

自 然 科 学 研 究 機 構

生 理 学 研 究 所 年 報

第35卷



2014

はじめに

生理学研究所年報第 35 巻をここに刊行し、2013(平成 25)年度における大学共同利用機関としての生理学研究所の事業活動、研究成果を報告させていただきます。

生理学研究所は 1977 年 5 月に開設され、2013 年度で 37 年目を迎えました。また 2004 年 4 月の法人化により大学共同利用機関法人自然科学研究機構を構成する 5 研究機関の 1 つとなって 10 年目（第 2 期中期目標・中期計画期間の 4 年目）となりました。「法人化」の後に、生理学研究所はいくつかの組織改編を行いながら、「人体基礎生理学の研究と研究者育成のための大学共同利用機関」としての役割を果たしてまいりました。2013 年には自然科学研究機構の研究大学強化促進事業の開始に伴ない、生理学研究所にも研究力強化戦略室が設けられました。研究面では、2011 年度からは 5 年間の「ヒトとモデル動物の統合的研究による社会性の脳神経基盤の解明」プロジェクトが特別経費として予算措置されています。2013 年度におきましても、コミュニティ研究者の皆様のご協力と、所員一同の努力によって、多数（152 件；法人化以前の約 2 倍）の共同研究・共同利用実験を行いつつ大きな成果をあげることができたものと自負しています。今後とも研究レベルの向上と大学共同利用機関としての更なる機能強化に努力していく所存であり、関係者の皆様のご評価・ご判定を仰ぐ次第であります。

生理学研究所の第 1 の使命は、人のからだと脳の働き、そしてそれらの仕組みについて、世界トップレベルの研究を進めることです。幸い、生理学研究所は、生理科学・脳神経科学の分野で高い評価（例えば、2008-2012 年 ISI 論文引用度指数：神経科学分野第 1 位、総合分野第 4 位）を受ける研究を展開することができました。第 2 の使命は、このような世界トップレベルの研究を基礎にして、全国の研究者コミュニティの方々との共同利用実験・共同研究を進めるということです。2013 年度は、「一般共同研究」34 件、「計画共同研究」53 件、超高压電子顕微鏡、機能的磁気共鳴画像装置（fMRI）、脳磁計（MEG）を供しての「共同利用実験」43 件、「研究会」20 件、「国際シンポジウム」1 件、「国際研究集会」2 件の事業を進め、国内外から多数の研究者の方々にご参加いただくことができました。また自動切削装置内蔵型走査型電子顕微鏡（3D-SEM）の本格的な共同利用や遺伝子導入用ウイルスベクターの供給を開始し、研究者コミュニティの要望に応える共同利用・共同研究を実施いたしました。本研究所の第 3 の使命は、若手研究者を育成することにあります。総合研究大学院大学（総研大）の基盤機関として大学院生の指導にあたりと共に、全国からの多数の大学院生を受託する形で指導もしています。更には、生理科学実験技術トレーニングコースを開催し、全国から 100 名以上の若手研究者・院生・学生を受け入れて教育すると共に、「多次元共同脳科学推進センター」を中心として、分野をまたぐ若手脳科学研究者の育成のための異分野連携的脳科学に関する多次元トレーニング&レクチャーを開催しました。加えて、「せいらけんニュース」隔月発刊や「せいらけん市民講座」4 回開催や出前授業やその他講演会 34 回の開催など、未来の研究者を育成するための多種の情報発信活動も研究力強化戦略室が中心となって行っておりましました。

所員一同「生体を対象に分子、細胞、器官、個体レベルの研究を推進し、究極において人体の機能を総合的に解明することを目指す」という創設来の基本姿勢を堅持しながら、主として脳の働きと生体恒常性の仕組みについての世界トップレベルの研究を推進し続けることができるよう、引き続き努力を重ねてまいりたいと考えております。皆様方のご支援・ご鞭撻を心よりお願い申し上げます。

2014（平成 26）年 9 月 4 日

生理学研究所 所長 井本敬二

生理学研究所年報

〔 目 次 〕

職 員（2013 年度）	i
研究活動報告	
分子生理研究系	11
細胞器官研究系	18
生体情報研究系	23
統合生理研究系	31
大脳皮質機能研究系	41
発達生理学研究系	53
個別研究・特別研究	64
行動・代謝分子解析センター	68
多次元共同脳科学推進センター	72
脳機能計測・支援センター	73
岡崎統合バイオサイエンスセンター	79
動物実験センター	80
技 術 課	82
研究発表	
発 表 論 文	99
学 会 発 表	117
一般共同研究報告	147
計画共同研究報告	171
超高压電子顕微鏡共同利用実験報告	209
生体機能イメージング共同利用実験報告	225
研究会報告	245
国際研究集会	429
各種シンポジウム	
平成 25 年度生理研国際シンポジウム	469
トレーニングコース	
第 24 回生理科学実験技術トレーニングコース	475
セミナー報告	479
大学院特別講義	503

職員（2013 年度）

所 長

井 本 敬 二

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

教 授 久 保 義 弘
 准 教 授 立 山 充 博
 助 教 中 條 浩 一
 生理研研究員 KECELI, Batu

日本学術振興会 山 本 泉
 特別研究員 (2013.4.1～)
 大 学 院 生 北 沢 和 寛
 " 条 慎一郎
 技術支援員 内 藤 知津江

分子神経生理研究部門

教 授 池 中 一 裕
 助 教 清 水 健 史
 特 任 助 教 稲 村 直 子
 NIPS リサーチフェロー 杉 尾 翔 太
 研 究 員 橋 本 弘 和
 " Wilaiwan Wisessmith
 大 学 院 生 鳴 海 麻 衣
 " 江 文

大 学 院 生 長 内 康 幸
 " 菊地原 沙 織
 " 國 澤 和 生
 (2013.4.1～)
 技術支援員 田 口 理 恵
 事務支援員 川 上 綾 子
 " 吉 田 寛 子

細胞器官研究系

生体膜研究部門

教 授 深 田 正 紀
 准 教 授 深 田 優 子
 特 任 助 教 横 井 紀 彦
 NIPS リサーチフェロー 奥 慎一郎
 (～2013.5.31)

大 学 院 生 大 川 都史香
 (～2014.3.31)
 " 関 谷 敦 志
 " 村 上 達 郎
 技術支援員 鈴 木 由 美
 " 渡 邊 聖 愛

神経細胞構築研究部門

客員教授 瀬 藤 光 利

細胞生理研究部門

教 授 富 永 真 琴
 特任教授(併任) 小 泉 周
 (2013.10.1～)
 准 教 授 小 泉 周
 (～2013.9.30)
 特任准教授 岡 田 俊 昭
 助 教 鈴 木 喜 郎
 " 内 田 邦 敏
 特 任 助 教 齋 藤 茂
 " 加 塩 麻紀子
 (2013.8.1～)
 NIPS リサーチフェロー 加 塩 麻紀子
 (～2013.5.31)

NIPS リサーチフェロー 沼田(佐藤)かおり
 " 高 山 靖 規
 (2014.3.1～)
 生理研研究員 高 山 靖 規
 (2013.4.1～2014.2.28)
 研 究 員 周 一 鳴
 " 平 沢 統
 (～2013.10.31)
 特任研究員 平 沢 統
 (2013.11.1～)
 " 加 塩 麻紀子
 (2013.6.1～2013.7.31)
 日 本 学 術 振 興 会 Derouiche Sandra
 外国人特別研究員 (2013.11.1～)

日本学術振興会 Md. Rafiqul Islam
外国人特別研究員 (2013.11.29～)

大 学 院 生 田 淵 紗和子
" 新 宅 健 司
" 橋 高 裕 貴
(～2014.3.31)
" 孫 武 平
" Gupta Rupali

大 学 院 生 西 本 れ い
" Kurganov Erkin
特別共同利用研究員 渡 邊 成 樹
技術支援員 齋 藤 くれあ
" 重 本 久 実
" 安 井 尚 美
事務支援員 伊 藤 嘉 美
" 岡 安 友 美

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

教 授 小 松 英 彦
助 教 郷 田 直 一
" 横 井 功
特任助教 眞 田 尚 久
(2013.4.1～)

研 究 員 橋 篤 導
(～2013.7.31)
" 安 川 涼 子
(～2013.12.31)
" 西 尾 亜希子

研 究 員 岡 澤 剛 起
(2013.4.1～)

大 学 院 生 波 間 智 行
技術支援員 太 田 知 宏
" 庭 木 由 紀
" 小 林 久美子
(～2013.9.30)
" 澤 栄 恵
(2013.10.1～)

神経シグナル研究部門

准 教 授 古 江 秀 昌
助 教 佐 竹 伸一郎
" 山 肩 葉 子
特任助教 歌 大 介
(～2014.3.31)

研 究 員 池 田 あずさ
(2013.8.1～)

日本学術振興会 秋 元 望
特別研究員 (2013.6.1～)

大 学 院 生 箱 崎 敦 志
特別共同利用研究員 古 賀 啓 祐
(2013.4.1～2014.3.31)

共同研究員 上 田 勇 輝
(～2013.5.31)
" 大 森 優
(～2013.11.30)

技術支援員 田 中 美 穂
" 中 村 亜由美

神経分化研究部門

教 授 吉 村 由美子
助 教 森 琢 磨
(～2014.3.15)

特任助教 森 琢 磨
(2014.3.16～)

" 宮 下 俊 雄
研 究 員 山 浦 洋
(2013.8.1～)

日本学術振興会 石 川 理 子
特別研究員
" 西 尾 奈 々
技術支援員 安 藤 恵 利
(～2013.7.17)
" 石 神 久美子
(2013.10.1～)

事務支援員 比 賀 昌 子

心循環シグナル研究部門

教 授 西 田 基 宏
(2013.8.1～)

特 任 助 教 西 村 明 幸
(2014.2.1～)

特別訪問研究員 外 山 喬 士
(2013.8.1～)

大 学 院 生 武 吉 恭 子
(2013.10.1～)

特別共同利用研究員 北 島 直 幸
(2013.8.1～)

” Caroline Sunggip
(2013.8.1～)

技術支援員 藤 森 仁 美
(2013.11.16～)

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

教 授 柿 木 隆 介

准 教 授 乾 幸 二

特任准教授 岡 本 秀 彦

助 教 三 木 研 作

特 任 助 教 望 月 秀 紀
(～2013.11.17)

” 鶴 原 亜 紀
(～2014.3.31)

” 坂 本 貴和子
(～2014.1.31)

” (併任) 坂 本 貴和子
(2014.2.1～)

NIPS リサーチフェロー 中 川 慧
研 究 員 本 多 結城子
(～2014.3.31)

日本学術振興会 小 林 恵
特 別 研 究 員 (2013.4.1～)
日本学術振興会 KECELI, Sumru
外国人特別研究員 (2013.10.1～)

事務支援員 加 藤 三津子

” 廣 岡 裕 子

” 中 村 和 子
(～2014.3.31)

生体システム研究部門

教 授 南 部 篤

助 教 畑 中 伸 彦

” 橘 吉 寿

” 知 見 聡 美

特 任 助 教 佐 野 裕 美

” 瀬 瀬 大 輔

大 学 院 生 金 子 将 也
(～2014.3.31)

大 学 院 生 Dwi Wahyu Indriani

” 竹 内 佐 織

技術支援員 宮 本 香 奈

” 磯 谷 ひとみ

” 松 澤 敬 子
(2013.4.1～)

計算神経科学研究部門

客 員 教 授 合 原 一 幸

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

教授(兼任) 重 本 隆 一
(～2014.3.31)

教授(兼任) 田 渕 克 彦
(～2013.9.30)

准教授(兼任) 松 井 広
(～2014.3.31)

NIPS リサーチフェロー Laxmi Kumar Parajuli
(～2013.9.30)

大学院生・生理研究員 Dwi Wahyu Indriati
(～2014.3.31)

大 学 院 生 Timotheus Budisantoso
(～2013.9.30)

大 学 院 生 Nur Farehan Mohamed Asgar
(～2014.3.31)
" 別 府 薫
(～2014.3.31)

技術支援員 山 田 幸 子
(～2014.3.31)
" 小 鹿 郁 子
(～2014.3.31)

大脳神経回路論研究部門

教 授 川 口 泰 雄
准 教 授 窪 田 芳 之
助 教 大 塚 岳
" 森 島 美絵子
研 究 員 植 田 禎 史
" 牛 丸 弥 香
" 畠 中 由美子
" AHMED, Syed Tanvir
(2013.5.16～)

技術支援員 小 島 滋 美
(～2014.1.31)
" 北 啓 子
" 塩 津 千 尋
" 服 部 宣 子
" 兵 藤 智栄美
(2013.4.1～)
" 成 松 亮 子
(2013.4.1～2014.2.28)
" AHMED, Syed Tanvir
(2013.4.16～2013.5.15)
" 加 藤 幸 奈
(2013.10.1～)

大 学 院 生 WAHAB, Luna
(2013.4.1～)
技術支援員 犬 塚 小百合

心理生理学研究部門

教 授 定 藤 規 弘
客 員 教 授 Jorge F. Bosch Bayard
(2013.9.1～2013.12.31)
客員准教授 廣 谷 昌 子
(2013.8.1～2013.12.31)
助 教 北 田 亮
特 任 助 教 原 田 宗 子
" 小 池 耕 彦
研 究 員 岡 崎 俊太郎
" 牧 田 快
" 島 田 浩 二
日本学術振興会
特別研究員 東島(宍戸)恵美子
" 菅 原 翔
大 学 院 生 高 橋 陽 香
" 橋 口 真 帆

大 学 院 生 濱 野 友 希
" 青 木 直 哉
" 小 山 総市朗
" 角 谷 基 文
" 山 崎 英 明
特別共同利用研究員 石 井 徹
" 中 川 恵 理
(～2013.8.31)
" Rajaei, Nader
" 川 口 彰 子
特定技術職員 木 村 玲 子
技術支援員 竹 中 邦 子
" 岩 瀬 恵
" 伊 藤 竜 樹
" 大河内 真須美

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
准 教 授 西 村 幸 男
助 教 吉 田 正 俊
特 任 助 教 小 川 正 晃
NIPS リサーチフェロー 笹 田 周 作

研 究 員 渡 辺 秀 典
" 加 藤 利佳子
" 笠 井 昌 俊
日本学術振興会
外国人特別研究員 Richard Veale
(2013.9.12～2014.1.11)

大 学 院 生 加 藤 健 治
 " 高 桑 徳 宏
 " 鈴 木 迪 諒
 " 西 原 陽 子
 特別共同利用研究員 澤 田 真 寛
 " 當 山 峰 道
 技術支援員 高 橋 伸 明
 " 伊 佐 かおる

技術支援員 柴 田 あゆみ
 " 山 西 ユ ミ
 " 清 水 琴 未
 (～2014.1.15)
 " 高 田 和 子
 " 嶋 田 ゆ う

生体恒常機能発達機構研究部門

教 授 鍋 倉 淳 一
 特任助教 稲 田 浩 之
 NIPSリサーチフェロー 石 川 達 也
 (2013.10.1～)
 日本学術振興会 中 畑 義 久
 特別研究員 (2013.10.1～)
 大 学 院 生 中 畑 義 久
 (～2013.9.30)
 " 宮 本 愛 喜 子
 (～2014.3.31)
 " 石 川 達 也
 (～2013.9.30)

大 学 院 生 中 村 佳 代
 " 穠 吉 亮 平
 " 川 本 恭 兵
 (～2014.3.31)
 特別共同利用研究員 Tamara Stevenson
 (2013.11.1～)
 技術支援員 大 場 多 津 子
 " 市 橋 結 貴
 " 蜂 須 賀 由 香 里
 事務支援員 齋 藤 永 子
 " 小 林 文 絵
 (2013.12.1～)

生殖・内分泌系発達機構研究部門

教 授 箕 越 靖 彦
 助 教 岡 本 士 毅
 特任助教 佐 藤 寛 之
 (～2013.4.30)
 NIPSリサーチフェロー 唐 麗 君
 研 究 員 横 田 繁 史
 大 学 院 生 上 條 真 弘
 (～2014.3.31)

大 学 院 生 高 木 一 代
 " Eulalia Coutinho
 " 佐 藤 達 也
 " Nur Farehan Mohamed Asgar
 (2014.1.1～)
 技術支援員 林 めぐみ
 (2013.4.1～)

環境適応機能発達研究部門

客員教授 矢 田 俊 彦

個別研究・特別研究

個別研究（村上グループ）

准 教 授 村 上 政 隆
 大 学 院 生 魏 飛

特別協力研究員 古 家 園 子
 (2013.4.1～)

個別研究（大橋グループ）

助 教 大 橋 正 人

個別研究（毛利グループ）

助 教 毛 利 達 磨

個別研究（樫原グループ）

助 教 樫 原 康 博

技術支援員 野 村 智 美

特別研究（永山グループ）

特 任 教 授 永 山 國 昭

事務支援員 鈴 木 小百合

行動・代謝分子解析センター

センター長 (併任) 池 中 一 裕

遺伝子改変動物作製室

准 教 授 平 林 真 澄

特 任 助 教 足 澤 悦 子

特別共同利用研究員 後 藤 哲 平
(～2014.3.31)

特別共同利用研究員、
日本学術振興会特別研究員 原 弘 真
(2014.2.1～)

特任専門員 垣 見 千 尋
(2013.4.1～2014.3.31)

技術支援員 山 内 恵 子

代謝生理解析室

教授 (併任) 箕 越 靖 彦

助教 (併任) 鈴 木 喜 郎

行動様式解析室

客 員 教 授 宮 川 剛

特任准教授 高 雄 啓 三

特別訪問研究員 林 愛

技術支援員 今 井 篤 子

〃 石 川 美 香

〃 中木原 敦 子

技術支援員 宮 舘 直 人
(2013.6.1～)

特任専門員 木 瀬 環
(～2014.3.31)

事務支援員 高 松 香

多次元共同脳科学推進センター

センター長 (併任) 伊 佐 正
(2013.4.1～)

特 任 教 授 吉 田 明

事務支援員 土 井 優

脳科学新領域開拓研究室

教授 (併任) 池 中 一 裕
(2013.4.1～)

教授 (併任) 山 森 哲 雄

客 員 教 授 小 林 和 人

〃 佐 倉 統

客 員 教 授 高 田 昌 彦

〃 西 田 眞 也

〃 宮 田 卓 樹

〃 望 月 秀 樹

客員准教授 小早川 令 子

脳情報基盤研究開発室

教授 (併任) 伊 佐 正
(2013.4.1～)

〃 (併任) 鍋 倉 淳 一

客 員 教 授 川 人 光 男

〃 銅 谷 賢 治

客 員 教 授 横 井 浩 史

〃 大 木 研 一

〃 森 郁 恵

客員准教授 大 野 伸 彦
(2013.4.1～)

社会的脳表現解析開発室

教授（併任） 定 藤 規 弘
 ”（併任） 小 松 英 彦
 客員教授 酒 井 邦 嘉

客員教授 尾 崎 紀 夫
 ” 友 田 明 美

脳科学研究戦略推進室

特任准教授 丸 山 めぐみ
 （2013.4.1～）
 特任助教 大 塩 り つ
 （2013.4.1～）
 特任研究員 本 木 和 美
 （2013.9.1～）
 特任専門員 嶋 田 弘 子
 （2013.4.1～）

特任専門員 寺 嶋 恵 子
 （2013.4.1～）
 技術支援員 齋 藤 理 恵
 （2013.7.16～）
 事務支援員 柴 田 真 希

流動連携研究室

客員助教 小 平 農
 （～2014.3.31）

客員助教 岡 本 正 博
 （2014.1.1～2014.3.31）

脳機能計測・支援センター

センター長(併任) 久 保 義 弘

形態情報解析室

准教授 村 田 和 義
 研究員 宮 崎 直 幸
 技術支援員 永 吉 美代子

技術支援員 河 口 好 江
 ” 加 藤 勝 己

生体機能情報解析室

教授（併任） 定 藤 規 弘
 准教授 達 本 徹
 （～2014.3.31）

技術支援員 山 本 忍
 （～2014.3.31）

多光子顕微鏡室

教授（併任） 鍋 倉 淳 一
 准教授 村 越 秀 治

博士研究員 柴 田 明 裕

電子顕微鏡室

准教授(併任) 村 田 和 義

准教授(併任) 窪 田 芳 之

ウイルスベクター開発室

教授（併任） 伊 佐 正
 ”（併任） 南 部 篤

准教授 小 林 憲 太
 技術支援員 影 山 梨 衣

霊長類モデル動物室

教授（併任） 伊 佐 正
 研究員 山 根 到

事務支援員 岡 本 友 紀

情報処理・発信センター

センター長(併任) 柿 木 隆 介

点検連携資料室

教授(併任) 伊 佐 正

准教授(併任) 村 上 政 隆

医学生理学教育開発室(客員研究部門)

客員教授 洪 谷 まさと

安全衛生管理室

教授(併任) 定 藤 規 弘

研究力強化戦略室(広報展開推進室 ~2013.10.31)

室長(併任) 鍋 倉 淳 一

教授(併任) 柿 木 隆 介

准教授 小 泉 周
(~2013.9.30)

特任助教 坂 本 貴和子
(2014.2.1~)

事務支援員 大和田 みゆき
(~2014.3.31)

〃 内 山 千保美

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 バイオセンシング研究領域
(細胞生理研究部門 併任)

生命時空間設計研究領域

(心循環シグナル研究部門 併任)

神経分化研究室

准教授 東 島 眞 一

研 究 員 木 村 有希子

〃 佐 藤 千 恵

技術支援員 鈴 木 幸 子

技術支援員 伊 木 志成子

〃 伊 藤 浩 子

〃 寺 澤 洋 子

生命動秩序形成研究領域

(ナノ形態生理研究部門 併任)

准教授(併任) 村 田 和 義

動物実験センター

センター長(併任) 箕 越 靖 彦

准教授(併任) 木 村 透

技術支援員 水 野 みどり

〃 松 永 ゆう子

〃 古 山 真基子

〃 不 退 久 恵

〃 鈴 木 敏 文

〃 山 中 緑

技術支援員 柴 田 紀 子
(~2014.3.31)

〃 都 築 正 夫
(~2014.1.31)

事務支援員 坂 本 愛
(~2013.9.30)

〃 橋 谷 久 美
(2013.10.1~)

〃 浦 川 裕 乃

動物実験コーディネータ室	特 任 教 授 佐 藤 浩	事務支援員 鈴 木 邦 子
技術課	課 長 大河原 浩	
研究系技術班	班 長 市 川 修	
	分子生理研究系技術係	
	係 長 佐 治 俊 幸	係 員 加 納 雄一朗 (2013.9.1～)
	係 員 山 本 友 美	
	〃 小 池 崇 子 (～2013.6.23)	
	細胞器官研究系技術係	
	係 長 山 口 登	係 員 高 橋 直 樹
	主 任 福 田 直 美	
	生体情報研究系技術係	
	係 員 森 将 浩	係 員 石 原 博 美
	〃 高 木 正 浩	
	統合生理研究系技術係	
	主 任 竹 島 康 行	主 任 佐 藤 茂 基
	大脳皮質機能研究系技術係	
	係 長 伊 藤 嘉 邦	係 員 神 谷 絵 美
	発達生理学研究系技術係	
	係 長 戸 川 森 雄	主 任 吉 友 美 樹
	主 任 齊 藤 久美子	
研究施設技術班	課長補佐(班長) 小 原 正 裕	
	脳機能計測・支援技術係	
	係 長 前 橋 寛	係 員 山 田 元
	情報処理・発信技術係	
	係 長 永 田 治	係 員 村 田 安 永
	主 任 吉 村 伸 明	
	動物実験技術係	
	係 長 伊 藤 昭 光	係 員 窪 田 美津子
	主 任 廣 江 猛	
	行動・代謝分子解析技術係	
	係 長 (未選考)	係 員 三 寶 誠

多次元共同脳科学推進技術係

係長(併任) (未選考)

特任専門員 木 瀬 環
(~2014.3.31)

技術支援員 加 藤 勝 己

〃 犬 塚 小百合

〃 岩 瀬 恵

〃 水 野 みどり

〃 高 田 和 子

〃 澤 栄 恵
(2013.10.1~)

〃 大 西 皆 子

〃 田 中 美 穂

〃 大 場 多津子

〃 宮 本 香 奈

〃 石 神 久美子
(2013.10.1~)

〃 不 退 久 恵

〃 松 永 ゆう子

〃 林 めぐみ

〃 鈴 木 由 美

〃 内 藤 千津江

〃 古 山 真基子

〃 鈴 木 敏 文

〃 塩 津 千 尋
(~2013.8.31)

〃 田 口 理 恵

〃 山 本 忍

〃 永 吉 美代子

〃 小 林 久美子
(~2013.9.30)

〃 柴 田 紀 子
(~2014.3.31)

〃 都 築 正 夫
(~2014.1.31)

技術支援員 比 賀 昌 子
(~2013.4.30)

〃 磯 谷 ひとみ

〃 山 中 緑

〃 齋 藤 くれあ
(2013.4.1~)

〃 新 関 奈央子
(2013.4.1~)

〃 安 藤 恵 利
(2013.5.1~2013.7.17)

〃 KECELI, Sumru
(2013.5.23~2013.9.30)

〃 藤 森 仁 美
(2013.11.16~)

事務支援員 浅 井 明 代

〃 坂 本 愛

〃 柴 田 利 江

〃 小 澤 祐 子

〃 芝 村 賞 子

〃 長 尾 法 子

〃 大和田 みゆき
(~2014.3.31)

〃 浦 川 裕 乃

〃 高 松 香

〃 内 山 千保美

〃 佐 藤 明 子

〃 安 井 亜 紀

〃 後 藤 美 穂

〃 加 藤 幸 奈
(2013.4.1~2013.9.30)

〃 橋 谷 久 美
(2013.10.1~)

〃 小 林 文 絵
(2013.12.1~)

【 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	
オーファン代謝型受容体 Prrt3 の機能解明に向けた、遺伝子改変マウスの作製 (山本友美, 山本 泉, 久保義弘, 周 麗, 夏目里恵, 崎村建司, 三宝 誠, 平林真澄)	
オーファン代謝型受容体 Prrt3 の機能解明に向けた、脳内発現パターンの解析 (山本友美, 山本 泉, 久保義弘, 今野幸太郎, 渡辺雅彦)	
オーファン代謝型受容体 Prrt3 結合蛋白同定と切断酵素同定に向けた研究 (山本 泉, 山本友美, 久保義弘, 横井紀彦, 深田優子, 深田正紀, 中尾和貴, 清成 寛, 今野幸太郎, 渡辺雅彦)	
Gi/o 蛋白質のアデノシン受容体活性化構造安定化作用の解析 (立山充博, 久保義弘)	
受容体—GIRK チャネル間距離と GIRK 活性化効率の相関についての研究 (立山充博, 久保義弘)	
KCNQ1 チャネルが KCNE1 存在下で開きにくくなるメカニズム (中條浩一, 久保義弘)	
全反射赤外分光法によるカリウムチャネル機能の解析 (中條浩一, 久保義弘, 塚本寿夫, 古谷祐詞)	
ATP 受容体チャネル P2X2 の膜電位と ATP に依存する構造変化の Cys 修飾速度測定による解析 (Batu Keceli, 久保義弘)	
相対的なサブユニット発現量に依存した Kv4.2/KChIP4 複合体のストイキオメトリーと性質の変化 (北沢和寛, 中條浩一, 久保義弘)	
hERG チャネルの S4-S5 リンカー-C リンカー間の相互作用による脱活性化の制御 (糸慎一郎, 中條浩一, 久保義弘)	
分子神経生理研究部門	15
概 要	
オリゴデンドロサイトの機能と病態 (清水健史, 長内康幸, 國澤和生, Wilaiwan Wisessmith, 李 佳益, 池中一裕)	
アストロサイトの機能と病態 (稲村直子, 杉尾翔太, 菊地原沙織, 池中一裕)	
脊髄神経発生における硫酸化プロテオグリカンの役割 (石野雄吾, 橋本弘和, 江 文, 池中一裕)	
N結合型糖鎖の構造決定と機能解析 (吉村 武, 鳴海麻衣, 小池崇子, 伊藤磯子, 加納雄一郎, 池中一裕)	
ナノ形態生理研究部門	17
概 要	

細胞器官研究系

生体膜研究部門	18
概 要	
PSD-95 パルミトイル化酵素によるシナプス機能制御 (深田優子, 深田正紀)	
新規パルミトイル化基質 Neurochondrin の同定と性状解析 (奥慎一郎, 深田優子, 深田正紀)	
脱パルミトイル化酵素の同定と性状解析 (関谷敦志, 村上達郎, 深田優子, 深田正紀)	

てんかん関連リガンド LGI1 の作用機構の解析 (横井紀彦, 大川都史香, 深田正紀, 深田優子)	
自己免疫性辺縁系脳炎における抗 LGI1 抗体の作用機構の解明 (大川都史香, 深田優子, 横井紀彦, 渡邊 修, 深田正紀)	
神経細胞構築研究部門	20
概 要	
神経変性疾患モデル脳の質量顕微鏡解析 (杉浦悠毅, 早坂孝宏, 梁 賢正, 瀬藤光利)	
細胞生理研究部門	20
概 要	
細胞外温度依存性の TRPM8 活性化温度閾値変化の解析 (藤田郁尚, 高石雅之, 内田邦敏, 富永真琴)	
TRPA1 スプライスバリエントによる機能制御機構の解析 (周 一鳴, 鈴木喜郎, 内田邦敏, 富永真琴)	
亜鉛イオンによる TRPM5 の機能抑制機構の解析 (内田邦敏, 富永真琴)	
トカゲ TRPA1 チャネルの熱による直接の活性化機構の解析 (Erkin Kurganov, 周 一鳴, 齋藤 茂, 富永真琴)	
ニワトリ TRPA1 チャネルの遺伝子クローニングと機能解析 (齋藤 茂, 福田直美, 太田利男, 富永真琴)	

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門	23
概 要	
下側頭葉皮質における光沢選択性ニューロンの性質 (西尾亜希子, 郷田直一, 下川文明, 小松英彦)	
二種類の色空間におけるサル V4 ニューロンの色選択性の比較 (眞田尚久, 波間智行, 小松英彦)	
素材識別に関わるサル視覚領野: fMRI 研究 (郷田直一, 横井 功, 橘 篤導, 岡澤剛起, 小松英彦)	
マカクサル V 4 ニューロンの自然テクスチャ選択性を説明する画像統計量 (岡澤剛起, 田嶋達裕, 小松英彦)	
素材カテゴリー知覚における下側頭葉皮質ニューロンの役割 (横井 功, 小松英彦)	
神経シグナル研究部門	25
概 要	
内因性の痛覚抑制機構とそれを利用した鎮痛法の開発 (古江秀昌, 井本敬二)	
G _{i/o} 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制における多様性 (佐竹伸一郎, 井本敬二)	
けいれん活動時における ERK1/2-MAP キナーゼの活性化と基質蛋白質のリン酸化 (山肩葉子, Angus C. Nairn, 小幡邦彦, 井本敬二)	
脊髄における痒み情報の伝達と調節機構の解明 (歌 大介, 井本敬二, 古江秀昌)	
脊髄後角シナプス伝達に対するケモカインの作用と疼痛発現機構 (秋元 望, 古江秀昌, 井本敬二)	
神経分化研究部門	27
概 要	
大脳皮質における細胞系譜依存的な神経細胞間結合の分子メカニズム (足澤悦子, 吉村由美子, 平林真澄, 三宝 誠, 八木 健)	
2 光子励起顕微鏡を用いた, 大脳皮質神経回路の形成メカニズム (宮下俊雄, 足澤悦子, 西尾奈々, 吉村由美子, 平林真澄, 三宝 誠, 八木 健)	

一次視覚野ニューロンにおける活動同期性の経験依存的発達 (石川理子, 吉村由美子)	
一次視覚野ニューロンにおける空間周波数選択性の経験依存的発達 (西尾奈々, 石川理子, 吉村由美子)	
心循環シグナル研究部門	29
概 要	
心血管リモデリングにおける機械感受性 TRPC チャネルの役割解析 (西田基宏, 北島直幸)	
P2Y ₆ 受容体による心筋細胞-細胞外基質間相互作用の生理的意義の解明 (西田基宏, Caroline Sunggip, 西村明幸)	
硫黄循環・代謝による心血管恒常性維持機構の解析 (西田基宏, 外山喬士, 西村明幸)	

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門	31
概 要	
ウィリアムズ症候群における顔倒立効果の神経生理学的検討 (中村みほ, 渡辺昌子, 稲垣真澄, 平井真洋, 三木研作, 本多結城子, 柿木隆介)	
随意運動抑制過程における周波数特性 (中田大貴, 坂本貴和子, 大塚明香, 湯本真人, 柿木隆介)	
ニコチンの体性感覚変化関連脳活動に対する効果 (小平 農, 和坂俊昭, 元村英史, 谷井久志, 乾 幸二, 柿木隆介)	
光点歩行運動(バイオロジカルモーション)知覚処理に関する発達変化: 2年間の追跡研究 (平井真洋, 渡辺昌子, 本多結城子, 柿木隆介)	
視覚刺激誘発脳磁場に対する空間周波数の影響の検討 (鶴原亜紀, 永田裕子, 鈴木雅也, 乾 幸二, 柿木隆介)	
痒みや痛みを想像したときの脳活動パターン (望月秀紀, Baumgartner U, Kampingc Sandra, Ruttorfd Michaela, Schadd Lothar R, Florc Herta, 柿木隆介, Treedea Rolf-Detlef)	
日本のプロ野球における相対的年齢効果: 歴史的解析 (中田大貴, 坂本貴和子)	
子どもの野球パフォーマンスに関係する体力要素 (中田大貴, 永見智行, 樋口貴俊, 坂本貴和子, 彼末一之)	
聴覚変化関連脳活動のプレパルス抑制に対するニコチンの効果 (小平 農, 鶴原亜紀, 元村英史, 谷井久志, 乾 幸二, 柿木隆介)	
自己ペース運動時の運動野活動再考 (鈴木正隆, 和坂俊昭, 乾 幸二, 柿木隆介)	
注意制御を司る脳内ネットワークの機能的特性の課題関連的变化 (木田哲夫, 柿木隆介)	
聴覚 P50 成分のプレパルス抑制 (乾 幸二, 鶴原亜紀, 中川 慧, 西原真理, 小平 農, 元村英史, 柿木隆介)	
静寂下及び雑音下において時間規則性が聴覚誘発脳磁場反応に与える影響 (岡本秀彦, Teismann Henning, Keceli Sumru, Pantev Christo, 柿木隆介)	
周波数コントラストがヒト聴覚野における側方抑制に与える影響 (Stein, Alwina, Engell Alva, 岡本秀彦, Andreas Wollbrink, Pia Lau, Robert Wunderlich, Claudia Rudack, Christo Pantev)	
生体システム研究部門	36
概 要	
運動課題遂行中のマカクサル赤核小細胞部ニューロンの活動様式 (畑中伸彦, 金子将也, 南部 篤)	
大脳基底核出力核における上肢運動課題遂行中の活動調節 (金子将也, 畑中伸彦, 南部 篤)	
我慢をする脳内メカニズム —視床下核の新たな機能を探る— (橘 吉寿, 南部 篤)	

小脳入力と大脳基底核入力の視床—大脳皮質投射への作用 (知見聡美, 川口泰雄, 木村 實, 南部 篤)	
大脳皮質—線条体経路の選択的な興奮誘導 (佐野裕美, 小林憲太, 加藤成樹, 知見聡美, 小林和人, 南部 篤)	
線条体投射ニューロンの選択的な興奮誘導 (佐野裕美, 知見聡美, 尾崎充宣, 田中謙二, 南部 篤)	
ジストニンノックアウトマウスにおける筋収縮 (佐野裕美, 堀江正男, 知見聡美, 竹林浩秀, 南部 篤)	
ハンチントン病モデルマウスを利用した病態生理学的解析 (Dwi Wahyu Indriani, Ratchanee Rodsiri, 佐野裕美, 南部 篤)	
運動—体性感覚皮質と大脳基底核の神経ネットワークの解明 (額綱大輔, 畑中伸彦, 南部 篤)	
計算神経科学研究部門	40
概 要	
短期的シナプス可塑性と新しい神経ダイナミクスの描像 (香取勇一, 合原一幸)	

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門	41
概 要	
電位依存性カルシウムチャネル配置の変化と機能 (Dwi Wahyu Indriati, 原田春美, 重本隆一)	
R 型電位依存性カルシウムチャネルの神経細胞膜上分布と役割 (Laxmi Kumar Parajuli, Pradeep Bahndari, 重本隆一)	
海馬における入力側依存性左右非対称性 (Matthew Julian Case, 重本隆一)	
シナプス接着因子 Neuroligin/Neurexin を標的とした自閉症モデル動物の評価・確立 (Wen-Hsin Chang, Nur Farehan Mohamed Asgar, 田淵克彦)	
グリア細胞刺激による神経活動および神経細胞死の制御 (別府 薫, 重本隆一, 松井 広)	
大脳神経回路論研究部門	43
概 要	
大脳皮質錐体細胞の抑制性シナプスの動態解析と微細構造 (窪田芳之, 塩津千尋, 北 啓子, Katie L Villa, Elly Nedivi)	
光刺激によって誘発される皮質細胞の膜電位振動 (大塚 岳, 川口泰雄)	
前頭皮質 5 層錐体細胞と抑制性細胞のシナプス結合特性 (森島美絵子, 川口泰雄)	
初期軸索形成による大脳皮質興奮性細胞の分類 (畠中由美子, 服部宣子, 川口泰雄)	
皮質領域間結合からみた錐体細胞の多様性 (植田禎史, 平井康治, 大塚 岳, 川口泰雄)	
前頭皮質第 5 層ニューロンの in vivo での発火様式 (牛丸弥香, 川口泰雄)	
前頭皮質局所回路特性を取り入れた強化学習の閉回路モデルとドーパミン作用仮説 (森田賢治, 森島美絵子, 川口泰雄)	
心理生理学研究部門	46
概 要	
視覚脱失が線条体外身体領域の形成に与える影響 (北田 亮, 吉原一文, 佐々木章宏, 橋口真帆, 河内山隆紀, 定藤規弘)	
柔かさと心地よさの関係性に関する心理物理学的研究 (北田 亮, 定藤規弘)	

- 幸福及び悲しみの顔表情による情動伝染の神経基盤
(原田宗子, 林亜希子, 定藤規弘, 飯高哲也)
- 注意の共有にともなう脳活動同期の発生に関連する脳領域の検討
(小池耕彦, 阿部沙織, Jorge F. Bosch-Bayard, 定藤規弘)
- 均衡する視覚運動制御の再帰的連環が二人の体動を同期させる
(岡崎俊太郎, 小池耕彦, 廣谷昌子, Jorge F. Bosch-Bayard, 高橋陽香, 橋口真帆, 定藤規弘)
- 書字単語の意味処理に第一言語, 第二言語の言語間の差異が与える影響～fMRIを用いた検討～
(牧田 快, 大石晴美, 木下 徹, 島田浩二, 中川恵理, 定藤規弘)
- 外国語学習に伴う脳機能変化の縦断的検討
(島田浩二, 廣谷昌子, Janna Fox, 中川恵理, 岡崎俊太郎, 濱野友希, 牧田 快, 定藤規弘)
- 描画時における視線先行と書字習熟度の関係
(穴戸恵美子, 福村直博, 岡崎俊太郎, 定藤規弘)
- 系列運動技能の睡眠依存的改善と線条体活動の関連性
(菅原 翔, 小池耕彦, 川道拓東, 牧田 快, 濱野友希, 高橋陽香, 中川恵理, 山崎英明, 定藤規弘)
- 涙の神経基盤：機能的 MRI 研究
(高橋陽香, 北田 亮, 佐々木章宏, 川道拓東, 定藤規弘)
- 聴覚刺激を用いた時間弁別課題に関連した神経活動
(橋口真帆, 原田宗子, 小池耕彦, 岡崎俊太郎, 定藤規弘)
- 手指の順序運動学習の神経基盤 機能的 MRI を用いた研究
(濱野友希, 菅原 翔, 青木直哉, 山崎英明, 定藤規弘)
- 一次運動野に対する経頭蓋直流電気刺激は運動技能の定着を促進する
(小山総市朗, 田中悟志, 田辺茂雄, 定藤規弘)
- 聞き手の肯定的反応が話し手に与える影響の神経基盤
(角谷基文, 小池耕彦, 岡崎俊太郎, 定藤規弘)
- 日本人英語学習者の L2 文産出時における母語転移：fMRI 実験による検討
(中川恵理, 横川博一, 小池耕彦, 牧田 快, 島田浩二, 定藤規弘)
- ベルベット錯触の神経基盤
(Nader Rajaei, 北田 亮, 青木直哉, 高橋陽香, 宮岡 徹, 大岡昌博, 定藤規弘)
- 社交不安障害患者における自己意識関連情動の神経基盤：機能的 MRI による解析
(川口彰子, 守田知代, 橋口真帆, 定藤規弘)

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門 53

概 要

- 眼球運動計測とサリエンシー計算論モデルを組み合わせたマカクザル認知行動異常のハイスループット検出法の開発
(吉田正俊, 伊佐 正)
- 刺激－報酬間連合学習における前頭前野神経回路の役割の解明
(小川正晃, 伊佐 正)
- サルを用いた脳情報の解読による中枢疾患創薬
(渡辺秀典, 西村幸男, 小松秀俊, 近藤祐介)
- 意識に上らない視覚刺激による行動価値の重み付け：「盲視」モデルサルにおける強化学習
(加藤利佳子, 高桑徳宏, 伊佐 正, Abdelhafid Zeghib, Peter Redgrave)
- In vivo* 2 光子イメージングによる上丘内側抑制機構の解明
(笠井昌俊, 伊佐 正)
- 神経活動に依存した刺激による四肢の随意運動制御
(笹田周作, 加藤健治, ステファン J グロイス, 門脇 傑, 宇川義一, 小宮山伴与志, 吉田 晋, 村山尊司, 飯塚正之, 西村幸男)
- サル頸髄硬膜下電気刺激による誘発運動の体部位局在性
(加藤健治, 西村幸男)
- 皮質盲視野に提示された条件刺激に対する中脳ドーパミンニューロンの応答
(高桑徳宏, 加藤利佳子, Peter Redgrave, 伊佐 正)
- 運動機能回復を支えるモチベーションの神経基盤
(澤田真寛, 加藤健治, 伊佐 正, 西村幸男, 尾上浩隆)

サル皮質脊髄路損傷後の手指巧緻性回復における脊髄固有ニューロンの寄与の検証 (當山峰道, 伊佐 正, 木下正治, 松井亮介, 渡邊 大, 加藤茂樹, 小林和人, 里宇明元)	
生体恒常機能発達機構研究部門	57
概 要	
虚血脳障害後回復期における神経回路再編と制御機構の解明 (高鶴裕介, 中村佳代, 鍋倉淳一)	
In Vivo 多光子顕微鏡を用いたミクログリア・アストロサイトによる大脳皮質神経回路再編機構の解析 (和気弘明, 宮本愛喜子, 加藤大輔, 穂吉亮平, 稲田浩之, 鍋倉淳一)	
In Vivo 多光子顕微鏡を用いた慢性疼痛形成期における大脳皮質体性感覚野神経回路再編 (石川達也, 金 善光, 鍋倉淳一)	
細胞内 Cl ⁻ 制御分子 KCC2 の発現制御と生体機能 (Andrew Moorhouse, 渡部美穂, 鍋倉淳一)	
伝達物質のスイッチングのメカニズムと細胞応答 (中畑義久, 石橋 仁, 鍋倉淳一)	
生殖・内分泌系発達機構研究部門	60
概 要	
レプチンによる中枢性血糖調節機構 (戸田知得, 岡本土毅, 箕越靖彦)	
視床下部－交感神経系による脂肪組織マクロファージの調節機構 (唐 麗君, 岡本土毅, 箕越靖彦)	
ストレプトゾトシン誘導性糖尿病における骨格筋 AMPK の調節作用 (横田繁史, 岡本土毅, 箕越靖彦)	
環境適応機能発達研究部門	62
概 要	
視床下部 Nesfatin-1 日内リズムによる摂食概日リズムの調節 (中田正範, Sedbazar U, 前島裕子, 矢田俊彦)	
インスリンの求心性迷走神経活性化と生理的役割 (岩崎有作, 中田正範, 出崎克也, 矢田俊彦)	
 個別研究・特別研究	
個別研究 (村上グループ)	64
概 要	
唾液分泌における傍細胞輸送と細胞内信号による調節 (村上政隆, 魏 飛, 成田貴則, 福島美和子, 橋本貞充, 澁川義幸, 佐藤正樹)	
個別研究 (大橋グループ)	65
概 要	
細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと発生シグナル制御 (大橋正人, 木下典行)	
個別研究 (毛利グループ)	65
概 要	
ウニ卵受精時のミトコンドリア活性化と一酸化窒素 (NO) 遊離との関連 (毛利達磨, 経塚啓一郎)	
個別研究 (檜原グループ)	66
概 要	
ラット運動神経細胞のチャネル発現の支配標的筋依存性 (檜原康博, 野村智美)	
特別研究 (永山グループ)	67
概 要	
電子顕微鏡用位相板の開発と応用 (永山國昭)	

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室	68
概 要	
ラット ES 細胞株の生殖系列への寄与条件に関する後方視的解析 (平林真澄)	
代謝生理解析室	68
概 要	
膀胱上皮細胞における TRP チャネルの役割 (渡邊成樹, 鈴木喜郎, 富永真琴)	
中枢性呼吸調節における TRP チャネルの役割 (平田 豊, 鈴木喜郎, 富永真琴)	
パーキンソン病における視床下核からの興奮性神経伝達 (渡邊 大, 長谷川拓, 西岡忠昭, 知見聡美, 南部 篤)	
エネルギー消費に及ぼす脱共役タンパク質 1 と骨格筋 AMPK の調節作用 (高木一代, 岡本土穀, 箕越靖彦)	
行動様式解析室	70
概 要	
精神疾患の中間表現型「未成熟脳」のメカニズム解明と制御法の探索 (高雄啓三, 宮川 剛)	
マウスを用いた脳表現型データベースの開発と応用 (高雄啓三, 宮川 剛)	

多次元共同脳科学推進センター

概 要

脳機能計測・支援センター

形態情報解析室	73
概 要	
20S プロテアソームにおけるプロテアソーム活性化因子 PbaB の結合様式の解析 (村田和義, 雲井健太郎, 加藤晃一)	
連続ブロック表面走査型電子顕微鏡の構造解析で明らかになった AAA タンパク質 Cdc48p によるミトコンドリアの 形態制御機構 (宮崎直幸, 村田和義, 江崎雅俊, 小椋 光)	
生体機能情報解析室	74
概 要	
大脳皮質フィールド電位における律動波の研究 (遠本 徹)	
多光子顕微鏡室	75
概 要	
シグナル分子活性化検出プローブのフォールディング効率改善法の確立 (柴田明裕, 中畑義久, 鍋倉淳一, 村越秀治)	
シナプス内の細胞骨格分子を制御するシグナル分子の活性イメージング (村越秀治)	
光応答性 CaMKII 阻害分子のシナプス可塑性と個体マウス学習研究への応用 (村越秀治, 安田涼平)	
光応答性 CaMKII 分子の開発とシナプス可塑性研究への応用 (村越秀治)	
二光子蛍光寿命イメージングによる分子間相互作用検出のための高感度蛍光タンパク質の開発 (村越秀治, 鍋倉淳一, 柴田明裕)	

ウイルスベクター開発室	76
-------------------	----

概 要

脳機能解析に有用なウイルスベクターの開発・提供と共同研究の推進
(小林憲太)

特定の神経路あるいは神経領域の機能解析
(小林憲太)

霊長類モデル動物室	77
-----------------	----

概 要

岡崎統合バイオサイエンスセンター

生命時空間設計研究領域	79
-------------------	----

概 要

背側脊髄の発生機構の解析
(佐藤千恵, 東島眞一)

胸びれのリズム運動司る神経回路の解析
(木村有希子, 東島眞一)

動物実験センター	80
----------------	----

概 要

技術課	82
-----------	----

概 要

(大河原浩)

施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置

(竹島康行)

②大脳皮質機能研究系

(1) 磁気共鳴装置

(伊藤嘉邦)

③脳機能計測・支援センター

(1) 形態情報解析室

(小原正裕, 山田 元, 加藤勝己)

(2) 生体機能情報解析室

(佐治俊幸)

(3) 多光子顕微鏡室

(前橋 寛)

(4) 電子顕微鏡室(生理研・基生研共通施設)

(小原正裕, 山田 元)

(5) 機器研究試作室(生理研・基生研共通施設)

(佐治俊幸)

④情報処理・発信センター

(1) ネットワーク管理室

(吉村伸明, 村田安永)

⑤岡崎共通研究施設

(1) 動物実験センター

(伊藤昭光, 廣江 猛, 窪田美津子)

分子生理研究系

神経機能素子研究部門

【概要】

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

今年度、これまでに引き続き、神経機能素子の遺伝子の単離、変異体やキメラ分子の作成、タンデムリピートコンストラクトの高効率作成、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Ca²⁺イメージング・全反射照明下でのFRET計測・一分子イメージング・膜電位固定下蛍光変化測定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、生理研内外の研究室との共同研究により、遺伝子改変マウスの作製と行動解析、免疫組織化学的解析、質量分析による結合タンパク質の同定、マイクロアレイ解析による遺伝子破壊の影響の解析、赤外分光による膜タンパク質の構造変化の解析等も進めている。以下に、今年度行った研究課題とその内容の要約を記す。

オーファン代謝型受容体 Prrt3 の機能解明に向けた、遺伝子改変マウスの作製

山本友美, 山本 泉, 久保義弘

周 麗, 夏目里恵, 崎村建司(新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野)

三宝 誠, 平林真澄(生理学研究所, 遺伝子改変動物作製室)

我々は、代謝型グルタミン酸受容体やGABA_B受容体と同じく、大きなN末細胞外領域と7回膜貫通部位を持つ、Family Cに属するオーファン代謝型受容体(Prrt3)の機能の解析に取り組んでいる。機能に関する手がかりを得るために、これまでに、Prrt3遺伝子破壊(KO)マウスを作製した。KOホモマウスは、1週間以内に高率に死亡したため、KOヘテロマウスを用いて網羅的行動解析を行い、空間記憶、恐怖条件付け記憶の長期保持が低下していることを明らかにした。昨年度、KOホモマウスを用いた網羅的行動解析を行うことを目的として、条件的KOマウスの作成を開始した。Floxマウスが得られたため、今年度、neo遺伝子を脱落させるための交配をまず行い、さらに、Emx1-Creマウスと交配させてPrrt3遺伝

子を脱落させたヘテロマウスを作製した。今後、大脳特異的KOホモと、対照としての同腹のfloxホモマウスを充分数揃え、網羅的行動解析を実施する計画である。

我々は、また、昨年度、Prrt3を含む分子複合体の精製と分子同定を目的として、FLAGと6xHisのdual tagを付加したPrrt3をThy1プロモーターにより神経細胞に発現するトランスジェニックマウスの作製を開始した。今年度、得られたマウスのPrrt3遺伝子の発現部位とレベルを解析し、神経細胞全般に高発現している系統と中程度発現している系統が得られたことが確認された。今後、結合タンパク質の精製等、種々の解析に供する計画である。

オーファン代謝型受容体 Prt3 の機能解明に向けた、脳内発現パターンの解析

山本友美, 山本 泉, 久保義弘

今野幸太郎, 渡辺雅彦(北海道大学大学院医学研究科解剖学講座解剖発生分野)

オーファン代謝型受容体 (Prt3) の機能に関する手がかりを得るために、特異抗体を作成し、脳内発現パターン、神経細胞内局在に関する解析を進めている。

昨年度、マウス脳新鮮凍結標本を用いて脳内発現部位を解析し、視床、黒質、橋核、海馬等で、KO マウスで消失する特異的染色を観察した。

生化学的解析により、Prt3 の存在する分画を解析したところ、シナプス部位で、PSD 分画ではない分画に存在したことから、シナプス前終末もしくは、シナプス後部

位の周辺部位に存在することが示唆された。*In situ hybridization* の解析結果から、mRNA は、大脳皮質の深層に多く発現しており、また、タンパク質は、視床に多く発現していた。これらの結果は、大脳皮質から視床に投射する神経細胞の神経前終末に高発現している可能性を示唆する。海馬においても、mRNA は錐体細胞層に高発現しているのに対し、タンパク質は錐体細胞層以外の層で発現していたことから、神経突起に発現していることが示された。

オーファン代謝型受容体 Prt3 結合蛋白同定と切断酵素同定に向けた研究

山本 泉, 山本友美, 久保義弘

横井紀彦, 深田優子, 深田正紀(生理学研究所, 細胞器官研究系, 生体膜研究部門)

中尾和貴(理化学研究所発生・再生科学総合研究センター, 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター)

清成 寛(理化学研究所発生・再生科学総合研究センター)

今野幸太郎, 渡辺雅彦(北海道大学大学院医学研究科解剖学講座解剖発生分野)

オーファン代謝型受容体 Prt3 は大きな N 末端細胞外領域を持つ 7 回貫通型受容体である。私たちは Prt3 に結合するタンパク質を昨年度作成した Prt3 特異抗体を用いて野生型マウス脳から精製し、検出された結合タンパク質同定を液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて行った。Prt3 主要結合タンパク質として、EAAT2, Go, および ATP1A3 を見いだした。なお、ウエスタンブロット解析法を用いた実験でもこれらの結合タンパク質が検出された。Prt3 の活性メカニズムはまだ解明されていないが、Prt3 は Go 共役型受容体である可能性があることがこの結果から示唆された。

N 末端細胞外領域が切断された Prt3 タンパク質 (80,

70 kDa) がどのように脳内で作成されるか検証するため、脳内細胞外プロテアーゼに着目して研究を行った。N 末端に抗原部位を持つ Prt3 抗体を用いて全長 Prt3 (120, 140 kDa) をマウス脳から精製し、tPA, Thrombin そして Plasmin と反応させウエスタンブロット解析を行った結果、tPA と反応させたサンプルから 80 kDa サイズの Prt3 が検出された。しかし tPA 遺伝子破壊ホモマウス脳を用いたウエスタンブロット法解析で、全長 Prt3 だけではなく切断された 80 と 70 kDa サイズの Prt3 も検出された。結果 Prt3 は tPA だけではなくほかの細胞外プロテアーゼ、またはプロセッシング酵素によって切断されることが示唆された。切断プロテアーゼ同定、Prt3 活性メカニズム解析等を今後も継続して実施する。

Gi/o 蛋白質のアデノシン受容体活性化構造安定化作用の解析

立山充博，久保義弘

G 蛋白質共役型受容体はリガンド結合により活性化し、G 蛋白質を介して細胞内へシグナルを伝える。我々は、受容体の細胞内領域に導入した蛍光タンパク質 CFP と YFP 間の蛍光共鳴エネルギー遷移 (FRET) 効率を計測することにより受容体の構造変化を捉えることに成功しており、また、G 蛋白質との結合により受容体活性型構造が安定となることを示した。今回、アデノシン受容体 1 型 (A1R) に結合する Gi1, Go およびキメラ型 Gqi5

という異なる G 蛋白質の作用について調べた。A1R コンストラクトは、単独発現時にリガンド投与による FRET 効率の微弱な減少を示したが、Gi1 や Gqi5 の共発現時には FRET の顕著な減少を示し、Go 共発現時には微弱なままであった。増強効果は Gi1 より Gqi5 の方が大きかったことから、受容体の活性型構造に対する安定化作用は、結合する G 蛋白質の種類により異なるということが示唆された。

受容体—GIRK チャネル間距離と GIRK 活性化効率の相関についての研究

立山充博，久保義弘

G 蛋白質依存性内向き整流カリウムチャネル (GIRK) は、主に、百日咳毒素 (PTX) 感受性 Gi/o 蛋白質由来の Gβγ により活性化される。これに対し、Gq 共役型ムスカリン受容体 1 型 (M1R) を高密度に発現させると、PTX 耐性 Gq 由来の Gβγ を介し GIRK が活性化されることが報告された。この結果は、M1R が GIRK に近接する場合に GIRK を活性化すると解釈できる。そこで、我々は、M1R と GIRK を異なる長さのアミノ酸リンカーで結合し、そ

の相対距離と量比を制御した条件下で、GIRK 電流を記録した。100 アミノ酸リンカーを用いると、M1R 刺激により GIRK 電流は 10 pA/pF 増加したが、250 アミノ酸リンカーでは 2 pA/pF の増加にとどまった。これらの結果は、GIRK 活性化が M1R からの距離に依存することを示すものである。現在、Gi/o 共役型受容体を用いて同様な実験を行い、解析を進めている。

KCNQ1 チャネルが KCNE1 存在下で開きにくくなるメカニズム

中條浩一，久保義弘

心臓の電位依存性カリウムチャネルである KCNQ1 は、修飾サブユニットである KCNE1 と複合体を構成することで、非常に開きにくいチャネルへと性質が大きく変わる。なぜ KCNE1 が存在すると KCNQ1 チャネルが開きにくくなるのかについての分子メカニズムはまだよくわかっていなかった。我々は、KCNE1 が存在するとき限り、電位センサードメインに属する 4 番目の膜貫通領域 (S4) 上にあるフェニルアラニン残基 (Phe232) が、ポアドメインに属する 5 番目の膜貫通領域 (S5) 上にある別のフェニルアラニン残基 (Phe279) とぶつかることで

KCNQ1 チャネルが開きにくくなることを見出した。これら 2 つのフェニルアラニン残基が電位センサーの動きに及ぼす影響を検討する目的で、Voltage clamp fluorometry 法を適用し、S4 の動きを蛍光強度変化として電流と同時に測定したところ、電位センサーの動きと電流の間に生じる遅延が存在し、この遅延がこれら 2 つのフェニルアラニン残基により生じていることが明らかとなった。以上の結果から、KCNE1 が KCNQ1 チャネルを開きにくくしている分子メカニズムについて、これら 2 つのフェニルアラニン残基が物理的に干渉することで、

チャネルの開状態を不安定化していることによると結論した。

全反射赤外分光法によるカリウムチャネル機能の解析

中條浩一, 久保義弘

塚本寿夫, 古谷祐詞 (分子科学研究所)

赤外分光法はタンパク質のイオン結合状態を赤外差スペクトルの取得により解析する非常に鋭敏な方法で、ロドプシンを中心とした構造機能連関研究に大きな成果を上げてきている。この方法をイオンチャネル、特に哺乳類のイオンチャネルに適用し、イオンの透過機構や分子間相互作用などを明らかにすることを目指している。前年度までに Fluorescence Detection Size Exclusion Chromatography (GFP-FSEC) を用いることで、赤外分光法による解析対象の候補として、KCNK1 とよばれる two-pore タイプのカリウムチャネルに絞り込み、全反射

赤外分光法による解析を行ってきた。KCNK1 はカリウムチャネルでありながら、pH などの条件によってナトリウムイオンも通することができる“緩い”選択性フィルターを持つ。野生型とナトリウムを良く通す変異体 (T118I) を用いることで、“緩い”選択性フィルターがどのような構造的基盤あるいは分子相互作用によってもたらされるのかを赤外分光法によって解析した。得られた差分スペクトルから、KCNK1 の特徴である“緩い”選択性フィルターが、イオンとの結合様式の違いによるものであるというデータを得つつある。

ATP 受容体チャネル P2X2 の膜電位と ATP に依存する構造変化の Cys 修飾速度測定による解析

Batu Keceli, 久保義弘

3 個の 2 回膜貫通型サブユニットで構成される ATP 受容体チャネル P2X2 は、膜電位依存性チャネルにみられる典型的な膜電位センサードメインが存在しないにも関わらず、膜電位依存的ゲーティングを示すことを、我々はこれまでに示してきた。

本研究では、膜電位と ATP に依存する P2X2 の構造の変化を、点変異により導入した Cys 残基の Cys 修飾剤による修飾の速度の、状態による違いとしてとらえることを目的とした。そこで、ATP 結合部位とチャネルポアを連結するリンカー部位に位置する Asp315 と Ile67 に点変異により Cys 残基を導入したコンストラクトをツメガエル卵母細胞に発現させた。そして、二本刺し膜電位固定法により、Cys 残基に結合する Cd^{2+} の投与によるチャネル電流の変化を記録し、その速度を、異なる状態間で比

較解析した。ATP 存在下、過分極状態と脱分極状態での速度を比較したところ、過分極状態の方が、有意に修飾が速かった。また、ATP 非存在下と存在下での修飾速度を比較したところ、ATP 非存在下では非常に遅く、ほとんど修飾が起らなかった。これらの結果から、リンカー部位において、膜電位と ATP 結合の有無に依存して構造の変化が起きることが明らかになった。

さらに、膜電位依存性のゲーティングを示さないチャネルポアの変異体 Thr339Ser を対象に、同様な実験を行ったところ、Cys 変異体の Cd^{2+} による修飾速度は、過分極と脱分極で差を示さなかった。この結果から、捉えた膜電位に依存する構造変化が、膜電位依存的なポアのゲーティングに伴うものであることが結論された。

相対的なサブユニット発現量に依存した Kv4.2/KChIP4 複合体のストイキオメトリーと性質の変化

北沢和寛, 中條浩一, 久保義弘

電位依存性 K⁺チャネルの一つ, Kv4.2 は, 心筋細胞, 神経細胞の樹状突起において, 修飾サブユニットと複合体を構成し, 細胞の興奮性を調節している。細胞内タンパク質である K⁺ Channel Interacting Protein 4 (KChIP4) は Kv4.2 の電流量を増加し, 不活性化を遅くし, 不活性化からの回復を速くする事が知られている。結晶構造解析により, 両サブユニットが 4:4 で結合することが明らかにされていたが, 量体数比(ストイキオメトリー)が変化するかどうかに関しては不明であった。我々は, これまで, KChIP4 の発現量が増加するに従い, Kv4.2 の性質が徐々に変化すること, また, Kv4.2 と KChIP4 を 4:2 及び 4:4 に固定するタンデムコンストラクトを用いて,

KChIP4 の結合数が増加することで, Kv4.2 の不活性化からの回復速度が速くなることを示した。今年度は, 一つの Kv4.2 に結合する KChIP4 の数を測定する目的で, 一分子蛍光イメージング法を用いた, サブユニット数の測定を行った。KChIP4 に monomeric enhanced GFP (mEGFP) を付加し(KChIP4-mEGFP), Kv4.2 と共発現させた。その結果, 両サブユニットの発現量が変化することで Kv4.2/KChIP4 複合体のストイキオメトリーが変化することが示された。これらの結果から, Kv4.2/KChIP4 複合体のストイキオメトリーと性質は両者の相対的発現量依存的に変化することが明らかとなった。

hERG チャネルの S4-S5 リンカー-C リンカー間の相互作用による脱活性化の制御

条慎一郎, 中條浩一, 久保義弘

電位作動性 K⁺チャネル(Kv)の hERG チャネルは, 他の Kv と比べて脱活性化が遅く, その機構は細胞内ドメイン間の相互作用により制御されることが示唆されている。これまでに, 電位センサードメイン-ポア形成ドメイン間を繋ぐ S4-S5 リンカーと, N 末端側細胞内ドメイン間の相互作用が知られているが, 未だ制御機構の解明には至っていない。我々は S4-S5 リンカーと相互作用する新しい領域を探索するため, システイン(Cys)二重変異体を用いた Cys-Cys 結合形成実験を行った。その結果, S4-S5 リンカーと, ポア形成ドメイン-C 末端側細胞内ド

メイン間を繋ぐ C リンカーのそれぞれに Cys を導入した二重変異体(野生型と比べて脱活性化が速い)において, Cys-Cys 結合の形成により脱活性化速度が回復することが分かった。さらに, これらの相互作用はチャネルの状態に依存し, 膜電位を脱分極した際(開状態)に, より距離が近くなることを示唆する結果も得られた。これらの結果から, 遅い脱活性化の制御には, 新しく S4-S5 リンカー-C リンカー間の相互作用が重要である可能性が示唆された。

分子神経生理研究部門

【概要】

分子神経生理部門では以下に示す 3 つのテーマに関して研究している。

- 1) グリア細胞の機能とその病態解明。
- 2) 哺乳類神経系の発生・分化。
- 3) 脳機能発現における糖鎖の役割。

1) グリア細胞は神経回路同様にネットワークを作っているが, その情報伝達様式は神経伝達と全く異なっており, しかも神経回路とは独立している。このネットワークがどのように脳機能を制御しているのか研究する。

2) 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。特に, プロテオグリカンがモルフォゲンの分布を制御することにより神経発生を調節している可能性に

ついて検討している。

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

オリゴデンドロサイトの機能と病態

清水健史, 長内康幸, 國澤和生, Wilaiwan Wisessmith, 李 佳益, 池中一裕

オリゴデンドロサイト(以下 OL)は, ミエリン形成後もニューロンの活動電位の伝導速度を調節していることが明らかとなり, また一つの OL は複数の軸索に対してミエリンを形成することから, OL がニューロン間の情報伝達を仲介, 調節している可能性が考えられている。この課題に取り組むため, OL-ニューロン間相互作用の分子機構の解析と, それら相互作用を生体内で標識する新規の技術開発に成功しており, 既にマウスの生体内で観察を行っている。また OL-ニューロン間相互作用に破

綻をきたすノックアウトマウスを用いて, ミエリン依存的なニューロン遺伝子の発現変動を解析し, 幾つかの候補遺伝子を同定した。一方で脱髄性疾患の病態解明も重要な課題である。我々は髄鞘巣で特異的に発現するシスタチン F とカテプシン C を同定し, それら遺伝子発現を人為的に操作できる遺伝子改変マウスを作製し, 脱髄性疾患への作用を OL 側とニューロン側の双方から明らかにしつつある。また脱髄誘導時に活性化されるミクログリア依存的な Wnt シグナルの機能解析も行っている。

アストロサイトの機能と病態

稲村直子, 杉尾翔太, 菊地原沙織, 池中一裕

近年, 伝達物質がアストロサイトから放出され, シナプス伝達を調節することが提唱されているが, そのメカニズムについては不明な点が多い。東京大学廣瀬謙造教授の開発したプローブを用いて培養アストロサイトから放出されるグルタミン酸を可視化し, また, 名古屋大学曾我部正博教授のグループと共同で, ルシフェリン発光を利用し, 培養アストロサイトから放出される ATP の可視化にも成功した。薬理学的実験からこの爆発的な ATP 放出には, 複数のチャネルが協調的に関わっている事, また興味深いことに開口放出が関与していないことを明らかにした。

また近年, 人においてアストロサイト異常に起因して

発症する白質脳症が複数報告されてきており, アストロサイトが脳白質の形成・維持に関与することが指摘されつつある。我々はアストロサイトの病態と白質脳症の関連を明らかにするために, 当該白質脳症の一つである MLC 病に着目し, その原因遺伝子である Mlc1 の遺伝子改変マウスを慶應義塾大学田中謙二准教授との共同研究により作成し, アストロサイトと白質脳症の病態との関連について解析を行っている。加えて, 我々は Mlc1 遺伝子改変マウスにおいて小脳形成不全という表現系も見出しており, 小脳発生におけるアストロサイトの役割についても解析を進めている。

脊髄神経発生における硫酸化プロテオグリカンの役割

石野雄吾, 橋本弘和, 江 文, 池一中裕

胎生期の脊髄では Wnt, BMP や Shh といったモルフォゲンが分泌される。これら分泌性因子は濃度勾配を形成し、その濃度に応じて様々な細胞応答を引き起こすことが知られている。しかしながら、モルフォゲンの濃度勾配形成機構についてはいまだ不明な点が多い。

本研究室では新しいモルフォゲンの濃度勾配形成機構として硫酸化糖鎖による制御について提唱している。硫酸化糖鎖のうちコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、HNK-1 などに着目し、モルフォゲンと硫酸化糖鎖の相互作用による細胞分化の制御機構の解明を試みている。これまでにケラタン硫酸やヘパラン硫酸

合成関連酵素の欠損マウスの解析により胎生 12.5 日におけるオリゴデンドロサイトの分化異常を明らかにしている。本年はこの発生制御のメカニズムについて解析を行った。ケラタン硫酸欠損マウスでは分化異常の他にパターン形成の異常も観察されており、Shh シグナリングとの相互作用による発生制御が示唆された。また HNK-1 欠損マウスにおいてもオリゴデンドロサイトの分化異常が明らかとなっている。以上のことから硫酸化糖鎖—モルフォゲン間の相互作用が発生へ大きく影響を与えていることが考えられる。

N 結合型糖鎖の構造決定と機能解析

吉村 武, 鳴海麻衣, 小池崇子, 伊藤磯子, 加納雄一朗, 池一中裕

糖鎖を有する分子は細胞表面や細胞外に存在し、細胞間相互作用やシグナル伝達に深く関わっている。これまでに我々は脳の発生時期に依存して劇的に発現量と構造が変化する N 結合型糖鎖を同定した。我々が確立した SDS-PAGE 後の目的蛋白質に修飾されている微量な N 結合型糖鎖を解析する方法 (Yoshimura et al., Anal Biochem, 2012) を用いて、あるシアル酸化糖鎖構造が特定の蛋白

質に結合していることを明らかにした。このシアル酸化糖鎖構造が結合するシグレックも同定しつつある。一方、末梢神経における酸性糖鎖の比率が中枢神経に比べ高いことを見出した。さらにこの酸性糖鎖がほぼ消失する糖転移酵素ノックアウトマウスの坐骨神経において髓鞘構造の異常や神経軸索変性を観察した。

ナノ形態生理研究部門

【概要】

本研究部門では、生体高分子や細胞内超微小形態を高い解像度で立体的に構造観察するための新しい電子顕微鏡法および画像解析法の開発を行い、生体における「構造と機能」の関係を研究している。その一つとして位相差電子顕微鏡の高分解能化がある。蛋白質複合体やウイルスを感染させた細胞などにゼルニケ位相差法を適応し、より迅速で解像度の高い三次元構造解析を行っ

ている。二つ目は、線形加速器を導入した加速電圧 500kV の Linac TEM による厚い生物試料の三次元観察の実用化を進めている。本研究部門は、形態情報解析室の村田和義准教授が併任しており、前任の永山國昭特任教授と共同で研究を続けている。研究活動の詳細は、形態情報解析室および特別研究(永山グループ)の項で合わせて紹介している。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) は脳内の速い興奮性シナプス伝達の大部分を司る。当部門では AMPA 受容体の動態や機能を制御する機構として以下の 2 点に着目し、シナプス可塑性およびてんかんなどの脳神経疾患発症のメカニズムの理解を目指す。

(1) パルミトイル化脂質修飾機構の全容解明

パルミトイル化修飾は、多くの蛋白質にみられる代表的な翻訳後脂質修飾であり、外界刺激に応答してシナプス蛋白質のシナプス膜局在を制御し、シナプス伝達効率や細胞内情報伝達を調節する。我々は独自に発見したパルミトイル化酵素群をツールにシナプス活動に応答した AMPA 受容体の動態制御機構および新規のパルミトイル化基質蛋白質の同定、性状解析を進めている。また、

長年不明である脱パルミトイル化酵素の同定を試みる。

(2) てんかん関連蛋白質 LGI1 によるシナプス伝達制御機構の解明

我々はシナプス後部の足場蛋白質 PSD-95 の蛋白質複合体として同定したてんかん関連分泌蛋白質 LGI1 の機能に関して精力的に解析を進めている。これまでに、LGI1 が脳内で ADAM22, ADAM23 受容体と結合し、AMPA 受容体機能を増強すること、LGI1 欠損マウスにおいて AMPA 受容体を介したシナプス伝達が減弱し、致死性てんかんが必発することを見出している。今年度は LGI1 の変異体や抗 LGI1 自己抗体を原因とする疾患の分子病態機構の解明を進めている。

PSD-95 パルミトイル化酵素によるシナプス機能制御

深田優子, 深田正紀

足場タンパク質 PSD-95 は AMPA 受容体をシナプス後部膜にアンカリングすることで、興奮性シナプス伝達を制御する。本研究では、パルミトイル化酵素サブファミリーのうち DHHC2 が神経活動抑制時にシナプス膜に直接挿入され、細胞膜での局所的な膜マイクロドメイン PSD の形成に重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、パルミトイル化 PSD-95 を特異的に認識する抗体

の作製に成功し、初めて生細胞レベルでパルミトイル化 PSD-95 の動態を超解像顕微鏡を用いて可視化することに成功した。これによってシナプスがさらに小さなナノサイズの構造単位 (ナノドメイン) が集まってできていることを発見し、DHHC2 がそのサイズと数を制御していることを明らかにした。

Fukata Y. et al., *J. Cell, Biol.* **202**, 145-161. (2013)

新規パルミトイル化基質 Neurochondrin の同定と性状解析

奥慎一郎, 深田優子, 深田正紀

蛋白質のパルミトイル化脂質修飾は外界刺激依存性に蛋白質の膜局在を制御する。本研究では、CSS-Palm 2.0 パルミトイル化部位予測プログラムを利用した *in silico* 解析により、パルミトイル化基質蛋白質をゲノムワイド

に探索し、多くの新規パルミトイル化基質を同定した。その中で、シナプス可塑性や神経突起の伸長に重要な役割を果たす Neurochondrin に着目し、DHHC1, 3, 7, 10 を Neurochondrin のパルミトイル化酵素と同定した。

DHHC1, 10 が酵素として機能することを最初に示した重要な知見となる。さらに, Neurochondrin のパルミトイル化が Neurochondrin の細胞内局在 (Rab5 ポジティブな

細胞内小胞) 決定に必須であることを見出した。

Oku S. et al., *J. Biol. Chem.* **288**, 19816-19829. (2013)

脱パルミトイル化酵素の同定と性状解析

関谷敦志, 村上達郎, 深田優子, 深田正紀

蛋白質パルミトイル化の修飾サイクルは DHHC ファミリーと脱パルミトイル化酵素により制御されるが, 脱パルミトイル化酵素は, パルミトイル化サイクルの発見から 35 年あまりの長い間未同定であった。我々は脱パルミトイル化の反応機構からセリン加水分解酵素に着目し, 機能未知の酵素群を網羅的に単離し, PSD-95 や癌遺伝子 Hras 等のパルミトイル化基質に対する反応活性

を評価した。その結果, *in vitro* で, あるサブファミリーが脱パルミトイル化活性を示すことを見出した。さらに我々は内在性蛋白質のパルミトイル化修飾の化学量論比を検出する実験系を確立し, これら酵素の生理的意義を明らかにしつつある。本研究により, 蛋白質の局在制御機構についての包括的な理解が進むと期待される。

てんかん関連リガンド LGI1 の作用機構の解析

横井紀彦, 大川都史香, 深田正紀, 深田優子

当部門ではこれまでに, 家族性側頭葉てんかんの原因遺伝子として考えられている LGI1 に着目して研究を進めている。LGI1 がどのようにシナプス伝達を制御しているのか, そしてその変異が何故, てんかんという病態を引き起こすのかを明らかにするために, LGI1 の変異体解析を進めている。側頭葉てんかん家系で見られる LGI1 の変異体を網羅的に作成し, 野生型 LGI1 との機能の違いを LGI1 の分泌能, ADAM 蛋白質との結合能, 細胞内

局在等の観点から解析した。すでに, LGI1 変異体をいくつかのカテゴリーに分類することに成功している。また, 変異体に特異的に結合する蛋白質の同定にも成功している。さらに, これら変異を有する病態モデルマウス群を作製し, 生化学的, 組織学的調査により LGI1 変異体の分子病態機構を明らかにしつつある。また, その病態機構の知見より, モデルマウスのてんかんに対する治療法の検討も進めている。

自己免疫性辺縁系脳炎における抗 LGI1 抗体の作用機構の解明

大川都史香, 深田優子, 横井紀彦, 渡邊 修(鹿児島大学医学部), 深田正紀

ごく最近, 亜急性の記憶障害やけいれん症状を主訴とする“辺縁系脳炎”の患者血清の多くに LGI1 に対する自己抗体が存在することが報告された。我々は鹿児島大学医学部の渡邊博士との共同研究により, 日本国内の辺縁系脳炎の多くの患者血清中に抗 LGI1 抗体が存在することを見出した。また, LGI1 抗体以外にも多数の新規自己

抗体の標的分子を同定した。さらに, 診断に有用と考えられる簡便で高い特異性を有する ELISA 法を確立した。抗 LGI1 抗体の作用機序として, 抗 LGI1 抗体が ADAM22 と LGI1 との結合を阻害し, シナプスにおける AMPA 受容体の量が減少することを見出した。この知見は LGI1-ADAM22 複合体が正常な脳機能に極めて重要であ

ることを示している。

Ohkawa T. et al. *J. Neurosci.* **33**, 18161-18174. (2013)

神経細胞構築研究部門

【概要】

本研究部門では神経細胞の極性や微小領域特性確立を支配する分子基盤解明を目指して研究を進めている。独自に開発した質量顕微鏡法を駆使して、極性決定や微小領域確立に寄与する物質、とりわけ脂質や脂質代謝物の特異的局在情報の蓄積を進めている。集められた膨大なデータを元に統計学的手法やバイオインフォマティクスを融合させ、これまでにない新しい視点から神経細胞

の極性決定、微小領域確立に関与する分子基盤解明に挑戦している。加えて、極性決定や微小領域確立における細胞骨格の寄与にも注目し、アクチン繊維や微小管による脂質局在の制御などを新しいテーマとして研究に取り組みだしている。また、障害や変性疾患における神経細胞構築の破綻についても、脂質や代謝物に着目し、その分子基盤解明に向けた研究を展開している。

神経変性疾患モデル脳の質量顕微鏡解析

杉浦悠毅(浜松医大), 早坂孝宏(浜松医大), 梁 賢正(浜松医大), 瀬藤光利

6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)の脳内投与によるパーキンソン病モデルを質量顕微鏡で解析した。野生型マウス脳では、6-OHDA 投与により中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンにおいて ATP の顕著な枯渇が観察された。一方、ポリ ADP リボースポリメラーゼ 1(PARP-1)のノックアウトマウスでは、6-OHDA 投与による ATP の枯渇は観察されなかった。さらに、PARP-1 ノックアウトマウスの中脳黒質ニューロンは 6-OHDA 投与による変性脱落に高い耐性を示した。これらの結果は、パーキンソン病における中脳黒質ドーパミン作動性ニューロンの脱落が PARP-1 依存的な ATP の枯渇によることを示唆している(文献 1)。

逆行性軸索変性を示すユビキチンカルボキシ末端加水分解酵素 L1(UCH-L1)の変異マウス(gad マウス)を質量顕微鏡で解析した。gad マウスの延髄では、 m/z 806.68 のサルファチド C18:0, および m/z 822.68 のサルファチド C18:0(OH)が蓄積していた。組織学的解析により、これらのサルファチドは軸索内の凝集体に蓄積していることが明らかになった。サルファチド C18:0 は細胞内の膜小胞に局在することが報告されており、サルファチド C18:0 の蓄積は軸索内凝集体における細胞内膜小胞の異常な集積を反映していることを示唆している(文献 2)。

1. Kim et al. *Cell Death Disease* (2013) 4: e919

2. Onishi et al. *Med Mol Morphol* (2013) 46: 160-165

細胞生理研究部門

【概要】

細胞は、それを取り巻く環境の大きな変化の中で、その環境情報を他のシグナルに変換し、細胞質・核や周囲の細胞に伝達することによって環境変化にダイナミックに対応しながら生存応答を行っている。細胞が存在する臓器・組織によって細胞が受け取る環境情報は異なり、従って細胞が持っている環境情報を受信する機能も異

なる。それらセンサー蛋白質は環境の変化に応じてダイナミックに感受性や発現等を変化させてセンシング機構の変化からよりよい生存応答を導く機能を有している。これらのセ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。そして、それは細胞の、組

織の、さらには個体の環境適応をもたらす。したがって、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す

している。特に、侵害刺激、温度刺激、機械刺激の受容機構について TRP チャネルに焦点をあてて解析を進めている。また、センサーは進化の過程で環境変化に応じてその機能や発現を変化させて適応してきたと考えられ、センサー蛋白質の進化解析によっていかに生物が環境変化に適応してきたかも解析している。

細胞外温度依存性の TRPM8 活性化温度閾値変化の解析

藤田郁尚, 高石雅之, 内田邦敏, 富永真琴

HEK293 細胞にラット TRPM8, ヒト TRPM8 を発現させてパッチクランプ法で解析すると, 30 度のときには冷刺激による活性化温度閾値が約 28 度で, 40 度のときにはその活性化温度閾値が約 35 度まで上昇することが分かった。マウス後根神経節細胞でも同様であった。種々の薬理学的解析から, この TRPM8 活性化温度の閾値変化は phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) 依存적であることを見いだした。また, human TRPM8 の 1008 番

目のアルギニンがこの PIP₂ の作用に関わることが, 点変異体解析によって明らかになった。同じ温度の水を, それ以前に曝露されていた温度によってより冷たく感じたり, より温かく感じたりする現象(ウェーバーノ 3 ボトル実験)が末梢感覚神経末に発現するメントール受容体 TRPM8 の PIP₂ の依存的な活性化温度閾値の変化で説明できるかもしれないと考えられた。

TRPA1 スプライスバリエントによる機能制御機構の解析

周 一鳴, 鈴木喜郎, 内田邦敏, 富永真琴

マウス感覚神経に Exon20 を欠失したスプライスバリエント TRPA1b を見いだした。TRPA1b は full length TRPA1 (TRPA1a) と結合して TRPA1a の細胞膜移行を促進させていることがわかった。TRPA1b 単独発現細胞は TRPA1 電流の活性化を示さなかったが, TRPA1a, TRPA1b 共発現細胞では, 共有結合修飾を介した TRPA1 活性化物質, 共有結合修飾を介さない TRPA1 活性化物質の両方による TRPA1 電流が著しく増大し, それは, 細胞膜での TRPA1a 発現量増大と合致した。TRPA1b 共発現がチャネルキネティクスに影響を及ぼしていないことは, 単一チャネル電流記録でも確かめられた。野生

型マウス後根神経節細胞に TRPA1b を強制発現させると TRPA1 応答が増大した。また, マウスの炎症性疼痛モデルと神経障害性疼痛モデルにおいて, TRPA1 欠損マウスでは有意に機械刺激痛覚過敏が減弱しており, TRPA1 が炎症性疼痛および神経障害性疼痛発生に関わっていることが分かった。さらに, TRPA1a 遺伝子の発現増加は一過的であったが, TRPA1b 遺伝子は持続的に増加しており, この TRPA1b の増加が TRPA1 機能増強を介して炎症性疼痛および神経障害性疼痛発生をもたらしているものと考えられた。

亜鉛イオンによる TRPM5 の機能抑制機構の解析

内田邦敏, 富永真琴

細胞外 ZnCl_2 が細胞内 Ca^{2+} 濃度増加によって活性化した TRPM5 電流を生理的濃度域で濃度依存的に抑制することが明らかになり, EC_{50} 値は保持電位に関係なく, 約 $4.3 \mu\text{M}$ であった。 ZnCl_2 , ZnSO_4 ともに TRPM5 抑制作用を示したことから, 亜鉛イオン (Zn^{2+}) 自身が作用しているものと考えられた。 ZnCl_2 はまた同様に, 温度によっ

て増大した TRPM5 電流も抑制した。この細胞外 Zn^{2+} による抑制はポア阻害作用によらないことが, イオン置換実験によって分かったが, ポアループの複数のアミノ酸 (His at 896, Glu at 926, Glu at 939) が関与していることが, 点変異体解析によって明らかになった。

トカゲ TRPA1 チャネルの熱による直接の活性化機構の解析

Erkin Kurganov, 周一鳴, 齋藤 茂, 富永真琴

トカゲ TRPA1 チャネルの化学刺激と温度刺激による活性化をパッチクランプ法で解析し, AITC によって活性化すること, 冷刺激ではなく熱刺激によって活性化することが分かった。AITC によるトカゲ TRPA1 は細胞外 Ca^{2+} 非存在下でも活性化されたが, 不活性化キネティクスが Ca^{2+} 存在下の電流と異なっていた。熱活性化トカゲ TRPA1 電流は細胞外 Ca^{2+} 非存在下ではほとんど観察されなかった。Arrhenius plot を用いた解析で, 活性化温度閾値が約 36 度であることがわかり, 温度上昇の開始温度の違いには影響されず, 温度変化を感知して活性化す

るのではないと考えられた。また, 温度刺激と化学物質刺激の間に相乗効果があることも判明し, 少量の AITC 存在下では, 活性化温度閾値は著しく低下し, 30 度では 25 度と比較してトカゲ TRPA1 を活性化する AITC 濃度が大きく減少した。さらに, パッチ膜による inside-out 法の記録で単一チャネルの開口が観察され, トカゲ TRPA1 は細胞内因子を必要とせず, 熱によって直接活性化することが明らかになった。加えて, 単一チャネル開口キネティクスが AITC と熱による活性化で異なることも見いだされた。

ニワトリ TRPA1 チャネルの遺伝子クローニングと機能解析

齋藤 茂, 福田直美, 太田利男, 富永真琴

ニワトリ TRPA1 チャネル遺伝子をクローニングして機能解析を行った。AITC 等の化学物質感受性は維持している一方, ニワトリ TRPA1 は熱刺激センサーであり, 活性化温度閾値は約 39.4 度であった。哺乳類等の恒温動物 TRPA1 は冷刺激感受性か温度感受性がないのに, 同じ恒温動物ニワトリの TRPA1 が爬虫類や両生類の TRPA1 と同様に熱によって活性化することは驚きである。また, トリの忌避剤として知られる methyl anthranilate

(MA) や dimethyl anthranilate, 2'-aminoacetophenone がニワトリ TRPA1 の刺激物質であることが明らかになり, トリの MA 忌避は TRPA1 活性化による侵害刺激作用によることが分かった。また, ヒト, マウス, ニワトリ, グリーントカゲ, ニシツメガエルの TRPA1 の MA 感受性とアミノ酸配比較による点変異体解析によって, MA のニワトリ TRPA1 活性化に関わるアミノ酸を同定した。

生体情報研究系

感覚認知情報研究部門

【概要】

感覚認知情報部門は視知覚および視覚認知の神経機構を研究対象としている。我々の視覚神経系は階層的に構築された複雑な並列分散システムである。そこでは低次領域で検出された比較的単純な特徴が高次領域で統合されて、生体にとって意味のある情報が取り出されて行動に利用される精巧な仕組みがあると考えられる。また視覚系で取り出された情報は、体性感覚や聴覚など他の感覚情報と統合されて外界の事物についての多感覚

間で整合性のある理解が生み出される仕組みがあると考えられる。視知覚に関す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と特定の視覚情報の脳内分布様式および行動との関係を調べている。具体的な課題として(1)物体表面質感の重要な要素である光沢の表現、(2)大脳皮質高次視覚野における色相や彩度の表現様式の研究、および(3)素材識別のメカニズムに関するいくつかの研究を行った。

下側頭葉皮質における光沢選択性ニューロンの性質

西尾亜希子, 郷田直一, 下川丈明(ATR 脳情報通信総合研究所), 小松英彦

光沢知覚の神経メカニズムを明らかにするために、光沢を均一に変化させることの出来る光沢空間上で光沢物体画像を作成し、それらの物体画像に対するサルの下側頭葉皮質ニューロンの反応を調べた。その結果、下側頭葉皮質には特定の光沢に選択性を持つニューロンが存在し、それらのニューロンは光沢知覚に重要な、ハイライト部分のコントラスト、ぼやけ、物体の明るさという三つのパラメータに関わる情報を表現している可能性が

高い事が明らかになった。またニューロン集団の反応を用いてそれらのパラメータを重回帰分析した結果、三つのパラメータはいずれもニューロン集団の応答から高精度に予測できた。またそれぞれのパラメータは主なる異なる細胞集団によって表現されていることが分かった。これらの結果は記録した下側頭葉皮質の光沢選択性ニューロンの活動が知覚的な光沢と密接な関わりを持つ事を示唆している。

二種類の色空間におけるサル V4 ニューロンの色選択性の比較

眞田尚久, 波間智行, 小松英彦

網膜で受容された色情報は外側膝状体(LGN)から一次視覚野を経由して高次視覚領域へと送られる。脳内における色情報処理は、光の波長に応答する段階から、色のカテゴリーを作る段階まで、様々なレベルがある。たとえば色情報処理の初期段階である LGN の神経細胞では、光受容細胞に由来する3つの色チャネルの軸によって情報が表現される(DKL)のに対し、高次視覚領域 IT 野の神経細胞では、ヒトの色表現に用いられる色空間

(CIExy)で鋭い色選択性をもつことが知られている。どちらの色空間も全ての色相を表現できるが、CIExy 色空間はより広い範囲の彩度を表わすことができるという違いがある。色知覚の神経基盤を理解するために、初期から高次に至る過程でどのように色表現が変化してゆくのかを知ることは重要な課題であるが、これまで色選択性の計測に用いられていた色空間は領域によって異なるものが使われており、比較が難しかった。そこで

DKL, CIExy という二つの異なる色空間で単一神経細胞の色選択性を直接比較した。色情報処理の中間段階である V4 野から、二つの色空間でそれぞれ色選択性を記録

した結果、高い彩度を選択性を持つものを除いて殆どの神経細胞で色選択性が一致し、DKL 色空間での色選択性を CIExy 色空間から予測できることが分かった。

素材識別に関わるサル視覚領野：fMRI 研究

郷田直一, 横井 功, 橘 篤導, 岡澤剛起, 小松英彦

本研究では、これまで、金属、プラスチック、木などの素材に関する視覚情報が脳においてどのように処理されるかについて fMRI 研究を行ってきた。本年度においては、サルを対象とした fMRI 実験により、サル V4 及び後部下側頭皮質の活動が各素材の多感覚的印象を反映していること、及び、それら領域の活動はヒト腹側高次視覚野の活動とも類似していることを明らかにした。さらに、これらサル脳領域の素材情報表現がどのよ

うに形成されるのかを明らかにするため、様々な素材の視触覚経験が脳の情報表現に与える影響を調べる新たな fMRI 実験を行った。数ヶ月にわたり、サルに 9 種の素材で作られた棒状の実物体を掴む視触覚経験課題を課し、この視触覚経験課題の前後において、サルがそれら 9 種の素材を観察しているときの脳活動を計測した。現在、様々な脳領域の情報表現が視触覚経験の前後でどのように変化するかについて解析を進めている。

マカクサル V4 ニューロンの自然テクスチャ選択性を説明する画像統計量

岡澤剛起, 田嶋達裕(理研 BSI), 小松英彦

我々は木目や布などの物体表面のテクスチャを視覚的に知覚できるが、脳がどのように画像特徴を抽出することでテクスチャ知覚を行っているかは分かっていない。一方、Portilla と Simoncelli (2000) は「テクスチャ合成」という手法を開発し、高次画像特徴を組み合わせることで自然テクスチャと区別のつかない画像を計算的に生成することに成功している。そこで本研究では視覚系がテクスチャ合成で使われるような高次画像特徴に応答することでテクスチャ知覚を行っているとの仮説をたて、サルの視覚野の一つである V4 野から単一神

経細胞応答を記録した。多数の合成したテクスチャへの神経応答を効率的なサンプリング法を用いて計測したところ、得られた各細胞の応答はテクスチャ合成で使われる高次画像特徴の組合せに選択性を持っていると考えられることで説明がつくことが明らかとなった。また得られた選択性はヒトのテクスチャ弁別や素材分類を説明するのに適していることも分かった。これらの知見は我々のテクスチャ知覚の根底にある処理メカニズムについて大きな示唆を与える。

素材カテゴリー知覚における下側頭葉皮質ニューロンの役割

横井 功, 小松英彦

我々は対象がどのような素材から出来ているかを金属、木材などの素材カテゴリーとして知覚することが出来る。これまでに下側頭葉皮質が素材知覚に関与してい

ることがサルとヒトを用いた機能的 MRI の研究によって明らかにされている。この研究では個々のニューロンがどのように素材知覚に関与しているかを明らかにす

るために、さまざまな素材刺激を視覚的に呈示しサルの下側頭葉皮質のニューロンから単一細胞外電位記録を行った。9種類の素材カテゴリー(金属, ガラス, 陶器, 石材, 樹皮, 木目, 皮革, 布, 毛)によって構成される素材刺激を、実物素材を写真撮影することによって作成し、注視課題遂行中のサルに視覚刺激として呈示した。大部分の下側頭葉皮質のニューロンは特定の素材刺激に選

択的な応答を示した。さらにそれらのニューロンのうち半数以上は、最も強い反応を生じた刺激と同じ素材カテゴリーに属する他の素材刺激に対しても強く反応し、カテゴリー依存的な選択性を示した。この結果は個々の下側頭葉皮質のニューロンが素材カテゴリー知覚の基礎となる情報を表現していることを示唆する。

神経シグナル研究部門

【概要】

当部門では分子, シナプス, 神経回路, シミュレーションに至る幅広い視点から神経シグナル伝達の機構を詳細に捉え、さらに *in vivo* 標本を用いた解析や行動解析など統合的視点から、それら多様なシグナル伝達が個体や行動に及ぼす影響を明確にするなど独創的な研究を行っている。

神経シグナル伝達機構の詳細な解析、特に小脳神経回路の解析から、種々のGタンパク質共役型受容体が、多

様なシグナル伝達調節をシナプス前性に行うことを見出した。脊髄神経回路の解析では、ケモカインによるシグナル伝達促進のシナプス前性の作用やノルアドレナリンによるシナプス後性の抑制性ニューロン賦活化作用を明らかにした。*In vivo* の解析や行動解析から、キナーゼや基質蛋白質のリン酸化はけいれんに、ノルアドレナリンの作用は下行性の痛みの抑制に、ケモカインの作用は痛みの増強に関与することを明確にした。

内因性の痛覚抑制機構とそれを利用した鎮痛法の開発

古江秀昌, 井本敬二

生体に備わる内因性の下行性痛覚抑制系、特に大脳皮質から青斑核—脊髄に至る抑制系は、緊張時などに作動して痛みを有効に抑制することが知られている。この抑制機構の詳細は不明のことが多いが、難治性疼痛に対しこの内因性の抑制を利用した鎮痛法が注目されている。そこで、*optogenetics* を用いて青斑核ノルアドレナリン神経を特異的に一定時間賦活化する手法を前年度に続き確立し、その抑制機構の詳細やこの系を利用した鎮痛法の開発を行った。

Optogenetics と *in vivo* パッチクランプ法を用いた解析から、青斑核ニューロンの興奮が低下した後にも、シナプス後性に脊髄 GABA ニューロンの活動・興奮が持続し、痛みが有効に抑制されることを見出した。また、青斑核の活動を低下させて鎮静作用を示す $\alpha 1$ 作動薬は、臨床用量以下の低い用量において逆説的に青斑核の活動を高め、脊髄の GABA を介した抑制性シナプス伝達を著明に増大し、鎮痛効果を現すことを証明した。

G_{i/o} 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制における多様性

佐竹伸一郎, 井本敬二

ラット小脳顆粒細胞(上行性線維)の 2 発パルス刺激(30~100 ミリ秒間隔)に伴い, 分子層介在神経(籠細胞)から記録される興奮性シナプス後電流(EPSC)は, 2 発目の振幅値と減衰時定数(τ)が刺激間隔に依存して増大する。減衰時間のペアパルス増強(PPP_{decay}, paired pulse prolongation of the EPSC decay)は, シナプス小胞の多重性放出の促進に伴う, 神経伝達物質グルタミン酸のシナプス間蓄積によって引き起こされたと推定している。PPP_{decay} の発現機構を追究する過程で, G_{i/o} 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制に複数の様式が存在するこ

とを発見した。mGlu 受容体(group III)作用薬 L-AP4 ならびに GABA_B 受容体作用薬 baclofen は, PPP_{decay} の減弱を伴うシナプス前抑制を惹起した。一方, カンナビノイド CB1 受容体の作用薬 WIN55212-2 は, PPP_{decay} に影響しない様式でシナプス前抑制を引き起こした。これらの結果は, ①G_{i/o} 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制には, 多重性放出の抑制の有無により区別される複数の発現メカニズムが存在すること, また②多重性放出の可逆的变化が, 脳の情報処理プロセスにおいて多様性を生み出す重要な役割を担っていることを示唆している。

けいれん活動時における ERK1/2-MAP キナーゼの活性化と基質蛋白質のリン酸化

山肩葉子, Angus C. Nairn (Yale University, Rockefeller University), 小幡邦彦, 井本敬二

ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) は, MAP キナーゼのサブファミリーのひとつで, 中枢神経系に多く存在し, 様々な役割を担っている。ERK1/2 の活性化は, てんかん発作を始めとする神経活動の増大時に起こることが知られているが, ERK1/2 の活性化とその基質蛋白質のリン酸化との関連については, 未だ不明な点が多い。本研究においては, ラットの急性・一過性のけいれんと持続性のけいれんを用いて, 脳内における ERK1/2 の活性化とその基質であるシナプシン I のリン

酸化状態の変化について, 比較検討した。急性・一過性のけいれんでは, シナプシン I の ERK1/2 によるリン酸化が, けいれん中に一旦大きく低下した後, ERK1/2 の活性化に従って大きく増大した。一方, 持続性けいれんの場合は, ERK1/2 の強い活性化と同時に, シナプシン I のリン酸化の大幅な低下が観察された。すなわち, 生体内における過剰な神経活動の興奮性の増大は, ERK1/2 の活性化とその基質蛋白質の脱リン酸化という対立する結果をもたらすことが判明した。

脊髄における痒み情報の伝達と調節機構の解明

歌 大介, 井本敬二, 古江秀昌

時に痒みは痛み以上に耐えがたい感覚であるにも関わらず, 脊髄における痒みの情報の伝達やその調節機構は痛みと比べ不明なことが多い。

そこで, 脊髄後角における痒みの伝達とその情報処理機構の詳細を明らかにするために, 成熟ラット脊髄後角からの *in vivo* パッチクランプ法を用い, 後肢皮膚への痒み物質投与により誘起されるシナプス応答と記録細胞

の発火特性との関係を解析した。まず, セロトニン塗布により, 数十分にわたり自発性の興奮性シナプス後電流の発生頻度が著明に増大する細胞を同定し, 次いで発火パターン解析を行った。多くのセロトニン応答細胞は tonic および delayed type の発火パターンを示し, 脊髄後角で観察される initial や phasic type の発火パターンを示さないことが見出された。今後はより詳細なセロトニン

応答細胞の特徴を調べるために形態組織学的解析を併せて行う予定である。

脊髄後角シナプス伝達に対するケモカインの作用と疼痛発現機構

秋元 望, 古江秀昌, 井本敬二

近年、免疫性因子であるサイトカインが脊髄における痛覚伝達に影響を与えることが注目されている。本研究はケモカインの1種である CCL-1 (C-C motif ligand 1) に着目し、痛覚伝達に対する CCL-1 の作用と疼痛発現機構について検討を行った。坐骨神経を結紮して作製した神経障害性疼痛モデルでは、脊髄後根神経節において CCL-1 の発現が一過性に上昇した。また、正常動物脊髄腔内に CCL-1 を投与するとアロディニアが惹起された。次いで、腰部脊髄スライスを作製し、後角第Ⅱ層、膠様質ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行い、CCL-1 の作用を解析した。一部の膠様質ニューロン

において、灌流投与した CCL-1 は自発性の興奮性シナプス後電流の発生頻度を著明に増加させた。また、テトロドキシシン(TTX) 存在下では、CCL-1 は微小興奮性シナプス後電流の頻度を増加させ、振幅には影響を与えなかった。さらに、CCL-1 は一部の膠様質ニューロンにおいて NMDA 電流の振幅を増加させた。これらの結果から、CCL-1 は神経障害後にその発現が上昇し、脊髄膠様質においてグルタミン酸を介した興奮性シナプス伝達の増大や、NMDA 電流の増加を引き起こし、神経障害性疼痛の発現に寄与することが明らかとなった。

神経分化研究部門

【概要】

大脳皮質の情報処理はその神経回路を基盤として成立している。機能的な神経回路の形成には、遺伝的プログラムにより進む過程と、その神経回路の動作を体験・学習を通してより効率化する可塑的調整の2つの段階があり、前者は脳の安定した機能発現につながり、後者は個々の生存環境に適合した脳機能の獲得に重要と考えられる。本研究部門では、大脳皮質で行われている情報処理の基盤となる神経回路やその形成のメカニズムを明らかにすることを目指して研究をおこなっている。昨年度に引き続き本年度も、げっ歯類を中心に、様々な発達段階にある動物、生後発達期に形態視を遮断して飼育した動物、神経回路形成に関連した分子の発現を操作

したマウスの大脳皮質を解析した。大脳皮質のスライス標本に光スキャン刺激法とホールセル記録法を適用した神経回路の機能解析、麻酔動物を対象に多点記録電極により複数のニューロンから同時に視覚反応を記録する視覚生理実験、フラビン蛋白蛍光イメージングや2光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージング、水迷路を用いた視覚弁別課題による視力テスト、越シナプスウィルストレーサーによる形態学的解析を組み合わせ研究を行っている。人事としては8月から山浦洋研究員が加わった。以下に本年度に行った研究内容の要約を記載する。

大脳皮質における細胞系譜依存的な神経細胞間結合の分子メカニズム

足澤悦子, 吉村由美子

平林真澄, 三宝 誠(遺伝子改変動物作製室)

八木 健(大阪大学大学院生命機能研究科)

我々は、細胞系譜依存的な神経細胞間結合の特性と形成メカニズムを解析するために、GFP でラベルされた iPS 細胞を用いて細胞系譜を可視化したキメラマウスを作製した。バレル皮質 4 層の星状細胞間からの同時ホールセル記録を行った結果、細胞系譜依存的に双方向性結合が形成されていた。双方向性結合を規定する分子として、初期胚に発現する DNA メチル化酵素 3b (Dnmt3b) に着目し、Dnmt3b 欠損キメラマウスを用いて神経細胞間

結合を調べた結果、細胞系譜依存的な双方向性結合が減少していた。さらに、Dnmt3b により発現制御を受ける、細胞接着因子のクラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) に着目した。cPcdh 欠損細胞間においても双方向性結合の減少が観察された。以上の結果より、細胞系譜依存的な双方向性結合には、胚発生初期の Dnmt3b によるメチル化と、cPcdh 分子の発現が関与していることが明らかになった。

2 光子励起顕微鏡を用いた、大脳皮質神経回路の形成メカニズム

宮下俊雄, 足澤悦子, 西尾奈々, 吉村由美子

平林真澄, 三宝 誠(遺伝子改変動物作製室)

八木 健(大阪大学大学院生命機能研究科)

本研究では、昨年度導入された 2 光子励起顕微鏡を用い、マウス大脳皮質一次視覚野 (V1) 局所神経回路の形成メカニズムに迫る。本年度は顕微鏡セットアップの最適化を行った。V1 への色素注入システム、頭部固定プレート、イソフルラン麻酔導入部品等を作成した。cPcdh 欠損マウス、および Dnmt3b 欠損マウスより作成したキメラマウスの V1 スライス標本を用いた神経回路解析により、それぞれの欠損細胞への興奮性入力層の特異性が低

下していることを見出したので、これらのキメラマウスの V1 より視覚刺激に応答する神経細胞の生体内 Ca^{2+} イメージングを行っている。KO マウス由来細胞の GFP 蛍光シグナルを Ca^{2+} 感受性色素 OGB1 の蛍光シグナルより分離できることを確認し、KO マウス由来と宿主由来の神経細胞間で視覚刺激に対する反応の違いを検証する事が可能になった。今後は本年度に確立した実験プロトコルにより、実験例を増やし解析を進める。

一次視覚野ニューロンにおける活動同期性の経験依存的発達

石川理子, 吉村由美子

これまでに我々は、ラット大脳皮質一次視覚野 (V1) スライス標本を用いた研究により、視覚野内の微小神経回路網が、開眼直後には存在せず、生後の視覚経験に依存して成熟することを見出した。今年度は、この回路網の機能的役割を明らかにするために、生後の視覚経験を操作したラット V1 の複数細胞から多チャンネル電極を

用いて細胞外記録を行い、視覚反応を解析した。回路網の成熟が細胞間の活動同期性に関わると考え、視覚刺激に対する発火タイミングの同期性を解析した。開眼直後のラット群では、同期した神経活動が観察されず、正常な視覚経験を経たラット群では、類似した視覚反応特性をもつ神経細胞間で高い同期性が観察された。微小回路

網の形成が阻害される両眼瞼縫合群では、このような同期性は観察されなかった。以上の結果より、微小回路網

は、類似した視覚反応性を示す細胞集団の活動同期性を高める機能を担うことが示唆される。

一次視覚野ニューロンにおける空間周波数選択性の経験依存的発達

西尾奈々，石川理子，吉村由美子

我々はこれまでに、発達期にラットの両瞼を縫合して形態視を遮断した状態で成熟するまで飼育すると、一次視覚野ニューロンの多くが低い空間周波数に選択性を示すようになる事を見出している。本年度は、空間周波数選択性の可塑的变化に必要な期間を調べる事を目的として、発達期の様々な期間に両眼を縫合したマウスと正常な視覚体験を経たコントロールマウスにおける一次視覚野の空間周波数特性を、フラビン蛍光イメージングを用いてマクロレベルで解析した。その結果、開眼直

前から4週齢までの2週間、形態視を遮断して飼育したマウスの一次視覚野は、低い空間周波数に対して反応選択性が高くなることが示された。一方、開眼前から3週齢まであるいは3週齢から4週齢まで形態視を遮断した場合の空間周波数特性は、コントロールと同様であった。以上の結果より、空間周波数選択性の可塑性には2週間という比較的長期の形態視遮断が必要である事が示唆された。

心循環シグナル研究部門

【概要】

2013年8月にスタートした心循環シグナル研究部門では、心血管組織の頑健性をストレス適応・不適応を制御するシグナル伝達機構の解析から明らかにしようとしている。今年度は、心不全の治療標的として同定したブリン作動性 P2Y₆ 受容体や TRPC3/6 チャンネルの欠損マウ

スを用いて、これらの機械感受性機構および病態形成における役割解析を行った。さらに活性硫黄の体肺循環・代謝をもとに、全く新しい生体レドックス制御システムの構築にも着手した。以下に各テーマごとの成果を記す。

心血管リモデリングにおける機械感受性 TRPC チャンネルの役割解析

西田基宏，北島直幸

初代培養心筋細胞・平滑筋細胞を用いた解析から、transient receptor potential canonical (TRPC) チャンネル (TRPC3 と TRPC6 のヘテロ 4 量体チャンネル) が機械伸展刺激やずり応力により誘発される持続的な Ca²⁺ 応答を制御する仲介分子であることを見出した。そこで、TRPC3 欠損および TRPC6 欠損マウスに大動脈狭窄による高血圧負荷を施したところ、メカニカルストレスによる代償性の心肥大は全く抑制されないものの、リモデリング

(線維化と拡張機能障害) が TRPC3 または TRPC6 の欠損により強く抑制されることを見出した。また、下肢虚血後の末梢循環に対する TRPC3/6 チャンネルの効果を調べところ、TRPC6 欠損マウスにおいて末梢血流が有意に回復することを見出した。この機序として、TRPC6 が血管成熟を負に制御していること、内皮依存的弛緩因子による TRPC6 のリン酸化が血管平滑筋細胞の筋分化を促進させる(負の制御を解除させる)ことを明らかにした。

P2Y₆ 受容体による心筋細胞－細胞外基質間相互作用の生理的意義の解明

西田基宏, Caroline Sunggip, 西村明幸

P2Y₆ 欠損マウスに大動脈狭窄による圧負荷を施したところ、野生型マウスと比べて顕著に突然死の割合が増加した。生き残った P2Y₆ 欠損マウスも圧負荷 6 週間後の時点で著しい心機能低下(心不全)を起こしていた。ラット心筋由来 H9c2 細胞株に P2Y₆ 受容体を発現させ、機械的伸展刺激を行ったところ、強い Ca²⁺応答が観察さ

れた。この Ca²⁺応答は、P2Y₆ 受容体の細胞外基質タンパク結合 (RGD) ドメインに変異を与えることで有意に減弱した。以上の結果から、P2Y₆ 受容体 RGD ドメインがメカニカルストレスに対する心筋適応(保護)に必要な可能性が示された。

硫黄循環・代謝による心血管恒常性維持機構の解析

西田基宏, 外山喬士, 西村明幸

活性酸素によるタンパク質の酸化的翻訳後修飾は、秩序だった細胞内のシグナル伝達に揺らぎをもたらす要因となる。我々は、硫化水素(H₂S)がガスではなく、求核性の高いイオン(HS⁻)として内因性および外因性の親電子物質の消去に働く可能性を報告した。しかし実際に

は、硫黄は体肺循環を介してグルタチオンなどのシステインチオール基と結合し、ポリ硫黄鎖を形成することで求核性の高い活性硫黄を形成することがわかり、心臓への内因性活性硫黄の蓄積が心筋の恒常性維持に関わることが明らかになってきた。

統合生理研究系

感覚運動調節研究部門

【概要】

初めに 2013 年の人事異動を列挙する。2013 年 3 月末に、和坂俊昭君が名古屋工業大に准教授として、守田知代さんが大阪大学工学研究科に講師として栄転した。新天地での活躍を期待している。4 月には、坂本喜和子さんが特任助教として、本多結城子さんが博士研究員として、中川慧君が NIPS Research Fellow として、小林恵さんが学振特別研究員として新たに採用された。若い力に期待している。10 月には、Sumru KECELI さんが学振外国人特別研究員として採用された。逆に、11 月には、望月秀紀君が米国の Temple 大学の Assistant Professor として採用された。国際的な活躍を期待している。

2013 年も他施設との共同研究が順調に進んでいる。国内では中央大学文学部(山口真美教授)、三重大学医学部(元村英史先生)、奈良女子大学生生活環境学部(中田大貴

先生)、神戸大学文学部(野口泰基先生)、愛知医科大学(西原真理先生、牛田享宏先生)、早稲田大学高等研究所(木田哲夫先生)、千葉大学医学部(桑原聡教授)。また国外では、ドイツ Munster 大学(Prof. Pantev)、Haiderberg 大学(Prof. Treede)との共同研究を行っている。脳波と脳磁図を用いた研究が本研究室のメインテーマだが、最近はそれに加えて機能的磁気共鳴画像(fMRI)、近赤外線分光法(NIRS)、経頭蓋磁気刺激(TMS)を用いた研究も行い成果をあげている。1つのテーマに固執せず、各研究者の自主性に任せて研究を行っていることが本研究室の最大の特徴である。研究テーマの幅が非常に広いことは、以下の研究報告を読んでもいただければ自明の事だと思う。

ウィリアムズ症候群における顔倒立効果の神経生理学的検討

中村みほ(愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所)、渡辺昌子(東尾張病院)

稲垣真澄(国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所)

平井真洋(自治医科大学先端医療技術開発センター)

三木研作、本多結城子、柿木隆介

ウィリアムズ症候群(以下 WS)患者は定型発達成人に見られるような倒立顔処理が正立顔処理に比べて苦手である(すなわち顔倒立効果を認めない)とする報告と、定型発達者と変わらずに顔倒立効果を認めるとする報告が混在している。我々はその認知機能を詳細に調べた WS 患者において、脳磁図および脳波により倒立効果の

発現の有無を検討した。それにより、自験例においても顔倒立効果を認める例と認めない例の存在を明らかにし、その違いは WS に特徴的な視空間認知障害のレベルに依存する可能性があることを示唆した。(Brain Dev 35: 323-330, 2013)

随意運動抑制過程における周波数特性

中田大貴(奈良女子大学生生活環境学部), 坂本貴和子
大塚明香(産業技術総合研究所健康工学研究部門)
湯本真人(東京大学医学部附属病院), 柿木隆介

脳磁図を用い, 体性感覚刺激 Go/No-go 課題時の随意運動抑制過程における周波数特性を検討した。被験者は健康成人 12 人, 左手の第 II 指と第 V 指にリング電極で刺激を与え, ①安静課題, ②第 II 指を Go 刺激, 第 V 指を No-go 刺激, ③第 V 指を Go 刺激, 第 II 指を No-go 刺激, とする 3 つの課題を行った。その結果, 刺激後 600-900 ms において, No-go 試行時にシータ, アルファ, ベータ

活動の peak rebound が見られた。刺激後 300-600 ms において, Go, No-go 試行時にアルファ活動の peak suppression が見られた。刺激後 200-300 ms において, Go, No-go 試行時にベータ活動の peak suppression が見られた。体性感覚刺激 Go/No-go 課題において皮質の周波数活動は, 意思決定, 運動抑制など異なる運動機能を反映していることが示された。(Clin Neurophysiol 124: 273-282, 2013)

ニコチンの体性感覚変化関連脳活動に対する効果

小平 農, 和坂俊昭, 元村英史(三重大学精神神経科)
谷井久志(三重大学神経精神科), 乾 幸二, 柿木隆介

ニコチンには聴覚, 視覚変化を脳内で前注意的に検出する過程を増強する作用があることが知られている。体性感覚変化においても同様な作用がニコチンにあるかどうかを, 脳磁図(MEG)を用いて検査したところ, ニコ

チンは体性感覚変化に伴う脳反応を増強した。感覚変化の前注意的検出過程に対するニコチンの増強作用は, すべての感覚系に共通することを示唆する所見であった。(Neuroscience 229: 20-26, 2013)

光点歩行運動(バイオロジカルモーション)知覚処理に関する発達変化: 2 年間の追跡研究

平井真洋(自治医科大学先端医療技術開発センター)
渡辺昌子(東尾張病院), 本多結城子, 柿木隆介

6 歳から 15 歳までの児童を対象に, 光点歩行運動(point-light walker; PLW)と統制刺激である光点位置を空間的にスクランブルした(scrambled PLW; sPLW)刺激に対する神経活動を, 同一児童を対象に 2 年間に渡り計測した。刺激提示後 130 ミリ秒後にみられた陽性成分(P1)と 200, 300 - 400 ミリ秒後にみられた二つの陰性成分(N1, N2)が両側後側頭部でみられた。P1 成分の振幅, 潜時ともに 1 年の発達に伴い減衰し, N1 ならびに N2 の陰性成分は PLW 条件で sPLW 条件よりも増大し, P1-N1

成分の振幅は 12 歳において 8 歳よりも有意に増大した。また, 両側後側頭部の特定の電極で観察された N1, N2 成分の潜時は発達に伴い減少したものの, 一貫した変化はみられなかった。これらの結果は, 統制刺激である sPLW よりも PLW に対して強い神経活動が全ての群で見られ, 1 年の発達においても初期成分の神経活動が変化することが示された。(Dev Cogn Neurosci 5:51-62, 2013)

視覚刺激誘発脳磁場に対する空間周波数の影響の検討

鶴原亜紀, 永田裕子(東海光学株式会社)

鈴木雅也(東海光学株式会社), 乾 幸二, 柿木隆介

視覚誘発電位を用いた研究では, P100 成分の潜時・振幅への空間周波数の影響が示されている。しかし, 領野間での影響の違いは不明である。本研究では, 視覚刺激として 0.28~18.1cycle per degree の 7 段階の空間周波数のサイン波縞刺激を提示し, 脳磁場を 306 チャンネル全頭型脳磁計で計測し, 視覚刺激誘発活動に対する空間周波数の影響を視覚諸領野で比較した。その結果, 被験者 12 名のうち 11 名で, V1・V6・両側 V2・両側 V3 領域付近に信号源が推定された。V1 と V2 の活動は 80ms, V6

の活動は 120ms 付近にピークが見られ, V1 と V2 の潜時・振幅は空間周波数によって有意に変化し, とともに 4.5cpd の縞で最大となった。一方, V6 と V3 の活動には空間周波数の影響は有意ではなかった。この結果は, 視覚領野間で空間周波数の影響が異なることを示すものであり, V1 と V6 の活動の分離は, 視覚誘発電位を用いた研究では困難であるが, 脳磁場の計測により分離できる可能性が示唆された。(Exp Brain Res 226(3): 347-355, 2013)

痒みや痛みを想像したときの脳活動パターン

望月秀紀, Baumgatner U (Heidelberg University), Kampingc Sandra (Heidelberg University)

Ruttorfd Michaela (Heidelberg University), Schadd Lothar R (Heidelberg University)

Florc Herta (Heidelberg University), 柿木隆介, Treedea Rolf-Detlef (Heidelberg University)

他人の痒みを見たり, 痒みを想像したりすると, 痒くなったり, 体を掻いてしまったりする。このような現象(contagious itch)は以前から知られている。しかしながら, その脳内メカニズムは不明だった。本研究では, 健常者 18 名を対象に, MRI を用いてそのメカニズムについて検討した。痒そうな画像(蚊に刺された皮膚など)や痛そうな画像(怪我をした腕など)を使って被験者に痒みや痛みを想像してもらい, その間の脳活動を MRI を用いて調

べた。痒みを見たり想像したりすると, 島皮質と大脳基底核の機能的ネットワークが強化されることがわかった。このような活動は痛みを想像したときには生じなかった。よって, 島皮質と大脳基底核の機能的ネットワークの活性化が, 痒みを想像すると掻きたくなるという現象に関係することが示唆された。(Pain 154: 1989-1998, 2013)

日本のプロ野球における相対的年齢効果：歴史的分析

中田大貴(奈良女子大学生生活環境学部), 坂本貴和子

1911 年から 1980 年に生まれた日本のプロ野球選手を対象とし, 相対的年齢効果を検討した。相対的年齢効果とは, 生まれ月によって生じる差のことであり, 日本のスポーツで活躍している選手の生年月日を調べてみると, 4~6 月生まれが多く, 1~3 月生まれが少な

いという現象である。日本のプロ野球選手では, 1910 年代に生まれた選手において, すでに統計的に有意な相対的年齢効果が認められ, 1940 年代以降に生まれた選手においては, さらにその効果量が増大した。以上の点から, 相対的年齢効果は, 野球の国際競争, マスメディアによ

る情報の伝達など、社会文化的な要因による影響を受け、**117: 276-289, 2013)**
時代と伴に変動すると推察された。(Percept Mot Skills

子どもの野球パフォーマンスに関係する体力要素

中田大貴(奈良女子大学生生活環境学部), 永見智行(早稲田大学スポーツ科学学術院)
樋口貴俊(立命館大学総合科学技術研究機構)
坂本貴和子, 彼末一之(早稲田大学スポーツ科学学術院)

野球をしている小中学生 164 名を対象とし、投球速度、打球速度に関係する体力要素を検討した。体力要素として、身長、体重、立ち幅跳び、反復横跳び、10 メートル走、背筋力、握力、長座体前屈、月年齢、野球経験月数を評価し、それぞれを独立変数とした重回帰分析を行った。その結果、月年齢、Body Mass index(kg・m⁻²)、立

ち幅跳び、10 メートル走、握力が投球速度に関係した。また月年齢、Body Mass index、立ち幅跳び、背筋力が打球速度に関係した。以上の結果は、小中学生の選手がパフォーマンス向上に向けた身体的トレーニングを行う際において、有益な科学的エビデンスになると考えられる。(J Strength Cond Res 27: **2887-2897, 2013)**

聴覚変化関連脳活動のプレパルス抑制に対するニコチンの効果

小平 農, 鶴原亜紀, 元村英史(三重大学精神神経科)
谷井久志(三重大学神経精神科), 乾 幸二, 柿木隆介

強い刺激により誘発される驚愕反応は先行する弱い刺激により抑制される(プレパルス抑制)。通常、プレパルス抑制は聴覚刺激を用いて瞬目反射で記録し、その抑制効果はニコチンで増強される。一方、聴覚変化に伴う脳反応も先行する弱い聴覚刺激により抑制される。この

抑制効果もニコチンが増強するか、脳磁図(MEG)を用いて検査したところ、増強作用を認めた。驚愕反応と脳反応におけるプレパルス抑制の類似性を示唆する所見であった。(Behav Brain Res **256: 27-35, 2013)**

自己ペース運動時の運動野活動再考

鈴木正隆, 和坂俊昭, 乾 幸二, 柿木隆介

自発運動に関連する脳活動は脳波や脳磁図で明瞭に記録できるにもかかわらず、それらの活動の起源は明らかにされていない。本研究はこの問題を解決すべく、示指自発運動時の脳活動を脳磁図で解析した。運動関連脳活動(movement-related cerebral field, MRCF)は明瞭に記録され、運動前活動(motor field, MF)とそれに続く二相もしくは三相の運動誘発活動から成っていた。MRCF の

起源は運動前野にあり、位置・ダイポールの向きともに全ての成分で差がなかった。正中神経刺激によって得られた初期成分の信号源推定の結果と比較すると、MRCFの信号源位置は3b野の外側、5野の前方、第二次体性感覚野の上方に位置した。これらの結果は、MRCFが一連の運動前野の活動を反映することを示している。(Brain Behav **3: 747-762, 2013)**

注意制御を司る脳内ネットワークの機能的特性の課題関連的变化

木田哲夫(早稲田大学高等研究所), 柿木隆介

本研究ではグラフ理論解析を脳磁場データ解析に適用し、注意制御を司る脳内ネットワークの機能的特性の課題関連的变化を検証した。被験者は手がかり刺激と標的刺激からなる多感覚性注意課題を行った。注意制御中のネットワーク特性を検証するため、手がかり刺激から標的刺激までの区間の MEG 信号を解析した。時間周波数解析では、 β 帯域振動が注意側対側半球で低下した。グラフ理論解析により、注意制御中には感覚運動野や前頭前野で媒介中心性が高いことがわかり、これらの領域

が注意制御中の情報の流れを調節するハブであると考えられた。一方、注意制御中にはクラスター係数の全脳平均値が低下したため、脳は全体として見ると局所的な結合を弱めようとする戦略をとると推測された。以上より、ネットワーク特性は脳内ネットワークの動的特性を理解する上で重要な指標になりうると考えられた。

(*PLoS One* 8: e79023, 2013)

聴覚 P50 成分のプレパルス抑制

乾 幸二, 鶴原亜紀, 中川 慧, 西原真理
小平 農, 元村英史, 柿木隆介

驚愕応答のプレパルス抑制 (PPI) と聴覚 P50 成分の sensory gating は、いずれも感覚情報処理抑制過程の評価に重要である。しかし、複数の先行研究が両者の間に関連がないことを示した。これは異なる指標を用いていることが原因かもしれない。本研究では、聴覚 P50 成分を用いて両者を直接比較した。P50 sensory gating については、2 発目のクリック音に対する大脳応答振幅は、左半球で 43%、右で 47% に減弱した。PPI はわずかな音圧増

加をプレパルスとして用い、変化関連 P50 に対する抑制を検討した。抑制率は 33~65% であった。両者のテスト応答はともに起源が上側頭回にあり、振幅は正の相関 ($r = 0.6$) を示したが、抑制の程度は両者で関連しなかった ($r = -0.1 \sim 0.14$)。このことから、sensory gating と PPI は、異なる抑制過程を反映すると考えられる。(SpringerPlus 2: 588, 2013)

静寂下及び雑音下において時間規則性が聴覚誘発脳磁場反応に与える影響

岡本秀彦, Teismann Henning (Munster University)
Keceli Sumru, Pantev Christo (Munster University), 柿木隆介

周囲の雑音が聴覚誘発神経活動に影響をあたえることが知られている。この研究では、同一の時間間隔で提示される規則的な音と、時間間隔がランダムな不規則な音を用いて。静寂下、及び雑音下において惹起される聴覚反応を計測した。その結果、音が聞き取りやすい静寂

下では、不規則な音が有意に大きい神経活動を惹起したが、雑音下では反対に規則的な音のほうが有意に大きい神経活動を示した。ヒト脳は周囲の音環境に応じて、自動的に聴覚処理に関連する神経活動を調節していると考えられる。(Behav Brain Funct 9(1): 44, 2013)

周波数コントラストがヒト聴覚野における側方抑制に与える影響

Stein, Alwina (Munster University), Engell Alva (Munster University), 岡本秀彦

Andreas Wollbrink (Munster University), Pia Lau (Munster University)

Robert Wunderlich (Munster University)

Claudia Rudack (Munster University), Christo Pantev (Munster University)

先行音が続く音により惹起される神経活動に影響をあたえることはよく知られている。この実験では、先行音として周波数除去雑音を用いて、除去幅や除去端の特性を変化させ、除去された周波数成分の中心に位置する試験音に対する側方抑制の効果がどのように変化する

かを調べた。側方抑制の低下が耳鳴りの悪化につながると考えられており、今回の結果はより有効なリハビリテーション療法の開発などに結びつくと考えられる。

(*PLoS ONE* 8(12): e80899, 2013)

生体システム研究部門

【概要】

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

治療法を探ることを目的としている。

そのために、①大脳基底核を巡る線維連絡を調べる、②課題遂行中の霊長類の神経活動の記録を行う、③大脳基底核疾患を中心とした疾患モデル動物(霊長類・げっ歯類)からの記録を行う、④このような疾患モデル動物に様々な治療法を加え、症状と神経活動の相関を調べる、⑤様々な遺伝子改変動物の神経活動を記録することにより、遺伝子・神経活動・行動との関係を調べることを行っている。

運動課題遂行中のマカクサル赤核小細胞部ニューロンの活動様式

畑中伸彦, 金子将也, 南部 篤

赤核は組織学的に上前方の小細胞部と下後方の大細胞部に別れる。その中でも、小細胞部は大脳皮質運動野(6野と4野)から入力を受け、下オリーブ核に投射を送る。下オリーブ核は反対側小脳へ投射を送るので、その情報の一部は視床を介して大脳皮質に戻される。よって赤核小細胞部は、橋核と同じく、大脳皮質-小脳-視床-大脳皮質というループ回路の入力部にあたる。また、赤核小細胞部は小脳歯状核から視床への投射の軸索側枝も同時に受け取っており、赤核小細胞部と小脳の間には、

更に小さなループ回路を含む複雑な神経連絡を持っている。これまで、運動課題遂行中のマカクサルで、赤核の活動を記録した報告はあるが、それらの活動が小細胞部なのか大細胞部なのかは不明であった。われわれは、ニホンザル大脳皮質上肢運動関連領域に慢性の埋め込み刺激電極を設置し、大脳皮質からの入力を電気刺激によって同定した赤核ニューロン(つまり赤核小細胞部)の、上肢運動課題遂行中の活動様式を調べている。その結果、赤核小細胞部ニューロンは、大脳皮質刺激に対し

て興奮性だけでなく、抑制性にも応答した。運動課題に抑制性に応答する赤核小細胞部ニューロンを記録したのち、GABA_A 受容体のアンタゴニストである Gabazine を記録中ニューロンの周囲に微量注入すると、運動課題

遂行中の抑制性応答が消失し、運動中の活動の増加が観察された。この結果は、赤核小細胞部が GABA 作動性の抑制性入力を受け取り、その活動を複雑に調整していることを示唆している。

大脳基底核出力核における上肢運動課題遂行中の活動調節

金子将也，畑中伸彦，南部 篤

淡蒼球内節と黒質網様部は、大脳基底核の出力核であり、その活動は大脳基底核－大脳皮質連関に大きく影響を与えると考えられる。その淡蒼球内節には時間的に異なる3つの入力が大脳皮質よりもたらされる。1)大脳皮質－視床下核－淡蒼球内節路(ハイパー直接路)は淡蒼球内節ニューロンを短潜時で興奮させる。2)大脳皮質－線条体－淡蒼球内節路(直接路)が続いて淡蒼球内節ニューロンを抑制する。3)大脳皮質－線条体－淡蒼球外節－視床下核－淡蒼球内節路(間接路)が再び淡蒼球内節ニューロンを興奮させる。また、大脳基底核の中継核である淡蒼球外節ニューロンも、視床下核と線条体からの入力を受けており、淡蒼球内節・外節ニューロンは拮抗する興奮性・抑制性入力によってどのように調節されているかを調べることは重要である。上肢運動課題遂行中のサル淡蒼球内節ニューロンにおいて、単一ユニット記録と神経遮断薬の微量注入を併用し、興奮性・

抑制性入力それぞれがどのように関わっていたか検討した。その結果、以下のような結果を得た；1)グルタミン酸作動性成分と GABA 作動性成分の両方が、運動に関連した淡蒼球内節・外節の神経活動に寄与しており、それらの強度はニューロン間で異なっていた；2)グルタミン酸作動性成分と GABA 作動性成分は、半数以上の淡蒼球内節・外節ニューロンにおいて、運動開始に先行していた；3)グルタミン酸作動性成分と GABA 作動性成分は、運動の方向によって、その大きさを変化させた；4)興奮性のグルタミン酸作動性成分と抑制性の GABA 作動性成分以外にも、影響は小さいが脱促進と考えられるグルタミン酸作動性成分と脱抑制と考えられる GABA 作動性成分が観察された；5)淡蒼球内節において遅延期間中にグルタミン酸作動性成分が観察された；6)薬物注入により行動の変化は観察されなかった。

我慢をする脳内メカニズム ―視床下核の新たな機能を探る―

橘 吉寿，南部 篤

視床下核は、大脳基底核の主要な入力部の一つである。もうひとつの入力部である線条体、あるいはドーパミン細胞が注目されているのに対し、視床下核はとりわけ忘れられた存在である。しかしながら、この小さな核には重要な機能が隠されている。実際、視床下核が破壊されると不随意運動のひとつであるバリスムが生じる。また、パーキンソン病の発現に視床下核の活動亢進を伴う

報告が数多くなされている。このように、視床下核は運動制御、とりわけ「運動抑制」に深く関与すると考えられてきた。この運動機能に加えて、視床下核と認知・情動を司る大脳皮質との線維連絡が最近報告された。眼球運動課題を訓練したニホンザルの視床下核から神経活動を記録したところ、「我慢する」という機能が視床下核に備わっていることが明らかとなった。

小脳入力と大脳基底核入力の視床－大脳皮質投射への作用

知見聡美, 川口泰雄, 木村 實(玉川大学), 南部 篤

小脳と大脳基底核は、随意運動の発現と制御において重要な役割を果たす高次中枢であり、どちらも視床を介して大脳皮質との間でループ回路を形成するが、大脳皮質－小脳ループと大脳皮質－大脳基底核ループとのそれぞれにおいて、運動情報がどのように伝達されるのか、よくわかっていない。本研究では、覚醒下サルの小脳核(CN)と淡蒼球内節(GPi)に電気刺激を加え、視床ニューロンの応答を解析した。視床－大脳皮質投射ニューロンは、CN の単発刺激に対して興奮とそれに続く抑制とい

う 2 相性の応答を示し、50－100 Hz の連続刺激では各刺激パルスに対応する興奮と抑制が観察された。一方、GPi の単発刺激は抑制とそれに続く弱い興奮という 2 相性の応答を惹起し、50－100 Hz の連続刺激を加えると刺激期間中に強い興奮が生じる例が多く観察された。GPi－視床投射は GABA 作動性投射であることから、抑制は GABA によるもの、それに続く興奮はリバウンドによるものと考えられる。

大脳皮質－線条体経路の選択的な興奮誘導

佐野裕美, 小林憲太, 加藤成樹(福島県立医科大学), 知見聡美, 小林和人(福島県立医科大学), 南部 篤

線条体と視床下核は大脳基底核の入力部であり、主に大脳皮質のグルタミン酸作動性ニューロンから入力を受ける。大脳皮質－線条体経路と大脳皮質－視床下核経路には各々に特異的に発現する受容体や分子はこれまでに報告されておらず、薬理学的手法や分子遺伝学的手法を用いたトランスジェニックマウスの作製によって各々の経路の神経生理学的役割を解析することは難しかった。

そこで、逆行性に遺伝子導入が可能なレンチウイルスベクター(FuGC ベクター)と、アデノ随伴ウイルス

(AAV)ベクターとの 2 重感染を利用して、Cre-loxP システムによる遺伝子導入法を用いて、光駆動性陽イオンチャネルであるチャネルロドプシンを大脳皮質－線条体経路に発現させようと試みた。その結果、大脳皮質－線条体経路に高効率かつ高発現量のチャネルロドプシンを発現させることができた。そこで、大脳皮質に記録電極と光ファイバーを接着したオプトロードを刺入し、青色光を照射したところ、光照射に応じた顕著な興奮が認められた。さらに、光刺激に応じて運動が誘導された。

線条体投射ニューロンの選択的な興奮誘導

佐野裕美, 知見聡美, 尾崎充宣, 田中謙二(慶應義塾大学), 南部 篤

大脳基底核の入力部の一つである線条体には、線条体－黒質投射ニューロンと線条体－淡蒼球外節ニューロンの二種類が存在する。線条体投射ニューロンの生理学的な役割を解明するため、線条体－黒質投射ニューロンと線条体－淡蒼球外節ニューロンの両方に光駆動性陽イオンチャネルであるチャネルロドプシンを発現するトランスジェニックマウス(PDE10A2-tTA::tetO-ChR2 マウス)と、線条体－淡蒼球外節投射ニューロンにチャネルロドプシンを発現するトランスジェニックマウス(D2-tTA::tetO-ChR2 マウス)を利用した。そして、線条体に記録電極と光ファイバーを接着したオプトロードを刺入し、青色光を照射したところ、いずれのマウスにおいても光照射に応じた顕著な興奮が認められた。さらに、PDE10A2-tTA::tetO-ChR2 マウスにおける線条体の光刺

激に対する応答を、大脳基底核の出力核である黒質網様部において記録したところ、抑制あるいは抑制－興奮と

いう光照射に応じた一過性の応答が認められた。

ジストニンノックアウトマウスにおける筋収縮

佐野裕美, 堀江正男(新潟大学), 知見聡美, 竹林浩秀(新潟大学), 南部 篤

Dystonin(ジストニン)はマウスの遺伝学的なジストニアの原因遺伝子であり, Dystonin-a アイソフォームを欠損するマウスでは, 姿勢異常や身体のだんねなど典型的なジストニアの表現型が認められている。そこで, このマウスにおける筋電図を記録した。その結果, 周期的な筋

収縮が認められ, さらに伸筋と屈筋が同期して収縮することが野生型マウスと比較して有意に多かった。これらの表現型はジストニアにおける筋収縮の特徴と一致しており, このマウスはジストニアのモデルマウスと位置付けることができた。

ハンチントン病モデルマウスを利用した病態生理学的解析

Dwi Wahyu Indriani, Ratchanee Rodsiri (Chulalongkorn Univ.), 佐野裕美, 南部 篤

ハンチントン病は大脳基底核を構成する線条体の投射ニューロンの脱落に起因する遺伝性の神経変性疾患であり, 舞踏運動などの不随意運動を示す。これまでに, ハンチントン病のモデルマウスが作製されており, これらのマウスの大脳基底核から神経活動を記録することにより, ハンチントン病の病態生理学的解析を行おうと試みた。実験にはハンチントン病モデルマウスである

YAC128 と BACHD を利用し, これらのマウスを覚醒下で無痛的に脳定位固定装置に保定し, 大脳基底核を構成する神経核から神経活動を記録した。淡蒼球外節および黒質網様部における自発発火を記録したところ, 自発発火頻度にも自発発火パターンにも野生型マウスと比較して有意な変化は認められなかった。

運動－体性感覚皮質と大脳基底核の神経ネットワークの解明

額額大輔, 畑中伸彦, 南部 篤

マーモセットを用いて一次運動野(M1), 体性感覚皮質3a 野及び, 3b 野の大脳基底核との神経連絡を調べた。まず, 皮質内微小電気刺激と体性感覚刺激に対する細胞応答記録を行い, M1, 3a 野, 3b 野の皮質マップを作成した。このマップを参考にして, M1, 3a 野, 3b 野の前肢領域に刺激電極を埋め込み, それぞれの皮質への電気刺激に対する線条体での順行性応答を記録し, 各皮質領域からの線条体への入力範囲を電気生理学的に同定した。M1, 3a 野, 3b 野それぞれの皮質から線条体の外背側部に入力を確認されたが, M1 からはより広い範囲に

入力があるのに対して, 3a 野及び 3b 野からは限局した範囲にしか入力はなかった。3a 野及び, 3b 野からの入力範囲は M1 からの入力範囲の中心に位置し, 3a 野と 3b 野からの入力範囲はほぼ同じであった。したがって, 運動情報と体性感覚情報は線条体で収束して処理されるが, 運動情報が支配的であることがわかった。今後は大脳基底核の出力部位である淡蒼球内節での M1, 3a 野, 3b 野それぞれからの入力応答分布を解析する。また, M1, 3a 野, 3b 野と大脳基底核の解剖学的な連絡関係も調べていく予定である。

計算神経科学研究部門

【概要】

計算神経科学研究部門では、神経細胞・神経回路網の非線形ダイナミクスが、脳機能にいかに関わっているかを解明し脳型コンピュータの基本原則を構築することを目指している。中でも記憶や注意などの高次機能の発現に、多安定性、引き込み、カオス、遷移ダイナミクスなど、非線形動力学系の豊かな特質がいかに関わっているかを探索している。

いるかについて、数理モデルによる解析を行い、実験的に検証可能な予測を試みている。また conductance injection (dynamic clamp) 法を用いた数理的方法と in vitro 生理学の融合や、脳科学ビッグデータの非線形解析手法の開発なども行い、現実に即した数理モデル化の方法を探索している。

短期的シナプス可塑性と新しい神経ダイナミクスの描像

香取勇一(東京大学), 合原一幸

脳内では多数の神経細胞(ニューロン)がシナプスを介して結合し、信号を伝達することで多様な神経ダイナミクス、柔軟な情報処理機構を生み出している。近年シナプスの信号伝達強度が様々な要因により短期間のうちに変化することが明らかになってきた。シナプスの信号伝達効率が短時間のうちに大きく増大(促進型シナプス)あるいは減少(減衰型シナプス)する短期的シナプス可塑性の特性は、神経ネットワークのダイナミクス、脳の情報処理に大きな影響を与えると考えられるが、その詳細は明らかではない。我々は短期的シナプス可塑性の影響を数理モデルを用いた数値計算や非線形動力学などの理論解析により検証している。セル・アセンブリ、すなわちシナプスを介して互いに強く結合したニューロンのグループが活動する状態は、脳内での情報処理の基本単位とも解釈することが出来、力学系のアトラクタ状態として特徴付けられる。我々は短期的シナプス可塑性による実効的なネットワーク構造の変化にともない、セル・アセンブリの構成とアトラクタ構造が動的に変化するという描像を提案し、神経ダイナミクスを新しいアプローチで理解しようと試みている。スパイクング・ニューロンを基に構成した神経ネットワークモデルの数値実験や神経集団のダイナミクスを扱うための平均場モデルを用いて、その特性を解析した。特に前頭前野の柔軟な情報表現に関する研究では、ネットワーク構

造・アトラクタ構造の変化にともない、局所的な神経ネットワークの情報表現における役割が動的に変化することを示し、生理実験データと併せて検証し、その妥当性を示した。また前頭前野における行動の計画・実行に関する数理モデルの研究では、短期的シナプス可塑性がシナプス性のワーキング・メモリーとして機能し、系列的動作の生成に重要な役割を担う可能性を示している。

さらに我々はニューロンの状態が2値変数で表されるスピン・モデルを基に短期的シナプス可塑性を持つ神経ネットワークモデルを構築、対応する平均場モデルを導出することで、その特性を多面的に解析している。均一なネットワーク、連想記憶ネットワーク、スパースな記憶パターンネットワーク、興奮性・抑制性ニューロンからなるネットワークなど様々な神経ネットワークの特性、分岐構造を解析し、短期的シナプス可塑性が振動現象、記憶パターン間の状態遷移などの多様な神経活動ダイナミクスを生じさせることを示した。

これらの神経ダイナミクスの研究は、生理・医学的な観点からの脳の理解をとおり、関連する疾患の理解・治療などへの臨床的応用の可能性があるだけでなく、脳の柔軟な情報処理装置としての側面を、新しい脳型コンピュータなどへ応用するなど、工学・情報科学的な応用へと発展していくと期待される。

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

【概要】

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

具体的な研究テーマとしては、1) グルタミン酸受容体および GABA 受容体と各種チャネル分子の脳におけ

る電子顕微鏡的局在を定量的に解析し、脳機能との関係を明らかにする。2) これらの分子の発達過程や記憶、学習の基礎となる可塑的变化に伴う動きを可視化し、その制御メカニズムと機能的意義を探索。3) 電依存性カルシウムチャネルの脳内微細構造上の局在を明らかにし、カルシウムシグナルにより制御されている種々の生理現象の分子基盤を明らかにする。4) 脳のシナプスやグルタミン酸受容体局在の左右差とその生理的意義を探索。

電位依存性カルシウムチャネル配置の変化と機能

Dwi Wahyu Indriati, 原田春美, 重本隆一

脳における情報処理が正常に機能するためには、シナプス伝達効率の最適化が必須である。聴覚系のシナプスでは特に、数百 Hz 以上の速度で送られてくる信号を正確に伝達する機能が必要である。ラットでは、生後3週間で聴覚系の機能が完成するが、それまでの間にシナプスの成熟が迅速に行なわれる。我々は、聴覚伝導路に位置する calyx of Held(前蝸牛核神経終末端)と MNTB(台形体核)主要神経細胞が形成する巨大シナプスの発達過程に着目し、シナプス前細胞における電位依存性カルシウムチャネルの局在を解析した。また小脳の顆粒細胞-プルキンエ細胞シナプスにおいても P/Q 型チャネルの機能がよく研究されているので、このシナプスにおける電位依存性カルシウムチャネルの局在を解析した。Calyx of Held と MNTB 細胞体上に形成されるグルタミン酸作動性シナプスは、凍結割断レプリカ像では、大きな細胞体とその周囲に密着した扁平な構造として観察されるため、細胞膜上に発現する受容体やチャネルの二次元的配置を解析するのに適している。Calyx of Held からのグルタミン酸放出は電位依存性カルシウムチャネルのうち主に P/Q 型によって引き起こされるカルシウムイオン

流入がトリガーとなる。P/Q 型チャネルを形成する Cav2.1 サブユニットの配置をレプリカ標識法により解析したところ、生後1週目では細胞膜に散在していたカルシウムチャネルが、生後2週目に開口放出部位(アクティブゾーン)に局在する様子が明らかになった。シナプス前細胞におけるカルシウムチャネルの局在変化の過程は、シナプス後細胞における受容体の凝集過程とよく一致しており、聴覚系における正確で素早いシナプス伝達を実現するために、シナプス前後細胞が協調して構造のチューニングを行なっていることが解明された。これらのカルシウムチャネルはアクティブゾーン内で数個から数十個のチャネルからなるクラスターを形成していた。さらに共同研究者の calyx of Held におけるカルシウムイメージングデータや電気生理学的結果と照らし合わせることで、カルシウムチャネルのクラスター周囲に小胞が位置して放出が起こるモデルが最も実験結果をうまく説明できることが明らかになった。小脳顆粒細胞-プルキンエ細胞シナプスにおいても P/Q 型チャネルはクラスターを形成していたが、強い刺激の後ではカルシウムチャネルの数やクラスターリングがダイナミッ

クに変化していることも明らかになった。

R 型電位依存性カルシウムチャネルの神経細胞膜上分布と役割

Laxmi Kumar Parajuli, Pradeep Bahndari, 重本隆一

神経細胞の興奮性は細胞膜上に発現しているイオンチャネルにより制御されている。中でも電位依存性カルシウムチャネルは神経細胞の活動依存的にカルシウムを流入することによって、細胞の電気的な興奮と細胞内セカンドメッセンジャー系の両方を調節し、種々の神経細胞の現象に関与する重要な分子である。しかし、その分布を正確に解析することは、電気生理学的にも解剖学的にも困難であり、不明な点が多く残されている。我々はシナプス可塑性やてんかん発作の発生に関与が指摘されている R 型カルシウムチャネル, Cav2.3 サブユニットの特異抗体を樹立し、マウス脳内の発現分布と共に海

馬 CA1 錐体細胞の細胞膜上の分布を免疫電子顕微鏡法を用いて定量的に解析した。この結果、この電位依存性カルシウムチャネルが樹状突起や樹状突起スパインの細胞膜上に非常に低密度で、散在的に発現している他、medial habenula-interpeduncular nucleus の投射路の神経終末上に集中的に局在していることを明らかにした。また Cav2.3 サブユニットのノックアウトマウスを解析したところ各種の行動学的異常が明らかになった。現在、medial habenula-interpeduncular nucleus の投射路に発現する R 型カルシウムチャネルの役割を解析するためにレスキューマウスを作成中である。

海馬における入力側依存性左右非対称性

Matthew Julian Case, 重本隆一

神経細胞はシナプスを介して機能的に結合し、情報伝達することで、脳の情報処理機構を担い、また、その機変化が学習・記憶の細胞レベルの素過程であると考えられている。グルタミン酸を介したシナプス伝達は、脳内の主要な興奮性シナプス伝達であり、シナプス前細胞から放出されたグルタミン酸がシナプス後細胞のグルタミン酸受容体に結合することで、興奮が伝達される。従って、シナプス後に発現するグルタミン酸受容体の種類や量、また、その分布が個々のシナプスでの伝達特性の調節に深く関与し、これらの変化が記憶形成に重要な役割を持つと考えられる。我々は、シナプスが脳の左側から情報を得るかあるいは右側からかによって、グルタミン酸受容体サブユニットの数やシナプスのサイズが異なることを明らかにした。さらに分離脳マウスを使った行動実験で、右側の海馬を主に使うマウスは左海馬を使うマウスに比べて空間学習能が優れていることを報告した。分離脳マウスに新規環境の探索を行かせた 90 分後に c-Fos 発現で神経細胞活動亢進を左右で比較した

ところ、右側の海馬を主に使うマウスのみならず左側の海馬を主に使うマウスでも、右側海馬歯状回で左側の 2 倍以上の陽性細胞を見出した。グルタミン酸受容体サブユニットの数やシナプスサイズに関する入力側依存性海馬シナプスの左右非対称性が失われている内臓逆位変異マウス iv mouse でも結果は同じであったことから、この左右非対称性の形成メカニズムは従来内臓で知られていた非対称性形成メカニズムとは異なることが明らかになった。また別の遺伝子変異マウスである beta microglobulin 欠損マウスでも、左右非対称性が失われていることを明らかにした。このマウスでは MHC classI 分子が細胞膜上に発現しない。MHC classI はこれまで視覚神経伝達路の発達に重要な役割を果たしていることが知られていたが、海馬における入力側依存性左右非対称性の発達にも必須の役割を持っていることが明らかになった。現在さらに数種の変異マウスを解析中であり、入力側依存性左右非対称性の形成メカニズムを解明したいと考えている。

シナプス接着因子 Neuroligin/Neurexin を標的とした自閉症モデル動物の評価・確立

Wen-Hsin Chang, Nur Farehan Mohamed Asgar, 田渕克彦

Neuroligin/Neurexin は異なるファミリーに属する細胞接着因子で、Neuroligin はシナプス後終末、Neurexin はシナプス前終末に局在し、これらがカルシウム依存的に結合することにより、シナプスの形成及び機能的成熟に寄与していると考えられている。近年、Neuroligin および Neurexin の遺伝子異常が自閉症患者から発見されたことから、これらの分子の機能異常が自閉症の原因と関係しているのではないかと考え、ヒトの自閉症患者から見つかったこれらの変異を再現した遺伝子改変マウスを作成し、自閉症の病態と関連づけて解析を行っている。我々は以前の研究で、Neuroligin-3 の細胞外のアセチルコリンエステラーゼ様ドメイン内の 451 番目のアルギニン をシステインに置換した変異は、マウスにおいても自閉症特有の社会行動の異常と、空間学習記憶能力の増強を

引き起こすことを見出している。現在進行中の研究として、このマウスのシナプス機能を調べたところ、R451C 変異は大脳皮質においては抑制性シナプス機能の増強を引き起こすのに対し、海馬では興奮性シナプス機能の増強を引き起こすという、脳の領域ごとに異なる効果を示すことを見出した。さらなる詳細な電気生理学的解析により、大脳皮質では GABA 受容体機能、海馬では NMDA 受容体 2B サブユニットの機能亢進が見られることがわかってきた。また自閉症患者から見つかった別の変異である R704C 変異（細胞内領域の 704 番目のアルギニンがシステインに置換された変異）を再現した Neuroligin-3 のノックインマウスでは、R451C マウスとは異なり、海馬において AMPA 受容体機能の減弱が認められたが、GABA 受容体機能に変化は見られなかった。

グリア細胞刺激による神経活動および神経細胞死の制御

別府 薫, 重本隆一, 松井 広

脳における情報処理は、ニューロン活動によって担われていると考えられている。ニューロンはグリア細胞と密接な連絡を取っているが、グリア細胞の脳内情報処理における役割を証明するには、グリア細胞からニューロンへのシグナル伝達の実態が解明される必要がある。本研究では、チャンネルドプシン 2 をアストロサイトに選択的に発現した遺伝子改変マウスを用いて、この課題に取り組んだ。In vivo の条件下において、これらのアストロサイトを光刺激すると、神経活動が誘発された。また、スライス標本を用いた解析から、グリア細胞の光刺激により、グルタミン酸が放出され、小脳プルキンエ細胞の

AMPA 受容体を活性化させることが明らかになった。また、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスにおいては、グリア細胞の光刺激により、長期的な可塑性が観察された。さらに虚血によるグリア細胞の酸性化がグルタミン酸の放出を引き起こし、神経細胞死を誘導することが明らかになった。光により活性化するプロトンポンプとして機能するアーキロドプシンをアストロサイトに選択的に発現した遺伝子改変マウスと脳梗塞モデルを用いて、グリア細胞の光刺激により細胞内酸性化を抑制し、小脳における虚血ダメージを縮小することが可能である事も示された。

大脳神経回路論研究部門

【概要】

大脳皮質は多くの領域から構成され、それらが機能分担をすることで知覚、運動、思考といった我々の知的活

動を支えている。大脳皮質がどのようにしてこのような複雑な情報処理をしているかは未だに大きな謎になっ

ている。この仕組みを知るためには、皮質内神経回路の構造と機能を明らかにする必要がある。新皮質回路を構成するニューロンは形態的に極めて多様であることが知られているが、この多様性を理解することが皮質機能の解明には不可欠であると考えている。本部門では、皮質出力がどのように作られるという観点から、皮質局所回路の構築原理を解明することを目標としている。そのために、多様な皮質領域や皮質下構造に投射する前頭皮質を構成する錐体細胞や、GABA 作働性介在細胞の

ニューロンタイプを、分子発現・生理的性質・軸索投射・樹状突起形態など多方面から同定した上で、これらの神経細胞間のシナプス結合を電気生理学・形態学の技術を組み合わせて調べている。本年度は、抑制性シナプス微細構造、シナプス後細胞に依存した抑制性伝達特性、皮質領野間投射選択性、錐体細胞初期軸索形成の解析を行うとともに、錐体細胞の層特異的光刺激法の開発や *in vivo* での投射サブタイプの発火記録を行った。

大脳皮質錐体細胞の抑制性シナプスの動態解析と微細構造

窪田芳之, 塩津千尋, 北 啓子

Katie L Villa, Elly Nedivi (マサチューセッツ工科大学(アメリカ))

マウスの大脳皮質視覚野の表層の錐体細胞の樹状突起上の抑制性シナプスを Teal-gephyrin で、また、興奮性シナプスを mCherry-PSD95 でラベルし、棘突起の動態変化も加味し、*in vivo* で、2 光子レーザー共焦点顕微鏡で観察し、それらの動態を明らかにした。その結果、樹状突起の幹にある抑制性シナプスよりも棘突起に存在する抑制性シナプスに、より可塑的な動態変化を見つけた。数日の単位で抑制性シナプスが出現したり消失したり

を繰り返すシナプスを、消失直後に電子顕微鏡を使った 3 次元再構築法で確認した。シナプスとしての形態的な条件を完全には満たしていないものの、前神経終末の膨らみや少数のシナプス小包、ごく小さいクレフト構造等を確認した。たとえシナプスが消失しても、次のシナプス形成に即対応できるように、ある程度、形態的構造を保持している事が推測できた。

光刺激によって誘発される皮質細胞の膜電位振動

大塚 岳, 川口泰雄

大脳皮質は外界からの入力を視床を介して上層で受け、情報処理を行った後に下層の錐体細胞を介して様々な脳領域に出力を行う。今回、2/3 層から 5 層への情報処理様式を検討するために、子宮内電気穿孔法を用いて 2/3 層錐体細胞群にチャネルロドプシンを発現させた脳切片(前頭皮質)において、光刺激によって誘発される神経活動について 5 層の細胞で検討した。その結果、2/3 層錐体細胞群への光刺激によって 5 層錐体細胞と介在細胞

である Fast-spiking (FS) 細胞において、膜電位のオシレーション活動が観察された。誘発された活動の同期性を検討するために、同時記録を行い膜電位の相互相関解析を行った。錐体細胞間や錐体細胞 / FS 細胞間で膜電位変動は同期していたが、錐体細胞 / FS 細胞間では同期性に時差が見られた。5 層で観察された膜電位振動の発生に錐体細胞と FS 細胞間の結合が関与していると考えられる。

前頭皮質 5 層錐体細胞と抑制性細胞のシナプス結合特性

森島美絵子, 川口泰雄

前頭皮質 5 層には投射先が異なる 2 種類の錐体細胞, 橋核投射細胞 (CPn 細胞) と対側線条体投射細胞 (CCS 細胞) がある。この二種類の錐体細胞では, シナプス結合選択性と伝達特性が異なる。近年, 新皮質 GABA 細胞が錐体細胞に対してランダムに抑制性シナプスを作ることが報告されているが, 投射サブタイプに依存した選択的抑制があるかどうか不明である。この点を検討するため, GABA 細胞の主要なサブタイプである FS 細胞と逆

行性蛍光標識法により同定した錐体細胞サブタイプからの二細胞ホールセル記録法で, シナプス結合様式と伝達特性を調べた。結合様式では, 抑制性結合確率, 及び興奮性結合確率に差が見られなかった。短期可塑性では, CPn 細胞からの FS 細胞への興奮性シナプスの方が CCS 細胞からのものに比べてより促進型であり, 周波数依存的な変化も見られた。

初期軸索形成による大脳皮質興奮性細胞の分類

畠中由美子, 服部宣子, 川口泰雄

大脳皮質興奮性神経細胞は層毎に特徴的な軸索投射を示す。これまでこれら細胞の初期軸索形成過程を調べ, (1) 分化直後に軸索を形成すること (2) 伸長方向は外側, 内側のいずれかであること (3) 早期に分化した細胞は外側に, その後分化した細胞は内側に伸長することを明らかにした。本年度は, 初期投射から 2 分される細胞群と成熟投射神経細胞との対応を引き続き調べた。分子発現ならびに最終的層分布を解析した結果, 外側投射ニュー

ロンは深層に分布する皮質下投射ニューロン, 内側投射ニューロンは全層に分布する脳梁投射ニューロンに該当することがわかった。これらニューロンが混在する 5 層においても, 皮質下投射ニューロンが脳梁投射ニューロンよりも先に分化のピークを迎えていた。以上の結果より, 大脳皮質興奮性神経細胞は, 早期に分化する皮質外投射ニューロン群とその後分化する脳梁投射ニューロン群の 2 つに分類されることが明らかとなった。

皮質領域間結合からみた錐体細胞の多様性

植田禎史, 平井康治, 大塚 岳, 川口泰雄

前頭皮質は皮質下の神経核だけでなく, 多様な皮質領域とも結合する。しかし, 多様な皮質下・皮質間投射に対応した錐体細胞分化則はよくわかっていない。5 層錐体細胞は皮質外軸索投射から大きく, 同側橋核投射細胞 (CPn 細胞) と反対側皮質投射細胞 (COM 細胞) に分かれる。COM 細胞の一部は対側線条体へも投射する。そこで, ラット前頭皮質の同側皮質間投射細胞を逆行標識で投射先ごとに同定し, その分子マーカー発現や発火パ

ターンを解析することで, CPn 細胞や COM 細胞との関係を調べた。COM 細胞は近傍の前頭皮質領域だけでなく, 遠隔皮質にも投射していた。遠隔皮質投射 COM 細胞の多くは, 反対側線条体にも投射していた。一方, CPn 細胞の一部も皮質間投射に関与していたが, それは主に近傍皮質への投射に限られていた。錐体細胞が皮質下・皮質間投射の両方の多様性に対応して規則的に分化していることが明らかになった。

前頭皮質第 5 層ニューロンの in vivo での発火様式

牛丸弥香, 川口泰雄

前頭皮質 5 層では、錐体細胞サブタイプには橋核投射細胞と対側線条体投射細胞があり、GABA 作働性細胞の主要なサブタイプには FS (fast spiking) 細胞がある。これら 3 つのサブタイプで、皮質徐波状態の脱分極状態 (Up 状態) での発火様式を比較した。錐体細胞サブタイプは同側橋核・対側線条体からの逆行性応答で同定し、細胞内染色で樹状突起形態・5 層内位置を調べた。FS 細胞はスパイク波形と、分子マーカーであるパルプアルブミン

免疫組織化学で同定した。スパイク間隔分布はニューロン種で異なり、橋核投射細胞に 10 ミリ秒以内のものが有意に多かった。Up 状態ではガンマ振動が入れ子リズムとして見られた。3 種のサブタイプともにガンマ振動と同期発火するスパイクが見られたが、その発火する位相は異なっていた。Up 内でのバースト発火やガンマ振動同期性は、ニューロンタイプごとに特異化していることがわかった。

前頭皮質局所回路特性を取り入れた強化学習の閉回路モデルとドーパミン作用仮説

森田賢治 (東京大学), 森島美絵子, 川口泰雄

ドーパミン細胞の上流にある、前頭皮質と線条体の内部回路特性の知見に基づき、報酬予測誤差を計算する仮説を提案した。感覚情報が新皮質に到達すると、それに対する行動プランが生成される、そのプランが別の種類の神経細胞集団に送られ、集団内相互作用によって、そこで保持される。プランが実行されると、それによってもたらされた価値の情報がドーパミン細胞に送られる。そして、立案時での期待値との誤差が計算され、相当す

る量のドーパミンが分泌される。分泌されたドーパミンの作用によって、プランの実行に関わる神経結合が強化され、次の機会には、プランがより実行され易くなる。プランの実行によってもたらされた価値が、あらかじめ期待されたものと同じだった場合には、ドーパミンは分泌されず、神経結合の強化は起こらない。そして、この仮説が報告されている幾つかの実験結果をうまく説明できることを示すとともに、検証可能な予測を導出した。

心理生理学研究部門

【概要】

認知、記憶、思考、行動、情動などに関連する脳活動を中心に、ヒトを対象とした実験的研究をすすめている。脳神経活動に伴う局所的な循環やエネルギー代謝の変化をとらえる脳機能イメージング (機能的 MRI) と、時間分解能にすぐれた電気生理学的手法、更には眼球カメラや motion capture による定量的行動計測手法を統合的に

もちいることにより、高次脳機能を動的かつ大局的に理解することを目指す。言語・非言語性のコミュニケーションを含む人間の社会行動の神経基盤を明らかにするため、3 テスラ MRI 2 台を用いて、社会的相互作用時の 2 個体同時脳機能計測を行い、共同注意を始めとする共同作業の神経基盤をあきらかにしつつある。

視覚脱失が線条体外身体領域の形成に与える影響

北田 亮, 吉原一文 (九州大学病院心療内科), 佐々木章宏 (理科学研究所), 橋口真帆
河内山隆紀 (ATR promotions), 定藤規弘

高次視覚野には体部位に対し選択的に強く活動する領域(線条体外身体領域, EBA)が存在する。晴眼者のEBAは触覚を用いて認識した体部位に対しても選択性を示すことを応用し, 視覚脱失がEBAの形成に与える影響を検討した。視覚障害者が物体模型(身体部位・車・急須)を識別しているときの脳活動をfMRIで測定した。背側部の体部位選択性は失明年齢と無関係であり, 晴眼者と差がなかった。腹側部は失明年齢に正相関した体部

位選択性を示し, 中後頭回では失明年齢によらず体部位選択性が失われていた。これらの結果は, EBAは視覚経験に依存する領域としない領域から形成されていることを示している。次にEBAのうち視覚経験に依存しない領域は, 運動野・体性感覚野から身体に関する情報を受け取るために, 形成されるという仮説を検証する。この仮説を検証する予備実験を実施した。

柔らかさと心地よさの関係性に関する心理物理学的研究

北田 亮, 定藤規弘

ヒトは物体と接触することで, 心地よさや不快さを経験する。物体との接触が引き起こす感情的な反応は, 子供が健やかに発達したり, 大人が精神の健康を維持する上で重要かもしれない。そこで「物体のどのような素材が心地よいのか」に関する心理物理学的研究を行っている。我々はこれまでに触覚粗さ知覚と不快さの関係性を

心理物理学的に明らかにした。次に触覚柔らかさ知覚と心地よさの関係性について検討を行うべく, 刺激を開発した。物理的硬さが異なるポリウレタンゲルを12種類用意し, この素材に対する物理的硬さの定量手法を確立した。次に速度と圧力を操作可能な刺激呈示装置の開発を行う予定である。

幸福及び悲しみの顔表情による情動伝染の神経基盤

原田宗子, 林亜希子 (名古屋大学大学院医学系研究科), 定藤規弘
飯高哲也 (名古屋大学大学院医学系研究科)

顔表情は, 他者に自己の感情を伝えたり, 他者の感情を推測する上で重要な情報の一つである。これまでに, 他者が感情を表出した顔表情を見た際に, 観察者に同じ感情が惹起されることが示されており, 情動伝染と呼ばれている。本研究では, 幸福及び悲しみの顔表情を表出した人が映っている短い動画を刺激として用いてfMRI実験を行い, 実験参加者が動画を見た際の情動伝染の神経基盤を幸福と悲しみの顔表情の条件間で比較した。解

析の結果, 幸福な顔表情では悲しみの顔表情と比較して左の前部帯状回がより活動し, 悲しみの顔表情では幸福な顔表情と比較して右の上側頭回及び両側の下頭頂葉がより活動することが示された。また, 右の下前頭回は幸福な顔表情と悲しみの顔表情とで共通に活動が見られた。これらの結果は, 顔表情による情動伝染に共通した神経基盤が存在する一方で, 表出された情動の種類によって異なる神経基盤が関与することを示唆している。

注意の共有にともなう脳活動同期の発生に関連する脳領域の検討

小池耕彦, 阿部沙織(東京医科歯科大学), Jorge F. Bosch-Bayard (Cuban Neuroscience Center), 定藤規弘

我々が共同作業をおこなう際は, アイコンタクトにより, 互いに注意を相手に向けており作業を開始できる状態である事実を共有していなければならない。我々は注意の共有を必要とする課題を用いてアイコンタクト中の脳活動同期を強化し, 脳活動同期が発生する場合としない場合を比較することで, 注意の共有にともなう脳活動同期の発生に関与する脳領域を明らかにすることを試みた。その結果, 注意の共有を学習した後にのみ, ア

イコンタクト中における右下前頭回の活動パターンが二者間で同期することが明らかになった。この右下前頭回での脳活動同期の発生は, 視覚野-上側頭溝間での機能的ネットワークの増強と関連していた。注意の共有に関係した脳活動同期の発生の責任部位を明らかにしたことで, 今後, 同期が発生するメカニズム, および注意の共有において同期が果たす機能的役割を明らかにできることが期待される。

均衡する視覚運動制御の再帰的連環が二人の体動を同期させる

岡崎俊太郎, 小池耕彦, 廣谷昌子 (Carleton University)

Jorge F. Bosch-Bayard (Cuban Neuroscience Center), 高橋陽香, 橋口真帆, 定藤規弘

社会的場面において行動が時間遅れなしで同調(同期)するメカニズムを探るため, 対面で静立する被験者ペア(44 名 22 組)の体動をモーションキャプチャで計測した。被験者ペアが見つめ合っている場合, 一方または両者が目隠しした場合の各条件において体動の無意識的な同期を分析した。相互相関解析の結果, 一方が目隠しした状態では体動が時間遅れを伴い同調していたが, 見つめ合っている場合は同期していた。また二者間に双

方向に存在する因果的影響量を, 影響の出し手と受け手の視覚条件によって比較した。受け手が目隠しをすると影響量は有意に減少した。見つめ合っている条件においても, 二者間の影響量の差と同調の時間遅れには相関があり, 影響量が均衡している場合に体動が同期した。これらの結果から, 因果的影響量は視覚的運動制御のゲインを示し, 均衡する視覚運動制御の再帰的連環が二者の体動の無意識的な同期に重要であることがわかった。

書字単語の意味処理に第一言語, 第二言語の言語間の差異が与える影響~fMRI を用いた検討~

牧田 快, 大石晴美(岐阜聖徳学園大学教育学部), 木下 徹(名古屋大学大学院国際開発研究部)

島田浩二, 中川恵理(神戸大学), 定藤規弘

L2 学習者は L1 よりもその処理が遅いことが知られている。例えば, 学習者の L2 読解時の WPM(word per minute: 一分間に読める文字数)は L1 よりも有意に遅いことが示されている。我々はこのような処理の違いが脳内でどのように表象されているのかを解明するため, 機能的磁気共鳴画像法(fMRI)を用いて実験を行った。課題は画面上に 2 つ順番に L1(日本語)或いは L2(英語)で呈示される書字単語を見て(先行語と後続語), 後続語が生

物か又は非生物かを判断するものであった。結果, 後続語(非自動的処理)では, 音韻情報を処理するとされる左下前頭回(BA44)が L2 で L1 より強く賦活, さらにこの領域は先行語(自動的処理)でも L2 の時により強い賦活を示した。以上より, L2 では意味処理の前段階での書記素一音素変換の処理が相対的に増大していること, その時に BA44 が重要な役割を担っていることが示唆された。

外国語学習に伴う脳機能変化の縦断的検討

島田浩二，廣谷昌子 (Carleton University)，Janna Fox (Carleton University)

中川恵理 (神戸大学)，岡崎俊太郎，濱野友希，牧田 快，定藤規弘

外国語学習に伴う脳機能変化の過程を調べるためには縦断的アプローチが必要となる。これまで外国語の熟達度の個人差を反映する脳機能の違いが横断的に検討されてきたが，本研究では外国語の学習に伴う脳機能の変化を縦断的に検討することを目的とした。英語を外国語とする日本語母語話者が学習群 6 名と非学習群 5 名に区分された。学習群のみ e-Learning による英語学習を 75 時間行った。英語使用のみで，話すのに必要な要素を伸ばす学習プログラムが用いられた。学習群では口頭式熟

達度テストの得点 (語彙と文法の正確さ) が学習の前より後で有意に高くなった。学習に伴う産出内容の正確さに対応して，fMRI 課題の文産出では左被殻の活動が学習に伴い増大した。文章理解で活動変化する領域はなかった。産出重点の英語学習は，産出内容の正確さを高め，左被殻の活動変化に関与したといえる。この結果は，左被殻が熟達度の個人差だけでなく，個人内の学習に伴う産出能力の熟達化過程に重要な役割を担っていることを示唆している。

描画時における視線先行と書字習熟度の関係

宋戸恵美子，福村直博 (豊橋技術科学大学 情報・知能工学系)，岡崎俊太郎，定藤規弘

ヒトが線や円を正確になぞって描くような運動の場合，手先位置に関する情報が重要な役割をなす。本研究ではこの視覚—運動協調の仕組みを調べるために，線をなぞるときの腕運動と視線の同時計測を行った。書字習熟度が違う複数の被験者に，顔から約 50cm 離れたディスプレイに提示された軌跡を，手に持ったペンでなぞるように指示した。目標軌跡にはジャーク最小軌道を利用し，ペン先の位置を感圧式のタッチパネルで検知した。被験者には一般の人に加えて，習字の段位をもつ被験者の

データも計測した。解析の結果，軌道をなぞるときには，ペン先の位置に対して視線の位置が先行していることを確認した。さらに書道の有段者の場合では，目標軌跡をより正確に描くことができおり，かつペン先位置に対する視線の先行量が未経験者よりも大きいことがわかった。この結果から，ヒトが線を描くような運動を正確に行う上で，視線の先行が重要である可能性が示唆された。

系列運動技能の睡眠依存的改善と線条体活動の関連性

菅原 翔，小池耕彦，川道拓東 (群馬大学)，牧田 快

濱野友希，高橋陽香，中川恵理 (神戸大学)，山崎英明，定藤規弘

タイピングで見られる手指の系列運動は，繰り返し練習により速く正確に遂行出来るようになる。習得された技能は夜間睡眠により定着し，その際に皮質線条体路が中心的な役割を担うことが報告されている。しかし，皮質線条体路が速度と正確性のいずれの改善に関与しているのかは不明であった。手指の系列運動学習後に 1 時

間の昼寝をした群と通常の夜間睡眠を取った群で，睡眠前後の課題成績を比較したところ，両群で有意に速度が速くなっていたが，正確さは夜間睡眠群のみ有意に改善していた。さらに，両側被殻の課題関連活動は，昼寝群では睡眠後低下したが，夜間睡眠群では上昇した。これらの結果から，線条体は夜間睡眠による運動技能の正確

性の改善に関与していることが明らかとなった。

涙の神経基盤：機能的 MRI 研究

高橋陽香, 北田 亮, 佐々木章宏 (理化学研究所), 川道拓東 (群馬大学), 定藤規弘

顔には他者の心的状況の推測に重要な手掛かりとなる社会的信号が豊富に含まれている。社会的信号の一つである表情の神経基盤は多く検討されてきたが、表情以外、例えば涙については検討されていない。昨年我々は、涙が有る表情条件では無い表情条件より、側頭頭頂接合部 (TPJ) と内側眼窩前頭前野 (mOFC) がより強い賦活を示すことを明らかにした。しかし涙は心的状況の推測に重要な手掛かりとなるだけでなく、他者の注意を引く刺

激でもある。そこで観察された賦活が注意の影響によるものであるのかを検討するため、涙を黒丸に置き換えたコントロール表情条件を加えて実験を行った。その結果、コントロール表情条件よりも涙が有る表情条件で mOFC がより強い賦活を示し、TPJ の賦活は示されなかった。したがって、TPJ の賦活は注意の影響によるものであり、一方 mOFC の賦活は涙に含まれる社会的な情報の処理に関与することが示唆された。

聴覚刺激を用いた時間弁別課題に関連した神経活動

橋口真帆, 原田宗子, 小池耕彦, 岡崎俊太郎, 定藤規弘

時間知覚の神経基盤は十分には理解されていないが、時間弁別課題に限ると線条体の関与が有力視されていた。しかしながら、時間弁別課題の遂行には時間情報の保持と弁別の実行が必要であることから、線条体が時間弁別に特異的なのか、それとも弁別一般に関与しているのかを明らかにする必要がある。そこで、時間弁別に特異的な神経領域と、弁別一般に関与する神経領域を描出する目的で、Harrington et al. (2010) の実験を改変し

た機能的 MRI 実験を行った。右利きの健常成人 30 名 (女性 15 名, 男性 15 名) が実験に参加した。課題は時間弁別課題と音程弁別課題であった。結果、時間弁別課題に関する領域は右下前頭回, 右頭頂小葉, 右中前頭回, 両側の小脳であった。弁別課題に共通する領域は線条体を含む計 8 領域であった。本結果は時間弁別課題に関与する領域は右半球優位であり、弁別一般に線条体が寄与する可能性を示す。

手指の順序運動学習の神経基盤 機能的 MRI を用いた研究

濱野友希, 菅原 翔, 青木直哉, 山崎英明, 定藤規弘

運動技能の測度には運動の速度と正確さがあり、学習が進むと運動をより素早く、より正確に遂行できるようになる。これまでヒトの運動学習の神経基盤を明らかにするために行われた研究では、神経活動変化が学習そのものに関連するのか、あるいはより素早い、またはより正確な動作に関連するのかの区別は明確ではなかった。この問題を明らかにするため、手指の系列運動学習を用

いた機能的 MRI 実験を実施した。その際、速度を優先させる形式と正確さを優先させる形式を交互に反復練習させた。両形式で同様の神経活動変化を示す領域を学習関連領域として描出した処、左下頭頂小葉と背側運動前野並びに右楔前部の課題関連活動が、学習が進むにつれて減少した。この所見は、これらの領域が手指の系列運動学習の初期段階で重要であることを示唆する。本研究

により速さや正確さといったパフォーマンスとは独立した。
に存在する運動学習の神経基盤の一端が明らかとなっ

一次運動野に対する経頭蓋直流電気刺激は運動技能の定着を促進する

小山総市朗, 田中悟志(浜松医科大学), 田辺茂雄(藤田保健衛生大学), 定藤規弘

技能の定着化には一次運動野(primary motor cortex, M1)が重要な役割を担う。本研究は、M1 への経頭蓋直流電気刺激(transcranial direct current stimulation, tDCS)が運動技能の定着を促進できるか検討した。研究はランダム化、単盲検化、群間比較デザインを用いた。22 名の被験者を tDCS 刺激群と偽刺激群に分け、運動技能の学習中に M1 に対し tDCS を行うことによって、学習後の

技能定着に促進効果があるかを検討した。被験者は初日に母指の屈曲運動技能を加速度を指標に学習し、学習から 1 時間後また 24 時間後に再度同じ課題を実施した。結果、運動学習中と学習 1 時間後は群間で母指屈曲の最大加速度に有意差を認めず、24 時間後では群間で有意差を認めた。この結果は、M1 への tDCS が 24 時間後の運動技能の定着を促進できることを示唆している。

聞き手の肯定的反応が話し手に与える影響の神経基盤

角谷基文, 小池耕彦, 岡崎俊太郎, 定藤規弘

我々はなぜ会話を楽しむことができるのか？会話は、遊びのようにそれ自体が目的であり、楽しさを内包していると考えられる。遊びの楽しさは、環境の操作と即座で直接的な反応との随伴性から生じている。よって、会話においては、「話し手の発話に伴う聞き手の適切な反応が、話し手にとって報酬として機能して楽しい会話の原動力となっている」という仮説を立てて、fMRI を用いた研究を行った。35 名の被験者を対象に、fMRI 内の話し手または PC の発するユーモアに対して聞き手が笑

うという実験課題を実施した。結果として、自分がユーモアを言って、聞き手からの笑いが随伴したときに主観的嬉しさは最も高く、この嬉しさに対応して、側坐核の活動が高くなることが示された。側坐核は多くの報酬刺激への活動が報告されており、嬉しさは側坐核と関係していると考えられる。本研究は、自分の行動に随伴する他者の適切な反応が会話の楽しさを生じさせることを明らかにした。

日本人英語学習者の L2 文産出時における母語転移：fMRI 実験による検討

中川恵理(神戸大学), 横川博一(神戸大学), 小池耕彦, 牧田 快, 島田浩二, 定藤規弘

日本人英語学習者の場合、Double Object (DO) 構文(give B the A) よりも Prepositional Object (PO) 構文(give the A to B) に対する選好性が強い。また、英語母語話者では同一構文に繰り返し接触した際の統語的プライミング効果は PO と DO で同程度に起こるが、日本人英語学習者では DO プライミングは起こりにくい。日本

人は PO から変換して DO 構文を産出しているという仮説を検証するため 41 名を対象に fMRI 実験を実施した。絵の内容を PO または DO 構文で表現するという課題を行ったところ、DO 構文産出開始までの反応時間(RT)は PO より長く、PO 構文のみプライミング効果により RT が短縮した。また、背側の運動前野および左下前頭回に

において、PO と比べ DO 構文産出時に強い活動がみられた。これらは DO 構文を産出する際には PO 構文と比べ

余分な処理負荷がかかることを示している。

ベルベット錯触の神経基盤

Nader Rajaei (名古屋大学), 北田 亮, 青木直哉, 高橋陽香, 宮岡 徹 (静岡理工科大学)
大岡昌博 (名古屋大学), 定藤規弘

ベルベット錯触とは、両手の間に挟んだワイヤの格子を動かすと、あたかもベルベットに触れているような感覚が得られる錯覚である。ベルベット錯触は多くの科学館で展示されるほど有名であるが、その機序は不明のままである。そこで健常者を対象とした機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) による実験を行った。実験条件として①強い錯触が起きる条件 (SI 条件) ②弱い錯触が起きる条件 (WI 条件) ③本物のベルベットに触れる条件 (R 条件)

④両手は合わせるが刺激のない条件 (N 条件) を用意した。錯触と本物のベルベットに触れたときには共通の神経基盤が関わりと予測した。そこで WI より SI 条件で強く活動する領域と N より R 条件で強く賦活する領域を評価した。すると中心後回・小脳が本物と錯触で共通に活動することが分かった。この結果は、一次体性感覚野を含めた脳内ネットワークがベルベット錯触に重要な役割を果たすことを示唆している。

社交不安障害患者における自己意識関連情動の神経基盤：機能的 MRI による解析

川口彰子 (名古屋市立大学大学院), 守田知代 (大阪大学大学院), 橋口真帆, 定藤規弘

社交不安障害 (SAD) の神経基盤解明を目的として自己意識関連情動に関する課題を用いた fMRI 研究を行った。本課題は健常者 (CTL) において、自己顔に対する恥ずかしさ情動と、それに伴う右島皮質前部の活動が、他者の観察で増大することが確認されている。

SAD では他者からの否定的評価に対する過剰な恐怖のため、恥ずかしさ情動が CTL よりも強く、他者観察による増幅効果も顕著であることを予想した。

結果として、SAD では CTL に比して自己顔に対する恥ずかしさ情動が観察条件に関わらず有意に強かった。観察による有意な増強効果はなかった。脳活動では、dorsomedial pre frontal cortex (dmPFC) で self-related activity に群間差があった。

SAD では自己顔写真により、他者評価への強い恐怖感が惹起され、この精神活動に dmPFC が関与している可能性が示唆された。

発達生理学研究系

認知行動発達機構研究部門

【概要】

平成 25 年度、認知行動発達機構研究部門では、7 月でほぼ耐震改修工事が終わり、8 月に明大寺研究棟 6 階の新しく改修した実験スペースに移動し、実験が再度本格的に稼働し始めた。伊佐が福島医大の小林教授、京都大の渡邊教授とともに文部科学大臣表彰・科学技術賞を受賞した他、西村准教授が経済産業省の Innovative Technologies 特別賞、木下正治君(弘前大学准教授に異動)が自然科学研究機構若手研究者賞、加藤健治君が総研大学長賞を受賞するなど、受賞が相次いだ。研究面では、英国 Sheffield 大学の Peter Redgrave 教授との、盲視サルの連合学習に関する研究がまとまってきた他、西村准教授の人工神経接続を脳梗塞サルに適用した研究、脊髄損傷サルの回復過程において側坐核が果たす役割に

関する研究、人工神経接続によってヒトの腰髄にリズムミクな磁気刺激を加えて歩行運動を誘発させる研究、マウス上丘から光子レーザー顕微鏡によってニューロン集団の活動を記録する研究、ウィルスベクター2 重感染法をさらに発展させる研究などが順調な仕上がりをを見せてきた。また平成 25 年度より生理学研究系が、広島大学とマツダを中核とするセンターオブイノベーション(COI)事業(文部科学省)に参加することになり、我々の研究室も視線計測による「注意の可視化」というテーマで参加することになった。また、西村准教授が新規発足した脳科学研究推進プログラム「BMI 技術を用いた自律支援、精神・神経疾患等の克服に向けた研究開発」に分担研究者として参加することになった。

眼球運動計測とサリエンシー計算論モデルを組み合わせた マカクザル認知行動異常のハイスループット検出法の開発

吉田正俊, 伊佐 正

ヒトと形態的・機能的類似性を持ち高次認知機能課題の遂行に優れているマカクザル(ニホンザルおよびアカゲザル)を用いて、動画を自発的に探索している際の眼球運動を計測することで、訓練を行わずに多数のマカクザルの中から認知行動異常をスクリーニングする方法を開発することを目的とした。リモート型アイトラッカーを用いて、モンキーチェアに座ったマカクザルが動画を見ているときの眼球運動計測を行った。頭部の固定をしているときの記録からは、動画を見るトレーニングをまったく行っていないサルでも動画の中のサリエンシーの高い部分を追って眼を動かしていることを明らかにした。さらに、頭部の固定をしていないサルで動画を見ているときの眼球運動計測を行った。サルは動画内の視覚刺激を見ていることを示唆するデータを得た。し

かし、頭部を固定しているときと比べて、頭が自由に動くために眼球運動の記録が出来ている時間は頭部固定時よりもより低い割合となっていることを見いだした。以上の実験と平行して、サリエンシー計算論モデルを用いて視線計測データを解析する方法が精神疾患の検出に有効かどうかをヒト統合失調症患者の視線計測データを用いて検証した。ヒト統合失調症患者が静止画像を自由視している間の視線計測データを取得した。それぞれの静止画像のうちどの部分が注意を惹くかを「サリエンシー」という値で定量化した。自発的な眼球運動がサリエンシーの高い部分に向けられているかを検証した。視線計測データのサリエンシー計算論モデルによる解析が統合失調症患者群と統制群とを判別するのに有効であることを示唆する結果を得た。

刺激—報酬間連合学習における前頭前野神経回路の役割の解明

小川正晃, 伊佐 正

前頭前野の中でも眼窩前頭皮質 (OFC) は、刺激—報酬間の連合学習によって得られたそれらの関係の特異的情報をコードし、生体レベルの報酬関連行動の柔軟な制御に寄与していると考えられている。OFC の機能異常は、強迫性障害、依存症、統合失調症などで認められることから、その機能理解はこれらの病態理解に寄与することができる。近年の研究に OFC の神経活動様式は明らかになってきたものの、行動制御に果たす OFC 活動の時間、神経回路特異的な役割は未解明である。

本研究は、最先端の光遺伝学法を用いて刺激—報酬間の連合学習中のげっ歯類 OFC の活動を時間、神経回路特

異的に制御し、その活動が行動に及ぼす影響、ならびに、下流の領域の活動におよぼす影響について電気生理学を用いて検討することにより、OFC 神経回路の役割について統合的に明らかにする。

2012 年度の終わりに着任したため、本年度は主にセットアップと行動のプレリミナリー実験を行った。現在のところ、刺激—報酬間連合学習中のマウス OFC の活動を光遺伝学法により時間特異的に抑制することによって、刺激提示によって誘起される報酬予測行動を変化させることができる可能性を見いだしている。

サルを用いた脳情報の解読による中枢疾患創薬

渡辺秀典, 西村幸男

小松秀俊, 近藤祐介 (武田薬品工業株式会社)

中枢創薬の障壁の一つは、モデル動物からヒトへの外挿性が極めて低いことである。本研究では中枢神経への薬効予測として利用できる脳活動バイオマーカーを探索することを目的として、ヒトへの外挿性の高いサルを用いて、向精神病薬の薬効を脳活動から検証した。

まず統合失調症状を模倣する精神攪乱物質であるケタミンをサルに投薬 (1.5 mg/kg, i.m.) し、その薬理作用差異を皮質表面脳波 (ECoG) より推定できるかを試みた。一次運動野から記録された ECoG 信号の周波数解析の結果、投薬直後のガンマ帯域 (40-160Hz) の活動上昇はケタミンの薬理効果であることが明らかになった。

次に抗精神病薬投与による統合失調症状回復状態を

脳活動からの推定を試みた。抗精神病薬としてハロペリドール (0.03 mg/kg, i.m.) 及びクロザピン (1.0 mg/kg, s.c.) を用意し、ケタミン投薬下における各抗精神病薬の薬理効果を ECoG 信号から推定できるかを調査した。その結果、ハロペリドール適用下ではケタミン投与によるガンマ帯域 (40-160Hz) の活動上昇は抑制された。一方でクロザピン適用下ではケタミンはガンマ帯域における高周波成分 (80-160Hz) の活動だけを抑制した。

本結果は ECoG のガンマ帯域の神経活動の観測は中枢薬の薬理効果の検出に十分に有効であることを示唆する。

意識に上らない視覚刺激による行動価値の重み付け：「盲視」モデルサルにおける強化学習

加藤利佳子, 高桑徳宏, 伊佐 正

Abdelhafid Zeghib, Peter Redgrave (University of Sheffield)

本研究では、「盲視」のモデル動物である第一次視覚

野損傷サルを用いて、障害視野に条件付け視覚刺激 (CS)

を提示することにより、意識に上らない視覚刺激を用いて新たな行動を学習し、獲得出来るかを調べた。学習課題としては、サルの前目に設置したモニター上に、見えない特別領域(TA)を設定、眼球運動による探索により、TAを見つけ出す課題を行わせた。TAの発見は、CSの提示により知らされる。結果、試行数に伴ってTAの特定にかかる時間が指数関数的に減少し、学習の成立が示

された。学習過程では、CSの提示直前の特定ベクトルのサッケードの選択確率が上がることが明らかになった。また、CSを障害視野に提示した場合は、CS提示後にも探索の続行が見られ、CSの提示が意識に上らない事が示唆された。これらの結果から、意識にのぼらない視覚刺激は二次強化因子として働き、新たな行動パターンを学習し獲得させ得ることが示された。

In vivo 2光子イメージングによる上丘内側方抑制機構の解明

笠井昌俊, 伊佐 正

上丘は視野内の目立つ物体に視線や体を向けそこに注意を向ける、という行動を生み出す中枢となる中脳の神経核である。上丘の生理機能とその基盤にある神経回路を同時に捕えるためには、従来の *in vitro* または *in vivo* の電気生理学的手法どちらかだけでは困難な点があった。近年発達している2光子顕微鏡によるカルシウムイメージングは、そのギャップを埋め、さらにそこから新しい知見を得ることを可能にする方法である。

我々は世界に先駆けて、上丘からの2光子カルシウムイメージングに成功し、これまでに、上丘における網膜部位再現(retinotopy)や周辺抑制(surround suppression)を神経細胞集団の活動と、上丘内での空間的な関係性を解

析してきた。

空間的に分離した2つの視覚刺激をマウスに見せた場合、視覚刺激の間隔に応じて、刺激に対する神経活動が、増強または減弱することを確認した。集団内の個々の神経細胞の活動に注目しさらに詳しく解析した結果、上丘空間上における2点の刺激の中心にあたる部分に近いほど視覚応答が増強し、反対に遠くなるにつれて応答が減弱することが明らかになった。これまで *in vitro* の実験で予測されていたメキシカンハット型の側方抑制機構が、視覚刺激に対する生きた動物の応答として上丘でも働いていることを明らかにすることができた。

神経活動に依存した刺激による四肢の随意運動制御

笹田周作¹, 加藤健治^{1,2,3}, ステファンJグロイス⁴, 門脇 傑⁴
宇川義一⁴, 小宮山伴与志⁵, 吉田 晋⁶, 村山尊司⁷, 飯塚正之⁷, 西村幸男^{1,3,8}
(¹生理学研究所発達生理学研究系, ²日本学術振興会特別研究員,
³総合研究大学院大学生命科学研究科, ⁴福島県立医科大学医学部,
⁵千葉大学教育学部, ⁶北海道医療大学リハビリテーション科学部,
⁷千葉県千葉リハビリテーションセンター, ⁸科学技術振興機構さきがけ)

本研究は上肢筋の随意筋活動により制御される連発磁気刺激を脊髄の歩行中枢へ行う事により上肢筋-腰髄間の人工神経経路を形成し“随意歩行”の再建を目指している。本年度は上肢筋-腰髄間の人工神経接続を2名の完全脊髄損傷患者に適用し、下肢歩行運動の随意制御を試みた。

2名の対象患者は両者ともにASIAスコアAで完全損傷であった。損傷からの期間は両者とも1年以上経過した慢性期であった。損傷領域は1名が第11胸髄、もう1名は第3胸髄であり、両者とも損傷領域より下流の神経支配領域にある下肢筋の随意的な運動、及び感覚機能は完全に失われている状態であった。一方で両者ともに上

肢の随意運動は可能であった。

半仰外姿勢で上肢筋—腰髄間の人工神経接続を付加し、対象患者が上肢筋活動により脊髄連発磁気刺激を制御し、麻痺した下肢歩行運動の随意制御を試みると、下肢の歩行様運動が発現した。この歩行様運動は人工神経接続を切断すると停止した。患者はこの人工神経接続を利用して麻痺した下肢の歩行用運動を発現させ、さらに歩行の開始・停止、及び歩行サイクルを随意的に制御す

ることが可能であった。この人工神経接続による下肢歩行運動の随意制御を 3 ヶ月間にわたって 5 回繰り返し、リハビリテーション効果を検討したが、人工神経接続が無い状態で下肢の随意的な運動機能は回復していなかった。

これらの結果は上肢筋—腰髄間の人工神経接続を装着する事で、完全脊髄損傷患でも下肢歩行運動を随意的に誘発・制御可能であることを示している。

サル頸髄硬膜下電気刺激による誘発運動の体部位局在性

加藤健治, 西村幸男

脊髄電気刺激は、脳梗塞や脊髄損傷後の下行性経路障害による四肢麻痺を再建する有効な方法である。すでに、脊髄内へ慢性留置した針電極を用いて機能的運動の誘発に成功しているものの、脊髄内電気刺激は侵襲度が高い為、低侵襲的な電極を使った方法が期待されている。本研究では、脊髄自体を傷つけないシート状電極を頸髄硬膜下に慢性的にマカクサルの頸髄 C5—T1 のレベルに留置し、低侵襲的な脊髄電気刺激法による誘発運動を調査した。

パルス幅 0.2 ms, 200 Hz, 3 発の電気刺激による鎮静下での誘発運動は、頸髄吻側に位置する電極では肩や腕の運動が、頸髄尾側に位置する電極では手首や指の運動が

誘発され、頸髄硬膜下電気刺激による誘発運動に、体部位局在性があることが示唆された。誘発運動の閾値は 500 μ A 以下であった。

覚醒下での脊髄刺激による誘発筋活動は、複数の筋に対して興奮と抑制効果が同時に観られた。さらに、指の伸筋に対して興奮効果がある場合には、その拮抗筋である指の屈筋に対しては抑制効果があったように、拮抗筋間における相反性効果が観られた。これらの結果は、低侵襲的な脊髄硬膜下微小電気刺激法においても、機能的な運動を誘発でき、下行性経路障害後の機能喪失を再獲得するための有効な方法であることが示唆された。

皮質盲視野に提示された条件刺激に対する中脳ドーパミンニューロンの応答

高桑徳宏, 加藤利佳子, Peter Redgrave (University of Sheffield), 伊佐 正

動物は報酬とその手がかりとなる視覚情報などの感覚入力との関係を頻繁に学習する(連合学習)。大脳基底核黒質緻密部(SNc)などのドーパミン(DA)ニューロンはこの学習に重要な役割を持つとされている。しかし、視覚情報がどの神経経路によって DA ニューロンに伝達されているか、また、どのような入力が合わさって活動が形成されるのかはよくわかっていない。

そこで、本研究では片側第一次視覚野(V1)を損傷したニホンザルを用いて古典的条件付け課題遂行中の SNc・

DA ニューロンの単一神経細胞活動の記録を行い、V1 を介さない視覚情報に対する DA ニューロンの活動を検証した。

その結果、DA ニューロンは損傷視野に提示された条件刺激(CS)に対しても、健常視野の CS に対する応答と同じように応答することが判った。この結果は、DA ニューロンの CS に対する応答に V1 を介さない(おそらく中脳上丘を介する)視覚入力に寄与していることを示唆している。

運動機能回復を支えるモチベーションの神経基盤

澤田真寛，加藤健治，伊佐 正，西村幸男
尾上浩隆（理化学研究所）

脳，脊髄損傷の患者は四肢の運動麻痺だけでなく，抑うつ症状を併発することがしばしば見られ，うつ症状によるモチベーションの減退は運動機能回復を妨げることが報告されている。しかしながら，その機能回復を支えるモチベーションの神経機序について未だ不明である。近年，われわれは脊髄損傷後に VSt を不活性化することによって，一度回復した手指の巧緻性が再び障害され，M1 の活動も大きく変化すること示した。そこで，VSt と M1 の活動の因果関係をさらに詳細に調べるため，2 頭のサルにおいて脊髄損傷後の機能回復過程のさまざ

まな時期で，精密把持運動中の VSt と M1 の電氣的活動を同時記録し，情報の流れを Granger causality 法にて解析した。すると，脊髄損傷前は VSt から M1 への causality はみられなかったが，機能回復中に VSt から M1 への 115 から 240Hz での causality が上昇し，機能が完全回復すると再び認められなくなった。この機能回復中における causality の一過性の出現は VSt の不活性化によって M1 の活動が変化するという結果と一致しており，VSt が M1 の活動を生成することが脊髄損傷からの機能回復に重要であることを示唆している。

サル皮質脊髄路損傷後の手指巧緻性回復における脊髄固有ニューロンの寄与の検証

當山峰道，伊佐 正
木下正治（弘前大学），松井亮介，渡邊 大（京都大学）
加藤茂樹，小林和人（福島県立医科大学）
里宇明元（慶応義塾大学）

マカクザルには，大脳皮質一次運動野から脊髄運動ニューロンへの下行路として，直接経路と頸髄中部に存在する脊髄介在ニューロン（PNs）を介した間接経路の少なくとも 2 つが存在する。この内系統発生的に新しい直接経路が手指巧緻性に重要であると考えられてきた。しかし皮質脊髄路を第 5 頸髄で切断すると 1-3 ヶ月後に精密把持は回復する一方，第 2 頸髄で切断すると回復しなかった。この結果から，手指巧緻性の回復に PNs を介する間接経路の寄与が示唆されていた。そこで我々は，PNs が回復に寄与することを明らかにするため，第 5 頸髄で皮質脊髄路を損傷したサル 3 頭に対して，ウイルスベク

ター 2 重感染法により PNs に選択的に遺伝子導入を行い，破傷風毒素を発現させることでその神経伝達を阻害した（Kinoshita et al. Nature, 2012）。その内 1 頭は，PNs の神経伝達を遮断した状態で皮質脊髄路を損傷させ，その後も PNs を阻害し続けた。すると精密把持は 4 ヶ月半経っても回復しなかった。他の 2 頭は，皮質脊髄路を損傷させた 1 ヶ月後に精密把持が回復した状態で PNs を阻害した。すると一旦回復した精密把持が部分的に障害された。これらより PNs が皮質脊髄路損傷後の手指巧緻性回復に寄与することが示唆された。

生体恒常機能発達機構研究部門

【概要】

当部門は，発達および障害回復の過程で一旦形成された機能的神経回路に起こる再編成のメカニズムを回路

レベルで解明することを主な目標に研究をしている。そのため，3 つのサブテーマについて研究を進めている。

1) フェムト秒パルスレーザーを用いた多光子励起法を利用して、マウス脳内微細構造の可視化技術の確立および技術向上をおこなった。これらの技術を利用して、発達期や障害における大脳皮質神経回路の変化を検討するために、シナプスの長期変化の観察およびその制御機構の解明を行っている。また、急性脳梗塞後の回復期の神経回路の変化を検討のために、ペナンプラ領域および障害と対側脳半球におけるシナプス再編の検討を行っている。加えて、これらのシナプス再編に対する各種グリア細胞の制御について検討を行っている。

2) 発達期や傷害後にダイナミックに変化する GABA

作動性回路の変化について、2つの観点から検討を加えている。一つは細胞内イオン環境の変化による GABA の興奮性から抑制性へのスイッチとその制御機構について細胞内 Cl イオンくみ出し分子 KCC2 の機能制御を中心に、神経栄養因子、環境/回路活動による制御を検討している。加えて、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、GABA とグリシン間の伝達物質のスイッチングのメカニズムを観察している。人事として、本年度中に石川達也氏および中畑義久氏が総研大卒業後それぞれ生理研研究員および JSPS 特別研究員に採用された。

虚血脳障害後回復期における神経回路再編と制御機構の解明

高鶴裕介(群馬大学), 中村佳代, 鍋倉淳一

急性脳障害の回復期には脳機能の大きな変化が観察される。その背景にある神経回路の長期変化を理解するために、脳虚血モデルマウスを用いて、ペナンプラと対側半球の相同領域における神経回路再編を、2光子励起顕微鏡を用いて観察している。障害と対側半球の相同領域において、障害早期にアストロサイトの活動が上昇していることが判明した。さらに、このアストロサイトの

活動とシナプス再編が亢進している時期が一致しているため、回復期におけるアストロサイト活動の亢進が、障害と対側半球の相同領域に代償回路が構築されるのに必要である可能性が示唆される。現在、脳梗塞後の長期的な神経回路再編と機能回復の関連を検討するために、慢性障害モデルマウスの行動評価基準の構築を行っている。

In Vivo 多光子顕微鏡を用いたミクログリア・アストロサイトによる大脳皮質神経回路再編機構の解析

和気弘明(基生研), 宮本愛喜子, 加藤大輔(基生研), 穂吉亮平, 稲田浩之, 鍋倉淳一

発達期における神経回路構築・再編を観察する目的にて、幼若期の大脳皮質錐体細胞とミクログリア細胞を2光子顕微鏡法による同時可視化する技術を構築した。ミクログリアの樹状突起への接触によりフィロポディアの形成が誘発されることを生体リアルタイムイメージング法を用いて観察した。さらに、ジフテリアトキシンをミクログリアに発達時期特異的に発現させ、ミクログリア細胞の大部分を生後1週後期に死滅させると大脳皮質体性感覚野におけるシナプス数の減少が観察され、ミクログリアによるシナプス新生という新たな機能を

見出した。また、ミクログリアによる障害神経細胞の軸索のラッピングにより神経細胞の膜電位の過剰脱分極から静止膜電位への戻ることが明らかになり、ミクログリアの障害細胞への接触は過剰興奮による細胞死の抑制作用を示すことが判明した。

運動学習獲得時における大脳皮質運動野細胞活動の同調性調節について、オリコデンドロサイト発現蛋白異常遺伝子改変マウスにレバー引き学習タスクを用いて、同領域における軸索および神経細胞のカルシウム上昇を指標として検討している。

In Vivo 多光子顕微鏡を用いた慢性疼痛形成期における大脳皮質体性感覚野神経回路再編

石川達也, 金 善光 (Kyung Hee Univeristy 韓国), 鍋倉淳一

慢性疼痛時における大脳皮質神経回路の再編機構を2光子顕微鏡や電気生理学的アプローチを駆使して行った。

末梢感覚神経の部分傷害後に末梢感覚神経の過剰活動と痛覚過敏が持続する。痛覚過敏形成時に限定して、大脳皮質錐体細胞のシナプスの新生・消失が更新し、その後ターンオーバー率は傷害前の値に戻るが感覚過敏は長期にわたり持続する。慢性疼痛時には、大脳皮質感覚野細胞の活動の増強が観察された。これらから、慢性疼痛時における大脳皮質感覚野における回路再編によ

る過剰応答回路の形成が持続する慢性疼痛発症の一因である可能性が示唆される。さらに、大脳皮質神経回路再編時にはアストロサイトの活動が亢進していることが判明し、アストロサイトによるシナプス再編の関与について検討を行い、アストロサイトから放出されるトロンボスポンジンが時期限定のシナプス再編を惹起していることが判明した。また、障害末梢側と同側大脳皮質においてもアストロサイト活動が上昇していることが判明し、同部位におけるシナプス再編と障害末梢と対側末梢に発症するミラーペインとの関連を検討している。

細胞内 Cl^- 制御分子 KCC2 の発現制御と生体機能

Andrew Moorhouse (University of New South Wales, オーストラリア)

渡部美穂 (浜松医科大学), 鍋倉淳一

未熟期および虚血や痙攣時に GABA は興奮性伝達物質としての作用を獲得する。GABA_A 受容体の細胞応答には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 によって主に制御されている。ドキシサイクリンにより KCC2 発現をコントロール可能な tetO マウスを作成し、CAMK2-TTA マウスと交配し、

大脳皮質および海馬錐体細胞における KCC2 の発現をコントロール化の可能なマウスを作成した。現在、痙攣モデル動物を用いて、KCC2 強制発現により痙攣の軽減が可能なのか検討を加えている。また、視床下部に存在するゴナドトロピン放出ホルモン産生神経細胞 (GnRH ニューロン、成熟期でも GABA に対して脱分極性応答を示す) に特異的に KCC2 を強制発現させ、視床下部からの黄体化ホルモンのパルス状分泌の変化、および排卵制御のメカニズムを検討している。

伝達物質のスイッチングのメカニズムと細胞応答

中畑義久, 石橋 仁 (北里大学), 鍋倉淳一

ラットおよびマウス聴覚中継路核である外側上オリブ核に内側台形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部内で発達変化する。この伝達物質のスイッチングは脊髄など他の中枢神経系の部位でも報告されているが、単一神経終末部から GABA とグリシンのどちらが放出される

かなど、その制御機構は十分には明らかになっていない。本研究課題では、脊髄および海馬の培養ニューロンを用いて、GABA およびグリシンを放出する機構を解明することを目的としている。神経回路活動が上昇すると、共放出シナプスにおける GABA 放出量が増加するが、グリシン放出は減少することが明らかとなり、両伝達物質

の放出が神経回路活動に依存して変化することが示唆された。

どちらの伝達物質がシナプス小胞内に取り込まれるかは、細胞質における伝達物質の濃度に依存するが、GABA はグリシンよりシナプス小胞に取り込まれやすいことが判明した。一方、シナプス伝達にはシナプス直下に存在する受容体も重要であるが、グリシン受容体拮抗薬のストリキニーネ存在下でニューロンを培養すると、シナプス直下のグリシン受容体が著明に減少し、グ

リシン放出開始後には、グリシン受容体の側方移動によりシナプス外からシナプス直下へ移動・集積することをグリシン受容体動態をQドットを用いた1分子イメージング技術等を用いて明らかにした。その結果、グリシン応答の増大を引き起こすことが判明した。シナプス前神経終末部からの伝達物質の放出自体がシナプス後膜の受容体の集合に重要であることが示唆された。現在、これらの現象のメカニズムや生理的意義について検討を進めている。

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。本年度実施した主たる研究課題は次の通りである。1)レプチンによる中枢性血糖調節機構、2)視床下部-交感神経系による脂肪組織マクロファージの調節機構、3)ストレプトゾトシン誘導性糖尿病における骨格筋 AMPK の調節作用。

レプチンによる中枢性血糖調節機構

戸田知得, 岡本土毅, 箕越靖彦

レプチンは、摂食抑制を引き起こすことが知られているが、糖代謝にも重要な調節作用を営んでいる。事実、レプチンは、脂肪萎縮症における糖尿病治療薬として臨床で用いられている。当部門では、これまでレプチンが視床下部腹内側核(VMH)に作用することによって、骨格筋での糖の利用を促進することを明らかにしてきた。本研究では、Hyperinsulinemic-Euglycemic clamp 法を用いてレプチンによる代謝調節作用を明らかにするとともに、VMH におけるレプチンのシグナル伝達機構を調べた。

その結果、レプチンは STAT3 を介して肝臓からの糖産生を制御すると同時に、MEK/ERK を介して骨格筋での糖利用を促進することを見出した。さらに、MEK/ERK シグナルは、VMH においてシナプス可塑性に作用をおよぼし、メラノコルチン受容体シグナルを増強することによって、骨格筋での糖利用を促進することが明らかとなった。

1. Toda, C et al, Diabetes 2013, 62: 2295-2307.

視床下部－交感神経系による脂肪組織マクロファージの調節機構

唐 麗君, 岡本土毅, 箕越靖彦

脂肪組織に存在するマクロファージ(M ϕ)は、脂肪組織内の微小環境において様々な調節を受け、組織内での機能を保つと考えられるが、その作用はいまだ不明な点が多い。本研究において、我々は、交感神経系が褐色脂肪組織(BAT)と白色脂肪組織の M ϕ に作用を及ぼし、TNF- α mRNA 発現を抑制することを見出した。

摂食促進神経ペプチド AgRP をマウス脳室内に投与すると、副睪丸脂肪組織(WAT)において、交感神経活動が抑制され TNF- α の mRNA 発現が亢進した。外科的神経切除、 β -AR 拮抗薬の投与により、WAT での TNF- α mRNA の発現が亢進した。一方、BAT では、AgRP を脳

室内に投与しても交感神経活動に変化は無く、TNF- α の発現にも変化がないが、 β -AR 拮抗薬を投与すると、TNF- α mRNA の発現が亢進した。さらに、 β -AR 遺伝子欠損(β -less)マウスでは、あまり肥満していないにも関わらず、両組織において TNF- α の mRNA 発現量が増加し、血中 TNF- α 濃度も肥満動物と同程度に増加していた。これらの実験結果から、交感神経は、脂肪組織において β 2-AR-PKA 経路を介して M ϕ からの TNF- α の発現を抑制することが分かった。この機構は、正常な脂肪組織において TNF- α の発現量を低値に保つ恒常性維持機構の一つと考えられる。

ストレプトゾトシン誘導性糖尿病における骨格筋 AMPK の調節作用

横田繁史, 岡本土毅, 箕越靖彦

本研究では、ストレプトゾトシン(STZ)誘導性インスリン依存性糖尿病マウスの代謝変化に及ぼす骨格筋 AMPK の調節作用を調べた。STZ を投与して糖尿病を発症させた C57BL/6J マウスは、骨格筋において AMPK が活性化し、その下流シグナルも活性化していた。骨格筋選択的 dominant negative-AMPK (DN-AMPK) 発現マウスに STZ を投与すると、血中インスリン値は低値であるにも関わらず、糖尿病による高脂肪酸血症、高ケトン体血症が正常化し、部分的ではあるものの高血糖も改善した。糖、脂肪負荷試験の結果も改善した。また、骨格筋及び脂肪組織重量が増加して体重減少が抑制され、生存率も増加した。脂肪組織重量の増加に伴い血中レプチン濃度が回復、血中アディポネクチン濃度も有意に増加した。

STZ 誘導性インスリン依存性糖尿病によって引き起こされる脂肪萎縮が、骨格筋 AMPK の活性化を抑制すると改善する機構を明らかにするため、筋肉から分泌され、

脂肪細胞に作用する“myokine”, interleukin-6 (IL-6)と irisin の発現を調べた。STZ 誘導性糖尿病マウスの骨格筋では、IL-6 および irisin の発現が上昇し、血中濃度も増加していた。皮下脂肪組織では UCP1 の発現が増加していた。しかし、DN-AMPK 発現マウスではこれらは正常レベルまで回復していた。さらに、浸透圧ポンプを用いて IL-6 中和抗体を STZ 誘導性糖尿病マウスに投与したところ、血中インスリン値は低値であるにも関わらず、血糖値および血中遊離脂肪酸濃度が有意に低下し、血中 irisin 濃度も低下した。さらに、骨格筋および脂肪組織重量も回復、血中レプチン濃度も増加した。

以上の実験結果から、骨格筋 AMPK が、インスリン依存性糖尿病における代謝異常の発現に関与することが明らかとなった。また、その代謝異常には、インスリンのみならず、それによって引き起こされる臓器間ネットワークの異常が関与すると考えられる。

環境適応機能発達研究部門

【概要】

本研究部門は摂食調節・糖代謝調節機構、肥満・糖尿病の成因を解明するために、全身-脳連関、中枢による摂食・代謝制御および概日リズム形成とそのメカニズムを明らかにすることを目的としている。本年度実施した主

たる研究課題は 1) Nesfatin-1 とオキシトシンによる摂食概日リズム調節、および、2) インスリンによる求心性迷走神経活性化と脳の活性化である。

視床下部 Nesfatin-1 日内リズムによる摂食概日リズムの調節

中田正範, Sedbazar U, 前島裕子, 矢田俊彦

Nesfatin-1 は nucleobindin2 (NUCB2) 由来の摂食抑制因子である。我々はこれまでに、視床下部室傍核の Nesfatin-1 ニューロンが摂食により活性化されること、さらに、摂食に伴って上昇するグルコースやインスリンで活性化されることを明らかにしてきた。今回、室傍核 Nesfatin-1/NUCB2 の発現に日内リズムがあるかを検討した。

ラットの食行動は、暗期に食べ明期にはほとんど食べない日内リズムを示す。NUCB2 は明期初期に発現がピークになり、暗期に低下を示し、食行動と逆転する日内リズムを示す。ラットの脳室内に Nesfatin-1 中和抗体を投与すると明期に摂食が亢進することから、室傍核 Nesfatin-1 発現の日内リズムが食行動の日内リズムに関

連している事が示唆された。さらに、肥満モデル動物の Zucker fatty ラットでは室傍核 NUCB2 発現の日内リズムが消失し、これに連動して食行動の日内リズムが消失し、明期に摂食が亢進していることを明らかにした。

本研究により、室傍核 Nesfatin-1 ニューロンが食行動の日内リズム形成に重要である事、食行動の日内リズムの変調が、肥満を引き起こす事が示唆された。以上の結果より、室傍核 Nesfatin-1 ニューロン機能への介入は、食行動の日内リズム変調の是正に有効であり、肥満および生活習慣病の予防・治療に繋がると示唆される。

1. Sedbazar U, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 434: 434-438, 2013.

インスリンの求心性迷走神経活性化と生理的役割

岩崎有作, 中田正範, 出崎克也, 矢田俊彦

膵から分泌されるインスリンは脳へも作用し、摂食抑制、中枢性糖脂質代謝調節、学習記憶などの重要な機能に関与する。末梢ホルモンの脳への作用経路には、脳神経へ直接作用する液性経路と、求心性迷走神経を介して神経情報として脳に伝達される神経経路がある。しかし、インスリンに関しては液性経路は存在するが、神経を介した脳作用は未知であった。本研究では、インスリンの求心性迷走神経への直接作用を解析した。

求心性迷走神経にはインスリン受容体が発現しており、インスリンはマウスより単離した求心性迷走神経細

胞を脱分極させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた。インスリンは血中濃度 (10^{-10} M) より高濃度 ($>10^{-8}$ M) でより多くの求心性迷走神経細胞を活性化したことから、求心性迷走神経は局所の高濃度インスリンを受容している可能性が示唆された。腓静脈中のインスリンは循環血中の約 100 倍高濃度 ($\sim 10^{-8}$ M) で検出された。ランゲルハンス周囲/内部にはインスリン受容体陽性神経が分布し、膵臓を支配する求心性迷走神経は高濃度インスリンに高頻度に応答した。糖尿病治療薬スルホニルウレア剤をマウス腹腔内に投与すると、速やかにインスリンが分泌さ

れ、求心性迷走神経が活性化された。従って、脾臓を支配する求心性迷走神経は、分泌されたインスリンを局所的に感知して脳に伝える役割があると推察される。

インスリン受容体基質2 (IRS2) 遺伝子欠損マウスは過食・肥満を呈しており、インスリンの求心性迷走神経作用が障害されていた。一方、インスリンの液性経路であ

る、視床下部弓状核の食欲亢進系 NPY ニューロンの抑制作用は正常であった。従って、インスリンの求心性迷走神経を介した脳作用には過食・肥満を防ぐ働きがあると示唆される。

1. Iwasaki Y, et al. *PLoS ONE* 8(6): e67198, 2013

個別研究・特別研究

個別研究 (村上グループ)

【概要】

複数の細胞からなる上皮膜レベルでの水・基質輸送を主眼に研究している。ことに外分泌腺のモデルとして水分分泌の多い唾液腺の輸送機構を研究している。近年細胞内を通過し分泌される水分輸送量より、細胞間隙をタイト結合を越えて輸送される水分量が持続刺激中には多くなることが見付き、傍細胞水輸送を重点的に研究している。

細胞構築を破壊せずに、分泌中の生理活動を測定するために、できるだけ摘出血管灌流顎下腺の実験系に限定し、複数の観測データを重ね合わせて検討している。具体的には Wistar/ST 雄性ラットの顎下腺を麻酔下に摘出し、動脈にカニューレを挿管して血管灌流を行う。また、

分泌導管にも挿管し、分泌する唾液を経時的に電子天秤で秤量し、時系列データを微分して分泌速度を求めている。この手法によりタイト結合を破壊せず、傍細胞水輸送と経細胞輸送を分離して観測することを可能にしている。

東京歯科大学および日本大学と共同で高速共焦点レーザー顕微鏡により、1-2 秒毎の唾液腺腺房の 3D 像解析を進めた。

2013 年初頭には唾液腺と外分泌に関するゴードンカンファレンスで discussion leader を勤め、3 月には国際歯科学研究学会 IADR にて唾液腺研究について 2013 Distinguished Scientist 賞を受賞した。

唾液分泌における傍細胞輸送と細胞内信号による調節

村上政隆, 魏 飛

成田貴則(日大生物資源)

福島美和子(昭和大歯)

橋本貞充, 澁川義幸, 佐藤正樹(東京歯大)

これまで、唾液腺腺房レベルで傍細胞水輸送を推定するために、共焦点レーザー顕微鏡ステージに血管灌流ラット顎下腺を設置し、mw=500 程度の蛍光物質が細胞間分泌細管に出現することを観測してきた。今回継続して観察を続けてきた急速凍結切断レプリカの観察と共焦点レーザー顕微鏡による 3D 観察とをあわせて考察する。

灌流状態の顎下腺のレーザー顕微鏡による高速スライスを実施し、約 2 秒間隔で z 軸方向 64 枚の 2D 画像を取込み、立体再構成を行った。また並行して細胞間分泌細管内の色素信号を計測した。一方、灌流中の唾液腺の小葉動静脈と導管を結紮し、小葉のスライスを作成、これを液体ヘリウムで冷却した純銅ブロックに圧着し急速凍結固定を施した。この凍結資料を Balzers BAF400 装置を用い、-110℃で凍結切断を行い、その後-100℃にて deep

etching を 3 分間実施した後、Pt-C 回転蒸着によりレプリカを作成した。

1) これまでオスミウム浸漬法により細胞質側より観察された細胞間分泌細管の直径は約 0.7 μm であったが、急速凍結切断レプリカでは 0.5 μm であった。2) 分子量 500 の蛍光色素は 1-2 μm 以下の狭い空間では信号を減少させた。3) 3D 再構成画像を回転させて、細胞間隙が display に平行な面で観察できるスライスを特定することができた。4) 細胞間隙において、蛍光色素は不均一に分布し、basal infolding などの構造により蛍光色素が排除されていることが示された。5) 細胞間隙を平面として含む 2D 像のムービーを作成し、細胞間隙内の蛍光色素の運動を観察した。現在この定量化を試みている。

個別研究（大橋グループ）

【概要】

当研究室では細胞内膜系の生理機能とそれを担うメカニズムをテーマに研究を行なっている。細胞内膜系では、生体膜の分裂・融合によってオルガネラを行き来するメンブレントラフィックにより物質の輸送、分配が行われている。分子は、その機能を発揮すべき細胞内外の正しい場所に送り届けられる。この「古典的な」生理機能に加え、近年、メンブレントラフィックが、一見無関係な細胞間、細胞内のシグナル伝達において、これまで考えられてきた以上に様々な役割を担っていることが注目され始めた。すなわち、細胞内分子の輸送選別が、シグナル伝達の分岐選別に直結しており、細胞内膜系が位置情報を介してシグナル伝達の動的な制御の場を提

供していることが、はっきりと意識されている。

そこで、我々は、発生過程の形態形成における平面細胞極性(PCP)形成のシグナル制御に注目し、現在、PCPシグナル伝達において、メンブレントラフィックに代表される細胞内膜系の動態がはたす役割と、その背後にあるメカニズムの研究を進めている。PCPシグナルは、内耳の有毛細胞が一貫した方向性を示すように、組織全体のグローバルな極性を感知して個々の細胞の極性を生み出す役割を果たしている。組織レベルと細胞内レベルの時空間情報をつなぐインターフェイスとしての細胞内膜系の役割を解明することが現在の主要テーマである。

細胞内膜系の選別輸送のメカニズムと発生シグナル制御

大橋正人，木下典行(基生研)

我々は、上皮系細胞の細胞内膜系分子の、fluorescence localization-based retrovirus-mediated expression cloning法による探索をすすめた。得られた分子から、哺乳動物モデル細胞系とアフリカツメガエルの発生実験系を利用し、PCPシグナルを制御する細胞内膜系タンパク質の候補を得た。これまでに、これらの制御機能分子のいくつかについて細胞内局在を規定する配列や局在を変化さ

せる変異を同定することに成功し、また、これらの機能分子の作用が、PCPシグナル下流の細胞骨格制御と関連していることを示唆するデータを得た。現在、細胞レベルでのタンパク質機能阻害実験系を工夫し、これら制御分子の細胞内局在と機能の相関を解析するとともに、関連する新たな制御因子の探索を始めているところである。

個別研究（毛利グループ）

【概要】

性による生物の生殖戦略は実に多様であるが、そのゴールは受精である。それは雄性配偶子(精子)が雌性配偶子(卵)を活性化させるという普遍的な現象である。この精子が卵を活性化させる現象とそれに引き続いて起こる短時間の多様な細胞内現象を受精と呼んでいる。しかしながら、受精機構の詳細はほとんど解明されていない。どのように精子が卵に近づいてどのように卵を活性化させるのか、その刺激のシグナルは何でどのように卵に伝えられるのか、その後、卵内でどのような反応

が引き起こされて発生のプログラムがどのように実行されるのかわかっていない。普遍的な現象として受精時には卵内の Ca^{2+} が著しく増加することが知られている。哺乳類や鳥類については卵内で細胞内 Ca^{2+} 変化が何によってどのように起こるのかある程度わかってきた。しかし、もっと単純なはずの海産無脊椎動物ウニ卵についてはまだ不明である。さらに卵内 Ca^{2+} 増加のシグナルに続いてどのようなシグナル(ポストカルシウムシグナリング)が引き起こされるのか不明である。これ

まで Ca^{2+} 増加の後の一酸化窒素 (NO) 遊離やミトコンドリアの活性化現象を発見したが、これらの現象と Ca^{2+}

増加との関係を本年も引き続き研究した。

ウニ卵受精時のミトコンドリア活性化と一酸化窒素 (NO) 遊離との関連

毛利達磨, 経塚啓一郎

昨年度までの研究からミトコンドリア阻害剤 CCCP, FCCP, rotenone, antimycin A, oligomycin などは(一酸化窒素)NO 遊離を阻害することがわかった。NO 遊離は Ca^{2+} 増加のピーク以降から起こることからミトコンドリアの活性化は NO 遊離の上流にあることが示唆された。本年度はさらに Ca^{2+} 遊離とミトコンドリア活性化との関係を詳しく見るために Ca 蛍光色素 (Ca Green dextran) とミトコンドリア電位依存性蛍光色素 (MitTracker Red

CMXR) の同時測定を共焦点顕微鏡を用いて行い, 受精時の変化を調べた。その結果ミトコンドリアの活性化は Ca^{2+} 増加のピークの途中で起こることがわかった。また, NO 吸収剤 PTIO のによる NO 遊離阻害はミトコンドリア活性化を阻害しなかったことから, そのシグナルは NO 遊離の上流にあることがさらに強く示唆される結果であった。

個別研究 (樫原グループ)

【概要】

生後動物の運動神経細胞の生存は, その支配標的器官である筋との結合に依存することは古くよりよく知られている。この依存性は, 運動神経細胞から筋へ作用する因子と共に, 筋から運動神経細胞へ作用する因子の相互作用によると考えられている。生後, 骨格筋は, 速筋と遅筋に分化するが, これらに結合している運動神経細胞の種々の電氣的性質も変化する。例えば, 生後直後では速筋を支配する運動神経細胞と遅筋を支配する運動神経細胞の活動電位に続く後過分極 (AHP) の期間に差

は無いが, 筋の発達に伴い, 遅筋を支配する運動神経細胞の AHP の期間は, 速筋を支配する運動神経細胞のそれより長くなる。さらに, 遅筋を支配する運動神経細胞の AHP の期間は, 運動神経細胞と筋との結合を絶つと短くなり, 筋と再支配すると正常に戻る。すなわち, 生後の運動神経細胞の AHP の期間は, 運動神経細胞と筋の結合に依存する。我々は, この電気生理学的知見に基づいて, 生後動物の運動神経細胞の分化を運動神経細胞の AHP に関与する分子発現を手がかりに解析している。

ラット運動神経細胞のチャネル発現の支配標的筋依存性

樫原康博, 野村智美

成熟ラットの運動神経細胞の活動電位に続く後過分極 (AHP) に関与すると考えられるチャネル分子の発現が, 支配する筋に依存するかを検討した。この目的のために, あらかじめ筋から逆向性に標識した長指伸筋を支配する運動神経細胞とヒラメ筋を支配する運動神経細胞体のチャネル分子の発現及び分布を調べた。次に, 長

指伸筋, ヒラメ筋さらに内側腓腹筋の個々の筋線維を支配する運動神経細胞終末のチャネル発現が, 結合している筋線維のファイバタイプに依存していることを幼若期から成熟期で確認した。さらに, これらの運動神経細胞体での AHP 関連チャネルの分子発現が運動神経細胞の筋支配の有無に依存するかを検討している。

特別研究（永山グループ）

【概要】

生理研の目指す脳・生体分子統合イメージング法を生体分子側からボトムアップ的に推進する特別研究において、200 kV と 500 kV 電子顕微鏡システムの位相差法

の高度化と安定作動に注力し開発および応用研究を行った。

電子顕微鏡用位相板の開発と応用

永山國昭

1947 年の Boersch による提案以来未解決であった位相差電子顕微鏡における位相板帯電防止に関する研究を継続し、応用研究を行った。特に帯電防止位相板を用いた 200kV 電顕の生物応用に関し成果があった。500kV 位相差電顕は生物応用への予備的調整を行った。生理研アウトリーチ活動の一環として 10 年来行ってきた出前授業「先人たちの見たミクロ世界」で用いているレーウエンフック顕微鏡をスマートフォンと組み合わせスマホ顕微鏡を発明した，最初の授業を愛宕小学校で行った。

【位相板応用】

Baylor 医科大の Wah Chiu 教授グループとの共同研究を遂行し，シアノバクテリアにおけるシアノファージ感染過程をファージの立体構造変化として可視化した (Nature)。Yale 大学の Hong-Wei Wang グループと共同研究を遂行し，ヒトダイサーの RNA 複合体の立体構造を解明した (Nature Str & Mol Biology)。東京大学片岡教授グループと数年前に行った位相差電顕共同研究が論文化された (Macromolecules)。

行動・代謝分子解析センター

遺伝子改変動物作製室

【概要】

脳機能を研究するには個体レベルでの解析が必須で、特に分子生物学的・発生工学的技術を駆使して作製する遺伝子改変動物を利用することは有益な解析手段といえる。ラットは、伝統的に生物・医学分野の生理学的な研究に用いられ、実験データなどの蓄積も豊富である。一方マウスは、遺伝子操作技術が確立しており小実験動物として主流を占めているが、体が小さいためサンプルの採取や生理学実験、とくに臓器移植などの外科的手技には向いていない。ラットにおける一連の生殖工学関連技術はマウスと同等の高い完成度にあるが、最近まで ES 細胞株の樹立方法が未開発だったので、

ノックアウト (KO) ラットを利用した逆遺伝学的研究は遅々として進まなかった。しかし 2008 年、ラットの ES 細胞株ならびに iPS 細胞株の樹立が報告され、2010 年には p53 遺伝子 KO ラットが、2012 年には Rosa26 遺伝子座への tdTomato 遺伝子ノックイン (KI) ラットの作製によって実証された。遺伝子改変動物作製室ではマウス・ラットの遺伝子改変技術を提供しつつ、ラット ES/iPS 細胞の樹立と遺伝子ターゲティングによる KO/KI ラットの作製準備を進めてきた。ここでは、ラット ES 細胞株の生殖系列への寄与条件に関する後方視的解析について概要を紹介する。

ラット ES 細胞株の生殖系列への寄与条件に関する後方視的解析

平林真澄

ラットでは 4 倍体胚補完や体細胞核移植で個体を作製する技術が確立されていないので、ES 細胞の遺伝形質だけを備えた個体を得るにはキメラを介して野生型ラットと交配する方法しかない。そこで、様々な系統から異なる培地で樹立したラット ES 細胞株を用い、キメラ経由で G1 世代への形質伝達を調べ、その成否に基づきラット ES 細胞株の生殖系列寄与に関わる条件を後方視的に解析した。全 16 ライン中 11 ラインの ES 細胞株

で生殖系列への寄与が確認でき、MEK および GSK3 の阻害剤にフォルスコリンを添加した培地で樹立したものでは、生殖系列寄与が 100% だった。毛色が有色とアルビノのグループ間には寄与率に差は認められず、ES 細胞株の遺伝的性も伝達への影響条件ではなかった。また、BLK 由来 ES 細胞株からのキメラ度 (アルビノに占める黒毛色の割合) と伝達度 (G1 産仔あたりの陽性個体の割合) に相関は認められなかった。

代謝生理解析室

【概要】

研究所内外が作成、保有する遺伝子改変マウス及びラットの代謝、生理機能を詳しく解析し、標的遺伝子の機能と行動変異のメカニズムを明らかにすることを目的に本年度より新たに開設された。計測する代謝・生理機能と担当者は以下の通りである。(1)運動系を中心とした、覚醒下での単一ニューロン活動など神経活動の計

測 (担当: 生体システム研究部門, 南部教授), (2) 自由行動下における脳内特定部位での神経伝達物質の分泌計測 (担当: 生殖・内分泌系発達機構研究部門, 箕越教授), (3) フラビンおよびヘモグロビン由来の内因性シグナルを利用した脳領域活動と膜電位感受性色素を用いた回路活動のイメージング (担当: 生体恒常機能

発達機構研究部門、鍋倉教授)、(4)自由行動下における摂食行動、エネルギー消費の計測(担当:生殖・内分泌系発達機構研究部門、箕越教授)、(5)自由行動下における体温、脈拍数、血圧の計測(担当:細胞生理研究

部門、富永教授、鈴木喜郎助教)。当面はマウスの解析を中心に行う。平成25年度より計画共同研究「マウス・ラットの代謝生理機能解析」を新設し、所外研究者の共同利用を開始した。

膀胱上皮細胞における TRP チャネルの役割

渡邊成樹(旭川医科大学・泌尿器科)

鈴木喜郎, 富永真琴

中枢性呼吸調節機構は、換気応答によって驚くべき厳密さで生体の P_{CO_2}/pH 変動を一定の狭い生理的範囲に調節している。この調節機構を担っている中枢化学受容細胞及びその化学受容器の分子実体は長い間謎であった。提案代表者は、これまでに脳幹・延髄由来のニューロン・グリア共培養細胞を用い、 CO_2/pH 負荷に対する細胞内応答を、 Ca^{2+} / pH のイメージング、perforated patch-clamp 法により検討したところ、高 CO_2 負荷によりグリア細胞が Ca^{2+} 応答をすることを見出してきている。この Ca^{2+} 応答を引き起こす Ca^{2+} チャネルの候補として、薬理的スクリーニングの結果、TRP チャネルのサブタイ

プが推定された。生理学研究所の富永教授と共に、TRP チャネルにおいて、どのサブタイプが換気応答の制御に関与するかを明らかにし、TRP チャネルが担う中枢性呼吸調節機構を解明することが本研究の目的である。推定されたサブタイプを含む、温度感受性 TRP チャネル欠損マウス群に対する高 CO_2 負荷による換気応答の変化を whole body plethysmography 法にて野生型マウスと比較した。その結果、高 CO_2 負荷による換気応答に有意な減弱が観察される温度感受性 TRP チャネル欠損マウスを見出しているが、個体差があるため解析を継続している。また O_2 濃度の条件を変えてその影響を検討している。

中枢性呼吸調節における TRP チャネルの役割

平田 豊(兵庫医科大学・生理学生体機能部門)

鈴木喜郎, 富永真琴

中枢性呼吸調節の役割の1つは、換気応答によって体内の二酸化炭素分圧 P_{CO_2}/pH を厳密に調節することであるが、その調節機構の鍵となる中枢 CO_2 および pH センサーの分子実体は未だ不明な点が多い。我々は環境化学物質および pH 変化を受容しうる TRP チャネルに着目

し、TRP チャネル欠損マウスに対する各種 CO_2 負荷における換気応答の変化を plethysmography 法にて解析した。その結果、一部のマウスにおいて換気応答の違いが観察された。現在は本応答の O_2 濃度変化に対する影響を解析している。

パーキンソン病における視床下核からの興奮性神経伝達

渡邊 大, 長谷川拓, 西岡忠昭(京都大学大学院生命科学研究科認知情報学講座)

知見聡美, 南部 篤(生体システム研究部門)

パーキンソン病における視床下核の役割を解明する

目的で、6-OHDA を黒質緻密部に局所投与することに

よって作製したパーキンソン病モデルラット視床下核に、遺伝子発現効率を高めた改変型テタヌトキシン遺伝子 (eTeNT) を発現させるレンチウイルスベクターを投与する実験を行なった。パーキンソン病モデルラットの淡蒼球内節では、皮質由来の抑制が著しく減弱し、多くのニューロンにおいて早い興奮と遅い興奮の 2 相性の応答が観察される。ウイルスベクターをパーキンソン病モデルラットの視床下核に注入してテタヌトキシ

ンを発現させると、早い興奮と遅い興奮の両方が著しく減弱し、抑制が観察されるようになった。以上の結果は、本ウイルスベクターにより視床下核からのグルタミン酸作動性神経伝達が増進できることを示している。今後、視床下核からのグルタミン酸作動性神経伝達が、パーキンソン病症状に果たす役割について調べて行く計画である。

エネルギー消費に及ぼす脱共役タンパク質 1 と骨格筋 AMPK の調節作用

高木一代, 岡本土毅, 箕越靖彦

マウスの熱産生組織として、褐色脂肪組織 (BAT) の他、骨格筋が知られている。しかし、食事誘導性熱産生 (DIT) における BAT と骨格筋の役割は不明である。本研究では、1 日のエネルギー消費量 (EE) から安静時代謝 (RMR)、運動 (Ex)、摂食による適応熱産生 (FT) を算出する方法を調べるとともに、EE に及ぼす脱共役タンパク質 (UCP1) と骨格筋 AMPK の調節作用を調べた。UCP1 ノックアウトマウス (UCP1-KO)、骨格筋特異的 dominant-negative-AMPK 発現マウス (dnAMPK-mTg)、両者をかけ合わせ得られたマウス (KO x Tg) に高脂肪食 (HFD) を摂取させ、

室温環境下で 1 日のエネルギー消費量 (EE) を調べた。その結果、KO x Tg マウスでは EE が低下した。UCP1-KO および dnAMPK-mTg マウスでは差がなかった。EE から、安静時代謝 (RMR)、運動 (Ex)、摂食による適応熱産生 (DIT) を算出すると、RMR と Ex に差は無く、DIT のみが低下していた。さらに KO x Tg マウスは、HFD の摂食量を一定にしても対照群に比べ体重が増加した。以上の結果から、マウスにおける DIT は、UCP1 および骨格筋 AMPK の両方が関与することが明らかとなった。

行動様式解析室

【概要】

マウスの遺伝子の 99% はヒトにもホモログ (対応する遺伝子) があり、さらに遺伝子ターゲティングなどの技術を応用することで、遺伝子を自由自在に操作することができる。マウスでは心理学的な解析をはじめとして、個体レベルでの多彩な解析技術が適用でき、ヒト脳の統合的理解のためのモデル動物として最適であると考えられる。全ての遺伝子の 80% 以上は脳で発現していると言われており、脳で発現する遺伝子の機能を調べるためにはその最終アウトプットである行動を調べることが

必要だと考えられる。我々は各種の遺伝子改変マウスに対して、知覚・感覚、運動機能、情動性などから記憶学習や注意能力など高次認知機能まで、幅広い領域をカバーした行動テストバッテリーを用いて解析し、各種遺伝子の新規機能の探索を行っている。国内外の多数の研究室との共同研究を行っており、これまでに行動様式解析室として 74 系統、3982 匹のマウスを解析している。この中には、精神疾患のモデルマウスとなるような系統も複数見つかった。

精神疾患の中間表現型「未成熟脳」のメカニズム解明と制御法の探索

高雄啓三, 宮川 剛

これまでに精神疾患様の行動異常を示すマウス系統を多数同定してきた。その中でも特に顕著な統合失調症様の行動異常を示す複数系統のマウスで共通して海馬歯状回の顆粒細胞が擬似的な未成熟状態にあるという「未成熟歯状回 (immature Dentate Gyrus; iDG)」現象が見られることが明らかになった (Yamasaki et al., *Mol Brain*, 2008; Ohira et al., *Mol Brain*, 2013; Takao et al., *Neuropsychopharmacology*, 2013)。この未成熟歯状回という現象は統合失調症や双極性気分障害の患者死後脳でも生じていることが示唆されており (Walton et al., *Transl Psychiatry*, 2012), 精神疾患の新たな中間表現型として非常に有望である。また, 統合失調症患者では海馬歯状回以外に前頭皮質も擬似的な未成熟状態にあることが示唆されており (Hagihara et al., *Mol Brain*, 2014), 統合失調症を含む精神疾患の発症には脳の様々な領域の細胞の成熟度異常が関係していると考えられ

る。マウスを用いた研究では, 歯状回の成熟した神経細胞が薬の投与やけいれん発作の誘導などによって疑似的な未成熟状態に戻ってしまうこと (脱成熟) も明らかとなっている (Kobayashi et al., *PNAS*, 2010; Shin et al., *Bipolar Disord*, 2013)。このような双方向性の成熟度変化は, 内的・外的攪乱に対する細胞レベルでのホメオスタティック可塑性によって起こっていると考えられる。行動様式解析室では, 光遺伝学や薬理遺伝学などの手法を用いて神経細胞の活動性を操作し, その成熟度変化を調べることで海馬歯状回の神経細胞をはじめとする各種の脳細胞の成熟度変化が起こるメカニズムの解明を目指している。また, 神経細胞成熟度の制御法を確立することができれば統合失調症やうつ病などの精神疾患の新たな予防・治療法の創出に大きく貢献すると期待できる。

マウスを用いた脳表現型データベースの開発と応用

高雄啓三, 宮川 剛

藤田保健衛生大学や京都大学などでの活動を合わせ, これまでに国内外 100 以上の研究室との共同研究で 172 系統 10000 匹以上の遺伝子改変マウスや各種薬物投与マウスなどについて網羅的行動データを取得している。個体ごとの生データはデータベースに登録しており, これらを用いて各種行動の指標となる数値間にどのような関連性があるか, 実験における各種のパラメータが行動データに及ぼす影響などについてインフォマティックス的解析を行うことが出来る。このデータベースを活用し, 遺伝子改変マウスのバックグラウンド系統として最も多く使われている C57BL/6J 系統についてのデータをまとめて, 実験を行う時間や実験時の週齢, ケージ内の同居マウスの匹数などの各種変数が実験結果に与える影響を解析している。実験を行う時間が活動性に影響を

与えることや, 週齢が進むにつれて痛覚感受性が鈍くなることなどが明らかとなっている。これらの実験時における各種変数が行動に与える影響を明らかにすることで行動解析のプロトコルの改良や標準化を推進していく。現在, 論文発表された 53 系統 3731 匹分のデータおよび各種遺伝子改変マウスの野生型コントロールとして使用された C57B/6 亜系統のマウスのデータ (1965 匹分) についてはデータベース <http://www.mouse-phenotype.org/> で公開している。この Web サイトではマウス用行動解析ソフトウェアの公開も行っている。この他, 行動実験後の各個体の行動データが付属したマウスの脳や血漿サンプルについてもリソース化を進めている。

多次元共同脳科学推進センター

【概要】

多次元共同脳科学推進センターは、全国の異分野研究者が参加し、脳内の様々な階層で生成されている情報を解析・操作する研究や社会性をもたらす脳活動を明らかにする研究の基盤的技術の研究開発、及び、異分野をまたぐ若手脳科学研究者の育成を行うネットワーク機構を構築し、サバティカル研究者の受け入れも行いながら、研究プロジェクトを推進するとともに人材養成を行う事業を推進している。

本センターは2008年4月に設置され、自然科学研究機構(生理学研究所、基礎生物学研究所)の複数の教授が併任し運営を開始した。併任教授に加えてプログラムオフィサーとして特任教授を置き、外部研究機関からも基礎的な脳科学及びその関連分野(臨床医学、工学、心理学、倫理学)を専門とする客員教授、客員准教授を選任し、外部の研究機関と連携した研究環境を整え運営されている。

2009年度には流動連携研究室を新設し、客員教授、客員准教授、客員助教を募集し、サバティカル的な制度を活用した長期滞在型共同研究の推進を図っている。

2012年度には本センターの脳内情報抽出表現研究室、霊長類脳基盤研究開発室及びNBR事業推進室を廃止し、霊長類脳基盤研究開発室及びNBR事業推進室の役割は、発展的に新設された脳機能計測・支援センターにウイルススペクター開発室及び霊長類モデル動物室へと引き継がれた。そして脳内情報抽出表現研究室を拡大した脳情報基盤研究開発室と社会的脳表現解析開発室を新設した。

さらに、2013年度には脳科学研究戦略推進室を新設し、昨年度まで認知行動発達機構研究部門において運営していた文部科学省「脳科学研究戦略推進プログラム」事務局業務を引き継いだ。本事務局は、プログラム全体管理のサポートや内部会議の主催、一般市民や専門家向けのアウトリーチ活動として、シンポジウムやワーク

ショップ、サイエンスカフェ、出張授業などを開催し、広報冊子の出版やオフィシャルウェブサイト運営業務などを行った。

〈多次元ブレインストーミング・脳科学新分野探索フォーラム〉

自然科学研究機構新分野創成センターブレインサイエンス研究分野との連携強化を進め、3つのテーマでブレインストーミングを実施した。将来の脳科学研究の方向性について、全国の様々な専門家から事前にインタビューを行い、そこで得られた情報にもとづいて、「大規模脳神経回路機能マップ」、「脳全体のシステムの理解」、「自発脳活動」をテーマにブレインストーミングを行い、新たな脳科学研究の方向性について議論を行った。

〈2013 多次元トレーニング&レクチャー「ヒト、サル、ラットの脳解剖学から学習・認知の理解へ」〉

脳の研究を進めるに当たり、脳の解剖学的知識は非常に重要だが、若手研究者や様々な分野から参入しようとする異分野の研究者にとっては十分な講義や実習を受ける機会がない。モデル動物としてマウス、ラット、サルが多くの研究に用いられているが、異なるモデル動物間やヒトとの種間の解剖学的な比較について学習する機会が殆どない。このような状況を踏まえて、学習・判断に関連する神経回路に焦点を絞った脳の構造と機能に関する講義・実習を実施した。

〈流動連携室の新設によるサバティカル事業の実施〉

今年度は、客員助教として信州大学医学部附属病院の小平農助教、福島県立医科大学の岡本正博助教が共同研究を実施した。

脳機能計測・支援センター

形態情報解析室

【概要】

形態情報解析室では、国内唯一の医学生物学専用超高圧電子顕微鏡 H-1250M、低温位相差電子顕微鏡、連続ブロック表面 SEM などを使用して、バクテリア、生体組織などの厚い試料や、細胞、ウイルス、タンパク質などの無染色氷包埋試料などから、高分解能の三次元構造観察を行っている。H-1250M は、生理研を代表する共同利用実験機器の一つであり、毎年これを利用した研究課題を全国から募集している。平成 25 年度は、細菌のクライオ観察から神経細胞の観察にいたるさまざまな生体の三次元形態研究について、外国からの 3 課題を含む合

計 17 課題が採択され実施された。また、位相差電子顕微鏡法および低温電子顕微鏡法による共同研究では、ノロウイルス様粒子の高分解能構造解析や液中環境セルの開発、連続ブロック表面 SEM では、酵母細胞内小器官の形態解析、原生動物の細胞変形運動の解析などの成果を得た。本研究室では、独自の研究に加えてこれらの共同研究を支援することで、それぞれの課題を達成するための付属装置の開発や電顕像からの最適な立体再構成法の研究も合わせて行っている。

20S プロテアソームにおけるプロテアソーム活性化因子 PbaB の結合様式の解析

村田和義

雲井健太郎，加藤晃一（岡崎統合バイオサイエンス）

真核生物 20S プロテアソーム自己組織化因子の古細菌ホモログとして同定された PbaA と PbaB は、それぞれ四量体を形成し、ATP 依存的なプロテアソーム活性化因子として機能することがわかった。では、PbaA、PbaB ホモ四量体がどのように 20S プロテアソームと相互作用して活性化するのかを、電子顕微鏡(電顕)トモグラフィと単粒子解析法により構造学的に調べた。

古細菌から抽出・精製した 20S プロテアソームに PbaA および PbaB のホモ四量体を反応させて、電顕グリッド上で酢酸ウラ溶液によりネガティブ染色した。そして、これを生理研の高分解能電子顕微鏡(日本電子製

JEM2200FS)にセットして、照射ダメージを受けない低い電子線量で、 $\pm 70^\circ$ の範囲で 2° 間隔の連続傾斜像を撮影し、三次元再構成した。次に、このトモグラムからプロテアソームの三次元像を切り出し、分類して整列化後、その平均像を得た。

その結果、プロテアソームと PbaB を反応させた場合に、プロテアソームの両端に、PbaB による明瞭なキャップ構造が見られた。また、このキャップには、完全なものと不完全なものが見られた。このことから、PbaB がプロテアソームの両端と相互作用し、動的にその内部への基質の誘導を促すことが明らかとなった。

連続ブロック表面走査型電子顕微鏡の構造解析で明らかになった AAA タンパク質 Cdc48p によるミトコンドリアの形態制御機構

宮崎直幸, 村田和義

江崎雅俊, 小椋 光(熊本大)

増殖している細胞において、オルガネラの形態は常に変化し、厳密に制御されている。これまでに、出芽酵母のミトコンドリアの形態制御に、サイトゾルに存在する AAA 型分子シャペロンの 1 つ Cdc48p が関与し、その機能欠損によって、ミトコンドリアが細胞内で巨大な塊を形成することをがわかった。しかし、観察された巨大なミトコンドリアは、膜融合により巨大なミトコンドリアが形成されているのか、あるいは小さなミトコンドリアが膜融合しないで集積しているのか、蛍光顕微鏡観察では解像度の限界から不明であった。

本研究ではこれを明らかにするために、出芽酵母細胞

の走査型電子顕微鏡を用いた連続ブロック表面観察 (SBF-SEM) を行った。SBF-SEM では試料表面をダイヤモンドナイフで薄く切削しながら、新たに現れる形態を SEM で連続的に取得し、これらをつなぎ合わせることでより細胞の 3 次元構造を明らかにする。

その結果、野生型酵母ではヒモ状につながったミトコンドリアが観察されたが、Cdc48p の機能欠損株では膜は繋がっていない断片化した小さなミトコンドリアが集積していることがわかった。今回得られた SBF-SEM の結果より、Cdc48p の機能欠損はミトコンドリア融合反応に異常を起こすことが分かった。

生体機能情報解析室

【概要】

ニホンザルを実験対象として、随意運動や意志・判断・学習・睡眠などの中枢神経機構についての研究を継

続している。大脳皮質に埋め込まれた電極から記録されるフィールド電位の解析を行った。

大脳皮質フィールド電位における律動波の研究

達本 徹

様々な状況に関連して脳内の神経が律動的に活動することが知られている。これらの律動的神経活動は多様な情報処理過程の基盤として役立っている可能性が指摘されているが、その生理学的な意義については未だ殆ど解明されていない。そこで、律動的神経活動の発生部位とその性状についての基礎的データを取得する目的で、覚醒や睡眠の様々な状態におけるニホンザルの大脳皮質フィールド電位を記録解析した。ケージ内で自由状態でのサルの脳活動を記録するために、サルの頭部に設置できる小型増幅器と無線テレメータと、テレメータと同期をとって撮影できる近赤外線ビデオ装置を開発製作した。覚醒・睡眠の各状態の記録を行ったが、解析は

まず睡眠状態における律動波の特徴を明らかにすることから開始した。その結果、海馬脳波においてガンマ周波数帯での脳活動とデルタ・シータ周波数帯での脳活動に相関が認められ、さらにその相関が REM 睡眠と Non-REM 睡眠の相変化に伴って変化するを見いだした。また、大脳新皮質において、睡眠紡錘波が皮質領野毎に特徴的な周波数で発生することや、複数の皮質領野間で時間的相関関係をもって出現することも明らかになった。睡眠中の律動的脳活動は記憶や学習との関係が報告されており、今回見つかった律動波の性質もそのような情報処理機構と関係している可能性がある。今後は海馬の脳活動と大脳新皮質の脳活動の関係を詳しく

解析し、背後に存在する神経機構を解明することを目標に研究を進めたい。

多光子顕微鏡室

【概要】

多光子顕微鏡室では、2光子蛍光顕微鏡を用いた共同研究を行うと共に、新たに組織深部で生化学反応を可視化できる2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡を構築した。この顕微鏡を用いることで組織深部において、細胞の形態などの構造だけでなく、生きた細胞内で起こるシグナル伝達や分子間相互作用をイメージングすること

ができるようになった。最先端の光学技術に加え、新規蛍光タンパク質や光制御可能なタンパク質分子の開発も行っており、これらの技術を電気生理学的手法などと組合せることで、神経細胞およびグリア細胞の機能に関する研究を推進している。

シグナル分子活性化検出プローブのフォールディング効率改善法の確立

柴田明裕，中畑義久，鍋倉淳一，村越秀治

細胞内のタンパク質分子の活性化を検出する方法として蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)がよく用いられる。この方法でタンパク質の活性化を可視化するためには、FRET プローブを細胞に発現させる必要がある。しかしながら、蛍光タンパク質を用いた FRET プローブはサイズが 50kDa 以上と比較的大きくなってしまうため、細胞内で凝集してしまうことが頻繁に起こることが問題であった。そこで本研究ではこのような不適切なフォールディングによる凝集が起こらないようにするための方法を確立することにした。まず、フォールディング効率を改善したいタンパク質を鋳型にしてエラー

誘発 PCR を行い、mCherry の N 末端に融合し、大腸菌に形質転換する。このようにしてライブラリーを作製したのち、大腸菌コロニーの蛍光を観察することにより明るい mCherry の蛍光をもつコロニーをピックアップする。明るい赤色の蛍光は鋳型の大腸菌内での可溶性が改善されたことを意味する。続いて、変異が導入された鋳型で FRET プローブを作製し、その反応性を確認したところ、反応のバラつきが劇的に減少しており、高感度に分子の活性化を検出することができた。今後は、この方法の有用性を様々な FRET プローブで確認していく予定である。

シナプス内の細胞骨格分子を制御するシグナル分子の活性イメージング

村越秀治

神経回路の形成、機能の基礎となるシナプス結合の可塑性は、シナプスの後端を形成するスパイン内の情報伝達系によって制御されていると考えられる。しかしながら、シナプス内で起こる生化学反応は、調べる方法論がないためにこれまで殆ど分かっていなかった。本研究では、自作の2光子蛍光寿命イメージング法を用いることで、海馬組織内の CA1 領域にある神経細胞樹状突起上

のスパイン内で起こるシグナル伝達過程を可視化し、シナプス可塑性の仕組みを解明することを目標としている。現在までに、自作の2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡を構築し、HeLa 細胞を用いて顕微鏡の評価を行い、実際に細胞内で分子間相互作用による FRET を観察できることを確かめた。現在は、各種キナーゼ分子の活性化を見るための FRET センサーを作製しているところである。

光応答性 CaMKII 阻害分子のシナプス可塑性と個体マウス学習研究への応用

村越秀治, 安田涼平(マックスプランクフロリダ研究所)

本研究では、シナプスの可塑性にとって重要な分子である CaMKII の活性化を光照射依存的に阻害可能な分子の開発を行っている。今年度までに、植物の光受容タンパク質キナーゼである Phototropin1 の LOV2 ドメインに CaMKII 阻害ペプチド(AIP2)を融合させることによって、光制御可能な CaMKII 阻害分子を作製することに成功した。この分子は青色光照射によって、LOV2 に結合して

いた AIP2 が解離し、CaMKII のキナーゼドメインに結合することで活性を阻害する。現在までに、この分子を用いて、単一スパインを刺激したときのスパイン形態の変化を光照射依存的に阻害できることを確認することができた。今後は、トランスジェニックマウスを作製し、学習における CaMKII の機能を調べる予定である。

光応答性 CaMKII 分子の開発とシナプス可塑性研究への応用

村越秀治

本研究では、シナプスの可塑性にとって重要な分子である CaMKII を青色光照射によって活性化することができる分子の開発を行っている。現在までに、CaMKII のヒンジ領域に植物の光受容タンパク質キナーゼである Phototropin1 の LOV2 ドメインを挿入することによって、光制御可能な CaMKII 分子を作製することに成功した。

この分子は青色光照射によって、分子構造が大きく変化し、キナーゼ活性が上昇する。今後は、この分子を用いて、単一スパインを刺激したときのスパイン形態の変化を 2 光子顕微鏡を用いて観察、解析することで CaMKII の機能を調べる予定である。

二光子蛍光寿命イメージングによる分子間相互作用検出のための高感度蛍光タンパク質の開発

村越秀治, 鍋倉淳一, 柴田明裕

本研究では、2 光子蛍光寿命イメージングによる蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の観察を高感度で行うことができる蛍光タンパク質の開発を行っている。エラー誘発 PCR をおこない mCherry または mRFP にランダムに変異を導入し、大腸菌に形質転換しライブラリーを作製したのち、大腸菌コロニーの蛍光を観察することにより

スクリーニングを行った。これによって、従来 FRET のアクセプターとしてよく用いられてきた mRFP と比べて 30%以上 FRET 効率を改善することに成功した。今後はこの分子の吸光計数、量子収率、スペクトル測定を行う予定である。

ウイルスベクター開発室

【概要】

遺伝子改変技術は、脳機能を解析するための必要不可欠なツールである。げっ歯類では、トランスジェニッ

ク法やノックアウト法といった優れた遺伝子改変技術を利用することが出来るが、霊長類では、現在のところ

ろこれらの技術を適用することは容易ではない。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターやレンチウイルスベクターに代表されるウイルスベクターは、げっ歯類から霊長類に至まで広範な哺乳類に適用可能な非常に優れた遺伝子改変ツールである。ウイルスベクター開発室には、日本有数の AAV ベクターあるいはレンチウイルスベクターの大量精製システムが備わっており、これら

のウイルスベクターの効率的な提供体制も整備されている。本研究室は、ウイルスベクターの提供拠点としての役割を担い、国内外の研究機関からの要望に応じて高品質なウイルスベクターの提供を行うことによって共同研究を推進している。また、これらのウイルスベクターを駆使して、脳の複雑な神経回路網を構成する特定神経路の機能解析に取り組んでいる。

脳機能解析に有用なウイルスベクターの開発・提供と共同研究の推進

小林憲太

国内外の研究機関からの要望に応じて、延べ150件のウイルスベクターの提供を行い、共同研究を進めている。いくつかの共同研究では、すでに興味深い結果が得られつつあり、共同研究の一つは論文として発表された。さらに、ウイルスベクターを大量に精製するための

技術提供にも対応出来る環境を整備した。また、我々が新たに開発した高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの一つである HiRet ベクターが、骨格筋へ投射する運動神経繊維において極めて高い逆行性の遺伝子導入効率を示すことを明らかにした。

特定の神経路あるいは神経領域の機能解析

小林憲太

我々が新たに開発した二重遺伝子導入システムを利用することにより、脳の複雑な神経回路網を構成している特定の神経路のみを解析することが可能となる。低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho ファミリーとその関連分子は、様々な細胞反応を制御するが、脳機能におけ

る役割は未だに不明な点が多い。現在、大脳基底核ループに焦点を当てて、大脳皮質-線条体路や線条体領域における Rho ファミリーとその関連分子の役割を網羅的に解析している。

霊長類モデル動物室

【概要】

平成 14 年に開始され、自然科学研究機構が代表機関となって京都大学霊長類研究所(分担機関)と共同推進してきた文部科学省補助事業ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)「ニホンザル」は、優れた認知能力を持ち、我が国の高次脳機能研究に不可欠なモデル動物であるニホンザルを、病原微生物学的にも安全かつ付加価値の高い実験用動物として繁殖育成し、国内の研究者を対象に安定的に供給する体制を構築することを

目的としている。事業推進の柱として平成 25 年度は以下4つの業務を行った。

(1) 研究用ニホンザルの繁殖・育成体制の整備

平成 28 年度までに本事業を集約(年間80～90頭を生産して年間70頭を出荷する体制へ移行)することが決まったため、生理学研究所の繁殖事業を停止(オスとメスの隔離)した。

(2) 研究用ニホンザルの供給事業の実施

平成 25 年度の提供実績は、25 件 63 頭であった。ユーザーの利便性を考えて出荷する個体はすべて 3 歳以上とした。分担機関からは 15 頭を出荷して、残りの 48 頭を代表機関から出荷した。また、かねてより要望のあった他分野への提供について検討した結果、眼科と感染症研究へ動物を提供した(眼科：2 件 6 頭、感染症：1 件 2 頭)。

(3) 研究用ニホンザルの特性に関するデータ収集

ユーザーの要望に応じて個体情報を提供することは可能であるが、飼育管理上の必要もあり、個体情報のデータベースは一般には公開していない。ニホンザルに

関する文献の検索と収集を実施して収集したデータは、ホームページにて公開している。

(4) プロジェクトの総合的推進

プロジェクトの円滑な運営のために運営委員会を 4 回開催した。供給検討委員会を開催して(6 月, 12 月), 応募書類の審査結果を運営委員会へ報告すると共に, 申請書類の訂正・質問をとおして申請者のニホンザル実験・飼育環境の改善に貢献した。出荷検査に関して疾病検討委員会委員の意見を聴取して(12 月), 提供動物の品質の維持・向上に努めた。

岡崎統合バイオサイエンスセンター

生命時空間設計研究領域

【概要】

ゼブラフィッシュを用い、脊髄・脳幹神経回路の形成機構および、回路の作動機構の解析を進めている。特定のクラスの神経細胞を GFP 等の蛍光タンパク質により可視化し、それら蛍光タンパク質陽性細胞の発生と機能

を追求している。また、チャネルロドプシンやハロロドプシンなどの光遺伝学的ツールを積極的に用いて運動系神経回路の機能解析を進めている。

背側脊髄の発生機構の解析

佐藤千恵，東島眞一

発生期背側でドメイン様に発現する複数の転写因子に関してトランスジェニックフィッシュを作製し、それぞれのトランスジェニックフィッシュにおける蛍光タンパク質の発現領域を詳細に検討した結果、発生期の背側は6つのドメインが形成されることが明らかとなっ

た。また神経伝達物質特性とリンクして蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックフィッシュと掛け合わせることで、それぞれのドメインから生じる神経細胞の神経伝達物質特性を明らかにすることに成功した。

胸びれのリズム運動司る神経回路の解析

木村有希子，東島眞一

胸びれのリズム運動は、外転筋、内転筋の左右相互のシンプルな運動からなり、陸上脊椎動物四肢の運動のプロトタイプと考えることができる。このリズム運動を司

る神経回路を特定のクラスの神経細胞を可視化したトランスジェニックフィッシュ、および光遺伝学ツールを用いて解析を進めている。

動物実験センター

【概要】

本年度は、山手地区 SPF 室において *Pasteurella pneumotropica* および *Pseudomonas aeruginosa* が検出され、感染対策を実施した。明大寺地区だけでなく、山手地区 SPF 施設でも上記感染症の侵入を許した点は大きな反省点である。特に、微生物学的クリーニングをする飼育室において *Pseudomonas aeruginosa* が検出されたことは、胚操作業務の遂行に支障を及ぼした。以下、感染事故の経緯と対策を中心に、本年度の業務活動を述べる。

1. 山手地区 SPF 施設の *Pasteurella pneumotropica* 感染事故

2013 年 2 月 19 日に行った定期モニタリングにおいて、SPF3 室のマウスから *Pasteurella pneumotropica* が検出された。SPF3 室から名古屋大学環境医学研究所に動物が移動していたため、この感染の情報を移動先の施設に連絡した。SPF3 室のマウスは処分し、部屋の消毒を実施した。SPF3 室に動線上関係する他の SPF 飼育室のマウスについても、*P. pneumotropica* を緊急検査した。その間、感染症対策委員会を開き、対応策を検討した。*P. pneumotropica* はカテゴリ C/D の微生物なので、感染の疑いのある動物を殺処分することなく、抗菌剤エンロフロキサシンを飲水投与して除菌することを目指した。緊急検査も含めて、その後、3 ヶ月間に渡るモニタリングでは、*P. pneumotropica* は一度も検出することがなく、SPF 施設から排除できたものと判断した。また、SPF3 室から動物を搬出し、実験を行った研究部門の飼養保管室と実験室も、部門の協力を得て消毒を実施した。2013 年 6 月以降、山手地区全体から *P. pneumotropica* は根絶できたと結論した。*P. pneumotropica* の侵入経路を特定することはできず、約 3 ヶ月間、動物の授受に規制がかかり、動物実験に大きな妨げとなった。

2. 山手地区 SPF6 室における *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) 感染事故

SPF6 室は融解移植したマウスを飼育するためにセンターが使用する部屋であるが、3 腹の仮親を検査に出したところ、1 匹が陽性であった(検査日 2013 年 8 月 20 日、報告日 2013 年 9 月 4 日)。SPF10 室は、SPF6 室で使

用するレシピエント、里親等をセンターが飼養保管する施設である。SPF6 室と SPF10 室は、動物を清浄化して各研究部門に送り出すための飼育室であり、最も高い清浄度が要求される。そこで、SPF6 と SPF10 両室の汚染検査を行い、以下の 3 点を軸として *Pseudomonas aeruginosa* を清浄化した。

(1) *P. aeruginosa* 検査(マウス個体、糞便、飲料水)

SPF6 室と SPF10 室のマウス個体から検体を採取し外部検査機関において再検査、及び全ケージから糞便を採取して自家検査を実施した。SPF6 室と SPF10 室において飼養保管中のマウス、7 月の検査から部門に移動したマウスも検査対象とした。移動した動物については、各部門において糞便を採取・提供してもらい、センターにて自家検査を行った。

(2) 抗菌剤による除菌

ニューキノロン系抗菌剤(エンロフロキサシン)を飲水投与した。

(3) 部屋の消毒

SPF6 室、SPF10 室、融解移植室の 3 室について、動物がいなくなった時点で消毒専門会社による消毒処置を行った。*P. aeruginosa* は感染力が強い菌ではないので、SPF6 室と SPF10 室に対して動線規制をかけなかった。SPF6 室で使用した器具・機材は分けて消毒した。

対策後、動物および糞便から *P. aeruginosa* は一度も検出されず、SPF 施設から排除できたものと判断した。

3. マウス検疫業務の強化

これまで、書類審査に問題が無い場合はマウス及びラットの導入を認めていた。しかし、それでも昨年度、MHV などの感染事故が発生した。特に、MHV 感染事故は多くのマウスを安楽死する必要がある、問題が大きい。そこで、検疫室を設け MHV 検査を実施することにした。MHV 検査は糞便を用いて行う。

4. 明大寺地区動物実験センターの改築・改修計画

明大寺地区動物実験センターの改修・改築工事の計画を、平成 27 年度施行を目標に立てている。本館をマウス・ラットの SPF 施設に、新館を中型・大型実験動物施

設にする予定である。新館の改修から手がけ、次いで本館の SPF 施設化を目指す。計画を立案するに当たり、多くの大学、企業の動物飼養保管施設を見学した。しかし、飼育ラックをどのようなタイプにするか、工事中にどのように実験動物を避難させるか等、検討すべき課題は多い。

5. 明大寺 P2A 実験室の整備

飼育ラック及び安全キャビネットを更新するとともに、ダクトへの繋ぎ換え工事を行い、P2A 実験室の環境整備を行った。

6. 山手地区一時保管室の光触媒による抗菌加工の実施

昨年度に引き続き、未施行であった一時保管室 1 を一時除染後、部屋の壁と天井に光触媒コーティング加工を

施した。光触媒(二酸化チタン)に光を照射することによって、ウイルス、細菌及び真菌などの微生物を分解する自浄作用が期待される。

7. 負担金徴収額の減少による赤字

山手地区において数部門が転出したことにより、マウス飼養保管数が減少し、負担金徴収額が減少した。また、MHV 検査体制、感染症対策にも支出を要した。そのため、2013 年度の財務状況は赤字となった。今後は、支出管理をより詳細に行っていく必要がある。

8. 教育訓練

本年度も「げっ歯類(マウス、ラット)の麻酔および疼痛管理」について教育訓練を実施した。山手地区利用者講習会も例年通り毎月開催した。受講者数は約 40 名で推移している。

技術課

大河原浩

【概要】

今年度、分子神経生理研究部門に配属させていた小池崇子技術職員の退職に伴い、神谷絵美技術職員を当該部門に併任させた後、加納雄一朗技術職員を採用し当該部門に配属させた。また、西田基宏教授の着任に伴い、石原博美技術職員を併任させた。

技術課組織の強化と研究支援体制の充実を図るため、吉友美樹技術係員、福田直美技術係員、佐藤茂基技術係員をそれぞれ技術主任に昇任させた。

課の研究活動への寄与と貢献を一層進めるため下記の事業を実施した。

①生理学実験技術トレーニングコースでの技術指導

生理学研究所が毎年主催し、実施している生理学実験技術トレーニングコースで、『生理学実験のための電気回路・機械工作・プログラミング』をテーマに、『生体アンプとバスチェンバーの作製』と『C言語によるPICプログラミング』の2コースを企画し、それぞれ3名と1名の受講者を受け入れた。

②生理学技術研究会の開催

全国の大学等技術職員の技術連携と交流を目的に第36回を、基礎生物学研究所・技術課と合同で2014年2月20日-21日の2日間にわたり開催した。会では、口演発表が24題(含む奨励研究採択課題技術シンポジウム口演発表)、ポスター発表が48題あり、研修講演として『メダカバイオリソースの現状と展望』(成瀬 清, 基礎生物学研究所 バイオリソース研究室 准教授), 特別講演として『技術職員として考えてきたこと』(古川 和彦, 基礎生物学研究所 技術課長)を行った。これらの報告は『生理学技術研究会報告(第36号)』にまとめた。

③奨励研究採択課題技術シンポジウムの開催

時代要請に対応した技術認識と向上に立った技術職員の業務の社会的開示を推進するために奨励研究採択者による第10回の報告会(2014年2月21日)を11演題で行った。この報告は『生理学技術研究会報告(第36号)』にまとめた。

④自然科学研究機構技術研究会の参加

自然科学研究機構技術職員の業務の紹介と技術連携を目的に、第8回を核融合科学研究所で開催した(2013年6月6-7日)。会では21演題の発表があり、詳細は

『第8回自然科学研究機構技術研究会集録』としてまとめた。

⑤海外技術研修

技術職員の先端技術情報収集と技術力向上を目的に国内外で研修を行っているが、日本とは異なった研究環境を体験し人間力アップを図るため、海外の最先端研究所(研究室)で技術研修を受けさせる機会を設けている。これまでに、ドイツでMRIや電顕、アメリカでMEGや電顕などの研修を受けさせてきた。

今回、先端電子顕微鏡関連技術、組織運営、機器管理等について研修させるため、山田元技術係員をアメリカMAXPLANCK研究所へ2週間、出張させた。

⑥東海・北陸地区国立大学法人等技術職員研修等の受講と参加

東海北陸地区大学等の技術職員の技術交流と向上を目的に、毎年当番校により東海・北陸地区国立大学法人等技術職員研修が行われており、本年は情報処理コース(北陸先端科学技術大学院大学, 1名)を受講した。さらに、東海・北陸地区技術職員合同研修に係わる技術職員代表者会議(北陸先端科学技術大学院大学, 1名)に参加し、今後の研修会開催について議論を進めた。

また、国立大学法人動物実験施設協議会第39回総会(浜松, 1名)、動物実験施設調査(名古屋大学, 2名)、サル飼育設備・検疫システム等の調査(滋賀医科大学, 2名)、パラフィン切片および新鮮凍結切片作成法の技術習得(北海道大学, 1名)、第36回日本神経科学大会(京都, 1名)、第91回日本生理学会大会(鹿児島大学, 1名)、NBR「ニホンザル」第10回公開シンポジウム(東京, 1名)、研究ミーティング(韓国, 1名)、第2回クレストチーム内ミーティング(静岡, 1名)、脳プロ公開シンポジウム(東京, 1名)、ベクトルビームの光科学とナノイメージング研究会(宮城, 1名)、戦略的創造研究推進事業(CREST)領域ミーティング(東京, 1名)、第17回講演会「MRI安全性の考え方」(名古屋大学, 1名)などに参加し、業務の研究支援力の強化を図った。

⑦放送大学利用による専門技術研修の受講

研究の高度化と多様化に対応するため技術職員の研修を推進している。今回放送大学研修科目として実践英

語'10(1名)、都市と防災(3名)の2科目を選び4名が受講した。

⑧科学研究費補助金(奨励研究)等の採択

業務を展開、推進していくための問題意識の養成、その解決のための計画および方法の企画能力の養成、さらに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3課題の採択を得た。

(1) 前橋 寛：細胞内シグナル伝達分子光操作ツールの開発

(2) 佐治 俊幸：生物学研究者のためのDIY機器で作る実験装置の製作テキスト

(3) 齊藤 久美子：非放射性試薬によるナトリウム依存性グルコース輸送体(SGLT)の活性測定法の開発

また、神経科学分野を含めた生理学実験技術の情報収集および情報交換を目的に研究集会のための旅費サポートとして、佐藤茂基技術主任が成茂神経科学研究助成基金に採択された。

⑨業務報告会とデータベース化事業の促進、および表彰制度の整備

課員の配属先研究部門での業務成果は技術課業務報告会で報告され、情報の共有化が図られている。また、その成果は技術課主催の生理学技術研究会、配属出向先部門での学会発表により所外に発信されているが、より広く活用され、即時的に発信するために、優れた成果をデータベース化する事業を技術課が研究部門と進め、その一部を技術課ホームページで公開している。今年度も、その編集を技術班長による専任とし、その更新を進めた。こうした事業の推進のなかで、優れたデータベースにはデータベース賞として表彰授与を所長より行った。こう

した事業の推進により、研究者との連携を深め、業務の活性化を進めた。

⑩安全衛生技能講習等の受講と参加

研究所の安全衛生を課業務として充実するために、第9回安全衛生情報交換会(核融合研、2名)、局所排気装置等定期自主検査者養成講習会(静岡大学、1名)、日本産業衛生学会主催合同セミナー(愛知教育大学、1名)、東海北陸地区国立大学法人等安全衛生担当者連絡会(名古屋大学、1名)、化学物質管理担当者連絡会(東京、1名)、化学物質取扱事業労働災害防止講習会(岡崎、1名)、防火管理講習会(岡崎、1名)、高圧ガス製造第二種CE設置事業所保安講習会(名古屋、1名)、高圧ガス保安講習会(名古屋、2名)を受講した。また、機構の安全衛生相互査察、巡視(国立天文台、2名)に参加した。

⑪岡崎3機関技術課長会と機構技術代表者会議の開催

岡崎3研究所の動向の意見交換を、事務センターの関係する課長および課長補佐を交え毎月1回開催した。また、核融合科学研究所、国立天文台も交え毎月1回、相互訪問またはテレビ会議による情報交換も行った。

⑫職場体験の受入れ等

広報展開推進室が推進する地域貢献活動を支援するため、岡崎中学校生徒(5中学校、13名)の職場体験を受入れ、ネットワーク管理室、機器研究試作室、動物実験センター、遺伝子改変動物作製室の技術職員が指導した。また、ひらめき☆ときめきサイエンス対応、スーパーサイエンススクール支援、文部科学省子供見学デー展示支援、せいりけん市民講座、自然科学研究機構シンポジウム、伊根実験施設オープンハウスなどのアウトリーチ活動の支援も行った。

施設の運営状況

①統合生理研究系

(1) 生体磁気計測装置

竹島康行

【概要】

今年度の生体磁気計測装置における研究成果については、統合生理研究系 感覚運動調節研究部門の研究活動報告と生体磁気計測装置共同利用実験報告に記載さ

れている。

生体磁気計測装置の稼働率を下表に示す。本装置は計測システムと解析システムから成るが、使用日数に解析

システムの使用分は含んでいない。システム全体の保守は二ヶ月毎の定期点検を基本としており、今年度は実験計画に影響するような不具合は発生していない。年度末に計測装置の基本サンプリング周波数及びデータ転送速度の向上などを図って、データ収集エレクトロニクス関連のアップグレードをおこなった。これにより計測

データはこれまでとは異なる保存形式となったが、解析システムのソフトウェアは昨年度から更新したものを運用しており、新旧のデータ形式に関わらず解析処理をおこなえる。

BTi 社製の解析システムは引続きスタンドアローンでの運用とした。

平成 2013 年度 生体磁気計測装置稼働率

年 月	日数	休日	点検 調整 日数	使用 日数	稼働率 (%)	使用者数(人)		備考
						延べ 総数	所外	
2013 年 4 月	30	9	0	18	86	27	14	
5 月	31	10	2	18	95	23	10	定期点検
6 月	30	10	0	17	85	20	5	
7 月	31	9	0	17	77	24	9	
8 月	31	9	2	16	80	17	10	定期点検
9 月	30	11	0	19	100	26	14	
10 月	31	9	0	18	82	21	9	
11 月	30	10	2	16	89	19	8	定期点検
12 月	31	12	0	15	79	18	6	
2014 年 1 月	31	12	3	7	44	8	4	定期点検
2 月	28	9	1	15	83	18	13	
3 月	31	11	6	11	79	11	4	MEG 記録ユニット交換
計	365	121	16	187	82	232	106	(稼働率は平均値)

*利用日数は装置を計測に使用した日数であり、保守作業などの計測外での使用は含んでいない。

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

*延べ総使用者数は所内使用者と所外使用者(共同研究、研究協力など)を合算したものである。

②大脳皮質機能研究系

(1) 磁気共鳴装置

伊藤嘉邦

【概要】

今年度の磁気共鳴画像装置における研究成果については、大脳皮質機能研究系 心理生理学部研究部門の研究活動報告と生体機能イメージング共同利用実験報告に記載されている。

磁気共鳴装置は独シーメンス社の 3T(テスラ)の物が 3 台あり、その内訳は 2001 年度から共同利用実験に供されている Allegra と、2010 年度に導入された 2 台の Verio からなる世界唯一の Dual fMRI 実験装置がある。MRI 装置の保守に関しては、メーカーによる定期保守が行われ

ている。それ以外に、実験用 PC を含む実験装置の保守および空調機・分電盤・消防設備等の点検を定期的に行っている。それぞれの装置ごとの稼働率を表に示す。なお、2 台の Verio に関しては単体でも実験に使用できるため、便宜上 Verio-A、Verio-B として個々の稼働率を算出している。なお、2014 年 3 月に、新規 MRI 装置導入のための準備として、Allegra を磁気共鳴装置棟から生理研棟地下へ移設する工事を行った。

2013 年度 磁気共鳴装置稼働率

Allegra

年 月	日数	休日	保守	使用 可能 日数	稼働率 (%)	使用		備考
						所内	所外	
2013 年 4 月	30	9	3	18	50	4	5	
5 月	31	10	2	19	63	12	0	
6 月	30	10	1	19	63	8	4	定期保守
7 月	31	9	0	22	86	16	3	液体ヘリウム補給
8 月	31	9	0	22	86	2	17	
9 月	30	11	2	17	59	3	7	
10 月	31	9	2	20	18	2	0	定期保守, 液体ヘリウム補給
11 月	30	9	0	21	79	15	0	
12 月	31	12	3	16	84	12	0	液体ヘリウム補給
2014 年 1 月	31	12	1	18	72	3	9	
2 月	28	9	4	15	90	4	9	
3 月	31	11	20	0	0	0	0	生理研棟地下へ移設
計	365	120	38	207	65	81	54	

Verio_A

年 月	日数	休日	保守	使用 可能 日数	稼働率 (%)	使用日		備考
						所内	所外	
2013 年 4 月	30	9	6	15	47	7	0	
5 月	31	10	9	12	67	5	3	
6 月	30	10	4	16	50	4	4	
7 月	31	9	2	20	75	1	14	
8 月	31	9	4	18	100	0	18	定期保守
9 月	30	11	0	19	97	1	16	
10 月	31	9	0	22	98	1	19	
11 月	30	9	2	19	87	9	6	定期保守
12 月	31	12	0	19	58	0	9	
2014 年 1 月	31	12	3	16	100	0	16	
2 月	28	9	2	17	82	7	15	
3 月	31	11	1	19	89	10	7	
計	365	120	33	212	77	45	119	

Verio_B

年 月	日数	休日	保守	使用 可能 日数	稼働率 (%)	使用日		備考
						所内	所外	
2013 年 4 月	30	9	3	18	89	15	1	定期保守
5 月	31	10	4	17	88	13	2	
6 月	30	10	3	17	94	13	3	
7 月	31	9	1	21	71	13	2	
8 月	31	9	3	19	100	0	19	
9 月	30	11	0	19	100	2	16	定期保守
10 月	31	9	0	22	100	1	21	
11 月	30	9	1	20	83	10	5	
12 月	31	12	1	18	89	6	8	
2014 年 1 月	31	12	2	17	94	5	10	定期保守
2 月	28	9	0	19	95	15	3	
3 月	31	11	1	19	95	16	2	
計	365	120	19	222	90	109	92	

③脳機能計測・支援センター

(1) 形態情報解析室

小原正裕, 山田 元, 加藤勝己

【超高压電子顕微鏡利用状況】

今年度における超高压電子顕微鏡共同利用実験は、合計 18 課題が採択され、ほぼ全課題が実施された。これらの共同実験の成果は、超高压電子顕微鏡共同利用実験報告の章に記述されている。超高压電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので下記に示す。稼働率は、利用日数と使用可能日数より求めている。なお、調整日は、

定期調整(含清掃)日と修理・改良と停電後のイオンポンプベーク等に要した日数を合わせた数である。昨年度末には、長い間念願であった高度化の一環として CMOS カメラが導入され、今までのフィルム写真撮影にかわり、より効率的な観察がなされ、予定より早く観察日程を終了することもあった様である。今後の成果が期待される。

2013 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
2013 年 4 月	30	9	5	16	5	0	5	31%	
5 月	31	10	4	17	11	2	13	76%	
6 月	30	10	9	11	5	4	9	82%	修理 5 日
7 月	31	9	8	14	5	1	6	43%	修理 1 日
8 月	31	9	4	18	0	0	0	0%	
9 月	30	11	6	13	0	2	2	15%	
10 月	31	9	6	16	0	2	2	13%	
11 月	30	10	6	14	0	3	3	21%	
12 月	31	12	4	15	0	2	2	13%	
2014 年 1 月	31	12	4	15	2	2	4	27%	

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
2014 年 2 月	28	9	6	13	0	5	5	38%	
3 月	31	11	7	13	0	5	5	38%	
計	365	121	69	175	28	28	56	32%	

フィラメント点灯時間 222.7時間

使用 CMOS イメージ枚数 7296 枚

使用フィルム枚数 0 枚

【クライオ位相差電子顕微鏡利用状況】

今年度におけるクライオ位相差電子顕微鏡の共同利用実験は合計 18 課題が採択され、全課題が実施された。これに加え、テラベース(株)による受託観察も行われた。

クライオ位相差電子顕微鏡の年間利用状況と利用者の所属、部署、共同研究者、観察方法、研究テーマの一覧を下記の表にまとめた。なお、稼働率は利用日数と使用可能日数より求めている。また、保守には位相板交換に要する日数を含んでいる。

今年度は、昨年度から続いている CCD カメラからのノイズ発生という問題解決のため、カメラの置き換えや調整などの保守に時間を取られたが、現在は安定に動作している。

以前から懸案であった位相差像観察用の位相板ホルダーを今年度 Air Lock 式に更新することになり、テラベース(株)によって 4 月の位相板交換後にこれまで使っていたグリッド 4 枚装填型位相板ホルダーから、グリッド 2 枚装填型 Air Lock 式位相板ホルダー(以下、Air Lock 式ホルダー)に置き換えられた。

しかし置き換え後の調整が一向に進まず、半年以上経過した 11 月になって漸く Air Lock 式ホルダーの実用に向けて調整が始まった。

今回の Air Lock 式ホルダー置き換えにより位相板交換の時間短縮が期待されたが、調整ではグリッドを搭載するブレード部分の形状見直しを何度も行い、位置合わせにもかなりの時間を要した。また、これまで 4 枚の位相板グリッドが装填出来たものからから Air Lock 式ホルダーでは 2 枚しか装填出来なくなったことと、ホルダーを鏡筒内に挿入する操作が煩雑になり何度もやり直すことが頻発するという現状から、本当に作業効率が上がったのか少々疑問が残る。さらに、Air Lock 式ホルダーに交換後は位相板のチャージアップ(帯電)が著しい状況が続いているため、位相板自体の問題か Air Lock 式ホルダーの構造から来る接地不良によるものか問題か特定できていない。今後はホルダーを従来型に一旦戻す可能性も含め、検討が必要である。

2013 年度 クライオ位相差電子顕微鏡年間利用状況

年月	総平日数	保守	使用可能日数	所内利用日数	所外利用日数	計	利用率	フィラメント点灯時間	備考
2013 年 4 月	21	3	18	4	8	12	67%	71.5	位相板交換 カメラ不調(ノイズ) 位相板ホルダー位置調整
5 月	21	2	19	3	5	8	42%	46.5	カメラ不調(ノイズ) 真空落ち
6 月	20	5	15	2	0	2	13%	1	Gatan カメラテスト
7 月	22	0	22	4	9	13	59%	68	
8 月	22	4	18	5	2	7	39%	25	カメラ不調(ノイズ)
9 月	19	1	18	5	12	17	94%	90.5	Tietz カメラ取付・調整

年月	総平 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	フィラメント 点灯時間	備考
2013 年 10 月	22	3	19	2	6	8	42%	34	Tietz カメラ調整 クライオホルダーテ スト 位 相 板 ホ ル ダ ー チェック
11 月	20	5	15	4	7	11	73%	51	Air Lock ホルダーテ スト
12 月	19	5	14	7	7	14	100%	98	Air Lock ホルダー可 動範囲チェック 対物絞りメンテナン ス 位相板交換
2014 年 1 月	19	3	20	6	5	11	55%	56	位相板交換(3 日)
2 月	19	2	17	5	3	8	47%	111	位相板交換 位相板温度ドリフト 調整
3 月	20	4	16	5	8	13	81%	47	位相板交換 カメラ不調
計	244	37	211	52	72	124	59%	699.5	

2013 年度 共同利用者の所属, 部署, 共同研究者, 観察方法, 研究テーマ一覧

所 属	部 署	共同研究者	観察方法※		研究テーマ
			クライオ	位相差	
国立感染症研究所	ウイルス第二部	片山和彦	○	○	カリシウイルス VLP の高分解能構造解析
東京農工大	大学院工学研究院	箕田弘喜	○	○	ハイブリッド顕微鏡用環境制御セルの開発
結核研究所		山田博之	○	○	Cryo-TEM による抗酸菌の基礎的形態サイズデー タの取得
埼玉大	教育	金子康子	○	○	先端電子顕微鏡による膜構造の形成と輸送機構 の解明
兵庫県立大大学院	生命理	峰雪芳宣	○		酢酸菌の合成するセルロースフィブリルの 3 次元 構造解析
岡山大学院	自然	山本 泰	○		葉緑体のチラコイド膜の構造変化と膜上に分布 する光化学系 II 関連タンパク質の動態
Dongguk University, Korea		Yong Rok Seo			3-dimensional structure analysis of mutant p53 protein oligomerization under nickel exposure
千葉大	真菌医学研究セン ター	山口正視		○	酵母細胞の位相差電子顕微鏡観察
Yale Univ. USA		重松秀樹, Fred Sigworth	○	○	位相差電子顕微鏡による AMPA 型グルタミン酸 受容体機能構造の可視化
Yale Univ. US		重松秀樹, Hong-Wei Wang	○	○	Single particle analysis of human dicer
崇城大学		國安明彦	○	○	骨格筋トライアドジャンクションの三次元構造 解析
テラベース(株)		香山容子, 甲斐憲子	○	○	受託研究「無帯電位相板の開発」
分子研	生命環境研究領域	加藤晃一	○	○	プロテアソーム重合過程の構造解析
大阪大学	蛋白質研究所	東浦彰史	○		PBCV-1 ファイバー状構造体の低温位相差顕微鏡 による観察
名古屋大学	細胞生理学研究所	大嶋篤典	○	○	イネキシン ギャップジャンクションの単粒子 解析

所 属	部 署	共同研究者	観察方法※		研究テーマ
			クライオ	位相差	
Academia Sinica, Taiwan	Institute of Chemistry	Wei-Hau Chang	○	○	Single particle analyses of RNA polymerase III and Noda virus
高知大学	教育研究部医学系基礎医学部門	内山淳平	○	○	新規巨大黄色ブドウ球菌バクテリオファージの低温位相差電子顕微鏡による3次元構造解析と構造的アプローチによる生命起源の探索
テラベース (株)		香山容子, 甲斐憲子	○	○	受託観察

※ 観察方法でクライオ、位相差共に○がないものは、通常の透過型電子顕微鏡として観察

(2) 生体機能情報解析室

佐治俊幸

【リアルタイム MRI 装置利用状況】

2012 年度にマグネットがクエンチし、装置が停止した。メーカーで修理部品や代替品、技術者の確保が出来ず、

再立ち上げの保証もなかったため修理を断念し、装置を廃棄処分した。

(3) 多光子顕微鏡室

前橋 寛

【概要】

今年度、多光子顕微鏡室では、新たに2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡を構築した。これにより現在、3台の2光子励起蛍光顕微鏡と2台の2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡(2-photon Fluorescence Lifetime Microscopy; 2pFLIM)が稼働している。

今年度、新規作製した自作2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡は2台のチタンサファイアパルスレーザーを用いて、イメージングと光刺激を同時に行うことができるように改良した。また、レーザーパワーと光軸合わせをコンピューター上から調節できるようにAOM(音響光学素子)を設置し、シリアル接続を介して制御するためのプログラムを作成した。

上述のように、装置の高度化を進める一方で、生きた細胞内での分子間の結合や構造変化を高いS/N比で検出できるようにするための新規蛍光タンパク質の開発も開始した。そのため新たに吸光光度計および分光光度計

を設置した。また、蛍光タンパク質の開発は、遺伝子レベルで行うため、様々なDNAコンストラクトを作製し、精製する必要がある。そのため、大腸菌を用いた形質転換、遺伝子導入、DNA精製等の技術支援を前年に引き続き行った。2013年11月には新たに博士研究員が着任し、光制御可能なタンパク質の開発も開始した。

二光子蛍光寿命イメージング顕微鏡の制御・解析はMatlabにより行われている。装置の開発を円滑に進めるため、前年度よりユーザーインターフェース作成法の習得を教科書、Webセミナー等で行った。また、これらの成果をもとに、データ解析用ソフトウェアのユーザーインターフェースの改良および、機能追加を行った。また、Image J マクロをベースにしたシナプス形態解析ソフトの開発も引き続き行っている。

なお、技術的およびプログラム開発は村越准教授の指導および協力のもとに行われた。

(4) 電子顕微鏡室(生理研・基生研共通施設)

小原正裕, 山田 元

【概要】

今年度の電子顕微鏡設置機器の稼働状況は以下の通りである。

明大寺地区に設置されていた透過型電子顕微鏡

JEM-1200EX, 走査型電子顕微鏡 S-800 は故障の為、十分な性能が発揮できていない旨の報告を前年度に行ったが、今年度透過型電子顕微鏡, 走査型電子顕微鏡共に代

替機器の導入の目途が立った為、廃棄を行った。

現在、明大寺電子顕微鏡室には透過型電子顕微鏡として JEM1010 が、山手地区には走査型電子顕微鏡としてカールツァイス社製 Σ IGMA が導入されている。

山手地区の JEM-1010 は大きな故障も見られず正常に稼働している。

一昨年度導入された電子顕微鏡試料の 3 次元再構築が可能な 3D-SEM (Σ IGMA/VP) は、3View の Stage が本体と通信不良トラブルで何度か停止したが、コントローラ交換後は安定に稼働している。

また、昨年度新たに導入された 2 台目の 3D-SEM (MERLIN) は、高解像度のため利用者に人気があり、高い稼働率を誇っている。トラブルとしては、動作不安定、所外利用者による反射電子検出器の破損による交換、ダイヤモンドナイフのストロークずれの調整等があったが、現在は安定に稼働している。

昨年度 MERLIN と同時に導入され、明大寺地区の共通施設棟 I の耐震改修工事完了までということで仮設置されている走査型電子顕微鏡 (Σ IGMA) も順調に稼働し

ている。

【活動】

明大寺電子顕微鏡室は、生理学研究所の耐震改修工事に伴い多くの部屋を供出した。さらに来年度以降電子顕微鏡室のある共通施設棟 I の改修工事が決定し、流用備品の洗い出しと搬出、不要備品の廃棄、新しい電子顕微鏡室の設計等の業務をおこなった。

山手地区電子顕微鏡室では前述の通り、2 台の 3D-SEM と走査型電子顕微鏡が稼働しており、それらの関連機器であるガラスナイフ作製器、ウルトラマイクローム、真空蒸着装置等の使用法指導、保守・管理を既存の業務と併せて行っている。

【研究内容一覧表】

今年度、電子顕微鏡室を利用した研究者は生理学研究所 20 人、基礎生物学研究所 7 人、機構外は 4 人の計 31 人であった。

下記に利用者の所属研究所、研究部門、研究内容の代表的なものの一覧を示す。

研究所、大学	研究部門	研究内容
生理学研究所	脳形態解析	神経伝達物質受容体の脳内局在性解析
	行動様式	精神疾患モデルマウス脳の 3 次元微細構造を観察し、コントロール群との違いを明らかにする
	神経分化	クラスター型プロトカドヘリンの脳内における局在解析
	心循環シグナル	メチル水銀によるミトコンドリアの機能障害を介した心筋障害
	大脳神経回路論	大脳皮質の局所神経回路の解析 神経細胞の観察
	個別研究 (村上グループ)	傍細胞輸送の形態生理学的研究
基礎生物学研究所	細胞間シグナル	シロイヌナズナ CEP1 ペプチドの受容体単離とペプチドホルモンのプロセッシング機構解明
	発生遺伝学	初期胚極細胞におけるミトコンドリアの形態
	生物進化	ドクダミの花弁化する苞の細胞形態の観察。また、類似形質を示す植物の細胞形態の観察
	高次細胞機構	主として高等植物を材料にした細胞内微細構造の観察およびタンパク質の細胞内局在の解明
名古屋大学		連続ブロック表面-走査電子顕微鏡 (SFB-SEM) による神経回路構造の解析
中部大学		内耳有毛細胞の観察

(5) 機器研究試作室 (生理研・基生研共通施設)

佐治俊幸

【概要】

機器研究試作室は多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良、それに関わる技術指導、技術相談を室の

役割とし、生理研・基生研の共通施設として運営されている。

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

(リキャップ台)と旋盤コース(小物入れ)、CAD コースの3 コースを開講した。参加希望者は、3 コース合わせ生理研 11 名、基生研 10 名で、各コース共に半日の講習を行った。

今年度は、3D プリンター(SCOOVO C170)を、生理研予算にて購入した。C170 は、低価格(本体¥180,000)でありながら、最少積層ピッチ 0.1mm、最大造形サイズ 175×150×150 mm(高さ×幅×奥行き)を実現し、本格的な造形物の制作を可能にしています。

なお、機器研究試作室の今年度の利用状況は、以下の通りである。

2013 年度 機器研究試作室 利用報告

機器研究試作室 部門別のべ利用状況

認知行動発達機構	115 名	心理生理学	10 名	技術課	1 名
生体恒常機能発達機構	46 名	広報展開推進室	6 名	形態情報解析室	1 名
テラベース	42 名	神経分化	5 名	大脳神経回路論	1 名
多光子顕微鏡	27 名	生殖・内分泌系発達機構	2 名	動物実験センター	1 名
感覚認知情報	24 名	生体膜	2 名	分子神経生理	1 名
生体システム	23 名		名		名
環境光生物	15 名	バイオリソース	2 名	初期発生	1 名
形態形成	11 名	R I 実験センター	2 名	時空間制御	1 名
生物進化	10 名	分析室	1 名	細胞間シグナル	1 名
共生システム	7 名	分子発生学	1 名	光学解析室	1 名
脳生物学	2 名	統合神経生物学	1 名	個別研究(星野)	1 名

機器研究試作室 利用人数表

月	生理研	基生研	合計	延べ時間
4	27	3	30	67
5	19	2	21	44
6	25	12	37	81
7	28	8	36	118
8	29	5	34	80
9	48	9	57	152
10	47	7	54	126
11	8	1	9	17
12	22	4	26	50
1	18	1	19	33
2	17	5	22	45
3	21	2	23	32
合計	309	59	368	845

機器研究試作室 利用機器表(件数)

月	フライス盤	ボール盤	横切盤	コンターマシン	NCフライス	旋盤	ベルトグラインダー	切断機	その他
4	15	11	7	6	0	0	0	2	2
5	12	10	4	2	0	3	0	1	0
6	15	16	8	7	0	7	1	5	4
7	13	13	8	16	0	6	3	2	4
8	14	9	4	10	3	2	2	2	4
9	21	26	10	16	0	10	3	7	5
10	25	17	11	12	0	5	5	5	10
11	4	1	1	1	1	5	0	0	1
12	14	5	0	7	1	6	2	0	5
1	6	9	7	1	0	3	0	0	5
2	9	3	6	8	0	1	2	0	2
3	9	7	7	3	0	1	1	2	3
合計	157	127	73	89	5	49	19	26	45

機器研究試作室 依頼製作品

マルチ電極ステージ	実体顕微鏡ケース	マウス頭部固定器
E T C チェンバー	水迷路プラットフォーム	ウオータージャケット
スライスチェンバー	オーサイトチェンバー	クライオ電顕試料台

④情報処理・発信センター

(1) ネットワーク管理室

吉村伸明, 村田安永

【概要】

生理学研究所における当施設の利用形態は、生体情報解析システム(後述)、情報サービス(e-mail, WWW 等)、プログラム開発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確保も重要である。このような現状をふまえたうえで、岡崎情報ネットワーク管理室とも連携しながら、施設整備を進めている。

生体情報解析システムは、データ解析・可視化、信号処理、画像処理、数式演算、統計処理、電子回路設計などの多くのネットワークライセンス用アプリケーションを備えている。ネットワーク認証により各部門施設の PC 上でこれらアプリケーションが供用できる。登録者は 122 名で、研究推進のための積極的な利用がある。

岡崎情報ネットワークは、MAC アドレスベース、も

しくは Web 認証ベースの動的 VLAN 機能を有する 1000BASE-T ネットワークで、利便性の向上とセキュリティの確保を両立している。また、構内全域での無線 LAN の利用が可能である。今年度はセキュリティインシデントが自然科学機構内外でも発生し、これに対応するため情報セキュリティポリシーの改訂を行った。特に部門施設で公開しているサーバーについて、サーバー管理者と連携しながらセキュリティ対策の強化を進めた。

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 478 名。WWW 登録者が 87 名。LAN の端末数が 2,114 台。所外からのメール受信数は 2,300 通/日、所外へのメール発信数は 3,000 通/日であった。WWW は 2,700 IP/日の端末から 13,000 ページ/日の閲覧があった。

⑤岡崎共通研究施設

(1) 動物実験センター

伊藤昭光, 廣江 猛, 窪田美津子

【概要】

今年度は、山手地区 SPF 室において *Pasteurella pneumotropica* および *Pseudomonas aeruginosa* が検出され、感染対策を実施した。その他に、マウス検疫業務の強化、明大寺 P2A 実験室の整備、山手地区一時保管室の光触媒による抗菌加工の実施などを進めた。

明大寺の動物棟Ⅰは、建設されてから 34 年あまりを経過しており、設備の老朽化が著しく、また、研究現場の現状にそぐわなくなっている。動物棟Ⅰ(マウス、ラット)と動物棟Ⅱ(マウス、サル、イヌ、ネコ等)を含む施設の機能改善および機能高度化を目的に、改築・改修に向けた話し合いが進められている。

実験動物の授受に関し、年間でのべ 77 件の導入と 115 件の供与があった。平均すると毎週約 4 件の授受が行われており、昨年よりやや少ない件数となった。また、授受の条件や書類内容の確認、利用者へのアドバイスなどに時間を多く費やしている。

【受精卵凍結・クリーンアップ事業】

実施件数は、明大寺と山手を合わせ、受精卵凍結保存がのべ 19 件、クリーンアップ兼受精卵凍結保存 18 件、融解・移植 14 件であった。昨年度と比較して凍結保存件数が減少した。

行動実験用に、発生工学的手法を用いて、生年月日をそろえたマウスを作製する依頼を 3 件受け、大量のマウス凍結胚の融解・移植を行った。

【明大寺地区 陸生動物室】

今年度の飼養保管室利用部門数は、17 部門(生理研 13 部門、基生研 2 部門、共通研究施設 1 部門、統合バイオサイエンスセンター1 部門)であった。

動物のべ飼育数は、昨年度と比べ、マウスはほぼ横ばいであったが、ラットは減少した。しかし、飼育ケージ数は、洗浄能力の上限に達しており、飼育ケージ数を増やさないようアナウンスをしたり、飼育や洗浄行程での工夫を検討したりしている。イヌはやや減少した。サルは生理研実験研究棟耐震工事が終了し、増加している。

マウス、ラットの一般飼養保管室では、カテゴリ A、B

の病原微生物がいない飼育環境を目指しており、2008 年 7 月以降、3 ヶ月に 1 度の微生物モニタリングを各飼養保管室で行ってきた。昨年度 10 月に MHV 感染が確認され、直ちに飼養保管室のクリーニングを行い終息した。その後は、カテゴリ A、B に関する病原微生物は確認されていない。

マウス地下 SPF 室は、3 部門 2 飼養保管室の利用があった。2009 年 6 月以降、3 ヶ月に 1 度の微生物モニタリングを行っているが、病原微生物は検出されていない。

施設の運用面としては、昨年度 P2A 実験室の安全キャビネットの風量が足りないことが判明したため、安全キャビネットを循環型に更新したが、今年度 8 月にはアイソラックも更新し、P2A 実験室の整備を行った。

これまではマウス導入時に、書類審査で導入基準に達した場合、直接飼養保管室に導入していたが、検疫強化の一環として、導入基準に達した場合でも、隔離飼育し、糞便による MHV 検査を行った上で導入することとした。

生理研実験研究棟の耐震工事中、マカクサル使用部門に、センター飼養保管室を貸し出していたが、耐震工事の終了と共に、貸し出しも終了した。また、マカクサル用に貸し出していたネコ飼養保管室に設置されたマカクサル飼育ケージは撤去された。その他、生理研実験研究棟耐震工事中に実験室として貸し出していた飼養保管室は返却された。

主な工事及び修理については、生理研実験研究棟の耐震工事に係り、ネコ飼養保管室のサルケージ撤去を行った。P2A 実験室にはアイソラック設置工事を行った。機構の特高電力工事のため火災報知器工事を行った。

その他、火災報知器センサーの交換。生理研実験棟耐震工事に伴う電話線混線修理。汚水槽フロート修理。自家発電施設の煙道の修理。空調給水ユニットポンプの修理。サルケージの溶接修理。ヒートポンプユニット圧縮機修理など、施設の経年劣化からと思われる工事及び修理を行った。

【山手地区 動物実験センター分室】

今年度の陸生動物利用部門数は、14 部門(生理研 11 部門、統合バイオサイエンスセンター2 部門、共通研究施設 1 部門)であった。1 部門が転出、2 部門が明大寺へ移動、1 部門が新規に利用を開始した。

利用者講習会を毎月開催するとともに、実際の利用方法について別途実務講習会を実施している。利用者講習受講者は 27 名であった。

全 SPF 飼育室およびマウス一時保管室 1、マウス一時保管室 2 の病原微生物モニタリングを 3 ヶ月に 1 回のペースで実施したところ、8 月の検査において SPF 飼育室の 1 室で *Pseudomonas aeruginosa* が確認された。その部屋の全頭に抗菌剤を投与し、動物搬出後、飼育室内のクリーニングを行った。

なお 2012 年 2 月に SPF 飼育室 1 室が *Pasteurella pneumotropica* 陽性となった飼育室は、クリーニングを行い、6 月の時点で対策を終了した。

感染症対策強化のため、SPF エリアに検疫室を設け、他施設から動物を導入する際には、糞便による MHV 検査を行うこととした。

一時保管室の 2 室で光触媒による抗菌加工を実施し、

飼育環境の清浄化を図った。

職場体験の中学生 2 名を受け入れ、実習を行った。

機器類では空調機給水ユニットポンプ修理、ケージ洗浄機およびオートクレーブでは配管からの蒸気漏れ修理等を行った。

【明大寺及び山手地区 水生動物室】

今年度の明大寺地区の利用状況は、生理研 1 部門、基生研 5 部門となっている。

基生研の耐震補強工事に伴い水生動物室の改修も行われたが、飼育形態は従来のままであったため、飼育水槽や周辺の機材、室温・水温などが現状に合わなくなってきた。そこで、老朽化した器材を含む、施設内の改修・更新を行い、「海水飼養保管実験室」6 室、「淡水飼養保管実験室」7 室に分割することにより、実験生物種に則した飼育保管環境を提供できるようになった。

今年度の山手地区の利用状況は、生理研 1 部門、基生研 1 部門、統合バイオサイエンスセンター3 部門、が水槽を利用している。

水槽用冷凍機 1 台が故障したため交換を行った。

陸生動物 部門別・動物種別搬入数(2013 年度)

部門 \ 動物種	明大寺地区							山手地区	
	マウス	ラット	スナネズミ	ハムスター	モルモット	ウサギ	サル	マウス	ラット
神経機能素子	106								
生体膜								98	38
細胞生理 B		1						38	
分子神経生理	138							54	22
神経シグナル	41							167	720
感覚認知情報							2		
生体システム	361	12					7	3	
認知行動発達	577	63					9		
脳形態解析								103	7
大脳神経回路論	63							104	148
形態情報解析室									
生体機能情報解析室									
広報展開推進室									80
生殖内分泌系	517								
生体恒常機能	414	17						1	
行動様式解析室	150							47	
多光子顕微鏡室	36	18							
動物実験センター	2	1						344	
統合神経生物学									
脳生物学	310	2					1	1	
光脳回路	758							3	
神経分化	160	83						102	25
個別研究									41
細胞生理								1,218	12
遺伝子改変動物作製室								1,649	319
心循環シグナル								412	48
合計	3,633	197					19	4,344	1,460

【 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.....	100
分子神経生理研究部門.....	100
ナノ形態生理研究部門.....	100
生体膜研究部門.....	101
細胞生理研究部門.....	101
感覚認知情報研究部門.....	102
神経シグナル研究部門.....	102
神経分化研究部門.....	103
心循環シグナル研究部門.....	103
感覚運動調節研究部門.....	103
生体システム研究部門.....	105
脳形態解析研究部門.....	106
大脳神経回路論研究部門.....	107
心理生理学研究部門.....	107
認知行動発達機構研究部門.....	108
生体恒常機能発達機構研究部門.....	110
生殖・内分泌系発達機構研究部門.....	110
個別研究（村上グループ）.....	111
個別研究（毛利グループ）.....	111
個別研究（永山グループ）.....	111
岡田名誉教授研究室.....	112
遺伝子改変動物作製室.....	112
行動様式解析室.....	113
形態情報解析室.....	114
ウイルスベクター開発室.....	114
生命時空間設計研究領域.....	115
動物実験センター.....	115

発 表 論 文

《神経機能素子研究部門》

1) 英文原著論文

1. Tateyama M, Kubo Y (2013) Binding of Gq protein stabilizes the activated state of the muscarinic receptor type 1. *Neuropharmacol.* 65: 173-181. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.10.006.
2. Tateyama M, Kubo Y (2013) Analyses of the effects of Gq protein on the activated states of the muscarinic M₃

receptor and the purinergic P2Y₁ receptor. *Physiological Reports* 1:e00134. doi: 10.1002/phy2.134.

2) その他(総説(英文, 邦文), 著作, 邦文論文など)

1. 中條浩一, 久保義弘 (2013) 電位依存性カリウムチャネル KCNQ1 の複合体ストイキオメトリーと機能制御機構. *生物物理* 53(6): 313-316.

《分子神経生理研究部門》

1) 英文原著

1. Kumar A, Torii T, Ishino Y, Muraoka D, Yoshimura T, Togayachi A, Narimatsu H, Ikenaka K, Hitoshi S (2013) The Lewis X-related α 1,3-fucosyltransferase, Fut10, is required for the maintenance of stem cell populations. *J Biol Chem* 288:28859-28868. doi: 10.1074/jbc.M113.469403.
2. Sedzik J, Jastrzebski JP, Ikenaka K (2013) Sequence motifs of myelin membrane proteins: towards the molecular basis of diseases. *J Neurosci Res* 91:479-493. doi:10.1002/jnr.23177.
3. Shimizu T, Tanaka KF, Takebayashi H, Higashi M, Wisessmith W, Ono K, Hitoshi S, Ikenaka K (2013) Olig2-lineage cells preferentially differentiate into oligodendrocytes but their processes degenerate at the chronic demyelinating stage of PLP-overexpressing

mouse. *J Neurosci Res* 91: 178-186. doi: 10.1002/jnr.23153.

4. Lee HU, Yamazaki Y, Tanaka KF, Furuya K, Sokabe M, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S, Ikenaka K (2013) Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia* 60:210-224. doi: 10.1002/glia.22427.
5. Ikenaka K (2013) Neuron-Oligodendrocyte Interactions in Neuroinflammation. *Advances in Neurobiology* 7, 6: 91-100.

2) 研究関係著作

1. 池田一裕 (2013) 脳白質における神経情報統合と精神疾患. *日本生物学的精神医学* 24(2):107-110.
2. 等誠司, 清水健史, 池田一裕 (2013) 免疫性神経疾患における神経幹細胞と再生戦略. *日本臨床* 71(5):795-800.

《ナノ形態生理研究部門》

形態情報解析室の項を参照

《生体膜研究部門》

1) 英文原著

1. Fukata Y, Dimitrov A, Boncompain G, Vielemeyer O, Perez F, Fukata M (2013) Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *J Cell Biol* 202:145-161. doi:10.1083/jcb.201302071.
2. Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, Miyazaki T, Yokoi N, Takashima H, Watanabe M, Watanabe O, Fukata M (2013) Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. *J Neurosci* 33: 18161-18174. doi:10.1523/JNEUROSCI.3506-13.2013.
3. Oku S, Takahashi N, Fukata Y, Fukata M (2013) In silico screening for palmitoyl substrates reveals a role for DHHC1/3/10 (zDHHC1/3/11) - mediated neurochondrin palmitoylation in its targeting to Rab5- positive endosomes. *J Biol Chem* 288:19816-19829. doi: 10.1074/jbc.M112.431676.
4. Zheng B, Deran M, Li X, Liao X, Fukata M, Wu X (2013) 2-Bromopalmitate analogues as activity-based probes to explore palmitoyl acyltransferases. *J Am Chem Soc* 135: 7082-7085. doi:10.1021/ja311416v.
5. Kawahara A, Kurauchi S, Fukata Y, Martínez-Hernández J, Yagihashi T, Itadani Y, Sho R, Kajiyama T, Shinzato N, Narusuye K, Fukata M, Luján R, Shigemoto R, Ito I (2013) Neuronal major histocompatibility complex class I molecules are implicated in the generation of asymmetries in hippocampal circuitry. *J Physiol* 591:4777-4791. doi: 10.1113/jphysiol.2013.252122.

《細胞生理研究部門》

1) 英文原著

1. Fujita F, Uchida K, Takaishi M, Sokabe T, Tominaga M (2013) Ambient temperature affects the temperature threshold for TRPM8 activation through interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci* 33: 6154- 6159. doi:10.1523/JNEUROSCI.5672-12.2013.
2. Miura S, Takahashi K, Imagawa T, Uchida K, Saito S, Tominaga M, Ohta T (2013) Involvement of TRPA1 activation in acute pain induced by cadmium in mice. *Mol Pain* 9:7. doi:10.1186/1744-8069-9-7.
3. Mannari T, Morita S, Furube E, Tominaga M, Miyata S (2013) Sensing of Blood-Derived Information by Astrocytic TRPV1 in the Sensory Circumventricular Organs of Adult Mouse Brains. *Glia* 61:957-971. doi: 10.1002/glia.22488.
4. Ota H, Katanosaka K, Murase S, Kashio M, Tominaga M, Mizumura K (2013) TRPV1 and TRPV4 play pivotal roles in delayed onset muscle soreness. *PLoS ONE* 8: e65751. doi:10.1371/journal.pone.0065751.
5. Oda S, Uchida K, Wang X, Lee J, Shimada Y, Tominaga M, Kadowaki M (2013) TRPM2 contributes to antigen-stimulated Ca^{2+} influx in mucosal mast cells. *Pflüger Archiv Eur J Physiol* 465:1023-1030. doi: 10.1007/s00424-013-1219-y.
6. Tabuchi S, Tsunematsu T, Kilduff TS, Sugio S, Xu M, Tanaka KF, Takahashi S, Tominaga M, Yamanaka A (2013) Influence of inhibitory serotonergic inputs to orexin/hypocretin neurons on the diurnal rhythm of sleep and wakefulness. *SLEEP* 36:1391-1404. doi: 10.5665/sleep.2972.
7. Zhou Y, Suzuki Y, Uchida K, Tominaga M (2013) Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity. *Nat Commun* 4:2408. doi:10.1038/ncomms3399.
8. Uchida K, Tominaga M (2013) Extracellular zinc ion regulates TRPM5 activation through its interaction with a pore loop domain. *J Biol Chem* 288:25959-25955. doi: 10.1074/jbc.M113.470138.
9. Tsunematsu T, Tabuchi S, Tanaka KF, Boyden ES, Tominaga M, Yamanaka A (2013) Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice.

- Behav Brain Res 255C:64-74. doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.021.
10. Nakatsuka K, Gupta R, Saito S, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T (2013) Identification of molecular determinants for a potent mammalian TRPA1 antagonist by using species differences. *J Mol Neurosci* 51: 754-762. doi:10.1007/s12031-013-0060-2.
- 2) 研究関係著作
1. 西本れい, 富永真琴 (2013) Transient Receptor Potential (TRP) と臨床麻酔. *臨床麻酔* 2013-3: 339-347.
 2. 富永真琴 (2013) 寒冷時に指先が痛くなる理由. *日本医事新報* 4647:66-67.
 3. 富永真琴 (2013) 温度感受性 TRP チャネルと疾患. *医学のあゆみ* 245:831-837.
 4. 富永真琴 (2013) 皮膚の温度受容体の機能と製品開発. *FRAGRANCE JOURNAL* 7: 53-57.
 5. 富永真琴 (2013) 植物由来の食品成分と温度感受性 TRP チャネル. *化学と生物* 51: 592-594.
 6. 富永真琴 (2013) 温度感受性 TRP チャネル. *生体の科学* 64:436-437.
 7. 富永真琴 (2013) TRP チャネル (TRPV1, TRPA1) の慢性疼痛への関与と鎮痛. *臨床整形外科* 48: 1175-1178.
 8. 富永真琴 (2013) TRP チャネルとかゆみ・痛みの関係- 治療への応用を踏まえて. *Derma* 212:11-16.
 9. 鈴木喜郎 (2013) カルシウム輸送体 TRPV5/6 の機能と異常. *腎と骨代謝* 26:175-180.

《感覚認知情報研究部門》

- 1) 英文原著
 1. Okazawa G, Komatsu H (2013) Image statistics for golden appearance of a painting by a Japanese Edo-era artist Jakuchu Ito. *Lecture Notes, in Computer Science (Computational Color Imaging)* 7786:68-79.
 2. Koida K, Yokoi I, Okazawa G, Mikami A, Widayati KA, Miyachi S, Komatsu H (2013) Color vision test for dichromatic and trichromatic macaque monkeys. *J Vision* 13:1. doi:10.1167/13.13.1.
- 2) 英文総説 (査読あり)
 1. Komatsu H, Nishio A, Okazawa G, Goda N (2013) 'Yellow' or 'Gold?': Neural processing of gloss information. *Lecture Notes, in Computer Science (Computational Color Imaging)* 7786:1-12.
- 3) 研究関係著作
 1. 小松英彦, 西尾亜希子 (2013) 光沢を見分ける脳細胞の活動. *O plus E* 35 (1): 92-94.
 2. 小松英彦 (2013) 質感の科学をめざして. *画像ラボ* 24(6):72-78.

《神経シグナル研究部門》

- 1) 英文原著
 1. Yamagata Y, Kaneko K, Kase D, Ishihara H, Nairn AC, Obata K, Imoto K (2013) Regulation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase by NMDA - receptor - induced seizure activity in cortical slices. *Brain Res* 1507:1-10. doi: 10.1016/j.brainres. 2013.02.015.
 2. Akimoto N, Honda K, Uta D, Beppu K, Ushijima Y, Matsuzaki Y, Nakashima S, Kido MA, Imoto K, Takano Y, Noda M (2013) CCL-1 in the spinal cord contributes to neuropathic pain induced by nerve injury. *Cell Death Dis* 4:e679. doi:10.1038/cddis.2013.198.
 3. Ikeda K, Satake S, Onaka T, Sugimoto H, Takeda N, Imoto K, Kawakami K (2013) Enhanced inhibitory neurotransmission in the cerebellar cortex of *Atp1a3* - deficient heterozygous mice. *J Physiol* 591:3433-3449. doi:10.1113/jphysiol.2012.247817.
- 2) 研究関係著作
 1. Konishi S, Satake S (2013) Physiological interactions between neurons and glia: roles of transporters in the control of intersynaptic crosstalk. "Glial Cells:

- Embryonic Development, Types/Functions and Role in Disease” (Eds. Kaur C, Ling EA), Nova Science Publishers, New York, pp 177-192.
2. 舟井優介, 西川精宣, 森隆, 浅田章, 井本敬二, 古江秀昌 (2013) アドレナリン $\alpha 2$ 作動薬全身投与による脊髄 $\alpha 1$ 受容体を介した抑制性シナプス伝達の促進. *Pain Res* 28:145-153.
 3. 箱崎敦志, 井本敬二, 林勸生, 河谷正仁, 古江秀昌 (2013) In vivo パッチクランプ法を用いた脊髄における内臓感覚シナプス伝達の解析と下部尿路機能の中枢性制御. *Pain Res* 28:155-165.
 4. 古江秀昌 (2013) 中枢性の痛覚抑制機構. *ペインクリニック* 34:1091-1099.
- 3) その他
1. 山肩葉子 (2013) 継続は力なり. *日本生理学雑誌* 75:51-52.

《神経分化研究部門》

- 1) 英文原著
 1. Funahashi R, Maruyama T, Yoshimura Y, Komatsu Y (2013) Silent synapses persist into adulthood in layer 2/3 pyramidal neurons of visual cortex in dark-reared mice. *J Neurophysiol* 109:2064-2076. doi: 10.1152/jn.00912

《心循環シグナル研究部門》

- 1) 英文原著
 1. Chen W, Oberwinkler H, Werner F, Gassner B, Nakagawa H, Feil R, Hofmann F, Schlossmann J, Dietrich A, Gudermann T, Nishida M, Del Galdo S, Wieland T, Kuhn M (2013) Atrial natriuretic peptide-mediated inhibition of microcirculatory endothelial Ca^{2+} and permeability response to histamine involves cGMP-dependent protein kinase I and TRPC6 channels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 33:2121-2129. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.001974.
- 2) 研究関係著作
 1. 西田基宏 (2013) 酸化ストレスによるレドックス恒常性異常と心筋リモデリング. 医学のあゆみ 特集「活性酸素 —基礎から病態解明・制御まで—」(企画 赤池孝章・末松誠), 医歯薬出版株式会社 247: 875-878.
 2. 西田基宏, 澤智裕 (2013) 硫化水素アニオンによるレドックス恒常性制御とその臨床応用. *生化学* 85: 996-999.
 3. 西田基宏 (2013) 硫化水素のケミカルバイオロジー～心不全保護効果の新たなメカニズム～. *日本 Shock 学会誌* (in press).

《感覚運動調節研究部門》

- 1) 英文原著
 1. Nakamura M, Watanabe S, Inagaki M, Hirai M, Miki K, Honda Y, Kakigi R (2013) Electrophysiological study of face inversion effects in Williams syndrome. *Brain Dev* 35:323-330. doi:10.1016/j.braindev.2012.05.010.
 2. Nakata H, Sakamoto K, Otsuka A, Yumoto M, Kakigi R (2013) Cortical rhythm of No-go processing in humans: An MEG study. *Clin Neurophysiol* 124:273-282. doi: 10.1016/j.clinph.2012.06.019.
 3. Kodaira M, Wasaka T, Motomura E, Tani H, Inui K, Kakigi R (2013) Effects of acute nicotine on somatosensory change-related cortical responses. *Neuroscience* 229: 20-26. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.060.

4. Hirai M, Watanabe S, Honda Y, Kakigi R (2013) Developmental changes in point-light walker processing during childhood: a two-year follow-up ERP study. *Dev Cogn Neurosci* 5:51-62. doi: 10.1016/j.dcn.2013.01.002.
 5. Omori S, Iose S, Otsuru N, Nishihara M, Kuwabara S, Inui K, Kakigi R (2013) Somatotopic representation of pain in the primary somatosensory cortex (S1) in humans. *Clin Neurophysiol* 124:1422-1430. doi:10.1016/j.clinph.2013.01.006.
 6. Tsuruhara A, Nagata Y, Suzuki M, Inui K, Kakigi R (2013) Effects of spatial frequency on visual evoked magnetic fields. *Exp Brain Res* 226:347-355. doi: 10.1007/s00221-013-3440-5.
 7. Mochizuki H, Baumgartner U, Kamping S, Ruttorf M, Schad LR, Flor H, Kakigi R, Treede RD (2013) Cortico-subcortical activation patterns for itch and pain imagery. *Pain* 154:1989- 1998. doi:10.1016/j.pain.2013.06.007.
 8. Nakata H, Sakamoto K (2013) Relative age effects in Japanese baseball: A historical analysis. *Percept Mot Skills* 117:276-289. doi:10.2466/10.25.PMS.117x13z1.
 9. Nakata H, Nagami T, Higuchi T, Sakamoto K, Kanosue K (2013) Relationship between performance variables and baseball ability in youth baseball players. *J Strength Cond Res* 27:2887-2897. doi: 10.1519/JSC.0b013e3182a1f58a.
 10. Kodaira M, Tsuruhara A, Motomura E, Tanii H, Inui K, Kakigi R (2013) Effects of acute nicotine on prepulse inhibition of auditory change-related cortical responses. *Behav Brain Res* 256C:27-35. doi:10.1016/j.bbr.2013.07.045.
 11. Ichikawa H, Otsuka Y, Kanazawa S, Yamaguchi MK, Kakigi R (2013) Contrast reversal of the eyes impairs infants' face processing: A near-infrared spectroscopic study. *Neuropsychologia* 51:2556-2561. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2013.08.020.
 12. Suzuki M, Wasaka T, Inui K, Kakigi R (2013) Reappraisal of field dynamics of motor cortex during self-paced finger movements. *Brain Behav* 3:747-762. doi:10.1002/brb3.186.
 13. Kida T, Kakigi R (2013) Task-related changes in functional properties of the human brain network underlying attentional control. *PLoS One* 8:e79023. doi:10.1371/journal.pone.0079023.
 14. Inui K, Tsuruhara A, Nakagawa K, Nishihara M, Kodaira M, Motomura E, Kakigi R (2013) Prepulse inhibition of change-related P50m no correlation with P50m gating. *SpringerPlus* 2:588. doi: 10.1186/2193- 1801-2-588.
 15. Okamoto H, Teismann H, Keceli S, Pantev C, Kakigi R (2013) Differential effects of temporal regularity on auditory-evoked response amplitude: a decrease in silence and increase in noise. *Behav Brain Funct* 9:44. doi:10.1186/1744-9081-9-44.
 16. Keceli S, Okamoto H, Kakigi R (2013) Hierarchical neural encoding of temporal regularity in the human auditory cortex. *Brain Topogr* (in press) doi: 10.1007/s10548-013-0300-3.
 17. Stein A, Engell A, Okamoto H, Wollbrink A, Lau P, Wunderlich R, Rudack C, Pantev C (2013) Modulatory effects of spectral energy contrasts on lateral inhibition in the human auditory cortex: an MEG study. *PLoS ONE* (in press) doi:10.1371.
 18. Okamoto H, Kakigi R (2013) Hemispheric asymmetry of auditory mismatch negativity elicited by spectral and temporal deviants: a magnetoencephalographic study. *Brain Topogr* (in press) doi: 10.1007/s10548- 013- 0347- 1.
- 2) 英文総説 (査読あり)
1. Ichikawa H, Tsuruhara A, Kanazawa S, Yamaguchi MK (2013) Two- to three-month-old infants prefer moving face patterns to moving top-heavy patterns. *Jpn Psychol Res* 55:254-263. doi: 10.1111/j.1468-5884. 2012. 00540.x.
- 3) 研究関係著作
1. 柿木隆介 (2013) 第 6 章 痛みの仕組みと心身相関. “ここまでわかった心身相関” (久保千春 編), 診断と治療社, 東京, pp 71-83.
 2. 坂本貴和子, 柿木隆介 (2013) 「黒岩匡子の口腔ケア&口腔リハビリ」を解剖する 「咀嚼と脳機能」の視点からみる. “なぜ「黒岩恭子の口腔ケア&口腔リハビリ」は食べられる口になるのか” (北村清一郎 編著), デンタルダイヤモンド社, 東京, pp 60-63.
 3. 三木研作, 柿木隆介 (2013) 脳磁図を用いた顔認知研究. “顔を科学する 適応と傷害の脳科学” (山

- 口真美, 柿木隆介 編), 東京大学出版会, 東京, 11章 pp 183-199.
4. 柿木隆介 (2013) 痛みと痒みの脳内認知機構. HUMAN SCIENCE 24:18-21.
5. 柿木隆介 (2013) さまざまな神経イメージング手法を用いた顔認知機構の解明. 脳神経外科ジャーナル 22:185-191.

《生体システム研究部門》

- 1) 英文原著
1. Chiken S, Nambu A (2013) High-frequency pallidal stimulation disrupts information flow through the pallidum by GABAergic inhibition. *J Neurosci* 33: 2268-2280. doi:10.1523/JNEUROSCI.4144-11.2013.
 2. Sano H, Chiken S, Hikida T, Kobayashi K, Nambu A (2013) Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra. *J Neurosci* 33:7583-7594. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4932-12.2013.
 3. Sotoyama H, Namba H, Chiken S, Nambu A, Nawa H (2013) Exposure to the cytokine EGF leads to abnormal hyperactivity of pallidal GABA neurons: implications for schizophrenia and its modeling. *J Neurochem* 126: 518-528. doi:10.1111/jnc.12223.
 4. Hasegawa Y, Tachibana Y, Sakagami J, Zhang M, Urade M, Ono T (2013) Flavor-enhanced modulation of cerebral blood flow during gum chewing. *PLoS One* 8:e66313. doi:10.1371/journal.pone.0066313.
 5. Chen S, Shin D, Watanabe H, Nakanishi Y, Kambara H, Yoshimura N, Nambu A, Isa T, Nishimura Y, Koike Y (2013) Prediction of hand trajectory from electrocorticography signals in primary motor cortex. *PLoS One* 8(12): e83534. doi: 10.1371/journal.pone.0083534.
 6. Miyachi S, Hirata Y, Inoue K, Lu X, Nambu A, Takada M (2013) Multisynaptic projections from the ventrolateral prefrontal cortex to hand and mouth representations of the monkey primary motor cortex. *Neurosci Res* 76:141-149. doi: 10.1016/j.neures. 2013. 04.04.
- 2) 英文総説 (査読あり)
1. Obeso JA, Guridi J, Nambu A, Crossman A (2013) Motor manifestations and basal ganglia output activity: the paradox continues. *Mov Disord* 28:416-418. doi:10.1002/mds.25358.
 2. Takada M, Hoshi E, Saga Y, Inoue KI, Miyachi S, Hatanaka N, Inase M, Nambu A (2013) Organization of two cortico-basal ganglia loop circuits that arise from distinct sectors of the monkey dorsal premotor cortex. “Basal Ganglia – An Integrative View” (eds Barrios FA Bauer C), InTech, Rijika, Croatia, Chapter 5. doi:10.5772/54822.
 3. Takada M, Inoue K, Koketsu D, Kato S, Kobayashi K, Nambu A (2013) Elucidating information processing in primate basal ganglia circuitry: a novel technique for pathway-selective ablation mediated by immunotoxin. *Front Neural Circuits* 7:140. doi: 10.3389/fncir. 2013. 00140.
- 3) 研究関係著作
1. 橘吉寿, 彦坂興秀 (2013) 腹側淡蒼球と報酬予測. *生体の科学* 64: 342-347.
 2. 南部篤 (2013) 大脳基底核. “最新心理学事典” 藤永保 (監修), 平凡社, 東京, pp 492-494.
 3. 南部篤 (2013) 大脳基底核疾患の病態生理. “パーキンソン病と運動異常” (辻省次, 高橋良輔編), 中山書店, 東京, pp12-20.

《脳形態解析研究部門》

1) 英文原著論文

1. Budisantoso T, Harada H, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K (2013) Evaluation of glutamate concentration transient in the synaptic cleft of the rat calyx of Held. *J Physiol.* 591:219-239. doi: 10.1113/jphysiol.2012.241398.
2. Budreck EC, Kwon OB, Jung JH, Baudouin S, Thommen A, Kim HS, Fukazawa Y, Harada H, Tabuchi K, Shigemoto R, Scheiffele P, Kim JH (2013) Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 725-730. doi: 10.1073/pnas.1214718110. Epub 2012 Dec 26.
3. Indriati DW, Kamasawa N, Matsui K, Meredith AL, Watanabe M, Shigemoto R (2013) Quantitative localization of Cav2.1 (P/Q-type) voltage-dependent calcium channels in Purkinje cells: somatodendritic gradient and distinct somatic co-clustering with calcium-activated potassium channels. *J Neurosci.*, 33: 3668-3678. doi:10.1523/JNEUROSCI.2921-12.2013.
4. Booker S, Gross A, Althof D, Shigemoto R, Bettler B, Frotscher M, Hearing M, Wickman K, Watanabe M, Kulik Á, Vida I (2013) Differential GABA_B receptor-mediated effects in perisomatic- and dendrite-targeting parvalbumin interneurons. *J Neurosci.*, 33:7961-7974. doi:10.1523/JNEUROSCI.1186-12.2013.
5. Kawahara A, Kurauchi S, Fukata Y, Martínez-Hernández J, Yagihashi T, Itadani Y, Sho R, Kajiyama T, Shinzato N, Narusuye K, Fukata M, Luján R, Shigemoto R, Ito I (2013) Neuronal major histocompatibility complex class I molecules are implicated in the generation of asymmetries in hippocampal circuitry. *J Physiol.* 591:4777-4791. doi: 10.1113/jphysiol.2013.252122. Epub 2013 Jul 22.
6. Fajardo-Serrano A, Wydeven N, Young D, Watanabe M, Shigemoto R, Martemyanov KA, Wickman K, Luján R (2013) Association of Rgs7/Gβ5 complexes with Girk channels and GABA_B receptors in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus.* 23:1231-1245. doi: 10.1002/hipo.22161.
7. Shih P-Y, Savtchenko LP, Kamasawa N, Dembitskaya Y, McHugh TJ, Rusakov DA, Shigemoto R, Semyanov A (2013) Retrograde synaptic signaling mediated by K⁺ efflux through postsynaptic NMDA receptors. *Cell Reports*, 5:941-951. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.026.
8. Dobi A, Sartori SB, Busti D, Van Der Putten HV, Singewald N, Shigemoto R, Ferraguti F (2013) Neural substrates for the distinct effects of presynaptic group III metabotropic glutamate receptors on extinction of contextual fear conditioning in mice. *Neuropharmacology.* 66, 274- 289. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.05.025. Epub 2012 May 27.
9. Wang W, Nakadate K, Masugi-Tokita M, Shutoh F, Aziz W, Tarusawa E, Lorincz A, Molnár E, Kesaf S, Li YQ, Fukazawa Y, Nagao S, Shigemoto R (2014) Distinct cerebellar engrams in short-term and long-term motor learning. *PNAS* 111:E188-193. doi: 10.1073/pnas.1315541111. Epub 2013 Dec 23.
10. Aziz W, Wang W, Kesaf S, Mohamed AA, Fukazawa Y, Shigemoto R (2014) Distinct kinetics of synaptic structural plasticity, memory formation, and memory decay in massed and spaced learning. *PNAS* 111:E194-202. doi: 10.1073/pnas.1303317110. Epub 2013 Dec 23.
11. Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K (2014) Optogenetic counteracting of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron* 81:314-320. doi: 10.1016/j.neuron.2013.11.011.
12. Ballesteros-Merino C, Watanabe M, Shigemoto R, Fukazawa Y, Adelman JP, Luján R (2014) Differential subcellular localization of SK3-containing channels in the hippocampus. *Eur J Neurosci.* 39:883-892. doi: 10.1111/ejn.12474. Epub 2014 Jan 9.

《大脳神経回路論研究部門》

1) 英文原著

1. Hatanaka Y, Yamauchi K (2013) Excitatory cortical neurons with multipolar shape establish neuronal polarity by forming a tangentially oriented axon in the intermediate zone. *Cereb Cortex* 23:105-113. doi: 10.1093/cercor/bhr383.
2. Defelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fitzpatrick D, Freund TF, González-Burgos G, Hestrin S, Hill S, Hof PR, Huang J, Jones EG, Kawaguchi Y, Kisvárdy Z, Kubota Y, Lewis DA, Marín O, Markram H, McBain CJ, Meyer HS, Monyer H, Nelson SB, Rockland K, Rossier J, Rubenstein JL, Rudy B, Scanziani M, Shepherd GM, Sherwood CC, Staiger JF, Tamás G, Thomson A, Wang Y, Yuste R, Ascoli GA (2013) New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons: analysis paper. *Nat Rev Neurosci* 14: 202-216. doi:10.1038/nrn3444.
3. Morita K, Morishima M, Sakai K, Kawaguchi Y (2013) Dopaminergic control of motivation and reinforcement learning: a closed-circuit account for reward-oriented behavior. *J Neurosci* 33: 8866-8890. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4614-12.2013.

4. Kubota Y, Nomura M, Karube F, Kawaguchi Y (2013) Functional significance of Rall's power of three halves law in cortical nonpyramidal cells. *Advances in Cognitive Neurodynamics (III)*: 45-50. doi: 10.1007/978-94-007-4792-0_7
5. Otsuka T, Kawaguchi Y (2013) Common excitatory synaptic inputs to electrically connected cortical fast-spiking cell networks. *J Neurophysiol* 109:795-806. doi:10.1152/jn.00071.2013.
6. Ueta Y, Hirai Y, Otsuka T, Kawaguchi Y (2013) Direction- and distance-dependent interareal connectivity of pyramidal cell subpopulations in the rat frontal cortex. *Front Neural Circuits* 7: 164. doi: 10.3389/fncir.2013.00164.

2) 英文総説（査読あり）

1. Tricoire L, Kubota Y, Cauli B (2013) Cortical NO interneurons: from embryogenesis to functions. *Front Neural Circuits* 7:105. doi:10.3389/fncir.2013.00105.

3) 研究関係著作

1. Kawaguchi Y (2013) Hierarchical organization of neocortical neuron types. In *Cortical Development* (eds. Kageyama R, Yamamori T), pp 181-202. Springer, Tokyo. doi: 10.1007/978-4-431-54496-8_8.

《心理生理学研究部門》

1) 英文原著

1. Kawamichi H, Tanabe HC, Takahashi HK, Sadato N (2013) Activation of the reward system during sympathetic concern is mediated by two types of empathy in a familiarity-dependent manner. *Soc Neurosci* 8:90-100. doi: 10.1080/17470919.2012.744349.
2. Anne T, Sugisawa Y, Shinohara R, Matsumoto M, Watanabe T, Tokutake K, Tomisaki E, Mochizuki H, Tanaka E, Okazaki S, Koeda T, Sadato N (2013) Validity and reliability of the interaction rating scale between children (IRSC) by using motion capture

analysis of head movement. *Public Health Research* 2:208-212. doi:10.5923/j.phr.20120206.06.

3. Hayashi MJ, Kanai R, Tanabe HC, Yoshida Y, Carlson S, Walsh V, Sadato N (2013) Interaction of numerosity and time in prefrontal and parietal cortex. *J Neurosci* 33:883-893. doi:10.1523/JNEUROSCI.6257-11.
4. Kitada R, Okamoto Y, Sasaki AT, Kochiyama T, Miyahara M, Lederman SJ, Sadato N (2013) Early visual experience and the recognition of basic facial expressions: involvement of the middle temporal and inferior frontal gyri during haptic identification by the early blind. *Front Hum Neurosci* 7:7. doi:10.3389/

- fnhum.2013.00007.
5. Miyahara M, Harada T, Ruffman T, Sadato N, Iidaka T (2013) Functional connectivity between amygdala and facial regions involved in recognition of facial threat. *Soc Cogn Affect Neurosci* 8:181-189. doi:10.1093/scan/nsr085.
 6. Miyahara M, Kitada R, Sasaki AT, Okamoto Y, Tanabe HC, Sadato N (2013) From gestures to words: Spontaneous verbal labeling of complex sequential hand movements reduces fMRI activation of the imitation-related regions. *Neurosci Res* 75:228-238. doi:10.1016/j.neures.2012.12.007.
 7. Morita T, Tanabe HC, Sasaki AT, Shimada K, Kakigi R, Sadato N (2013) The anterior insular and anterior cingulate cortices in emotional processing for self-face recognition. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 9(5):570-579. doi: 10.1093/scan/nst011.
 8. Tanaka S, Ikeda H, Kasahara K, Kato R, Tsubomi H, Sugawara SK, Mori M, Hanakawa T, Sadato N, Honda M, Watanabe K (2013) Larger right posterior parietal volume in action video game experts: A behavioral and voxel-based morphometry (VBM) study. *PLoS ONE* 8:e66998. doi:10.1371/journal.pone.0066998.
 9. Sakai H, Uchiyama Y, Shin D, Hayashi MJ, Sadato N (2013) Neural activity changes associated with impulsive responding in the sustained attention to response task. *PLoS ONE* 8:e67391. doi:10.1371/journal.pone.0067391.
 10. Yoshida Y, Tanabe HC, Hayashi MJ, Kawamichi H, Kochiyama T, Sadato N (2013) The neural substrates of the warning effect: a functional magnetic resonance imaging study. *Neurosci Res* 76:230-239. doi:10.1016/j.neures.2013.05.008.
 11. Matsunaga M, Bai Y, Yamakawa K, Toyama A, Kashiwagi M, Fukuda K, Oshida A, Sanada K, Fukuyama S, Shinoda J, Yamada J, Sadato N, Ohira H (2013) Brain-immune interaction accompanying odor-evoked autobiographic memory. *PLoS One* 8:e72523. doi:10.1371/journal.pone.0072523.
 12. Kawamichi H, Sasaki AT, Matsunaga M, Yoshihara K, Takahashi HK, Tanabe HC, Sadato N (2013) Medial prefrontal cortex activation is commonly invoked by reputation of self and romantic partners. *PLoS One* 8:e74958. doi:10.1371/journal.pone.0074958.
 13. Makita K, Yamazaki M, Tanabe HC, Koike T, Kochiyama T, Yokokawa H, Yoshida H, Sadato N (2013) A functional magnetic resonance imaging study of foreign-language vocabulary learning enhanced by phonological rehearsal: the role of the right cerebellum and left fusiform gyrus. *Mind Brain Edu* 7:213-224. doi:10.1111/mbe.12029.
 14. Anne T, Tokutake K, Tanaka E, Watanabe T, Tomisaki E, Mochizuki Y, Wu B, Shinohara R, Sugisawa Y, Okazaki S, Sadato N (2013) Short version of the interaction rating scale advanced (IRSA-Brief) as a practical index of social competence development. *Intern J of Appl Psychol*, 3(6): 169-173. doi: 10.5923/j.ijap.20130306.04.
- 2) 研究関係著作
1. 定藤規弘 (2013) 社会脳科学とコホート調査. 生存科学 B23:43-48.
 2. 穴戸恵美子 (2013) “話す-話すときに何が起きているのか?” 行動科学ブックレット 10, 二瓶社, 東京, pp. 80.

《認知行動発達機構研究部門》

- 1) 英文原著
 1. Nishimura Y, Perlmuter SI, Ryan WE, Fetz EE (2013) Spike-timing dependent plasticity in primate corticospinal connections induced during free behavior. *Neuron* 80: 1301-1309. doi:10.1016/j.neuron. 2013. 08.028.
 2. Chen D, Shin D, Watanabe H, Nakanishi Y, Kambara H, Yoshimura N, Nambu A, Isa T, Nishimura Y, Koike Y (2013) Prediction of hand trajectory from electrocorticography signals in primary motor cortex. *PLoS One* 8:e83534. doi: 10.1371/ journal. pone. 0083534.

3. Sooksawate T, Isa K, Matsui R, Kato S, Kinoshita M, Kobayashi K, Watanabe D, Kobayashi K, Isa T (2013) Viral vector-mediated selective and reversible blockade of the pathway for visual orienting in mice. *Front Neural Circuits* 7:162. doi:10.3389/fncir.2013.00162.
 4. Yamamoto T, Oishi T, Higo N, Murayama S, Sato A, Takashima I, Sugiyama Y, Nishimura Y, Murata Y, Yoshino-Saito K, Isa T, Kojima T (2013) Expression of secreted phosphoprotein 1 in the motor cortex among primate species and during postnatal development and functional recovery. *PLoS One* 8:e65701. doi: 10.1371/journal.pone.0065701.
 5. Takei T, Seki S (2013) Spinal premotor interneurons mediate dynamic and static motor commands for precision grip in monkeys. *J Neurosci* 33:8850-8860. doi:10.1523/JNEUROSCI.4032-12.2013.
 6. Takei T, Seki K (2013) Synaptic and functional linkages between spinal premotor interneurons and hand-muscle activity during precision grip. *Front Comput Neurosci* 7:40. doi:10.3389/fncom.2013.00040.
 7. Nishimura Y, Perlmuter SI, Fetz EE (2013) Restoration of upper limb movement via artificial corticospinal and musculoskeletal connections in a monkey with spinal cord injury. *Front Neural Circuits* 7:57. doi: 10.3389/fncir.2013.00057. eCollection 2013.
 8. Sugiyama Y, Higo N, Yoshino-Saito K, Murata Y, Nishimura Y, Oishi T, Isa T (2013) Effects of early versus late rehabilitative training on manual dexterity after corticospinal tract lesion in macaque monkeys. *J Neurophysiol* 109:2853-2865. doi: 10.1152/jn.00814.2012.
 9. Kaneda K, Isa T (2013) GABAergic mechanisms for shaping transient visual responses in the mouse superior colliculus. *Neurosci* 235:129-140. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.061.
 10. Kojima T, Higo N, Oishi T, Nishimura Y, Yamamoto T, Murata Y, Yoshino-Saito K, Onoe H, Isa T (2013) Gene network analysis of differentially expressed genes between primary motor and prefrontal association cortices of macaque brain. *Neurochem Res* 38:133-140. doi:10.1007/s11064-012-0900-4.
 11. Wanakhachornkrai O, Umeda T, Isa K, Tantisira M, Tantisira B, Isa T (2013) Reorganization of sensory pathways after neonatal hemidecortication in rats. *Neurosci Res* (in press). doi:10.1016/j.neures.2013.11.003.
 12. Hata K, Mizukami H, Sadakane O, Watakabe A, Ohtsuka M, Takaji M, Kinoshita M, Isa T, Ozawa K, Yamamori T (2013) DNA methylation and methyl-binding proteins control differential gene expression in distinct cortical areas of macaque monkey. *J Neurosci* 33:19704-19714. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2355-13.2013.
- 2) 和文原著
1. 佐藤圭太, 森下壮一郎, 渡辺秀典, 西村幸男, 加藤龍, 伊佐正, 横井浩史 (2013) 硬膜下電極からのサル捕食運動中の状態判別とロボットアーム動作決定. *日本ロボット学会誌* 31(1):51-59.
- 3) 英文総説 (査読あり)
1. Isa T, Kinoshita M, Nishimura Y (2013) Role of direct vs indirect pathways from the motor cortex to spinal motoneurons in the control of hand dexterity. *Front Neurol* 4:191. doi:10.3389/fneur.2013.00191.
- 4) 研究関係著作
1. 伊佐正 (2013) 「神経回路学」の時代. *日本神経回路学会誌* 20(3):97-99.
 2. 西村幸男, 伊佐正 (2013) 脊髄損傷後の機能回復を支える大脳辺縁系と大脳皮質運動野の機能的神経結合. *日本神経回路学会誌* 20(3):135-142.
 3. 西村幸男 (2013) 神経活動依存的刺激による機能再建と神経可塑性の誘導. *神経内科* 79(4):500-504.
 4. 西村幸男 (2013) 脊髄神経回路への人工神経接続による随意運動機能の再建. *医学のあゆみ* 246(8):582-587.
 5. 西村幸男 (2013) 人工神経接続による運動機能再建. *脳* 21 16(1):30-36.
 6. 伊佐正 (2013) BMI の神経生理学. *医学のあゆみ* 245(6):535-539.
 7. 木下正治, 伊佐正 (2013) 霊長類でのオプトジェネティクス. *生体の科学* 64(1):59-64.
 8. 伊佐正 (2013) 神経回路を自在に操作する技術について. *日本生物学的精神医学会誌* 24(1 号別冊):35-41.
 9. 吉田 正俊 (2013) 盲視の神経機構 *BRAIN and NERVE* Vol.65, No.6, pp671-677.

《生体恒常機能発達機構研究部門》

1) 英文原著

1. Ishibashi H, Witt MR, Nabekura J, Nielsen M (2013) Modulation of diazepam-insensitive GABA_A receptors by micromolar concentrations of thyroxine and related compounds in vitro. *Brain Res* 1490:1-8. doi:10.1016/j.brainres.2012.10.038.
2. Goto K, Kato G, Kawahara I, Luo Y, Obata K, Misawa H, Ishikawa T, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M (2013) In vivo imaging of enteric neurogenesis in the deep tissue of mouse small intestine. *PLoS One* 8(1):e54814. doi:10.1371/journal.pone.0054814.
3. Beppu K, Kosai Y, Kido MA, Akimoto N, Mori Y, Kojima Y, Fujita K, Okuno Y, Yamakawa Y, Ifuku M, Shinagawa R, Nabekura J, Sprengel R, Noda M (2013) Expression, subunit composition, and function of AMPA-type glutamate receptors are changed in activated microglia; possible contribution of GluA2 (GluR-B)-deficiency under pathological conditions. *Glia* 6:881-91. doi:10.1002/glia.22481.
4. Takatsuru Y, Eto K, Kaneko R, Masuda H, Shimokawa N, Koibuchi N, Nabekura J (2013) Critical role of the astrocyte for functional remodeling in contralateral hemisphere of somatosensory cortex after stroke. *J Neurosci* 33 : 4683 - 4692. doi : 10.1523 / JNEUROSCI.2657- 12.2013.
5. Takatsuru Y, Nabekura J, Koibuchi N (2013) Activity of the layer II/III neurons in the somatosensory cortex (SSC) plays a critical role on functional recovery after focal stroke in the contralateral SSC. *Neurosci Lett*

543:168-171. doi:10.1016/j.neulet.2013.03.049.

6. Ishibashi H, Yamaguchi J, Nakahata Y, Nabekura J (2013) Dynamic regulation of glycine-GABA co-transmission at spinal inhibitory synapses by neuronal glutamate transporter. *J Physiol* 591: 3821- 3832. doi: 10.1113/ jphysiol.2012.250647.
7. Miyamoto A, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J (2013) Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front Cell Neurosci* 7:70. doi:10.3389/fncel.2013.00070.
8. Takatsuru Y, Nakamura K, Nabekura J (2013) Compensatory contribution of the contralateral pyramidal tract after experimental cerebral ischemia. *Front Neurol Neurosci* 32: 36- 44. doi: 10.1159/ 000346409.
9. Nakagawa H, Hishikawa K, Eto K, Ieda N, Namikawa T, Kamada K, Suzuki T, Miyata N, Nabekura J (2013) Fine spatiotemporal control of nitric oxide release by infrared pulse-laser irradiation of a photolabile donor. *ACS Chem Biol* 8: 2493-2500. doi: 10.1021/ cb400361m.

2) 英文総説 (査読あり)

1. Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura J (2013) Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci* 36(4): 209-217. doi:10.1016/j.tins.2012.11.007.
2. Eto K, Ishikawa T, Sun Kwang K, Nabekura J (2013) Mechanisms of neural circuit remodeling in the primary somatosensory cortex in mouse models of chronic pain. *Brain Nerve* 65(6):623-633.

《生殖・内分泌系発達機構研究部門》

1) 英文原著

1. Toda C, Shiuchi T, Kageyama H, Okamoto S, Coutinho EA, Sato T, Okamatsu-Ogura Y, Yokota S, Takagi K, Tang L, Saito K, Shioda S, Minokoshi Y (2013) Extracellular signal-regulated kinase in the ventromedial hypothalamus mediates leptin-induced glucose uptake in red-type skeletal muscle. *Diabetes* 62:2295-2307. doi:

10.2337/db12-1629.

2. Rodriguez-Araujo G, Nakagami H, Hayashi H, Mori M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Nakaoka Y, Takami Y, Komuro I, Morishita R, Kaneda Y (2013) Alpha- synuclein elicits glucose uptake and utilization in adipocytes through the Gab1/PI3K/Akt transduction pathway. *Cell Mol Life Sci* 70:1123-1133. doi: 10. 1007/ s00018- 012-

- 1198-8.
- 2) 英文総説
1. Kahn BB, Minokoshi Y (2013) Leptin, GABA, and glucose control. *Cell Metab* 18:304-306. doi: 10.1016/j.cmet.2013.08.015.
- 3) 研究関係著作
1. 箕越靖彦 (2013) 肥満症例における食欲調節の変化. *Surgery Frontier* 20:255-259.
 2. 箕越靖彦 (2013) 脳における生体エネルギー代謝調節機構と肥満における異常. *実験医学 増刊号* 31: 69-75.
 3. 箕越靖彦 (2013) 中枢神経系とエネルギー代謝調節. *実験医学 増刊号* 31:3251-3256.
 4. 箕越靖彦 (2013) 視床下部による糖・脂質代謝調節. *BIO Clinica* 28:49-54.
 5. 箕越靖彦 (2013) 中枢性摂食・代謝調節機構の標的分子. “糖尿病の分子標的と治療薬辞典” (春日雅人監修, 綿田裕孝, 松本道宏編), 羊土社, 東京, pp.164-179, 182-183.

《個別研究（村上グループ）》

- 1) 英文原著
1. Seo Y, Satoh K, Morita H, Takamata A, Watanabe K, Ogino T, Murakami M (2013) Mn-citrate and Mn-HIDA: Intermediate-affinity chelates for manganese-enhanced MRI. *Contrast Media & Molecular Imaging* 8: 140- 146. doi: 10.1002/ cmmi. 1510.
 2. Matsuki-Fukushima M, Fujita-Yoshigaki J, Murakami M, Katsunmata-Kato O, Yokoyama M, Sugiyama H (2013) Involvement of AQP6 in the mercury-sensitive osmotic lysis of rat parotid secretory granules. *J Memb Biol* 246: 209-214. doi:10.1016/S1349-0079 (11) 80024-1.
 3. Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y (2013) Testing the constant-volume hypothesis by magnetic 1 resonance imaging of the mussel heart in the *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Biol* (in press). doi:10.1242/jeb.092577.
- 2) 研究関係著作
1. 村上政隆 (2013) 摘出灌流顎下腺を用いた水分泌の実験. “新訂生理学実習書” (日本生理学会教育委員会監修), 11 章 2, B-1, pp 214-218.

《個別研究（毛利グループ）》

- 1) 英文原著
1. Hirohashi N, Alvarez L, Shiba K, Fujiwara E, Iwata Y, Mohri T, Inaba K, Chiba K, Ochi H, Supran CT, Kozur N, Kakiuchi Y, Kaupp UB, Baba SA (2013) Sperm from sneaker male squids exhibit chemotactic swarming to CO₂. *Curr Biol* 23:775-781. doi: 10. 1016/ j.cub. 2013. 03.040.

《個別研究（永山グループ）》

- 1) 英文原著
1. Taylor DW, Ma E, Shigematsu H, Cianfrocco MA, Noland CL, Nagayama K, Nogales E, Doudna JA & Wang H-W (2013) Substrate-specific structural rearrangements of human dicer. *Nat Struct Mol Biol* 6:662-670. doi:10.1038/nsmb.2564
 2. Tockary TA, Osada K, Chen Q, Machitani K, Dirisala A, Nomoto T, Uchida S, Tou K, Matsumoto Y, Nitta K, Nagayama K, Kataoka K (2013) Tethered PEG crowdedness determining shape and blood circulation profile of polyplex micelle gene carriers (L-lysine). *Macromolecule* 46:6585-6592. doi: 10. 1021

/ma401093z.

3. Dai W, Fu C, Raytcheva D, Flanagan J, Khant HA, Liu X, Rochat RH, Haase-Pettingell C, Piret J, Ludtke SJ, Nagayama K, Schmid MF, King JA, Chiu W (2013) Visualizing virus assembly intermediates inside marine cyanobacteria. *Nature* 502:707-710. doi: 10. 1038/

nature12604.

2) その他

1. 曾我部正博, 永山國昭, 難波啓一, 原田慶恵 (2013) 統合バイオイメージング公開シンポジウム「医学・生命科学の革新的発展に資する統合バイオイメージングの展望報告」. *生物物理* 53:329-333.

《岡田名誉教授研究室》

1) 英文原著

1. Sabirov RZ, Kurbannazarova RS, Melanova NR, Okada Y (2013) Volume-sensitive anion channels mediate osmosensitive glutathione release from rat thymocytes. *PLoS One* 8:e55646. doi: 10. 1371/ journal. pone. 0055646.
2. Moritoh S, Komatsu Y, Yamamori T, Koizumi A (2013) Diversity of retinal ganglion cells identified by transient GFP transfection in organotypic tissue culture of adult marmoset monkey retina. *PLoS One* 8:e54667. doi: 10.1371/journal.pone.0054667.
3. Tsunematsu T, Tanaka KF, Yamanaka A, Koizumi A (2013) Ectopic expression of melanopsin in orexin/hypocretin neurons enables control of wakefulness of mice in vivo by blue light. *Neurosci Res* 75:23-28. doi:10.1016/j.neures.2012.07.005.
4. Koizumi A, Tanaka KF, Yamanaka A (2013) The manipulation of neural and cellular activities by ectopic expression of melanopsin. *Neurosci Res* 75:3-5. doi:10.1016/j.neures.2012.07.010.
5. Yawo H, Koizumi A, Hegemann P (2013) Adventure beyond borders of scientific fields with optogenetics. *Neurosci Res*. 75:1-2. doi: 10.1016/ j.neures. 2013. 02. 001.

6. Shimizu T, Iehara T, Sato K, Fujii T, Sakai H, Okada Y (2013) TMEM16F is a component of a Ca^{2+} -activated Cl^- channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl^- channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C748-C759. doi:10.1152/ajpcell.00228.2012.
7. Enoki R, Koizumi A (2013) A method of horizontally sliced preparation of the retina. *Methods Mol Biol* 935:201-205. doi:10.1007/978-1-62703-080-9_13.
8. Koizumi A, Morita Y, Kawamoto S (2013) Science communication: Reward research outreach in Japan. *Nature* 500:29. doi:10.1038/500029a.
9. Sato-Numata K, Numata T, Okada T, Okada Y (2013) Acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in human epithelial cells are highly sensitive to temperature and independent of ClC-3 . *Pflügers Arch* 465:1535-1543. doi:10.1007/s00424-013-1296-y.

2) 研究関係著作

1. 岡田泰伸 (2013) 細胞死のチャネルメカニズムとその病態. *日本病態生理学雑誌* 21:14-16.

3) その他

1. 岡田泰伸 (2013) OPINION: バックグラウンドからフォアフロントへ: 細胞生死と生体恒常性に関わるセンサーチャネル (前編). *日本生理学雑誌* 75: 249-257.

《遺伝子改変動物作製室》

A. 英文原著

1. Hirabayashi M, Tamura C, Sanbo M, Kato-Itoh M, Kobayashi T, Nakauchi M, Hoshi S (2013) A retrospective analysis of germline competence in rat

embryonic stem cell Lines. *Transgenic Res* 22:411-416. doi: 10.1007/s11248-012-9638-7.

2. Miwa K, Lee JK, Takagishi Y, Ophhof T, Fu X, Hirabayashi M, Watanabe K, Jimbo Y, Kodama I,

- Kumuro I (2013) Axon guidance of sympathetic neurons toward cardiomyocytes by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *PLoS One* 8:e65202. doi: 10.1371/journal.pone.0065202.
3. Tomita K, Sperling M, Cambridge SB, Bonhoeffer T, Hübener M (2013) A molecular correlate of ocular dominance columns in the developing mammalian visual cortex. *Cereb Cortex* 23:2531-2541. doi: 10.1093/cercor/bhs232.
4. Hwang IS, Hara H, Chung HJ, Hirabayashi M, Hochi S (2013) Rescue of vitrified-warmed bovine oocytes with Rho-associated coiled-coil kinase inhibitor. *Biol Reprod* 89:26. doi: 10.1095/biolreprod.113.109769.

《行動様式解析室》

1) 英文原著

1. Ohira K, Takeuchi R, Shoji H, Miyakawa T (2013) Fluoxetine-Induced Cortical Adult Neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 38:909-920. doi: 10.1038/npp.2013.2.
2. Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Toyama K, Nakamura HK, Kuroiwa M, Maeda J, Atsuzawa K, Esaki K, Yamaguchi S, Furuya S, Takagi T, Walton NM, Hayashi N, Suzuki H, Higuchi M, Usuda N, Suhara T, Nishi A, Matsumoto M, Ishii S, Miyakawa T (2013) Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38(8):1409-1425. doi: 10.1038/npp.2013.38.
3. Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S (2013) Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep* 3:1224. doi: 10.1038/srep01224.
4. Ohira K, Kobayashi K, Toyama K, Nakamura HK, Shoji H, Takao K, Takeuchi R, Yamaguchi S, Kataoka M, Otsuka S, Takahashi M, Miyakawa T (2013) Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. *Mol Brain* 6:12. doi:10.1186/1756-6606-6-12.
5. Umemori J, Takao K, Koshimizu H, Hattori S, Furuse T, Wakana S, Miyakawa T (2013) ENU-mutagenesis mice with a non-synonymous mutation in *Grin1* exhibit abnormal anxiety-like behaviors, impaired fear memory, and decreased acoustic startle response. *BMC Res Notes* 6:203. doi:10.1186/1756-0500-6-203.
6. Ageta-Ishihara N, Yamakado H, Morita T, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Takahashi R, Kinoshita M (2013) Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. *Mol Brain* 6:35. doi:10.1186/1756-6606-6-35.
7. Watanabe Y, Katayama N, Takeuchi K, Togano T, Ito R, Sato M, Yamazaki M, Abe M, Sato T, Oda K, Yokoyama M, Takao K, Fukaya M, Miyakawa T, Watanabe M, Sakimura K, Manabe T, Igarashi M (2013) Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short-term plasticity. *J Biol Chem* 288(48):34906-34919. doi: 10.1074/jbc.M113.504050.
8. Paemka L, Mahajan VB, Skeie JM, Sowers LP, Ehaideb SN, Gonzalez-Alegre P, Sasaoka T, Tao H, Miyagi A, Ueno N, Takao K, Miyakawa T, Wu S, Darbro BW, Ferguson PJ, Pieper AA, Britt JK, Wemmie JA, Rudd DS, Wassink T, El-Shanti H, Mefford HC, Carvill GL, Manak JR, Bassuk AG (2013) PRICKLE1 interaction with SYNAPSIN I reveals a role in autism spectrum disorders. *PLoS One* 8(12):e80737. doi: 10.1371/journal.pone.0080737.
9. Yamashita N, Takahashi A, Takao K, Yamamoto T, Kolattukudy P, Miyakawa T, Goshima Y (2013) Mice

lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition. *Front Behav Neurosci* 7:216. doi:10.3389/fnbeh.2013.00216.

2) 英文総説

1. Hagihara H, Takao K, Walton NM, Matsumoto M, Miyakawa T (2013) Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. *Neural Plast* 2013:318596. doi:10.1155/2013/318596.

3) 研究関係著作

1. 昌子浩孝, 萩原英雄, 高雄啓三, Noah M. Walton, 松本光之, 宮川剛 (2013) 精神疾患の中間表現型としての未成熟歯状回. *基礎心理学研究*, 32 (1):1-19.
2. 宮川剛, 高雄啓三 (2013) 第 6 章 脳の高次機能 7 遺伝子と行動. “改訂第 3 版 脳神経科学イラストレイテッド” (真鍋俊也, 森寿, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛 編), 羊土社, pp 258-268.

《形態情報解析室》

1) 英文原著論文

1. Wu Y, Wang C, Chen Y, Tu I, Miyazaki N, Murata K, Nagayama K, Chang W (2013) Zernike phase contrast cryo-electron microscopy reveals 100 kDa component in both symmetric and asymmetric protein complexes. *J Physics D* 46:494008. doi: 10.1088/ 0022-3727/ 46/49/ 494008.
2. Kumoi K, Satoh T, Murata K, Hiromoto T, Mizushima T, Kamiya Y, Noda M, Uchiyama S, Yagi H, Kato K (2013) An archaeal homolog of proteasome assembly factor functions as a proteasome activator. *PloS One* 8:e60294. doi:10.1371/journal.pone.0060294.

2) その他

1. Kazuyoshi Murata (2013) 「Electron Crystallography of

2D Crystals」*Encyclopedia of Biophysics*, Editor Gordon C. K. Roberts, ISBN: 978-3-642-16711-9, Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978- 3- 642- 16712-6.

2. Miyazaki N, Akita F, Nakagawa A, Murata K, Omura T & Iwasaki K. (2013) Cryo-electron tomography: moving towards revealing the viral life cycle of Rice dwarf virus. *J. Synchrotron Rad.* 20, 826-828. doi: 10.1107/ S090904951302219X.
3. 村田和義 (2013) 電子顕微鏡によるバイオイメーシング. *映像情報メディア学会誌* 67(9):748-752.
4. 宮崎直幸, 村田和義 (2013) 電子直接検出カメラ (direct electron detector) の TEM への応用. *顕微鏡* 48(1): 52-60.

《ウイルスベクター開発室》

1) 英文原著

1. Hirano M, Kato S, Kobayashi K, Okada T, Yaginuma H, Kobayashi K (2013) Highly efficient retrograde gene transfer into motor neurons by a lentiviral vector pseudotyped with fusion glycoprotein. *PLoS One* 8:e75896. doi:10.1371/journal.pone.0075896.

2) 英文総説

1. Kato S, Kobayashi K, Kobayashi K (2013) Dissecting circuit mechanisms by genetic manipulation of specific

neural pathways. *Rev Neurosci* 24:1-8. doi: 10. 1515/ revneuro-2012-0043.

2. Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Takada M, Kobayashi K (2013) Vectors for highly efficient and neuron-specific retrograde gene transfer for gene therapy of neurological diseases. “Gene Therapy-Tools and Potential Applications” (ed. Francisco Martin Molina), Chapter 15, InTech Press, Rijeka, Croatia, pp 387-398.

《生命時空間設計研究領域》

A. 英文原著

1. Satou C, Kimura Y, Hirata H, Suster ML, Kawakami K, Higashijima S (2013) Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* 140:3927-3931. doi: 10.1242/ dev. 099531.
2. Mizuno H, Sassa T, Higashijima S, Okamoto H, Miyawaki A (2013) Transgenic zebrafish for ratiometric imaging of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} response in teleost embryo. *Cell Calcium* 56:236-245. doi: 10. 1016/j.ceca.2013.06.007.
3. Hirabayashi R, Hozumi S, Higashijima S, Kikuchi Y (2013) Ddx46 Is required for multi-lineage differentiation of hematopoietic stem cells in zebrafish. *Stem Cells Dev* 22:2532- 2542. doi: 10. 1089/ scd. 2012.0623.
4. Reimer MM, Norris A, Ohnmacht J, Patani R, Zhong Z, Dias TB, Kusch V, Scott AL, Chen Y, Rozov S, Frazer SL, Wyatt C, Higashijima S, Patton EE, Panula P, Chandran S, Becker T, Becker CG (2013) Dopamine from the brain promotes spinal motor neuron generation during development and adult regeneration. *Dev Cell* 25:478-491. doi: 10.1016/ j.devcel. 2013. 04. 012.
5. Aoki T, Kinoshita M, Aoki R, Agetsuma M, Aizawa H, Yamazaki M, Takahoko M, Amo R, Arata A, Higashijima S, Tsuboi T, Okamoto H (2013) Imaging of Neural Ensemble for Retrieval of a Learned Behavioral Program. *Neuron* 78:881-894. doi:10.1016/ j.neuron.2013. 04. 009.
6. Kimura Y, Satou C, Fujioka S, Shoji W, Umeda K, Ishizuka T, Yawo H, Higashijima S (2013) Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming. *Curr Biol* 23: 843-849. doi:10.1016/j.cub.2013.03.066.
7. Shimozono S, Iimura T, Kitaguchi T, Higashijima S, Miyawaki A (2013) Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development. *Nature* 496:363-366. doi:10.1038/nature12037.

《動物実験センター》

1) 英文原著論文

1. Kimura T (2013) The regulatory effects of resistant starch on glycemic response in obese dogs. *Arch Anim Nutr* 67:503-509.

2) その他

1. 木村透, 廣江猛 (2013) 新しい前培養および体外受精用培地を用いた凍結保存. C57BL/6J マウス精子に対する受精率の有意なる改善成績. *日比較医学会誌* 20:1-6.

b. 学会発表

〔 目 次 〕

神経機能素子研究部門.....	118
分子神経生理部門.....	118
ナノ形態生理研究部門.....	120
生体膜研究部門.....	120
細胞生理研究部門.....	121
感覚認知情報研究部門.....	122
神経シグナル研究部門.....	123
神経分化研究部門.....	124
心循環シグナル研究部門.....	125
感覚運動調節研究部門.....	125
生体システム研究部門.....	127
脳形態解析研究部門.....	128
大脳神経回路論研究部門.....	129
心理生理学研究部門.....	130
認知行動発達機構研究部門.....	133
生体恒常機能発達機構研究部門.....	136
生殖・内分泌系発達機構研究部門.....	138
個別研究（村上グループ）.....	139
個別研究（毛利グループ）.....	139
特別研究（永山グループ）.....	140
遺伝子改変動物作製室.....	140
行動様式解析室.....	141
形態情報解析室.....	142
生体機能情報解析室.....	143
多光子顕微鏡室.....	143
ウイルスベクター開発室.....	143
生命時空間設計研究領域.....	143
動物実験センター.....	144

学 会 発 表

《神経機能素子研究部門》

1. 立山充博, 久保義弘 (2013.3.28) Binding of the Gq protein stabilizes the active conformation of the M1R and M3R, but not of P2Y₁R. 第90回日本生理学会大会 (東京)
2. 中條浩一 (2013.3.27) Gating modulation of KCNQ channels via the voltage-sensing domains. シンポジウム「New functions and regulatory mechanisms of a voltage sensor domain」第90回日本生理学会大会 (東京)
3. Batu Kuceli, Yoshihiro Kubo (2013.3.29) Subunit stoichiometry and signal flow analyses in the P2X2 trimer upon voltage- and [ATP]- dependent activation. 第90回日本生理学会大会 (東京)
4. 北沢和寛, 中條浩一, 久保義弘 (2013.3.28) The speed of recovery from inactivation of Kv4.2-KChIP4 complex changes depending on the stoichiometry. 第90回日本生理学会大会 (東京)
5. 立山充博, 久保義弘 (2013.6.21) FRET analyses of the stabilizing effect of Gi1 protein on the agonist-induced activated conformation of the A_{1a}R. 第36回日本神経科学大会 (京都)
6. 糸慎一郎, 中條浩一, 久保義弘 (2013.6.20) Analyses of the regulation mechanisms of the gating of hERG channel by cyclic nucleotide binding homology domain. 第36回日本神経科学大会 (京都)
7. Nakajo K (2013.7.23) Dynamic aspects of the subunit stoichiometry of the KCNQ/KCNE channel complex. IUPS2013 Symposium “Potassium channel complexes: Dynamic aspects of the assembly and regulation towards their physiological roles” (Birmingham, UK)
8. 黒木麻湖, 河合靖, 長友克広, 久保義弘, 齊藤修 (2013.9.26) 緑茶カテキン類による TRPA1 と TRPV1 の活性化. 第84回日本動物学会 (岡山)
9. 織田麻衣, 黒木麻湖, 久保義弘, 齊藤修 (2013.9.26) 魚類 TRPA1 の機能解析. 第84回日本動物学会 (岡山)
10. 塚本寿夫, David Farrens, 久保義弘, 小柳光正, 寺北明久, 古谷祐詞 (2013.9.26) 哺乳類メラノプシンが示す特徴的な分子特性. 第84回日本動物学会 (岡山)
11. Yoshihiro Kubo (2013.10.23) Dynamic aspects of the function and stoichiometry of ion channel complexes. (Plenary lecture) The 65th Annual meeting of Korean Physiological Society (Seoul, Korea)
12. 北沢和寛, 中條浩一, 久保義弘 (2013.10.25) Kv4.2 の不活性化からの回復速度は KChIP4 の結合数に依存して変化する. 第60回中部日本生理学会 (岐阜)
13. 糸慎一郎, 中條浩一, 久保義弘 (2013.10.25) hERG チャネルの環状ヌクレオチド結合相同ドメインによる脱活性化過程の制御. 第60回中部日本生理学会 (岐阜)
14. Hisao Tsukamoto, Koichi Nakajo, Yoshihiro Kubo, Yuji Furutani (2013.10.28) ATR-FTIR spectroscopic analyses on a mammalian two-pore domain potassium channel, TWIK-1. 第51回日本生物物理学会年会 (京都)

《分子神経生理部門》

1. 池中一裕 (2013.1.12) 私のグリア研究. 包括的神経グリア研究会 2013 (館山寺) 招待講演)
2. 石野雄吾, 池中一裕 (2013.2.1) The function of morphogens is mediated by acidic sugar chains in the developing mouse spinal cord. GCOE 第5回 NAGOYA グローバルリトリート (大府) (ポスター)
3. 稲村直子 (2013.2.18) Analysis of ATP release from astrocytes 第2回脳研生理研合同シンポジウム (新潟) (ポスター)
4. 池中一裕 (2013.2.19) Cause for impaired remyelination

- in chronic demyelinated lesions.第2回脳研生理研合同シンポジウム (新潟)
5. 石野雄吾 (2013.3.14) Acidic sugar chains have function as master regulator in morphogenesis of developing spinal cord.第6回神経発生討論会(和光)
 6. 橋本弘和,石野雄吾,吉村武,内村佳子,内村健治,門松健治,池中一裕 (2013.3.14) Keratan sulfate regulates oligodendrocyte development in the embryonic spinal cord,第6回神経発生討論会 (和光) (ポスター)
 7. 清水健史 (2013.3.18) Molecular mechanisms that control a precise number and target axons of myelination. 第18回グリアクラブ (ニセコ)
 8. 長内康幸 (2013.3.18) Detection of neurons that are ensheathed by one oligodendrocyte through induction of synapse-like structure between axon and myelin membrane.第18回グリアクラブ (ニセコ)
 9. Wilaiwan Wisessmith (2013.3.20) Exploring the role of Cathepsin C and Cystatin F in demyelinating diseases.第18回グリアクラブ (ニセコ)
 10. 鳴海麻衣 (2013.3.20) Keratan sulfate regulates oligodendrocyte development in the embryonic spinal cord.第18回グリアクラブ (ニセコ)
 11. Hirokazu H, Yugo I, Takeshi Y, Keiko U, Kenji U, Kenji K, Kazuhiro I (2013.4.14) Keratan sulfate regulates oligodendrocyte development in the embryonic spinal cord .International Society for Neurochemistry American Society for Neurochemisry 24th Biennial Joint Meeting (Mexico) (Poster)
 12. W.Wisessmith, T.Shimizu, K.F.Tanka, K.Ikenaka (2013.4.14) Exploring the role of Cathepsin C and Cystatin F in demyelinating diseases. International Society for Neurochemistry American Society for Neurochemisry 24th Biennial Joint Meeting (Mexico) (Poster)
 13. 橋本弘和 (2013.5.25) Keratan sulfate regulates oligodendrocyte development in the embryonic spinal cord.日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム(名古屋) (ポスター)
 14. 鳴海麻衣 (2013.5.25) Keratan sulfate regulates oligodendrocyte development in the embryonic spinal cord . 日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム (名古屋) (ポスター)
 15. Wilaiwan Wisessmith (2013.5.25) Exploring the role of Cathepsin C and Cystatin F in demyelinating diseases. 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (名古屋) (ポスター)
 16. Wilaiwan Wisessmith, Takahiro Shimizu,Kazuhiro Ikenaka (2013.6.13) Exploring the role of Cathepsin C and Cystatin F in demyelinating diseases. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society.The 56th annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry.The 23rd Annual Conference of the Japanese Neural Network Society. (Kyoto)
 17. 稲村直子,田中謙二,古家喜四夫,曾我部正博,池中一裕 (2013.6.13)アストロサイトによるATP放出の解析。第36回日本神経科学大会。第56回日本神経化学大会。第23回日本神経回路学会大会。(京都)
 18. 鳴海麻衣,吉村武,鳥居知宏,池中一裕 (2013.6.20) マウス脳内に発現する新規シアル酸化N結合型糖鎖の解析。第36回日本神経科学大会。第56回日本神経化学大会。第23回日本神経回路学会大会。(京都)
 19. 橋本弘和,石野雄吾,吉村武,内村佳子,内村健治,門松健治,池中一裕 (2013.6.20) 胎生期脊髄におけるケラタン硫酸によるオリゴデンドロサイト発生の制御。第36回日本神経科学大会。第56回日本神経化学大会。第23回日本神経回路学会大会。(京都)
 20. 鳴海麻衣,吉村武,鳥居知宏,池中一裕 (2013.8.6) マウス脳内における新規N結合型糖鎖の解析。第32回日本糖質学会 (大阪) (ポスター)
 21. 橋本弘和,石野雄吾,吉村武,内村佳子,内村健治,門松健治,池中一裕 (2013.8.7) ケラタン硫酸によるオリゴデンドロサイトの発生制御。第32回日本糖質学会 (大阪)
 22. 橋本弘和,石野雄吾,吉村武,内村佳子,内村健治,門松健治,池中一裕 (2013.9.11) ケラタン硫酸によるオリゴデンドロサイトの発生制御。第86回日本生化学会大会 (横浜)
 23. 鳴海麻衣,吉村武,鳥居知宏,池中一裕 (2013.9.11) マウス脳内における新規N結合型糖鎖の解析。第86回日本生化学会大会 (横浜)
 24. Kazuhiro Ikenaka (2013.10.18) Keratan sulfate regulates oligodendrocyte development in the embryonic spinal cord. Neurogenesis 2013 in Matsushima 招待講演(松島)
 25. 長内康幸 (2013.10.26) 脳梁中のオリゴデンドロサイ

- トが髄鞘形成をする神経軸索の同定。第 18 回グリア研究会 (仙台)
26. 江文 (2013.10.26) 脊髄の発生における Sulfatase1 と Sulfatase2 の役割。第 18 回グリア研究会 (仙台)
27. Kazuhiro Ikenaka (2013.11.7) Glia cell biology In demyelinating and dysmyelinating disorders. PACTRIMS Basic Science Lecture (Plenary) 6th Congress of the Pan-Asian Commottee for Treatment and

- Research in Multiple Sclerosis. (Kyoto)
28. 池中一裕 (2013.11.8) 慢性脱髄巣における髄鞘再生抑制機構の解明。第 43 回日本臨床神経生理学学会学術大会。(高知) (招待講演)
29. 池中一裕 (2014.1.10) グリアアセンブリが脳を操る。新学術領域研究「グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態」公開シンポジウム発表者名, 発表

《ナノ形態生理研究部門》

形態情報解析室の項を参照

《生体膜研究部門》

1. Yokoi N. (2013・2・18) Molecular Pathogenic Mechanisms of Human LGI1 Mutations Linked to Familial Lateral Temporal Lobe Epilepsy. 第 2 回脳研生理研合同シンポジウム (新潟)
2. Oku S. (2013・2・18) In silico screening for palmitoyl substrates reveals Neurochondrin/Norbin palmitoylation regulates its early endosomal localization. 第 2 回脳研生理研合同シンポジウム (新潟)
3. 深田正紀, 深田優子 (2013・3・14) LGI1 変異によっておこるてんかんの分子病態の解明. 第 6 回神経発生討論会 (和光)
4. 横井紀彦, 深田正紀, 深田優子 (2013・6・6) 神経分泌蛋白質 LGI1 の変異を原因とする“てんかん”の分子病態機構の解明と治療法の開拓. 平成 25 年度生理学研究所 研究会「シナプス恒常性維持の分子基盤とその破綻」(岡崎)
5. Fukata M. (2013・7・14-19) Role of synaptic DHHC2 palmitoyl transferase in the postsynaptic subdomain organization. FASEB Science Research Conference “Protein Lipidation, Signaling, and Membrane Domains” (Vermont, USA)
6. Fukata Y., Dimitrov A., Boncompain G., Vielemeyer, O., Perez, F., and Fukata M. (2013・7・14-19) Local PSD-95 palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. FASEB Science Research Conference “Protein Lipidation, Signaling, and Membrane Domains” (Vermont, USA)
7. Fukata M. (2013・7・22-26) Direct imaging of palmitoylated PSD-95 in neurons. IUPS2013 Symposium (Birmingham, UK)
8. 深田正紀 (2013・8・6) シナプス伝達制御の中心的機構とその破綻～新しいてんかん分子病態の解明～. がん・ゲノム・脳 支援活動 3 領域合同シンポジウム (東京)
9. Yokoi N., Fukata Y., Kase D., Miyazaki T., Jaegle M., Imoto K., Meijer D., Watanabe M., Fukata M. (2013・10・10) Pathogenic mechanism of epilepsy-related LGI1 mutations in vivo. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium (岡崎)
10. Yokoi N., Fukata Y., Kase D., Miyazaki T., Jaegle M., Imoto K., Meijer D., Watanabe M., Fukata M. (2013・11・11) Molecular pathogenic mechanisms of epilepsy caused by LGI1 mutations. 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, CA)
11. Fukata M., Sekiya A., Murakami, T., Perez, F., Fukata, Y. (2013・12・4) Role of synaptic palmitoylation cycles in the postsynaptic subdomain organization. 第 36 回日本分子生物学会 (神戸)
12. Sekiya A., Murakami, T., Kobayashi K., Fukata Y., Fukata M. (2013・12・4) Identification and

- Characterization of Depalmitoylating Enzyme Family in Neurons. 第36回日本分子生物学会(神戸)
13. Tatsuro Murakami, Atsushi Sekiya, Yuko Fukata, Masaki

- Fukata (2013・12・4) Regulatory mechanism of H-Ras trafficking by novel depalmitoylating enzymes. 第36回日本分子生物学会(神戸)

《細胞生理研究部門》

1. 富永真琴 (2013.2.16) TRP チャネルと安全性薬理. 第4回日本安全性薬理研究会学術集会(東京)
2. Tominaga M (2013.3.6) Nociception and TRP channels. Joint symposium on Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica & Tzu Chi University (Hualien, Taiwan)
3. 加塩麻紀子(2013.3.27) 過酸化水素による TRPM2 機能制御と生理機能. 第90回日本生理学会大会(東京)
4. 齋藤茂(2013.3.27) TRPA1 チャネルの侵害性の温度・化学物質感受性の脊椎動物種間の多様性. 第90回日本生理学会大会(東京)
5. 内田邦敏 (2013.3.27) 細胞外亜鉛イオンによる TRPM5 活性阻害作用. 第90回日本生理学会大会(東京)
6. 西本れい(2013.3.27) 静脈麻酔薬プロポフォールはヒト TRPA1 を活性化する. 第90回日本生理学会大会(東京)
7. 周一鳴(2013.3.27) マウス TRPA1 の新規 splicing variant の同定とチャネル活性の制御. 第90回日本生理学会大会(東京)
8. 高山靖規 (2013.3.28) TRPV4 とアノクタミン1の機能的連関. 第90回日本生理学会大会(東京)
9. 藤田郁尚 (2013.3.28) TRPM8 の冷温度閾値は暴露温度によってホスファチジルイノシトール-4,5 ニリン酸の結合を介して変化する. 第90回日本生理学会大会(東京)
10. 田淵紗和子(2013.3.29) オレキシン神経の時期特異的運命制御を用いた新規ナルコレプシーモデルマウスの解析. 第90回日本生理学会大会(東京)
11. Erkin Kurganov (2013.3.29) Properties of heat and chemical sensitivity of green anole lizard TRPA1. 第90回日本生理学会大会(東京)
12. 西本れい (2013.5.23) パッチクランプ法を用いたプロポフォールのヒト TRPA1 活性化の解析. 日本麻酔

- 科学会第60回学術集会(札幌)
13. 富永真琴 (2013.5.31) 温度感受性 TRP チャネルと皮膚・免疫機能. 第24回多摩アレルギー談話会(東京)
 14. 富永真琴 (2013.6.20) 温度センサーの可塑性と温度情報の統合機構. Neuro2013(京都)
 15. 田淵紗和子 (2013.6.20) オレキシン神経運命制御によるナルコレプシーの症状発現メカニズム解析. Neuro2013(京都)
 16. Tominaga M(2013.7.4) Physiological function of TRPV4 in choroid plexus. International Conference for Neurons and Brain Disease (Singapore, Singapore)
 17. 富永真琴 (2013.7.13) 侵害受容体 TRPV1 と TRPA1 の脊椎動物における機能進化. 第35回日本疼痛学会(大宮)
 18. Shigeru Saito (2013.7.8) Functional evolution of noxious temperature and chemical receptors, TRPA1 and TRPV1, in vertebrates. SBE2013 annual meeting of Society for Molecular Biology and Evolution (Chicago, USA)
 19. 齋藤茂 (2013.8.30) 侵害性の温度・化学物質受容体 TRPA1 チャネルの機能的多様性と分子基盤. 日本進化学会第15回大会(つくば)
 20. 齋藤茂(2013.9.27) 温度・化学物質受容体の脊椎動物種間の機能的多様性と分子基盤. 日本動物学会第84回大会(岡山)
 21. 富永真琴 (2013.9.21) 温度感受性 TRP チャネルによる温度受容・侵害受容. 第156回日本獣医学会学術集会(岐阜)
 22. Zhou Y (2013.10.20) A novel mouse TRPA1 alternative splicing variant regulates its channel activity. NIPS-Chulalongkorn University Joint Symposium (Bangkok, Thailand)
 23. 高山靖規 (2013.10.25) TRPV4 と TMEM16A の機能的相互作用を介したクロライド流出による細胞内からの水流出の促進. 第60回中部日本生理学会(岐阜)

24. エルキン クルガノフ (2013.10.25) グリーンアノールトカゲ TRPA1 の温度・化学物質に対するチャネル特性. 第60回中部日本生理学会(岐阜)
25. 鈴木喜郎 (2013.10.25) TRPM6 チャネルの母子間 Ca^{2+} 輸送への関与. 第60回中部日本生理学会(岐阜)
26. Tominaga M (2013.11.2) Functional Regulation of TRPM5 and TRPA1. The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of taste and Olfactory Perception (Fukuoka)
27. 富永真琴 (2013.11.9) 侵害受容の分子機構. 第43回日本臨床神経生理学会学術大会 (高知)
28. Tominaga M (2013.12.8) Molecular mechanisms of nociception through TRPA1 activation. The 44th NIPS International Symposium & the 5th Asian Pain Symposium (Okazaki)
29. Zhou Y (2013.12.18) Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity. The 44th NIPS International Symposium & the 5th Asian Pain Symposium (Okazaki)
30. Takaishi T (2013.12.18) 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. The 44th NIPS International Symposium & the 5th Asian Pain Symposium (Okazaki)

《感覚認知情報研究部門》

1. Okazawa G, Komatsu H (2013.3.4) Image statistics for golden appearance of a painting by a Japanese Edo-era artist Jakuchu Ito. The Fourth Computational Color Imaging Workshop (千葉)
2. Komatsu H (2013.3.4) 'Yellow' or 'Gold?': Neural processing of gloss information. The Fourth Computational Color Imaging Workshop (千葉)
3. 郷田直一, 橘 篤導, 岡澤剛起, 小松英彦 (2013.6.20) Material information processing in monkey visual cortex: a functional MRI study. 第36回日本神経科学大会 (京都)
4. 下川丈明, 西尾亜希子, 郷田直一, 小松英彦 (2013.6.20) Perceptual gloss parameters represented in inferior temporal cortex: a canonical correlation analysis of neuronal data. 第36回日本神経科学大会 (京都)
5. 岡澤剛起, 田嶋達裕, 小松英彦 (2013.6.21) Image features determining texture selectivity of macaque V4 neurons revealed by adaptive sampling. 第36回日本神経科学大会 (京都)
6. 波間智行, 小松英彦 (2013.6.21) Effect of luminance contrast on color selective activity in area V4. 第36回日本神経科学大会 (京都)
7. 田嶋達裕, 鯉田孝和, 今井千尋, 合原一幸, 鈴木秀幸, 小松英彦 (2013.6.22) Categorical modulation of color population code. 第36回日本神経科学大会 (京都)
8. 波間智行, 安田正治, 坂野 拓, 岡澤剛起, 小松英彦 (2013.8.6) サル V4 野と下側頭皮質の細胞の色選択性応答に対する輝度コントラストの影響. 視覚科学フォーラム第17回研究会 (草津, 滋賀)
9. 眞田尚久, DeAngelis GC (2013.8.6) サル MT 野における奥行き運動 (Motion-in-depth) 知覚の神経基盤. 視覚科学フォーラム第17回研究会 (草津, 滋賀)
10. 安川涼子, 郷田直一, 小松英彦 (2013.9.6) 織物の心理的距離の触覚経験による変化. 繊維学会秋季研究発表会 (名古屋)
11. 郡司 雅, 郷田直一, 蒲池みゆき (2013.9.12) 音素配列に基づく幼児の言語獲得モデルの検証. 日本認知科学会第30回大会 (東京)
12. Nishio A, Shimokawa T, Goda N, Komatsu H (2013.11.11) Canonical correlation analysis revealed perceptual gloss parameters represented in the monkey inferior temporal cortex. Society for Neuroscience annual meeting 2013 (San Diego, USA)
13. Namima T, Okazawa G, Komatsu H (2013.11.12) Effects of luminance contrast on color selectivity in monkey visual area V4. Society for Neuroscience annual meeting 2013 (San Diego, USA)
14. Okazawa G, Tajima S, Komatsu H (2013.11.12) Natural texture selectivity of macaque V4 neurons examined by adaptive sampling. Society for Neuroscience annual meeting 2013 (San Diego, USA)
15. Komatsu H, Namima T, Yasuda M, Banno T, Okazawa G

(2013.11.12) Effects of luminance contrast on the color selective responses in monkey inferior temporal cortex.

Society for Neuroscience annual meeting 2013 (San Diego, USA)

《神経シグナル研究部門》

1. Uta D, Furue H, Imoto K (2013.2.18) In vivo spinal synaptic responses and scratching behaviors evoked by cutaneous 5-HT application. 2nd Joint conference of BRI and NIPS (新潟)
2. Uta D, Imoto K, Furue H (2013.3.29) Firing pattern and morphological analysis of substantia gelatinosa neurons receiving TRPA1-expressing afferents in rat spinal dorsal horn. 第90回日本生理学会大会 (東京)
3. Kawatsu R, Imoto K, Uta D, Okamoto T, Andoh T, Masui K, Taya K, Yamamura Y, Ikeda M, Furue H (2013.3.27) Inhibitory action of levobupivacaine on TTX resistant (NaV1.8) sodium channel. 第90回日本生理学会大会 (東京)
4. Hakozaki A, Imoto K, Hayashi Y, Sasaki E, Kawatani M, Furue H (2013.3.27) In vivo analysis of synaptic responses evoked in parasympathetic preganglionic nucleus in the rat lumbosacral spinal cord. 第90回日本生理学会大会 (東京)
5. Furue H (2013.3.27) In vivo analysis of spinal GABAergic inhibition of nociceptive transmission. (GABAニューロン賦活の in vivo 解析と痛覚抑制回路の同定。) . 第90回日本生理学会大会 (東京)
6. Furue H (2013.3.28) Nerve Action Potential and Nociceptive transmission. 第90回日本生理学会大会 (東京)
7. Tonomura S, Meir I, Ebara S, Kuroda D, Uta D, Furue H, Furuta T, Bagdasarian K, Ahissar E, Kumamoto K (2013.3.30) Full visualization of single trigeminal ganglion neuron. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 (香川)
8. 歌大介, 秋元望, 井本敬二, 古江秀昌 (2013.6.2) In vivo パッチクランプ記録法を用いた脊髄後角における痒み情報伝達の解析. 第15回ブレインサイエンス研究会 (福岡)
9. 山肩葉子, 兼子幸一, 加勢大輔, 石原博美, Angus C Nairn, 小幡邦彦, 井本敬二 (2013.6.20) Both NMDA- and non-NMDA-receptors are necessary for ERK1/2 activation by seizure activity in cortical slices. 第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会 合同大会, Neuro2013 (京都)
10. 佐竹伸一郎, 池田啓子, 川上潔, 井本敬二 (2013.6.21) Suppressed extrasynaptic diffusion of climbing fiber neurotransmitter in the cerebellar cortex of the Atp1a3-deficient heterozygous mice. 第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会 合同大会, Neuro2013 (京都)
11. Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H (2013.6.21) Firing pattern of spinal dorsal horn neurons receiving pruritogen serotonin-responsive afferents in the rat spinal cord. 第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会 合同大会, Neuro2013 (京都)
12. Kawatsu R, Imoto K, Uta D, Okamoto T, Taya K, Yamamura Y, Ikeda M, Furue H (2013.6.21) Selective use-dependent inhibition of levobupivacaine on TTX resistant (NaV1.8) sodium currents. 第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会 合同大会, Neuro2013 (京都)
13. Ebara S, Tonomura S, Kumamoto K, Kuroda D, Furuta T, Furue H, Uta D (2013.6.22) Full visualization of single trigeminal ganglion neuron. 第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会 合同大会, Neuro2013 (京都)
14. Uta D, Imoto K, Furue H (2013.7.12) In vivo patch-clamp analysis of local anesthetic actions on synaptic transmission to the adult rat spinal dorsal horn. 第35回日本疼痛学会 (大宮)
15. Kawatsu R, Imoto K, Uta D, Taya K, Yamamura Y, Furue H (2013.7.13) Inhibitory action of local anesthetic, levobupivacaine on NaV1.8 channel. 第35回日本疼痛学会 (大宮)

学会 (大宮)

16. Hakozaiki A, Imoto K, Hayashi Y, Sasaki E, Kawatani M, Furue H (2013.8.28) Synaptic responses evoked in parasympathetic preganglionic neurons by stimulation of primary afferent fibers innervating the bladder. 43rd ICS (Barcelona, Spain)
17. Furue H (2013.9.5) In vivo spinal inhibitory synaptic responses evoked by optoactivation of descending noxious inhibitory system. The 11th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences (Hamamatsu, Japan)
18. 山肩葉子, Angus C Nairn, 小幡邦彦, 井本敬二 (2013.9.12) Contrasting feature of ERK1/2 activation and a decrease in synapsin I phosphorylation in the rat brain during status epilepticus induced by kainic acid *in vivo*. 第86回日本生化学会大会 (横浜)
19. Ikeda K, Satake S, Kawakami K (2013.9.23) Increased inhibitory neurotransmission in the cerebellum of the *Atp1a3*-deficient heterozygous mice. Second Symposium on ATP1A3 in Disease: Genotype/Phenotype Correlations, Modelling and Identification of Potential Targets for Treatment (Rome, Italy)
20. Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2013.10.10) Intense training did not compensate for learning deficits in the kinase-dead knock-in mouse of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α . The 3rd NIPS-CIN Joint Neuroscience Symposium (Okazaki, Japan)
21. Yamagata Y (2013.10.22) New insights into Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II function in learning and memory revealed by kinase-dead knock-in mouse. 1st CU-NIPS Symposium "Frontier in

Physiological Sciences Research: From Basic Research to Diseases and Treatments" (Bangkok, Thailand)

22. Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H (2013.10.26) In vivo patch-clamp recording analysis of excitatory synaptic transmission in the adult rat spinal dorsal horn evoked by cutaneous application of a pruritogen. The 23th International Symposium of Itch (Osaka, Japan)
23. Yao I, Matsumura S, Katano T, Yamagata Y, Imoto K, Ito S (2013.11.11) Synaptic localization of CaMKII in the spinal dorsal horn of kinase-dead knock-in mouse in the maintenance of neuropathic pain. Neuroscience 2013 (San Diego, USA)
24. Furue H (2013.12.18-20) Spinal GABAergic excitation by optogenetic activation of descending noradrenergic system. Asian Pain Symposium 2013 (Okazaki, Japan)
25. Akimoto N, Uta D, Honda K, Takano Y, Imoto K, Noda M, Furue H (2013.12.18) Effect of Chemokine (C-C motif) Ligand 1 on Synaptic Transmission in the Spinal Dorsal Horn. The 5th Asian pain Symposium 2013 (Okazaki, Japan)
26. Uta D, Imoto K, Furue H (2013.12.18-20) Firing pattern and morphological analysis of substantia gelatinosa neurons receiving TRPA1-expressing afferent fibers in adult rat spinal dorsal horn. The 5th Asian Pain Symposium (Okazaki, Japan)
27. Koga K, Tsuda M, Inoue K, Imoto K, Furue H (2013.12.18-20) Excitation of GABAergic Inhibitory Interneurons Mediated Through Presynaptic P2X3 Receptor in the Rat Spinal Dorsal Horn. The 5th Asian Pain Symposium (Okazaki, Japan)

《神経分化研究部門》

1. Tarusawa E, Toyoda S, Kobayashi T, Sanbo M, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y. (2013.6.21) Dnmt3b epigenetically regulates specificity of synaptic connections in mouse barrel cortex. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto)
2. Yoshimura Y. (2013.6.22) Experience-dependent maturation of visual cortical circuits and function. The

36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto)

3. Toyoda S, Kawaguchi M, Kobayashi T, Tarusawa E, Toyama T, Okano M, Oda M, Nakauchi H, Yoshimura Y, Sanbo M, Hirabayashi M, Hirayama T, Hirabayashi T, Yagi T. (2013.6.22) Dnmt3b-dependent DNA methylation regulates stochastic expression of clustered

- Protocadherin genes and dendritic self-avoidance in single neurons. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto)
4. Mori T, Yoshimura Y. (2013.11.11) Glycoprotein from an attenuated rabies strain increases an affinity toward non-neuronal cells and long-range projection neurons. Neuroscience2013 (San Diego, USA)
5. Ishikawa A, Komatsu Y, Yoshimura Y. (2013.11.12) Experience-dependent emergence of fine-scale networks in visual cortex. Neuroscience2013 (San Diego, USA)

《心循環シグナル研究部門》

1. Nishida M. (2013.9.12-15) Invited symposium: Role of TRPC channels in mechano-chemo transduction in the heart. 6th International Workshop on Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias (MEC2013), Oxford, UK.
2. Kitajima N, Tomita-Numaga T, Nishida M. (2013.9.12-15) poster presentation: Role of TRPC3 channels in mechanical stress-induced cardiac fibrosis. 6th International Workshop on Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias (MEC2013), Oxford, UK.
3. 西田基宏 (2013.8.31) 創薬研究から見てきた TRPC チャネルの新たな生理機能 アカデミア創薬シンポジウム「創薬から学問へ」 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム (熊本市)
4. 西田基宏, 北島直幸, 外山喬士, 富田拓郎 (2013.10.25-26) TRPC3/6 チャネルによる心臓リモデリング制御 第60回中部日本生理学会 (岐阜)
5. 外山喬士, 西田基宏 (2013.12.6) 含硫機能性食品を用いた心不全治療 シンポジウム「次世代心不全治療の新機軸」 第23回日本循環薬理学会 (福岡)
6. 西田基宏 (2014.3.17) Role of TRPC3 channels in mechano-chemo transduction in hearts. 第91回日本生理学会大会 (鹿児島)
7. 西田基宏 (2014.3.19) Regulation of cardiovascular remodeling by oxidative modification of G proteins. 第87回日本薬理学会年会 (仙台)
8. 富田拓郎, 角田将明, 島内司, 喜多紗斗美, 岩本隆宏, 西田基宏 (2014.3.20) Regulation of peripheral circulation by TRPC channels and its therapeutic application. 第87回日本薬理学会年会 (仙台)
9. 西田基宏, 外山喬士, 熊谷嘉人, 富田拓郎 (2014.3.29) 活性硫黄種によるレドックス恒常性維持機構に基づいた新規心不全治療戦略の構築 日本薬学会第134年会 (熊本)
10. 西田基宏, 島内司, 松金良祐, 武吉恭子, 富田拓郎 (2014.3.30) TRPC チャネルを標的とした新規末梢循環改善薬の探索 日本薬学会第134年会 (熊本)

《感覚運動調節研究部門》

1. Kakigi R (2013.8.30) Face perception, 5th Asian and Oceanian Congress of Clinical Neurophysiology (Bali, Indonesia)
2. Kakigi R (2013.8.30) Evoked potentials and fields, 5th Asian and Oceanian Congress of Clinical Neurophysiology (Bali, Indonesia)
3. Okamoto H, Keceli S, Teismann H, Lagemann L, Pantev C, Kakigi R (2013.8.29) Population-level frequency tuning of portable player users: a magnetoencephalographic study. 5th Asian and Oceanian Congress of Clinical Neurophysiology (Bali, Indonesia)
4. Tsuruhara A, Inui K, Kakigi R (2013.8.29) Geometrical aspects in the face inversion effect: a magnetoencephalographic study. 5th Asian and Oceanian Congress of Clinical Neurophysiology (Bali, Indonesia)
5. Okamoto H (2013.10.11) Auditory evoked magnetic fields. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium (Okazaki, Japan)
6. Kakigi R (2013.10.11) Face perception and recognition. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium (Okazaki, Japan)

7. Kakigi R (2013.10.21) Painful and itchy brain. 1st Joint CU-NIPS Symposium Frontier in Physiological Sciences Research : From Basic Research to Diseases and Treatments. 1st Joint CU-NIPS Symposium (Bangkok, Thailand)
8. Proietti V, Kobayashi M, Quadrelli E, Bulf H, Kanazawa S, Yamaguchi MK, Macchi Cassia V (2013.9.4) Cross-cultural evidence of perceptual narrowing toward adult faces in 3- and 9-month-old infants. Joint Cognitive Psychology Section & Developmental Psychology Section Annual Conference 2013 (Reading, UK)
9. Kakigi R (2013.12.19) Pain and itch perception in humans. 5th Asian Pain Symposium (Okazaki, Japan)
10. 鶴原亜紀, 乾幸二, 柿木隆介 (2013.1.23) 顔の倒立効果における図の上下非対称性の影響: 脳磁図計 (MEG) による計測 日本視覚学会 2013 年冬季大会 (東京)
11. 岡本秀彦 (2013.2.18) Effects of temporal regularity on auditory evoked fields in noise. 第2回脳研生理研合同シンポジウム (新潟市)
12. 和坂俊昭 (2013.2.18) The unpredicted visual feedback modulates activation in somatosensory areas during movement execution. 第2回脳研生理研合同シンポジウム (新潟市)
13. 鶴原亜紀, 乾幸二, 柿木隆介 (2013.6.7) 正立顔および倒立顔に対する定常的視覚誘発脳磁場 第28回日本生体磁気学会 (新潟市)
14. 岡本秀彦, Teismann H, Pantev C, 柿木隆介 (2013.6.7) 音の継時的変化と周波数変化に対する聴覚誘発脳磁場反応 第28回日本生体磁気学会 (新潟市)
15. 望月秀紀, 柿木隆介 (2013.6.8) 掻破欲求に関連した磁場変化の計測 第28回日本生体磁気学会 (新潟市)
16. 岡本秀彦, Keceli S, 柿木隆介 (2013.6.20) 時間規則性が聴覚誘発脳磁場に与える影響-脳磁図を用いて 第36回日本神経科学大会 (京都市)
17. 柿木隆介 (2013.6.21) 脳内研究の最前線~痛みとかゆみの脳内認知機能はどこまで解明されたか~ 第58回日本透析医学会学術集会 (福岡市)
18. 小林恵 (2013.6.25) 乳児期における顔処理能力の発達-NIRS 順応法による検討 日本赤ちゃん学会第13回学術集会 ラウンドテーブル企画 (福岡市)
19. 望月秀紀 (2013.7.5) 脳磁図による痒みの脳内認知機構の解明 第15回日本ヒト脳機能マッピング学会 (東京)
20. 岡本秀彦 (2013.7.5) 聴覚誘発脳磁場の最前線 第15回日本ヒト脳機能マッピング学会 (東京)
21. 坂本貴和子, 柿木隆介 (2013.7.13) 舌刺激時の fMRI 第35回日本疼痛学会 第18回日本口腔顔面痛学会学術大会合同シンポジウム (さいたま市)
22. 望月秀紀 (2013.7.13) かゆみ刺激時の fMRI 第35回日本疼痛学会 第18回日本口腔顔面痛学会学術大会合同シンポジウム (さいたま市)
23. 小林恵 (2013.9.20) NIRS を用いた神経順応パラダイムによる発達障害児の顔処理特性の検討 日本心理学会第77回大会 (札幌市)
24. 岡本秀彦 (2013.10.25) 音の周波数変化と時間的变化により惹起された聴覚誘発脳磁場反応 第58回日本聴覚医学会総会・学術講演会 (松本市)
25. 中川慧 (2013.11.8) 聴覚変化関連脳磁場活動における早期成分の検討: P50 の動態に関して 第43回日本臨床神経学会学術大会 (高知市)
26. 乾幸二 (2013.11.7) 【シンポジウム 2 難治性疼痛の診断と治療】侵害刺激誘発脳電位 第43回日本臨床神経学会学術大会 (高知市)
27. 柿木隆介 (2013.11.9) 【教育講演 18 疼痛の神経生理】疼痛関連脳電位の現況 第43回日本臨床神経学会学術大会 (高知市)
28. 岡本秀彦 (2013.11.9) 音の周波数変化と経時変化により惹起される聴覚誘発脳磁場反応 第43回日本臨床神経学会学術大会 (高知市)
29. 小平農 (2013.11.8) 表皮内電気刺激法による皮膚 A-delta, C 線維機能障害評価の有用性 第43回日本臨床神経学会学術大会 (高知市)
30. 柿木隆介 (2013.11.22) 視覚誘発脳波・脳磁図の新展開 第51回日本神経眼科学会総会 (秋田市)
31. 小林恵, Macchi Cassia V, 金沢創, 山口真美, 柿木隆介 (2013.12.7) 乳児の顔認知に対する自己の年齢の効果 - 顔処理バイアスの形成過程の検討 日本基礎心理学会第32回大会 (金沢市)

《生体システム研究部門》

1. 額田大輔, 畑中伸彦, 南部篤 (2013.2.27) 覚醒下マーモセットの運動一性感覚関連領野の体部位再現マップ, 第2回日本マーモセット研究会大会 (東京)
2. Nambu A, Tachibana Y (2013.3.6) Mechanism of Parkinsonian Neuronal Oscillations in the Primate Basal Ganglia. 11th Triennial meeting of International Basal Ganglia Society (Eilat, Israel)
3. Nambu A, Chiken S. (2013.3.4,6) High-frequency pallidal stimulation disrupts information flow through the pallidum by GABAergic inhibition. 11th Triennial meeting of International Basal Ganglia Society (Eilat, Israel)
4. Chiken S, Ohta C, Sato A, Sasaoka T, Kurokawa M, Nambu A (2013.3.4,6) Functional role of dopamine D1 and D2 receptors in information processing through the basal ganglia. 11th Triennial meeting of International Basal Ganglia Society (Eilat, Israel)
5. 橋吉寿, 岩室宏一, 喜多均, 高田昌彦, 南部篤 (2013.3.29) パーキンソン病モデルサルの大脳基底核における異常リズム生成機構. 第90回日本生理学会大会 (東京)
6. 竹林浩秀, ペパリアシム, 佐野裕美, 玉巻伸章, 南部篤, 田中謙二 (2013.3.30) Npas4 mRNA expression can trace photoactivation of striatal medium spiny neurons at the cellular level. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 (高松) Nambu A (2013.5.27)
7. Microelectrode recording: some tips from basic neurophysiology. Satellite Symposium of the 16th Quadrennial Meeting of the World Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery (Tokyo)
8. Nambu A (2013.5.29) Hyperdirect pathway and motor control. The 16th Quadrennial Meeting of the World Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery (WSSFN) (Tokyo)
9. Chiken S (2013.6.17) Functional role of dopamine D1 and D2 receptors in information processing through the basal ganglia. NIPS Mini-International Symposium (Okazaki)
10. 金子将也, 畑中伸彦, 南部篤 (2013.6.20) サル赤核の運動課題遂行中の神経活動. Neuro2013 (京都)
11. 陳超, 辛徳, 中西康彦, 神原裕行, 吉村奈津江, 渡辺秀典, 南部篤, 伊佐正, 西村幸男, 小池康晴 (2013.6.20) 一次運動野の皮質脳波を用いた腕軌道のデコーディング. Neuro2013 (京都)
12. 渡辺秀典, 佐藤雅昭, 南部篤, 西村幸男, 川人光男, 伊佐正 (2013.6.20) サル到達把持運動における皮質表面電位と皮質内局所電位の上肢運動・筋電位の推定精度の比較. Neuro2013 (京都)
13. 滝上紘之, 除明, 佐野裕美, 内ヶ島基政, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 三村将, 田中謙二 (2013. 6. 20) 腹側線条体間接路神経の選択的除去. Neuro2013 (京都)
14. 辛徳, 中西康彦, 陳超, 神原裕行, 吉村奈津江, 渡辺秀典, 南部篤, 伊佐正, 西村幸男, 小池康晴 (2013.6.21) サルの皮質脳波から推定した筋電信号を用いた腕の角度の推定. Neuro2013 (京都)
15. 深堀良二, 加藤成樹, 小林憲太, 佐野裕美, 南部篤, 八尾寛, 磯村宜和, 小林和人 (2013. 6. 22) HiRet ベクターを応用した二重遺伝子導入法による特定神経路におけるチャンネルロドプシン遺伝子の高レベルな発現誘導. Neuro2013 (京都)
16. 佐野裕美, 知見聡美, 小林和人, 田中謙二, 南部篤 (2013. 6. 22) 運動制御における線条体投射ニューロンの生理学的役割. Neuro2013 (京都)
17. 深堀良二, 加藤成樹, 小林憲太, 佐野裕美, 南部篤, 八尾寛, 磯村宜和, 小林和人 (2013.6.22) HiRet ベクターを応用した二重遺伝子導入法による特定神経路におけるチャンネルロドプシン遺伝子の高レベルな発現誘導. Neuro2013 (京都)
18. 木下正治, 笠原洋紀, 畑中伸彦, 松井亮介, 知見聡美, 伊佐かおる, 水上浩明, 小澤敬也, 南部篤, 渡辺大, 伊佐正 (2013.6.22) 一次運動野に導入した光感受性膜タンパク質による, 行動中のマカクザル前肢筋活動の光遺伝学的抑制. Neuro2013 (京都)
19. 知見聡美, 川口泰雄, 木村實, 南部篤 (2013. 7. 13) Differential information processing through the basal ganglia-thalamo-cortical and cerebello-thalamo-cortical pathways. 日本比較生理生化学第35回大会 (葉山)
20. 南部篤 (2013.7.18) ABCs of the basal ganglia. Neural Oscillation Conference (岡崎)
21. 知見聡美, 南部篤 (2013. 7. 18) High-frequency

- pallidal stimulation blocks local neuronal activity and information flow through the basal ganglia. 神経オシレーション：共振とディスリズミア (岡崎)
22. 佐野裕美, 田中謙二, 南部篤 (2013. 7. 18) Concurrent activation of striatal direct and indirect projection neurons by using optogenetics. Neural Oscillation Conference (岡崎)
23. 知見聡美, 川口泰雄, 木村實, 南部篤 (2013. 7. 21) 小脳入力と大脳基底核入力の視床－大脳皮質投射への作用. 第28回日本大脳基底核研究会 (修善寺)
24. 佐野裕美, 田中謙二, 南部篤 (2013. 8. 22) 線条体投射ニューロンの運動制御における役割. 包括脳夏のワークショップ (名古屋)
25. Nambu A (2013.8.29) Cortico-basal ganglia loop and pathophysiology of movement disorders. International Society for the Advancement of Clinical Magnetoencephalography (ISACM meeting 2013) (札幌)
26. 佐野裕美 (2013.9.27) Physiological roles of cortico-striatal and striatal projections in voluntary movements. Optogenetics2013 (東京)
27. Chiken S, Ohta C, Sato A, Sasaoka T, Kurokawa M, Nambu A (2013. 10. 10) Dopamine D1 and D2 receptors differently modulate information processing through the basal ganglia. The 3rd NIPS-CIN Joint Neuroscience Symposium (Okazaki)
28. 佐野裕美, 田中謙二, 南部篤 (2013. 10. 10) Concurrent activation of striatal direct and indirect projection neurons by using optogenetics. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium (岡崎)
29. Koketsu D, Inoue K, Kato S, Kobayashi K, Nambu A, Takada M (2013.10.10) Immunotoxin-Mediated Tract Targeting in the Primate Brain : Selective Elimination of the Cortico-Subthalamic “Hyperdirect” Pathway, The 3rd NIPS-CIN Joint Neuroscience Symposium (Okazaki)
30. 南部篤 (2013.10.12) 大脳基底核23の問題. 日本神経回路学会 オータムスクール ASCONE2013「運動～身体を動かす脳の謎」(上諏訪)
31. Nambu A (2013.10.21) Pathophysiology of movement disorders: lessons from electrophysiology. 1st Joint Chulalongkorn-NIPS Symposium (Bangkok, Thai)
32. Chiken S (2013. 10. 21) What is dopamine telling striatal neurons through D1 and D2 receptors? 1st Joint Chulalongkorn-NIPS Symposium (Bangkok, Thai)
33. Tachibana Y (2013. 11.10) The primate ventral pallidum encodes expected reward value and regulates motor action. Neuroscience 2013 (San Diego, USA)
34. Koketsu D, Hatanaka N, Isa T, Nambu A (2013. 11. 12) Neurophysiological and Anatomical Study of Area 3a using Marmoset, Neuroscience 2013 (San Diego, USA)
35. Hatanaka N, Miyachi S, Nambu A, Takada M (2013. 11. 12) Neuronal networks innervating the jaw-opening and jaw-closing muscles: A retrograde transneuronal tracing study with rabies virus in the rat. Neuroscience 2013 (San Diego, USA)
36. 南部篤 (2013.11.16) 基礎医学からみたパーキンソン病. 第28回せいらけん市民講座 (岡崎)
37. 南部篤 (2013.11.22) パーキンソン病に対する脳深部刺激療法の作用メカニズム. ナショナルバイオリソースプロジェクト「ニホンザル」第10回公開シンポジウム (東京)

《脳形態解析研究部門》

1. 重本隆一 (2013.06.21) Large-scale 3D reconstruction of serial images by scanning electron microscopy 第36回日本神経科学大会 (京都)
2. 重本隆一 (2013.06.22) Freeze-fracture replica labeling reveals ion channel clustering on neuronal membranes 第36回日本神経科学大会 (京都)
3. 松井広 (2013.06.21) Optogenetic manipulation of brain and behavior 第36回日本神経科学大会 (京都)
4. Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka Y, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K, (2013.11.12) Optogenetic glial alkalization relieves ischemic brain damage. Society for Neuroscience (New Orleans, USA)

《大脳神経回路論研究部門》

1. Ueta Y, Otsuka T, Morishima M, Ushimaru M, Kawaguchi Y (2013.2.1) Multiple layer 5 pyramidal cell subtypes relay feedback projections from secondary to primary motor cortex. 第5回 NAGOYA グローバルリトリート (愛知県知多郡東浦町)
2. Otsuka T (2013.2.19) Excitatory synaptic inputs to cortical Fast-spiking cell subnetworks. 第2回脳研生理研合同シンポジウム (新潟)
3. 窪田芳之 (2013.3.9) 神経の形, 神経どうしのつながりを見る. 第10回脳をみるシンポジウム in 三原 (広島県三原市)
4. Kubota Y, Hatada S, Kawaguchi Y (2013.3.29) An excitatory and inhibitory synapse density on various GABAergic nonpyramidal cells in the rat cerebral cortex. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 (高松)
5. 窪田芳之 (2013.6.1) 電子顕微鏡連続切片の再構成による大脳皮質抑制性神経細胞の特徴抽出. 第9回IIRSセミナー (東京)
6. Kubota Y (2013.6.20) Locally limited conductance of IPSCs elicited by cortical fast spiking basket cell. Neuro2013 (京都)
7. Kawaguchi Y (2013.6.21) Cortical pyramidal cell subtypes and connection specificity. Neuro2013 (京都)
8. Morita K, Morishima M, Sakai K, Kawaguchi Y (2013.6.21) Neural circuit mechanism of reinforcement learning: new hypothesis on the mechanism of dopaminergic representation of reward prediction error. Neuro2013 (京都)
9. Kubota Y (2013.6.25) Locally limited conductance of IPSCs elicited by cortical fast spiking basket cell. NIPS International Workshop The sixth international Neural Microcircuit Conference "Functional Mechanism of Cortical Microcircuit" (岡崎)
10. Ueta Y, Otsuka T, Kawaguchi Y (2013.6.25) Multiple layer 5 corticopontine and commissural neurons relay cortical feedback from secondary to primary motor cortex. NIPS International Workshop The sixth international Neural Microcircuit Conference "Functional Mechanism of Cortical Microcircuit" (岡崎)
11. Hatanaka Y, Yamauchi K, Namikawa T, Kawaguchi Y (2013.6.25) Classification of excitatory cortical neurons by their initial axonal outgrowth. NIPS International Workshop The sixth international Neural Microcircuit Conference "Functional Mechanism of Cortical Microcircuit" (岡崎)
12. Ushimaru M, Kawaguchi Y (2013.6.25) Frontal cortical neuron activity during slow oscillation. NIPS International Workshop The sixth international Neural Microcircuit Conference "Functional Mechanism of Cortical Microcircuit" (岡崎)
13. Karube F, Fujiyama F, Kawaguchi Y (2013.6.25) Local circuitry of layer 6 spiny neurons in rat frontal cortex. NIPS International Workshop The sixth international Neural Microcircuit Conference "Functional Mechanism of Cortical Microcircuit" (岡崎)
14. 牛丸弥香, 植田禎史, 川口泰雄 (2013.6.27) 脳波リズムと視床-皮質サブネットワーク活動の解析. 日本睡眠学会第38回定期学術集会 (秋田)
15. 窪田芳之 (2013.9.27) 大脳皮質非錐体細胞の樹状突起の形態解析. 第54回日本組織細胞化学学会 (東京)
16. Morita K, Kawaguchi Y (2013.9.27) Involvements of Basal Ganglia Pathways in Reversal Learning and Time Preference: Predictions of the Corticostriatal Temporal Difference (TD) Hypothesis. 2013 Annual Conference of the Society for Neuroeconomics (EPFL, Lausanne, Switzerland)
17. 窪田芳之 (2013.10.20) 樹状突起分岐部の微小管のFIB/SEMによる観察. SEM連続断面観察による生物組織三次元再構築法 研究部会 第一回研究会 (久留米)
18. Ueta Y, Hirai Y, Otsuka T, Kawaguchi Y (2013.10.10) Direction- and distance-dependent interareal connectivity of pyramidal cell subpopulations. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium (岡崎)
19. Hatanaka Y, Yamauchi K, Namikawa T, Kawaguchi Y (2013.10.10) Classification of excitatory cortical neurons by their initial axonal outgrowth. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium (岡崎)
20. Kawaguchi Y (2013.10.11) Twenty cortical neuron types over 20 years. The 3rd NIPS-CIN Joint Neuroscience

Symposium (岡崎)

21. Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Kawaguchi Y (2013.11.7) Locally limited conductance of IPSCs elicited by cortical fast spiking basket cell. Cell Symposia "The Networked Brain" (San Diego, USA)
22. Morita K, Kawaguchi Y (2013.11.11) Effects of manipulations of the basal ganglia pathways on reversal learning and time preference: predictions of the corticostriatal temporal difference (TD) hypothesis with implications for addiction. 2013 annual meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA)
23. Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Karube F, Lübke J, Kawaguchi Y (2013.11.9) Differences in size of cortical synapses underly distinct modes of inhibitory control. 2013 annual meeting of the Society for Neuroscience

(San Diego, USA)

24. Hatanaka Y, Yamauchi K, Namikawa T, Kawaguchi Y (2013.11.12) Excitatory neurons are classified into two distinct groups according to their initial axonal direction. 2013 annual meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA)
25. Ueta Y, Kawaguchi Y (2013.11.13) Selective participation of corticopontine and commissural neurons in ipsilateral corticocortical projections from the rat frontal cortex. 2013 annual meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA)
26. Kawaguchi Y (2013.11.22) Pyramidal and GABAergic cell subnetworks in the cortex. NEOCORTICAL ORGANIZATION 2 (岡崎)

《心理生理学研究部門》

1. 川道拓東(2013.1.12) 社会学習を支える社会能力の神経基盤。ネアンデルタールとサピエンス交替劇の真相：学習能力の進化に基づく実証的研究。第6回研究大会（東京）。
2. 北田 亮（2013.1.13）触覚による表情模倣の神経基盤—晴眼者と視覚障害者の比較（新学術領域研究「学際的研究による顔認知メカニズムの解明」冬の班会議，沖縄）
3. 川道拓東，田邊宏樹，高橋陽香，吉原一文，松永昌宏，菅原翔，牧田快，定藤規弘（2013.1.31）援助行動時の報酬系の賦活と共感特性の影響。第2回社会神経科学研究会（岡崎，愛知）。
4. 北田亮，定藤規弘（2013.1.31）顔による表情と個人の識別に関わる神経基盤。第2回社会神経科学研究会（岡崎，愛知）。
5. 小池耕彦，田邊宏樹，岡崎俊太郎，佐々木章宏，菅原翔，島田浩二，高橋陽香，中川恵理，吉原一文，Bosch-Bayard J, 定藤規弘（2013.1.31）dual fMRIを用いた，みつめあい状態の神経基盤の解明。第2回社会神経科学研究会（岡崎，愛知）。
6. 佐々木章宏，北田亮，岡本悠子，定藤規弘（2013.1.31）社会的随伴性認知に関わる神経基盤の解明。第2回社会神経科学研究会（岡崎，愛知）。
7. 原田宗子，Bridge DJ, Chiao JY（2013.1.31）自己の社会的立場の認識が計算能力に与える影響とその神経活動。第2回社会神経科学研究会（岡崎，愛知）。
8. 松永昌宏，川道拓東，小池耕彦，吉原一文，吉田優美子，高橋陽香，中川恵理，定藤規弘（2013.1.31）社会脳システムが幸福感を決定する。第2回社会神経科学研究会（岡崎，愛知）。
9. 吉原一文，田邊宏樹，川道拓東，小池耕彦，山崎未花，定藤規弘（2013.1.31）恐怖刺激による交感神経活動の変化に関連する神経基盤。第2回社会神経科学研究会（岡崎，愛知）。
10. Matsunaga M, Isowa T, Yamakawa K, Ohira H, Sadato N（2013.2.1）Association between positive emotions and immune functions. 第5回 NAGOYA グローバルリトリート（大府，愛知）。
11. Harada T, Bridge D, Chiao JY. (2013.2.18) Dynamic social power modulates neural basis of math calculation (poster No.15), 第2回新潟脳研・生理研合同シンポジウム（新潟）。
12. 北田 亮（2013.2.27）触覚と脳が作る素材感。応用脳科学アカデミー（東京）。
13. 北田 亮（2013.3.2）早期失明が顔情報の脳内処理に与える影響。新学術領域研究「学際的研究による顔

- 認知メカニズムの解明」fMRI・NIRS 班 研究会（京都）。
14. 松永昌宏（2013.3.2）私達は脳のどこで幸せを感じているのだろうか？—社会神経科学的観点から幸せを検証する—。精神神経内分泌免疫学研究会第 17 回研究集会（大津，滋賀）。
 15. 北田 亮・河内山隆紀（2013.3.13）MRI 画像解析入門（多次元脳トレーニング&レクチャー「ヒト，サル，ラットの脳解剖学から情動・判断の理解へ」（岡崎，愛知）。
 16. Nakagawa E, Morishita M, Yokokawa H（2013.3.16）The effects of lexical processing on oral sentence production by L2 learners: Syntactic priming experiment using a picture description task. American Association for Applied Linguistics (Dallas, Texas).
 17. 北田 亮(2013.3.19) 触覚コミュニケーションの認知脳科学的メカニズム. 名工大・生理研連携シンポジウム&ワークショップ「触感の解析と理解」(愛知)。
 18. 定藤規弘（2013.5.11）機能的 MRI による社会能力発達における神経基盤の解明. 第 33 回日本脳神経外科コンgres 総会（大阪）。
 19. 北田 亮(2013.6.4) スキンシップが惹起する情動の脳認知科学的メカニズム. 新学術領域「質感脳情報学」班会議（金沢，石川）。
 20. Fujimoto S, Yamaguchi T, Otaka Y, Sadato N, Osu R, Kondo K, Tanaka S（2013.6.21）Facilitative effect of dual-hemispheric transcranial direct current stimulation (tDCS) on performance in tactile discrimination task. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto, Japan).
 21. Kawamichi H, Sasaki AT, Matsunaga M, Yoshihara K, Takahashi HK, Tanabe HC, Sadato N（2013.6.21）Reputation representation in medial prefrontal cortex is modulated by familiarity. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto, Japan).
 22. Takahashi HK, Kitada R, Sasaki AT, Kawamichi H, Sadato N（2013.6.21）Tears modulate recognition of sadness: an fMRI study. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto, Japan).
 23. Matsunaga M, Kawamichi H, Koike T, Yoshihara K, Yoshida Y, Takahashi HK, Nakagawa E, Sadato N（2013.6.22）Neural substrates associated with happiness. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto, Japan).
 24. Sadato N（2013.6.22）"We-mode" neuroscience using dual fMRI. 5th Japan-Canada Symposium on Innovations in Neuroscience (Kyoto, Japan).
 25. Sasaki AT, Kitada R, Okamoto Y, Sadato N（2013.6.22）Neural substrates of social contingency. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto, Japan).
 26. 菅原翔, 小池耕彦, 濱野友希, 瀧澤修, 定藤規弘（2013.7.5）Multiband GE-EPI を用いた脳機能イメージングの高解像度化および静音化：実用化を目指した検討. 第 15 回ヒト脳機能マッピング学会（東京）。
 27. 定藤規弘（2013.7.6）超高磁場 MRI への期待 social neuroscience perspective. 第 15 回日本ヒト脳機能マッピング学会（東京）。
 28. Koike T, Sugawara SK, Hamano YH, Sadato N（2013.7.20）The usage of multiband GE-EPI sequence: social neuroscience perspective. マルチバンド撮像法講演会（東京）。
 29. Sugawara SK.（2013.8.2）Praise facilitates the human skill formation. The 8th Course of the International School on Mind, Brain and Education (Erice, Italy).
 30. 島田浩二（2013.8.10）外国語音声処理の自動化に関わる脳内メカニズム：機能的 MRI による検討. 第 39 回全国英語教育学会北海道研究大会（札幌）。
 31. Sumiya M, Arimitsu K & Igarashi K（2013.8.23）Friendship on adolescents with autism spectrum disorders in respect to loneliness, sex difference, and autism spectrum traits. The 4th Asian Cognitive Behavior Therapy (CBT) Conference (Tokyo, Japan).
 32. 宍戸恵美子, 大河内真須美, 磯谷真理, 杉尾政彦, 山本美咲, 定藤規弘, 井本敬二（2013.8.25）自閉症スペクトラムの幼児の言語発達と姿勢制御についてのケースレポート. 日本行動療法学会第 39 回大会（東京）。
 33. 定藤規弘（2013.8.27）褒めを科学する. 第 18 回まなび講座（泉佐野市）。
 34. Sadato N（2013.9.17）Communication and brain. Osaka 20 years from now - Re-inventing the City (Osaka, Japan).
 35. 定藤規弘（2013.9.20）「私たち」の脳科学に向けて：

- 2 個人同時計測 MRI 研究. 日本心理学会第 77 回大会 (札幌).
36. 小池耕彦 (2013.9.20) 共同作業の記憶～二者間での同期的な神経活動として. 日本心理学会公募シンポジウム S-045 社会脳研究の最前線—ハイパースキャニングによる共感/協調的コミュニケーション— (北海道).
37. 田邊宏樹 (2013.9.20) 二台の MRI を繋げて共同注意の神経メカニズムを探る: We-mode neuroscience の第一歩. 日本心理学会第 77 回大会 9.20 札幌コンベンションセンター (札幌, 北海道).
38. Kitada R (2013.10.17) Neural representation underlying the recognition of facial and bodily expressions in the early blind. Blind Brain Workshop (Pisa, Italy).
39. 定藤規弘 (2013.11.2) 発達から見た認知機能—脳機能画像法による社会能力発達過程へのアプローチ. 第 13 回精神疾患と認知機能研究会 (東京).
40. Makita K, Oishi H, Kinoshita T, Shimada K, Tanabe HC, & Sadato N (2013.11.10) The impact of second language proficiency on an automatic process of written words: an fMRI study. The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
41. Sasaki AT, Kitada R, Okamoto Y, Sadato N (2013.11.10) Neural substrates of contingency detection for self and others - an fMRI study. The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
42. Koike T, Tanabe HC, Okazaki S, Sadato N (2013.11.12) Cerebral and cerebellar involvement in joint attention. The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
43. Nakagawa E, Yokokawa H, Koike T, Makita K, Shimada K, & Sadato N (2013.11.13) Syntactic priming effect during second language sentence production by Japanese learners of English: An fMRI study. The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, USA).
44. 北田亮 (2013.11.20) 触覚のテクスチャ知覚に関わる神経基盤. 実物質感研究集会, (名古屋).
45. 堺浩之, 内山祐司, 定藤規弘 (2013/11/20) 高速な移動を欲する神経基盤: fMRI 研究. 計測自動制御学会システム・情報部門学術講演会 (大津, 滋賀).
46. 内山祐司, 堺浩之, 橘篤導, 定藤規弘 (2013.11.20) 有効視野課題成績低下の神経基盤. 計測自動制御学会システム・情報部門学術講演会 (大津, 滋賀).
47. 北田亮 (2013.11.22) ヒトの触覚に関する脳の解剖的・機能的構造. 触覚講習会, 東京大学, (東京).
48. Kitada R, Yoshihara K, Sasaki AT, Hashiguchi M, Kochiyama T, Sadato N (2013.11.28) Hand preference in the superior part of the extrastriate body area develops supramodally. 第 3 回社会神経科学研究会 (岡崎, 愛知).
49. Nakagawa E, Yokokawa H, Koike T, Makita K, Shimada K, & Sadato N (2013.11.28) Syntactic priming effect during second language sentence production by Japanese learners of English: An fMRI study. 第 3 回社会神経科学研究会 (岡崎, 愛知).
50. 小池耕彦, 田邊宏樹, 岡崎俊太郎, 定藤規弘 (2013.11.28) 共同注意に関与する大脳・小脳ネットワークの解明. 第 3 回社会神経科学研究会 (岡崎, 愛知).
51. 角谷基文, 五十嵐一枝, 有光興記 (2013.11.28) 思春期の自閉症スペクトラム児の友人関係と孤独感—性差と自閉の特性の観点から—. 第 3 回社会神経科学研究会 (岡崎, 愛知).
52. 小山総市朗, 田中悟志, 田辺茂雄, 定藤規弘 (2013.11.28) 経頭蓋直流電気刺激は運動記憶の固定化を促通する. 第 3 回社会神経科学研究会 (岡崎, 愛知).
53. 穴戸恵美子, 定藤規弘, 井本敬二 (2013.11.28) 発達障害児における発語と身体運動について 2 つのケースレポート. 第 3 回社会神経科学研究会 (岡崎, 愛知).
54. 島田浩二, 廣谷昌子, 岡崎俊太郎, 田邊宏樹, 定藤規弘 (2013.11.28) 共同注意は大人の単語学習を促進するのか? 第 3 回社会神経科学研究会 (岡崎, 愛知).
55. 濱野友希, 菅原翔, 伊藤嘉邦, 小池耕彦, 定藤規弘 (2013.11.28) 自然な会話実験を可能とする新しい fMRI 計測環境の提案—マルチバンド撮像法と光マイクを用いて—. 第 3 回社会神経科学研究会 (岡崎, 愛知).
56. 牧田快, 大石晴美, 木下徹, 島田浩二, 中川恵理, 廣谷昌子, 田邊宏樹, 定藤規弘 (2013.11.28) 第二言語の習熟度が第二言語の書字の自動的な処理に及ぼ

す影響：fMRI を用いた脳機能計測による研究. 第3

回社会神経科学研究会（岡崎，愛知）.

《認知行動発達機構研究部門》

1. 吉田正俊（2013 年 1 月 25 日）意識の比較-認知-神経-心理-学を目指して. 平成 24 年度 生理学研究所研究会 グローバルネットワークによる脳情報処理(岡崎)
2. 渡辺秀典, 佐藤雅昭, 南部篤, 西村幸男, 川人光男, 伊佐正（2013 年 1 月 25 日）皮質表面電位 (ECoG) と皮質内局所電位 (LFP) によるサル上腕運動の推定精度の比較. 第 25 回自律分散システム・シンポジウム(仙台)
3. 西村幸男（2013 年 1 月 25 日）Restoring Lost Function Via An Artificial Neural Connection. 第 7 回日仏先端科学シンポジウム（滋賀）
4. Masaharu Kinoshita（2013 年 2 月 1 日）Genetic dissection of the neural circuit for hand dexterity in macaque monkeys. 第 5 回 NAGOYA グローバルリトリート（愛知）
5. Masatoshi Yoshida（2013 年 2 月 1 日）A Saliency Computational Model Reveals Blindsight in Monkey. Tuebingen University セミナー（Tuebingen, Germany）
6. 伊佐正（2013 年 2 月 2 日）ウイルスベクターを用いた霊長類の神経回路機能解析. 第 5 回脳プロ公開シンポジウム（東京）
7. 梅田達也（2013 年 2 月 18 日）上肢運動遂行中の末梢感覚神経集団による運動キネマティクス情報の表現. 第 2 回新潟脳研生理研合同シンポジウム（新潟）
8. 伊佐正（2013 年 3 月 8 日）ウイルスベクター 2 重感染法による経路選択的・可塑的神経伝達遮断法. 大阪大学蛋白質研究所セミナー（大阪）
9. 笹田周作, 加藤健治, 門脇傑, 宇川義一, 小宮山伴与志, 西村幸男（2013 年 3 月 29 日）ヒト腰髄に存在する歩行に関わる Motor Primitive. 第 90 回日本生理学会大会（東京）
10. 伊佐正（2013 年 4 月 6 日）傷害を受けた脳が示す驚くべき能力について. 第 67 回近畿脊髄外科研究会イブニングセミナー（大阪）
11. 伊佐正（2013 年 5 月 16 日）霊長類の神経回路機能を自在に操作する. 第 60 回日本実験動物学会総会シンポジウム（つくば）
12. 伊佐正（2013 年 5 月 30 日）サッケードを指標とする盲視の脳内メカニズム. 大阪大学精神神経科セミナー（大阪）
13. 伊佐正（2013 年 6 月 4 日）Manipulation of neural circuits by genetic tools. Toronto University セミナー（Toronto, Canada）
14. 伊佐正（2013 年 6 月 5 日）Key elements for functional recovery from the partial spinal cord injury; spinal cord, cortex and beyond. The Winifred Masterson Burke Medical Research Institute Weekly Colloquium (NY, USA)
15. 西村幸男（2013 年 6 月 13 日）1. Restoring volitional control via artificial neural connection 2. Motivational regulation of functional recovery after spinal cord injury. Tuebingen University セミナー（Tuebingen, Germany）
16. 渡辺秀典（2013 年 6 月 14 日）硬膜下皮質電位から算出された仮想的皮質内局所電位によるサル筋電位の推定. 自律分散システム研究会～生体-機械協調システム研究の進展～（岡崎）
17. 笹田周作（2013 年 6 月 14 日）上肢筋-腰髄間の人工神経接続を利用した下肢歩行運動の随意制御. 自律分散システム研究会～生体-機械協調システム研究の進展～（岡崎）
18. Masaaki Ogawa（2013 年 6 月 17 日）Risk-responsive orbitofrontal neurons track salience acquired through associative learning. Mini-International Symposium（岡崎）
19. Masahiro Sawada, Kenji Kato, Hirotaka Onoe, Tadashi Isa, Yukio Nishimura（2013 年 6 月 17 日）Ventral striatum regulates activity of motor related areas during the recovery after spinal cord injury. Mini-International Symposium（岡崎）
20. 陳 超, 辛 徳, 中西 康彦, 神原 裕行, 吉村 奈津江,

- 渡辺 秀典, 南部 篤, 伊佐 正, 西村 幸男, 小池 康晴 (2013 年 6 月 20 日) 一次運動野の皮質脳波を用いた腕軌道のデコーディング. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
21. 渡辺 秀典, 佐藤 雅昭, 南部 篤, 西村 幸男, 川人 光男, 伊佐 正 (2013 年 6 月 20 日) サル到達把持運動における皮質表面電位と皮質内局所電位の上肢運動・筋電位の推定精度の比較. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
22. 伊佐かおる, 松井亮介, 加藤茂樹, 木下正治, 小林憲太, 渡辺大, 小林和人, 伊佐正 (2013 年 6 月 20 日) ウィルスベクター2 重感染法を用いた経路選択的遮断法のマウス指向運動制御系を指標とする考察. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
23. 笹田周作, 加藤健治, 門脇傑, 宇川義一, 小宮山伴与志, 西村幸男 (2013 年 6 月 20 日) ヒト腰髄に存在する歩行に関わる Neural module. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
24. 笠井昌俊, 伊佐正 (2013 年 6 月 20 日) 2 光子イメージングを用いたマウス上丘の側方抑制を示す細胞集団活動の記録. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
25. 當山峰道, 木下正治, 松井亮介, 加藤茂樹, 長谷川拓, 笠原洋紀, 伊佐かおる, 渡辺大, 小林和人, 里宇明元, 伊佐正 (2013 年 6 月 20 日) サルの皮質脊髓路損傷後の手指巧緻性回復における脊髓固有ニューロンの寄与の検証. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
26. 梅田達也, 佐藤雅昭, 川人光男, 伊佐正, 西村幸男 (2013 年 6 月 20 日) 随意運動中の抹消感覚神経集団による運動キネマティクス情報の表現. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
27. 石田章真, 梅田達也, 伊佐正, 飛田秀樹 (2013 年 6 月 21 日) 内包出血後の麻痺側前肢の集中使用は出血側運動野の体部位再現を変化させ運動機能改善を促進する. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
28. 加納史也, 山本朗仁, 酒井陽, 西村幸男, 伊佐正, 上田実 (2013 年 6 月 21 日) 歯髄幹細胞を用いた霊長類の脊髓損傷後機能回復. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
29. 辛 徳, 中西 康彦, 陳 超, 神原 裕行, 吉村 奈津江, 渡辺 秀典, 南部 篤, 伊佐 正, 西村 幸男, 小池 康晴 (2013 年 6 月 21 日) サルの皮質脳波から推定した筋電信号を用いた腕の角度の推定. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
30. 加藤健治, 澤田真寛, 西村幸男 (2013 年 6 月 21 日) 脳-筋肉間の人工神経接続による脳梗塞モデルサルの手の運動機能再建. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
31. 小川正晃, Matthijs A.A. van der Meer, Guillem R. Esber, Domenic H. Cerri, Thomas A. Stalnaker, Geoffrey Schoenbaum (2013 年 6 月 21 日) 不確実な報酬予測に対する眼窩前頭皮質神経細胞の反応ーリスク? もしくはサリエンス?. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
32. 西村幸男 (2013 年 6 月 21 日) 運動機能回復に対する腹側線条体の役割. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
33. 平田雅之, 松下光次郎, 鈴木隆文, 吉田毅, 佐藤文博, 梅田達也, 西村幸男, 長谷川功, 安藤博士, シェインモリス, 柳沢琢史, 貴島晴彦, 川人光男, 吉峰俊樹 (2013 年 6 月 21 日) 脳表脳波を用いたワイヤレス体内埋込型ブレインマシンインターフェース装置. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
34. 加藤利佳子, 高桑徳宏, Abdelhafid Zeghibib, Peter Redgrave, 伊佐正 (2013 年 6 月 22 日) 意識に昇らない視覚刺激による行動の最適化課程. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
35. 高桑徳宏, 加藤利佳子, Peter Redgrave, 伊佐正 (2013 年 6 月 22 日) 意識に昇らない視覚刺激による連合学習. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
36. 澤田真寛, 尾上浩隆, 加藤健治, 伊佐正, 西村幸男 (2013 年 6 月 22 日) 脊髓損傷後の回復過程における腹側線条体の役割. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
37. 吉田正俊, Richard Veale (2013 年 6 月 22 日) サリエンスーマップに基づいた視覚補填を目指して. 第 36 回日本神経科学大会 (京都)
38. 伊佐正 (2013 年 7 月 6 日) バイオリソースプロジェクトにおけるニホンザル. 第 22 回サル類の疾病と病理のための研究会ワークショップ (岐阜)
39. Umeda Tatsuya, Sato Masa-aki, Kawato Mitsuo, Isa Tadashi, Nishimura Yukio (2013 年 7 月 6 日) Estimation of Firing of Primary Afferents from Joint Kinematics During Voluntary Arm Movements of Monkeys. 第 35 回国際 IEEE 大会 (大阪)
40. Masatoshi Kasai (2013 年 7 月 10 日) Two photon

- imaging of lateral inhibition in the superficial superior colliculus. Gordon Research Conference (MA, USA)
41. Kaoru Isa, Thongchai Sooksawate, Ryosuke Matsui, Masaharu Kinoshita, Shigeki Kato, Kenta Kobayashi, Dai Watanabe, Kazuto Kobayashi, Tadashi Isa (2013 年 7 月 10 日) Selective blockade of crossed tecto-reticular pathway by double infection of viral vectors impaired orienting responses in mice; methodological considerations. Gordon Research Conference (MA, USA)
 42. Rikako Kato, Norihiro Takakuwa, Abdelhafid Zeghib, Peter Redgrave, Tadashi Isa (2013 年 7 月 10 日) Acquisition of novel behaviour by visual reinforcement without awareness: instrumental learning in blindsight monkeys. Gordon Research Conference (MA, USA)
 43. 笹田周作 (2013 年 7 月 26 日) 上肢筋－腰髄間の人工神経接続を利用した下肢歩行運動の随意制御. 第 27 回ヒトの随意運動制御研究会 (川越)
 44. 笹田周作, 中島剛, 二橋元紀, 大塚裕之, 小宮山伴与志 (2013 年 7 月 27 日) 上肢皮膚反射に対する上下肢ペダリング運動の相乗効果. 第 21 回日本運動生理学会 (川越)
 45. 笹田周作 (2013 年 7 月 28 日) 人工神経接続を用いた脊髄損傷患者の随意歩行再建の試み. 第 21 回日本運動生理学会 (川越)
 46. 笹田周作, 宇川義一 (2013 年 8 月 7 日) 上肢筋－腰髄間の人工神経接続による下肢歩行運動の随意制御. 第 1 回日本スポーツ健康科学学会 (東京)
 47. 伊佐正 (2013 年 8 月 17 日) 傷害を受けた脳が示す可塑性とその修飾機構. 臨床神経生理研究会 (福岡)
 48. 小川正晃 (2013 年 8 月 30 日) 不確実な報酬予測に対する眼窩前頭皮質神経細胞の反応, リスク？もしくはサリエンス？. 包括脳夏のワークショップ (名古屋)
 49. 當山峰道 (2013 年 8 月 31 日) Verified contribution of propriospinal neurons to recovery of hand dexterity after a corticospinal tract lesion in the monkey. 包括脳夏のワークショップ (名古屋)
 50. 伊佐かおる (2013 年 8 月 31 日) ウィルスベクター2重感染法によるマウス指向運動に関する神経経路の選択的・可塑的制御. 包括脳夏のワークショップ (名古屋)
 51. Tadashi Isa (2013 年 9 月 3 日) Key elements for functional recovery after partial spinal cord injury; spinal cord, cortex and beyond. Newcastle University Extra IoN Seminar (UK)
 52. Tadashi Isa (2013 年 9 月 5 日) Key elements for functional recovery after partial spinal cord injury; spinal cord, cortex and beyond. Sheffield University invited Seminar (UK)
 53. Tadashi Isa (2013 年 9 月 6 日) Key elements for functional recovery after partial spinal cord injury; spinal cord, cortex and beyond. 15th Spinal Research Network Meeting (London, UK)
 54. 西村幸男 (2013 年 9 月 6 日) Potentials of activity dependent stimulation during free behavior. 第 7 回 Motor Control 研究会 (東京)
 55. 西村幸男 (2013 年 9 月 13 日) Neural substrates for functional recovery after from brain damage; spinal cord, cortex and limbic system. LE2013 (神奈川)
 56. Tadashi Isa (2013 年 9 月 20 日) Dissectioning the circuit for functional recovery after neuronal damage. Plenary Lecture, the 10th Biennial Conference of the Chinese Neuroscience Society 年会 (北京, 中国)
 57. 小川正晃 (2013 年 9 月 26 日) Tracking salience is increased by optogenetic inhibition of nucleus accumbens neurons. International Symposium Optogenetics 2013 (東京)
 58. 西村幸男 (2013 年 10 月 7 日) 脊髄損傷からの機能回復戦略～神経メカニズムから Spinal Computer Interface～. 第 77 回未来医療セミナー (大阪)
 59. Yukio Nishimura (2013 年 10 月 10 日) Motivational regulation of functional recovery after spinal cord injury. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium (岡崎)
 60. Masatoshi Kasai, Tadashi Isa (2013 年 10 月 10 日) Two-photon imaging for lateral inhibition of neural ensemble in the superficial layer of the superior colliculus. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium (岡崎)
 61. Tadashi Isa (2013 年 10 月 10 日) Designing ECoG-based brain-computer interfaces. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium (岡崎)
 62. 西村幸男 (2013 年 10 月 17 日) 人工神経接続による随意運動機能の再建. 日本神経外科学会第 72 回学術総会 (横浜)

63. Yukio Nisimura (2013年10月21日) Restoring volitional control through artificial neural connection. 1st Joint CU-NIPS Symposium (バンコク, タイ)
64. Tadashi Isa (2013年10月21日) Neural plasticity during recovery after spinal cord injury. 1st Joint CU-NIPS Symposium (バンコク, タイ)
65. 高桑徳宏, 加藤利佳子, Peter Redgrave, 伊佐正 (2013年10月26日) 意識に上らない視覚刺激による連合学習. 第60回中部日本生理学会 (岐阜)
66. 加藤健治, 澤田真寛, 西村幸男 (2013年10月26日) 大脳皮質一筋間の人工神経接続による麻痺手の随意制御の再建. 第60回中部日本生理学会 (岐阜)
67. S.Sasada, K.Kato, S.Kadowaki, T.Komiyama, Y.Ugawa, Y.Nishimura (2013年11月9日) Neural modules for walking in human lumbar spinal cord. Neuroscience2013 (San Diego, USA)
68. M.Yoshida, R.Veale (2013年11月11日) A Saliency-guided neural prosthesis for recovery of visual attention: design and simulation. Neuroscience2013 (San Diego, USA)
69. M.Sawada, K.Kato, H.Onoe, T.Isa, Y.Nishimura (2013年11月11日) Ventral striatum regulates brain activity of motor related areas during the recovery after spinal cord injury. Neuroscience2013 (San Diego, USA)
70. T.Tohyama, M.Kinoshita, R.Matsui, S.Kato, K.Isa, D.Watanabe, K.Kobayashi, M.Liu, T.Isa (2013年11月12日) Verified contribution of propriospinal neurons to recovery of hand dexterity after a corticospinal tract lesion in the monkey. Neuroscience2013 (San Diego, USA)
71. K.Kato, M.Sawada, Y.Nishimura (2013年11月13日) Rapid adaptation to brain-controlled functional electrical stimulation of paretic muscle in stroke monkeys. Neuroscience2013 (San Diego, USA)
72. R.Kato, N.Takakuwa, A.Zeghib, P.Redgrave, T.Isa (2013年11月13日) Process of forming novel behavior by visual reinforcement without awareness: Instrumental conditioning in blindsight monkeys. Neuroscience2013 (San Diego, USA)
73. N.Takakuwa, R.Kato, P.Redgrave, T.Isa (2013年11月13日) Classical conditioning reinforced by visual stimuli in blindsight monkeys. Neuroscience2013 (San Diego, USA)
74. 伊佐正 (2013年11月17日) 自発サッケードを指標とするサリエンシー検出機構. 第4回脳表現型の分子メカニズム研究会 (福岡)
75. Masaaki Ogawa (2013年11月19日) Tracking salience acquired through associative learning, Not risk, in Orbitofrontal Neurons. 13th China-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (北京, 中国)
76. 伊佐正 (2013年11月20日) 脳・脊髄損傷研究の現状と将来展望. NBR 公開シンポジウム (東京)
77. 伊佐正 (2013年12月13日) 「無意識の視覚系」の実体を求めて. 応用脳科学アカデミー (東京)
78. 伊佐正 (2013年12月19日) 障害脳が獲得する新たな機能—盲視に関する統合的研究—. 国立精神神経医療センター招待セミナー (東京)

《生体恒常機能発達機構研究部門》

1. 渡部美穂, 鍋倉淳一, 福田敦夫 (2013.6.20) GnRH ニューロンで GABA の興奮性入力を抑制性に変化させると生殖機能に異常がみられる. Modulation of excitatory action of GABA in GnRH neurons in vivo cause impairment of fertility. Neuro2013 (京都)
2. 柴田和輝, 中原聡一郎, 田中謙二, 鍋倉淳一, 井関峰生, 渡辺正勝, 松木則夫, 小山隆太 (2013.6.20) てんかん脳における細胞内 cAMP レベルの上昇と軸索分枝形成の関連. cAMP signaling mediates activity-induced robust axonal branching in the epileptic brain. Neuro2013 (京都)
3. Kim SK, Ishikawa T, Koizumi S, Nabekura J (2013.6.20) Causal role of astrocyte-induced cortical synapse remodelling in neuropathic mechanical hypersensitivity in mice. Neuro2013 (京都)
4. 宮本愛喜子, 江藤 圭, 鍋倉淳一 (2013.6.21) 大脳皮質発達期におけるミクログリアによるスパイン形成. Dendritic spine formation by microglia in immature

- barrel cortex. 第36回日本神経科学大会(京都)
5. Nakahata Y, Ishibashi H, Nabekura J(2013.6.21) 活性化依存的なグリシン受容体の動的・機能的変化. Activation-dependent modulation of glycine receptor dynamics and function. 第36回日本神経科学大会 Neuro2013(京都)
 6. 石橋 仁, 江藤 圭, 石川達也, 鍋倉淳一 (2013.6.21) 慢性痛による大脳皮質一次体性感覚野の GABAA 受容体機能の変化. Changes of GABAA receptor function in the primary somatosensory cortex by persistent pain. Neuro2013(京都)
 7. 鍋倉淳一, 金善光, 和氣弘明, 江藤 圭 (2013.6.21) グリアによる大脳皮質感覚野シナプス再編. Glia-induced remodeling of neuronal circuits in the somatosensory cortex. Neuro2013(京都市)
 8. 鍋倉淳一(2013.8.4) 病態時における神経回路再編とミクログリア. 第12回MSワークショップ(福岡)
 9. Nakahata Y, Ishibashi H, Hirata H, Nabekura J (2013.9.6) Dynamic modulation of diffusing glycine receptors at synapses. The 11th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences(浜松)
 10. Nabekura J, Kato G, Eto K, Kim SK, Wake H (2013.10.21) Long term plasticity of cortical circuits and glia. The 1st CU-NIPS Symposium(バンコク)
 11. 鍋倉淳一 (2013.10.30) Glial contribution to remodeling of cortical Synapses. 第51回日本生物物理学会(京都)
 12. Miyamoto A, Eto K, Nabekura J (2013.11.10) Involvement of microglia in dendritic spine formation in immature barrel cortex. Neuroscience 2013(San Diego, USA)
 13. Nakahata Y, Ishibashi H, Hirata H, Nabekura J (2013.11.11) Activation-dependent spatial dynamics of postsynaptic glycine receptors. Neuroscience 2013 (北米神経科学学会) (San Diego, USA)
 14. Nabekura J(2013.11.11) Remodeling of Synapses in somatosensory cortex of chronic pain model mouse. The 3rd NIPS-CIN Joint Neuroscience Symposium(岡崎)
 15. 鍋倉淳一(2013.11.24) 発達期および障害回復期における神経回路の再編. 第23回耳科学会(宮崎)
 16. 鍋倉淳一(2013.12.8) 慢性疼痛に伴う大脳皮質神経回路の再編. 第6回運動器疼痛学会(神戸)
 17. Nabekura J(2013.12.18) Remodeling of synapses in somatosensory cortex in chronic pain mouse. The 5th Asian Pain Symposium(岡崎)
 18. Nabekura J(2014.1.10) Cortical synapse remodeling in chronic pain. International Symposium on Glyco-Neuroscience(淡路)
 19. 石川達也, 石橋 仁, 鍋倉淳一(2014.1.26) The role of primary somatosensory cortex in causing mirror-image pain. 第2回シナプス再編におけるグリア戦略研究会(熱海)
 20. 宮本愛喜子, 江藤 圭, 村越秀治, 柴田圭輔, 小泉修一, 鍋倉淳一(2014.1.27) Formation of synapses in somatosensory cortex of developing mice. 第2回シナプス再編におけるグリア戦略研究会(熱海)
 21. Nakahata Y, Ishibashi H, Hirata H, Nabekura J (2014.1.29) The dynamic modulation of postsynaptic glycine receptor clustering. The 34th Annual Meeting of the Australian Neuroscience Society (ANS 2014) (Adelaide, Australia)
 22. 石川達也, 石橋 仁, 鍋倉淳一(2014.2.25) ミラーイメージペイン発症における大脳皮質 S1 の役割. 新潟脳研一生理研合同シンポジウム(岡崎市)
 23. 宮本愛喜子, 江藤 圭, 村越秀治, 柴田圭輔, 小泉修一, 鍋倉淳一(2014.3.2) 発達期バレル野におけるシナプス形成に対するミクログリアの関与. JST-C R E S T 「脳神経回路の形成・動作原理解明と制御技術創出」研究領域(東京)
 24. Nabekura J, Kato G, Miyamoto A, Wake H(2014.3.10) Synapse remodeling of cortical synapses; elimination and generation of synapses by microglia. The 1st IPBS International Symposium(大阪)
 25. 石橋 仁, 山口純弥, 中畑義久, 鍋倉淳一 (2014.3.17) 抑制性シナプスにおけるグルタミン酸トランスポーターの役割. 第91回日本生理学会大会(鹿児島市)
 26. 後藤 桂, 加藤 剛, 川原 勲, 國安弘基, 鍋倉淳一, 高木 都(2014.3.17) 切離吻合術を受けたマウス小腸における内因性および外因性新生腸壁内神経. 第91回日本生理学会大会(鹿児島市)
 27. 中村佳代, 和氣弘明, 鍋倉淳一(2014.3.17) 脳血管障害後の神経回路再編成に対する K^+ -Cl-cotransporter

- (KCC2) の役割. Role of K⁺-Cl⁻ cotransporter (KCC2) for neural reorganization after cerebrovascular disease. 第91回日本生理学会大会(鹿児島市)
28. 宮本愛喜子, 江藤 圭, 村越秀治, 柴田圭輔, 小泉修一, 鍋倉淳一(2014.3.18) 発達期マウス大脳皮質体性感覚野におけるミクログリアによるシナプス形成: 生体2光子顕微鏡による観察. 第91回日本生理学会大会(鹿児島市)
29. 石川達也, 石橋 仁, 鍋倉淳一(2014.3.18) 大脳皮質

一次体性感覚野のミラーイメージペイン発症における役割. The role of primary somatosensory cortex in causing mirror-image pain. 第91回日本生理学会大会(鹿児島市)

30. Nabekura J(2014.3.24) Remodeling of Cortical Synapses in Living Mice: Glia-Synapse Interaction. 第1回 名古屋大学神経回路国際シンポジウム Nagoya International Symposium on Neural Circuits(名古屋)

《生殖・内分泌系発達機構研究部門》

1. 箕越靖彦, 岡本土毅(2013.2.15-17) 視床下部 AMPK による摂食調節機構. 第9回宮崎サイエンスキャンプ(宮崎)
2. 箕越靖彦, 岡本土毅(2013.2.22-23) 視床下部室傍核 AMPK による食物嗜好性調節機構. 第27回日本糖尿病・肥満動物学会(東京)
3. 唐麗君, 箕越靖彦(2013.3.23) Agouti-related protein and sympathetic nerve regulate TNF- α mRNA abundance in white adipose tissue. 第1回生活習慣病の分子細胞病態学研究会(東京)
4. Minokoshi Y, Shiuchi T, Okamoto S(2013.3.27-29) Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan(東京)
5. Takagi K, Minokoshi Y(2013.3.27-29) Role of UCP1 and muscle AMPK in diet-induced thermogenesis. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan(東京)
6. Tang L, Minokoshi Y(2013.3.27-29) Agouti-related protein and sympathetic nerve regulate TNF- α mRNA abundance in white adipose tissue. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan(東京)
7. 箕越靖彦, 唐麗君(2013.4.25-27) 白色脂肪組織での TNF- α 産生に及ぼす中枢性調節機構. 第86回日本内分泌学会学術総会(仙台)
8. Minokoshi Y, Okamoto S(2013.5.2-4) Role of hypothalamic AMPK in feeding behavior. 2013 Seoul

International Congress of Endocrinology and Metabolism (Seoul, Korea)

9. Minokoshi Y, Tang L(2013.5.16-18) Regulatory role of central and autonomic nervous system in TNF- α mRNA abundance in white adipose tissue. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会(熊本)
10. 箕越靖彦, 岡本土毅(2013.5.24-26) 視床下部 AMPK による摂食調節機構. 第67回日本栄養・食糧学会大会(名古屋)
11. 箕越靖彦, 岡本土毅(2013.6.28-29) 中枢における食物選択調節機構の解明と治療への応用可能性. 第31回日本肥満症治療学会学術集会(東京)
12. 横田繁史, 岡本土毅, 箕越靖彦(2013.8.24) 骨格筋 AMPK 活性の抑制はストレプトゾトシン誘導性インスリン依存性糖尿病の代謝異常を改善する. 第18回アディポサイエンス・シンポジウム(豊中)
13. Minokoshi Y, Okamoto S(2013.9.10-13) Regulatory role of hypothalamic AMP-activated protein kinase in feeding behavior. 36th Naito Conference Molecular aspects of energy balance and feeding behavior(札幌)
14. Yokota S, Okamoto S, Minokoshi Y(2013.9.10-13) Suppression of AMP kinase activity in skeletal muscle improves metabolic abnormalities of streptozotocin-induced insulindeficient diabetes mellitus in mice. 36th Naito Conference Molecular aspects of energy balance and feeding behavior(札幌)
15. Okamoto S, Minokoshi Y(2013.9.10-13) AMPK in the paraventricular hypothalamus regulates food selection behavior in mice. 36th Naito Conference Molecular

- aspects of energy balance and feeding behavior (札幌)
16. Tang L, Minokoshi Y (2013.9.10-13) Sympathetic regulation of TNF- α mRNA abundance in white adipose tissue. 36th Naito Conference Molecular aspects of energy balance and feeding behavior (札幌)
 17. 箕越靖彦, 戸田知得 (2013.10.11-12) 骨格筋でのグルコース取り込みに及ぼす視床下部の調節機構. 第34回日本肥満学会 (東京)
 18. 岡本土毅, 箕越靖彦 (2013.10.11-12) AMPK による食物嗜好性の調節機構. 第34回日本肥満学会 (東京)
 19. 横田繁史, 岡本土毅, 箕越靖彦 (2013.10.11-12) 骨格筋 AMPK 活性の抑制はストレプトゾトシン誘導性インスリン依存性糖尿病の代謝異常を改善する. 第34回日本肥満学会 (東京)
 20. 横田繁史, 岡本土毅, 箕越靖彦 (2013.10.25-26) 骨格筋 AMPK 活性の抑制はストレプトゾトシン誘導性インスリン依存性糖尿病の代謝異常を改善する. 第60回中部日本生理学会 (岐阜)
 21. 箕越靖彦 (2013.12.11) 脳とエネルギー代謝. 大阪大学医学部特別講義 (吹田)

《個別研究 (村上グループ)》

1. Murakami M, Narita T, Matsuki-Fukushima M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M, Wei F (2013.3.23) Confocal microscope observation on paracellular fluid transport in salivary gland. 91st general session of the IADR (Seattle, USA)
2. Seo Y, Takamata A, Ogino T, Morita H, Murakami M (2013.3.27) Diffusion of manganese chelates in the rat brain measured by T₁-weighted MRI. 第90回日本生理学会 (東京)
3. Murakami M, Wei F, Narita T, Matsuki-Fukushima M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M (2013.3.28) Assessment of paracellular transport upon onset of secretory stimulation in the isolated perfused submandibular salivary gland. 第90回日本生理学会 (東京)
4. Wei F, Narita T, Sugiya H, Murakami M (2013.3.28) Effect of Danshen component, salvianolic acid B on intracellular Ca²⁺ level of rat submandibular gland. 第90回日本生理学会 (東京)
5. Yamazaki F, Imaizumi-Ohashi Y, Yokoi-Hayakawa M, Satoh K, Satoh K, Kondoh T, Murakami M, Seo Y (2013.3.28) Magnetic resonance imaging of the temporomandibular joint in the mouse. 第90回日本生理学会 (東京)
6. Murakami M, Wei F, Narita T, Fukushima-Matsuki M, Hashimoto S, Shibukawa Y, Sato M (2013.7.23) Confocal Microscope Observation of Paracellular Fluid Transport by the isolated perfused submandibular gland. The 37th IUPS (Birmingham, UK)
7. Wei F, Murakami M (2013.10.25) Danshen- induced salivary fluid secretion in the perfused submandibular gland of the rat. 第61回中部日本生理学会 (岐阜)
8. 村上政隆, 魏飛, 成田貴則, 福島美和子, 橋本貞充, 澁川義幸, 佐藤正樹 (2013.12.14) ラット顎下腺細胞間分泌細管の微細形態: 急速凍結固定切断試料の電顕観察と高速共焦点レーザー顕微鏡観察. 第58回日本唾液腺学会学術集会 (東京)

《個別研究 (毛利グループ)》

1. 毛利達磨, 経塚啓一郎 (2013. 9. 26) ウニ卵受精時のミトコンドリア活性化と一酸化窒素遊離. 日本動物学会第84回大会 (岡山)

《特別研究（永山グループ）》

1. 永山國昭, 伏見謙 (2013・1・28) 水から見た生命エネルギー/情報カップリング, 立命館大学「生命進化と水」シンポジウム (草津)
 2. 永山國昭 (2013・1・31) 進化論的視座による二元論の超克, 第2回総研大異分野フォーラム (葉山)
 3. 甲斐憲子, 香山容子, 新井善博, 小坂展慶, 落谷孝広, 永山國昭 (2013・5・20) がん細胞由来エクソソームのゼルニケ位相差電子顕微鏡クライオ観察, 日本顕微鏡学会 (大阪)
 4. 箕田弘喜, 小沼翼, 上野竜佑, 山本直紀, 永山國昭 (2013・5・21) 電子・光子ハイブリッド顕微鏡を使った蛍光たんぱく質発光の研究, 日本顕微鏡学会 (大阪)
 5. 村田和義, 宮崎直幸, 江崎雅, 小椋光, 箕田弘喜, 新井善, 永山國昭 (2013・5・21) GFP-CLを用いた光顕・電顕相関観察法の試み, 日本顕微鏡学会 (大阪)
 6. 中村吉男, 史蹟, 永山國昭, 新井善博, 香山容子 (2013・5・21) 透過電子顕微鏡用多孔位相板の作製, 日本顕微鏡学会 (大阪)
 7. 永谷幸則, 新井善博, 三宮工, 白井忠雄, 相原龍三, 飯島義市, 永山國昭 (2013・5・22) 500 kV LinacTEMの開発とRFチョッパ技術, 日本顕微鏡学会 (大阪)
 8. 永山國昭, 村田和義, 箕田弘喜, 上野竜佑, 山本直紀 (2013・10・30) 蛍光蛋白質の電子線による発光活性, 日本生物物理学会 (京都)
- 出前授業
1. 永山國昭 (2013・7・20) 見えない真実を観る一顕微鏡が拓く生物の世界一, 第27回岡崎げんき館・せいりけん市民講座 (岡崎)
 2. 永山國昭 (2013・12・13) 昔のヒトが見たミクロの世界, 岡崎市スーパーサイエンススクール (愛宕小学校)

《遺伝子改変動物作製室》

1. 原 弘真, 田切美穂, 平林真澄, 保地眞一 (2013. 3. 27) 凍結乾燥ケーキにおけるコラプス形成と復水ウシ精子の正常性との関係. 第116回日本畜産学会 (広島)
2. 八代育子, In-Sul Hwang, 山根伊織, 能登一葉, 原弘真, 平林真澄, 保地眞一 (2013. 3. 27) ガラス化したウシ成熟卵母細胞の蘇生率は回復培養液へ添加したROCK阻害剤によって改善される. 第116回日本畜産学会 (広島)
3. 平林真澄, 田村千尋, 後藤哲平, 三宝 誠, 保地眞一 (2013. 5. 15) 単為発生胚に由来するラットES細胞株の樹立. 第60回日本実験動物学会 (つくば)
4. 後藤哲平, 田村千尋, 三宝 誠, 保地眞一, 平林真澄 (2013. 5. 16) ラットの内部細胞塊および胚性幹細胞におけるインプリント遺伝子のDNAメチル化解析. 第60回日本実験動物学会 (つくば)
5. Tarusawa E, Toyoda S, Kobayashi T, Sanbo M, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y (2013.6.21) Dnmt3b epigenetically regulates specificity of synaptic connections in mouse barrel cortex. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto)
6. Toyoda S, Kawaguchi M, Kobayashi T, Tarusawa E, Toyama T, Okano M, Oda M, Nakauchi H, Yoshimura Y, Sanbo M, Hirabayashi M, Hirayama T, Hirabayashi T, Yagi T (2013.6.22) Dnmt3b-dependent DNA methylation regulates stochastic expression of clustered Protocadherin genes and dendritic self-avoidance in single neurons. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kyoto)
7. 平林真澄, 田村千尋, 後藤哲平, 三宝 誠, 保地眞一 (2013. 9. 12) フォルスコリンの2i培地への添加はラットES細胞株の樹立に有効か? 第106回日本繁殖生物学会 (東京)
8. Hwangi I-S, Yashiro I, Hara H, Hirabayashi M, Hochi S (2013.6.22) Rescue of vitrified-warmed bovine oocytes by recovery culture in the presence of Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor. 第106回日本繁殖生物学会 (東京)

9. 原 弘真, 田切美穂, 平林真澄, 保地眞一 (2013. 9. 12) 凍結乾燥ウシ精子の発生能に及ぼすコラプスの影響。第 106 回日本繁殖生物学会 (東京)
10. 高山雄平, 上野山賀久, 三宝 誠, 平林真澄, 富川順子, 今村拓也, 平嶋 昂, 柳原 萌, 前多敬一郎, 束村博子 (2013. 9. 12) コンディショナルKiss1 ノックアウトマウスを用いたキスペプチンニューロンの機能解析。第 106 回日本繁殖生物学会 (東京)
11. 中村 翔, 上野山賀久, 池上花奈, 富川順子, 後藤哲平, 田村千尋, 三宝 誠, 平林真澄, 前多敬一郎, 束村博子 (2013. 9. 12) 性行動の脱メス化およびオス化におけるキスペプチンの役割。第 106 回日本繁殖生物学会 (東京)
12. 美辺詩織, 林 真弓, 後藤哲平, 三宝 誠, 平林真澄, 上野山賀久, 前多敬一郎, 束村博子 (2013. 9. 13) 後脳上衣細胞可視化マウスの作製。第 106 回日本繁殖生物学会 (東京)
13. 堀田章徳, 山本彩子, 後藤哲平, 平林真澄, 前多敬一郎, 大森保成, 本道栄一, 井上直子 (2013. 9. 13) 遺伝子改変スunks 作製に向けた胚移植法の確立。第 106 回日本繁殖生物学会 (東京)
14. Goto T, Tamura C, Sanbo M, Kato-Itoh M, Kobayashi T, Nakauchi H, Hochi S, Hirabayashi M (2013.10.29) DNA methylation status of imprinted genes in rat ICM cells, rat ES cells and mouse ES cells. The 64th AALAS national meeting (Baltimore, USA)
15. Hirabayashi M, Tamura C, Sanbo M, Goto T, Kato-Itoh M, Sato H, Kobayashi T, Nakauchi H, Hochi S (2013.10.29) Successful derivation of rat embryonic stem cell lines from parthenogenetically developing blastocysts. The 64th AALAS national meeting (Baltimore, USA)
16. Ikegami K, Abe H, Haruta T, Minabe S, Goto T, Sanbo M, Tamura C, Hirabayashi M, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H (2013.11. 13) Synchronized intracellular Ca²⁺ oscillations in cultured kisspeptin/neurokinin B/dynorphin -GFP neurons obtained from the hypothalamic arcuate nucleus of transgenic mice. The 43rd annual meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA)
17. Goto T, Timikawa J, Abe H, Fukunuma T, Imamura T, Takase K, Sanbo M, Tamura C, Hirabayashi M, Tsukamura H, Maeda K, Uenoyama Y (2013.11. 13) Region-specific enhancer for Kiss1 expression in the hypothalamic arcuate nucleus of female mice. The 43rd annual meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA)

《行動様式解析室》

1. 服部剛志, 岡本昌之, 駒田致和, 小山佳久, 高雄啓三, 宮川 剛, 片山泰一, 伊藤 彰, 佐藤 真, 遠山正彌 (2013.6.21) DBZ KO マウスにおける大脳皮質発達の解析. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会, 第 56 回日本神経化学学会大会, 第 23 回日本神経回路学会大会, 合同大会) (京都)
2. 安村美里, 吉田知之, 高雄啓三, 山崎真弥, 阿部 学, 植村 健, 宮川 剛, 崎村建司, 三品昌美 (2013.6.22) IL1RAPL1 欠損マウスの行動学的解析. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会, 第 56 回日本神経化学学会大会, 第 23 回日本神経回路学会大会, 合同大会) (京都)
3. 奥田耕助, 渡邊 紀, 小林静香, 真鍋俊也, 高雄啓三, 宮川 剛, 深谷昌弘, 阪上洋行, 西岡朋生, 天野睦紀, 貝淵弘三, 水口 雅, 田中輝幸 (2013.6.22) 相互作用蛋白探索と loss-of-function 解析による神経発達障害原因遺伝子 CDKL5 の機能研究. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会, 第 56 回日本神経化学学会大会, 第 23 回日本神経回路学会大会, 合同大会) (京都)
4. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 高雄啓三, 吾郷由希夫, 佐藤宏祐, 野尻奈央, 田中智大, 田熊一敬, 角田慎一, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央 (2013.6.22) 妊娠期の非晶質ナノシリカ曝露が次世代の情動機能へ及ぼす影響探索. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会, 第 56 回日本神経化学学会大会, 第 23 回日本神経回路学会大会, 合同大会) (京都)
5. 高雄啓三, 萩原英雄, 大平耕司, 昌子浩孝, 服部聡子, 小清水久嗣, 梅森十三, 高木 豪, 石井俊輔, 宮

- 川 剛 (2013.6.22) Schnurri-2 マウスで見られる精神疾患の中間表現型としての未成熟歯状回は育成後に出現する. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会, 第 56 回日本神経化学学会大会, 第 23 回日本神経回路学会大会, 合同大会) (京都)
6. 小清水久嗣, 大平耕司, 萩原英雄, 高雄啓三, 高木 豪, 片岡正和, 石井俊輔, 高橋正身, 宮川 剛 (2013.6.22) 歯状回ニューロンの成熟異常を示すマウスの海馬における BDNF-MAPK シグナル経路の調節異常. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会, 第 56 回日本神経化学学会大会, 第 23 回日本神経回路学会大会, 合同大会) (京都)
7. Takao K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Takagi T, Ishii S, Miyakawa T (2013.11.7-8) Immature dentate gyrus, a candidate endophenotype for psychotic disorders, emerges after adolescence in Schnurri-2 KO mice. 12th Annual MCCA (The Molecular and Cellular Cognition Society) meeting (San Diego, USA)
8. Koshimizu H, Ohira K, Hagihara H, Takao K, Takagi T, Kataoka M, Ishii S, Takahashi M, Miyakawa T (2013.11.10) Dysregulation of BDNF-MAPK signaling pathway in the hippocampus of mice with “immature dentate gyrus”. Neuroscience 2013 (San Diego, USA)
9. Hagihara H, Takagi T, Ishii S, Graef IA, Gerald CR, Miyakawa T (2013.11.10) Decreased parvalbumin immunoreactivity and altered perineuronal net labeling in the frontal cortex of schizophrenia model mice. Neuroscience 2013 (San Diego, USA)
10. Takao K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Takagi T, Ishii S, Miyakawa T (2013.11.13) Immature dentate gyrus, a candidate endophenotype for psychotic disorders, emerges after adolescence in Schnurri-2 KO mice. Neuroscience 2013 (San Diego, USA)

《形態情報解析室》

1. 村田和義 (2013.2.28) 電子顕微鏡による分子から細胞までの構造生物学. 第 2 回生物物理化学研究会 (名古屋)
2. 宮崎直幸, 大村敏博, 村田和義, 岩崎憲治 (2013.05.20) クライオ電子線トモグラフィによるウイルスの細胞内ナノ分解能観察. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会 (大阪)
3. 宮崎直幸, 江崎雅俊, 小椋光, 村田和義 (2013.05.20) Serial Block-Face SEM による酵母ミトコンドリアの形態変化の観察. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会 (大阪)
4. 村田和義, 江崎雅俊, 小椋光, 荒井重勇, 山本悠太, 丹司敬義, 田中信夫 (2013.05.20) 超高压 STEM トモグラフィによる細胞まるごとの三次元構造解析. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会 (大阪)
5. 中野賢太郎, 岡田仁, 森川晃成, 多持隆一郎, 村田和義, 宮崎直幸, 高木智子, 佐藤眞美子, 谷澤英樹, 野間健一, 大隅正子 (2013.05.20) FIB SEM を用いた分裂酵母の細胞分裂時の核構造の形状変化の効率的な解析. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会 (大阪)
6. 村田和義, 宮崎直幸, 江崎雅俊, 小椋光, 箕田弘喜, 新井善博, 永山國昭 (2013.05.21) GFP-CL を用いた光顕・電顕相関観察法の試み. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会 (大阪)
7. 高見茂, 村田和義, 堀江沙和, 佐原資謹, 酒井俊男 (2013.05.22) 超高压電子顕微鏡法による鋤鼻受容細胞滑面小胞体の三次元解析. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会 (大阪)
8. ブルブル ナイーマ, 米谷 裕太, 村田 和義, 金子 康子 (2013.09.13) ダイズ根粒感染細胞中の共生体膜の形成. 日本植物学会第 77 回大会 (北海道)
9. 難波大介, 西村美保, 坂本浩隆, 村田和義, 高木孝士, 山本泰 (2013.09.13) 光化学系 II の quality control : 光ストレス下でのハウレンソウ葉緑体チラコイド膜構造変化の電子顕微鏡による観察. 日本植物学会第 77 回大会 (北海道)
10. 村田和義 (2013.10.19) 電子顕微鏡のバイオ応用. 日本顕微鏡学会「様々な極微イメージング技術研究部会」第 1 回研究会 (福岡)

11. 宮崎直幸, 村田和義 (2013.10.20) 生理研 3View-SEM による形態観察の現状と応用例 (単一細胞から組織まで). 日本顕微鏡学会「SEM 連続断面観察による生物組織三次元再構築法研究部会」第 1 回研究会 (福岡)
12. 松澤朋寛, 村田和義, 西川幸希, 藤吉好則, 大嶋篤典 (2013.10.28) Structural analysis of C. elegans innexin-6 gap junction channels by electron microscopy. 第 51 回日本生物物理学会年会 (京都)
13. 村田和義, 宮崎直幸, 上野竜佑, 箕田弘喜, 山本直紀, 永山国昭 (2013.10.30) 細胞内での GFP-CL の観察. 第 51 回日本生物物理学会年会 (京都)
14. 永山国昭, 村田和義, 箕田弘喜, 上野竜佑, 山本直紀 (2013.10.30) 蛍光蛋白質における光および電子発光の電子線活性化. 第 51 回日本生物物理学会年会 (京都)
15. 村田和義 (2013.11.16) ウイルス粒子感染の構造解析. 第 57 回日本顕微鏡学会シンポジウム (名古屋)
16. 村田和義 (2013.11.20) 電子顕微鏡による分子から細胞までの構造生物学. 山田研究会・統合バイオサイエンスシンポジウム (愛知)
17. 村田和義 (2013.12.5) 最先端電子顕微鏡技術による細胞の立体構造解析. 第 36 回日本分子生物学会年会フォーラム (神戸)
18. 呉屋俊史, 中井朋則, 竹内美由紀, 梶村直子, 村田和義, 峰雪芳宣 (2013.12.07) 電子線トモグラフィー法による酢酸菌セルロースリボンの観察. 日本顕微鏡学会・関西支部「若手の会」設立記念講演会 (滋賀)

《生体機能情報解析室》

1. 竹内佐織, 村井理絵, 島津秀紀, 磯村宜和, 達本徹 (2013 年 6 月 20 日) サル大脳皮質における睡眠紡錘波の時間空間的分布. 日本神経科学大会 (京都市)
2. 美馬達哉, 竹内佐織, 村井理絵, 島津秀紀, 磯村宜和, 達本徹 (2013 年 6 月 21 日) Coupled Oscillations in Primate Hippocampus during Rapid Eye Movement Sleep. 日本神経科学大会 (京都市)

《多光子顕微鏡室》

1. 村越秀治 (2013.6.20) Optogenetic manipulation of CaMKII activity in neuron. Neuro2013 (京都)
2. 村越秀治 (2013.10.30) Imaging and controlling the activity of signaling molecules in dendritic spines of hippocampal neurons. 第 51 回日本生物物理学会 (京都)
3. 村越秀治 (2014.3.27) シナプス可塑性に関与するシグナル分子活性化の可視化・制御. 第 119 回解剖学会 (栃木)

《ウイルスベクター開発室》

1. 小林憲太, 加藤成樹, 貝淵弘三, 小林和人 (2013.6.20) 特定神経路における Rho GTPase シグナル伝達系の機能解析. Neuro 2013 (京都)

《生命時空間設計研究領域》

1. Higashijima, S. 2013 年 11 月 4 日. "Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in

- zebrafish" Jenaia Workshop on Zebrafish Genetics, Transgenesis, and Systems Biology, Ashburn USA
2. Higashijima, S., Kimura, Y., and Satou, C. 2013年12月18日. "Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish" 第36回日本神経科学大会, 神戸
 3. Higashijima, S., Kimura, Y., and Satou, C. 2014年3月17日. "Functional analysis of locomotor circuits in the spinal cord and brainstem in zebrafish" 第91回日本生理学会大会, 鹿児島

《動物実験センター》

1. 木村 透, 柴田紀子 (2013.5.15-17) 空気清浄装置と光触媒加工飼育ラック用いた飼養保管施設の環境衛生管理。第60回日本実験動物学会総会 (つくば)
2. 木村 透 (2013.9.20-22) 改質澱粉を用いた肥満犬の血糖値調節。第156回日本獣医学会学術集会 (岐阜)
3. 高岡 秀, 木村 透 (2013.11.9) 光触媒を用いた実験動物施設の浄化。第44回日本比較臨床医学会学術大会 (岡崎)
4. 木村 透 (2013.11.9) 実験動物の疾患—臨床医学・獣医学の架け橋とならんことを期待して。第44回日本比較臨床医学会学術大会 (岡崎) 2013.5.15-17

【 一般共同研究報告 】

一般共同研究報告

〔 目 次 〕

1. 生物多様性に基づくイオンチャンネル・受容体の機能のメカニズムと生理的役割の解析（岡戸晴生ほか）	148
2. 腸内の味覚成分を化学受容する仕組みの解明（齊藤 修ほか）	148
3. 中枢神経系におけるグリア細胞の発生過程と機能構築形成への関与の解析（小野勝彦ほか）	149
4. 新規シナプスオーガナイザーの探索（吉田知之ほか）	150
5. 睡眠中の律動的神経活動の研究（美馬達哉ほか）	150
6. ジストニア・偏頭痛病態モデルマウスのナトリウムポンプ <i>Atp1a3</i> , <i>Atp1a2</i> 遺伝子ノックアウトマウスの シナプス機能解析（池田啓子ほか）	151
7. 大脳皮質視覚野における経験依存的発達メカニズム（小松由紀夫ほか）	151
8. 睡眠・覚醒状態に依存した海馬から扁桃体への活動伝播の解明（高田則雄ほか）	152
9. ジストニア様症状を示す遺伝子改変マウスの病態解析（竹林浩秀ほか）	152
10. 電気刺激法を用いた運動野ネットワークの解析（星 英司ほか）	153
11. 辺縁皮質刺激に対する大脳基底核ニューロン応答（佐藤澄人ほか）	154
12. 大脳皮質第6層ニューロンの局所結合解析（荻部冬紀ほか）	154
13. 遺伝子改変動物を利用した抑制性ニューロンの特性についての研究（柳川右千夫）	155
14. 室傍核における <i>Nesfatin-1</i> からオキシトシン・ <i>CRH</i> 神経へのシグナル伝達機構の解明（矢田俊彦ほか）	155
15. 中枢神経における <i>TRPV</i> チャンネルの局在と機能解析（宮田清司ほか）	156
16. 霊長類味覚に対する <i>TRP</i> チャンネルの役割（鈴木南美ほか）	156
17. 内臓機械痛覚過敏における <i>TRP</i> チャンネルの機能解析と機能性胃腸疾患病態との関連（杉山敏郎ほか）	157
18. 温度感受性 <i>TRP</i> チャンネルに対する天然由来の新規作用成分の探索（寺田祐子ほか）	158
19. 温度感受性 <i>TRP</i> チャンネルの活性化機構の解析と機能的役割（太田利男ほか）	158
20. ラットヒゲにおける一次感覚ニューロンの機能形態の同時追究（榎原智美ほか）	159
21. 人工神経代替装置によるニューロリハビリテーション法の開発（小宮山伴与志ほか）	160
22. ゼブラフィッシュを用いた脳脊髄神経細胞の発生・機能回路構築の生理学的・分子生物学的研究 （小田洋一ほか）	160
23. ゼブラフィッシュを用いたセロトニン神経回路の生理学的・分子生物学的研究（前川真吾ほか）	161
24. 動物実験人道的エンドポイント構築のためのエビデンス集積（小木曾昇ほか）	161
25. 唾液腺タイト結合タンパク質の翻訳後修飾による機能制御（杉谷博士ほか）	162
26. <i>TRPV4</i> 活性化に伴う海馬からの <i>ATP</i> 放出機構とその生理学的意義の解明（柴崎貢志ほか）	162
27. 脊髄損傷前後の手指巧緻運動中の脳活動の解析（小池康晴ほか）	163
28. 情報欠落のない新たな生物試料電子線トモグラフィー法の開発と応用（馬場則男ほか）	164
29. 老化に伴う神経原線維変化形成機序に関する蛋白化学的研究（吉田裕孝）	164
30. <i>DNA</i> およびクロマチン高次構造の電子顕微鏡による解析（加藤幹男ほか）	165
31. 脳・神経系発生分化過程において時空間特異的な発現をする糖鎖の構造と機能の解析と医療への応用 （等 誠司ほか）	166
32. 大脳皮質および大脳基底核による網様体脊髄路の制御（高草木薫ほか）	166
33. 脳損傷後の麻痺肢集中使用による中枢神経系再編への影響の解析（飛田秀樹ほか）	167
34. 真核生物における <i>RNA</i> 分解制御機構の解明（細田 直）	168

1. 生物多様性に基づくイオンチャンネル・受容体の機能のメカニズムと生理的役割の解析

岡戸晴生, 平井一坂本志伸 (東京都医学総合研究所神経細胞分化プロジェクト)

吉村 崇, 中根右介, 太田 航 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

岡村康司, 藤原祐一郎 (大阪大学大学院医学系研究科/生命機能研究科)

西野敦雄 (大阪大学大学院理学研究科)

前嶋 翔 (富山大学大学院理工学教育部)

岡戸グループは, ユウレイボヤ幼生から単離した AMPA 型グルタミン酸受容体のホモログ ciGluA (W), およびその Q→R 変異体 (m) を付属サブユニットであるホヤ stargazin とツメガエル卵母細胞に共発現させ, カルシウム非存在下, 存在下 (5 mM) でのグルタミン酸 (200 μ M) 応答を解析した。cGluA 野生型 (W) では高い応答性, 内向き整流性, カルシウム透過性を示した。ヘテロ (W+m), 変異体 (m) では, いずれも低い応答性, 内向き整流性の消失がみられたが, 変異体 (m) でカルシウム透過性を消失したのに対して, ヘテロ (W+m) ではカルシウム透過性を示した。

吉村グループはウズラの脳深部に存在するオプシン 5 陽性髄液接触ニューロンが脳内で直接光を受容し, 繁殖活動の季節性を制御する脳深部光受容器であることを示した。また, オプシン 5 ノックアウトマウスおよび盲目マウスの行動解析を通じて, 環境温度が行動リズムに影響をおよぼすことを見出した。さらに trp チャンネルのノックアウトマウスについて行動リズムを解析したところ,

環境温度の変化に対する反応性が低下していた。

岡村グループは, アメリカムラサキウニ由来電位依存性プロトンチャンネル SP-VSOP の活性化速度が哺乳類のもの (mVSOP) よりも 20 倍以上速い機構について解析を行った。昨年までキメラ分子などの解析から N 末端側と膜貫通領域 S3 の細胞側半分の領域 S3a が活性化速度の違いに重要であることがわかっていった。mVSOP の S3a の 163 番目のヒスチジン (His163) をウニ型へ変異させると顕著に活性化が速くなるが His164 の変異では変化しなかった。また mVSOP の N 末端側を欠失させても活性化が速くなった。最近の mVSOP の X 線結晶構造からウニ VSOP の構造を予測したところ, N 末端側の細胞内領域と S3a の His163 の側鎖との距離は直接相互作用できる近距離にあると判断された。一方 His164 の側鎖は S0 とは反対側を向いていた。これらから, 電位依存性プロトンチャンネルは活性化速度が速い特性がデフォルトであり, 速度を遅くする分子構造の構築が進化の過程で獲得されたと考えられた。

2. 腸内の味覚成分を化学受容する仕組みの解明

齊藤 修, 黒木麻湖, 織田麻衣 (長浜バイオ大学バイオサイエンス学部)

久保義弘 (生理学研究所)

我々は, 小腸の内分泌細胞株 STC-1 が渋み成分の茶カテキン (EGCG) に応答することを見出したことを発端に, これまでに STC-1 細胞の EGCG 応答を担うのは TRPA1 チャンネルであること, また TRPA1 を活性化する EGCG 成分を詳しく検討すると, EGCG ではなく EGCG の酸化産物がチャンネルを活性化する実体であることなどを明らかにした。また, TRPA1 と同様に感覚神経に発現する TRPV1 も酸化 EGCG への高い応答能を示した。さ

らにニワトリとガラガラヘビの TRPA1 と TRPV1 についてカテキン応答性を検討すると, 動物種で応答性は異なり, TRPA1 は哺乳類から, TRPV1 は鳥類から酸化 EGCG への応答性を示した。今年度は更に以下の研究を進めた。

テアシネンシン A の合成と TRP チャンネル活性化能: EGCG の自動酸化産物が TRPA1 と TRPV1 を活性化し, その中には多くの生理活性が知られる EGCG の二量体テアシネンシン A (TS-A) と D (TS-D) が検出された。これら

が TRPA1 と TRPV1 を活性化することが期待された。そこで、まず四位らの方法に従って TS-A を EGCG から合成・精製した。そして、TRPA1 と TRPV1 にどう作用するか Ca^{2+} イメージング法で検討した。マウス TRPA1 は低濃度の TS-A で強く活性化され、酸化 EGCG 中で TRPA1 を活性化するリガンドの一つが TS-A であることが判明した。一方、TRPV1 に対しては、TS-A は酸化 EGCG より活性が低く、酸化 EGCG 中の TS-A 以外の分子が TRPV1 リガンドと考えられた。TS-D の調製と活性測定が次の課題である。

TRP チャンネル上のカテキン認識部位の検討：マウス TRPA1 は酸化 EGCG に応答し、ニワトリ TRPA1 は応答

しない。またラット TRPV1 は酸化 EGCG に応答し、ガラガラヘビ TRPV1 は応答しない。そこで、マウス TRPA1 とニワトリ TRPA1 の間で、またラット TRPV1 とヘビ TRPV1 の間で、それぞれ N 端側アンキリンリピート部と C 端側 6 回膜貫通部を交換したキメラチャネルを作成し、カテキン応答性を Ca^{2+} イメージング法で解析した。ラット N 端側-ヘビ C 端側-キメラ TRPV1 は発現が検出されなかったが、これ以外の 3 種のキメラは発現することが出来き、カテキン感受性 TRP の膜貫通部の存在がカテキン応答性獲得に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後は更に詳しいキメラ解析が必要である。

3. 中枢神経系におけるグリア細胞の発生過程と機能構築形成への関与の解析

小野勝彦（京都府立医科大学 神経発生生物学）

竹林浩秀（新潟大学医学部 解剖学第二教室）

鹿川哲史（東京医科歯科大学 難治疾患研究所）

渡辺啓介（新潟大学医学部 解剖学第二教室）

後藤仁志（京都府立医科大学 神経発生生物学）

中枢神経系を構成するニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトは共通の前駆細胞である神経幹細胞から分化しますが、発生の初期段階で細胞が全て分化してしまうと幹細胞は枯渇してしまいます。そこで、神経幹細胞は、胎生期から成体に至るまで一生にわたって存在し続け必要に応じて細胞を供給するために、自己を複製する能力も合わせ持っています。今年度は、この制御機構を解明しました。

神経幹細胞を細胞増殖因子である FGF2 と Wnt3a で刺激すると自己複製が促進します。これまでに、(1) FGF2 と Wnt3a シグナルの活性化により β -catenin が核内に移行し、cyclin D1 の発現誘導を介して神経幹細胞の増殖を促すこと、(2) さらにこの β -catenin が Notch シグナルを増強することで神経幹細胞がニューロンに分化しないよう抑制すること、を報告しました。今年度の研究では、培養下で神経幹細胞に cyclin D1 を過剰発現させたりノックダウンさせたりすることにより、この分子に神経幹細胞がアストロサイトに分化しないよう抑制する別の機能があることを新たに発見しました。さらにその分子機構として cyclin D1 は、STAT3-p300 複合体の形成を阻

害し、さらに STAT3 の GFAP プロモーターへの結合も弱めることを明らかにしました。生体内で cyclin D1 をノックダウンすると GFAP 陽性アストロサイトの出現が増強されたことから、一連の現象が生体内でも生じていることが強く示唆されました。

これら一連の研究は、神経幹細胞が自己複製するときになぜニューロンやアストロサイトへ分化しないまま増殖するのかその仕組みを解決する新たな発見として極めて重要なものです。神経幹細胞の自己複製制御により、脳神経系のサイズや神経幹細胞から産生されるニューロンとグリア細胞の数のバランスが決定され、機能的神経回路の構築に大きく影響していることが予想されます。神経損傷や神経疾患で見られるグリア瘢痕形成や神経再生にも重要な役割を担っていることが考えられます。

このような、神経幹細胞の自己複製を人為的に操作することが出来れば、損傷や疾患の克服に繋がる可能性があります。すなわち、本研究成果をきっかけに幹細胞の増幅や目的とする細胞種への分化を人為的かつ効率的に促す方法の確立など、難治性疾患の治療法開発への応用が期待されます。

4. 新規シナプスオーガナイザーの探索

吉田知之 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学))

植村 健 (信州大学医学部医学科分子細胞生理学講座)

安村美里 (山梨大学リエゾンアカデミー研究医養成プログラム)

深田優子, 深田正紀

中枢シナプス形成の一端はシナプスオーガナイザーと呼ばれるシナプス前終末と後終末を誘導する活性を有する一部の細胞接着分子が担うことが知られている。しかし、複雑な中枢シナプス形成の特異性を保証するためには多様なシナプスオーガナイザー分子の組み合わせによる調節が必要と考えられる。本研究では新規のシナプスオーガナイザーを同定し、シナプス形成の特異性維持機構を明らかにすることを目的とした。

私共はシナプス誘導に関わる細胞接着分子を吸着させたビーズと培養神経細胞を共培養することによって人工

的にシナプスを誘導させる実験系を確立している。この人工的シナプス誘導時にビーズとの間に形成されるシナプス接着分子複合体を架橋試薬によって架橋した後、洗浄、単離した。得られた複合体に含まれるタンパク質を生理学研究所、生体膜研究部門 (深田博士) との共同研究にて、網羅的に質量分析法にて同定した。現在、同定された細胞接着分子がシナプスオーガナイザーとして機能するか否かを共培養実験によって検証しており、新たなシナプスオーガナイザーを提案していく予定である。

5. 睡眠中の律動的神経活動の研究

美馬達哉 (京都大学大学院医学研究科)

島津秀紀 (マサチューセッツ工科大学)

磯村宜和 (玉川大学)

遠本 徹

霊長類の睡眠や記憶固定の仕組みを解明する目的で、睡眠中のサルの大脳新皮質と海馬皮質のフィールド電位を記録し、律動的脳活動が睡眠ステージ毎にどのように変化するかを定量的に解析する研究を行った。

大脳新皮質と海馬には無菌的手術により電極を埋め込み、回復後にテレメーターを用いて自然睡眠中の脳活動を記録した。また、睡眠ステージを大脳新皮質の電気活動をもとにヒトと同等の基準で NREM1-4 及び REM に分類した。Hilbert-Huang Transform を用いて周波数スペクトルを調べ、さらに周波数間カップリングについて解析した。

その結果、海馬の脳活動において、デルタ・シータ波とガンマ波の間に、振幅および位相のカップリングがあ

ることが判明した。このカップリングは睡眠ステージによって変化し、NREM4 において最も顕著であり、REM では低下することが判明した。また、齧歯類では REM 睡眠中に海馬シータ波と呼ばれる周期的脳活動が出現することが報告されているが、サルにおいては同等の脳活動は認められなかった。

REM 睡眠と NREM 睡眠は記憶固定において異なる役割を担っているという仮説があり、今回発見された海馬における周波数間カップリングの変化は、その異なる役割に対応している可能性がある。また、齧歯類とサルでは睡眠時脳活動がかなり異なることが示唆されたため、霊長類における研究をさらに進めたい。

6. ジストニア・偏頭痛病態モデルマウスのナトリウムポンプ *Atp1a3*, *Atp1a2* 遺伝子ノックアウトマウスのシナプス機能解析

池田啓子（兵庫医科大学・生物学）

井本敬二（生理学研・神経シグナル）

佐竹伸一郎（生理学研・神経シグナル）

ナトリウムポンプは、細胞膜内外の Na^+ と K^+ の濃度を調節する能動輸送酵素である。 α および β のサブユニットから構成され、ほ乳類の脳では、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ が発現している。 $\alpha 3$ サブユニットはニューロンに特異的に発現し、 $\alpha 2$ サブユニットはグリアに特異的に発現するとされてきた。近年、ヒトナトリウムポンプ $\alpha 3$ サブユニット遺伝子の変異は、急性発症性ジストニアパーキンソン症と小児交互性片麻痺の、ヒトナトリウムポンプ $\alpha 2$ サブユニット遺伝子の変異は、家族性片頭痛の原因であることが明らかになった。本研究は、ナトリウムポンプ $\alpha 3$ サブユニット遺伝子ノックアウトヘテロマウス (*Atp1a3*^{+/-}) および $\alpha 2$ サブユニット遺伝子ノックアウトヘテロマウス (*Atp1a2*^{+/-}) を用いて、解剖学的・電気生理学的解析を中心に、疾患の病態発症機序解明を行い、新規治療薬の開発につなげることを目的とした。

今年度、以下の知見を中心に論文として報告した (J. Physiol. 2013)。
①小脳へのカイニン酸投与により誘発したジストニア症状は、野生型に比べて *Atp1a3*^{+/-} では症状

が強く現れた。②成長段階のマウス *Atp1a3* mRNA の発現は小脳に高いこと。蛍光抗体染色法によると、pincheaux 構造（小脳の籠細胞の軸索終末がプルキンエ細胞の軸索起始部に結合する場所）に $\alpha 3$ サブユニットが集積している。③小脳のスライス標本を用いた電気生理学的解析より、神経伝達回路の変化の有無を検索した。*Atp1a3*^{+/-} では小脳分子層の介在ニューロンからプルキンエ細胞への抑制性の神経伝達の特異的に亢進していることが明らかになった。

併行して、*Atp1a3*^{+/-} の基底核における神経回路の異常の有無について、電気生理学的解析を開始した（南部教授、知見博士との共同研究）。

Atp1a2^{+/-} については、昨年末に個体化し、バッククロスを開始した。同マウスは痙攣をおこしやすい傾向にあること、扁桃体が発火しやすく、不安恐怖行動が増強していること、が先行研究からわかっている。小脳やその他脳部位を用いた電気生理学的解析により片頭痛の病態基盤を検索する予定である。

7. 大脳皮質視覚野における経験依存的発達メカニズム

小松由紀夫（名古屋大学環境医学研究所）

杉村岳俊（名古屋大学環境医学研究所）

吉村由美子

視覚野において片眼遮蔽により引き起こされる眼優位性の可塑的变化は、大脳皮質の経験依存的機能発達のモデルとして長年にわたって研究されてきた。シナプス可塑性はその基礎過程と考えられ、スライス標本を用いて多くの研究がなされて、特性と分子機構が異なる複数の種類のシナプス可塑性の存在が明らかとなった。また、遮蔽眼からのシナプス入力に減弱が、非遮蔽眼からのシナプス入力に増強が生じることも判明してきた。しかし、片眼遮蔽すると視覚野内のどのシナプスにどのような可

塑的变化が起きるかは明らかにされていない。本研究では、片眼遮蔽した動物の視覚野からスライス標本を作製し、ケージド・グルタミン酸を用いるレーザー・スキャン局所刺激法によりシナプス伝達を解析し、片眼遮蔽により 2/3 層錐体細胞のシナプスに生じる変化を調べた。

ラットでは、感受性期に片眼遮蔽を 3 日間行くと、遮蔽眼刺激により視覚野に誘発される細胞外電位（視覚誘発電位）は減弱するが、非遮蔽眼刺激により誘発される電位には変化が見られない。4 日以上遮蔽を続けると、

遮蔽眼刺激により誘発される反応の減弱に加えて、非遮蔽眼刺激により誘発される反応の増強が生じる。遮蔽眼反応の減弱だけが起きる遮蔽 3 日、非遮蔽眼反応の増強も起きる遮蔽 6 日、及び片眼遮蔽なしの 3 群の Long-Evans ラットを実験に用いた。眼瞼縫合は右目に施し、左半球の視覚野からスライス標本を作製した。スライス上の各部位の細胞にレーザー・スキャン局所刺激法により活動電位を発生させ、2/3 層、4 層、5 層の細胞に由来する興奮性シナプス後電流 (EPSC) を両眼視領域の 2/3 層錐体細胞からホール・セル記録し、3 群の動物間で EPSC の大きさを比較した。

2/3 層刺激により誘発された EPSC の大きさは、遮蔽 3 日では変化が見られなかったが、遮蔽 6 日で有意に増大した。4 層刺激によって誘発された EPSC の振幅は、遮蔽 3 日で有意に減少し、遮蔽 6 日でコントロールのレベルに戻った。5 層の刺激によって誘発された EPSC の振幅は、遮蔽 3 日、6 日のどちらでも変化が見られなかった。以上の結果は、遮蔽 3 日で遮蔽眼から 4 層細胞を介して 2/3 層錐体細胞に送られる興奮性シナプス入力に減弱が起こり、遮蔽 6 日で非遮蔽眼から 4 層細胞及び 2/3 層細胞を介して 2/3 層錐体細胞に送られる興奮性シナプス入力に増強が起きることを示唆する。

8. 睡眠・覚醒状態に依存した海馬から扁桃体への活動伝播の解明

高田則雄 (慶應義塾大学医学部)

佐野裕美, 南部 篤 (生体システム研究部門)

覚醒時の海馬活動が睡眠時に再生されることや、海馬と大脳皮質の神経細胞活動の相関関係が睡眠・覚醒状態とで異なること、さらに海馬からの神経繊維投射を受ける扁桃体の活動が睡眠時に外界刺激無しに上昇することなど、脳領域間の神経活動の関係性が脳状態に依存して変化することが知られている。これらのことより海馬から扁桃体への神経活動の伝播特性が脳状態に依存して変化している可能性があるとして着想した。そこで本研究では、マウスの海馬を活性化させた時の扁桃体における神経応答が、覚醒下と睡眠下とで同じか異なるかを比較することを目指した。まず海馬の活性化に対して扁桃体が顕著な応答を示すかどうか麻酔下マウスを用いて確認した。そのために fMRI 計測を行って海馬活性化に応答する脳領域を特定した。海馬の活性化には光感受性蛋白質 (チャ

ネルロドブシン) を海馬神経細胞に発現させた遺伝子改変マウス (Htr5B-tTA::tetO-ChR2) を用いた。この結果予想外なことに、扁桃体の応答は毎回安定的に生じる訳では無いことを観察した。扁桃体での応答強度のばらつきが脳の状態に依存している可能性を検証するために、無麻酔マウスから fMRI 計測および電気生理計測できる計測系の確立に取り組んだ。この結果、マウスの頭蓋骨を固定した状態で電気生理計測可能な系を確立した。マウスは頭蓋骨が固定された状態で睡眠・覚醒状態を自発的に行き来した。現在はこの計測系をさらに発展させて、計測時に騒音の発生する fMRI 計測の最中にもマウスが睡眠・覚醒状態を行き来できる条件を確立中である。今後は以上の計測系を活用し、脳領域間の神経活動の伝播特性が脳状態依存的に変化するのかどうか検証する。

9. ジストニア様症状を示す遺伝子改変マウスの病態解析

竹林浩秀, 堀江正男, ベパリ アシム, 梨本淳一郎 (新潟大学, 医歯学, 神経生物・解剖)

佐野裕美, 知見聡美, 南部 篤 (生体システム研究部門)

ジストニアは不随意運動を生じる神経難病であり、その病態は依然として不明の点が多い。我々は、*dystonin* (*Dst*) 遺伝子の特定のアイソフォームに変異を導入した

新規遺伝子改変マウスを作製し、このホモ接合型マウスは生後 2 週間ほどでジストニア様症状を示す事を確認した。*dystonin* 遺伝子は、細胞骨格に結合する大きな遺伝

子産物をコードしており、マウス1番染色体上の遺伝子座から複数のアイソフォームが発現することが知られている。自然発生ミュータントマウスの *dystonia musculorum* マウスは、*dystonin* 遺伝子の異常により起こることが知られているが、我々の作製した *dystonin* 遺伝子のホモ接合型変異マウスも、*dystonia musculorum* マウスと同様の表現型を示していた。

今年度は、ICR バックグラウンドの *dystonin* 変異マウスのコロニーを生理学研究所の動物実験施設に導入し、不随意運動を示すホモ接合型マウスとコントロールの野生型マウスの筋電図解析を行った。その結果、ホモ接合型マウスにおいて、ジストニアに特徴的な波形を確認す

ることができた。さらに、神経組織学的な解析を行ったところ、後根神経節の変性、および、感覚神経におけるニューロフィラメントの異常な蓄積など、自然発生ミュータントの *dystonia musculorum* マウスで報告されているものと同様の組織異常が観察された。

今後は、我々の作製した新規 *dystonin* 遺伝子変異マウスの中樞神経系について、生理学的・組織学的な解析を進め、感覚神経の異常からジストニア発症までの間に起こる現象を明らかにして、本モデルマウスにおけるジストニアの発症機序や責任脳回路を明らかにしていく予定である。

10. 電気刺激法を用いた運動野ネットワークの解析

星 英司（東京都医学総合研究所）

知見聡美，南部 篤（生体システム研究部門）

人を初めとする霊長類前頭葉には複数の運動関連領域がある。運動課題遂行中の動物の前頭葉から記録された神経細胞活動を解析することによって、運動の準備や実行における各運動関連領域の機能的役割については解明されつつある。しかしながら、各領域の情報が統合されて最終的な運動出力となるメカニズムについては、極めて重要であるにもかかわらず、依然として未解明の問題として残されている。そこで、この問題を解決するための技術開発を目指して本研究を実施した。

まず、一次運動野（M1）、運動前野（PM）、補足運動野（SMA）に電極を刺入し、微小電気刺激法を用いて体部位再現を同定した。続いて、SMAとPMの上肢領域に刺激電極を、M1の上肢領域に多点電極を刺入した。

本年度は以下に記す技術的進歩が得られた。1）SMAとPMを、個別に、同時に、あるいは、時間差をもって順番に刺激しながら、それに伴うM1のLFPとスパイク

活動を全層性に多点同時記録することに成功した。2）LFPについては、current source density analysis で source と sink を同定することによって、M1の各層のシナプス活動の変化をミリ秒の精度で同定することに成功した。3）スパイクについては、電気刺激によって誘発されるM1局所内でのスパイク伝播をヒストグラムや相互相関解析を用いて捉えることに成功した。さらに、4）SMAとPMへ与える刺激のタイミングの変化に伴うM1のLFPとスパイク活動の変化を解析することにより、これらの領域がダイナミックな相互作用を与え合っている実態を明らかにすることに成功した。

こうして確立された実験・解析手法を用いることにより、今後、SMAやPMなどのM1へ入力する各脳部位の演算結果がM1において統合されるメカニズムの解明につながることが期待される。

11. 辺縁皮質刺激に対する大脳基底核ニューロン応答

佐藤澄人 (北里大学医学部 脳神経外科)

知見聡美, 南部 篤 (生体システム研究部門)

大脳皮質－大脳基底核－視床－大脳皮質回路は並列した 3 系統のループ (運動系, 連合系, 辺縁系) に分かれており, それぞれハイパー直接路, 直接路, 間接路が働いていると考えられている。本研究は辺縁系ループの構造と機能を明らかにすることを目的に, ニホンザルを用いて覚醒下に視床下核ニューロンの細胞外ユニット記録を行い, ①一次運動野, ②補足運動野, ③前辺縁皮質の電気刺激に対する応答, 自発発射, および視床下核内における機能分布について検討した。

2 頭のニホンザルの 3 半球で調べ, 計 190 個の視床下核ニューロンを記録した。一次運動野, 補足運動野, 前辺縁皮質の刺激に応答するニューロンはそれぞれ, 47 個, 36 個, 50 個で, うち 17 個は一次運動野と補足運動野の両者に応答した。前辺縁皮質と運動系皮質との収束性入力は見られなかった。残りの 77 個のニューロンはいずれの皮質刺激にも応答しなかった。

各皮質刺激に対する応答は, いずれも早期興奮・後期

興奮の二相性パターンを示し, 潜時および持続時間は, 一次運動野, 補足運動野, 前辺縁皮質の刺激の順に長くなる傾向 (潜時は有意差あり) がみられた。各皮質刺激に応答する 3 群といずれにも応答しない群と合わせた 4 群間において, 自発発射の平均発射頻度, 変動係数, burst index に有意差は認めなかった。

視床下核内における各皮質刺激に応答するニューロンの分布は, 一次運動野が外側部, 前辺縁皮質が最内側部, 補足運動野がその中間部にそれぞれ位置していた。

本研究の結果, 視床下核における辺縁系ループに関わるニューロンは最内側に存在し, 大脳皮質刺激に対して運動系ループと同様の二相性の反応パターンを示すことが明らかとなった。すなわち, 早期興奮はハイパー直接路, 後期興奮は間接路を介するものと考えられる。一方, その反応の潜時と持続時間は運動系に比べて長く, 情報の処理速度は遅いことが示唆された。

12. 大脳皮質第 6 層ニューロンの局所結合解析

荏部冬紀 (同志社大学 高等研究教育機構)

藤山文乃 (同志社大学大学院 脳科学研究科)

重松直樹 (熊本大学大学院 生命科学研究部)

哺乳類の大脳新皮質は層構造を持ち, 統合された出力情報は, 主に第 5 層 (L5) と第 6 層 (L6) の錐体細胞によって皮質下へ送られる。前年度に, ラット二次運動野 (M2) の L6 では, 視床投射細胞 (CTh) と対側皮質投射細胞 (COM) が主要な投射細胞であることを示した。これまでの報告では, L6 細胞の興奮性局所結合は極めて低い確率であるとされているが, その出力情報がどのようにして形成されているかを明らかにするためにはより詳細な研究が必要である。

そのために本年度は以下のような実験を行った。

1. 既報では L6 細胞には pcp4 と preproCCK の発現パターンが異なる集団が存在することが報告さ

れている。M2 における L6CTh/L6COM について, 免疫組織化学法によりこの点を検討した。

2. M2 を含むスライス標本を作製し, ホールセル細胞内記録によって膜特性を観察した。
3. ホールセルによる二細胞同時記録を用いて, 両タイプにおける神経結合について観察した
4. これまでに, L5 - L6 細胞間での興奮性結合があることが報告されている。グルタミン酸による単一細胞刺激法により, L5 から L6COM/L6CTh への興奮性入力について観察した。

以上の実験から, L6CTh と L6COM は, 電気生理学・

物質発現・投射の面から異なる細胞タイプであり、また、層内・層間の興奮性入力から見ても異なることを示唆する結果を得た。今後、これらの違いが M2 の局所回路や

皮質外への情報伝達にどのように関わるかを明らかにしたい。

13. 遺伝子改変動物を利用した抑制性ニューロンの特性についての研究

柳川右千夫（群馬大学大学院医学系研究科）

小脳は運動活動の統合や平衡の保持に加え、認知や情動に関与していることが知られている。プルキンエ細胞は小脳皮質の投射ニューロンであり、小脳の機能において重要な役割を果たしている。プルキンエ細胞は、代表的な抑制性ニューロンの GABA ニューロンである。GABA は、グルタミン酸脱炭酸酵素によって合成され、小胞型 GABA トランスポーター（VGAT）によってシナプス小胞内に蓄積される。我々は、VGAT 完全型ノックアウトマウスを作製、解析した。その結果、口蓋裂、臍帯ヘルニア、呼吸不全を呈し、出生日にすべて死亡することを観察し、出生後の VGAT の役割や機能については探究することができなかった。そこで、プルキンエ細胞における VGAT の役割を明らかにするために、VGAT 条件付きノックアウトマウス（VGAT-flox マウス）とプルキンエ細胞特異的に Cre recombinase が発現する L7-Cre ノックインマウスとを交配し、プルキンエ細胞特異的 VGAT ノックアウトマウス（L7-VGAT マウス）を作製した。最初に、VGAT とカルビンディンの各プローブを用いた 2 重 in situ hybridization 法で L7-VGAT マウスを解析

した結果、プルキンエ細胞における VGAT の発現が生後 2 週齢で約 40% 消失、40 週齢でほぼ 100% 消失することを観察した。そこで、生後 40 週齢の L7-VGAT マウスの運動機能についてコントロールマウスと比較検討した結果、ロータロッドテスト、フットプリントテストで、障害が観察された。一方、小脳の形態学的特徴について、L7-VGAT マウスとコントロールマウスとを比較検討した結果、分子層と顆粒細胞層のそれぞれの厚さ、プルキンエ細胞の密度などに違いがなかった。また、それぞれのマウス小脳核におけるプルキンエ細胞とのシナプス関連分子についてパルブアルブミン、ゲフィリン、GABA-A 受容体の発現を免疫染色で検討した結果、違いがなかった。以上の結果は、L7-VGAT マウスはプルキンエ細胞の変性が認められず運動失調を呈することを示唆する。運動失調モデルマウスは多数知られているが、プルキンエ細胞の脱落や変性を伴わないマウスは限られている。L7-VGAT マウスは、認知機能や情動におけるプルキンエ細胞の役割を知る上でも有用なモデルマウスになることが期待される。

14. 室傍核における Nesfatin-1 からオキシトシン・CRH 神経へのシグナル伝達機構の解明

矢田俊彦（自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門）

前島裕子（自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門）

摂食統合中枢の室傍核(PVN)内で Nesfatin-1→オキシトシン/CRH 神経経路の重要な役割が示唆されているが、Nesfatin-1 受容体が未同定であることから、その細胞内情報伝達は未解明である。そこで本研究では、Nesfatin-1 が PVN において活性化するニューロン種、および内因性 PVN Nesfatin-1 の情報を受け取る神経ペプチドの同定を

目的とした。Nesfatin-1 100 pmol を第 3 脳室に投与すると、PVN に有意な c-Fos タンパクの発現増加が見られた。これら c-Fos タンパクを発現しているニューロンを同定するために、オキシトシン(Oxt)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)およびバソプレッシン(AVP)と c-Fos の二重免疫染色を行った。Nesfatin-1 脳室内投与により

c-Fos タンパク発現頻度が有意に増加したのはオキシトシンニューロンであり, PVN の Oxt ニューロンの 16% に c-Fos タンパクが発現した。一方 CRH, AVP ニューロンにおいては増加傾向のみであった。さらに PVN において shRNA を用いて Nesfatin-1 のプロホルモン NUCB2 の mRNA の発現を約半分にノックダウンしたところ, Oxt mRNA 発現が著明に低下しており, 摂食量の亢進が見られた。一方 CRH や AVP mRNA の発現に有意な変化はな

かった。

以上の結果から, PVN において Nesfatin-1 は Oxt の発現を調節し, これを介して摂食を調節していることが明らかになった。一方, CRH や AVP の発現調節には Nesfatin-1 の関与は少ない。PVN の Nesfatin-1→Oxt 神経シグナル伝達は摂食調節に重要な役割を持つと考えられる。

15. 中枢神経における TRPV チャネルの局在と機能解析

宮田清司, 吉田亜矢加, 古部瑛莉子, 萬成哲也 (京都工芸繊維大学大学院・応用生物学部門)

高山靖規, 橋高裕貴, 富永真琴 (自然科学研究機構・生理学研究所・細胞生理研究部門)

Transient receptor potential (TRP) チャネルは, 温度・化学物質・物理的刺激を受容する感覚受容体であるとともに, 刺激を受けるとカルシウムイオンなどのイオンを透過させることで情報伝達を担うことが知られている。昨年度の本共同研究において, TRPV1 が血液関門を欠く脳室周囲器官のアストロサイトに特異的に存在し, TRPV1 agonist の静脈内および脳室内投与によりアストロサイトに Fos 発現を誘導することを報告した (Glia 2013)。本年度は, 脳室周囲器官のアストロサイト TRPV1 が発熱などの体温調節機構に関与することを明らかにすることを目的とした。

TRPV1 KO マウスを用いて, グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分でパイロジェンである lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内および脳室内投与しても, 脳室周囲器官アストロサイトに誘導される STAT3 核凝集が生じないことが明らかになった。さらに, 野生型マウスで生じる, LPS の脳室内投与による体温上昇が, TRPV1 KO マウスでは全く生じないことがわかった。さらに, 末梢 LPS 投

与によりアストロサイトに誘導される STAT3 核凝集は, 高張食塩水を腹腔内投与すると阻害されることも明らかになった。

次に, TRPV1 agonist である resiniferatoxin (RTX) を野生型マウスに脳室内投与すると, 脳室周囲器官アストロサイトに STAT3 核凝集を誘導し, 顕著な体温低下を引き起こした。しかし, STAT3 核凝集と体温低下は, TRPV1 KO マウスでは全く生じなかった。

以上の結果より, 脳室周囲器官アストロサイトに存在する TRPV1 は, 脳の炎症反応情報伝達経路において, 情報の検知・伝達に重要な役割を担っていることが明らかになった。また, TRPV1 による体温調節は, LPS 刺激による発熱時においては, 発熱維持に働くが TRPV1 単独の活性化は体温低下を生じ逆の作用を持つことが明らかになった。これは, アストロサイト内の情報伝達シグナリングによる TRPV1 分子のリン酸化などの修飾状態により, TRPV1 の発熱における機能が大きく変化することが推測される。

16. 霊長類味覚に対する TRP チャネルの役割

鈴木南美, 西栄美子, 伊藤聡美, 筒井 圭, 今井啓雄 (京都大学霊長類研究所)

斎藤 茂, 富永真琴 (自然科学研究機構生理学研究所)

本研究では霊長類の味覚に対する TRP チャネルの役割を検討する。平成 25 年度は以下の実験と考察を行った。

我々は苦味に対する霊長類の味覚応答を中心に研究を行っている。二瓶法を用いたニホンザルの行動実験の結

果、特定の苦味 (Phenylthiocarbamide, 以下 PTC) に対する受容体 (TAS2R38) を遺伝的に欠損した個体でも、高濃度の PTC に対して忌避反応を示すことがわかった。当初は、他の苦味受容体や嗅覚受容体がこの忌避反応に関与する可能性を考えていたが、富永教授・斎藤特任助教により、TRP チャンネルが関わっている可能性を示唆され、ニホンザルの TRP チャンネルが PTC 受容に関わっている可能性を検討した。

ニホンザルの舌から調製した total RNA より TRPA1 チャンネル complementary DNA をクローニングし、アフリカツメガエル卵母細胞用の発現ベクター (pOX+) に組み込んだ。このベクターを基に生理学研究所で in vitro

transcription により complementary RNA を作製し、それを卵母細胞に注入してタンパク質を強制発現させた。数日後に、電位固定法で様々なリガンドに対する応答を計測したところ、PTC に対しても反応する卵母細胞が複数観察された。この反応の大きさは用量依存的であることから、ニホンザルの TRPA1 チャンネルは PTC に応答することが示された。しかし、卵母細胞での応答に必要な用量は、行動実験での二瓶選択に必要な用量とは完全に一致しなかった。今後さらに培養細胞での応答も検討しながら、ニホンザルの PTC 応答に対する TRP チャンネルの影響を検討していきたい。

17. 内臓機械痛覚過敏における TRP チャンネルの機能解析と機能性胃腸疾患病態との関連

杉山敏郎, 三原 弘, 山脇秀元 (富山大学医学薬学研究部第三内科講座)

富永真琴 (生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

申請者らは、これまで消化管における TRP チャンネルファミリーの分布と機能解析を進め、小腸、胃の TRPV2 が消化管弛緩運動に関わっており、適応性弛緩異常が中心病態である機能性ディスペプシアの病態関連分子であり、新規創薬への道が開かれる可能性が高いこと等を明らかにしてきた。この検討過程で病態と治療法が全く確立していない非ステロイド系鎮痛剤 (NSAIDs) による小腸潰瘍病態に小腸 TRP チャンネルが関連する可能性が判明、本研究では NSAIDs による小腸潰瘍病態における小腸 TRP チャンネル解析を進め、小腸 NSAIDs の新規予防薬開発への道を切り拓くことを目的とした。

NSAIDs は細胞膜構成成分であるアラキドン酸代謝に関与し、プロスタグランジン経路の律速酵素である cyclooxygenase-1 (COX1) および cyclooxygenase-2 (COX2) を阻害する。そのために、他のアラキドン酸代謝経路のチトクローム p450 経路が相対的に活性化される。チトクローム p450 経路の代謝産物である 5, 6-EET は TRPV4 を活性化することが報告されており、この経路を介して、NSAIDs 小腸潰瘍病態が惹起されている可能性が推定される。そこで、マウス、ラットおよびヒト小腸上皮にお

ける TRPV4 遺伝子および蛋白発現を検討し、小腸上皮細胞の基底膜側に局在することが確認された。さらに TRPV4 を発現しているラット小腸上皮細胞株 (IEC-6) を用いて TRPV4 機能をカルシウムイメージ法にて確認、TRPV4 は機能的であることも確認した。次いで、IEC-6 単層細胞系での細胞透過性の検討を経上皮電気抵抗測定法 (TER) で評価した。その結果、代表的 NSAIDs であるインドメタシン処理で細胞透過性が亢進、さらに、その亢進は、5, 6-EET を介した TRPV4 活性化に起因することを明らかにした。野生型マウスに比較して TRPV4 欠損マウスではインドメタシン誘発小腸潰瘍が抑制されることも確認された。NSAIDs 小腸潰瘍は広範スペクトラム抗生剤処理により抑制されることが知られているが、細菌あるいは細菌由来炎症起因子の小腸組織内侵入が潰瘍形成の初期トリガーであり、本研究により、NSAIDs 投与は TRPV4 活性化を介して細胞膜透過性を亢進させ、腸内細菌由来炎症起因子が組織内に侵入、炎症が惹起され、組織傷害が進行、小腸潰瘍形成に至る機序が強く推定される (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 307: 33-40, 2014)。

18. 温度感受性 TRP チャネルに対する天然由来の新規作用成分の探索

寺田祐子, 渡辺達夫 (静岡県立大学食品栄養科学部)

内田邦敏, 富永真琴 (自然科学研究機構生理学研究所)

本研究では, 天然物, 特にアジアやアフリカで伝統的に用いられている薬草類に注目して, 温度感受性 TRP チャネルに対する新規の作用成分の探索を大目標としている。

我々は, TRP チャネルを強制発現させた細胞及び, 生体内で TRP チャネルを高発現している神経を用い, 96 穴プレートを用いる cell-based assay によるスクリーニングによって, アフリカの伝承薬 *Voacanga africana* の根皮由来のアルカロイドである, voacangine が TRPV1, TRPM8 に対してアンタゴニスト, TRPA1 に対してアゴニスト活性を持つこと, ならびに TRPV2, TRPV3 には作用しないことを見出した。さらに, 蛍光顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法とパッチクランプ法により, voacangine の化学物質・温度刺激・pH など, 様々な TRPM8 チャネル活性化刺激に対する阻害特性の詳細な解析を行った。

TRPM8 は, menthol, icilin などの冷涼感を引き起こす化学物質や, 28℃以下の低温で活性化する受容体である。voacangine の menthol, icilin, 低温に対する阻害作用をおもにパッチクランプにて調べた結果, voacangine は化学アゴニストである menthol, icilin を強力に阻害したが, 低温による TRPM8 の活性化は阻害しなかった。このことから, voacangine は化学アゴニストを選択的に阻害する特性を持つことがわかった。これまでに stimulus-selective (阻害する刺激に選択性がある) TRPM8 アンタゴニストの報告は全くなく, voacangine が初めてである。voacangine は低温による TRPM8 の活性化を阻害しないことから, TRPM8 遮断薬の副作用である低体温を引き起こさない可能性があり, TRPM8 遮断薬の優れたシード化合物になり得ることが分かった。

なお, 本研究の成果は, *Journal of Natural Products*, vol. 77, 285-297 (2014) に掲載された。

19. 温度感受性 TRP チャネルの活性化機構の解析と機能的役割

太田利男, 中塚一将, 高橋賢次 (鳥取大学・農学部)

齋藤 茂, Rupali Gupta, 富永真琴 (生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) は主に知覚神経に発現している非選択的陽イオンチャネルあり, 多くの刺激性化学物質や物理的刺激により活性化されるため, TRPV1 と共に侵害受容チャネルとしての機能的な重要性が指摘されている。それ故, TRPA1 は末梢性鎮痛薬のターゲット分子として着目され, 現在までに多くの遮断薬が開発されている。しかし, それら遮断薬における抑制作用の分子基盤については, 未だに十分に明らかにされていない。我々はこれまで, 本共同研究を通して薬物感受性における種間差を利用し, TRPV1 における作動薬感受性アミノ酸領域を明らかにしている。本研究では, 近年我々が遺伝子クローニングしたニシツメカエル *Xenopus tropicalis* TRPA1 (xtTRPA1) とヒト及びマウス TRPA1 に対する遮断薬の作用を比較することにより, そ

の遮断作用に関与する分子基盤について検討した。

異所性発現させた xtTRPA1 及び単離した背根神経節 (DRG) ニューロンを用いて, TRPA1 チャネル活性を蛍光イメージング法による Ca 濃度変化として計測した。また, アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて膜電位固定法による膜電流測定も行った。XtTRPA1 発現 HEK293 細胞において, 共有結合性 TRPA1 アゴニストの cinnamaldehyde によるチャネル活性化作用は非選択的 TRP 遮断薬 (Ruthenium Red) により抑制されたが, 選択的 TRPA1 遮断薬である AP18, A967079 及び HC030031 では抑制されなかった。非共有結合性アゴニストである carvacrol による TRPA1 活性に対しても, これら遮断薬は抑制作用を示さなかった。これに対して, AP18, A967079 及び HC030031 はヒト及びマウス TRPA1 発現細胞に対し

て強い抑制作用を示した。同様な TRPA1 遮断薬に対する感受性は単離した DRG ニューロン及び卵母細胞発現系でも観察された。ヒト、マウス及びカエル TRPA1 のアミノ酸比較により候補アミノ酸を検索し、チャネル遺伝子変異体を作成後、発現機能解析を行った。その結果、TRPA1 チャネルの第 5 膜貫通領域の二つのセリン残基が AP18 及び A967079 感知部位として重要であることが

分かった。一方、これらのアミノ酸は HC030031 に対する認識部位としては機能していなかった。

以上の成績より、薬物感受性における種間差を利用することにより TRPA1 チャネル遮断薬の作用点が明らかになり、TRPA1 をターゲットにした新規鎮痛薬の開発における基礎的知見を得ることが出来た。

20. ラットヒゲにおける一次感覚ニューロンの機能形態の同時追究

榎原智美, 外村宗達, 黒田大地, 熊本賢三 (明治国際医療大学・解剖学教室)

古江秀昌, 歌 大介, 井本敬二 (神経シグナル部門)

一次体性感覚ニューロンは偽単極性ニューロンで細胞体は神経節に存在する。本研究ではラット三叉神経節細胞体から *in vivo* 細胞内電位記録を行い、また、記録細胞の標識を併せて行い、一次体性感覚ニューロンの応答・発火特性と中枢や末梢の形態との関係を明らかにした。

標識に成功したニューロン 21 例のうち 7 例は、ラット顔面部のヒゲ洞毛の毛包で棍棒状終末 club-like ending を呈した。全てのニューロンはヒゲのたわみによって反応し、そのヒゲ洞毛の毛包に終末していた。また、club-like endings (n=7) は、Merkel endings を含むその他の終末 (n=14) に比べ、活動電位の持続時間 action potential duration およびその半値幅が著しく短かった ($p<0.02$)。

また、5 つの club-like endings の末梢軸索は、細胞体から枝分かれすることなく受容部の洞毛に到達し単独の短い棍棒状に終末した。他の 2 例は洞毛のカプセル内で二分し、それぞれの先端に一つずつ終末を呈した。一方、全ての中軸索は多数の側枝を三叉神経核に伸ばしていた。

次いで、連続 semi-thin 切片を再構築し末梢を観察したところ、約 50 の club-like endings が、毛軸に平行に帯状に整列していた。そこは、洞毛にひとつある馬蹄形の輪状塊という特殊な構造物の上皮生毛包への付着部に相当した。電顕で観察すると、club-like endings は上皮性毛包の硝子膜とはわずかに隔てられ、背面は輪状塊から起こる弾性線維と密接していた。

今までの研究では 1 洞毛に進入する軸索は約 150 と報告されている (Rice et al., 1986)。本研究では 1 軸索すなわち 1 ニューロンが 1 (まれに 2) 終末を呈する、即ち 1 洞毛の約 1/3 の軸索が輪状塊の限られた領域に分布し、この情報を三叉神経核の広い領域に投射することが示された。短い半値幅を呈する club-like endings は動きの変化に特に敏感であると推測される。非常にシンプルな構造を呈するこのシステムから得られた成果は、モデル化やシミュレーションにも有用であり、今後、皮膚の動きを一次感覚ニューロンが如何に符号化するか、さらに研究を遂行する必要がある。

21. 人工神経代替装置によるニューロリハビリテーション法の開発

小宮山伴与志, 大塚裕之 (千葉大学)

宇川義一, 門脇 傑 (福島県立医科大学)

鈴木伸弥 (東京学芸大学)

吉田 晋 (千葉県立保健医療大学)

村山尊司, 川上貴弘 (千葉リハビリテーションセンター)

笹田周作, 加藤健治, 西村幸男 (生理学研究所・認知行動発達機構研究部門)

本申請では日常生活下で非侵襲的に記録された生体情報に依存した電気刺激を末梢神経に施すことによって、脳梗塞や脊髄損傷患者への歩行障害回復のためのニューロリハビリテーション法の開発を目的としている。

歩行中の下肢運動は股関節、膝関節そして足関節の屈曲伸張が協調的に繰り返される。この協調的な関節運動により、足部は身体上前方に振り出される遊脚相と身体後方に体重を支えながら蹴り出す立脚相を繰り返す。この運動パターンは足底部への感覚入力により修飾される事が四足歩動物を用いた研究により明らかにされてきた。そこで、昨年度に引き続き健康成人被験者を用いて、歩行運動中の足底部へ歩行運動位相に依存した電気刺激を

施すことにより人工的な足底の感覚入力を作り出し、歩行運動を促進しうるかを検討した。

足底への刺激は、随意的な歩行中の足部運動位相を遊脚相あるいは立脚相に分け、どちらかの運動位相で与えた。

遊脚相で刺激をすると股関節及び膝関節屈曲が生じ、脚の振り出しが促進された。一方、立脚相での刺激では被験者間で共通した傾向が観られなかった。これらの結果は歩行中の遊脚相における足底へ感覚入力は足の振り出しを促進し、歩行障害を持つ患者さんの歩行機能を改善しうる可能性を持つ。

22. ゼブラフィッシュを用いた脳脊髄神経細胞の発生・機能回路構築の生理学的・分子生物学的研究

小田洋一 (名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻)

東島眞一 (自然科学研究機構生理学研究所時系列生命現象研究部門)

神経細胞はさまざまな興奮性を持ち、それにしたがって活動電位の時系列として情報をコードする。その興奮性には電位感受性イオンチャネルが大きく寄与する。硬骨魚後脳に存在するマウスナー (M) 細胞は一对の巨大な網様体脊髄路ニューロンであり、脱分極の開始時に一発の活動電位を発生してすばやい逃避運動を駆動する (Zottoli, 1977, Kohashi and Oda, 2008)。対照的に、M 細胞と同時期に隣り合う後脳分節に分化し、共通の形態学的特徴をもつ分節間相同ニューロン (MiD2cm, MiD3cm) は脱分極の大きさを反映して連続的に発火する (Nakayama and Oda, 2004)。本研究ではゼブラフィッシュ胚および仔魚の M 細胞とその分節間相同ニューロンを対象として電気生理学的、薬理学的、分子生物学的手法

を駆使し、神経細胞の単発発火特性の獲得過程および分子メカニズムを調べた。

まずゼブラフィッシュの発達過程で M 細胞がどのような発火パターンを示すのかを調べた。受精後 1-2 日胚の M 細胞は脱分極電流を注入すると、他の相同ニューロンと同じように電流量に比例した頻度で活動電位を発生した。ところが、受精後 3 日仔魚では過渡的に発火し、4 日仔魚では脱分極の開始時に 1 回だけ活動電位を発生する単発発火特性が獲得された。この発達過程に一致して低閾値型電位依存性カリウムチャネルの阻害剤デンドロトキシン (DTX) I 感受性のカリウム電流量が増加した。

DTX 投与によって本来単発発火する M 細胞の発火回数は増加した。さらに、低閾値型電位依存性カリウムチャ

ネルサブユニット mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べ、DTX 感受性 Kv1 チャンネル α サブユニットのなかで *zKv1.1a* (*kcnab1a*) のみが M 細胞に発現することを示した。しかし予想外にも *zKv1.1a* は連続発火する MiD2cm, MiD3cm 細胞や、受精後 2 日の M 細胞にも発現していた。一方、Kv チャンネルのはたらきを修飾する β サブユニットのうち *zKv β 2b* (*kcnab2b*) だけが単発発火を示す受精後 5 日仔魚の M 細胞に特異的に発現し、連続発火する受精後 2 日の M 細胞や MiD2cm, MiD3cm 細胞には発現しないことを見出した。

さらに、アフリカツメガエル卵母細胞による再構成系を用いて、*zKv1.1a* が低閾値型電位依存性カリウムチャンネルとして機能し、*zKv β 2b* と共発現させると電流量が増加することを明らかにした。

最後に、*zKv β 2b* をノックダウンした個体では M 細胞が連続発火することを示した。

これらの結果から Kv β 2 サブユニットと Kv1.1 α サブユニットとの共発現が M 細胞の単発発火特性の獲得に極めて重要であると結論した (Watanabe *et al.*, *J. Neurophysiol.*, 2014)。

23. ゼブラフィッシュを用いたセロトニン神経回路の生理学的・分子生物学的研究

前川真吾, 細川 浩 (京都大学大学院情報学研究科)

東島眞一

セロトニン作動性神経は精神疾患から睡眠, 運動, 呼吸といった生命活動に至るまで, 生物の行動に広く影響を与えることが知られているが, 運動や行動におけるセロトニン作動性神経の役割については未知な点が多い。本研究ではゼブラフィッシュをモデルとして, セロトニン作動性神経回路の運動や行動における生理学的な役割の解明を目的とした。

昨年度の研究により, *tph2* 遺伝子のプロモーター・エンハンサーを用いて, ゼブラフィッシュセロトニン作動

性神経特異的に GFP およびチャンネルロドプシンを発現させた系統を作出した。GFP を発現させた系統を用いて後部縫線核から脊髄へ投射する神経線維の解剖学的解析を行った。またチャンネルロドプシンを発現する系統に青色の光刺激を与えた結果, 光刺激に応じてスパイクを誘発できることが分かった。この系統を用いて, 非侵襲的かつ人為的にセロトニン作動性神経の活動を制御し, その際のゼブラフィッシュの行動変化を解析する予定である。

24. 動物実験人道的エンドポイント構築のためのエビデンス集積

小木曾昇 (国立長寿医療研究センター・実験動物管理室)

木村 透 (自然科学研究機構 動物実験センター)

動物実験人道的エンドポイントを構築することを目的として, 注射麻酔と吸入麻酔の比較, 胚移植等の外科処置による影響 (妊娠, 出産, 離乳まで), 麻酔の種類と外科的処置による影響, 行動実験装置 (水迷路実験) を用いた水温による影響等を調べることにした。今年度は, 第一歩として飼育環境 (温・湿度, 照度) の変化による

影響をストレスとしての観点から測定した。飼育環境を室温 17℃にしたときの酸化ストレスを測定したが, d-ROMs および BAP 成分の検査成績に大きな変化が生じなかった。予想とは異なり, さらに低温暴露しなければ, これらのストレスマーカーは変化しないことがわかった。

25. 唾液腺タイト結合タンパク質の翻訳後修飾による機能制御

杉谷博士 (日本大学・生物資源科学部・獣医生化学研究室)

橋本貞充 (東京歯科大学・生物学講座)

佐藤慶太郎, 瀬尾芳輝 (獨協医科大学・生理学講座)

石川 透 (帯広畜産大学・基礎獣医学研究部門)

福島美和子 (日本大学・松戸歯学部・生理学講座)

成田貴則, 松浦幸子 (日本大学・生物資源科学部・獣医生化学研究室)

村上政隆 (自然科学研究機構・生理学研究所)

唾液腺における水やイオン分泌は、腺房部での基底側から腺腔側への水・イオン輸送が関与する。この輸送は、腺房細胞内を経由する傍細胞輸送系と、細胞間を経由する傍細胞輸送系とで制御される。傍細胞輸送系制御にはタイト結合タンパク質が機能すると考えられる。傍細胞輸送系の検討にはラット顎下腺灌流標本を用い、灌流液に細胞膜非透過性蛍光色素 (ルシファーイエロー) を添加し、分泌刺激の後の分泌液中の蛍光色素を測定することにより、血管から分泌液への蛍光色素移行を定量する方法が有効と考えられた。分泌刺激薬として臨床的にも広く用いられているピロカルピンによる唾液分泌について検討を行った。灌流顎下腺において、ピロカルピンは用量依存的に唾液分泌を促進したが、特徴ある分泌パターンを示した。すなわち、刺激直後の一過性ピークを持つ分泌とそれに続く持続的な分泌、さらに刺激を停止した後も持続した唾液分泌が認められた。高濃度のピロカルピン刺激では、刺激中よりも刺激後の分泌が促進された。この状態の腺房細胞には形態的な変化もなく、

また、水チャネルの 1 つであるアクアポリン 5 (AQP5) の局在にも変化は認められなかったことから、細胞障害によるものではないことが考えられた。ピロカルピン刺激後に M3 アンタゴニスト処理を行うと刺激後の分泌は認められなかった。灌流液中のカルシウムイオンを除去するとピロカルピンによる唾液分泌は抑制された。ピロカルピン刺激時における細胞内カルシウムイオン動態や酸素消費量においても唾液分泌にリンクした持続反応が認められた。ルシファーイエローを灌流することによる傍細胞系輸送系へのピロカルピンの効果においても、分泌にリンクした反応が認められた。これらのことから、M3 受容体刺激による一連の細胞内シグナルが傍細胞輸送系機能と共役していることが示唆された。一方で、細胞実験により、唾液腺腺房細胞機能の減弱とタイト結合タンパク質のクローディン 3 の発現低下の関連が示唆されていることから、翻訳後制御は未だ明らかではないが、クローディン 3 の唾液腺傍細胞輸送系への関与が考えられる。

26. TRPV4 活性化に伴う海馬からの ATP 放出機構とその生理学的意義の解明

柴崎貢志 (群馬大学大学院医学系研究科分子細胞生物学分野)

関野祐子 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

稲村直子, 池田一裕 (生理学研究所分子神経生理部門)

中枢神経系には神経細胞だけでなく、神経細胞の数倍のグリア細胞が存在する。特に、アストロサイトは神経細胞と機能連関していると想定され、近年の研究で積極的に神経情報伝達に貢献することがわかってきた。しかしながら、グリア細胞を用いた研究の進展は、神経研究に比べるとまだまだ発達段階にあり、グリア細胞の機能

解析・分子レベルの研究の推進が急務である。そして、神経細胞とグリア細胞の研究成果が融合してこそ、脳機能を制御する分子メカニズムの実体を明らかとすることが出来る。

アストロサイトが放出する重要なグリオトランスミッターとして ATP が同定されている。しかし、どのような

アストロサイトが ATP を放出するのか？あるいは、どのようなタイムコースで放出が行われるのかは全く不明である。生理学研究所（池中一裕教授の研究室）には、ATP イメージングを可能とする超高感度画像取得システムが生理学研究所共同利用機器として導入され、リアルタイム ATP イメージングが行われている。

我々は培養アストロサイトとマウス海馬スライス標本からの ATP 放出リアルタイムイメージングを行った。柴崎・稲村・池中は、2 種類の TRPV4 特異的な化学リガンド投与に対して生じる 10%のアストロサイトからの ATP 放出が、野生型の標本でのみ認められ、TRPV4KO 標本ではこの現象が認められないことを示した。つまり、海馬において TRPV4 活性化依存的に 1 部のアストロサイトから ATP 放出が惹起されることを明らかにした

（Shibasaki et al. J. Biol. Chem. 印刷中）。また、柴崎・稲村・池中は、TRPV4 活性化→VNUT 含有小胞への放出シグナルというカスケードを経てアストロサイトの ATP 放出が引き起こされることも見いだした（投稿準備中）。関野は、海馬スライス標本にグルタミン酸を投与した際に特定細胞から ATP 放出が認められることを見いだしている。最近、アストロサイト由来の ATP 放出が減弱し、これが鬱病発症の引き金となっている可能性が見いだされた。我々は、海馬内においてどのアストロサイトがどのような刺激に応答してどのようなシグナリングカスケードによって ATP 放出を引き起こすのか詳細に調べており、脳内に存在する新たなグリアアセンブリが明らかに出来る。そして、その知見に着目することで、今後の臨床研究への応用が見込まれる。

27. 脊髄損傷前後の手指巧緻運動中の脳活動の解析

小池康晴，辛 徳，神原裕行，陳 超（東京工業大学）

梅田達也（横浜市立大学）

森本 淳（ATR 脳情報研究所）

伊佐 正，渡辺秀典，加藤健治（生理学研究所・認知行動発達機構研究部門）

霊長類の脊髄損傷後の手指巧緻運動中の回復は脊髄神経回路の機能代償が関与していることが知られている。しかし運動機能回復時において大脳皮質などの上位中枢神経はどのような変化を起こして機能を改善させているかについては不明な点が多い。本研究では脳損傷モデル動物としてサルを用いて、脊髄損傷における手指巧緻運動の回復過程において、中枢神経系の神経活動の遷移を解析し、その作用機序を明らかにする事を目的とする。

脊髄損傷モデルの手術前後の脳活動を比較するために、脳活動から動きに関連した情報をデコーディングすることが重要となる。何故なら、脳の活動変化の中でも運動に関連した情報が、どのように変化するかを確認出来ることになるからである。そこで、ECoG 電極から運動情報を抽出するための信号処理及び、手先の位置や筋電図を推定するためのアルゴリズムの検討を行った。

まず、一次運動野の ECoG 信号を用いた手先の軌道を推定するため、2頭のサルの一次運動野から 15あるい

は 32 チャンネルの ECoG を用いて手先の軌道を推定した。そのなかでは、電極の位置や個数による推定精度の違いを詳細に調べ、中心溝に沿った電極が最も推定に寄与していること、さらに、電極の数を増やしても推定精度はその数に比例して高くなり、10 個程度の電極で最も高い精度を示すことを見いだした。特徴パラメータについても、デコーダの重みを解析することで、1.5 Hz ~4 Hz の δ 波と 90 Hz 以上の γ 波が重要な情報を含んでいることが示唆された。

また、一次運動野の ECoG 信号を用いた把持力を推定するため、2頭のサルの一次運動野から 15あるいは 16 チャンネルの ECoG を用いて把持力を推定した。把持力を力センサで計測することにより、把持力の大きさだけでなく、その時間的な変化も記録し、推定を行った。その結果、電極の位置や特徴パラメータについても手先の軌道推定と同様、90 Hz 以上の γ 波が重要な情報を含んでいることが示唆された。

28. 情報欠落のない新たな生物試料電子線トモグラフィー法の開発と応用

馬場則男 (工学院大学 情報学科 コンピュータ科学科)

馬場美鈴 (工学院大学 総合研究所 産学共同研究センター)

申請者が開発した、非線形離散濃度階調再構成法の実用化にあたって問題となる重要な点は、試料傾斜に伴う視野外の投影像の混入問題である。本年度はこの問題の解決に取り組んだ。一般の生物切片等では、試料傾斜角度が増すにつれ、それまでの角度では現れなかった視野が混入してくるため、再構成の基本理論から外れ本来は再構成不可能と扱われる。しかし、実際には、従来法の反復再構成法 SIRT などで、それぞれ独自の工夫によってうまく回避しているようである。(ちなみに、反復処理を伴わない FBP では実質の問題は起きない。) 申請者も SIRT で採用した、断層領域拡大方式を応用することとした。この方式は、 0° の視野がカバーする断層像領域を奥行方向(z)に直交する水平方向(x)に広げ(最大傾斜角度 $\theta_{\max}$ に対して、 $1/\cos(\theta_{\max})$ 倍にする)、広げた断層像範囲にも再構成することでその問題を回避する方法である。

0° 視野の断層像内だけで反復再構成しようとする、視野外の余計な投影像部分を取り除く必要があるが、これは原理的に不可能である。そこで、上述のような水平方向に広げた断層像領域で再構成を考える。広げた領域ではも

はや全ての投影像シリーズに対して方程式は立たず、広がり距離に従って成立する投影像の枚数は減っていく。しかし、それぞれの断層位置で、数値計算としては、投影線の幾何から、成立する傾斜角度範囲が決まり、方程式を立てることができる。すなわち、通常の(x-z)断層面が長方形であるのに対して、ここでは、水平方向に長く、両端から楔状の切れ目の入った、ある種歪んだ矩形形状となる。この方法によって、提案している非線形再構成法を行ったところ、予想通り 0° 視野の断層像内に関しては境界付近を除きほぼ視野外の問題が回避された。

次に、本離散濃度階調再構成では、量子化単位と呼ぶ微小点(大きさは画素)の移動によって再構成する特殊な方法が採られるが、この移動に関する収束条件として、その微小点の密度に対する閾値設定がある(孤立か集中か)。今回、シミュレーションの段階ではあるが、この閾値設定を動的に変化させることで、これまでより断層像の収束性、ロバスト性を向上できた。今後、実際の試料に応用し、最初に述べた視野外の問題解決と合わせて、本再構成の汎用化を達成する計画である。

29. 老化に伴う神経原線維変化形成機序に関する蛋白化学的研究

吉田裕孝 (独立行政法人国立長寿医療研究センター・NC 企業連携共同研究部 (エーザイ))

生化学的手法、細胞生物学手法を用いて大腸菌で発現したリコンビナント・タウ、培養細胞で発現したタウならびに脳マイクロダイアリシス法によりマウス脳から回収したタウ(神経細胞外のタウ)の分子動態について解析を行なった。

(1) 大腸菌発現リコンビナント・ヒトタウタンパク質の解析

大腸菌で発現し精製したリコンビナント・タウをヘパリン存在下あるいは非存在下で 37°C にて 48 時間インキュベート後、SDS 電気泳動およびネイティブ電気泳動に供し、CBB 染色によりゲル上の移動度、泳動パターンを観察した。SDS 電気泳動ゲル上ではヘパリン存在下あ

るいは非存在下で処理したタウの主要なバンドは 55kDa 付近にみられ、ヘパリン存在下で処理したタウはわずかながらゲルトップにも検出された。未変性状態のタウを解析した結果、ヘパリン存在下で処理したタウのほとんどはゲルトップに検出された。これに対し、ヘパリン非存在下で処理したタウは、単量体だけでなく複数のオリゴマーとしても検出された。

(2) ニューロブラストーマ SHSY5Y 細胞発現タウの解析

ヒトタウを発現するニューロブラストーマ SHSY5Y 細胞株を樹立し、これを本実験に使用した。細胞密度が 80% コンフルエント時に培養液(10%FBS を含む

DMEM-F12 培養液)の交換を行ない、24 時間後培養液を回収し、この培養上清より生化学的に精製したタウ画分を分析に供した。培養細胞は Triton X-100 (1%) を含む PBS で可溶化し、遠心後可溶性画分を回収し分析に供した。これらの試料を(1)と同様に解析した結果、SDS 電気泳動後イムノブロット法により、細胞抽出液のみならず細胞培養液からの画分にもタウが検出され、タウが細胞外に放出されることが確認された。さらに 未変性状態のタウを解析した結果、両画分に含まれるタウはともにオリゴマー状であることが明らかとなった。

(3)マウス脳マイクロダイアリス回収液中タウの解析
2, 3 および 27 ヶ月齢のマウスから脳マイクロダイアリス法により得られた回収液を(1), (2)の実験と同様の手法を用いて解析した。マウス脳マイクロダイアリス法により回収された神経細胞外液中のタウはオリゴマー状であること、タウ量は加齢とともに増加することが明らかとなった。

これらオリゴマー状タウの高次構造形態観察のため、生化学的精製を検討している。

30. DNA およびクロマチン高次構造の電子顕微鏡による解析

加藤幹男 (大阪府立大学高等教育推進部門)

村田和義 (生理学研究所)

DNA はその塩基配列と環境(超らせん, タンパク質の結合, イオン強度など)にしたがって多様な高次構造変化を惹き起こす。このような高次構造の動態を知ることには、長大なゲノム DNA の核内収納や特異的な遺伝子発現の調節機構の解明に重要である。DNA 高次構造の解析には、高分解能な電子顕微鏡観察が有効である。我々はこれまでに、単離された超らせん DNA 分子(プラスミド), 単離微小核内クロマチンの電子顕微鏡観察を進めてきたが、高次構造と DNA 配列を直接に対応づけることは困難であった。そこで、二重鎖 DNA を部分的に変性し、そこに標識オリゴ DNA 鎖を塩基対形成させることによって DNA 配列を位置づけ検出する方法を、JEM1010 電子顕微鏡を用いて検討した。

モデルとなる二重鎖 DNA (129bp) の一方の鎖をビオチン修飾したもの、およびそのビオチン化 5' 末端に相当する 5' ビオチン化オリゴ DNA を混合し、熱変性後に徐冷することで、二重鎖 DNA のビオチン化末端側にオリゴ DNA が侵入した鎖置換型構造の形成を試みた。この試料にストレプトアビジンを加えて、末端にストレプトアビジンが結合したモデル標識分子(標識された二重

鎖 DNA では、一方の末端に 2 個のストレプトアビジンが結合すると期待される)を調製し、酢酸ウラン染色後に検鏡した。

ストレプトアビジンのみを染色し観察すると、平均粒径 19.4nm (s.d.=4.4, n=45) の粒状構造が見られた。また、ストレプトアビジンと処理をしていない DNA では、平均長 40.3nm (s.d.=5.1, n=17) の構造が見られた。ストレプトアビジン処理を行ったモデル標識試料では、40~50nm 程度の鎖状構造の一方の端に 15~24nm 程度の粒状構造が 1 個または 2 個付加されているものが観察された。これらの結果は、二重鎖 DNA の一部の領域に一本鎖オリゴ DNA を配列依存に侵入させることによって標識し、領域を特定することが可能であることを示唆する。結合したストレプトアビジンの数(2 個)に基づき、電子顕微鏡観察によって鎖置換構造の形成を明確に判定できるので、さまざまな標識条件(標的 DNA 配列, オリゴ DNA 鎖長, 変性・再生条件など)において標識効率を検討し、超らせん DNA やクロマチンの構造解析に用いるとともに、二重鎖 DNA の融解・再対合の過程の解析にも役立つ。

31. 脳・神経系発生分化過程において時空間特異的な発現をする糖鎖の構造と機能の解析と医療への応用

等 誠司 (滋賀医科大学医学部)

辻 崇一 (東海大学 糖鎖科学研究所)

山中龍也 (京都府立医科大学医学部)

正木 勉, 出口章広 (香川大学医学部)

糖タンパク質や糖脂質などに結合する糖鎖は、細胞間相互作用やシグナル伝達などにおいて様々な役割を演じている。中枢神経の発生・分化の過程や、病変に伴って糖タンパク質糖鎖の組成は大きく変動するが、その詳細な動態や意義についてはまだ十分に解明できていない。本共同研究は糖鎖関連遺伝子群の発現解析と糖鎖分析とを通じて中枢神経系の発生・分化の過程の糖鎖変化を網羅的に把握し、それを基に様々な神経疾患と糖鎖変化の関連を解析することを目的とする。

昨年度までに、時空間特異的な発現の見られる糖鎖関連遺伝子群の中から、新規 $\alpha 1,3$ フコース転移酵素遺伝子 Fut10 に注目し、発生・発達期のマウス脳における発現分布や酵素学的性質を検討した。その結果、神経幹/前駆細胞が集積している脳室周囲に Fut10 遺伝子の強い発現を認め、未分化な神経幹/前駆細胞の発現する LewisX は Fut10 が主に生合成すること、神経幹細胞から分化した細胞が発現する LewisX は、Fut10 同様に $\alpha 1,3$ フコース転移酵素活性をもつ Fut9 が生合成していることを見いだした。

平成 25 年度は、神経幹細胞や ES 細胞の未分化性維持

における Fut10 および LewisX の役割を解析した。その結果、神経幹細胞や ES 細胞で Fut10 をノックダウンすると、未分化性が維持できず、不適切な分化を誘導することがわかった。従って、Fut10/LewisX は幹細胞の未分化性に関わると考えられるが、その分子メカニズムは不明である。そこで、Fut10 が生合成する LewisX エピトープがどのような N 結合型糖鎖に付加されているのか、池中研究室が長年にわたって開発をしてきた分析システムを駆使して解析を行った結果、例えば A2G2Fo2FB と表記されるような分岐型の糖鎖などが同定された。これらは脳の中では比較的マイナーな成分であり、神経幹/前駆細胞において特殊な機能を担っていると考えられる。今後、A2G2Fo2FB などの分岐型 LewisX 含有糖鎖を発現している糖タンパク質を同定することが、その機能を明らかにしていくために是非とも必要であり、平成 26 年度以降の共同利用研究の課題である。

今後、さらに Fut10 の神経発生における役割を解明するため、共同研究としてコンディショナルノックアウトマウスを作製中である。

32. 大脳皮質および大脳基底核による網様体脊髄路の制御

高草木薫 (旭川医科大学・脳機能医工学研究センター)

梅田達也 (横浜市立大学・医学部)

伊佐 正, 西村幸男 (生理学研究所・認知行動発達機構研究部門)

手指の巧緻運動の制御には対側の大脳皮質一次運動野から下行する外側皮質脊髄路が重要な役割を担っている。一方、脳卒中や脊髄損傷に伴う運動麻痺からの回復過程において麻痺側肢と同側の一次運動野が活動することが知られており、同側の一次運動野から脊髄への下行系も巧緻運動の制御に関わる可能性が指摘されている。しか

し、大脳皮質一次運動野から同側肢の運動ニューロンに至る興奮性下行路はまだ同定されていない。

我々はサルを用いた神経生理学的研究において、抑制性神経伝達物質の一つであるグリシンの受容体拮抗薬であるストリキニンを systemic に投与し、運動細胞に対するシナプス後抑制を除去することにより、一次運動野か

ら対側運動ニューロンへの多シナプス性経路が存在することを証明してきた。そこで本研究では、同様のパラダイムに基づき、運動ニューロンの細胞外および細胞内記録を用いて同側皮質から上肢運動ニューロンへの投射を媒介する興奮性下行路の同定を試みた。

延髄錐体に微小電気刺激を加えると、対側前肢筋を支配する運動ニューロンプール (motor nucleus) には単シナプス性の興奮性電場電位が誘発されるが、同側の motor nucleus には、興奮性電場電位は誘発されない。しかしながら、これまで我々は、ストリキニン投与後、同側の motor nucleus にも興奮性電場電位が誘発されること、 α

運動細胞からの細胞内電位記録によりこの興奮性電場電位が多シナプス性 EPSP によって誘発されていることを明らかにしてきた。さらに、上部頸髄レベルで網様体脊髓路を切断すると、ストリキニン存在下において錐体刺激による多シナプス性 EPSP が消失し、興奮性作用が腹側索を下行する網様体脊髓路ニューロンによって媒介されていることを示してきた。今回、我々は、2 頭のサルを用いて同様の実験を行い、運動ニューロンが同側の一次運動野から網様体脊髓路ニューロンを介して、潜在的な興奮性作用を受け取っていることを確認した。

33. 脳損傷後の麻痺肢集中使用による中枢神経系再編への影響の解析

飛田秀樹, 石田章真 (名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経生理学分野)

梅田達也, 伊佐かおる, 伊佐 正 (生理学研究所・認知行動発達機構研究部門)

脳血管障害後の上肢運動機能障害に対する有効なリハビリテーション方策として、CI 療法に代表される麻痺側上肢の集中的使用が注目されている。しかし、その詳細な作用機序は未だ明らかになっていない。これまでの検討により、内包出血後の麻痺肢集中使用は運動野前肢領域を拡大し、運動機能回復を促進することが示唆された。加えて、拡大した運動野前肢領域からは同側の赤核へと線維連絡があることが示された。本年度はそれを受け、その運動皮質-赤核-脊髓経路が、CI 療法による運動機能改善に寄与しているかを、ウイルスベクターを用いた選択的経路遮断法 (Kinoshita et al., Nature, 2012) を用いて検討した。

方法として、Wistar 系雄ラットの一側の内包部に collagenase (type IV, 15 U/ml, 1.4 μ l) を注入し内包出血モデルを作成した。出血後 1-8 日目に非麻痺肢を拘束し麻痺肢のみ使用を可能にした ICH-CIMT 群および出血後通常飼育を行った ICH 群を設定した。出血後 12 日および 26 日目に運動機能評価 (リーチ・ステップ機能) を行った。その後、出血同側の赤核にレンチウイルスベクター (NeuRet-TRE-EGFP.eTeNT) を 2 箇所注入し、1 週後に運動野にアデノ随伴ウイルスベクター (AAV1- CaMKII-rtTAV16) を 6 箇所注入した。その後 6 週間通常飼育を行い、皮質から赤核へ投射する経路にのみ、二重にウィ

ルス感染をさせた。その後、Doxycycline (DOX) を腹腔投与 (10 μ g/g body weight) および 3 週間経口投与 (飲水中に溶解させる, 3 mg/mL in a 5 % sucrose solution) し、その間の運動機能の変化を計測した。その後、深麻酔下にて経心的に脱血および paraformaldehyde 固定を行い、脳及び脊髓を取り出した。クライオスタットを用いて 40 μ m 厚の冠状切片を作成した後、必要に応じて nissl 染色、抗 GFP 染色および in situ hybridization を行った。

その結果、DOX 投与前では ICH-CIMT 群が ICH 群に比べ有意に良好な運動機能回復を示したが、DOX 投与 1 日後より顕著な運動機能の低下を示し、ICH 群と同程度の機能を呈した。特にリーチ課題において顕著な機能の低下が確認され、前肢の伸展や回旋など、前肢の近位筋の機能が低下していることが示唆された。なお DOX 投与後 7 日後には DOX 投与前と同等の運動機能に戻った。

以上の結果より、内包出血後の麻痺肢集中使用により確認された運動機能回復は、同じく以前に確認された皮質-赤核間の線維連絡を介していることが示唆された。本研究の成果は CI 療法を始めとする脳血管障害後のリハビリテーションの作用機序の一端を明らかにするものであり、有意義なものとする。今後、成果をまとめ国際誌に投稿する予定である。

34. 真核生物における RNA 分解制御機構の解明

細田 直 (名古屋市立大学大学院薬学研究科)

細胞内において産生された RNA は、その役割を終えると分解をうける。また、異常と判断された RNA は速やかに分解される。細胞内では様々な局面で RNA 分解機構が機能している。本研究では、哺乳動物細胞において、核・細胞質において RNA 分解をコントロールする機構を解明する。

核・細胞質で共通した RNA 分解をコントロールする目印として、3'末端に露出した短鎖ポリ A 鎖が想定された。本研究では、この短鎖ポリ A 鎖に、ポリ A 分解酵素複合体、3'→5'エキソヌクレアーゼ (エキソソーム) 複合体などをリクルートする分子機構の解明を試みた。

(1) 細胞質 mRNA 分解

研究代表者らは、正常な mRNA 分解では翻訳終結因子 eRF3-eRF1 が mRNA 分解の律速段階であるポリ A 鎖短縮化に機能することを明らかにしている。また、翻訳領域上に間違っポリ A 鎖が付加され終止コドンが欠失したノンストップ mRNA の品質管理では、翻訳終結因子類似の HBS1-DOM34、が機能することを明らかにしている。さらに、eRF3、HBS1 には類似タンパク質 GTPBP1、GTPBP2 の存在が知られている。そこでこれらと相互作

用する因子の同定を行うことにより細胞質 mRNA 分解機構をコントロールする機構の解明を目指した。哺乳動物培養細胞にこれらタンパク質を発現させ、相互作用因子を免疫沈降法により単離し質量分析装置 (MALDI-TOF MS) により同定した。

(2) 核 RNA 分解

核 RNA 分解では、RNA の 3'末端に短鎖ポリ A が付加される。出芽酵母において、このポリ A 付加に、TRAMP (ポリ A ポリメラーゼ Trf4/5, RNA 結合蛋白質 Air1/2, RNA ヘリカーゼ Mtr4) 複合体が機能することが明らかにされている。哺乳動物細胞におけるこの複合体については長らく未解明であったが、研究代表者らは近年、哺乳動物細胞においてポリ A ポリメラーゼ Trf4/5 と相同性の高い PAPD7 を単離同定した。そこで、PAPD7 と相互作用する因子を同定することにより、哺乳動物 TRAMP 複合体の構成因子、さらに核 RNA 分解をコントロールする機構の解明を目指した。哺乳動物培養細胞に PAPD7 を発現させ、相互作用因子を免疫沈降法により単離し質量分析装置 (MALDI-TOF MS) により同定した。

【 計画共同研究報告 】

計画共同研究報告

〔 目 次 〕

1. メラノプシンの構造揺らぎと機能発現の相関（古谷祐詞ほか）	173
2. 興奮性神経伝達による基底核神経回路の機能制御の解明（渡邊 大ほか）	173
3. ドーパミン受容体ノックアウトマウスを用いた大脳基底核機能の解析（榎山俊彦ほか）	174
4. 大脳基底核における Cbln1 ファミリータンパク質の役割（柚崎通介ほか）	175
5. 遺伝子改変サルモデルを用いた大脳基底核の機能と病態の解明（高田昌彦ほか）	175
6. 実細胞空間の構造解析（市川一寿ほか）	176
7. 連続ブロック表面—走査電子顕微鏡（SBF-SEM）による神経回路構造の解析（深澤有吾）	176
8. 髄鞘の形成と疾患におけるミトコンドリア動態の変化とその役割の検討（大野伸彦ほか）	177
9. アストロサイト突起を基軸とする脳回路形態解析（平瀬 肇ほか）	178
10. 性周期制御における GABA 興奮性作用の役割（渡部美穂ほか）	178
11. 神経伝導速度を介した神経回路の修飾基盤（和氣弘明）	179
12. 多光子顕微鏡を用いた嗅球ニューロンのターンオーバーを制御する微小環境の可視化解析（澤本和延ほか）	179
13. 再生・新生した腸管神経細胞機構の in vivo 可視化解析および神経新生機構の解析（高木 都ほか）	180
14. 母子分離マウスのマイクログリアがシナプス可塑性に与える影響について（高鶴裕介ほか）	181
15. 中枢性エネルギー代謝調節系における分子メカニズム基盤に関する生理学的研究（中里雅光ほか）	181
16. 摂食調節ペプチドによるエネルギー代謝調節の研究（塩田清二ほか）	182
17. コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの合成抑制による脳高次機能の異常の解析（五十嵐道弘ほか）	183
18. Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) ノックアウトマウスに対する薬物投与反応の行動解析による機能障害パスイェ同定（田中輝幸ほか）	184
19. 神経系特異的 Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体 NHE5 ノックアウトマウスの行動解析（若月修二ほか）	184
20. QRFP 欠損マウスの行動解析による QRFP の生理学的役割の解明（山中章弘ほか）	185
21. 視覚異常マウスを活用した中間表現型の解明（小池千恵子ほか）	186
22. 乳幼仔・小児・成熟個体におけるナノマテリアルの情動・認知行動毒性学的評価（森下裕貴ほか）	186
23. 電位センサーを持った機能未知タンパク質の記憶・学習に与える影響の解析（岡村康司ほか）	187
24. NPRP-C マウスを活用した精神疾患の中間表現型の解明（片野泰代ほか）	187
25. FcγRIIB 欠損マウスを活用した精神疾患の中間表現型の解明（上野浩司ほか）	188
26. 脂肪細胞における UCP1 発現制御における TRP チャネルの機能解析（河田照雄ほか）	188
27. TRP チャネルが担う中枢性呼吸調節機構の解明（平田 豊ほか）	189
28. 膜流動性と細胞信号伝達に関する研究（高木昌宏ほか）	189
29. 筋機械痛覚過敏の発症と維持におけるイオンチャネルの役割（片野坂公明ほか）	190
30. アノールトカゲにおける TRP イオンチャネル受容体活性化温度閾値の種間比較（赤司寛司ほか）	191
31. ヤギ induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) の作出とそれを応用した遺伝子改変動物の作出（大蔵 聡ほか）	191
32. 生殖を制御する脳内メカニズム解明のための遺伝子改変モデルの作製とその解析（東村博子ほか）	192
33. キメラ動物作製法を利用した小脳構築原理の解明（金子涼輔ほか）	192
34. 神経回路形成におけるクラスター型プロトカドヘリンの機能解析（八木 健ほか）	193
35. 骨形成因子 (BMP) 阻害蛋白質 CHRDL 1 のコンディショナルノックアウトマウス作製（山岸 寛ほか）	193

36. 分裂酵母ゲノムの3次元構造解析 (大隅正子ほか)	194
37. ハイブリッド顕微鏡用環境制御セルの開発 (箕田弘喜ほか)	195
38. ノロウイルスの高分解能構造解析 (片山和彦ほか)	196
39. Gatan 3View によるエポキシ包埋結核菌の観察, 実験結核肺病変における結核菌の局在部位の検討及び, cryo-TEM による抗酸菌の基本的な形態計測 (山田博之ほか)	197
40. 先端電顕観察法によるイネ種子細胞内タンパク質顆粒形成機構の解明 (増村威宏ほか)	197
41. ミドリムシのオルガネラ観察 (岩崎憲治ほか)	198
42. AAA タンパク質 Cdc48/p97 によるオルガネラ形態制御の分子機構の解明 (江崎雅俊ほか)	199
43. 逆行性レンチウイルスベクターを用いた覚醒を導く神経機能の解析 (山中章弘ほか)	200
44. 逆行性ウイルスベクターを用いた体液恒常性維持神経回路の解析 (野田昌晴ほか)	200
45. 光遺伝学的手法によるマカクザルニューロン活動の操作と機能解明 (蔵田 潔ほか)	201
46. PET 分子イメージングによる霊長類脳遺伝子発現抑制実験におけるターゲット蛋白の発現量, 発現部位の非 侵襲測定法の確立 (尾上浩隆ほか)	201
47. マカクサル運動皮質損傷後の機能回復にともなう代償的運動出力経路の解明 (肥後範行ほか)	202
48. 時計関連遺伝子欠損マウスの行動様式解析 (清水貴美子ほか)	203
49. オプトジェネティクスを用いたマカクサル感覚運動機能の解析に関する基盤的研究 (関 和彦ほか)	203
50. 網羅的行動テストバッテリーを用いた <i>Septin</i> 欠損マウスの解析 (上田(石原)奈津実ほか)	204
51. ヒストン H2B ユビキチンリガーゼ <i>Bre1a</i> の神経幹細胞における機能の解析 (等 誠司ほか)	204

1. メラノプシンの構造揺らぎと機能発現の相関

古谷祐詞, 塚本寿夫 (分子科学研究所)
寺北明久, 小柳光正 (大阪市立大学理学研究科)
久保義弘 (生理学研究所)

動物は外界の光情報を、視覚だけでなく概日時計の調節や瞳孔反射にも利用している。ヒトなど哺乳類の場合、このような「視覚外」の光受容に、網膜内の光感受性神経節細胞が関わるということが明らかにされている。光感受性網膜神経節細胞ではメラノプシンという光受容タンパク質が、最初に光シグナルを受け取る役割を果たす。メラノプシンと、脊椎動物の視細胞に存在して視覚を担う光受容タンパク質（視物質）とは、同じオプシンファミリーに属するタンパク質であるが、それぞれ異なるサブファミリーに分類される。

メラノプシンは、「視覚外」の光受容を担うために適した分子特性を持つと考えられる。しかし、これまで哺乳類メラノプシンが、ほかの光受容タンパク質と比べてどのように異なる分子特性を持つのか不明であったため、哺乳類メラノプシン分子が、具体的にどのような特徴を持ち、それが光感受性神経節細胞の応答特性と関連しているのか明らかではなかった。

私たちは前年度までに、哺乳類メラノプシンのうちマウスとヒトのメラノプシンについて、哺乳培養細胞を用いてタンパク質を大量調製することに成功していた。

今年度はまず、哺乳類メラノプシンの分子特性が、

近縁な他の光受容タンパク質とどのように異なるのかを、精製したタンパク質を生化学的に分析することにより解析した。その結果哺乳類メラノプシンは他の光受容タンパク質よりも熱安定性が低く、不安定であることが明らかになった。言い換えれば、哺乳類メラノプシンは、分子としてより「揺らいだ」構造を持つことが示唆された。さらに、部位特異的変異を用いた解析により、哺乳類メラノプシンの熱安定性の違いを生み出すアミノ酸残基（群）を同定することにも成功した。

次に、生化学解析から明らかになった哺乳類メラノプシンの分子特性が、細胞レベルの機能発現にどのように関連するのかを明らかにするため、哺乳類メラノプシンを強制発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の光応答を電気生理学的に解析した。その結果、卵母細胞においても哺乳類メラノプシンが不安定な構造を持つことを示唆する結果を得た。今後も、メラノプシンがどのような特徴を持つのかをタンパク質レベルおよび細胞レベルで解析を進めることにより、具体的にどのような分子特性が、メラノプシンの生理機能と関連しているのかを明らかにしていくことを目指す。

2. 興奮性神経伝達による基底核神経回路の機能制御の解明

渡邊 大, 長谷川拓, 西岡忠昭 (京都大学大学院生命科学研究科認知情報学講座)
知見聡美, 南部 篤 (生体システム研究部門)

視床下核は、淡蒼球内節および淡蒼球外節に対する唯一のグルタミン酸作動性の興奮性入力であり、ハイパー直接路として基底核のダイナミックな情報処理に関わり、同時に、間接路を介した情報伝達も担う重要な核である。しかしながら、視床下核が基底核の機能発現にどのように関わるか、その詳細は不明である。本研究では、視床下核からその投射先への神経伝達を特異的に遮断する目的で、遺伝子発現効率を高めた改変型テタヌス

トキシン遺伝子 (eTeNT) を発現させるレンチウイルスベクターを用いた。昨年度の共同利用研究により、ウイルスベクターの視床下核内局所投与が、視床下核からその投射先である淡蒼球内節と外節への神経伝達を特異的に遮断することを、すでに確認している。本年度は、6-OHDA を黒質緻密部に局所投与することによって作製したパーキンソン病モデルラットの視床下核に、ウイルスベクターの局所注入を行った。ウイルスベクター注入後

6 週目以降において、大脳基底核の出力部である淡蒼球内節の神経活動を記録した。正常なラットの淡蒼球内節のニューロンは、大脳皮質運動野の電気刺激に対して、ハイパー直接路を介した早い興奮、直接路を介した抑制、間接路を介した遅い興奮の 3 相性応答を示す。一方、パーキンソン病モデルラットの淡蒼球内節では、抑制が著しく減弱し、多くのニューロンにおいて早い興奮と遅い興奮の 2 相性の応答が観察されることがわかった。次に、ウイルスベクターをパーキンソン病モデルラットの視床下核に注入してテタヌストキシンを発現させると、早い興奮と遅い興奮の両方が著しく減弱し、抑制が観察され

るようになった。淡蒼球内節における直接路を介した抑制は、投射先の視床と大脳皮質を脱抑制によって興奮させて運動の発現に寄与するのに対し、ハイパー直接路と間接路を介した興奮は運動を抑制すると考えられている。したがって本研究の結果は、視床下核からのグルタミン酸作動性神経伝達を遮断することにより、パーキンソン病における無動や寡動の症状を改善する可能性を示唆している。今後、パーキンソン病モデルラットにおける行動解析を行い、テタヌストキシン発現時の症状の変化について調べる計画である。

3. ドーパミン受容体ノックアウトマウスを用いた大脳基底核機能の解析

靱山俊彦，西條琢真（東京慈恵会医科大学医学部 薬理学講座）

知見聡美，南部 篤（生体システム研究部門）

大脳基底核の神経回路におけるシナプス伝達の障害、特に黒質—線条体ドーパミン系の障害によってパーキンソン症候群や舞蹈病に代表される運動異常が生じる。これら運動異常の発症機序を理解するためには、大脳基底核の線条体におけるシナプス伝達を解析することによって、神経回路の同定とその機能を解明する必要がある。本研究では、ドーパミン D2 受容体ノックアウトマウス線条体のニューロン間シナプス伝達の特徴を明らかにするために、平成 25 年度はマウス脳スライスを用いたホールセルパッチクランプ法およびセルアタッチ法による解析による電気生理学的解析を行なった。

I) ドーパミン D2 受容体ノックアウト (D2R KO) マウスの脳スライス標本を用いたホールセル記録により、以下の結果を得た。

1) 野生型マウスでは、線条体において刺激頻度依存的に GABA 遊離が抑制されるが、D2R KO マウスでは、この刺激頻度依存性抑制が阻害された。

2) 野生型マウスではシナプス前 D2R 活性化によって N 型カルシウムが選択的に遮断されて GABA 遊離が抑制されるが、D2R KO マウスでは、GABA 性シナプス伝達に関与する N 型チャネルの割合が有意に減少した。

II) セルアタッチ記録による解析では、野生型マウスにおいて、線条体の記録ニューロン近傍に高頻度 (5-10 Hz) 電気刺激を与えることによって、ニューロンの発火頻度が減少したが、D2R KO マウスではこのような発火頻度減少は見られなかった。

以上から、GABA 遊離における内因性のドーパミンおよび D2R の機能、および D2R と N 型カルシウムチャネルの強固な選択的共役、さらにニューロン発火修飾におけるドーパミンおよび D2R の生理的機能が示唆される (Neuroscience 263:138-47. doi:10.1016/j.neuroscience. 2014. 01.010, 2014)。

4. 大脳基底核における Cbln1 ファミリータンパク質の役割

柚崎通介（慶應義塾大学医学部）

佐野裕美，南部 篤（生体システム研究部門）

近年，補体ファミリーに属するタンパク質 Cbln1 が小脳顆粒細胞から分泌され，小脳平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおいてシナプス形成・維持およびシナプス可塑性を制御することが分かった。一方，Cbln1 やそのファミリータンパク質 Cbln2, Cbln4 は小脳以外の脳領域にも発現するものの，その機能や生理的意義については不明である。そこで本研究では，大脳基底核に焦点を絞り，Cbln1 ファミリータンパク質およびその受容体であるグルタミン酸 1 受容体（GluD1）の機能の解明を目指した。

Cbln1 および Cbln4 は視床束傍核（parafascicular nucleus: Pf 核）に発現している。Cbln1 遺伝子欠損（KO）マウスでは，Pf 核からの投射を受ける線条体中型有棘細胞（medial spiny neuron: MSN）の樹状突起上の棘突起

が野生型マウスより有意に増加していることが報告された。しかし，その生理的意義や Cbln4 との関連など不明な点が多い。GluD1 は Cbln1/4 と *in vitro* にて結合する。実際にこれまでに GluD1 KO マウスの線条体において Cbln1/Cbln4 タンパク質が低下していることを免疫組織化学染色によって確認した。また北大渡辺研究室との共同研究により，線条体における GluD1 の局在を明らかにした。GluD1KO マウスは生理学研究所に搬入し，クリーンアップ後に現在繁殖中である。これらのマウスを用いて，GluD1 KO マウスの線条体における MSN の棘突起形態について詳細な検討を進める。また南部研究室において大脳基底核機能について電気生理学的・行動学的に解析を行う準備を進めた。

5. 遺伝子改変サルモデルを用いた大脳基底核の機能と病態の解明

高田昌彦，井上謙一（京都大学霊長類研究所）

小林和人（福島県立医科大学医学部）

星 英司（東京都医学総合研究所）

畑中伸彦，南部 篤（生体システム研究部門）

我々は，平成 25 年度に開発に成功した，狂犬病ウイルス CVS 株由来の高発現型ウイルスベクターを用いた神経投射の逆行性越シナプスの多重トレーシングにより，大脳基底核の機能と病態の基盤となる多シナプス性神経回路の基本的枠組みを解析している。具体的には，単一サル個体の前頭前野や運動関連領域に 4 種類の異なる蛍光蛋白（緑，赤，青，赤外）を発現する狂犬病ウイルス

ベクターを注入し，各蛍光蛋白で二次ニューロンとしてラベルされた淡蒼球内節/黒質網様部ニューロン，三次ニューロンとしてラベルされた線条体ニューロンの分布様式や，複数の蛍光蛋白で多重ラベルされた単一ニューロンの分布様式を解析することにより，前頭葉皮質に投射する多シナプス性出力に基づく大脳基底核の機能マッピングをおこなっている。

6. 実細胞空間の構造解析

市川一寿, 大島大輔 (東京大学医科学研究所腫瘍数理解分野)

相良 洋 (東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリー)

これまで多くのシグナル伝達研究が行われてきた。たとえば、転写因子 NF- κ B は TNF α などの細胞外刺激によって足場たんぱく質である TRAF2 や 6 が複雑な複合体を形成し、そこで IKK の活性化に引き続いて I κ B のリン酸化とユビキチン化が起こる。I κ B は NF- κ B と複合体を形成して NF- κ B を細胞質に局在させている。しかし I κ B のユビキチン化によってプロテアソーム依存的な分解が生じ、I κ B フリーな NF- κ B が生成される。この結果 NF- κ B は核内移行して転写制御を行う。興味深いことに NF- κ B の標的遺伝子の一つに I κ B が含まれており、この結果 I κ B が産生されて核内移行し、そこで NF- κ B と再び結合して核外に放出される。ここで IKK の活性化が継続していれば上記のサイクルが繰り返され、核内 NF- κ B が振動する。NF- κ B の振動パターンは遺伝子発現プロファイルを制御する可能性が指摘されており、NF- κ B の振動パターンを制御する因子とメカニズムの同定は重要である (Ichikawa, et al., IET Syst.Biol., To be published)。我々は NF- κ B 振動の3次元モデル細胞を使ったコンピュータシミュレーションを行い、拡散、N/C 比などの空間パラメータが振動パターンを制御し得ることを見出した (Ohshima, et al., PLoS ONE, (2012) 7:e46911)。たんぱく質の拡散定数はたんぱく質固有の値であるが、ミトコ

ンドリアや ER などのオルガネラの空間分布の変化により、その実効的な値が制御されることが予想される。実際、hypoxia やウイルス感染によってミトコンドリアが核周辺に集積することが報告されている (Al-Mehdi, et al., Sci.Signal., 2012, 5, ra47; Murata, et al., J Gen Virol, 2000, 81, 401)。

コンピュータシミュレーションによってオルガネラの空間構造が NF- κ B の振動パターンを制御するメカニズムの解明を行うためには、できるだけ本物の細胞に近い細胞内構造をコンピュータに再現し、オルガネラの分布などを操作しながらシミュレーションを行う必要がある。蛍光タンパクを発現させて光学顕微鏡で画像を取得する方法や、コヒーレンと X 線を使う方法を含めて多くの方法があるが、これらを比較検討した結果、現時点では SEM を用いる方法が解像度、自由度、再現度などの点から最適であると判断し、画像取得を行った。当初画像間位置合わせが正確な Zeiss SEM+Gatan ミクロトームの SBF-SEM を使用する予定であったが、最終的には通常の SEM を用いた。MEF (マウス胎児繊維芽細胞) の肝細胞を用い、500 枚程度の切片 (厚さ 50nm) を連続的に撮像した。

7. 連続ブロック表面—走査電子顕微鏡 (SBF-SEM) による神経回路構造の解析

深澤有吾 (名古屋大学大学院, 医学系研究科)

本研究では生理学研究所に新規に導入された SBF-SEM を神経科学研究に有効に活用する技術を確認し、ナノスケールの空間解像度を保ちながらこれまでより広い観察領域 (10 μ m 立方程度) の神経回路構造と分子局在情報を得ることを目的とした。具体的には、1) 免疫標識と組織構造の同時観察を可能にし、2) シナプスや神経軸索の連続且つ広範囲観察の可否について検討を行った。

試料はホルマリン固定された蛍光タンパク質を神経細

胞の細胞膜上に発現する遺伝子改変マウスの脳を用い、蛍光タンパク質に対する各種免疫組織化学的処理を行った後に、SBF-SEM 観察に最適化されたオスミウム処理を行うプロトコールに従って処理し、観察を行った。DAB を反応産物とする試料では、免疫反応が比較的強く施された場合のみ、SEM 上で確実に免疫陽性であることが判別できたが、少しでも弱いと偽陰性と判別される可能性が高いことが分かった。免疫金粒子による検出においては、免疫反応が元々試料表面のみで起こること

から、標識箇所を見つけ出すこと自体に困難な点があることが予想され、実際に標識は殆ど観察できなかった。用いた方法では、試料の帯電対策のために試料表面を予め暴露する切削作業を行う必要があること、さらに処理された組織片が強く黒色化するため、組織試料表面から選択的に画像を取得することが難しいことが予想されており、実際に強い免疫反応を示す組織像が得られなかったことから、本機器による免疫電子顕微鏡試料の観察には、更なる技術的な改良が必要であることが分かった。シナプスや軸索の神経組織の微細構造の観察を広範囲

に行えるかどうかとも合わせて検討した。その結果、広範囲 (25 ミクロン四方) が観察できる 5000 倍以下の倍率を使用したときの試料切削が安定し、それ以上の観察倍率では切削が不安定になることが分かり、神経組織特有の微細な構造を十分な空間解像度で観察することが難しい問題点が浮き彫りになった。免疫組織化学的な処理を行った試料では微細構造の保持状態が低いため、低い空間解像度での各構造の同定がより難しいので、今後、この問題点を克服する装置の利用条件や試料の処理方法を開発する必要があると考えている。

8. 髄鞘の形成と疾患におけるミトコンドリア動態の変化とその役割の検討

大野伸彦, 斎藤百合花

(山梨大学大学院医学工学総合研究部解剖学講座分子組織学教室)

本研究ではまず、1 ヶ月齢において野生型および PLP 過剰発現 (PLP-tg) マウスを経心臓的に環流固定し、視神経、脊髄後索および小脳白質組織のブロック染色樹脂包埋試料を作製した。ミクロトーム組込み型走査電子顕微鏡 (SBF-SEM) を用いて連続断面画像を取得し、Amira および TrakEM2 を用いて軸索およびその中に含まれるミトコンドリア (Mito) を抽出し、それらの形態学的な特徴を比較した。

その結果、1 ヶ月齢においてはいずれの組織においても軸索内 Mito の総体積 (Mito 体積総和/軸索体積)、密度 (Mito 数/軸索体積)、および個々の Mito の体積、径、長さに有意な差を認めなかった。

次に視神経に焦点を絞って、10 日齢、1 ヶ月齢、3 ヶ月齢の野生型および PLP-tg マウスの視神経組織試料を調整し、同様に SBF-SEM を用いて観察、解析を行った。その結果、10 日齢野生型の無髄軸索に比較して1 ヶ月齢で髄鞘の形成に伴って軸索径の増大が認められるが、同時に軸索 Mito の総体積の有意な増加が認められた。この増加の際には Mito の密度はむしろ減少していたが、個々の Mito の径と長さは大幅に増加していた。また、3 ヶ月齢では1 ヶ月齢に比較して軸索の径のさらなる増加が見られたが、これに伴って、Mito の密度は減少した

が、個々の Mito の体積、長さ、径が増加し、Mito の総体積は増加していた。

一方で、10 日齢の無髄軸索において、個々の Mito の体積は野生型と相違はないものの、その密度と総体積が野生型に比較して大きく増加していた。しかし1 ヶ月齢では10 日齢と比較して個々の Mito の体積が増加したがその密度が大きく減少しており、結果的に Mito の総体積は10 日齢 PLP-tg と有意差を認めなかった。

3 ヶ月齢 PLP-tg では一部の軸索に脱髄が見られた。有髄軸索では野生型に比較して軽度の長さの減少が認められたが、その他の有意な変化を認めなかった。一方で、脱髄軸索においては、個々の Mito は長さが短くなるが径が増大することで体積の変化はなかったが、野生型と比較して、密度と総体積の増加が認められた。

こうした結果から、髄鞘の形成・軸索径の増加と、Mito の融合・総体積増加に強い相関があることが示唆された。また PLP-tg では無髄軸索において既に Mito 分布変化が引き起こされること、また脱髄に伴って Mito の断片化と腫大、もしくは局在変化が関連する可能性が示唆された。現在、長期的な脱髄に伴う変化や網膜における変化を含め、さらに検討を進めている。

9. アストロサイト突起を基軸とする脳回路形態解析

平瀬 肇, 大江祐樹, 篠原良章

(理化学研究所・脳科学総合研究センター)

我々の最近の研究で, 豊かな環境で飼育することにより, ラット海馬CA1放線状層 (stratum radiatum) で記録される脳波 (ガンマ波) および, スパイン型シナプス数に左右差が生じることが分かっている (Shinohara et al. Nature Communications 2013)。一方, グリア細胞の一種であるアストロサイトの働きもシナプス可塑性に重要であることが示されている。そこで, 経験に依存する海馬CA1放線状層の神経回路の構造変化を網羅的に観測するために, 先端電子顕微鏡 (Serial block-face electron microscope; Carl Zeiss 社製 Merlin) を利用して, ゲッシ目 (マウス・ラット) および霊長類 (コモンマーモセット) の神経・グリア回路の連続電子顕微鏡図の撮影に取り組んだ。次世代の霊長類実験動物種として有望視されているコモン・マーモセットの電子顕微鏡サンプル作製も検討した。

まず, 飼育環境の異なる8週齢のラットに深麻酔を施し, 脳を灌流固定した。固定された脳を取り出した後に, 脱水, 電子染色のための重金属の付加・チャージの除去

等の所定の標準プロトコルに従って, 電子顕微鏡観測用のサンプルを樹脂に包埋した。その後, サンプルを専用のリベット型サンプル保持金具に固定し, 樹脂を観測箇所表面まで切削した。仕上がったサンプルを先端電子顕微鏡に設置し, 厚さ50nm毎に海馬CA1放射状層・網状分子層の電子顕微鏡図を400枚撮影した。複数の動物からリベット固定までのサンプル作製を行ったが, 電子顕微鏡の反射電子検出器 (BSED sensor) の不慮の破損などが相重なり, 本共同研究期間中に撮影できたのは, 上記のサンプルのみであった。なお, 撮影できたサンプル (約 $25 \times 25 \mu\text{m}$, 4096×4096 ピクセル) については, 画質はおおむね良好であったが, 後シナプス肥厚のコントラストが低いことに気づいた。この条件で, 前シナプス部にシナプス小胞の集合体を確認できた。撮影時の画像取得解像度を上げればさらに細かい構造物も見える可能性がある。今年度以降, 複数のサンプルの撮影を試み, 本格的なデータ解析ができるようにしたい。

10. 性周期制御における GABA 興奮性作用の役割

渡部美穂 (浜松医科大学医学部医学科神経生理学講座)

鍋倉淳一 (生理学研究所発達生理学研究系生体恒常機能発達機構研究部門)

脳による生殖内分泌調節の最終共通路は視床下部に存在する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンである。卵巣から分泌されるエストロジェンの作用により, GnRH ニューロンから GnRH が大量分泌され, その結果, 下垂体から黄体形成ホルモン (LH) が大量分泌され, 排卵が引き起こされる。通常の GnRH および LH はパルス状に分泌され, 卵胞成熟に関与している。GnRH ニューロンが周期的な GnRH の大量分泌やパルス状分泌を引き起こすメカニズムは明らかされていない。これまでに, 成熟動物の脳内において主要な抑制性伝達物質である GABA が GnRH ニューロンでは興奮性に作用することを明らかにしてきた。GnRH ニューロン制御に

おける興奮性 GABA 入力役割について個体レベルで明らかにするために, テトラサイクリン遺伝子発現誘導系をマウス個体に応用し, 特定の時期に GnRH ニューロンのみで $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ 共役担体 (KCC2) を発現誘導することにより, GnRH ニューロンへの GABA 入力を興奮性から抑制性に変化させることができる遺伝子改変マウスを作成し検討を行った。ドキシサイクリン投与中止3日後から GnRH ニューロンで KCC2 タンパクが発現誘導され, 5日後には十分な KCC2 タンパクが発現誘導されること, 発現誘導された KCC2 が機能していることを確認できた。生殖機能への影響を調べたところ, ドキシサイクリン投与中止により, 排卵を引き起こす周期的な LH 分泌が低

下し、発情期が長く続くという乱れた性周期を示し、妊娠がみられなくなった。ドキシサイクリンの再投与により、周期的な性周期が回復し、妊娠が認められた。また、卵巣には成熟卵胞が認められず、小さな卵胞が多数観察

された。雄マウスの繁殖能力には影響がみられなかった。以上の結果より、雌マウスの GnRH ニューロンの活動性制御において興奮性 GABA 入力は重要な役割を持つことが明らかになった。

11. 神経伝導速度を介した神経回路の修飾基盤

和氣弘明（自然科学研究機構 基礎生物学研究所）

情動・認知といった高次脳機能に障害を呈する精神・神経疾患の病態解明・治療法の開発が現代社会で早急に求められている。近年イメージング技術の革新からグリア細胞が神経回路の恒常性を維持し、その機能の破綻によって精神・神経疾患の形成に寄与することが報告されてきている。グリア細胞の中でもオリゴデンドロサイトは髄鞘を形成し神経伝導速度を制御する役割を持つ。神経伝導速度を制御することにより情報伝達を効率化する役割を持っていることがこれまで様々な研究によって示唆されている。さらに近年、統合失調症患者のスクリーニングから髄鞘タンパク質の発現に変化が認められることがわかった。私たちはこれまで、神経活動依存性に白質の可塑的变化を誘導するメカニズムとしてオリゴデンドロサイトー軸索間の結合による情報伝達を示した(Wake et al., *Science*, 2011)。これは神経活動そのものが髄鞘化を介してその神経細胞の可塑的变化またはその活動パターンを変化させることができることを示唆する。

そこで今回はこの髄鞘の恒常性が損なわれているモデルマウス (PLP-tg) を用いて髄鞘化の運動学習への寄与を調べた。PLP-tg はこれまで2ヶ月齢においてわずかな神経伝導速度の低下を示す。さらに行動実験によって統

合失調様の表現系を持つことが知られている。このマウスの神経細胞の発火パターンをウィルスによるカルシウム感受性蛍光タンパク質の発現と2光子顕微鏡を組み合わせることによって可視化する。さらに2光子顕微鏡下で前肢レバー引きによる水報酬学習課題を行わせることで学習時の神経細胞の発火パターンを正常群と比較する。その結果 PLP-tg は正常群に比し運動学習障害を認め、その原因として第1次運動野2/3層のレバーに同期した神経活動の低下および、レバー引きとは関係のない活動(自発活動)の上昇を認めた。これらの自発活動の高い細胞のポピュレーションは同一ではなく入れかわりながら存在することがわかった。また髄鞘関連タンパク質を発現する mRNA が正常群では運動学習に関連して変化するのに対し、PLP-tg 群では変化しないことがわかった。これらより運動学習行動に関連して髄鞘が変化することによってその効率を上げること、PLP-tg 群ではその変化が認められないことによって自発活動の上昇が認められ、それによって運動学習を発動するシグナル・ノイズ比の低下を認めることで学習効率の低下を招くことがわかった。

12. 多光子顕微鏡を用いた嗅球ニューロンのターンオーバーを制御する微小環境の可視化解析

澤本和延（名古屋市立大学大学院医学研究科再生医学分野・教授）

澤田雅人（名古屋市立大学大学院医学研究科再生医学分野・助教）

哺乳類の脳室下帯では、成体でも神経幹細胞が存在し、生涯にわたり新生ニューロンを産生している。新生ニューロンが嗅覚の一次中枢である嗅球へと移動し、成熟し

て神経回路に組み込まれる一方で、古いニューロンは細胞死を起こしており、嗅球ニューロンは常に入れ替わっている。これまでの研究から、嗅球に到着した新生ニュー

ーロンの生存には嗅覚入力が必要であることが示唆されているが、生きた動物で同一ニューロンを長期間追跡することが困難であるため、嗅球ニューロンのターンオーバーに嗅覚入力を与える影響は十分に研究されていなかった。我々は以前、生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門との計画共同研究により、多光子顕微鏡を用いた嗅球ニューロンの長期生体イメージング法を確立し、嗅覚入力に嗅球ニューロンのターンオーバーを時空間的に制御することを報告した (Sawada et al., *J. Neurosci.*, 2011)。しかし、その詳細な制御メカニズムは不明である。そこで本研究では、周囲の血管およびグリアとの関係に着目し、確立した嗅球ニューロンの生体イメージング法をさらに発展させることによって、ニューロンのターンオーバーが生じる微小環境とその制御機構を解析することを目的とした。

嗅球の新生ニューロン全てで Venus を発現するマウス

(VGAT-Venus マウス) を用い、血管に赤色蛍光色素を注入して嗅球ニューロンと血管の同時生体イメージング法を確立した。血管への赤色蛍光色素の注入により、血管を可視化するだけでなく、血流速度の測定も可能になった。このイメージング法を用いてニューロンのターンオーバーと血管の関係を解析中である。

ミクログリアは生理的条件下で死細胞を貪食し、周囲の微小環境の恒常性を保つ機能を持つ。嗅球ニューロンのターンオーバーにおけるミクログリアの貪食の役割を解析するため、ミクログリアで GFP を発現するマウス (*Iba1-GFP* マウス) を用いた嗅球ミクログリアの生体イメージングを行った。その結果、ミクログリアの貪食小胞の動態を捉えることが可能になった。

以上の解析方法が確立されたことにより、血管やミクログリアが嗅球ニューロンのターンオーバーを時空間的に制御する可能性を検討することが可能になった。

13. 再生・新生した腸管神経細胞機構の in vivo 可視化解析および神経新生機構の解析

高木 都, 後藤 桂 (奈良県立医科大学分子病理学講座)

稲田浩之, 石川達也, 鍋倉淳一 (生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門)

我々はこれまでに 5-HT₄ 受容体作動薬クエン酸モサブリド (以下 MOS) は、下部消化管切離吻合術後に損傷した壁内神経系の再生・新生促進作用を有することを見いだしているが、共焦点顕微鏡励起光の深部到達度に限界があるため組織修復過程で生じる肉芽組織深部の詳細な観察はこれまで不可能であった。

そこで本研究では、壁内神経細胞が蛍光標識された遺伝子改変マウス (Thy1 promoter GFP/YFP H-line mouse) を用い、高深部到達性かつ低侵襲性の 2 光子励起顕微鏡 (以下 2PM) を用いて小腸切離吻合術後形成される肉芽組織深部の in vivo イメージングを用い、吻合部肉芽組織内の詳細な観察および損傷腸壁内神経系の再生・新生過程に対する MOS の効果の解析、さらには損傷神経再構築機構の解明を試みた。

その結果、我々は平成 24 年度までに、2PM を用いることでこれまで不可能であった吻合部深部までの観察が十分に可能であることを明らかにした。さらには、取得した画像から定量的解析を進めた結果、MOS 群では他の 2 群 (自然回復群, MOS + 拮抗薬同時投与群) と比較

し新生神経細胞が表面から約 100 μm の深さに集中して有意に増加 (約 4 倍) しているという結果を得た。これらの研究結果は、PLOS ONE 8 (1), e54814, 2013 に刊行した。

そして平成 25 年度には、損傷神経再構築機構を明らかにするため、MOS 群において手術直後に PKH26 蛍光色素でマーキングした中枢神経系由来神経幹細胞を尾静脈より移植し、一定の飼育期間後同様に吻合部 in vivo イメージングを実施し、さらにはその後に採取した組織 (イメージングをしないで組織標本用に用意したものも含む) の凍結切片標本を作製し、まず YFP の緑色蛍光と PKH26 の赤色蛍光を観察し撮像後、抗 PGP 9.5 抗体による免疫染色を実施して撮像し三者を比較検討した。

その結果、in vivo イメージングにより、吻合部付近で緑色蛍光を示す細胞と赤色蛍光を示す細胞 (ネットワーク) が観察された。また、免疫組織化学的解析の結果、PGP9.5 陽性神経節は PKH26 蛍光陽性細胞と YFP 緑色蛍光陽性細胞の両者から構成されており、このことから血流を介して移植した神経幹細胞は内在性の神経幹細胞と

同様に肉芽組織深部で神経細胞に分化している事が認められた。

今後は、腸管壁内神経系の再構築過程の解明をさらに

進めるために、神経幹細胞移植実験の回数を追加して定量的解析を行う予定にしている。

14. 母子分離マウスのマイクログリアがシナプス可塑性に与える影響について

高鶴裕介（群馬大学大学院・医学系研究科・応用生理学分野）

鍋倉淳一（自然科学研究機構・生理学研究所・生体恒常機能発達機構研究部門）

社会構造の複雑化にともない、人の発達・成長過程を取り巻く環境が大きく変化している。この時期における身体的・心理的ストレスの影響が、長い時間経過の後に様々な精神疾患を引き起こすことが知られるようになってきている。しかしながら、このような慢性ストレス疾患発症のメカニズムは未知の部分が多く、効果的な治療法が確立されているとは言えない。

研究提案者はこれまで慢性ストレスモデルとして知られている母子乖離(Maternal deprivation; MD) マウスを用いた研究を続けており、MD マウスにおける体性感覚野のシナプス可塑性の異常（シナプス構造の不安定化）および知覚過敏症の存在を報告している（Takatsuru et al., 2009）。また、MD マウスでは体性感覚野においてグルタミン酸の過剰放出が起こっており、電気生理学的な過剰興奮が起こっていることがわかっている（Toya and Takatsuru et al., 2014）。

近年、マイクログリアが脳においてシナプス構造に対し積極的な働きかけを行っていることが *in vivo* imaging の手法により明らかになっており、過剰興奮を起こした

シナプスを「刈り込む」役割があることが示唆されている（Wake et al., 2009）。この働きの誘因となる因子の一つとしてグルタミン酸濃度の上昇が重要であることも示唆されている（Kato et al., unpublished data）。

そこで本研究課題では、MD マウスの体性感覚野におけるマイクログリアの動態について *in vivo* imaging の手法を用いて検証することを行った。MD マウスおよび対照群について、約 15 分間の imaging を行い、次に、末梢刺激を 20 分間入力した後でのマイクログリアの突起伸長／退縮の様子について経時的に観察した。その結果、MD マウスの体性感覚野において、伸長／退縮を起こす突起の数が増加しており、これらの突起が伸長した状態で制止する時間が増加していることがわかった。また、上記と同様な 20 分間の末梢刺激を行った際、MD マウスのみ体性感覚野におけるグルタミン酸濃度の持続的な上昇が認められることも分かった。

本研究結果をまとめた論文を作成中であり、近日中に投稿予定である。

15. 中枢性エネルギー代謝調節系における分子メカニズム基盤に関する生理学的研究

中里雅光，山口秀樹，十枝内厚次，上野浩晶，清水浩一郎，モイン アブサレー エムディ

（宮崎大学医学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野）

我々がセクロトペプチドーム解析で発見した NERP-1 と NERP-2 はバソプレシン分泌を抑制する。ラット脳スライスをを用いて、バソプレシン分泌細胞が集積する視床下部視索上核外側の神経細胞を標的に whole cell patch clamp を実施し、アンギオテンシン II (AngII) で誘導した NERP-1 と NERP-2 投与によるバソプレシン神経の興

奮性シナプス前入力 (EPSCs) と抑制性シナプス前入力 (IPSCs) を測定した。さらに視床下部視索上核にダイアリシスプローブを挿入し、視床下部視索上核への NERP-1 と NERP-2 のマイクロインジェクション後の AngII 作動性グルタミン酸放出量を定量した。

AngII は EPSCs を増大させるのに対し、IPSCs には影

響しなかった。NERP-1 と NERP-2 は, AngII によって生じる EPSCs の増大を抑制した。NERP-1 の EPSCs 抑制作用は, 細胞体からの電氣的興奮を遮断するテトロドキシン (TTX) の処置によっても抑制されないことから, バソプレシン神経のシナプス前グルタミン酸神経の末端に作用し, グルタミン放出を抑制していると考えられる。一方 NERP-2 は, TTX もしくは GABA-A 受容体拮抗剤のビククリンの前処置で, AngII による EPSCs の抑制作用が消失した。NERP-2 はバソプレシン神経のシナプス前グルタミン酸神経の末端に投射する GABA 介在神経細胞に作用して, GABA の放出を亢進することが明らかになった。マイクロダイアリス解析によって, NERP-1 と NERP-2 が AngII 作動性のグルタミン酸放出を抑制することが確認できた。同じ前駆蛋白 VGF から合成される NERP-1 と NERP-2 が, 異なる機序でバソプレシン分

泌抑制に機能することが明らかになった。

また NERP-2 は摂食と覚醒に機能するオレキシン系を活性化し, 摂食に機能する。摂食に機能するペプチドの多くは, 胃酸分泌を調節することから NERP-2 の胃酸分泌機能を解析した。ラット脳室内への NERP-2 の投与は, 胃酸分泌と胃運動を亢進した。NERP-2 の脳室内投与は迷走神経遠心路の神経核である背側迷走神経運動核の神経を活性化し, 迷走神経遠心神経活動を亢進させた。アトロピン投与により NERP-2 の胃への作用は消失することから, NERP-2 は, 迷走神経を介して消化に機能することが明らかになった。

NERPs は中枢で神経内分泌津細胞の分泌を促進性もしくは抑制性に調節し, 生体の恒常性維持に貢献している。今後セクロトペプチドーム解析で探索中の他のペプチドについてさらに解析を進めていく。

16. 摂食調節ペプチドによるエネルギー代謝調節の研究

塩田清二, 平子哲史 (昭和大学医学部解剖学講座顕微解剖学部門)

太田英司 (昭和大学歯学部口腔解剖学講座)

影山晴秋 (桐生大学医療保健学部栄養学科)

竹ノ谷文子 (星薬科大学薬学部運動生理学研究室)

岡本土毅, 箕越靖彦 (自然科学研究機構生理学研究所)

ガラニン様ペプチド (GALP) は, 60 アミノ酸残基からなり, 種差を越えて高いホモロジーを有することが特徴である。免疫化学組織的手法により GALP はレプチンの作用を受けるとともに視床下部内で複数の摂食調節ニューロンと神経相関を行なうことが明らかになっている。さらに我々は, GALP を脳室内に投与するとその直後に呼吸商が低下することを見出した。これは脂質代謝が亢進していることを示唆する結果であり, GALP の新しい生理作用として注目した。本研究では, GALP の抗肥満作用の機序を解明するために, 脂質代謝に注目し検討した。実験動物は C57BL/6 マウスを用い, 脳室内に生理食塩水を投与した Vehicle 群あるいは GALP を投与した GALP 群を設けた。先行研究で呼吸商の差が最大となった投与後およそ 100 分後に解剖し, 肝臓および脂肪組織中の脂質代謝に関連する遺伝子の mRNA レベルを Real-time PCR 法により測定した。脳内で作用した GALP が末梢組織へ影響を与える経路を明らかにするために末

梢の交感神経遮断薬である Guanethidine を腹腔内投与した後に GALP を脳室内投与し, 呼吸商を測定した。さらに, 雄性 C57BL/6J マウスに高脂肪食 (60 en % fat) を給餌させることで食事誘発性肥満 (DIO) マウスを作成した後, GALP または vehicle の点鼻投与を 2 週間行った。脳室内投与後およそ 1 時間後から呼吸商が GALP 群で Vehicle 群と比較し有意に減少した。また, 肝臓中の脂肪酸酸化に関与する遺伝子発現は GALP 群で有意に増加し, 脂肪酸合成に関与する遺伝子発現はそれぞれ有意に減少した。また, 脂肪組織中の脂肪分解に関与する HSL, ATGL の遺伝子発現が増加した。GALP 投与によりみられた呼吸商の減少は, 交感神経遮断により消失した。加えて, 肝臓および脂肪組織での遺伝子発現の変化も交感神経遮断によって消失した。DIO マウスへの GALP 点鼻投与によって, 体重が有意に減少した。また, 血糖値も GALP 群で減少傾向がみられた。本研究の結果から, GALP は摂食調節作用に加え, 肝臓および脂肪組織での脂質代謝を

改善することで抗肥満作用を示している事が示唆された。 ていることが明らかとなった。
また、GALP による脂質代謝亢進作用は交感神経を介し

17. コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの合成抑制による脳高次機能の異常の解析

五十嵐道弘¹, 武内恒成^{1,2}, 吉岡 望¹, 渡辺裕美¹, 和田芳野¹ (¹新潟大学・医歯学系・分子細胞機能学,
同・超域学術院, ²愛知医科大学・医学部・生物学)
高雄啓三, 宮川 剛 (生理学研究所・行動様式解析室)

コンドロイチン硫酸(CS)は、細胞外基質の最も主要な糖鎖の1つであり、脳内では perineural net (PNN) と呼ばれるシナプス周囲部に局在する構造に強く局在する。PNN は中枢神経系の多様な部位に存在し、その機能は、軸索成長の抑制、神経幹細胞の分化抑制、脳損傷時の炎症の限局化など多岐にわたり、シナプス可塑性に関与する。申請者は、これらの事象への CS の関与を直接的に証明するため、CS 合成酵素群のうち、CSGalNAcT-1/2 (T1/T2)のノックアウトマウス(KO)を作成済み^{1),2)}で、その機能を解析することとした。

T1-KOについては既に軟骨の発生への異常を記載した¹⁾が、脊髄損傷時に著しい回復が認められた²⁾。この回復時には、T1-KO で PNN の脊髄での局在も消失しており、また RNAi 実験でも KO 同様の回復が認められた²⁾。脳の形成は異常が発生時に生じているが、形態学的には回復が認められるため、層形成異常は出生後には認められなくなる。従って、当該マウスの脳機能解析では、免疫組織化学と行動解析が重要な方法論となる。

行動解析については、T1-KO に関して凍結胚を生理学研究所に送付し、これを胚操作で成体にしてもらった。25 年度はホモマウスの解析が得られた。

24 年度に共同研究を実施したヘテロマウスについては、活動量が亢進していたが、25 年度に解析したホモ

マウスは、体重減少、活動性亢進、運動能力の向上、驚愕反応の増強などが、有意に変化していた。従って、活動量の亢進がこの遺伝子変異を特徴づける1つの変化と推測された。この結果は、さらに薬理学的な解析などを追加することによって、病態モデルとしての有用性が検討できると考えられた。

組織化学的解析については、すでに T1-KO マウスは PNN の CS 濃縮障害を見出していたが、これは脳内の部位ごとに違いが見られた。また著明な巨視的变化や、脊髄損傷修復への効果が見られない T2-KO も、脳内の部位によっては T1-KO よりも PNN での CS 濃縮度が低下していることを見出した。この点で、今後に行動解析を行うことで高次脳機能変化を捉える事が可能であることを示唆する結果であった。

以上の結果は、すでに論文として発表した syntaxin-1A の KI マウス³⁾ 同様、T1-KO の高次機能の異常を強く示唆するものであり、ホモマウスですでに有意な異常が見られたことから、薬理学的解析などでさらに大きな変化が明示できるものと思われる。

(文献) 1) Watanabe Y et al. *Biochem J* 432:47-55 (2010).
2) Takeuchi K et al. *Nat Commun* 4:2740 (2013). 3) Watanabe Y et al. *J Biol Chem* 288: 34906-19 (2013).

18. *Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)*ノックアウトマウスに対する薬物投与反応の行動解析による機能障害パスウェイ同定

田中輝幸, 奥田耕助 (東京大学大学院医学系研究科 発達医科学教室)
高雄啓三, 宮川 剛 (生理学研究所・行動様式解析室)

(目的) *Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)*は、てんかんを伴う発達障害の原因遺伝子であるが、その生体内分子機能と loss-of-function による分子病態機序はほとんど分かっていない。当研究室ではこれらの解明のため、*Cdkl5* ノックアウト (KO) マウスを作製し、生理学研究所行動・代謝分子解析センター行動様式解析室との共同研究によって、これまで *Cdkl5* KO マウスにおける不安様行動の亢進、うつ様行動の亢進等の情動異常と、長期記憶、作業記憶の障害を同定した。更に我々は、*Cdkl5* KO マウスにおけるシナプス NMDA 受容体の局在・機能の異常と、興奮性アミノ酸投与に対する易痙攣性の亢進を同定した。我々は、*Cdkl5* KO マウスにおけるシナプス伝達異常がその行動異常の基礎メカニズムの一つであるという仮説を立て、本年度はその検証のため、NMDA 受容体阻害薬を用いた行動異常のレスキュー実験を計画した。

(方法) ① NMDA 誘発性痙攣に対する NMDA 受容体阻害薬の効果検証：

まず日齢 26~27 日の *Cdkl5* KO 雄マウスと同腹仔の野生型 (WT) 雄マウス各 6 体に NMDA 52.5 mg/kg を腹腔内投与し、その後 60 分間の様子をビデオ撮影し、痙攣最大スコアを記録する。次に *Cdkl5* KO マウス 6 体に、NMDA 受容体阻害薬 Ifenprodil 50 mg/kg を腹腔内投与し、30 分後に NMDA 52.5 mg/kg を腹腔内投与する。その後 60 分間の様子をビデオ撮影し、痙攣最大スコアを記録する。痙攣スコアは、modified Racine スケールに従う。

② 情動異常に対する NMDA 受容体阻害薬の効果検証：

Cdkl5 KO 雄マウス及び同腹仔の WT 雄マウスを各 20 匹用意し、NMDA 受容体阻害薬 Ifenprodil 2 mg/kg、あるいは MK-801 0.05 mg/kg を腹腔内投与し、30 分後より明暗選択試験、オープンフィールド試験、高架式十字型迷路試験を行う。

(結果) ① WT マウスと *Cdkl5* KO マウスに NMDA を投与し、60 分間の痙攣スコアを計測した結果、WT マウスは全例が軽いミオクロニー発作 (スコア 2) に留まったのに対し、KO マウスは強い全身性强直間代発作 (スコア 5~7) を起こした。それに対し、*Cdkl5* KO マウスに Ifenprodil を投与後に NMDA を投与し、60 分間の痙攣スコアを計測したところ、全例痙攣が軽いミオクロニー発作 (スコア 2) に留まり、強い全身性强直間代発作がレスキューされた。

(考察) *Cdkl5* KO マウスは NMDA 投与に対し、WT マウスに比べ顕著な易痙攣性を示すが、NMDA 受容体 GluN2B 選択的阻害剤 Ifenprodil は、その NMDA 誘発痙攣スコアを WT マウスと同程度にまで下げた。このことから、*Cdkl5* KO マウスにおける易痙攣性が NMDA 受容体の中でも特に GluN2B を含む受容体の機能亢進によることが示唆された。

同様に情動異常に対する NMDA 受容体阻害薬の効果判定実験を行う予定であったが、必要数の KO マウス、WT マウスが準備出来ず、今後施行する。

19. 神経系特異的 Na^+/H^+ 交換輸送体 NHE5 ノックアウトマウスの行動解析

若月修二, 荒木敏之 (独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所・疾病研究第五部)
高雄啓三, 宮川 剛 (生理学研究所・行動様式解析室)

研究目的

NHE 5 は神経系特異的に発現する Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE) をコードする遺伝子 SLC9A5 としてクローニン

グされたが NHE として機能すること以外、その生体内における役割はほとんど解明されていない。また、脊髄小脳失調症 4 型、常染色体優性小脳失調症の患者で変異

が見つかった遺伝子座に当該遺伝子が含まれているなど、神経変性疾患との関与が示唆されていることから NHE 5 の生理的役割と病態との関連を明らかにすることを目的とした。

研究方法

網羅的行動様式テストバッテリーを用いて行動観察を行った。昨年度に引き続き、成熟した NHE 5 ノックアウトマウスおよび野生型マウスを比較し、運動・学習能力、社会性および感覚機能等、脳神経系の機能評価を行った。成熟型で NHE 5 ノックアウトマウスと野生型マウス間で有意な違いが観察された場合、週齢を変えて幼若期、高齢期のマウスを用いて同様の観察を行った。

今後の展望

昨年度までに NHE 5 ノックアウトマウスとポリグル

タミン病モデルとを交配させたマウス脳においてポリグルタミン凝集体数が顕著に増加することを発見した。培養細胞を用いた解析から NHE 5 の機能を低下させた細胞では凝集タンパク質の分解に寄与するオートファジーのはたらきが低下していた。これらのことから NHE 5 がオートファジーのはたらきを促進することが示唆された。一方、本年度は貴所行動様式解析室との共同研究により NHE 5 ノックアウトマウスにおいて野生型と比較して主に社会性行動に変化を認めた。今後は同マウスの表現型を明確にするため、引き続きさらに詳細な行動学的解析を行う計画である。

今後の解析を通じて、神経変性疾患モデルにおける凝集タンパク質除去への NHE 5 の寄与を明確にし、これを強化する方法を確立することで、NHE 5 を治療標的とした疾患症状の改善方法の開発を目指す予定である。

20. QRFP 欠損マウスの行動解析による QRFP の生理学的役割の解明

山中章弘，犬東 歩，常松友美（名古屋大学・環境医学研究所）

田淵紗和子（総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻）

高雄啓三，宮川 剛（生理学研究所・行動様式解析室）

QRFP は GPR103 の内因性リガンドとして近年同定された神経ペプチドの 1 つである。QRFP を産生する神経細胞は、視床下部に存在するが、その生理的な役割についてほとんど分かっていなかった。QRFP と QRFP 産生神経が、どのような生理的役割を担っているのかについて明らかにするために、QRFP 遺伝子欠損マウスを作成した。本研究では、これらの QRFP マウスの行動を網羅的に解析することで、QRFP が担う生理的役割の解明を行う。これまでの研究から、摂食代謝調節への関与が考えられており、それらを中心に解析を行った。QRFP 欠損マウスの同腹仔である野生型マウス、もしくはヘテロマウスと自発行動量、摂食量、飲水量、呼吸交換率を経時的に記録し、比較した。自発行動、摂食量、飲水量は

野生型、ヘテロ、QRFP 欠損マウスの間で有意な変化は認められなかったものの、呼吸交換率の有意な低下と体重の増加が認められた。特に、暗期と明期の呼吸交換率の調節において、大きな差が認められた。これらのことから、QRFP がマウスの代謝調節において重要な役割を担っており、また、日内リズムなどと協調的に働き、代謝を調節している可能性が示唆された。今後はさらに研究を進め、体内時計の中核である視交叉上核との機能的連関のメカニズムや、代謝調節における下流の神経回路の同定を試みる。また、光遺伝学、薬理遺伝学等を用いた神経回路機能操作や、ジフテリアトキシン A 断片等を用いた特異的運命制御によって生理的役割を明らかにしていく予定である。

21. 視覚異常マウスを活用した中間表現型の解明

小池千恵子 (立命館大学薬学部・大学院生命科学研究科)

高雄啓三, 宮川 剛 (生理学研究所・行動様式解析室)

遺伝子ターゲティング法は、遺伝子の機能を探る上で中心的な位置を占める方法であるが、遺伝子改変マウスを用いて、学習、記憶、注意、情動性、薬物感受性に関して詳細に調べられているケースは少なく、遺伝子の高次脳機能における未知の役割を見落としている場合が多いと推測される。我々は、行動テストバッテリーを用いて、視覚異常マウスの行動を体系的かつ効率的にスクリーニングすることにより、遺伝子と種々の行動・精神疾患との関係を明らかにしたいと考え解析を行っている。その結果、視覚異常マウスにおいては不安様行動の低下・社会性行動の低下などの様々な表現型を持つことが示されてきた。

Light/Dark transition テストにおいては、視覚異常マウスでは野生型マウスと比較して明箱での滞在時間が長く、

マウスの光感受性に依存した結果であると考えられた。一方、自発運動活性の上昇、不安様行動の低下、社会性行動の低下が、Open field, Elevated plus maze, Social interaction テストにより明らかとなり、これらの反応は光感受性とは独立して生じるものと考えられていた。以上の結果より対象マウスは視覚異常に特化していると考えていたが、表現型から視覚以外の経路にも発現がある可能性が示唆され、さらなる解析を行った。Barns maze, T-maze, Fear conditioning といった記憶と学習テストの解析結果は、マウスの行動異常が影響し、明確な結果を得ることは難しかったが、学習・記憶能力には影響はないものと考えられた。今後は、さらに行動異常の原因を特定するためのさらなる解析を行う予定である。

22. 乳幼仔・小児・成熟個体におけるナノマテリアルの情動・認知行動毒性学的評価

森下裕貴, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 堤 康央 (大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野)

高雄啓三, 宮川 剛 (生理学研究所・行動様式解析室)

従来素材とは異なる有用機能を発揮するナノ・サブナノマテリアルは、今後もさらなる市場拡大が期待されており、安全性情報の収集が喫緊の課題となっている。特に、情動・認知行動への影響評価は、最重要課題と考えられているものの、実験手法の困難さから検討された例は乏しい。そこで本研究では、ナノ・サブナノマテリアルの物性と情動・認知行動毒性との連関を追求することで、安全なナノ・サブナノマテリアル開発に必須の情報の集積を図っている。具体的には、乳幼仔・成体・妊娠マウス、授乳期マウスに種々のナノ・サブナノマテリアルを静脈内・経鼻・経気道・経口投与した後、網羅的行動テストバッテリーにより、多岐に渡る情動・認知行動を解析している。平成 23 年度までに、2011 年の Nat. Nanotechnol. 誌で報告したナノマテリアルの生殖・発生毒性に関する知見をもとに、非晶質ナノシリカを妊娠期曝露したマウスの仔に関して、網羅的行動テストバッテ

リーを実施した。その結果、これらのマウスがうつ様行動・驚愕反応の亢進、社会的行動の低下を示す可能性を見出した。平成 24 年度は、ナノマテリアルよりもさらに微小化の進んだサブナノマテリアルを妊娠期曝露したマウスの仔に関して、網羅的行動テストバッテリーを実施した。その結果、サブナノ白金を妊娠期曝露したマウスが、うつ様行動・不安様行動の低下を示す可能性を明らかとした。さらに、平成 25 年度には、妊娠期曝露に着目した評価にとどまらず、授乳期に母乳を介してナノ銀に曝露した乳幼仔について、網羅的行動テストバッテリーを実施した。その結果、現実想定される曝露量の 100 倍程度を母マウスが曝露しても、仔の情動認知・機能に影響を与えないことを見出した。以上のように、安全性情報の収集が必要不可欠である脆弱な個体を対象として、ナノ・サブナノマテリアルの情動・認知行動毒性に関する知見を先駆けて見出し、順調に、社会ニーズや

緊急性の高い研究成果を積みあげつつある。

今後は、継続した共同研究のもと、引き続き、これら情動・認知行動異常が生じるメカニズムを、脳科学的解析、生化学的解析、組織学的解析などを駆使して追及す

る予定である。また、粒子径や表面修飾の異なる各種ナノ・サブナノマテリアルを用いてこれら検討を実施することにより、物性と情動・認知行動毒性の連関を解析する予定である。

23. 電位センサーを持った機能未知タンパク質の記憶・学習に与える影響の解析

岡村康司（大阪大学大学院・医学系研究科）

高雄啓三，宮川 剛（生理学研究所・行動様式解析室）

本研究課題では、膜電位センサーを有するものの、ポアドメインを持たず、その機能が不明である蛋白質 voltage sensor domain only protein2 (VSOP2)に着目し、その機能解明を目指した研究を行っている。我々のこれまでの研究結果から VSOP2 は小脳を中心として神経系に発現が認められることが分かっている。そこで本研究では VSOP2 が記憶・学習に及ぼす影響を考慮した行動学的解析を進め、また網羅的な行動様式解析を行うことで、本蛋白質が神経回路の情報処理にもたらす影響を調べることを目的としてきた。それにより、本実験がこれまで困難であった VSOP2 の機能解明の契機となることを期待した。

本実験は先年度より行ってきたが、本年度も引き続き、実験動物に新潟大学の崎村教授との共同研究によって作

出された VSOP2 遺伝子ノックアウトマウスを使用した（本ノックアウトマウスでは VSOP2 遺伝子が neomycin 耐性遺伝子に置換されている）。本年度は5種類程の実験を新たに行ったが、残念ながらいずれの項目においても有意な違いを見出すことは出来なかった。

しかし前年度の実験では、2種類ほどのテストにおいて野生型とノックアウトマウスとの間に違いの見える結果を得られているため、今後はこれらの項目に着目し、その行動に関わる神経領域について VSOP2 遺伝子の発現を再度詳細に確認したいと考えている。また、これらの実験に加え、電気生理学的実験、生化学的実験を組み合わせることで VSOP2 の機能を明らかにしたいと考えている。以上の内容が、今後膜電位センサー機能の新たな側面を理解するのにつながることを期待している。

24. NPRP-C マウスを活用した精神疾患の中間表現型の解明

片野泰代，伊藤誠二（関西医科大学・医化学講座）

高雄啓三，宮川 剛（生理学研究所・行動様式解析室）

難治性疼痛の一つである神経障害性疼痛は末梢神経損傷を起因として発症し、長期わたってアロディニアなどの病態生理的な痛みが出現する中枢性感作が生じる。我々は、本病態に関わる機能性分子の探索同定を目的とし、神経障害性疼痛モデルマウスを用いて脊髄後角 PSD 画分を用いてプロテオミクスを実施し、関連候補分子を複数同定した。

本分子群は、神経障害性疼痛（Neuropathic pain）に関連する分子であると想定されることから、今回着目した一つを Neuropathic pain related protein (NPRP)の一つとして

NPRP-C と名付けた。これまでの解析で NPRP-C は脊髄のみならず、大脳、中脳、小脳など中枢神経系で広く同レベルでの発現が western blot によって確認されている。そのことから、NPRP-C の中枢神経系における生体内での機能を網羅的行動解析にて明らかにし、その他病態への関与と当該疾患における機序について明らかにすることを目的とし、「網羅的行動テストバッテリー」を実施した。

「網羅的行動テストバッテリー」では基本データとして、体重、体温、反射性などに加え、感覚・知覚、運動、

情動、睡眠・リズム、注意、学習・記憶、社会的行動など、様々な行動領域で用いられている代表的なテストを組み合わせて実施することから、NPRP-C 欠損マウスにおける特徴と影響を鑑別できる。

現時点での結果として野生型との比較において、体重の減少、活動性の僅かな増加、不安様行動の低下、が示されている。さらに、疼痛発現に関与する因子のファクターになりうる評価として熱感受性に関して Hot Plate Test で latency が有意に短い、つまり熱刺激に対する

閾値が低いという傾向を示しており、本分子が末梢からの侵害刺激に対する応答に影響する可能性を示した。

これまでの結果から、本分子の欠損が疼痛だけではなく、多岐にわたり野生型と異なる表現型を示す事が期待できるデータとなっている。

現在解析進行中である今後のデータを確認し、中枢神経系における NPRP-C の役割を明らかにするとともに、精神疾患へ関与について解析を進める予定である。

25. FcγRIIB 欠損マウスを活用した精神疾患の中間表現型の解明

上野浩司, 岡本 基 (岡山大学大学院 保健学研究科)

高雄啓三, 宮川 剛 (生理学研究所・行動様式解析室)

FcγRIIBは免疫グロブリン IgG の Fc 部分と結合する受容体の一種で、一般的には免疫に関わる細胞に発現していることが広く知られている。近年、この分子が脳の抑制性介在ニューロンの一種である Parvalbumin 蛋白陽性ニューロン(PV ニューロン)上に発現していることを発見するとともに、FcγRIIB 欠損マウスでは感覚入力遮断による PV 蛋白減少が起りにくいことや PV ニューロン樹状突起の分枝が多いことを観察した。

PV ニューロンは形態的に Basket 細胞と Chandelier 細胞に分類される。PV ニューロンは錐体細胞、抑制性介在ニューロンの細胞体や軸索起始部にシナプスを形成しており、他の抑制性介在ニューロンと比較して強い抑制

作用を示す。PV ニューロンの抑制機能に異常があれば、錐体細胞の活動にも異常を来とし、行動にも異常が見られると考えられる。

現在のところ、マウスの繁殖が予定通りに進まず、行動実験が行えていない。25 年度は岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門において FcγRIIB 欠損マウス及び野生型マウスから胚を取り出して凍結処理した。その凍結胚を生理学研究所に送付してマウスを作るところまで進んでいる。行動様式解析室を訪問し今後の研究の打ち合わせ、行動実験の説明を受け準備を進めている。マウスが出来次第、網羅的行動テストバッテリーを使って実験を進めていく予定である。

26. 脂肪細胞における UCP1 発現制御における TRP チャネルの機能解析

河田照雄, 高橋信之, 後藤 剛, 高橋春弥, Kim Min Ji (京都大学大学院農学研究科)

内田邦敏, 富永真琴 (生理学研究所)

メタボリックシンドロームは肥満を必須条件とするため、肥満状態の改善は、その予防・改善に重要である。脱共役タンパク質-1 (UCP1) は、脂肪細胞において、エネルギーを熱産生によって消費する機能を持っているため、UCP1 発現制御機構を明らかにすることは、抗肥満作用を持つ薬剤や機能性食品の開発につながる。そこで、本研究では、様々な生理機能を有する TRP チャネルに

着目し、その脂肪細胞における UCP1 発現制御における役割を明らかにすることを目的とする。

昨年度までの共同研究において、TRPV1 ノックアウトマウスでは魚油摂取による UCP1 発現誘導が認められないこと、ならびに魚油摂取による尿中カテコールアミンレベルの上昇が認められないことを明らかにし、魚油摂取による褐色脂肪組織中の UCP1 発現誘導に TRPV1

が関与している可能性を動物レベルで明らかにした。そこで今年度は、魚油中に含まれる各種脂肪酸をそれぞれ単独で TRPV1 強制発現 HEK 細胞に添加し、細胞内カルシウムイオン濃度変化を検討した。その結果、これまでに本共同研究で得られた結果と同様に、魚油の主要脂肪酸成分である EPA に強い細胞内カルシウムイオン濃度上昇作用が認められた。その一方で、オレイン酸やリノレン酸などの他の脂肪酸成分には、そうした細胞内カル

シウムイオン濃度上昇作用は認められなかった。これらの結果より、動物レベルで観察された TRPV1 による UCP1 発現誘導作用は、魚油中に含まれる EPA を介したものであることが示唆された。

現在、より詳細に TRPV1 活性化メカニズムを明らかにするため、EPA を含む魚油脂肪酸成分による TRPV1 活性化能をパッチクランプ法により検討している。

27. TRP チャネルが担う中枢性呼吸調節機構の解明

平田 豊（兵庫医科大学 生理学学生体機能部門）

鈴木喜郎，富永真琴（生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター）

中枢性呼吸調節機構は、換気応答によって驚くべき厳密さで生体の P_{CO_2}/pH 変動を一定の狭い生理的範囲に調節している。この調節機構を担っている中枢化学受容細胞及びその化学受容器の分子実体は長い間謎であった。提案代表者は、これまでに脳幹・延髄由来のニューロン・グリア共培養細胞を用い、 CO_2/pH 負荷に対する細胞内応答を、 Ca^{2+} / pH のイメージング、perforated patch-clamp 法により検討したところ、高 CO_2 負荷によりグリア細胞が Ca^{2+} 応答をすることを見出し始めている。この Ca^{2+} 応答を引き起こす Ca^{2+} チャネルの候補として、薬理学的スクリーニングの結果、TRP チャネルのサブタイプが

推定された。生理学研究所の富永教授と共に、TRP チャネルにおいて、どのサブタイプが換気応答の制御に関与するかを明らかにし、TRP チャネルが担う中枢性呼吸調節機構を解明することが本研究の目的である。

昨年度に引き続き、推定されたサブタイプを含む、TRP チャネル欠損マウス群に対する高 CO_2 負荷による換気応答の変化を whole body plethysmography 法にて野生型マウスと比較の予定であったが、多機関への供与中止の事態が発生したため、換気応答の観察は困難となった。これまでのデータの解析を行った。個体差によるバラツキがあるので、今後の計測条件や計画を検討した。

28. 膜流動性と細胞信号伝達に関する研究

高木昌宏，白 京玉，藪内里実（北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科）

内田邦敏，富永真琴（自然科学研究機構生理学研究所）

細胞膜には、様々なチャネルや受容体が存在しており、シグナル伝達過程に関与するといわれている。細胞膜構造は従来、リン脂質が均一に分散していると考えられてきたが、近年飽和脂質やコレステロールを多く含む「ラフトドメイン」が注目されている。T 細胞では免疫刺激によりラフトの凝集が認められる。また、外界からの温度受容には TRP チャネルが関与していることが知られており、温度変化を感知するセンサーとして知られている。Menthol は TRP チャネルの一つである TRPM8 受容

体を活性化し、温度低下がなくても冷感を引き起こす。ここでは、T 細胞を例に Menthol が膜流動性や細胞信号伝達にどのような影響を及ぼすか調べた。

温度低下によってラフトの蛍光標識である CT-B の蛍光が強くなり、ConA による免疫刺激は、低温 (17℃) ではラフトの凝集が見られなかった。Menthol 添加後は、いずれもより高い温度 (23 ~ 27℃) でその挙動が確認できた。このことから、Menthol が存在する場合には、ラフトの T 細胞の活性化に必要なクラスタリングは、より

高い温度が必要であることがわかった。また Menthol は、低温時の膜流動性低下と同様の影響を細胞信号伝達に及ぼしていると考えられた。さらに Laurdan を用いて膜流動性を調べた結果、ラフト領域は非ラフト領域に比べて顕著に膜流動性の低下が確認できた。つまり、Menthol は、ラフト領域と非ラフト領域に対して、異なる流動性

変化もたらしていると考えられた。また、Menthol がラフトに存在する T 細胞受容体に対しても、低温時と同様の刺激を与えていることを考えると、ラフトに存在する TRPM8 との特異的な相互作用ではなく、膜流動性の変化も TRPM8 活性化に関与していることが示唆された。

29. 筋機械痛覚過敏の発症と維持におけるイオンチャネルの役割

片野坂公明, 田口 徹 (名古屋大学環境医学研究所)

村瀬詩織, 久保亜抄子, 松田 輝, 水村和枝 (中部大学生命健康科学部理学療法学科)

加塩麻紀子, 富永真琴 (生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

運動後に遅れて生じる遅発性筋痛は、機械刺激に対する痛覚過敏を特徴とし、その発生機構はよくわかっていない。我々は、この運動後の筋機械痛覚過敏において、「NGF 依存性の経路」と「GDNF 依存性の経路」により筋細径線維受容体の機械感受性が亢進すること、また、その過程で幾つかの TRP チャネルが関与することを明らかにしてきた。しかし、TRP チャネルの発現細胞と役割、また GDNF の産生機構については不明であった。

本研究では、マウスおよびラットを用いて、各種の筋痛痛覚過敏関連因子の筋組織での変動と痛覚行動を手がかりとして、遅発性筋痛発症の機序を解明するための幾つかの実験を行った。

まず、侵害受容体の機械応答に関与する TRP チャネルを明らかにするため、機械刺激感受性の後根神経節細胞 (DRG) における TRP チャネルの発現を調べた。神経活動マーカーである pERK の発現を指標に、侵害的機械刺激感受性の DRG 細胞を免疫組織化学的に同定し、TRPV1・TRPV2 との共発現を蛍光二重染色法により調べた。今回は、筋を支配する DRG 細胞の二重染色を実施できておらず、予備検討として皮膚への機械刺激によるデータを解析した。その結果、機械刺激依存的 pERK 陽性細胞の 24.1% が TRPV1 陽性であり、36.2% が TRPV2 陽性細胞であった。また、その多くが侵害受容性ニュー

ロンを含む小型から中型の細胞であった。これらの TRP チャネルの活性化は機械感受性侵害受容体の機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。

また、運動後の筋における GDNF mRNA の発現は、運動負荷後 12 時間にピークを迎えるが、その発現細胞は不明であった。そこで、in situ ハイブリダイゼーション法により発現細胞の同定を試みた。その結果、GDNF mRNA は運動後の骨格筋細胞の細胞膜近く、特に筋細胞核あるいは筋サテライト細胞核と見られる領域で増大することが明らかとなった。

さらに、NGF および GDNF 依存性経路は、どちらか一方を阻害すると遅発性痛覚過敏を生じないことから、両経路間の協働的作用の有無を検討した。単独では機械痛覚過敏を誘発しない低用量の NGF と GDNF を同時に腓腹筋に注入したところ、単独投与の場合よりも強い筋痛覚過敏が観察された。また、筋痛覚過敏時の腓腹筋への圧迫刺激により、L4-6 の DRG において pERK 陽性細胞の有意な増加が観察された。この結果から、NGF と GDNF 依存性の両経路間に何らかのクロストークが存在することが示唆された。

以上、本研究により、遅発性筋痛の発症機序に関する幾つかの新しい知見が得られた。

30. アノールトカゲにおける TRP イオンチャネル受容体活性化温度閾値の種間比較

赤司寛司, 牧野能士, 河田雅圭 (東北大学大学院生命科学研究科)

斎藤 茂, 富永真琴 (自然科学研究機構生理学研究所)

キューバに生息するアノールトカゲ3種 (*Anolis sagrei*, *A. homolechis*, *A. allogus*) は, 温度環境の異なる生息地に適応することで, 共存を可能にしている。これまでの野外の研究で, *Anolis sagrei*, *A. homolechis*, *A. allogus* の体温は, それぞれ約 34, 31, 27°C であった。

異なる温度適応に関する機構として, 異なる温度環境を感受し, 行動的調節を行うことが考えられる。そこで, このキューバ産アノールトカゲ3種を用い, 温度感受性 TRP イオンチャネル受容体 (TRPA1) の活性化温度を, 電気生理学的手法を用いて測定し, 種間比較することを

目的とした。3種 TRPA1 は, *A. allogus* において皮膚での発現量は少なかったが, すべて皮膚で発現していた。実験では, あらかじめ用意したアノールトカゲの TRPA1 遺伝子をのせた発現ベクターを用いて, ツメガエルの卵母細胞に TRPA1 を発現させた。さらに, 電気生理学的手法 (パッチクランプ法) により, 発現させた各種の TRPA1 イオンチャネルの活性化温度閾値を測定し, 比較した。実験の結果, 有意に活性化温度閾値が異なることを支持する結果は得られなかった。

31. ヤギ induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) の作出とそれを応用した遺伝子改変動物の作出

大蔵 聡, 松田二子 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

平林真澄 (生理学研究所)

多ニューロン発火活動のリアルタイムモニタリング法が確立されているシバヤギは, 反芻家畜の繁殖機能制御の脳内メカニズムを解明するうえで, 極めて優れたモデル動物である。本研究では, induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を利用するという新たなアプローチを用いて, 高効率に, ジーンターゲットによる遺伝子改変ヤギを作製する技術の開発を目指した。この技術開発に成功すれば, 家畜の生理機能解析に有用な種々のノックアウト・ノックインヤギの作出が可能となり, 畜産分野の発展へ多大な貢献が期待できる。

胎齢 120 日のシバヤギ胎子から採取した線維芽細胞に Yamanaka Factors と呼ばれる 4 遺伝子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*) のレトロウイルスベクターを感染させた (day 0)。ヤギの 4 遺伝子はクローニングされていないため, ヒトの 4 遺伝子を導入して, ヤギ iPS 細胞の樹立をめざした。レトロウイルス感染から 2 日後 (day 2) に, ヤギ線維芽細胞をフィーダー細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 上に播種した。その後 day 6 に阻害剤 (3

μM GSK3 β inhibitor, 1 μM MEK inhibitor) の添加を開始し, day15-20 頃に出現してきた細胞コロニーのピックアップを行った。ピックアップしたコロニーの形態は, ヒトやマウス, ラット等の iPS 細胞とは異なっており, ピックアップ後に培養を続けたが, 細胞は増殖しなかった。その後, ウイルスベクターの濃度, 播種するヤギ線維芽細胞および MEF の細胞数, 培地の種類, 添加する阻害剤の組合せを変えて実験を実施したが, ヤギ iPS 細胞の樹立にはいたらなかった。線維芽細胞の採取時期が適切でなかった, ヒトではなくヤギの 4 遺伝子を導入する必要があった, 4 遺伝子に加えて別の遺伝子を導入する必要があったなどが原因として考えられた。

本研究でヤギ iPS 細胞を樹立できなかったことから, 別のアプローチからノックアウト・ノックインヤギの作出を目指す必要がある。今後は, 近年急速に発展してきたゲノム編集技術 (TALEN, CRISPR/Cas 等) を用いてヤギ線維芽細胞の遺伝子改変を試みる予定である。

32. 生殖を制御する脳内メカニズム解明のための遺伝子改変モデルの作製とその解析

東村博子, 上野山賀久, 井上直子 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

前多敬一郎 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

平林真澄 (生理学研究所)

本研究はラット、マウスおよび唯一の交尾排卵モデル動物であるスunksといった神経内分泌学研究に重要な意義をもつ実験動物の遺伝子改変モデルを作成し、生殖機能を制御する脳内メカニズムの解明を目指している。

キスペプチンは、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の分泌を制御し、卵巣から分泌されるエストロジェンの GnRH ニューロンへのフィードバック作用を仲介するニューロンとして注目されている。キスペプチンニューロンは、齧歯類の脳内ではふたつの集団を形成しており、前腹側室周囲核 (AVPV) のキスペプチンニューロン集団はエストロジェンの正のフィードバックを仲介することにより排卵を制御し、視床下部弓状核 (ARC) の同ニューロン集団は GnRH のパルス状分泌を制御しており、卵巣発育を制御することで生殖機能全体の中核として機能していると考えている。本研究では、ふたつのキスペプチンニューロン集団の生理的役割を明らかにするため、Cre/loxP システムを用い、それぞれの

キスペプチンニューロン集団で特異的にキスペプチン遺伝子 (*Kiss1*) 発現を欠損するようなコンディショナル KO ラットの作出をめざし、キスペプチンニューロン特異的に Cre リコンビナーゼを発現する (*Kiss1-Cre*) ラットおよび *Kiss1-floxed* ラットを作製している。*Kiss1-Cre* ラットは現在表現型を解析中である。

また、生殖機能を調節するエネルギー状態を脳が感知するためのセンサー細胞のコンポーネントのひとつと仮定しているモノカルボン酸トランスポーター (*Mct1*) の機能解明のため、*Mct1* 遺伝子のコンディショナル KO マウスを作製している。マウス ES 細胞に *Mct1* 遺伝子のターゲティングベクターを導入し、相同組換えをおこした ES 細胞の選抜中である。

また、唯一の交尾排卵モデル動物であるスunksの遺伝子改変動物の作製に向け、スunks iPS 細胞の樹立に成功した。現在、iPS 細胞を用いた注入キメラを作製中である。

33. キメラ動物作製法を利用した小脳構築原理の解明

金子涼輔 (群馬大学大学院医学系研究科)

平林真澄 (生理学研究所)

哺乳類の脳の形態やサイズは動物種ごとに異なる。しかし、その構築原理には不明な点が多い。本研究では動物種ごとに異なる脳形態が作られるメカニズムに着目し、哺乳類脳の形態形成に関わる新たなメカニズム解明を目的とする。まず、マウスとラットの小脳の差異をモデル解析系とする。そのため、キメラ動物作製法を用いてマウス頭蓋内にラット ES/iPS 細胞由来の小脳を作り、その形態を解析する。具体的には小脳欠損マウス (Cerebelless マウス、国立精神神経医療研究センター星野幹雄博士との共同研究) 3.5 日胚にラット ES/iPS 細胞を注入し、異種キメラ動物を作製し、その小脳形態を解析する。

今年度は異種キメラ動物の作製法確立を目的として① Cerebelless マウス 3.5 日胚採取、②ラット ES/iPS 細胞株の選択、③ラット iPS 細胞-マウスキメラ脳の観察を行った。

① Cerebelless マウス 3.5 日胚採取：本実験では Cerebelless アリルをホモに有する 3.5 日胚が多数必要となる。昨年度に確立した手法にしたがい、ヘテロオスとホモオスとの自然交配により 3.5 日胚を採取し凍結保存した。現在、69 個の胚を凍結保存している。採卵と凍結を継続実施中である。

②ラット ES/iPS 細胞株の選択：野生型マウス胚とのキメラ率を指標として、最適なラット ES/iPS 細胞株を

選択した。その結果、緑色蛍光タンパク質 EGFP を恒常的に発現するラット iPS 細胞株 T1-3 が高寄与率キメラ動物作製に適することを見いだした。

③ラット iPS 細胞-マウスキメラ脳の観察：野生型 C57BL/6 マウス 3.5 日胚へラット iPS 細胞株 T1-3 を注入し、キメラ動物を得た。灌流固定し、脳切片を作製・観

察した。その結果、ラット iPS 細胞マーカー EGFP 陽性の細胞を脳内各所に認めた。

今後は上記③ラット iPS 細胞-マウスキメラ脳における EGFP 陽性細胞の細胞種を免疫染色等によって調べる。さらに、小脳欠損マウス胚を用いてラット iPS 細胞-マウスキメラを作製・解析する。

34. 神経回路形成におけるクラスター型プロトカドヘリンの機能解析

八木 健, 平林敬浩, 平山晃斉, 長谷川園子 (大阪大学)

平林真澄 (生理学研究所)

クラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) 遺伝子はゲノム上の比較的狭い領域に特殊なクラスター構造を形成しており、多様化したプロトカドヘリン (Pcdh) α , Pcdh β , Pcdh γ 分子群を発現している。マウスではこれまでに Pcdh α が 14 分子種 ($\alpha 1$ - $\alpha 12$, $\alpha c 1$, $\alpha c 2$), Pcdh β が 22 分子種 ($\beta 1$ - $\beta 22$), Pcdh γ が 22 分子種 ($\gamma A 1$ - $\gamma A 12$, $\gamma B 1$, $\gamma B 2$, $\gamma B 4$ - $\gamma B 8$, $\gamma c 3$ - $\gamma c 5$) 存在することが知られており、いずれの分子種も一回膜貫通型タンパク質で中枢神経系において強く発現している。これら約 60 種のアイソフォームから構成される cPcdh は個々の神経細胞で差次的発現し、各分子は分子種特異的な細胞接着活性を有することから神経回路形成における神経細胞の個性化に寄与していることが示唆されている。本研究では、その cPcdh の分子的多様性がシナプス形成時の細胞選択や機能的神経回路形成にどのように関与しているかを明らかにすることを目的として、種々の cPcdh 遺伝子改変マウスを作製した。

これまでの研究で全ての cPcdh 遺伝子を欠損させたノックアウトマウスを作製したが生後まもなく死亡してし

まうため生体における神経回路形成における同遺伝子の機能解析が不可能であった。そこでまず本研究では Cre 発現依存的に全ての cPcdh 遺伝子を欠損する cPcdh 遺伝子コンディショナルノックアウト (cPcdh cKO) マウスの作製・解析を行った。現在、この cPcdh cKO マウスと脳の各領域特異的に Cre を発現する各種トランスジェニックマウスと交配することで領域特異的に cPcdh 遺伝子を欠損させたマウスについて解析を進めており、これまでに興味深い表現型が得られている。

また cPcdh の内、他の分子種とは異なり、ほぼ全ての神経細胞で発現している Pcdh $\gamma c 3$, c4, c5 分子種の機能を解析することを目的とし、Cre 発現依存的にこれらの分子種以外が欠損する遺伝子改変マウスを作製した。さらに、CRISPR/Cas9 系を利用し Pcdh $\gamma c 3$, c4 遺伝子ノックアウトマウスの作製にも成功した。

今後、これらの遺伝子改変マウスについて詳細な解析を行うことで神経回路形成における cPcdh 遺伝子の分子的多様性の意義が明らかになると思われる。

35. 骨形成因子 (BMP) 阻害蛋白質 CHRDL 1 のコンディショナルノックアウトマウス作製

山岸 覚 (浜松医科大学解剖学講座神経機能学分野)

平林真澄 (生理学研究所)

骨形成因子 (BMP) は、骨形成だけでなく、成長因子、サイトカイン、モルフォゲンとしても機能する重要な因

子である。BMP は局所的に作用するが、受容体を発現している細胞は多く存在するので、ターゲット以外の細

胞に作用してしまう可能性がある。この副作用を抑制し、適材適所で機能する為には、BMP の厳密な濃度調節が必要である。Chordin に代表される BMP 阻害因子は、細胞外で BMP と結合することにより、BMP の効果を減弱し、微妙な濃度調節を行っている。Chordin 以外の BMP 阻害因子としては、Noggin, follistatin, CHRDL が知られている。

CHRDL1 は神経幹細胞からグリア細胞の分化を抑え、神経細胞を分化させる機能が知られている。また、X 染色体関連巨大角膜症の発症に拘わっている事が報告されている。更には、他の BMP 抑制因子の機能から、胚軸形成や血管形成、軸索伸張誘導にも関連していると予想される。しかしながら、実際の機能は未解析であり、不明な点が多い。

そこで我々は、未だに CHRDL 1 ノックアウトマウスの論文報告が無い事に注目し、CHRDL 1 のコンディショナルノックアウトマウス作製し、生体内での CHRDL

1 の機能を明らかにすることとした。

CHRDL1 コンディショナルノックアウトマウスのターゲティングベクターは、アメリカの KOMP (knockout mouse project) から購入した。ターゲティングベクターは X 染色体上にある CHRDL 1 の遺伝子 exon2, exon3 に loxP 配列が挿入され、Cre 存在下で組換えが生じ、フレームシフトを起こすようにデザインされている。

昨年度 ES 細胞へのエレクトロポレーションが行われ、3 つのポジティブクローンを得ることができた。本年度はこの ES 細胞を用いてキメラマウスの作製を試みたが、その多くは腸ヘルニアにより致死となり、難航した。

しかしながら、数多くインジェクションすることにより、低確率ながらも生存するキメラマウスが得られ、雄 5 匹雌 1 匹の計 6 匹のキメラマウスを得ることに成功した。現在 C57BL/6 マウスと交配し、ジャームライントランスミッションを待っている段階である。

36. 分裂酵母ゲノムの 3 次元構造解析

大隅正子, 佐藤真美子, 高木智子 (日本女子大学)

野間健一 (The Wister Institute, Gene Expression and Regulation Program)

中野賢太郎 (筑波大学大学院 生命環境科学研究科)

岡田 仁 (認定 NPO 法人総合画像研究支援)

宮崎直之, 村田和義 (生理学研究所)

遺伝子の転写や複製といった核内における様々な分子活動を深く理解するためには、ゲノムの構造を知ることが重要である。ゲノムの 3 次元構造を解明するため、3C (Chromosome Conformation Capture) 実験のデータを元にして、コンピューターシミュレーションによりゲノム構造のモデル化を行う技術を開発したが、正確なモデリングのためには、核および核小体の大きさ・形状の情報が必要不可欠である。そこで、SBF-SEM により多数の細胞で細胞核と核小体を計測し、それらの平均 3D 形状を算出することを目的とする。

細胞周期を同調していない分裂酵母では、各周期の長さから考えて全細胞の 75% が G2 期に属している。そこで、細胞の平均構造を知るため G2 期の細胞核の形状、核小体の形状を詳しく計測する。正確な核の 3D 構造を得ることが重要であるため、Gatan 3View を内蔵した

SBF-SEM を用いて解析した。核の大きさだけでなく、核小体も観測するため、細胞はオスミウム酸による固定法を検討する。細胞ごとの大きさのばらつきの影響を抑えるために、20 個以上の細胞の計測を行う。得られた核の平均 3D 構造は、これまでに開発したコンピューターシミュレーションによる 3 次元ゲノム構造のモデリングで、束縛条件を決めるのに活用することを目的とする。

各細胞周期で、核およびゲノムの 3 次元構造がどのように変化するかを調べるため、今年度は、細胞周期を同調させた細胞から S, G1, M 期の核の形状の測定をするために 23 細胞を選び、解析ソフト、アミラ 5 を用いて計測した。

FIB SEM 法では、試料を削るときに Ga イオンを吹き付けながら行うために、試料の導電性がさらに高められ

るのに比して、SBF SEM 法では SEM 内に内蔵されたミクロトームにより切片作製後試料表面を SEM で記録するために、固定による重金属の導電性のみであるため、チャージを起こしやすい難点がある。酵母細胞は TEM 解析においても、通常のアスミウム酸固定法は用いられない難試料であるが、3D SEM 法においても、3D 解析

を行うにあたっての基本的な幾つかの問題点を見出すことができた。一方、現在電顕試料の固定法として、酵母以外では殆ど用いられていない過マンガン酸カリウム固定が、SBF SEM および FIB SEM 法による観察において、有効な固定法であることが立証できた。

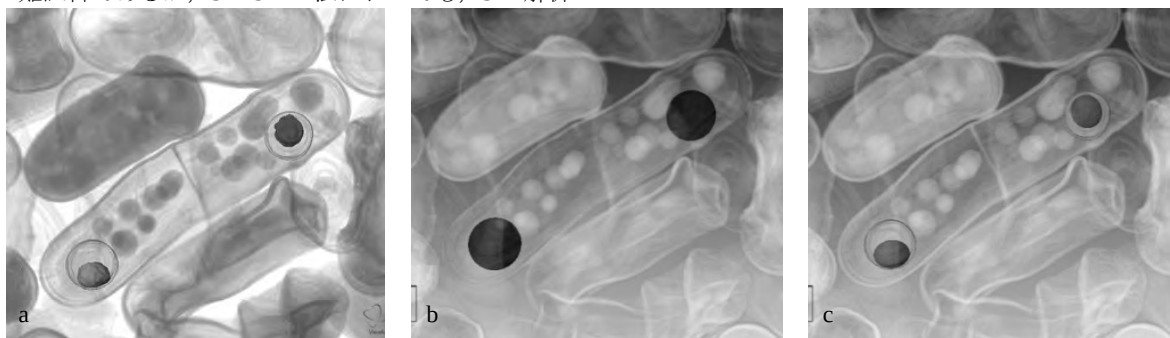


図 Amira による 3D 解析像 a. 核と核小体を 3D 解析、体積計測 b, c. 計測した核、核小体を楕円体と近似し x 軸, y 軸, z 軸の長さを計測

37. ハイブリッド顕微鏡用環境制御セルの開発

箕田弘喜, 川名佑貴, 上野竜佑 (東京農工大学)

浸水状態の生体高分子の光学顕微鏡・電子顕微鏡同時直接観察を実現するため、透過電子顕微鏡に光学顕微鏡を組み合わせた電子・光子ハイブリッド顕微鏡に、環境制御型透過電子顕微鏡法(E-TEM)を組み合わせた環境制御セル(以下セルという)の製作を進めている。これまで封じきりタイプやガスフロータイプなど幾つかのタイプのセルの開発を進めてきたが、今回は、比較的高い分解能が得やすい炭素膜による封じきりタイプのセルを使い、電子線照射による試料ダメージの環境依存性を調べた。

生物試料がクライオ条件下と液中条件下にあるものについて、ハイブリッド顕微鏡にて電顕観察し、露光時間(電子照射量)の増加による試料の損傷を調べた。無固定の生物試料では、電子線照射損傷により、構造破壊が進むことが予想される。その破壊の程度を定量的に調べるために、カタラーゼの薄膜結晶試料を用いて、電子の照射量に対する電子回折パターンの強度の減衰を調べた。

実験の結果、結晶由来の回折ピークの強度の減衰は、クライオ条件下に比べて液中条件下で、数倍程度遅くなるという結果を得た。現在、再現性の確認を進めている。

上記と並行して、電子・光子ハイブリッド顕微鏡のハ

イブリッド機能を利用して、蛍光タンパク質に対する電子線照射の影響も調べている。EGFP は蛍光タンパク質の一つであり、電子線照射により破壊され、退色すると予想される。しかし、実験の結果、その予想に反し、電子線による励起発光(CL)が見出されたとともに、電子線照射をすることで、EGFP からの光照射による励起蛍光(PL)についても、蛍光強度が増強するという驚くべき結果を得た。

見出されたこの現象について、試料の周囲環境に対する影響を調べるため、「常温乾燥」、「凍結(クライオ条)」、「液中」の異なる環境条件下で、同様の観察を行っている。その結果、乾燥条件と比べて、液中条件下では、PL 蛍光強度の増強効果は小さく、CL 発光強度も小さいという結果が得られている。これらの結果は、試料を支持する下地膜の種類によっても異なることから、電気的な効果、すなわち、試料の帯電状態に影響がある可能性が考えられた。そこで、H26 年度は、試料の pH を変化させた条件でも実験を進める予定である。液中条件下による CL 強度の低下は試料の破壊によるものであり、試料の電子線損傷を抑制するための指標となる可能性があるため、CL 強度の環境依存性についても、今後研究を進める予定である。

38. ノロウイルスの高分解能構造解析

片山和彦, 村上耕介, 戸高玲子 (国立感染症研究所)

宮崎直之, 村田和義 (生理学研究所)

背景：ヒトノロウイルス (HuNoV) 感染による下痢症は、世界中で毎年数百万人規模の感染者を出し、大きな問題となっている。発見から 40 年以上が経過するが、HuNoV を研究するためのモデル動物や、効率良くウイルスを増殖させる培養細胞が限られているため、病原性発現機構は不明な点が多く、効果的な治療薬も存在しない。

HuNoV の粒子構造の研究は、組換えバキュロウイルスで大量発現させたウイルス様中空粒子 (VLP) を用いて行われてきた。しかし、感染性粒子の構造は未だ決定されていない。一方、近年、マウスから発見され、モデルウイルスとして利用され始めたマウスノロウイルス (MNV) は、マウス由来の株化培養 RAW で増殖させることが可能であるため、感染性ウイルス粒子を用いて構造解析が行われつつある。しかし、MNV-VLP 作製と安定した供給ができず、VLP の構造解析は進んでいない。

目的：本研究では、唯一培養細胞で増殖可能な MNV-VLP と MNV 感染性粒子の高分解能三次元構造をクライオ電顕により解析し、両者を比較検討することで、MNV 粒子形成、細胞への感染の分子機構を研究する。本年度は、大量発現に成功した MNV-VLP の構造解析を推進した。

方法：MNV-VLP を親水化処理した Quantifoil 上に、Vitrobot (FEI company) を用いて急速凍結して氷包埋する。凍結グリッドは液体窒素素内でクライオ試料ホルダー (Gatan 914) に載せてクライオ電子顕微鏡 JEM2200FS

(JEOL) にセットし、高分解能クライオ電子顕微鏡像を CCD カメラ (Tietz F416) を用いて記録する。画像データは EMAN Software を使って単粒子解析し、高分解能三次元構造を解析する。得られた電顕マップには構造が既知の類似ウイルスを使ったホモロジーモデリングを行い、MNV-VLP の分子モデリングを試みる。

結果：MNV-VLP のクライオ電子顕微鏡写真が得られた。部分的に粒子のアグリゲーションが認められたが、グリッド当たり数千のイメージ取得が可能であった。現在、画像データを EMAN Software を使って単粒子解析し、高分解能三次元構造を解析している。

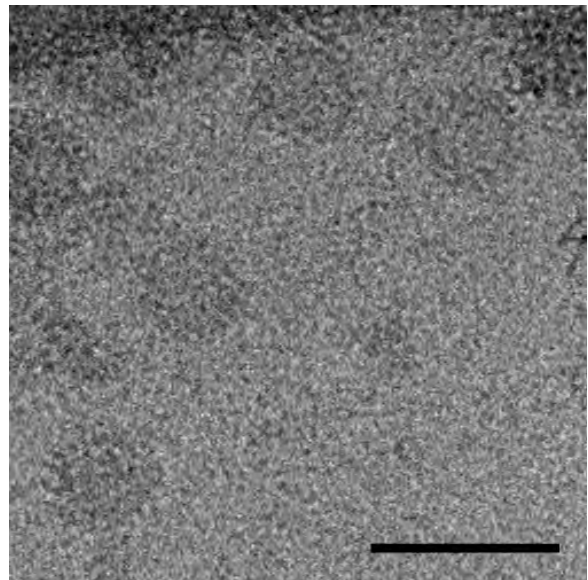


図 MNV-VLP のクライオ電顕像。スケール 100nm。

39. Gatan 3View によるエポキシ包埋結核菌の観察，実験結核肺病変における結核菌の局在部位の検討及び，cryo-TEM による抗酸菌の基本的な形態計測

山田博之（公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部）

甲斐憲子（テラベース株式会社）

宮崎直幸，村田和義（生理学研究所 脳機能計測・支援センター形態情報解析室）

Gatan 3view（連続ブロック表面 SEM）を用いて低菌量吸入感染により形成された肺結核病変のエポキシ樹脂ブロックにおける結核菌の局在部位の特定を試みた。今回用いたサンプルは，通常の TEM 観察用に作製したエポキシ樹脂ブロックで，Gatan 3view 観察のためには導電性が不足していたため，観察像は帯電によるノイズが多数発生してしまい，詳細な微細構造の観察は困難であった。このため，潜在感染モデルの検討はできなかった。このように，組織での観察が帯電によるノイズ発生で微細構造の観察が困難であったことから，より樹脂領域が多い結核菌のエポキシ樹脂包埋サンプルでは，より多くのノイズの発生が懸念されたため，Gatan 3 view による観察は実施しなかった。

また，グルタルアルデヒド固定した抗酸菌サンプルの氷包埋 Cryo-TEM 観察は，結核菌 (*Mycobacterium*

tuberculosis H37Rv 株) および非結核性抗酸菌 *M. abscessus*, *M. aurum*, *M. austroafricanum*, *M. celatum* type I, *M. celatum* type II, *M. chelonae*, *M. chitae*, *M. farcinogenes* の 6 種，1 亜種について実施した。

結核菌 H37Rv 株の形態計測では，菌体幅，菌体長，aspect ratio の平均 $\pm$ SD はそれぞれ $0.55 \pm 0.055 \mu\text{m}$ ， $2.673 \pm 0.831 \mu\text{m}$ ， 4.88 ± 1.43 であった。また，*M. abscessus* に関しては，菌の凝集が著しく再検の必要を認めた。一方，*M. farcinogenes* では，抗酸菌には稀な菌体の分岐が見られ，SEM 観察像の裏付けが得られた。本研究は非常に地味な仕事であるが，将来の抗酸菌の微細形態アーカイブ構築に向けて，今年度は残りの抗酸菌種が約 30 種について，さらにデータの蓄積を行いたい。

40. 先端電顕観察法によるイネ種子細胞内タンパク質顆粒形成機構の解明

増村威宏，佐生 愛（京都府立大学大学院・生命環境科学研究科）

【目的】

イネ種子貯蔵タンパク質は，種子形成期の同一細胞内の粗面小胞体上でグルテリンとプロラミンが合成されるが，グルテリンは貯蔵型液胞（PB-II）へ，プロラミンは小胞体由来のプロテインボディ（PB-I）へ別々に集積する。PB-I には，大きさが異なる複数のプロラミン分子種が層状に局在するが，PB-I 内部における各プロラミンの立体的配置は不明のままであった。

本研究では，立体構造の観察に適している SBF-SEM などの先端電子顕微鏡により PB-I 構造の解析を行い，種子形成期のイネ種子より組織を調製し，胚乳細胞内の PB-I 形成機構を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

試料調製は，京都府立大学にて実施した。成熟期のイ

ネ種子より，プロテインボディを含む組織から観察試料を調製した。種子を半切し，4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて，脱気しながら室温で 3 時間固定した。PBS で洗浄後，新しい PBS を加え室温・減圧下で一晩浸漬した。PBS を 1% 酢酸ウラニル溶液に交換し，室温・減圧下で一晩浸漬した。両刃カミソリで種子を厚さ 1 mm 以下にスライスし，EtOH シリーズで脱水を行った。50% LR-White/EtOH で一晩，100% LR-White で更に一晩置換した。LR-White を入りゼラチンカプセルに種子スライスを移し，60℃で重合させた。

試料の観察は，生理学研究所にて実施した。観察試料を 1 mm 角にトリミングし，シルバースペイントを用いてサンプルを試料台に接着し，シルバースペイントでコーティングした。SBF-SEM を用いて（SEM；MERLIN，

ZEISS 社), 加速電圧: 1.3 kV, I Probe: 150 pA, Mag: 5, 000, 画像のサイズ: 4, 096 x 4, 096, Slice 数: 30, Pixel size: 5.11 nm, Slice thickness: 100 nm, Field of View: 20.9 μm の条件で画像取得を行った。得られた連続断層像を画像処理し, Fiji でアライメントし, スタックファイルを作成した。また, Amira ソフトを用い, 画像中のデンプン粒やプロテインボディの一部をセグメンテーションした。

【結果と考察】

今年度はイネ完熟種子を材料に用い, 試料を調製した。その試料を生理学研究所の SBF-SEM を用いて観察を行

った。その結果, イネ種子中のデンプン粒とプロテインボディの立体的な位置関係を示す像が得られた。デンプン粒の隙間を埋めるようにプロテインボディが観察された。しかし, TEM 観察像で区別出来た2種類のプロテインボディを明確に区別することは困難だった。PB-I, PB-II を区別するためには, 電子染色の条件を SBF-SEM に合わせる必要があると考えられた。次年度は, SBF-SEM 観察においても PB-I, PB-II を区別し, PB-I 内部における各プロラミンの立体的配置を観察する予定である。

41. ミドリムシのオルガネラ観察

岩崎憲治 (大阪大学・蛋白質研究所)

宮崎直之, 村田和義 (生理学研究所)

本研究では, 我が国において分子レベルの研究が進んでいるミドリムシ内の光センサー器官 PFB について, 当該研究機関が所有する先端電子顕微鏡技術- ミクロトーム組み込み型走査電顕や位相差電顕を用いて構造学的研究を行う。本年度は, 申請書の研究計画に記載の Serial Block Face SEM (SBF-SEM) を用いたミドリムシ一匹丸ごとの三次元構造再構成を試みた。その目的は, 光センサー器官である PFB の細胞, 鞭毛等に対する配向の規則性の検証, 探索を行うためである。

研究室において明暗周期で培養したミドリムシを生理研に輸送し, 化学固定およびブロック染色を施してから樹脂に包埋して, SBF-SEM で連続スライス表面像を観察した。その結果, ミドリムシ細胞体丸ごとの三次元再構成像を得る事ができた。この像から, 細胞内部のオルガネラの構造を立体的に観察する事ができた。しかし, PFB 光センサーの配向の規則性に関しては, 固定時のアーティファクトとしてミドリムシの細胞体が激しく変形しており, 細胞形状に対する相対的な配置の評価を行う事ができなかった (図)。このような細胞体変形は, 細胞が化学固定液に曝され, 固定されるまでに起こったと考えられる。

PFB の位置の同定ならびに配向の様子は, 主鞭毛の位置の同定とその本体側末端の位置の同定とが必要である。

通常, 主鞭毛の位置は遊走時等にみられる円筒状の細胞形状から容易に同定できるが, 今回, 固定時の激しい細胞体変形によりそれも困難であった。今後は, 細胞体が伸張する状態で化学固定できる条件を検討し, 細胞体軸が同定できる条件で, 再度データ収集を試みる予定である。

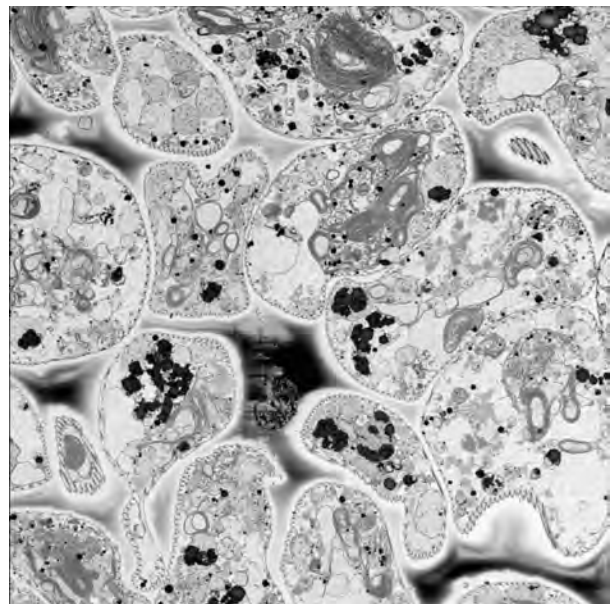


図 ミドリムシの SBF-SEM 像

42. AAA タンパク質 Cdc48/p97 によるオルガネラ形態制御の分子機構の解明

江崎雅俊, 小椋 光 (熊本大学)

宮崎直幸, 村田和義 (生理学研究所)

ミトコンドリアは ATP を産生するオルガネラで、増殖細胞においてヒモ状の形態を示す。この形態は静的なものではなく、ミトコンドリアの融合と分裂によって維持されている。この形態維持機構の破綻は重篤な神経変性疾患の原因となることも近年明らかとなってきた。

私たちは、サイトゾルに存在する AAA 型シャペロンの 1 つ Cdc48 の機能欠損が、ミトコンドリアの巨大な塊の形成を引き起こすことを蛍光顕微鏡観察によって見出していた (図 1A-B, Esaki & Ogura, 2012)。しかしながら、この巨大な塊は、膜融合して巨大なミトコンドリアが形成されていることを示すのか、あるいは小さなミトコンドリアが膜融合しないで集積しているのか、解像度の限界から、不明なままであった。そこでこの点を明らかにするために、出芽酵母細胞の超高圧走査透過型電子顕微鏡観察 (ST-HVEM) および走査型電子顕微鏡を用いた連続断面観察 (SBF-SEM) を行った。

ST-HVEM では、1MeV の高加速電子を用いることによって、数 μm の試料でも十分に電子が透過でき、また、厚い試料を、直径数 nm の電子線プローブを用いて走査し、透過像を微小な点から独立に集めるため、非弾性お

よび多重散乱電子の画像への影響が抑えられる。その結果、樹脂に包埋した約 3 μm の酵母細胞において、オルガネラや膜構造の観察に成功した (図 2)。これは、厚い生物試料について超薄連続切片を用いずに細胞内構造を直接 3 次元観察した初めての例である (Murata et al., 2014)。

一方、SBF-SEM ではまず、樹脂包埋された細胞の、切削表面に現れる超微形態を走査電子顕微鏡 (SEM) 観察する。そして、さらに試料表面をダイヤモンドナイフで薄く切削し、新たに出現する表面の形態を SEM で取得する。これを繰り返す、得られた細胞の連続断面画像から 3 次元構造を再構築する。野生型酵母の SBF-SEM 観察では、ヒモ状につながったミトコンドリアが観察されたが、Cdc48 の機能欠損株では、断片化した小さなミトコンドリアが集積している様子が観察され、それぞれのミトコンドリア膜は繋がっていないことが明らかとなった (図 1C-D)。これにより、Cdc48 は、ミトコンドリア融合反応において極めて重要な役割を果たしていることが分かった (Miyazaki et al., 2014)。

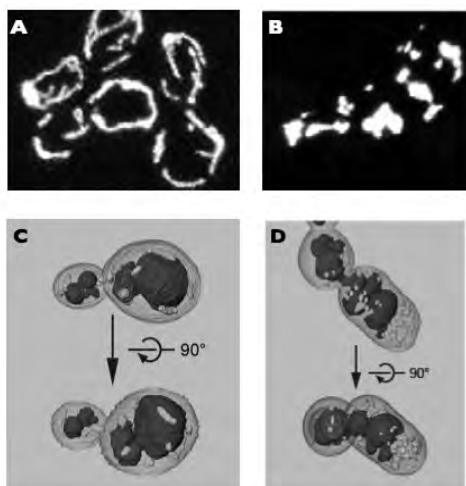


図 1 Cdc48 変異株ではミトコンドリアが凝集する
A-B) 蛍光タンパク質を用いたミトコンドリア形態観察像 (A, 野生株; B, Cdc48 変異株)。共焦点蛍光顕微鏡を用いて取得した 3 次元画像を 2 次元に投影した。
C-D) SBF-SEM 連続断面画像から構築した 3D モデル。(C, 野生型株; D, Cdc48 変異株)

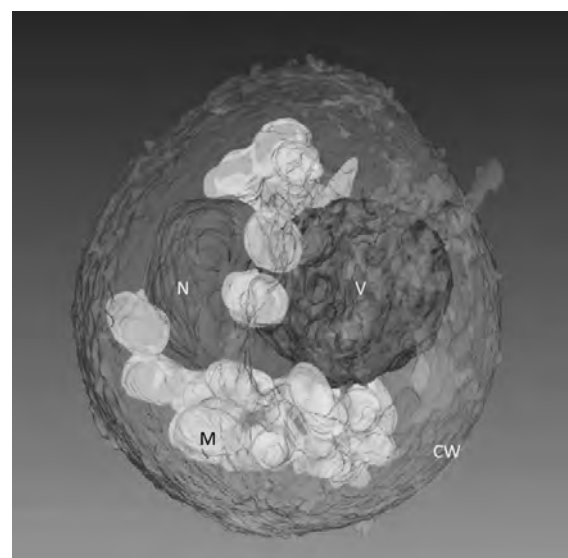


図 2 酵母の走査透過型超高圧電子顕微鏡観察による 3 次元再構成像
細胞膜 (CW), 核 (N), 液胞 (V) およびミトコンドリア (M) がはっきりと観察された。

43. 逆行性レンチウイルスベクターを用いた覚醒を導く神経機能の解析

山中章弘, 犬東 歩, 常松友美 (名古屋大学・環境医学研究所)

田淵紗和子 (総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻)

乾あずさ (名古屋大学理学部)

小林憲太 (生理学研究所・ウイルスベクター開発室)

逆行性レンチウイルスベクターを用いて特定の神経回路を標識し、その活動を光遺伝学や薬理遺伝学を用いて操作することを試みている。特に視床下部に細胞体が存在し、睡眠覚醒調節に重要な神経ペプチド「オレキシン」を産生する神経細胞を対象に研究を行っている。視床下部に少数が疎らに存在するオレキシン神経細胞は、脳内の幅広い領域に軸索を投射しているが、どのオレキシン神経がどの領域に投射しているかなど、投射先とその役割について十分分かっていなかった。そこで、逆行性レンチウイルスベクターを用いて、オレキシン神経細胞の投射先別に感染させ、どのオレキシン神経細胞がどの領域に投射しているのかについて明らかにすることを試みた。オレキシン神経細胞特異的に tTA を発現する遺伝子

改変マウスを用い、主な投射先のひとつである、青斑核に TetO 下流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を有する逆行性レンチウイルスベクターを感染させた。tTA は TetO に作用して下流の遺伝子発現を促進させるため、青斑核に投射するオレキシン神経細胞が GFP を発現すると考えられる。しかしながら、今回の実験ではオレキシン神経細胞に GFP の発現が全く認められなかった。このことは、青斑核に感染させた逆行性レンチウイルスベクターの逆行性感染と遺伝子発現調節が上手くいっていないことを示している。今後は原因を詳細に検討すると同時に狂犬病ウイルスなど他の逆行性標識の可能性についても検討を行う予定である。

44. 逆行性ウィルスベクターを用いた体液恒常性維持神経回路の解析

野田昌晴, 檜山武史 (基礎生物学研究所)

小林憲太 (生理学研究所)

ナトリウムは体液を構成する主要なイオンであり、細胞内外の物質輸送や神経活動など重要な生理機能に関わっている。体液のナトリウムレベルは脳において常に監視され、塩分摂取行動の制御などを通じて一定に保たれている。Na レベルセンサーである Na_x チャンネルは脳弓下器官と終板脈管器官に発現しており、特に脳弓下器官には、体液ナトリウムレベルの監視と塩分摂取行動の制御に関わる中枢が存在することが、過去の我々の研究から明らかになっている。しかし、塩分摂取行動の制御を担う神経回路の実体はまだ明らかになっていない。本研究では、逆行性遺伝子導入ウィルスベクターを用いて、その解明を試みた。

動物に利尿剤を投与し水と塩欠乏食だけをしばらく与え続けると、塩欠乏状態に陥る。この時、動物は塩分に対する渴望を示し、食塩水の摂取量が増える。アンジオ

テンシン II 受容体 AT1a の阻害剤を予め脳室内に投与しておく、食塩摂取の増加は失われる。脳において、AT1a 受容体は、脳弓下器官や終板脈管器官のニューロンに特に高い発現を示した。そこで、本研究では脳弓下器官の AT1a 発現ニューロンに着目して以下の実験を行った。

脳弓下器官からの神経投射先として報告されている神経核のうち、ある神経核 (論文未発表のため、以下、神経核 X と記載) を破壊すると塩欠乏時の塩分摂取の増加が失われた。神経核 X に逆行性標識薬 (蛍光標識したコレラトキシン b サブユニット) を局所注入し、神経核 X に投射している脳弓下器官のニューロンを標識したところ、そのほとんどが AT1a を発現していた。

内在性の AT1a 遺伝子を loxP 配列で挟んだ AT1a-floxed マウスの神経核 X に Cre リコンビナーゼ遺伝子をコード

した逆行性遺伝子導入ウィルスベクターを局所注入し、神経核Xに投射しているニューロン特異的に *AT1a* 遺伝子を欠損させたマウスを作成した。このマウスを用いて行動解析を行ったところ、塩欠乏時の塩分摂取量の増加

が見られなかった。以上の結果から、脳弓下器官のニューロンのうち、神経核Xに投射する *AT1a* 発現ニューロンが塩分摂取行動を担っていることが明らかになった。

45. 光遺伝学的手法によるマカクザルニューロン活動の操作と機能解明

蔵田 潔，木下正治（弘前大学大学院・医学研究科）

伊佐 正（生理学研究所・認知行動発達機構研究部門）

近年開発されたチャンネルロドプシン2等の光遺伝学的ツールは、ニューロン活動をミリ秒単位で制御することを可能にし、神経回路を操作的に調べる上で非常に重要になってきている。光遺伝学はマウスなどの小さな脳を持つ動物ではすでに多数の報告がなされているが、マカクザルのような大型の脳を持つ動物での報告はまだ僅かである。我々のこれまでの研究により、光照射によって細胞を過分極させる改変型ハロロドプシン *eNpHR* をマカクザルの一次運動野 (M1) に導入し光刺激を行うことで、マカクザル M1 ニューロンのスパイク活動を抑制できることを確認している。本研究では、光刺激によりニューロン活動だけでなくマカクザルの筋活動を変容させることを目的として実験を行った。

実験には本共同利用研究開始以前に、過分極性オプシンである ArchT の遺伝子を搭載したアデノ随伴ウィルスベクター AAV1-CAG-ArchT.GFP を右半球の M1 に注入した1頭のマカクザルを用いた。この注入実験は生理学研究所霊長類遺伝子導入実験施設において行われ、注入か

ら1週間以上経過した後、生理学研究所の飼養、実験施設へと移送し実験を行った。実験ではサルに餌の小片を与えて前肢の到達保持運動を行わせ、同時に金属微小電極に光ファイバーを張り合わせた *optorode* をサル M1 に刺入してニューロン活動記録、電気刺激、光刺激を行い、さらに前肢の筋群から筋電図 (EMG) の記録も行った。M1 の *optorode* から微小電気刺激を行い EMG に短潜時の応答が現れる部位を検索し、さらに同じ部位で *optorode* から波長 589 nm の光刺激を行った。1試行の M1 光刺激ではサルの行動自体の明確な変容は観察されなかったが、数千回の光刺激の効果を加算平均することで、M1 ニューロン活動だけでなく前肢 EMG にも光刺激による活動の変化が観察された。M1 微小電気刺激により EMG は増強されたのに対し、M1 光刺激により EMG は減弱するという逆向きの効果が観察された。これは導入した過分極性オプシンの ArchT が光刺激により活性化され、M1 ニューロンの活動さらに前肢筋群の活動が抑制されたためと考えられる。

46. PET 分子イメージングによる霊長類脳遺伝子発現抑制実験におけるターゲット蛋白の発現量、発現部位の非侵襲測定法の確立

尾上浩隆，林 拓也，横山ちひろ，田原 強，高良沙幸

（理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター）

山森哲雄，渡我部昭哉（基礎生物学研究所）

伊佐 正，南部 篤，西村幸男，額綱大輔，畑中伸彦，高司雅史，加藤利佳子（生理学研究所）

木下正治（弘前大学）

shRNA を発現するウィルスベクターを脳実質に注入することにより、サル類（マカクサル、マーモセット）に

おいても遺伝子発現抑制が可能になってきた。昨年度に引き続き、PET (Positron Emission Tomography) による

分子イメージング技術の適用し, *in vivo* での遺伝子発現の変化を非侵襲的に捉えるために、マーモセットの MRI 頭部画像を取得しウィルスベクターの注入を行った。

アデノ随伴ウイルス(AAV)を用い、マーモセットのドーパミン D1 または D2 受容体遺伝子の shRNA を組み込んだ遺伝子ベクターを作製し、麻酔下でステレオ固定装置固定下において MRI 画像を撮像した頭部画像をもとに発現抑制ベクターを脳実質(線状体)に注入した。

ドーパミン D1 受容体の発現変化は $[^{11}\text{C}]\text{SCH23390}$ を用いて、D2 受容体については $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ を用いて PET による測定を行った。その結果、それぞれの受容体

の発現が線状体で 1-2 割程度減少したが、投与部位では 4 割程度、有意に減少していること、目的外の遺伝子発現(shD1R に対しては D2R)に対しては影響がほとんどないことを確認した。また、部位特異性、受容体選択性については、*in situ hybridization* によっても確認され、PET の結果と良い相関性が認められた。したがって、 $[^{11}\text{C}]\text{SCH23390}$ および $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ を用いた PET による非侵襲的測定法は、*in vivo* における線状体の D1, D2 受容体発現量、発現部位の測定に有用な測定法であることが確認された。

47. マカクサル運動皮質損傷後の機能回復にともなう代償的運動出力経路の解明

肥後範行, 村田 弓 (産業技術総合研究所)

大石高生 (京都大学霊長類研究所)

山本竜也 (つくば国際大学)

西村幸男, 伊佐 正 (生理学研究所・認知行動発達機構研究部門)

マカクサル的大脑皮質第一次運動野をイボテン酸により不可逆的に損傷した後、把握動作を用いたリハビリ運動訓練を行うことによって精密把握を含む巧緻動作が回復することを明らかにした(Murata et al., 2008)。また、PET を用いた脳機能イメージングとムシモールを用いた神経活動抑制実験の結果から、運動前野腹側部において脳活動の上昇が生じることが機能回復に必須であることが明らかになった(Murata et al., submitted)。さらに近年の解剖学的解析によって、回復に伴って運動前野腹側部からの出力線維に構造的な変化が生じていることを示した。新たに形成される運動前野腹側部からの出力線維が、どのような機能的な役割を持っているのかを知るためには、特定の経路に選択的な不活性化を行う必要がある。そこで生理学研究所認知行動発達機構研究部門の伊佐正教授らが確立した、遺伝子導入技術を用いた経路選択的不活性化を用いた実験を計画した。具体的には、第一次運動野損傷後把握動作の回復が見られた個体に逆行性レンチウイルスベクターとアデノ随伴ウイルスベクターの 2 重感染を行う。ただし大腦皮質に対するウイルスの感染効率が未知のため、今年度は第一次体性感覚野から第

一次運動野への感覚入力経路を阻害する実験を行うことで大腦皮質に対するウイルスの感染効率を検証した。マカクサルの中心溝周辺領域において、皮質内微小刺激をもちいた運動機能地図の同定を行うとともに、触覚刺激を与えながら電気生理記録を行うことで、第一次運動野と第一次体性感覚野の手領域の同定を行った。解剖学的トレーサーを用いた先行研究から、第一次体性感覚野の中ではブロードマンの 2 野から運動野への出力が多く出ているため、この領域をターゲットとしてアデノ随伴ウイルスベクターの導入を行った。一方、第一次運動野の中では中心溝前壁に体性感覚野からの入力を多く受ける領域があるため、この領域を中心に逆行性レンチウイルスベクターの導入を行った。実験を進める中で、ウイルスベクター導入に用いるマニピレータが第一次運動野と第一次体性感覚野にアクセスするために最適な形状や、導入の障害となる硬膜と脳実質の癒着を防ぐ方法など、技術的な改良を行った。今後、まずは大腦皮質へのウイルス導入手技の確立を目指し、その後に運動前野腹側部からの運動出力経路を標的にした実験を行う。

48. 時計関連遺伝子欠損マウスの行動様式解析

清水貴美子（東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻）

高雄啓三，宮川 剛（生理学研究所・行動様式解析室）

鬱病などの感情障害はしばしば生体リズムの異常を伴い、またリズム障害の患者では鬱病などの発症頻度が高い事が知られている。このように時計システムと情動などの高次脳機能との連関が示唆されているものの、時計システムが精神機能に寄与するメカニズムに関しては何もわかっていない。本研究課題では、時計関連遺伝子の欠損マウスを用いて行動の表現形を解析することによって、精神機能をはじめとしたさまざまな機能と生体リズム維持機構との連関を明らかにする事を目的とする。

本研究の目的を達成するため会議・検討を行い、2種類の時計発振遺伝子と時計のアウトプットに関わると考えられる遺伝子の、計3種の変異マウスについて解析を行う計画を立てた。一つ目の時計変異マウスについては、網羅的行動テストバッテリーに向けて、さらにバックク

ロスが必要であると判断し、Bl6 系統へのバッククロスを進めた。マイクロサテライトマーカーによる遺伝子背景の検査を行った結果、97.5% Bl6 background であった。今後再度、バッククロスをおこない、マウスを繁殖させ、行動解析を行う予定である。

2つ目の時計変異マウスは、ノックアウトにした場合の生育に問題がある為、Cre をもちいた前脳特異的なコンディショナルノックアウトマウスをもちいる。現在ノックアウトの効率を確認中であり、確認でき次第、マウスの繁殖および行動解析に供したい。

時計のアウトプットにかかわる遺伝子に関しては Bl6 系統でありノックアウトマウスが完成しているため、今後できるだけ早く繁殖をすすめ、行動解析に供する予定である。

49. オプトジェネティックスを用いたマカクサル感覚運動機能の解析に関する基盤的研究

関 和彦，山田 洋，武井智彦，戸松彩花（国立精神・神経医療研究センター・モデル動物開発研究部）

小林憲太（生理学研究所・ウイルスベクター開発室）

光遺伝学的技術を用いてマカクサルの末梢神経活動を人為的に制御する技術を確立することが本研究の目的であった。本年度は認知行動発達研究部門及びウイルスベクター作成室と共同で、光刺激によって神経細胞活動の抑制が可能な、アーキロドブシンを末梢神経に導入するために必要なウイルスベクターの検討を行った。具体的には以下のウイルスベクターを作成し、ラット座骨神経及び後根神経節（DRG）に微量注入し、1か月後にDRG 及び末梢神経・脊髄を摘出して導入効率を確認し

た。その結果、生理学的実験を行うためにはより効率の良い導入ができるウイルスベクターの開発が必要である事が判明した。以下は試したベクターである。

AAV2

AAV1-CAGGS-EGFP

AAV5-CAGGS-EGFP

AAV DJ-CAGGS-EGFP

AAVDJ-CAG-Arch-GFP

50. 網羅的行動テストバッテリーを用いた *Septin* 欠損マウスの解析

上田(石原)奈津実, 澤田明宏, 木下 専 (名古屋大学大学院理学研究科)
高雄啓三, 宮川 剛 (生理学研究所・行動様式解析室)

胎生期から生後発達期にかけての脳組織でみられるニューロンやグリア細胞の分裂, 移動, 突起伸展などの現象には微小管やアクチン細胞骨格系による細胞形態と運動の制御が不可欠である。成体脳においてもアクチン細胞骨格系のリモデリングが長期可塑性の構造的基盤の一端を担うことが確立している。一方, 重合性ヌクレオチド結合蛋白質ファミリーSEPT1-14 から成るセプチン細胞骨格系も神経系に大量に存在するが, その生理的意義には不明な点が多い。申請者らはこれまでに, セプチンがアクチン系やリン脂質 2 重膜と相互作用しつつ多様な形状に高次集合するユニークな活性を持ち, 細胞分裂と分裂後の多様な細胞現象に関与することを示してきた。神経系においては大脳皮質形成時の細胞移動や培養ニューロンのスパイン形成におけるセプチン細胞骨格系の関与が RNAi 実験から示唆されている。しかし, セプチン遺伝子破壊マウスの多くが胎生致死となるか軽微な異常しか示さないことも災いして, 非分裂細胞におけるセプ

チン細胞骨格系の機能解析は十分になされていない。本研究では, 生体脳におけるセプチンの機能を探索することを目的とし, *Septin* 欠損マウスの行動学的表現型を系統的にスクリーニングした。

C57BL/6J 系統, 同性(雄), 同腹, 同生育環境の野生型および *Septin* 欠損マウス各 20 個体, 計 2 群 40 個体に対して標準プロトコルに準拠した行動学的試験を系統的に施行し, 以下の指標に関する定量的データを取得した: 自発活動量, 痛覚感受性, 協調運動/平衡感覚, 聴覚性驚愕反応, 社会的行動, 不安様行動, うつ様行動, 絶望様行動, 学習・記憶, 恐怖条件付け。

スクリーニングの結果, 野生型対照群と比較して, *Septin* 欠損マウス群では特定の課題で異常を呈することが明らかとなった。26 年度は一部異常が見られた課題について異なる実験系で野生型および *Septin* 欠損マウス各 20 個体, 計 2 群 40 個体を用いての再検を行う。

51. ヒストン H2B ユビキチンリガーゼ *Bre1a* の神経幹細胞における機能の解析

等 誠司 (滋賀医科大学医学部)
平林真澄 (生理学研究所)

神経幹細胞は, 発生過程に沿って, 神経幹細胞自身の増殖期→神経細胞産生期→グリア細胞産出期と, 性質を大きく変化させる。この過程には, エピジェネティクスが深く関与すると考えられているが, その分子機構は不明な点が多い。我々は最近, 神経幹細胞の未分化性の維持に関与し, しかも細胞周期を制御している因子として, ヒストン H2B ユビキチンリガーゼ *Bre1a* を同定した。本研究では, *Bre1a* の機能解析を行うことにより, 神経発生におけるエピジェネティクス制御の意義を明らかにする。

我々はこれまでに, トラップライン ES 細胞を用いた *Bre1a* ノックアウトマウスを作製し, 解析してきたが, 胎生早期致死であったため, 神経発生における *Bre1a* の

機能を解析できなかった。そこで本研究では, *Bre1a* コンディショナルノックアウトマウスを作製する。すでに, ターゲティングベクターは作製済みなので, 行動・代謝分子解析センター遺伝子改変動物作製室と共同で ES 細胞に遺伝子導入し, 組換えのおきた ES 細胞からキメラマウスを作製する。一方, *Bre1a* の gain-of-function を解析するために, 神経幹細胞特異的な Nestin プロモーター下で *Bre1a* (もしくは機能ドメインを欠いた *Bre1a* ΔC) を発現するトランスジェニックマウス (Nestin-*Bre1a*/ *Bre1a* ΔC-IRES-EGFP tg) の作製も行う。すでに, ベクターの作製は完了しているので, マウス受精卵にインジェクションし, トランスジーンの挿入されたマウスを選別する。

本年度は、Nestin-*Bre1a*-IRES-EGFP tg マウスの1ラインについて解析を行った。胎生期の脳を用いて、western blotting にて *Bre1a* の発現量を定量したところ、20~40%の発現上昇を確認し、期待通りの発現パターン

を示していた。今後は、このラインを用いて神経幹細胞の未分化性維持の変化や、神経発生から成体脳における神経細胞新生まで幅広く神経機能の解析を行い、神経発生や脳機能における *Bre1a* の役割を解析する。

【 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. 超高压電子顕微鏡を使った細胞骨格・膜系ダイナミクスの解析（唐原一郎ほか）	210
2. 深海微生物の微細形態と進化に関する研究（山口正視）	210
3. 超高压電子顕微鏡を用いた膜構造の形成と輸送機構の解明（金子康子ほか）	211
4. フェロモン受容系構成ニューロンの超高压電子顕微鏡を用いた三次元解析（高見 茂）	212
5. 超高压電子顕微鏡トモグラフィーによる染色体および核内ゲノム高次構造の解析（臼井健悟ほか）	213
6. 網膜アマクリン細胞間の電気シナプスの機能と三次元形態構造の対応（日高 聡ほか）	213
7. 超高压電子顕微鏡を使った植物 γ チューブリンを導入した分裂酵母の全微小管端の解析（紅 朋浩ほか）	214
8. 細菌べん毛基部体の細胞内構造の立体観察（加藤貴之ほか）	215
9. 副腎皮質ステロイドホルモンの生成および分泌に関わる微細構造の細胞化学的研究（野田 亨）	216
10. 原生生物の細胞構造の解析（洲崎敏伸ほか）	216
11. 超高压電子顕微鏡を使ったバクテリアセルロース合成機構の解析（峰雪芳宣ほか）	217
12. 葉緑体のチラコイド膜の構造変化と膜上に分布する光化学系II関連タンパク質の動態（西村美保ほか）	218
13. コンピュータトモグラフィー法によるラット脊髄神経化学解剖の3D解析（坂本浩隆ほか）	219
14. 嗅覚新生ニューロンの遊走・分化過程における形態変化の三次元微細構造解析（樋田一徳）	220
15. Electron tomography of Herpes simplex virus-infected mammalian cells（Rebecca Lauder ほか）	220
16. 3-dimensional structure analysis of mitochondria under exposure of silica dioxide (SiO ₂) nanoparticles (Young Rok Seo ほか)	221

1. 超高圧電子顕微鏡を使った細胞骨格・膜系ダイナミクスの解析

唐原一郎, 栗原剛正 (富山大学大学院理工学研究部)

竹内美由紀 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

峰雪芳宣 (兵庫県立大学大学院生命科学研究科)

村田和義 (生理学研究所)

これまでに筆者らは、細胞骨格および小胞などの膜系のダイナミクスの局所的な三次元解析を行ってきた。一方で、内膜系の全体像を捉えるためには、細胞全体における三次元イメージングを行う必要がある。そのためのアプローチとして、X 線マイクロ CT を行っている。この方法で、シロイヌナズナ種子の胚において細胞内部の構造まで非侵襲で可視化できることを報告した。しかし、可視化された細胞内部の構造がいずれのオルガネラにあたるのか特定できていない。そこで超高圧電子顕微鏡の電子線トモグラフィーにより、シロイヌナズナ種子の胚のオルガネラの 3 次元構造を可視化し、X 線 CT 像と比較することを考えた。本年度はシロイヌナズナ種子を超高圧電子顕微鏡で観察するための条件検討を行った。

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. の Col-0 株の乾燥種子の一部をカミソリで切り取り、グルタルアルデヒド水溶液中で前固定およびオスミウム酸水溶液中で後固定を行い、Spurr 樹脂に包埋した。酢酸ウランおよび Reynold's の鉛溶液により 1 μm の厚さの切片の二重染色を行った。直径 25nm の金粒子の塗布とカーボンコートをした後、幼根部の横断切片を超高圧電子顕微鏡観察に供した。カスバリー線を形成する点でも興

味深い内皮細胞に着目し、撮影倍率は 1 千倍で -60° から 60° まで回転させて傾斜画像を撮影した。

通常の超薄切片の場合、プロテインボディ内部においては、重金属を含む globoid の内部が抜けたように見えることが先行研究により報告されている。切片作製時に、樹脂との親和性の低い構造そのものが切片から脱離してしまい、観察できていない可能性が考えられている。今回の 1 μm の厚さの切片においてもこのような内部が抜けて見える領域が観察されたことから、この抜けが見られる複数の大きなオルガネラはプロテインボディと推測された。その一方で、プロテインボディと推測されるオルガネラの内部には、通常の超薄切片では見られないような、電子密度の高いコンパートメントも同時に観察された。1 μm の厚さのため、内部が抜けずに切片内に留まった globoid が観察できたという可能性が考えられる。一方、問題点としては、通常の超薄切片 (80 nm) で得られた像と比べ、細胞内の電子密度つまり細胞内構造のコントラストが低く、今回の染色条件ではオルガネラの輪郭が明瞭には識別できなかったため、今後の課題として、en bloc 染色を行うなど、染色法の改良が必要であることが示唆された。

2. 深海微生物の微細形態と進化に関する研究

山口正視 (千葉大学・真菌医学研究センター)

現在地上には、核膜に包まれた核を持つ真核生物と、これを持たない原核生物の 2 つの種類の生物しか生存していない。真核生物は原核生物から進化したという説が定説になっているが、その直接的証拠はない。本研究は、隔離された深海という環境で、原核生物から真核生物への進化の途上にある生物を、電子顕微鏡を用いて形態学的に探索し、進化の直接的証拠を得ようとするものである。現在、試料は、超薄切片法を用いて通常の電子顕微

鏡で観察しているが、薄い切片からは、微生物の全体の構造が想像できないので、数 μm の厚い切片を超高圧電子顕微鏡で観察することによって、それぞれの微生物の全体像を解析する。

2010 年 5 月に、研究船「なつしま」に乗船し、伊豆・小笠原諸島の明神海丘の海域および初島沖で、水深 800 ~ 1,200 メートルの海底からウロコムシやウミケムシなど多種類の小動物を採集した。試料は、船上で 1 mm 角

に細切し、グルタルアルデヒドで固定した。固定した試料を研究室に持ち帰り、樹脂に包埋し、小動物に共生している微生物を超薄切片法で観察している。微生物が存在する試料については、もう一度、急速凍結置換固定法を用いて再固定を行い、生の試料に近いアーティファクトの少ない試料を調製した(Yamaguchi et al, J Electron Microsc 60: 283-287, 2011)。

本研究では、ウロコムシの脚に高頻度で付着しているねじねじ状の微生物に着目して、この微生物の立体像を明らかにすることを当面の目標とした。まず、試料ブロックから、通常の超薄切片と1~2 μm の厚切り切片を交互に作製して、千葉大学の通常の電子顕微鏡で超薄切片を観察して目的の微生物が存在するブロックを選び出した。次に、厚切り切片を生理学研究所の超高压電子顕微鏡で観察し、目的の微生物をねらってトモグラフィー撮影を行った。撮影した画像を、コンピュータに取り込んで、目的の微生物の三次元再構築を行った。これまで、3個体について解析を行った結果、この微生物は、長さが1~2 μm 、巾が0.4~0.5 μm で、細胞壁、原形質膜、およびリボソームと線維状構造からなる細胞質を持つことが明らかになった。この微生物は、その特徴的構造から新種の微生物と考えている。

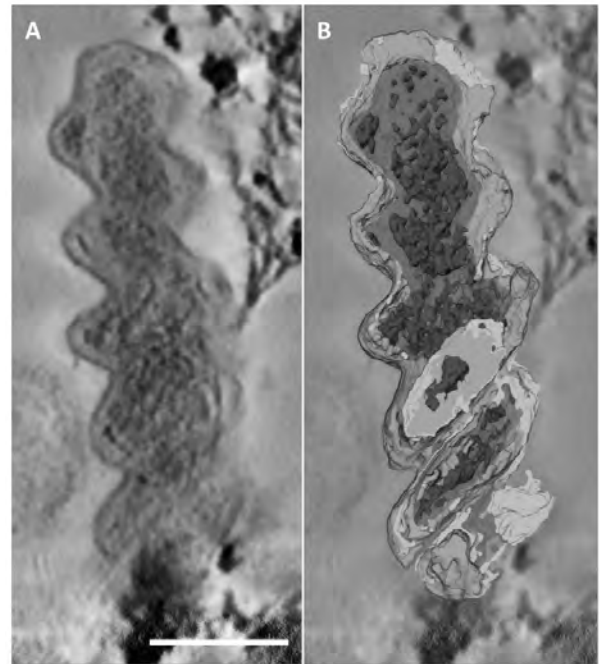


図 ねじねじ状微生物の超高压電顕トモグラフィーの三次元断層像 (A) とそのセグメンテーション像 (B)。スケール 500 nm。

3. 超高压電子顕微鏡を用いた膜構造の形成と輸送機構の解明

金子康子, ブルブル ナイーマ (埼玉大学)

村田和義 (生理学研究所)

根粒菌は、共生窒素固定を行うマメ科植物根粒の感染細胞内で、植物細胞が形成する共生体膜に包まれて共生体として存在する。有限成長型に分類される球形のダイズ根粒の場合、根粒が放射状に肥大成長する過程で感染細胞も肥大化し、感染細胞中の共生体数は増え続ける。急速凍結したダイズ根粒断面の反射電子像を低温・低真空走査電子顕微鏡で観察すると、数個体の根粒菌を含んだ繭のような形状の共生体が、肥大した感染細胞中にぎっしりとつまって観察できた。感染細胞中の共生体が増殖する過程で、膨大な量の共生体膜が必要となるが、それがどのような仕組みで形成中の共生体に運ばれるかは分かっていない。これまでに、発達中の感染細胞で、植物細胞の核近傍に多量の膜とアクチン繊維が蓄積され

る部位があることと、共生体膜付近に突起様膜構造が存在することを観察した。また、酵素処理により感染細胞を単離した後、低浸透圧下で穏やかに融解した細胞内容物中にも、長い突起を形成した膜構造が見つかった。さらに、感染細胞の核近傍に蓄積した膜を、マイクロインジェクションにより FM1-43 で蛍光染色すると、およそ 30 分後に細胞周辺部に共生体の形状をした蛍光が観察されるようになった。このことから、核近傍で形成された膜が、突起様の構造を経て細胞周辺部の共生体まで運ばれることが示唆された。

発達中のダイズ根粒を高圧凍結した後、断面をクライオ走査電子顕微鏡で観察したところ、共生体膜に巻きつくように接する多数のひも様の構造が確認できた。こ

のひも様構造の太さは細胞融解物中の膜で形成される突起様構造の太さとほぼ同じであった。この細胞溶解物中の突起様膜構造には、アクチン繊維が共局在することを蛍光顕微鏡観察で明らかにした。また、細胞溶解物を急速凍結して突起様膜構造をクライオ電子顕微鏡観察し、傾斜シリーズ画像を取得して立体構築を試みたところ、

突起部分は球形の膜構造から突出した筒状の構造であることが確認できた。

これは、発達中のダイズ根粒感染細胞中に存在するアクチン繊維と共存する突起様膜構造が、植物細胞の核近傍で形成された膜を細胞周辺部で増殖する共生体まで輸送する仕組みであることが考えられる。

4. フェロモン受容系構成ニューロンの超高压電子顕微鏡を用いた三次元解析

高見 茂 (酒井電子顕微鏡応用研究所)

種特異的な化学シグナルであるフェロモンを受容する鋤鼻系は主嗅覚系とは異なる機能的特性を有しているが、微細形態学レベルでの研究は遅れている。我々はこれまで、主に齧歯類のラットを実験モデルとして研究を行ってきた。今回は、フェロモン受容が行われる感覚細胞、鋤鼻受容細胞の樹状突起終端に焦点を当てた。

鋤鼻受容細胞は双極性ニューロンでもあり、細胞体から 1 本の樹状突起が感覚上皮表面に向かって伸び、一方で、1 本の軸索が感覚上皮基底側に向かって伸びる。感覚上皮頂部では、支持細胞の細胞質突起により個々の樹状突起が互いに接することなく分離される接着複合体領域を形成する。この領域の上部で樹状突起は終端部を形成し、そこから多数の微絨毛が生える。この微絨毛にはフェロモン受容体が存在するので、その密度や長さは、個々の鋤鼻受容細胞の生理学的特徴を類推するために必要不可欠である。

エポン樹脂包埋した成獣ラットの鋤鼻感覚上皮の基底側から頂部に向かって、樹状突起の長軸方向に垂直な面での連続準超薄切片を作製し、トルイジン青で染色した。上記の接着複合体領域はトルイジン青に濃染し、微絨毛領域は逆に淡染する。したがって、準超薄切片内でほぼ均一の濃度で淡染されている領域が見いだされれば、そ

の隣接切片を超高压電子顕微鏡 (HVEM) 用に調整した。鋤鼻器の感覚上皮表面は平坦ではなく凹面となっているために、出来る限り大きな組織ブロックを薄切し、微絨毛と樹状突起終端部の効率的な「面出し」を行った。淡染する微絨毛領域に近接して、個々の樹状突起終端が識別できる領域がトルイジン青染色標本で確認することができた。その隣接切片グリッドメッシュ (フォルムパール膜貼付単孔メッシュ, thin bar grids) に載せ、10 分間飽和酢酸ウラン溶液で染色し、まず通常の透過電子顕微鏡 (Jeol-1010) の資料室に挿入して、80 kV 加速電圧下で観察した。そして、樹状突起終端とそこから生える微絨毛が確認された切片のみを HVEM 観察した。

異なる厚さの切片を HVEM で観察したが、厚さ 500 ミクロンでは、微絨毛が重なり過ぎ、立体観察は困難であった。厚さ 300/200 ミクロンの厚さの切片では、傾斜角度を変化させることにより、微絨毛の三次元観察が可能であった。ただし、1 個の樹状突起終端 (直径は 0.5 から 2.5 ミクロン) は平坦ではなく、膨らんでいるものもあったので、厚さ 300 あるいは 200 ミクロンの単一切片からの情報だけでは、1 個の樹状突起終端から生える微絨毛の総数を計測はできないこともわかった。

5. 超高压電子顕微鏡トモグラフィーによる染色体および核内ゲノム高次構造の解析

臼井健悟（独立行政法人理化学研究所）

加藤幹男（大阪府立大学大学院）

相馬崇裕（独立行政法人理化学研究所）

根岸 豊（横浜市立大学大学院）

テロメアは恒常的なヘテロクロマチン領域として知られ、非常にコンパクトな構造を形成している。さらにテロメアはT-loopと呼ばれる特殊な高次構造を形成することで線状ゲノム DNA の末端保護を行っている。コンパクトで高密度化された構造自体も DNA の保護機能に欠かせず、これらの機能が失われるとガン化や細胞死を招く。テロメアではゲノム DNA の保護を行うと同時に、様々な現象が起きている。例えば細胞周期の S 期では DNA の複製のために DNA ポリメラーゼがテロメアに作用し、場合によってはテロメアの長さを維持するためにテロメラーゼがテロメア末端に作用する。また近年テロメアでも RNA が転写されることが見出され、S 期に限らずコンパクトな構造を保ちながら常に様々な生命現象が起きていることが明らかとなった。しかしながら、どのようにしてコンパクトな構造を保ちながらこれらの生命現象を行っているかは不明である。

そこで我々はどのようにしてコンパクトな構造の維持と RNA の転写などの生命現象を両立しているかを知るため、染色体内部でのテロメアの構造を調べることを目標

とした。方法はテロメア DNA をビオチン化 PNA プローブと蛍光／金粒子架橋ストレプトアビジンで標識後、超高压電子顕微鏡で観察し、染色体内部におけるテロメアの高次構造を可視化するというものである。これまで、染色体をスライドガラス上で標識した後、グリッド上へ試料を載せることにより、染色体の形が維持されたまま観察することができた。しかしながら、グリッドへ移行する前段階では蛍光が観察されていたにもかかわらず、電子顕微鏡では重金属が観察されなかった。これはグリッドへ移行する途中で標識が脱落したものと考えられた。

そこで今年度は、染色体への金粒子の標識方法の再評価を行った。今回は PNA プローブで標識後、グリッドへ移行した後に金粒子架橋ストレプトアビジンで標識を行った。染色体の形状はこれまで同様保たれ、金粒子の観察をすることができた。しかしながら、非特異的な金粒子が数多く観察され、テロメアと非テロメア領域の判別が難しく、精細なテロメアの高次構造をトレースするには至らなかった。今後は、洗浄過程の条件をより精査し、真のテロメアを反映した構造観察を目指す。

6. 抑制性網膜アマクリン細胞間の電気シナプスの機能と三次元形態構造の対応

日高 聡（藤田保健衛生大学医学部生理学教室）

村田和義（生理学研究所）

ニューロン間の電気シナプスの働きを明らかにするためには、ギャップ結合の微細形態の同定や樹状突起間でのギャップ結合の存在部位の同定を行う必要がある。神経系で特徴的な巨大なギャップ結合を形成している網膜アマクリン細胞に着目して、ギャップ結合の微細形態と電気シナプスの生理機能との関係を調べた。電気生理学実験を行なった細胞に、Neurobiotin を注入して発色すると、色素カップリングの形成から樹状突起間のギャップ結合部位を同定できる。Neurobiotin 注入と同時に、電

極内にシグナル伝達系の調節物質を充填して注入すると、ギャップ結合の透過性の調節や電気シナプスの制御を測定できる。これまでに、細胞内の高濃度の環状 AMP (cAMP) がアマクリン細胞 (interstitial amacrine cells) 間のギャップ結合を遮断し、電気シナプスを抑制することを明らかにした (Hidaka, 2012)。また、細胞内低 Ca^{2+} 濃度で調節物質の未投与の場合では、強い色素カップリングが観察され、同型の細胞が樹状突起の先端同士で結合していた。電極内に 5mM cAMP を充填し、dual whole-cell

patch clamp 法で調べた所、コントロールに比べ、細胞間コンダクタンスは減少した。また、細胞内 cAMP による電気シナプスの調節様式を調べる目的で、cAMP と共にギャップ結合に対する特異抗体を電極内に充填して調べた所、ギャップ結合蛋白の細胞内ドメインに対する抗体が、電気シナプスに対する cAMP による調節効果を打ち消すことが分かった。

上記のような性質を示したギャップ結合細胞間チャネルの微細形態構造を明らかにするために、ギャップ結合に対する特異抗体で染色した標本をエポン樹脂に包埋し、切片を薄く切り、厚さ 1 μ m 切片を作成し、1,000kV

の加速電圧で超高压電子顕微鏡下で観察した。超高压電子顕微鏡の試料ステージの傾斜によって 2° づつ $\pm 60^\circ$ で撮影し、IMOD プログラムを用いてその立体再構成を行って、ギャップ結合細胞間チャネルの微細構造を解析した。調節物質の投与による、ギャップ結合細胞間チャネルの微細構造の変化を検討した。これまでに、未染色のギャップ結合と、抗体染色のギャップ結合とを比較した所、調べた標本では微細構造の違いは見つからなかった。調節物質の投与や抗体染色による微細構造の変化を見出すためには、標本の作製の仕方を検討する必要がある。

7. 超高压電子顕微鏡を使った植物 γ チューブリンを導入した分裂酵母の全微小管端の解析

紅 朋浩 (名古屋大学大学院医学系研究科)

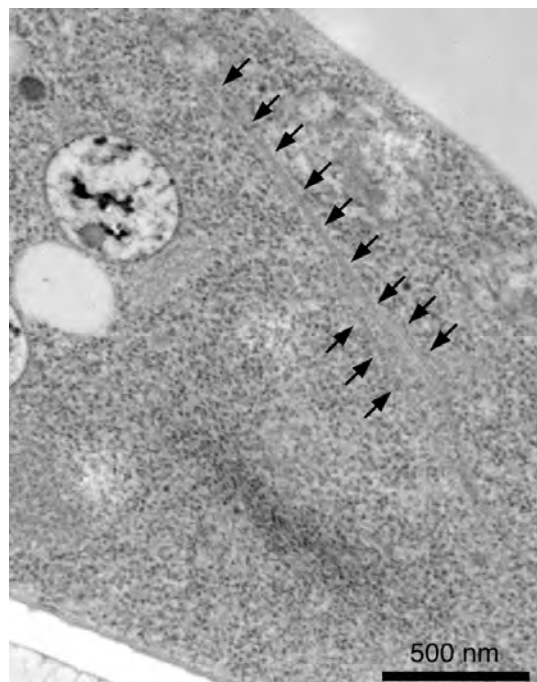
堀尾哲也 (日本体育大学体育学部)

峰雪芳宣 (兵庫県立大学大学院生命理学研究科)

村田和義 (生理学研究所)

被子植物は中心体を持たず、他の生物と異なる微小管形成機構を持っていると考えられているが、その詳細はほとんど分かっていない。 γ チューブリンは真核生物の微小管形成に必須の分子である。分裂酵母では自身の γ チューブリンを動物細胞の γ チューブリンに置き換えても顕著な異常は見られないが、被子植物の γ チューブリンに置き換えると間期微小管のダイナミクスに異常が生じる。我々は、その異常の程度が下等な植物の γ チューブリンでは小さいことを見つけた。このことは進化に伴って微小管形成の仕組みに植物特有の変化が生じた可能性を示唆する。そこで我々は、植物の γ チューブリンが微小管構造へどのような影響を持つのかを理解するために、これらの細胞での細胞質微小管の末端の構造を調べることにした。電子線トモグラフィーを適応することで、微小管端の構造から微小管ダイナミクスの違いを推定できる。今回の共同利用では、前回に引き続き、電子線トモグラフィーを分裂酵母に適用するための条件検討を行なった。

前年の観察では微小管があまり保存されていないという問題があったため、今回は急速凍結固定を高圧法から浸漬法に変えて試料調製を行なった。通常の薄切片



【図の説明】分裂酵母 YM1 株の急速凍結固定、エポン包埋試料。薄切片をウラン染色、鉛染色し、JEM-1400EX で観察した。多数の細胞質微小管が観察された(矢印)。10,000 倍で撮影。Bar = 500 nm。

(80nm) では多数の微小管が観察され(図), 試料調製に関しては大きな改善が見られた。前回同様, 250nm 厚の切片を作製し, 超高压電子顕微鏡を用い, 細胞全体を把握でき, かつ最大の拡大像が得られる倍率を選び, トモグラム解析のための撮影を行った。超高压電子顕微鏡撮影には比較的安定した像が観察された野生株の YM1 株の包埋試料を用いた。

IMOD を用いたトモグラム像からは今のところはっきりとした微小管像は得られていないが, これには分裂酵母での包埋の難しさとそれによる切片の歪みなど, 技術的な要素が多分に影響しているものと思われる。より安定した観察と計測を行なうためにはこれらの技術的な問題を克服する工夫が必要と考えられた。

8. 細菌べん毛基部体の細胞内構造の立体観察

加藤貴之, 川本晃大, 難波啓一 (大阪大学大学院生命機能研究科)

村田和義 (生理学研究所・形態情報解析室)

細菌べん毛は運動器官で, 細胞外に細長く伸びるらせん繊維型プロペラを根元の回転モーターが高速回転させて推進力を発生する。回転モーターにあたるべん毛基部体は膜貫通型のタンパク質複合体で, 膜を可溶化して単離精製した基部体の立体構造解析は以前より進めているが, 固定子やべん毛タンパク質輸送装置など, 基部体に弱く結合している膜貫通型の構成タンパク質は, 可溶化と精製の過程で基部体からほとんど解離してしまうため, 機能状態での立体構造の観察は難しい。真に機能を持ち動作状態にあるべん毛基部体の立体構造を観察するためには, べん毛を有する細胞全体を試料として電子線トモグラフィーによる立体像を観察するほかはない。しかし, サルモネラ菌やビブリオ菌など細菌の菌体でさえ厚さは1ミクロン前後あり, 研究室に保有する加速電圧 300 kV のクライオ電子顕微鏡でも電子線が十分に透過せず, そのため詳細な立体像の観察は困難である。よって, 超高压電子顕微鏡を活用し, クライオ電子線トモグラフィーによる構造解析を実施することとした。幸い, 超高压電子顕微鏡には電子線直接検知型の高感度 CMOS カメラが平成 24 年度に導入されたため, トモグラフィーのための多くの傾斜像の記録が効率よく実施できるようになっていた。

今回の実験では, 俵型の細胞の極に複数のべん毛を持つ海洋性ビブリオ菌の変異株を試料とした。ホーリーカーボン薄膜を搭載した電子顕微鏡グリッド上に, この

ビブリオ菌変異株を急速凍結氷包埋し, それらを試料として持参して, 超高压電子顕微鏡によるクライオ電子線トモグラフィーのデータ収集を実施した。クライオ試料ホルダーは備え付けの装置を利用した。電子線直接検知型 CMOS カメラを用い, -60° から 60° までの傾斜角度範囲で 2° ごとに傾斜した試料の像を 61 枚記録してトモグラムを計算したところ, 細胞の極に複数の基部体とそこから細胞外に伸びるべん毛の立体像を確認することができた。残念ながら CMOS カメラのピクセルラインの多くに欠陥がみられたため, ライン上のノイズが複数のった立体像となったが, 加速電圧 300 kV のクライオ電子顕微鏡を用いて得たトモグラムに比べて明らかに解像度の高い立体像が得られたことは成果であった。

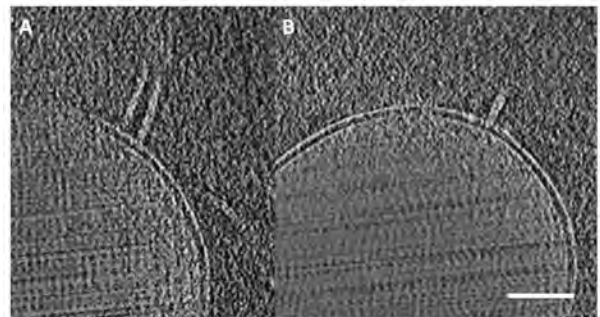


図 細菌べん毛基部体の超高压クライオ電顕トモグラフィーによる三次元再構成の各断面像 (A,B)。スケール 200 nm。

9. 副腎皮質ステロイドホルモンの生成および分泌に関わる微細構造の細胞化学的研究

野田 亨 (藍野大学医療保健学部理学療法学科)

副腎皮質は組織学的に球状帯, 束状帯, 網状帯に大別され, それぞれを構成する細胞からアルドステロンを代表とする電解質コルチコイド, コーチコステロンを代表とする糖質コルチコイド, テストステロンを代表とする男性ホルモンが別々に分泌されている。しかしながら, これらのステロイドホルモンの分泌機構はよく知られていない。これまでの著者らの研究ではラット副腎皮質の細胞の脂肪滴周囲に小管様構造が存在することを重金属による古典的染色法で見出した。本年度はこの小管様構造が脂肪滴被覆蛋白を含む構造であるか, またステロイドホルモンの代謝と関係する構造であるかなどを免疫組織化学的に検討することを目的とした。

脂肪細胞の脂肪滴では脂肪滴被覆蛋白として Perilipin family の存在が知られている。このうち Perilipin 1, および Perilipin 3(TIP47)について, ラット副腎クリオスタット切片を用いて酵素抗体法による免疫組織化学法で標識を試みた。この試料から作製した超薄切片, および厚切り切片を通常電子顕微鏡および超高圧電子顕微鏡(H-1250)で観察したところ, 副腎皮質の脂肪滴の表面に

一部, 電子密度の高い反応産物を認めた。しかしすべての脂肪滴の表面で反応が確認できず, 有意な反応であるか不明であった。次にステロイドホルモン合成酵素の一つであるアルドステロン合成酵素 (Aldosterone Synthase; CYP11B2)に対する特異抗体を用いて, 同様の免疫組織化学的標識を行ったところ, 有意な標識は得られず, 小管構造などの細胞内の膜構造を描出することはできなかった。

上記の実験結果より, ステロイドホルモン産生細胞である副腎皮質細胞には脂肪細胞における脂肪滴とは異なり, Perilipin family の標識は明瞭ではなく, またステロイドホルモン合成酵素の一つである Aldosterone Synthase も副腎皮質細胞内に証明することはできなかった。今回, 標識を試みた Aldosterone Synthase は Corticosterone から Aldosterone への反応を触媒するものであり, 脂肪滴内に含まれるとされる Cholesterol ester からみると, いわば最終段階の反応といえる。脂肪滴に直接, 関係した小管構造を描出するためにはもう少し上流の反応に関わる酵素を標識すべきかと考えられた。

10. 原生生物の細胞構造の解析

洲崎敏伸, MD Shafiqul Islam, 松元里樹, 柳生 理 (神戸大学大学院理学研究科)

福田康弘 (東北大学大学院農学研究科)

中鉢 淳 (豊橋技術科学大学エレクトロニクス先端融合研究所)

岩間尚文 (新分野創成センターイメージングサイエンス研究分野)

ミドリゾウリムシなどの持つ共生生物と, 宿主細胞のオルガネラとの微細構造的関連性に関して, 生理学研究所の H-1250M 型超高圧電顕を用いた電子線トモグラフィにより, 様々な新たな知見を得ることができた。方法としては, ミドリゾウリムシを金属圧着法により急速凍結したのち, 1%OsO₄ と 0.5%グルタルアルデヒドを含むアセトン置換液を用いて凍結置換固定を行った後, Spurr 樹脂に包埋し, 厚切り切片 (0.2~5 μm) を作製したものを超高圧電顕で観察した。撮影した電顕写真から, 電子線トモグラフィ法を行い, 得られた画像データか

ら細胞内のオルガネラ間の立体的相互関係を解析した。

本年度は特に, 共生クロレラを取り囲む共生胞膜 (PV 膜) と周囲のオルガネラとの詳細な位置関係について解析し, PV 膜とミトコンドリア外膜との膜融合が生じていることを見出した。また, 隣接するミトコンドリア間にも緊密な結合が存在し, これを介して共生藻の周囲のミトコンドリアのほとんどは連結しあっていることを示した。これらの結果は海外の学会でも報告し, 最優秀発表賞を得た¹⁾ (洲崎, Islam, 松元, 柳生)。

一方, 原生生物渦鞭毛虫類の染色体の, 常に凝集して

いるユニークなクロマチン構造の立体構造を解明する目的で、超高压電子顕微鏡を用いた三次元構造解析を行う予定であったが、この研究は準備段階のまま次年度に持ち越した（福田）。

さらに、従来実施してきた原生生物の細胞内共生生物に加え、新たに昆虫類の細胞内共生生物微細構造についても電子線トモグラフィーを実施する計画を立案した。この研究も次年度に引き継いだが、その予備的研究として、生理学研究所に新たに導入された SBF-SEM を用いた観察を行った。その結果、昆虫に存在する「菌細胞」の内部に相利共生を行っている細菌の細胞内に、直径

20-30 nm の細長い繊維状構造の束を見出した。原核細胞の内部にあるこのような構造はいままで報告がなく、今後詳細な微細構造を超高压電顕による電子線トモグラフィー法を用いて解析する予定である（中鉢）。

また、電子顕微鏡像から立体再構成をするプログラムの不備な部分を補い、これを使った電子顕微鏡像の解析も実施した（岩間）。

- 1) Song, C. et al., 2013. Changes in cell wall properties of symbiotic zoochlorella during symbiosis in *Paramecium bursaria*. KSMCB2013, Gangnam, Seoul, Oct. 9-11, 2013.

11. 超高压電子顕微鏡を使ったバクテリアセルロース合成機構の解析

峰雪芳宣，中井朋則（兵庫県立大学大学院生命理学研究科）

呉屋俊吏（兵庫県立大学理学部）

村田和義（生理学研究所）

我々は酢酸菌（*Gluconacetobacter xylinus*）を使ってセルロース合成の仕組みについて研究を行っている。酢酸菌は直径 1 μ m 弱の細菌なので、切片の作製なしに超高压電子顕微鏡法と電子線トモグラフィー法を組み合わせた観察が可能と思われる。本研究では、超高压電子顕微鏡を使ってセルロースが合成される菌体表面の構造がどのようなになっているか明らかにすることを目的としている。今年度は新しくカメラが装着された超高压電子顕微鏡を使って氷包埋した酢酸菌のセルロース合成の場の観察を試みた。

実験方法

Quantifoil R3.5/1 mesh (Cu-200) 上に菌液を滴下後、全自動瞬間凍結装置 Vitrobot (FEI カンパニー社製) を使用して、液体エタンで急速凍結を行った。急速凍結した酢酸菌は、超高压電子顕微鏡 H-1250 M を使って倍率 5,000 倍 (0.79 nm/pixel) で -60° から $+56^{\circ}$ の範囲で 2° ごとに画像を取得し、トモグラムを作製した。トモグラム解析は IMOD を使用した。

結果

今回の方法では JEM-2200FS を使用した前回の方法に比べ、細胞の X-Y 面の中央縦断面像で細胞の境界の 2 つ

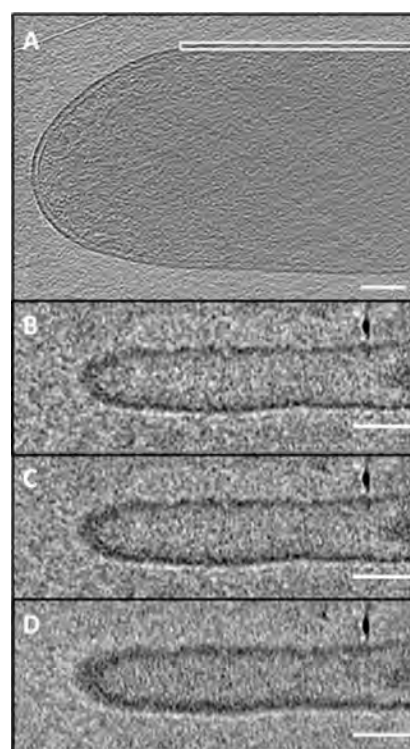


図 H-1250M で取得した画像から再構成した酢酸菌の電子線トモグラム像。(A)：中央縦断面 (X-Y 平面) 像。(B)～(D)：(A) の細長い矩形で囲んだ部分を図の面に対して垂直方向 (X-Z 平面) にスライスした画像。(C)，(D) はそれぞれ (B) の位置から画像を 5 枚または 10 枚重ね合わせた像。Scale bar は 100 nm を示す。

の膜をはっきりと観察できた (図 A)。細胞表層は、X-Z 面で外膜、ペリプラズム、細胞膜、細胞質が区別できた (図 B-D)。セルロース合成酵素複合体の大きさは約 10 nm で、細胞膜上に 1 列に並んでいると考えられている。今回の方法でこの顆粒の並んでいる状況が判別できることを期待したが、観察した領域では期待した構造を確認す

ることはできなかった。今回細胞膜上に並ぶセルロース合成酵素複合体が観察できなかったのは、観察した場所に期待する構造がなかったためか、存在していても検出できなかったのか不明である。今後はより多くの菌体からトモグラムを作製し、セルロース合成酵素複合体が観察できるか試みる予定である。

12. 葉緑体のチラコイド膜の構造変化と膜上に分布する光化学系 II 関連タンパク質の動態

西村美保, 難波大介 (岡山大学大学院自然科学研究科)

村田和義 (生理学研究所)

山本 泰 (岡山大学大学院自然科学研究科)

光は植物の光合成に必要不可欠だが、夏の直射日光のような強すぎる光は、植物の光合成機能にダメージを与え、光合成を阻害してしまうことが知られている。本研究では、光合成の反応が行われている葉緑体のチラコイド膜に焦点を当て、強光ストレス下でチラコイド膜の構造がどのように変化しているのかについて調べた。

チラコイド膜は、積み重なり (スタック) 構造を形成したグラナと、グラナを結合するストロマチラコイドからなり、グラナ上には水の分解を担う光化学系 II (PSII) 複合体が多数存在している。PSII 複合体の反応中心結合タンパク質 D1 は強光照射で容易に損傷して光合成能が低下するが、チラコイド膜上に存在する FtsH による分解を受けることで新しい D1 が再合成され、光合成の機能を回復する。迅速な D1 分解のためには、FtsH プロテアーゼはなるべく PSII 複合体の近くに存在することが望ましい。しかしながらグラナスタックの膜間距離は 2-4nm といわれており、高さ約 6nm の FtsH プロテアーゼが PSII の豊富に存在するグラナスタック中に存在しているかどうかは明らかではなかった。

我々はまず光照射前後のホウレンソウチラコイド膜構造の変化を電子顕微鏡で観察した。通常グラナは平坦にスタックしているが、強光下では大きく外側に曲がるのが分かった。この屈曲によりグラナ辺縁部の膜間距離が広がるため、FtsH プロテアーゼがグラナ中に移動できるようになる可能性が考えられた。そこで次に D1 タンパク質と FtsH プロテアーゼを金コロイドで免疫標識し、光照射前後の分布変化を観察した。暗条件下では、グラ

ナスタックに D1, グラナ辺縁部およびストロマチラコイドに FtsH が観察されたが、強光条件下ではグラナスタック中にも FtsH の存在が確認された。チラコイド膜の構造変化がグラナスタックへの FtsH の移動を可能にし、素早い D1 分解を可能にしていると考えられる。

さらにトモグラフィーで得られたチラコイド膜の三次元構造を暗条件と強光条件で比較したところ、強光下ではチラコイド膜の積み重なり構造が緩んでおり、チラコイド膜上のタンパク質の可動性が上がることを示唆する

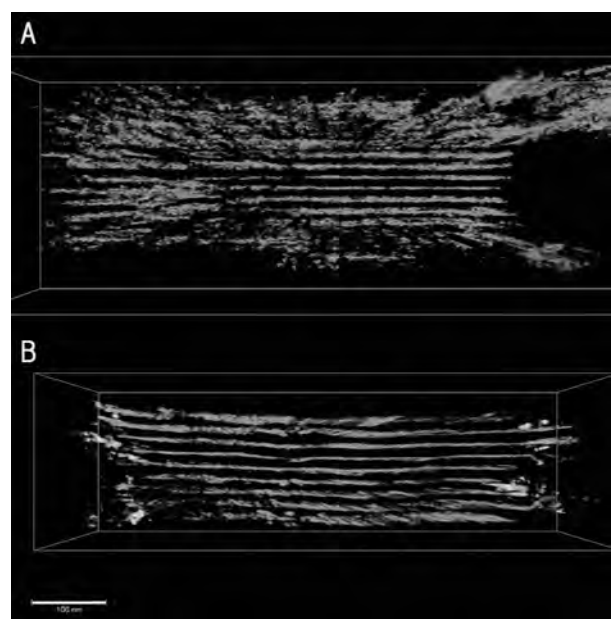


図 チラコイド膜の電顕トモグラフィー三次元再構成像。
(A) 暗条件。(B) 強光下。スケール 100 nm。Yoshioka-Nishimura et al. Plant Cell Physiol. 2014 から改編。

結果が得られた。以上より、光合成の品質管理機構におけるチラコイド膜構造変化の重要性について明らかにした。

13. コンピュータトモグラフィー法によるラット脊髄神経化学解剖の 3D 解析

坂本浩隆, 越智拓海, 佐藤慧太 (岡山大学大学院自然科学研究科理学部附属臨海実験所)

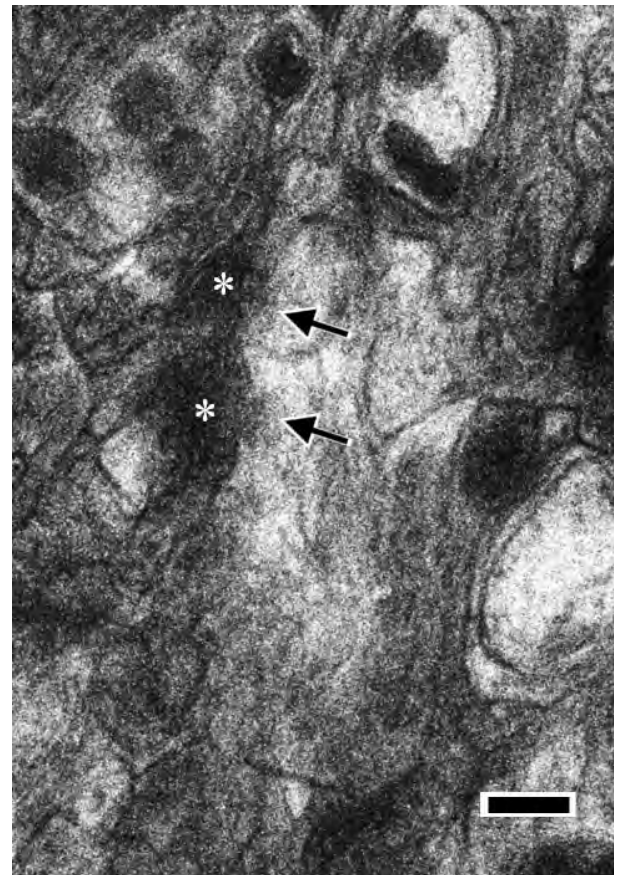
河田光博, 高浪景子 (京都府立医科大学大学院解剖学・生体構造科学)

村田和義 (生理学研究所・脳機能計測センター・形態情報解析室)

我々はこれまでに、脊髄（腰髄）に存在する gastrin-releasing peptide (GRP) ニューロン系が雄優位な脊髄内局所神経ネットワークを構築し、自律神経系と骨盤底筋群を同時に制御することにより、勃起、射精などの雄の性機能を調節していることを見出した ([Sakamoto et al., 2008, *Nature Neuroscience*](#))。そしてこれまで、GRP 免疫組織化学法と雄性性機能に関与する球海綿体脊髄核 SNB ニューロンの逆行性標識法とを組み合わせ、超微形態学的に SNB ニューロンの樹状突起上に GRP 作動性のシナプス入力が多数存在することを、超高压電子顕微鏡 (H-1250M) を用いて明らかにしている ([Sakamoto, Ariei, Kawata, 2010, *Endocrinology*](#))。また、脊髄 GRP ニューロンから脊髄内の自律神経核である仙髄副交感神経核への投射について、多重免疫組織化学を超高压電子顕微鏡に応用して、コンピュータトモグラフィー・三次元立体再構築法を確立してきた ([Oti et al., 2012, *Histochemistry and Cell Biology*](#))。

ここで、最近、他のポピュレーションの脊髄内 GRP ニューロン系が痒み感覚を特異的に伝達することが報告された ([Sun and Chen, 2007, *Nature*](#)) が、この脊髄感覚 GRP 系に関する組織学解析は乏しい。そこで、我々は免疫組織化学法を用いて、成熟ラットの体性感覚神経系における GRP の発現解析を行い、脊髄後根神経節とその中枢性軸索入力部位である脊髄後角における GRP の局在解析を行った。その結果、すべてのレベルの脊髄後根神経節において、少数の小型細胞の細胞体に GRP 免疫陽性が確認され、脊髄後角表層においても、GRP 免疫陽性線維が確認された。そこで、この脊髄後角に発現する GRP 免疫陽性線維の由来を明らかにするために、片側の脊髄後根神経切除を行ったところ約 65% の免疫陽性強度が低下したため、その多くが一次感覚神経由来であることが示唆された ([Takanami et al., 2014, *Journal of*](#)

Comparative Neurology)。これまでの GRP ニューロン系を中心とした脊髄内雄性・性機能回路の超微形態学的な研究展開の実績を応用し、現在、脊髄感覚 GRP ニューロン系について、超高压電子顕微鏡 (H-1250M) を用いて解析を実施している。従来の免疫電子顕微鏡解析では、脊髄後角表層において、明調性小胞や有芯性小胞を多く含む神経軸索終末に GRP 免疫陽性を多く認めた。今回、連続ブロック表面走査型電子顕微鏡で用いられるエリス



図説: ラットの頸髄後角表層、厚さ 1 μ m 切片での、1,000kV の加速電圧の超高压電子顕微鏡観察像、神経軸索終末における GRP 免疫陽性シグナル (*) とシナプス構造 (矢印) (スケールバー = 100 nm)

マン法による電子染色を、超高压電子顕微鏡に応用した。その結果、神経軸索終末に GRP シグナルが存在し、明瞭なシナプス構造が観察された (図)。今後は、痒みの伝達機構を明らかにするために、生理的に痒みを誘発した

際、脊髄後角 GRP 神経軸索終末の超微細構造変化をコンピュータトモグラフィー・三次元立体再構築法を用いて、解析を進めていく予定である。

14. 嗅覚新生ニューロンの遊走・分化過程における形態変化の三次元微細構造解析

樋田一徳 (川崎医科大学)

嗅球の嗅覚系神経回路を構成する介在ニューロンの一部は、生後も新生することが知られている。側脳室下帯に存在する神経幹細胞から新生し、吻側方向へ向かう側脳室前角の壁に沿う経路 (Rostral Migratory Stream; RMS) を遊走し嗅球に至る。細胞の起源や細胞分化については分子機構を中心とした解析がよくなされているが、遊走過程の形態変化とニューロン種の表現型発現の詳細は未だ不明の点が多い。本研究は定位脳手術により各種のトレーサーを注入して新生細胞を特異的に標識し、嗅球へ向かう標識細胞群を時差的にレーザー顕微鏡で同定し、更に超高压電顕で解析を行うものである。

トレーサーは Cell Tracker Orange (CTO; Molecular Probe) を用い、標識された細胞が、24 時間~72 時間後に嗅球へ到達するのが確認された。また主要な介在ニューロンである TH (tyrosine hydroxylase) ニューロンを GFP 標識した TH-GFP マウスに Anti-Tetramethyl Rhodamine による CTO に対する免疫染色を用いた多重蛍光標識、そして最終的に metal 増感 DAB に置換染色し、超高压電顕解析が可能となる。

これまでの解析から RMS 中の遊走細胞は、嗅球へ向かう方向とその逆方向それぞれ突起を伸ばしており、薄膜状に先端が微細に分岐し、その膜表面には微絨毛様の構造が超高压電顕で認められている。これらは、今年度行った超薄連続切片再構築法による解析においても確認されている。RMS 中の遊走細胞がいつ、どこで TH を発現するかを経時的に解析したところ、マウス RMS の標識注入部位から嗅球までの約 3.5mm のうち、嗅球入口にあたる 2mm の時点で TH を発現する GFP(+)/CTO(+) 細胞が観察される。この多重標識細胞は嗅球に近づくにつれて CTO 標識が弱くなる。この細胞を抗 GFP 抗体を用いて解析を行っているが、昨年度までに認められた遊走経路の進行方向に沿った二方向性の突起は短くなり、方向が多方向に向かうなどの突起の形態による細胞極性の多様性がレーザー顕微鏡と超高压電顕で観察された。このような分化過程の細胞は観察できる数が限られていること、突起の蛍光標識が弱いことなどから、現在、標識法を調整し、超高压電顕での厚い切片内の丸ごとの構造解析を継続している。

15. Electron tomography of Herpes simplex virus-infected mammalian cells

Rebecca Lauder, Frazer Rixon

(MRC-University of Glasgow, Centre for Virus Research, Glasgow, United Kingdom)

Kazuyoshi Murata

(National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

Herpes simplex virus (HSV) replication in mammalian cells has both cytoplasmic and nuclear stages. The virus enters the cell by membrane fusion at the plasma membrane and the virus capsid is transported to the nuclear pore where the DNA

genome is released into the nucleus. New DNA-containing capsids are assembled in the nucleus and bud through the nuclear envelope into the cytoplasm, where they undergo further maturation to form the infectious virus particle before

leaving the cell by exocytosis. Although the structures of isolated virus particles have been extensively studied (Zhou et. al. 2000; Schmid et al. 2012), very little is known, at the structural level about the processes occurring inside the infected cell. The main reason for this is the large size of mammalian cells and the poor penetrating power of most electron microscopes. In studies using 200 KeV cryo-EMs in Glasgow and at Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A., we have demonstrated the feasibility of visualising HSV capsids in thin regions (<300 nm thick) of infected cells. Initial results show that a characteristic arrangement of tegument proteins seen at the portal vertex of virion capsids (the PVAT) is maintained after the capsid has entered the cell, thereby confirming that important structural information can be obtained from such samples. To image events occurring in the thicker regions of the cell close to and inside the nucleus, we are attempting to use cryo-HVEM. Cells are grown directly on gold EM finder grids and vitrified for imaging. Difficulty in locating virus particles inside thick (micron or more) regions of cells is expected to represent a major difficulty. To overcome this, virus particles labeled with fluorescent protein tags have been generated. Vitrified grids of cells grown on finder grids and infected at high multiplicity with these viruses will be examined on a cryo-fluorescent microscope in Glasgow and promising areas for EM examination identified before they are sent to Okazaki. Initial results confirm that the greater penetrating power of 1MeV electrons allows much thicker regions of the cell to be imaged. However, the low contrast of the images makes identifying

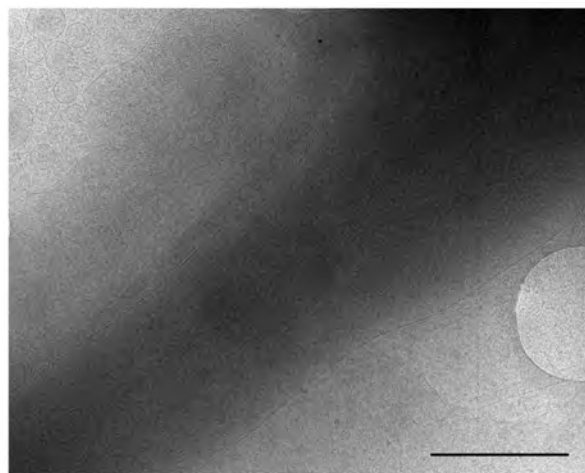


Figure 1. Representative HVEM image of a human fibroblast cell after whole mount grid preparation. Scale 1 μ m.

structures difficult. Work is continuing to determine optimal imaging conditions and to examine methods for enhancing contrast. The major initial aim of this study is to carry out structural analysis of capsids bound to nuclear pores to determine whether interaction between the pore and PVAT triggers release of virus DNA from the capsid into the nucleus.

Refs:

- Schmid, M.F., Hecksel, C.W., Rochat, R.H., Bhella, D., Chiu, W. and Rixon, F.J. (2012). A Tail-like Assembly at the Portal Vertex in Intact Herpes Simplex Type-1 Virions. *PLoS Pathog* 8(10): e1002961. doi:10.1371/journal.ppat.1002961.
- Zhou, Z.H., Dougherty, M., Jakana, J., He, J., Rixon, F.J. and Chiu, W. (2000). Seeing the Herpesvirus Capsid at 8.5Å. *Science* 288, 877-880.

16. 3-dimensional structure analysis of mitochondria under exposure of silica dioxide (SiO₂) nanoparticles

Young Rok Seo

(Department of Life Science, Dongguk University, Seoul 100-715, Republic of Korea)

Over the last decade, the field of nanotechnology has been growing rapidly within various industries. As the widespread applications of various kinds of nanoparticles, use of nanoparticles is increasing continuously. Silica dioxide (SiO₂), one of widely used nano-materials, have been used in

a diversity of industrial fields, including the plastics, rubber, ceramics, coatings, adhesives, and medical industries. However, nanoparticles are hazardous to human health because of their unusual physicochemical properties. Several studies have investigated the cytotoxic and genotoxic effects

of SiO₂ nanoparticles in both in vitro and in vivo systems. Further, it has been suggested that the genotoxicity caused by SiO₂ nanoparticles may be due to proinflammatory effects, modification of chromatin structure, and liberation of DNase or a potent inducer of cytogenic damage. Our group has investigated in vitro and in vivo genotoxicity test of SiO₂ for accurate evaluation to avoid controversial results which caused by nanoparticle's physicochemical properties. Recent research has reported that SiO₂ nanoparticles could penetrate the cells and disperse in cytoplasm and deposited inside mitochondria. It is well known that mitochondria produce cellular reactive oxygen species (ROS) with the potential to cause cellular damage. Concerning with mechanism of mitochondrial generation of ROS, we hypothesized that SiO₂ might induce cytotoxicity and genotoxicity by damaging

mitochondria. In order to investigate the toxic effect of SiO₂ nanoparticles in terms of alteration of mitochondria structure, we have undertaken phenomenological study using electron microscopy. To examine structural change of mitochondria, three-dimensional reconstruction applying a high voltage electron microscopy was conducted. Our result showed mitochondria structural difference between normal, 20nm (SiO₂^{EN20(-)}) and 100nm (SiO₂^{EN100(-)}) SiO₂ nanoparticle treated samples. For obtaining better refined mitochondria structure, three-dimensional reconstruction is in progress. This result might suggest a new approach and provide novel evidence on toxic effect induced by SiO₂ nanoparticles. However, accurate cellular response and mechanism are not clarified yet. Therefore, further study about mechanism will be carried out based on this structural investigation.

【 生体機能イメージング 共同利用実験報告 】

生体機能イメージング共同利用実験報告

〔 目 次 〕

1. マルチモーダルな質感知覚の脳内情報処理機序（藤崎和香ほか）	226
2. 脳磁場計測による多感覚環境下での注意機構の解明（木田哲夫）	226
3. 脳磁場計測による視覚的短期記憶・物体認知メカニズムの解明（松吉大輔ほか）	227
4. 脳磁図と脳波を用いた音声コミュニケーションのヒト脳機能研究（軍司敦子ほか）	227
5. 非侵襲的脳機能計測法を用いた多種モダリティー刺激による誘発脳反応と皮質間連絡線維伝導の計測 （寶珠山稔）	228
6. Williams 症候群およびその他の発達障害を持つ患者の認知機能研究（中村みほほか）	228
7. 視覚を中心とした物体認識に関わる脳磁場信号の計測（野口泰基ほか）	229
8. 視・聴・触覚間の時間的同期判断を可能にする脳内情報処理機序の解明（藤崎和香ほか）	230
9. 機能的 MRI との同時計測による経頭蓋直流電気刺激法の大脳ネットワークへの影響の検討（田中悟志）	230
10. 共同把持力一致課題における 2 人組の同時脳活動計測：コミュニケーション形成の神経基盤を探る （渡邊克巳ほか）	231
11. 表情と音声による視聴覚情動知覚の文化差を生み出す神経基盤（田中章浩ほか）	232
12. クロスモーダルな感覚情報の脳内表現様式の解明（宮脇陽一ほか）	233
13. 語用論の神経基盤の解明に向けて（松井智子ほか）	233
14. ベルベットハンド錯触の神経基盤の解明（宮岡 徹ほか）	234
15. 顔色処理の脳内メカニズムの解明（南 哲人ほか）	235
16. 随意性の低い効果器の訓練による随意性向上と神経基盤の変化（荒牧 勇）	236
17. スポーツと脳構造（荒牧 勇）	236
18. 社会性の脳内機能にかんする国際的研究コンソーシアムの形成（飯高哲也）	237
19. 脳活動によるユーザ体感品質(Quality of Experience)の客観的評価に関する研究（岩田 彰ほか）	237
20. Dual fMRI 装置を用いた会話コミュニケーション時の脳活動解明（湯浅将英）	238
21. 噛み締め圧の強さと相関する脳活動の解明（中村浩幸ほか）	239
22. 時間割引能力の発達とその脳機構の解明（田中沙織）	239
23. 疲労と意欲低下に関わる自律神経機能変調の神経メカニズム研究（渡辺恭良ほか）	240
24. 脳波と脳磁図による聴覚の変化探知メカニズムの解明（元村英史ほか）	240
25. 時間情報処理の神経基盤の解明（林 正道）	241
26. 意識および認知状態の遷移に伴う周波数特異的な脳機能的ネットワークの構造変化の分析 （多賀厳太郎ほか）	241

1. マルチモーダルな質感知覚の脳内情報処理機序

藤崎和香 (産業技術総合研究所 ヒューマンライフテクノロジー研究部門)

西田真也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所 人間情報研究部)

本吉 勇 (東京大学 教養学部・大学院総合文化研究科)

郷田直一, 小松英彦 (生理学研究所 感覚認知情報研究部門)

物体の材質についての情報は、視覚だけでなく聴覚など多くの感覚から得られる。例えば視覚的には物体の見た目から、それが硝子なのか金属なのかそれとも木なのかといったことを判断できる。同様に聴覚的にも、例えばその物体が叩かれた際の衝撃音を聴くことで、叩かれた物体の材質をある程度判断できる。しかしながら人間の脳がどのように、それぞれの感覚モダリティから得られた情報を統合して感覚間で一体感のある材質知覚を実現させているのかについては未解明である。そこで本研究では、fMRI と心理物理の両面からこの問題に迫り、感覚間で一体感のある材質知覚を実現しているマルチモーダルな質感知覚の脳内情報処理機序を明らかにすることを目的とする。

平成 25 年度においては、第一に、前年度までに行ってきた心理物理実験の成果を論文誌に報告した (Fujisaki, Goda, Motoyoshi, Komatsu, Nishida, Audio-visual integration in the human perception of materials. Journal of Vision, 14(4:12) 1-20, 2014)。硝子、金属、陶器、木材、紙材、石材などの材質について、視覚刺激と聴覚刺激をさまざまに入れ替えた視聴覚動画セットを用いて、材質

カテゴリー判断課題 (硝子らしい、紙らしいなど) と材質特性判断課題 (見た目が透明、音が響くなど) を行い、材質のカテゴリー知覚と、材質の特性知覚では、統合のルールが異なっていることを明らかにした。材質カテゴリー知覚における視聴覚統合は、強い非線形 AND タイプの情報統合であり、一方、材質の特性知覚は重みづけ平均による統合で説明できる。

また、前年度までの心理実験と予備的 fMRI 実験の結果に基づいて、多感覚の質感情報の統合を調べるために有効な視聴覚条件を精査し、視覚 4 種、聴覚 2 種の条件の組み合わせからなる fMRI 用視聴覚動画刺激を新たに準備した。さらに、本年度に実施された生理学研究所 fMRI 装置の移転に伴い、実験に使用する fMRI 装置を当初予定より変更し、刺激呈示装置、撮像法、実験デザインなどの再調整を行った。これら新規刺激、実験装置を用いて、これまでに延べ 5 回の fMRI 実験を実施した。現在、視覚野、聴覚野、及び上側頭回等の多感覚領域において、視聴覚統合と関連する脳活動がみられるか解析を進めている。

2. 脳磁場計測による多感覚環境下での注意機構の解明

木田哲夫 (早稲田大学高等研究所)

注意制御中の脳内ネットワーク特性を明らかにすることを目的として、視覚刺激、聴覚刺激、体性感覚刺激からなる多感覚注意課題を遂行している際の脳磁場活動を 306ch 生体磁気計測装置で計測した。解析に際し、ベースライン期間、注意制御期間、注意による感覚変動期間を設定した。計測した脳磁場信号に対してマルチテーパー法により時間周波数解析を行ったところ、アルファ帯域およびベータ帯域のパワー低下 (脱同期化) を認めた。さらにアルファ帯域からガンマ帯域までの各周波

数帯域において信号源の推定を行い、得られた信号源空間におけるデータに対して全脳での網羅的結合解析およびグラフ理論解析を行った。その結果、注意制御期間には中心性などの大局的なネットワーク特性やクラスター係数などの局所的な脳内ネットワーク特性が時空間的かつ周波数依存的に変化することが明らかになった。これらの結果の一部は、北米神経科学会 (SfN2013) および国際臨床神経生理学会 (ICCN2014) にて発表した。また、個々の感覚系に注意を向ける際の脳内ネットワーク特性

について詳細に検討する目的で、様々な特徴を有する視覚刺激を用いた注意課題を遂行している際の脳磁場を生体磁気計測装置で計測した。このデータに関しては、現

在データ解析中である。今後サンプル数をさらに増して検証する必要があるため、現在も脳波・脳磁図を用いた脳活動データの計測を継続的に行っている。

3. 脳磁場計測による視覚的短期記憶・物体認知メカニズムの解明

松吉大輔, 渡邊克巳 (東京大学先端科学技術研究センター)

ヒトが一度に記憶できる情報には制約があり、視覚物体に換算して3つから4つ程度しか保持できない事が知られている。大脳の後部頭頂葉から外側後頭部にかけての領域は、記憶に保持している物体個数に対応して活動が上昇し、3-4 つで飽和する事から、視覚的短期記憶に関与する領域であると考えられており、脳波 (EEG) や機能的磁気共鳴画像 (fMRI) による研究が多く行われている。

本研究では、この脳活動を従属指標とし、視覚的短期記憶・物体認知に関する諸現象のメカニズムを、空間解像度・時間解像度の両面において優れる脳磁場 (MEG) を計測することで明らかにしようとするものである。

本年度においては、EEG において視覚的短期記憶を測

定する際に用いられる代表的パラダイムである半視野注意法 (Vogel et al., 2004, Nature) を用い、注意を向けた視野と反対側半球の後部頭頂葉から外側後頭部にかけて、脳磁図 (MEG) を用いた計測が可能かどうかを、事象関連脳磁場と周波数解析を用いて検討した。

その結果、EEG とは異なり、MEG においては、半視野注意法による視覚的短期記憶関連活動の計測が困難であることが判明した。同様の検討をおこなっている研究者からも、類似の状況に直面している旨の情報を受けており、EEG と MEG の技術的差異に起因している可能性が考えられたため、本パラダイムを MEG にて適用することを中止し、別パラダイムによる検討を行う予定である。

4. 脳磁図と脳波を用いた音声コミュニケーションのヒト脳機能研究

軍司敦子, 稲垣真澄 (国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所)

岡本秀彦, 柿木隆介 (統合生理研究系)

自己発声音のモニタリング機能の解明を目指し、変換聴覚フィードバック (TAF) によって変化する発話中の運動調整を反映する脳磁場 (MEG) 反応について検討した。

健常成人 14 名を対象に、母音/a/の持続発声 (5 秒) 中の脳磁場反応を解析した。自分の声を変調して聞こえる条件 (TAF 条件) と、変調されずにフィードバックされる条件 (control) を実施し、条件毎の加算平均波形から差分波形を算出した。さらに、発声実験で録音された声を両耳に提示した聴取実験における MEG 反応も解析した。発生源解析には、条件毎の加算平均信号を解析ツール (Minimum Norm Estimation: MNE) を用い、差分波形

で得られた第 1 成分の潜時付近における信号寄与について検討した。

頂点潜時 $\pm 1SD$ (mean $\pm SD$: 143.0 ± 37.5 ms) 間を解析したところ、発声および聴取実験のいずれにおいても、一次運動野付近の活動は control よりも TAF 条件で有意に増大した ($p < .001$)。

以上から、発話時の聴覚フォーワード情報とフィードバック情報の照合プロセスによって生じる、発話時における発声・構音器官の運動調節にともなう脳活動を可視化したといえる。さらに、運動の伴わない聴取のみからも運動調節にかかわるフォーワード情報が生じている可能性を示唆した。

5. 非侵襲的脳機能計測法を用いた多種モダリティー刺激による誘発脳反応と皮質間連絡線維伝導の計測

寶珠山稔 (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)

本共同利用研究では、視覚と聴覚における複数モダリティー刺激による誘発脳反応相互の影響と電流源推定による視覚経路における聴覚情報連関部位の同定を行った。

目的：ヒトは情緒的な刺激や特定の感情状態は、視覚および聴覚情報とした受取ることが可能である。情緒的情報は、脳活動の他の情報処理に変化を与え、生理的状态や病態にも影響を与えると考え、多種モダリティー刺激の相互連関部位を脳磁場計測により同定することを目的とした。方法：100名の健常被験者（脳磁場計測の被験者と同年代）により評価された情緒の音楽（陽性および陰性情緒の未知の曲）による聴覚刺激を与えつつ、視覚誘発脳磁場（VEF）を計測し、視覚情報処理過程において情緒刺激によって変化する脳反応と脳部位を計測した。脳反応計測は、14名の健常成人（平均年齢26.5±6.2 (SD) 歳）について実施した。視覚刺激として風景および中性の表情のヒトの顔画像を呈示し VEF の各成分を計測した。視覚刺激呈示開始後約 170ms で生じる VEF 成分 (M170) は、側頭葉下面領域にその反応源が推定され、顔の刺激によって生じた場合にのみ、陰性情

緒の音楽を聴いた条件で M170 成分の推定電流値は右半球で増大した。風景画像刺激による VEF 成分に変化は認められなかった。また、第一次視覚野に電流源が推定される刺激後約 100ms で生じる成分 (M100) での電流値は聴覚刺激条件での差は生じなかった。情緒刺激となりうる聴覚刺激は、大脳辺縁系などの活動を介して視覚情報の入力プロセスに変化を生じたものと考えられたが、情緒に関する活動と入力された視覚刺激との相互作用は視覚刺激の形態認知が生じる視覚情報処理の背側経路における側頭葉下面領域で生じていると考えられた。

その他、慢性感覚障害による体性感覚誘発脳磁場（日本末梢神経学会, 2014）、非言語性聴覚刺激による言語関連脳活動（World Congress of Music Therapy, 2014）、に関する研究を行い、いずれも専門学会にて発表予定である。

Jomori I, Hoshiyama M, et al., Effects of emotional music on visual processes in inferior temporal area. Cognitive Neuroscience, 2013, 4: 21-30.

6. Williams 症候群およびその他の発達障害を持つ患者の認知機能研究

中村みほ (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所機能発達学部)

平井真洋 (自治医科大学先端医療技術開発センター)

稲垣真澄 (国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所知的障害研究部)

三木研作, 本多結城子, 柿木隆介 (国立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部門)

我々はウィリアムズ症候群（以下 WS）を対象に、神経生理学的、神経心理学的検討によりその認知機能の検討を続けている。WS は認知能力のばらつきが大きく、視覚認知機能内部でも、運動視、位置、三次元知覚に関わるとされる背側経路の機能の障害が、顔、色、形の認知にかかわるとされる腹側経路の機能に比べ強い事、過度の人なつつこさ等特異な対人認知を示すことなどの特徴を持つことで知られている。本年度は、これまで生理学研究所で実施してきた、WS の顔認知に関する神経生

理学的実験（脳磁図並びに脳波による）についてまとめた論文を発表した。その内容は以下のとおりである。

WS 患者は定型発達成人に見られるような倒立顔処理が正立顔処理に比べて苦手である（すなわち顔倒立効果を認めない）とする報告と、定型発達者と変わらずに顔倒立効果を認めるとする報告が混在している。我々はその認知機能を詳細に調べた WS 患者において、脳磁図および脳波により倒立効果の発現の有無を検討した。それにより、自験例においても顔倒立効果を認める例と認め

ない例の存在を明らかにし、その違いは WS に特徴的な視空間認知障害のレベルに依存する可能性があることを示唆した。(Nakamura et al. Brain Dev 35 : 323-330, 2013)

また、さらに、WS の社会性の認知発達に関連して、他者の視点取得に関する心理実験を愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所において行い、その成果を発表した。

内容は以下のとおりである。

WS 患者を対象に、視点取得課題（ある物体を別の視点からみるとどのように見えるかを問う課題。社会性の発達と関連があるとされている。）を心的回転課題（物体を回転させるとどのように見えるかを問う課題。）と

の比較において検討した。WS 患者においては精神年齢を一致させたコントロール群に比して両課題ともに低い成績を示した。また、WS 患者において、精神年齢の増加に伴い心的回転課題では成績の改善がみられるのに対し、視点取得課題ではそれを認めなかった。心的回転課題は視空間認知機能と関連すると考えられるが、視点取得課題とは異なる発達過程を示すことが示唆された。

(Hirai et al. Front Hum Neurosci 7 : 856, 2013)

また、これらの知見を応用して、カブキ症候群をはじめとするその他の疾患について同様の検討を実施予定である。

7. 視覚を中心とした物体認識に関わる脳磁場信号の計測

野口泰基，喜多伸一，松本絵里子，横山武昌（神戸大学）

ある刺激をまとまりのある「物体」として認識した時、ヒトの脳は特有の神経活動パターンを示す。fMRI などを用いた過去の研究により、これら物体認識に関わる脳領域の位置（空間）情報は詳細に調べられてきた。一方で物体認識に関わる神経活動の時間的な流れは、未だ不明な点が多い。本研究課題では脳磁計の優れた時間分解能を活かし、視覚を中心とした物体認識に関わる神経活動の流れを追うことを目的として研究を進めてきた。今年度は主に以下の 2 点について実験を行い、また現在までに得られた結果のまとめを行った。

1. 道具刺激の無意識知覚

前年度に引き続き、意識的な見えや実感を伴わない「無意識物体知覚」に関する研究を進めた。特に道具刺激（ナイフやハンマーなどの運動を誘発する刺激）に注目し、それらを意識的・無意識的に知覚している時の脳磁場反応を記録した。一般に道具刺激知覚時の特徴として、ヒトの脳では左半球における μ リズム（8-13Hz）の抑制が

見られる。今回、無意識提示された道具刺激への脳磁場反応を調べたところ、意識提示時と同様の μ リズム（8-13Hz）抑制が見られた。これらの結果は、道具刺激の知覚に特化した左半球の神経処理回路が、無意識状態においても機能し得ることを示している (Suzuki et al., 2014 *Cortex*, vol. 50, 100-114)。

2. 単語共感覚の脳内機構

「共感覚 (synaesthesia)」は限られた人にもみられる稀有な能力で、ある刺激に対して通常は起こり得ない感覚（無彩色の文字に対する幻の色など）が共起される現象を指す。そのような現象の仕組みを調べることは、物体認識のメカニズムを解明する上での手掛かりになることが期待される。本実験では共感覚者を対象に、様々な文字や単語に対する脳磁場反応を記録した。その結果、物体認識に関わる腹側高次視覚野に加え、左半球の言語野の活動も共感覚の発生に関与していることが示された (Yokoyama et al., 2014 *NeuroImage* vol. 94 360-371)。

8. 視・聴・触覚間の時間的同期判断を可能にする脳内情報処理機序の解明

藤崎和香 (産業技術総合研究所 ヒューマンライフテクノロジー研究部門)

西田真也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所 人間情報研究部)

天野 薫 (情報通信研究機構 脳情報通信融合研究センター, 科学技術振興機構)

久方留美 (日本学術振興会特別研究員 P D, NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

田邊宏樹, 北田 亮, 原田宗子, 定藤規弘 (生理学研究所 心理生理学研究部門)

人間の脳が異なる感覚モダリティ間の時間を比較するためには、物理的・生物学的な時間のずれや、誤対応、組み合わせの爆発など、さまざまな困難を乗り越えなければならない。本研究の目的は、このような困難を乗り越えて異なる感覚モダリティ間の時間比較を可能にしている人間の脳内情報処理機序を心理物理学の実験手法と脳イメージング手法を組み合わせで解明することである。

知覚研究ではこれまで **what** 経路と **where** 経路が並列処理されていると考えられてきたが、さらに近年、**when** 経路も分かっているのではないかという議論が始まっている。本研究はクロスモダリティの心理物理と脳イメージングを組み合わせることによって、まず感覚モダリティの組み合わせに共通した **when** 経路の解明を目指す。

我々は近年、聴触覚の感覚モダリティの組み合わせでは、視聴覚、視触覚の組み合わせよりも、時間のずれが検知されやすい (同期・非同期弁別が容易である) ことを発見した (Fujisaki & Nishida, 2009, EBR)。またこの聴触覚の優位性は、バインディング課題では消失するこ

とを発見した (Fujisaki & Nishida, 2010, Proc R Soc B)。これらの心理物理の知見を基に、本研究では fMRI を用いて、特定の感覚モダリティの組み合わせ (特に聴触覚の組み合わせについて) の同期知覚に対応した脳部位の同定を試みるとともに、感覚モダリティの組み合わせに共通した同時性判断の責任中枢 (**when pathway**) の解明を目指す。

今年度はまず、触覚刺激を改良したうえで、視聴覚、視触覚、聴触覚の同期・非同期弁別課題を行った (Verio 使用)。その結果、昨年度は触覚の応答が見られなかったが、今年度は全ての被験者において、視覚、聴覚、触覚の反応が見られた。また STS はマルチモーダル刺激に対してネガティブに応答した。ただし、同期と非同期の違いはあまり顕著にみられなかった。その後 CiNet において、刺激の最適化を目的に、順応パラダイムを用いた実験を行った。その結果、2 Hz では順応パラダイムでも STS に応答がみられることがわかった。

9. 機能的 MRI との同時計測による経頭蓋直流電気刺激法の 大脳ネットワークへの影響の検討

田中悟志 (名古屋工業大学 若手研究イノベータ養成センター)

経頭蓋直流刺激法 transcranial Direct Current Stimulation; tDCS) は、頭部に置いた電極から微弱な電気刺激を与えることにより神経細胞の活動を修飾し、脳機能を一時的に変化させる手法であり、神経疾患や脳卒中等の機能障害に対するリハビリテーションへの応用が期待されている。しかしながら、その作用機序に関しては不明な点も多い。本研究の目的は、ヒト脳全体の活動を計測できる機能的 MRI を用いて、tDCS が脳領域間のネットワークに与える影響を全脳レベルで健常者を対象とした実験に

より明らかにすることである。健常成人 8 名を対象として予備的な実験を行った。まず安静時の脳活動を機能的 MRI を用いて撮像し、その後 tDCS を第二次体性感覚野 (secondary somatosensory area; S2) をターゲットとして実施した。tDCS 実施後に機能的 MRI を用いて再び安静時の脳活動を撮像した。tDCS の刺激条件は、陽極電極を右半球または左半球の S2 直上、陰極電極を対側半球の S2 の直上に貼付した 2 条件と偽刺激条件の合計 3 条件とした。tDCS は 2mA の刺激強度で 10 分間行い、偽刺激は

刺激群と同じ電極配置で最初の 15 秒間のみ 2mA で刺激した。被験者は 3 条件全てに参加し、実験間隔は 1 週間以上空けた。実験の結果、左 S2 に陽極刺激、右 S2 に陰極刺激を行なった場合のみ左 S2 と左楔前部、下前頭回の機能的結合が有意に低下するという予備的結果を得た。

本研究により、tDCS は刺激を行った第二次体性感覚野直下の皮質活動のみではなく、ネットワークレベルで脳活動に影響を与えていることが示唆された。今後被験者を増やして検討していく予定である。

10. 共同把持力一致課題における 2 人組の同時脳活動計測： コミュニケーション形成の神経的基盤を探る

渡邊克巳，高橋康介，阿部匡樹

(東京大学先端科学技術研究センター認知科学分野)

本研究は、コミュニケーションの典型である複数人の共同運動課題において、どのように複数人が冗長な個々の役割を自律的に組織化するのか、またどのような神経基盤がこの組織化に関与しているのかを明らかにすることを目的とした。実験では 2 人の握力の合計を標的力に合わせるといふ共同力発揮課題を用い、その力配分の決定および調整、またそれに関する脳活動を調べた。昨年度は dual fMRI を用いた 2 人同時脳活動計測の実験環境構築に重点を置いたが、本年度は生理研にて幾度か合同会議および予備実験を行い、データの確認並びに実験プロトコルの修正を行った後、年度末に本実験を実施した。

本実験には初対面の同性同士で構成された 19 組のペアが参加した。実験課題は、モニタ画面上にカーソル位置によって示される握力を、標的力（個々の最大握力の 20%）に可能な限り正確に一致させ続けることであつた。課題は 30 秒間行われ、課題条件として 1) 個々の力を一致させる個別課題、2) 2 人の平均力を一致させる共同課題、3) 個別課題時のパフォーマンス（カーソル運動）を注視する課題、4) 共同課題に関する同様の注視課題、の 4 条件が課された。これら 4 条件の課題を 1 ブロック、4

ブロックを 1 セッションとし、休憩を挟みつつ計 3 セッション分の試技が行われた。試技中のペアの脳活動は dual fMRI によって、握力は非金属製・fMRI 用特殊フィルター付握力測定装置によって測定された。なお、本番のセッション前には最大握力の測定、本番セッション後には自閉症スペクトラム指数 (AQ) 質問用紙への記入が行われた。

個別課題ではどの被験者も問題なく標的力を維持し続けることができたが、共同課題では平均力の提示以降に徐々に力の修飾が生じ、ペアのうち一方の力が増大し、一方の力が減少するという傾向が見られた。興味深いことに半数以上のペアでは各々に固有の力配分が安定的かつ無意識的に形成され、この配分には個々の最大握力ならびに社会性が影響を及ぼしている可能性が示唆された。脳活動に関しては現在解析を進行中であるが、予備実験においては前補足運動野 (preSMA)、背内側前頭前野 (dmPFC) などが共同課題時に有意な活動の増大を示しており、これらの活動が共同課題時特有の組織化、力配分の決定に関与していることが予想される。

11. 表情と音声による視聴覚情動知覚の文化差を生み出す神経基盤

田中章浩 (東京女子大学 現代教養学部心理学専攻)

高木幸子 (東京女子大学 大学院人間科学研究科生涯人間科学専攻)

田部井賢一 (三重大学 大学院医学系研究科認知症医療学講座)

原田宗子, 定藤規弘 (自然科学研究機構 生理学研究所 大脳皮質機能研究系心理生理学部門)

他者の情動を適切に知覚することは、円滑な社会的コミュニケーションをおこなう上で非常に重要である。Tanaka et al (2010, Psychol Sci) は表情と音声の視聴覚統合様式に文化差があることを初めて明らかにし、日本人はオランダ人よりも声優位性が高いことを心理実験によって示した。本研究ではこの知見を踏まえ、日本人とオランダ人の参加者を対象に、fMRI を用いて視聴覚情動知覚の文化差の神経基盤を検討する。平成 25 年度は、昨年度の予備実験結果を踏まえ、1) 日本人およびオランダ人の被験者を対象に fMRI 実験を実施し、2) 実験データの解析を実施した。

1) 本実験の実施

日本人を対象とした実験は平成 25 年 6 月に、オランダ人を対象とした実験は平成 25 年 8~9 月にかけて実施した。実験では動画刺激（日本人およびオランダ人による喜びと怒りの情動表現）を視聴覚提示し、顔と声の情動価（一致/不一致）を操作した。被験者は顔または声のいずれかに注意を向けて、2 肢強制選択（喜び/怒り）で情動を判断した。上記に加えて、視覚/聴覚単独提示の条件も設けた。

実験データの予備的な解析から、課題中の反応欠損値および課題間違いと、脳機能計測中の頭部の動きを基準

に、複数名の被験者のデータを除外し、日本人被験者 20 名、オランダ人被験者 15 名の計 35 名のデータを最終的な分析対象とした。

2) データ解析

まず課題遂行中の行動データを解析したところ、オランダ人と比較して、日本人は情動知覚の際に声への依存性が高いという先行研究と同様の結果が得られた（図 1）。

次に、課題遂行中の脳画像データを解析し、通文化的側面および文化特異的側面について検討を進めている。現在までの解析の結果、通文化的側面としては、文化によらず、顔と声で感情が一致する刺激の観察時には、一致しない刺激と比較して、帯状回に有意な活動が認められる（図 2）など、いくつかの知見が得られた。また、文化特異的な側面としては、外集団刺激からの情動知覚時（日本人被験者がオランダ人刺激を、オランダ人被験者が日本人刺激を観察）には、オランダ人と比較して、日本人では左右中側頭回および楔部に有意な活動が認められるなどの結果が得られている。

今後は、視聴覚情動知覚に関与する脳部位および部位間の結合強度が実験参加者の文化的背景によってどのように異なるのかを引き続き検討する。

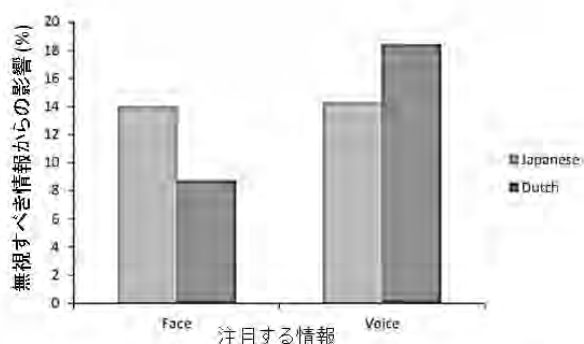


図1. 行動データの分析結果

縦軸の値が大きい方が無視すべき情報からの影響が大きいことを示す

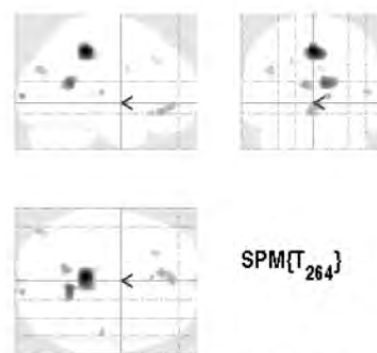


図2. 脳画像データ解析の結果

顔と声の感情が、一致 > 不一致 (FWE, $p < .05$)

12. クロスモーダルな感覚情報の脳内表現様式の解明

宮脇陽一（電気通信大学 先端領域教育研究センター）

中谷 駿（電気通信大学 情報理工学部）

神谷之康（ATR 脳情報通信総合研究所）

高橋陽香，青木直哉，北田 亮，定藤規弘（生理学研究所 心理生理学部門）

感覚野の情報処理は，単一の感覚モダリティだけでは閉じず，視覚，聴覚，触覚などの複数の感覚器から得た情報が相互作用することにより，統一された知覚表象が獲得されている。このような異種感覚間の情報相互作用には，高等生物が生息環境に適応する過程で獲得してきた，複数情報を統合し補完する巧みな情報処理手法の普遍原理を理解するための重要なヒントが隠されているに違いない。そこで本研究では，fMRI によってヒト脳活動を計測することにより，大脳皮質感覚野における異種感覚情報の相互作用および統合過程を調べ，ヒト脳内での異種感覚情報の表現様式を解明することを目的とする。

まず，平成 25 年 4 月より fMRI 装置が 3T Allegra から 3T Verio へと移行したことに伴い，新たに実験環境を構築し，刺激パラメータ，実験条件等の再調整を行った。広視野での刺激提示が必要であったため，新たに導入された高磁場対応型液晶モニタである BOLDscreen を用いて刺激作成および提示が可能な実験環境の構築を行い，視野角 18 度での retinotopy map の同定実験，高次視覚野（MT, PPA, LOC, FFA）の同定実験を実施することがで

きた。

続いて，触覚刺激情報のクロスモーダルな脳内表現について調べるため，被験者の示指先端部に触覚刺激を与えた際の脳活動を fMRI で計測した。今年度は主に触覚刺激の空間パターンの制御に重点を置き，定量的かつ体系的な刺激操作方法を用いて，様々な触覚刺激条件下での脳活動パターンの計測を行った。計測した脳活動パターンと刺激条件との関係性を，単一ボクセル解析およびマルチボクセルパターン解析の手法を用いて解析した。

これまでに 5 名分の被験者（うち 2 名の被験者については 2 回の繰り返し実験）を完了しており，いくつかの興味深い知見を得ている。特に顕著な傾向として，全被験者において，低次視覚野が共通に応答する傾向にあること，頭頂間溝部において両側性の応答が見られることが挙げられる。マルチボクセルパターン解析の結果には個人差が見られており，現在この個人差が生起する要因を詳細に検討している段階である。今後は，実験条件の精査とともに解析方法の改良を行い，本現象を多側面から検証していく予定である。

13. 語用論の神経基盤の解明に向けて

松井智子（現：東京学芸大学国際教育センター／元：京都大学霊長類研究所）

内海 彰（電気通信大学大学院情報理工学研究科総合情報学専攻）

菊知 充（金沢大学子どものこころの発達研究センター）

中村太戯留（慶應義塾大学環境情報学部）

ヒトの言語活動においては，いわゆるオモテの意味とウラの意味とがある。オモテの意味（文字通りの意味）は，発達の比較的早期に理解できるようになるが，一方でウラの意味（文字通りとは異なる意味）の理解は，やや遅れて理解できるようになること，および語用障害ではこの発達が障害されることが知られている（松井，2013）。

そこで本研究では，語用障害のうち，注意欠陥／多動

性障害，Asperger 障害，高機能自閉症の鑑別に，比喩・皮肉文テスト（安立他，2006）が活用されていることを鑑み，皮肉と比喩を題材として，①成人を対象に磁気共鳴装置を用いた実験を行い，特に情動伝達に関わる神経基盤を明らかにすることとともに，②その結果を，子供を対象とした小児用 MEG や NIRS による実験の基礎データとして活用することを目的として推進している。

本年度は、これまでに①の枠組みで実施した(A)「プロソディを含む皮肉発話の解釈課題」と(B)「パンチラインとしての隠喩的表現の解釈課題」のfMRI実験の結果の解釈を深めるため、データの再検証を実施した。

これまでの皮肉理解のイメージング研究は、主に文字を刺激として提示した際の反応を測定したものが報告されている(Rapp, et al., 2012; Uchiyama, et al., 2012)。一方、ヒトが皮肉を理解するためには、相手の発話の文字通りの意味や文脈情報に加えて、どのような口調で相手が発話したのかというプロソディ情報が重要な役割を果たすことが知られている(内海, 2000)。そこで本研究では、相手の発話を音声として提示した際の脳活動を磁気共鳴装置で捉えることを試みた。結果、(a)左下前頭回(ブロードマンの47野)がプロソディと文脈が不一致となる条件で賦活すること、および(b)両側島皮質と内側前頭前野と脳幹がプロソディと発話のオモテの意味が不一致となる条件で賦活することが確認された(Fig. 1)。しかし、文字を刺激として用いた先行研究が対象としている文脈と発話のオモテの意味との不一致の条件に関しては、今回のプロソディ情報を含む発話を用いた実験においては賦活を確認することはできなかった。この結果から、プロソディ情報を含む皮肉理解のプロセスは文字情報のみ

の場合とは異なる可能性が示唆された。次年度は、検証の継続と論文投稿を行う。

引用文献

- 安立多恵子・平林伸一・他 (2006). 比喩・皮肉文テストを用いた注意欠陥／多動性障害, Asperger 障害, 高機能自閉症の状況認知に関する研究 脳と発達, **38**, 177-181.
- 松井智子 (2013) 子どものうそ, 大人の皮肉. 岩波書店.
- Rapp, A. M., Mutschler, D. E. & Erb, M. (2012). Where in the brain is nonliteral language? A coordinate-based meta-analysis of functional magnetic resonance imaging studies. *NeuroImage*, **63**, 600-610.
- Uchiyama, H. T., Saito, D. N., Tanabe, H. C., Harada, T., Seki, A., Ohno, K., Koeda, T. & Sadato, N. (2012). Distinction between the literal and intended meanings of sentences: A functional magnetic resonance imaging study of metaphor and sarcasm. *Cortex*, **48**, 563-583.
- Utsumi, A. (2000). Verbal irony as implicit display of ironic environment: Distinguishing ironic utterances from nonirony. *Journal of Pragmatics*, **32**, 1777-1806.

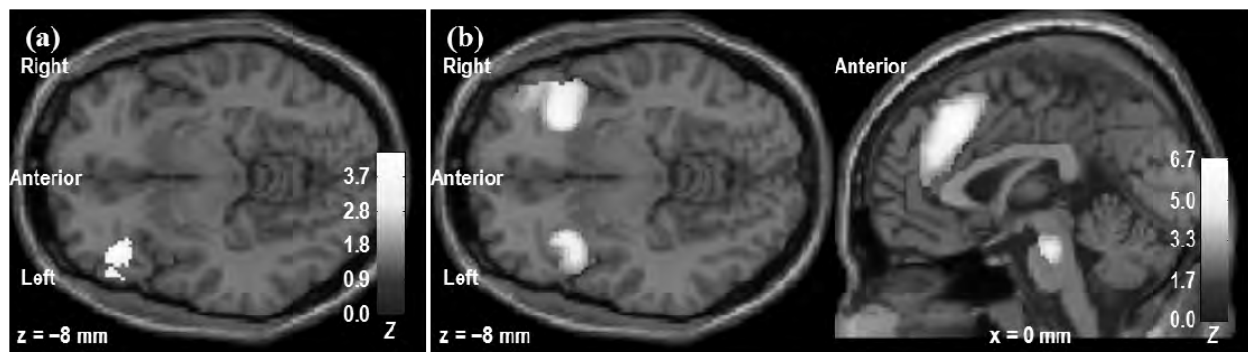


Fig. 1: (a) プロソディと文脈の不一致効果, (b) プロソディと発話のオモテの意味の不一致効果

14. ベルベットハンド錯触の神経基盤の解明

宮岡 徹 (静岡理科大学)

大岡昌博, Rajaei Nader, Mohammad Azzeim (名古屋大学)

Velvet Hand Illusion (VHI) とは、2本の平行に張った棒を両手で挟んで棒と直行方向に両手を同時に動かすと、ベルベットのような滑らかな面が感じられる錯触である。

この錯触が脳でどのように生起されるのかは不明である。

申請者らは、VHIを生起させる条件について心理物理

学実験で確認しつつ、メカニズム解明のための fMRI 実験を実施した。fMRI 実験用に、非磁性素材を用いた刺激装置を開発し、Siemens Verio を用いた実験を行った。

【fMRI 実験】 18 歳以上の健常者 30 名が実験に参加した。各参加者は、両腕をクッションやベルトで固定された状態のまま仰臥位になった。本実験用に開発した、レシプロ機構により往復運動する方式の触覚刺激装置を用い、参加者の手を刺激した。

実験計画は、①ベルベット錯触が起きる条件 (Illusion 条件)、②Illusion 条件と類似した刺激だが錯触が弱い条件 (No Illusion 条件)、③本物のベルベットを感じる条件 (Real Velvet 条件)、④他の条件と同じように手を重ね合わせるが、触覚刺激のない条件 (No touch 条件) の 4 条件からなっていた。

【fMRI 実験の解析結果】 解析には SPM8 を使用し、Dartel 法により解剖的標準化を行い、標準の集団解析を実施した。

「本物のベルベットに触れたときに賦活する神経基盤のうち、錯触を経験したときに活動する領域はどこか？」を明らかにするため、No Illusion 条件に対して Illusion 条

件で強く賦活した領域 (Illusion vs. No Illusion) と No tactile 条件に対して Real 条件で強く賦活した領域 (Real Velvet vs. No touch) の重複を、Conjunction 解析で描出した。この解析により、両側の中心後回 (一次体性感覚野)・小脳で有意な活動がみられた。この結果は、体性感覚野と小脳のネットワークがベルベット錯触に重要な役割を果たしていることを示している。

【今後の研究】 今後は、平成 25 年度に採集したデータの詳細な解析を、生理学研究所の定藤教授と北田助教の助言をもとに実施する予定である。また、平成 25 年度の実験は触覚のみの条件であり、VHI により賦活された脳活動が視覚でも賦活されるのかは不明である。そこで、VHI の生起メカニズムをさらに解明するために、ランダムドットで形成された視覚刺激が表面を形成する条件としない条件を比較し、触覚実験データで描出された賦活領域が視覚でも賦活されるかどうか検証する追加実験を実施する。さらに、fMRI の実験で得られた知見に基づいて、VHI と同様な効果を生じるハプティック・ディスプレイの設計提案を行う。

15. 顔色処理の脳内メカニズムの解明

南 哲人 (豊橋技術科学大学 エレクトロニクス先端融合研究所)

中島加恵 (豊橋技術科学大学 電子・情報工学専攻)

fMRI を用いて、脳内のどの部位が顔色処理に関係しているのかを同定した。全体脳の解析を行った結果、顔処理に関係する左右の紡錘状回 (FFA: fusiform face area) と後頭顔領域 (OFA: occipital face area) で活動が得られた。これら 4 つの領域について ROI 解析を行い、顔色の処理について検討した結果、左の紡錘状回に、形 (顔かどうか) と色 (肌色か青色か) の交互作用が見られ、自然な顔色により強い活動を示していることが分かった。これらの結果が、英語論文としてアクセプトされた (Nakajima K, Minami T*, Tanabe HC, Sadato N, Nakauchi S. Facial color processing in the face-selective regions: an fMRI study. Human Brain Mapping, 2014 Sep;35 (9):4958-64.)。

さらに、「真っ赤になって怒る」、「恐怖で顔が青ざめる」という表現があるように、表情と顔色とは強い結びつきがあると考えられる。そこで、表情認知に顔色

が影響を及ぼすという現象を調べた。表情認知に顔色が影響を与えるのであれば、特に曖昧な表情の判断を行う場合に顔色の情報が大きく影響を及ぼすと考えられる (例えば、怒っているのか、怯えているのかが曖昧な表情の場合、顔色が赤みを帯びていれば怒り、顔色が青みを帯びていれば怯えの表情と判断される)。そこで、まずは、2 つの表情をモーフィングし、曖昧な表情画像を作成した上で、顔色を操作した顔刺激を用いた心理物理実験により、表情判別確率が変化するかどうかを調べた。その結果、顔色を赤色に変化させると、怒りと判断する閾値が通常の色と比較して下がること示され、この結果は、赤い顔が怒って見えることを示唆している。

この顔色による表情知覚処理の促進効果の脳内処理メカニズムを明らかにするために、fMRI を用いた実験を行った。つまり、脳内で行われる表情知覚処理に顔色の

情報がどのように作用し、表情知覚処理が促進させるのかを調査した。被験者 34 名の実験が終了し、行動実験レ

ベルでは、表情判別における顔色の効果を再現できていることを確認した。

16. 随意性の低い効果器の訓練による随意性向上と神経基盤の変化

荒牧 勇 (中京大学スポーツ科学部)

我々はどのようにして運動の随意性を獲得していくのか？本研究は、随意性の低い運動システムに対して、運動訓練、経頭蓋直流電気刺激、筋電気刺激、リアルタイム fMRI フィードバックなどの手法により、随意性を向上・獲得することを試み、その随意性の向上・獲得に伴う脳神経系の機能的・構造的変化を MRI を用いた脳機能画像解析、脳構造画像解析により明らかにすることを目的とする。昨年度までの成果として、週 3 回のサッカーのリフティング訓練によりリフティング連続回数が増加することに伴い、運動視に関連する MT/V5 領域、左半身の制御に関する左小脳の灰白質体積が発達するという結果を得た。リフティング回数が増えるにつれて、利き足でない左足でのボールタッチ回数が増加していることから、左小脳の発達は、訓練により左足の随意性が向上したからではないかという仮説に至った。

本年度は、このリフティング研究から生まれた仮説を

検証するために、随意性の低い左手を徹底的に訓練することで左小脳が発達することを明らかにすることを試みた。訓練する課題は、非利き手でのハンドボールの投球とした。

17 名の被験者に対して、4 週間にわたり、週 3 日、1 日につき 50 球、非利き手である左手でのハンドボール投球訓練を行った。訓練期間の前後に 10 球ずつテスト投球を行い、左手での投球の速度と、的中心からの距離を計測した。訓練前後に全脳の T1 強調解剖画像を計測した。

1 か月の投球訓練の結果、左手投球での球速と正確性（的中心からの距離）は有意に向上した。このパフォーマンス向上にともない、左小脳の灰白質体積は有意に増加した。

小脳は身体同側の運動制御と運動学習に関わる脳領域である。よって、訓練による非利き手の投球能力の向上は、同側小脳の発達に支えられていることが示唆された。

17. スポーツと脳構造

荒牧 勇 (中京大学スポーツ科学部)

スポーツと脳の構造にはどのような関係があるだろうか？近年、脳の構造が運動・認知スキルや気質・性格と関連すること、また、「経験」が脳構造を変化させることが明らかになりつつあるが、スポーツと脳構造の関係は未解明な点が多い。

スポーツには競技種目ごとに必要とされる運動機能・認知機能・社会コミュニケーション機能・気質・性格などにそれぞれの特性がある。このため、競技者は、その競技の特性に必要な脳機能に関連する脳部位の構造に特徴がある可能性がある。そこで本研究は、1) さまざまな競技種目の競技者の MRI 脳画像を計測し、競技ごとの脳構造の特徴を明らかにすること、2) 競技内での競技

力を決定する脳構造の特徴を明らかにすることを目的とする。

今年度は、ハンドボール選手の競技力と関連する脳構造の特徴を明らかにする研究をおこなった。全国トップレベルの大学ハンドボール選手 15 名に対して、MRI による T1 強調脳解剖画像を計測した。また、各被験者の実際の試合中のプレイのミスの回数をカウントし、ミス率を算出した。脳解剖画像は、脳灰白質の局所的な体積・密度を調べる Voxel Based Morphometry の手法で解析した。

VBM 解析の結果、ハンドボール選手の試合中のミスが多い選手ほど、島皮質の灰白質体積が大きいことが明ら

かとなった。

島皮質は、不安、痛み、吐き気など、どちらかという
とネガティブな心身の情報に関連する領域である。この
島皮質の灰白質の体積が試合中のミス率と関連すること
から、島皮質の発達具合を調べることは、競技力を評価

する指標の一つとなりうる。ただし、島皮質の発達がミ
スを引き起こすのか、ミスにより誘発された反応により
島皮質が発達したのかについては本研究だけでは言及で
きない今後の課題である。

18. 社会性の脳内機能にかんする国際的研究コンソーシアムの形成

飯高哲也（名古屋大学 大学院医学系研究科）

国際的研究コンソーシアム形成に関しては、米国
Northwestern 大学、南アフリカの Capetown 大学との共同
研究の計画を進めた。各人種で応用が可能な顔刺激の作
成と、被験者の心理社会的状態を判定するための質問紙
の標準化についての検討を行った。その中で平成 25 年 5
月には Northwestern 大学において、国際シンポジウムが
開催された。そこで"Cultural values modulate emotional
processing in the amygdala"という演題で招待講演を行っ
た。その内容は Oxford University Press から後日出版され
る予定である。

社会性脳機能の研究にかんしては、顔の表情への共感
性について fMRI を用いた実験を行った。そこでは相手
の笑顔や怒り顔を見た時の脳内反応を、動画刺激を用い
て調べた。相手の表情が笑顔の場合と怒り顔の場合では、
それぞれ共感性に関わる脳領域が異なっていることが分
かった。本研究結果は現在国際誌に投稿中である。顔認
知に関しては、平成 23 年の報告書に研究成果として記載

した顔の虚記憶実験の短期記憶版実験を行った。長期記
憶と同様に短期記憶でも扁桃体の活動が変化することを
示した。その結果は国際誌に投稿中である。

その他には、日本心理学会の英文誌に受理された顔認
知の総説の掲載が決定した。近年話題になっている、先
天性相貌失認に関する和文の総説を出版した。fMRI の原
理である BOLD 効果に関する総説を出版した。

- 1) **Iidaka T.** Role of the fusiform gyrus and superior
temporal sulcus in face perception and recognition: An
empirical review. Japanese Psychological Research 56
(1), 33-45, 2014
- 2) **飯高哲也.** 先天性相貌失認 Brain and Nerve 66 (4),
403-411, 2014
- 3) **飯高哲也.** 脳画像で見る精神疾患 「それぞれの画
像検査法と臨床応用：fMRI (BOLD)」監修：山内
俊雄，編集：松田博史，pp. 46-58，新興医学出版，
2013

19. 脳活動によるユーザ体感品質 (Quality of Experience) の客観的評価に関する研究

岩田 彰（名古屋工業大学 おもひ領域）

田中悟志（名古屋工業大学 若手研究イノベータ養成センター）

伊奈嵩紘（名古屋工業大学大学院 情報工学研究科）

通信技術の急速な進歩により、視覚・聴覚情報に加え
触覚情報などの五感情報のネットワーク利用が可能とな
りつつある。しかし、ネットワークを介してこれらの情
報を転送すると、ネットワーク遅延や揺らぎなどの影響
によって時間的同期性などの情報の出力品質が大きく劣
化する可能性がある。このような五感情報サービスにお

いて、最終的な受け手である人が体感する品質、ユーザ
体感品質 (Quality of Experience: QoE) は重要な要因である。
これまでの QoE の評価は質問紙などによる主観評価が
一般的であった。本研究では機能的 MRI の高い空間解像
度に着目し、脳活動による QoE の客観的評価手法の確立
を目指した。本研究では特に、異種感覚情報の同期非同

期をどのように認知しているかを脳活動から客観的に予測する手法を開発するために、健常者を対象とした機能的 MRI 実験を実施した。成人健常者 20 名を対象とした機能的 MRI 実験を行い、異種感覚間時間差検出課題の成績と相關する脳部位を同定する実験を行った(実験 1)。その結果、視聴覚刺激が非同期であると被験者が判断した時に、右半球の腹側後頭頂皮質周辺が特異的に活動するという事が明らかになった。実験 1 で異種感覚情報の同期非同期判断の検出にしていることが示唆された右半球の腹側後頭頂皮質周辺をターゲットとし、実験 2 では実験 1 とは独立の 4 名の被験者グループを用いて実験を行った。その領域の活動振幅から異種感覚情報の時間差が予測できるかを実験 1 と同様の実験パラダイムを用いて検討した。しかしながら、右半球の腹側後頭頂皮質の

振幅からは、被験者の同期非同期という主観的判断内容を有意に予測することはできなかった。これは BOLD 信号の振幅が 1 試行のレベルでみるとかなりのばらつきを持っているためであると推測された。今後は振幅データだけでなく、機械学習などを用いて活動の空間的パターンなどから、被験者の同期非同期という主観的判断内容を読み出せるか検討していきたい。

業績

伊奈嵩紘, 田中悟志*, 石橋豊, 荒牧勇, 定藤規弘, 岩田彰. 機能的 MRI を用いた視聴覚刺激同期判断課題における非同期判断に関わる脳活動の検討, 日本感性工学会論文誌 vol. 13, No. 1, pp.1-6. (2014).

20. Dual fMRI 装置を用いた会話コミュニケーション時の脳活動解明

湯浅将英 (湘南工科大学／東京電機大学)

人は文章を理解するとき、入力された個々の単語の意味や役割(主語, 目的語)を把握し文全体の単語をつなげ、その意味を理解する。さらに文章を理解する過程では心的表象として「状況モデル」を構築するとされる。会話理解の場合も同様、相手の発言を様々なレベルで理解し、状況モデルを構築していると考ええる。これまでの研究で音韻や語彙、文の理解の解明は進んでいるが、会話における状況の理解はいまだ進んでいない。会話では相手が言った言葉を受けて、自らが発言し話が進んでいくため、文章や物語を読むときと異なる仕組みがあると考えられる。本研究では、会話の状況を理解する理論モデルを検討し、神経基盤を脳活動計測より探る。本報告では、Dual fMRI 装置利用の準備のため実施した fMRI 装置 1 台を用いた二者間会話時の実験を述べる。

本実験では、fMRI 測定室内と室外の実験協力者ら互いの声が聞こえる環境を構築し、脳を撮像する時間を固定するために発話を制限した。これまでの実験で、二種類の状況モデルが異なる会話として「旅行先が決まる会話

I」「旅行先が決まらない会話 II」を作成した。実験協力者 21 名の大学生を用いた fMRI 実験の結果、会話 II よりも会話 I のときに左側頭回付近に有意な賦活が見られた。先行研究との比較検討により、賦活部位にて話の進行状況を理解している可能性が考えられた。

さらに、話が決まらない会話として「否定的な反応を返す会話」を追加し予備実験を実施した。これは会話 I と同じように話が展開していくが、実験協力者と対立するような返答をすることで状況が構築されないものである。実験協力者 8 名を用いた計測により、左側頭回付近に有意な賦活が見られた。この部位は文章や物語理解の時に賦活するとされ、前述の比較実験結果と同様の賦活結果が得られた。

これらのことから、会話において状況が構築される際に活動する特有の脳部位が存在することが確認され、有意な知見が得られた。今後、実験を追加し、人の会話時、コミュニケーション時の神経基盤を探っていく。

21. 噛み締め圧の強さと相関する脳活動の解明

中村浩幸（岐阜大学 大学院医学系研究科）

加藤新英（岐阜大学 医学部医学科）

定藤規弘，原田宗子（自然科学研究機構 生理学研究所 大脳皮質機能研究系心理生理学部門）

強いストレスを受ける人は噛み締めが強く、歯の摩耗が激しい。この事実から、ストレス状況に反応する情動系の脳活動と噛み締めの強さの間に何らかの関係があるのではないかという、疑問が出てくる。本研究では、fMRIを用いて特に情動系の主要な出力系である扁桃体の活動が噛み締め圧の強さと相関して抑制されるか否かを検討した。

健常な岐阜大学医学部学生 27 名（18-37 歳）を被験者とした。それぞれの被験者の歯列模型から、クリアリテーナを作製した。被験者にクリアリテーナを装着してもらい、噛み締め時の接触点を確認した。接触点に、平板圧センサを歯科用レジンにて圧着し、噛み締め圧をモニタした。被験者は、この噛み締め圧センサを装着して、コンピュータ画面上の圧モニタを指標に、最大噛み締め圧の 60%、30%、10%、0%（安静時）による噛み締めを

行った。

課題はブロックデザインを用い、音声により 3 段階（60%、30%、10%）の噛み締め圧をランダムに指示した。各被験者で 2 セッション行った。個人ごとにその解剖画像から扁桃体の位置を同定し、その座標を中心とする半径 5mm の ROI から扁桃体の活動を抜き出した。扁桃体の活動と噛み締め圧との関係を被験者全体でグループ解析した結果、有意な相関は認められなかった。（ $p > 0.05$ （片側検定））。それぞれの個人データから、扁桃体活動を抽出して噛み締め圧との相関を解析した結果、噛み締め時に両側扁桃体活動が亢進したヒトは 6 名、両側扁桃体活動が抑制されたヒトは 8 名、いずれともいえなかったヒトは 13 名だった。

したがって、噛み締めが扁桃体活動に何らかの影響を持つとは結論できなかった。

22. 時間割引能力の発達とその脳機構の解明

田中沙織（大阪大学社会経済研究所）

われわれが意思決定を行う際に頼りにする価値や効用は、報酬の大きさや確率、時間遅れなどに影響を受けることが分かっている。近年はそれに加え、他者から得る「社会的効用」の存在が提唱されている。

社会効用は、自分だけでなく相手の所得も考慮した効用を意味し、自分と相手の所得のバランスを決めるパラメータ（社会効用パラメータ）が正の場合は相手の所得増加が効用の増加につながり、負の場合は減少につながる。我々は、前年度までに社会効用を測定する行動および fMRI 実験（被験者は自分と他人の写真と収入の組み合わせに対して、右の状況と左の状況のどちらが良いかをボタン押しで選択する）を実施し、今年度は引き続き行動および脳活動データの解析を行った。

社会効用パラメータに関する経済学の先行研究（Yamada and Soto, 2013）で見られた「相手の性別」に対

する異質性を脳活動で調べるために、行動データから、男女の同性・異性への社会効用パラメータを推定し、相手別の活動と、相手別で推定した社会効用パラメータとの関係を見た。その結果、相手の収入に対する活動と、相手の性別別に推定した社会効用パラメータとの相関を相手の性別で分けて見てみると、島皮質では女性は相手が男性の時のみに有意な負の相関が見られた。男性では相手が男女どちらでも、見られなかった。つまり、島皮質においては、男性に対する妬みが強い女性ほど、相手の男性との所得の差に強く反応するという解釈ができる。一方、背外側前頭前野では、女性も男性も、相手が女性でも男性でも有意な相関が見られた。この結果は、背外側前頭前野は、相手の性別には関係なく、妬みが強い人ほど相手の収入に対して強く反応することを示している。これらの結果を解釈すると、男女ともに背外側前頭前野

は相手の収入に対する敏感さが見られる。これは、いわゆる理性的な回路なので、合理的に社会効用の計算をしている部位だと考えられる。一方、島皮質はいわゆる情

動に関わる部位なので、女性が男性に感じるものには、感情的なものが含まれていることを示唆しており、相手の性別に対する異質性を確認できた。

23. 疲労と意欲低下に関わる自律神経機能変調の神経メカニズム研究

渡辺恭良, 水野 敬, 佐々木章宏 (理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター)
定藤規弘 (自然科学研究機構生理学研究所)

疲労と意欲は表裏一体の関係にある。しかしながら、その詳細な神経メカニズムは明らかでない。一方、急性疲労と慢性疲労に共通し、安静時にも関わらず副交感神経活動の低下および交感神経活動の亢進が観察される (Mizuno, K. et al., *Behav. Brain Funct.*, 7: 17, 2011; Tanaka, M. et al., *Life Sci*, 84 (7-8): 235-239, 2009; Tanaka, M. et al., *Behav. Brain Funct.*, 7: 46, 2011)。これら自律神経機能の変調は、疲労状態の客観的かつ定量的な評価に資する生理的バイオマーカーとして確立されてきた。しかしながら、疲労・意欲低下による自律神経機能変調の神経メカニズムは明らかでない。よって、本研究は、fMRI と心電図または脈波計測により、疲労と意欲低下の

神経メカニズム解明および疲労・意欲低下に関わる自律神経機能変調の神経メカニズムを明らかにすることを目的とした。ワーキングメモリ課題の 2-back task を用いて精神的疲労を引き起こす疲労負荷課題中の fMRI と心電図の同時計測を行った。数人の被験者における個人解析の結果から、疲労負荷の時間経過によって帯状回の賦活レベルが低下する傾向が得られた。また、交感神経の活動は疲労負荷により亢進し、かつ、帯状回の賦活度と逆相関の関係にあるケースがみられた。今後、集団解析を行い、精神的疲労および意欲低下による自律神経の機能変調に関わる神経基盤の同定を試みる。

24. 脳波と脳磁図による聴覚の変化探知メカニズムの解明

元村英史 (三重大学医学部付属病院精神科神経科)
乾 幸二

取り巻く環境の変化を速やかに察知する変化検出は極めて基本的かつ重要な情報処理戦略であり、この変化関連脳活動は時間分解能に優れた脳波や脳磁図で捉えることができる。我々はイベント発生後にみられる後期活動を標的として研究を進めている。本年度は連続する音が突然に消えた時に誘発される聴覚 Offset 反応の大腦半球差について検討を行った。

右利き健常者を対象とし、全頭型脳磁図計 (Vectorview, ELEKTA Neuromag) を用いて左右それぞれの片耳に 1000 ms, 70dB のホワイトノイズをランダムに呈示し、音終了後約 100 ms にみられる比較的大きな誘発脳活動である Offset-N1m について解析を行った。この誘発脳活動の信号源は聴覚領域 (おそらく上側頭回) に推定され、左

右の片耳刺激において誘発される Offset-N1m の推定された脳内部位に統計学的な有意差はみられなかった。推定された皮質活動は音刺激の呈示側に関わらず、右側の活動強度は左側に比して有意に高いものであった。

通常、連続音の途中で突然に音特性 (周波数, 音圧など) を変化した音刺激パラダイムを用いて変化関連脳活動を測定する。よって、厳密には変化検出に関わる脳活動だけでなく変化した音自体についての情報処理活動も重畳することになる。しかし、音の終わりに誘発される Offset 反応はその後に処理する感覚情報は存在しない極めて純粋な変化関連脳活動であると考えられる。つまり、今回の結果は変化関連脳活動における右半球優位を示唆するものである。

我々はすでに慢性期の統合失調症患者における変化関連脳活動の減弱を明らかにした（投稿準備中）が、今後

は更にその左右差にも注目し、統合失調症の病態解明を目指したい。

25. 時間情報処理の神経基盤の解明

林 正道（University of Helsinki, Institute of Biomedicine/Physiology）

時間は我々の環境を構成する最も基本的かつ重要な要素である。経過時間を正確に把握することは、音声やリズムの認識、運動制御や意思決定などにおいて特に重要であるとされている。数百ミリ秒のレンジにおける時間情報処理の生物学的モデルとして、時間の長さ（時間長）は特定の時間長に対して選択的応答を示すニューロン群によってコードされているとする「時間長チャネルモデル」が提案されている。しかしながら、実際にヒトの脳にそのようなニューロン群が存在するのかはよく分かっていない。

我々は反復抑制法とよばれる実験パラダイムを用い、時間長弁別課題遂行中の脳活動を機能的磁気共鳴画像法（fMRI）で計測することにより、ヒトの脳に時間長選択的な応答特性をもつニューロン群が存在するのかを検討した。反復抑制法は、ある特徴をもつ刺激が反復して呈示された場合に、その特徴に対して応答するニューロン群の活動が減弱する現象（神経アダプテーション）を利用する。本実験の場合、もしある脳領域に特定の時間長に選択的応答を示すニューロン群が存在するならば、その領域では同じ時間長をもつ刺激が反復して呈示された場

合に、異なる時間長の刺激が呈示された場合に比べて BOLD 信号が減弱すると予想される。

我々の実験では視覚刺激を用いてアダプター刺激（300ms または 420ms）、およびテスト刺激（各アダプター刺激に対して短い/同じ/長い時間長を持つ刺激）を順番に呈示した。被験者はテスト刺激の時間長がアダプター刺激に対して「短い」、「同じ」、「長い」のいずれであったかをボタン押しで回答するように求めた。21名の健常被験者を対象に、実験課題遂行中の脳活動を fMRI により計測した。

一般線形モデルによってテスト刺激の offset に対する活動強度を各条件で推定した。解析の結果、right Supramarginal Gyrus (rSMG) における BOLD 信号が、アダプター刺激とテスト刺激の時間長が同一であった場合に減弱し、テスト刺激がアダプター刺激よりも短い、あるいは長い場合には回復することが示された。本研究の結果、および先行して行われた我々の実験結果から、時間長に選択的応答を示すニューロン群が rSMG に存在している可能性が示された。

26. 意識および認知状態の遷移に伴う 周波数特異的な脳機能的ネットワークの構造変化の分析

多賀巖太郎，笹井俊太郎（東京大学大学院教育学研究科）

脳がどのようにヒトの行動を生みだしているのかを知るために、様々な刺激や課題を用いて、それに対する脳活動を計測するが行われてきた。これにより、異なる脳機能は異なる脳領域に局在することが明らかにされてきた。一方、刺激を与える、また課題を遂行させるなど、明示的に脳の活動を誘発しなくとも、脳は自発的に秩序を持って活動していることが知られている。この自発活

動は長らく単なる雑音であると考えられてきた。しかし近年、機能的に類似した脳領域間でこの自発活動が相関することや、刺激に誘発された活動が自発活動の状態に依存して変化することが発見された。これらのことから自発活動は単なる雑音ではなく、脳活動の時空間秩序を拘束する役割があると考えられている。

筆者らはこれまで機能的磁気共鳴画像法および近赤外

分光法を用いて自発活動に見られる脳の時空間秩序を検討してきた。その結果、脳には脳全体の情報を分離し、また統合する空間構造があり、自発活動の周波数に応じて複数の異なる空間構造が存在することを明らかにした。そこで本課題においては、この周波数特異的な空間構造とヒトの行動との関係性の解明を大きな目標とし、注意を向ける対象の違いが、どのように周波数特異的な情報統合の空間構造に影響を与えるかを検討する。より具体

的には、視覚情報に対して注意を向けているとき、聴覚情報に対して注意を向けているとき、心拍に対して注意を向けているとき、さらに自己について注意を向けているときの、4種類の課題遂行時の脳活動を磁気共鳴画像法により計測し、条件間で周波数特異的な活動の空間構造を比較する。これまでに上記のデザインを用いて 45 人の被験者に対して実験を行ってデータを取得し、現在取得したデータの解析を進めている。

【 研 究 会 報 告 】

研究会報告

〔 目 次 〕

1. 膜機能分子の機能・構造ゆらぎの時空間スペクトル解析 (代表者：老木成稔 2013年9月5日－9月6日)	247
2. 新規シグナル伝達分子とその生理学的可能性 (代表者：森 泰生 2013年9月26日－9月27日)	254
3. 心血管膜輸送分子の構造・機能・病態の統合的研究戦略 (代表者：岩本隆宏 2013年11月27日－11月28日)	261
4. 構造の多様性に立脚した糖鎖機能の解明に向けて (代表者：古川 清 2013年11月14日－11月15日)	272
5. シナプス恒常性維持の分子基盤とその破綻 (代表者：大塚稔久 2013年6月6日－6月7日)	280
6. 視知覚の現象・機能・メカニズム－生理学的，心理物理学的，計算論的アプローチ (代表者：村上郁也 2013年9月12日－9月13日)	287
7. シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス (代表者：神谷温之 2013年12月12日－12月13日)	297
8. グローバルネットワークによる脳情報処理 (代表者：田中真樹 2014年1月10日－1月11日)	306
9. 神経オシレーション：共振とディスリズミア (代表者：池田昭夫 2013年7月18日－7月19日)	313
10. 第3回社会神経科学研究会「社会的行動の決定機構」 (代表者：松田哲也 2013年11月28日－11月29日)	327
11. 自律分散システム研究会～生体-機械協調システム研究の進展～ (代表者：横井浩史 2013年6月14日)	334
12. 感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻 (代表者：南 雅文 2013年9月2日－9月3日)	337
13. 個体内の記憶回路の同定とその機能解析による 学習記憶制御基盤の統合的理解 (代表者：喜田 聡 2013年12月11日－12月12日)	345
14. 上皮膜輸送の多層的コントロールによる生体の恒常性維持機構 (代表者：石黒 洋 2013年8月26日－8月27日)	351
15. TRP チャネル研究を通じて見えてきた新たな生理学への光 (代表者：柴崎貢志 2013年6月13日－6月14日)	362
16. 温熱生理研究会 (代表者：中村和弘 2013年9月5日－9月6日)	373
17. 細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会 (代表者：重村憲徳 2013年11月28日－11月29日)	389
18. 電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用 ～ 分子から細胞への機能イメージング ～ (代表者：臼田信光 2013年11月13日－11月14日)	402

19. Frontiers in Neural Control of Actions
 (代表者：高田昌彦 2013 年 6 月 17 日) 411

20. Neural Decoding and Brain-Computer Interfaces
 (代表者：Tatsuya Umeda 2013 年 7 月 1 日) 420

1. 膜機能分子の機能・構造ゆらぎの時空間スペクトル解析

2013年9月5日－9月6日

代表・世話人：老木成稔（福井大学・医学部）

所内対応者：久保義弘（生理学研究所・神経機能素子）

（1）高速 AFM による膜機能分子のゆらぎの直接観察

○相馬義郎，山下隼人（慶應義塾大学・医）

（2）TCA による嗅細胞情報変換チャネル抑制と風味阻害機構の検証

○竹内裕子，倉橋 隆

（大阪大学大学院・生命機能研究科・生理学研究室）

（3）酸性環境に暴露される細胞膜および lysosome 膜のプロトン flux 機構

○久野みゆき，海住太郎（大阪市立大学大学院・医学研究科・分子細胞生理学）

（4）細菌機械受容チャネルの機械刺激感受性に対する脂質環境の効果

○野村 健¹，曾我部正博²

（¹京都府医大院・医・細胞生理/バイオイオノミクス，

²名大院・医・メカノバイオロジー・ラボ）

（5）KcsA チャネルダイナミクスの一分子研究

○老木成稔，岩本真幸，角野 歩，炭竈享司，清水啓史（福井大・医）

（6）Activation-signal transmission in the trimeric P2X2 receptor channel upon voltage- and [ATP]- dependent gating

○Batu Keceli，久保義弘（生理研・神経機能素子）

（7）脱分極状態で観察された膜電位感受性ナトリウムチャネルの二つの結晶構造

○入江克雅，谷 一寿，廣明洋子，下村拓史，藤吉好則

（名大・細胞生理学研究室センター（CeSPI））

（8）膜蛋白質ダイナミクスの解析に資する時間分解赤外分光計測法の開発

○古谷祐詞（分子科学研究所）

（9）電位依存性ホスファターゼ（VSP）の酵素活性は，電位センサーの動いた大きさに従い段階的に発揮される

○坂田宗平^{1,2}，岡村康司^{1,3}

（¹大阪大学大学院・医学系研究科，²大阪大学・未来戦略機構，³大阪大学大学院・生命機能研究科）

（10）EGFR 細胞内ドメイン構造変化ダイナミクスの 1 分子 FRET 計測

○岡本 憲二，佐甲靖志（理化学研究所）

（11）塩化物イオンポンプのタンパク質ダイナミクス

○水野 操，水谷泰久（大阪大学大学院）

（12）機械受容チャネルの構造変化に関する時間的マルチスケール解析：全原子 MD と粗視化 MD

○澤田康之¹，松尾秀俊²，曾我部正博³

（¹名大院・医・細胞生物物理学，²名大・医，³名大院・医・メカノバイオロジー・ラボ）

【参加者名】

岡本憲二（独立行政法人理化学研究所），佐甲靖志（独立行政法人理化学研究所），廣島通夫（独立行政法人理化学研究所），岡村康司（大阪大学），藤原祐一郎（大阪大学），坂田宗平（大阪大学），入江克雅（名古屋大学），下村拓

史（名古屋大学），倉橋 隆（大阪大学），竹内裕子（大阪大学），相馬義郎（慶應義塾大学），曾我部正博（名古屋大学），澤田康之（名古屋大学），中川優哉（名古屋大学），野村 健（京都府立医科大学），久野みゆき（大阪

市立大学), 古谷祐詞 (分子科学研究所), 塚本寿夫 (分子科学研究所), 稲熊あすみ (分子科学研究所), 藤原邦代 (分子科学研究所), 老木成稔 (福井大学), 清水啓史 (福井大学), 岩本真幸 (福井大学), 炭竈享司 (福井大学), 角野 歩 (福井大学), 水野 操 (大阪大学), 三尾

和弘 (産業技術総合研究所), 橘高裕貴 (生理学研究所), 内田邦敏 (生理学研究所), 久保義弘 (生理学研究所), 立山充博 (生理学研究所), 中條浩一 (生理学研究所), Keceli Batu (生理学研究所), 山本 泉 (生理学研究所), 北沢和寛 (生理学研究所), 桑慎一郎 (生理学研究所)

【概要】

膜蛋白質分子の機能を明らかにするには分子内の微細構造から膜内の集合離散まで広い空間領域と, 原子のナノ秒のゆらぎから分子間相互作用に要する秒から分の時間領域まで, 広い時空間の事象を追跡する必要がある。イオンチャネルの場合, 電気生理学的手法によるミリ秒から分までの現象の測定を基礎として知識が構築されてきたが, 今や結晶構造という静止像, 分光学による部分構造, 原子間力顕微鏡による全体像, 分子動力学法によるナノ秒程度の振る舞いなど, さまざまな手法による広い時間・空間領域に広がる知見が集約されつつある。本年度の研究会では以上のような様々なレベルでの方法論による多岐にわたるチャネルに対するトピックスが発表

された。発表者も広い分野の研究領域から広い年齢層の参加があった。比較的長い発表時間であったため, 方法のバックグラウンドから詳細に説明する余裕があり, 個々の発表は極めてレベルの高いものであり, 聴衆の理解が深まった。さらに, 発表に対する活発な議論が交わされた。ここでも時間に余裕があったため, 十分な議論を通して相互の理解を深めることができた。特に若い研究者の積極的な議論への参加があったことが喜ばしい。議論を通して新しいアイデアの発想にも寄与し, 協同研究に発展するものも期待できる。チャネル研究の若い研究者を発掘し, チャネル生理学の研究領域を盛り上げるような研究会となった。

(1) 高速 AFM による膜機能分子のゆらぎの直接観察

○相馬義郎, 山下隼人 (慶應義塾大学・医)

高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) は, 溶液中で機能中の生体分子を電子顕微鏡レベルの空間分解能とビデオレートに迫る時間分解能で直接観察することを可能にした革新的な 1 分子観察技術である。

高速 AFM を用いて, CFTR イオンチャネルの分子動態の直接観察を試みた。AFM ステージ上に展開された脂質 2 重膜に upside-down で挿入されている CFTR 2 量体を高速 AFM 観察すると, 1 つの粒子内に 2 組の NBD1, NBD2 および Regulatory domain に相当していると考え

られる 6 つのドメインおよびそれらのドメインのゆらぎが直接観察できた。さらに, 同一脂質 2 重膜ステージ上において, 複数の CFTR 分子がそれぞれ異なったゆらぎ方をしているのが観察できた。

また, 抗 CFTR 抗体-CFTR 複合体のゆらぎや水チャネル AQP4 に対する抗 AQP4 抗体の結合・解離のプロセスの直接観察も行なった。研究会では, 膜機能分子の作動機構の解明のためには, これらの新しい動態情報に基づいて, どのようにアプローチすべきかについて議論した。

(2) TCA による嗅細胞情報変換チャネル抑制と風味阻害機構の検証

○竹内裕子, 倉橋 隆

(大阪大学大学院 生命機能研究科 生理学研究室)

嗅覚受容は嗅細胞線毛から始まる。直径 100 nm の嗅

線毛の細胞膜には嗅覚情報伝達カスケードに必要な因子

(嗅覚受容蛋白質・アデニル酸シクラーゼ・G タンパク質) やチャネル (CNG チャネル・ $\text{Cl}_{(\text{Ca})}$ チャネル) が高密度に発現し、匂い刺激によるシグナル応答電流を発生させる。1994 年 Kurahashi らは、匂い刺激そのものが匂い応答電流を抑制する現象を報告し、その後、各種の匂い物質による CNG チャネル電流の抑制が確認された (Chen et al., 2006JGP; Takeuchi et al., 2009JGP; Kishino et al., 2011JPS)。今回の実験では、匂い物質の中でも特に抑制能の強い TCA (Trichloroanisole) による情報変換チャネル電流抑制とその電気生理学的特性を検証した。更に

日常的に存在している飲食品内の TCA がチャネル抑制に関わることを、単離嗅細胞を用いたパッチクランプ法によるデータで示す。その結果、TCA は極低濃度であっても、CNG チャネル活性を抑制することが示された。これは LogD を始めとする TCA の持つ化学的な特性がチャネル抑制に貢献していることが示唆される。また、TCA が含まれている飲食品から得られた匂い物質を単離嗅細胞に投与したところ、応答電流の減少が見られたことから、TCA が飲食品の風味阻害に関わる可能性を示している。

(3) 酸性環境に暴露される細胞膜および lysosome 膜のプロトン flux 機構

○久野みゆき, 海住太郎 (大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学)

生体内には強い酸性環境に曝される細胞があり、骨組織を溶解する機能を担う破骨細胞もそのひとつである。破骨細胞では、細胞内酸性小胞のひとつである lysosome (pH ~5) 膜の exocytotic fusion によりプロトンポンプ (V-ATPase) -rich な細胞膜 (ruffled membrane) が形成される。V-ATPase を介して分泌される酸は骨吸収窩 (細胞外) に強い酸性環境 (pH ~4) を作り出し、lysosome と類似した pH 環境を再現する。骨吸収窩、酸性小胞の pH は pH 勾配を作り出す V-ATPase と pH 勾配を解消する H^+ leak に、buffer, 膜電位, counter ion flux などの影響が

加わり決定されるが、酸性環境に応じて H^+ flux がどのように変化するのか、またその応答機構についてはわからないことが多い。破骨細胞膜では、細胞外 pH を >7 から <5 まで徐々に下げていくと 3 段階の変化が生じる: 1) H^+ efflux の抑制, 2) inward currents, 3) inward/outward fluxes。また破骨細胞膜の endocytosis によって作られる細胞内小胞では一端酸性化した後も pH 変動が起こる。これらの現象から酸性環境におけるプロトン flux 機構について考えた。

(4) 細菌機械受容チャネルの機械刺激感受性に対する脂質環境の効果

○野村 健¹, 曾我部正博²

(¹京都府医大 院・医・細胞生理/バイオイオニクス,

²名大院・医・メカノバイオロジー・ラボ)

細菌には MscS, MscL と呼ばれる機械受容チャネルが細胞膜上に発現している。低張液への暴露で上昇した細胞膜の張力を閾値の低い MscS から順に感知し、ゲートを開いて水分子、イオン、浸透圧調節物質などを細胞外へ放出することで細胞の破裂死を防いでいる。いずれのチャネルも高次構造が明らかにされており、ゲーティング機構の詳細な研究が進められている。しかしチャネルタンパク質が脂質分子とどのように相互作用して膜張力

を感知し、チャネルが開くのかの詳細なメカニズムはよく分かっていない。本研究では、様々な脂質組成のリポソーム膜に MscS 及び MscL を共再構成し、脂質環境の違いが MscS, MscL の機械刺激感受性に与える影響をパッチクランプ法で検討した。その結果、以下のことが明らかになった。①リポソームの膜厚を薄くすると、MscL の活性化閾値が下がる。②コレステロールは膜の流動性や膜内圧力分布を変化させ、MscS および MscL の

活性化閾値を上げる, ③リゾリン脂質 (LPC) は膜の局所的な曲率を変化させ, MscS 及び MscL の活性化閾値を下げる。これらの結果から, MscS と MscL の機械刺激感受性は, 両チャネルを取巻く脂質環境の違いに影響され,

その程度はそれぞれのチャネルで異なることが分かった。この違いと各チャネルの膜張力感知機構および活性化 (開口) 機構の違いの関係について議論した。

(5) KcsA チャネルダイナミクスの一分子研究

○老木成稔, 岩本真幸, 角野 歩, 炭竈享司, 清水啓史 (福井大・医)

イオンチャネルがどのようにしてイオンを選択・透過し, ゲートの開閉でイオン流を制御するのか。これらチャネル分子の最も基本的な性質は KcsA カリウムチャネルの1分子レベルの研究からその理解が大きく進展してきた。私達は最近, 細胞膜内葉 (inner leaflet) の酸性リン脂質 (phosphatidylglycerol, phosphatidylserine など) が活性化ゲートを制御していることを発見した。このとき N 末端両親媒性ヘリックス (M0 ヘリックス) が酸性リン脂質のセンサーであり, 膜界面で回転することで開状態

を安定化することを解明した (roll-and-stabilize model)。一方, KcsA チャネルの構造を膜に埋め込まれた状態で観察するために原子間力顕微鏡を適用し, 開状態では細胞質側の活性化ゲートが大きく開いているところを観察することができた。この観察で, ゲートを開いているときにはチャネルは膜上で孤立し, 閉状態では集合状態を形成することが初めて明らかになった。今後 M0 ヘリックスを手掛かりに, ゲーティングと集合・離散をリンクする分子機構を明らかにしたい。

(6) Activation-signal transmission in the trimeric P2X2 receptor channel upon voltage- and [ATP]-dependent gating

○Batu Keceli, 久保義弘 (生理研・神経機能素子)

In this study we aimed at clarifying the transmission path of activation signal generated by extracellular ATP and hyperpolarization in the P2X2 trimer, from the aspect of subunit stoichiometry. Detailed analyzes of voltage- and [ATP]-dependent gating in the tandem trimeric constructs (TTC) harboring critical mutations at ATP binding (K308A), linker (D315A) and pore (T339S) levels, revealed that; (1) Voltage- and [ATP]-dependent gating of P2X2 can be observed with ATP molecules bound but not one. (2) D315A mutation in the linker region on β -14 creates two different gating modes and at least two subunits with D315A are required to produce this effect. (3) T339S mutation, which

creates constitutive activity at all membrane potentials, shows gradual changes from WT with increasing number of T339S in the TTC suggesting independent contribution of three subunits at the pore level. (4) In the TTCs, voltage- and [ATP]-dependent gating differs depending on the relative location of one D315A with respect to one K308A but it is similar for one T339S relative to one K308A (or D315A). Our findings suggest that each intersubunit ATP binding signal is directly transmitted on the corresponding β -14 strand down to the level of D315 and then it spreads to all three subunits equally at the pore level.

(7) 脱分極状態で観察された膜電位感受性ナトリウムチャネルの二つの結晶構造

○入江克雅, 谷 一寿, 廣明洋子, 下村拓史, 藤吉好則

(名大・細胞生理学研究所 (CeSPI))

膜電位感受性 Na チャネル (Nav) は脱分極による活性化の後に速やかに不活性化することで活動電位の過剰な発生を抑えている。しかしながら、この速やかな不活性化の分子メカニズムは未解明の部分が多い。

今回、我々は原核生物由来 Nav の二次元結晶の極低温電子顕微鏡を用いた構造解析を行い、単一の結晶中に構造が異なる二つのチャネル分子を観察した。いずれのチャネルにおいても電位センサーは活性化状態に対応する構造であったが、一方のチャネル分子 (MolA) は選択性フィルターに相当する明瞭な電子密度が観測され、もう一方の分子 (MolB) では開口を担う S6 ヘリックスの下部が MolA よりも開き選択性フィルター部分の電子密

度は消失していた。結晶中において、MolA は近接する MolA と相互作用していたが MolB ではそのような相互作用は見られず、これが二つの構造の違いを生み出していると考えられる。二次元結晶中では電位差が生じないためチャネルは活性化を経て不活性化状態にある可能性が高く、MolB は不活性化の定常状態に達した構造を反映しており、MolA は結晶中の相互作用によって不活性化の遷移状態に留まった構造であると考えられる。

本研究結果より、S6 ヘリックスの下部の開口が選択性フィルターの崩壊を誘発するという不活性化の構造変化スキームが示唆された。

【Xiao-Dan Li 博士 (Paul Scherrer Institute) との共同研究】

(8) 膜蛋白質ダイナミクスの解析に資する時間分解赤外分光計測法の開発

○古谷祐詞 (分子科学研究所)

イオンチャネルや G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 等の膜タンパク質の動作機構を解明するためには、それらが外界からの物理・化学刺激を受容し、活性化状態を形成する過程での構造変化 (ダイナミクス) を明らかにする必要がある。さらに、GPCR においては、G タンパク質との相互作用やその活性化機構を明らかにすることも重要である。これまで光を受容するロドプシンなどの光受容タンパク質に対しては、パルスレーザー等を用いることで、フェムト秒から分に至る様々な時間領域での構造変化やタンパク質間相互作用が様々な分光学的手法により明らかにされてきた。一方、多くのイオンチャネ

ルや GPCR では、基質やイオンなどの結合に伴う構造変化を解析する手法が求められており、ストップフロー法などの手法が考案されている。しかしながら、測定には多量の試料を必要とするなど、改善の余地がある。本発表では、急速溶液交換装置を全反射赤外分光法と組み合わせることで、数マイクログラム程度の膜タンパク質試料での時間分解計測を可能とする新しい手法について、塩化物イオンポンプであるファラオニスハロロドプシン (pHR) に適用した例を報告した^[1]。

[1] Furutani, Y., Kimura, T., and Okamoto, K. (2013) *BIOPHYSICS* 9, 123-129.

(9) 電位依存性ホスファターゼ (VSP) の酵素活性は、電位センサーの動いた大きさに従い段階的に発揮される

○坂田宗平^{1,2}, 岡村康司^{1,3}

(¹大阪大学大学院医学系研究科, ²大阪大学未来戦略機構, ³大阪大学大学院生命機能研究科)

電位依存性ホスファターゼ (VSP) は電位センサーとイノシトールリン脂質を脱リン酸化する活性を持った細胞内ドメインで構成されている。我々は以前、脱リン酸化活性の膜電位依存性を計測し、電位センサーの動きと酵素活性が強く共役していることを示した。この共役のメカニズムは未だ不明であるが、電位センサーの状態に注目すると以下の2つの可能性が考えられる。1つは、VSPの酵素活性は電位センサーが完全に活性化したときのみ発揮されるモデルであり、もう1つは酵素活性には電位センサーの完全な活性化は不要で、電位センサーの

動いた大きさに比例した大きさの活性が発揮されるモデルである。最近我々は、VSP において *resting state* と *activated state* の間に安定状態 (中間状態) を持つ変異体を作成することに成功した。共役のメカニズムを明らかにするために、この変異体の電位依存的な酵素活性の計測を行ったところ、*resting state* から中間状態、中間状態から *activated state* の両方の電位センサーの動きに対応して、酵素活性が発揮されることが分かった。このことは VSP は電位センサーが動いた大きさに従い、段階的に酵素活性を発揮することを示唆している。

(10) EGFR 細胞内ドメイン構造変化ダイナミクスの1分子 FRET 計測

○岡本憲二, 佐甲靖志 (理化学研究所)

上皮成長因子 (EGF) 受容体 (EGFR) は膜蛋白質分子の1つであり、EGF 刺激に反応する細胞内信号伝達経路の起点となる分子である。EGFR は複数種のアダプター分子と結合することが知られており、細胞内 C-末端ドメインにその結合サイトを有している。2007年に森松らの1分子観察実験により、EGFR とアダプター分子の1つである Grb2 との間での結合・解離反応におけるメモリ効果の存在が示された。メモリ効果のような非線形的な現象は、細胞内信号制御において重要な役割を果たしている可能性がある。しかしそのメカニズムとしては、EGFR 分子の構造変化、特に、構造ヒステリシスのよう

な現象が関与していることが考えられるが、いまだ明らかにされていない。反応の履歴と構造との相関を明らかにするためには、個別分子の反応・ダイナミクスを追跡して観察する必要がある、われわれは1分子 FRET 計測を用いた構造変化ダイナミクスの直接観察を試みている。EGFR の C-末端近傍の天然変性ドメインのみの断片分子を精製して2種類の蛍光ラベルを施し、*in vitro* 環境で FRET 計測をおこなった。FRET 分布では、Tyr のリン酸化や溶液中への Grb2 添加により、Grb2 結合サイトとは離れた部位において顕著な構造変化が見られた。

(11) 塩化物イオンポンプのタンパク質ダイナミクス

○水野 操, 水谷泰久 (大阪大学大学院)

ハロロドプシン (HR) は、光駆動イオンポンプである。レチナール発色団の光異性化がトリガーとなり、さまざまな中間体を經由するサイクル反応の間に、塩化物イオ

ンを細胞外から細胞内へポンプする。レチナールは、タンパク質中に含まれるリジン残基とプロトン化シッフ塩基を介して結合している。HR では、シッフ塩基近傍に

アニオン結合サイトがある。この結合サイトには、塩化物イオンの他にもさまざまなアニオンが結合する。レチナール発色団の電子状態は、結合するアニオンの影響を受けることが知られている。われわれは、時間分解共鳴ラマン分光法をもちいて、HR の幅広い時間スケールにわたるタンパク質ダイナミクスを追跡し、ダイナミクス

に対する結合アニオンの効果を調べている。結合サイトにあるアニオンは、塩化物イオンの移動開始前のピコ秒領域におけるレチナールの異性化に対するタンパク質部分の応答速度には影響を与えないが、ナノ秒以降では塩化物イオンの移動が起こる L 中間体の生成速度および発色団構造に影響をおよぼすことがわかった。

(12) 機械受容チャネルの構造変化に関する時間的マルチスケール解析：全原子 MD と粗視化 MD

○澤田康之¹，松尾秀俊²，曾我部正博³

(¹名大院・医・細胞生物物理学，²名大・医，³名大院・医・メカノバイオロジー・ラボ)

イオンチャネル研究の究極目標の一つはゲーティング機構の詳細を理解することにある。膜張力で活性化する細菌機械受容チャネル MscL はこの目標達成に最も近いチャネルである。MscL は分子量 15kDa/136 アミノ酸の 2 回膜貫通型サブユニットのホモ 5 量体であり、内側ヘリックス (TM1) がポアを裏打ちし、外側ヘリックス (TM2) が外壁を構成する。TM1 は細胞質端を斜め内側に向けて傾いており、脂質膜内葉で隣同士が交差して 5 角形のポア最狭部 (ゲート) を構成する。交差部は TM1 の Leu19-Val23 と隣接する TM1 の Gly22 の疎水相互作用によりチャネルを閉状態にロックしている。TM2 の膜-ペリプラズム境界近傍に位置する Phe78 は膜張力セン

サーとして働く。MscL の開口過程については、これまで全原子分子動力学 (MD) シミュレーションを用いて解析されてきたが、その過程は過度の膜張力発生下で本来の開口時間よりもはるかに短いシミュレーション時間で行われていた。今回、緩和された条件下で長時間シミュレーションを実行できる粗視化 MD を実行し、同様の開口を試みた。その結果、全原子 MD と同様の開口過程が観察でき、更に張力刺激無しに自発開口する G22N 変異体と張力刺激を与えても開口しない F78N 変異体を作成して野生型との構造変化の差異を解析した結果、変異体によって差異が観察される時間が異なることが判明した。

2. 新規シグナル伝達分子とその生理学的可能性

2013年9月26日－9月27日

代表・世話人：森 泰生（京大・院工及び地球環境）

所内対応者：久保義弘（生理学研究所 神経機能素子）

- (1) 蛍光性サーモセンサーの開発と生体の恒常性を担う熱産生機構の可視化

○清中茂樹^{1,2}, 梶本武利¹, 坂口怜子³, 森井 孝⁴, 森 泰生^{1,2}

(¹京大院・地球環境, ²京大院・工, ³京大・iCeMS, ⁴京大・エネ研)

- (2) タンパク質型 Ca^{2+} インジケーターによる小胞体・ミトコンドリア内腔 Ca^{2+} 動態の可視化と機能解析

○鈴木純二¹, 金丸和典¹, 石井邦明², 大倉正道³, 大久保洋平¹, 飯野正光¹

(¹東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学, ²山形大学 医学部 薬理学,
³埼玉大学 脳科学融合研究センター)

- (3) 細胞がストレスを感じる仕組みと疾患

○一條秀憲（東大院・薬・細胞情報学）

- (4) 膵 β 細胞甘味受容体によるグルコース代謝の制御

○小島 至, 中川祐子, 大津義晃, 濱野邦久, 長澤雅裕（群馬大学・生体調節研究所）

- (5) RhoA/Rho キナーゼを介した逆行性シナプス小胞エンドサイトーシス制御機構とその役割

○江口工学¹, 高橋智幸^{1,2}

(¹沖縄科学技術大学院大学・細胞分子シナプス機能ユニット,

²同志社大学大学院・脳科学研究科・分子細胞脳科学分野)

- (6) ムスカリン M2 受容体依存的 GIRK チャネル活性化におけるパーシャルアゴニスト作用の分子機構

陳 以珊¹, ○古谷和春^{1,2}, 稲野辺厚^{1,2}, 倉智嘉久^{1,2}

(¹大阪大・院医, ²大阪大・臨床医工学融合研究教育センター)

- (7) 細胞極性タンパク質 mInsc は noncanonical な 3 量体 G タンパク質経路を介して好中球ケモタキシスを制御する

鎌倉幸子, 早瀬純也, ○住本英樹（九州大院・医・生化学）

- (8) 細胞内 pH によるエンドサイトーシスとプロトンチャネルの制御について

○久野みゆき, 李 光帥, 日野佳子, 森浦芳枝, 川脇順子, 酒井 啓

(大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学)

- (9) メカノ感受性 ATP-Ca^{2+} シグナリングは表皮細胞の創傷治癒を促進する

○古家喜四夫^{1,2}, 高田弘弥¹, 曾我部正博^{1,2}

(¹名古屋大・院医・細胞生物物理, ²名古屋大・院医・メカノバイオロジーラボ)

- (10) 腎集合管 α 間在細胞におけるバソプレシン V1a 受容体による Aldosterone-mineralocorticoid 受容体シグナルの制御

泉裕一郎¹, 堀加穂理², ○河原克雅³, 野々口博史⁴

(¹Systems Biology Center, National Heart, Lung and Blood institute, NIH (USA),

²兵庫医科大学腎臓内科, ³北里大学医学部生理学, ⁴北里大学メディカルセンター一般内科)

- (11) ガス様分子による心臓のレドックス恒常性制御

○西田基宏¹, 外山喬士¹, 北島直幸², 富田拓郎²

(¹岡崎統合バイオ・生命時空間設計研究領域・心循環シグナル研究部門, ²九大・院薬)

【参加者名】

西田基宏（自然科学研究機構統合バイオサイエンスセンター）、外山喬士（自然科学研究機構統合バイオサイエンスセンター）、北島直幸（自然科学研究機構統合バイオサイエンスセンター）、武吉恭子（自然科学研究機構統合バイオサイエンスセンター）、清中茂樹（京都大学）、森 泰生（京都大学）、坂口怜子（京都大学）、澤村晴志朗（京都大学）、植田誉志史（京都大学）、小島 至（群馬大学）、長澤雅裕（群馬大学）、中川祐子（群馬大学）、濱野邦久（群馬大学）、大津義晃（群馬大学）、河原克雅（北里大学）、曾我部正博（名古屋大学）、古家喜四夫（名古屋大学）、永田晃一（田辺三菱製薬）、一條秀憲（東京大学）、高橋智幸（同志社大学）、中西節子（沖縄科学技術大学院

大学）、江口工学（沖縄科学技術大学院大学）、堀 哲也（同志社大学）、住本英樹（九州大学）、飯野正光（東京大学）、大久保洋平（東京大学）、金丸和典（東京大学）、鈴木純二（東京大学）、久野みゆき（大阪市立大学）、古谷和春（大阪大学）、西本れい（生理学研究所）、岡本土毅（生理学研究所）、佐藤達也（生理学研究所）、橘高裕貴（生理学研究所）、周一鳴（生理学研究所）、久保義弘（生理学研究所）、立山充博（生理学研究所）、中條浩一（生理学研究所）、Keceli Batu（生理学研究所）、山本泉（生理学研究所）、北沢和寛（生理学研究所）、条慎一郎（生理学研究所）

【概要】

ヒトなどの全ゲノム配列が解明され、生命システムを構成する遺伝子の情報を得たものの、遺伝子に直接コードされていない生体分子、及びそれらの構造、機能、制御が生み出す動作原理や生理的役割については、依然として不明である。特に、シグナル伝達分子においては、その反応性や時空間特性が生理学的意義を有するが、決して遺伝情報中に直接書き込まれてはいない。そのため、今後の生命科学においては、広義の「エビゲノム」の考えに基づいた固有のアプローチと理解が必須である。近年、シグナル伝達機能が認められているセカンドメッセンジャー分子に加え、新規生体物質や、シグナル伝達における生理的意義が再評価されつつあるユニークな分子群が注目されている。本研究会では、例えば、活性酸素種・活性酸素種とその関連活性種分子群（障害性物質と認知されてきた）、抗酸化系、硫黄メディエーター、ガス

状生理活性物質、新規ヌクレオチド類等に具体的に着目し、これらと Ca^{2+} やプロテインキナーゼなどのオースドックスなシグナル伝達分子との相互作用、タンパク質修飾、細胞応答、分泌、免疫、循環、神経系といった異なる視点から、シグナル伝達機構研究に関して注目すべき成果を上げている研究者が集い、各々の成果を発表、討議した。その中で、新規のタンパク質機能に基づいた新たなシグナル経路の存在が明らかになった。また、シグナル経路としては知られていても、今まで、検討されていなかった系での意義が示された。さらには、細胞内小器官内での機能的な不均一性（局在性）も明らかとなった。これらの成果は、今後のさらなる追究によって、シグナル研究の breakthrough となる大きな可能性を有すると考えられる。

(1) 蛍光性サーモセンサーの開発と生体の恒常性を担う熱産生機構の可視化

○清中茂樹^{1,2}、梶本武利¹、坂口怜子³、森井 孝⁴、森 泰生^{1,2}

(¹京大院・地球環境, ²京大院・工, ³京大・iCeMS, ⁴京大・エネ研)

体温調節は、哺乳類をはじめとした恒温動物の生命維持に必須である。生体内の温度制御機構に関しては、複数のオルガネラにおいて異なる機構が提案されているが、未だに物議をかもしている。その大きな原因の1つとして、従来の方法ではオルガネラで熱産生機構を評価でき

なかったことが挙げられる。今回、我々は、GFPの蛍光を利用した遺伝子工学的な温度センサーである thermosensor GFP “tsGFP”を開発した。tsGFPにおいては、サルモネラ菌由来の温度感知タンパク質として知られる TlpA を GFP の N 末端および C 末端に融合させた。

TlpA は 37°C 付近の温度変化を感知して可逆的に大きく構造変化を起こすため、tsGFP は生体温度付近の温度変化に対して鋭敏な蛍光変化を示した。また、tsGFP にオルガネラ移行シグナルを付加することにより、各オルガネラでの温度産生を評価することが可能となり、実際に褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアからの熱産生、および骨格筋細胞の小胞体からの熱産生の可視化に成功し

た。興味深いことに、ミトコンドリア移行型 tsGFP を用いることで、HeLa 細胞におけるミトコンドリアの温度不均一性を確認し、その不均一性はミトコンドリア膜電位と相関があることがわかった。以上より、我々が開発した tsGFP は、生体内の温度変化を非侵襲的に評価できる新たなツールになると期待される。

(2) タンパク質型 Ca^{2+} インジケーターによる小胞体・ミトコンドリア内腔 Ca^{2+} 動態の可視化と機能解析

○鈴木純二¹、金丸和典¹、石井邦明²、大倉正道³、大久保洋平¹、飯野正光¹
(¹ 東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学、² 山形大学 医学部 薬理学、³ 埼玉大学 脳科学融合研究センター)

Ca^{2+} シグナルは、オシレーションやウェーブなどの特徴的なパターンを示し、収縮・分泌・細胞死などの細胞機能発現に至るパスウェイの制御に重要な役割を果たす。 Ca^{2+} シグナルの形成には、小胞体やミトコンドリアなどの細胞小器官が Ca^{2+} ストアあるいはバッファーとして機能することが不可欠であるが、従来の測定法には制限があり、小器官内腔の Ca^{2+} 動態には不明な点が多く残されている。そこで今回、小器官内腔の Ca^{2+} 動態可視化を可能とするタンパク質型 Ca^{2+} インジケーター CEPIA を開発した。小胞体に CEPIA を発現させた培養 HeLa 細胞を刺激したところ、細胞質 Ca^{2+} ウェーブに対応した小胞体内腔 Ca^{2+} 濃度のウェーブ状低下の観察に初めて成功し、本

測定法の高い時空間分解能が実証された。また、小脳ブルキンエ細胞小胞体への CEPIA 発現も可能であり、スライス標本において神経刺激に伴う樹状突起小胞体および、単一スパイン内小胞体の Ca^{2+} 動態を捉えることができた。さらに、多色変異体 CEPIA を開発し、HeLa 細胞の小胞体・ミトコンドリア・細胞質における Ca^{2+} 動態を同時に可視化し、小器官が Ca^{2+} を取り込む際に見られる予想外の動態を明らかにした。このように CEPIA は、細胞種を問わず、小器官内腔の Ca^{2+} 動態を高時空間解像度で可視化できるインジケーターであり、今後の応用が期待される。

(3) 細胞がストレスを感じる仕組みと疾患

○一條秀憲 (東大院・薬・細胞情報学)

ストレス応答は個体が恒常性を保つために必要な最も基本的な生命現象のひとつであり、その破綻は、がん、神経変性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患などをはじめとする多様な疾患の発症原因となる。ホルモンやサイトカインなどの細胞表面に存在する特異的受容体を介したシグナル伝達機構と比して、物理化学的ストレスによって活性化されるシグナルは、そのストレスセンサーの分子実体、存在場所、ならびにその時空間的制御機構について不明な点が多く残されており、トリガーとしてのス

トレスセンサーの同定は、個体の恒常性維持機構を知る上で極めて重要な課題である。一方で近年、細胞内オルガネラである小胞体やミトコンドリアが炎症や細胞死を担うストレスシグナルの発信源や経由地として重要な働きを担っていることが知られており、特定のストレスシグナルに必須の“特別な場”として注目されている。

本研究会では、我々がオリジナルに見出した新たなストレス応答システムに焦点を当てながら、特に SOD1 変異ならびに SOD1 構造変化と ALS 発症機構ならびにその

生理的病理的意義について報告した。

(4) 膵β細胞甘味受容体によるグルコース代謝の制御

○小島 至, 中川祐子, 大津義晃, 濱野邦久, 長澤雅裕 (群馬大学・生体調節研究所)

インスリン分泌を調節するもっとも重要な因子であるグルコースは、細胞内で代謝されてその機能を発揮すると考えられてきた。我々は、膵β細胞に甘味受容体が発現していること、グルコースが甘味受容体を活性化して素早い細胞内シグナルを産生することを明らかにして来た。グルコース誘発性インスリン分泌は、素早い第一相と、持続する第二相から構成されるが、甘味受容体を抑制すると第一相だけでなく持続相も抑制される。このことは、甘味受容体シグナルがグルコース代謝を調節している可能性を示唆している。そこで、細胞内 ATP 濃度 ($[ATP]_i$) の変化をモニターし、甘味受容体がグルコース代謝を制御するかを検討した。その結果、①甘味受容

体アゴニストであるスクラロースは $[ATP]_i$ を増加させた。②スクラロースはグルコースによる $[ATP]_i$ 増加を増強した。③スクラロースはコハク酸による $[ATP]_i$ 増加を増強した。④このスクラロース作用はカルバコール, GLP-1, 高濃度 KCl では再現されなかった。⑤非代謝性の 3-O-methylglucose (3OMG) は一過性に $[ATP]_i$ を増加し、⑥3OMG はコハク酸による $[ATP]_i$ 増加を増強した。⑦甘味受容体をノックダウンするとグルコースによる $[ATP]_i$ 増加が抑制され、インスリン分泌も抑制された。以上の結果から、グルコースは甘味受容体に作用して自身の代謝を促進すると考えられた。

(5) RhoA/Rho キナーゼを介した逆行性シナプス小胞エンドサイトーシス制御機構とその役割

○江口工学¹, 高橋智幸^{1,2}

(¹ 沖縄科学技術大学院大学・細胞分子シナプス機能ユニット,

² 同志社大学大学院・脳科学研究科・分子細胞脳科学分野)

シナプス前末端膜に融合して開口したシナプス小胞は、エンドサイトーシスによって前末端内に取り込まれて再利用される。高頻度のシナプス伝達において多数の小胞が開口放出する場合、小胞膜の取り込みを加速して再利用に備える必要があるが、小胞開口数を、取り込み速度に帰還させる仕組みは不明であった。我々は、ラット脳幹 calyx of Held シナプス前末端に膜容量測定法を適用し、PKG 阻害剤が小胞エンドサイトーシスを減速させること、これと同様な減速効果が NO 吸収剤細胞外投与によって惹起され、PKG 阻害剤の作用は NO 吸収剤同時投与によって増強されないことを見出した。NO は NMDA

受容体の活性化に伴いシナプス後細胞から放出されることが知られていることから、この NO が逆行性に前シナプス末端内の PKG を活性化してエンドサイトーシスを加速すると推論された。さらに PKG の下流には RhoA と Rho キナーゼが働いて前末端内の PIP_2 量を増加させることにより小胞エンドサイトーシスを加速することを見出した。これは開口放出されたグルタミン酸の量に応じてエンドサイトーシスが加速する仕組みであり、小胞開口数を取り込み速度にフィードバックするメカニズムと言える。

(6) ムスカリン M2 受容体依存的 GIRK チャネル活性化におけるパーシャルアゴニスト作用の分子機構

陳 以珊¹, ○古谷和春^{1,2}, 稲野辺厚^{1,2}, 倉智嘉久^{1,2}
(¹大阪大・院医, ²大阪大・臨床医工学融合研究教育センター)

パーシャルアゴニスト (部分作動薬) は受容体に結合しアゴニスト活性を示すが, 薬物の濃度を高くしてもシグナルの活性度がフルアゴニスト (完全作動薬) に比べて低い値で飽和する。この薬理特性から, パーシャルアゴニストはフルアゴニストと同時に投与すると競合的アンタゴニストとしても働き, 例えば内因性交感神経刺激作用 (ISA) をもつ β 受容体阻害薬なども同受容体のパーシャルアゴニストである。数多くのパーシャルアゴニストが臨床で用いられている。この分子機構として受容体レベルの機構が幾つか提案されている。今回我々は, ムスカリン M2 受容体依存的 GIRK チャネル活性化におけるパーシャルアゴニスト作用の分子機構を解析した。ピ

ロカルピンはこのシグナル伝達系においてパーシャルアゴニストとして作用することが知られているが, この作用は *X.oocyte* に M2 受容体および GIRK チャネルだけを発現させただけでは再現することが出来ず, この条件ではピロカルピンはフルアゴニストのように機能する。一方, フルアゴニストである ACh に対する心筋細胞の生理的応答の再現に必要な RGS 蛋白質が, ピロカルピンのパーシャルアゴニスト作用の再現にも必要であった。パーシャルアゴニスト投与時には RGS 蛋白質を介した G 蛋白シグナル系の負の制御が増強されており, この系では細胞内シグナル伝達レベルでパーシャルアゴニスト作用が発揮されていると考えられた。

(7) 細胞極性タンパク質 mInsc は noncanonical な 3 量体 G タンパク質経路を介して好中球ケモタキシスを制御する

鎌倉幸子, 早瀬純也, ○住本英樹 (九州大院・医・生化学)

ケモタキシスが適切に行われるには, 細胞の「運動能の亢進」ばかりでなく「濃度勾配に沿った方向性の維持」が必要である。私達は, Gi ファミリー三量体 G タンパク質を介した好中球のケモタキシスにおいて, mInsc タンパク質 (Inscuteable の哺乳類ホモログ) が遊走方向の維持に必要であることを明らかにした。遊走時には走化性因子刺激に応じて好中球の前方部に仮足が形成されるが, この仮足には「 $G\beta\gamma$ サブユニットから遊離した GDP 結合型 Gai」が集積し, それに mInsc のパートナータンパク質 LGN (およびそのホモログ AGS3) が直接結合する。その結果, mInsc および mInsc と会合した Par- aPKC 複

合体も仮足へとリクルートされる。また, mInsc を欠損した好中球および aPKC 活性を阻害した好中球のケモタキシスでは, 運動能は正常であるにもかかわらず方向性が低下していた。このように, GPCR のリガンドである走化性因子を介したケモタキシスでは, 「GDP 結合型 Gai→mInsc→aPKC」というシグナリング経路で方向性が維持されることが考えられた。一般に, 三量体 G タンパク質からのシグナリングは GTP 結合型 $G\alpha$ (および遊離型 $G\beta\gamma$) を介して行われるが, ここで示したケモタキシス時の方向性維持機構では「GDP 結合型 Gai を介した新規な (noncanonical な) シグナル伝達経路」が働いている。

(8) 細胞内 pH によるエンドサイトーシスとプロトンチャネルの制御について

○久野みゆき, 李 光帥, 日野佳子, 森浦芳枝, 川脇順子, 酒井 啓
(大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学)

電位依存性プロトンチャネルの働きには2面性がある。例えば、生理的には自然免疫に貢献するが、病的には組織障害を増悪する。現在、さまざまな因子がチャネル活性を増強することが報告されている一方、抑制のメカニズムは余り知られていない。私達は、endocytic internalization/recruitment を迅速な機能調節メカニズムのひとつと想定しているが、単一チャネル電流が測定困難というハードルもあり判定が難しかった。今回、on-off が明確で定量可能な endocytosis を誘起する刺激として NH_4Cl 負荷法を用いた。破骨細胞に NH_4Cl を負荷すると、細胞内 pH が上昇すると共に endocytosis が促進される。

H^+ チャネル近傍の細胞内 pH と膜容量を同時記録すると、pH 6.5~pH 7.5 で細胞内 pH 上昇につれて H^+ チャネルが膜容量と共に減少した。同様の現象はマイクログリアでも見られたが、 H^+ チャネル遺伝子を発現させた COS7 細胞では生じなかった。これらの結果は、細胞内 pH がプロトン透過の driving force とチャネルの gating を変える直接効果だけではなく、細胞膜で利用できる channel 数の制御にも関わり、破骨細胞やマクロファージでは生理的 pH で少なくとも 1/3 程度の H^+ チャネルが細胞内予備プールに存在することを示唆している。

(9) メカノ感受性 ATP- Ca^{2+} シグナリングは表皮細胞の創傷治癒を促進する

○古家喜四夫^{1,2}, 高田弘弥¹, 曾我部正博^{1,2}
(¹名古屋大・院医・細胞生物物理, ²名古屋大・院医・メカノバイオロジーラボ)

表皮の創傷治癒には様々な細胞や因子による秩序立った多段階制御が必要である。その最終過程として表皮細胞(ケラチノサイト)の増殖と遊走による傷口の閉鎖がある。我々は、伸展刺激がこの創傷閉鎖を促進することをすでに報告しているが、今回、このプロセスに ATP- Ca^{2+} シグナリングが関与していることを見いだした。伸展可能な PDMS チャンバーに HaCaT ケラチノサイトを培養し、コンフルエント達成後に線状の創傷を形成してその閉鎖過程を観察した。創傷形成3時間後の修復過程にある細胞層に一軸伸展(20%)刺激を与えると創傷部位に面した一列の細胞から後方に向かって線状の Ca^{2+} 波が伝播

した。ATP イメージングすると Ca^{2+} 応答に先立ってその一列の細胞から ATP が放出され拡散することが分かった。ATP 分解酵素 Apyrase, ATP 受容体阻害剤 Suramin, ヘミチャネル阻害剤 CBX はこの Ca^{2+} 波と創傷閉鎖促進効果を抑制した。また Ca^{2+} 波と創傷閉鎖は、TRPC6 の活性化剤 Hyperforin で増強され、PIP2 の不活性アナログの DiC8-PIP2, PLC 阻害剤の U73122 で抑制された。ケラチノサイトにおける創傷閉鎖の伸展依存性促進効果にはメカノ感受性ヘミチャネルを介した ATP 放出と ATP 受容体 (P2Y_2) 活性化による DAG を介した TRPC6 活性化による Ca^{2+} 流入が関与していると考えられる。

(10) 腎集合管 α 間在細胞におけるバソプレシン V1a 受容体による Aldosterone-mineralocorticoid 受容体シグナルの制御

泉裕一郎¹, 堀加穂理², 〇河原克雅³, 野々口博史⁴

(¹Systems Biology Center, National Heart, Lung and Blood institute, NIH (USA),

²兵庫医科大学腎臓内科, ³北里大学医学部生理学, ⁴北里大学メディカルセンター一般内科)

バソプレシン V1a 受容体 (V1aR) 機能不全マウス (V1aR^{-/-}) は, 腎尿細管性アシドーシス (IV 型) を引き起こした。このことは, V1aR が集合管 α -間在細胞 (IC-A) における aldosterone (Aldo)- mineralocorticoid 受容体 (MR) 軸を介して, 尿中への酸分泌を制御している可能性を示唆する。V1aR^{-/-} マウスは, 腎髄質集合管における MR と 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2) の発現量が低下し, Aldo-MR 軸の細胞内シグナルが低下していた。SV40 不死化ラット由来培養集合

管 IC における MR の核-細胞質比は, 11.2% から 47.2% (+Aldo) に, 18.7% から 61.2% (+VP) に増加した (C: Aldo (-), VP (-))。Western blot 法では, chromosome condensation-1 (RCC-1) (+Aldo) と Ran GTPase-activating protein 1 (Ran Gap1) (+VP) が各々増加した。V1aR RNA 干渉法は, Aldo-, VP-誘導による活性化レベルを元のレベルまで低下させた。結論: VP は, 集合管 IC-A の Aldo-MR 軸を活性化し, Aldo-MR 複合体の核内輸送に必須である。

(11) ガス様分子による心臓のレドックス恒常性制御

〇西田基宏¹, 外山喬士¹, 北島直幸², 富田拓郎²

(¹岡崎統合バイオ・生命時空間設計研究領域・心循環シグナル研究部門, ²九大・院薬)

心臓のレドックス恒常性は, 酸素由来の様々な活性分子種および活性酸素と生体分子との反応により生じる親電子性の 2 次生成物 (親電子物質) とその消去系によって巧妙に制御されている。我々は, 心不全の初期から継続的に発現増加する NO 合成酵素 (iNOS) に着目し, iNOS 由来の NO が炎症性転写因子 NF- κ B に機能修飾 (S-ニトロソ化) を与えることでアンジオテンシン系を負に調節することがわかった。一方, 心不全慢性期では, NO がグアニンヌクレオチドと反応することで親電子性の 8-nitro-cGMP を形成し, 8-nitro-cGMP が低分子量 G

タンパク質 H-Ras を特異的に活性化することで心筋老化を誘導することがわかった。さらに, 硫化水素イオン (H₂S/HS⁻) が高い求核性を持つことに着目し, 心筋梗塞マウスに NaHS を持続投与したところ, 心筋梗塞 4 週間後の心臓における 8-nitro-cGMP 形成が顕著に抑制され, これに伴って心機能低下が有意に改善された。以上の結果は, ガス様の親電子物質と求核物質が心臓のレドックス状態を決定づける重要な分子であることを強く示唆している。

3. 心血管膜輸送分子の構造・機能・病態の統合的研究戦略

2013年11月27日－11月28日

代表・世話人：岩本隆宏（福岡大学医学部薬理学）

所内対応者：久保義弘（生理学研究所神経機能素子）

(1) H^+/Ca^{2+} 交換輸送体の分子機構

○瀧木 理（東京大学大学院理学系研究科生物化学）

(2) 真核生物 CaCA 結晶構造から哺乳類 NCX 変異解析を検証する

○岩本隆宏（福岡大学医学部薬理学）

(3) PIP_2 による TRPM4 チャンネルの制御機構－催不整脈性変異体を手がかりとした解析

○胡 耀鵬¹, 岡村康司², 森 誠之³, 井上隆司¹ (¹福岡大学大学院医学研究科 細胞分子制御学,
²大阪大学大学院医学系研究科 統合生理学, ³京都大学大学院工学研究科 合成生物化学)

(4) 末梢循環障害における TRPC6 チャンネルの役割

○富田拓郎¹, 角田将朗¹, 島内 司¹, 喜多紗斗美³, 岩本隆宏³, 西田基宏²

(¹九州大学大学院薬学研究院創薬育薬産学官連携分野,

²岡崎統合バイオサイエンスセンター（生理学研究所）心循環シグナル研究部門,

³福岡大学医学部薬理学)

(5) PMCA とカルシウムホール: 新しいカルシウムシグナリングの機序

○塩谷孝夫（佐賀大学医学部生体構造機能学講座 器官・細胞生理学分野）

(6) 家族性洞不全症候群患者に見出された心房型ミオシン重鎖遺伝子(MYH6)変異と機能解析

○石川泰輔¹, 小和瀬晋弥², 有村卓朗³, 野上昭彦⁴, 辻 幸臣¹, 木村彰方³, 蒔田直昌¹

(¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子生理学, ²横浜労災病院循環器科,

³東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, ⁴筑波大学循環器内科)

(7) ヒト iPS 由来心筋を用いた薬剤誘発性不整脈の研究

○黒川洵子¹, 李 敏¹, 諫田泰成², 芦原貴司³, 関野祐子², 古川哲史¹

(¹東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理学分野,

²国立医薬品食品衛生研究所薬理部, ³滋賀医科大学呼吸循環器内科)

(8) 血管内皮細胞における小胞体カルシウムセンサー蛋白質 STIM1 の役割

○平野勝也, 平野真弓, 花田亜希子（九州大学大学院医学研究院 分子細胞情報学）

(9) 心血管病態における sigma-1 受容体の役割

○田頭秀章, 福永浩司（東北大学大学院薬学研究科薬理学分野）

(10) 心筋 Na チャンネルの細胞内分布リモデリングが Na チャンネル遮断薬による催不整脈性の機序に関与する可能性について：シミュレーション研究

○津元国親, 倉智嘉久（大阪大学大学院医学系研究科 分子細胞薬理学）

(11) 洞房結節細胞自動能におけるミトコンドリア NCLX の寄与－シミュレーション解析

○竹内綾子, 松岡 達（福井大学医学部形態機能医科学講座 統合生理学）

(12) KCNE1 存在下において KCNQ1 のゲーティングが遅くなるメカニズム

○中條浩一, 久保義弘（生理学研究所神経機能素子研究部門）

(13) G-CaMP による in vivo カルシウムイメージングとオプトジェネティクス

○中井淳一, 大倉正道, 安藤恵子（埼玉大学 脳科学融合研究センター）

(14) 中枢神経系の血管網を被覆するペリサイトの由来とリクルートメント方式に関する研究

○山本誠士^{1,2}, 東英梨月¹, 村松 昌², 新飯田俊平², 笹原正清¹

(¹富山大学大学院医学薬学研究部病態病理学,

²国立長寿医療研究センター バイオバンクオミックスユニット)

(15) 蛍光イメージング技術を駆使した血管形成メカニズムの解析

○福原茂朋, 望月直樹 (国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部)

(16) 平滑筋収縮制御機構における Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャンネル (TMEM16A) の役割

○山村寿男, 邊見 智, 大城隼也, 近藤るびい, 鈴木良明, 今泉祐治

(名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

(17) Prostaglandin E シグナルによる lysyl oxidase 分解亢進が動脈管弾性線維の形成不良を引き起こす

○南沢 享¹, 横山詩子², 青木浩樹³, 中邨智之⁴, 石川義弘²

(¹東京慈恵会医科大学細胞生理学講座, ²横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学,

³久留米大学循環器病研究所, ⁴関西医科大学薬理学講座)

(18) 心臓型アデニル酸シクラーゼの選択的阻害剤ビダラビンによる不整脈治療の可能性

○吹田憲治, 藤田孝之, 石川義弘 (横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学)

(19) 心筋前駆細胞としての atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs): マウスおよびヒト心筋組織における

CD230 (prion protein) をマーカーとする細胞の探索

○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)

【参加者名】

中井淳一 (埼玉大学), 富田拓郎 (九州大学), 島内 司 (九州大学), 濡木 理 (東京大学), 蒔田直昌 (長崎大学), ハーレル ダニエル (長崎大学), 石川泰輔 (長崎大学), 黒川洵子 (東京医科歯科大学), 五領田小百合 (東京医科歯科大学), 大矢 進 (京都薬科大学), 丹羽里実 (京都薬科大学), 柴岡里奈 (京都薬科大学), 田頭秀章 (東北大学), 平野勝也 (九州大学), 諫田泰成 (国立医薬品食品衛生研究所), 倉智嘉久 (大阪大学), 古谷和春 (大阪大学), 津元国親 (大阪大学), 西田基宏 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター), 外山喬士 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター), 吹田憲治 (横浜市立大学), 石川義弘 (横浜市立大学), 渡邊泰秀 (浜松医科大学), 山下寛奈 (浜松医科大学), 田代美由紀 (浜松医科大学), 草刈洋一郎 (東京慈恵会医科大学), 赤池 徹 (東京慈恵会医科大学), 志村大輔 (東京慈恵会医科大学), 大森衣里子 (東京慈恵会

医科大学), 福原茂朋 (国立循環器病研究センター研究所), 赤羽悟美 (東邦大学), 伊藤雅方 (東邦大学), 岩本隆宏 (福岡大学), 喜多紗斗美 (福岡大学), 藤井 誠 (福岡大学), 後藤雄輔 (福岡大学), 吉岡弘毅 (福岡大学), 胡耀鵬 (福岡大学), 尾松万里子 (滋賀医科大学), 黒瀬 等 (九州大学), 竹内綾子 (福井大学), 松岡 達 (福井大学), 山本誠士 (富山大学), 山村寿男 (名古屋市立大学), 鈴木良明 (名古屋市立大学), 鬼頭宏彰 (名古屋市立大学), 松木克仁 (名古屋市立大学), 栗田 卓 (名古屋市立大学), 西村歌織 (名古屋市立大学), 林 恵介 (名古屋市立大学), 塩谷孝夫 (佐賀大学), 山村 彩 (金城学院大学), 山川裕之 (慶応大学), 西本れい (生理学研究所), 村田和義 (生理学研究所), 笠井昌俊 (生理学研究所), 久保義弘 (生理学研究所), 立山充博 (生理学研究所), 中條浩一 (生理学研究所), Keceli Batu (生理学研究所), 北沢和寛 (生理学研究所), 糸慎一郎 (生理学研究所)

【概要】

平成25年11月27日(水), 28日(木)の2日間, 生理学研究所1階大会議室にて研究会「心血管膜輸送分子の構造・機能・病態の統合的研究戦略」を開催した。本研究会は, 心血管イオンチャンネル・トランスポーター研

究を精力的に推進する研究者を中心に, さらに近年脚光を浴びている膜輸送分子の三次元構造解析や心血管機能の生体分子イメージング解析の専門家を招いて, 本研究分野の活性化と次世代の学際的・融合的研究戦略の構築

を目的として企画された。当日の参加者は 60 名で、その内、学部生・大学院生は 15 名、助教・研究員・ポスドクは 20 名と若手中心の構成であった。本研究会では、コアメンバーを中心に 2 題の特別講演と 17 題の一般発表が行われ、活発な討議を行った。内容は、心血管系の各種イオンチャネル・トランスポーターの構造と機能を研究テーマとするものから、ヒトやマウスの遺伝子異常による不整脈発生機序の研究、心血管病と細胞内 Ca^{2+} 制御異常の研究、イオンチャネル・トランスポーターを標的とした創薬や循環器系薬物の作用機序解析、心血管系の分化・再生やペリサイトリクルトメントに関する研究な

ど、多岐にわたった。従来の参加メンバーに加え、構造生物学者である濡木理教授（東京大学）、生体分子イメージングの専門家である中井淳一教授（埼玉大学）、福原茂朋室長（国立循環器病研究センター）が新たに加わったことで、膜輸送分子の構造－機能連関や心血管系の高次機能について多角的・統合的に幅広く議論を行うことができた。また、多くの研究者は、研究成果のみならず今後の研究展望についても報告しており、本研究会での議論が今後の研究進展や具体的な共同研究の実施に役立つことが期待された。

(1) $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の分子機構

○濡木 理（東京大学大学院理学系研究科生物化学）

CaCA ファミリーに属するタンパク質は Na^+ や H^+ の濃度勾配を利用して Ca^{2+} の輸送を行うことにより、細胞内における Ca^{2+} 濃度の制御にかかわる。ヒトの CaCA の不全是高血圧症を惹起することが既に報告されている。我々は、 CaCA ファミリータンパク質のうち古細菌に由来する $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の結晶構造を $2.3\text{\AA}$ の分解能で明らかにした。この結晶構造において、イオンとの結合部位は細胞の内側に開いた状態を示していた。過去に報告された細胞の外側に開いた状態の CaCA ファミリータンパク質の構造との比較から、2 本の膜貫通ヘリックス

が配向を変えることにより、イオン結合部位が細胞の内側あるいは外側に開いた状態を相互に遷移することが明らかになった。さらに、変異体を用いた実験から、結晶構造において H^+ が結合していると考えられた 2 つの保存されたグルタミン酸残基は Ca^{2+} との結合にもかかわっており、これらの結合は相互に排他的であることが示された。過去に報告された他の CaCA ファミリータンパク質の構造との比較から、 H^+ あるいは Ca^{2+} の結合に依存して、細胞内、あるいは細胞外側に開いた状態の間の遷移が引き起こされるという輸送モデルを提唱した。

(2) 真核生物 CaCA 結晶構造から哺乳類 NCX 変異解析を検証する

○岩本隆宏（福岡大学医学部薬理学）

1990 年に心筋 NCX1 がクローニングされて以来、 NCX の構造と機能について変異解析が進められ、私たちもその一端に携わってきた。最近、真核生物 CaCA の結晶構造が解かれたことから、そのスーパーファミリーに属する哺乳類 NCX の変異解析について検証してみた。 NCX と CaCA の全アミノ酸配列はかなり異なっているが、イオン結合に関わるアミノ酸は良く保存されている。以前の NCX 変異解析において、イオン結合に関わるアミノ

酸への変異導入は輸送活性を損失させた。また、その近傍の特定アミノ酸の変異は NCX 阻害剤 (SEA0400 , Ni^{2+}) の効力を変化させた。このように、 NCX 変異解析から得られた知見は、 CaCA 構造から推定される NCX の構造と機能に良く合っていた。一方、Cys 走査変異法から、 NCX は当初 9 回膜貫通ヘリックス (TM) 型構造であると推定されたが、 CaCA と同様に 10 回 TM 型構造であると考えられた。このように、Cys 走査変異法によるトポロジー

予測は注意が必要であるが、生理的条件下の構造・機能情報が得られる利点がある。以前、TM8の中央部に導入したCys残基に対してCys修飾剤が内・外側からアクセス可能であることを報告した。この部位はゲーティング

バンドルの構造変化で内・外側に相互に露出される位置に相当しており、濡木らの提唱するCaCA輸送モデルを生理的条件下で支持する知見として興味深い。

(3) PIP₂によるTRPM4チャネルの制御機構—催不整脈性変異体を手がかりとした解析

○胡 耀鵬¹, 岡村康司², 森 誠之³, 井上隆司¹ (¹福岡大学大学院医学研究科 細胞分子制御学, ²大阪大学大学院医学系研究科 統合生理学, ³京都大学大学院工学研究科 合成生物化学)

TRPM4チャネルは、家族性房室伝導障害・Brugada症候群等の遺伝子性不整脈や心ストレス時の催不整脈性異常興奮に関与することが示唆されている。本研究では、膜電位感受性ホスファターゼ(VSP)を用い、このチャネルの活性化と内因的な膜PIP₂含量の変動との定量的関係や催不整脈性遺伝子変異によって受ける影響について検討した。HEK293細胞にヒトTRPM4(野生型:EKE⁵⁻⁷, E7K変異体:EKK⁵⁻⁷ or ENE⁵⁻⁷変異体)及びゼブラフィッシュVSPを共発現し、パッチ電極から導入したCa²⁺ (1μM)によって内向きTRPM4電流を活性化した。脱分極パルスの強度や持続時間を変えながらVSPを活性化し、細胞

膜のPIP₂含量を段階的に減少させ、電流の抑制率と抑制からの回復を観察した。VSP活性化で引き起こしたPIP₂減少に伴う抑制の程度は、ENE⁵⁻⁷変異体で最も顕著で、ついで野生型, E7K変異体の順であった。これに対し-60mVにおける抑制からの回復の早さは、E7K変異体>野生型>ENE⁵⁻⁷変異体の順であった。膜のPIP₂にはTRPM4電流維持作用があること、またE7K変異体においてはこの作用が亢進しており電流の過剰活性が生じていること、更にそこではTRPM4チャネルN端の5から7番目のアミノ酸残基の荷電状態が決定的な役割を果たしていることが推測された。

(4) 末梢循環障害におけるTRPC6チャネルの役割

○富田拓郎¹, 角田将朗¹, 島内 司¹, 喜多紗斗美³, 岩本隆宏³, 西田基宏²

(¹九州大学大学院薬学研究院創薬育薬産学官連携分野,

²岡崎統合バイオサイエンスセンター(生理学研究所)心循環シグナル研究部門,

³福岡大学医学部薬理学)

動脈硬化症等による末梢循環障害に対して、閉塞部位を迂回する側副血行路形成が治療法として有効である。近年、末梢循環の修復には血管新生よりむしろその後の血管成熟が重要と考えられつつある。しかし未だ血管成熟を制御する分子メカニズムは明らかでない。我々は、血管の筋原性緊張に必須の非選択的カチオンチャネルTRPC6が末梢循環のリモデリングを負に制御する因子であることを本研究にて明らかにした。TRPC6欠損マウスにおいて下肢虚血後の血流回復がWTよりも有意に促

進していた。血流回復の促進は血管新生ではなく血管成熟の亢進を伴っていた。下肢虚血後の末梢血管におけるTRPC6は一過的にリン酸化されており、その後時間経過に伴ってリン酸化レベルは低下した。末梢循環障害改善薬であるシロスタゾールはTRPC6リン酸化レベルの増加と相関して血管成熟および血流回復を促進させた。以上の結果は、末梢血管におけるTRPC6のリン酸化による抑制が下肢虚血後の血流回復度を決定することを強く示唆した。

(5) PMCA とカルシウムホール: 新しいカルシウムシグナリングの機序

○塩谷孝夫 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座 器官・細胞生理学分野)

カルシウムホールは、細胞膜 Ca^{2+} -ATPase (PMCA) の細胞質側の近傍に生じる、直径 100 nm ほどの細胞内微小ドメインである。PMCA の Ca^{2+} 汲み出しによって、この微小ドメイン内の Ca^{2+} 濃度は極めて低いレベルに保たれており、そこでローカルなカルシウムシグナリングが行われると考えられる。その存在を示す実験事実としては、マウス心室筋細胞から得られた Na/Ca 交換 (NCX) 電流の記録から、1) PMCA の選択的阻害はローカルな Ca^{2+} 濃度変化によって NCX 電流の細胞内 Ca^{2+} 濃度依存性を低濃度側にシフトさせること、2) このとき NCX 電流の逆転電位に変化は見られずグローバルな Ca^{2+} 濃度は変化

しないことが示された。この結果は、PMCA の近傍にグローバル濃度と異なった、より低い Ca^{2+} 濃度の領域であるカルシウムホールが存在し、その領域の Ca^{2+} 濃度を NCX のカルシウム結合ドメイン (CBD) が検知していることを示す。カルシウムホールは、細胞内微小ドメインとして、内部のローカルな Ca^{2+} 濃度をグローバルな Ca^{2+} 濃度から遮蔽し、そこに個々のカルシウムシグナリングのプロセスを分離する機序として作用することが考えられた。カルシウムホールは、カルシウムシグナリングの万能性と普遍性をもたらす、細胞内コンパートメント化のメカニズムなのかもしれない。

(6) 家族性洞不全症候群患者に見出された心房型ミオシン重鎖遺伝子 (MYH6) 変異と機能解析

○石川泰輔¹, 小和瀬晋弥², 有村卓朗³, 野上昭彦⁴, 辻 幸臣¹, 木村彰方³, 蒔田直昌¹

(¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子生理学, ²横浜労災病院循環器科,

³東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, ⁴筑波大学循環器内科)

洞不全症候群 (SSS) は加齢や基礎心疾患などを原因として発症する孤発例が多いが、家族性 SSS には何らかの遺伝的素因の関与が示唆される。これまでに家族性 SSS の原因遺伝子として、心筋 Na チャネル (SCN5A) やペースメーカーチャネル (HCN4) が報告されている。一方、心拍数や SSS 罹患性を左右するリスク遺伝子として、心房型ミオシン重鎖 (MYH6) がゲノムワイド関連解析によって明らかにされているが、MYH6 がどのように SSS と関連するかは不明であった。我々は SCN5A・HCN4 変異を持たない家族性 SSS 患者 9 例の遺伝子解析を行い、1 家系に新規 MYH6 変異 E933del を同定した。この変異は動物種・アイソフォームを超えて高度に保存される S2

領域に存在した。S2 領域はミオシン結合タンパク C (MyBP-C) との結合に重要な役割を果たすコイル構造で、その構造異常はサルコメアの構造に何らかの基質的变化をもたらすことが示唆される。GFP タグを付けた変異 MYH6 をラット新生児心筋細胞に強制発現させると、サルコメア構造の破壊を示す共焦点蛍光画像が確認された。さらに免疫沈降実験から、変異 MYH6 は正常 MYH6 に比べて MyBP-C 結合能が亢進していることが判明した。以上より、家族性 SSS の新たな分子病態として、MYH6 の変異による心房筋サルコメア構造異常やサルコメア構成要素間の結合能の異常が考えられた。

(7) ヒト iPS 由来心筋を用いた薬剤誘発性不整脈の研究

○黒川洵子¹, 李 敏¹, 諫田泰成², 芦原貴司³, 関野祐子², 古川哲史¹

(¹東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理学分野,

²国立医薬品食品衛生研究所薬理部, ³滋賀医科大学呼吸循環器内科)

ヒト iPS 由来心筋を利用することにより, 動物実験が中心であった前臨床の心毒性試験の予測性が向上すると期待されている。しかし, 株・分化誘導法によらず, ヒト iPS 心筋の電気生理学的性質は, 自動能を示す未熟型であり, 薬物誘発性不整脈など心室性不整脈の評価には不向きな可能性がある。まず我々は, ヒトでの QT 延長が見られる濃度域の HERG 阻害剤をヒト iPS 心筋細胞に投与したところ, 膜電位が脱分極して自律拍動が停止したため, 活動電位幅 (APD) の延長を計測できなかった。そこで, ヒト iPS 由来心筋と成人心室筋の電気的性質の違いに注目し, ヒト iPS 心筋に不足している X 因子をア

デノウイルスベクターで導入したところ, 自律拍動能が消失し, ヒト iPS 心筋の静止膜電位が深くなり, 第 4 相の立ち上がりが消失し, ペーシングによってプラトー相をもつ心室筋様活動電位が得られた。この X 因子が導入された iPS 心筋では APD が安定的に計測できるようになり, HERG 阻害剤による濃度依存的な APD 延長が見られ, QT 延長と同濃度域であることが示された。さらに, 心筋細胞シミュレーションモデルを用いて, X 因子の役割について解析した。以上の結果より, 本研究で開発した X 因子入りのヒト iPS 心筋が, 薬物誘発性不整脈の評価に適していることが示された。

(8) 血管内皮細胞における小胞体カルシウムセンサー蛋白質 STIM1 の役割

○平野勝也, 平野真弓, 花田亜希子 (九州大学大学院医学研究院 分子細胞情報学)

血管内皮細胞において貯蔵部作動性 Ca^{2+} 流入は Ca^{2+} シグナルの発生機構として重要な役割を果たす。この Ca^{2+} 流入機構においては小胞体蛋白質 STIM1 が貯蔵 Ca^{2+} 量のセンサーとして機能する。本研究では, 内皮 NO 産生における STIM1 の役割と, STIM1 のリン酸化反応による貯蔵部作動性 Ca^{2+} 流入の調節機構を明らかにした。小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害薬タプシガルギン (TG) は, 培養内皮細胞において持続的 Ca^{2+} 流入を引き越し, 摘出血管において内皮依存性血管弛緩反応を引き起こした。TG による Ca^{2+} 流入, 及び, トロンビン (T) が引き起こす Ca^{2+} 流入と NO 産生の一部が STIM1 の発現抑制により阻

害された。細胞外 Ca^{2+} を除去して TG あるいは T で刺激すると一過性の細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇が観察され, その際, STIM1 がリン酸化されることを Phos-tag SDS-PAGE 法により明らかにした。細胞外 Ca^{2+} を再添加すると, T によりリン酸化された STIM1 は脱リン酸化されたが, TG によるリン酸化は不可逆的に持続した。STIM1 変異体の解析より C 末端領域がリン酸化されることが明らかとなった。キナーゼ阻害剤の作用から, STIM1 リン酸化は貯蔵部作動性 Ca^{2+} 流入の持続相に関与することが示唆された。STIM1 は貯蔵部の Ca^{2+} 枯渇によりリン酸化され, Ca^{2+} 流入の持続に関与することが示唆される。

(9) 心血管病態における sigma-1 受容体の役割

○田頭秀章, 福永浩司 (東北大学大学院薬学研究科薬理学分野)

Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) を服用しているうつ病患者では, 心疾患による死亡率や心疾患発症

リスクが有意に低下するという報告がある。私達は多くの SSRI が, オープン受容体である sigma-1 受容体

(Sig-1R)の高親和性アゴニストであることに着目した。本研究では、SSRIと選択的 Sig-1R アゴニストである SA4503 を用いて、循環器における Sig-1R の生理機能と病的心筋肥大に伴う受容体の動態について追究し、興味ある知見を得た。1) Sig-1R に親和性を持つ SSRI, fluvoxamine は圧負荷に伴う心臓肥大と心筋障害を抑制する。2) 選択的 Sig-1R アゴニスト SA4503 はマウス圧負荷モデルおよびラット閉経後圧負荷モデルで心機能障害を抑制し、eNOS の活性化を介して血管内皮細胞を保

護する。3) ラット培養心筋細胞では、Sig-1R 刺激は筋小胞体 IP₃ 受容体を介して、心筋ミトコンドリアへの Ca²⁺ 輸送を促進し、ミトコンドリア ATP 産生を促進し、心筋肥大と心筋障害を抑制する。これらの結果は、生理的狀態では Sig-1R はミトコンドリア Ca²⁺ 輸送に関与して、心筋エネルギー代謝と細胞内 Ca²⁺ 恒常性を維持し、病的狀態では Sig-1R アゴニスト処置は心筋ミトコンドリア機能を改善することを示している。

(10) 心筋 Na チャネルの細胞内分布リモデリングが Na チャネル遮断薬による 催不整脈性の機序に関与する可能性について：シミュレーション研究

○津元国親，倉智嘉久（大阪大学大学院医学系研究科 分子細胞薬理学）

【背景】心筋細胞内でのナトリウム(Na)チャネル分布は、先天的ないし後天的な要因により変化する。先行研究において、虚血境界領域に残存する心筋細胞の Na チャネルは、介在板に偏在化することが示された。しかしながら、この Na チャネルの細胞内リモデリングの病態生理学的意義については未だ不明な点が多い。【方法】心筋線維モデルを用いて、Na チャネルの細胞内分布変化、およびI群抗不整脈薬投与によるNaチャネル遮断の興奮伝導に及ぼす影響をコンピュータシミュレーションにより解析した。さらに、健常細胞と虚血心筋からなる環状心筋線維モデルを用いて、期外刺激によるリエントリー誘発

の可能性を検討した。【結果】虚血心筋でみられる Na チャネルの介在板への偏在化は、Na 電流の著明な減少を引き起こし、結果として興奮伝導速度の顕著な低下を認めた。さらに、虚血心筋へのI群抗不整脈薬投与によるNaチャネル遮断は、健常細胞の場合に比べ、より容易に伝導ブロックを引き起こした。また、Naチャネル遮断下において健常細胞と虚血心筋の組織境界に与えた期外刺激は、リエントリーを誘発した。【結語】陳旧性心筋梗塞の患者におけるI群抗不整脈薬の催不整脈性に、Naチャネルの虚血誘発性細胞内リモデリングが関与することを示唆するものである。

(11) 洞房結節細胞自動能におけるミトコンドリア NCLX の寄与—シミュレーション解析

○竹内綾子，松岡 達（福井大学医学部形態機能医科学講座 統合生理学）

我々は、マウス心房筋由来培養心筋細胞 HL-1 において、ミトコンドリア Na-Ca 交換輸送体 NCLX が、筋小胞体に Ca を供給することによって拍動リズムを制御することを報告した (Sci Rep, 2013)。しかし、実際の心臓ペースメーカー細胞＝洞房結節細胞の自動能発生における NCLX の寄与は不明である。洞房結節細胞の自動能の機序については、比較的新しい“Ca クロック仮説”と従来の“膜クロック仮説”の間で未だ結論がでていない。そこで“Ca クロック”として Maltsev and Lakatta (ML)

model (Am J Physiol, 2009)を、“膜クロック”として Himeno model (Am J Physiol 2008)を選択し、ミトコンドリア Ca 動態を実装して、自動能発生における NCLX の寄与を解析した。その結果、何れのモデルでも NCLX の発現量減少により筋小胞体 Ca 含量が減少した。しかし、ML model では活動電位発生間隔が延長したのに対し、Himeno model では短縮した。Himeno model では細胞内 Na 濃度の減少に伴う内向き陽イオン電流(Ist)の活性化が活動電位発生間隔の短縮をもたらすこと、ML model

ではその効果が小さいことが明らかとなった。従って、洞房結節細胞の拍動リズムにおける NCLX の寄与は、細

胞膜チャネルと筋小胞体 Ca 動態のバランスで異なることが示唆された。

(12) KCNE1 存在下において KCNQ1 のゲーティングが遅くなるメカニズム

○中條浩一, 久保義弘 (生理学研究所神経機能素子研究部門)

KCNQ1 は KCNE1 とともにイオンチャネル複合体を構成し、心筋で I_{Ks} と呼ばれるカリウム電流を構成する。KCNE1 は、KCNQ1 チャネルの電位依存性を変化させ、ゲーティングを著しく遅くすることが知られている。今回我々は、KCNQ1 の S4 セグメント上の Phe232 と S5 セグメント上の Phe279 それぞれの変異体の解析により、KCNE1 による電位依存性の変化が両アミノ酸残基の側鎖の体積に依存していることを見出した。そこで Voltage clamp fluorometry 法を適用し、それぞれの変異体において S4 セグメントの動きに変化が見られるかを検証した。

野生型の KCNQ1-KCNE1 チャネルにおいては、脱分極時に電位センサーがまず動き、遅れて電流が測定された。一方 F232A および F279A 変異体においては、電位センサーの動きとゲートの開閉がほぼ同時に起こることがわかった。KCNE1 存在下で S4 セグメントが細胞外に動く際、S4 セグメント上の Phe232 と S5 セグメント上の Phe279 がエネルギー障壁として働いており、チャネルが開く際にこの障壁を乗り越える必要があるために KCNQ1-KCNE1 チャネルのゲーティングが遅くなっていると考えられる。

(13) G-CaMP による in vivo カルシウムイメージングとオプトジェネティクス

○中井淳一, 大倉正道, 安藤恵子 (埼玉大学 脳科学融合研究センター)

我々は細胞機能をモニターすることを目的に Genetically encoded Ca^{2+} indicator (GECI)を開発している。最近、G-CaMP2 をベースに改良を加え、蛍光変化量が大い G-CaMP6, 7, 8 を開発した。また、RFP をベースとして赤色カルシウムプローブ R-CaMP を開発した。G-CaMP6-actin 融合タンパクを作成しマウスの海馬 CA3 神経細胞に発現させたところ、シナプス前細胞の電気刺激に対応したスパインの蛍光変化を捉える事ができた。また、新たに開発した G-CaMP をゼブラフィッシュの視蓋に発現させたところ、網膜に映った餌のゾウリムシの

像に対応すると考えられる視蓋の部位で蛍光変化を捉える事ができた。さらに線虫の運動神経細胞に G-CaMP とチャネルロドプシン、体壁筋に R-CaMP を発現する改変体を作成し、レーザー顕微鏡下で自由運動中の線虫を自動追尾しながら光刺激を与えたところ、光刺激による神経細胞の活性化とそれに対応する筋肉活動を捉える事ができた。G-CaMP と R-CaMP および、これらとオプトジェネティクスの組み合わせは、神経系、循環器系の研究に有効である。

(14) 中枢神経系の血管網を被覆するペリサイトの由来とリクルートメント方式に関する研究

○山本誠士^{1,2}, 東英梨月¹, 村松 昌², 新飯田俊平², 笹原正清¹

(1 富山大学大学院医学薬学研究部病態病理学,

²国立長寿医療研究センター バイオバンクオミックスユニット)

脳微小血管は血管内皮細胞とペリサイトによって構成される。一般的に、ペリサイトは血管周囲の結合組織由来間葉系細胞または神経堤細胞から発生・分化すると考えられているが、中枢神経系におけるペリサイトリクルートメントについては未解明な部分が多い。マクロファージ (MΦ) 形成不全マウス胎仔脳の免疫組織化学的検討を行った結果、中脳背側部にリクルートされる NG2 陽性細胞の劇的な減少が観察されるとともに、脳微小血管における NG2 陽性ペリサイトの被覆率が有意に減少していることが明らかになった。また、MΦ 形成不全マウスと野生型マウスの発現遺伝子をマイクロアレイによって比較した結果、MΦ 形成不全マウスでは、ペリ

サイト関連遺伝子の発現が減少していることが確認された。さらに、GFP トランスジェニックマウス胚頭部より分画した MΦ 系細胞を用い、matrigel plug assay および explant culture を試みた結果、GFP 陽性細胞はペリサイトマーカーを発現することが示された。さらに、心臓の拍動が阻害されるマウスにおける免疫組織化学的解析の結果、MΦ を含む血球系細胞が胎仔体内にリクルートされておらず、また、脳血管はペリサイトにより被覆されていなかった。以上の結果より、脳血管発生期における NG2 陽性ペリサイトの少なくとも一部の起源は、造血系細胞由来の MΦ がペリサイトへ分化転換を行うと結論付けられた。

(15) 蛍光イメージング技術を駆使した血管形成メカニズムの解析

○福原茂朋, 望月直樹 (国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部)

血管形成には、内皮細胞の“形態・運動”, “増殖”, “遺伝子発現” の厳密な制御が重要である。しかし、生体でこれら内皮細胞機能が、如何に制御されているかについては、不明な点が多い。我々は、これら疑問を解明するため、ゼブラフィッシュをモデル動物として用いた蛍光イメージング解析を行い、以下の研究成果を得た。① 血管形成における内皮細胞増殖の役割とその制御機序を解明するため、内皮細胞で細胞周期バイオセンサーFucciを発現するゼブラフィッシュを樹立・解析した。その結果、尾側血管の形成には、アンジオブラストの発生と増殖が重要であることが示された。② 内皮細胞の形態・運動を制御するシグナル系を解析するため、内皮細胞にお

けるアクチン細胞骨格と Rho ファミリー G 蛋白質活性を可視化できるゼブラフィッシュを樹立した。その結果、尾側静脈の血管新生には、Bone morphogenetic protein (Bmp) による Cdc42 を介した糸状仮足形成が重要であることが示された。③ 細胞の増殖・分化・生存に重要な核転写調節因子 β カテニンの活性を、生体の内皮細胞で可視化できるゼブラフィッシュを樹立・解析し、尾側静脈の形成過程において Bmp が β カテニン依存的な転写を亢進すること、さらにこの β カテニン依存的な転写が、静脈内皮細胞の分化とその生存を制御していることを示した。

(16) 平滑筋収縮制御機構における Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネル (TMEM16A) の役割

○山村寿男, 邊見 智, 大城隼也, 近藤るびい, 鈴木良明, 今泉祐治
(名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

Ca^{2+} 活性化 Cl^- (Cl_{Ca}) チャネルは, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇により活性化し, 平滑筋収縮, 神経伝達, 上皮性分泌などの基本的な生理機能に関与する。最近, TMEM16 遺伝子ファミリーに属する TMEM16A が, 血管平滑筋に発現する Cl_{Ca} チャネルの分子実体として報告された。本研究では, 血管平滑筋に発現する TMEM16A の生理機能と病態での発現変化を解析した。マウス門脈平滑筋細胞には, 複数の TMEM16A スプライスバリエント体が発現していた。全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡を用いた FRET 解析によって, TMEM16A はスプライスバリエント体のホモもしくはヘテロ二量体で機能的 Cl_{Ca} チャネルを形成していることが

示唆された。また, 胆汁性の肝硬変を起こし, 門脈圧亢進症を呈する胆管結紮 (BDL) モデルマウスの門脈平滑筋において, TMEM16A の発現量, 電流量, 収縮力が対照群と比較して減少していた。平滑筋において, Cl_{Ca} チャネル活性が減弱すると, 細胞膜が過分極し, 細胞の興奮性が低下することが知られているため, BDL モデルで観察された TMEM16A の機能発現低下は, 門脈圧の上昇に対して抑制的に働いていると考えられる。本研究成果は, 血管平滑筋に機能発現する Cl_{Ca} チャネルの生理機能や病態での役割を解明するのに役立つことが期待される。

(17) Prostaglandin E シグナルによる lysyl oxidase 分解亢進が 動脈管弾性線維の形成不良を引き起こす

○南沢 享¹, 横山詩子², 青木浩樹³, 中邨智之⁴, 石川義弘²
(¹東京慈恵会医科大学細胞生理学講座, ²横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学,
³久留米大学循環器病研究所, ⁴関西医科大学薬理学講座)

動脈管は胎生期にのみ開存し, 生直後の肺呼吸の開始とともに閉塞にむかう。生直後の血管収縮に伴う機能的閉鎖から, 血管内腔面が閉塞し, 索状の線維性組織 (解剖学的閉鎖) へと変化する。隣接する他の血管と異なる構造上の特徴として, 動脈管には弾性線維の形成不良が認められ, 出生後に収縮性刺激に曝された動脈管は弾力性に乏しいため, 速やかに恒久的な閉塞へと進むことができる。我々は, プロスタグランジン E (PGE) 刺激が特異的受容体 EP4 を介して, エラスチンを架橋するための酵素 lysyl oxidase の分解を亢進するために, 動脈管の弾

性線維形成が不良になることを明らかにした。PGE-EP4 シグナルは従来の cAMP 経路ではなく, cSrc-PLC を介して, ライソゾームでの lysyl oxidase の分解を亢進していた。一度細胞外に出た lysyl oxidase を再び細胞内に取り込んで分解する機序として, クラスリン依存性のエンドサイトーシスが関与していることも明らかにした。PGE-EP4 シグナルは動脈管において, 血管拡張作用のみならず, 血管リモデリングにおいても極めて重要な働きをしていることが判明した。

(18) 心臓型アデニル酸シクラーゼの選択的阻害剤ビダラビンによる不整脈治療の可能性

○吹田憲治, 藤田孝之, 石川義弘 (横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学)

【背景】アデニル酸シクラーゼ (AC) は β アドレナリン受容体 (β -AR) シグナル伝達の主要な構成因子であ

り、9 種類存在するそのサブタイプの発現はそれぞれ高い臓器特異性を示す。近年、我々は抗ヘルペス薬であるビダラビンが心臓型 AC の選択的阻害剤であることを明らかにした。心房細動 (AF) は臨床的に最も問題となる不整脈の一つである。交感神経活動の亢進を誘因とする AF に対しては β -AR 遮断薬 (β 遮断薬) の使用が推奨されているが、副作用として心機能抑制や気管支収縮等が問題となる。今回、我々はビダラビンの AF 治療薬としての有用性を検討した。

【方法・結果】経食道ペーシングによって誘発したマウスにおける AF の持続時間は、ノルエピネフリン (NE) 投与による交感神経刺激により顕著に延長した。ビダラ

ビンおよびメトプロロール (β 遮断薬) は、NE 投与／非投与いずれの条件下でも AF 持続時間を有意に短縮した。メトプロロール投与群で観察された心機能抑制 (左室駆出率の低下) は、ビダラビン投与群では認められなかった。また筋小胞体のリアノジン受容体からの異常な Ca^{2+} リークは、心房細動の促進因子であると考えられている。マウスの心房から単離した心筋細胞において、ビダラビンはイソプロテレノール刺激により促進される Ca^{2+} リークを有意に抑制した。

【結論】ビダラビンによる心臓選択的 AC 阻害の AF 治療における有用性が示唆された。

(19) 心筋前駆細胞としての atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) : マウスおよびヒト心筋組織における CD230 (prion protein) をマーカーとする細胞の探索

○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)

Atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) は、ランゲンドルフ灌流による成体マウス心室筋細胞単離の最終段階で得られた「心筋細胞を含まない小型細胞分画」の培養中に発見された、自動的に拍動する細胞である。ACMs の多くは多核であり、cardiac troponin T (cTnT) などの心筋細胞に特徴的なタンパク質を発現していること、心筋前駆細胞のマーカーとして報告されている CD230 (prion protein, Prp) を強く発現していることなどを明らかにした。培養中の ACMs を観察したところ、既に拍動している ACMs に対して小型で丸い形状の PrP 陽性細胞が遊走し融合することを見出した。このことから、ACMs は細

胞融合によって、より大型で複雑な形状の多核細胞に成長する可能性があると考えられた。免疫組織染色法によってマウス心室組織を調べたところ、PrP と cTnT を共発現する小型細胞が心室筋細胞の間に単独またはクラスター状で存在することがわかった。PrP 陽性細胞は血球系幹細胞マーカーである CD45 を発現していなかった。これらのことから、PrP/cTnT 陽性細胞は心筋前駆細胞の一種である可能性が示唆された。さらに、ヒト心室組織においても、PrP/cTnT 陽性細胞が心室筋細胞の間に存在することを明らかにした。

4. 構造の多様性に立脚した糖鎖機能の解明に向けて

2013年11月14日－11月15日

代表・世話人：古川 清（長岡技術科学大学大学院・工学研究科）

所内対応者：池中一裕（生理学研究所・分子生理研究系）

(1) タンパク質の糖鎖修飾の場と機能

古川 清（長岡技術科学大学大学院・工学研究科）

(2) 比較糖鎖生物学：これからの開拓領域

鈴木詔子（東京大学大学院・新領域創成科学研究科）

(3) 糖鎖機能の解明に向けた糖タンパク質精密化学合成

梶原康宏（大阪大学大学院・理学研究科）

(4) 糖鎖研究のための1分子イメージングの可能性と課題

鈴木健一（京都大学・iCeMS）

(5) 糖脂質マイクロドメインの構造解明における新規アプローチ

樺山一哉（東海大学・糖鎖科学研究所）

(6) ケラタン硫酸による脊髄発生の制御

橋本弘和（生理学研究所・分子神経生理）

(7) プロテオグリカン研究の魅力～細胞の分化を制御するコンドロイチン硫酸

北川裕之（神戸薬科大学薬学部・生化学研究室）

(8) 脳内新規シアル酸含有糖鎖の構造と機能解析

鳴海麻衣（生理学研究所・分子神経生理）

(9) 線虫 *C. elegans* でこそわかる糖鎖の機能の解析

野村一也（九州大学大学院・理学研究院）

(10) GON ドメインによる ER-Golgi 輸送制御と2型糖尿病における意義

三谷昌平（東京女子医科大学・医学部・第二生理学教室）

(11) ゴルジタンパク質のゴルジ体形成における機能解析

佐藤あやの（岡山大学大学院・自然科学研究科）

(12) 糖鎖を見る：分子模型からムービーへ

加藤晃一（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・生命動秩序形成研究領域,
名古屋市立大学大学院・薬学研究科）

(13) 大規模ターゲットプロテオミクスによる細胞内ネットワーク構造解明

松本雅記（九州大学・生体防御医学研究所・トランスオミクス医学研究センター）

(14) 多様性の中に存在する糖鎖の厳密な発現制御

岡 昌吾（京都大学大学院・医学研究科・人間健康科学系専攻）

【参加者名】

古川 清（長岡技術科学大学大学院・工学研究科）、池中一裕（生理学研究所・分子生理研究系）、鈴木詔子（東京大学大学院・新領域創成科学研究科）、梶原康宏（大阪大学大学院・理学研究科）、鈴木健一（京都大学・iCeMS）、樺山一哉（東海大学・糖鎖科学研究所）、橋本弘和（生理

学研究所・分子神経生理）、北川裕之（神戸薬科大学薬学部・生化学研究室）、鳴海麻衣（生理学研究所・分子神経生理）、野村一也（九州大学大学院・理学研究院）、三谷昌平（東京女子医科大学・医学部・第二生理学教室）、佐藤あやの（岡山大学大学院・自然科学研究科）、加藤晃一

(自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・生命動秩序形成研究領域, 名古屋市立大学大学院・薬学研究科), 松本雅記 (九州大学・生体防御医学研究所・

トランスオミクス医学研究センター), 岡 昌吾 (京都大学大学院・医学研究科・人間健康科学系専攻)

【概要】

糖転移酵素遺伝子のクローニング, それに引き続く遺伝子のノックアウトマスの作製と表現型の解析は, 当初予想をもしていなかった機能が, タンパク質や脂質に結合した糖鎖に刻まれていることを明らかにしてきた。しかしながら, 昨今の糖鎖生物学の研究では機能をもち構造に興味が集申し, そうしたところで統合生物学的思考が形成されつつある。糖質研究の高まりをさらに堅実なものとするために, 本研究会では自然界における糖鎖の姿を今一度多面的に見つめ直した。講演では, 新たな構造をもつ糖鎖の発見と新たな機能への期待, 生物の進化・多様化の中で自己と非自己の識別に糖鎖がインターフェイスとして機能してきたこと, タンパク質の疎水面を被覆するために糖鎖は結合していること, 糖脂質は二量体を形成しその糖鎖を介して受容体分子を制御していること, グリコサミノグリカン鎖の硫酸基がモルフォゲンやE-カドヘリンと結合し, 細胞の増殖分化を制御して

いること, ゴルジのタンパク質が自身の組織化や細胞内輸送を制御していること, 特定の糖鎖発現が細胞内輸送経路の分別に関与している可能性などが報告され, 活発に討論された。こうした糖鎖の機能や糖鎖が関与する生物現象をさらに掘り下げるためには, タンパク質に結合した糖鎖の揺らぎ, 細胞膜の流動性, 生物現象に対応して変化する細胞内ネットワークのダイナミクスを視野に入れた研究が重要であり, 本研究会でこれらの研究視点からの発表もあり, 糖鎖の動態など予想外の情報がもたらされた。さらに, 研究会終了後総合討論会をもち, 糖鎖のもつ性質を構造面から「硫酸コード (糖鎖は硫酸基をちりばめる屋台骨で, 硫酸基の散在の仕方で異なる機能が発現)」, またその機能を「識別・分別コード」, 「被覆コード」, 「自己組織化コード」といった視点で糖鎖の姿を捉え, 糖鎖機能への考え方を改めて見つめ直す絶好の機会となった。

(1) タンパク質の糖鎖修飾の場と機能

古川 清 (長岡技科大大学院・工学研究科)

哺乳動物では見られない (失われた) 個体再生などの機能は, 他の動物門の生物で維持されている。マウスの発生成長分化に N-型糖鎖が必須であるが, 発生分化と似た機構をとる再生に関しては糖鎖の機能は不明である。個体再生能をもつプラナリアやミミズを蛍光標識をしたレクチンを用いて全個体染色を行うと, 再生部位で染色性の変化が観察された。そこでこれらの生物の N-型糖鎖の構造を解析すると, 主としてオリゴマンノース型糖鎖で, キシロース, フコース, メチル基を中心とした多様

な修飾が見られた。こうした固有の修飾が再生に関与するかどうか, 今後の課題である。

N-型糖鎖修飾は主として細胞膜や細胞外マトリクスを構成するタンパク質で見られるが, 我々は細胞核ヒストンタンパク質の一部が N-型糖鎖修飾を受けていることを見出した。ヒストン H1, H2A, H2B, H3, H4 のいずれの分子種でもその 5%ほどに N-型糖鎖が結合しており, その機能や生合成経路に興味が持たれる。

(2) 比較糖鎖生物学：これからの開拓領域

鈴木詔子（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

生物が進化・多様化する過程で形成された糖鎖構造の多様性を調べ、“糖鎖の歴史”という観点から糖鎖の機能を探る道を開拓する。演者らは、これまでにハトなどある種の鳥類に発現が報告されていた 2 つの糖鎖抗原、Gal α 1-4Gal および Gal β 1-4Gal に関する研究を行ってきた。これらの糖鎖抗原は、哺乳類には発現が見られない一方、ある種の魚類や両生類などにも発現されている。すなわち、これらの糖鎖抗原の発現が、脊椎動物の進化・多様化の過程で何らかの理由により取捨選択されたと考えられる。その理由の一つとして、自己-非自己の境界面に局在する糖鎖が巧妙なインターフェイスとして利用され

ていることが挙げられる。例えば、Gal β 1-4Gal は、メダカの組織において外皮や内皮、上皮など外部と接触する部位に強く発現が見られ、異物に対する防御壁として機能している可能性がある。鳥類や魚類は、人々の大切な食材でもあり、これらの生物が発現する様々な糖鎖と感染症との関係を調べることは、学術的にも社会的にも意義は大きい。ヒトや哺乳類、モデル動物で得た糖鎖機能の知見や解析技術を生かしつつ、研究対象生物を拡大すれば、未知の糖鎖構造の発見や、生物種特異的に発現される糖鎖の機能解明に繋がると期待できる。

(3) 糖鎖機能の解明に向けた糖タンパク質精密化学合成

梶原康宏（大阪大学大学院・理学研究科）

本研究では、ヒト型糖鎖をもつ様々な糖タンパク質を化学合成し、その糖鎖機能について考察した。合成のために、まず標的とする糖タンパク質主鎖を幾つかのペプチドセグメントならびに糖ペプチドセグメントにわけて、それぞれ固相合成により調製した。そして、**native chemical ligation** を利用して連結し全長に相当する糖ペプチド鎖を得、そしてフォールディング操作をおこなうことで正しい 3 次元構造をもつ糖タンパク質を精密に化学合成した。糖鎖については、複合型 2 分枝シアリル糖鎖ならびに **M9** 型のハイマンノース型糖鎖を糖鎖-Asn として鶏卵より単離し、ペプチド固相合成に利用することで、それぞれの糖鎖をもつ糖タンパク質を合成した。シアリル糖鎖をもつ例としては、エリスロポエチン、イン

ターフェロン β などを合成し、その血中安定性、生理活性を調べたところ、シアリル糖鎖はタンパク質の溶解性に大きな影響を与え、その結果タンパク質活性に影響を与えることを確認した。また、ハイマンノース型糖鎖をもつ糖タンパク質では、その正しい 3 次元構造体とミスフォールド体を作り分けた。そして小胞体内フォールディングセンサー酵素 **UGGT** との相互作用を調べたところ、**UGGT** はミスフォールドによりタンパク質表面に提示される疎水性アミノ酸を認識し、ミスフォールド体と判断していることを確認した。今後様々な糖タンパク質を化学合成し、糖鎖機能を化学の視点で明らかにしていく予定である。

(4) 糖鎖研究のための 1 分子イメージングの可能性と課題

鈴木健一（京都大学・iCeMS）

細胞膜上の脂質ラフトは、シグナル伝達のためのプラットフォームとして注目されてきた。しかし、その構

造や機能はいまだ議論が続いている。糖脂質ガングリオシドは、ラフトの主要成分であるとされているが、今ま

で天然のものと同じように振舞うプローブが存在しなかったため、生細胞膜上での動的挙動はまったくわかっていなかった。本講演では、岐阜大・木曾研究室との共同研究によりガングリオシドの蛍光プローブを作製することに成功したことが示された。さらに生細胞膜上での1分子イメージングにより、ガングリオシドはそれぞれコレステロールにより安定化されたホモダイマーを一時

的に形成し、短寿命のホモダイマーラフトともいうべき構造を形成することが示された。さらにガングリオシドのホモダイマーラフトは、EGF受容体活性制御に重要であり、特にホモダイマーラフトとEGF受容体間の糖鎖相互作用が重要であることが示された。また本講演では、糖鎖研究において、1分子イメージングが貢献できる点、これから克服すべき課題について議論した。

(5) 糖脂質マイクロドメインの構造解明における新規アプローチ

樺山一哉（東海大学・糖鎖科学研究所）

我々は糖脂質マイクロドメインの機能および構造の解析に向けて、生化学・分子生物学的手法の他に、蛍光顕微鏡によるライブセルイメージング、電子顕微鏡による局在および構造観察、質量分析装置による網羅的脂質解析などを組み合わせて、細胞膜脂質の組成変化が起こす様々な現象をダイナミックに捉えていきたいと考えている。最近の成果としては、コレステロールを除去することでインスリン受容体の膜流動性が低下することを、FRAP法を用いて計測している。また、界面活性剤と糖

脂質の簡便かつ迅速な分離法を開発することで、マイクロドメイン画分に存在する糖脂質の詳細な質量分析に成功している。さらには、マイクロ流体デバイスを用いた層流イメージングなどを新たな解析ツールにすべく研究を進めている。これらの解析手法を細胞膜脂質の役割解明に積極的に取り入れて行くことで、病態における細胞膜矯正療法ともいうべき新たな治療戦略を構築していきたい。

(6) ケラタン硫酸による脊髄発生の制御

橋本弘和（生理学研究所・分子神経生理）

Wnt や Shh といったモルフォゲンは胎生期脊髄のパターニングや発生に関与し、酸性糖鎖と結合しやすい事が知られている。本研究ではケラタン硫酸による胎生期脊髄の発生に着目し解析を行なった。胎生期脊髄において高硫酸化ケラタン硫酸は Floor plate や Notochord に発現していた。そこでケラタン硫酸の役割を検討するために、ケラタン硫酸欠損マウスの解析を行なった。胎生 12.5 日において pMN ドメインを含むドメイン構造が腹側にシフトしていた。この pMN ドメインは発生初期に

Motorneuron を産生するが胎生 12.5 日から Oligodendrocyte の産生へと変化する。ケラタン硫酸欠損マウスにおいてこの Oligodendrocyte 前駆細胞数が著しく減少していた。一方で Motorneuron の産生は増加していた。そこで pMN ドメインにおける Motorneuron から Oligodendrocyte 産生のスイッチングに関わる遺伝子の変化を観るとスイッチングの異常が認められた。よってケラタン硫酸が胎生期脊髄発生、特にオリゴデンドロサイト分化へ重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

(7) プロテオグリカン研究の魅力～細胞の分化を制御するコンドロイチン硫酸

北川裕之 (神戸薬科大学薬学部・生化学研究室)

コンドロイチン硫酸鎖は、様々な細胞増殖因子や細胞外マトリックス成分と相互作用し、細胞接着、移動、増殖、分化、形態形成といった様々な細胞活動を制御している。これらコンドロイチン硫酸鎖の機能発現は、生合成によって厳密に調節されていると考えられている。実際、コンドロイチン硫酸鎖の生合成に関与する酵素遺伝子の変異が、様々な疾患を引き起こすことも見いだされている。しかしながら、コンドロイチン硫酸鎖の作用機構には不明な点も多く残されている。

最近我々は、「コンドロイチン硫酸鎖がリガンドとして受容体を活性化する」というコンドロイチン硫酸鎖の新しい作用機構をいくつか報告してきた。本発表では、コンドロイチン硫酸鎖含むグリコサミノグリカン多糖が欠損したマウスの胚性幹 (ES) 細胞を用い、コンドロイチン硫酸鎖が E-カドヘリンと結合することにより細胞内にシグナルを伝えること、そしてコンドロイチン硫酸鎖が ES 細胞の初期の分化段階において未分化な状態を脱する引き金として機能していることを報告した。

(8) 脳内新規シアル酸含有糖鎖の構造と機能解析

鳴海麻衣 (生理学研究所・分子神経生理)

我々は「シアル酸化糖鎖構造 6-sialyl-Lewis C を介した細胞間相互作用が脳内で果たす機能の解明」を目的とし研究を行っている。成体マウス脳に発現する「6-sialyl-Lewis C 構造含有 N 結合型糖鎖」のコア構造である A2G'2F のシアル酸化パターンを明らかにした。また、成体マウス脳における糖転移酵素遺伝子の mRNA 発現をインサイチュハイブリダイゼーションで検討した。これらの結果から、マウス脳ニューロンでは

6-sialyl-Lewis C 構造の合成に ST6GalNAcIV と β 3GalTII が関与することが示唆された。さらに微量糖鎖の解析技術を応用し、マウス脳由来膜タンパク質を SDS-PAGE で展開したゲルからの糖鎖の抽出、解析を行なった。これにより、6-sialyl-Lewis C 構造付加糖蛋白質の候補としてカルレティキュリン (CRT) を同定した。今後はマイクロリアによる脳内細胞の貪食に 6-sialyl-Lewis C 構造付加 CRT が与える影響に焦点を当てて研究を進める。

(9) 線虫 *C. elegans* でこそわかる糖鎖の機能の解析

野村一也 (九州大学大学院・理学研究院)

線虫 *Caenorhabditis elegans* は優れたモデル生物であり、その糖鎖科学の研究における有用性を紹介した。私達は、産総研の糖鎖遺伝子データベース GG-DB (GlycoGeneDataBase) に掲載されているヒト糖鎖遺伝子のオーソログ遺伝子を線虫ゲノムから全て選び出し、並行して *in silico* クローニング法による線虫糖鎖遺伝子同定をすすめてそれらの成果を線虫糖鎖遺伝子データベース (CGGDB: *C. elegans* GlycoGene Database) としてまとめた (近日公開予定)。こうして作り上げた線虫糖鎖

遺伝子リストをもとにして、全糖鎖遺伝子に対する RNAi を行い、また欠失変異体株を取得するなどして糖鎖遺伝子の機能阻害が発生や形態形成にどんな影響を及ぼすかを網羅的に検討した。その成果から今回はコンドロイチン、スフィンゴ糖脂質、GPI アンカー、N-型糖鎖の合成遺伝子の機能阻害結果について報告した。特に糖鎖遺伝子の機能阻害が体細胞分裂や減数分裂異常をひきおこし、また配偶子幹細胞ニッチの維持に不可欠であることを紹介して、糖鎖が幹細胞分裂の維持や細胞分裂制

御に必須であるという新パラダイムを提唱した。CGGDB についても簡単に紹介し、CRISPR-Cas9 のシステムなどを利用することで、線虫による糖鎖研究が今後のプレイ

クスルーをもたらしうることを紹介して議論の材料とした。

(10) GON ドメインによる ER-Golgi 輸送制御と 2 型糖尿病における意義

三谷昌平（東京女子医科大学・医学部・第二生理学教室）

ADAMTS9 遺伝子は、GWAS によって 2 型糖尿病感受性遺伝子であると言われているマトリックスメタロプロテアーゼ分子をコードしている。線虫のオーソログである gon-1 遺伝子の機能低下では、生殖腺の増殖と形態形成に異常が認められた。この表現型は Oligosaccharyl-transferase の機能阻害と似ており、小胞体機能の異常と関連を示唆し、しかもプロテアーゼではなく、C 末端に存在する GON ドメインと呼ばれる部分に依存していることが明らかになった。さらに、GON ドメインに小胞体局在シグナルを付与したものの活性が確認され、分泌蛋白質や膜蛋白質の小胞体から Golgi 体への輸送が障害されることが分かった。この現象は哺乳類細胞でも再現さ

れ、温度感受性 VSVG を指標にすると、ADAMTS9 阻害下で小胞体に蓄積が見られた。一方、哺乳類に線虫の GON ドメインの cDNA を導入することで回復した。線虫 GON ドメインのアミノ酸配列は保存されているが、塩基配列の違いにより、ヒト ADAMTS9 に対する siRNA による分解を受けずに作用できたこと、GON ドメインによる小胞体から Golgi 体への輸送の制御機能が明らかになった。哺乳類細胞株で ADAMTS9 の機能阻害を行うと、2 型糖尿病の特徴である β 細胞でのインスリン分泌能の低下と脂肪細胞、骨格筋細胞、肝臓細胞等の末梢細胞でのインスリン抵抗性が再現された。

(11) ゴルジタンパク質のゴルジ体形成における機能解析

佐藤あやの（岡山大学大学院・自然科学研究科）

細胞の中で作り出された様々な物質を正しい目的地へと送り届けるため、細胞内には細胞内輸送とよばれる物流システムが存在する。この物流は、主に小胞を介して行われると考えられている。細胞が作り出す全タンパク質のうち、およそ 1/3 は、小胞体の中で作られ、物流システムに乗せられ、次の目的地であるゴルジ体へ輸送される。この小胞体からゴルジ体への輸送は、COPII と呼ばれる小胞によって媒介されている。ゴルジ体は、小胞体から輸送されたタンパク質に糖鎖修飾などの化学修飾を施し、最終目的地への荷札をつける役割を担う。ゴルジ体周辺では、COPI と呼ばれる小胞による輸送が重要であると考えられている。

我々は、輸送に中心的な役割を果たす細胞内小器官で

あるゴルジ体と、その周辺輸送を司る COPI 小胞の研究を進めてきた。そして、COPI 小胞の種別化にゴルジタンパク質ファミリーが関与することを見出した。本研究では、ゴルジファミリーに属する、Giantin が輸送にどのように関与するかを明らかにし、輸送の分子機構の理解へ繋げることを目的とした。siRNA を用いた Giantin のノックダウンを行い、Giantin 欠損細胞で、1) 細胞内輸送 (SEAP secretion assay, VSVG transport assay), 2) 細胞表面の糖鎖構造 (蛍光標識レクチンを使用), 3) 微小管重合阻害剤の影響がどのように変化するかを解析した。これらの解析結果から、Giantin はゴルジ体 stack の組織化を介して輸送を調節すると考えられた。

(12) 糖鎖を見る：分子模型からムービーへ

加藤晃一（自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・生命動秩序形成研究領域，
名古屋市立大学大学院・薬学研究科）

構造生物学研究の進展により，糖鎖とタンパク質（レクチン）の複合体の 3 次元構造は数多くの例が明らかとなっている。しかしながら，少なくとも遊離の状態にある糖鎖の 3 次元構造は水溶液中でダイナミックに揺らいでおり，糖鎖とタンパク質の相互作用のエナジेटクスを正しく理解するためには，こうした糖鎖の動態を定量的に解明する必要がある。本講演では，タンパク質の細胞内運命の決定にかかわる高マンノース型糖鎖を例にとり，糖鎖の安定同位体標識技術，ランタニドプローブ

を利用した常磁性 NMR 計測，レプリカ交換法による分子動力学計算を駆使することで，糖鎖のコンフォメーションのダイナミクスが原子レベルの動画として示された。これにより，マンノース 1 残基のトリミングが糖鎖の動的構造に及ぼす影響が明らかになった。講演の中では，糖鎖の不均一性の中にみられる意外な均一性の問題や生命分子の動的秩序形成と高次機能発現に関するプロジェクトも紹介された。

(13) 大規模ターゲットプロテオミクスによる細胞内ネットワーク構造解明

松本雅記（九州大学・生体防御医学研究所・トランスオミクス医学研究センター）

細胞の癌化には活発な増殖状態に加えて，様々な細胞機能の変化が生じている。例えば，古くから癌細胞において好氣的条件下での解糖亢進（Warburg 効果）が知られている。癌関連遺伝子の変異に端を発する癌化シグナルは，細胞内ネットワークを変化させ，様々な生命機能に影響を与えていると考えられているが，その全体像は不明である。このような細胞内ネットワークの構造変化を調べるためにはタンパク質の精密かつ網羅的な解析法の確立が求められている。

われわれは，大規模な組み換えタンパク質ライブラリーと高感度定量技術である MRM 法を組み合わせた，

新規タンパク質定量解析法である iMRM (information based MRM) 法を独自に開発した。本方法によってヒト正常繊維芽細胞における約 600 種類の代謝酵素の絶対量計測が可能であり，その発現量ダイナミックレンジは 5 ～6 桁に及ぶことが判明した。さらに，各種癌原遺伝子の導入による代謝経路への影響を iMRM 法によって定量化解析したところ，癌化細胞においていくつかの解糖系酵素の顕著な発現量増加に加えて，多数の代謝酵素の発現量変化が認められた。このように，細胞癌化プロセスによってタンパク質レベルでグローバルな代謝経路の再構築がおこっていることが明らかとなった。

(14) 多様性の中に存在する糖鎖の厳密な発現制御

岡 昌吾（京都大学大学院・医学研究科・人間健康科学系専攻）

糖タンパク質に存在する N-型糖鎖は小胞体で高マンノース型糖鎖として付加された後，ゴルジ体から細胞表面への輸送過程で様々な複合型糖鎖に変換され，最終的に糖タンパク質は細胞表面で多様な糖鎖を持つ。しかし，細胞表面に輸送された糖タンパク質の糖鎖は必ずし

もすべての糖鎖が複合型に変換される訳ではなく，高マンノース型糖鎖のまま細胞表面に発現することもある。また，特徴的な複合型糖鎖がタンパク質特異的，糖鎖付加部位特異的に発現することも知られている。従って，糖鎖には多様性があるが，その中に厳密な制御機構が存

在していることが予想される。このような制御機構については不明な点が多い。そこで本研究会では、我々が長年研究してきた神経系で高発現し、学習や記憶等の脳の高次機能に重要な役割を担っている HNK-1 糖鎖の発現

制御機構解析について発表し、その知見を基に、細胞内の輸送経路の違いが厳密な制御機構の手がかりとなり得るかについて議論した。

5. シナプス恒常性維持の分子基盤とその破綻

2013年6月6日－6月7日

代表・世話人：大塚稔久（山梨大学 医学部 生化学講座第一教室）

所内対応者：深田正紀（生体膜研究部門）

（1）神経伝達物質放出におけるアクティブゾーンタンパク質 CAST の機能

小林静香（東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク分野）

（2）神経筋接合部シナプスの成長過程におけるアクティブゾーン密度の維持と老化による衰退

西宗裕史（University of Kansas School of Medicine, Department of Anatomy and Cell Biology）

（3）新規遺伝子導入ツールの脳機能解析への応用

小林憲太（生理学研究所 脳機能計測・支援センター ウイルスベクター開発室）

（4）神経分泌蛋白質 LGI1 の変異を原因とする“てんかん”の分子病態機構の解明と治療法の開拓

横井紀彦（生理学研究所 生体膜研究部門）

（5）シナプス可塑性による海馬回路活動の制御

北西卓磨（京都大学 白眉センター 松尾研究室）

（6）情動記憶制御における扁桃体中心核シナプス可塑性の生理的意義と分子機序

渡部文子（東京慈恵医科大学 神経科学研究部 神経生理学研究室）

（7）自閉症モデルマウスを用いた発症メカニズムの解明

定方哲史（群馬大学 先端科学研究指導者育成ユニット）

（8）脳の形成を司る細胞外因子リーリンのプロテオリシスによる機能制御機構の解明

河野孝夫（名古屋市立大学大学院 薬学研究科 病態生化学分野）

（9）補助サブユニットによるグルタミン酸受容体の機能制御

住岡暁夫（長寿医療研究センター 分子基盤研究部 標的治療開発室）

（10）シナプス接着分子 Neuroligin の神経活動依存性プロセッシング

富田泰輔（東京大学大学院 薬学系研究科 臨床薬学教室）

【参加者名】

深田正紀（生理学研究所）、深田優子（生理学研究所）、横井紀彦（生理学研究所）、大川都史香（生理学研究所）、高橋直樹（生理学研究所）、村上達郎（生理学研究所）、関谷敦志（生理学研究所）、澤田明宏（名古屋大学院）、増田博紀（名古屋大学）、中尾章人（京都大学）、澤村晴志朗（京都大学大学院）、松尾直毅（京都大学）、北西卓磨（京都大学）、平野 満（京都大学大学院）、山口一真（京都大学）、尾藤晴彦（東京大学）、秋 明貞（東京大学）、富田泰輔（東京大学大学院）、大塚稔久（山梨大学）、小林憲太（生理学研究所）、黒田啓介（名古屋大学）、真

野善有（名古屋大学大学院）、木下 専（名古屋大学）、定方哲史（群馬大学）、真鍋俊也（東京大学）、小林静香（東京大学）、植村 健（信州大学）、西宗裕史（University of Kansas）、渡部文子（東京慈恵会医科大学）、河野孝夫（名古屋市立大学）、服部光治（名古屋市立大学）、住岡暁夫（国立長寿医療研究センター）、狩野方伸（東京大学）、佐野慶和（東京大学）、森 大輔（名古屋大学大学院）、橋本浩一（広島大学）、奥慎一郎、山肩葉子（生理学研究所）、吉村由美子（生理学研究所）、山本真理子（名城大学）、畠中由美子（生理学研究所）

【概要】

学習や記憶、情動の発現などの脳高次機能が正常に働くためには、脳内の神経回路網での適切な情報処理が不

可欠である。この情報伝達の要がシナプスであり、内的・外的要因によるシナプス応答のメカニズム（恒常性維持

の分子基盤)の解明は、基礎的神経科学の発展のみならず、最終的には、気分障害、自閉症や統合失調症といった精神神経疾患の発症機序の理解に繋がると考えられる。一方で、シナプスに着目した研究においても、扱う対象生物(線虫、マウス、ヒトなど)、用いる実験技術の種類や規模が年々多様化しており、一研究室が全てを担うことは困難である。そこで、シナプス研究を分子から個体

レベルまで統合的に解析し、正常機能とその破綻がどのような疾患・障害につながるかを明らかにするために、第一線で活躍する様々なバックグラウンドを持った研究者を招聘し、かつ演題数を絞込むことで、十分な質疑応答の時間をとる。そして、そこから次世代の新たなテーマの発掘、新分野の創設につながるような共同研究を見出すことも今ひとつの目的である。

(1) 神経伝達物質放出におけるアクティブゾーンタンパク質 CAST の機能

小林静香 (東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク分野)

中枢神経系シナプスのシナプス前終末に存在するアクティブゾーンは、神経伝達物質放出のために機能的に特化した領域である。このアクティブゾーンを構成する cytomatrix at the active zone (CAZ) には、RIM1, Munc13-1, Piccolo および Bassoon などの複数のタンパク質が存在し、これらが互いに結合・協調しながらアクティブゾーンの構造形成・機能維持に重要な役割を果していると考えられてきた。近年、新たな CAZ タンパク質として CAST (CAZ-associated structural protein) が同定されたが (Ohtsuka et al., 2002), この分子の機能的役割についてはいまだ不明な点が多い。そこで我々は、アクティブゾーンにおける CAST の機能について検討するため CAST 欠

損マウスを作製し、神経伝達物質放出ならびにシナプス可塑性における表現型を中心に解析を行った。その結果、CAST 欠損マウスではシナプス前性の短期可塑性に障害が認められ、神経伝達物質放出確率の低下およびエンドソームを介したシナプス小胞リサイクル過程の変化が示唆された。さらに、この変異マウスでは、1 シナプス小胞当たりに充填されているグルタミン酸量が増加したことに起因する、量子サイズの増大が認められた。本セミナーでは、これら CAST 欠損マウスの解析結果を中心に、正常な神経伝達が行われる上で CAST が果している機能的役割について考察したい。

(2) 神経筋接合部シナプスの成長過程におけるアクティブゾーン密度の維持と老化による衰退

西宗裕史 (University of Kansas School of Medicine, Department of Anatomy and Cell Biology)

プレシナプスのアクティブゾーンはシナプス小胞が形質膜に融合する部位であり、シナプス伝達において重要な機能を担っている。マウス神経筋接合部では、生後2ヶ月間にシナプスの面積が約3倍増大し、1つのシナプス終末内に離散分布するアクティブゾーンの数も増大する。興味深い事に、シナプス前終末が肥大し形態を複雑化させている生後2ヶ月間、アクティブゾーンの密度はほぼ一定に保たれる。このようなアクティブゾーン密度は中枢神経系の大型シナプス (Calyx of Held) でも、一定に保

たれる傾向がある。アクティブゾーン密度維持は以下への寄与が考えられる: 各アクティブゾーンでの Ca^{2+} イオン濃度緩衝作用とシナプス小胞アクセスの維持、シナプス間隙での伝達物質濃度と除去の調節、シナプス後膜のレセプター分布の均質化。

では、アクティブゾーン密度の保事に寄与している分子メカニズムは何か? 神経筋接合部では、プレシナプスオーガナイザーであるラミニン $\beta 2$ が、その特異的受容体である電位依存性カルシウムチャネルの細胞外ドメイ

ンに結合してチャンネルをポストシナプスの junctional fold 上方に定着させる。また、カルシウムチャンネルの細胞内ドメインがアクティブゾーン特異的蛋白質に結合し、その足場になる事でアクティブゾーン蛋白質複合体を形成しシナプス小胞融合部位を形成する。このモデルは、リガンドであるラミニン $\beta 2$ 欠損マウスやレセプターである電位依存性カルシウムチャンネルの P/Q-type/N-type ダブルノックアウトマウスの表現型が支持している。さらに、アクティブゾーン特異的蛋白質 Bassoon は結合した P/Q-type 電位依存性カルシウムチャンネルの不活性化を調整することから、シナプス伝達の効率を改善していると考えられる。

さらに、アクティブゾーン密度は生涯保持されるのか？老化マウスの神経筋接合部ではアクティブゾーン特異的蛋白質 Bassoon の量が極端に低下し、一部のシナプ

スでは検出限界以下になる。このようなアクティブゾーン数の低下がシナプス伝達効率を低下させる事は、Pierson syndrome 患者、ラミニン $\beta 2$ や Bassoon 欠損マウスの表現型が支持している。幸いなことに、老化神経筋接合部の Bassoon 低下は、筋肉の運動により改善する。老化ラットを 2 ヶ月間トレーニングすると、老化神経筋接合部の Bassoon の免疫組織染色信号強度は若い成熟ラットのそれと同じレベルに改善される。トレーニング後は、より強い筋力を示す傾向があるので神経筋接合部の機能改善に寄与したと考えられる。これらの結果は、シナプス伝達に必須な役割を果たすアクティブゾーンは可塑的な構造体であり、ラミニン等の分子メカニズムによる維持される必要があり、老化や Pierson syndrome 等の病的状況においてその分子メカニズムが破綻し、シナプス機能が阻害されることが考えられる。

(3) 新規遺伝子導入ツールの脳機能解析への応用

小林憲太 (生理学研究所 脳機能計測・支援センター ウイルスベクター開発室)

脳機能は、複雑な神経回路網によって制御されている。脳機能を理解するためには、複雑な回路網を構成する特定の神経路が持つ役割を詳細に解析する必要がある。最近、我々は、げっ歯類と霊長類の中枢神経系において、軸索の末端より感染して細胞体へと逆行性に輸送されてから導入遺伝子を発現する改良型レンチウイルスベクター (高頻度逆行性遺伝子導入ベクター) の開発に成功した。高頻度逆行性遺伝子導入ベクターを利用することにより、ある任意の神経領域に投射する特定神経路の機

能解析を行うことが出来る。さらに、我々は、高頻度逆行性遺伝子導入ベクターとアデノ随伴ウイルスベクターを組み合わせた二重遺伝子導入システムの開発にも成功した。このシステムを用いることによって、特定神経路で特異的に導入遺伝子を発現誘導することが可能となる。本セミナーでは、高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの性質と二重遺伝子導入システムの原理について解説すると共に、実際にこれらの遺伝子導入ツールを利用した研究を紹介する。

(4) 神経分泌蛋白質 LGI1 の変異を原因とする“てんかん”の分子病態機構の解明と治療法の開拓

横井紀彦 (生理学研究所 生体膜研究部門)

“てんかん”は罹患率 1%程度の頻度の高い神経疾患であり、激しいけいれんや意識消失、時には幻覚・幻聴などを伴う。てんかんは神経細胞および神経回路の異常な興奮により引き起こされると考えられているが、その

病態、病因は不明な点も多い。LGI1 は神経分泌蛋白質であり、家族性側頭葉てんかんの患者で 30 種以上の変異が報告されている¹⁾。また、記憶障害やけいれんを主な症状とする辺縁系脳炎を引き起こす自己抗体の主要な標的

としても報告されており²⁾, LGI1 がヒトの脳や神経細胞の興奮性の制御に重要な役割を担うことは明白である。これまでに、我々は LGI1 ノックアウトマウスが生後三週以内にてんかん発作の重積により全て死亡することを示し、LGI1 が神経膜蛋白質 ADAM22 および ADAM23 のリガンドとして機能し、AMPA 受容体機能を促進することを見出した^{3,4)}。しかし、LGI1 の生理機能と、LGI1 変異体による分子病態は未だ明らかではなかった。我々は LGI1 の変異を原因とするてんかんの分子病態を明らかにするため、ヒトでてんかんを引き起こす LGI1 の変異体を分泌不全型と分泌型に分類し、それぞれの変異体を発現する LGI1 変異マウスを作成し、マウス脳内での LGI1 変異体の機能欠損を生化学的、組織化学的に調査した。その結果、野生型 LGI1 がシナプス間隙へ分泌され、ADAM22, ADAM23 と結合するのに対し、分泌不全型

LGI1 変異体は構造異常のために小胞体に留まり、最終的には分解されること、分泌型 LGI1 変異体は ADAM22 との結合が選択的に阻害されていることを見出した。以上の結果は LGI1 の変異によって引き起こされるてんかんが、分泌不全や蛋白間相互作用不全を原因とする構造的病（conformational disease）であること、そして、LGI1-ADAM22 タンパク質複合体を起点とした脳の興奮メカニズムの重要性を示すものであった。さらに我々は LGI1 の構造異常を標的とした、てんかん治療法の開拓の取り組みも行っており、合わせて報告したい。

1) Kalachikov et al. Nat. Genet. 30: 335, 2002.

2) Lai et al. Lancet Neurol. 9: 776, 2010.

3) Fukata Y, et al. Science 313: 1792, 2006.

4) Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 3799, 2010.

(5) シナプス可塑性による海馬回路活動の制御

北西卓磨（京都大学 白眉センター 松尾研究室）

新しい場所 —たとえば学会会場— を訪れたとき、しばらく歩き回れば、私達はすぐに通路や部屋の位置関係を覚えらる。こうしたすばやい記憶獲得の最中に、神経回路はどのような情報処理を行うのだろうか？

シナプス可塑性は、神経細胞が記憶学習にともない新たな情報を獲得する仕組みだと考えられている。しかし、生じた可塑的变化が、周囲の神経活動をどう制御するのかは、あまり知られていない。

私達は、ウイルスベクターとマルチユニット記録を組み合わせた手法を開発し、シナプス可塑性が、海馬の場所細胞（place cell）の発火パターンをどう制御するかを調べた。この手法では、遺伝子改変を局所的に行うことで、従来の遺伝子改変動物等における脳機能全般や動物行動の変化の影響を排し、行動中の動物において局所神経回路の作動メカニズムを単離できる。具体的な手順としては、シナプス可塑性を阻害する GluR1-c-tail 遺伝子を、ウイルスベクターを用いて片側のラット CA1 野に局所導入し、遺伝子導入された神経細胞と、反対側同部位

の野生型細胞の発火活動をマルチユニット記録で一斉に計測した。その結果、GluR1-c-tail を発現した細胞群では、動物が新奇環境を探索するときの場所細胞活動（環境のなかの特定の場所を選択的な発火活動）の形成が遅くなることが分かった。さらに、この細胞群は、海馬の複数の投射経路のうち、CA3 野から CA1 野に伝播する脳波（slow gamma oscillation）に対してのみ、正確なタイミングで応答できなくなった。こうした結果から、海馬 CA3 → CA1 経路における GluR1 依存性シナプス可塑性が、CA1 野の場所細胞活動のすばやい形成に寄与すると考えられる。またこれらの結果は、シナプス可塑性が、細胞レベルでは神経細胞の発火パターンを調節するとともに、回路レベルでは特定の投射経路の情報伝達を増強するという、2 重の役割を持つことを示唆している。学習の最中に脳領域間の情報の流れをコントロールすることで、発火パターンの素早い形成を手助けするというのが、シナプス可塑性の一般的な役割かもしれない。

(6) 情動記憶制御における扁桃体中心核シナプス可塑性の生理的意義と分子機序

渡部文子 (東京慈恵医科大学 神経科学研究部 神経生理学研究室)

情動は、認知や意欲などの発現に深く関与するとともに、危険な場所や刺激を記憶・学習することで、個体の生存に重要な意義を持つ。扁桃体はこのような情動発現や情動依存的学習に中心的役割を担う。扁桃体の中でも外側外包中心核 (CeC) は痛み扁桃体とも呼ばれ、痛み侵害受容刺激の中継核である腕傍核 (lateral parabrachial nucleus: IPB) から直接的に入力を受ける一方、扁桃体基底外側核 (BLA) から入力を受ける。すなわち、CeC は、痛みの直接シグナルとしての IPB 入力と、皮質や視床で高次の処理を受けたマルチモダルな感覚シグナルとしての BLA 入力という、異なる二経路の「連合の場」とみなすことができる。

今回我々は、これら二経路のシナプス伝達が、恐怖記憶形成依存的に顕著なシナプス増強を起こすことを見出した。さらにこの二経路のシナプス伝達は恐怖記憶形成後においてのみ有意な相関を示したことから、連合学習による異シナプス間相互作用が示唆される。以上の結果から、CeC シナプス可塑性の情動記憶形成への関与が示され、橋の腕傍核という原始感覚入力の可塑性が恐怖記憶形成によって制御されることが明らかとなった。この

ような原始感覚中継核の高次脳機能への関与は、今までほとんど注目されてこなかったが、我々は IPB の活動が恐怖記憶の形成そのものに関与するという知見も得ており、IPB が教師シグナルとして機能することが示唆される。しかしながら一方、このような教師シグナルに可塑性があることは、一見むしろ有害であるように思われる。IPB-CeC シナプス増強は、様々な急性および慢性疼痛モデル動物などにおいても報告され、また小脳 LTD においても教師シグナルの可塑性が報告されているが、その生理的意義はほとんどわかっていない。そこで現在、IPB-CeC シナプス可塑性の生理的意義をモデルマウスを用いて検討中である。

以上、CeC が高次処理された感覚情報シグナルに「負情動」という情動的価値を付加する「連合の場」として示された。このことから、情動依存的連合学習には、複数の「連合の場」が階層的に存在し、それぞれの階層で異なるモダリティによる連合がホモシナプスおよびヘテロシナプス可塑性制御を介して複合的に形成されると考えられる。

(7) 自閉症モデルマウスを用いた発症メカニズムの解明

定方哲史 (群馬大学 先端科学研究指導者育成ユニット)

自閉症は、三歳までに発病する精神疾患として知られ、“対人関係における障害”、“言語などによるコミュニケーションの障害”、“興味の限局、反復的で常同的な行動”を特徴とした疾患である。CAPS2 は、分泌顆粒の分泌に関与する CAPS1 のホモログとして、我々が新規遺伝子としてクローニングし、小脳において BDNF を含む顆粒の分泌に関与していることなどが明らかになった。CAPS2 遺伝子はヒト 7 番染色体長腕部にある自閉症責任領域 (AUTS1) に位置しているため、我々は作製した CAPS2 KO マウスの行動解析を行った。その結果、社会性行動の異常、母性行動の異常、多動、新奇環境への適応力の低下、小脳 VI, VII 葉の低形成、プルキンエ細胞の

減少が見られ、自閉症で見られるような様々な形質を示すことが明らかになった。そこで、ヒト自閉症患者の血中における CAPS2 の発現を解析したところ、自閉症患者特異的に CAPS2 の exon3 がスキップしていることが分かった。この exon3 がスキップした欠損型 CAPS2 は、シナプス部に輸送されなくなることなどが判明した。これらの結果から、欠損型 CAPS2 の発現によって BDNF の局所的分泌が異常になり、これが神経ネットワークの形成異常につながる可能性が示唆された。

最近我々は CAPS2 exon3 スキップマウスを作製した。予備的なデータとして、exon3 がスキップした CAPS2 は、軸索に輸送されないこと、このマウスは新奇環境への適

応不全，不安の高進，社会性行動の異常を示すことが分かっている。自閉症関連遺伝子は多数報告されているが，ヒト・マウスで共通して強い関連が示されている遺伝子

は CAPS2 をおいて他にない。解剖学的・生理学的・行動学的形質を詳細に解析し，自閉症発症のメカニズムを解明する。

(8) 脳の形成を司る細胞外因子リーリンのプロテオリシスによる機能制御機構の解明

河野孝夫（名古屋市立大学大学院 薬学研究科 病態生化学分野）

哺乳類の脳皮質には，機能や構造が類似した神経細胞からなる層構造がある。この構造は，神経ネットワーク形成と機能を効率良く行うために重要であり，その破綻は，統合失調症や読字障害などの精神神経疾患発症の原因やリスクと考えられている。従って，層構造の形成機構を解明することは，これら疾患を理解する上で非常に重要である。

リーリンは，脳形成不全を呈するリーラーマウスの原因遺伝子産物として同定された巨大分泌蛋白質である。リーリンが神経細胞の移動を制御し，層構造形成に非常に重要な分子であることは明らかであるが，具体的な機能やその調節機構は明らかになっていない。

我々は，高度に保存されたリーリンの C 末端領域（CTR）に着目し研究を行い，リーリンは，CTR の内部で切断（プロテオリシス）を受けることを見いだした。

Proprotein convertase family のプロテアーゼがこの切断を担い，これにより C 末端から 6 アミノ酸残基を欠くリーリン（リーリン Δ 6）が生じる。リーリン Δ 6 に比べ，完全長 CTR を持つリーリンは，セマフォリンの受容体として知られる Neuropilin1 に結合しやすいことが分かった。また，Neuropilin1 は既知リーリン受容体である VLDLR と複合体を作り，完全長 CTR を持つリーリンの VLDLR への結合性を制御することが明らかになった。さらに，各種リーリン変異体の異所性発現系を用いた実験や，CTR 欠失リーリンを発現するノックインマウスの解析により，完全長 CTR を持つリーリンは，脳皮質上層の神経細胞の配置や，樹状突起発達に必要であることが明らかになった。以上より，リーリンの機能がプロテオリシスにより制御されることは，脳皮質形成を制御する上で必要であることが示唆された。

(9) 補助サブユニットによるグルタミン酸受容体の機能制御

住岡暁夫（長寿医療研究センター 分子基盤研究部 標的治療開発室）

グルタミン酸はヒトの脳で主要な興奮性の神経伝達物質である。イオンチャンネル型グルタミン酸受容体は，薬理学的に AMPA 型・NMDA 型・カイニン酸型に分類される。AMPA 受容体は興奮性シナプスの主に速い情報伝達を担い，NMDA 受容体は Ca^{2+} を透過しシナプスを修飾する。グルタミン酸受容体の機能制御の仕組みを明らかにすることは，シナプスと神経回路網によって担われる脳高次機能を理解する上で重要である。

近年，補助サブユニットがグルタミン酸受容体の機能を制御することが明らかになりつつある。補助サブユニットは，チャンネル孔を形成せず，チャンネル孔サブ

ユニットに結合し，チャンネルの性質や局在などを調節し，チャンネルの機能を制御する。AMPA 受容体補助サブユニットのプロトタイプである TARPs は AMPA 受容体の生理機能に重要な役割を担っている。自発的変異を発端とする TARPs の研究から，補助サブユニットによるグルタミン酸受容体の機能制御という，新たな一面が明らかになり，複数の研究グループによって新規な補助サブユニットの探索が試みられている。

従来の探索では，脳からグルタミン酸受容体の複合体を精製し，プロテオーム解析する手法が主に取られている。この方法では，生体内での複合体を維持する温和な

条件で、膜面分から効率的にグルタミン酸受容体を可溶化することが望まれる。しかし、グルタミン酸作動性の興奮性シナプスでは後シナプス側でシナプス後肥厚と呼ばれる密な構造体を形成しており、温和な条件下でこのシナプス後肥厚は不溶である。このため、シナプスに分布するグルタミン酸受容体を、複合体を維持し高効率で抽出・精製し、プロテオーム解析することは困難である。そこで、今回、私たちは、新たに FLIPR 法を利用した網

羅的な補助サブユニットの探索法を構築した。そして新規手法の評価を目的に、補助サブユニットの研究が進んでいる AMPA 受容体を対象に、補助サブユニットの探索を試みた。さらに、主にシナプス後肥厚に分布するためにプロテオーム解析が困難な NMDA 受容体を対象に、新規手法による補助サブユニットの探索を試みた。これらの研究成果について紹介したい。

(10) シナプス接着分子 Neuroligin の神経活動依存性プロセッシング

富田泰輔 (東京大学大学院 薬学系研究科 臨床薬学教室)

シナプスは二つの異なる神経細胞を繋ぎつつ、刺激に応じてダイナミックにその形態を変化させる、神経可塑性を支える素子である。近年になり、シナプス接続の構造的基盤を支える分子機構として、シナプス接着分子の重要性が示されつつある。これらシナプス接着分子はシナプスの種類や、ニューロトランスミッターによる伝導効率、すなわちシナプス強度を決定する。また、これら接着分子の機能や量の異常が、統合失調症や自閉症などの神経回路異常によって惹起される疾患の原因遺伝子もしくは遺伝的リスクとなることが明らかとなり、病的状態における神経接着因子の役割が注目を浴びている。本研究においては、強いシナプス誘導能を持つ接着分子 Neuroligin の代謝に着目し解析した。そして Neuroligin 1 が細胞外領域において ADAM10 によるシェディングを受け、その結果生じた C 末端断片が γ セクレターゼの基質となることを見出した。またリガンドである Neurexin

の結合や NMDA 受容体の活性化により、ADAM10 による Neuroligin 1 のシェディングが亢進したこと、そしてピロカルピン誘導性てんかんモデルにおいても Neuroligin 1 のプロセッシング亢進が観察されたことなどから、シナプス形成及び伝達過程において Neuroligin 1 プロセッシングが制御されていることが示された。さらにこれら切断産物を模倣した変異型 Neuroligin 1 の過剰発現の解析から、Neuroligin 1 の切断がそのスパイン形成能に対して負の制御を行なっていることが示唆された。一方、抑制性シナプスに局在する Neuroligin 2 は ADAM10 とは異なるメタロプロテアーゼによってシェディングされていることも明らかとなった。すなわち、これら接着分子がそれぞれのシナプスにおける神経活動依存性にプロセッシングを受けることで、シナプスの数や形態および機能の特異的に変化させていると考えられた。

6. 視知覚の現象・機能・メカニズム - 生理学的, 心理物理学的, 計算論的アプローチ

2013 年 9 月 12 日 - 9 月 13 日

代表・世話人：村上郁也（東京大学大学院人文社会系研究科）

所内対応者：小松英彦（生理学研究所）

(1) 弱視の症状理解と援助法の開発 心理物理学的アプローチ

前原吾朗（神奈川大学人間科学部）

(2) LIP 野ニューロンにおける感覚情報の蓄積スピードは課題によって変化する

宇賀貴紀（順天堂大学大学院医学研究科）

(3) 局所運動信号の関係性についての視覚処理過程

丸谷和史（NTT コミュニケーション科学基礎研究所）

(4) サル MT 野における奥行き運動(Motion-in-depth)選択性とそのメカニズム

眞田尚久（生理学研究所感覚認知情報研究部門）

(5) 視覚的顕著性の計算モデルの高度化と視線推定への応用

佐藤洋一（東京大学生産技術研究所）

(6) 色依存性の静止画が動いて見える錯視

北岡明佳（立命館大学文学部）

(7) 中心暗点を有する眼疾患患者の第一次視覚野反応

増田洋一郎（東京慈恵会医科大学眼科学講座）

(8) サル大脳皮質 V1 野および V4 野の機能構築：2 光子カルシウムイメージング法による解析

藤田一郎（大阪大学大学院生命機能研究科）

(9) 大脳皮質 MT/MST 野の活動は動く視覚刺激のフーリエ成分に依存する

三浦健一郎（京都大学大学院医学研究科）

(10) 聴覚随伴性視覚運動知覚の諸相

寺本 渉（室蘭工業大学情報電子工学系学科）

(11) 方位カラム形成再考：種差，視体験効果，臨界期

田中 繁（電気通信大学 脳科学ライフサポート研究センター）

(12) 尾状核尾部における情報統合と感覚運動変換

山本慎也（産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門）

(13) 知覚と運動における学習の干渉と固定化

四本裕子（東京大学大学院総合文化研究科）

(14) ネコ初期視覚系における刺激特徴選択性と刺激文脈依存的反応修飾

佐藤宏道（大阪大学大学院医学系研究科）

【参加者名】

前原吾朗（神奈川大学），宇賀貴紀（順天堂大学），丸谷和史（NTT コミュニケーション科学基礎研究所），佐藤洋一（東京大学），北岡明佳（立命館大学），増田洋一郎（東京慈恵会医科大学），藤田一郎（大阪大学），三浦健一郎（京都大学），寺本 渉（室蘭工業大学），田中 繁（電気通信大学），山本慎也（産業技術総合研究所），四

本裕子（東京大学），佐藤宏道（大阪大学），村上郁也（東京大学），鯉田孝和（豊橋技術科学大学），西田眞也（NTT コミュニケーション科学基礎研究所），金沢 創（日本女子大学），楊 嘉楽（中央大学），市川寛子（中央大学），佐藤夏月（中央大学），栗木一郎（東北大学），篠崎隆志（情報通信研究機構），天野 薫（情報通信研究機構），

湯浅健一 (東京大学), 山岸典子 (情報通信研究機構/大阪大学/ATR 脳情報通信総合研究所), 谷川 久 (新潟大学), 谷藤 学 (理化学研究所), 日比野奈美香 (東京工業大学), 坂井友洋 (東京工業大学), 由良浩己 (東京工業大学), 張 聡 (東京工業大学), 永福智志 (福島県立医科大学), 寺尾将彦 (東京大学), 伊藤 南 (東京医科大学), 田嶋達裕 (理化学研究所), 野口泰基 (神戸大学), 平松千尋 (九州大学), 須田悠紀 (順天堂大学), 山下和香代 (鹿児島大学), 福島邦彦 (ファジィシステム研究所), 池添貢司 (大阪大学), 佐藤多加之 (理研 BSI), 岡田真人 (東京大学), 久方瑠美 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), 五十嵐康彦 (東京大学), 唐木田亮 (東京大学), 四倉晋平 (東京大学), 田仲顕至 (東京大学), 中村大樹 (電気通信大学), 谿 雄祐 (豊橋技術科学大学), 村井祐基 (東京大学), 行松慎二 (中京大学), 安田恭子 (愛知淑徳大学), 寺島裕貴 (東京大学), 松田

勇祐 (東京工業大学), 根岸一平 (高知工科大学), 菊池眞之 (東京工科大), 東 和樹 (豊橋技術科学大学), 杉森順子 (愛知工科大学), 大森敏明 (神戸大学), Matthew de Becht (NICT Ci Net), 庄野 逸 (電気通信大学), 林大輔 (東京大学), 鬢櫛一夫 (中京大学), 大脇崇史 (豊田中央研究所), 平山貴士 (中部大学), 小濱 剛 (近畿大学), 喜多伸一 (神戸大学), 高橋伸子 (愛知淑徳大学), 堺 浩之 (豊田中央研究所), 宮下真信 (沼津高専), 若林 和 (豊橋技術科学大学), 定金 理 (基礎生物学研究所), 渡辺英治 (基礎生物学研究所)

以下, 生理学研究所

小林 恵, 吉田正俊, 加藤利佳子, 小川正晃, 宍戸恵美子, 笠井昌俊, 石川理子, 鶴原亜紀, 吉村由美子, 森 琢磨, 小松英彦, 郷田直一, 横井 功, 眞田尚久, 安川涼子, 西尾亜希子, 岡澤剛起, 波間智行

【概要】

平成 25 年度生理学研究所研究会「視知覚の現象・機能・メカニズム・生理学的, 心理物理学的, 計算論的アプローチ」は, 平成 25 年 9 月 12, 13 日に岡崎コンファレンスセンター中会議室において開催された。生理学・脳計測 8 件, 心理物理学 5 件, 工学 1 件の合計 14 件の講演があり, 参加者は 93 名であった。初日は, まず前原氏が弱視の特性データおよびビデオゲームによる症状改善について報告した。次に宇賀氏が遂行課題切り替えに連動してサル LIP 野ニューロンの応答増大の傾きが変わることを報告した。丸谷氏は長距離離れた 2 刺激の同期の検出特性, また光流動からの粘性印象の特性という 2 成果を紹介した。眞田氏はサル MT 野ニューロンが奥行き運動時に生じる左右眼の視覚運動信号への選択性を示す様子を報告した。佐藤氏は網膜偏心度依存性を考慮して顕著性マップを作成する新手法を紹介した。北岡氏は静止図形観察時に明所視と薄明視とで見えの運動方向が変

わるなど様々な運動錯視をデモした。増田氏は中心暗点を有する患者での対応皮質領域の課題依存性 fMRI 賦活を報告した。藤田氏はサル V1 野, V4 野のイメージング法データをモデルにより模擬できる可能性を論じた。二日目は, 三浦氏が複合波運動刺激に対してサル MT/MST 野ニューロンがそのフーリエ成分に応答することを報告した。寺本氏は, 聴覚刺激によって視覚運動の定位が影響される現象を報告した。田中氏は, 齧歯類一次視覚野方位カラムの成立に影響する因子について発表した。山本氏は, 尾状核尾部ニューロンの視覚対象・位置選択性について報告した。四本氏は, 知覚学習・運動学習における特異性や睡眠の効果などを概説した。佐藤氏は, ネコ一次視覚野, 外側膝状体, 網膜神経節細胞に着目し方位選択的周辺修飾の機序を論じた。異なるアプローチによる様々な視知覚研究が堪能できる非常に有意義な研究会であった。

(1) 弱視の症状理解と援助法の開発 心理物理学的アプローチ

前原吾朗 (神奈川大学人間科学部)

弱視とは, 幼児期に正常な視覚経験が得られなかったこと (斜視など) が原因で起こる視覚障害である。多く

の場合, 一方の眼 (弱視眼) にのみに視力の低下などが起こり, 他方の眼 (固視眼) は健常に働く。弱視は脳で

行われる視覚情報処理に問題があるため、眼鏡などを用いた光学的矯正は効果がない。弱視の症状やメカニズムを理解するためには、心理物理学的研究が不可欠である。弱視によって視力が低下し、両眼立体視ができなくなることはよく知られているが、コントラスト感度低下、空間知覚の歪み、時間解像度低下といった症状も伴うことが心理物理学研究によって示唆されている。また、弱視のメカニズムに関しては、眼間抑制の不均衡、ノイズ増加、サンプリング解像度低下、不規則な神経結合といった要因の影響が示唆されている。本講演では、こうした心理物理学研究の例として、明るさ知覚の障害に関する研究（Maehara, Thompson, Mansouri, Farivar, & Hess, 2011）と眼間抑制と弱視症状に関する研究（Black, Thompson, Maehara, & Hess, 2011; 他）の発表を行う。これらの研究

の特色は、弱視眼が強く抑制される両眼分離視事態（左右の眼に異なる画像が呈示される）で課題を行うことにある。また、眼間抑制の不均衡に着目した新しい弱視眼訓練法（To, Thompson, Bum, Maehara, Hess, & Cooperstock, 2011; 他）の紹介も行う。この訓練法は iPod でゲームを行うというものであるが、左右の眼を同時に使わなくてはゲームがプレイできないようになっている。弱視眼を鍛えるのではなく、両眼の使用を狙っている点がこれまでの訓練法とは異なっている。アイパッチを用いた従来の方法では7歳くらいまでしか効果が見られないが、新しい訓練法は成人にも効果があった。統計的に有意な視力の向上が見られたが、効果の見られない実験参加者もあり、どのようなタイプの弱視に対して有効であるのかについては更なる検討が必要であるといえる。

（2）LIP 野ニューロンにおける感覚情報の蓄積スピードは課題によって変化する

宇賀貴紀（順天堂大学医学部生理学第一講座）

状況に応じて柔軟に判断をし、多様な選択を行うことはヒトの重要な認知機能のひとつである。このような柔軟性の一部は、長期にわたる学習によって獲得され、その神経基盤としてシナプスの可塑的变化が対応すると考えられてきた。しかし、速い判断の切り替えはシナプスの可塑性では説明できず、短時間でダイナミックにスイッチする神経回路を必要とする。

本講演では、運動方向の判断課題と奥行きの判断課題の2つの知覚判断課題をランダムに切り替えるタスクスイッチ課題をサルに訓練し、知覚判断を担当する大脳皮質 LIP 野から神経活動を記録した研究を紹介し、どのようなメカニズムで素早い判断の切り替えが起きるのかを考える。運動方向と奥行きの感覚情報を表現する MT 野の活動はルールに依存しない。それに対し、LIP 野では

運動方向・奥行き情報のどちらも蓄積されるが、ルールに依存して不要な情報が差し引かれている。すなわち、ルールに則って感覚情報の蓄積ゲインが変化し、最終的な判断に必要な計算がなされているようである。知覚判断の有力なモデルである証拠蓄積モデルでは、感覚受容器からの情報が脳で蓄積（時間積分）され、一つの選択肢に合致する情報が十分に貯まったら判断が確定すると仮定されている。ルールに依存した蓄積ゲイン調節のモデルとして、一度貯めた情報を時間と共に廃棄する方法（Leaky integrator 仮説）の有用性を最後に提案する。

以上の結果は、状況に応じた柔軟で素早い判断の切り替えを行う際、感覚情報をどのように蓄積して判断に寄与させるかを瞬時に制御することで切り替えが実現されていることを示唆する。

（3）局所運動信号の関係性についての視覚処理過程

丸谷和史（NTT コミュニケーション科学基礎研究所）

私たちの周りを取り巻く動的な状況は、複数の物体が運動したり、運動する物体の形状が時間変化したりする

場合を多く含んでいる。このような複雑な状況でも私たちの視覚系は正しく外界を捉えることができるが、それ

には、初期的な局所運動検出の結果生じる複数の信号を比較し、その関係性から統計的な性質を抽出することが必要となる。今回は、こうした局所運動信号の関係性を処理する視覚過程について、私たちの研究グループで最近行った二つの研究の結果を紹介する。うちひとつでは、視角にして数十度から百度といった非常に離れた距離で生じた 2 つの運動信号を、10 Hz を超える非常に高い時間精度で比較するプロセスを視覚系が備えていることを示す (Maruya, et al., 2013)。このような高い時間精度で空間的に離れた局所信号を比較する過程は、ほかの属性の処理過程の中では見つかっておらず、視覚運動処理に特有である (cf. Fujisaki & Nishida, 2010; Holcombe, 2009)。もう一つの研究では、液体という私たちの生活の中であ

りふれた非剛体物体の質感知覚に、その運動によって生じる局所運動信号群が持つ統計的な情報が寄与を行っていることを示す (Kawabe et al., VSS2012, Maruya et al., VSS2013)。時間変化するある物体によって生じる運動場内で、極端な速度差が存在しないときには、その物体は液体であるように見える。さらにこうした液体性の質感知覚が成立しているときにのみ、運動場の平均速度の変化が液体の粘性変化として感じられることが明らかになった。これらの研究はいずれも、バイオリジカルモーションなどの個別の刺激を用いて議論が行われてきた、複雑な動的物体、動的世界の符号化の一般的な理解につながると考える。

(4) サル MT 野における奥行き運動 (Motion-in-depth) 選択性とそのメカニズム

眞田尚久 (生理学研究所感覚認知情報研究部門)

我々は物体の奥行き方向の動き (Motion-in-depth) を知覚することができる。Motion-in-depth 知覚には主に二つの両眼手がかりがあることが知られている。一つは両眼視差の時間的变化 (Change in horizontal disparity, CD) であり、もう一つは物体が奥行き運動することによって左右網膜像上に生じる、両眼間速度差 (Interocular velocity difference, IOVD) である。心理物理学的研究においてはどちらの手がかりが Motion-in-depth 知覚に寄与しているのか長年議論されている (Cumming and Parker, 1994, Shioiri et al., 2000) が、生理学的研究においてはそもそも視覚野の神経細胞が Motion-in-depth 選択性を持つのかすら未だによく分かっていない。

覚醒状態のマカクザル MT 野細胞から細胞外電位記録を行い、Motion-in-depth 選択性を測った。視覚刺激に Random dots stereogram を用い、刺激の両眼視差を動的に変化させることで奥行き方向に運動する刺激を作成し、

奥行きの運動方向及び速度に対する選択性を調べた。その結果、約半数の神経細胞が有意に刺激の前進もしくは後退運動に選択的に反応することが分かり、サル MT 野には奥行き方向の運動選択性が有ることが明らかになった。

また CD, IOVD どちらの手がかりの寄与率が高いのかを調べるために、単一手がかり刺激をそれぞれ作成し (IOVD 条件, CD 条件), 選択性及びその強さを Combined 条件と比較した。単一手がかり刺激での Motion-in-depth 選択性は、IOVD 条件では約半数の神経細胞が強い選択性を示したが、CD 条件で選択性があるものは約 10% と少なく、両眼間速度差手がかりの寄与率がより高いことが明らかになった。奥行き運動の方向選択性は IOVD 条件と CD 条件、及び Combined 条件で同じである傾向があることから、これらの手がかりの統合が MT 野で起こっていることが示唆される。

(5) 視覚的顕著性の計算モデルの高度化と視線推定への応用

佐藤洋一 (東京大学生産技術研究所)

人の視覚的注意メカニズムを踏まえ、視野内のどこを

注視しやすいかを定量的に表現するモデルとして視覚的

顕著性モデルが知られている。1998年にIttiらにより定式化が行われて以来、自然画像から視覚的顕著性マップを計算するための手法が数多く提案されてきている。しかしながら、既存の視覚的顕著性モデルでは、画像全体を均一に扱われることがほとんどであり、人間の注意のメカニズムにおいて重要な役割を果たしている中心視と周辺視での視野特性の違いが反映されていなかった。これに対し、本講演では、視覚刺激を受容する網膜部位に応じた視覚特性が変化することを考慮した視覚的顕著性モデルを紹介する[1]。具体的には、従来モデルでは均一な重みが用いられていた特徴マップの統合段階において、各特徴マップを現在の注視位置からの距離・方向に応じた領域に分割し、それぞれの特徴・領域に対して異なる重みパラメータを割り当てることで統合を行う。それぞれの重みパラメータは、実際に計測した視線データに対する学習によって最適化することにより、視野特性に対応した顕著性モデルを実現している。評価実験により、既存モデルに比べてサッカー予測性能の高い顕著性マップが計算できることを確認するとともに、獲得した重みパラメータの分析により、視野特性と視覚的顕著性モデルにおける最適な特徴・スケール選択の関わりを明

らかにした。次に、人の顔を撮影した画像から人がどこを見ているのかを推定する視線推定の問題に対して、視覚的顕著性を手掛かりとしたアプローチを紹介する[2]。鍵となるアイデアは、人が見ている映像の視覚的顕著性マップを注視点座標の存在確率分布として捉え、提示映像と同期して撮影した目画像から注視点を推定する回帰推定器を学習するというものである。具体的には、目画像の類似度をもとにした顕著性マップの統合により代表目画像とその注視点座標の確率分布を高い精度で生成し、ガウス過程回帰により目画像と注視点座標の関係性を学習する。これにより、既存の視線推定手法とは異なり、事前に既知の点を注視する校正処理を必要とせず、自然な動作の中での視線推定が可能となった。

- [1] H. Kubota, Y. Sugano, T. Okabe, Y. Sato, A. Sugimoto and K. Hiraki, "Incorporating Visual Field Characteristics into a Saliency Map", In Proc. Symposium on Eye Tracking Research and Applications (ETRA2012), pp. 333-336, 2012.
- [2] Y. Sugano, Y. Matsushita, and Y. Sato, "Appearance-based Gaze Estimation using Visual Saliency," IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence, 34(2), pp. 329-341, 2013.

(6) 色依存性の静止画が動いて見える錯視

北岡明佳（立命館大学文学部）

静止画が動いて見える錯視のうち、フレーザー・ウィルコックス錯視系統の錯視群は、特定の繰り返しパターンに沿ってパターンが動いて見える錯視である。これまでは、フレーザー・ウィルコックス錯視も、その「最適化」バージョンも、輝度とコントラストが高い方が錯視量が多く、色は若干の促進的効果を持つが、本質的には輝度が重要な役割を果たすと考えられてきた。ところが、近年になって、刺激が暗い方が錯視量が多いという亜種が発見され、さらに色が重要であるという錯視が発見された。後者についても輝度の役割は重要なのであるが、これまで錯視の方向は「黒→濃い灰色→白→薄い灰色→黒、その繰り返し」という記述表現が「最適化型」フレーザー・ウィルコックス錯視の本質であったが、色依存性の錯視は、濃い灰色の代わりに短波長色、薄い灰色の代

わりに長波長色を置くという特徴とともに、それらの色の間で輝度差は必要ではないという点がこれまでのフレーザー・ウィルコックス錯視群とは異なる。さらに、この色依存性のフレーザー・ウィルコックス錯視は、明るい条件と暗い条件では錯視の方向が逆転するということがわかった。明るい時には錯視の方向は「暗→短波長色→明→長波長色→暗、その繰り返し」であるが、暗い時には「暗→長波長色→明→短波長色→暗、その繰り返し」となる。暗い時というのは物陰程度でも十分であるが、杆体が働くような薄明視の時に強い錯視を得る。これまではフレーザー・ウィルコックス錯視系統の錯視群のメカニズムは脳のレベルと想定されていたが、網膜の関与も検討する必要が出てきた。これらの問題を考察する。

(7) 中心暗点を有する眼疾患患者の第一次視覚野反応

増田洋一郎 (東京慈恵会医科大学眼科学講座)

両眼の中心視野を障害された患者は、日常生活活動を大きく制限させられる。そのため、当該患者の視覚再建を実現させるために精力的に治療研究(網膜再生, 人工網膜など)がおこなわれている。この視覚再建医療成功のためには、入力を失っていた視覚神経回路が再び正常に機能する必要があるが、経シナプス変性などにより機能の低下～消失をきたしたり、可塑性により機能に変化をきたしていると、治療後に復活した視覚入力を知覚できず、結果的に視覚再建が不成功に終わる可能性がある。そのため、当該患者の視覚神経回路の構築と機能を把握しておくことは重要である。

後天性に両眼中心視野障害をきたす網膜疾患として、代表的なものに錐体ジストロフィ (CRD) とレーベル遺伝性視神経症 (LHON) があるが、それぞれ障害される網膜細胞は異なる。錐体ジストロフィは視細胞の変性、レーベル遺伝性視神経症は網膜神経節細胞の変性であり、この障害される網膜細胞の違いにより、視覚神経回路の構築と機能が異なる可能性が指摘されている。

本講演では CRD, LHON における網膜病変部の第一次視覚野投射領域における脳反応を fMRI で計測した結果を提示し、その反応の違いから視覚神経回路の構築と視覚再建医療への展望を考察してみたい。

(8) サル大脳皮質 V1 野および V4 野の機能構築： 2 光子カルシウムイメージング法による解析

藤田一郎

(大阪大学大学院生命機能研究科, 脳情報通信融合研究センター (CiNet))

「異なる特徴選択性を持つ神経細胞が、一つの皮質領域内でどう配置されているか」の理解は、その領域の機能的神経回路やそこで行われている情報処理の解明にとって重要な手がかりを与える。近年、哺乳類インビボ標本への適用が可能となった 2 光子 Ca^{2+} イメージング法は、単一細胞レベルの空間解像度と活動電位列を反映できる時間解像度の両方を持ち合わせており、この問題の探究に新しい展開をもたらさう。本講演では、この手法をサルの大脳皮質視覚野に適用した私たちの最近の研究から 2 つの話題 (V1 野と V4 野の機能構築) を紹介する。

V1 野の実験では、矩形波グレーティングを刺激として動物に提示し、個々の細胞について最適方位と方位選択性のバンド幅を決定した。皮質局所における細胞集団の最適方位の多様度と個々の細胞の方位選択性の鋭さの間には明瞭な負の相関があり、計測領域に含まれる細胞の最適方位が均一である領域に比べ、最適方位が多様な(不

均一な) 領域においては方位選択性が低かった。この結果は V1 局所の細胞間の相互作用が、方位選択性に関して非特異的に行われていることを示唆する (Ikezo et al., submitted)。

V4 野の実験においては、視覚刺激として自然動画を提示した。30 分の自然動画刺激に対する反応から、その細胞の反応を近似記述できる符号化モデルを作成し、モデルの妥当性は、モデル生成には利用しなかったビデオ 30 分への反応を予測できるかどうかで行った。予測性能は高くないものの、ほとんどの細胞について有意なモデルの作成が可能であった。こうして作成した個々のモデルに仮想サイン波グレーティングを入力として与え、その反応に基づいて個々の細胞の最適方位と最適空間周波数を推定し、皮質上での選択性の分布を調べたところ、皮質表面に平行な方向に最適方位および最適空間周波数が規則的に変化する機能地図が V4 野内に存在することが示唆された。

(9) 大脳皮質 MT/MST 野の活動は動く視覚刺激のフーリエ成分に依存する

三浦健一郎（京都大学大学院医学研究科）

大脳皮質 MT (Middle Temporal) 野およびその領野から投射がある MST (Medial Superior Temporal) 野には視覚刺激の動きの方に選択性を持って応答するニューロンが高い割合で含まれる。これらの領野は動きの知覚や眼や身体の動きの視覚的制御に関わることが知られている。広い視野の動きで誘発される追従眼球運動は MT/MST 野が関係する行動出力の一つである。われわれは、MT/MST 野までに行われる視覚運動解析のメカニズム、およびそれらの領野の神経活動と追従眼球運動との関係を明らかにすることを目的とし、様々な視覚運動刺激を用いてサル大脳皮質 MT/MST 野の運動方向選択性ニューロンの性質を調べてきた。様々な粗さの正弦波運動縞を用いて調べた結果、MT/MST 野ニューロンの活動が視覚刺激の空間周波数に依存し、MT 野に比べて MST 野のニューロンの最適空間周波数がより低い傾向があることがわかった。MST 野の段階ではより粗く大まかなパターンの動きが抽出されることが示唆される。さらに、矩形波縞から基本周波数成分を除いた Missing

Fundamental (MF) 縞を基本周期の $1/4$ ずつ動かした時のニューロン活動を調べた。矩形波は基本波と奇数高調波で構成され、基本波を除いた後は第 3 高調波が最大の振幅を持つ成分（主要なフーリエ成分）となる。MF 縞を基本周期の $1/4$ ずつ動かした場合、第 3 高調波成分はその成分の $3/4$ 周期ずつ動くことになり、これは $1/4$ 周期ずつ反対方向に動くことと同じである。ランダムドット刺激を様々な方向に動かしてニューロンの最適運動方向を調べ、MF 縞をそのニューロンの最適方向とその逆方向に動かした時の反応を調べた結果、MF 縞を最適方向の逆方向に動かした時により大きな反応が起こることがわかった。この結果は MT/MST 野のニューロンが主要なフーリエ成分の動きに依存することを示している。また、MF 縞を基本周期の $1/4$ ずつ動かした時には、刺激の動きの方向と逆方向への追従眼球運動が誘発されるが、この眼球運動の性質は MT/MST 野のニューロン活動の性質を反映したものと考えられる。

(10) 聴覚随伴性視覚運動知覚の諸相

寺本 渉（室蘭工業大学大学院工学研究科）

脳は常に複数の感覚系から信号を受け取り、それらを一つのイベントとして関連づけるべきかどうかの判断を行っている。こうした感覚間相互作用が行われる脳の情報処理段階について、近年では比較的初期に行われている可能性も指摘されている。本研究では何ら空間情報を持たない音高情報と視覚運動情報が関連づけられるのか、またそれが視覚・聴覚情報処理のどの段階で行われているかについて、対応付け学習パラダイムを用いて検討を行った。まず、高い音と低い音に合わせて左右に仮現運動する光点を 3 分間観察すると、その後高い音と低い音を聞いただけで、事前に聴いた音色と動きのパターンの組み合わせを再現する形で、その場で点滅する光点が、あたかも動いて見えるようになることを見いだした。しかも、この効果は、学習した視野位置に選択的に生じ、

眼間転移しないこともわかった。また、学習が成立するためには、学習時に視覚運動が知覚される必要があることも示された。次に、この音高情報と視覚運動情報の関連づけの周波数選択性について調べた。学習刺激として、仮現運動刺激とともに、2100Hz と 400Hz の音を提示し、テスト刺激として学習刺激よりも周波数が 0, ± 1 , $\pm 1/2$, $\pm 1/4$ オクターブ離れた音を提示した。その結果、有意な学習効果が得られたのは音の周波数が学習刺激とテスト刺激で一致したときのみであった。さらに、この現象に音高変化と視覚運動刺激の運動方向の明示的な対応付けが必要か否かについての検討を行った。学習刺激として仮現運動刺激とともに周波数構造は異なるが弁別可能な 2 つの複合音を提示した。その結果、被験者が音の変化と視覚運動刺激の運動方向の対応関係に気づいてい

なくとも、弁別不可能な周波数構造の違いを手がかりに学習が成立することが示された。これらの結果は、聴覚

情報と視覚運動情報の相互作用が視覚および聴覚情報処理の比較的初期段階で行われていることを示唆する。

(11) 方位カラム形成再考：種差，視体験効果，臨界期

田中 繁（電気通信大学 脳科学ライフサポート研究センター）

Hubel と Wiesel によって視覚野の方位カラムが発見されて以来、多くの電気生理実験や光学計測が行われるとともに、ヘップ学習則に基づく自己組織化モデルのシミュレーションによって、方位選択性の形成メカニズムや視体験効果が解明された感がある。しかしながら、まだ完全な理解に達したという訳ではない。例えば、げっ歯類の視覚野では最適方位はネコや旧世界ザルのように視覚野の皮質表面に沿って連続的に分布してはおらずランダムな配列を呈することが Ohki らによって二光子励起 Ca^{2+} イメージングによって明らかにされた。なぜ、哺乳類のなかでも種による違いが現れるのであろうか？また、方位カラムは視体験に先立って形成されることが Stryker らのグループから報告されている一方で、仔ネコに 1・2 週間シリンダーレンズメガネを掛けさせて単一方位を視体験させたときには、経験方位を表現するドメインが顕著に拡大することが我々の実験からわかっている。この過剰表現は、単一方位視体験を 30 日齢に開始した場合に最大となり、50 日齢以降に開始した場合には方位マップは変化しないこともわかっている。さらに、一旦経験方位が過剰表現した動物において、メガネを外して 1 週間正常視体験を許すと過剰表現が減少するものの、

メガネ飼育を開始した日齢に依存してある程度の過剰表現が残ることも確認されている。こうした現象に対する辻褃の合った説明はまだなされていない。

そこで、我々は自己組織化の数理モデルを用いて上記の謎の解明を図った。その結果、皮質内興奮性結合の強度の総和を一定に保ちつつスパースにしていくとき、結合頻度が 10%以上のときには方位マップが形成されるのに対し、それより小さくなるとランダムな方位分布が得られた。このことは、ネコとげっ歯類との方位表現の相違を説明するメカニズムである可能性が示唆された。また、単一方位視体験に先立つ正常視体験の期間が短く、個々のニューロンの方位選択性が低い場合には、単一方位視体験によって方位マップは経験方位を過剰表現するが、正常視体験の期間が長く方位選択性が十分に高くなった後では、方位マップの再編を促さなくなることや、一旦再編されたマップは再度正常視体験をさせても回復しにくくなることもわかった。このことは、シナプス可塑性の分子メカニズムが日齢に依存しなかったとしても、個々のニューロンの方位選択性がマップ再編の度合いを制御し得ることを示唆するものと考えられる。

(12) 尾状核尾部における情報統合と感覚運動変換

山本慎也（独立行政法人 産業技術総合研究所）

我々は周囲を見渡すことによって、自分の周りの世界を把握している。網膜の構造上、視覚の解像度は中心窩付近のみが高いため、視覚情報を集めるためには周囲を見渡す眼球運動が必須になってくる。では、我々はどのように眼球を動かして外界を把握しているのであろうか？実は、我々は外界をくまなく探索しているのではなく、物体から物体に向かって急速眼球運動（サッカード）

を行っている（『物体指向性サッカード』）。サッカードを開始する脳内機構に関しては、これまでさまざまな研究がなされてきたが、ある特定の物体に向けてサッカードが生じるメカニズムに関しては、未だ十分な解明がなされているとは言い難い。

このような物体指向性サッカードを生じさせる脳内メカニズムが満たすべき必要条件として、まず、「どこに

(where) 何が (what) あるかをコードする」という点が挙げられる。このことは、古典的には『情報統合（バインディング）問題』に対応する問題である。また、二つ目の必要条件として、「統合された感覚情報をサッカードの運動指令に変換する」という点が挙げられる。このことは、古典的には『感覚運動変換』と呼ばれる問題に対応する。すなわち、物体指向性サッカードという問題設定には、情報統合問題と感覚運動変換という、神経科学における重大問題が二つも含まれていることになる。

このような条件を満たす領域として、我々は解剖学的な観点から『尾状核尾部』に注目した。尾状核尾部の解剖学的な特色として、「側頭葉を中心に大腦皮質視覚関連領域から入力を受け取っていること」と、「上丘に多くのニューロンが投射することが知られている黒質網様部の背外側部へ投射していること」が挙げられる。これら

の解剖学的特徴は、特定の物体に向けたサッカードを生じさせるメカニズムとしての必要条件に対応しているといえる。本発表では、これらの観点に基づき、尾状核尾部が特定の物体に向けたサッカードを誘発する神経基盤であることを示す電気生理学的な証拠を提示したい。さらに、情報統合問題と感覚運動変換の背後に存在する共通の計算メカニズムについても問題提起を行いたい。

References

- Yamamoto S, Monosov IE, Yasuda M, Hikosaka O (2012) Journal of Neuroscience, 32 (32), 11005-11016
- Yamamoto S, Kim HF, Hikosaka O (2013) Journal of Neuroscience, 33 (27), 11227- 11238
- Hikosaka O, Yamamoto S, Yasuda M, Kim HF (2013) Trends in Cognitive Sciences, doi: 10.1016/j.tics.2013.07.001.

(13) 知覚と運動における学習の干渉と固定化

四本裕子（東京大学大学院総合文化研究科）

視覚刺激の呈示や視覚課題の繰り返しによる知覚感度の向上を知覚学習といい、ある種の知覚学習は、レチノトピックな位置特異性や方位特異性を持つことが知られている。知覚学習の効果は睡眠により固定化されるが、学習の効果が固定化される前に別の学習を行うと干渉が生じることが報告されている。知覚学習による脳の機能や構造の可塑性は、繰り返しの学習課題の前後のイメージングで明らかにされつつある。

一方、キーパッドを特定のシークエンスでタップするタッピング課題や、外的な方位変換を加えたリーチング課題など、ある特定の運動を繰り返すことによりその精度や速度が上昇することを運動学習という。運動学習においても、シークエンス特異性や体側特異性、方向特異性が観察され、運動学習効果の固定化に睡眠が必要である。さらに、異なる運動学習の組み合わせが互いに干渉

をもたらす点において、視覚学習と運動学習の類似点は顕著である。

視覚学習と運動学習には、それぞれ異なる脳の領域が関与しているが、その性質の類似性は、脳内にある程度共通した可塑性の特徴があることを示唆している。講演では、知覚学習と運動学習の両方について、(1) 学習後の睡眠中の脳活動、(2) 異なる刺激や運動を用いた学習効果の干渉、(3) 学習を長期におこなった場合の課題成績や脳機能の変化、(4) 老化が学習に及ぼす効果、を検証した一連の研究を紹介しながら、両者間の類似性とその類似性が示唆することをまとめる。

また、学習や運動制御において、注意などのトップダウンのコントロールがそれらの成績をいかに変えうるかを調べた実験を通して、ダイナミックな脳の働きの中での、低次の皮質の機能や役割について述べる。

(14) ネコ初期視覚系における刺激特徴選択性と刺激文脈依存的反応修飾

佐藤宏道 (大阪大学医学系研究科認知行動科学)

ネコ一次視覚野 V1 ニューロンの受容野周囲にグレーティングを呈示すると、受容野内に呈示したグレーティング刺激に対する反応が抑制される。この効果は、受容野内外の刺激の傾きや空間周波数などの差が小さいほど強く、大きくなると弱まる。このことから受容野内外が一様なパターンで刺激されているのか、周囲とは区別される図形によって刺激されているのかによって分化的に応答が変化する性質と考えられ、これを文脈依存的反応修飾 Contextual Modulation または受容野周囲抑制 Surround Suppression, SS と呼ぶ。我々は麻酔下ネコ V1 の SS の性質を詳しく調べるとともに、そのメカニズムについて検討した。

その結果、SS によってニューロンの方位選択性はシャープになること、SS の空間周波数チューニングは受容野応答の最適空間周波数に比べて幅広い周波数範囲に応答し、そのピークは刺激呈示後の時間経過とともに、低空間周波数から高空間周波数側にシフトすることなど、刺激の時空間特徴に応じてダイナミックに変化することが明らかになった。

更に、SS の形成メカニズムについて解析した。まず、GABA_A 受容体拮抗薬ビククリンの投与により皮質内抑制の寄与について調べたが、V1 ニューロン応答の SS およびその方位依存性はほとんど影響を受けず、皮質内抑

制は主たる役割を果たしていないことが分かった。次に皮質下からの求心性入力の影響を調べるため、外側膝状体 LGN の SS を検討したところ、V1 のそれに比べて弱いが、方位依存的な SS を示すニューロンが多く見られた。LGN の SS についてさらに詳しく検討したところ、ほとんどの LGN ニューロンが最適空間周波数より高い周波数で、最適サイズよりも大きな刺激に対して明らかな方位チューニングをしめし、これが V1 の方位選択性の元になっていると考えられた。この性質は LGN ニューロンの受容野が真円ではなく、特定の向きに伸びた長円形であることによる。さらに LGN の受容野構造の形成メカニズムを調べるため、網膜神経節細胞 RGC と LGN ニューロンの同時記録を行い、単シナプス性結合関係を有するニューロンペア間で、受容野特性および受容野の重なり方を解析したので講演の中で解説する。

これらの結果は、V1 の刺激特徴選択性や刺激文脈依存的反応修飾など、これまで皮質内メカニズムによって説明されてきた現象が、網膜および LGN のレベルにおいてその基本形が存在しており、それが V1 に反映されていること。そして処理ステージが進むと、性質が強められるとともに、より文脈依存的になっていくことを示唆している。

7. シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス

2013 年 12 月 12 日－12 月 13 日

代表・世話人：神谷温之（北海道大学 大学院 医学研究科）

渡邊 大（京都大学 大学院 生命科学研究科）

所内対応者：吉村由美子（神経分化研究部門）

- (1) プルキンエ細胞軸索終末の直接パッチクランプ記録による機能解析
川口真也, 坂場武史（同志社大学）
- (2) Presynaptic Ca^{2+} dynamics at cerebellar mossy fiber boutons
Delvendahl I (University of Leipzig)
- (3) Activity-dependent neurotrophin signaling underlies developmental switch of Ca^{2+} channel subtypes mediating neurotransmitter release
三木崇史, 平井宏和, 高橋智幸（同志社大学, 群馬大学）
- (4) 繰り返し LTD 誘発後の長期持続的シナプス減弱（LOSS）生起時の樹状突起棘の動態
長谷川翔, 富永恵子, 小倉明彦（大阪大学）
- (5) 海馬ガンマオシレーションにおけるカイニン酸受容体の役割
鈴木江津子, 神谷温之（北海道大学）
- (6) 鳴禽類音声コミュニケーション能力の生後発達機構
安部健太郎（京都大学）
- (7) Local calcium signaling in spatio-temporal regulation of neuronal remodeling
榎本和生（東京大学, OBI）
- (8) 神経細胞内シグナル伝達分子の活性化観察・操作
村越秀治（生理研）
- (9) CaMKII: a bifunctional molecule both as a kinase and as a postsynaptic structural element gating synaptic plasticity
林 康紀（理研 BSI）
- (10) *Staggerer* マウスにおけるプルキンエ細胞の mGluR を介した応答は発達期の ROR α を必要とする
飯塚 朗, 松崎泰教, 今野 歩, 平井宏和（群馬大学）
- (11) 生後発達期の小脳登上線維刈り込みにおける各線維の絶対的な入力強度の役割
川田慎也（東京大学）
- (12) 小脳抑制性シナプス可塑性 RP の運動学習への関与
田中進介, 川口真也, 平野丈夫（京都大学）
- (13) 受容体側方拡散の小脳プルキンエ細胞シナプスにおける AMPA 受容体トラフィッキングへの寄与
山口和彦（理研 BSI）
- (14) オプトジェネティクスを利用したラットウィスカ光刺激パターンニング
八尾 寛, 本城達也, 姫 志剛, 横山超一, 石塚 徹（東北大学）
- (15) Substance P activates nonselective cation channels in nNOS-expressing GABAergic neurons in mouse visual cortex
遠藤利朗（名古屋大学）

【参加者名】

神谷温之 (北海道大学), 南 賢明 (北海道大学), 鈴木江津子 (北海道大学), 江川 遼 (東北大学), 八尾 寛 (東北大学), 飯塚 朗 (群馬大学), 張 文欣 (信州大学), 大塚稔久 (山梨大学), 喜多村和郎 (東京大学), 川田慎也 (東京大学), 狩野方伸 (東京大学), 榎本和生 (東京大学), 渡部文子 (東京慈恵会医科大学), 志牟田美佐 (東京慈恵会医科大学), 林 康紀 (理化学研究所), 山口和彦 (理化学研究所), 水田恒太郎 (理化学研究所), 阿部弘基 (横浜市立大学), 実木 亨 (横浜市立大学), 入江智彦 (国立医薬品食品衛生研究所), 小松由紀夫 (名古屋大学), 遠藤利朗 (名古屋大学), 杉村岳俊 (名古屋大学), 久場健司 (名古屋大学), 平野丈夫 (京都大学), 田中伸介 (京都大学), 安部健太郎 (京都大学), 渡邊 大 (京都大学), 長谷川拓 (京都大学), 王 丹 (京都大学), 長谷川翔 (大阪大学), 小倉明彦 (大阪大学), 川口

真也 (同志社大学), 山下愛美 (同志社大学), 高橋智幸 (同志社大学), 緑川光春 (同志社大学), 三木崇史 (同志社大学), 堀 哲也 (同志社大学), 橋本浩一 (広島大学), 桂林秀太郎 (福岡大学), 大町優史 (沖縄科学技術大学院大学), 高木 博 (OIST), Delvendahl Igor (University of Leipzig) 村越秀治 (生理学研究所), 笠井昌俊 (生理学研究所), 中畑義久 (生理学研究所), 窪田芳之 (生理学研究所), 柴田明裕 (生理学研究所), 北沢和寛 (生理学研究所), 畠中由美子 (生理学研究所), 石川達也 (生理学研究所), 平沢 統 (生理学研究所), 鍋倉淳一 (生理学研究所), 森 琢磨 (生理学研究所), 足澤悦子 (生理学研究所), 宮下俊雄 (生理学研究所), 山浦 洋 (生理学研究所), 石川理子 (生理学研究所), 西尾奈々 (生理学研究所), 吉村由美子 (生理学研究所)

【概要】

複雑な脳の神経ネットワークにおける情報伝達は、シナプスレベルでのダイナミックかつ精緻な機能調節を受ける。シナプス伝達の分子的基盤やその修飾と可塑性の機構解明を目指すボトムアップ的なシナプス研究は、神経科学の進歩に多大な貢献を果たしてきた。とりわけ、電気生理学、形態学、光学計測、分子生物学、遺伝学などの多様な実験的アプローチと、シミュレーションなどの数理的アプローチの有機的な連携に基づく多角的な研究手法が大きな研究成果やブレークスルーにつながってきた。本研究会では前年度まで開催されてきた2つのシナプス関連の研究会を基に交流の輪を拡げ、研究手法の枠を超えた最先端のシナプス研究者の交流と連携のプラットフォーム構築を目指した。同時に、次代を担う大学院生や若手研究者のコミュニティ形成を推進するために、若手研究者の積極的な参加を促した。若手中心の一般発表12題に加え、国際的な第一線のシナプス研究に

関する特別講演3題の計15題の発表が行われた。ライブチヒ大学からの国外参加者を含む4題の発表は英語で行われた。セミクローズド形式の研究会の特徴を活かして、未発表データを含めた最新の研究成果の報告が相次ぎ、質疑応答では終始活発な討論が行われた。先端的イメージングや光操作などの最新の解析手法を駆使した発表に加え、軸索や神経終末からの電気生理学的直接記録など、これまでの限界を超える研究内容の発表が続き、シナプス・神経ネットワークのミクロスコピックな研究フィールドの国際的優位性をあらためて確認する有意義な研究会となった。本研究会の2つの主要な目的、すなわち、最先端の超領域的なシナプス・神経回路の研究ネットワークの構築と、次代を担う若手研究者へのコミュニティの継承、に関して大きな一歩となった。ぜひこの流れを維持し発展させて行くことが重要と考えられた。

(1) プルキンエ細胞軸索終末の直接パッチクランプ記録による機能解析

川口真也, 坂場武史 (同志社大学 脳科学研究科)

シナプス前終末は通常 $1\ \mu\text{m}$ にも満たない微細な構造で、活動電位到達から1ミリ秒以下で迅速に伝達物質

を放出する特殊な機能部位であるため、その機能解析は困難である。私たちは、小脳プルキンエ細胞の軸索終末

からパッチクランプ記録し、抑制性シナプス前部での伝達物質放出機構を明らかにすることを試みた。初代分散培養したプルキンエ細胞に AAV ベクターを用いて EGFP を発現させることにより、表面が露出した直径 1 ~ 3 μm の軸索終末を選別してパッチ電極をアプローチすることが可能となり、その終末から直接パッチクランプ記録を行った。膜容量測定法やシナプス前・後部からの同時記録により、プルキンエ細胞の軸索終末部は、即時放出可能なシナプス小胞が多く存在していること、そ

の活動電位による放出確率は低いことが分かった。一方、軸索終末部の膜興奮性は低く、そのため軸索から終末にかけて活動電位の伝播が弱まることから、単一軸索 2 部位からの同時記録により分かった。以上から、プルキンエ細胞の軸索終末は、低い膜興奮性が軸索からの情報伝達を活動頻度に依存して弱めることにより、終末の放出可能プール枯渇を回避しながら、シナプス伝達を柔軟に変化させると考えられる。

(2) Presynaptic Ca^{2+} dynamics at cerebellar mossy fiber boutons

Igor Delvendahl^{1,2}, Lukasz Jablonski^{1,2}, and Stefan Hallermann^{1,2}

(¹ Carl-Ludwig-Institute for Physiology, Medical Faculty, University of Leipzig, Liebigstr. 27, 04103 Leipzig, Germany

² European Neuroscience Institute Göttingen, Grisebachstr. 5, 37077 Göttingen, Germany)

We quantified Ca^{2+} transients at the cerebellar mossy fiber bouton (cMFBs) to granule cell synapse using direct presynaptic patch-clamp recordings, two-photon Ca^{2+} imaging and modeling. The transient increase in Ca^{2+} following an AP had 227 nM amplitude, decaying with 70 ms time constant. We found a low intracellular fixed buffer capacity. During

high-frequency trains of APs, residual Ca^{2+} sums linearly. Measuring Ca^{2+} transients at remote cMFBs during dye loading indicated the presence of a mobile buffer with slow binding kinetics, which speeds the decay of residual Ca^{2+} transients in cMFBs. Our findings provide important constraints to understand the Ca^{2+} dynamics at the release site.

(3) Activity-dependent neurotrophin signaling underlies developmental switch of Ca^{2+} channel subtypes mediating neurotransmitter release

三木崇史 (同志社大学神経生理学)

神経伝達物質放出は、神経前末端に存在する電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) を介するカルシウム流入によって引き起こされる。この VDCC は主に P/Q, N, R 型の 3 種類のサブタイプによって担われている。多くのシナプスでは生後発達過程で N, R 型は P/Q 型にスイッチすることが知られており、チャネル特性の違いからこのスイッチは高頻度での神経伝達物質放出を効率的に引き起こすのに必須であると考えられている。今回の研究会では神経前末端における VDCC サブタイプスイッチのメカニズムに関する研究について発表した。私たちは、小脳スライス培養を用い、プルキンエ細胞-小脳核シナプスにおいて VDCC スイッチが再現されることを確認

した。この系を用い、神経活動と細胞外カルシウムイオンが VDCC スイッチに必須であることを薬理実験により明らかにし、またその下流としての TrkB シグナルを見出した。最後に、*in vivo* における神経活動依存的 Trk シグナルの VDCC サブタイプスイッチへの影響を検討した。ラット生後発達期に小脳皮質へ直接経時的に薬物を投与し、その後急性スライスを作成し測定を行った結果、神経活動や Trk シグナルの長期的抑制は VDCC スイッチを阻害した。以上の結果から、神経活動依存的な Trk シグナルが、生後発達期 VDCC サブタイプスイッチのメカニズムを担うことが示唆された。

(4) 繰り返し LTD 誘発後の長期持続的シナプス減弱 (LOSS) 生起時の樹状突起棘の動態

長谷川翔, 富永恵子, 小倉明彦 (大阪大学大学院 生命機能研究科 神経可塑性生理学研究室)

動物が記憶を獲得し固定するのは, シナプス結合の可塑性によっている。当研究室では記憶の固定過程の解析のため, 長期測定や観察が可能な培養海馬切片を用いている。これまでに, CA3-CA1 シナプスの LTP・LTD は 1 回の誘発では 24 時間以内に消失するが, 繰り返し誘発すると, 長期持続性の伝達強度増強・減弱がシナプスの新生・廃止を伴って生起することがわかっている。これらの現象を RISE (Repetitive LTP-Induced Synaptic Enhancement), LOSS (LTD-repetition-Operated Synaptic Suppression) とよび, 固定過程のガラス器内再現と想定して解析を進めている。

RISE 生起時の CA1 錐体細胞樹状突起棘の動態を経時的に追跡すると, まず棘新生率と廃止率がともに高まる「ゆらぎの増大」が起こり, 次に廃止率が先に刺激前レベルに戻る結果, 総和として棘数が増加した (Oe et al, Sci Rep 3:1957, 2013)。今回, 種々の点で RISE と鏡像的な LOSS について同様の検討を行ったところ, 生起刺激直後から棘退縮率が形成率を上回り, 比較的単調に棘数の減少が進行することがわかった。また, RISE 生起の際にみられた棘動態の既存棘密度依存性はみられず, どの領域でもほぼ均等に廃止が進行した。したがって, LOSS はこの点では RISE と鏡像的ではない。

(5) 海馬ガンマオシレーションにおけるカイニン酸受容体の役割

鈴木江津子 (北海道大学医学研究科神経生物学分野, 日本学術振興会)

神谷温之 (北海道大学医学研究科神経生物学分野)

海馬で見られる高周波帯域の律動波であるガンマオシレーション (20-80 Hz) は, 記憶の獲得や想起に関連することが示されている。急性海馬スライス標本を用いた *in vitro* 実験においても, ムスカリン性アセチルコリン受容体作動薬のカルバコールや低濃度のカイニン酸などの薬剤を投与することにより海馬 CA3 野においてガンマオシレーションを誘導することができる。CA3 野に高密度に存在する興奮性ニューロン (錐体細胞) 及び抑制性ニューロン (バスケット細胞) からなる反回性神経回路が律動波の生成に寄与すると想定されているが, 局所神経回路機構の詳細や受容体機構については不明な点が多

い。そこで我々は, 海馬 CA3 野のガンマオシレーションにおけるカイニン酸受容体の役割について, 新規に合成されたカイニン酸受容体選択的阻害薬である ACET を用いて検討した。急性海馬スライス標本を作成し, CA3 野よりフィールド電位 (local field potential: LFP) を記録した。低濃度のカイニン酸を灌流投与することにより頑健なガンマオシレーションが誘導されたが, ACET を共投与することにより完全に消失した。反回性抑制回路を構成する興奮性ないし抑制性ニューロンに発現するカイニン酸受容体がガンマオシレーションの発生に重要な役割を担うことが示された。

(6) 鳴禽類音声コミュニケーション能力の生後発達機構

安部健太郎 (京都大学大学院 医学研究科)

鳴禽類 (スズメ亜目) に属する鳥類の多くは, ヒトと

同様に, 生後に「さえずり」と呼ばれる音声シーケンス

を用いた音声コミュニケーション能力を生後の社会環境から得られる情報に依存して獲得・発達させるため、高次音声情報処理および後天的な能力発達のモデル動物として有用である。

我々はこれまでに、鳴禽類の音声識別能力は生後の社会環境からの情報を受けて発達することをしめしており、鳴禽類の音声コミュニケーション能力の発達に寄与する先天および後天的要因についてその詳細を明らかにする研究に現在取り組んでいる。最近、我々は、鳴禽類において生後の社会情報入力依存的に発現が変化する遺伝子群を明らかにし、それらの発現の制御の鍵となる転写

制御因子を明らかにした。また、それらの遺伝子発現制御機構の活性を人為的に制御することにより、鳴禽類において生後の後天的情報依存的な「さえずり」などの音声コミュニケーション能力の発達を抑制及び促進することに一部成功した。これらの成果は鳴禽類の音声コミュニケーション能力の発達に及ぼす先天的要因と後天的要因、及びそれらの相互作用のメカニズムの一端を明らかにし、動物における生後の環境に依存した柔軟な発達機構の分子メカニズムを明らかにすることに貢献することが期待される。

(7) Local calcium signaling in spatio-temporal regulation of neuronal remodeling

榎本和生（東京大学，OBI）

ニューロンは自身の神経突起を巧みに配線することにより複雑な神経回路を構築する。神経突起の配線は、伸長・ガイダンスといったプログレッシブな過程に加え、不要な神経突起の刈り込みというリグレッシブな過程により達成される。近年、神経突起の伸長・ガイダンスについては多くの知見が得られている一方で、刈り込みを制御するメカニズムについては不明な点が多い。中でも、「ニューロンは如何にして不要な神経突起のみを“選択的に”刈り込むのか」という最も根本的な問題は未解決である。ショウジョウバエ幼虫から蛹へと変態する過程において、体表感覚ニューロンは幼虫期に発達させた樹状突起を一旦完全に刈り込み、成虫期までに新たな樹状突起を再構築する。我々は、この刈り込み過程における樹状突起内のカルシウム動態を長期に渡ってライブイメージングし、局所的なカルシウム流入が樹状突起の選

択的な刈り込みを引き起こす時空間的なトリガーとなる可能性を見出した。遺伝学的な解析から、この局所的カルシウム流入は電位依存性カルシウムチャネル（VGCC）を介して起こり、また VGCC 変異体においては樹状突起の刈り込みが顕著に阻害されることが明らかになった。従って、我々が見出した局所的カルシウム流入は樹状突起の刈り込みに必要である。さらに、光遺伝学を用いた実験を行い、刈り込まれる樹状突起においてはその興奮性が増大しており、VGCC を介したカルシウム流入経路が選択的に活性化していることを示した。以上の結果から、「ニューロンは樹状突起膜の興奮性を局所的に増大させることによりカルシウム流入を誘導し、不要な樹状突起のみを選択的に刈り込む」という新たなメカニズムが明らかになった。

(8) 神経細胞内シグナル伝達分子の活性化観察・操作

村越秀治（生理学研究所 脳機能計測・支援センター，多光子顕微鏡室）

神経回路の形成、機能の基礎となるシナプス結合の可塑性は、シナプスの後端を形成するスパイン内のカルシウムシグナルによって制御されていると考えられている。しかしながら、スパインのサイズは 0.1–1 フェムトリッ

トル程度と非常に小さく、しかも組織深部に位置するため、内部で起こるシグナル伝達過程は、これまで殆ど明らかにされてこなかった。しかし最近、“2 光子蛍光寿命イメージング法（2pFLIM; 2-photon Fluorescence Lifetime

Imaging microscopy)”や“光を用いた分子操作法”の進歩により、組織深部で分子活性を可視化したり、操作することが可能になり、入力刺激に対するシグナル分子の動態を詳細に調べることが可能になった。このような方法を用いて、最近我々は、青色光または2光子励起でCaMKIIの活性を1ミクロンの空間分解能と秒レベルの時間分解能で可逆的に操作することができる光応答性CaMKIIやCaMKII阻害ペプチドの開発に成功した。こ

れらの新規光応答性分子を用いることで、短時間のCaMKII活性化がスパインの可塑的变化の惹起に必要十分であることを明らかにした。また、ケイジドグルタミン酸の2光子アンケイジングにより、可塑的变化を引き起こしたスパイン中での低分子量Gタンパク質(Cdc42, RhoA)の活性化イメージングについても合わせて紹介させて頂いた。

(9) CaMKII: a bifunctional molecule both as a kinase and as a postsynaptic structural element gating synaptic plasticity

Yasunori Hayashi (RIKEN Brain Science Institute)

The size of a dendritic spine is dynamically regulated during activity dependent plasticity of synaptic transmission. It is, therefore, conceived that the mechanism regulating the size of a synapse is a critical part of the plasticity mechanism. Here, we demonstrate that Ca²⁺/calmodulin-dependent

protein kinase II (CaMKII), a pivotal kinase involved in regulating synaptic plasticity, mediates activity-dependent structural modification of dendritic spines through a novel activity-regulated F-actin stabilizing function.

(10) *Staggerer* マウスにおけるプルキンエ細胞の mGluR を介した応答は発達期の ROR α を必要とする

飯塚 朗, 松崎泰教, 今野 歩, 平井宏和 (群馬大学大学院医学系研究科 神経生理学)

小脳は生後も発達し、マウスでは生後3週間かけて神経回路をほぼ完成させが、小脳生後発達に重要な転写制御分子の一つにプルキンエ細胞(PC)とインターニューロンに発現する核内受容体, retinoid orphan receptor α (ROR α)がある。ROR α が機能的に欠損している *Staggerer* マウスの小脳は、顆粒細胞の増殖不全とPC樹状突起の伸長障害が見られ、顆粒細胞軸索である平行線維(PF)からPC樹状突起へのシナプス形成も顕著に障害されている。本研究では、ROR α を介したPF-PCシナプス形成に臨界期があるのかを調べるため、生後1週と生後3週の *staggerer* マウス小脳に、レンチウイルスベクターを用いてROR α 遺伝子を導入した。

生後1週でレンチウイルスベクターを小脳に接種する

と、ROR α は生後10日あたりから発現するが、これによりPF-PCシナプスは機能的にも形態的にも顕著に回復した。他方、生後3週で接種した場合、AMPA型グルタミン酸受容体を介した早いEPSCは回復するものの、mGluR依存性TRPC電流の回復は全く見られなかった。また、余剰な登上線維—プルキンエ細胞の刈取りも回復が見られなかった。これらの結果から、ROR α が制御するPF-PCシナプス形成において、AMPA型グルタミン酸受容体を介した早いシナプス伝達には生後3週までに明らかな臨界期は存在しないが、mGluRを介した遅い伝達の臨界期は生後3週までの間に存在し、それ以降にROR α が発現しても、mGluRシグナルの回復が見られないことが明らかとなった。

(11) 生後発達期の小脳登上線維刈り込みにおける各線維の絶対的な入力強度の役割

川田慎也（東京大学）

発表内容

発達期におけるシナプスの刈り込みは機能的な神経回路を形成する上で不可欠なプロセスである。これまでの研究からシナプス強度の相対的な差がシナプスの刈り込みに重要であることが知られてきた。しかし、シナプス強度のもう1つの側面である絶対的な強度がシナプスの刈り込みにどのような役割を果たしているかは明らかではなかった。そこで小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスで絶対的な強度が減少している γ -2 PC-KO マウスを作製し、解析した。 γ -2 PC-KO マウスではシナプス除去後期過程が特異的に障害されており、それには電位依存性カルシウムチャネルを介した Arc の活性化が関与していることが明らかとなった。以上よりシナプスの刈り込みにはシナプス強度の相対的な差だけでなく、絶対的な

強度も大きく関与していることが分かった。

質疑内容

Q: シナプス除去前期過程は何故正常に進行するのか。

A: 前期過程は異なる入力間の競合により刈り込みが行われるが、後期過程は細胞体に存在するシナプスの非選択的除去が起こるので十分な強さの入力が必要になる。

Q: Arc は野生型マウスにおいて発達に伴い発現が増加するのか。

A: 既に報告されている文献によると生後 9 日目から 16 日目にかけて Arc の発現が上昇する。

これら以外にも多くの質問を受け、非常に有意義な発表であった。

(12) 小脳抑制性シナプス可塑性 RP の運動学習への寄与

田中進介，平野丈夫（京都大学・理学研究科・生物物理）

川口真也（京都大学・理学研究科・生物物理，同志社大学・脳科学研究科）

小脳のシナプス可塑性は運動学習に重要と考えられてきたが、抑制性シナプス可塑性の役割については知見がなかった。小脳プルキンエ細胞では Rebound Potentiation (RP) と呼ばれる抑制性シナプス伝達の長期増強が知られている。RP の運動学習への寄与を調べるため、RP を選択的に阻害したトランスジェニックマウスを作製した。先行研究で、GABAA 受容体と細胞内分子である GABARAP との結合が RP の誘導と維持に必要であり、GABAA 受容体の結合部位と相同なペプチドにより、この結合と RP を阻害できることが報告されていた。トランスジェニックマウスでは、L7 プロモーターを用いてこ

のペプチドをプルキンエ細胞特異的に発現させた。このトランスジェニックマウスでは、RP が抑制されていたが、小脳皮質構造・プルキンエ細胞の受けるシナプス入力・プルキンエ細胞の活動電位発火特性に異常は認められなかった。次に、このトランスジェニックマウスで反射性眼球運動である前庭動眼反射 (VOR) 及び視運動性眼球運動 (OKR) を測定した。トランスジェニックマウスは、野生型と同様の VOR と OKR の基本動特性を示したが、VOR の適応変化は障害されていた。以上の結果は、プルキンエ細胞上の抑制性シナプスでおこる可塑性 RP が運動学習に関与することを示している。

(13) 受容体側方拡散の小脳プルキンエ細胞シナプスにおける AMPA 受容体トラフィックへの寄与

山口和彦 (理研・脳センター・行動遺伝)

小脳スライスおよび培養プルキンエ細胞を用いて AMPA 受容体トラフィックにおける側方拡散の寄与を、全く拡散バリアがない場合 (モデル 1)、スパインの付け根周辺に拡散バリアがある場合 (モデル 2)、シナプス膜近傍に拡散バリアがある場合 (モデル 3) について検討した。テタヌストキシン細胞内投与により、AMPA 受容体エクソサイトーシスを阻害した時の EPSC の減少は、あらかじめ投与した dynasore により完全に阻害された。モデル 1 の場合、この条件でも拡散による減少が期

待されるため、モデル 1 は除外される。Dynasore 投与によりエンドサイトーシスを阻害した場合、培養プルキンエ細胞スパイン上に表面発現した GluA2 密度は puncta 内で増加した。この時スパイン側面での GluA2 表面発現密度に変化はなかった。この結果はモデル ii) を支持しなかった。従ってモデル iii), すなわち受容体の拡散バリアがシナプス膜近傍にある可能性が示唆され、小脳プルキンエ細胞シナプス AMPA 受容体トラフィックにおける側方拡散の寄与は小さいと結論された。

(14) オプトジェネティクスを利用したラットウイスカ光刺激パターンニング

八尾 寛, 本城達也, 姫 志剛, 横山超一, 石塚 徹 (東北大学・生命科学研究科)

Thy1 プロモーター制御下にチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現するトランスジェニックラインの一つ (W-TChR2V4) においては、三叉神経節の機械受容ニューロン特異的に ChR2 が発現し、頬ひげ (ウイスカ) の毛包に分布する機械受容神経終末に ChR2 が高密度に分布している。そこで、光をもちいた触覚の時空間パターン (Optogenetic tactile pattern, OTP) の有効性を評価した。W-TChR2V4 ラットのウレタン麻酔下に、マルチユニット活動 (MUA) と局所フィールド電位 (LFP) を計測した。一侧のウイスカを剃り、LED あるいはファイバー付き LED で青色光を照射した。バレル野において、反対側の

ウイスカ床の青色光照射に同期した MUA のバースト活動 (Light-evoked burst, LEB) を計測した。LEB に引き続いた活動休止期に引き続き、アフターバーストが認められた。また、LFP については、光照射に同期したネガティブ応答とこれに引き続くスピンドル振動 (10-20 Hz) が認められた。単一ウイスカ青色光照射の場合、光刺激部位による違いが認められた。ウイスカ光照射の時空間パターンの違いにより特異的なバレル野のニューロン活動が引き起こされたことが示唆される。OTP と電気生理学的計測法、イメージングと組み合わせることにより、パターン応答情報処理メカニズムの解明が期待される。

(15) Substance P activates TRP-like Ca^{2+} -permeable cation channels through a phosphatidylcholine-specific phospholipase C signaling pathway in nNOS-expressing GABAergic neurons in visual cortex

遠藤利朗, 小松由紀夫 (名古屋大学 環境医学研究所)

大脳皮質の一酸化窒素合成酵素陽性神経細胞 (nNOS 細胞) に対する P 物質 (Substance P, SP) の作用機序を調べた。GAD67-GFP ノックインマウス視覚野の急性スライス標本で、nNOS 細胞は SP に対して非選択的陽イオン電流による脱分極を示した。この電流は TRP チャネルの

阻害薬ルテニウムレッドによって抑制された。一方ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C (PC-PLC) の阻害薬 D609 はそれ自身で K^+ 電流を誘発し、SP を追加投与すると K^+ 電流が抑制された。 K^+ 電流をあらかじめ阻害すると、D609 は SP による非選択的陽イオン電流を抑制

した。SP は大脳皮質の nNOS 細胞において PC-PLC を介した信号経路を通じて TRP 様電流を誘発すると考えられる。またこれとは別経路で K^+ 電流を誘発するが、この

経路は通常は PC-PLC 依存的に抑制されていると考えられる。

8. グローバルネットワークによる脳情報処理

2014年1月10日ー1月11日

代表・世話人：田中真樹（北海道大学医学研究科）

所内対応者：南部 篤（生体システム研究部門）

- (1) 前頭葉と大脳基底核をつなぐ連合系ループの機能

星 英司（東京都医学総合研究所）

- (2) Prefrontal-striatal interaction of dynamically represented reward value during anticipating future rewards

地村弘二（東京工業大学精密工学研究所）

- (3) サル下部側頭葉における物体の表象と記憶想起を司る局所神経回路内の情報伝達と計算原理

平林敏行（東京大学医学部統合生理学教室）

- (4) 新世界ザルマーモセットの側頭・前頭回路のミラーニューロンシステム

一戸紀孝（国立精神・神経医療研究センター）

- (5) 短期記憶中の前頭前皮質，中脳腹側被蓋野および海馬ネットワークの同期活動

藤澤茂義（理化学研究所脳総合研究センター）

- (6) ヒトの脳の大域的同期ダイナミクスの機能的役割の操作的解明

北城圭一（理研 BSI-トヨタ連携センター）

- (7) 皮質脳波法による視覚カテゴリーの復号化

長谷川功（新潟大学医学部 超越学術院）

- (8) 2種類の神経活動から淡蒼球外節の機能を考える

吉田篤司（北海道大学 医学研究科）

- (9) 神経路選択的な遺伝子導入による神経ネットワークの機能操作

井上謙一（京都大学 霊長類研究所）

- (10) 大脳基底核が制御する運動機能の解明を目指して ～分子生物学的手法を利用した挑戦～

佐野裕美（生理学研究所）

- (11) 神経-グリアネットワークの機能と破綻

松井 広（東北大学 大学院医学系研究科）

【参加者名】

高田昌彦，井上謙一（京大霊長類研究所），長谷川功（新潟大学），星 英司，山形朋子，中山義久，角田吉昭，

横山 修（東京都医学総合研究所），一戸紀孝，鈴木 航，阿部 央，宮川尚久（国立精神・神経医療研究センター），

藤澤茂義（理化学研究所）、北城圭一（理研 BSI-トヨタ連携センター）、田中真樹、吉田篤司、竹谷隆司、植松明子（北海道大学）、地村弘二（東京工業大学）、平林敏行（東京大学）、松井 広（東北大学）、望月 圭、西田知史（京都大学）、石田裕昭（Italian Institute of Technology）、渡我部昭哉（基礎生物研究所）、小松英彦、高桑徳宏、

南部 篤、橋 吉寿、畑中伸彦、知見聡美、佐野裕美、瀬瀬大輔、金子将也、尾崎充宣、Dwi Wahyu Indriani、Rodsiri Ratchanee、鈴木迪諒、橋口真帆、吉田正俊、岡本正博、青木直哉、渡辺秀典、小川正晃、加藤利佳子、郷田直一、波間智行、菅原 翔（生理学研究所）、合計 48 名

【概要】

本会はシステム神経科学の研究者が中心となって長年にわたって続けている研究会であり、今年度は霊長類を用いた研究を行っている研究者に加え、磁気刺激や二光子顕微鏡、分子ツールなど様々な研究手法を用いている研究者にも講演をお願いした。改修を終えたばかりの生理研（明大寺）1 階の大会議室が会場となった。

初日は、前頭-基底核機能、前頭-側頭葉機能、周期的脳活動などに関する 3 つのセッションがあった。7 名のスピーカーのうち 6 名は 40 歳代半ばまでの若手 P I であり、最新の研究内容を含んだレベルの高い講演が続いた。初日ということもあり、多数の質問を打ち切らずに進行したため、予定時間を 30 分ほど超過して初日終了となった。その後、隣のセミナー室を利用して、懇親

会を開催した。

2 日目は 2 つのセッションがあり、分子ツールを用いた研究を中心に、若手研究者による基底核、小脳回路に関する講演があった。いずれも新しい研究手法を駆使した最新の知見であり、多くの参加者は寝不足であったにもかかわらず、多くの質問が寄せられた。すべての講演が終了した後は、本会に長年携わってきた京大の高田先生による講評をいただくとともに、来年度から本会を引き継ぐ予定の星先生からの挨拶があった。

昨年に引き続き、小さめの会場でじっくりと講演を聞き、互いに忌憚のない意見交換をすることができた。研究会後も懇親会で大いに盛り上がり、様々なレベルでの交流ができたことは大変有意義であった。

（1）前頭葉と大脳基底核をつなぐ連合系ループの機能

星 英司（東京都医学総合研究所）

前頭葉の高次脳領域（前頭前野と運動前野）が大脳基底核と形成する連合系ループの機能を解析するために、一連の電気生理学的研究を行った。高次脳機能処理における重要な三要素である「行動ゴール決定」、「アクション選択」、そして、「行動ゴールのモニタリング」に着目し、これらの要素を含んだ課題を遂行しているサルの前頭葉と大脳基底核・淡蒼球における連合系ループ部位より細胞活動を記録したところ、複数の興味深い知見が得られた。まず、1) 視覚情報にもとづいて行動ゴールを決定する過程は、前頭葉と淡蒼球で同時に反映されること、2) アクション選択は前頭葉が先行し、淡蒼球はこれに続くこと、そして、3) 淡蒼球におけるゴールとアクションの表現時間は、前頭葉に比べてより短時間であ

ることが見出された。これらの結果は、前頭葉と大脳基底核がゴール決定やアクション選択に特異的な関与をすること、ならびに、決定されたゴールや選択されたアクションの保持には前頭葉が主要な関与をすることを明らかとした。次に、4) 行動の結果にもとづいてゴールを更新する必要がある状況下では、ゴールに向かって到達運動を実行している最中に、前頭前野だけでなく淡蒼球も行動ゴールを反映することが見出された。これは、連合系ループ全体が、行動ゴールのモニタリング過程において重要な役割を果たすことを示唆する。こうした一連の発見は、認知的行動制御が前頭葉-大脳基底核連合系ループの機能連関によって達成される実態の一端を明らかとした。

(2) Prefrontal-striatal interaction of dynamically represented reward value during anticipating future rewards

地村弘二 (東京工業大学精密工学研究所)

Representation of reward value is one of the factors that determines decision variables and recruitment of executive control. Neuroimaging studies of decision-making and cognitive functions have primarily focused on task-related transient changes in activity magnitudes. Here I demonstrate an alternative mechanism, temporally dynamic modulation, that involves complementary changes in temporal patterns of activity systematically occurring in brain regions and individuals.

In a series of behavioral and neuroimaging experiments, I will talk about the dynamic and interactive neural mechanisms in decision-making situations. Functional MRI was administered during the entire phases in intertemporal choice behavior, i.e., choice, anticipation, and consumption of reward. While anticipating a delayed reward (~60 sec),

ventromedial prefrontal cortex and ventral striatum showed a dynamic activity pattern of subjective value of the delayed reward formulated by behavioral economics function of delay discounting. On the other hand, anterior prefrontal cortex showed a complementary pattern, an inverse of the subjective value dynamics. Importantly, dynamics in the prefrontal and ventral striatum regions reflected individuals' degree of delay discounting. A mixed-effect functional connectivity analysis comprehensively revealed that these three mechanisms were interactively signaling during decision-making and anticipating the future reward. These collective evidences demonstrate shifts in activation dynamics, not simple unitary changes in activity magnitude, modulated by representation of reward value, suggesting a flexible fronto-striatal mechanism maximizing reward value coding.

(3) サル下部側頭葉における物体の表象と記憶想起を司る局所神経回路内の情報伝達と計算原理

平林敏行 (東京大学医学部統合生理学教室)

霊長類の下部側頭葉は、物体についての視覚表象ならびに記憶を司る脳領域として知られている。これまでに、サルを用いた単一神経細胞活動の記録により、この領域において物体の視覚表象や記憶想起に関わる神経細胞群の活動が多く示されてきた。しかし、これらの神経細胞群が互いにどのような回路を形成し、どのような計算原理で上記の神経表象を形成しているかについては未解明のままである。本研究では、物体間対連合記憶課題を遂行中のマカクザル下部側頭葉から多細胞同時記録を行い、Granger 因果性解析 (Hirabayashi *et al.*, 2010) 及

び相互相関解析を用いて単一神経細胞間の機能的結合の強さと方向性を求めた。これにより、課題遂行中の局所神経回路内における、対連合記憶関連ニューロン間の情報伝達とそのダイナミクスを解析し、回路の計算原理を明らかにした。本研究会では、まず物体間対連合記憶の想起信号を生成する局所神経回路の動作について紹介する (Hirabayashi *et al.*, 2013a)。さらに、物体間対連合の視覚表象の形成が領野間の階層的な計算原理によって成立しているという新しい仮説 (Hirabayashi *et al.*, 2013b) について議論したい。

(4) 新世界ザルマーモセットの側頭・前頭回路のミラーニューロンシステム

一戸紀孝（国立精神・神経医療研究センター）

コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) は家族で協調的で模倣的に子供を育て、多産で遺伝子改変動物作成も可能であり、近年興味を持たれているモデル動物である。自己と他者の同様の行動や目的の両者に一個の神経細胞が発火するミラーニューロンは、模倣をすることが知られている、この動物に存在することが証明できれば、この細胞の機能について、マカクとは別の角度から研究する機会を提供すると考えられる。この動物のもう一つの特徴は、溝が少なく、マカクザルでアクセスしにくい領野に、脳表から簡便に到達できると同時に、逆に、溝というランドマークが少ないために、脳の領野の部位を事前に知る事が困難であるということである。

今回、我々は側頭葉にある数少ないマーモセットの浅い溝である上側頭溝 (STS) が、他者行動を表現する領野のよいランドマークとなる事を麻酔下のマーモセットで見いだした。その領域から、他の動物が摂餌行動中に餌に触れた時に強く反応する領野を同定し、蛍光の逆行性のトレーサーである CTB-Alexa555 (Ichinohe et al., 2012) を注入し、1週間後に、前頭葉を開頭して成体で蛍光実体顕微鏡で見ると、ミラーニューロンがマカクで記録される部位と相同と考えられる腹側運動前野 (area 6v) 周囲に、明るいスポットが確認されたので、この STS 領野と 6v 周囲に多点電極を刺入・固定し、覚醒下で他者が摂餌行動を行っているのを観察しているときと、自分が摂餌行動している際に、神経活動の記録を行った。

神経活動に関しては、自己でも他者でも、餌にタッチしているタイミングの周囲の活動に焦点を当てて解析を行った。その結果、STS 周囲は、他者がバナナ（より好ましい餌）でも、パン（それほど好ましくない餌）に手で触れた時に強い反応を示した。また、この領域は、他者がピンセットでバナナにタッチして持ち上げても、ほぼ同様の反応を見せた。しかし、餌を置かず取るふりをするだけの行動を見せると、反応は著しく現弱した。このことは、STS 周囲は、他者の行動の目的に反応していることを推測させる。これに対して、6v 周囲は、他者が手でバナナ、パンに触れた時には、強い反応を見せるが、ピンセットで触れた時には、反応が著しく減弱し、どのような手法で餌を取るかにも、反応する事が示された。餌がない時の、手で摂餌をする方法についての減弱は、STS より弱く、やはり 6v 周囲がより餌を取る手法に関与している可能性を示している。また、自己が餌に触れて餌を取ったときの反応に関しては、6v 周囲の他者行動への反応を示す細胞の 30% が、反応を示しミラーニューロンである事が示された。STS 周囲で同様の強い反応はごくまれに見られる程度であった。この強い結合のある 6v 周囲-STS 周囲の細胞は他者の行動の表現に類似点があるが、抽象的なレベルで違いが見られ、これらの協同的な働きにより、他者および自己のモニタリング、そして、可能性として模倣に関わっていることが示された。

(5) 短期記憶中の前頭前皮質、中脳腹側被蓋野および海馬ネットワークの同期活動

藤澤茂義（理化学研究所脳総合研究センター）

前頭前皮質 (PFC)、海馬、および中脳辺縁系回路は、報酬関連行動において重要な役割を果たしていると考えられているが、これらの領域がどのように相互作用して機能を遂行しているかはまだ明らかになっていない。本研究では、T 字型迷路を用いた短期記憶課題を遂行中のラットにおいて、PFC、海馬 CA1、および中脳腹側被

蓋野 (VTA) の 3 領域から同時に高密度細胞外電位記録を行い、ニューロンの発火活動と局所細胞外電位を観測した。その結果、PFC および VTA において、2~5 Hz の周波数帯域をもつ低周波オシレーション (4-Hz オシレーション) が、特に短期記憶を必要とする区間において強く観測された。また、PFC および VTA の局所回路で生

成されるガンマ波 (30-80Hz) およびニューロンの発火活動を調べたところ、これらは 4-Hz オシレーションの位相において活動の強さが違うことが観測され、このことよりこの 4-Hz オシレーションは PFC および VTA の局所回路の活動に強く影響を与えていることが明らかになった。この 4-Hz オシレーションは、海馬においてはほとんど観測されなかったが、海馬で強く観測される

シータ・オシレーション (～8Hz) と 4-Hz オシレーションは位相の同期関係にあることが明らかになった。以上の結果により、4-Hz とシータオシレーションの位相同期により、これらのオシレーションは前頭前皮質-大脳基底核の報酬関連回路と、海馬およびその関連部位での空間・エピソード記憶系回路の統合をサポートしているのではないかと考えられる。

(6) ヒトの脳の大域的同期ダイナミクスの機能的役割の操作的解明

北城圭一 (理研 BSI-トヨタ連携センター)

近年、ヒトの非侵襲脳計測により脳活動の大域的同期ダイナミクスにより構築されるネットワークと知覚、認知、運動等の脳機能とかかわりを示す神経関連研究が数多く報告されている。より因果的な機能解明をするためには同期ダイナミクスの操作が不可欠であるがこの観点からの研究は方法論的な問題によりこれまでほとんどなされてこなかった。これに関して、我々は、経頭蓋磁気刺激(TMS)は脳の振動同期ダイナミクスやそれにとまなう情報流の制御手法として用いることができ、同期ダイナミクスと脳機能との因果関係を示すことができると推測した。そこで TMS-脳波計測システムを用いてヒトの脳活動の同期ダイナミクスの機能的、因果的役割を操作的に検証することを大目的とし、まずはヒトの脳の同期ダイナミクスの TMS による制御可能性を実験検証した。その結果、TMS はヒト脳波の大域的位相同期

ダイナミクスを制御することができることが明らかになった。より具体的には我々は、安静時の TMS-脳波計測で、

1. ヒトの脳波の振動位相を局所、大域的に TMS によりリセットできること
2. 脳波位相リセットとその大域的伝搬は脳状態依存的であること
3. 脳波位相リセットの大域的伝搬にともなって領野間の大域的ネットワークでの有向情報流の変化が引き起こされていることを示した。

さらに、ヒトの脳の同期ダイナミクスと脳機能との因果関係を操作的に示す知覚実験結果を紹介し、脳の同期ダイナミクス、大域的ネットワークの操作解明手法としての TMS-脳波手法の有効性を示す。

(7) 皮質脳波法による視覚カテゴリーの復号化

長谷川功 (新潟大学医学部 超越学術院)

わたしたちは脳の表面に「網をかける」ように張りめぐらせて局所フィールド電位を多点記録する柔軟なメッシュ型の皮質脳波 (Electrocorticography: ECoG) 電極を考案し、ラットやサル動物モデルと臨床研究で、微小電極法との比較において、皮質脳波の信号記録特性を検証する系を開発しました (1, 2)。マカクザルでは、メッシュ型電極を脳表のみならず脳溝に広範囲留置するこ

とも可能となりました (3)。本研究会では、マカクザル下側頭葉からの高密度記録、およびヒト腹側後頭側頭皮質からの臨床計測で得た皮質脳波を、脳情報デコーディングのアプローチで解析した結果 (4; Miyakawa et al in preparation) から垣間見られる、種々の視覚カテゴリーの脳内表現について、話題を提供します。

(8) 2種類の神経活動から淡蒼球外節の機能を考える

吉田篤司（北海道大学 医学研究科）

大脳基底核は複数の核で構成され、行動選択や強化学習などに関与する。これらの機能を発現する回路として、DeLong らにより提唱された直接路、間接路、さらには南部らによって提案されたハイパー直接路という概念が広く受け入れられている。しかし、これらは非常に単純化されており、また、解剖学的研究からは、実際の経路はもっと複雑であることが示唆されている。これまで、淡蒼球外節（GPe）は間接路の一部とされ、線条体から抑制性の投射を受けることから行動時にはニューロンの自発活動が減少すると考えられてきた。しかし実際は、活動を減少させるニューロン（decrease-type neuron）よりも、増加させるもの（increase-type neuron）の方が多いことが報告されている（Goldberg and Bergman, 2011）。我々の以前の研究でも、antisaccade や滑動性追跡眼球運動を行っているサルGPeから単一ニューロン活動を記録したところ、両タイプの課題関連活動が認められた（Yoshida and Tanaka, 2009a,b）。しかし、それぞれのタイ

プが行動のどのような側面を反映しているのか未だ明らかではない。今回我々は prosaccade や antisaccade 課題に加えて NoGo 課題を導入するとともに、固視点の色によって課題の種類を事前に知らせた場合（deliberate 条件）と、ターゲットの色によって初めて課題の種類を提示し、瞬時の行動選択をさせた場合（immediate 条件）でGPeの神経活動を比較した。その結果、increase-type ではいずれの条件でも神経活動と antisaccade の潜時に相関を認め、decrease-type では immediate 条件でのみ antisaccade と NoGo 課題で類似した活動を示した。これらの結果から、前者が運動生成の促進に、後者が反射的な運動の抑制に関与している可能性が示唆された。また、increase-type neuron の反応から、これまで提唱されている3つの経路に加えて、大脳皮質-視床下核-淡蒼球外節-淡蒼球内節/黒質網様部という経路が行動の選択に関与する可能性が考えられた。

(9) 神経路選択的な遺伝子導入による神経ネットワークの機能操作

井上謙一（京都大学 霊長類研究所）

さまざまな症状を呈する精神・神経疾患の病態を理解し、効果的な治療法の開発に結びつけるためには、個々の疾患の原因となる遺伝子や細胞機能の異常を調べるとともに、発現する症状（機能失調）がどの神経路の関与によるものか、という神経ネットワークと脳機能との関係を一つ一つ解明することが極めて重要である。このことを実現するためには、ヒトと進化的にも行動学的にも近縁のサル類において、特定の神経回路機能に介入し行動学的・生理学的解析を行うアプローチが有効であると考えられる。私達はその1つとして、神経路選択的な遺伝子導入による神経ネットワーク操作技術を開発し、高次脳機能解析に応用している。本発表では、まず逆行

性感染型レンチウイルスベクターを利用したイムノトキシン神経路標的法により、ハイパー直接路を選択的に除去したモデルサルを作製し、運動野刺激に対する淡蒼球内節ニューロンの早い興奮性応答がハイパー直接路を経由するものであることを明らかにした結果を紹介する。次に、逆行性感染型レンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターによる多重感染とテトラサイクリン誘導性転写制御システムを組み合わせた、神経路選択的な伝達制御法を黒質線条体ドーパミン投射系に適用し、薬剤依存的かつ可逆的にパーキンソン病様の運動障害が誘発されるモデルサルを作出した実験結果を紹介する。

(10) 大脳基底核が制御する運動機能の解明を目指して ～分子生物学的手法を利用した挑戦～

佐野裕美 (生理学研究所)

大脳基底核の障害に起因するパーキンソン病、ハンチントン病、ジストニアなどでは、重篤な運動障害が認められることから、神経回路全体として随意運動の制御に重要であることはよく知られている。これまでに大脳基底核に関する様々な基礎研究や臨床研究が行われており、直接路、間接路、ハイパー直接路を中心とした神経回路モデルも提唱されてきた。そのため、教科書的には大脳基底核が制御する機能の作動原理が明らかにされているように思われがちである。しかし、個々の神経経路が制御する生理機能についての詳細は、十分に解明されていないのが現状である。

我々のグループでは、以下のような分子生物学的手法を用いて、大脳皮質-線条体経路や線条体投射ニューロンが神経活動と行動に果たす役割の解明に取り組んでいる。

(1) イムノトキシン細胞標的法：標的とするニューロンに特異的にヒトインターロイキン2受容体を発現するトランスジェニックマウスを作製し、局所にイムノトキシンを注入することにより、特定のニューロンを後天的かつ選択的に除去する。

(2) 光遺伝学 (optogenetics)：ウイルスベクターあるいはトランスジェニックマウスを用い、標的とするニューロン特異的に光受容体であるchannelrhodopsin-2を発現させ、光照射により特定の神経経路特異的に興奮を誘導する。

このような手法を用い、淡蒼球外節や黒質網様部などから記録するとともに、マウスの行動変化を観察している。今回の講演では、失敗も含めたこれまでの試みと研究成果について報告する。

(11) 神経-グリアネットワークの機能と破綻

松井 広 (東北大学 大学院医学系研究科)

チャネルロドプシンやアーキオロドプシンを発現している細胞に光を当てると、膜電位を脱分極させたり過分極させたりすることができる。細胞の活動を特異的に光操作できる性質が注目され、光遺伝学の脳科学への応用が始まったのは8年程前のことである。光遺伝学の第一のターゲットとされたのは神経細胞であり、特定の神経細胞の活動が、こういった脳機能と結びついているのかを調べる研究が進んだ。我々のグループでは、この技術をグリア細胞に適用するという、これまであまり考えられてこなかった応用に挑んでいる。グリア細胞は、脳の中の不活性な細胞と見なされ、脳内情報の担い手であるとは捉えられてこなかった。ところが、近年のイメージング研究を通して、グリア細胞は何らかの情報を活発にコード化していることが、明らかになりつつある。しかし、神経から情報を受け取っているとはいえ、グリア

の活動を神経へとフィードバックする術がなければ、グリアが脳内情報処理に参加しているとは言い難い。グリアから神経への情報伝達の道筋がきつとあるはずだ、と考えられるようにはなったが、これまで、グリア細胞だけを特異的に刺激する方法がなかったため、グリアー神経間信号伝達の存在やその意義を検証することはできなかった。そんなところに、光遺伝学という技術が登場した。我々のグループは、グリアー神経間の信号伝達を調べることにこそ、この技術を活用するべきであると気がついたわけである。さらに我々は、チャネルロドプシンやアーキオロドプシンは、細胞膜電位を変化させるだけでなく、細胞内イオン環境を操作するツールにもなることに気が付いた。この性質を活用して、これまで誰もチャレンジしたことのない光遺伝学応用を展開しているので、研究の一部をご紹介します。

9. 神経オシレーション:共振とディスリズミア (Conference on Neural Oscillation)

2013 年 7 月 18 日－7 月 19 日

代表・世話人：池田昭夫（京都大学医学研究科脳病態生理学講座 臨床神経学）

美馬達哉（京都大学大学院医学研究科附属脳機能総合研究センター）

所内対応者：南部 篤（生体システム研究部門）

- (1) Electrophysiological study of human sensorimotor control
Chun Kee Chung (Seoul University)
- (2) Watching the human brain at work from within: Neural oscillations and their behavioral correlates
Nathan Crone (Johns Hopkins University)
- (3) Clinical ECoG/single unit analysis for epilepsy surgery and brain mapping
Kensuke Kawai (The University of Tokyo)
- (4) High-frequency neural oscillations in pediatric epilepsy
Tomoyuki Akiyama (Okayama University)
- (5) Dynamic modulation of neural oscillation under physiological and epileptic conditions
Riki Matsumoto (Kyoto University)
- (6) Causality analysis of the local field potential and its application to epileptic seizure
Ryosuke Hosaka (Fukuoka University)
- (7) Beta oscillatory activity of single neurons in the subthalamic nucleus in patients with Parkinson's disease
Kazutaka Kobayashi (Nihon University)
- (8) Functional couplings between bilateral motor cortices and subthalamic nuclei in patients with Parkinson's disease
Kenji Kato (National Institute for Physiological Sciences)
- (9) Oscillations in parkinsonism
Olivier Darbin (University of Southern Alabama)
- (10) ABCs of the Basal Ganglia
Atsushi Nambu (National Institute for Physiological Sciences)
- (11) Restoration of motor function and brain neuroplasticity in stroke hemiparesis
Satoko Koganemaru (Kyoto University)
- (12) How do humans choose one arm from the other?
Rieko Osu (ATR)
- (13) Where there is smoke, there is craving - neural circuits of addiction
Takuya Hayashi (RIKEN)
- (14) Age-related changes across the primary and secondary somatosensory areas: An analysis of neuromagnetic oscillatory activities
Koichi Hagiwara (Kyusyu University)
- (15) Statistical method for detecting phase shifts in alpha rhythm from single-trial electroencephalogram
Yasushi Naruse (NICT)
- (16) Controlling neural oscillations and causal information flow in the human brain
Keiichi Kitajo (RIKEN)
- (17) Spatiotemporal analysis of human neural oscillation by simultaneous fMRI-EEG

Hiroaki Mizuhara (Kyoto University)

(18) Large scale spatiotemporal spike patterning associated with wave propagation of beta oscillation in motor cortex

Kazutaka Takahashi (Chicago University)

【参加者名】

Borgil Bayasgalaan (京都大), Christian Altmann (京都大), Chun Kee Chung (ソウル大), June Sic Kim (ソウル大), Kazutaka Takahashi (Chicago Uni.), Manyoel Lim (ソウル大), Nathan Crone (Johns Hopkins Uni.), Olivier Darbin (Uni. of Southern Alabama), 秋山倫之 (岡山大学), 芦塚あおい (京都大), 麻生俊彦 (京都大), 阿部十也 (NCNP), 池尻達紀 (京都大), 池田昭夫 (京都大学), 石井 徹 (京都大), 稲野理賀 (京都大), 井内盛遠 (京都大), 茨木拓也 (東京大), 上原新太郎 (情報通信研究機構), 宇川義一 (福島県立医科大), 宇佐美清英 (京都大), 枝川光太郎 (大阪大), 大須理英子 (ATR), 太田真紀子 (京都大), 奥村栄一 (横河電機), 小野健太郎 (京都大), 小野島隆之 (京都大), 加藤健治 (生理学研究所), 加藤 徹 (岡崎市民病院), 金澤恭子 (京都大), 金沢星慶 (京都大), 川合謙介 (東京大), 川口典彦 (東北大学), 北城圭一 (理化学研究所), 切原賢治 (東京大), 國枝武治 (京都大学), 久保孝富 (NAIST), 軍司敦子 (NCNP), 額額大輔 (生理学研究所), 小金丸聡子 (京都大), 小林一太 (日本大), 小林勝弘 (岡山大学), 小林勝哉 (京都大), 斉藤景子 (京都大), 斉藤秀和 (札幌医科大), 佐藤 啓 (京都大), 佐野裕美 (生理学研究所), 清水崇宏 (東京大), 清水豪士 (大阪大), 下竹昭寛 (京都大), 白松知世 (東京大), 杉野寿哉 (京都大), 高橋秀俊 (NCNP), 田川みなみ (群馬大), 武井雄一 (群馬大), 竹田昂典 (九

州大), 多田真理子 (東京大), 知見聡美 (生理学研究所), 堤 涼介 (東京大), 東口大樹 (名古屋大), 富永 渉 (京都大), 飛松省三 (九州大), 中江卓郎 (京都大), 中里信和 (東北大), 長峯 隆 (札幌医科大), 成瀬 康 (情報通信研究機構), 南部 篤 (生理学研究所), 野瀧一平 (名古屋大), 萩原綱一 (九州大), 畑中伸彦 (生理学研究所), 花川 隆 (NCNP), 花島律子 (東京大), 林 拓也 (理化学研究所), 深谷 親 (日本大), 福田敦夫 (浜松医科大学), 藤原祐介 (ATR), 文室知之 (京都大), 保坂亮介 (福岡大), 前澤仁志 (北海道大), 榎 奈央 (京都大), 松橋真生 (京都大), 松本理器 (京都大), 三上佑介 (京都大), 三國信啓 (札幌医科大), 水口暢章 (情報通信研究機構), 水原啓暁 (京都大), 美馬達哉 (京都大), 虫明 元 (東北大), 矢澤省吾 (札幌医科大), 柳澤琢史 (大阪大), 山尾幸広 (京都大), 山村頼子 (NAIST), 山本啓之 (名古屋大), 横地房子 (都立神経病院), 横山ちひろ (理化学研究所), 吉村 弘 (徳島大), 分部利紘 (東京大), 桜庭理恵 (東北大学), 大城武史 (東京大), 井上岳司 (京都大), DWI WAHYU, Indriani (NIPS), Zeghibib (NIPS), 南 哲人 (豊橋科学技術大), 別府 薫 (NIPS), 下田良輝 (NIPS), Sumru Keceli (NIPS), 松井 広 (NIPS), 渡辺秀典 (NIPS), 笹田周作 (NIPS), 西田南海子 (北野病院), 緒方勝也 (九州大学), 岩崎真樹 (東北大学)

【概要】

本研究会は、神経活動の特徴の一つである律動性、即ちオシレーションに着目し、回路モデルから単一神経細胞記録やスライス実験、ヒトでの研究、臨床応用に至る異なる分野の研究者が領域横断的かつ有機的に連携することで、その機能的意義を統一的に理解し発展させるとともに、次世代の研究者を育成することを目指すものである。

本年の研究会では学生30人を含む112人の参加があり、てんかん・海馬とオシレーション (てんかん発作の生起モデル, 治療, 脳機能マッピング, 高周波振動など), 皮質基底核ループとオシレーション (視床下核の神経生理, パーキンソン病における振動現象など), 脳機能ネッ

トワークのイメージング (皮質の運動機能可塑性, リハビリ, 意思と運動制御, 依存のイメージングなど), 脳律動研究の新展開 (非侵襲的振動カップリング研究, 単一試行での位相シフト検出, 情報の流れと因果性の検出, 脳波・MRI 同時記録による脳律動解析, in vivo での大規模な神経スパイク伝搬など) の分野について口演と活発な討論が行われたほか、主に若手研究者による32のポスター演題についてはベテラン・若手を交えた意見交換がなされた。基調講演は韓国ソウル大学の Chun Kee Chung 教授により感覚運動調節におけるオシレーションの役割と研究の動向についてレクチャーいただき、また生理学研究所の南部教授が教育講演として基底核の神

経生理を学生にもわかりやすいように基礎から運動調節の最先端まで日本語で解説していただいた。

計算論・生理学・神経科学・臨床神経生理学・脳外科学など様々な分野からこれほどの研究者・学生が集まったことは神経オシレーションに関する関心の高まりと、

このような統一的な研究会を継続することの必要性を示すものであり、本会において学生・若手研究者が多く参加・発表・討論できたことは今後の脳研究の発展に大きく貢献できたと考えられる。

(1) Electrophysiological study of human sensorimotor control

Chun Kee Chung

(MEG Center, Department of Neurosurgery, Seoul National University Hospital, 110-744 Seoul, South Korea)

Neurophysiological studies regarding normal or abnormal sensory and motor processing in the human brain were investigated using magnetoencephalography. This lecture covers the following subjects of research: cortico-muscular coherence (CMC), motor planning, somatosensory response, and movement trajectory prediction. First, we developed the robust source analysis method which enhances the synchronization between muscle and motor cortex activity. Utilizing this method, relationship between beta-band CMC and motor performance in healthy people and patients with Parkinson's disease with deep brain stimulator was investigated. Recent results of oscillatory sensory reafference during steady-state motor output will be presented. Second, cortical representation of sequence category within the area involved in motor planning was investigated. Although the

ability to make specified plans prior to taking action is of importance in human surviving, the neural mechanism of converting motor planning into actual executive orders is not totally understood. Third, to understand how the brain receives and regulates external stimuli, modulatory effect of interfering stimuli with different intensities on somatosensory evoked field following median nerve stimulation was investigated. Lastly, we'll present a predictability of movement trajectory based on the change of brain activity according to different movements. To enhance the prediction performance, we suggested a novel prediction algorithm which uses additional feedback information. We could find out sensory-motor interaction and integration as well as the neural activity each of motor and somatosensory using magnetoencephalography.

(2) Watching the human brain at work from within: Neural oscillations and their behavioral correlates

Nathan E. Crone

(Dept of Neurology, The Johns Hopkins University School of Medicine)

Epilepsy surgery offers a unique opportunity to observe the human brain at work from within. When surgical planning requires long-term monitoring with implanted electrodes, clinicians and scientists can study the dynamics of neural networks with unprecedented spatial and temporal resolution as they participate in both normal and pathological brain states. However, this requires the interpretation of complex

EEG signals that reflect the organized activity of large populations of neurons. One obvious and important way in which population activity is organized is in oscillations, which can occur at different frequencies and can be augmented or suppressed under different physiological conditions. For example, oscillations at lower frequencies are suppressed during functional activation of cortical

populations and may reflect a gating mechanism by which thalamocortical circuits control the flow of information across brain networks. On the other hand, oscillations at higher frequencies that are enhanced during functional activation may reflect the organized activity of subpopulations of neurons that selectively code for task-relevant information. These changes in oscillatory activity can be used to create a virtual movie of the human brain at work as its different functional-anatomic components are recruited in real time to perform everyday tasks. Moreover, functional interactions between the different components of large-scale brain networks can also be visualized by measuring correlations and causal relationships between oscillations recorded at different brain sites. The dynamics of these interactions may offer greater insights into how individual brain regions

contribute to network activity and thus to overall brain function. This information is not just interesting from a scientific perspective, but also has the potential to provide much needed guidance to clinicians seeking to maximize the resection of tissue responsible for seizures while minimizing the resection of tissue responsible for normal function. To do this it will also be necessary to distinguish normal from abnormal oscillations, which can occur at the same frequencies, and likewise, to distinguish normal from abnormal network activity. Recent recordings from smaller and more closely spaced intracranial electrodes have discovered normal and abnormal population activity at scales that pose new challenges and opportunities for the surgical management of epilepsy.

(3) Clinical ECoG/single unit analysis for epilepsy surgery and brain mapping

Kensuke Kawai, Naoto Kunii, Takeshi Matsuo, Nobuhito Saito (Dept. of Neurosurgery, The University of Tokyo)

Naohisa Miyakawa, Isao Hasegawa (Dept. of Physiology, Niigata University)

While intracranial electroencephalography (iEEG) or electrocortico-graphy (ECoG) has been widely used for localization of epileptic foci and brain mapping, there has been growing interest in single-neuron recording in human that may offer the highest temporal resolution and functional specificity. To directly compare their properties, it is crucial to perform these recordings simultaneously. We propose surgical techniques to simultaneously implant micro- and macro-electrodes and present the findings obtained from those recordings.

We employed a wireless navigation system instead of stereotactic device and modified the Behnke-Fried electrodes, to correctly position the depth-microwire electrodes (Type 1) in open craniotomy. Additionally, we developed and implanted hybrid-type electrode for recording of ECoG and single units from the brain surface (Type 2).

Type 1 electrodes were placed mainly in the parahippocampal gyrus with a precision of 3.6 mm. Mean successful recording rates of unit activities improved dramatically as we refined the electrodes and implantation

techniques, which reached 28.1% (15.6-46.9%) for Type 1 and 53.8% (16.7-100%) for Type 2, in 7 patients who underwent the implantation during last 1 year. The stable recording was maintained through the entire recording period for nearly 4 weeks. There was no additional complication associated with microelectrodes.

We successfully recorded different aspects of the ictal neural activity with single-unit, LFP and iEEG in a local brain region of 2 patients. Different neurons showed various firing patterns at the onset of seizure and some neurons increased firing rate corresponding to the high frequency oscillation of iEEG.

A visually evoked single unit response represented particular pattern of response only to the photograph of a family member. Microwire recording revealed task-related high gamma activity that was not detected by subdural surface electrodes.

Simultaneous multi-level neural activity in human may lead to further understanding of epileptogenicity and brain function.

(4) High-frequency neural oscillations in pediatric epilepsy

Tomoyuki Akiyama (Dept. of Neurology, Okayama University Hospital)

High-frequency oscillations (HFOs) are conventionally classified into ripples (80-250 Hz) and fast ripples (≥ 250 Hz). In epilepsy surgery determination of the localization and extent of the epileptogenic zone, resection of which is necessary and sufficient to suppress epileptic seizures, is important to improve post-surgical seizure outcome. Compared with interictal spikes, a conventional marker of epilepsy, it has been suggested that interictal HFOs be a better surrogate marker of the epileptogenic zone. Studies on HFOs recorded by intracranial EEG have shown that surgical resection of the brain tissue(s) generating high rates of HFOs, especially fast ripples, is associated with better post-surgical outcome. HFOs can be identified by visual inspection or automated detection. We developed a method of automated HFO detection to make color topographic maps of the occurrence rate of HFOs. Using this method, we demonstrated more complete resection of HFO-generating

brain tissue(s) resulted in better seizure control in pediatric intractable epilepsy (Akiyama et al. 2011a). Efficient and precise identification of HFOs and differentiation of pathological (epileptogenic) HFOs from physiological HFOs are needed to understand the mechanism of epilepsy and to further improve post-surgical outcome.

Ictal HFOs as well as interictal HFOs are important to understand the initiation and propagation of seizure activities. Relationship between the area of surgical resection and the brain region where HFOs start and spread affects post-surgical seizure outcome. In neocortical epilepsy, when HFOs stay mostly within the resection margin throughout seizures, post-surgical outcome seems favorable (Ochi et al. 2007). Visualization of such HFOs, especially by color topographic movies, is helpful to interpret dynamic changes of HFO distribution during seizures (Akiyama et al. 2006, 2011b).

(5) Dynamic modulation of neural oscillation under physiological and epileptic conditions

Riki Matsumoto, Akio Ikeda (Dept. of Neurology, Graduate School of Medicine, Kyoto University)

Takeharu Kunieda (Dept. of Neurosurgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University)

A better understanding of epileptic networks as well as the mechanisms involved in human higher cortical functions requires a detailed knowledge of neuronal connectivity. We developed a new method, cortico-cortical evoked potential (CCEP), to electrically track cortico-cortical connections in patients who underwent chronic subdural electrode implantation for presurgical evaluation of intractable partial epilepsy. Cortico-cortical connections were investigated by stimulating a part of the brain through subdural electrodes and recording the cortical evoked potentials that emanate from adjacent/remote cortical regions via neuronal projections. In addition to its utility as 'functional tractography' to trace functional and seizure networks in vivo, CCEP and concomitant induced HFOs (HFOCCEP) could be used as a

dynamic measure of cortical excitability/connectivity. By recording SEP and CCEP from the primary somatosensory cortex (SI), we first evaluated the HFO behaviors between the two modes of transmission: vertical thalamo-cortical (HFOSEP) and horizontal cortico-cortical (HFOCCEP) projections. The responsible HFO bands were different between the two projections with the latter peaking at < 200 Hz. In the normal control cortex, CCEP N1 (AUC) and induced HFON1 (power) showed significant positive correlation, indicating the increased neuronal synchrony following the input of external electrical stimulation. By means of CCEP and HFOCCEP, we found that cortico-cortical connectivity/excitability did change between the awake, slow wave sleep, and REM stages. Regarding

epileptogenicity, the cortical excitability increased at the epileptic focus compared with the control cortex. Upon single pulse stimulation, the epileptic focus produced larger CCEP during seizure generation. Even at the interictal state, HFO

behavior did change between the focus and control cortex with the focus showing higher power at the fast ripple and ripple bands. Stimulus-triggered HFOs would be clinically useful as a surrogate marker of epileptogenicity.

(6) Causality Analysis of the Local Field Potential and its Application to Epileptic Seizure

Ryosuke Hosaka (Department of Applied Mathematics, Fukuoka University)

Epileptic seizure is a paroxysmal and self-limited phenomenon. Characteristics of the epileptic seizure are abnormal hyper-synchrony of large population of neurons. Focal seizures are usually initiated in the presence of pathological causes, and it is propagated to even distant normal cortex. In conventional experimental setup, the epileptic seizure was induced by the electrical stimulation. But the procedure had a drawback that the neural activities were exposed to the electrical artifacts. So, our current understanding for the seizure-genesis is quite limited.

To overcome the drawback, we developed an animal model and protocols to induce the epileptic seizure with the ChR2 photostimulation, which enable us to monitor the electrical neural activities under epileptic seizure genesis. To infer the

information flow under the epileptic seizure genesis, we applied the Granger causality for the LFPs recorded from the septal and temporal sides of the hippocampus of rat brain. The Granger causality estimates the information flow requiring autoregressive modeling of time series data. In short, if knowing time series X2 helps predict the future of the other time series X1, X2 “Granger causes” X1

At the initial phase of the seizure, the information flowed from photostimulation side to the opposite side. Then the information flowed from septal to temporal sides, regardless of the side on which the photostimulation was applied. Current study results revealed dynamic, bidirectional and asymmetric causal relationships along the longitudinal axis of hippocampus in the seizure-genesis and termination.

(7) Beta oscillatory activity of single neurons in the subthalamic nucleus in patients with Parkinson's disease

Kazutaka Kobayashi, Yoichi Katayama

(Department of Neurological Surgery, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan)

Introduction

Analyses of the neural activity of single neurons in patients with Parkinson's disease (PD) have shown increased neuronal firing in the subthalamic nucleus (STN), which is consistent with firing rate-based models and is associated with akinesia. In addition, local field potential recordings in the STN in patients with PD have shown increased beta-band activity, which is also related to akinesia. These findings suggest that both beta-band activity and increased neuron firing in the STN are involved in akinesia. However, the

relationship between beta-band activity and firing rate in the STN is unclear. Because the dorsal part of the STN is a motor area, we hypothesized that there would be a relationship between the STN motor area and the distribution of beta-band activity, which is related to motor symptoms (akinesia). In this study, we investigated the beta-band activities of single neurons and analyzed their relationships with the neuronal firing rate. In addition, we investigated the relationship between the STN motor area and the distribution of beta-band activity.

Methods

We analyzed the frequencies of single neurons in patients with advanced PD who underwent implantation of deep brain stimulation electrodes in the STN. The neurons were classified as beta-band neurons (neurons with significant oscillatory activity at the beta-band) and nonoscillatory neurons (neurons without significant oscillatory activity at any band). Firing rates, distributions within the STN, and the proportions of neurons responding to passive joint movement (kinesthetic neurons) were compared between the 2 groups.

Results

The firing rate of beta-band neurons was significantly

higher than that of nonoscillatory neurons. Beta-band neurons were widely distributed within the STN, and there was no significant intergroup difference in neuron distribution between the dorsal STN and the ventral STN. We did not note any significant intergroup difference in the proportion of kinesthetic neurons.

Conclusion

The higher firing rate of beta-band neurons was consistent with the firing rate model of akinesia. The dorsal STN is a motor area, but the beta-band activity of a single neuron may not specifically reflect the motor symptoms of PD because of the wide distribution of beta-band neurons.

(8) Functional couplings between bilateral motor cortices and subthalamic nuclei in patients with Parkinson's disease

Kenji Kato (Dept. of Developmental physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Fusako Yokochi (Tokyo Metropolitan Neurological Hospital, Dept. of Biosciences and Informatics)

Junichi Ushiba (Faculty of Science and Technology, Keio University)

Objective: The abnormal synchronization and oscillation of neuronal activity in the subthalamic nucleus (STN) has been suggested to be associated with the sensorimotor dysfunction in Parkinson's disease (PD). However, the underlying mechanisms are poorly understood. We simultaneously recorded local field potentials from the bilateral STNs using electrodes for deep brain stimulation and electroencephalogram from the bilateral motor cortices (MCx) in eleven patients at rest, and investigated the functional couplings between bilateral STN and MCx.

Methods: First, we evaluated functional couplings using the coherence analysis, focused on their amplitude and frequency of their peaks in the sub-beta (3-14 Hz) and beta (15-35 Hz) frequency bands. In addition to coherence analysis, we analyzed the partial coherence to further interpret their functional couplings, and also computed the Granger causality to evaluate the causal influences between subcortical and cortical activities.

Results: Significant couplings in the sub-beta and beta

frequency bands were observed between the STN and contralateral STN (STN–cSTN), the STN and ipsilateral MCx (STN–iMCx), and the STN and contralateral MCx (STN–cMCx), simultaneously. The STN–iMCx coherence was stronger than the STN–cMCx coherence in the beta frequency band. The peak frequencies of the STN–cSTN coherence were similar to those of the STN–iMCx and STN–cMCx coherences in each patient. The partial coherence could be also observed significantly between them. Lastly, the causality between the STN and MCx was the strongest in the one-way direction from the MCx to the ipsilateral STN since the MCx strongly influences the ipsilateral STN activity probably via the hyperdirect pathway.

Conclusions: We observed the significant STN–cSTN, STN–iMCx and STN–cMCx couplings in PD patients. Synchronized activity through the cortico-subcortical transmission may have an important role in the pathophysiology of PD.

(9) Oscillations in parkinsonism

Olivier Darbin

(Dept. of Neurology, University South Alabama,

Division of System Neurophysiology, National Institute for Physiological Sciences)

Over these last 30 years, there has been an accumulation of evidences that a variety of oscillatory phenomena occur in the sensory-motor circuitry and the basal ganglia specifically. It is established that a relation exists between the oscillatory activities and movements in both healthy and pathological conditions (i.e. Parkinsonism). The most significant finding is that β -band activity (10- to 35-Hz) is increased in the parkinsonian basal ganglia and reduced by antiparkinsonian treatments. More recently, gamma band (50-200Hz) and its coupling to beta band activity in parkinsonism was reported to

differ from other neurological conditions. Both cellular and circuitry properties contribute to the generation of oscillatory activities in basal ganglia. Their alterations in pathological conditions may lead to abnormal timing or magnitude in the development of these oscillatory activities and, finally, disrupt the sensory-motor processing. Though oscillatory abnormalities are hallmarks for parkinsonism, their causal relationship to movement and non-movement disorders remains subject to debate.

(10) ABCs of the Basal Ganglia

Atsushi Nambu (National Institute for Physiological Sciences)

The basal ganglia (BG) are composed of four nuclei: 1) the striatum, which comprises the caudate nucleus and putamen, 2) the globus pallidus, which consists of the external segment (GPe) and internal segment (GPi), 3) the subthalamic nucleus (STN), and 4) the substantia nigra, which is divided into the pars reticulata (SNr) and pars compacta (SNc).

The BG receive inputs from the wide areas of the cerebral cortex. Information processed in the BG returns mainly to the cerebral cortex, especially to the frontal lobe, via the thalamus. Through this cortico-BG loop, the BG control cortical activity, including the motor, prefrontal, and limbic cortices.

The striatum and STN are the input nuclei of the BG, and receives excitatory glutamatergic inputs from the cerebral cortex. On the other hand, the GPi and SNr are the output nuclei, which project outside the BG to the thalamus. Information in the input nuclei is transferred to the output nuclei via the following three different pathways.

1) Direct pathway: striatal neurons containing gamma-aminobutyric acid (GABA) and substance P project monosynaptically to the GPi/SNr.

2) Indirect pathway: striatal neurons containing GABA and enkephalin project polysynaptically to the GPi/SNr by way of sequential connections with the GPe and STN.

3) Hyperdirect pathway: STN neurons receiving cortical inputs project monosynaptically to the GPi/SNr.

Dopaminergic neurons in the SNc project to the striatum and modulate differentially the activity of striatal projection neurons: excitatory on striatal direct pathway neurons through the dopamine D1 receptors, and inhibitory on striatal indirect pathway neurons through dopamine D2 receptors.

Neurons in the output nuclei of the BG are inhibitory GABAergic and fire at high frequency, and thus neurons in the target structures, such as the thalamus, are continuously inhibited. When striatal neurons are activated by cortical inputs, they inhibit GPi/SNr activity through the striato-GPi/SNr direct pathway. As a result, continuous inhibition

from the output nuclei to the target structures is temporally removed (disinhibition), and neurons in the target structures, including thalamic and cortical neurons, are activated, resulting in the release of a selected motor program.

On the other hand, signals through the hyperdirect and indirect pathways have excitatory effects on the GPi/SNr, and thus have inhibitory effects on thalamic neurons. Considering the conduction velocities, signals through the hyperdirect and indirect pathways make clear initiation and termination of the selected motor program. They also inhibit other competing motor programs.

The pathophysiology of hypokinetic and hyperkinetic

movement disorders can be explained by activity imbalance between the direct, indirect, and hyperdirect pathways. In Parkinson's disease, dopaminergic inputs to the striatum, i.e., excitatory inputs to direct pathway neurons and inhibitory inputs to indirect pathways neurons, are reduced. Both changes attenuate motor-related disinhibition in the thalamus, and finally cause akinesia. On the other hand, in dystonia, the activity of the direct and indirect pathways is elevated. This change reduces outputs from the GPi and evokes large disinhibition in the thalamus, resulting in involuntary movements.

(11) Restoration of motor function and brain neuroplasticity in stroke hemiparesis

Satoko Koganemaru (Human Brain Research Center, Kyoto University)

After stroke insults, neuronal plasticity and reorganization are induced in brain-wide areas, not only perilesional but also remote areas. This process may compensate tissue damages to bring functional recovery in the early stage. Within 6-12 month after stroke, over-activation in several brain regions returns to normal level in well-recovered stroke patients. Otherwise, in the chronic stage, brain-wide activations, particularly in contralesional areas, still remain in severely impaired patients. Changes of brain-wide network underlie a functional recovery after stroke.

Use-dependent plasticity is an important physiological basis of motor functional changes by a task specific training. It is reported to occur in a specific M1 region involving a trained task. It is also considered to underlie motor recovery by a task specific training.

Recently, we have developed a new hybrid-rehabilitation to induce use-dependent plasticity and functional recovery in the paretic upper-limbs after stroke. It consists of 5 Hz rTMS of the upper-limb area of the primary motor cortex (M1) and extensor motor training of the paretic upper-limb for hemiparetic stroke patients (Koganemaru et al., Brain 2010). Patients with chronic stroke often show increased flexor hypertonia in their affected upper limbs. Our previous study showed that our protocol combining rTMS and extensors

motor training, had a greater effect on motor recovery than either intervention alone. Although our previous study showed that the task-specific plastic change in M1 is associated with beneficial effects of our proposal, we do not know whether this M1 plasticity occurs alone or in combination with the multi-regional functional reorganization of the motor-related brain network. Here, we investigated this hypothesis using functional magnetic resonance imaging (fMRI).

Eleven chronic stroke patients were scanned while performing the visual-triggered upper-limb extensors or flexors movements in separate blocks. After the pre-intervention scanning, patients received the hybrid-rehabilitation for 6 weeks. Post-intervention fMRI scans were performed after the intervention. Clinical assessment revealed the motor improvement with reduced flexor hypertonia of the affected limb. The fMRI analysis showed the significant reduction of brain activation after hybrid-rehabilitation in the ipsilesional sensorimotor cortex and bilateral premotor cortex (PMC) only for the extensors but not for the flexor movement. Furthermore, the amount of change in the contralesional PMC activation was negatively correlated with the clinical improvement.

Our results showed that the use-dependent plasticity

induced by repetitive motor training with rTMS is related to the task-specific multi-regional brain reorganization. The present study provides a key to understand why task-specific

repetitive motor training of the target action is the most powerful rehabilitation strategy to help patients.

(12) How do humans choose one arm from the other?

Rieko Osu, Toshinori Yoshioka, Kaoru Amemiya (ATR Computational Neuroscience Labs)

Xiao Yupeng, Nicolas Schweighofer (University of South California)

How do humans choose one arm of the other to reach single targets in front of the body? In this presentation, we will introduce two different approaches to this question. The first one is computational approach to the choice base on behavioral experiment, and the other is the decoding of the choice by early brain activity detected by EEG.

1. Computational approach to hand choice

Previous motor control theories and decision-making models predict that humans choose the movement that minimizes a cost (the negative of a reward) that takes into account end-point errors and effort. To test the respective influence of end-point error, effort, target hits, as well as a possible handedness bias in arm choice, right-handed subjects performed a center-out shooting task to 24 targets of either 2 or 3 cm in diameter using either left or right arm. Each subject performed repeated movements to each target in a forced condition first, followed by a free condition. In the forced condition, subjects were instructed to use their right and left arms alternately to reach each target. In the free condition, subjects chosen to use either hand to reach the targets. The forced condition allowed us to measure end-point error, success rate, and to estimate effort via inverse dynamics of a two-link arm model. For both large and small size targets, we found that choice varied systematically over movement directions, and was highly correlated with effort, which also

varied systematically over directions. Subjects used their right hand more often than the left hand, and more so for the 2cm target. The logistic decision making model fitting revealed that effort and bias significantly predicted choice.

2. Decoding hand choice

When the expected cost is similar, how human finally select the hand? Do subjects randomly select one from the other? Does background brain activity affect the choice? To address these questions, we started to measure EEG during hand choice task. Subjects were asked to look at the fixation point for 2 s after which a target was presented. Then, after a delay period randomized between 0.5 and 5 s during which subjects made hand choice, go-cue was presented and subjects reached the target as quickly as possible. We decoded the resulting hand choice from 64 ch EEG (biosemi) amplitude (after 1-30Hz band-pass filter) during the latter half of the fixation period. The decoding accuracy improved slightly above chance level (about 60%) just before the target presentation. The result suggests that the neural activity preceding target presentation may be partly related to the bias in the future hand choice.

Our results are a first step in understanding arm choice in stroke patients with unilateral impairments, who often show “non-use”, i.e., they do not use paretic arm although they can use when given a free choice to use either arm.

(13) Where there is smoke, there is craving - Neural circuits of addiction

Takuya Hayashi (Functional Architecture Imaging Unit, RIKEN Center for Life Science Technologies)

Drug cues such as the sight or smell of cigarette smoke can

trigger cravings and cigarette use. Cravings are also

influenced by other factors in daily life, such as drug availability and individual self-control. Combining transcranial magnetic stimulation (TMS) and functional magnetic resonance imaging (fMRI), I and Alain Dagher of the Montreal Neurological Institute at Canada's McGill University and his colleagues identified two distinct regions of the frontal cortex that interact to regulate smokers' cravings for cigarettes. Earlier work had shown greater craving-related activity in a key decision-making region, dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) in smokers who are told they can smoke immediately after being scanned². This time, we therefore used a technique called transcranial magnetic stimulation to temporarily inactivate the DLPFC of the participants just before their scan. Whereas subjective cravings were greater when cigarettes were immediately available, we found that this effect was eliminated by inactivating DLPFC

Using fMRI, we then determined that the strongest signal associated with cravings was located within the medial orbitofrontal cortex (mOFC), an area thought to assign value to available stimuli and actions. In addition, in keeping with our earlier findings, the DLPFC showed greater craving-related activity when they could smoke immediately

Inactivating the DLPFC attenuated this craving-related signal in mOFC, as well as others in the anterior cingulate and ventral striatum, brain regions associated with transforming value into action. These findings indicate that the DLPFC may incentivize decisions about drug seeking based on knowledge of drug availability, and suggest that aberrant circuitry between dorsolateral prefrontal and orbitofrontal cortices may underlie addiction. I would also present recent data that implicate abnormal default mode network in smokers.

(14) Age-related changes across the primary and secondary somatosensory areas: An analysis of neuromagnetic oscillatory activities

Koichi Hagiwara, Katsuya Ogata, Shozo Tobimatsu
(Dept. of Clinical Neurophysiology, Kyushu University)

We assessed neuromagnetic oscillatory activities to evaluate the age-related changes in functional connectivity between the primary (SI) and secondary (SII) somatosensory areas. Here, we adopt a recently-introduced idea for inter-areal connectivity analysis, called weighed phase-lag index (wPLI). wPLI measures consistency of phase relationship between signals in separate areas while diminishing the effect of volume conduction. We consolidate the impact of aging on the coherent oscillatory activities between SI and SII.

Fifteen young (5 females, aged 29.0 ± 4.1 years) and fifteen elderly (5 females, aged 63.7 ± 3.7 years) volunteers participated in this study. The right median nerve was electrically stimulated at the wrist with mean inter-stimulus interval of 3 s. Continuous neuromagnetic signals were

recorded using a 306-channel MEG (Elekta, Neuromag). First, we calculated phase-locking factors to assess local field synchrony in SI and SII. Then, wPLI was computed for the evaluation of inter-areal connectivity between SI and SII.

We identified a significantly correlated activity among SI and bilateral SII regions. Overall, the elderly subjects showed significantly enhanced coherent activities between all regions.

The wPLI analysis strongly suggested that the functional coupling between SI and SII is affected by the cortical disinhibition due to normal aging. A benefit for using wPLI is that it is unaffected by amplitudes of signals and is specific for true synchrony. Therefore, for the first time, we provided the electrophysiological evidence for age-related changes in oscillatory neural activities across the somatosensory areas.

(15) Statistical method for detecting phase shifts in alpha rhythm from single-trial electroencephalogram

Yasushi Naruse (Center for Information and Neural Networks, NICT)

Recent experimental studies have shown the influence of instantaneous phase and amplitude of ongoing oscillations in electroencephalogram (EEG) and magnetoencephalogram (MEG) on the performance of a variety of cognitive tasks. Hence, it is important to estimate precisely the instantaneous phase and amplitude of the ongoing oscillations. Moreover, the ongoing oscillations are synchronized and/or reset by external stimuli. These phenomena are caused by phase shifts of the ongoing oscillations. Therefore, it is also important to detect the shifts.

First, we develop a method that can be used to estimate the instantaneous phases and amplitudes of the alpha rhythm with high accuracy by modeling the phase and amplitude as Markov random field (MRF) models. We generated simulated data that consist of oscillatory activities in the alpha frequency range and observation noise. The instantaneous phase and amplitude estimates from the simulated data obtained with our method have significantly greater accuracy than those obtained with Hilbert transform.

Second, we developed a method for detecting phase shifts of the ongoing oscillations in a single trial based on the above mentioned method. Our method used the line process technique, which is a Bayesian method for detecting discontinuity in an image, to detect shifts of the phase and amplitude of an ongoing oscillation. By using our method, we detected phase shifts of the alpha rhythm in flash EEG data after the flash stimulus onset in a single trial. We found that the timings of the phase shifts in the early latency period (50 – 150 ms) were similar among many of the trials, and that those in the late latency period (200 – 600 ms) were different among the trials. The conventional averaging method can only detect phase shifts that occur at similar timings between many of the trials, and therefore, the phase shifts that occur at differing timings cannot be detected using the conventional method. Consequently, our obtained results indicate the practicality of our method. Thus, we believe that our method will contribute to studies examining the phase dynamics of nonlinear alpha rhythm oscillators.

(16) Controlling neural oscillations and causal information flow in the human brain

Keiichi Kitajo (RIKEN Brain Science Institute, RIKEN BSI-Toyota Collaboration Center)

Increasing evidence indicates that synchronous neural oscillations are important in dynamically linking distant brain regions establishing functional information flow in the human brain. Although we can evaluate communication between brain areas by phase synchronization analyses of electroencephalography (EEG) signals, it is difficult to estimate causal and directional information flow between these brain areas only by EEG phase synchronization analyses.

In this talk I give an overview of our new manipulative approach to synchronous neural oscillations and information flow in the human brain. By using combined single-pulse TMS (transcranial magnetic stimulation) – EEG (electroencephalography) recordings, we demonstrated that

we could manipulate the phase dynamics of ongoing neural oscillations at local areas. Specifically we found that we could induce phase resetting of ongoing neural oscillations at TMS-target areas. Moreover, we found that TMS-induced phase resetting propagated from targeted cortical areas to the rest of the brain in a state-dependent way.

Next we evaluated directional and causal information flow using an information theoretic measure, transfer entropy. By using transfer entropy, we succeeded in demonstrating that single-pulse TMS can modulate directional information flow among synchrony networks. Our results indicate that single-pulse TMS can manipulate and control both incoming and outgoing information in the TMS-targeted area.

We also found that repetitive TMS could modulate large-scale synchrony networks in a frequency-specific way. We propose this new manipulative approach for investigating

functional roles of neural oscillations, synchrony, and large-scale causal and directional information flow in the human brain.

(17) Spatiotemporal analysis of human neural oscillation by simultaneous fMRI-EEG

Hiroaki Mizuhara (Graduate School of Informatics, Kyoto University)

Neural synchrony is a possible candidate to explain how cortical networks dynamically emerge for appropriate processing. The neural synchrony has been often studied by rat or cat electrophysiology. It has been also observed as power enhancements or phase synchronization on the scalp EEG. However, the scalp EEG is just the resultant of the sum of multiple cortical activities. The blur effect caused by the volume conduction makes researchers hard to discuss the generator/source of the EEG activity. Results only from the scalp EEG cannot provide concrete evidence of whether or not the EEG activity is actually reflecting cortical networks.

Many researchers have started to use simultaneous fMRI-EEG recordings for the purpose of getting high spatial information on the scalp EEG activities. One of the conventional approaches in the world is to identify cortical activity which occurs at the timing of when EEG events appear on the scalp. In our previous simultaneous fMRI-EEG recording during a cognitive task, we identified the cortical activities which were accompanied with the theta EEG power fluctuation appearing around on the frontal-midline electrode site. Long-distant phase synchronizations on the scalp EEG were also analyzed for identifying cortical

networks in our simultaneous fMRI-EEG studies. We also succeeded to identify cortical areas respectively for slow and fast oscillations, which showed the phase-amplitude coupling during a working memory task. These methods were based on the regression analysis of fMRI data, where the time series of EEG events were used as the explanatory variables. This leads the identification of cortical activities which occur when EEG events appear.

Note that the cortical areas from these methods do not entirely imply the generator/source of EEG events. The methods could merely identify cortical areas which have ‘correlation’ to the temporal fluctuation of EEG events. To against this problem, we proposed a method to reconstruct cortical EEG activity by using the simultaneous fMRI-EEG. In contrast to the previous methods, we used the fMRI time series as the explanatory variable and the EEG power as the response variable in the regression analysis. The regression coefficients are then used as the filter coefficients in the Beamformer method to reconstruct the cortical EEG activities. The methods thus enable us to investigate the neural oscillation with the EEG temporal and the fMRI spatial precisions.

(18) Large scale spatiotemporal spike patterning associated with wave propagation of beta oscillation in motor cortex

Kazutaka Takahashi (The University of Chicago)

Wave propagation has been observed in cortical areas mainly via aggregate signaling instead of individual neuron spiking. At the same time, studies have documented functional interactions among cortical neurons but have

largely ignored their spatial arrangement on the cortical surface.

Here we use a functional network analysis to demonstrate that certain motor cortical neurons in non-human primates

spatially coordinate their spiking activity that mirrors wave propagation along the rostro-caudal axis as measured by local field potential oscillations. We also demonstrate that sequential spiking of neuron pairs contains task-relevant information whose magnitude peaks when the neurons are

spatially oriented along the wave axis.

We hypothesize that the spatial anisotropy of spike patterning may reflect the somatotopic organization of motor cortex and may be a general property shared by other topographically organized cortices.

10. 第3回社会神経科学研究会「社会的行動の決定機構」

2013年11月28日－11月29日

代表世話人：松田哲也（玉川大学脳科学研究所）

所内対応者：定藤規弘（心理生理学研究所部門）

（1）瞬きから探る脳内情報処理機構

中野珠実（大阪大学大学院生命機能研究科）

（2）精神疾患を性差の観点から考える：妊産婦のうつ病と摂食障害を中心に

尾崎紀夫（名古屋大学大学院医学系研究科）

（3）Social isolation disrupts cortical plasticity

高橋琢哉（横浜市立大学大学院医学研究科）

（4）精神疾患の中間表現型としての未成熟脳

宮川 剛（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）

（5）特別講演①性関係：性ホルモンにより決定される社会的行動の最小単位

佐久間康夫（東京医療学院大学）

（6）社会的認知機能のシステム生理学的理解

磯田昌岐（関西医科大学医学部）

（7）正直さ・不正直さの脳内メカニズム

阿部修士（京都大学こころの未来研究センター）

（8）児童虐待に起因する発達性トラウマ障害の神経基盤

友田明美（福井大学子供のこころの発達研究センター）

（9）ヒト記憶過程における報酬と罰の効果を媒介する神経基盤

月浦 崇（京都大学大学院人間・環境学研究科認知科学分野）

（10）特別講演②「私たち」の脳科学に向けて：2個人同時計測MRI研究

定藤規弘（自然科学研究機構生理学研究所）

【参加者名】

相澤優香（早稲田大学）、青木直哉（生理学研究所）、阿部彩織（東京医科歯科大学）、阿部修士（京都大学こころの未来研究センター）、阿部匡樹（東京大学先端科学技術研究センター）、天野大樹（理化学研究所）、飯高哲也（名古屋大学大学院）、石井敬子（神戸大学大学院）、石塚佳奈子（成精会刈谷病院）、磯崎三喜年（国際基督教大学）、磯田昌岐（関西医科大学）、井出野尚（早稲田大学）、伊藤文人（京都大学こころの未来研究センター）、伊藤竜樹（生理学研究所）、伊藤嘉邦（生理学研究所）、請園正敏（明治学院大学大学院）、岡崎俊太郎（生理学研究所）、岡田理恵子（玉川大学）、尾崎紀夫（名古屋大学大学院）、梶村昇吾（京都大学大学院）、川口彰子（名古屋市立大学大学院）、川端美智子（京都大学大学院）、北地 雄（総合東京病院）、北田 亮（生理学研究所）、

木下 専（名古屋大学大学院）、小池耕彦（生理学研究所）、小泉径子（福井大学子どものこころの発達研究センター）、郷 康広（生理学研究所）、後藤崇志（京都大学大学院）、小山総市朗（総合研究大学院大学大学院）、佐久間康夫（東京医療学院大学）、櫻井芳生（鹿児島大学）、定藤規弘（生理学研究所）、佐藤 剛（グロービス経営大学院大学）、佐藤達也（生理学研究所）、佐藤洋平（恵仁会くろさわ病院）、宍戸恵美子（生理学研究所）、島田浩二（生理学研究所）、須恵明音（玉川大学大学院）、菅原 翔（生理学研究所）、角谷基文（総合研究大学院大学大学院）、高木一代（生理学研究所）、高野裕治（NTTコミュニケーション科学基礎研究所）、高橋琢哉（横浜市立大学大学院）、高橋陽香（生理学研究所）、高橋英彦（京都大学大学院）、高橋英之（大阪大学大学院）、高橋

宗良 (玉川大学), 橘 吉寿 (生理学研究所), 月浦 崇 (京都大学大学院), 坪井宏仁 (金沢大学), 鶴身孝介 (京都大学大学院), 富永仁志 (京都大学大学院), 友田明美 (福井大学子供のこころの発達研究センター), 中川恵理 (神戸大学大学院), 中川 潤 (東京医科歯科大学大学院), 長島 泉 (杏林大学大学院), 中嶋智史 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), 中野珠実 (大阪大学大学院), 中村太戯留 (慶應義塾大学), 中村文彦 (北海道大学大学院), 中山敦雄 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所), 橋口真帆 (総合研究大学院大学大学院), 橋本直樹 (北海道大学大学院), 濱野友希 (総合研究大学院大学大学院), 林亜希子 (名古屋大学大学院), 原田宗子 (生理学研究所), PierceNathan (国際基督教大学大学院), 日道俊之 (京都大学大学院), FANHONGWEI (東京大学), 藤井貴之 (玉川大学大学院), 藤澤隆史 (福

井大学子どものこころの発達研究センター), 藤田弥世 (京都大学), Jorge F. Bosch-Bayard (生理学研究所), 前岡 浩 (畿央大学), 牧田 快 (生理学研究所), 松井克宣 (浜松ホトニクス株式会社), 松尾 篤 (畿央大学), 松田哲也 (玉川大学), 松田真由美 (早稲田大学), 丸山めぐみ (生理学研究所), 水野 敬 (理化学研究所), 宮内カルロス (東京大学大学院), 宮川 剛 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所), 向井康敬 (名古屋大学), 村井翔太 (同志社大学大学院), 村上優衣 (北海道大学大学院), 森川真子 (名古屋大学大学院), 守田知代 (大阪大学大学院), 柳岡開地 (京都大学), 柳澤邦昭 (京都大学), 山崎英明 (生理学研究所), 山本真江里 (名古屋大学), 吉田篤司 (北海道大学大学院), 渡辺光咲 (玉川大学大学院)

【概要】

ヒトは、複雑な社会の中で生きていくことができる能力を持っています。それには、社会的シグナルを正確に認知し、自分にとってあるいは相手にとって最適な言動を選択することができる必要があります。ヒトの心を理解するためには、この社会の中で生きるために働く心の理解が必要です。本研究会は、ヒトの社会的心に関連する、既存の学問分野を超えた新しい視点での研究を行っている研究者が集まり、ディスカッションすることを通

じて、日本におけるこの分野の研究の推進に貢献することを目的としています。

日本においても、近年ヒトの社会的こころに関する研究について継続的に議論できる機会を設ける必要があります。そこで、本研究会ではヒトの社会的心に関連する、既存の学問分野を超えた新しい視点での研究を行っている研究者による講演を実施し、日本におけるこの分野の研究の推進に貢献することを目的としています。

(1) 瞬きから探る脳内情報処理機構

中野珠実

(大阪大学大学院生命機能研究科, 大阪大学大学院医学研究科)

人間は、およそ3秒に1回の割合で自発的に瞬きをしている。自発的な瞬きは、眼球湿潤という生理機能のために生じていると一般的に認識されているが、実は、眼球湿潤のためには20秒に1回程度の瞬きで十分である。そのため、何故こんなに頻回に瞬きをしているのか、その機能的役割は明らかでない。講演者らは、同じ映像を観察しているときの人々の瞬きのタイミングを計測したところ、映像の暗黙の切れ目で、皆の瞬きが同期して生じることを発見した。さらに、対面コミュニケーション時には、発話の切れ目で生じた話者の瞬きに対し

て、聞き手の瞬きが0.25秒程度遅れて同期することを明らかにした。一方、コミュニケーションの障害が主症状である自閉症スペクトラム障害の成人では、そのような話者への瞬目引き込みが生じなかった。これら一連の行動研究から、自発性の瞬きは、連続的な情報を分節化して脳内で処理する過程に関与している可能性が考えられる。そこで、映像を見ているときの瞬きに

伴い、脳の中で何が生じているかを、機能的磁気共鳴画像法により調べた。すると、瞬きに伴い、視覚的注意を制御している前頭眼野と頭頂葉の神経ネットワークの

活動が一過性に低下する一方、内的な処理に関与しているとされるデフォルト・モード・ネットワークの活動が一過性に上昇を示した。このことから、自発的な瞬きは、

拮抗する神経ネットワークの状態を一過性に変動させることで、注意を内的に解除し、情報の分節化をしていることが示唆される。

(2) 精神疾患を性差の観点から考える：妊産婦のうつ病と摂食障害を中心に

尾崎紀夫（名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野）

精神疾患の患者を理解するには、生物学的次元、心理社会的次元、さらには実存的次元へと思いを至らせることが必要である。例えば、性差とは生物学的に規定されるものであるが、同時に女性性・男性性を持つ心理社会的、実存的な意味を含み、実際、精神疾患の発症率、発症年齢、症状、経過、予後などに男女差が見られる。特に発症率の性差は明確で、うつ病は2倍、摂食障害は10倍、女性に多く、自閉症スペクトラム障がいには5倍男性に多い。女性の生涯で、出産後は妊産婦やその家族にとって喜ばしい時期である一方、うつ病を初めとする気分障害の発症率の高い時期であり、母のみならず児にも重大な健康問題を引き起こすとの既報を背景として、2004年以来、我々は妊産婦を対象として前向きコホート研究を実施してきた。その結果、産後一ヶ月のうつ病が約10%に生じ、産後1週以内にマタニティブルーを呈する群は産後うつ病のハイリスク群であること（Ishikawa N, et al., J Psychosom Res, 2011）、産後に抑うつ的になる結果、損害回避（「取り越し苦労と悲観主義」、「不確実性に対する恐れと焦り」といった「否定的認知」）が高まること（Furumura K, et al., PLoS One, 2012）、

抑うつ的になると過去の養育体験の捉え方も変化し、「自分は母のケアを得られなかった」と追想し（Hayakawa N, et al. PLoS One, 2012）、さらには、児への愛着形成不全も生じること（投稿中）を確認している。また、近年、我が国の若い女性はBMIが年々低下しているが、自分をやせていると考えていない。この一般女性が持つ「過剰なやせ願望」傾向と深く関わる摂食障害、特に神経性無食欲症は、体重が著しく減少しているにもかかわらずやせを認めず、拒食を続け、時に死に至る。我々のMRI構造画像解析では、患者群で頭頂後頭連合野、帯状回、視床の体積減少を認め、視空間認知や体性感覚などの障害を示唆した。また、NIRSと摂食障害評価尺度に関して、患者群ではOFCの反応性と社会的孤立に負の相関が、健常群では正の相関が見られた。OFCの機能が低い健常群は適応的に行動し社会的孤立を生じず、OFCの機能が低い患者群では社会的に孤立するが自覚が乏しくなる可能性が示唆された。本講演では、我々の妊産婦のうつ病と摂食障害の検討結果を中心に、精神疾患について、性差の観点から考える予定である。

(3) Social isolation disrupts cortical plasticity

高橋琢哉（横浜市立大学大学院医学研究科生理学）

Stressful events during early childhood can have a profound lifelong influence on emotional and cognitive behaviors. However, the mechanisms by which stress affects neonatal brain circuit formation are poorly understood. Here, we find that neonatal social isolation disrupts molecular, cellular and circuit developmental processes leading to behavioral dysfunction. Neonatal isolation prevents long-term

potentiation and experience-dependent synaptic trafficking of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors normally occurring during circuit formation in the rodent barrel cortex. This is mediated by an increase of the stress glucocorticoid hormone, associated with reduced Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II (CaMK II) signaling, and results in the attenuation of the

whisker-sensitivity at the cortex. These effects lead to defects in whisker-dependent behavior in juvenile animals. These results indicate that neonatal social isolation alters neuronal plasticity mechanisms and perturbs the initial establishment of

a normal cortical circuit, potentially explaining the long lasting behavioral effects of neonatal stress.

(4) 精神疾患の中間表現型としての未成熟脳

宮川 剛

(藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・システム医科学研究部門,
生理学研究所・行動様式解析室, JST, CREST)

統合失調症と双極性気分障害は社会的行動の障害を伴う精神疾患であり、多くの遺伝要因と環境要因が複雑に関与する脳の疾患である。その病因・病態について様々な仮説が提唱されているものの、未だ決定的な合意が得られていない。この背景には、診断が生物学的指標ではなく問診を中心とした主観的な基準に依拠していること、それぞれの精神疾患が生物学的には異質な集団を複数包含してしまっていること、さらに、この結果、妥当性の高い動物モデルがほとんどなかったこと等があると考えられる。演者らは、脳で発現している遺伝子の機能の最終アウトプットレベルは行動である、という視点にたち、多くの系統の遺伝子改変マウスについて「網羅的行動テストバッテリー」を行うことによって、遺伝子・脳・行動の関係を調べてきた。この 9 年間で、国内外 90 以上の研究室との共同研究として、160 系統以上の異なる系統のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスについての解析を行ってきたが、興味深いことにほとんどの系統で何らかの行動レベルの表現型が見いだされている。さらにこれらのマウスから、「マウスの精神疾患」とも言って過言でないような社会的行動異常を含む顕著な行動異常のパターンを示す系統が 10~20 系統ほど同定されている。演者らが評価した遺伝子改変マウスの中でも、 α -CaMKII ヘテロ欠損

マウスは、ケージメイトへの過剰な攻撃行動、作業記憶の障害や激しい「活動量の波」など、ヒトの精神疾患の症状に似たとりわけ顕著な行動異常のプロファイルを示した。このマウスの脳についてトランスクリプトーム解析、プロテオミクス解析、形態学的解析、電気生理学的解析などの各種解析を行ったところ、海馬歯状回のほとんどの神経細胞が成熟の一手手前で止まってしまっており、正常に機能できていないことが明らかになった。さらに、この「未成熟歯状回」様の表現型を示す他の遺伝子改変マウスや野生型のマウスに同様な現象をもたらす薬物などが次々と見つかりつつある。加えて、これらの「未成熟歯状回」様の表現型を示すマウスの海馬や前頭葉は、統合失調症や双極性気分障害の患者の死後脳と比較した場合、遺伝子・タンパク発現パターンが酷似していることもわかり、「未成熟前頭葉」といった中間表現型も存在することが示唆されている。これらのマウスで見られる「未成熟脳」は、患者死後脳でしばしば報告されているパルバルブミン陽性細胞数の低下、オリゴデンドロサイトの異常、大脳皮質の薄化、軽度の慢性炎症なども伴っている場合が多く、精神疾患の中心的な中間表現型の有力な候補であると考えられる。ここでは、この「未成熟脳」を例にとり、脳内中間表現型に焦点をあてた精神疾患の研究戦略について議論する。

(5) 性関係：性ホルモンにより決定される社会的行動の最小単位

佐久間康夫(東京医療学院大学)

主要な女性ホルモンであるエストラジオール (E2) が

雌ラットの警戒心を低下させ、行動量を増加させること

はオープンフィールド活動や輪回し量から定量的に示されている。血中 E2 が増加している発情雌ラットは雄の縄張りに侵入し、雄を挑発する。発情雌の行動のこの動機付け要素を誘惑行動と呼ぶ。挑発された雄の追尾・攻撃に対し、雌は突進と急停止を繰り返す歩行で逃げるので、追いついた雄は雌の尾根部に鼻から突き当たる。ラットには尾根部から分泌される、鋤鼻系で受容され不安を惹起する警報フェロモンと主嗅覚系を介して不安を抑制する安寧フェロモンが存在する。おそらく安寧フェロモンの作用で雄は攻撃を中断し、雌にマウンティングして交尾が始まる。雄のマウンティングによる側腹部・尾根部への触・圧刺激により、雌はロードーシス反射を起こし、イントロミッションを許す。マウンティングに反応して起こる雌の一連の行動を受容行動と呼ぶ。誘惑行動と受容行動が 10 回前後繰り返されると雄は射精し、性的不応となり性行動が終了する。ラットの性的

不応期は比較的短時間であるが、この時期が数日におよぶ C57BL/6 マウスでは、オレキシン A の枯渇が不応期に対応する。雌の誘惑行動では内側視索前野 (POA)、ロードーシス反射などの受容行動では POA と視床下部腹内側核 (VMN) の双方が E2 の作用部位で、POA では誘惑行動の促進と受容行動の脱抑制、VMN では受容行動の促進が起こる。POA と VMN からは雌雄共に腹側被蓋野、中脳中心灰白質や脳幹運動野への投射があるが、E2 による K⁺チャネル、特に BK チャネルの新規合成の有無がこれらの投射路の E2 感受性の性差、ひいては行動の性差を決める。この他にも交尾の際の情動・感覚刺激により両性で社会行動の制御に関わるオキシトシンが放出されるなど、性行動の研究から一対一のつがい形成という社会的行動の最小単位の成立に関わるさまざまな分子基盤が明らかになってきた。

(6) 社会的認知機能のシステム生理学的理解

磯田昌岐 (関西医科大学医学部生理学第二講座)

我々が己をよりよく知るためには他者が必要であろう。そもそも自己や私という概念自体が他者抜きには成立しない。自己の身体特性、感情特性、思考特性、行動特性などから構成される包括的自己像 (いわゆる自己意識) も、自己の「内部」のみににおいて決定されるというよりは、他者との比較、他者による評価、あるいは他者からの期待を通じて社会的に形成され、同時にそれらを通じて絶えず変化する。他者、あるいは他者との関係性は、我々の思考、感情、動機づけ、行動発現に重大な影響を及ぼす。無麻酔マカクザルを用いたシステム生理学研究の発展により、状況依存的な行動制御の神経機構が

明らかにされてきた。しかし、従来研究におけるそのような「状況」とは、集団から隔離抽出された個に対して設定される行動文脈であり、社会的要因 —あるいは他者要因— を扱うものではなかった。発表者らは、行動制御における他者要因の重要性に着目し、自他関係の枠組みのなかで認知、情動、運動の神経機構を解明しようと試みている。今回は、自他の行動識別、他者行為のモニター、そして他者の行動情報の利用に際し、前頭葉内側皮質の細胞がどのように使われているかを紹介する。また、これらの社会的認知機能に異常を呈するサル個体で見出された遺伝子異常についても紹介したい。

(7) 正直さ・不正直さの脳内メカニズム

阿部修士 (京都大学 こころの未来研究センター 上廣こころ学研究部門)

嘘は人間社会において極めて普遍的な現象であり、心理学の分野で多くの研究が行われてきた。さらに、近年の脳機能画像研究の発展、とりわけ社会神経科学に対す

る注目の高まりから、ヒトの正直さ・不正直さの背景にある神経機構についての研究が蓄積されつつある。本講演では、まずヒトの嘘を対象とした神経科学による研究

成果を振り返る。一部の先行研究は、実験室的・恣意的な条件設定のために、必ずしも現実世界における正直さ・不正直さを検討する実験パラダイムとなっているとは言いがたいことを示す。次に、この問題点を踏まえたうえで、近年行われている正直さ・不正直さの脳機能画像

研究を取り上げる。特に発表者が最近行った、正直さの個人差とその背景にある報酬感受性についての fMRI 研究を中心に紹介し、報酬系と前頭前野の相互作用について議論する。

(8) 児童虐待に起因する発達性トラウマ障害の神経基盤

友田明美 (福井大学子どものこころの発達研究センター)

児童虐待は実に年間 66,000 件以上 (H24 年度) も発生しており、とどまるどころを知らない。児童虐待には殴る、蹴るといった身体的虐待や性的虐待だけでなく、暴言による虐待、不適切な養育環境、家庭内暴力 (domestic violence: DV) を目撃させることなど心理的虐待も含まれる。生命の危機に至らないケースでも、被虐待児はうつ病や心的外傷後ストレス障害 (PTSD) を始めとする重い精神症状を患うことが多く、またそれは衝動的な子どもや薬物依存の増加といった社会問題とも関係している。

私たちの“こころ”は、知覚・感情・記憶など様々な機能を統合している。心身ともに大きく変化する発達期の虐待で受けた身体的な傷がたとえ治癒したとしても、発達過程の“こころ”に負った傷は簡単には癒やされないことがこれまでの研究でわかってきた。すなわち発育途上にある子どもの脳においては、虐待や体罰といったストレス負荷により分子レベルで神経生物学的な変化が起こり、さまざまな影響が残る。こうした児童虐待に

よるトラウマは、子どもたちに重篤な影響を与え、その発達を傷害するように働くことがある。そしてそれは、従来の「発達障害」の基準に類似した症状を呈する場合がある。こうした子どもたちのもつ障害を発達障害としてのトラウマ障害と名づけてもさしつかえないであろう。従来から発達臨床の専門家と虐待臨床の専門家のあいだには溝があった。そのため、今もお発達臨床と虐待臨床の交差する領域に光の当たらない暗がりがある。それは小児科医療、精神科医療だけでなく心理臨床の領域でも同様で、この暗がりの存在は子どもに関わる全ての分野に影響を及ぼし続けている。また臨床の現場では、虐待・ネグレクトによって引き起こされる反応性愛着障害・解離を背後に持つ多動性行動障害と、ADHD とでは鑑別に苦慮するケースが多く、さまざまな薬物治療への感受性も違ってくる。本セミナーでは、虐待に伴う脳の器質的な変化と発達障害との関連など、脳科学的知見についてご紹介したい。

(9) ヒト記憶過程における報酬と罰の効果を媒介する神経基盤

月浦 崇 (京都大学大学院人間・環境学研究科 認知・行動科学講座)

報酬や罰の効果によって学習は影響を受けることが知られているが、それらがヒトのエピソード記憶に対してどのような影響を与えるのかについては、未だに十分に理解が進んでいないのが現状である。本講演では、金銭的な報酬や罰によってヒトの記憶を担う脳内機構がどのような影響を受けるのかについて、これまでに我々が行ってきた fMRI 研究を紹介する。また、金銭的な価値に還元することのできない社会的文脈において存在

し得る報酬や罰も、私たちの人間社会には存在し、それらもまた社会的報酬や罰としてヒト記憶に影響を与える。そのような社会的報酬や罰がヒト記憶に与える影響とその神経基盤について、顔刺激を用いた我々の fMRI 研究を紹介する。それらの研究をもとに、報酬や罰の効果によって影響されるエピソード記憶の過程とその神経基盤について考察する。

(10)「私たち」の脳科学に向けて：2 個人同時計測 MRI 研究
"We-mode" neuroscience using dual functional MRI

定藤規弘（自然科学研究機構 生理学研究所）

ヒトの社会性発達機構の研究は、行動観察により様々な社会的行動特性を抽出し、対応する神経基盤を、機能的磁気共鳴画像（機能的 MRI）を用いて明らかにすることにより展開してきた。機能的 MRI は個人が単独で特定の課題を行っている時の活動を計測するものであり（I-mode）、社会的相互作用の特徴である「双方向性」（We-mode）を計測できなかった。2 台の MRI を用いて、コミュニケーションをとっている 2 名の神経活動を同時に計測したところ、2 者の神経活動はペア特異的にア

イコンタクトで同期し、共同作業を通じてその同期は強まること、その神経基盤として mirror neuron system が関与することが判明した。社会性の重要な要素である即時的な双方向性コミュニケーションの神経基盤を解明する上で、2 個人同時計測 MRI は重要な知見を与えること、ひいては個人間の関係性を脳科学的手法で研究する、という意味での「私たち」の脳科学（We-mode neuroscience）を大きく推進することが期待される。

11. 自律分散システム研究会～生体-機械協調システム研究の進展～

2013年6月14日

代表・世話人：横井浩史（電気通信大学）

所内対応者：伊佐 正（生理研・認知行動発達）

（1）末梢感覚神経活動による上肢運動の情報表現

梅田達也（横浜市立大学）

（2）硬膜下皮質電位から算出された仮想的皮質内局所電位によるサル筋電位の推定

渡辺秀典（生理研・認知行動発達）

（3）大脳皮質－筋間の人工神経接続による脳梗塞モデルサルの上肢麻痺筋の随意制御

加藤健治（生理研・認知行動発達）

（4）上肢筋－腰髄間の人工神経接続を利用した下肢歩行運動の随意制御

笹田周作（生理研・認知行動発達）

（5）皮質脳波法による視覚情報の解読

長谷川功（新潟大学医学部）

【参加者名】

長谷川功（新潟大学医学部）、梅田達也（横浜市立大学）、渡辺秀典（生理研・認知行動発達）、笹田周作（生理研・認知行動発達）、加藤健治（生理研・認知行動発達）、横井浩史（電気通信大学）、伊佐 正（生理研・認知行動発達）、杉 正夫（電気通信大学）、土居慶市（大阪大学）、横田将志（大阪大学）、漁野康紀（首都大学東京）、坂井郁也（電気通信大学）、菊池亮平（中央大学）、松田圭司（松山大学）、関山浩介（名古屋大学）、鈴木隆文（情報

通信研究機構）、森下壮一郎（電気通信大学）、笠井昌俊（生理研・認知行動発達）、伊佐かおる（生理研・認知行動発達）、鈴木迪諒（生理研・認知行動発達）、加藤利佳子（生理研・認知行動発達）、高柳礼香（生理研・脳プロ）、柴田真希（生理研・脳プロ）、丸山めぐみ（生理研・脳プロ）、高桑徳宏（生理研・認知行動発達）、寺嶋恵子（生理研・脳プロ）、久保義弘（生理研・神経機能素子）

【概要】

ヒトを含む霊長類において、入力された情報を脳がどのように表現するのか、また出力となる運動を脳がどのように実現しているのかについては、生理学や神経科学、または制御工学や情報処理、あるいは医用工学といった幅広い学問分野において注目されている重要な研究課題である。

この分野に関して、脳からの情報読解、運動制御のメカニズムや脳損傷後の機能代償、人工神経接続による運動機能再現、ブレインマシンインタフェースなどの研究について5名の先生にご登壇頂き、生体-機械協調システムという観点から最新の研究成果をご紹介頂いた。

（1）末梢感覚神経活動による上肢運動の情報表現

梅田達也（横浜市立大学）

これまでの単一神経活動記録の実験から、個々の末梢感覚神経は四肢の位置や動きに応答し、運動キネマティ

クス情報をコードしていると考えられている。しかし、集団としてどのように運動情報をコードし、そして大脳

皮質に情報伝搬されているのか明確ではない。そこで、我々は、到達保持運動をしているサルの頸髄後根神経節から複数の神経活動と上肢運動軌跡を同時記録する実験を行った。2頭のサルから10–16神経細胞の活動が記録できた。スパース線形回帰分析を用いて、末梢感覚神経が集団として上肢の複雑な運動キネマティクス情報を正確に表現していることを明らかにした。更に、大脳

皮質感覚野の皮質脳波を同時記録したところ、後根神経節細胞の活動から運動キネマティクス情報を持つガンマ波の時間変化を再構成することに成功した。以上の結果から、複数の後根神経節細胞が表現している上肢の運動キネマティクス情報が、大脳皮質感覚野に伝達されているであろうと推察される。

(2) 硬膜下皮質電位から算出された仮想的皮質内局所電位によるサル筋電位の推定

渡辺秀典（生理研・認知行動発達）

硬膜下皮質電位 (ECoG) は低侵襲の神経活動記録手法として注目されている。一方で皮質内局所電位 (LFP) は高侵襲であるが実質的な神経活動の情報を反映させている。我々はサル運動中の ECoG から LFP の算出を回帰分析によって可能にし (Watanabe, et al., 2012), 低侵襲的な記録手法による皮質内の神経活動情報の抽出を示した。しかし算出 LFP が実際の運動情報を有するかは不明である。そこで我々は ECoG から算出された仮想的 LFP における筋電位 (EMG) 情報の有無を評価した。サル運動野から 32 極の ECoG と 4 極の LFP, 並びに 12 の EMG は記

録された。LFP と EMG の推定には sparse linear regression 法を用いた。また 42 極の仮想的 LFP は算出された。運動情報の評価基準として記録/算出 LFP による EMG 波形と実測 EMG の相関係数 (R) とした。その結果, 算出 LFP による EMG 推定精度は記録 LFP によるそれよりも有意に高い ($R_{\text{imaginary}}=0.86\pm0.09$, $R_{\text{real}}=0.77\pm0.09$; $p<0.01$, paired t-test)。本研究を通じて低侵襲的な記録手法による脳からの運動情報抽出の可能性を示唆する。

Watanabe H, et al., J Neural Eng. 2012 9(3):036006

(3) 大脳皮質－筋間の人工神経接続による脳梗塞モデルサルの上肢麻痺筋の随意制御

加藤健治（生理研・認知行動発達）

脊髄損傷や脳梗塞など中枢神経障害後の四肢の運動・体性感覚麻痺は、大脳皮質と脊髄とを結ぶ神経経路の切断に起因するものである。しかしながら、損傷領域の上位に位置する大脳皮質、下位に位置する脊髄・末梢神経・筋肉の機能は残存されており、損傷領域をバイパスして残存した神経構造同士を繋ぐことで、失った機能が再建できる可能性がある。本研究では、運動・体性感覚機能の麻痺した脳梗塞モデルサルを作成し、人工神経代替装置を介して神経間をつなぐ“人工神経接続”によって、失った上肢の運動機能を再建できるかどうか検討した。大脳皮質運動関連領域に低侵襲の 45 極のシート状電極 (Electrocorticogram ; ECoG) を留置し、そこから得られた脳活動 (Local Field Potentials ; LFP) を抽出すること

で、大脳皮質⇒筋間の人工神経接続を試みた。本研究での人工神経接続は、以下のパラダイムで構成される。(i) 45 極の ECoG より任意の 1 極を選び、そこから記録された脳活動を、運動関連周波数帯域 (high- γ 帯域: 80-120 Hz) でフィルタリングする。(ii) high- γ 帯域脳活動における特徴的波形を検出し、検出波形頻度に応じて筋への電気刺激の強度と周波数を随意制御する。人工神経接続中、脳梗塞により片麻痺になったサルは自らの脳活動を随意的に変化させながら電気刺激を制御し、随意的に麻痺した筋を運動制御することができた。さらに、人工神経接続を施した 25 分間で、手首の力制御タスクのパフォーマンスは有意に向上し、サルが自ら人工神経接続に対して学習できることが明らかになった。これらの

結果は、サルが随意的に脳活動を変化させて大脳皮質⇒筋間の人工神経接続の利用方法を学習することで、失っ

た上肢運動機能の随意制御が再建できることを示唆している。

(4) 上肢筋－腰髄間の人工神経接続を利用した下肢歩行運動の随意制御

笹田周作 (生理研・認知行動発達)

脊髄損傷による歩行機能の喪失は、腰髄にある下肢歩行中枢への下降性入力遮断が原因である。しかし、損傷領域の上流である上位中枢及びその下流にある脊髄内神経回路網はその機能を残存しており、それらを何らかの方法で接続できれば歩行機能再建の可能性はある。この問題に対する解決策の一つとして、Closed-loop 型の Brain-computer interface を用いて、物理的に離れた神経組織間を人工的に接続する“人工神経接続”が挙げられる。人工神経接続はある部位の生体信号を記録し、その生体信号に応じた刺激を物理的に離れた部位へ行う事により記録部位と刺激部位の間に強固な活動関係を作り出すことで、人工的な神経接続として機能する刺激パラダイムである。我々は、随意的な歩行様腕振り運動中に生じる

上肢筋の活動パターンに依存した腰髄への脊椎上磁気刺激により上肢筋－腰髄間の人工神経接続を形成し、下肢歩行様運動の随意制御を試みた。

上肢筋－腰髄間の人工神経接続は、腕振り運動中に生じる三角筋の筋電図活動量の振幅変化に比例して頻度変調する刺激波形により、腰髄へ脊椎上磁気刺激を施すことによって達成した。人工神経接続下では、腕振り運動により下肢の歩行様運動が生じ、その運動の開始・停止、更にその歩調もまた変調可能であった。人工神経接続を利用して下肢歩行様運動を随意制御することが可能であり、脊髄損傷患者の随意歩行機能再建が出来る可能性を示している。

(5) 皮質脳波法による視覚情報の解読

長谷川 功 (新潟大学医学部生理学教室)

わたしたちは脳の表面に「網をかける」ように張りめぐらせて局所フィールド電位を多点記録する柔軟なメッシュ型の皮質脳波 (Electrocorticogram: ECoG) 電極を設計し、さらにラットやマカクザルの動物モデルで、刺入型の微小電極法との比較において、高密度のメッシュ型 ECoG 電極によって得られる信号の記録特性を検証する系を開発しました。マカクザルでは、メッシュ型電極を脳表のみならず脳溝に広範囲留置することも可能となりました。この手法を用いてマカクザル下側頭葉の神経活動を計測すると、ECoG で記録した神経活動には顔や体などといった基本レベルの視覚カテゴリーの情報が含ま

れていることがわかりました。さらに、下側頭葉局所において微小電極を用いたユニット記録由来の神経活動と ECoG 法で得られた信号からヒトの顔かサルの顔かの種の判別、顔の個体識別、顔の角度判別、という異なる階層カテゴリーの情報を解読できるかどうかを検討した結果、基本カテゴリーでは ECoG がユニットの判別成績を上回る傾向にあり、細かいカテゴリー (顔の動物種、角度、個体) では逆にユニットの判別成績が ECoG を上回りました。網状電極を用いた ECoG 法は、基礎的な神経科学の研究にとっても、次世代 Brain-machine interface の開発にとっても重要な手法となりつつあります。

12. 感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻

2013年9月2日－9月3日

代表・世話人：南 雅文（北海道大学大学院薬学研究院）

所内対応者：鍋倉淳一（生体恒常機能発達機構研究部門）

- (1) うつ病の新規治療ターゲットとしての BDNF-TrkB シグナル
橋本謙二（千葉大学 社会精神保健教育研究センター 病態解析）
- (2) 統合失調症サイトカインモデルでみられた社会行動異常：ドパミン神経系との関連性
外山英和・那波宏之（新潟大学 脳研究所 分子神経生物学）
- (3) 脳発達期の栄養状態が統合失調症発症脆弱性に与える影響—マウスを用いた検討
吉川武男（理化学研究所 脳科学総合研究センター 分子精神科学）
- (4) 情動行動発現における脊髄後角- 腕傍核- 扁桃体路の意義
加藤総夫（東京慈恵会医科大学 神経科学）
- (5) 痛みによる不快情動生成の脳内メカニズム
南 雅文（北海道大学 薬学研究院 薬理学）
- (6) 味覚嫌悪学習による嗜好性変化とその中枢メカニズム
乾 賢・志村 剛（大阪大学 人間科学研究科 行動生理学）
- (7) 嗅覚入力が誘発する先天的な冷たい恐怖と後天的な温かい恐怖
小早川高（大阪バイオサイエンス研究所）
- (8) モノアミンが制御する線虫の記憶学習行動とその神経回路
森 郁恵（名古屋大学 理学研究科 分子神経生物学）
- (9) 情動記憶の脳内表現と表出の制御
松尾直毅（京都大学 白眉センター）
- (10) The habenula acts as the switchboard in fear response and aggression
岡本 仁（理化学研究所 脳科学総合研究センター）
- (11) 恐怖記憶制御のマイクロエンドフェノタイプ
喜田 聡（東京農業大学 応用生物科学部）
- (12) 情動の制御機構を解明するための神経情報基盤の構築 脳プロ課題 G の活動
貝淵弘三（名古屋大学 医学系研究科）

【参加者名】

南 雅文（北海道大学薬学研究院薬理学研究室）、松尾直毅（京都大学白眉センター）、橋本謙二（千葉大学社会精神保健教育研究センター病態解析研究部門）、外山英和（新潟大学脳研究所分子神経生物学）、竹本 誠（熊本大学大学院生命科学研究部知覚生理学分野）、森 郁恵（名古屋大学理学研究科生体構築論講座）、乾 賢（大阪大学人間科学研究科行動生理学研究分野）、小早川高（（公財）大阪バイオサイエンス研究所神経機能学部門）、吉川武男（理化学研究所脳科学総合研究センター分子精神科学研究チーム）、喜田 聡（東京農業大学応用生物科学部バイ

オサイエンス学科）、中山大輔（東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室）、高橋由香里（東京慈恵会医科大学神経科学研究部神経生理学研究室）、笠井慎也（東京都医学総合研究所精神行動医学研究分野依存性薬物プロジェクト）、加藤総夫（東京慈恵会医科大学神経科学研究部神経生理学）、貝淵弘三（名古屋大学医学系研究科神経情報薬理学）、黒田啓介（名古屋大学大学院医学系研究科神経情報薬理学）、中牟田信一（名古屋大学大学院医学系研究科神経情報薬理学講座）、瀬崎真衣子（筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構）、岡本 仁（（独）理化学研究所脳

科学総合研究センター発生遺伝子制御研究チーム), 木下 専 (名古屋大学理学研究科生命理学専攻), 近藤怜苑 (名古屋大学医学部), 張 心健 (名古屋大学大学院医学系研究科神経情報薬理学), 金田勝幸 (北海道大学薬学研究院薬理学研究室), 松田隆志 (基礎生物学研究所生命科学科統合神経生物学研究部門), 鍋倉淳一 (生理学研究所生体恒常機能), 稲田浩之 (生理学研究所生体恒常機能), 中畑義久 (生理学研究所生体恒常機能), 石川達也 (生理学研究所生体恒常機能), 宮本愛喜子 (生理学研究所生体恒

常機能), 中村佳代 (生理学研究所生体恒常機能), 穂吉亮平 (生理学研究所生体恒常機能), 川本恭兵 (生理学研究所生体恒常機能), 高雄啓三 (生理学研究所行動様式), 西村幸男 (生理学研究所認知行動発達), 渡辺秀典 (生理学研究所認知行動発達), 加藤大輔 (基礎生物学研究所光脳回路論), 橋 吉寿 (生理学研究所生体システム), 橋口真帆 (生理学研究所心理生理), 北沢和寛 (生理学研究所神経機能素子), 東島 (宍戸) 恵美子 (生理学研究所心理生理), 東島眞一 (統合バイオ生命時空間設計)

【概要】

快・不快情動はヒトを含む高等動物において行動の動機付けに関わる重要な脳機能であり脳研究の重要な課題である。また、本来は行動の動機付けを介して生体を守るシステムであるはずの情動システムではあるが、その異常は、うつ病や不安障害などの精神疾患や薬物依存を引き起こす。精神疾患や薬物依存の増加は社会的な問題となっており、有効な治療薬・治療法の創製は急務の課題となっている。このような学術的・社会的背景より、快・不快情動の神経機構の解明が期待されている。本研究会では、感覚刺激あるいは薬物によって惹起される快・不快情動に着目する。嗅覚や味覚、痛覚は原始的な感覚であるが故に、これらの感覚入力によって快・不快情動を引き起こす神経回路は生体が生まれながらに有しているものである。また、薬物投与による刺激はその標的分子が既知のことが多い。そのような単純ではあるが根元的な刺激や作用標的分子が明らかな刺激による快・

不快情動生成に関わる神経機構の解明を突破口として、「こころ」のメカニズム、さらには、快・不快情動生成機構の破綻としての「こころ」の病のメカニズムに迫ろうとするものである。従来は、嗅覚、味覚、痛覚、薬物依存、精神疾患などの異なったセッションやシンポジウム、あるいは、異なった学会において、研究成果発表や討論が行われてきたものを、「情動」をキーワードとして一堂に集め、密な情報交換と活発な討論を行うことにより、情動研究の推進を図る。今回は、特に、マイクロエンドフェノタイプ同定やプロテオミクスなどの切り口から情動・精神機能研究を展開する研究者の講演を中核として、学際的な研究会を開催し、新たな情動研究戦略の設定のための非常に貴重な機会となった。今後も本研究会を継続し、様々な切り口からの情動研究の融合を図ることは、本邦の情動研究の飛躍的なレベルアップに資するものであると考えられた。

(1) うつ病の新規治療ターゲットとしての BDNF-TrkB シグナル

橋本謙二 (千葉大学社会精神保健教育研究センター 病態解析研究部門)

うつ病の発症率は非常に高く、我が国でも大きな社会問題になっている。うつ病の治療には、抗うつ薬が処方されているが、治療効果を発現するためには数週間以上を要する。また現在の抗うつ薬では奏功しない治療抵抗性患者が存在することが指摘されている。以上のことから、うつ病に対する新たな治療薬の開発が急務である。

これまでの多くの基礎・臨床研究から、脳由来神経栄養因子 (BDNF: Brain-derived neurotrophic factor) がうつ病の病態および治療メカニズムに関わっていることが

判ってきた。幾つかの基礎研究から、うつ症状発現に対して BDNF は脳部位により逆の作用を有していることが指摘されている。例えば、海馬においては、BDNF が低下するとうつ症状を引き起こし、BDNF を海馬に投与すると抗うつ効果が観察される。一方、報酬系である側坐核においては、BDNF の増加はうつ症状の発現に関わっていることが報告されている。本研究会では、うつ病の発症に関わっている海馬および側坐核における BDNF およびその受容体である TrkB の役割と新規治療ターゲッ

トについて、考察したい。

(2) 統合失調症サイトカインモデルでみられた社会行動異常；ドパミン神経系との関連性

外山英和（新潟大学脳研究所分子神経生物学分野）

那波宏之（新潟大学脳研究所分子神経生物学分野）

上皮成長因子(EGF)は ErbB 受容体のリガンドの一つである。また、この分子はドパミン神経に対して神経栄養因子活性を示すことが知られている。我々のこれまでの研究では、幼若期に EGF に暴露されたラットは、成熟後、社会性行動の低下や知覚フィルター機能異常など、統合失調症に関連する認知行動異常を示すことがわかっている。最新の我々の研究によると、この末梢からの EGF に反応して黒質-淡蒼球ドパミン神経は過剰発達する。このことが、本モデル動物の知覚フィルター機能

障害に関与していると判明している。しかし、本モデル動物の社会性行動異常とドパミン神経との関係は明らかになっていなかった。予備実験において、本モデル動物は前頭皮質においてもドパミン代謝異常を呈していた。そこで我々は腹側被蓋野(VTA)-内側前頭皮質(mPFC)経路を中心に詳細な電気生理学・神経化学的解析を行った。本口演では、これらの解析結果を紹介するとともに、VTA- mPFC ドパミン神経の活動異常に対する非定型抗精神病薬の効果についても論じたい。

(3) 脳発達期の栄養状態が統合失調症発症脆弱性に与える影響- マウスを用いた検討

吉川武男（理化学研究所 脳科学総合研究センター 分子精神科学研究チーム）

統合失調症は、思春期以降好発する精神疾患の中でも最も重篤であり、発症頻度も約1%と決して少なくない。発症病理の詳細は未だ不明であるが、遺伝学的にも環境的にも脳発達期の微細な侵襲が将来の顕在発症の脆弱性を形成すると考えられている。前者は、リスク遺伝子の多くが脳の発達期に発現開始・増加を示し、後者については、母体や胎児が受けるさまざまなストレスイベントがリスク要因となっているという疫学データの蓄積がある。

リスク環境要因の1つとして、母体が曝された飢饉の大規模事例が2つ報告されている。近年、統合失調症のミエリン仮説に関連して、栄養素として必須脂肪酸の役割が注目されている。我々は、妊娠の2週間前から離乳期までの間、母マウスにアラキドン酸 (arachidonic acid: AA), ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA) 欠乏食を与え、生まれてきた仔マウスには通常食を与えた「脳発達期必須脂肪酸欠乏マウス」を作成した。対照

群は、母マウスにも通常食を与えたものである。

「脳発達期必須脂肪酸欠乏マウス」は、成体になったときの行動はヒトの軽度精神病状態、あるいは精神病前駆状態に対応すると考えられる表現型を示し、遺伝子発現では複数のミエリン関係の遺伝子発現レベルが低下していた。前者はモデルとしての「表面妥当性」、後者は「構成妥当性」と考えることも可能であると思われる。

ミエリン関連の遺伝子発現レベル低下の「上流メカニズム」を探るため、発現制御に関わると思われる転写因子群の発現量を調べたところ、対照群に比較して低下していた。この低下の原因を探るべく、発現量の低下していた転写因子遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態を調べたところ、メチル化が亢進している所見を得た。脳発達期の栄養状態と DNA メチル化状態の因果関係はなお不明ながらも、エピジェネティックスマークを刻印していることが示唆された。

(4) 情動行動発現における脊髄後角—腕傍核—扁桃体路の意義

加藤総夫 (東京慈恵会医科大学・神経科学研究部)

「痛みシステム」の生物学的目的は、侵害受容情報を検出し、その原因から身体を遠ざける運動を誘発するとともに、その動物の既定の行動プログラムと実行優先度を書き換え、それによって組織損傷の治癒を促し、かつ、侵害受容を受けうる可能性やその影響を減少させ、結果として生存可能性を上昇させることにある。この既定プログラムの書き換えに伴った内部状態の変化が情動の本態であるとの想定の下、この書き換えのメカニズムの分子・細胞機構の解明を目指している。

C 線維由来の侵害受容情報を主に受ける脊髄後角浅層上行性投射ニューロンの大部分は、外側腕傍核 (lateral parabrachial nucleus; LPB) に投射し、また、LPB からは、扁桃体中心核外側部/外包部 (CeL/CeC) への密な投射がある。この侵害受容と扁桃体を結ぶ経路が「痛みシステム」の可塑性とその結果として生じる情動学習において担う役割を検討し、以下の新事実を見出した。

(1) 末梢 C 線維脱失は神経障害性疼痛による LPB-CeC シナプス伝達増強を消失させ、足底電気ショッ

クを無条件刺激とした恐怖条件付けを有意に減弱させる。

(2) LPB の薬理的な不活性化は恐怖条件付けを有意に減弱させる。(3) LPB ニューロンへの ChR2-YFP 発現ベクター感染動物から作製した扁桃体スライスにおいて CeC/CeL の YFP 陽性線維投射領域のニューロンのほとんどが光照射誘発単シナプス性 EPSC および複シナプス性 IPSC を示す。(4) 足底および口唇部へのホルマリン注射は、CeC の ERK リン酸化を誘発し、疼痛行動が消失した投与 6 時間後、LPB-CeC シナプス伝達が顕著に増強する。(5) 口唇部ホルマリン注射動物は自発的溫度嗜好テストにおいて冷温環境に対する忌避を示す。以上の観察結果は、C 線維に起始する侵害受容情報が LPB から扁桃体中心核への興奮性投射を介して扁桃体の情報処理に強く影響を及ぼし、恐怖学習から慢性痛に至る情動行動の可塑的制御に関与する可能性を強く支持する。

[研究協力者：渡部文子，高橋由香里，佐藤 優，杉村弥恵，宮沢祐太，杉本真理子]

(5) 痛みによる不快情動生成の脳内メカニズム

南 雅文 (北海道大学 薬学研究院 薬理学研究室)

痛みは、侵害刺激が加わった場所とその強さの認知に関わる感覚的成分と侵害受容に伴う不安、嫌悪、抑うつ、恐怖などの負の情動（以下、不快情動と呼ぶ）の生起に関わる情動的成分からなる。痛みによる不快情動は、生体警告系としての痛みの生理的役割にとって重要であるが、慢性疼痛では、痛みにより引き起こされる不安、抑うつ、恐怖などの不快情動が、患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、精神疾患・情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環をも生じさせる。しかしながら、慢性疼痛による情動機構の可塑的変化のメカニズムはおろか、痛みによる不快情動生成の神経機構についてもほとんど

わかっていないのが現状である。

我々は、痛みによる不快情動生成機構について、「extended amygdala」を構成する脳領域である分界条床核に着目して研究を進めている。昨年の本研究会では、背外側分界条床核内 CRF 神経情報伝達の亢進が、痛みによる不快情動生成に関与していることを示す研究結果を報告している。本研究会では、背外側分界条床核内 NPY 神経情報伝達が痛みおよび CRF による不快情動生成を抑制することを示すとともに、背外側分界条床核内神経細胞に対する CRF と NPY の作用を検討した電気生理学的解析のデータを示し、痛みによる不快情動生成のメカニズムについて論じたい。

(6) 味覚嫌悪学習による嗜好性変化とその中枢メカニズム

乾 賢 (大阪大学 人間科学研究科 行動生理学)

志村 剛 (大阪大学 人間科学研究科 行動生理学)

味覚は、食物摂取行動において、口腔内に入れた物質を体内に取り込むか、忌避するか最終的な判断を下すための手がかりとなる。食物が呈する味は、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味という5つの基本味によって構成されている。これらのうち、甘味、塩味、うま味は糖類、ミネラル、アミノ酸の存在を示すシグナルとして機能する。ヒトや多くの動物にとって、これらの味覚は快刺激であり、食物摂取を促進する。一方、酸味と苦味は腐敗物と毒物が呈する不快な刺激である。そのため、ヒトや動物は酸味や苦味を忌避する傾向にある。これらの味覚に対する好み（味覚嗜好性）は生得的なものであることが、ヒトを含む霊長類、サル、げっ歯類などで確認されている。

生得的な味覚嗜好性は可塑的なものであることが、一般的に知られている。例えば、子供は苦いコーヒーを飲むことができないが、大人は好んで摂取する。このような味覚嗜好性の変化とその原因は多様であるが、最も典型的な現象の一つに、味覚嫌悪学習（conditioned taste aversion, CTA）がある。ヒトや動物が食物摂取後に体調

不良を経験すると、その食物の味に対する嫌悪を獲得する。このCTAによって味覚に対する嗜好性が「好ましい（快）」から「嫌い（不快）」へと変化する。我々はこのCTAによる味覚嗜好性の変化の中枢メカニズムを、ラットを用いた実験によって解明しようとしている。

数多くのCTAに関する先行研究によって、脳内味覚伝導路に沿って存在する脳部位（結合腕傍核、扁桃体、大脳皮質味覚野）の可塑的变化がCTAの成立に必須であることが示されている。しかし、これらの脳部位の関与だけではCTAにおける味覚嗜好性の変化を十分に説明することができない。そこで我々は、嗜好性に基づく摂取行動の神経基盤として注目されている脳内報酬系に着目している。脳内報酬系の一部である、側坐核から腹側淡蒼球への神経連絡の役割を、行動薬理学的手法やMRIを用いたイメージング法を用いて調べた。本研究会ではこれらの一連の研究成果について紹介する。また最近、扁桃体基底外側核から側坐核、分界条床核、扁桃体中心核への遠心性投射路がCTAに関与していることを示唆する実験結果を得たので、併せて報告したい。

(7) 嗅覚入力が誘発する先天的な冷たい恐怖と後天的な温かい恐怖

小早川高 ((公財) 大阪バイオサイエンス研究所)

近年、光遺伝学やイメージングなどの技術進歩により、特異的な神経回路が情動や行動制御に果たす役割を解明することが可能になってきた。その一方で、情動や行動を特異的に誘発する方法や計測する技術に関しては旧来の手法に頼るという状況が続いている。私たちは、人工化合物ライブラリーのスクリーニングを実施することで、特定の化学構造ルールを満たす一連の匂い分子「恐怖臭」によって極めて強力な先天的恐怖情動が誘発されることを初めて解明した。既知の自然物に由来する匂い分子ではFreezing行動を伴わない弱い恐怖情動反応しか誘発できなかったが、恐怖臭の発見により様々な強度で定量的に恐怖情動反応を誘発する技術が確立された。恐怖臭を

用いて誘発した先天的恐怖と、電気ショックやLiClの腹腔注射を匂い分子と関連学習させることで誘発した後天的な恐怖はFreezing行動の誘発レベルやストレスホルモンの血中濃度などの既知の恐怖指標を用いて比較する限りは同等レベルと評価され区別できない。しかし、繰り返しの感覚刺激によって後天的恐怖では馴化が起こるが、先天的恐怖では逆に強化が見られるという明確な相違点が存在した。先天的と後天的な恐怖を区別して計測する新たな恐怖指標を探索した。その結果、同等レベルのFreezingを示す個体であっても、先天的恐怖においてのみ体表面と体深部温度の3℃もの同時低下と心拍数の急速な半減という極めて強力な生理応答が誘発されること

が明らかになった。

全脳活性化マッピング法と特異的な脳領域の薬理阻害実験により、先天的と後天的な恐怖の違いを表現する脳領域と、先天的な恐怖の強度を表現する脳領域が存在することが明らかになった。恐怖臭によって誘発される強力な先天的恐怖は、扁桃体中心核-PAG 経路に加え、線条体、中隔、大脳皮質などを含む広範な脳領域の神経活動によって制御されることが示唆された。向精神薬に対す

る応答特異性の解析結果から、恐怖臭による先天的な恐怖を制御する分子ターゲットとヒトの恐怖に関連する精神状態を制御する分子ターゲットの共通性も明らかになった。以上の結果から、哺乳類の脳には先天的な冷たい恐怖と後天的な温かい恐怖の少なくとも 2 種類の異なる恐怖モードが存在することが示唆される。恐怖臭と多次元情動測定法や全脳活性化マッピングを活用した最新の研究成果について報告する。

(8) モノアミンが制御する線虫の記憶学習行動とその神経回路

森 郁恵 (名古屋大学大学院理学研究科 生命理学専攻 分子神経生物学グループ)

行動は、過去の経験に基づく記憶と、その記憶に付随する情動によって規定されると考えられる。記憶または情動のそれぞれを担う分子機構は明らかになりつつあるが、情動に基づいて記憶がどのように行動に反映されるかは未だ不明な点が多い。線虫 *C. elegans* は飼育温度を記憶し、飼育環境の変化 (快・不快情報) に基づいて行動を変化させる。我々の研究グループでは、これまでに、セロトニン、オクトパミンなどのモノアミンが快・不快情報の伝達・統合に関与していることを明らかにした。このことは、モノアミンによる情動行動の制御が、哺乳動物から線虫に至るまで進化的に保存されていることを示唆する。また、線虫の主要な温度受容ニューロンは温度を受容するだけでなく、温度記憶を形成することを示した。この単一細胞による温度記憶は快・不快情報に関わらず形成されることがわかった。これらは、温度受容細胞における記憶情報が、飼育環境の変化によらず常に

神経回路上に想起されることを示唆する。また、記憶情報は、下流の介在ニューロンに伝達される際に、モノアミンの入力に依存して異なる様式で処理されることで、飼育環境の変化に応答した行動変化が実現すると考えられる。さらに、この単一細胞による温度記憶には CaMK (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase) の線虫ホモログをコードする *cmk-1* 遺伝子などのリン酸化酵素が重要な役割をしていることが明らかになってきた。現在、これらの温度記憶を制御するリン酸化酵素の基質を同定するために、名古屋大学医学系研究科貝淵研究室と共同で、リン酸化プロテオミクスによる基質の同定を試みている。本研究によって、モノアミンによる情動入力神経回路上でどのように記憶情報処理を制御するか、また単一細胞での CMK-1 リン酸化酵素を介した記憶のメカニズムが明らかにされると期待される。

(9) 情動記憶の脳内表現と表出の制御

松尾直毅 (京都大学 白眉センター)

記憶情報は脳内のどこで、どのように保持されているのであろうか? という記憶痕跡に関わる疑問は長年にわたる脳神経科学の基本的な重要課題である。これまでに immediate-early genes (IEGs) の神経活動依存的な発現を利用した活動マッピングや、*in vivo* ユニット記録などの研究から、記憶と相関を示す細胞集団の存在が示唆され

ている。演者らも IEGs のひとつ *c-fos* 遺伝子のプロモーターとテトラサイクリン誘導発現系を活用したトランスジェニックマウスの開発を行い、脳の各階層における記憶痕跡の可視化とその解析を行ってきた。

記憶と特定の機能的細胞集団の間の因果関係を実証するためには、これらの機能的細胞集団の活動を選択的に

抑制もしくは賦活化することにより、記憶の想起が阻害される、もしくは人為的に再生されることを動物個体レベルで直接検証することが必要である。そこで本講演では、演者らのテタヌス毒素によるシナプス伝達遮断や

DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) システムを用いたアプローチについて紹介し、情動記憶の脳内表現とその表出の制御について議論を交わしたい。

(10) The habenula acts as the switchboard in fear response and aggression

Hitoshi Okamoto (RIKEN Brain Science Inst.)

The habenula (Hb) is an evolutionarily conserved diencephalic structure that acts as a relay nucleus connecting the limbic forebrain with the brain stem monoaminergic systems. In mammals, the Hb is subdivided into medial and lateral regions (MHb and LHb, respectively). We recently discovered that the dorsal and ventral Hb (dHb and vHb) of zebrafish correspond respectively to the MHb and LHb of mammals. In mammals, the LHb is activated by receiving the unpredictable aversive stimuli, and represses the activity of dopaminergic and serotonergic neurons. We established the in transgenic zebrafish in which the neural transmission from the vHb is specifically inhibited. The active avoidance learning was specifically impaired, demonstrating the essential role of the vHb in the aversive learning.

The functions of the MHb in mammals have long remained ambiguous. Recently, we demonstrated in zebrafish that the lateral subnuclei of the dorsal habenula (dHbL) are asymmetrically connected with the dorsal and intermediate parts of the interpeduncular nucleus (d/iIPN). This pathway further projects to the region containing the equivalents of the

dorsal raphe, the periaqueductal gray, and the dorsal tegmental nuclei. Specific silencing of the dHbL-d/iIPN pathway rendered animals extraordinarily prone to freeze in response to conditioned fear stimuli, while the control fish showed only flight behaviors, implicating this pathway in experience-dependent reevaluation of danger during the fear conditioning trials.

We wondered whether the same capacity of this pathway is utilized in case of fighting between two males which have become territorial after isolation, because constant reevaluation of the opponent's strength is necessary during fight until the dominant winner and subordinate loser is ultimately determined. In wild-type zebrafish, it is reported that previous winning experience remarkably increases the probability of winning a subsequent contest. However, this experience-dependent behavior was not found in dHbL-silenced fish. Most of the dHbL-silenced winners of the first interaction lost the second interaction against a naive dHbL-silenced fish, suggesting the role of the dHbL-d/iIPN pathway in accumulation of confidence upon victory in fight.

(11) 恐怖記憶制御のマイロエンドフェノタイプ

喜田 聡 (東京農業大学応用生物科学部)

記憶は不安定な短期記憶から遺伝子発現依存的な「記憶固定化」のプロセスを経て安定な長期記憶へと移行する。さらに、記憶が想起されると、短期記憶と同様に不安定な状態に戻り、再び安定化されて貯蔵されるためには、固定化と類似した「再固定化」が必要とされる。また、恐怖記憶の場合、記憶が想起される時間が長くなる

と、恐怖記憶を軽減する「消去」が誘導される。我々は、恐怖条件付け文脈課題及び受動的回避反応課題を用いて、想起後の恐怖記憶制御プロセスの意義とそのメカニズムの解析を進めている。

受動的回避反応課題ではマウスが明箱から暗箱に移動すると電気ショックを受け、暗箱に対する恐怖記憶を形

成する。従って、マウスを再度明箱に入れた場合には、恐怖記憶は想起されるものの、恐怖記憶消去は誘導されず、暗箱に移動して、電気ショックを受けない場合にのみ消去が誘導される。従って、この課題では、再固定化と消去を区別して解析できるメリットがある。我々は、受動的回避反応課題では、マウスを明箱に戻して、記憶再固定化を誘導すると海馬、扁桃体、前頭前野における遺伝子発現を経て恐怖記憶が強化されることを明らかに

した。さらに、マウスが暗箱に滞在すると、扁桃体、前頭前野における遺伝子発現を経て恐怖記憶消去が誘導されることを明らかにした。現在、これら遺伝子発現が誘導されるニューロン集団の生化学的な性状解析を行っており、これらニューロンにおいて遺伝子発現ばかりではなく、プロテオソーム依存的タンパク質分解も活性化されることが明らかとなっている。発表では、このような情動記憶を制御するニューロン集団に関して議論する。

(12) 情動の制御機構を解明するための神経情報基盤の構築 脳プロ課題Gの活動

貝淵弘三 (名古屋大学医学系研究科)

快・不快、恐怖などの情動はモノアミン系神経により制御されていることが知られており、モノアミン系神経による報酬系は線虫からヒトまで幅広く保存されています。モノアミンやグルタミン酸の細胞内シグナルの一部が明らかになりつつありますが、情動に関連する細胞内シグナルについては不明な点が多く残っています。脳科学研究推進プログラム(脳プロ)の課題Gでは、情動の制御や記憶機構を理解するための情報基盤を構築することを目的とし、関連する神経回路の動作原理を制御するメカニズムの一端を明らかにすることを目標としています。そのため、神経回路機能解析、プロテオミクス、コンピュータシミュレーションの3つのグループが連携し、データ駆動型の研究を遂行しています。神経回路機能解析グループは、線虫から哺乳類までの各モデル生物における情動・意思決定の回路の特徴を抽出し、シナプスレベルでの情報の統合が、どのように行われているかを明らかに

することを目指しています。プロテオミクスグループは、快感や恐怖を生じる際、マウスの側坐核や扁桃体などの特定の神経核で起こるリン酸化反応を網羅的に解析し、情動制御に関わるシグナル伝達経路を特定します。これらのシグナル伝達経路の神経細胞機能や神経回路の動作・再編における役割を明らかにしようとしています。コンピュータシミュレーショングループは他のグループと共同して、リン酸化プロテオミクスのデータベースを構築しつつあります。さらに、得られたシグナル伝達系を既知のものと統合し、報酬予測、恐怖条件付けなど情動制御に関わる細胞機能を予測しうるモデルの作成を試みています。得られたデータベースは脳科学コミュニティに幅広く貢献するものと考えています。本研究会では、課題Gの活動を紹介するとともに、リン酸化データベースの現状についてお話したいと思います。

13. 個体内の記憶回路の同定とその機能解析による 学習記憶制御基盤の統合的理解

2013 年 12 月 11 日－12 月 12 日

代表・世話人：喜田 聡（東京農業大学応用生物科学部）

所内対応者：鍋倉淳一（生体恒常機能発達機構研究部門）

（1）小脳皮質回路の機能構築と運動制御・運動記憶

喜多村和郎（東京大学大学院医学系研究科神経生理学）

（2）条件づけ恐怖の維持，消失，復元に関わる神経回路

野村 洋（東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学）

（3）異なるセルアセンブリの光遺伝学的活性化による連合記憶の人工的創出

大川宜昭（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）生化学）

（4）ゼブラフィッシュは記憶研究に適したモデル生物であるか？

吉原良浩（独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター シナプス分子機構研究チーム）

（5）塩濃度の記憶に基づく線虫の塩走性行動の制御機構

國友博文（東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻）

（6）長期記憶形成に必要なグリア転写因子 Repo による 遺伝子発現

松野元美（公益財団法人東京都医学総合研究所）

（7）鳥類の早期学習におけるメモリープライミング

本間光一（帝京大学薬学部生命薬学講座病態分子生物学）

（8）社会学習による音声スキル獲得・制御の神経基盤

渡邊 大（京都大学大学院生命科学研究科高次脳機能学分野）

（9）サルの前頭葉-大脳基底核ネットワークに見出された複数の記憶表現

星 英司（東京都医学総合研究所・前頭葉機能プロジェクト）

【参加者名】

喜多村和郎（東京大学 大学院医学系研究科 神経生理学），星 英司（東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野 前頭葉機能プロジェクト），王 丹（京都大学 物質－細胞統合システム拠点），大川宜昭（富山大学 大学院医学薬学研究部（医学）生化学講座），本間光一（帝京大学 薬学部 病態分子生物学），齊藤 実（東京都医学総合研究所 運動感覚システム研究分野 学習記憶プロジェクト），野村 洋（東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室），中山大輔（東京大学大学院 薬学系研究科 薬品作用学教室），松野元美（公益財団法人東京都医学総合研究所 学習記憶プロジェクト），井ノ口馨（富山大学 大学院医学薬学研究部 生化学），國友博文（東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻），海老原てい（東京農業大学 農学研究科バイオサイエンス専攻 動物分子生物学的研究室），天野翔次郎（東京農業大学 農学研究科 動物分子生物学的研究室），弥武優郁（東京農

業大学 応用生物科学部バイオサイエンス学科 動物分子生物学的研究室），長葭大海（東京農業大学 応用生物科学部バイオサイエンス学科 動物分子生物学的研究室），岸本拓也（東京農業大学 農学研究科 動物分子生物学的研究室），渡邊 大（京都大学 生命科学研究科 高次脳機能学分野），吉澤雄博（東京農業大学 農学研究科 動物分子生物学的研究室），櫻井雅弘（東京農業大学 農学研究科 動物分子生物学的研究室），今村菜津子（東京大学大学院 薬学系研究科 薬品作用学教室），山肩葉子（生理学研究所 神経シグナル），石川理絵（東京農業大学 農学研究科 動物分子研究室），林 康紀（独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 記憶メカニズム研究チーム），宮川英理子（京都大学 人間・環境学研究科，共生人間学専攻，認知・行動科学講座，認知科学分野 船橋新太郎研究室），宮下俊雄（生理学研究所 神経分化研究部門），鍋倉淳一（生理学研究所生体恒常機能発達機構），稲田浩之

(生理学研究所生体恒常機能発達機構), 中畑義久 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 石川達也 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 宮本愛喜子 (生理学研究所生

体恒常機能発達機構), 中村佳代 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 穂吉亮平 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 川本恭兵 (生理学研究所生体恒常機能発達機構)

【概要】

記憶研究は、現在、転換期を迎えている。これまでは、特定の遺伝子に着目する遺伝学的手法を用いて記憶制御基盤の解明が進められてきた。しかし、現在、ウイルスを用いた分子遺伝学的手法、光遺伝学的手法、*in vivo* レコーディング及びイメージング技術の進展により、個体内の分子のみならず、回路・シナプス・細胞に特化して介入操作を加えることで、個体内の記憶回路にフォーカスした研究を展開することが可能となりつつある。現在、国内では、欧米に比較すると、個体を対象とする記憶研究は盛んであるとは言い難い。しかし、ショウジョウバエや線虫を中心としたモデル生物を用いた記憶研究は活発であり、一方で、高度な分子生物学・生理学・イメージング技術を有する神経科学研究者は多く、このような多彩な研究が融合することで、欧米を凌駕する新たな記憶研究を進展させることも可能である。今回は、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、鳥類、マウス、

そして、霊長類と幅広い種を対象として記憶研究を進める研究者が一同に揃って研究会を行った。分子から、細胞、回路、行動に至るレベルの研究が紹介され、光遺伝学、分子遺伝学、生理学、二光子イメージングと多彩な技術を用いた革新的な研究成果が披露された。研究会を通して、それぞれの種の特徴を生かした研究が紹介され、記憶回路の本質に迫る幅広いディスカッションが展開された。以前は米国コールドスプリングハーバー研究所において、このような様々なモデル生物を対象とする記憶研究者が集うミーティングが行われていたものの、最近ではこのような機会は極めて少なくなっている。この現状の中で、今年度の記憶回路研究会は、昨年に引き続き、記憶研究の今後の新展開を考える上での非常に貴重な機会を提供できたと考えられる。オールジャパンの新たな融合的研究が産まれるためにも、この会を継続することは大いに意義がある。

(1) 小脳皮質回路の機能構築と運動制御・運動記憶

喜多村和郎 (東京大学大学院医学系研究科)

小脳皮質は、矢状断に沿った帯状の構造を形成しており、それぞれのバンドは、さらに細かい微小帯域から構成されている。微小帯域の大きさはプルキンエ細胞数個程度の幅であり、同じ微小帯域に含まれるプルキンエ細胞は、ギャップ結合で共役した同じ下オリーブ核からの投射により、同期した登上線維入力を受ける。これらのプルキンエ細胞の出力は小脳核を介して下オリーブ核へと返され、閉ループを形成している。この構造はマイクロコンプレックスと呼ばれ、小脳の基本回路とされている。すなわち、それぞれの微小帯域は小脳皮質の機能単位であり、その活動と運動発現の関係を明らかにすることが、小脳による運動制御・運動学習のメカニズム解明に必須であると考えられる。我々は、小脳皮質の機能構築を明らかにするために、生体内で小脳皮質の帯状構造を可視化することのできるマウスを作成した。小脳帯

状構造の分子マーカーであるアルドラーゼCの発現を蛍光タンパク質で可視化するマウスである。このマウスの小脳皮質において、プルキンエ細胞における自発および感覚誘発性の登上線維応答を2光子カルシウムイメージングにより観察し、小脳皮質の帯状構造と登上線維入力の同期性の関係を調べた。その結果、登上線維応答の同期性とアルドラーゼCの発現が密接に関係しており、バンドの境界と同期性の境界が1細胞レベルで精密に一致していることを明らかにした。また、覚醒状態でのマウスの運動と微小帯域活動の関係を明らかにする目的で、頭部固定下でマウスに運動課題を行わせる装置を開発している。本会議では、これらの結果とともに、小脳微小帯域活動とその運動制御・運動記憶への寄与について議論する。

(2) 条件づけ恐怖の維持, 消失, 復元に関わる神経回路

野村 洋 (東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室)

経験によって獲得された記憶は, 様々な調節過程を経て維持される。特に恐怖記憶は強く脳内で維持され, 不安障害などの病態へ関与する。私たちは, 恐怖記憶が形成後に受ける調節過程の解明を目指して研究を進めている。記憶課題としてマウスの文脈的恐怖条件づけを用いている。マウスを実験箱に暴露し, 電気ショックを与えることで実験箱と電気ショックの関係を学習させる。マウスは再度実験箱に暴露された時, 恐怖記憶を想起し, 四肢をすくませる。学習時, 最初期遺伝子 Arc を含めた様々な遺伝子の発現が迅速に誘導され, 記憶の固定化に寄与する。しかし, 固定化された記憶の“維持”に寄与

する遺伝子発現は不明な点が多い。そこで私たちは, 学習の 2~24 時間後の Arc 発現を測定し, 学習 12 時間後に Arc 発現が誘導されること, この遅延性の Arc 発現が記憶の維持に寄与することを見出した。特に, 学習時に活性化したニューロン集団では, 選択的に遅延性の Arc 発現が認められた。また遅延性の Arc 発現は, 脳由来神経栄養因子 BDNF に依存して誘導された。現在, 遅延性の Arc 発現と樹状突起スパインとの関係についての解析を進めている。さらに発表では, 恐怖が一度消失した後, 再び発現するようになるメカニズムについても合わせて議論する。

(3) 異なるセルアセンブリの光遺伝学的活性化による連合記憶の人工的創出

大川宜昭, 井ノ口馨 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 生化学講座)

記憶は, 学習時の感覚入力に応答し活性化した一部の神経細胞集合体 (セルアセンブリ) にコードされと考えられている。セルアセンブリの人為的活性が, 対応する記憶の想起を導くことが知られているが, 異なるイベントの個別情報の連合が, どのようにセルアセンブリ・レベルで起こるのかは未知である。この疑問の解明を目的とし, 我々は, 海馬 CA1 と扁桃体外側基底核 (BLA) に形成された連合が起きていない異なるセルアセンブリの人為的同期活性化により, 新しい人工連合記憶の創出を試みた。ある種の文脈性恐怖条件付け学習課題では, マウスを事前にチャンバーに暴露し, 文脈情報の獲得の後, 同一チャンバー内で即時電気ショックを与えると連合学習が成立する (paired 条件) が, チャンバーが異なると成立しない (unpaired 条件)。神経活動時に発現誘導される最初期遺伝子の発現を指標に, この事前暴露と即時ショック時の活性化細胞を調べることで, CA1 と BLA での各イベントに対応するセルアセンブリの出現を明ら

かにした。c-fos 遺伝子は最初期遺伝子の一つであり, このプロモーター活性依存的に転写因子 tTA を発現するマウスでは, 薬剤制御により特異的イベント時に活性化した神経細胞内に TRE 配列下流の遺伝子の発現を誘導できる。このシステムを利用し, 連合記憶の成立しない unpaired 条件付けで活性化した CA1 と BLA のセルアセンブリへ, 光依存的に神経活動を誘導する ChR2 遺伝子を発現誘導させ, 翌日 CA1 と BLA への同期的光照射を行った。ショックと連合していない事前暴露に使用したチャンバーでのさらに翌日のテストにおいて, コントロールである光照射無し, もしくは EYFP 発現マウスと比べ, 前日に光照射をした ChR2 発現マウスでは, 恐怖反応の出現率が有意に上昇した。この結果は, 異なるセルアセンブリの同期活性化が, 個々の情報の連合を誘導し新たな連合記憶を創出することを示している。これは, 日々の環境変化に対応するための記憶のアップデート機構の一つであろう。

(4) ゼブラフィッシュは記憶研究に適したモデル生物であるか？

吉原良浩 (理化学研究所・脳科学総合研究センター)

ゼブラフィッシュは、体外での受精、迅速な発達、稚魚の身体の高透明性、大規模変異体スクリーニングの有効性、多様な遺伝学的技術やイメージング技術の適用性などの利点から、生物学の様々な分野において有益なモデル脊椎動物として利用されている。また、ゼブラフィッシュの神経系は哺乳類と同様の基本構造・構成細胞を有し、視覚・嗅覚・聴覚・体性感覚などの入力刺激に対して明確かつ再現性の高い出力行動を発現することから、神経科学においてもそのモデル脊椎動物としての有用性が示されてきた。しかしながら、記憶メカニズムの解明にゼブラフィッシュを用いた研究は非常に少なく、この分野においてはマウス・ショウジョウバエ・線虫などに遅れをとっているのが現状である。私たちのグループは、嗅覚入力から行動出力へと至る神経回路メカニズムの解明へ向けた研究をゼブラフィッシュを用いて行っている。

嗅覚は、餌を探し出す、交配相手を見つける、親子・仲間を識別する、危険から逃避するなど、すべての生物にとって個体の生存や種の保存に直結する重要な化学感覚である。すなわち外界に存在する多種多様な匂い分子が嗅細胞で受容され、その情報が嗅球さらには高次嗅覚中枢へと伝達・処理されて、嗅覚イメージの形成、快・不快の情動創出、特異的な行動の発現、さらには匂い記憶の成立へと至る。

本講演では、まずゼブラフィッシュ嗅覚系の神経回路基盤を紹介し、次に記憶研究におけるゼブラフィッシュの有用性について議論する。特にサケの母川回帰行動(あるいはヒトにおけるブルースト効果)のような嗅覚インプリンティングの神経回路メカニズムの解明へ向けてのゼブラフィッシュの利用の可能性について論じる。

(5) 塩濃度の記憶に基づく線虫の塩走性行動の制御機構

國友博文 (東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻)

記憶と個体の行動の変化との関係を明示的に調べるには、シンプルな神経回路を持つ生物が適している。線虫 *C.エレガンス* は、培養されていた環境の塩(塩化ナトリウム)の濃度を記憶することができる。そして、培養時に十分な餌が与えられていた場合にはその塩濃度に向かい、飢餓を経験した場合にはその塩濃度を避けるように行動する。すなわち、線虫の塩走性は、餌の有無と塩の濃度とを関連付けて記憶する連合学習である。我々は、この学習に必要な十分な神経回路を同定し、そこに生じた分子レベル・神経応答レベルの変化と行動の変化との関係を明らかにすることによって、記憶と学習の分子・神経機構の解明に寄与することを目指している。

この学習には、たった一個の味覚神経 ASER から塩濃度の情報が入力すれば十分である。神経回路の動作と行動との関係を明らかにするため、ASER、および後シナ

プス介在神経について、培養条件による応答様式の変化を調べている。ASER と AIB 介在神経は、塩濃度の低下により脱分極する。これまでに、ASER から AIB へのシナプス伝達の効率が培養時の塩濃度に依存して変化することが、塩に対する行動の変化を引き起こす原因の一つであることを明らかにした。一方、介在神経は AIB のみでは十分ではなく、並行する神経回路が働いていることが示唆された。この結果は、介在神経を個別に殺傷した個体を用いた塩走性行動の観察結果と一致した。AIB と並行する介在神経を調べたところ、AIY 介在神経の塩応答が、培養条件に依存して変化することを見出した。遺伝学的細胞殺傷法を用いた介在神経の機能阻害、オプトジェネティクスを用いた神経回路の人為的活性化/不活性化などの実験を組み合わせ、この応答様式の変化が学習による行動の変化に結びつくか調べている。

(6) 長期記憶形成に必要なグリア転写因子 Repo による遺伝子発現

松野元美（公益財団法人東京都医学総合研究所）

齊藤 実（公益財団法人東京都医学総合研究所）

神経・グリア相互作用は神経機能の維持や制御において、様々な役割を持つ。しかし、記憶形成に必要な神経・グリア相互作用やそれを担う分子機構はまだ不明な点が多い。先の実験により、私たちはショウジョウバエのホモフィリック細胞接着因子 *Klingle* (*Klg*) が長期記憶学習後、神経・グリアの相互作用を司り、グリア転写因子 *Repo* の発現増加を促すことを見いだしている。*Repo* はショウジョウバエの胚発生において、グリアの分化成熟を制御することが知られているが、成虫脳での機能については未知であった。今回私たちは *Repo* 依存性のグリアグルタミン酸トランスポーター *Dea1* の発現増加が長

期記憶形成に必要であること、*Klg/Repo* シグナル低下は長期記憶学習依存性の細胞死を誘導することを明らかにした。さらに加齢個体では *klg*, *repo* の発現低下に伴い、長期記憶学習依存性の細胞死が誘導されること、*repo* の強制発現は加齢性長期記憶障害を抑制することも併せて明らかにした。私たちの結果は長期記憶形成が細胞の生存リスクの上で形成されており、その形成には *Klg/Repo* を介したグリア遺伝子発現増加による神経保護が必要であること、その破綻が加齢性長期記憶障害を引き起こすことを示唆している。

(7) 鳥類の早期学習におけるメモリープライミング

本間光一（帝京大学薬学部病態分子生物学）

ある種の学習には、固有の学習臨界期（その時期にしか習得できない時期のこと）が存在します。ヒトの学習では、第一言語の習得や絶対音感の確立、社会性の獲得などがそれにあたります。ヒト以外の動物では、ニトリやカモなど鳥類のヒナが孵化直後に親を記憶して追いかける刷り込み学習がその典型的な例として知られています。私たちは、孵化後2、3日間に限定されている刷り込み学習における臨界期の開始を決定する因子が甲状腺ホルモンであり、このホルモンが学習を開始すると同時に脳内へ流入し、臨界期の扉をわずか20～30分間の生化学的反応で開くことを初めて明らかにしました。また臨界期を過ぎた鳥であっても、ホルモンを注射することで刷り込みが可能になることを示しました。さらに

甲状腺ホルモンには、その後の学習を効率よく習得できるようにプライミングする機能があることもわかりました。私たちがメモリープライミングと呼ぶこの脳機能は、甲状腺ホルモンが脳に一過的に作用することで賦与されますが、長期にわたって学習の習得効率を向上させる効果をもたらすので、学習そのものはプライミング直後に行う必要はありません。本研究会では、刷り込み学習にもたらす甲状腺ホルモンの作用メカニズムとメモリープライミングについて発表します。これらの研究成果は、学習臨界期を逃しても再び学習可能な時期をもたらすといった新しい視点の創薬の可能性を提案するものと考えています。

(8) 社会学習による音声スキル獲得・制御の神経基盤

渡邊 大（京都大学大学院生命科学研究科高次脳機能学分野）

我々ヒトは、模倣や教育といった社会的相互作用を特

徴とする「社会学習」を通じて様々なスキルを獲得する。

社会学習により獲得する行動や能力は世代を超えて文化的に伝搬する。したがって、子孫の行動や認知面にも大きな影響をもつ学習プロセスといえる。しかしながら、このような社会学習に関する神経基盤について未解明な点が多い。我々は、ヒトと同様に音声コミュニケーションの能力を学習し子孫へ伝承するソングバードをモデル動物として、社会学習とその結果獲得される行動スキルに関する神経機構について解析を進めている。ソングバードの中には、ヒトの言語と同様に文法規則に従って多様に変化する音声の特徴とするジュウシマツのような種が存在する。文法情報を神経活動がどのようにコード

するか明らかにするために、発声中の個体より単一細胞の精度で神経活動計測を行い、前運動領域 HVC から基底核への投射ニューロンのバースト発火が音声の配列規則（音素タイプ、音素間の遷移、反復の開始・終止・回数）をコードすることを明らかにした。HVC は聴覚系皮質および前頭前野より入力をうけることから、HVC の上流を解析することで文法情報の生成プロセスが明らかになると期待出来る。また分子遺伝学的手法により遺伝子改変ソングバード個体作成に成功した。これにより社会学習の分子基盤の解明が期待出来る。遺伝子改変ソングバードから得られた最新の知見についても紹介する。

(9) サルの前頭葉-大脳基底核ネットワークに見出された 複数の記憶表現

星 英司（東京都医学総合研究所）

遺伝子、分子、シナプス、細胞、そして、回路といった様々なレベルでの記憶情報処理が最終的に行動発現につながる段階で、記憶情報はニューロン活動として表現される。我々は、認知行動課題を遂行しているサルの前頭葉-大脳基底核領域からニューロン活動を記録する手法を用いて脳機能解析を行ってきたが、その過程で、記憶表現に関する複数の特性を見出してきた。視覚情報の短期記憶における前頭前野の役割を調べる研究では、記憶された視覚図形と続いて提示された選択肢の情報を統合して行動を選択する課題をサルが行っている最中に、前頭前野よりニューロン活動を記録した。その結果、記憶に関連した活動は、記憶の最中よりもむしろ行動選択時に増強していることが明らかとなった。続いて、感覚

情報と行動情報の連合に基づく行動制御における前頭葉—大脳基底核連関の解析を行った。視覚図形との連合に基づいて行動方向を決定する課題を行っているサルにおいて、前頭葉とこの連合の長期記憶の座とされる大脳基底核からニューロン活動を記録した。その結果、大脳基底核は感覚情報に基づく行動の決定に主たる関与をする一方で、決定された情報は前頭葉で短期記憶として蓄えられ、その後の実際の動作発現につながる事が明らかとなった。こうした一連の結果は、前頭葉の記憶表現は記憶することが主たる目的ではなく行動制御を達成するためのゴール指向的であること、そして、その記憶表現を確立する過程は大脳基底核などの他の脳部位によってサポートされていることを示唆する。

14. 上皮膜輸送の多層的コントロールによる生体の恒常性維持機構

2013 年 8 月 26 日－8 月 27 日

代表・世話人：石黒 洋（名古屋大学総合保健体育科学センター）

所内対応者：鍋倉淳一（生体恒常機能発達機構研究部門）

- (1) ラット腸管粘膜上皮におけるニコチン酸誘発性経上皮アニオン分泌
唐木晋一郎（静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府）
- (2) 受容体型ナトリウムポンプと容積感受性アニオンチャネルの機能連関による癌細胞増殖制御メカニズム
藤井拓人（富山大学医学薬学研究部）
- (3) マウス大腸における NaCl 吸収
鈴木裕一（仙台白百合女子大学人間学部健康栄養学科）
- (4) 腎集合管間在細胞の役割：酸，Ca 分泌
安岡有紀子（北里大学医学部生理学）
- (5) Lipopolysaccharide 誘導性急性炎症下における腎ナトリウム依存性リン酸トランスポーターの発現制御
池田翔子（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）
- (6) LAT1 阻害は血管内皮細胞増殖を抑制する
末弘淳一（杏林大学医学部薬理学）
- (7) 腸内環境が脂肪酸のセンシングメカニズムに及ぼす影響
山本明子（名古屋大学総合保健体育科学センター）
- (8) 味覚神経経路の発生工学的トレーシングによる生体恒常性維持機構との連関の表出
杉田 誠（広島大学大学院医歯薬保健学研究院）
- (9) 食品ペプチドによる GLP-1 分泌を介した血糖上昇抑制
比良 徹（北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門）
- (10) インクレチンの膝・膝外作用と炎症
山田祐一郎（秋田大学大学院医学系研究科）
- (11) ARHGAP9 は SLC26STAS ドメインを介して CFTR クロライドチャネル活性を抑制する
洪 繁（慶應義塾大学医学部）
- (12) 高速原子間力顕微鏡を用いた CFTR チャネル 1 分子動態の直接観察
相馬義郎（慶應義塾大学医学部システム医学）
- (13) Cl⁻輸送と連結したマウス末梢気道線毛運動振幅の調節
田中早織（大阪医科大学生理学）
- (14) Na⁺/K⁺/2Cl⁻共輸送体の周期的な発現変化に伴った細胞内 Cl⁻濃度変化が細胞周期進行を制御する
宮崎裕明（京都府立医科大学大学院医学研究科）
- (15) リン制限による腎性貧血の進展予防と鉄トランスポーターSLC11A2(DMT1)の発現変動
中尾真理（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）
- (16) ENaC 細胞内動態の数値モデル構築による上皮 Na⁺輸送制御解析への定量的アプローチ
笹本浩平（京都府立医科大学大学院医学研究科）
- (17) 日本人型シスチン尿症を発症させるアミノ酸トランスポーター変異体の機能解析
永森収志（大阪大学大学院医学系研究科）

【参加者名】

石黒 洋 (名古屋大学総合保健体育科学センター, 大学院医学系研究科健康栄養医学), 早田洋樹 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学), 中張隆司 (大阪医科大学医学部生理学), 田中早織 (大阪薬科大学薬学部薬物治療学), 池内優紀子 (大阪薬科大学薬学部薬物治療学), 丸中良典 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学), 金井好克 (大阪大学医学系研究科生体システム薬理学), 角谷昌子 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学教室), 十河進仁 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学), 持丸由香 (名古屋大学大学院医学系研究科健康栄養医学研究室), 谷口いつか (名古屋大学大学院医学系研究科健康栄養医学研究室), 宮崎裕明 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学), 笹本浩平 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学), 洪 繁 (慶應義塾大学医学部システム医学講座), 横山紀子 (京都府立医科大学 大学院医学研究科細胞生理学), 比良徹 (北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門食品栄養学研究室), 孫 紅昕 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学), 河原克雅 (北里大学医学部生理学), 櫻井裕之 (杏林大学医学部薬理学教室), 野村 健 (京都府立医科大学細胞生理学丸中良典研究室), 山本明子 (名古屋大学医学部医学系研究科健康栄養医学), 中尾真理 (徳島大学 HBS 臨床栄養学分野), 池田翔子 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床栄養学分野), 木村 徹 (杏林大学医学部薬理学), 唐木晋一郎 (静岡県

立大学大学院薬食生命科学総合学府環境生理学研究室), 鈴木裕一 (仙台北百合女子大学人間学部健康栄養学科), 末弘淳一 (杏林大学医学部薬理学教室), 永森收志 (大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理), 藤井拓人 (富山大学医学薬学研究部薬物生理学), 酒井秀紀 (富山大学大学院医学薬学研究部薬物生理学), 相馬義郎 (慶應義塾大学医学部薬理学教室), 竹谷 豊 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床栄養学分野), 杉田誠 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院 基礎生命科学部門口腔生理学研究室), 山田祐一郎 (秋田大学大学院医学系研究科内分泌・代謝・老年内科学), 樽野陽幸 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学), 細木誠之 (京都府立医科大学 細胞生理), 山口 誠 (名古屋大学総合保健体育科学センター健康栄養医学研究室), 鈴木喜郎 (岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理部門), 桑原厚和 (静岡県立大学大学院環境生理学研究室), 桑原裕子 (愛知医科大学医学部生理学講座), 鍋倉淳一 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 稲田浩之 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 中畑義久 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 石川達也 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 宮本愛喜子 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 中村佳代 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 亀吉亮平 (生理学研究所生体恒常機能発達機構), 川本恭兵 (生理学研究所生体恒常機能発達機構)

【概要】

化管, 腎尿管, 気道などの上皮膜による物質輸送は, 体液調節, 消化液の分泌, 栄養素の吸収, 粘膜防御などを担っている。生体の恒常性が維持されるためには, 環境の変化に適応して, 上皮膜輸送の基質選択性や速度が適切に調節される必要がある。消化管に例にとると, 栄養素の感知, 分解, 吸収には, 腸管粘膜の上皮細胞, 内分泌細胞, 神経叢からなるネットワークの多層的コントロールが必要であり, バランスが崩れると様々な疾患が発症する原因となる。上皮膜輸送の研究は, 多くの難病やコモンディジーズの病態の解明および創薬につながり, 社会的貢献度が高い。

本研究会は, 平成25年8月26日～8月27日に開催し, 上皮膜の研究者に加え, システム医学, 基礎栄養学, 生物物理学, 分子動力学シミュレーションの専門家が集ま

り, 秋田大学大学院医学系研究科内分泌・代謝・老年内科学の山田祐一郎教授を招いた。16題の研究発表(発表15分, 討論10分)と山田教授のインクレチンに関する特別講演(1時間)が行われ, 各研究室の若手研究者, 大学院生を交えて, 活発な討論が行われた。一般講演では, 腸管粘膜におけるニコチン酸誘発性アニオン分泌, 受容体型 Na^+ ポンプと容積感受性アニオンチャネルの機能連関による癌細胞増殖制御, 大腸における NaCl 吸収機構, 腎 Ca^{2+} 分泌における集合管間在細胞の役割, 急性炎症下における腎リン酸トランスポーターの発現制御, 血管内皮細胞の増殖における LAT1 の役割, 腸内環境が脂肪酸の感知に及ぼす影響, 味覚神経経路のトレーシング, 食品ペプチドによる GLP-1 分泌, SLC26S7AS を介する ARHGAP9 の CFTR に対する作用, 原子間力顕微鏡

による CFTR の 1 分子動態の観察, Cl^- 輸送と末梢気道の線毛運動の関係, NKCC の周期的発現変化を伴う細胞周期進行の制御, リン制限による SLC11A2 の発現変動, ENaC 細胞内動態の数理モデル, 日本人型シスチン尿症

の原因となるアミノ酸トランスポーター変異体, について斬新な研究が紹介された。

今後, 本研究分野のさらなる発展, 若手研究者のますますの活躍, 共同研究の推進が期待できる。

(1) ラット腸管粘膜上皮におけるニコチン酸誘発性経上皮アニオン分泌

唐木晋一郎¹、桑原厚和¹

(¹ 静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府)

ニコチン酸は, ニコチン酸アミドとともにナイアシンあるいはビタミン B3 と呼ばれ, 生体内では主に肝臓でトリプトファンから生合成され, 消化管では腸内細菌によっても産生されることが知られている。ナイアシンは NADH や NADPH の構成成分であり, 欠乏すると皮膚炎, 下痢, 神経障害を症状とするペラグラを発症する。さらにニコチン酸はナイアシンとしての作用の他, ヒドロキシカルボン酸受容体 2 (HCA2) (GPR109A, NIACR1, PUMA-G or HM74a) を介して種々の生理作用を惹起することも報告されている。本研究では, Ussing chamber に装着したラット腸管粘膜-粘膜下組織標本を用い, ニコチン

ン酸が HCA2 受容体刺激を介する一過性の経上皮アニオン分泌を惹起することを発見した。また, この作用は TTX 非感受性であり, COX 抑制剤 piroxicam によって完全に消失した。さらに, HCA2 受容体は主に大腸の粘膜に発現していることが qRT-PCR 法によって示され, 免疫組織化学的手法により, 上皮に散在する細胞に局在していることが示された。大腸粘膜は腸内細菌の産生するニコチン酸を HCA2 受容体によって感受し, 一過性の腸液分泌を惹起することによって腸内フローラに影響を与え, 腸管粘膜と腸内フローラの恒常性維持に寄与している可能性が示唆された。

(2) 受容体型ナトリウムポンプと容積感受性アニオンチャネルの機能連関による癌細胞増殖制御メカニズム

藤井拓人¹、舩山佳佑¹、清水貴浩¹、酒井秀紀¹

(¹ 富山大学医学薬学研究部薬物生理学)

ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞において, ウアバインは, Na^+ , K^+ -ATPase のイオン輸送活性を阻害する濃度 ($\text{IC}_{50}=2 \mu\text{M}$) より低濃度で, ミトコンドリア活性 ($\text{IC}_{50}=51 \text{ nM}$) および細胞増殖能 ($\text{IC}_{50}=34 \text{ nM}$) を減少させることを見出した。ヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞および口腔癌由来 KB 細胞においても同様の結果が得られた。興味深いことに, この抑制効果は容積感受性外向き整流性アニオンチャネル (VSOR) の特異的阻害剤である DCPIB ($10 \mu\text{M}$) により阻害された。HT-29 細胞を用いたホールセルパッチクランプ実験において, ウアバインは, 等張条件で VSOR 依存性 Cl^- 電流を有意に増大させた ($\text{EC}_{50}=24 \text{ nM}$)。それに伴い, HT-29 細胞の細胞容積は時間依存的に減少

した。これらウアバインによる効果は, siRNA を用いた Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 1$ -isoform のノックダウン, および methyl- β -cyclodextrin (5 mM) 処理によるカベオラの破壊により抑制された。ウアバイン処理により細胞内の活性酸素種 (ROS) レベルは増加 ($\text{EC}_{50}=38 \text{ nM}$) し, ROS スカベンジャー EUK134 ($20 \mu\text{M}$) および N-acetyl-L-cysteine (NAC), NADPH oxidase 阻害剤 apocynin (2 mM) 処理により, ウアバインによる VSOR 活性化およびミトコンドリア活性の減少は阻害された。以上の結果より, カベオラに存在する非イオン輸送型 Na^+ , K^+ -ATPase は, シグナル伝達系の受容体として機能し, ROS の産生による VSOR 活性化を介して, ヒト癌細胞の増殖抑制に寄与す

ることが示唆された。

(3) マウス大腸における NaCl 吸収

鈴木裕一¹, 林 久由¹, 長井宏樹¹

(¹ 仙台白百合女子大学人間学部, 静岡県立大学食品栄養科学部)

ヒトでは小腸内に、一日あたり食物、消化液、腸液等
に由来する電解質液が 10L 前後流入する。この電解質液
は食物の消化吸収の効率を高める上で必要な役割を果た
した後、便中に排泄されることなく最終的に大部分再吸
収されている。この再吸収は、NaCl 吸収とそれ伴う水吸
収で担われている。

本研究では、マウス大腸における $^{22}\text{Na}^{36}\text{Cl}$ 吸収活性を、
in vitro の Ussing chamber 系で検討した。特に、大腸を盲
腸・近位結腸・中位結腸・遠位結腸の部位別に分け測定
し、各部位の NaCl 吸収活性とその内容物の NaCl およ
び水分濃度との関係を解析した。阻害剤を用いた測定結
果から、 ^{22}Na 吸収は、 Na^+/H^+ exchanger の NHE3, Cl^- 吸
収は $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger の Slc26a3 (DRA) が主要な役割
を果たしていることが示唆された。詳細に部位別の検討

を行うと、盲腸では NHE3 活性<DRA 活性であり、近位
結腸では NHE3 は活性があったが、DRA の活性は見られ
なかった。中位結腸では NHE3 と DRA はほぼ同程度見
られた。遠位結腸でも NHE3=DRA であったが中位結腸
に比べやや活性が低かった。腸管内容物の NaCl 濃度と
水分の濃度を大腸部位別に比較すると、中位結腸で内容
物の NaCl 濃度はより近位部と変わらないものの、水分
量が著明に低下していた。以上より、マウスでは中位結
腸が、等張性の NaCl 吸収およびそれに伴う水吸収によ
り腸管内からの NaCl と水分の回収に主要な役割を果た
していることが示唆された。大腸におけるその他の部位
の NaCl 吸収の生理的意義に関してはさらに検討が必要
であると考えられる。

(4) 腎集合管間在細胞の役割：酸，Ca 分泌

安岡有紀子¹, 佐藤雄一², 野々口博史³, 河原克雅¹

(¹ 北里大学医学部, ² 北里大学医療衛生学部,

³ 北里大学メディカルセンター)

背景：高 Ca 血症 (Hypercalcemia) 時の腎応答 (腎結
石防止) として、太い Henle の上行脚 (TAL) の Ca 再吸
収抑制 (尿中 Ca 排泄増加), 集合管主細胞 (PC) の水再
吸収抑制 (尿希釈化), α 間在細胞 (IC-A) の酸分泌亢進
(尿酸性化) が知られており、腎尿細管に発現する
Calcium-sensing receptor (CaSR) の細胞内シグナルが制御
していると考えられている (Riccardi D & Brown EM,
2010)。しかし、TAL 側底膜に発現している CaSR は、
集合管では IC-B (アルカリ分泌細胞) 側底膜にのみ発現
し (IHC 法), PC, IC-A には発現していなかった (Yasuoka
Y et al, 2011)。方法：C57BL/6J マウス (オス, 10 wk) に、
 CaCl_2 , CaP, CaCO_3 をそれぞれ経口負荷 (6-7 d) し、(a)

血液・尿データ, (b) 集合管 AE1 (IC-A), pendrin (IC-B),
CaSR (IC-B) mRNAs の発現量 (c) 集合管の細胞高を調
べた。膜輸送体・受容体 mRNA の発現量は、定量的 ISH
法 (TSA-ISH) により評価した。結果：1) CaCl_2 負荷：血
液・尿酸性化, PC・IC-B 細胞高不変, IC-A 肥大, AE-1
mRNA 増加, 2) CaP 負荷：血液・尿 pH 不変, PC 細胞
高不変, IC-A・B 肥大, AE-1, pendrin mRNAs 増加, 3)
 CaCO_3 負荷：血液 pH 不変・尿アルカリ化, PC・IC-A 細
胞高不変, IC-B 肥大, pendrin, CaSR mRNAs 増加。結論：
過量に経口摂取された Ca 塩による腎結石を防ぐため、
腎集合管間在細胞 (IC-A, IC-B) は、調節性に酸・アル
カリ分泌を亢進していることが明らかになった。

(5) Lipopolysaccharide 誘導性急性炎症下における 腎ナトリウム依存性リン酸トランスポーターの発現制御

池田翔子¹, 山本浩範¹, 竹谷 豊¹

瀬川博子², 宮本賢一², 武田英二¹

(¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床栄養学分野,

²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学分野)

電解質異常は、敗血症患者に多くみられる合併症の一つである。リン代謝異常も疾病の重症度に関与することが報告されているが、そのメカニズムの詳細は明らかでない。そこで本研究では、グラム陰性菌細胞壁の構成成分である Lipopolysaccharide (LPS) 誘導性敗血症モデル動物を用い、急性炎症下におけるリン代謝の変動とその分子メカニズムの解析を行った。

7-9 週齢の C57BL/6J 雄マウスに LPS (2-20mg/kg B.W.) を腹腔内投与した結果、3 時間後において血中リン濃度の上昇、尿中リン排泄率の上昇及びカルシウム排泄率の低下、リン利尿因子である副甲状腺ホルモン (PTH)、繊維芽細胞増殖因子 (FGF23) の上昇を観察した。次に腎でのリン再吸収を担う II 型ナトリウム依存性リン酸トラン

スポーター (Npt2/ SLC34) 発現を検討した結果、特に Npt2a 発現が LPS により著しく抑制されることが明らかになった。また、腫瘍壊死因子 TNF- α の投与においても、血中 PTH 濃度の上昇、Npt2a 発現の抑制が観察された。さらに、副甲状腺摘出 (PTX) ラットでは、LPS による尿中リン排泄率の上昇および Npt 2a 発現の抑制が消失した。

以上より、LPS 誘導性急性炎症下では、PTH を介した腎 Npt2a 発現の低下により、尿中リン排泄率の上昇が生じることが示唆された。今後さらに詳細な検討を行い、LPS による Npt 発現調節機構および、敗血症時の輸液・栄養管理におけるミネラル、特にリンの重要性について明らかにしたいと考えている。

(6) LAT1 阻害は血管内皮細胞増殖を抑制する

末弘淳一¹, 櫻井裕之¹

(¹杏林大学医学部薬理学教室)

種々の癌細胞に高発現する Na⁺非依存アミノ酸トランスポーター LAT1 は、アミノ酸取り込みを促進し細胞増殖に寄与することから、癌治療薬開発の有望な分子標的として考えられている。LAT1 選択的阻害薬として見出された化合物 JPH203 はアミノ酸取り込みを競合的に阻害し、ヒト結腸腺癌 HT-29 の細胞増殖抑制、ゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍効果を示すことが報告されている。LAT1 の発現は癌細胞のみならず、活性化リンパ球、脳毛細血管内皮細胞といった正常組織においても発現することが一部報告されているが、我々は今回、血管内皮増殖因子 VEGF で刺激した臍帯静脈内皮細胞 HUVEC において、LAT1、及びその機能的な複合体を形成する 4F2hc

が誘導されることを新たに見出した。細胞増殖への寄与を検討するため、JPH203 存在下で MTT アッセイによる計量的用量-反応関係を解析したところ、IC₅₀: 5-10 μ M にて増殖抑制が確認された。LAT1 を高発現する頭頸部扁平上皮癌モデルである Ca9-22, HEp-2 では IC₅₀: 100 μ M であることから、これらと比較し HUVEC は JPH203 に対する感受性が高いと言える。

以上の VEGF 刺激下での血管内皮細胞に対する JPH203 の作用は、抗血管新生治療薬としての可能性を示唆するものであり、同薬の in vivo 抗腫瘍効果に寄与する重要なメカニズムであると考えられる。

(7) 腸内環境が脂肪酸のセンシングメカニズムに及ぼす影響

山本明子¹, 中莖みゆき¹, 山口 誠¹, 近藤志保¹

持丸由香¹, 谷口いつか¹, 石黒 洋¹

(¹名古屋大学大学院医学系研究科健康栄養医学)

【目的】胆汁酸は、脂肪酸と混合ミセルを形成し、消化・吸収に役立つ。一方、GPR40は中鎖～長鎖脂肪酸の受容体で、膵β細胞や上部小腸の消化管内分泌細胞に発現し脂肪摂食によるCCK分泌を担う。我々は、GPR40の脂肪酸センシングに胆汁酸が及ぼす影響を解析した。

【方法】マウスのGPR40をPC12細胞に遺伝子導入した安定発現系(PC12-mGPR40細胞)を作成し、fura-2を用いて $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。C12脂肪酸(500μM)とコール酸(30μM)が $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響をコントロール(PC12-WT細胞)と比較した。【結果】C12単独投与では、PC12-mGPR40細胞、PC12-WT細胞ともに反復する

一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が見られた。C12とコール酸の同時投与では、PC12-mGPR40細胞では持続する Ca^{2+} oscillationが見られ、PC12-WT細胞では一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のみが見られた。 Ca^{2+} oscillationの発生中にH89を投与すると Ca^{2+} oscillationは消失し、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は残存した。PC12-mGPR40細胞に、C12とdibutyl cAMPを同時投与すると、 Ca^{2+} oscillationが見られた。

【結論】GPR40発現細胞において、C12と胆汁酸の同時投与は細胞内cAMPの上昇を介して Ca^{2+} oscillationを引き起こす。

(8) 味覚神経経路の発生工学的トレーシングによる 生体恒常性維持機構との連関の表出

杉田 誠¹, 山本州代¹, 廣野 力¹, 柴 芳樹¹

(¹広島大学大学院医歯薬保健学研究院・基礎生命科学部門・口腔生理学研究室)

本研究ではマウスにおいて苦味受容体を発現する味細胞に、経細胞性に移行するトレーサータンパク質(tWGA-DsRed)を選択的に発現させ、味細胞から移行したトレーサーにより標識されるニューロンを検出し、苦味情報を伝導し処理するニューロンの脳内局在を明らかにした。苦味受容味細胞で発現したtWGA-DsRedを受け取る延髄孤束核ニューロンは延髄孤束核の後方部に集積した。延髄孤束核領域の脳スライス標本中で、tWGA-DsRedにより標識されるニューロンの細胞機能をホールセルパッチクランプ法により解析すると、苦味情報を受け取る延髄孤束核ニューロンは、AMPA受容体を介し神経伝達物質グルタミン酸によるシナプス入力を受

け取り、cholecystokininはこのシナプス伝達を促進することが示唆された。延髄孤束核内でtWGA-DsRedにより標識されるニューロンのニューロン種・発現分子を免疫組織化学的に解析した結果、苦味情報を受け取るニューロンは、tyrosine hydroxylaseを発現するカテコールアミンニューロンおよびpro-opiomelanocortinニューロンであることが検出された。発生工学的トレーシングを用いて標識された苦味情報を伝導・処理するニューロンのニューロン種の同定と、そのニューロン機能のcholecystokininによる修飾様式の同定により、味覚情報処理システムと摂食行動の恒常性維持機構とは相互に影響しあい、調節されることが示唆された。

(9) 食品ペプチドによる GLP-1 分泌を介した血糖上昇抑制

比良 徹¹, 樋口謹行¹, 原 博¹

(¹ 北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門食品栄養学)

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は, Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) とともに, インスリン分泌を促進する消化管ホルモン, 即ちインクレチンとして知られ, GLP-1 アナログや DPP-IV 阻害剤がインクレチン関連薬として糖尿病治療に導入されている。GLP-1 の分泌は, 腸上皮に散在する消化管内分泌細胞 (L 細胞) において, グルコースや脂肪酸により促進されるが, 食品ペプチドによる GLP-1 分泌についてはよく知られていない。

我々は GLP-1 産生細胞株およびラット腸管において, トウモロコシの難消化性タンパク質 Zein の加水分解物 (ZeinH) が強く GLP-1 分泌を促進することを見いだし

た。麻酔下ラットの in situ 腸管結紮ループ試験により, ZeinH は回腸部では直接的に GLP-1 分泌を促進する一方で, 十二指腸では迷走神経を介して間接的に GLP-1 分泌を誘導することが示された。

覚醒ラットにおいても, ZeinH を回腸内に直接投与することで, GLP-1 分泌が亢進し, これによりインスリン分泌が促され, 腹腔内糖負荷時の血糖上昇が抑制された。さらにこのペプチドは, 経口投与でも血糖上昇を抑制しその作用は GLP-1 の分泌を介していた。以上により, 食品ペプチドの経口投与が GLP-1 分泌促進を介して血糖値を制御できることが示された。

(10) インクレチンの膵・膵外作用と炎症

山田祐一郎 (秋田大学大学院医学系研究科内分泌・代謝・老年内科学)

インクレチンとは, 食事に伴い血中レベルが上昇し膵β細胞のインスリン分泌を促進する消化管因子であり, 上部小腸などに存在する K 細胞からの GIP (gastric inhibitory polypeptide), 下部小腸などに存在する L 細胞からの GLP-1 (glucagon-like peptide-1) がその実体である。これらγペプチドホルモンは, 膵β細胞に発現する GIP 受容体や GLP-1 受容体に作用し細胞内 cAMP 濃度を上昇させることで, インスリン分泌の増幅経路を刺激する。

GIP 受容体や GLP-1 受容体は, 膵β細胞以外にも様々な組織・細胞で発現し, 多様な生理活性を有している。例えば, GIP 受容体は脂肪細胞や骨芽細胞に発現してお

り, それらの作用を包括すると GIP は食事に伴い生体内に吸収した栄養素を効果的に蓄えることが生理作用と捉えられる。一方, GLP-1 は中枢神経系や胃に作用し食欲や胃運動を抑制することで血糖コントロールを改善し, 血管や神経細胞に作用し糖尿病合併症の進展を抑制することができるが, その生理的な役割については未だ不明な点が多い。最近, 我々は肺や腎における GLP-1 作用を検討するなかで, GLP-1 が炎症に及ぼす作用を見出した。これらから, GLP-1 の生体防御における役割を考えてみたい。

(11) ARHGAP9 は SLC26STAS ドメインを介して CFTR クロライドチャネル活性を抑制する

洪 繁 (慶應義塾大学 医学部 システム医学)

【目的】我々はこれまで, 分泌上皮細胞の管腔膜に発

現する CFTR Cl⁻チャネルと SLC26 Cl⁻/HCO₃⁻輸送体ファ

ミリーが物理的に結合し、機能的に共役していることを報告してきた(EMBO J 2002)。特に SLC26 の細胞内ドメイン STAS が CFTR の R ドメインに結合し、STAS が CFTR の Cl⁻ 輸送活性を著明に活性化することを報告した(Nat Cell Biol 2004)。本研究では、STAS が CFTR を活性化する分子機構を明らかにするために、STAS に結合し機能調節する分子を同定することを目的とした。

【方法】ヒト膵がん細胞株 Capan-1 の可溶性分画と Glutathione-sepharose 4B beads に結合させた GST 融合ヒト SLC26-STAS ドメイン(aa.515-754)を反応させ、結合蛋白を精製した。結合蛋白は LC/MSMS で解析した。同定された ARHGAP9 蛋白の GTPase Activating protein domain(GAP)を用いて SLC26 輸送体及び CFTR に対する

影響を検討した。

【結果】ARHGAP9-GAP は、SLC26A6-STAS に結合した。GAP は SLC26A6 及び A3 の活性に影響を与えなかった。ARHGAP9 の標的である Rac1 は GAP に結合するが、SLC26A6 の活性に影響を与えなかった。GAP は CFTR 活性に影響を与えなかったが、STAS による CFTR の活性化をほぼ完全に抑制した。STAS は GTPase 活性を認めなかった。

【結論】ARHGAP9-GAP は、GAP 活性に非依存的に SLC26A6-STAS の機能を抑制することで、CFTR の活性化を抑制していると考えられた。SLC26 と CFTR の機能連関を抑制する新規分子として、ARHGAP9 蛋白が同定された。

(12) 高速原子間力顕微鏡を用いた CFTR チャネル 1 分子動態の直接観察

相馬義郎¹, 山下隼人¹

(¹ 慶應義塾大学医学部 薬理学教室)

Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) は、ABC 蛋白質スーパーファミリーに属している膜蛋白で、呼吸上皮や消化管上皮に発現して分泌吸収機能において重要な役割を果たしている。現在まで、その作動メカニズムの研究は、電気生理学・生化学的手法による機能データを、他の ABC 蛋白の結晶構造に基づいたホモロジーモデルを用いて解釈するという手法で行われてきた。しかしながら、このアプローチはある意味、単なる類推に過ぎないことを否めない。さらにチャネル以外の機能を持つ他の ABC 蛋白を研究対象にすること

はできなかった。

最近、我々のグループは、高速原子間力顕微鏡を用いて、精製単離された CFTR 分子の姿を 300ms/frame の動画として捉えることに成功した。CFTR 分子は、単粒子解析の結果と同じく二量体を形成しており、さらにその細胞内ドメインのゆらぎが観察された。この 1 分子動態の直接観察という新しい種類の情報から、今までの未解決問題に対する答えと共に、生体機能分子全体に共通した作動原理についての新たな知見が得られることを期待している。

(13) Cl⁻ 輸送と連結したマウス末梢気道線毛運動振幅の調節

田中早織^{1,2}, 池内優紀子^{1,2}, 松村人志², 中張隆司¹

(¹ 大阪医科大学 生理学, ² 大阪薬科大学 薬物治療学)

気道線毛運動は、肺の宿主防御機構である粘液線毛クリアランスを駆動するエンジンの役割を果たしている。Cl⁻ 分泌活性化は気道上皮線毛運動の細胞内 Cl⁻ 濃度 ([Cl⁻]_i) の減少を引き起こす。本研究では、気道上皮細胞における [Cl⁻]_i と気道線毛運動の関係について、

Carbocystein (CCys, 粘液溶解剤) を用い検討した。

CCys は、細胞容積を減少 ([Cl⁻]_i の減少) と CBA 増加を起こしたが、CBF 増加は僅かであった。CCys の効果は, bumetanide, DIDS 非感受性であり, Cl⁻ チャネル阻害剤 (NPPB, CFTR (inh) 172) により消失した。このこと

は, CCys が Cl^- チャンネルを活性化, Cl^- 分泌を増加させ, これに伴う $[\text{Cl}^-]_i$ 減少を介して線毛運動を活性化 (特に CBA 増加) させていることを示している。さらに, HCO_3^- 非存在下 Cl^- -free 溶液により線毛運動を活性化により, CCys の効果がほぼ再現でき, この効果は NPPB によって完全に消失した。

クラミドモナスの研究から, inner dynein は CBA を outer dynein は CBF を調節していることが示されている。本研究において CCys は, Cl^- チャンネルを活性化することで $[\text{Cl}^-]_i$ を減少させ, これが inner dynein を活性化し, CBA を増加させている可能性が示唆された。

(14) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体の周期的な発現変化に伴った細胞内 Cl^- 濃度変化が細胞周期進行を制御する

宮崎裕明^{1,2}, 丸中良典^{1,2}

(¹ 京都府立医科大学大学院 細胞生理学, ² 平安女学院大学 日本食育・健康研究所)

我々は, 胃癌由来細胞株 MKN28 細胞において細胞内 Cl^- の低下が G_1 期から S 期にかけての細胞周期進行を特異的に抑制することを明らかにした。すなわち, G_1 期から S 期への移行には細胞内 Cl^- 濃度を高く維持することが必要であると考えられる。細胞内 Cl^- 濃度は, Cl^- チャンネルや K^+/Cl^- 共輸送体 (KCC), $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC) などの Cl^- 輸送体の発現・活性レベルのバランスによって決定される。即ち, Cl^- チャンネルや Cl^- 輸送体の発現・活性が変化することにより細胞周期の進行・停止が制御されている可能性がある。そこで本研究では, 細胞周期進行に伴った Cl^- チャンネル (CLC-2, CLC-3) や

Cl^- 輸送体 (NKCC, KCC) の発現レベルと細胞内 Cl^- 濃度の変化について検討した。細胞周期を同調させた MKN28 細胞において NKCC のタンパクレベル発現が M 期に減少し G_1 期と S 期において増加していた。一方, KCC や CLC-2 および CLC-3 のタンパク発現レベルに関しては, 細胞周期に伴った優位な変化は認められなかった。また, 細胞内 Cl^- 濃度を測定したところ, M 期において最も減少し G_1 期から S 期にかけて増加した。以上のことから, NKCC の発現・活性変化が細胞内 Cl^- 濃度を決定し, 細胞周期の進行を制御している可能性が強く示唆された。

(15) リン制限による腎性貧血の進展予防と鉄トランスポーター SLC11A2(DMT1)の発現変動

中尾真理¹, 山本浩範¹, 中橋乙起¹, 池田翔子¹

阿部航太郎¹, 竹谷 豊¹, 武田英二¹

(¹ 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 臨床栄養学分野)

【背景, 目的】慢性腎臓病 (CKD : Chronic Kidney Disease) 患者における心血管疾患の発症及び進展予防には, 高リン血症の改善および予防が重要であり, 食事中リン摂取量の管理が重要とされている。しかしながら, CKD 患者にみられる腎性貧血に対するリン制限食摂取の効果については不明である。本研究では, 腎不全モデルラットを用い, リン制限が腎性貧血に及ぼす影響と腸管鉄トランスポーターの発現変動を解析した。

【方法】8 週齢 Wistar 系雄ラットにアデニンを負荷し CKD モデルラットを作成, 2 群に分け, CKD-CP 群にコントロール食 (Pi : 1.06%), CKD-LP 群にリン制限食 (Pi : 0.2%) を 7 日または 14 日間投与した。

【結果】血液生化学検査の結果, CKD ラットへのリン制限食の投与は, 高リン血症および低カルシウム血症, 高 PTH 血症を改善した。さらに, 貧血指標である赤血球数及びヘモグロビン値は, リン制限食により有意な上昇

が認められた。興味深いことに、血中エリスロポエチン濃度は、CKD-LP群でCKD-CP群に比して有意に増加した。また、DMT1タンパク発現は、リン制限食投与7日目で増加し、mRNA発現は、14日目で増加することが確認された。

【考察、結論】以上のことから、CKDモデルラットへのリン制限食の投与は、エリスロポエチンの濃度低下を防ぎ、腎性貧血の進展を予防すること、また、腸管鉄吸収に重要なDMT1発現にも影響を及ぼすことが明らかになった。

(16) ENaC 細胞内動態の数値モデル構築による 上皮 Na⁺輸送制御解析への定量的アプローチ

笹本浩平¹, 新里直美^{2,4}, 丸中良典^{2,3,4}

(¹京都府立医科大学 医学部 医学科,

²京都府立医科大学 大学院 医学研究科 細胞生理学,

³京都府立医科大学 大学院 医学研究科 バイオイオノミクス,

⁴平安女学院大学 日本食育・健康研究所)

ENaC (上皮型 Na⁺チャネル) は肺胞および腎集合管上皮細胞などに発現し、肺水腫からの回復や出生時の羊水のクリアランスなど、また腎集合管において、Na⁺ (再)吸収を介しての肺腔内液吸収および体液量制御などに重要な働きを担っている。ENaC を介する上皮細胞内への Na⁺流入量は経上皮細胞 Na⁺輸送量を規定しており、電気生理学的経上皮 Na⁺電流測定により検証し得る。この Na⁺流入量は主に肺胞上皮頂端膜上に存在する ENaC 数に依存し、ENaC の細胞内貯蔵部位から頂端膜および頂端膜から細胞内への移動速度制御により調節されていることより、ENaC による Na⁺吸収量制御機構を明らかにするためには、上皮細胞内 ENaC 動態制御機構を解明することが不可欠である。頂端膜から細胞内へ移動した ENaC が細胞内において品質チェックを受けた後、細胞内貯蔵部位へリサイクルするか、分解されるかにより、

Na⁺吸収に寄与する上皮頂端膜上 ENaC 発現量を規定しているという数値モデルを我々は構築した。この数値モデルには次の4ステップを含んでいる。

- 1) Insertion : 細胞内貯蔵部位から頂端膜への移動過程
- 2) Endocytosis : 頂端膜から細胞内への移動過程
- 3) Recycling : エンドサイトーシス後の細胞内貯蔵部位への移動過程
- 4) Degradation : エンドサイトーシス後に分解される過程

我々はこの数値モデルにおける数学的解析解を求めた。この数値モデルおよび種々の条件下での ENaC の電気生理学的測定結果を用いて、上皮細胞内 ENaC 動態制御に関与する機構解析を行なうことにより、各種条件下での細胞内 ENaC 動態を予測し、その機構解明をもたらす可能性が示されたので報告する。

(17) 日本人型シスチン尿症を発症させるアミノ酸トランスポーター変異体の機能解析

永森収志¹, 河本泰治^{1,2}, Pattama Wiriyaermkul¹, 金井好克¹

(¹大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理,

²大阪大学医学部 MD 研究者養成プログラム)

シスチン尿症は、シスチンを腎尿細管から再吸収するトランスポーターb⁰+AT の機能不全により多発性結石を形成し、重篤な腎機能障害に陥る常染色体劣性の疾患で

ある。日本人患者の約8割が共通の変異である P482L 変異を保持している。一般的にトランスポーターの C 末端領域は輸送機能に関与せず、むしろタンパク質の細胞膜

における発現に影響する。しかし、P482L 変異は C 末端変異にもかかわらず、培養細胞系において細胞膜での発現を変化させることなく $b^{0,+}AT$ の輸送機能を著しく低下させる。この P482L 変異が $b^{0,+}AT$ の機能消失を起こす原因を明らかにするため、P482L 変異体ノックイン (KI) マウスを作成したところ、KI マウスはシスチン尿症様症状を示した。次に、腎臓刷子縁膜小胞を調整し、ウェスタンブロット法および免疫染色法により野生型および P482L 変異体の発現量と局在を比較した。変異体は刷子

縁膜上に野生型とほぼ等量発現しており、免疫染色においても変異体は野生型と同様に頂端膜上に局在していた。次に ^{14}C -シスチンを用いて KI および野生型マウス刷子縁膜小胞の基質輸送活性と基質結合活性を測定した。変異体は輸送機能を失っていたが、野生型と同様の基質結合能を保持していた。P482L 変異は基質結合部位には影響を及ぼさないが、基質輸送に必要な構造変化を妨げていることが示唆される。

15. TRP チャネル研究を通じて見えてきた新たな生理学への光

2013年6月13日－6月14日

代表・世話人：柴崎貢志（群馬大学大学院 医学系研究科 分子細胞生物学分野）

所内対応者：富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門）

- (1) TRPC3 阻害薬 Pyr3 はマウス脳内出血モデルにおけるアストロサイト活性化および脳機能障害を改善する

白川久志¹, 宗像将也¹, 中川貴之¹, 金子周司¹

(¹ 京都大学 薬学研究科 生体機能解析学分野)

- (2) Ca^{2+} 依存性カルモジュリンキナーゼ II によるリン酸化を介した心血管 TRPC6 チャネル制御の分子基盤

井上隆司¹, 史 娟¹, 下司直美¹, 高橋真一¹, 清中茂樹²

市川 純¹, 胡 耀鵬¹, 森 泰生², 伊東祐之³

(¹ 福岡大学大学院医学研究科細胞分子制御学, ² 京都大学大学院工学研究科合成生物化学,

³ 九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学)

- (3) 軟骨細胞モデルにおける Ca^{2+} 透過チャネルの分子実体とその機能解析

鈴木良明¹, 伊奈山宗典¹, 船橋賢司¹, 栗田 卓¹, 山村寿男¹, 大矢 進¹, 今泉祐治¹

(¹ 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

- (4) 活動電位の伝導抑制効果を持つ植物成分によるラット脊髄膠様質の TRPA1 活性化

熊本栄一¹, 藤田亜美¹, 羅 清甜¹, 蔣 昌宇¹, 大坪瀬奈¹, 康 欽¹, 松下晋大¹

(¹ 佐賀大学 医学部 生体構造機能学講座)

- (5) 機械受容チャネル TRPV2 の制御機構

長澤雅裕¹, 小島 至¹ (¹ 群馬大学 生体調節研究所)

- (6) 末梢循環障害における TRPC6 チャネルの役割

富田(沼賀)拓郎¹, 角田将朗¹, 島内 司¹, 岩本隆宏², 喜多紗斗美², 西田基宏¹

(¹ 九州大学大学院 薬学研究院 創薬育薬産学官連携分野, ² 福岡大学医学部薬理学教室)

- (7) ニューロン-グリア機能連関における TRPV4 の重要性

柴崎貢志¹, 高山靖規², 稲村直子³, 池田一裕³, 富永真琴², 石崎泰樹¹

(¹ 群馬大学大学院医学系研究科分子細胞生物学,

² 岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門, ³ 生理学研究所分子神経生理部門)

- (8) 脈絡叢上皮細胞における TRPV4 と ANO1 の細胞外カルシウム依存的機能連関

高山靖規¹, 柴崎貢志², 鈴木喜郎¹, 山中章弘³, 富永真琴¹

(¹ 岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門,

² 群馬大学大学院医学系研究科分子細胞生物学, ³ 名古屋大学環境医学研究所 神経系分野 II)

- (9) TRPP3 チャネルにおける電位感受性機構の解明

沼田朋大¹, 山田和徳², 廣瀬伸一³, 森 泰生¹

(¹ 京都大学大学院工学研究科合成生物化学,

² 金沢大学大学院医学系研究科 臓器機能制御学 リウマチ・膠原病内科, ³ 福岡大学医学小児科)

- (10) TRPM4 阻害薬 9-phenanthrol はラット摘出心臓の虚血再灌流障害を抑制する

高橋 賢¹, 朴 虎林¹, 王 静¹, 成瀬恵治¹

(¹ 岡山大学 医歯薬学総合研究科)

- (11) 透過型電子顕微鏡を用いた三次元再構成法によって明らかにされた TRPC5 イオンチャネルの構造

マミテリ ナシルハジ¹, 三尾和弘¹, 小椋俊彦¹, 清中茂樹², 森 泰生², 佐藤主税¹

(¹産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門, ²京都大学大学院工学研究科合成生物化学)

(12) ラット腸管神経系, 脊髄後根神経節における TRPM2 チャンネルの局在に関する免疫組織化学的検討

松本健次郎¹, 渡辺智章¹, 五十幡陽¹, 高木加奈子¹, 田嶋公人¹, 堀江俊治¹

(¹城西国際大学 薬学部 薬理学)

(13) 侵害受容性 TRPA1 チャンネルを介した Cadmium による急性発痛作用

三浦冴子¹, 高橋賢次¹, 内田邦敏², 齋藤 茂², 富永真琴², 太田利男¹

(¹鳥取大学農学部・獣医薬理学, ²岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)

(14) TRPA1 の角膜アルカリ外傷に及ぼす影響

岡田由香¹, 白井久美¹, 宮嶋正康², ピーター・ライナック³, 雑賀司珠也¹

(¹和歌山県立医科大学 眼科, ²和歌山県立医科大学 動物施設,

³ニューヨーク州立大学 細胞生物学)

(15) TRPM5 の機能解析: 温度依存性と亜鉛による阻害作用

内田邦敏¹, 富永真琴¹ (¹岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)

(16) ヒト TRPV4 チャンネルアンキリンリピートドメインの構造生物学・生化学的解析

稲田 仁¹, Erik Procko², Marcos Sotomayor², Rachele Gaudet²

(¹東北大学大学院医学系研究科 発生発達神経科学分野, ²Dept of Mol Cell Biol, Harvard University)

(17) PI(4,5)P₂ の減少・枯渇による抑制作用は Receptor-operated TRPC6/7 電流の不活性化を加速する

齊 郷平¹, 森 誠之², 今井裕子¹, 岡村康司³, 森 泰生⁴, 井上隆司²

(¹九州大学大学院歯学府全身管理歯科, ²福岡大学医学部生理学,

³大阪大学医学部統合生理学, ⁴京都大学大学院工学研究科合成生物化学)

【参加者名】

宮津 基 (旭川医科大学), 大場貴喜 (秋田大学), 稲田 仁 (東北大学), 大和田智彦 (東京大学), 原 雄二 (東京女子医科大学), 松本健次郎 (城西国際大学), 伊藤智哉 (東京工業大学), 佐藤主税 (産業技術総合研究所), Nassirhadjy MEMTILY (産業技術総合研究所), 柴崎貢志 (群馬大学大学院), 小島 至 (群馬大学), 長澤雅裕 (群馬大学), 渡邊泰秀 (浜松医科大学), 田代美由紀 (浜松医科大学), 波多野紀行 (愛知学院大学), 鈴木裕可 (愛知学院大学), 犬飼洋子 (愛知医科大学), 伊藤 理 (名古屋大学), 今泉祐治 (名古屋市立大学), 山村寿男 (名古屋市立大学), 鈴木良明 (名古屋市立大学), 鬼頭宏彰 (名古屋市立大学), 大城隼也 (名古屋市立大学), 梅田俊太郎 (名古屋市立大学), 大羽輝弥 (名古屋市立大学), 松木克仁 (名古屋市立大学), 西村歌織 (名古屋市立大学), 栗田 卓 (名古屋市立大学), 林 恵介 (名古屋市立大学), 白川久志 (京都大学), 三宅崇仁 (京都大学), 崎元伸哉 (京都大学), 宮之原遵 (京都大学), 筒井真人 (京都大学), 森 泰生 (京都大学), 森 誠之 (京都大学), 沼田朋大 (京都大学), 平野 満 (京都大学), 木村 祐 (京

都大学), 香西大輔 (京都大学), 浜野 智 (京都大学), 小川 臨 (京都大学), 植田誉志史 (京都大学), 高橋 賢 (岡山大学), 雑賀司珠也 (和歌山県立医科大学), 岡田由香 (和歌山県立医科大学), 平山三智子 (和歌山県立医科大学), 太田利男 (鳥取大学), 鳩澤永子 (鳥取大学), 清水翔吾 (鳥取大学), 川端二功 (九州大学), 西田基宏 (九州大学), 富田拓郎 (九州大学), 外山喬士 (九州大学), 北島直幸 (九州大学), 武吉恭子 (九州大学), 島内司 (九州大学), キャロライン スンギップ (九州大学), 松尾友樹 (九州大学), 城戸瑞穂 (九州大学), 合島怜央奈 (九州大学), 木附智子 (九州大学), 井上隆司 (福岡大学), 熊本栄一 (佐賀大学), 小原一朗 (キリン株式会社), 小林淳一 (キッセイ薬品工業㈱), 渡邊修造 (ラクオリア創薬㈱), 佐藤 梓 (ラクオリア創薬㈱), 朴 熙万 (ラクオリア創薬㈱), 守口由紀子 (ラクオリア創薬㈱), 山田晃子 (ラクオリア創薬㈱), 山澤美緒 (ラクオリア創薬㈱), 高石雅之 (株式会社マングラム), 川田直樹 (小野薬品工業㈱), 高熊万之 (田辺三菱製薬㈱), 永田晃一 (田辺三菱製薬㈱), 高田美生 (旭化成ファーマ), 田端考統

(旭化成ファーマ), 加賀谷賢太 (田辺三菱製薬), 安武晃一 (日産化学工業株式会社), 富永真琴 (岡崎統合バイオ), 鈴木喜郎 (岡崎統合バイオ), 齋藤 茂 (岡崎統合バイオ), 内田邦敏 (岡崎統合バイオ), 加塩麻紀子 (岡崎統合バイオ), 周一鳴 (岡崎統合バイオ), 高山靖規

(岡崎統合バイオ), 橋高裕貴 (岡崎統合バイオ), Sun Wuping (岡崎統合バイオ), Rupali Gupta (岡崎統合バイオ), 新宅健司 (岡崎統合バイオ), 西本れい (岡崎統合バイオ), Erkin Kurganov (岡崎統合バイオ), 渡辺成樹 (岡崎統合バイオ), 寇 珍珍 (岡崎統合バイオ)

【概要】

H25年度のTRPチャンネル研究会(代表 群馬大学・柴崎(以下敬称略))には多様な分野の研究者が参集し、2日間にわたって最新の研究成果発表と活発な討論が行われた。17題の最新研究成果が発表された。

白川ら脳内出血の改善に及ぼすアストロサイトTRPC3阻害の影響を解析した。井上らは心疾患へのCaMKIIとTRPC6の関与を調べた。鈴木らは軟骨細胞におけるSTIMとOraiチャンネルの機能解析を行った。

熊本らは脊髄後角第II層(膠様質)におけるTRPA1チャンネルの解析をした。

長澤らはTRPV2の局在制御機構を調べた。富田らは末梢循環障害におけるTRPC6チャンネルの役割を解析した。

柴崎らはニューロン-グリア機能連関におけるTRPV4チャンネルの重要性を調べた。高山らは脈絡叢上皮細胞に

おけるTRPV4とANO1の機能連関と水輸送を解析した。

沼田らはTRPP3チャンネルの電位感受性機構を細胞内のアミノ酸配列に着目して解析した。高橋らはTRPM4阻害薬9-phenanthrolの心臓虚血再灌流障害への効果を検証した。

ナルハジらは透過型電子顕微鏡を用いてTRPC5チャンネルの構造を明らかにした。松本らはラット胃、小腸、大腸におけるTRPM2の発現を調べた。

三浦らはCadmiumによる急性疼痛にTRPA1チャンネルが関わることを明らかにした。岡田らはTRPA1の角膜アルカリ外傷に及ぼす影響を解析した。

内田らはTRPM5の温度感受性と亜鉛による阻害作用を調べた。稲田らはヒトTRPV4チャンネルの構造解析を行った。齊郷らはPI(4,5)P₂減少とReceptor-operated TRPC6/7電流の関連性を解析した。

(1) TRPC3阻害薬Pyr3はマウス脳内出血モデルにおけるアストロサイト活性化および脳機能障害を改善する

白川久志¹, 宗像将也¹, 中川貴之¹, 金子周司¹

(¹京都大学 薬学研究科 生体機能解析学分野)

脳内出血(intracerebral hemorrhage; ICH)は重篤な後遺症を呈することが多いため新たな薬物治療法の確立が強く求められている。近年、血管の破綻により漏出した血液由来因子が、ICHにおける病態増悪に関与することが示されつつある。当研究室でも以前TRPC3が、トロンビン誘発アストロサイト異常活性化を特異的に媒介することを報告した(Shirakawa et al., J Neurosci, 2010)。そこで本研究では、マウスを用いてコラゲナーゼ(0.025 U)注入モデル(collagenase induced ICH: cICH)および自家血(15 μ L)注入モデル(autologous blood induced ICH: bICH)を用いて、ICH後の脳機能障害に対するTRPC3選択的阻

害薬Pyr3の影響について検討した。その結果、両ICHモデルにおいてPyr3は血腫体積に影響を与えずに、ICH後の神経機能障害および運動機能障害を有意に抑制した。さらに、Pyr3はICH惹起6-24時間後から投与しても、有意な寛解作用を発揮した。免疫組織化学的手法により、ICH後の傷害周辺部のアストロサイト集積が、Pyr3投与により顕著に抑制された。以上の結果より、ICH後の脳機能障害に対してTRPC3阻害薬が寛解作用を有することおよびその作用機序としてグリア細胞の活性化抑制が重要であることが示された。

(2) Ca^{2+} 依存性カルモジュリンキナーゼ II によるリン酸化を介した 心血管 TRPC6 チャネル制御の分子基盤

井上隆司¹, 史 娟¹, 下司直美¹, 高橋真一¹, 清中茂樹²市川 純¹, 胡 耀鵬¹, 森 泰生², 伊東祐之³(¹福岡大学大学院医学研究科細胞分子制御学,²京都大学大学院工学研究科合成生物化学,³九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学)

Ca^{2+} 依存性カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) は種々の Ca^{2+} シグナル伝達を介した細胞機能調節に関わる重要なリン酸化酵素である。我々は以前の研究で, CaMKII が心血管機能や病態に密接に関わる TRPC6 チャネルの活性維持や活性化の促進において必須の役割を果たしていることを報告した。本研究では, このリン酸化制御の分子構造的基盤を明らかにするため, TRPC6 蛋白質のキメラ, 欠失体, 点変異体を用いた系統的な検討を行った。その結果, TRPC6 チャネル C 末端の IP₃/カルモジュリン共通結合領域の遠位側と膜貫通部第一細胞内ループの第 487 番目の Threonine 残基 (Thr⁴⁸⁷) の相互作用が, この

チャネルの活性維持や受容体による活性化に不可欠であることが判明した。更に, Thr⁴⁸⁷ の機能喪失型変異体 (T498A) を胎児大動脈平滑筋由来細胞 A7r5 に強制発現すると, アルギニン⁸-バゾプレッシンで誘発される TRPC6 様電流が著しく減少された。TRPC6 チャネルを介した過剰な Ca^{2+} 流入は, 高血圧, 原発性肺高血圧症, 急性低酸素性肺血管収縮, 心肥大, 心不整脈, 家族性分節性巣状硬化症等, 種々の病態に密接に関わっていると考えられている。本研究で得られた結果は, 今後これらの細胞内 Ca^{2+} 動態異常と関連した病態をより深く理解する上で, 新たな重要な手掛かりとなることが期待される。

(3) 軟骨細胞モデルにおける Ca^{2+} 透過チャネルの分子実体とその機能解析

鈴木良明¹, 伊奈山宗典¹, 船橋賢司¹, 栗田 卓¹, 山村寿男¹, 大矢 進¹, 今泉祐治¹(¹名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

炎症時に関節内のマスト細胞から分泌されたヒスタミン (His) は, 軟骨細胞を刺激して細胞内 Ca^{2+} シグナルを介した細胞増殖や基質合成を引き起こす。今回, この持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇において, ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) が機能すると仮定し, 軟骨細胞における Ca^{2+} 流入機構の分子メカニズムの解明を目指した。実験に用いた軟骨細胞モデル (ヒト軟骨肉腫由来細胞: OUMS27) において, Orai1, Orai2, STIM1 がタンパクレベルで発現していた。thapsigargin (TG) によって誘発した SOCE は, SKF-96365 や Gd^{3+} によって有意に抑制されたが, ruthenium red による影響を受けなかった。また,

2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) の効果の違いから, SOCE に Orai1 が主に関与していることが示唆された。Orai1 のドミナントネガティブ体あるいは siRNA の導入により, SOCE は顕著に抑制された。一方で Orai2 の siRNA により SOCE は増強された。全反射蛍光顕微鏡による一分子可視化から, TG あるいは His 投与により細胞膜近傍での STIM1 と Orai1 の共局在化が観察された。以上から, 軟骨細胞における His 誘発性 Ca^{2+} 流入機構の 1 つとして, Orai1 と STIM1 を介した SOCE が寄与することが明らかとなった。

(4) 活動電位の伝導抑制効果を持つ植物成分によるラット脊髄膠様質の TRPA1 活性化

熊本栄一¹, 藤田亜美¹, 羅 清甜¹, 蔣 昌宇¹, 大坪瀬奈¹, 康 欽¹, 松下晋大¹

(¹佐賀大学 医学部 生体構造機能学講座)

我々は今まで活動電位の伝導抑制作用を持つ化学物質が脊髄後角第 II 層 (膠様質) における TRPA1 を活性化して神経終末からのグルタミン酸の自発放出を促進することを報告してきた。今回、この点をさらに検討するために、膠様質で TRPA1 作動薬として働くワサビ成分アリルイソチオシアネート (AITC) やシナモン成分シナムアルデヒド (CA) に伝導抑制作用があるかどうかを調べた。一方、伝導抑制作用を持つオレガノ成分カルバクロールやキャラウェイ成分カルボンが膠様質の TRPA1 を活性化するかどうか検討した。さらに、ジンゲロンによる TRPA1 の活性化作用を詳しく調べた。実験は、蛙坐骨神経に air-gap 法, ラット脊髄横断薄片の膠様質

ニューロンへホールセル・パッチクランプ法を適用して行った。その結果、以下のことが明らかになった。(1) AITC と CA は複合活動電位を抑制した。(2) カルバクロールやカルボンは TRPA1 を活性化して自発性興奮性シナプス後電流 (EPSC) の発生頻度を増加させた。(3) ジンゲロンは AITC と同様、電位作動性 Na⁺チャネル阻害薬テトロドトキシン感受性に GABA 作動性自発性抑制性シナプス伝達を促進した。また、CA と同様、後根刺激誘起単シナプス性 EPSC を抑制した。以上より、伝導抑制作用を持つ植物成分の多くは膠様質の TRPA1 を活性化することが示された。

(5) 機械受容チャネル TRPV2 の制御機構

長澤雅裕¹, 小島 至¹ (¹群馬大学 生体調節研究所)

TRPV2 チャネルは、温度刺激、伸展刺激によりチャネルが開いてカルシウムの流入が生じると報告されてきた。一方、我々は線維芽細胞、膵β細胞、マクロファージ、がん細胞などにおいて、増殖因子・血清・fMLP、機械刺激により TRPV2 チャネルが細胞膜に移行し、それに伴い持続的な細胞内カルシウム濃度の上昇を生じることを報告してきた。我々は TRPV2 チャネルの制御機構では、チャネルの開閉制御だけでなく、チャネル分子のトランスロケーションが重要であると考えている。機械受容チャネルの阻害剤としてガドリニウムがよく知られ

ているが、その薬理作用は十分に明らかにされていない。そこで今回、がん細胞をモデル細胞として用い、機械刺激により惹起される TRPV2 チャネルのトランスロケーションに対するガドリニウムの作用を検討した。その結果、ガドリニウムは機械刺激により惹起される TRPV2 チャネルの細胞膜へのトランスロケーションを抑制することが明らかになった。さらにこの系を用いて、他の TRPV チャネルの動態とガドリニウムの効果についても検討を行った。

(6) 末梢循環障害における TRPC6 チャネルの役割

富田(沼賀)拓郎¹, 角田将朗¹, 島内 司¹, 岩本隆宏², 喜多紗斗美², 西田基宏¹

(¹九州大学大学院 薬学研究院 創薬育薬産学官連携分野, ²福岡大学医学部薬理学教室)

糖尿病や閉塞性動脈硬化症において観察される末梢循環障害は、間歇性跛行 (運動時の痛み) を大きな症状と

し、脳梗塞・虚血性心不全と併存する予後不良の疾患である。末梢循環障害はマウスの下肢虚血をモデルとして

研究が進められている。マウスの大腿動脈の結紮および除去により下肢における血流を消失させると、残存した近傍の血管から血管新生および血管成熟が誘発され、下肢の血流量は時間と共に回復する。これまでに下肢虚血後の血流回復に重要となる様々な分子がノックアウトマウスの解析等により同定されてきたが、未だ血流回復の全体を網羅する分子メカニズムは明らかにされていない。我々は、末梢循環障害改善薬であるシロスタゾールが血管平滑筋に多く発現するジアシルグリセロール活性化型 TRPC6 チャンネルをリン酸化依存的に抑制することを明

らかにした。そこで血管平滑筋細胞特異的に TRPC6 を過剰発現させたマウスに下肢虚血を施した結果、TRPC6 が血流回復機構における血管成熟を負に制御することがわかった。さらに、下肢虚血後の末梢血管における TRPC6 は一過的にリン酸化されており、その後時間経過に伴ってリン酸化レベルは低下した。シロスタゾールは TRPC6 リン酸化レベルの増加と相関して血管成熟を促進させた。以上の結果は、末梢血管における TRPC6 のリン酸化状態が下肢虚血後の血流回復度を決定することを強く示唆している。

(7) ニューロン-グリア機能連関における TRPV4 の重要性

柴崎貢志¹, 高山靖規², 稲村直子³, 池田一裕³, 富永真琴², 石崎泰樹¹

(¹群馬大学大学院医学系研究科分子細胞生物学,

²岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門,

³生理学研究所分子神経生理部門)

我々は、TRPV4 がニューロンの他、アストロサイトに発現するが、TRPV4 はアストロサイトのごく一部の垂集団のみに限局して発現することを見いだしている。また、その垂集団アストロサイトが TRPV4 活性化に伴い、ATP とグルタミン酸をグリオトランスミッターとして放出し、ニューロン興奮性を調節することを明らかにしている。つまり、脳内環境の変化に依存して、ニューロンのみならず、アストロサイトもその興奮状態を変化させ、

且つ、グリオトランスミッターという伝達物質放出を介して、ニューロン機能の調節を行っていることが明らかになった。これまでの我々の解析結果より、TRPV4 陽性アストロサイトが放出するグリオトランスミッターは ATP とグルタミン酸のみではないことが示唆されている。そこで、TRPV4 陽性アストロサイトが放出する新規グリオトランスミッターの同定を試みている。

(8) 脈絡叢上皮細胞における TRPV4 と ANO1 の細胞外カルシウム依存的機能連関

高山靖規¹, 柴崎貢志², 鈴木喜郎¹, 山中章弘³, 富永真琴¹

(¹岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門,

²群馬大学大学院医学系研究科分子細胞生物学,

³名古屋大学環境医学研究所 神経系分野 II)

TRPV4 は低浸透圧刺激や細胞の伸展、温熱刺激や GSK1016790A (GSK) などによって活性化される非選択的カチオンチャンネルであり、脳室内において脳脊髄液分泌を担う脈絡叢に高発現することがよく知られている。しかし、TRPV4 の生理的役割は未だに不明瞭である。本研究において、我々は脈絡叢上皮細胞 (CPEC) におけ

るカルシウム活性化クロライドチャンネルの機能的発現を初めて観察し、その分子実体がアノクタミン (ANO) であることを明らかにした。脈絡叢では ANO1, ANO4, ANO6, ANO10 の発現が示唆された。これらの内、ANO1 は最もカルシウム感受性の高いチャンネルである。そこで、HEK293T 細胞を用いて GSK 誘発性クロライド電流を測

定した結果, TRPV4 と ANO1 を共発現する細胞では細胞外カルシウム依存的に電流が著しく増大した。しかしながら, このような機能連関は ANO4, ANO6, ANO10 との共発現では有意でなかった。また, 単離した CPEC において GSK 誘発性クロライド電流を測定した結果, ANO1/ANO2 阻害剤によって抑制されるクロライド電流

が観察された。脈絡叢において ANO2 発現は示唆されなかったため, TRPV4-ANO1 連関は CPEC においても機能的であることが示された。これらの結果から TRPV4-ANO1 連関は脳脊髄液分泌に影響すると考えられる。

(9) TRPP3 チャンネルにおける電位感受性機構の解明

沼田朋大¹, 山田和徳², 廣瀬伸一³, 森 泰生¹

(¹ 京都大学大学院工学研究科合成生物化学,

² 金沢大学大学院医学系研究科 臓器機能制御学 リウマチ・膠原病内科,

³ 福岡大学医学小児科)

TRPP3 は腎臓, 心臓に豊富に発現するカルシウム透過型, 非選択的陽イオンチャンネルであり, 舌の酸感受および中心管へ投射する神経の酸誘導性の活動電位の増加にかかわることが知られている。現在まで, TRPP3 の電位依存性及び酸感受性に関する報告はあるがその分子機構については, 未だ知られていない。本研究では, パッチクランプ法を用い TRPP3 を発現させた HEK293T 細胞で脱分極刺激を与えた結果, 電位依存性チャンネルに特徴的な時間依存的なゆっくりとした外向き電流とそれに引き続く tail 電流が観察された。そこで, 電位感受性に重要と考えられる電位センサーの第 4 番目の膜貫通領域 (S4

= Segment4) 内の陽電荷アミノ酸を中性化する点変異を導入し, 機能評価を行った。その結果, gating charge と活性化曲線の変化が得られたため, 電位センサーにおける陽電荷アミノ酸が電位感受性に重要であることが分かった。また, S4 内の変異体は酸活性化電流を大きく抑制した。さらにヒト腎組織における TRPP3 の発現を免疫染色により検討した結果, 遠位尿細管, 近位尿細管および集合管に局在していることが分かった。これらの結果より, 腎臓におけるカルシウムおよびナトリウムの再吸収や興奮性細胞における膜の脱分極により, TRPP3 が機能している可能性が示唆された。

(10) TRPM4 阻害薬 9-phenanthrol はラット摘出心臓の虚血再灌流障害を抑制する

高橋 賢¹, 朴 虎林¹, 王 静¹, 成瀬恵治¹

(¹ 岡山大学 医歯薬学総合研究科)

TRPM4 受容体の特異的阻害薬である 9-phenanthrol (9-Phe) を前投与したところ, 左冠動脈前下行枝を 30 分間結紮してその後再灌流したラットの生存率が向上した。次に心収縮能と組織障害を詳細に調べるため, ラット摘出心臓の全虚血・再灌流実験を行った。その結果, 9-Phe 投与群において左室内圧により測定した心収縮能に有意な改善が認められた。心外膜から記録した ECG において, 9-Phe の前投与による心室細動・頻脈などの不整脈の抑制が見られた。さらに 9-Phe の前投与は組織障害マ

ーカーおよび梗塞巣を有意に減少させた。驚くべきことに, 5-HD (5-hydroxydecanoate, ミトコンドリア K_{ATP} チャンネル阻害薬) の同時投与により 9-Phe による収縮能回復と組織障害の抑制効果は消失した。TRPM4 の抑制は虚血再灌流障害から心臓を保護する。この効果は古典的プリコネディショニングに必要なミトコンドリア K_{ATP} チャンネルを介さない。TRPM4 は虚血再灌流障害の治療の有効なターゲットとなり得る。

(11) 透過型電子顕微鏡を用いた三次元再構成法によって明らかにされた TRPC5 イオンチャネルの構造

マミテリ ナシルハジ¹, 三尾和弘¹, 小椋俊彦¹, 清中茂樹², 森 泰生², 佐藤主税¹

(¹産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門,

²京都大学大学院工学研究科合成生物化学)

TRPC5 は、神経型の陽イオン透過性チャネルである。また、成長円錐の誘導および脳内の神経回路網の形成等に重要な役割を果たすことが知られている。また、TRPC5 は酸化ストレスを感知することが知られている。その三次元構造を解明するために、FLAG タグを付けた TRPC5 を培養 HEK293 細胞で多量に発現させた。このチャネルが正常な機能を有することを、蛍光色素による細胞内カルシウム濃度変化と電気生理学的測定の二通りの方法により確かめた。次いで、可溶化した TRPC5 を

精製したところ、銀染色およびウェスタンブロットで約 112kDa のバンドが検出された。本精製タンパク質を、SDS-PAGE 後の Native-PAGE および架橋実験で分析した結果より、TRPC5 は四量体であると推定された。精製タンパク質を負染色し、透過型電子顕微鏡を用いて観察し単粒子解析したところ、分解能 20Å で構造が得られた。TRPC5 はベル形粒子で、高さは 230Å、幅は 130Å であった。他の TRP チャネルとその構造を比較した。

(12) ラット腸管神経系、脊髄後根神経節における TRPM2 チャネルの局在に関する 免疫組織化学的検討

松本健次郎¹, 渡辺智章¹, 五十幡陽¹, 高木加奈子¹, 田嶋公人¹, 堀江俊治¹

(¹城西国際大学 薬学部 薬理学)

TRP チャネルは皮膚だけでなく、腸管の神経系にも多く発現し様々な消化管機能に関与していることが明らかになっている。TRPM2 は、カルシウムイオン透過性のカチオンチャネルであり、腸管の免疫系細胞における発現と炎症性腸疾患への関与が示唆されている。しかしながら消化管神経系における TRPM2 の発現と機能について明らかにされていない。そこでラット消化管における TRPM2 の局在と炎症性腸疾患モデルにおける内臓痛への関与について検討を行った。

ラット胃、小腸、大腸において TRPM2 発現神経の局在を免疫組織化学的に検討したところ、粘膜、粘膜下層、筋層の神経上に TRPM2 の免疫反応性が観察された。一

方食道では検出されなかった。TRPM2 は筋間神経叢と脊髄後根神経節の細胞体に局在していた。2 重染色による検討を行ったところ、筋間神経叢の細胞体において内在性知覚神経のマーカーである NeuN や substance P、軸索において CGRP との共局在が観察された。脊髄後根神経節において、大径、小径のニューロン上の TRPM2 は A 線維のマーカー NF200 と共存した。C 線維のマーカーである IB4、substance P や CGRP との共存が観察された。炎症性腸疾患モデルラットにおいて TRPM2 遮断作用が報告されているエコナゾールを前処置したところ、病態モデルで惹起された内臓痛覚過敏性は正常動物レベルまで回復した。

(13) 侵害受容性 TRPA1 チャネルを介した Cadmium による急性発痛作用

三浦冴子¹, 高橋賢次¹, 内田邦敏², 齋藤 茂², 富永真琴², 太田利男¹

(¹鳥取大学農学部・獣医薬理学,

²岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)

環境汚染物質である Cadmium (Cd) は、急性暴露により気道や消化管に疼痛や炎症を惹起する。しかし、その分子基盤は現在まで明らかにされていない。近年、TRPA1 が亜鉛 (Zn) により活性化されることが報告された。そこで、本研究では Zn と同じ第 12 族元素である Cd によるマウス知覚神経及び異所性発現細胞に対する作用について検討した。

Cd はマウス背根神経節ニューロン (DRG) において、fura-2 レシオ (F₃₄₀/F₃₈₀) を増加させた。この反応は細胞外 Ca 除去及び TRPA1 阻害薬により抑制された。野生型マウスにおいて、Cd 感受性 DRG は TRPA1 作動薬にも感受性を示したが、TRPA1 遺伝子欠損マウス (TRPA1^{-/-})

では生じなかった。Cd 蛍光指示薬を導入した野生型 DRG では、Cd 適用により細胞内への Cd 流入が生じた。ヒト TRPA1 発現 HEK293 細胞において、Zn 感知部位の変異体は Zn に加えて、Cd に対する感受性も低下していた。Cd のマウス足底内投与により疼痛行動が誘発され、この行動は TRPA1^{-/-}マウスでは減弱していた。

以上の成績より、Cd は知覚神経に対して TRPA1 活性化を介した興奮作用を有すること、更に Cd による TRPA1 活性化機構は Zn と類似していることが示唆された。Cd の急性暴露による疼痛を伴った病態には、侵害受容性チャネルである TRPA1 の活性化が関与している可能性が示された。

(14) TRPA1 の角膜アルカリ外傷に及ぼす影響

岡田由香¹, 白井久美¹, 宮嶋正康², ピーター・ライナック³, 雑賀司珠也¹

(¹和歌山県立医科大学 眼科, ²和歌山県立医科大学 動物施設,

³ニューヨーク州立大学 細胞生物学)

【目的】角膜は眼表面の組織で、その透明性と形状の維持は良好な視力の維持に必須であり、眼表面に位置する事から外傷を受けやすい。特にアルカリ外傷は重篤な角膜混濁、視力障害をきたし難治性である。TRPA1 が角膜アルカリ外傷に及ぼす影響を検討した。【方法】1) TRPA1^{-/-} (KO) 及び^{+/+} (WT) に 1N NaOH でアルカリ外傷を作製後の角膜混濁や炎症反応を免疫染色法や real time RT-PCR 法で検討した。2) その反応が角膜組織細胞に由来するのか骨髄由来の細胞によるものかを検討するため、骨髄移植をしたマウスを用いて 1) と同様の検討を行った。3) WT に同様の外傷作製後 TRPA1 レセプター

の antagonist である HC-030031 を腹腔投与し検討した。

【結果】1) WT に比べ KO はアルカリ外傷後の角膜混濁、炎症反応は軽度であった。2) KO マウスに WT 骨髄を移植した群は WT マウスに KO 骨髄を移植した群に比べの角膜混濁、炎症反応は軽度であった。3) HC-030031 投与でアルカリ外傷後の角膜混濁、炎症反応を抑制できた。【結論】TRPA1 を抑制することでアルカリ外傷後の炎症反応、角膜の瘢痕や混濁を抑制することができた。この反応は骨髄由来の細胞ではなく、角膜組織細胞が関与していた。TRPA1 を制御することで、角膜創傷治癒をコントロールできる可能性が示唆された。

(15) TRPM5 の機能解析：温度依存性と亜鉛による阻害作用

内田邦敏¹, 富永真琴¹ (¹ 岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門)

TRPM5 は Ca^{2+} 依存性陽イオンチャネルであり、1 価の陽イオンの透過性が高く Ca^{2+} 非透過性のチャネルである。その発現部位は味細胞、膵臓、脳幹等に局限しており、細胞内 Ca^{2+} によって活性化され膜の脱分極を引き起こすことで細胞の興奮性を調節していると考えられている。TRPM5 は Ca^{2+} 以外にも PIP_2 によって活性が調節されることが報告されているが、活性化剤および阻害剤に関する報告はとても少ないのが現状である。2005 年、15-31°C の温度範囲において温度上昇にともなって TRPM5 の活性化が増強することが報告された (Talavera

et al. Nature. 2005)。しかし、それ以降、細胞内 Ca^{2+} 濃度との関係など TRPM5 の温度依存性に関する詳細な解析はなされていない。そこで、我々は TRPM5 を HEK293 細胞に強制発現させ、パッチクランプ法を適用して TRPM5 の温度依存性の解析を行ったのでその解析結果を紹介する。

また、TRPM5 の内在性の活性調節物質の 1 つとして細胞外 Zn^{2+} が生理的濃度の範囲で TRPM5 活性を阻害することを見いだしたので、その結果についても報告する。

(16) ヒト TRPV4 チャネルアンキリンリピートドメインの構造生物学・生化学的解析

稲田 仁¹, Erik Procko², Marcos Sotomayor², Rachelle Gaudet²(¹ 東北大学大学院医学系研究科 発生発達神経科学分野,² Dept of Mol Cell Biol, Harvard University)

TRPV4 は、浸透圧受容や機械的刺激受容、骨の恒常性などの生理機能に重要な役割を果たしている Ca^{2+} 透過性陽イオンチャネルである。近年、TRPV4 の変異がヒトにおける神経疾患や骨形成異常などの遺伝疾患を引き起こすことが報告された。変異 TRPV4 チャネルでは活性が恒常的に上昇していることから、過剰な Ca^{2+} 流入により神経や骨の異常が引き起こされていると考えられる。TRPV4 活性は、N 末の細胞内アンキリンリピートドメイン (ARD) に ATP や CaM が結合することで制御される。我々は、ヒト TRPV4-ARD の ATP 結合型と非結合型の構造を X 線結晶解析によって決定した。TRPV4-ARD の構造は、6 つのアンキリンリピートとモチーフとそれらをつ

なぐ 5 つのループからなる。ATP 結合型と非結合型の構造比較より、3 番目のループに大きな変化が観察され、活性制御領域であることが示唆された。また、CD スペクトル法、システイン修飾法、MD シミュレーション法による解析より、ATP 存在下でタンパク質の安定性が増加することが明らかにされた。さらに、TRPV4-ARD にヒトの遺伝疾患で報告された変異を導入し、熱安定性と ATP 結合能を解析した結果、ほとんどの変異体では熱安定性が低下しており、いくつかの変異体では ATP 結合能が変化していることが明らかになった。これらより、一部の変異体の表現形を説明できることが示唆された。

(17) PI(4,5)P₂ 減少・枯渇による優性的抑制作用は Receptor-operated TRPC6/7 電流の不活性化を加速する。

齊 郷平¹, 森 誠之², 今井裕子¹, 岡村康司³, 森 泰生⁴, 井上隆司²

(¹九州大学大学院歯学府全身管理歯科, ²福岡大学医学部生理学,

³大阪大学医学部統合生理学, ⁴京都大学大学院工学研究科合成生物化学)

近年の研究から, 様々なイオンチャネルやトランスポーターにおいて, リン脂質の一種である, PI(4, 5)P₂ による modulation・regulation 作用が明らかとなってきた。TRP チャネルスーパーファミリーにおいても, PI(4, 5)P₂ の重要性が知られつつある。この中で我々は昨年, TRPC チャネル群に属する, DAG 感作型 (活性型) TRPC3/6/7 チャネルが, PI(4, 5)P₂ の減少・枯渇によって, DAG 存在下においても優性的に抑制されることを明らかにした。しかし, 生理的受容体による継時的な PI(4, 5)P₂ の変化と, イオンチャネル活性の関係性については, TRPC のみならず, 他のイオンチャネルも同様に, 殆ど不明であ

る。本研究では, 受容体刺激後の TRPC6/7 電流(Receptor-operated TRPC currents)と, PI(4, 5)P₂ もしくは DAG の動的特性 (キネティクス) の比較, 検討を行った。その結果 PI(4, 5)P₂ の減衰 kinetics と, TRPC6/7 電流の活性化, 不活性化 kinetics の間に, 直線的比例関係を見出した。更に PI(4, 5)P₂-PLC-DAG 代謝と連動した, TRPC チャネル開閉モデルを作成した。実験的データと, このモデルから得られた結果を総合的に判断すると, PI(4, 5)P₂ 減少による優性的な抑制機構は, Receptor-operated TRPC6/7 電流の不活性化 kinetics を加速させると考えられた。

16. 温熱生理研究会

2013年9月5日－9月6日

代表・世話人：中村和弘（京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット）

所内対応者：富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理）

- (1) 侵害性の温度・化学物質受容体 TRPA1 チャンネルの機能的な種間多様性とその分子基盤

齋藤 茂^{1,3}, 鳩澤永子², 福田直美¹, 太田利男², 富永真琴^{1,3}(¹岡崎統合バイオ(生理研)・バイオセンシング, ²鳥取大・農, ³総研大・生理)

- (2) Properties of heat and chemical sensitivity of green anole lizard TRPA1

Erkin Kurganov^{1,2,3}, Yiming Zhou^{1,3}, Shigeru Saito^{1,3}, Makoto Tominaga^{1,2,3}(¹Division of Cell Signaling, NIPS, ²The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI,³Okazaki Institute for Integrative Bioscience)

- (3) Warm 刺激, Cool 刺激は侵害刺激か, 非侵害刺激か?

－In Vivo パッチクランプ法による温度感受性 DRG ニューロンの分類と解析－

八木淳一¹, 小林 靖², 大木 紫¹, 平井直樹¹(¹杏林大学医学部統合生理学, ²防衛医科大学校解剖学)

- (4) Thermo- and hygro- sensitivity in heat wave

Hong Luo (Global Science and Culture Publishing)

- (5) 視床下部背内側部から吻側延髄縫線核への興奮性の直接入力社会的敗北ストレスによる褐色脂肪熱産生を惹起する

片岡直也, 中村和弘（京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット）

- (6) 慢性疲労症候群患者にみられた著明なストレス性高体温反応の機序について

岡 孝和, 須藤信行（九州大学大学院医学研究院心身医学）

- (7) ヒト褐色脂肪の活性化・増量によるエネルギー消費亢進と体脂肪減少

斉藤昌之¹, 米代武司² (¹天使大学大学院看護栄養学研究科, ²北海道大学大学院医学研究科)

- (8) 寒冷誘導熱産生の季節変動：褐色脂肪組織の寄与

米代武司¹, 松下真美², 岩永敏彦¹, 斉藤昌之²(¹北海道大学大学院医学研究科, ²天使大学大学院看護栄養学研究科)

- (9) Timing difference between subjective and physical temperature peaks in warm and cold senses

Hsin-Ni Ho¹, Katsunari Sato^{2,3}, Scinob Kuroki¹, Junji Watanabe¹, Takashi Maeno³, Shin'ya Nishida¹(¹NTT Communication Science Laboratories, ²Nara Women's University, ³Keio University)

- (10) 頭頸部冷却が深部体温に及ぼす影響

松田真由美¹, 和田哲志¹, 丸井朱里¹, 佐藤暢夫^{1,2}, 永島 計¹(¹早稲田大学人間科学学術院体温・体液研究室, ²東京女子医科大学大学院医学研究科麻酔科学分野)

- (11) 身体局所加温に対する生理, 心理反応の個人内・間変動要因

山口秀明¹, 高橋 涼², 奥山祐輝², 前田享史²(¹株式会社アイシン・コスモス研究所, ²北海道大学大学院工学研究院)

- (12) 皮膚温冷感覚の知覚学習

Hiroaki Mano^{1,2}, Wako Yoshida², Suyi Zhang¹, Ben Seymour^{1,2,3}(¹独立行政法人 情報通信研究機構 脳情報通信融合研究センター 脳情報通信融合研究室,²株式会社国際電気通信基礎技術研究所 認知機構研究所 行動変容研究室,

³Computational and Biological Learning Laboratory, Department of Engineering, University of Cambridge)

(13) 機能的磁気共鳴画像法による温熱生理研究

河内山隆紀 (ATR 脳活動イメージングセンタ)

(14) 臓器間神経ネットワークによる体重調節機構の解明

山田哲也 (東北大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科学分野)

(15) 視床下部室傍核のニューロペプチド Y が褐色脂肪熱産生を低下させる仕組み

中村佳子, 中村和弘 (京大学生命科学系キャリアパス形成ユニット)

(16) 視床下部室傍核から延髄縫線核へのオキシトシン入力は褐色脂肪熱産生を活性化する

中村和弘 (京大学生命科学系キャリアパス形成ユニット)

(17) マウス皮膚局所へのメントール刺激と冷刺激に対して活性化する中枢部位

山國紘志¹, 松村 潔¹, 中村和弘²

(¹大阪工業大学・工・生命工学, ²京大学生命科学系キャリアパス形成ユニット)

(18) 体温恒常性維持におけるナルディライジンの役割

西城さやか¹, 大野美紀子¹, 中村和弘², 平岡義範¹, 松岡龍彦¹

松村成暢³, 西 清人¹, 北 徹⁴, 木村 剛¹, 西英一郎¹

(¹京都大学大学院医学研究科循環器内科学, ²京大学生命科学系キャリアパス形成ユニット,

³京都大学大学院農学研究科食品生物科学, ⁴神戸中央市民病院)

(19) 非活動期の体温のウルトラディアンリズムと睡眠覚醒リズムの同期とその生理学的意義

佐藤暢夫^{1,2}, 丸井朱里², 松田真由美², 尾崎 眞¹, 永島 計^{2,3}

(¹東京女子医科大学大学院医学研究科麻酔科学分野,

²早稲田大学人間科学学術院体温・体液研究室,

³早稲田大学重点領域研究機構応用脳科学研究所)

(20) 雌ラットにおけるエストロゲンの心拍, 動脈圧日内リズムへの影響

丸井朱里, 綱川みずき, 小幡千紗, 松下はるか, 松田真由美, 永島 計

(早稲田大学人間科学学術院体温・体液研究室)

(21) タミフルの体温低下作用 —交感神経節遮断の可能性—

小野秀樹¹, 岩嶋優依², 茶菌かおり², 山本昇平², 大澤匡弘², 福島章紘¹

(¹武蔵野大学薬学部, ²名古屋市立大学大学院薬学研究科)

(22) ハムスターの冬眠時体温調節機構 —覚醒期の体温上昇機構—

田村 豊, 門田麻由子 (福山大学薬学部薬理学研究室)

【参加者名】

米代武司 (北海道大学), 斉藤昌之 (天使大学), 山田哲也 (東北大学大学院), 佐藤暢夫 (東京女子医科大学), 八木淳一 (杏林大学), 小野秀樹 (武蔵野大学), 福島章紘 (武蔵野大学), 永島 計 (早稲田大学), 相澤優香 (早稲田大学), 松下はるか (早稲田大学), 松田真由美 (早稲田大学), 丸井朱里 (早稲田大学), 小幡千紗 (早稲田大学), 原田大義 (早稲田大学), 脇 直也 (早稲田大学), 綱川みずき (早稲田大学), 伊藤杏奈 (早稲田大学), 田口素子 (早稲田大学), 鈴木晴香 (早稲田大学), 三好一史 (静岡県立大学), 亀山大輔 (静岡県立大学), 寺田祐

子 (静岡県立大学), 岡本土毅 (生理学研究所), 西村直記 (愛知医科大学), 犬飼洋子 (愛知医科大学), 佐藤麻紀 (愛知医科大学), 楠堂達也 (中部大学), 河内山隆紀 ((株)ATR-Promotions), 中村和弘 (京都大学), 中村佳子 (京都大学), 片岡直也 (京都大学), 西英一郎 (京都大学), 西城さやか (京都大学), 梅田真郷 (京都大学), 松村 潔 (大阪工業大学), 山國紘志 (大阪工業大学), 眞野博彰 (情報通信研究機構), 芝崎 学 (奈良女子大学), 田村 豊 (福山大学), 門田麻由子 (福山大学), 松崎健太郎 (島根大学), 志内哲也 (徳島大学), 大塚愛理 (徳

島大学), 岡 孝和 (九州大学), Hsin-Ni Ho (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), 片山義三 (株式会社薬物安全性試験センター), 小田英志 (花王株式会社), 山口秀明 ((株) アイシン・コスモス研究所), Hong LUO (Global Science and Culture Publishing), 安 鋼 (コタ株式会社), 藤田郁尚 ((株) マンダム), 富永真琴 (岡崎統合バイオ), 鈴木喜郎 (岡崎統合バイオ), 齊藤 茂 (岡崎統合バイオ),

内田邦敏 (岡崎統合バイオ), 加塩麻紀子 (岡崎統合バイオ), 周 一鳴 (岡崎統合バイオ), 高山靖規 (岡崎統合バイオ), 橘高裕貴 (岡崎統合バイオ), Wuping Sun (岡崎統合バイオ), 西本れい (岡崎統合バイオ), Rupali Gupta (岡崎統合バイオ), Erkin Kurganov (岡崎統合バイオ), 寇 珍珍 (岡崎統合バイオ), 渡邊成樹 (岡崎統合バイオ), 周 士勝 (岡崎統合バイオ)

【概要】

H25 年度の温熱生理研究会 (代表 京都大学・中村 (以下敬称略)) には多様な分野の研究者が参集し, 2 日間にわたって最新の研究成果発表と活発な討論が行われた。

2 題の招待講演では最近注目される温熱生理学関連のトピックスが発表された。河内山は fMRI を用いたヒト非侵襲脳イメージング研究の基本原則から温熱生理関連の最新知見までをわかりやすく解説した。山田は肝臓ー脳ー褐色脂肪の連関を通じた新しい代謝・体重調節機構を報告した。

一般演題では 20 題の最新研究成果が発表された。齋藤らは TRPA1 の種間多様性を, Kurganov らはトカゲ TRPA1 の熱・化学感受性を解析した。八木らは温度感受性 DRG ニューロンを電気生理学的に分類した。Luo は熱波で生じる身体症状への温度と湿度の影響を調べた。

片岡らはストレス性褐色脂肪熱産生を駆動する中枢神経路を特定し, 岡らは慢性疲労症候群のストレス性高体温症の機序を臨床的に考察した。齊藤らは成人褐色脂肪を再活性化・増量する方策を探索し, 米代らは褐色脂肪

の寒冷誘導熱産生の季節変動を解析した。

Ho らは温度覚の主観的・身体的知覚が時間的に異なることを示し, 松田らは頭頸部冷却の深部体温への影響を検証した。山口らは成人の局所加温に対する生理・心理反応を解析し, 眞野らはヒトの皮膚温冷感覚の知覚学習を解析した。

中村佳子らは NPY が褐色脂肪熱産生を抑制する中枢機構を, 中村和弘は褐色脂肪熱産生を惹起するオキシトシン神経投射を同定した。山國らはマウス皮膚にメントール・冷刺激を与え, 活性化する脳部位を調べた。西城らはナルディライジン欠損マウスの体温異常の発現機構を調べた。

佐藤らはマウスの体温変動リズムと睡眠覚醒の相互作用を解析し, 丸井らは雌ラットの循環器調節へのエストロゲンの影響を調べた。小野らはタミフルの体温低下作用機序を解析し, 田村らはハムスター冬眠覚醒に関わる神経ペプチドを特定した。

(1) 侵害性の温度・化学物質受容体 TRPA1 チャンルの機能的な種間多様性とその分子基盤

齋藤 茂^{1,3}, 鳩澤永子², 福田直美¹, 太田利男², 富永真琴^{1,3}

(¹岡崎統合バイオ(生理研)・バイオセンシング, ²鳥取大・農, ³総研大・生理)

環境温度は生命活動に大きな影響を与えるため, 温度感覚の情報伝達の初期過程を担う温度受容体は動物の進化過程においても重要な役割を果たしてきたと考えられる。複数の TRP チャンルが温度受容体として同定されており, 哺乳類の TRPA1 は痛みとして感知される低温や刺激性化学物質で活性化される。我々は, 脊椎動物の TRPA1 の進化過程を調べるため, ニシツメガエル (両生類), グリーンアノールトカゲ (爬虫類), ニワトリ (鳥

類) から TRPA1 を単離して機能解析を行った。3 種の TRPA1 は哺乳類と同様に刺激性化学物質で活性化されるが, 低温ではなく高温刺激で活性化された。TRPA1 の活性化温度閾値は各種が忌避する温度閾値と一致していたことから, TRPA1 の温度感受性がそれぞれの種の生理的な特性に適合するように進化してきたと考えられる。哺乳類, ゼブラフィッシュ (魚類), ショウジョウバエ (昆虫) などの TRPA1 のチャンネル特性の知見を考慮して

TRPA1 の機能の進化過程を推定した。脊椎動物の祖先状態では TRPA1 は既に刺激性化学物質および高温の感受性を獲得していたが、その後、特定の種において温度感受性が変化したと考えられる。

また、解析の過程で、ニワトリ TRPA1 が鳥類忌避剤により活性化されることを見出した。複数の脊椎動物種の

TRPA1 にこの鳥類忌避剤を作用させたところ、種間で感受性が異なっていた。この感受性の種間多様性を利用した突然変異チャネルの解析により TRPA1 の鳥類忌避剤の活性に重要なアミノ酸を特定した。TRPA1 の比較解析によりチャネル機能の種間多様性とその分子基盤の一部が明らかになった。

(2) Properties of heat and chemical sensitivity of green anole lizard TRPA1

Erkin Kurganov^{1,2,3}, Yiming Zhou^{1,3}, Shigeru Saito^{1,3}, Makoto Tominaga^{1,2,3}

(¹Division of Cell Signaling, NIPS, ²The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI,

³Okazaki Institute for Integrative Bioscience)

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a member of the large TRP super family of ion channels, and functions as a Ca^{2+} -permeable non-selective cation channel that is activated by various noxious stimuli. TRPA1 was initially identified as a potential mediator of noxious cold stimuli in mammalian nociceptive sensory neurons while TRPA1s from non-mammalian vertebrates (snakes, green anole lizards and frogs) were recently reported to be activated by heat, but not cold stimulus. In this study, we examined properties for TRPA1 channel of green anole (gaTRPA1) relating to thermal and chemical stimulation in whole-cell and single-channel recordings. Heat activates gaTRPA1 with a temperature threshold for activation of 35.8°C, while heat together with allyl isothiocyanate (AITC), a chemical

agonist, had synergistic effects on gaTRPA1 channel activation in that either the temperature threshold or activating AITC concentration was reduced in the presence of the other stimulus. gaTRPA1 channels were also activated by heat and AITC in excised membrane patches with an inside-out configuration. By comparing the kinetics of heat- and AITC-evoked single-channel currents, we defined similarities and differences of gaTRPA1 channel responses to heat and AITC. We observed similar current-voltage relationship and unitary amplitudes for heat- and AITC-evoked currents while we found that heat-activated currents showed shorter durations of both open- and closed-times. Our results suggest that the gaTRPA1 channel is directly activated by heat and chemical stimuli.

(3) Warm 刺激, Cool 刺激は侵害刺激か, 非侵害刺激か?

—In Vivo パッチクランプ法による温度感受性 DRG ニューロンの分類と解析—

八木淳一¹, 小林 靖², 大木 紫¹, 平井直樹¹

(¹杏林大学医学部統合生理学, ²防衛医科大学校解学)

脊髄後根神経節 (DRG) ニューロンは、生体内外の多様な刺激に反応できるよう多種多様に分化している。DRG ニューロンの性質を統合的に解析するため、麻酔下のラットを用いた DRG ニューロンのパッチクランプ法を開発した。C 線維を有する C-type DRG ニューロンの電気生理学的性質を解析したところ、C-type DRG ニューロ

ンは、受容野 (後ろ足有毛部) への温度刺激の反応閾値から C-Heat (42–55°C), C-Warm (32–40°C), C-Cool (23–26°C) および C-Cold (5–12°C) に分類された。一方、C-type DRG ニューロンは、活動電位の形状とイオン電流の発現パターン (I_h, I_A, CaT) から 3 つのクラスに分類され、それぞれ、Class I; 高閾値機械受容型 (HTM),

Class II ; 中閾値機械受容型 (MTM), Class III ; 低閾値機械受容型 (LTM) であった。C-Heat は, Class I あるいは II に属する 2 種類に分類された。C-Warm, C-Cold は Class I に属し, C-Cool は Class III に属した。したがって,

DRG ニューロンの分類上, Warm 情報は侵害受容性 C 線維により中枢へ伝えられ, Cool 情報は触覚 C 線維により伝えられると考えられる。

(4) Thermo- and hygro- sensitivity in heat wave

Hong Luo (Global Science and Culture Publishing)

In the last year we have discussed the possibility of thermo-hygro-sensation converging in Transient Receptor Potential (TRP) channel. Earlier years we have reported the relationship of environmental humidity and human health. On the other hand, a record-breaking heat wave continues more than 40 days in China this summer. More than half of provinces are involved with above-normal temperatures including Beijing. This summer north China becomes rainy, while in south China Typhoon follows dry heat wave. The high temperature and high humidity have made wet heat relative diseases increased and more than 40 people died in the wave. The aims of this study were prevention and treatment the diseases with analysis the mechanism and the possible of thermo- and hygro- sensitivity resetting in heat wave.

The emergency medical dispatches this summer (2013) in the heat wave of Beijing “120” medical emergency center were tracked and analyzed. The weekly dispatches were increased 6.3% to 12.0% compared to the same period last year. The top events included trauma, cardiovascular diseases,

cerebrovascular diseases, traffic accident, digestive diseases, respiratory diseases, fever and poisoning, in which the increase rate of dispatch weekly in respiration, cardiovascular and digestive diseases were achieved 31.5%, 23.1% and 22.5% respectively compared to the same periods last year.

Generally the vital activities of cardiovascular and respiratory patients are believed more sensitive to low temperatures, therefore cardiovascular and respiratory events are increased in cold weather. This study showed the cardiovascular, respiratory and digestive events increased in extremely wet hot days. The reason could be high temperature, high humidity and low atmospheric pressure reset relative sensors or receptors in the systems or other parts of body, which affected the cardiovascular, respiratory, digestive and metabolic activities or sensitivity to wet heat directly or indirectly. When the regulations were over the ability and broke homeostasis, wet heat relative diseases could happen. Consider with our previous work, this study suggested that TRP channel could be a candidate target to prevent and treat wet heat relative diseases.

(5) 視床下部背内側部から吻側延髄縫線核への興奮性の直接入力は社会的敗北ストレスによる褐色脂肪熱産生を惹起する

片岡直也, 中村和弘 (京大大学生命科学系キャリアパス形成ユニット)

心理ストレスによって引き起こされる体温上昇は哺乳類において幅広く観察される自律生理反応である。本研究では, 褐色脂肪組織 (BAT) における交感神経性の熱産生がストレス性体温上昇に寄与するという仮説を立て, ストレス性 BAT 熱産生反応に関わる中枢神経機構を探

索した。

テレメトリー温度プローブを肩甲骨間 BAT と腹腔内に挿入したラットへ社会的敗北ストレスを与えると, BAT 温度が即座に上昇し, 遅れて腹腔温度も上昇した。この反応は, β -アドレナリン受容体拮抗薬によって有意

に減弱したことから、心理ストレスによって惹起された交感神経性 BAT 熱産生と体温上昇であることが分かった。次に、BAT 熱産生の指令を中継する交感神経プレモーター領域として知られる吻側延髄縫線核 (rMR) へグルタミン酸受容体の拮抗薬を微量注入すると、ストレス性の BAT 熱産生と体温上昇反応が消失した。この結果は、rMR が上位の脳領域からストレス性のグルタミン酸入力を受け、その情報を脊髄の交感神経出力系へ中継することを示している。組織化学的解析の結果、視床下部背内側部 (DMH) から rMR へ投射するニューロン群がストレスによって活性化することを見出した。そこで、DMH へ神経抑制剤を微量注入すると、ストレス性 BAT 熱産生と体温上昇反応が消失した。さらに、ストレス反

応に關与する DMH から rMR への直接の神経投射が BAT 熱産生出力に機能するか、光遺伝学的手法を用いて検証した。光駆動性のカチオンチャンネル, ChIEF を、ウイルスを用いて DMH のニューロンに発現させると、rMR に分布するその軸索終末へ ChIEF が輸送された。この軸索終末へ光照射を行うと、BAT 交感神経活動と BAT 温度が上昇した。さらに、この反応はグルタミン酸受容体拮抗薬を rMR に注入することで消失した。

以上の結果から、心理ストレスは DMH から rMR へのグルタミン酸作動性神経投射を活性化し、その結果、rMR からの交感神経プレモーター出力が亢進することによりストレス性の BAT 熱産生が惹起され、体温が上昇するという機構が提示される。

(6) 慢性疲労症候群患者にみられた著明なストレス性高体温反応の機序について

岡 孝和, 須藤信行 (九州大学大学院医学研究院心身医学)

背景：慢性疲労症候群 (CFS) 患者はしばしば微熱を生じるが、微熱の成因については不明な点が多い。CFS の発症や経過に心理社会的ストレスが關与するが、心理的ストレスは核心温を上昇させることが知られている。そこで我々は、CFS 患者の微熱の成因にストレスが關与しているのかどうかを検討するために、CFS 患者にストレスインタビューを行い、体温、発熱に關与する血中サイトカイン、血中カテコルミンの変化を観察した。

方法：当科に治療目的で入院した CFS 患者 (26 歳, 女性) に 1 時間, ストレスインタビューを行い、腋窩温, 鼓膜温, 指皮膚温, 血中カテコルミン, 血中 IL-1 β , IL-6 (発熱性サイトカイン), TNF- α , IL-10 (解熱性サイトカイン) レベルを、インタビュー前, インタビュー開始 30 分後, 60 分後, 120 分後に測定した。なおインタビュー開始時間は、それまでの入院経過から体温の日内変動の

少ないと思われる 14 時から開始した。

結果：腋窩温は 37.2°C からストレスインタビュー開始 60 分後, 38.2°C へと 1.0°C 上昇したが、開始 120 分後には 36.7°C と低下した。鼓膜温は 37.1°C から 37.9°C へと上昇したが、腋窩温より変化は少なかった。ストレスインタビュー中、指皮膚温は低下し、血中アドレナリン、ノルアドレナリン値は増加した。治療前後を通して血中サイトカイン値は顕著な変化を示さなかった。また腋窩温上昇時には倦怠感の増悪を訴えた。

考察および結論：CFS 患者の中に、顕著なストレス性高体温 (心因性発熱) をきたす症例がある。この症例の腋窩および鼓膜温上昇には血中の発熱性、および解熱性サイトカインは關与せず、交感神経機能亢進が關与したと考えられる。

(7) ヒト褐色脂肪の活性化・増量によるエネルギー消費亢進と体脂肪減少

斉藤昌之¹, 米代武司² (¹天使大学大学院看護栄養学研究科, ²北海道大学大学院医学研究科)

ヒト褐色脂肪の機能は fluorodeoxyglucose-positron emission tomography / computed tomography (FDG-PET/

CT) によって評価できる。我々は、2006 年から 2013 年 3 月までに 250 名余りの健常者 (20-72 歳) で FDG-

PET/CT 検査を行い、1) 温暖条件では検出されないが2時間の寒冷刺激で活性化・検出され、その頻度は、2) 夏季よりも冬季に増える、3) 若年者では半数以上になるが壮高年者では激減するなどを報告し、更に、4) 褐色脂肪が実際に寒冷暴露や食事摂取後のエネルギー消費亢進に寄与しており、5) 褐色脂肪の不活性化・減少が肥満進展の一因になることなども明らかにした¹⁾。本研究では、褐色脂肪を再活性化・増量することにより肥満を軽減する試みを行った。

若年の成人男性を対象とし、寒冷刺激（室温 19°C、薄着）2 時間後に FDG-PET/CT を行い、褐色脂肪活性が検出できないかあるいは極めて低い被験者 22 名を選抜し慢性寒冷群（12 名）と対照群（10 名）に分けた。慢性寒冷群は薄着で 17°C の部屋で毎日 2 時間過ごし、対照群は通常の室温で生活した。6 週間後に FDG-PET/CT により褐色脂肪活性を測定したところ、慢性寒冷群では有意

に上昇していた。同時に呼気分析法によって全身エネルギー消費量（EE）を測定したところ、褐色脂肪活性の上昇に対応して寒冷誘導熱産生（27°C と 19°C 2 時間寒冷刺激時の EE の差）も増加していた。更に慢性寒冷群では体脂肪量が低下しており、しかもその低下量は褐色脂肪活性の増加量に比例していた²⁾。同様の効果は TRP チャネルアゴニストであるカプシエイトやパラドール含有植物抽出物の長期投与後にも見られた。これらの結果は、寒冷刺激や TRP 刺激を長期間続けると褐色脂肪が再活性化・増量し、それによりエネルギー消費量が増え、結果的に体脂肪量が減少することを示しているの、ヒト肥満の予防に応用できると思われる³⁾。

1) Saito M: Diabetes Metab J 2013, 37: 22-29.

2) Yoneshiro T, et al.: J Clin Invest 2013; 123: 3404-3408.

3) Saito M, Yoneshiro T: Curr Opin Lipidol 2013, 24: 71-77.

(8) 寒冷誘導熱産生の季節変動：褐色脂肪組織の寄与

米代武司¹，松下真美²，岩永敏彦¹，斉藤昌之²

(¹北海道大学大学院医学研究科，²天使大学大学院看護栄養学研究科)

【背景】小型げっ歯類において褐色脂肪（BAT）は、非震え熱産生（BAT）の場として寒冷環境下での体温維持に寄与する。ヒトの褐色脂肪も寒冷暴露時に起こるエネルギー消費（寒冷誘導熱産生，CIT）に寄与するが（J Clin Invest 2013），その代謝活性は冬に最大になり，夏に最低になる。一方，CIT 自体もある程度，季節変動することが報告されているものの，BAT の季節変動との関係は不明である。本研究では，健康被験者を対象とし，室温 19°C の寒冷に暴露した時の CIT と筋の震え（shivering）の有無，体温変化について夏と冬に測定し，それらの季節変動に対する BAT 活性の寄与を調べた。

【方法】若年男性 44 名を対象とし，冬に室温 19°C，2 時間の寒冷刺激を組み合わせた陽電子断層撮影/コンピュータ断層撮影（PET/CT）を行って BAT 最大活性を評価した。PET/CT の診断結果に基づき，被験者を BAT 高活性群と低活性群の 2 群に分けた。同被験者を対象に，温暖と寒冷条件でエネルギー消費量，筋電図，鼓膜と体

表の温度を測定する実験を夏と冬で 2 回行い，急性寒冷刺激に応じて起こる CIT，筋の震え，体温変化の季節変動を評価した。

【結果】冬の CIT は BAT 低活性群に比べ，高活性群の方が顕著に高かったが，夏では両群ともに CIT が低下し，群間差は消失した。BAT 最大活性の個人差は，冬の CIT に対して独立した規定因子になったが，夏の CIT に対してはなかった。急性寒冷刺激による鼓膜温度の変化を調べたところ，冬には BAT 低活性群に比べて高活性群の方が低下しにくかった。しかし，冬に比べ，夏の鼓膜温度低下量は BAT 高活性群では有意に大きくなったのに対し，低活性群ではほとんど変化しなかった。

【結論】ヒト BAT は冬には CIT に寄与して寒冷暴露時の体温調節に役立つが，夏になると BAT 活性が低下すると，それにより寒冷環境下での体温維持能力が低下することが示された。

(9) Timing difference between subjective and physical temperature peaks in warm and cold senses

Hsin-Ni Ho¹, Katsunari Sato^{2,3}, Scinob Kuroki¹, Junji Watanabe¹, Takashi Maeno³, Shin'ya Nishida¹

(¹NTT Communication Science Laboratories, ²Nara Women's University, ³Keio University)

Human's ability to sense changes in skin temperature is critical for homeostatic regulation and object discrimination. To date, studies on behavioral and neural responses to a dynamic change in skin temperature mainly focus on responses to abrupt temperature changes. These data reflect the reaction time, sensation intensity and differential threshold to temperature steps or impulses, but give no information on how our central nervous system encodes and represents the temporal structure of incoming temperature signals. In this study, we presented the sinusoidally-modulated temperature stimulation (2 sec cycle) to human participants and asked them to press a key in synchrony with

the time of subjective temperature peak (i.e., when they perceived the sinusoid stimulation reaching the hottest or coldest temperature). We found that the timing of the subjective temperature peak does not match that of the physical temperature peak for both warm and cold stimuli. For warm stimuli, the subjective peak timing is subject to delay (around 200 ms) to the time of physically hottest temperature, while for cold stimuli, the perceived peak timing precedes the time of physically coldest temperature (around 300 ms). Our results suggest that our sense of cold determines the maximum intensity based on the temperature transient, rather than the absolute temperature.

(10) 頭頸部冷却が深部体温に及ぼす影響

松田真由美¹, 和田哲志¹, 丸井朱里¹, 佐藤暢夫^{1,2}, 永島 計¹

(¹早稲田大学人間科学学術院体温・体液研究室, ²東京女子医科大学大学院医学研究科麻酔科学分野)

【はじめに】温度条件によって生じる快・不快感を「温熱的快適感」という。我々はヒトにおいて体表面の局所的な加温・冷却実験を行い、温熱的快適感には部位差があることを明らかにしている。例えば暑熱環境では顔や頸部の冷却で強い快適感が生じるが、腹部の冷却で生じる快適感は小さい。この温熱的快適感の特徴は、暑い時に頭頸部を冷やす行動と結びつき、脳温を低く保つ為に役立っているかもしれない。現在、実験でヒトの脳温を直接測定することは難しいが、鼓膜温は脳表面の温度変化を反映すると報告されている。本研究では鼓膜温を脳温の指標とし、正常体温および高体温の条件において頭頸部冷却を行い脳温へ及ぼす影響について検証した。

【方法】健康な成人男性6名を対象とし、同一被験者に対して正常体温および高体温時に4回の局所冷却実験を行った（①扇風機で顔面に送風、②額を温度刺激装置で冷却、③頸部を温度刺激装置で冷却、④冷却無し；コントロール施行）。実験中、鼓膜温、食道温、皮膚温、発

汗量、皮膚血流、血圧、心拍を測定した。鼓膜温は熱電対先端に薄く脱脂綿を巻き、鼓膜に接触させ測定した。全身及び冷却部位の温度感覚、温熱的快適感をVAS法にて被験者に申告させた。

【結果】正常体温時、いずれの冷却方法およびコントロール施行において鼓膜温と食道温の差は認められなかった。高体温時、顔面への送風で鼓膜温は食道温より有意に低い値を示したが、額冷却、頸部冷却、コントロール施行では鼓膜温と食道温の差は認められなかった。

【考察】今回用いた温度刺激装置による額や頸部の冷却では脳温を下げる効果はないが、高体温時に顔面へ送風すると体幹部深部温（食道温）より脳温（鼓膜温）を低く維持できる可能性が示唆された。偶蹄類やネコ科動物等、頸動脈網がある動物は頭部を冷却しなくとも高体温時に脳温を低く維持することができる（選択的脳冷却）。しかし、ヒトにおいては高体温時に脳温を低く保つ為に頭部を冷やすという行動性の調節が必要であると考えられる。

(11) 身体局所加温に対する生理、心理反応の個人内・間変動要因

山口秀明¹, 高橋 涼², 奥山祐輝², 前田享史²(¹株式会社アイシン・コスモス研究所, ²北海道大学大学院工学研究院)

【背景・目的】

快適性と省エネ性を両立する温熱環境の制御方法として身体局所部位の加温／冷却が注目されている。しかしながら、局所温度刺激に対する生理、心理反応には個人内・間変動があり、目的とする効果の安定的誘導にはこの変動要因を明らかにすることが重要である。本研究では、局所加温を対象に、同条件に対する生理、心理反応の個人内・間変動要因を検討した。

【方法】

健康男性被験者 5 名を対象に 7 月, 11 月, 2 月に実施し、いずれも室温 27~28°C, 相対湿度 40~60%RH 環境下にて行った。実験はすべて仰臥位で、1 時間安静→腹部 40°C 15 分加温→40 分安静とした。測定項目は、直腸温、皮膚温、腹部血流量、酸素摂取量、全身温冷感とした。

【結果・考察】

ここでは、変動要因として熱放散と熱産生のバランスの差に着目した。その結果、加温前の足底部皮膚温と酸素摂取量の状態に応じて、以下に示すような一定のパターンで生理、心理反応が出現する可能性を見出した。

(生理反応)

足底部皮膚温が 34°C 以上の状態では、加温時、終了後の腹部血流増加がほとんどみられない。34°C 未満では加温時、終了後共に腹部血流量は増加するが、30°C 以下ではその増加量が減少する。また、足底部皮膚温が 33°C 以上、酸素摂取量が 3.5ml/kg/min 以上では加温時、終了後に酸素摂取量が減少し、足底部皮膚温が 32°C 以下では末梢部平均皮膚温が上昇する。

(心理反応)

足底部皮膚温が 34°C 以上、もしくは酸素摂取量が 4.0ml/kg/min の場合には“暖かい”足底部皮膚温が 33°C 以下、かつ酸素摂取量が 3.5ml/kg/min では全身への波及性はなく、それ以外の状態では“少し暖かい”の申告となる。

これらは、熱放散と熱産生のバランスが同条件に対する生理、心理反応の個人内・間変動要因の 1 つである可能性を示す結果である。抽出した足底部皮膚温は、下腿部皮膚温と足指皮膚温の差と負の相関関係 ($r = -0.78$ $P < 0.01$) にあることから足部 AVA の状態を反映していると考えられ、熱放散と熱産生のバランスを捉えるには手部ではなく、足部に注目することが有効である可能性が示唆された。

(12) 皮膚温冷感覚の知覚学習

Hiroaki Mano^{1,2}, Wako Yoshida², Suyi Zhang¹, Ben Seymour^{1,2,3}(¹独立行政法人 情報通信研究機構 脳情報通信融合研究センター 脳情報通信融合研究室,²株式会社国際電気通信基礎技術研究所 認知機構研究所 行動変容研究室,³Computational and Biological Learning Laboratory, Department of Engineering, University of Cambridge, Trumpington Street, Cambridge CB2 1PZ, UK.)

1948 年、チャールズ・シェリントン卿により提案された感覚分類には、外部環境を知覚する能力である Exteroception と、interoception と呼ばれる我々の身体内部環境の生理学的状態を知覚する能力が存在していた。interoception は、温度感覚と痛みの感覚様相を連携し、解剖学的にも生理学的にも外受容的な体性感覚とは異なる

求心路で、末梢性には、小径の髄鞘化の程度の低い、あるいは髄鞘化されていない求心性線維によって、脊髄視床路を通じ伝達されていくとされる。中枢性には、温度感覚や痛みの皮質再現は、現在までのところ一定のコンセンサスを得ていない。その中で我々は、先行研究において不足している要素の一つに、皮質処理の特徴であ

る可塑性, 知覚学習の実証が欠如している事に着目した。

そこで本実験では, 温度感覚における知覚学習の不可を検討するため, 健常被験者の下腿後外側に装着した温冷刺激装置から呈示される, 微少な温覚あるいは冷覚の変化を検出する, 温度判別課題を実施した。本研究では, これまでに得られた予備的なデータを紹介する。

我々は, 右脚または左脚のどちらかに, 39度のベースライン温度から, 微少な温度上昇パルスの有無を検出する課題だけを繰り返す(温覚検出), あるいは, 25度のベースライン温度から, 微少な温度低下パルスの有無を検出する課題だけを繰り返す(冷覚検出), 1インターバルの検出課題を用い, 被験者の両脚の温覚と冷覚の変化

検出能を得た。次いで, 被験者を, 合計5日のトレーニングとして, 左右のどちらかの刺激部位に, 温覚または冷覚のどちらかのパルス検出課題のみを繰り返し行った。被験者は, トレーニング終了後の別日に, 左右の脚の, 温覚・冷覚の検出能力を再テストされ, 学習を評価された。

我々の結果は, トレーニング期間にわたる検出精度の漸進的向上と, トレーニングによるパフォーマンス改善の左右固有性, 温覚・冷覚の温度変化方向固有性を示し, これらは, 温度感覚知覚学習の解剖学的・機能的に特異的な機序を示唆すると考える。

(13) 機能的磁気共鳴画像法による温熱生理研究

河内山隆紀 (ATR 脳活動イメージングセンタ)

本講演では, 機能的磁気共鳴画像法を用いた温熱生理学研究の可能性を探るために, 同計測法の原理や解析法, 課題設計上の注意点などを紹介し, 適用例として幾つかの先行研究を紹介したい。

磁気共鳴画像法 (fMRI) は, ヒト非侵襲脳イメージング研究の中では中心的な役割を果たしている計測法である。装置の性質上, 従来は医学系の大学などを中心して研究が行われてきたが, 近年, 実験専用機の導入も盛んであり, 例えば, 生理学研究所を初めとして京都大学・こころの未来研究センターや情報通信研究機構・脳情報通信融合研究センターなどの大学や公的研究機関, 有償で実験環境を提供する ATR 脳活動イメージングセンタなどで様々な研究分野の研究者が比較的容易に実験することができるようになった。

ヒト非侵襲脳イメージング法の中で fMRI は特に空間解像度に優れた手法であり, 数ミリのオーダで脳活動を計測することができる。したがって, 脳の機能局在性の

評価に適しており, 「ある認知機能に関して脳のどの領域が関係しているのか?」という疑問に答えることができる。一方で時間解像度については fMRI が血液動態を計測するため電気生理学に基づく計測法である脳波や脳磁図には及ばない。しかしながら, 近年, 神経-血管連関に関するモデルを用いることで時間解像度の問題を解析的に補完し, 時系列データに基づく領域間の機能的結合を分析することができるようになっている。温熱生理学研究においては, 温度感覚やその快不快感情に関連した領域を個別に特定するだけでなく, 認知モジュールとしてのそれらの脳領域が機能的に結合することで構築された神経ネットワークについても評価することが可能である。fMRI は温度感覚の情報処理機構の解明に大きく貢献する可能性を持っていると言えよう。本講演が, 参加者の皆様が fMRI を用いた脳イメージング研究を遂行する上での一助となれば幸いである。

(14) 臓器間神経ネットワークによる体重調節機構の解明

山田哲也 (東北大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科学分野)

個体には, エネルギー摂取の増加に対して摂食抑制や

エネルギー消費を亢進するという, ネガティブフィード

バック機構が内在している。我々はこの機構に臓器間神経ネットワークも重要な役割を担っていることを報告してきた。例えば、UCP1 を白色脂肪組織に後天的に遺伝子導入する手法を用いた研究により、白色脂肪組織からの求心性神経シグナルが視床下部のレプチン抵抗性を改善し、摂食を抑制する働きを有していることを見出した (Cell Metab. 2006)。また、PPAR γ の発現亢進を伴う肝でのエネルギー蓄積過剰は、迷走神経求心路を介して脳に伝達され、交感神経を活性化しエネルギー消費を増加させることを発見した (Science 2006)。

上記のようなネガティブフィードバック機構が破綻なく機能すれば、理論的には体重増加自体が生じないと思われる。しかし肥満者数が爆発的に増加している現状があり、これらのネガティブフィードバック機構に相反するシステムを体が備えている可能性が想起された。我々はこの一端を説明しうる新たな肝臓からの臓器間神経ネットワークを見出した (Cell Metab. 2012)。まず、高脂肪食をマウスに与えた際、体重増加に先駆けて肝臓のグルコキナーゼ (GK) の発現が著明に上昇することを確認した。次に、マウスの肝臓に GK を遺伝子導入したところ (GK マウス)、褐色脂肪の UCP1 など熱産生関連遺伝

子の発現が低下し、その熱産生が抑制された。次に、BAT 熱産生低下が体重に及ぼす影響を飼育温度を変えて検討した。GK マウスを軽度の寒冷条件下 (23°C) で飼育すると、酸素消費量が増加し、内臓脂肪重量はホルモン感受性リパーゼの発現上昇を伴い減少した。一方、28°C で飼育すると、酸素消費量が減少し内臓脂肪重量や体重が増加した。これらより、BAT 熱産生が低下していると、寒冷条件下では体温維持のため熱獲得効率の低い熱産生が代償的に働くことで内臓脂肪重量が減少し、一方、寒冷ストレスがない条件では BAT 熱産生低下によるエネルギー消費の低下が、直接的に体重増加の表現型に繋がったと考えられた。更なる解析により、この肝 GK から褐色脂肪に至る臓器間ネットワークは、迷走神経-脳-交感神経活性低下を通じて生じることや、レプチンによる摂食抑制効果に影響を与えないが、褐色脂肪の熱産生亢進作用を抑制することが解った。この肝 GK-脳-BAT 連関は、エネルギー摂取増加に呼応するエネルギー消費の低下を司っており、個体レベルのエネルギー代謝システムにおいて、ポジティブフィードバック機構として機能していると考えられた。

(15) 視床下部室傍核のニューロペプチド Y が褐色脂肪熱産生を低下させる仕組み

中村佳子, 中村和弘 (京大大学生命科学系キャリアパス形成ユニット)

ニューロペプチド Y (NPY) が視床下部室傍核に作用すると、摂食量が著しく増加するだけでなく、褐色脂肪熱産生は抑制され、エネルギー消費量が低下する。しかし、NPY の作用によって褐色脂肪熱産生が抑制される中枢神経機構は分かっていない。NPY 作用による視床下部室傍核からの信号が、褐色脂肪への交感神経出力を制御する中枢神経経路のどこかを抑制する可能性が想定される。

そこで私達は、NPY が褐色脂肪への交感神経出力を抑制する仕組みを調べるため、麻酔ラットを用いた *in vivo* 生理実験を行った。まず、NPY を側脳室あるいは視床下部室傍核へ注入すると、皮膚冷却による褐色脂肪交感神経活動、褐色脂肪温度、呼気二酸化炭素濃度ならびに脈拍の上昇が抑制された。次に、NPY 作用による視床下部室傍核からの信号が、褐色脂肪熱産生の制御に関わる吻

側延髄縫線核の交感神経プレモーターニューロンを抑制する可能性について検討した。吻側延髄縫線核に NMDA を注入し、グルタミン酸受容体を介して局所ニューロンを刺激すると褐色脂肪熱産生が惹起されるが、この反応は視床下部室傍核への NPY 注入によって消失した。このことから、NPY 作用による視床下部室傍核からの信号は、吻側延髄縫線核の交感神経プレモーターニューロンあるいはその下流 (脊髄の交感神経節前ニューロンなど) を抑制することが示された。一方、吻側延髄縫線核の GABA_A 受容体をビククリン注入によって阻害することでも褐色脂肪熱産生が生じるが、もし NPY の作用によって吻側延髄縫線核の下流が抑制されるのであれば、この反応は室傍核への NPY 投与によって抑制されるはずである。しかし、吻側延髄縫線核へのビククリン注入による褐色脂肪熱産生は室傍核への NPY 注入によって全く

抑制されなかった。

これらの結果から、視床下部室傍核に NPY が作用すると、何らかの神経経路を介して、吻側延髄縫線核の交感

神経プレモーターニューロンが GABA 抑制を受け、褐色脂肪への熱産生出力が抑制されると考えられる。

(16) 視床下部室傍核から延髄縫線核へのオキシトシン入力は褐色脂肪熱産生を活性化する

中村和弘 (京大大学生命科学系キャリアパス形成ユニット)

オキシトシンは多彩な作用を持つペプチドホルモンだが、代謝調節における機能は不明である。オキシトシンを含有するニューロンは視床下部の室傍核と視索上核にのみ局在し、軸索を脳下垂体へ投射してオキシトシンを内分泌するだけでなく、脳内への投射を通じたオキシトシンの放出によって、様々な神経修飾機能を持つと考えられている。

私は、褐色脂肪への熱産生出力に関わる交感神経プレモーターニューロンが分布する吻側延髄縫線核にオキシトシン含有ニューロンの軸索終末が分布することを見出した。逆行性神経トレーシング実験の結果、これらのオキシトシン含有ニューロンの終末は視床下部室傍核の尾

側部からの投射に由来するものであった。麻酔ラットの吻側延髄縫線核へオキシトシンを微量注入すると、褐色脂肪組織の交感神経活動、褐色脂肪組織温度ならびに脈拍が上昇した。オキシトシンによって惹起されるこの褐色脂肪熱産生と頻脈の反応は、あらかじめオキシトシン受容体拮抗薬、L-368899 を吻側延髄縫線核へ注入しておいた場合には惹起されなかった。

これらの結果から、視床下部室傍核尾側部から吻側延髄縫線核へ投射するオキシトシン含有神経の終末から放出されるオキシトシンが交感神経プレモーターニューロンを活性化することで褐色脂肪熱産生を亢進させ、代謝を上昇させると考えられる。

(17) マウス皮膚局所へのメントール刺激と冷刺激に対して活性化する中枢部位

山國紘志¹, 松村 潔¹, 中村和弘²

(¹大阪工業大学・工・生命工学, ²京大大学生命科学系キャリアパス形成ユニット)

【背景と目的】皮膚へのメントール塗布は冷感と対寒反応を引き起こす。その求心経路を解明するため、私たちはマウス皮膚へのメントール塗布によって活性化される脳領域を cFOS 免疫染色で検討している。2011 年度の本研究会では、右後肢メントール塗布により、橋の傍小脳脚核 (parabrachial nucleus:PB) で cFOS 陽性細胞が両側性に増え、その増加は刺激と反対側 (左側) でより大きいことを報告した。その際、次の 2 課題が残された。課題 1 : メントールの溶媒のエタノール単独の塗布により、程度は弱い PB において cFOS 陽性細胞の増加がおこった。エタノールの揮発による温度低下が刺激となった可能性がある。課題 2 : グルーミングにより、右後肢以外の部位にメントール刺激が広がった可能性がある。これが両側性に cFOS 陽性細胞が増えた原因かもし

れない。今回は実験方法を一部変更し、これらの課題を検討した。

【方法】課題 1 については、エタノールではなく、オリーブオイル (非揮発性) をメントールの溶媒として実験を行った。さらに、右後肢の冷却に対する反応を調べた。課題 2 については、頭部と上腕が下肢に届かないよう、プラスチック製のスカート状の器具をマウス腰部に装着して実験を行った。

【結果および考察】課題 1 : オリーブオイル単独の塗布では、エタノール単独の塗布と比べ、PB における cFOS 陽性細胞は少なく、左右差も見られなかった。オリーブオイルに溶かした 10%メントール塗布では、以前と同様に両側の PB で cFOS 陽性細胞が増え、その程度は刺激と反対側 (左側) でより大きかった。右後肢の冷却でも同

様の反応が見られた。エタノール単独による cFOS 陽性細胞の増加は、揮発による冷却の結果と考えられる。課題 2：スカート状の器具によりメントールが右後肢から広がらないことを確認した。この条件下においても、メ

ントール刺激は PB の cFOS 陽性細胞を両側性に増加させ、その程度は左側でより大きかった。メントール刺激に対する神経信号は両側性に PB に入力し、その強さは刺激と反対側でより大きいことが確認できた。

(18) 体温恒常性維持におけるナルディライジンの役割

西城さやか¹, 大野美紀子¹, 中村和弘², 平岡義範¹, 松岡龍彦¹,
松村成暢³, 西 清人¹, 北 徹⁴, 木村 剛¹, 西英一郎¹

(¹京都大学大学院医学研究科循環器内科学, ²京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット,

³京都大学大学院農学研究科食品生物科学, ⁴神戸中央市民病院)

哺乳類の体温恒常性は厳密に維持されており、その核心温は、①-1) 中枢性の体温セットポイント設定、①-2) 中枢による外気温の感知と末梢への指令、②末梢性の熱産生および放散、によりコントロールされているが、その分子機構については明らかになっていない部分も多い。我々が作製した遺伝子改変マウス（ナルディライジン欠損マウス：NRDc^{-/-}）は、常温で野生型マウスより 1.5°C 体温が低く、寒冷暴露下で体温が 10°C 台の前半まで低下したことから、NRDc が体温恒常性維持に必須であることが明らかになった。

今回我々は、常温（24°C）および温度中性域（体温維持に基礎代謝以外のエネルギーを必要としない温度帯、マウスでは 30°C 前後）における野生型および NRDc^{-/-}の酸素消費量測定を行い、以下の知見を得た。

1) 常温で NRDc^{-/-}の酸素消費量は亢進しており、β3 アゴニスト投与による熱産生のさらなる亢進は認めないこと、

2) 野生型、NRDc^{-/-}ともに温度中性域で酸素消費量は大きく減少するが、依然 NRDc^{-/-}で有意に亢進している

こと、

3) 温度中性域で NRDc^{-/-}の β3 アゴニストに対する反応性は回復するが、体温は常温時と変わらず野生型より 1.5°C 低いこと。

以上から、NRDc^{-/-}においては BAT での熱産生が一次的に亢進しているだけでなく、常温での熱放散亢進を補償するため BAT 熱産生がさらに亢進していることが示唆された。このため常温で BAT 熱産生はピークに達しており、これが低温不耐性の原因と考えられた。また、温度中性域で β3 アゴニストに対する反応性が回復するにもかかわらず体温が上昇しなかったことから、NRDc^{-/-}では体温セットポイントが低下している可能性が示唆された。一方培養細胞の系で、NRDc が PGC1α の転写コアクチベーター活性抑制を介して UCP1 発現を調節することを明らかにした。

以上から NRDc は、中枢神経系（体温セットポイント設定）、末梢循環系あるいは皮膚（熱放散）、BAT（熱産生）での独立した機能を介して、体温恒常性を制御していることが明らかになった。

(19) 非活動期の体温のウルトラディアンリズムと睡眠覚醒リズムの同期とその生理学的意義

佐藤暢夫^{1,2}, 丸井朱里², 松田真由美², 尾崎 眞¹, 永島 計^{2,3}

(¹東京女子医科大学大学院医学研究科麻酔科学分野, ²早稲田大学人間科学学術院体温・体液研究室, ³早稲田大学重点領域研究機構応用脳科学研究所)

【目的】哺乳類の体温は日内変動を示し、活動期に上昇し、非活動期に低下する。また、この概日リズム以外

にも、特に非活動期において 2-3 時間の周期的な体温変動が見られウルトラディアンリズムとよばれる。体温と

睡眠のリズムはよく相関することが示唆されているが明らかではない部分も多い。また環境温度や摂食条件は体温のリズムに強い影響を及ぼす外的因子として知られている。今回の研究では、暑熱／寒冷負荷、絶食時の体温や睡眠覚醒リズムを調べることに、2 つのリズムの相互作用を解析することを目的とした。

【方法】8 週令 ICR 雄マウス 7 匹を用いて、イソフルラン、ペントバルビタールナトリウム麻酔下に脳波 (EEG)、筋電図 (EMG)、体温 (Tb) 測定用テレメーター (TL11M2-F20-EET; DSI, St. Paul, MN) を腹腔内に留置し連続測定した。術後、個別ケージに移し、自由摂食、12/12 時間の明暗サイクル (7:00am 明期開始)、27°C の環境で飼育した。その後、自由摂食もしくは絶食下に 27°C、20°C、32°C の環境で 30 時間暴露し、後半 24 時間の 10 分毎の平均 Tb、覚醒時間の割合 (%Wake) を求めた。

【結果】いずれの摂食、環境温度条件でも暗期に Tb が上昇し、明期に Tb が低下する二相性の体温変化を示した。また、明期の Tb には 2-3 時間周期のウルトラディアンリズムが認められた。明期において Tb は自由摂食群、絶食群とも 20°C、27°C と比較して 32°C で有意に Tb が上昇していた ($p<0.05$)。同じ環境温度条件下では絶

食時は自由摂食時に比べて明期暗期とも有意に Tb が低下していた ($p<0.05$)。明期において、いずれの条件でも %Wake の増加に合わせて Tb が上昇し、%Wake の減少に合わせて Tb が低下していた。すべての条件で Tb 上昇時に 10 分前の %Wake との相関係数が最も高値となった。Tb 下降時は 27°C 自由摂食、20°C 絶食、32°C 自由摂食、絶食で 10 分前、27°C 絶食、20°C 自由摂食で 20 分前の %Wake との相関係数が最も高値となった。

【考察】いずれの環境温度でも自由摂食時よりも絶食時で Tb が有意に低下したが、概日リズムはよく保たれていた。また、明期暗期の各相の平均 Tb の差が自由摂食時、絶食時ともに環境温度で変化していたことから、Tb の概日リズムは摂食条件よりも環境温度に影響を受ける可能性が示唆された。明期 Tb のウルトラディアンリズムは自由摂食、27°C の環境では 10 分毎の bin の 1 つ前の覚醒時間との強い相関が見られたことから、睡眠からの覚醒により生じたものであると考えられた。しかし、環境温度の低下や絶食条件では相関関係が変化することから各々のリズムが解離してしまう可能性を示唆している。

(20) 雌ラットにおけるエストロゲンの心拍、動脈圧日内リズムへの影響

丸井朱里, 綱川みずき, 小幡千紗, 松下はるか, 松田真由美, 永島 計
(早稲田大学人間科学学術院体温・体液研究室)

1.はじめに

エストロゲンの心血管系に与える影響が注目されており、心臓のアドレナリン β 受容体の関与が報告されている。本研究では、エストロゲンの動脈圧日内リズムに対する影響を調べ、同時に心拍数日内リズムとの関係を調べることを目的にした。また血漿ノルアドレナリン濃度を調べ、エストロゲンが交感神経に及ぼす影響を推察した。

2.実験方法

7 週齢の成熟メスラットを用い、環境温 27°C、12/12h の明暗サイクル (7:00am より明期)、自由摂食飲水の条件下で飼育した。イソフルラン吸入麻酔下に、後腹膜腔より両側卵巢摘出を行った後、2 本のシリコンチューブ (カネカメディックス; 長さ、3 cm; 内径、1.57 mm; OVX

群)、もしくはエストラジオール (E_2 ; シグマアルドリッチジャパン; 50.6 mg) 含有シリコンチューブ (OVX- E_2 群) を皮下に留置した。腹腔内に体温、活動量、心電図、動脈圧測定用ラジオテレメーター (Data Sciences International, TL11M2-C50-PXT) を留置した。10 日の回復後、イソフルラン吸入麻酔下にシリコンチューブを取り出した。体温、活動量、心電図、動脈圧測定は初回の手術後 24 日間行った。チューブ取り出し 1 日前、取り出し 7 日後、取り出し 21 日後にイソフルラン吸入麻酔下に心腔穿刺を行い、各々 1 ml の血液を採取し遠心、血漿を採取し -80°C で凍結保存した。血漿ノルアドレナリン濃度と血漿エストロゲン濃度を ELISA (ノルアドレナリン濃度, LDN, Noradrenaline Research ELISA; エストロゲン濃度, Cayman Chemical Company, Estradiol EIA Kit) にて

測定した。

3.結果

平均動脈圧は OVX 群が OVX-E₂ 群に比べてチューブ取り出し 1 日前, 取り出し 7 日後, 14 日後において高値であった。一方, OVX-E₂ 群において E₂ 含有チューブを除去後, OVX—OVX-E₂ 群間の平均動脈圧の差に変化は見られなかった。血漿ノルアドレナリン濃度はチューブ取り出し 1 日前において OVX 群が OVX-E₂ 群に比べて有意に高かった ($P<0.05$)。OVX-E₂ 群では E₂ 含有チューブを除去すると血漿ノルアドレナリン濃度は増加した ($P<0.05$)。血漿エストロゲン濃度はチューブ取り出し 1 日前において OVX-E₂ 群が OVX 群に比べて有意に高かった ($P<0.01$)。OVX-E₂ 群では E₂ 含有チューブを除去

すると, 取り出し 7 日後, 取り出し 21 日後において血漿エストロゲン濃度は OVX—OVX-E₂ 群間で差が見られなくなった。

4.考察

メスラットにおいて血漿エストロゲンが低下すると平均動脈圧が上昇することが示唆された。またエストロゲン欠乏により血漿ノルアドレナリン濃度が上昇した。しかしエストロゲン補充の中断後, 血漿エストロゲン濃度が低下し, 血漿ノルアドレナリン濃度が増加しているにも関わらず平均動脈圧に変化が見られなかったことから, 交感神経性の作用以外にもエストロゲン欠乏によって平均動脈圧が上昇する機序があると予想された。

(21) タミフルの体温低下作用 —交感神経節遮断の可能性—

小野秀樹¹, 岩嶋優依², 茶菌かおり², 山本昇平², 大澤匡弘², 福島章紘¹

(¹武蔵野大学薬学部, ²名古屋市立大学大学院薬学研究科)

抗インフルエンザウイルス薬であるタミフルは, プロドラッグであり, カルボキシルエステラーゼにより抗ウイルス作用のある活性体に代謝される。インフルエンザ患者において, タミフル服用後の体温低下が著明であり, 低体温の副作用もある。

我々はタミフルがインフルエンザに感染していないマウスの正常体温を著明に低下することを報告している (2008)。タミフルをマウス脳室内に微量投与しても著明に体温を低下することから, タミフルは脳へ移行して中枢性に体温を低下すると予想してきた。一方, タミフルの我々の未発表の薬理作用や既知の有害事象がニコチン受容体作動性に働き, 中枢性に体温を低下するのではないかと考えてきた。しかし, タミフル活性体には作用はないが, 未変化体は予想と反対に, 交感神経節のニコチン受容体機能を遮断して, 褐色脂肪組織での熱産生を抑制して体温を低下することを示唆する結果を得ている (2013)。

本発表においては, タミフルの化学構造がエステル型の局所麻酔薬と類似していること, さらに局所麻酔薬は知覚神経の伝導遮断よりも低濃度で交感神経系を抑制することから, 数種局所麻酔薬の体温低下作用を検討した。さらにニコチン受容体チャネル内部のテトラカインサイトに結合する禁煙補助薬ブプロピオンが体温を低下することから, 皮下投与のプロカイン, ブプロピオン, タミフル未変化体について, 腹腔内投与ニコチンの中枢性の体温低下作用への拮抗作用などを比較した。中枢移行性が高いプロカインとブプロピオンは体温低下作用のない低用量においてニコチンの作用を抑制し, これらもニコチン受容体を介する作用と拮抗することが示された。さらに, 未変化体は脊髄ラットの動脈血圧測定実験において, 神経節を刺激するニコチンの昇圧作用を抑制した。

以上, タミフル未変化体が視床下部—縫線核—脊髄—交感神経—褐色脂肪組織の熱産生経路における交感神経節での神経伝達を遮断して体温を低下することが示唆された。

(22) ハムスターの冬眠時体温調節機構 ―覚醒期の体温上昇機構―

田村 豊, 門田麻由子 (福山大学薬学部薬理学研究室)

【研究の背景・経緯】

シリアン・ハムスター (以下, ハムスター) は, 寒冷環境下短日周期で飼育すると冬眠行動を誘発する。ハムスターの冬眠は体温変化により 3 期に分類できる。すわなち, 体温が下降していく導入期, 6°C の低体温が持続する維持期, および体温が上昇していく覚醒期の 3 期である。当研究室では, 冬眠時のハムスターの体温を制御する中枢神経機構の解明を試みている。

これまでの研究により, 導入期の体温下降は A_1 受容体を介するアデノシン系, 維持期の低体温は μ_1 受容体受容体を介するオピオイドペプチド系, および体温が上昇する覚醒期は type-1 受容体を介する thyrotropin-releasing hormone (TRH) により制御されていることを明らかにしている。近年, TRH の生理作用発現にオレキシンが関与することが報告されている。オレキシンは摂食を制御するだけでなく覚醒維持に重要な役割を果たすことが知られている。そこで本研究では, 覚醒期のメカニズムを TRH とオレキシンを中心に検討した。

【実験方法】

実験には自家交配により得られた体重 100g~120g のハムスターを用いた。ハムスターの冬眠は, 環境温度 5°C, 明期 8 時間, 暗期 16 時間で飼育することにより誘発させた。ハムスターの体温はテレメトリーシステムにより, 非拘束下で連続記録した。また, 薬物は予め植え込んでおいたガイドカニューレを介して側脳室内に投与した。

【結果・考察】

冬眠ハムスターにオレキシンを投与すると体温が上昇しハムスターは覚醒した。しかしながら, 非冬眠ハムスターにオレキシンを投与しても体温変化は認められなかった。一方, 非冬眠ハムスターに TRH を投与すると体温が上昇した。この TRH による体温上昇はオレキシン 1 (OX1) 受容体拮抗薬の併用により有意に抑制された。さらに, TRH 投与による冬眠からの覚醒は, オレキシンの抗血清を前投与することにより抑制された。

以上の結果は, TRH はオレキシン神経系を介して覚醒期の体温上昇を惹起していることを示唆する。

17. 細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会

2013年11月28日－11月29日

代表・世話人：重村憲徳（九州大学大学院 歯学研究院 口腔機能解析学分野）

所内対応者：古江秀昌（生理学研究所 生体情報研究系）

- (1) コモンマーモセット盲腸における味覚情報伝達分子の発現
今井啓雄（京都大学霊長類研究所 分子生理部門 遺伝子情報分野）
- (2) 脊椎動物の季節感知機構
吉村 崇（名古屋大学 トランスフォーメティブ生命分子研究所）
- (3) CALHM1 イオンチャネルを介した味蕾における甘味・苦味・旨味の神経伝達機構の解明
樽野陽幸（京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞生理学部門）
J Kevin Foskett（ペンシルバニア大学医学部 生理学部門）
- (4) ゼブラフィッシュ嗅球における匂い地図の包括的解析
小出哲也（理化学研究所 脳科学総合研究センター）
- (5) 脳内 Na センサーと体液調節
檜山武史（基礎生物学研究所 統合神経生物学研究部門）
- (6) ゼブラフィッシュ捕食行動をモデルとした視覚認知過程の可視化
武藤 彩（国立遺伝学研究所 初期発生研究部門）
- (7) 糖尿病発症過程におけるグルコーストランスポーターの異常
大坪和明¹，高松真二²，高 叢笑³，是金宏昭³，谷口直之³
(¹熊本大学大学院 生命科学研究部，²大阪大学大学院 医学系研究科
³理化学研究所 グローバル研究クラスター)
- (8) アミノ酸トランスポーターと細胞内アミノ酸シグナリング
永森収志，金井好克（大阪大学大学院 医学系研究科 生体システム薬理学）
- (9) エネルギー代謝制御における TRPV1 の食品成分センサー機能について
後藤 剛，金 珉智，高橋信之，河田照雄（京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻）
- (10) AMPK による食物嗜好性の調節機構
岡本土毅（生理学研究所 発達生理学研究室）
- (11) 代謝情報制御における転写調節因子の機能について
亀井康富（京都府立大学 生命環境科学研究科 分子栄養学研究室）
- (12) 脂肪細胞の栄養因子センサーについて
田中智洋^{1,2}，伊村明浩¹，鍋島陽一¹
(¹公益財団法人 先端医療振興財団 先端医療センター 医薬品開発研究グループ，
²京都大学大学院 医学研究科 メディカルイノベーションセンター)
- (13) ナトリウム依存性リン酸トランスポーターがかかわる生体内リン感受機構
瀬川博子（徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 分子栄養学分野）
- (14) 尿酸排出トランスポーターABCG2 と高尿酸血症・痛風について
高田龍平（東京大学 医学部附属病院 薬剤部）
- (15) 新世界ザルにおける苦味受容体 TAS2R4 のリガンド感受性の種間差
筒井 圭（京都大学 霊長類研究所 遺伝子情報分野）
- (16) ステレオトロード法によるラット鼓索神経の単一線維味覚応答の同時記録

峯積博之 (東京薬科大学 生命科学部 脳神経機能学研究)

(17) PGC1 α 骨格筋特異的遺伝子改変マウスにおけるロイシンの骨格筋同化シグナル

吉村亮二¹, 佐藤沙耶¹, 南貴美子¹, 三浦進司², 亀井康富³

(¹京都府立大学 生命環境科学研究科, ²静岡県立大学 食品栄養科学部

³京都府立大学 生命環境科学研究科)

(18) 転写共役因子 PGC-1 α による骨格筋分岐鎖アミノ酸代謝制御

畑澤幸乃^{1,2}, 只石 幹³, 小川佳宏¹, 北浦靖之⁴, 下村吉治⁴, 亀井康富², 三浦進司⁵

(¹東京医科歯科大学, ²京都府立大学, ³国立健康栄養研究所, ⁴名古屋大学, ⁵静岡県立大学)

(19) ラット鼓索神経における塩味表現様式のステレオトロード法による解析

菅野菜月 (東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 脳神経機能学研究室)

(20) マウスの舌スライス標本を用いた味細胞の高速膜電位イメージング

土岡由季 (東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 脳神経機能学研究室)

(21) ヒトとニホンザルにおけるスクロースとスクラロースへの感受性の違い

西栄美子, 筒井 圭, 今井啓雄 (京都大学霊長類研究所 分子生理部門 遺伝子情報分野)

(22) アミノ酸トランスポーターLAT1 の血管内皮細胞チューブ形成への関与

原 早織, 大垣隆一, Printip Wongthai, 中込咲綾, 永森收志, 金井好克

(大阪大学大学院 医学系研究科 生体システム薬理学)

(23) 乳酸菌由来脂肪酸代謝物が糖・脂質代謝異常の改善に与える影響

山國加成衣, 金 英一, 金 珉智, 後藤 剛, 高橋信之, 河田照雄 (京都大学大学院 農学研究科)

【参加者名】

重村憲徳, 吉田竜介 (九州大学大学院歯学研究院), 今井啓雄, 伊藤聡美, 筒井 圭, 西栄美子 (京都大学霊長類研究所), 吉村 崇 (名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所), 樽野陽幸 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学部門), 小出哲也 (理化学研究所脳科学総合研究センター), 檜山武史 (基礎生物学研究所統合神経生物学研究部門), 武藤 彩 (国立遺伝学研究所初期発生研究部門), 大坪和明 (熊本大学大学院生命科学研究部), 永森收志, 原 早織 (大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学), 後藤 剛, 金 珉智, 高橋信之, 山國加成衣 (京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻), 岡本土毅 (生理学研究所発達生理学研究系), 亀井康富, 吉村亮二, 畑澤幸乃 (京都府立大学生命環境科学研究科分子栄養学研究室), 田中智洋 (先端医療振興財団)

先端医療センター医薬品開発研究グループ・京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター), 瀬川博子 (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学分野), 高田龍平 (東京大学医学部附属病院薬剤部), 峯積博之, 菅野菜月, 土岡由季 (東京薬科大学生命科学部分子生命科学科脳神経機能学研究室), 久光 隆 (国立循環器病研究センター), 丸山 豊, 犀川和佳奈 (味の素), 岩槻 健 (東京大学分子細胞生物学研究所), 片川吉尚 (朝日大学歯学部), 宇野茂之 (日本大学医学部), 乾 賢 (大阪大学人間科学研究科), 服部義人 (東京薬科大学生命科学部), 加塩麻紀子 (生理学研究所細胞器官研究系), 古江秀昌, 歌 大介, 秋元 望, 古賀啓祐 (生理学研究所生体情報研究系)

【概要】

センサー分子の機能解析に関する最新の成果の発表に加えて, トランスポーターとセンサー機能の連関, および代謝変化をもたらすセンシング機構に関する発表が行われた。セッション 1 (五感センサー) では, これまで不明であった味蕾細胞での ATP 放出チャンネルが

CALHM1 電位依存性チャンネルであること, ゼブラフィッシュをモデルとして包括的な解析により臭球における匂い地図が初めて作製されたこと, 中枢 Na イオンセンサー分子である Nax がエンドセリン-3 により調節されて生理的 Na イオン濃度に応答可能になること, ゼブラフィッ

シュの補食行動における視覚認知過程をリアルタイムで可視化することに成功したことが報告された。セッション 2 (トランスポーター) では、グルコースセンサーとして機能する GLUT の糖転移酵素 GnT-Iva の活性低下が糖尿病発症に深く関与していること、アミノ酸トランスポーター LAT1 がガン細胞における細胞外アミノ酸濃度のセンサーとして機能していること、リン酸トランスポーターの機能解析から Ca イオンとは独立したリン酸センシング機構の存在が示唆されること、ABCG2 が新規尿酸トランスポーターとして機能して痛風発症リスクと深く関係していることが紹介された。セッション 3 (代謝センサー) では、TRPV1 が魚油含有高度不飽和脂肪酸のセンサーとして機能して生体のエネルギー代謝バランスを調節していること、エネルギー状態をセンシングする AMP キナーゼの中枢神経細胞での活性化が食物指向性を変化

させること、FOXO1 や PGC1 といった転写調節共役因子がエネルギー代謝のセンサーとして機能して代謝制御に関与していること、脂肪細胞における NaK-ATPase の活性を制御して細胞機能を制御する栄養因子センサーの存在が示唆されることが発表された。さらに、特別講演としてサル盲腸に発現する甘味受容体と魚類の光受容性季節センサーの生理機能に関する講演がそれぞれ行われた。また大学院生を含む若手研究者の発表の場として、ポスター発表とその演者による口頭発表 (ポスタートーク) があり、若手研究者の発表について活発なディスカッションが行われた。センサー分子に関する研究だけでなく、その周辺領域に関わる若手研究者が集まり、貴重な情報交換の場としても盛況であったことから、次年度開催の要望が多く出された。

(1) コモンマーモセット盲腸における味覚情報伝達分子の発現

今井啓雄 (京都大学霊長類研究所 分子生理部門 遺伝子情報分野)

京都大学霊長類研究所では、実験動物個体の有効利用を図るため、他の実験等に用いられる動物個体でも解剖等の際に「多重利用」として資試料を保存している。現在、分子生物学用の試料としては 14 種、123 個体、1700 サンプルが DNA, RNA やタンパク質の抽出用に保存され、共同利用・共同研究等に供されている。

近年、味覚受容体が舌以外の消化管やその他臓器等に発現していることが報告されている。そこで我々は、ニホンザルや南米原産のコモンマーモセット等、非ヒト霊長類を対象に、RT-qPCR 法を用いて味覚情報伝達に関わる gustducin と TRPM5、および各種味覚受容体などがどの臓器に存在するかスクリーニングした。その結果、これらの mRNA が、コモンマーモセットで特異的に盲腸や

大腸などで、舌と同量もしくはそれ以上に発現していることが確認された。また、免疫組織染色法を用いて、これらのタンパク質が存在している細胞の特定を試みた結果、特徴的な細胞に陽性シグナルが観察された。 α -gustducin といくつかの味覚受容体が共存していることから、これらの細胞では味覚受容と同様に、腸内の低分子または腸内細菌の表面分子等を受容することが示唆された。マーモセット類は樹液等を摂取して盲腸や大腸で発酵していることが報告されているため、そのような採食生態と関連があるかも知れない。

Gonda S, Matsumura S, Saito S, Go Y, Imai H. (2013) Expression of taste signal transduction molecules in the caecum of common marmosets. *Biology Letters* 9: 20130409

(2) 脊椎動物の季節感知機構

吉村 崇 (名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所)

熱帯以外の地域に生息する多くの動物は、餌が豊富で

温暖な時期に子孫が成長できるように季節繁殖する。な

かでも鳥類は空を飛ぶため、生殖腺の大きさを劇的に変化させるなど、特に洗練された季節適応能力を持つ。ウズラを使った研究から、長日刺激が下垂体隆起葉において甲状腺刺激ホルモン(TSH)の分泌を促すことが明らかになった。さらにこのTSHは視床下部内側基底部(MBH)に作用し、甲状腺ホルモン活性化酵素(DIO2)の発現を誘導した。DIO2によって長日条件下で局所的に活性化された甲状腺ホルモンは性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロンとグリア細胞の形態変化をもたらし、GnRHの季節性分泌を制御していると考えられた。TSHは従来、下垂体前葉から分泌され、甲状腺に作用するホ

ルモンとして知られていたが、下垂体隆起葉で産生され脳に作用する場合は「春告げホルモン」という全く異なる機能を持つことが明らかになった。魚類も季節繁殖し、甲状腺ホルモンが関与することが知られていたが、解剖学的に下垂体隆起葉は存在しない。最近サクラマスを用いて、下垂体隆起葉に代わる季節繁殖の中枢を探索し、魚類に特有の器官である血管嚢が季節センサーとして機能していることを示した。本講演では脊椎動物の季節繁殖の制御機構の進化について考察するとともに、比較生物学的アプローチの有効性について紹介したい。

(3) CALHM1 イオンチャネルを介した味蕾における甘味・苦味・旨味の神経伝達機構の解明

樽野陽幸 (京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞生理学部門)

J Kevin Foskett (ペンシルバニア大学医学部 生理学部門)

多くの哺乳類は5基本味(甘味, 苦味, 塩味, 酸味, うま味)を舌に存在する味覚受容器官である味蕾によって認識する。このうち, 甘味, 苦味, 旨味については, 味物質により興奮した味蕾細胞が神経伝達物質であるATPを非小胞性に放出し, 求心性味神経へと味情報を伝達していることが知られている。しかしこれまで, 味覚情報を舌から脳へと伝達するしくみである味細胞からのATPの放出機構の分子実体は不明であった。今回筆者らは, 近年発見された電位依存性イオンチャネル Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) が, 味蕾における甘味, 苦味, 旨味受容細胞からのATPの放出に必須のタンパク質であることを発見したので報告する。

CALHM1 ノックアウトマウスにおいて, 野生型マウスで観察される甘味, 苦味, 旨味に対する味神経応答および嗜好性の著しい低下がみられた一方, 塩味および酸味に対する応答にほとんど変化はなかった。このことに合致して, CALHM1 は味蕾において甘味, 苦味, 旨味受容細胞に特異的に発現していた。また, 培養細胞にCALHM1を発現させると形質膜にATP透過性が付与され, さらに, CALHM1 ノックアウトマウスの味蕾において味刺激によるATP放出が消失した。

以上の結果から, CALHM1 は甘味, 苦味, 旨味の受容に必須の新規電位依存性ATP透過性イオンチャネルであると結論づけた。

(4) ゼブラフィッシュ嗅球における匂い地図の包括的解析

小出哲也 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

嗅覚は物体や個体から発せられる化学物質を受容し, その情報を鼻から脳へ伝えることによって, 食べ物や繁殖相手の探索, 危険や捕食者からの回避といった生存に欠かせない生得的行動を駆動する。匂いの情報は, まず嗅球上に, 糸球体の活性化パターン, すなわち「匂い地図」として提示される。しかしながら, 脊椎動物の嗅球

における匂い地図の包括的解析はなされていない。そこで我々は, ゼブラフィッシュをモデルとして, カルシウムセンサー GCaMP と MAPK のリン酸化を指標とした神経活動マッピングを行い, 嗅球における匂い地図の包括的解析に取り組んできた。その結果, 魚類にとっての匂い分子であるアミノ酸, ヌクレオチド, 胆汁酸に加え,

我々はアミン類が特異的に活性化する糸球体群を同定した。興味深いことに、モノアミン神経伝達物質であるドーパミン、アドレナリン、セロトニン、ヒスタミンも匂い分子として特定の糸球体を活性化する。さらに、ゼブラフィッシュのフェロモン候補分子、プロスタグランジン

F2 α (性フェロモン)、皮膚抽出物 (警報フェロモン) が活性化する糸球体も見出した。本研究では、匂い地図の包括的解析から見えてきた匂いの入力から行動出力に至る嗅覚神経回路の仕組みについて紹介する。

(5) 脳内 Na センサーと体液調節

檜山武史 (基礎生物学研究所 統合神経生物学研究部門)

体液 (血液及び脳脊髄液) のナトリウム (Na) 濃度は常に脳で監視されており、水分や塩分の摂取及び排出の制御を通じて 135~145 mM に厳密に維持されている。たとえば、長時間の脱水によって体液の Na 濃度が上昇すると、喉の渇きをおぼえ、水分を補給するとともに塩分を回避しようとする。我々の研究から、こうした摂食行動制御の中枢が感覚性脳室周囲器官の 1 つである脳弓下器官 (SFO) に存在すること、そのセンサー分子の実体が SFO のグリア細胞に発現する Na チャネル Na_x であること、体液 Na 濃度の情報が乳酸を介してグリア細胞か

らニューロンへ伝達されることなどが明らかになってきた。しかし、Na_x は体外 (*in vitro*) では約 150 mM を超えなければ活性化せず、生体内には Na_x の活性化閾値を調節する何らかの制御機構が存在するものと推定された。

最近、Na_x の活性化閾値が SFO において局所的に産生されるエンドセリン-3 によって調節され、それによって 135~145 mM の範囲の Na 濃度に応答可能となる調節機構が存在することを明らかにした。

文献: Hiyyama TY *et al.*, *Cell Metabol.* 17, 507-519, 2013

(6) ゼブラフィッシュ捕食行動をモデルとした視覚認知過程の可視化

武藤 彩 (国立遺伝学研究所 初期発生研究部門)

ゼブラフィッシュは昼行性の動物であり、視覚系が良く発達している。捕食行動は視覚依存的な行動であることから、餌などの視覚情報の入力から捕獲行動という運動出力に至るまでの神経プロセスを研究するための良い系になる。我々は捕獲行動における視覚認知の神経プロセスを、主として機能的神経回路の可視化により明らかにすることを目指している。神経活動は、膜電位変化に伴うカルシウム (Ca) イオンの流入を蛍光プローブを用いることでイメージングできる。これまでに、タンパク質性 Ca プローブ GCaMP の改良とその遺伝子導入ゼブラ

フィッシュの作製を行い、体や脳がまだ透明で蛍光イメージングに適した稚魚の時期を利用して Ca イメージングを行った。その結果、餌となるゾウリムシを周囲で泳がせたときに、それを視覚的に知覚する際の脳活動を Ca シグナルとして捉えることに成功した。また、捕獲行動の開始と相関する Ca シグナルは中脳視蓋前方に位置したことから、この部位が捕獲行動を司る回路と機能的に結合していることが示唆された。視蓋の神経細胞は方向選択性だけでなく刺激特異性も示し、特定の神経細胞集団の活動が餌の認識に関わると考えられる。

(7) 糖尿病発症過程におけるグルコーストランスポーターの異常

大坪和明¹, 高松真二², 高 叢笑³, 是金宏昭³, 谷口直之³

(¹熊本大学大学院 生命科学研究部, ²大阪大学大学院 医学系研究科,

³理化学研究所 グローバル研究クラス)

近年のライフスタイルの変化に伴い増加する糖尿病の詳細な病態形成メカニズムは解明の途上にある。2 型糖尿病発症過程では膵臓 β 細胞の血糖に応じたインスリン分泌機能が低下し, それと符合して β 細胞表面でグルコースセンサーとして機能するグルコーストランスポーター (GLUT) の発現が障害される。我々は糖転移酵素 GnT-IVa (遺伝子 *Mgat4a*) の欠損マウスの解析から GnT-IVa による GLUT の糖鎖修飾が β 細胞表面での GLUT の発現およびグルコースセンサー機能に不可欠で

あることを明らかにしてきた。実際, ヒト 2 型糖尿病患者や高脂肪食摂取マウス β 細胞では, GnT-IVa の発現が著しく低下し, β 細胞表面における GLUT の発現低下を伴うインスリン分泌機能不全が生じていることを発見した。一方, β 細胞特異的に *MGAT4A* 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスでは高脂肪食負荷による β 細胞機能障害が低減されており, 長期間血糖レベルのコントロールが良好に保持されたことから, GnT-IVa が β 細胞で糖尿病抑制因子として機能することを明らかにした。

(8) アミノ酸トランスポーターと細胞内アミノ酸シグナリング

永森収志, 金井好克 (大阪大学大学院 医学系研究科 生体システム薬理学)

アミノ酸はタンパク質の部品としてだけではなく, 生体反応を制御するシグナルとして重要である。なかでもロイシン (Leu) は, mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナル系を発動し, 多彩な代謝制御に関わっている。細胞外のアミノ酸情報 (Leu 濃度情報) を細胞内の mTOR 系に伝える細胞膜受容体は明らかになっていないことから, アミノ酸トランスポーターがアミノ酸シグナルを媒介する膜タンパク質であると考えられている。がん細胞では, アミノ酸トランスポーター-LAT1 (L-type amino acid transporter 1) が高発現し, その抑制は mTOR 系の遮断と細胞増殖抑制に繋がることから, がん細胞株をモデル細

胞として, アミノ酸シグナリングへのトランスポーターの寄与について検討した。複数のがん細胞株に対して定量プロテオミクス及び輸送機能解析を行ったところ, LAT1 はすべての細胞株に発現し, かつ Leu 輸送の主要な経路であることが示された。さらに, LAT1 によって取り込まれた Leu に対する細胞応答の全貌を明らかにするため, LAT1 阻害薬存在下/非存在下でリン酸化プロテオーム解析を行い, 発動されるシグナル系と制御される代謝系を明らかにした。本研究は, アミノ酸シグナリングにおける LAT1 の役割とともに, トランスポーターを介するシグナル機構の解析手法を提示する。

(9) エネルギー代謝制御における TRPV1 の食品成分センサー機能について

後藤 剛, 金 珉智, 高橋信之, 河田照雄 (京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻)

魚油中に多く含まれる EPA (eicosapentaenoic acid) や DHA (docosahexaenoic acid) に代表される n-3 系多価不飽和脂肪酸は, 肥満に伴う代謝異常症に対して有用であることが報告されているが, その詳細な作用機序には未解

明な部分が多い。本研究では, 魚油が肥満に伴う代謝異常症に与える影響について詳細な検討を行った。

EPA および DHA それぞれを高含有する魚油を含む高脂肪食をマウス (C57BL/6J, ♂) に 10 週間摂取させたと

ころ、体脂肪の蓄積抑制が認められ、糖・脂質代謝異常の改善が認められた。魚油摂取は酸素消費量を増大させており、その一因として、肩甲骨間褐色脂肪組織および鼠径部白色脂肪組織における脱共役たん白質 1 (UCP1) の発現上昇が関与しているものと考えられた。UCP1 の発現上昇の要因について検討したところ、魚油摂取マウスにおいて尿中カテコールアミン量が上昇しており、交感神経活動の亢進が示唆された。魚油による交感神経活性化の要因として、カプサイシン受容体である TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V

member 1) の関与を検討したところ、DHA や EPA 添加によって TRPV1 が活性化されることが示唆された。そこで、TRPV1 欠損マウスを用いて魚油の摂食実験を行ったところ、TRPV1 欠損により、魚油による交感神経活性化や UCP1 発現誘導などの作用が消失することが明らかとなった。

以上の結果から、魚油摂取時の交感神経活性化を介した体脂肪蓄積抑制作用には TRPV1 が関与することが示唆され、TRPV1 が食餌由来の脂肪酸センサーとして機能することが推察された。

(10) AMPK による食物嗜好性の調節機構

岡本土毅 (生理学研究所 発達生理学研究室 生殖・内分泌系発達機構研究部門)

AMP キナーゼ (AMPK) は、酵母から植物、哺乳動物に至るほとんど全ての真核細胞に発現するセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞内エネルギーレベルの低下によって活性化し、細胞の ATP レベルを回復させる。また視床下部 AMPK 活性は摂食に調節を及ぼす。私はマウス視床下部室傍核 (PVH) にレンチウイルスを用いて活性型 AMPK を発現させると、高脂肪食ではなく炭水化物食への嗜好性が高まる事を見出した。そしてこの食餌嗜好性の調節には PVH における脂肪酸酸化の上昇が関わる事を明らかにした。マウスを 1 日絶食させると PVH での AMPK 活性が高まり、脂肪酸酸化が亢進するとともに炭水化物食を多く摂取した。さらに AMPK または CRH に

対する shRNA を PVH に発現させると、絶食による食物嗜好性への効果が消失した。この結果から PVH に含まれる CRH ニューロンが AMPK-脂肪酸酸化調節機構を介して炭水化物嗜好性を制御しており、絶食による代謝変化の早期正常化に寄与すると考えられる。

一方、KKAy 肥満マウスや高脂肪食負荷肥満マウスでは、PVH での AMPK 活性、脂肪酸酸化が低下し、CRH mRNA レベルも減少しており、高脂肪食に対する嗜好性が亢進していた。肥満マウスでは PVH 内の CRH ニューロンにおいて AMPK を介する脂肪酸酸化調節機構に異常を来し、高脂肪食に対する食餌嗜好性が高まると考えられる。

(11) 代謝情報制御における転写調節因子の機能について

亀井康富 (京都府立大学 生命環境科学研究科 分子栄養学研究室)

Forkhead protein-O1 (FOXO1) はフォークヘッド型の転写因子であり、生体代謝の同化ホルモンであるインスリンシグナルに拮抗する。我々は、エネルギー欠乏により骨格筋における FOXO1 の遺伝子発現が増加することを踏まえ、FOXO1 を骨格筋特異的に過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、FOXO1 が骨格筋萎縮を引き起こすことを示した。また、脂質合成および糖取り込み増加が FOXO1 によって抑制される事を見出した。さらに、タ

ンパク質分解酵素遺伝子が FOXO1 によって転写活性化されることを示した。この結果は、FOXO1 が骨格筋でのエネルギー欠乏への適応 (糖利用の抑制、タンパク質分解促進) のセンサー分子である事を示唆する。

FOXO1 のみならず、転写共役因子 PPAR γ co-activator 1 α (PGC1 α) は、骨格筋代謝および骨格筋量の維持に重要であることが示唆される。我々は、PGC1 α が骨格筋のミトコンドリア増加とエネルギー代謝 (脂肪酸 β 酸化)

亢進を引き起こすことを見出した。さらに、PGC1 α の過剰発現により、筋萎縮が抑制される事が報告されている。本研究ではFOXO1およびPGC1 α を骨格筋アミノ酸代謝

の主要制御因子と想定し、その分子機序を明らかにするとともにFOXO1とPGC1 α が骨格筋量を調節する作用機序についての検討結果を紹介する。

(12) 脂肪細胞の栄養因子センサーについて

田中智洋^{1,2}, 伊村明浩¹, 鍋島陽一¹

(¹公益財団法人 先端医療振興財団 先端医療センター 医薬品開発研究グループ,

²京都大学大学院 医学研究科 メディカルイノベーションセンター)

脂肪細胞はエネルギー貯蔵庫であると同時に、栄養状態のセンサーとして働き、アディポカインの分泌や自律神経求心路を介して栄養情報を中枢へ伝達すると考えられている。しかし、脂肪細胞における栄養状態のセンシング機構や分子実体は必ずしも明らかではない。

Na, K-ATPase (NaK) はあらゆる哺乳類細胞に発現し細胞膜内外の電気化学勾配を維持する、細胞生存に必須の分子である。近年、NaKが細胞特異的な刺激応答性活性変化を示し、housekeeperとしての役割を超えた動的機能を有する可能性が示されている。我々は、副甲状腺細胞からの低Ca応答性ホルモン分泌にNaKの膜移行が関与することを示した (Imura et al. Science, 2007)。3T3-L1

成熟脂肪細胞に50種以上の栄養物質やホルモンを急性(8分間)添加し、後半4分間のNaK活性(Ouabain感受性86Rb取込み)を検討した。ほとんどの物質がNaK活性に影響を及ぼさない中、アミノ酸による活性促進と脂肪酸による活性抑制が明らかとなった。特にアミノ酸作用は血漿中の生理的濃度域において観察され、d体では認めないこと、未分化な3T3-L1線維芽細胞でも生じないことから、何らかの生理応答を反映する可能性が示唆される。現在、これら栄養因子によるNaK活性変化の下流で制御される既知、未知の脂肪細胞機能の探索に取り組んでいる。

(13) ナトリウム依存性リン酸トランスポーターがかかわる生体内リン感受機構

瀬川博子 (徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 分子栄養学分野)

リンは骨の重要な構成要素であるだけでなく、細胞内でATPなどの高エネルギーリン酸化合物の構成成分としてエネルギー代謝の維持に必須の役割を演じている。また細胞膜のリン脂質を構成し、細胞膜機能の維持のうえでも重要な役割を果たしている。多くの生理機能を担うリンの生体内バランスは厳密にコントロールされており、この恒常性の破綻は生命の危険をも招く。これまでリン代謝調節は副甲状腺ホルモン(PTH)、ビタミンD、カルシトニンなどカルシウム調節ホルモンの付随的な作用として行われていると考えられてきた。しかしながら近年、新規リン代謝調節因子(FGF23, PHEX, Klotho,

FRP4)などの関与が明らかとなりリン代謝調節機構の複雑さ、カルシウムとは独立した調節系の存在やリン感受機構の存在が考えられている。我々は、上記の調節因子と生体内リン濃度の調節に重要な役割を果たしている腸及び腎リン酸トランスポーター分子(NaPi2a-2c/SLC341-3)についてモデル動物等を用いて検討し、様々な報告を行ってきた。特に、SLC34A3はヒトにおいてその遺伝子変異により遺伝性低リン血症を引き起こすリン酸トランスポーターである。本講演にて、ナトリウム依存性リン酸トランスポーターがかかわる生体内リン感受機構について概説する。

(14) 尿酸排出トランスポーターABCG2 と高尿酸血症・痛風について

高田龍平（東京大学 医学部附属病院 薬剤部）

痛風や尿路結石の病態発症に深く関与するとともに、動脈硬化症、腎疾患やパーキンソン病などとの関連性にも注目が集まっている尿酸について、トランスポーターによる全身動態制御を中心に、演者らはさまざまな研究を行ってきた。

まず、新規尿酸トランスポーターとして ABCG2/BCRP を見出し、ABCG2 が ATP 依存的に尿酸を細胞外に排出することを *in vitro* 実験により示した。また、日本人に高頻度に見られる ABCG2 遺伝子の機能半減型遺伝子多型（Q141K）・機能欠損型遺伝子多型（Q126X）を持つヒトは血清尿酸値が高値であること、両多型の組み合わせにより見積もられる ABCG2 機能が低い人ほど痛風発症リスクが高いことを、ヒト血液検体を用いた解析により

見出した¹⁾。

つづいて、ABCG2 が消化管から糞中への尿酸排出を担い、ABCG2 の機能低下による高尿酸血症が腸管への尿酸排泄の低下によることを、*Abcg2* ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験および臨床サンプルを用いた解析により示した。この結果から、ABCG2 の機能低下が新たな病態分類である“腎外排泄低下型”高尿酸血症を引き起こすことが明らかとなり、新たな高尿酸血症の病態分類を提案することができた²⁾。これらの研究成果は個別化医療や予防医学への応用も期待されている。

1) *Science Translational Medicine* (2009)

2) *Nature Communications* (2012)

(15) 新世界ザルにおける苦味受容体 TAS2R4 のリガンド感受性の種間差

筒井 圭（京都大学 霊長類研究所）

苦味受容体（TAS2R）は舌の味蕾に発現し苦味感覚を担う G 蛋白質共役型受容体（GPCR）である。TAS2R はヒトでは約 25 種類が存在し、それぞれがどのような苦味物質を受容するかが明らかになっている。含まれる苦味物質の種類や量は食物によって異なるため、TAS2R の受容特性（どのような苦味物質をどれくらいの感度で受容するか）は動物種間の食性の違いに応じて異なっている可能性が考えられる。しかし、実際にそのような違いが存在するのかはほとんど分かっていない。そこで、近

縁な種間で TAS2R の受容特性が異なっている可能性を検討するため、新世界ザル（マーモセット、オマキザル、ヨザル、クモザル）の TAS2R4 を HEK293T 細胞に発現させ、様々な苦味物質に対する応答をカルシウムイメージングにより比較した。その結果、コルヒチンに対する応答の大きさが種間で異なることが明らかとなった。さらに、種間における感受性の違いをもたらすアミノ酸残基を変異体解析により同定した。

(16) ステレオトロード法によるラット鼓索神経の単一線維味覚応答の同時記録

峯積博之（東京薬科大学 生命科学部 脳神経機能学研究）

味神経の一つである鼓索神経は、口腔内の味物質や温度変化などに応答し活動電位を発生する。味神経の味情報表現様式に関しては未解明な点が多い。これには、単一鼓索神経線維の活動電位を分離することが技術的に

難しく、研究者の手技や主観に大きく依存してきたことにも原因がある。私たちは、中枢神経系で用いられている多電極法の一つであるステレオトロード法を末梢神経系に応用し、問題点を解決しようとした。麻酔下の

ラットの鼓索神経を外科手術によって露出し、1/8 程度に切断した神経線維束をガラス製の支持台に載せ、2本の微小電極を線維束の異なる地点に刺入し、2チャンネル記録した。この記録からオフラインでスパイクソーティングした。8匹の動物から、合計35個の単一神経線維活動(ユニット)を分離抽出した。このうち27個のユニットがいずれかの味刺激に応答し、発火率を上昇さ

せた。100 mM 食塩には15個、500 mM ショ糖には18個のユニットが応答した。味質に対して一種類のみに応答するものと、二種類以上の味刺激に応答するユニットの両者が存在した。この方法では、安定して1時間以上の神経記録ができ、複数の単一線維応答を同時記録できる。味情報の味神経による表現様式の詳細な解明が進むかもしれない。

(17) PGC1 α 骨格筋特異的遺伝子改変マウスにおけるロイシンの骨格筋同化シグナル

吉村亮二¹, 佐藤沙耶¹, 南貴美子¹, 三浦進司², 亀井康富³

(¹京都府立大学 生命環境科学研究科, ²静岡県立大学 食品栄養科学部,

³京都府立大学 生命環境科学研究科)

ロイシンはmTOR経路を活性化し、筋タンパク質合成を促進することが知られている。一方、転写共役因子であるPPAR γ co-activator-1 α (PGC-1 α)の過剰発現により筋萎縮が抑制され、さらにPGC-1 α 1のアイソフォームであるPGC-1 α 4の過剰発現では筋線維が肥大することが報告されている。そこで本研究では、ロイシンによるmTOR経路の活性化の条件を検討し、PGC-1 α 骨格筋特異的遺伝子改変マウスを用いてロイシンによるmTOR経路活性化がPGC-1 α を介するか検討した。絶食状態の

C57BL/6 雄性マウスへロイシン (1.35 mg/10 μ l/g 体重)を胃管により投与した。投与30分後に解剖し、骨格筋を用いてmTORの標的分子である4E-BP1のリン酸化をウェスタンブロット法により検出した。その結果、4E-BP1のリン酸化量はロイシン投与により増加した。このため現在、絶食状態のPGC-1 α 骨格筋特異的遺伝子改変マウスを用いて、ロイシンによる4E-BP1のリン酸化に及ぼす影響を検討中である。

(18) 転写共役因子 PGC-1 α による骨格筋分岐鎖アミノ酸代謝制御

畑澤幸乃^{1,2}, 只石 幹³, 小川佳宏¹, 北浦靖之⁴, 下村吉治⁴, 亀井康富², 三浦進司⁵

(¹東京医科歯科大学, ²京都府立大学, ³国立健康栄養研究所, ⁴名古屋大学, ⁵静岡県立大学)

PGC-1 α はエネルギー代謝に関与し、運動に応答して骨格筋で発現増加することが知られている。我々が以前作製した、骨格筋特異的PGC-1 α 過剰発現マウス(PGC-1 α Tg マウス)は、骨格筋の顕著な赤筋化が生じ、持久運動能力の向上が見られた。このマウスの表現型に関与する遺伝子発現変化を調べるために、マイクロアレイ法を用いて網羅的な解析を行った。その結果、PGC-1 α によって亢進することが知られている脂肪酸代謝などのほか、これまでにPGC-1 α との関連が知られていなかった分岐

鎖アミノ酸(BCAA)代謝関連経路の遺伝子発現増加が認められた。つづいて、PGC-1 α Tg マウスの骨格筋及びPGC-1 α をレトロウイルスで過剰発現させたC2C12筋芽細胞において、Real time PCR法を用いてBCAA代謝酵素の発現が増加していることを確認した。さらに、これらのサンプルにおいてBCAA量が減少していた。骨格筋におけるPGC-1 α はBCAA代謝に役割を果たしているかもしれない。

(19) ラット鼓索神経における塩味表現様式のステレオトロード法による解析

菅野菜月（東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 脳神経機能学研究室）

塩味の受容には上皮性ナトリウムチャネル依存性および非依存性機構の両者が存在する。ナトリウム塩はこの両方を活性化させるが、非依存性機構は不明である。私たちは、ステレオトロード法を鼓索神経記録に適用し、複数の単一線維活動（ユニット）を同時記録し、各種塩味溶液に対する応答性、および上皮性ナトリウムチャネル阻害薬であるアミロライドの効果などを解析することで、塩味が味神経でどのように情報表現されるか探索している。この一例を報告する。麻酔したラットの 1/8 に割断した鼓索神経線維束の異なる地点に 2 本の電極を刺入した。味刺激は、各種呈味溶液を舌前半部を被うチャンパーに 20 秒間流すことで行った。スパイクソー

ティングは、解析ソフトウェアを用いてオフラインで行った。この一例では、一回の神経記録で 4 個の単一ユニットが抽出された。これらのユニットは 45 分の全記録期間で持続的に活動し、各味刺激に対して応答し発火頻度を上昇させた。食塩水で味刺激すると濃度依存的な発火頻度上昇が、全てのユニットで観察された。アミロライドによって食塩水に対する味応答が抑制されたユニットは 3 個存在した。これは今までに報告されてきた N ユニットに相当すると考えられる。今後、さらに多くの鼓索神経単一神経線維の応答性を多量の塩味溶液を用いて解析する予定である。

(20) マウスの舌スライス標本を用いた味細胞の高速膜電位イメージング

土岡由季（東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 脳神経機能学研究室）

味細胞は味蕾内で相互に情報交換を行っている可能性が考えられている。味蕾内の情報処理様式を解明するためには、味蕾構造が保持された条件で複数の味細胞から味刺激に対する応答を同時測定することが重要である。私たちは、マウスの有郭乳頭を含む舌スライスを用いた膜電位イメージング系の確立をめざしている。膜電位感受性色素である di-8-ANEPPS 160 μM で厚さ 150 μm の舌スライスを染色した後、CCD カメラを用いフレームレート 1 kHz でイメージングを行った。NaCl 液を充填したガラス管を用いて味孔に留置し、1~80 μA で 200 ミリ秒間電気刺激すると、味細胞は陽性電流、陰性電流に対して共に脱分極応答を示した。この脱分極応答の振幅は味

孔付近で大きく、基底側で小さかった。脱分極応答の閾値は 5 μA であり、1/2 ピーク時間が約 40 ミリ秒のゆっくりした時間経過を示した。一般に細胞外電場に対して神経細胞は陽性電極付近で過分極応答することが多いが、味蕾の応答では過分極応答は一切観察されなかった。このため、味蕾中の味細胞の応答は、電場に対する受動的な応答というより、電位依存性チャネルなどによる脱分極性電流が関与している可能性が考えられた。しかし、この応答は TTX、アミロライド、カドミウムなど各種イオンチャネル阻害剤によって影響を受けなかった。未知のチャネルがこの脱分極応答に関与しているかもしれない。

(21) ヒトとニホンザルにおけるスクロースとスクラロースへの感受性の違い

西栄美子，筒井 圭，今井啓雄（京都大学霊長類研究所 分子生理部門 遺伝子情報分野）

ヒトは人工甘味料であるスクラロースをスクロースの 600 倍甘く感じるといわれている。本研究ではニホン

ザルがヒトの甘味知覚のモデルとなりうるかを検討するため、二瓶法によるニホンザルのスクロース、スクラ

ロースへの感受性の比較を行った。また、ヒトについてもこれら 2 種の甘味料への感受性を Visual Analog Scale (VAS) 法により測定した。

二瓶法と VAS 法による実験の結果、ニホンザルとヒトはともにスクラロースに対しスクロースに対してよりも強い感受性を示すことが分かった。しかし、この感受性の差はニホンザルでは約 50 倍、ヒトでは約 500 倍であり、ヒトにおいてより大きな差が見られた。実験系が

異なるために直接の比較はできないが、ニホンザルとヒトでスクラロースへの感受性に大きな差は認められなかった。一方でスクロースに対しニホンザルはヒトよりも強い感受性をもっていることが示唆された。

これらの違いは、甘味受容体である TAS1R2/TAS1R3 のアミノ酸配列が種間で異なることが原因として考えられるため、今後、受容体レベルでの感受性の比較を行う予定である。

(22) アミノ酸トランスポーターLAT1 の血管内皮細胞チューブ形成への関与

原 早織, 大垣隆一, Printip Wongthai, 中込咲綾, 永森収志, 金井好克
(大阪大学大学院 医学系研究科 生体システム薬理学)

LAT1 (L-type amino acid transporter 1) は、大型側鎖を持つ中性アミノ酸を輸送するトランスポーターであり、その正常組織における発現は、血液脳関門や胎盤関門等に限られるが、多くのがん組織で発現が亢進している。LAT1 によるアミノ酸の供給は、がん細胞の高い増殖能を担っていると考えられていることから、がんの診断と治療の分子標的として注目され、LAT1 阻害薬の抗腫瘍効果が実証されている。また、腫瘍組織では LAT1 の発現と新生血管の密度に相関があるとの報告もあり、LAT1 の血管新生への関与が想定されているが、その役割は解明されていない。我々はまず、ゼノグラフト腫瘍組織の新生血管の内皮細胞に、LAT1 が発現していることを免

疫染色により見出した。次に、基底膜マトリックス上にヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を撒き、血管様のチューブ構造を形成させる *in vitro* 血管新生アッセイを行い、LAT1 阻害の影響を検討した。その結果、LAT1 阻害薬が、HUVEC のチューブ形成を濃度依存的に抑制することを明らかにした。さらに、LAT1 のノックダウンによっても、阻害薬と同様にチューブ形成が抑制された。これらの結果は、LAT1 が血管新生に関与することを示すものである。LAT1 阻害薬の抗腫瘍効果には、がん細胞の LAT1 を抑制することによる増殖抑制効果とともに、血管新生の抑制も寄与していることが示唆される。

(23) 乳酸菌由来脂肪酸代謝物が糖・脂質代謝異常の改善に与える影響

山國加成衣, 金 英一, 金 珉智, 後藤 剛, 高橋信之, 河田照雄
(京都大学大学院 農学研究科)

【目的】乳酸菌により産生されるリノール酸由来の脂肪酸 KetoA (10-keto-12c-18:1) は、核内受容体 PPAR α の高いリガンド活性をもつ。PPAR α 活性化は脂質代謝を亢進し、脂質異常症改善作用を示す。本研究では肥満に伴う代謝異常に対する KetoA の摂取効果を検討した。

【方法】肥満モデルマウス KK-Ay を用い、KetoA 摂取が糖・脂質代謝異常に与える影響を検討した。

【結果・考察】0.1% KetoA 含有高脂肪食の 4 週間の摂

取は、体重、白色脂肪重量、血糖値や血中中性脂肪値を有意に低下させ、耐糖能異常を改善した。しかし PPAR α が高発現する肝臓や骨格筋における PPAR α 標的遺伝子の発現量に変化はなく、本条件下では KetoA 摂取は肝臓や骨格筋における PPAR α 活性化を誘導しないものと考えられた。一方で KetoA 摂取群では、褐色脂肪組織 (BAT) の UCP1 発現量が有意に増加しており、BAT でのエネルギー消費亢進が示唆された。BAT の UCP1 発現は交感神

経系の強い支配を受けること、脂肪酸の EPA や DHA が TRPV1 を介して交感神経を活性化することから、Ca イメージングにより KetoA の TRPV1 への作用を検討したところ、KetoA は TRPV1 を活性化させることが示唆され

た。以上より、KetoA 摂取時の代謝異常改善効果には、TRPV1 を介した交感神経系の活性化による BAT でのエネルギー消費亢進作用が関与するものと考えられた。

18. 電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用 ～ 分子から細胞への機能イメージング ～

2013年11月13日－11月14日

代表・世話人：臼田信光（藤田保健衛生大学）

所内対応者：村田和義（生理学研究所）

（1）電子顕微鏡技術を利用した脳科学研究

深澤有吾（名古屋大学大学院 医学部）

（2）嗅覚系新生ニューロンの遊走・分化

樋田一徳（川崎医科大学 解剖学）

（3）細胞生物学研究における超高压電子顕微鏡の必要性和今後の展望

臼倉治郎（名古屋大学 エコトピア科学研究所）

（4）医学生物学領域における走査電顕鏡の発展と細胞内構造の研究

名黒知徳（鳥取大学 医学部）

（5）SBF-SEMを用いた生体3次元微細構造観察

大野伸彦（山梨大学 医学部）

（6）“ナノスーツ”を用いた生きたままの生物試料の観察

針山孝彦（浜松医科大学 医学部）

（7）イオン液体の液状導電付与剤としての電子顕微鏡観察への応用

桑畑 進（大阪大学 工学研究科）

（8）位相差電顕の最近の応用展開と GFP の電子線発光

永山國昭（生理学研究所）

（9）生理研共同研究施設（電顕）の紹介

村田和義（生理学研究所）

（10）深海微生物の細胞構造から探る生物進化

山口正視（千葉大学 真菌医学研究センター）

（11）電子線トモグラフィーと連続切片法による原生動物における細胞内共生オルガネラの3次元構造解析

洲崎敏伸（神戸大学 理学部） ソン・チホン（韓国 KBSI）

（12）電子線トモグラフィーを使った植物細胞表層のナノマシンの解析

峰雪芳宣（兵庫県立大学 生命理学研究科）

（13）阪大超高压電顕センターでの研究と微細構造解析プラットフォームの紹介

鷹岡昭夫（大阪大学 超高压電顕センター）

（14）免疫組織化学の超高压電子顕微鏡観察への応用

坂本浩隆（岡山大学 自然科学研究科）

（15）超高压電子顕微鏡を用いた神経細胞、神経膠細胞の三次元観察 ～ホルモン、ホルモン受容体と脳機能～

小澤一史（日本医科大学 基礎医学）

【参加者名】

永山國昭（生理学研究所）、臼田信光（藤田保健衛生大学）、深澤有吾（名古屋大学）、樋田一徳（川崎医科大学）、臼倉治郎（名古屋大学）、名黒知徳（鳥取大学）、大野伸

彦（山梨大学）、針山孝彦（浜松医科大学）、桑畑 進（大阪大学）、山口正視（千葉大学）、洲崎敏伸（神戸大学）、峰雪芳宣（兵庫県立大学）、鷹岡昭夫（大阪大学）、坂本

浩隆（岡山大学）、小澤一史（日本医科大学）、佐生 愛（京都府立大学）、松下敦子（総合研究大学）、栗林剛正（富山大学）、竹内美由紀（東京大学）、野田 亨（藍野大学）、森山陽介（藤田保健衛生大学）、山田博之（結核予防会結核研究所）、五十嵐郁男（帯広畜産大学）、松元里樹（神戸大学）、朱 とん（総合研究大学）、金子康子（埼玉大学）、Bulbul Nayeema（埼玉大学）、高浪景子（京都府立医科大学）、内田正哉（埼玉工業大学）、中井朋則（兵庫県立大学）、吉田裕孝（国立長寿医療研究センター）、増村威宏（京都府立大学）、鈴木えみ子（国立遺伝学研究所）、吉田清和（大阪大学）、長岡紀幸（岡山大学）、大隅正子（総合画像研究支援）、唐原一郎（富山大学）、江崎雅俊（熊本大学）、谷 一寿（名古屋大学）、石井大佑（名古屋工業大学）、柳生 理（神戸大学）、箕田弘喜（東京農工大学）、Islam MD Shafiqul（神戸大学）、高橋知里（愛知学院大学）、菌村貴弘（金沢医科大学）、中鉢 淳（豊橋技術科学大学）、紅 朋浩（名古屋大学）、益田有里子（静岡大学）、戸辺綾貴子（東京医科歯科大学）、高久康春（浜松医科大学）、村中祥悟（浜松医科大

学）、東 陽介（科学技術振興機構）、藤原武志（三重大学）、大南祐介（日立ハイテクノロジーズ）、葦原雅道（FEI Company）、二村和孝（日立ハイテクノロジーズ）、大嶋卓（日立製作所）、荻原伸介（日本電子）、中嶋香織（日本電子）、大崎光明（日本電子）、大崎暁弘（日本電子）、平井良治（日本電子）、本郷孝四郎（日本電子）、高野 清（日本電子）、春田知洋（日本電子）、長谷部祐治（日本電子）、乙部博英（旭化成ケミカルズ）、小池紘民（マイクロスコープ）、花市佳明（花市電子）、高橋佳子（花市電子）、板倉公治（花市電子）、秋山 薫（花市電子）、宇崎崎晴基（日本エフイー・アイ）、木村直也（東レリサーチセンター）、藤谷 洋（日本ローバー）、岩井修平（カルツァイスマイクロスコピー）、石村貴暢（マックスネット）、石原あゆみ（ライカマイクロシステムズ株）、阿部 淳（分子研）、児玉隆治（基生研）、岩間尚文（核融合研究所）、新井善博（テラベース）、香山容子（テラベース）、甲斐憲子（テラベース）、斎藤善平（テラベース）、池田 充（テラベース）、宮崎直幸（生理学研究所）、村田和義（生理学研究所）

【概要】

本研究会は、「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」「分子から細胞への機能イメージング」をテーマにして開催いたしました。100名の参加者を得て、15演題の口演と20演題のポスター発表について活発な議論が行われました。最新の超高压電子顕微鏡や改めて注目を集める走査型電顕を用いた細胞構造の立体観察、“生きた”またはこれに近い状態の細胞や生物の電顕観察法など、従来の医学・生物学電子顕微鏡研究に新たなブレークスルーを生むような新規観察法をテーマとして取り上げられました。これらの最先端の観察法を用いた深海生物学から脳科学にいたる広い医学・生物学の研究領域から発表をいただくとともに、生理学研究所の共同研究機器（電子顕微鏡）を中心とした共同研究が紹介されました。現在の生物電顕で何ができて何ができないか、今後どのようにすべきかについて、新たな指針が示されました。

本研究会は、2000年から提案代表者：藤吉好則（元京都大学）、所内対応者：永山國昭（生理学研究所）により始まり、今回が14回目となりました。2011年度からは村田和義（生理学研究所脳機能計測・支援センター）が所内対応者を務めております。電子顕微鏡を主な対象として、これまで“定量化”、“位相情報回復”、“生体分子の高分解能構造解析”、“感染症の現場観察”、“環境セル観察”など、生体構造の可視化における先端的な内容を扱ってきました。国内を中心とした最先端顕微鏡群の研究成果とともに、生理学研究所が共同研究機器として提供している超高压電顕、クライオ位相差電顕、連続ブロック表面SEMなどの成果を持ち寄り、医学・生物学に必要な可視化技術を討論して、新規の生体観察方法を想像する機会を今後も提供していきたいと考えています。

(1) 電子顕微鏡技術を利用した脳科学研究

深澤有吾 (名古屋大学大学院・医学系研究科・分子細胞学)

分子に立脚した生命現象の解析は、さまざまな機能を担う生体分子により精緻に組み上げられた生物の姿を明らかにしつつある。電子顕微鏡を用いた生体観察法は「分子レベルの空間解像度で生体組織そのものを観察できる」点において、今後益々その重要性が増すと考えられる。神経科学領域の研究においては、その特徴的機能単位であるシナプスや樹状突起、軸索の構造と分子発現の機能との関係を理解する上で、電子顕微鏡による構造と分子局在の解析から得られる知見は必須である。演

者らはこれまで、シナプス伝達と神経細胞の興奮性制御を担う分子群を対象に、その分布を種々の免疫電子顕微鏡技術を用いて定量的に明らかにしてきた。また、シナプス構造の形態変化やシナプス自体の増減が学習・記憶中の脳内でダイナミックに起きていることを明らかにした。本発表では、これらの知見を紹介しながら、神経科学研究における電子顕微鏡による生体観察の今後の展開について考えてみたい。

(2) 嗅覚系新生ニューロンの遊走・分化

樋田一徳, 清蔭恵美, 徳岡晋太郎, 赤木貴彦 (川崎医科大学)

上哺乳類の中樞神経系では、生後もニューロンが新生することが知られている。このうち嗅球内の介在ニューロンの一部は、前頭内側脳室下帯で新生し、そこから吻側遊走経路 (rostral migratory stream; RMS) に沿って嗅球へ向かい走行し、嗅球神経回路に組み込まれる。我々は従来、この遊走過程の細胞の形態的特徴を、その化学的性質発現とともに解析を試みている。具体的には新生領域に定位脳手術によりトレーサーを生体注入して新生細胞を特異的に標識し、更に標識した細胞が RMS に沿って走行し嗅球へ向かう細胞群をレーザー顕微鏡、超高压電顕、Neurolucida、透過電顕連続切片法で解析した。観察された細胞は RMS の各領域に観察され、進行方向 (嗅

球へ向かう方向) とその逆方向 (起源の脳室下帯への方向) にそれぞれ突起を伸ばしており、Neurolucida デジタル形態計測により、RMS 部位における遊走方向による速度と遊走過程による突起形態に多様性が見られた。この部位の超高压電顕では、特に進行方向への突起は先が多様に分枝あるいは薄膜状に微細に分岐しているのが観察された。現在、更により高コントラスト標識法へ改善するとともに、遊走細胞の超薄連続切片観察により周辺組織、特に astroglia との関係を注目して、嗅球へ到達した新生細胞が放射状に嗅球各層へ分布する際の形態変化について解析を進めている。

(3) 細胞生物学研究における超高压電子顕微鏡の必要性和今後の展望

臼倉治郎 (名古屋大学 エコトピア科学研究所 融合プロジェクト部門)

加速電圧 100 万ボルト以上の超高压電子顕微鏡は新幹線と並んで、日本の誇る技術の一つであった。開発当初は分解能の高さと透過力が優れていることで、材料系では必須な研究手段となると予測され、実際にその特性を活かした多くの研究がなされた。しかし、電子レンズの

収差補正が可能となった現在では、分解能に関してはその地位を 300KV 電顕に奪われている。透過力の高いことは現在でも NO 1 であり、この性質を利用して特色ある研究がなされている。生物系では 1 ミクロン前後の厚い切片から内部の立体構造を求めるトモグラフィーが一

般的である。30 年ほど前から、筋肉 T 管の膜を特異的に染色したり、神経を特異的に染色するなどして標的構造の立体視が試みられてきた。現在でもこのラインの仕事が生物系超高压の主流であるが、最近では、凍結切片を作ることなく、細胞全載の状態でクライオ電顕による構

造解析も試みられており、我々も挑戦している。ここでは、これまでの生物系超高压電顕の沿革と、その流れの中での超高压クライオ電顕の位置について述べ、何が期待できるかを明確にしたい。

(4) 医学生物学分野における走査電顕鏡検の発展と細胞内構造の研究

名黒知徳（鳥取大学医学部 解剖学講座）

透過型電子顕微鏡（TEM）は 1930 年代初期に考案され、数年後には商用機が製品化された。走査型電子顕微鏡（SEM）も 1930 年代に開発されたが、実用化はずいぶん遅れて 1960 年代中半であった。そのため医学生物学領域における SEM による研究は 1970 年代に入ってやっと活発になった。その後、電界放出型 SEM の登場により分解能が飛躍的に向上し、SEM での研究に大きな発展をもたらした。試料作製法も観察表面の刮出法、乾燥法、導電法など、次々と生物試料を観察する新しい方法が開発された。細胞内構造の研究のために、超薄切片法やレプリカ法が TEM の試料作製法として 1970 年代にはすでに確立されていた。しかし、SEM による細胞内構

造の観察は K. Tanaka (1972) によってようやく開始された。当時、SEM は二次電子によって表面微細形態を捉えるものとして細胞や組織の表面構造の研究は盛んに行われたが、SEM で細胞内部の観察を試みる研究者はいなかった。今回は無謀とも思われていたその試料作製法開発の歩みを簡単に紹介するとともに、K. Tanaka & T. Naguro (1981) が開発したオスミウム浸軟法を応用した例として、ミトコンドリアおよびゴルジ装置の SEM 像について報告する。TEM の連続切片法や Tomography 法などとの比較を行い、この方法の長所と短所について考察する。

(5) SBF-SEM を用いた生体 3 次元微細構造観察

大野伸彦（山梨大学大学院医学工学総合研究部解剖分子組織学教室、自然科学研究機構生理学研究所多次元共同脳科学推進センター脳科学新領域開拓研究室）

Special block face-ScanningElectron Microscopy (SBF-SEM) は、組み込み式ミクロームによる表層切削と SEM による試料の断面観察とを交互に反復することにより、数 10-数 100 μ m に及ぶ比較的広範囲の領域から、透過型電子顕微鏡による連続切片観察に類似した画像を、>数 nm 程度の解像度で比較的迅速に取得する方法である。この装置を用いることで、多大な時間と労力が必要であった従来の連続切片の透過型電子顕微鏡に代わり、細胞やオルガネラの形態や分布の正確な解析がより簡便に、短時間で行うことが可能になると期待されている。実際、こうしたアプローチをマウス中枢神経における脱髄モデルや遺伝子改変マウスの解析に応用する

ことで、脱髄における軸索内のミトコンドリアの形態学的変化や、細胞骨格とミトコンドリアの相互作用の役割が明らかになった。また SBF-SEM を包埋前免疫染色と組み合わせることで、脊髄の炎症性脱髄病変において異なる蛍光蛋白質でラベルされた単球由来マクロファージとミクログリア由来マクロファージの核形態の相違が示され、また脱髄において単球由来マクロファージが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。SBF-SEM は従来から観察されてきた多くの細胞組織に対して応用が可能な方法であり、これまでの透過型電子顕微鏡観察では得ることが困難であった形態学的情報を得る方法として、今後広く用いられていくと考えられる。

(6) “ナノスーツ”を用いた生きたままの生物試料の観察

針山孝彦 (浜松医科大学医学部総合人間科学 (生物学))

生物表面の微細構造の観察／解析には、走査型電子顕微鏡が有効な機器として用いられているが、高倍率・高分解能で表面微細構造を観察する場合、試料を高真空環境下 ($10^{-5} \sim 10^{-7}$ Pa) に曝さなければならず、生物が含む水分やガスなどが奪われて微細構造は容易く変形する。出来るだけ生きたままの像を得るためには、様々な化学的前処理を生物試料に施した後に予備乾燥したり、あるいは真空度を $10^{-2 \sim 3}$ Pa 程度に下げた低真空SEMなどの機器側の開発が行われたりしてきたが、前者は微細構造が崩れ後者は解像度が下がるなどの問題が生じる。我々は、生きたままの生物の電子顕微鏡観察は不可能だという考えを払拭し、生物がもつ真空耐性を増強する技術として、生物が体表にもつ細胞外物質 (ECS) に電子線またはプラズマ照射することで重合促進させてナノ薄膜を形成させた。この薄膜が超高真空下でも体内

の水分やガスの放出を抑制する表面保護効果を生み出すことを見出し、生きたままの電子顕微鏡観察に適用することに成功した。そして、全身を覆って生物を保護するこの薄膜構造を「ナノスーツ」と名付けた。さらにこれを一般化するために ECS の成分を模倣し、類似した化学官能基をもつ溶剤の中から生体適合性という観点で界面活性剤 (Tween20) を ECS 疑似物質として選択した。希釈した Tween20 を薄く塗布した生物試料に、電子線あるいはプラズマ照射し重合促進させることにより観察に成功した。

Takaku et al, 2013 Proc. Natl. Sci. USA. 110(19): 7631-7635

<http://www.jst.go.jp/pr/jst-news/backnumber1308.htm>

(7) イオン液体を液状導電剤として用いる生物試料の電子顕微鏡観察法

桑畑 進, 望月衛子, 岸田祥子, 津田哲哉 (大阪大学大学院工学研究科)

イオン液体は常温で液体の有機塩であり、1992年に空気中でも安定なイオン液体が合成されて以来、新規なイオン液体の合成とそれらを用いた化学反応やデバイスの構築など、種々の研究が活発に行われている。イオン液体は、通常の液体とは異なる以下に示す興味深い特徴を有している; (i) 測定不能なほどに小さな蒸気圧, (ii) 難燃焼性, (iii) 高溶解性 (セルロース溶解等), (iv) 高いイオン伝導性。演者らは、(i) の特徴、すなわちイオン液体が真空中でも蒸発しないことに注目し、これを走査型電子顕微鏡に入れて観察した所、全く帯電せずに観察できるということを発見した。つまり、イオン液体は電子

顕微鏡観察における液状導電剤としてふるまうのである。そこで、この事実を基に種々の新規電子顕微鏡観察法を開発する中、複雑な形状を有し、かつ乾燥すると形状が変化する生物試料にイオン液体を利用するという発想を得、種々の手法の開発に取り組んでいる。イオン液体を試料表面に塗布して観察する場合、金属スパッタのような“むら”が出来ないので帯電を完全に抑えた電頭像が得られること、試料によっては化学固定等の作業を省略できるため、試料の準備が極めて短時間に行えること、などの色々なメリットが出てきている。それらについて、具体的な例を示して説明する。

(8) 位相差電子顕微鏡の最近の応用展開と GFP の電子線顕微鏡

永山國昭（生理学研究所）

最初に応用展開 2 つの Nature 論文を紹介する。1 つめは蛋白質構造解析。米国エール大学他との共同研究で、RNA のスプライジングを行うヒトのダイサーとその基質である RNA 分子の結合複合体について 3 次元構造を明らかにした¹⁾。ヒトダイサーは、結晶化しにくく X 線結晶構造解析は困難で、電子顕微鏡法が有望視されていたが、ウイルスなどに比べベタ違いに小さいため像にコントラストがつかずほとんど見えなかった。その構造解析の壁を位相差低温電顕で突破できた。2 つめは細胞内ウイルスの構造解析。ベイラー医科大他の国際研究グループとともに、炭酸ガス固定の主役シアノバクテリア内のウイルスについて立体構造形成過程の詳細をはじ

めて明らかにした。感染初期にまずウイルスの外殻ができ、次に DNA がその中に封入され、最後に角や尾が形作られるモデルが提出された。特に DNA 封入に決定的役割を持つ中間構造が発見された。最後に電顕・光顕複合顕微鏡法を用いた現在進行形の研究を紹介する。蛍光蛋白質について、増強蛍光とカソードルミネッセンス (CL) の両者が想定外の長時間、電子線照射下で発光し続けるという発見があった。講演では有機物である蛍光蛋白質がなぜ電子線破壊を免れ長時間発光できるのか、その物理化学的理由を考察する。

文献：1. DW Taylor et al., Nature Str. Mol. Biol. 20 (2013) 662-670, 2. Wei Dai et al., Nature, Octo.31, 2013。

(9) 生理研共同研究施設（電顕）の紹介

村田和義（生理学研究所）

生理学研究所では、最先端の電子顕微鏡機器を使用した共同研究を国内外から広く募集し実施している。超高压電子顕微鏡 H-1250M、位相差低温電子顕微鏡、連続ブロック表面 SEM がこれにあたる。H-1250M は国内唯一の医学生物学専用超高压電子顕微鏡であり、生理研を代表する共同利用実験機器の一つである。昨年度はこれに電子直接検出 (CMOS) カメラが導入され、脳・神経組織などの厚切り切片、バクテリアや培養細胞などの氷包埋試料などのトモグラフィー三次元形態解析が本格的に行えるようになった。位相差低温電子顕微鏡は、永山國昭前生理研教授らにより開発された電顕用 Zernike 位

相板を使用した装置で、タンパク質複合体、ウイルス、バクテリア、培養細胞などの無染色無固定の凍結試料に位相板を使って明瞭な位相コントラストを与えて、自然に近い状態での高分解能構造解析を行う。連続ブロック表面 SEM は、ダイヤモンドナイフによる自動切削装置 (Gatan 3View) を備えた走査電子顕微鏡 (SEM) で、アジア・オセアニア地区で初めて生理研に導入され、これによる共同研究が今年度から開始された。現在この装置を用いて、樹脂包埋された脳などの組織標本の三次元形態解析が活発に行われている。講演では、これらの最先端共同研究機器とその最近の成果を紹介する。

(10) 深海微生物の細胞構造から探る生物進化

山口正視（千葉大学 真菌医学研究センター）

【はじめに】地球上には、二重膜で包まれた核をもつ真核生物と、これをもたない原核生物の 2 つの種類の生物しか存在していない。真核生物は原核生物から進化し

て生まれたとされるが、両者の細胞の違いはあまりにも大きく、真核生物がどのようにして原核生物から生じたかは、生物学上、最大のなぞの一つである。

真核生物の起源を解明する方法の一つは、原核生物から真核生物への進化の途上にある生物を見つけ出し、その生物の微細構造、DNA、構成する分子種などを詳しく調べることである。今回、深海で、そのような可能性のある生物を発見したので報告する。

【材料と方法】2010 年に、研究船「なつしま」に乗船し、八丈島の南の明神海丘で、水深 1,200 メートルの海底から試料を採集し、電顕観察を行なった。

【結果と考察】今回発見した生物は、大きさが 10 マ

イクロメートルで、細胞壁をもち、カビのように見えるが、真核生物に特徴的な二重膜で包まれた「真核」を持っていない。この生物は、一重膜で包まれた大きな「核様体」をもち、細菌によく似た「共生体」を持っていた。しかし、ミトコンドリアはもっていなかった。われわれは、この生物は、原核生物にも真核生物にも属さない新しい生命体と考え、パラカリオン・ミョウジネンシスと命名した（明神海丘から見つけ出された *parakaryote* 「准核生物」の意味）。

(11) 電子線トモグラフィーと連続切片法による原生動物における細胞内共生オルガネラの 3 次元構造解析

洲崎敏伸 (神戸大学 理学部)

Song Chihong (Div. Electron Microsc. Res., KBSI, Korea)

淡水の原生動物や無脊椎動物には、細胞内にクロレラやその近縁種（共生クロレラ）を持つ生物が多く知られている。共生藻類の細胞内共生は、それぞれの生物で独立に獲得されたものと考えられ、共生クロレラの細胞内共生は生物の系統を超えた普遍的な現象である可能性が示唆されている。そこで、このような細胞内共生現象に関する体系的な知見を得る目的で、共生クロレラをもつミドリアメーバ (*Mayorella* sp.), ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*), ミドリラッパムシ (*Stentor* sp.), ミドリヒドรา (*Hydra viridis*), などを用いて、共生クロレラの宿主細胞内での共生状態を、透過型電子顕微鏡を用いて解析した。その結果、すべての生物において、共生クロレラは一重の包膜 (PV 膜) で覆われた構造を

持つオルガネラ様構造として宿主細胞の内部に定着していることがわかった。凍結置換法を用いてミドリゾウリムシを固定し、共生クロレラの周辺の細胞内構造を超高圧電子線トモグラフィーおよび連続超薄切片法を用いた 3 次元立体構造解析を行った。その結果、共生クロレラの PV 膜はミトコンドリアやトリコシスト (分泌小胞) と結合し、さらにそれらは小胞体や纖毛基粒体と結合し、全体として複雑なネットワークを形成していることが判明した。特に、PV 膜とミトコンドリアの間には特徴的な結合構造が認められ、ミトコンドリアが共生藻類の細胞内共生に何らかの機能を果たしている可能性が示唆された。

(12) 電子線トモグラフィーを使った植物細胞表層のナノマシンの解析

○峰雪芳宣¹, 唐原一郎², 紅 朋浩³, 竹内美由紀⁴,

中井朋則¹, 堀尾哲也⁵, 栗林剛正², 村田和義⁶

(¹ 兵庫県大・院・生命理学, ² 富山大・院・理工, ³ 名大・院・医,

⁴ 東大・院・農, ⁵ 日体大・体育・自然, ⁶ 生理学研究所)

植物の間期表層微小管 (MT) はセルロース束の沈着方向を制御する事で細胞の形を決定し、分裂前期に帯状の MT として出現する分裂準備帯は、将来の分裂面の挿

入位置を決定する。我々は、電子線トモグラフィー法 (ET) を使ってこれら植物の細胞表層のナノマシンについて研究を行って来た。

タマネギ子葉表皮の接線方向の切片を使ったコロラド大、阪大での ET 観察から、分裂準備帯の MT が配列する過程では、MT に沿って出現した microfilament (MF) が、やがて、MT-MF-MT の架橋を経て、MT-MT 架橋を形成することを見つけた。また、生理研 H-1250M を使って子葉の 500nm 厚の横断切片の ET 解析を行い、細胞膜-MT の架橋の様子の観察を可能にした。ET で MT 端に γ tubulin ring complex の cap 構造が観察できるが、タマネギ MT ではこの cap 構造の出現頻度は低く、動物に比べ MT 端が不安定な事を示唆した。被子植物 γ tubulin は特

有のアミノ酸配列をもち、分裂酵母の間期の正常な MT 形成制御の機能を消失している。これが植物 MT の cap 構造の不安定性に起因していると考え、ET で植物 γ tubulin 発現分裂酵母株の MT 端の様子を観察する努力を開始した。

また、セルロース合成のモデル生物酢酸菌を使った研究では、JEM2200FS のクライオ ET で、酢酸菌が菌体外に放出したセルロースリボンの細かい 3D 解析を可能にした。

(13) 阪大超高压電顕センターでの研究と微細構造解析プラットフォームの紹介

鷹岡昭夫 (大阪大学 超高压電子顕微鏡センター)

大阪大学には世界最高の加速電圧を持つ 3MV 超高压電子顕微鏡があり、長年日立製作所 (ハイテクノロジーズ) と共同して、装置の開発や改良に携わってきた。装置完成後は他機関からの遠隔観察や超高压電顕トモグラフィーの開発を手がけた。3MV 電顕は試料透過能が優れ、汎用電顕の約 10 倍、1MV クラス電顕の約 3 倍厚い生物切片を明るく観察できる。このため、試料の立体構造解析に珍重され、細胞組織、複合材料、電子デバイスのトモグラフィー観察に広く利用されている。

阪大電顕センターには生物学の専門教官はおらず、生理学研究所の濱清先生には、3MV 電顕の利用を通じて立体観察法について色々ご教授頂き、また、先生の紹介で

知り合った UCSD の Prof. Mark Ellisman とはトモグラフィー観察や米国からの遠隔観察を行った。

平成 14 年からは文部科学省のナノテクノロジー総合支援プロジェクト、平成 19 年からはナノテクノロジーネットワーク、平成 24 年からは微細構造解析プラットフォームとして、学外・学内のユーザーに解放し、3MV 電顕を中心に各種電顕を利用した観察支援を毎年 40~50 件行っている。ほぼ半数が超高压電顕の利用であり、この内、細胞組織のトモグラフィーが 10 件程度である。これを効率化するため、ユーセントリックゴニオメータ、トモグラフィー自動撮像系、および、自動輪郭抽出ソフトウェアの開発が行われている。

(14) 免疫組織化学の超高压電子顕微鏡観察への応用

坂本浩隆 (岡山大学 大学院自然科学研究科/理学部附属臨海実験所)

我々は、「形態科学」からホルモンの行動制御を担う神経基盤の解明を目指して研究を推進している。これまでに、脊髄に存在する gastrin-releasing peptide (GRP) ニューロン系が雄優位な脊髄内神経ネットワークを構築し、自律神経系と骨盤底筋群を同時に制御することにより、勃起・射精などの雄の性機能を調節していることを報告した (1)。一方、ラット球海綿体筋を支配する球海綿体脊髄核 (SNB) は、腰髄下部に存在し、雄優位の

性的二型核を示す運動ニューロン群であり、勃起や射精など、雄の性行動に重要な役割を果たす。我々は GRP 免疫組織化学法と SNB ニューロンの筋からの逆行性標識法とを組み合わせることにより、超微形態レベルで SNB ニューロンの樹状突起上に GRP 作動性のシナプス入力が存在することを明らかにした (2)。さらに、我々は二重免疫電顕法を超高压電子顕微鏡観察へ応用し、神経化学的特性を踏まえた三次元立体再構築・トモグラ

フィー法による効率的な解析を行う先端の技法も確立した。本技法により、脊髄 GRP ニューロンから脊髄内の自律神経核である仙髄副交感神経核への神経投射を電顕的かつ効率よく解析することに成功した (3)。

本発表では、我々がこれまでに携わってきた「形態科学」を切り口とした、ホルモンの行動制御とその神経基盤に関する研究成果の一端と、今後の超高压電子顕微鏡

観察の展望について議論したい。

References:

- (1) Sakamoto H. *et al.*, **Nat. Neurosci.**, 11: 634–6 (2008).
- (2) Sakamoto H. *et al.*, **Endocrinology**, 151: 417–21 (2010).
- (3) Oti T. *et al.*, **Histochem. Cell Biol.**, 138: 693–7 (2012).

(15) 超高压電子顕微鏡を用いた神経細胞、神経膠細胞の三次元観察 ～ホルモン、ホルモン受容体と脳機能～

小澤一史 (日本医科大学 大学院医学研究科 解剖学・神経生物学分野)

脳の神経細胞には、末梢から分泌される性ステロイドホルモンや副腎皮質ステロイドホルモンといったステロイドホルモンの受容体を発現し、その制御を受ける神経細胞が存在する。例えば海馬の錐体細胞にはグルココルチコイドやミネラルコルチコイドに対する受容体が発現し、血中のグルココルチコイドやミネラルコルチコイドの変動に対応して、神経細胞機能や形態の変化を起こすことが知られる。これら機能形態学的な変化のうち、樹状突起の棘 (spines) の変化や周囲の神経膠細胞 (glia

cells) の変化を立体的に捉えるためには、三次元構築を容易に観察することの出来る超高压電子顕微鏡の利用が極めて有用である。また、現在ではトモグラフィー観察が容易に出来るようになり、超微細構造の立体観察も容易に出来るようになっている。本講演では、ステロイドホルモンとその受容体発現により制御される神経細胞や神経膠細胞の微細構造変化について、超高压電子顕微鏡を利用して観察した結果について概説し、超高压電子顕微鏡の生物分野における有用性について考察する。

19. Frontiers in Neural Control of Actions

2013 年 6 月 17 日

代表・世話人：高田昌彦（京都大学霊長類研究所）

所内対応者：南部 篤（生体システム）、伊佐 正（認知行動発達）、西村幸男（認知行動発達）

Opening Remarks

Tadashi Isa (NIPS)

- (1) Resolving paradoxical effects of central serotonin depletion on punished behaviour: towards a unifying account of serotonin function

A C Roberts (University of Cambridge)

- (2) Behavioral and cardiovascular biomarkers reveal two underlying dimensions of trait-like anxiety in primates

Yoshiro Shiba (University of Cambridge)

- (3) Risk-responsive orbitofrontal neurons track acquired salience

Masaaki Ogawa (NIPS)

- (4) Genes selectively expressed in the primate neocortex: the functional significance and manipulation

Tetsuo Yamamori (NIBB)

- (5) Manipulation of primate neuronal circuits by the use of modified lentiviral vector with enhanced retrograde transfer

Ken-ichi Inoue (Primate Research Institute, Kyoto University)

- (6) Probing the influence of basal ganglia input and output stages during different cognitive demands using saccades

Jay J. Jantz (Queen's University)

- (7) Withholding of desired actions - a possible role of the subthalamic nucleus-

Yoshihisa Tachibana (NIPS)

- (8) Non-linear dynamic in the basal ganglia

Olivier Darbin (University of South Alabama/NIPS)

- (9) Re-evaluation of network in the basal ganglia with new morphological approach

Fumino Fujiyama (Doshisha University)

- (10) Decoding tourettism and its response to deep brain stimulation

Kevin W. McCaig (Primate Research Institute, Kyoto University)

- (11) Functional role of dopamine D1 and D2 receptors in information processing through the basal ganglia

Satomi Chiken (NIPS)

- (12) Ventral striatum regulates activity of motor related areas during the recovery after spinal cord injury

Masahiro Sawada (Kyoto University)

- (13) Rehabilitation-based acceleration of corticospinal plasticity after traumatic brain injury

Hiroshi Nakagawa (Osaka University)

Concluding Remarks

Masahiko Takada (Primate Research Institute, Kyoto University)

【参加者名】

Angela Roberts (University of Cambridge), Yoshiro Shiba (University of Cambridge), Jay Jantz (Queen's University),

Oliver Darbin (University of South Alabama/NIPS), Fumino Fujiyama (Doshisha University), Tetsuo Yamamori (NIBB),

Yoshihisa Tachibana (NIPS), Masaaki Ogawa (NIPS), Masahiro Sawada (Kyoto University/NIPS), Ken-ichi Inoue (Primate Research Institute, Kyoto University), Kevin McCairn (Primate Research Institute, Kyoto University), Hiroshi Nakagawa (Osaka University), Masahiko Takada (Primate Research Institute, Kyoto University), Atsushi Nambu (NIPS), Tadashi Isa (NIPS), Yukio Nishimura (NIPS), Yoko Tsukamoto (Doshisha University), Oh Yoon Mi (Doshisha University), Satomi Chiken (NIPS),

Michiaki Suzuki (NIPS), Yoko Nishihara (NIPS), Dwi Wahyu Indruani (NIPS), Rikako Kato (NIPS), Hidenori Watanabe (NIPS), Abdelhafid Zeghibib (Sheffield University/NIPS), Masatoshi Yoshida (NIPS), Daisuke Koketsu (NIPS), Nobuhiko Hatanaka (NIPS), Norihiro Takakuwa (NIPS), Shinichi Higashijima (NIPS), Shysaku Sasada (NIPS), Masatoshi Kasai (NIPS), Takamichi Tohyama (Keio University/NIPS), Hiromi Sano (NIPS), Kenji Kato (NIPS)

【概要】

脳が運動・行動をどのようにコントロールしているのかは、神経科学の長年に渡る大きなテーマの一つである。従来は、比較的単純な運動課題をサルなどに課し、神経活動と運動との相関を解析することによって研究がなされてきた。しかし、最近では、運動課題に様々な工夫を加えるとともに、光遺伝学などを含む分子生物学的手法、行動中のげっ歯類からの神経活動記録、コンピュータシミュレーション、局所薬物注入などの薬理学的手法、マルチユニット記録、ブレインマシンインターフェイスを利用した解析など、新手法が導入され、新たな展開を見せている。

今回、Angela Roberts 教授(ケンブリッジ大学), Douglas

Munoz 教授(クイーンズ大学)の研究グループが Neuro2013(6月20-23日に京都で開催)に参加と生理研での共同研究のため来日した。そこで、この機会を利用して、大脳基底核と前頭連合野を中心に、これらの領域が如何に運動・行動をコントロールしているのか、特に上記のような新たな手法によって明らかにされた最新の知見について討論するとともに、新手法を用いた共同研究を始めることを目的に研究会を計画した。

講演者としては、とくに若手を中心に企画したが、彼らの有望さを改めて認識することになった。本研究会がきっかけになり、国際共同研究の提案もあり、今後の発展が期待される。

(1) Resolving paradoxical effects of central serotonin depletion on punished behaviour: towards a unifying account of serotonin function

Angela C. Roberts (University of Cambridge)

Unifying accounts of serotonin (or 5-hydroxytryptamine, 5-HT) function have been hampered by the paradoxical findings that gross depletion of central 5-HT across different studies increases sensitivity to punishment in terms of subsequent response choice while decreasing sensitivity to punishment-induced response suppression. To resolve this apparent paradox, the study I shall present determined whether both effects could be found in the same animals by localized 5-HT depletions in the amygdala or orbitofrontal cortex (OFC) of a New World monkey, the common marmoset. We compared performance in a probabilistic visual

discrimination response choice task with punishment-induced response suppression in a variable interval test of punishment sensitivity that employed the same reward and punisher. Similar paradoxical effects of both enhanced and diminished response to punishment were observed following localised 5-HT depletions in both the amygdala and OFC. I will describe a novel, unitary account of the findings in terms of the causal role of 5-HT in the anticipation of both negative and positive motivational outcomes and discuss this in relation to current theories of 5-HT function and our understanding of mood and anxiety disorders.

(2) Behavioral and cardiovascular biomarkers reveal two underlying dimensions of trait-like anxiety in primates

Yoshiro Shiba, Andrea M. Santangelo, Katrin Braesicke, Carmen Agustin-Pavon, Gemma Cockcroft, Mark Haggard, Angela C. Roberts (University of Cambridge)

High trait anxiety is a risk factor for the development of anxiety disorders. Like the disorders themselves high trait anxiety has marked phenotypic variation at the level of symptomatology and neural circuits, suggesting that there may be different symptoms and distinct neural circuits associated with risk for these disorders. The present study addresses this issue, specifically with respect to phasic and diffuse fear, associated with different types of anxiety disorder, and their relationship to the functioning of two distinct regions of ventral prefrontal cortex (vPFC), that contribute independently to anxiety and fear regulation.

In the common marmoset monkey, we investigated individual differences in Pavlovian conditioned cardiovascular and behavioral fear responses (n=27) and determined whether the observed differences were associated with innate fear responses to a rubber snake (n=13) and performance on tests of behavioral flexibility that are differentially dependent upon two distinct vPFC regions

(n=13).

Seven out of 27 marmosets failed to acquire discriminative conditioned fear responses; a failure that was predicted early in training by cue-associated hyper-vigilance and context-associated hypotension and related to heightened emotionality to a rubber snake. Cue-associated hyper-vigilance and context-associated hypotension also differentially predicted, respectively, reduced perseverative responding on an orbitofrontal-dependent and ventrolateral prefrontal-dependent behavioral flexibility test.

The results support the existence of two independent, behavioral and cardiovascular measures, or biomarkers, of trait-like anxiety in the marmoset related to cue-associated and context-associated processing, which may reflect altered functioning in two distinct neural circuits associated, respectively, with the orbitofrontal and ventrolateral prefrontal cortex.

(3) Risk-responsive orbitofrontal neurons track acquired salience

Masaaki Ogawa^{1, 4}, Matthijs A. A. van der Meer², Guillem R. Esber³, Domenic H. Cerri¹, Thomas A. Stalnaker³, and Geoffrey Schoenbaum^{1, 3}

(¹ University of Maryland School of Medicine, ² University of Waterloo,

³ NIDA-Intramural Research Program, ⁴ NIPS)

Decision-making is impacted by reward uncertainty and risk (i.e. variance). Activity in the orbitofrontal cortex, an area implicated in decision-making, has been shown to covary with these quantities. However, this activity could reflect the heightened salience of situations in which multiple outcomes -reward and reward omission - are expected. To resolve these accounts, rats were trained in a simple odor-cued response task, in which 4 different odor cues were associated with 4 different probabilities of reward, 100, 67,

33 and 0%, respectively. Consistent with prior reports, some orbitofrontal neurons (36%) fired differently in anticipation of uncertain (33% and 67%) versus certain reward (100% and 0%). However, over 90% of these neurons also fired differently prior to 100% versus 0% reward (or baseline), or prior to 33% versus 67% reward. These responses are inconsistent with risk, but fit well with the representation of acquired salience linked to the sum of cue-outcome and cue-no-outcome associative strengths. Thus, these results

suggest a novel mechanism whereby the orbitofrontal cortex might regulate learning and behavior.

Reference:

1. Ogawa et.al, (2013) *Neuron* 77 (2), 251-258

(4) Genes selectively expressed in the primate neocortex: the functional significance and manipulation

Tetsuo Yamamori (NIBB)

We have been studying the genes selectively expressed in the primate neocortical areas, and found the two groups of the genes: One group of the genes are selectively expressed in the association areas and the other group of the genes are selectively expressed in the primary visual cortex (Yamamori, *Progress Neurobiol*, 2011). These two areas have been expanded during the course of the primate evolution. To explore the molecular mechanisms underlying such evolution of the primate cortex, it would be important to select an appropriate primate model.

The marmoset is a small New World monkey and has increasingly become an attractive animal model to investigate the primate specific brain together with the recent advance of transgene technology. Studies on visual sensory systems in marmosets are among those of such topics, and in this talk I would mainly focus on ocular dominance column (ODC) in marmosets, because there has been a controversy on the existence of the adult ODC in marmosets. To clarify this issue, we have investigated the time course of the expression of several activity-dependent genes evoked by visual inputs in the primary visual cortex (V1) of adult marmosets. In order to examine the rapid time course of activity-dependent gene expression, marmosets were first monocularly inactivated by tetrodotoxin (TTX), kept in darkness for two days, and then exposed to various length of light stimulation as originally reported by Markstahler et al. (1998). Our results clearly

demonstrated the ocular dominance type of gene expression pattern in V1. IEGs were expressed in columnar patterns throughout layers II-VI of all the marmosets tested. Each IEG dynamically changed its laminar distribution from a half to several hours upon a stimulus onset with the unique time course for each gene. On the other hand, *HTR1B* and *HTR2A* mRNAs sustained a certain level of expression regardless of visual stimulation, despite that a blockade of the retinal activity by TTX reduced their levels, suggesting the regulation of *HTR1B* and *HTR2A* expressions by retinal spontaneous activity. The complex and dynamic regulation of activity-dependent genes revealed in this study should be related to a highly differentiated laminar structure of primate visual systems, reflecting the functional significance of the activity-dependent gene expression in marmoset V1. Additional analysis of regulatory factors, unexpectedly, we found consistent phosphorylation of Ser-133 of CREB in dark rearing, and transiently dephosphorylated in response to visual stimulation in layer IVC β of V1 opposite to the IEG ODC pattern. These data suggest that such CREB-related molecules are together involved in regulation of IEGs and other genes in the marmoset V1 as well. These mechanisms may contribute to the function of the highly stratified visual cortex of primates, the basis of complex visual function. Finally, I would like to discuss the use of marmosets for genetic manipulation.

(5) Manipulation of primate neuronal circuits by the use of modified lentiviral vector with enhanced retrograde transfer

Ken-ichi Inoue (Primate Research Institute, Kyoto University)

Using a retrograde gene-transfer lentiviral vector (NeuRet vector), we established two experimental systems that

permitted pathway-selective cell ablation and pathway-selective gene expression, respectively. For the former system, we attempted selective removal of the cortico-subthalamic “hyperdirect” pathway. After electrical stimulation in the motor cortex, triphasic responses consisting of an early excitation, an inhibition, and a late excitation are usually detected in the internal segment of the globus pallidus (GPi). In the present study, the NeuRet vector expressing human interleukin-2 receptor α -subunit was injected into the subthalamic nucleus of macaque monkeys. Then, immunotoxin injections were made into the supplementary motor area. In these monkeys, single neuron activity in the GPi was recorded in response to the SMA

stimulation. We found that the early excitation was largely reduced with neither the inhibition nor the late excitation affected. For the latter system, we injected the NeuRet vector carrying the gene encoding tetanus toxin light chain downstream of the tetracycline-responsive element into the striatum, and then injected adeno-associated viral vector carrying the tetracycline reverse-transactivator gene into the nigra. We observed that parkinsonian motor deficits were induced after doxycycline administration in the monkeys injected with the two vectors. The present data indicate that the application of the NeuRet vector enables us to manipulate a particular neuronal population in primates.

(6) Probing the influence of basal ganglia input and output stages during different cognitive demands using saccades

Jay J. Jantz, Masayuki Watanabe, Douglas P. Munoz
(Queen's University)

It has been shown that the network state of the basal ganglia (BG) is dynamically altered to influence a variety of behaviors. To determine how such state changes occur, we compared the input stages (caudate nucleus and the subthalamic nucleus, STN), and the output stage (substantia nigra pars reticulata; SNr) of the BG circuit, during different cognitive tasks. We contrasted two different saccade paradigms: spontaneous and purposive saccades. We chose saccadic eye movements as a behavioral model because the saccade control circuit is well-defined, and the SNr sends GABAergic efferents to the superior colliculus (a critical structure for saccade initiation), to influence saccades. Two monkeys performed the following paradigms: viewing a blank screen freely (spontaneous task); and generate a saccade toward (purposive, pro-saccade) or away from (purposive, anti-saccade) a peripheral visual stimulus. During these tasks we examined the behavioral effect of artificial activation of the caudate nucleus, STN, or SNr, using low-current electrical stimulation. We found a dramatic change in the

effect of stimulation depending on the cognitive task. In the spontaneous task, stimulation of the BG input stages (either the caudate nucleus or STN) produced a bias of saccades toward the contralateral hemifield with respect to stimulation site, while stimulation of the BG output stage (SNr) produced an ipsilateral bias of saccades. In contrast, during purposive saccade tasks, stimulation of the caudate nucleus or STN prolonged reaction times for contralateral or bilateral saccades respectively (i.e. opposite effect to stimulation during the spontaneous task), while SNr stimulation prolonged contralateral saccadic reaction times only (i.e. consistent with stimulation during the spontaneous task). These results support a task-dependent modulation of BG network state, such that artificial activation of BG input structures is dependent on task demands, while artificial activation of BG output has a consistent effect regardless of task. Furthermore, they emphasize the importance of addressing differences in BG signaling under varying cognitive demands, while treating BG disorders.

(7) Withholding of desired actions - a possible role of the subthalamic nucleus-

Yoshihisa Tachibana (NIPS)

In daily life situations, we should occasionally suppress the desired action that positive reward outcomes are expected. However, it remains unknown which brain area contributes to withholding the desired action. Here we found that the primate subthalamic nucleus (STN) plays such an important role, using a memory-guided saccade task with positionally biased reward outcomes. STN neurons showed higher activity in highly motivated states (large-reward trials) than in less-motivated states (small-reward trials). The differential

activity lasted from the cue presentation of expected rewards to the reward delivery. The reward-related sustained activities were very similar to those observed in the ventral pallidum that is interconnected with the subthalamic nucleus. Chemical inactivation of the ventral pallidum resulted in impulsive saccadic behaviors. These data suggest that the subthalamo-pallidal pathway may contribute to successful withholding of desired actions.

(8) Non-linear dynamic in the basal ganglia

Olivier Darbin (University of South Alabama/NIPS)

Over the last 30 years, the functions (and dysfunctions) of the sensory-motor circuitry have been mostly conceptualized using linear modelizations which have resulted in two main models. The "rate hypothesis" use the firing rate to characterize the basal ganglia neuronal activity and this model is based on the sequential arrangement of excitatory and inhibitory pathways. The "oscillatory hypothesis" use oscillatory activities identified in both single unit and network (i.e. LFPs) activities to characterize the motor circuitry activities and associated with the notion of loops into the motor circuitry. In the rate and oscillatory models, the basal ganglia data stream is envisaged as a random temporal combinations of independent simple patterns issue from it probability distribution of interval interspikes or its spectrum of frequencies respectively.

More recently, non-linear analyses have been introduced in the modelization of motor circuitry activities and they have provided evidences that complex temporal organization exist in the basal ganglia neuronal activities. In regard to

movement disorders, these complex temporal organizations in the neuronal data stream differ between conditions (i.e. parkinsonism, dyskinesia, healthy control) and are responsive to treatments (i.e. L-DOPA, DBS). A body of evidences have reported that basal ganglia neuronal entropy (a marker for complexity in time series) is higher in hypokinetic state. In line with these findings, an entropy-based model has been recently formulated to introduce high complexity in the basal ganglia neuronal activity as a marker for alteration of motor processing and a factor of motor inhibition.

Importantly, these non-linear features have also been identified in global signals (EEG), muscular activities (EMG) or kinetic of motor symptoms (tremor, gait) of PD patients. It is therefore warranted that non-linear analyses will be further investigated to better understand the neuronal dysfunctions underlying the large spectrum of parkinsonian motor symptoms including tremor, rigidity and hypokinesia.

(9) Re-evaluation of network in the basal ganglia with new morphological approach

Fumino Fujiyama (Doshisha University)

The basal ganglia are composed of four major nuclei: the neostriatum, the globus pallidus (GP), the substantia nigra (SN) and the subthalamic nucleus (STN). The aim of the present study was to provide a complete axonal trajectory of the single neurons in each nucleus with a viral vector expressing membrane-targeted green fluorescent protein. We are getting the findings at odds with the previous concept of a dual striatofugal system: direct/indirect pathways and patch/matrix compartments. We further propose the additional projecting scheme originating from the neostriatum, GP and

STN by way of the segregated area of the GP.

In addition to the projecting scheme of the basal ganglia, we are trying to address the local circuit of the neostriatum. We here introduce the transgenic mice expressing dendritic membrane-targeted GFP (green fluorescent protein) in parvalbumin-producing neurons as a tool to clarify the relationship between striatal interneurons and striatopetal glutamatergic afferents.

We hope that our approaches are useful to establish the new scheme of the basal ganglia network.

(10) Decoding tourettism and its response to deep brain stimulation

Kevin W. McCairn (Primate Research Institute, Kyoto University)

Tourette syndrome (TS) is a complex hyperkinetic motor and neuropsychiatric disorder that is believed to arise from abnormalities within cortico-basal ganglia circuits (CBCs); with recent imaging studies in human TS patients also suggesting that the cerebellum plays a role in encoding tic behavior. Using a recently established monkey model of TS, which utilizes striatal microinjection of the GABA antagonist bicuculline, we used multi-electrode recording to simultaneously record from all the critical nodes in the CBC and cerebellum during overt tic expression. The results showed that induction of motor tics induced stereotyped phasic patterns of neuronal activity at each of the recorded nodes in the CBC-cerebellar network. The latencies of neuronal activation for an individual tic showed the earliest

response was in the striatum and pallidal complex, with overlapping latencies in the M1 and Cerebellum - suggesting a divergent output from the basal ganglia for the tic signal, and demonstrating that TS tic generating networks extend beyond the classical CBC networks. We then used high-frequency deep brain stimulation (HF-DBS) targeted to the output of the CBC (the globus pallidus internus) to try and disrupt tic expression. HF-DBS was capable of reducing the amplitude of tic events but not the frequency. This therapeutic effect was correlated with suppression of the phasic neuronal activity in the pallidum which drives tics, and was dependent on complex locking of single-unit activity with the stimulation pulse.

(11) Functional role of dopamine D1 and D2 receptors in information processing through the basal ganglia

Satomi Chiken (NIPS)

Dopamine in the basal ganglia plays a crucial role in controlling voluntary movements. The striatum, one of the input stations of the basal ganglia, receives excitatory inputs from the cerebral cortex and dopaminergic inputs from the substantia nigra pars compacta. Striatal projection neurons are divided into two groups: direct pathway neurons with dopamine D1 receptors (D1Rs) projecting to the internal segment of the globus pallidus (GPi) and indirect pathway neurons with dopamine D2 receptors (D2Rs) projecting to the external segment of the globus pallidus (GPe). To clarify the role of D1Rs and D2Rs in information processing through the basal ganglia, we recorded activity of GPi and GPe neurons in D1R knockout mice harboring doxycycline (Dox)-regulated D1R expression (D1R-rescued) and D2R knockout (D2RKO) mice under awake state.

In D1R-rescued mice, before Dox administration, both GPi and GPe neurons exhibited cortically evoked triphasic responses, composed of early excitation followed by inhibition and late excitation, similar to those observed in wild-type mice. However, after suppression of D1R

expression by Dox administration, the cortically evoked inhibition in GPi neurons was markedly attenuated, while no significant changes were observed in GPe neurons. The cortically evoked inhibition of GPi neurons is mediated by the cortico-striato-GPi pathway, suggesting that excitability of striato-GPi direct pathway neurons was decreased after suppression of D1R expression. On the other hand, in D2RKO mice, the cortically evoked inhibition and the following excitation in GPe neurons were drastically increased. The cortically evoked inhibition and late excitation of GPe neurons are mediated by the cortico-striato-GPe and cortico-striato-GPe-subthalamo-GPe pathways, respectively, suggesting that excitability of striato-GPe indirect pathway neurons was enhanced in D2RKO mice.

These results suggest that dopamine crucially controls striatal excitability: D1R-mediated inputs maintain excitability of striato-GPi direct pathway neurons, while D2R-mediated inputs suppress excitability of striato-GPe indirect pathway neurons.

(12) Ventral striatum regulates activity of motor related areas during the recovery after spinal cord injury

Masahiro Sawada (Kyoto University/NIPS)

Motivation is a key issue for functional recovery after neuronal damage. However the neuronal mechanism underlying such psychological effect on functional recovery remains unclear. We recently found that the ventral striatum (VSt), a center for processing motivation, increased the activity in association with that of the motor cortex (Nishimura et al. 2011) and inactivation of these regions causes significant deficit on the finger dexterity (Nishimura et al. 2007 and Sawada et al. 2012) following recovery from the spinal cord injury in monkeys. These results imply that VSt interacts with motor cortex during functional recovery,

but it is still obscure causal relationship in activities between VSt and motor cortex exists. To clarify this issue, we investigate effect of inactivation VSt on oscillatory brain activity in motor related areas before and after the spinal cord injury.

We performed a unilateral lesion of the corticospinal tract at the mid-cervical spinal segment in a monkey and recorded the electrocorticographic (ECoG) signals from frontal robe including the ventral, dorsal premotor, primary motor cortices while the monkey was performing reach and -grasp task with the ipsilesional hand.

Finger dexterity impaired immediately after the injury, but it gradually recovered within a month. At the early stage after the spinal cord injury (two weeks), the beta band activity (15 - 30Hz) was increased during the rest and the high gamma activity (>100 Hz) was increased during reach and -grasp, those compared with monkey was intact. We performed unilateral focal inactivation of VSt by microinjections of muscimol, a GABA_A receptor agonist (1μl/site, 5μg/μl). Inactivation of VSt caused significant deficit on the finger dexterity during recovery, whereas no

effect in intact. The beta band (15-30Hz) activities increased during rest. Furthermore the high gamma (>100Hz) band and these under 30Hz decreased, gamma band (30-50Hz) activity increased during reaching and grasping, despite it had no effect on the ECoG signals before the spinal cord injury.

These results indicate that the Vst, a center for processing motivation, regulates the activity of motor related areas through frequency coding and maintenance of functional recovery of finger dexterity after the spinal cord injury.

(13) Rehabilitation-based acceleration of corticospinal plasticity after traumatic brain injury

Hiroshi Nakagawa (Osaka University)

Rehabilitative training is one of the most effective methods for the recovery of motor functions after brain injury. As rehabilitative contents, simple repetitive training with a reaching task was often used. According to prior studies, however, such training does not promote motor activity of the upper extremities in stroke patients. We previously demonstrated that intraspinal axon rewiring of the corticospinal tract (CST) is critical to the recovery from motor deficits after traumatic brain injury (TBI) in mice. Here we explored what kind of rehabilitative training is effective for the recovery and CST rewiring. After the brain injury, two different types of rehabilitative training were conducted: the first task was a food retrieval task (simple reaching training), and the second one was a rotarod task

(bilateral movement training). Multiple behavioral tests were then used to assess the recovery of forelimb motor functions. In these tests, the TBI + rotarod group performed the forelimb motor tasks better than the TBI-only group. Rewiring of the intact CST that originated from the contralesional cortex was examined in the cervical spinal cord by labeling of these fibers. The number of sprouting CST fibers was significantly increased in the TBI + rotarod group. TBI + reaching training, however, did not largely enhance axonal sprouting as compared to the TBI-only group. These results indicate that bilateral movement training effectively promotes axonal rewiring and recovery of motor functions, whereas the effect of simple repetitive training is limited.

20. Neural Decoding and Brain-Computer Interfaces

2013年7月1日

代表・世話人：Tatsuya Umeda (Yokohama City Univ.)

所内対応者：Tadashi Isa (NIPS)

- (1) Sparse Bayesian inference methods for decoding 3D reach and grasp kinematics and joint angles with primary motor cortical ensembles
Kazutaka Takahashi (University of Chicago)
- (2) A novel tool for understanding motor and cognitive functions
Naotaka Fujii (RIKEN BSI)
- (3) Brain Machine Interface based on musculo-skeletal model
Yasuharu Koike (Tokyo Institute of Technology)
- (4) Sensory feedback interfaces in the dorsal root ganglia
Douglas Weber (University of Pittsburgh)
- (5) Encoding the forelimb joint kinematics by the dorsal root ganglion neurons in monkeys
Tatsuya Umeda (Yokohama City University)
- (6) Sensory Responses in the Motor Cortex and their implications for Brain-Machine Interfaces
Aaron Suminski (University of Chicago)
- (7) Restoring Volitional Control via Artificial neural connection
Yukio Nishimura (NIPS)
- (8) Physiological mechanism of deep brain stimulation
Atsushi Nambu (NIPS)
- (9) Efficacy of Brain-Machine-Interfaces in chronic stroke rehabilitation
Ander Ramos-Murguialday (University of Tübingen)
- (10) Brain machine interfaces using human electrocorticograms
Masayuki Hirata (Osaka University)
- (11) Decoding sensorimotor cortex excitability using scalp electroencephalogram in humans
Junichi Ushiba (Keio University)

【参加者名】

Douglas Weber (ピッツバーグ大学), Ander Ramos-Murguialday (チュービンゲン大学), Aaron Suminski (シカゴ大学), Kazutaka Takahashi (シカゴ大学), 小池康晴 (東京工業大学), 平田雅之 (大阪大学), 牛場潤一 (慶應大学), 藤井直敬 (理研), Callum Ross (シカゴ大学), 則武 厚 (関西医科大学), 松下光次郎 (大阪大学), 柳澤琢史 (大阪大学), 菅田陽怜 (大阪大学), 梅田達也 (横浜市立大学), 伊佐 正 (生理研), 南部 篤 (生理研), 西村幸男 (生理研), 郷 康広 (生理研), 丸山めぐみ (生理研), 畑中伸彦 (生理研), 吉田正俊 (生理研), 小川正晃 (生理研), 渡辺秀典 (生理研), 加藤利佳子 (生理

研), 笠井昌俊 (生理研), 笹田周作 (生理研), ZEGHBIB Abdelhafid (生理研), 當山峰道 (生理研), 加納史也 (生理研), 澤田真寛 (生理研), 戸川森雄 (生理研), 伊佐かおる (生理研), Richard Edmund Veale (生理研), 加藤健治 (生理研), 高桑徳宏 (生理研), 西原陽子 (生理研), 鈴木迪諒 (生理研), 額額大輔 (生理研), 松崎政紀 (基生研), 武見充晃 (慶應大学), Olivier DARBIN (生理研), Dwi WAHYU INDRIANI (生理研), 佐野裕美 (生理研), 東島真一 (生理研), 橘 吉寿 (生理研), 春日翔子 (慶應大学), 柴田真希 (生理研), 橘高裕貴 (生理研), 知見聡美 (生理研)

【概要】

近年，多細胞・多領域から神経活動が同時記録されるようになり，これらの神経活動が集団として運動・感覚・情動に関する詳細な情報をコードしていることが明らかとなってきた。一方，多細胞・多領域から記録されたデータがもつ情報を活用して，外部機器を操作する Brain computer interfaces (BCI) の研究事例も多く発表されてきている。しかしながら，神経活動記録から情報処理，外部機器操作に至るまでの多様な分野における最新の知識・技術が求められ，一人の研究者が統合的に研究を進めていくことは難しい状況となってきている。

本研究会では，多細胞・多領域記録の解析とそれを活

用した BCI の研究分野の第一線で活躍している研究者を招へいし，最近得られた知見について発表・議論を行った。特に，マルチユニット記録から脳波記録の解析，また動物を用いた基礎的な研究から，正常被験者や患者さんを用いた臨床的な研究と幅広い BCI 関係の仕事が報告された。各々異なったバックグラウンドの研究者を招へいすることで，それぞれ得意分野の発表・議論を通じて互いの知識・技術を補強することができたと考えられる。さらに，国内 7 名に加え国外からも 4 名の研究者を招へいし，国際的な人的交流を行うことができた。

(1) Sparse Bayesian inference methods for decoding 3D reach and grasp kinematics and joint angles with primary motor cortical ensembles

Kazutaka Takahashi (University of Chicago)

Sparse Bayesian inference methods are applied to decode three-dimensional (3D) reach to grasp movement based on recordings of primary motor cortical (M1) ensembles from rhesus macaque. For three linear or nonlinear models tested, variational Bayes (VB) inference in combination with automatic relevance determination (ARD) is used for variable selection to avoid overfitting. The sparse Bayesian

linear regression model achieved the overall best performance across objects and target locations. We assessed the sensitivity of M1 units in decoding and evaluated the proximal and distal representations of joint angles in population decoding. Our results suggest that the M1 ensembles recorded from the precentral gyrus area carry more proximal than distal information.

(2) Novel tools for understanding motor and cognitive functions

Naotaka Fujii (RIKEN BSI, Wako, Japan)

Electrocorticogram (ECoG) captures neural population activity. ECoG array implanted chronically can provide stable signal over years so that it is suitable for extracting motor intention in BCI development. We succeeded to decode 3-dimensional trajectories of arm motion in monkeys from ECoG signal and showed stable decoding performance without recalibrating the decoder for more than a year. ECoG was also thought to be useful in describing neural functions in

terms of network connectivity because of higher temporal resolution and wider area coverage. To reveal the network functions, we applied data mining analysis of inter-regional connectivity of ECoG signal and found dynamical modulation of meta-module structures in primate during social cognitive tasks. ECoG recording and data mining approach are powerful tools for extracting latent network structures in motor and cognitive processing.

(3) Brain Machine Interface based on musculo-skeletal model

Yasuharu Koike (Tokyo Institute of Technology)

Non-invasive measurement method, such as EEG, fMRI or NIRS, has been used for Brain Computer Interface. EEG has nice temporal resolution, and it is used for BCI, such as amplitudes of different frequency bands; imagining movement of different parts of the body; slow cortical potentials and gamma band rhythms. Although EEG-based BMIs are generally portable and easy to use in practical application, few studies have tried to reconstruct kinematic

information in time series.

Recently, Electrocorticography (ECoG) is an alternative approach to less invasive BMIs. In this talk, we introduce reconstruction of muscle activity time series using EEG or ECoG recordings and controlling wrist robot by reconstructed muscle activity signals.

(4) Sensory feedback interfaces in the dorsal root ganglia

Douglas J. Weber (University of Pittsburgh)

Over the last 2 decades, advances in microsystems engineering have enabled the development of neural prostheses that interface directly with neurons in the brain, spinal cord and peripheral nerves. These so-called “neural interfaces” serve as bi-directional communication channels, allowing information to be read-out by decoding signals recorded from neurons or written-in via patterned electrical stimulation of neurons. We are exploiting these technologies for two purposes: 1) to advance our understanding of how the nervous system senses and controls limb motion, and 2) to develop advanced prosthetic devices that interface directly with the nervous system for control. My talk will focus on research in my lab that is aimed at understanding how

somatosensory neurons encode information about touch, force, limb position and motion. By recording and decoding the output of these neurons, we can provide limb-state feedback for controlling functional electrical stimulation (FES) systems to reanimate paralyzed limbs. Conversely, patterned stimulation of somatosensory neurons can be used to provide amputees with touch and proprioception for prosthetic limbs. Such feedback will be essential for users of the dexterous prosthetic limbs developed recently by the DARPA-funded Revolutionizing Prosthetics Program. Ultimately, these bidirectional neural interfaces will make the prosthesis feel and function like a native limb.

(5) Encoding the forelimb joint kinematics by the dorsal root ganglion neurons in monkeys

Tatsuya Umeda (Yokohama City University)

The activity of a single peripheral afferent is correlated with joint kinematics of the extremity. In this study, we investigated whether population of dorsal root ganglion (DRG) neurons could encode forelimb joint kinematics of behaving monkeys and send the information to the primary

sensory cortex.

Two multi-electrode arrays (each array containing 48 channels) were chronically implanted in the DRGs at the level of C7 and C8 spinal segments of two monkeys. Neuronal responses to reaching and grasping movements

were simultaneously recorded and 3-D trajectories of hand/arm movements were tracked by using an optical motion capture system. 14 and 12-16 neurons were recorded in monkey 1 and 2, respectively. The DRG ensemble included muscle spindle, cutaneous and joint receptors. Using a sparse linear regression analysis, forelimb joint kinematics could be reconstructed from the temporal firing pattern of a subset of

DRG ensembles ($R=0.8$ for elbow joint angle, 0.6 for elbow joint angle velocity). Furthermore, we recorded electrocorticogram (ECoG) signals from the primary sensory cortex of one monkey, concurrently with DRG recording. The sparse regression analysis showed that joint kinematics information encoded by the DRG population activity potentially transferred to the primary sensory cortex.

(6) Sensory Responses in the Motor Cortex and their implications for Brain-Machine Interfaces

Aaron Suminski (Department of Organismal Biology & Anatomy, University of Chicago)

The brain typically utilizes a rich supply of feedback from multiple sensory modalities to control movement. Brain-machine interfaces (BMI) offer the promise of recovered functionality to individuals suffering from severe motor dysfunction by recording movement commands directly from the patient's primary motor cortex (MI) and rerouting them to an external device, such as a computer cursor or a prosthetic arm. Most current BMI implantations depend solely on visual feedback for closed-loop control; thereby neglecting other potentially beneficial feedback modalities. In this talk, I will describe recent experimental evidence demonstrating strong visual and somatosensory

influences on the activity of MI neurons and discuss the usefulness of these sensory-like responses in brain-machine interface training and control. Furthermore, I will show that the control of a cursor driven by the activity of neural ensembles in MI is significantly improved when visual and somatosensory information about the cursor position is available to the BMI user. These findings demonstrate two important facts. First, that the term 'motor' cortex conceals the unmistakable sensory-like responses of neurons in the precentral gyrus. Second, they demonstrate the need for augmenting cortically-controlled BMIs with multiple forms of natural or surrogate sensory feedback.

(7) Restoring Volitional Control via Artificial neural connection

Yukio Nishimura

(Department of Developmental Physiology, National Institutes for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

Functional loss of limb control in individuals with spinal cord injury or stroke is attributed to interruption of descending pathways to spinal network. Although neural circuits locate below and above the lesion remain most of their function. I will show an artificial neuronal connection that bridges supra-spinal system and spinal network beyond the lesion site restores lost function. The artificial connection was produced by a brain-computer interface that can detect the neural activity and converted in real-time to activity-contingent electrical stimuli delivered to nervous system. A

promising application is to bridge impaired biological connections, as demonstrated for cortically controlled electrical stimulation to a spinal site. Our results document that monkey utilized artificial connection instead of physiological connections. Recent work has shown that volitionally controlled walking in individuals with spinal cord lesion can be restored by EMG-controlled magnetic stimulation to lumbar vertebra. A second application of the artificial connection is to produce Hebbian synaptic plasticity through cortically spike-triggered stimulation to a spinal

related site, which can strengthen physiological mono-synaptic connections between the motor cortex and spinal cord. These results suggest that artificial neural connections can compensate for interrupted descending pathways.

Furthermore, these paradigms have numerous potential applications, depending on the input signals, the computed transform and the output targets.

(8) Physiological mechanism of deep brain stimulation

Atsushi Nambu (Division of System Neurophysiology,
National Institute for Physiological Sciences and Department of Physiological Sciences,
Graduate University for Advanced Studies, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Japan)

To elucidate the mechanism of deep brain stimulation (DBS) targeting the internal segment of the globus pallidus (GPi), neuronal activity of the GPi and the external segment of the globus pallidus (GPe) was examined during local electrical microstimulation in normal awake monkeys. Single pulse stimulation of the GPi evoked brief inhibition in neighboring GPi neurons, which was mediated by gamma-aminobutyric acid type A (GABA-A) receptors. High-frequency stimulation of the GPi completely inhibited spontaneous firings of GPi neurons by activation of GABA-A and gamma-aminobutyric acid type B receptors. Local single pulse stimulation directly excited some GPi neurons. Such directly evoked responses were also inhibited by high-frequency stimulation through GABA-A receptors. In contrast to the GPi, single pulse and high-frequency

stimulation of the GPe induced complex responses composed of GABAergic inhibition and glutamatergic excitation in neighboring GPe neurons. Cortically evoked triphasic responses of GPi neurons were completely inhibited during high-frequency GPi stimulation. These findings suggest that GPi-DBS dissociates inputs and outputs in the GPi by intense GABAergic inhibition and disrupts information flow through the GPi.

We also tried closed-loop DBS targeting the subthalamic nucleus (STN). Stimulation was generated based on the activity of the primary motor cortex, and was applied to the STN. This procedure successfully ameliorated parkinsonian symptoms in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6- tetrahydropyridine (MPTP) induced primate model.

(9) Efficacy of Brain-Machine-Interfaces in chronic stroke rehabilitation

Ander Ramos-Murguialday (University of Tübingen, Germany)

Recently, a controlled double blind and randomized study proved the efficacy of using Brain-Machine-Interfaces (BMIs) to restore motor function in chronic paralysed stroke patients. After a strict inclusion criteria, 32 patients were selected to participate in the study and were divided in 2 groups depending on the feedback they obtained when using the BMI. One group received contingent feedback (i.e. the brain oscillations controlled the movement of an orthotic device) and the second one received sham feedback (i.e.

movements of the orthosis were randomized and were not linked to brain activity). Both groups received identical behavioral physiotherapy and were controlled for placebo effects. Only the group receiving contingent feedback presented significant gain in motor scores (Fugl-Meyer scores), significant increase in BMI performance, significant lateralization of BOLD response towards perilesional areas and significant increase in EMG activity on the paralyzed muscles. Neurophysiological correlates of three findings will be

discussed.

(10) Brain machine interfaces using human electrocorticograms

Masayuki Hirata (Osaka University, Japan)

Brain machine interfaces (BMIs) using electrocorticograms (ECoGs) are a promising candidate of the clinical application of high performance BMIs. We demonstrated that gamma power, especially that within the central sulcus, is an excellent feature to decode movement onset and type, independent of the severity of motor dysfunction. Using the decoding features, real time control of a robotic arm was successfully performed by the patients that subdural grid electrodes were placed to treat intractable epilepsy or intractable pain. Most recently we started a

clinical trial in severe ALS patients using a wired BMI system involving the temporary placement of newly-developed personalized electrodes.

A fully implantable wireless system is indispensable for clinical application of ECoG BMIs to reduce infection risk. We are now developing the implantable system, which includes a 128-ch integrated amplifier circuit, 3D personalized high density electrodes, a wireless data transfer system and a wireless battery charger. We aim to put the implantable system to clinical use as soon as possible.

(11) Decoding sensorimotor cortex excitability using scalp electroencephalogram in humans

Junichi Ushiba (Department of Biosciences and Informatics, Faculty of Science and Technology, Keio University, Japan.)

Brain-Computer Interface (BCI) is a technology to bypass motor output neural pathways by directly translating motor-related brain signals into commands for control of motor-driven orthosis or neuromuscular electrical stimulation. Since extrinsic feedback is expected to promote motor learning, approaches using BCI might facilitate neural plasticity and restore lost function after stroke (Shindo et al. J Rehabil Med 2011). Such rehabilitation-oriented BCI exploits electroencephalogram mu and beta oscillations recorded over the sensorimotor areas, and their event-related desynchronization (ERD) following motor attempting is used as a feature that represent increased sensorimotor cortex excitability. However, it remains unclear whether the sensorimotor cortex excitability is actually correlated with ERD. Thus, we assessed the association of ERD with primary motor cortex (M1) excitability during motor imagery of right wrist movement (Takemi et al., J Neurophysiol 2013). M1

excitability was tested by motor evoked potentials (MEPs), short-interval intracortical inhibition (SICI) and intracortical facilitation (ICF) using transcranial magnetic stimulation. Data showed that the large ERD during wrist motor imagery was associated with significantly increased MEP amplitudes and reduced SICI, but no significant changes in ICF. From these results, we concluded that ERD magnitude during wrist motor imagery represents M1 excitability. The recent clinical trial with a single case A-B-A-B design to test the importance of BCI closed-loop fashion will be also introduced in this talk.

This study was conducted under collaboration with Department of Rehabilitation Medicine, Keio University School of Medicine (Professor Meigen Liu), and was supported by the Strategic Research Program for Brain Sciences (SRPBS) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology Japan.

【国 際 研 究 集 会】

国際研究集会

〔 目 次 〕

1. Frontier of Cognitive Neuroscience: Neural Mechanisms of Metacognition (代表者：小村 豊 2013 年 10 月 18 日－10 月 19 日)	429
2. 大脳皮質神経回路の機能的作動機構 Functional Mechanism of Cortical Microcircuitry (代表者：金子武嗣 2013 年 6 月 24 日－6 月 26 日)	435

1. Frontier of Cognitive Neuroscience: Neural Mechanisms of Metacognition

2013年10月18日－10月19日

代表・世話人：小村 豊（産業技術総合研究所）

所内対応者：伊佐 正（生理学研究所・認知行動発達）

吉田正俊（生理学研究所・認知行動発達）

(1) Sources of stimulus control for metacognition: A case of corvid species

Kazuhiro Goto (Sagami WU, Japan)

(2) Expectation facilitates metacognition for perceptual judgements

Ryota Kanai (University of Sussex, UK)

(3) Neuronal circuits for monitoring decisions and actions

Marc Sommer (Duke University, USA)

(4) Neuronal correlates of “explicit-like” memory in the macaque prefrontal cortex: A source of metacognitive behavior

Akio Tanaka (Kyoto Univ, Japan)

(5) Tracking salience acquired through associative learning, not risk, in Orbitofrontal Neurons

Masaaki Ogawa (NIPS, Japan)

(6) The pulvinar houses a confidence map of vision

Yutaka Komura (AIST, Japan)

(7) A social interpretation of metacognition

Bahador Bahrami (UCL, UK)

【参加者名】

Akio Tanaka (Kyoto Univ), Bahador Bahrami (University College London), Kazuhiro Goto (Sagami WU), Kazuyuki Samejima (Tamagawa Univ), Kenji Matsumoto (Tamagawa Univ), Kosuke Sawa (Sensyu Univ), Marc Sommer (Duke University), Masaaki Ogawa (NIPS), Richard Veale (NIPS), Ryota Kanai (University of Sussex), Satoshi Tajima (RIKEN BSI), Sumru Keceli (NIPS), Yoko Nishihara (総研大), 石川哲朗 (東京工業大学), 太田 智, 小俣 圭 (浜松医科大学), 片平健太郎 (名古屋大学), 加藤利佳子 (生理研), 菊池瑛理佳 (放射線医学総合研究所), 北野安寿子 (東京大学), 木村美枝子 (東京大学), 酒井雅子 (アイシン精機), 佐藤洋平 (くろさわ病院), 鈴木迪諒 (総研大), 高見享佑 (大阪大学), 田中観自 (東京大学),

戸嶋真弓 (総研大), 中尾 央 (総研大), 中原 潔 (高知工科大学), 中村國則 (成城大学), 新國彰彦 (茨城県立医療大学), 西田知史 (京都大学), 野々村聡 (玉川大学), 長谷川国大 (名古屋大学), 深代麻緒 (大阪大学), 船橋新太郎 (京都大学こころの未来研究センター), 松田英子 (東京大学), 松本有央 (産業技術総合研究所), 南 哲人 (豊橋技術科学大学), 宮川英理子, 宮崎 茜 (北海道大学), 望月 圭 (京都大学), 結城笙子 (東京大学), 村井千寿子 (玉川大学), 岩崎純衣 (京都大学), 菊池沙織 (生理研), 林 俊介 (名古屋大学), 小松英彦 (生理研), 高桑徳宏 (総研大), 橘 吉寿 (生理研), 二瓶裕司 (豊橋技術科学大学), 宮本健太郎 (東京大学), 岡澤剛起 (生理研), 井内 勲 (岡崎市立病院)

【概要】

メタ認知とは、考えていることを、考えることである。それによって、私たちは、自分自身が考えていることを知り、自身をコントロールすることができる。メタ認知は、意識や意思の問題を含み、興味深い、長い間、哲

学をはじめ、人文学の対象であった。しかし、近年、巧妙にデザインされた行動課題と、ヒト・動物から得られた神経科学的知見や計算論的アプローチが組み合わさって、定量できるようになり、サイエンスの俎上に

のってきた。

一方で、メタ認知は、特に、不確実な状況のときに、その存在意義が、クローズアップされる。その不確実性というのも、様々な側面をもち、各々、異なる影響を及ぼすことが明らかになりつつある。知覚・注意から、記憶・社会性にまで広がる、メタ認知と不確実性の“神経科学の今”をのぞいてみたい。そんな希望のもと、今回、行動心理、神経生理、計算科学の各分野において、本テ

マに造詣の深い、国内外の研究者から講演していただくことができた。

発表者は異なる領域で研究を進めているが、全員が共通の対象を研究テーマとして仕事を進めている研究当事者であるため、通常の学会やシンポジウムでは得られない様々な視点からの活発な議論が行われた。この結果、本研究集会は講演者 7 人、座長 7 人、参加者 58 人の参加のもとで盛況な会を開催することに成功した。

(1) Sources of stimulus control for metacognition: A case of corvid species

Kazuhiro Goto (Sagami WU, Japan)

Metacognition refers to a self-reflective process such as monitoring and reporting of ones' own mental state. Comparative psychologists developed nonverbal tests of metacognition to understand whether such a private event become a stimulus to control one's own behavior despite being extraneously unobservable. Exploring for the prevalence of metacognition in the animal kingdom, evidence for metacognition is abundant in rhesus monkeys but it is yet sparse in other species. We thus examined whether crows (*Corvus macrorhynchos*) flexibly modulate their behavior by monitoring their internal state when performing a memory task. Crows performed a delayed matching-to-sample task, and they were given either an escape option to decline taking

test or a low-risk option to report “not confident” after taking the test. Accurate memory performance yielded a reward with a higher probability, whereas inaccurate memory performance resulted in no such recompense. The escape option yielded a reward with a lower probability. We found they escaped no more frequently when the item-to-remembered is omitted than when they were present, indicating that the crows decline the test by using the delay interval as a cue. In contrast, when reporting confidence retrospectively, the crows utilized the escape option to maximize reward probability. These results suggest crows retrospectively recognize confidence, whereas evidence for prospective memory monitoring was not confirmed.

(2) Expectation facilitates metacognition for perceptual judgements

Ryota Kanai (University of Sussex, UK)

Recent evidence suggests that probabilistic and temporal expectations about target presentation can facilitate perceptual processing. We asked whether prior expectation about the probability of target presentation can increase metacognitive sensitivity for perceptual decision. To dissociate expectation from attention we used a dual-task paradigm. Expectation was manipulated by changing the frequency with which a peripheral Gabor patch is presented in a block, and attention

by presenting participants with a concurrent, central visual search task. We found that metacognitive sensitivity increased for expected compared to unexpected perceptual events but only under full attention. We successfully modelled these results using a Bayesian signal detection theoretic framework, showing how a bottom-up signal detection model can be reconciled with top-down influences.

(3) Neuronal circuits for monitoring decisions and actions

Marc Sommer (Duke University, USA)

Two of the major jobs of the brain are to think and to act. But once the brain initiates a thought or action, how does the brain monitor it? Lack of monitoring would impair learning and lead to ambiguity about the source of events. The brain monitors its own functions explicitly (sensory feedback) and implicitly (internal circuits). Internal circuits have advantages such as speed; they are predictive rather than reactive. My laboratory has studied the internal circuits for action in detail, and I will review those findings. Studying the internal circuits for thought is more difficult, but recently we have made progress. We recorded from neurons in three areas of frontal

cortex as monkeys made decisions. They had to keep track of their decisions so that later in the task, they could wager on whether they were correct or not. This is an example of "metacognitive monitoring." We found activity correlated with metacognition, persisting from decision to bet, in only one frontal cortical area: the supplementary eye field (SEF). The results suggest that the SEF is one node in a circuit for metacognition. Presently, we are testing whether the SEF is also involved in metacognitive control of decisions. The overall goal is to understand the internal circuits for continuity of thought.

(4) Neuronal correlates of "explicit-like" memory in the macaque prefrontal cortex: A source of metacognitive behavior

Akio Tanaka (Kyoto Univ, Japan)

Human memory can be classified into two broad categories: explicit (conscious) and implicit (unconscious). While it is probably impossible to acquire indisputable evidence of conscious experiences in nonhuman animals, recent studies have shown that macaque monkeys can discriminate between the presence and absence of memories, which is a defining functional property of human explicit memory. I will show that one kind of this "explicit-like" memory is manifested as spatially selective delay-period activity of lateral prefrontal neurons while monkeys are engaged in a modified oculomotor delayed-response task. In this task, the subjects were sometimes offered a choice to take or decline a memory test and sometimes forced to take the test.

Firstly, their memory performance was higher when they chose to take the test than when forced to take it, which indicates the use of explicit-like memory. Secondly, delay-period activity of prefrontal neurons was correlated with the decision to take or decline the test, such that its directional selectivity was weaker when the decline option was selected. Thirdly, muscimol injections resulted in an increase in the probability of declining the test, and impaired memory performance especially on forced tests and less on chosen tests. Together, these results suggest that memory-related signals in this brain area serve as a source of monkeys' metacognitive behavior (i.e., to take or decline the test).

(5) Tracking salience acquired through associative learning, not risk, in Orbitofrontal Neurons

Masaaki Ogawa^{1, 4}, Matthijs A. A. van der Meer², Guillem R. Esber³,
Domenic H. Cerri¹, Thomas A. Stalnaker³, and Geoffrey Schoenbaum^{1, 3}

⁽¹⁾ University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA,

⁽²⁾ University of Waterloo, Waterloo, Canada,

⁽³⁾ NIDA-Intramural Research Program, Baltimore, USA,

⁽⁴⁾ National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

Decision-making is impacted by reward risk (i.e. variance). Activity in the orbitofrontal cortex, an area implicated in decision-making, has been shown to covary with this quantity. However, this activity could reflect the heightened salience of situations in which multiple outcomes -reward and reward omission - are expected. To resolve these accounts, rats were trained in a simple odor-cued response task, in which 4 different odor cues were associated with 4 different probabilities of reward, 100, 67, 33 and 0%, respectively. Consistent with prior reports, some orbitofrontal neurons

(36%) fired differently in anticipation of uncertain (33% and 67%) versus certain reward (100% and 0%). However, over 90% of these neurons also fired differently prior to 100% versus 0% reward (or baseline), or prior to 33% versus 67% reward. These responses are inconsistent with risk, but fit well with the representation of acquired salience linked to the sum of cue-outcome and cue-no-outcome associative strengths, as predicted by a new model of attention in associative learning. Thus, these results suggest a novel mechanism whereby the orbitofrontal cortex might regulate learning and behavior.

(6) The pulvinar houses a confidence map of vision

Yutaka Komura (AIST, Japan)

The pulvinar, a visual thalamic nucleus, shows a marked evolutionary expansion, and interconnects with multiple visual cortices. Despite of its anatomical importance in vision, the functional role of the pulvinar in a subject's visual experience has been not well understood. Recently we discovered that trial-by-trial fluctuations of pulvinar responses predicted monkeys' upcoming behaviors of confidence

reports. Computational modeling suggested that such fluctuations reflected internal noise. Moreover, functional silencing of the pulvinar affected the confidence reports only when a visual target appeared in the contralateral visual field. These results indicate that the pulvinar activities contribute to a subject's confidence in visual percepts and also provide a generative view of metacognition.

(7) A social interpretation of metacognition

Bahador Bahrami (UCL, UK)

A long history of research is dedicated to how decision, reaction time and confidence are connected to one another in the context of perceptual/motor tasks. More recently, the same

ideas have been extended to economic decision making. I will discuss the possibility that confidence in a decision is not just a consequence of perceptual evidence and economic gain/loss

but in fact a means for social interaction among decision making agents. The fact that we often resolve disagreements by comparing how confident we are in our opinions demonstrates this point clearly. In my talk I will explore the

social nature of decision confidence and discuss a few empirical and theoretical approaches we have taken to understand the cognitive and computational basis of collective decision making.

2. 大脳皮質神経回路の機能的作動機構 Functional Mechanism of Cortical Microcircuitry

2013 年 6 月 24 日－6 月 26 日

代表・世話人：金子武嗣（京都大学）

所内対応者：窪田芳之（大脳神経回路論研究部門）

Symposium session

- (1) In Vivo Imaging of Coordinated Excitatory and Inhibitory Synaptic Dynamics on Pyramidal Cell Dendrites
Elly Nedivi (Massachusetts Institute of Technology, U.S.A.)
- (2) Neuronal timing in prefrontal networks
Thomas Klausberger (Medical University Vienna, Austria)
- (3) Dendritic transformations of excitatory input in hippocampal and cortical pyramidal neurons
Mark Harnett (Howard Hughes Medical Institute, U.S.A.)
- (4) Functional neuroanatomy and signal integration in presubicular cortical neurons
Desdemona Fricker (Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, France)
- (5) Synapse reorganization in formation of motor memory
Yi Zuo (University of California, Santa Cruz, U.S.A.)
- (6) Delineation of the Learning Engram by a Novel Synaptic Optogenetic Tool "Activated Synapse targeting PhotoActivatable Rac1 (AS-PaRac1)"
Akiko Hayashi-Takagi (The University of Tokyo, Japan)
- (7) Locally limited conductance of IPSCs elicited by cortical fast spiking basket cell
Yoshiyuki Kubota (National Institute of Physiological Sciences, Japan)
- (8) Compartmentalized GABAergic inhibition in neocortical dendrites
Michael J Higley (Yale University School of Medicine, U.S.A.)
- (9) Visual cortical processing: clones, interneurons, and cholinergic modulation
Yang Dan (University of California, Berkeley, U.S.A.)
- (10) Local circuit in the sensorimotor cortex
Takeshi Kaneko (Kyoto University, Japan)
- (11) GABAergic neurones - their role for synchronous network activity and plasticity
Hannah Monyer (University Hospital and DKFZ Heidelberg, Germany)
- (12) A Disinhibitory Circuit Mediates Motor Integration In The Somatosensory Cortex
Soohyun Lee (New York University, U.S.A.)
- (13) Functional Architecture of Minicolumns in Visual Cortex
Kenichi Ohki (Kyushu University, Japan)
- (14) The Neural Coding program at the Allen Institute: Structural and functional imaging of cortical networks
Clay Reid (Allen Institute for Brain Science, U.S.A.)
- (15) Layer 1 of the neocortex: establishment and maintenance of a transient important network of neurons during early neocortical development
Joachim Lübke (Research Centre Jülich GmbH, Germany)
- (16) Enhanced staining for whole mouse brain circuit reconstruction

Shawn Mikula (Max-Planck Institute for Medical Research, Germany)

(17) NMDA spikes in cortical networks

Lucy Palmer (University of Bern, Switzerland)

(18) Synaptic mechanisms of sensory perception

Carl Petersen (Brain Mind Institute, Switzerland)

Poster session

P1 Kenta Funayama (The University of Tokyo, Japan)

Long delayed cortical responses impact visual processing in mouse

P2 Yasuhito Watanabe (German Cancer Research Center, Germany)

The Ubiquitin Proteasome System acts Downstream of GABA Signaling and regulates Dendrite Development

P3 Etsuko Tarusawa (National Institute of Physiological Sciences, Japan)

Dnmt3b epigenetically regulates specificity of synaptic connections in mouse barrel cortex

P4 Masaaki Ogawa (National Institute of Physiological Sciences, Japan)

Risk-responsive Orbitofrontal Neurons Track Acquired Salience

P5 Yumiko Hatanaka (National Institute of Physiological Sciences, Japan)

Classification of excitatory cortical neurons by their initial axon outgrowth

P6 Mika Ushimaru (National Institute of Physiological Sciences, Japan)

Frontal cortical neuron activity during slow oscillation

P7 Yoshifumi Ueta (National Institute of Physiological Sciences, Japan)

Multiple layer 5 corticopontine and commissural neurons relay cortical feedback from secondary to primary motor cortex

P8 Kenta M. Hagihara (Kyushu University, Japan)

Silencing activity of individual neurons throughout development does not prevent maturation of orientation selectivity in mouse visual cortex

P9 Makoto Kinoshita (Nagoya University, Japan)

Differential clustering of septin subunits beneath specific perisynaptic membrane domains in the cerebellar cortical neurons and glia

P10 Akiko Yamashita (Nihon University School of Medicine, Japan)

Gap-junctions, Basket Terminals and Chandelier Cartridges of Parvalbumin-immunoreactive GABA Cells in the Primate Cerebral Cortex

P11 Hiroyuki Hioki (Kyoto University, Japan)

Cell Type-Specific Inhibitory Inputs to Dendritic and Somatic Compartments of Parvalbumin-Expressing Neocortical Interneuron

P12 Jaerin Sohn (Kyoto University, Japan)

Preprodynorphin-expressing Interneurons Constitute a Subpopulation of Somatostatin-positive Neurons in the Mouse Primary Somatosensory Cortex

P13 Ayako Ishikawa (National Institute of Physiological Sciences, Japan)

Experience-dependent emergence of fine-scale networks in visual cortex

- P14 Akiya Watakabe (National Institute for Basic Biology, Japan)
Differential labeling of the cortical projection neuron subpopulations by TET-double infection method (TEDI)
- P15 Satoru Kondo (Kyushu University, Japan)
Three-dimensional functional maps of mouse primary visual cortex
- P16 Fuyuki Karube (Doshisha University, Japan)
Local Circuitry of Layer 6 Spiny Neurons in Rat Frontal Cortex
- P17 Osamu Sadakane (National Institute for Basic Biology, Japan)
Visualization of dendritic spines in marmoset neocortex in vivo
- P18 Hirofumi Morishita (Icahn School of Medicine at Mount Sinai, U.S.A.)
Nicotinic Modulation of Subtype-Specific GABAergic Neurons by Lynx Family Members
- P19 Masatoshi Kasai (National Institute for Physiological Sciences, Japan)
Two photon imaging for lateral inhibition of neural ensemble in the superficial layer of the superior colliculus
- P20 Satomi Kikuta (Tohoku University, Japan)
Involvement of the store operated calcium entry in the long-lasting spontaneous calcium transient in the striatal GABAergic neuron
- P21 Meng-Tsen Ke (RIKEN-CDB, Japan)
SeeDB: a Simple and Morphology-preserving Optical Clearing Agent for Neuronal Circuit Reconstruction
- P22 Yoshiaki Shinohara (RIKEN-BSI, Japan)
Lateralized Enhancement of Experience-induced Hippocampal Gamma Oscillations
- P23 Makoto Osanai (Tohoku University, Japan)
Cortical Activity Regulates the Tetrodotoxin-Resistant Slow Ca^{2+} Oscillation in the Striatum
- P24 Jun Kubota (The University of Tokyo, Japan)
Experience-dependent Postsynaptic Inositol 1, 4, 5-trisphosphate Signaling Regulates Presynaptic Functions in the Mature Barrel Cortex
- P25 Takuma Mori (National Institute for Physiological Sciences, Japan)
Glycoprotein From An Attenuated Rabies Strain Increases An Affinity Toward Non-Neuronal Cells And Long-Range Projection Neurons
- P26 Adam Ponzi (Okinawa Institute of Science and Technology, Japan)
Order and Chaos in a model of the Striatal Medium Spiny Neuron Network
- P27 Nakagawa (RIKEN-BSI, Japan)
Position- and cell type-specificity in electrical coupling between neocortical layer 5 excitatory neurons in neonatal mice

【参加者名】

シンポジウム講演者：	Monyer (Heidelberg University), Joachim Lübke (Research
Carl Petersen (Brain Mind Institute), Clay Reid (Allen	Centre Jülich GmbH), Lucy Palmer (University of
Institute for Brain Science), Desdemona Fricker (Centre de	Melbourne), Mark Harnett (Howard Hughes Medical
Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière),	Institute), Michael J Higley (Yale University School of
Elly Nedivi (Massachusetts Institute of Technology), Hannah	Medicine), Shawn Mikula (Max-Planck Institute for Medical

Research), Soohyun Lee (New York University), Thomas Klausberger (Medical University Vienna), Yang Dan (University of California, Berkeley), Yi Zuo (University of California, Santa Cruz), 大木研一 (九州大学), 金子武嗣 (京都大学), 林 (高木) 朗子 (東京大学), 窪田芳之 (生理学研究所) 以上18名

一般参加者:

石川理子 (生理学研究所), 伊藤栄祐 (群馬大学), 今井猛 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター), 太田啓介 (久留米大学), 大槻元 (九州大学 分子生理学教室), 小川正晃 (生理学研究所), 小山内実 (東北大学大学院医学系研究科), 兼崎琢磨 (Carl Zeiss Microscopy Japan Co., Ltd.), 笠井昌俊 (生理学研究所), 荏部冬紀 (同志社大学大学院 脳科学研究科), 高至輝 (東京大学大学院医学系研究科), 菊田里美 (東北大学大学院), 木下専 (名古屋大学), 木村壘 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 久保田淳 (東京大学大学院医学系研究科), 根東寛 (九州大学), 近藤将史 (玉川大学), 定金理 (基礎生物学研究所), 篠原良章 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 孫在隣 (京都大学大学院医学研究科), 高司雅史 (基礎生物学研究所), 田川義晃 (京都大学), 田中琢真 (東京工業大学), 田村篤史 (東北大学大学院 医学系研究科), 足澤悦子 (生理学研究所), 豊泉太郎 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 中川直 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 中村悠 (京都大学大学院 医学研究科), 萩原賢太 (九州大学), 日置寛之 (京都大学大学院医学研究科), 深澤有吾 (名古屋大学大学院医学系研究科), 舟山健太 (東京大学大学院薬学系研究科), 正水芳人 (基礎生物学研究所), 松井鉄平 (九州大学), 三嶋恒子 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 宮下俊雄

(生理学研究所), 村上知成 (九州大学 医学系学府), 村山正宜 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 毛内拓 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 森琢磨 (生理学研究所), 森下博文 (マウントサイナイ医科大学), 山下晶子 (日本大学医学部), 渡我部昭哉 (基礎生物学研究所), 渡辺康仁 (ドイツがん研究センター), RAMMOHAN SHUKLA (基礎生物学研究所), 江文 (生理学研究所), Mir Shahram Safari (理化学研究所), Meng-Tsen KE (Riken center for developmental biology; graduate school for biostudies, Kyoto university), Adam Ponzi (OIST), 川口泰雄 (生理学研究所), 大塚岳 (生理学研究所), 畠中由美子 (生理学研究所), 牛丸弥香 (生理学研究所), 植田禎史 (生理学研究所), Alsayed Alsayed Abdelhamid (生理学研究所), Luna Wahab (生理学研究所), Tanvir Ahmed (生理学研究所), 松崎政紀 (基礎生物学研究所), 田中康裕 (基礎生物学研究所), 稲田浩之 (生理学研究所), 宮本愛喜子 (生理学研究所), 仲神友貴 (基礎生物学研究所), 西尾奈々 (生理学研究所), 眞田尚久 (生理学研究所), 吉村由美子 (生理学研究所), 東島真一 (生理学研究所), 中村佳代 (生理学研究所), 田中康代 (生理学研究所), 渡辺秀典 (生理学研究所), 佐藤千恵 (生理学研究所), 長谷川亮太 (基礎生物学研究所), 倉本恵梨子 (京都大学), 和氣弘明 (基礎生物学研究所), 川本恭兵 (生理学研究所), 大久保文貴 (基礎生物学研究所), 小松英彦 (生理学研究所), 細谷俊彦 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 加藤大輔 (基礎生物学研究所), Carole Landisman (Harvard University),

以上79名

内訳: 国内80名 (日本人71名, 外国人9名)

国外17名 (日本人2名, 外国人15名)

【概要】

大脳皮質とその関連する神経核では, 中枢神経系の最も高度な情報処理を行っており, 認知・感情・思考・記憶・意識など, 科学的立場から未だに神秘的に見える機能を実現している。そうした機能が, どのような作動原理によって実現されているのか, 大きく興味をもたれる。

近年, 多くの新しい技術が導入され, 大脳皮質や海馬の局所神経回路の作動原理と, 生理的意義が明らかにされつつある。本国際研究集会では, 平成25年6月24-26

日に, 愛知県岡崎市の岡崎コンファレンスセンターにて開催し, 世界的にトップレベルの研究者18名に, ホットな研究成果を紹介していただいた (下記参照)。国内から80名, 海外から17名 (米国8名, ドイツ3名, スイス2名, オーストリア1名, フランス1名) の参加があった。さらに若手研究者の為に, ポスターセッションを設け, 27のポスター発表があった。18演題のシンポジウム発表は, いずれも, 非常に活発な議論や意見交換があり, 非常に意義深い国際会議であった。

【抄録：シンポジウム講演】

(1) In Vivo Imaging of Coordinated Excitatory and Inhibitory Synaptic Dynamics on Pyramidal Cell Dendrites

Katherine L Villa^{1,2}, Kalen P Berry^{1,2}, Jerry L Chen^{1,2}, Jae Won Cha³, Peter T.C. So^{3,4},
Elly Nedivi^{1,2,5}

¹Picower Institute for Learning and Memory. ²Department of Biology. ³Department of Mechanical Engineering.
⁴Department of Biological Engineering. ⁵Department of Brain and Cognitive Sciences. Massachusetts Institute of
Technology, Cambridge, MA 02139, USA)

A critical feature of brain plasticity is the capacity to dynamically adapt in response to the environment by remodeling connections between neurons. Inhibitory neurons are known to play a vital role in defining the window for critical period plasticity during development, and it is increasingly apparent that they continue to exert powerful control over experience-dependent cortical plasticity in adulthood. Recent *in vivo* imaging studies demonstrate that long-term plasticity of inhibitory circuits is manifested through structural rearrangements. Changes in sensory experience drive this structural remodeling of inhibitory interneurons in a cell type and circuit specific manner. We recently found that inhibitory synapse formation and elimination occurs with a great deal of spatial and temporal precision, and is often locally coordinated with excitatory synaptic changes on the same dendrite, largely clustered within a 10 μ m distance. Yet, the nature of the clustered inhibitory and excitatory synaptic dynamics remains

temporally unresolved in terms of whether the two events occur simultaneously or if one of the two events drives the change, while the other adjusts to it. Does the presence of a dynamic inhibitory synapse destabilize neighboring spines, or do excitatory synaptic changes drive inhibitory synapse dynamics? Are the valence changes of coordinated events weighed in the same direction, or are they compensatory? I.e. does excitatory synapse loss drive formation or loss of an inhibitory synapse? To further probe the nature of ‘coordination’ between inhibitory and excitatory synaptic dynamics we double-labeled L2/3 pyramidal neurons in the mouse visual cortex via *in utero* electroporation using YFP as a cell fill and Teal-Gephyrin to label inhibitory synapses. Upon reaching adulthood, these mice were implanted with cranial windows and labeled cells in binocular visual cortex were imaged *in vivo* at short intervals using spectrally resolved two-photon microscopy.

(2) Neuronal timing in prefrontal networks

Thomas Klausberger

(Center for Brain Research, Department for Cognitive Neurobiology,
Medical University of Vienna, Spitalgasse 4, 1090 Vienna, Austria)

The prefrontal cortex has been implicated in several higher order cognitive functions including executive control, decision making and goal directed behaviour, selective attention, working memory and conceptual categorisation. Damage to the prefrontal cortex in humans causes personality

and social difficulties and a decline in moral judgment. Furthermore, dysfunctions in the prefrontal cortex are implicated in several neuropsychiatric diseases including schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder, depression, Alzheimer’s disease as well as drug addiction.

Neuronal computation in the prefrontal cortex is delivered by the coordinated input output transformation carried via neuronal assemblies coordinated on various time scales. Disorders of cortical function can be recognised as disorders of temporal coordination.

The flow of information in the cerebral cortex is maintained by the activity of glutamatergic pyramidal cells. Their precise spike timing and firing rate allow the maintenance of distributed cell assemblies and dynamic synfire chains. Network oscillations support the organisation of such activity and the frequency of the oscillations is highly correlated with ongoing behaviour and brain states. Gamma oscillations (40-80 Hz) have been linked to sensory processing, working memory, conceptual categorization, binding of information and attention; and gamma oscillations are altered in pathological conditions including schizophrenia, dementia,

and autism. Spindle oscillations (8-14 Hz) are a hallmark of non-REM sleep, in which the reticular nucleus of the thalamus acts as pacemaker and thalamocortical cells participate in the sleep spindles involving the entire cerebral cortex. The occurrence of spindles is often modulated by simultaneously occurring slow ~ 1 Hz oscillations. The temporal organisation of such network oscillations are governed by the activity of distinct types of GABAergic interneurons.

We recorded the activity of identified types of GABAergic interneurons as well as pyramidal cells of the prefrontal cortex during gamma, spindle and slow oscillations. Our results indicate that the exact temporal interaction of distinct types of neurons underlies the generation of synchronous activity in the medial prefrontal cortex.

(3) Dendritic transformations of excitatory input in hippocampal and cortical pyramidal neurons

Mark T. Harnett

(Howard Hughes Medical Institute, U.S.A.)

The rules governing the processing of information in mammalian cortical circuits are poorly understood. Even at the single cell level, we have an incomplete picture of how neurons integrate the thousands of inputs they receive distributed in space and time to perform computational operations. Are there shared motifs for integration between similar cell types, dendritic compartments, and/or respective positions within a microcircuit? How are these motifs implemented at the biophysical level? I will discuss recent

experiments investigating how different dendritic domains within and across pyramidal neuron cell types in rodent primary sensory cortex and dorsal hippocampus perform excitatory input transformations. Delineating the fundamentals of dendritic operation across circuit components should provide critical insight into the principles of neural computation as well as advance our understanding of neurological and psychiatric dysfunction.

(4) Functional neuroanatomy and signal integration in presubicular cortical neurons

Jean Simonnet, Roxanne Lofredi, Emmanuel Eugène, Ivan Cohen,

Richard Miles and Desdemona Fricker

(Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière CRICM

UPMC / INSERM UMR S975 / CNRS UMR7225

CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France.)

The Presubiculum is part of the temporal lobe circuits for spatial information processing. Presubicular neurons are sensitive to head-direction, discharging without adaptation when the head of an animal is oriented in one specific direction. In this way, and in association with the place cells, they contribute as a sort of compass to hippocampal function in spatial behaviours. Multimodal information from several upstream brain regions converges in Presubiculum: Thalamic nuclei convey vestibular information, while visual information is relayed from visual and retrosplenial cortices. These signals are integrated within the presubicular microcircuit to give a specific output signal to downstream regions.

I will describe the functional neuroanatomy of this transitional cortical area between hippocampus and neocortex. Presubiculum is organized in six layers, with different layers containing distinct neuronal populations. Principal neurons in superficial layers (II/III) and deep layers (V/VI) are regular

spiking, with little adaptation *in vitro*, consistent with a role in maintained signaling of head position. In layer IV, we identified a population of intrinsically bursting pyramidal neurons. Uncaging and focal application of glutamate revealed the expression of a graded, TTX-sensitive EPSP amplification in presubicular neurons. In addition, we found an all-or-none dendritic boosting of glutamatergic excitation, providing a voltage- and site-dependent dynamic increase in presubicular input-output relations. We suggest that this voltage- and site dependent boosting may be due to a previously described TTX-insensitive Na current. Using stereotaxic injection of retrograde tracers into either LMN or ADN we revealed two specific neuronal output populations in the presubiculum: Labeled neurons following ADN injections were regular spiking neurons in deep layers of the presubiculum. Retrogradely labeled neurons after a LMN injection are the intrinsically bursting neurons of layer IV.

(5) Synapse reorganization in formation of motor memory

Xinzhu Yu, Tonghui Xu, Min Fu and Yi Zuo

(Department of Molecular Cell and Developmental Biology, University of California, Santa Cruz, USA)

One fundamental question in neuroscience is how the brain processes and stores information. As the information-processing elements in the brain, neurons communicate via specialized connections called synapses. The majority of excitatory synapses reside at dendritic spines, which thus serve as a good proxy for synaptic connectivity. Using transcranial two-photon microscopy to visualize fluorescently-labeled neurons in the brain of transgenic mice (YFP-H line),

our recent studies followed the dynamics of spines on apical dendrites of L5 pyramidal neurons in the motor cortex during different forelimb specific motor learning. We found that novel tasks lead to rapid emergence of new spines on dendrites of pyramidal neurons in the motor cortex. Subsequent training of the same task preferentially stabilizes these learning-induced spines, which persist long after training terminates and thus may provide a structural basis for

durable motor memory. Furthermore, spines that emerge during repetitions of the same motor task tend to cluster along dendrites, whereas spines formed during tandem execution of different motor tasks does not cluster. This suggests that the spatial distribution of synapses is actively regulated *in vivo*,

and may encode memory traces for motor tasks. These studies have established a research platform to follow synapse reorganization during learning over time in living mice, which enable further investigations into motor learning and memory.

(6) Delineation of the Learning Engram by a Novel Synaptic Optogenetic Tool "Activated Synapse targeting PhotoActivatable Rac1 (AS-PaRac1)"

Akiko Hayashi-Takagi

(Lab of Structural Physiology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine,
Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan)

Optogenetics is a powerful tool to elucidate the nature of neural circuits by controlling the action potential, the most prominent feature of neuron. However, even in an identical cell, a distinct subset of synapses are activated to produce a different spike chain, indicating that not only a cell level, but also synaptic level of photo-manipulation would be a complementary yet potent tool. For this aim, namely "Synaptic Optogenetics", we here developed a novel probe AS-PaRac1 (Activated Synapse targeting PhotoActivatable Rac1), which is targeted only in the recently generated/enlarged spine. Activity-specificity was confirmed as follows: (1) AS-PaRac1 was strongly co-localized with SEP-GluA1, a marker for AMPA receptor exocytosis. (2) A single spine LTP protocol by glutamate uncaging induced the recruitment of AS-PaRac1 in the stimulated spine. (3) In a freely moving animal, motor learning induced AS-PaRac1 accumulation in the M1 cortex, and the extent of spine enlargement and the accumulation of AS-PaRac1 was highly

correlated after learning. Accumulation of AS-PaRac1 was dependent on local protein synthesis, and required ubiquitin-proteasome pathway. Taken together, we concluded that AS-PaRac1 is a reliable marker of recently activated synapse. Of note, AS-PaRac1 containing spines underwent spine shrinkage, while spines without AS-PaRac1 were intact upon photostimulation through optic fiber *in vivo*. Finally, mice were subjected to RotaRod motor learning, followed by photostimulation over M1 cortex to elicit the spine shrinkage specific for newly generated/enlarged spine during learning. Acquired learning was abolished after photostimulation in mice with AAV containing AS-PaRac1, while general motor activity was not affected, suggesting the spines delineated by AS-PaRac1 spines were necessary structures of the learning engram. This novel approach, Synaptic Optogenetics, combined with various tasks could be a powerful tool to uncover the causal relationship between the synapse and behavioral manifestations.

(7) Locally limited conductance of IPSCs elicited by cortical fast spiking basket cell

Yoshiyuki Kubota^{1,2,3}, Satoru Kondo^{1,3,4}, Masaki Nomura^{3,5}, Sayuri Hatada¹, Noboru Yamaguchi¹,
Fuyuki Karube^{1,3,6}, Joachim Lübke^{7,8,9} and Yasuo Kawaguchi^{1,2,3}

(¹ National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan; ² SOKENDAI, Okazaki, Japan; ³ JST-CREST, Tokyo, Japan; ⁴ Kyushu Univ., Fukuoka, Japan; ⁵ RIKEN RCAI, Yokohama, Japan; ⁶ Doshisha University, Kizugawa, Japan; ⁷ Research Centre Jülich, Jülich, Germany; ⁸ RWTH/University Hospital Aachen, Aachen, Germany; ⁹ JARA Translational Brain Medicine, Jülich, Germany)

The cerebral cortex consists of a repeating columnar arrangement of microcircuits that form networks with distinct computational properties¹. These microcircuits are composed of excitatory pyramidal cells and different types of non-pyramidal GABAergic interneurons². Pyramidal cells in cortical microcircuit integrate 5,000 – 60,000 excitatory and inhibitory inputs terminating on their dendrites and spines, before transmitting signals to other neocortical neurons. Inhibitory circuits are crucial in the regulation of cortical activity²⁻⁴, but relations between the synapse target membrane site and functional effects of inhibitory inputs are poorly understood. Inhibitory synapses target multiple membrane domains of pyramidal cells: soma, axon initial segment, dendrites, and spines^{5,6}, producing inhibitory postsynaptic potentials (IPSP) with different properties. For example, IPSPs on the dendrite are unlikely to conduct over long distances, effectively reducing only adjacent EPSPs. A full understanding of how synaptic inhibition influences different regions of a target neuron requires data on the physiology and anatomy of inhibitory synapses across the full extent of dendritic and somatic domains.

To address these questions, we analyzed the connections of FS basket cells onto target pyramidal cells in layer V of rat

frontal cortex using paired whole-cell patch-clamp recordings combined with intracellular biocytin-filling in order to correlate the structural and functional properties of these connections. 3D reconstructions of light microscopical data with *Neurolucida* and 3D reconstructions of electron microscopical images of synapses from serial ultrathin sections were made so that we could simulate the electrical actions of synapses made with different membrane domains of a postsynaptic pyramidal cell. We modeled inhibitory contacts that established synapses at the soma, on a dendritic shaft and on a dendritic spine with dramatically different functional affects.

Our data shows single cortical FS basket cells make synaptic contacts with dendrites, spines and somata of layer V pyramidal cells. Spatial factors at both pre- and post-synaptic sites produce three different forms of inhibition. We found somatic terminals are large and provide a strong global control of pyramidal cell activity. Smaller, dendritic shaft synapses are locally effective. Synapses on spines have strictly local actions to veto excitatory inputs to that spine. It will be useful to ask how these three modalities of inhibitory operation are integrated in the control of cortical circuits and resulting behaviors.

(8) Compartmentalized GABAergic inhibition in neocortical dendrites

Chiayu Q. Chiu, Gyorgy Lur, and Michael J. Higley

(Department of Neurobiology, Yale School of Medicine, New Haven, CT USA)

GABAergic inhibition plays a critical role in shaping neuronal activity in the neocortex. Numerous experimental

investigations have examined perisomatic inhibitory synapses, which control action potential output from pyramidal neurons.

However, most inhibitory synapses in the neocortex are formed onto pyramidal cell dendrites, where theoretical studies suggest they may focally regulate cellular activity. The precision of GABAergic control over dendritic electrical and biochemical signaling is unknown. Using cell type-specific optical stimulation in combination with 2-photon calcium (Ca^{2+}) imaging, we show that

somatostatin-expressing interneurons exert compartmentalized control over postsynaptic Ca^{2+} signals within individual dendritic spines. This highly focal inhibitory action is mediated by a subset of GABAergic synapses that directly target spine heads. GABAergic inhibition thus participates in localized control of dendritic electrical and biochemical signaling.

(9) Visual cortical processing: clones, interneurons, and cholinergic modulation

Yang Dan

(University of California, Berkeley, U.S.A.)

I will discuss the excitatory and inhibitory microcircuit in the visual cortex and cholinergic modulation of cortical processing. Using optogenetic manipulations, we found that different subtypes of inhibitory interneurons have distinct effects in shaping the visual response properties of cortical neurons. Intracellular recording and stimulation combined

with two-photon imaging allowed us to map the functional connectivity between excitatory neurons and different types of inhibitory interneurons. Optogenetic modulation of the cholinergic input to the visual cortex can rapidly modulate cortical responses and visual perception.

(10) Local circuit in the sensorimotor cortex

Takeshi Kaneko

(Kyoto University, Kyoto, Japan)

In spite of recent progress in brain sciences, the local circuit of the cerebral neocortex, including motor areas, still remains elusive. Morphological works on excitatory cortical circuitry from thalamocortical (TC) afferents to corticospinal neurons (CSNs) in motor-associated areas are reviewed here. First, TC axons of motor thalamic nuclei have been re-examined by the single neuron labeling method. There are layer (L) 3–4-targeting and L1-preferring TC axon types in motor-associated areas, being analogous to core and matrix types, respectively, of E. G. Jones (1998) in sensory areas. However, the arborization of core-like motor TC axons spreads widely and disregards the columnar structure that is the basis of information processing in sensory areas, suggesting that motor areas adopt a different information-processing framework such as area-wide laminar organization.

Second, L5 CSNs receive local excitatory inputs not only from L2/3 pyramidal neurons but also from L3–4 spiny neurons, the latter directly processing cerebellar information of core-like TC neurons. In contrast, basal ganglia information is targeted to apical dendrites of L2/3 and L5 pyramidal neurons through matrix TC neurons. Third, L6 corticothalamic neurons (CTNs) are most densely innervated by L3–4 spiny neurons located just above CTNs. Since CTNs receive only weak connections from L2/3 and L5 pyramidal neurons, the TC recurrent circuit composed of TC neurons, L3–4 spiny neurons and CTNs appears relatively independent of the results of processing in L2/3 and L5. It is proposed that two circuits sharing the same TC projection and L3–4 neurons are embedded in the neocortex: one includes L2/3 and L5 neurons, processes afferent information in a feedforward way

and sends the processed information to other cortical areas and subcortical regions; and the other circuit participates in a dynamical system consisting of the TC recurrent circuit and

may serve as the basis of autonomous activity of the neocortex.

(11) GABAergic neurones –their role for synchronous network activity and plasticity

Hannah Monyer

(Department of Clinical Neurobiology, Medical Faculty of Heidelberg University ;
German Cancer Research Center (DKFZ))

A major research focus in our lab is to study the contribution of GABAergic interneurons for rhythmic synchronous activity. We investigate preferentially the hippocampus, and more recently the medial entorhinal cortex, two brain structures that are crucially involved in spatial coding and spatial memory. Genetic manipulations aimed at reducing the excitatory drive and hence the recruitment of GABAergic interneurons or abolishing the electrical coupling between GABAergic interneurons. Our studies highlight the functional role of local GABAergic interneurons for spatial or temporal coding in the hippocampus. The genetic manipulations were always associated with distinct spatial memory deficits. These results will be summarized and discussed in the context of current models of memory formation and storage.

To establish a causal relationship between neuronal activity and behaviour, it will be required to manipulate activity of selective neurones “online”. To this end we use optogenetics combined with in vivo recordings in freely moving mice. Our first study involves on line identification and manipulation of a specific class of interneurons, namely parvalbumin-positive cells in the medial entorhinal cortex. The study gave insight into neuronal connectivity and the contribution of identified neurones in the medial entorhinal cortex for spatial coding.

In addition I will present data demonstrating the presence of long-range GABAergic cells that connect the hippocampus and entorhinal cortex bidirectionally. Also these data will be discussed in a larger context, since there is good reason to believe that long-range GABAergic neurones are more abundant in the forebrain as previously thought. By virtue of their connectivity – the target cells are most often local interneurons - this class of cells is ideally suited to synchronize brain regions over long distance. Similarly to local GABAergic interneurons, long-range GABA cells do not constitute a homogenous cell population. Based on the expression of neurochemical markers, we were able to identify several subtypes. Thus, the hippocampus harbors parvalbumin- and somatostatin-positive long-range GABA cells that project to extrahippocampal regions. In addition, within one class further specification may reflect the differential targeting. For instance, based on retrograde labeling studies we postulate that hippocampal long-range somatostatin-positive cells targeting the septum and entorhinal cortex constitute discrete neuronal subpopulations.

Finally, I will briefly discuss the contribution of postnatally-generated GABAergic interneurons for plasticity in the brain and will exemplify how generation and survival of newborn GABAergic cells is regulated in an intricate fashion.

(12) A Disinhibitory Circuit Mediates Motor Integration In The Somatosensory Cortex

Soohyun Lee¹, Illya Kruglikov¹, Z Josh Huang², Gord Fishell¹ and Bernardo Rudy¹

⁽¹⁾ NYU Neuroscience Institute, Department of Physiology and Neuroscience
Smilow Research Center, New York University School of Medicine, New York, NY 10016, USA;

² Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 11724 USA)

The influence of motor activity on sensory processing is crucial for sensory perception and the precise execution of motor tasks. However, the mechanisms by which motor activity modulates sensory processing are not known. To unravel the circuit by which activity in the primary vibrissal motor cortex (vM1) modulates sensory processing in the primary somatosensory barrel cortex (S1), we used optogenetics to examine the long-range inputs from vM1 to the various neuronal elements present in the superficial layers of S1. We found that S1-projecting vM1 pyramidal neurons

strongly recruit VIP-(vasointestinal peptide)-expressing GABAergic interneurons (INs). Furthermore we found that VIP INs preferentially inhibit somatostatin (SST)-expressing INs, inhibitory neurons that target the distal dendrites of pyramidal cells. Consistent with this vM1-mediated disinhibitory circuit we found that in vivo the activity of VIP INs is strongly and specifically increased and that of SST INs reduced during whisking. Our results suggest novel circuitry by which inputs from motor cortex influence sensory processing in sensory cortex.

(13) Functional Architecture of Minicolumns in Visual Cortex

Kenichi Ohki

(Kyushu University, Fukuoka, Japan)

It has been suggested that local cortical circuits are composed of arrays of anatomical units that run perpendicular to the cortical surface. There are two such anatomical units, called a minicolumn and a microcolumn. A minicolumn is a one-cell-wide vertical array of cell bodies of neurons. A microcolumn is a group of neurons, located roughly vertically, and their apical dendrites make a bundle in upper layers. It has been suggested that neurons in a microcolumn send axons to specific targets, and a microcolumn may serve as a cortical output unit, but it is still under debate whether these anatomical structure have any functional correlate.

We examined whether neurons that belong to either of these anatomical units share the same function in visual processing. We obtained 3-dimensional functional maps of mouse visual cortex with in vivo 2-photon volume imaging of calcium signal, in which a volume (340x170x200 micron)

was scanned every 0.6 seconds, using a combination of a resonant scanner and a piezo drive. We successfully reconstructed three-dimensional functional maps in layer 2/3, 4 and 5 of mouse visual cortex. We tested whether neurons in each minicolumn share the same selectivity for orientation, spatial frequency, or receptive field position. We found functional microarchitectures for these three features are fundamentally different. For orientation selectivity, minicolumns are mosaic of shared selectivity and randomness: some minicolumns share orientation selectivity, but others do not. Spatial frequency selectivity is completely intermingled, and not related to minicolumns. Retinotopy is significantly scattered, but coarsely clustered due to global retinotopic map, whose scale is much larger than minicolumns. Thus, minicolumns are specifically related to orientation selectivity, neither to spatial frequency or retinotopy.

(14) The Neural Coding program at the Allen Institute: Structural and functional imaging of cortical networks

Robert Clay Reid

(Allen Institute for Brain Science, Seattle, Washington, U.S.A.)

Local circuits in the cerebral cortex consist of tens of thousands of neurons, each of which makes and receives thousands of connections. A major impediment to understanding these circuits is that we have no wiring diagrams of their interconnections. But even if we had a wiring diagram, understanding the network would also require information about each neuron's function. Recently, we have demonstrated that the relationship between structure and synaptic connectivity can be studied in the cortex by combining in vivo physiology with subsequent network anatomy with electron microscopy (Bock et al., Nature,

2011), leading towards a functional connectome. This research program is continuing as part of a larger program at the Allen Institute, called MindScope, that seeks to examine the computations that lead from visual input to behavioral responses by observing and modeling the physical transformations of signals in the cortico-thalamic visual system of mice (Koch and Reid, Nature, 2012. I will describe other aspects of this program, including calcium imaging experiments to examine the physiological properties of pyramidal neurons that project between different cortical areas: the functional projectome.

(15) Layer 1 of the neocortex: establishment and maintenance of a transient important network of neurons during early neocortical development

Max Anstötz¹, Iris Hack¹, Gabriele Radnikow¹, Dirk Feldmeyer^{1,2,3}, Jan Koch⁴,
Cate Cosgrove⁵, Gianmaria Maccaferri⁵ and Joachim Lübke^{1,2,3}

(¹Institute of Neuroscience and Medicine INM-2, Research Centre Jülich GmbH, 52425 Jülich, Germany; ²Department of Psychiatry, Psychotherapy and Psychosomatics, RWTH/University Hospital Aachen, 52074 Aachen, Germany; ³JARA Translational Brain Medicine, Germany; ⁴Department of Neurology, Medical University Göttingen, 37077 Göttingen, Germany and ⁵Northwestern University, Department of Physiology, Feinberg School of Medicine, 303 East Chicago Avenue IL 60611-3008, USA)

Layer 1 (L1) neurons, Cajal-Retzius (CR) cells and GABAergic interneurons are among the earliest generated neurons in the neocortex. However, their role in the establishment of an early cortical microcircuitry is still poorly understood. CR-cells have been suggested to play a key role in the structural and functional organization of the neocortex, in particular in layer formation, the inside first - outside last patterning and positioning of early and late generated principal neurons. Here, we investigate structural and functional aspects of CR-cells and GABAergic interneurons in the developing neocortex taken advantage of CXCR4-EGFP mice where CR-cells are easily identifiable by their

fluorescent appearance and the *reeler* mouse, a meanwhile established model to study cortico-and synaptogenesis. The dendritic morphology and axonal projection, their input-output relationship and intrinsic electrophysiology was studied using whole cell patch-clamp recordings combined with intracellular biocytin-filling. Subsequent quantitative light- and electron microscopy was carried out on the biocytin-filled neurons.

Confocal microscopy revealed that CR-cells and GABAergic interneurons form a dense network of neurons in L1 throughout various neocortical areas. CR-cells reached a peak at postnatal day (P) 7 with a marked decline until their

nearly complete disappearance at P14. During their highest expression, CR-cells form a dense horizontal axonal network throughout the entire L1 spanning ~2 mm of cortical surface. GABAergic interneurons form clusters around CR-cells and ~10% also undergo selective cell death. CR-cells received dense GABAergic and non-GABAergic synaptic input and in turn provided synaptic output preferentially with spines or shafts of terminal tuft dendrites of pyramidal neurons.

In the *reeler* mouse the normal inside first-outside last pattern of cortical lamination is severely disturbed causally related to the lack of *reelin*. In wild type mice, CR-cells show the characteristic bipolar orientation of their dendrites and axons. In contrast, CR-cells in the *reeler* mutant display a variety of different morphologies. Both, their dendritic configuration and axonal projection are no longer confined to layer 1, but are mainly shifted to the underlying cortical

layers (cortical wall). In several cases the axonal projection was found to terminate as deep as in the white matter. As in wild type mice, CR cells in the *reeler* mouse receive dense GABAergic and non-GABAergic input and established synaptic contacts preferentially with dendritic spines or shafts of excitatory neurons. These findings suggest that CR cell axons follow their natural target structures, L2/3 pyramidal neurons, that due to the loss of the inside-out pattern are now located close to the white matter. GABAergic interneurons do not undergo such severe changes of their dendritic morphology and axonal projection patterns.

Taken together, the target specificity of CR-cells is not affected by the severe alterations in cortical layer formation in the *reeler* mouse. The axonal projection and input-output relations of CR cells in normal and *reeler* mice suggest that they are an integral part of an early cortical network.

(16) Enhanced staining for whole mouse brain circuit reconstruction

Shawn Mikula¹ and Winfried Denk¹

(¹ Max-Planck Institute For Medical Research, Heidelberg, Germany)

Circuit diagrams have proven very useful for the functional exploration of neural circuits and fairly complete cellular connection diagrams may ultimately be necessary to completely understand the higher functions in the mammalian brain. Existing circuit reconstruction techniques are limited to volumes of a few hundred microns in size, due in large measure to deficiencies in staining. Here we describe two staining methods that preserve ultrastructure throughout the whole mouse brain. Both methods preserve the extracellular space (ECS), which is greatly reduced during conventional fixation, and use potent osmiophilic reagents to amplify osmium tetroxide staining. One method is an enhanced membrane stain with excellent ultrastructural preservation, whereas the other method is an enhanced cytoplasm stain that densely and completely labels the interior of all neural and

glial processes. We found that ECS preservation provides space between all neural processes except at two locations: 1) inter-cellular junctions, which allow for the identification of electrical and chemical synapses, and 2) myelin sheaths, which frequently make extensive and intimate contact with neighboring axons. Both staining methods result in electrically conductive samples that allow for imaging without additional charge-compensation methods and yield image stacks through which all neural processes can be reliably traced. We are currently validating that we can, in fact, trace inter-areal connections by combining our staining methods with serial blockface electron microscopy (SBEM) as the next stage towards proving that such samples are suitable for dense-circuit mapping of the whole mouse brain.

(17) NMDA spikes in cortical networks

Lucy M. Palmer^{1,2} and Matthew E. Larkum³

(¹ Physiology Institute, University of Bern, Bülhplatz 5, Bern, Switzerland 3012; ² Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, Melbourne, Australia 3100; ³ NeuroCure Cluster of Excellence, Humboldt University, Charitéplatz 1, Berlin, Germany)

The laminar organization of projections into the cortex results in layer 2/3 pyramidal neurons receiving feedback input onto apical and tuft dendrites and feedforward input onto basal dendrites. In vitro work has shown that these different dendritic regions can generate dendritic spikes which are mediated by either NMDA or Ca^{2+} channels. Despite being a robust mode of cellular processing in vitro, evidence for dendritic spikes and their relationship to somatic spiking has not been decisively shown in pyramidal neurons in vivo. We investigated the occurrence of dendritic spikes in L2/3 pyramidal neurons in the hindlimb somatosensory cortex of urethane anesthetized rats using single-cell Ca^{2+} imaging and patch-clamp electrophysiology in vivo. NMDA spikes occur

in tuft dendrites both spontaneously and following sensory input, and have a large influence on the number of output action potentials from the neuron. Using two-photon activation of a novel intracellular caged NMDA receptor antagonist (tc-MK801), we found that NMDA spikes typically ($83 \pm 2\%$) occur in multiple branches simultaneously. Moreover, stimulation of layer 1 fibers significantly increased the probability that sensory stimulation evoked NMDA spikes in the pyramidal cell tuft dendrites. These results demonstrate that NMDA receptors play a vital role in coupling the tuft region of the pyramidal neuron to the spike initiation zone near the cell body.

(18) Synaptic mechanisms of sensory perception

Carl Petersen

(Laboratory of Sensory Processing, Brain Mind Institute, Faculty of Life Science, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL), CH1015, Switzerland.)

A key goal of modern neuroscience is to understand the neural circuits and synaptic mechanisms underlying sensory perception. Here, I will discuss our efforts to characterise sensory processing in the mouse barrel cortex, a brain region known to process tactile information relating to the whiskers on the snout. Each whisker is individually represented in the primary somatosensory neocortex by an anatomical unit termed a 'barrel'. The barrels are arranged in a stereotypical map, which allows recordings and manipulations to be

targeted with remarkable precision. In this cortical region it may therefore be feasible to gain a quantitative understanding of neocortical function. We have begun experiments towards this goal using whole-cell recordings, voltage-sensitive dye imaging, viral manipulations, optogenetics and two-photon microscopy. Through combining these techniques with behavioral training, our experiments provide new insight into sensory perception at the level of individual neurons and their synaptic connections.

【抄録：ポスター発表】

P1 Long delayed cortical responses impact visual processing in mouse

Kenta Funayama¹, Nobuyoshi Matsumoto¹, Genki Minamisawa¹, Norio Matsuki¹,
and Yuji Ikegaya¹

(¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Tokyo, Japan)

Neurons in the primary visual cortex (V1) respond selectively to spatiotemporal patterns of visual stimuli¹. For example, they respond with increased firing rates to a specific orientation of a visual grating stimulus. This characteristic is called the orientation selectivity. Most previous studies have presented the grating stimulus for a few seconds, revealing response selectivity of V1 neurons in detail^{2, 3, 4}. However, thorough analysis of temporal dynamics in the neuronal response is still lacking.

In the present study, we monitored the temporal response dynamics of a V1 neuron to the unique grating stimulus; it was presented in a flash form which lasts for only a few milliseconds (flash grating). By in vivo patch-clamp

recording, we found a new response pattern in mouse V1 layer 2/3 neurons. The flash grating elicited a complex response consisting of a well-known spike response with a latency of approximately 0.1 s and thereafter a prolonged spike response (long delayed response) with a latency of 0.5-2 s. Both V1 responses had similar orientation selectivity. Moreover, the neuronal and behavioral responses to the visual stimulus were modulated by preceding flash gratings in an orientation-selective manner. Thus, contrary to the passive information processing model, V1 mingles instantaneously ongoing inputs with immediately preceding information and thereby may modify visual perception.

P2 The Ubiquitin Proteasome System acts Downstream of GABA Signaling and regulates Dendrite Development

Yasuhito Watanabe¹, Khodosevich Konstantin¹, and Hannah Monyer^{1,*}

(¹Department of Clinical Neurobiology at the German Cancer Research Center (DKFZ) and the Medical Faculty of the Heidelberg University, Heidelberg 69120, Germany)

The stimulating effect of GABA (gamma-aminobutyric acid) signaling on dendrite growth has been indirectly linked with downstream suppression of DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) and its interacting molecule FEZ1 (fasciculation and elongation protein zeta 1). How DISC1 and FEZ1 are downregulated is currently unknown. We speculated whether and how these players interact with the ubiquitin proteasome system (UPS), the latter is also known

to be involved in dendrite development. Our experiments provide evidence that FEZ1 interacts with Cdc20 (cell division cycle 20) /APC (adenomatosis polyposis coli) complex, and is degraded by UPS. We will discuss our findings in the context of dendrite development in postnatal dentate granule neurons, and will provide new data explaining the underlying mechanism.

P3 Dnmt3b epigenetically regulates specificity of synaptic connections in mouse barrel cortex

Etsuko Tarusawa^{2, 5, 6}, Syunsuke Toyoda¹, Toshihiro Kobayashi^{3, 4}, Makoto Sanbo⁶,
Masumi Hirabayashi⁶, Takeshi Yagi^{1, 2}, Yumiko Yoshimura⁵

(¹KOKORO-Biology Group, Laboratories for Integrated Biology, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Suita, Japan; ²Japan Science and Technology Agency-Core Research for Evolutional Science and Technology, CREST, Osaka University, Suita, Japan; ³Division of Stem Cell Therapy, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan; ⁴Japan Science Technology Agency, ERATO, Tokyo, Japan; ⁵Division of Developmental Neurophysiology, National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, Okazaki, Japan; ⁶Section of Mammalian Transgenesis, Center for Genetic Analysis of Behavior, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

Clustered protocadherin (cPcdh), one of the cell adhesion molecules, consists of 58 isoforms. Some of these isoforms are stochastically expressed in individual neurons. We have recently demonstrated that this stochastic expression is epigenetically regulated by the DNA methyltransferase Dnmt3b during early development. In cells lacking Dnmt3b, many types of cPcdh isoforms were commonly expressed and the diversity of cPcdh expression was decreased. This diversity might be implicated in cell recognition leading to the generation of specific synaptic connections, because cPcdh isoforms interact homophilically and contribute to spine formation.

To test this hypothesis, we established iPS cells from embryonic lethal Dnmt3b KO mice and produced chimera mice by injection of the iPS cells into wild-type (WT) mouse blastocysts. Dnmt3b KO cells were kept in the chimera mice until synaptic connections were established. We conducted whole-cell recordings from layer 4 cells in barrel cortical

slices prepared from 2 week-old mice, and analyzed EPSCs evoked in WT and KO cells by firing of other cortical cells in layer 2-6, resulting from focal glutamate uncaging using laser scanning photostimulation. WT cells received strong excitatory inputs, mostly from cells in layer 4, but KO cells received substantial inputs from all layers. Photostimulation of layer 4 evoked larger EPSCs in amplitude in WT than KO cells. The effect of Dnmt3b KO was further characterized by dual whole-cell recordings from layer 4 cells. There was no difference in the detection probability of excitatory connections and EPSC amplitude in connected pairs between WT and KO cell pairs, but reciprocal connections were found less frequently in KO than WT cell pairs. These results suggest that cPcdh expression with diverse combinations of isoforms, regulated by Dnmt3-mediated DNA methylation, contributes to the establishment of specific synaptic connections in barrel cortex.

P4 Risk-responsive Orbitofrontal Neurons Track Acquired Salience

Masaaki Ogawa^{1, 4}, Matthijs A. A. van der Meer², Guillem R. Esber³, Domenic H. Cerri¹, Thomas A. Stalnaker³, and
Geoffrey Schoenbaum^{1, 3}

(¹ University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA; ² University of Waterloo, Waterloo, Canada; ³ NIDA-Intramural Research Program, Baltimore, USA; ⁴ National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

Decision-making is impacted by reward uncertainty and risk (i.e. variance). Activity in the orbitofrontal cortex, an area implicated in decision-making, has been shown to covary

with these quantities. However, this activity could reflect the heightened salience of situations in which multiple outcomes -reward and reward omission - are expected. To resolve these

accounts, rats were trained in a simple odor-cued response task, in which 4 different odor cues were associated with 4 different probabilities of reward, 100, 67, 33 and 0%, respectively. Consistent with prior reports, some orbitofrontal neurons (36%) fired differently in anticipation of uncertain (33% and 67%) versus certain reward (100% and 0%). However, over 90% of these neurons also fired differently

prior to 100% versus 0% reward (or baseline), or prior to 33% versus 67% reward. These responses are inconsistent with risk, but fit well with the representation of acquired salience linked to the sum of cue-outcome and cue-no-outcome associative strengths. Thus, these results suggest a novel mechanism whereby the orbitofrontal cortex might regulate learning and behavior.

P5 Classification of excitatory cortical neurons by their initial axon outgrowth

Yumiko Hatanaka^{1, 2}, Kenta Yamauchi³, Tomohiro Namikawa⁴ and Yasuo Kawaguchi^{1, 2}

(¹ National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan; ² Japan Science and Technology Agency, CREST (Core Research for Evolutional Science and Technology), Tokyo, Japan; ³ Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Suita, Japan; ⁴ Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Japan)

Excitatory cortical neurons are output neurons whose axons project subcortically or intracortically (i.e. ipsilateral cortico-cortical and callosal projection), although there are some exceptions such as certain local-circuit neurons. Basically, subcortically projecting neurons are located in deep layers, intracortically projecting neurons are located in upper layers and to some extent in deep layers, and local-circuit neurons are located between these two layers. Recently, we have shown that embryonic day (E) 12.5 labeled ventricular zone (VZ) cell-progeny, which give rise to deep layer neurons, initiate directed axon outgrowth in the intermediate zone (IZ) before radial migration into the cortical plate (CP) (1, 2). This observation prompted us to examine whether all excitatory cortical neurons initiate directed axon outgrowth in the IZ, and if so, how initial axonal extension is associated with the mature projection pattern. To address this question, we labeled mouse VZ cells in the lateral cortex at several developmental stages (from E11.5 to E15.5) by *in utero* electroporation, and examined axonal formation by their progeny, as well as marker expression and the layer distribution of labeled cells at later stages. We found that all labeled CP cells and many IZ cells exhibited long tangential

processes in the IZ. Notably, these processes only extended either laterally or medially, and their direction was age-dependent: the vast majority of the processes derived from earliest emigrants from E12.5 or earlier VZ progeny extended laterally, while those from E13.5 or later extended medially toward the corpus callosum. Marker expression of the labeled cells was consistent with the idea that the former is a subcortical projection population and the latter a callosal projection population. At postnatal 3 weeks, E12.5 labeled cells were distributed mainly in deep layers, while E13.5 or later labeled cells were distributed in upper layers including layer IV and to some extent in deep layers. These results indicate that excitatory cortical neurons share a common trait of directional axon outgrowth in the IZ, and that they can be classified into two distinct groups according to their axonal direction; a subcortical (lateral) projection group, which develops axons earlier, and a callosal (medial) projection group, including intracortical projection neurons in deep layers, local circuit neurons in layer IV, and neurons in upper layers. Although some of them may prune their initial projections during maturation, it seems that the formation of callosal projections is the default mode of the latter group.

P6 Frontal cortical neuron activity during slow oscillation

Mika Ushimaru and Yasuo Kawaguchi

(National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan; JST CREST, Tokyo, Japan)

During deep sleep or anesthesia, cortical neurons show membrane potential transitions between depolarized (Up) and hyperpolarized (Down) states. This rhythmic activity can be detected extracellularly in local field potentials (LFPs) as the slow wave (SW). When the animals are awake, SWs disappear and the cortical activity desynchronizes (DS). Up-state depolarizations during SW are assumed to be maintained by recurrent excitations among cortical pyramidal cells, but their initiation mechanism has not been revealed well yet.

Previously we found that ventroanterior (VA)/ventromedial (VM) thalamic nuclei, relaying basal ganglia outputs to the frontal cortex, include more cells firing prior to the Up onset than ventrolateral nucleus relaying the cerebellar outputs. Comparing relative firing frequency between Up-states and DS, there are more Up-active and its phase-selective cells in VA/VM, whereas more DS-active cells in VL. These suggest that basal ganglia-related thalamic nuclei send Up phase-selective outputs to the frontal cortex and participate in cortical Up initiation.

In the frontal cortex, excitatory pyramidal neurons and inhibitory GABA neurons make neural circuit. Pyramidal cells are differentiated into several subgroups based on their extracortical projection targets. One projection subtype is cortico-pontine (CPn) cells, another crossed-corticostriatal (CCS) cells.

It is expected that these two subtypes of pyramidal neurons may be differentially participated in Up state and DS activities from following reasons: (1) VA/VM innervate mainly layer 1 (L1) whereas VL does L2/3; and (2) dendritic arborizations of CPn and CCS cells are different in both L1 and L2/3.

L2/3 and L5 were further divided into sublayers by the immunostaining for the vesicular glutamate transporter type 2 (VGluT2), which is expressed in thalamocortical fibers, stronger in L2/3b and L5b than that in L2/3a and L5a. Furthermore, fast-spiking GABA cells may be diverse among their sublayers. Therefore, we recorded unit activities of these neuron subtypes during SW and DS from the sublayers of frontal cortex, and found different firing state dependency among them.

P7 Multiple layer 5 corticopontine and commissural neurons relay cortical feedback from secondary to primary motor cortex

Yoshifumi Ueta^{1,2}, Takeshi Otsuka^{1,2,3} and Yasuo Kawaguchi^{1,2,3}

(¹ Division of Cerebral Circuitry, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan; ² Japan Science and Technology Agency, Core Research for Evolutional Science and Technology, Tokyo, Japan; ³ Department of Physiological Sciences, Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Okazaki, Japan)

Both primary motor cortex (M1) and higher-order motor cortices play an essential role in voluntary movements. Higher-order motor cortices, such as the secondary motor area (M2) in rodents, possibly select future action patterns and transmit them to the primary motor cortex (M1). To better understand motor processing, we characterized “top-down” and “bottom-up” connectivity between M1 and M2 in the rat

cortex. Somata of pyramidal cells (PCs) in M2 projecting to M1 were distributed in lower layer 2/3 (L2/3) and upper layer 5 (L5), whereas PCs projecting from M1 to M2 had somata distributed throughout L2/3 and L5. M2 afferents terminated preferentially in upper layer 1 of M1, which also receives indirect basal ganglia output through afferents from the ventral anterior and ventromedial thalamic nuclei. On the

other hand, M1 afferents terminated preferentially in L2/3 of M2, a zone receiving indirect cerebellar output through thalamic afferents from the ventrolateral nucleus. While L5 corticopontine cells with collaterals to the spinal cord did not participate in corticocortical projections, corticopontine cells with collaterals to the thalamus contributed preferentially to

connections from M2 to M1. L5 callosal projection (commissural) cells participated in connectivity between M1 and M2 bidirectionally. We conclude that the connectivity between M1 and M2 is directionally specialized, involving specific PC subtypes that selectively target lamina receiving distinct thalamocortical inputs.

P8 Silencing activity of individual neurons throughout development does not prevent maturation of orientation selectivity in mouse visual cortex

Kenta M. Hagihara^{1,3}, Yoshiaki Tagawa^{2,3*}, Takashi Yoshida^{1,3}, and Kenichi Ohki^{1,3*}

(¹Kyushu University, Graduate School of Medical Sciences, Department of Molecular Physiology, Fukuoka, Japan;

²Kyoto University, Graduate School of Biophysics, Kyoto, Japan; ³CREST, Tokyo, Japan)

Orientation selectivity is a fundamental property underlying the visual information processing in early visual cortex. However, it remains unclear whether this property is formed genetically or develops dependently on other factors such as neuronal activity during developmental stages.

It was reported that total suppression of cortical activity in ferret visual cortex by application of TTX during development prevented maturation of orientation selectivity (Chapman and Stryker, 1993). However, if activity of all neurons in visual cortex was suppressed, non-cell autonomous factors also might be suppressed, which could prevent the normal development of orientation selectivity. To address whether neurons require their own activity to mature orientation selectivity, we suppressed activity of a subset of neurons, and examined whether these neurons normally mature orientation selectivity.

Active wave-like spontaneous activity is observed in the cortex during the neonatal period. This activity starts to decrease around the time of eye opening, and visually evoked response appears (Rochefort et al., 2009). We found that expression of Kir2.1 significantly reduced wave-like spontaneous activity and totally suppressed visually evoked activity in neurons expressing Kir2.1. We then examined orientation selectivity of neurons whose activities were suppressed during developmental stages with in vivo two-photon calcium imaging. Surprisingly, neurons silenced by Kir2.1 showed normal visual response and orientation selectivity. We will discuss roles of wave-like spontaneous activity during neonatal period and visually evoked activity after eye opening for maturation of orientation selectivity in the mouse visual cortex.

P9 Differential clustering of septin subunits beneath specific perisynaptic membrane domains in the cerebellar cortical neurons and glia

Hiroyuki Kurita¹, Yugo Fukazawa², Natsumi Ageta-Ishihara¹, Ryuichi Shigemoto² and Makoto Kinoshita¹

(¹Nagoya University Graduate School of Science, Nagoya, Japan;

²National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

Septins are ubiquitous GTPases that form filamentous heteropolymers, constitute relatively stable component of

membrane skeleton and serve as scaffolds and/or diffusion barriers for specific cortical molecules including membrane

proteins. Despite their abundance in metazoan nervous systems, functional redundancy among structurally similar septin subunits has been hampering reverse genetic approaches to their roles in the mammalian brain. To gain physiological insights from subcellular localization, we focused on the cerebellar cortex where this protein family is the most abundant, and systematically examined the distribution of individual subunits. Three-dimensional reconstruction of immunoelectron microscopy images from serial ultrathin sections of the rat cerebellar molecular layer revealed cell-type selectivity and differential subcellular distribution patterns of the major septin subunits SEPT2/3/4/5/6/7/8/11: Immunogold particles for SEPT3 were found almost exclusively in the parallel fibers (granule cell axons) and dendritic shafts and spines of Purkinje cells, those for

SEPT2/4/8/11 were preferentially in Bergmann glial processes where septins frequently cluster beneath concave plasma membranes that tightly surround the dendritic spine necks and stalks of Purkinje cells, and those for SEPT5/6/7 were in these neuronal and glial components. On the basis of the unique subcellular distribution of the septin subunits and the previous biochemical and structural findings, we predict that SEPT5-611-7-3 and SEPT42-811-7 are the common heterooligomer combinations respectively in the parallel fibers or Purkinje cell dendrites, and Bergmann glial processes. The perisynaptic septin clusters, in conjunction with their non-septin interacting partners (e.g., syntaxins, GLAST, nonmuscle myosins), may define previously uncharacterized plasma membrane domains at the inter-neuronal and glia-neuron interfaces.

P10 Gap-junctions, Basket Terminals and Chandelier Cartridges of Parvalbumin-immunoreactive GABA Cells in the Primate Cerebral Cortex

Akiko Yamashita

(Nihon University School of Medicine, Itabashi, Tokyo, Japan)

Among GABAergic interneurons in the primate cerebral cortex, basket cells and chandelier cells have terminals on the cell bodies and initial segments of the axons of the pyramidal cells respectively, and those GABAergic cells contain parvalbumin (PA), a calcium-binding protein (1, 2). Moreover, basket cells are known to connect each other with gap junction (3). In the cerebral cortex of the macaque monkeys, we also found connexin 36-immunoreactive (CX36-ir) puncta, putative gap junctions, on dendrites of PA-ir cells. In the monkey cortex, however, the densities of CX36-ir puncta were lower than those in the rats and cats (3). We also observed PA-ir terminal-like structures on initial segments of the axons and the cell bodies of the pyramidal cells. The densities of these PA-ir terminal-like structures were higher in the primate than in the rodent. Moreover, the

densities of PA-ir terminal-like structures were different among the areas of the cortex. In the primary motor cortex, a higher density of PA-ir terminal-like structures was observed than in the prefrontal and premotor cortices. The densities of basket and chandelier terminals, and gap-junctions of PA-GABA cells were different, suggesting that the inhibition on the pyramidal cells by GABA cells may differ among the species. PA-GABA cells in the primate cortex may have low frequency of synchronized activation and high performance of inhibition on the pyramidal cells. Moreover, the inhibition of PA-GABA cells on pyramidal cells specialized among cortical area in the primate cerebral cortex. Among the primate motor related areas, PA-GABA cells in the primary motor area inhibit pyramidal cells more strongly than in the premotor and prefrontal areas.

P11 Cell Type-Specific Inhibitory Inputs to Dendritic and Somatic Compartments of Parvalbumin-Expressing Neocortical Interneuron

Hiroyuki Hioki¹, Jaerin Sohn¹, Shinichiro Okamoto¹, Hiroshi Kameda², Eriko Kuramoto¹, Fumino Fujiyama^{3,4}, and Takeshi Kaneko¹

(¹ Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; ² Department of Physiology, School of Medicine, Teikyo University, Tokyo, Japan; ³ Laboratory of Neural Circuitry, Unit for Systems Neuroscience, Graduate School of Brain Science, Doshisha University, Kyoto, Japan; ⁴ Core Research for Evolutionary Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Japan)

Neocortical GABAergic interneurons are divided into at least three distinct subgroups by chemical markers: 1) parvalbumin (PV)-expressing cells; 2) somatostatin (SOM)-producing cells; 3) the cells immunoreactive for other markers such as vasoactive intestinal polypeptide (VIP). PV-producing fast-spiking neurons are a major component of cortical GABAergic interneurons, and well known to generate gamma oscillation by mutual chemical and electrical connections in the neocortex. Although it was clearly demonstrated that PV neurons form a dense gap junction network with each other not only at the proximal sites but also at the distal dendrites, comprehensive quantitative data on the chemical connections are still lacking. To elucidate the connectivity, we investigated inhibitory inputs to PV neurons in the somatosensory cortex, using the transgenic mice in which the dendrites and cell bodies of PV neurons were completely visualized.

We first examined GABAergic inputs to PV neurons by labeling postsynaptic and presynaptic sites with the immunoreactivities for gephyrin and vesicular GABA transporter. The density of GABAergic inputs was highest on

the cell bodies, and almost linearly decreased to the distal dendrites. However, since the surface area of the dendrites was much larger than that of cell bodies, GABAergic inputs per PV neuron were approximately 6-fold more numerous on the dendrites than on the cell bodies, suggesting the importance of dendritic GABAergic inputs. We then investigated inhibitory inputs from three distinct subgroups of GABAergic interneurons by visualizing the axon terminals immunopositive for PV, SOM, or VIP. The targets of PV and SOM inputs were almost exclusively the dendrites, and about 60% and 25% of inhibitory inputs to the dendrites were derived from PV and SOM neurons, respectively. In contrast, VIP inputs clearly preferred the cell bodies to the dendrites, and about 62% of inhibitory inputs to the cell bodies were originated from VIP neurons.

This compartmental organization of inhibitory inputs suggests that PV neurons, together with gap junctions, constitute mutual connections at the dendrites, and that their activities are negatively controlled by the somatic inputs of VIP neurons.

P12 Preprodynorphin-expressing Interneurons Constitute a Subpopulation of Somatostatin-positive Neurons in the Mouse Primary Somatosensory Cortex

Jaerin Sohn, Hiroyuki Hioki, Shinichiro Okamoto and Takeshi Kaneko

(Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan)

Dynorphins and enkephalins, opioid peptides, have modulatory influences through κ - (KOR) and μ - opioid receptors (MOR), respectively, in the central nervous system.

Preprodynorphin (PPD) and preproenkephalin (PPE) are precursors for those peptides, and abundantly expressed in the neocortex. We previously reported that PPE was expressed in

neocortical GABAergic interneurons in the rat primary somatosensory cortex (S1). Neocortical interneurons are roughly classified into three distinct subgroups by chemical markers, such as parvalbumin (PV), somatostatin (SOM) and the others. PPE-immunoreactive interneurons were negative for PV or SOM but positive for MOR (Taki et al., 2000).

In the present study, we investigated the chemical characteristics of preprodynorphin (PPD)-immunopositive cells in the mouse S1 by the double fluorescence labeling method. PPD-positive cells were mainly distributed in the middle layer. Almost all PPD-positive cells displayed the signals for glutamate decarboxylase 67 kDa isoform (GAD67) mRNA. This indicates PPD-expressing cells are GABAergic interneurons in S1. Almost all PPD-positive

interneurons showed SOM immunoreactivity, and inversely, they accounted for about half (46.0%) of SOM-positive interneurons. Since it is known that some SOM-expressing neurons are also immunoreactive for neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase 1 (NOS), calretinin (CR) and reelin, we subsequently investigated the colocalizations of immunoreactivities for those markers and PPD. Most PPD-positive neurons also showed immunoreactivity for reelin and some PPD-positive neurons were also immunoreactive for CR. In contrast, few of them showed immunoreactivities for NPY or NOS.

These findings suggest that PPD can be applied as a useful marker for a subgroup of SOM-positive interneurons in the mouse S1.

P13 Experience-dependent emergence of fine-scale networks in visual cortex

Ayako Ishikawa¹, Yukio Komatsu², Yumiko Yoshimura¹

(¹National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 444-8585, Japan.

²Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan.)

We previously demonstrated that pairs of adjacent layer 2/3 pyramidal cells recorded simultaneously in rat visual cortex frequently shared common inputs from nearby excitatory cells in layer 2/3 and 4, when they were monosynaptically connected, suggesting that multiple fine-scale networks of precisely interconnected excitatory neurons are embedded in a small area in visual cortex. In this study, we examined the effect of visual deprivation during early postnatal development on the maturation of the fine-scale network using visual cortical slices prepared from 3-week-old rats, which were reared in normal visual environment without or with binocular lid suture from the day of eyelid opening, or in darkness from birth. We conducted dual whole-cell recordings from layer 2/3 pyramidal cell pairs. In dark-reared rats, the detection probability of excitatory connections in the cell pairs was only half, and excitatory postsynaptic current (EPSC) amplitude was significantly smaller, compared with normally reared rats. In contrast, the connection probability and EPSC amplitude in rats with eyelid suture were

indistinguishable from those in normal rats. We then analyzed monosynaptic EPSCs evoked in layer 2/3 pyramidal cells by the firing of other cortical neurons in layer 2-5 resulting from focal glutamate uncaging using laser scanning photostimulation. The amplitude and number of EPSCs evoked by photostimulation were both significantly lower in dark-reared rats for each of the stimulated cortical layers, compared with normal rats, whereas binocular suture did not affect the development of either parameter. Thus, the maturation of individual synaptic connections to layer 2/3 pyramidal cells was retarded by dark rearing but not by binocular suture. In order to test whether visual deprivation affects the fine-scale network, we estimated the number of shared EPSCs by applying cross-correlation analysis to photostimulation-evoked EPSCs of simultaneously recorded neurons. In rats subjected to either type of deprivation, pairs of layer 2/3 pyramidal cells rarely shared common excitatory inputs from cells in layer 4 and 2/3, regardless of whether they were monosynaptically connected or not, indicating that

patterned vision is required for the establishment of fine-scale networks. Therefore, we suggest that the fine-scale networks are organized to optimize the information processing in visual

cortex adaptively to the visual environment during early development.

P14 Differential labeling of the cortical projection neuron subpopulations by TET-double infection method (TEDI)

Akiya Watakabe¹, Shigeki Kato², Kazuto Kobayashi², Hiroaki Mizukami³,
Keiya, Ozawa³, Tetsuo Yamamori¹

(¹Div. of Brain Biol., Natl. Inst. Basic Biol., Okazaki;

²Inst Biomedical Sciences, Fukushima medical Univ, Fukushima, Japan;

³Div Genetic Therap, Ctr Molecular Medicine, Jichi Medical Univ., Tochigi, Japan)

To identify and characterize various subtypes of cortical projection neurons, we developed TET-double infection method (TEDI) for their retrograde labeling. The principle of TEDI is to infect the target cells with two components of the TET-system. That is, the coding sequences for the TET-activator and the transgene under the TET Responsive Element (TRE) are packaged in two viral vectors: one in a rabies-G protein coated retrograde lentiviral vector and the other in a VSV-G coated lentiviral vector or adenoassociated viral vector (AAV). By infecting these vectors at the terminal and the origin, respectively, high-level expression of the transgene occurs only in the neurons that connect the two

points of infection. We now enhanced the technique by incorporating two fluorescent proteins to label distinct populations of projection neurons simultaneously. For example, we were able to differentially label the corticothalamic and corticopontine cells in the barrel cortex from the cells of origins to their terminals. We were also able to label corticocortical and corticothalamic cells of the barrel cortex projecting to the motor cortex and the thalamus (including reticular nucleus, VPM and PO), respectively. By simultaneous labeling, TEDI provides a novel means to analyze the subtle lamina structure of the mammalian neocortex composed of dendritic and axonal processes.

P15 Three-dimensional functional maps of mouse primary visual cortex

Satoru Kondo, Kenichi Ohki

(Department of Molecular Physiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan)

It has been suggested that local cortical circuits are composed of arrays of anatomical units that run perpendicular to the cortical surface. There are two such anatomical units, called a minicolumn and a microcolumn. These anatomical structures are also regarded as a functional unit for cortical processing but it is still in debate. We performed in vivo two-photon volume imaging of calcium signal from layers 2/3, 4 and 5 of mouse primary visual cortex. We reconstructed three-dimensional maps of orientation, spatial frequency, or

receptive field position and tested whether neurons in a minicolumn share the same selectivity for these visual features. We found functional microarchitectures for these three features were fundamentally different. Orientation map showed minicolumnar structure that are functionally separated from neighboring minicolumns but lacked global map. Spatial frequency selectivity was completely intermingled, and related to neither minicolumns nor global maps. Receptive field position map was significantly scattered, but coarsely

clustered. The scale of clustering was much larger than minicolumns, and likely corresponded to global retinotopic map. We also tested whether neurons in a microcolumn share the same selectivity by dendrite imaging and obtained the similar results as minicolumn. Thus, functional

microarchitectures for these three features are fundamentally different among three different visual features, and minicolumns and microcolumns are specifically related to orientation selectivity, neither to spatial frequency nor receptive field position,

P16 Local Circuitry of Layer 6 Spiny Neurons in Rat Frontal Cortex

Fuyuki Karube^{1,2,3,4}, Fumino Fujiyama⁴, and Yasuo Kawaguchi^{1,2,3}

(¹ National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan; ² The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Okazaki, Japan; ³ CREST, JST, Tokyo, Japan; ⁴ The Graduate School of Brain Science, Doshisha University, Kyoto, Japan.)

The deeper part of neocortex is composed of layer 5 (L5) and 6 (L6), both of which project to diverse cortical and subcortical regions. L5 excitatory pyramidal cells are now known to make specific intra- and inter-laminar connections, depending on extracortical projection and firing patterns. Some excitatory cells in L6 like those in L5 innervate the thalamus [corticothalamic (CTh) cells]. Others in L6 send axons to additional cortical areas [corticocortical (CC) cells, including commissural (COM) cells]. Whereas L6 CTh cells are characterized by regular spike (RS) firing and slender pyramidal cell morphology, L6 CC cells have not been well identified in correlation of their electrophysiological and morphological properties as well as in target selection of ipsilateral cortical areas. Therefore, we searched for output cortical areas of L6 CC cells in the rat frontal cortex by retrograde tracing, and also investigated their morphological/electrophysiological identity and local connection patterns by whole cell recording combined with presynaptic cell stimulation. L6 CC cells projected to ipsilateral perirhinal

and orbitofrontal cortices in addition to the contralateral frontal cortex. Most CC cells were morphologically not typical pyramidal cells, such as inverted pyramidal cells, and showed initial burst firing (doublet/triplet spikes) to phasic depolarization. Otherwise a few burst spiking pyramidal cells were found, but their extracortical targets have not been identified.

Both L6 CT and CC cells received excitation from L5 pyramidal cells. However, L6 CTh cells received synaptic inputs from upper L5 more often than lower L5, whereas L6 COM cells equally from both L5 sublayers. Furthermore, L5 CTh cells, more found in an upper L5 sublayer, induced EPSCs in L6 CTh cells more frequently than L6 COM cells. Paired recordings revealed frequent connection among L6 COM cells, whereas intra-laminar excitatory connection for L6 CTh cells was few. These results suggest L6 synaptic connections are organized according to corticothalamic and corticocortical projection diversity.

P17 Visualization of dendritic spines in marmoset neocortex in vivo

Osamu Sadakane¹, Akiya Watakabe¹, Masanari Ohtsuka¹, Masafumi Takaji¹, Tetsuya Sasaki², Masatoshi Kasai³,
Tadashi Isa³, Go Kato⁴, Junichi Nabekura⁴, Hiroaki Mizukami⁵, Keiya Ozawa⁵, Hiroshi Kawasaki⁶
and Tetsuo Yamamori¹

⁽¹⁾ Div. Brain Biology, NIBB, Aichi, Japan;

² Dept. Ultrastructural Research, National Institute of Neuroscience, NCNP, Tokyo, Japan;

³ Div. Behavioral Development, NIPS, Aichi, Japan;

⁴ Div. Homeostatic Development, NIPS, Aichi, Japan;

⁵ Div. Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical Univ., Tochigi, Japan;

⁶ Dept. Molecular and Systems Neurobiology, Grad. Sch. of Medicine, Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan)

The dynamics of dendritic spines is thought to represent the rewiring of neural circuits, and hence, to be the basis of learning and memory. To understand the neural basis of learning and memory associated with higher cognitive process, it is crucial to investigate the spine plasticity in the primate neocortex, which has the most specialized cortical areas among mammals. Our specific aim in this study is to develop the method to observe the spine plasticity in the neurons of the primate neocortex. We chose the marmoset as a model animal for the study of primate brain, because the relatively flat surface of the marmoset neocortex allowed us to observe various neocortical regions, some of which are difficult to access in larger monkeys with more distinct gyrus and sulcus. We used the AAV vector to express hrGFP and successfully

observed the spiny structures of neurons repeatedly from anesthetized animals using two-photon microscopy. To observe each dendritic spine clearly, strong and sparse expression of fluorescent protein was required. We achieved this requirement by amplifying the hrGFP expression using the TET-Off system, while titrating the amount of TET-activator driven by the Thy1S promoter (Ako et al., Mol. Cell. Neurosci., 2011) for sparse expression. The method we developed here will be useful to answer the questions whether and how the plastic state of neural circuits differ in specific cortical areas in the primate neocortex, which questions may be related to the higher order cognitive function or the malfunction of it.

P18 Nicotinic Modulation of Subtype-Specific GABAergic Neurons by Lynx Family Members

Michael Demars^{1,5}, Noreen Bukhari^{1,5}, Poromendro Burman^{1,5}, Ayan Hussein^{1,5}, Scott Russo^{2,5},
and Hirofumi Morishita¹⁻⁵

(Departments of ¹Psychiatry, ²Neuroscience and ³Ophthalmology, ⁴Mindich Child Health & Development Institute,

⁵Friedman Brain Institute Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA)

The ability of the mammalian neocortex to adapt based on experience greatly declines after a developmental phase known as the critical period. Recent findings revealed that Lynx1, a protein that binds and inhibits signaling through nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), acts as a brake to limit ocular dominance plasticity following the critical period

via increased expression (1). Lynx1 belongs to a larger Lynx family of proteins with high sequence homology (2). Another member of the Lynx family, Lypd6, has also been shown to bind and modulate nAChRs. However, in contrast to Lynx1, Lypd6 binding potentiates calcium currents through nAChRs (3). We hypothesize that members of the Lynx family may

act in concert to regulate critical period plasticity through modulation of nAChRs.

We show that expression of *Lypd6* rather declines across developmental critical period in visual cortex. Further, as opposed to the expression of *Lynx1* primarily in parvalbumin interneurons, we show the distribution of *Lypd6* in a subset of low layer somatostatin interneurons, which are involved in

both local feedback as well as long-range cortico-cortical circuits. Employing a combination of molecular, structural, and physiological techniques, we attempt to elucidate the coordinated contribution of the *Lynx* family members to visual cortical plasticity. Our findings highlight the diversity and specificity of nicotinic homeostasis regulated by *Lynx* family in each GABAergic neuron subtypes.

P19 Two photon imaging for lateral inhibition of neural ensemble in the superficial layer of the superior colliculus

Masatoshi KASAI¹, Tadashi ISA^{1,2}

(¹National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan;

²The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Okazaki, Japan)

The superior colliculus (SC) is a brainstem center which plays a key role in mediating the signal for sensory-motor translation. The superficial layer of the SC (sSC) is directly innervated by the optic tract and visual space is represented in the retinotopic coordinates. In the visual pathway as well as other sensory system, firing activity of neurons in response to the stimuli presented in their response field are often inhibited by stimuli presented outside their receptive field. These effects are known as “lateral inhibition” and thought to enhance the contrast of sensory information. It has been hypothesized that horizontal inhibitory connection in the sSC is the key element of such lateral inhibition; however, the way of its neural implementation remained elusive, especially at the neuronal population level. Therefore, we examined how the lateral inhibition is organized in the sSC, and tried to

elucidate its micro-circuit mechanism, by applying an in vivo two-photon Ca^{2+} imaging in anesthetized mice. We could successfully record neuronal activities from more than one hundred of neurons simultaneously during presentation of visual stimuli. First, we demonstrate the stimulus-size tuning in the sSC. The larger the stimuli size, the less the neural activity of the neurons which were located in the center of the receptive field. Second, mutual inhibition between two stimuli presented in remote positions has been observed. The peripheral stimulation significantly reduced the neuronal activity evoked by the stimulus presented in the receptive field center. Thus, we succeeded in establishing the experimental preparation in which we can analyze the neural mechanism of lateral inhibition in the neuronal population of the sSC.

P20 Involvement of the store operated calcium entry in the long-lasting spontaneous calcium transient in the striatal GABAergic neuron

Satomi Kikuta¹, Yuchio Yanagawa² and Makoto Osanai¹

(¹ Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan;

² Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Japan)

We previously reported that the long-lasting spontaneous Ca^{2+} transients (spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients), which lasted

up to about 300 s, were observed in striatal cells. These Ca^{2+} transients were mainly caused by the Ca^{2+} release from the

intracellular Ca^{2+} store (ER) via IP_3 receptors. But, the mechanisms that underlie the spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients remain unclear. Store operated Ca^{2+} entry (SOCE) is thought to be activated by the depletion of Ca^{2+} in ER by the Ca^{2+} release from that. Thus, we investigated whether SOCE involved in the spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients or not.

In the striatum, there are no reports concerning SOCE. Therefore, at first, we confirmed the presence of SOCE in the striatal neurons using Ca^{2+} imaging in the striatal slice preparations. In the striatum more than 95% neurons are GABAergic, thus, the GAD67-GFP knock-in mice were used for visualization of the GABAergic neurons. After depletion of Ca^{2+} in the ER by the application of thapsigargin, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was elevated when the extracellular Ca^{2+} concentration returned to normal level from the Ca^{2+} -free condition. This

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation was blocked by the application of the blocker of the SOCE, SKF96365. Thus, striatal GABAergic neuron has SOCE. Next, we investigated the contribution of SOCE in the spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients. To quantify the amount of the Ca^{2+} influx, we used the method of the Mn^{2+} quenching of the fluorescent Ca^{2+} indicator. The time constant of the quenching was faster in the neurons exhibiting the spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients compared with the neurons not exhibiting the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients under of TTX administration. SKF96365 tended to decrease the frequency of the spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients. These results suggested that the spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients led to activate SOCE in the striatal cells, and that SOCE might contribute to the maintenance of the high $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels during the spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients.

P21 SeeDB: a Simple and Morphology-preserving Optical Clearing Agent for Neuronal Circuit Reconstruction

Meng-Tsen Ke^{1,2}, Satoshi Fujimoto¹, and Takeshi Imai^{1,2,3}.

⁽¹⁾ Laboratory for Sensory Circuit Formation, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe 650-0047, Japan;

⁽²⁾ Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan;

⁽³⁾ PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST), Saitama 332-0012, Japan)

We report a water-based optical clearing agent, SeeDB, which clears fixed brain samples in a few days without quenching many types of fluorescent dyes, including fluorescent proteins and lipophilic neuronal tracers. Unlike previous methods, our method maintained a constant sample volume during the clearing procedure, an important factor to keep cellular morphology intact, and facilitated the quantitative reconstruction of neuronal circuits. Combined with two-photon microscopy and an optimized objective lens, we were able to image the adult mouse brain from the dorsal to the ventral side. Taking the advantage of this non-disturbing clearing solution, we used SeeDB to specify the wiring pattern of the olfactory bulb circuits in the mouse. In the mouse olfactory system, olfactory sensory neurons expressing a given type of odorant receptor converge their axons to a pair of glomeruli in the olfactory bulb. Odor inputs

to a single glomerulus are then relayed to 20-50 mitral and tufted cells through their primary dendrites. Although sister mitral cells connecting to the same glomerulus receive correlated excitatory inputs, it remains unknown to what extent the inhibitory modulations are diverse among sister mitral cells. Using single glomerulus labeling with fluorescent dextran tracers, we described the near-complete wiring diagram of the sister mitral cells in the bulb. We demonstrate the diversity of dendrite wiring pattern among sister mitral cells, providing an anatomical basis for non-redundant odor coding model. Our simple and efficient method is powerful for image intact morphological architecture at large scales, both in the adult and developing brains. The simple and non-toxic composition of SeeDB also made it suitable for routine usage.

P22 Lateralized Enhancement of Experience-induced Hippocampal Gamma Oscillations

Yoshiaki Shinohara, Aki Hosoya and Hajime Hirase

(Laboratory for Neuron-Glia Circuitry, RIKEN BSI, Wako, Japan;)

Gamma oscillations have gathered attention because they are implicated in higher order brain functions such as sensory binding and memory. But, how an animal's experience organizes these gamma activities remains largely elusive.

We find that the power of hippocampal theta-associated gamma oscillations tends to be greater in rats reared in an enriched environment than those reared in an isolated condition. This experience-dependent gamma enhancement is

consistently larger in the right hippocampus across subjects, coinciding with a lateralized increase of synaptic density in the right hippocampus. Moreover, interhemispheric coherence in the enriched environment group is significantly elevated at the gamma frequency. These results suggest that enriched rearing sculpts the functional left-right asymmetry of hippocampal circuits by reorganization of synapses.

P23 Cortical Activity Regulates the Tetrodotoxin-Resistant Slow Ca^{2+} Oscillation in the Striatum

Makoto Osanai¹, Atsushi Tamura¹, Naohiro Yamada², Yuichi Yaguchi² and Fumito Oboshi²

(¹ Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan;

² The Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Japan)

Calcium ion (Ca^{2+}) is a universal intracellular messenger, and plays enormous versatile rolls in cells. Especially in a nervous system, it is well known that Ca^{2+} triggers a neurotransmitter release from the presynaptic terminal. On the other hand, an intracellular signal transduction, which depends on metabotropic receptors, causes Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store, the endoplasmic reticulum (ER). Physiological meanings of the role of the Ca^{2+} released from ER remain less well-defined.

The striatum plays an important role in linking cortical activity to basal ganglia outputs. Previous reports suggested that Ca^{2+} signaling in the striatal neuron may modulate cellular functions and synaptic transmission. However, induction mechanisms of the calcium signaling in the striatum remain unclear.

We have found the long-lasting spontaneous calcium transients (slow Ca^{2+} oscillation), which lasted up to about 300 s, in the striatal neurons and astrocytes. The Ca^{2+} oscillations were not induced by action potentials, but induced by Ca^{2+} release from ER via IP3 receptor. Transient rate of these Ca^{2+} oscillations in neurons were reduced by an

antagonist of mGluR5, thus, mGluR5-PLC-IP3 pathway might involve to the Ca^{2+} oscillation.

This slow Ca^{2+} oscillation did not blocked, but the auto- and cross-correlations were modified by TTX administration. In the condition of TTX administration, the rhythmicity of the Ca^{2+} oscillations increased compared to the control condition. The number of the correlated cell pairs of the Ca^{2+} oscillations was decreased by TTX administration. These phenomena were observed only in the corticostriatal slice but not in the striatal slice.

In the computer simulation study, we found out that the spontaneous Ca^{2+} oscillation could alter the firing rate of the medium spiny neuron via modulation of Ca^{2+} -activated potassium channels.

These results suggested that the TTX-insensitive glutamate release, such as transmitter release from astrocytes, activates mGluR5 and elicits the spontaneous Ca^{2+} oscillations, and that the cortical activity dependent transmitter release activates another type of metabotropic receptors and regulates the slow Ca^{2+} oscillation, which may modulate the input/output relationship of the striatal neuron via Ca^{2+} -activated

potassium channels.

P24 Experience-dependent Postsynaptic Inositol 1, 4, 5-trisphosphate Signaling Regulates Presynaptic Functions in the Mature Barrel Cortex

Jun Kubota, Kazunori Kanemaru, Yohei Okubo, Masamitsu Iino
(Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan)

Alteration of sensory input can change the strength of neocortical synapses. This process occurs throughout life, but the underlying mechanisms remain unclear especially in mature animals. Here we investigated the effects of whisker deprivation in mice after the critical period. Whisker deprivation, beginning at the critical period (postnatal day [P] 12–14), decreased the presynaptic release probability at L4–L2/3 synapses in the barrel cortex. As reported previously, the type 1 cannabinoid receptor (CB1R) is involved in this change. On the other hand, we found that whisker deprivation, beginning at older ages (P18–20) when synapses are almost mature, also decreased the presynaptic release probability at L4–L2/3 synapses with a CB1R-independent manner. We searched for a responsible signaling mechanism, and found

that a positive allosteric modulator of the metabotropic glutamate receptor (mGluR) restored deprivation-induced weakening. Furthermore, application of mGluR antagonists to intact mice produced effects similar to those of whisker deprivation. mGluR is coupled to inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) signaling in the postsynaptic neurons. We thus suppressed the IP3 signaling in the L2/3 pyramidal neurons using an IP3 hydrolyzing enzyme, IP3 5-phosphatase (5ppase). The expression of 5ppase produced effects similar to those of whisker deprivation or mGluR antagonist application. These results suggest that experience-dependent mGluR-IP3 signaling in the postsynaptic neurons retrogradely regulates the presynaptic functions in the mature barrel cortex.

P25 Glycoprotein From An Attenuated Rabies Strain Increases An Affinity Toward Non-Neuronal Cells And Long-Range Projection Neurons

Takuma Mori and Yumiko Yoshimura
(National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan)

Rabies glycoprotein is the most essential gene for cell-to-cell spreading of rabies virus. Each rabies virus strain has a variant of glycoprotein and shows different toxicity, which is believed to reflect the efficiency of cell-to-cell spreading.

The goal of this study is to clarify if glycoprotein-deleted rabies virus coated with glycoprotein variants shows different characteristics. We used glycoproteins from three rabies strains of different attenuation levels, virulent Challenge Virus Standard (CVS), less virulent Street Alabama Dufferin B19 (SAD), and highly attenuated High Egg Passage-Flury

(HEP) to produce glycoprotein-deleted rabies virus and compared the tropisms among these glycoproteins *in vitro* and *in vivo*.

We first examined if these glycoproteins show different affinities to neuronal and non-neuronal cells *in vitro*. We generated glycoprotein-deleted HEP expressing GFP (HEP-deltaG-GFP) coated with glycoproteins of CVS (CVSG), SAD (SADG) or HEP (HEPG). We then measured the infectious titers of HEP-deltaG-GFP coated with one of the glycoproteins on neuro-2a, a neuroblastoma cell line and BHK-21, a non-neuronal cell line. We found that HEP-

deltaG-GFP coated with HEPG (HEPG-HEP-deltaG-GFP) showed higher affinity to BHK-21 than to neuro-2a. Both CVSG- and SADG-HEP-deltaG-GFP showed similar affinities to both of the cell lines.

We next applied HEP-deltaG-GFP to tracing of monosynaptic neuronal networks *in vivo*. We introduced genes of one of the rabies glycoproteins, RFP, and TVA to layer 2/3 pyramidal neurons in mouse somatosensory cortex by *in utero* electroporation and then injected EnvA-HEP-deltaG-GFP into the electroporated area in adulthood. We observed presynaptic neurons in layers 2/3, 4, 5 and thalamus, and very few astrocytes. The local distribution

patterns of presynaptic neurons were similar between CVSG- and SADG-HEP-deltaG-GFP. On the other hand, HEPG-HEP-deltaG-GFP visualized less neurons and more astrocytes than CVSG- and SADG-HEP-deltaG-GFP. Surprisingly, even though HEPG-HEP-deltaG-GFP did visualize less local neurons, it was able to visualize more callosal and thalamic neurons than CVSG- or SADG-HEP-deltaG-GFP.

These findings show that HEPG lost a part of neurotropism but acquired an affinity to non-neuronal cells and some projection neurons. HEPG-HEP-deltaG-GFP may be useful to visualize astrocytes and monosynaptically connected long-range projection neurons.

P26 Order and Chaos in a model of the Striatal Medium Spiny Neuron Network

Adam Ponzi and Jeffery R Wickens

(Okinawa Institute of Science and Technology (OIST), Okinawa, Japan)

The striatum forms the main input structure to the Basal Ganglia (BG). It is 90% composed of medium spiny neurons (MSNs) which inhibit each other through collaterals, receive excitatory projections from cortex and are the only cells projecting outside the striatum. Because of its inhibitory structure the MSN network is often thought to act selectively, transmitting the most active cortical inputs downstream in the BG while suppressing others. However studies show that local MSN network connections are too sparse and weak to perform global selection and their function remains puzzling. Here we suggest that rather than generating a static stimulus dependent activity pattern the MSN network is optimized to generate stimulus dependent dynamical population activity patterns. Indeed various experimental studies have shown that individual MSNs and MSN assemblies display diverse response profiles locked to task and reward predicting events with phasic activity peaks broadly distributed across the whole spectrum of delays after task events. We have previously shown that such activity emerges in a spiking MSN network model but only at realistic connectivities of ~15% and only when MSN generated inhibitory post-synaptic

potentials (IPSPs) have realistic properties [1]. Here we investigate how network generated population activity interacts with temporally varying cortical driving activity, as would occur in a behavioural task. We find [2] that at unrealistically high connectivity a stable regime is found where network activity separates into fixed stimulus dependent regularly firing and quiescent components. Around 15% connectivity a transition to a dynamically unstable regime occurs where all cells constantly switch between activity and quiescence. Only in the marginally stable transition regime do weak changes in cortical driving interact with many population components so that sequential cell assemblies are reproducibly activated for many hundreds of milliseconds locked to cortical variations and PSTH display strong stimulus and temporal specificity. Based on calculations from a simplified rate model we show that the MSN network, characterized by its connectivity and IPSP properties, sits precisely at the edge of chaos, and that this confers a variety of optimal properties. We discuss how these special properties may be utilized in behaviours strongly recruiting the striatum.

P27 Position- and cell type-specificity in electrical coupling between neocortical layer 5 excitatory neurons in neonatal mice

Nao Nakagawa, Naomi Matsumoto and Toshihiko Hosoya

(Laboratory for Local Neuronal Circuits, RIKEN BSI, Wako, Japan)

One of the major questions in neocortical research is the extent to which neuronal organization is stereotyped. Our previous analyses have revealed that the arrangement of subcerebral projection neurons (SCPNs), which are the major pyramidal neuron subtype in mouse layer 5, was highly organized. SCPNs aligned radially to form columnar units, and these units were periodically located. This periodic columnar organization was observed in multiple cortical areas and the typical wavelength of the periodicity was 30 μm . Under specific visual stimulation, neurons in single columnar units exhibited strongly correlated expression of the immediate early gene c-Fos. Therefore, SCPNs have a periodic columnar arrangement, and neuronal activity leading to c-Fos expression is similar among neurons in the same repeating units.

It is not known what mechanisms generate the columnar functional organization. One of the possible mechanisms is electrical coupling mediated by gap junctions, which are

present in developing cortical neurons. To investigate electrical coupling between layer 5 excitatory neurons in the neonatal mouse brain, we performed whole-cell patch clamp recordings from multiple neurons in acute brain slices and detected electrical coupling by measuring responses to electrical stimulation in neighboring neurons. Detected electrical coupling was confirmed to be sensitive to gap junction blockers. In the first postnatal week, electrical coupling was found between neighboring SCPNs with high probability (40-50%). This electrical coupling showed stringent cell-type specificity. Moreover, radially-arranged SCPNs were coupled more frequently than those arranged tangentially. The electrical coupling was specific to the early cortical development, as it almost disappeared in the second postnatal week. These results raise the possibility that electrical coupling is involved in the construction of the periodic columnar organization.

【 各種シンポジウム 】

2013（平成 25）年度生理研国際シンポジウム

44th NIPS International Symposium “International symposium”

第 44 回生理研国際シンポジウムは、第 5 回アジアペインシンポジウムとして 2013 年 12 月 18 日より 12 月 20 日までの 3 日間開催された。

10 名の外国からの招待講演者を含む計 14 名の外国（中国、韓国、台湾、カナダ、ドイツ、イギリス）からの参加者があった。また、国内からの参加者は 95 名（招待講演者 14 名）であり、計 109 名の参加を得た。講演 24 題、ポスター発表 31 題であった。運営は技術課の協力を得て細胞生理研究部門が中心となっており、討議も活発であり、盛会であったと言える。



The 44th NIPS International Symposium “The 5th Asian Pain Symposium”

December 18 – December 20, 2013
Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan

44th NIPS International Symposium was held as the 5th Asian Pain Symposium with people from China, Korea, Taiwan, Canada, Germany and United Kingdom in addition to Japan. One hundred nine researchers (14 from abroad) participated in this symposium with 24 oral and 31 poster presentations, and the meeting was really fruitful with a lot of discussion.

Program

Dec 18 (Wed), 2013

Opening Remark

Makoto TOMINAGA (Okazaki Institute for Integrative Bioscience)

Session 1

Chair: Koichi NOGUCHI (Hyogo College of Medicine)

13:00-13:25

Takayuki NAKAGAWA (Kyoto University, Japan)
“Roles of TRPA1 in oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy”

13:25-13:50

Kazue MIZUMURA (Chubu University, Japan)
“Muscle pain and neurotrophic factors”

13:50-14:25

Lan BAO (Chinese Academy of Sciences, China)
“The trafficking regulation of Nav1.8 in primary sensory neurons”

Session 2

Chair: Kazue MIZUMURA (Chubu University)

14:45-15:10

Seiji ITO (Kansai Medical University, Japan)
“Bifurcate roles of nitric oxide in neuropathic pain”

15:10-15:35

Koichi NOGUCHI (Hyogo College of Medicine, Japan)
“Pronociceptive lipid mediators in spinal cord in neuropathic pain”

15:35-16:10

Seog Bae OH (Seoul National University School of Dentistry, Korea)
“Chronic pain as an intractable neuroinflammatory disease”

Session 3

Chair: Seiji Ito (Kansai Medical University)

16:30-16:55

Makoto TOMINAGA (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, Japan)
“Molecular mechanisms of nociception through TRPA1 activation”

16:55-17:30

Xu ZHANG (Chinese Academy of Sciences, China)
“Role of FXR2, γ subunit of Na^+, K^+ -ATPase, in inflammatory pain”

Poster Session 17:30-18:30

Dec 19 (Thu)

Session 4

Chair: Makoto TOMINAGA (Okazaki Institute for Integrative Bioscience)

9:00-9:25

Junichi NABEKURA (National Institute for Physiological Sciences, Japan)
“Remodeling of synapses in somatosensory cortex in chronic pain mouse”

9:25-10:00

Min ZHUO (University of Toronto, Canada)
“Presynaptic form of long-term potentiation in the anterior cingulate cortex mediates injury-related anxiety”

Session 5

Chair: Fusao KATO (Jikei University School of Medicine)

10:20-10:45

Yasushi KURAISHI (University of Toyama, Japan)
“Involvement of oxidative stress in herpes-associated acute pain and itch in mice”

10:45-11:10

Emiko SENBA (Wakayama Medical University, Japan)
“Exercise training attenuates neuropathic pain by modulating microglial activation”

11:10-11:45

Bai Chuang SHYU (Academia Sinica, Taiwan)

“Differential mechanisms of P2X7 and BDNF in central post-stroke pain”

Session 6

Chair: Emiko SENBA (Wakayama Medical University)

13:15-13:40

Makoto TSUDA (Kyushu University, Japan)

“Microglial transcription factors and neuropathic pain”

13:40-14:15

Yong-Jing GAO (Nantong University, China)

“Chemokine-mediated astroglial-neuronal interaction in neuropathic pain”

14:45-14:40

Hiroshi UEDA (Nagasaki University, Japan)

“Roles of amplification of LPA synthesis through microglial activation in neuropathic pain”

Session 7

Chair: Hiroshi UEDA (Nagasaki University)

15:00-15:25

Masabumi MINAMI (Hokkaido University, Japan)

“Role of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced aversion”

15:25-16:00

Xian-Guo LIU (Sun Yat-sen University, China)

“Cytokine microenvironment hypothesis of chronic pain”

Session 8

Chair: Masabumi MINAMI (Hokkaido University)

16:20-16:45

Ryusuke KAKIGI (National Institute for Physiological Sciences, Japan)

“Pain and itch perception in humans”

16:45-17:20

Wei-Zen SUN (National Taiwan University Hospital, Taiwan)

“Awake or asleep? Behavioral correlates of the brain

metabolic activity and functional connectivity by pregabalin, alpha-2-delta antagonist, in awake neuropathic pain model”

Dec 20 (Fri)

Session 9

Chair: Yasushi KURAISHI (University of Toyama)

9:30-9:55

Hidemasa HURUE (National Institute for Physiological Sciences, Japan)

“Spinal GABAergic excitation by optogenetic activation of descending noradrenergic system”

9:55-10:20

Guang-Yin XU (Soochow University, China)

“Epigenetic regulations of chronic visceral pain in functional gastrointestinal disorders”

Session 10

Chair: Hidemasa HURUE (National Institute for Physiological Sciences)

10:40-11:05

Fusao KATO (Jikei University School of Medicine, Japan)

“Nociceptive amygdala in various chronic pain models”

11:05-11:40

Jun CHEN (Fourth Military Medical University, China)

“Painful neuropathy and the environment - Prediabetes and Metabolic syndrome, risks of a western lifestyle”

Closing Remark

Makoto TOMINAGA (Okazaki Institute for Integrative Bioscience)

Posters

There were 31 poster presentations.

【トレーニングコース】

第 24 回生理科学実験技術トレーニングコース

“生体機能の解明に向けて”—分子・細胞レベルからシステムまで—

2013 年 7 月 29 日－8 月 2 日

担当：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

【概要】

生理学研究所の生理科学実験技術トレーニングコースは、今年で 24 回目を迎え、7 月 29 日（月）より 8 月 2 日（金）までの 5 日間、生理学研究所の明大寺、山手両キャンパスで開催した（担当：川口泰雄）。生理学研究所は、シナプスから個体行動レベルまでの各階層を縦断する研究を行い、大型共同利用機器を保有している。これらの利点を生かして神経科学に関する多様な技術の普及や、それらを使った研究レベルの向上が、このコースの目的である。今年度も、生理研実験研究棟が耐震改修工事に入っており、コースや募集人員（約 110 名）は、例年より若干少なかった。しかし、それでも、194 名の応募があり、117 名の方々が採択され実際に下記のコースを受講された。受講者の 8 割程が大学院生で、他は学部学生と、大学や企業の研究者の方達でした。開催にあたっては、日本生理学会と日本神経科学学会からご援助をいただいた。実習指導には生理研職員を中心として、他大学からの講師の先生も含めて、80 人程の研究者があたった。

【講演】

1. 「ウイルスベクターを用いた摂食行動発現機構の解明 —代謝センサーAMPK の研究から—」
箕越靖彦（生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門 教授）
2. 「「私たち」の脳科学に向けて：2 個人同時計測 MRI 研究」
定藤規弘（生理学研究所 心理生理学研究部門 教授）

【講義】

「動物実験教育訓練：—生理学研究と動物実験—」

佐藤浩（生理学研究所 動物実験コーディネータ室 特任教授）

【実習内容】

- (1) in situ hybridization 法
- (2) ジーンターゲットマウス作製の基礎から応用へ
- (3) 2 光子顕微鏡による細胞内分子活性化の FRET イメージング
- (4) TEM トモグラフィーおよび連続ブロック表面 SEM による細胞の三次元形態解析
- (5) 2 光子励起顕微鏡による生体内微細構造・細胞活動イメージング
- (6) in vitro 発現系を用いたイオンチャネル・受容体の機能解析
- (7) パッチクランプ法
- (8) スライスパッチクランプ法
- (9) In vivo 標本およびスライス標本からのブラインドパッチクランプ法
- (10) 神経性代謝調節研究法入門
- (11) 色と質感知覚の脳内メカニズムの実験的解析
- (12) 脳磁図によるヒト脳機能研究の基礎
- (13) ヒト脳機能マッピングにおけるデータ解析入門
- (14) 生理学実験のための電気回路・機械工作
- (15) 生理学実験のためのプログラミング

各コースのさらに具体的な内容に関しては、以下を参照されたい。

<http://www.nips.ac.jp/training/2013/courses3.html>

トレーニングコース終了時には、例年参加者からアンケートをいただいている。以下 URL にアンケートの主な質問項目に対する回答結果の集計を示す。

<http://www.nips.ac.jp/training/2013/questionnaire/TC2012Q.pdf>

【 セ ミ ナ ー 報 告 】

セミナー報告

1. Transgenic mouse models to study neuroglia functions in the brain: (1) impact of glial glutamate receptors and (2) the potential of NG2 glia differentiation

Frank Kirchhoff (Department of Molecular Physiology, University of Saarland, Germany)

(2013.4.1)

Glial cells are important components of brain function. However, their contributions to synaptic transmission or to CNS development and injury processes still require mechanistic explanations. In my presentation I will discuss several genetic mouse models that helped us to obtain a better understanding of the CNS.

In the cerebellum, Bergmann glial (BG) cells express α -amino -3- hydroxy -5- methyl -4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-type glutamate receptors (AMPA) composed exclusively of GluA1 and/or GluA4 subunits. With the use of conditional gene inactivation, we found that the majority of cerebellar GluA1/A4-type AMPARs are expressed in BG cells. In young mice, deletion of BG AMPARs resulted in retraction of glial appendages from Purkinje cell (PC) synapses, increased amplitude and duration of evoked PC currents, and a delayed formation of glutamatergic synapses. In adult mice, AMPAR inactivation also caused retraction of glial processes. The physiological and structural changes were accompanied by behavioral impairments in fine motor coordination. Thus, BG AMPARs are essential to optimize synaptic integration and cerebellar output function throughout life.

Similarly, we used conditional gene targeting to ablate the essential subunit of NMDA receptors (NR1) in mature oligodendrocytes in vivo. Focussing on the optic nerve, we discovered that activation of oligodendroglial NMDA receptors in development marks a previously unrecognized neuronal (axonal) stimulation of myelin formation. Moreover, by using a well-established ex vivo model of ischemia and comparing NMDA receptor mutants and wildtype optic nerves we identified that glutamate-mediated signals can be "axon-protective" under hypoxic/hypoglycemic conditions, rather than simply toxic as previously hypothesized. We therefore can propose a new model in which oligodendroglial NMDA receptor activation orchestrates a metabolic support for the axon that is elegantly coupled to axonal energy needs.

Glial fate-mapping experiments employed the transgenic split-Cre/loxP system as well as a novel NG2-CreERT2 knockin mouse line. Thereby, we revealed the wide differentiation potential of NG2-glia. In a context-dependent fashion as given by development or injury processes, NG2 glia can generate oligodendrocytes, astrocytes or even neurons in vivo.

2. Acute cardiovascular and cerebrovascular effects of energy drink consumption

Jean-Pierre Montani (Department of Medicine / Physiology University of Fribourg / Switzerland)

(2013.4.3)

Consumption of refined sugars in the form of soft drinks is increasingly recognized as a public health concern with major implications for cardiovascular diseases. These adverse consequences might be exacerbated by caffeine, which is often added to soft drinks, particularly in popular "energy" drinks. In young healthy subjects, we tested whether the

acute consumption of an energy drink would impact on hemodynamic variables, particularly in elevating blood pressure, and affect cerebral blood flow velocity (measured by transcranial Doppler) and microvascular endothelial function. We also tested whether consuming a popular energy drink would potentiate the cardiovascular responses to a

mental stress test. Our results show that consumption of an energy drink increases the workload to the heart and decreases cerebral blood flow velocity. Performing a mental arithmetic task imposes an additional cardiovascular load.

Taken together, our data suggest that the acute ingestion of an energy drink results in an unfavourable cardiovascular and cerebrovascular profile, which could affect people suffering from hypertension and cerebrovascular diseases adversely.

3. ゲノムを通して我が身を知る～ヒトとサルの間にあるもの～

郷 康広 (新分野創成センター ブレインサイエンス研究分野 特任准教授)

(2013.5.22)

ヒトの全ゲノム配列が解読されて 10 年あまり、ゲノム解析の勢いはとどまるところを知らない。いわゆる次世代シーケンサーの登場による配列解読技術の飛躍的な進歩もあり、様々なヒトの病気の解明やヒトの多様性研究のためにすでに数万人規模の全ゲノム配列が解読されたと言われている。しかし、いくら多様なヒトゲノムが明らかになったとしても、ヒトの本質的な理解、さ

らには進化的意義を知るためには、ヒトゲノムだけでなく、ヒト以外の種と比較することが必要不可欠である。そこで、私はヒトの比較対象としてヒト以外の霊長類、特にチンパンジーやマカクザルのゲノム解析、トランスクリプトーム解析を中心に研究をすすめている。それら、ヒト以外の霊長類ゲノムを調べる事によって見えてくる「ヒトとサルの間にあるもの」について考えてみたい。

4. Neural Correlates of Active Vision

伊藤淳司 (ユースリッヒ総合研究機構 研究員)

(2013.6.4)

Recent studies have emphasized the functional role of neuronal activity underlying oscillatory local field potential (LFP) signals during visual processing in natural conditions. While functionally relevant components in multiple frequency bands have been reported, little is known about whether and how these components interact with each other across the dominant frequency bands. We examined this phenomenon in LFP signals obtained from the primary visual cortex of monkeys performing voluntary saccadic eye movements (EMs) on still images of natural-scenes. We identified saccade-related changes in respect to power and phase in four dominant frequency bands: delta-theta (2-4 Hz), alpha-beta (10-13 Hz), low-gamma (20-40 Hz), and high-gamma (>100 Hz). The phase of the delta-theta band component is found to be entrained to the rhythm of the repetitive saccades,

while an increment in the power of the alpha-beta and low-gamma bands were locked to the onset of saccades. The degree of the power modulation in these frequency bands is positively correlated with the degree of the phase-locking of the delta-theta oscillations to EMs. These results suggest the presence of cross-frequency interactions in the form of phase-amplitude coupling (PAC) between slow (delta-theta) and faster (alpha-beta and low gamma) oscillations. We have also found that spikes evoked by visual fixations during free viewing are phase-locked to the fast oscillations. Thus, signals of different types and on different temporal scales are nested to each other during natural viewing. Such cross-frequency interaction may provide a general mechanism to coordinate sensory processing on a fast time scale and motor behavior on a slower time scale during active sensing.

5. Role of the Superior Colliculus in coordinating the orienting response

Douglas P. Munoz (Queen's University, Canada)

(2013.6.18)

The visual system must efficiently select crucial elements from the excessive information available in the environment for detailed processing. This selection process is greatly influenced by a bottom-up saliency-based mechanism, in which the saliency or conspicuity of objects (or locations) in the environment is encoded, and the appearance of a salient object can initiate an orienting response to allocate neuronal resources toward that object for computationally intensive processing. Saccadic eye movements and attention shifts, as components of the orienting response, are evoked by the presentation of a salient stimulus and are modulated by the

stimulus saliency. The superior colliculus (SC) is a phylogenetically well-preserved subcortical structure, known for its central role in the initiation of eye movements and attention and in multisensory integration. The SC is also hypothesized to encode stimuli based upon saliency to coordinate the orienting response. In this presentation, I will review recent evidence showing a key role for the SC in coordinating orienting to salient stimuli. This includes modulations of eye movements, attention, and transient pupil responses.

6. Neural circuits for information seeking

Ethan Bromberg-Martin (Laboratory of Sensorimotor Research, National Eye Institute, NIH)

(2013.6.26)

Humans and animals can be strongly motivated to seek advance information about future rewards. This motivation is likely to be supported by a pathway including lateral habenula neurons (LHb) and midbrain dopamine neurons (DA), which transmits a phasic reward signal reflecting the subjective value of getting information. This raises two major questions. (1) What neural signals does the brain use to compute the value of getting information? (2) Once it is computed, how is this value sent to the LHb-DA pathway to motivate behavior?

As a first step toward answering these questions, I will show that some LHb neurons receive a new type of tonic, sustained signal that anticipates the time of getting information about uncertain future rewards. This tonic signal could help to compute the value of getting information and to generate the phasic signal when information is received. I will

also show preliminary evidence that the tonic and phasic information signals could be sent to the LHb-DA pathway by an output nucleus of the basal ganglia, and that these signals are enhanced by conditions that enhance information seeking behavior. These data suggest a possible role for the basal ganglia in computing the value of information and using it to motivate behavior.

(Selected publications) Bromberg-Martin ES, Hikosaka O. Lateral habenula neurons signal errors in the prediction of reward information. *Nature Neuroscience* (2011), Vol. 14, no. 9, pp. 1209-1216.

Bromberg-Martin ES, Hikosaka O. Midbrain dopamine neurons signal preference for advance information about upcoming rewards. *Neuron* (2009) Vol. 63, no. 1, pp. 119-126.

7. クラスター型プロトカドヘリンによる大脳皮質神経結合特異性の制御

足澤悦子 (生理学研究所 神経分化研究部門 特任助教)

(2013.6.27)

大脳皮質の機能的な神経回路の形成には、遺伝的に定められた大まかな結合形成と生後の感覚体験に依存する結合の可塑的調整の2つの段階が考えられる。我々は、大脳皮質の特異的な神経結合形成に遺伝子プログラムが関与している可能性を検証するために、多様化膜分子群であるクラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) に着目した。この分子は、58種類のアイソフォームからなるが、胎生期のメチル化制御により、最終的に個々の神経細胞には10数種のアイソフォームを発現し神経細胞の個性を決定している。しかし、その神経細胞の個性が果たす役割はまだ明らかにされていない。一つの可能性として、接着分子である cPcdh が神経回路の特異的シナプス形成に関与していることが考えられる。そこで我々は、cPcdh を全て欠損した神経細胞におけるシナプス結合特異性を電気生理学的に検証した。

cPcdh 全欠損マウスは生後すぐに死亡するため、我々は胎生期の cPcdh 全欠損マウスから iPS 細胞を作製し、野生型マウスの受精卵に戻すことでキメラマウスを作製した。大脳皮質のバレル野4層の星状細胞からダブルホールセル記録を行い、シナプス結合確率を調べたところ、cPcdh 全欠損細胞間シナプス結合確率は、野生型細胞間と同レベルであり、機能的なシナプスを形成していることがわかった。しかし、野生型細胞間では、約7割が双方向性にシナプス結合しているのに対し、全欠損細

胞間では、3割程度と有意に減少していることが明らかになった。さらに、4層の星状細胞のバレル皮質内における興奮性シナプス入力様式をレーザースキャン光刺激法で網羅的に調べたところ、cPcdh 全欠損細胞は正常細胞に比べて全層からのシナプス入力数が増加していた。以上の結果より、cPcdh の欠損は、シナプス結合確率には影響しないが、その特異性やそれに伴うシナプス入力数に影響を与えることが明らかとなった。

さらに我々は、cPcdh の発現様式を制御するメチル化酵素 (Dnmt3b) の欠損によって、個々の神経細胞においてほとんどのアイソフォームを発現するようになったマウスから同様に iPS 細胞を作製し、キメラマウスを解析したところ、Dnmt3b を欠損した細胞同士においても、シナプス結合確率は変わらないが、双方向性結合確率が3割程度と有意に減少していることを突き止めた。また層間の神経結合にも異常が観察された。したがって、メチル化制御を受けず、ほとんどすべての cPcdh アイソフォームを発現している細胞、つまり cPcdh 発現の多様性を欠く細胞においてもシナプス結合の特異性が低下していると考えられる。以上2つの実験結果は、大脳皮質のシナプス結合特異性は、cPcdh の全アイソフォームの欠損、および全アイソフォームの発現のいずれかにより、cPcdh 発現の個性が失われると、シナプス結合の特異性が低下することを示唆している。

8. Neuromodulatory Interventions to Improve Upper Limb and Lower Limb Motor Functions and Possible Mechanisms

V. Reggie Edgerton (University of California, Los Angeles, CA)

(2013.6.27)

Experiments with mice, rats, cats, monkeys and humans have shown that locomotor function as well as upper limb fine motor control can be improved by modulating the physiological state of the spinal cord. These modulatory techniques include epidural stimulation, transcutaneous stimulation of the lumbosacral and cervical spinal cord and

pharmacological neuromodulation. Also, when these techniques are combined plus applied consistently with motor training, further functional improvement in motor function can be realized. Experimental evidence of these neuromodulatory effects will be shown in rats and humans after complete paralysis.

9. GHB activates GABAA receptors, a new insight into an old drug

Nathan Absalom (Faculty of Pharmacy, University of Sydney, Australia)

(2013.7.1)

γ -hydroxybutyrate (GHB) is a small molecule with complex pharmacology. Present in low concentrations in the mammalian brain, it acts as a neuromodulator. When taken exogenously, it is used to treat narcolepsy and to ameliorate the withdrawal effects of alcohol, and is used as a recreational drug at higher concentrations, sometimes used as a “date-rape” drug. However, the pharmacology of GHB is unclear, and the full extent of its interactions with membrane proteins in the brain is yet to be fully elucidated. It has been demonstrated that GHB activates the GABAB receptor at high concentrations, but the receptor that mediates other actions of GHB has yet to be identified. We have demonstrated through ligand-binding studies and two-electrode voltage clamp electrophysiology that GHB binds to specific cys-loop ligand-gated ion channels, $\alpha 4\beta 1-3\delta$ γ -aminobutyric acid (GABAA) receptors, in the brain. We hypothesize that these receptors mediate part of the

physiological effects of GHB. To fully understand the range of GABAA receptors, which comprise the so-called “GHB receptors,” we have employed a range of methods including ligand-binding studies of mice lacking GABAAR subunits of interest, electrophysiology of receptors containing mutations at the interface of two subunits and manipulation of relative amounts of RNA of subunits injected into the oocyte. We have demonstrated that the $\alpha 4$ -subunit is essential for binding of approximately half of the “GHB receptors” in the brain, and that the relative level of β -subunits within the GHB complex affects the function of GHB at these receptors. We hypothesize that GHB may exert physiological effects via interactions at the same receptor.

参考文献

Absalom N et al. $\alpha 4\beta \delta$ GABAA receptors are high-affinity targets for γ -hydroxybutyric acid (GHB). *Proc Natl Acad Sci USA* (2012) 109: 13404-13409.

10. The evolution of rhythmicity in vertebrate feeding and locomotion

Callum F. Ross (Dept. of Organismal Biology & Anatomy Univ. of Chicago)

(2013.7.2)

Abstract: Mammalian feeding provides a rich source of material for evolutionary neuromechanics: the use of comparative behavioral, physiological, and morphological data to test hypotheses about the origin and evolution of sensorimotor systems. Mammals suckle their young, with a weaning period of transition from suckling to chewing. Mammals also employ a unique form of chewing: mastication, characterized primitively by transverse movements of precisely occluding teeth. Mastication evolved in the morphological context of reduced mandibular postdentary bones, reduction in tooth replacement to a condition of diphyodonty, a shift from ankylosis of teeth in the dentary to anchoring the teeth to the mandible via a richly innervated periodontal ligament, and the development of

gamma-motoneurons for control of muscle spindles. Biomechanical modeling suggests that early mammals could also modulate muscle activities to control loads at the jaw joint and teeth. Mammalian mastication is also more rhythmic than the chewing of lizards and fish. High rhythmicity is hypothesized to facilitate motor control, especially tongue-jaw coordination. Our recent discovery that mammals and birds locomote with higher rhythmicity than other terrestrial vertebrates suggests that high rhythmicity characterizes multiple musculoskeletal systems, and might improve energetic efficiency. Our recent work on the role of cortex in control of primate feeding suggests an important role for cortex in control of mammal feeding, including possibly rhythmicity. The sensorimotor cortex precisely

encodes 3D jaw and tongue movements and coordination, and manifests changes in dynamical states with changes in cycle type. The large number of unique sensorimotor components in the mammalian feeding system and the increases in brain size characteristic of mammals suggests

that studies of the role of cortex, cerebellum and basal ganglia in control of mammal feeding promises important new insights into the origin and evolution of complex sensorimotor systems.

11. 神経障害性疼痛発現における CCL-1 の関与

秋元 望 (生理学研究所 神経シグナル研究部門 日本学術振興会特別研究員)

(2013.7.17)

慢性疼痛の一つである神経障害性疼痛の発現に、脊髄グリア細胞やサイトカインが関与することが報告されている。本研究では、神経障害性疼痛の症状の一つであるアロディニア発現に、ケモカインの1つである C-C motif ligand 1 (CCL-1)が重要であることを発見した。アロディニアのモデルとして坐骨神経を部分結紮したマウスを使用した。結紮直後のマウスの脊髄後根節において CCL-1 の発現上昇、および脊髄において CCL-1 の受容体・CCR-8 の発現が上昇していた。CCL-1 を正常なマウスの脊髄腔内に投与すると、一時的な強いアロディニアが発現し、逆に結紮前からの CCL-1 中和抗体の投与または CCR-8 ノックダウンマウスにおいては、結紮による

アロディニアの発現は抑制された。アロディニアは NMDA 受容体の拮抗薬 MK-801 により抑制され、CCL-1 は脊髄後角の自発性グルタミン酸放出を増強させることが電気生理学的解析から判明した。CCL-1 を髄腔内に単回投与したところ、脊髄において NMDA 受容体サブユニットのリン酸化、グリア細胞や炎症性サイトカインの発現上昇が引き起こされることが示唆された。これらの結果より、CCL-1 は神経障害によって産生され、脊髄においてミ興奮性シナプス伝達の促進やグリア細胞の活性化を引き起こすことによって、神経障害性疼痛の発現に関与することが示唆された。

12. The role of phosphoinositides in sensitization and desensitization of TRPV1 channels

Tibor Rohacs (UMDNJ New Jersey Medical School, Department of Pharmacology and Physiology, Newark, NJ USA)

(2013.7.22)

Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) is a polymodal, Ca²⁺-permeable cation channel crucial to regulation of nociceptor responsiveness. Sensitization of TRPV1 by G-protein coupled receptor (GPCR) agonists to its endogenous activators such as low pH and noxious heat is a key factor in hyperalgesia during tissue injury as well as pathological pain syndromes. Conversely, chronic pharmacological activation of TRPV1 by capsaicin leads to calcium influx-induced adaptation of the channel. Paradoxically, both conditions entail activation of phospholipase C (PLC) enzymes, which hydrolyze phosphoinositides. We found that in sensory neurons PLC β

activation by bradykinin lead to a moderate decrease in phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate [PI(4, 5)P₂], but no sustained change in the levels of its precursor PI(4)P. Preventing this selective decrease in PI(4, 5)P₂ inhibited TRPV1 sensitization, while selectively decreasing PI(4, 5)P₂ independently of PLC potentiated the sensitizing effect of protein kinase C (PKC) on the channel, thereby inducing increased TRPV1 responsiveness. Maximal pharmacological TRPV1 stimulation lead to a robust decrease of both PI(4, 5)P₂ and its precursor PI(4)P in sensory neurons. Attenuating the decrease of either lipid significantly reduced desensitization, and simultaneous depletion of

PI(4,5)P₂ and PI(4)P independently of PLC inhibited TRPV1. We found that, on the mRNA level, the dominant highly Ca²⁺-sensitive PLC isoform in dorsal root ganglia is PLC δ 4. Capsaicin-induced desensitization of TRPV1 currents

was significantly reduced in mice lacking this isoform. We propose a comprehensive model in which differential changes in phosphoinositide levels mediated by distinct PLC isoforms result in opposing changes in TRPV1 activity.

13. Cortical circuits underlying the sense of smell

Norimitsu Suzuki (Eccles Institute of Neuroscience, John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, Australia)

(2013.8.7)

The primary olfactory (or piriform) cortex is a trilaminar paleocortex that is thought to construct unified “odour images” from the odour components identified by the olfactory bulb. How the piriform cortex (PC) accomplishes this sophisticated synthetic task, despite its relatively simple architecture, is unknown. One strategy for studying the PC is to take a bottom-up cell physiological approach using in vitro

patch-clamp recordings from acute slices of the PC. I will describe some of our recent slice experiments that identify the basic microcircuits involved in excitatory and inhibitory synaptic processing in the PC. I will also present some new data about sensory processing by inhibitory circuits in the PC using in vivo and in vitro approach.

14. A 'big data' approach to area V4 (V4 野への「ビックデータ」アプローチ)

Jack Gallant (University of California at Berkeley)

(2013.8.29)

Form vision is mediated by a hierarchical, parallel arrangement of several dozen visual areas. Relatively peripheral areas such as V1 represent simple visual features, while relatively central areas represent complex objects. Mid-level areas such as V4 appear to represent features of intermediate complexity, such as curvature and texture. However, no current computational models of V4 capture all these tuning properties. We have addressed this problem in two ways. First, we have collected extremely large data sets from single V4 neurons. (In some cases we have probed neurons with more than one million distinct natural images.) Second, we have modeled these data using a combination of

computational analysis, statistical and machine learning methods. In one approach we used low-rank regularization to build a model of V4 based on principles of invariance and sparse coding. In another approach we developed a new algorithm to fit highly nonlinear Volterra series models V4 neurons. Both the computational and Volterra models show that complex, nonlinear response mechanisms explain many tuning properties reported previously in V4. This big data approach offers, for the first time, the prospect of finding a unified computational model that explains the function of V4 in intermediate vision.

15. TRPC チャネルによる心血管リモデリング制御

西田基宏 (岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命時空間設計研究領域 教授)

(2013.9.25)

高血圧や虚血などのストレスにより誘発される心臓の組織構造改変 (リモデリング) は心機能を低下させる原因として注目されている。心臓リモデリングの発症・進展には、心筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により生じる転写因子 Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) の活性化が関与することわかっている。しかし、心臓の興奮収縮連関を担うリズムカルな細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇では NFAT が活性化されないことから、興奮転写連関を担う別の Ca^{2+} 流入経路の存在が示唆されている。我々は、ラット初代培養心筋細胞を用いて NFAT 活性化につながる Ca^{2+} 流入経路を解析し、ジアシルグリセロール (DAG) により直接活性化される transient receptor potential (TRP) チャネル (TRPC3 と TRPC6) がアンジオテンシン (Ang) II 刺激による NFAT の活性化を仲介することを明らかにした。TRPC3 が TRPC6 とヘテロ 4 量体を形成する意義としては、①様々な環境変化を感知す

るマルチモーダル機能の獲得、②チャネル活性の fine-tuning、③細胞内シグナルタンパク質との複合体形成による活性酸素シグナリングの増幅、などがわかってきた。さらに、スクリーニングにより TRPC3 チャネルを選択的に阻害する化合物 (Pyrazole-3) を新たに同定し、Pyrazole-3 が血圧・心拍数に影響を与えない用量で心重量の増大 (心肥大) と心機能の低下を著しく改善することを様々な心不全モデルマウスを用いて確認した。興味深いことに、TRPC3 阻害は心臓リモデリングの原因と考えられている線維化と虚血 (新生血管数の減少)、および酸化ストレスを有意に抑制することを明らかにした。以上の結果から、TRPC3 チャネルが心不全治療薬の新たな標的分子となる可能性が示された。本セミナーでは、我々がこれまで報告してきた知見に加えて、心臓で TRPC が TRPC3/6 ヘテロ 4 量体チャネルを形成する生理的意義についても考察したい。

16. 生体分子の微細空間分布から生理的現象を理解する試み

深澤有吾 (名古屋大学大学院医学研究科 機能構築医学専攻 分子細胞学分野)

(2013.9.26)

神経細胞の個々の機能は生体分子の相互作用により実現されているので、適切な機能発現のためには、機能に関わる分子が組織化し効率良く特定の相互作用が起きる場 (機能ドメイン) を形成していると考えられる。そこで、各神経細胞の機能に関係する分子を同定し、その生化学的性質を明らかにすると同時に、関連分子の空間分布を神経細胞の持つ微細構造上で定量的に明らかにすることが、神経細胞機能を支える分子メカニズムの理解に有効であると考えられる。しかし、シナプスや軸索起始部など神経固有の機能を創出する機能ドメイン

は光学顕微鏡レベルでは正確な形態情報を取得できないほど小さく、また、定量的に脳内分子の局在を検出・可視化することも技術的に困難であった。そこで演者らは、効率良く分子局在を可視化できるように各種の局在解析法を改良しながら、シナプスを中心にその分子分布と形態を電子顕微鏡レベルで解析してきた。本発表では脳内分子の局在と超微細構造を定量的に解析し、その機能的意義や個体レベルの表現型との対応について検討した研究成果を中心にご紹介する。

17. 細胞間隙を介する物質輸送を制御する分子機構

古瀬幹夫（神戸大学大学院医学研究科 生理学・細胞生物学講 細胞生物学分野）

(2013.9.26)

上皮は、体を様々な区画に仕切りつつ選択的な物質輸送を行うことにより、内部環境の恒常性維持に寄与する。上皮による物質輸送は、細胞膜を介する経細胞輸送と、細胞間隙を介する受動輸送である傍細胞輸送から成る。経細胞輸送に比べて傍細胞輸送を制御するメカニズムの理解は遅れていたが、近年、その律速となる細胞間接着装置タイトジャンクション(TJ)の分子構築が解明されたことにより、TJの核心部分を構成する接着分子クローディンファミリー各タイプの個性と発現の組み合わせが傍細胞輸送の特性を規定するという基本概念が確立された。このような状況をふまえ、私たちの研究グループは、傍細胞輸送を制御する分子基盤のさらなる理解を目指して新しい研究を進めている。まず、細胞シー

ト内に多数存在しながらこれまで無視されてきたトリセルラーコンタクト、すなわち3つの上皮細胞の角が接する領域に着目し、この位置に形成される特殊な接着構造であるトリセルラーTJ(tTJ)の構成分子を同定して、tTJの形成機構と上皮バリア機能における役割を明らかにしつつある。さらに、傍細胞輸送が上皮細胞シート周囲の液性環境の変化にダイナミックに応答することを見出し、そのメカニズムをTJ、細胞骨格、細胞内シグナル伝達の観点から解明しようとしている。このような研究から得られる成果を従来のTJ研究の知見と統合することにより、傍細胞輸送の分子メカニズムの全貌、さらには経細胞輸送と傍細胞輸送の共役による全上皮輸送の包括的な理解に近づくことができると考えている。

18. 炎症時の痛み「ワサビ受容体」に関わる仕組みを明らかに — 炎症性疼痛や神経障害性疼痛の発生にワサビ受容体のスプライスバリエーションが関与する

富永真琴（生理学研究所 細胞生理研究部門）

(2013.10.1)

富永先生には最近プレスリリースされたこととお話頂く予定です。

<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2013/09/post-257.html>

19. T MR イメージング技術の発展と神経科学への応用

塚元鉄二（GEヘルスケア・ジャパン株式会社）

(2013.10.4)

核磁気共鳴現象に基づくイメージング原理が1970年代初頭に報告されて以降、MR装置は急速な発展を遂げてきた。その主な理由は、CT装置のようにX線被ばくを伴うことのない安全性が第一に挙げられるが、さらに、生体情報を反映した様々な画像を撮像できるという特徴にある。臓器別に多様な撮像法が開発されているが、MRイメージングの中枢神経系への主な応用例としては拡散強調撮像法がある。早期脳虚血検出といった臨床応用に留まらず、神経科学分野においても異なる領域の連

関を研究するツールとして確立されつつある。しかし、神経科学に最もインパクトを与えた手法は、Ogawa et. al. による機能的磁気共鳴撮像法(functional MRI: fMRI)であろう。初期にBOLD(Blood Oxygenation Level Dependent)法と呼ばれたこの手法により、脳機能イメージングが大いに発展した。開発初期の単純な課題による感覚・運動系の研究から、快・不快といった情動や社会的行動を決定するメカニズムを対象としたfMRI研究が近年注目されている。ここではMR技術の歴史、特に

fMRI を用いた脳機能イメージングの発展を中心に、今後の動向について説明する。

20. 超高磁場 MRI でみる脳の微細構造

福永雅喜 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

(2013.10.4)

MRI による生体構造の観察は、装置要因としての空間分解能、信号雑音比 (SNR) とともに、組織パラメータである緩和時間およびコントラストに依存する。一方、磁場強度の上昇は、SNR の上昇に加え、磁気共鳴の物理パラメータである共鳴周波数の上昇をもたらす、信号の位相分散やシフトが顕著となる。我々は、これらに鋭敏な測定手法を超高磁場 MRI にて開発し、従来とは一線を画す組織コントラストを達成した。これまで感度面から困難であった高空間分解能画像も実用的となり、白質・灰白質間のコントラスト改善のみならず、各分画内の微

細構造を描出するコントラストバリエーションを捉えることが可能となった。特に大脳皮質では、ヒト *in vivo* 測定において層状構造が検出され、そのコントラストは皮質内の鉄に由来し、ミエリンと非常に高い相関を持って共存することを、剖検脳による MRI と histology から検証した。これは、白質、灰白質に画一的なコントラストを求める従来の MRI からのパラダイムシフトをもたらす、個体レベルでの脳構造・機能連関の理解に繋がると期待している。

21. 「台湾における SPF 実験動物飼育管理の現状」「哺乳動物赤血球型アニオン交換輸送体のクラスリン介在性エンドサイトーシス」

王 振吉 (ワン チェンチー) (中央研究院生物医学科学研究所, 台湾)

(2013.10.23)

台湾における SPF 実験動物飼育管理の現状

The laboratory animal facility contains specific pathogen free (SPF) area, clean area and conventional area. Health monitoring is an essential program for rodents. One can determine the pathogen status and general state of health for mice and rats. We attempt to monitor the health of laboratory rodents using serological tests for viruses, bacteria as well as mycoplasma. Microscopic examination (e.g. pin worms) and pathological analysis are applied to parasite infections. In the SPF area, routine screening is performed quarterly including (1) proportional selection of mice for serologic tests, and (2) gross and microscopic evaluations of pathology as well as the serologic tests are carried out for sentinel mice or rats housed in same rooms. Recently, we have replaced open mouse cages to microisolators. Researchers and laboratory personnel are trained to properly handle the animals in order to keep the infection rate as low as possible.

哺乳動物赤血球型アニオン交換輸送体のクラスリン介在性エンドサイトーシス赤血球主要膜内在性タンパク質であるアニオン交換輸送体 1 (AE1) はアンキリンやアデューシンとの結合を介してスペクトリン-アクチン膜骨格を脂質二重層に連結し、赤血球膜が物理的安定性を維持するうえで不可欠の役割を果たしている。AE1 の膜構造への組み込みの仕組みは不明であるが、時期特異的な AE1 の膜への輸送、あるいは膜から細胞内小胞へのエンドサイトーシスが生じるとされる。本研究では、特にエンドサイトーシスに焦点をあて、これに関わる AE1 の分子内シグナルを明らかにすることを目的とした。そのために、N 末端に EGFP、4 番目の細胞外ループに FLAG エピトープを付加したマウス AE1 変異体を培養細胞に発現させ、共焦点顕微鏡や細胞表面タンパク質ビオチン化法などで、その細胞表面発現と動態の解析を行った。本研究の結果から、哺乳動物の赤血球型 AE1 は、その N 末端ストレッチ内の YXX(X)Φ 配列の認識によりク

ラスリン介在性のエンドサイトーシスで細胞表面からゴルジ体に輸送される性質をもつことが明らかになった。この知見は、AE1の細胞膜構造への安定的組み込み

に、アンキリン等、他のタンパク質との相互作用によるYXX(X)Φ配列依存性クラスリン介在性エンドサイトーシスの調節が関与することを示唆するものである。

22. インスリン欠乏型糖尿病における骨格筋 AMPK と臓器間代謝調節ネットワークの重要性

横田繁史（生理学研究所 発達生理学研究室 生殖・内分泌系発達機構）

(2013.11.19)

インスリン欠乏型糖尿病（インスリン依存性糖尿病，IDDM）は，膵臓からのインスリン分泌不全により，高血糖，高脂肪酸血症，高ケトン体血症を引き起こし，骨格筋，脂肪組織重量が減少して死に至る病気です。一方，AMPK（AMP-activated protein kinase）は，細胞内エネルギーの枯渇を感知して活性化するセリン/スレオニンリン酸化酵素です。AMPKの活性化は，ミトコンドリア合成，脂肪酸酸化，糖利用など，ATP産生をもたらす異化

代謝を促進し，タンパク質合成などのATPを消費する同化作用を抑制します。最近，我々は，IDDMの代謝異常が，インスリン欠乏だけで無く骨格筋AMPKの活性化が重要であることを見出しました。本セミナーでは，IDDMにおける骨格筋AMPKの調節作用について，骨格筋—脂肪組織—肝臓という臓器間ネットワークの観点から私どもの研究成果を報告します。

23. Unified neural mechanisms of context-dependent and independent altruism.

Yosuke Morishima（University Hospital of Psychiatry, University of Bern, Switzerland）

(2013.11.21)

Human altruism has a unique feature among animals. It goes beyond genetically unrelated individuals and shows huge heterogeneity among individuals. In my previous study, I demonstrated that the grey matter volume in TPJ reflects the inter-individual variation of altruism. However, structural differences do not tell when and how altruistic acts are taken. In addition, altruistic acts are driven by various motivations, such as empathy, reciprocity and social norms. I therefore investigated neural mechanisms underlying context-independent and -dependent altruistic decision making processes. Firstly, I have examined brain regions involved in altruistic acts, independent of contexts. I found that the

anterior insular cortex and inferior parietal cortex including TPJ are active when altruistic action is taken. Secondly, depending on the decision contexts, other brain areas are also recruited when altruistic acts are taken. Connectivity analysis has revealed that the anterior insular cortex drives the inferior parietal cortex and the context-dependent areas. The results suggest that the anterior insular cortex serves as the centre of altruistic behaviour by orchestrating context-independent and -dependent brain areas. Lastly, I will discuss the current problems in human cognitive neuroscience and future perspectives to address causality in neural mechanism of cognition.

24. Temporal Dynamics of Eye Gaze Patterns in Interactions with Human and Artificial Agents

Matthias Scheutz (Tufts University)

(2013.12.4)

Human social interactions are comprised of complex patterns of actions and reactions. In particular, eye gaze plays an important social role as it is indicative of an individual's focus of attention and can thus reveal important aspects of the individual's internal states to others. In this talk, we present data from several human-human and human-robot interaction studies that were specifically designed to probe the temporal

dynamics of human eye gaze patterns in realistic social interaction tasks. The results show interesting similarities between human-human and human-robot conditions such as the temporal dynamics of attention distributions after onsets of movements by interactants, but also important differences in patterns of facial fixations or overall distributions of attention allocation.

25. Active vision in marmosets: a New World for visual neuroscience

Jude F. Mitchell (The Salk Institute)

(2013.12.5)

Our understanding of the neural mechanisms underlying perception and cognition has been limited by the lack of tools to modulate the activity of specific neural circuits in the awake animal. Recent advances in optogenetic techniques have begun to make this level of control possible in the mouse. However, mice are difficult to train, and the mouse brain differs substantially from the primate brain. While the rhesus macaque has traditionally been the model system of choice for studying perception and cognition, smaller New World primates, the common marmoset (*Callithrix jacchus*), offer many advantages including the potential to develop transgenic lines (Sasaki et al, 2009). Studies in the anaesthetized marmoset have detailed the anatomy and physiology of their visual system (Rosa et al, 2009) while studies of auditory processing have established their utility for awake neurophysiological investigations (Lu, Liang, and Wang 2001). However, a critical unknown is whether marmosets can perform visual tasks under head restraint. This

has been essential for studies in the macaque, enabling both accurate eye tracking and head stabilization for neurophysiology. In one set of experiments we compared the free viewing behavior of head-fixed marmosets to that of macaques, and found that their saccadic behavior is comparable across a number of saccade metrics and that saccades target similar regions of interest including faces. In a second set of experiments we applied behavioral conditioning techniques to determine if the marmoset could control fixation for liquid reward. Two marmosets could fixate a central point and ignore peripheral flashing stimuli, as needed for receptive field mapping. One highly trained marmoset also performed an orientation discrimination task, exhibiting a saturating psychometric function with reliable performance and shorter reaction times for easier discriminations. The marmoset is a viable model for studies of active vision and its underlying neural mechanisms.

26. Gq 共役型受容体活性型構造の Gq 結合による安定化

立山充博（神経機能素子研究部門）

(2013.12.9)

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、アゴニストとの結合により活性化し、三量体 G タンパク質を介して多様な細胞内応答を引き起こす。我々は、アゴニスト結合による受容体の構造変化、および構造変化に対する G タンパク質結合の効果について、FRET 計測により検討した。Gq 共役型受容体であるムスカリン受容体 3 型 (M3R) やプリン受容体 1 型 (P2Y1R) の細胞内第 3 ループ (i3) と C 末端に、蛍光タンパク質 YFP と CFP をそれぞれ附加し、その FRET 効率を測定すると、アゴニスト投与による有意な FRET 減少が観察された。 β アドレナリン受容体の X 線構造解析により i3 に連なる 6 番目の膜貫通部位がアゴニスト結合時に受容体の中心部から外にずれることが示されていることと併せると、FRET 減少はアゴニスト結合による活性型構造を反映するものと考えられる。我々は、さらに、i3 への蛍光タンパク質の挿

入を工夫することで Gq 蛋白質活性化能を維持した FRET コンストラクトの作製に成功した。これらのコンストラクトもアゴニスト投与による FRET 減少を示したが、その減少量は Gq 蛋白質の共発現により M3R では有意に増大した。これは、Gq タンパク質の結合により M3R の活性化構造が安定化したものと考えられた。一方、アゴニスト投与による P2Y1R コンストラクトの FRET 減少は Gq 蛋白質を共発現しても有意な変化を示さなかった。以上の結果は、アゴニストの結合した活性型構造の安定性が受容体により異なることを示唆するものである。

ところで、ムスカリン受容体 1 型 (M1R) の活性化構造は、膜電位により影響を受けることが示唆されている。そこで、我々は、M1R の FRET コンストラクトを用い膜電位依存性について解析を行った。その結果についても紹介したい。

27. Regulation of calcium homeostasis by SARAF

Eitan Reuveny (Department of Biological Chemistry, Weizmann Institute of Science, Israel)

(2013.12.13)

講演要旨

Store operated calcium entry (SOCE) is a principal cellular process by which cells regulate basal calcium, refill intracellular Ca^{2+} stores and execute a wide range of specialized activities. STIM and Orai proteins have been identified as the essential components enabling the reconstitution of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels that mediate SOCE. In addition to these important molecule needed for functional SOCE, other proteins exist that shape this response. In this talk I will describe in detail the molecular identification of SARAF, a negative regulator of SOCE. I will show that SARAF plays a key role in shaping cytosolic Ca^{2+} signals and determining the content of the

major intracellular Ca^{2+} stores. In addition, I will provide some evidence for the molecular mechanism controlling its activity. Finally, I will show that SARAF is an important component in protecting cells from Ca^{2+} overfilling.

参考文献

- (1) Palty R, Raveh A, Kaminsky I, Meller R, Reuveny E. SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. Cell 149: 425-438 (2012)
- (2) Raveh A, Cooper A, Guy-David L, Reuveny E. Nonenzymatic rapid control of GIRK channel function by a G protein-coupled receptor kinase. Cell 143:750-760 (2010)

28. Trajectory-dependent firing in hippocampal place cells reflects nucleus reuniens-mediated input from the medial prefrontal cortex.

伊藤 博 (Norwegian University of Science and Technology)

(2013.12.18)

Animals experience a wide range of behavioral events at the same spatial location. Variations in experience at specific locations are expressed in firing patterns of hippocampal place cells by an orthogonal space and rate coding scheme in which distinct sets of neurons are activated at different spatial locations, whereas experience and behavioral context modulate the distribution of activity across the active place cell population in each place (Leutgeb et al., 2005). While integration of space and experience is thought to be part of the neural basis for episodic memory, the wider circuits supporting such integration remain to be characterized. A potential source of contextual input to the hippocampus is the medial prefrontal cortex (mPFC) (e.g. Jones and Wilson, 2005; Navawongse and Eichenbaum, 2013). These prefrontal neurons, however, do not directly project to the hippocampus. Here we asked if a thalamic midline nucleus, the nucleus reuniens (Re), could serve as a potential relay between mPFC and the hippocampus. The Re has reciprocal anatomical connections with mPFC and gives rise to a major excitatory input to CA1 (Vertes et al., 2007).

We recorded the activity of neurons in Re as well as CA1 when animals performed a continuous alternation task in a figure-8 maze. In this task, the majority of CA1 cells with a place field on the stem of the maze showed a

trajectory-dependent change of their peak firing rate (Wood et al., 2000). Our findings support the idea that Re is a source of trajectory-dependent firing, because 1) many Re cells showed trajectory-dependent rate change, 2) CA3 cells, which do not receive Re inputs, showed significantly smaller rate change compared to that of CA1 cells, and 3) lesions of Re caused significant reduction of rate change in CA1 cells. We further validated the lesion studies by optogenetic manipulation of Re activity. As many thalamic nuclei have relay functions, we also explored possible sources of contextual information to the Re. We recorded the activity of mPFC cells in the figure-8 alternation task and found that a significant proportion of mPFC cells exhibited trajectory-dependent rate change similar to the one observed in Re and CA1 cells. Finally, we asked whether we can predict animals' future trajectories from the firing rate of neurons in mPFC, Re and CA1 on the stem of the alternation task, and our analysis of correct and incorrect trials suggests that Re plays a key role in relaying decision-related information from mPFC to CA1. Taken together, our results identify a functional circuit consisting of mPFC, Re and CA1, that is required for conjunctive representation of current position and future trajectory in hippocampal neurons.

29. New hippocampal anatomy by optogenetics 海馬新解剖学 "オプトジェネティクスによる新展開"

Keigo Kohara (Picower Institute for Learning and Memory at MIT, U.S.A.)

(2013.12.19)

Formation of episodic memory requires precise information routing in the hippocampus. For more than a hundred years, the trisynaptic circuit has been considered the main anatomical substrate of the hippocampal circuitry responsible for learning and memory. However, the hippocampus includes a region located between CA3 and CA1, named

"CA2", whose intrahippocampal connectivity has remained elusive. Here, by using cell type-specific transgenic mice, viral tracers, optogenetics and patch-clamp recordings we examined CA2 circuits in the hippocampus. Our findings redefine hippocampal functional anatomy, allowing a deeper understanding of the biology of learning and memory.

30. Temporal coordination of neuronal activity in the entorhinal-hippocampal circuit

水関健司 (Allen Institute for Brain Science, New York University, U.S.A)

(2013.12.26)

Although hippocampal theta oscillations are believed to be essential for the formation and retrieval of episodic memories, it is not clear how the information is handled in the hippocampal formation during theta states. We simultaneously recorded the activity of many (~100) neurons and local field potentials (LFP) from multiple layers of the hippocampus and entorhinal cortex of rats performing spatial tasks. Analysis of the temporal delays between population activities in successive anatomical stages suggests that the temporal windows set by the theta cycles allow for local circuit interactions and thus a considerable degree of computational independence in subdivisions of the hippocampus-entorhinal cortex loop.

To uncover the mechanism of local circuit computation, it is essential to understand how the individual neurons in a given region participate in information processing. The hippocampal CA1 region is one of the most extensively studied regions of the brain and most studies tacitly assume

that pyramidal neurons in this region represent a homogeneous cell population. However, using high spatial resolution silicon probes, we found that deep and superficial pyramidal cells were strikingly different in terms of firing rate, burst propensity, spatial representation, and temporal relationship to various LFP oscillations. Thus, CA1 pyramidal cells in adjacent sub-layers can address their targets jointly or differentially, depending on brain states and oscillations, thereby form functionally distinct streams.

We also addressed a long-standing “neuromyth” (SFN Neuromyths, “We use only 10% of our brain”). The answers are both complex and interesting. Firing rates, spike transfer strengths and magnitude of population synchrony in the hippocampus formation showed lognormal-like distribution mostly irrespective of brain states and environments. Our finding suggests that the brain is largely a preconfigured network where a minority of highly active neurons does most of the work all the time.

31. 受容体活性化カチオンチャネルとその生理的重要性

富田拓郎 (九州大学大学院薬学研究院 創薬育薬産学官連携分野)

(2014.1.7)

細胞膜受容体を介した細胞内カルシウム (Ca^{2+}) 濃度変化は、細胞の増殖、分化あるいは細胞死といった細胞の生理応答に重要である。受容体刺激に惹起される Ca^{2+} 流入は phospholipase C (PLC) により制御され、ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOC) および受容体作動性 Ca^{2+} 流入 (ROC) に大別される。これらカルシウム流入は、細胞内のグローバルなカルシウム動態というよりは、むしろ細

胞膜局所のカルシウム上昇を担う。その生理的重要性を、B 細胞受容体 (BCR) シグナル伝達機構における TRPC3 の重要性、SOC の必須構成因子 STIM1・Orai1 の新たな制御機構と皮膚組織、特に皮膚角化細胞における重要性および TRPC6 の血管リモデリングにおける重要性を紹介する。これらの研究から見えてきた問題点や将来的な研究展開について議論したい。

32. Cdc42 の新規プレニル-パルミトイル化修飾の同定とその機能的役割

西村明幸 (Cornell University, Department of Molecular Medicine)

(2014.1.7)

低分子量 G 蛋白質の一種である Cdc42 には, C 末 9 アミノ酸が異なる脳特異的な選択的スプライシングバリエント (bCdc42) が存在するが, 両者の機能的な違いについてはこれまでほとんどわかっていない。今回, 我々は bCdc42 が Cdc42 とは異なる脂質修飾を受けることを明らかにした。Cdc42 は C 末端に CaaX モチーフを有し, システインのプレニル化, aaX ペプチドの切断, カルボキシメチル化という一連の CaaX プロセッシングを受ける。一方, bCdc42 はシステインが 2 つ並んだ CCaX モチーフ

を有し, 従来の CaaX プロセッシング以外に, これらシステインがプレニル-パルミトイル化修飾されることが明らかとなった。また, このプレニル-パルミトイル化修飾は CCaX モチーフを有する他の分子でも見られ, CCaX モチーフにおける共通の翻訳後修飾であることが示唆された。我々はさらに CaaX プロセス型とプレニル-パルミトイル型 bCdc42 の機能的な違いについて解析を行った。今回, 細胞内シャペロン分子 RhoGDI との相互作用, 細胞内局在における両者の違いについて紹介したい。

33. Haptic processing in inner perisylvian regions (SII/Insula) of the macaque monkey

石田裕昭 (Italian Institute of Technology (IIT), Brain Center)

(2014.1.15)

Neuropsychological studies revealed that damage to SII induces abnormal hand-manipulation, frequently accompanied by impairments of tactile object recognition in the absence of more basic somesthetic dysfunction. Furthermore, the degree of recovery of manual dexterity in stroke patients revealed that it more positively correlates with the activation of SII than of the primary somatosensory cortex (SI). This evidence suggests that dexterous manual control and high-level haptic perception closely tie into each other in the area SII.

In non-human primates, the area SII and the adjacent posterior insular cortex (pIC) show multiple digits and hand representations. Although hodological studies in the macaque monkey brain have revealed that the hand region of SII/pIC is characterized by the presence of dense reciprocal connections with the hand regions of area AIP and area PMv, the physiological properties during dexterous hand manipulation

in this area remain largely unknown.

In my talk, I'll demonstrate a hand-manipulation-related activity in the hand region of SII/pIC of macaque monkey. Our results showed a set of task-related neurons were only activated during monkey's active hand-manipulation. Furthermore, these hand-manipulation-related neurons showed evident grip-type-selectivity in precision grip.

Most interestingly, in our pilot study we also found a few neurons that responded not only during a specific hand-manipulation of the macaque monkeys such as self-grooming but also during grooming action observation.

Mirror neurons have never been recorded before in the SII/insula, although their existence has been proposed on the basis of human fMRI studies. This new type of mirror neurons will enlarge our understanding of social communication, binding motor responses and social touch.

34. The role of astrocytic Gq G-protein coupled receptor signaling in neuronal function in vivo

江藤 圭 (Dr.Kei Eto) (Department of Pharmacology, University of North Carolina at Chapel Hill)

(2014.1.23)

Astrocytes are the most abundant cell population in the central nervous system and have various important roles in brain function.

Processes of astrocytes contact with neuronal synapses and communicate with neurons via G coupled receptors (GPCR) on astrocytes. Since astrocytes express various Gq-GPCR, neurotransmitters from synapses induce release of calcium from intracellular store and modulate astrocytic activities in vitro and in vivo.

On the other hand, even though astrocytic calcium signaling was thought to modulate neuronal activities by releasing gliotransmitters, recent studies showed that increasing or obliterating astrocytic Gq-GPCR mediated calcium signaling did not alter synaptic plasticity in vitro.

Thus, it is still unclear whether astrocyte can modulate neuronal function or not.

To further understand the role of astrocyte in neuronal function, I investigate the effect of astrocytic activation on neuronal function in visual cortex in vivo. To selectively activate astrocytes in vivo, I used a new genetically modified mouse line, GFAP-hM3Dq mouse that express engineered muscarinic Gq-GPCR (hM3Dq receptor) under the control of an astrocytic GFAP promoter. This Gq-GPCR is not activated by any known endogenous ligand, but is activated by synthetic drug, clozapine-N-oxide (CNO) which can cross blood brain barrier. In this talk, I will introduce my recent results about this study, and technical advances about imaging system and genetically encoded calcium indicators.

35. 上肢筋－腰髄間の人工神経接続による下肢歩行運動の随意制御

笹田周作 (生理学研究所 認知行動発達機構研究部門)

(2014.1.27)

上肢筋－腰髄間の人工神経接続による下肢歩行運動の随意制御

36. 行動マウスにおける海馬神経回路ダイナミクスの二光子イメージング

佐藤正晃 (理化学研究所脳科学総合研究センター記憶メカニズム研究チーム)

(2014.1.28)

海馬は古くから記憶に重要な脳部位であることが知られているが、げっ歯類でも脳表から比較的深くに存在するために、近年までイメージングによる回路機能の解析は技術的に困難であった。我々は、学習や認知に伴う海馬神経回路の活動を二光子レーザー顕微鏡で可視化するために、イメージングウインドウ埋め込みによる深部脳イメージング手技、蛍光カルシウムセンサータンパク質発現トランスジェニックマウス、バーチャルリアリティ環境下でのマウス行動課題、大規模イメージング

データの自動解析プログラムなどの基盤技術の開発を行い、顕微鏡下で行動するマウスの海馬 CA1 野の数百個の細胞の活動を単一細胞の解像度でイメージングする技術を確立した。本セミナーでは、これらの技術を用いて明らかになった海馬 CA1 神経回路活動の行動依存的な変化と、学習に伴う海馬神経回路活動の可塑的变化をイメージングするために開発した新規バーチャルリアリティ行動課題について紹介する。

37. グリア細胞による中枢神経系恒常性維持機構の解明

和氣弘明 (基礎生物学研究所 独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ)
(2014.1.28)

近年, 光学イメージング技術の発達によりグリア細胞—神経細胞の相互作用を可視化することが可能になり, その生理的な機能が着目されている。またこれらの生理機能が破綻した結果として精神・神経疾患を惹き起こすという観点から様々な研究が進められており, グリア細胞による中枢神経系恒常性維持が脳の高次機能を保つ上で非常に重要な役割を果たすと考えられている。本セミナーでは中枢神経系において神経免疫を担うミクログリア細胞および髄鞘化を担うオリゴデンドロサイトに着目し, この2種類のグリア細胞が生理的な状態で神

経回路活動の時間的・空間的制御をする可能性について紹介したい。すなわち, まずミクログリアがその免疫細胞としての機能からシナプス活動をモニターし, 発達期及び障害期において貪食することによってシナプス数を制御し神経回路におけるシナプス活動の空間的な配置を規定して神経回路活動の空間的制御を行うことを考察する。さらにオリゴデンドロサイトが神経活動依存性に髄鞘化を行い, 神経伝導速度を調節することで神経回路活動の時間的な制御に関わることを示し, その破綻による精神疾患発症の可能性について言及したい。

38. MYELIN MODULATES AXONAL SURVIVAL BY REGULATING AXONAL ORGANELLE MORPHOGENESIS AND DISTRIBUTION

Bruce Trapp (Department of Neurosciences, Cleveland Clinic)

(2014.2.4)

The interaction between myelin forming cells and axons is one of the best described examples of cell-cell interactions in mammals. Myelin plays multiple roles essential for normal nervous system function. Best known is the insulation of axons to permit rapid propagation of nerve impulses by saltatory conduction. By concentrating voltage gated sodium channels at nodal axoplasm myelin also saves energy. To attain similar conduction speeds of myelinated axons, unmyelinated axons would have to have diameters 100 times larger than myelinated axons.

Myelin, therefore, also conserves space. One of the most clinically relevant functions of myelin is provide trophic support essential for axonal survival.

This function reflects the fact that axons can be meters away from the neuronal cell body and has to rely on glia support rather than on neuronal gene transcription to respond to many local changes in environment. Since axonal degeneration is the major cause of neurological disability in primary diseases of myelin, we have been investigating the mechanisms by which myelin provides trophic support to

axons. The purpose of this presentation is to summarize these studies with an emphasis on morphological studies of normal and abnormal myelin-axon interactions. Myelin is essential for long-time axonal survival.

This is best illustrated by the primary axonal degeneration that develops in mice null for the myelin proteins MAG, PLP or CNP. The precise mechanisms by which myelin stabilizes the axon is poorly understood. Historically, two general features are common to the axonal pathologies that precede axonal degeneration: the axonal cytoskeleton is abnormal and the pathologies dominate in paranodal regions. We extend these observations by comparing paranodal axoplasm in myelinated and dysmyelinated axons using time lapse imaging and 3- dimensional electron microscopy.

In month-old dysmyelinated axons, we detect alterations in the distribution of axonal mitochondria and their associations with smooth endoplasmic reticulum.

By 6 months of age, the stability, length and orientation of microtubules which contain increased phospho tau epitopes were detected.

Alterations in microtubules inhibit axonal transport and contribute to paranodal axonal swellings due to organelle accumulation. These data provide compelling evidence that myelin facilitates axonal organelle morphogenesis and distribution. In addition, these studies are unraveling the

cascade of molecular and morphological changes that eventually result in axonal degeneration so we can identify therapeutic targets that may delay or stop axonal degeneration in primary diseases of myelin.

39. 遺伝学的アプローチによる閉塞結合形成機構の研究

泉 裕士（神戸大学大学院 医学研究科・細胞生物学分野 准教授）

（2014.2.12）

上皮が十分なバリア機能を発揮するには、細胞同士の隙間をシールする細胞間接着装置（閉塞結合）が欠かせない。これまで、脊椎動物の閉塞結合であるタイトジャンクションの構造タンパク質の研究から、細胞間をシールする分子基盤の基本形がかなり明らかにされてきた。しかしながら、タイトジャンクションの形成を司る制御機構については未だ不明な点が多い。その理由の一つと

して、主に哺乳類培養上皮細胞を用いるタイトジャンクション研究では、遺伝学的手法による網羅的な解析が容易でないことがあげられる。そこで私は、ショウジョウバエの閉塞結合に注目して遺伝学的アプローチにより研究を進め、タイトジャンクションを含む閉塞結合の普遍的な形成制御機構の解明を目指している。本セミナーでは、これまでの研究の進展について紹介したい。

40. 抑制回路を介したコリン作動性ニューロンによる覚醒脳の動作制御機構

惣谷和広（独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・大脳皮質回路可塑性研究チーム）

（2014.2.18）

研究背景

大脳皮質神経回路網における GABA ニューロンの機能は、単に神経回路網の活動レベルを抑制するだけではなく、興奮性ニューロンの特徴選択的な情報処理や生後発達初期の感受性期における神経回路網の成熟に重要な役割を果たすことが想定されている。しかし、GABA ニューロンが3次元空間の神経回路網内にどのように分布し、その作用はどの程度の広がりを持つか？そもそも大脳皮質情報処理機構における抑制の役割は定量的に直接的に何なのか？大脳皮質神経回路網動作原理における抑制系回路の機能に関する重要な問題は、未だ解明されていない。そこで我々は、「in vivo 二光子励起機能的 Ca²⁺イメージング法」とチャネルロドプシンを用いた光による神経細胞刺激法を駆使し、神経回路網の「構造と機能」という視点から GABA ニューロンの機能解析を行い、抑制系による大脳皮質神経回路網の動作制御機構の解明を目指してきた。

今回の発表内容

大脳皮質神経回路網の動作制御機構を理解する上で、覚醒脳からの神経活動を細胞レベルで計測し解析することは重要である。そこで今回は、げっ歯類における大脳皮質初期視覚野の興奮性ニューロンと GABA ニューロンの視覚応答反応を麻酔時と覚醒時に計測し解析を行った。その結果、GABA ニューロンの視覚応答性が、麻酔時よりも増大し、視覚刺激に応答する信頼度も増強した。それに対し、興奮性ニューロンは、麻酔時と覚醒時に視覚応答性に変化はなかったものの、視覚刺激に対して視覚応答している時間の長さが短縮された。

次にこれらの反応特性の違いに前脳基底部（the Basal Forebrain: BF）からのコリン作動性ニューロンの活動が関わっているのかどうかを検討するため、BF を電気刺激またはチャネルロドプシン刺激を行うことによって、麻酔下で興奮性ニューロンと GABA ニューロンの視覚

応答に対するBF刺激の効果を解析した。またさらにBF刺激の効果がどのレセプターを介しているのかを調べるため、急性スライスによる薬理学的実験を行った。

その結果、脳の覚醒効果は、BFのコリン作動性ニューロンの活動が、大脳皮質初期視覚野1層ではニコチンレ

セプターを介して、また、2/3層ではニコチン／ムスカリンレセプターを介して、直接的にGABAニューロンの活動に作用することによって、興奮性ニューロンの視覚応答特性を修飾するという、抑制回路が介在する新しい脳神経回路網動作制御機構の一端が明らかとなった。

41. 運動発現中のラットにおける運動野細胞の同期的活動の集団特性

木村梨絵 (玉川大学 脳科学研究所)

(2014.2.24)

運動野の細胞間で見られる、数ミリ秒以内の同期的発火活動は、運動の開始様式などによって、集団としてどのような機能的意味をもつのかは明らかでない。本研究では、頭部固定のラットに、外発的または内発的に前肢でレバーを操作すると報酬を獲得できるという、二種類

の運動課題を行わせた。一次および二次運動野の神経活動をマルチユニット記録し、運動の開始様式などに関連する同期的活動の集団特性を定量的に検討した。この結果、集団として同期的活動は安定に存在することを明らかにした。

42. 社会的文脈の中でやり取りされる金銭的な報酬や罰が記憶に与える影響とその神経基盤

重宗弥生 (京都大学大学院 人間・環境学研究科 認知行動科学講座 認知科学分野)

(2014.2.24)

私達は人間関係の中で日常生活を営んでおり、ヒトから報酬や罰を受ける方が、ヒト以外から報酬や罰を受けるよりも嬉しさや、悲しさを感じるだろう。先行研究より金銭的な報酬や罰が記憶を促進することが示されているが、そのような金銭的な報酬や罰の情報は社会的な

文脈では異なった処理を受け記憶に影響を与える可能性がある。本セミナーでは社会的な文脈における報酬や罰のやり取りが記憶に与える影響についての研究結果を紹介させてもらう。

43. 脳磁図 (MEG) を用いた変化関連活動および抑制系の検討

中川 慧 (生理学研究所 感覚運動調節研究部門)

(2014.2.28)

自己を取り巻く環境に発生した新たな事象に対し、脳は自動的にそれらを認知することができるシステムを備えている。この変化に対する脳の自動応答は、脳磁図や脳波を用いることで、変化関連活動として記録される。これらの刺激応答は、注意状態に依存されない脳活動と捉えられており、これまで明らかにできなかった高次脳機能の評価に有用な指標となる可能性がある。また、認知確立のためには、一定時間他の認知を抑制する機能も

重要となる。我々は、変化に対する自動応答が一定時間保持される仕組みを「抑制系」として捉え、刺激変化前に微弱な先行刺激を与えることで、抑制系を評価する手法を確立した。

本セミナーでは、これまでに研究室で行ってきた変化関連活動に関する知見、および最新の体性感覚刺激に対する抑制系の研究を中心に報告する。

44. 発がんシグナルを制御する新規 Ras ファミリー蛋白質の機能解析 (Functional analysis of atypical Ras family protein in oncogenic signal)

多胡憲治 (自治医科大学生化学講座構造生化学部門)

(2014.2.28)

低分子量 GTP 結合蛋白質である κ B-Ras は、転写因子 NF- κ B を阻害する Ras ファミリーとして同定された。これまでに私達は、 κ B-Ras による NF- κ B 阻害の分子機構を解析してきた。最近になり、私達は、 κ B-Ras の新しい機能として、がん遺伝子 Ras (G12V) を起点とした発がんシグナルにおいて κ B-Ras が重要な役割を担っていることを見出した。さらに、 κ B-Ras の蛋白質複合体を精製し、新規の κ B-Ras 結合蛋白質として、TRB3, SmgGDS, DDB1, NONO を同定した。 κ B-Ras はこれらの結合蛋白質との相互作用、活性調節を介して、発がんシグナルに関与する可能性が考えられる。

A small GTPase κ B-Ras was identified as a Ras family protein inhibiting a transcription factor NF- κ B. We previously clarified the molecular mechanism how κ B-Ras inhibits the NF- κ B activation. In the current study, we found that κ B-Ras harbors the critical roles in Ras (G12V)-caused oncogenic signals. Furthermore, we purified κ B-Ras-containing protein complexes, and identified novel κ B-Ras binding proteins including TRB3, SmgGDS, DDB1, NONO. Our study suggests that κ B-Ras could contribute to the oncogenic signaling pathway through the interaction with these binding proteins.

【 大 学 院 特 别 讲 义 】

大学院特別講義

1. 第164回 (2013.4.24)
演者：統合生理研究系・感覚運動調節研究部門 柿木隆介 教授
演題：様々な神経イメージング手法を用いたヒト顔認知機構の解明
2. 第165回 (2013.5.15)
演者：分子生理研究系・神経機能素子研究部門 久保義弘 教授
演題：イオンチャネル・受容体の構造と機能の動的側面
3. 第166回 (2013.6.5)
演者：細胞器官研究系・細胞生理研究部門 小泉 周 准教授
演題：哺乳類網膜神経細胞の形態学的・機能的多様性と網膜初期視覚情報処理
4. 第167回 (2013.9.18)
演者：発達生理学研究系・生殖・内分泌系発達機構研究部門 箕越靖彦 教授
演題：代謝と摂食を制御・統合する AMPK の機能
5. 第168回 (2013.10.16)
演者：電子顕微鏡室 村田和義 准教授
演題：電子顕微鏡による分子から細胞までの構造生物学
6. 第169回 (2013.11.20)
演者：大脳皮質機能研究系・心理生理学研究部門 定藤規弘 教授
演題：社会能力の発達過程:脳機能画像法による解析
7. 第170回 (2013.12.11)
演者：統合生理研究系・計算神経科学研究部門 合原一幸 客員教授
演題：生体システムの非線形ダイナミクスと数理モデリング
8. 第171回 (2014.1.15)
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：新皮質錐体細胞の多様性と機能構築
9. 第172回 (2014.2.12)
演者：多光子顕微鏡室 村越秀治 准教授
演題：シナプス可塑性のシグナル伝達システム
10. 第173回 (2014.3.5)
演者：統合生理研究系・感覚運動調節研究部門 乾 幸二 准教授
演題：感覚記憶の計測

生理学研究所年報 第35巻

発行 2014 年 12 月 25 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

