っている装置だが、物質の微細構造を観察するためには解像力に加えて像のコントラストが必要であ

る。高分子試料は一般に像のコントラストが低いため、通常は特定の部分に重金属原子を付着させる「染色」「シャドウイング」などの前処理を行い、コントラストを高

めた試料を観察している。しかし、これらの前処理手法が適用できないため、内部構造の判定できない試料も数多く存在している。また、染色法の場合はナノスケールの構造が染色過程で元の構造と変わってしまう可能性がある。こうした問題に対して、これまで元素分析の手法を組み合わせる試みが成されてきたが、多量の電子線を照射する必要があるため電子線損傷という別の問題が引き起こされていた。あるいは、非常に大きなデフォーカスで観察する手法も提案されているが、この場合も分解能がかなり犠牲となってしまう。

こうした問題を解決すべく、位相差 TEM が開発された。この装置は位相差光学顕微鏡と同様に位相板を後焦

点面に配置しており、散乱ビームと非散乱ビームの間に干渉を生じさせて無染色試料も高いコントラストで観察できる。この場合、正焦点付近でも高いコントラストが得られるので、デフォーカスコントラスト法とは異なり分解能を大きく犠牲にする事も避けられる。例として、カーボンブラックを充填した天然ゴムの場合は、カーボンブラック粒子と同時に、コンパウンディングに用いられるステアリン酸の結晶格子も撮影されていた。また、ブロックコポリマーやその他の高分子試料も、無染色のまま高いコントラストで観察された。この様に高分子材料の分野でも、位相差 TEM による無染色観察で研究の幅が大きく広がると期待される。

(16) ブロックコポリマーの無染色 TEM 観察と電子線トモグラフィー

長谷川博一（京都大学大学院工学研究科）

ブロックコポリマーは異種の鎖状高分子を共有結合で連結した自然界には存在しない構造を持つ高分子であるが、その連結効果により様々の興味深い現象が発現する。「マイクロ相分離」もその一つであり、互いに非相溶な高分子を成分とするブロックコポリマーは、分子のサイズ程度である数十～数百 nm の周期と、1, 2, 3 次元の様々な幾何学的パターンを持った規則的な相分離構造を形成する。これらのパターンを利用した電子材料、パターンドメディア、ナノコンポジット、ナノ多孔体、フォトニッククリスタルなどのナノ材料の開発研究が盛んであるが、TEM によるマイクロ相分離構造の観察は不可欠である。

ジエン系高分子を一成分とするブロックコポリマーの

TEM 観察には従来からオスミウム酸染色法が用いられてきたが、ポリアセチレンなどの機能性高分子を成分とするブロックコポリマーには染色不可能なものも多く、無染色 TEM 観察法の開発が望まれていた。近年、エネルギーフィルタリング TEM や位相コントラスト TEM が開発され、無染色観察が可能となった。我々はこれらの手法を用いていくつかのブロックコポリマーについてマイクロ相分離構造の無染色観察を行い、良好な結果を得た。また、複雑なマイクロ相分離構造や構造欠陥の研究には 3 次元構造の観察が有効であるが、我々は電子線トモグラフィーを用いることにより興味深い構造や現象を見出すことができた。講演ではこれらの手法を用いたいくつかの研究例を紹介する。

(17) エネルギーフィルター TEM による高分子の可視化

堀内 伸（産業技術総合研究所 ナノテクノロジー研究部門）

高分子は軽元素のみから構成されるため、TEM での観察には重金属による染色が必要にある。エネルギーフィルター TEM (EFTEM) により、試料を透過した非弾性散乱電子を分光し、結像することにより、無線色により良好なコントラストで高分子を観察することが可能であり、

さらに、元素マッピング、EELS を併用することにより、構造を定量的に解析することが可能となり、得られる情報は通常の TEM に比べはるかに高くなる。高分子界面は、複合材料、塗膜、接着など高分子材料のいろいろな局面において材料の性能、機能に影響を与える。我々

は、高分子界面の解析に EFTEM を適用し、界面ナノ構造と物性との相関に関して研究を行ってきた。本講演では、元素マッピングによる高分子界面の可視化と ImageEELS による元素組成の定量的解析を行い、界面接

着強度と界面ナノ構造との相関、及びゴム材料における無機フィラーとゴムとの相互作用に関する研究例を紹介する。

(18) シリカ系ナノ細孔材料の TEM 観察

佐々木優吉 (財団法人ファインセラミックスセンター)

酸化珪素を主な成分とするナノ空間材料 (ゼオライトやメソポーラスシリカ) は、0.4nm~数 nm の細孔チャンネルが規則的に三次元配列している。ナノ空間材料の多くは準安定相であり、電子線照射によって短時間で非晶質化する。ナノ空間材料の高分解能 TEM 観察を実現するためには、高感度記録媒体を用いた低電子線照射量観察が最も有効であり、これによって空間分解能 0.2nm 以下の像を得ることが可能である。

ナノ空間材料は、結晶構造に由来して形成される微細な細孔チャンネルが機能場として利用される。本研究では、CCD カメラを用いた低電子線照射量観察を行い、ナ

ノ空間材料内の細孔チャンネルの高分解能 TEM 観察を実現するとともに、イオン交換能を有する Si-Al-O 系ゼオライトの高分解 TEM 観察像の画像定量解析を試みた。その結果、イオン交換 ($\text{Na}^+ \Rightarrow \text{Ag}^+$) 状態が、像観察によって判別可能であることを確認した。

また、層状ケイ酸塩内での有機カチオンのミセル形成によって、非晶質酸化珪素を壁とする直径約 3nm の細孔チャンネルが一次元に規則配列したメソポーラスシリカが形成される過程を、低電子線照射量観察によって解明した結果についても紹介する。

(19) 電子線ホログラフィーによるマイクロ~ナノ領域の電場・磁場の観察

平山 司 (財団法人ファインセラミックスセンター)

真空中や試料中の電場・磁場を電子線ホログラフィーで観察することを顕微鏡学的に表現すれば、「純位相物体を透過した電子波の低空間周波數位相情報を強度情報に変換して画像表示する」ということになる。また、これは「見えないものを無染色で観る」という本講演会の趣旨にぴったりあてはまる。

電子線ホログラフィーは、Gabor が電子レンズの収差を補正するという目的で 1940 年代に考案した手法であり、ホログラムの撮影と像再生の 2 段階の操作よりなる結像方法である。ホログラムは電界放出型電子銃を持つ電子顕微鏡を用いて、試料や観察したい空間を通り抜けた電子波 (物体波) と何も存在しない空間を通ってきた電子波 (参照波) を重ね合わせて干渉させることによ

て得られる。この 2 つの電子波を干渉させるのに使うのが電子線バイプリズムである。得られた干渉縞は「ホログラム」と呼ばれ、試料の位相情報は干渉縞の曲がりとしてフィルムや CCD カメラ等に記録される。

撮影したホログラムは、以前はマッハツエンダー干渉計と呼ばれる光学装置を用いて再生したが、最近ではコンピューターを用いた解析が主に用いられるようになった。フーリエ変換等を用いて位相情報を抽出し、試料直下の複素波動場を求めることができる。複素波動場は視覚的に表現しにくいので、位相の傾きを濃淡で表す「位相分布像」や同じ位相値の部分等を等位相線として結ぶ「干渉顕微鏡像」などで表現する。

(20) 偏光と位相差による生体試料の可視化観察——光学顕微鏡でみる数十 nm の世界——

加藤 薫 (産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門)

この発表では、偏光と位相差による、位相物体としての生体試料の光学顕微鏡観察のエッセンスを取り扱う。

【偏光観察の概説】複屈折は光学的異方性の一つである。偏光顕微鏡で観察できる。複屈折の観察は、位相差と関係が深い。複屈折性の試料の界面で、光波は、o波とe波という2つの波に分かれる。試料透過後にo波とe波の間に位相差(リタデーション)を生じるが、偏光顕微鏡は、o波とe波の位相差を検出するのである。

【偏光顕微鏡とシンヤスコープ】最も簡便な偏光顕微鏡は、対物側、コンデンサー側に、1対の偏光器を取り付けたものである。しかし、実際に、偏光器を顕微鏡の中に組み込むと、偏光特性の劣化が生じる。例えば、偏光器だけの状態で、消光比が100万でも、同じ偏光器を顕微鏡に組み込むと、消光比は低下してしまう。これを改善したのが、レクティファイアー(井上信也博士の考案)

である。この顕微鏡で、井上らは、精子内部の染色体の構造が調べ、細胞中のDNA構造の最初の知見を出した。

【Polscope】偏光顕微鏡での解析では、回転ステージでの試料の回転操作が必須で、画像処理には馴染まない。そこで、試料を固定し、偏光波の振動方向と状態を電子制御し、サンプルのリタデーションを計測する顕微鏡システム(PolScope)が考案された。私はこのシステムの立ち上げと生体試料観察への応用に取り組み、神経成長円錐内部のアクチン繊維束(直径数十nm)を無染色で可視化することに成功した。movieを交えて紹介する。

【偏光から位相差へ】偏光顕微鏡は、生細胞内の微結晶を観察できるが、ランダムな方向をとる蛋白は観察できない。蛋白質の量比を捉えるには、位相差顕微鏡の方が適している。私は大瀧と共同で、位相差顕微鏡の改良に取り組み、アクチンの網目の可視化に成功した。

(21) アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞観察への適用

大瀧達朗 (株式会社ニコン)

位相差顕微鏡は、生細胞の無染色観察に威力を発揮する。近年我々は、位相差顕微鏡の欠点であるハロを減じ、位相差の検出力を高めたアポディゼーション位相差法を開発した。最近開発した開口数1.30の油浸アポディゼーション位相差対物レンズは、光学顕微鏡の解像限界以下の微細構造、例えば細胞小器官のアクチン束や顆粒等の観察に適する。このアポディゼーション法の原理と生細胞観察について述べる。

位相差法による像コントラストは、位相物体で生じる直接光と回折光の変調した合成で得られる。位相差が微小な場合、回折光強度は位相差に比例する。検出力を高めるためには直接光の強度を弱めると良いが、検出力を高めるほどハロが発生しやすい。不要なハロは、細胞全体など大きな構造に多く見られる点に着目し、大きな構造だけを選択的に低コントラストにするのがアポディゼーション法である。構成は、顕微鏡の対物レンズ内に置

かれたリング形状の位相板に、アポディゼーション帯と呼ぶ吸収帯を設ける。アポディゼーション帯の作用で所定の大きさの物体で生じる回折光の強度を減じ、その大きさの物体の像コントラストを低くする。一方、微細な観察対象の回折光の大部分は変調が無く、高コントラストの像が得られる。

結果は、直径20-60nmのアクチン束やストレスファイバーを無染色の生細胞内で可視化できたことに加え、明るい光学系を利用してタイムラプス像として捉えた。ミトコンドリアや核膜も良好に可視化できている。さらに特徴的なことは、像の低周波数成分を低コントラストにする効果で、断層的な像を得ることができる。このようにアポディゼーション位相差法は、生細胞の微細構造を無染色のまま観察する方法として優れており、特に生細胞の動的観察に有効な方法である。

19. DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開

2005 年 11 月 17 日－11 月 18 日

代表・世話人：鳥越秀峰（東京理科大学理学部）

所内対応者：永山國昭（ナノ形態生理）

- (1) ミニサテライト DNA 配列が形成する特殊高次構造の生化学解析と電子顕微鏡解析
加藤幹男（大阪府立大学大学院理学系研究科）
- (2) Polypurine/polypyrimidine 配列の比較ゲノム解析
金谷重彦（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科）
- (3) 特殊 DNA 構造に基づく人工的遺伝子発現制御とテロメア調節機構に関する解析
鳥越秀峰（東京理科大学理学部応用化学科）
- (4) 酵母ゲノムにおいてヌクレオソーム形成を阻害する DNA 構造による転写制御機構の解析
清水光弘（明星大学理工学部）
- (5) ほ乳類βグロビン遺伝子転写制御領域に存在する進化的に保存された DNA 構造
木山亮一（産業技術総合研究所）
- (6) 人工染色体の構築と利用
池野正史（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）
- (7) DNA 塩基損傷の認識と修復機構
菅澤 薫（理化学研究所）
- (8) バクテリアのプラスミド分配に関与するらせん状構造体を視覚化する試み
仁木宏典（国立遺伝学研究所系統生物研究センター）
- (9) 細胞死 DNA 断片化の生理学
水田龍信（東京理科大学生命科学研究所）
- (10) DNA に印された配列以外の情報を読む
大山隆（甲南大学理工学部）
- (11) 地球上は細胞外 DNA だらけ？—微生物バイオフィームから見た DNA—
野村暢彦（筑波大学大学院生命環境科学研究科）
- (12) 植物細胞における生体防御・プログラム細胞死・細胞周期制御のクロストーク
朽津和幸（東京理科大理工学部）
- (13) Analytic theory for DNA condensation
石本志高（理化学研究所）
- (14) ゲノム生理学研究会への提言
永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

【参加者名】

鳥越秀峰（東京理科大）、田中宏幸（奈良先端大）、木山亮一（産総研）、水田龍信（東京理科大）、仁木宏典（遺伝研）、池野正史（藤田保健衛生大）、加藤幹男（大阪府立大）、菅澤薫（理化研）、金谷重彦（奈良先端大）、清

水光弘（明星大）、朽津和幸（東京理科大）、石本志高（理化研）、大山隆（甲南大）、野村暢彦（筑波大）、丁雷（生理研）、福井由宇子（基生研）、小澤一益（統合バイオ）

【概要】

平成 17 年度大学共同利用機関法人自然科学研究機構生理学研究所研究会 No.19「DNA 構造を基盤とするゲノム生理学の展開」は、提案代表者：鳥越秀峰（東京理科大学理学部）、所内対応者：永山國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター・ナノ形態生理）のオーガナイズにより平成 17 年 11 月 17-18 日に岡崎コンファレンスセンター2 階小会議室で開催された。出席者約 20 名を集め、口頭発表 14 件が行われ、白熱した議論が展開された。主たるトピックスとしては、「DNA 高次構造とゲノム機能」、「クロマチン構造とゲノム機能」、「DNA 情報制御とゲノム機能」

機能」、「多様な生命現象とゲノム機能」、「DNA 構造の原点から見たゲノム機能」が取り上げられた。初日の講演会終了後に懇親会が催され、さらに掘り下げた議論が展開され、参加者相互間の学問的理解が深まり、非常に有意義であった。これらの流れの中で、新しい共同研究の展開が模索されると共に、永山教授により開発されて生理学研究所に導入された位相差電子顕微鏡の共同利用の機運が高まり、「染色体の構造異常」に特に焦点を当てて共同利用を展開する方向性が提示された。

(1) ミニサテライト DNA 配列が形成する特殊高次構造の生化学解析と電子顕微鏡解析

加藤幹男（大阪府立大学大学院理学系研究科）

ミニサテライト DNA は、一般に、ゲノムに散在している 10bp から 100bp 程度の単位が数回から数十回縦列に繰り返している配列である。これらのミニサテライト領域においては、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。本研究では、海水魚 *Acanthopagrus latus* 由来の 30bp を単位とするミニサテライト DNA を材料として、多型をもたらす構造要因を明らかにするために、電気泳動移動度、化学修飾、および電子顕微鏡などによる解析を試みた。

化学修飾実験の結果から、一本鎖状態のミニサテライト DNA は、反復単位においてヘアピン様構造を形成することが示唆された。マグネシウムイオンの存在は、こ

れらの化学修飾実験の結果に影響しなかったが、電気泳動移動度には大きく影響することがわかった。すなわち、マグネシウムイオンは、塩基対形成に影響を与えることなく、一本鎖 DNA 分子を凝縮させる（電気泳動移動度を大きくする）ことが示唆された。凝縮した一本鎖 DNA 構造は、電子顕微鏡によって直接観察された。このような一本鎖状 DNA の高次構造形成は、DNA 複製の鋳型鎖で起こると相補鎖の合成を一時停止することでミスアライメントを誘発したり、新生相補鎖においては Okazaki fragment 5' 側での高次構造形成を誘発したりすることで、繰り返す数の変動をもたらす原因のひとつであると考えられる。

(2) Polypurine/polypyrimidine 配列の比較ゲノム解析

金谷重彦（奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科）

Polypurine/polypyrimidine 配列は、3 重鎖構造(Triplex)のような特殊な立体構造の構築と関係し、転写制御や複製機構といった分子生物学的機能との関連が示唆されている。また現在、ゲノムプロジェクトの進展に伴って、250 種以上のバクテリアに加え、ヒトやマウスのような高等真核生物のゲノム配列も決定されている。そこで、3

重鎖構造のような非 B 型 DNA 構造のゲノム多様性を把握する目的で、これらのゲノムデータを基に AG または TC 含量が 90%で 300bp 以上の長さを閾値とし、生物種間における Polypurine/polypyrimidine 配列の出現特徴を調べた。結果、バクテリアでは Archaea にのみ 2 種見つかかり、どちらも *Metanosarcina* 属であった。また、脊椎動

物ゲノムでは大量の Polypu/py 断片が見つかり, *H.sapiens* において染色体間でその分布形態に特徴が見られた。更に今回, Polypu/py 配列がヒト染色体の複製タイミング

に与える影響について, ヒトゲノム全体に拡張して解析を行った。

(3) 特殊 DNA 構造に基づく人工的遺伝子発現制御とテロメア調節機構に関する解析

鳥越秀峰 (東京理科大学理学部応用化学科)

様々な生物の染色体の全塩基配列が明らかにされ, 多数の遺伝子が同定されているが, 機能未知のままの遺伝子は少なくない。機能未知の遺伝子発現を人工的に活性化・抑制して表現型を検討するのが, 機能未知の遺伝子機能を推測する有力な手段である。本研究では, 任意の遺伝子上流配列を認識し, 下流の任意の遺伝子発現を人工的に制御し得る人工転写因子の創製を試みたので紹介する。具体的には, 機能未知の遺伝子の上流配列と 3 本鎖核酸を形成しうる 1 本鎖核酸に, 転写因子の活性化・抑制ドメインをつなげ, これを機能未知の遺伝子の上流配列に結合させ, 機能未知の遺伝子発現を制御するものである。

一方, 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, 3'末端は突出した 1 本鎖 DNA 領域である。テロメア長の変化は細胞の老化や癌化と密接な関係にある。テロメア長の調節には, テロメラーゼと共に, テロメアの 2 本鎖及び 1 本鎖 DNA 領域に特異的に結合する蛋白質が関与する。本研究では, 分裂酵母のテロメア 1 本鎖 DNA 領域とこの領域に特異的に結合する蛋白質 Pot1 について解析したので紹介する。分裂酵母のテロメア 1 本鎖 DNA 領域は G 塩基に富み, Na⁺や K⁺イオン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 本鎖核酸を形成した。これに Pot1 蛋白質を添加すると, 4 本鎖核酸がほどけることを見つけた。この現象と他の結果を合わせてテロメア調節機構について考察する。

(4) 酵母ゲノムにおいてヌクレオソーム形成を阻害する DNA 構造による転写制御機構の解析

清水光弘 (明星大学理工学部)

多くの真核生物遺伝子の転写は, クロマチンの構造変化を介して制御されていると考えられているが, このことを *in vivo* で検証する方法は限られている。この問題に対して, 我々は, 出芽酵母ゲノムの正確な位置に, 比較的短い, 様々なヌクレオソーム阻害配列を導入することによって, 局所的クロマチンの機能を解析する新しいアプローチを確立した。出芽酵母 α -細胞特異的遺伝子 *BARI* のプロモーター領域に, A_n•T_n と (CG)_n•(CG)_n 配列 (それぞれ B' 構造と Z-DNA を形成できる) を挿入し, $\alpha 2$ /Mcm1p による転写抑制におけるヌクレオソームポジショニングの機能について解析した。A_n または (CG)_n 配

列が長くなるほど, α 細胞における *BARI* の脱抑制が大きくなった。そして, この *BARI* の脱抑制が見られた A_n または (CG)_n を挿入したプロモーターでは, ヌクレオソームポジショニングが破壊されていることが示された。したがって, ヌクレオソームポジショニングは α -細胞特異的遺伝子の転写抑制機構に本質的な役割を持つことが実証された。このアプローチの普遍性を調べるために, 無機リン酸飢餓状態で誘導発現される *PHO5* 遺伝子の発現制御におけるヌクレオソームの機能の解析も進めている。

(5) ほ乳類βグロビン遺伝子転写制御領域に存在する進化的に保存された DNA 構造

木山亮一 (産業技術総合研究所)

ヌクレオソームは 1 細胞中に約 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から非常に複雑であり、特に高次のクロマチン構造と機能との関係については研究が余り進んでいない。我々は、このような複雑なクロマチンの状態を解析する作業仮説として、「ヌクレオソームには階層構造(hierarchy)がある」と考えている⁽¹⁻³⁾。すなわち、全てのヌクレオソームが同じような挙動を示すわけではなく、機能的に重要なヌクレオソーム(key nucleosome)のグループとそうでないものがあるということである。我々は、今回、ジヌクレオソーム(ヌクレオソーム二量体)の解析結果^(4,5)をもとに、約 30 個以上のグロビン遺伝子プロモータ領域に関して塩基配列の比較を行い、遺伝子の転写開始点から 200~400 bp 上流の領域に高等動物において進化的に保存された領域を見いだした。この領域は、塩基配列自体の相同

性は低い、AA-あるいは TT-ジヌクレオチドの高い出現頻度を特徴とし、折曲り構造(ベント DNA 構造)を示した。また、ヒト、マウス、ラビット及びギャラゴの 4 つの種における 18 個の遺伝子領域の解析から AA-ジヌクレオチドの平均の周期は約 13 bp であった。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。

1. Onishi & Kiyama. *Nucl. Acids Res.* 29, 3448-3457, 2001:
2. Kiyama & Trifonov. *FEBS Letters* 523, 7-11, 2002:
3. Onishi & Kiyama. *Recent Devel. Nucl. Acids Res.* 1, 131-150, 2004:
4. Kato et al. *J. Mol. Biol.* 332, 111-125, 2003:
5. Kato et al. *J. Mol. Biol.* 350, 215-227, 2005.

(6) 人工染色体の構築と利用

池野正史 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

遺伝子の発現制御や、遺伝子の次世代への伝達を担う染色体は、ゲノム DNA を精密かつ柔軟に調整する構造体であり、細胞周期に伴いダイナミックにその構造を変化させる。染色体が保有する 3 機能領域、複製起点・セントロメア・テロメアにより、染色体は細胞核内に安定に維持される。この染色体の機能領域はゲノム配列に依存して形成される。私たちはこれまでに、ヒト-アルファサテライト DNA を用いて、ヒト細胞染色体とは独立に存在しうる「人工染色体」を構築し、ゲノム配列に基づく染色体の構造形成を示した。人工染色体の構築は再現

的であると同時に、一度細胞内で構築された人工染色体を微小核融合法により様々な細胞株に移すことができることから、遺伝子導入ベクターとしての利用開発に取り組んでいる。また、遺伝子発現領域などの染色体機能領域を人工染色体上に再現することが可能であり、染色体機能の解析系を構築している。本研究会では、ヒト型遺伝子を付加した人工染色体を保有する細胞やマウスの作製と、人工染色体からの遺伝子発現や人工染色体の次世代への伝達安定性について紹介する。

(7) DNA 塩基損傷の認識と修復機構

菅澤 薫 (理化学研究所)

ゲノム DNA は活性酸素や放射線、化学物質などによって絶え間なく損傷を受けている。DNA 損傷は転写や複

製の妨げとなり、細胞死や突然変異、ゲノム不安定化等をもたらすことによって、がんなどのさまざまな病態を

引き起こす可能性がある。このような事態を未然に回避するための防御機構として、種々の DNA 修復機構が生物にとって重要な役割を果たしている。

DNA 損傷の大部分は、塩基部分の損傷と単鎖切断によって占められる。しかしながら、長大なゲノム DNA に発生した数少ない損傷塩基を、圧倒的過剰に存在する正常塩基の中から見つけ出して修復するのは決して容易なことではない。我々は、紫外線や化学物質によって誘起

される種々の塩基損傷を対象とするヌクレオチド除去修復(NER)機構に着目し、C 群色素性乾皮症(XPC)タンパク質を含む複合体の機能が損傷部位の認識と修復反応の開始に必須であることをこれまで示してきた。XPC 複合体の生化学的な性状解析から明らかになった、NER 機構が化学構造上まったく共通性を持たない種々の塩基損傷を認識するための分子基盤、および NER 反応の分子機構について議論する。

(8) バクテリアのプラスミド分配に関与するらせん状構造体を視覚化する試み

仁木宏典 (国立遺伝学研究所系統生物研究センター)

バクテリア、すなわち原核細胞での染色体の移動機構に関してその分子的なメカニズムは長らく不明である。特に、真核細胞の染色体分配で重要なチューブリンやアクチンが原核細胞には存在していないことから、全くことなる染色体の移動機構が考えられてきた。しかしながら、チューブリンやアクチンといった細胞骨格タンパクが原核細胞に見いだされ、その一部は DNA の移動機構に関与していることが近年、明らかにされた。

バクテリアの性決定因子である F プラスミドは固有のプラスミド移動機構を持っており、これは 3 つの遺伝子により構成されている。この移動の分子機構を明らかに

するため蛍光タンパク標識方法を利用して、生きた細胞内でプラスミドの移動とその移動のためのモータータンパク質 SopA を観察した。プラスミドと SopA タンパク質は細胞内をそれぞれ周期的に移動しその局在を変化させる。このとき、SopA タンパク質は細胞の極付近に凝縮し強い蛍光輝点として観察される。さらに、この構造とは別に、SopA タンパク質は繊維状の構造体を形成し、細胞内をらせん状に走る。この構造が、プラスミドの移動とその方向性の決定に重要な働きを持つものを考えられる。らせん状 SopA の構造変化を生きた細胞内で追い、プラスミドの運動性を作り出す機構を探っている。

(9) 細胞死 DNA 断片化の生理学

水田龍信 (東京理科大学生命科学研究所)

多細胞生物の細胞死は、顕微鏡下での形態学的特徴から、ネクローシスとアポトーシスの 2 つに大別される。過剰な外的刺激による強引な細胞死であるネクローシスに対して、アポトーシスは遺伝子に制御された自発的な細胞死であり、形態形成、神経系、免疫系の確立など、基本的な生命現象に深く関与している。しかし、その生理的メカニズムに関しては不明な点が多い。アポトーシスの生化学的特徴として有名なものに、ヌクレオソーム単位での DNA 断片化がある。この現象はリンカー部位での DNA の切断として説明されているが、コアのヌク

レオソーム単位が 146 塩基対に対して、観察される DNA 断片が 180~200 塩基対とやや長く、単純にリンカー部位での切断だけでは説明できない。我々はこれまで、アポトーシス時の DNA 断片化を触媒する酵素の一つに注目し解析を行ってきた。その結果、この酵素が働くためにはリンカーヒストンが必要であることを見出した。このことは、リンカーヒストンのリンカー-DNA 結合部位がこの酵素の標的となることを示している。リンカーヒストンは染色体の折り畳みに必須とされてきたが、染色体の分解にも重要な機能を有することが示唆された。

(10) DNA に印された配列以外の情報を読む

大山隆, 福江善朗, 井上正太郎, 隅田周志, 棚瀬潤一 (甲南大学理工学部)

DNA の塩基配列と構造は、コインの表と裏のように切っても切れない関係にある。したがって、同じ塩基配列をもつ DNA が同じ構造をもつことは当然としても、意外なことに、異なった塩基配列をもつ DNA が同じような高次構造をとったり、似たような機械的特性をもったりする場合がしばしばある。最近になって、DNA のこのような高次構造や特性は遺伝情報の一つ（高次の遺伝情報）となっていて、世代を越えてクロマチンを再現するために機能したり、遺伝子発現を保証するためのクロマチンの構築や維持に寄与したりしていることが明らかになってきた。

我々はこれまでの研究で、負の超らせんを擬態したベント DNA がクロマチン内の DNA の空間的位相を制御して、転写活性化因子などが標的配列に結合できるように

していることを明らかにしてきた。これとは別に、最近我々は、クラス II 遺伝子のプロモーターには共通の機械的特性があることを発見した。興味深いことに、プロモーターとは無関係な DNA 断片にこの特性をもたせると、この断片が細胞内でプロモーターとして機能することが明らかになった。また我々は、DNA が自己集合する性質をもっていることも見出した。DNA の自己集合は生理的濃度のマグネシウムイオン存在下で起こり、混合 DNA 溶液中でも起こる。この現象は、反復配列の折り畳みや、相同的組換え、減数分裂時の染色体対合など、さまざまな生命現象に関与している可能性がある。本研究会では、DNA のコンフォメーションや機械特性に隠された遺伝情報と DNA の自己集合現象の生物学的意義について議論する。

(11) 地球上は細胞外 DNA だらけ？—微生物バイオフィームから見た DNA—

野村暢彦 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)

海洋に浮遊する細胞外 DNA の大規模解析が Venter によりなされ約二千種に属する新規遺伝子が検出された。海洋以外にも多くの地球環境で細胞外 DNA の報告が相次いでいる。また、それらの DNA 長は数十キロ bp という遺伝子情報を有するのに十分な点も興味深いところである。

一方、その地球環境上のあらゆるところで微生物は同種あるいは異種の微生物細胞と細胞外高分子物質（細胞外マトリクス）からなるバイオフィームを形成し集団生活を送っていることが明らかとなってきた。興味深

いことに、このバイオフィームを構成する細胞外マトリクス中には細胞外 DNA が含まれており、DNase 処理を行うとバイオフィーム形成能が失われる。それは DNA が細胞内の遺伝情報の発現や維持だけでなく、細胞外においては“遺伝”とは全くことなる働きを司っている可能性を有していることを示唆している。

以上の背景を中心に、微生物バイオフィーム形態の三次元時空間解析からの DNA についてと、さらに DNA の物性についての研究を紹介させていただき議論の材料とさせていただきます

(12) 植物細胞における生体防御・プログラム細胞死・細胞周期制御のクロストーク

朽津和幸 (東京理科大学理工学部)

植物は動物のように移動して不利な環境から逃げる代わりに、病原体の感染を認識し、生体防御応答を誘導す

るなど、悪環境や外敵から自分を守る巧妙な自然免疫システムを進化の過程で獲得して来た。感染防御応答の過

程では、感染部位の細胞が自律的な細胞死を起こすと同時に、周辺の組織で迅速な防御遺伝子発現や抗菌性物質の合成などが誘導され、病原体の増殖と拡散を阻止する。この細胞死は、動物のアポトーシスとの類似点や相違点が指摘されているが、その機構は未解明の点が多い。病原菌由来のタンパク質を感染シグナルとして認識し、高度に同調的に自律的な細胞死が誘導される培養細胞を用いた実験系を構築し、解析した結果、自然免疫・細胞死シグナル伝達系が細胞周期の時期により厳密に制御され、細胞死に先立ち細胞周期が特定の時期に停止するとい

う、細胞周期と細胞死のクロストーク機構の存在が明らかとなった。細胞死制御の分子機構を解析するため、動植物ゲノムの比較解析の新しい手法を開発し、新規細胞死制御因子の同定と機能解析を試みている。アポトーシス抑制因子 IAP の相同遺伝子は植物ゲノム中に見出されないが、BIR ドメインと共通の起源から進化したと考えられる BLD (BIR-like domain) を持つ新規遺伝子群 ILP ファミリーを発見した。ヒトにも ILP が存在し、HsILP1 はヒト培養細胞のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

(13) Analytic theory for DNA condensation

石本志高, 菊池伯夫 (理化学研究所)

二重らせん DNA 鎖は、多量のマイナス電荷をまとった高分子一本鎖である。しかし、適当な水溶液中では電荷がさえぎられ自由な半屈曲性高分子鎖となる。さらに、spermine(4+), spermidine(3+), Mg^{2+} 等のプラスの多価イオンを加えると、鎖間にファンデルワールス力に似た短距離有効引力が生じることも知られていた。加えてここ十年の研究で、トロイド状 (ドーナツ状の形態) に巻きついた状態が基底状態の第一候補であることが分かってきた。この DNA 凝縮と呼ばれる現象では、運ぶ遺伝情報や線状・環状の違いに依らず、また DNA の全長にも鈍感で、経験的に一定の半径に巻きつくことが知られている。DNA 輸送等 DNA マニピュレーションへの応用が

期待されている。

これら構造転移に関する物理的過程は、数理モデルでモデル化され、自由エネルギーに関して分子動力学やモンテカルロ計算で一定の理解が得られてきた。けれど、引力ありでは非常に煩雑になり、また、これらのアプローチでは予言性を持つ解析的な理論に至らない。我々は、このモデルをファインマン的な経路積分において引力項付きで定式化し、解析的にトロイド状態を導出した。さらに、構造を決めるパラメータを発見し、これを基にウィップ (ロッド) -トロイド相転移や共生相、グローブール -トロイド相転移、コイル -ウィップ相転移等、構造相転移を議論する。

(14) ゲノム生理学研究会への提言

永山國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

この研究会の主旨は分子生物学を越えた DNA 情報の生物学的、生理学的活用にある。昨年もゲノム構造研究は、配列構造から物理構造へと肉薄し、本丸のクロマチン立体構造へ向かうべしと提言した。今年はさらに踏み込んだこの研究会の出口について社会連携の提言を行いたい。

2002 年よりスタートしたもう 1 つの研究会「電子位相顕微鏡の医学的・生物学的応用」は大変生産的で、約 10

の研究グループと共同研究を行い、特許 4 件、論文発表済 6 報、投稿予定 5 報の成果をあげた。さらに来年度研究会の延長線上に、私を代表者とし研究会メンバー数人を分担者とする特別推進研究を応募するまでだった。その内容は位相差電子顕微鏡法をさらに発展させ、トモグラフィーと融合し、生命時系列現象の「4 次元アトラス」作りを行うものである。無染色氷包埋法の確立により生物電顕の効率が 100 倍向上したことがこうした時間

空間4次元電顕（4次元アトラス）の作成を可能にしている。

ゲノム生理学研究会もこうした大型のプロジェクトに発展する余地を持っている。しかし、そのためにはしっかりとした研究会の出口が見えなければならない。

体細胞遺伝変異による癌関連病，生殖細胞遺伝変異による遺伝病等の診断に染色体構造異常の検出は欠かせない。しかし何を持って染色体構造異常を定義するのか。この研究会はそこに切り込めるはずだ。我々は DNA 配

列構造，DNA トポロジー構造，DNA 物理構造，クロマチン構造，染色体構造，核構造など幅広い階層構造を研究対象としており，これらの相互関連をつかまえられる数少ない研究者集団と言える。現在，国はポストゲノムのプロジェクトとして「染色体構造異常と病態診断」を大きな目玉にしようとしている。ここを1つの出口と見据え，社会への提言可能な研究者集団に成長し，我々独自のプロジェクトを提案できる実力を身につけたい。

20. 唾液腺研究からの生理機能研究, その戦略的展開

2006年2月24日-2月25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) マウス顎下腺の器官形成過程での細胞動態: 高圧凍結/凍結置換 (HPF/FS) 法の
応用による微細構造学的解析
松浦 幸子 (松本歯科大学・口腔解剖学)
- (2) 唾液腺の上皮管腔形成におけるクロロディンの役割
檜枝洋記 (大阪大学大学院・理学研究科生物科学専攻)
- (3) ラット顎下腺腺房細胞のタイト結合と細胞骨格の構造変化
橋本貞充 (東京歯科大学・病理学, 口腔科学研究センター)
村上政隆 (自然科学研究機構生理学研究所・ナノ形態生理)
- (4) ラット唾液腺 AQP5 と AQP1 に対する自律神経切除及び SNI-2011 投与の影響
李 雪飛, 細井和雄 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子生理学分野)
- (5) AQP5 は傍輸送経路調節のシグナルを受容するのか?
村上政隆 (自然科学研究機構生理学研究所・ナノ形態生理)
Murdiastuti K (Gadjah Mada 大学歯学部 歯周病学, Jogjakarta, Indonesia)
細井和雄 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス専攻口腔分子生理学)
Hill AE (Cambridge 大学, 生理学研究室)
- (6) ラット耳下腺における aquaporin-6 の存在
松木美和子, 橋本貞充 (東京歯科大学口腔科学研究センター, 同病理学講座)
道家洋子, 佐藤慶太郎 (日本大学松戸歯学部生理学)
下野正基 (東京歯科大学口腔科学研究センター, 同病理学)
杉谷博士 (日本大学松戸歯学部生理学)
- (7) 発生工学的トレーシングによる特定味覚伝導路の可視化
杉田 誠, 柴 芳樹
(広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医学専攻・病態探究医科学 (口腔生理学))
- (8) ラット上唾液核細胞への抑制性シナプス入力に関する検討
藤井 昭仁 (岡山大学医歯薬学総合研究科・口腔生理学分野)
- (9) 摂食飼料の性状とラット顎下腺唾液分泌の分析
小橋 美由紀 (岡山大学医歯薬学総合研究科・口腔生理学分野)
- (10) 分泌型 IgA の細胞内輸送機構
浅野正岳, 小宮山一雄 (日本大学・歯学部病理学)
- (11) 耳下腺腺房細胞の開口放出における cAMP 分解系の役割
杉谷博士 (日本大学松戸歯学部・生理学)
西連寺央康 (同・歯科麻酔・生体管理学), 佐藤慶太郎 (同・生理学)
- (12) 耳下腺腺房細胞のアミラーゼ分泌機構における Rab エフェクターと SNARE の関係
今井あかね, 梨田智子, 下村浩巳 (日本歯科大学新潟歯学部・生化学・先端研究センター)
福田光則 (理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット)

【参加者名】

松浦幸子（松本歯大口腔解剖）、檜枝洋記（大阪大大院理生物）、橋本貞充（東京歯大）、李雪飛（徳島大大院）、松木美和子（東京歯大）、佐藤慶太郎（日本大松戸歯）、杉田 誠（広島大大院医歯薬）、藤井昭仁（岡山大大院

医歯）、小橋美由紀（岡山大大院医歯）、杉谷博士（日本大松戸歯）、浅野正岳（日本大歯）今井あかね（日本歯大新潟歯）、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糸に、1)全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)形態形成と補修のテーマを討論することにより横糸として紡ぎ、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第2回目が開催された。

(1) マウス顎下腺の器官形成過程での細胞動態：高圧凍結/凍結置換 (HPF/FS) 法の応用による微細構造学的解析

松浦 幸子（松本歯科大学 口腔解剖第2）

マウス顎下腺の発生は胎生 11 日、口腔粘膜上皮が増殖肥厚し直下の間葉組織に陥入する出芽成長に始まる。上皮塊はその後、増殖と分枝を繰り返し樹状に分岐した導管とその先端の腺房に分化し基本形態がつくられる。腺原基として確認される E13 以降、上皮塊先端部は球状であり（終末球）、下方成長と分枝のみでは説明できない増殖成長様式が存在することを示す。終末球・上皮細胞は重層から単層になり、腺腔・管腔を備えた腺房と介在部に形態分化し、次いで唾液の合成、分泌、輸送を行う

機能的分化を遂げる。この形態変化に関与していると考えられる細胞内の可溶性物質の局在については、これまで技術的な問題から解明が進んでいなかった。そこで顎下腺の器官形成過程での細胞動態を、細胞・組織内での物質の保持、不動化に優れている高圧凍結/凍結置換 (HPF/FS)法を応用した微細構造学的解析で明らかになったことを紹介し、唾液腺器官形成研究への新たな視点を提供する。

(2) 唾液腺の上皮管腔形成におけるクローデインの役割

檜枝洋記（大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻）

哺乳類の唾液腺における上皮管腔形成は、細胞シートの単純な変形・伸長によるものではなく、組織構築のダイナミックな変化を伴っている。すなわち、口腔上皮細胞シートから細胞塊が形成された後、その内部に腔が生じ、外界と通じることによって管腔構造が完成する。この過程がタイトジャンクション(TJ)やアピカル膜の新たな形成を伴っていることに着目し、マウス胎仔唾液腺の

上皮管腔形成過程における TJ 分子クローデインの役割を解析した。培養唾液腺原基におけるクローデインの発現を阻害すると、上皮管腔形成が著しく抑制された。また、アピカル膜分子の発現・局在が阻害され、アピカル膜の微細構造にも異常が見られた。クローデインがアピカル膜形成と共役することによって唾液腺の上皮管腔形成に寄与している可能性について考察する。

(3) ラット顎下腺腺房細胞のタイト結合と細胞骨格の構造変化

橋本貞充 (東京歯科大学・病理学講座, 口腔科学研究センター)

村上政隆 (自然科学研究機構生理学研究所・ナノ形態生理学)

タイト結合の選択的透過機構の解析を目的として, ラット唾液腺下腺を用いた, 急速凍結法によるディープエッチング・フリーズフラクチャーレプリカ法により, タイト結合と腺腔側膜直下の細胞骨格の超微構造変化について検討した。タイト結合を構成する膜内粒子は, 細胞膜直下に介在する短小な微細線維を介し, 深部のアクチン線維束と直接結合していた。CCh/IPR 混合刺激により, 腺腔面の平滑化と分泌顆粒の融合が起こると共に, タイト結合を構成する膜内粒子の配列が変化し基底側方向に

伸長した。タイト結合の膜内粒子と細胞膜を裏打ちする短小な微細線維を介して, 直下のアクチン線維との直接結合しており, タイト結合部および腺腔側膜直下のアクチン線維束は, 非刺激群に比べ刺激群ではより密となっていた。このことから, 腺腔側細胞膜直下のアクチン細胞骨格の動的な構造変化にともない, タイト結合の膜貫通蛋白の局在が変化し, 傍細胞輸送経路の透過性が亢進する可能性が示された。

(4) ラット唾液腺 AQP5と AQP1に対する自律神経切除及び SNI-2011投与の影響

李 雪飛, 細井和雄 (徳島大学大学院ヘルスパイオサイエンス研究部口腔分子生理学分野)

【目的】本研究はラット顎下腺における水チャネル, アクアポリン(AQPs)の自律神経系による調節機構を明らかにする目的で行った。

【方法】7週齢雄性のSDラットを用い, 顎下腺を支配する自律神経である交感神経または副交感神経切除を上頸神経及び鼓索神経を切断することにより行った(それぞれCSTD, CTDとする)。術後15日目からSNI-2011(10mg/kg), ピロカルピン(0.3mg/kg)クロロキン(50mg/kg)を連続7日間経口投与した。AQP5とAQP1の蛋白質レベルをウェスタンブロッティングで, 又mRNAレベルをノーザンブロッティングとRT-PCR, リアルタイムPCRにより解析した。

【結果】CSTDはAQP5及びAQP1蛋白質レベルに大きな影響を与えなかった。CTDはラット顎下腺の重量とAQP5蛋白質レベルを減少させたが, AQP5 mRNAレベルには顕著な影響を与えなかった。CTDラットに対するムスカリ

ンM3アゴニスト, SNI-2011の投与は, 低下したAQP5蛋白質含有量を著明に回復させ, AQP1含有量を増加させたが, ピロカルピン投与はこれらに影響を与えなかった。SNI-2011投与はAQP5及びAQP1 mRNAレベルに顕著な影響を示さなかった。CTDはリソソーム酵素カテプシンB, D, Eの活性を上昇させ, SNI-2011はこの上昇を抑制した。カテプシンB, D, EのmRNAレベルもCTDにより上昇したが, SNI-2011はこの上昇を抑制しなかった。リソソーム変性剤であるクロロキンの投与によりリソソームを変性させ, その機能を抑制すると, 副交感神経切除により減少したAQP5の発現は回復した。

【結論】副交感神経によるAQP5発現レベルの調節は転写レベルによるのではなく, リソソーム酵素系により制御されていると考えられた。

(5) AQP5は傍輸送経路調節のシグナルを受容するのか？

村上政隆（自然科学研究機構生理学研究所，ナノ形態生理）

Murdiastuti K（Gadjah Mada 大学歯学部 歯周病学, Jogjakarta, Indonesia）

細井和雄（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス専攻口腔分子生理学）

Hill AE（Cambridge 大学, 生理学研究室）

灌流顎下腺(SMG)を用い，carbachol 刺激による水分分泌速度を電子天秤にて測定しながら，sucrose 添加により灌流液の浸透圧を上昇させると，水分分泌は減少する。しかし，浸透圧差により水分分泌が駆動されたとした場合の予測値より大きな分泌速度の減少が観察される。この現象は，浸透圧を AQP5 が感知し，傍細胞輸送が浸透圧に応じ調節されているモデルによれば説明できる(Hill & Shachar-Hill, 2006)。遺伝的に SMG の AQP5 が低く発現したことを Western-blot で確認しながら AQP5 を非常に低発現させたラット (Murdiastuti, K. *et al.* 2002)を用い，

灌流 SMG 高浸透圧実験を行なった結果，水分分泌は水分分泌が浸透圧差により駆動されたとした場合の予測値と一致した。これらの AQP5 低発現ラットでは傍細胞輸送の調節が失われ，浸透圧差に従った分泌が行なわれたことを示唆している。一方，Hg イオンを SMG 導管から逆行性に注入すると Hg 濃度に依存して水分分泌は阻害されたものの，高浸透圧による水分分泌現象は浸透圧差で予測される変化は正常ラットと同様であった。これらの結果は AQP5 と傍細胞輸送を含むフィードバック制御回路の存在を示唆している。

(6) ラット耳下腺における aquaporin-6の存在

松木美和子，橋本貞充，下野正基（東京歯科大学 口腔科学研究センターおよび病理学講座）

道家洋子，佐藤慶太郎，杉谷博士（日本大学松戸歯学部 生理学教室）

Aquaporin (AQP)は，水を選択的に透過する機能をもつ 6 回膜貫通型のチャンネルタンパクとして発見された。現在，AQP0-AQP12 までの 13 種類が同定・報告されており，さらに，水以外にグリセロール，尿素，脂質，イオンの透過機能を持つタイプも明らかとなった。AQP は細胞形質膜に局在し，ほ乳類においては，消化管，肝臓，脳，肺などの臓器に分布するとともに，細胞内小器官の膜上にも存在し，刺激に応じて局在の変化するタイプも存在する。我々は，唾液腺における AQP の存在を検討し

たところ，ラット耳下腺における AQP6 mRNA の発現を RT-PCR にて確認した。また，AQP6 タンパク質の発現を抗 AQP6 抗体を用いた western blotting により確認した。さらに，共焦点レーザー顕微鏡により AQP6 が介在部導管および腺房細胞のタイト結合付近に局在すること，また，b レセプター刺激により局在が変化することを認めた。これらのことから，ラット耳下腺に AQP6 が発現し，分泌機能に関与する可能性が示唆された。

(7) 発生工学的トレーシングによる特定味覚伝導路の可視化

杉田 誠，柴 芳樹

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座 (口腔生理学))

生物は有害物質の摂取をさけ，必要栄養物質を摂取するために，進化の過程で味覚受容の多様性を獲得しまし

た。哺乳類は，塩味，酸味，甘味，苦味，うま味の 5 つを基本味として認識します。そして味覚は 5 基本味の組

み合わせで、認知されます。味を感知する細胞(味細胞)に発現する味覚受容体に、味物質が結合することにより惹起される味覚情報は、複数の神経細胞を介し、脳内の各種神経細胞に投射され、受容・識別されるとともに、唾液分泌反射、行動的・情動的反応を惹起します。しかし、味覚情報がどのように脳に伝達され味覚が認識されるか、また味覚刺激により誘発される反射・反応が惹起されるかについては不明な点が多く存在します。そこで自身の研究では、発生工学的アプローチを用いて、苦味および甘味情報を伝導する神経回路を可視化することで、味覚認識が脳内でいかに行われるかを明らかにしようと試みました。特にマウスにおいて、苦味受容体もしくは甘味/うま味受容体を発現し、苦味もしくは甘味/うま味を感知する味細胞に、シナプス間を移動するトレーサータンパク質(tWGA-DsRed)を選択的に発現させ、脳内

でトレーサーに標識される神経細胞の位置を比較したところ、苦味と甘味の情報を伝導する脳内神経回路に差異がみられ、延髄弧束核・橋結合腕傍核・視床後内側腹側核において、甘味受容味細胞からの入力を受ける神経細胞群は、苦味受容味細胞からの入力を受ける神経細胞群に比べ、より前方に配置していました。大脳皮質味覚野と扁桃体においては、部分的重複と分離が観察されました。観察された苦味と甘味の情報を伝導する脳内神経回路の差異は、味覚識別を可能にする神経基盤の一端を示していると考えられ、このトランスジェニックマウスは、味覚受容・識別を可能にする神経細胞群の細胞機能、唾液分泌反射や行動的・情動的反応を惹起する神経回路基盤、そして神経回路の構築に関与する分子を解明するために、有効に用いることができると考えられました。

(8) ラット上唾液核細胞への抑制性シナプス入力に関する検討

藤井昭仁 (岡山大学医歯薬学総合研究科 口腔生理学分野)

近年、上唾液核細胞へのシナプス入力において、興奮性はグルタミン酸、抑制性は GABA_A およびグリシン受容体を介することが明らかとなった。唾液腺活動は上位中枢からの制御を受けているが、抑制性入力に注目した研究は未だなされていない。本研究では、除脳および正常ラットの矢状断新鮮脳スライス標本を用い、1) GABA およびグリシンの灌流 2) 上唾液核周囲の電気刺激で誘発される抑制性シナプス後電流をホールセルパッチクラ

ンプ法にて測定した。除脳動物の 17% (n=7/41)では上位中枢からのみ抑制性入力を受けていることが示唆された。83% (n=34/41)では上位および下位中枢から抑制性入力を受けていることが示唆された。本研究において全ての上唾液核細胞は上位中枢から抑制性入力を受けていることが明らかとなった。このことから唾液分泌は興奮性入力のみならず上位中枢からの下行性抑制性入力によっても調節されていることが示唆された。

(9) 摂食飼料の性状とラット顎下腺唾液分泌の分析

小橋美由紀 (岡山大学医歯薬学総合研究科・口腔生理学分野)

【目的】摂食時に唾液分泌が誘発されることはよく知られている。本研究では、顎下腺からの唾液分泌量を測定し、様々な性状の飼料を摂取した時の唾液分泌動態について検索した。

【方法】ラットを測定箱の中で、自由に摂食・飲水出来るよう訓練をした。訓練を終えたラットに、麻酔下で顎下腺カニューレと両側咀嚼筋筋電図用電極を装着し、唾液分泌量と咬筋活動量を測定した。

【結果】1) 3 分間の唾液分泌量は粉末飼料、硬ペースト状飼料、中ペースト状飼料、固形飼料、軟ペースト状飼料の順に多かった。2) 摂食飼料の乾燥重量は軟ペースト状飼料、中ペースト状飼料、硬ペースト状飼料、そして粉末飼料と固形飼料の順に多かった。3) 3 分間の筋活動量は種々の飼料で似通っていた。4) 歯ぎしりは記録中に大きな筋活動を引き起こしたが、唾液の分泌は誘発しなかった。このことから唾液分泌は、単に顎運動や歯根膜感覚だけでは

生じないことが考えられた。また、飼料の水分含有量などの性状が分泌量に影響することがわかった。

(10) 分泌型 IgA の細胞内輸送機構

浅野正岳, 小宮山一雄 (日本大学 歯学部 病理学教室)

口腔は消化器系・呼吸器系組織の門戸であり、常に外来抗原にさらされている。これら抗原の生体内への侵入は、血清由来の IgG 分子を中心とする全身免疫および唾液腺をはじめとする口腔由来の局所免疫（粘膜免疫）により制御されている。局所免疫において主体的働きを担う分子が分泌型 IgA (S-IgA) であり、IgA2 分子 (2 量体 IgA) と joining chain (J chain) および 2 量体 IgA のレセプターである polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) の細胞外領

域である secretory component (SC) から構成されている。これら S-IgA の構成成分である IgA および J chain は上皮下の形質細胞により、また SC は上皮細胞により産生される。上皮細胞内の S-IgA の輸送経路については MDCK 細胞のシステムにより多くのことが解明されて来た。本発表では S-IgA の上皮細胞内輸送経路について概説し、最近新たに注目されている pIgR の機能についてまとめてみたいと考えている。

(11) 耳下腺腺房細胞の開口放出における cAMP 分解系の役割

杉谷博士, 佐藤慶太郎 (日本大学松戸歯学部 生理学講座)
西連寺央康 (日本大学松戸歯学部 歯科麻酔・生体管理学講座)

耳下腺腺房細胞においては、 β アドレナリン受容体刺激により細胞内 cAMP 濃度の上昇が起こり、消化酵素アミラーゼの開口放出が引き起こされる。細胞内 cAMP の合成に関しては、受容体に共役した三量体 GTP 結合タンパク質の活性化に引き続くアデニル酸シクラーゼの活性化に依存する。一方、cAMP 分解は、分解酵素である cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) が担っている。現在、PDE には基質特異性、阻害剤親和性、活性調節機構等が異なる 11 種類の PDE ファミリーが報告されている。我々は、ウサギ耳下腺腺房細胞のアミラーゼ開口放出における cAMP 分解系の役割を検討した。

アミラーゼ分泌に対する PDE 阻害剤の効果を検討したところ、非刺激時のアミラーゼ分泌に対する効果は認められなかったが、rolipram の存在下で β アゴニストであ

るイソプロテレノールによるアミラーゼ分泌が促進された。細胞内 cAMP 濃度に対する rolipram の効果を検討したところ、イソプロテレノールによる cAMP 産生が有意に促進された。陰イオン交換カラムによりウサギ耳下腺腺房細胞の cAMP-PDE を部分精製したところ、 Ca^{2+} 、カルモジュリン、cGMP などには非依存性の活性を示した。また、部分精製画分において抗 PDE4B 抗体と反応するバンドが認められた。さらに、抗 PDE4B 抗体を用いて免疫沈降を行った後の部分精製画分には cAMP-PDE 活性は認められなかった。

以上の結果より、ウサギ耳下腺腺房細胞では PDE ファミリーのうち PDE4B が存在し、 β 受容体の活性化を介する調節性開口放出の調節に関わることが示唆された。

(12) 耳下腺腺房細胞のアミラーゼ分泌機構における Rab エフェクターと SNARE の関係

今井あかね¹, 梨田智子¹, 下村浩巳^{1, 2}, 福田光則³

(日本歯科大学新潟歯学部¹ 生化学講座・²先端研究センター, ³理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット)

我々はラット耳下腺腺房細胞内の soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor (SNARE) の局在とイソプロテレノール(IPR)刺激によるアミラーゼ分泌に対する Rab27 とそのエフェクターの関与を明らかにしてきた。Rab は真核細胞において細胞内膜輸送をコントロールする低分子量 GTPase でエフェクターによって制御を受けている。一方、唾液腺の開口分泌メカニズムに SNARE 仮説を当てはめた検証がなされてきたが、具体的には不明な点が多かった。この別々と思われてきたメカニズムの共役を解明するために、Rab3, Rab8, Rab27 の共通エフェクターである Slp4-a/granuphilin と t-SNARE である

syntaxin の相互作用がアミラーゼ分泌に関与しているかどうかを調べた。COS-7 細胞に Slp4-a, Munc18-2, syntaxin2 または 3 を発現させ相互作用を調べた結果、Munc18-2 依存的に Slp4-a と syntaxin が結合した。また、Slp4-a の syntaxin との結合ドメインである Slp4-a-linker domain の GST 融合タンパク質あるいは Slp4-a-linker domain に対する抗体をストレプトリジン O 処理腺房細胞に導入すると、濃度依存的に IPR 刺激によるアミラーゼ分泌を阻害した。これらの結果から、IPR 刺激によるアミラーゼ分泌に Slp4-a と syntaxin の相互作用が関与していることが示唆された。

21. 生物ロコモーションの統合的研究

2005年11月24日－11月25日

代表・世話人：東島眞一（岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化）

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・神経分化）

- (1) 卵由来精子活性化ペプチドによる精子鞭毛運動修飾の解析
馬場昭次（お茶の水女子大大学院・人間文化・人間環境科学）
- (2) 海生プランクトンの運動とチャネル
筒井泉雄（一橋大学・生物）
- (3) 尾索動物オタマジャクシの遊泳運動
西野敦雄（岡崎統合バイオ・時系列生命現象・神経分化）
- (4) プラナリアの行動制御を担う脳機能と神経回路網の解析
阿形清和（京都大学・生物物理）
- (5) 魚類の遊泳を支配する中枢神経系の形態と機能
植松一眞（広島大大学院・生物圏科学・水族生理学）
- (6) 硬骨魚後脳の分節構造にもとづいて構築された逃避運動回路と
小田洋一（名古屋大大学院・理・生命科学）
- (7) ゼブラフィッシュの脊髄神経回路の構築
東島眞一（岡崎統合バイオ・時系列生命現象・神経分化）
- (8) 昆虫の匂い源探索の行動制御機能
神崎亮平（東京大大学院・情報理工学・知能機械情報学）
- (9) 生物運動の力学シミュレーション
劉浩（千葉大・工・電子機械工学・生物機械）
- (10) ウサギ跳躍運動の発現・制御機構：ネコ歩行制御系との比較
松山清治（札幌医大・医・第二生理）
- (11) 歩行における運動軌道計画
西井淳（山口大・理・自然情報科学科）

【参加者名】

馬場昭次（お茶の水女子大大学院）、筒井泉雄（一橋大学）、西野敦雄（岡崎統合バイオ）、阿形清和（京都大学）、植松一眞（広島大大学院）、小田洋一（名古屋大大学院）、東島眞一（岡崎統合バイオ）、神崎亮平（東京大大学院）、劉浩（千葉大）、松山清治（札幌医大）、西井淳（山口大）、岡村康司（岡崎統合バイオ）、柴小菊（東京大学）、小橋常彦（名古屋大学）、谷合由章（山口大学）、

日置智子（山口大学）、衣川亜衣子（神戸大学）、久木田文夫（岡崎統合バイオ）、岩崎広英（岡崎統合バイオ）、村田喜理（岡崎統合バイオ）、木村有希子（岡崎統合バイオ）、黒川竜紀（岡崎統合バイオ）、MD.ISRAIL HOSSAIN（岡崎統合バイオ）、佐々木真理（岡崎統合バイオ）、佐藤千恵（岡崎統合バイオ）、野田昌晴（基生研）

【概要】

生物のロコモーションは、ゲノムにより決定された生物種毎に異なるスケール、形態に規定されながら、それに伴う物理環境に適用できるような大きな多様性を示

す。その一方で、それを構成する分子や細胞特性、神経回路などのユニットは共通なものを使用しており、マクロな共通原理に裏付けられている。このように共通の構

成分に依存しながらも生物種によって特化した生理機能を発揮できるシステムの理解は、ポストゲノム時代の生物学や生理学の大きな目標のひとつとも位置付けられる。多様な生物のロコモーションの原理を理解することは、単に生物の生理機構を解明することに留まるのではなく、医用工学への応用、マイクロマシンの開発、ロボティクスへの応用など、21 世紀の人間社会に密接に関わる工学分野へと大きく波及する可能性が期待される。今回は、平成 14 年度に行なわれた研究会に引き続き、

ロコモーションの要素と構成に焦点を当て、基礎生物学分野のロコモーション研究者(無脊椎動物鞭毛繊毛運動、尾索動物オタマジャクシ)、数理科学的立場の研究(エネルギー効率や流体力学の立場からの数理シミュレーション)、神経解剖学的視点(頭足類の高速処理神経システム、脊椎動物型中枢神経回路)、イオンチャネルなどの分子的要素の視点(筋細胞膜特性)の各分野から研究者を集め、一泊二日での研究会を行なった。

(1) 卵由来精子活性化ペプチドによる精子鞭毛運動修飾の解析

馬場昭次 (お茶の水女子大大学院・人間文化・人間環境科学)

受精は、卵と精子の相互作用によって成り立っている。卵ゼリー層に含まれる因子が、精子の運動活性化、卵への走化性、先体反応、種特異的な膜認識など、様々な受精の過程に深く関わっていることは、ほ乳類を始めとする多くの生物で知られている。その中でも、低分子で拡散性の精子活性化因子は、卵から離れた精子にも作用することができ、広範囲にわたって卵と精子の相互作用を仲介し、受精の過程において重要な役割を果たしていると考えられている。

ここでは、ウニの精子活性化ペプチドの一つである speract について、そのケージド体を用いて speract の作用で精子の鞭毛運動が非対称性を増すことを示した実験、LED ストロボ照明を蛍光の励起に用い鞭毛内カルシウムイオンの変動と鞭毛運動を同時に測定した実験、ホヤ精子の活性化・走化性誘因因子である SAAF を用いて行った精子の走化性行動時における鞭毛運動の変化の詳細な解析などについて報告した。

(2) 海生プランクトンの運動とチャネル

筒井泉雄 (一橋大学)

筋の進化を考える上で平滑筋から骨格筋への変遷は最も注目すべき項目の 1 つである。筋の構造の変化以上に機能(筋細胞収縮の際の細胞内 Ca イオン濃度増加プロセス)の変化は特筆すべきものである。平滑筋では Ca の細胞外から細胞内へ流入が必須であるが、骨格筋においては Ca の細胞外から細胞内へ流入は必須ではなく、細胞内 Ca の増加は細胞内の Ca 貯蔵部位からの放出によって制御されている。骨格筋収縮時における細胞内 Ca イオン濃度増加プロセスは、脊椎動物骨格筋細胞においては興奮収縮連関(Excitation-Contraction ; E-C coupling)として報告(Schneider & Chandler 1972)され、T 管膜に存在している機能分子 Dihydropyridine(DHP)受容体が、膜の脱分極を感知し細胞内 Ca を貯蔵部位から遊離させる

ことが報告されている。膜の脱分極を感受し細胞内 Ca を遊離させる機構(Depolarization-induced-Ca-release ; DICR)の有無が骨格筋と平滑筋を分けていると考えられ、この情報伝達を司る機能分子 Dihydropyridine(DHP)受容体の作用実体は膜内電荷移動(Charge Movement : CM)として捉えられている。DHP 感受性の CM の有無を骨格筋平滑筋分離の指標とすることができることから、動物進化の段階において重要な位置を占めている海生プランクトンを用いて、この DHP 感受性 CM の有無、運動に必須の細胞内 Ca イオン濃度増加プロセス、流入を司るチャネル特性の三者の関連解明を系統発生的に試みたので報告した。

(3) 尾索動物オタマジャクシの遊泳運動

西野敦雄（岡崎統合バイオサイエンスセンター・時系列生命現象・神経分化）

ホヤ、オタマボヤ、ウミタルなどを含む尾索動物は、オタマジャクシ形態を生じる。そのオタマジャクシ形態は、脊椎動物のオタマジャクシに比べて著しく少数で単純な細胞構成から成り立っている。しかしながら、それぞれのオタマジャクシ形態は複数の運動パターンを示し、また鋭敏な感覚刺激に対する反応をも行うなど、その形態の単純さに関わらず、各々の遊泳に関わる情報処理は画一的ではない。

ホヤ幼生、オタマボヤ、ウミタル幼生が示す運動は、個々の神経・筋肉細胞の生理現象から体まるごとの運動を再構成することが実現できると期待される。またそれ

ぞれの運動機能の多様性、さらには脊椎動物のオタマジャクシ形態の遊泳機構との相違の理解は、各々の系統発生と適応戦略を考える上で本質的な問題を含んでいると考えられる。

以上を考え、運動パターンの高速度画像解析、筋肉細胞の電気生理学的特徴の解析、神経・筋肉系に発現しているイオンチャネル分子種の同定を進めている。現在までに定めた各動物種の運動生理学上の特徴を紹介しながら、その中で最も解析が進展しているカタユウレイボヤ幼生における結果を中心に議論を深めた。

(4) プラナリアの行動制御を担う脳機能と神経回路網解析

阿形清和（京都大学大・生物物理）

われわれは、1991年からプラナリアの再生研究の近代化に努め、特に脳の再生については重点的に取り組んできた。多くの脳で発現する遺伝子をRNAi法でノックダウンし、*nou-darake* 遺伝子を筆頭に脳の再生に関与する遺伝子を同定することに成功した。と同時に、その過程で脳の機能異常のプラナリアが多数でき、プラナリアが脳の高次機能の解明にきわめて有用な動物であることを示した。

頭部遺伝子ライブラリー由来の約5万クローンをシーケンシングし、それらの遺伝子の発現解析を行いデータベース化している。また、約1,000個の単一神経細胞につ

いて200種類の遺伝子について発現プロファイリングをしており、プラナリアの脳の神経細胞が多様化していることを個々の神経細胞の発現解析で明らかにしている。

近年、個々の遺伝子についてはRNA干渉法で機能解析が可能となっており、プラナリアは脳の再生システムと組み合わせることによって、再生脳できれいに遺伝子のノックダウンが可能である。その結果、脳の再生に関与する遺伝子、行動制御に関する遺伝子が同定できるようになった。ここでは主に、負の走行性を指標にプラナリアの行動制御に関わる遺伝子を紹介した。

(5) 魚類の遊泳を支配する中枢神経系の形態と機能

植松一眞・吉田将之（広島大学大学院生物圏科学研究科・生物圏共存科学専攻・水族生理学研究室）

サケが体側筋で産卵することを知ったことをきっかけに、我々の魚類神経科学研究が始まった。ようやくコイで遊泳中枢を同定したものの、その細胞構築と脊髄との連絡様式の解明は不十分であった。ここ数年の研究で、

内側縦束核の細胞構築の概要が明らかになった。これまで内側縦束核の一部とされていた細胞集団は動眼神経核であった。この研究には、魚類において初めてクローニングしたアセチルコリン合成酵素の遺伝子を元に作製

した mRNA プローブを用いた。さらに内側縦束核のニューロンは脊髄の末端まで軸索を伸ばし、側枝により運藤ニューロンや介在ニューロンと接続していることが分かった。また、遊泳に同期して活動するニューロンも見つかった。

また、関連した研究として、真骨魚類の小脳に特有な出力細胞である、いわゆる広樹状突起細胞の形態・伝達物質・他の脳領域との連絡様式が新たに解明された。哺乳類において小脳は運動の制御に必須の器官である。し

かしながら、魚の小脳体を切除しても、ほぼ正常に泳ぐことができる理由は未だ不明である。一方、古典的恐怖条件付けの手法によりキンギョの小脳体が記憶の場である可能性を示す結果を得た。

さらに、キンギョの最初期遺伝子 c-fos (ニューロンが活動すると発現する) をクローニングし、c-fos に対する mRNA プローブを用いて、遊泳直後に遊泳中枢のニューロンや脊髄運動ニューロンに c-fos が多く発現することを確認した。

(6) 硬骨魚後脳の分節構造にもとづいて構築された逃避運動回路

小田 洋一 (名古屋大学大学院理学研究科)

脊椎動物の脳は吻尾軸方向に並ぶ分節を一つの基本構造として成り立つ。我々は分節構造にしたがって配置されるニューロンが機能的にどのような関係にあるかを、サカナの逃避運動を制御する回路構成から理解したいと考えている。

我々はマウスナー・シリーズの入出力特性と相互結合および逃避運動における活動を調べ、以下の結果を得た。

(1) 金魚のマウスナー・シリーズは、逃避運動の誘発に必要な聴神経から同じように求心性投射を受ける。

(2) M 細胞から MiD2cm と MiD3cm へ一方方向の結合が見出され、同側へは抑制性結合、対側へは興奮性結合であった。

(3) 逃避運動中のゼブラフィッシュ稚魚から後脳 RS ニューロンの活動をカルシウムイメージングで計測した。

多くの逃避運動は M 細胞の発火を伴う (M escape) が、M 細胞の活動を伴わずに起こる逃避運動 (Non M escape) もまれに起こる。M escape の潜時は Non M escape より 5 ミリ秒短い。

(4) M 細胞を破壊すると、遅い Non M escape しか起こらない。

(5) M 細胞と MiD3cm の活動は相補的であり、それぞれ M escape と Non M escape の発現に関与すると考えられる。

これらの結果から、聴覚入力で誘発される逃避運動は M 細胞とその相同ニューロンからなる多重の回路によって制御されるが、最も潜時の短い逃避運動の発現には M 細胞が優先して働くことが必要であると考えられる。

(7) ゼブラフィッシュ脊髄神経回路の構築

東島眞一 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・時系列生命現象・神経分化)

ゼブラフィッシュ脊髄神経回路の形成機構を、発生期に少数の細胞で発現する転写因子の観点から調べている。脊髄神経回路について、発生から機能までをつなげ、また、哺乳類の対応する細胞 (特定の転写因子を発現する細胞) の回路中での機能に関して手がかりを得ることを目的としている。本研究では、alx (哺乳動物 Chx10 のゼブラフィッシュホモログ) に関する解析を中心に発

表する。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 を発現する細胞を可視化した (以下、alx 細胞と呼ぶ)。その結果、alx 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 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。仮想運動時の alx 細胞の活

動を調べた結果, *alx* 細胞にはおおまかに分けて2種類存在し, 早く産まれるものはより強い運動(逃避, 早い遊泳)時に活動し, 遅く産まれるものは通常の遊泳行動時に活動することが明らかとなった。また, どちらのタイ

プのものも運動ニューロンに興奮性のシナプス結合をしていた。これらのことから, *alx* 細胞は逃避, 遊泳時に運動ニューロンの活動を直接制御する神経細胞であることが示された。

(8) 昆虫の匂い源探索の行動制御機構

神崎亮平 (東京大学大学院情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻)

匂いは空中に分布し, 分布状態を絶え間なく複雑に変化させている。このような環境下でも昆虫は数キロメートルにわたり, たとえば雄の蛾は, 雌が放出するフェロモンの匂いを頼りに雌の居所を探し出している。われわれが暗闇で, 匂い源を探し出すことを想像すると昆虫がいかに困難な問題を解決しているかがわかる。ここでは, このような昆虫の匂い源探索行動をモデルとして, 微小な脳システムが, この問題をいかにして解決しているかを, 鱗翅目昆虫カイコガ(*Bombyx mori*)をモデルとしてま

ず(1)行動戦略から, そして(2)この行動戦略を解発する神経基盤について, ニューロンレベルでの分析結果から説明する。次に, (3)このような分析結果をロボティクスにより統合し, 昆虫の神経・行動機能に基づいた小型移動ロボットを用いた(1)と(2)の検証結果を紹介する。また, (4)実際に飛行する昆虫に超小型のテレメトリを装着することにより, 無拘束下で, 自由に飛行する昆虫の生体情報(飛翔筋活動など)を遠隔計測することが可能となってきたので, この研究結果についても併せて紹介した。

(9) 生物運動の力学シミュレーション

劉 浩 (千葉大学 工学部)

Characterized by complex geometry and complicated dynamic process, biological mechanical phenomena in swimming and flying are usually of four-dimensional nature, namely, spatial three-dimensional and one-dimensional in time. The current paradigm for understanding of power and energetics in swimming and flying relies exclusively on the consistent potential theories to analyze the physics qualitatively as well as the observations and measurements to visualize the flow so as to support the theories. We propose a new paradigm of *simulation-based biological fluid dynamics* to digitize and visualize swimming and flying by using a computational mechanical modeling of the biological fluid dynamics through

faithful reconstruction of morphology and representation of realistic kinematics of individual object. We have developed an integrated computational system as a baseline for the simulation-based biological fluid dynamics, which involves four subsystems of the morphological modeling, the kinematic modeling, the computational fluid dynamic modeling, and the post-processing for visualization. This integrated system has been validated to be feasible in modeling fluid dynamic phenomena in animal locomotion through a series of stepwise studies and applications for two realistic modeling of hydro-and aerodynamics of undulatory swimming and insect flight.

(10) ウサギ跳躍運動の発現・制御機構：ネコ歩行制御系との比較

松山清治 (札幌医科大学・医学部・生理学第二講座)

自然界において各動物種は環境や生態的地位に適応してそれぞれに特有の歩行パターンを発達させている。四足哺乳類のネコとウサギについて見ると、これらは生態系で捕食者 - 被食者の対極的地位にあり、このためネコは探索-捕獲行動に必要な低速移動のための左右交代性歩行 walk から高速移動に適する左右非交代性歩行 gallop まで幅広い歩行パターンを備えているが、ウサギは被食回避のための高速逃避行動に直結する gallop 類似の跳躍歩行 hopping を基本パターンとしている。この歩行パターンの違いはそれぞれの動物種において特異発達した歩行器官とともにその運動制御に関わる中枢神経機構の違いによると考えられる。

われわれはウサギの左右非交代性跳躍歩行とネコの左右交代性歩行の発現に関わる神経機構にどのような違いがあるかを知るため、新たにウサギ跳躍実験標本を開発し、これを用いて跳躍歩行誘発に関わる脳幹 - 脊髄神経機構の特徴について検討した。具体的には除脳ウサギ標本の中枢内で跳躍歩行誘発部位を同定し、さらに誘発された跳躍運動の動作解析も行いその特徴を明らかにした。また跳躍歩行誘発に関わる脳幹由来の下行性投射系の同定も試みた。本研究ではウサギを用いた研究で得られた成績について報告するとともに、これらを従来のネコの研究で得られた成績と比較し両動物種の歩行制御機構の特徴と違いについて考察した。

(11) 歩行における運動軌道計画

西井淳 (山口大学理学部自然情報科学科)

多足動物が歩くとき、歩容、歩幅、脚の運動周期、脚や胴体の運動軌道等の運動パラメータの選び方は無数に存在する。生体はどのようにして、その中からある1つの組合せを選んでいるのだろうか？ この問題は、生体の運動様式の理解につながるだけでなく、神経系が運動の学習・制御を行う仕組みを検討する上でも、その計算アルゴリズムの本質に関わる極めて重要な問題である。

生体が運動を行う際、その消費エネルギーを低く押さ

えることは生存確率を高くするために重要であろう。そこで、生体の様々な運動が「消費エネルギー最小化」という拘束条件に基づいて計画されているかどうかの検討を現在すすめている。今回は、(1)多足歩行における歩容・歩幅・足の運動周期、および(2)遊脚運動軌道に関する検討結果を報告した。また、歩行運動の学習制御モデルについても紹介した。

22. バイオ分子センサー研究会

2006年6月9日-6月10日

代表・世話人：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) Distribution of volume-sensitive maxi-anion channels in cardiomyocytes and its ATP releasing role
Amal K. Dutta, Ravshan Z. Sabirov, 浦本 裕美, 岡田 泰伸（生理学研究所・機能協関）
Yuri E. Korchev, Andrew Shevchuk (MRC Clinical Center, United Kingdom)
- (2) 細胞容積センサー機能を生み出す境界面分子群の相互作用
赤塚 結子（三重大学大学院医学系研究科・再生統御医学）
清水 貴浩, 岡田 泰伸（生理学研究所・機能協関）
- (3) 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・統合神経生物学）
渡辺 英治（基礎生物学研究所・神経生理学）
- (4) 代謝型グルタミン酸受容体シグナル伝達のリガンド依存性
立山 充博, 久保 義弘（生理学研究所・神経機能素子）
- (5) 機械受容チャネルの分子機構
成瀬 恵治（名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生物物理学）
- (6) 摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用
箕越 靖彦, 志内 哲也, 岡本 士毅, 斉藤 久美子（生理学研究所・生殖, 内分泌系発達機構）
- (7) 共鳴ラマン分光法が明らかにする一酸化炭素により ON/OFF が制御される転写調節因子 NPAS2 のしくみ
内田 毅（岡崎統合バイオサイエンスセンター・生体分子）
- (8) PKA/Ca²⁺シグナルを制御する線条体神経細胞質センサーの機能的連関
西 昭徳（久留米大学医学部・薬理学）
- (9) Ca²⁺センサータンパク質 NCS-1 の神経の興奮性と生存における生理的役割
西谷 友重（国立循環器病センター研究所・循環分子生理）
- (10) B リンパ球特異的アダプター分子 BCAP の機能発現機構
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）
- (11) 胆汁酸誘導体によるビタミン D 受容体活性化機構の解析
槇島 誠, 川名 克芳（日本大学医学部・生化学）
安達 竜太郎（大阪大学大学院医学系研究科）
- (12) 酸化ストレスセンサーとユビキチンライゲース：Nrf2-Keap1 システムによる酸化ストレス応答機構
小林 聡（筑波大学・TARA センター）
- (13) 生理活性脂質受容体 BLT とプロトン感知性受容体 G2A
横溝 岳彦（東京大学大学院医学系研究科・生化学分子生物学）
- (14) 電位センサーをもつイノシトールリン脂質ホスファターゼの機能
岡村 康司, 村田 喜理, 岩崎 広英, 佐々木 真理, Israil Hossain
（岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化）
- (15) 温度感受性 TRP チャネルの構造と機能
富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理）

【参加者名】

内田 毅, 岡村 康司, 岩崎 広英, 久木田 文夫, 佐々木 真理, Md. Israil Hossain, 村田 喜理, 富永 真琴, 富永 知子, 柴崎 貢志, 飯田 陶子, 稲田 仁, 曾我部 隆彰, Sravan Mandadi, 島貫 恵実, 西井 博子, 富樫 和也, 東 智広, 村山 奈美枝, 島 麻子, 三村 明史, 林 良樹, 平松 弘嗣, 永山 國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 岡田 泰伸, Amal Kumar Dutta, 清水 貴浩, 浦本 裕美, 沼田 朋大, 温井 美帆, 久保 義弘, 立山 充博, 長友 克広, 石井 裕, 箕越 靖彦, 志内 哲也, 東 幹人, Abduqodir

Toychev, 李 順姫, Elbert Lee, 鍋倉 淳一, 松本 希, 張 一成, 北村 明彦 (生理学研究所), 野田 昌晴, 檜山 武史, 清水 秀忠, 渡辺 英治, 山田 美鈴, 堀口 吾朗, 藤倉 潮 (基礎生物学研究所), 横溝 岳彦 (東京大・院医), 槇島 誠 (日本大・医), 川名 克芳 (大阪大), 小林 聡 (筑波大), 黒崎 知博 (理化学研究所), 成瀬 恵治 (名古屋大・院医), 西谷 友重, 若林 繁夫 (国立循環器病センター研究所), 西 昭徳 (久留米大・医), 赤塚 結子 (三重大・医)

【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。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、核蛋白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。こうした趣旨のもとに過去3年間バイオ分子センサー研究会が行われたが、バイオ分

子センサーによって感知された細胞環境情報が細胞生存応答をもたらすためにいかに細胞内で情報交換・情報統合されているかについての視点が欠けていた。この点こそ、センサーが機能する本質である。そこで、バイオ分子センサータンパク質の構造と機能の解明に加えて、センサー間相互作用、情報統合にも踏み込んだ新たな研究転換を目指してこの研究会を開催した。60名余りのバイオ分子センサー研究者が一同に会し、15題の演題発表があった。対象のセンサーは、電位センサー、温度センサー、機械刺激センサー、脂質センサー、ガスセンサー、 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) Distribution of volume-sensitive maxi-anion channels in cardiomyocytes and its ATP releasing role

Amal K. Dutta, Ravshan Z. Sabirov, 浦本 裕美, 岡田 泰伸 (生理学研究所・機能協関)
Yuri E. Korchev, Andrew Shevchuk (MRC Clinical Center, United Kingdom)

ATP release is known to be induced by cell swelling from a variety of cell types including cardiomyocytes and to play a crucial role in purinergic signaling. Cardiomyocytes swell in various pathophysiological conditions such as congestive cardiac failure, ischemia, endotoxic shock and dilated or hypertrophic cardiomyopathies. In the present study, we examined the involvement of volume-sensitive maxi-anion channels in swelling-induced ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in primary culture and their distribution pattern on the sarcolemmal surface. Using a luciferin-luciferase assay, ATP was

found to be released to the bulk solution when the cells were subjected to hypotonic, hypoxic or ischaemic stress. The cell surface ATP level on a single cardiomyocyte, measured by a biosensor technique, was found to exceed a micromolar level. Conventional patch-clamp studies showed that all three stimuli induced activation of single-channel events with a large unitary conductance (~390 pS). The pharmacological properties of the swelling-induced ATP release and maxi-anion channel were identical to each other. The channel was selective to anions and showed significant permeability to ATP^{4-} ($P_{\text{ATP}}/P_{\text{Cl}} \sim 0.1$) and

MgATP²⁻ ($P_{ATP}/P_{Cl} \sim 0.16$). After taking a 3-D image of the cell by a scanning ion conductance microscopy technique in which a fine-tipped patch pipette was employed as a probe to monitor the cell surface morphology, the same pipette was employed for patching the specified regions on the cells. We found that the density of functional ATP-conductive maxi-anion channel is

higher in the central region of the cell body compared to the cell extensions. These results indicate that maxi-anion channels are distributed on the sarcolemma predominantly near the cell body center and serve as a pathway for ATP release in hypotonic, hypoxic and ischemic conditions.

(2) 細胞容積センサー機能を生み出す境界面分子群の相互作用

赤塚 結子 (三重大学大学院医学系研究科・再生統御医学)

清水 貴浩, 岡田 泰伸 (生理学研究所・機能協関)

細胞外及び細胞内の浸透圧変化に対応して自らの体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⁻ 流出が駆動力となり、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ン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⁻チャンネル(VSOR)と名づけられているが、最近では容積

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。

我々は VSOR の分子同定を目指す過程で、その制御因子として ABC トランスポータスーパーファミリーに属する ABCF2 を同定した。ABCF2 を大量発現させた HEK 細胞では、VSOR の電流が抑制されることと、RVD の遅延が起こることがわかっている。また、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、さらにその結合量は低浸透圧刺激によって増えることを見出し、RVD 過程における細胞膜直下で、アクチン-アクチニン-4-ABCF2 が相互作用して容積センサーとして働き、VSOR を制御する可能性が示唆された。

(3) 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・統合神経生物学)

渡辺 英治 (基礎生物学研究所・神経生理学)

Na_x は電位作動性 Na チャンネル・ファミリーに属し、体内 Na⁺濃度付近を閾値とする Na⁺センサーとして働く。我々は Na_x 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、Na_x が哺乳動物の塩/水恒常性の中核である脳室周囲器官(CVO)に発現し、体液 Na⁺レベルセンサーとして機能することを明らかにしてきた。Na_x によって検出された情報が CVO の活動に変換される機構を調べるため、Na_x の細胞内局在を調べた。免疫電子顕微鏡法と二重免疫染色法により、Na_x が上皮細胞と星状細胞から広がったニューロン周囲膜状突起に特異的に発現することを示した。CVO の一つである脳弓下器官から単離したグリア細胞

においてイオンイメージングを行ったところ細胞外 Na⁺レベル増加に応答した。さらに、グルコース・イメージング法を用いて CVO の Na_x 陽性グリア細胞が Na 依存的にグルコース取り込みを増加させること、その過程で Na_x が重要な役割を果たすことを明らかにした。以上より、Na_x を発現するグリア細胞がまず体液 Na⁺レベルの生理的増加を検出し、次にグリアのグルコース代謝の亢進を含む細胞内 Na 依存的な機構を介して CVO の神経活動を制御することが示唆された。非興奮性グリア細胞と興奮性神経細胞との緊密なコミュニケーションに基づいて Na 恒常性の制御中枢が機能すると考えられる。

(4) 代謝型グルタミン酸受容体シグナル伝達のリガンド依存性

立山 充博, 久保 義弘 (生理学研究所・神経機能素子)

代謝型グルタミン酸受容体 1 型(mGluR)について, グルタミン酸のみならず細胞外の多価陽イオンによっても活性化されること, 複数種の GTP 結合蛋白質と共役しうること, が知られている。すなわち, mGluR1 を介するシグナル伝達の上流と下流には, 複数の経路が存在する。我々は, 異なるタイプのリガンドであるグルタミン酸と Gd^{3+} では, 活性化されるシグナル伝達経路に差異があるという可能性を検証した。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変動と細胞内 cAMP 濃度 ($[cAMP]_i$) 変動を同時に記録することにより, グルタミン酸が mGluR1 を介して Gq ($[Ca^{2+}]_i$ 上昇) と Gs ($[cAMP]_i$ 上昇) を活性化することを確認した。これに対して, Gd^{3+} 投与では Gq の活性化は見られ

たが, Gs の活性化は見られなかった。この結果は, 活性化されるシグナル伝達経路が, リガンドのタイプにより異なることを示している。X 線結晶構造解析により, グルタミン酸のみ結合した場合とグルタミン酸と Gd^{3+} の両方が結合した場合では, mGluR1 の細胞外の構造に差異があることが, 明らかになっている。そのため, リガンドのタイプによりもたらされる受容体の立体構造の差異により活性化されるシグナル伝達経路に差異が生じるものと考えられる。そこで, mGluR1 を介するシグナル伝達受容体構造依存性について, FRET を用いた解析を進めている。

(5) 機械受容チャネルの分子機構

成瀬 恵治 (名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生物物理学)

機械受容チャネルは外界からの機械的刺激を電気信号に変換するイオンチャネルで, 細菌からヒトに至るまであらゆる細胞に存在する。体性感覚系・心血管系などにおいて重要な役割を果たしている。

近年, トリ及びヒト心筋より伸展依存性・カルシウム依存性カリウムチャネル(SAKCA)の単離・同定を行った。SAKCA チャネルは STREX 配列という独特な配列をもっており, この STREX 配列が伸展刺激受容活性の責任配列であることがわかった。マウス・ウサギの STREX 配列は伸展刺激感受性がなかったため, トリ・ヒトの STREX 配列と比較したところ ERA₆₇₂₋₆₇₄ (トリ),

ERA₇₁₂₋₇₁₄ (ヒト) が重要であることが判明した。トリ STREX 配列の Ala⁶⁷⁴ を Thr⁶⁷⁴ に置換, または STREX 配列自体を除去することにより SAKCA の伸展刺激感受性を失わせることが出来た。STREX-GFP と SAKCA チャネルを共発現させた CHO 細胞に発現させると細胞膜に STREX 配列が集まることになり, 且つ, SAKCA チャネルの伸展感受性が消失した。Excised パッチ膜の細胞質側から STREX 配列からなる合成ペプチドを投与すると SAKCA チャネルの伸展感受性が消失した。これらのことから STREX 配列は細胞膜に存在する物質と結びつき膜の張力を感知することが示唆された。

(6) 摂食行動に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用

箕越 靖彦, 志内 哲也, 岡本 士毅, 斉藤 久美子 (生理学研究所・生殖, 内分泌系発達機構)

AMP キナーゼ(AMP-activated protein kinase)は, 細胞内のエネルギーレベルの低下 (AMP/ATP 比の上昇) 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ことから

“metabolic sensor”と呼ばれている。しかし近年の研究により, AMP キナーゼは, メトホルミン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, さらに自律神経によって活性化することが明らかとな

り、AMP キナーゼが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、エネルギー消費を調節することが明らかとなった。

さらにごく最近 AMP キナーゼは、エネルギー消費だけでなく、摂食行動をも制御することが判明した。我々は、レプチン、インスリン、グルコース、メラノコルチン、ニコチンなど摂食抑制因子の多くが、視床下部 AMP キナーゼ活性を低下させることをみいだした。また、絶食後や摂食促進神経ペプチド AGRP によって活性が逆に

上昇した。さらにアデノウイルスを用いて dominant negative (DN)あるいは constitutively-active (CA) AMPK を視床下部に発現させると、DN は摂食抑制を、CA は摂食亢進を引き起こした。このように 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であり、特に視床下部 AMP キナーゼは、栄養素、ホルモンの共通シグナル分子として摂食行動を制御すると考えられる。

(7) 共鳴ラマン分光法が明らかにする一酸化炭素により ON/OFF が制御される転写調節因子 NPAS2のしくみ

内田 毅 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・生体分子)

NPAS2 は一酸化炭素 (CO) センサーとして新たに発見されたヘム蛋白質で、哺乳類の脳で発現し、転写調節因子として働く。DNA と結合する basic helix-loop-helix ドメインと 2 つの PAS ドメインをもち、酸素センサー蛋白質である FixL や DOS と高い相同性をもつ。各 PAS ドメインはそれぞれ 1 つのヘムと結合し、そこに CO が結合する。NAD(P)H による還元状態で BMAL-1 という蛋白質とヘテロダイマーを形成し、配列特異的に DNA と結合するが、ヘムに CO が結合すると DNA から解離する。つまり、CO の結合というシグナルが BMAL-1 との界面に伝わり、BMAL-1 とのヘテロダイマーが解離することで、DNA から遊離する。

CO による NPAS2 のシグナル伝達機構を明らかにする

ため、共鳴ラマン分光法を用いてセンサー部位であるヘム周辺の構造について検討した。その結果、最近いくつかのセンサーヘム蛋白質で見つかっているように、Cys が酸化型のヘムに配位しており、これがヘム鉄の還元により、His に交換することがわかった。この His は近傍のアミノ酸残基と水素結合をしているが、CO の結合によりヘム鉄から解離し、近傍との水素結合も切断される。このようにセンサー部位であるヘムに CO が結合・解離することにより、ヘム近傍に存在する水素結合のネットワークを含む構造が変化することにより、BMAL-1 とのヘテロダイマーが解離・形成し、遺伝子の発現が制御されることが明らかになった。

(8) PKA/Ca²⁺シグナルを制御する線条体神経細胞質センサーの機能的連関

西 昭徳 (久留米大学医学部・薬理学)

線条体神経には、PKA と細胞内 Ca²⁺シグナルを統合・制御する 2 つのリン酸化タンパク、DARPP-32(Dopamine- and cAMP-Regulated Phosphoprotein, Mr 32 kDa)と RCS(Regulator of Calmodulin Signaling)が選択的に発現している。DARPP-32 は PKA により Thr34 残基がリン酸化されると PP-1 活性を抑制する。また、PKA によりリン酸化された DARPP-32 は PP-2B により脱リン酸化される。一方、RCS は PKA により Ser55 残基がリン酸化されると calmodulin と結合し、

Ca²⁺/calmodulin 依存性酵素活性を抑制する。つまり、DARPP-32 は PKA/Ca²⁺シグナルのセンサーとして、RCS は PKA シグナルのセンサーとして機能している。黒質から線条体に投射するドーパミン作動性神経は、線条体における運動機能や認知機能の調節に中心的役割を担っている。これまでの研究により、ドーパミンによる線条体神経の機能調節には DARPP-32 によるドーパミン細胞内情報伝達の増幅が重要であり、DARPP-32 と RCS は機能的相互作用

を示すことを明らかにした。ドーパミン情報伝達における DARPP-32 と RCS リン酸化の機能的役割, 相互作用を

紹介する。

(9) Ca²⁺センサータンパク質 NCS-1の神経の興奮性と生存における生理的役割

西谷 友重 (国立循環器病センター研究所・循環分子生理)

NCS-1(Neuronal Ca²⁺ sensor -1)は、主に神経や心臓に発現している Ca²⁺結合タンパク質で、もともと神経のシナプス伝達に関わる因子として知られていた。私たちは以前、NCS-1 が A-タイプ K⁺チャネル(Kv4)の Ca²⁺感受性の活性化因子であることを初めて報告したが、その後、他の Ca²⁺チャネルやイノシトールリン酸化酵素の活性化などを介して神経伝達物質の分泌促進を行うこと、またシナプスの短期可塑性を制御することなど多様な機能を持つことが報告されている。しかし、NCS-1 の興奮性細胞のサバイバル-アポトーシス経路における役割については今のところ全く報告がない。私たちは、最近の実験

結果から NCS-1 が、1)障害を受けた神経においてその発現量が増加すること、2)NCS-1 高発現細胞が種々のストレスに対し抵抗性を示すことから、NCS-1 が障害神経におけるサバイバル因子として働くという全く新規の機能を持つこと、さらに 3)NCS-1 がサバイバル促進作用を持つ神経栄養因子 GDNF の下流に存在しその作用を仲介するという、神経栄養因子と Ca²⁺センサーの新たな相互関係を明らかにしつつある。本研究会では、私たちの最近の見解を中心に NCS-1 の持つ多彩な機能について紹介し、パイオ分子センサータンパク質としての NCS-1 の生理的意義について議論したい。

(10) B リンパ球特異的アダプター分子 BCAP の機能発現機構

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)

B リンパ球受容体(BCR)を介する抗原認識によって引き起こされるシグナルは、B 細胞の分化・活性化に必須であり、したがって、BCR シグナルの分子機序解明は依然として重要な課題である。

BCR を介するシグナルの第一段階は Syk をはじめとするチロシンキナーゼの活性化によって生じるが、私たちは Syk の生理的基質 BCAP を単離し、この分子のノックアウトマウスを作製することにより、まず、その生理機能を探索した。BCAP 欠損マウスでは B リンパ球の最終分化の障害、および T 細胞非依存性免疫応答の低下が認

められ、この B 細胞特異的アダプター分子 BCAP が BCR の下流で働き、生体において重要な役割を担っていることを明らかにした。更に、なぜこのような B リンパ球の最終分化の障害が生じるかを *in vitro* の実験を駆使して探索した。その結果、BCAP 欠損 B 細胞は野生型 B 細胞に比し、生存・増殖反応を司っている転写因子 c-Rel の減少が認められた。この c-Rel の減少が *vivo* においても重要な機構であることは、BCAP 欠損マウスより採取した骨髄細胞に c-Rel を強制発現すると、B リンパ球の最終分化が回復することにより確かめられた。

(11) 胆汁酸誘導体によるビタミン D 受容体活性化機構の解析

榎島 誠, 川名 克芳 (日本大学医学部・生化学)

安達 竜太郎 (大阪大学大学院医学系研究科)

活性型ビタミン D₃ の受容体であるビタミン D 受容体

(VDR)は、カルシウム代謝や骨代謝の調節のみならず、

免疫調節、細胞の分化誘導など様々な生理作用を有することが知られている。我々の研究により、核内レセプター FXR に加えて VDR も胆汁酸の受容体として機能することが明らかになった。

活性型ビタミン D3 (内分泌シグナル) と二次胆汁酸であるリトコール酸 (生体異物シグナル) の 2 種類のリガンドに反応する VDR とこれらのリガンドとの構造活性相関を明らかにするために、VDR 変異体に対する活性型ビタミン D3 とリトコール酸の作用を比較検討し、VDR のリガンド結合ポケットへの結合様式の相違を明らかにしたが (平成 15 年度バイオ分子センサー研究会)、今回はリトコール酸誘導体の VDR に対する効果を検討した。

リトコール酸の 3 位水酸基の修飾により VDR に対する活性が増加した。検討した誘導体の中でリトコール酸アセテートが最も強く VDR を活性化した。リトコール酸アセテートの FXR に対する作用は弱く、PXR には作用しなかった。リトコール酸 3 位修飾体のうち、イソリトコール酸やウルソコラン酸はリトコール酸よりも強力に FXR を活性化したが、VDR には作用しなかった。活性型ビタミン D3 とリトコール酸とでは、VDR に対する結合様式のみならず、VDR-RXR ヘテロ二量体としての活性化様式に相違があるとの報告もあり、VDR の生理機能を解明する上で胆汁酸誘導体の利用は有用であると考えられる。

(12) 酸化ストレスセンサーとユビキチンライゲース : Nrf2-Keap1 システムによる酸化ストレス応答機構

小林 聡 (筑波大学・TARA センター)

外来ストレスに対する生体防御機構では、センサーによるストレス感知と細胞内因子へのシグナルの伝播、そして最終的には、転写因子の活性化による防御系遺伝子の誘導的発現という一連の秩序だったプロセスにより、恒常性維持がもたらされる。近年我々は、活性酸素種や食餌性異物である親電子性物質に代表される“酸化ストレス”に対する生体防御機構において、Nrf2-Keap1 システムがきわめて重要な機能を有していることを、分子生物学ならびに遺伝子破壊マウスの解析を通じ証明してきた。転写因子 Nrf2 は、酸化ストレス応答遺伝子を発現誘導するメインプレーヤーであり、一方 Keap1 は Nrf2 の核移行を阻害する抑制性因子である。最近我々は、Keap1

が 2 つのシステイン残基により酸化ストレスを感知する“センサー”として機能していること、さらに非ストレス下では Nrf2 を分解抑制させる“ユビキチンライゲース”としても機能することを明らかにした。また、このストレス応答制御機構の破綻と疾患の相関を示唆する知見として、ヒト肺ガンにおける keap1 遺伝子変異を見出している。このことは、ストレス応答の抑制機構もまた生体の恒常性維持には重要であることを意味している点で、興味深い。本発表では、酸化ストレス応答制御における Keap1 の分子機構を中心に、その生理的意義についても考察したい。

(13) 生理活性脂質受容体 BLT とプロトン感知性受容体 G2A

横溝 岳彦 (東京大学大学院医学系研究科・生化学分子生物学)

生理活性脂質は産生細胞への刺激に伴って産生され、標的細胞に作用したのち速やかに分解されるという特徴を有する。生理活性脂質の作用は細胞膜に存在する G タンパク質受容体(GPCR)と核内受容体を介して行われる。ロイコトリエン B4(LTB4)は、好中球の活性化因子として知られる生理活性脂質であり、我々は LTB4 高親和性受容体 BLT1 と低親和性受容体 BLT2 を同定し、解析を進めてい

る。共に Gi/o, Gq ファミリーの G タンパク質を活性化する GPCR であるが、BLT1 は白血球特異的に、BLT2 は比較的広範な発現を示す。BLT1 欠損マウスでは、好中球が関与する古典的炎症モデルにおいて減弱した反応が見られることに加え、Th1 型、Th2 型免疫反応にも異常が観察され、LTB4 が免疫反応においても重要なメディエーターであることが明らかになりつつある。G2A はかつてリン

リン脂質である LPC (リゾフォスファチジルコリン) の受容体であると報告されたが、我々は最近、G2A が細胞外のプロトン濃度を感知するプロトンセンサーであるこ

と、LPC はむしろ G2A に対して抑制的に作用することを見いだした。これまでに得られた知見を総括し、今後の展望を討論したい。

(14) 電位センサーをもつイノシトールリン脂質ホスファターゼの機能

岡村 康司, 村田 喜理, 岩崎 広英, 佐々木 真理, Israil Hossain
(岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化)

従来、膜電位センサーはイオンチャネル固有の構造と考えられ、膜電位変化によるシグナル伝達についての研究は、イオンチャネルまたはトランスポーターなどのイオンの出入りを制御する分子に限定されてきた。我々はホヤゲノムからイオンチャネル関連分子を網羅的に検索した (*Physiol. Genomics*, in press) ところ、電位依存性チャ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を見出した。この分子は電位センサーがイオン通路以外の機構を制御する初めての例であり、現在論争になっている電位センサーの動作原理を理解する上でも、また膜電位変化の生理的役割を捉えなおす上でも、

新たな視点を提供する。昨年度本研究会では、この分子がチャネルと同様なゲート電流を示し電位感受性をもつこと、in vitro において PIP3 のリン酸を脱リン酸化するホスファターゼ酵素活性を有すること、また K チャネル活性を指標とした実験からその酵素活性が膜電位に依存して変化することなどを報告した (*Nature*, 2005)。今回は、①これまで K チャネル活性を指標として解析してきた VSP の電位依存的酵素活性が、PIP2 の可視化によっても確認できたこと、②酵素活性の膜電位依存性が S4 様のドメインの特性で規定されること、③脊椎動物の相同分子が Ci-VSP と同様に電位依存的ホスファターゼの性質をもつこと、について新たな知見を得たので報告する。

(15) 温度感受性 TRP チャネルの構造と機能

富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理)

哺乳類には現在までに 6 種類の温度感受性 TRP チャネルが知られており、それぞれが特異な活性化温度閾値を有する (TRPV1 > 43 度, TRPV2 > 52 度, TRPV3 > 32-39 度, TRPV4 > 27-35 度, TRPM8 < 25-28 度, TRPA1 < 17 度)。TRPV1 の活性化温度閾値は固定したものではなく、PKC によるリン酸化によって 10 度以上も変化する。TRPV4 の温度閾値は体温近傍であるが、TRPV4 は感覚神経にはほとんど発現せず、表皮ケラチノサイトや視床下部視索前野に発現することから、皮膚での温度受容や体温調節にも重要な働きをしていることが推測される。

新生仔マウスのケラチノサイトの培養系を確立し、発現する TRPV4 ならびに TRPV3 の機能的な発現を Ca^{2+} -imaging 法で確認した。さらに、前回の本研究会で新規温度感受性 TRP チャネル TRPM2 を報告し、TRPM2 が膵β細胞でのインスリン分泌に関与することを発表したが、TRPM2 は K_{ATP} チャネル非依存的、cAMP 依存的なインスリン分泌に関わることが明らかとなった。また、種々の TRP チャネルの機能を制御することが報告されている 2-APB が TRPM2 活性を強く抑制することを見出した。

23. 体温調節, 温度受容研究会

2006年9月27日-9月28日

代表・世話人: 永島 計 (早稲田大学 人間科学学術院)

所内対応者: 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・細胞生理研究部門)

- (1) 建築環境工学あるいは環境心理学の立場からの温冷感および快適感
久野 覚 (名古屋大学大学院環境学研究科都市環境学専攻)
- (2) 体温調節における皮膚温の役割
中村 真由美, 依田 珠江 (早稲田大学 人間科学学術院)
江崎 秀範 (ホンダ技術研究所)
彼末 一之 (早稲田大学 スポーツ科学学術院)
- (3) 視索前野 GABA 受容機構を介した発熱時および寒冷時の熱産生
大坂 寿雅 (国立健康・栄養研究所)
- (4) ヒト暑熱環境下における皮膚血管拡張反応と皮膚交感神経活動の関係
上條 義一郎
(信州大学大学院医学研究科 加齢適応医科学独立専攻 個体機能部門 スポーツ医科学分野)
- (5) 骨格筋エネルギー代謝に及ぼす視床下部の調節作用
箕越 靖彦, 志内 哲也, 岡本 士毅, 李 順姫, 鈴木 敦, 斉藤 久美子
(生理学研究所 発達生理学研究室系生殖・内分泌系発達機構)
- (6) 脂肪エネルギー消費分子としての UCP1 の役割
岡松 (小倉) 優子, 斉藤 昌之 (北海道大学大学院 獣医学研究科)
- (7) 細胞外液浸透圧と体温調節
鷹股 亮 (奈良女子大学 生活環境学部 生活健康学講座)
- (8) 運動時の体温決定因子: 末梢からの非温熱性入力的重要性
能勢 博 (信州大学大学院 医学研究科 スポーツ医科学分野)
- (9) 磁気共鳴 (MR) 信号を利用した脳温・深部温の評価
吉岡 芳親, 神原 芳行, 松村 豊 (岩手医大 先端医療研究センター)
及川 浩 (岩手県立二戸病院 放射線科)
江原 茂 (岩手医大 放射線科)
井上 敬, 小川 彰 (岩手医大 脳外科)
- (10) 生体リズムと体温
山仲 勇二郎, 高須 奈々, 橋本 聡子, 本間 研一 (北海道大学大学院医学研究科第一生理学講座)
- (11) 冬眠中のハムスターのエネルギー代謝と酸化機構
橋本 眞明, Peter G. Osborne (旭川医大・第一生理)
- (12) ヒトの体温調節における脊髄の役割についての仮説
紫藤 治, 丸山 めぐみ, アブドゥル・ハク (島根大学医学部 環境生理学講座)
和田 昭彦, 北垣 一 (島根大学医学部 放射線医学講座)
- (13) UCP1 遺伝子導入による肥満・糖尿病に対する治療法開発
片桐 秀樹 (東北大学大学院 医学系研究科 創生応用医学研究センター 再生治療開発分野)
- (14) 老化と体温調節
山下 均 (国立長寿医療センター研究所 老化制御研究部)

(15) 発熱に関わるホスホリパーゼ A₂ のアイソタイプ

松村 潔 (大阪工業大学情報科学部 生物科学研究室)

堀 あいこ, 山本 知子, 細川 浩, 小林 茂夫 (京都大学情報学研究科 生体情報処理分野)

(16) 発汗のメカニズム

芝崎 学 (奈良女子大学 生活環境学部)

(17) 体温リズムの調節機構とその生理学的意義

永島 計 (早稲田大学 人間科学学術院)

(18) 冷感における冷受容チャネルの役割

細川 浩, 阿部 潤次, 岡澤 慎, 澤田 洋介, 松村 潔, 小林 茂夫 (京都大学)

(19) 温度感受性 TRP チャネルの構造・発現・機能

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・細胞生理研究部門)

【参加者名】

斉藤 昌之, 岡松 (小倉) 優子, 北尾 直也 (北海道大学大学院獣医学研究科), 山仲 勇二郎 (北海道大学大学院医学研究科), 橋本 眞明 (旭川医科大学医学部), 吉岡 芳親 (岩手医科大学先端医療研究センター), 片桐 秀樹 (東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター), 大坂 寿雅 (国立健康・栄養研究所), 彼末 一之 (早稲田大学スポーツ科学部), 永島 計, 小林 章子, 中村 真由美, 狩野 真清, 依田 珠江, 安原 祥 (早稲田大学人間科学部), 能勢 博, 上條 義一郎, 後藤 正樹, 宮川 健 (信州大学大学院医学研究科), 篠崎 圭一, 宮澤 誠司 (岐阜大学大学院連合獣医学研究科), 山下 均 (国立長寿医

療センター研究所 老化制御研究部), 久野 覚 (名古屋大学大学院環境学研究科), 細川 浩 (京都大学情報学研究科), 松村 潔 (大阪工業大学情報科学部), 芝崎 学, 鷹股 亮 (奈良女子大学生生活環境学部), 末盛 智彦 (岡山大学大学院医歯学総合研究科), 紫藤 治, 丸山 めぐみ (島根大学医学部医学科), 箕越 靖彦, 岡本 士毅, 志内 哲也 (生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構), 富永 真琴, 富永 知子, 柴崎 貢志, 飯田 陶子, 稲田 仁, Sravan Mandadi, 曾我部 隆彰, 西井 博子, 富樫 和也, 東 智広, 村山 奈美枝, 島 麻子 (岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理)

【概要】

体温は最も古くかつ精力的に研究されてきた生理学分野である。しかしながら, 他のホメオスタシス調節機構, 例えば循環調節あるいは体液調節 (浸透圧調節) に比較し, 遅れをとっていることは否定できない。この原因としては, 温度受容器の分子レベルの解析, 体温・代謝にかかわる化学物質の発見, 体温調節にかかわる特異的な神経機能の同定の遅れに起因しているところが大きいと思われる。しかしながら, この10年以内の飛躍的な躍進により, これらの問題点が解決されつつある (温度感受性イオンチャネルの発見, 中枢-末梢にいたる神経回路網の同定, 発熱に関わる物質の同定, 熱産生の分子機構, 生理心理学的手法, 新たな測定技術等)。しかし, 残念

ながら体温調節は他の調節系に比べ非常に多くの生理機能に関係しているため, 体温に関する研究者が各々のフィールドに分散し, 十分な情報が得られないことが多い。今回の研究会の目的は '体温' をキーワードに, これらの研究者が集まり, 各々の研究成果を発表・情報交換し, 個々の知識を統合, 体温調節の新たな概念を確立することであった。また体温研究における問題点を討議, かつ明らかにし, あらたな研究テーマを創成することを目的とした。研究会においては基礎研究から臨床応用までを目的とする多彩な研究者が集まり, 有意義な討議がなされた。また将来への研究会の発展につながる問題提議がなされた。

(1) 建築環境工学あるいは環境心理学の立場からの温冷感および快適感

久野 覚 (名古屋大学大学院環境学研究科都市環境学専攻)

古くから、温冷感の測定には、日本語の場合「暑い」「暖かい」「どちらでもない」「涼しい」「寒い」を、英語の場合「hot」「warm」「neutral」「cool」「cold」を並べた尺度が使われている。しかし、環境が変動している場合にこの尺度では困る場合がある。例えば、夏期に屋外から冷房空間へ入った場合、屋外では「暑い」であり、入室後は「涼しい」となるが、やがて「どちらでもない」と変化する。尺度上でオーバーシュートすることになる。

一方、このオーバーシュート現象とも絡み、快適感については、「comfortable」という言葉だけでは十分捉えることができないので「pleasant」という言葉も併用するべ

きであるという議論がかつて起こった。現在、測定尺度としては、不快の度合いを測る片側尺度を使う場合が多いが、pleasantな状態も評価するために「快適-不快」の両側尺度が用いられることも多い。この場合は、中間点の問題が生じる。

ここでは、Gagge が使った温度感覚、McIntyre の positive/negative thermal pleasure, Cabanac の pleasantness を紹介しつつ、全体を統一的に説明できる久野の二次元温冷感モデルについて説明する。環境状態と生理状態を二軸にとった平面上で、上述の現象が説明できることを示す。

(2) 体温調節における皮膚温の役割

中村 真由美, 依田 珠江 (早稲田大学 人間科学学術院)

江崎 秀範 (ホンダ技術研究所)

彼末 一之 (早稲田大学 スポーツ科学学術院)

恒温動物でも体温は部位によって異なり、大きく変動する部位(shell)と比較的に安定に保たれる中心部(core)に分かれる。つまり体温調節とはcoreの温度を調節する(制御量とする)機能と考えられる。これは基本的にはnegative feedbackにより達成されている。さらにそれに加えて、最も高頻度で出現する「外乱」である環境温変化にするfeed forwardを行うことで制御の質を高めている。環境温変化は皮膚で受容される。皮膚温の情報は特に行動性体温調節に重要な役割をはたす。そして温度に関係した感覚は「熱い・冷たい」という温度感覚と、「暑い・

寒い」という温熱的快・不快感(快適感)に区別され、またそれぞれ全身の感覚と局所感覚がある。このような感覚が、①どのような機序で発生し、②どのような特徴を持ち、③相互にどのように関係するか、などについてはまだ不明な点が多い。我々は皮膚温と温熱的感覚の関係性を調べることを目的として、皮膚温、局所的温度感覚・快適感をコンピュータの人体模型上に再現するシステム(データ可視化システム)を開発した。そこで得られたデータを中心に皮膚からの温度入力、特にヒトでの特徴について概観する。

(3) 視索前野 GABA 受容機構を介した発熱時および寒冷時の熱産生

大坂 寿雅 (国立健康・栄養研究所)

ウレタン・クロラロース麻酔ラットの皮膚を2-6°C冷やすと酸素消費率が増加する(Osaka, J Physiol, 2004)。視索前野背側部にGABAを微量注入しても熱産生反応が誘起されるが、この部位にGABA_A受容体拮抗薬である

bicuculline methiodide (BMI)を前投与しておくとも皮膚冷却によって誘起される熱産生反応が阻止される(Osaka, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004)。したがって視索前野のGABA受容機構が寒冷時の熱産生を介してい

る。では、この機構は発熱時の熱産生に寄与しているであろうか。

発熱物質であるリポ多糖類(LPS, 1 µg/kg)をウレタン・クロラロース麻酔ラットに静脈内投与したところ三相性の熱産生反応がおき、極大値は約 60, 100, 130 分だった。心拍数は酸素消費と並行して増加し、結腸温度は単相性に 1.5-2.5 °C 上昇した。LPS 投与後の 40, 80, 120 分に視索前野背側部に BMI を両側注入すると熱産生反応

は阻止された。視索前野腹内側部は発熱の最終メディエーターとされるプロスタグランジン(PG)E₂感受性部位であるが、この部位に PGE₂ を注入して誘起される熱産生、頻脈、高体温の反応も視索前野背側部への BMI 前投与によって阻止された。したがって、視索前野背側部の GABA 受容機構は寒冷時のみならず発熱時の熱産生も介しており、視索前野からの熱産生出力機構であると考えられる。

(4) ヒト暑熱環境下における皮膚血管拡張反応と皮膚交感神経活動の関係

上條 義一郎

(信州大学大学院医学研究科 加齢適応医科学独立専攻 個体機能部門 スポーツ医科学分野)

ヒトの皮膚交感神経(節後線維)には発汗神経、血管収縮神経、血管拡張神経が含まれると言われている。一方、皮膚血流の神経性調節も能動性収縮と能動性血管拡張が関与しており非常に複雑である。そこで、我々は暑熱環境下における皮膚交感神経活動(SSNA)の増強と皮膚血管拡張の関係を探るために、安静座位で water-perfused suit を着用した被験者5名の腓骨神経から SSNA とその支配領域の皮膚血流量(LDV; レーザー血流計)、発汗活動(SR)、平均血圧(MAP)を同時測定した。暑熱負荷は suit に流す水温を 34°C から 40°C まで 2°C ずつ 30 分毎に上昇させ、各ステージ最終 10 分間にデータ収録を行った。その結果、皮膚血管コンダクタンス(CVC=LDV/MAP)は bretylium により局所性に収縮活動

を抑制した部位において暑熱負荷上昇に従い増加したが、正常部位では変化しなかった。このことは、正常部位の能動性血管拡張が収縮活動により抑制されることを示す。また、同じ神経支配領域内の異なる 2 箇所測定された CVC を 20 秒毎に区切り 10 分間の相関関数と対応する 20 秒間のバースト数を求めたところ、2 箇所の CVC の相関係数はバースト数増加により高くなる傾向を示した。そこで各ステージのバースト多発時(間隔<2 秒)のその発生から 20 秒間の CVC と SR を加算平均したところ、SR の振幅は暑熱負荷 40°C で大きく増加するのに対し、CVC の振幅は暑熱負荷 38°C で増加し、バーストの振幅の増加と一致した。これらの結果は皮膚血管拡張に SSNA の増強が関与することを示す。

(5) 骨格筋エネルギー代謝に及ぼす視床下部の調節作用

箕越 靖彦, 志内 哲也, 岡本 士毅, 李 順姫, 鈴木 敦, 斉藤 久美子

(生理学研究所 発達生理学研究室・内分泌系発達機構)

骨格筋はヒトにおいて最大の臓器であり、熱産生、特に交感神経による熱産生に重要な役割を果たしていることが知られている。私どもはこれまで、熱産生を促進するホルモン・レプチンが骨格筋においてグルコース、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、視床下部に作用して交感神経を活性化し、β作用を通して骨格筋でのグルコースの取り込みを促進する。また同時に、視床下部・交感神経系、及び骨格筋への直

接作用によって骨格筋 AMP キナーゼを活性化し、脂肪酸酸化を高める。

さらに私どもは最近、睡眠・覚醒の調節に関わる視床下部神経ペプチド・オレキシンが、レプチンと同様、交感神経のβ作用を介して骨格筋でのグルコース利用を促進することを見いだした。オレキシンを視床下部腹内側核(VMH)に作用させると、運動や摂食行動を惹起しない微量投与によって骨格筋支配交感神経活動を活性化し、

グルコース利用を促進した。また、アドレナリン β 受容体ノックアウトマウスではオレキシンによるグルコースの取り込み促進作用が完全に抑制された。オレキシンは、食餌探索行動を始め様々な行動発現に際して活性化す

る。このことからオレキシンは、覚醒レベルを維持するとともに骨格筋での代謝を調節することで、行動発現並びにその遂行に寄与している可能性がある。

(6) 脂肪エネルギー消費分子としての UCP1 の役

岡松 (小倉) 優子, 斉藤 昌之 (北海道大学大学院 獣医学研究科)

褐色脂肪のミトコンドリアに存在する脱共役タンパク質(UCP1)は、交感神経由来のアドレナリンの β 作用により活性化されて、酸化リン酸化を脱共役し、エネルギーを熱に変換する。熱産生分子としての UCP1 が、寒冷下での体温維持に重要であることは、1)寒冷刺激により褐色脂肪への交感神経活動が増加する、2)UCP1 欠損マウスやアドレナリン β 受容体欠損マウスが寒冷不耐性である、などの事実からも明らかである。一方、UCP1 が活性化すると褐色脂肪では細胞内の中性脂肪や血中から供給される脂肪酸が熱産生の基質として燃焼されるので、脂肪エネルギー消費分子としての機能も注目されている。そこで、エネルギー消費における UCP1 の役割を明

らかにするために、アドレナリン β 3 受容体作動薬を用いて検討した。 β 3 受容体作動薬を単回投与すると、野生型マウスでは、褐色脂肪組織温度が上昇し、全身のエネルギー消費量(酸素消費量)が増加した。さらに、慢性投与すると体脂肪が減少した。しかし、UCP1 欠損マウスでは何れの反応も認められなかった。また、慢性投与時には、野生型マウスにおいては褐色脂肪のみならず、通常 UCP1 の発現が見られない白色脂肪にも UCP1 が新たに出現していた。これら異所性発現した UCP1 のエネルギー消費への寄与についても検討しているのであわせて紹介したい。

(7) 細胞外液浸透圧と体温調節

鷹股 亮 (奈良女子大学 生活環境学部 生活健康学講座)

体温調節機能と体液調節機能は、密接に関連し合い機能している。古くから、脱水は体温上昇時の体温調節機能を抑制することが知られている。通常脱水は、細胞外液(血漿)量の減少と細胞外液(血漿)浸透圧の上昇を伴う複合的な刺激であるが、我々は主に血漿浸透圧が体温調節機能に及ぼす影響について研究を行い、以下の点を明らかにした。

血漿浸透圧上昇は、体温上昇時の体温調節機能を抑制する。この抑制は、体温調節反応である発汗および皮膚血管拡張反応の核心温閾値を上昇させることによる。ヒトにおける実験では、血漿浸透圧 1 momol/kg H₂O の上昇に対して、皮膚血管拡張および発汗の核心温閾値の上昇は、約 0.03-0.04 °C である。

血漿浸透圧上昇による体温調節反応の抑制は、少量の水分を飲み込むと一時的に解除される。血漿浸透圧上昇時に少量の水分を摂取することにより口渇感およびバゾプレッシン分泌が一時的に抑制されるが、これは口腔咽頭反射として知られている。少量の水分摂取により、浸透圧調節反応が抑制されるだけでなく、血漿浸透圧の変化を伴わずに体温調節反応の抑制が解除されたことから、血漿浸透圧上昇時の体温調節反応の抑制は中枢性であり、血漿浸透圧上昇による体温調節反応の抑制に関与する中枢部位は、浸透圧調節部位と少なくとも一部は共有していることが示唆された。

血漿浸透圧上昇による体温調節反応の抑制は、暑熱順化により減弱する。

(8) 運動時の体温決定因子：末梢からの非温熱性入力的重要性

能勢 博 (信州大学大学院 医学研究科 スポーツ医科学分野)

運動時の体温は、活動筋の産熱と皮膚血流・発汗による熱放散のバランスによって決定される。従来から、運動時の体温は運動強度に比例して上昇することが知られており、この原因として、勿論、活動筋からの熱産生が増加することが考えられるが、それとは別に、一定の体温上昇による皮膚血管拡張などの放熱が抑制されることも関与する。この現象が「産熱の亢進」と「放熱の抑制」が同時に起こっている点において「発熱」の現象に似ていることから、運動開始時には「脳の意志」によって体温を上昇させているのではないかと、との仮説が成立する。一方、最近、我々は、1)運動時には運動強度に比例して血漿浸透圧が上昇し、この浸透圧に比例して皮膚血管拡張が抑制されること、2)この皮膚血管拡張抑制は、運動前に低張性食塩水を輸液しておけば抑制することができること、3)暑熱順化すれば運動時の皮膚血管拡張が亢進するが、この際、血漿浸透圧上昇による皮膚血管拡張抑制の感受性が鈍化していること、を明かにした。以上の結果は、運動強度に依存する体温上昇は、脳の意志によって決定されるのではなく、末梢の血漿浸透圧上昇によって体温調節反応が抑制され、「仕方なく」上昇していることを意味する。では、何のために皮膚血管拡張の抑制が起きるのか、本発表では、その合目的性についても考察する。

張が抑制されること、2)この皮膚血管拡張抑制は、運動前に低張性食塩水を輸液しておけば抑制することができること、3)暑熱順化すれば運動時の皮膚血管拡張が亢進するが、この際、血漿浸透圧上昇による皮膚血管拡張抑制の感受性が鈍化していること、を明かにした。以上の結果は、運動強度に依存する体温上昇は、脳の意志によって決定されるのではなく、末梢の血漿浸透圧上昇によって体温調節反応が抑制され、「仕方なく」上昇していることを意味する。では、何のために皮膚血管拡張の抑制が起きるのか、本発表では、その合目的性についても考察する。

(9) 磁気共鳴 (MR) 信号を利用した脳温・深部温の評価

吉岡 芳親, 神原 芳行, 松村 豊 (岩手医大 先端医療研究センター)

及川 浩 (岩手県立二戸病院 放射線科)

江原 茂 (岩手医大 放射線科)

井上 敬, 小川 彰 (岩手医大 脳外科)

磁気共鳴法の非侵襲性と磁気共鳴信号の温度依存性を組み合わせることで、非侵襲的な深部温度計測を行った。使用した装置は、GE社製 SIGNA Horizon LX 3.0 T であり、健康成人ボランティアを対象とした。測定部位は、大脳(男女各18名)と下腿部(男性5名)のヒラメ筋(中心側)と腓腹筋(外側)である。下腿部では、室温環境下(20-25℃)と共に、腓腹部表面より加温(40℃)・冷却(10℃)を行いながら内部温度を計測した。

大脳深部白質では、関心領域を、 $2 \times 2 \times 2 \text{cm}^3$ とした場合、数分程度の積算を行えば、 0.2°C 以内の再現性で温度計測が可能であり、経時的にもこの程度の精度で追跡・評価ができると考えられた。下腿部では、体動やそれに伴う血流の変動を考慮する必要があると思われたが、やや精

度が低下した。男性(n=18)では、前頭葉の温度は、深部白質の温度より約 0.4°C 低く ($p < 0.05$)、女性(n=18)では、差がなかった。また、男性では、深部白質の温度と鼓膜温が相関したが、女性では相関しなかった。室温環境下では、腓腹筋付近の温度は、ヒラメ筋付近の温度に較べ約 2°C 低かった。また、腓腹部表面の温度を 10°C (冷却) にすると、腓腹筋付近では、有意に温度が下がったが、中心側のヒラメ筋付近では、有意な変化は認められなかった。環境温度が下がった場合でも、下腿部中心部の温度は維持される傾向にあり、大きな温度勾配ができることが分かった。空間・時間分解能は、現段階では数 mL・数分であるが、磁気共鳴法を用いることで、生理的条件下での深部温度の評価が可能である。

(10) 生体リズムと体温

山仲 勇二郎, 高須 奈々, 橋本 聡子, 本間 研一 (北海道大学大学院医学研究科第一生理学講座)

昼夜変化のない環境下で深部体温リズムを長期にわたり測定すると被験者の約 20%の被験者で睡眠覚醒リズムと乖離し, それぞれの周期でフリーランする内的脱同調がみられる。内的脱同調はヒトの生物時計が複数の振動体により構成されることを示唆しているが, 振動体の局在や振動体間の同調機序については不明である。

当教室では脱同調パラダイムを用いて, ヒトの睡眠覚醒リズムが強制的なスケジュールにメラトニンリズムと

は関わりなく同調すること。しかし, 身体運動を加えることにより, メラトニンリズムの同調も促進されることを示し, いわゆる非光同調の機構を明らかにすることにより, この問題へアプローチすることが可能と考えられた。今回は, ヒトの生物時計の 2 振動体仮説, 体温リズムの解析法について述べる。また, 身体運動が生物時計に与える影響について検討した隔離実験データを報告する。

(11) 冬眠中のハムスターのエネルギー代謝と抗酸化機構

橋本 眞明, Peter G. Osborne (旭川医大・第一生理)

室温 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒暗下で冬眠中のシリアン・ハムスター (*Mesocricetus auratus*) は, 直腸温 6°C , 呼吸は Biot 様で 4~6 分に一回 4~6 呼吸が連続し, 心拍は不整で 4~8 回/分, エネルギー代謝は覚醒安静時の 1~5% 程度である。覚醒を開始すると心拍と呼吸は規則的になり, 5~6 時間で覚醒に至る。褐色脂肪組織 (BAT) の温度変化が検出されるのは心電図に変化が現れてから 1~3 時間後である。温度上昇が始まると 2~3 時間で 30°C 以上も体温が上昇し, エネルギー代謝の盛んな臓器は強い酸化ストレスに曝され, 冬眠動物にはそれに対処する生得的機構が存在すると思われる。脳の局所活動 (エネルギー代謝) は局

所血流とよく一致することが知られているが, 覚醒中の脳血流は BAT 温度上昇に伴い, 急激に増加する。体内抗酸化物質の一つとされるアスコルビン酸 (AA) はゲッ歯目動物では肝臓で合成され血液で運ばれ, 活性酸素種による酸化産物デヒドロ AA となり, 局所的にグルタチオンによる還元をうけ再生される。冬眠からの覚醒中の動物で血漿, 脳脊髄液, 脳組織中の AA, 尿酸, グルタチオン濃度を測定した。組織中 AA, グルタチオン共に変化はなく, 血漿中, 脳脊髄液中の尿酸, グルタチオンは覚醒に伴い増加, AA は減少した。

(12) ヒトの体温調節における脊髄の役割についての仮説

紫藤 治, 丸山 めぐみ, アブドゥル・ハク (島根大学医学部 環境生理学講座)

和田 昭彦, 北垣 一 (島根大学医学部 放射線医学講座)

脊髄はその加温や冷却により対応する体温調節反応が発現することから, 体温調節機構の一翼を担っていると考えられる。しかし, その生理的役割については未だ解明されていない。脊髄は硬膜に包まれ脊髄管内に存在し, その周囲には良く発達した前後の内椎骨静脈叢が存在する。脊髄管内の椎骨動脈叢は上行腰静脈や腰静脈を介し, 腸骨静脈や下大静脈と連絡するが, これら静脈には弁が

存在しない。従って, 腹腔内圧が上昇した時には, 腹腔内の静脈血が椎骨に囲まれて変形し難い静脈叢へ移動すると考えられる。これらから, 我々は次の仮説を考えた。下肢運動中には活動筋を経由した体内で最も温度の高い静脈血が下肢から躯幹部へ帰還する。この時, 運動による腹筋の収縮や呼吸運動により腹腔内の静脈が定期的な圧迫され, 下肢から帰る高温の静脈血の多くが脊髄管の

静脈叢内を經由して、右心房へ帰還する。この結果、脊髄は高温の静脈血により周囲から加温され、皮膚血管拡張や発汗などの体温調節反応を迅速に起こすと伴に、そ

の反応強度を増加させる。今回はこの仮説を検証する第一歩として、下肢運動後の腹部静脈造影を direct contrast-enhanced MR venography により行った。

(13) UCP1遺伝子導入による肥満・糖尿病に対する治療法開発

片桐 秀樹 (東北大学大学院 医学系研究科 創生応用医学研究センター 再生治療開発分野)

肥満・糖尿病患者の増加が注目を集めているが、その治療法としては現在でも食事療法や運動療法が中心である。これらの病態ではインスリン抵抗性やレプチン抵抗性はその発症に関与している。そこで我々は、モデル動物に肥満・糖尿病を発症させた後、エネルギー消費を亢進させる目的で、脱共役蛋白 UCP1 を肝臓及び腹腔内脂肪組織に発現させ、治療効果を検討し、個体におけるエネルギー代謝調節機構を解析した。

まず、高脂肪食により肥満・糖尿病を発症させたマウスの肝臓に UCP1 遺伝子を導入したところ、脂肪肝改善などの肝における局所効果に加え、内臓脂肪組織の脂肪蓄積の減少やレプチン抵抗性の改善といった多臓器における代謝改善効果が認められ、その結果、肥満・糖尿病・

高脂血症が改善した。

次に、高脂肪食負荷にて肥満・糖尿病の病態発症後の腹腔内脂肪組織に UCP1 遺伝子導入を試みたところ、その発現は局所的・限定的であったにもかかわらず、体重増加は抑制され、耐糖能・インスリン抵抗性・レプチン抵抗性の著明な改善が観察された。

以上、一臓器(組織)でのエネルギー代謝の亢進により、他臓器の代謝が影響を受けることが認められたことから、臓器・組織間の代謝情報ネットワークの存在が示唆される。このエネルギー・糖代謝恒常性維持機構の破綻が肥満・糖尿病とも考えられ、代謝情報ネットワークをターゲットとした治療法開発の可能性について論じてみたい。

(14) 老化と体温調節

山下 均 (国立長寿医療センター研究所 老化制御研究部)

われわれ恒温動物において最も重要な生理機能である体温調節能が老化と共に低下する。これは例えば、加齢動物における耐寒性の低下として観察され、その原因の一つとして熱産生機能の低下が関連することが示唆されてきた。熱産生機能を担う中心分子としては、ミトコンドリアに局在する脱共役蛋白質(Uncoupling protein, UCP)の重要性が明らかとなっている。特に、褐色脂肪組織に特異的に存在する UCP1 は最も強力な熱産生蛋白質であり、寒冷環境下での体温調節や過食時における余剰エネルギーの消費など、いわゆる適応性熱産生において重要な役割を果たすことが明らかとなっている。しかしながら、一般的にヒトでは褐色脂肪組織は生後急速に消退し

成人では UCP1 を検出することが難しいことからヒトでの UCP1 の実質的な役割には疑問が持たれていた。このような状況下において、我々は UCP1 遺伝子を欠損するマウスを作製し、体温調節とエネルギー代謝における UCP1 の普遍的な役割、加齢・個体老化における UCP1 欠損の影響を解析してきた。その結果、①UCP1 は通常の室温環境下での恒温性制御においても重要であること、②UCP1 欠損による熱産生の低下は体表からの熱放散の抑制と UCP1 非依存性の熱産生により部分的に代償されるが、これらの代償作用も老化と共に低下し体温調節能の低下を招くこと、などが明らかとなった。今回、これらの成績について報告したい。

(15) 発熱に関わるホスホリパーゼ A₂ のアイソタイプ

松村 潔 (大阪工業大学情報科学部 生物科学研究室)

堀 あいこ, 山本 知子, 細川 浩, 小林 茂夫 (京都大学情報学研究科 生体情報処理分野)

感染・炎症時に起こる全身性の発熱では、脳内プロスタグランジン E₂(PGE₂)が本質的な役割を果たしている。PGE₂は生体膜リン脂質を原材料とし、3段階の酵素反応(アラキドン酸カスケード)を経て生成される。これまでの研究により発熱に関わるアラキドン酸カスケードの第2段階はシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)、第3段階はミクロソーム型 PGE 合成酵素(mPGES-1)であることが確定した。しかしその第1段階の酵素ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)のアイソタイプは未確定である。PLA₂には10種類以上のアイソタイプがあり、カルシウム依存性細胞質型(cPLA₂)、カルシウム非依存性細胞質型(iPLA₂)、分泌型(sPLA₂)の3群に大別される。本研究ではそれぞれの群に特異的な阻害剤を用いて、発熱に関わる PLA₂ のアイソタイプの特定を行った。

In vivo 実験: ラットに LPS を静脈投与し発熱を起し

た。3群の PLA₂にたいする阻害剤のうち、iPLA₂特異的阻害剤(BEL)腹腔内投与のみが LPS による脳脊髄液中の PGE₂濃度上昇と発熱を抑制した。しかし BEL 腹腔内投与は LPS による血中サイトカインの上昇、脳血管内皮細胞の COX-2 発現も低下させた。すなわちこの結果からは、発熱時の脳内 PGE₂産生に iPLA₂ が関与しているか結論できない。そこで次の *ex vivo* 実験を行った。

Ex vivo 実験: ラットに LPS を静脈投与し1時間後に脳血管・髄膜を採取した。このサンプルを PLA₂阻害剤含有の緩衝液中で培養し、放出された PGE₂を測定した。その結果 iPLA₂阻害剤が COX-2 発現を抑制することなく PGE₂産生を低下させた。

以上の結果は iPLA₂が発熱に関わるホスホリパーゼ A₂のアイソタイプであることを示す。

(16) 発汗のメカニズム

芝崎 学 (奈良女子大学 生活環境学部)

エクリン汗腺からの発汗による熱放散は、運動時や暑熱暴露時の体温調節において必要不可欠である。古代ギリシャの時代から汗に関する記述はあるが、汗腺機能などを含む発汗の調節メカニズムに関する研究は、この1世紀の間に飛躍的に進んだ。発汗反応は、主に核心温度や皮膚温度の変化によって増減するが、これらの温度の変化とは独立して、運動に関連する要因や体液調節に関

する要因によっても変化する。また、発汗反応は、様々な環境に適応した変化を示すことも報告されている。今回の発表では、汗に関する研究の歴史を含め、これまでの発汗に関する研究を紹介し、現在わかっている神経経路と汗腺周囲のメカニズム、および今日の発汗調節に関する見解を要約する。

(17) 体温リズムの調節機構とその生理学的意義

永島 計 (早稲田大学 人間科学学術院)

体温調節機構の解明は、主に恒温動物がいかに体温の恒常性を維持しているかを明らかにすることを目標に行われきた感がある。しかしながら、定常的环境下において明らかな体温の概日リズムが存在する。この現象は必

ずしも体温は一定に調節されているわけではない可能性を示唆している。しかしながら、この体温概日リズムのメカニズム、その生理学的意義は未だ明らかではない部分が多い。この疑問を解決するためにわれわれは、次の

ような実験を行い、知見を得たので紹介する。i) 熱放散効率を変化させる環境温度を変化させても体温の概日リズムは保たれる。また視交叉上核を破壊したラットでは環境温度の変化に対しても、体温はほぼ一定である。この際いずれのラットも熱産生、熱放散を共に変化させることによって体温を維持している。; ii) 温度中性域においては、視交叉上核破壊ラットあるいは時計遺伝子ノックアウトマウスにおいて体温は熱産生依存性にゆらぎを

みせるが、正常ラット、マウスにおいては熱産生の変化に対する体温の変化は小さく、昼夜の熱放散効率の変化が体温のリズムを決定づける主たる因子と考えられた。これらの実験により、体温リズムは生体により制御されたものであり、時間の情報が体温調節機構を変化させることによる現象であるとわれわれは考えている。またこれらの反応は体内のエネルギーの効率的な利用、保持に重要と考えられ、その実験的証拠も提示する。

(18) 冷感における冷受容チャネルの役割

細川 浩, 阿部 潤次, 岡澤 慎, 澤田 洋介, 松村 潔, 小林 茂夫 (京都大学)

環境温の低下で生まれる冷感、行動性体温調節を引き起こす不可欠の因子である。温度低下による冷受容チャネルの活性化で末梢の冷線維が興奮し、そのインパルスが脳に伝わることで冷感が起きる。末梢神経細胞には、TRPM8 と TRPA1 の二種の冷受容チャネルが発現している。これらのチャネルの冷感における役割を検討した。まず、TRPM8 と TRPA1 の発現系を用いて、22種の冷感剤と12種の刺激物質による活性化を検討した。その結果、すべての冷感剤はTRPM8を活性化したがTRPA1を活性化しなかった。一方、すべての刺激物質はTRPA1を活性化したがTRPM8を活性化しなかった。このこと

はTRPM8 と TRPA1 は、共に冷却で活性化されるが、冷感を生むのはTRPM8でありTRPA1ではないことを示す。TRPM8が冷感を引き起こすにはTRPM8のたんぱく質が皮膚直下の神経終末に存在することが必要である。冷感剤のほとんどは舌で冷感を引き起こす物質であったので、舌におけるTRPM8たんぱく質の発現を免疫染色法で解析した。TRPM8陽性の神経細胞線維は、舌の前部にある茸状乳頭付近に多く存在していた。その神経線維の先端は、上皮細胞層に達していたが味蕾には達していなかった。以上のことから、TRPM8は舌の冷感に関与するが、味覚系とは異なると示唆された。

(19) 温度感受性 TRP チャネルの構造・発現・機能

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・細胞生理研究部門)

哺乳類には現在までに6種類の温度感受性TRPチャネルが知られており、それぞれが特異な活性化温度閾値を有する (TRPV1 > 43度, TRPV2 > 52度, TRPV3 > 32-39度, TRPV4 > 27-35度, TRPM8 < 25-28度, TRPA1 < 17度)。TRPV1は、カプサイシン・酸・43度以上の熱という生体に痛みを惹起する複数の刺激によって活性化するが、その活性化温度閾値は固定したものではなく、PKCによるリン酸化によって10度以上も低下する。従って、体温でもTRPV1が活性化して痛みを惹起しうることになり、急性炎症性疼痛の1つのメカニズムと考えられる。TRPV4の温度閾値は体温近傍であるが、TRPV4は感覚

神経にはほとんど発現せず、表皮ケラチノサイトや視床下部視索前野に発現することから、皮膚での温度受容や体温調節にも重要な働きをしていることが推測される。新生仔マウスのケラチノサイトの培養系を確立し、発現するTRPV4ならびにTRPV3の機能的な発現をCa²⁺-imaging法で確認した。また、体温計をマウスに埋め込み、自由行動下での体温計測も行っている。さらに、報告されている6つのTRPチャネルに加えて、TRPM2が温度を感知して開口する新たな温度感受性TRPチャネルであることを見だし、膵β細胞においてインスリン分泌に関与することを報告する。

24. 痛みの分子機構と治療戦略研究会

2005年12月15日-12月16日

代表・世話人：仙波 恵美子（和歌山県立医科大学・医学部）

所内対応者：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・細胞生理研究部門）

- (1) PMA-induced re-sensitization of desensitized TRPV1 is mediated by PKC epsilon and phosphorylation at Ser 800
Sraavan Mandadi（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）
- (2) 膀胱上皮細胞の蓄尿と痛みに関する検討
百田芳春（秋田大学医学部・機能制御医学講座）
- (3) テトロドトキシン非感受性ナトリウム電流はプロスタグランジンの影響を受けない
鄭泰星（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学）
- (4) 侵害受容性小型 DRG ニューロンにおける $\text{Na}_v1.9$ 電流の異常増大（“キンドリング”）の誘発メカニズム
柿村順一（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学）
- (5) 後根神経節ニューロンの活動電位発生における TTX 非感受性 Na チャネル・ $\text{Na}_v1.9$ の役割
中本千泉（広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学）
- (6) 末梢神経特異的な新しい CRMP-2 isoform (periCRMP-2) の解析
片野泰代（関西医科大学 医化学）
- (7) GPR7 の侵害刺激伝達における役割
山本達郎（千葉大学大学院医学研究院・麻酔学領域）
- (8) ラットの三叉神経脊髄路核尾側亜核の侵害受容ニューロンに対する 5HT_{2A} 受容体サブタイプの役割
岡本圭一郎（和歌山県立医科大学医学部・生理学/解剖学）
- (9) ラット脊髄膠様質ニューロンにおける興奮性シナプス伝達のホスホリパーゼ A2 活性化による促進
藤田亜美（佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座）
- (10) 脊髄膠様質ニューロンにおける GIRK チャネルの機能的役割
中塚映政（佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座）
- (11) 関節前肢不動化モデル動物の行動学的変化と脊髄可塑的变化
大迫洋治（高知大学医学部 整形外科）
- (12) ラット癌性疼痛モデルにおける機械的および熱性痛覚過敏に対する TRPV1 および TRPV2 の関与
篠田雅路（名古屋大学大学院医学系研究科・機能形態学講座・機能組織学分野）
- (13) 脊髄後角膠様質細胞の形態学的分類と興奮性・抑制性シナプス入力との相関
八坂敏一（九州大学大学院医学研究院・統合生理学）
- (14) 脊髄内痛覚情報伝達に対するドーパミン受容体の作用
玉江昭裕（九州大学大学院医学研究院・統合生理学）
- (15) 脊髄内痛覚情報伝達に及ぼす ATP のシナプス前性および後性作用
塩川浩輝（九州大学大学院医学研究院・統合生理学）
- (16) ミクログリアにおける P2X_4 受容体の発現制御機構
津田誠（九州大学大学院薬学研究院・薬効解析学分野）
- (17) シスプラチンによって引き起こされる痛覚過敏のメカニズムの解析
堀紀代美（名古屋大学大学院医学系研究科・機能形態学講座・機能組織学分野）
- (18) 神経結紮誘発性神経因性疼痛に対するモルヒネ先制鎮痛効果
松本みさき（長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野）

(19) がん性神経因性疼痛とモルヒネ耐性

木口倫一 (長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・分子薬理学分野)

(20) 帯状疱疹後神経痛モデルマウスにおける皮膚神経線維の組織学的変化

佐々木淳 (富山大学・薬学部・薬品作用学)

(21) GeneChip による帯状疱疹痛モデルマウスの脊髄後角における網羅的遺伝子発現解析

高崎一朗 (富山大学生命科学先端研究センター)

(22) 神経根性疼痛モデルにおける遺伝子解析

高山文治 (福島県立医科大学 整形外科)

(23) 運動器障害によって作製した慢性痛症モデル動物：発症誘導要因としての炎症の役割は？

櫻井博紀 (愛知医科大学 痛み学講座)

(24) 加齢ラットにおける遅発性筋痛 (DOMS) について

松田輝 (名古屋大学環境医学研究所・神経性調節)

(25) 加齢変化が関与する異常疼痛発現の神経機構

北川純一 (日本大学歯学部 生理学)

(26) 求心路遮断性疼痛に対する鏡療法は自己受容感覚に関連した痛みにも有効である

住谷昌彦 (大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻酔集中治療医学講座)

(27) 病的痛みは視覚とクロスモーダルである

住谷昌彦 (大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻酔集中治療医学講座)

(28) 触覚刺激による痛覚抑制は皮質レベルで生じる

乾 幸二 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・感覚運動調節部門)

(29) 痛み関連脳活動の報告—第3報—

牛田享宏 (高知大学医学部 整形外科)

教育講演 (1) DRG における TRP family の発現と機能

野口光一 (兵庫医科大学・解剖)

教育講演 (2) ミクログリアの活性化と神経細胞傷害

錫村明生 (名古屋大学環境医学研究所・神経免疫)

教育講演 (3) イメージングによる痛覚認知メカニズムの研究：主として MEG と fMRI について

柿木隆介 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・感覚運動調節部門)

【参加者名】

森山 朋子 (弘前大学医学部), 梁瀬 晴子, 百田 芳春 (秋田大学医学部), 矢吹 省司, 関口 美穂, 高山 文治, 立原 久義, 渡辺 和之, 小林 義尊, 加藤 欽志, 町下 智 (福島県立医科大学医学部), 山本 達郎, 田辺 瀬良美, 土橋 玉枝 (千葉大学大学院医学研究院), 岩田 幸一, 北川 純一, 原田 聡之, 鈴木 郁子 (日本大学医学部), 高崎 一朗 (富山大学生命科学先端研究センター), 佐々木 淳, 藤田 真英, 大森 優 (富山大学薬学部), 鈴木 重行, 杉浦 康夫, 尾崎 紀之, 篠田 雅路, 堀 紀代美 (名古屋大学大学院医学系研究科), 肥田 朋子, 松居 宏樹, 岩本 泰子, 長谷川 多美子, 山本 綾, 森下 光 (名古屋大学医学部), 錫村 明生, 水村 和枝, 佐藤 純, 片野

坂 公明, 田村 良子, 松田 輝, 妹尾 詩織, 那須 輝頭 (名古屋大学環境医学研究所), 熊澤 孝朗, 橋本 辰幸, 山口 佳子, 櫻井 博紀, 高畑 成雄, 大道 裕介, 吉本 隆彦, 山田 郁美 (愛知医科大学医学部), 田崎 洋光 (鈴鹿医療科学大学保健衛生学部), 伊藤 誠二, 片野 泰代 (関西医科大学医学部), 真下 節, 住谷 昌彦 (大阪大学大学院医学系研究科), 仙波 恵美子, 岡本 圭一郎 (和歌山県立医科大学医学部), 松原 貴子, 大鶴 直史 (神戸大学医学部), 野口 光一 (兵庫医科大学医学部), 緒方 宣邦, 柿村 順一, 松富 智哉, 鄭 泰星, 中本 千泉 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科), 牛田 享宏, 川崎 元敬, 池本 竜則, 泉 仁, 西上 智彦, 大迫 洋治 (高知大

学医学部), 吉村 恵, 玉江 昭裕, 塩川 浩輝, 八坂 敏一 (九州大学大学院医学研究院), 井上 和秀, 津田 誠, 長谷川 茂雄 (九州大学大学院薬学研究院), 熊本 栄一, 中塚 映政 (佐賀大学医学部), 植田 弘師, 井上 誠, 松本 みさき, 木口 倫一 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科), 柿木 隆介, 乾 幸二 (生理学研究所 感覚運動調節研究部門), 富永 真琴, 富永 知子, 柴崎 貢志, 稲田

仁, 曾我部 隆彰, Mandadi Sravan, 富樫 和也, 東 智広, 村山 奈美枝 (岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理部門) 天野 賢一 (持田製薬 創薬研究所), 加藤 久晴(BTG), 米良 紀久, 近藤 渉 (日本たばこ産業(株)医薬総合研究所), 本田 繁之, 森江 俊哉, 池田 和仁 (大日本住友製薬(株)薬理研究所)

【概要】

最近の痛みの基礎研究の進展は目覚ましい。各種侵害受容器やイオンチャネルのクローニングと機能の解明が進み, 様々な動物モデルにおいて, 一次知覚伝達系や脊髄後角での細胞内シグナリングやグリアの活性化・サイトカインの産生等が痛覚系の可塑性に働くメカニズムが明らかにされてきた。しかし, これらの研究成果が, ヒトにおける疼痛にどのように関与しているかという点は, まだまだ未解明である。神経因性疼痛など鎮痛薬が奏効しない難治性の疼痛については, その発症機序の解明と新たな鎮痛薬の開発が急務となっている。また最近では, 痛みによる脳活動の変化が脳画像により可視化され, これまで不明であった脳による痛みの制御機構が明らかになり, 慢性痛のメカニズムの解明につながる事が期待されている。

痛みのメカニズムを解明し, その原因治療に迫るには, 基礎医学・臨床医学の各領域の研究者の共同作業が必要である。本研究会は, 痛みの発生と制御の分子機構につ

いて, 様々な側面から議論を行い, 新たな治療戦略の構築と, わが国の疼痛研究のさらなる発展を目指すものである。

平成 17 年度の本研究会では, 末梢から脳にいたる痛覚伝達系の各レベルでの研究の到達点と未解明の問題点が明らかにされた。末梢レベルでは, TRPV1 の感作・脱感作のメカニズム, TTX 非感受性 Na チャネルの痛覚受容における役割, 脊髄後角での可塑性におけるドーパミンや ATP, ミクログリア活性化の役割, また, 癌性神経因性疼痛モデル, 帯状疱疹後神経痛モデルにおける疼痛発症のメカニズム, さらに運動器障害による慢性痛や遅発性筋痛についても新たなモデルが提唱された。中枢レベルでは, 加齢による異常疼痛発症のメカニズム, 病的疼痛における視覚系の関与と治療への応用, 脳イメージング法を用いた痛みの中枢メカニズムの解析などの研究発表に対し, 活発な議論が行われた。

(1) PMA-induced re-sensitization of desensitized TRPV1 is mediated by PKC epsilon and phosphorylation at Ser 800.

Sravan Mandadi^{1,2}, Tomoko Tominaga^{1,2}, Mitsuko Numazaki³,
Namie Murayama^{1,2}, Basil D. Roufogalis⁴, Makoto Tominaga^{1,2}

(¹ Section of Cell Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience,

² Department of Physiological Sciences, The Graduate University for Advanced Studies,

³ Department of Anesthesiology, University of Tsukuba School of Medicine,

⁴ Faculty of Pharmacy, University of Sydney)

Important mechanisms that regulate inhibitory and facilitatory effects on TRPV1-mediated pain are desensitization and phosphorylation, respectively. Using Ca²⁺-imaging, we have previously shown that desensitization of TRPV1 upon successive

capsaicin applications was reversed by protein kinase C activation in dorsal root ganglion neurons and CHO cells. Here, using both Ca²⁺-imaging and patch-clamp methods, we show that PMA-induced activation of PKCε is essential for increased

sensitivity of desensitized TRPV1. TRPV1 has two putative substrates S502 and S800 for PKC ϵ -mediated phosphorylation. Patch clamp analysis of HEK293 cells expressing single mutants S502A or S800A and double mutant S502A/S800A show equal contribution of S502 or S800 towards increased sensitivity of desensitized TRPV1. Since S502 is a non-specific substrate for TRPV1 phosphorylation by other kinases PKA or CAMKII, a role of PKC specific substrate S800 is further investigated. Evidence for *in vivo* phosphorylation of TRPV1 at S800 is demonstrated for the first time. We also show that

the expression level of PKC ϵ parallels the amount of phosphorylated TRPV1 protein. These results, obtained using an antibody specific for TRPV1 phosphorylation at S800. Furthermore, the anti-phosphoTRPV1 antibody detects phosphorylation of TRPV1 in rat DRG neurons and may be useful for research regarding nociception in native tissues. This study identifies PKC ϵ and S800 as important therapeutic targets that regulate sensitivity of TRPV1 and may be effectively used for better management of TRPV1-mediated pain states regulated by PKC.

(2) 膀胱上皮細胞の蓄尿と痛みに関する検討

百田芳春, 梁瀬晴子, 石濱寛子, 河谷正仁 (秋田大学医学部 機能制御医学講座)

過活動膀胱や間質性膀胱炎では尿意切迫感や蓄尿時膀胱痛という症状を引き起こし, 膀胱粘膜の知覚神経の異常な活動が推察されている。また膀胱上皮細胞は ATP や一酸化窒素を放出し, 知覚神経に情報を伝達している可能性が考えられている。膀胱は蓄尿時には交感神経が優位になり, β 作用を介する膀胱排尿筋の弛緩と, α 作用による内尿道括約筋の収縮によって蓄尿が維持されると認識されている。尿意切迫感や膀胱痛は蓄尿機能の異常と考えれば, 膀胱におけるアドレナリン作動性受容体の役割が重要になる。我々は, 膀胱にはアドレナリン作動性 α 1A, 1B 及び 1D 受容体を発現することを確認し, 膀胱上皮細胞には少なくとも α 1D を発現していることを明ら

かにし, 膀胱上皮細胞にベジクル性モノアミントランスポーターを発現すること, また膀胱上皮細胞にカテコールアミンを含むことを見出してきた。そこで蓄尿過程において, カテコールアミンの作用が優位になり, これらを受容する膀胱上皮細胞の α 1D 受容体が, 膀胱からの ATP の放出を調節し, 知覚神経を介する脊髄反射を引き起こし蓄尿の維持に関連していると考えた。 α 1D 受容体拮抗薬 (ナフトピジル, 1.5mg/kg) により, 膀胱拡張時に発生する知覚神経 (L6 後根線維) の放電および尿中 ATP 量が抑制された。従って, 何らかの膀胱拡張時に膀胱上皮から放出される ATP によって蓄尿時における膀胱痛が発生すると考えた。

(3) テトロドトキシン非感受性ナトリウム電流はプロスタグランジンの影響を受けない

鄭泰星, 柿村順一, 松富智哉, 中本千泉, 緒方宣邦
(広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学)

Nav1.8 および Nav1.9 は痛覚伝搬に関わる小型後根神経節(DRG)ニューロンに特異的に発現する TTX-非感受性 Na チャネルである。Nav1.8 によって引き起こされる Na 電流が prostaglandin E₂(PGE₂)により増強されることが報告されている。この結果は, 炎症などに伴う疼痛過敏の病態生理のひとつとして広く認められている。さらに最近, Nav1.9 についても同様の結果が報告されている。本報告は, これまでの私達の研究で得られた DRG ニュ

ーロンにおける TTX-非感受性 Na 電流に関する知見を基に, PGE₂ と Na チャネルの関連を再検討したものである。

Nav1.8 によって引き起こされる Na 電流は, PGE₂ によって全く影響を受けなかった。先に私たちは Nav1.9 電流について, 記録中に電流の大きさが一過性に増大するという現象(“kindling”)が観察されること, またこの kindling は ATP をピペット内に加えると抑制されることを報告している(Pflugers Arch, 449, 76-87, 2004)。ATP をピペッ

ト内に加え、kindling を抑制した条件下では、PGE₂ は Nav_v1.9 電流に対しても効果は認められなかった。細胞内環境に影響を与えないナスタチン法を用いて検討した場合も同様の結果であった。一方、全く同一の実験条件下で、カプサイシン投与による内向き電流は、PGE₂ によって著明に増大した。

PGE₂ は Nav_v1.8 および Nav_v1.9 による TTX-非感受性 Na

電流を増強しない。これまでに報告されている TTX-非感受性 Na 電流に関する実験では、Nav_v1.9 の kindling を PGE₂ の Na 電流に対する薬理作用であると誤認した可能性が考えられる。今回の結論は TTX-非感受性 Na チャンネルと PGE₂ の関連についての定説を根本的に否定するものである。

(4) 侵害受容性小型 DRG ニューロンにおける Nav_v1.9電流の異常増大 (“キンドリング”) の誘発メカニズム

柿村順一, 鄭泰星, 松富智哉, 中本千泉, 緒方宣邦

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学)

Nav_v1.9 は侵害受容性小型 DRG ニューロンに特異的に発現している Na チャンネルである。Nav_v1.9 電流のキンドリングは、細胞内環境が保たれた状態で記録することができるナスタチン法では観察されないことから、何らかの細胞内因子により調節を受けることが示唆される。私達は細胞内 ATP の減少がキンドリングを誘発する要因である事を既に報告している。しかし、ATP 以外の調節因子の関与は未だ明らかではない。そこで本研究では Nav_v1.9 電流に対する GTP および PKC 活性化薬 PMA の効果を検討した。

GTP (500 μM)を細胞内添加した群では、対照群と比較して、キンドリングの発生率およびピーク電流値の増大率に有意な差は認められなかった。PMA (100 nM)を添加した群では、発生率には影響が認められなかったが、増大率には有意な低下が認められた。PMA 添加群におい

て、保持電位-80mV ではピーク電流値が経時的に減少するが、-120mV では維持される現象がみられ、不活性化曲線の過分極側への移行が確認された。このことより、PMA による増大率の低下は、チャンネルの不活性化が原因であると考えられ、ATP によるキンドリングに対する直接的抑制作用とは異なるものである。

以上の事より、G タンパク質系や PKC 系が Nav_v1.9 のキンドリングに直接的に関与している可能性は低いと考えられたが、PKC 系はキンドリングと無関係に、Nav_v1.9 の不活性化を促進することが確認された。現時点においては、キンドリングを誘発する直接的な要因の一つとして、細胞内 ATP の減少が挙げられる。神経障害時に細胞内 ATP が枯渇することにより Nav_v1.9 電流が増大し、神経細胞の興奮性に対して促進的に作用する可能性が考えられる。

(5) 後根神経節ニューロンの活動電位発生における TTX 非感受性 Na チャンネル・Nav_v1.9の役割

中本千泉, 松富智哉, 鄭泰星, 柿村順一, 緒方宣邦

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科・病態探求医科学・神経生理学)

侵害情報を伝搬する小型 DRG ニューロンに特異的に発現している Nav_v1.9 は、他の Na チャンネルより過分極側に活性化閾値を示し、持続型の Na 電流を起こす。これらの性質から、Nav_v1.9 が活動電位の閾値下でニューロンの興奮性を制御している可能性が示唆される。本研究では、単一のマウス小型 DRG ニューロンにおいて、電位

固定法による Na 電流記録と電流固定法による活動電位記録を併せて解析することにより、Nav_v1.9 が活動電位発生に果たす役割を検討した。

Nav_v1.9 電流が記録されたニューロンにおける膜電位記録では、通常では活動電位が誘発されないような閾値下の脱分極通電によって起こる、TTX 投与によっても消失

しない持続的な脱分極反応が観察された。この脱分極反応は通電が終了した後も継続し、最終的に活動電位発生を誘導した。このことは、この脱分極反応が $\text{Na}_v1.9$ によるものであり、これが脱分極通電による受動的な脱分極に加えて閾値下での脱分極を増強し、活動電位の発生を促進したことを示す。さらに、 $\text{Na}_v1.8$ ノックアウトマウスにおいて、F イオンを細胞内陰イオンとして用いて $\text{Na}_v1.9$ 電流を異常に増大させたときのみ、TTX 存在下でも活動電位が起これることを見出した。この場合の活

動電位は通常と異なり、全か無の法則に従わず、脱分極通電の強さに依存した大きさを示した。

これらの結果から、小型 DRG ニューロンにおいて、正常時には、 $\text{Na}_v1.9$ は、それ自身では活動電位の本体にはならず、活動電位の発生に対して促進的調節を行っていることが示された。さらにその大きさが異常に増大するような状況では、それ自身が、非定型的ではあるが、活動電位の本体になり得ることが示された。

(6) 末梢神経特異的な新しい CRMP-2 isoform (periCRMP-2) の解析

片野泰代 (関西医科大学 医化学教室)

【目的】 1 次求心性線維は侵害刺激を脊髄へ伝達する。刺激に伴い後根神経節細胞(DRG)では CGRP や SP などの生理活性物質が産生され、DRG の中枢側と末梢側へ極性をもって輸送される。物質輸送の極性決定機構を明らかにする目的で DRG 中枢側(C fraction)と末梢側(P fraction)神経線維を用いたプロテオミクス解析を行い、P fraction に特異的な分子を同定し、更なる解析を行ったので報告する。

【方法】 C および P fraction は L4-6 の脊髄神経より得、可溶化後、ラージサイズ(20 X 70cm)ゲルを用い 2 次元電気泳動を行った。銀染色後、発現量に有意差がある、あるいは特異的なスポットを MALDI TOF-MS にて同定した。同定分子に対し、生理機能を明らかにするために坐骨神

経損傷モデルを用い解析した。

【結果と考察】 P fraction 特異的分子として CRMP-2 を同定した。CRMP-2 は神経系に広く存在し、発生過程で重要な機能を担う。また修飾などの違いにより複数のスポットとして検出されるが、同定した CRMP-2 スポットは脊髄、DRG、脳などの組織には認められなかったことから P fraction に特異的であるとし periCRMP-2 と名付けた。現時点では、他の CRMP-2 スポットとの構造、修飾の違いについては明らかになっていない。periCRMP-2 は坐骨神経結紮後、その発現量が減少することから末梢組織に特異的な神経変性および再生機構への関与が示唆された。

(7) GPR7の侵害刺激伝達における役割

山本達郎 (千葉大学大学院医学研究院麻酔学領域)

GPR7 は、1995 年に発見された orphan G protein coupled receptor である。この受容体は、オピオイド受容体とソマトスタチン受容体に高い相同性を有しており、神経細胞に発現していることが報告されている。GRP7 は大脳皮質・海馬・視床下部・脊髄に分布していることが知られてきた。2002 年その内因性リガンドとして neuropeptide W (NPW) と neuropeptide B (NPB) が相次いで報告された。NPW や NPB を GPR7 に作用させると、forskolin による cAMP の蓄積が抑制される。最近の報告では、炎症や神

経因性疼痛時に GPR7 の発現がシュワン細胞で増加することが報告されている(Zaratin et al, 2005)。また、NPB-null mice では炎症時の hyperalgesia の発症が抑制されることが報告されている(Kelly et al, 2005)。我々は各種疼痛モデルにおける NPW と NPB をラット髄腔内投与の効果を検討した。NPW, NPB は投与量依存性に、フォルマリントの疼痛行動、カラゲニン皮下注による mechanical allodynia・Seltzer モデルでの mechanical allodynia を抑制した。しかしながらコントロールラットにおける hot

plate test と von Frey hair により mechanical nociceptive test では鎮痛効果を示さなかった。これらの結果から、GPR7

は脊髄後角細胞の過敏化に関係した疼痛に選択的に作用することが明らかとなり、今後の展開が期待される。

(8) ラットの三叉神経脊髄路核尾側亜核の侵害受容ニューロンに対する 5HT_{2A} 受容体サブタイプの役割

岡本圭一郎, 木村晃久, 堂西倫弘, 玉井靖彦 (和歌山県立医科大学医学部生理学第一)
仙波恵美子 (和歌山県立医科大学医学部解剖学第二)

Temporomandibular disorder は顎顔面部の慢性疼痛を主症状とする病態である。原因として中枢神経系の可塑的变化によるメカニズムが示唆され、内因性の疼痛制御機構の変調が関与しているとされる。三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)の侵害受容ニューロンは5HT 性下行性入力によって 5HT_{2A} 受容体を介しその興奮性が変調されると推測される。今回 Vc 部の 5HT_{2AR} の役割を電気生理学的 (細胞外記録), Fos 免疫組織化学的, 行動学的 (顎顔面部ホルマリンテスト) に雄ラットを用い検討した。Vc と C2 脊髄の移行部 (Vc/C2)の浅層から Deep unit (顔面部深部組織に機械刺激に対する受容野を持つが皮膚から

の入力を持たない) または WDR unit を単離した。Vc/C2 部表面に 5HT_{2AR} 作動薬(DOI)を滴下しておくホルマリン咬筋注射 or pinch 刺激によって引き起こされる Deep or WDR unit activity は vehicle 群に対し低下した。DOI を脳室内投与するとホルマリンの咬筋注射による Fos 陽性細胞数は vehicle 投与群と比較して Vc/C2 部の浅層で減少した。Intracisternal に DOI を投与するとホルマリン咬筋刺激による顔面部の疼痛関連行動時間は vehicle 群と比較して短縮した。以上の結果は Vc/C2 領域に存在する 5HT_{2AR} は顎顔面部侵害刺激に対し抗侵害作用を示し、顎顔面痛の発現や持続に深く関与することを示唆する。

(9) ラット脊髄膠様質ニューロンにおける興奮性シナプス伝達のホスホリパーゼ A₂活性化による促進

藤田亜美, 岳海源, 柳涛, 古賀亜希子, 中塚映政, 熊本栄一 (佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座)

脊髄後角の痛み伝達におけるホスホリパーゼ A₂(PLA₂) の役割を知るために, PLA₂ 活性化作用を持つメリチンが, 皮膚末梢から脊髄に入力する痛み情報の制御に重要な役割を果たす膠様質ニューロンの興奮性シナプス伝達にどんな作用を及ぼすかを調べた。実験は, 成熟ラット脊髄横断薄切片の膠様質ニューロンにホールセル膜電位固定法を適用することにより行った。メリチンは濃度依存性に自発性の興奮性シナプス後電流(sEPSC)の発生頻度を増加させた (EC₅₀ = 1.1 μM)。この作用は PLA₂ 阻害剤 (4-bromophenacryl bromide, 10 μM), 細胞外 Ca²⁺ 除去, Ca²⁺

チャンネル阻害剤 La³⁺(30 μM)により抑制される一方, アラキドン酸(AA)代謝阻害剤である indomethacin (INDO; 100 μM) や nordihydroguaiaretic acid(NDGA; 100 μM)により影響を受けなかった。メリチンと同様な sEPSC 発生頻度増加は AA(50 μM)によってもみられ, これも INDO や NDGA により影響を受けなかった。以上より, 脊髄後角の PLA₂ 活性化により生成される AA は, その代謝経路を介さずに神経終末の膜電位依存性 Ca²⁺ チャンネルを通して細胞外から細胞内へ流入する Ca²⁺ 量を増加させることによりグルタミン酸放出を促進すると示唆される。

(10) 脊髄膠様質ニューロンにおける GIRK チャネルの機能的役割

中塚映政, 藤田亜美, 古賀亜希子, 柳涛, 熊本栄一 (佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座)

G 蛋白共役型 K チャネル (GIRK チャネル) は中枢神経系に広く存在し, シナプス伝達に重要な役割を果たしている。これまでに GIRK チャネルには4つのサブユニット(GIRK1-4)が存在することが明らかとなっているが, 近年, 脊髄において GIRK1 と GIRK2 サブユニットが膠様質に特異的に発現しており, 熱性痛覚過敏やモルヒネの鎮痛作用などに関与することが指摘された。今回, 我々は後根付き成熟ラット脊髄横断切片の膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用して, 痛覚情報伝達における GIRK チャネルの機能的役割を検討した。後根を反復性電気刺激しても膠様質ニューロンに緩徐なシナプス応答は観察されなかったが, 脊髄深層を局所的に反復性電気

刺激すると約30%の膠様質ニューロンにおいて緩徐な抑制性シナプス後電流(slow IPSC)が発生した。この slow IPSC の振幅は刺激回数依存的に増強し, 灌流液から Ca を除去することによって有意に減少した。また, slow IPSC の振幅は K チャネル阻害剤存在下および細胞膜 G タンパク質阻害剤存在下において著明に減少し, GIRK チャネル阻害薬によって有意に抑制された。以上の結果より, 脊髄介在ニューロンあるいは下行性抑制性神経線維終末から遊離される内因性神経伝達物質によって GIRK チャネルが活性化し, 膠様質ニューロンの膜が過分極することが明らかとなった。したがって, 本機序が脊髄内 GIRK チャネルの鎮痛機構に寄与することが示唆された。

(11) 関節前肢不動化モデル動物の行動学的変化と脊髄可塑的变化

大迫洋治 (高知大学医学部 神経生物・解剖学教室)

牛田享宏, 川崎元敬 (高知大学医学部 運動機能学教室)

西上智彦 (高知大学医学部 リハビリテーション部)

骨折, 捻挫, 打撲などの運動器の診療に際し, 保存療法の一部として局所の安静が用いられることが多い。しかし近年, 関節の不動化に伴う廃用が筋骨格系の運動機能障害のみならず患肢の痛みなどの発症要因となっていることが指摘されている。そこで我々は, 関節の不動化が感覚情報処理機能に及ぼす影響について検討する目的で, ギブス固定法により作製した手関節拘縮モデルラットの行動学的および電気生理学的解析を行い, 以下のような興味深い変化を認めている。①拘縮に陥った前肢(以下患肢)はグルーミング, 摂食行動, 歩行などの ADL

動作に用いることはない。②患肢を触られると逃避行動を示す。③脊髄後角細胞において関節運動や痛みの伝達に関与する wide-dynamic range (WDR)細胞数の割合が増加している。今回はこれら行動学的・電気生理学的評価に加え, モデル動物の脊髄における神経ペプチドの放出や最初期遺伝子の発現など神経化学的解析結果を報告する。モデル動物に認められるこれらの変化は, 関節の拘縮に伴う不動化が脊髄へ入力する感覚情報を長期的に変調し, ひいては脊髄内細胞の性格にも可塑的变化を引き起こしている可能性を示唆すると考える。

(12) ラット癌性疼痛モデルにおける機械的および熱性痛覚過敏に対する TRPV1, TRPV2の関与

篠田雅路, 荻野亜希奈, 尾崎紀之, 杉浦康夫

(名古屋大学大学院医学系研究科 機能形態学講座 機能組織学分野)

【目的】 癌の進展により自発痛, 機械的および熱性痛覚過敏が生じるが, そのメカニズムは不明な点が多い。今回わ

れわれはラットの癌性疼痛モデルの作成を試みた。また腫瘍部位における自発痛、機械的および熱性痛覚について、熱感受性受容体である TRPV1, TRPV2 の関与を検討した。【方法】Fisher 系ラット(9W, ♂, n=6)の足底に扁平上皮癌(SCC-158)を移植し、腫瘍部位における自発痛、機械的および熱性痛覚閾値の変化を観察した。腫瘍移植 22 日後 Capsazepine (TRPV1 アンタゴニスト) および Ruthenium red (TRPV1,2 アンタゴニスト) を腫瘍部位に投与し、痛覚閾値の変化を観察した。また後根神経節(DRG) における TRPV1,2 の発現の変化を観察した。

【結果】腫瘍移植 14 日目以降、腫瘍移植部において自発痛、機械的および熱性痛覚過敏が出現した。反対側の足底においても熱性痛覚過敏が出現した。機械的痛覚過敏は Capsazepine ならびに Ruthenium red により、熱性痛覚過敏は Ruthenium red により完全に抑制された。また腫瘍移植側 DRG において、中型および大型の TRPV1 陽性細胞と大型の TRPV2 陽性細胞が増加した。反対側 DRG では大型の TRPV1 陽性細胞が増加した。【考察】癌による機械的痛覚過敏には TRPV1, 熱性痛覚過敏には TRPV1 と TRPV2 の関与が示唆された。

(13) 脊髄後角膠様質細胞の形態学的分類と興奮性・抑制性シナプス入力との相関

八坂敏一 (九州大学大学院医学研究院 統合生理学)

痛みを伝える主な線維である A δ および C 線維は脊髄後角・特に膠様質にシナプスを作る。膠様質細胞は全て介在神経で、その約 30%が抑制性伝達物質を持っており、また脳幹からの下行性調節系線維からの入力も受けているため、膠様質は痛み情報が最初に修飾される部位として注目されている。膠様質細胞は電気生理学的・形態学的・神経化学的に多様であることが知られており、近年これらの要素を組み合わせることで膠様質細胞の特徴を調べる試みがいくつか報告されている。これらの報告ではそれぞれの細胞タイプについて、主に後根刺激による興奮性のシナプス応答が調べられている。脊髄における抑制性神経伝達が正常な感覚情報処理に必須であることはよく知られていることであるが、後根刺激による抑制性シナ

プス応答については一部しか報告されていない。今回我々は、脊髄後角膠様質細胞の形態を分類し、それぞれの細胞タイプで観察される後根刺激により起こる興奮性および抑制性シナプス入力を調べた。細胞のタイプは 4 種類に分類され、それらはこれまでの報告とよく一致するものであった。細胞タイプごとのシナプス入力を調べたところ、細胞タイプごとに特徴的な入力パターンを持っていることが明らかとなり、それぞれに異なった神経回路を介していることが推測された。我々の結果と他の報告とを考え合わせると、脊髄膠様質においていくつかのタイプの異なる神経細胞が複雑に絡み合った機能的モジュールを形成していることが示唆された。

(14) 脊髄内痛覚情報伝達に対するドーパミン受容体の作用

玉江昭裕 (九州大学大学院医学研究院 統合生理学)

下行性痛覚抑制経路の一つにドーパミン系の関与が示唆されてきたが、その作用機序に関しては明らかではなかった。そこで細胞レベルでのメカニズムを理解するため、我々は行動学的研究および脊髄膠様質からのホールセルパッチクランプ法を用いて痛覚情報伝達におけるドーパミンの働きを検討した。ドーパミンの髄腔内投与は機械的痛覚閾値を上昇させ、D2 様受容体作動薬は同様の作用を示したが、D1 様受容体作動薬は作用を示さなかつ

た。電流固定下において、ドーパミンは膠様質神経細胞を過分極させ、後根電気刺激により誘起された活動電位を抑制した。電圧下では、TTX 存在下にドーパミンは外向き電流を誘起し、それは電極内液への Cs⁺もしくは GDP- β -S 付加により阻害され、またバリウム存在下において抑制された。ドーパミンにより誘起された電流の逆転電位は、ネルンストの式により計算された K⁺チャネルの平衡電位にほぼ一致した。D2 様受容体作動薬はドーパ

ミンによる外向き電流と同様の作用を示したが、D1様受容体作動薬は何ら作用を示さなかった。また、ドーパミンによる外向き電流は、D2様受容体拮抗薬によって抑制され、D1様受容体拮抗薬では抑制されなかった。一方、ドーパミンは微小EPSCの振幅および発生頻度には有意

な変化を引き起こさなかった。これらにより、ドーパミンは主にシナプス後性に働き、D2様受容体を介しG蛋白によって仲介されるK⁺チャンネルを活性化し、膠質細胞に外向き電流を誘起することが示唆された。

(15) 脊髄内痛覚情報伝達に及ぼすATPのシナプス前性および後性作用

塩川 浩輝, 古江 秀昌, 吉村 恵 (九州大学大学院医学研究院 統合生理学)
中塚 映政 (佐賀大学医学部医学科生体構造機能学講座)

近年、ATP-P2X受容体は脊髄後角において侵害性感覚情報を修飾することが明らかとなり、注目されている。今回、我々はラット脊髄スライス標本を用いて脊髄後角深層細胞からパッチクランプ記録を行い、シナプス前ならびにシナプス後細胞におけるP2X受容体の役割を薬理的に検討した。約60%の脊髄後角深層細胞において、ATP受容体広作動域作動薬であるATP- γ Sの灌流投与によって内向き電流が観察された。しかし、同一細胞において、P2X受容体作動薬である α,β -methylene ATPの灌流投与による内向き電流は観察されなかった。一方、ATP- γ Sあるいは

α,β -methylene ATPの灌流投与によって、約70%の細胞においてグルタミン酸を介する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。ATP- γ Sの灌流投与によって生じた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は、いずれもATP-P2X受容体拮抗薬であるPPADSによって阻害され、TNP-ATPによっては阻害されなかった。以上の結果より、脊髄後角深層細胞のシナプス前とシナプス後細胞には異なるサブタイプのATP-P2X受容体が発現しており、異なったメカニズムで痛覚情報を増強することが明らかになった。

(16) ミクログリアにおけるP2X₄受容体の発現制御機構

津田 誠, 井上和秀 (九州大学大学院薬学研究院薬効解析学分野)

最近、神経因性疼痛に脊髄後角でのグリア細胞の役割が注目されている。以前我々は、神経因性疼痛動物モデルの脊髄後角において、ATP受容体サブタイプであるP2X₄受容体の発現がミクログリアで著明に増加し、同受容体を遮断することでアロディニアが抑制されることを報告した。すなわち、ミクログリアにおけるP2X₄受容体の発現増加が神経因性疼痛発症において重要なステップであることを示した。本研究では、P2X₄受容体の発現制御機構として、細胞外マトリックス分子であるフィブロネクチン(FN)およびその膜受容体であるインテグリンを介する経路を見出した最近の研究成果について報告する。

初代培養ミクログリア細胞をFNで処置することで、P2X₄受容体のmRNAおよびタンパク質レベルが増加し、P2X₄受容体介在性の細胞内カルシウム応答も増大した。FNによるP2X₄受容体発現増強作用は、インテグリン機能阻害抗体で抑制され、また、MEK阻害剤で著明に抑制された。In vivo神経因性疼痛モデルの脊髄後角では、P2X₄受容体の発現増加初期に、FN発現レベルの増加が認められ、さらに、ERKの活性化もミクログリア特異的に誘発された。以上の結果より、FNはMAPキナーゼを活性化してP2X₄受容体発現を増加すると考えられ、in vivoにおいてもミクログリアでのP2X₄受容体発現増強機構の一端を担っている可能性が示唆された。

(17) シスプラチンによって引き起こされる痛覚過敏のメカニズムの解析

堀 紀代美, 尾崎紀之, 篠田雅路, 杉浦康夫

(名古屋大学大学院医学系研究科 機能形態学講座 機能組織学分野)

鈴木重行 (リハビリテーション療法学専攻 理学療法学分野)

【目的】シスプラチン投与ラットにみられる痛覚過敏のメカニズムを明らかにするため、皮膚および筋の知覚神経におけるイオンチャネルの発現を調べた。

【方法】SD 雄性ラットにシスプラチンを反復投与した。皮膚と筋に対する痛覚テストを行なった後、後根神経節(DRG)を採取し、TRPV1, TRPV2, P2X₃, ASIC3 の発現を免疫組織化学的に調べた。また、逆行性トレーサー Fluoro-Gold(FG)を用い、腓腹筋由来の DRG 細胞におけるイオンチャネルの発現も調べた。

【結果】シスプラチン投与群では皮膚の機械的痛覚過敏が確認され、また熱性痛覚鈍麻となる傾向が見られた。また、シスプラチン投与群では腓腹筋の圧痛閾値の低下と

握力の低下を認め、筋の痛覚過敏の存在も示唆された。

シスプラチン投与群の DRG では TRPV2, P2X₃, ASIC3 陽性細胞数が有意に増加し、P2X₃ と ASIC3 は FG で標識された筋由来の DRG 細胞でも有意に増加していた。

【結論】シスプラチン投与により皮膚の機械的痛覚過敏に加え、筋の痛覚過敏も示唆された。DRG において TRPV2, P2X₃, ASIC3 陽性細胞が増加していたことから、シスプラチンによる痛覚過敏にはこれらのイオンチャネルの関与が考えられた。また筋由来の DRG 細胞においても P2X₃, ASIC3 陽性細胞が増加しており、筋の痛覚に変化をもたらしていると思われた。

(18) 神経結紮誘発性神経因性疼痛に対するモルヒネ先制鎮痛効果

松本みさき, 井上 誠, 植田弘師 (長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野)

【目的】神経因性疼痛治療の一つとして、神経傷害前に薬物を適用するという先制適用が有効であることが知られている。本研究では、坐骨神経結紮誘発性神経因性疼痛に対するモルヒネの先制適用の有効性を評価し、その分子機構を明らかにすることを目的としている。

【方法】ddY 系雄性マウス (体重 20-24 g) を用い、マウス右後肢の坐骨神経の半分を完全に結紮することで神経因性疼痛モデルを作成した。鎮痛効果の指標として、右後肢に熱刺激あるいは機械刺激を与え、後肢を退くまでの閾値を評価した。

【結果】以下の4点について明らかになった。①坐骨神経結紮 30 分前にモルヒネを皮下投与することで、結紮 7 日後に認められる熱性過敏応答ならびに機械性アロディ

ニアが完全に抑制された。②同様な鎮痛効果はモルヒネの脳室内前処置によっても観察されたが、脊髄クモ膜下腔内前処置では観察されなかった。③神経傷害後の脊髄後角において認められる c-Fos ならびに PKC γ の発現上昇も、結紮 30 分前にモルヒネを処置することで完全に抑制された。④モルヒネ前処置による鎮痛効果並びに脊髄蛋白質発現上昇に対する抑制効果はセロトニン受容体やノルアドレナリン受容体阻害薬の脊髄クモ膜下腔内処置により完全に拮抗された。

【考察】本研究からモルヒネは先制鎮痛効果を発揮することが明らかになった。その効果の分子機構としてはセロトニン系ならびにノルアドレナリン系下降性抑制神経の賦活化によるものであることが明らかになった。

(19) がん性神経因性疼痛とモルヒネ耐性

木口倫一, 三浦花子, 中原麻美, 井上誠, 植田弘師 (長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野)
下山恵美 (千葉大学 大学院医学研究院 自律機能生理学)

モルヒネに代表される麻薬性鎮痛薬は強力な鎮痛効果を示すが、一方で乱用時に依存性および耐性が形成されることが問題視されている。しかしがん患者の訴える疼痛緩和など、臨床の場において正しく用いられる限り、依存性および耐性は形成されないとされている。そこで今回我々は、がん性疼痛モデルにおける慢性疼痛下に、モルヒネ鎮痛効果と耐性形成がどのように影響を受けるかを検討した。

BALB/c 雄性マウスの右後肢坐骨神経近傍に Meth A Sarcoma 細胞腫 5×10^4 細胞を接種すると、15日後に外観上顕著な肥大が観察された。一方、熱および機械的刺激誘発性の痛覚過敏やアロディニア現象は接種後より徐々に観察され、15日後には最大となった。接種15日後の

剖検では肥大したがん細胞が坐骨神経を絞扼し、神経を損傷していることが観察された。正常マウスおよびがん性疼痛マウスの両群において、モルヒネ (3mg/kg) 投与はいずれも有意な鎮痛効果を示したが、両群における鎮痛効果の曲線下面積(AUC)には有意差は観察されなかった。モルヒネ (3 mg/kg) を1日1回、6日間慢性的に投与したとき、正常マウス群では鎮痛効果が30%程度に減弱することが観察されたが、がん性疼痛マウス群では殆ど鎮痛効果の減弱は観察されなかった。これらの結果より、がんによる慢性疼痛時にはモルヒネ耐性形成能が欠如することが確認された。本発表の機会を通じてがん末期におけるモルヒネ増量とモルヒネ耐性との関連について議論してゆきたいと考えている。

(20) 帯状疱疹後神経痛モデルマウスにおける皮膚神経線維の組織学的変化

佐々木淳 (富山大学 薬学部 薬品作用学)

帯状疱疹後神経痛では、衣類が擦れるだけで激しい疼痛感覚を生じるアロディニアが認められることが多く、その発現部位は疱疹部位だけでなく隣接した皮膚節にも及ぶ。アロディニア部位が疱疹部位を越えて広がる説明として、疱疹部位を支配する末梢神経損傷をトリガーとする中枢感作仮説が用いられることが多い。しかし、末梢神経の損傷領域とアロディニア発現領域との対応を詳しく調べた報告はない。そこで本研究では、帯状疱疹後神経痛モデルマウスを用いて、疱疹部位とそれに隣接した皮膚節におけるアロディニアの発現、皮膚神経線維の損傷の有無を調べた。疱疹部位では疱疹出現2-3日前からアロディニアが発現したが、隣接した皮膚節では疱疹出現とほぼ同時期から観察された。また、疱疹部位の方が

高いアロディニアスコアを示した。免疫染色法を用いて表皮内神経線維数を調べた結果、疱疹部、隣接した皮膚節共に、有意に神経線維数が減少しており、減少の程度は疱疹部の方が重度であった。神経興奮薬物であるカプサイシンにより誘発される疼痛関連行動の発現時間も、疱疹部、隣接した皮膚節共に、有意に減少した。坐骨神経の電子顕微鏡画像から、有髄神経線維数、無髄神経数共に、コントロールに比べて有意に減少しており、神経線維の変性も観察された。以上の結果より、アロディニア部位が疱疹部位を越えて広がるのは、末梢神経での強い免疫・炎症反応が、疱疹部位だけではなく、隣接した皮膚節の神経線維も損傷してしまうことが原因の一つであることが示唆される。

(21) GeneChip による帯状疱疹痛モデルマウスの脊髄後角における網羅的遺伝子発現解析

高崎 一朗 (富山大学・生命科学先端研究センター・ゲノム機能解析分野)

谷口 佳奈, 佐々木 淳, 倉石 泰 (富山大学・薬学部・薬品作用学)

本研究では、帯状疱疹痛の疼痛関連遺伝子の同定と治療薬開発のためのターゲット分子の探索を目的として、マウスに単純ヘルペスウイルス I 型(HSV-1)を経皮接種することにより作製される帯状疱疹痛モデルマウスを用い、脊髄後角における遺伝子発現を網羅的に解析した。

雌性 C57BL/6J マウスを使用し、後肢膝関節下部に HSV-1(1×10^6 pfu)を経皮接種した。疼痛関連反応の測定は、von Frey filament (1.6 mN および 9.8 mN) を使用し、後肢足蹠に適用した際に生じる逃避反応を疼痛関連行動の指標とした。網羅的遺伝子発現の解析には 10,000 種類以上のプローブが搭載されたマウス発現解析用 GeneChip(Murine Genome U74Av2, Affymetrix)を使用した。

HSV-1 接種マウスの脊髄後角から RNA を抽出し、Affymetrix 社のプロトコルに従い GeneChip 解析を行った。

HSV-1 接種マウスは、帯状疱疹様の皮疹を発症し、アロディニアと痛覚過敏が観察された。脊髄後角を接種側と非接種側に分けて RNA を抽出し、GeneChip 解析を行ったところ、非接種側と比較して接種側で 2 倍以上発現の増大する遺伝子が 139 個、1/2 以下に発現の減少する遺伝子が 9 個検出された。

今回は発現の増大した遺伝子に注目し、いくつかのターゲット分子に対する阻害薬、抗体投与およびノックアウトマウスにおける行動解析を行ったので紹介したい。

(22) 神経根性疼痛モデルにおける遺伝子解析

高山 文治, 菊地 臣一, 矢吹 省司, 関口 美穂, 渡辺 和之, 立原 久義 (福島県立医科大学整形外科講座)

藤田 勇, 今里 暁, 中谷 紀章², 嶋田 英輝², 新庄 勝浩 (ファイザー(株)中央研究所)

【目的】 腰椎椎間板ヘルニアによる疼痛の病態には、機械的因子と化学的因子の両者が関与していると考えられている。機械的因子とは、ヘルニア塊による神経組織の機械的な圧迫のことであり、化学的因子とは、椎間板髄核に含まれるサイトカインなどの炎症惹起物質のことである。疼痛の機序を解明するためには、機械的因子と化学的因子を区別する 2 種類の神経根性疼痛モデルの検討が必要である。我々は、これらの 2 種類のモデルでの疼痛の機序を解明するため、Gene Chip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

【方法】 ラットの第 5 腰椎椎弓の後根神経節 (DRG) の直上に骨孔をあけ、機械的因子としてステンレス製の rod を挿入したモデル (rod 群) と化学的因子として尾椎から採取した髄核を留置したモデル (髄核群) を作成した。von Frey filament を用いた痛覚閾値の測定を行い、閾値の低下を認

めたラットのみから DRG 組織を採取し、GeneChip 解析を行った。

【結果】 行動学的検討では、両群で術後 3 日より疼痛閾値の低下を示し、術後 21 日まで持続した。GeneChip 解析では、術後 3 日は両群ともに類似した遺伝子発現変動が認められた。しかし、術後 7 日目は、rod 群と髄核群では、異なる遺伝子の発現変動が認められた。rod 群では、炎症に関連した遺伝子と cell cycle に関連した遺伝子の発現上昇が認められた。一方、髄核群では、疼痛に関与していると考えられるイオンチャンネル遺伝子の発現上昇が認められた。

【考察】 本研究の結果より、機械的因子と化学的因子による疼痛の機序は、時間の経過に伴い異なってくる機序が存在する可能性が示唆された。

(23) 運動器障害によって作製した慢性痛症モデル動物：発症誘導要因としての炎症の役割は？

櫻井博紀¹，橋本辰幸¹，大道裕介¹，吉本隆彦^{1,2}，高畑成雄^{1,3}，江口国博^{1,4}，山口佳子¹，熊澤孝朗¹

(¹愛知医科大学痛み学講座，²名古屋大学大学院医学系研究科

³札幌医科大学大学院医学研究科，⁴愛知学院大学歯学部生理学講座)

運動器障害が慢性痛症の発症の原因の一つとして考えられている。これまで、我々は運動器障害を誘因として長期の痛み行動を呈する慢性痛症モデルラットを 2 種類発した。

筋傷害性モデル：一側下肢腓腹筋内側頭に LPS に続き 24 時間後に高張食塩水を反復投与することで作製。

不動化モデル：一側下肢を屈曲位で 2 週間ギプス固定することで作製。

これらのモデルは足底での痛み行動が両側性に亢進し、10 週以上持続する。

この長期の痛み行動は反対側まで及ぶことより中枢の

関与が示唆された。

LPS による炎症誘発が痛み行動の長期持続に関与している可能性を考え、不動化モデルにおいて、ギプス固定前に LPS を投与したところ、逆に痛み行動は長期持続しなかった。また、筋傷害性モデルにおいても LPS を高濃度にする痛み行動は長期持続しなかった。

これらのことより、慢性痛症発症に至る LPS による炎症誘発として、ある至適条件が伴わなければならないことが示唆された。条件として、炎症の程度、および、炎症誘発後から次の刺激が加わるまでの時間の 2 点が可能性として考えられる。

(24) 加齢ラットにおける遅発性筋痛 (DOMS) について

松田 輝¹，田口 徹，田村 良子，水村 和枝 (名古屋大学環境医学研究所 神経性調節分野

¹名古屋大学大学院医学系研究科 リハビリテーション療法学専攻)

不慣れな運動後に生じる筋痛 (遅発性筋痛：以下 DOMS) は筋の圧痛を主な特徴とし、強度で不慣れな運動を行ってから 24~72 時間後にピークとなるが、安静時の痛みはほとんどない。そのメカニズムは不明だが、伸張性収縮 (Eccentric Contraction：以下 ECC) によって生じやすいことが知られている。そこで我々は、若年ラット (8 週齢) に ECC を負荷し、筋圧痛閾値、脊髄後角における c-Fos 陽性細胞の発現を指標に、ラットにおいても DOMS が生じることを示した。

今回、130~139 週齢の加齢ラットを用いて、長指伸筋 (EDL) に ECC を負荷し、圧痛閾値測定と c-Fos の脊髄後角における発現を指標に加齢による DOMS の変化を調

べた。その結果、圧痛閾値は若年ラットでは ECC 負荷後 1~3 日目まで有意に低下し (2 日目に最低値)、4 日目に戻ったが、加齢ラットでは、1~5 日目まで有意に低下し (3 日目に最低値)、7 日目で戻り、遅発性筋肉痛が長く続くことが明らかになった。ECC3 日後 (若年群では 2 日後) に運動筋を圧迫刺激することによって生じる c-Fos 蛋白発現は、若年ラットでは脊髄 L4 レベルの後角表層にのみ有意に増加したが、加齢ラットでは脊髄 L4 に加え L5 レベルの後角表層にも有意な増加が観察され、筋からの痛み情報が若年ラットよりも脊髄の広いレベルに伝達されることが明らかになった。

(25) 加齢変化が関与する異常疼痛発現の神経機構

北川純一，坪井美行，岩田幸一 (日本大学 歯学部 生理学)

高齢化が進む日本において、身体機能の低下を防止す

るため、加齢に伴う痛みの受容機構の変化を解明するこ

とは、高齢者の QOL の維持につながる重要な研究テーマであるといえる。今回は、我々がこれまでに調べた老齢ラットを用いて行ってきた加齢現象が痛覚受容に与える影響に関する研究結果について報告する。

免疫組織化学的検索により、成熟ラットの脊髄表層と深層には数多くのセロトニンおよびノルアドレナリン合成酵素であるドーパミンβヒドロキシラーゼ陽性線維が存在するが、老齢ラットでは有意に減少していた。後足底への CFA 注射後に誘導される発熱・腫脹は、老齢ラットにおいて成熟ラットより長期間持続した。脊髄後角に分布する WDR ニューロン活動は、炎症の有無に関わ

らず大きな違いはみられなかったが、成熟ラットの NS ニューロンの活動性は炎症により増加した。熱刺激に対して、炎症がない時には老齢ラットは、成熟ラットの応答性に比べ強い反応を示したが、CFA 注射後には、逆に成熟ラットの応答性が顕著に増加し、老齢ラットより強い反応を示した。老齢ラットの自発放電は炎症の有無に関わらず高い発火頻度を示していた。以上の結果から、加齢に伴う異常疼痛発症には、下行性疼痛抑制系の機能不全による上行路と下行路における機能のアンバランスが原因となる可能性が示された。

(26) 求心路遮断性疼痛に対する鏡療法は自己受容感覚に関連した痛みにも有効である

住谷昌彦, 真下節 (大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻酔集中治療医学講座)

宮内哲 (独立行政法人情報通信研究機構関西先端研究センター脳情報グループ)

【背景】幻肢痛の治療として報告された鏡療法は、CRPS に対しても有用とされ難治性疼痛全般への治療効果が期待される。しかしながら、幻肢痛に対する効果は逸話的でしかなく、これまで検証されたことはない。そこで今回我々は、幻肢痛を含む求心路遮断性疼痛に対して鏡療法を行い、その効果を検証した。

【対象】四肢切断 6 人, 腕神経叢損傷 4 人, 末梢神経損傷 2 人, 脊髄部分損傷 1 人

【方法】鏡療法: 1 日 1 回 10~15 分間, 健側四肢を鏡に映しながら自由に運動させ, 患側四肢が鏡の中で動いているような映像を観察させた。これを患者の希望に応じ数週間~数ヶ月継続した。その際, 自発的に述べる痛みの性質を適宜記録した。

【結果】鏡療法によって, 疼痛軽減 50%以上: 5 人, 25-50%軽減: 4 人, 0-25%軽減: 4 人であり, 有意な疼痛緩和が得られた(VAS: 6.15+/-1.8→4.38+/-2.4, $p<0.01$)。自発的に述べる痛みを exteroceptive な性質 (EX 群) (例: 針で刺されるような) と proprioceptive (PR 群) な性質 (例: 絞られるような) に分類すると, 鏡療法は PR 群に対して有意に疼痛緩和を示した($p<0.01$)。

【結論】鏡療法は, 求心路遮断性疼痛に対して有用である。特に自己受容感覚に関連した痛みの疼痛緩和効果が強い。皮膚受容器 (外受容器) は運動への関与が少ないことが知られており, 鏡療法は求心路遮断による知覚運動協応 (身体表象) の破綻を, 視覚を介して代償・補正する治療であると考えられる。

(27) 病的痛みは視覚とクロスモーダルである

住谷昌彦, 真下節 (大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学麻酔集中治療医学講座)

宮内哲 (独立行政法人情報通信研究機構関西先端研究センター脳情報グループ)

【背景】視覚と体性感覚が相互に影響を及ぼしあうことは既に知られている。我々はこれまで, CRPS 患者の病的な痛みあるいは求心路遮断による体性感覚経験の変化が視覚を介した空間認知に影響を与えることを示してきた。今回は, 視覚経験の変化が体性感覚認知, 特に病的

な痛みの認知に影響を与えるかを検討した。

【方法】20° プリズムによる非患側 (左右) 方向への視野偏位に対する順応を用いて視覚経験を变化させた。実験 1) 5 人の CRPS 患者 (患側: 右 4, 左 1) にプリズム順応を行った。実験 2) 右 CRPS 患者 2 人に対して患側方向視

野偏位プリズムなど複数のプリズムを用いてプリズム順応を行った。実験1, 2ともにプリズム順応は1日1回プリズムを着用して50ポインティング動作を2週間行う。順応前・順応直後・順応開始2週間後の3時点で疼痛の程度(VAS)・プリズム順応の程度を評価した。

【結果】実験1, 2ともに順応直後にVASが変化した患者はいなかったが, 5例全例で2週間後には疼痛が軽減した(VAS: 5.8+/-1.48→2.4+/-1.52, $p<0.02$) (実験1)。プリ

ズム順応は非患側方向の偏位に対して方向特異的に疼痛緩和効果があった(実験2)。

【結論】プリズム順応による視覚経験の変化は, 方向特異的に再現性のある疼痛緩和効果を示した。このことから, 病的な痛みは視覚とクロスモーダルであると言える。またプリズム順応によって疼痛緩和とともにCRPSの特徴的な症状も寛解したことから, 臨床応用できる可能性がある。

(28) 触覚刺激による痛覚抑制は皮質レベルで生じる

乾 幸二, 辻 健史, 柿木隆介

(自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・感覚運動調節研究部門)

痛む部位に触覚刺激を加えると疼痛が軽減することはよく知られており, 実験的にも確認されている。しかしながらその機序は明らかにされていない。MelzackとWall(1965)による閾門制御説の提唱以来, 多くの研究がこの抑制の責任部位を脊髄と考えそのメカニズムを検討してきたが, 抑制が皮質レベルで生じる可能性についてはほとんど検討されてこなかった。

【方法】9名の健康成人男性の背中(第9胸椎の高さ)に, 痛覚刺激(ES, 表皮内電気刺激法)と触覚刺激(TS, 皮膚表面電気刺激)を種々のタイミングで与え, 大脳皮質の応答を脳磁図を用いて記録した。TSからESまでのconditioning-test interval (CTI)は11条件で, それぞれ-500, -300, -100, -60, -40, -20, 0, 50, 100, 300, 500ミリ秒である。これにES及びTS単独呈示のコントロール条件を加え,

計13条件の記録を行った。

【結果・考察】痛みの程度(VASスコア)は, CTI-20msの条件で最も低かった。脳磁図では, ESにより刺激後150ミリ秒付近を頂点とする明瞭な磁場成分が全例で記録され, 信号源解析の結果は第一次体性感覚野と第二次体性感覚野が主な活動源であることを示した。ペア刺激の際のESに対する皮質応答は, 先行するTSにより顕著に抑制されたが, 遅れて皮質に到達する触覚信号(CTI-40, -60, -100ms)によっても明瞭に中断された。この結果は, この抑制が皮質レベルで生じたことを示す。抑制の程度は, TSの信号がESの信号よりも脊髄に先に到達するか遅れて到達するかに影響を受けず, 脊髄の関与は小さいか, なかったものと考えられる。

Inui K et al.: Cerebral Cortex, in press

(29) 痛み関連脳活動の報告—第3報—

牛田享宏, 池本竜則, 泉仁 (高知大学医学部整形外科)

村田和子 (高知大学医学部放射線部)

田中茂樹 (仁愛大学心理学科)

運動器における痛みの研究はこれまで局所の病態やそれに伴う疼痛発生メカニズムに主眼がおかれてきた。しかし, 痛みは主観的な感覚であるため局所のメカニズムだけでは説明出来ない点が多い事がわかってきている。そこで我々は患者本人が苛まされている痛みを理解するためには最終的に痛みを認識している脳の活動の分析を

行う必要があると考え, 脳SPECTやfunctional MRI(以下fMRI)を用いた研究を行ってきた。これまでの結果ではアロゲニアと痛覚過敏を持つ慢性の神経因性疼痛患者に対して, 疼痛部に実際に痛み刺激を加える“実体験タスク”を行うと帯状回, S1, S2に活動を認めた一方で痛みの中核である視床の活動は検出することが出来なかつ

た。また、アロデニア症状を有する患者に痛みの経験を想起させる“仮想の痛み刺激タスク”を用いて患者の中で引き起こされる脳内の信号伝達を捉える研究を行ったところ、“仮想の痛み刺激タスク”のビデオを見ただけでも少なからず不快感を訴えており、“実体験タスク”の際にみられる帯状回や前頭前野における脳活動を認めた。

次に我々は健常者に手掌を注射針で刺すような光景を“仮想の痛み刺激タスク”として視認させた際みられる脳活動部位を検出する実験を行った。この結果を患者の場合と比較することで、慢性疼痛患者特有の脳活動パターンについての調査も併せて行ったので報告する。

教育講演 (1) DRG における TRP ファミリーの発現と機能

野口光一 (兵庫医科大学 解剖学第2講座)

1997年にカプサイシン受容体 TRPV1 の遺伝子がクローニングされ、熱刺激によっても活性化され、複数の有効刺激を持つ多刺激痛み受容体として機能することが明らかとなって以降、TRP ファミリーの研究は盛んとなり、ペインリサーチにおける中心テーマとなっている。一次感覚ニューロンの神経終末に存在する TRP ファミリー分子が、温度刺激やその他刺激を活動電位に変換し、その情報が中枢へと伝達されると考えられており、その感受性の調節機構などに関して数多くの報告がなされている。

本研究会では、TRP ファミリー分子の中で、3つのサ

ブファミリーのそれぞれ代表的な分子、TRPV1, TRPA1, TRPM8 に関して、ラット DRG を用いて詳細に分布を調べた結果を報告する。また、TRPA1 や TRPM8 など、冷刺激に関与すると考えられている分子について、末梢炎症モデルやニューロパチックペインモデルにおける発現変化とその機能的意義についても報告する。さらに本教室でこの数年来研究を続けている細胞内シグナル伝達因子との関係に関する仕事にも触れたい。TRPA1 の特異的な発現から推察される特定の神経栄養因子による調節機構の可能性についても言及したい。

教育講演 (2) ミクログリアの活性化と神経細胞傷害

錫村明生 (名古屋大学環境医学研究所 神経免疫)

炎症性神経疾患のみならず虚血性疾患、変性性疾患においても変性に陥った神経細胞の周囲に活性化されたミクログリアが存在する。これらは、変性神経細胞からのシグナルにより活性化され、神経保護作用を担っている可能性も考えられるが、変性細胞を貪食・処理する役割や、反対に直接エフェクターとして神経細胞を傷害している可能性も考えられる。実際に *in vitro* の神経細胞とミクログリアの共培養系でみると、ミクログリアを活性化することにより周囲の神経細胞は細胞死に陥る。ミクログリアと神経細胞をミリポア膜で分離して培養し、直接の接触なしにミクログリアを活性化しても神経細胞死が誘導できることから、ミクログリア由来の液性因子が神経傷害性に働いていると考えられる。これら液性因子と

して、炎症性サイトカイン以外に、一酸化窒素やフリーラジカル、興奮性アミノ酸などがあげられている。また、海馬のスライス培養を LPS と IFN γ で刺激することにより、海馬の長期増強 (LTP) が抑制される。これは、培養中のグリア細胞が活性化されサイトカインをはじめとする液性の傷害因子を産生し、神経細胞の機能障害、特にシンプスの可塑性を障害することによると考えられる。この実験系に炎症性サイトカインや NO の産生阻害薬を添加すると、LTP の抑制は解除される。

以上の結果から活性化ミクログリアが直接あるいは間接的に神経細胞の生存、機能を障害することは明らかである。本研究会では、我々の実験成績を示し、ミクログリアの神経傷害機序について考察する。

教育講演 (3) イメージング手法による痛覚認知メカニズムの研究：主として MEG と fMRI について

柿木隆介 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・感覚運動調節研究部門)

ヒトでの脳内痛覚認知機構を、高い時間分解能 (ミリ秒単位) を有する脳磁図(MEG)と、高い空間分解能を有する機能的磁気共鳴画像(fMRI)を用いて解析した。近年の科学技術の進歩により、小径有髄の A δ 線維(first pain)と無髄の C 線維(second pain)を選択的に刺激することが可能となってきた。MEG は初期認知機構の解明に適している。A δ 線維刺激の場合、MEG の頂点潜時は上肢刺激では 200msec (C 線維刺激の場合は 750msec。以下も同様)、下肢刺激では 250msec 前後(1200msec)である。MEG を詳細に解析することにより、A δ 線維刺激、C 線維刺激共に、

左右の上下肢いずれの部位を刺激しても刺激対側の第 1 次感覚野(SI)と両側の第 2 次感覚野(SII), 島, 扁桃体, 帯状回が、時間的にオーバーラップしながら活動する事が明らかとなった。fMRI は視床, 島, 帯状回における活動部位の詳細な解析に適している。A δ 線維刺激, C 線維刺激共に、両側の視床, SII, 島, 帯状回に有意な活動上昇が見られた。島前部, 帯状回の一部, pre-SMA では、C 線維刺激により特異的に活動が上昇しており、second pain 認知に特異的な部位である可能性が示唆された。

25. TRP チャネル研究会

2006年7月13日-7月14日

代表・世話人：井上隆司（福岡大学医学部）

所内対応者：富永真琴（岡崎共同研究機構生理学研究所）

(1) 温度感受性 TRP チャネル

富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門）

(2) 癌性疼痛における TRPV1 の役割

尾崎紀之，浅井英明，長嶺健二郎，篠田雅路，杉浦康夫

(名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学機能組織学)

藤内 祝（細胞治療学（ハイメディック）寄附講座）

上田 実（頭頸部・感覚器外科学講座顎顔面外科学分野）

(3) シクロホスファミドによるマウス膀胱炎における TRPV1 の役割

中村靖夫，河谷正仁（秋田大学医学部機能制御医学講座器官制御学分野）

富永真琴，東智広，森山朋子（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門）

並木幹夫（金沢大学医学部泌尿器科）

(4) グリコール酸ピーリングによる表皮ターンオーバー促進のメカニズム

傳田澄美子，傳田光洋，日比野利彦（(株)資生堂 ライフサイエンス研究センター）

根岸 圭，櫛方暢晴，若松信吾（東京女子医科大学附属青山女性医療研究所・美容医療科）

(5) マクロファージに発現する TRPV2 チャネルの制御機構

長澤雅裕，小島至（群馬大学生体調節研究所）

(6) 筋細胞変性のメカニズム ～筋ジストロフィー，心筋症の新しい治療ターゲット～

岩田 裕子，片野坂友紀，重川宗一，若林繁夫（国立循環器病センター研究所）

(7) Microtubule-associated protein 7 類似蛋白 (MAP7R) による TRPV4 機械受容の閾値の調節

鈴木誠（自治医大薬理）

(8) マウス蝸牛外有毛細胞における TRPV4 受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 動態

沈静，久保伸夫，山下敏夫（関西医科大学耳鼻咽喉科学教室）

原田成信（はらだ耳鼻科）

鈴木誠（自治医科大学薬理学教室）

(9) TRPV4 シグナルは NaK-ATPase をリクルートするか

伊村明浩（京都大学大学院医学研究科・先端領域融合医学研究機構）

(10) TRP チャネルとしてのマウス PKD2L1 遺伝子の機能解析

村上 学，大場貴喜，徐 峰，佐藤栄作，尾野恭一，渡邊博之，伊藤 宏，飯島俊彦

(秋田大学医学部機能制御医学)

(11) 神経細胞死における TRPM2 の中心的な役割

金子周司，川上聖子，伊藤悦子，南 利幸（京都大学大学院薬学研究科，生体機能解析学分野）

久米利明，赤池昭紀（京都大学大学院薬学研究科，薬品作用解析学分野）

原 雄二，若森 実，高田悠記，森 泰生（京都大学大学院工学研究科，分子生物化学分野）

(12) 細胞容積調節に関与する TRPM7 チャネルの性質

沼田朋大，清水貴浩，岡田泰伸

(生理学研究所機能協関，総研大生理科学専攻，日本学術振興会)

(13) 心肥大シグナルと TRPC1 チャネル蛋白

大場貴喜, 渡邊博之, 高橋陽一郎, 伊藤 宏
(秋田大学医学部内科学講座 循環器内科学分野・呼吸器内科学分野)
村上 学, 尾野恭一, 飯島俊彦 (秋田大学医学部・機能制御医学講座)

(14) PLC γ 2 と TRPC3 の機能的相互作用による B 細胞受容体シグナルの増幅

沼賀 拓郎 (総研大・生命・生理)
森 泰生 (京都大学大学院工学研究科, 分子生物化学分野)

(15) Desensitization and activation of mTRPC5 expressed in HEK cells

Insuk So
(Department of Physiology and Biophysics,
Seoul National University College of Medicine, Korea)

(16) チロシンリン酸化による TRPC チャネルの活性制御

久恒智博 (理研・発生神経生物)
黒田有希子, 中村健, 道川貴章, 水谷顕洋 (東大医科研・脳神経発生分化)
中村京子, 井上貴文 (カルシウムオシレーション国際プロジェクト・科技団)
御子柴克彦 (理研・発生神経生物, 東大医科研・脳神経発生分化,
カルシウムオシレーション国際プロジェクト・科技団)

(17) 血管緊張度調節における機械刺激による TRPC6 チャネル増強作用の生理的役割

井上隆司 (福岡大学医学部生理学)
Lars Jorn Jensen, 伊東祐之 (九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学)
森泰生 (京都大学大学院工学研究科合成生物)

(18) 脳毛細血管内皮細胞における TRP チャネルの生理的機能と SK チャネルとの機能連関

今泉祐治, 山崎大樹, 山村寿男, 大矢進 (名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学)
村木克彦 (愛知学院大学薬学部細胞薬理学)
浅井清文 (名古屋市立大学大学院医学研究科分子神経生物学)

(19) 心筋線維化における $G\alpha_{12/13}$ を介した Ca^{2+} シグナリングの役割

西田 基宏 (九州大学大学院薬学研究院)

(20) 創薬標的としての TRP チャネル

佐野頼方, 稲村耕平, 岡田英嗣, 望月忍 (アステラス製薬株式会社, 研究本部, 分子医学研究所)

(21) 内皮細胞における膜伸展刺激によって誘発される Ca 放出の分子機構

成瀬恵治 (名古屋大学大学院医学研究科・細胞科学講座細胞生物物理学)

【参加者名】

Mandadi Sravan (統合バイサイエンスセ), So Insuk (ソウル大・医), 飯田 陶子 (統合バイサイエンスセ), 石井 正和 (昭和大), 石井 裕 (生理研), 板津 直美 (名古屋市大院), 伊藤 悦子 (京都大院), 稲田 仁 (統合バイサイエンスセ), 井上 華 (生理研), 井上 隆司 (福岡大・医), 今泉 祐治 (名古屋市大院), 今里 暁 (ファイザー), 伊村 明浩 (京都大院), 岩田 裕子 (国循セ), 浦本 裕美 (生理研), 大野 晃稔 (名古屋市大院), 大場 貴喜 (秋田大・医), 大矢 進 (名古屋市大院),

岡田 泰伸 (生理研), 小川 明日香 (名古屋市大・薬), 尾崎 紀之 (名古屋大院), 片野坂 友紀 (国循セ), 加藤 賢太 (京都大院), 金子 周司 (京都大学), 木村 泰介 (名古屋市大院), 久保 伸夫 (関西医大), 久保田 幸治 (京都大院), 小島 至 (群馬大・生体調節研), 小山 晃紀 (昭和大・薬), 坂本 多穂 (名古屋市大・薬), 佐々木 真理 (統合バイサイエンスセ), 佐野 頼方 (アステラス製薬), 柴崎 貢志 (統合バイサイエンスセ), 島麻子 (統合バイサイエンスセ), 島貫 恵実 (統合バイサイエンスセ)

サイエンスセ), 清水 貴浩 (生理研), 新庄 勝浩 (ファイザー), 須崎 正隆 (治医大), 鈴木 商信 (東京大院), 鈴木 誠 (自治医大), 曾我部 隆彰 (統合バイサイエンスセ), 曾我部 正博 (名古屋大院), 高橋 信之 (生理研), 高橋 陽一郎 (秋田大・医), 田中 良一 (名古屋市大・薬), 沈 静 (関西医大), 傳田 澄美子 (資生堂), 富樫 和也 (統合バイサイエンスセ), 富永 真琴 (統合バイサイエンスセ), 中尾 賢治 (京都大院), 中川 哲彦 (ファイザー), 長澤 雅裕 (馬大・生体調節研), 中條 浩一 (生理研), 永田 雅俊 (大阪大学), 中村 靖夫 (秋田大・医), 成瀬 恵治 (名古屋大院), 新見 大輔 (京都大院), 西井 博子 (統合バイサイエンスセ), 西田 基宏 (九州大院), 丹羽 里実 (名古屋市大・薬), 温井 美帆 (生理研), 沼賀 拓郎 (京都大

院) 沼田 朋大 (生理研), 萩原 民雄 (昭和大・医), 原田 成信 (原田耳鼻咽喉科), 東 智広 (統合バイサイエンスセ), 久恒 智博 (理研), 檜山 武史 (基礎生物研), 藤森 智宏 (名古屋市大・薬), 藤原 祐一郎 (生理研), 堀田 真吾 (名古屋市大・薬), 前田 良太 (京都大学), 松浦 孝範 (大阪大学), 南 利幸 (京都大院), 村上 学 (秋田大・医), 村山 奈美枝 (統合バイサイエンスセ), 森 泰生 (京都大院), 森村 浩三 (名古屋市大・薬), 森本 岳 (名古屋市大・薬), 柳 文乃 (名古屋市大・薬), 山岡 とも子 (京都大院), 山崎 大樹 (名古屋市大・薬), 山村 寿男 (名古屋立大・薬), 山本 伸一郎 (京都大院), 吉田 卓史 (京都大院), 若森 実 (京都大院), 渡邊 博之 (秋田大・医)

【概要】

TRP 蛋白質(transient receptor potential protein)は, 近年, 産学両分野の研究者の強い関心を集めつつある, 種々の物理化学刺激によって活性化される広範な Ca^{2+} 流入チャネル群 (TRP チャネル遺伝子スーパーファミリー) である。この蛋白質は中枢・末梢神経系を始めとしたほぼ全ての組織に発現しており, 知覚伝導, 体液調節, 血圧・消化管運動・呼吸調節, 免疫・炎症反応, 生殖行動など, 生体の多彩な機能の調節やその破綻によって生じる疾病にも密接に関わっていることが明らかになりつつある。また, 家族性低マグネシウム血症, 多発性嚢胞腎等の遺伝性疾患や, ムコリピドーシス, 筋ジストロフィー, アルツハイマー病などの進行性変性疾患との関連も示唆されており, 未だ有効な治療法のない様々な疾患に対する薬物治療の有望な分子標的となる可能性が, 世界の医療関係・製薬企業の注目を集めている。本研究会では, 7

月 13 日から 2 日間にわたり, 本邦のみならず韓国も含めた 90 人近くの TRP 蛋白質 (チャネル) の研究者が一同に会し, 21 題の口演, 4 題のポスター発表を行い, 活発な情報交換と討議を行った。発表の内容は, 個々の TRP チャネルの活性化・制御機構に関する最新の成果から, 病態の解明につながる新しい知見の発表, 更に次世代の創薬に向けたハイスループットスクリーニングの試みに到るまで極めて多岐にわたり, 改めてこの蛋白質ファミリーを中心とした今後の研究の重要性と可能性を実感させる充実した会となった。そして研究会の終了後, 複雑且つ多種多様な TRP チャネルの全体像をつかみ, 今後進むべき研究の方向性を決めていくには, このような会を通じた定期的な情報交換が必要不可欠であることを再認識した, という感想や意見が多数の参加者から寄せられている。

(1) 温度感受性 TRP チャネル

富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門)

哺乳類には現在までに 6 種類の温度感受性 TRP チャネルが知られており, それぞれが特異な活性化温度閾値を有する (TRPV1 > 43 度, TRPV2 > 52 度, TRPV3 > 32-39 度, TRPV4 > 27-35 度, TRPM8 < 25-28 度, TRPA1 < 17 度)。多くは感覚神経に発現しているが, TRPV3 や TRPV4

のように表皮ケラチノサイトに強く発現するものもある。カプサイシン受容体 TRPV1 が熱のみならずカプサイシンで活性化するように, 温度感受性 TRP チャネルの多くは 温度以外の有効刺激を有する。TRPV1 の活性化温度閾値は固定したものではなく PKC 依存的なリン酸

化によって10度近く低下し、体温でも活性化するようになる。これは、急性炎症性疼痛発生の1つのメカニズムと考えられている。TRPV4はケラチノサイトに加えて視床下部視索前野に発現することから、皮膚での温度受容や体温調節にも重要な働きをしていることが推測される。ケラチノサイトが受容した温度刺激はどのようにし

て感覚神経に伝達されるのであろうか。新生仔マウスのケラチノサイトと感覚神経の共培養系の確立を目指している。私達はまた、TRPM2が温度受容体として機能することを見出したので、その活性化機構を生理学的意義とあわせて報告したい。

(2) 癌性疼痛におけるTRPV1の役割

尾崎紀之, 浅井英明, 長嶺健二郎, 篠田雅路, 杉浦康夫

(名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座機能組織学分野)

藤内 祝 (細胞治療学 (ハイメディック) 寄附講座)

上田 実 (頭頸部・感覚器外科学講座顎顔面外科学分野)

【目的】癌に伴う痛みのメカニズムを明らかにするため、マウスおよびラットに癌細胞を移植し、痛覚と知覚神経節におけるtransient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1(TRPV1)の変化を観察した。

【材料と方法】マウスの足底部および大腿部に、またラット下顎歯肉部に扁平上皮癌を移植し、痛覚、腫瘍浸潤、知覚神経節におけるTRPV1陽性細胞の変化を調べた。

【結果】マウスの足底部や大腿部に扁平上皮癌を移植すると自発痛を示唆する行動や足底部の機械的および熱性痛覚過敏が見られた。後根神経節においてTRPV1陽性細

胞が増加し、TRPV1拮抗薬capsazepineは熱性痛覚過敏を抑制した。またラット下顎歯肉部に扁平上皮癌を移植すると顔面の機械的および熱性痛覚過敏が見られ、三叉神経節でTRPV1陽性細胞が増加した。

【結論】マウスおよびラットに扁平上皮癌を移植し癌性疼痛の動物モデルを開発した。また腫瘍移植群の知覚神経節においてTRPV1が増加し、TRPV1の拮抗薬が痛覚過敏を抑制したことから、扁平上皮癌の移植による癌性疼痛にはTRPV1の関与が示唆された。

(3) シクロホスファミドによるマウス膀胱炎におけるTRPV1の役割

中村靖夫, 河谷正仁 (秋田大学医学部機能制御医学講座器官制御学分野)

富永真琴, 東智広, 森山朋子 (岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)

並木幹夫 (金沢大学医学部泌尿器科)

TRPV1は膀胱が炎症時の痛覚過敏や過活動に関与していると報告されている。また、間質性膀胱炎の患者の膀胱内へのカプサイシンの注入によって、症状およびペインスコアの改善が報告されている。そこで本研究では、TRPV1欠損マウス(TRPV1 KO)に抗癌剤であるシクロホスファミド(CYP)を投与して慢性膀胱炎を引き起こし、その膀胱機能への影響について評価を行った。

1. 覚醒下拘束下における膀胱内圧測定: 溶媒腹腔内投与群のICIにおいてWT(337.6±27.5秒)とTRPV1 KO(288.7±35.9秒)で差を認めなかった。WTにおいてCYP

(150mg/kg)腹腔内投与群のICI(116.8±8.2秒)は溶媒腹腔内投与群のICIより短縮した(p<0.01)。一方、TRPV1 KOにおいてCYP(150mg/kg)腹腔内投与群のICI(251.5±16.5秒)は溶媒腹腔内投与群のICIと有意差を認めなかった。溶媒腹腔内投与群のMVPにおいて各群間で有意差を認めなかった。

2. 病理組織学的検討: 溶媒腹腔内投与群ではWTにおいてもTRPV1 KOにおいても光顕微鏡下で炎症所見は認められなかった。CYP(150mg/kg)腹腔内投与群ではWTにおいてもTRPV1 KOにおいても膀胱の出血および炎症

所見を認めた。膀胱の出血および炎症の領域や範囲に光顕微鏡下で WT と TRPV1 KO 間に明らかな差を認めなかった。

【結論】今回の実験結果から CYP で誘発された慢性膀胱炎による頻尿の発現機序に TRPV1 が関与していることが示唆された。

(4) グリコール酸ピーリングによる表皮ターンオーバー促進のメカニズム

傳田澄美子, 傳田光洋, 日比野利彦 (株) 資生堂 ライフサイエンス研究センター)
根岸 圭, 櫛方暢晴, 若松信吾 (東京女子医科大学附属青山女性医療研究所・美容医療科)

グリコール酸(GA)によるケミカルピーリングの作用を3次元皮膚モデルを用いて検討した。GA 塗布後に培地中に放出される情報伝達物質を測定し, BrdU 取り込みの後, 組織学的検討を行った。GA 塗布 10 分後までに ATP が遊離し, 24 時間後に IL-1 α および BrdU 陽性細胞数が増加していた。この細胞増殖は酸感受性イオンチャネルである VR1 のアンタゴニストによって抑制された。

また, 培養ケラチノサイトに GA を投与すると細胞内 Ca 濃度が上昇し, これは VR1 アンタゴニストによって抑制された。よって, GA は皮膚モデルにおいて表皮・真皮の細胞増殖を促進し, これには VR1 を介した表皮細胞内 Ca 濃度変化とそれに続いて起こる ATP 遊離, さらに IL-1 α などのサイトカインによる表皮-真皮相互作用が関与していると考えられた。

(5) マクロファージに発現する TRPV2チャネルの制御機構

長澤雅裕, 小島至 (群馬大学生体調節研究所)

マクロファージには TRPV2 チャネルが発現していたが, TRPV ファミリーの他のメンバーTRPV1, 3-6 の発現は極めて低かった。非血清存在下, TRPV2 チャネルは細胞内に局在したが, 血清投与により一部が細胞膜に移行した。さらに fMLP を投与すると細胞膜への移行が促進された。パッチクランプ法により Cs⁺をチャージキャリアーとしたチャネル電流が観察されたが, TRPV チャネルを抑制する ruthenium red, 変異型 TRPV2 遺伝子導入, TRPV2 siRNA の投与により抑制された。この Cs⁺電流は fMLP 投与によって増加した。また fMLP 投与により急速でかつ持続的な細胞内 Ca²⁺濃度の増加が惹起されたが, 細胞外液 Ca²⁺の除去, ruthenium red 投与, 変異型

TRPV2 遺伝子導入, siRNA 投与などにより持続相の Ca²⁺上昇が消失し一過性の上昇になった。fMLP により惹起される TRPV2 の細胞膜へのトランスローケーションは PI-3 キナーゼを抑制するワートマニンや百日咳毒素によりブロックされた。fMLP によるマクロファージの遊走は ruthenium red 投与, 変異 TRPV2 遺伝子導入, siRNA 投与により抑制された。以上の結果から, マクロファージにおいて, fMLP は百日咳毒素感受性G 蛋白を介する PI-3 キナーゼ活性化に依存する機構によって TRPV2 を細胞内から細胞膜へとトランスローケーションさせ, この機構が持続的な細胞質 Ca²⁺濃度上昇さらにはマクロファージ遊走に関与していると結論された。

(6) 筋細胞変性のメカニズム ～筋ジストロフィー, 心筋症の新しい治療ターゲット～

岩田 裕子, 片野坂友紀, 重川宗一, 若林繁夫 (国立循環器病センター研究所)

ジストロフィー筋細胞におけるストレッチ刺激による Ca²⁺ 流入の増大と筋細胞壊死の関係を解明し, ストレッ

チ感受性チャネルの病態形成における役割を検討した。この目的のため, 心筋より GRC/TRPV2 をクローニング

し、心筋症・筋ジストロフィー症筋細胞における TRPV2 含量および局在変化を検討した。TRPV2 を心筋細胞膜に過剰発現させたマウスを用いて病態形成における役割を検討した。

TRPV2 発現細胞は、成長因子、ストレッチ、浸透圧刺激等に反応して、細胞内から細胞膜へ局在変化し、Ca²⁺流入を増加させた。TRPV2 の局在をしらべたところ、正常筋細胞では、細胞内および介在板（心筋）に存在し、ジストロフィンまたはデルタサルコグリカン(δ-SG)欠損筋細胞では筋細胞表面膜に多く存在していた。一方 TRPV2 含量は両者筋細胞で大差なかった。心筋症ハムス

ター筋細胞へアデノウィルスベクターを用いてδ-SG 遺伝子を導入または、TRPV2 アンチセンス遺伝子を導入することにより、細胞膜に存在する TRPV2 が減少し、Ca 動態の異常およびストレッチ刺激に対する細胞変性が軽減された。TRPV2 を心筋細胞膜に過剰発現させたマウスは繊維化を伴う心筋症を呈した。

ジストロフィン複合体異常に基づく筋細胞変性に TRPV2 を介する Ca²⁺流入の増大が重要な役割を果たしており重要な治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

(7) Microtubule-associated protein 7 類似蛋白 (MAP7R)による TRPV4機械受容の閾値の調節

鈴木誠 (自治医大薬理)

TRPV4 は機械受容チャネルで、低浸透圧による cell-swell で活性化される。これはアラキドン酸の放出からその代謝産物によると考えられている。しかし、TRPV4 ノックアウトマウスでは圧力やせん断力での反応がなくなっており、生化学的経路のみで説明できない部分もありうる。我々は MAP7 が TRPV4 の結合蛋白である事を示した。しかし、この蛋白は機械受容の閾値は変化無く膜への移動に関与していた。今回 MAP7R を神

経組織よりクローニングした。TRPV4 の stable transform cell を作製し、さらに TRPV4+MAP7R の stable transform cell を作製した。細胞内 Ca の変化から、TRPV4 の活性化は MAP7R によって 2kPa から 0.5kPa 以下に有意に低下した。パッチクランプでも MAP7R+TRPV4 細胞では直接膜を吸引する事で、活性を観察する事ができるようになった。MAP7R は機械受容 TRP チャネルの閾値を変えうるはじめての蛋白といえる。

(8) マウス蝸牛外有毛細胞における TRPV4受容体刺激による細胞内 Ca²⁺動態

沈静, 久保伸夫, 山下敏夫 (関西医科大学耳鼻咽喉科学教室)

原田成信 (はらだ耳鼻科)

鈴木誠 (自治医科大学薬理学教室)

Ca²⁺透過性チャネルと考えられている浸透圧感受性受容体(TRPV4)は、細胞内情報伝達機構において重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。内耳液のイオン環境及び透過性の変化による局所の浸透圧変化は、蝸牛の外有毛細胞の運動能及び細胞内 Ca²⁺濃度に影響を与え、結果聴覚機能になんらかの影響を与える可能性も考えられる。TRPV4 の遺伝子が、蝸牛の内毛細胞、外有毛細胞、螺旋神経節細胞、血管条 margin 細胞に発現していることは既に報告されているがその機能は不明であった。そこで我々は、野生型及び TRPV4 knock-out マ

ウスを用い、蝸牛の TRPV4 の発現、単離外有毛細胞における低浸透圧刺激による細胞内 Ca²⁺動態について比較検討を行った。

RT-PCR 方法によって、野生型のマウス蝸牛において TRPV4 遺伝子の発現が検出されたが、knock-out マウスの蝸牛では陰性であった。single-cell RT-PCR 解析により、TRPV4 遺伝子は野生型マウス蝸牛の螺旋神経節細胞、外有毛細胞、内毛細胞に発現していることが確認された。これらの細胞では TRPV4 免疫反応も陽性であったが、knock-out マウスにおいては、いずれの細胞でも陰性であ

った。又、低浸透圧刺激及び TRPV4 の agonist である 4 α -PDD に対して、野生型マウス外有毛細胞の[Ca²⁺]_i 上昇が認められた。この上昇は TRPV 受容体の antagonist である Ruthenium Red により抑制された。一方、TRPV4 knock-out マウス外有毛細胞では、低浸透圧刺激及び

4 α -PDD による[Ca²⁺]_i 上昇が認められなかった。

以上の結果から、TRPV4 受容体が外有毛細胞における細胞内情報伝達機構において重要な役割を演じている可能性が考えられた。

(9) TRPV4シグナルは NaK-ATPase をリクルートするか

伊村明浩（京都大学大学院医学研究科・先端領域融合医学研究機構）

ヒト型老化疾患モデルマウスとして報告された *klotho(kl)* マウスをヒントにして、Klotho 分子の機能を解析してきた。Klotho 分子は一回膜貫通型の I 型膜タンパクであり、主として遠位尿細管、脈絡膜、上皮小体の細胞内の膜構造中に分布する。細胞膜表面に分布する量は少ないこと、また、膜貫通部位近傍で切断されて分泌され、体液中を循環することが判っていた。その細胞膜上での結合分子の探索のため、免疫沈降法と LC-MS による解析を行ったところ、Na,K-ATPase を同定した。Na,K-ATPase は細胞膜内外のイオン濃度勾配を調節する基本的な分子である。Klotho は、細胞内部で Na,K-ATPase とカップルすることで活性調節を行う分子ではないかと考え、脈絡膜の Na,K-ATPase 発現を比較したところ、トータル発現量では差はなかったが、KO マウスの Na,K-ATPase の細胞表

面分布量は有意に低下していた。

脳脊髄液は脈絡膜によってその大部分が産生されているが、その成分管理システムは知られていない。試みに脳脊髄液中の Ca 濃度を測定したところ、*kl*-KO マウスでは有意に低下していた。我々は、1. 脳脊髄液の成分管理に Na,K-ATPase が関与している 2. 脈絡膜細胞自体に感知システムが備わっている 3. 感知システムが何らかの機構で Na,K-ATPase の活性制御を行う という想定で仮説を立てた。脳脊髄液を感知するシステムに該当すると思われるセンサー分子を調べたところ、TRPV4 が有力な候補の一つであると考えられるいくつかのデータを得た。現在我々は、Klotho 分子は TRPV4 シグナルに従って Na,K-ATPase を細胞膜にリクルートするための分子装置であると想像している。

(10) TRP チャンネルとしてのマウス PKD2L1 遺伝子の機能解析

村上 学, 大場貴喜, 徐 峰, 佐藤栄作, 尾野恭一, 渡邊博之, 伊藤 宏, 飯島俊彦
(秋田大学医学部機能制御医学)

多発性嚢胞腎(polycystic kidney disease ; PKD)は PKD1(85%)あるいは PKD2(10%)の遺伝子変異により常染色体優勢遺伝をきたす疾患である。PKD 分子はアミノ酸配列の類似性から transient receptor potential (TRP)チャネルの一翼をになうと考えられている。本研究では残る5%の多発性嚢胞腎の原因遺伝子の候補として、マウスではその cDNA クローンが知られていない PKD2L1 に着目し、その全長 cDNA およびゲノム遺伝子構造を明らかにし、さらに TRP チャンネルとしての陽イオンチャネル機能を解析した。

PKD2L1 はマウス染色体 19C3 に位置し、15 のエキソ

ンを有することが明らかになった。PKD2L1 は生体に広く発現が認められた。HEK293 細胞における単独発現では細胞膜よりも粗面小胞体 (ER) に発現が多かったが、PKD1 との共発現により PKD2L1 の多くは細胞膜表面へ移行すること、PKD1 と結合すること、陽イオンチャネルを形成することが明らかになった。さらにアミノ酸 C 末端にある coiled-coil domain を削ることにより、上記の膜移行効果が消失したことから、PKD2L1 の coiled-coil domain が PKD1 との結合に重要であることが明らかになった。さらに PKD2L1 のアミノ酸配列上に ER 上に留まるための配列(ER retention signal: KDEL)に似た配列を 2

つ見出し、この配列が PKD2L1 単独発現時における細胞内局在に重要であることが明らかになった。

【結語】PKD2L1 は PKD1 と結合することにより ER から

細胞膜表面へ移行し、陽イオンチャネルを形成する。本研究により PKD2L1 の異常により多発性嚢胞腎を来たす可能性が示唆された。

(11) 神経細胞死における TRPM2の中心的な役割

金子周司, 川上聖子, 伊藤悦子, 南 利幸 (京都大学大学院薬学研究科, 生体機能解析学分野)

久米利明, 赤池昭紀 (京都大学大学院薬学研究科, 薬品作用解析学分野)

原 雄二, 若森 実, 高田悠記, 森 泰生 (京都大学大学院工学研究科, 分子生物化学分野)

過酸化水素を初代培養ニューロンに暴露させると、短時間の内にニューロン死が惹起される。この過酸化水素誘発ニューロン死と、細胞内酸化還元状態によって開口が制御されている TRPM2 チャネルとの関連について研究した。免疫染色法によって、ラット胎仔由来大脳皮質ニューロンの大多数で TRPM2 タンパクの発現が確認された。培養ニューロンへの過酸化水素適用は、ニューロン死と同じ濃度範囲で、Ca²⁺流入による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こした。クローニングしたラット TRPM2

cDNA の一次配列は Nudix モチーフ領域でヒトやマウスとは異なっていたが、ヒト胎児腎臓由来 (HEK) 細胞に強制発現させると過酸化水素による Ca²⁺流入および細胞死が観察された。低分子干渉 RNA を用いた遺伝子サイレンシングによって、TRPM2 の発現低下に伴って、過酸化水素誘発 Ca²⁺流入の減少と過酸化水素誘発ニューロン死の減少が認められた。これらの結果から、神経細胞において TRPM2 チャネルは神経の細胞内 Ca²⁺調節と生存において重要な役割を果たしていることが示唆された。

(12) 細胞容積調節に関与する TRPM7チャネルの性質

沼田朋大, 清水貴浩, 岡田泰伸 (生理学研究所機能協働, 総研大生理科学専攻, 日本学術振興会)

動物細胞は異常浸透圧下での膨張後、速やかに正常容積へと復帰する能力を持つ。この Regulatory Volume Decrease (RVD) と呼ばれる容積調節は、膨張時に細胞内 Ca²⁺濃度上昇が起き、それに引き続いて KCl 流出と水流出がもたらされることによって達成される。HeLa 細胞にパッチクランプ法を適用し、この際の Ca²⁺流入経路と考えられる膜伸展感受性カチオンチャネルの性質を単一チャネルレベルで調べた結果、21 pS の単一チャネルコンダクタンスを持ち、膜伸展刺激、電位、阻害剤(Mg²⁺, ruthenium red, SKF96368, Gd³⁺)感受性を示した。ホールセルの電流成分は、細胞容積感受性、外向整流性、阻害剤感受性を示した。RT-PCR 法で mRNA の発現を調べた結

果、TRPM7 の発現を確認した。さらに siRNA を用い、TRPM7 をノックダウンすると単一チャネル、ホールセル電流を抑制した。fura-2 細胞内 Ca²⁺測定法で、低浸透圧刺激によって実際に Ca²⁺流入が起こり、これは阻害剤、siRNA により抑制されることが確認された。RVD 過程もまたこれらの阻害剤や siRNA により抑制されることが判明した。また HEK293T 細胞に TRPM7 を発現させ電流性質を調べた所、HeLa 細胞に内在的に発現している電流性質と同様の結果を得た。従って、TRPM7 チャネルが RVD をトリIGGERする Ca²⁺流入経路を与えることが明らかになった。

(13) 心肥大シグナルと TRPC1 チャネル蛋白

大場貴喜, 渡邊博之, 高橋陽一郎, 伊藤 宏

(秋田大学医学部内科学講座 循環器内科学分野・呼吸器内科学分野)

村上 学, 尾野恭一, 飯島俊彦(秋田大学医学部・機能制御医学講座)

心肥大形成において細胞内 Ca 濃度の上昇は calcineurin/NFAT 系を介した心肥大シグナルの活性化に関わっている。本研究では、細胞の増殖・分化に関連する新しい Ca 流入チャネルとして近年注目されている TRP チャネルについて、その心肥大形成における役割を検討した。

新生仔ラット培養心筋細胞にエンドセリンによる肥大刺激を加えると、肥大大心筋細胞では細胞表面積や BNP 発現の増加とともに TRPC1 チャネル蛋白の up-regulation が認められた。次にタブシガーギンで誘発されたストア作動性 Ca 流入(SOCE)を測定したところ、肥大大心筋細胞では対象の約 2.5 倍に増加していた。HEK293T を用いた発現解析では、TRPC1 過剰発現細胞では SOCE 増加による細胞内 Ca 濃度上昇とともに、NFAT 転写活性の亢進を認

めた。これらの反応は、TRPC1 の C 端欠損体を共発現させると有意に抑制された。さらに免疫沈降法を用いた検討から、肥大大心に発現している TRPC1, C3, C5, C6, M4 チャネル蛋白と TRPC1, その足場蛋白である Homer はホモ/ヘテロ多量体によるチャネル複合体を形成していることが示唆された。TRPC1 の up-regulation は腹部大動脈結紮ラットの肥大大心でも認められ、正常ラット心発達過程では、TRPC1, Homer は胎生期に多く発現しており、新生期、成熟期と経時的に減少、肥大大心で up-regulation するという胎児性心筋遺伝子産物の特徴を有していた。

TRPC1 チャネル蛋白は心肥大過程において再発現し、SOCE-NFAT 転写活性を介して心肥大反応を制御していると考えられる。

(14) PLC γ 2 と TRPC3 の機能的相互作用による B 細胞受容体シグナルの増幅

沼賀 拓郎 (総研大・生命・生理)

森 泰生 (京都大学大学院工学研究科, 分子生物化学分野)

免疫 B 細胞において、B 細胞受容体刺激に惹起される細胞内 Ca²⁺濃度上昇は、細胞内ストアからの放出による一過的な上昇と、それに引き続く細胞外からの流入による持続的なオシレーションにより構成される。これまでに我々は、ニワトリ免疫系 B 細胞株である DT40 を用いて、Ca²⁺ 流入によるホスホリパーゼ C (PLC) γ 2 の、形質膜への集積を伴う活性化により、持続的な Ca²⁺ オシレーションが制御されていることを報告した。また、PLC γ 2 のこの活性化には TRPC3 との機能的・物理的相互作用が重要であることを示した。そしてこの PLC γ 2 の Ca²⁺ 依存的な活性化が、BCR シグナリングの増幅において重要であるということを提唱した。今回、DT40 に内在的に発

現する TRPC3 のノックアウト(KO) 細胞株を作製した。その解析から、内在的 TRPC3 が、ジアシルグリセロール (DAG) 活性化チャネルを構成していることが示唆された。また TRPC3-KO 細胞において、PLC γ 2 の膜集積が抑制されることを明らかにした。この結果と一致してイノシトール 3 リン酸産生、および Ca²⁺オシレーションの抑制が観察された。一方、PLC γ 2 のもうひとつの産物である DAG について、シグナル経路の解析を行った結果、TRPC3 チャネルの欠損により PKC β の形質膜への移行、および ERK の活性化が抑制されていることを明らかにした。これらのことから、TRPC3 と PLC γ 2 は、B 細胞シグナル伝達全体を増幅させることを明らかにした。

(15) Desensitization and activation of mTRPC5 expressed in HEK cells

Insuk So (Department of Physiology and Biophysics, Seoul National University College of Medicine, Korea)

The classical type of transient receptor potential channel (TRPC) is a molecular candidate for Ca^{2+} -permeable cation channels in mammalian cells. TRPC5 are rapidly desensitized after activation by G protein coupled receptor. First, we investigated the desensitization process of mTRPC5 and localized the molecular determinants of the desensitization by mutagenesis. TRPC5 was initially activated by muscarinic stimulation with 100 μM carbachol and then decayed rapidly even in the presence of carbachol (desensitization). Increased EGTA and omitting MgATP in the pipette solution slowed the rate of desensitization. Protein kinase C (PKC) inhibitors, 1 μM chelerythrine, 100 nM GF109203X and PKC peptide inhibitor (19-36), inhibited the desensitization of TRPC5 activated by 100 μM carbachol. When TRPC5 current was activated by intracellular GTP γ S, PKC inhibitors prevented the desensitization. Mutation of T972 to alanine slowed the desensitization process dramatically among 11 mutants. We conclude that the desensitization process of TRPC5 occurs via PKC phosphorylation and threonine at 972 residue might be important for PKC phosphorylation of mouse TRPC5.

Since TRPC channels have calmodulin (CaM) binding sites at their C-termini, we investigated the effect of CaM on mTRPC5. TRPC5 was initially activated by muscarinic stimulation with 50 μM carbachol and then decayed rapidly even in the presence of carbachol. Intracellular CaM (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) increased the amplitude of mTRPC5 current activated by muscarinic stimulation. CaM antagonists (W-7 and calmidazolium) inhibited mTRPC5 currents when they were applied during the activation of mTRPC5. Pretreatment of W-7 and calmidazolium also inhibited the activation of mTRPC5 current. Inhibitors of myosin light chain kinase (MLCK) inhibited the activation of mTRPC5 currents, whereas inhibitors of CaM-dependent protein kinase II did not. However, inhibitors of CaM or MLCK did not show any effect on GTP γ S-induced currents. Application of both Rho kinase inhibitor and MLCK inhibitor inhibited GTP γ S-induced currents. We conclude that CaM and MLCK modulates the activation process of mTRPC5 without any effect on the desensitization process.

(16) チロシンリン酸化による TRPC チャネルの活性制御

久恒智博 (理研・発生神経生物)

黒田有希子, 中村健, 道川貴章, 水谷顕洋 (東大医科研・脳神経発生分化)

中村京子, 井上貴文 (カルシウムオシレーション国際プロジェクト・科技団)

御子柴克彦 (理研・発生神経生物, 東大医科研・脳神経発生分化,

カルシウムオシレーション国際プロジェクト・科技団)

様々な細胞外刺激は, PLC を活性化し, その結果 TRPC チャネルの活性化を促す事が知られている。しかしながら, TRPC チャネルの詳細な活性制御機構は明らかにされていない。我々は, TRPC6 チャネルが Src ファミリーチロシンキナーゼの一つ, Fyn によりチロシンリン酸化されることを初めて明らかにした。また, EGF 刺激によ

り TRPC6 チャネルのチロシンリン酸化が COS-7 細胞内で増大すること, さらにシングルチャネルレコーディング法により Fyn による TRPC6 チャネルのチロシンリン酸化がそのチャネル活性を増大させることを明らかにした。現在, 我々は, 他の TRPC チャネルのチロシンリン酸化の可能性を調べている。

(17) 血管緊張度調節における機械刺激による TRPC6チャネル増強作用の生理的役割

井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

Lars Jorn Jensen, 伊東祐之 (九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学)

森泰生 (京都大学大学院工学研究科合成生物)

血管内圧の上昇は、‘myogenic response’と呼ばれる反射性血管収縮反応を引き起こす。本研究では、この反応の分子機序を明らかにする目的で、機械刺激による活性化が報告されている TRPC6 チャネルの制御における血管収縮性メディエーター20-HETE の役割について検討した。

TRPC6 を過剰発現した HEK293 細胞にカルバコール (100 μ M)を投与し、続いて低浸透圧溶液暴露(HTS)による細胞膨張を引き起こすと、受容体活性化陽イオン電流 (I_{TRPC6})の振幅は可逆的な増強を示した。HTSによる I_{TRPC6} の増強効果は、20-HETE の産生を選択的に阻害することが知られている HET0016(3-10 μ M)の前投与によってほぼ完全に抑制された。ラット腸間膜動脈第2, 3分枝の筒状

標本内を収縮発生の閾値に近い低濃度のフェニレフリン (0.05-1.0 μ M)で刺激し灌流内圧を増加させると、myogenic response の著しい増強が観察された。HET00166 (10 μ M)による前処置は、この myogenic response の増強をほぼ完全に抑制した。

これらの結果は、20-HETE の産生がラット腸間膜動脈の中枢部において、myogenic response を媒介する重要な過程であることを示唆しており、この過程には、交感神経刺激によって既に活性化されている血管の TRPC6 チャネルが、機械刺激によって更に増強されるという、ある種の synergism が重要な役割を果たしていると考えられた。

(18) 脳毛細血管内皮細胞における TRP チャネルの生理的機能と SK チャネルとの機能連関

今泉祐治, 山崎大樹, 山村寿男, 大矢進 (名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学)

村木克彦 (愛知学院大学薬学部細胞薬理学)

浅井清文 (名古屋市立大学大学院医学研究科分子神経生物学)

脳血管内皮細胞において、TRP チャネルは主な Ca^{2+} 流入経路として重要な生理的役割を果たしていると考えられている。本研究では、ウシ脳血管内皮不活化細胞 (t-BBEC 117)を用い、ATP 刺激に対する反応において作動する TRP チャネルの機能的役割とサブタイプの同定について検討した。ATP 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には一過性上昇と持続相の 2 相が観察された。細胞外液を Ca^{2+} -free にすることにより消失した持続相には、TRPC3 が寄与していることを示唆する薬理学的な結果を得た。ホールセルクランプ下で ATP により惹起された膜電流は、主に非選択性陽イオンチャネル電流とアパミン感受性の Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル電流であった。RT-PCR による検討により t-BBEC 117 には TRPC1, TRPC3, TRPM7,

SK2, P2Y₁, P2Y₂および P2Y₁₂が発現していることが示唆された。結果を総合すると、P2YX 受容体を ATP 刺激することにより、SK2 と TRP チャネル (TRPC3 あるいは TRPC1 と 3 の複合体と推定される) がそれぞれ Ca^{2+} 遊離と DAG 産生を介して活性化される。SK2 による細胞の過分極は TRP チャネルを介した Ca^{2+} 流入を増幅させ、さらにこれが $[Ca^{2+}]_i$ と SK2 チャネル活性を高く保つと考えられる。t-BBEC 117 細胞の増殖は適当な濃度の細胞外 ATP により促進され、その促進は SK2 チャネルブロッカーにより抑制された。ATP 作用時の SK2 と TRP チャネルの相乗的な機能連関が脳血管内皮細胞増殖を促進させる可能性を示した。

(19) 心筋線維化における $G_{\alpha_{12/13}}$ を介した Ca^{2+} シグナリングの役割

西田 基宏 (九州大学大学院薬学研究院)

心筋線維芽細胞は、正常心筋細胞における細胞外マトリックスの維持や、障害心筋・不全心筋における線維化や免疫応答のメディエーターとして中心的役割を果たしている。三量体 G_{12} ファミリータンパク質 $G_{12/13}$ は、様々な G protein-coupled receptor と共役し、様々な細胞応答を引き起こす。しかし、心臓における $G_{12/13}$ タンパク質の役割については未だ明らかでない。我々は、 $G_{12/13}$ 選択的阻害タンパク (p115-RhoGEF の RGS ドメイン (p115-RGS)) を用いて、アンジオテンシン(Ang) II 受容体刺激による $G_{\alpha_{12/13}}$ 活性化が、Ang II 刺激による活性酸素 (ROS) 生成および MAP kinase 活性化に関与することを明

らかにした。また、心筋線維芽細胞では、Ang II 受容体刺激による $G_{12/13}$ の活性化が、ROS 産生と細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇を介して NFAT 活性化を引き起こすことを明らかにした。 $G_{\alpha_{13}}$ 活性化による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が SKF96365 処置により完全に抑制されたことから、受容体活性化 Ca^{2+} 透過型チャネルの活性化の関与が示唆された。 $G_{\alpha_{13}}$ を介した Ca^{2+} 流入は interleukin-6 の発現誘導に関与していた。一方、心筋特異的に p115-RGS を発現させたマウスでは、大動脈狭窄により惹起されるコラーゲン産生が有意に抑制された。これらの結果は、 $G_{\alpha_{12/13}}$ が心臓の線維化応答に関与することを示唆している。

(20) 創薬標的としての TRP チャネル

佐野頼方, 稲村耕平, 岡田英嗣, 望月忍 (アステラス製薬株式会社, 研究本部, 分子医学研究所)

イオンチャネルに関する研究は、測定技術の進歩 (パッチクランプ法など) や遺伝子クローニングにより飛躍的に進歩してきた。そして現在、ヒトゲノム情報をもとに網羅的なイオンチャネル遺伝子の単離、および解析が行なわれつつある。その結果、イオンチャネルが生体内において重要な生理機能を担っていることが明らかになりつつある。一方、現在医療現場で使用されている治療薬のうちおよそ 15% はイオンチャネルを標的としていることから、創薬標的分子としてもイオンチャネルが有効であることが期待されている。そこで我々は、イオン

チャネル分子の生理機能解明を通して、創薬標的としてのイオンチャネル研究を行っている。イオンチャネルの生理機能解明には、イオンチャネル単体での機能、単離組織における機能、個体レベルでの機能などさまざまな情報を必要とする。この中から、我々は最も単純化された系としてクローン化された遺伝子の機能解析に着目し、創薬標的としてのイオンチャネル研究を行なっている。本研究会では、上記のイオンチャネル研究の中から特に TRP チャネルに着目し、創薬研究標的としての研究結果を報告する。

(21) 内皮細胞における膜伸展刺激によって誘発される Ca 放出の分子機構

成瀬恵治 (名古屋大学大学院医学研究科・細胞科学講座細胞生物物理学)

伸展刺激に対してヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は形態変化・タンパク質発現などさまざまな応答をする。我々のこれまでの研究から伸展可能 PDMS (polydimethylsiloxane, シリコーン) 膜上に培養した HUVEC に伸展刺激によるカルシウム透過性機械受容 (SA) チャネルを介したカルシウム上昇が重要であることが判明した。近年の研究により TRP チャネルが機械受容チャネルの構成成分であることが報告され始めたので、

HUVEC における伸展依存性カルシウム上昇に TRPV2 が関与しているかどうかを検討した。TRPV2 を HUVEC の cDNA ライブラリより分離した。COS7 細胞に一過性に発現させると伸展依存性カルシウム上昇が見られ、HUVEC に TRPV2 の siRNA を導入すると伸展依存性カルシウム上昇は抑えられた。以上から、TRPV2 が HUVEC において伸展依存性カルシウム流入に強く関与していることが示唆された。

26. 神経科学の道具としての fMRI 研究会

2005 年 11 月 24 日－11 月 25 日

代表・世話人：Kang Cheng (Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute)

所内対応者：定藤 規弘 (生理学研究所心理生理学)

- (1) Parallel Acquisition Methods in Functional MRI
Matthew Nielsen, Osamu Takizawa (Siemens-Asahi Medical Technologies Ltd., Tokyo, Japan)
- (2) SENSE or TSENSE, Which is best for fMRI?
R. Allen Waggoner and Mauro Castagli (RIKEN - Brain Science Institute)
- (3) Nonlinear Local Electro-Vascular Coupling
Riera JJ, Wan X, Jimenez JC, Kawashima R (Tohoku University)
- (4) Spatial precision of BOLD fMRI: a combined point spread function and modeling study
Ken'ichi Ueno, R. Allen Waggoner, Keiji Tanaka, Kang Cheng
(Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute)
- (5) Direct demonstration of tuning to stimulus orientation in human V1: a high-resolution fMRI study with a novel stimulation paradigm
Pei Sun, Justin Gardner, Mauro Costagli, Kenichi Ueno, R. Allen Waggoner, Keiji Tanaka, Kang Cheng
(Lab. for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute, Wako-shi, Japan)
- (6) Retinotopy analysis of higher order visual areas in humans
Naokazu Goda (生理学研究所感覚認知情報)
- (7) A method for evaluation of learning effects within a stimulus-related brain activity during paired-association task
Hiroki C. Tanabe (生理学研究所心理生理学)
- (8) MEG/fMRI spatio-temporal source localization method
Okito Yamashita, Masaaki Sato, Taku Yoshioka
(国際電気通信基礎技術研究所 脳情報研究所)
- (9) Spontaneous and event related EEG correlates of Fmri
Xiaohong Wan, Jorge Riera, Ryuta Kawashima (NICHe, Tohoku University)
- (10) Neural substrates of spontaneous electroencephalographic activity related to the emergence of the hypersonic effect
Manabu Honda^{1,2,3}
¹Department of Cortical Function Disorders, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry;
²Laboratory of Cerebral Integration, National Institute for Physiological Sciences;
³SORST, JST)
- (11) Spatial position representation in the human brain revealed by parametric analysis Masaya Misaki,
Satoru Miyauchi, Takashi Abe, and Shigeyuki Kan
(Brain Information Group, National Institute of Information and Communications Technology)

【参加者名】

万 小紅 (東北大), Jorge Riera (東北大), Kang Cheng (理研), Matthew Nielsen (シーメンス), Pei Sun (理研), R. Allen Waggoner (理研), 磯尾 綾子 (理研), 上野 賢一 (理研), 郷田 直一 (生理研感覚認知情報), 近藤 洋

史 (NTT), 滝沢 修 (シーメンス), 田中 靖人 (情報通信研究機構), 松田 佳尚 (理研), 三崎 将也 (情報通信研究機構), 宮内 哲 (情報通信研究機構), 望月 寛子 (産総研), 山下 宙人 (ATR), Mauro Costagli (理研),

野口 泰基 (生理研感覚運動調節), 定藤 規弘 (生理研心理生理), 神作 憲司, 田邊 宏樹, 齋藤 大輔, 荒牧 勇, 豊田 浩士, 田中 悟志, 原田 宗子, 中下

悟, 村瀬 未花, 内山 祐司, 大塩 立華, 牧 陽子, 森戸 勇介, 酒井 朋子, 内山 仁志, 間野 陽子

【概要】

This year's Seiriken Kenkyu Kai: fMRI —A Tool for Neuroscience Research— (平成 17 年度生理研研究会「神経科学の道具としての機能的 MRI 研究会」) was smoothly and successfully conducted on Nov. 24 and 25, 2005 at Seiriken.

The meeting attracted more than 40 attendees from universities and research institutions. Ten speakers (with one cancellation due to family emergency) presented their recent works on methodological aspects of fMRI and related techniques (MEG and EEG), including parallel imaging, electro-vascular coupling, fMRI-constrained source localization for MEG and EEG measurements, and novel stimulation paradigms and analysis methods for fMRI studies.

Dr. Matthew Nielson and Dr. Allen R. Waggoner presented their works on parallel imaging. Dr. Nielson examined the effects of parallel acquisition methods on EPI quality and time-series statistics and concluded that due to reduced echo train length using multiple receiving coils, parallel imaging in general helps in reducing geometric distortion. Dr. Waggoner compared two types of parallel imaging reconstruction methods, i.e., SENSE and TSENSE and by making systematic comparisons using data acquired from both auditory and visual experiments concluded that TSENSE is especially useful in the presence of large motions.

Simultaneous measurements of EEG and fMRI continued to attract attentions at the meeting. Dr. Jorge Rieta addressed the issue related to the nonlinear electro-vascular coupling, and presented a detailed biophysical model of how electrical and hemodynamic brain signals are generated within a basic cortical unit. The model explicitly addressed several aspects in relation to EEG and fMRI data fusion. Dr. Xiaohong Wan presented their recent works on simultaneous EEG and fMRI measurements both in spontaneous and event-related activities, and outlined a model interpreting the physiological meaning of fMRI by correlating

them with the concurrently recorded stimulus-evoked EEG signals and those recorded during the resting state. In a theoretical study, Dr. Yamashita presented a framework for localizing MEG sources based on fMRI activation patterns.

The inherent limitation of BOLD fMRI's spatial resolution has not been successfully addressed. Dr. Ueno presented their recent works investigating point-spread functions (PSF) of BOLD signal in the tissue region of human V1 using spatially localized and size-varied stimuli. A subsequent modelling study indicated that with the measured PSF of ~ 1.8 mm, BOLD fMRI can be used for resolving human ocular dominance columns with measure ~ 1.0 mm in width, as has been shown previously. Dr. Sun further presented their recent high-resolution works with a novel stimulation paradigm, showing that the tuning to stimulus orientation in human V1 could be directly demonstrated using BOLD fMRI.

Some interesting activation results were also presented at the meeting. Dr. Goda presented some detailed retinotopic mapping results in higher order visual areas and clearly showed the existence of multiple retinotopic representations around areas V4, V3A and MT. Dr. Tanabe presented a method for evaluating learning effects within a stimulus-related brain activity when the subjects performed a paired-association task. Finally, using a parametric analysis method, Dr. Masaki presented their recent data regarding the spatial position representation in the human occipito-parieto-frontal regions.

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) Parallel Acquisition Methods in Functional MRI

Matthew Nielsen, Osamu Takizawa (Siemens-Asahi Medical Technologies Ltd., Tokyo, Japan)

We examine the effects of parallel acquisition methods on echo-planar image quality and time-series statistics as typically used in fMRI. In EPI, one train of RF echoes encodes one 2D image. Without parallel acquisition, the required echo train length is equal to the number of pixels along the phase-encoding axis of the image, and within one echo train, the amplitude of each echo decreases exponentially with time constant $T2^*$. To be maximally sensitive to the BOLD effect while having a high SNR, each echo should occur slightly earlier than $T2^*$. However, images are at least 64×64 pixels, and the time needed to form and sample 64 echoes is typically 30-60ms while $T2^*$ in human cerebral cortex is 70-80ms in a homogeneous 1.5T field. Such a long acquisition window relative to $T2^*$ means (1) that most of the echoes cannot

occur at the optimum point in time, and (2) that k-space is sampled with non-uniform sensitivity causing image blurring. In addition, systematic phase errors accumulated with each echo cause distortion and "N/2 ghost" artifacts, making a shorter acquisition desirable.

Parallel acquisition methods use multiple RF coils with different, overlapping sensitivity profiles to simultaneously receive multiple samples of each echo. Information about the sensitivity profiles is used to combine data from all coils and thereby reduce the number of echoes required to encode an image. In anatomical images, such methods cause a tolerable reduction in SNR, but this reduction does not immediately apply to fMRI.

(2) SENSE or TSENSE, Which is best for fMRI?

R. Allen Waggoner and Mauro Castagli (RIKEN - Brain Science Institute)

Partially Parallel Imaging techniques are having dramatic effects on many areas of MRI. But there are many different methods of acquisition and reconstruction, which works best for fMRI? We compare the traditional SENSE method with TSENSE, a method originally developed for minimizing the motion reconstruction errors in cardiac imaging. Motion effects are also a problem for fMRI, but the magnitude of the

motions are not as large as in the case of cardiac imaging. To determine if TSENSE is also beneficial for fMRI, we have collected both SENSE and TSENSE data sets, with various levels of acceleration, during the same experimental session. Both visual and auditory paradigms were used to evaluate the relative performance of SENSE versus TSENSE.

(3) Nonlinear Local Electro-Vascular Coupling

Riera JJ, Wan X, Jimenez JC, Kawashima R (Tohoku University)

In this paper, we present a detailed biophysical model of how electrical and hemodynamic brain signals are generated within a basic cortical unit. The model is obtained from coupling a canonical neuronal mass and an expandable vasculature. In this proposal, we explicitly address several aspects related to electroencephalographic (EEG) and functional magnetic resonance imaging (fMRI) data fusion: a)

the impact of the cerebral architecture (at different physical levels) on the observations; b) the physiology involved in electro-vascular coupling; and c) energetic considerations to gain a better understanding of how the glucose budget is used during neuronal activity. The model has three components. The first is the neural mass model of three neuronal sub-populations that responds to incoming excitatory synaptic

currents. The second and third components model the generation of measured electrical and hemodynamic signals respectively. In the first part, we describe, in some detail, the biophysical model and establish its face validity using simulations of visually evoked responses under different

luminous contrasts and flicker frequencies. Finally, we will use exactly the same model as a forward or observation model to estimate underlying biophysical parameters using real EEG and fMRI data.

(4) Spatial precision of BOLD fMRI: a combined point spread function and modeling study

Ken'ichi Ueno, R. Allen Waggoner, Keiji Tanaka, Kang Cheng
(Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute)

The inherent limitation of BOLD fMRI's spatial resolution has not been sufficiently addressed in relation to the field strength, tissue-vessel compartments and sensory stimuli employed. In this study conducted on a Varian 4 Tesla system, we investigated point spread functions of BOLD signal in the tissue region of human V1 using spatially localized and size-varied stimuli (4°, 2°, 1°, 0.5°, 0.25° and 0.125° in visual angle). For each size, a block of 16s stimulus-on period, in which the stimulus was flashed at 4Hz, and a block of 16s blank period were repeated 14 times. The activation amplitudes for all voxels within the ROI defined by 4° stimulus, calculated as %

signal changes between stimulus and blank periods, were then plotted against the geometric distance from the activation center. We found that the activation size decreased gradually as the stimulus size decreased, and the amplitude of the % signal change at the activation center also scaled with the stimulus size. From stimulus size 2° to the smallest size (0.125°), the estimated FWHM of BOLD signal decreased monotonically. The linear fit between FWHMs and stimulus sizes resulted in an intercept of ~1.8mm, which was taken as the estimated point spread. A modeling study in the context of mapping functional architectures using this point spread function was conducted.

(5) Direct demonstration of tuning to stimulus orientation in human V1: a high-resolution fMRI study with a novel stimulation paradigm

Pei Sun, Justin Gardner, Mauro Costagli, Kenichi Ueno, R. Allen Waggoner, Keiji Tanaka, Kang Cheng
(Lab. for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute, Wako-shi, Japan)

Although the preference for stimulus orientations in human visual cortex has been inferred indirectly in a few studies using fMRI, tuning to particular stimulus orientations has not been directly demonstrated using this technique. In an effort towards revealing orientation selectivity and its spatial arrangement in human V1, we have conducted an fMRI study with a novel stimulation paradigm and a differential mapping method. High-resolution (0.625x0.625x3mm) fMRI images were acquired using a 4-segment EPI pulse sequence with a 3-inch surface coil. Two slices (volume TR=2s) were prescribed to cover individual subject's V1 in the banks of the calcarine sulcus. During the experiment, subjects viewed epochs of 36s

full-field square-wave gratings sandwiched between 24s blank displays, and performed a color-change detection task on the central fixation point. Each grating rotated continuously in a clockwise direction for 270 deg (15 deg per TR). The gratings started rotation at either 0 or 90 deg, thereby creating two orientation conditions that are orthogonal to each other continuously, each of which was repeated 12 times. After voxels that responded to these grating stimuli were identified, we performed a voxel-by-voxel analysis and calculated the differential response (difference of averaged estimated hemodynamic response functions to the two orthogonal gratings) for the middle 180 deg. We found that

responses of the majority of activated voxels were modulated by the grating's orientation and individual voxels were sharply tuned to particular orientations. Our results, therefore, provide

the first demonstration that orientation selectivity in humans can be directly studied using fMRI.

(6) Retinotopy analysis of higher order visual areas in humans

Naokazu Goda (生理学研究所感覚認知情報)

視覚皮質は複数の視覚野から構成されている。このうち、いくつかの視覚野の位置と境界はレチノトピーに基づいて定めることが可能である。このため、fMRI 研究において視覚野間の機能比較の際にレチノトピーに基づく視覚野定義がよく利用される。しかしながら、ヒトの V3 野より高次の視覚野に関してはレチノトピーについてまだ不明な点も多く、それらの位置と境界を fMRI を用いて定めることは容易ではない。この理由には、高次視覚

野ではそもそも明瞭なレチノトピーが存在しないこと、使用する視覚刺激が高次視覚野の賦活に適していないこと、レチノトピー及び視覚野地図がヒトとサルの間で大きく違っているためにサルについての電気生理学的知見を援用できないことなどが考えられる。本発表では、現在行っているヒト高次視覚野領域（特に V4 野や V3A 野の周辺部）のレチノトピー解析について報告し、測定・解析手法に関する諸問題について考察する。

(7) A method for evaluation of learning effects within a stimulus-related brain activity during paired-association task

Hiroki C. Tanabe (生理学研究所心理生理学)

To clarify the distribution of the neural substrates and their dynamics during learning, we conducted functional MRI with paired-association learning. We developed a method called whole-brain cross-trial regression analysis to evaluate temporal changes of brain activity. In this seminar, I'll talk on this method in detail, and then show the data applied with this.

In the experiment, subjects had to find pre-defined pairs in a trial and error manner. Each trial consisted of the successive presentation of a pair of stimuli (S1 and S2) with a fixed interval of 1550 ms. Feedback was given by picture whether the response was correct or incorrect to the subjects in each trial. We applied a whole-brain cross-trial regression analysis to investigate the learning effect in the stimulus- or

feedback-related neural activity. Briefly, we at first calculated the linear trend (slope) from the 1st to the last trial at each scan point using the least squares method in each and every voxel for each individual. Group inference was then conducted by a one sample t-test using the average of the delay period (5 to 8th scan point) and feedback period (12 to 14th scan point) summary images of each subject, which should represent the recall process for the paired associates and building association, respectively. The results indicate that representation of paired associates might be accomplished by unimodal sensory, polymodal associate, and memory-related areas. The superior temporal sulcus is seemed to be involved in building paired association.

(8) MEG/fMRI spatio-temporal source localization method

Okito Yamashita, Masaaki Sato, Taku Yoshioka
(国際電気通信基礎技術研究所 脳情報研究所)

To clarify the brain function, it is important to know how a certain task is processed by several brain regions involved. MEG is one of the key tools to answer this question due to its high temporal resolution. MEG, however, does not have enough spatial resolution by itself, therefore the spatial information

obtained by the other modalities such as fMRI should be combined. In this talk I will present a source localization method of MEG based on fMRI activities, which is now developing in ATR.

(9) Spontaneous and event related EEG correlates of fMRI

Xiaohong Wan, Jorge Riera, Ryuta Kawashima
(NICHe, Tohoku University)

In this presentation, we will talk about our works in simultaneous EEG and fMRI recording, both in spontaneous and event-related activities. Currently, simultaneous EEG/fMRI technique is believed to be most promising to explore the spatiotemporal human brain functions, due to their noninvasive feature. However, there are several technical and theoretical issues to be solved prior to implement this advanced technique into cognitive/psychological neurosciences. Firstly, how to get the clean EEG signals from the noisy data during fMRI scanning? Secondly, how to fuse the two different modalities in one framework? In theoretical consideration,

combination of the electrical signals of EEG with the hemodynamic responses of BOLD signals definitely enhances us to understand the nature of functional imaging in terms of physiological basis, because the functional imaging signals are not a direct measure of neural activity, rather, are related to the cerebral energy consumption and blood flow.

In outline, the first part of our presentation will be focused on the technical issues of data analysis, and the later part will be related to the physiological meaning of fMRI signals implicated by correlation with the concurrent EEG signals in stimulus evoked and resting conditions.

(10) Neural substrates of spontaneous electroencephalographic activity related to the emergence of the hypersonic effect

Manabu Honda^{1,2,3}

¹Department of Cortical Function Disorders, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry;

²Laboratory of Cerebral Integration, National Institute for Physiological Sciences;

³SORST, JST)

Sounds containing an inaudible high-frequency component (HFC) with non-stationary fluctuation activate deep-lying brain structures and evoke physiological, psychological, and behavioural responses (hypersonic effect). To evaluate the emergence of the hypersonic effect using the electroencephalogram (EEG), we

analyzed the regional cerebral blood flow (rCBF) and spontaneous EEG simultaneously measured.

First, to examine the whole neuronal network involved in the emergence of the hypersonic effect, principal component analysis was applied to the rCBF data measured from subjects who were

exposed to full-range sound including both HFC and low-frequency component (LFC) and LFC alone. The activity of the first principal component of rCBF data including the upper brainstem (midbrain), hypothalamus, thalamus, precuneus, prefrontal cortex, and anterior cingulate gyrus was significantly correlated with the alpha2 component recorded from 7 electrodes in the central and parieto-occipital regions. Vice versa, the averaged alpha2 potential

obtained from the above 7 electrodes was significantly correlated with the rCBF of deep-lying brain structures. These results show that the alpha2 potential of spontaneous EEG measured from central and parieto-occipital regions is a plausible index of the deep-lying brain activity reflecting the emergence of the hypersonic effect.

(11) Spatial position representation in the human brain revealed by parametric analysis

Masaya Misaki, Satoru Miyauchi, Takashi Abe, and Shigeyuki Kan

(Brain Information Group, National Institute of Information and Communications Technology)

Most fMRI studies to date have linked a predefined function to a specific brain region. However how the brain processes the information had not been defined so much from fMRI activation data. To determine how information is processed in a specific region of the brain, we explored which region was activated and how the task parameters modulated the activation.

In the experiment, which had an event-related design, we explored the spatial position representation in the human brain while the subject tracked a moving point with their eyes. The fMRI data was analyzed using parametric modulation. We used a non-linear regression analysis using an artificial neural network in which the target spatial position was the regression parameters.

Viewpoint- and head-centered spatial positions were used to define the regression parameters.

The analyses revealed that the activations of the visual cortices and the dorsal stream areas were systematically modulated depending on the spatial positions of the target. The correspondence between the target position and the activated region was most distinct in the visual cortices, and this correspondence became less distinct from the parietal regions to the premotor regions. Viewpoint- and head-centered representations were intermixed in each region, and it is noticed that head-centered modulations were observed even in the primary visual cortex.

【 各種シンポジウム 】

トロポニン発見 40 周年記念国際シンポジウム 第 33 回生理研カンファレンス

Regulatory proteins of striated muscle

– structure, function and disorder –

〔筋収縮の調節タンパク質—構造、機能および疾患—〕

平成 17 年 10 月 25 日–10 月 28 日

自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター

本シンポジウム (“Regulatory Proteins of Striated Muscle: Structure, Function and Disease”)は江橋節郎先生が筋収縮時のカルシウム調節タンパク質であるトロポニンを発見されてから 40 周年を迎えたことを記念して、大槻磐男（東京慈恵会医科大学客員教授）と岡田泰伸（生理学研究所細胞器研究系教授）を組織委員長として平成 17 年 10 月 25～28 日の 4 日間、岡崎コンファレンスセンターで開催された。

海外から 11 名、国内から 21 名の筋収縮関連分野の代表的研究者による招待講演と国内外から 31 題のポスター発表が行われ、参加者延べ 130 人により 4 日間にわたって活発な議論が展開された。

本シンポジウムの内容は、(1)トロポニンとトロポミオシンの制御、(2)心筋制御とその病態、(3)ミオシンの制御、(4)EC カップリングとその病態、(5)筋収縮タンパク質、(6)モーター分子などである。

セッションの合間に A. F. Huxley 卿と A. Weber 教授からのトロポニン発見 40 周年のお祝いのメッセージが披露され、その返礼のスピーチが 83 才の江橋節郎先生から英語で行われ、参加者に深い感銘を与えた。



October 26

Opening remark N. Mizuno (NIPS)

1. Regulation by troponin and tropomyosin (Chaired by I. Ohtsuki and Y. Maeda)

1. I. Ohtsuki (Jikei Univ.)
Structure, Function and Disorder of Troponin
2. J. Gergely (Boston Biomed, Res. Inst.)
Highlights of the regulation of striated muscle contraction by Ca^{2+}
3. Y. Maeda (RIKEN Harima)
Structural basis of troponin-tropomyosin mediated calcium regulation

4. R. J. Fletterick (Univ. Calif.SanFrancisco)
Ca Ion and Troponin Switch
5. B. J. Sykes (Univ. Alberta)
Structure and Dynamics of Calcium Regulatory Proteins ; from solution to intact muscle fibers
6. T. Wakabayashi (Teikyo Univ.)
Structural basis for Ca^{2+} -regulated muscle relaxation at interaction sites of troponin with actin and tropomyosin
7. S. E. Hitchcock-DeGregori (Robert Wood Johnson Med Sch.)
Tropomyosin: A regulator of actin filament dynamics and contractile function
8. L. S. Tobacman (Univ. Illinois)
The Thin Filament as a Regulatory Molecular Assembly
9. M.A. Geeves (Univ. Kent)
Cooperativity in Tropomyosin and Troponin on the Thin Filament
10. M. Miki (Fukui Univ.)
Conformational changes of the reconstituted skeletal muscle thin filament observed by fluorescence measurements
11. T. Arata (Osaka Univ.)
Calcium structural transition of troponin in the complexes, on the thin filament, and in muscle fibers as studied by site-directed spin-labeling ESR.
12. M. Tanokura (Univ. Tokyo)
Solution structure of the complex of troponin C with troponin I fragment from scallop striated adductor muscle
13. Y. Nitani (RIKEN, ERATO)
Crystal structure of tropomyosin: a flexible coiled-coil
14. H. Kagawa (Okayama Univ.)
A C. elegans model for studying troponin regulation of muscle contraction and animal behavior

October 27

2. Cardiac regulation and disorders (Chaired by R. J. Solaro and R.L. Moss)

15. R. L. Moss (Univ. Wisconsin Med. Sch.)
Cooperative mechanisms in the activation of force and the kinetics of force development in striated muscles
16. R. J. Solaro (Univ. Illinois Chicago, Center for Cardiovasc.Res.)
Heart Failure, Ischemia/Reperfusion Injury, and Cardiac Troponin
17. J. Mogensen (Skejeby Univ. Hosp.)
Clinical troponin mutations in cardiomyopathies
18. S. Morimoto (Kyushu Univ. Sch. Med.)
A knock-in mouse model for dilated cardiomyopathy caused by $\Delta K210$ mutation in cardiac troponin T
19. T. Toyo-oka (TUERO Tohoku Univ.)
Cardiac troponin as the most specific and sensitive biomarker for myocardial cell degradation in clinical practice

3. Regulation by myosin (Chaired by A. G. Szent-Gyorgyi and K. Kohama)

20. A. G. Szent-Gyorgyi (Brandeis Univ.)
How calcium regulates some myosins: past and present
21. K. Kohama (Gunma Univ.)
Calcium inhibition of Physarum myosin

4. EC-coupling and disorder (Chaired by Y. Ogawa and M. Iino)

22. M. Endo (Saitama Med.Sch.)

Calcium-Induced Release of Calcium from the Sarcoplasmic Reticulum

23. Y. Ogawa (Juntendo Univ. Med Sch)

Dysregulation of the gain of CICR through ryanodine receptor 1 (RyR1); the putative mechanism underlying malignant hyperthermia

24. M. Iino (Univ. Tokyo)

Regulation of cell function by Ca^{2+} oscillation

25. C. Toyoshima (Univ. Tokyo)

Ion pumping by calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum

5. Contractile proteins (Chaired by K. Wakabayashi and N. Yagi)

26. K. Wakabayashi (Osaka Univ.)

Roles of Structural Alterations of Thin Actin Filaments in Muscle Contraction

27. H. E. Huxley (Brandeis Univ.)

The Length of the Active Crossbridge Stroke in Muscle during Steady Shortening

October 28

6. Motor proteins (Chaired by S. Ishiwata and T. Yanagida)

28. S. Ishiwata (Waseda Univ.)

Cooperative Functions of Actomyosin Motors Focusing on the Auto-Oscillation (SPOC)

29. T. Yanagida (Osaka Univ.)

A mechanism for the muscle contraction based on actin filament rotation

30. T. Oda (RIKEN Harima)

Modeling of F-actin structure using electron microscopy and X-ray fiber diffraction

31. K. Kinosita Jr (Waseda Univ.)

How Two-Foot Molecular Motors May Walk

32. E. Katayama (Univ. Tokyo)

Actomyosin sliding as revealed by quick-freeze deep-etch replica electron microscopy of myosin crossbridges during in vitro motility assay

7. Closing session

Closing remarks

総合研究大学院大学・生理学研究所 国際シンポジウム (第34回生理研コンファレンス)

総合研究大学院大学・生理学研究所 国際シンポジウム (第34回生理研コンファレンス) 「感覚間統合と可塑性～ヒト高次脳機能への多角的アプローチ～」は、2006年3月8-10日の3日間に、自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンターにおいて開催された。異なる感覚間の統合を脳がいかにしているか、は神経科学におけるきわめて重要な問題である。近年、脳血流を用いた機能画像法や電気活動の非侵襲的計測法の進歩は目覚しく、この問題を生きた人間において観測・研究することが可能となった。本シンポジウムでは、感覚間統合と脳可塑性に焦点をあて、PET, fMRI, EEG, MEG, TMS あるいはそれらの組み合わせにより多面的に探求を続けている研究者を招聘し、その交流を目指して企画された。最先端の研究を行なっている研究者 (海外より13名, 国内より6名) に講演していただき、活発な討論が交わされた。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71名 (海外より16名, 国内より55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。



Wednesday, March 8th

Welcome remarks

1. Amedi, Amir (Harvard Med School / USA)

Towards closing the gap between visual neuroprostheses and sighted restoration: Insights from studying vision, cross-modal plasticity and sensory substitution.

2. Giraux, Pascal (NIH / USA)

Tactile memory function in blind

3. Macaluso, Emiliano (Fondazione Santa Lucia / ITALY)

Multisensory spatial representations and attention control

4. Naito, Eiichi (Kyoto Univ / Japan)
Seeing and feeling limb movements in humans
5. Spence, Charles (Univ Oxford / UK)
Crossmodal attention and multisensory integration: A cognitive neuroscience perspective
6. Rauschecker, Josef P (Georgetown Univ / USA)
Cross-modal and intra-modal plasticity of auditory function

Thursday, March 9th

7. Lee, Dong Soo (Seoul National Univ / KOREA)
FDG PET and neuroplasticity in cortical deafness
8. Kang, Eun Joo (Kangwon National Univ / KOREA)
How Brain Responds to Audio-Visual Speech cues?
9. Naito, Yasushi (Kobe City Hosp / JAPAN)
Clinical application of functional imaging in neuro-otology
10. Osaki, Yasuhiro (Mount Sinai School of Med / USA)
Auditory processing in cochlear-implanted patients
11. Fujioka, Takako (Univ Toronto / CANADA)
Musical training and cortical plasticity
12. Beauchamp, Michael S (Univ Texas / USA)
Multisensory integration in lateral occipital-temporal cortex
13. Sakai, Kuniyoshi L (Univ Tokyo / Japan)
Brain development in second language acquisition
14. Lewis, James W (West Virginia Univ / USA)
Multimodal processing of hand-manipulated tool sounds
15. Sekiyama, Kaoru (Hakodate Future Univ / Japan)
Brain activation during auditory-visual speech perception

Friday, March 10th

16. Neville, Helen J (Univ Oregon / USA)
Specificity of cross-modal plasticity
17. Rolls, Edmund T (Univ Oxford / UK)
Representation of the pleasantness of the taste and smell of food in the brain, and its interaction with cognition
18. Shibasaki, Hiroshi (Kyoto Univ / Japan)
Clinical neurophysiology of sensorimotor integration and plasticity --- Pathophysiology of focal dystonia ---
19. Sadato, Norihiro (NIPS / Japan)
Learning effect in cross-modal integration

Adjourn

名古屋大学環境医学研究所・生理学研究所合同シンポジウム

この合同シンポジウムは、将来的に名古屋大学環境医学研究所と生理研との協力関係を深め、概算要求につなげられるように意図されたものであり、下記の通り開催された。環境医学研究所からは所長をはじめ 24 名、生理学研究所からは所長、副所長をはじめ 27 名の参加があり、活発な討論が行われた。さらに、シンポジウム後の懇親会では具体的な連携研究の進め方について議論された。

日時：平成 17 年 10 月 31 日（月） 1：30～5：30

会場：生理研（明大寺地区） 1 階 会議室

1. 佐藤 純（名古屋大学環境医学研究所 神経性調節分野）
気象変化による疼痛増悪現象—特にその気圧検出部位について—
2. 李 鍾国（名古屋大学環境医学研究所 循環器分野）
心臓突然死動物モデルにおける遺伝子発現プロファイル解析～マウス完全房室ブロックモデルを用いた研究
3. 小松 由起夫（名古屋大学環境医学研究所 視覚神経科学分野）
ラット視覚野の T 型 Ca^{2+} チャンネル依存性長期増強と眼優位可塑性
4. 箕越 晴彦（生殖・内分泌系発達機構）
生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの調節作用—レプチン作用を中心に—
5. 鍋倉 淳一（生体恒常機能発達機構）
発達期における抑制性神経回路の再編成—伝達物質のスイッチング
6. 平林 真澄（遺伝子改変動物作製室）
ラットにおける発生工学の現状と展望

日本学術振興会・二国間交流事業・韓国とのセミナー

神経疾患の多くは原因不明の疾患であるため根本治療法の開発ができず、対症療法しか行えない状態が長く続いてきた。しかし、近年分子遺伝学的解析技術のめざましい進展により、神経疾患の原因遺伝子が続々と同定されつつある。しかしながら、原因遺伝子が同定されても、その変異がなぜ個々の疾患の病態を引き起こすのか、まだまだ理解されていない。このことが明らかにされなければ原因遺伝子が分かったとしても治療法の開発にはなかなかつながらない。

そこで、本セミナーにおいては神経疾患の原因遺伝子の同定だけでなく、すでに原因遺伝子の同定された神経疾患において、遺伝子変異が実際どのような機序で神経細胞やグリア細胞を変性脱落させるのか、またこの現象が神経回路網にどのような変化を引き起こすのかを検討した。

韓国は現在神経科学全般に大変な力をつけてきているが、特に神経疾患の治療法の開発には力を注いでいるため、本情報交換は極めて有意義なことであった。さらに韓国は距離のもっとも近い隣国であり、時差もないため共同研究にはふさわしい国である。この情報交換セミナーをきっかけにさらに共同研究の輪が広がるように工夫した。

日程：平成18年2月9日（木）～平成18年2月10日（金）

会場：岡崎ニューグランドホテル

プログラム：

Korea-Japan Basic Scientific Cooperation Program Korea-Japan Joint Seminar

“Molecular and systemic basis of neurological disorders”

Date: February 9 (Thu)- 10 (Fri), 2006

Place: Okazaki New Grand Hotel

Thursday, February 9th

Opening remarks

(Professor Kyung Hwan Kim : Dean of Yonsei University Medical School, and Director of BK21 Project for Medical Science, Yonsei University)

Session I (Chairperson: Keiji Imoto)

1. Yasushi Okamura (OIIB/NIPS)
Voltage-regulated phosphatase conserved among chordates
2. Yoshihiro Kubo (NIPS)
Regulation mechanisms and structural rearrangements of metabotropic glutamate receptor
3. Im Joo Rhyu (College of Medicine Korea University)
Ataxic Calcium Channel Mutants. What happens in their cerebella? –Molecular and morphological approaches –

Session II (Chairperson: Ryuichi Shigemoto)

4. Tadashi Isa (NIPS)
Functional recovery of dexterous finger movements after the lesion of the corticospinal tract at cervical spinal cord in monkeys

5. Woong Sun (College of Medicine Korea University)

Programmed cell death of adult generated hippocampal neurons is required for the maintenance of the normal hippocampal function

6. Hiroyuki Nawa (Niigata University)

Perinatal perturbation of neurotrophic factors / cytokines results in distinct cognitive/behavioral impairments; Implication in schizophrenia

Session III (Chairperson: Chang-Sub Uhm)

7. Yong-Ku Kim (College of Medicine, Korea University)

Biological prediction factors associated with suicidal behavior in major depressive disorder

8. Jin Woo Chang (Yonsei University College of Medicine)

Recent experimental strategies for the treatment of rat model of Parkinson's disease with 6-OHDA

9. Ryosuke Takahashi (Kyoto University Graduate School of Medicine)

The molecular mechanisms of familial parkinsonism

Session IV (Chairperson: Norihiro Sadato)

10. Gen Sobue (Nagoya University)

Pathogenesis-based therapeutic approaches for spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)

11. Jong Doo Lee (Yonsei University College of Medicine)

Regional alteration of GABA-A receptor activity in spastic diplegia type cerebral palsy on 18F- fluorofluminil positron emission tomography

12. Dong Goo Kim (Yonsei University College of Medicine)

Neuropsychological, neurochemical and neuroimaging assessment of computer addicts in Korean adolescents

13. Yasuhisa Fujibayashi, (University of Fukui)

Non-invasive monitoring of cell transplantation /gene therapy using a reporter estrogen receptor gene.

Friday, February 10th

Session V (Chairperson: Atushi Nambu)

14. Kuniaki Nagayama (OIIB/NIPS)

In situ subcellular structures revealed with phase contrast electron microscopy

15. Yasunobu Okada (NIPS)

Requisite roles of disordered cell volume regulation in apoptosis.

16. Bae Hwan Lee (Yonsei University College of Medicine)

Improvement of functional recovery by cell transplantation in spinal cord injured rats

Session VI (Chairperson: Makoto Tominaga)

17. Sun Joon Bai (Yonsei University College of Medicine)

Pain dynamics – cortical observation by fMRI

18. Kazue Mizumura (Nagoya University)

Peripheral correlates of muscle mechanical hyperalgesia after eccentric contraction - an approach for the mechanism of muscle pain -

19. Hee Chul Han (College of Medicine, Korea University)

Objective measurement of arthritic pain and its application

20. Sun Wook Hwang (Graduate School, Korea University)

Polymodal nature of TRPA1, the thermal, chemical and mechanical pain sensor

Concluding Remarks (Professor Noboru Mizuno : Director-General, NIPS)

* OIIB : Okazaki Institute for Integrative Bioscience

** NIPS : National Institute for Physiological Sciences

This seminar was granted by Japan Society for the Promotion of Science (to Ikenaka K), International Cooperation Program of Korea Science and Engineering Foundation (to Uhm CS, F02-2005-000-10061-0), and Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University and Korea University.

【トレーニングコース】

第 16 回 生理科学研究所 生理科学実験技術トレーニングコース

2005 年 8 月 1 日－8 月 5 日

主催：自然科学研究機構 生理学研究所

共催：日本生理学会，日本神経科学学会

文部科学省特定領域研究「統合脳」総括班

所内世話人：井本敬二（神経シグナル）

【概要】

生理学研究所の一大行事に成長した「生理研トレーニングコース」は、2005 年度も活発に行われました。受講者は 192 名。受講料は 10,200 円。

コースの構成は、ほぼ前年通りで、月曜日午後に講演と研究部門紹介、火曜日から金曜日までの 4 日間を実習コースにあてました。その他の行事として、水曜日夕方に交流会、金曜日 15 時以降に研究室訪問を設定しました。

受講者のトレーニングコースに対する評価は、高いものでした。また所内の若手研究者にも教育実習としてかけがえのない経験になっていると思われまます。

問題点としては、287 名という多数の応募者の内、100 名近い人を断らなくてはならなかったことがあげられます。またロジに泊まれる人が限られているのも毎年の問題です。しかしながら 200 名近い受講生は、生理研のキャパシティから考えて、少し多すぎるのかも知れません。実際、脳機能画像解析入門のコースでは、人数が多すぎて冷房が効かないといった問題が起こりました。

関連企画としてトレーニングコースの直前に、生理学研究所『バイオとナノテクのアプローチ融合による生体センサー分子機構の解明に向けて』と文部科学省特定領域研究「統合脳 5 領域」レクチャーコース『神経科学の先端技術：分子・細胞から個体システムまで』の 2 つのレクチャーコースが催されました。いずれも参加者には好評でしたが、トレーニングコースと合わせて参加するには、期間・旅費の面で難しいという声も聴かれました。

なおトレーニングコース受講者を対象としたアンケートの集計は、生理研ウェブサイト <http://www.nips.ac.jp/training/2005/TC2005Q.pdf> に掲載しています。

【講演】

- (1) 大脳の局所神経回路

窪田芳之（大脳神経回路論）

- (2) システム神経科学がめざすもの

南部篤（生体システム）

【実習コース】

- (1) 位相差断層電子顕微鏡の原理と実践

永山國昭，大河原浩，R. Danev，厚沢季美江（ナノ形態生理）
白井信光（藤田保健衛生大），新井善博（日本電子）

- (2) 凍結割断レプリカ免疫標識法

重本隆一，深澤有吾（脳形態解析）

- (3) in situ hybridization 法を用いた二重染色法

小野勝彦，田中謙二，等誠司，池中一裕（分子神経生理）

- (4) 超高压電子顕微鏡による生物試料の立体観察

有井達夫，古家園子（形態情報解析室）

- (5) 局所神経回路構築の形態学的解析 A: 光顕2重染色法, B: 超薄連続切片シナプス観察法
窪田芳之, 川口泰雄 (大脳神経回路論)
- (6) 2光子励起顕微鏡法によるシナプス・開口放出の研究
河西春郎, 根本知己 (生体膜)
- (7) パッチクランプ基礎実験技術法
久木田文夫 (神経分化), 富永真琴, 柴崎貢志, 富樫和也, 東智広 (細胞生理)
鍋倉淳一, 張一成, 前島隆司 (生体恒常機能発達機構)
清水貴浩, 高橋信之, 井上華, ダッタアマルクマール, 沼田朋大, 岡田泰伸 (機能協関)
- (8A) パッチクランプバイオセンサー法 A: パッチクランプバイオセンサー法によるATP放出解析
清水貴浩, 高橋信之, 井上華, ダッタアマルクマール, 沼田朋大, 岡田泰伸 (機能協関)
- (8B) パッチクランプバイオセンサー法 B: 穿孔パッチクランプバイオセンサー法による細胞内シグナル伝達解析
鍋倉淳一, 張一成, 前島隆司 (生体恒常機能発達機構)
- (8C) パッチクランプバイオセンサー法 C: パッチクランプバイオセンサー法による温度受容解析
富永真琴, 柴崎貢志, 富樫和也, 東智広 (細胞生理)
- (9) *in vitro* 発現系を用いたイオンチャネル・受容体の機能解析
岡村康司, 岩崎広英, 村田喜理 (神経分化)
久保義弘, 立山充博, 中條浩一, 藤原祐一郎 (神経機能素子)
- (10) スライスパッチクランプ法 A: 初心者体験コース, B: 一般コース
宮田麻理子, 佐竹伸一郎, 井上剛, 佐々木幸恵, 井本敬二 (神経シグナル)
舩山俊彦 (脳形態解析)
- (11) ゼブラフィッシュを用いた神経回路機能の解析
東島眞一 (神経分化)
- (12) 摂食・飲水行動発現機構入門
箕越靖彦, 岡本土毅, 志内哲也, 李順姫, 斉藤久美子 (生殖・内分泌系発達機構)
- (13) 電気生理学及び心理物理学的手法による視知覚メカニズムの解析
小松英彦, 伊藤南, 小川正, 郷田直一, 鯉田孝和 (感覚認知情報)
- (14) 麻酔下動物での電気生理実験
伊佐正, 関和彦, 西村幸男 (認知行動発達機構)
- (15) 慢性動物実験法入門
南部篤, 畑中伸彦, 橘吉寿, 伊藤昭光, 知見聡美, 宮本香奈, 高良沙幸 (生体システム)
- (16) 脳磁図によるヒト脳機能研究の基礎
金桶吉起, 柿木隆介 (感覚運動調節)
- (17) 脳機能画像解析入門
田邊宏樹, 定藤規弘, 本田学, 神作憲司, 齋藤大輔, 豊田浩士,
荒牧勇, 原田宗子, 守田知代 (心理生理学)
- (18) 生理学実験のための電気回路・機械工作 —OPアンプによる増幅器とチェンバー作製—
小原正裕, 山口登, 戸川森雄, 大庭明生 (技術課)

【 セ ミ ナ ー 報 告 】

セミナー報告

1. 上達の早道は練習順序の工夫にある？ ～計算論的運動制御研究のホットトピックス～

大須 理英子（計算神経科学部門，ATR 脳情報研究所主任研究員）

(2005.4.13)

2. AMPK Family: 腫瘍細胞での悪性化誘導と正常細胞での機能 ～癌生理学的研究からの見解と今後の課題～

鈴木 敦（国立がんセンター研究所支所 がん組織生理機能解析プロジェクト，神奈川科学技術アカデミー）

(2005.5.11)

癌細胞が生体内で増殖するためには、腫瘍血管からの酸素や栄養素の供給が重要と考えられる。しかし、多くの腫瘍組織は不十分な血管新生に伴う低栄養・低酸素という劣悪な微小環境に曝されている。例えば、新生血管に依存性が高い肝癌細胞は、低栄養条件で死滅する一方、大腸癌細胞や膵癌細胞のように新生血管への依存性が低い細胞は低栄養条件下においても増殖が可能である。我々は、低栄養・低酸素条件において死滅せず、増殖を可能とするメカニズムとして、AMPK が重要な役割を担うことを見いだした。IGF や TGF-beta は腫瘍の悪性度を高めることが知られており、これらは AMPK-alpha を活性化する。また AMPK の活性化因子として LKB1 が良く知られているが、IGF や TGF-beta は LKB1 非依存・ATM 依存的に活性化することを明らかにした。

AMPK には関連因子が存在し、我々は SNARK と ARK5 を単離した。SNARK と ARK5 は AMPK と同様、共に悪

性腫瘍の低栄養耐性能に関与する。加えて SNARK は、細胞間接着の解離を、ARK5 は浸潤・転移を誘導することを見いだした。さらに我々は、ARK5 の発現は腫瘍悪性度と強い相関関係があること、ARK5 の活性が Akt や新規因子である Nak によって制御されていることを見いだした。

正常組織における AMPK Family の制御機能や生理機能は、未だに不明な点が多い。SNARK の KO mouse は、脳の発生異常や体躯の巨大化を引き起こすが、その詳細は不明である。また、ARK5 は炎症部や創傷部の治癒に関与する繊維芽細胞の遊走に関与するが、正常組織での主要発現部である脳と心臓での生理機能は不明である。特に脳での発現は非常に強く、重要な生理機能に関与している可能性が高い。癌組織での動向がほぼ明らかになった現在、正常組織、特に神経系での生理作用の解析が今後の重要な研究課題である。

(担当：箕越 靖彦)

3. マカクザル盲視モデルにおける残存視覚，急速眼球運動，空間的注意

吉田 正俊（生理学研究所 発達生理学研究系 認知行動発達研究部門）

(2005.6.1)

第一次視覚野に損傷を持った患者では「盲視」という現象がみられることがある。この患者では損傷の反対側に視野欠損が起きており、欠損視野内に提示された視覚刺激は意識には上らないとされている。ところがこの患者は欠損視野内に提示された視覚刺激の位置を指差しや眼球運動によって偶然よりも高い確率で当てることができる。この視覚的意識と視覚運動変換とが乖離する「盲

視」という現象は意識のメカニズム解明の鍵として注目を浴びてきた。

マカクザルの第一次視覚野を片側的に除去して作成した実験モデルでは人での盲視現象と同様な行動を示すことが報告されている(Cowey and Stoerig '95)。しかし、視覚的意識は空間的注意と密接な関係にあるため、空間的注意の効果を無視して視覚的意識について議論すること

はできない。そこで私はマカクザル盲視モデルに急速眼球運動を行動の指標とした視覚運動変換課題を行わせることで、第一次視覚野を片側性に除去したことによる視覚検出能力および急速眼球運動への影響を調べた。またさらに視覚運動変換が空間的注意によってどのように影響を受けるかについて検証した。

除去した第一次視覚野と反対側の視野(「盲」視野)での視覚誘導性急速眼球運動課題の成績は術後 2 ヶ月程度で回復した。しかし視覚刺激のコントラストを下げてテストすると「盲」視野における検出閾値は正常視野と比べて上昇していることが明らかになった。また、「盲」

視野内の視覚標的への急速眼球運動は不正確であり、急速眼球運動のダイナミクスも正常視野へのものと比べて変化していることを見いだした。

また空間的注意課題の結果から、「盲」視野に提示した手掛かり刺激に空間的注意を向けることで「盲」視野での視覚検出能力が向上することが示唆された。またさらに記憶誘導性急速眼球運動課題の結果から、「盲」視野に提示した刺激の位置をワーキングメモリーとして保持して将来の行動に利用できることが示唆された。

以上の結果を元にして、第一次視覚野を経由しない視覚経路が持つ機能について議論する。

(担当：本田学)

4. Myelin Basic Protein - Functional diversity generated by conformational adaptability, modification, and microdomain targeting

George Harauz (University of Guelph, Molecular and Cellular Biology, and Biophysics Interdepartmental Group)

(2005.6.9)

Myelin basic protein (MBP) is a family of developmentally-regulated proteins that arise from different transcription start sites of the Golli (genes of the oligodendrocyte lineage) gene complex, and by alternate splicing to generate different isoforms. The best-studied member of this family is the 18.5 kDa “classic” MBP, that is preponderant in adult human and bovine myelin. Further diversity of this MBP isoform is achieved by a plethora of post-translational modifications: Nterminal acylation, methylation, deamidation, phosphorylation, ADP-ribosylation, and deimination (the irreversible enzymatic conversion of arginine to citrulline). These changes result in the cumulative reduction of MBP’s net positive charge, and a protein preparation from myelin can be separated by ion exchange chromatography into a series of charge components or isomers denoted C1 to C8. The least-modified form, C1, has a net charge of +19 at neutral pH, and predominates in normal adult myelin. The most-modified form, C8, has a net charge of +13 at neutral pH and is primarily deiminated. Intermediate forms are deamidated and phosphorylated. MBP is a candidate autoantigen in multiple sclerosis (MS), in which the proportion of the deiminated isoform C8 is increased. Interestingly, the proportion of C8 is increased also in developing myelin in

children less than 5 years of age. Structurally, MBP is a highly-flexible and extended molecule of the emerging “intrinsically-unstructured” or “conformationally adaptable” class that is now known to comprise several hundred proteins, including many involved in signalling. In other words, the protein is designed to interact with numerous other molecules via a “fly-casting” mechanism, that facilitates rapid association with no loss of specificity.

The main function of the classic 18.5 kDa MBP is to hold the cytoplasmic leaflets of the oligodendrocyte membrane processes in close apposition, thus maintaining the structural integrity of the myelin sheath. Charge reduction by post-translational modification attenuates this interaction. In particular, we have shown by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy that a central immunodominant epitope of MBP forms a surface-associated amphipathic alpha-helix. Upon deimination of the protein to the C8 form, this epitope becomes more exposed, and the carboxyterminus becomes expelled from the membrane.

The classic 18.5 kDa MBP interacts with calmodulin, actin, tubulin, clathrin, and phospholipase C, and we have shown that several of these interactions are modulated by charge reduction due to protein modification.

We have also recently found that phosphorylated MBP is localised in detergent-resistant membrane microdomains in adult myelin, whereas methylated and deiminated MBP are found in bulk myelin. We are currently investigating the pattern of MBP modification in two spontaneously demyelinating transgenic mouse lines that are models for MS. In one of these, the enzyme peptidylarginine deiminase II is overexpressed under the control of the MBP promoter. The characterisation of this mouse line will be presented.

Our studies thus support the conjecture that MBP functions

ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) は、選択的スプライシングにより発生段階において異なる isoform が産生されるタンパク質ファミリーである。その中でも最もよく研究されているのが、分子量 18.5kD の成人で最も多く存在する”classic”MBP であり、この MBP isoform は N 末端アセチル化、メチル化、リン酸化 ADP リボシル化、脱アミド化、脱イミノ化などの様々な翻訳後修飾によってさらなる多様性をもつ。これらの修飾は MBP の正電荷を減少させ、イオン交換クロマトグラフィーにより、この MBP は有効電荷の異なる C1 から C8 までの isomer に分離できる。MBP は多発性硬化症 multiple sclerosis (MS) における自己抗原の候補分子の一つで、この疾患において脱イミノ化された C8 の量が増加している。さらに興味深いことに 5 歳未満の幼児でもこの C8 の割合の増加がみられる。

MBP は、細胞膜同士を接着させることで、密に神経軸索の周りを取り囲むミエリン鞘の構築と維持に働く。翻訳後修飾による電荷の減少によりこの相互作用は弱まり、

also in signal transduction mechanisms involved in cytoskeletal organisation. We postulate further that there is an equilibrium amongst the classic charge isomers in adult myelin, with deimination representing a means for protein turnover, and methylation and phosphorylation representing a means for modulating MBP's interactions with actin, tubulin, and other molecules. In MS, this equilibrium is shifted towards deimination, resulting not only in instability of myelin and its physical deterioration, but in disruption of signalling pathways.

特に C8 form においては両親媒性の α ヘリックスからなる免疫優勢エピトープがより露出し、C 末端側が細胞膜から露出することが明らかとなった。

18.5kDa MBP はカルモジュリン、アクチン、チューブリン、clathrin、およびホスホリパーゼ C と相互作用をもつが、我々はこれらの相互作用が翻訳後修飾による電荷の減少により変化することを明らかにした。現在、MS のモデルとなる二系統の脱髄を起こすトランスジェニックマウスでの MBP の翻訳後修飾について検討を行っている。

我々の研究から、MBP は細胞骨格構築を含むシグナル伝達にも関わっていることが推測される。脱イミノ化はタンパクの turnover に、メチル化やリン酸化は MBP とアクチンなど他の分子との相互作用に関わるなど、成体のミエリンでは MBP の isomer 間に平衡状態が存在することが推測される。MS においては、この平衡状態が脱イミノ化にシフトすることで、ミエリンが不安定になるのみでなく、シグナル伝達の破綻が起こる。

(担当：池中 一裕)

5. シトルリン化蛋白質と神経変性疾患

石神昭人 (東京都老人総合研究所 老化制御研究ユニット)

(2005.6.9)

ペプチジルアルギニンデアミナーゼ (PAD) は、ペプチド中のアルギニンをシトルリンに変換する翻訳後修飾酵素である。シトルリンを含む蛋白質をシトルリン化蛋白質と総称する。最近、シトルリン化蛋白質が関節リウマチや多発性硬化症の原因であると考えられるようになって

た。我々は、これら疾患以外にもアルツハイマー病や乾癬、アトピー性皮膚炎にもシトルリン化蛋白質が関与することを明らかにしている。最近の知見について報告したい。

(担当：池中 一裕)

6. 代謝型グルタミン酸受容体を介するシグナル伝達の多様性

立山 充博 (生理学研究所 分子生理研究系 神経機能素子研究部門 助教授)

(2005.6.15)

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) は神経のシグナル伝達を担う膜上機能分子であり, G 蛋白質と共役して多様な細胞応答をもたらす。この受容体のサブタイプの一つである mGluR1 は, 遺伝子欠損マウスを用いた研究などから, 記憶や学習に関係する「神経回路の可塑性」, すなわち, 小脳における神経シナプス伝達効率の長期抑圧や海馬における長期増強に重要な役割を果たしていることが知られている。

mGluR は, G 蛋白質共役型受容体の中でも class 3 に分類されるが, 他の class の受容体とは異なり, 複数の G 蛋白質と共役すること, グルタミン酸のみならず Ca^{2+} や Gd^{3+} などの細胞外の多価陽イオンによっても活性化されることが知られている。すなわち, mGluR を介するシグナル伝達の上流と下流には, 複数の経路が存在する。われわれは, 異なるタイプのリガンドであるグルタミン酸と Gd^{3+} では, 活性化されるシグナル伝達経路に差異があるのではないかという可能性を検証した。細胞内 Ca^{2+}

濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 変動と細胞内 cAMP 濃度 ($[\text{cAMP}]_i$) 変動を同時に記録することにより, グルタミン酸が mGluR を介して Gq ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇) と Gs ($[\text{cAMP}]_i$ 上昇) を活性化することを確認した。これに対して, Gd^{3+} は Gq を活性化したが, Gs を活性化しなかった。これは, 活性化されるシグナル伝達経路が, リガンドのタイプにより異なることを示している。

結晶構造解析の研究から, mGluR は異なる二つの活性化型構造を有することが示唆されている。これは, グルタミン酸のみの場合とグルタミン酸と Gd^{3+} が共存する場合では, mGluR の細胞外領域の構造が異なるという知見による。リガンドのタイプにより活性化されるシグナル伝達経路に差異が生じるということとは, リガンドによりもたらされる受容体の立体構造の差異に起因する可能性があるため, FRET (Fluorescent resonance energy transfer)を用い, さらに, 検討をおこなった。

(担当: 本田学)

7. The role of nectin-1 shedding in synaptogenesis: taking it off ?

Dr. Seung T. Lim (Research Assistant Professor, University of Rochester)

(2005.7.4)

Nectin is a calcium-independent cell adhesion molecule, localized to puncta adherentia junctions of the synapse. Nectin-1 interacts with afadin, an actin-binding protein that connects nectin to the actin cytoskeleton. This nectin-afadin intercellular adhesion system plays a role in the formation of synapses. Nectin-1 undergoes a regulated, multi-step set of endoproteolytic cleavage events by several sheddases in an activity-dependent manner. Our data indicates that these multiple process events include b-secretase and intramembranous proteolytic processing mediated by BACE1

and presenilin (PS)-dependent gamma-secretase respectively. This event is analogous to amyloid precursor protein processing. We have identified several amino acid residues that are necessary for these cleavage events through site-directed mutagenesis. Overexpression of these point-mutant polypeptides in primary hippocampal neurons reveals that ectodomain cleavage of nectin-1 plays a role in maintaining the morphology of dendritic spines and formation of new synapses. In addition, our data also provides that BACE1 and PS-1 are synaptic modulators.

(担当: 富永真琴)

8. Imaging synaptic function and plasticity in the neocortex

Karel Svoboda (Cold Spring Harbor Laboratory)

(2005.7.4)

How do synaptic circuits change in response to novel experience?

Optical techniques hold great promise for dissecting the mechanisms of plasticity at the level of circuits and even individual synapses. I will describe how we use laser scanning

photostimulation to search for the loci of experience-dependent plasticity in cortical circuits (i.e. the engram). We then use long-term in vivo imaging to study the synaptic mechanisms of plasticity.

(担当：河西春郎)

9. 電位センサーをもつイノシトールリン脂質ホスファターゼ Ci-VSP の機能

村田 喜理 (岡崎統合バイオサイエンスセンター 神経分化研究部門 特別研究員)

(2005.7.6)

従来、膜電位変化による情報伝達は、電位依存性イオンチャンネルによる、イオンの移動を介して行われる経路のみが知られていた。今回我々は、脊椎動物の祖先と関連が深い尾索動物ホヤ(*Ciona intestinalis*) のゲノムから、イオンチャンネルとは異なる仕組みで電気的情報を細胞内へ伝達する新しいタンパク質を発見した。Ci-VSP (*Ciona* Voltage Sensor-containing Phosphatase) と名付けられたそのタンパク質は、電位感受性イオンチャネルと同様の、4つの膜貫通ドメインを持つ電位センサーをもちながら、イオン透過路を欠いており、その代わりに、ホスファタ

ーゼ活性を示す PTEN と相同性を示す、酵素ドメインを持っていた。

我々は、Ci-VSP が実際に膜電位感受性を持つこと、酵素ドメインが PTEN と同様のイノシトールリン脂質を基質とするホスファターゼ活性を示すことを確かめ、さらに、この膜電位感受性と酵素活性がカップルしていることを見いだした。Ci-VSP は、イオンの移動なしで、膜電位変化を直接酵素活性の制御に用いる、全く新しい情報伝達分子である。

(担当：本田学)

10. 生物がにおいやフェロモンを感知するメカニズム

東原 和成 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 分子認識化学分野)

(2005.7.14)

匂いやフェロモンは、生態系に偶然的にランダムに存在するのではなく、それぞれの生物の生活環境において必然的に存在し、生物時計(時間)と生存空間(距離)が厳密に制御された形で設計された「目に見えない力」をもつ情報網の媒体であるといえる。そして、生物は、水棲生物から陸棲生物にかけての進化の過程で、それぞれの生活環境に適した種特異的な匂いやフェロモン分子を選択し、それらを受容できるセンサーシステムを獲得し、その結果、交尾相手や個体の認識を正確におこなうことができ、種の進化と保存が適切に行われてきた。匂いセンサーである嗅覚受容体は、様々な生物において、多重

遺伝子群を形成しており、G タンパク質共役型受容体のなかでも最大のサブファミリーを形成している。我々は、嗅覚受容体が多種多様な幅広い匂い分子を正確に識別するメカニズムを明らかにしてきた。嗅覚受容体は、精子など鼻以外の細胞でも発現しており、生体内化学センサーとして重要な機能を持っているようだ。また、カイコガ性フェロモンの受容体の同定および機能解析に成功し、高感度・高選択性の昆虫フェロモンセンサー機構を明らかにした。マウスでは、遺伝子にコードされている新規ペプチドが性特異的フェロモンとして機能していることを見出したので紹介する。

(担当：富永真琴)

11. Approach for Synapse Competition: in vivo imaging

Jeff W. Lichtman (Harvard University)

(2005.7.29)

Jeff Lichtman 教授は、発達期および再生期における神経回路再編成機構であるシナプス競合および余剰シナプスの除去を、神経筋接合部をモデルに研究をしており、毎年 Nature, Science などの雑誌に掲載されるなど、シナプス形態の長期可塑性に関して世界のトップランナーです。特に、同氏が持つシナプスの in vivo imaging を用いた同一シナプスの長期連続観察の技術は神経回路の研究を大きく飛躍させたことは言うまでもありません。

今回、横浜で開催される神経科学会の招待講演者として来日され、3 日間という短い日本滞在期間中に、生理研でのセミナーに応じて頂きました。多くの方のご参加をお待ちしております。生理研以外の方も遠慮なく参加下さい。

参考文献：

1. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord.
Nat Med. 2005 May;11(5):572-7.
2. Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding.
Neuron. 2004 Nov 18;44(4):651-61.
3. Comment on "Reelin promotes peripheral synapse elimination and maturation".
Science. 2004 Mar 26;303(5666)
4. Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus.
J Cell Biol. 2004 Mar 29;164(7):1077-87.
5. LTP: perils and progress.
Nat Rev Neurosci. 2003 Nov;4(11):926-9.
6. Synaptic dynamism measured over minutes to months: age-dependent decline in an autonomic ganglion.
Nat Neurosci. 2003 Sep;6(9):956-60.
7. Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition.
Nature. 2003 Jul 24;424(6947):430-4.

(担当：鍋倉淳一)

12. ニューロンからグリア細胞への情報伝達：シナプス小胞の異所放出の役割

松井 広 (Oregon Health & Science University, Vollum Institute)

(2005.7.29)

従来、ニューロン-グリア細胞間の情報伝達の多くは、シナプス前細胞からシナプス間隙に向けて放出された伝達物質が、シナプス間隙からあふれ出て、グリア細胞まで拡散 (スピルオーバー) した結果、起きる現象であると考えられてきた。つまり、ニューロンからグリア細胞への情報伝達は、ニューロン間のシナプス伝達の副産物とされてきたのである。しかし、私たちの研究は、シナプス前細胞のシナプス小胞が、シナプス間隙に向けて放出されるだけでなく、グリア細胞のほうに向けても放出されていることをつきとめた。この現象を「異所放出」とよぶ。このたびのセミナーでは、小脳登上線維からプルキニエ細胞へ向けた通常の放出と、バーグマングリア細胞に向けた異所放出との特性の違いを説明する。また、グリア細胞の Ca²⁺透過型 AMPA 受容体の性質、その分布の仕方や密度を、電

気生理学的手法および免疫電顕による定量的解析法を用いて調べ、これらの解析結果も紹介する。さらに、AMPA 受容体のマルコフ・モデルを使用し、異所放出による一過性の現象として、シナプス外でのグルタミン酸濃度が 1-2mM 濃度まで上昇することを示す。結論として、高濃度のグルタミン酸によってしか活性化されない低親和性の AMPA 受容体がグリア細胞に存在し、それらの AMPA 受容体は、スピルオーバーによってではなく、異所放出によって活性化されていることを述べる。最後に、これらの AMPA 受容体が活性化されることによって、活動の盛んなシナプスの位置情報がグリア細胞に伝わり、それを受けてグリア細胞がそれらのシナプスを取り囲むようになる、という仮説を紹介する。

(担当：岡田泰伸)

13. 癌抑制遺伝子 PTEN—その制御機構と病態—

前濱 朝彦 (東京都臨床医学総合研究所 細胞膜情報伝達プロジェクト)

(2005.8.9)

癌抑制遺伝子 PTEN は高い発癌頻度を示す遺伝病 (Cowden 病) の原因遺伝子の一つであると考えられているほか、その変異が腫瘍病変の形成と強い関連性をもつことが指摘されている。我々は以前に PTEN 遺伝子産物が脂質セカンドメッセンジャーであるホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PIP3) を基質とし、その D3 位を脱リン酸化する全く新規なホスファターゼ活性を示すことを明らかにした。すなわち PTEN 遺伝子産物

は PIP3 を脱リン酸化することによってその細胞内レベルを減少させ、PIP3 を介する細胞増殖・生存の細胞内シグナルに対して負の作用をもっていると考えられる。本セミナーでは脂質ホスファターゼとしての PTEN 遺伝子産物の生化学的特性を中心に、最近我々が見いだした PICT-1 による PTEN の機能制御および本機能制御機構の破綻と病態との関連性について考察していく。

(担当: 岡村 康司)

14. 随意運動遂行における感覚運動統合過程

和坂 俊昭 (生理学研究所 統合生理研究系感覚運動調節研究部門 研究員)

(2005.8.24)

感覚系がヒトの身体運動に重要な役割を果たしていることに疑問の余地はない。運動中、周囲の状況は絶えず変化しており、これに対応するために外界や身体内部から多くの感覚情報が中枢へと入力されている。このとき、中枢神経系においては不必要な情報は排除され、必要な情報が選択、抽出される。私はこれまでに脳波や脳磁図を用いて、随意運動を遂行するときに主働筋を支配する運動関連領域と、身体各部位を支配する体性感覚領域の

活動の関連性を検討してきた。今回の発表では、下肢の主働筋、拮抗筋 (相反性神経支配に相当する制御機構が大脳レベルにも存在するのか)、同名筋 (大脳半球間を越える統合作用が存在するのか) を支配する体性感覚領域の活動の変化、上肢の一次体性感覚野と二次体性感覚野の活動の変化 (一次感覚野とより高次の感覚中枢の機能的な差異) から、随意運動遂行における体性感覚系の働きについて発表した。

(担当: 本田 学)

15. Burst discharges in the basal ganglia of normal and parkinsonian monkeys

Thomas Wichmann (米国 Emory 大学医学部 準教授)

(2005.9.12)

Burst discharges are common in the primate basal ganglia, and they become more prevalent in parkinsonism. In this talk, the temporal structure of bursts, and the timing of neuronal discharges that precede or follow them will be examined in neuronal spike trains from the basal ganglia of awake normal and parkinsonian Rhesus monkeys. The results demonstrate

that such burst discharges are often embedded into predictable spike sequences, and that the duration of bursts is related to the length of inter-burst intervals. These interactions are enhanced in parkinsonism, perhaps contributing to abnormal information processing under these circumstances.

(担当: 南部 篤)

16. Visual processing in developmental disorders: perinatal brain damage, Williams syndrome, and refractive screening.

(発達障碍と視覚的情報処理：周産期の脳損傷, ウィリアムズ症候群, 及び屈折異常診断)

Dr. Oliver Braddick (Professor of Department of experimental Psychology, Univ. Oxford, UK)

(2005.9.14)

Because visual functions develop early in infancy, and involve a large part of the brain, they provide a unique window on the developing human brain. We have used measures of visual cortical function in the first months of life, including orientation-specific evoked potentials and control of selective attention, to study children at risk of perinatal brain damage, either through adverse events when born at term or through very premature birth. These early cortical measures are found to be good predictors of later neurological outcome. Later, from 3-5 years, tests which measure children's visual attention and the frontal control of visuospatial processing provide sensitive indicators of subtle impairments which are not usually apparent on conventional neurological and psychological testing. We have studied a large cohort of individuals with Williams syndrome (WS), a rare genetic disorder with a characteristic deficit of spatial cognition and relatively good production of language. Tests of global form and motion thresholds, and of visuo-motor control, support the idea that WS children and adults have a deficit of function in the dorsal relative to the ventral cortical stream. Other tests show deficits in the fronto-parietal systems that use

spatial information for planning and executive control. However, the dorsal stream vulnerability shown in measures of motion coherence thresholds is not unique to WS but is also evident in a wide range of neurodevelopmental disorders including individuals with autism, fragile x, dyslexia, hemiplegia, and perinatal brain damage with extremely premature births. In addition we have developed, photo and videorefractors, new, safe, non-invasive paediatric instruments to carry out screening on total infant populations and identified significant refractive errors (near and far sightedness and astigmatism) as precursors of common visual disorders such as strabismus and amblyopia. From these programmes, screening 9000 8-9 month old infants, we have found that high hyperopia predicts poor vision at 4 years, which can be prevented in many cases by infant refractive correction with the wearing of glasses. This hyperopic infant group also shows a range of subtle but significant deficits in preschool and school entry visuo-motor, visuo-cognitive and attentional tests. We will discuss the two-way relationships between optical development and developing brain systems.

(担当：金桶 吉起)

17. Local and global processing of form and motion : development and brain mechanisms.

(形と動きについての局所的・大域的情報処理：発達過程と脳内機構)

Dr. Janette Atkinson, (Professor of Visual development Unit, department of Psychology, Univ. College London, UK)

(2005.9.14)

Visual areas beyond V1/V2 have large receptive fields which can integrate local information about contour orientation (shape) and motion direction to extract larger scale structure of the visual scene. The functions of these higher-level ventral- and dorsal-stream systems can be tested psychophysically through coherence thresholds for global form and global motion stimuli. Our functional brain imaging experiments show that global form and motion tests

activate distinct, non-overlapping networks in extra-striate visual areas. We have investigated the early development of global processing in infants by behavioural testing and visual event-related potentials. These results show that, although local processing of contour orientation develops before that of motion direction in the first months of life, infants integrate local motion signals to detect global structure almost as soon as the local signals are available, whereas the integration of

global form information develops more gradually. However, in middle childhood, form coherence thresholds attain adult levels more rapidly than for motion, and global motion thresholds are impaired in a wide range of neurodevelopmental disorders. This phenomenon of dorsal stream vulnerability has

been identified in individuals with genetic disorders of Williams syndrome, autism and fragile x, as well as in children who have suffered perinatal brain damage leading to hemiplegia, in those born extremely prematurely and in a subset of dyslexics.

(担当：金桶 吉起)

18. 摂食による脳高次機能活性化

大村 裕 (九州大学 名誉教授)

(2005.9.20)

摂食により、脳脊髄液中のグルコース濃度は数分以内に2-3mM から2倍に上昇し30分以上持続する。

この上昇により、

1) ラット第三脳室壁にある上皮細胞はグルコースセンサーなので、この上昇に反応してそこで産生している酸性繊維芽細胞増殖因子(aFGF)を脳脊髄液中に放出する。aFGFはまず摂食中枢に働き、そのニューロンのPKCを活性化してニューロン活動を抑制する。次にaFGFは海馬CA1ニューロンに作用してLTPを促進する。そして情動性および空間性学習記憶が促進される。aFGFは同時に細胞性免疫機能を促進させる。

2) この2倍のグルコース上昇はラット海馬CA1ニュー

ロンに直接作用してシナプス前および後のシナプス活動を強く促進する。したがって神経化学的にはシナプス前のシナプシンI (site3)のリン酸化が促進し、シナプス後ではCAMKII, PKC, ERK およびGLUR1のリン酸化が促進する。これらがシナプス電位の増加をおこしている。またLTP持続時にはPKCおよびMARCKS (plasticityに関与)のリン酸化が促進している。したがって空間性学習記憶が促進している。接食により脳内に増加したaFGFおよびグルコースは独立的に脳高次機能を促進している。これは脳での冗長度である。しかし生体にとって冗長度は大きな特徴である。

(担当：鍋倉淳一)

19. 視床ハイブリッド神経回路を用いた、シナプス配線図と信号処理の連関解析 “Nucleotide release contributes to airway surface liquid homeostasis”

井上 剛 (生理研 神経シグナル)

(2005.9.22)

脳神経回路は、多くの神経細胞がシナプスによって適切に配線されることにより構成される。脳内信号処理はそのシナプス配線図という基盤の上で行われる。その配線図と信号処理の因果関係を明らかにするためには、実験者側で配線図を任意にいじり、それぞれの配線図がどのような信号処理をもたらすのかを対応付ける必要がある。今回、私はこの問題に取り組むため、マウス視床ハイブリッド局所神経回路を構築した。このハイブリッド回路では、マウス視床スライス標本から4点パッチクラ

ンプ記録を行い、その4つの細胞間のシナプス配線図をダイナミッククランプ法による人工シナプスを用いて任意に描いた。人工シナプスのカインेटクスとサイズは、実際にボルテジクランプ記録・カレントクランプ記録によって測定されるシナプス電流・電位を元に、リアリストティックに再現した。その結果、それぞれの配線図がどのような信号処理に関与しているかを対応させることが可能であった。このハイブリッド神経回路を用いて明らかになった成果について今回ご報告いたします。

(担当：小野 勝彦)

20. Synchrony-dependent Propagation of Signals in In Vitro Neural

Alex Reyes (NewYork 大学 助教授)

(2005.10.19)

The manner in which neural signals are represented in networks remains unclear. To examine experimentally how signals are processed, a multilayer feed forward network of neurons was reproduced in an in vitro slice preparation using a computer-driven iterative procedure. When constant and time-varying frequency inputs were delivered to the first layer of the network, the firing of neurons in successive layers became progressively more synchronous. Synchrony persisted under a wide range of network configurations, suggesting that

synchrony is the default state of feed forward networks. The fact that synchrony is so robust raises the problem of how to limit its spread

throughout cortex. However, we find that the spread of synchrony can be effectively confined by adding lateral inhibition. These data coupled with the fact that frequency information can be encoded by synchronous activity suggest that synchrony provides a viable means of transmitting signals in the central nervous system.

(担当：宮田 麻理子)

21. 絶食処置が肥満犬の血液性状に与える影響

木村 透 (動物実験センター)

(2005.10.28)

【緒言】

従来、肥満犬の絶食処置は比較的 안전한減量方法とされているが、生体側が受ける影響は明らかにされていない。また、減量後に食餌を再開した時に生じる問題も十分には調べられていない。本試験では、先ず肥満犬に絶食処置を施して減量を試みた。次いで、食餌を再開し、再び体重が増加する過程における血液性状の変化を調べた。

【材料および方法】

試験犬：外観的に肥満症と判断されたビーグル犬 7 頭 (雄 1 頭, 雌 6 頭) を用いた。試験方法：絶食期間は 3 週間とし、飲水は自由とした。絶食試験終了後は、徐々に飼料を与え、自由採食に切り換えた。試験開始前および試験開始 1 日目, 1 週目, 2 週目, 3 週目に採血を行なった。さらに、絶食終了後 1 週目および 3 か月目に同様の処置を施した。一般臨床症状を観察するとともに、血液検査, 血液凝固系検査および血清生化学検査を実施した。

【成績】

臨床所見：絶食終了後、体重は急激に増加し始め、初期体重を上回る個体も見られた。血液検査成績：絶食期間中、ほとんど変化は見られなかった。しかし、絶食終

了後に赤血球系に減少を見た。血液凝固系検査：血液凝固能に変化は見られなかった。血清生化学検査：絶食処置で、総コレステロールとリン脂質は半減したが、遊離脂肪酸は 4-5 倍に上昇した。いずれも食餌再開後もとの値に復した。血糖値は絶食後徐々に低下し、採食再開後にはやや高い値を示した。インスリンは、試験開始前に高値を呈するものが見られたが、絶食により著しく低下した。しかし、絶食試験終了後、急激に上昇し 131IU/ml もの高い成績をとる個体が現れた。絶食とともに、3-ヒドロキシ酪酸は 100 倍にも増加し、その結果総ケトン体は 3 倍以上に上昇した。しかし、飼料摂取により、ケトン血症は速やかに改善された。

【考察】

以上の成績から、肥満犬における絶食処置は、ヒトと同様に脂質・糖代謝に重大な影響を及ぼすことがわかった。さらに、絶食終了後に食餌を再開した場合、内分泌系および脂質・糖代謝系に重大な変化が現れることも明らかとなった。食餌再開後に見られた血清生化学成分の変動は、肥満犬の体重の変化に深く関係するものと思われた。

(担当：小野 勝彦)

22. Imaging action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons using voltage sensitive dyes.

Lucy M. Palmer (Division of Neuroscience (Greg J Stuart lab) John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra 0200 Australia)

(2005.11.8)

The action potential (AP) is the fundamental electrical signal used by neurons to relay information in the central nervous system. Consequently, where APs are initiated has important consequences for the processing and exchange of information in the brain. Pioneering work in the 1950's suggested that APs are generated in the axon initial segment, however, the precise location in the axon is not known. I will present voltage imaging data illustrating that synaptically evoked APs in cortical layer 5 pyramidal neurons are initiated at an average axonal distance of 35 μ m from the soma. This finding was supported by analyzing AP characteristics during local application of a low sodium external solution at different

locations along the axon, and after mechanically severing the axon at different lengths. By labeling the oligodendrocyte process that ensheathed the proximal region of the layer 5 pyramidal neuron axon, the site of AP initiation was morphologically identified as the distal axon initial segment. Since the initial segment receives a high density of inhibitory synapses, we also investigated the impact local applications of GABA to the axon initial segment. The site of AP initiation in these experiments was identical to that observed under control conditions, indicating that the site of AP initiation is robust even under conditions of axonal inhibition.

(担当：窪田)

23. 行動進化の研究モデル動物としてのイトヨ

北野 潤 (Peichel Lab, Division of Human Biology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA)

(2005.11.17)

動物界に見られる多様な行動はいかなるメカニズムで進化してきたのだろうか。とりわけ求愛行動は、種内では非常に似通った固定的な行動でありながら、種間には多くのバリエーションがあり、種分化の過程で生じた何らかの遺伝学的、神経学的変化がその多様化の基盤にあると考えられる。我々は、イトヨの求愛行動をモデル系とし、いかなる遺伝的メカニズムで求愛行動の進化が生じるのかを解明することを目指している。イトヨは、北半球の多様な水域に分布する魚であり、日本列島周辺には、日本海型と太平洋型という遺伝的に異なる2型のイトヨが生息している。我々は、この2型が同一水域に生息している北海道東部から2型のイトヨを採集し、野外採集個体、及び、人工交配によって得られた F1 個体と雑種個体の求愛行動を観察した。その結果明らかとなっ

た求愛行動の分化、及び、その遺伝について報告する。さらに野外採集個体のマイクロサテライト分析の結果、これら2型間には生殖隔離が存在し、別種として存在していることを確認した一方で、実験室内では人工受精により容易に交雑個体が作成できることを確認した。この結果に基づいて行った見合い交配実験によって、求愛行動の違いが2型間の生殖隔離に果たす役割が示唆された。この2型は、容易に交雑個体が作成できるほど近縁種であるにも関わらず、求愛行動が非常に異なっており、行動の進化研究モデルとして理想的であると考えられる。現在、Peichel らによって確立された連鎖地図を用いて、交雑個体を用いた求愛行動の遺伝子座マッピングを進行中である。

(担当：重本隆一)

24. 樹状突起スパインのネック形態と NMDA 受容体を介するカルシウムシグナルの関連

野口 潤 (細胞器官研究系 生体膜研究部門)

(2005.11.30)

海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起にはスパインと呼ばれるトゲ状の構造が多数あり, グルタミン酸作動性の入力
の 90%がスパイン上に終わる。それぞれのスパインはス
パイン頭部と, ネックから成っており, 形態的に非常に
多様であることから形態と機能との関連が議論されてき
た。今回我々は 2 光子励起アンケイジング法とカルシウ
ムイメージングを組み合わせる方法を開発し, それを用

いてシナプス可塑性の誘導に必須である NMDA 受容体
を介するカルシウムシグナルとスパイン形態の関連につ
いて調べた。その結果, NMDA 受容体の分布とスパイン
ネック形態がカルシウムシグナルに与える影響について
興味深い知見を得たので紹介する。また, 現在我々は in
vivo において 2 光子励起イメージングを行なうシステム
を立ちあげつつあるので簡単に説明したい。

(担当: 小野勝彦)

25. 最新の RNAi : miR RNAi 発現ベクターまたは, ステルスの最新の結果

神田 東作 (インビトロジェン (株) テクニカルセールススペシャリスト)

(2005.11.30)

26. ProtoArray タンパク質マイクロレイキット : 活性型タンパク質プロテインアレイと応用性

上野 雄介 (インビトロジェン (株) テクニカルセールススペシャリスト)

(2005.11.30)

27. Organization and Function of Visual Cortical Circuits

Edward Callaway (Systems Neurobiology Laboratories The Salk Institute for Biological Studies La Jolla, CA, U.S.A)

(2005.12.1)

We have studied primary visual cortex (V1) to better
understand how neural circuits give rise to perception. We
have found that cortical circuits are extremely precise, such that
different neuron types, and even neighboring neurons of the
same type, are connected differently. For example, different
types of inhibitory neurons with overlapping dendritic arbors
receive connections from different cortical layers. And
neighboring excitatory neurons only receive common input
from the same presynaptic neurons in the minority of cases
when they are directly connected to each other. This
fine-scale and cell type-specific organization implies that
studies of relationships between circuits and function should
match this level of organization. We have exploited differences
in the laminar projections within V1 of different types LGN
neurons to correlate these cell types with their functional

properties. We find that red-green and blue-yellow color
opponent LGN neurons comprise parallel pathways that project
to different layers of V1, and neurons with blue-on versus
blue-off receptive fields project to distinct zones. To test
hypotheses about contributions of specific cell types to
neuronal responses and to perception, we have developed
methods to allow reversible inactivation of selected cell types in
primates. We find that expression of an insect neuropeptide
receptor which couples to GIRK channels can be used to
selectively, quickly, and reversibly eliminate the activity of
LGN or cortical neurons in vivo. Future application of these
methods will allow in vivo tests of the role of particular cell
types within the functioning cortical network.

(担当: 窪田)

28. A closer examination of several extrinsic connections to inferotemporal cortex in macaque

Kathleen S. Rockland (理化学研究所 脳科学総合研究センター 認知脳科学研究グループ
脳皮質機能構造研究チーム チームリーダー)

(2005.12.7)

The connections to inferotemporal cortex are broadly known, but it is still unclear 1) how these combine within a functional architecture, and 2) how these might subserve neuronal properties. In this seminar, I will review and re-examine several major extrinsic projection systems to this

region (from amygdala, CA1, pulvinar, and early visual areas). I will also discuss potential postsynaptic targets. A main goal will be to review these individual components at the single axon level, and raise questions about specialized microcircuitry organization.

(担当：小松 英彦)

29. Synaptic plasticity regulated by stargazin-like TARPs

David S. Brecht (Department of Physiology, University of California at San Francisco)

(2005.12.9)

Brecht 教授は、シナプス伝達における一酸化窒素の役割とその調節の分子機構について一連の優れた研究成果を挙げられたことで高名です。その後、Brecht 教授は、stargazin を含む TARP (transmembrane AMPA receptor regulatory proteins) の役割について精力的に研究を進め、stargazin が AMPA 受容体を膜表面に発現させるのに必要な分子であること、stargazin と PSD-95 の相互作用によって AMPA 受容体がシナプス後部に運ばれること等を明らかにされました。さらに、最近、stargazin が AMPA 受容体チャネルの機能修飾にも関わっていることを発表されました。本講演ではこれらの研究内容をご紹介します予定で

参考文献

- (1) TARP gamma-8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. Nature Neurosci (2005) 8: 1525-1533.

- (2) Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. Nature (2005) 435: 1052-1058.
- (3) Interaction with the unfolded protein response reveals a role for stargazin in biosynthetic AMPA receptor transport. J Neurosci (2005) 25:1095-1102.
- (4) Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. Neuron (2005) 20: 269-277
- (5) Stargazin is an AMPA receptor auxiliary subunit. PNAS USA (2005) 102: 485-90.
- (6) Dynamic interaction of stargazin-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses. Science (2004) 303: 1508-1511.

(担当：久保 義弘)

30. 代謝型グルタミン酸および GABAB 受容体による淡蒼球ニューロン活動の制御

金田 勝幸 (生理研・認知行動発達機構研究部門)

(2005.12.14)

大脳基底核の主要な核の一つである淡蒼球は、主として線条体と淡蒼球自身から GABA 作動性抑制性入力を、また、視床下核からグルタミン酸作動性興奮性入力を受

けている。一方、淡蒼球はその GABA 性投射を大脳基底核のほぼすべての核に送っている。したがって、大脳基底核による運動制御機構を理解する上で淡蒼球ニューロ

ンの活動制御機構を解明することはきわめて重要であると考えられる。これまでの報告から、淡蒼球ニューロンの高頻度の自発発火は、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体および GABAA 受容体を介して制御されていることが明らかとなっているが、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluRs) や GABAB 受容体の淡蒼球での役割については、その豊富な発現にもかかわらず、不明の点が多い。

今回の昼食セミナーでは、mGluR1 と GABAB 受容体がシナプスから遊離されたグルタミン酸や GABA によって活性化されるのかどうか、また、その活性化が淡蒼球ニューロンの活動にどのような影響を与えるのかを、ラット脳スライス標本を用いたホールセル記録により解析した結果について紹介したい。

(担当：小野勝彦)

31. 線条体介在ニューロンの運動制御における役割—サブスタンス P 受容体発現ニューロンの

選択的破壊による検討

知見 聡美 (米国テネシー大学医学部 博士研究員)

(2005.12.27)

大脳基底核は運動制御において重要な役割を果たし、その病変により重篤な運動障害を生じることが広く知られているが、大脳基底核が運動を制御する機構については、未だ不明な部分が多い。私は、動物の個体そのものを用いた *in vivo* における電気生理学的解析と、動物

が実際に行う運動の行動学的解析により、大脳基底核が運動を制御する機構を解明することを目指している。大脳基底核の入力部である線条体の介在ニューロンが運動制御において果たす機能について解析した結果を中心に、これまでに行ってきた実験について報告する。

(担当：南部 篤)

32. 発育途中のネコ大脳皮質視覚野の眼優位カラム (Ocular Dominance Column) に特異的な因子の探索

富田 浩一 (マックスプランク研究所, Dr. Mark Hubener lab)

(2006.1.13)

ノーベル賞学者 Hubel と Wiesel によって発見されたネコ大脳皮質視覚野の眼優位カラムは、機能的カラムの形成メカニズム及び可塑性研究のよいモデル系と考えられている。この形成メカニズムに関しては、眼からの視覚情報によって主に決定されると考えられてきたが、最近この説は否定されつつあり、カラム形成の初期過程で

は視覚情報ではなく、特に内因性の遺伝情報によるとの説が主流となってきた。しかし、この説を直接肯定する報告はなく、これを直接証明しようと幼弱なネコの眼優位カラムに特異的な遺伝子の単離を試み、現在大きな可能性を秘めた候補因子をいくつか得た。今回のセミナーではこれらの候補因子について報告する。

(担当：鍋倉淳一)

33. アレキサンダー病モデルマウスの解析：GFAP に関する一般的な知識も含めて

田中 謙二 (生理研・分子神経生理部門)

(2006.1.20)

発表者はアストロサイトの *in vivo* における機能を知りたいと考え、アストロサイト特異的疾患をマウスで再現することを試みた。失われた機能からアストロサイト

の生理機能を類推するというものである。模擬した疾患はアレキサンダー病という疾患で、これはアストロサイトのマーカーとしてよく知られる *glial fibrillary acidic*

protein (GFAP)の点変異のよっておこる(小児)神経疾患である。当日は、モデルマウスの組織学、行動解析から得られた所見について話すだけでなく、GFAPの一般的

な知識についても言及し、GFAPを研究のツールとして用いることを予定している研究者に情報を公開したい。

(担当:小野 勝彦)

34. Modulation by melatonin of information processing in the retina

楊 雄里 (Yang Xiong-Li) (中国 上海 復旦大学 神経生物学研究所)

(2006.1.24)

I will present some of our recent results, showing how melatonin, a primary hormone originally discovered in the pineal gland, differentially modulates signal pathways of rod and cone photoreceptors in the outer retina. Our data show that melatonin suppresses cone signal at the horizontal cell level by activating the melatonin MT1 receptor, which in turn reduces the intracellular concentration of cGMP, but rod signal at the bipolar cell level by activating the melatonin MT2 receptor, which in turn increases the intracellular cGMP. Such modulation caused by melatonin may be in part responsible for circadian changes of retinal functions.

楊教授は1982年本生理学研究所金子章道教授の研究室にて網膜水平細胞の研究を実施、この仕事により博士号を授与されています。中国に帰国後は上海生理学研究所の所長をつとめられ、中国科学院院士の称号をおもちで現在復旦大学神経生物学研究所教授として中国神経生理学をリードされている科学者です。1月20-23日葉山で開催された総合研究大学院大学の国際シンポジウムにて招待講演される機会に生理学研究所にてセミナーを行いました。

(担当:村上政隆)

35. Carnitine transport in the male reproductive tract: A novel organic ion transporter

and its role in male reproduction

Chumpol Pholpramool (タイ, バンコック, マヒドール大学 理工学部副学部長
生理学教室主幹 アジアオセアニア生理科学連合会長)

(2006.1.24)

Professor Chumpol Pholpramool is conducting the research in the field of male reproductive physiology with particular emphases on the epididymis and sperm maturation, male fertility regulation, spermatogonial stem cells; and the influence of exercise and sport training on sexual maturation and other functional developments in school children. In the seminar he stressed the importance of carnitine transport and application of the experimental results in Physiological experiments.

Pholpramool教授はアジアオセアニア生理科学連合(FAOPS)の創設に御努力され、2002年より会長を勤められています。アジアオセアニアの若手生理学者の育成にも勤められています。1月20-23日葉山で開催された総合研究大学院大学の国際シンポジウムにて招待講演される機会に生理学研究所にてセミナーを行いました。

(担当:村上政隆)

36. Traveling waves in visual cortex during binocular rivalry

David J. Heeger (Department of Psychology and Center for Neural Science New York University)

(2006.1.27)

When the two eyes view dissimilar patterns, one experiences a perceptual illusion called binocular rivalry. Instead of seeing both patterns superimposed, they are perceived in alternation. What makes this phenomenon remarkable is the dissociation between a constant physical stimulation and fluctuating perceptual experience. In spite of widespread interest, and an impressive volume of high-quality work on this topic, many of the central questions concerning the neural processing underlying binocular rivalry remain open. Particularly controversial is the role of primary visual cortex(V1) in rivalry. To address this controversy, we are

capitalizing on an interesting aspect of the perceptual phenomenon; during an alternation, one sees a traveling wave in which the dominance of one pattern emerges locally and expands progressively as it renders the other pattern invisible. We used fMRI to measure traveling waves of cortical activity in early visual areas accompanying perceptual traveling waves. These waves of activity propagated over subregions of cortex that corresponded retinotopically to the perceptual waves, and the spatiotemporal dynamics of cortical waves co-varied with the propagation speeds of perceptual waves.

(担当：小松 英彦)

37. 逆行性シナプス伝達を担う内因性カンナビノイドの同定と合成経路の解明

前島 隆司 (生体恒常機能発達機構研究部門)

(2006.2.28)

脳内のマリファナと称される内因性カンナビノイドは、中枢神経系の多くのシナプスにおいて逆行性シグナル分子として働くことが明らかになってきました。その作用はシナプス前終末に存在するカンナビノイド受容体を介して生じ、神経伝達物質の放出を短期的もしくは長期的に抑制します。これまでに、内因性カンナビノイドとして、アナンダミド、2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)などアラキドン酸を持つ生理活性脂質が複数報告されてきました。しかしながら、どの分子が逆行性シナプス伝達を担うのか、またその生合成を担う分子機構もはっきりしていませんでした。またその一方で、内因性カンナビノイドの誘導過程として、(1) 細胞内のカルシウム濃度上昇、(2) Gq型G蛋白質共役型受容体(mGluR1/5な

ど)の活性化、(3) (1)と(2)の相乗が報告されていましたが、これらが単一の分子機構で説明されるのか、または独立した複数の機構で説明されるのかも不透明でした。このような経緯のなか、最近演者らはG蛋白質共役型受容体を介する誘導過程((2)と(3))は、Ca²⁺感受性も持ちGq蛋白質により活性化されるホスホリパーゼCγ(PLCγ)の働きで説明され、さらにこれにより2-AGが合成されることを示しました。今回の昼食セミナーでは、小脳ブルキンエ細胞における実験を中心にその研究を紹介させていただきます。さらに、この逆行性シナプス伝達の機能的役割について他のグループの論文も交え考察いたします。

(担当：小野 勝彦)

38. 『生理』をどう捉えるか —光学的アプローチから光をあてる—

神野 耕太郎 (東京医科歯科大学名誉教授)

(2006.3.8)

最近、生理学の意味の問い直しをせまられているようにみえる。これに対してわれわれはどう応じたらよいの

だろうか。このセミナーでは、電位活動の光学的測定/イメージング法の開発とその適用に関した'先駆的'研

究に係わった私の実体験を踏まえて、『生理』をどう捉え、『生理学』とはなんだろうか、ということを考えて

みる。また、研究に際しての問題意識、背景、隠されたエピソードなども紹介する。

(担当：岡田泰伸)

39. フリーズフラクチャー・ディープエッチ電子線トモグラフィーで可視化された細胞膜構造

諸根 信弘 (国立精神・神経センター神経研究所 微細構造研究部 神経形態研究室)

(2006.3.9)

神経組織を含めた細胞膜表面には、高度に特殊化されたナノドメイン構造が構築されている。これらのドメイン構造群は協調的に機能するとともに、膜表面での相互作用(シグナル伝達)と高頻度で相関を持つと考えられる。最近では、活きた細胞膜中でのタンパク質・脂質1分子の運動軌跡が、超高速(数万フレーム/秒以上の)カメラ観察により日常的に可視化され、ナノドメイン構造に基づく、新しい細胞膜構造概念のパラダイムシフトが期待されている(京大再生研・楠見明弘先生ら)。私たちの研究グループでは、細胞膜の組織・分子の構造をハ

イコントラストで3次元可視化できる「フリーズレプリカ・電子線トモグラフィー」を採用して、膜タンパク質・脂質の濃縮ドメイン膜骨格、カベオラ、クラスリン被覆ピットの形成に対するナノレベルイメージングを行っている。(実際、膜表面にはディープエッチング、膜内部疎水面にはフラクチャーの手法を利用している。)今回のセミナーでは、細胞膜のコンパートメント構造など、1分子イメージングと相補的に良く一致する研究例を含めて、本研究手法の展望をご紹介します。

(担当：重本隆一)

40. ニューロングリア細胞間の情報伝達が引き起こす細胞外空間の動的変化

松井 広 (生理学研究所・脳形態解析研究部門)

(2006.3.14)

ニューロングリア細胞間の情報伝達は、シナプス間隙に放出された伝達物質が溢れ出て(スピルオーバー)、グリア細胞まで拡散することによって生じると考えられてきた。しかし、シナプス前細胞からグリア細胞のほうに向けても、シナプス小胞の直接的な放出(異所放出)が生じることを、我々はつきとめた(Matsui and Jahr, 2003; 2004; Matsui et al., 2005)。小脳の登上線維-プルキニエ細胞間のシナプスでは、バグマングリア細胞がシナプス部位を取り囲んでいる。バグマングリア細胞の低親和性Ca透過型AMPA受容体を活性化させるには、異所放出による高濃度のグルタミン酸が必要であると分かった。つぎに我々は、このようなニューロングリア細胞

間の情報伝達によって、バグマングリア細胞の形態がどのような影響を受けるのかを、二光子励起イメージング法を用いて調べることにした。その結果、グリア細胞の微小突起の形態は、数分単位で刻々と変化していることが明らかになった。またシナプス刺激によって、微小突起の先端部で、AMPA受容体を介したCa流入が起こることも確認された。このようなシナプス刺激によって、グリア細胞の形態がどのように制御されているか調べ、グリア細胞の細胞膜に高密度に発現しているグルタミン酸トランスポーターと、シナプス部位の距離がいかに調節されているのかをつきとめようと考えている。

(担当：小野勝彦)

【 大学院特別講義 】

大学院特別講義

1. 第 78 回 (2005.4.13)
演者：統合生理研究系・生体システム研究部門 南部 篤 教授
演題：大脳基底核と随意運動
2. 第 79 回 (2005.5.11)
演者：細胞器官研究系・生体膜研究部門 河西 春郎 教授
演題：シナプス研究と 2 光子励起法
3. 第 80 回 (2005.6.15)
演者：岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理研究部門 富永 真琴 教授
演題：痛み刺激受容・温度受容の分子機構
4. 特別回 (2005.7.11)
演者：生理学研究所・前機構長 佐々木 和夫 名誉教授
演題：前頭連合野の機能研究 –サルからヒトへ・ヒトからサルへ–
5. 第 81 回 (2005.7.13)
演者：岡崎統合バイオサイエンスセンター・ナノ形態生理研究部門 永山 國昭 教授
演題：分子機構学—構造解析から機能へ
6. 第 82 回 (2005.9.14)
演者：岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化研究部門 岡村 康司 教授
演題：膜興奮性とイオンチャネル ～膜電位シグナル伝達の新機構～
7. 第 83 回 (2005.10.12)
演者：分子生理研究系・分子神経生理研究部門 池中 一裕 教授
演題：グリア細胞の新たな機能
8. 第 84 回 (2005.11.30)
演者：生体情報研究系・感覚認知情報研究部門 小松 英彦 教授
演題：視覚の働きと仕組み
9. 第 85 回 (2005.12.21)
演者：大脳皮質機能研究系・脳形態解析研究部門 重本 隆一 教授
演題：記憶の脳内痕跡：グルタミン酸受容体とシナプスの変化を追う
10. 第 86 回 (2006.1.11)
演者：細胞器官研究系・機能協関研究部門 岡田 泰伸 教授
演題：アニオンチャネルの新機能とミステリー

11. 第 87 回 (2006.2.22)

演者：大脳皮質機能研究系・大脳神経回路論研究部門 川口 泰雄 教授

演題：大脳皮質ニューロンの多様性

12. 第 88 回 (2006.3.8)

演者：発達生理学研究系・認知行動発達機構研究部門 伊佐 正 教授

演題：正常脳と損傷脳の機能代償過程から学ぶこと

【 その他のセミナー 】

山手イブニングセミナー

1. 演題：Structural and Functional Properties of Nitric Oxide Synthase
日時：2005年10月18日
演者：Prof. Denis L. Rousseau, Ph.D. (Professor and University Chairman Department of Physiology and Biophysics)
2. 演題：温度感受性 TRP チャネルー構造・発現・機能と生理学的意義
日時：2006年1月17日
演者：富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域)

プロテオミクスセミナー

1. 演題：ディフェレンシャルディスプレイ 2D-DIGE システムと細胞蛍光イメージング装置 IN Cell Analyzer の紹介を用いた複合プロテオーム解析
日時：2005年4月27日
演者：Amersham Biosciences 社 (現 GE ヘルスケアバイオサイエンス社)
内容：2D-DIGE システムの紹介を中心に開催した。このシステムでは、比較したい2つのサンプルを、異なる蛍光色素でラベルし、1枚のゲルで2次元電気泳動を行うことで、容易に2のサンプル間で発現量の異なるタンパク質を同定することが可能となった。またサーモエレクトロン社製マススペクトルとアマシャム社製液体クロマトグラフィーシステムを組み合わせた LC/MS/MS システムである Ettan MDLC, そのマススペクトル解析で同定されたタンパク質の細胞内挙動を統計的に検討するための蛍光イメージング装置 IN Cell Analyzer の紹介も行われた。
2. 演題：“Zoom In” 手法を用いた二次元電気泳動によるタンパク質分離分析 (Multiplexed Proteomics)
日時：2005年6月8日
演者：Invitrogen 社
内容：Invitrogen 社は、2次元電気泳動からタンパク質の蛍光染色までの技術をトータルに提供しており、特にミニゲルを用いた2次元電気泳動 ZOOM システムは、従来の方法よりも大幅な時間短縮が実現され、約1日半でタンパク質スポットの検出が可能である。また現在、広く用いられているタンパク質スポット検出用の蛍光試薬 SYPRO Ruby や、リン酸化タンパク質のみを染色する ProQ Diamond など各種タンパク質蛍光検出試薬の紹介もなされた。
3. 演題：MALDI-TOF/MS および LC/MS におけるプロテオミクス解析
日時：2005年7月14日
演者：Bruker Daltonics 社
内容：今回よりマススペクトロメトリーシステム (質量分析計) のメーカーにセミナーを依頼した。Bruker Daltonics 社は、分析室に1台設置されている MALDI/TOF-MS のメーカーで、セミナーの前半に、その MALDI/TOF-MS を利用して、どこまで何を明らかに出来るのか、という具体的なアプリケーションの解説、後半に液体クロマトグラフィー(LC)を組み合わせた最新の LC/MS システムの紹介が行われた。

4. 演題：プロテオーム解析における質量分析法 — 蛋白質の機能解析を目指して—
日時：2005 年 7 月 27 日
演者：島津製作所
内容：今回のセミナーでは、イオン化原理やハードウェアの構造などのマスペクトル解析のきわめて基本的な解説が前半で行われた。その後、島津製作所が提供している最新のプロテオーム解析技術について、MALDI/TOF-MS および最新液体クロマトグラフィーを組み合わせた LC/MS を中心に紹介が行われた。

5. 演題：バイオマーカー探索・翻訳後修飾解析に向けた新プロテオミクスソリューションの提案
日時：2005 年 9 月 22 日
演者：ABI (アプライドバイオシステムズ) 社
内容：前回まで中心であった MALDI 方式のイオン化方法とは異なる ESI 方式によるイオン化を利用した LC/MS (液体クロマトグラフィーとマスペクトルを組み合わせたシステム) が解説された。リン酸化などの翻訳後修飾の解析を目的としたアプリケーションも併せて紹介された。また、二次元電気泳動を用いず、マスペクトル解析のみで、2 サンプル間で発現量の異なるタンパク質を同定することが出来る「ICAT」試薬や「iTRAQ」試薬の解説も行われた。

6. 演題：AKTA システムによるタンパク質精製の原理と実技
日時：2005 年 9 月 27 日
演者：Amersham Biosciences 社 (現 GE ヘルスケアバイオサイエンス社)
内容：サテライトセミナーとして、タンパク質分析・精製に利用する液体クロマトグラフィーである Amersham 社製 AKTA システムのセミナーおよび講習会を開催した。午前中、クロマトグラフィーの原理、アプリケーションの紹介をセミナー形式で行ってもらい、午後から生理研に共通機器として導入済みの AKTAexplorer10XT を使って実際に、抗体精製や各種融合タンパク質精製のデモンストレーションを行った。

7. 演題：プロテオミクス解析のための LC/MS 最新技術セミナー
日時：2005 年 10 月 24 日
演者：AMR 社および Thermo 社共催
内容：今回は予め岡崎 3 研究所から公募したサンプルを AMR 社/Thermo 社に送り、その解析結果と共に、バイオサイエンス分野における LC/MS システムの応用技術が紹介された。特に MS 解析で優れた結果を出すために必要な、タンパク質サンプル調製について詳細な解説が行われた。

8. 演題：新型 NanoLC-LIT-TOFMS によるプロテオーム解析のご紹介
日時：2005 年 11 月 15 日
演者：日立ハイテク社
内容：今回は日立ハイテク社により、イオントラップ型 TOF マスペクトロメトリーシステムという、これまでとは異なる最新機種の紹介が行われた。日立ハイテク社は、ハードウェアからソフトウェアまでを一から開発しており、その経験を踏まえて、現在の MS 解析技術の特徴と問題点を説明してもらった。説明は、実際に開発に携わった担当者によるもので、実際の開発現場の話しを直接、聞くことが出来た。

9. 演題：ウォーターズ UPLC/MS セミナー

日時：2005年11月22日

演者：Waters社

内容：前半はLC/MS（旧 Micromass 社）に関する解説を、後半は詳細な液体クロマトグラフィー（LC）システムに関する解説が行われた。さらにプロテオーム解析と関連し、代謝産物の網羅的解析手法である「メタボローム解析」についての解説も行われた。

合同セミナー

1. 演題：Imaging synaptic inhibition with Clomeleon, a genetically encoded chloride indicator

日時：2006年2月23日

演者：George J. Augustine (Department of Neurobiology, Duke University Medical Center, USA)

内容：Clomeleon is a genetically encoded indicator that uses FRET to provide an absolute measure of the internal Cl⁻ concentration ($[Cl^-]_i$). We have developed transgenic mice with Clomeleon expression targeted selectively to neurons by employing a neuron-specific promoter, Thy1. This transgene was introduced into several lines of transgenic mice, each of which express Clomeleon in specific subsets of neurons.

The ability of Clomeleon to report changes in $[Cl^-]_i$ associated with phasic synaptic activity was tested in vitro by preparing acute slices from the brains of these transgenic mice. $[Cl^-]_i$ was imaged in brain slices from the cerebellum, amygdala and hippocampus of 14–20-day-old mice. In all of these regions, synaptic activation caused detectable rises in $[Cl^-]_i$, although relatively large inhibitory events are required to produce an adequate signal/noise. These results indicate that Clomeleon can report changes in $[Cl^-]_i$ associated with phasic synaptic inhibition. We also used Clomeleon to examine the properties of tonic inhibition of cerebellar granule cells. Application of the GABA_A receptor antagonists reduced resting $[Cl^-]_i$ in these cells, due to blockade of tonic activation of GABA_A receptors. Cl⁻ imaging allowed us to examine the spatial distribution of tonic inhibition in the cerebellum. GABA_A antagonists decreased $[Cl^-]_i$ in the molecular layer, where granule cell axons (parallel fibers) reside, and also in some mossy fiber terminals. These results indicate that Clomeleon can be used to image tonic release of GABA and that this release causes tonic inhibition at several loci within the cerebellar cortex. In summary, Clomeleon permits imaging of both phasic and tonic inhibition of central neurons in vitro. This ability should enable imaging of the spatiotemporal dynamics of inhibitory circuits in the brain.

主な論文

1. Duebel J, Haverkamp S, Schleich W, Feng G, Augustine GJ, Kuner T, Euler T. (2006) Two-photon imaging reveals somatodendritic chloride gradient in retinal ON-type bipolar cells expressing the biosensor Clomeleon. *Neuron*. 49:81-94.
2. Gitler, D., Y. Xu, H-T. Kao, D. Lin, S. Lim, J. Feng, P. Greengard, and G.J. Augustine (2004) Molecular determinants of synapsin targeting to presynaptic terminals. *J. Neurosci.* 24:3711-3720.
3. Nishiki T, Augustine GJ (2004) Synaptotagmin I synchronizes transmitter release in mouse hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:6127-6132.
4. Kuner, T. & G.J. Augustine (2000) A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 22: 447-459.
5. Miyata, M., E.A. Finch, L. Khiroug, K. Hashimoto, S. Hayasaka, S.-I. Oda, M. Inouye, Y. Takagishi, G.J. Augustine & M. Kano (2000) Local calcium release in dendritic spines required for long-term synaptic depression. *Neuron* 28: 233-244.

(担当：鍋倉淳一)

2. 演題：脳の情報表現を Cell Assembly と Brain-Machine Interface から観る

日時：2006 年 3 月 22 日

演者：櫻井 芳雄（京都大学大学院文学研究科 心理学研究室）

内容：脳の柔軟な情報表現は、協調的に活動するニューロン集団，すなわち Cell Assembly が実現している。その実態をとらえるには，課題遂行中の動物から長期間にわたりマルチニューロン活動を記録し，近接したニューロン間の同期活動も含め解析する必要がある。今回はその最新の記録法と解析法について解説し，これまで得られた実験結果を紹介する。また，マルチニューロン活動が表す Cell Assembly が確かに情報そのものであり，課題に応じて可塑的に変わることを構成的手法により確かめる方法が Brain-Machine Interface である。その方法と現在の研究プロジェクト，及び予備的な結果についても紹介する。

(担当：小松英彦)

生理学研究所年報 第27卷

発行 2006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