岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 17 巻



1996

はじめに

平成７年度の生理学研究所年報をお届けします。

生理学研究所では平成５年度以来多くの人事更新が行われました。７年度にも５つの部門が研究体制を一新して発足しました。新しく発足した部門でも既にそれぞれの研究プロジェクトが動きはじめましたし，１～２年先発の部門での研究は着々と進展しています。生理学研究所はいま，多くの意欲的な研究者を迎えて第２の創設期ともいうべき活気に充ちています。それぞれ独自のプロジェクトに取組みながら，お互いの交流を深めることによって総合的に人体生理機能解明をめざすという研究所全体の新しい動きは既に始まっています。

今年度のリポートにはまだその成果は充分に見られませんが，研究の新しい流れと充実ぶりはおくみ取りいただけるものと思います。このような人事の更新と新しい研究プロジェクトの発足に伴い，多くのベテランの研究者が停年を迎え，あるいは新しい研究の発展をめざして生理学研究所を去っていかれました。失われたものの大きさを思います。然しながら，彼等の科学者としてのスピリットはしっかりと新しい研究者に受け継がれています。

平成８年８月

濱　清

主な職員（1995年度）

所　　長　濱　　清

分子生理研究系

神経化学研究部門

教　　授	小幡邦彦
助 教 授	丸山　敬
助　　手	児島伸彦
〃	山肩葉子
〃	淺田英穂
非常勤研究員	川村勇樹（～1996. 3.31）
大学院学生	石橋英俊（1995. 4. 1～）
〃	久米秀明（1995. 4. 1～）

細胞内代謝研究部門

客員教授	菅野富夫（～1996. 3.31）
客員助教授	佐藤洋一（～1995. 7.31）
〃	葉原芳昭（～1996. 3.31）
助　　手	桑原厚和（～1996. 3.31）
外国人特別研究員	BUSIK, Julia V.（～1995.10.31）
特別研究学生	田中敬子（～1996. 3.31）
〃	丹羽光一（～1996. 3.31）

超微小形態生理研究部門

教　　授	永山國昭（1996. 3.1～併任）
助 教 授	村上政隆
助　　手	東　晃史
〃	瀬尾芳輝（～1996. 3.31）
〃	石川　透
非常勤研究員	足立栄希（1996. 1.17～）
特別協力研究員	新里直美
特別研究学生	関　泰長（1995. 4. 1～）

細胞器官研究系

生体膜研究部門

教　　授	山岸俊一
助　　手	久木田文夫
〃	古家喜四夫
〃	筒井泉雄
大学院学生	中野春男（1995. 4. 1～）
中国政府派遣研究員	房　家智（1995.10.15～）

能動輸送研究部門

客員教授	高井義美
客員助教授	井上純一郎
助　　手	白瀧博通
〃	三浦久幸（～1995. 9.30）
特別協力研究員	千本松孝明
特別研究学生	大石秀人
〃	神野靖也

機能協関研究部門

教　　授	岡田泰伸
助 教 授	老木成稔
助　　手	樫原康博
〃	挾間章博
〃	富永真琴
特別協力研究員	久保町子（～1995. 3.31）
〃	立田　浩
〃	伊藤彰子
〃	林　誠治
〃	山本　隆

	助手	富永知子 (～1995.10.27)	特別協力研究員	Ian Douglas. (～1995. 4.15)
	〃	森島繁 (1996. 2. 1～)	〃	Tracey GRANT (1995. 7. 5～1995. 8.31)
	非常勤研究員	三好毅志 (1995. 6. 1～)	〃	周軍 (1996. 1. 5～)
	外国人特別研究員	周士勝 (1995. 4. 1～)	外国人研究員	Sabirov, Ravshan (1995. 4. 1～)

生体情報研究系

神経情報研究部門

教授	池中一裕	
助教授	湯浅茂樹	
助手	中平健祐	
〃	鹿川哲史	
〃	馬場広子 (1994.10. 1～)	
非常勤研究員	山田真久 (～1996. 3.31)	
〃	山口宜秀 (～1995.12.31)	
大学院学生	若園佳彦	
〃	IVANOVA Anna	
〃	熊田竜郎 (1995. 4. 1～)	
特別研究学生	田村雅一	
〃	池田浩司	
〃	田中文啓	
〃	山田斉	
〃	奥村俊一郎 (～1995.10. 1)	
受託研究員	小泉克久	

液性情報研究部門

教授	井本敬二 (1995. 4. 1～
助教授	森泰生 (1995.12. 1～)
助手	米村重信 (～1995. 4. 1)
〃	伊藤雅彦 (～1995. 4. 1)
〃	中井淳一 (1995. 9. 1～)
〃	若森実 (1995.12. 1～)

高次神経機構研究部門

客員教授	三品昌美
客員助教授	千坂修
助手	八木健
大学院学生	甲斐信行
〃	安田昌弘
〃	光村直洋
〃	塚田晃代
受託研究員	谷口雅彦

情報記憶研究部門

客員教授	金子章道
客員助教授	中谷敬
助手	倉橋隆
非常勤研究員	河合房夫 (1995. 4. 1～)

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

教授	小松英彦
助手	花澤明俊 (1995. 4. 1～)
特別研究学生	木下正治 (1995. 4. 1～)

生体システム研究部門

教授	森茂美
助教授	松山清治
助手	宮下英三

	特別研究学生	村上郁也 (1994. 4. 1～)	助手	中隣克己
			非常勤研究員	松井利浩 (1995. 8. 1～)
			特別協力研究員	山田高嗣
			〃	伊藤壽一 (1995. 7. 1～)
			〃	本間裕
			〃	横山貴康
			特別研究学生	浅野目充
			〃	久世文也
			〃	小倉光博
統合生理研究施設	**高次脳機能研究プロジェクト**		**感覚・運動機能研究プロジェクト**	
	教授	伊佐正 (1996. 1. 1～)	教授	柿木隆介
			助教授	金桶吉起 (1995. 9. 1～)
	自律機能研究プロジェクト		助手	小山幸子
	客員教授	栗城眞也	〃	寶珠山稔
			非常勤研究員	北村吉宏 (～1996. 3.31)
			特別協力研究員	中村昭範 (1995. 4. 1～)
			大学院学生	下条素子
			〃	渡邊昌子
			〃	向敬
生理機能研究施設	**超高圧電子顕微鏡室**		**組織培養標本室**	
	助教授	有井達夫	助手	古家園子
動物実験施設	助教授	尾崎毅		
技術課	課長	南定雄		
研究系技術班	班長	大庭明生		
	分子生理研究系技術係		**細胞器官研究系技術係**	
	技官	大河原浩	係長	小原正裕
	〃	高木正浩	技官	池田晃子
	〃	阿部ゆかり	〃	佐藤茂基
	〃	葛目博子	〃	山本友美
	〃	神原叙子 (1995. 4. 1～)	〃	神谷絵美
	生体情報研究系技術係		**生体調節研究系技術係**	
	技術主任	伊藤嘉邦	技官	吉友美樹
	技官	齊藤久美子	〃	森将浩
	〃	水谷裕美	〃	戸川森雄
	〃	関口直美	〃	高須千慈子

技　官　三寶　誠

研究施設技術班

生理機能技術係

係　長　市川　修
技術主任　伊藤昭光
技　官　水谷文保（－1995. 4. 1）
〃　吉村伸明
〃　高橋直樹（1995. 4. 1－）
〃　村田安永（1995. 8. 1－）

動物実験技術係

技　官　佐治俊幸
〃　小木曽昇
〃　廣江猛

工作技術係

係　長　加藤勝己
技　官　山口登

統合生理技術係

技術主任　瀬尾道
技　官　永田治
〃　竹島康行

電子顕微鏡技術係

係　長　前橋寛

1995年度　生理学研究所年報

目　　次

はじめに

主な職員（1995年度）

研究活動報告

分子生理研究系 …… 9
細胞器官研究系 …… 23
生体情報研究系 …… 39
生体調節研究系 …… 65
統合生理研究施設 …… 78
生理機能研究施設 …… 89
動物実験施設 …… 96
技術課 …… 98

研究発表

発表論文 …… 118
学会発表 …… 146

共同研究報告 …… 179

計画共同研究報告 …… 224

磁気共鳴装置共同利用実験報告 …… 236

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告 …… 270

生体磁気計測装置共同利用実験報告 …… 290

研究会報告 …… 301

国際シンポジウム

生理研コンファレンス …… 487

セミナー報告

生理研セミナー …… 493
昼食セミナー …… 504

分子生理研究系

神経化学研究部門 …… 9

概　要

グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)欠失マウスの作成と神経伝達物質 GABA の生理機能の解析

（淺田英穂，川村勇樹，丸山　敬，季　鳳雲，神原叙子，小幡邦彦）

アルツハイマー病アミロイド生成機構の培養細胞における検討

（丸山　敬，富田泰輔，久米秀明，淺田英穂，川村勇樹，小幡邦彦）

ラット海馬の長期増強(LTP)に関連して発現する遺伝子の検索の試み

（丸山　敬，久米秀明，小幡邦彦）

脳内 Fyn 活性化によるけいれん誘発とタンパク質リン酸化変化

（児島伸彦，石橋英俊，小幡邦彦）

神経活動と Ca^{2+} / カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ

（山肩葉子，小幡邦彦）

超微小形態生理研究部門 …… 13

概　要

唾液腺水分分泌のエネルギー効率

（村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透）

磁場勾配 NMR による細胞内外での物質拡散の観察

（瀬尾芳輝，大河原浩，石川　透，村上政隆，D. Gross,K. Zick, U. Ammer, J. L.-McDouall,M. Steward, 森田康司，植村　理，日下義章）

細胞内代謝研究部門 …… 20

概　要

ラット副腎クロマフィン細胞の自発的 $[Ca^{2+}]_i$ 変動および脱分極にたいする GABA の効果

（BUSIK, Julia V.，阿部ゆかり，菅野富夫）

膵島を構成するA細胞とB細胞の Ca^{2+} 応答の解析

（浅田尚登，岩永敏彦，菅野富夫）

Effects of GABA on spontaneous $[Ca^{2+}]c$ dynamics and electrial properties of rat adrenal chromaffin cells

（J. Busik, M. Nakamura, Y. Abe, I. Shibuya and T. Kanno）

細胞器官研究系

生体膜研究部門 …… 23

概　要

イカ巨大神経細胞膜に発現する Cl^- コンダクタンスの基本的性質
（山岸俊一，筒井泉雄，古家喜四夫）
ナトリウムチャネルのゲート機構におけるタンパク質構造変化
（久木田文夫）
乳腺細胞カルシウムシグナリングとプリン受容体
（古家喜四夫，中野春男，山岸俊一，榎本浩一）
機械的刺激によるカルシウム波の伝播機序
（古家喜四夫，神谷絵美，山岸俊一）
ユウレイボヤ (Ciona) 心筋における興奮収縮連関 (EC-coupling) 機構
（筒井泉雄）
乳腺筋上皮細胞の単離培養とその性質
（中野春男，古家喜四夫，山岸俊一，古家園子）
乳腺上皮細胞の機械的及びプリン受容体刺激によって活性化されるクロライドチャネル
（房家智，古家喜四夫，山岸俊一，榎本浩一）
ラット胎仔培養ニューロンにおける電気的カップリング
（中西圭子，久木田文夫）
機能協関研究部門 …… 31
概　要
細胞容積調節の分子機構とイオンチャネル
（岡田泰伸，富永真琴，富永知子，老木成稔，挾間章博，久保町子，三輪晃子）
消化管上皮細胞の吸収・分泌機能とイオンチャネル
（鍛治田英俊，津村剛彦，上田俊二，挾間章博，森島　繁，岡田泰伸）
心筋細胞機能とイオンチャネル
（富永真琴，森島　繁，Andrew F. James，周　士勝，岡田泰伸，堀江　稔，篠山重威）
能動輸送研究部門 …… 36
概　要
翻訳後脂質修飾が Rab3A の活性化におよぼす影響
（神野靖也，白瀧博通，山本友美，千本松孝明，高井義美）
生体情報研究系
神経情報研究部門 …… 39
概　要

特異的遺伝子の転写活性を指標としたグリア細胞の発生機序の解析
（馬場広子，田中文啓，水谷裕美，熊田竜郎，池中一裕）
オリゴデンドロサイトの発生分化
（鹿川哲史，山田真久，山口宜秀，小泉克久，Anna Ivanova，山田　斉，奥村俊一郎，大庭明生，池中一裕）
小脳顆粒細胞の成熟
（若園佳彦，池中一裕）
組織特異的に遺伝子発現を行うレトロウイルスベクターの開発と遺伝子治療への応用
（田村雅一，池田浩司，庄盛由紀夫，池中一裕）
中枢神経系の形態形成機構
1．アストログリアの初期発生様式とその多様性
（湯浅茂樹）
2．リーラーミュータントマウス小脳におけるニューロン—グリア相関
（湯浅茂樹，熊田竜郎）
3．マウス蝸牛神経背側核の発生機構
（湯浅茂樹，Anna Ivanova）
4．扁桃核の発生機構
（湯浅茂樹）
液性情報研究部門 …… 53
概　要
電位依存性ナトリウムチャネルの発現
（井本敬二）
リアノジン受容体(RyR-1)によるL型Ca^{+2}チャネル（ジヒドロピリジン受容体）の活性化
（中井淳一，Allen PD, Dirksen RT,Beam KG, Nguyen HT, Pessah IN）
電位依存性Ca^{2+}チャネルの分子的多様性
（若森　実，森　泰生，Arnold Schwartz，額田敏秀，新留徹広）
神経特異的Ca^{2+}チャネル欠損マウスの作成
（森　泰生，井本敬二）
脳スライスを用いた神経細胞樹状突起のCa^{2+}代謝の解析
（井本敬二，Fritjof Helmchen, Bert Sakmann）
高次神経機構研究部門 …… 58
概　要

脳神経形成・学習に関連する新たな情報伝達分子の同定
（安田昌弘，八木　健）
酵母系での蛋白質相互作用を利用した脳形成・機能制御分子の同定
（甲斐信行，八木　健）
シナプス結合部に存在する分子の同定
（光村直洋，八木　健）
新たな薬剤（ピューロマイシン）耐性遺伝子を用いたマウス胚幹細胞遺伝子操作法の開発
（三宝　誠，八木　健）
NMDA 受容体サブタイプ欠損マウスの解析
（崎村建司，八木　健，三品昌美）
マウス，コラプシンの単離と遺伝子欠損マウスの作製
（谷口雅彦，成瀬一郎，八木　健）
ニューロピリン欠損マウスの作製
（木津川尚史，藤沢　肇，八木　健）
情報記憶研究部門 …… 61
概　要
イモリ嗅細胞のＴ型カルシウム電流による活動電位発生の促進
（河合房夫，倉橋　隆，金子章道）
生体調節研究系
高次神経性調節研究部門 …… 65
概　要
大脳視覚野における色情報表現様式
（花沢明俊，村上郁也，小松英彦）
視知覚における充填現象の神経機構
（小松英彦，木下正治）
生体システム研究部門 …… 67
概　要
歩行運動の制御と高次脳機能
（森　茂美，松山清治，宮下英三，中隣克己，高須千慈子）
網様体脊髄路投射の脊髄支配様式および作動様式
（松山清治，中隣克己，森　茂美）
ラットのヒゲ運動系における感覚・運動統合機序の解析
（宮下英三，森　茂美）

ラット歩行能力の生後発達とセロトニン作動系
（中隣克己，高須千慈子，松山清治，森　茂美）
ネコの小脳正中部刺激によって誘発される姿勢筋緊張の増強効果
（浅野目充，中隣克己，松山清治，森　茂美）
ラット黒質からの下行性投射経路の同定
（小倉光博，山田高嗣，宮下英三，森　茂美）
ダイテルス核を起始核とする前庭脊髄路軸索の頚・胸髄レベルにおける多髄節支配様式
（久世文也，松山清治，森　茂美）
歩行運動制御における小脳・脳幹神経機構の関わり
（松井利浩，浅野目充，松山清治，森　茂美）
ラット脚内核刺激に対する脚橋核領域ニューロンの応答様式の解析
（山田高嗣，小倉光博，宮下英三，森　茂美）
延髄後疑核近傍呼息ニューロンの脊髄支配様式
（Timothy W. Ford，松山清治，中隣克己，森　茂美）

統合生理研究施設

概　要
感覚・運動機能研究プロジェクト …… 78
概　要
体性感覚刺激による脳磁図
（柿木隆介，下条素子，宝珠山稔，北村吉宏，小山幸子，渡邊昌子）
視覚刺激による脳磁図
（中村昭範，柿木隆介，小山幸子，宝珠山稔，北村吉宏）
文字認知に関する脳磁図
（小山幸子，柿木隆介，宝珠山稔，北村吉宏）
頭部磁気刺激による誘発筋電図
（宝珠山稔，柿木隆介）
高次脳機能研究プロジェクト …… 85
概　要
自律機能研究プロジェクト …… 86
概　要
視覚文字認識の脳内プロセス
（栗城真也，平田恵啓，小林哲生）

生理機能研究施設

組織培養標本室 …… 89

含むマウスGAD65cDNA (0.6kb) フラグメントをプローブとして，マウスゲノムDNAライブラリーのスクリーニングを行った。その結果約20Kbの3種類のゲノムDNAが得られ，制限酵素地図，サザンブロット，シーケンスによるエクソン位置の決定を行ない，ターゲティングに用いるDNAフラグメントE10 (7.5Kb) を決定した。このE10ゲノムDNAにはエクソン1から4までが存在し，positive selectionにネオマイシン耐性遺伝子を単独あるいはLacZ遺伝子と結合型で挿入し，さらにnegative selectionのためにジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子を結合したターゲティングベクターを作成した。このベクターをエレクトロポレーション法によりES細胞に導入し，G418選別，PCRおよびサザンブロットにより，ネオマイシン耐性遺伝子単独型では70クローン中4クローン，LacZ遺伝子結合型では168クローン中9クローンに相同的組換えを起こしたES細胞を得た。これらの細胞をマウス胚に導入しキメラマウスを作成し，数種類のキメラマウスが得られた。現在それらのキメラマウスから生まれた子マウスからゲノムDNAを取りPCRおよびサザンブロットにより解析中である。またGAD65とGAD67のES細胞でのダブルミュータント作成のために，ピューロマイシン耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターを作成し，現在ES細胞に導入している。

アルツハイマー病アミロイド生成機構の培養細胞における検討

丸山　敬，富田泰輔，久米秀明，淺田英穂，川村勇樹，小幡邦彦

アルツハイマー病の病因として神経毒性を持つβ/A4タンパク質 (β/A4) の蓄積が考えられている。アミノ酸40数個のβ/A4はアミノ酸700個程度の前駆体 (APP) に由来することがすでに明らかになっている。APPの代謝の研究によってβ/A4の生成機構が明白になれば，アルツハイマー病の病因の解明や治療法の開発に直接的に重要な成果となることが期待される。APPからのβ/A4の生成機構の検討，およびβ/A4の生成を抑制する薬物のスクリーニングを行うために，培養細胞で各種の変異APPの発現を行った。

1．βセクレターゼとγセクレターゼの性質

COS細胞でβ/A4配列以下のC末100アミノ酸からなるフラグメント (C100) を発現させると，ただちにγセクレターゼが機能してβ/A4が分泌された。β/A4からN末側に30個以上付加すると，γセクレターゼが機能しなくなり，そのまま分泌された。25以下であれば，一部γセクレターゼによって切断されて分泌された。しかし，βセクレターゼによる切断は見られなかった。APP分泌系ではβセクレターゼが速度決定段階であることが確認された。

2．Presenilin-1とPresenilin-2

家族性アルツハイマー病の遺伝子解析から未知の膜タンパク質Presenilin-1 (PS-1) とPresenilin-2 (PS-2) が報告された。この遺伝子とAPPの代謝を検討するために，培養細胞でAPP

と PS-1 および PS-2 の共発現を行った。アルツハイマー家系で見いだされた変移を持った PS-1 は，病態と関連の深い β/A4 (1-42) の分泌を増加する傾向が観察され，さらに詳しく検討を行っている。

3．神経系培養細胞での発現

培養細胞としては，ニューロンとグリアの中間的な性質を持つとされる H4 (neuroglioma) を選んだ。野性型 APP での発現を確認したのち，β/A4 の分泌量が上昇する Swedish 変異を発現し，β/A4 の分泌を確認した。この培養系に各種の蛋白質分解酵素阻害剤や代謝阻害剤を付加して β/A4 の生成への影響を検討した。その結果，プロトンポンプの阻害剤であるバヒロマイシンが β/A4 の分泌を特異的に抑制することが見いだされた。この培養細胞の β/A4 の生成機構は，実際の患者脳の現象に直結できるわけではないが，β/A4 の生成を抑制する視点に基づいたアルツハイマー病治療薬の可能性について検討する有用な系であることが期待される。

ラット海馬の長期増強 (LTP) に関連して発現する遺伝子の検索の試み

丸山　敬，久米秀明，小幡邦彦

ラット海馬スライスにおける長期増強 (LTP) は記憶のモデルとして注目されている。この現象は反復する電気刺激後に伝達効率が上昇するというものである。その分子機構として NMDA 受容体の活性化などが提唱されている。しかし，電気刺激による LTP は，限局された領域の現象であり，未知の遺伝子の検索は困難であった。最近になり，Kチャンネルの阻害剤の一つである TEA (tetraethylammonium) 処理によっても同様の現象が観察されることが報告された。TEA 処理では海馬スライスの多くのニューロンで LTP が誘発されると考えられる。そこで，TEA 処理した海馬スライスのメッセージから通常の脳全体のメッセージを差分して，LTP に関連した遺伝子の検索をめざした。スクリーニングとしては，in situ hybridization (ISH) によって，ある特定の細胞だけに発現していることを指標とした。

500個程度のクローンを検索し，海馬のニューロンに特異的に発現しているクローンを特定していった。いくつかは部分塩基配列では未知のものであった。その中の一つ，kw8 は，発生分化に関連した転写調節因子に見られる塩基性ヘリックス－ループ－ヘリックス・モチーフ (bHLH) を持つ新規の遺伝子であった。その領域は神経分化調節因子とされる NeuroD とほとんど相同であったが，他の領域はまったく既存のタンパク質と相同性が見られなかった。神経の可塑性は，神経細胞として分化した後にあらたな神経回路が形成されるという意味で，神経細胞の再分化と考えられる。kw8 が成体の神経組織のおいても発現されており，bHLH 転写調節因子であることから，この可塑性に関連していることが期待される。

LTP の分子機構については，すでに確定された受容体などの活性化や既存のタンパク質の燐

酸化などを中心に議論が進められている。しかし，我々は，TEA 処理によって出現する遺伝子を差分法によって，未知の遺伝子の検索を目指している。その結果，kw8 をはじめとして，特異的な発現が見られる遺伝子が特定されつつある。その機能や LTP との関連については，いまだ不明であるが，なんらかの新しい神経可塑性の機構が見いだされる可能性が期待される。

脳内 Fyn 活性化によるけいれん誘発とタンパク質リン酸化変化

児島伸彦，石橋英俊，小幡邦彦

昨年に引き続き，成熟脳におけるチロシンキナーゼ Fyn の役割を調べる目的で作成した正常 Fyn cDNA と負の活性制御に重要な531番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した活性型 Fyn cDNA を発現するトランスジェニックマウスの解析を行っている。これらのトランスジーンの発現はカルモジュリンキナーゼⅡアルファサブユニットのプロモータによって制御されており生後の前脳ニューロンに限定して認められる。免疫沈降 in vitro キナーゼ活性測定によって調べた前脳での Fyn の比活性は正常型では内在の Fyn とほぼ同等，活性型ではその約1.5倍であった。正常型 Fyn 発現マウスでは目立った表現型は認められないが，活性型 Fyn 発現マウスでは生後１，２か月で自発けいれんによる死亡する例が頻繁に観察された。このことからニューロンにおける Fyn 活性の調節が脳の興奮と抑制のバランスに重要である可能性が示唆された。この仮説を検討するためにペンチレンテトラゾルによるけいれん誘発実験を行った結果，活性型 Fyn 発現マウスではけいれん誘発に必要な投与量は野生型，Fyn 欠損，正常型 Fyn 発現マウスと差はないが，強直性けいれんに必要な投与量が有意に少ないことがわかった。すなわちこれらの動物では間代性けいれんから強直性けいれんへ速やかに移行する。それが興奮性の増大によるか抑制性の減弱によるかについてを知るためには今後これらの動物の詳細な薬理，生理学的検討が必要である。各種けいれんモデル動物では歯状回苔状線維の出芽が報告されている。これらの動物の脳切片で Timm 染色を行ったが，そのような形態変化は観察されなかった。

Fyn ノックアウトマウスでは多岐にわたる神経障害が報告されており Fyn が脳の様々な機能に関与していることが予想されるが，ニューロンにおける Fyn の基質はまだ十分同定されていない。正常型および活性型 Fyn 発現マウスの前脳抽出物の抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロット解析を行ったところ，複数種のタンパク質 (PY180, 175, 120, 100) のチロシンリン酸化が野生型に比べ著明に増大していた。これらのリン酸化は Fyn 欠失マウスでは逆に減弱しているので，これらのタンパク質は Fyn によって優先的にリン酸化される基質タンパク質である可能性が高い。今後はこれらのタンパク質の同定を試み，Fyn 活性化によるけいれん誘発との関連を検討したい。

神経活動と Ca^{2+} / カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ

山肩葉子，小幡邦彦

Ca^{2+} / カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（以下，カルモジュリンキナーゼⅡと略称）は，シナプス可塑性をはじめとして，様々な神経機能に関与することが示唆されている。培養細胞，スライスを用いた *in vitro* の実験系においては，神経細胞の興奮性やシナプス活動とカルモジュリンキナーゼⅡの活性との関連が調べられているが，動物個体を対象とした *in vivo* における神経活動とカルモジュリンキナーゼⅡとの関連は不明である。そこで，生体における強力な神経活動の活性化のモデルとして，ラットに電撃けいれんショックを与え，刺激後の時間経過を追って，脳内のカルモジュリンキナーゼⅡの活性状態の変動を観察した。カルモジュリンキナーゼⅡは，Ca^{2+} / カルモジュリンによって活性化されると，286位の Thr の自己リン酸化が起り，その結果，Ca^{2+} / カルモジュリン非依存性の活性が出現することが知られている。本研究においては，(1)286位の Thr の自己リン酸化を特異的に認識するリン酸化特異抗体を作成し，それを用いた定量的イムノブロットによって自己リン酸化レベルを測定する，(2) Ca^{2+} / カルモジュリン存在下ならびに非存在下におけるペプチド基質のリン酸化活性の測定を行う，という二つの方法により，活性化型のカルモジュリンキナーゼⅡを定量的に検出した。

電撃けいれんショック刺激後30秒というごく早期に，すなわちまだ全身けいれんが持続しているような時期に，海馬および大脳皮質のホモジネートにおけるカルモジュリンキナーゼⅡの，Ca^{2+} / カルモジュリン非依存性活性と自己リン酸化レベルは，コントロールの半分近くまで低下していた。その後，速やかに回復に向かい，５分後，すなわちけいれんが終了する時期までには，コントロールレベルに戻り，その後，この状態が持続した。また，これらの時間経過中，Ca^{2+} / カルモジュリン非依存性の活性と自己リン酸化レベルは，よく一致した変動を示した。

以上の結果から，活性化型のカルモジュリンキナーゼⅡは，電撃けいれんショック刺激の直後に，脱リン酸化，リン酸化の一連の過程を経ることによって，一過性に減少するものと考えられる。この活性化型のキナーゼの一過性の減少は，けいれん発作波の持続，あるいは，けいれん発作波の他の部位への波及と関連しているのかもしれない。

超微小形態生理研究部門

【概要】

超微小形態生理部門は，生体に存在するイオンや種々の生体分子の特徴的な秩序構造，それに伴う特異的な物理化学的挙動や超微小構造がどのようにマクロな生理機能とむすびつくのか，またこの維持に必要なエネルギー代謝を総括的に研究するために設立された。このため，生体高分

子から個体レベルまでを対象とし，細胞環境を破壊することなく生体電解質，生体分子の動的挙動および量を測定できる核磁気共鳴法，可視および蛍光分光法を用い，分子運動，物質輸送，エネルギー代謝を主テーマに研究を進めてきた。

分子運動グループは，細胞内電解質をはじめとする生体分子の緩和時間を測定し，生体分子が生体内の種々の区画でどのような運動状態にあるのかを研究している。今年度は，パルス磁場勾配 NMR 法を用い種々の物質拡散の観測を行なった。

物質輸送グループは，唾液腺細胞をはじめとする上皮膜細胞の高い輸送能力に着目し，各輸送体による Na^+, K^+, Cl^-などの輸送が細胞の全エネルギー代謝のなかでどのような位置にあるかを多核種核磁気共鳴，臓器潅流，酸素消費測定，経時的イオン出納測定法，パッチクランプ法などをくみあわせ研究している。本年は，ラット顎下腺腺房細胞の TEA 非感受性，Ca^{2+}依存性 K^+チャネル，管腔側膜に存在する Ca^{2+}依存性 Cl^-チャネル活性のサイクリック AMP による調節機構についてホールセルパッチクランプ法により検討した（年報第16巻に記載）。

エネルギー代謝グループは，P-31 NMR や酸素消費測定を行い，輸送グループと連携し輸送活性とエネルギー供給系の協調機構を研究しているが，本年は，継続課題として唾液腺水分分泌に対する Na 輸送体の寄与研究を進め，分泌速度と酸素消費の同時測定を行ない，唾液分泌のエネルギーコストから Na 輸送体の寄与を調べた。エネルギー代謝グループはこれに加え，磁気共鳴装置室の活動に記載した医学・生物学領域における多核種磁気共鳴法の開発と応用の一環として多くの P-31 NMR による実験をサポートしてきた。

平成７年６月，石川　透は文部省在外研究員としてトロント小児疾患病院研究所に赴任，二年間の予定で上皮性 Na チャネル (r Na C) の分子生物学的手法による研究を開始した。平成７年７月にトロント小児疾患研究所（カナダ）の Y Marunaka, ９月に NIH (USA) の RJ Tumer,11月に RL Evans (NIH, USA), SP Soltoff (Harvard Medical School, USA), DI Cook (Univ Sydney, Australia), A Dinudom (Univ Sydney, Australia, S Dissing (Univ Copenhagen, Denmark), MC Steward (Univ Mmchester, UK), JT Seo （Yonsei Univ, 大韓民国）が来所し，情報交換と共同研究打ち合せを行なった。また，平成８年２月 Yehuda Sharf (Univ Tel-Aviv, Israel), 魏睦新（南京医科大，中国）が来所，共同研究を行なった，平成８年３月には，GJ Galloway (Univ Queenslmd, Australia), Hadassah Shinar (Univ Tel-Aviv, Israel), A Ehsani (Arizona U, USA) が来所，情報交換と共同研究を行なった。村上政隆は，９月コペンハーゲン大にて共同研究打ち合せ後，アクアポリンと上皮水輸送シンポジウム（マンチェスター），第１回ステンセンシンポジウム（フィレンツエ），第７回アジアオセアニア生化学遵合（シドニー）に出席発表した。その後シドニー大にて羊唾液腺水分泌の共同研究を行なった。平成８年２月に NIH, Harvard 大 (USA) 及びトロント小児疾患研究所（カナダ）にて唾液腺輸送体のエネルギーコストについて研究打ち合せを行なった。瀬尾芳輝は，８月にコペンハーゲン大（デンマーク），フラウンフオッファー研究所（ドイツ），マンチェスター大（連合王国）にて，10月パルス磁場勾配 NMR 法による細胞内水・Na 拡散測定の

共同研究打ち合せを行ない，12月にテルアビブ大学（イスラエル）にて多量子フィルター画像法についての共同研究，平成８年２月アリゾナ大(USA)にて高速NMR画像法について，NIH-(USA), トロント大（カナダ）にて細胞内水の制限拡散について研究打ち合せを行なった。足立栄希が，平成８年１月より非常勤研究員として赴任した。永山国昭が，平成8年3月より超微小形態生理部門の教授として着任した。

唾液腺水分分泌のエネルギー効率

村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透

【緒言】

唾液腺腺房における原水分分泌は管腔膜での Cl^- 放出が一次機構と見做され，細胞内に高い Cl^- の電気化学ポテンシャルは基底側膜の二次能動輸送により維持されると信じられている。二次能動輸送は中性共輸送体 (Na^+ /K^+ /2Cl^- symport) と二つの対向輸送体 (Na^+ /H^+ & Cl^-/HCO_3^- anti-port) の両方が働く。今回，水分分泌と酸素消費速度を潅流ラット顎下唾液腺にて同時測定し，水分分泌のエネルギーコストを求めた。それぞれの輸送体活性を阻害剤により抑制，あるいは潅流液の bicarbonate の存在，非存在条件で水分分泌のエネルギーコストを測定し，各輸送体の寄与を検討した。

【方法】

雄性 Wistar 系ラット，体重 250-350g,pentobarbital Na (50mg/kg) IP 下に顎下腺 (150-280mg) を摘出，動静脈・導管にカニュレーションし，2ml/min で定流潅流した（37℃）。潅流液組成 (mM) は対照として： Na^+ 146; K^+ 4.4; Ca^{2+} 1.0; Mg^{2+} 1.0; Cl^- 149.4; glucose 5.0; pH 7.4, HEPES 10 mM, 100% O_2 ガスで飽和した溶液を用い，重炭酸添加実験では NaCl を 25mM 減じ，$NaHCO_3$ を同濃度添加，95% O_2 5% CO_2 混合ガスを用いた。動静脈側においた酸素電極にて酸素分圧動静脈差を測定し，潅流速度，酸素溶解度との積より酸素消費速度を計算した。分泌唾液は電子天秤上のカップに導き，15秒毎に累積分泌量を測定，経時データの時間微分より水分分泌速度を計算した。薬品： Acetylcholine (ACh) は 1mM, Dimethyl amiloride (DMA, Research Biochem) を Na^+ /H^+ antiporter を阻害するため，bumetanide (Gift from Sankyo Pharm.) を Na^+ /K^+ /2Cl^- symporter を阻害するために用いた。

【結果と考察】

1）Inactivation of Na^+ /H^+ exchanger by DMA （重炭酸なしの実験)。

ACh (1μM) 刺激中，DMA を 2μM, 6.9μM, 17μM の濃度で添加した。ACh の持続刺激は，阻害剤を加えなくても水分分泌速度を緩やかに減少させるが，DMA 添加は水分分泌を一過性に約 30ml/g-min 増加させた後 DMA の濃度に依存し減少を加速させた。

動や大きさの異方性がある場合，そして，iv）複雑な構造を持つ系についての拡散画像の測定，について代表的な結果を報告する。

【方法】

測定にはMSL-100分光器(2.34 T, Bruker)にパルス磁場制御用にマイクロ画像測定ユニットを一部改造し用いた。拡散測定用プローブは，高磁場勾配領域(25 ～ 600G/cm)ではDiff25拡散プローブ，低磁場勾配領域(0.1 ～ 50G/cm)ではG43マイクロ画像プローブ用いた。共にRFコイル径は12mmで円柱型試料（直径x高さ9.1 × 10mm）をコイル中心に置き，試料温度は22.5 ± 0.5℃に保った。

拡散時間の短い領域(5 ～ 100ms)ではSpin-Echoパルス磁場勾配法(SE-PFG)を用い，拡散時間の長い領域(100ms ～)ではStimulated-Echoパルス磁場勾配法(STE-PFG)を用いた。自由拡散の場合には，測定信号強度の減少は，拡散係数(D), 拡散時間(Δ-δ/3), 磁場勾配パルス幅(δ), 磁場勾配強度(g), 核磁気回転比(γ)より，

$$M/Mo = \exp[-\gamma^2 \cdot D \cdot \delta^2 \cdot g^2 \cdot (\Delta-\delta/3)]$$

と表される。一般的には，磁場勾配強度を変化させ，一連の信号強度の減少を測定し，$\gamma^2 \cdot \delta^2 \cdot g^2(\Delta-\delta/3)$に対し$\log_e(M/Mo)$をプロットする。自由拡散の場合には勾配が拡散係数となる。

引加磁場勾配強度は，既知の長さを持つファントムを用い，一定の読取磁場勾配を引加して一次元スライスを測定し，そのFTプロファイルの周波数幅から求めた。最終的には，純水($2.17 \cdot 10^{-9} m^2/s$)またはベンゼン($2.14 \cdot 10^{-9} m^2/s$)の拡散係数を用い校正した。3 ～ 1000msの拡散時間内で5％以下の誤差と再現性を確認した。

1）赤血球細胞内での含フッ素有機酸の拡散：透過性のない境界内部での制限拡散(Jpn. J. Phtsiol. 45: 2, 243-253,1995)

3-trifluoromethyl hippurate (TFMH)はパラアミノ馬尿酸の含フッ素相似体であり，腎尿細管ではPAH輸送坦体により取り込まれ分泌される。ヒト赤血球においては，膜透過性は極めて小さく，NMRの時間領域(～ $5 \cdot T_1$)では事実上不透過とみなせる。赤血球は直径8ミクロン厚さ2ミクロンのパンケーキ状の形をしており，細胞内には分子量65000のヘモグロビン蛋白がぎっしり(34%W/W)パックされている。

低浸透圧ショック法を用い，細胞内の可溶性蛋白を洗い流した後，5mM TFMH添加生理食塩水中でresealし赤血球ゴーストを作成した。ゴースト内液は細胞外液と同組成であり，細胞内外でのTFMHの拡散速度は同一のはずである。が，正常ゴースト浮遊液中の^{19}F PFG NMRによるTFMH信号強度の減衰は，2成分となった。サポニンで膜に8-10nmの穴を開けると，拡散は一成分となり，細胞外とほぼ同じ拡散係数を示した。速い成分は細胞外，遅い成分は細胞内のTFMHの拡散係数を示すことが明らかになった。TFMHと膜タンパク質との相互作用は無視でき，遅い成分は細胞膜が正常で，TFMHに対し不透過な場合のみ観測できることを示した。

透過性のない境界内部での分子の運動は，コンパートメントの大きさ(r)に依存する。拡散測定中の分子の拡散距離は自由拡散の場合，$R = (2D\Delta)^{1/2}$となる。Rがrに対して小さければ，

分子の運動は境界面で影響されず，自由拡散と同じ拡散係数を示す。一方，R が r に対して大きければ，分子は境界面で跳ね返され，見かけ上の拡散距離が小さくなり，結果として測定される拡散係数が小さくなる。よって，透過性のない境界内部では，見かけの拡散係数は拡散距離すなわち拡散時間 (Δ) に強く依存する。

拡散時間を 5 ～ 1000ms に変化させた時，細胞外 TFMH は一定の拡散係数を示し，拡散距離は単調に大きくなった。一方，細胞内 TFMH の拡散係数は，拡散時間を長くすると著しく小さくなった。しかし，計算される拡散距離は，ほぼ一定値を示した。また，ゴーストを球形に近似すると，半径は $R = (5D\Delta)^{1/2} = 3$ ミクロンとなり，ゴーストの大きさとよく一致した。

正常赤血球中に取り込ませた TFMH においても，ほぼ同様の結果が得られ，ヘモグロビン蛋白の影響は誤差範囲であった。このように，透過性のない境界内部での分子の拡散係数は，コンパートメントのサイズに強く依存し，その大きさについての情報を得ることができた。

2）灌流唾液腺の細胞内外の水の運動：透過性の高い境界を持つ場合 (Magn. Reson. Med. 31, 131-138, 1994)

ラット唾液腺を摘出し，動脈よりリンガー液を定流ポンプで灌流することにより，48時間以上，唾液分泌などの生理機能を保つことができる。この系を用い，刺激分泌連関の各ステップを解析している。

唾液腺の細胞膜は水に対し比較的高い透過性 ($Pd = 3 \cdot 10^{-3}$cm/s) を持つため，細胞内からの水透過速度は 4/sec 程度であり，水の磁気緩和速度と同等の大きさである。このような場合，測定される細胞内外の水の拡散係数には，細胞内外の水の移動による項が付加される。定性的には，水の細胞内外での移動を無視できる短い拡散時間を用いた場合，細胞内外の真の水の拡散係数を求めることができる。一方，水の透過速度に対し，十分長い拡散時間を用いた場合は，細胞内外の拡散係数は荷重平均され，ただ一つの拡散係数を観測することになる。拡散時間をふった測定結果より，細胞内外の拡散係数，水の透過性，細胞内外液量を求めることができた。

3）座骨神経内の水の運動：区画に運動性や大きさの異方性がある場合

末梢神経は神経軸索が束をなした構造をしており，解剖学的異方性が大きい，また，神経軸索は神経血管関門を形成する神経髄鞘におおわれ，水等の低分子に対しても不透過な境界によって区分されており，神経組織内水分子の拡散係数には異方性が存在すると考えられる。

ラット座骨神経を摘出し，神経の長軸方向への拡散係数 (D_0) と長軸に垂直方向の拡散係数 (D_{90}) を測定し，3 個の水の拡散係数を得た。それぞれ，細胞外間質，神経軸索，神経膠細胞内の水の拡散係数に対応すると考えられた。細胞外間質の水の信号を除去する目的で，常磁性緩和試薬を含む生理食塩水に浸漬後，測定すると 2 個の水の拡散係数を得た。この内中間速の拡散係数が，D_{90} では小さく，D_0 では大きくなった。円筒状の構造を持つ軸索腔に対して，長軸方向に平行な水の運動は制限されないが，垂直な水の運動は，軸索管腔が数～数十ミクロンと小さいために管腔壁に運動を制限され，見かけの拡散係数が小さくなったものと考えられる。

複雑な分画を持つ系では，測定された拡散係数と解剖的分画との同定に工夫が必要であるが，

一旦確定できれば，ミクロンオーダーの構造変化を，非侵襲的に末梢観察し得る。

4）椎間板軟骨組織中の水の運動：複雑な構造を持つ系への拡散画像の応用

椎間板軟骨は不均一な組織であり，中心部の比較的均一で無構造な髄核から周辺の繊維輪外層に向けて同心円状に連続的に組成や構造が変化する。荷重により生じる力学的応答は部位により異り，椎間板の60～80％を占める水分子の動態に反映すると考えられる。

椎間板軟骨を各部位毎に5mm角に切りだし，長軸方向への拡散係数(D_0)と長軸に垂直方向の拡散係数(D_{90})を測定した。単一の拡散係数が得られ，拡散時間を5～1000msにふっても変化しなかった。繊維輪部ではD_0はD_{90}に対し5～10％大きくなったが，髄核部では拡散係数の方向依存性は全く認められなかった。しかしながら，椎間板軟骨は連続的に組成や構造が変化しており，5mm角の平均値は，部位による変化の検出には粗すぎ，また，切り出した標本では，荷重を懸けたときの変化が測定できない。

Stimulated-Echoパルス磁場勾配法を磁気共鳴画像法に取り入れ，拡散画像の測定を行なった。測定装置は，BIOSPEC47/40 (4.7T, Bruker)に内径12cmの自己シールド型勾配コイルを用いた。成牛尾椎椎間板を上下椎体および周囲軟部組織とともに摘出し，内径78mmのバードケージ型コイル中央に置いた。2ms Sincパルスを90°パルスに調整し，FOV 5.5cm, 128×128マトリックス，スライス厚2mm, 拡散時間500ms, 1.1msの磁場勾配パルスを静磁場に垂直方向(Read axis)に強度を2～16 G/cm/2G/cmステップに，8画像を測定した。この画像の強度から，各ピクセル単位(0.43×0.43×2mm)の拡散係数を計算し画像化した。繊維輪部では$0.95 \cdot 10^{-5}cm^2/s$, 髄核部では$1.4 \cdot 10^{-5}cm^2/s$と，部位による拡散係数の差はより顕著に得られた。

磁気共鳴拡散画像には，測定感度・精度や測定可能な拡散速度の範囲など，まだ改善する余地があるものの，不均一な試料における拡散係数の測定への応用は今後進むものと考えられる。

細胞内代謝研究部門

【概要】

本部門では，部門設置以来，ニューロン・パラニューロンおよび各種分泌細胞の刺激－放出連関のメカニズム，とりわけCa^{2+}シグナル動態を解明することを課題として研究を進めてきた。この課題に沿って，開設当初より用いてきた顕微蛍光測光法や蛍光顕微画像解析法とともに，平成6年度より部門に設置された，Indo-1対応紫外レーザー共焦点顕微鏡による画像解析法，さらに，画像解析法とパッチ電極を用いた細胞膜イオン電流測定法との同時適用をもって細胞内Ca^{2+}空間動態等に関する解析を行った。

佐藤洋一に変わり8月より葉原芳昭（北海道大学）が客員助教授に赴任し，本部門の助手時代から行っていた紫外レーザー共焦点顕微鏡を用いた分泌細胞のCa^{2+}動態の画像解析を進展させた。学位取得後10月まで滞在したJulia Busikは，パッチ電極による膜電流測定を蛍光顕微画像

解析と同時に行う装置を組み上げ，副腎髄質細胞の自発的な膜電位発火および細胞内 Ca^{2+} 濃度振動発生の機構についての解析を行った。5月から10ヶ月にわたり文部省内地研究員として北海道教育大学旭川校の浅田尚登が滞在し，膵島を構成する個々の細胞での Ca^{2+} 動態と細胞種を同定する研究などを，主に紫外レーザー共焦点顕微鏡画像解析法をもちいて行った。

この間，数件の研究課題の申し込みを受け，種々の細胞での細胞内 Ca^{2+} 動態についての共同研究を進め，また，生理研研究会としては，「内分泌細胞とニューロンの相互作用，クロム親和性細胞を中心に」の開催をお世話した。

ラット副腎クロマフィン細胞の自発的 $[Ca^{2+}]_i$ 変動および脱分極にたいする GABA の効果

BUSIK, Julia V.，阿部ゆかり，菅野富夫

酵素的に単離したラット副腎クロマフィン細胞では，そのおよそ60％で静止時においても自発的な活動電位の発生および細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変動が認められる。そこで，蛍光顕微画像解析装置 (Argus-50/Ca) にパッチ電極による膜電位固定装置を組み合わせ，fura-2 による細胞内 Ca^{2+} 画像取得と同時に細胞膜電流の記録を可能にしたシステムをもちいて，この自発的な膜電位変動や $[Ca^{2+}]_i$ 変動にたいする GABA 添加の効果を調べた。ラット副腎クロマフィン細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の自発的変動は，50μM から 1mM の GABA の添加により停止したが，しばしば，停止に先立って $[Ca^{2+}]_i$ スパイクの増強が認められた。この GABA の効果は $GABA_A$ 受容体のアゴニストである muscimol により再現できた。自発的な活動電位発生については，GABA 添加 (100μM) により，小さな一過性の脱分極バーストに続いて停止した。GABA 添加では，おそらく Cl^- コンダクタンス増大による内向き電流により脱分極が引き起こされていることから，ラット副腎クロマフィン細胞での自発的活動電位発生や $[Ca^{2+}]_i$ 変動の生理的な調節に GABA が関与しているものと考えている。

膵島を構成するＡ細胞とＢ細胞の Ca^{2+} 応答の解析

浅田尚登（北海道教育大）
岩永敏彦（北海道大）
菅野富夫

Indo-1 対応紫外部レーザー共焦点顕微鏡を用いて，マウスの膵島を構成する細胞における種々

の分泌刺激にたいする Ca^{2+}応答の様式を調べるとともに，膵島を灌流チャンバー内においたまま，固定，細胞膜透過処理を行いインスリン，グルカゴン等の抗体で標識した。この操作により Ca^{2+}画像を記録した同じ光学断面での細胞種の同定が可能となった。コラゲナーゼによる分離後1から2日培養したマウス膵島にIndo-1を負荷（室温，1時間）したとき，Indo-1蛍光は表層部の細胞でしか認められなかったものの，ごく薄い光学断面での個々の細胞の Ca^{2+}濃度 ($[Ca^{2+}]_i$ 変動を捉えることが可能になった。分泌刺激に応答した時の膵島の Ca^{2+}画像はモザイク状に見え，表面灌流液のグルコース濃度の15mMまたは11mMへの上昇 (15mMまたは11mM) に応じて $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する細胞と，高くしたグルコース濃度を3mMまで低下させた時に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する細胞が区別できた。免疫組織化学法によって前者の細胞がインスリン陽性細胞（B細胞）であり，後者がグルカゴン陽性細胞（A細胞）であることを確認した。A細胞はまた，アルギニン塩酸塩 (5または10mM) や，アラニン (5mM) 添加に応じて速やかな $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を起こしたが，B細胞では，それらの刺激にたいしてほとんど反応が認められないか，ゆっくりとした弱い Ca^{2+}反応が見られただけであった。

Effects of GABA on spontaneous $[Ca^{2+}]c$ dynamics and electrial properties of rat adrenal chromaffin cells

J. Busik, M. Nakamura, Y. Abe, I. Shibuya and T. Kanno

Large portion of rat adrenal chromaffin cells (about 60%) shows spontaneous $[Ca^{2+}]c$ oscillations and discharges spontaneous action potentials. The effects of γ-aminobutyric acid (GABA) on the spontaneous $[Ca^{2+}]c$ oscillations and electrial properties of rat adrenal chromaffin cells were investigated using Fura-2 $[Ca^{2+}]c$ imaging and patch clamp techmiques. GABA at 50μM-1 mM arrested spontaneous $[Ca^{2+}]c$ oscillations. The arrest was often preceded by one $[Ca^{2+}]c$ spike of higher amplitude. The effect of GABA was mimicked by muscimol, a $GABA_A$ receptor agonist. GABA (100μm) eliccited a transient burst of action potentials. Further analysis showed that GABA at 100μM induced inward whole-cell currents in voltage-clamp experiments and produced depolarization and membrane conductance increase in current-clamp experiments. The effects appear to be due to an increase in chloride ion conductance since the degree of GABA-induced depolarization depend on the pippete $[Cl^-]$. Thus, GABA may play a role in the physiological regulation of rat adrenal chromaffin cells by directly modifying the discharge of spontaneous action potentials and spontaneous $[Ca^{2+}]c$ oscillations.

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

生体膜研究部門は各種細胞のイオンチャネル，リセプター，サイトーシス活動等を探索し，細胞がいかに固有の生理的活動を発現するか，というメカニズムの解明を目指して研究を進めてきている。

神経膜の活動については，イカ巨大神経標本で細胞内 Ca^{2+} とアニオン種によって発現する大きな Cl^- コンダクタンスの性質の解析，および神経膜ナトリウムチャネルの開閉機能と蛋白構造変化の解析を進めた。

乳腺組織からの乳分泌のメカニズムについて研究し，乳腺上皮細胞，筋上皮細胞各々の活動様式とプリン受容体を介した細胞間相互作用の解明を進めた。

筋細胞に関する研究では骨格筋 E-C coupling 機構の分子進化の比較生理学的研究を進めた。

白求恩医科大学の房家智助教授が 6 ヶ月間中国政府派遣研究員として，分泌細胞，神経細胞の研究に参加した。

国際共同研究の一環として筒井が Plymouth の海洋生物学研究所を訪れ，海洋生物の筋細胞機能の進化に関する研究を行った。Plymouth からは Dr. Q. Bone と A. Chrachri が来所した。

一般共同研究としては，橋本（東京医科歯科大），榎本（島根医大），堀江（横浜市大医），柴（広島大歯），井上（徳島大）各氏との共同研究が進められた。

研究会は「音響情報のトランスダクションと脳内表現をめぐる学際的展望（亀田和夫氏）」および「内外受容器のブドウ糖分子識別ならびに反応発現機構（坂田利家氏）」を担当した。

イカ巨大神経細胞膜に発現する Cl^- コンダクタンスの基本的性質

山岸俊一，筒井泉雄，古家喜四夫

神経膜においては細胞内外の K^+ イオン濃度と静止膜 K^+ イオン透過性が静止膜電位形成の主役となっている。このとき，人工海水 (ASW) 中の Cl^- イオンを膜を透過しないと見られる他のアニオンに置換しても，静止電位，活動電位には殆ど影響を与えない。この正常条件で細胞外または細胞内の K^+ イオン濃度を変化させると，高い K^+ 選択性を示す。

このとき 10^{-9} ～ 10^{-6}M の Ca^{2+} を細胞内に投与して，一分間以上潅流すると Cl^- コンダクタンスが増大するが，この濃度範囲では可逆的である。0.1mM 以上の Ca^{2+} 細胞内投与では，K^+ イ

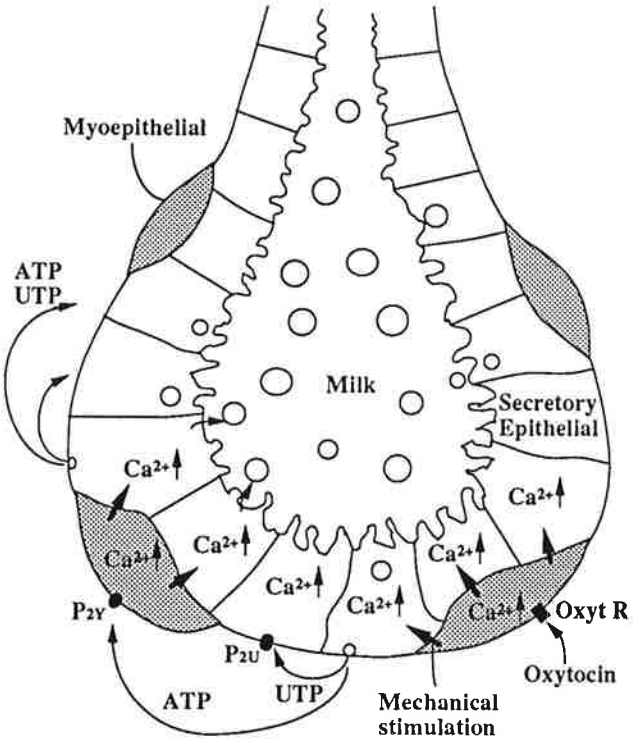


図　乳腺腺胞での分泌上皮と筋上皮の細胞間相互作用の模式図

ン（ヌクレオチド）受容体は乳腺における細胞間情報伝達機構のかなめとして働いていることを明らかにした。図に乳腺腺胞における分泌上皮と筋上皮の相互作用の模式図を示す。

機械的刺激によるカルシウム波の伝播機序

古家喜四夫，神谷絵美，山岸俊一

培養マウス乳腺上皮細胞を機械的に刺激すると，細胞間を約 10μm/sec で 2- 300μm 伝わって消えるカルシウム波が観測された。この伝播は離れたコロニー間でも起こり，外液を介した液性因子によっている。乳癌細胞のピペッティング上清液の分析からこの因子がヌクレオチド (ATP, UTP, UDP) であり，またこの受容体としてプリン (P_{2U}) 受容体が関与することを遺伝子クローニングによってすでに明らかにした。しかし，このカルシウム波の伝播速度は，２次元の単純拡散方程式で求められるヌクレオチド程度の分子の拡散速度よりも遅く，その伝播機序は完全には解明されていなかった。

ヌクレオチドによるカルシウム上昇は P_{2U} 受容体を介し，セカンドメッセンジャーによる細

胞内ストアからの遊離であり，受容体への結合とカルシウム上昇の間には時間的な delay（潜時）がある。その潜時がアゴニストの濃度依存的であると考えると，単純拡散でもカルシウム波の伝播の様相は説明できそうである。このことは細胞内のカルシウム増大機構に正帰還回路系がある時に起こり得ることで，乳腺細胞においても十分考え得るモデルである。そこで，培養乳癌細胞を用いて，UTP による細胞内カルシウム反応の潜時をはかり，その濃度依存性と温度依存性を測定した。

その結果，UTP 3μM 以上ではほとんどの細胞が反応し，濃度が高くなるほど反応の潜時は短くなり，ある一定値（7－8秒）に近づいた。濃度が低くなると急激に潜時は長くなり，反応しない細胞も増えてきた。この潜時 (t_{delay}) と UTP 濃度 (x) の関係は $t_{delay} = a\ x^{-b} + c$ の関係式でフィットでき，パラメータ a, b, c が求められた。24℃と35℃の結果を比較すると35℃では約1桁低濃度側にシフトした。

機械的刺激によって誘発されたカルシウム波の伝播は $t_{wave} = t_{diffusion} + t_{delay}$ で表される。2次元の拡散方程式より1点から放出された UTP が拡散して距離 r のところでピークになるまでの時間は $t_{diffusion} = r^2/4D$, そのときの濃度は $x = M/e\pi r^2$ で表される。以上のことから $t_{wave} = r^2/4D + a(M/e\pi r^2)^{-b} + c$ となる。ここで D は拡散定数，M は放出された全質量を表す。この式を用いて，実測のカルシウム波を M をパラメータとしてフィットさせたところ図に示すように24℃，35℃ともによい一致を見た。

このようにカルシウム波の伝播速度は，ヌクレオチドの拡散時間と，それが細胞に作用してカルシウム上昇が起こるまでの潜時によって説明されることが明らかになった。

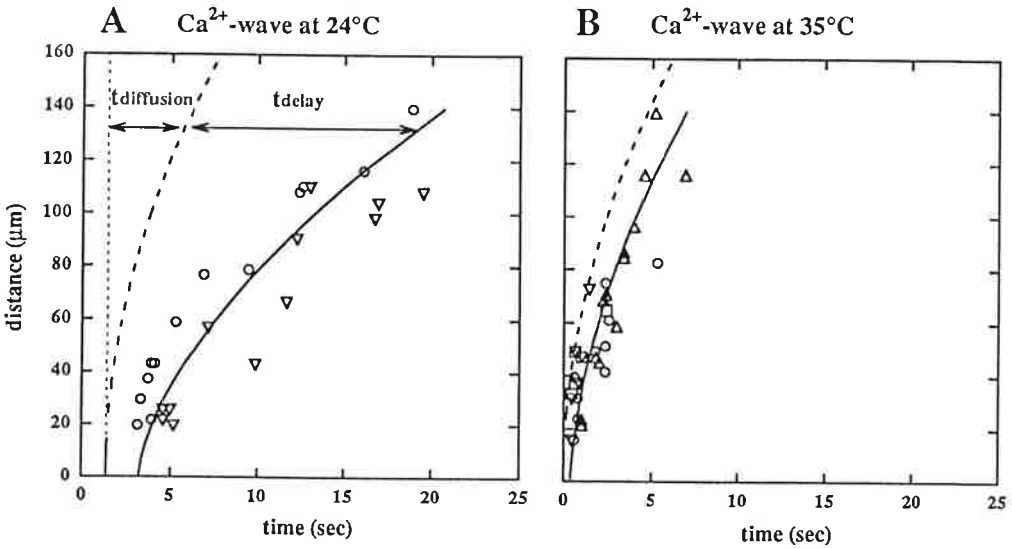


図　ヌクレオチドの拡散時間とカルシウム反応の潜時によるカルシウム波伝播速度の説明
カルシウム波の伝播（データ点）とヌクレオチドの拡散（点線）の差はカルシウム反応の潜時 (t_{delay}) によって説明される。実線は理論式によるフィッティング。A；24℃，B；35℃

ユウレイボヤ (Ciona) 心筋における興奮収縮連関 (E-C coupling) 機構

筒井泉雄

細胞内カルシウムシグナリングをトリガする機構の中で，膜の脱分極によるトリガ機構 (Depolarization-induced-Ca-release; DICR) は，これまでに高等脊椎動物の骨格筋細胞において興奮－収縮連関 (E-C coupling) として確認されただけであり，現在のところ，骨格筋T管膜だけに存在していると考えられている。この情報伝達を司る機能分子は Dihydropyridine (DHP) 受容体であり，膜電位センサーとL型 Ca^{2+} チャネルの2つの機能を有していると考えられている。平滑筋と骨格筋の中間的な性質を持つ脊椎動物心筋においても，膜の興奮に伴う DICR 機構の存在が報告されているが機能的には収縮に関連せず，細胞内カルシウムシグナリングにはL型 Ca^{2+} チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入が必須であるとされている。心筋細胞は固体発生において最終的に分化して現れるものであり，他の組織の性質を併せ持っている可能性が高い。したがってこの DICR 機構が，機能していなくとも何らかの形で潜在的に多くの筋肉細胞において存在している可能性が推察される。体側筋では脊椎動物の無顎類において初めて DICR 機構が発現することをすでに報告しているので，今回はさらに系統的に脊椎動物より下位にある原索動物であるユウレイボヤ (Ciona) の心筋を用いて DICR 機構存在を調べた。ユウレイボヤ心筋細胞はロダン酸存在下では，外界からの Ca^{2+} の流入を阻止した状態でも，電気的な刺激によって収縮することを発見した。このことは DICR 機構がユウレイボヤ心筋細胞に存在し機能的に収縮を引き起こすことのできる分子であることを示唆し，さらに DICR 機構そのものが，発生的に脊椎動物発生よりさかのぼった機構であることを示唆している。

乳腺筋上皮細胞の単離培養とその性質

中野春男，古家喜四夫，山岸俊一
古家園子（組織培養標本室）

乳腺の腺胞は，分泌上皮細胞のまわりを筋上皮細胞が篭のように取り囲み，それが，脳下垂体後葉から分泌されたオキシトシンにより収縮することによって，腺胞にたまったミルクを放出する。このとき，筋上皮細胞の収縮は分泌上皮細胞に機械的ストレスを及ぼしている。我々は分泌上皮細胞が機械的刺激によって ATP, UTP 等のヌクレオチドを放出し，まわりの細胞の P_{2U} 受容体を刺激することによってカルシウム波が起こることをすでに明らかにしている。

今回，機械的刺激と筋上皮細胞の収縮との関連を明らかにするため，乳腺筋上皮細胞の単離培養を試み，その方法を確立した。筋上皮細胞は，紡錘状の細胞であり，細胞内に規則的で密なア

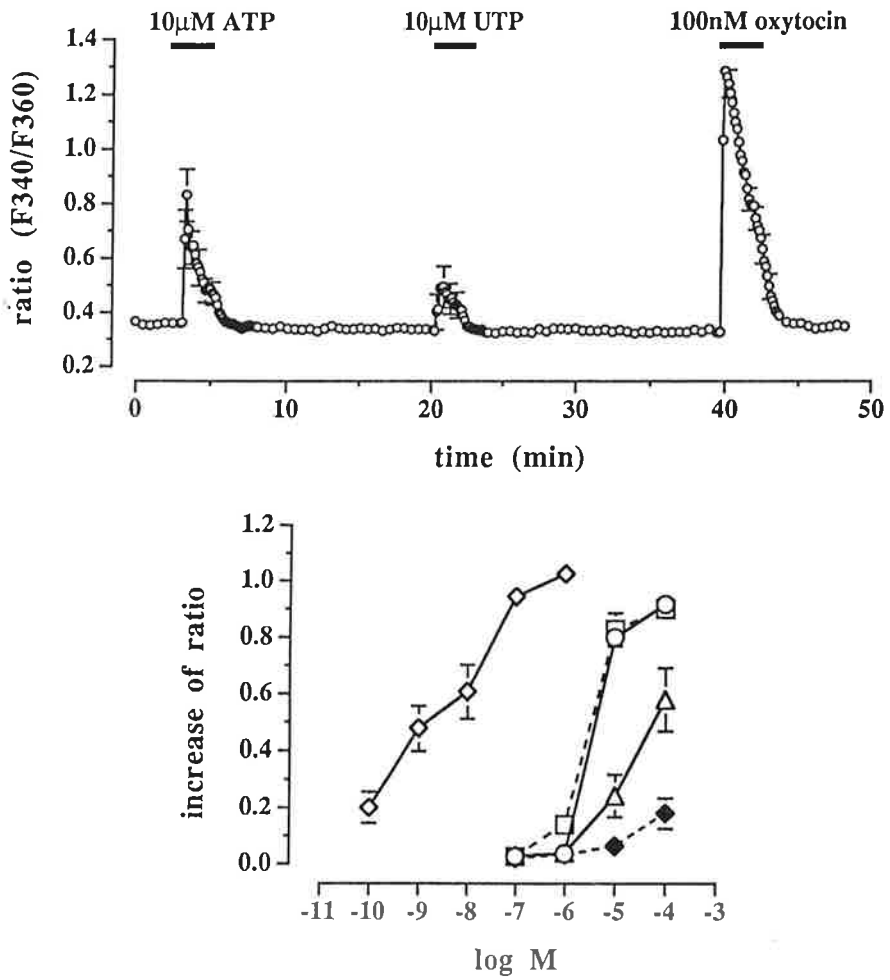


図1上；乳腺筋上皮細胞での ATP, UTP, oxytocin によるカルシウム反応。下； fura-2 蛍光比増加分で測定した ATP (○), ADP (□), UTP (△), UDP (◆), oxytocin (◇) の用量反応曲線。

クチンフィラメントを持つことが，NBD-Phallacidin による蛍光像，及び電顕像により示された。又，オキシトシンによって細胞内カルシウム濃度が増加し，収縮を引き起こした。この反応は，外液のカルシウムによらず，細胞内カルシウムストアからのカルシウム遊離によることが明らかとなった。

筋上皮細胞の約8割は，ATP にも反応し，細胞内カルシウム濃度増加と収縮を起こした。この反応は，細胞内カルシウムストアからのカルシウム遊離により起こり，プリン受容体拮抗薬 suramin で抑制された。また，各種ヌクレオチドの効力が，ATP ＝ ADP〉UTP〉UDP の関係にあることから，P_{2Y} 型のプリン受容体の存在が示唆された。図1に単離培養した筋上皮細胞のカルシウム反応に対するオキシトシン，及び各種ヌクレオチドの作用と用量反応曲線を示す。

筋上皮細胞がATPによって収縮するという結果は，オキシトシンによって起こった筋収縮が機械的刺激となって分泌上皮細胞からヌクレオチドを放出させ，それが再び筋上皮細胞に作用し，筋収縮が起こることを意味している。即ち，筋上皮と分泌上皮細胞がヌクレオチドと機械的刺激を介して相互作用していることを示している。

乳腺上皮細胞の機械的及びプリン受容体刺激によって活性化されるクロライドチャネル

房家智（白求恩医大，長春，中国）
古家喜四夫，山岸俊一
榎本浩一（島根医大）

乳腺上皮細胞はP_{2U}プリン受容体を持ち，ATP, UTP等のヌクレオチドに反応するとともに，機械的刺激にも応答し，細胞内カルシウムの上昇が起こる。この時，細胞膜電位はカルシウム依存性カリウムチャネル（IKチャネル）が開くことによって過分極反応（電位固定下では外向き電流）が起こることはすでに報告した。この過分極反応に先立って速い一過性の脱分極（電位固定下では内向き電流）が時として見られることがあった。今回それについて詳しく調べ，クロライド電流であることを明らかにした。

乳腺上皮細胞のIKチャネルはキャリブドトキシン(CTX) 10nMによって完全に抑制される。その状態で刺激を与えると静止電位では一過性の内向き電流のみが見られた。各種内外イオン条件でその電流の電位依存性を見たところ，平衡電位はクロライドイオンのそれに近い値となった。イオン選択性はI^-〉Br^-〉Cl^-〉Acetateであった。またDIDS, Gadolinium, Glibenclamide等には影響されなかったがNiflumic acid 10μMによって抑制された。

以上のように乳腺上皮細胞において，機械的あるいはプリン受容体刺激によってまずクロライドチャネルが開くことが示されたが，その生理的意味についてはまだ明らかではない。

ラット胎仔培養ニューロンにおける電気的カップリング

中西圭子（愛知県コロニー研究所・生理）
久木田文夫

ラット胎仔ニューロンを1週間以上培養を続けると，個々のニューロンの細胞内カルシウムイオン濃度が，自発的にかつ同期して変動するようになる。この変動は，一般にニューロン間の機

能的シナプスによると考えられている。近年，幼若ラットスライス標本においても，細胞内カルシウムイオン濃度の変動が伝播することが報告され，この伝播は gap junction を介しておこっていると考えられている。このことから，この培養系における細胞内カルシウムイオン濃度の同期する変動も，gap junction を介しておこっている可能性もあり，この変動が実際に機能しているシナプスかどうか，またニューロン・ニューロン間の gap junction の存在の有無を確認する目的で，任意の2つのニューロンのパッチクランプ法による電位変化の同時測定を試みた。

現在までのところ，任意の2つのニューロンにおいて，細胞内カルシウムイオン濃度でみられたのと同様な time course で，膜電位の同期する自発的変動がみられ，このニューロン間で，電気的なカップリングがみられることがわかった。また，この電気的カップリングは細胞内カルシウムイオン濃度の自発変動と同様，細胞外液のカルシウムイオンを必要としていること，また Na-channel blocker である TTX で消失することがわかった。

今後，この電気的カップリングが化学的シナプスによるものか，あるいは gap junction を介する電気的シナプスによるものかを検討するとともに，このモデル系を使って，神経系でのシナプス伝達の発達に関与する因子などを検索していく予定である。

機能協関研究部門

【概要】

細胞機能のすべては，細胞膜上のチャネルや（キャリアーやポンプなどの）トランスポータの働きによって担われたり，支えられたりしている。本部門では，1）イオンチャネルとトランスポータとの機能的協力関係・構造的相関関係，および2）イオンチャネルの各種細胞機能における役割について解明することを目標にしている。

1995年度の研究テーマ（担当スタッフ）は，①細胞容積調節の分子機構とイオンチャネル（岡田，老木，富永，富永知，森島，挟間，三輪），②消化管上皮細胞の吸収・分泌機能とイオンチャネル（挟間，岡田），③心筋細胞機能とイオンチャネル（富永，森島，岡田），④内向整流性 K^+ チャネルの構造機能相関（老木，富永知，三輪，岡田），⑤運動神経細胞シナプス形成過程におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチドの役割（樫原，岡田），などである。これらの内，すでに論文発表の形をなしたものを中心に以下報告する。

細胞容積調節の分子機構とイオンチャネル

岡田泰伸，富永真琴，富永知子，老木成稔，挾間章博，久保町子，三輪晃子

多くの細胞は正常浸透圧環境下のみならず異常浸透圧環境下においても細胞容積を一定に保つ能力をもっている。低浸透圧環境下での膨張後の容積調節能は Regulatory Volume Decrease (RVD) と呼ばれ，このメカニズムには容積調節性イオンチャネル群の関与が知られている。その一つである容積感受性 Cl^- チャネルの分子実体は未だ不明のままである。最近，多剤耐性薬物排出ポンプ遺伝子 (mdr1) を外来性に強制発現させた細胞系においてのみ低浸透圧負荷によって大きな容積感受性 Cl^- 電流が発生するという観察に基づき，MDR1 すなわちＰ糖蛋白が浸透圧性膨張時には容積感受性 Cl^- チャネルに機能スイッチするとの仮説が発表された (Valverde et al. 1992)。その後，Ｐ糖蛋白は容積感受性 Cl^- チャネルそのものではないが，このチャネルに対してのＣキナーゼを介する制御因子であるという仮説が提出された (Hardy et al. 1995)。そこで私達は，内在性のＰ糖蛋白が浸透圧性細胞膨張時に本当に容積感受性チャネルやそのＣキナーゼ仲介性制御因子として振舞うかどうかをヒト小腸上皮細胞株 Intestine 407 を用いて検討した。

本細胞におけるＰ糖蛋白の発現は，Northern blot 法，RT-PCR 法，Western blot 法，間接蛍光抗体法で確認された。Ｐ糖蛋白遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド（図１）を４日間投与するとＰ糖蛋白の発現の著しい減少が見られたにもかかわらず，容積感受性 Cl^- チャネルの全細胞電流には（コントロールのセンスヌクレトチド投与細胞のそれと）なんらの差も見られなかった（図２）。数種類のＰ糖蛋白単クローン抗体はいずれも浸透圧性膨張時の Cl^- 電流に有意な影響を与えなかった。また，Ｐ糖蛋白の基質を細胞内に投与しておいても容積感受性 Cl^- 電流の発生はなんら影響を受けなかった。また，Ｃキナーゼを活性化させる TPA や OAG の投与によってもこの Cl^- 電流に有意の変化は見られなかった。これらの結果によって，内在性Ｐ糖蛋白については「ポンプ／チャネルスイッチ仮説」も「Ｃキナーゼ仲介性制御因子仮説」も当てはま

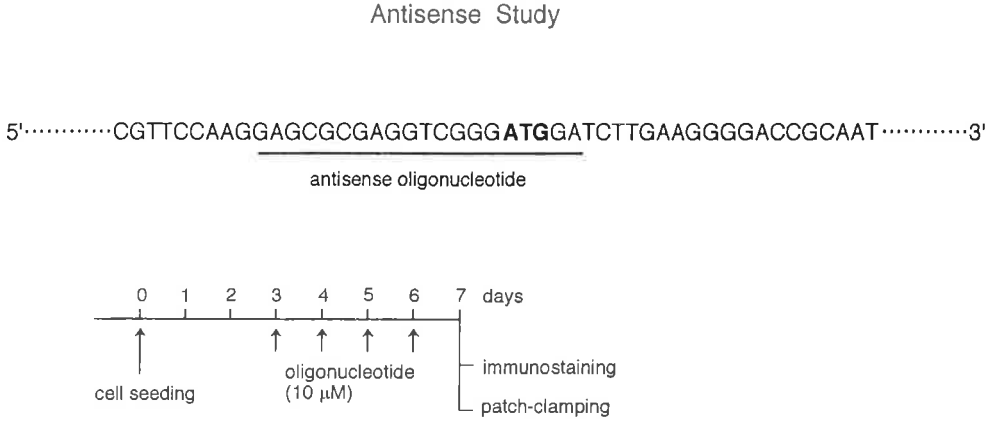


図１　Ｐ糖蛋白アンチセンス法。

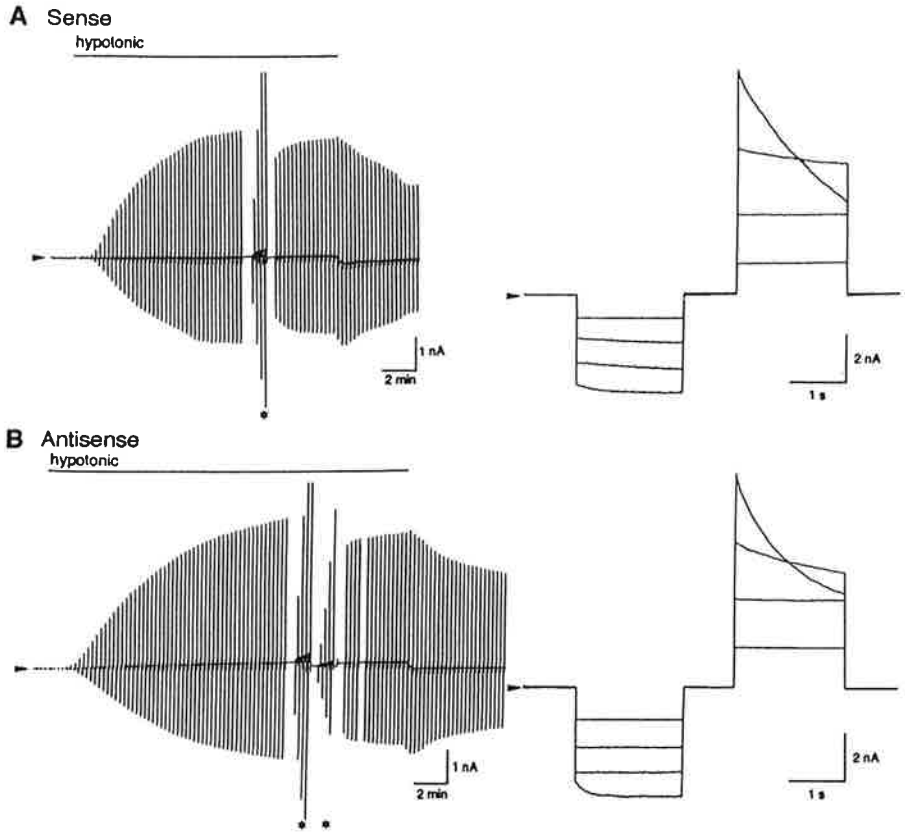


図2　P糖蛋白アンチセンス，センスオリゴヌクレオチド投与 Intestine 407 細胞における容積感受性 Cl^- チャネル電流。

らないことをはじめて明らかにした［発表論文：Tominaga, Tominaga, Miwa & Okada, 1995, Volume-sensitive chloride channel activity does not depend on endogenous P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 270, 27887-27893］。

細胞内 Mg^{2+} 及び ATP による容積感受性 Cl^- チャネルの調節機構についても現在調べており，その詳細が明らかになりつつある。

消化管上皮細胞の吸収・分泌機能とイオンチャネル

鍛治田英俊，津村剛彦，上田俊二（京都大・医）
挾間章博，森島　繁，岡田泰伸

小腸，胃などの消化管上皮細胞のイオンチャネルとその吸収・分泌機能における役割について研究しているが，1995年度は京大・医・内科との共同研究によってモルモット胃腺より酸分泌細胞を単離して，この基底側壁膜にパッチクランプ法を適用した。その結果，この膜にノイズ解析法でのみとらえることのできる非常に小さい単一チャネルコンダクタンス（約0.5ピコシーメンス）を示す Cl^- チャネルを見いだし，このミニ Cl^- チャネルは細胞外の pH の（7以下への）低下によって著しく抑制されることを明らかにした［発表論文：Kajita, Morishima, Shirakata, Kotera, Ueda, Okuma & Okada, 1995, A mini-Cl^- channel sensitive to external pH in the basolateral membrane of guinea pig parietal cells. *J. Physiol.* 488, 57-64］。

更に同膜上に，エンドセリンB受容体刺激によって pH 非感受性の別の Cl^- チャネルが発現することを見いだし，それは非常に大きな単一チャネルコンダクタンス（約300ピコシーメンス）を持つマキシ Cl^- チャネルであることを明らかにした［発表論文：Kajita, Kotera, Shirakata, Ueda, Okuma, Oda-Ohmae, Takimoto, Urade & Okada, 1995, A maxi-Cl^- channel coupled to endothelin-B receptors in the basolateral membrane of guinea pig parietal cells. *J. Physiol.* 488, 65-75］。

現在は，単離小腸腺部上皮細胞の Cl^- チャネルの性質や，培養大腸上皮細胞の Cl^- 分泌を担う CFTR 型 Cl^- チャネルと外向整流性 Cl^- チャネルの関係をパッチクランプ法で調べており，興味ある結果が出始めている。

心筋細胞機能とイオンチャネル

富永真琴，森島　繁，Andrew F. James, 周　士勝，岡田泰伸
堀江　稔，篠山重威（京都大・医）

自律神経刺激下における心筋細胞の活動電位の変調には，サイクリック AMP 賦活性 Cl^- チャネルの活性化も関与することが知られている。しかし，このチャネルの特異的な阻害剤は未だ知られておらず，その研究に一定の困難があった。最近，この Cl^- チャネルの性質および一次構造が上皮細胞の CFTR Cl^- チャネルに大変よく似ていることが明らかにされた。また，この上皮細胞サイクリック AMP 賦活性 Cl^- チャネル活性は ATP 感受性 K^+ チャネルの阻害剤としてよく知られている経口糖尿病薬 glibenclamide によって著しく抑制されることが最近明らかになった。

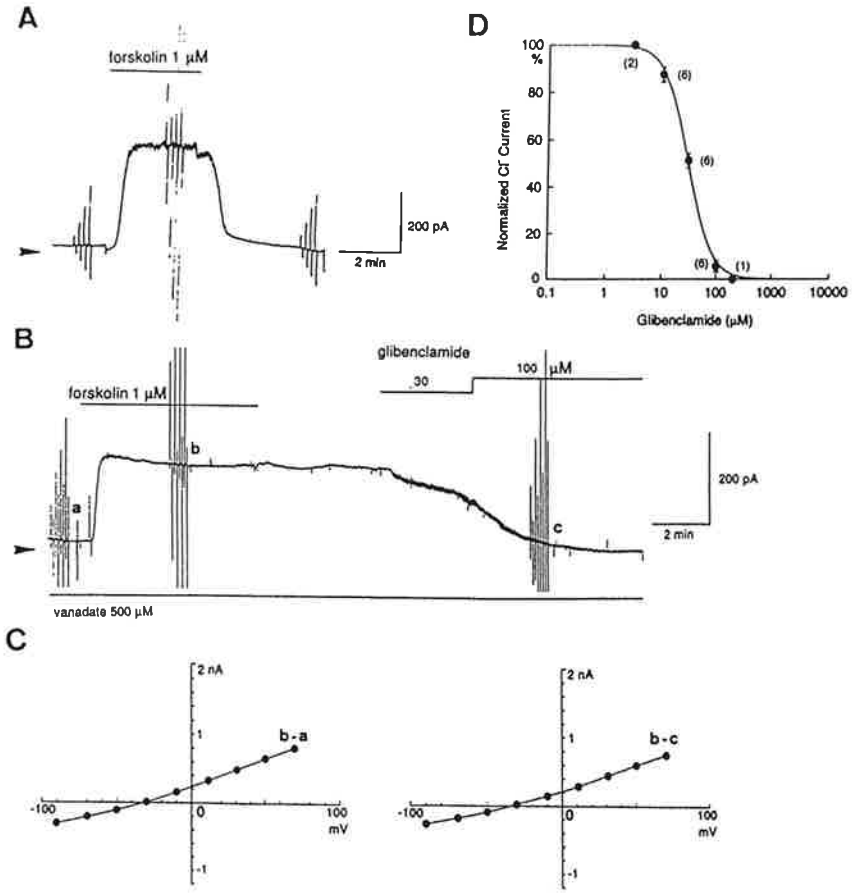


図3　心筋 CFTR 型 Cl^- チャネルの経口糖尿病薬グリベンクラミド感受性。

そこで私達は，心筋細胞サイクリック AMP 賦活性 Cl^- チャネルもまた glibenclamide 感受性を示すかどうかをパッチクランプ法を用いて検討した。その結果，glibenclamide はイソプロテレノールやフォルスコリンで活性化される心室筋細胞 CFTR 型 Cl^- チャネル電流を著しく抑制し（図3），フォルスコリンで短縮された活動電位持続時間を glibenclamide が同じ濃度領域でもとへ戻すことが明らかとなり，glibenclamide は心筋細胞のサイクリック AMP 賦活性 Cl^- チャネルにたいしても有効な阻害剤であることがはじめて明らかにされた［発表論文：Tominaga, Horie, Sasayama & Okada, 1995, Glibenclamide, an ATP-sensitive K^+ channel blocker, inhibits the cardiac cyclic AMP-activated Cl^- conductance. *Circul. Res.* 77, 417-423］。

このほか，この CFTR 型 Cl^- チャネルとその遺伝子の心筋組織内発現分布や，CFTR 型 Cl^- チャネルへの anthracene-9-carboxylic acid の効果及びフォスファターゼによる調節や，新生児ラット心筋の transient outward current (I_{to}) の性質などについてのデータがまとまりはじめている。

能動輸送研究部門

【概要】

本研究部門では，細胞内小胞輸送の分子メカニズムの解明を目的として研究を行っている。従来より，細胞内小胞輸送とその制御機構の異常は，種々の内分泌，神経，免疫疾患の病因と密接に関係していると考えられており，細胞内小胞輸送の分子メカニズムを解明することは，生物学のみならず医学においても極めて重要である。

最近，細胞内小胞輸送の制御に低分子量 GTP 結合蛋白質（G蛋白質）が関与していることが明らかになっている。この低分子量G蛋白質は，分子量２～３万でサブユニット構造を有してない一群のG蛋白質であり，現在，60種類以上のメンバーが見出されており，スーパーファミリーを作っている。このスーパーファミリーの中で Rab ファミリーが細胞内小胞輸送の制御に関与している。私共は，Rab ファミリーに属する低分子量G蛋白質とその活性制御蛋白質および標的蛋白質を見出し，低分子量 G 蛋白質が細胞内小胞輸送に果たす機能と作用機構について解析を進めている。

昨年度までに，私共は Rab ファミリーのメンバーである Rab3 を発見し，この中の Rab3A が特に神経伝達物質の放出の制御に関与していることを明らかにしている。また，私共は，この Rab3A の GDP と GTP の交換反応を制御し，Rab3A の細胞質と細胞膜との間の移動を制御する蛋白質である Rab GDI を発見している。この Rab GDI は，ヨーロッパ EMBL のグループとの共同研究において，Rab3A のみならずほとんどの Rab ファミリーのメンバーの制御蛋白質であることも解明している。さらに，私共は，Rab3A の標的蛋白質を精製し，その cDNA をクローニングして一次構造を決定し，Rabphilin-3 と命名している。また，Rabphilin-3 がシナプスにおいてシナプス小胞上の蛋白分子を介してシナプス小胞に局在しており，Ca^{2+}依存性にリン脂質に結合することも明らかにしている。この Rabphilin-3 は，従来から知られているシナプトタグミンと類似した構造を有している。このシナプトタグミンは Rab3A 蛋白質とは直接結合していないが，Ca^{2+}依存性に細胞膜リン脂質と結合する一方，Ca^{2+}チャネルに連結しているシンタキシンやニューレキシンなどの蛋白質と結合することによって，シナプス小胞を前シナプス膜に融合させると考えられている。

本年度，私共は，神経伝達物質の放出反応における Rab3A の活性制御機構を物質的基盤に基づいて解明するために，Rab3A の GDP/GTP 交換反応促進蛋白質 (Rab3 GEP) と GTPase 活性促進蛋白質 (Rab3 GAP) を精製した。また，少なくとも Rab3A のC末端の翻訳後脂質修飾部がシナプス小胞のリン脂質に結合することで，Rab3A は GTP と結合して活性型へ変換され，さらに，シナプス小胞上で Rab3A が GTP 結合型の活性型に保持されることを明らかにした。このように，本年度の研究により神経伝達物質の放出反応における Rab3A の活性制御機構の解明がかなり進んだ。

今後，神経伝達物質の放出機構を分子レベルで解明すると共に，その成果を各種「細胞内小胞

輸送病」の原因の解明に応用したいと考えている。

翻訳後脂質修飾が Rab3A の活性化におよぼす影響

神野靖也，白瀧博通，山本友美，千本松孝明，高井義美

昨年度までに，私共は Rab ファミリーのメンバーである Rab3 を発見し，この中の Rab3A が特に神経伝達物質の放出反応の制御に関与していることを明らかにしている。また，Rab3A のC末端の2個のシステイン残基が翻訳後脂質修飾を受けることを明らかにしている。さらに，Rab3A の活性制御蛋白質である Rab GDI や Rab3 GEP, Rab3 GAP が翻訳後脂質修飾を受けた Rab3A にのみ作用し，翻訳後脂質修飾を受けていない Rab3A には作用しないことを明らかにしている。現在，翻訳後修飾が種々の蛋白質の機能や活性制御に深く関与していることが明らかになっている。このことから，翻訳後修飾が蛋白質の機能や活性制御におよぼす影響を解析することは重要な課題となっている。そこで本年度は，翻訳後脂質修飾が Rab3A の活性化機構におよぼす影響を詳細に検討した。

Rab3A は GDP 結合型の不活性型から GDP が解離し，その後 GTP が結合して GTP 結合型の活性型に変換されるが，GDP は翻訳後脂質修飾に関係なく Rab3A から急速に解離した。しかし，Rab3A が翻訳後脂質修飾を受けると，GTP の Rab3A への結合が抑制された。この脂質修飾による GTP の Rab3A への結合抑制作用は，脂質修飾部がシナプス小胞膜などを構成するリン脂質と結合することで解除された。この結果から，Rab3A は，少なくとも脂質修飾部を介してシナプス小胞のリン脂質と結合して GTP 結合型の活性型に変換されると考えられる。また，Rab3A はその機能を遂行するまで GTP 結合型に留まっていると考えられるが，脂質修飾を受けた Rab3A では，GTP 結合型 Rab3A から GTP が急速に解離した。しかし，脂質修飾を受けていない Rab3A では，GTP 結合型 Rab3A からの GTP の解離はほとんど起こらなかった。さらに，この脂質修飾を受けた Rab3A からの GTP の解離は，脂質修飾部がシナプス小胞膜などを構成するリン脂質と結合することで抑制された。これらの結果から，Rab3A はシナプス小胞上で GTP 結合型に変換された後も，少なくともその機能を遂行するまで脂質修飾部を介してシナプス小胞のリン脂質と結合して GTP 結合型の活性型で留まっていると考えられる。以上の結果から，現在，私共は神経伝達物質の放出反応における Rab3A の活性化機構のモデルを次のように考えている。GDP 結合型 Rab3A は Rab GDI と複合体を形成して細胞質に存在している。何らかの機序で，GDP 結合型 Rab3A が Rab GDI から解離すると，GDP が GDP 結合型 Rab3A から解離して Rab3A は脂質修飾部を介してシナプス小胞に結合する。そこで，Rab3A は GTP と結合して活性型に変換され，その機能を遂行するまでシナプス小胞上で GTP 結合型の活性型に留まっている。しかし，このモデルでは，GDP 結合型 Rab3A の Rab GDI からの解離機構や Rab3A のシナプス

小胞への局在化機構については明らかではない。そこで，今後，これらを明らかにして神経伝達物質の放出反応における Rab3A の役割と機能について解明していきたいと考えている。

生体情報研究系

神経情報研究部門

【概要】

神経情報部門では神経系の発生と分化の分子機構の解明を目的とした研究と遺伝子治療法の開発的研究を行っている。

神経系では多種多様な細胞が存在し，それらが複雑な三次元ネットワークを形成することによって高次機能の営みが可能となっている。その発生過程において，神経系を構成する多くの細胞は共通の前駆細胞である神経上皮細胞から発生・分化してくるので，脳神経系構築の分子機構解明の第一歩として，神経上皮細胞からどのようにして種々の細胞種への分化決定がなされるのか分子・細胞生物学的に研究している。当部門では多くの脳特異的遺伝子をクローニングしており，その発現調節機構を明かにすることにより分化機構解明する方向（馬場，田中，熊田，秋田，池中）と，遺伝的に神経系の分化に異常を示す突然変異マウスの解析によって分化に関連する遺伝子の同定を通して分化機構解明にアプローチしている（鹿川，山田（真），山口，小泉，Ivanova, 山田（斉），奥村，大庭，池中)。また，小脳の顆粒細胞の分化過程を電気斉理学的にも解析（若園，池中）するとともに，免疫組織学的手法や in situ hybridization 法を駆使して形態学的にもアプローチしている（湯浅)。

以上の研究において開発した神経系における遺伝子導入技術を利用して遺伝子治療の基礎的研究を行っている（田村，池田，庄盛，池中)。

中枢神経系の形態形成過程において，未分化神経上皮細胞からのニューロン・グリア前駆細胞の発生・移動・分化と，これらの細胞の層状配列の多様性が脳の各部位の構築の多様性の基盤となっている。この構築の原型はアストログリアによって形成される枠組み構造が重要な役割を演じていることが明らかになりつつある。湯浅はアストログリアがどのような秩序と多様性をもって発生するかを新たなマーカーを用いて系統的に解析を進めている。さらに，ニューロン—グリア間の細胞間相互作用が皮質形成にどのように関与するかを，リーラーミュータントマウスを用いて検討している（湯浅，熊田)。また，これまで殆ど未開の領域であった神経核形成の機構について，蝸牛神経背側核（湯浅，Ivanova)，扁桃核（湯浅）を対象として解明を試みている。

ポレーション法を用いた遺伝子導入法では，細胞毒性が強いために脳初代培養系に用いることは困難であった。このためプロモーター解析は，主に株化した細胞を用いて行われてきた。しかし，多くの種類の細胞が混在し合う脳の中で，お互いに関連し合いながら分化していくグリア細胞において，細胞特異的および分化特異的に発現調節をするGFAPプロモーターの活性化のメカニズムを知るには，混合グリア培養系あるいは脳スライス培養などを用いて，分化の過程を追いながらプロモーター解析をするのが好ましい。このような観点から，プロモーター下流にレポーター遺伝子としてLacZを結合した融合遺伝子をレトロウイルスベクターに組み入れ，感染によって脳初代培養系に導入することで，これらの細胞同士の連絡や分化を阻害することなしにプロモーターの変化を追うことを可能にした。本年度はこの系を用いて，さらにプロモーターのどの部分がこの遺伝子の発現調節に重要であるかを検討した。いろいろな長さのGFAPプロモーターにLacZを結合したウイルスを，それぞれマウス脳グリア細胞培養系に感染させた後，X-Gal染色およびFDG-FACSを用いて，アストロサイトの中でのそれぞれのプロモーター活性の違いを解析した。この結果256bp GFAPプロモーターはそれ自体でアストロサイト特異的に活性を認めるが，2.1kb, 2.0kb, 1.5kbのプロモーターの方がより活性が強いことが判った。ヒトGFAPプロモーターでは1.5kb付近に細胞特異性を決める調節部分があると報告されているが，今回の結果からは少なくともマウスGFAP遺伝子においては，この部分の存在するプロモーターと欠除したものとの間に明らかな活性の違いは認めなかった。今後は，レポーター遺伝子にアルカリフォスファターゼ(ALP)を用い，さらにピューロマイシン耐性遺伝子を組み入れたウイルスベクターを作製して，すでにGFAPプロモーター・LacZを持つ細胞に再び感染させることによって，別々なプロモーターの活性を同一細胞内で比較できる系を準備中である。アストロサイトの分化の過程，あるいはサブポピュレーションの違いによってプロモーターの活性に重要な部分が変化することがあれば，このような系を用いて明らかにしていくことができると思われる。

オリゴデンドロサイトの発生分化

鹿川哲史，山田真久，山口宜秀，小泉克久，Anna Ivanova
山田　斉，奥村俊一郎，大庭明生，池中一裕

我々は中枢神経系の初期発生に興味を持ち，その多様な細胞種の起源や構築システムの解明をめざしている。そのうち細胞分化マーカーがもっとも豊富なオリゴデンドロサイトを中枢神経系構築の一つのモデルとして，生体での細胞系譜及び細胞分化因子を明らかにしたいと考えている。

UDP-ガラクトース・セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ(CGT)

CGTは，オリゴデンドロサイトの早期マーカーのガラクトセレブロシド(GalC)の，合成酵素である。すなわち，CGT遺伝子はGalCよりさらに早期に，オリゴデンドロサイト特異的に発現

していることが予想された。我々は，CGTcDNA の PCR クローニングに成功し，これを用いて，マウス脳における CGTmRNA の分布すなわちオリゴデンドロサイト前駆細胞の分布を in situ hybridization 法で検討した。CGT 陽性細胞は胎生17日マウス脳にはじめて検出された。この分布は脊髄と延髄の境界領域の腹側から始まり，その後数日の間にニューロフィラメントーM陽性神経軸索に沿って延髄の全領域に広がっていくことが明らかとなった。小脳では生後5日にはじめて観察され，これは延髄からの分布の広がりの延長上に見られた。また，生後2日から5日の間には間脳や大脳の subventricular zone からも CGT 陽性細胞が観察された。これらのことから，オリゴデンドロサイトの分布は脳内の限られた領域からニューロフィラメント陽性神経軸索に沿って脳全体に分布が広がることが示唆された。

ミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP)

我々は突然変異動物，トランスジェニックマウスの系を用いて，PLP 遺伝子産物がオリゴデンドロサイトの分化を多段階で調節していることを示唆してきた。現在は分子レベルでの作用機序解明を試みている。

PLP 蛋白質を脳初代培養系に添加すると，ガラクトセレブロシド陽性オリゴデンドロサイト数が増加する。これは PLP が分化調節因子として機能していることを示唆しているが，その作用機序には3つの可能性がある。すなわち，細胞増殖の促進，細胞分化の促進，または，細胞をオリゴデンドロサイトに分化誘導する事も考えられた。そこで，ブロモデオキシウリジン (BrdU) を実験系に加え，分裂細胞数の変化を観察した。PLP 添加で，分裂細胞数は約2倍に増加しており，PLP には細胞増殖促進機能があることが明らかとなった。

PLP は非常に疎水性の高い蛋白質であるので，液性因子として細胞外へ放出されるためには何らかのプロセシングを受けている可能性がある。PLP の増殖因子としての機能ドメインを明らかにするために，PLP の様々な部位のペプチドを合成し，オリゴデンドロサイト増殖活性を検討した。そのうち，アミノ酸番号215から232のペプチドのみに活性が見られた。このペプチド部分はジンピー突然変異マウスでは欠損し，他の PLP 突然変異マウスにおいても変異近傍に位置する。この結果は，これら変異 PLP 遺伝子産物には活性が見られない事とよく一致した。PLPcDNA 導入によって PLP を発現している NIH3T3 細胞培養上清にはこの領域を含む PLP-C 末端領域が存在していることが明らかとなり，生体内でもプロセスされた PLP-C 末端ペプチドが液性の細胞増殖因子として作用していることが示唆された。

我々は PLP が細胞内膜輸送を調節し，この調節を介してオリゴデンドロサイトの分化を調節している可能性も提唱した。PLP 突然変異マウスの一つラムシェーカーではオリゴデンドロサイトはガラクトセレブロシド陽性細胞まで分化するが，その後ミエリンを形成できない。この事実は，我々が強制発現させたラムシェーカー変異 PLP が細胞内膜輸送されない事と一致する。PLP の機能阻害実験として，PLP に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを培養オリゴデンドロサイトに加えると，ミエリン様膜形成が阻害された。更に我々は，PLP 蛋白質にイノシトール6リン酸結合活性があることを見いだした。これらの結果から，PLP がイノシトールリン酸

系を介して細胞内膜輸送を調節し，膨大な細胞膜の集合体であるミエリンの形成に機能している事が示唆された。

小脳顆粒細胞の成熟

若園佳彦，池中一裕

脊椎動物の中枢神経系における神経細胞は，グリア系細胞と共通の前駆細胞である神経上皮細胞をその起源とし，分裂・移動を繰り返し特定の領域において成熟した神経細胞へと分化し，神経回路を形成して活動電位を発生するようになる。活動電位の発生においてK^+電流は，再分極による活動電位からの回復や膜電位の保持など重要な役割を担っていることが知られている。このK^+イオンを選択的に透過させるK^+チャネルは，神経発生の初期においてすでに認められるNa^+やCa^{2+}チャネルに対して遅れて発現し，神経細胞の成熟化に伴いその電流特性を遅延整流型からA電流型へと導く異なるタイプのK^+チャネルを発現することにより活動電位の発生を可能とすることが両生類において報告されている。我々は，神経細胞の分化におけるK^+チャネルの遺伝子と機能の発現，特に膜電位依存性K^+チャネルについてマウスの小脳顆粒細胞を用いて解析を試みている。

発生期における脳の初代培養系はin vitroにおいて神経細胞の分化を可能とする。しかしながら，これらの系においては多種雑多な細胞集団を形成することから個別の細胞の分化を検討することは困難である。そこで，我々は小脳皮質が分子層，プルキンエ細胞層，顆粒層からなる比較的単純な構造を示し，主な神経細胞は顆粒細胞をはじめ，プルキンエ細胞，籠細胞，星状細胞，ゴルジ細胞に限局され，そして，さらに小脳発生期において幼弱な顆粒細胞は，（1）軟膜直下において分裂・増殖を繰り返し外顆粒層を形成する（2）外顆粒層において双極細胞へと形態変化し平行線維を伸ばす（3）平行線維を保持した状態で移動の向きを平行線維に対して接線方向から垂直方向へ変え，プルキンエ細胞層を通って内顆粒層へ達し成熟した神経細胞へと分化することが知られ，細胞移動や形態によりその分化の度合いを知ることが可能であることから小脳顆粒細胞を用いることとした。

最近，永田らにより確立された小脳microexplant cultureは，培養条件に従来までの高K^+濃度存在やグリア細胞との共培養を必要とせず，ホルモンを含む合成培地下，ポリ-L-リジン／ラミニンの二重被覆上で顆粒細胞の移動を容易にするとともに，長期間の培養を可能とし，さらにin vivoにおける細胞移動や形態変化を模倣すると報告した。しかしながら，この系における顆粒細胞の直接的な同定は為されていない。そこで，我々ははじめに，この培養系が顆粒細胞の分化を追う上で適当であるか否かを免疫細胞化学的及び電気生理学的に検討を試みた。

永田らの方法に従い生後2日齢のマウス小脳から得られたmicroexplant cultureは，培養数時

間後，細い線維と多角形細胞がexplant付近に出現し，培養経過に伴い多くの細い線維はexplantから放射状に伸張した。多角形細胞もまたexplantから放射状に移動し双極細胞へと形態変化を行い，細い線維を伸ばした。その後，双極細胞は移動の向きを線維に対して垂直方向に変え小集団を形成した。これらは永田らにより観察されたものと一致した。8日間の培養後，小脳顆粒細胞の特異的マーカーである抗Zic抗体による免疫染色は，Zic陽性細胞の大多数が小集団において認められることを明らかにした。以上の結果から，この培養系における顆粒細胞はexplantから放射状に移動し小集団を形成する傾向があることが明らかとされた。また，小脳皮質において平行線維に特異的な抗グルタミン酸抗体による免疫染色は，この培養系における顆粒細胞が培養経過に伴い双極な突起を持つ細胞からT型の突起を持つ細胞へと形態変化をすることを明らかにした。さらに我々は，この培養系の顆粒細胞のGABA応答における電気生理学特性をパッチクランプ法により検討した。形態学的及び抗Zic抗体による免疫染色の結果から顆粒細胞と考えられる小集団を形成している細胞の大多数は，10μM GABAに対して応答を示した。このGABA応答はピクロトキシンにより抑制され，パッチ電極内のCl^-をF^-に置換した結果，反転電位を-30mV付近にシフトさせた。さらに，ビククリンにより抑制を受けることや連続的なGABAの曝露により脱感作されることからCl^-チャネルと連関するGABA A受容体を有することが明らかとなった。この結果は，これまでに小脳顆粒細胞のGABA応答性について報告された知見と良く一致することから，この培養系における顆粒細胞は電気生理学的にもin vivoの性質を保持しているものと考えられた。

以上の結果から，我々は，この小脳microexplant cultureを小脳顆粒細胞の分化を追うモデルとして適当であることを明らかとした。

現在，我々は，パッチ電極内にルシファーイエローを加え細胞を蛍光標識し，形態と電気活動を同時に記録することにより小脳顆粒細胞の分化を電気生理学的に解析している。

また，マウス小脳顆粒細胞は生後においてもなお分裂能を有することが知られ，この培養系の初期においてBrdU標識された細胞は培養経過に伴い小集団を形成することから，この培養系における顆粒細胞もまた分裂能を有することが明らかとなった。さらに，この培養系おける細胞に対してレトロウィルスベクターによる外来遺伝子の導入の可能性を検討したところ，β－ガラクトシダーゼ遺伝子の導入もまた確認された。以上の結果は，今後，この培養系において神経細胞の分化に関わる遺伝子の導入を含めた分子レベルでの解析もまた可能であることを示唆するものである。

組織特異的に遺伝子発現を行うレトロウイルスベクターの開発と遺伝子治療への応用

田村雅一，池田浩司，庄盛由紀夫，池中一裕

我々は従来より組織特異的な遺伝子発現を可能とするレトロウイルスベクターの開発を行ってきた。近年脳グリオーマを対象とした遺伝子治療への応用も検討しており，その際マウスMyelin Basic Promoterを内在性プロモーターとして使用することで脳グリオーマ特異的な遺伝子発現が可能となることがわかった。実際的には脳グリオーマ内に殺細胞遺伝子のHerpes Simplex Virus Thymidine Kinase (HTK)を導入し，その後ガンシクロビルを宿主に投与することでHTKを導入されている腫瘍細胞を殺すことにより治療するという方法である。この方法は既に米国で脳腫瘍に対して臨床応用されている方法であるが，我々の用いているベクターは組織特異性を持つために腫瘍周辺の正常分裂細胞に感染することがないという安全性における大きな利点があると考える。また昨年度，当グループの吉松らにより開発されたウイルスパッケージング細胞は従来用いられているものにポリオーマウイルス初期領域遺伝子を導入したもので約100倍の力価のウイルスを産生し得る。悪性腫瘍に対するレトロウイルスを用いた遺伝子治療においては，腫瘍細胞の数が膨大であるのに対してレトロウイルスベクターの力価が高くないために全腫瘍細胞を死滅させることが難しいというのが大きな問題であった。我々の開発したウイルスパッケージング細胞をもちいてLacZを発現するウイルス産生細胞を作成し，脳グリオーマ内に移植して数日後に腫瘍内でのウイルス感染状況を調べたところ，約4mm径の大きさの腫瘍に4×10^5個のウイルス産生細胞を移植しただけで5日後に30%程度の腫瘍細胞へのウイルス感染がみられた。またウイルス産生細胞を数回移植すれば全腫瘍細胞への感染が可能であることがわかった。同様にHTKを発現させる高力価のウイルスを産生する細胞も樹立し治療実験を行っている。

中枢神経系の形態形成機構

1．アストログリアの初期発生様式とその多様性

湯浅茂樹

中枢神経系の発生過程において，ニューロンの移動と皮質への配列，神経核形成を規定する位置情報にニューロン―アストログリア間の相互作用が関与することが明らかになりつつある。アストログリアの発生と分化様式については，胎生期放射状グリアを一つの起源とすることは明らかである。しかし，in vivoにおいて，その他の発生起源と発生時期，脳の各部位における発生様式の多様性については殆どわかっていない。これは，アストログリアの発生早期から発現し，分化するまで発現が持続するマーカーが乏しかったことによる。テネイシンは幼若アストログリ

アに発現する細胞外基質接着因子で胎生期放射状グリアの突起にも発現する。この分子の遺伝子発現を指標としてin situ hybridizationを行なうことにより，胎生期アストログリア前駆細胞の細胞体を標識できることを見いだした。この標識方法により，マウス脳内各部位のアストログリア前駆細胞の発生様式について検討している。

①大脳（図1）：新皮質においては胎生15日の脳室上衣層に初めて標識細胞が出現し，胎生17日には多数の標識細胞が皮質へ向かって放射状に移動，配列した。これらのテネイシン遺伝子発現細胞は新生仔期になるとアストログリアの分化マーカーであるGFAP免疫陽性となること，また，脳室上衣層内のみならず，皮質に分布後もbromodeoxyuridineを取り込み，分裂能を保持することが，in situhybridizationと免疫組織化学の二重標識により明らかになった。このアストログリア前駆細胞の発生部位は側脳室背外側部ならびに側脳室前角部に強く局在していた。

②小脳（図2）：小脳原基において胎生13～14日にはテネイシン遺伝子発現細胞は脳室上衣層に局在し，その後，表層へ向かって放射状に移動して周生期には皮質に層状に配列した。胎生13～14日には，テネイシン免疫陽性の放射状突起は脳室面から軟膜面へ到達していた。周生期にはテネイシン免疫陽性の突起は短縮して，皮質に柵状に配列するようになった。生後5日以降，皮質に配列したテネイシン遺伝子発現細胞はGFAP免疫陽性の放射状突起を軟膜へ向かって伸長し，Bergmann gliaの形態を示すことが，テネイシンin situ hybridizationとGFAP免疫染色との二重標識により明らかになった。この細胞体は分裂能を保持しており，その周辺にテネイシン遺伝子を発現した星状のアストログリアの出現が認められた。これらの所見から，小脳Bergmannグリアは胎生期放射状グリアから分化することが明かとなり，しかも皮質アストログリアの発生中心の一つとなることが示唆された。また，Bergmann glia前駆細胞である放射状グリアは胎生期にプルキンエ細胞の皮質への移動をガイドし，生後小脳ではBergmann gliaに分化後，外顆粒細胞の移動をガイドすると考えられる。

③海馬（図3）：胎生15日海馬原基において，海馬采に近接した神経上衣層からテネイシン遺伝子発現細胞が移動を開始し，周生期に歯状回形成部位に層状に配列した。生後2日には層状に配列したこれらの細胞はGFAP免疫陽性の突起を軟膜に向かって伸長し，単極性アストログリアの形態を示した。一方，アンモン角に面した脳室上衣層からは胎生18日以降，テネイシン遺伝子発現細胞が放射状に移動し，分子層に到達したものはGFAP免疫陽性の星状アストログリアに分化した。以上の所見から，歯状回，アンモン角のアストログリアは異なった区画の神経上衣層から発生し，それぞれ歯状回顆粒細胞，アンモン角錐体細胞の発生・移動と同じ経路をたどって分布することが明らかになった。移動過程にあるテネイシン遺伝子発現細胞は，移動経路に配列するGFAP免疫陽性のグリア突起と接する像が認められ，ニューロンと同様，放射状グリアによってガイドされることが示唆された。

今後，テネイシン遺伝子プロモーターにherpes simplex virus thymidine kinase遺伝子をつないだconstructをもちいてトランスジェニックマウスを作製し，発達過程の特定の時期にgancic-lovirを投与することによって，テネイシン遺伝子発現細胞のサブセットを破壊し，神経構築の

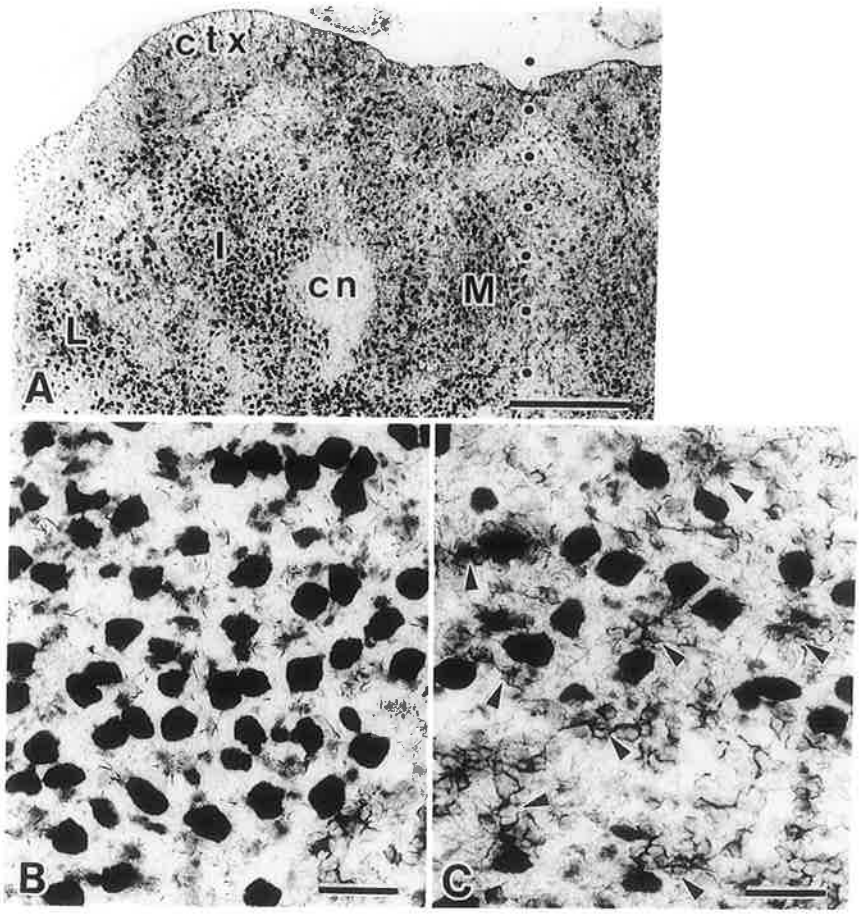


図4．リーラーマウス小脳（生後6日）前頭断面におけるプルキンエ細胞とアストログリアの分布。プルキンエ細胞はL7 mRNAのin situ hybridization，アストログリアはGFAP免疫染色で同一切片の標識を行なった。A．大部分のプルキンエ細胞はcluster (medial, intermediate, lateral) を作って皮質下に分布している。B．intermediate clusterの強拡大。intermediateおよびlateral cluster内にはGFAP免疫陽性のアストログリアはほとんど認められない。C．medial clusterの強拡大。medial cluster内にはGFAP免疫陽性のアストログリアがプルキンエ細胞に接して分布する (arrow heads)。cn, cerebellar nucleus; ctx, cortex; I, intermediate cluster; L, lateral cluster; M, medial cluster. Scale bars: A, 500μm; B and C, 50μm.

陽性のアストログリアはすべてのcluster内に広く分布が認められた。このような，プルキンエ細胞とアストログリアの相互関係は生後2カ月のリーラー小脳においても持続しており，プルキンエ細胞のサブセットにはアストログリアに対しGFAPの産生を誘導するものとしないものが存在することが明らかになった。今後，プルキンエ細胞によって産生されアストログリアの分化誘導作用を持つ可能性のある分子の発現について検討する予定である。

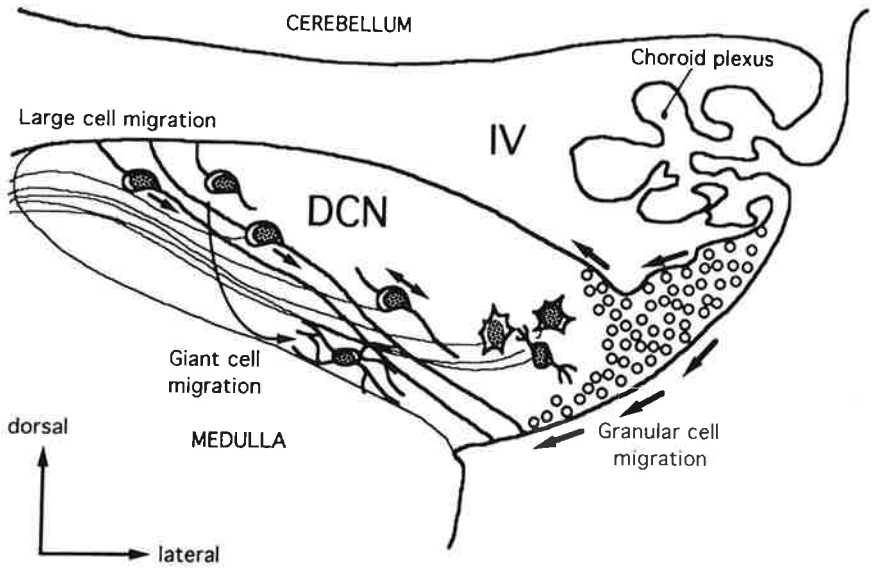


図５．マウス蝸牛神経背側核の発生機構。投射ニューロンのうち giant cell は胎生11日に一次菱脳唇から発生して深層に分布する。大型投射ニューロンの多くのものは胎生12－13日に同じ領域から発生し，早期に下丘に軸索を伸長する。同時に，樹状突起を脳室面と軟膜の両方向に伸ばし，細胞体が perikaryal trans-location により移動する。顆粒細胞は胎生16日以降，２次菱脳唇から発生して神経核内へ進入し，浅層に分布する。DCN, dorsal cochlear nucleus; IV, 4th ventricle.

３．マウス蝸牛神経背側核の発生機構（図５）

湯浅茂樹，Anna Ivanova

蝸牛神経背側核 (dorsal cochlear nucleus, DCN) は小脳と共通の起源である菱脳唇 rhombic lip から発生し，小脳が背側に発達するのに対し，DCN は腹側にむかって延髄背外側に発達する。DCN の発生における神経細胞の移動と配列の様式ならびに分化過程について小脳発生との類似性に着目しつつ検討を行なった。bromo-deoxyuridine (BrdU) によって神経細胞の最終分裂時期に標識を行ない，以後の移動・分布を免疫組織化学的に調べると，DCN 内の大型ニューロンは胎生11～13日に一次菱脳唇神経上皮から発生し，斜め腹外側に向かって移動し，DCN 原基の腹外側に一過性に集積したのち，内側に向かって再配列した。一方，小型の顆粒細胞は胎生16日以降，第４脳室外側陥凹に面した２次菱脳唇から発生し，内側に向かって DCN 原基内に進入した。そして，脳室側神経上衣層内および軟膜下を移動した後，原基内の表層1/3に分布した。さらに，カルボシアニン系蛍光色素 DiI をマウス胎仔下丘に注入し，DCN 内の投射ニューロンを逆行性に標識して confocal 顕微鏡で観察した。胎生16日にはすでに原基 subventricular zone から深層にわたって標識ニューロンが検出され，これらのニューロンは発生後数日以内に下丘に投射することが明らかになった。最も早く発生した深部 giant neuron は樹状突起の発達が早期から明らか

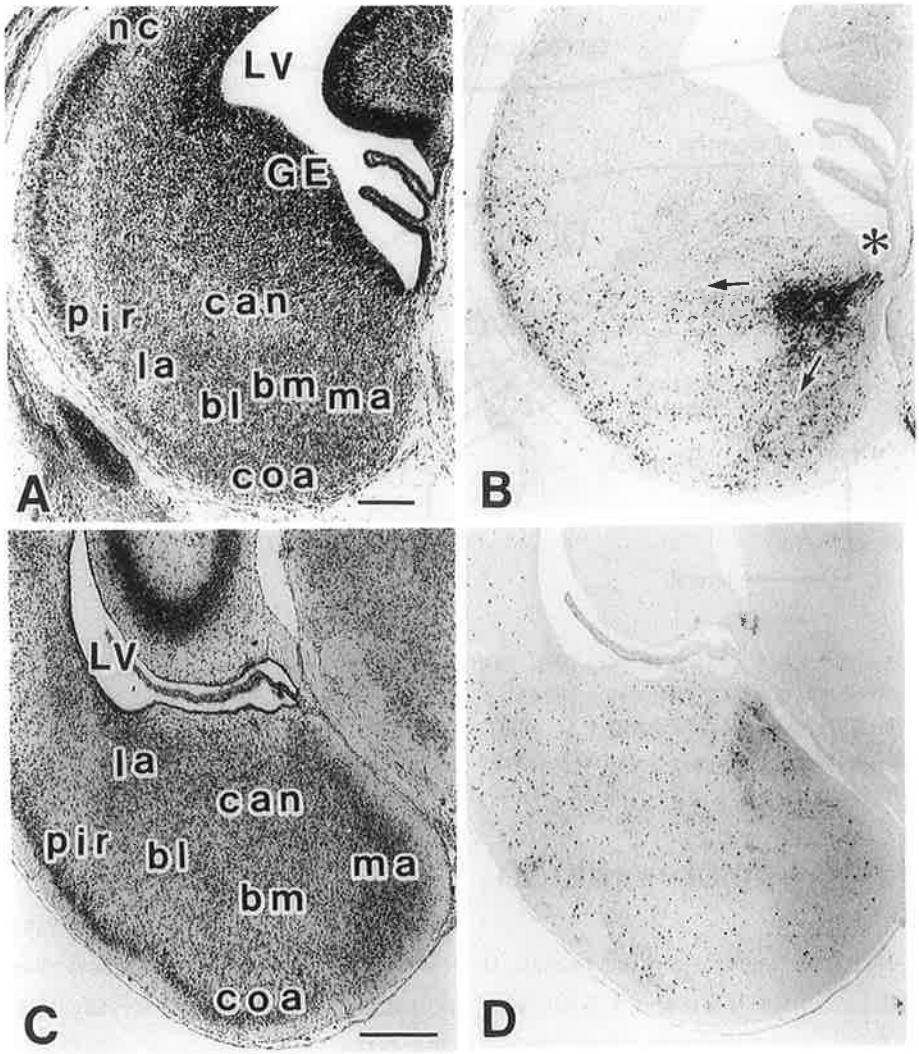


図6．A，B：胎生14日マウス前脳腹側部の横断面。C，D：生後5日の前脳腹側部横断面。A，Cは Nissl 染色，B，Dは抗 calbindin 抗体による免疫染色像。胎生14日には，ganglionic eminence 内側の限局された領域（＊）から，扁桃核と梨状葉へ至る calbindin 陽性細胞の2つの細胞移動の流れが認められる。生後5日には calbindin 陽性細胞は扁桃核から梨状葉に広く分布していた。bl, basolateral amygdaloid nucleus; bm, basomedial amygdaloid nucleus; can, central amygdaloid nucleus; coa, cortical amygdaloid nucleus; GE, ganglionic eminence; la, lateral amygdaloid nucleus; LV, lateral ventricle; ma, medial amygdaloid nucleus; nc, neocortex; pir, piriform cortex. Scale bars, 200μm.

であった。これに対し，多数の逆行性に標識されたニューロンは胎生15～17日には突起を軟膜面と脳室面の両方に伸ばした像を呈しており，投射ニューロンの大部分は，初め perikaryal translocation により細胞体が一旦外側へ集積し，その後，核周囲部のみが再配列して，極性をもったニューロンに分化することが示唆された。

以上の結果から，DCN の形成過程において，大型ニューロンは一次菱脳唇，顆粒細胞は 2 次菱脳唇から発生し，移動経路も前者は実質内，後者は実質周辺を移動して，小脳発生におけるプルキンエ細胞，顆粒細胞に，各々，対応した発生様式をとることが明らかになった。

4．扁桃核の発生機構（図 6）

湯浅茂樹

扁桃核は系統発生的に古い大脳辺縁系に属し，これまで ganglionic eminence の神経上皮から発生すると漠然と考えられてきたが，明確な発生部位については不明なままであった。扁桃核には胎生期から calbindin が限局性に発現すること，また calbindin 発現ニューロンは発生直後から標識可能なことから，calbindin 免疫組織化学と bromodeoxyuridine 標識により，扁桃核ニューロンの発生様式について検討した。扁桃核ニューロンは ganglionic eminence 内側の非常に狭い領域の神経上皮から胎生13～14日に発生することが明らかになった。さらに，この領域から同時に梨状葉，preoptic area のニューロンの一部も発生し，各々が異なった移動経路をたどって扁桃体，梨状葉，視床下部に分布することが明らかになった。これら 3 つの領域は成体で相互に密接な神経回路を形成して，情動に関わる入力を処理し，これを内分泌反応あるいは行動として表現する中枢へと伝達する役割を持つことを考え合わせると，これらのニューロンの相互認識過程には共通の分子機構が関与することが示唆される。今後，マウス子宮内胎仔の側脳室内へレトロウィルスベクターを注入することによって，扁桃核ニューロン前駆細胞を外来遺伝子により標識し，上記の 3 つの領域の細胞系譜に共通性があることを証明する予定である。

液性情報研究部門

【概要】

液性情報研究部門では，分子生物学的手法と生理学的手法を用いて，脳神経系における情報伝達の分子メカニズムに関する研究を行っている．これまで私たちのグループでは，神経伝達物質受容体・イオンチャネルなどのシナプス間情報伝達に重要な役割を果たす機能的分子の cDNA クローニング・発現を行い，分子自体の機能を検討してきた．それらの分子の中でも，特に Ca^{2+} シグナリングに関連する分子に興味を持っており，具体的には電位依存性 Ca^{2+} チャネル・リアノジン受容体（Ca^{2+} 放出チャネル）が中心的な研究課題となっている。

しかしながら，チャネル分子に関して発現系を用いて得られた知見と，運動・知覚・記憶など高次脳神経機能の理解に必要な知識の間には，大きなギャップが存在している。このギャップを狭めることを目指し，生体に近い条件で分子の機能を観察するためにパッチクランプとイメージングを組み合わせ，神経細胞の局所的 Ca^{2+} 動態を生理的条件で定量的に解析することを始めている。

なお1995年3月に月田承一郎は，京都大学医学部に移り，1995年4月より井本敬二が，京都大学医学部より着任した。

電位依存性ナトリウムチャネルの発現

井本敬二

電位依存性 Na^+ チャネルは，進化的には Ca^{2+} チャネルに類似したチャネルである。従来 Na^+ チャネルの機能解析には，アフリカツメガエル卵母細胞の発現系が多く用いられてきたが，卵母細胞には，サイズが大きいため電位固定が不十分である，内因性のカルシウム依存性 Cl^- チャネルを有しているなどの欠点がある。これらの欠点を回避するために，培養細胞で Na^+ チャネルを発現させる方法を検討した。

pCI-neo を発現ベクターとして用い，CHO-K1 細胞にラット Na^+ チャネルⅡを発現させた。スクリーニングには RNA dot blot と電気生理学的測定の両者を併用したが，結局は後者の方が手間がかからないという結論に達した。方法が確立したため，今後変異 Na^+ チャネルの発現を細胞を用いて行い，チャネルゲート機構の検討をおこなっていく予定である。

リアノジン受容体 (RyR-1) によるL型 Ca^{+2} チャネル（ジヒドロピリジン受容体）の活性化

中井淳一
Allen PD （Brigham and Women's 病院，麻酔科）
Dirksen RT,Beam KG （コロラド州立大，解剖，神経生物）
Nguyen HT （Boston 小児病院，循環器）
Pessah IN （California-Davis 大，分子生物科学）

骨格筋の興奮収縮連関とは，細胞膜の脱分極によって引き起こされる細胞内ストア（筋小胞体）からの Ca^{+2} 放出過程である。興奮収縮連関には電位センサーであるL型 Ca^{+2} チャネル（ジヒドロピリジン受容体）と Ca^{+2} 放出チャネルであるリアノジン受容体の2つの分子が必須である。これら2つの分子間の情報伝達は，今のところ分子同士の直接のカップリングによるものと推測されているが，詳細は不明である。もしリアノジン受容体が直接 Ca^{+2} チャネルとカップリングするのであれば，リアノジン受容体からも Ca^{+2} チャネルに対して逆行性の情報が伝達され，Ca^{+2} チャネルのチャネル活性に影響を与える可能性が考えられる。我々は骨格筋型のリアノジ

ン受容体(RyR-1)を欠損したマウス(dyspedic mice)を用いてこの仮説を証明した。

実験はdyspedic miceの骨格筋細胞を培養し，パッチクランプ法と蛍光Ca^{+2}イオン測定法を用い，Ca^{+2}電流とCa^{+2}放出を同時測定することによって行われた。その結果，dyspedic miceでは骨格筋型の興奮収縮連関を欠くのみならず，L型Ca^{+2}電流も正常の約30分の1に減少していた。そしてRyR-1 cDNAをこのdyspedic myotubeに発現させることにより，骨格筋型の興奮収縮連関とL型Ca^{+2}電流の両方が回復した。

次にL型Ca^{+2}電流の減少の原因をさらに詳しく調べるため，細胞表面に発現しているL型Ca^{+2}チャネルの分子数を反映するcharge movementを測定した。dyspedic myotubeとRyR-1を発現したdyspedic myotubeではcharge movementに差がなく，RyR-1を欠くdyspedic myotubeとRyR-1を発現したdyspedic myotubeでL型Ca^{+2}チャネルの分子数に変化がないことが明らかとなった。

以上の実験結果はリアノジン受容体(RyR-1)がL型Ca^{+2}チャネルに対して逆行性の情報伝達を行い，L型Ca^{+2}チャネルのチャネル活性を増加させることを示しており，リアノジン受容体が直接L型Ca^{+2}チャネルとカップリングしていることを示唆している。

1．Nakai J, Dirksen RT, Nguyen HT, Pessah IN, Beam KG & Allen PD (1996) Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. Nature 380: 72-75

電位依存性Ca^{2+}チャネルの分子的多様性

若森　実，森　泰生
Arnold Schwartz（Cincinnati大）
額田敏秀（東京都精神医学総合研）
新留徹広（エーザイ筑波研）

脳神経系における情報処理能の成立には，活動電位の発生，神経伝達物質の放出等に加え，シナプス可塑性，及び軸索伸長を含む複数の神経細胞レベルの素過程が寄与することが知られている。各過程は神経突起，前シナプスにおけるdouble linear array構造，及び成長円錐等，特定の神経細胞内微小構造を発現の場にしており，それらの構成蛋白質の一つとして電位依存性Ca^{2+}チャネルは，電位変化に感応してCa^{2+}を選択的に透過させ，細胞内Ca^{2+}濃度を局所的，一過性に上昇させた結果，細胞内の諸反応を引き起こす（その異常は細胞の損傷，死につながる）という中心的な役割を果たしている。しかしながら，神経細胞素過程を引き起こすメカニズムを知る上に必須のCa^{2+}チャネルの分類には，多くの問題が内在していた。そのうえに，Ca^{2+}チャネルに備わっている機能的可塑性の分子的機序は，明らかになっていないことが多い。我々のグルー

200-300nM の Ca^{2+} 上昇が見られ，その Ca^{2+} 上昇は，時定数 100ms 以下の速さで消失した。また神経細胞に通電し，いろいろな頻度で神経細胞を発火させ，同時に Ca^{2+} 濃度を測定した結果，Ca^{2+} 濃度は発火頻度に比例して変化した。

これらの結果より，細胞内 Ca^{2+} は，神経細胞の発火頻度を化学的変化に変換する役割を果たしていると考えられる。

1．Helmchen F, Imoto K & Sakmann B (1996) Ca^{2+} bufferring and action potential-evoked Ca^{2+} signaling in dendrites of pyramidal neurons. Biophys J 70: 1069-1081

高次神経機構研究部門

【概要】

本研究部門では哺乳動物行動を制御する脳神経系の形成・機能発現の分子メカニズムを解明して行くことを目的として研究を行っている。脳形成・機能制御関連遺伝子を探索するとともに，遺伝子ターゲティング法によるマウス個体レベルでの機能解析を行っている。

現在までに脳形成・機能発現に重要な Fyn, NMDA 受容体のサブタイプ等の遺伝子欠損マウスを作製し，遺伝子と脳形成・行動制御との関連について研究を行っている（八木，二木，三品)。特に，学習・記憶，情動行動については多くの知見が得られており，これらの分子メカニズムをどう煮詰めるかを模索しているところである。また，脳形成・機能発現に関わると考えられる新たな分子を総括的に得ており，今後これらの個体レベルでの機能について解析を深めて行きたいと考えている（安田，甲斐，光村)。

技術的には，効率よいキメラマウス作製系を確立するとともに，遺伝子ターゲティング法に関連した遺伝子操作の新たな方法・技術の開発を行っている（三宝)。

脳神経形成・学習に関連する新たな情報伝達分子の同定

安田昌弘，八木　健

Fyn 欠損マウスでは，脳形成や学習・情動行動の異常が認められており，脳神経系で Fyn と共役する分子はこれらの分子機構において重要な分子であることが予想される。我々は，グルタチオン -S-トランスフェラーゼ (GST) と Fyn との融合タンパク質によるアフィニティーカラムを用いることにより，脳神経系で Fyn と結合するタンパク質の同定を試みた。その結果，このアフィニティーカラムには Fyn アミノ酸配列に特異的に多くのタンパク質が結合してくることが明らかとなった。このアフィニティー精製タンパク質を抗原としてモノクローナル抗体を作製したと

ころ，130kDa に対する抗体が作製できた。この抗体による分子機能を解析した結果，1）p130 は Fyn と結合する，2）p130 は脳特異的に発現する．3）p130 はシナプス肥厚分画に濃縮する，4）空間学習や情動行動に異常がある DBA/2 マウス系統で分子量が異なる，ことが明らかとなった。

酵母系での蛋白質相互作用を利用した脳形成・機能制御分子の同定

甲斐信行，八木　健

多種多様な行動制御を司る脳神経系では神経回路の多様な分化がおこる。現在までに神経回路の多様性を生み出す分子機構の存在が想定されているが殆どその実体は明らかとなっていない。このような分子機構を司る分子を単離・同定するためには，その発現が領域・時期において限定されていることが予想されるため，精度の高い分子単離・同定システムが必要となる。我々は，酵母内での結合蛋白質同定系を用いて脳形成・機能発現で重要な機能をもつことが明らかとなっている Fyn と結合する分子の同定を試みた。

その結果，現在までに Fyn との結合の強い分子を 5 クローン単離した。この内，1 クローンはすでに Fyn との結合が明らかにされている hn-RNPK であった。また 2 クローンは未知の分子であり，脳で特徴的な発現が認められている。

シナプス結合部に存在する分子の同定

光村直洋，八木　健

シナプスは脳の神経回路形成・機能発現に重要な場の 1 つである。現在までに報告されている Fyn, NMDA 受容体などの学習・記憶に関わる分子は殆どシナプスに濃縮されている。そこで我々はシナプスに濃縮している分子を生化学的に濃縮する方法を確立して，シナプス可塑性に関わる分子の単離を試みた。PSD-95 はシナプス肥厚に濃縮する分子であり，近年 NMDA 受容体や shaker 型カリウムチャンネルとの結合が報告されている分子である。我々はこの PSD-95 と相同な機能をもつ分子が脳神経系で複数存在することを予想して，この分子に特徴的な GLGF モチーフをプローブとして cDNA を単離した。その結果，PSD-95 を含む少なくとも 3 種類の相同分子がマウス脳において同定された。

新たな薬剤（ピューロマイシン）耐性遺伝子を用いたマウス胚幹細胞遺伝子操作法の開発

三宝　誠，八木　健

近年，遺伝子欠損マウスの作製法が開発され多くの成果が報告されている。しかし，この技術は未だ一般的なものではなく幾つかの克服されなければならない技術的な壁がある。この壁を乗り越えるために現在，我々はより簡便なキメラマウス作製技術の開発に努めている。また，今まではマウス胚幹細胞のG418耐性株でのみ変異マウス作製系が成功していたが，他の薬剤については未知であった。他の薬剤を使うことにより，胚幹細胞でのダブルミュータントの作製，他の遺伝子導入等が可能となる。現在，我々はこれらの点からの技術開発を進めている。

その結果，現在までにピューロマイシンが胚幹細胞を効率よく死滅させることができること，ネオマイシンと同時に二重選別ができること，二重選別された胚幹細胞は効率よくキメラマウスとなること，得られたキメラマウスより胚幹細胞由来の子孫マウスが効率よく得られることを確認した。また本年度，脳領域・時期特異的なターゲティング法をCre-loxP系を用いて試み，その有効性について確認した。

NMDA受容体サブタイプ欠損マウスの解析

崎村建司，八木　健，三品昌美

現在までにNMDA受容体サブタイプ欠損マウスを4種作製して，その行動異常，脳形成異常の解析を行ってきた。また本年度は新たな遺伝子欠損マウスの作製に成功し，現在，脳機能異常について解析を試みている。（計画共同研究の項参照）

マウス，コラプシンの単離と遺伝子欠損マウスの作製

谷口雅彦，成瀬一郎，八木　健

コラプシンは神経伸長を阻害する細胞外分子であり，神経経路形成，シナプス形成機構に重要な分子であることが想定されている。われわれは現在までにマウスでこの分子を同定し，遺伝子構造を解析した。現在，遺伝子欠損マウスの作製に成功し，神経回路形成異常について解析している。（計画共同研究の項参照）

ニューロピリン欠損マウスの作製

木津川尚史，藤沢　肇，八木　健

ニューロピリンは神経回路形成において特徴的な発現をする細胞膜受容体である。我々はこの分子の神経回路形成に関わる分子機能解析を目的として遺伝子欠損マウスの作製を試みている。現在までに遺伝子ターゲティングマウスの作製に成功し，神経回路形成異常について解析している。(計画共同研究の項参照)

情報記憶研究部門

【概要】

情報記憶研究部門では，主に電気生理学的手法を用いて感覚情報処理の初期過程や情報処理機構，さらには記憶との関連についての研究を行うことを目的として研究を進めている。感覚系の中でも，特に，嗅覚受容細胞を対象にし，その細胞内情報処理機構に関して解析している。嗅細胞は，匂い物質を受容して電気的な信号に変換する神経細胞であり，その情報処理機構を解明することは嗅覚の特性を知るために必要である。また，最近の研究から，この情報変換機構はG蛋白介在性アデニレートシクラーゼ系によって仲介されていることが明らかになりつつある。感覚細胞は，刺激の入力—出力特性が定義しやすいので，システムを定量的に解析する実験を行う上で利点をもつ。このような細胞内情報処理機構を定量的に解析することは，後に，その研究で得られた知見や実験手法を，実験的には困難である脳神経細胞や分泌細胞に応用することが可能であろうと期待される。

本研究部門では，嗅細胞を組織内から急性単離し，単一細胞に対するパッチクランプ法を適用し，匂い物質によって活性化する膜イオンチャネル，及び膜電位に依存するイオンチャネルを解析している。最近の実験において，匂い物質により誘起されるトランスダクション電流成分には，興奮性成分に加えて抑制性成分が共存することを見出した。また，嗅細胞に対してケージドcAMP法を適用して，光照射に対する細胞内cAMP濃度のジャンプを起こす実験系を確立し，細胞内システムを定量的に解析している。このcAMP応答が匂い物質によって抑制されることから，抑制現象は匂いレセプターに対するものであるというより，細胞内情報変換機構のかなり下流部位にあることが明らかとなった。この抑制性成分を考慮に入れることにより，従来から説明のつかなかった嗅覚応答の時間特性（刺激終了後に発生するoff応答や0.5秒もの長い潜時）を説明することができ，また心理学的に知られるマスキングの現象を嗅細胞レベルで説明する可能性を提起した。

また，本研究部門に非常勤研究員として在籍している河合は，イモリ嗅細胞の膜電位依存性チャ

ネルの電気生理学的特性の解析を進めてきた。その結果，嗅細胞において初めてT型Ca^{2+}チャネルを発見するとともに，膜の脱分極によるT型Ca^{2+}チャネルの活性化は活動電位の発生を促進することを明らかにした。

イモリ嗅細胞のT型カルシウム電流による活動電位発生の促進

河合房夫，倉橋　隆，金子章道

嗅細胞は，匂い物質を検出して電気信号に変換する神経細胞である。これまでの研究により，嗅細胞繊毛においては，匂い物質の受容に伴うG蛋白介在性アデニレートシクラーゼの活性化により，内向き電流が生じることが明らかにされている。こうした内向き電流は，嗅細胞の細胞体及び軸索に存在する膜電位依存性Na^{+}チャネルを活性化させることにより活動電位を生じさせ

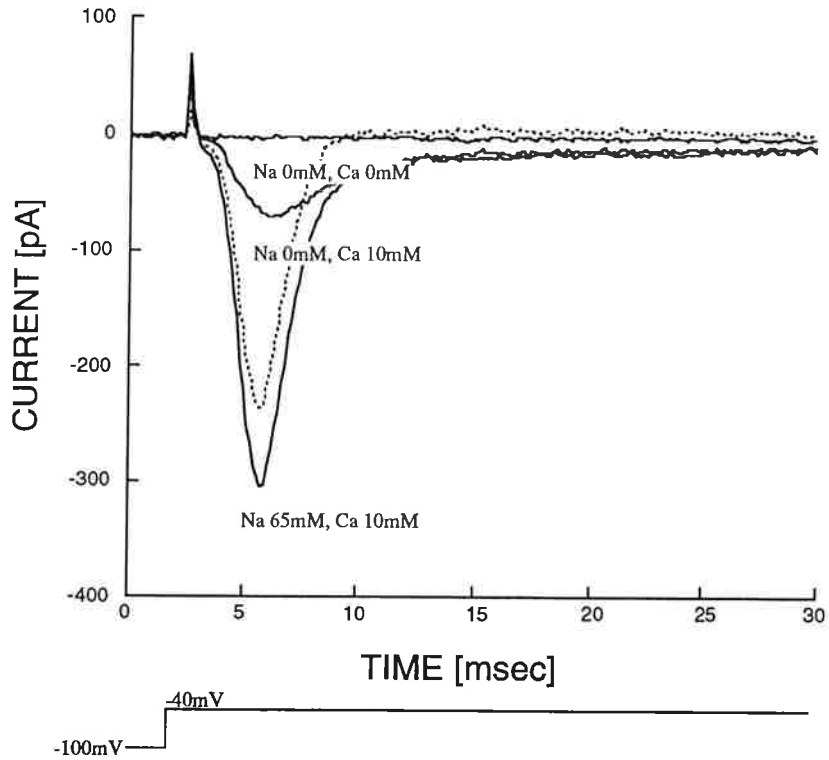


図1：イモリ嗅細胞の内向き電流は3種類の成分からなる。図中に示したイオンを含む3種類の溶液中で測定した脱分極刺激に対する膜電流の重ね書き。Na^{+}, Ca^{2+}は等しいモル数のコリンに置換した。破線は，Na^{+}電流を示す。K^{+}電流を除去するため，Cs^{+}パイペットで記録した。

るものと考えられてきた。

本研究では，嗅細胞の活動電位発生のイオン機構を解析するため，まず，標準リンゲル液，及び細胞外液から Na^+ を除去した条件下で単離イモリ嗅細胞に電流を注入し，その膜電位活動を測定した。その結果，標準状態に見られた活動電位は，Na^+ の除去によりその頻度が減少したものの，Na^+ フリー溶液中においても著明な活動電位が見られた。しかしながら，この溶液から，さらに Ca^{2+} の除去あるいは Ca^{2+} チャネルのブロッカーである Ni^{2+} を添加することにより活動電位は消失した。このことから，イモリ嗅細胞の活動電位の発生には，Na^+ 電流以外に Ca^{2+} 電流も関与することが示唆された。

そこで，本研究では，活動電位の及ぼすこうしたイオン電流成分の影響を詳細に検討するため，ホールセルパッチクランプ法を用いてイモリ嗅細胞細胞体の内向きイオン電流の膜電位依存性，薬理学的特性，カイネティクスを解析した。まず，内向き電流のみを分離するため，K^+ チャネルのブロッカーである TEA を外液中に添加し，さらに，Cs^+ パイペットを用いることにより K^+ 電流を除去した。図１は，コントロール溶液，Na^+ フリー溶液，Na^+ , Ca^{2+} フリー溶液のそれぞれの溶液中において，脱分極させた場合の膜電流である。コントロール溶液中での応答振幅は約 300pA 程度であるが，外液から Na^+ を除去することにより応答振幅は減少した。この時の残存した電流には，一過性の成分以外に持続性の電流成分も確認された。しかしながら，この持続性内向き電流成分の振幅は数 pA 程度であり，一過性のものと比較してその振幅は極めて小さかった。さらに，外液から Ca^{2+} を除去することにより，内向き電流成分はほぼ完全に消失した。このことから，Na^+ フリー溶液中で測定された一過性及び持続性の内向き電流は，Ca^{2+} 電流であることが示唆される。そこで，こうした２種類の一過性 Ca^{2+} 電流 ($I_{Ca,T}$) 及び持続性 Ca^{2+} 電流 ($I_{Ca,L}$) のサブタイプを判別するため，これら２種類の Ca^{2+} 電流の薬理学的特性を測定した。その結果，$I_{Ca,T}$ は，細胞外液の Ca^{2+} を Ba^{2+} に置換することよりほとんど影響を受けず，0.1mM Ni^{2+} の添加により選択的に抑制された。一方，$I_{Ca,L}$ は，Ca^{2+} /Ba^{2+} 置換あるいは，dihydropyridine アゴニストである Bay K 8644 (0.3μM) により増強され，また，dihydropyridine アンタゴニストである nifedipine (1M) あるいは 0.1mM Cd により抑制された。さらに，これら２種類の Ca^{2+} 電流の膜電位依存性についても検討したところ，$I_{Ca,T}$ は保持電位 (Vh ＝-100mV, -80mV, -60mV) の脱分極により著しく応答振幅が減少したのに対し，$I_{Ca,L}$ には著明な変化が見られなかった。これらの２種類の Ca^{2+} 電流の薬理学特性及び膜電位依存性から，$I_{Ca,T}$, $I_{Ca,L}$ は，それぞれ，Ｔ型 Ca^{2+} 電流及びＬ型 Ca^{2+} 電流であると結論した。

ところで，前述したように電流注入により生じた活動電位は，細胞外液が Na^+ フリー条件下で Ni^{2+} を付加することより完全に消失した。このことから，活動電位の生成には，$I_{Ca,T}$ が関与するものと考えられる。従来から，活動電位の発生には Na^+ 電流 (I_{Na}) が関与することが知られているため，本研究では，活動電位に及ぼす I_{Na} 及び $I_{Ca,T}$ の影響を検討するため，それぞれのイオン電流の活性化曲線を比較した。その結果，I_{Na} 及び $I_{Ca,T}$ は，それぞれ膜電位が約 -60mV, -70mV より脱分極側で活性化を示した。この結果から，$I_{Ca,T}$ が活性化を開始する膜電位は，I_{Na}

答を線形に加算したモデルに当てはめることができたが，他のニューロンの活動は非線形な加算を仮定しないと説明できなかった。この結果はV1が色情報の変換において重要な役割を果たしており，高次の視覚領野でみられる特定の色に対する選択性の形成にV1が関与していることを示唆している。

視知覚における充填現象の神経機構

小松英彦，木下正治

視知覚における充填とは，視野の刺激が存在しない場所にあたかもその近辺に存在するのと同じような刺激がひろがって存在するかのように知覚される現象である。充填は様々な事態において知覚されるが，その最も顕著な例は盲点における充填である。網膜の視神経円板には光受容器が存在しないため，視野には視覚情報の存在しない盲点が生じる。しかし充填により盲点周囲の視野と同じ色や明るさが盲点内部にも知覚される。充填は視覚情報を補間する機能のあらわれと考えられ，充填のメカニズムを明らかにすることにより，これまで知られていなかった視覚系の重要な働きを明らかにすることにつながると私達は考えている。これまでにサルの盲点を取り囲む一様な色の刺激により盲点内部に充填知覚が生じることを行動学的に明らかにしてきた。1995年度は大脳皮質一次視覚野(V1)で盲点を表現する領域のニューロンが，充填知覚が生じている条件下で反応するかどうかを，注視タスクを行っているサルの単一ニューロン活動記録により調べた。片目を遮蔽して単眼のみ開いて盲点にあたる視野に視覚入力がない状態にすると，V1の盲点表現領域の4層および2，3層のニューロンは視覚刺激に反応しなかった。しかし深層には視覚刺激に反応するニューロンが存在した。これらのニューロンは盲点周辺に広がる大きな受容野をもっていた。またこれらのニューロンは刺激に対して空間加算性を示した。この結果は盲点周辺の視野に呈示された視覚情報が，V1の盲点表現領域に伝えられるメカニズムが存在することを示しており，盲点における充填知覚にV1が関与することを示唆している。

生体システム研究部門

【概要】

歩行運動の制御と高次脳機能

森　茂美，松山清治，宮下英三，中﨑克己，高須千慈子

目的をもった歩行運動の発動には高次脳機能の関与を必要とする。高次脳から始まる歩行発動信号（フィードホワード信号）は脳幹および脊髄に分散配置されている要素的神経機構を活動させる。フィードホワード信号は視覚，前庭感覚，体性感覚器官からのフィードバック信号と絶えまなく参照・対比され，その内容が歩行運動の目的に適合するように修飾される。歩行運動の制御と高次脳機能のかかわりを解明するためには，個体発生的な観点からと系統発生的観点からの研究を並行して進めることが必要である。この目的を達成するため生体システム部門ではラット・ネコ・サルを実験動物として用い，多角的な立場からの研究を展開している。

1．新生ラットにみられる歩行運動の生後発達過程

新生ラットは生後約２週間で四足歩行運動を開始する。また新生ラットを水浸させると，生後数時間で前肢運動を主体とする遊泳運動を開始する。これらの観察成績から次の２点が推察される。(1)前肢および後肢のリズム運動を発動させる基本的神経機構はラットの生後初期に脊髄部に形成されている。(2)四足運動の発動には体幹の荷重を支持する抗重力活動の発達が必要である。抗重力筋の制御にかかわる神経機構は，リズム活動の制御にかかわる神経機構よりも遅れて発達してくることが推定される。中枢神経機構の発達過程においてモノアミンやセロトニンを神経伝達物質とする作動系は胎性期の早期に発達し，他の神経系にみられる分化・発達に影響をおよぼすことも知られている。本研究では胎生期にセロトニン作動系の発達が障害されたと考えられる新生ラットを用いて歩行運動の生後発達過程を解析した。得られた研究成績からセロトニン作動系は四肢の協調運動にかかわる要素的神経機構の形成・発達に重要な役割を果たしていることが推定された。

2．成ネコにみられる四足歩行運動と筋トーヌスの制御機構

ネコの脳幹内には四足歩行運動と筋トーヌスの制御にかかわる四つの基本的神経機構がすでに同定されている。それらは視床下部歩行誘発野，中脳歩行誘発野，橋中心被蓋野背側部と腹側部である。これらの部位に微小電気刺激を加えると中枢無傷ネコでも除脳ネコでも刺激部位に特有な歩行運動が誘発される。一方小脳は高次脳からの歩行発動信号およびフィードバック信号の統合中枢であると推定されているが，歩行運動の発動に対して小脳が直接関与するか否かの疑問は

これまで解明されていない。この疑問を解明するため脳幹が上位脳から離断された除脳ネコを用い，小脳刺激によりトレッドミル上での歩行運動が誘発できるか実験を行った。小脳正中部でその白質を微小刺激すると筋トーヌスの増強をともなう四足歩行運動が誘発できた。その歩容は同一動物の中脳歩行誘発野刺激で誘発される歩行運動の歩容とほとんど変わらなかった。小脳白質に加えた微小電気刺激は室頂核前庭路および室頂核網様体路を興奮させ，それぞれの小脳遠心路は前庭脊髄路および網様体脊髄路を下行する信号によって歩行運動を誘発していることが解明できた。

3．サルにみられる四足歩行運動と直立二足歩行運動

トレッドミル上での四足歩行運動を成サルは比較的容易に学習した。サルの歩容は他の四足動物における歩容とは異なり，四肢は右後肢・左前肢・左後肢・右前肢の順で着地を繰り返した。その着地相（時間）はトレッドミルの速度増加に対応して有意に短縮したが遊脚相（時間）はほぼ一定であった。サルを用いて直立二足歩行運動の学習ができるかについても予備的実験を現在進めている。四足歩行運動の場合には体幹の荷重が左右の前肢および後肢で支持される。しかし直立二足歩行の場合には左右後肢のみで荷重が支持され，さらに体幹を直立位に維持する必要がある。すなわちサルの高次脳は直立二足歩行運動の遂行に際して，四足歩行運動時とは基本的に異なる戦略（ストラトジィー）の構築を必要とすることが推定される。直立二足歩行運動の学習過程をシステマティックに解析するため，四肢，体幹の動きを軌跡（トラジェクトリー）として描画し，それらの特徴を解析することから，歩行戦略の構築と上位脳機能とのかかわりを解明する予定である。

網様体脊髄路投射の脊髄支配様式および作動様式

松山清治，中隣克己，森　茂美

脳幹の中央部に位置する網様体には，大脳皮質・大脳基底核・小脳などの上位中枢の運動司令とともに末梢の感覚情報が伝達される。網様体はこれらの入力信号を統合・処理し中枢神経系の全般にわたり上行および下行性に伝達する。これより網様体は運動の発現・形成の基礎的過程に深く関与すると考えられる。また網様体は細胞構築学的特徴により複数の網様核群に分類され，これらは機能的に異なる特徴を有すると考えられる。本研究では運動制御の基礎的過程に関与する網様体の特徴を明らかにするために，網様体の下行性出力系である網様体脊髄路に着目し，以下の２項目について解析を試みた。両者の実験系とも実験動物にはネコを用いた。

1．巨大細胞性被蓋野および大細胞性被蓋野に由来する網様体脊髄路投射の脊髄支配様式

網様体脊髄路の主たる起始部位である内側橋・延髄網様体は細胞構築学的に橋と延髄背側部に位置する巨大細胞性被蓋野および延髄腹側部に位置する大細胞性被蓋野の２つに大別される。こ

れらの領域からは脊髄の全長にわたり網様体脊髄路軸索が下行する。本研究では，２つの網様核由来の下行性軸索について脊髄支配様式に関する単一軸索レベルでの解析を行ない，その特徴について比較・検討した。このため順行性神経標識法である PHA-L 法を用い，それぞれの網様核由来の網様体脊髄軸索およびその分枝を脊髄の全長にわたり標識した。動物は PHA-L 注入後４－８週間で経心臓的に潅流固定された。頚・胸髄および腰・仙髄部について50μm 連続切片標本を作製した。これらの連続切片標本の観察により同定された単一軸索について脊髄内走行・支配様式を解析し，以下の特徴を明らかにした。１）巨大細胞性被蓋野の網様体脊髄路軸索の中で脊髄内を長距離にわたり下行するものは，3-10μm の太い軸索直径を有するものであった。これらの軸索は複数の髄節にわたり１髄節あたり１－４本程度の軸索側枝を分枝した。また頚・胸髄部において下行性軸索は頚膨大部で他の部位より多く軸索側枝を分枝する傾向を示した。軸索側枝の全ては脊髄前角の介在細胞層を支配したが，一部のものは体幹筋支配運動神経細胞層も支配した。２）大細胞性被蓋野の網様体脊髄路軸索は 4μm 以下の細い軸索直径を有するものが主体であった。これらの多くは脊髄全長にわたり下行した。これらの軸索は１髄節あたり平均１本程度の軸索側枝を分枝するのみであった。軸索側枝の全ては脊髄前角の介在細胞層を支配したが，一部のものは四肢筋支配運動細胞層も支配した。以上の成績より巨大細胞性被蓋野および大細胞性被蓋野に由来する網様体脊髄路投射は脊髄支配様式に関して異なる構築原理を有することが明らかとなった。

２．網様体脊髄路細胞の活動様式と脊髄支配様式に関する解析

網様体脊髄路細胞は動物の運動に際して様々な活動様式を示す。本研究では網様体脊髄路細胞の活動様式とその脊髄支配様式ついて解析を試みた。実験には上丘前縁ー乳頭体後縁で上位脳を離断した除脳ネコ標本を用いた。この除脳ネコを脳定位装置および腰髄固定装置に固定した後に無動化し，中脳歩行誘発野刺激により fictive locomotion を誘発した。この際の網様体脊髄路細胞の発射活動を腰髄部において網様体脊髄路軸索から軸索内記録した。記録電極には 2% neurobiotin-1M KCl 溶液封入微小ガラス管ピペットを用いた。また fictive locomotion の周期および位相は同時記録した後肢の伸筋・屈筋支配神経から導出した群発射活動から決定した。軸索の発射活動を記録後，軸索内に neurobiotin を電気泳動的に注入した。注入後５－20時間後に動物を潅流固定し，脳幹・脊髄組織を摘出した。腰髄部の 50μm 連続切片を作製し，ABC/DAB 組織化学染色により neurobiotin 陽性線維を標識した。これらの解析より以下の成績が得られた。１）fictive locomotion 誘発時の網様体軸索の発射様式は locomotion 周期と対応する phasic pattern と，対応を示さない silent pattern, tonic pattern に分類された。２）neurobiotin 陽性軸索は腰髄内で 5-40mm にわたり標識できた。これらの軸索は腰髄部で軸索側枝を分枝し，主に脊髄の介在細胞層を中心に投射した。３）phasic pattern の発射活動を示す軸索の中に，腰髄の膨大部で他の領域に比較してより多くの軸索側枝を分枝するものを認めた。以上の解析より網様体脊髄路細胞の作動様式と脊髄支配様式の関連性について新たな知見が得られるものと期待できる。

ラットのヒゲ運動系における感覚・運動統合機序の解析

宮下英三，森　茂美

感覚・運動統合機序を解明するため，ラットのヒゲ運動系をモデル系とした。ヒゲ運動皮質を中心とした神経線維結合を解析した研究結果 (Exp. Brain Res. 1994 (99) 223-232, Neurosci. Lett. 1995 (195) 69-71) から，ヒゲ運動皮質はヒゲ感覚皮質と相互神経線維結合があり，ヒゲ運動皮質は上丘経由で顔面神経核にアクセスしていることが示唆された。

本研究では，感覚・運動統合機序をニューロン間の機能的結合度を指標として解析した。ヒゲ運動皮質，ヒゲ感覚皮質および上丘各々に formvar 被覆ニクロム線電極（外径：25μm）を，頬皮下に formvar 被覆ステンレス線電極（外径：50μm）をケタミン麻酔下にて慢性的に埋め込み，複合ニューロン活動およびヒゲ筋電図を導出した。導出した複合ニューロン活動をオフライン処理（クラスターカッティング）により単一ニューロン活動に分離した後，time dependent scatter diagram (Brain Res. 660 (1994) 209-21) を作成し，２種類のヒゲの動く状態（探索行動中の自発的なヒゲの動きと触覚刺激による受動的なヒゲの動き）におけるニューロン間の機能的結合度を評価した。

ヒゲ運動皮質，ヒゲ感覚皮質および上丘各々から同時にニューロン活動を導出できた12個のニューロングループの内，３個のニューロングループで各々のニューロン間に有意な機能的結合が見られた。これら３個のニューロングループに共通した特徴として，探索行動中と触覚刺激中とではニューロン間の機能的結合度に変化があった。また，探索行動中はヒゲ運動皮質のニューロンからヒゲ感覚皮質および上丘のニューロンに興奮性機能的結合を示すが，触覚刺激中は上丘およびヒゲ感覚野のニューロンからヒゲ運動野のニューロンに興奮性機能的結合を示すといった，機能的結合度がダイナミックに変化するニューロングループもあった。これらの結果から，感覚・運動統合機序を機能的結合度を視標として抽出できることが示唆された。

本研究は平成７年度科学研究補助金（奨励研究Ａ）により遂行された。

ラット歩行能力の生後発達とセロトニン作動系

中﨑克己，高須千慈子，松山清治，森　茂美

セロトニン (5-HT) の選択的合成阻害剤である para-chlorophenylalanine (PCPA) を妊娠早期より妊娠母ラットに投与（妊娠第８日に 300mg/kg, 妊娠第９日から出産日まで連日 80mg/kg）すると，胎生期から 5-HT 作動系の働きが抑制された新生ラット実験モデルを作製できる。この PCPA 投与妊娠ラットより出生した仔ラット（Ｐ群）では，歩行運動および遊泳運動に代表され

る運動の生後発達が対照群（C群）のそれらに比較して有意に遅延し，特に生後早期では遊泳運動における四肢の協調運動が障害された。この成績は運動制御にかかわる要素的神経機構（サブプログラム）の発達様式，およびその発達順序を定めるプログラムの形成過程に遅延または障害が生じていることを推定させる。これらのサブプログラムのそれぞれは神経回路網によって構成されると考えられることから，それらの胎生期および生後の発達に 5-HT 作動系は重要な役割を果たすことが推定される。

本研究では，運動制御にかかわる要素的神経回路網の一部を構成する運動神経細胞の生後発達と 5-HT 作動系のかかわりを明らかにすることを目的とした。このため新生仔ラット実験モデルを用いて，第一に上・下肢伸筋を支配する運動神経細胞の生後発達様式を，その樹状突起の伸びの程度および細胞体面積を指標として形態学的に解析した。第二に 5-HT 作動系の起始核である縫線核およびその下行性投射領域における 5-HT 作動系の生後発達様式を免疫組織染色法を用いて形態学的に解析し，次の 4 点が解明できた。

1）上腕三頭筋・大腿四頭筋支配運動神経細胞の樹状突起は，生後 1 ・ 6 日齢においてC群ではそれぞれの運動核内およびその周辺に豊富に分布したが，P群ではそれぞれの運動核内およびその周辺に疎に分布し，これらの樹状突起の伸びはC群に比べて明らかに抑制されていた。生後14・22日齢の上腕三頭筋・大腿四頭筋支配運動神経細胞の樹状突起の伸びでは，C群とP群の間に明らかな差は認められなかった。

2）上腕三頭筋・大腿四頭筋支配運動神経細胞の細胞体面積では，生後 1 日齢においてP群の平均値 (246.5 ± 71.9μm^2, 254.3 ± 76.1μm^2) はC群 (301.2 ± 97.7μm^2, 296.8 ± 93.4μm^2) に比べて有意に低値を示した。生後22日齢における上腕三頭筋・大腿四頭筋支配運動神経細胞の細胞体面積では，P群の平均値 (523.5 ± 160.7μm^2, 591.7 ± 261.7μm^2) はC群 (564.4 ± 254.4μm^2, 649.3 ± 335.5μm^2) に比べて低値を示した。

3）縫線核群の一つである大縫線核において，生後 1 日齢で両群ともに 5-HT 免疫反応性細胞が染色されたが，P群ではC群に比べて染色性の低い細胞が多数認められた。また大縫線核およびその周囲における 5-HT 免疫反応性神経線維および varicosity は，C群で豊富に分布したがP群で疎に分布した。

4）頚・腰膨大部における 5-HT 免疫反応性神経線維および varicosity は，C群で生後 1 日齢より前角を中心とした灰白質内に密に分布した。P群の頚・腰膨大部における 5-HT 免疫反応性神経線維および varicosity は，生後 1 ・ 6 日齢において灰白質内に疎に分布し，C群に比べてこれらの神経線維および varicosity の密度は明らかに減少していた。生後14・22日齢の頚・腰膨大部における 5-HT 免疫反応性神経線維および varicosity の脊髄内分布ではC群とP群の間に明らかな差は認められなかった。

以上の成績は，5-HT 作動系が運動神経細胞の発達に対して胎生期から生後にかけて促進的に機能することを示唆する。5-HT 作動系はノルアドレナリン作動系とともに胎生期の中枢神経系内で最も早期に成熟し，大脳皮質・脳幹および脊髄などそれらの投射領域において，他の神経細

胞群の分化・発達・増殖を促進することがすでに明らかにされている。これらの成績と本研究で得られた成績から 5-HT 作動系は，運動制御にかかわり運動神経細胞にその一部を構成される要素的神経回路網の形成・発達に対して促進的に機能することが推定された。

ネコの小脳正中部刺激によって誘発される姿勢筋緊張の増強効果

浅野目充，中隣克己，松山清治，森　茂美

室頂核 (fastigial nucleus) の刺激，破壊実験から小脳虫部 (vermis) は室頂核を介して歩行運動や姿勢筋緊張の制御に重要な役割を果たすことが推定されている。本研究では反射直立姿勢を維持している除脳ネコを実験モデルとして用い，1）小脳正中部およびその近傍に微小電気刺激を加えた場合に姿勢筋緊張にどのような変化が発現するのか，2）筋緊張の変化を誘発できる部位が存在するとすれば，それはどのような神経機構の賦活によって発現するのかを解明しようと試みた。そのため第一には，小脳正中部およびその近傍に systematic に連続微小電気刺激 (0.2ms, 50Hz, 5-20s, 5-50μA) を加えた。筋緊張の変化は姿勢筋（上腕三頭筋，大腿四頭筋，腓腹ヒラメ筋，頚二腹筋，腰多裂筋）から導出した筋活動および左右前肢・後肢に加わる床反力の記録から解析した。第二には，筋緊張に変化が生じた部位を通電微小破壊し，その部位に神経標識物質 (0.4% CTb-HRP) を微小圧注入し (0.05μl), 起始細胞群および遠心性線維群をそれぞれ逆行性および順行性に標識した。注入後の生存期間は12～52時間とした。これらの解析によって以下の成績を得た。1）小脳正中部白質の特定領域を刺激した場合にのみ全身的な姿勢筋緊張レベルの増強効果が誘発された。2）この部位に CTb-HRP を注入した場合，逆行性標識細胞群は左右の室頂核内で吻尾側方向に一様に分布していた。順行性に標識された遠心性線維は結合腕の外側縁さらに前庭神経核群の外側を橋網様核に向かって下行した。一部の線維は外側および上前庭神経核に侵入していた。以上の成績から，姿勢筋緊張の増強効果は両側室頂核から始まる交叉性通過線維 (fastigioreticular および fastigiovestibular tract) の刺激効果によるものと考えられた。

ラット黒質からの下行性投射経路の同定

小倉光博，山田高嗣，宮下英三，森　茂美

本研究では大脳基底核の出力核である黒質からの下行性投射，とくに黒質の内側領域と外側領域からの投射様式を順行性標識物質である Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) を用いて解析した。PHA-L はラット黒質網様部に電気泳動的に注入した。さらにそれらの神経終末の分

布様式と延髄網様体に軸索投射する脚橋被蓋核細胞の分布様式がどの程度一致するかについても解析を行った。そのため同一個体の延髄網様体に逆行性標識物質である Choleratoxin B subunit (CTb) を微小圧注入した。

黒質からの下行性投射線維は次の 3 群に大別された。第 1 群の線維は内側に向かい中心灰白質の外側部，動眼神経核，内側縦束間質核などに投射した（黒質中心灰白質路)。第 2 群の線維は背側に向かい主に上丘の中間層に投射した（黒質視蓋路)。第 3 群の線維は 尾側に向かい脚橋被蓋領域に達し上小脳脚周囲に投射した（黒質脚橋被蓋路)。

上丘に投射する線維は黒質外側注入例では上丘の外側領域に，脚橋被蓋領域に投射する線維は上小脳脚外側部に限局して終末した。外側注入例と比較して黒質内側注入例では，上丘に投射する線維は上丘の広い領域に投射する傾向を認めた。脚橋被蓋領域に投射する線維は上小脳脚の腹側および背外側部に終末し，この終末領域は外側注入例のそれとは異なる領域に投射した。また黒質全域注入例では，上丘に投射する線維は上丘の全域に終末しており，脚橋被蓋領域に投射する線維は外側注入例，内側注入例のそれぞれを含む領域に終末していた。

黒質脚橋被蓋路について見ると，延髄網様体に軸索投射する細胞体は，上小脳脚近傍に広く分布していた。PHA-L 神経終末と CTb 細胞体は脚橋被蓋核よりも内側の領域において分布が一致した。特に上小脳脚腹側部において，順行性標識された神経終末が逆行性標識された細胞体に近接している像も認められた。

これらの成績から次の 2 点が解明できた。

1）黒質からの下行性投射路は主として，黒質中心灰白質路，黒質視蓋路，黒質脚橋被蓋路であり，そのうち黒質視蓋路，黒質脚橋被蓋路には明らかな体部位局在が認められた。

2）脚橋被蓋領域に投射する線維はさらに延髄網様体投射細胞にシナプス結合している可能性が示唆された。

これまで運動制御に関与する神経機構として，大脳皮質－基底核群－視床－大脳皮質という閉ループを経て大脳皮質より投射される皮質脊髄路が重要とされてきた。今回の我々の研究は黒質からの下行性投射が網様体脊髄路に接続している事を示しており，大脳基底核からの下行性投射経路も運動制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

ダイテルス核を起始核とする前庭脊髄路軸索の頚・胸髄レベルにおける多髄節支配様式

久世文也，松山清治，森　茂美

これまで我々は網様体からの下行性出力路である網様体脊髄路について脊髄内の多髄節支配様式を単一軸索レベルにおいて明らかにしてきた。本研究では網様体脊髄路と同様に脊髄の全長に

わたり下行性軸索を投射する前庭脊髄路に着目し，その脊髄内支配様式を明らかにしようとした。このため順行性神経標識法（PHA-L 法）を用いてダイテルス核から始まる下行性軸索群について単一軸索レベルでの多髄節支配様式の解析を試みた。

実験には成ネコを用いた(n = 3)。ケタミン麻酔下にネコ後頭骨に小孔を開けた。この小孔より Woods 金属封入電極および 5%PHA-L 溶液封入ピペットから成る二連微小ピペットを正中より右側 4mm の位置で水平より60度の角度で脳幹内に刺入した。この際 Woods 金属封入電極より神経細胞活動の細胞外記録を行い，小脳表面から深さ 12 ～ 15mm の部位で高振幅の multi unit が記録される部位に電極を固定した。次にこの電極を刺激電極とし，この部位に微小電気刺激(300Hz, duration: 200μs, train: 10, 50 ～ 80μA) を加えた。刺激側の前・後肢伸筋の促通効果が誘発されることから電極固定部がダイテルス核であることを確認した。次にこの部位に二連微小ピペットの他方から PHA-L を微量 (0.3μl) 圧注入した。3 ～ 7 週間の生存期間の後，深麻酔下にて動物を潅流固定し，脳幹および脊髄を摘出した。脳幹と頚髄・胸髄の 50μm 全連続凍結切片を作製し，これらを PHA-L 免疫組織化学法により PHA-L 陽性線維を標識した。これらの連続切片標本を光学顕微鏡的に観察し，PHA-L 陽性線維の分布・走行・分枝様式について解析した。

PHA-L 注入部位はダイテルス核内で背腹方向に 1.2 ～ 2mm, 内外側に 0.5 ～ 1mm の領域に限局していた。脊髄内では PHA-L 標識軸索およびその側枝・終末線維は頚髄から下部胸髄にかけて観察できた。PHA-L 標識軸索は注入側の前索の腹側縁を中心に分布していた。これらの軸索の直径は頚髄および上部胸髄で 1 ～ 10μm であった。直径 3μm 未満の軸索群のほとんどは頚髄内あるいは上部胸髄で終止したのに対し，直径 3μm 以上の軸索群は下部胸髄まで下行した。次に下行性軸索の頚・胸髄における多髄節支配様式を明らかにするために，直径 3μm 以上の太い軸索群について単一軸索レベルでの解析を行った。連続切片上より20本の単一軸索についてその走行軌跡を 5 髄節から11髄節にかけて追跡することができた。これらの軸索のほとんどは多髄節にわたり複数の軸索側枝を分枝していた。単一軸索の分枝する軸索側枝の数は頚髄では1髄節あたり最高4本であるのに対し，胸髄では最高 2 本であった。これらの成績よりダイテルス核由来の前庭脊髄路軸索群の脊髄内多髄節支配様式について一部を明らかにすることができた。

歩行運動制御における小脳・脳幹神経機構の関わり

松井利浩，浅野目充，松山清治，森　茂美

上丘前縁と乳頭体後縁を結ぶ面で上位脳を離断した除脳ネコにおいて中脳歩行誘発野に連続微小電気刺激を加えると歩行運動が誘発できる。また，最近の研究から小脳正中部白質に連続微小電気刺激を加えると同様に歩行運動が誘発できることが見出された。本研究では歩行運動の発現および制御に小脳および脳幹神経機構がどのように関わるかを明らかにすることを目的とした。

このために脳幹の代表的下行性出力路である網様体脊髄路に着目し，中脳歩行誘発野および小脳正中部白質の歩行誘発部位が網様体脊髄路細胞とどの様な神経連絡様式をもつかを電気生理学的に明らかにしようと試みた。

実験には除脳ネコ (n = 8) を用いた。中脳歩行誘発野と小脳正中部白質に微小電気刺激 (50Hz, 0.2ms duration, 15-70μA) を加え歩行運動の誘発を確認した後，電極をそれぞれの部位に固定した。次に上部腰髄 (L1-2) の腹側に銀ボール電極を固定した。橋延髄網様体の内側領域に記録電極を刺入し，神経細胞活動の細胞外記録をおこなった。その際，腰髄の刺激 (single pulse, 0.2ms duration, 0.10-0.5μA) により逆行性応答を示すものを網様体脊髄路細胞として同定した。同定した網様体脊髄路細胞について中脳歩行誘発野または小脳正中部白質に単発または連発刺激 (train 1-4, 300Hz, 0.2ms duration, 40-70μA) を加えた際の応答様式を解析した。

その結果，内側橋延髄網様体 (P3-10, 正中より外側 1.0-3.0mm) より230個の網様体脊髄路細胞が記録できた。27％の細胞が中脳歩行誘発野刺激または小脳正中部白質刺激により促通効果を受けていた。また，８％の細胞は両者から促通効果を受けていた。以上の成績より中脳歩行誘発野と小脳正中部白質歩行誘発部位からの出力の一部は内側橋延髄網様体の網様体脊髄路細胞を介して脊髄へ伝達されていることが示された。また，この両者の遠心性出力は同一網様体脊髄路細胞に一部収束していることが示された。

ラット脚内核刺激に対する脚橋核領域ニューロンの応答様式の解析

山田高嗣，小倉光博，宮下英三，森　茂美

大脳基底核からの出力は視床を介して大脳皮質に送られる経路と脚橋核領域を介して脳幹網様体あるいは脊髄に送られる経路に大きく二分することができる。本研究では，大脳基底核（特に四肢の体部位再表現部位である脚内核）から脚橋核領域への投射経路に着目し，脚内核刺激に対する脚橋核領域ニューロンの応答様式を解析した。

ケタミン麻酔下，電気生理学的に同定した脚内核に刺激電極を挿入した後，細胞外記録電極を脚橋核領域に挿入した。脚内核の単一パルス刺激（パルス幅： 250μs, 刺激強度： 100μA）に対する脚橋核領域ニューロンの複合ユニット活動を記録した。窓型弁別装置を用いて単一ユニット活動に分離した後，bin 幅 5ms の peri-stimulus time histogram を作成し，このユニットの特性を解析した。刺激前 200ms の平均発射頻度を自発発火頻度とし，刺激に対する応答が自発発火頻度の90パーセンタイルを上回るユニットを興奮性ユニット，10パーセンタイルを下回るユニットを抑制性ユニットとした。脚橋核領域で包括的にユニット活動を記録するように記録電極の位置を系統的に変化させ，記録部位はニッスル染色標本を作成して再構築した。

脚橋核領域で合計366個のユニットを記録した。このうち，113個（30％）は興奮性ユニット，

37個（10％）は抑制性ユニット，73個（20％）は興奮－抑制性ユニットであり，143個（40％）のユニットは脚内核刺激に応答しなかった。潜時の中央値は各ユニット共 2.5ms であった。自発発火頻度の中央値は，興奮性ユニットと興奮－抑制性ユニットでは 7.5ms であったのに対し，抑制性ユニットでは 17.5ms であった。また，興奮性ユニットと興奮－抑制性ユニットは P6.0 ～ P7.0 のレベルに散在していたのに対し，抑制性ユニットは P6.5 と P7.5 のレベルに局在していた。さらに，刺激強度を変化させた例（2個のユニット）では刺激強度が強くなるにしたがって興奮性ユニットから興奮－抑制性ユニットに変化した。したがって，興奮性ユニットと興奮－抑制性ユニットは同一のニューロングループである可能性がある。これらのことから，脚内核刺激に応答する脚橋核領域ニューロンには少なくとも2種類（抑制性ユニットと興奮性ユニットおよび興奮－抑制性ユニット）のニューロングループがあることが示唆された。

延髄後疑核近傍呼息ニューロンの脊髄支配様式

Timothy W. Ford (Institute of Neurology, London)
松山清治，中隣克己，森　茂美

呼吸運動の基本的パターンは延髄網様体内に存在する神経回路により形成される。この領域には呼吸の位相と同期して周期的に発射活動を示す呼吸ニューロン群が広く分布する。とくに延髄後疑核近傍の網様体には呼息相に一致して発射活動を示す呼息ニューロン群が局在している。これらの呼息ニューロンは脊髄へ下行性軸索を伸ばし，脊髄呼吸運動ニューロンへ投射する。本研究ではこの呼息ニューロン軸索の脊髄支配様式を解明しようと試みた。

実験動物にはネコを用いた。ネンブタール麻酔下で脳定位装置にネコ頭部を固定し，延髄尾側部を露出した。延髄背側面より後疑核近傍に記録電極を刺入し呼吸ニューロン活動を細胞外記録した。呼吸位相は同時記録した横隔膜筋活動をもとに決定した。呼息相に一致した発射活動の特徴をもとに呼息ニューロン群の存在部位を正確に同定した。同定された部位に順行性神経標識物質である PHA-L を微量圧注入（5％溶液，0.1μl）した。注入4－6週間の生存期間後に，動物を経心臓的に潅流固定し脳および脊髄組織を摘出した。延髄および胸髄部 (T7-T10) について 50μm 連続凍結切片を作製した。これらの切片を PHA-L 免疫組織化学法により免疫染色し，PHA-L 陽性軸索および終末線維を標識した。これらの連続切片標本を光学顕微鏡的に検索し，呼息ニューロン軸索の走行および脊髄支配様式について解析した。この結果，以下の3点を明らかにできた。1）呼息ニューロン群由来の下行性軸索は延髄尾側部で交差し，PHA-L 注入反対側の脊髄前索および側索に向って下行する。2）下行性軸索は胸髄内で軸索側枝を脊髄灰白質に向って直角に分枝する。単一軸索が分枝する軸索側枝は1髄節あたり1本程度であった。3）軸索側枝は脊髄灰白質に進入後分枝を繰り返し，下行性軸索と同側の前角を中心とした領域を神経

支配している。

統合生理研究施設

【概要】

分子生物学，細胞生理学研究の急速な進歩により，神経科学は新たな発展と展開を示している。統合生理研究施設は，脳全体がシステムとしていかに働くかについて，ヒトおよび霊長類を対象として研究を行っている。すなわち，分子，細胞レベルでの最新の知識あるいは小動物での実験結果を統合して，ヒトおよび霊長類での脳機能，特に記憶，判断，認知などの高次脳機能や，各種感覚刺激に対する認知過程を解明することが本施設の目的である。またこれらの研究はヒトの精神・神経疾患の病態解明，さらには治療にもつながるものと期待される。

本施設は，感覚・運動機能研究プロジェクト，高次脳機能研究プロジェクト，自律機能研究プロジェクト（客員部門）の3部門より構成されている。現在，本施設には脳磁計 (MEG), 脳波計 (EEG) および3次元脳再構成装置が装備されている。感覚・運動機能研究プロジェクトおよび自律機能研究プロジェクトは，これらの装置を駆使してヒト脳機能の解明を行っている。また高次脳機能研究プロジェクトは，1995年3月に佐々木和夫が定年退官し，新たに1996年1月より伊佐正が教授として赴任した。主としてサルを対象とし，視覚・運動連関機構の解明などを行っていく予定である。

感覚・運動機能研究プロジェクト

【概要】

本年は，(1)体性感覚刺激による脳磁図の研究，(2)視覚刺激による脳磁図の研究，(3)文字認知に関する脳磁図の研究，(4)頭部磁気刺激による誘発筋電図の研究，を主要テーマとして行った。

体性感覚刺激による脳磁図に関しては先ず，感覚認知に対する各種干渉作用について研究した。両側の正中神経を同時に電気刺激して，その時の相互干渉作用を見たところ，第1次感覚野 (SI) の反応には変化が見られなかったが，第2次感覚野 (SII) での反応は有意に振幅低下した。また片側の正中神経刺激時に，左右それぞれの手掌に持続的な触覚刺激を加えたところ，一部の成分の有意な振幅の低下あるいは増加が見られた。下肢では後脛骨神経，腓腹神経，腓骨神経および大腿神経電気刺激による脳磁界を測定し，その発生電流双極子の位置推定を行った。いわゆる "homunculus" に一致した分布を示す例とそうでない例があり，個人差および個人内での左右差が大きいことが明らかとなった。

視覚刺激としては，臨床的に最も広く用いられている白黒格子縞反転刺激を用いて，半側および四半側視野刺激時での，後頭葉の視覚野での反応部位の相違を詳細に検討した。

文字認知に関しては日本語特有の漢字と“かな”の認知過程の相違を検討した。いずれに対し

ても両側の視覚野→側頭葉後下部という経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。

頭部磁気刺激による誘発筋電図の研究としては，いわゆるGo/No-go paradigmを用いて試行判断が錐体路に及ぼす影響について検討し，No-go時には抑制効果が有意に大きいことを明らかにした。

体性感覚刺激による脳磁図

柿木隆介，下条素子，宝珠山稔，北村吉宏，小山幸子，渡邊昌子

体性感覚刺激による誘発脳磁図は，somatosensory evoked magnetic field （SEFと略）と称される。本年度は主として，正中神経刺激によるSEF (median SEF) と下肢神経刺激によるSEF (lower limb SEF) について研究をおこなった。

正中神経刺激による脳磁場 (median SEF)

median SEFでは，主として感覚認知に対する各種干渉作用について研究した。両側の正中神経を同時に電気刺激して記録されるSEF （bilateral波形）と，左右それぞれの片側刺激によるSEFを加えた波形（summation波形）を比較した。また両者の相違を明確にするために引き算を行った（difference波形）。すると，第1次感覚野 (SI) が発生源である初期反応には変化が見られなかったが，第2次感覚野 (SII) での反応（潜時約80-120msecの中期成分）は有意に振幅低下した（図1）。SIIのニューロンは，身体左右いずれへの刺激に対しても反応することが知られており（両側反応），両側の正中神経を同時に刺激することにより，SII内での何らかの干渉作用が出現したものと思われた。また片側の正中神経刺激時に，左右それぞれの手掌に持続的な触覚刺激を加えてその変化を見た。刺激と同側の手掌に触覚刺激を加えたところ，すべての成分の振幅は有意に低下したが，潜時約30-40msecの3M成分は増大した。また刺激と対側手掌への触覚刺激では，潜時約20-30msecの2M成分は有意に振幅増大したが，他の成分には変化は見られなかった（図2）。またいずれの場合もSII成分には有意差はみられなかった。本現象の機序の解明は単純ではないと思われるが，感覚情報の何らかの半球間伝達が起こっている事が考えられる。

下肢神経刺激による脳磁場 (lower limb SEF)

SIの下肢の感覚野は半球間裂に面しており一部は冠状部に存在すると考えられている。同部の解剖は単純では無く，下肢の各部位に対する受容野の分布は明瞭ではないが，脳波ではその詳細を明らかにすることは不可能である。本研究では後脛骨神経，腓腹神経，腓骨神経および大腿神経電気刺激による脳磁界を測定し，その発生電流双極子の位置推定を行った。すると，いわゆる“homunculus”に一致した分布を示す例は全体の約65％で，そうでない例，すなわち4つの神経の受容野が極めて隣接している場合（1cm以内）が35％に見られた。前者をタイプ1（図3），後者をタイプ2に分類した。同一個人における左右差，例えば右刺激ではタイプ1，左刺激では

タイプ2といった例も70%に見られた。上肢刺激に比し個人差および個人内での左右差が極めて大きく，これはSIの下肢の感覚受容野の特異的所見と考えられた。

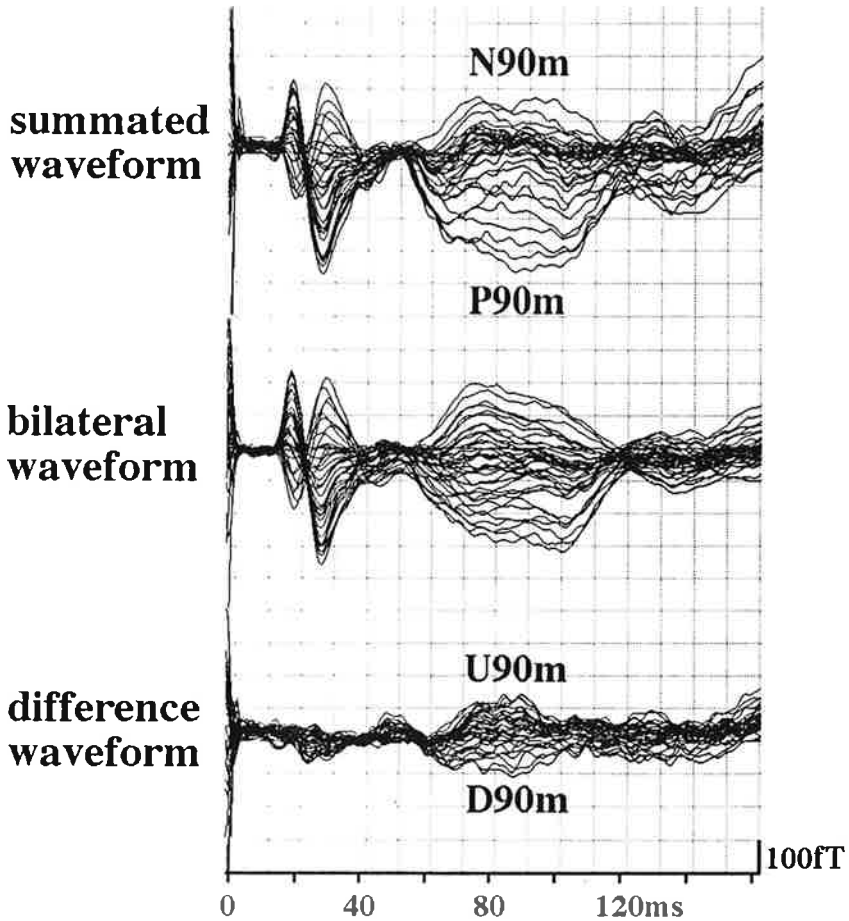


図1：体性感覚誘発脳磁場を用いて両側同時感覚刺激による相互干渉作用を検討した。"summated" 波形は左右の正中神経を片側ずつ電気刺激して得られた波形を加算したもの。"bilateral" 波形は左右の正中神経を同時に電気刺激して得られた波形。前者から後者を引き算して "difference" 波形を得た。脳磁計を左半球の感覚野付近において記録し37チャンネルでの波形を重ね書きした。第1次感覚野を起源とする初期成分には明かな差は見られないが，第2次感覚野を起源とする中潜時成分 (N90m-P90m) は "bilateral" 波形では振幅が小さく，その差は "difference" 波形で明瞭でありU90m-D90m 成分が出現する。

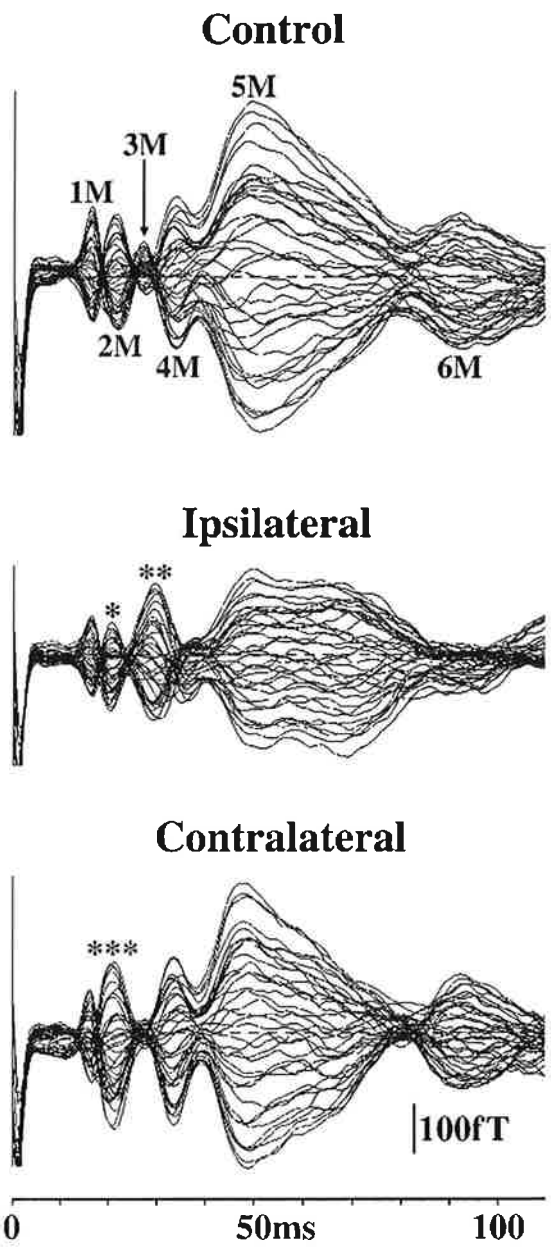


図２：末梢神経電気刺激による体性感覚誘発脳磁場を用いて，感覚受容機構に対する触覚干渉作用を検討した。右正中神経を電気刺激して左半球に置いた脳磁計の37チャンネルでの波形を重ね書きした。"Ipsilateral" 波形は右手掌に持続的触覚刺激を与えた時の波形で，"Contralateral" 波形は左手掌に持続的触覚刺激を与えた時の波形。"Control" 波形は干渉刺激を与えていない時のもの。"Ipsilateral" 波形では 3M 成分が振幅増加するが他の成分は低下する。"Contralateral" 波形では 2M 成分が振幅増加するが他の成分には変化が見られない。

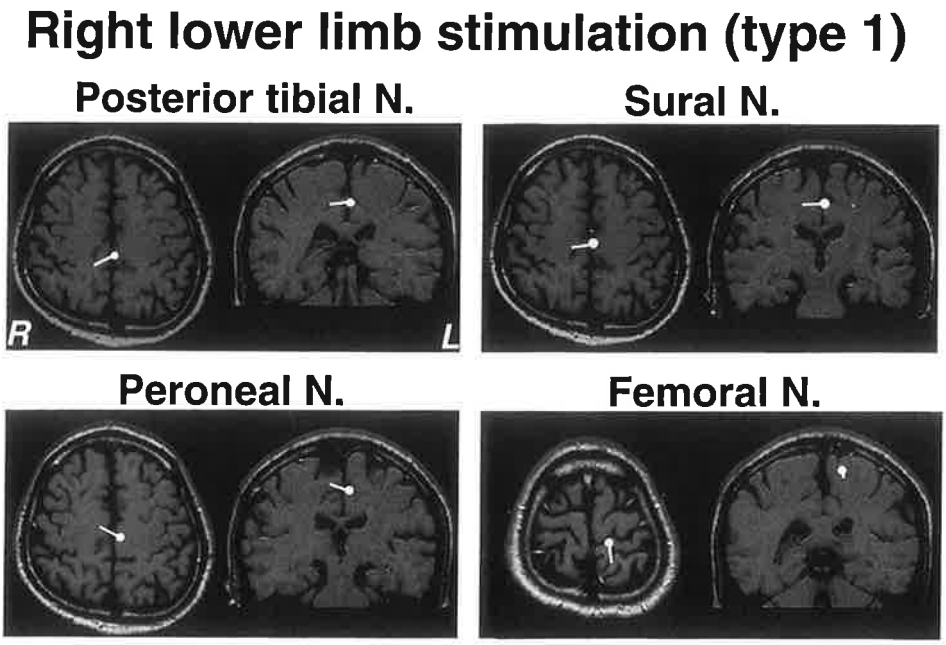


図3：右下肢の4つの異なった神経刺激に対する推定双極子の位置と方向をMRI上に示した。足首のPosterior tibial nerveとSural nerve刺激に対する双極子位置は極めて類似しているが，下肢近位部（そけい部）のFemoral nerve刺激に対する双極子は上方に存在し，その方向も前2者とは大きく異なっていた。膝のPeroneal nerveに対する双極子の位置はPosterior tibial nerveとFemoral nerveの中間であった。これはいわゆるhomunculusにほぼ一致した所見でありタイプ1に分類されるものであった。

視覚刺激による脳磁図

中村昭範，柿木隆介，小山幸子，宝珠山稔，北村吉宏

視覚刺激としては，臨床的に最も広く用いられている白黒格子縞反転刺激を用いて，半側および上下四半側視野刺激時での後頭葉視覚野での反応部位の相違を詳細に検討した。いずれの刺激に対しても刺激後約75msec, 100msec, 145msecに反応が認められた（75m, 100m, 145mと命名）。100m成分が最も再現性が高くしかも振幅が大きかったため，主としてこの成分を解析の対象とした。半側，四半側刺激いずれの場合においても視野対側の鳥距溝付近に双極子が推定された。しかし，上四半側視野刺激時での双極子位置は，下四半側視野刺激時での双極子位置よりも有意に低位にあり（距離の平均は0.81cm）（図4），これは視覚受容野のいわゆる“cruciform model”に合致したものであった。

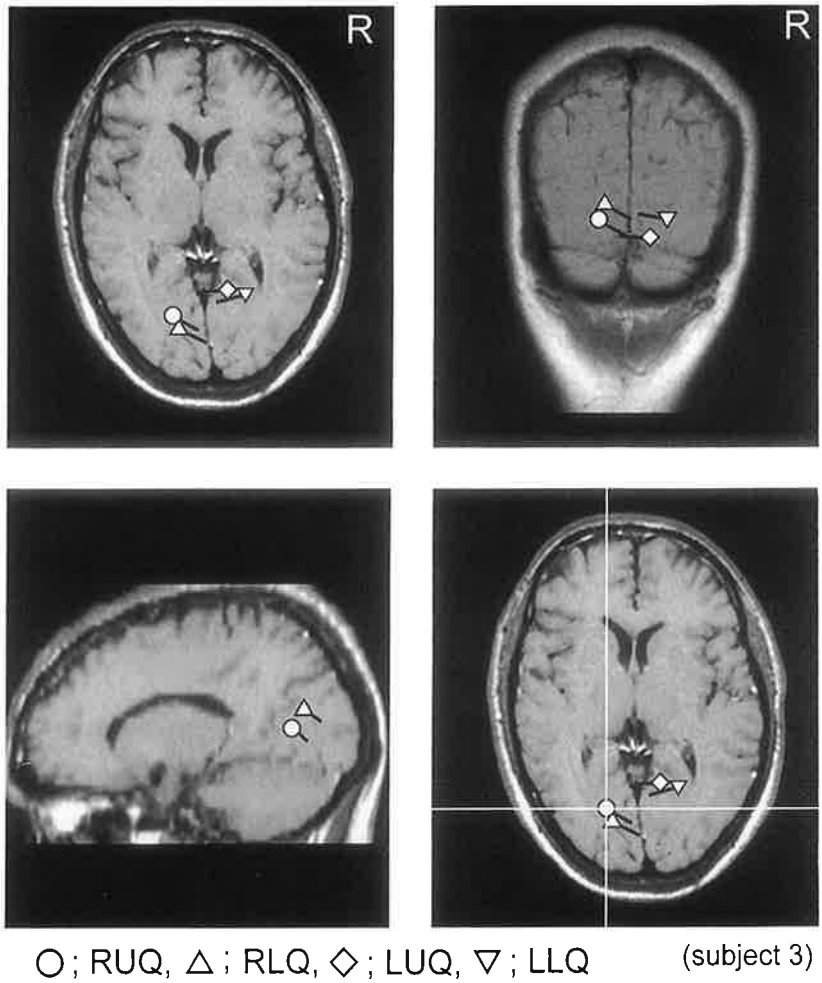


図4：左右上下四半側視野刺激に対する推定双極子をMRI上に示した。R, L: 右と左，U, L: 上と下，Q: 四半側を示す。例えばRUGは右上四半側視野刺激である。双極子はいずれの場合も視野と対側の後頭葉に推定され，下部刺激では上部刺激よりも上方に位置推定された。これはいわゆる "cruciform model" に合致した所見であった。

文字認知に関する脳磁図

小山幸子，柿木隆介，宝珠山稔，北村吉宏

文字認知に関しては日本語特有の漢字と“かな”の認知過程の相違を検討した。従来より，漢字の認知は視覚野→左側頭葉後下部→ Wernicke 野（上側頭回後部）という経路，“かな”の認知は視覚野→左角回→ Wernicke 野（上側頭回後部）という経路が提唱されているが，未だ結論が出ていない。本実験では，漢字，かな，アルファベットを 1 文字ずつランダムに呈示し，アルファベットの出現回数を数えさせた。これにより，漢字と“かな”に対する事象関連脳反応（いわゆる P300）を減弱することが可能となった。するといずれの被験者においても漢字と“かな”に対する脳磁図波形には一貫した条件差は見られなかった。また，すべての被験者で漢字，“かな”に対して刺激後約 150-300msec に紡錘状回側頭葉後下部（Brodmann37 野に相当）に双極子が推定され（1M および 2M 成分），その位置は潜時と共に前方に移動した（図 5）。この成分に加え，潜時約 200-250msec に両側半球のシルビウス裂周辺に双極子が推定された。ただし，この成分は左半球のみあるいは右半球のみに推定される例もあった。角回付近には 1 部の被験者以外では双極子は推定されなかった。以上の結果より，文字認知には左角回よりもむしろ視覚野→側頭葉後下部という経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。

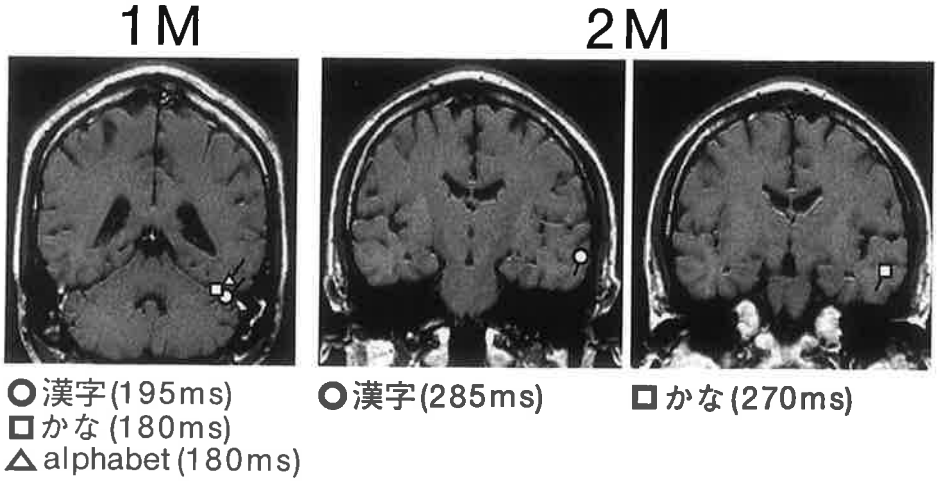


図 5 ：漢字，かな，アルファベットに対する 2 つの反応 (1M, 2M) の推定双極子を MRI 上に呈示した。脳磁計は左半球に置いて記録。両成分共に紡錘状回，側頭葉後下部に双極子が推定されたが，潜時の遅い 2M 成分は 1M 成分よりも前方に位置推定された。すなわち，情報は時間経過とともに前方に移動していることが示唆された。各種文字に対する双極子位置には明かな差はなかった。なおアルファベットに対する 2M 成分は本実験でのパラダイム（本文参照）では記録困難である。

頭部磁気刺激による誘発筋電図

宝珠山稔，柿木隆介

ヒトの随意運動発現の電気生理学的要素を，経頭蓋的磁気刺激法 (transcranial magnetic stimulation, TMS) を用いた誘発筋電図 (magnetic evoked potential, MEP) を用いて検索している。TMS は，刺激コイルを用いて局所に渦電流を生じさせることにより，大脳皮質各部を局所的，非侵襲的に刺激することが可能である。この手法を用いて，大脳皮質各部の種々の条件刺激による四肢での MEP の変化を観察し，随意運動の発現機構についての研究をしている。本年度は，運動直前の「判断」に関する情報処理が錐体路にどのような影響を及ぼすかについて，いわゆる Go/No-go パラダイムを用いて検索した。被験者は前方のモニターに映し出される赤ないしは青の丸に注目する。視覚刺激は 1 秒に 1 回呈示され，(1)青青青青，(2)青青青赤，(3)赤赤赤赤の 3 つの組み合わせのいずれかである。TMS は 4 番目の視覚刺激呈示 150msec 後に左運動野付近の頭皮上に与えて，右上肢より MEP を記録する。被験者は 4 つめの信号が出た直後にどのように運動を遂行するか判断する。(1)の場合には右手首をできるだけ速く伸展させる (Go)。(2)の場合には運動を行わない (No-go)。(3)の場合には特に反応せず，これを control として用いる。(2)と(3)の違いは，(3)の場合は 1 番目の信号が赤なので被験者は運動の可否を判断する必要がない，すなわちリラックスした状態で磁気刺激を受けることである。すると Control 時に比し，Go 時には共同筋（手首伸筋）の MEP の振幅は有意に増強し拮抗筋（手首屈筋）は低下した。ところが No-go 時には共同筋，拮抗筋ともに有意に振幅低下した。これは大脳皮質における抑制の判断が著明に錐体路の活動を抑制することによるものと思われた。

高次脳機能研究プロジェクト

【概要】

外界に現れた視覚対象を視線を動かして見る，腕を伸ばしてつかむという我々が日常頻繁に行う動作は，中枢神経系が，空間座標系において表現される物体の位置情報を多数の骨格筋の時間的，空間的活動パターンという身体座標系に属する情報に変換する過程と言い換えられる。このように座標軸の変換過程とも呼べる視覚-運動変換の神経機構の解明は，現在脳の統合機能研究の中心的課題の一つといえる。

当研究プロジェクトでは，平成 8 年 1 月より伊佐が教授として赴任し，このような視覚－運動変換過程を，神経回路のレベルから動物の行動レベルまでより綜合的に理解を進めるための実験システムを現在セットアップ中である。具体的には，中枢神経系の視覚－運動変換に関連する領域の局所神経回路内での信号伝播機構を解析するため，スライス標本を用いたパッチクランプ法

などの電気生理学的実験システムと，サルを用いた視覚刺激に対する眼球運動と上肢到達運動の軌跡を記録解析し，中枢神経諸領域の単一神経細胞活動との相関を解析するシステムを構築している。将来的にはこれらの実験によって得られた知見をより有機的に組み合わせてシステムとしての脳のさらに深い理解に繋げることを目指している。

研究活動報告（平成８年１月より赴任したので特になし）

自律機能研究プロジェクト

視覚文字認識の脳内プロセス

栗城真也，平田恵啓，小林哲生（北大電子研）

１．はじめに

ヒトの言語機能のなかには，話しことばの理解や発話のほかに書かれた文字（視覚文字）の理解がある。視覚文字理解の脳内プロセスについては，古くは Wernicke-Geschwind の直列的モデルがあり，1990年以降の PET 観察に基づいたモデルでは，文字や意味理解の異なる戦略に応じて直列・並列的に複数の部位が活動するとされている。この研究では，PET 観察に欠けている時間的な情報を MEG により得ることと，双極子解析と MRI 画像により正確に活動位置を特定することを目的に，視覚的に与えられた読める文字と読めない疑似文字を処理する時の脳の活動を観察した。

２．実験方法

レンズやプリズム，スクリーンからなる光学伝送装置により磁気シールド室内に文字刺激を導入し，被験者がスクリーンを凝視している状態で37チャンネル SQUID を用いて後頭部，デュアル37チャンネル SQUID により左右両側頭部から MEG 信号を記録した。文字刺激は，同時に呈示した（0.2秒間）３文字のカタカナ（サンプル）とその1.8～2.8秒後に呈示する（0.2秒間）一個のひらがな（プローブ）からなり，被験者はプローブ文字がサンプル文字のいずれかと一致するかどうかを判断する。MEG 信号はプローブ呈示後の約１秒間，すなわち，一文字カタカナに対する反応を計測した。ここで，プローブとサンプルは形態が異なるので，カタカナは音韻的に処理されると仮定することができる。５名の被験者（男性）を測定した。

疑似文字の実験では，刺激文字としてカタカナの構成線分を上下に任意の距離ずらせて作成したものを用いた。先の実験と難易度を合わすためにサンプルの疑似文字は３個の同じ文字とし，プローブ疑似文字との一致を判断させた。ここで，サンプルやプローブの時間的経過は上と同一である。この実験では読めない疑似文字が図形的に処理されると仮定する。６名の被験者(男性)を測定したが，うち４名は上の実験と共通である。

3．実験結果と検討

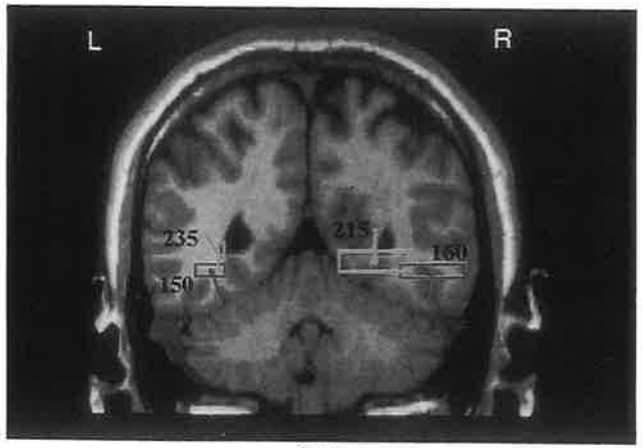
両実験課題に共通してプローブの呈示 (onset) 後 150 ～ 450ms 間にいくつかのピーク成分が観測され，振幅が大きくて再現性のある主な成分として第 1 ～第 3 成分が観察された。潜時の範囲は，カナ文字ではそれぞれ 150-210, 210-280, 270-410ms にあり，疑似文字では 125-180, 180-250, 250-460ms にあった。これらの成分のピーク前後の潜時 15ms の期間において 3.5ms おきに単一電流双極子解析を行い，goodness of fit 値が90％以上の潜時の双極子を選別してその座標 (X, Y, Z) を平均した。さらに，各被験者に対して行った 6 ～ 8 回の複数測定の結果に対して上の手順で双極子解析を行い，測定試行間の双極子位置の平均と標準偏差を求めた。最後に双極子位置を同じ被験者の MRI 画像に重ねて解剖学的な領域や位置，特に脳溝との関係を決定した。全被験者についての結果をまとめると次のようになる。

カナ文字課題では，第 1 成分と第 2 成分（一部）は後頭葉内側部にあり，頭頂後頭溝にあるものがもっとも多い。この場所は 2 次ないし 3 次の視覚野 (extra-striate cortex) に対応する。150ms 以降のこれらの活動は文字の視覚情報処理に関わるものと思われる。一方，視覚一次反応は約 100ms 潜時に生ずることが知られているが，この実験では，刺激強度が弱いためか，ほとんど一次反応は観測されていない。

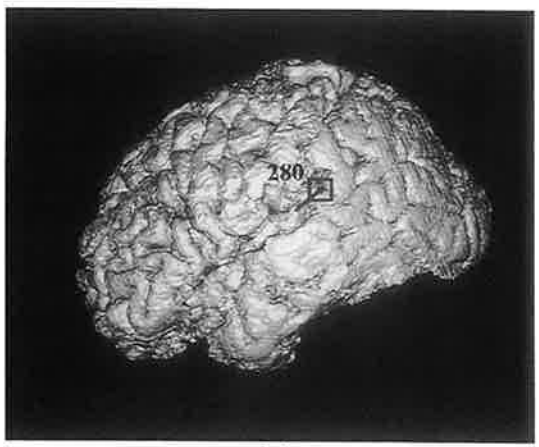
210ms 以降の第 2 ないし第 3 成分の活動は側頭葉の一部の場所にあり，上側頭溝付近とシルビウス裂の後端（縁上回）にある。また，これらは左脳半球にあるものがほとんどである。MEG 計測と別個に行った実験から，カナ文字課題について被験者間の平均反応時間は 670ms であった。第 3 成分の潜時 270 ～ 410ms はこの反応時間から単純運動時間を引いたものの前にあり，音韻的判断を行う課題に関連した脳活動として解釈できる。また，左脳半球活動優位の結果も音韻的活動であることを示唆している。上側頭溝と縁上回の機能はこの実験からは弁別できないが，後者の活動は音韻的記憶に関連するとする PET 研究の仮説がある。

疑似文字課題の第 1 成分と第 2 成分（一部）の活動は後頭―側頭部の腹側（下部）にある側副溝の近傍にあり，一般的には紡錘状回や下側頭回を含む領域としてまとめることができる。また，被験者間では左脳半球の活動が優位である。この場所は，PET 観察では文字や単語の処理に関する早期の活動があるとされている。カナ文字ではなく読めない疑似文字に対して紡錘状回の活動が主であることは興味深い。第 2，第 3 成分は右側頭葉に集中しており，その位置は上側頭回と縁上回にある。これらはカナ文字課題で観測された左側頭葉の活動と homologous な関係にある。ここで第 3 成分の潜時 250 ～ 460ms は，疑似文字課題の平均反応時間 606ms から運動反応時間を引いたものの前にあり，図形的処理に関連した反応と考えることができる。しかし，PET 観察では右側頭の一部に限局した図形認識に関する活動は報告されていない。

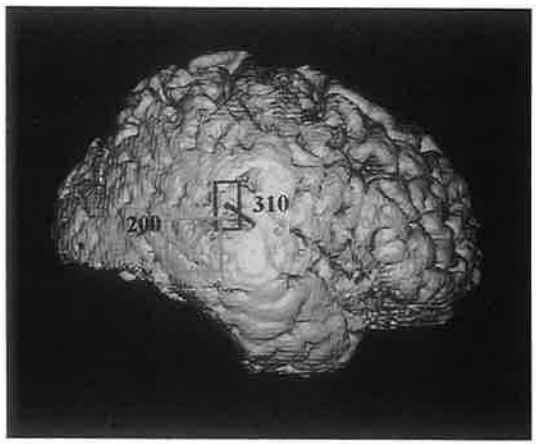
以上，読むことのできるカナ文字と図形的な疑似文字の照合課題に関する脳内活動を MEG で解析し，それぞれ，左と右の側頭部に限局した 300ms 以降の遅い反応を特定することができた。



S3



S6



S1

生理機能研究施設

組織培養標本室

【概要】

組織培養標本室は組織培養室および組織標本室から成る。組織培養室では各種の組織細胞の初代培養や継代培養，脳切片のスライス培養，モノクローナル抗体の作製などを行っている。又，組織標本室は主に免疫組織化学が行えるように，クライオスタットやミクロトーム，蛍光顕微鏡等を整備している。平成７年度は組織培養室（251号室）に安全キャビネットやオートクレーブを整備し，培養細胞専用のP2実験室に改造した。これにより培養細胞に遺伝子やウイルスを導入することができるようになった。本年度の常時利用者は所内10部門39名，所外10名であった。

グアニリンの作用および結合部位に関する形態学的研究

古家園子，成瀬　達（名大・医・内科）

グアニリンは膜結合型グアニレートサイクラーゼCを活性化する生理活性物質として小腸から単離されたペプチドである。15のアミノ酸残基からなり，その分子構造は病原性大腸菌が産生する熱耐熱性エンテロトキシン(STa)と類似している。グアニリンは腸管のグアニリン／STa受容体と結合し，グアニル酸シクラーゼを活性化して細胞内のcGMPを増加させ，電解質や水の輸送をコントロールしていると考えられている。グアニリンの結合部位および作用を調べる為に^{125}I-グアニリンをラットの大腿静脈から静注し，潅流固定後，光顕および電顕オートラジオグラフィを行った。また，体重1kg当たり25pmoleから500pmoleのグアニリンを静注し，消化管における作用を形態学的に検討した。この結果，静注されたグアニリンは十二指腸の陰窩の杯細胞の分泌を引き起こした。この作用はアトロピンによって完全に阻害されるので，グアニリンはコリン作動性神経を介して陰窩の杯細胞の分泌を引き起こしていることが明らかになった。

超高圧電子顕微鏡室

【概要】

医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H-1250M型）が昭和57年３月に導入されて，同年11月よりこれを用いての共同利用実験が開始された。平成７年度は共同利用実験計画が14年目に入ったこ

とになる。本研究所の超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から積極的な応募があり，平成７年度は最終的に12課題が採択され，そのうち10課題が実施された。７月には，生理研生命科学実験技術トレーニングコースの一課題として超高圧電顕操作実習を２日間行った。このほかに国際共同研究の１課題が実施されている。これらは，主に①厚い生物試料の立体観察と三次元解析②生物試料の高分解能観察③生物試料の自然状態における観察の３課題に分けることができる。これらのうち共同利用実験の成果は，超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。

本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は，共同利用実験等147日，修理調整等78日である（技術課超高圧電顕室報告参照）。電顕フィルム使用枚数は7,588枚，フィラメン点灯時間は615.6時間であった。装置は，平均88％の高い稼働率で利用されており，10^{-6}Pa 台の高い真空度のもとに，安定に運転され，多くの成果をあげている。

超高圧電顕室では，上記の共同利用実験計画を援助するとともに，これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発に当たっている。また超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開発，自然状態における観察のための基礎実験等に取り組んでいる。

高電圧で加速された電子によるイメージングプレート像の結像特性を明らかにしたので，これを用いての応用研究が期待される。また走査線本数1,024本のハーピコン撮像管を用いて，蛍光板（カメラ室下部に設置されている）に投影された超高圧電顕像を観察することによる広視野高感度高解像度観察システムを開発導入した。この結果，低い電子線照射量のもとで，より広い視野を観察しながら焦点合わせを容易に行うことが可能となった。

超高圧電顕によるフィルム像とイメージングプレート像の特性Ⅱ

有井達夫，吉村伸明

昨年の年報では，画素サイズ 25μm の電顕用イメージングプレート（Fuji: FDL UR-V; 16,384階調）[1]とこれに対する読みとり機 (Fuji: FDL 5000) の特性を超高圧電顕 H-1250M（常用加速電圧 1,000kV）を用いて測定しフィルムと比較検討した。イメージングプレートから直接得られるディジタル量は，ログアンプを介して出力されているので，変換式

$$I = \text{Const.} \times 10^{(\text{raw data})}/4096 \qquad (1)$$

を用いれば強度を求めることができ，このとき平均強度は照射電子線量に対して線形性を広範囲に保っており，電顕フィルムと良く一致していることを報告した[2]。

今回，さらに，詳細に，特性を検討した。

前回と同様に，反射電子線，およびＸ線の影響を少なくするために，プレート上の直径約

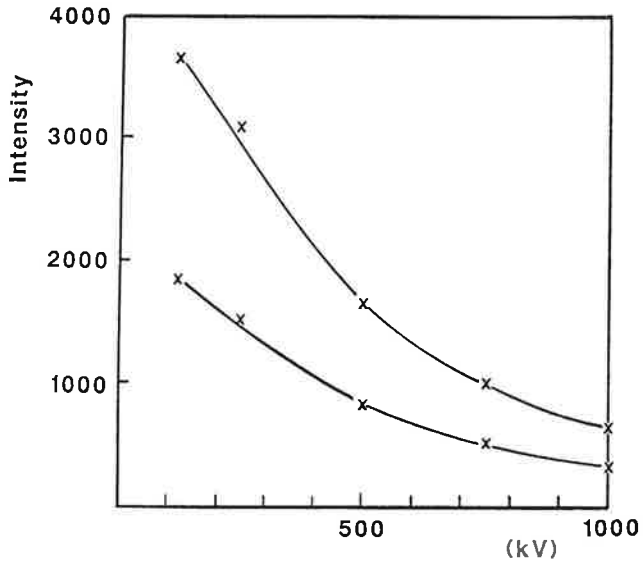


図1　同一照射量に対する平均強度の加速電圧依存性

15mm の円形領域のみに，電子線を一様照射して，このとき照射量 (8×10^{-14}C/cm^2 ～ 1×10^{-9}C/cm^2) および加速電圧 (114kV ～ 1,000kV) を変えてディジタル量を得，(1)式を用いて平均強度，標準偏差を計算した。

イメージングプレートからの強度は，加速電圧の増加とともに減少し，1,000kV での値は，114kV の値の約1/6になる（図1）。1,000kV では電子はイメージングプレートを透過している。

平均強度および標準偏差の値より電子のばらつき効果による検出量子効率 (DQE) を，求めた。電子に対する検出量子効率は，一般的には，照射量に，依存する形で表せるが，これは全てのノイズを，電子線に換算する結果となるので電子の個数が増加するときには，量子ノイズがイメージングプレート中の蛍光体の分布のばらつきなどによるノイズと同程度になる場合がある。このとき電子数のばらつきによる DQE の値を下げることになる。照射量が少ないところでは，バックグランドのばらつきがきくこともある。そこで電子に対する検出量子効率として，比較的電子の少ないところで電子線のばらつき効果のみを取り出す次式を用いる[3)]。

$$\eta' = (I_E - I_0)^2 / (N \cdot (\sigma_E^2 - \sigma_0^2))$$

N：画素あたりの平均電子数，I：平均強度，σ：標準偏差

読みとり装置からの Raw data が，対数の値で出力されているためにカットオフ効果が，効いているので，標準偏差を求める場合には，この部分を，避けて，電子線の個数の変動に対する量子検出効率を求める必要がある。電子の個数の少ないときの電子による平均強度の2乗とバックグランドノイズ分を考慮した標準偏差の2乗（バリアンス）の電子線の個数変化に対する傾きの比を画素あたりの電子の個数で割ると，電子線の変動に対する DQE を求めることができる（図2）。

イメージングプレートの 114kV での基本画素 ($25\mu m \times 25\mu m$) に対する見かけ上の DQE は最

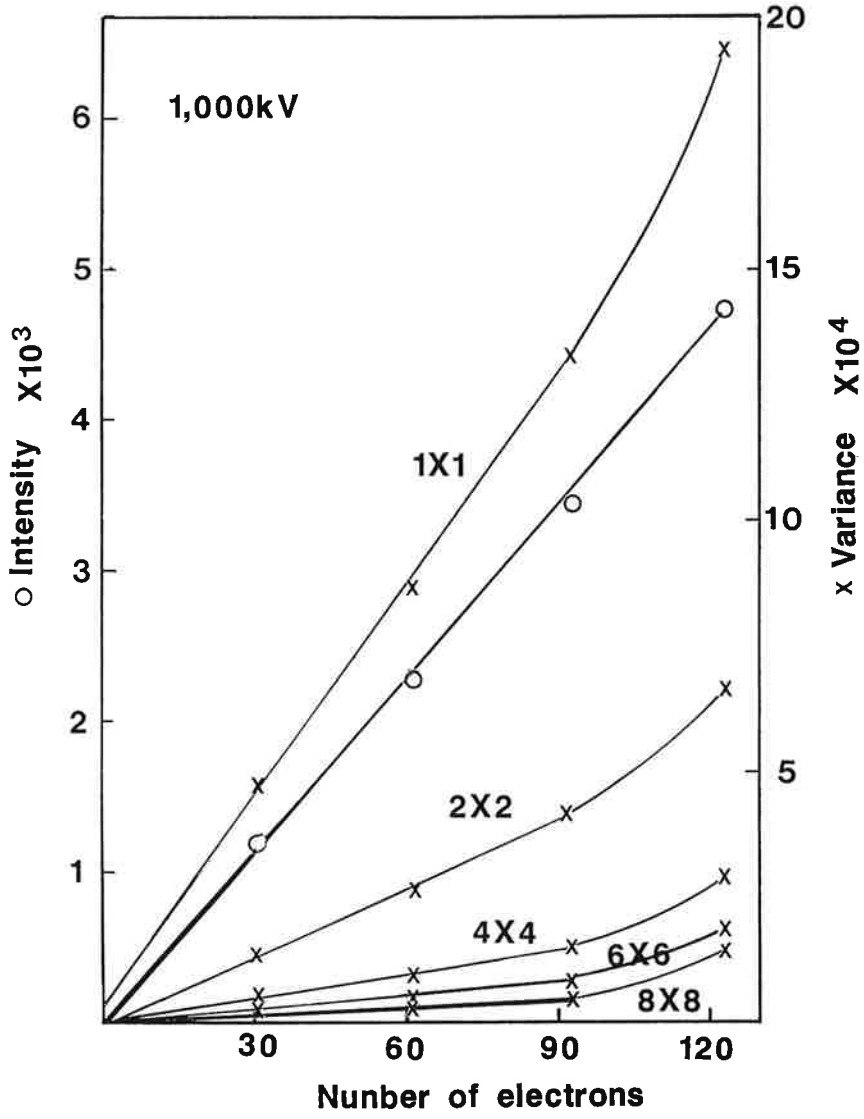


図2　平均強度と標準偏差の照射量依存性，画素サイズを変化させて同時表示(1,000kV)

高感度(S = 200)のときに，約3.5と理想値(DQE = 1)よりも高いが点像分布関数（直径10μmの対物絞りを通常のフィルム撮影位置に置き下部3cmにフィルムまたはイメージングプレートを設置して，制限視野絞りの像がフィルムおよびプレート上で約直径3mmになるような倍率で投射レンズによって発散性に電子線を照射して得られるこの絞りの影より実験的に求めた）[2]を考慮した実効的な画素サイズ8×8画素にすると1.0程度まで減少する（図3）。加速電圧1,000kVでは，基本画素で1.0程度と理想値に近いが点像分布関数の拡がりを考慮して8×8画

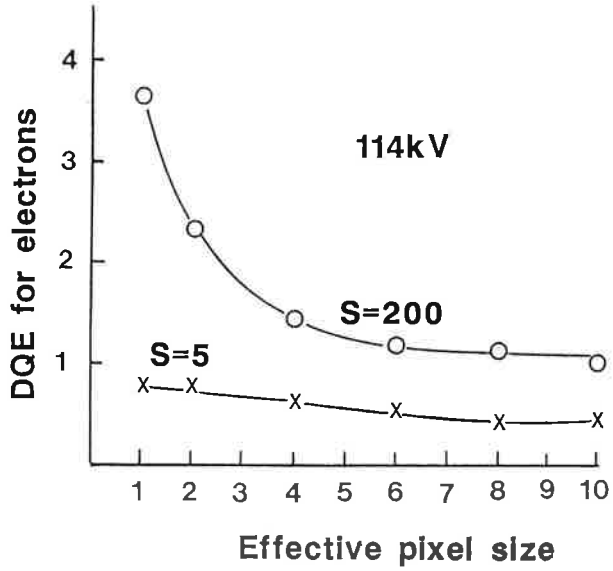


図3　電子線検出効率の画素サイズ依存性 (114kV) 最高感度 (S = 200), 最低感度 (S = 5)

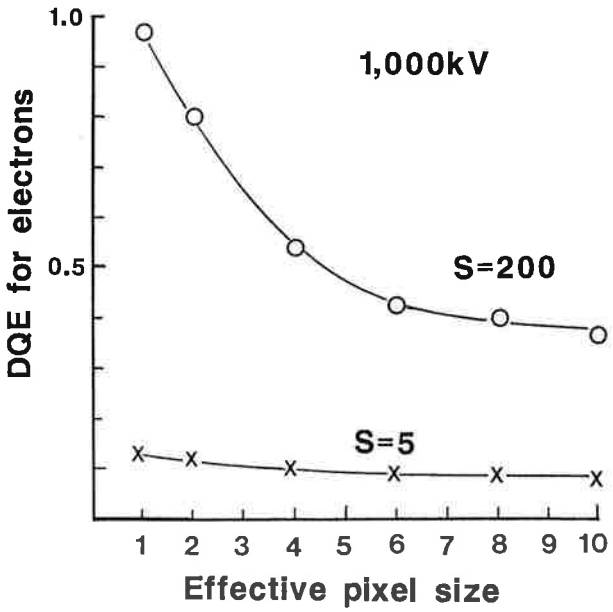


図4　電子線検出効率の画素サイズ依存性 (1000kV) 最高感度 (S = 200), 最低感度 (S = 5)

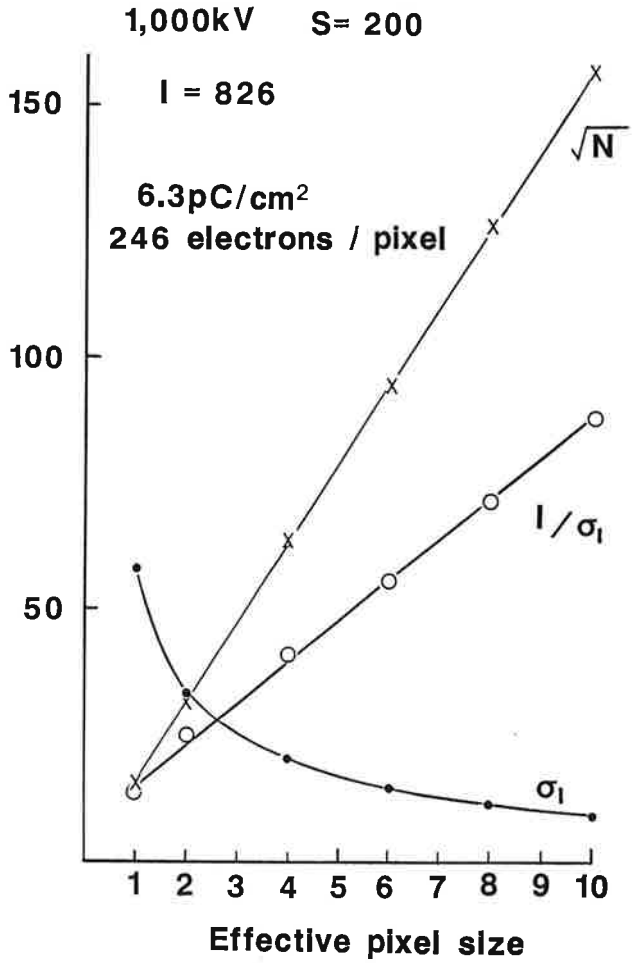


図5　加速電圧 1000kV で一様電子線照射量 6.3pC/cm^2, 最高感度 (S = 200) のときの標準偏差, 平均強度／標準偏差, √N（N：平均電子数）の画素サイズ依存性

素を１画素とすると0.4程度まで減少する（図４）。この値はフィルムの場合よりも高い。光電子増倍管の電圧を下げて最低感度 (S = 5) にすると DQE は約1/2～1/8に減少する。このときには，イメージングプレートの DQE はフィルムよりも低くなる。

点像分布関数の拡がりよりも小さい構造は，点像分布関数による効果によって，コントラストは変化している。そこで観察可能なコントラスト変動は，構造の大きさ，平均照射量，画素サイズ，感度におうじて変化するので画素サイズに応じた標準偏差／平均強度の値が，観察可能なコントラストの指標になる（例図５）。図では平均照射量が 6.3pC/cm^2 （246電子数／画素），S = 200 のときの有効画素のなかの平均電子数，平均強度／標準偏差の値を，有効画素 (N × N) のN の関数としてプロットしてある。基本画素では，検出可能なコントラスト値（標準偏差／平均強度）が，1/15程度と大きいが，画素サイズを大きくとることにより，８×８画素を１画素とする

ことで1/70程度と減少していることがわかる。画素サイズを大きくしたときに検出可能なコントラスト値が減少することは，有効画素あたりの平均電子数が増加することと乳剤の個数が増加することによっている。

X－線用の乳剤の大きさは，当初，5-10μm と，されており，最近のものでも，約 3μm 程度と考えられる。オリジナルな１画素（25μm 平方×膜厚 (110μm)）のなかには，多めに見積もっても，８×８×38＝2,432個程度しかないことになる。画素あたりの乳剤の個数のばらつきによる標準偏差を考えると2,432の平方根は，49である。しかも乳剤は，均一の大きさでも，均等にばらまかれているわけでもない。

一方，電顕フィルムの乳剤の大きさは，約 0.24μm と，一桁小さい値であり，一画素を 20μm 平方とすると，乳剤層の厚さ，約 10μm として，170/μm^2 の値が知られており，全体としては，170×20×20＝68,000個／画素である。68,000の平方根は，約260であり，イメージングプレートに比較して，十分な数があるといえる。高い電子線照射量（１画素あたり約10,000個の電子数，S ＝ 200）のときの平均強度と標準偏差の値から，イメージングプレートの乳剤の個数を概算してみると平均強度／標準偏差＝29（ヒストグラムを求めると，２種類のノイズが加え合わさっているように見える）故，測定値のばらつきを画素あたりの乳剤の個数のばらつきのみによるとして考えると29×29＝841個／画素と求めることができ，オーダーとしては，妥当である。８×８画素にすると，画素あたりの電子数および乳剤の数が増加するので平均強度／標準偏差＝123となり１％以下のコントラスト変化を検出できる。

空間分解能の低い状態では，加速電圧 1,000kV においても，最高感度 (S ＝ 200) においては，イメージングプレートは，フィルムと比較して1.2倍から倍程度感度が高いことが，市販の回折格子（1mm あたり2,160本： 463nm 間隔）からの高分散回折模様（長時間，回折模様の強度変化が少ないので利用した）からも実験的に確かめることができる。両者のデータを同等に比較できる量に変換して取り扱うことが重要である。フィルムの，光学的濃度（黒化度；O.D.）のデータは，log (O.D.) を，用いれば，イメージングプレートの raw data と比較できるようになることに注意する必要がある。

今後，より電顕用にするには，発光効率を維持しながら，乳剤のサイズを，より小さくし，膜厚を薄くし，目的に応じて，画素サイズを大きくとることも必要である。

また，強度は時間とともに減少することが知られているが，このとき全体として一定の割合で減少するので標準偏差も同様に減少し，像質には，通常，変化は生じないと考えられる。

1）N. Ogura, K. Yoshida, Y. Kojima and H. Saito: ICEM 13-Paris, 219-220 (1994).
2）T. Arii, C. Butzer, N. Yoshimura: J. Electron Microsc. 44. 258 (1995).
3）T. Arii, N. Yoshimura and Y. Kamiya: J. Electron Microsc. 42, 55-63 (1993).
4）有井達夫，吉村伸明：日本物理学会講演概要集　1995年秋の分科会　第２分冊 p543 (1995).
5）有井達夫，吉村伸明：日本物理学会講演概要集　第51回年会　第２分冊 p560 (1996).

動物実験施設

【概要】

今日の生命科学における目ざましい成果は，生化学的分析や合成技術，そしてエレクトロニクスやコンピューター等の技術に負うことは論を待たない。個体レベルから細胞レベル，分子レベルに至る巧妙に工夫された様々な動物実験が展開されている。実験科学である医学，生物学にとって，研究を進めるためには，研究の目的にかなう動物の供給と，動物実験の場は不可欠の要素であり，動物実験施設に求められる役割もここにある。設立20年を経て，生理学研究所，基礎生物学研究所ともに単に研究人口が増加したにとどまらず，研究内容にもまた大きな変革の跡が見られる。動物を用いた遺伝子操作実験は世界的規模で展開されつつあり，トランスジェニックマウスや，遺伝子ノックアウトマウス等の人工動物が生命の謎を解き明かす道具として用いられるようになった。生理学研究所においては，生理学における究極のテーマである“脳”の機能の解明に向かって大きく踏み出そうとしている。動物実験施設で実施される動物実験もこのような流れを反映して，いくつかの重要な変化が現れている。一つには，遺伝子操作によって作出された系統動物の維持や，遺伝子操作実験が必要とする飼育スペースは従来の飼育スペースの数倍に及ぶため，飼育動物の数量が飛躍的に増えてきたことである。増え続けるTg動物に対しては，受精卵凍結保存，SPF化を伴う外注による委託飼育などが考えられ，技術的な課題とともに，現実的で効果的な方策の検討が必要となった。動物実験施設では，Tg動物のSPF化とSPF環境を整備するため，SPF飼育室で飼育中のTgマウスの微生物モニタリングを実施，ティザー，センダイなど8項目について全例陰性であることを確認した。また，一般飼育室におけるマウスについての検査では，一部のコロニーに緑膿菌による汚染のあることを確認した。今後は，Tg動物やミュータントなどの系統保存が多くなると考えられるので，このような微生物モニタリングの必要性は高まってくると思われる。

飼育室の微生物学的管理と並行して動物実験施設が取り組んできたもう一つの課題は，検疫体制の強化である。学習や高次の運動機能の研究には，ニホンザル，ネコ，ラットなどがよく用いられているが，導入されるニホンザル及びネコの多くは由来・経歴ともに不明である。実験が長期にわたり人に接する機会の多いこれらの動物の検疫は，人と動物双方の健康を守るために重要である。とりわけニホンザルには肝炎や結核をはじめ人と共通の感染症が多く，慎重の上にも慎重を期すことが必要である。陸生動物室増築棟一階に新設した検疫室の整備を行うとともに，検疫項目や検疫期間中の飼育観察の充実を図っているが，人員やスタッフの限られている現状はなお十分とはいえない状況である。動物実験施設の実験室需要，なかでもサル類を用いて行う実験室需要の増加は，施設内の限られた実験スペースでは十分対応することはできず，対応に苦慮しているところであるが，当面して生理研研究棟内に設けられる実験区域の整備に対しては，これまでの施設での経験や知識を生かし，実験の安全を確保することに努めていきたい。

動物実験の環境としては，以上のようなハード的な部分とともに，実験動物福祉に配慮する動物実験指針のようなソフト的要素も重要である。動物実験施設は動物実験指針の履行の中心的役割を果たすことが期待されることはもちろん，実験動物と動物実験技術の専門的集団として，動物の入手から実験期間中の飼育管理に至るまでに存在する諸々の問題の解決に取り組んでいる。

技　術　課

南　定雄

平成７年度は前年の退職者に代わって神原叙子（公務員試験農学Ⅱ種），高橋直樹（公務員試験電気・電子Ⅱ種）が平成７年４月１日付けで技官として採用され，約１ヶ月間の新任者研修の後，分子生理研究系および生理機能研究施設へ出向した。さらに，８月１日付けで村田安永技官が宮崎大学工学部技官より転任し，生理機能研究施設へ出向した。４月１日付けの内部異動では瀬尾　道生体調節研究系技術主任が研究施設技術班技術主任を命ぜられ統合生理研究施設へ出向した。また，森　将浩技官は統合生理研究施設から生体調節研究系技術係生体システム研究部門へ出向した。一方，４月１日付けで水谷文保技官が生理機能研究施設から分子科学研究所へ転出した。水谷は出向先の超高圧電子顕微鏡室では顕微鏡の維持，画像解析に従事し，生体情報研究系では実験への計算機応用を試み，電子計算機室へ出向後は，所内ネット・ワークの普及に尽力して現在運用中のシステムを確立させた。

技官業務の約90％は出向先である研究部門・施設での技術支援であるが，技術課共通の時間には，サプライショップ（消耗品800点），純水製造装置等，共通設備の管理や各種の委員会活動を行って研究環境の維持や課の円滑な運営を図っている。

技術課研修は，９月に所外研修として岡崎市農業バイオセンターおよびヤマハ株式会社（浜松市内）の好意により実施した。動物管理や研究への支障を少なくするため２班に分け実施日を２回とした。11月には技術課内報告会を行い，全技官が出向先の業務内容ならびに技術支援上の開発，工夫，改良，経験を発表し，出向先の業務の理解を深めると共に技術交流や協力関係の充実を図った。

技官の個人的な研修では，東海地区国立学校等教室系技術職員合同研修の電子・電気（実施：名古屋大学），情報処理（名古屋工業大学）コースへ３名が参加した。豊橋技術科学大学の公開講座（コンピュータネットワークの基礎と応用　夜間計８回）には新任者を含め５名が参加した。この講座は生理研が進めているネットワークの整備と時期的に一致し実践的な研修となった。海外技術研修では顕微画像処理技術の導入のため１名がカリフォルニア大学サンディエゴ校へ出張した。また，業務に直接必要なクレーンや玉掛けの受講にも数名が参加した。その他講演依頼，各種セミナー，機器操作説明等の発表・研修に十数名が参加した。技術課からの支援はないが自主的に危険物取扱い，実験動物技術師等の資格認定を取得したものが数件あった。これらの各種研修は個人の技術向上のみならず課の技術水準の向上にも有益であり事情が許すかぎり参加を奨励している。

自主研鑽の一環として技術課内部でプロジェクト活動を行っている。班の構成員は出向部門や技官の専門とは直接関係なく，技官各人の個人目標書（課内資料）をもとに募っている。７年度

は，前年度からの継続を含め，簡易NCフライス盤開発（チーフ：山口），疾患モデル動物病因検索（小木曽），生理学技術に関する基礎学習班（阿部），脳空間表示検討班（大庭），NMRプローブ開発（大河原），回路解析（小原）の6課題を設定した。当活動は関連技術の習得，技術的視野の拡大，専門技術の向上等を目指すもので課の技術水準の向上ならびに相互協力，協調など技術支援態勢の充実にも大きく寄与している。

生理研の技官の主な業務は技術支援であり，研究業務ではないが技術の向上，知識の蓄積，研究支援に必要な研究活動も行っている。そのために技官向けの補助金として，文部省科学研究費（奨励研究B）を申請している。平成7年度は「系統維持中に出現したてんかん様発作を起こすラットの病態検索」（小木曽　昇技官）および「NMR用二核種測定プローブの性能向上」（大河原　浩技官）が採択された。

生理学技術研究会（第18回）は1996年2月に生理学研究所において開催し，国内の28生理科学研究機関から関係技術者100名の参加を得た。口演やパネル発表に続いて2日目は研修講演と実習に当て，インターネット，手術ナビゲーション，マウス胚の凍結保存，共焦点顕微鏡の応用，遺伝子工学，画像処理技術に関して専門の教官ならびに技術者から参加者全員が講義や実習の指導を受けた。これらは技術支援に必要な理論や新技術の動向を知るきわめて重要かつ有意義な研修であった。第18回生理学技術研究会についての詳細は「生理学技術研究会報告第18号」にまとめられている。

なお，技術課の各種活動に係る経費は研究部門・施設からの好意ならびに一部は亘　弘生理学研究所名誉教授よりの技術課活動基金からの寄付によった。謝意を表すとともに今後とも技術課活動への理解とご協力をお願いしたい。



第18回生理学技術研究会（1996．2．15～16）

研究系技術班

大庭明生

研究系技術班は，４研究系，13部門（専任部門：８部門，客員部門：５部門）からなり，21名の技官から構成される。６年度に研究テーマの終了した専任部門が２部門あり，所属技官は研究室と研究機器の整理に当たった。７年度は３専任部門に新任研究者の着任があり，所属技官による研究室の改築と実験機器等の整備が行われた。８年度には客員部門の２部門に新任研究者の着任が予定されており，それにより全研究系部門の研究体制が整う。

研究所の研究者も従来の医学系研究者から理学系，工学系の研究者の着任が増しており，現場では技術支援の内容の再考を迫られている。特に分子生物学的技術（遺伝子工学，抗体作製，免疫組織化学，培養技術等）とコンピュータサイエンス（画像処理，データ通信，電気回路，設計工作技術等）を２大潮流として変貌しつつあり，技術支援内容から技官を生物系，工学系にまとめ直し，部門を越えた技官構築を迫っている。また，新たな分野への移行のために，研究所としての研修システムの構築が必要である。

研究施設技術班

生理学研究所に所属する次の４研究施設には，技術課から技官が出向し，各施設で設備の運転および維持管理，利用者への技術支援，利用技術の開発等を行っている。

１．統合生理研究施設　生理学研究所直属の施設で高次脳機能，感覚・運動機能，自律機能の各研究プロジェクトからなっている。

２．生理機能研究施設　生理学研究所に直属した施設で，生体機能検査室，組織培養標本室，超高圧電子顕微鏡室，電子計算機室，磁気共鳴装置室からなっている。

３．動物実験施設　省令による生理学研究所と基礎生物学研究所の共通施設として運営されている。陸生動物室および水生動物室からなっており，陸生，水生動物の搬入，実験動物の飼育管理のほか各室設備，機器の維持管理等を行っている。

４．共通施設　生理学研究所および基礎生物学研究所の共通施設として運営されている。これらは電子顕微鏡室，機器研究試作室，低温・冷凍実験室である。

1．統合生理研究施設

(1) 生体磁気計測室

永田　治，竹島康行

本年度における装置の保守上の問題としては，上下各センサにおいてLHeのブローアップが各一件発生している。これはセンサ傾斜のフロー増加によるパッキングの過冷却が原因と見られるが，復旧までに予冷等の作業が必要なため1週間以上を要し温度変化による素子破壊の原因にもなりかねないため，計測中以外のセンサ状態においては適宜通常状態に維持する注意を要する。

また，前年度より検討されていたネットワーク環境は以下のように改善された。

生体磁気計測装置(SQUID)は，データサンプリング条件にもよるが1実験において60MByte前後のデータを収集し，一日の実験では通常300MByte程度のデータ量が発生する。また，同時に画面のXダンプ等の画像情報を採取した場合はさらに100MByte程度のデータが見込まれる。従来これらのデータはすべてが施設内ローカルエリアネットワークの基幹であるイーサネット(10base2)によってディスクサーバに転送され解析保存されていた。したがってこのネットワークライン上に生データ及び画像データを始めとする膨大なデータが流れることとなる。

通常イーサネット上では30％を越えると過負荷であるといわれているが，ネットワークアナライザによる解析の結果当施設においては実に平均70％以上という高負荷状態であることが判明した。これは計測中に順次ディスクサーバに転送されるデータと他サーバにおける解析データがほぼ同時にネットワーク上を占有することがあるためで，それによるコリジョンも確認されている。

これらネットワークの過負荷によるコリジョンの発生がそのままデータパケット喪失につながるものではないが，再送による時間的ロスとネットワーク自体の信頼性という観点からは早急な対応が望まれていた。

以上のような状況を改善するため基本的な打開策として，トポロジの変更及び基幹であるネットワークを同軸ケーブルからツイストペアであるCDDIに変更することで，転送速度を10Mbpsから100Mbpsに引き上げバンド幅を拡大することで，将来的なデータの増加に対してもある程度対応できる環境の構築をおこなった。

当初FDDIを導入することも検討されたが，媒体に光ファイバケーブルを使用するため維持管理が複雑になることと伝送媒体自体の機械的強度の問題を考慮し，category5のツイストペアケーブルを使用するCDDIを選択した。

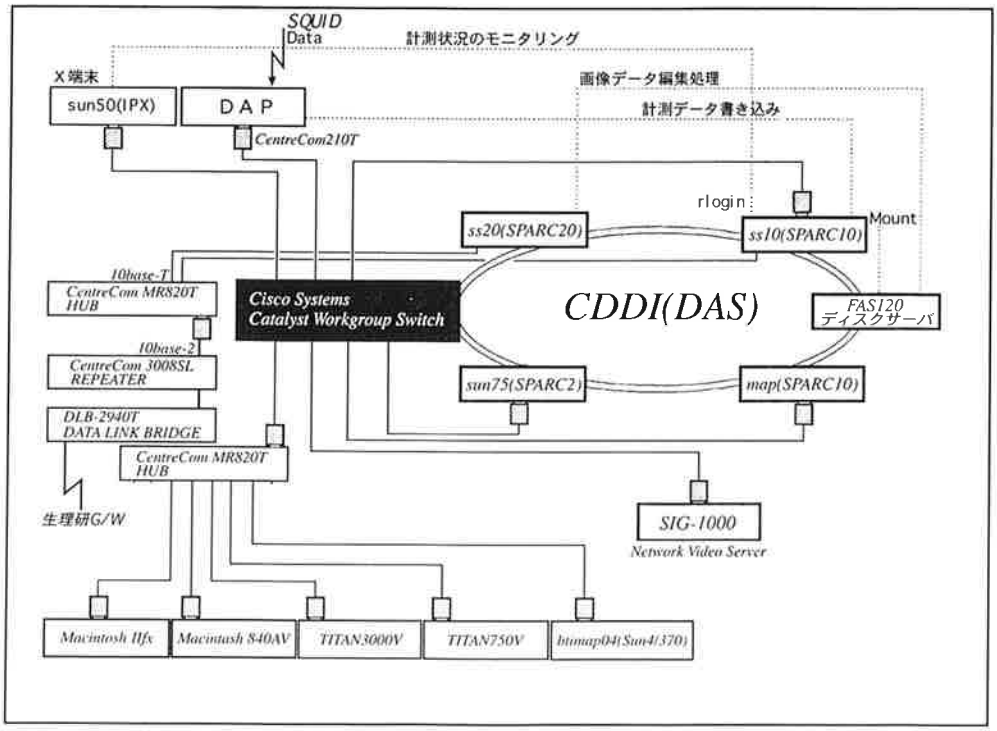
当施設に導入したCDDIは基本的にDASと呼ばれる二重ループを構成するトポロジであるため部分的な断線等の障害に対する信頼性は高く，同時に二回線に障害がでなければ通常の運用が可能である。また，バックボーンである生理研基幹へは従来通り10base2によりリピータを介して接続されておりゲートウェイを介してデータ転送は可能である。

ただし，SQUIDの前段処理装置であるDAPは，従来の10baseによるものでなければコントロールできない制約があるため一部に10baseTによる構成を残してはいるが，ディスクサーバ

とその他解析装置はすべてCDDIのインターフィスによって接続されている。そのため，生理研基幹に接続されているゲートウェイは2枚の10baseとCDDIカードを搭載することとなり拡張性を犠牲にする結果となったがゲートウェイマシンにおいて現状以上の周辺装置は当面必要で無いと思われるので問題はない。

以下に統合生理研究施設のうち地階の生体磁気計測装置室周辺のネットワーク構成を示す。

統合生理研究施設ローカルエリアネットワーク構成



2．生理機能研究施設

(1) 超高圧電子顕微鏡室

吉村伸明

今年度における共同利用実験は合計12課題が採択され，その内10課題が実施された。これらの共同利用実験の成果は，超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。

超高圧電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので以下にこれを示す。稼働率は，利用日数と使用可能日数より求めている。

1995年度　超高圧電顕月別稼働率

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
1995年 4月	30	10	5	15	12	0	12	80%	修理１日
5月	31	11	6	14	9	2	11	79%	修理１日
6月	30	8	6	16	11	2	13	81%	
7月	31	10	6	15	5	3	8	53%	修理１日
8月	31	8	6	17	7	2	9	53%	
9月	30	10	12	8	7	0	7	88%	改造５日
10月	31	10	5	16	6	5	11	69%	
11月	30	10	6	14	4	9	13	93%	
12月	31	11	5	15	3	12	15	100%	
1996年 1月	31	12	8	11	3	6	9	82%	改造２日
2月	29	9	9	11	4	9	13	118%	改造６日
3月	31	11	4	16	5	21	26	163%	
計	366	120	78	168	76	71	147	88%	

フィラメント点灯時間　　615.6時間

使用フィルム枚数　　7,588枚

(2) 電子計算機室

伊藤昭光，高橋直樹，村田安永

今年度は，中央コンピュータシステム（生体情報解析システム），所内LAN，パソコン利用環境等の整備を前年度と同様に作業を進めた。また今年度は，岡崎国立共同研究機構として超高速

ATM ネットワークシステム（以下 ATM という）の導入が進められ，現在稼働中の LAN (FDDI)（以下 FDDI という）と新しい ATM が並立することとなる。

生理学研究所における中央コンピュータの利用形態は，情報サービス（E-mail, news, gopher 等），ファイルサービス（FTP, NFS 等），高性能共通機器サービス（ワークステーション，高画質フルカラープリンタ等），プログラム開発及びメディア変換などに分類することができる。また，これらの利用形態を円滑に運用していくためには，所内 LAN (NIPS) の管理，整備も重要になってきている。この様な現状をふまえたうえで，中央システム「生体情報解析システム」の整備を進めている。

現在，中央システムの運用形態は，システムの移行期であるために，旧システムと新システムが混在している。年度の始めにおいて，古いコンピュータが故障するなど，サービスに支障をきたし始めたため，動作の安定しているコンピュータへサービスの移行を進めているが，一部で旧式コンピュータや特殊な通信ソフトウェア等を使用しているため，完全に新しいシステムへ移行することができない問題が生じている。この問題を解決するためには，現行のサービスの見直しや研究所内の各研究部門が所有するコンピュータを把握する必要があるため，各研究部門の所有するコンピュータの現状調査を進めている。

今回，ATM の導入を進めているが，既に運用に入っている FDDI があるため，ATM の安定稼働が確認できるまでは平行運用することにしている。ATM と FDDI では，接続形態や運用形態などが異なるため，生理研 LAN (NIPS) 全体の運用方針を見直す必要性も考えられるが，当面の間，研究部門の協力を得ながら各種テストを繰り返し，生理研にあった LAN の形態を見いだしていきたい。

ATM の導入や旧システムから新システムへの完全移行など，最近では電子計算機室だけでなく研究部門等の協力を必要とする場合が多い。新しいサービス（WWW 等）の検討も進められているが，生理研内には多種多様なコンピュータが200台近くも LAN に接続されており，全てのコンピュータに各種サービスを同様に行うことは困難になってきている。しかし今後とも，サービスの見直しや新しいコンピュータへの移行等は必要となるため，電子計算機室でもいろいろな方策（講習，各種手引き書，運用見直し等）を検討しているが，コンピュータを利用する各人の協力もお願いしたい。

(3) 磁気共鳴装置室

市川　修

平成７年度における磁気共鳴装置室共同利用実験は，14の研究テーマが採択された。これらの実験成果については，磁気共鳴装置共同利用実験報告の章に詳述されている。

平成７年度　磁気共鳴装置月別稼働率

年　月	総日数	保　守	使用可能日　数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備　考
1995年　4	30	0	30	0	6	6	20	
5	31	0	31	0	6	6	19	
6	30	0	30	0	21	21	70	
7	31	1	30	2	5	7	23	保守
8	31	0	31	0	12	12	39	
9	30	2	28	0	10	10	36	停電ほか
10	31	3	28	0	8	8	29	停電ほか
11	30	0	30	0	10	10	33	
12	31	1	30	0	6	6	20	保守
1996年　1	31	14	17	1	1	2	12	定期保守
2	28	0	28	2	12	14	50	
3	31	2	29	0	10	10	34	保守
計	365	23	342	5	107	112	33	

＊保守以外の日祝祭日は，使用可能日数に含めた。

3．動物実験施設

佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛

【陸生動物室】

本年度の陸生動物室の飼育室利用は，生理研14部門，基生研13部門，計27研究部門であった。飼育室の利用件数は月平均62件（延べ739件）で前年度比1.1％の増加となった。搬入動物数は，

昨年同様トランスジェニックマウス等の輸入動物を含めて11種，延べ6,103匹で，前年度より27.9％減少となったが，長期飼育動物の増大によると思われる。動物種別搬入数では，ウサギ，モルモット，ネコなどの増加が見られたのに対し，材料採取で大量使用していたマウスやラットが減少した。しかし，のべ飼育数による動物種別では，TG マウスの系統維持なども含めたマウス飼育数は前年度の23.9％をはじめとして，モルモットやネコで増加した。

最近ではミュータント動物やトランスジェニック動物を含めて，国内外の搬出入が増加し，16件（搬出７件，搬入９件）にも及んだ。施設では，海外への TG 動物の輸出入のための手続き方法の確立につとめ，動物輸送が円滑に行うことができるようになった。

動物実験施設の新館が稼働して２年目を迎え，本館とともに飼育室の利用は順調に増えた。マウスやウサギは，抗体作製を目的とした利用が依然として増加傾向にあり，飼育期間も長期化している。それに加えて，特にトランスジェニックマウス飼育室利用が３部門増えたことから飼育室の飽和度が高くなっており，今後の利用者の実験計画に基づいた飼育室の使用計画の策定が課題となっている。また，所外に動物を搬出する際，SPF 動物である事の証明を要求する施設があり，利用者の要望もあったことから，７月より本館地階の SPF 室を稼働した。この SPF 室について微生物モニタリングを行った結果，これまでのところ特定病原体(SP)による汚染は認められなかった。

飼育中の動物に関するトラブルとしては，床敷網に趾を挟んで腰椎脱臼したものがウサギで３例認められたほか，導入前の感染や輸送ストレス，飼育環境変化によると思われる死亡例がネコで，食欲不振や下痢の症状を示すものがネコ，サルでそれぞれ数例認められた。搬入後数日で死亡したものはネコで７例，サルで１例であった。

この他，ウサギを用いた抗体作製実験における失宣で衰弱または死亡する例が散見された。手技失宣としては，麻酔薬投与量のミス，過剰量の採血の他，実験前後の保定ミスによる腰椎脱臼等が目立った。

検疫は，ネコ102件（昨年度比232％増），サル16件（57％減）について行った。ネコについては，搬入時に蚤やダニ等が寄生した個体が見られた。搬入直後に抗生物質の投与，妊娠や感染症動物の隔離等の飼育方法を改良した結果，死亡率はわずかに減少したが，飼育環境の違いによるストレス等の影響で衰弱したり死亡するものも相変わらず見られた。サルは捕獲ニホンザル由来のものが多いため，例年同様体重のばらつきや，外傷のあるもの等，実験動物としての適性に問題のあるものが見られた。

実験室の利用は，イヌの実験による長期使用の他に，ウサギの抗体作製のための抗原投与や部分採血，全採血等を目的とする手術室や解剖室の利用が増加した。

設備・機器関係では，経年劣化により SPF 室空調機器が制御不能になったことから，温湿度制御器及びセンサーをエアー制御方式から電気式に改修した。飼育設備についても高圧蒸気滅菌（オートクレーブ）やケージ洗浄機の蒸気漏れの他に，腐食による流水ユニットの漏水，電磁弁動作不良，超音波洗浄機の電気回路の故障の他，マウスのケージ蓋やラットブラケットケージ，

ウサギ固定器，ウサギやイヌケージの床敷等の溶接外れが相次いで起こり修理を行った。また今年度末にATMネットの工事が行われ，各実験室，飼育室にデータ通信用コンセントが設置された。

【水生動物室】

平成7年度の水生動物室利用状況は，生理研・基生研両研究所あわせて8部門・施設，55件の利用があった。加熱冷却ユニットの動作不良が9件あり，5件を施設で4件を業者に依頼して修理した。今後は加熱冷却ユニットの老朽化に対応する為に予算要求等の必要がある。またフロン対策も考慮にいれた熱源集中発生管理の温度コントロール方式への改修を希望している。

昨年度，一昨年度ともに2件発生した水槽の亀裂がさらに4件発生した。1件は，補修不能なほどの大きな亀裂であったために，新規に製作を依頼した。他3件は，当て板をしての補修を行った。1t水槽の架台の改装と合わせて，水槽の更新計画も必要に迫られている。

水生動物室では，飼育用の淡水と海水を地下タンクに備蓄し揚水ポンプにより一端2Fへ汲み上げた後に，室内の流し台や水槽付近の給水バルブへ配管している。この給水システム中の淡水塩素除去フィルターのコントローラの動作不良が発生し，水道水の垂れ流しがあった。また，2Fタンクのフロートスイッチの動作不良が発生したため，交換を行った。

設備全体的に老朽化が進んでいるが，全面改装は予算的に無理があるため，故障箇所を逐次改修している。

【伊根実験室】

平成7年度の利用は，ヤリイカを用いた神経生理学実験を中心に，のべ145日，15名の利用があった。実験セットが増加し実験スペースが不足したため第2水槽室を改修し実験スペースとして利用可能にした。また，海水揚水ポンプの動作不良が発生したため修理を行った。

室利用状況（平成7年度）

室名＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
手術室	5	5	6	7	6	6	2	11	5	3	10	2	68
生理実験室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
生化学実験室	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
測定室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
手術実験室	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
解剖室	2	2	2	2	0	4	3	2	0	0	2	0	19
レントゲン室	4	4	2	4	3	6	4	4	0	5	1	0	37
標本室	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
計	13	13	13	15	11	19	11	20	7	10	15	4	151

＊は長期使用も含む

陸生動物　部門別・動物種別搬入動物数（平成７年度）

部門＼動物種	ラット	マウス	TGマウス	SPFマウス	ウサギ	モルモット	ネコ	サル	イヌ	ヒヨコ	ウズラ	合計
神経化学	238	55	3	0	5	0	0	0	0	0	0	301
超微小形態生理	148	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	162
細胞内代謝	115	99	0	0	8	0	0	0	0	0	0	222
生体膜	20	52	0	0	0	22	0	0	0	0	0	94
機能協関	126	0	0	0	0	423	0	0	0	0	0	549
能動輸送	417	10	0	0	2	0	0	0	0	0	0	429
神経情報	0	482	3	0	1	0	0	0	0	0	0	486
高次神経機構	2	698	3	1,619	2	0	0	0	0	0	0	2,324
高次神経性調節	2	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	9
生体システム	105	0	0	0	0	0	90	7	0	0	0	202
高次液性調節	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
組織培養標本室	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16
動物実験施設	39	0	0	0	13	254	0	0	2	0	0	308
生理研技術課	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
細胞機構	0	1	0	0	10	0	0	0	0	0	0	11
細胞増殖	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
細胞情報	0	8	0	0	10	0	0	0	0	0	0	18
細胞融合	2	70	41	0	2	0	0	0	0	0	0	115
生殖	0	41	0	0	15	0	0	0	0	0	0	56
細胞分化	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
形態形成	0	47	0	0	95	0	12	0	0	19	7	180
感覚情報処理	34	194	0	0	4	0	0	0	0	0	0	232
情報制御	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4
行動制御	13	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	19
種分化第一	176	97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	273
細胞器官培養室	0	61	3	0	5	0	0	0	0	0	0	69
RI実験施設	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5
合計	1,453	1,930	53	1,619	189	713	102	16	2	19	7	6,103

陸生動物　月別・動物種別搬入動物数（平成７年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ラット	170	176	149	110	104	135	59	82	70	107	161	130	1,453
マウス	275	60	160	125	96	201	182	254	219	179	88	91	1,930
TGマウス	0	0	3	0	0	11	2	0	3	33	1	0	53
SPFマウス	0	0	0	78	148	174	219	183	204	217	205	191	1,619
ウサギ	4	5	22	12	12	28	22	13	27	11	18	15	189
モルモット	45	66	57	60	79	44	74	76	43	52	53	64	713
ネコ	9	14	10	9	0	8	9	10	3	12	8	10	102
サル	6	0	0	1	0	0	4	3	0	0	0	2	16
イヌ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
ヒヨコ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	19
ウズラ	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7
月合計	509	321	401	395	439	601	578	621	569	613	553	503	6,103

水生動物　月別・動物種別搬入動物数（平成７年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ワキン	0	600	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	640
メダカ	0	1,000	0	0	1,000	0	0	0	0	0	1,000	0	3,000
コイ	0	0	10	10	3	0	0	0	0	0	0	0	23
イモリ	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,000
ゼノパス	0	10	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	50
ホタテ	25	0	10	0	10	21	0	0	0	0	0	0	66
タコ	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
クルマエビ	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6
ヒトデ	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	50
イカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	24
ニジマス	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	0	35
月合計	1,032	1,610	60	10	1,013	71	46	0	0	24	1,035	0	4,901

4．共通施設

(1)　電子顕微鏡室

前橋　寛

(A)　電子顕微鏡室の状況

今年度は，顕微画像処理装置の充実を図る為，連続切片からの立体再構築および３次元計測を行う顕微鏡３次元画像処理装置を設置した。この装置では，顕微鏡（オリンパス，BX-50）からのテレビ画像入力やタブレットからのペン入力，イメージカラースキャナーからの入力ができる。また，３次元画像処理ソフト（ライズエスアイ，OZ for Windows）は Windows Ver3.1 上で動く為，汎用のソフトウェアを用いて出力画像が加工できる。

さらに，経年劣化により性能低下した 200kV 電子顕微鏡（日本電子，JEM-200CX）２台を整理した。また，液性情報部門より，利用が多い汎用型 120kV 電子顕微鏡（日本電子，JEM-1200EX）の移管を受けて，利用者の便宜を図った。

(B)　研究内容一覧表

本年度，室を利用してなされた研究の総件数は32件であった。機構内では20件あり，機構外は，国内で９件，国外ではハンガリー，ブルガリア，フランスの研究者による利用が３件あった。下記の表はその研究部門・施設，大学，研究所と研究内容の一覧表である。

利用内容一覧表（1－1）

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	神経情報	・移植オリゴデンドロサイトのミエリン形成の同定 ・carbocyanin 蛍光色素 DiI で標識したマウス胎児脳組織標本の観察 ・神経細胞の発生・分化の解析
	神経化学	・ラット海馬の観察 ・培養細胞の免疫染色の観察
	機能協関	・分泌刺激に応じた上皮細胞膜の形態変化の観察 ・運動伸縮筋シナプス結合形成における順向性栄養因子の役割
	細胞内代謝	・分泌細胞の形態観察
	組織培養標本室	・小腸絨毛上皮細胞下繊維芽細胞の免疫組織学的研究
	技術課	・てんかんラット脳の微細構造観察

利用内容一覧表（1－2）

研究所	部門・施設	研究内容
基生研	形態形成	・動物細胞の分化形態の観察
	生殖	・魚類の生殖細胞の発生
	細胞分化	・カイコ及びショウジョウバエを用いた抗体染色標本の観察
	細胞機構	・高等植物におけるオルガネラの機能変換の形態および免疫組織学的観察 ・植物細胞内タンパク局在の観察
	大型スペクトログラフ	・鞭毛藻の光感覚色素の細胞内局在の観察
	細胞器官培養室	・マウス Notch1 タンパク質分布の免疫組織化学的解析 ・単細胞藻類の観察
分子研	機器センター	・金属微粒子の観察 ・ナノメートルサイズを有する物質の結晶学的観察

利用内容一覧表(2)

所外（国内）

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
北海道大学	清水洋平	卵成熟過程での紡錘系の形成及び減数分裂精子形成過程での紡錘系形成の観察
東京大学	雨宮昭南	ウニ胚の観察
東京学芸大学	古川隆博	中心目珪藻の葉緑体の細胞内配置の観察
東邦大学	大塚輝彌	網膜における色情報変換の神経回路の解析
鶴見大学	尾口仁志	ハイドロキシアパタイトと骨の Interface の観察
東海大学	大城香	ラン藻及びシアノファージの微細構造の観察
名古屋大学	家田秀明	消化管ホルモンの免疫組織学的研究
名城大学	新居直祐	葉緑体の観察
九州大学	松山倫也	魚類のセルトリ細胞の構造解析

所外（国外）

国名，大学，研究所	研究者名	研究内容
ハンガリー バイオロジカルリサーチセンター	Mustardy, L.	免疫電顕法を用いた脂質生合成系の局在の研究
ブルガリア ブルガリア科学アカデミー	Tsvetkova, N.	ホウレンソウとシロイヌナズナの葉緑体膜の構造と解析
フランス ピエール・マリーキュリー大学	S. Tuji	大腸の神経支配に関する研究

(C) 技術研修

○コンピュータによる走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像の立体表示の試み

前年度導入した SEM 画像取り込み装置（電子光学研究所，EMPire2000）によって SEM 画像のコンピュータへの取り込みが容易になった。そこで，試料台を約５度づつ傾斜することにより７画面を取り込んで回転表示を試みた。試料はタンポポの花粉である。軸がずれるため，フリーソフトの NIHImage を用い簡単なマクロを作成し軸合わせを行った。表示にも，NIHImage のアニメーション機能を用いた。図１にその一部のステレオペアを示す。

正確に立体情報を得るためにはこのように立体視が必要である。もともと１枚の SEM 画像は立体的に見えるが，これは電子線の角度に応じて２次電子の発生量が違うためであり凸になっているか凹になっているかはその濃淡だけでは分からない。そこで図１のように立体視を行うが，立体視をするには多少の経験が必要である。また専用のビュアー藻あるがうまく設定しなければならない。そこで，コンピュータを用いて回転表示を試みた。容易に立体的に観察できるようになった。

機器研究試作室利用人数表

月	生理研（人）	基生研（人）	その他（人）	合　　計	延べ時間（h）
4	35	12		47	73
5	53	8		61	72
6	41	8		49	73
7	47	2		49	93
8	41	7	1	49	89
9	32	9	2	43	60
10	33	6	2	41	74
11	25	11		36	52
12	40	2	1	43	74
1	58	4		62	113
2	36	7		43	68
3	33	20	1	54	89
合計	474	96	7	577	937

機器研究試作室部門別利用状況

高次神経性調節	119	生体システム	79	超微小形態生理	61
統合生理研究施設	49	動物実験施設	35	液性情報	32
細胞内代謝	23	超高圧電顕室	18	生体膜	13
機能協関	10	情報記憶	8	技術課	7
電子顕微鏡室	6	神経情報	5	神経化学	5
磁気共鳴装置室	3	所長研究室	1		
大型スペクトロ	16	種分化機構第一	14	RI 実験施設	13
発生生物学	11	電子計算機室	7	エネルギー変換	6
情報制御	6	生殖	5	技術課	4
計時機構	3	細胞融合	3	人工気象室	3
感覚情報処理	1	分析室	1	洗浄室	1
形態形成	1	細胞分化	1		
分子研その他	7				

(3)　低温・冷凍実験室

低温環境を必要とする実験および各種臓器の摘出，タンパク質やペプチド等生理活性物質の抽出，分離，精製等一連の操作に使用するほか，変質しやすい実験材料，試料，試薬等の長期保存等に多く使用されている。

【研　究　発　表】

a．発表論文

b．学会発表

a．発表論文

〔目　　次〕

神経化学研究部門 …… 118
超微小形態生理研究部門 …… 119
細胞内代謝研究部門 …… 120
生体膜研究部門 …… 121
機能協関研究部門 …… 122
能動輸送研究部門 …… 124
神経情報研究部門 …… 128
液性情報研究部門 …… 129
高次神経機構研究部門 …… 131
情報記憶研究部門 …… 132
高次神経性調節研究部門 …… 132
生体システム研究部門 …… 133
感覚・運動機能研究プロジェクト …… 136
高次脳機能研究プロジェクト …… 139
自律機能研究プロジェクト …… 140
組織培養標本室 …… 141
超高圧電子顕微鏡室 …… 141
超高圧電子顕微鏡共同利用実験 …… 142
動物実験施設 …… 143
江橋研究室 …… 144

発　表　論　文

《神経化学研究部門》

1. Miyazawa T, Sato K & Obata K (1995) A synaptic vesicle-associated protein (SVP-38) as an early indicator of delayed neuronal death. J Cerebral Blood Flow and Metabolism 15: 462-466

2. Ishimaru M, Hashimoto T, Obata K & Fukamauchi F (1995) Methamphetamine-induced dopaminergic hyperactivity is not accompanied with increase in tyrosine hydroxylase mRNA of the rat midbrain. Neurosci Lett 191: 107-110

3. Maruyama K, Tagawa K, Kawamura Y, Asada H, Ishiura S & Obata K (1995) Secretion of Alzheimer β/A4 protein (1-40) and intracellular retention of β/A4 protein (1-42) in transfected COS cells. Biochem Biophys Res Commun 207: 971-977

4. Saito Y, Maruyama K, Saido TC & Kawashima S (1995) N23K, a gene transiently up-regulated during neural differentiation, encodes a precursor protein for a newly identified neuropeptide nociceptin. Biochem Biophys Res Commun 217: 539-545

5. Yamagata Y, Obata K, Greengard P & Czernik AJ (1995) Increase in synapsin I phosphorylation implicates a presynaptic component in septal kindling. Neuroscience 64: 1-4

6. Asada H, Ip NY, Pan L, Razack N, Parfitt MM & Plunkett RJ (1995) Time course of ciliary neurotrophic factor mRNA expression is coincident with the presence of protoplasmic astrocytes in traumatized rat striatum. J Neurosci Res 40: 22-30

7. Langan TJ, Plunkett RJ, Asada H, Kelly K & Kaseloo P (1995) Long-term production of neurotrophic factors by astrocyte cultures from hemiparkinsonian rat brain. Glia 14: 174-184

8. Suzuki E, Kojima N, Yoshimura K, Uyemura K, Obata K & Akagawa K (1995) Cloning and sequence analysis of cDNA for a possible DNA-binding protein 5E5 in the nervous system. J Biochem 118: 122-128

9. Kawamura Y, Kume H, Itoh Y, Ohtsuka S, Kimura S & Maruyama K (1995) Localization of three fragments of connectin in chicken breast muscle sarcomeres. J Biochem 117: 201-207

10. Baum L, Seger R, Woodgett JR, Kawabata S, Maruyama K, Koyama M, Silver J & Saitoh T (1995) Overexpressed tau protein in cultured cells is phosphorylated without formation of PHF: implication of phosphoprotein phosphatase involvement. Mol Brain Res 34: 1-17

11. Ikeda K, Shirao T, Toda M, Asada H, Toya S & Uyemura K (1995) Effect of a neuron-specific actin-binding protein, drebrin A, on cell-substratum adhesion. Neurosci Lett 194: 197-200

12. 小幡邦彦 (1995) カイニン酸によるけいれん，神経細胞死と可塑的変化　日本生理学雑誌57増刊号：239-244

13. 小幡邦彦 (1995) 脳はなぜ脳になったのか。化学 50: 12-13

14. 淺田英穂，小幡邦彦，Plunkett RJ (1995) 外傷ラット線条体における反応性アストロサイトと毛様体神経栄養因子 (CNTF) mRNA の変化。Neurosciences 21: 83-86

15. 松山眞千，淺田英穂，並木　淳，河瀬　斌，戸谷重雄 (1995) 側頭部悪性線維性組織球腫の1例　脳神経外科ジャーナル 4: 400-403

《超微小形態生理研究部門》

1. Ishikawa T, Murakami M (1995) Tetraethylammonium-insensitive, Ca^{2+} activated whole cell K^+ currents in rat submandibular acinar cells. Pflugers Arch 429: 748-750

2. Seo Y, Ammer U, Ishikawa T, Murakami M (1995) Restricted diffusion of an ^{19}F-labelled organic acid in human erythrocytes analysed by ^{19}F pulsed field gradient NMR. Jpn. J. Physiol, 45: 229-239

3. Ishikawa T, Cook DI (1995) A Ca^{2+} -activated 23pS potassium channel in a human submandibular gland duct cell line (HSG). Cell. Physiol. Biochem. 5: 232-242

4. Seo Y, Murakami M (1995) Relaxation characteristics of intracellular Na^+ as measured by

double quantum filtered (DQf) NMR J Molecular Liquid 65/66: 433-436

5. Kuwata K, Ueki S, Era S, Sogami M & Watari H (1995) Spin-lattice relaxation times of water in polarized and depolarized rabbit vagus nerves. Biochem Biophys Res Commun 215: 459-466

6. Koizuka I, Seo R, Kubo T, Matsunaga T, Murakami M, Seo Y, Watari H (1995) High-resolution MRI of the human cochlea. Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl 520: 256-257

《細胞内代謝研究部門》

1. Tanaka K, Shibuya I & Kanno T (1995) Potentiation of cholecystokinin-induced amylase release by peptide VIP in guinea pig pancreatic acini. Jpn J Physiol 45: 241-256

2. Shinozaki H, Abe Y, Miyasaka K, Funakoshi A & Kanno T (1995). Ursodeoxycholate (UDCA) potentiates cholecystokinin (CCK)-induced $[Ca^{2+}]_c$ dynamics and secretory response but not CCK-JMV-180-induced responses in dispersed perifused acini of the rat pancreas. Biomed Res 16 (3) 199-206

3. Niwa K, Horikoshi H & Kanno T (1995) Troglitazone (CS-045) potentiates glucose-induced biphasic insulin secretion in the absence of potentiation of Ca^{2+} signaling in rat pancreatic islets. Biomed Res 16 (5) 345-351

4. Okada N, Ohshio G, Manabe T, Iwamura M, Habara Y & Kanno T (1995) Intracellular Ca^{2+} dynamics and in vitro secretory response in acute pancreatitis induced by a choline-deficient, ethonine-supplemented diet in mice. Digestion 56: 502-508

5. Satoh Y, Habara Y, Ono K & Kanno T (1995) Carbamylcholine-and catecholamine-induced intraceller callcium dynamics of epithelial cells in mouse ileal crypts. Gastroenterol 108: 1345-1356

6. Shinozaki H, Funakoshi A, Miyasaka K & Kanno T (1995) Mechanism of the stimulatory effect of ursodeoxycholate (UDCA) on pancreatic exocrine secretion: an in vitro study. Biomed Res 16 (6) 439-443

7．菅野富夫 (1995) Series; 目でみるバイオサイエンス，膵外分泌機構。臨床雑誌「内科」75: 685-688 南江堂

8．佐藤洋一，葉原芳昭，菅野富夫 (1995) マウス十二指腸と回腸の陰窩上皮細胞の細胞内カルシウム動態：Carbachol と Catecholamine に対する反応。消化管ホルモン (XIII) 253-258 医学図書出版

9．菅野富夫 (1995) Ca^{2+} シグナルと膵腺房細胞の正常・異常分泌反応。消化管ホルモン (XIII) 22-28 医学図書出版

10. 石岡克己，菅野富夫 (1995) 副交感神経緊張過度によるラット膵外分泌不全に対するプロカインによる脱抑制。消化管ホルモン (XIII) 生理 II 186-190, 医学図書出版

11. 菅野富夫 (1995) 消化管ホルモンと消化管の機能。内分泌・糖尿病科 1 (3) 321-328 科学評論社

《生体膜研究部門》

1．Sugita M, Shiba Y, Furuya K, Yamagishi S & Kanno Y (1995) Involvement of intracellular calcium ions in the release of the fluorescent dye calcein by cholinergic and α-adrenergic agonists from rat parotid acinar cells. Pflügers Archiv 429: 555-560

2．Kato K, Tsutsui I, Furuya K, Ozaki T & Yamagishi S (1995) Regional differences in the contractile and intracellular Ca^{2+} responses of the guinea pig vas deferens to neurotransmitters and excess K^{+}. Experimental Physiology 80: 721-733

3．Enomoto K, Furuya K, Yamagishi S, Oka T & Maeno T (1995) Release of arachidonic acid via Ca^{2+} increase stimulated by pyrophosphonucleotides and bradykinin in mammary tumor cells. Cell Biochem Func 13: 279-286

4．Mitaku S, Suzuki K, Odashima S, Ikuta K, Suwa M, Kukita F, Ishikawa M & Itoh H (1995) Interaction stabilizing tertiary structure of bacteriorhodopsin studied by denaturation experiments. Proteins Structure, Function and Genetics 22: 350-362

5. Ohkawa T, Tsutsui I & Nosaka S (1995) Early events in plasma membrane of *Chara corallina* after electrical stimulation. I. Studies under current clamp conditions. Plant Cell Physiol 36: 299-312

6. Kishimoto U, Ohkawa T, Tsutsui I & Inoue I (1995) Voltage dependence of the ouabain-sensitive current of the squid axon membrane. In: Cephalopod Neurobiology Ed. Abbott N J, Williamson R and Maddock L M, Oxford Univ Press pp53-70

7. Yamagishi S, Furuya K & Kukita F (1995) The effects of internal Ca^{2+} and Mg^{2+} on ion channels in the squid giant axon. In: Cephalopod Neurobiology. Ed. Abbott N J, Williamson R & Maddock L M, Oxford Univ Press pp153-160

8. Abbott N J, Brown E R, Pichon Y & Kukita F (1995) Electrophysiology of squid Schwann cells. In: Cephalopod Neurophysiology. Ed. Abbott N J, Williamson R & Maddock L M, Oxford Univ Press pp197-212

9. 榎本浩一，古家喜四夫 (1995) カルシウム蛍光測光／パッチクランプ同時測定法　日本生理学雑誌 57: 117-126

10. 山岸俊一，古家喜四夫 (1995) イカの巨大神経線維と巨大シナプス　実験医学バイオマニュアル UP シリーズ：脳・神経研究プロトコール　御子柴克彦，清水孝雄篇 pp106-112

《機能協関研究部門》

1. Tominaga M, Horie M, Sasayama S & Okada Y (1995) Glibenclamide, an ATP-sensitive K^+ channel blocker, inhibits the cardiac cyclic AMP-activated Cl^- conductance. Circul Res 77: 417-423

2. Kijima H, Okada Y, Oiki S, Goshima S, Nagata K & Kazawa T (1995) Free ion concentrations in receptor lymph and role of transepithelial voltage in the fly labellar taste receptor. J Comp Physiol A 177: 123-133

3. Kajita H, Morishima S, Shirakata Y, Kotera T, Ueda S, Okuma M & Okada Y (1995) A mini-Cl^- channel sensitive to external pH in the basolateral membrane of guinea pig parietal cells. J

Physiol (London) 488: 57-64

4. Kajita H, Kotera T, Shirakata Y, Ueda S, Okuma M, Oda-Ohmae K, Takimoto M, Urade Y & Okada Y (1995) A maxi-Cl^- channel coupled to endothelin-B receptors in the basolateral membrane of guinea pig parietal cells. J Physiol (London) 488: 65-75

5. Tominaga M, Tominaga T, Miwa A & Okada Y (1995) Volume-sensitive chloride channel activity does not depend on endogenous P-glycoprotein. J Biol Chem 270: 27887-27893

6. Oiki S, Koeppe II RE & Andersen OS (1995) Voltage-dependent gating of an asymmetric gramicidin channel. Proc Natl Acad Sci USA 92: 2121-2125

7. Hagar K, Hazama A, Kwon HM, Loo DDF, Handler JS & Wright EM (1995) Kinetics and specificity of the renal Na^+ /*myo*-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocyte. J Membrane Biol 143: 103-113

8. James AF, Xie L-H, Fujitani Y, Hayashi S & Horie M (1995) ET_A receptors mediate inhibition of the cardiac PKA-dependent Cl^- current via a pertussis toxin-sensitive mechanism. Heart & Vessels S9: 83-85

9. 挾間章博, 岡田泰伸 (1995) パッチクランプ法。Clinical Neuroscience 13, 386-387

10. 岡田泰伸 (1995) 生理科学における研究組織化とアジア諸国からの研究者受入れ問題について。日本生理学雑誌 57: 114-115

11. 老木成稔 (1995) イオンチャネル研究のための脂質平面膜法。日本生理学雑誌, 57: 193-224

12. 樫原康博 (1995) Neurotrophism と神経細胞のアポトーシス。臨床医 21: 2130-2133

13. 樫原康博 (1995) 発達過程における神経細胞の生死の標的依存性と順向性・逆向性栄養因子。組織培養 21: 76-83

14. 林　誠治 (1995) 膜二回貫通型イオンチャネルによるスーパーファミリーの形成。ファルマシア 31: 522-523

《能動輸送研究部門》

1. Kuroda, S., Shimizu, K., Yamamori, B., Matsuda, S., Imazumi, K., Kaibuchi, K., and Takai, Y. (1995) Purification and characterization of REKS from *Xenopus* eggs Identification of REKS as a *Ras*-dependent mitogen-activated protein kinase kinase kinase. J. Biol. Chem., 270: 2460-2465

2. Bourgoin, S., Harbour, D., Desmarais, Y., Takai, Y., and Beaulieu, A. (1995) Low molecular weight GTP-binding proteins in HL-60 granulocytes. J. Biol. Chem., 270: 3172-3178

3. Yamamori, B., Kuroda S., Shimizu, K., Fukui, K., Ohtsuka, T., and Takai, Y. (1995) Purification of a *Ras*-dependent mitogen-activated protein kinase kinase kinase from bovine brain cytosol and its identification as a complex of B-*raf* and 14-3-3 proteins. J. Biol. Chem., 270: 11723-11726

4. Chung, S-H., Takai, Y., and Holz, R. W. (1995) Evidence that the *Rab*3A-binding protein, Rabphilin-3A, enhances regulated secretion Studies in adrenal chromaffin cells. J. Biol. Chem., 270: 16714-16718

5. Kuribara, H., Tago, K., Yokozeki, T., Sasaki, T., Takai, Y., Morii, N., Narumiya, S., Katada, T., and Kanaho, Y. (1995) Synergistic activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factor and *rho*A p21, and its inhibition by clostridium botulinum C3 exoenzyme. J. Biol. Chem., 270: 25667-25671

6. McGeady, P., Kuroda, S., Shimizu, K., Takai, Y., and Gelb, M. H. (1995) The farnesyl group of H-ras facilitates the activation of a soluble upstream activator of mitogen-activated protein kinase. J. Biol. Chem., 270: 26347-26351

7. Gotoh, T., Hattori, S., Nakamura, S., Kitayama, H., Noda, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsui, H., Hatase, O., Takahashi, H., Kurata, T., and Matsuda, M. (1995) Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 Domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. Mol. Cell Biol., 15: 6746-6753

8. Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y. (1995) A downstream target of *RHO*1 small GTP-binding protein is *PKC*1, a homo-

log of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J., 14: 5931-5938

9. Takaishi, K., Sasaki, T., Kameyama, T., Tsukita, Sa., Tsukita, Sh., and Takai, Y. (1995) Translocation of activated *Rho* from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. Oncogene, 11: 39-48

10. Nishimura, N., Goji, J., Nakamura, H., Orita, S., Takai, Y., and Sano K. (1995) Cloning of a brain-type isoform of human rab GDI and its expression in human neroblastoma cell lines and tumor specimens. Cancer Res., 55: 5445-5450

11. Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Komuro, R., Ohtsuka, T., Maeda, M., Suzuki, H., Igarashi, H., and Takai, Y. (1995) Doc2: a novel brain protein having two repeated C2-like domains. Biochem. Biophys. Res. Commun., 206: 439-448

12. Araki, K., Nakanishi, H., Hirano, H., Kato, M., Sasaki, T., and Takai, Y. (1995) Purification and characterization of *Rab* GDIβ from rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun., 211: 296-305

13. Takahashi, K., Sasaki, T., and Takai, Y. (1995) Heterotetramer formation of prenylated *Rab*3A with two Rabphilin-3A molecules.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 217: 979-986

14. Sakaguchi, G., Orita, S., Maeda, M., Igarashi H., and Takai, Y. (1995) Molecular cloning of an isoform of Doc2 having two C2-like domains. Biochem. Biophys. Res. Commun., 217: 1053-1061

15. Miyazaki, M., Kaibuchi, K., Shirataki, H., Kohno, H., Ueyama, T., Nishikawa, J., and Takai, Y. (1995) Rabphilin-3A binds to a Mr 115,000 polypeptide in a phosphatidylserine- and Ca^{2+}-dependent manner. Mol. Brain. Res., 28, 29-36

16. Regazzi, R., Sasaki, T., Takahashi, K., Jonas, J-C., Volker, C., Stock, J. B., Takai, Y., and Wollheim, C. B. (1995) Prenylcysteine analogs mimicking the C-terminus of GTP-binding proteins stimulate exocytosis from permeabilized HIT-T15 cells comparison with the effect of Rab3AL peptide. Biochim. Biophys. Acta, 1268: 269-278

17. Takai, Y., Sasaki, T., Tanaka, K., and Nakanishi, H. (1995) *Rho* as a regulator of the cytoskeleton. Trends in Biochemical Sciences, 20: 227-231

18. Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., and Sasaki, T. (1995) Effects of prenyl modifications on interactions of small G proteins with regulators. In Methods in Enzymology, (Casey, P. J., and Buss, J. E., eds.) Vol. 250, pp. 122-133, Academic Press, Inc., San Diego

19. Kuroda, S., Shimizu, K., Yamamori, B., and Takai, Y. (1995) Cell-free assay system for *Ras*-dependent MEK activation. In Methods in Enzymology, (Balch, W. E., Der, C. J., and Hall, A., eds.) Vol. 255, pp. 257-265, Academic Press, Inc., San Diego

20. Mizuno, T., Nakanishi, H., and Takai, Y. (1995) Purification and properties of *Rac*2 from Human Leukemia cells. In Methods in Enzymology, (Balch, W. E., Der, C. J., and Hall, A., eds.) Vol. 256, pp. 15-25, Academic Press, Inc., San Diego

21. Tanaka, K., Sasaki, T., and Takai, Y. (1995) Purification and properties of recombinant *Rho*-GDP dissociation inhibitor. In Methods in Enzymology, (Balch, W. E., Der, C. J., and Hall, A., eds.) Vol. 256, pp. 41-49, Academic Press, Inc., San Diego

22. Takaishi, K., Sasaki, T., and Takai, Y. (1995) Cell motility assay and inhibition by *Rho*-GDP dissociation inhibitor. In Methods in Enzymology, (Balch, W. E., Der, C. J., and Hall, A., eds.) Vol. 256, pp. 336-347, Academic Press, Inc., San Diego

23. Kikuchi, A., Nakanishi, H., and Takai, Y. (1995) Purification and Properties of *Rab*3A. In Methods in Enzymology, (Balch, W. E., Der, C. J., and Hall, A., eds.) Vol. 257, pp. 57-70, Academic Press, Inc., San Diego

24. Sasaki, T., and Takai, Y. (1995) Purification and Properties of bovine *Rab*-GDP dissociation inhibitor. In Methods in Enzymology, (Balch, W. E., Der, C. J., and Hall, A., eds.) Vol. 257, pp. 70-79, Academic Press, Inc., San Diego

25. Shirataki, H., and Takai, Y. (1995) Purification and Properties of Rabphilin-3A. In Methods in Enzymology, (Balch, W. E., Der, C. J., and Hall, A., eds.) Vol. 257, pp. 291-302, Academic Press, Inc., San Diego

26. Kaibuchi, K. and Takai, Y. (1995) *Smg* GDS In Guidebook to the small GTPases, (Zerial, M., and Huber, L. A., eds.) pp. 131-134, Oxford University Press, Oxford

27. Tanaka, K., Kikuchi, A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., and Takai, Y. (1995) *Rho* GDI In Guidebook to the small GTPases, (Zerial, M., and Huber, L. A., eds.) pp. 231-234, Oxford University Press, Oxford

28. Kikuchi, A. and Takai, Y. (1995) *Rab*3A In Guidebook to the small GTPases, (Zerial, M., and Huber, L. A., eds.) pp. 312-316, Oxford University Press, Oxford

29. Kikuchi, A. and Takai, Y. (1995) *Rab*3B In Guidebook to the small GTPases, (Zerial, M., and Huber, L. A., eds.) pp. 316-317, Oxford University Press, Oxford

30. Kikuchi, A. and Takai, Y. (1995) *Rab*3C In Guidebook to the small GTPases, (Zerial, M., and Huber, L. A., eds.) pp. 318-320, Oxford University Press, Oxford

31. Sasaki, T., Kikuchi, A., Kaibuchi, K., and Takai, Y. (1995) *Rab* GDI In Guidebook to the small GTPases, (Zerial, M., and Huber, L. A., eds.) pp. 374-376, Oxford University Press, Oxford

32. Shirataki, H., Kaibuchi, K., and Takai, Y. (1995) Rabphilin-3A In Guidebook to the small GTPases, (Zerial, M., and Huber, L. A., eds.) pp. 382-384, Oxford University Press, Oxford

34. 清水一也，黒田真也，山森文平，高井義美 (1995) Ras をめぐる分子間相互作用　実験医学 13: 639-645

35. 今住克則，佐々木卓也，高井義美 (1995) Rab と Rho 低分子量G蛋白質のシグナル伝達系における分子間相互作用　実験医学 13: 645-656

36. 山森文平，清水一也，黒田真也，高井義美 (1995) 14-3-3 タンパク質と細胞内シグナル伝達機構　細胞工学 14: 317-322

37. 高石健司，佐々木卓也，高井義美 (1995) Rho 低分子量G蛋白質による接着分子の制御　実験医学 13: 2162-2167

《神経情報研究部門》

1. Miyao, Y., Shimizu, K., Tamura, M., Yamada, M., Tamura, K., Nakahira, K., Kuriyama, S., Hayakawa, T. and Ikenaka, K. (1995) A simplified general method for determination of recombinant retrovirus titers. Cell Structure And Function., 20, 177-183

2. Ono, J., Harada, K., Takahashi, M., Maeda, M., Ikenaka, K., Sakurai, K., Sakai, N., Kagawa, T., Fritz-Zieroth, B., Nagai, T., Nihei, A., Hashimoto, S.and Okada, S. (1995) Differentiation between dysmyelination and demyelination using magnetic resonance diffusional anisotropy. Brain Res., 671, 141-148

3. Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., and Mikoshiba, K. (1995) The *reeler* gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. Neuron., 14, 899-912

4. Nakao, J., Yamada, M., Kagawa, T., Kim, Seung U., Miyao, Y., Shimizu, K., Mikoshiba, K., and Ikenaka, K. (1995) Expression of proteolipd protein gene is directly associated with secretion of a factor influencing oligodendrocyte development. J. Neurochem., 64, 2396-2403

5. Mikoshiba, K., Okano, H., Miyawaki, A., Furuichi, T. and Ikenaka, K. (1995) Molecular genetic analyses of myelin deficiency and cerebellar ataxia. in "Gene expression in the central nervous system" Progress in Brain Res., 105, A. C. H. Yu, L. F. Eng, U. J. McMahan, H. Schulman, E. M. Shooter and A. Stadlin eds., pp.23-41, Elsevier

6. Shimizu, K., Miyao, Y., Tamura, M., Kishima, H., Ohkawa, M., Mabuchi, E., Yamada, M., Hayakawa, T. and Ikenaka, K. (1995) Infectious retrovirus is inactivated by serum but not by cerebrospinal fluid or fluid from tumor bed in patients with malignant glioma. Jpn. J. Canser Res., 86, 1010-1013

7. Kuriyama, S., Masui, K., Sakamoto, T., Nakatani, T., Tominaga, K., Fukui, H., Ikenaka, K., Mullen, C. A., and Tsujii, T. (1995) Bacterial cytosine deaminase suicide gene transduction renders hepatocellular carcinoma sensitive to the prodrug 5-fluorocytosine. Int. Hepatol. Commun. 4, 72-79

8. Ikenaka, K. and Kagawa, T. (1995) Transgenic systems in studying myelin gene expression.

Dev. Neurosci. 17, 127-136

9. Kuriyama, S., Nakatani, T., Masui, K., Sakamoto, T., Tominaga, K., Yoshikawa, M., Fukui, H., Ikenaka, K. and Tsujii, T. (1995) Bystander effect caused by suicide gene expression indicates the feasibility of gene therapy for hepatocellular carcinoma. Hepatology., 22, 1838-1846

10. 大庭明生，鹿川哲史，池中一裕，(1995) Non-RI プローブによる In situ ハイブリダイゼーション法　実験医学，13, 77-88

11. 田村雅一，小泉克久，吉松忠憲，池中一裕，(1995) レトロウイルスベクターの最近の進歩　最新医学，50, 1671-1685

12. 池中一裕，若園佳彦，秋田裕美，中平健祐，(1995) 神経発生とカリウムチャネル　神経進歩，204, 823-828

13. 池中一裕，小泉克久，田村雅一，(1995) レトロウイルスベクターを用いた癌に対する組織特異的遺伝子治療 BIOTHERAPY TODAY, 2, 66-70

14. 吉松忠憲，田村雅一，池中一裕，(1995) 神経組織への遺伝子導入。古庄敏行，清水信義，北川照男，武部啓　編集，「臨床遺伝医学［VI］遺伝子治療と予防」診断と治療社，91-114

a）発表論文

1）原著論文

吉野　薫，湯浅茂樹，川村光毅 (1995) 生後発達期および成体マウスの脳内へ移植された不死化神経細胞株 V1の移動，分化と宿主神経構築への統合。脳神経 47, 1149-1157

2）総説

湯浅茂樹 (1995) 小脳系神経回路の発生機構。日本神経精神薬理誌 15, 177-183.

湯浅茂樹 (1995) 海馬発生における神経細胞移動とグリアの分化。神経進歩 39, 801-813.

《液性情報研究部門》

1）原著論文

1. Yonemura S, Itoh M, Nagafuchi A & Tsukita S (1995) Cell-to-cell adherens junction formation

and actin filament organization: Similarities and difference between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. J Cell Sci 108: 127-142

2. Sagara J, Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S & Kawai A (1995) Cellular actin-binding ezrin-radixin-moesin (ERM) family proteins are incorporated into the rabies virion and closely associated with viral envelope proteins in the cell. Virology 206: 485-494

3. Takaishi K, Sasaki T, Kameyama T, Tuskita S, Tukita S & Takai Y (1995) Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites, and cleavage furrows. Oncogene 11: 39-48

4. Yasui W, Kuniyasu H, Akama Y, Kitahara K, Nagafuchi A, Ishihara S & Tsukita S (1995) Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in human gastric carcinomas: Correlation with histology and tumor progression. Oncology Res 2: 111-117

5. Oyama T, Knai Y, Ochiai A, Akimoto S, Oda T, Yanagihara K, Nagafuchi A, Ishihara S & Tsukita S (1995) A truncated beta-catenin disrups the interaction between E-cadherin and alpha-catenin: A cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. Cancer Res 54: 6282-6287

6. Yatani A, Wakamori M, Niidome T, Yamamoto S, Tanaka I, Mori Y, Katayama K & Green S (1995) Stable expression and coupling of cardiac L-type Ca^{2+} channels with β1-adrenoceptors. Circulation Research 73: 335-342

2) 総説，その他の著作

1. Varadi G, Mori Y, Mikala G & Schwarz A (1995) Molecular determinants of calcium channel action and drug sites. Trens Pharmacol Sci 16: 43-49

3) 学会発表抄録・アブストラクト

1. Wakamori M, Niidome T, Katayama K, Nukada T & Mori Y (1995) Modulation of the α_{1A} (P/Q-type) and α_{1B} (N-type) Ca channels by distinct G-proteins. Soc Neurosci Abstr 25: 515

《高次神経機構研究部門》

1. Abe, S., Yagi, T., Ishiyama, S., Hiroe, M., Marumo, F., and Ikawa, Y. (1995) Molecular cloning of a novel serine/threonine kinase, MRK, possibly involved in cardiac development. *Oncogene* 11, 2187-2195.

2. Yoshida, M., Yagi, T., Furuta, Y., Takayanagi, K., Kominami, R., Takeda, N., Tokunaga, T., Chiba, J., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1995) A new strategy of gene trapping in ES cells using 3' RACE. *Transgenic, Res.* 4, 277-287.

3. Watanabe, S., Kai, N., Yasuda, M., Kohmura, N., Sanbo, M., Mishina, M., and Yagi, T. (1995) Stable production of mutant mice from double gene converted ES cells with puromycin and neomycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 213, 130-137.

4. Ikeda, K., Araki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., and Mishina, M. (1995) Reduced spontaneous activity of mice defective in the e4 subunit of the NMDA receptor channel. *Mol. Brain Res.* 33, 61-71.

5. Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T., Kang, Y., Aizawa, S., and Mishina, M. (1995) Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR $\delta 2$ mutant mice. *Cell* 81, 245-252.

6. Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., and Mishina, M. (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor $\varepsilon 1$ subunit. *Nature* 373, 151-155.

7. Yagi, T. (1995) Gene targeting of fyn tyrosine kinase in murine nervous system. *Genes for development, cell growth and infectious diseases,* John Libbey Eurotext in Paris, pp17-27.

8. Miyakawa, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Matsuura, H., Tateishi, K., and Niki, H. (1995) Enhanced susceptibility of audiogenic seizures in Fyn-kinase deficient mice. *Mol. Brain Res.* 28, 349-352.

9. 八木　健 (1995) “遺伝学を用いた学習・記憶の分子メカニズムの解析”, *蛋白質・核酸・酵*

素, 40, pp 2175-2180

10. 八木　健 (1995) "特集遺伝子ターゲティング　特集によせて", *組織培養*, 21, 22, pp1-3

11. 八木　健 (1995) ジーンターゲティングによる行動異常の解析, *日本実験モデル*, 11, pp29-31

12. 八木　健 (1995) "遺伝子ターゲティングによる脳機能解析", *蛋白質・核酸・酵素*, 40, pp. 599-608

《情報記憶研究部門》

1. Villa P, Kurahashi T & Kaneko A (1995) L-Glutamate-Induced Responses and cGMP-Activated Channels in Three Subtypes of Retinal Bipolar Cells Dissociated from the Cat. J. Neurosci 15: 3571-3582.

2. 倉橋隆 (1995) パッチクランプ実験におけるデータ誤差補正の実際　日本味と匂い学会誌 2, No.2: 49-54.

3. 伊藤嘉邦, 倉橋隆, 金子章道 (1995) 薬物刺激用圧力制御装置　日本生理学雑誌 57: 127-134.

4. 河合房夫, 神山斉己, 臼井支朗 (1995) 網膜外網状層 GABA レセプターダイナミックスと光順応機構, 電子情報通信学会論文誌 D-II, J78-D-II, No.5: 855-864

《高次神経性調節研究部門》

1）原著論文

2）総説, その他の著作

小松英彦 (1995) 色覚をつかさどる神経細胞, 科学, 65, 454-460

小松英彦 (1995) 色彩知覚のニューロン機構, 神経研究の進歩, 39, 551-560

3）学会発表抄録論文，アブストラクトなど

1．Kinoshita M, Murakami I, Kimura T & Komatsu H (1995) Perceptual filling-in occurs at the monocular scotoma without reorganization of retinotopic map of the monkey V1. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience Abstracts, 282

2．Murakami I, Kinoshita M, Kimura T & Komatsu H (1995) Do V1 neurons representing the blind spot region to stimuli for perceptual filling-in? Fourth IBRO World Congress of Neuroscience Abstracts, 282

3．Komatsu H,Murakami I, & Kinoshita M(1995) Spatial summation properties of the macaque V1 neurons in the retinotopic representation of the blind spot. Society for Neuroscience Abstract,21: 1648

《生体システム研究部門》

1）原著論文

1．Homma Y, Nonaka S, Matsuyama K & Mori S (1995) Fastigial projection to the brainstem nuclei in the cat: an anterograde PHA-L tracing study. Neurosci Res 23: 89-102

2．Iwakiri H, Oka T, Takakusaki K & Mori S. (1995) Stimulus effects of the medial pontine reticular formation and the mesencephalic locomotor region upon medullary reticulospinal neurons in acute decerebrate cats. Neurosci Res 23: 47-53

3．Miyashita E, Mori S (1995) The superior colliculus relays signals descending from the vibrissal motor cortex to the facial nerve nucleus in the rat. Neurosci Lett 195: 69-71

4．Myoga H, Nonaka S, Matsuyama K & Mori S (1995) Postnatal development of locomotor movements in normal and para-chlorophenylalanine-treated newborn rats. Neurosci Res 21: 211-221

5．Yokoyama T, Nonaka S & Mori S (1995) Histochemical properties of intrinsic laryngeal muscles in cats. J Autonomic Nerve System 56: 50-60

2）総説及び著書（分担執筆）

1．Mori S, Homma Y & Nakajima K (1995) Locomotion and Posture: Modulation by Upper Neurons. Age-Related Dopamine-Dependent Disorders Ed. Segawa M & Nomura Y (Monogr Neural Sci Vol 14) Basel, Karger, 168-177

2．Mori S, Iwakiri H, Homma Y, Yokoyama T & Matsuyama K (1995) Neuroanatomical and neurophysiological bases of postural control. Negative Motor Phenomena Ed. S Fahn et al. (Advances in Neurology Vol 67) Lippincott-Raven Publisher 289-303

3．森　茂美 (1995) 平衡感覚と姿勢の制御　新医科学大系（刺激の受容と生体運動）7: 245-271

4．森　茂美 (1995) 歩行運動の制御機序：行動制御の側面から　日本神経精神薬理学雑誌 Jpn J Psychopharmacol 15: 281-287

5．松山清治，森　茂美 (1995) 行動発現の基礎過程と脳幹網様体　日本生理学会雑誌増刊号 J Physiol Soc Jpn 57: 183-191

3）学会抄録

1．Homma Y, Matsuyama K & Mori S (1995) Fastigiofugal projections to the brainstem and the spinal cord in the cat. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S178

2．Homma Y, Yokoyama T, Matsuyama K & Mori S (1995) Fastigiofugal projection to the brainstem and spinal cord in the cat. 4th IBRO Congress of Neuroscience Abstructs 331

3．Iwakiri H, Asanome M & Mori S (1995) Paradoxical sleep-suppressing effect of serotoninergic systems projectiong to the medial pontine reticular formation in cats. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S179

4．Iwakiri H, Matsuyama K, Asanome M & Mori S (1995) Paradoxical sleep-suppressing action of serotonergic system projecting to the medial pontine reticular formation in freely moving cats. 4th IBRO Congress of Neuroscience Abstructs 61

5．Matsuyama K & Mori S (1995) Collateral Branching patterns of single pontine reticulospinal axons innervating multiple spinal segments of the cat. Jpn J Physiol 45 (Suppl 2) S58

6. Matsuyama K, Nakajima K & Mori S (1995) Axon collateral branching properties of single pontine reticulospinal axons in the spinal cord of the cat. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S178

7. Matsuyama K, Nakajima K, Miyashita E & Mori S (1995) Spinal innervation patterns of the nucleus reticularis magnocellularis in the cat. 4th IBRO Congress of Neuroscience Astructs 331

8. Miyashita E, Yamada T & Mori S (1995) Evaluation of functinal connectivities among three neurons in the rat vibrissal sensory-motor system using time dependent scatter diagrams. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S178

9. Miyashita E, Hamada Y, Ogura M & Mori S (1995) Functinal connectivity of neuron in the sensory-motor system changes depending on the patterns of vibrissal movements in rats: Analysis by time dependent scatter diagrams. Abs Society for Neuroscience 21: 2075

10. Mori S (1995) Brainstem mechanisms of postural fixation in relation to postural muscle tone. Electroenceph Clin Neurophysiol 97: S16

11. Mori S, Iwakiri H, Matsuyama K & Asanome M (1995) An increase in the extracellular levels of 5-HT and agonists in the medial pontine reticular formation results in an increase in wake proportion in a freely moving cat. Sleep Res 24A, 46

12. Nakajima K, Miyashita E, Matsuyama K & Mori S (1995) Postnatal development of locomotor capability in relation to maturation of serotoninergic innervation in newborn rats. Jpn J Physiol 45 (Suppl 2) S63

13. Nakajima K, Myoga H, Matsuyama K & Mori S (1995) Postnatal developement of swimming movements in relation to maturation of serotoninergic innervation in newborn rats. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S179

14. Nakajima K, Myoga H, Matsuyama K & Mori, S. (1995) Contribution of serotonergic system to postnatal development of locomotor movements in newborn rats. 4th IBRO Congress of Neuroscience Astructs 348

15. Yokoyama T, Nonaka S & Mori S (1995) Muscle fiber distributions of intrinsic laryngeal

muscles in cats. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S509

16. 岩切裕昌，中隣克己，松山清治，森　茂美 (1995) 内側橋網様体に投射するセロトニン系と睡眠・覚醒 J Physiol Soc Japan 57: 72

《感覚・運動機能研究プロジェクト》

1）原著論文

1．Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Watanabe S, Shimojo M & Kitamura Y (1995) Gating of somatosensory evoked responses during active finger movements: magnetoencephalographic studies. J Neurol Sci 128: 195-204

2．Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995) Pain-related magnetic fields following painful CO_2 laser stimulation in man. Neurosci Lett 192: 45-48

3．Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Shimojo M, Kitamura Y & Watanabe S (1995) Topography of somatosensory evoked magnetic fields following posterior tibial nerve stimulation. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 95: 127-134

4．Kaneoke Y, Koike Y, Sakurai N, Washimi Y, Hirayama M, Hoshiyama M & Takahashi A (1995) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease detected by electrogastroencephalography. J Auton Nerv Syst 50: 275-281.

5．Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995) Somatosensory evoked magnetic fields after mechanical stimulation of the scalp in humans. Neurosci Lett 195: 29-32

6．Kitamura Y, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Shimojo M & Watanabe S (1995) Pain-related somatosensory evoked magnetic fields. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 95: 463-474

7．Kitamura Y, Uemura S, Sato T, Yamada N, Morimoto K, Mori A & Kimura H (1995) Induction of c-*fos* and reduction of dynorfin in dentate granule cells of a rat model of epilepsy by systemic administration of kainic acid: An immunohistochemical study. Psychit Clin Neurosci 49: S213-S216

2) 総説，その他の著作

1．柿木隆介 (1995) 脳波，脳磁図を用いたヒト脳機能の非侵襲的検索　日生誌 57: 増刊号 23-30

2．柿木隆介 (1995) 事象関連電位 P300 の臨床　検査と技術 23: 363-364.

3．柿木隆介 (1995) 新しい痛覚検査法の紹介　CO_2 レーザー刺激誘発電位　慢性疼痛 14: 35-40

3）アブストラクトその他

1．Kakig R & Hoshiyama M (1995) Topography of somatosensory evoked magnetic fields following posterior tibial nerve stimulation. Jpn J Physiol 45 (suppl 1) S152

2．Hoshiyama M & Kakigi R (1995) Somatosensory evoked magnetic fields following stimulation of the lip in humans. Jpn J Physiol 45 (suppl 1) S152

3．Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995) Bilateral second sensory cortices are initially activated following painful stimulation in man: A magnetoencephalographic study. Jpn J Physiol 45 (suppl 2) S237

4．Kakigi R (1995) Clinical application of laser evoked potentials. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 97: S27

5．Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Shimojo M, Kitamura Y & Watanabe S (1995) Topography of somatosensory evoked magnetic fields by posterior tibial nerve stimulation. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 97: S121

6．Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995) Pain-related magnetic fields following painful CO_2 laser stimulation in man. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 97: S121

7．Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995) Somatosensory evoked magnetic fields following stimulation of the lip in humans. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 97: S120

8. Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995) Somatosensory evoked magnetic fields following mechanical stimulation of the scalp in humans. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 97: S121

9. Koyama S, Kakigi R, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995) Event-related magnetic fields during a character discrimination task. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 97: S124

10. Kitamura Y, Kakigi R, Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Nagata O, Takeshima Y, Mori M, Shimojo M, Watanabe S (1995) Pain-related somatosensory evoked magnetic fields. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 97: S121

11. Shimojo M, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Kitamura Y & Watanabe S (1995) Intracerebral interaction caused by bilateral median nerve stimulation in man. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 97: S122

12. Osaka M, Osaka N, Koyama S, Nambu A, Nakatani K & Kakigi R (1995) peak alpha frequency of magnetoencephalography (MEG) changes during the performance of verbal working memory task. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 97: S123

13. Kaneoke Y & Vitek JL (1995) The motor thalamus in the Parkinsonian primate: Enhanced burst and oscillatory activities. Abstracts of the 25th Annual Meeting of Society for Neuroscience 1428

14. 柿木隆介，小山幸子，宝珠山稔，北村吉宏，下条素子，渡邊昌子 (1995) CO_2 レーザー刺激による痛覚関連誘発脳磁界（痛覚脳磁界）日本生体磁気学会誌 8: 104-105

15. 宝珠山稔，柿木隆介，小山幸子，北村吉宏，下条素子，渡邊昌子 (1995) 口唇および頭皮刺激による体性感覚誘発脳磁場　日本生体磁気学会誌 8: 22-23

16. 北村吉宏，柿木隆介，宝珠山稔，小山幸子，下条素子，渡邊昌子 (1995) 上肢電気刺激による痛覚関連誘発脳磁界　日本生体磁気学会誌 8: 106-107

17. 柿木隆介，小山幸子，宝珠山稔，渡邊昌子，下条素子 (1995) 体性感覚誘発反応に対するgating効果　脳波と筋電図 23: 184

18. 宝珠山稔，柿木隆介，小山幸子，北村吉宏，下条素子，渡邊昌子 (1995) 随意運動前での経頭蓋的磁気刺激による誘発筋電図の変化　脳波と筋電図 23: 212

19. 金桶吉起，Vitek JL (1995) 随意運動における大脳基底核の役割　臨床神経 35: 1518

《高次脳機能研究プロジェクト》

1）原著論文

1. Sasaki K, Kyuho S, Nambu A, Matsuzaki R, Tsujimoto T & Gemba H (1995) Motor speech centres in the frontal cortex. Neurosci Res 22: 245-248

2. Sasaki K, Gemba H, Nambu A & Matsuzaki R (1995) Prefrontal activity on no-go decision. Baumgartner C, Deecke L, Stroink G, Williamson SJ (eds) Biomagnetism: Fundamental Research and Clinical Applications, Elsevier, Amsterdam: 274-277, 1995

3. Nambu A, Matsuzaki R, Gemba H & Sasaki K (1995) Magnetic fields in the cerebral cortex associated with visually initiated finger movements in human subjects. Baumgartner C, Deecke L, Stroink G, Williamson SJ (eds) Biomagnetism: Fundamental Research and Clinical Applications, Elsevier, Amsterdam: 141-144

4. Tokuno H, Takada M, Nambu A & Inase M (1995) Somatotopical projections from the supplementary motor area to the red nucleus in the macaque monkey. Exp Brain Res 106: 351-355

5. Tokuno H, Takada M, Nambu A & Inase M (1995) Direct projections from the orofacial region of the primary motor cortex to the superior colliculus in the macaque monkey. Brain Res 703: 217-222

2）総説，その他の著作

1. 佐々木和夫 (1995) 研究の概要。日本生理学雑誌　増刊号「脳の動的機構とその基礎過程」：11-12.

2. 佐々木和夫 (1995) 脳機能　対　精神活動。蛋白核酸酵素 40: 12-13.

3．佐々木和夫 (1995)MEG による前頭連合野の動態研究。神経研究の進歩 39: 989-995.

4．南部篤 (1995) 高次脳機能に関連する脳磁場。臨床脳波 37: 219-226

5．南部篤，佐々木和夫 (1995) MEG （脳磁場計測）によるヒトの非侵襲的脳機能計測。実験医学別冊バイオマニュアル UP シリーズ脳，神経研究プロトコール細胞培養から機能解析へ：218-221

6．佐々木和夫，玄番央恵，南部篤，久宝真一，松崎竜一，遠本徹 (1995) 脳磁場および脳電場計測による前頭連合野の動態研究。日本生理誌 57, 増刊号 13-21.

7．佐々木和夫 (1995) MEG による脳高次機能研究。Clinical Neuroscience 13: 955-959

《自律機能研究プロジェクト》

1．Kuriki S, Okita Y, Kobayashi T & Takeuchi F (1995) Localization of auditory cortical sources from multichannel-recorded magnetic fields elicited by monosyllable speech sounds. In Biomagnetism: Functional Research and Clinical Applications. Ed. C Baumgartner et al. Elsevier, Amsterdam, 174-178

2．Kuriki S, Okita Y & Hirata Y (1995) Source analysis of magnetic field responses from the human auditory cortex elicited by short speech sounds. Exp Brain Res 104: 144-152

3．Fujimaki N, Hirata Y, Kuriki S & Nakajima H (1995) Event-related magnetic fields at latencies of over 400ms in silent reading of Japanese Katakana meaningless words. Neurosci Res 23: 419-422

4．Kobayashi T, Kato K, Owada T & Kuriki S (1995) Difference of EEG spectral powers observed between binocular rivalry and binocular fusion. Front Med Biol Eng 7: 11-19

5．Kuriki S, Hirata Y, Fujimaki N, Tsuchiya N & Kobayashi T (1995) Neuromagnetic study of human cortical areas related to visual/auditory information processing. Hum Brain Mapp Suppl. 1: 237

6. Kuriki S, Nogai T, Hirata Y (1995) Cortical sources of middle latency responses of auditory evoked magnetic field. Hear Res 92: 47-51

7. 栗城真也, 平田恵啓, 野界武史, 沖田善光 (1995) 脳磁界によるヒト聴覚皮質の活動解析。日本生理学会雑誌57増刊号： 31-41

8. 白井直人, 小林哲生, 栗城真也 (1995) 脳磁界信号源推定における電流双極子数問題－二双極子推定評価シミュレーション－。生体・生理工学シンポジウム論文集 10: 13-16

9. 加藤和夫, 小林哲生, 栗城真也 (1995) 視野闘争・視野融合刺激の交替に伴う脳波と脳磁界。生体・生理工学シンポジウム論文集 10: 49-52

10. 栗城真也 (1995) 脳から発生する磁界と脳磁図 In 生体磁気計測 119-171 コロナ社

11. 栗城真也 (1995) 脳をみる　オーム社

《組織培養標本室》

1. Ornberg RL, Furuya S, Goping G, Kuijpers GAJ (1995) Granule swelling in stimulated bovine adrenal chromaffin cells: regulation by internal granule pH. Cell &Tissue Res 279: 85-92

2. Zhong ZG, Misawa H, Furuya S, Kimura Y, Noda M, Yokoyama S, Higashida H (1995) Over-expression of choline acetyltransferase reconstitutes discrete acetylcholine release in some but not all synapse formation-defective neuroblastoma cells. J. Physiol (Paris) 89: 137-145

《超高圧電子顕微鏡室》

1. Taniguchi, M., Watanabe, N., Aoki, S., Kihara, H., Phansiri, S., Taniguchi, T., Arii, T. (1994) Comparative studies on cultured plant protoplasts using X-rays and optical microscopes and high voltage electron microscope. X-ray Microscopy IV. eds. A. I. Erko et al. (Springer Verlag). 240-245.

2. Arii, T., Butzer, C., Yoshimura, N. (1995) Characteristics of Fuji FDL 5000 Imaging Plate

system and EM films for HVTEM applications. J. Electron Microsc. 44, 258.

3. Taniguchi, M., Suzuki, N. Arii, T., Taniguchi, T. (1995) Electrofusion of plant protoplasts and three dimensional network of actin filaments observed with confocal scanning laser microscopy. Zoological Studies 34, Supple.I, 17-18.

4. 有井達夫, Butzer, Christine, 吉村伸明　超高圧電顕によるフィルム像とイメージングプレート像の特性　第51回日本電顕学会予稿集 p201.

5. 有井達夫, 吉村伸明 (1995) 超高圧電顕によるイメージングプレート像の特性　日本物理学会秋の分科会　講演概要集 2 p.543.

6. 有井達夫, 吉村伸明 (1995) 電子線二次元検出器としてのイメージングプレートの感度と分解能　日本結晶学会平成 7 年度年会　講演要旨集 p.113.

7. 谷口美恵子, 鈴木直哉, 有井達夫 (1995) 植物培養細胞の電気融合過程の共焦点レーザー顕微鏡観察, 生物物理 35, S119.

8. 有井達夫 (1995) 超高圧電顕に対する電子線二次元検出器としてのイメージングプレートの特性。日本電顕学会　高性能電子顕微鏡技術講演会予稿集 p24-25.

9. Sasaki, K., Saka, H. Arii, T. (1995) Cyclic motion of grain boundary induced by electron beam irradiatio in intermetallic compound (1995) Abstracts of the 117th Meeting of JIM. p11

《超高圧電子顕微鏡共同利用実験（除アブストラクト）》

1. Taniguchi, M., Watanabe, N., Aoki, S., Kihara, H., Phansiri, S., Taniguchi, T., Arii, T. (1994) Comparative studies on cultured plant protoplasts using X-rays and optical microscopes and high voltage electron microscope. X-ray Microscopy IV. eds. A. I. Erko et al. (Springer Verlag). 240-245.

2. Araki, N., Yokota, S., Takashima, Y., Ogawa, K. (1995) The distribution of cathepsin D in two types of lysosomal or endosomal profiles of rat hepatocytes as revealed by combined immunocytochemistry and acid phosphatase enzyme cytochemistry. Exp. Cell Res. 217, 469-

476.

3. Araki, N., Makita, T., Takashima, Y. (1995) Redistribution and fate of colchine-induced alkaline phosphatase in rat hepatocytes: Possible formation of autophagosomes whose membrane is derived from excess of plasma membrane. Histochem. and Cell Biol.104, 257-265.

4. Taniguchi, M., Suzuki, N. Arii, T., Taniguchi, T. (1995) Electrofusion of plant protoplasts and three dimensional network of actin filaments observed with confocal scanning laser microscopy. Zoological Studies 34, Supple.I, 17-18.

5. 荒木伸一 (1995) ライソゾーム形状の機能的変化について。日本解剖学雑誌 70 (3) 225-227.

6. 野田　亨 (1995) ゴルジ装置：立体構造，In 電子顕微鏡で見るミクロの世界ー生物系ー，日本電子顕微鏡学会編（学際企画）p.36-37.

7. 浜　清 (1995) 細胞質性星状グリア細胞：超高圧電顕法，In 電子顕微鏡で見るミクロの世界ー生物系ー，日本電子顕微鏡学会編（学際企画）p116-117.

《動物実験施設》

1. Wei Mu-Xin, Naruse S, Ozaki T, Nokihara K, Ando E & Wray V (1994) The effect of pituitary polypeptide on guinea pig gallbladder in vitro. Peptides: Biology and Chemistry (Ed. Lu Gui-Shen, Tam James P & Du Yu-Cang) 222-224

2. Wei Mu-Xin, Naruse S, Nakamura T, Nokihara K & Ozaki T (1994) The effect of pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) 389 on gallbladder on smooth muscle in vitro. Biomedical Research 15: Suppl 2, 221-223

3. Liu F, Naruse S, Ozaki T, Nokihara K, Sazi T, Kondo T & Toda Y (1995) Effect of gastrin-releasing peptide (GRP) on guinea pig gallbladder contraction in vitro. J Gastroentrol 30: 764-767

4. Watanabe Y, Ito T, Harada T, Takahashi M, Kobayashi S, Ozaki T & Nimura Y (1995) Expression of *ret* proto-oncogene products in the hypoganglionic segment of small intestine of

congenital aganglionosis rats. J. Pediatric Surgery 30: 641-645

5．渡井　有，岡松孝男，福岡大太郎，尾崎　毅，河谷正仁 (1995) 先天性 Aganglionosis Rat における c-fos を用いた知覚機能の検討　昭医会誌 55: 314-318

6．Karaki H, Mitsui-Saito M, Takimoto M, Oda K, Okada T, Ozaki T & Kunieda T (1996) Lack of endothelin ET_B receptor binding and function in the rat with a mutant ET_B receptor gene Biomedical and Biophysical Research Communications 222: 139-143

《江橋研究室》

1．Synchrotron Radiation in the Biosciences(1994) edited by B. Chance, J. Deisenhofer, S. Ebashi, D.T. Goodhead, J.R. Helliwell, H.E. Huxley, T. Iizuka, J. Kirz, T. Mitsui, E. Rubenstein, N. Sakabe, T. Sasaki, G. Schmahi, H.B. Stuhrmann,. Wuthrich and G. Zaccai

2．Ebashi, S., and Kuwayama.(1994) Is Phosphorylation the main physiological action of myosin light chain Kinase?, CAN. J. Physiol. Pharmacol., 72, 1377-1379

3．Ebashi, S(1995) Introductory remarks In smooth muscle contraction: New Regulatory Modes edited by Kohama, k and Saida, k Japan Scientific Societies Press Tokyo, Karger Basel, Tokyo pp vii-x

4．Ebashi, S.(1995) Calcium ion and muscle contraction In Calcium as cell signal: Proceedings of the Yamada Conference XXXIX on Calcium as Cell Signal April 26-28, 1994 Tokyo, Japan edited by Kosaku Maruyama, Y. Nonomura and K. Kohama Igaku-Shoin Tokyo, New York PP1-11

5．江橋節郎（1995）筋運動と収縮タンパク質（特別講演）体力科学44.1, 3-6

b．学会発表

〔目　　次〕

神経化学研究部門 …… 146
超微小形態生理研究部門 …… 147
細胞内代謝研究部門 …… 150
生体膜研究部門 …… 151
機能協関研究部門 …… 152
能動輸送研究部門 …… 153
神経情報研究部門 …… 156
液性情報研究部門 …… 160
高次神経機構研究部門 …… 161
高次神経性調節研究部門 …… 162
生体システム研究部門 …… 163
感覚・運動機能研究プロジェクト …… 165
高次脳機能研究プロジェクト …… 169
自律機能研究プロジェクト …… 170
組織培養標本室 …… 171
超高圧電子顕微鏡室 …… 171
超高圧電子顕微鏡共同利用実験 …… 172
動物実験施設 …… 173
江橋研究室 …… 173

学　会　発　表

《神経化学研究部門》

1．丸山　敬，田川一彦，淺田英穂，川村勇樹，葛目博子，小幡邦彦 (1995.3) 培養細胞におけるアルツハイマー病アミロイド前駆体タンパク質の異常代謝の検討　日本薬理学会年会（名古屋）

2．児島伸彦，Wang J, Mansuy I, Kandel E R (1995.3) 非受容体型チロシンリン酸化酵素 Fyn 過剰発現の成熟脳における効果　第72回日本生理学会大会（名古屋）

3．淺田英穂，川村勇樹，丸山　敬，小幡邦彦 (1995.3) マウス・グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子のクローニングと発現　第72回日本生理学会大会（名古屋）

4．池田圭朗，白尾智明，淺田英穂，Kaub P, 戸谷重雄，植村慶一 (1995.3) ドレブリン蛋白が細胞基質間接着に及ぼす影響　第72回日本生理学会大会（名古屋）

5．斎藤祐見子，丸山　敬，川島誠一 (1995.6) 神経分化に関与する新規遺伝子 N16K の cDNA のクローニング及びその解析　日本神経化学会（京都）

6．Sekino Y & Obata K (1995.7) Optical recordings reveal a possible role for the CA2 region in activity propagation from CA3 to CA1 regions in rat hippocampal slices. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience （京都）

7．Yamagata Y & Obata K (1995.7) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in septal kindling. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience （京都）

8．Kojima N, Yagi T, Yasuda M & Obata K (1995.7) Effects of overexpression of Fyn and its activated version in the brain. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience （京都）

9．丸山　敬，久米秀明，淺田英穂，川村勇樹，葛目博子，小幡邦彦 (1995.9) 長期増強に関連した遺伝子のクローニングの試み　日本生化学会（仙台）

10．笹川　昇，反町洋之，斎藤直人，下川雅文，丸山　敬，荒畑喜一，石浦章一，鈴木紘一 (1995.9) in vitro における，ミオトニン・プロテイン・キナーゼ (MtPK) の発現様式に関す

る考察　日本生化学会（仙台）

11. 斎藤祐見子，丸山　敬，西道隆臣，川島誠一 (1995.9) 神経分化に関与する新規遺伝子のcDNAのクローニングとその発現　日本生化学会（仙台）

12. Sekino Y & Obata K (1995.11) CA2 region modulates activity propagation from CA3 to CA1 in rat hippocampal slices. 25th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego)

13. Asada H, Maruyama K, Kawamura Y & Obata K (1995.11) Molecular cloning of mouse glutamic acid decarboxylase and GABA release from cDNA-transfected cells. 25th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego)

14. Kojima N, Mansuy I, Wang J, Pragnell M & Kandel E R (1995.11) Rescuing impairment of long-term potentiation in Fyn defficient mice by introducing the Fyn transgene. 25th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego)

《超微小形態生理研究部門》

1．桑田一夫，瀬尾芳輝，恵良聖一 (1995.3) MRIにおける磁化移動コントラスト法 (MTC) の応用。第72回生理学会大会（名古屋）Application of the magnetization transfer contrast to MRI. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S22

2．瀬尾芳輝，村上政隆 (1995.3) 磁気共鳴法による細胞内外の分子自己拡散速度画像の測定。第72回生理学会大会（名古屋）Diffusion coefficient image of water in cartilage measured by pulsed-field gradient magnetic resonance imaging. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S23

3．亘　弘 (1995.3) デオキシヘモグロビン (S = 2) の電子スピン共鳴。第72回生理学会大会（名古屋）Election spin resonance of deoxyhemoglobin. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S15

4．石川　透，村上政隆 (1995.3) ラット顎下腺腺房細胞のTEA非感受性Ca依存性Kチャネル。第72回生理学会大会（名古屋）Ishikawa T & Murakami M (1995) Tea-insensitive, Ca^{2+}-activated K^{+} currents in rat submandibular acinar cells. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S41

5．Steward M C, Seo Y, & Murakami M (1995.3) Cell volume changes in rat salivary glands mea-

sured by pulsed-gradient NMR. 第72回生理学会大会（名古屋）Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S43

6．村上政隆，石川　透，瀬尾芳輝 (1995.3) 唾液分泌速度及び酸素消費に及ぼす輸送体阻害剤の効果。第72回生理学会大会（名古屋）Effects of transport blockers on fluid secretion and oxygen consumption by the rat mandibular salivary gland. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S46

7．Yoshida T, Kakiya J & Watari H (1995.3) Effects of circulatory occlusion on muscle energetics and PI peak splitting during exercise. 第72回生理学会大会（名古屋）Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S105

8．Yoshida T & Watari H (1995.3) Non-invasive determination of muscle respiratory capacity in excising man. 第72回生理学会大会（名古屋）Jpn J Physiol 45 (Suppl 2) S261

9．瀬尾芳輝 (1995.6) 磁場勾配 NMR による細胞内外での物質拡散の観察。平成７年度　日本分光学会 NMR 研究部会シンポ「磁場勾配を用いる NMR の基礎と応用」（東京）講演要旨集：26-31

10. Seo Y, Morita Y, Kusaka Y & Murakami M (1995.8) Diffusion of water in rat sciantic nerve measured by ^{1}H PFG NMR spectroscopy and microimaging: Compartmentation and anisotropy. 3rd Int Conf Magn Reson Microscopy (Wurzburg) Abstracts: 120

11. Uemura O, Kusaka Y, Nakajima S, Hase H, Hirasawa Y, Morimoto T & Seo Y (1995.8) Strain and water kinetics in the compressed intervertebral disc analyzed by high resolution MRI. 3rd Int Conf Magn Reson Microscopy (Wurzburg) Abstracts: 123

12. Murakami M, Ishikawa T & Seo Y (1995.9) Energy cost for fluid secretion in the perfused mandibular salivary gland. Aquaporins & Epithelial Water Transport (Manchester) 51

13. 瀬尾芳輝 (1995.9) イメージングと拡散現象。第23回日本磁気共鳴医学会大会（東京）日磁医誌 15 (Suppl): 83-86

14. 瀬尾芳輝 (1995.9) in vivo NMR の現状と将来。第23回日本磁気共鳴医学会大会（東京）日磁医誌 15 (Suppl): 343-346

15. 桑田一夫。惠良聖一，曽我美勝，瀬尾芳輝，村上政隆 (1995.9) オフ・レゾナンス照射下の磁気緩和現象。第23回日本磁気共鳴医学会大会（東京）日磁医誌 15 (suppl): 232

16. 林　知也，桑田一夫，下山雄平，惠良聖一，中村浩二，亘　弘 (1995.9) Vector ESR による牛血清アルブミンの分子ゆらぎ。第33回日本生物物理学会年会（札幌）生物物理 35 (Suupl): S100

17. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，亘　弘 (1995.9) 1H-NMR 及び CD による血清アルブミン構造転移の研究－ molten globule-like state. 第33回日本生物物理学会年会（札幌）生物物理 35 (Suppl): 108

18. Murakami M & Seo Y (1995.9) NMR studies of ion transport in the salivary gland. 7th FAOBMB Congress. (Sydney)SYM-6-2

19. Seki Y, Naruse S, Seo Y (1995.10) Esophageal stage of swallowing measured by snapshot movie. Biospec User's Meeting 95

20. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，梶原孝彦，亘　弘 (1995.10) 酸性側における血清アルブミン構造転移の研究。第34回 NMR 討論会（筑波）NMR 討論会講演要旨集 34: 241-244

21. Seo Y, Morita Y, Kusaka Y, & Murakami M (1995.10) Analysis of compartmentation and anisotropy of diffusive motion of water in rat sciatic nerve measured by ^{1}H pulsed field gradient NMR. 第34回 NMR 討論会（筑波）NMR 討論会講演要旨集 34: 255-258

22. 吉崎和男，早野尚志，平川和文，村上政隆，亘　弘 (1995.10) 31p-飽和移動 NMR 法によるヒト骨格筋の酵素反応速度の測定。第34回 NMR 討論会（筑波）NMR 討論会講演要旨集 34: 261-264

23. 村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透 (1995.10) 唾液腺水分分泌のエネルギー要求。第42回中部日本生理学会（愛知）

24. Murakami M, Ishikawa T & Seo Y (1995.11) Energy cost for fluid secretion by the mandibular salivary gland of rat. 国際ワークショップ Concerted mechanisms of transporters for salivary secretion （岡崎）Abstracts: 5

25. Yoshimura Keiichi, Hiramatsu Yukiharu & Murakami M (1995.11) Cyclic AMP potentiates amylase release by Ca^{2+}. 国際ワークショップ Concerted mechanisms of transporters for salivary secretion（岡崎）Abstracts: 8

26. Seo Y (1995.11) NMR microimaging of salivary gland. 国際ワークショップ Concerted mechanisms of transporters for salivary secretion Abstracts: 25

27. 林　知也，桑田一夫，下山雄平，恵良聖一，中村浩二，亘　弘 (1995) Vector EPR による牛血清アルブミンの動的構造。ESR 討論会講演要旨集 34: 97-99

《細胞内代謝研究部門》

1. Shibuya I, Niwa K, Habara Y & Kanno T (1995) Calcium imaging of pancreatic islets by ratiometric laser confocal microscopy. Jpn J Physiol 45 (suppl.1) S12

2. Niwa K, Shibuya I, & Kanno T (1995) Effect of low temperature on cytoplasmic calcium concentration and insulin release in rat pancreatic islet. Jpn J Physiol 45 (Suppl 1) S12

3. Yoshihashi K, Shibuya I & Kanno T (1995) The role of the sodium-calcium exchanger in regulating cytosolic calcium concentration in rat pancreatic B cells. Jpn J Physiol 45 (Suppl.1) S12

4. Nakamura M, Shibuya I, & Kanno T (1995) Effects of gamma aminobutyric acid on spontaneous Ca^{2+} oscillations in isolated rat chromaffin cells. Jpn Physiol 45 (Suppl.1) S20

5. Tanaka K, Shibuya I & Kanno T (1995) PACAP-induced increase in $[Ca^{2+}]_c$ and catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells. Jpn J Physiol 45 (Suppl.1) S20

6. Habara Y & Kanno T (1995) Exocytosis and local Ca^{2+} dynamics in rat perithoneal mast cells. Jpn J Physiol 45 (Suppl.1) S29

《生体膜研究部門》

1．Yamagishi S, Tsutsui I, Furuya K (1995.3) Emergence of Cl^- conductance in squid giant axons. Second Joint Meeting of the Physiological Societies of Japan, UK, and Eire. (Okazaki)

2．Abbott N J, Brown E R, Kukita F, Tsutsui I & Inoue I (1995.3) Axon-Schwann cell signalling in the squid. Second Joint Meeting of the Physiological Societies of Japan, UK, and Eire. (Okazaki)

3．Inoue I, Tsutsui I, Brown E R & Bone Q (1995.3) Role of nifedipine sensitive intramembrane charge movement in excitation-contraction coupling in striated muscle fibres. Second Joint Meeting of the Physiological Societies of Japan, UK, and Eire. (Okazaki)

4．Hirono C, Sugita M, Furuya K, Yamagishi S & Shiba Y (1995.3) Potentiation by isoproterenol of carbacol-induced ionic currents, calcium release and Ca^{2+} mobilization in rat parotid acinar cells.

5．榎本浩一，古家喜四夫，山岸俊一，前野巍 (1995.4) 乳癌細胞のヌクレオチド受容体の性質 第72回日本生理学会大会（名古屋）

6．久木田文夫 (1995.9) 溶液粘性依存性のナトリウムチャネル開閉速度のスローダウンの機構 第33回日本生物物理学会年会（札幌）

7．古家喜四夫，榎本浩一，山岸俊一 (1995.9) 機械的刺激によるカルシウム波の伝播機序　第33回日本生物物理学会年会（札幌）

8．今田千晴，古家喜四夫，大沢芳夫 (1995.9) 乳癌細胞の細胞内カルシウム反応の温度依存性 第33回日本生物物理学会年会（札幌）

9．筒井泉雄，井上　勲 (1995.9) ユウレイボヤ (Ciona) 心筋における興奮収縮連関機構　第33回日本生物物理学会年会（札幌）

10．大川和秋，筒井泉雄 (1995.9) シャジクモ節間細胞原形質膜における初期イオン電流　第33回日本生物物理学会年会（札幌）

Ca^{2+} sensors for neurotransmitter release. The 4th IBRO (International Brain Research Organaization) Meeting "Molecular Mechanisms of Neurotransmitter"

10. Takai Y. (1995.10) Small GTP-binding proteins in signal transduction. The Ninth International Conference on Second Messengers and Phosphoproteins

11. Takai Y. Tanaka K. and Sasaki T. (1995.11) Target molecules for ras and rho small G proteins. Workshop on "G Proteins: Structural Features and their Involvement in the egulation of Cell Growth"

12. 高井義美 (1995.3) シグナル伝達研究の展望。第24回ヒューマンサイエンス基礎研究セミナー

13. 白瀧博通，佐々木卓也，高井義美 (1995.4) 低分子量 GTP 結合蛋白質と小胞輸送。第24回日本医学会総会

14. 高井義美 (1995.5) 低分子量Ｇタンパク質と神経伝達物質の放出機構。第１回日本生化学会春季シンポジウム「細胞内トラフィック」

15. 高井義美 (1995.6) *Rho* 低分子量Ｇ蛋白質の機能と作用機構。千里ライフサイエンスセミナー「癌浸潤・転移」

16. 高井義美 (1995.6) 低分子量Ｇ蛋白質の機能と作用機構。生命と化学セミナー「生理活性発現の化学」

17. 田中一馬，高井義美 (1995.7) *Rho* 低分子量Ｇ蛋白質の機能と作用機構。大阪大学蛋白研究室セミナー「情報伝達における分子間相互作用」

18. 高井義美 (1995.8) 低分子量Ｇ蛋白質とシグナル伝達。第19回阿蘇シンポジウム

19. 佐々木卓也，白瀧博通，中西宏之，高井義美 (1995.9) 低分子量Ｇ蛋白質と細胞内小胞輸送。第68回日本生化学会大会

20. 平野尚伸，中西宏之，高井義美 (1995.9) *Rab*3A GDP 解離促進蛋白質 (*Rab*3A GDS) の精製と性状解析。第68回日本生化学会大会

21. 今住克則，佐々木卓也，荒木敬司，平野尚伸，中西宏之，高井義美 (1995.9) *Rab*3A GTPase 活性促進蛋白質 (*Rab*3A GAP) の精製と性状解析。第68回日本生化学会大会

22. 荒木敬司，白瀧博通，平野尚伸，加藤正樹，佐々木卓也，高井義美 (1995.9) 新しい *Rab* GDP 解離抑制蛋白質 (*Rab* GDI*β*) の精製と性状解析。第68回日本生化学会大会

23. 神野靖也，白瀧博通，萩誠一，三浦久幸，山本友美，大石秀人，千本松孝明，高井義美 (1995.9) *Rab*3A と *Rab*3A 標的蛋白質 Rabphilin-3A のシナプス小胞への結合様式。第68回日本生化学会大会

24. 後藤孝也，服部成介，中村俊，野田亮，貝淵弘三，高井義美，松井秀樹，畠瀬修，高橋秀宗，倉田毅，松田道行 (1995.9) CRK-SH3 結合性ヌクレオチド交換因子 C3G の基質特異性。第68回日本生化学会大会

25. 栗原秀夫，横関健昭，多胡憲治，森井成人，成宮周，佐々木卓也，高井義美，堅田利明，金保安則 (1995.9) 低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho による Phospholipase D の活性化。第68回日本生化学会大会

26. 野中秀太郎，田中一馬，高井義美 (1995.10) 酵母低分子量Ｇ蛋白質 Rho1 の標的蛋白質候補遺伝子のクローニング。第54回日本癌学会総会

27. 尾崎公美，田中一馬，今村博司，亀山毅明，野中秀太郎，幸野秀志，高井義美 (1995.10) 酵母 Rho1 関連遺伝子のクローニングと解析。第54回日本癌学会総会

28. 高石健司，佐々木卓也，高橋和男，月田承一郎，月田早智子，高井義美 (1995.10) Rho による細胞間接着及び細胞質分裂の制御機構。第54回日本癌学会総会

29. 大塚稔久，黒田真也，清水一也，山森文平，高井義美 (1995.10) Ras の標的蛋白質としての B-Raf と 14-3-3 蛋白質の複合体の精製と性状解析。第54回日本癌学会総会

30. 高井義美 (1995.10) 細胞内シグナル伝達機構。第30回日本肝臓学会東部会

31. 高井義美，佐々木卓也，白瀧博通，中西宏之 (1995.10) Rab3A 低分子量Ｇタンパク質と神経伝達物質の放出機構。第48回日本細胞生物学会

32. 高井義美，田中一馬，佐々木卓也 (1995.12) Ras および Rho 低分子量G蛋白質の標的蛋白質。第18回日本分子生物学会年会

33. 幸野秀志，田中一馬，三野彰久，野中秀太郎，尾崎公美，高井義美 (1995.12) 酵母低分子量G蛋白質 RHO1 を介するシグナル伝達経路に関与する遺伝子群の単離と解析。第18回日本分子生物学会年会

34. 福井浩司，藤田恭之，木村敏啓，佐々木卓也，Thomas C. Südhof, Richard Scheller, 高井義美 (1995.12) Protein Kinase C (PKC) による Munc-18/n-Sec1/rbSec1 のリン酸化とその意義。第18回日本分子生物学会年会

35. 小室竜太郎，佐々木卓也，織田聡，高井義美 (1995.12) PC12 細胞の Ca^{2+} 依存性分泌における Rabphilin-3A の生理機能の解析。第18回日本分子生物学会年会

36. 三浦久幸，白瀧博通，神野靖也，千本松孝明，萩誠一，山本友美，大石秀人，高井義美 (1995.12) 低分子量 G 蛋白質 Rab3A と Rab3A 標的蛋白質 Rabphilin-3A のシナプス小胞への結合様式。第18回日本分子生物学会年会

37. 織田聡，佐々木卓也，内藤陽，小室竜太郎，阪口岳，前田美幾，五十嵐久永，高井義美 (1995.12) 2つの C2 領域を有する新しい蛋白質 Doc2 の単離とその生理機能の解析。第18回日本分子生物学会年会

《神経情報研究部門》

1. Macklin, W. B., Trapp, B. D., Kagawa, T. and Ikenaka, K. (1995.3) Hypomyelination in transgenic mice with multiple copies of the myelin proteolipid protein gene., Twenty-Sixth Meeting of the American Society for Neurochemistry, (Santa Monica, USA)

2. Kim, S. U., Kagawa, T. and Ikenaka, K. (1995.3) Long- term culture of oligodendrocytes derived from transgenic mice with multiple copies of proteolipid protein gene., Twenty-Sixth Meeting of the American Society for Neurochemistry, (Santa Monica, USA)

3. Ikenaka, K., Yamaguchi, Y., Koizumi, K., Ochiai, K., Nakakita, S., Natsuka, S. and Hase, S. (1995.3) Isolation and characterization of brainspecific N-linked sugar chain., Twenty-Sixth

Meeting of the American Society for Neurochemistry, (Santa Monica, USA)

4. Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K.,Ikenaka, K. and Mikoshiba, K. (1995.3) An allogeneic antibody raised against an antigen present normal but not reeler mutant mice disturbed the histotypic organization of normal cerebral cortical cells in reaggregation culture., 第72回日本生理学会大会, (名古屋)

5. Miyata, T., Nakajima, K., Ikenaka, K., Mikoshiba, K. and Ogawa, M. (1995.3) Distribution of a reeler gene-related antigen in the developing mouse cerebellum., 第72回日本生理学会大会, (名古屋)

6. Ikenaka, K., Wakazono, Y., Yuasa, S., Kurahashi, T. and Kaneko, A. (1995.3) Gene Expression during Cerebellar Granule Cell Differentiation., 第20回生理研コンファレンス日英合同生理学岡崎シンポジウム, (岡崎)

7. Ikenaka, K. (1995.4) Astrocyte cell-lineage analysis through measurement of GFAP promoter activity., The Second Joint Meeting of the Physiological Sciences of Japan and U.K. and Eire, (名古屋)

8. Yoshimatsu, T., Tamura, M., Kuriyama, S., Yamada, M., Miyao, Y., Shimizu, K. and Ikenaka, K. (1995.5) Production of high titer recombinant retrovirus., 第1回日本遺伝子治療学会, (東京)

9. Kagawa, T., Oba, A. and Ikenaka, K. (1995.7) Localization of mRNA for UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase in the brain during mouse development., International Symposia on Myelin and Myelin Forming Cells, (岡崎)

10. Yamaguchi, Y., Niinobe, M., Kagawa, T., Mikoshiba, K. and Ikenaka, K. (1995.7) PLP is inositol hexakisphosphate-binding protein; isolation and characterization using isositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding assay., International Symposia on Myelin and Myelin Forming Cells, (岡崎)

11. Yamada, M., Jung, M., Kagawa, T., Nave, K.-A. and Ikenaka, K. (1995.7) PLP gene products induce secretion of a humoral factor that regulates maturation/survival of oligodendrocytes., International Symposia on Myelin and Myelin Forming Cells, (岡崎)

12. Ikenaka, K., Yamada, M., Yamaguchi, Y. and Kagawa, T. (1995.7) The role of PLP in myelination and dysmyelination., Fifteenth Meeting of the International Society for Neurochemistry, (京都)

13. Ikenaka, K., Nakahira, K., Baba, H., Morita, N. and Mikoshiba, K. (1995.7) Detection of GFAP promoter activity using retrovirus vectors., Fifteenth Meeting of the International Society for Neurochemistry, (京都)

14. Ikenaka, K., Wakazono, Y., Yuasa, S., Kurahashi, T. and Kaneko, A. (1995.7) Gene Expression during Cerebellar Granule Cell Differentiation., IBRO Satellite Symposium, (東京)

15. 山口宜秀，新延道夫，鹿川哲史，御子柴克彦，池中一裕，(1995.9) ミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) はイノシトールポリリン酸に高親和性の結合活性を示す，第68回日本生化学会大会，(仙台)

16. 小泉克久，山田真久，鹿川哲史，池中一裕，(1995.9) アンチセンス DNA を用いたミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) 遺伝子発現の調節，第68回日本生化学会大会，(仙台)

17. 鹿川哲史，大庭明生，池中一裕，(1995.9) 中枢神経系におけるオリゴデンドロサイトの起源，第68回日本生化学会大会，(仙台)

18. 池中一裕，(1995.9) レトロウイルスを用いた癌の遺伝子療法の進歩と治療への応用，第33回日本癌治療学会総会ランチョンセミナー，(札幌)

19. 池中一裕，馬場広子，(1995.9) 神経系特異的に発現する遺伝子の転写因子のクローニングのストラテジー，日本生物物理学会，(札幌)

20. 宮尾泰慶，清水恵司，田村雅一，馬淵英一郎，貴島晴彦，山田正信，大川元久，吉松忠憲，御子柴克彦，早川徹，池中一裕，(1995.10) 悪性グリオーマの特異的遺伝子治療における MBP プロモーターの有用性，第54回日本癌学会総会，(京都)

21. 栗山茂樹，中谷敏也，増井一弘，阪本たけみ，富永謙太郎，吉川正英，福井博，池中一裕，辻井正，(1995.10) ウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子導入肝癌細胞による腫瘍形成抑制効果に関する検討，第54回日本癌学会総会，(京都)

22. 増井一弘，栗山茂樹，阪本たけみ，中谷敏也，富永謙太郎，吉川正英，福井博，池中一裕，辻井正，(1995.10) 大腸菌由来シトシンデアミナーゼ遺伝子導入細胞の親株細胞に対する障害性 (bystander effect) の検討，第54回日本癌学会総会，（京都）

23. 田村雅一，清水恵司，山田正信，宮尾泰慶，吉松忠憲，貴島晴彦，中川秀光，早川徹，池中一裕，(1995.10) HTK 遺伝子導入腫瘍細胞を利用した脳腫瘍遺伝子治療，第54回日本癌学会総会，（京都）

24. 阪本たけみ，栗山茂樹，増井一弘，松為裕二，福井博，池中一裕，辻井正，(1995.10) レトロウイルスベクターによる suicide 遺伝子導入腫瘍細胞のプロドラッグに対する耐性獲得機構，第54回日本癌学会総会，（京都）

25. 山田真久，M.Jung, 鹿川哲史，K.-A. Nave, 池中一裕，(1995.10) PLP 遺伝子産物の発現と分化・生存因子の放出，第48回日本細胞生物学会大会，（仙台）

26. 馬場広子，田中文啓，秋田裕美，池中一裕，(1995.10) グリア特異的遺伝子の転写活性を指標としたアストロサイト不死化細胞株の樹立，第48回日本生物学会大会，（仙台）

27. Ikenaka, K., (1995.10) Gene therapy of glioma using retroviral vectors., International Symposium of Molecular Neurosurgery based on Gene Therapy, （名古屋）

28. 池中一裕，(1995.10) ミエリンプロテオリピド蛋白質遺伝子発現異常とミエリン形成異常，千里ライフサイエンスセミナー　ブレインサイエンスシリーズ　第８回「グリア細胞の最前線ー病態との関連ー」，（大阪）

29. Kagawa, T., Oba, A. and Ikenaka, K. (1995.11) Localization of mRNA for UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase in mouse brain during development. Society for Neuroscience 25th Annual Meeting, (San Diego, USA)

30. 池中一裕，(1995.11) レトロウイルスベクターの改良，第２回遺伝子治療研究会ワークショップ，（東京）

31. 吉松忠憲，田村雅一，池中一裕，(1995.12) 高力価の組み換えレトロウイルス産生株の樹立，第18回日本分子生物学会年会，（名古屋）

質の解析，日本発生生物学会，1995.

11. 八木　健，安田昌弘，甲斐信行，宮川　剛，二木宏明，遺伝子欠損で明らかとなったFynの多様性と特異性，日本分子生物学会，1995.

12. 安田昌弘，光村直洋，八木　健，Postsynaptic densityに存在するFyn結合タンパク質の同定，日本分子生物学会，1995.

13. 光村直洋，甲斐信行，八木　健，マウス脳で発現する新しいカドヘリン様受容体(CNR)の多様性，日本分子生物学会，1995.

14. 甲斐信行，八木　健，マウス中枢神経系Fyn結合分子の特徴的な発現様式，日本分子生物学会，1995.

15. 宮川　剛，八木　健，Fyn欠失マウスにおける聴覚性痙攣発作感受性の亢進，日本分子生物学会，1995.

《高次神経性調節研究部門》

1. Kinoshita M, Murakami I, Kimura T & Komatsu H (1995.7) Perceptual filling-in occurs at the monocular scotoma without reorganization of retinotopic map of the monkey V1. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience (Kyoto)

2. Murakami I, Kinoshita M, Kimura T & Komatsu H (1995.7) Do V1 neurons representing the blind spot region respond to stimuli for perceptual filling-in? Fourth IBRO World Congress of Neuroscience (Kyoto)

3. Komatsu H (1995.7) Neural representation of color in the inferior temporal cortex of the macaque monkey. Physiology and Anatomy of the Association Cortices (Satellite Symposium of 4th IBRO Meeting) (Inuyama)

4. Komatsu H, Murakami I & Kinoshita M (1995.11) Spatial summation properties of the macaque V1 neurons in the retinotopic representation of the blind spot. Society for Neuroscience (San Diego, USA)

5. Komatsu H, Murakami I & Kinoshita M (1995.12) Surface representation in the visual system. Ninth Toyota Conference (Mikkabi)

6. 小松英彦 (1995.10) 大脳皮質における色情報処理。カラーフォーラム JAPAN '95 (東京)

《生体システム研究部門》

1. Homma Y, Yokoyama T, Matsuyama K & Mori, S. (1995.7) Fastigiofugal projection to the brainstem and spinal cord in the cat. 4th IBRO Congress of Neuroscience (Kyoto)

2. Iwakiri H, Matsuyama K, Asanome M & Mori, S. (1995.7) Paradoxical sleep-suppressing action of serotonergic system projecting to the medial pontine reticular formation in freely moving cats. 4th IBRO Congress of Neuroscience. (Kyoto)

3. Mori S (1995.10) Brainstem mechanisms of postural fixation in relation to postural muscle tone. 10th International Congress of Electromyography and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

4. Mori S, Iwakiri H, Matsuyama K & Asanome M. (1995.9) An increase in the extracellular levels of 5-HT and agonists in the medial pontine reticular formation results in an increase in wake proportion in a freely moving cat. 2nd International Congress of World Federation of Sleep Research Society (Nassou, The Bahamas)

5. Matsuyama K, Nakajima K, Miyashita E & Mori, S. (1995.7) Spinal innervation patterns of the nucleus reticularis magnocellularis in the cat. 4th IBRO Congress of Neuroscience (Kyoto)

6. Matsuyama K & Mori S (1995.3) Collateral projection patterns of single pontine reticulospinal axons innervating multiple spinal segments of the cat. 2nd Joint Meeting of the Physiological Society of Japan, U.K. and Eire (Okazaki)

7. Miyashita E, Hamada Y, Ogura M & Mori S (1995) Functional connectivity of neuron in the sensory-motor system changes depending on the patterns of vibrissal movements in rats: Analysis by time dependent scatter diagrams 25th Annual Meeting of Society for Neuroscience (SanDiego, California)

8. Nakajima K, Myoga H, Matsuyama K & Mori, S. (1995.7) Contribution of serotonergic system to postnatal development of locomotor movements in newborn rats. 4th IBRO Congress of Neuroscience (Kyoto)

9. Nakajima K, Miyashita E, Matsuyama K & Mori S (1995.3) Postnatal development of locomotor capability in relation to maturation of serotoninergic innervation in newborn rats 2nd Joint Meeting of the Physiological Society of Japan, U. K. and Eire (Okazaki)

10. 岩切裕昌，浅野目充，森　茂美 (1995.3) 睡眠覚醒制御に関与する内側橋網様体セロトニンの機能的役割　第72回日本生理学会大会（名古屋）

11. 小倉光博，山田高嗣，宮下英三，森　茂美 (1995.10) ラット黒質網様部と脚橋被蓋核および延髄網様体投射細胞との形態学的接続様式，第42回中部日本生理学会（名古屋）

12. 中隣克己，茗荷秀昭，松山清治，森　茂美 (1995.3) 新生ラットの遊泳運動とセロトニン作動系とのかかわり　第72回日本生理学会大会（名古屋）

13. 中隣克己，松山清治，森　茂美 (1995.10) セロトニン作動系と新生ラット歩行能力の発達　第42回中部日本生理学会（名古屋）

14. 本間　裕，松山清治，森　茂美 (1995.3) ネコ小脳室頂核の脳幹および脊髄に対する神経線維，終末の投射様式　第72回日本生理学会大会（名古屋）

15. 松山清治，中隣克己，森　茂美 (1995.3) ネコ橋網様体脊髄路軸索群の脊髄内下行レベルの差異と分枝様式　第72回日本生理学会大会（名古屋）

16. 宮下英三，山田高嗣，森　茂美 (1995.3) ラットのひげ運動系における感覚・運動統合機序　第72回日本生理学会大会（名古屋）

17. 森　茂美，宮下英三，浅野目充，中隣克己 (1995.10) トレッドミル上でのサルの四足歩行運動とその歩容，第42回中部日本生理学会（名古屋）

18. 横山貴康，野中　聡，森　茂美 (1995.3) ネコ内喉頭筋の筋線維タイプの分布　第72回日本生理学会大会（名古屋）

《感覚・運動機能研究プロジェクト》

1. Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.4) Bilateral second sensory cortices are initially activated following painful stimulation in man: A magnetoencephalographic study. The Second Meeting of the Physiological Societies of Japan and U.K. and Eire. Nagoya Symposium (Nagoya)

2. Koyama S, Nageishi Y & Shimokochi M (1995.6) ERPs during word recognition: N400 and reaction time. The XIth International Conference on Event-Related Potentials of the Brain (Okinawa)

3. Koyama S, Nageishi Y & Shimokochi M (1995.6) ERPs during memory search task: N400 and search. The XIth International Conference on Event-Related Potentials of the Brain (Okinawa)

4. Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.7) Bilateral second sensory cortices are initially activated following painful stimulation in man: A magnetoencephalographic study. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience (Kyoto)

5. Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Shimojo M, Kitamura Y & Watanabe S (1995.10) Topography of somatosensory evoked magnetic fields following posterior tibial nerve stimulation. The Tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium.Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

6. Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.10) Pain-related magnetic fields following painful CO_2 laser stimulation in man. The Tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium. Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

7. Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.10) Somatosensory evoked magnetic fields following stimulation of the lip in humans. The Tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium. Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

8. Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.10) Soma-

tosensory evoked magnetic fields following mechanical stimulation of the scalp in humans. The Tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium. Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

9. Koyama S, Kakigi R, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.10) Event-related magnetic fields during a character discrimination task. The Tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium. Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

10. Kitamura Y, Kakigi R, Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Nagata O, Takeshima Y, Mori M, Shimojo M & Watanabe S (1995.10) Pain-related somatosensory evoked magnetic fields. The Tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium. Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

11. Shimojo M, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Kitamura Y & Watanabe S (1995.10) Intracerebral interaction caused by bilateral median nerve stimulation in man. The Tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium. Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

12. Shimojo M, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Kitamura Y & Watanabe S (1995.10) Differentiation of receptive fields in the sensory cortex following stimulation of various nerves of the lower limb in man: Magnetoencephalographic study. The Tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium. Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

13. Nakamura A, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Kitamura Y & Shimojo M (1995.10) Visual evoked magnetic fields to half- and quadrant-field pattern reversal stimulation. The Tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium. Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

14. Kakigi R (1995.10) Clinical application of laser evoked potentials. The Xth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

15. Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Shimojo M, Kitamura Y & Watanabe S (1995.10) Topography of somatosensory evoked magnetic fields following posterior tibial nerve stimula-

tion. The Xth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

16. Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.10) Pain-related magnetic fields following painful CO_2 laser stimulation in man. The Xth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

17. Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.10) Somatosensory evoked magnetic fields following stimulation of the lip in humans. The Xth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

18. Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.10) Somatosensory evoked magnetic fields following mechanical stimulation of the scalp in humans. The Xth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

19. Koyama S, Kakigi R, Hoshiyama M, Kitamura Y, Shimojo M & Watanabe S (1995.10) Event-related magnetic fields during a character discrimination task. The Xth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

20. Kitamura Y, Kakigi R, Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Nagata O, Takesh-ima Y, Mori M, Shimojo M & Watanabe S (1995) Pain-related somatosensory evoked magnetic fields. The Xth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

21. Shimojo M, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Kitamura Y & Watanabe S (1995.10) Intracerebral interaction caused by bilateral median nerve stimulation in man. The Xth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

22. Osaka M, Osaka N, Koyama S, Nambu A, Nakatani K & Kakigi R (1995) peak alpha frequency of magnetoencephalography (MEG) changes during the performa-nce of verbal working memory task. The Xth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology (Kyoto)

23. Kaneoke Y & Vitek JL (1995.11) The motor thalamus in the Parkinsonian primate: Enhanced burst and oscillatory activities. 25th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego)

24. 柿木隆介 (1995.2) 新しい痛覚検査法の紹介　CO_2 レーザー刺激誘発電位　日本慢性疼痛学会（京都）

25. 柿木隆介，宝珠山稔 (1995.3) ヒトの後脛骨神経刺激による体性感覚誘発脳磁界　第72回日本生理学会大会（名古屋）

26. 宝珠山稔, 柿木隆介 (1995.3) 口唇刺激による体性感覚誘発磁界　第72回日本生理学会大会（名古屋）

27. 柿木隆介，小山幸子，宝珠山稔，北村吉宏，下条素子，渡邊昌子 (1995.5) CO_2 レーザー刺激による痛覚関連誘発脳磁界（痛覚脳磁界）第10回日本生体磁気学会（仙台）

28. 宝珠山稔，柿木隆介，小山幸子，北村吉宏，下条素子，渡邊昌子 (1995.5) 口唇および頭皮刺激による体性感覚誘発脳磁場　第10回日本生体磁気学会（仙台）

29. 北村吉宏，柿木隆介，宝珠山稔，小山幸子，下条素子，渡邊昌子 (1995.5) 上肢電気刺激による痛覚関連誘発脳磁界　第10回日本生体磁気学会（仙台）

30. 柿木隆介，宝珠山稔，北村吉宏，下条素子，渡邊昌子 (1995.5) CO_2 レーザー刺激による痛覚関連誘発脳磁界（痛覚脳磁界）第36回日本神経学会（名古屋）

31. 宝珠山稔，柿木隆介，小山幸子，北村吉宏，下条素子，渡邊昌子 (1995.5) 口唇刺激による体性感覚誘発脳磁場　第36回日本神経学会（名古屋）

32. 北村吉宏，柿木隆介，宝珠山稔，小山幸子，下条素子，渡邊昌子 (1995.5) 上肢電気刺激による痛覚関連誘発脳磁界　第36回日本神経学会（名古屋）

33. 金桶吉起，Vitek JL (1995.5) 随意運動における大脳基底核の役割　第36回日本神経学会（名古屋）

34. 北村吉宏，柿木隆介，宝珠山稔，小山幸子，下条素子，渡邊昌子 (1995.7) 上肢電気刺激による痛覚関連誘発脳磁界　第 4 回 MI 研究会（東京）

35. 北村吉宏，柿木隆介，宝珠山稔，小山幸子，渡邊昌子，下条素子 (1995.10) 下肢電気刺激による痛覚関連誘発脳磁界　第25回日本脳波・筋電図学会（京都）

36. 渡邊昌子，柿木隆介，宝珠山稔，北村吉宏，小山幸子，下条素子 (1995.10) ヒトの痛覚認知におよぼす侵害的冷覚刺激の影響　第25回日本脳波・筋電図学会（京都）

37. 柿木隆介，北村吉宏 (1995.12) 痛覚関連体性感覚誘発脳磁界　第17回日本疼痛学会（福岡）

《高次脳機能研究プロジェクト》

(学会抄録)

1. Nambu A, Takada M, Tokuno H & Inase M (1995) Reversed somatotopical representations in the subthalamic nucleus as revealed by cortical inputs from the primary motor cortex and the supplementary motor area. International Basal Ganglia Society Vth International Triennial Meeting, Abstract: 63

2. Nambu A, Takada M, Tokuno H & Inase M (1995) Double somatotopical representation in the subthalamic nucleus revealed by cortical inputs from the primary motor cortex and the supplementary motor area. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, Abstract: 324

3. Takada M, Tokuno H, Nambu A & Inase M (1995) Somatotopical arrangement of inputs from the supplementary motor area to the putamen in the macaque monkey. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, Abstract: 316

4. Sasaki K (1995) Activities of the human frontal association cortex studied by use of MEG. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, Abstract: 75

1. Nambu A, Takada M, Tokuno H & Inase M (1995) Reversed somatotopical representations in the subthalamic nucleus as revealed by cortical inputs from the primary motor cortex and the supplementary motor area. International Basal Ganglia Society Vth International Triennial Meeting, Abstract: 63

2. Nambu A, Takada M, Tokuno H & Inase M (1995,7) Double somatotopical representation in the subthalamic nucleus revealed by cortical inputs from the primary motor cortex and the supplementary motor area. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, Abstract: 324 (Kyoto)

3. Takada M, Tokuno H, Nambu A & Inase M (1995,7) Somatotopical arrangement of inputs from the supplementary motor area to the putamen in the macaque monkey. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, Abstract: 316 (Kyoto)

4．Sasaki K (1995,7) Activities of the human frontal association cortex studied by use of MEG. Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, Abstract: 75 (Kyoto)

5．玄番央恵，佐々木和夫 (1995,4) 運動野活動の体性感覚野による一過性代償．第72回日本生理学会大会（名古屋）

《自律機能研究プロジェクト》

1．Kuriki S, Hirata Y & Kobayashi T (1995·3) Brain dynamics revealed by neuromagnetic approach. Second International Symposium on Bioscience and Human-Technology (Tsukuba)

2．Kuriki S, Hirata Y, Fujimaki N, Tsuchiya N & Kobayashi T (1995·6) Neuromagnetic study of human cortical areas related to visual/auditory information processing. First International Conference on Functional Mapping of the Human Brain (Paris)

3．Kuriki S (1995·7)Dynamic characteristics of brain activation in visual and auditory functions: Based on MEG recordings and MRI registrations. Sonderkolloquium; Nurnberg-Erlangen University (Erlangen)

4．Kuriki S (1995·10) MEG study on the cortical activity during visual and auditory information processing. The 10th Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium, Visualization of Information Processing in the Human Brain: Recent Advances in MEG and Functional MRI (Tokyo)

5．寿永七月男，小林哲生，栗城真也 (1995·5) 多チャネル同時計測された脳磁界 α リズムの時空間特性の解析。日本 ME 学会大会（東京）

6．黄孔良，加藤和夫，小林哲生，栗城眞也 (1995·5) 仮名短期記憶課題遂行時における誘発電位。日本 ME 学会大会（東京）

7．加藤和夫，小林哲生，栗城真也 (1995·5) 両眼刺激の競合的知覚に伴う脳波リズムの抑制。日本 ME 学会大会（東京）

8．小池佑辰，平田恵啓，小林哲生，栗城真也 (1995·5) 色変化に伴う誘発脳磁界。日本生体磁

気学会大会（仙台）

9．栗城真也，平田恵啓，藤巻則夫，小林哲生 (1995·6) 視覚文字の音韻的照合における脳活動。非侵襲脳機能局在研究会（東京）

10. 小池佑辰，平田恵啓，小林哲生，栗城真也 (1995·10) 色変化に伴う誘発脳磁界（第２報）。電気関係学会北海道支部連合大会（札幌）

11. 黄孔良，加藤和夫，小林哲生，栗城真也 (1995·10) ひらがなとカタカナの音韻的照合時における事象関連電位。電気関係学会北海道支部連合大会（札幌）

12. 栗城真也 (1995·11) MEG （脳磁図）計測による脳機能解析。秋田ＭＥ研究会（秋田）

《組織培養標本室》

1．古家園子，尾崎有香，中山孝 (1995, 4) アストロサイト，小腸絨毛上皮下線維芽細胞および筋層介在細胞を染めるモノクローナル抗体の解析。第100回日本解剖学会総会（東京）

2．家田秀明，成瀬達，古家園子，軒原清史，北川元二，早川哲夫 (1995, 11) 消化管におけるプログアニリン産生細胞の局在。第37回日本消化器病学会，名古屋

《超高圧電子顕微鏡室》

1．垰本勝司，有井達夫，浜　清 (1995.4) 培養 glioma 細胞の細胞骨格に及ぼす各種成長因子及び Cytokine の影響に関する免疫電顕立体観察。第13回日本脳腫瘍病理学会（熊本）

2．有井達夫，Butzer, Christine, 吉村伸明 (1995.5) 超高圧電顕によるフィルム像とイメージングプレート像の特性。第51回日本電顕学会（堺）

3．有井達夫，吉村伸明 (1995.9) 超高圧電顕によるイメージングプレート像の特性。日本物理学会1995年秋の分科会（堺）

4．谷口美恵子，鈴木直哉，有井達夫 (1995.9) 植物培養細胞の電気融合過程の共焦点レーザー

顕微鏡観察。第33回生物物理学会年会（札幌）

5．有井達夫，吉村伸明 (1995.10) 電子線二次元検出器としてのイメージングプレートの感度と分解能。日本結晶学会平成７年度年会（名古屋）

6．Sasaki, K., Saka, H. Arii, T. (1995.12) Cyclic motion of grain boundary induced by electron beam irradiatio in intermetallic compound. Japan Instit. Metals '95 Fall Annual Meeting (Honolulu)

《超高圧電子顕微鏡共同利用実験》

1．荒木伸一，横田貞記，高島庸一郎，小川和朗 (1995.4) ラット肝細胞におけるライソゾームの形状とカテプシンＤ含量の関係。日本解剖学会第100回総会（東京）

2．永田哲士，臼田信光 (1995.4) 超高圧電顕による厚い組織化学的標本の三次元的観察。日本解剖学会第100回総会（東京）

3．橋本龍樹，米山綱雄，大谷　浩，田中　修 (1995.4) 抗体産生細胞における分泌阻害剤 (brefeldin A) による形態変化の超高圧・免疫電顕による検討。日本解剖学会第100回総会（東京）

4．垰本勝司，有井達夫，浜　清 (1995.4) 培養 glioma 細胞の細胞骨格に及ぼす各種成長因子及び Cytokine の影響に関する免疫電顕立体観察。第13回日本脳腫瘍病理学会（熊本）

5．追手　巍，森岡哲夫，斉藤真子，清水不二雄 (1995.4) ラット・メサンギウム細胞上に存在する Thy-1 抗原の性状。第84回日本病理学会総会（名古屋）

6．Sasaki, K. Saka, K. (1995.6) Crystallographic analysis of grain boundary vibration induced by electron beam irradiation in $CuGa_2$. 7th Int. Conf. Intergranular and Interphase Boundaries in Meterials (Lisbon).

7．谷口美恵子，鈴木直哉，有井達夫 (1995.9) 植物培養細胞の電気融合過程の共焦点レーザー顕微鏡観察。第33回生物物理学会年会（札幌）

8．Sasaki, K., Saka, H. Arii, T. (1995.12) Cyclic motion of grain boundary induced by electron beam irradiation in intermetallic compound. Japan Instit. Metals '95 Fall Annual Meeting (Honolulu).

《動物実験施設》

1．Naruse S, Nakamura M, Wei M, Ozaki T, Ando E, Nokihara K, Wray V Kitagawa M & Hayakawa T (1995.10) Effects of PACAP-VIP hybrid peptides on gastric blood flow in conscious dogs. The 2nd International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides (Hanover)

2．成瀬　達，尾崎　毅 (1995.3) PACAP および関連ペプチドの胆嚢に対する作用。第72回日本生理学会（名古屋）

《江橋研究室》

1．江橋節郎 (1995.1) 無機イオンと生命　講書始め（東京）

2．江橋節郎 (1995.3) 科学技術とは何か?! 脳の世紀を目前にして（特別講演）シンポジウム '95 明日をめざす科学技術－科学技術振興調整費の成果を中心として－（東京）

3．江橋節郎 (1995.3) ささやかな科学（特別講演）日本物理学会第50回年会，生体物理，磁気共鳴，X線，粒子線，統計力学・物性基礎論合同シンポジウム　蛋白質構造研究の新展開（横浜）

4．Ebashi S(1995.7) Neuroscience vs Pharamacology 4th IBRO World Congress of Neuroscience (Kyoto)

5．江橋節郎 (1995.9) 無機イオンと生命　循環器学術講演会特別講演（東京）

6．Ebashi S(1995.9) Should biological science become an exact science? The XVIII Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases (Kyoto)

7．Ebashi S(1995.11) The Ca^{2+} Concept as the Fundamental of Physiology and Pharmacology of Living Organism 第47次韓国薬理学会　秋期学術大会（韓国・慶州）

【共同研究報告】

共同研究報告

〔目　　次〕

1．ミオシン ATPase 反応中間体の構造（田之倉優他）…… 179
2．味刺激によるマウス脳内 c-fos 発現分布様式（小川　尚他）…… 181
3．タンパク質の「モルテン・グロビュール構造」に関する物理化学的研究
（惠良聖一他）…… 183
4．分泌時間経過に沿った腺房細胞細胞内メッセンジャーの動態
（村上政隆他）…… 184
5．肥満細胞における開口放出と細胞内局所 Ca^{2+} 変動[1]（葉原芳昭他）…… 185
6．温熱処理マウス乳癌細胞の細胞内カルシウム濃度に及ぼす
カルモジュリン阻害剤の影響（近藤　隆他）…… 186
7．聴覚中枢電気活動の光学的測定（橋本　亨他）…… 187
8．肝細胞分泌神経再生促進因子の作用発現機構（堀江秀典他）…… 189
9．遺伝子操作による P_{2U} 受容体機能の研究（榎本浩一他）…… 190
10．多価陰イオン蛍光物質の細胞内外カルシウムイオン依存性分泌機構
（柴　芳樹他）…… 191
11．イカ巨大神経カリウムホメオスタシス維持機構の研究（井上　勲他）… 192
12．培養伊東細胞における Na^{+}-Ca^{2+} exchanger の同定（有井滋樹他）…… 194
13．小腸陰窩上皮細胞のサイクリック AMP 依存性 Cl^{-} 分泌における
CFTR の役割（上田俊二他）…… 197
14．中枢神経系におけるグリア細胞の起原とその分化過程
―組み換えウイルスによる細胞標識，遺伝子転写活性可視化による解析―
（森田規之他）…… 198
15．悪性脳腫瘍に対する腫瘍内増殖性レトロウイルスベクターを用いた
遺伝子治療の開発的研究（清水恵司他）…… 201
16．脳特異的糖鎖に関する研究（池中一裕他）…… 202
17．オプシン産生の日周期変動因子の解析（鈴木龍夫他）…… 203
18．線虫 *C. elegans* のサイクリックヌクレオチド依存性チャンネルに関する
電気生理学的研究（森　郁恵他）…… 204
19．虚血様負荷による LTP 発生とニューロン障害の相関（青木　藩他）… 205
20．随意運動の中枢機序に関する研究（達本　徹他）…… 207

21. 大腸の粘膜筋板におけるセロトニン含有神経に関する研究
（石川一志他） …… 208
22. 先天性 A ganglionosis ラットにおける NO の意義（角田ゆう子他） …… 210
23. グアニリン受容体を介した腸液分泌調節（成瀬　達他） …… 212
24. 消化管におけるセロトニンの機能的役割の研究（藤宮峯子他） …… 215
25. 消化管機能制御作用をもつミルク由来生理活性物質の探索
（原田悦守他） …… 217
26. 気道分泌に関わるイオンチャネルと細胞膜動員の分子的制御機構
（岩田重信他） …… 219

1．ミオシン ATPase 反応中間体の構造

田之倉優，鈴木良和（東京大・生物生産工学研究センター）
江橋節郎，小幡邦彦（生理研）

ミオシンの ATP 加水分解活性は，筋肉が収縮する際の化学的エネルギー (ATP) の力学的エネルギー（収縮）への変換過程の鍵を握っている。ミオシンにおけるエネルギー変換の機序を分子レベルで明らかにするためには，ATP の加水分解に伴うミオシンの高次構造の変化，とくに反応中間状態におけるミオシンの高次構造を解明することが重要である。本研究では，ミオシン ATPase の反応中間体における立体構造ならびにヌクレオチドとの相互作用を明らかにすることを目指して，平滑筋ミオシンサブフラグメント 1 (S1) と ADP との複合体について，ミクロ環境

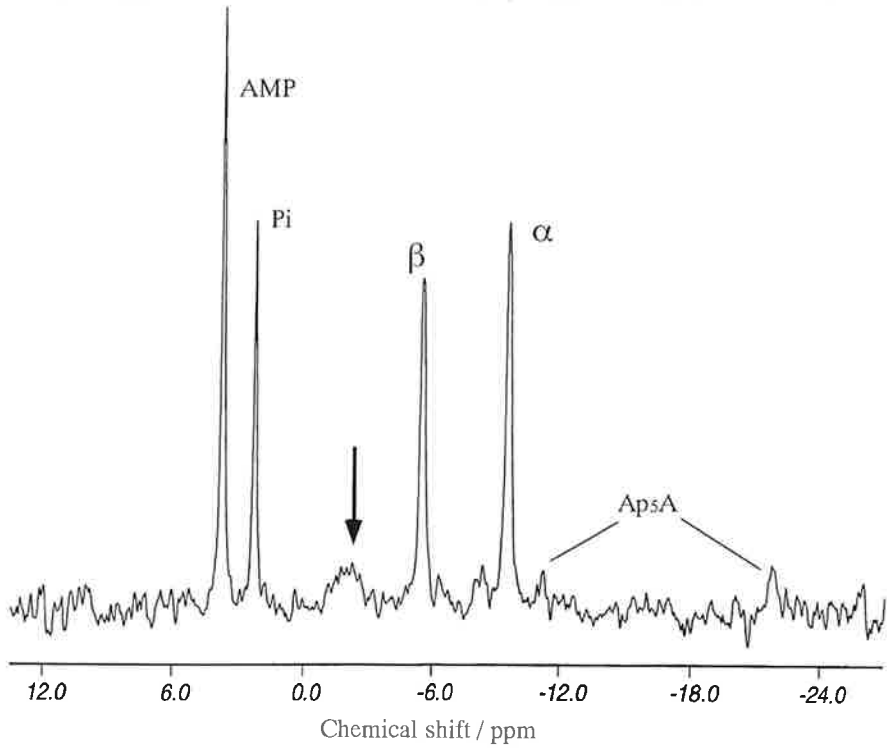


図 1．トリ砂のう平滑筋ミオシン S1 の10℃における 162MHz ^{31}P NMR スペクトル (Bruker AM400)。測定には，1.4mM S1, 2.8mM ADP, 0.3M KCl, 10mM $MgCl_2$, 0.1mM EGTA, 2mM DTT, 40μM Ap_5A, 50mM Imidazole/HCl (pH7.0) を含む重水溶液を用いた。スペクトルは，5,000回の積算（60°パルス，3.0秒間隔）により，LB = 20Hz のウインドウをかけて得られた。化学シフトは 85% H_3PO_4 を外部基準として表した。S1 と複合体を形成した ADP の β リン酸のシグナルを矢印で示した。α と β は，それぞれ遊離の ADP の α および β リン酸のシグナルである。Ap_5A は，試料に混入した myokinase に対する阻害剤である。AMP と無機リン酸 (P_i) は，Ap_5A を加えたにも関わらず混入している myokinase 活性により測定中に生成した。

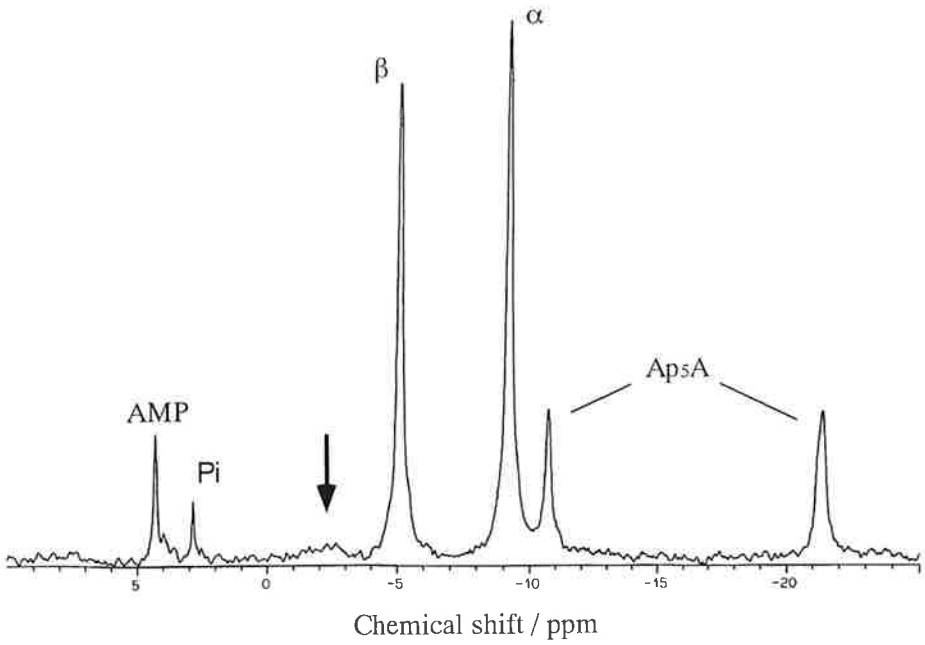


図２．トリ砂のう平滑筋ミオシン S1 の30℃における 202MHz ^{31}P NMR スペクトル (JEOL α-500)。測定には，0.86mM S1, 2.58mM ADP, 0.6M KCl, 10mM $MgCl_2$, 0.1mM EGTA, 2mM DTT, 200μM Ap_5A, 10μM leupeptin, 50mM Imidazole/HCl (pH7.0) を含む重水溶液を用いた。スペクトルは，12,000回の積算（60°パルス，4.0秒間隔）により，LB = 20Hz のウインドウをかけて得られた。化学シフトの基準ならびにシグナルの帰属は図１と同じである。

および相互作用のよいプローブである燐核磁気共鳴法 (^{31}P NMR) による測定を行った。

ミオシンはトリ砂のう平滑筋から抽出し (Ebashi, 1979), *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼで処理して S1 を得た（田之倉ら，1995)。^{31}P NMR スペクトルは JEOL α500 NMR 分光計を用いて 202MHz で，また Bruker AM400 NMR 分光計を用いて 162MHz で，85％無機リン酸を化学シフトの外部標準として測定した。

10℃，pH7.0 で，S1 に対してモル比２倍の ADP が存在する条件における 162MHz ^{31}P NMR スペクトルを測定したところ，スペクトルには遊離の ADP のシグナルに加えて，S1-ADP 複合体の βリン酸のシグナルが -2 ～ -3ppm にかけて強度が弱く幅広いシグナルとして観測された（図１)。温度依存性と磁場強度依存性を調べた結果，30℃，pH7.0 で，S1 に対してモル比３倍の ADP が存在する条件における 202MHz ^{31}P NMR スペクトルで，同様に -2 ～ -3ppm に S1-ADP 複合体の βリン酸のシグナルが観測された（図２)。いずれの場合も複合体のシグナルの強度が弱く線幅がブロードであり，温度依存性について明確に観測することは出来なかった。複合体シグナルのブロードニングの原因としては，化学シフトの異方性の効果や，平滑筋 S1 の分子量が著しく大きいためなどが考えられるが，現在までに行った 121 ～ 202MHz の測定ではいず

れであるかはっきりした結論は得られていない。いずれにしても，骨格筋ミオシン S1 (Tanokura and Ebashi, 1993) の場合に比べると，シグナルの化学シフトが似ていることから複合体中の ADP の β リン酸の周りの環境は似ていることが示されるものの，線幅がブロードであり，より詳細に解析するためには分子量の小さな S1 を得る条件を検討することが必要がある。

2．味刺激によるマウス脳内 c-fos 発現分布様式

小川　尚，橋本弘司（熊本大・医・生理学第二）
小幡邦彦（生理研）

味覚拒否行動など味覚学習には，扁桃核と共に大脳皮質味覚野は必須の脳内構造とされている。味覚学習時には刺激に伴って，蛋白質合成の増加，mRNA 発現の増加，伝達物質合成の増加があるはずで，最近，ラットの脳幹味覚関連領域で味覚刺激や味覚嫌悪学習に伴い，FOS 蛋白質合成（即ち c-fos mRNA 合成）が行われていることが報告されている。刺激に伴い一過性に発現する FOS 蛋白質の免疫組織化学的手法ならびに c-fos mRNA の *in situ* hybridization 法による脳内部位の同定は，学習・記憶の研究に大きく貢献している。

本研究では，組織化学的に適した大きさの脳を持つマウスを用い，味覚拒否行動時に FOS 蛋白質の増加を生じている脳内部位を免疫組織化学的に調べ，味覚学習に関与する部位を同定する事を目的とした。

動物は，未経験の味を有する溶液（条件刺激）を摂取させた後で，胃腸障害を起こしたり，嘔吐中枢を刺激する薬物（無条件刺激）を与えると味覚嫌悪学習を獲得する。本実験では，蒸留水で 1 日10分間の給水トレーニングを行ったマウスに対して，条件刺激として 0.1M LiCi を摂取させて塩味条件刺激と胃腸障害（無条件刺激）を同時に起こさせた。また，無条件刺激の給水溶液として 0.1M NaCl （塩味条件刺激），あるいは 0.5M sucrose 溶液（甘味条件刺激）を摂取させ，摂取直後に等張の 0.15M LiCl を体重の0.2％だけ腹腔内に注射し（無条件刺激），味覚嫌悪学習のモデルとした。

給水トレーニング後のマウスに NaCl を摂取させると，結合腕周囲核において背側外側亜核にのみ FOS 陽性細胞が見られるが（図 1a），LiCl による嫌悪学習獲得後では NaCl 摂取に対する拒否行動が観察され，背側外側亜核と，外部外側亜核の 2 ヶ所に陽性細胞が見られると共に，内側内側核にも比較的多数見られた（図 1b）。甘味に対する嫌悪学習獲得後の結果も，塩味に対する嫌悪学習の結果と同様であった。また，大脳皮質においても FOS 陽性細胞の分布を調べたが，顕著な差は見られなかった。

これらの結果は，従来ラットで知られている結合腕周囲核の FOS 蛋白質合成部位とは異なる部位で c-fos mRNA が発現していることを示しており，動物種により味覚伝導路など神経回路網

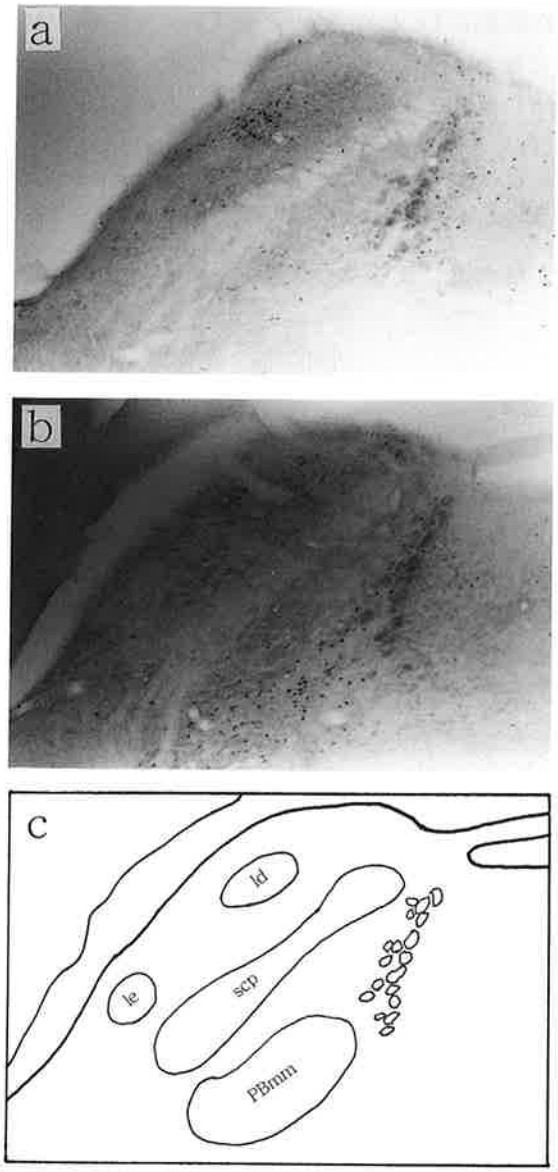


図１．溶液摂取30分後のマウス結合腕周囲核での FOS 陽性細胞の分布。(a) 0.1M NaCl 摂取，(b) 0.1M LiCl 摂取にて味覚嫌悪学習獲得翌日に 0.1M NaCl を摂取させた。(c) 結合腕周囲核の脳地図。
PBld Parabrachial nucleus, dorsal lateral part
PBle Parabrachial nucleus, external lateral part
PBmm Parabrachial nucleus, medial medial part
scp superior cerebellar peduncle

が異なるためか，あるいは，条件刺激呈示法の差異によるものなのかは今後明らかにする必要がある。

3．タンパク質の「モルテン・グロビュール構造」に関する物理化学的研究

惠良聖一，中村浩二，桑田一夫，林 知也（岐阜大・医・第２生理）
曽我美勝（藤田保衛大・衛生・生理）
村上政隆（生理研）

近年，タンパク質の高次構造に関する研究において，天然状態と変性状態の中間体として見いだされているモルテン・グロビュール構造が注目されている。細胞内でタンパク質が合成される場合，正しい立体構造を形成するには，分子シャペロンの介添えが不可欠であるが，この分子シャペロンが認識する構造がモルテン・グロビュール状態である。しかもモルテン・グロビュール構造は，このようなタンパク質－タンパク質間相互作用の問題のみに留まらず，タンパク質の細胞膜透過の問題にも深く関与しているので，この特異的な構造の立体構造について詳細に検討を加え，その生理機能との関連を研究することは，細胞生物学の領域にとって重要なことである。今回我々はその基礎研究として，ウシ血清アルブミン (BSA) の酸性 pH 域にて観測される N-F 転移について，レーザー・ラマン分光法を用いて測定を行った。

BSA は2.5%，0.10M NaCl にて，N, F, E 型になるように調整した。レーザー・ラマン分光測定は日本分光社製 R-800 を用い，Ar レーザーによって 514.5nm で励起した。

BSA には，S-S 結合が BSA1 分子当たり17個存在している。ラマン分光法では，一般にタンパク質内の S-S 結合の S-S 伸縮振動を反映するラマン線は 500 ～ 550cm^{-1} に観察される。これまでの報告によれば，510cm^{-1} 付近にラマン線があるときは，分子内の S-S 結合がゴーシュ・ゴーシュ・ゴーシュのコンフォメーションをとっているとされている。今回の我々の測定でも，BSA の N, F, E 型のいずれにおいても 510cm^{-1} 付近にピークが認められたが，そのピークの高波数側に肩 (shoulder) も観測されたので，BSA 分子内の17個の S-S 結合のコンフォメーションは単にゴーシュ・ゴーシュ・ゴーシュのみではなく，トランスのコンフォメーションも存在していることが明らかになった。

タンパク質の二次構造変化に関しては，そのマーカー・バンドとして，ヘリックス含量に対しては $R\alpha = (I_{940}/I_{1004})$ を指標としてヘリックス含量を見積もることができ，不規則構造に対しては $R_R = (I_{1250}/I_{1340})$ を指標として不規則構造含量を見積もることができる。BSA が N, F, E 型へと変化するにつれて，$R\alpha$ 値は0.49，0.42，0.27と減少し，さらに R_R 値は0.62，0.66，0.78と増加した。このことから，N→F→Eへの構造転移に伴ってヘリックスは明らかに減少し，不規則構造は増加した。これらの結果は，CD で求めた二次構造含量の変化によく対応していた。

以上の予備的なラマン測定結果から，この方法はタンパク質のモルテン・グロビュール構造の解析に非常に有力な手段であることが判明した。

4．分泌時間経過に沿った腺房細胞細胞内メッセンジャーの動態

杉谷博士，横山三紀，吉垣純子，三井由香，古山俊介（日大松戸・歯）
吉村啓一，平松幸治（北大・歯）
赤川公朗（杏林大・医）
村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透（生理研）

本共同研究は，持続分泌を維持するために細胞はどのように受容体以下の機構を運転するかを明かにするために，分泌時間経過に沿った腺房細胞細胞内メッセンジャーの動態を計測することを目的に開始された。今年度は，耳下腺腺房細胞において開口放出に関連し以下の項目について検討した。

1）耳下腺開口放出における VAMP-2 の役割：ラット耳下腺腺房細胞においては cyclic AMP (cAMP) 依存性にアミラーゼの開口放出が引き起こされる。この開口放出に関連するタンパク質を明らかにする目的で神経終末に存在する開口放出関連タンパク質に対する抗体を用いて検討したところ，分泌顆粒膜に抗 VAMP-2 抗体に反応する 18kDa タンパク質の存在を認めた。このタンパク質は VAMP-2 を特異的に分解するプロテアーゼ（ボツリヌスB）で処理により分解されたことより，VAMP-2 であると同定した。さらに耳下腺腺房細胞をストレプトリジンOにより可透過性にし，ボツリヌスBで処理したところ，cAMP によるアミラーゼの開口放出が阻害された。一方，カルシウムによりアミラーゼ放出は引き起こされるが，これに関してはボツリヌスBは効果を示さなかった。このことより，VAMP-2 が cAMP 依存性の開口放出に関連するタンパク質であることが明らかとなった (J. Biol. Chem., in press)。他にも，神経終末に存在する開口放出関連タンパク質の一つである syntaxin に対する抗体と反応するタンパク質が耳下腺および舌下腺に認められた。しかし発現の割合は舌下腺の方が高い。この役割については現在検討中である。

2）一酸化窒素 (NO) による開口放出の調節：NO は細胞内および細胞外メッセンジャーとして種々の生体機能に関与することが知られているが，耳下腺機能との関連を検討した。ウサギ耳下腺は極めて高い一酸化窒素合成酵素 (NOS) が存在することを認めたので，これを精製した。精製 NOS はカルシウム・カルモジュリン依存性に活性化される酵素であった。このことより，細胞内カルシウム動態に関与してその活性調節がなされるものと推測された。分離腺房細胞にムスカリン性受容体刺激を加えるとアミラーゼ放出が引き起こされるが，この分泌は NOS 阻害剤で阻害された。さらに，NO ドナーは単独でアミラーゼ分泌を引き起こした。このことから，NO がアミラーゼ開口放出の調節に何らかの関与があることが考えられ，現在さらに検討している。

3）ラット耳下腺を beta-アゴニスト刺激すると，アミラーゼ分泌と同時に 26kDa タンパク質がリン酸化される。この脱リン酸化には 2C ホスファターゼが関与することを以前報告したが，この酵素を精製したところカルシウムにより活性阻害を受ける新しいタイプの 2C ホスファターゼであることが示唆された (Arch. Biochem. Biophys., in press)。この機能についても検討中である。

4）ラット耳下腺単離細胞潅流系（perifusion 系）でアミラーゼ分泌を測定し，Cキナーゼのアミラーゼ分泌における役割ついて検討した。カルバコール (CCh) やサブスタンス P (Sub P) などいわゆる Ca^{2+}系アゴニストは，単独投与で刺激開始と同時に急激にアミラーゼ分泌を起こし一過性のピークの後減少し，プラトーレベルに達し分泌が維持される。PDBu (phorbol 12, 13-dibutyrate) は，CCh によるアミラーゼ分泌初期ピークを増強した。PDBu の増強効果は時間依存性であり，最大の増強効果を得るためにはあらかじめ 5 分間 PDBu を投与しておく必要があった。活性型フォルボールエステル，PMA (4β-phorbol 12-myristate 13-acetate) も同様の増強作用を示し，不活性型フォルボールエステル，4αPMA は増強効果を示さなかった。

潅流液より Ca^{2+}を取り除くと，PDBu のアミラーゼ分泌増強作用は消失した。C－キナーゼ抑制剤スタウロスポリン (0.5-2.5μM) は，CCh と PDBu によるアミラーゼ分泌増強効果を減少させたが，CCh 単独のアミラーゼ分泌は抑制しなかった。同様に，chelerythrine (20 μM) も CCh 単独のアミラーゼ分泌は抑制しなかった。今回の結果により，CCh によるアミラーゼ分泌においてCキナーゼは主要な役割を果していないことが示唆された。

5．肥満細胞における開口放出と細胞内局所 Ca^{2+}変動[1]

葉原芳昭（北大大学院獣医研究科）
菅野富夫（北大大学院獣医学研究科，生理研）

正常肥満細胞に比べて大型の分泌顆粒を有する beige mouse の腹腔内肥満細胞を採取し，開口放出に伴う細胞内局所 Ca^{2+}の変動を走査型共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて解析した。Indo-1/AM のインキュベーション法で Indo-1 を負荷した beige mouse の腹腔内肥満細胞の蛍光画像に蛍光が認められない空胞が観察され，これらは Indo-1 が取り込まれていない顆粒であると考えられた。従って Indo-1 を用いた場合には Fura-2 で問題となっている compartmentalization の程度は弱いと考えられる。この肥満細胞を compound 48/80 で刺激すると細胞内 Ca^{2+}濃度が上昇したが Monck ら[2]がディジタル共焦点画像取得法でとらえたような，細胞膜と顆粒の接着・開口という現象は明瞭ではなかった。この理由は不明であるが，細胞膜近くに存在する顆粒と細胞膜間の細胞質領域は狭く，装置の空間的分解能によっては蛍光をとらえることができず，あたかも顆粒が開口したかのように誤解する可能性がある。通常の肥満細胞では開口放出に伴い顆粒領域の拡大と変形が観察されるが beige mice の肥満細胞ではそれが認められないことから，開口放出が起きていない可能性がある。しかしながら，compound 48/80 刺激後にヒスタミン分泌は行われており，今後検討する余地が残る。

ラットの副腎髄質細胞を分離し，Indo-1 を負荷して細胞内の Ca^{2+}動態を見たが，カルバコールや PACAP 等の刺激では共焦点画像解析装置の時間的分解能を越える速度で細胞内 Ca^{2+}が変

動し，空間的な差をとらえることは今後の装置の改良に待たねばならない。

レーザー共焦点画像解析装置は依然として改良すべき点が残っており，生物現象の解明に利用するまでには多くの試行錯誤が必要であると結論される。

[1]Habara, Y. and Kanno, T. *Experimental Physiology* (1997) 81: 319-328

[2]Monck, J. R. *et al. J. Cell Biol.* (1992) 116: 745-759

6．温熱処理マウス乳癌細胞の細胞内カルシウム濃度に及ぼすカルモジュリン阻害剤の影響

近藤　隆（神戸大・医・放射線基礎医学）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研・北海道大）

温熱は放射線や制癌剤の効果を増強する作用を有し，新しいがん治療の一技術として臨床に用いられている。今まで共同研究を通じて，温熱処理による培養腫瘍細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加および温熱増感作用を有する各種カルシウム代謝阻害剤の併用効果について検討してきた。その結果，42℃あるいは44℃（1時間）の温熱処理は不可逆的に細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を高めること，TMB-8, ベラパミルあるいはジルチアゼム併用時にさらに $[Ca^{2+}]_i$ を高めること，またこれらは主に細胞外液からの Ca^{2+} 流入とその蓄積によることを示した。しかしながら，これら薬剤による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の増強機構は必ずしも明らかになっていない。ベラパミルにはカルモジュリン (CM) 阻害剤としての作用があるとの報告もあり，本研究では初めに CM 阻害剤で温熱致死増強作用が報告されている W-7 を用い，細胞致死効果の異なる42℃および44℃処理後の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を検討した。細胞として培養マウス乳癌 FM3A 細胞を用いた。$[Ca^{2+}]_i$ は Fura-2 を負荷した細胞について画像解析法を用いて測定した。$[Ca^{2+}]_i$ は処理温度，温熱処理時間および温熱処理後のインキュベーション時間に依存して増加した。37℃で W-7 を存在させた場合 $[Ca^{2+}]_i$ は変わらなかったが，温熱併用処理すると $[Ca^{2+}]_i$ は W-7 の濃度依存性 (～ 100μM) に増加した。特に，W-7 と44℃処理との併用時には，温熱単独処理では認められない 500nM 以上の高い $[Ca^{2+}]_i$ を示す細胞の割合が急増した。これらの増加は IC_{50} 値が低い W-5 では認められなかった。$^{45}Ca^{2+}$ の取込みを測定したところ，44℃処理細胞では，細胞外からの Ca^{2+} の取込み量が増加しており，W-7 を存在させた場合さらに増加した。次に，アミトリプチリンについて調べたところ，37℃で $[Ca^{2+}]_i$ は濃度依存性 (～ 100μM) にある程度増加したが，44℃処理との併用時には，さらに $[Ca^{2+}]_i$ は増加した。また，Ca ＝ ATPase 阻害剤であるルテニウムレッド (500μM) 存在下において44℃処理併用時に，$[Ca^{2+}]_i$ はさらに増加した。これ結果は，ベラパミルや W-7 と44℃併用処理による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は CM 阻害を介した Ca-ATPase 活性化の阻害による Ca^{2+} 排出機能の低下によることを示唆する。

7．聴覚中枢電気活動の光学的測定

橋本　亨（東京医歯大・医用研）
山岸俊一（生理研）
柳沢慧二（鶴見大・歯）
堀川順生（東京医歯大・難治研）

膜電位感受性蛍光色素を用いて，モルモットの聴覚中枢の活動状況を可視画像化し，聴覚中枢の機能的構成を解明することを目的とした。

ネンブタール麻酔，人工呼吸した実験動物の大脳皮質聴覚野を直視下に置き，皮質表面に膜電位感受性色素溶液 (RH795: 0.5 ～ 1 × 10^{-3}) を与えて，聴ニューロンを染色する。Xe ランプのパルス発光を聴覚野に照射し，この励起光 (480 ～ 546nm) により発生する蛍光発光 (620 ～ 1,000nm) を，落射蛍光実体顕微鏡と冷却 CCD カメラ（浜松フォトニクス）により観測する。観測された蛍光発光のうち，中枢電気活動に関係なく発生している背景画像を画像の減算により差し引きすることにより，中枢電気活動の空間パターンを光学的に記録することができた。音刺激に対応して発生する聴覚中枢電気活動の時間的変化を，蛍光発光の瞬時空間パターンの時系列としてとらえた。

図１に，モルモットの鳴き声（調波構造を備えたもの，56dB SPL）によって聴覚中枢に誘起される蛍光発光の変化を示す。中段の画像は，刺激開始後の潜時： 30ms において観察される蛍光発光から潜時： 27ms において見られる蛍光発光を差し引いた差分画像で，3ms の間に起こった中枢活動の変化を画像化したものである（16回加算）。図の中央部に白く見える領域は蛍光発光の増加が発生していることを示している。中央左上部と右下部に黒く見える領域は蛍光発光の減少が発生していることを示している。上段の画像は，潜時： 33ms における蛍光発光と潜時： 30ms にみられる蛍光発光を差し引きした差分画像である。中央上部に蛍光発光の増加を示す空間パターンが見られる。下段は，潜時： 27ms において観察される蛍光発光と潜時： 24ms において見られる蛍光発光の差分画像を示す。上段，中段と比較すると，差分の小さいこと，すなわち蛍光発光の変化が弱いことがわかる。刺激開始から画像観測を行うまでの時間を順次変えていくと，それぞれの潜時に対応した応答画像が得られ，中枢活動の時間経過を観察することができる。潜時の異なる蛍光画像の差分を取ることにより，応答の空間的広がりの時間的変化を画像化することができた。

聴覚刺激として実験動物の鳴き声のレパートリを用意して，順次刺激に用いたところ，中枢電気活動が複数個の島状の領域として観察された。中枢活動の所在を示す島状の領域は，刺激開始後一定の潜時を経て現れ，時間の経過とともに空間的に移動するように見え，やがて消滅する。活動の中心が外側より背内側に移行する有り様が判ったが，活動自身が空間伝播しているというより，それぞれの部位の活動の時間経過の差により見かけの中心が移動しているのであろう。

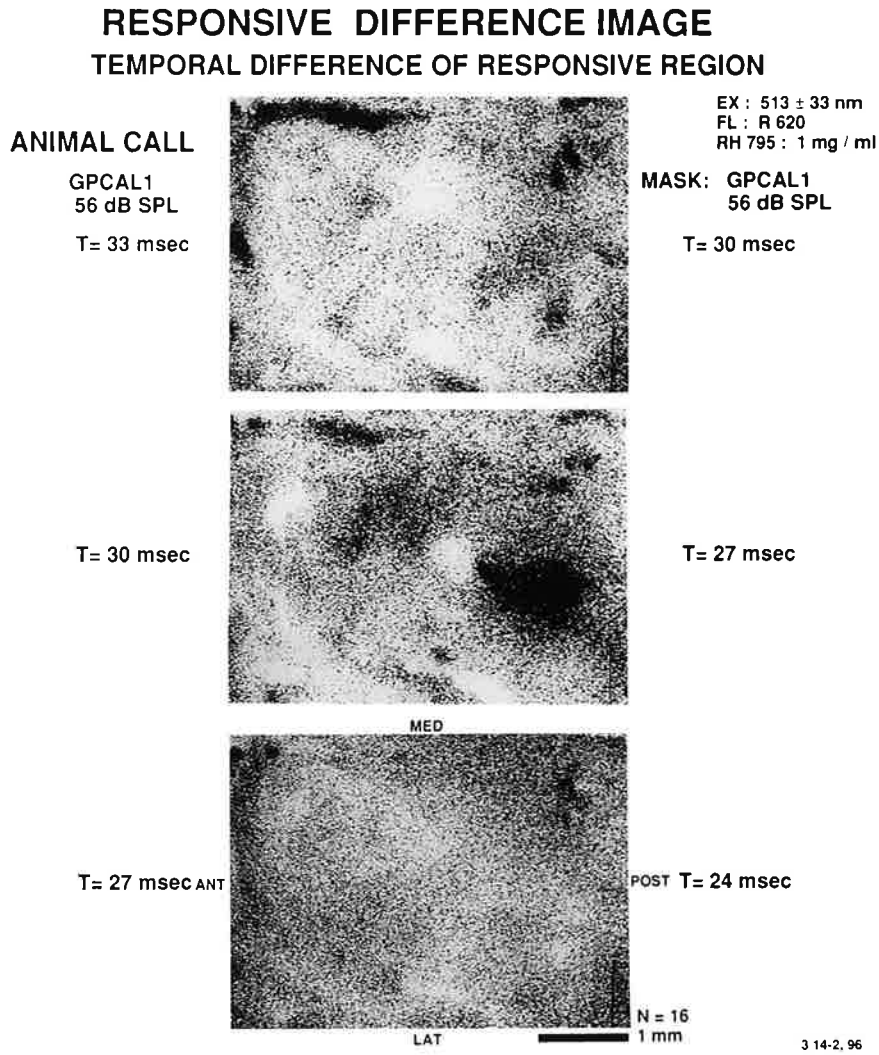


図１．モルモットの鳴き声刺激に対応した聴覚中枢活動の光学的測定
刺激音：調波構造を備えたもの，56dB SPL, 持続時間： 160ms, 加算回数：16回
上段：潜時： 33ms において観察される蛍光発光と潜時： 30ms において見られる蛍光発光との差分画像
中段：潜時： 30ms において観察される蛍光発光と潜時： 27ms において観察される蛍光発光との差分画像
下段：潜時： 27ms において観察される蛍光発光と潜時： 24ms において見られる蛍光発光との差分画像

種固有の応答パターンの存在および音声信号の識別機構の可視画像化の可能性が期待されるので，その方向へ研究を展開させたいと考えている。

8．肝細胞分泌神経再生促進因子の作用発現機構

堀江秀典（横浜市大・医・生理）
高野雅彦（横浜市大・医・眼科）
中西圭子（愛知県コロニー研究所・生理）
久木田文夫，山岸俊一（生理研）

培養肝細胞から分泌される物質の中に神経再生促進・生存維持作用のある因子が含まれていることを世界に先駆け発見した。この肝由来神経活性化因子(LDNA)は，末梢神経系の神経線維切断端からの神経再生を促進し，その生存維持機能を発現する。作用機序から既知因子とは異なる新規の因子と考えられている。この因子は24カ月齢の老化したマウスから摘出した網膜からの神経再生を促進することが判明した。また，眼窩内線維性嚢胞腺腫により眼窩内容除去術を受けた患者（70才）より術前に研究用に眼球の一部を提供していただく許可を得て網膜を培養した。網膜片より神経突起再生が見られ，LDNAにより神経再生が促進された。成熟ラットの肝細胞が分泌した因子が老化したヒトやマウスの網膜からの神経再生を促進したという結果から，LDNAが種を越えた老化中枢神経を活性化する作用を持つことが明らかとなり，新たな老人性痴呆抑制等の医薬として開発されることが期待される。現在大量の肝細胞の培養上清を集めLDNAを各種クロマトグラフィーを用いて分離精製し，そのアミノ酸シークエンスを決定すべく研究を推進中である。

LDNAは神経細胞に直接作用することなく神経細胞を取り巻くシュワン細胞などの細胞系を刺激し，神経栄養因子を分泌させ神経再生促進・生存維持機能を発現するものと考えられている。その作用機序を電気生理的に解明するため，成熟ラットの脊髄後根神経節より摘出し分離したシュワン細胞にパッチクランプ法を適用しイオン電流測定を試みた。しかし，細胞体が小さく安定したチャンネル電流の測定にはまだ至っていない。ホールセルクランプ法による感覚神経細胞のイオン電流の測定は確立しているので，シュワン細胞と感覚神経細胞を混合培養しシュワン細胞からの信号応答を感覚神経細胞の電気応答として記録する方法を試み始めたところである。今後肝由来神経活性化因子(LDNA)の遺伝子クローニングを確立するとともにこの因子による膜電位応答を介した神経再生促進作用の発現機構を解明していきたい。

9．遺伝子操作による P_{2U} 受容体機能の研究

榎本浩一（島根医大，生理）
古家喜四夫，山岸俊一（生理研）

乳腺上皮細胞等多数の細胞は細胞外 UTP や ATP に反応し，細胞内 Ca^{2+} の上昇を起こす。この反応にはプリン受容体が関係する。プリン受容体は分泌，細胞増殖，免疫，炎症さらに負傷の治癒と関係があると考えられている。乳腺分泌上皮細胞にはプリン受容体のサブタイプであるヌクレオチド (P_{2U}) 受容体が存在する。乳腺分泌上皮細胞を機械的に刺激して発生するカルシウム波は，刺激により放出された ATP, UTP, UDP が隣接する細胞の P_{2U} 受容体に作用し，細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出を起こすことによる。

P_{2U} 受容体は細胞膜を 7 回貫通する G 蛋白共役型の受容体である。P_{2U} 受容体を持たないヒト白血病由来細胞株 K-562 に乳癌 P_{2U} 受容体を強制発現させた。P_{2U} 受容体が発現していることは，RT-PCR により P_{2U} 受容体の mRNA がとらえられ，ATP, UTP, UDP の投与による細胞内 Ca^{2+} 上昇の出現がみられたことで確認した。

乳腺上皮細胞と P_{2U} 受容体発現 K-562 細胞のヌクレオチド刺激による細胞内 Ca^{2+} 変化の用量－作用曲線はほぼ同一であり，乳腺分泌上皮細胞では P_{2U} 受容体以外のプリン受容体の寄与はないと結論した。乳腺上皮細胞において ATP, UTP は PI 代謝回転を促進したが，UDP は IP_3 上昇を起こさなかった。P_{2U} 受容体導入 K-562 細胞でも UDP により PI 代謝回転のない Ca^{2+} 上昇がみられるので，P_{2U} 受容体は PI 代謝回転以外の経路も活性化していると考えられる。

ブラジキニンと P_{2U} 刺激は細胞内 IP_3 上昇を起こすが反応には相加性があるため，異なる細胞内情報伝達経路をとると考えられる。両者は異なる G 蛋白とカップルし，$PLC/IP_3/Ca^{2+}$ 放出という経路をとっているのかもしれない。

P_{2U} 受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 上昇とともに発生する乳腺上皮細胞の膜電位変化は不定で，一過性の脱分極，過分極または脱分極と過分極のまじりあった，複雑な波形が観察できた。膜電位固定法により膜電位を-120mV から-40mV に変化させながら P_{2U} 刺激を行うと，P_{2U} 刺激により惹起される内向き電流と外向き電流のあることが判明した。外向き電流は Ca^{2+} 依存性 K チャネルによるものであることはすでに報告した。内向き電流については現在分析中だが，Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルによるらしい。

10. 多価陰イオン蛍光物質の細胞内外カルシウムイオン依存性分泌機構

柴　芳樹，広野　力，杉田　誠（広島大・歯）
古家喜四夫，山岸俊一（生理研）

［目的］唾液腺等の外分泌腺細胞での多価陰イオン物質の自律神経作動薬による分泌機構は，水分泌機構とも一部共役している可能性があり，また細胞内外のカルシウムイオンが重要な役割を果している。本研究は多価陰イオンとして蛍光物質を用い自律神経作動薬による分泌と水分泌との関連並びにその分泌機構を解明し，さらに細胞内外の Ca^{2+} の分泌に果たす各々の役割を明らかにする。

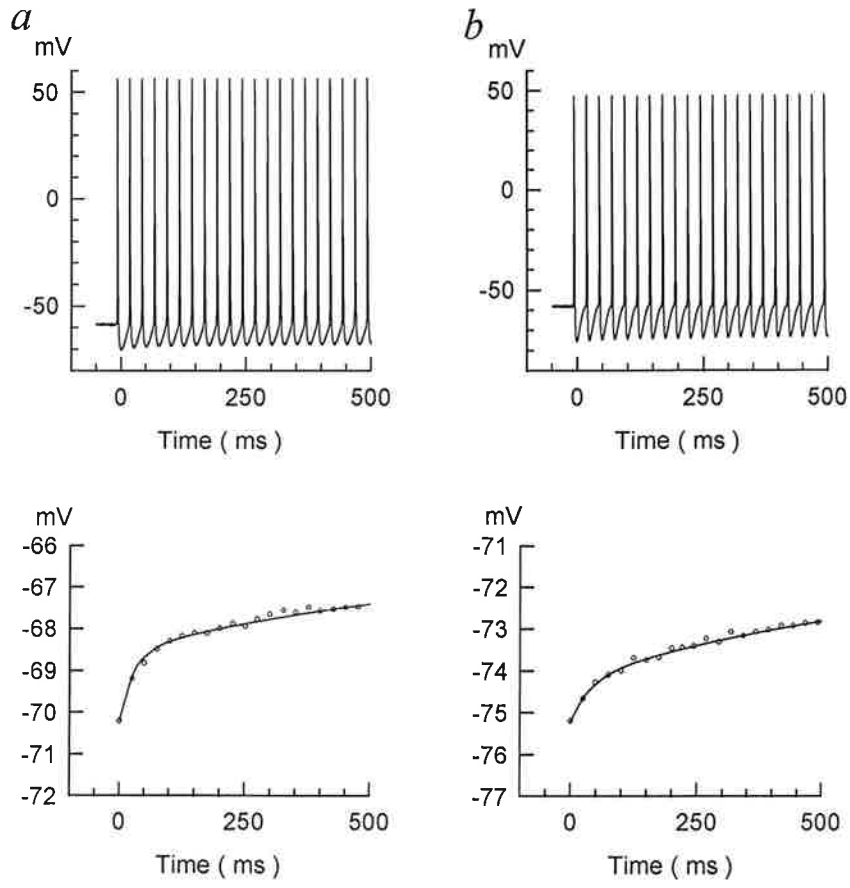
［方法］ラット耳下腺より腺房をコラゲナーゼ処理により分離した。腺房細胞内に多価陰イオン蛍光物質のカルセインを負荷しカルバコール，イソプロテレノール等の自律神経作動薬によるカルセインの分泌量を蛍光分光光度計で測定した。コンフォーカルレーザー顕微鏡でカルセインの分泌に伴う構造変化を観察した。腺房細胞内に fura-2 を負荷し，自律神経作動薬による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定しカルセイン分泌との関連を解明した。

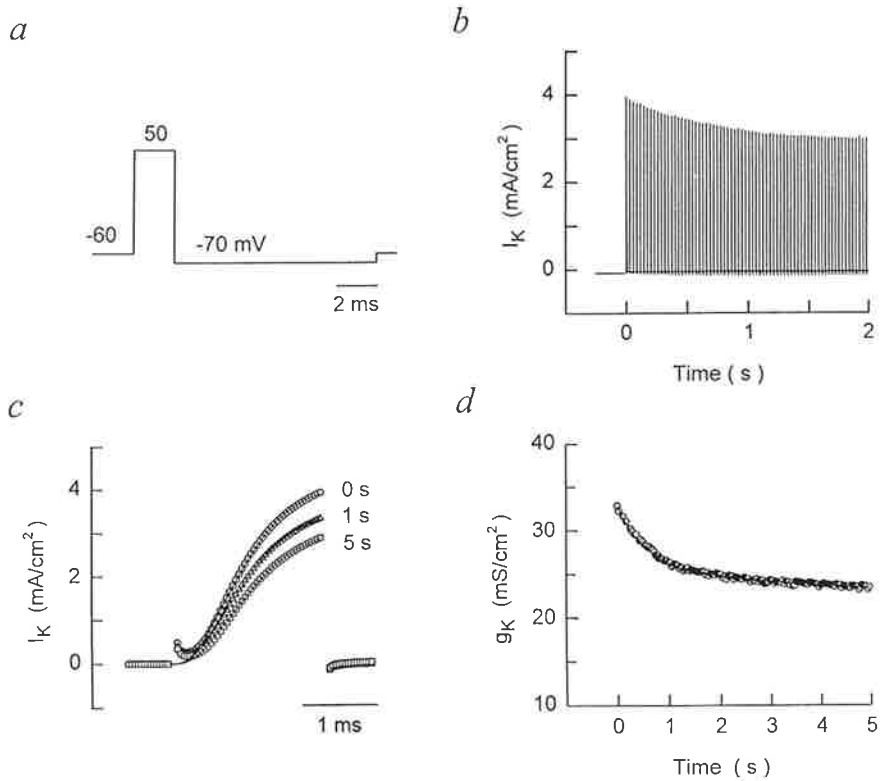
［結果・考察］腺房細胞内に負荷したカルセインは副交感神経作動薬のカルバコールで顕著に分泌され，アミラーゼ分泌を顕著に誘導する交感神経作動薬の中でも β 作用をもつイソプロテレノールでは分泌されなかった。しかしカルバコールとイソプロテレノールを同時に作用させると，カルバコール単独の場合に比べてカルセイン分泌量が約 2 倍に増強された。カルセイン分泌に対する内外 Ca^{2+} の影響を調べたところ，腺房細胞内に BAPTA を負荷して Ca^{2+} をキレートするとカルバコール刺激によるカルセイン分泌は起こらないが，細胞外液を Ca^{2+} free にした場合はカルバコール刺激による分泌は影響を受けなかった。しかしカルバコール刺激によるカルセイン分泌のイソプロテレノールによる増強は細胞外 Ca^{2+} の除去により抑制された。コンフォーカルレーザー顕微鏡による観察ではカルバコールにより細胞質のカルセインが，時間的には水分泌の初期相と対応して，細胞間分泌細管ないし腺腔内に分泌されることが示唆された。fura-2 を細胞内に負荷し ARGUS-50 により測定した細胞内 Ca^{2+} 濃度は，カルバコールにより上昇し，カルバコール存在下でほぼ一定値に保たれる。またイソプロテレノールはそれ自体は細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させないが，カルバコールによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を増強した。イソプロテレノールの増強効果はプロプラノロールやアテノロールで抑制され，cAMP 類似体によっても，イソプロテレノールに比べ弱いながらも増強された。以上の結果より，カルバコール応答のイソプロテレノールによる増強効果は β 作用で，細胞内 cAMP 濃度上昇を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度増加が増強されることと，細胞外からの Ca^{2+} 流入が促進されることにより起こると推定された。

11. イカ巨大神経カリウムホメオスタシス維持機構の研究

井上　勲（徳島大・酵素研）
筒井泉雄，山岸俊一（生理研）

神経興奮の結果，神経細胞から K^+ が流出する。流出した K^+ は神経細胞と保持細胞であるグリア（又はシュワン）細胞間の微小間隙 (periaxonal space) に蓄積され，続く活動電位発生に影響を及ぼすと考えられるが，実際はその効果はわずかでありカリウムホメオスタシスが保たれている。Frankenhaeuser & Hodgkin (1958) はイカ巨大神経を用いて活動電位 train 中の後電位が減衰することを実験的に示し，それが K^+ 蓄積による現象と考え，拡散方程式から拡散スペース (F-H space) を算出し，27nm の値を得た。この値は電顕観測から得た実測値，40-60nm に比べて小さい。この差を説明する仮説として，シュワン細胞による K^+ の能動的取込 (glutamate





hypothesis) 及び受動的取り込み (spatial buffering) が提出されている。しかし，後電位は K^+ 平衡電位だけでなく K^+ コンダクタンス (g_K) の関数でもある。g_K は不活性化することが知られており，この効果を無視したことにより K^+ 平衡電位変化が過大見積りされた可能性がある。我々は g_K は不活性化の寄与の大きさに関する実験を行った。

40Hz 10s の活動電位 train 中の後電位の減衰は時定数 25, 400, 7000ms の指数関数で近似された（図 1*a*）。細胞内を infusion し，外液に 1.2M glucose を加えると K^+ 蓄積が減少し，最後に完全に無くなる。この過程において後電位減衰のうち時定数 25ms の成分のみが減少した（図 1*a*）。 次に，TTX を含む高張溶液中で完全に K^+ 蓄積が無くなった状態で活動電位の代わりに 40Hz の電圧パルスを与え（図 2*a*）電圧固定下で K^+ 電流を記録した（図 2*b*）。 脱分極パルス終了時の g_K を時間に対してプロットし（図 1*b*），指数関数で近似すると時定数 400, 7000ms を得た。これらの結果は，後電位の減衰のうち時定数 25ms 最も速い成分のみが K^+ 蓄積によるもので，他の 2 つは g_K 不活性化によるものであることを示す。K^+ 蓄積による後電位の減衰は 1-2mV とわずかであり，これにより続く活動電位への影響は無い。また，シュワン細胞の能動的・受動的 K^+ 輸送を修飾する様々な薬物 (glutamic acid, ACh, ouabain, Ba^{2+}, EGTA) は後電位の減衰に対して全く影響を及ぼさなかった。

時定数 25ms の成分の結果を Frankenhaeuser & Hodgkin の拡散方程式に代入した結果 F-H space 40nm を得た。この結果は periaxonal space の実測値に一致する。これらの結果から，

periaxonal space からの K^+ の除去は自由拡散のみにより，したがってこの速い K^+ 除去に対してシュワン細胞の能動的・受動的 K^+ 輸送の寄与は無いことが結論された。

12. 培養伊東細胞における Na^+-Ca^{2+} exchanger の同定

中村敏夫，有井滋樹，古谷正晴（京都大・医・第一外科）
富永真琴，岡田泰伸（生理研）

伊東細胞 (fat-storing cell, stellate cell, perisinusoidal cell, hepatic lipocyte) は肝類洞壁構成細胞のひとつであり，Vitamin A の貯蔵細胞としてよく知られている。活性化した伊東細胞は肝繊維化におけるコラーゲンなどの細胞外基質の主たる産生細胞として重要な役割を担っている。培養伊東細胞は培養経過とともに活性化し，それは *in vivo* での活性化をよく反映するが，今回我々はラットを用い培養活性化伊東細胞における Na^+-Ca^{2+} exchanger (NCX) の発現を初めて見いだし，その発現と活性化との関係を検討した。

NCX 活性を調べるために，fura-2 を用いて細胞外液を低 Na^+ 液に置換したときの細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べ，その特性について検討。活性化伊東細胞における Na^+-Ca^{2+} exchanger の発現を Western Blot でも確認し，更に経時的 NCX mRNA 発現を Northern hybridization 法にて解析。これらを伊東細胞の活性化に伴う形態変化および活性化指標としての α-smooth muscle actin (α-SMA) 発現（免疫組織染色）と対比検討し，NCX 発現と伊東細胞の活性化との関係を調べた。

fura-2 を用いた実験で，7 日間培養伊東細胞において細胞外液を低 Na^+ 液に置換すると細胞内 Ca^{2+} の上昇がみられ，これは細胞外液に Ca^{2+} が存在しない条件ではみられなかった。かつその反応は細胞外 Na^+，Ca^{2+} 濃度依存性を示し，Ni^{2+} で不完全ながら抑制された。この低 Na^+ 液に対する細胞内 Ca^{2+} の上昇反応は最短で培養 5 日目から確認できるようになるが，培養 7 日目以降で検出が容易となることが判ったので，犬心筋 NCX に対するモノクローナル抗体を用い Western Blot を行ったところ，培養 7 日目にその発現がみられるが，培養 1 日目では発現していないことが確認された。Northern Blot で経時的に NCX mRNA 発現を調べたところ，伊東細胞の胞体内脂肪滴が急速に減少し α-SMA が確認されるようになる 3 日目よりその発現がみられるようになり，伊東細胞の α-SMA が強発現し，分裂増殖がはじまり多核のものも出現し始める 5 日目には著明に増強し，その後発現が持続することが示された。これらから，伊東細胞の NCX は活性化とともに発現するものと考えられた。

以上，培養伊東細胞における NCX 発現を初めて明らかにした。それは活性化に伴い発現がみられることから，新しい活性化指標としてのみならず，肝繊維化や細胞増殖等との関連にも興味がもたれる。

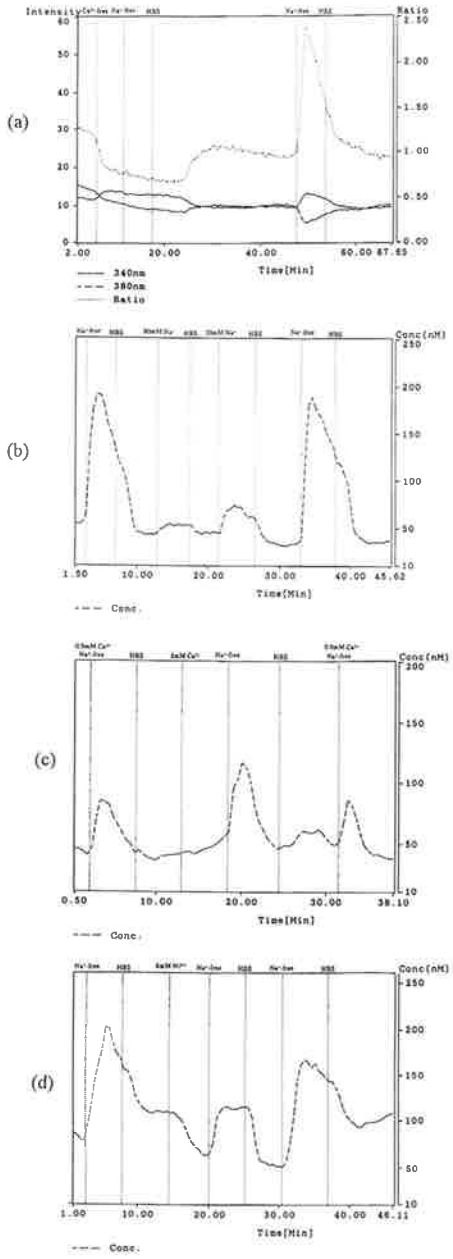


Fig. 1　細胞外液を，Na^+を等モルの NMDG で置き換えた低 Na^+液に置換した時の培養伊東細胞の細胞内 Ca^{2+}の変化をモニターした。(a): Na^+ -free とすると $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がみられ，これには細胞外 Ca^{2+}の存在が不可欠である。(b): $[Ca^{2+}]_i$ の上昇反応は外液 Na^+濃度依存的である。(c): 外液 Ca^{2+}濃度依存的でもある。(d): Ni^{2+}により $[Ca^{2+}]_i$ の増加は不完全ながら抑制される。

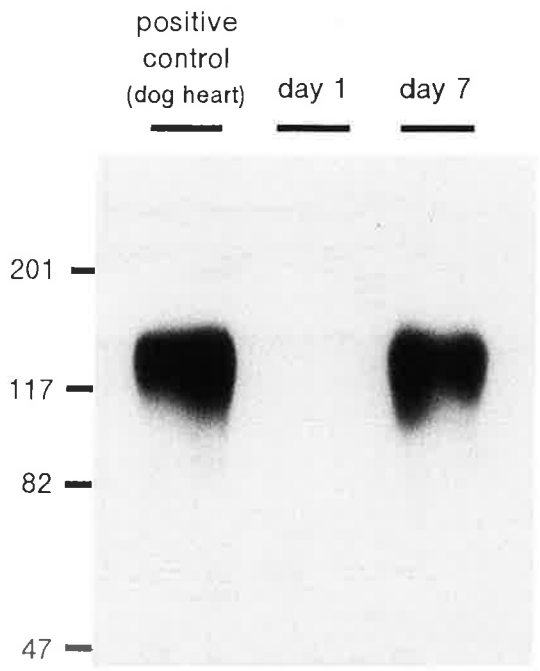


Fig. 2　活性化伊東細胞における NCX 発現の Western Blot 解析。培養 1 日目では検出されないが，活性化状態にある 7 日目には強い発現がみられる。

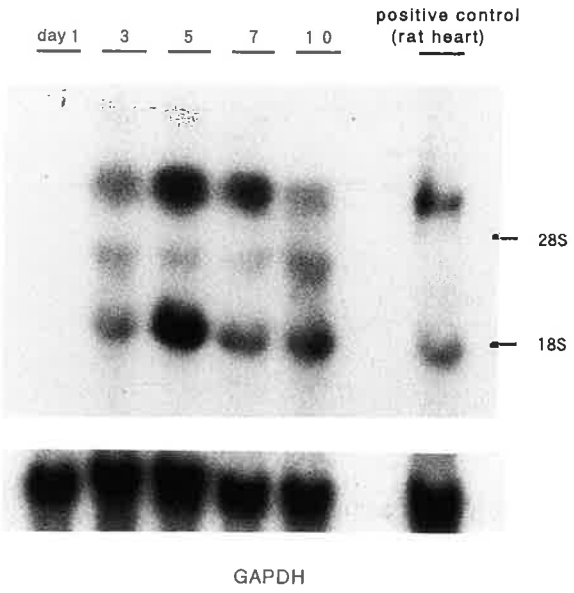


Fig. 3　培養伊東細胞の経時的 NCX mRNA 発現 (Northern Blot Analysis)。3 日目より発現がみられ，5 日目で著明に増強し，以後その発現が持続する。

13. 小腸陰窩上皮細胞のサイクリック AMP 依存性 Cl^- 分泌における CFTR の役割

上田俊二，今田祐子，細川雅也，富永正幸，津村剛彦（京都大・医）
岡田泰伸，挾間章博（生理研）

小腸において Cl^- 分泌は陰窩上皮細胞により担われている。特にサイクリック AMP (cAMP) 刺激に対する Cl^- 分泌は管腔側膜に存在する CFTR 蛋白を介するものと言われている。CFTR は cAMP 依存性 Cl^- チャネルとして働くだけでなく ATP チャネルとしても機能し，CFTR を介して細胞外に放出された ATP が他の Cl^- チャネルを活性化するという報告も気道上皮細胞においてなされている。本研究では我々が確立した単離小腸陰窩上皮系を用いて cAMP 依存性の Cl^- 分泌が CFTR のみを介するのか，あるいは CFTR がレギュレータとして働き他の Cl^- チャネルを活性化するのかを検証することを目的とした。

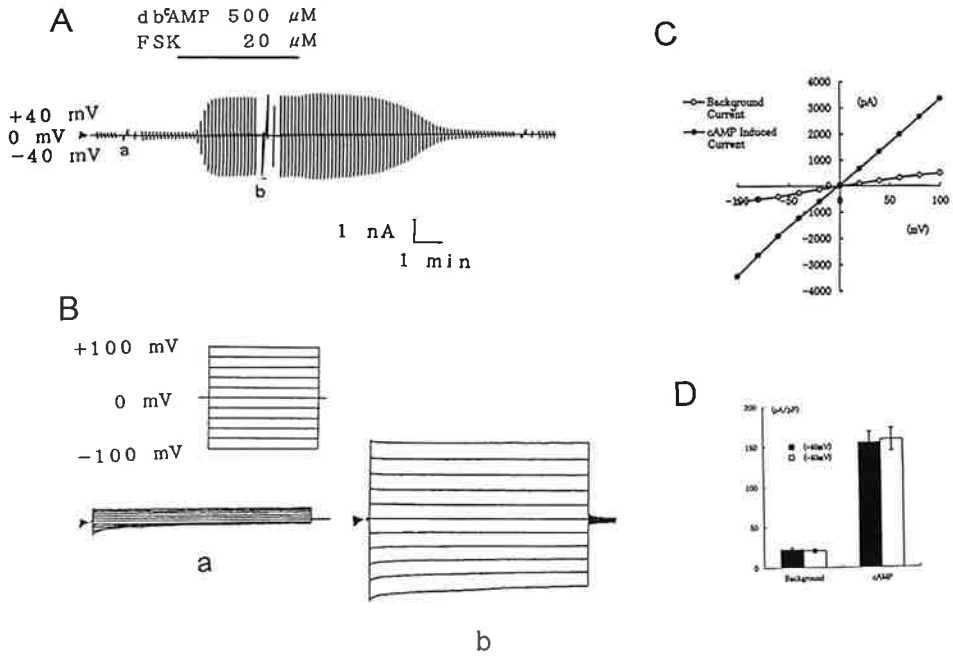


図　小腸陰窩上皮細胞の cAMP 依存性 Cl^- 電流
A．± 40mV のステップパルス時の dbcAMP とフォルスコリンによる電流の活性化と wash out による電流の減少　細胞内外とも 150mM KCl 溶液
B．a. cAMP 刺激前の -100mV から＋ 100mV まで 20mV 毎のスッテプパルスによる電流のトレースとパルスプロトコール　b. cAMP により活性化された電流の a と同じパルスによる電流のトレース
C．ステップパルスを加えた直後の電流による IV カーブ
D．± 40mV での cAMP による電流の活性化　39例の膜容量あたりの電流量の平均値と ± SD

機械的振動法または酵素法を用いてモルモット小腸より陰窩上皮を単離し，パッチクランプ全細胞記録法を適用した。その結果，クリプト基底部の細胞において高率にパッチクランプ全細胞記録が得られたが，他の部位ではほとんど成功しなかった。このクリプト基底部の細胞を500μMdbcAMP + 20μM フォルスコリンにより刺激したところ，電位依存性，時間依存性のない電流が活性化された。細胞内を 150mMKCl に固定し，細胞外液を 150mM, 50mM, 15mMKCl に置換し，逆転電位の測定を行ったところ，このチャネルが Cl チャネルであると仮定したときの理論上の値とよく一致した。しかしながら，このパッチクランプ全細胞記録が得られる細胞はノマルスキー顕微鏡で特徴的な顆粒を有しており，またこの顆粒はニュートラルレッド生体染色で染色された。さらに抗ヒトリゾチーム抗体で陰窩上皮細胞に免疫染色を行ったところ，クリプト基底部の細胞はパネート細胞であることが明かとなった。次に細胞外液を 150mM KBr, KI, KF, Kgluconate に置換することにより他のアニオンとの透過性を比較した。permeability ratio は Br(1.8) > Cl(1.0) > I(0.8) > F(0.06) = gluconate(0.05) のアイゼンマン 3 型であった。Cl^-チャネルブロッカーである DIDS は 500μM の濃度では無効であった。以上の結果はこれまで気道上皮，膵，大腸培養細胞等で報告されている CFTR を介した Cl^-電流の性質とよく一致している。これまで文献的にパネート細胞のパッチクランプ法による電流の報告は見られないが，小腸クリプトには mRNA レベルで CFTR が豊富に存在することが確認されており，それを介した Cl^-電流の記録に成功した。この結果はパネート細胞のもつ何らかの生理機能の一面を示すものと考えられる。今後，DIDS 以外のブロッカーに対する反応（グリベンクラミド，フルフェナム酸，DPC, NPPB），ATP, PKA 依存性の有無，コレラトキシン，VIP による細胞内 cAMP 上昇に対する反応の有無を検討していく。さらにはパッチクランプ単一チャネル記録法によるチャネルコンダクタンス測定を行っていく。

14. 中枢神経系におけるグリア細胞の起原とその分化過程 —組み換えウイルスによる細胞標識，遺伝子転写活性可視化による解析—

森田規之，河田光博（京都府立医大・医）
岡野英之，三浦正幸（筑波大・医学専門学群）
小川正晴，宮田卓樹（高知医大・医）
仲嶋一範（理化学研）
池中一裕（生理研）

申請者らはこれまで，組み換えレトロウイルス遺伝子導入法によって，サブクローンした遺伝子プロモーター領域の転写活性を神経系初代培養細胞で検出，可視化する方法を開発してきた。今回，マウス大脳皮質のアストロサイトにおける分化形質発現時期とその細胞系譜を明らかにす

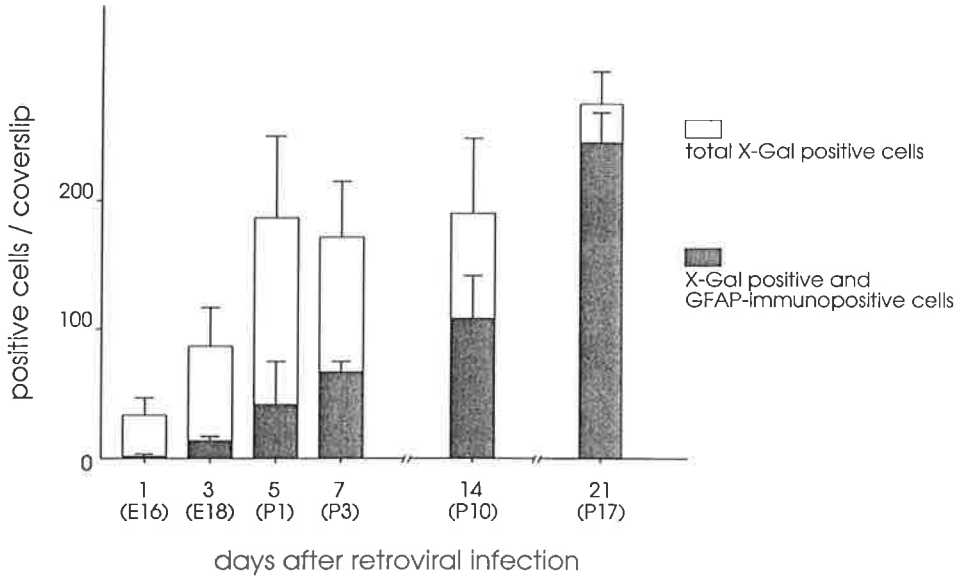


図1　マウス大脳皮質初代培養細胞における GFAP の発現
GFAP 転写活性が可視化された細胞（白）のうち，同時に免疫蛍光抗体法によっても GFAP が検出された細胞（網かけ）を示す。

る目的で，グリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) に注目して解析を行った。転写活性可視化のためのウイルスベクターとして，SIN (self inactivation) ベクター（U3 領域に点突然変異を導入した 3'LTR のため，逆転写の過程で 5'LTR プロモーターが失活する）を新たに作出し，内部プロモーターである GFAP プロモーターの転写活性を β-ガラクトシダーゼの酵素活性として鋭敏に検出することを企てた。この系を用いてマウス GFAP 遺伝子プロモーター領域の再検討を行ったところ，これまでに明らかにしていた細胞種特異性を示す最小領域である転写開始部位上流 256bp よりも，2.5kb を用いた方が転写活性が高く，より高感度の検出に適することが明らかとなった（GFAP ウイルス)。そこで次に，胎生 ICR マウスの大脳皮質から調製した脳初代培養細胞における GFAP の発現時期を，転写活性の可視化（X-gal 染色法)，および免疫蛍光抗体法で比較検討した。X-gal 陽性細胞はウイルス感染翌日の胎生16日相当から検出され，陽性細胞数は培養日数につれて急速に増加した。X-gal 陽性細胞のうち同時に GFAP 免疫陽性の細胞は，感染翌日ではほとんど認められず，時間差をもって感染後 3 日目から増加した（図 1)。こうした検出時期の時間差は，GFAP が重合し線維束を形成してはじめて免疫染色性を示すためと考えられ，転写活性の可視化によって，免疫染色よりも早い発生段階からアストロサイトを検出できることが明かとなった。さらに，レトロウイルスによる遺伝子組み込みが増殖細胞の G2 期になされることから，検出された細胞が胎生15日相当の時点で分裂能を有すると考えられた。次に，アストロサイト前駆細胞の出現部位を検討するため，胎生15日マウス大脳皮質スライスを培養し，ウイ

リオーマ摘除腔液との混合培養後のレトロウイルスの活性は60分でもレトロウイルス自然失活と同様70％以上を示した。また，各種薬剤による補体のレトロウイルス失活抑制効果はFT-175で80％（15分）および30％（60分）と最も高い効果を認めた（表１）。【考察】悪性グリオーマ手術摘除腔にレトロウイルスベクターを直接注入する方法は遺伝子導入効率の点から期待できることが示唆された。また，レトロウイルスベクターの血清補体による失活の抑制には，現在までにコブラ毒や各種補体に対するモノクローナル抗体を用いた方法などが報告されているが，これらの方法を実際の臨床に応用するにはまだまだ問題がある。その点，今回示したFOYやFUT-175は長年日本において急性膵炎や全身性汎血管内凝固症候群(DIC)に対して重篤な副作用無く使用されてきた薬剤であり，しかもこれら薬剤の上記疾患に対する有効血中濃度でレトロウイルスの補体による失活を最大限に抑制した。以上のことより，全身癌に対してもFUT-175等の補体系阻害剤を併用することで，レトロウイルスベクターの補体による失活を安全に抑制することが可能となり，遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの全身投与も可能となることが期待される。

16. 脳特異的糖鎖に関する研究

長谷純宏，長束俊治，中北慎一，尾嵜恭子（大阪大・理・化学）

我々は蛍光標識された（ピリジルアミノ化）糖鎖のHPLCパターンを比較する事による特異的糖鎖の検出法を開発した。通常用いられているレクチンや抗体など相補性を用いた方法とは別の見方が出来ると考えている。この方法はピリジルアミノ化(PA)糖鎖が逆相HPLCで高感度かつ高い分解能で簡便に分離精製出来ることを利用している。またPA糖鎖の二次元糖鎖マップを利用すると多種類の混合物より比較的簡便に単一のPA糖鎖を精製する事が可能であり，構造解析も行なえる。一方，糖蛋白質糖鎖の糖鎖構造決定が多く報告され数多くの糖鎖構造に関する知見が蓄積して来た。これに伴い，糖蛋白質糖鎖の構造が臓器特異的に現われる例が報告されている。そこで，本方法を用い，臓器に特異的に発現する糖鎖の検出を試みた所，マウスの脳に特異的に量多く発現している糖鎖(BA1, BA2)を見い出し構造決定を行なった。BA1とBA2はマウスの発達段階に特徴的に変動していた。これら２種の糖鎖が大脳と小脳のどの糖蛋白質に結合しているのかについての検索をLCAアフィニティークロマトグラフィー及びSDS-PAGEによる分離により行った。マウスの大脳と小脳をホモジナイズし，ミトコンドリア画分，ミクロソーム画分，細胞質画分を調製し，それぞれの画分をヒドラジン分解-N-アセチル化により糖鎖を切り出した。得られた糖鎖をピリジルアミノ化により蛍光標識後，陰イオン交換，分子サイズ，逆相の各HPLCを用いて分離，定量し，BA-1とBA-2の存在について調べた。BA-1とBA-2を定量したところ，ほとんどが膜画分に存在していた。そこで膜画分に含まれる糖蛋白質を界面活性剤で可溶化した。この可溶画分をLCAカラムを用いてアフィニティクロマトグラフィー行った。メチ

ルマンノシドで溶出される画分にほとんどのBA-1とBA-2が存在していた。LCAカラムに吸着した蛋白質をSDS-PAGEでさらに分離し，得られたそれぞれのバンドから蛋白質を抽出し，脱塩，凍結乾燥した。それぞれの画分を上記の方法によりBA-1とBA-2を定量し，脳特異的糖鎖の存在について調べた。その結果，BA-1とBA-2は分子量180k, 120k, 100kの高分子量蛋白質に含まれていることが明らかとなった。SDS-PAGEから抽出した画分からはHPLCパターン上に不純物のピークが現われ易いため，今後LCAカラムに吸着した蛋白質をHPLCで分離してBA-1とBA-2の存在を調べる予定である。

17. オプシン産生の日周期変動因子の解析

大塚輝彌（東邦大・理・生物）
林　孝彰（慈恵医大・眼）
鈴木龍夫（兵庫医大・薬理）

網膜視細胞の外節は昼夜で大きく形態学的な変化を示し，それに伴って外節膜にある視物質の量が日周期変動することを示唆する知見がこれまで多くの動物種で報告されている。これまで本研究グループはキンギョ網膜の錐体視細胞のオプシンに注目して，免疫組織化学的にオプシンを輸送すると見られる小胞を同定して，光と内在性リズムによってこの小胞数が増減することを明らかにした。さらに免疫電顕法で解析した結果，直径30-100nmの小胞構造が認められたことから，夜間に増加する陽性顆粒は錐体オプシンの輸送小胞であることを確認した。さらにオートラジオグラムでは錐体で新しく作られるタンパクの細胞内分布の日周期変動を精細に解析した。今回はimmunoaffinity purificationを用いて新しく産生される青錐体オプシンのみを定量的に解析し，これまでの結果を支持する結果を得た。

実験には体長数cmのキンギョを用いた。朝6時に点灯し，夕方6時に消灯する12時間明暗サイクル下で飼育した。点灯または消灯直前にキンギョ数匹に100μCi ^{35}S-methionineを眼球内投与した。その後一定時間毎にキンギョを殺して眼球を摘出した。新しく生成される青錐体オプシンを選択的に抽出して定量的な解析を行うため，抗青錐体オプシンと結合したProtein A Sepharose (CL-4B, Phamacia)を用いた。結合した青錐体オプシンはさらに，SDS-PAGEで青錐体オプシンのみを分離した。この後，^{35}S-methionineを取り込んだ青錐体オプシンをBAS2000 IIで定量的に測定した。

この結果，オプシンの生成は点灯後と消灯後の両者とも，時間に伴って直線的に増加することが明らかになった。これはオートラジオグラフィの所見とも一致して，オプシン生成が昼夜行われていることを示唆している。さらに，消灯後の増加が点灯後の約2倍あった。これは昼に比べて夜間に錐体タンパクの生成量が大きいことを直接証明した。これまでの結果と比較すると，免

疫組織化学的に解析したオプシン輸送小胞数の比は昼夜で約10倍，オートラジオグラムで解析したタンパク合成量の比では数倍である。これらの結果に比べると，本研究成果は錐体オプシンを直接測定しているにも係わらず，昼夜の比が著しく小さい。この原因として考えられるのは，immunoaffinity purification では標的となるタンパクの精製までの過程で，人工産物が入り込む可能性が高く，そのどれもが昼夜の比を実際の値から少なくする方向に働く要因となる。このため昼夜の比が期待される結果より小さい値が出たと考えられる。いずれにしても青錐体オプシンが夜間に増加するというこれまでの仮説を支持するには充分な結果である。

18. 線虫 *C. elegans* のサイクリックヌクレオチド依存性チャンネルに関する電気生理学的研究

倉橋　隆，金子章道（生理研）
小松秀俊，森　郁恵，大島靖美（九州大・理・生物）

線虫 *Caenorhabditis elegans* の *tax-4* 遺伝子の突然変異体は，温度走性や化学走性行動が異常である。この *tax-4* 遺伝子をクローン化したところ，哺乳類の視覚や嗅覚において重要な役割を担っている環状ヌクレオチド依存性チャンネルと非常に高い相同性を持つことがわかった。*tax-4* 遺伝子に GFP (A green fluorescent protein) をレポーター遺伝子として連結し，野生型線虫個体に導入して *tax-4* 遺伝子の発現を調べたところ，温度受容ニューロン AFD, 化学受容ニューロン ASE, AWC などの，*tax-4* 突然変異体で異常になっている行動に関するすべての刺激受容ニューロンで，Tax-4 タンパクが発現していることがわかった。さらに，一部の Tax-4 タンパクは，これらのニューロンの刺激受容の場である神経終末に存在することが明らかになった。この結果は，視細胞や嗅細胞における環状ヌクレオチド依存性チャンネルと同様に，Tax-4 タンパクが，刺激受容に直接関与していることを示唆する。

本研究は，Tax-4 タンパクが，チャンネルとして機能しうるかどうかを電気生理学的に解析するために行った。まず，Tax-4 タンパクを哺乳類の HEK293 細胞で発現させるために，*tax-4* 遺伝子の cDNA を哺乳類の発現ベクター (pCI) に連結した。リン酸カルシウム法により，このプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし，インサイドアウトパッチを作成して，環状ヌクレオチドに対する膜電位変化の検出を試みた。コントロールとして，ラットの嗅細胞から単離した環状ヌクレオチド依存性チャンネルに関しても，同様の実験を試みた。しかし，最初に行ったコントロールのチャンネルに関しての実験で，全く応答を得ることができなかったため，トランスフェクションが効率良く起こっていないのではないかと考えられた。そこで，最近開発されたクラゲの蛍光色素である GFP (A green fluorescent protein) を，トランスフェクションのマーカー遺伝子として用いることを試みた。GFP 遺伝子とチャンネル遺伝子の 2 つのプラスミド

DNA を同時にトランスフェクションしたところ，GFP の蛍光が見られる細胞，つまりトランスフェクションよって DNA を取り込んだ細胞は，全体のわずか１～２割であることがわかった。GFP を発現する細胞についてインサイドアウトパッチの作成を行ったが，コントロールの嗅覚チャンネルについても，再び環状ヌクレオチドに対する応答を検出できなかったため，現在，問題点について検討している。

19. 虚血様負荷による LTP 発生とニューロン障害の相関

青木　藩，藤戸　裕，里　康光（札幌医大・第二生理）
森　茂美，松山清治（生理研）

シナプス伝達の可塑性の一つとして長期増強 (LTP) がある。海馬 CA1 領域におけるシナプス入力の高頻度刺激に誘発される LTP は NMDA 受容体活性化依存性とされている。一方，海馬 CA1 領域は虚血負荷に対して極めて脆弱な部位である。例えば，一過性の脳虚血後数日を経て生ずる遅発性神経細胞死の発生する代表的領域は海馬 CA1 領域である。低酸素及び虚血により神経伝達物質が過剰に放出される。特に NMDA 受容体の活性化が神経細胞を破壊する因子とみられる。このように NMDA 受容体の活性化が LTP の発現とニューロン死に共通して関与しているとみられる。本共同研究では海馬スライス標本を用いて，虚血様負荷によるシナプス伝達の抑制効果および増強効果 (Crepel et al.; J Neurophysiol 69: 1774-78, 1993) が認められるか否かを解析した。

実験動物には生後６－８週のラットを用いた。動物を麻酔後，断頭して脳を摘出し，95% O_2, 5% CO_2 混合ガスで飽和して（酸素化）氷冷した人工脳脊髄液 (ACSF) 中で，海馬を含む脳スライスを作製した。得られたスライス標本は酸素化した ACSF に移し，室温で１時間以上インキュベートしてから実験槽に移した。実験槽は，酸素化した ACSF （温度35℃）で灌流した。シナプス入力刺激のため双極刺激電極を CA1 領域の放線状層に置き頻度 0.05Hz で加えた。実験槽内を虚血様状態にするには，95% N_2, 5% CO_2 混合ガスに交換しグルコースを除いた。虚血様負荷からの回復には，酸素化した ACSF で灌流した。

本共同研究では，まず生理学研究所森研究室に脳スライス標本実験セットアップの設置を行った。虚血様負荷によるシナプス伝達抑圧効果を確認するため，15分間の虚血様負荷を与えると，CA1 領域放線状層におけるフィールド EPSP は虚血負荷開始後約５分で消失し，不可逆的なシナプス伝達障害が引き起こされた。虚血様負荷に LTP が誘発され得るかを試すため，３分間の虚血様負荷を与えた。図１Ａの例に示すように，通常の ACSF 中では短いピーク潜時（約 5ms）のフィールド EPSP は虚血負荷開始60分後に約40％増強された。灌流液を低 Mg^{2+} (0.1mM) にして，フィールド EPSP の NMDA 受容体成分を顕在化させた例では（図１Ｂ），短いピーク潜時の

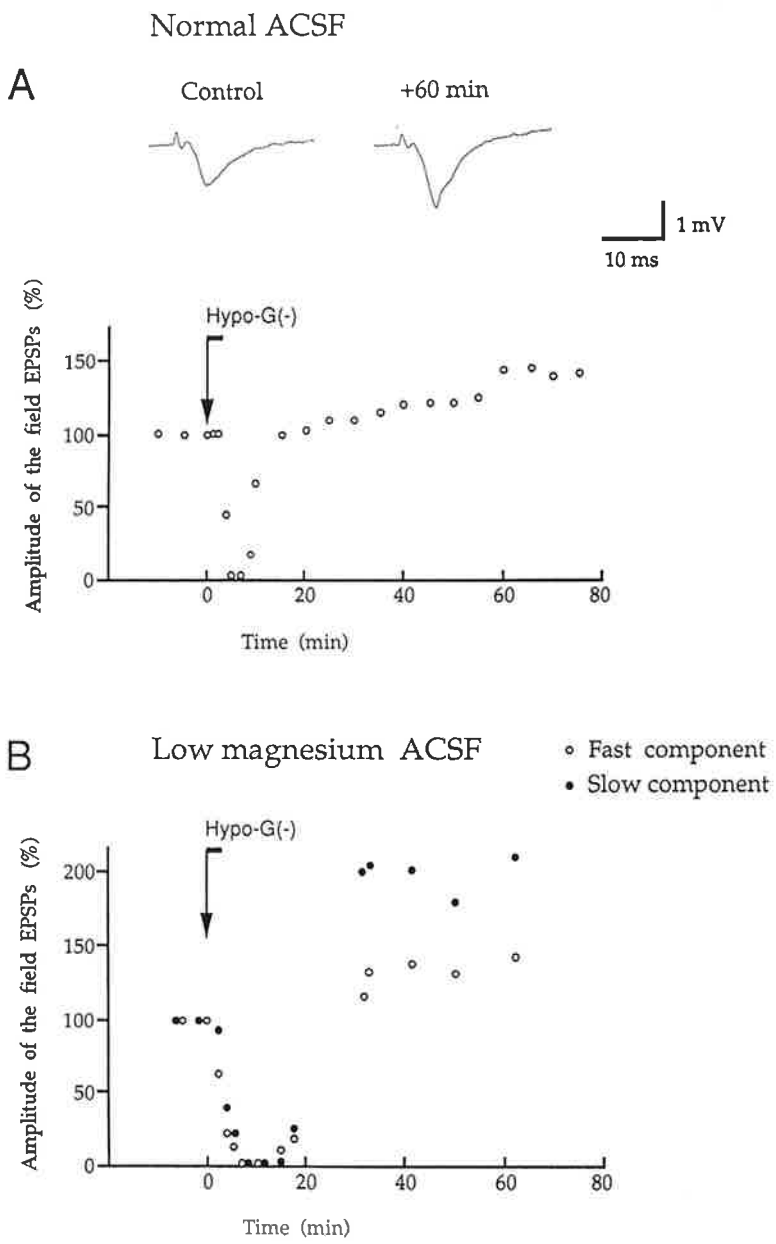


図1　3分間の虚血様負荷 [Hypo-G(-)] に誘発された海馬 CA1 領域のフィールド EPSP の長期増強。
A，通常人工脳脊髄液 (ACSF) 中での Hypo-G(-) の効果。B，低 Mg^{2+} ACSF 中での Hypo-G(-) の効果。

成分は虚血負荷後64分に39％増強され，NMDA 受容体成分とみられる遅い EPSP （約 10ms) の成分は111％増強された。以上の成績から，興奮性シナプス伝達の NMDA 成分と共に non-NMDA 成分も虚血様負荷により長期増強されると見られる。今後グルタミン酸受容体のサブタイプ拮抗

薬投与などを行い虚血様負荷によるLTPの発現の本態を解析し，ニューロン死との関連を追及していきたい。

20. 随意運動の中枢機序に関する研究

達本　徹（京都大・医学研究科・認知行動脳科学）
佐々木和夫（京都大・名誉教授）
南部　篤（東京都神経科学総合研・病態神経生理）
久宝真一，松崎竜一（関西医大・生理学第2教室）
森　茂美（生理研）

神経心理学的研究や神経生理学的研究は，意思や判断の中枢として前頭葉が重要な機能を持つことを示唆してきた。しかし，その本態については未解明な点が多い。前頭葉が重要な関与をすることが示された運動課題の一例として，go-nogo弁別運動課題がある。これは，2種類の色の光刺激をランダムな順序で被験者の眼前に呈示し，被験者は刺激が予め決められたある一方の色の時のみ運動（たとえばボタン押し）を行い(go)，他方の色なら何も行わない(nogo)，という課題である。サルの大脳皮質に埋込んだ電極から記録される大脳皮質フィールド電位の解析や，脳磁計によるヒトの誘発脳磁場の研究から，この課題を遂行すると，サルでもヒトでも，nogoの時に限って光刺激の約0.1秒後に両側前頭葉の大脳皮質のある特定の部位の錐体細胞に特徴的な神経活動が観察されることがあきらかになった。また，サルにgo刺激を呈示しておき，この神経活動の潜時と等しい約0.1秒後にこの皮質部位を電気刺激すると，go刺激で行われるはずの運動が抑制されることがわかった。このことから，この前頭葉の神経活動は，『運動をやめておく』という判断や運動の抑制に直接関わっていると考えられた。この部位がどのようにして賦活されるのか，またどのような経路で運動を抑制するのか，この部位が障害されるとどうなるのか，などは不明である。この点の解明を目的とし，同じ課題を遂行中のサルの脳活動状態をポジトロンCT (PET) 法で計測した。PET法は時間分解能は劣るが空間分解能にすぐれ，脳全体を網羅的に計測できる。大脳皮質フィールド電位記録法は時間・空間分解能ともにすぐれるが脳全体を網羅するのが困難であり，脳磁場計測法は時間分解能および非侵襲性においてすぐれるが，空間分解能はやや劣る。そのため，これらの特徴を相補的に組み合わすことにより，理解の深まることが期待される。PET法による計測実験は現在進行中であり，最終結果はまだ得られていないが，次のことが今までの計測結果から示唆されている。まず，本課題遂行中は前頭葉のある部位の局所脳血流量が有意に増加すること。また，他の皮質領野や深部核にも，局所脳血流量の増加する部位のあること，など。これらの結果をさらに解析することにより，判断や運動抑制にかかわる部位の特定，さらにその相互連関を明らかにしていく予定である。

21. 大腸の粘膜筋板におけるセロトニン含有神経に関する研究

石川一志（旭川医大）
尾崎　毅（生理研）

大腸および小腸における粘膜筋板は，形態学的研究によりその厚さに大きな相違がある事が知られている。小腸では本筋は極めて薄く，主に絨毛の局所的な運動に関与すると考えられているが，大腸では比較的厚く発達し，必ずしも局所的な作用を有するとは考えにくいが，その実態は不明な点が多い。これを明らかにするためには様々な角度からの基礎的研究が不可欠である。近年，本筋の運動に対する神経性調節という視点からの研究が行われ，幾つかの知見が報告されている。著者らは今回セロトニン (5-HT) 含有神経に着目し，粘膜筋板が比較的良く発達しているモルモットの大腸を用いて，本筋に対する 5-HT の作用について検討した。

近位結腸の外側筋層を除去した粘膜筋板の条片標本を，恒温漕内で灌流して等帳性収縮に対する 5-HT の効果を調べた。正常 Krebs 液で灌流した場合に出現する律動的な自発収縮は，5-HT を作用させる事により増大したが（図 1a），これは 5×10^{-6}M から 10^{-4}M までの狭い濃度範囲ではあるが容量ー反応的な増大であった。10^{-5}M アトロピン (Atr) 存在下では，5×10^{-7}M から 10^{-5}M の濃度の 5-HT は自発収縮を抑制したが（図 1b），5×10^{-5}M から 10^{-4}M の濃度の 5-HT ではある程度の収縮増大が誘起された。10^{-6}M テトロドトキシン (TTX) は 5×10^{-6}M から 10^{-4}M の濃度の 5-HT による収縮増大を完全に消失させたが（図 1c），自発収縮の抑制は消失させなかった。Atr 存在下で 5×10^{-9}M ニューロキニンＡによって引き起こされた収縮増大は，10^{-5}M の 5-HT によってやはり強く抑制された（図 1d）。一方，5-HT による本筋の収縮は 5-HT3 タイプの受容体阻害剤である 10^{-5}M の Ondansetron で完全に抑制された（図 2a-c）。

以上の結果は，モルモット近位結腸の粘膜筋板に対して 5-HT は収縮増大と抑制の両方の効果を有する事を示している。この収縮増大は主にコリン作動性神経を，一部は非コリン作動性促進神経を介した反応であり，しかも 5-HT3 受容体が関与している事を示唆している。一方，収縮抑制は TTX 非感受性であり，神経を介さない筋細胞に対する直接作用であると考えられる。この収縮抑制にはケタンセリン，Ondansetron, LY53, 857 および SB204070 は無効であったので，5-HT2, 5-HT3 あるいは 5-HT4 以外のタイプの受容体の関与が考えられるが，詳細は今後の研究課題である。また，近年，5-HT は腸管の内腔にも漏出する事が明らかにされてきている。5-HT は神経からの放出だけでなく粘膜に存在する内分泌細胞からも分泌されるとされているので，傍分泌の様式で粘膜直下にある本筋に作用している可能性もあり，腸管内腔の情報を何らかの形で腸壁の神経や粘膜筋板などに伝達する役割を担っている事も考えられる。

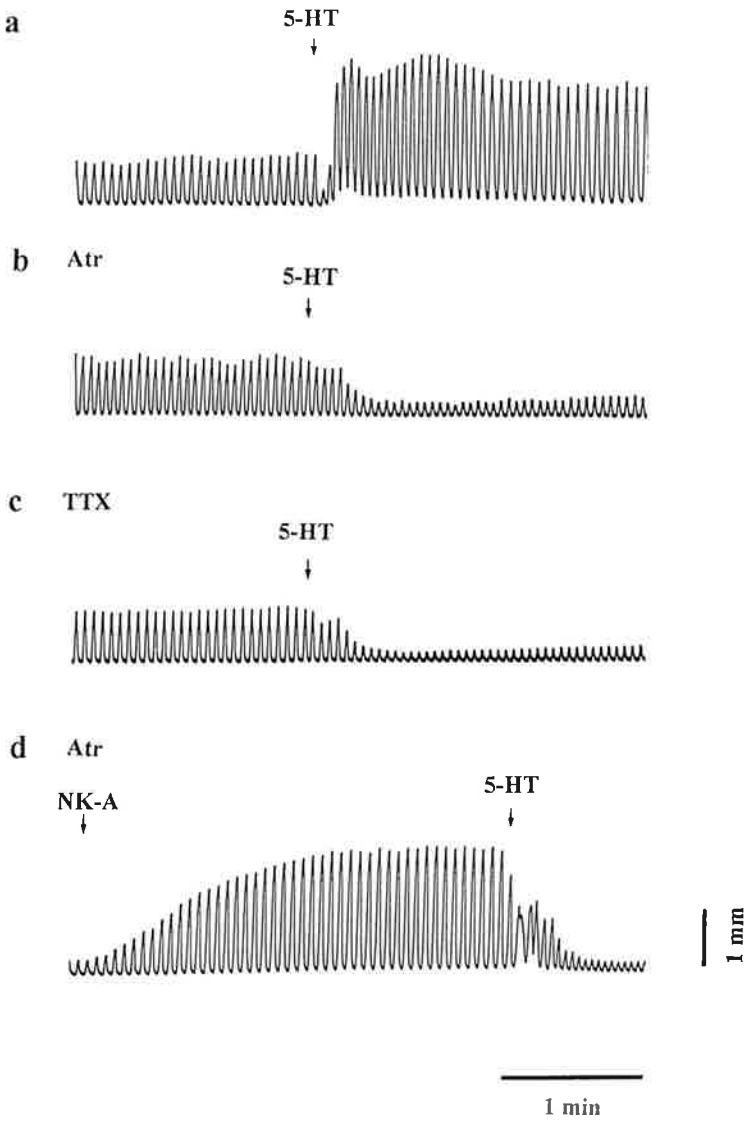


図1　粘膜筋板の運動に及ぼす 5-HT (10^{-5}M) の効果
a: 正常灌流液，b: アトロピン (Atr) 10^{-5}M 存在下，c: テトロドトキシン (TTX) 10^{-6}M 存在下 ,d: Atr10^{-5}M 存在下でニューロキニンA (NK-A) 5×10^{-9}M で収縮させた状態。

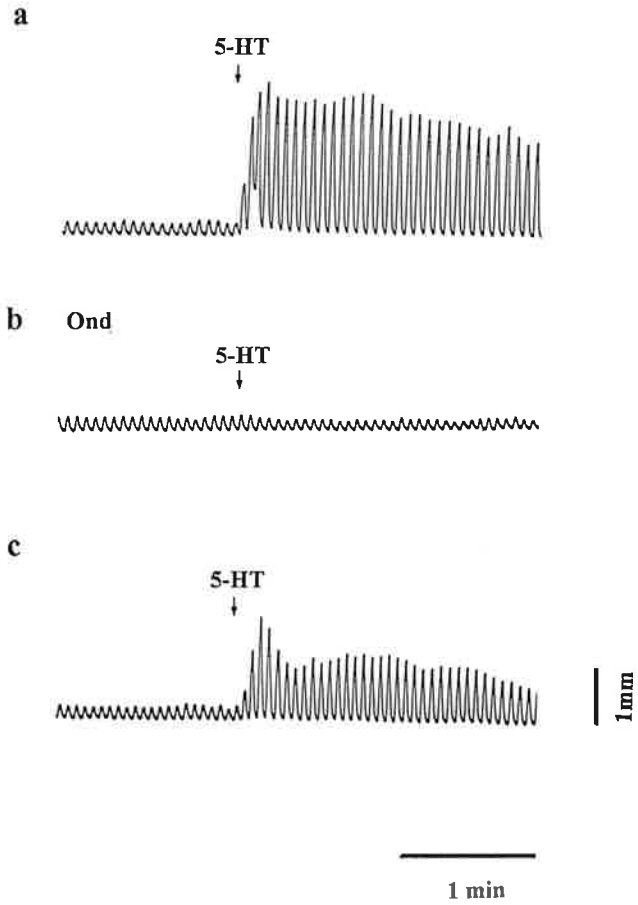


図2　粘膜筋板の運動に及ぼす 5-HT (2×10^{-5}M) の効果に対する Ondansetron の抑制効果
a: 正常灌流液，b: Ondsetron (Ond) 10^{-5}M, c: 正常灌流液。

22. 先天性 A ganglionosis ラットにおける NO の意義

角田ゆう子，鈴木　誠，渡井　有，椛沢由博，五味　明（昭和大・外科）
河合正仁（秋田大・医・第二生理）
尾崎　毅（生理研）

目的） Hirshsprung 病腸管の NO の分布を知る目的で実験モデルとして先天性 aganglionosis ラット腸管を用いて NADPH 染色を行った結果，先天性 aganglionosis ラットの狭小部腸管には NADPH 染色陽性の神経節細胞および神経線維は認められなかった。対照群では全ての腸管に陽

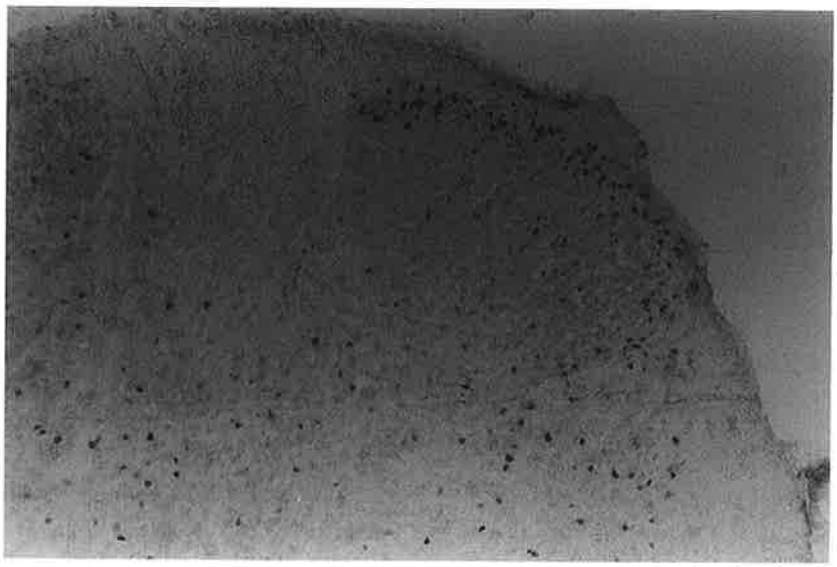


Figure 1　control 群の脊髄に出現した c-fos 陽性細胞分布は，後角表層のⅠ・Ⅱ層からⅤ－Ⅷ，中心管を取り巻くⅩ層におよぶ。

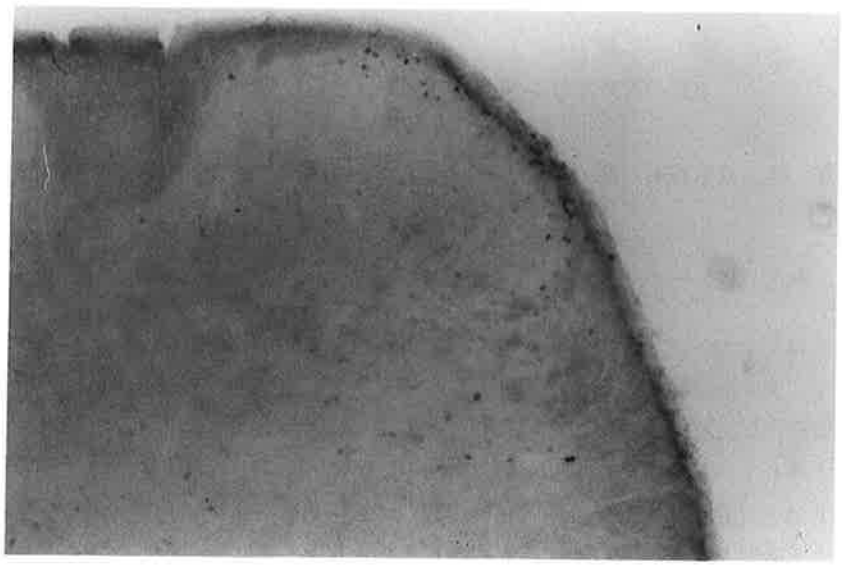


Figure 2　aganglionosis 群の脊髄に出現した c-fos 陽性細胞分布は，後角表層のⅠ・Ⅱ層に限局されている。

性の神経節細胞と神経線維のネットワークを認めた。今回は aganglionosis 腸管の知覚機能に関する研究を c-fos をパラメーターとして行った。

対象・方法）日齢20－24の aganglionosis ラット (n = 10) と同腹の健常ラットの control 群 (n

＝10) を用いて，ウレタン麻酔下に，経肛門的にバルーンを挿入し，約 80mmHg にて直腸を拡張し，2時間留置した後，還流固定，脊髄を摘出し，冷蔵保存した。脊髄を各分節に分けクリオスタットを用いて約 40μm の切片を作成，抗 c-fos 抗体を用いて，免疫組織染色（ABC 法）をおこなった。各群において一切片一片面あたりに，発現の明らかな c-fos の局在・出現数を100倍の弱拡大にて検鏡し，計測した。

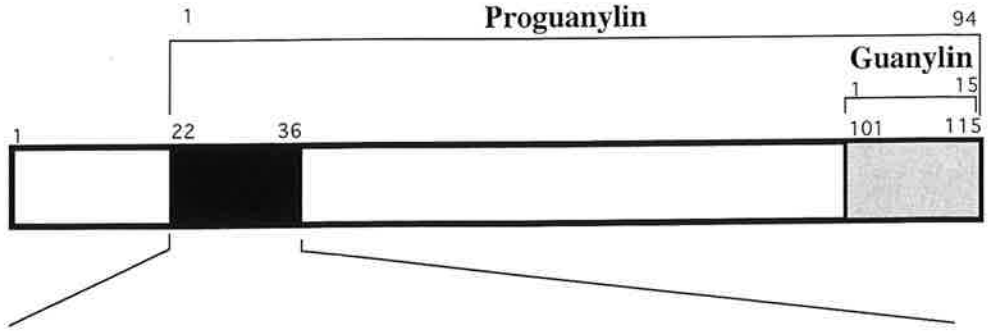
結果）両群で肛門直腸部拡張刺激により腰仙部脊髄に c-fos の発現を認めた。control 群では L_6 を中心に L_5 から L_1 にかけて存在した。脊髄内分布は，後角表層の laminael Ⅰ層からⅡ層，自立神経節前ニューロンの分布するⅤからⅦ層，後交連を含むX層に分布を認めた。この結果は，骨盤神経の電気刺激による c-fos 発現部位と一致し，また成熟ラットの直腸拡張刺激による c-fos 発現分節および領域ともほぼ一致していた。したがって，この拡張刺激は骨盤神経の知覚路を介して脊髄の2次・3次ニューロンを活性化したと考えられた。Aganglionosis ラットにおける c-fos の分布は，control 群と同様に，下部腰髄と仙髄に限局されていた。また脊髄内分布は laminael Ⅰ・Ⅱ層に限局されており，このことは骨盤神経刺激ではなく肛門－会陰部に存在する会陰神経刺激の結果出現したとも考えられた。c-fos の一切片一片側あたりの出現数は，control 群で57.6＋34.0個，aganglionosis ラット群で22.5＋15.9個と，両群間に有意差を認めた（$p < 0.001$）。すなわち，Hirschsprung 病で増生している神経線維は，低下している可能性が示唆された。

23. グアニリン受容体を介した腸液分泌調節

成瀬　達，家田秀明，関　泰長，北川元二，早川哲夫（名古屋大・医・第二内科）
古家園子，魏陸　新，尾崎　毅（生理研）
安藤英治，軒原清史（島津製作所）

グアニリンは Currie ら[1]により大腸癌細胞株 (T84) におけるグアニレートサイクレース活性を指標として，ラット空腸から単離された15アミノ酸残基よりなるペプチドである。グアニリンは小腸より管腔内に分泌され，小腸粘膜に存在する受容体と結合することにより，cGMP を上昇させると考えられている。病原性大腸菌の熱耐性エンテロトキシンによる下痢は，この毒素がグアニリンと共通の受容体を介して，小腸粘膜細胞のグアニレートサイクレース活性を刺激し，Cl 分泌の亢進と水吸収を抑制することにより引き起こされる考えられている。ところが，ヒトの血中ならびに組織におけるグアニリンは15アミノ酸残基ではなく，約 10kDa の大分子型が主体であり，グアニリンの前駆体（プログアニリン）であることが分かってきたが[2]，ラットにおける分子型は不明である。

当初，ヒト小腸のグアニリン産生細胞はインサイツーハイブリダイゼーション法ではパネート細胞であるとされていたが[3]，その後免疫組織化学的にはクローム親和性細胞である[4]とも報



Amino acid sequences of N-terminal fragment (1-15) of proguanylin

	22							30						36
Human :	Val	Thr	Val	Gln	Asp	Gly	Asn	Phe	Ser	Phe	Ser	Leu	Glu	Ser	Val
Rat :	Val	Thr	Val	Gln	Asp	Gly	Asp	Leu	Ser	Phe	Pro	Leu	Glu	Ser	Val

図1　プレプログアニリンの推定構造とN端1－15のアミノ酸配列

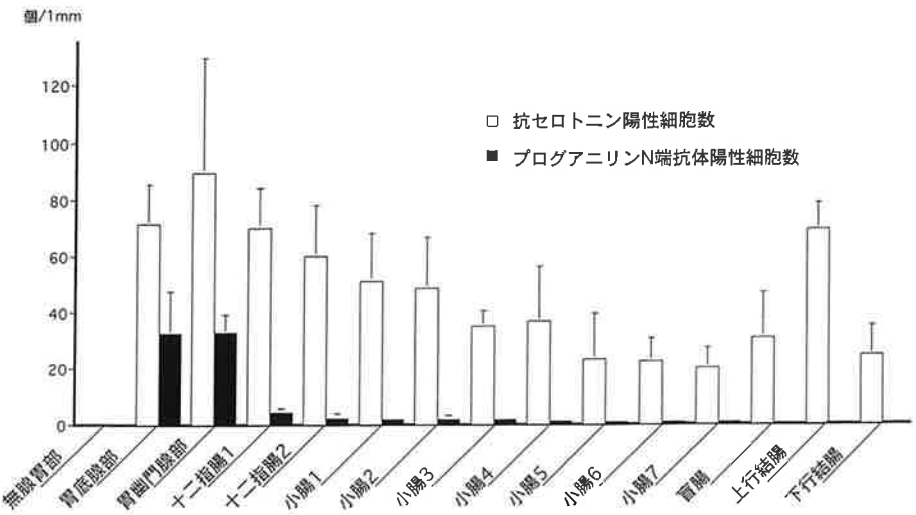


図2　ラット消化管におけるプログアニリンN端抗体陽性細胞とセロトニン陽性細胞の分布

告されている。一方，ラットグアニリンのmRNAはインサイツーハイブリダイゼーション法では小腸粘膜細胞に発現しており[5]，逆にグアニリンの免疫活性は杯細胞に存在する[6]など，グアニリンの産生細胞と生合成の過程は報告により一致していない。本研究では，プログアニリンのN端フラグメント特異抗体を用いて（図1），ラットにおけるプログアニリンの産生細胞を免疫組織化学的に検索した。

方法：ヒトプログアニリン（1－15）をFmoc法により化学合成し，KLHとコンジュゲート後，家兎の皮下に免疫し，このN端フラグメント特異抗体抗体(TNS-6)を得た。8週齢の雄性ウィスター系ラットをペントバルビタール麻酔下にて4％パラフォルムアルデヒドにより潅流固定した。消化管の凍結切片を作製し，TNS-6（5000－10000倍）によりアビジンビオチンペルオキシダーゼ法により免疫染色を行った。ヒトプログアニリン（1－15）フラグメントによる吸収試験を行った。また，抗セロトニンならびに抗ソマトスタチンモノクローナル抗体を用いて，免疫二重染色を行った。

成績：プログアニリン（1－15）の免疫活性をラット胃，十二指腸ならびに空腸に認めたが，遠位小腸ならびに大腸にはほとんど存在していなかった（図2）。プログアニリン（1－15）陽性細胞は胃では主として幽門腺底部に存在し，十二指腸では陰窩に多く，ピラミッド状もしくは紡錘状の形で細胞質に多数の細顆粒を有し，基底顆粒細胞の形態的特徴を備えていた。パネート細胞ならびに杯細胞には免疫活性を認めなかった。大多数のプログアニリン（1－15）陽性細胞はセロトニン陰性であったが，ソマトスタチン陽性であった。

考案ならびに結論

本研究はプログアニリン（1－15）フラグメントに対する抗体により胃ならびに小腸の基底顆粒細胞が特異的に染色されることを示した。この結果は，ラットでは抗グアニリン抗体により杯細胞が染まるという成績とは一致しないが，モルモットやヒトではグアニリン産生細胞は陰窩のクローム親和性細胞であるという報告[4]と同様，プログアニリンが内分泌される可能性を示唆するものであった。しかしながら，プログアニリンN端抗体陽性細胞とセロトニンを含有するクローム親和性細胞は一致しなかった。この成績はラットに特徴的なものなのか，今後，検討する必要がある。セロトニンとは異なり，大多数のプログアニリン（1－15）陽性細胞はソマトスタチン陽性であり，プログアニリンがソマトスタチンのようにパラクライン（傍分泌）されることにより，近傍の細胞機能を調節している可能性が示唆された。

文献

(1) Currie MG, et al. Proc Natl Acad Sci 89: 947, 1992

(2) Kuhn M, et al. FEBS 318: 205, 1993.

(3) De Sauvage FJ, et al. Proc Natl Acad Sci 89: 9089, 1992

(4) Cetin Y, et al. Proc Natl Acad Sci 91: 2935, 1994.

(5) Lewis LG, et al. BBRC 196: 553, 1993.

(6) Cohen MB, et al. BBRC 209: 803, 1995.

24. 消化管におけるセロトニンの機能的役割の研究

藤宮峯子（滋賀医大・第一解剖）
山本育男（滋賀医大・第二外科）
尾崎　毅，桑原厚和（生理研）

本課題による平成7年度の共同研究でセロトニン(5HT)が腸管機能（特に運動）の調節に重要な役割を有することが明らかになった。また腸管からの5HT分泌は壁内のPACAPおよびVIP含有神経やCCK含有内分泌細胞の制御を受けることが明らかになった。

具体的には，ラット十二指腸の灌流実験で種々の濃度の5HT1受容体アンタゴニストのmethysergide, 5HT2受容体アンタゴニストのketanserin, 5HT3受容体アンタゴニストのgranisetron, azasetron, 5HT4受容体アンタゴニストのSB204070を血行性に投与した際の腸管運動の変化を内圧測定法にて調べた。灌流腸管はおよそ1分間に1回の規則的な収縮運動を示し，収縮の強度を示す%motility indexとfrequencyを薬物効果の指標とした。Methysergide (10^{-6}M)およびketanserin (10^{-5}M)の投与では%motility index, frequencyとも有意な変化を示さなかったが，granisetron (10^{-10}M)の投与で%motility index, frequencyは有意に抑制された。Azasetron 10^{-9}Mの投与で%motility indexは有意に抑制され10^{-10}Mでfrequencyは有意に抑制された。またSB204070 10^{-10}Mで%motility indexは有意に抑制され，frequencyは10^{-9}Mで変化を認めなかった。以上の実験結果から5HTによる腸管運動の調節は5HT3および5HT4受容体を介して行われることが明らかになった。

一方，5HT分泌の制御機構を調べた実験では以下の結果を得た。ラット十二指腸を血行性および管腔性に灌流し，門脈血中および管腔中の両方向に放出される5HT量をHPLCで測定した。PACAP38, PACAP27, VIPおよびCCKを血行性に投与した際の5HT分泌量の変化を比較検討した。PACAP38 1μMの投与では管腔内への基礎分泌量(4.35 ± 0.28ng/min)は2.38 ± 0.29ng/minと有意に減少し，血中への基礎分泌量(2.37 ± 0.16ng/min)はPACAP38の投与で変化はなかった(2.91 ± 0.37ng/min)。またPACAP27 1μMの投与でも管腔中への基礎分泌量(4.43 ± 0.80ng/min)は有意に減少し(2.39 ± 0.54ng/min)，一方血中への基礎分泌量(2.07 ± 0.28ng/min)は変化を受けなかった(2.04 ± 0.28ng/min)。VIP 1μMの投与で管腔中への基礎分泌量(4.38 ± 0.61ng/min)は有意に減少し(2.96 ± 0.36ng/min)，血中への分泌量(1.79 ± 0.18ng/min)は変化を受けなかった(1.46 ± 0.17ng/min)。一方CCK 1μMの投与においては管腔中への基礎分泌量(2.28 ± 0.58ng/min)は増加し(3.37 ± 0.50ng/min)，血中への分泌(2.32 ± 0.38ng/min)は変化がなかった(2.49 ± 0.54ng/min)。以上の結果よりラット十二指腸から管腔への5HT分泌は，PACAP38, PACAP27およびVIPで抑制され，CCKで刺激されることが明らかになった。

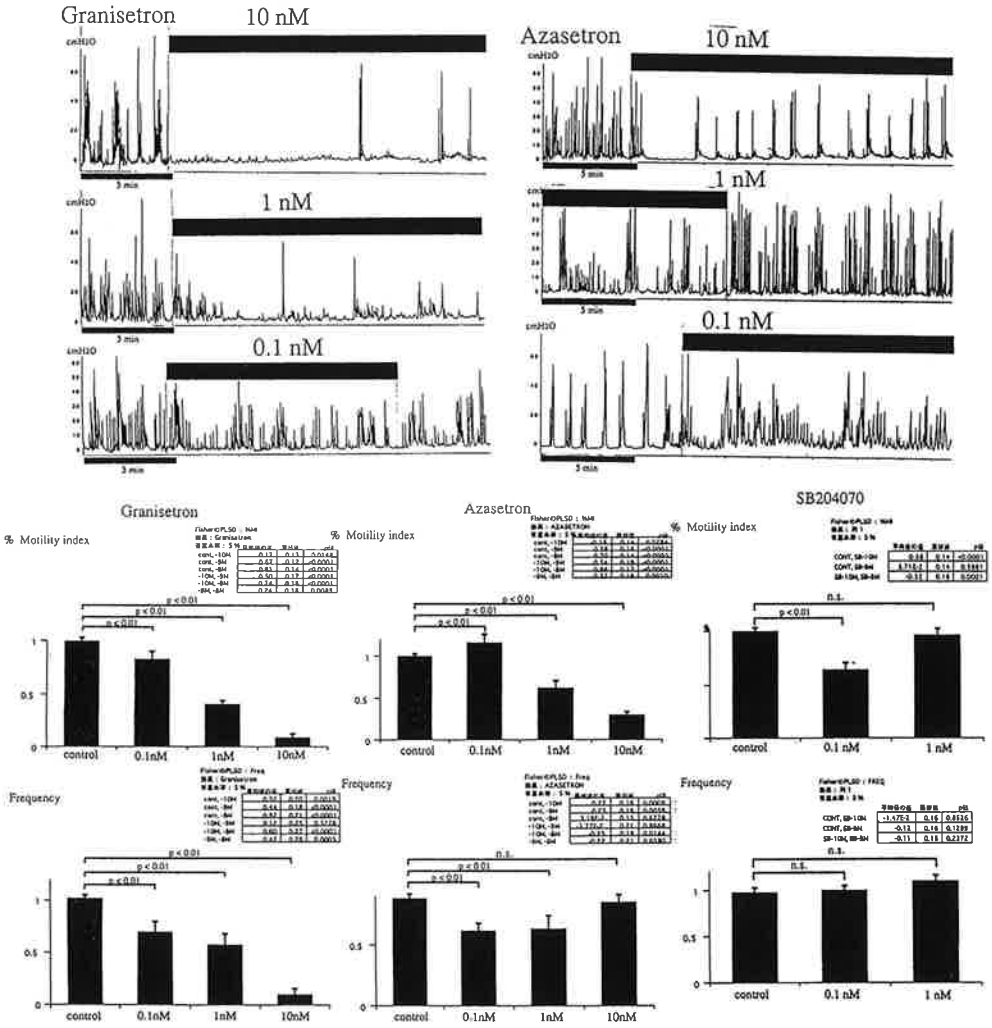


図1　5HT3 受容体アンタゴニスト (granisetron, Azasetron) と 5HT4 アンタゴニスト (SB204070) の腸管運動に対する影響

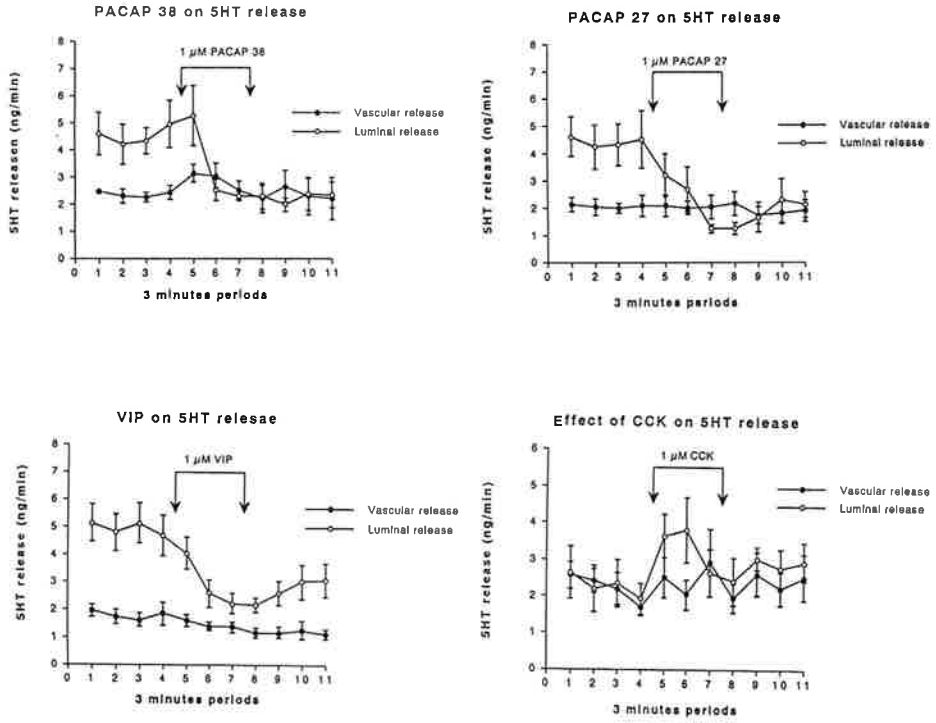


図2　PACAP38, PACAP27, VIP および CCK の血液中および管腔中への 5HT 分泌量に与える影響

25. 消化管機能制御作用をもつミルク由来生理活性物質の探索

原田悦守，斉藤俊之，七條喜一郎，竹内崇，古村浩一（鳥取大・農・獣医生理）
尾崎　毅（生理研）

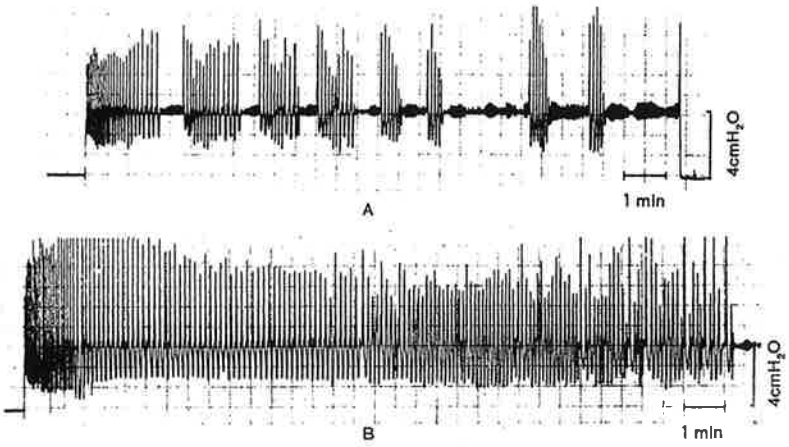
母乳は，蛋白質，炭水化物，脂肪，ミネラルなどの栄養素のみならず，免疫関連物質，ホルモン，成長因子など，多くの生理活性物質を極めて高濃度含んでいる。しかしながら，ミルクの飲用によってどのような生理作用が期待できるのか明確ではない。

この研究では，ミルク成分及び腸管内で生成された生理活性物質の消化機能，特にその運動制御作用を解析した。

①モルモットの摘出腸管から作成した回腸のホールセグメントを用いて，Trendelenburg 法による内圧変動に対する腸管の運動性を指標として検討を進めた。腸管標本の作成，低圧トランス

表－1　腸管内圧と蠕動出現回数の関係

腸管内圧(cmH_2O)	0	0.5	1	2	3	5	8	10
蠕動出現回数(/10分)	0	0	13	54	75	94	96	92



図－1　蠕動運動に対するナロキソンの影響
A；ナロキソン添加前。蠕動運動の休止期が15分間で8回見られた。
B；ナロキソン添加後。蠕動運動の休止期が消失し，蠕動運動は持続的となった。

デューサーの感度など，装置の改良によって漸く，圧上昇に対する腸管の蠕動波を記録できるようになった。

②腸管圧を0から10cmH_2Oまで段階的(0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 10)に上げていくと，蠕動波が出現し（閾値圧1cmH_2O），その頻度は内圧に比例して増加した（表－1）。

③標本槽内へナロキソンを添加すると，15分間で8回あった蠕動運動（腸管内圧4cmH_2O）の停止期が消失し，蠕動運動は持続的となった（図－1）。

蠕動停止期にある標本にサブスタンスP(SP)を添加すると，再び蠕動を起こした。また，閾値圧は2.5cmH_2Oから1.5cmH_2Oへ低下した。

この実験から，蠕動波形成に対するエンケファリンの抑制性支配及びSPを伝達物質とした促進性経路の存在が確認された。

④内圧変動による蠕動波出現反応をウサギ及びラットについても試みた。不規則的な蠕動波は頻繁に認められたものの，閾値・頻度が一定した蠕動波は観察できなかった。

現在，この蠕動波の出現を個体発生学的観点から解析し，出現機構に関与するカゾモルフィンなどミルク由来活性物質の同定を進めている。

26. 気道分泌に関わるイオンチャネルと細胞膜動員の分子的制御機構

岩田重信，三輪正人，高須昭彦，平野光芳，加藤久幸，馬場　錬（藤田保衛大・医）
挾間章博，岡田泰伸（生理研）

気道上皮細胞は，単なるバリアではなく，様々な生理活性物質を産生代謝していること以外に，気道内の水分量の調節をおこなっていることが知られている。なかでも気道上皮細胞管腔側のクロライドチャネルは，刺激時活性化され，種々の病態における気道過分泌の一翼を担っているとされる。しかしながら，過去の研究を検討してみると，気道上皮全体で輸送されたイオン総量と相関する短絡電流の測定，プラスティックディッシュ上に密着させて培養した単離細胞に対するパッチクランプはそれぞれなされてきたが，それらの場合上皮としての物質輸送をおこなっている状態でのシングルチャネルを捉えているとは言いがたい。また，分泌能を持つ気道上皮細胞に存在するクロライドチャネルとしては，cyclicAMP 依存性である cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR), outwardly rectifying chloride channel (ORCC) の外に Ca 依存性および細胞容積感受性のものが報告されているが，同じ気道上皮細胞でも極性の有無によりそれらの機能が全く異なる可能性が従来より示唆されてきた。すなわち電気生理学的には同様の態度をとるものでも，極性のない細胞では，気道上皮本来の分泌機能とは全く無関係の作用を行っていることがありうる。我々はこのような従来の気道分泌研究の限界を乗り越えるため，昨年度の本共同研究において，正立顕微鏡下に設置できるウッシングチャンバーを独自に開発し，極性の保たれたモルモット初代培養気管上皮細胞管腔側クロライドチャネル活性のパッチクランプ法による測定系を確立した。

最近，難治性呼吸器疾患であるびまん性汎細気管支炎や副鼻腔気管支症候群で特徴的にみられる気道過分泌に14員環のマクロライド系抗生物質が著効を示すことが多施設において確認されているが，その基礎的機序は全く不明である。一方，気道分泌機構において，CFTR と ORCC の相互作用の重要性を示唆する結果が相次いで報告されているが，それらの結果から，サイクリック AMP 刺激で活性化される CFTR のみならず，細胞外に分泌された ATP により活性化される ORCC も上皮細胞や粘膜下腺細胞等の気道分泌の調節機構に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

そこで，今年度は気道上皮細胞のクロライド分泌に占める ORCC の割合を短絡電流を測定することにより検討し，ORCC も CFTR と同じくクロライド分泌に寄与していることを確認した。そこで，我々が初めて確立したシステムを用い，14員環のニューマクロライド剤の一つである Roxithromycin の ORCC に対する効果をパッチクランプを適用し検索した。基底側よりイソプロテレノールの投与後同じく基底側より Roxithromycin を加えたところ ORCC の著明な抑制効果が観察され，この効果は用量依存的であった。また，ダイブチリックサイクリック AMP による ORCC の著明な活性化も，やはり Roxithromycin で抑制された (Jap. J. Antibiotics 48 Suppl.A 58-

60, 1995)。次にイソプロテレノール を基底側より投与後，excised patch (inside-out) によるシングルチャネルレコーディングをおこなったが，Roxithromycin 投与後 ORCC の著明な抑制効果が確認された（耳鼻咽喉科展望 39 in press 1996)。マクロライドによる抑制効果がチャンネルタンパクを露出させた excised patch でも確認されたことから，ORCC に対する直接作用であることが示唆され，マクロライド剤が気道上皮細胞管腔側のクロライドチャネルブロッカーとして作用し気道過分泌を抑制している可能性が考えられた。本実験で確立された実験システムを用いることにより，種々の病態での気道過分泌治療に新しい道が開けると考えられ，さらに詳細に多角的に検討する必要があると思われる。

【 計画共同研究報告 】

計画共同研究報告

〔目　　次〕

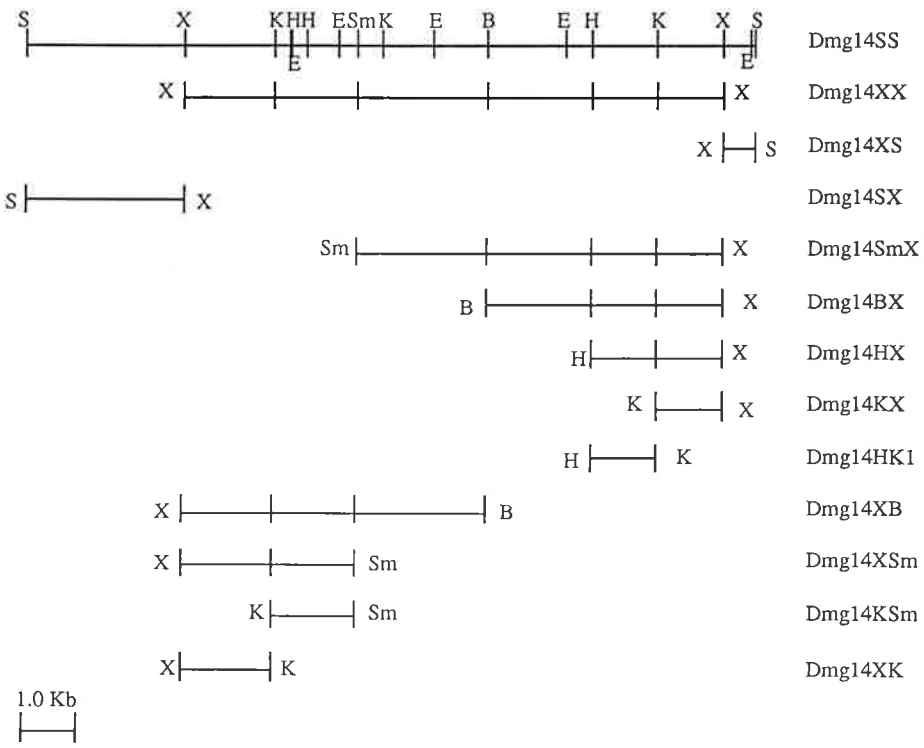
1．ドレブリンA欠失マウスを用いた中枢シナプス可塑性の研究（白尾智明他）…… 224
2．Fyn チロシンキナーゼ欠失マウスの行動異常に関する生理心理学的解析（二木宏明）…… 225
3．NMDA 受容体チャネル欠損マウスの作成と機能解析（崎村建司他）… 226
4．遺伝子ノックアウト法による神経系膜分子の機能解析（藤澤　肇）…… 227
5．Collapsin のジーンターゲティング（谷口雅彦）…… 228
6．終脳特異的接着分子テレンセファリンのノックアウトマウスの作製（森　憲作他）…… 229
7．プロテオグリカン型プロテインイチロシンフォスファターゼの中枢神経系発生における機能解析（野田昌晴他）…… 230

1．ドレブリンＡ欠失マウスを用いた中枢シナプス可塑性の研究

林　謙介，田中聡一，白尾智明（群馬大・医・行動分析）
児島伸彦，小幡邦彦（生理研）
関野祐子（新技術事業団さきがけ研究21「細胞と情報」領域研究者）

ドレブリンはアクチンに結合して細胞骨格を変化させ，細胞の形態変化を誘導する。従って中枢神経細胞シナプス後部に局在しているドレブリンＡはシナプスの可塑的変化に付随して起こる細胞骨格の変化に関与している可能性が高い。本研究は標的組み換え法によりドレブリンＡ欠失マウスを作製し，このマウスを用いてドレブリンＡ欠失によりシナプス可塑性にどのような変化が起きるかを学習行動の解析あるいは海馬スライスを用いた解析により明らかにする。

Dmg14SS及びそのサブクローンの制限酵素地図



B:BamHI, E:EcoR I, H: Hind III, K:Kpn I, S:Sal I, Sm: Sma I, X: Xba I

ドレブリンEとAの完全欠失マウスは神経系の正常発生そのものが不可能であると考えられるので，本研究ではドレブリンEは発現するがドレブリンAを発現できなくなっているようなノックアウトマウスを作製する必要がある。そこで，ドレブリンAに特異的なエクソンINS2を含む部分の遺伝子の構造を詳細に解析する必要がある。そこでエクソンINS2の前後の2種類のcDNAの塩基配列をプライマーとして用いて，全長約100塩基対のプローブを作製した。このプローブを用いて，八木らにより作製されたES細胞のgenomeのライブラリーをスクリーニングし，5種類のクローンfDmg14, 18, 19, 22, 26を単離精製した。そしてまずfDmg14の解析を進めた。制限酵素Sal Iによりインサートを切り出すと，約19Kbであった。図にその制限酵素地図とサブクローニングしたフラグメント示す。

Dmg14-XSにはラットドレブリンcDNAの1908番から1996番，及びその後ろに対応するエクソン2本があったが，C末端には到達していないことが解った。

Dmg14-XKにもラットドレブリンcDNAに対応するエクソンが複数発見された。

Dmg14-HKには，エクソンINS2が発見された。エクソンINS1に対応すると考えられるエクソンも発見されたが，ほ乳類ではエクソンINS1の存在がまだ証明されていないので，現在ラットのmRNAの解析を進めることにより，エクソンINS1の有無を確認中である。また同時にエクソンINS2の特異制限酵素部位を用いてターゲット用ベクターの作製を行っている。

Dmg14-EE（昨年度はこのフラグメントはDg1と呼ばれていた。）にはラットドレブリンcDNAに対応する4本（382～531，532～608，609～761，762～826）のエクソンが確認された。

Dmg14-KSmにはラットドレブリンcDNAに対応する2本（194～310，382～534）のエクソンが確認されている。現在第一エクソンの存在部位の確認を急いでいる。

2．Fynチロシンキナーゼ欠失マウスの行動異常に関する生理心理学的解析

二木宏明，宮川　剛（東京大・文）
八木　健（生理研）

昨年度に引き続き，Fyn欠失マウスの行動異常の性質を分析している。昨年度までの研究によって，Fyn欠失マウスでは恐怖反応の亢進と聴覚性痙攣発作の感受性亢進が明らかになったので，その成果を下記の論文として公刊した。

1．Miyakawa, T., Yagi, T., Watanabe, S. & Niki, H. Molec. Brain Res., 179: 179-182, 1994.
2．Miyakawa, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Matsuura, H., Tateishi, K. & Niki, H. Molec. Brain Res., 28: 349-352, 1995.
3．Miyakawa, T., Yagi, T., Kagiyama, A. & Niki, H. Molec. Brain Res. 1996 (In press).

本年度は，種々な薬物により誘発した痙攣の感受性について実験を行い，次のようなことを見

いだした。

Fyn ホモ欠失マウスは対照のヘテロ欠失マウスに比べて，pentylenetetrazol, picrotoxin, bicuculline, kainic acid, NMDA の投与により誘発した myoclonic convulsion が起こりやすかった。しかしながら，strychinine による痙攣発作に関しては，ホモ欠失マウスとヘテロ欠失マウスの間で差が見られなかった。

次年度以降は，見いだされた Fyn 欠失マウスにおける恐怖反応の亢進と痙攣発作感受性の亢進が，benzodiazepine receptor の density の減少と関連しているかどうか，結合実験で検討する予定である。

3．NMDA 受容体チャネル欠損マウスの作成と機能解析

崎村建司（新潟大・脳研・基礎神経科学）
八木　健，三品昌美（生理研）

我々は，記憶，学習など脳の高次機能を分子レベルで理解する目的で，電位依存性の Mg^{2+} 閉塞と高い Ca^{2+} 透過性という特性を持ち，シナプスの可塑性発現に関与することが示されている NMDA 型受容体チャネルに着目し研究を進めてきた。その結果，NMDA 型受容体チャネルは少なくとも ε, ζ 二つのサブユニットファミリーにより構成されており，その機能的多様性の基盤が，ε サブユニットの分子的多様性によっていることを明らかにした。さらに，その発現分布や Mg^{2+} に対する感受性などから，ε1 および ε2 サブユニットが可塑性に関与する分子であるという作業仮説をたてた。この仮説のもと，まず ε1 サブユニットを標的遺伝子組換え法を用いて欠損したマウスを作成し解析をおこなった結果，ε1 サブユニットが可塑性に関与する分子であり，さらにある種の学習にも必要な分子であることが明らかになった。

本年度は，可塑性に関与する分子として仮定したもう一つのサブユニット ε2 のノックアウトをおこなった。開始メチオニンをコードするエクソンを含む遺伝子 DNA 断片にネオマイシン耐性遺伝子を挿入したターゲッティングベクターを作成し，ES 細胞 TT2 に導入後，標的組換えをおこしている細胞を得た。これら細胞をマウス胚に導入しキメラマウスを作成し，その子孫より二種類の細胞由来のマウスの作成に成功した。ε2 サブユニット欠損マウスは，哺乳反応が消失しており出生後24時間以内に死亡することから，このサブユニットが生存に必須の分子であることが明らかになった。しかし，人工的に飼育すると生後 3 日までは発育させられることから，ε2 サブユニット欠損マウスの死因は，哺乳反射の消失による脱水および栄養障害であることが明らかになった。さらに，バレレッテ構造として知られている口髭からの一次求心神経が脳幹三叉神経核において髭の配列を投射する形で二次神経とのシナプスを形成する領域が，ε2 サブユニット欠損マウスでは消失しており，シナプス形成の異常が考えられた。また，海馬 CA1 領域

での NMDA 受容体チャネルを介する電流成分が検出できず，さらにこの領域での長期抑圧も認められなかった。これらのことは，ε2 サブユニットは，可塑性に関与する分子であるという仮説を実験的に証明するものであり，さらに ε2 サブユニットが，発生における神経ネットワーク形成に関与する分子であることを示すものであった。

本年度の研究成果は，下記の論文として刊行した。

1．Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., Arakawa, M., Takahashi, T., Nakamura, Y., Mori, H. and Mishina, M., Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor ε2 subunit mutant mice. Neuron 16: 333-344, 1996.

4．遺伝子ノックアウト法による神経系膜分子の機能解析

木津川尚史，藤沢　肇（名古屋大，理），八木　健（生理研）

動物の神経系は膨大な数の神経細胞から成り立っており，個々の神経細胞は特定の標的器官や他の神経細胞と結合し，特定の神経回路を形成している。このような神経細胞間の特異的結合の形成には細胞膜表面分子が重要な働きを担っていることが知られている。ニューロピリン（neuropilin; A5 から改名）はそのような膜タンパク質である。ニューロピリンの細胞外領域は，a1, a2, b1, b2, c のドメインからなっており，a1, a2 は補体成分 C1r, C1s のドメイン 3 に，また b1, b2 ドメインは血液凝固因子 V, VIII のドメイン C1, C2 に類似性をもつ繰り返し構造であることがわかっている。細胞膜貫通ドメインと細胞内ドメインに関しては類似性をもつタンパク質は見つかっていない。

ニューロピリンは，特定の神経細胞，血管内皮細胞，肢芽などの間充織に発現するが，その発現は各々の器官で形態形成が終わるにつれて消失することがわかっている。ニューロピリンの生体内における機能解析のために，すでにニューロピリンを過剰発現するキメラマウスを作成しており，そのキメラマウスでは神経線維の走行異常，心臓・血管の形成異常，肢芽の形成異常がみられた。これらの形態形成における異常は，本来ニューロピリンの発現が消失するべき部位，ステージでニューロピリンが発現し続けたことによるものと考えられ，ニューロピリンが神経線維の伸長の制御，心臓・血管系の形成，肢芽の発生に関与していること，そして発生の正しい時期にニューロピリンが消失することが正常な形態形成に必要であることが示唆された。これらの可能性を検証するためには，正常なニューロピリンの発現を妨げる方法が有効であると考えられる。そのためにニューロピリンのターゲテイングを共同研究として行っている。昨年度までに，ニューロピリンゲノム DNA のクローニングとターゲテイングベクターの作成を行った。昨年度はその

ベクターにより相同的組換えを起こしたES細胞を得て，キメラマウスを作成した。現在はそれらのマウスを掛け合わせ，ニューロピリン遺伝子欠損マウスを作成中である。ニューロピリン遺伝子欠損マウスが得られれば，正常発生においてニューロピリンがどのように働いているか解明できるのではないかと期待している。

5．Collapsin のジーンターゲティング

谷口雅彦（愛知県コロニー・研究所），八木　健（生理研）

脳神経研究の中で神経回路形成過程の解明は最も重要な領域の一つである。神経回路形成過程において，growth cone の目的の場所への伸展は非常に重要である。ニワトリにおいて dorsal root ganglia (DRG) の growth cone の伸展を抑制する蛋白 Collapsin が発見され，クローニングされた。その後，collapsin と相同性のある遺伝子が，様々な種及び種内で報告され，Collapsin/Semaphorin family と呼ばれている。マウス collapsin (semaphorin D) は DRG の NGF-responsive axon には作用するが，NT-3-responsive axon には作用せず，また，E12.5 の脊髄の ventral で発現していることを考えると脊髄への axon の選択的投射に関与している可能性が高い。さらにマウス collapsin の mRNA の発現様式も興味深い。これらのことより collapsin は神経回路形成過程において重要な役割をしていることが考えられる。しかし，collapsin の生体内での役割は全く分かっていない。そこで，collapsin の神経回路形成過程における分子機能を解明するために，ジーンターゲティングを行うことを計画した。

昨年度に，マウス collapsin の cDNA と開始コドンのあるエクソンを含むゲノム DNA を得た。このゲノム DNA を用いて Cre-loxP システムを利用できるターゲティングベクターを作製した

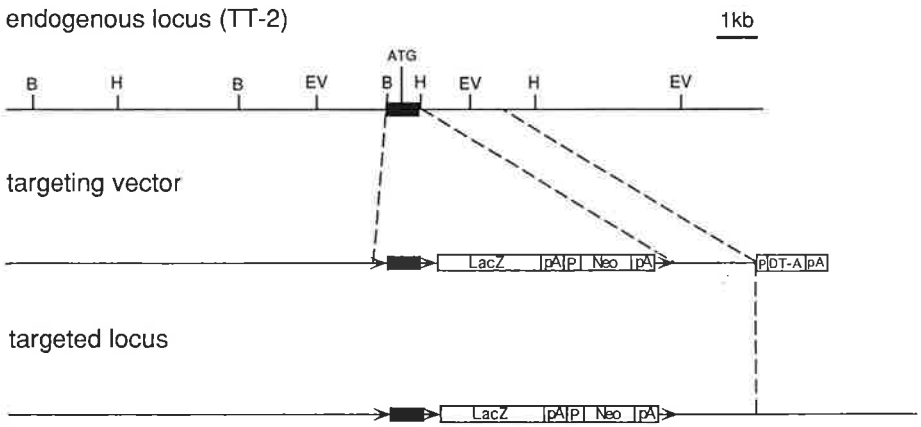


図1　Collapsin のジーンターゲティングベクター

（図１）。作製方法は，３つのloxPサイト（矢印）のそれぞれの間にエクソンとLacZ-ネオマイシン(Neo)を挿入し，その5'と3'側にcollapsinゲノムDNAを結合させた。また，ゲノムDNAの3'側にnegative selectionに使用するジフテリア毒素Aフラグメント(DT-A)を結合させ，ターゲティングベクターを作製した。このターゲティングベクターをエレクトロポレーション法でTT-2細胞に導入して，相同組換えを起こしたTT-2細胞を得た。その後，このTT-2細胞にCre蛋白をtransientに作用させてloxPサイトの組換えを起こさせ，目的とする３種類のTT-2細胞を得た。これら４種類のTT-2細胞はマイクロインジェクション法により，生殖系列キメラマウスとなった。その結果，これらのキメラマウスより，collapsinノックアウトマウス・collapsinをCreの発現によりconditionalにノックアウトできるマウス・collapsinの代わりにLacZを発現させるマウスが得られている。現在，これらのcollapsin遺伝子変異マウスの解析中である。

６．終脳特異的接着分子テレンセファリンのノックアウトマウスの作製

杉野英彦，森　憲作（理研フロンテイア・ニューロン機能分子）
八木　健（生理研）

学習・知覚・記憶等の多様な高次機能を有する脳はきわめて複雑であるが，秩序だった神経回路網により形成される。正しく機能すべく神経回路網を形成するためには，個々のニューロンどうしの正確なシナプス結合が必要である。そこで神経系の発生過程においてニューロン間の認識・接着を司る細胞膜表面分子が重要な役割を演ずる。

近年，神経系で発現する細胞接着分子が次々と同定されている。これらの多くは軸索にのみ発現する接着分子（軸索性細胞接着分子：AxCAM）であり，AxCAMは軸索の伸長，軸索束形成，標的ニューロンの認識等に働いていると考えられる。

一方シナプス後部を形成する樹状突起あるいは細胞体に特異的に発現する細胞認識　接着分子（樹状突起性細胞接着分子：DenCAM）はこれまで全く知られていなかった。しかし1994年になり森らのグループによりこのDenCAMの１つであるテレンセファリン(TLN)が初めてクローニングされた。TLNは細胞外領域に９個のイムノグロブリン様ドメインを持つIgスーパーファミリー分子で免疫系における細胞接着分子ICAM-1および３と最も高い相同性を示した。非常に興味深いことにこのTLNは，脳の最も吻側セグメントでありかつ，記憶学習といった高次機能を担当する終脳セグメントでのみ発現している。TLNの発現は胎生期で低く，生後すぐに劇的に増加する。この時期は終脳における樹状突起の伸長およびシナプス形成の時期と一致する。

これらのことよりTLNは，終脳部という空間情報をAxCAMに与えるアドレス分子であり，その成体における発現の維持からも，終脳における学習や記憶に伴うシナプスの可塑的変動に関わっていることも推測される。

そこで我々は，TLN の脳における働きを明らかにするために，マウス TLN 遺伝子のターゲッティングを計画した。まず，ターゲッティングベクター作製のために，マウスゲノミック DNA のクローニング，制限酵素地図の作成，エクソン／イントロンの位置の決定した。マウス TLN ゲノミック DNA は全長約 7Kb の領域に，11個のエキソンから構成されていた。現在までにこのゲノミック DNA を用いて，機能ドメインの大部分を欠くターゲッティングベクターを構築し，ES 細胞にターゲッティングベクターを導入，ホモロガスリコンビネーション（相同組み換え体）mutant ES 細胞のスクリーニングを行っている。TLN の様に樹状突起と細胞体にのみ，そしてかつ終脳部といったセグメントに特異的な接着分子のターゲッティングは報告されていない。従ってこの実験により，終脳特異的接着分子 TLN が終脳の構築と機能に及ぼす役割が明らかにされるものと期待される。

7．プロテオグリカン型プロテインチロシンフォスファターゼの中枢神経系発生における機能解析

野田昌晴，前田信明（基生研）
八木　健（生理研）

中枢神経系には数多くのプロテオグリカンが存在し，神経系の発生における諸過程で重要な機能を果たしていると考えられる。その中の１つ，6B4 プロテオグリカンはプロテオグリカン型チロシンフォスファターゼ，PTP-ζの細胞外領域に相当する分子である。これら２つの分子種は選択的スプライシングにより産生され，tenascin や N-CAM, contactin 等の分子と結合することが明らかになっている。6B4 プロテオグリカンは大脳皮質神経細胞の形態分化促進活性を有し，PTP-ζと共に中枢神経系での細胞内情報伝達に重要な役割を果たしていると考えられる。我々は 6B4 プロテオグリカン及び PTP-ζの中枢神経系での生理機能を明らかにする目的で，両分子の発現を欠失させたノックアウトマウスの作製を試みた。

ターゲティングベクター構築のために，マウスゲノムライブラリーより 6B4 プロテオグリカン (PTP-ζ) のＮ末端をコードするエクソンを含むゲノム DNA クローンを単離した。このクローンより切り出した DNA 断片と，positive selection のための neo 耐性遺伝子，また negative selection のためのジフテリアトキシン・Ａフラグメント遺伝子を組み合わせてターゲティングベクターを作製した。このベクターを胚性幹細胞（ES 細胞）TT-2 にエレクトロポレーションにより導入し，G418 を含む培地で一定期間培養することにより neo 耐性遺伝子を有するクローンを選択した。次にこれらのクローンより少量の DNA を抽出し，PCR により相同組換え体を選別した。陽性結果が出たクローンについてサザンブロットによりさらに詳しく解析したところ，３つのクローンに相同組換えが生じていたが，このうちの２つは目的の遺伝子部位以外にもベクターが挿

入されていることが判明した。正しい相同組換えのみを起こしたクローンについて，コルヒチン処理により間期の細胞を集め，染色体数を測定し，正常に40本であることを確認した。これまでにこのクローンを240個の初期胚（８細胞期）にマイクロインジェクションし，12匹の仮親マウスに移植した。その結果，94匹の子が得られたが，その中にキメラマウスは存在しなかった。

【 磁気共鳴装置
共同利用実験報告 】

磁気共鳴装置共同利用実験報告

〔目　　次〕

磁気共鳴装置室概要
1．超高速磁気共鳴画像法による消化管運動の研究（小幡邦彦他）…… 238
2．リアルタイム磁気共鳴装置による脳の functional imaging に関する研究
（宮内　哲他）…… 240
3．定量的な磁化移動コントラスト・イメージング法の開発（恵良聖一他）… 242
4．MRI によるラット脊髄圧迫の研究（松井宣夫他）…… 243
5．核磁気共鳴法による小腸虚血・再潅流時のエネルギー代謝の検討
（正岡　昭他）…… 244
6．圧迫による椎間板内のひずみおよび水分子拡散係数の測定による
正常椎間板内の水分子保持機構の解明（日下義章他）…… 245
7．MRI による内耳病変の検出（武田憲昭他）…… 248
8．^{31}P-NMR 法によるヒト骨格筋作業時の筋エネルギー代謝の
定性・定量的評価に関する研究（平川和文他）…… 251
9．核磁気共鳴法による細胞内水･電解質・基質の動的挙動の解析
（瀬尾芳輝他）…… 254
10．マウス移植脳腫瘍の経時的観察（池中一裕他）…… 256
11．MRI によるサル側頭葉の観察と微小電極定位への利用（藤田一郎他）　257
12．MRI によるサル視覚皮質の観察と電極定位（小松英彦他）…… 259
13．サル大脳皮質の定位的脳地図の作成と記録への応用（酒田英夫他）…… 260
第14回核磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ
（代表者　村上政隆）…… 262
（1995年11月９日～11月11日）
第15回核磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ
（代表者　村上政隆）…… 265
（1996年３月７日～３月８日）

磁気共鳴装置室

【概要】

磁気共鳴画像装置 (MRI & MRS) は，磁気共鳴という非常に小さいエネルギー現象を利用し生きた状態で，組織構築を破壊することなく，断層画像・燐化合物量など多種多様の情報を観測するために導入された。1988年度は装置の立ち上げ，1989年度には公募共同利用研究を開始した。1994年度は(1)生体内部の非破壊三次元観察。(2)生体活動に伴う形態およびエネルギー状態の連続観察，の研究テーマのもとに14課題（採択共同実験者数59名）が採択され実施された。1995年１月～12月の磁気共鳴画像装置の利用状況の内訳は，共同利用実験等123日，修理調整等21日，利用率36％であった。

磁気共鳴装置運営委員会所外委員として磁気共鳴装置室の設立より多大なる貢献を頂いた有水昇（東京都立医療技術短期大学），曾我美　勝（藤田保健衛生大学）両委員は平成７年３月末で任期を了え，４月より，金子昌生（浜松医科大学），西川弘恭（明治鍼灸大学）両教授が所外委員に就任した。

1994年生理学研究所に導入されたリアルタイム磁気共鳴画像解析装置は，マウスからイヌまでの実験動物を用い，磁気共鳴画像を毎秒30枚の速度で測定・記録し，高速で磁気共鳴画像を再構築できる。1994年度は本装置の立ちあげを進め，1995年度より「超高速磁気共鳴画像法の生体応用」のテーマで共同研究をくみ，１）体液の流体力学の解析，２）消化管運動の非破壊的動作解析　などを進める為の実験システムの開発・予備実験を行なった。1996年３月リアルタイム画像解析用多核種 MRI 探査器が生理学研究所に導入され，MRI データを高速高画質で NTSC フォーマットに変換することが可能になった。

磁気共鳴装置室では共同利用実験計画の援助の一環として２回の磁気共鳴装置共同利用ワークショップを行った。第14回ワークショップとして国際学術共同研究ミーテイング“唾液分泌の為の輸送体蛋白間の協奏機構”と合同で開催，磁気共鳴装置室は核磁気共鳴を利用し水電解質輸送の研究を推進している第一線研究者を中心に参加を援助した。 海外よりの８名を含めのべ25名の参加者を得1995年11月９－11日行われた。本ワークショップでは，パルス磁場勾配法による唾液腺細胞内外の水拡散係数の測定，唾液腺の NMR イメージングなど最新の実験結果が報告された。

1995年度の共同利用実験成果を検討し，1996年度の実験研究計画を打ち合せるため，第15回ワークショップを1995年３月７－８日の両日開催し，1994年度及び1995年度共同利用実験研究者（所外23名，所内10名）を対象として共同利用のガイダンス，装置性能／操作についての改良点，今後の装置改善等について打ち合せが行われた。また，新規に共同利用実験に参加される研究者に，安全教育，MRI 及び MRS 測定等の基本実習を行なった。本ワークショップでは，教育講演として，G. Galloway (Queensland Univ.), H. Shinar (Tel-Aviv Univ.) を招聘し「NMR 実験とパルス系列の設計，クイーンズランド大学 MR センターの動物ヒト用 NMR 装置の実験例」，「生体組織電解質の緩和機構と物理的状態」について講演していただいた。３月18日には「リアルタイム画像

取込み装置」についてセミナーを開催 Ali Ehsani 博士 (Arizona Univ.) を招聘した。

また，２月27日－３月６日 Yehuda SHARF 博士 (Tel Aviv Univ.) を招聘，電解質の NMR 測定に関する共同研究，２月７日－３月16日魏睦新博士（南京医科大学）を招聘，消化管運動の MRI 測定に関する共同研究を実施した。

1．超高速磁気共鳴画像法による消化管運動の研究

成瀬　達，関　泰長，家田秀明，中江泰之，石黒洋，北川元二，早川哲夫（名古屋大・医・第二内科）
瀬尾芳輝，村上政隆，佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛，尾崎　毅（生理研）

嚥下運動により口腔から咽頭に送り込まれた食物は食道の蠕動運動により速やかに胃に移送される。この移送に要する時間は咽頭および上部食道で約１秒，上部食道から下部食道まで約８－10秒である。本研究では消化管運動の中で一番速い食道運動の超高速磁気共鳴画像法による記録を試みた。

方法：体重 3-3.7kg の家兎 (Japanese White) 5 羽を用いた。昨年度作製したアクリル製固定器に家兎の頭頚部が動かないように無麻酔状態で固定した。経鼻的に新生児の尿道用バルーンカテーテル (6Fr) を上部食道まで挿入した。バルーン内に0.6％クエン酸アンモニウム鉄溶液 0.6ml を注入し，直径約 1cm に拡張させると同時に撮像を開始した。

磁気共鳴施設の ABX Biospec 47/40 (Bruker 社，静磁場強度 4.7T, 磁石内口径 40mm)，内径 200mm のバードケージ型 RF コイルを用いて，Snap Shot 法により食道の矢状断 1H 像を得た。(撮像条件： Field of view 225mm, data matrix 96x96, spectral width 72 kHz, relaxation delay 3.4 msec, echo-time 1.9 msec, slice-thickness 6 mm, number of accumulation 1)

成績：食道の矢状面 1H 像を 3 画像／秒で得ることができた。上部食道内で拡張されたバルーンが，二次蠕動により食道内を移動し，胃内に送られる過程を記録することが可能であった (図)。この移動に要する時間は３－30秒であり，バルーンの移動距離から算出した最高速度は 8.3cm／秒であった。また，自発嚥下運動に引き続く食道壁の伸展，収縮が口側から肛門側に移動する動き（一次蠕動）も確認できた。

結論：超高速磁気共鳴画像法により食道内の食物の移動ならびに食道の蠕動運動のような速い運動を捉えることが可能であった。本法は消化管の運動生理ならびに病態生理の解明に有用な手段である。

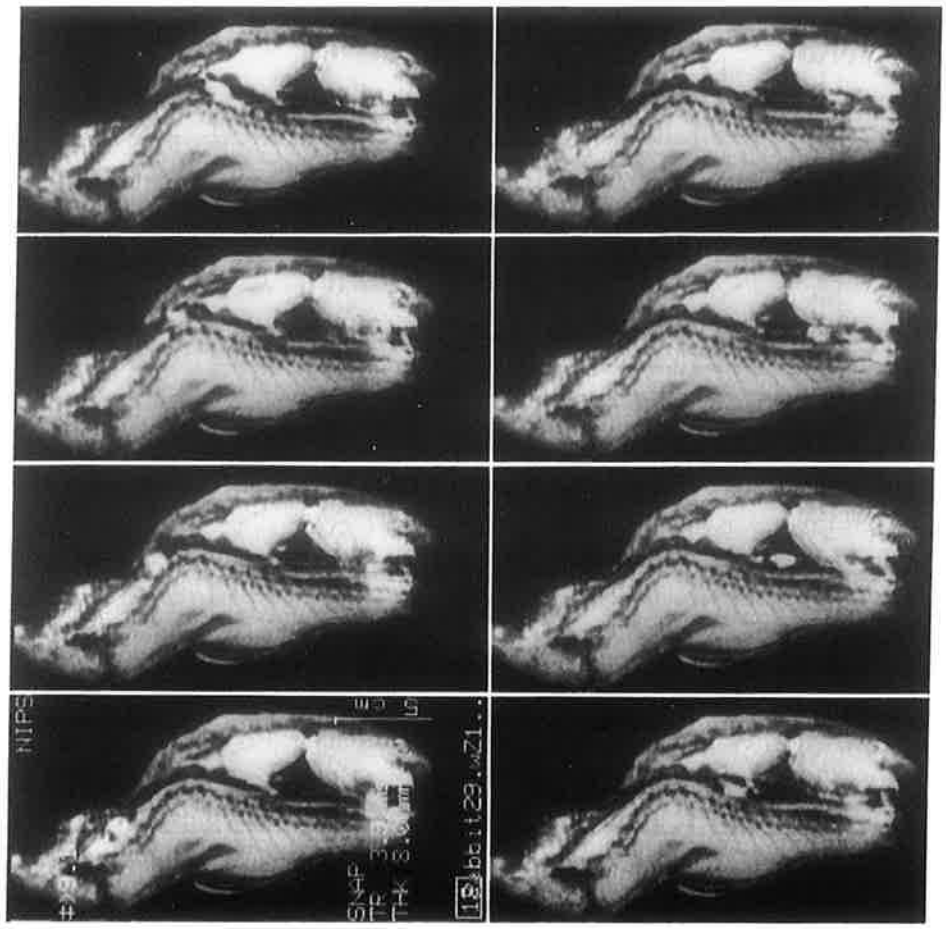


図　家兎の食道内バルーンの動き

3．定量的な磁化移動コントラスト・イメージング法の開発

桑田一夫，惠良聖一（岐阜大・医・2生理）
加藤一夫（稲沢市民病院・病理）
曽我美勝（藤田保衛大・衛生・生理）
瀬尾芳輝，村上政隆（生理研）

申請者らは，これまで^{1}H-NMRを用い蛋白質及び生体組織内における水の動的特性を測定し，水構造の変化と蛋白質の構造転移との関連を研究してきた。その結果，交差緩和時間が水分子プロトンと蛋白質プロトン間の相互作用の性質を鋭敏に反映するパラメーターであることが分かった。MRIは，生体組織内に存在する水分子プロトンのプロトン密度及び動的挙動を画像化しているが，交差緩和時間を選択的に反映するような画像を構成すれば，水分子と蛋白質との相互作用を生体組織内で定量化できる可能性がある。

しかし，実際に臨床で用いられる磁化移動コントラスト・イメージング法は，

1）SARの限界のため，系が充分平衡に達するまでオフ・レゾナンス照射を行う事が出来ない。つまり，一過性のMTを議論する必要がある。

2）シムが不完全なため，オフ・レゾナンス効果の見積もりが難しい。

3）一般に照射強度が弱いため，不完全飽和の状態で解析する必要がある。

4）T_1discriminationの影響が強く現れる。

等の問題点を含んでいる。これらは臨床で用いられている人体用MRIに本質的に付きまとう問題であるから，こういった問題点を研究することが最終的に，医学に役立つと考え，実験用MRIではなく，実際の臨床用MRIを用い，様々な条件でMTC画像を撮影した。その結果，1）については，照射パワーとオフ・レゾナンス照射位置を選べば，一過性のMTも定量化出来ることが分かった。2）については，シムを毎朝，調整する以外，方法がない。3）については，現在，R. S. Balabanをはじめ，多くの臨床系研究者は完全飽和を仮定しているため，問題がある。我々が開発した厳密な定式化を用いべきであろう(J. Magn. Reson. B 104 ,11-25 (1994))。4）の影響は臨床機を用いた実験で確認され，実際，TRを短くした方がMTの影響が強く出てくる。これは，1）の結果と符号するものである。即ち，何回も掃引している間に，次第に系が平衡に達してゆく。実際，照射時間がT_2よりも短いと，スピン温度も成立していない可能性がある。

4．MRIによるラット脊髄圧迫の研究

福岡宗良，泉田　誠，大塚隆信，松井宣夫（名古屋市大・医・整形外科）
加藤泰治（名古屋市大・医・分子医研）
亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

目的：ラットの脊髄後方圧迫モデルを作製し，脊髄圧迫形態や脊髄内部の変化について，MRIを用いて非侵襲的に調べ，脊髄圧迫疾患の病態を明らかにする。

方法：7週令雄Wistar系ラットの下位胸椎部の椎弓を可動性がでるまで薄く削り，その上に子宮頚管拡張器の一種であるラミナリアの小片を設置し，脊髄の圧迫形態と輝度変化についてMRIで経時的に観察後屠殺し，脊髄の組織標本を作製した。MRI画像と麻痺の程度，病理組織所見とを比較検討した。MRI撮像条件はspin echo法を用い，T1強調像(TR500ms/TE30ms)，T2強調像(TR2000ms/TE80ms)で脊髄矢状断像と，脊髄圧迫部中央とその上下椎体部の横断像を撮影し，矢状断像から脊髄圧迫率を求めた。

結果：このモデルでは，術後1～2週（以下早期）までラミナリアの容積の増大とともに，脊髄の圧迫の程度は徐々に増強し，その後次第に圧迫の程度は減少した。したがって麻痺も早期に最も強く，その後徐々に軽快した。MRIで術後経時的に8週間以上観察できたラットは45匹で，平均観察期間は13.8週であった。麻痺の評価は池田らの分類を用いた。早期の後肢の麻痺を分類すると，grade 0: 9匹，grade 1: 4匹，grade 2:13匹，grade 3:16匹，grade 4: 3匹であった。また，MRI最終観察時の圧迫部脊髄の輝度変化の有無によって4群に分類した。A群：T2強調像でhigh, T1強調像でlow。B群：T2強調像で明らかにhigh, T1強調像でiso。C群：T2強調像で軽度high, T1強調像でiso。D群：T2強調像，T1強調像ともiso。A群は5匹で，早期の麻痺がgrade 3または4で圧迫率は全て71%以上であった。B群は6匹あり早期の麻痺がgrade 3で圧迫率は全て61から70%であった。C群は17匹，D群は17匹であったが，C群，D群とも早期の麻痺のgrade, 圧迫率とも一定の傾向は認めなかった。病理所見については，T2強調像でhighを認めたものは，H-E染色で圧迫部脊髄の白質に小空胞を多数認め，神経細胞の萎縮，脱落も輝度変化のないものに比べより高度であり，K-B染色で圧迫部頭側の後索に脱髄を認める例もあった。T2強調像でhigh, T1強調像でlowを呈した例は，さらに後索に嚢胞様変化を認めるものも存在し，その範囲はT1強調横断像でのlowの領域と比較的よく一致していた。

考察：脊髄の亜急性または慢性圧迫実験として，漸増性圧迫モデルの報告例は種々あるが，麻痺の回復過程についての報告は稀である。圧迫材料にラミナリアを用いることで麻痺の出現から回復までを通じて評価可能であり，MRIにより非侵襲的に脊髄の形態や内部の変化を観察できた。

5．核磁気共鳴法による小腸虚血・再潅流時のエネルギー代謝の検討
—小腸虚血・再潅流障害における好中球の関与，および好中球エラスターゼ阻害剤の効果に関する実験的検討—

加藤丈博，片岡　誠，桑原義之，佐藤篤司，木村昌弘，正岡　昭（名古屋市立・医・第二外科）

【目的】好中球数の増減が小腸虚血・再潅流障害にどの様な影響を及ぼすか，また好中球エラスターゼ阻害剤の効果を ^{31}P-MRS 法を用いたエネルギー代謝の変動より検討した。

【方法】6 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い上腸間膜動脈を30分間閉塞した後，150分再潅流した。実験群を，Ⅰ群：対照群 (n = 7)，Ⅱ群：好中球増加群（実験開始 6 時間前に G・CSF 100μg/kg を腹腔内に注入した群）(n = 7)，Ⅲ群：好中球減少群（実験開始 4 日前に cyclophosphamide100mg/kg を腹腔内に注入した群）(n = 7)，Ⅳ群：好中球エラスターゼ阻害剤投与群（ono-5046　30mg/kg を再潅流時に静注）(n = 7) の 4 群に分け in vivo にて核磁気共鳴装置を用い，^{31}P-MRS 法にて β-ATP, Pi, PH の変化を経時的に測定した。なお β-ATP, Pi 値は虚血前値を100％として表した。

【成績】（好中球数）測定開始時の好中球数はⅠ群：1224 ± 600/mm^3，Ⅱ群：6492 ± 1069/mm^3，Ⅲ群：20 ± 23/mm^3 であった。（β-ATP の変動）β-ATP は各群とも同様に虚血直後より急激に低下し，虚血後30分値は各群ともほぼ30％で，有意差を認めなかった。再潅流後は各群とも急激に上昇したが，その程度はⅠ群の再潅流後150分時が62±7.4％であったのに対しⅡ群は46±4.4％と有意に低値で，Ⅲ，Ⅳ群は，有意に高値であった。（Pi の変動）各群とも虚血後，急激な上昇を認めたが，虚血後30分ではⅠ群に比してⅡ群のみ有意に高値であった。再潅流後低下したが，Ⅰ群に比してⅡ，Ⅲ群は，有意に高値であったが，Ⅳ群では有意差を認めなかった。（pH の変動）pH は各群とも虚血時に低下し，再潅流後は回復した。虚血時から再潅流時にわたってⅡ群において有意に低値であった。Ⅲ，Ⅳ群は，Ⅰ群と差は認めなかった。

【結論】①好中球増加群では虚血時の pH の低下がより著明で，再潅流後の β-ATP, Pi, PH の回復は不良であった。②好中球減少群，好中球エラスターゼ阻害剤投与群では，再潅流後の β-ATP の回復は良好であった。③好中球増加群でその障害が増悪し，好中球減少群でその障害が抑制されたことから，好中球が小腸虚血・再潅流障害において重要な増悪因子として作用している可能性が示唆され，好中球エラスターゼ阻害剤の投与によりその障害は軽減された。

6．圧迫による椎間板内のひずみおよび水分子拡散係数の測定による正常椎間板内の水分子保持機構の解明

日下義章，植村　理，中島慎一郎（京都府立医大・整形外科）
瀬尾芳輝，村上政隆（生理研）

【目的】椎間板の力学的特性は同心円上に変化し，圧迫を受けた椎間板内のひずみは部位により異なると考える。われわれはすでに椎間板内の水が圧迫により求心性に移動することを明らかにした。この奇異な水の移動は椎間板の不均一なひずみにより生じると考え，本研究では，高分解能 MRI を用いて圧迫負荷による椎間板内のひずみの部位による相違を解析し，椎間板内の水の求心性移動の機序を明らかにした。

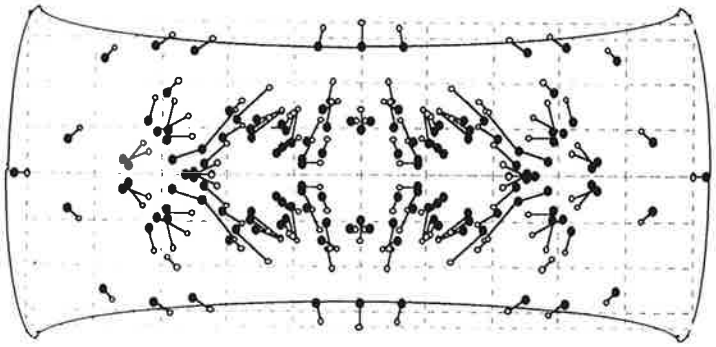
【方法】屠殺直後の成牛尾椎椎間板 (n = 11) を摘出し，径 0.3mm のナイロン糸（3－5本）を前後方向にエックス線透視下で刺入した。高分解能 MRI 装置 (Biospec 47/40, 4.7T; Bruker 社製) のマグネット内で，自作した圧迫試験器を用いて脊柱長軸方向に 30kg の定荷重を240分間加え，圧迫開始前から経時的に正中冠状断の gradient echo 像を得た。撮像条件は，TR/TE = 150/20ms, Flip angle = 30°, FOV = 5cm, matrix = 256 × 256 とし，撮像時間は 1 分16秒であった。得られた画像で，ナイロン糸の断面は低信号の点として，線維輪の線維も低信号の曲線として詳細に観察できた。MR 画像でナイロン糸断面の位置，線維輪の線維の位置を椎間板内のひずみのマーカーとして使用した。データ解析のため，圧迫前の椎間板の半径と厚みをそれぞれ100として標準化した座標を作製し，圧迫開始後の各時点における11椎間板から得られたマーカーの位置を同一座標上に表示した。以上から，圧迫負荷による椎間板内のひずみを経時的に測定し，椎間板内の各部位における断面積の変化を算出した。

【結果】MR 画像上で圧迫を受けた椎間板内の各部位のひずみを明瞭に追跡できた。いずれの部位でも，椎間板内は縦方向には圧縮されるが，横方向には遠心性にひずんだ（図左）。圧迫開始後早期における横方向の遠心性のひずみは髄核周囲と線維輪内層で大きく，線維輪外層で小さかった（図右）。この結果，圧迫開始後30分までは椎間板髄核の断面積は増加し，60分後までは圧迫前より大きい値であった。線維輪では逆に断面積が減少した。圧迫開始後60分を越えると椎間板の縦方向の圧縮の影響が大きくなり，髄核部を含めて椎間板内のすべての部位で断面積は圧迫開始前より減少した。

【考察】本研究結果における椎間板内各部位の断面積の増減は，体積の増減と考えることができる。したがって，正常椎間板の軸方向に圧迫負荷を加えると，椎間板内では不均一なひずみが生じ，圧迫開始後早期の髄核部では体積が増加し，線維輪では体積が減少することが明らかになった。以上より，われわれが従来より報告してきた，圧迫開始後早期における椎間板内の求心性の水の移動は，椎間板内部の特有のひずみが原因であることを明らかにした。



圧迫開始後60分の椎間板の正中冠状断像。



圧迫開始後60分での椎間板基質のひずみの部位による相違。圧迫前の位置と圧迫による移動先を示す。

学会発表リスト

- Uemura, O., Kusaka, Y., Nakajima, S., Hase, H., Hirasawa, Y., Morimoto, T., Seo, Y.: Strain and water kinetics in the compressed intervertebral disc analyzed by high resolution MRI. 31rd international conference on magnetic resonance microscopy, Würzburg, Germany, 1995. 8. 25-31.
- 植村　理，日下義章，中島慎一郎，長谷　斉，平澤泰介，森本武利，瀬尾芳輝：圧迫による椎間板内ひずみの高分解能 MRI による測定，第10回日整会基礎学会，軽井沢，1995. 10. 13.
- Uemura, O., Kusaka, Y., Nakajima, S., Seo Y., Hase, H., Morimoto, T., Hirasawa, Y.: Uneven strain of the intervertebral disc matrix under axial load causes centripetal water flow within the disc. The 42st Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Atlanta, USA, 1996. 2. 18-22.

• Nakajima, S., Kusaka, Y., Uemura, O., Hase, H., Seo Y., Hirasawa, Y.: MRI measurement of water diffusion in the intervertebral disc before and during axial compression. The 42st Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Atlanta, USA, 1996. 2. 18-22.

7．MRIによる内耳病変の検出

肥塚　泉（聖マリアンナ医大）
武田憲昭，瀬尾　律（大阪大・医）
外池光雄（工業技術院・電子技術総合研）
村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

実験目的

メニエール病の本態は内リンパ水腫と言われている。これを直接証明するには，蝸牛内で蝸牛管と前庭階を境している，ライスネル膜と呼ばれる薄い膜を描出することが必要である。我々はこれまで，人側頭骨標本，健康成人ボランティアを対象としてMRIによる内耳微細構造の撮影を行ってきた。これら両者について，蝸牛基底板，半規管クプラなどの画像化に成功した[1)]。しかしながらライスネル膜については，今現在，満足な結果が得られていない。今年度は静磁場強度4.7TのBiospecを用いてライスネル膜の描出を試みた。

対象および方法

実験には体重350～450gの白色モルモットを用いた。ネンブタールにて腹腔内麻酔後，写真1に示すような，サーフェスコイルを埋め込んだ台にモルモットを固定して撮影を行なった。撮影にはBruker社のBiospec (4.7T) を用いた。パルスシーケンスはGradient Echo (GE) を用いた。各パラメータは次の通りである。repetition time (TR) は150.0msec, echo time (TE) は6.8msec, スライス厚は1.0mm, 撮影マトリックスは128×128あるいは256×256，field of view (FOV) は1.0cm, 加算回数は2回とした。画像データの処理にはNIHイメージを用いた。

結果及び考察

図1に本装置を用いて撮影したモルモット蝸牛のMRI画像を示す。蝸牛内微細構造については，基底回転，第2回転，頂回転の，それぞれの基底板についてはこれまで通り，比較的良好に描出することが可能であった。しかしながら，今回の主目的であるライスネル膜については描出が困難であった。ライスネル膜はそのほとんどが，一層の細胞で構成されている。つまりこれ自体を描出することが可能な空間分解能を，現在のシステムで得ることは困難と思われる。ライスネル膜は，蝸牛管と前庭階を境している。蝸牛管内は，細胞内液と同様，高いカルシウム濃度を有す内リンパ液で満たされている。一方，前庭階は，細胞外液と同様，高いナトリウム濃度を有す，外リンパ液で満たされている。また両者の蛋白組成および濃度は微妙に異なっている。つまり，これら性質が異なった液体で満たされている2つのcompartmentは各々，異なった物性を有していると思われる。そしてこの物性の違いをNMR信号の強度の差として捉えることができれば，ライスネル膜自体は描出不可であっても，これが存在する部位が，界面として描出することが可能になる。今後は，この2つのcompartmentの物性の違いを強調して，画像化することが可能な撮影シーケンスを開発することが，ライスネル膜描出の重要なキーポイントになると思

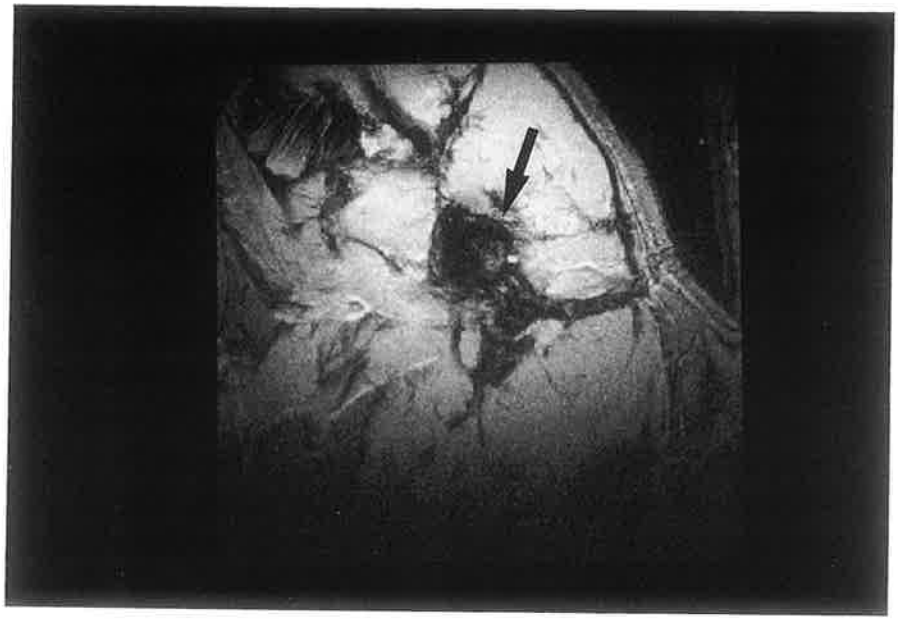


図１：モルモット蝸牛の MRI 画像。蝸牛基底板が描出された（矢印）

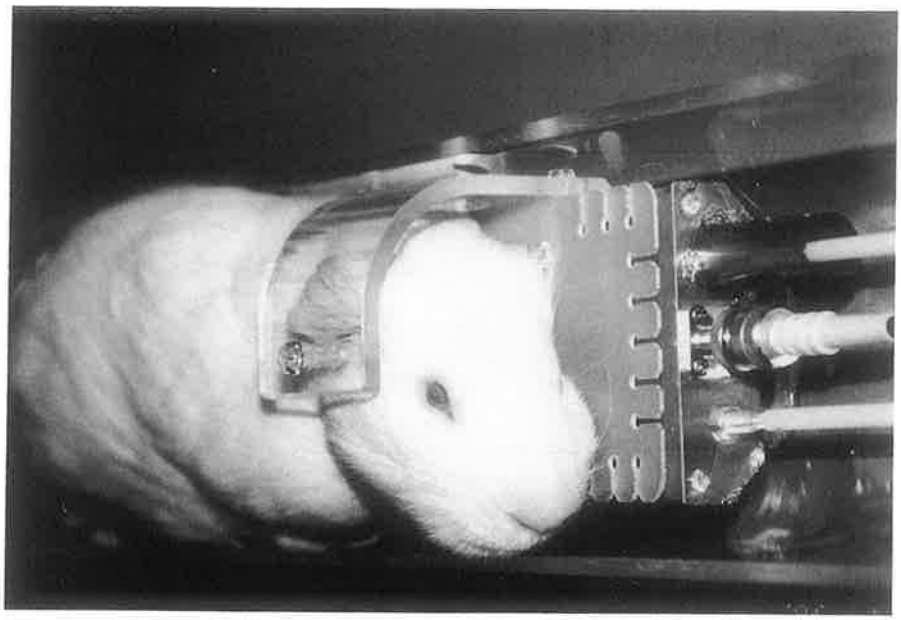


写真１：サーフェスコイルを埋め込んだ台に，モルモットを固定。

われる。

参考文献

1) Koizuka I, Seo R, Sano M, Matsunaga T, Murakami M, Seo Y, Watari H. High-resolution magnetic resonance imaging of the human temporal bone. ORL 53: 357-361, 1991

8．^{31}P-NMR 法によるヒト骨格筋作業時の筋エネルギー代謝の定性・定量的評価に関する研究

平川和文，岡田修一，高田義弘（神戸大・発達科学）
吉崎和男（徳島大・医），村上政隆（生理研）

【目的】

運動時骨格筋エネルギー代謝の評価方法を検討するため，低筋温条件およびウォーミング・アップ(W-up)条件下で肘屈曲運動を負荷し，^{31}P-NMR 法により骨格筋エネルギー代謝を連続測定して，コントロール条件と比較・検討した。

【方法】

被験者は健康な成人男性９名である。彼らの年齢，身長，体重および最大肘屈曲筋力は，それぞれ25±６歳，172±４cm，69±11kg，29±４kgであった。

低筋温条件は，主運動前に主働筋である上腕二頭筋上にアイスノンを置き，約20分間冷却することにより行った。主運動は，無酸素的エネルギー供給が主となる50％最大筋力(MVC)負荷による，疲労困憊までの最大静的肘屈曲運動とした。

一方，W-up 条件としては，１kgの負荷による肘屈曲運動を主運動前に10分間行わせた。主運動としては，約 20% MVC 負荷による動的肘屈曲運動（30回／分）を５分間行わせた。

^{31}P-NMR スペクトルは，直径40mmの表面コイルを上腕二頭筋上に置き，30秒毎に安静・運動・回復と連続的に測定した。得られたスペクトルから Pi, PCr, Pi/PCr 比および筋細胞内 pH を算出した。

【結果および考察】

低筋温処理の結果，主働筋深部温は27～32度に低下した。そして，主運動持続時間は，187±66秒から143±80秒と約24％減少した。主運動時の筋細胞内 pH は，図１に示す如く，運動および回復においてコントロール条件より有意に高い値を示した。主運動は，アイソメトリック運動のため筋血流は阻止されていることが推測されるとともに，また運動強度から速筋線維が主に動員された解糖系エネルギー供給を主とする運動と考えられる。このことから，パフォーマンスの低下は，低筋温による解糖系エネルギー供給の抑制結果と推察される。

一方，W-up 条件では，主働筋深部温は34度から35.5度とコントロール条件より約1.5度上昇した。そして筋エネルギー代謝面では，図２に見られる如く，運動時の筋細胞内 pH は運動後半から回復にかけて，W-up 条件のほうがコントロール条件より有意に高い値を示した。このことは，W-up 運動により主運動時の酸化的燐酸化によるエネルギー供給が高まり，運動がより有気的条件下で遂行できるようになることを示唆する。

以上まとめると，低筋温条件下では解糖系エネルギー供給能は抑制され，その結果パフォーマンスの低下が導かれること，また W-up 運動は筋温を高め，その結果筋での酸化的燐酸化による

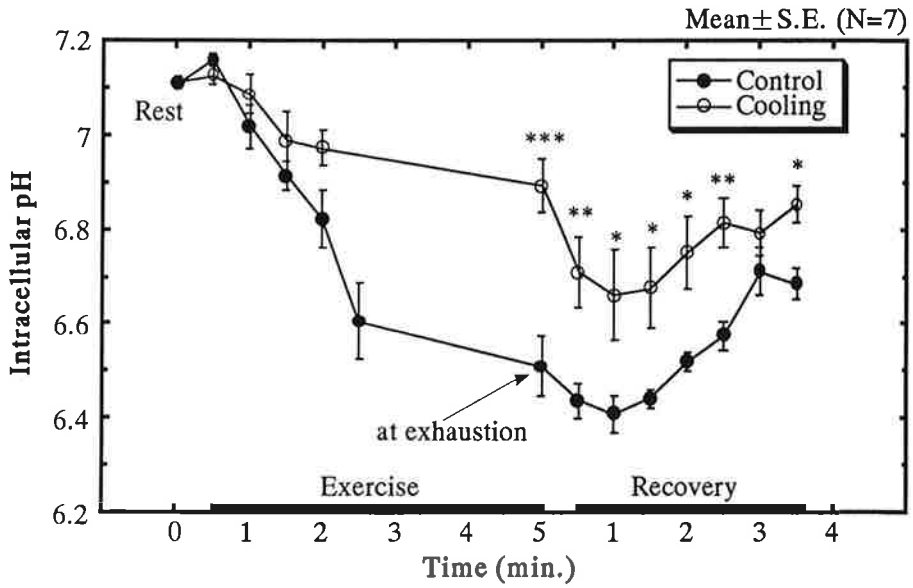


図１．50% MVC 負荷最大静的肘屈曲運動時の骨格筋エネルギー代謝の低筋温条件とコントロール条件の比較

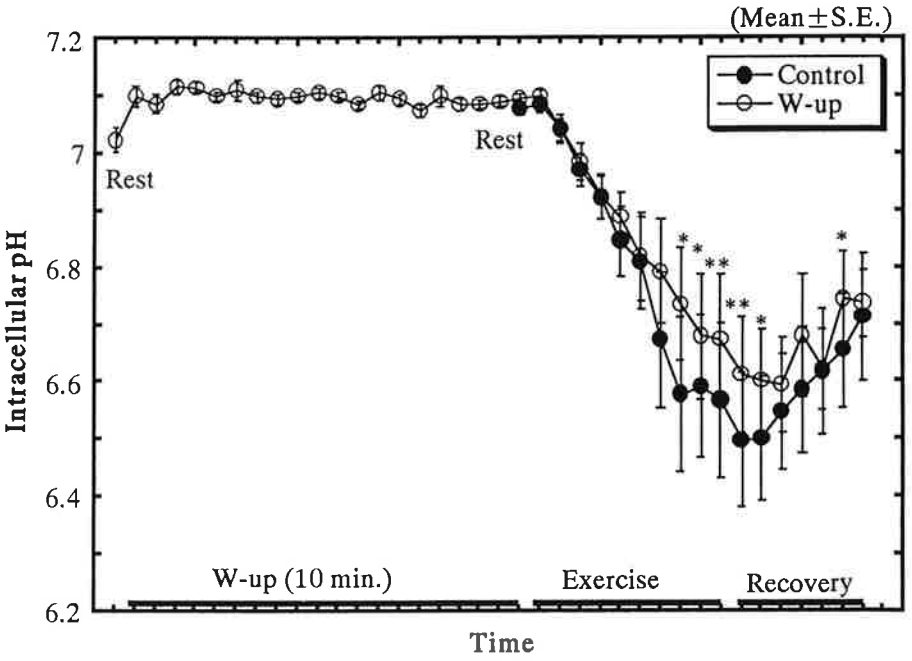


図２．W-up および 20% MVC 負荷動的肘屈曲運動時の骨格筋エネルギー代謝の W-up 条件とコントロール条件の比較

運動時エネルギー供給が促進され，運動をより有気的条件下で遂行できるようになることが認められた。このことは，筋温・体温の低下を防ぐことは，運動時の骨格筋エネルギー供給を円滑に行う上で，重要なコンディショニングづくりであることを示唆するものである。

9．核磁気共鳴法による細胞内水・電解質・基質の動的挙動の解析

H. Shinar, Y. Sharf （テルアビブ大）
瀬尾芳輝，村上政隆（生理研）

Anisotropic and Restricted Diffusion of Water in Sciatic Nerve-A ^{2}H Double Quantum-Filtered NMR Study.

We have observed diffusion characteristics of $^{1}H_2O$ in rat sciatic nerve by using pulsed-filed gradient NMR. In the intact nerve, more than 3 diffusion components were detected, and all components have diffusion anisotropy, but only one component represented restricted diffusion. However, all the water resonances associated with the same chemical shift in the ^{1}H-NMR spectrum. Therefore, assignment of these diffusion components are very difficult.

Deuterium nuclei have long been used as a probe for the motional and orientation of molecules. The anisotropic molecular motion causes un-equivalent energy splitting of the spin = 1, and the spectrum is split by the residual quadrupolar interaction. We have reported that the interaction of the water molecules with the collagen fibers is responsible for this anisotropic rotation.

When we look into the anatomical structure of peripheral nerve, the nerve consists of 3 major compartments: perineurium (outer collagen sheath), endoneurium (inside of perineurium) and nerve fibers covered by myelin sheath, and remind that there are specific fibers in each compartments.

Rat sciatic nerve (wet weight 30 mg) was incubated in D_2O saline solution for 30 min, and was placed in a capillary (1 mm i.d.), and the capillary was set in a 5-mm NMR tube. ^{2}H NMR spectrum was observed by a ARX-500, AMX-360wb and AMX-300wb spectrometers.

A typical ^{2}H single-quantum (SQ) NMR spectrum of sciatic nerve consisted of 3 resonances: a couple of splitting and one isotropic signa. In order to analyse the molecular motion of anisotropic signals, we have used double-quantum (DQ) NMR spectroscopy. We can selectively observe the DQ coherences during the evolution period tDQ which indicates the presence of anisotropic motion of the water molecules. The detectable DQF signal was formed during creation period t so that we can select selective windows for different mode of molecular motion. We have detected 3 DQF signals in the rat sciatic nerve: signals A and B correspond to the outer and inner splitting of the SQ spectrum and signal C has a small residual quadrupolar interaction and overlapped the big isotropic resonance in the SQ spectrum. The DQF eliminate the isotropic resonance and selectively detect the anisotropic signal. The 3 DQF signals were assigned as D2O in epineurium, endoneurium and axon.

Pulsed-field gradient experiments were done to analyse diffusion characteristics of 3 DQF sig-

nals. The 3 DQF signals showed anisotropic diffusion, but only one (axoplasm water) represented restricted diffusion. From restricted diffusion of the axoplasm water, the inner-diameter of axon was estimated as 7.5 um. Anisotropic diffusion of water in endoneurium and epineurium might be caused by thick collagen bundles and myelinated axons. These structures reduce effective diffusion area of water perpendicular to the longitudinal axis.

10. マウス移植脳腫瘍の経時的観察

池中一裕，小泉克久，田村雅一（生理研）
宮尾泰慶（大阪大・医・脳神経外科）
山田正信（大阪府立成人病センター）

我々は脳腫瘍の遺伝子治療を，主にマウス脳内腫瘍モデルにおいて検討している。これまでは細胞障害性遺伝子を脳腫瘍内に導入後，薬剤投与の後マウスを解剖し腫瘍発育の程度等について効果判定を行ってきた。今回，脳内腫瘍移植，細胞障害性遺伝子導入後の腫瘍発育状況やその後の薬剤投与中の腫瘍縮小の様子について経時的観察を行うために，磁気共鳴装置の利用を計画した。実施計画としては，まずマウス (C3H/HeN) の脳内に定位的に腫瘍細胞 (RSV-M glioma) を 1×10^5 個移植し，3日後に腫瘍発育を観察する。その後殺細胞遺伝子 herpes simplex virus thymidine kinase を定位的に導入し，さらに5日後に腫瘍を観察する。その後ガンシクロビルをマウスに投与しながら3日毎に腫瘍の縮小の様子を観察する。

11. MRIによるサル側頭葉の観察と微小電極定位への利用

藤田一郎，加藤　誠（大阪大・医・認知脳科学）（小野薬品寄付講座）

霊長類上側頭溝内皮質には顔の視覚像に応答する細胞が多く存在し，この領域における顔応答性細胞については詳細な研究が報告されている。しかし，それらの研究の多くは，記録用微小電極を頭頂部より刺入しているために記録部位の同定精度はよくない。そこで我々は上側頭溝に近い側頭部より記録用微小電極を刺入し，上側頭溝下壁(STS)の単一神経活動の細胞外記録を行った。さらに下側頭葉回部(TE)の単一細胞の活動記録も行い，STSとTEの神経細胞の40個の刺激図形に対する視覚応答性を比較した。記録実験には麻酔・不動化したニホンザルを用いた。前もってMRI撮影し上側頭溝の形状・位置を知ることにより，効率的な神経細胞の活動記録を行うことができた。さらに記録用微小電極の刺入回数を少なくすることで電極刺入路近傍の神経細胞の損傷を最小限にすることもできた。MRIはニホンザル頭部の前額断面，及び，側断面のMRIを2mmの間隔で撮影した。直径3mmのポリエチレンチューブを側頭部にレジンでstereotaxicに固定し，チューブ内に流動パラフィンを満たしてマーカーとした。このマーカーと上側頭溝との相対位置を計算し，記録用微小電極を刺入する位置を決定した。

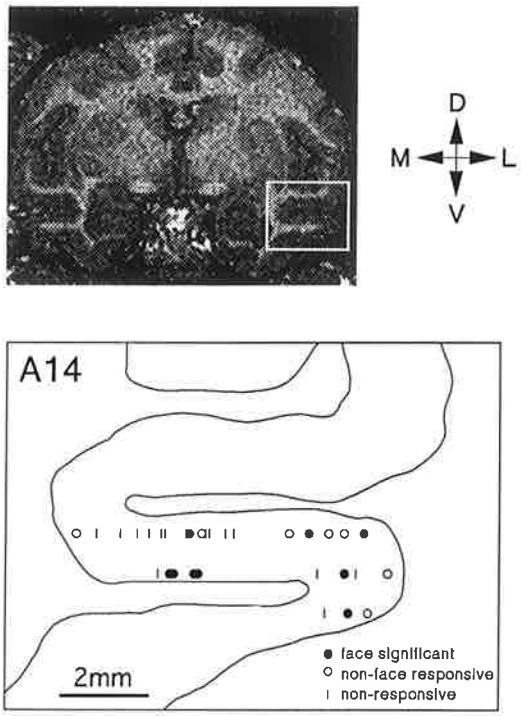


図1　MRIに基づく記録部位の同定

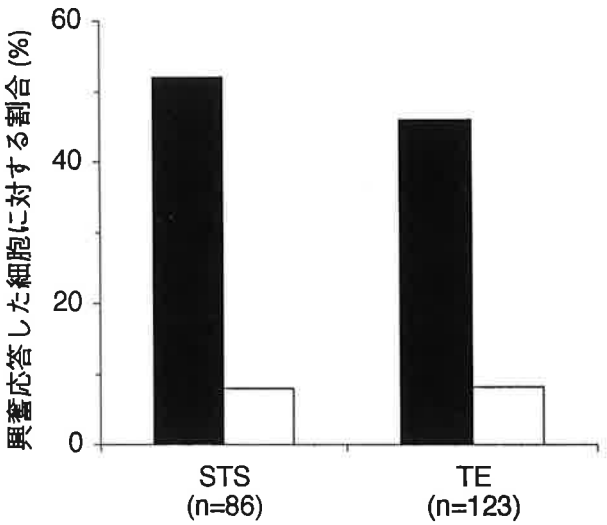


図２　顔応答性細胞の割合

図１の黒丸は顔に対して１％有意水準で興奮応答した細胞の位置を，白丸は顔以外の視覚刺激に対して１％有意水準で興奮応答した細胞の位置を，縦棒は提示した40個の視覚刺激図形に対して全く応答しなかった細胞の位置を示す。このようにMRIを基準にして電極の刺入位置を決定することによって，上側頭溝内皮質細胞の活動を効率よく記録することができた。ここに示す記録部位は脳切片標本を組織学的に作製し，同定したものと非常によく一致していた。図２の黒いカラムは顔に対して１％有意水準で興奮応答した細胞の割合を，白いカラムは最適の顔刺激に対する応答が最適の非顔刺激に対する応答の２倍以上という条件を満たす細胞である。STSとTEの分布の間には統計学的な差はなく，これら２つの領域に顔応答性細胞はほぼ等しく分布していることが分かった。

12. MRIによるサル視覚皮質の観察と電極定位

小松英彦（生理研）
三上章允（京都大・霊長研・行動神経）
宮下暢夫（順天堂大・医・第一生理）

サルの脳の各部位が，視覚認知，行動などにおいてどのような役割を果たしているか明らかにするために，知覚，行動とニューロン活動，あるいは磁気による脳内刺激との関係を調べた。このようなサルを用いた脳研究において，MRIを用いたサルの脳構造の測定は，実験精度の向上，実験時間の短縮，動物の有効利用という観点から，非常に有用である。サルの脳は個体差が大きく，脳内の標的部位の同定が困難であり，MRI画像によって早く確実な標的部位の同定が可能となる。微小電極による単一神経細胞活動記録に先立った，記録を行う部位の位置決め，記録後の電極刺入位置の同定および経頭蓋的磁気刺激における刺激部位の同定を行う目的で，MRI撮影を行った。

MRI撮影は頭部の手術を行う前および終えた後のサルに対して行った。プローブ内で頭部を固定するために，手術前のサルでは，日大第一生理によって開発されたアクリル製の脳定位装置を用いた。手術後のサルでは，ヘッドホルダーをアクリルの固定具によって固定した。ヘッドホルダー，電極刺入用チェンバーは非磁性体のデルリンで作製した。これらは，頭蓋表面に径3mmのアクリル製ボルトを固定し，それをアンカーとして歯科用セメントで同時に包埋した。静脈を確保し，ネンブタール麻酔下で撮影を行った。ワセリン，流動パラフィンなどの粘性を持った液体を，脳定位装置または，記録用チェンバーの内壁の決められた位置に付着させ，脳内構造と定位装置，チェンバーとの相対位置を知るためのマーカーとした。プローブは径30cmまたは20cmのものを使用した。チューニング，マッチングが最適にとれなかった場合には，リンゲル液の小パックをプローブ内に置き，充填率を補正した。シークエンスはIRを用い，スライス厚2mm，スライス間隔6mm，6回加算，マトリックス256×256で撮影を行った。

この様にして撮影した画像は大脳皮質の脳回および灰白質と白質の境界が明らかであり，大脳基底核や小脳の構造も十分に把握できるものだった。単一細胞活動の記録実験においては，脳内の標的部位の同定による電極刺入用チェンバーの取り付け位置および角度の決定，電極刺入位置の同定を行うことができた。経頭蓋的磁気刺激においては，MRI像をもとに刺激部位を決定した。サルが学習課題遂行中に磁気刺激を行い，学習課題遂行に及ぼす効果を，刺激部位および刺激のタイミングとの関係で解析した。遅延リーチング反応課題の遂行は，リーチング運動直前に磁気刺激を運動前野背側部に対して与えると，手がかり刺激の呈示からレバー放しまでの反応時間と，レバーを放してからタッチモニターへの反応までのリーチング時間の延長が引き起こされた。このデータは，経頭蓋的磁気刺激が，動物の脳内機能の解明に役立つことを示すとともに，サルの運動前野背側部がリーチング運動の遂行に関連することを示した。

13. サル大脳皮質の定位的脳地図の作成と記録への応用

酒田英夫，羅　雅登，田中裕二，楠　真琴（日本大・医・第一生理）
森　茂美，宮下英三（生理研）

サルの頭頂間溝の形態はサルによって個体差が大きく，特に尾側部分は深部で複雑に折れ曲がっており，これまでのようにただ単純に電極を刺していったのではなかなかこのようなニューロン群を探すことが難しい。また，記録できても組織切片を作成するまで正確な場所がわからず，また，切片上で位置を確認したにしてもその情報を次の記録実験に生かすことはなかなか難しかった。しかし，本共同研究ににおいて作成した定位的脳地図と定位的記録方法を組み合わせて，記録実験中に特定のニューロン群の脳内での局在を容易に確認できるようになった。

頭頂連合野には手で何かを操作しようとするときに活動するニューロン群があり，このようなニューロン群は頭頂間溝後壁の前方部のAIP野にあることがわかった。この領域の後方のLIP野の後部あるいはV3a野の近傍の領域には純粋な視覚刺激にだけ反応するニューロン群がある。この中には物体の長軸方向に選択性のあるニューロンが見つかっている。今回我々は面の傾きに選択的なニューロン群がやはりこの領域にあることを見つけた。

立体的な視覚刺激の呈示には3Dコンピュータグラフィックスを使い，サルに偏向メガネをかけさせて，左右それぞれの目に視差のある視覚刺激を与えて立体的な視覚刺激を呈示した。図1は面の傾きに選択性があると思われるニューロンの一例で，このニューロンは四角い板状の視覚刺激で，水平軸を中心に角度を変えてその反応を調べると，奥向きに45度傾いた刺激には強い反応があったが，他の傾きではそれほど強い反応はみられなかった。一方このニューロンは円筒形の視覚刺激で傾きを変えて同様に刺激しても，どの傾きに対しても反応がなかったので，ある程度の広さを持った面に反応し，しかもその傾きに選択性があると考えられる。

またこれらのニューロンで両眼刺激と片眼刺激の反応を比較したところ，片目にしか入力がない状態や偏向メガネをはずして両目に同じ刺激を与えた場合は反応が大きく減少した。従って，このニューロンの反応には両眼視差の手がかりが重要であると考えられる。このことは，多くのニューロンの反応が刺激までの距離によって変化することからも示唆された。また，これらのニューロンのは刺激の幅，長さ厚さを変えて反応を調べると，長さが長いほど，幅が広いほど反応が強くなる傾向があり，厚みが増えるほど反応の減少が見られた。このことは，ニューロンの活動にはある程度の広がりをもった面に対して反応していることを示唆している。

以上の結果は頭頂連合野のニューロンが空間内の面の傾きの認識に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆され，共同実験によって作成したMRI定位的脳地図によってこのようなニューロンがLIP野の後部あるいはV3a野の近傍の領域にあることが確かめられた。

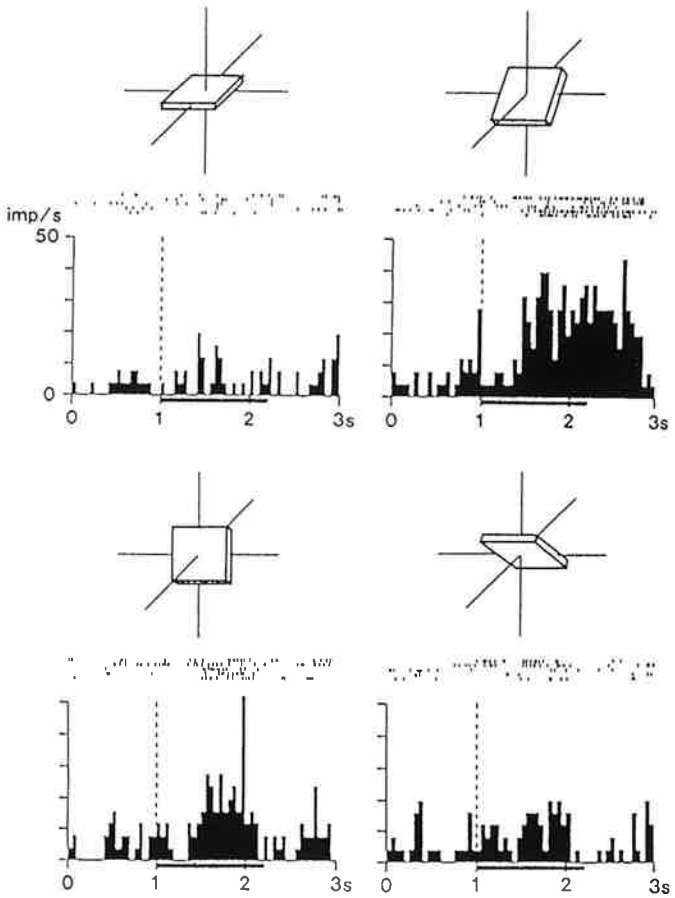


図1　面の傾きに選択性のある頭頂連語野ニューロン

第14回核磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ及び
国際共同研究ミーテイング「唾液分泌の為の輸送体蛋白間の協奏機構」合同

(1995. 11. 9-11. 11)

国際共同研究ミーテイング「唾液分泌の為の輸送体蛋白間の協奏機構」

1. Water transport and cell volume regulation by salivary acinar cells.

M. C. Steward (Manchester University)

2. Characteristics of water transport pathway in salivary gland

T. Nakahari (Osaka Medical College)

3. Isoprenaline induces cell swelling by activating Na^+ /K^+ /2Cl^- cotransport in isolated perfused rat mandibular salivary glands.

J. T. Seo, J. B. Larcombe-McDouall, R. M. Case & M. C. Steward (University of Manchester)

4. Anion dependence of cell volume and intracellular pH in isolated perfused rat salivary glands.

J. T. Seo, R. M. Case & M. C. Steward (University of Manchester)

5. Energy cost for fluid secretion by the mandibular salivarygland of the rat

M. Murakami, T Ishikawa & Y. Seo (National Institute for Physiological Sciences)

6. Two types of exocytosis-endocytosis coupling mechanisms in salivary acinar cells visualized by confocal laser and scanning electron microscopy.

A. Segawa & A. Riva (Kitasato University, University of Cagliari)

7. Mechanisms of fluid secretion in salivary glands: a new hypothesis deduced from morphological studies.

A. Segawa (Kitasato University)

8. Cyclic AMP potentiates amylase release by Ca^{2+}

K. Yoshimura & Y. Hiramatsu (Hokkaido University)

9. The role of vesicle-associated membran protein-2 on the cAMP-dependent amylase secretion in parotid acinar cells.

J. Yoshigaki, M. Yokoyama, Y. Dohke, S. Furuyama, & H. Sugiya (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

10. Immunocytochemical localization of laminin, amylase, cathepsin-D and actin in the rat parotid glands

S. Hashimoto & M. Shimono (Tokyo Dental College)

11. Structural modifications of striated ducts

B. Tandler (Kyushu Dental College)

12. Control of the amiloride-sensitive Na^+ current in salivary ducts by intracellular anions.

A. Dinudom, P. Komwatana, J. A. Young & D. I. Cook (University of Sydney)

13. Fine structure and cell proportion of the main excretory duct epithelium of the rat submandibular gland with special reference to the tuft cells.

A. Sato & S. Miyoshi (Fukuoka Dental College)

14. Upregulation of the Na^+ /K^+ /$2Cl^-$ cotransporter in rat parotid acinar cells by muscarinic stimulation.

R. L. Evans & R. J. Turner (NIDR, National Institute of Health)

15. Involvement of direct phosphorylation in the regulation of the rat parotid Na^+ -K^+ -$2Cl^-$ cotransporter.

A. Tanimura, S. J. Reshkin & R. J. Turner (NIDR, National Institute of Health)

16. Salivary formation in sheep parotid gland.

D. I. Cook (University of Sydney)

17. The role of sodium-bicarbonate cotransport on bicarbonate accumulation in pancreatic duct cell.

K. Ishiguro, S. Naruse, M. C. Steward, & R. M. Case (University of Manchester)

18. Two receptor-mediated pathways involving both $[Ca^{2+}]_i$ and PKC that participate in the activation of fluid secretion in parotid acinar cells.

S. Soltoff (Harvard Medical School)

19. Control of $Ins(1,4,5)P_3$ synthesis and degradation in exocrine acinar cells.

S. Dissing (University of Copenhagen)

20. Is ganglioside GQ1ba Excalibur ? -Inhibitory effect of gangliosides on the activity of NAD-metabolizing enzymes.

M. Yokoyama, S Furuyama & H. Sugiya (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

21. mini-report on calciosome

S. Hashimoto (Tokyo Dental College)

22. Ca^{2+} /calmodulin-stimulated nitric oxide synthase in the rabbit parotid gland.

H. Sugiya, Y. Mitsui, H. Michikawa, J. Yoshigaki, M. Yokoyama & S. Furuyama (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

23. Salivary kallikrein family and processing of the growth factor precursors.

K. Hosoi (Tokushima University School of Dentistry)

24. Connexin expression in the salivary glands

K. Muramatsu, S. Hashimoto, T. Inoue & M. Shimono (Tokyo Dental College)

25. NMR microimaging for study of salivary secretion.

Y. Seo & M. Murakami (National Institute for Physiological Sciences)

＜討論参加者＞

David I. Cook, Anuwat Dinudom （シドニー大・医), Steen Dissing （コペンハーゲン大・医), Richard L. Evans (NIDR · NIH),Barnard Tandler (九州歯科大), Stephen P. Soltoff (ハーバード大・医), Martin C. Steward （マンチェスター大・理), Jeong T. Seo （延世大・歯), Kazuo Hosoi （徳島大・歯), Hiroshi Ishiguro, Susumu Naruse （名古屋大・医), Sadamitsu Hashimoto, Takashi Muramatsu （東京歯大), Takashi Nakahari （大阪医大), Atsuko Sato （福岡歯大), Keiichi Yoshimura （北海道大・歯), Aikhisa Segawa （北里大・医), J. Yoshigaki, M. Yokoyama, H. Sugiya （日本大・松戸歯), Masataka Murakami, Yoshiteru Seo （生理研)

＜概要＞

第14回ワークショップとして国際共同研究ミーテイング“唾液分泌の為の輸送体蛋白間の協奏機構”と合同で開催，磁気共鳴装置室は核磁気共鳴を利用し水電解質輸送の研究を推進している第一線研究者を中心に参加を援助した。海外よりの８名を含めのべ25名の参加者を得1995年11月９－11日行われた。分子レベル～マクロな分泌機能の実験結果を人類の財産として共有し新しいステップに押し上げるため最新知見の総合と異なる研究法をとるグループ間交流の活性化を目的に Turner, Dissing, Young ら第一線の研究者とともに研究グループを編成した。1992 Turner, Foskett, 唾液腺の分泌機構につき情報交換と討論を続け，1994 Riva, Segawa の参加で形態を含むよりリアルな分泌機構の研究へ展開した。種々の方法を駆使，灌流腺の結果も遊離細胞の結果も同じテーブルで検討するためテーマを「輸送体の協奏機構」として国際学術共同研究95－96を始めた。今回のワークショップの結果，外分泌の水電解質輸送部分（膜を介する輸送部分）の理解が深化する一方，水電解質分泌に伴う開口分泌について細胞内情報伝達を共通項としたチャネル・輸送体活性との関係が大問題となり，amylase 分泌の形態・生理計測と開口放出関連蛋白を追跡することが合意された。磁気共鳴関係では，パルス磁場勾配法による唾液腺細胞内外の水拡散係数の測定，唾液腺の NMR イメージングなど最新の実験結果が報告された。

第15回核磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ

(1996. 3. 7-3. 8)

＜討論参加者＞

Graham Galloway (Univ Queensland) Hadassah Shinar (Tel-Aviv Univ), 横野　諭，田家　諭（香川医大），宮下暢夫（順天堂大・医），肥塚　泉（聖マリアンナ医大），瀬尾　律（大阪厚生年金病院），曾我美　勝，中上　寧（藤田保衛大），泰羅雅登（日本大・医），新原寿志，高橋則人，西川弘恭（明治鍼灸大），平川和文（神戸大・発達科学），桑田一夫，白紙伸一，奥村　歩（岐阜大・医），三上章允（京大霊長類研），日下義章，植村　理（京都医大），福岡宗良，佐藤篤司，加藤丈博，桑原義之，木村昌弘（名古屋市大・医），関　泰長，成瀬　達（名古屋大・医），花市敬正（名古屋工大），今野　卓（神戸大・自然科学），永山国昭（東京大・生理研），村田昌之（京都大・理），足立栄希，瀬尾芳輝，村上政隆，市川修，大河原浩，高木正浩（生理研）

＜概要＞

1995年度の共同利用実験成果を検討し，1996年度の実験研究計画を打ち合せるため，第15回ワークショップを1995年３月７－８日の両日開催し，1994年度及び1995年度共同利用実験研究者（所外23名，所内10名）を対象として共同利用のガイダンス，装置性能／操作についての改良点，今後の装置改善等について打ち合せが行われた。また，新規に共同利用実験に参加される研究者に，安全教育，MRI 及び MRS 測定等の基本実習を行なった。本ワークショップでは，教育講演として，G. Galloway (Queensland Univ.), を招聘し「NMR 実験とパルス系列の設計，クイーンズランド大学 MR センターの動物ヒト用 NMR 装置の実験例」，H. Shinar (Tel-Aviv Univ.)「生体組織電解質の緩和機構と物理的状態」について講演していただいた。

【 超高圧電子顕微鏡
共同利用実験報告 】

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告

〔目　　次〕

1．グリオーマ細胞の接着能，浸潤能に関する超高圧電顕観察
（垰本勝司他）…… 270
2．突然変異 BUS マウスの聴器・脳聴覚系の微細構造（野田坂佳伸他）… 272
3．*Zoophagus* 属菌類の捕食枝の超高圧電顕的研究（深山尚仙他）…… 274
4．糸球体における内皮細胞とメサンギウム細胞の接着様式（追手　巍他） 276
5．培養細胞全載組織化学的標本の三次元的観察（永田哲士他）…… 278
6．超高圧電子顕微鏡による卵白リゾチーム結晶の電子線回折
（谷口美恵子他）…… 280
7．クリスタル状のアクチンシートの電子線回折（一海孝光他）…… 282
8．コルヒチン投与ラット小腸吸収上皮細胞基底部に観察される小管構造
（野田　亨）…… 282
9．中枢神経系ニューロン・グリアの三次元構造解析
―マウス海馬歯状回 Mossy cell における thorny excrescence
の超高圧電子顕微鏡による観察―（藤瀬　昇他）…… 284
10．過冷却液体・固体界面および固・固体界面の構造の動的観察
（佐々木勝寛他）…… 286

1．グリオーマ細胞の接着能、浸潤能に関する超高圧電顕観察

垰本勝司，伊地智昭浩（兵庫県立成人病センター脳神経外科）
有井達夫，浜　　清（生理研）

【実験目的】

グリオーマ細胞は正常脳組織に容易に浸潤する性質を持つが，そのメカニズムはよくわかっていない。これまで培養グリオーマ細胞において細胞骨格に及ぼす各種成長因子，サイトカインの影響に関する免疫電顕立体観察を行ってきたが，細胞浸潤には突起の伸展のみならず細胞外マトリックス等の細胞接着因子が関係すると考えられることから，培養系においてグリオーマ細胞と正常グリア細胞の Co-culture を行い細胞相互の interaction を超高圧顕微鏡を用いて立体的に観察する事を目的とした。

【実験方法】

生後１日目の SD Jcl ラット脳組織を分離し，20%FBS 加 MEM 培地で培養し Astrocyte と Oligodendrocyte を得た。これらの培養細胞中に，株化されたラットグリオーマ細胞である C6 細胞を加えて，サーモノックス板上で共同培養を行い，24時間，48時間後に PIPES Buffer で洗浄，

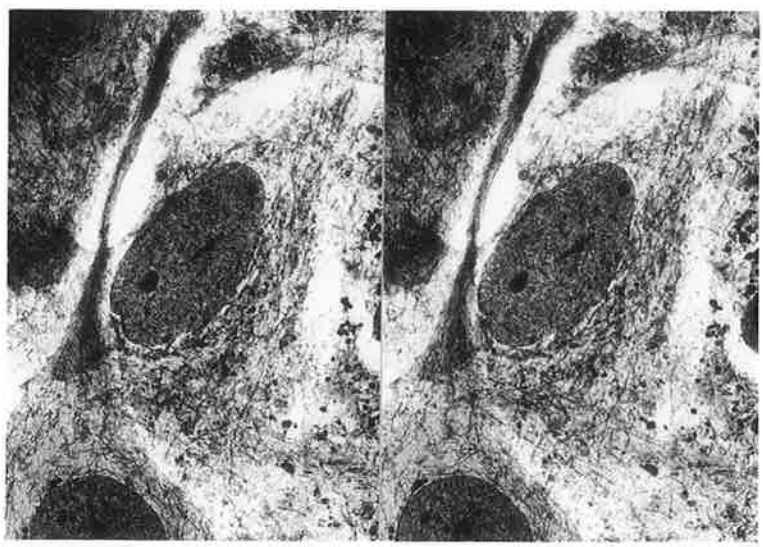


Fig. 1 (× 1,400)
Stereo-pair of high voltage electronmicrograph of Type-1 astrocyte in the primary culture from rat new born brain. The cell has large oval nucleus and many mitochondrias in the cytoplasm. It has also large elongated cell process.

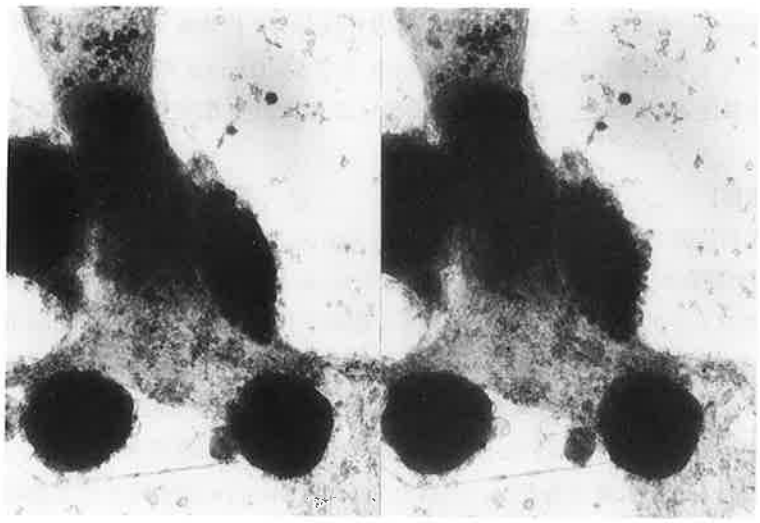


Fig. 2 (× 1,400)
Low magnification stereo-pair of high voltage electronmicrograph of co-culture with type-1 astrocytes and C6 glioma cells. Four glioma cells are attached to the cell surface of a type-1 astrocyte (center).

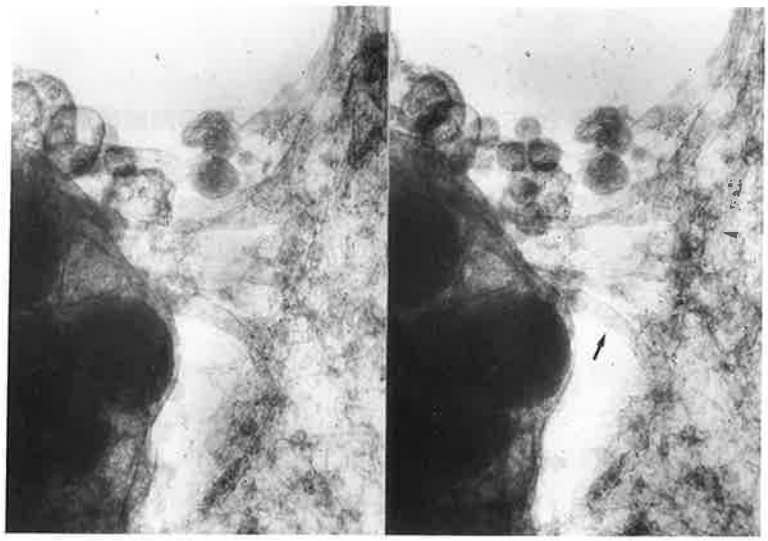


Fig. 3 (× 17,000)
High magnification stereo-pair of high voltage electronmicrograph of co-culture with type-1 astrocyte and C6 glioma cell. Glioma cell (left) is attached to astrocyte (right) with small processes (arrow). Colloidal gold particles of CD44 are seen on the cell processes and cell surface of astrocyte (arrow heads).

4% Paraformaldehyde で固定した。抗 CD44 抗体及び抗 EGFR 抗体を 4 ℃12時間作用させた後，抗マウス金コロイドで標識し，2% Glutal-aldehyde 及び 1% Osmium 酸で二重固定した後，アセトン系列で脱水後臨界点乾燥し，カーボン蒸着後日立 H-1250M 型超高圧電子顕微鏡で立体観察をおこなった。

【結果および考察】

ラット新生児の培養グリア細胞は大型の Type-1 Astrocyte と小型の Oligodendrocyte 及び Microglia の 3 種類の細胞からなり，大型の Type-1 Astrocyte は広い胞体から長い突起をのばす。細胞質にはミトコンドリアが核周辺部を中心に多く認められ，細胞膜の近傍に glial filament が索状に走行していた (Fig.1)。小型の Oligodendrocyte と Microglia は円形で細胞表面に小さな突起を有し Astrocyte の細胞膜に付着する傾向が認められた。培養日数を経るに従って Oligodendrocyte は減少傾向を認め，接着が弱いため pipetting により容易に剥離できた。これら小型細胞を出来るだけ除去し 1 週間培養すると主に大型の Type-1 Astrocyte が突起を充分伸ばして広がった。この時期に C6 ラットグリオーマ細胞を加えると，24時間以内に小型で bipolar ないし tripolar な細胞突起を持つ C6 グリオーマ細胞が大型の Astrocyte に付着しはじめた (Fig. 2)。接着面の観察において Type-1 astrocyte の細胞表面から伸びた小突起が C6 astrocytoma cell の細胞膜に接着し，astrocyte 側の表面に直径 10nm の抗 CD44 金コロイドが認められた (Fig.3)。このことからグリオーマ細胞と Type-1 astrocyte の接着に CD44 が何らかの役割を持っている可能性が示唆される。

2．突然変異 BUS マウスの聴器・脳聴覚系の微細構造

野田坂佳伸（北海道大・歯・中研）
鎌田　勉，亀田和夫（北海道大・歯・生理）
有井達夫（生理研）

突然変異 BUS は多動を特徴とする行動異常を示すマウスとして東海林らによって分離され，米澤らが形態学的に検討した[1-2]。遺伝子は劣性で，ヘテロは異常を示さず，ホモは生後10日目くらいより蝸牛コルチ器に組織配列の大きな乱れが生じ，14－15日に至って行動的な異常を発現する。この組織学的異常の発現とともに聴覚機能も異常になり，ABR によって聴覚機能を調べたところ，この系統と全く異なる正常系統 KYF およびヘテロ個体ではクリック音に対する ABR は正常波形を示したが，ホモでは10日以降になっても 100dB HL の音に対して小さなピークを示すにのみとどまり，機能的にも異常であった[3]。聴器の異常ばかりではなく，脳組織標本に空洞が観察され，この実体が何か調べる必要も指摘された[2]。そこで，このマウスの聴器および脳組織を電子顕微鏡で検討することとした。野田坂による走査電顕による観察では，正常系統

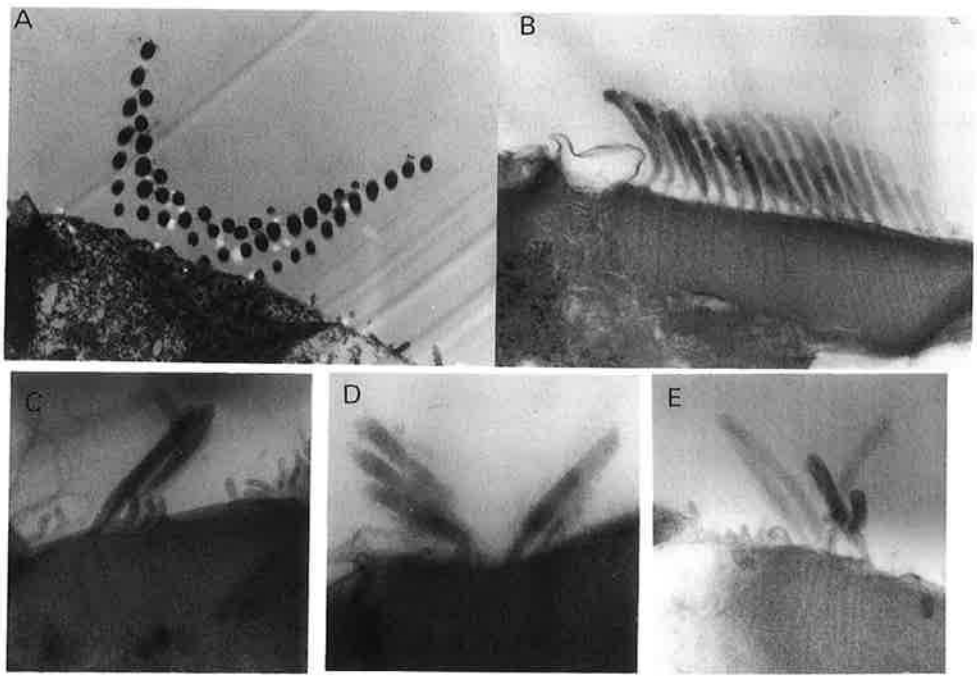


図１．有毛細胞・聴毛の超高圧電顕像。Ａ－Ｂ：正常系統マウス10日齢のもの。聴毛の数が多く，配列も規則正しく一定方向に並んでいる。Ｃ－Ｅ：BUSホモマウス10日齢のもの。聴毛の数も少なく，配列・方向が乱れている。倍率はＡ－Ｃが，１万倍，Ｄ，Ｅが1.5万倍である。

KYF, BUSヘテロ個体ではコルチ器に正常の有毛細胞が存在し，聴毛の配列も正常であった[2)]。しかし，ホモでは聴毛は存在したが，その数も少なく，配列も乱れていた。さらに透過電顕による微細構造の観察を通常の透過型電顕および超高圧電顕にて行った。

材料はBUSヘテロ，ホモマウス，および対照正常系統としてKYFを使用した。生後０，10，15，20日齢それぞれ５個体をと殺後，蝸牛を切り出し，カルノフスキー固定液によって固定，通法によりエポキシ包埋して普通透過電顕用に0.5超高圧電顕用に２ミクロンの切片を作成した。ウラン鉛二重染色後，1000kV超高圧電顕（日立H-1250M）にて観察した。

正常系統およびBUSヘテロでは各齢とも内・外有毛細胞の聴毛に異常は見られなかった。走査電顕による全体の配列が正常であるばかりでなく，透過電顕による観察でも聴毛の配列は同方向に規則正しく配列し，聴毛の断面でも規則的配列が見られた。それに対してBUSホモでは，聴毛の数の減少と配列の乱れが顕著に見られた。透過電顕では聴毛の数全体を１切片の厚さで捕らえられないにもかかわらず，正常と明白に異なっていた。また聴毛配列が正常では方向がそろっているのに反し，ホモでは方向がまちまちで配列異常が透過電顕像でも明らかであった(図参照)。透過電顕による観察は単に聴毛の数や配列だけではなく，聴毛内部や細胞体の微細構造の異常を見いだすためであったが，今回の観察では指摘するに至らなかった。更に広く観察し，聴毛の数

の減少がいかなる細胞成分の異常によるかを形態学的に捕捉する必要があろう。脳組織についても検討したが，光顕で見られる空洞のオリジナル構造がどのようなものであるのか，電顕像として捕らえることは困難であった。さらに光顕像との対比を行う必要があると思われた。

1）Yonezawa, S., R. Shoji, T. Kamada, et al. Hearing impairment in the bustling mouse, BUS/Idr. Teratology 48: 6, 1993.

2）Yonezawa, S., Y. Nodasaka, T. Kamada, et al. Cochlear histopathology of the mutant bustling mouse, BUS/Idr. Acta Otolaryn. (in preparation).

3）鎌田勉，米澤敏，亀田和夫　突然変異マウスの聴覚異常　日本音響学会聴覚研究会資料 H-95-39, p.1-4, 1995.

3．*Zoophagus* 属菌類の捕食枝の超高圧電顕的研究

深山尚仙，犀川政稔（東京学芸大・生物）
有井達夫（生理研）

Zoophagus は接合菌綱ゾウハゲ目の一属である。*Z. insidians* Sommerstorff (Sommerstorff, 1911), *Z. tentaclum* Karling (Karling, 1936) と *Z. pectosporus* (Drechsler) Dick の3種が，ワムシまたはセンチュウの捕食菌として知られている。どれもからだは無隔壁の菌糸でできており，菌糸には短い側枝である捕食枝がたくさんついている。*Z. insidians* の場合には，捕食枝先端はただ丸くなっているだけであるが，電顕でみるとその部分の細胞壁外層はやすりのような畝構造となっている (Whisler and Travland, 1974). それに対し，*Z. pectosporus* の捕食枝先端部分はいったんくびれたノブ状で，細胞壁外層はひび割れ構造になっている (Saikawa and Morikawa, 1985)。*Z. tentaclum* は Karling による原記載以来報告がないが，捕食枝上に触手のような細い二次的な側枝が数本あり，他の2種と明かに区別することができる。どの菌も捕食枝先端から分泌される粘着物質で動物を捕捉する。

最近，本研究の著者のひとり（深山）は群馬県長野原町北軽井沢で採集した腐葉土から新種と思われる *Zoophagus* 菌を得た．それは全体的な形態や，センチュウを捕食する姿は *Z. pectosporus* とよく似ていた。しかし，捕食枝先端のノブはより大きく，しかもノブ全面をとげ状の突起 (1.2-1.8 × 0.2μm) が覆っていた。しかもとげととげの間には膜状の物質が介在した。

これを超高圧電顕で観察したところ，膜は非常に薄く，しかも全体が連続していることがわかった (Fig. 1)。原形質の抜けたアメーバの pellicle にも似ているが，図から判断すると，膜はとげ状突起がノブの全面から生じる際，同時に分泌された粘着物質が互い連続し，とげの伸長につれてそのまわりを覆ったものと考えられる。いままでに知られた菌類の微細構造において，分泌によって生じたこのような細胞外の膜状構造はわれわれの知る限り知られていない。

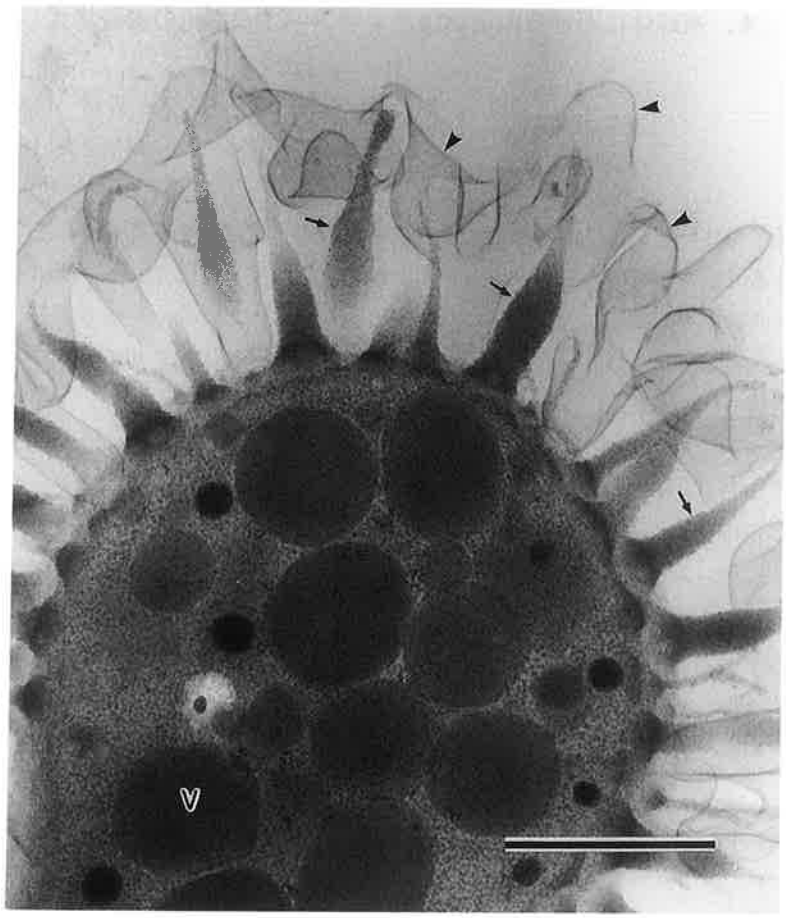


Fig. 1. High voltage electron micrograph of the apical knob of a predacious side-branch of hypha in *Zoophagus* sp. The knob is covered with a number of spines (arrows) and an undulating veil (arrowheads). V, vesicle. Scale bar = 1μm.

References

Karling, J. S. 1936. A new predacious fungus. Mycologia 28: 307-320.

Saikawa, M. and Morikawa, C. 1985. Electron microscopy on a nematode-trapping fungus, *Acaulopage pectospora*. Canad. J. Bot. 63: 1386-1390.

Sommerstorff, H. 1911. Ein Tiere fangender Pilz. (*Zoophagus insidians*, nov. gen., nov. spec.) Österreichsche Botanische Zeitschrift 61: 361-373.

Whisler, H. C. and Travland, L. B. 1974. The rotifer trap of *Zoophagus*. Arch. Microbiol. 101: 95-107.

4．糸球体における内皮細胞とメサンギウム細胞の接着様式

追手　巍，森岡哲夫（新潟大・医・腎研・免疫病態）
有井達夫（生理研）

私どもは腎糸球体メサンギウム細胞と血管内皮細胞の細胞相互作用を解析するため，両細胞を混合培養する系で検索してきた。ラット・メサンギウム細胞膜上には Thy-1.1 抗原が存在している。しかしメサンギウム細胞における，この分子の機能については全く不明である。そこでこの抗原に対する2種類の単クローン抗体を用いて，この抗原の存在様式を共焦点レザー顕微鏡，超高圧電子顕微鏡で検索した。

［方法］ ラット・メサンギウム細胞の培養：既報（生理学研究所年報 10: 283, 1989）のごとく行った。ラット・血管内皮細胞の培養法：フィブロネクチンをコートした培養皿上に胸部大動脈を切り出し primary culture を行う。出現した内皮細胞を含むコロニーを集め，クローニングし，内皮細胞源とした。メサンギウム細胞，内皮細胞ともに継代5代までの細胞を実験に供した。免疫染色（金コロイド法）後，固定，エポン包埋し，1μm の切片を作製，超高圧電子顕微鏡で平面及び傾斜観察した。レーザー蛍光顕微鏡用標本は上記と同様に混合培養した標本を二重染色 (fluorescein と rhodamine) し，20－30枚の断層像を撮影した。ストアーした画像をコンピュター処理し，立体画像，垂直方向の画像を構築し免疫電顕像と比較検討した。使用した抗血清はウサ



図1：混合培養したラット・メサンギウム細胞とラット・血管内皮細胞の共焦点レザー顕微鏡所見。単クローン抗体 OX-7 を TRITC（赤色，arrows），1-22-3 を FITC（緑色）で染色。共通部位は黄色 (arrowheads) となる。

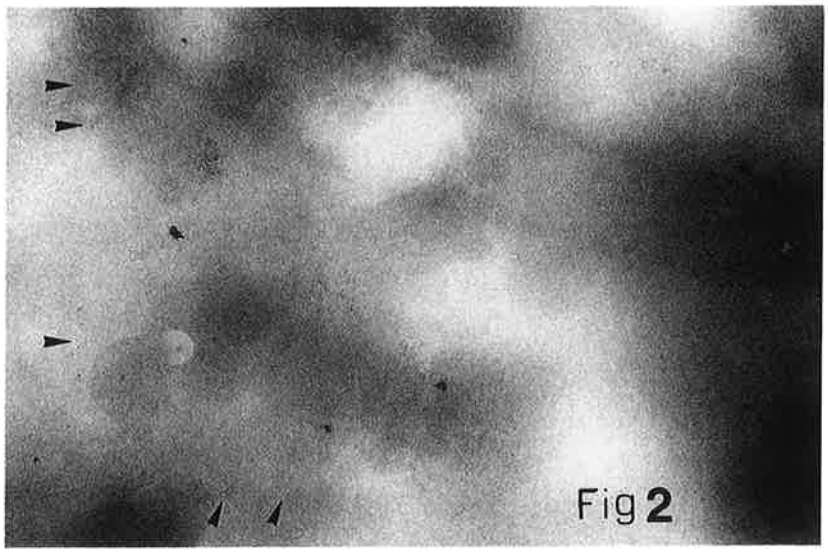


図２：図１と同様の混合培養細胞の超高圧免疫電子顕微鏡所見。単クローン抗体 1-22-3 を immune gold 法で検索した。

ギ抗－第８因子，上述の 1-22-3 マウス単クローン抗体および 1-22-3 抗体と関連した抗原 (Thy-1.1) を認識する市販の単クローン抗体，OX-7 である。両抗体が Thy-1.1 分子を認識することは，培養メサンギウム細胞膜蛋白との western blot 法，Thy-1.1 cDNA を COS 細胞に移入し，発現した Thy-1.1 分子との結合性により確認した。

［結論および考察］ １）２種類の単クローン抗体，1-22-3 と OX-7 はメサンギウム細胞表面と反応するが，内皮細胞には特異性を認めない。２）1-22-3 抗体は主に両細胞の接着部位近辺に強く発現していた（図１，arrowheads; 黄色，図２，arrowhead)。３）OX-7 抗体は両細胞の接触する部位だけでなく，他の細胞表面部位や，細胞外と思われる部位にも局在していた（図１，arrows; 赤色)。以上のことから，メサンギウム細胞上に存在する Thy-1.1 分子のうち，特異なエピトープが内皮細胞との接触部位に局在することが判明した。この成績は引用文献１，２の形で発表された。

引用文献： １）追手　巍，森岡哲夫，斎藤真子，清水不二雄。ラット・メサンギウム細胞上に存在する Thy-1 抗原の性状。日本病理学会誌 84 (1): 238, 1995. ２）Oite T, Saito M, Suzuki Y, Arii T, Morioka T, Shimizu F. A specific Thy-1 molecular epitope expressed on rat mesangial cells. Exp Nephrol in press, 1996.

5．培養細胞全載組織化学的標本の三次元的観察

永田哲士，臼田信光（信州大・医）
有井達夫（生理研）

（研究目的）

培養細胞を in vitro で培養瓶の底に沈めた電顕メッシュの上に単層培養し，一定時間培養後，固定，組織化学的反応，臨界点乾燥して，培養細胞全載組織化学的染色標本を作製し，超高圧電顕で観察すると，組織化学反応陽性の特定の細胞小器官の微細構造と相互の位置関係を三次元的に観察することができる。我々はこの方法により各種の培養細胞の酵素反応を利用し，catalase, AcPase, G-6-Pase, ZIO 飯能等により飲作用小胞[1]，過酸化小体[2,3]，ゴルジ装置[4]，水解小体[5]，小胞体[6]など細胞小器官の微細構造や，RI 標識した培養細胞全載標本を radioautography した巨大分子合成[7,8]等について報告した。今回は前報同様の実験で，ラット初代培養肝細胞の過酸化小体，ゴルジ装置，水解小体等について DAB, TPPase, AcPase 反応を行った結果について報告

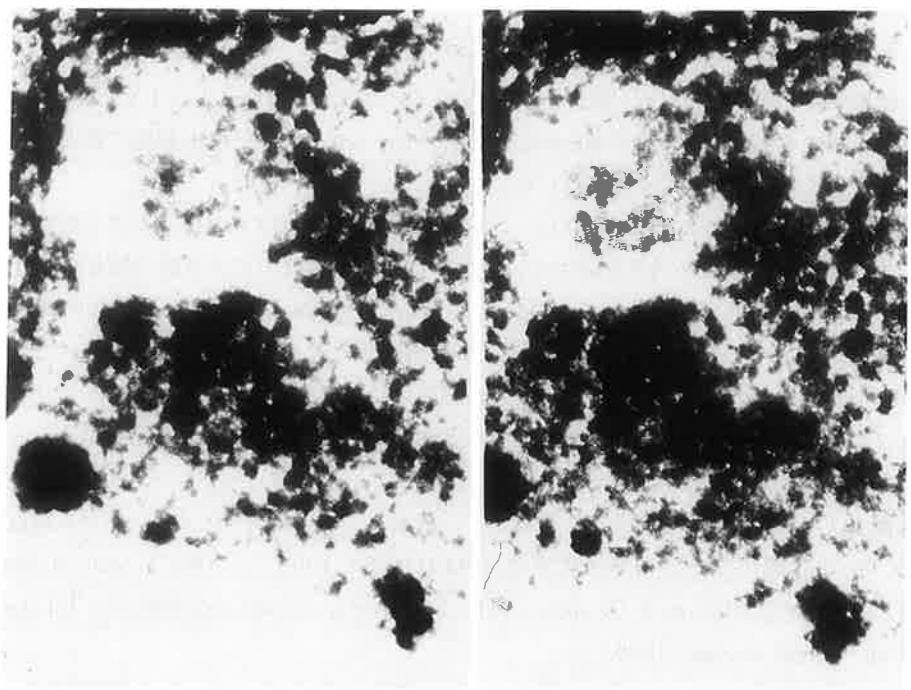


図１．ラット肝細胞培養全載組織化学的標本 (TPPase) の超高圧電顕写真。
肝細胞を培養24時間の後 clofibrate 添加培養24時間，緩衝 2% paraformaldehyde 前固定，TPPase 反応を行い，１％四酸化オスミウムで後固定，臨界点乾燥，日立 H-1250M 型電子顕微鏡（生理研，1000kV）で観察し，±８°で立体写真撮影，ステレオペアを作製した。TPPase 反応陽性の Golgi 装置の微細構造が立体視される。×6,700.

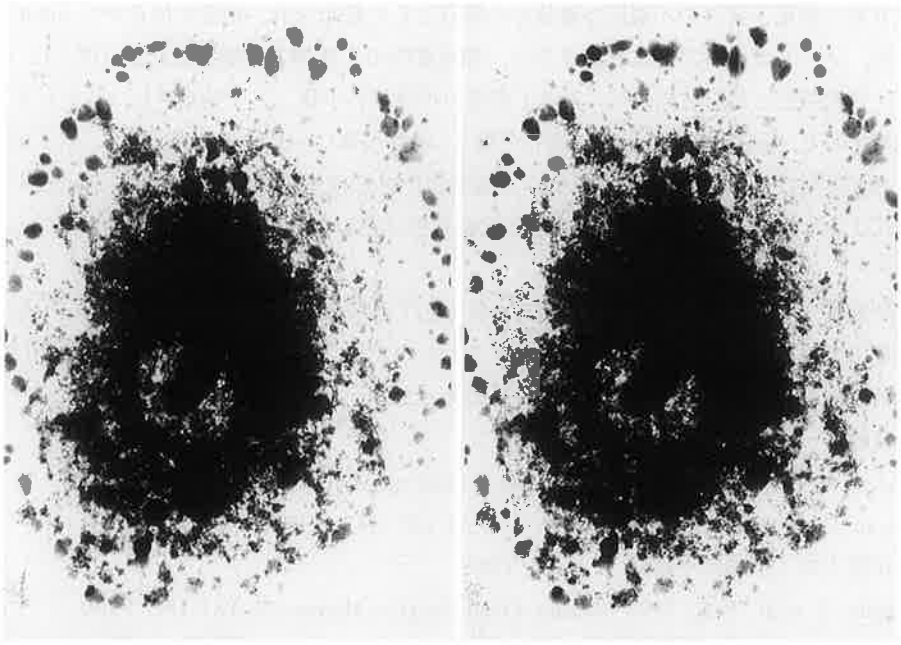


図２．ラット肝細胞培養全載組織化学的標本 (AcPase) の超高圧電顕写真。
間細胞を培養24時間の後 bezafibrate 添加培養24時間，緩衝 2% paraformaldehyde 前固定，AcPase 反応を行い，１％四酸化オスミウムで後固定，臨界点乾燥，日立 H-1250M 型電子顕微鏡（生理研，1000kV）で観察し，± 8 °で立体写真撮影，ステレオペアを作製した。AcPase 反応陽性の水解小体の三次元的配列が立体視される。×6,100.

する。

（材料及び方法）

初代培養肝細胞は成熟雄 Sprague-Dawley ラットの肝臓をコラーゲナーゼ潅流法で分離し，電顕メッシュにフォルムバール支持膜を張り，コラーゲン被覆した金メッシュを Petri dish の底に沈め，Leibowitz L-15 培養液に分散して，単層培養を行って，培養後48時間で得られた単層培養細胞を用いた。培養48時間後に，培養液を交換し，正常培養液でさらに24時間培養，あるいは過酸化小体増殖剤の clofibrate (0.2mM) または bezafibrate (0.5mM) を加え，24時間培養して，緩衝 2% paraformaldehyde (pH7.2) で前固定，DAB 反応，thiamine pyrophosphatase (TPPase) 反応，および acid phosphatase (AcPase) 反応を行い，１％四酸化オスミウムで１時間後固定，臨界点乾燥した。試料はいずれも，日立 H-1250M 型超高圧電子顕微鏡（生理研，1000kV）で観察し，立体写真撮影後，ステレオ・ペアを作製した。

（結果及び考察）

超高圧電顕によりラット肝細胞全載標本を観察すると，clofibrate または bezafibrate 添加群では球形の DAB 陽性顆粒が多数認められ，過酸化小体に相当すると考えられ，無添加対照群ではこれらの小体はほとんど認められなかった。TPPase 反応を観察すると，核周辺部の細胞質中に

核を取り巻く高電子密度の不規則な嚢状の小器官として認められ，形態と局在からGolgi装置と考えられ，ステレオ・ペアを立体視すると，細胞質内の立体構造が観察された（図1）。AcPase反応は，核周囲部と細胞質周辺部に高電子密度の小球状の小体として観察され，ステレオ・ペアを立体視すると，反応陰性の小胞体の間に分散し，水解小体に一致すると考えられ，上下に重なった三次元的関係が明らかになった（図2）。過酸化小体増殖剤投与群と非投与群を比較すると，増殖剤によるTPPase, AcPase各酵素反応の有意な差は認められなかった。

（結論）

培養肝細胞全載標本に過酸化小体増殖剤を投与して各種の酵素組織化学反応を行い，超高圧電子顕微鏡で観察して，細胞小器官を立体視することができ，細胞小器官の微細構造および相互の三次元的位置関係を明らかにすることが可能であった。

（引用文献）

1）Nagata, T. et al.: Proc. XIth Internat. Cong. Electron Microsc. 2: 1183-1184, 1986.
2）Nagata, T. et al.: J. Clin. Electron Microsc. 20: 681-682, 1997.
3）永田哲士他：生理研年報 9: 473-474, 1988.
4）Nagata, T. et al.: Proc. XIIth Internat. Cong. Electron Microsc. 2: 184-185, 1990.
5）永田哲士他：生理研年報 13: 283-285, 1992.
6）永田哲士他：生理研年報 14: 286-288, 1993.
7）永田哲士他：生理研年報 15: 326-328, 1994.
8）Nagata, T.: Cell. Mol. Biol. 41: 783-792, 1995

6．超高圧電子顕微鏡による卵白リゾチーム結晶の電子線回折

谷口美恵子，荒金宏臣，谷　孝二（名古屋大・理）
有井達夫（生理研）

目的

タンパク質分子の構造解析はX線結晶解析を主として行われているが，X線構造解析には大きくて質のよい単結晶が必要であり，また位相決定が難しいと言った問題点がある。

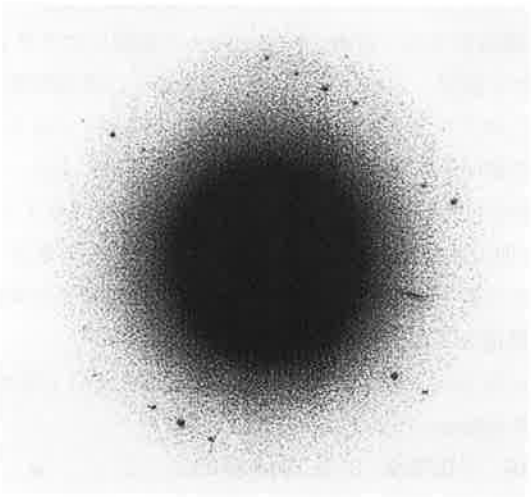
電子線回折では小さな結晶からでも回折像が得られ，また実像を観察することにより位相も簡単に決められる。透過能の高い超高圧電子顕微鏡を用いることで小さくても厚みのある3次元結晶からでも回折像がえられるのではないか，と考え卵白リゾチーム結晶の超高圧電子線回折を行った。

試料および実験方法

卵白リゾチームは，結晶が簡単に得られる，結晶化条件に幅がある，結晶に多型性がある，す

結晶化条件

	正方晶	斜方晶	針状結晶
リゾチーム濃度　(w/v)	2%	2%	2%
塩化ナトリウム濃度(w/v)	3.5%	3.5%	3.5%
pH	4.0	4.0	10.5
温度　(℃)	25	40	25



28.1Å間隔の回折スポットが見える.

針状結晶の回折像

でに構造が分かっているといった理由からサンプルとして採用した。今回観察した試料の結晶化条件は別表の３種類で，それぞれで正方晶，斜方晶，針状の結晶がみられた。

電子線回折は照射損傷を低減するために電子線の量を少なくしてサイドエントリー標準ホルダーおよびクライオホルダーを用いて室温と液体窒素温度でおこなった。回折像はフイルムとイメージングプレートでとりこんだのであるが，フィルムやイメージングプレートを送っている間に試料が損傷を受けないために回折像が見えたと同時に，試料上部のシャッターを閉めるようにした。結晶の実像は，試料を酢酸ウランでネガティブ染色して観察した。

結果と考察

電子線回折では針状結晶でクライオをもちいたとき回折像がえられた。また針状結晶の実像では同様の周期の格子縞が観察された。しかし，回折像はまだ質のよいものが得られておらず，原因としては照射損傷や，試料室を高真空にするため試料が乾燥して結晶構造がこわれる事などが考えられる。今後，試料を真空にひく前に急速冷却するなど，試料の乾燥や照射損傷を防ぐ方法を検討したいと考えています。

7．クリスタル状のアクチンシートの電子線回折

一海孝光（愛知県立芸大），有井達夫（生理研）

我々はアクチンフィラメントのクリスタルを作り，それの構造を電子線回折によって明らかにすることを目的としている。これまでに低いイオン強度の緩衝液中のアクチンは1μg/ml以下になるとフィラメントを作りやすいという性質を持っているので[(1)]，この条件下でアクチンフィラメントのクリスタルを作ることを試みてきた。この方法によって作ったクリスタル状のアクチンフィラメントの電子線回折を行った所，Direct Spotの近傍にアクチンモノマーの周期構造にもとずくと思われる反射を観察したが，直ぐに消えてしまい，その写真をとることが出来なかった。電子線照射に対しこのクリスタルは壊れやすい性質を持っていると思われる。我々がアクチンフィラメントの構造を解明したい直接の動機は次の様な理由による。アクチンは重合すると体積が増える[(2)]と共に，密度も大きくなる[(3)]。これは一見矛盾しているようにも見える。しかし我々はF-アクチンの構造に関する結晶学的な知識を持っていないので重合アクチンがサブユニットに較べてどれほど密に折り畳まれているかはわからない。そこでこの問題を解決するために，アクチンフィラメントの構造を明らかにしたいと考えている。

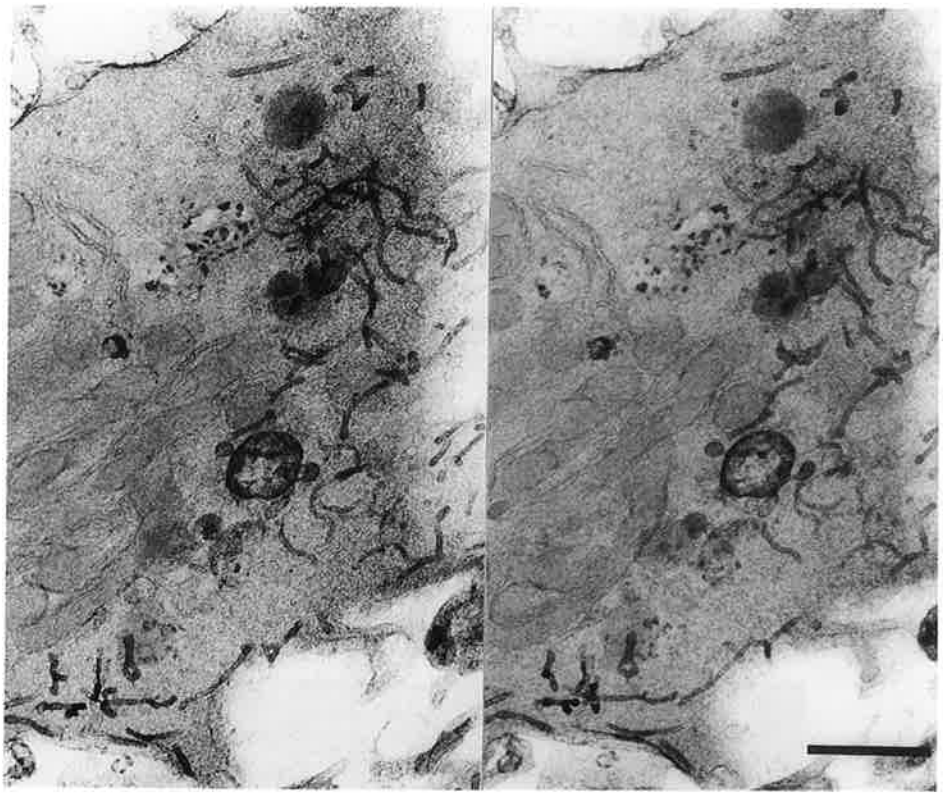
(1) Ikkai, T. and Kondo, H. Biochem. Mol. Biol. Int. 37, 1153-1161 (1995)
(2) Ikkai, T. and Ooi, T. Science 152, 1756-1757 (1966)
(3) 一海孝光，近藤博司　生物物理　35巻 1D09 (1995)

8．コルヒチン投与ラット小腸吸収上皮細胞基底部に観察される小管構造

野田　亨（京都大大学院・生体構造医・機能微細形態）

ラットにコルヒチン(0.7mg/100g b.w.)を投与すると小腸吸収上皮細胞には様々な構造変化が生じる。それらは細胞頂上部細胞質への核の移動，有窓層板の増加，細胞全域へのゴルジ装置の分散化，側基底部形質膜における微絨毛形成などで，それらの現象の多くは，特に細胞内の蛋白輸送の障害の結果，細胞全体の極性が失なわれたと理解される。今回の研究ではコルヒチンを投与したラット小腸吸収上皮細胞の基底部形質膜に注目し，特にその部位で観察された小管構造の出現とその立体構造の特徴を報告する。

ラットにコルヒチン(0.7mg/100g b.w.)を投与すると小腸吸収上皮細胞の基底部細胞質にその内腔に酵素細胞化学的に検出したalkaline phosphataseやp-nitrophosphate (p-NPP)を基質としたNa-K ATPase，あるいはK^+イオンに依存性を示さないp-NPPase活性を示す小管構造が出現した。反応産物は形質膜のそれよりやや高密度に認められたが，小管ではその内容より，小管を形



図－1：コルヒチン投与後3時間のラット小腸吸収上皮。p-NPPase 活性を検出した組織の 1μm 厚切り切片のステレオ像。反応産物は形質膜と共に小管構造に陽性である。図右側は形質膜の en face 像が，図下部には形質膜の横断像が現れており，小管構造は形質膜の直下に網状に分布していることがわかる。Bar ＝ 1μm

成する膜の内腔側に主として分布していた。小管の径は 30 ～ 40nm, 長さは 1μm から長いものでは 5μm におよぶ。細胞基底部の小管の分布は形質膜と密接な関係を示し，形質膜の横断像が観察される部分ではその直下で形質膜と平行な走行を示し，形質膜の en face 像が観察される部位ではかなり広い範囲で網工状構造として認められた。薬剤投与後の経過をみると，コルヒチン投与後5時間のものは投与後1時間のものに比べて，その出現頻度と小管の長さが増加しているように観察された。

この小管構造は形質膜との密接な関係が認められ，形質膜の p-NPPase 活性を示す酵素を含むある種の蛋白を細胞内に取り込んで形成された一種のエンドゾームと考えられる。コルヒチン投与による出現機構は不明であるが，endocytosis に関係した構造として興味深い。

9．中枢神経系ニューロン・グリアの三次元構造解析
—マウス海馬歯状回 Mossy cell における thorny excrescence の超高圧電子顕微鏡による観察—

藤瀬　昇，小坂俊夫（九州大・医・第３解剖）

mossy cell は海馬歯状回 hilus の主ニューロンであり，形態的特徴として thorny excrescence を有している。また神経回路としては，歯状回顆粒細胞から入力を受けて同側および対側歯状回分子層の最内層へ興奮性の入力を投射し，特徴的な興奮性 feedback loop を形成している。臨床的には，側頭葉てんかんにおいて最も脆弱なニューロンの一つとして知られている。その形態はゴルジ染色でよくわかり，多方向性に伸びた樹状突起の比較的近位に thorny excrescence を有している。顆粒細胞からの mossy fiber terminals を主に受けているのがこの thorny excrescence で，電顕的には，複雑に入り組んだ thorny excrescence が非常に大きな mossy fiber の axon terminals から非対称性シナプス結合を受けている像が観察される。これを超高圧電子顕微鏡を用いて観察してみると，あたかもぶどうの房のような特徴的な複雑な形態をしているのがよくわかる（図１）。

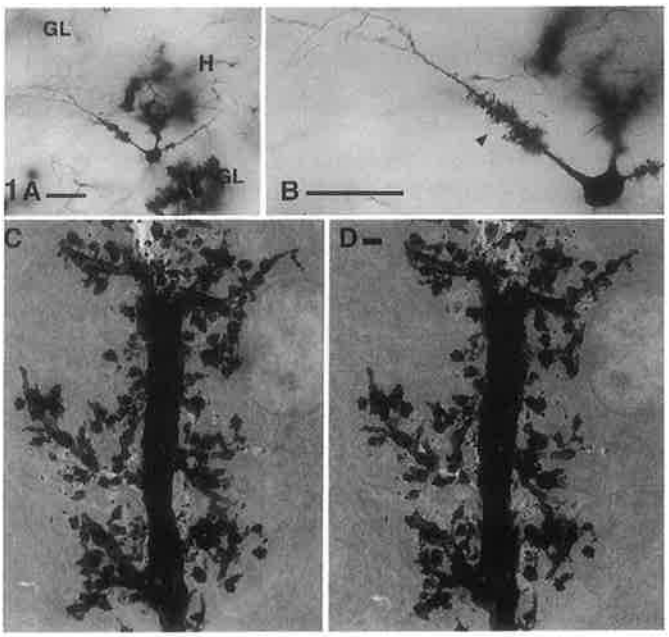


図１．マウス海馬歯状回 Mossy cell. ゴルジ染色。
A）100μm 厚切片。弱拡大。GL, granule cell layer; H, hilus. B）強拡大。arrowhead: thorny excrescence. C，D）arrowhead in B の超高圧電子顕微鏡による stereo pair image. scale bars in A, B: 50μm; D: 1μm.

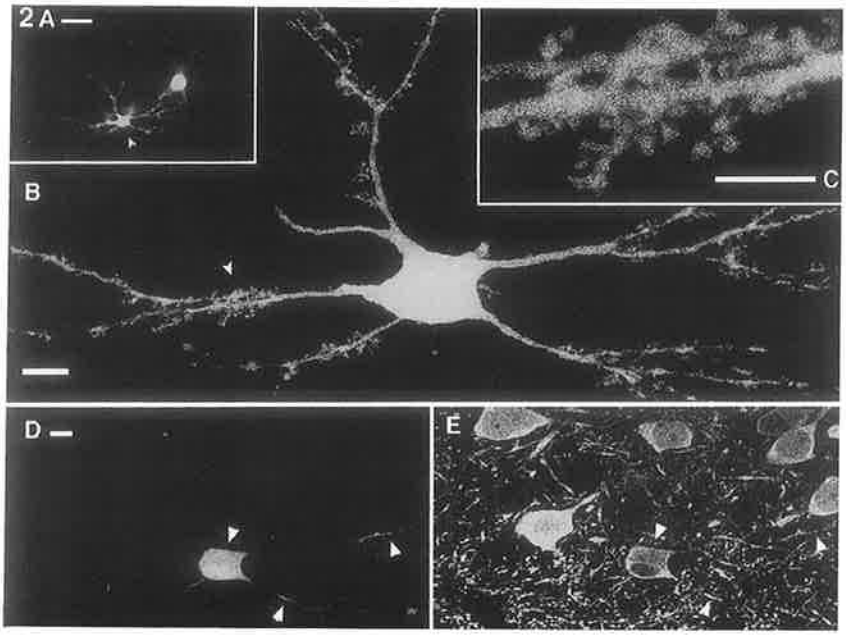


図2．400μm スライスで細胞内に Lucifer Yellow を注入したニューロン。
A）arrowhead: mossy cell. B）arrowhead in A の mossy cell の共焦点レーザー顕微鏡像。arrowhead: thorny excrescence. C）arrowhead in B の強拡大。D）single optical section of B. E）Dと同一切片の calretinin 免疫染色。arrowheads がそれぞれ対応している。scale bars in A: 50μm, B: 10μm, C: 5μm, D: 10μm.

今回我々は，マウス腹側海馬歯状回 hilus に密に分布している calretinin (CR) 免疫陽性大型細胞が mossy cell であることを，いくつかの方法を用いて証明した。その内の一つとして，生きた400μm スライスの状態で細胞内に蛍光色素 Lucifer Yellow (LY) を注入し，形態を確認した上で，固定した後 50μm の切片を作成して CR 免疫染色との蛍光二重染色を行ったところ，mossy cell は CR 免疫陽性であった。この時共焦点レーザー顕微鏡を用いて，強拡大にて thorny excrescens を観察したところ，超高圧電顕像とよく対応していた（図2）。

10. 過冷却液体・固体界面および固・固体界面の構造の動的観察

佐々木勝寛，坂　公恭（名古屋大・工）
有井達夫（生理研）

我々は，これまで金属や半導体材料の固・液界面の原子構造を，高分解能超高圧電子顕微鏡を用いて観察してきた。特に，最近低融点金属を用いて固・液界面での反応をその場観察する方法を考案し，固・液界面及び固・固体界面の反応と電子線照射の影響を観察している。特に，$Ga/CuGa_2$ および $CuGa_2/CuGa_2$ 界面においては，電子線照射により界面が振動的な運動を示すという，新しい物理現象を見出してきた。本年度のこの共同研究では，我々が注目している固・固体界面の一つ $CuGa_2$ 粒界において起きる粒界振動について集中的な実験を行った。

試料作成は以下のように行った。まず Cu と Ga を，真空蒸着装置内で１：２の化学量論比となるように，Carbon 膜上に同時蒸着した。これを約260℃で熱処理し単相の $CuGa_2$ 多結晶薄膜としたものを電子顕微鏡試料とした。

電子顕微鏡観察は，名古屋大学の超高圧電顕 H-1250ST, 300kV 級電顕 H-900NA と生理学研究所の H-1250M の機能をそれぞれ組み合わせて使用し(1) H-900NA で基礎的な結晶学的データを集める。(2) H-1250ST では，加速電圧を 1000kV から 200kV に変化させ，照射電子線加速電圧の影響を調べる。(3) H-1250ST 加熱ホルダーと H-1250M 用低温ホルダーを用い，温度に対する依存性を調べるなどの一連の実験を行った。

電子線の加速電圧が 1000kV においては，電子線密度が $2 \times 10^{23} e/m^2 s$ 以上になると，ある特定の粒界は振動現象を起こした。粒界振動を起こす粒界の結晶学的性質は次のように分類された。まず大まかには，小傾角粒界と，特定の方位関係を持った大傾角粒界である。後者の特定の方位関係には，主として次のようなものが見出された。(1) (101)//(101), ‹010›//‹010›, (2) (101)//(110), ‹101›//‹001›, (3) (110)//(101), ‹001›//‹010›。このほかにもいくつかの例外が見出されたが，それらも単純な低指数で表される方位関係に指数づけされた。

高分解能観察より，振動している粒界には特別な粒界相などは存在せず，固・固体反応によって現象が進行していることがわかった。

加速電圧を 1000kV から 200kV まで変化させると，粒界振動を起こさせる最低電子線密度は低加速電圧ほど上昇するが振動はどの電圧でも観察された。

振動周期と温度の関係を－160℃から260℃の間で調べた。高温側では，振動周期，振幅とも35℃以上で低下し，55℃以上で振動は観察されなくなった。低温側では，小傾角粒界では－70℃まで振動が観察されたが，大傾角粒界では０℃以下で急激に振動が弱まり－20℃以下では振動は観察されなかった。

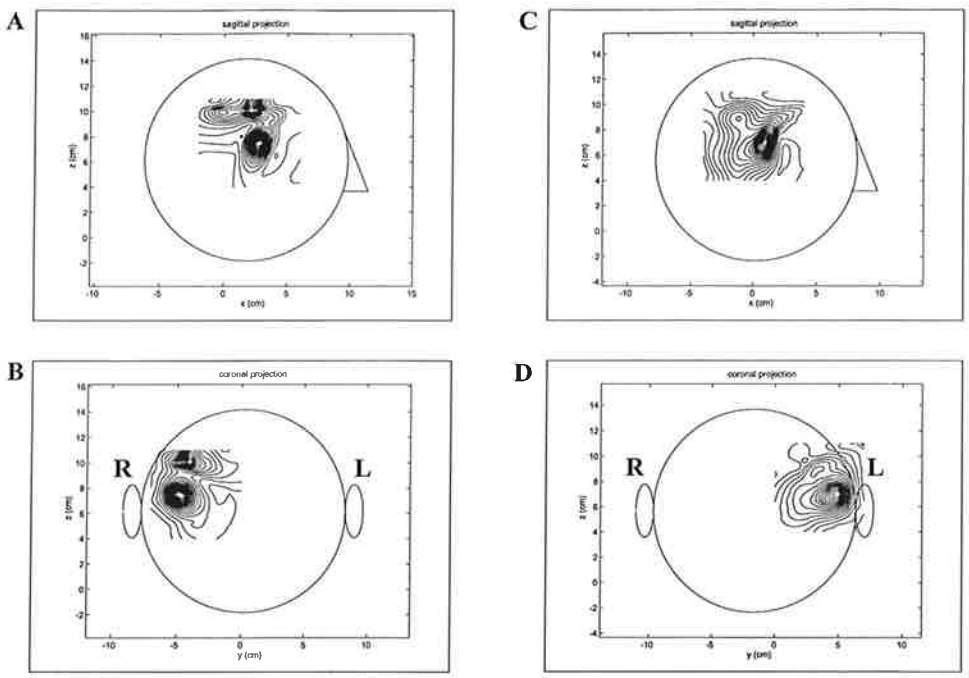
以上のような結果から，この現象は電子線照射により発生する格子間原子と粒界転位との相互作用に深く関係していることが示唆された。また，振動の振幅と周期を説明する簡単なモデルを提案した。

【 生体磁気計測装置
共同利用実験報告 】

1．体性感覚野 (SI・SII) における注意の影響に関する研究

宮内　哲（郵政省通信総合研）
彦坂興秀（順天堂大・医・第１生理）
多喜乃亮介（白梅学園短大）

平成７年度は，従来の single dipole 推定の代わりに，一度に複数の活動源を推定することができる Multiple Signal Classification (MUSIC) アルゴリズムによる活動源の推定を行なった。体性感覚刺激(強度：閾値の1.2～1.5倍の電気刺激, 加算回数：500回, 試行間間隔： 500 ～ 800msec) を被験者の左右の人差し指に与え，体性感覚野上に置いたコイル（BTI 社製，37チャネル）から体性感覚誘発脳磁場を記録した。その結果，人差し指への電気刺激により，対側半球では第一次体性感覚野及び第二次体性感覚野に相当する領域に活動源が推定され（図１，A，B），同側半球では第二次体性感覚野に相当する領域に活動源が推定された（図１，C，D）。従来の single diple 推定では，対側半球の第二次体性感覚野の活動は，直前に第一次体性感覚野から出現する成分のために検出が困難であった。MUSIC アルゴリズムによる活動源の推定では，５名中４名



A(sagittal), B(coronal): 左手人差し指への体性感覚刺激に対する対側半球の誘発脳磁場の MUSIC による解析結果。第一次体性感覚野と第二次体性感覚野に相当する領域に二つの活動源が推定された。
C(sagittal), D(coronal): 左手人差し指への体性感覚刺激に対する同側半球の誘発脳磁場の MUSIC による解析結果。第二次体性感覚野に相当する領域に活動源が推定された。

において明確な活動源が対側の第二次体性感覚野に推定され，複数の活動源の推定に対するMUSICアルゴリズムの有用性が確認された。

研究成果

- Missing auditory stimuli activate the primary and associate auditory cortices: A combined study MEG with fMRI.
  S. Miyauchi, R. Takino, Y. Sasaki, B. Puetz, and H. Okamura
  The tenth Tokyo Institute of Psychiatry International Symposium, 1995/10/12, Tokyo
- Activation of the superior temporal sulcus (STS) associated with missing auditory stimulus.
  R. Takino, B. Puetz, Y. Sasaki, S. Miyauchi
  The tenth international congress of Electromyography and Clinical Neurophysiology, 1995/10/19, Kyoto
- A comparison of vector and radial magnetometer arrays for whole-head magnetoencephalography.
  P. Hughett, S. Miyauchi, Tenth International Conference on Biomagnetism, 1996/02/16-21, Santa Fe, New Mexico, USA
- fMRIを中心とした非侵襲的脳機能研究
  宮内　哲，1996-03-04, 平成7年度生命工学研究総合推進会議総会シンポジウム，筑波
- Covariance incorporated MEG-MUSIC algorithm and its application to detect SI and SII when large background brain activity exists. 関原謙介，宮内　哲，小泉英明，2nd International Conference on Functional Mapping of the Human Brain, 1996, Boston

2．人間の高次認知機能の脳磁計測

芎阪直行（京都大），中谷和夫（専修大），芎阪満里子（大阪外国語大）
南部　篤（東京都神経科学総合研），小山幸子，柿木隆介（生理研）

ヒトの高次認知機構，とくに運動視知覚とワーキングメモリの脳磁計測による検討を行った。運動視の実験では，異なる空間周波数成分をもつ正弦波のグレーティングパタンを静止および各種運動条件下で加算し誘発脳磁場の変化を求めた。イニオン（Ozを含む）下部の後頭から頭頂（Czを含む）にかけて37点のセンサーで観測される磁場変化のデータから等磁界線マップを求め，マップから電流双極子（ダイポール）の位置の推定を行った。

また，ヒトの認知記憶の高次脳内機構の検討のため，リスニングスパン（Listening Span）を用いたワーキングメモリのMEGによる解析を行った。リーディングスパンテストの測定方法をもとにして作成されたリスニングスパンテストにより，被験者のワーキングメモリ容量を実験心理

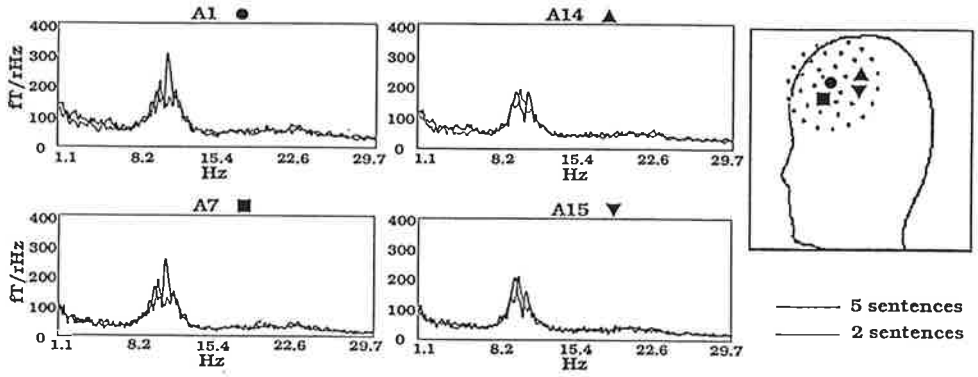


図１．ある被験者のワーキングメモリ負荷状態（二，五文条件下）での誘発脳磁場のパワースペクトル。記号と部位を対応させて表示。

学的に測定し，それと被験者のワーキングメモリ遂行中の脳磁図のパワースペクトル特性の比較を行った。最もワーキングメモリ負荷の高い五文条件（閉眼状態で連続した五文を聞きとり，その中に含まれる五単語を記憶して報告する）では二文条件と比べ顕著な差異が左半球前頭部位で観察された（被験者６名)。ピーク周波数は，パワースペクトルのアルファ波帯域でのピークを測定してその周波数を測定した。脳磁図の変化傾向は，ワーキングメモリの処理効率の個人差により影響を受けた。ここでは，リスニングスパンテストで4.0以上の高スパンの被験者の２文条件と，５文条件の脳磁図の比較を行った。その結果，文の数が増えてワーキングメモリの負荷が高まると，脳磁図のアルファ波ピークが高い周波数に出現する傾向がみられた。図は１名の被験者の脳磁図のパワーを２文と５文条件で重ね合わせたものである。A1, A7, A14, A15 は頭部の位置を示し，図の●■▲▼の部位とそれぞれ対応している。図のアルファ波のピーク周波数の変化から，２文条件に比較して，５文条件ではより高い周波数にピーク周波数が出現していることがわかる。また，５文条件での高い周波数のピークの出現に部位差があり，A1, A7 では，高い周波数成分が出現しているが，A14 では，双峰性のピークとなり A15 では，より低い周波数のピークの出現が認められる。この結果から，ピーク周波数の高い周波数への移行は，側頭部位の A1 から前頭，中心部位にかけて顕著であるが，A14 から後頭部位にかけては移行が認められないことがわかる。また，このピーク周波数の移行は，５文条件で顕著であり，他の３文，４文条件および文の聴き取り条件では２文条件とほとんど差異はみられなかった。このことから，被験者リスニングスパンのほぼ限界でピーク周波数の変化が生じるものと考えられる。さらに，この傾向は主として左半球に認められた。従って，ワーキングメモリの負荷，とくにここでは言語情報処理と関連した場合には，左半球の側頭部，前頭部位にかけて負荷に伴う脳内処理の変化が生起したことが推察できる。

文献

Ashida H & Osaka N (1995) Motion aftereffect with flickering test stimuli depends on adapting

velocity. Vision Research, 35, 1825-1833.
中谷和夫 (1995) 行動空間の感性情報処理 (新版 "情報処理ハンドブック", 6章4節：オーム社)
苧阪満里子 (1994) ワーキングメモリの認知神経心理学的研究：脳波からのアプローチ，風間書房
Osaka, M., Osaka, N., Koyama, S., Nambu, A., Nakatani, K. & Kakigi, R. (1996) Peak alpha frequency of magnetoencephalography (MEG) changes during the performance of verbal working memory tasks. Electroencephalography & Clinical Neurophysiology, 97, S123.
苧阪満里子，苧阪直行 (1994) 読みとワーキングメモリ容量，心理学研究，65, 339-345
苧阪直行，蘆田　宏，苧阪満里子，小山幸子，南部　篤，中谷和夫，柿木隆介 (1996) 脳磁場計測 (MEG) による運動視に関与する脳内部位の推定，日心59回大会，論文集 p.461.
苧阪満里子，苧阪直行，小山幸子，南部　篤，中谷和夫，柿木隆介 (1996), 脳磁図によるワーキングメモリの脳内機構に関する研究，日心59回大会，論文集 p.782.

3．脳の高次機能に関する研究

達本　徹（京都大・医学研究科・認知行動脳科学）
佐々木和夫（京都大・名誉教授）
南部　篤（東京都神経科学総合研・病態神経生理）
久宝真一，松崎竜一（関西医大・生理学第2）
柿木隆介（生理研）

1．目的

暗算や，多声・和声音楽のイメージ演奏に集中すると，前頭部に 5-7Hz のシータ波（前頭知的シータ波）が生じ，その電流双極子は左右大脳半球前頭葉の皮質領野に広く分布することがこれまでの脳磁計を用いた研究で示されている (Sasaki et al. 1994)。このシータ波の出現と，これらの精神作業に対する集中の主観的な度合とのあいだには相関関係が認められ，前頭連合野の働きと何らかの関係をもつことが推測されている。本研究ではこの点の理解を深めるため，一定の時間間隔の予告 (W) ―命令 (I) 刺激による，主観的（内省的）時間計測（推測）課題に伴う前頭知的シータ波について実験をおこなった。

2．方法

被験者には，光ファイバーを介し2色の光刺激（0.1s 持続）(W) の何れかを呈示する。一方の色を go の，他方を no-go の予告刺激として，一定時間 (1.5-6.0s) 後の第3の色の命令刺激中（0.5s 持続）(I) に親指でボタンを押すか押さないかを指示する (go/no-go W-I)。または一色の W 後 I でボタンを押し，他方の W の後には I を与えず，W-I 刺激間隔を推定して運動させる (on/off W-I)。

go/no-go W-I の go の時も I を予測して，I 開始後迅速に運動するようさせる。脳磁場と脳波により脳活動を記録し，W 開始時点で各々100回加算平均した。また周波数分析により，W-I 持続時間のシータ波の消長を観察した。

3．結果

8名の健常被験者のうち，4名において W-I 課題により，W-I 持続中に前頭知的シータ波が出現した。go/no-go W-I の go 試行，on/off W-I の on および off 試行の W-I 持続中には所謂 CNV が記録された。周波数分析により，go/no-go の go 試行，および on/off の off 試行の W-I 持続中にはシータ波が増大していることがわかった。また，go/no-go の go よりも on/off の off の方がシータ波の発現が著明であった。go/no-go の go に比べ on/off の off の折には I 刺激が与えられず，全く手掛かり刺激なしに主観的時間計測をしなければならないのと良く対応している。この時間計測に伴うシータ波の発現部位は，暗算や音楽のイメージ演奏に伴う前頭知的シータ波の発現部位と，同一の分布パターンを示した。

4．考察

このように，主観的（内省的）時間計測課題という比較的抽象的事象への集中課題の際に前頭知的シータ波が発現しうる，という事実は，このシータ波の意義と前頭連合野の機能に何等かの示唆を与えるものであろう。とくに，「意識」との関連で興味がもたれる。

4．ヒトにおける嗅覚刺激誘発脳磁界の測定

佐久間研司，中島健二（鳥取大・医・神経内科）
柿木隆介，金桶吉起，宝珠山稔，北村吉宏，下条素子（生理研）

【目的】嗅覚の中枢伝導路については動物における実験ではいくつか報告はあるが，これらにおいても依然明らかでないことが多い。ヒトにおける研究はこれまで脳波記録による誘発電位を用いる方法が用いられてきたが，その刺激方法の困難さおよび，頭蓋における電気抵抗などの問題により困難である。そこで今回われわれは，嗅覚刺激誘発反応の発生起源を脳磁図を用いて検討した。

【対象，方法】対象は健常成人9名。嗅覚刺激としてアミルアセテート（バナナ臭）を用い，対照として同量の無臭空気を与えた。1回の刺激は 100ms の持続時間で 0.26MPa の圧力をもって与えられ，inter stimulus interval は嗅覚疲労を考え 4000ms 以上とした。嗅覚刺激と無臭空気刺激は右鼻前庭にチューブを挿入し，これにより，MEG への磁性体の影響を排除する目的で 20cm 延長した反対側に装着されたサーミスタ呼吸ピックアップにより呼気と吸気を判定し，吸気の開始時と同期し，1試行につきニオイ刺激及び無臭空気刺激をランダムに50回ずつ左鼻前庭に装着されたチューブを通じて呈示した。両者の反応の差を明らかにするため嗅覚刺激反応と

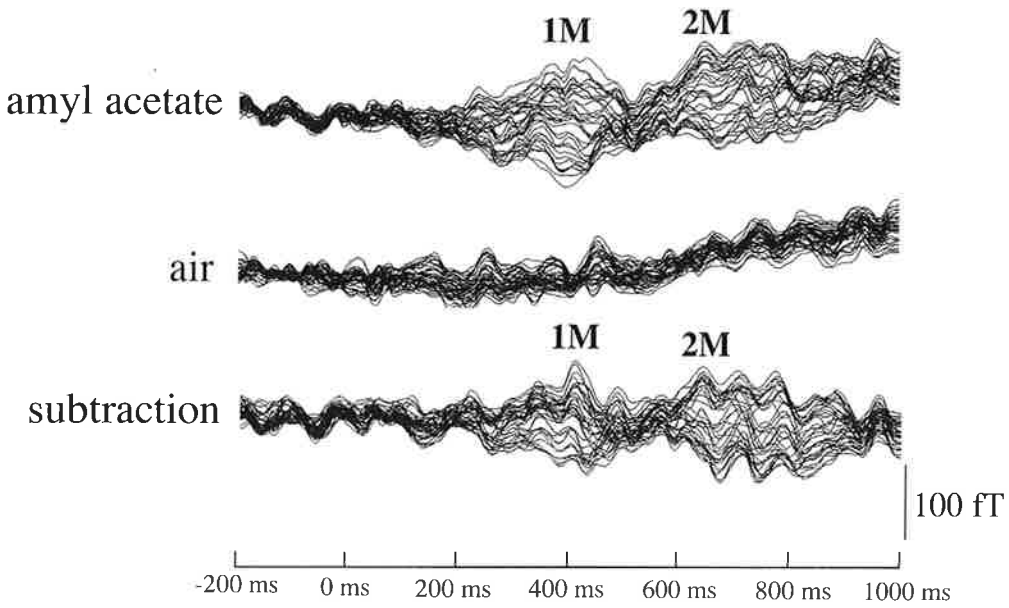


FIG. 1. OEFs after olfactory stimulation of the left nostril with amyl acetate and odorless air and the "subtraction" waveform at the C3 position in one subject. Thirty-seven waveforms are superimposed to illustrate the nomenclature for each identifiable component. Two polarity-reversed deflections 1M and 2M are identified only in "amyl acetate" and "subtraction" waveform.

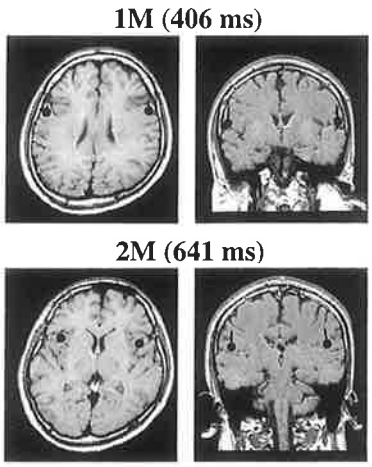


FIG. 2. Representative ECDs of OEFs overlapping on axial and coronal MRI views in subject 1. ECDs of 1M were identified along the superior bank of the Sylvian fissure in bilateral hemispheres symmetrically oriented to the upper and anterior direction. The ECDs of 2M were located in similar but slightly deeper regions as compared with those of the 1M. EDC locations in the left hemisphere were slightly arranged less than 1 cm to show bilateral ECDs in the same MRI slice.

無臭空気刺激反応の差を求めて解析した。2台のBTi社製，37チャンネル脳磁計（直径14cm）を使用し，10－20法のFz, C3, C4を中心とした位置で記録した。測定は磁気シールド室で行い，刺激の際に発生する雑音を排除する目的で磁気シールド室全体にホワイトノイズを発した。

【結果】脳磁計をFzに置いた場合には明らかな反応は見られなかった。C3およびC4に置いた場合には，9名中5名で明らかなmagnetic fieldsがみられた。これら5名中2名で1Mと2Mが見られ(Fig. 1.)，3名では1Mのみが見られた。1Mおよび2Mがみられた2名では1Mの潜時は各々329と406msで，2Mの潜時は各々685と641msであった。1MのECDsは両側のシルヴィウス裂の上縁の左右対称性に認められた。2Mは1Mよりもわずかに深部に想定された。1Mのみがみられた3名では，それらの潜時はそれぞれ272, 312, 332msであったが，これらの2名では両側のシルヴィウス裂の上縁に左右対称的に想定され(Fig. 2.)，また残る1名では側頭葉上部に想定された。

【考察，結論】1M, 2Mは共に嗅覚刺激に対してのみ出現するが，その潜時を考慮すれば嗅覚弁別能などの高次の嗅覚を反映しているものと考えられ，高次脳機能の検討に応用可能と考えられた。

【研　究　会　報　告】

研究会報告

〔目　　次〕

1．海馬の機能と病態
（代表者：片岡喜由）
（1995年９月28日～９月29日）…… 301

2．シナプスの形成・維持・可塑性
（代表者：小田洋一）
（1995年12月14日～12月15日）…… 317

3．モータータンパク質の構造変化は化学―力学エネルギー変換過程にどの様に寄与するのか
（代表者：児玉孝雄）
（1996年１月25日～１月26日）…… 325

4．NMR の細胞及び分子生理学研究への応用
（代表者：曽我美勝）
（1995年12月21日～12月22日）…… 333

5．内分泌細胞とニューロンの相互移行・クロム親和を中心に
（代表者：菅野富夫）
（1995年７月19日～７月20日）…… 345

6．音響トランスダクションと脳内表現をめぐる学際的展望
（代表者：亀田和夫）
（1995年12月４日～12月５日）…… 356

7．生理学実験手技に関する研究会
（代表者：栗原　敏）
（1995年８月17日～８月25日）…… 366

8．内外受容器のブドウ糖分子識別ならびに反応発現機構
（代表者：坂田利家）
（1995年12月11日～12月12日）…… 368

9．細胞内シグナルのプロセシングと細胞機能の調節
（代表者：小島　至）
（1995年10月26日～10月27日）…… 376

10．心血系イオン・チャネルの機能と病態
（代表者：平岡昌和）
（1996年１月29日～１月30日）…… 386

11. ミエリンとミエリン形成細胞に関する研究会
（代表者：植村慶一）
（1995年７月10日） …… 400
12. 神経回路の成立と維持の分子機構
（代表者：工藤佳久）
（1995年10月12日～10月14日） …… 413
13. 網膜における視覚情報処理の新しい展開―定性的理解から定量的理解へ―
（代表者：臼井支朗）
（1995年７月27日～７月29日） …… 424
14. 運動及び行動発現のストラテジー：感覚認知，自律神経／情報及び運動各系の相互連関
（代表者：西野仁雄）
（1996年１月11日～１月12日） …… 452
15. 運動性神経回路の機能特性：大脳皮質から脊髄の機能と形態
（代表者：山本哲朗）
（1995年９月７日～９月８日） …… 462
16. 腸管における電解質水代謝と体液調節
（代表者：鈴木裕一）
（1996年１月12日） …… 470
17. 生殖細胞の構造と機能発現の解明
（代表者：年森清隆）
（1995年11月17日～11月18日） …… 477

1．海馬の機能と病態

1995年9月28日～29日
代表者：片岡喜由（愛媛大）
世話人：小幡邦彦

(1) 海馬台複合体と視床前核群との相互結合にみられる局所対応
石塚典生（東京都神経研）

(2) tenascin 遺伝子の発現をマーカーとした海馬アストログリアの発生様式の検討
湯浅茂樹（生理研）

(3) 海馬錐体細胞のカルシウムスパイク
伊藤憲一，三浦正巳，加藤宏司（山形大・医・第二生理）

(4) 海馬ニューロンの Ca^{2+} 透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体チャネル
伊佐　正，小澤瀞司（群馬大・医・第二生理）

(5) 光学計測による遅い CA3-CA1 伝達の検出とアデノシンの関与
関野祐子（新技団さきがけ21）
小幡邦彦（生理研）
落石知世（工技院・生命工学研）

(6) 海馬スライス苔状線維―CA3 野系 LTP 発現に伴うグルタミン酸遊離の増大
前田武彦（京都大・薬・薬理）
佐藤公道（京都大・薬・分子作用制御）

(7) 海馬切片神経活動に対するグルコースおよびその代謝物質の効果
和田　浩，岡田安弘，鍋谷まこと，小林恵三（神戸大・医・第一生理）

(8) 酸性線維芽細胞増殖因子の学習・記憶促進―正常および病態
大村　裕（日本臓器製薬・生物活性）
佐々木和男（富山大・工）
李　愛軍（九州大・医）
木村　宏，遠山育夫，花井一光（滋賀医大）

(9) ニューロンの異常発火と組織学的変化との関連
小山生子（小山クリニック）

(10) 海馬錐体細胞樹状突起の興奮性とてんかん発作
丸　栄一，大津　洋（日本医大・第二生理）
芦田　廣（防衛医大・第二生理）

(11) けいれん準備性における海馬の役割
板野俊文（香川医大・生物学）

(12) ラット海馬体ニューロンの文脈応答性

小野武年，西条寿夫，小林恒之（富山医薬大・医・第二生理）

(13) ラットの虚血性海馬体損傷と空間記憶障害に対するカルシウムチャネル遮断薬の効果

田村了以，小野武年（富山医薬大・医・第二生理）

中田泰史（富山化学工業）

(14) 幼若砂ネズミにおける脳虚血後の Heat shock protein の発現

新井　一，佐藤　潔（順天堂大・医・脳神経外科）

(15) トリメチル錫による海馬損傷と一酸化窒素合成酵素 (NOS) 含有細胞について

金井裕彦，加藤進昌（滋賀医大・精神科）

池田正行（東京医歯大・神経内科）

赤池雅司（ヘキストジャパン医薬総合研）

(16) トリメチル錫投与ラットにおける海馬苔状繊維の発芽

赤池雅司（ヘキストジャパン医薬総合研）

加藤進昌（滋賀医大・精神科）

(17) Mild hypothermia の脳保護作用—実験的，臨床的考察—

宮澤隆仁（防衛医大・脳神経外科）

(18) 一過性脳虚血後にサル海馬に生ずる遅発性神経細胞死

山嶋哲盛，山下純宏（金沢大・医・脳神経外科）

滝田正寿（工技院・生体情報）

西道隆臣（臨床研・遺伝情報）

小野武年（富山医薬大・医・第二生理）

吉岡　亨（早稲田大・人間科学）

(19) 虚血と神経細胞死—培養細胞実験系を中心として—

中村洋一，辻　浩二，片岡喜由（愛媛大・医・第一生理）

【討論参加者】

石塚典生，靭負正雄（東京都神経研），伊藤憲一，吉岡成知，長瀬輝顕（山形大・医），小澤瀞司，伊佐　正，小保方馨（群馬大・医），関野祐子（新技団さきがけ21），前田武彦（京都大・薬），岡田安弘，和田　浩，小林恵三（神戸大・医），大村　裕（日本臓器製薬），小山生子（小山クリニック），丸　栄一，大津　洋（日本医大），板野俊文（香川医大），小野武年，小林恒之，田村了以（富山医薬大・医），金井裕彦，加藤進昌（滋賀医大），赤池雅司（ヘキストジャパン医薬総合研），新井　一（順天堂大・医），宮澤隆仁（防衛医大），山嶋哲盛，光田幸彦（金沢大・医），中村洋一，片岡喜由（愛媛大・医），湯浅茂樹，小幡邦彦（生理研）

【研究会概要】

昨年まで5回にわたって続けられた海馬研究会に劣らず19題が寄せられた。うちとけた雰囲気の中で活発な討論と意見の交換が行われ，海馬に対する関心の広さと深さが印象づけられた。海馬と視床前核群をめぐる線維連絡の詳細な分析（石塚），発生過程でのグリアの発現様式（湯浅），CA3-CA2-CA1と結ぶアデノシン依存性伝達経路（関野ら）の研究は，海馬の構造的基礎としての新しい局面を思わせた。海馬CA1錐体細胞のカルシウムスパイクの発生（伊藤ら），カルシウム透過性AMPA受容体チャネル（伊佐ら），苔状線維入力の長期増強発現におけるグルタミン酸遊離亢進（前田ら）の所見は，海馬高次機能の機能的要素としての重要性を指摘している。てんかんとの関連では，コバルト法モデルでの焦点部の膜電位や樹状突起棘構造の変化（小山），kindlingモデルでは，EPSC変化と棘消失（丸ら），扁桃核刺激により誘発される海馬の構造機能変化（板野）が報告され，常に古くて新しい関心事であることが示された。高次機能としては，自然発症老化マウスの線維芽細胞成長因子による学習・記憶促進作用（大村）ニューロンの文脈応答性（小野ら）に関する新しい所見が注目される。病態生理学的側面からは，幼若動物ニューロンの虚血抵抗性（新井ら）やエネルギーレベルと神経活動の乖離，乳酸の効果（和田ら），サルを用いた虚血モデルでの蛋白分解酵素活性化（山嶋ら），低脳温（宮沢）やL型カルシウムブロッカー（田村ら）による虚血障害防止，虚血培養細胞での所見（中村ら），トリメチル錫によるニューロン応答と障害（金井ら，赤池ら）があり，それぞれ臨床との関連で重要な課題であることがうかがわれた。

(1) 海馬台複合体と視床前核群との相互結合にみられる局所対応

石塚典生（東京都神経研）

ラット視床前核群（AV, AD, AM核）へWGA-HRPあるいはPHA-Lを注入して，視床投射細胞の分布と，視床から海馬領域への投射線維分布を海馬長軸直交断面を使用して調べ，横断面上での部位局在結合様式を明らかにした。

AV核は海馬台・前海馬台と，AD核は顆粒性脳梁後部皮質(RSG)と，そしてAM核は無顆粒性脳梁後部皮質(RSA)と相互結合が見られた。AV核と海馬台との結合には，CA1よりの海馬台とAVの内側，嗅内野よりの海馬台とAVの外側とが対応していた。またAVの背内側亜核は前海馬台のⅠ層に，内外側亜核は前海馬台外固有層の中型細胞領域へ投射し，表層の小型細胞領域には投射軸索の分布を欠いた。AM核からはRSAの他に嗅内野へも投射があり，主として分離板の下部に分布するほかⅠ層Ⅵ層にも標識終末が見られた。AD核からの投射軸索はRSGから後海馬台に連続し，さらに前海馬台外固有層の傍海馬台よりに分布したが，RSAと傍海馬台への分布は見られなかった。

(2) tenascin 遺伝子の発現をマーカーとした海馬アストログリアの発生様式の検討

湯浅茂樹（生理研）

tenascin はアストログリアによって産生される細胞外基質分子であるとともに，胎生期神経上皮細胞においてすでに遺伝子発現が認められる。神経上皮において tenascin 遺伝子を発現する細胞は皮質に移動して，周生期以降にアストログリアの分化マーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) 免疫陽性となる。したがって，tenascin 遺伝子発現細胞はアストログリア前駆細胞と考えられる。本研究においては，海馬アストログリアのマウス胎生期から新生仔期における発生様式を，tenascin 遺伝子の発現を指標として，in situ hybridization により検討した。海馬アストログリアは皮質層構造の分布領域によって異なった形態を示す。特に歯状回に層状に配列するアストログリアは単極性に放射状突起を伸張する特徴的な形態を示し，星状の形態を示すものとは異なった発生経路をとることが予想されるため，特にこの領域に注目して解析を行なった。

胎生15日海馬原基において tenascin 遺伝子は脳室面神経上皮に強く発現しており，海馬采に隣接した限局された部位から標識細胞が移動を開始した。胎生16～17日になると，標識された細胞移動の流れは軟膜下実質内を接線方向に移動し，形成されつつある歯状回に集積した。生後2日になると標識細胞は歯状回に層状に配列し，抗 GFAP 抗体を用いた2重標識により tenascin 遺伝子発現細胞は GFAP 免疫陽性の単極性の放射状突起を軟膜方向へ伸張していた。また，これらの細胞は BrdU との2重標識で分裂能を示した。

一方，アンモン角領域へは胎生17日以降，側脳室に面した広い領域の神経上皮より標識細胞が放射状に移動し，生後2日には皮質に分布した tenascin 遺伝子発現細胞は GFAP 免疫陽性の星状突起をもつアストログリアに分化した。

さらに，アストログリア前駆細胞の移動経路に一致して GFAP 免疫陽性の放射状グリアの突起配列が認められ，これらの突起配列は歯状回ならびにアンモン角への神経細胞の発生移動経路とも一致していた。

以上の所見から，海馬アストログリア前駆細胞は分布する層構造に対応して発生母地と発生時期，移動経路が異なることが明らかになった。さらに，その移動には神経細胞の移動と共通のガイド機構が関与することが示唆された。

(3) 海馬錐体細胞のカルシウムスパイク

伊藤憲一，三浦正巳，加藤宏司（山形大・医・第二生理）

この実験では，海馬錐体細胞がカルシウムスパイクを発生しうるのか，そしてこのスパイクが

発生した時どの程度の細胞内カルシウムの変化をきたすのを調べた。モルモットの海馬スライス標本(500μm)を用いて，CA1錐体細胞にカルシウム蛍光指示薬であるfura2を細胞内注入し，細胞内のカルシウムの変化と膜電位を同時記録した。刺激としてCA2/CA3領域の尖頭樹状突起層にタングステン電極を置き，30Hzで20発のパルスをシナプス入力として加えた。

これまでの我々の実験から，標準の人工脳脊髄液ではNaスパイクに対応したカルシウム上昇が見られるが，それ以外のカルシウム上昇成分は前者に比べ非常に僅かであった。少なくとも，この条件下では，カルシウムスパイクに相当する電位変化と細胞内カルシウム変化は観察されなかった。他方，錐体細胞にシナプスを形成している数種類の抑制性ニューロンが，錐体細胞の細胞内カルシウムの調節に重要な役割を果たしていることが，ムスカリニック・アセチルコリン受容体の薬理学的実験から明らかになった。そこで，抑制性入力をブロックするために$GABA_A$受容体の拮抗薬であるPicrotoxin (10μM)とBicuculline (25μM)を灌流液に加えて同様のシナプス入力を加えると，非常に半値幅の狭いスパイク(<1ms)と幅の広いスパイク(>5ms)と緩除なシナプス電位の3種類の電位が記録された。この時，これらのスパイクに対応した細胞内カルシウム上昇が，細胞体を中心として，尖頭及び基底樹状突起層で観察された。しかし，このカルシウム上昇がこれまでに報告されているNaスパイクによるものなのか，あるいはカルシウムスパイクによるものなのか区別することは出来ないので，Naスパイクを細胞内からブロックするためにNaチャネルブロッカーであるQX-314 (25-50μM)をfura2と一緒にガラス電極に詰めて，細胞内に注入しシナプス刺激を加えた。その結果，尖鋭なスパイクは消失し，幅の広いスパイクと緩除なシナプス電位が残ったが，カルシウム上昇はQX-314注入前とほとんど変わらなかった。そして，刺激を弱めると，この幅の広いスパイクは全か無の法則に従う反応を示し，それに伴ってカルシウム上昇反応も消失／出現を示したことから，この幅の広いスパイクをカルシウムスパイクと判定し，海馬CA1領域の錐体細胞はカルシウムスパイクを発生しうると結論した。

この結果から，カルシウムスパイクの発生は，抑制性入力により活性化される$GABA_A$受容体によって抑圧されていると考えられる。In vivoでは興奮性入力が錐体細胞に入った時，抑制系が少ない場合にはカルシウムスパイクが発生し，細胞内カルシウムが一過性に増大して，これによってトリガーされる細胞内変化（例えば長期増強）が引き起こされる可能性があると考えた。

(4) 海馬ニューロンのCa^{2+}透過性AMPA型グルタミン酸受容体チャネル

伊佐　正，小澤瀞司（群馬大・医・第二生理）

筆者らはラット海馬の単層培養標本で内向き整流特性と高いCa^{2+}透過性を示すAMPA型グルタミン酸受容体を特異的に発現しているニューロン（Ⅱ型ニューロンと略す）を見い出した。単一ニューロンRT-PCR法によりこれらのニューロンのAMPA受容体のサブユニット構成を調べ

たところ，受容体 GluR1, GluR4 サブユニットから成り，GluR2 サブユニットを欠いていた。またⅡ型ニューロンは小型の非錐体細胞であり，GABA 合成酵素 GAD を発現していることから，これらのニューロンが抑制性介在ニューロンであることが示唆された。

培養標本で見い出されたⅡ型ニューロンが海馬のどの部位に存在するのか，Ca^{2+}透過性 AMPA 受容体が実際に興奮性シナプス伝達を担う受容体であるのかを明らかにするために，ラット海馬切片の非錐体細胞を対象として Whole-cell patch-clamp 法により AMPA 受容体の特性を調べたところ，Ⅱ型ニューロンは海馬の広範な領域，特に CA1, CA3 野の放線層，歯状回の分子層に多く存在することが明らかになった。また局所刺激によってこれらのニューロンに発生する EPSC の CNQX 感受性成分は顕著な内向き整流特性を示した。これらのニューロンでは内向き整流特性と高い Ca^{2+}透過性は常に相関していることから，内向き整流特性と高い Ca^{2+}透過性をもつ AMPA 受容体が興奮性シナプス伝達の受容体として機能していることが結論された。現在，単一ニューロン RT-PCR 法によりこれらのニューロンの AMPA 受容体のサブユニット構成を調べているが，海馬切片の 7 個のⅡ型ニューロンすべてで GluR2 サブユニットの発現を検出していない。

(5) 光学計測による遅い CA3-CA1 伝達の検出とアデノシンの関与

関野祐子（新技団さきがけ21）
小幡邦彦（生理研）
落石知世（工技院・生命工学研）

ラット海馬スライス内 CA3 領域への入力線維 (mossy fiber) を電気刺激し，CA1 領域で電気的な応答が記録されたスライスでは，Schaffer 側枝を介する速い CA1 への伝播と，CA2 領域を介すると考えられる遅い CA1 への伝播の 2 種類があることが光学計測により明かとなった。CA2 領域は CA3 と CA1 の移行部であり，その生理的機能の特性はこれまでほとんど解析されていなかった。そこで我々は，この CA2 領域の海馬内興奮伝播における役割に着目した。

mossy fiber を電気刺激しても，CA2 および CA1 領域では電気的および光学的な応答が記録されないスライス標本で，アデノシンによる抑制を，A1 受容体拮抗薬 (8-cyclopenty ltheophylline) により解析した場合の興奮伝播の様子を比較した。アデノシンによる抑制を解除すると，mossy fiber 刺激により CA2 領域の興奮が誘発されるようになり，CA1 領域の遅い興奮伝播が field potential 計測および光学測定により観察されることが判明した。

今回，CA2 領域が通常の海馬内シナプス伝達に関与していることを明らかにした研究，CA2 のアデノシン A1 受容体拮抗薬に対する反応を調べた研究および精製したアデノシン A1 受容体蛋白に対するウサギ抗血清による免疫組織染色により，アデノシン A1 受容体が他の領域に比較

してCA2領域への局在性が高いことを示唆する研究を報告した。

(6) 海馬スライス苔状線維―CA3野系LTP発現に伴うグルタミン酸遊離の増大

前田武彦（京都大・薬・薬理）
佐藤公道（京都大・薬・分子作用制御）

我々は海馬スライス苔状線維―CA3野系LTPが，海馬内の他の経路のLTPとは，薬物感受性，および誘導機構の点で，異なることを明らかにしてきた。そこでLTP発現機構を明らかにするため，自発性シナプス後電流(sEPSC)の解析と，伝達物質遊離検出の二つの実験を行った。ラット海馬スライスのCA1野放線層，または歯状回顆粒細胞層へ刺激電極を刺入し，CA1野またはCA3野錐体細胞からそれぞれ誘発性シナプス後電流(eEPSC)の記録を行った。sEPSCの記録は，テトロドトキシンの灌流適用下行った。CA3記録においてテタヌス後，eEPSCの振幅が増大するLTPが発現した。この時，sEPSCの頻度は増大したが振幅は変化しなかった。一方，CA1記録においてはテタヌス後，sEPSCの振幅が増大したが，頻度は変化しなかった。この実験とは別に，錐体細胞膜より作製したアウトサイドアウトパッチ(OP)電極をCA1野放線層，またはCA3野透明層の表面上に固定し，苔状線維またはSchaffer側枝の電気刺激により遊離される興奮性アミノ酸を検出する系を確立し，このOP電流と錐体細胞からのホールセル電流の同時記録を行った。その結果，CA3野ではLTP発現に伴いOP電流の増大が観察されたが，シナプス後細胞へのAMPA適用により誘発されるWC電流の振幅に変化は認められなかった。CA1野ではLTPに伴い，AMPA誘発性WC電流の振幅増大が観察されたが，OP電流に変化は認められなかった。以上，二つの実験結果から苔状線維―CA3LTP発現時には，シナプス前終末からの伝達物質遊離増大が，またSchaffer側枝―CA1LTP発現時には，シナプス後細胞の応答性増大の可能性が示唆される。

(7) 海馬切片神経活動に対するグルコースおよびその代謝物質の効果

和田　浩，岡田安弘，鍋谷まこと，小林恵三（神戸大・医・第一生理）

無グルコース時およびグルコースの代りに，他の中間代謝物質で置換時のそれら物質の神経活動とエネルギー代謝に対する効果を知る目的で，成熟モルモットおよび幼若・成熟ラットから海馬切片を作成し，神経活動を記録するとともに，切片のATP, CrPを測定した。

グルコース(10mM)を灌流液から除去した場合，成熟脳からの海馬切片においては切片ATP,

CrPの減少は緩除で，グルコース除去後60分後でもとの70％に減少したが，CA_3野錐体細胞層で記録されるシナプス電位（場の集合電位）は30分で消失した。これは錐体細胞（CA_3野）の細胞内誘導においても確認され，シナプス電位消失，スパイクの消失，逆行性電位の消失，静止膜電位の脱分極が順次に引き起こされた。グルコースの代りに乳酸(5mM)，ピルビン酸(5mM)，β-OH-酪酸(5mM)で置換した場合，ATP，CrPなどのエネルギーレベルは高く維持されているにも拘らず，神経活動は維持されなかった。これはシナプス電位の維持にはグルコースの存在あるいはグルコースの嫌気的代謝の回転が重要であることを示唆している。同様な実験を発達時のラット脳からの海馬切片で行なうと，生後4日目の脳からの切片においては，乳酸の投与で神経活動，ATPともに長期に維持されたが，生後7日，10日，13日，16日のラット脳での結果は成熟脳の結果と同様であった。

これらの結果から成熟脳においては，神経活動の維持には嫌気的代謝が重要な意味をもつが，幼若脳においては嫌気的代謝，好気的代謝ともに神経活動の維持に関与する可能性が示唆された。

(8) 酸性線維芽細胞増殖因子の学習・記憶促進―正常および病態

大村　裕（日本臓器製薬・生物活性）
佐々木和男（富山大・工）
李　愛軍（九州大・医）
木村　宏，遠山育夫，花井一光（滋賀医大）

摂食あるいはブドウ糖投与によって血糖値が上昇すると脳脊髄液中のブドウ糖濃度が上昇し，これに反応して脳室壁の上衣細胞から酸性線維芽細胞増殖因子(aFGF)が遊離され，脳実質内を拡散する。まず摂食中枢に到着して摂食を抑制した後，2時間後には，海馬などのニューロン内に取り込まれている。

1．aFGFの生理学的作用：マウスにブドウ糖投与後，受動性回避学習あるいはモリス水迷路学習を行うと，投与2時間目が有意に学習・記憶を促進させる。これらは，抗aFGF抗体を脳室内に前処理として入れておくと起こらない。またラットにaFGFを持続的に脳室内に投与すると，受動的回避学習による記憶促進は日とともに増大する。aFGFは海馬でシナプス電位の長期増強(LTP)を促進するが，海馬内の転写因子zif/268は変化しない。これらのことは，摂食により内因性aFGFが学習・記憶に促進的に作用したことを示している。

2．aFGFの病態生理学的作用：SAM（老化促進モデルマウス）P8の生後3ヵ月目から週1回aFGFあるいはaFGF(1-15)や[^{16}AL]aFGF(1-29)の皮下投与で，生後10ヵ月間，対照食塩水投与に比し，有意に学習・記憶を正常に維持できた。Acetylcholine transferase (ChAT)活性検索で，海馬に投射する内側中隔のコリン作動性ニューロン内ChAT含有量は対照群で著明に減少して

いるが，aFGF 群は正常マウス R1 に近い。ムスカリン受容体密度は海馬ニューロンで，NMDA 受容体密度は大脳皮質で，aFGF 投与群は有意に高い。また，海馬の aFGF 受容体密度は対照群で低下するが aFGF 群では正常である。aFGF 群では LTP 促進がみられるが対照群ではみられない。これらのことから aFGF およびそのフラグメントが SAM の脳機能老化防止に有効であることを示している。さらに SAMP8 の加齢による T 細胞性免疫低下が aFGF 群では正常化している。これらのことは脳機能と T 細胞性免疫機能とが密接に関連していることを示している。

(9) ニューロンの異常発火と組織学的変化との関連

小山生子（小山クリニック）

猫大脳皮質運動野に作ったコバルト (CO.) 誘発癲癇症の焦点野を摘出し，Golgi 染色を行うと，光学顕微鏡下に異常を呈す錐体細胞と，ほぼ正常と思われる錐体細胞とが入り乱れている像が観察される。異常錐体細胞とは，主として先端樹状突起上の膨隆部出現，スパイン消失，更に細胞体変形等である。やや正常と見られる錐体細胞は，正常な細胞体を有し，わずかにスパインの減少を遠位の樹状突起上に認められるに過ぎない。

更に焦点における異常発火（バースト細胞）を呈する細胞を HRP 標識して観察すると光学顕微鏡下には，ほぼ正常な形態をもつ大錐体細胞並びに，スパイン星状細胞等であった。この大錐体細胞を電顕下に観察すると，先端樹状突起上のスパインの変形とスパインの消失が著明である。すなわち，スパイン頭部のシナプス後膜の異常な拡大と，スパイン頭部凹状変形 (Concaved) し，神経終末部を完全に包み込む形態をしているのが特徴的である。これらの錐体細胞はグルタミン酸抗体陽性（gl. 陽性）で，その先端樹状突起上のスパインには，gl. 陽性終末がシナプスを形成している。従ってこのスパインの変形は，入力神経終末より gl. の過剰放出の結果と推測される。

また錐体細胞体表面に終る GABA 陽性シナプスは，シナプス小胞の消失が著明であった。

以上の結果から，CO. 誘発癲癇症焦点野ニューロンの異常発火は，ニューロンへの入力の異常に起因すると考えられる。

(10) 海馬錐体細胞樹状突起の興奮性とてんかん発作

丸　栄一，大津　洋（日本医大・第二生理）
芦田　廣（防衛医大・第二生理）

一般に，神経細胞の樹状突起は他の神経細胞から電気的興奮や抑制情報を受け取り細胞体に伝

える受動的な役割しか果たしていないと考えられてきた。しかし，近年，樹状突起も細胞体と同様に活動電位を発生させて情報を統合するという積極的な役割を担っていることが明らかにされつつある。本研究では，興奮性シナプス入力を受けて樹状突起のいかなる部分で活動電位が発生し，どのように伝導するかを慢性電流源密度解析法を用いて検討した。さらに，キンドリング刺激中およびてんかん発作発現時に，このような樹状突起活動電位の発生と伝導がどのように変化するかについても検討を行った。

正常海馬 CA1 錐体細胞では，単発の海馬交連刺激により，集合活動電位が細胞体から 400μm 離れた尖頭樹状突起部で初発し，0.1m/sec から 1.0m/sec の速度で細胞体部に向かって伝導した。この時，集合活動電位の吸い込み電流量は細胞体部に向かうにつれ増大し，細胞体部で最大電流量に達した。

一方，5Hz の海馬交連刺激（キンドリング刺激）中では，正常時に樹状突起中央部および先端部で発生していた集合活動電位は次第に抑制され，樹状突起起始部または細胞体部で優勢に発生するようになった。樹状突起起始部および細胞体部で発生した集合活動電位の多くは樹状突起上をその先端部に向かって逆行的に伝導した。後発射 (afterdischarge) 出現中も同様な活動電位発生の異常が観察された。さらにキンドリングてんかん焦点の形成が進むと，発作間欠期でも樹状突起中央部および先端部での活動電位発生は抑制され，樹状突起起始部および細胞体部での活動電位発生が著しく促進されるようになった。

以上の結果は，樹状突起の異常興奮が発作の発現において重要な役割を果たしているという従来の予想を支持するものではなく，逆に，発作の発現における樹状突起興奮性低下の重要性を示唆するものである。

(11) けいれん準備性における海馬の役割

板野俊文（香川医大・生物学）

けいれん準備性はどの様に，また脳のどの部分に記憶されているのかを明らかにするため，海馬を中心に解析を行っている。今回はヒト側頭葉てんかんのモデルであるキンドリングを用いて，ラット海馬におけるけいれん準備性の保持を，生化学的にまた形態学的に検索した。

扁桃体に双極性の慢性電極を挿入し，閾値下の双極性矩形波で１日２回刺激する。徐々に既に決定されているステージ (C1-C5) に従い，けいれんのステージが上昇し，15から20回の刺激で，強いけいれんを伴う後発射を得る。一度この準備性を獲得したラットはほぼ生涯にわたり準備性を保持しており，通常はけいれん発作は表さないが，弱刺激にも感応し，強いけいれん発作を示す。

脳内微小透析法を用いて，グルタミン酸，アスパラギン酸，および GABA を測定した。ステージにともない，細胞外のグルタミン酸と GABA 濃度は上昇したが，アスパラギン酸はほとんど

変化がなかった。次に亜鉛の分布を検討した。CA3 の反回側枝の部分に新しい沈着が認められたことより，促通性のシナプス形成が示唆された。さらに通常の光学顕微鏡レベルでも，詳細に細胞面積や単位面積当たりの細胞数を計測し，統計処理を行うと，DG や CA1 において有意差が認められた。

これらの変化はまだ強いけいれん発作を示さないステージより始まっており，異常神経細胞興奮による結果ではない。よってけいれん準備性は海馬に痕跡をとどめており，形態変化を伴うような半永久的なものであることが判明した。またこの回路を遮断するような神経細胞の移植によって改善される事からも，けいれん準備性における海馬の役割が明らかであることを証明した。

(12) ラット海馬体ニューロンの文脈応答性

小野武年，西条寿夫，小林恒之（富山医薬大・医・第二生理）

ラット海馬体から43個の複雑スパイク型細胞の単一ニューロン活動を記録した。そのうち37個が場所ニューロンであった。これらの場所ニューロンの応答性を，オープンフィールド内のランダムな場所で報酬を獲得する空間学習課題と，報酬呈示の文脈を変え，特定の場所で報酬を獲得する空間学習課題を用いて比較した。その結果，場所フィールドは変化しなかったが，特定の場所で報酬を獲得する空間学習課題では，行動学的変数（ラットの移動速度，移動方向，回転角度）にたいする応答性が顕著になった。また，31個の場所ニューロンのうち 6 個では，報酬を呈示する場所を変えるとその場所に新しい場所フィールドが出現した。以上の結果から，ラット海馬体の場所ニューロンは，環境内の外的情報および歩行移動中の内的感覚など，様々な情報を状況に応じて柔軟に処理し，環境内における自己の居場所を表現していると考えられる。

(13) ラットの虚血性海馬体損傷と空間記憶障害に対するカルシウムチャネル遮断薬の効果

田村了以，小野武年（富山医薬大・医・第二生理）
中田泰史（富山化学工業）

海馬体 CA1 領域は，低酸素状態に対する感受性が高く，一過性脳虚血により顕著な遅発性神経細胞壊死が起こる。この神経細胞壊死の発現過程には，細胞外または細胞内小器官から細胞質内へのカルシウムイオン流入の関与することが示唆されている。本研究では，ラットで，15分間の一過性脳虚血を行い，虚血性脳障害に対する中枢性カルシウム遮断薬 (tamolarizine) の効果を，

行動学的（場所学習記憶課題）および病理組織学的に解析した。その結果，tamolarizine 投与群ラットでは，非投与群と比較して，一過性脳虚血による場所学習・記憶の障害，および，海馬体 CA1 領域の選択的神経細胞壊死が軽度であることが明らかになった。これらのことから，tamolarizine による細胞質内へのカルシウム流入の遮断は，海馬体 CA1 領域の選択的神経細胞壊死を予防し，その結果，場所の学習・記憶機能が維持されることが示唆された。

⑭ 幼若砂ネズミにおける脳虚血後の Heat shock protein の発現

新井　一，佐藤　潔（順天堂大・医・脳神経外科）

〔目的〕 私達はこれまでに幼若砂ネズミ脳が虚血抵抗性を有していることを明らかにしてきた。今回は，虚血後の幼若動物脳における Heat shock protein (HSP) の発現を免疫組織学的手法により解析した。**〔方法〕** 1）14日齢砂ネズミの両側総頚動脈を，30分閉塞した。実験動物を，血流再開後30分間の直腸温をコントロールしなかった群 (group1) と，37℃ (group2) と38℃ (group3) に維持した群の 3 群に分けた。2）血流再開後72時間後に動物脳を灌流固定し脳切片を作製，これらを HSP70 に対する monoclonal antibody を用いて免疫組織学的に染色した。3）別の実験動物では血流再開 7 日後に動物脳を灌流固定し，脳切片を Crystal violet にて染色，海馬 CA1 領域の生存神経細胞数を算定した。**〔結果〕** 1）group1 および group2 の動物の海馬では，海馬 CA1 と歯状回に HSP の発現を認めた。group3 では海馬 CA1, CA3 そして歯状回に HSP の著明な発現をみた。2）14日齢動物の両側頚動脈を30分間閉塞すると，group2 では海馬 CA1 の錐体神経細胞の約1/3が死滅した。また，group3 では約半数の動物が死亡したが，生存した動物の海馬 CA1 には著名な神経細胞壊死巣が発現した。しかし，group1 では海馬 CA1 に明らかな神経細胞壊死巣をみることはなかった。**〔考察〕** 脳虚血後に神経細胞に発現する HSP が，どのような生物学的作用を有しているかは未だ明らかではない。今回の実験では，HSP の発現は必ずしも神経細胞の生存に必須ではなく，むしろ動物脳に加わった虚血及び熱負荷の程度を反映する結果となった。

(15) トリメチル錫による海馬損傷と一酸化窒素合成酵素(NOS)含有細胞について

金井裕彦，加藤進昌（滋賀医大・精神科）
池田正行（東京医歯大・神経内科）
赤池雅司（ヘキストジャパン医薬総合研）

Trimethyltin hydroxide (TMT) をラットに経口投与する事によって記憶障害や自発けいれんが見られるが，このような作用はTMTによる脳組織傷害と関連して起こると推測される。我々はTMTによる海馬損傷に注目し，海馬の一酸化窒素合成酵素(NOS)含有細胞に対するTMTの影響について検討した。

Sprague-Dawley rats（6週齢，雄性）に，TMTの水溶液9mg/kgを単回経口投与した。TMT投与後10日目，2週間後，6週間後に屠殺し，Nissl染色およびNADPH diaphrase (NADPHd)染色を行った。また，TMT投与後5日目のラットを用いて海馬のconstitutiveNOS活性を測定した。

NADPHd染色の結果，NADPHd陽性細胞（NOS含有細胞）であるCA1および海馬interneuronはTMT投与によるCA3/4錐体細胞脱落後も保持されていた。さらに，TMT投与後5日目の海馬NOS活性はコントロール群と比較して有意な差はなかった。組織学的所見とあわせて考えるとNADPHd陽性細胞はTMTによる組織毒性に対して比較的抵抗性であると思われる。一酸化窒素(NO)は逆行性神経伝達物質の候補となっており，海馬内でも長期増強への関与が示唆されるなど神経伝達への関与が注目されている。しかしながら，TMTの効果が顕在化する5日目において，constitutive NOSに組織学的，生化学的変化は認められなかった。

ちなみに，従来の報告ではNADPHd染色ではCA1はNADPHd-negativeと言われていたが，固定法によっては染まることが最近になって報告されている。さらに，歯状回（特にupper blade）のinner molecular layerが中等度に染色された。また，CA3/4の変性に伴い，同部にNADPHd陽性細胞の出現が見られた。これはinducible NOSが発現したgliaと思われた。

(16) トリメチル錫投与ラットにおける海馬苔状繊維の発芽

赤池雅司（ヘキストジャパン医薬総合研）
加藤進昌（滋賀医大・精神科）

トリメチル錫は錫化合物の中でも強い神経毒性を示すことが知られている。ラットに単回投与すると投与数日後より自発運動の増加，自傷行動，放射状迷路やモーリス迷路での空間学習障害がみられ，病理組織学的には海馬錐体細胞の脱落が観察される。しかしながら，空間学習障害は試行を繰り返すことにより対照群のレベルに到達する。

今回，Trimethyltin hydroxide （以下 TMT）9mg/kg を SD ラットに単回経口投与し，経時的に海馬苔状繊維を観察（Timm 染色）した。

投与 2 週目より 1 年後まで観察した結果，CA 野全体の染色は薄くなったが，苔状繊維の発芽がみられ，時間経過とともに顕著になった。CA3-4 の錐体細胞の脱落およびグリア細胞の増加が顕著であった。

一方，TMT の神経毒性は副腎摘出により重度となり副腎皮質ホルモンを補充することにより軽減されるとの報告がある。ステロイド受容体が海馬に存在することから，TMT の神経毒性とステロイドとの関係は興味深い。

そこで，副腎摘出あるいはコルチコステロン補充ラットを作製し，TMT を投与したときの苔状繊維の変化について検討した。

副腎摘出 (ADX) およびコルチコステロン補充ラット (ADX ＋ CS) では苔状繊維の変化はみられなかった。副腎摘出ラットに TMT を投与した (ADX ＋ TMT) 動物では，ADX ＋ CS ＋ TMT 動物に較べ，細胞脱落および苔状繊維の発芽が顕著であった。

以上の事から，細胞脱落により苔状繊維が発芽し，機能回復に関与している可能性が推測されるが，発芽が永続的であることは機能回復のみに関与しているとは考えられなかった。また，TMT の神経毒性におけるコルチコステロンの役割については今後検討を要する。

(17) Mild hypothermia の脳保護作用—実験的，臨床的考察—

宮澤隆仁（防衛医大・脳神経外科）

Profound hypothermia が患者の脳を保護する上で極めて有益であることは古くからよく知られている。最近，2－3℃の脳温のわずかな低下が虚血性脳障害や外傷性脳損傷を軽減することが明らかとなり，多くの動物実験により確認された。ところが，動物では種により脳冷却システムが異なっていること，また実験中の体温および脳温の管理に細心の注意を払わないと実験結果が容易に修飾されることを認識する必要がある。mild hypothermia の有効性のメカニズムは極めて multi-factorial であり，特定するには至っていない。実験的に，mild hypothermia は脳虚血による glutamate 増加を抑制するが，外傷による glutamate 増加を抑制しないので，必ずしもすべてを glutamate theory のみで説明することはできない。従って，未知のメカニズムが存在する可能性は十分にある。臨床においては mild hypotehrmia を頭部外傷患者に対応して応用し始めており，その効果を実証する報告も散見される。しかし，心不整脈，凝固異常，出血，感染などの合併症が依然として問題となっており，特に rewarming 時の出血に対する対策は急務である。冬眠動物では，冬眠中完全な脳虚血状態となるが覚醒後は何ら神経症状を残すことはない。そのメカニズムは全く明らかでなく，サイトカインなど何らかの液性因子の関与が示唆されており，

mild hypothermia との関連で興味深い。

(18) 一過性脳虚血後にサル海馬に生ずる遅発性神経細胞死

山嶋哲盛，山下純宏（金沢大・医・脳神経外科）
滝田正寿（工技院・生体情報）
西道隆臣（臨床研・遺伝情報）
小野武年（富山医薬大・医・第二生理）
吉岡　亨（早稲田大・人間科学部）

一過性脳虚血後に CA-1 ニューロンに生ずる遅発性神経細胞死の成因に関しては，現在なお不明な点が多い。今回我々は，ニホンザルを用いて Ca イメージングと IP_3 解析，ウエスタンブロット，免疫組織化学的ならびに電顕的な検索を行い，その成因に関して考察した。

実験方法としては，開胸による腕頭および鎖骨下動脈の20分間クランプ *(in vivo)* と海馬スライスの20分間低酸素一低ブドウ糖刺激 *(in vitro)* の二つのアプローチを用いた。

結果：36℃での低酸素一低ブドウ糖刺激後には CA-1 に特異的に Ca 動員が見られ，*in vitro* の Ca 動員領域は *in vivo* 標本の遅発性死領域と完全に一致した。Ca 動員の程度は33℃で半減し29℃で約５％となったが，同様に，IP_3 も CA-1 において刺激後には温度依存性の低下を示した。さらに，免疫組織化学的に CA-1 ニューロンの PIP_2 染色性も刺激後に温度依存性の増加を示した。一方，活性型のμカルパイン（Ca 依存性のプロテアーゼ）のみを認識する抗体を用いると，*in vivo* 標本のウエスタンブロットおよび *in vitro* 標本の免疫組織化学の両者において，虚血後に CA-1 ニューロンに特異的にμカルパインの活性化が見られた。電顕的には一過性脳虚血後の CA-1 ニューロンにはライソゾームの空胞化が見られた。上記抗体を用いて免疫電顕を行うと活性型のμカルパインを示す DAB の局在は空胞化したライソゾーム膜に一致して見られた。

結論：一過性脳虚血後に CA-1 ニューロンに生ずる遅発性神経細胞死の成因として，PI 加水分解による内在性の Ca 動員→μカルパインの活性化→ライソゾーム膜蛋白の限定分解→ライソゾーム酵素の放出が推定される。

(19) 虚血と神経細胞死―培養細胞実験系を中心として―

中村洋一，辻　浩二，片岡喜由（愛媛大・医・第一生理）

虚血による神経細胞死の引き金は細胞外グルタミン酸濃度上昇である。培養神経細胞に興奮性

アミノ酸を短時間暴露すると，その後ゆっくりと細胞死が観察され，in vitro における虚血神経細胞死のモデルとされている。この実験系で最近得られた我々の知見を話題提供する。

NO 合成酵素阻害剤として知られる diphenyliodonium (DI) が細胞死を防禦することを見出したが，その作用機序は予想に反し，NMDA 受容体を直接ブロックすることによる Ca^{2+} 流入阻害であった。

興奮性アミノ酸暴露により細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察されるが，その程度はせいぜい 1μM 程度にとどまる。しかしながら，^{45}Ca を用いての測定では細胞内への流入量は細胞内濃度に換算すると数 mM に相当した。

In vivo においては虚血により枯渇した ATP は一旦回復し，再灌流後 2 日後以降再度減少し遅延性に神経細胞死が起こる。培養神経細胞をグルタミン酸に短時間暴露した場合は ATP は連続的に減少し，回復相は見られなかった。

グルタミン酸暴露による培養神経細胞の細胞死の主要な原因は膨大な量の Ca^{2+} の流入であるが，in vivo において虚血再灌流後にみられる遅延性神経細胞死では，それに加えて他の要因（例えばミクログリアの増殖・活性化等）をもっと重要視する必要がありそうだ。

2．シナプスの形成・維持・可塑性

1995年12月14日～15日
代表者：小田洋一（大阪大・基礎工）
世話人：丸山　敬

(1)　嗅球―終脳神経回路の形成機構について
平田たつみ（名古屋大・理）

(2)　シナプス特異結合の分子メカニズム
能瀬聡直（基生研）

(3)　培養皮質細胞上に記録される Silent Synapse とその活性化
木村文隆（大阪大・医）

(4)　非神経細胞における神経伝達物質放出の再構成
森本高子（国立精神神経センター）

(5)　脳のカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅣの活性制御機構
奥野幸子（旭川医大・第一生化学）

(6)　カルシウム依存性リン酸化酵素による CREB の転写調節
萩原正敏（名古屋大・医）

【討論参加者】

平田たつみ（名古屋大・理），木村文隆，畠　義郎（大阪大・医），森本高子（国立精神神経センター），奥野幸子（旭川医大・第一生化学），萩原正敏（名古屋大・医），笠井陽子（三菱化学生命研），武内恒成，内田洋子（東京都老人研），武井延之（京都工繊大・繊維），添田博充，辰巳仁史，俣賀宣子（東医歯大・難治研），平野丈夫（京都大・医），真鍋俊也（東京大・医），斉藤祐見子（東京都臨床研），小田洋一，山本亘彦，斉藤康彦，森田眞弘，川崎圭祐（大阪大・基礎工），関野祐子（新技団さきがけ21），斉藤佳子（東京都神経研），白尾智明，吉原基二郎，五十嵐道弘，林　謙介，田中聡一，呈　希彤（群馬大・医），伊丹千晶（東京農工大・電子情報工学），田中正彦，澤田　誠（藤田保衛大・総医研），東　秀二（京都府医大），今泉美佳（上智大・生命科学研），能瀬聡直（基生研），小幡邦彦，湯浅茂樹，淺田英穂，児島伸彦，山肩葉子，川村勇樹（生理研）

【研究会概要】

本研究会では，ニューロンが正しい標的細胞を見つけてシナプス結合をつくり，シナプスが伝達機能を獲得し，さらに可塑性を発揮する過程と機構について，３つのセッションを設けて講演と議論を行った。セッション１「神経成長・シナプス形成因子」では，平田氏が嗅球から終脳への投射経路に僧帽細胞に特異的な分子からなる誘導路の存在を示唆され，能瀬氏はショウジョウ

バエの神経－筋結合を材料に神経標的認識の誘引シグナルと阻害シグナルおよびシグナルの冗長性について明解な成果を発表された。セッション2「シナプス伝達機構の形成と活性化」では，木村氏がラット皮質視覚野細胞の孤立培養系でできるautapseを用いてサイレントシナプスの存在を示し，森本氏は非神経細胞である線維芽細胞にシナプトタグミンを発現させると脱分極に依存した神経伝達物質放出が残ることを発表された。セッション3「シナプス可塑性と蛋白質リン酸化」では，奥野氏が脳の3つのカルシウム／カルモジュリン依存性蛋白質リン酸化酵素(CaMK)のなかで特にCaMK-IVがリン酸化により活性化される機構を丁寧に説明された。萩原氏はcAMPやカルシウムによるCREBのリン酸化が誘導する転写調節ネットワークについて精力的な研究結果を発表され，更にそれが神経細胞への入力によって起こる興味深い事例を紹介された。

本研究会には30才代の研究者を中心に集まっていただき，研究発表にとどまらず十分な議論を行うために，(1)各講演のアブストラクトを参加者には事前に配布し，(2)各講演者には必ず研究の背景と結論を明示した上で専門分野以外の人にも理解しやすいように平易に説明していただくことをお願いし，さらに(3)オーガナイザーにははじめにoverviewをしていただいた。また，(4)各講演を40分にし討論の時間を30分以上確保した。その結果，各々の研究の背景や実験が手に取るように理解でき，問題の核心に関して次々にホットな議論が飛び交った。討論では，それぞれの現象を単なる実験標本でおこるものとしてとらえるのでなく，生体内で実際に機能しうるかに着目した活発な議論がたびたびなされたことが印象的であり，大変意義深いブレイン・ストーミングになった。

(1) 嗅球―終脳神経回路の形成機構について

平田たつみ（名古屋大・理）

発生時に，嗅球の僧帽細胞はその軸索を終脳の尾側に向かって伸長し，嗅索を形成する。その後，僧帽細胞の軸索は側糸を形成して終脳古皮質にある標的に侵入し，ここの神経細胞とシナプス結合をつくる。この嗅球－終脳神経回路は，構造が比較的単純である等の理由から，形態学的および生理学的に古くから研究されてきた。しかし，その回路形成の分子的な機構についてはいまだ何も明らかにされていない。

我々は僧帽細胞に特異的に発現する膜蛋白質ニューロピリンをマーカーに用いてこの神経回路形成機構の解析を進めている。僧帽細胞の軸索がまだ終脳から伸びだしていない時期のマウス胚終脳をメンブレンフィルターの上で培養すると，培養下でも僧帽細胞の軸索が伸長する。この軸索伸長のパターンは時間的にも空間的にも生体内での伸長パターンと完全に一致していた。そこで嗅球断片と終脳の様々な領域とを組み合わせて培養し，僧帽細胞の軸索がどの様な対応をするかを検討した。僧帽細胞の軸索は嗅球断片を予定嗅索領域と密着させて培養した時にのみ，嗅索

様の細い束を形成して伸長した。この軸索の伸長には，予定嗅索域内に嗅球からの軸索があらかじめ存在している必要はなく，終脳自身に軸索伸長を誘導するCueが備わっていると思われた。さらにこのCueは終脳内で非常に厳密に局在しており，特異的に僧帽細胞の軸索に作用すると考えられた。

現在までのところ，僧帽細胞の軸索伸長を促進する分子は報告されていない。我々は，マウス胚の終脳中に僧帽細胞の軸索伸長を制御する分子があると考え，解析を行った。その結果，終脳の古皮質と新皮質から調製した細胞膜分画に，僧帽細胞の神経線維の伸長を促進する活性があることを見いだした。これは蛋白質性の因子であり，神経細胞が合成していると考えられた。一方，中隔野，間脳および中脳から調製した膜分画には神経線維伸長促進活性は認められなかった。この終脳古皮質および新皮質に局在する膜結合性野神経線維伸長促進活性の分子的な性質や詳しい局在はまだわかっていないが，これが嗅球—終脳神経回路形成に関与している可能性が考えられる。

(2) シナプス特異結合の分子メカニズム

能瀬聡直（基生研）

我々は比較的構成が単純で，遺伝学的アプローチが可能なショウジョウバエの神経－筋結合を材料として用い，シナプス特異結合の分子機構を探っている。ショウジョウバエ胚の体壁の神経－筋結合系は，半体節あたり約30個の運動ニューロンが，30本の筋肉繊維と結合することにより成り立っている。発生過程において，個々の運動ニューロンは決まった神経路に沿って軸索を伸ばし，特定の筋肉とシナプス結合することがわかっており，神経特異結合研究のシンプルなモデル系を提供する。我々がこの系における標的認識分子として同定したConnectinは，leucine rich repeat familyに属する接着分子で，ショウジョウバエに胚の少数の運動神経，およびそれらの標的筋肉において発現している。最近我々は異所発現系を用い，Connectinがin vivoおいて神経－筋標的認識に関与していることを示すことに成功した。本会においては，このConnectinの機能に関する実験結果を紹介するとともに，関連した他の研究室の仕事についても触れ，研究の現状について概説する。その上で，このシンプルなモデル神経回路が形成される分子メカニズムについて私なりの考えを述べてみたい。特に以下の点について，ディスカッションができればと願っている。

1．標的認識における誘引シグナルと阻害シグナル

異所発現系を用いた機能解析から，Connectinは神経－筋標的認識において，2重の役割を果たしていることが示唆された。まず，ともにこの分子を発現する特定の運動神経と，その標的筋肉間の，誘引的なシグナルとして働くことにより，両者の結合を促進する。それと同時に，他の近傍の神経に対し阻害的に働きかけることにより，不適切な領域への侵入を防ぐ。同様に，異所

発現系を用いた他のグループの研究により，細胞接着分子 Fasciclin III が誘引的な，分泌蛋白質 Semaphorin II が阻害的なシグナルとして，神経－筋標的認識に関与することが示唆されている。以上の結果からおそらく，標的認識過程におけるシグナルとして，誘引的なものと阻害的なものがあり，両者が共に働くことにより，正しいシナプス結合が間違いなくできるのではないかと考えられる。

2．神経認識分子の機能的 redundancy

Connectin, Fasciclin III, Semaphorin II は，異所発現の実験から標的認識への関与が示されたが，これら遺伝子を欠失したミュータントにおいては，神経－筋結合に大きな異常は見られない。このことから，神経－筋結合において，複数の認識分子が関与しており，何重もの保証をうけているように思われる。

3．神経－筋結合形成のステップ仮説と muscle domain

神経－筋結合形成の過程を詳しく見ると，いくつかのステップにおける特異的な選択の積み重ねにより，最終的に正しい結合が達成されることがわかる。特に標的認識過程においては，まず特定の筋肉群 (muscle domain) を標的領域として選択し，その後その中から，1 から 2 本の筋肉を標的として認識シナプスを形成する。例えば Connectin の発現を見ると，ちょうど特定の muscle domain に対応しており，その選択に関与していると考えられる。一方でさらにこの中から，特定の筋肉を選択する過程に関与する，別の認識分子が存在しているはずである。各ステップにおける成長円錐の選択肢は，それほど多くはないと思われる。したがって各ステップにおいて複数の認識分子が関与するというような redundant なシステムであっても，必要な遺伝子の数はそれほど多くはないかもしれない。

(3) 培養皮質細胞上に記録される Silent Synapse とその活性化

木村文隆（大阪大・医）

神経終末からの伝達物質の放出様式には少なくとも 2 つの様式があることが知られている。1 つは細胞体で発生した活動電位が神経終末に伝わり脱分極を与えることにより電位依存性の Ca-channel の活性化を惹き起こしこれに続く一連の過程を経て伝達物質の放出を導くものである。一方，神経終末は活動電位の到来とは無関係に自発的に伝達物質を放出しておりシナプス後膜にいわゆる微小シナプス後電流（流）を起こしていることが知られている。さてこれまでに全てのシナプス部位で両様式の放出が行われているのかどうかを検討した研究は報告されていないが，本研究により自発的な放出を行うことが出来ても活動電位の到来に応じて伝達物質を放出することの出来ないシナプス（サイレントシナプス）が存在することを示す結果を得た。

実験はラットの皮質視覚野細胞を孤立培養して行った。培養には先ず，アガロース上にコラー

ゲンの微小領域を形成してこの領域（島と呼ぶ）上にのみ細胞が生育できるようにする。このような細胞の中から，島上に単一細胞のみが生育した孤立細胞から実験を行った。このような孤立細胞では細胞体，樹上突起，軸索がこの島内にのみ留まるため，この細胞由来のシナプスは全てこの細胞に作られ，かつこの細胞上のシナプスは全てこの細胞由来のものである (autapse)。記録は whole-cell patch 電極を用いて，膜電位固定（一部膜電流固定）下で行った。孤立細胞に whole-cell patch 電極を用いて，膜電位固定（一部膜電流固定）下で記録を行った。

26個の細胞で興奮性の微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を記録することができこれらには autapse が形成されていることが確認された。しかし，これらの細胞に細胞体の興奮によって伝達物質の放出がみられるかどうかを検討したところ，Na-spike に引き続いて 100pA 以上の振幅の誘発電流を記録することができたのは38％の細胞だけであった。しかしながら，Na-spike 依存性の誘発電流の振幅と mEPSC の頻度及び平均振幅との間には何の相関もみられなかった。また，Na-spike 依存性に充分な振幅の EPSC を誘発しない細胞では High K を投与することによって mEPSC の出現頻度を上昇させることができなかった。このことからこのような細胞では活動電位の興奮がブロックされているのではなく活動電位がシナプス終末に到来してもそれを伝達物質の放出に結びつける何らかのメカニズムに障害があることが示唆された。即ち，伝達物質を自発的に放出できても活動電位依存性には放出できないシナプス（サイレントシナプス）が存在することが推測される。

さらにこのようなサイレントシナプスの出現頻度が培養条件によって左右されることを示唆する結果を得た。培養中に興奮性アミノ酸の拮抗剤であるキヌレン酸 (1mM) を加えておくと活動電位依存性の誘発電流を記録することは困難であったが，キヌレン酸を培養液から除去して培養を継続すると活動電位依存性の誘発電流を記録することができるようになった。以上より，シナプス後細胞が自発的に放出される伝達物質に対して反応をすることにより，その情報がシナプス終末に伝えられて，活動電位依存性の伝達物質放出のメカニズムが完成する可能性が考えられる。

(4) 非神経細胞における神経伝達物質放出の再構成

森本高子（国立精神神経センター）

神経伝達物質放出機構を解明することは，シナプスの形成，可塑性といった脳の機能の研究にとっても重要なことである。神経伝達物質放出機構を解明する手段としては主に次の二つの手段があげられる。ひとつめは既に存在する神経伝達物質放出機構を抗体等を用いて修飾する方法，もう一つは非神経細胞において神経特異的なたんぱく質を導入することによって神経伝達物質放出機構を再構成していくことである。近年，非神経細胞である線維芽細胞にアセチルコリンを取り込ませ，培養筋肉細胞を detector として電気生理的に線維芽細胞からのアセチルコリン放出が

検討できることがMu-ming Pooの研究室において明らかにされた。線維芽細胞をアセチルコリンを含んだ溶液で保温し洗浄した後筋肉細胞と接触させる。そして筋肉細胞からパッチクランプ法によるwhole cell recordingを行った。するとアセチルコリン放出に相当するMEPS様currentが観測された。

私はシナプス小胞たんぱく質のひとつであるシナプトタグミンを形質導入した線維芽細胞とコントロールの細胞からのアセチルコリン放出を比較することにより神経伝達物質放出におけるシナプトタグミンの役割を明らかにしようとした。放出量を測定するパラメーターとして1分間に何回eventが見られるかを示すfrequency, currentの大きさをしめすamplitudeを用いる。静止状態ではシナプトタグミンをtransfectした細胞からのアセチルコリン放出のfrequencyは，約2分の1に減少していた。しかしamplitudeは変化していなかった。細胞外にATPを加えることにより細胞内カルシウム濃度を上昇させたときのアセチルコリン放出を調べた。コントロールの細胞においてATPによりfrequencyが約1.8に上昇した。シナプトタグミンをtransfectした細胞ではATP存在下ではアセチルコリン放出は阻害されておらず，frequencyはATP添加前の4倍に上昇した。さらに自発的なアセチルコリン放出だけでなく線維芽細胞を脱分極刺激することによって得られるアセチルコリン放出を調べた。線維芽細胞に於いてもVoltage-sensitive Ca-channelが存在することが報告されている。コントロールの線維芽細胞を脱分極刺激することによって潜時が3.6ms前後のアセチルコリン放出に相当すると思われる電流の変化が筋肉細胞から観測された。この電流の変化はカルシウムチャンネルのブロッカーであるコバルトイオンによって阻害された。シナプトタグミンをtransfectした細胞でこの脱分極刺激によるアセチルコリン放出はコントロールの細胞よりamplitudeが有意に大きく，failiure rateが有意に減少していた。潜時については有意差は見られなかった(3.0ms)。

また，endocytosisのマーカーであるHRPを用いて細胞内へのHRPの取り込みを調べた。シナプトタグミンをtransfectした細胞にはコントロールの細胞より約2倍HRPが多く蓄積していた。このことはHRPの取り込みは変化していないがシナプトタグミンをtransfectした細胞ではHRPの放出が阻害されているためであると考えられる。さらに電子顕微鏡観察を行ったところ，シナプトタグミンをtransfectした細胞ではHRP(＋)の小胞構造が多数見られた。

以上の結果から，次のようなシナプトタグミンの神経伝達物質放出における役割が示唆された。すなわちシナプトタグミンはrestingなカルシウムレベルでは分泌を阻害している。この阻害はカルシウム濃度の上昇によって取り除かれる。シナプトタグミンはrestingなカルシウムレベルで分泌を阻害することによってカルシウム濃度の上昇に応答した神経伝達物質放出に促進的な働きをしているものと考えられる。さらにXenopus胚から単離した，培養神経－筋肉細胞シナプス系を用いてシナプトタグミンを神経細胞で過剰発現させたときに見られた影響と比較し，神経伝達物質放出機構について検討したい。

(5) 脳のカルモデュリン依存性プロテインキナーゼⅣの活性制御機構

奥野幸子（旭川医大・第一生化学）

細胞内情報伝達にセカンドメッセンジャー応答性の多機能性タンパク質リン酸化酵素が重要な働きをしていると考えられて，Aキナーゼ，Cキナーゼ，CaM-キナーゼⅡなどのプロテインキナーゼの研究が盛んに行われてきた。特に脳ではカルシウムイオンが脳の働きの制御に重要な役割を演じていると考えられ，CaM-キナーゼⅡが研究されてきた。CaM-キナーゼⅡは1979年に私達の教室で見出された酵素で，その後私達はその活性制御機構や生理作用などを研究してきたが，1992年に当時遺伝子クローニングに米国の Sikela によって見出されていた脳とT細胞に分布する CaM-キナーゼⅣも基質特異性が広く多機能性であることを見出し，脳や免疫系の情報伝達系で重要な働きをしている可能性を示した。また最初シナプシンⅠのサイトⅠをリン酸化する酵素として米国の Greengard らによって見出されていた CaM-キナーゼⅠも現在では多機能性であると考えられており，脳のカルシウムシグナリングは CaM-キナーゼⅡだけでなく，少なくとも CaM-キナーゼⅠ，Ⅱ，Ⅳの三つのカルシウム／カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素を視野に置いて考えなければならなくなっている。

脳のカルシウム／カルモデュリン依存性多機能性タンパク質リン酸化酵素の比較

	CaM-キナーゼⅡ	CaM-キナーゼⅣ	CaM-キナーゼⅠ
サブユニット構造	オリゴマー	モノマー	モノマー
細胞内分布	細胞膜と細胞質	核	細胞質
活性化機構	自己リン酸化	CaM-キナーゼⅣキナーゼによるリン酸化	CaM-キナーゼⅠキナーゼによるリン酸化

上の表に三つの CaM-キナーゼの特に興味深い特徴を簡単にまとめた。CaM-キナーゼⅡがシナプス後膜肥厚部などの細胞膜や細胞質に分布しているのに対し，CaM-キナーゼⅣは脳では核に限局して存在しており，CaM-キナーゼⅠは核にはなく細胞質に分布していると報告されている。これらの酵素はそれぞれ例えば CaM-キナーゼⅡは神経伝達を，CaM-キナーゼⅣは gene expression を制御するというように役割分担しているものと思われる。また私達は CaM-キナーゼⅡがカルシウム／カルモデュリン存在下で Thr-286 を自己リン酸化して著明に活性化することを報告し，この酵素の興味深い自己活性制御機構を明らかにしたが，その後1993年に CaM-キナーゼⅣをリン酸化して著明に活性化する CaM-キナーゼⅣキナーゼを脳に見出し，脳のカルシウムシグナリングにカルシウム／カルモデュリン／キナーゼ／キナーゼ・カスケードが存在することを示した。翌1994年米国の Edelman らは CaM-キナーゼⅠについても，これをリン酸化して著明に活性化する同様な CaM-キナーゼⅠキナーゼが脳に在ることを報告した。このように中枢神経細胞のカルシウムシグナルの伝達にカルシウム／カルモデュリン／キナーゼ／キナーゼ・カスケー

ドが大きな役割を演じていることが明らかになってきた。

研究会ではCaM-キナーゼⅣキナーゼによるCaM-キナーゼⅣの活性制御について私達の研究を中心に紹介する。

(6) カルシウム依存性リン酸化酵素によるCREBの転写調節

萩原正敏（名古屋大・医）

昨年，ショウジョウバエとマウスで，転写因子CREBをノックアウトすると長期記憶が失われることが報告された。このことは，分化・発生といった従来の研究領域に加えて，記憶など高次神経系の複雑な生命現象が転写調節研究の対象となったことを意味する。従来から神経系の発生に関与する転写因子の研究はなされているが，CREBに関する議論はこれと全く異なる視点から出発している。すなわち，神経細胞の一過性の電気的興奮物質的な基盤へと変換を行うのが，CREBなどの転写因子ではないかとのアイデアに基づいている。CREBはもともとは，cAMPによる転写調節研究から見出された転写因子で，リン酸化により活性化されることが判っている。近年カルシウム依存性の転写活性化にも大きな役割を果たす事が証明されつつあり，神経細胞興奮時にこの転写因子が活性化される可能性が高い。今回は，神経細胞に高発現するカルモジュリン依存性リン酸化酵素が，このCREB/ATFファミリーを活性化するメカニズムについて，現在の到達点を明らかにする。

3．モータータンパク質の構造変化は化学ー力学エネルギー変換過程にどの様に寄与するか

1996年1月25日～26日
代表者：児玉孝雄（九州工大）
世話人：丸山　敬

(1)　X線結晶解析でみたミオシンの構造変化
須藤和夫（東京大・教養）

(2)　筋肉のX線回折実験：ミオシン頭部の形態変化の証拠
八木直人（東北大・医）

(3)　X線からみたアクトミオシンモーターの構造変化：溶液ー筋肉
若林克三（大阪大・基礎工）

(4)　ミオシン頭部による分子内ドメイン運動と分子上アクチン移動の検出
荒田敏昭（大阪大・理）

(5)　ATPase kinetic pathway において異なるステップを形成するミオシンー ATP アナログ複合体の化学修飾および ^{19}F-NMR による解析
丸田晋策（創価大・工）

(6)　クライオ電子顕微鏡で構造変化を検出する方法
若林健之（東京大・理）

(7)　F1-ATPase の構造
白木原康雄（国立遺伝研）

(8)　ミオシンがエネルギーを小出しに使うことと関係があるかもしれない現象
郷　信広（京都大・理）

(9)　ミオシンネック領域の長さと運動速度の関係から予測される，分子内屈曲運動変曲点の位置
上田太郎（工業技術院・融合領域研）

(10)　非対称揺らぎモデル
徳永万喜洋（新技術事業団・柳田プロジェクト）

(11)　平滑筋ミオシンの構造変化
尾西裕文（国立循環器病センター）

(12)　ミオシンの ATP 結合ポケット（ATP 加水分解部位とその周辺）の構造変化
平塚寿章（旭川医大・医）

(13)　ステップサイズの大きさ
柳田敏雄（大阪大・基礎工）

⑭　エネルギー論的特徴から示唆されるミオシンモーターの構造変化

児玉孝雄（九州工大・情報工）

【討論参加者】

荒田敏昭（大阪大・理・生物），安藤敏夫（金沢大・理・物理），石渡信一，加藤宏一，藤田英明，新藤嘉明，多田隈尚史（早稲田大・理工），上田太郎，伊藤光二，鈴木　誠（工業技術院・融合研），大岩和弘，山田　章（郵政省・通信総合研），尾西裕文（国立循環器病センター），片山栄作（東京大・医科研），木下一彦，宮下英威，安田涼平（慶應大・理工），郷　信広（京都大・理），児玉孝雄，小松英幸，加世田与士，新原真美（九州工大・情報工），白木原康雄（国立遺伝研），重松順司（工技院・九州工大），須藤和夫（東京大・教養），関本　謙（京都大・基礎物理研），太和田勝久（九州大・理），今福泰治（九州大・医・分子生命），平塚寿章（旭川医大・医），前田雄一郎，前田佳代，小田俊郎，佐野健一，西條由美子（松下電器産業・国際研），眞島利和（電子技術総合研），丸田晋作，大木高志（創価大・工），三木正雄（福井大・工），御橋広眞（名古屋大・院），八木直人（東北大・医），柳田敏雄，徳永万喜洋，石井由晴，樋口秀男，石島秋彦（新技術事業団・柳田プロジェクト），青木高明，若林克三，杉本泰伸，武澤康範（大阪大・基礎工），若林健之，安永卓生，佐伯喜美子，阿部亮敦，松浦能行，孟　　宇（東京大・理）

【研究会概要】

モータータンパク質の原子座標の解明とタンパク質工学の確立は，化学－力学エネルギー変換のメカニズムをモータータンパク質の構造変化から理解しようとする研究分野の飛躍的発展をもたらした。こうしたタンパク質分子の構造変化は，タンパク質分子の機能を理解する上で重要なのであろうか？

今回のディスカッションミーティングでは以下の４つのテーマで最近のトピックスを基に討論した。

(1)　分子モーターの構造変化の検出とその解釈

(2)　他のタンパク質研究者から見たモーター分子の構造変化

(3)　モーター分子の構造変化と運動

(4)　モーター分子の種々の研究から示唆される構造変化

総合討論では，タンパク質の構造変化が化学－力学エネルギー変換の共役場で果たす役割について活発な討論が行われた。

(1) X線結晶解析でみたミオシンの構造変化

須藤和夫（東京大・教養）

細胞性粘菌ミオシンⅡモータードメインの結晶構造を MgADP · BeF_x と MgADP · Vanadate 存在下で 2 Å分解能で解いたところ，大きい構造の差がC末端ドメインで見られた。

SH1-SH2αらせんに続く α/βドメインは他の部分からはなかば独立しているが，MgADP · BeF_x 存在下では SH1/SH2αらせんから分子基軸方向に対して真下に延びている。一方，MgADP · Vanadate 存在下では SH1/SH2αらせんに続く βstraud がほぼ90°傾き，α/βドメインは大きくスイングしている。スイングする方向は，N末端の βバレルから遠ざかる方向で，F-actin に結合しているとすれば，アクチンの軸に近づく方向である。どちらの構造でも SH1/SH2αらせんは完全で，SH1 と SH2 が近づくことはない。この構造が，ATPase サイクルの準安定中間状態に対応しているかどうかは，今のところはっきりはしない。しかし，ミオシンモータードメイン中で，SH1/SH2αらせんに続く α/βドメインが大きくスイングできることは，ミオシンの機能を考える上で重要であろう。

(2) 筋肉のX線回折実験：ミオシン頭部の形態変化の証拠

八木直人（東北大・医）

骨格筋のX線回折実験において，ミオシン頭部の形態変化を検出していると考えられる結果を2つ示した。

① 硬直状態のファイバーに ADP を加えると，14.4nm の位置の子午線反射の強度が50～80%増加する。これは電子顕微鏡法によって報告されている ADP によるミオシン頭部の形態変化でよく説明される。

② 収縮中のファイバーに 500Hz の正弦波振動を加えると，14.4nm 反射の強度は，張力と逆位相で変化する。この結果は，アクチンと結合しているミオシン頭部の形態が張力によって変化すると考えれば説明できる。

(3) X線からみたアクトミオシンモーターの構造変化：溶液ー筋肉

若林克三（大阪大・基礎工）

ミオシン頭部にATP加水分解中間体アナログと考えられているADP・AlF_4, AFDP・BeF_3やADPを作用させてX線溶液散乱法により構造変化を調べた。ADP・AlF_4やADP・BeF_3はADP・V_i (vanadate)を作用させたときと同様に慣性半径がヌクレオチドフリーに比べて約3Å減少し，分子の最大長が約10Å小さくなった。この結果はATP加水分解中の変化と対応しているところから，これらADP + metallofluorides結合頭部はミオシン頭部のADP・P_i ternary complexの構造と似た構造であることが証明された。特にADP・BeF_3の結合時にも構造変化が起きていることは，Raymentらのグループのturncated S1の結晶解析からの予想とは異なっている。このことは，ATP結合ポケットの開閉とグローバルな構造変化とは直接関係ないか，結晶中と溶液中の構造が異なっていることを示唆している。また，ADPのみを結合したときはフリーなミオシン頭部の慣性半径より約1.5Å位小さくなっていることが示唆された。この結果は最近のアクトミオシンのrigorコンプレックスにADPを結合させたときの電顕による構造変化と同じ方向の変化であった。

(4) ミオシン頭部による分子内ドメイン運動と分子上アクチン移動の検出

荒田敏昭（大阪大・理）

ミオシン頭部レギュラトリードメイン軽鎖にrigidに結合したスピンラベルの角度分布をESRにより測定したところ，活性収縮筋では広い角度分布をもっており，このドメインは大きく（>60°）動いていると考えられる（パクストロークかは不明）。G-アクチンのミオシン頭部上で結合部位移動を化学架橋法，電顕により示し，アクトーS1複合体モノマーのX線溶液構造の解析結果を示した。

(5) ATPase kinetic pathwayにおいて異なるステップを形成するミオシンーATPアナログ複合体の化学修飾および^{19}F-NMRによる解析

丸田晋策（創価大・工）

収縮サイクルにおいてミオシン頭部の構造がどのように変化しているかを調べるために，収縮

サイクルにおいて異なるステップを示すと思われるいくつかの複合体を形成させ，各々の複合体のミオシン頭部における局所的な部位での構造を比較した。

Trp ケイ光増加，アクトーミオシンの解離及びアクチンとの相互作用の実験から M・8-Br (N_3)-ATP は M・ATP のステップ，M・ADP・BeFn (AlF_4^-, ScFn, V_i) は M^*・ATP → M^{**}・ADP・P_i を示していると考えられる。ケイ光標識した ADP アナログ (ε-ADP, ε-8-Br-ADP) およびフッ素で標識した ADP アナログ (TFNDP) を用いてこれらの複合体を形成させて活性部位の構造をアクリルアミドによるケイ光消光と ^{19}F-NMR で調べると 8-Br-(N_3)-ATP と AlF_4^-複合体では ATP 結合 cleft が広く BeFn, V_i, ScFn 複合体では狭くなっていることが示唆された。さらに BeFn, V_i, AlF_4^-複合体の ATP 結合部位のアデニン部分が結合する部位での構造にも差が見られた。

また化学修飾の実験から各複合体の活性システイン残基と活性リジン残基 region の構造も各々異なっていることが示された。ATP が加水分解されているとき，ミオシン頭部の局所的な部位において連続した構造変化が起こっていると思われる。

(6) クライオ電子顕微鏡で構造変化を検出する方法

若林健之（東京大・理）

クライオ電子顕微鏡によれば，生理的条件下でのモーター蛋白質の構造を研究することができる。これまでも画像平均化はより S/N 比を向上させ細いフィラメント構造の Ca^{2+}濃度変化や，アクチン平滑筋ミオシン S1 の ADP 添加によって生じる構造変化が発表されている。

さらにすべてを平均化するのではなく，画像分類を主成分分析で行った後に平均化する方法も考案した。この場合１つ１つの分子像をより高いコントラストで得ることが重要であり，撮影条件を工夫することにミオシン一分子の双頭構造とロッドを観察できるようになった。ATP 存在下ではミオシン頭部の分子内屈曲を観察できた。

(7) F1-ATPase の構造

白木原康雄（国立遺伝研）

F1ATPase (F1) は，呼吸鎖が形成する膜を隔てた水素イオンの濃度差を ATP に変換する ATP 合成酵素の膜から突き出した部分である。$\alpha 3\beta 3$ 複合体は，F1 の 5 分の 1 程度の ATPase 活性を示す中核的複合体である。牛の F1 の構造モデルを使っての分子置換法を用いた構造解析と得られた結晶構造について述べる。

ヌクレオチド無しで得られた結晶中では，$\alpha 3\beta 3$ 複合体は3個の α サブユニット，3個の β サブユニットが等価であるような対称的構造をとる。従って，α サブユニット β サブユニットそれぞれ1個分のモデルを，非対称な牛の F1 のサブユニット構造のなかから rotation function 法で探した。こうして非対称単位あたりのモデルを確立したあと，rotation function, translation function の計算，rigid body refinement を行い，Rfactor43% を得た。Xplor を用いて通常の refinement を行い，現在 Rfactor は16.2%である。

ヌクレオチド非存在下で，3個の α サブユニット，3個の β サブユニットは等価であるような対称的構造をとる。これはヌクレオチド存在下でのミトコンドリア F1 の非対称な構造と対照的である。α サブユニット，β サブユニットとも，ミトコンドリアの F1 のサブユニットのうち，開いたサブユニット (αTP, βE) と非常によく似たコンホメーションをとっており，それをうけて活性部位のインターフェースは開いている。

(8) ミオシンがエネルギーを小出しに使うことと関係があるかもしれない現象

郷　信広（京都大・理）

ATP が ADP + P_i に変換されたあと，解放されたエネルギーがミオシン分子に蓄えられ，ミリ秒程度の時間をかけて小出しに使っていると考えられているようなので，蛋白質に関する一般的な常識から見て，どのような仕組みが考えられるかを考察した。結論としてエンタルピーの山をいくつも順々に超えるのがその仕組みの背景にあるのではないかと提し，それに関連のある他の蛋白質における現象を紹介した。

(9) ミオシンネック領域の長さと運動速度の関係から予測される，分子内屈曲運動変曲点の位置

上田太郎（工業技術院・融合領域研）

ミオシン力発生に関する分子内屈曲説を検証することを目的として，軽鎖結合領域の長さを改変した変異細胞性粘菌ミオシン重鎖遺伝子を作成，発現した。これらの変異ミオシンおよび野生型ミオシンをコンベンショナルなインビトロ運動アセイしたところ，運動速軽鎖結合領域の数に直線的な関係を認めることができた。運動速度と歩幅が比例すると仮定すると，この結果は歩幅と軽鎖領域の長さが比例することを意味し，分子内屈曲説を強く指示するものである。なお，速度がゼロになる点として屈曲点の位置を推定したところ，いわゆる SH1-SH2 領域付近となった。

この推定はミオシン頭部がSH1-SH2領域付近を屈曲点として大きく構造変化するという最近の構造的知見とも合致するものである。

(10) 非対称揺らぎモデル

徳永万喜洋（新技術事業団・柳田プロジェクト）

ATPにより活性化された状態で，アクチン・ミオシン相互作用に，非対称ゆらぎが起こると考えるモデルにより，一方向性の滑り・力発生を起こすことができる。ATPの化学的エネルギーが力学的に変換される分子機構に関し，結晶構造に基づいて議論を行った。

(11) 平滑筋ミオシンの構造変化

尾西裕文（国立循環器病センター）

アクチンとミオシンの結合には両蛋白質を構成する疎水性アミノ酸残基が重要であると考えられている。我々は平滑筋ミオシン重鎖の Trp^{546}-Phe^{547}-Pro^{548} を遺伝子工学的に変換し，それらの役割を研究した。その結果は，ミオシンATPaseのアクチンによる活性化が著しく低下し，rigor状態のアクチンーミオシンの結合に異常が起こることを示していた。そこで，我々は，これらの疎水性残基がアクチンとミオシンの結合に重要な構成員になると提案する。

(12) ミオシンのATP結合ポケット（ATP加水分解部位とその周辺）の構造変化

平塚寿章（旭川医大・医）

ミオシンのATP結合ポケットに特異的に強く結合する色素であるPPBAを使って研究した。ミオシンS-1と色素の二元複合体にヌクレオチドを加えて形成された二元複合体について調べたところ，ミオシンのATP結合ポケットのATPase反応の各ステップに対応した構造変化を検出することができた。重要な点は，ATPを結合して加水分解している最中はポケットは閉じているか固くなっていることである。

(13) ステップサイズの大きさ

柳田敏雄（大阪大・基礎工）

一分子力学測定：

単一アクチンフィラメントの両端をビーズを介して２つのレーザーでトラップし，ガラス表面に固定した一分子の単頭ミオシンと相互作用させ，ミオシン頭部１つが発生する変位をビーズの変位を nm 精度で計測することにより求めた。結果は，１分子の ATP でミオシン頭部１つが引き起こす変位は 20nm 以上になった。この大きな変化は，１回のミオシン頭部の構造変化，又はアクチンとの結合解離で説明できず，１回の ATPase サイクル中に何回も力学反応が起こり得るというルースカップリングをサポートする。

一分子 ATPase 反応：

蛍光色素１分子を水溶液中で実時間イメージする技術を使って，蛍光 ATP アナログ１分子の，１分子のミオシンによる加水分解反応を直接検出（イメージング）する計測系を開発した。この光学系と上記の１分子力学光学系を組み合わせ，力学反応と ATPase 反応が１分子レベルで直接計測可能になった。

(14) エネルギー論的特徴から示唆されるミオシンモーターの構造変化

児玉孝雄（九州工大・情報工）

化学－力学共役におけるミオシンモーター (M) の役割は，ATP 加水分解の化学エネルギーをタンパク質コンフォーメーションの変化の“かたち”で蓄え，アクチンと分子間相互作用して，力学過程に変換することである。ATP 分解反応サイクルは速い相と遅い相とに２分して考えることができ，それぞれがユニークなエネルギー論的特徴を示す。M · ADP から M · ATP を経由して M · ADP · P_i に至る速い相は，$\Delta H > 0, \Delta S > 0, \Delta Cp < 0$ であり，M · ADP が M · ADP となる遅い相は逆に $\Delta H < 0, \Delta S < 0, \Delta Cp > 0$ である。このような熱力学的パラメータから示唆される反応サイクルでのコンフォメーション変化のひとつの可能性は，分子表面における疎水性残基の溶媒への露出と溶媒からの遮蔽である。一方，ΔCp が著しい温度依存性を示すことを説明するには，さらに，内部エネルギーレベルの異なる少なくとも２つの巨視的状態間の転移を考える必要性がある。いずれにしても今後の課題は，タンパク質分子内での化学過程に共役した“弱い”相互作用の組み替えによるディスクリートな領域での構造変化とその物理的必然性を，構造データ，実験分子ダイナミックス，理論面から総合的に追求することである。

4．NMR の細胞及び分子生理学研究への応用

1995年12月21日～22日

代表者：曽我美勝（藤田保衛大・衛生）

世話人：村上政隆

(1) マイカに配向固定された運動蛋白質の滑走面部位の表面電位測定と水和効果

須田　斎（東海大・開発工）

(2) トレハロースおよびその異性体のリン脂質二重膜との相互作用
—固体高分解能 NMR による解析—

櫻井　実，佐瀬　学，浅川直紀，井上義夫（東工大・生命理工）
日野明寛，小林昭一（農水省・食総研）

(3) NMR による蛋白質分子内部運動の解析

桑田一夫，恵良聖一（岐阜大・医）
曽我美勝（藤田保衛大・衛生）

(4) 酸性側における血清アルブミン・ molten globule-like state の研究

曽我美勝，梶原孝彦，中上　寧（藤田保衛大・衛生）
恵良聖一，桑田一夫（岐阜大・医）

(5) 分子間交差緩和スペクトル測定法とその応用

曽我美勝，梶原孝彦，中上　寧（藤田保衛大・衛生）
加藤一夫（稲沢市民病院）
恵良聖一，桑田一夫（岐阜大・医）
上坂伸宏（日本医大・第一生理）

(6) 同調 HeLa 細胞の細胞内自由水の測定 II

福崎　稔（東海大・短）
梅原利宏，冨永靖徳（お茶の水大・理）
鈴木正哉，蓮見賢一郎（蓮見癌研究所）
灰田宗孝（東海大・医）
真下　悟（東海大・理）

(7) 糖鎖のゲル化機構と構造変化の解明

渡部徳子，大塚章宏（東京水産大・水産）

(8) ^{13}C ^{31}P NMR による肝の代謝解析

森川茂広，犬伏俊郎（滋賀医大・分子神経生物学研究センター）

(9) NMR の唾液腺電解質輸送研究への応用

村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

⑽ 複合現象の回路網表現

今井雄介（大阪医大・第一生理）

⑾ 生体インピーダンス法による体組成測定のラット及びマウスへの応用とその有用性

高橋則人，西川弘恭（明治鍼灸大・生理）

池内隆治（明治鍼灸大・東洋医学）

⑿ ヘモグロビン Koeln 患者赤血球の磁化移動現象

上坂伸宏（日本医大・第一生理）

曽我美勝（藤田保衛大・衛生）

惠良聖一（岐阜大・医）

加藤一夫（稲沢市民病院）

A.N. Schechter (LCB/NIDDK/NIH)

⒀ ^{31}P-磁化移動 NMR 法の開発によるヒト骨格筋のクレアチン・キナーゼ反応の測定

吉崎和男（徳島大・医）

早野尚志（京府医大）

平川和文（神戸大・発達科学）

⒁ ^{1}H-CSI 法による内頸動脈閉塞症の病態の検討

森下博之，成瀬昭二，古谷誠一，前田知穂（京府医大・放）

⒂ 脳機能磁気共鳴画像法における皮質静脈の流速変化の影響

中島和広，成瀬昭二，古谷誠一，前田知穂（京府医大・放）

⒃ SSI の非天然構造の解析

今野　卓，鎌足雄司（神戸大・自然科学）

片岡幹雄（大阪大・理）

赤坂一之（神戸大・理）

【討論参加者】

森川茂弘（滋賀医大），惠良聖一，桑田一夫（岐阜大・医），西川弘恭，高橋則人，新原寿志（明治鍼灸大），馬場俊輔，成瀬昭二，古谷誠一，中島和広，森下博之（京都府立医大），上坂伸宏（日本医大・第一生理），須田　斎（東海大・開発工），福崎　稔（東海大・短），梅原利宏（お茶の水女子大），鈴木正哉（蓮見癌研），渡部徳子（東京水産大・水産），吉崎和男（徳島大・医），加藤一夫（稲沢市民病院），曽我美勝，中上　寧（藤田保衛大・衛生），今井雄介（大阪医大），櫻井　実（東工大・生命理工），今野　卓（神戸大・理）

【研究会概要】

細胞及び分子生理学の分野において，NMR 及び他の物理的測定法を併用し，低分子，高分子，細胞膜などの構造変化とその機能相関，分子間交差緩和（磁化移動）及び拡散定数測定による細

胞内水構造，電解質輸送，^{13}C-, ^{31}P-NMR による細胞内代謝，PH の研究及び機能磁気共鳴画像などの研究が進められている。

この研究会において，(1)凍結や乾燥（脱水）に対して細胞を保護するトレハロースの作用機序について，^{1}H-NMR, 熱分析，FT-IR, 分子動力学的解析についての報告及び多糖類の溶液⇄ゲル変換における ^{1}H-NMR による拡散定数測定を用いた高分子と水の相互作用の基礎的研究。(2) SSI（ストレプトマイセス・サタライシン・インヒビター），チトクローム c のネイテブ状態，中間状態（モルテン，グロビュール状態），アンフォルディング状態の ^{1}H-NMR 研究。(3) ^{1}H-磁化移動を用いた生体高分子と水分子相互作用，細胞内水構造，^{31}P-磁化移動を用いた骨格筋クレアチン・キナーゼの研究。(4) ^{13}C-, ^{31}P-NMR による細胞代謝の研究。(5) ^{23}Na-, ^{39}K-NMR による電解質輸送及び回路網熱力学による各種膜輸送の研究。(6)脳機能磁気共鳴画像。(7) Surface Force Apparatus を用いたタンパク質分子間力測定などが報告された。総合討論において，今後の本研究会の在り方及び細胞内水構造，電解質・水輸送の諸問題が討議された。ついで水・膜透過の絶対反応速度論的解析の試みが報告された。

(1) マイカに配向固定された運動蛋白質の滑走面部位の表面電位測定と水和効果

須田　斎（東海大・開発工）

筋収縮の力発生メカニズムの解明にあたり，現在我々はミオシン分子が，ATP 加水分解時に表面電位（あるいは表面電荷量）をどのように変化させているのかを分子間力測定装置を用いて直接測定することを試みている。このためには，吸着媒体として用いるマイカ基板上に，アクチンと相互作用するサイトをマイカとは反対側，すなわち溶媒側に向けた状態でモーター蛋白質を配向固定する必要がある。このような配向固定技術として，組み換え DNA を導入された変異性細胞性粘菌を用い HMM (Heavy MeroMyosin) をカルチャーし，その尾部に反応性の高い SH 基を含むアクチンC末端を融合タンパク質として合成し，ビオチン化後，ストレプトアビジンで修飾する。このストレプトアビジン・ビオチン化 HMM をビオチン化 BSA を介在させてマイカ上に配向固定する。現在，ビオチン化 BSA の代わりにビオチン化 LB 膜を用いて平面性，高密度化並びに膜流動性を活かした新しいモーター蛋白質固定法の改良を平行して行っている。

このように相対する 2 つのマイカ表面に配向固定された HMM 単一層間の相互作用力を界面間距離を関数として測定し，DLVO 理論に基づき解析することにより HMM の表面電位ないしは表面電荷密度を決定できる。ATP の存在下及び非存在下で測定を行ったところ，これまでの結果では，ATP 加水分解時には，表面電位が高まる傾向に変化することが明らかになってきた。これは，ウサギ骨格筋ミオシンをキモトリプシン処理して単離精製した S1 のマイカ表面への物理吸着法で得た結論とほぼ一致している。さらに，運動性の活性チェックや吸着量の定量化をあわ

せて行い，ミオシンヘッド一個当たりの電荷量を定量化し，加水分解反応による電荷量変化を計測する。

(2) トレハロースおよびその異性体のリン脂質二重膜との相互作用 —固体高分解能 NMR による解析—

櫻井　実，佐瀬　学，浅川直紀，井上義夫（東工大・生命理工）
日野明寛，小林昭一（農水省・食総研）

トレハロース (TRE) は，凍結や乾燥といった物理化学ストレスから細胞を保護する働きに優れている。乾燥耐性における TRE の作用機構については，現在，water replacement 仮説と vitrification 仮説の二つが提案されているがどちらが有効であるか判明していない。前者は，極限乾燥状態においてこの糖は結合水の役割をすることを主張する。すなわち，細胞膜表面やタンパク質の表面に水素結合し，それらの native 構造を安定化する。一方，後者では，細胞中の糖－水混合系が乾燥過程においてガラス化するため，膜やタンパク質はミクロカプセルの中に閉じ込められた状態になり物理的に安定化する，と考える。

本研究では，膜表面と糖の相互作用に関する知見を得ることを目的として，凍結乾燥状態における TRE-DPPC 二重膜混合系の DSC 熱分析，FT-IR および CP/MAS NMR 測定を行った。また，同様な実験をネオトレハロース (NEO)-DPPC 系についても行い，TRE の場合と比較することにより上の仮説の妥当性について検討した。

まず，TRE と NEO の立体構造の違いを明らかにするため，グリコシド結合の回転に関する断熱ポテンシャルマップを分子力学及び分子軌道計算より求めた。その結果，TRE は屈曲した構造をしているのに対し，NEO では伸展した構造が安定であることがわかった。

次いで，DSC 測定により二重膜のゲル－液晶相転移温度の TRE (または NEO)/DPPC 組成比依存性を調べた。その結果，いずれの糖の場合もモル比 1 以上の領域で転移温度は40℃付近に収束することが判明した。この値は，水和 DPPC の転移温度に近い。したがって，残留水が膜表面に結合しているか添加された糖が結合水の役割をしているかどちらかの可能性が考えられる。

この点を検討するため，FT-IR 法により DPPC の P ＝ O 非対称伸縮振動を観測した。その結果，糖を含まない DPPC 二重膜および TRE (or NEO)-DPPC 混合系いずれにおいても，対応する信号は 1244cm^{-1} に観測された。もし糖が直接的に膜の極性基に水素結合しているとすれば，立体構造上大きな違いをもつ二つの糖が同程度の摂動を膜表面に及ぼすとは考えにくい。したがって，凍結乾燥状態では残留水が膜表面に結合していると考えるのが妥当である。

さらに，脂質極性基の運動性を詳細に調べるため CP/MAS 法を用いて ^{31}P 核の緩和時間 T_1, $T_{1\rho}$, T_{DD} 及び T_2^* を測定した。その結果，T_1 及び T_{DD} の値は TRE (or NEO) と DPPC の組成比

によらずほぼ一定であった。しかし，DPPC-TRE 系において $T_{1\rho}$ の値は，糖の組成比が増加するにしたがって減少する傾向を示した。また，線幅より求めた T_2^* 値は，いずれの糖の場合も糖添加によって減少した。

^{31}P 核の緩和には，双極子－双極子相互作用のみならず化学シフトの異方性の効果も効いている。したがって，見かけの緩和時間から分子運動の情報を引き出すのは容易ではない。Griffin らによれば，DPPC 二重膜状態での ^{31}P 核の CSA は 230ppm であり，TRE を添加すると 190ppm に減少する。このデータと CSA 緩和の理論式に基づけば，TRE 添加にともなって CSA 機構による緩和時間は1.5倍程度増加するはずである。したがって，$T_{1\rho}$ のように減少するものは CSA 機構よりむしろ双極子－双極子相互作用が支配的であると考えられる。一方，T_1, T_{DD} では両緩和機構が同程度に効いていると解釈される。

結局，固体 NMR から結論できることは，次のとおりである。すなわち，TRE 添加により $T_{1\rho}$ で検出されるような数 10KHz 程度の運動が顕著に影響を受ける。BPP の理論に基づけば，この領域の運動性は増大する（相関時間が短くなる）といえる。これらがどのような運動モードに対応するかは今のところ明らかではない。したがって，$T_{1\rho}$ において TRE と NEO との差が最も明確に現われてはいるが，膜との相互作用の違いを反映しているものなのかどうか不明である。むしろ，$T_{1\rho}$ を除く他のデータについては両者に違いはみられないことから，膜との相互作用に関して TRE と NEO には本質的な差異はないとみなしたほうがよいかもしれない。

以上を総括すると，少なくとも凍結乾燥サンプルでは，膜と糖の間に直接的相互作用が存在するとは考えにくい。膜と糖の間に結合水が保持されていると考えるのが合理的である。

(3) NMR による蛋白質分子内部運動の解析

桑田一夫，惠良聖一（岐阜大・医）
曽我美勝（藤田保衛大・衛生）

オフ・レゾナンス照射を用いた１次元および２次元 NMR を使用し，蛋白質（cytochrome C の天然状態，モルテン・グロビュール状態（A状態）および変性状態）の内部運動を調べた。モルテン・グロビュール状態では天然及び変性状態に比し，ピークの線幅が全体的に幅広くなっており，特に，芳香族プロトンで著明であった。またオフ・レゾナンス照射に伴う縦緩和時間の変化は，部位により異なっているが，モルテン・グロビュール状態では他の状態に比べ，特に芳香族プロトン及びメチル基近傍のピークで大きく短縮した。これは同状態が内部に疎水性のコアを有することを示唆している。また２次元スペクトルでは，天然状態以外では観測できる交差ピークの数は激減した。しかし観測できた幾つかの交差ピークを比較してみると，モルテン・グロビュール状態では，交差ピークが消失するオフ・レゾナンス周波数のばらつきが大きく，またオフ・レ

ゾナンス周波数に対する交差ピーク強度の分散曲線が左にシフトしていることが分かった。これは同状態におけるスピン緩和が双極子相互作用以外の寄与，たとえば化学シフトの揺らぎ等を含んでいることを示唆している。

(4) 酸性側における血清アルブミン・ molten globule-like state の研究

曽我美勝，梶原孝彦，中上　寧（藤田保衛大・衛生）
惠良聖一，桑田一夫（岐阜大・医）

ヒト血清アルブミン (HSA) の α ヘリックス含量 (f_α) は，主として N → F 転移において減少した (N → F: pH4.6 → 3.4, f_α, 0.70 → 0.55; F → E: pH < 3.0, f_α, 0.55 → 0.52)。^{1}H-NMR スペクトル及び f_2 照射して求めた主鎖，側鎖の交差緩和時間 (T_{IS}) は N → F 転移において，それぞれネイティブ状態からアンフォルディング状態のスペクトル，T_{IS} 値の顕著な増加を示した。即ち，F 型において主鎖，側鎖の著明なゆらぎ増加を示した。HSA の N → F, F → E 転移は，それぞれ独立に同時進行するという Wallevick モデル (1973) と一致した。報告された N → F 転移における分子容の若干の増加，ANS 蛍光の著明な増加，H-D 交換反応の終了，高い f_α 含量，^{1}H-NMR スペクトル変化，T_{IS} の著明な増加（主鎖，側鎖のゆらぎ増加）は，HSA の F 型は molten globule または molten globule-like state であることを示唆した。また，ウシ・メルカプトアルブミン・F 型も，前述の構造に近いだろう。

(5) 分子間交差緩和スペクトル測定法とその応用

曽我美勝，梶原孝彦，中上　寧（藤田保衛大・衛生）
加藤一夫（稲沢市民病院）
惠良聖一，桑田一夫（岐阜大・医）
上坂伸宏（日本医大・第一生理）

ウシ血漿アルブミン (BPA) の溶液→ゲル（BPA*ゲル）変換において，水分子のスピン・格子緩和時間 (T_1), スピン・スピン緩和時間 (T_2) が短縮するが，特にタンパク質プロトンを f_2 照射して求めた水への分子間交差緩和時間 (T_{IS}) が大幅に減少することを見出した。ついでラット正常肝，腫瘍肝等においても，特に T_{IS} 値が顕著な差を示すことを見出し，交差緩和イメージング法（MTC imaging と同等）を開発した。交差緩和イメージング法の基礎的研究として，BPA 溶液，

BPA*ゲル，合成高分子ゲル，各種生体組織を用い，$\gamma H_2/2\pi$ 単位で 69 ～ 350Hz, -100 ～ 100p.p.m. を f_2 照射し，水への磁化移動の作用スペクトル ($[1-(I_\infty/I_O)]$ vs f_2(p.p.m.), I_O, I_∞は長時間 f_2 照射前，後の水の磁化)，分子間交差緩和スペクトル ($1/T_{IS}$ vs f_2(p.p.m.)) を求めた。タンパク質ゲル，合成高分子ゲル，生体組織のオフ・レゾナンス f_2 照射による磁化移動において，^{1}H-NMR スペクトルのブロード成分が非常に寄与していることを見出した。

(6) 同調 HeLa 細胞の細胞内自由水の測定Ⅱ

福崎　稔（東海大・短）
梅原利宏，冨永靖徳（お茶の水大・理）
鈴木正哉，蓮見賢一郎（蓮見癌研究所）
灰田宗孝（東海大・医）
真下　悟（東海大・理）

細胞の活動と生体水の動態を調べることを目的として同調培養をおこなった HeLa 細胞における細胞内自由水の測定をおこなった。細胞周期における水の変化は，同調培養をおこなった HeLa 細胞を用いて，NMR (Nuclear Magnetic Resonance) によって T_1 測定が既におこなわれており，この変化は生体高分子の変化とも深く関係していることが示唆されている。[Science 192, 904 (1976)] 本実験では細胞内の水の自由度をさらに詳しく知る目的で，合成期から分裂期にかけた水の並進拡散と回転拡散の変化を，NMR および TDR (Time Domain Reflectometry) 法によって測定した。

[装置および方法] HeLa 細胞のＳ期同調には，DNA 合成阻害剤として，チミジンおよびアフィディコリンを用いた。阻害剤の除去後，１時間毎に採取した細胞を 3000rpm,10分間の遠心により培養液を除去し試料を作成した。NMR は日本電子 ^{1}H-NMR, EX-90Q を使用し，T_1 緩和時間およびパルス磁場勾配法による拡散係数を測定した。TDR 装置は，ヒューレットパッカード，デジタイジングオシロスコープ，HP54120T を使用して誘電緩和時間の測定をおこなった。

[結果] Ｓ期同調した細胞の自由水の拡散係数は少なくとも２成分存在し，fast 成分が 1.3×10^{-5}, slow 成分が 0.9×10^{-6}cm^2/sec 程度であった。また磁化減衰の各信号強度の比から拡散係数の分布を求めたところ，HeLa 細胞の培養再開後およそ５時間目より 1.5×10^{-6}cm^2/sec 以上の拡散係数を持つ水が観測され分裂期ではその相対量はおよそ25％であった。さらに TDR 法による電気伝導度も同様に増加した。これらのことから分裂期における水と電解質の細胞内への移動が示唆された。

(7) 糖鎖のゲル化機構と構造変化の解明

渡部徳子，大塚章宏（東京水産大・水産）

生体系における糖鎖の担う役割の重要性が注目されてきているが，本研究においては陽イオンによる多糖類のゾルーゲル転移機構とその構造変化の研究の一環としてジェランガムに関する結果を報告する。

ジェランガムは4糖を繰り返し単位とする天然多糖で，4糖当たり1個のカルボキシル基を有する。二重らせん構造を形成してからゲル化するといわれている。本研究においては，Na^+，K^+，Ca^{2+}，Mg^{2+}により1％ジェランガム水溶液のゲル化を行い，形成されたゲル中の水プロトンの T_1, T_2 緩和時間及びパルス磁場勾配法による拡散計測を行った。ゲル中の水の場合制限拡散が観測され，その見かけの拡散係数の解析から，ゾル状態，弱いゲル状態，真のゲル状態，脆いゲル状態における糖鎖骨格構造の違いが識別された。ゲル化に対するそれぞれの陽イオンの効率と架橋点の局所構造は異なるが，糖鎖によって形成されるゲル骨格構造は陽イオンによらず一定であることが明かにされた。さらに，環境制御型電子顕微鏡によりNMRの結果から解析された糖鎖骨格構造を検証した。

(8) ^{13}C ^{31}P NMRによる肝の代謝解析

森川茂広，犬伏俊郎（滋賀医大・分子神経生物学研究センター）

ラット肝臓一時阻血モデルにおいて，in vivo ^{31}P, ^{13}C-NMRを用いて，ATPレベルとcarbohydrateの代謝を同時に観察し，相互の関係について検討した。

（方法） 装置は，2T CSI OMEGAを用い，^{31}P, ^{13}C 二重同調表面コイルとデカップリング用の ^{1}H コイルを組み合わせ測定した。ラットは，48時間絶食の後開腹し，肛門部に阻血用のbaloon occludorを装着した。実験は3群（A：阻血なし，B：10min, C：30min阻血，各4匹）に分け，阻血解除直後から3-[^{13}C]alanineを静脈内に300mg/kg one shot, 600mg/hg/hで1時間持続投与し，^{13}C-NMR (10min), ^{31}P-NMR (5min)を阻血前から，解除90分後まで，交互に連続的に観察した。

（結果及び考察） ATPレベルは，阻血により，B，C群とも20％まで低下し，解除後，各々90％，75％まで回復した。in vivo ^{13}C-NMRでは，[^{13}C]alanineの投与により，alanineの他，Glu/Gln (C2, 3), glucose, glycogenの信号が検出され，glucose, glycogenの生成は，ATPレベルと正の相関を示し，生体レベルで肝臓におけるgluconeogenesis, glycogenesisが，ATPレベルによってコントロールされていることが明らかとなった。

(9) NMR の唾液腺電解質輸送研究への応用

村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

生体細胞をとりまく電解質の環境には，細胞内に K が多く Na が少ない，細胞外に Na が多く K が少ないという共通点がある。この環境は，細胞膜を介し電解質を動かす駆動力（電気化学的ポテンシャル差）として生理機能の基本機構に組み込まれる。例えば，電解質の動き→アミノ酸／糖など基質の動き→分泌，のように，基本生理機能の基盤となる。細胞内の電解質を測定することは，細胞の生理機能の基礎研究の中で重要な位置を占める。細胞内信号量の変化を電解質の正味の流入あるいは流出として検証することができるからである。本研究会では核磁気共鳴の唾液腺電解質輸送研究への応用についてこれまで行なってきた研究結果について，1．輸送モデルとしての唾液腺，2．化学シフト剤による細胞内外の NMR 信号の分離，3．反転回復法による細胞内 K の測定，4．二量子フィルター NMR 法を中心に概説した。

(10) 複合現象の回路網表現

今井雄介（大阪医大・第一生理）

古典熱力学は直接生体システムに適用することはできなかった。非平衡熱力学は平衡から離れた開放系を取り扱うことができるが，定常状態にある場合に限られていて生体システムに適用することはできない。回路網熱力学は動的な生体システムを取り扱う新しい手段として開発された。しかし回路網熱力学の熱力学根拠および回路網熱力学での非等温系の取扱は問題とされていた。

今回，回路網熱力学の熱力学根拠があること，および熱伝導，熱電気現象と熱浸透現象の非等温系の取扱を応用例で示し，回路網熱力学の妥当性があることを示した。

(11) 生体インピーダンス法による
体組成測定のラット及びマウスへの応用とその有用性

高橋則人，西川弘恭（明治鍼灸大・生理）
池内隆治（明治鍼灸大・東洋医学）

生体インピーダンス法 (Bioelectrical Impedance Analysis: BIA) は，非侵襲的な体組成測定法の一つで，その測定法や信頼性などについての報告が多数ある。しかし，BIA を実験動物に応用し

⑮ 脳機能磁気共鳴画像法における皮質静脈の流速変化の影響

中島和広，成瀬昭二，古谷誠一，前田知穂（京府医大・放）

【目的】 fMRI の信号変化域と一致する皮質静脈の流速が脳賦活時に変化するか検討した。
【方法】 健常成人を対象とし，手の掌握運動を負荷した。装置は 1.5T 臨床用 MR 装置（SMT-150HP; 島津）を使用した。fMRI は GRE 法 (TR/TE/FA = 400ms/60ms/40°) で運動負荷前後の差分画像を作成した。流速測定には cine-MRA 及び phase contrast 法を使用した。また，MR 画像に対する流速の影響を見るため flow phantom 実験を行った。
【結果】 流速測定にて信号変化域の皮質静脈では，脳賦活により流速が10～20％増加した。
【考察・結語】 脳賦活時に皮質静脈の流速が増加することが確認され，流速変化が fMRI の信号に関与する可能性が示された。

⑯ SSI の非天然構造の解析

今野　卓，鎌足雄司（神戸大・自然科学）
片岡幹雄（大阪大・理）
赤坂一之（神戸大・理）

放射菌由来サテライシンインヒビター (SSI) は酸性条件下で，天然 (N), 低温変性 (D') 及び高温変性状態 (D) の 3 つの異なる熱力学的状態をとる。本研究では，これらの状態の巨視的構造を X 線溶液散乱 (SAXS) · CD · NMR の構造情報を合わせ，比較検討した[1)]。

SAXS データのギニエ解析から，N 状態は 2 量体であるが D', D 状態は単量体であること，*Rg* の値を考慮すると 3 つの広がり方の程度は N ＜ D' ＜ D の順であることがわかった。また Kratky 解析より，N と D' は球状構造をとるのに対し D は高度に変性した鎖状構造をもつことが明らかとなった。結局，CD と NMR の結果を併せて検討することで，低温変性状態ではペプチド鎖の約半分はランダム鎖に近い状態にあるものの部分的に固有な高次構造を持ち，全体としてコンパクトであることが明らかになった。D' 状態のこの構造は，非天然状態としては，極めて特異なものである。これに対し，高温変性状態はより高度に変性しているが分子内相互作用は残り，完全にランダムな構造ではないことがわかった。

5．内分泌細胞とニューロンの相互移行・クロム親和を中心に

1995年7月19日～20日
代表者：菅野富夫
世話人：菅野富夫

(1) Catecholamine secretion in chromaffin cells is negatively controlled by a granul membrane-associated heterotrimeric Go GTP-binding protein which interacts with GAP-43.

Aunis, Dominique (INSERM)

(2) Effects of GABA on $[Ca^{2+}]_c$ dynamics and electrical properties of rat adrenal chromaffin cells.

Busik, Julia (生理研)，中村美奈子（北海道大)，菅野富夫（北海道大，生理研)

(3) ラット副腎髄質細胞のレセプターを介する分泌応答の制御機構

藁科　彬（新潟大・医・第一生理)

(4) Cytosolic Ca^{2+} elevation induced by muscarinic receptor activation in adrenal chromaffin cell

中里幸和（北海道大・獣医)

(5) Voltage-dependent Na channels in bovine adrenal chromaffin cells

和田明彦（宮崎医大)

(6) Regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells: Possible roles of myosin II and cortical F-actin.

熊倉鴻之助（上智大)

(7) 培養ウシ副腎髄質細胞における Ca^{2+} / カルモデュリン依存性プロティンキナーゼⅡの活性化とカテコールアミン分泌及びチロシン水酸化酵素の活性化との相関性について

柳原延章（産業医大)

(8) The regulation by zinc ion of P2u-stimulated responses in PC12 cells.

小泉修一，井上和秀（国立衛生試)

(9) Molecular mechanisms of neurotransmitter secretion: Functional studies at synapses formed in culture.

持田澄子（東京医大)

(10) Extracellular phosphorylation of synaptic proteins during synaptogenesis.

黒田洋一郎（都立神経研)

(11) Multiple transmitter control of adrenal medulla.

Wakade, Arun R.(Wayne State Univ.)

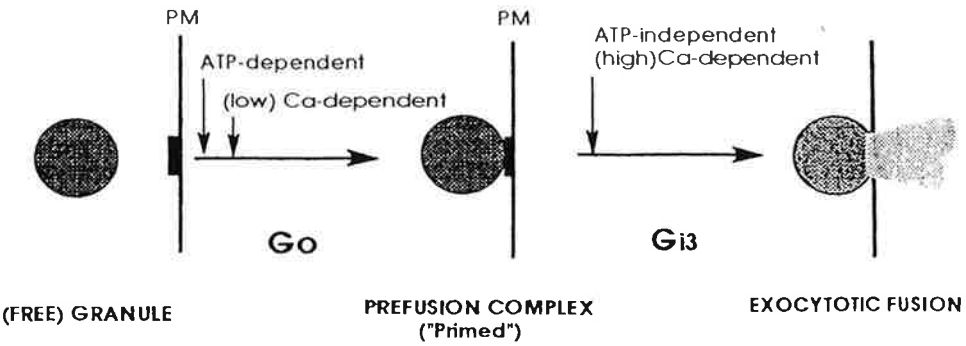
参加者

藁科　彬（新潟大・医），井上和秀，小泉修一（国立衛生試・薬理），持田澄子（東京医大），柳原延章，渋谷　泉（産業医大），岩永俊彦，中里幸和，田中俊子（北海道大），熊倉鴻之助（上智大・生命科　学研），黒田洋一郎（東京都神経科学総合研），和田明彦（宮崎医大），立川英一（岩手医大）Wakade, Arun R. (Wayne State Univ.), Busik, Julia, Aunis, Dominique, 菅野富夫（生理研）

(1) Catecholamine secretion in chromaffin cells is negatively controlled by a granul membrane-associated heterotrimeric Go GTP-binding protein which interacts with GAP-43.

Aunis, Dominique (INSERM)

In streptolysin-O-permeabilized cultured chromaffin cells, it has been shown that G-protein effectors affect calcium-evoked catecholamine secretion. Activation of G-protein with mastoparan (MP), GTR-γ-S, aluminium fluoride or benzalkonium chloride inhibited catecholamine secretion (1). These effectors were found to stimulate GTPase activities asscociated with purified chromaffin granule membranes in a range of concentration that was similar to their inhibitory effect on secretion in permeabilized cells. GPAnt-2, a peptide known to antagonize the effects of MP on Go blocked both the inhibitory effect of MP on secretion and the stimulatory effect of MP on chromaffin granule membrane GTPase activity (1). Antibodies were raised against the C-terminal end of Go, Gi1/2 and Gi3 alpha-subunits and used in permeabilized cells : specific affinity-purified antibodies raised against Go were the only ones able to reverse both the MP-induced inhibition of catecholamine release and the MP-evoked stimulation of chromaffin granule membrane-associated



GTPase activity. From these experiments an inhibitory Go-protein, possibly located on the membrane of secretory granules is involved in the final stages of exocytosis in chromaffin cells.

Anti-Go, anti-Gi_3 and anti-$Gi_{1/2}$ antibodies were used immuno-cytochemically localize GTP-binding proteins in cultured bovine chromaffin cells (2). Secretory granules were visualized with rat immunoglobulins raised against dopamine-β-hydroxylase (DBH), a specific marker of secretory granules in chromaffin cells ; double labelling was examined by confocal laser microscopy and analyzed on serial optical sections (0,2μm). Gi_3 was found to be on the plasma membrane while $Gi_{1/2}$ appeared as associated with cytoskeletal-like filamentous structures surrounding nucleus. In contrast, Go was present on all DBH-positive intracellular organelles, confirming previous biochemical data (1, 3).

Studies on permeabilized chromaffin cells were performed to determine the role of Go in the control of exocytosis. Regulated exocytotic process which requires MgATP and calcium can be described as two sequential steps : ATP seems to act before calcium by maintaining the secretory apparatus in a *primed* state. Low calcium concentration is sufficient for modulating the ATP-priming step, while higher calcium concentration up to 100 μM are required to trigger the final fusion step (4). Therefore exocytosis can be dissected into distinct ATP-dependent and ATP-independent phases in permeabilized cell models. We found that in addition to Go there is a second heterotrimeric GTP-binding protein involved in the regulated release of catecholamines from chromaffin cells (5). Go protein controls the ATP-dependent priming reaction while the other G protein is involved in the late calcium-dependent, ATP-independent step occuring after the ATP-dependent priming reaction (6).

This model predicts that in resting cells free granules are under the control of an activated granule-bound form of Go protein which prevents the priming reaction. In stimulated cells the priming reaction is triggered by ATP, low calcium and the inhibition of granule-bound Go protein (1). Primed granules can then undergo fusion with the plasma membrane. Our data suggest that the fusion reaction requires high calcium concentration and the stimulation of a second trimeric G-protein. On the basis of data obtained on mast cells (7) and from our most recent data on chromaffin cells (Vitale, Aunis & Bader, unpublished), this trimeric G-protein is likely to be of the Gi_3 type and to be localized on the plasma membrane as evidenced from laser confocal immunocytochemistry (see above).

The location of Go on secretory granules predicts the existence of a putative intracellular pseudoreceptor, which may directly or indirectly participate in the control of regulated exocytosis. We found that purified GAP-43, the intracellular neuronal 43-kDa *Growth-Associated Protein* present in axonal growth cones and presynaptic terminals (8) and which activates purified Go (9), stimulates guanine nucleotide binding and guanine nucleotide exchange activity associated with

purified chromaffin granule membranes. The introduction of adrenal medullary purified GAP-43 into permeabilized chromaffin cells blocked calcium-dependent exocytosis and this effect could be specifically reversed with antibodies against the C-terminal domain of Go (10). A synthetic peptide corresponding to the N-terminal GAP-43 domain that interacts with Go inhibited catecholamine secretion ; this effect could be selectively reversed by the C-terminal peptide of Go. GAP-43 may thus act as the intracellular pseudoreceptor of membrane-bound Go regulating the priming step of exocytosis in chromaffin cells.

All the above described data have been acquired using bovine chromaffin cells maintained in primary culture and permeabilized with bacterial toxins. We also examined the role of Go and GAP-43 in regulated exocytosis using pressure microinjection combined with amperometric measurement of catecholamine secretion from individual chromaffin cells (11). Microinjection of anti-Go antibodies produced the expected response to high K^+ -stimulation whereas anti-$Gi_{1/2}$ had no effect. Microinjection of of the Syntetic peptide corresponding to the domain of GAP-43 that interacts with Go inhibited secretion. All these data strongly support the idea that GAP-43, or a related similar isoform, controls the exocytotic priming step in chromaffin cells by stimulating the granule-associated Go trimeric protein. The molecular nature of this Go trimeric protein is presently unknown and thus remains to be determined.

REFERENCES.

(1) Vitale, N., Mukai, H., Rouot, B., Thiersé, D., Aunis, D. & Bader, M. F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 14715-14723.

(2) Chasserot-Golaz, S., Dirrig, S., Vitale, N., Aunis, D. & Bader, M. F. (1995) in preparation.

(3) Toutant, M., Aunis, D., Bockaert, J., Homburger, V. & Rouot, B. (1987) *FEBS Lett.* 215, 339-344.

(4) Neher, E. & Zucker, R. S. (1993) *Neuron* 10, 21-30.

(5) Vitale, N., Thiersé, D., Aunis, D. & Bader, M. F. (1994) *Biochem. J.*300, 217-227.

(6) Vitale, N., Aunis, D. & Bader, M. F. (1994) *Cell. Molec. Biol.* 40, 707-715.

(7) Aridor, M., Rajmilevich, G., Beaven, M. A. & Sagi-Eeisenberg, R. (1993) *Science* 262, 1572-1579.

(8) Skene, J. H. P. (1989) *Ann. rev. Neurosci.* 12, 127-156.

(9) Strittmatter, S. M., Valenzuela, D., Sudo, Y., Linder, M. E. & Fishman, M. C., (1991) *J. Biol. Chem.* 226, 22465-22471.

(10) Vitale, N., Deloulme, J. C., Thiersé, D., Aunis, D. & Bader, M. F. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30293-30298.

(11) Vitale, N., Gonon, F., Thiersé, D., Aunis, D. & Bader, M. F. (1995) submitted for publication.

(2) Effects of GABA on $[Ca^{2+}]_C$ dynamics and electrical properties of rat adrenal chromaffin cells.

Busik, Julia (生理研), 中村美奈子 (北海道大), 菅野富夫 (北海道大, 生理研)

Large portion of rat adrenal chromaffin cells (74%) shows spontaneous $[Ca^{2+}]_C$ oscillations in the absence of any stimuli. We have previously shown that extracellular $[Ca^{2+}]_C$ entry is an important factor for the spontaneous oscillations. In the present study the effects of one of the possible physiological regulators, γ-aminobutyric acid (GABA), on the spontaneous $[Ca^{2+}]_C$ oscillations eletrical properties of rat adrenal chromaffin cells were investigated using Fura-2 $[Ca^{2+}]_C$ imaging and patch clamp techniques.

GABA at 50μM-1mM arrested spontaneous $[Ca^{2+}]_C$ oscillations. The arrest was often perceded by one $[Ca^{2+}]_C$ spike of higher amplitude. The effect of GABA was mimicked by muscimol, $GABA_A$ receptor agonist, but not baclofen, $GABA_B$ receptor agonist.

Rat adrenal chromaffin cells spontaneously discharge action potentials, which are Na^+ spikes with a Ca^{2+} component, GABA (100μM) elicited a brief flurry of action potentials of diminished amplitude, followed by arrest of action potentials. Further analysis showed that GABA at 100μM induced inward whole cell current and produced depolarization and membrane conductance increase in rat adrenal chromaffin cells. The effects were probably due to an increase in chloride ion conductance since the amplitude of GABA-induced current and the degree of depolarization depened on pipette $[Cl^-]$.

Thus, GABA may be a physiological substance that directly regulates discharge of spontaneous action potentials and spontaeous $[Ca^{2+}]_C$ oscillations in rat adrenal chromaffin cells.

(3) ラット副腎髄質細胞のレセプターを介する分泌応答の制御機構

藁科　彬 (新潟大・医・第一生理)

ラット副腎髄質細胞のムスカリン，ブラジキニン，ヒスタミン等の刺激による分泌は，初期の一過性応答とそれに続く持続相からなる。数十 μM オーダーの外液低 Ca^{2+}濃度，または 1mM 以下の Ca^{2+}流入の抑制時に，初期成分は持続成分に比較し，よく保持され，この成分への細胞内 Ca^{2+}ストアの寄与が示唆された。しかし，EGTA を含む Ca^{2+}-free Krebs (EGTA-Krebs) 溶液中や 2mM 以上の Ni^{2+}の存在下では分泌は正常の10%以下に急減した。Ca^{2+}指示色素を負荷した髄質細胞を，上記のアゴニストあるいはカフェインにより，EGTA-Krebs 溶液中で刺激すると，

一過性の鋭い $[Ca^{2+}]_i$ の変化がみられるが，これらの応答は thapsigargin (TG) と ryanodine (RY) のどちらよっても完全に抑制された。一方，正常 Krebs 溶液中のアゴニスト刺激による分泌は TG および RY によって全く抑制されなかった。これらの結果は細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離は，Ca^{2+} 流入が正常か，または全く無いときには分泌への寄与は極めて少なく，減弱した Ca^{2+} 流入と協同するときのみ，分泌に顕著に関与するものと結論された。更に，Mn^{2+} 消光の実験から，アゴニスト刺激の初期には持続相よりも強い Ca^{2+} 流入があり，これが正常溶液の中での著明な初期相形成に寄与することが示唆された。この初期の Ca^{2+} 流入は TMB-8 により選択的に抑制され，ホルボルエステルや外液 ATP により複雑な修飾をうけ，分泌応答に影響することが見いだされた。

(4) Cytosolic Ca^{2+} elevation induced by muscarinic receptor activation in adrenal chromaffin cell

伊藤茂男，中里幸和（北海道大・大学院獣医学研究科・薬理）

モルモット分離副腎髄質細胞を用いて，ムスカリンによるカテコルアミン分泌と細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]i$) の変化を調べた。$[Ca^{2+}]i$ は fura-2 を負荷した単一細胞を用いて測定した。ムスカリンによる分泌はピレンゼピンと 4-DAMP により抑制された。ムスカリンは一過性及びそれに続く持続的 $[Ca^{2+}]i$ の増加を起こした。一過性の $[Ca^{2+}]i$ は外液の Ca^{2+} 除去下においても観察され，カフェインの前投与及びイノシトール三燐酸 ($InsP_3$) の細胞内投与で抑制された。ムスカリンは単一髄質細胞への Mn^{2+} 流入を促進した。ムスカリンによる持続的な $[Ca^{2+}]i$ の増加は外液の Ca^{2+} 除去，D-600 投与及び細胞の膜電位固定 (-60mV) により顕著に抑制された。以上の成績により，モルモット副腎髄質細胞では，M1 ムスカリン受容体の刺激は $InsP_3$ 感受性 Ca^{2+} 放出と電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介する Ca^{2+} 流入を起こすことが示された。

(5) Voltage-dependent Na channels in bovine adrenal chromaffin cells

和田明彦（宮崎医大）

Voltage-dependent Na channels are a family of proteins, which differ in their pharmacology, electrophysiology and molecular structure. In adrenal medulla, Na channels are sensitive to tetrodotoxin (TTX)/ saxitoxin (STX) (site 1 toxin), and relatively insensitive to μ-conotoxin, and brevetoxin PbTx-3 (site 5 toxin) allosterically potentiates veratridine (site 2 toxin)-induced ^{22}Na

influx via Na channels, thereby enhancing ^{45}Ca influx via voltage-ependent Ca channels, a prerequisite for the secretion and synthesis of catecholamines.

Although the density of Na channels is thought to be an important determinant of cell excitability, much remains unknown about the intra-and extra-cellular signals that modulate the up-and down-regulation of Na channels. Transformation of PC12 into sympathetic neuron-like cells by NGF is associated with the increased density of brain type II/IIA Na channels and peripheral nerve type 1 Na channels, but cAMP-dependent protein kinase is necessary at the transcriptional or posttranslational step (s) in the former (but not the latter) isoform of Na channels. In addition, it has not been examined whether protein kinase C modulates the density of Na channels at any given tissues.

In the present study, we treated cultured bovine adrenal chromaffin cells with cAMP-related coumpounds and protein kinase C activators, and charactrized Na channels by [^{3}H] STX binding and $^{2}2Na$ influx caused by veratridine and PbTx-3.

(6) Regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells: Possible roles of myosin II and cortical F-actin.

K. Kumakura, M. Ohara-Imaizumi, H. Misonou, K, Ikeda, T. Sakurai*, and Y. Nonomura*. Life Science Institute, Sophia University, and *Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

Recently, we have suggested that myosin light chain kinase (MLCK) plays an essential role in ATP-dependent priming of Ca^{2+} induced exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells (Kumakura et al., J. Neurosc. 14: 7695-7703, 1994), demonstrating that a specific inhibitor of MLCK, wortmannin and a peptide inhibitor corresponding to the pseudosubstrate domain of MLCK, inhibits ATP-dependent release of catecholamine from digitonin-permeabilized cells.

To clarify the implication of actin-myosin interaction or cortical F-actin in this mechanism, we studied the dynamic changes in actin network during Ca^{2+} -dependent exocytosis using rohdamine-phalloidin with Laser scanning confocai imaging system. We found that wortmannin produced remarkable disassembly of cortical F-actin, and that wortmannin blocked an increase of F-actin assembly by phalloidin observed as an increase of fluorescence intensity in the permeabilized cells. Impairment of ATP-dependent priming may reduce the supplement of the secretory vesicles to readliy-releasable pool, and consequently may affect the kinetics of the secretory response. We, therefore, examimed the effect of wortmannin on the kinetics of catecholamine release upon

physiological stimulation of the intact chromaffin cells by use of real-time monitoring technique (Kumakura et al., J. Neurochem. 46: 1851-1858, 1986). Upon a repetitive stimulation with acetylcholine (ACh) each of which lasts for about 4 s every 30 s, control cells responded with rather constant amplitude. In contrast, the amplitude of the secretory response in wortmannin treated cells decreased rapidly after the initial response that was comparable to that in the control cells. Upon a sustained stimulation with ACh, the initial velocity of the transient response was not affected by wortmannin. However, the late phase of the secretory response declined much faster in wortmannin-treated cells than in control cells. These results suggest, as we assumed, that impairment of ATP-dependent priming reduces the supplement of the secretory vesicles to readily-releasable pool, and consequently affects the kinetics of the secretory response. It is likely that these effects are due to the disassembly of cortical F-actin by wortmannin. We can not explain how the inhibition of MLCK results the disassembly of F-actin at present. We obviously need further evidences to conclude the disassembly of cortical F-actin is attributable to these changes in the kinetics of secretory response. However, in our preliminary experiments, another actin depolymerizing agent that selectively inhibits actin-myosin interaction produced the same characteristic changes is the kinetics of the secretory response.

On the basis of these results, we tentatively conclude that cortical F-actin plays an essential role for ATP-dependent priming or vesicle recycling stage in exocytosis. This putative role of cortical F-actin seems to be supported by actin-myosin interaction and MLCK in a variety of secretory cells including neurons.

Supported by grants from Ministry of Education, Science & Culture of Japan, 05680683, 06044199 to K. K., and 06780659, 07780705 to M. O.-I.. Grants from Nissan Science Foundation and from Hayashi Memorial Foundation for Female Natural Scientists to M. O.-I. are also acknowledged.

(7) 培養ウシ副腎髄質細胞における Ca^{2+} / カルモデュリン依存性プロティンキナーゼⅡの活性化とカテコールアミン分泌及びチロシン水酸化酵素の活性化との相関性について

柳原延章（産業医大・薬理）

Ca^{2+} / カルモデュリン依存性プロティンキナーゼⅡ（CaM キナーゼⅡ）は，その広範囲な基質特異性から刺激に対応した細胞内 Ca^{2+} の作用を伝達する重要な酵素として注目されている。最近 CaM キナーゼⅡの合成基質として syntide2 を用いて，自己燐酸化による Ca^{2+} -independent

protein kinase 活性の上昇をこの酵素の活性化と見なすことにより，CaM キナーゼⅡの活性化を細胞レベルで測定出来るようになった。そこで今回，培養ウシ副腎髄質細胞でのアセチルコリン(ACh) による CaM キナーゼⅡの活性化とを検討し，カテコールアミン (CA) 分泌，チロシン水酸化酵素 (TH) 活性と比較した。1）培養細胞を ACh で刺激すると，CaM キナーゼⅡ活性は時間及び濃度依存性に上昇した。この時間経過と濃度反応曲線は，CA 分泌及び TH 活性の上昇のそれらと非常によくにていた。2）細胞外液から Ca^{2+} を除去すると，ACh による CaM キナーゼⅡ活性の上昇及び，CA 分泌，TH 活性の上昇は消失した。3）ACh の CaM キナーゼⅡ活性の上昇効果はニコチンと同程度であり，一方ヘキサメトニウムはその効果を抑制した。4）細胞を $^{32}P\text{-}PO_4$ でラベル後 ACh で刺激すると，CaM キナーゼⅡの自己リン酸化反応の増強が観察された。

以上を要約すると，副腎髄質細胞を ACh で刺激すると CaM キナーゼⅡの自己リン酸化及び活性化が見られ，これらの反応は CA 分泌及び TH 活性に密接に相関していた。これらの事により，CaM キナーゼⅡはカテコールアミン正合性及び分泌の調節に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

(8) The regulation by zinc ion of P_{2U}-stimulated responses in PC12 cells.

小泉修一，井上和秀（国立衛生試）

Uridine 5'-triphosphate (UTP)-evoked increase in intracellular Ca^{2+} concentration ([Ca]i) and release of dopamine were investigated using rat phaeochromocytoma PC12 cells. UTP (1-100 μM) evoked an increase in $[Ca^{2+}]i$ in a concentration dependent manner. This response was decreased to about 30% by extracellular Ca^{2+} -depletion, but not abolished. This [Ca]i rise was mimicked by ATP but not by 2-methyl-thio ATP or α, β-methylene-ATP in the absence of external Ca^{2+}, suggesting that the response was mediated by P_{2U}-purinoceptors, a subclass of P_2-purinoceptors. The UTP-evoked [Ca]i rise consisted of two components; a transient and a sustained one. When external Ca^{2+} was removed, the sustained component was abolished, on the other hand, the transient component was decreased by about 70% but did not disappear. These results suggest that UTP induces Ca^{2+} -mobilization and, subsequently, Ca^{2+} -influx. The UTP-evoked increase in $[Ca^{2+}]i$ was not affected by Cd^{2+} or nicardipine, but was significantly inhibited by Zn^{2+} in the presence of external Ca^{2+}. Zn^{2+}, however, did not affect the Ca^{2+} response to UTP in the absence of external Ca^{2+}. UTP evoked the release of dopamine from the cells. This release was abolished by Ca^{2+} -depletion or Zn^{2+}, but not by Cd^{2+} or nicardipine. Taken together, the data demonstrate that UTP stimulates P_{2U}-purinoceptors and induces a rise in $[Ca^{2+}]i$ both by Ca^{2+} -mobilization and Ca^{2+} -influx in PC12 cells. The UTP-evoked dopamine release requires external Ca^{2+} which may

enter the cells through pathway sensitive to Zn^{2+}, but insensitive to Cd^{2+} or nicardipine.

(9) Molecular mechanisms of neurotransmitter secretion: Functional studies at synapses formed in culture

持田澄子（東京医大）

I have employed superior cervical ganglion neurons (SCGNs) to determine the function of presynaptic proteins in the secretion of neurotransmitter. SCGNs form cholinergic synapses in culture in the presence of nerve growth factor. These synapses expressed many presynaptic proteins characteristic of nature synapses; immunofluorescence staining showed the presence of synaptophysin, synaptotagmin, VAMP/ synaptobrevin-2, syntaxin and neurexin. The function of these proteins seems to be similar to that of mature synapses because botulinum neurotoxins A, E and C_1 inhibited transmitter release.

These synapse provide a useful preparation for investigation of acetylcholine release mechanisms. Two features of this preparation are particularly useful: the large cell bodies (30-40 μm) of these neurons and the short diffusion distance from cell body to release site at the synaptic terminals. Thus, it is possible to introduce large molecules, such as antibodies, peptides or neurotoxins, into the presynaptic neurons while detecting resultant changes in ACh release by measuring postsynaptic electrical responses. With this approach, I have obtained evidence supporting roles for syntaxin, a presynaptic membrane protein which forms a complex with calcium channels, as well as myosin II and myosin light chain kinase in neurotransmitter secretion.

Impairment of syntaxin by botulinum neurotoxin C_1 or anti-syntaxin antibodies introduced into the persynaptic neuron inhibited ACh release without affecting Ca^{2+} influx through Ca^{2+} influx, indicating that syntaxin plays an important role in evoked release of neurotransmitter.

For functional block of myosin activity, I employed anti-myosin II IgG for blocking myosin function, SM-1, an inhibitory peptied, and wortmannin for inhibition of myosin light chain kinase. When introduced into presynaptic neurons, these agents resulted in inhibition of synaptic transmission, apparently owing to an inhibition of ACh release from the presynaptic terminals, suggesting a model in which myosin light chain kinase phosphorylates myosin, and the resultant change in actin-myosin interaction is involved in neurotransmitter release.

(10) Extracellular phosphorylation of synaptic proteins during synaptogenesis

黒田洋一郎（東京神経科学総合研）

ラット大脳皮質細胞を単離培養するとニューロン間に多数のシナプスが形成される。この時，培養初期より細胞膜を透過できない ecto protein kinase 阻害剤 K-252b を添加すると，シナプスの形成数が著しく減少した。また，K-252b は，培養細胞の膜外表面で生じていると考えられる蛋白質リン酸化反応をも阻害した。このシナプス形成に関与する蛋白質の同定を試み，まず最高分子量で K-252b の効果の強い単一バンドを選んで切り出し，この蛋白質の部分アミノ酸配列の決定を行なった。その結果，この蛋白質は微小管関連蛋白質 MAP1b であることが判明した。さらに，MAP1b に膜貫通部位の存在も示された。これらの結果から，MAP1b の細胞外ドメインのリン酸化が皮質ニューロン間のシナプス形成に関与している可能性が示唆された。さらにモルモット海馬スライスで観察される長期増強 (LTP) の形成は ecto protein kinase 阻害剤 K-252b で抑制され，ecto prosphotase 阻害剤 PK-682 で促進された。LTP の分子メカニズムとして，細胞外リン酸の関与が必須であることが示唆された。

6．音響トランスダクションと脳内表現をめぐる学際的展望

1995年12月4日～5日

代表者：亀田和夫（北海道大）

世話人：山岸俊一，栗城眞也（生理研）

(1) 発声の基本周波数の制御における聴覚の関与の時間特性

河原英紀（ATR 人間情報通信研）

(2) 末梢での喉頭神経支配

吉田義一（久留米大・医，吉田耳鼻咽喉科病院）

(3) 発声運動中の喉頭求心性入力

坂本尚志（旭川医大・第二生理）

(4) 有毛細胞トランスダクションの最近の研究

大森治紀（京都大・医・生理）

(5) 聴覚末梢におけるフィードバック機構

和田　仁（東北大・工）

(6) 理論的に最適な聴覚フィルタ関数

入野俊夫（NTT 基礎研）

(7) ニューラルネットワークにおける時空間パターンの内部表現と遅延反応課題における前頭連合野と運動前野の活動から推測される感覚野の働き

味岡義明（豊田工大・工）

(8) 聴覚情報処理と脳梁

杉下守弘（東京大・医・音声研）

大伴　潔（東京学芸大・特殊教育）

山崎久美子（東京医歯大・教養部）

(9) 聴覚中枢研究の動向

力丸　裕（同志社大・工）

(10) 上オリーブ核の個体発生と進化

工藤　基（金沢大・医・第三解剖）

(11) 一次聴神経におけるフォルマントの表現

平原達也（NTT 基礎研）

P. Cariani, B. Delgutte (Eaton Peabody Laboratory, U. S. A.)

(12) モルモット皮質聴覚領活動の冷却 CCD カメラによる光学的計測

橋本　享（東京医歯大・医用器材研）

⑬　順応現象からみた聴覚情報

柏野牧夫（NTT 基礎研究所）

⑭　音楽知覚過程の認知科学的モデル化

阿部純一（北海道大・文・心理システム）

⑮　聴覚始動性の行動と大脳皮質フィールド電位

玄番央恵（関西医大・第二生理）

参加者氏名

亀田和夫，鎌田　勉（北海道大・歯），阿部純一（北海道大・文），坂本尚志（旭川医大・生理），和田　仁（東北大・工），杉下守弘（東京大・医音声研），堀川順生（東京医歯大・難研），村田計一（東京医歯大・名誉教授），吉川欣也（東京都臨床医学総合研），橋本　享（東京医歯大・医材研），後藤真孝（早稲田大院・理工），大川　剛（法政大・工），川田　晋（電気通信大院・情報システム），西方敦博（東京工業大・教育工開発センター），平原達也，柏野牧夫，入野俊夫，林　　実（NTT 基礎研），近藤康弘，三浦　淳（本田技術研），高木　明（静岡県立総合病院・耳鼻科），筧　一彦（名古屋大院・人間情報），黒柳　奨（名古屋工大院・電気情報工学），味岡義明（豊田工大・工），棚橋汀路（愛知医大・耳鼻科），黄　　捷（理研），北村達也（北陸先端大院・情報），工藤　基（金沢大・医解剖），浜田貴志，高野佐代子（金沢工業大院・システム設計工学），丸山直滋（新潟大・名誉教授），橋彌和秀（京都大・霊長研），倉片憲治（奈良先端大院・情報科学），大森治紀（京都大・医・生理），河原英紀（ATR 人間情報通信研），力丸　裕（同志社大・工），マルコン シャンドル（フジテック），玄番央恵（関西医大・生理），矢島幸雄（兵庫医大・生理），福留公利（九州芸工大・音響設計），吉田義一（久留米大・医耳鼻科），山岸俊一（生理研）

研究会概要

「音響情報がいかにトランスジュースされ，最終的に脳内にどのように表現されるか」をテーマとして研究会を開いた。参加者は基礎医学・臨床医学から工学および心理学にわたり，大学院生など若い参加者も多く，よき対話と相互理解の機会となった。例えばヒトの情報処理をコンピュータモデル化しようとする工学者は末梢・中枢の実際の神経支配様式に触れることができ，生体の形態・機能の複雑な実態からその統一的な理解に苦慮している医学者に，モデル構築の可能性を示唆した。発表に当たって生理研の視聴覚機器が活用されて有毛細砲の動きや被験者の当惑などがまざまざと実感され，感動的であった。

動物実験からは有毛細砲のイオンチャンネル・喉頭の形態と機能といった末梢機構から，大脳の工学的計測やフィールド電位計測から感覚・学習機構に議論が及び，ヒトにおけるデータでは脳梁の聴覚情報伝送の再評価から音楽聴の問題まで広く論じられた。最新の工学手法に触れたことは聴ニューロン活動の解析に新しい展望を開くかも知れないし，聴覚情報による発声制御の

データは行動制御の脳内ヒエラルキーの解明に手掛かりを与えることもあろう。

わが国では未だ学際的対話の機会は少ない。この研究会で具体的な学際研究が発表されるには至らないが，対話の場を与えた価値は高かった。このような研究会が引き続き行われることが参加者から強く要望された。

(1) 発声の基本周波数の制御における聴覚の関与について

河原英紀（ATR 人間情報通信研）

変換聴覚フィードバック (TAF: Transformed Auditory Feedback) は，発声時に聴覚を介してフィードバックされる音声の特定のパラメタを，信号処理技術を用いて疑似白色信号に基づいて実時間で変換し，疑似白色信号の性質を用いることによって，知覚から生成への影響を定量的に測定する方法である。操作する音声パラメタとして音声の基本周波数を用いた実験の結果は，知覚される基本周波数に変動が生じた場合にその変動を打ち消す方向への応答があることを示した。この応答は，変動から 150ms 程度の位置において最大の値を示す比較的速い応答と，400ms 程度の位置において最大値を示す遅い応答から構成されていることが認められた。TAF による測定結果を用いることにより，様々な条件における音声の基本周波数の軌跡の特性を，定量的に予測できることが示された。

(2) 末梢での喉頭神経支配

吉田義一（久留米大・医・耳鼻咽喉科）

喉頭の枠組み内における支配神経線維の胞体の所在，線維の走行，分布などを自律神経，感覚神経ならびに運動神経について紹介した。

成績はネコでの順行性ならびに逆行性の各種トレーサー法，組織化学法（蛍光抗体法を含む），免疫組織化学法などによるものである。交感神経は脊髄中間外側核の節前細胞，頚部交感神経幹内の節後細胞の局在と喉頭内での分布領域を示した。副交感神経では支配神経である上喉頭・反回神経内ならびに喉頭内での神経節の存在とそのニューロンの数，中枢との線維連絡，性質を述べた。

感覚神経では喉頭内の分布形式と密度，節状神経節内胞体の局在と数，孤束核への投射に触れた。運動神経に関しては特に疑核内での各内喉頭筋支配運動ニューロンの配列，数，大きさについて述べ，更にサルとの比較した成績を紹介した。末梢では支配順序，神経筋接合部についても

発表した。

(3) 発声運動中の喉頭求心性入力

坂本尚志（旭川医大・生理学第二）

除脳ネコ発声モデルにおける上位中枢からの運動指令と，喉頭からの求心性入力の統合機構について報告した。

単一呼吸ニューロンの活動記録から，発声に先行する吸息は，中心灰白質から直接投射を受けていない弧束核の吸息ニューロンの活動の増大によること。また，その増大は，後顔面神経核の呼ニューロンの抑制により引き起こされる脱抑制により誘発されることが明らかとなった。単一上喉頭神経線維の活動記録から，発声時の喉頭求心性入力は発声に伴う声帯の固有振動数を正確にフィードバックしていることが明らかになった。上喉頭神経切断の結果から，喉頭からの求心性入力は喉頭反射の経路を介して運動細胞に送られている可能性，および呼吸運動中枢にも影響を与える可能性が推測された。

延髄孤束核の吸息ニューロンのレベルにおいて，上位中枢からの運動司令と，末梢の喉頭からの求心性入力が統合され，音声生成に関与している可能性が示唆された。

(4) 有毛細胞トランスダクションの最近の研究ーレビューー

大森治紀（京都大・医・生理）

有毛細胞は感覚毛に加わる機械力がトランスヂューサーチャネルを開き受容器電位を発生する。トランスヂューサーでは順応機構がチャネル分子との関連で研究されている。機械的なゲート特性を持つイオンチャネルは機械刺激量がゲートに加わる過程に大きな多様性があり分子としての特定に困難がある。受容器電位は細胞内 Ca イオンの増大を引き起こしグルタミン酸を最有力候補とする神経伝達物質を放出する。小脳顆粒細胞に発現した NMDA 受容体をセンサーとする生物検定系によって興奮性アミノ酸の放出を確認した。

(5) 聴覚末梢におけるフィードバック機構

和田　仁（東北大・工）

60年代の Bekesy の研究によると，蝸牛の周波数選択性は聴神経におけるそれよりも，かなり鈍いものであった。70年代に，精度の高い計測手法を用い，生きた動物で蝸牛の周波数選択性を調べてみたところ，その選択性は聴神経のそれに近いものであり，刺激音圧が低いほど，その選択性は鋭いものであった。70年代終わりには，蝸牛が起源と考えられる，耳音響放射が発見された。また80年代には，単離された外有毛細胞に，電気および機械的刺激を加えると，細胞が自ら筋肉のように伸縮することも発見された。現在では，聴覚の鋭敏な周波数選択性に，この外有毛細胞の動きが大きく関与していると考えられている。本研究では，レーザ変位計による基底板振動の直接計測結果，耳音響放射計測結果，単離外有毛細胞の可動性計測結果および基底板挙動の数値シミュレーション結果を基に，蝸牛におけるフィードバック機構について述べる。

(6) 理論的に最適な聴覚フィルタ関数

入野俊夫（NTT 基礎研）

内耳における基底膜振動を模擬するためにガンマトーンフィルタ（ガンマ分布関数を包絡線として持つ正弦波）がよく用いられている。ガンマトーン関数は，reverse-correlation (revcor) 法により信号入力と聴神経発火から基底膜振動の伝達関数を推定するための近似関数として用いられて来た。また，心理物理実験的な聴覚フィルタ形状の近似関数としても良い。この関数は，推定に必要なパラメータ数が少なくて近似度が高いが，信号処理理論的な最適性や優位性が知られていなかった。本報告では，Mellin 変換によって得られるスケール表現を変形した表現において最小不確定性を満たすのがガンマチャープ関数になり，ガンマトーン関数はこれの第一次近似となっていることを示す。また，心理物理的な聴覚フィルタの形状の非対称性は，ガンマチャープ関数により良く近似できるを示す。また，短時間 Mellin 変換により音声信号を解析した結果を示す。

(7) ニューラルネットワークにおける時空間パターンの内部表現と遅延反応課題における前頭連合野と運動前野の活動から推測される感覚野の働き

味岡義明（豊田工大・工・制御情報工学）

本稿では，簡単なニューラルネットワークを用いて前頭連合野と運動前野の活動データから感覚野の働きに対する一つの説明を試みる。まず加重和，しきい関数，遅延からなる簡単なニューロンモデルを組み合わせた連続時間・非対称相互結合型ニューラルネットワーク (Adaptive Junction) において，時空間パターンが排他的線形可分離である場合，如何なる時空間パターンの集合に対しても一次連鎖が存在することが理論的に証明された。このことから一次連鎖は Adaptive Junction における最も基本的な内部表現であると考えられる。一方で猿を用いた遅延反応課題において運動前野や前頭連合野で記録された特徴的な発火パターンより，猿の前頭連合野と運動前野で一次連鎖が実行されていることはほぼ間違いがない。故に感覚野では，入力刺激を排他的線形可分離な時空間パターンに変換することが主な機能のうちの一つであると推測される。

(8) 聴覚情報処理と脳梁

杉下守弘（東京大・音声言語医学研）
大伴　潔（東京学芸大・特殊教育研）
山崎久美子（東京医歯大・教養）

左右の耳に同時に異なる言語刺激を呈示する条件（ダイコティックリスニング）下で，脳梁全切断例は「強い左耳刺激抑制」を呈する。これは，左耳から右半球にいたった聴覚情報が脳梁を介して「言語優位半球である左半球」に到達しなくなったために生ずると考えられる。「左耳刺激の強い抑制」は脳梁全切断だけでなく脳梁部分切断でも生ずると考えられるが，脳梁のどの部分かは未だ明らかではないので検討した。対象としたのは５例の症例で，２例は脳腫瘍，１例は脳動脈奇形，残り２例は重度てんかんで，いずれも脳梁部分切除術が行われた。「左耳刺激の強い抑制」は２例の症例でのみ認められた。これらの症例は膝・膨大法で脳梁後部15.5－18.5％が切除されていた。吻・膨大法で脳梁後部20－24％が切除されていた。したがって，聴覚情報は右半球から左半球へ脳梁の後部5/1－4/1を介して伝達されると思われる。

(9) 聴覚中枢研究の動向

力丸　裕（同志社大・工・知識工）

Neuroscience 集会（San Diego1995年11月12－16日）の参加者は2万人におよび，聴覚分野でも200を越える演題が出され，聴覚研究の Mushrooming 現象が伺えた。聴覚研究の中心は末梢機構にあったが，中枢研究の割合が増し，比率は逆転した。末梢研究が減少したのではなく，中枢研究が激増したためである。神経生理の分野ではトノトピー以外が主流となり，時間的な情報処理に関連した題材が増加してきた。神経解剖では，以前のような連絡を調べるだけではなく，機能と関連したものが目立った。最近，外側毛帯（とりわけ背側核）が研究者の興味を集めている。上オリーブの演題も多かったが，内側核については皆無といってよかった。哺乳類の行動学的研究は，その重要性にもかかわらず，数が少なかった。神経行動学分野での歌鳥の演題が大幅増加した。総じて，視覚研究の二番煎じではない，聴覚研究ならではの「時間情報処理」に関連した研究への指向性が感じられた。

(10) 上オリーブ核群の個体発生と進化

工藤　基（金沢大・医・第3解剖）

上オリーブ核群は両耳機能－音源定位中枢として近年研究が進んでいる。動物種による変異が多いので個体発生も興味深い。同時期に生まれた細胞が同じ形質を発現するかどうか BrdU を用いた免疫組織化学による方法で調べた。1）外側核 (LSO)：交叉性は早期に (E12-E13) 非交叉性は後期に (E14-E16) 生まれる。交叉が早く非交叉が後という原則が他の系で示唆されていたが聴覚系で始めての発見である。2）内側核 (MSO)：上オリーブ核群の中で最も早期 (E12) に分裂する。神経発生の早い細胞は系統発生的にも古いといわれているので，鳥や爬虫類の Nucleus Laminaris との相同仮説を支持する。3）上傍核 (SPN)：大小の細胞を含む核だが発生時期は一様に E13 であることから系統の同じ単一起源を示唆する。4）内側台形体核 (MTB): Glycine 作動性の形態の均一な細胞集団で発生時期は E14 である。

(11) 一次聴神経におけるフォルマントの表現

平原達也（NTT 基礎研）
P. Cariani, B. Delgutte (Eaton Peabody Laboratory, U. S. A.)

母音の音韻性判断に重要であるフォルマントの一次聴神経上における表現を明らかにするために，基本周波数 (F0) が 150Hz と 350Hz の合成母音刺激に対するネコの一次聴神経の応答を測定した。その結果，F0 = 150Hz の刺激では F1を構成する個々の調波成分は分離されずに F1 周波数が平均発火頻度プロファイルのピークとして表現されるが，F0 = 350Hz の刺激では個々の調波成分は独立したピークとして表現され F1 周波数自身はピークとして表現されないことがわかった。また，後者の場合，発火間隔は常に調波成分周期に対応した。さらに，発火頻度・時間間隔いずれの表現においても独立したピークとして表現される F1 領域にある 2 つの強い調波成分音の振幅比は，物理的な振幅比を再現していた。これらの結果は，フォルマントが陽に表現されない場合には，調波成分音の振幅比情報が母音の音韻性を決定する要因と成りうることを示唆する。

(12) モルモット皮質聴覚領活動の冷却 CCD カメラによる光学的計測

橋本　享（東京医歯大・医用器材研）

大脳皮質聴覚領のニューロン活動に伴う膜電位変化を，膜電位感受性蛍光色素 (RH795) を用いて蛍光画像に変換して，その変化を冷却 CCD カメラにより観察した。Xe ランプのパルス発光を蛍光色素の励起光源に用い，蛍光発光の瞬時パターンを観察した。種固有の音声刺激に対する応答を時系列的に観察することにより，音声刺激に含まれる情報要素の所在とその脳内表現を実験的に調べた。脳の神経活動を光学的に観測する技術の発端は25年以上も前に遡り，この方法の原理は神経細胞をはじめとする興奮性をもった細胞膜に膜電位感受性色素を取り込ませると，神経活動に伴う膜電位の変化に対応して吸光や蛍光発光など膜の光学的性質に変化が生じたことに着目し，神経活動を可視画像化したものである。

この方法を中枢電気活動の光学的測定法として聴覚野に適用し，音声認識の神経機構に迫ろうというのが本報告の主題である。光学的測定法の適用例や研究成果についても紹介した。

(13) 順応現象からみた聴覚情報処理

柏野牧夫（NTT 基礎研究所）

一定の刺激にさらされた場合に知覚特性が変化する順応現象は，すべてのモダリティの様々なレベルでみられる。聴覚でも，ラウドネス，ピッチ，空間定位，定位の動き，周波数変調，振幅変調，言語音声などに関する多様な順応現象が知られている。順応は，特定の処理を行う神経ユニットの感度変化や，ユニット間の相互抑制などによって生じると考えられている。これは，単なる知覚の錯誤ではなく，刻々と変化する外界の状況に応じて適切に知覚するという生体の適応性の現れである。聴覚系の情報処理を，(1)音響信号を受容し神経パルスに変換する過程，(2)各周波数帯域における強度変化や時間情報を符号化する過程，(3)周波数変化・振幅変調の相関・両耳間差の変化などの特徴を抽出する過程，(4)特徴を統合して音響事象の記述を得る過程，の 4 段階に分けるならば，その各段階において，順応が情報処理を効率化する上で重要な役割を担っていることがわかる。

(14) 音楽知覚過程の認知科学的モデル化

阿部純一（北海道大・文・心理システム科学）

聞き手が，聴覚系に入力された音の流れを，単なる音の流れとしてではなく，“音楽 (music)”として認識できるためには，心の中で（言い換えるならば神経系の中で）“リズム的体制化 (rhythmic organization)”と“調性的体制化 (tonal organization)”の処理が十全に行われることが前提となる。著者らは，現在までのところ，問題の単純化のために，調性的体制化の過程とリズム的体制化の過程をそれぞれ独立にモデル化してきている。具体的には，音符の列を入力データとして採り，各要素音がもつ“音高”情報のみからその音列（メロディ）全体の“調”を漸進的に解釈していく調認定モデル，および，同じく各要素音の“音長（音価）情報”のみから“拍および拍子”を解釈していく拍認定モデル，をそれぞれ提案してきている。本発表では，そうしたモデルのアルゴリズムと心理学的妥当性について，またさらには，今後の課題について報告した。

(15) 聴覚始動性の行動と大脳皮質フィールド電位

玄番央恵（関西医大・第二生理）

サルに自発性レバー上げ運動を訓練した後，手術により大脳皮質の表面と 2.0-3.0mm 深部に電極を慢性的に設置した。サルに１種類の聴覚刺激を与え，刺激に応じて迅速，的確にレバー上げをするようになるまでの学習過程中，慢性電極を用いて大脳皮質フィールド電位を記録し，分析した。刺激が純音の場合，学習初期の刺激と運動を結びつける認知学習に聴覚連合野が関与し，後期の熟練学習に大脳－小脳連関の関わることが判明した[1]。刺激が複合音の場合は学習完成期までの日数が純音の場合より相当短く，認知学習に左前頭前野の関与することが明らかになった[2]。さらに２種類の純音の弁別を伴う GO/NO-GO 課題について検討したところ，運動をしないという判断と運動抑制に関わる皮質活動（NO-GO 電位）を主溝の背側壁で記録した[3,4]。その際，主溝より腹側の部位と眼窩前頭前野で運動する場合に著名な電位（GO 電位）の出現することが分かった。

１）Gemba & Sasaki, Exp Brain Res, 70 (1988) 43-49.
２）Gemba et al., Neurosci Lett, 190 (1995) 93-96.
３）Gemba & Sasaki, Brain Res, 537 (1990) 340-344.
４）Gemba, Neurosci Lett, 159 (1993) 21-24.

7．生理学実験手技に関する研究会

1995年8月17日～25日

代表者：栗原　敏（慈恵医大）

世話人：岡田泰伸（生理研）

講演

(1) 機能発現法によるcDNAクローニング

久保義弘（都神経研），井本敬二（生理研）

(2) 細胞への遺伝子導入

金田安史（大阪大・細胞生体工学センター），田村雅一，池中一裕（生理研）

(3) マウス個体を用いた遺伝子操作

八木　健（生理研）

実技

(1) 細胞内Ca^{2+}濃度変化の画像解析

葉原芳昭（北海道大・獣医）

浅田尚登（北教大・旭川）

奥川　久，中村　竜（ニコン）

(2) 神経活動に伴う蛋白質リン酸化および遺伝子発現変化

児島伸彦，山肩葉子，丸山　敬，浅田英穂，小幡邦彦（生理研）

(3) パッチクランプ

中山晋助，成瀬恵治，告野正典，L. M. Smith（名古屋大・医）

久木田文夫，老木成稔，森島　繁，挾間章博，富永真琴，岡田泰伸（生理研）

(4) 神経発生における遺伝子発現

池中一裕，鹿川哲史，馬場広子，山田真久（生理研）

(5) 神経ネットワークの標識・同定

松山清治，宮下英三，中隣克己，森　茂美（生理研）

(6) 脳磁図を用いたヒト脳機能の研究

柿木隆介，宝珠山稔，小山幸子（生理研）

(7) 摘出モルモット腸管の蠕動反射記録法

尾崎　毅（生理研）

(8) 超高圧電子顕微鏡操作実習

有井達夫（生理研）

［参加者氏名］

久保義弘（都神経研），金田安史（大阪大・細胞生体工学センター），葉原芳昭（北海道大・獣医），浅田尚登（北教大・旭川），奥川　久，中村　竜（ニコン），中山晋介，成瀬恵治，告野正則，L. M. Smith（名古屋大・医），栗原　敏（慈恵医大），秩父志行（近畿大・医），酒井秀紀（富山医薬大・薬），松波謙一（岐阜大・医），井本敬二，田村雅一，池中一裕，八木　健，児島伸彦，山肩葉子，丸山　敬，浅田英穂，小幡邦彦，久木田文夫，老木成稔，森島　繁，挾間章博，富永真琴，岡田泰伸，鹿川哲史，馬場広子，山田真久，松山清冶，宮下英三，中隣克己，森　茂美，柿木隆介，宝珠山稔，小山幸子，尾崎　毅，有井達夫，山岸俊一（生理研）

［概要］

本年は，第6回目の研究会であり，昨年からはじまった「生命科学実験技術トレーニングコース」としては第2回目のものである。全国から学部学生，大学院生，若手研究者を中心に多数（講演受講者116名，実習受講者185名）の参加者が得られた。講演は“分子細胞生物学の展開と生理科学”というテーマで行われ，分子生物学的実験技術の紹介と，その導入による生理学研究の新しい展開が生き生きと示された。実習は昨年より更に2項目増え，質量ともに充実化され，小グループ制による実技指導はとても有益であったとの感想が多数寄せられた。

8．内外受容器のブドウ糖分子識別ならびに反応発現機構

1995年12月11日～12日

代表者：坂田利家（大分医大・医・第一内科）

世話人：山岸俊一（生理研）

(1) エネルギー代謝における神経ヒスタミンの新しい展開

坂田利家，吉松博信，黒川　衛（大分医大・医・第一内科）

(2) 膵β細胞におけるフリーラジカル産生と感受性

櫻井孝司，寺川　進（浜松医大・光量子医学）

(3) 膵β細胞の NAD (P) H に及ぼす glucagon の作用

北里　宏，何　莉萍（滋賀医大・第二生理）

(4) 満腹物質 aFGF の老化脳および免疫低下の防止

大村　裕，佐々木和男，李　愛軍，木村　宏，遠山育夫（日本臓器・生物活性科学研）

(5) グルコースの免疫器官支配神経活動への効果

新島　旭（新潟大・医）

(6) 視床下部ブドウ糖：エストロゲン―カルシウムネットワークと行動

粟生修司（九州大・医・第一生理）

(7) 褐色脂肪細胞における GLUT4 vesicle のリサイクリング

尾松万里子，北里　宏（滋賀医大・第二生理）

(8) 膵 B 細胞のカルシウムシグナリング：ミオシン軽鎖リン酸化酵素の役割

仁木一郎，飯田有二，日高弘義（名古屋大・医・薬理）

(9) Glucagon-like peptide-1 (7-37) の膵 B 細胞 Ca^{2+}電流に対する作用

泉井　亮，菅世智子（弘前大・医・第一生理）

(10) ラット膵島におけるグルコースからのグリセルアルデヒドの生成

三輪一智，谷口繁生，村田富保（名城大・薬・病態生化）

(11) 新しい膵ペプチド PACA-P によるグルコース誘発インスリン分泌の調節

矢田俊彦，中田正範，八重倉和朗（鹿児島大・医・第一生理）

(12) 膵β細胞内ブドウ糖代謝機構と糖尿病におけるその異常

石田　均，清野　裕（京都大・医・臨床代謝栄養）

参加者

泉井　亮（弘前大・医・第一生理），櫻井孝司（浜松医大・光量子医学），仁木一郎（名古屋大・医・薬理），三輪一智，豊田行康，田口忠緒（名城大・薬・病態生化），新島　旭（新潟大・医），藤田恒夫（日本歯大・新潟歯学部・第二解剖），北里　宏，尾松万里子，何　莉萍（滋賀医大・

第二生理)，柏木厚典，平出美和（滋賀医大・第三内科)，石田　均（京都大・医・臨床代謝栄養)，大村　裕（日本臓器・生物活性科学研)，足立　明（岡山大・歯・口腔生理)，井元敏明（鳥取大・医・第一生理)，粟生修司（九州大・医・第一生理)，坂田利家（大分医大・医・第一内科)，矢田俊彦（鹿児島大・医・第一生理)，山岸俊一（生理研）

研究会概要

糖の代謝学は古くから研究されてきた系であるが，これを生体の代謝調節系として理解しようとすると，不明な点が多い。とりわけ，糖受容蛋白あるいは糖輸送蛋白によるブドウ糖分子の識別から代謝に至る機構，血糖の恒常性維持に関与する調節機構などの解明は，重要な課題である。本年度の研究会では先ず，ブドウ糖分子の受容体レベルでの識別，更にその細胞内情報としての電気信号や化学信号の機作が，免疫組織学や分子生物学的手法によって明らかにされ，活発な意見の交換がおこなわれた。血糖の恒常性維持に関する各器官の役割についても，新しい成果が発表された。具体的には，フリーラジカル，NAD (P) H, aFGF, グルカゴン様ペプチド，グリセルアルデヒド，PACA-P, Glut, 神経ヒスタミンといった物質による調節能がとりあげられた。これに自律神経機能との絡みを加え，細胞レベルでの糖分子の，また同時に糖分子に対する反応発現機序についても，活発な討議がおこなわれた。今回の研究会が目指したブドウ糖分子の識別，更にその反応発現に至る機構，これらの問題を各領域から多角的に討議し，課題の解明に向け，より一歩前進した成果をおさめることができた。

(1)　エネルギー代謝における神経ヒスタミンの新しい展開

坂田利家，吉松博信，黒川　衛（大分医大・医・第一内科）

ラットを絶食下におくと，血中のヒスタミン (HA) が24時間後より上昇し始め，48時間後には絶食前値の２倍に達し，それ以降は平衡状態となる。この HA 上昇は視床下部 HA 神経系の賦活化によっており，視床下部腹内側核ニューロンの糖欠乏状態がその主因をなしている。しかし，血糖の推移を調べてみると，絶食48時間後にはむしろ回復傾向が認められた。脳内 HA 神経系の活動性を示すヒスチジン脱炭酸酵素活性は，絶食経過に一致して上昇した。しかも前駆アミノ酸の L-ヒスチジン (HD) 濃度に依存していた。一方，絶食経過と共に視床下部 HD 濃度は減少したが，その95％減を境に，一転して HD 濃度は急上昇し，その結果 HA 神経系が賦活化され，脂肪分解が中枢性に誘発されることが判明した。以上の結果から，中枢のエネルギー欠乏→中枢内 HA 賦活化→末梢脂肪分解→中枢への遊離脂肪酸供給といった恒常性維持機構が推察された。

(2) 膵β細胞におけるフリーラジカル産生と感受性

櫻井孝司（生理研），寺川　進（浜松医大・光量子医学）

ラットから摘出した膵組織中のβ細胞においてフリーラジカルの発生とその効果について検討した。β細胞のラジカル感受性はビデオ顕微鏡下に直接観察した脱顆粒反応によって定量した。ラジカル産生は化学発光法で測定した。一酸化窒素 (NO) 産生剤 (SNP 10μM, NOC-12 10μM) は，それぞれ一過性の脱顆粒反応パターンを示した。この反応は 8-Br-cGMP (3mM) によるものと類似し，NO 合成阻害剤 L-NIO (0.5mM) の存在下で有意に阻害された。NO の産生は計測できなかった。一方，スーパーオキシド (O_2^-) を産生するキサンチン・キサンチン酸化酵素の存在下では，持続性の脱顆粒反応が見られた。この反応パターンは過酸化水素 (10μM) や催糖尿病薬 (Streptozotocin, 1mM) によっても惹き起こされた。グルコース (15mM) 刺激時に，MCLA 溶液中の島細胞から化学発光が認められ，O_2^- の持続的な産生が起こる事が示された。β-carotene (1mM) または rat serum (10%) を終始添加した条件下では持続性脱顆粒反応および O_2^- 産生のいずれも検出できなかった。以上により，*in vitro* の膵β細胞はラジカル産生能とラジカル感受性を有する事が示された。

(3) 膵β細胞の NAD (P) H に及ぼす glucagon の作用

北里　宏，何　莉萍（滋賀医大・第二生理）

細胞外グルコース濃度が中程度であるとき，細胞外液に glucagon を加えると，β細胞のスパイクバーストの持続時間は延長し，細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇した。即ち，glucagon はβ細胞の電気的活動に細胞外 glucose 濃度を高くしたのと同様の変化をもたらす。細胞外グルコース濃度を 2.8mM から 11.1mM に変えると，細胞内の還元型 pyridin nucleotides (NAD (P) H) の濃度は上昇した。11.1mM グルコース存在下で glucagon を作用させると NAD (P) H の濃度は更に上昇した。細胞外に Ca^{2+} が存在しない場合，glucagon は NAD (P) H 濃度に変化をもたらさなかった。また，Ca^{2+} が存在する条件下で glucagon を作用させているとき，細胞外液から Ca^{2+} を取り除くと，NAD (P) H の濃度は低下した。細胞外に Ca^{2+} が存在しても，calmodulin 拮抗剤である chlorpromazine, W-7, trifluoperazine のいずれかを与えると gluccagon によって増大させられた NAD (P) H は減少した。以上の実験結果は，膵β細胞において cAMP 単独ではグリコーゲン分解は促進されず，Ca^{2+} /calmodulin が cAMP と協同して働いたときにのみ促進されることを，強く示唆している。

(4) 満腹物質 aFGF の老化脳および免疫低下の防止

大村　裕，吉井春夫，深田有理子（日本臓器製薬・生物活性科学研）
佐々木和男（富山大・工・生体情報）
李　愛軍（九州大・医・生理）
堀　信顕（九州大・歯・薬理）
遠山育夫，木村　宏（滋賀医大・分子神経）

SAM （老化促進モデルマウス） P8 の生後 3 週目から，aFGF のN端フラグメント aFGF (1-15) や [^{16}AL]aFGF (1-29) の週 1 回皮下投与で，10ヵ月間，対照食塩水投与群に比し，有意に学習・記憶を正常に維持した。Choline acetyltransferase (ChAT) 活性検索で，海馬に投射する内側中隔コリン作動性ニューロンの ChAT 量は対照群の著名な現象に対し，aFGF フラグメント群は正常化している。また，海馬ニューロンの aFGF 受容体とムスカリン受容体密度は，対照群で低下するが aFGF 群では正常である。aFGF フラグメント群では10ヵ月目の海馬スライス標本での長期増強促進がみられるが対照群ではみられない。さらに SAMP8 の加齢によるT細胞性免疫低下が aFGF フラグメント群では有意に正常化している。これらのことから，aFGF フラグメントが加齢による脳老化と免疫低下の正常化に寄与すること，また脳学習・記憶能とT細胞性免疫能は密接に関連していることを示している。

(5) グルコースの免疫器官支配神経活動への効果

新島　旭（新潟大・医）

低血糖はストレス刺激であり，末梢，中枢野グルコースセンサーを介して肝臓，膵臓，副腎などを支配する交感神経活動の促進をおこす。また，血糖上昇は交感神経活動を抑制し迷走神経活動を亢める。一方，膵臓，胸腺などの免疫器官には自律神経支配があり，ストレス刺激により脾臓への交感神経活動が亢ると脾臓の NK 細胞活性が低下するという。

そこで，麻酔ラットを使用し，静脈内或いは口腔内にグルコースを投与し脾臓交感神経活動，胸腺への迷走神経活動への効果を観察した。脾臓交感神経活動はグルコーッス 50mg, 100mg, 200mg (0.5ml) の静脈内投与により用量依存的に抑制され 150mg (1ml) の皮下注射でも緩りとした抑制が観察され，胸腺支配迷走神経では促進反応が見られた。5％グルコースによる味覚刺激では脾臓交感神経では抑制，胸腺迷走神経ではわずかな促進が見られた。グルコースは自律神経を介して免疫機能を促進することが示唆される。

(6) 視床下部ブドウ糖：エストロゲン―カルシウムネットワークと行動

粟生修司（九州大・医・第一生理）

視床下部腹内側核 (VMH) には摂食停止及び雌性行動促進機構が共存している。モルモットVHM で記録されるニューロンの約20％は大型で樹状突起が発達しており，A電流成分をよく示すが，ブドウ糖及びエストラジオールはこのタイプのニューロンに対して特異的に作用し，興奮性反応を引き起こす。エストロゲンはブドウ糖の取込みを促進する。一方で絶食は VMH エストロゲン受容体陽性細胞を減少させることが知られており，フドウ糖及びエストロゲン受容機構に相互作用が存在する。最近，我々は VHM が胃迷走神経を介してカルシウム (Ca) 代謝を調節していることを見いだした。視床下部による摂食及び Ca 代謝調節に性差が認められ，ブドウ糖の視床下部外側野注入による胃酸分泌抑制作用もエストロゲンで修飾されることも報告されている。これらのことは，視床下部のブドウ糖，エストロゲン及び Ca 調節系は互いにネットワークを形成し，行動やホメオスタシス系の調節を行っていることを示唆している。

(7) 褐色脂肪細胞における GLUT4 vesicle のリサイクリング

尾松万里子，北里　宏（滋賀医大・第二生理）

単離したラット褐色脂肪細胞を用いてインスリンによるグルコース輸送促進機構を検討した。細胞外に 200nM アデノシンが存在するとき，インスリンによるグルコース輸送増大は約30倍であったが，アデノシンを取り去ると，その増大は半減した。形質膜のグルコーストランスポータアイソフォームである GLUT4 を光親和性標識化合物で標識した後免疫沈降法で定量すると，インスリン処理をおこなった細胞の形質膜に増大する GLUT4 の量は細胞外アデノシンを取り去ることによって半減した。各膜分画の GLUT4 をウエスタンブロッティングによって定量したが，インスリンによる形質膜 GLUT4 の増加は細胞外アデノシンに影響されなかった。

以上のことから，褐色脂肪細胞において細胞内ベシクルにストアーされている GLUT4 はインスリン刺激によって形質膜にトランスロケーションされ，細胞外アデノシンはトランスロケーションの最終段階である膜融合機構に関連していると考えられた。

(8) 膵B細胞のカルシウムシグナリング：ミオシン軽鎖リン酸化酵素の役割

仁木一郎，飯田有二，日高弘義（名古屋大・医・薬理）

膵B細胞からのインスリン分泌にとって最も重要な分泌刺激物質であるブドウ糖は，複数のセカンドメッセンジャーを介してインスリン分泌を調節する。これらのセカンドメッセンジャーのうち，中心的であると考えられているのが，細胞内Ca^{2+}の上昇である。ブドウ糖を含む多くの分泌刺激物質のもたらす細胞内Ca^{2+}の上昇はその分泌パターンと比較的よく符合するが，Ca^{2+}上昇以降のメカニズムすなわちカルシウムシグナリングの分子機構は十分に解明されていない。従来細胞内Ca^{2+}の担う情報は，カルシウム結合蛋白質によって伝達される。これまでに数百種が報告されているカルシウム結合蛋白のうち，早くから分泌との関連が指摘されていたものにカルモジュリンがある。カルモジュリンは蛋白質リン酸化酵素を含むCa^{2+}依存性に複数の酵素を活性化する。そこで，カルモジュリン依存性プロテインキナーゼであるミオシン軽鎖リン酸化酵素(MLCK)の役割を単離ラット膵島を用いて検討した。

膵島のホモジネートを，[γ-^{32}P]-ATPおよび外から与えたミオシン軽鎖と共にインキュベートし，この基質に対する^{32}Pの取り込みを検討したところ，時間依存性の取り込みが見られ，更にMLCKの阻害剤であるML-9によって濃度依存性に抑制された。この阻害剤は，Ca^{2+}流入によりインスリン分泌を惹起する高K^+やブドウ糖刺激によるインスリン分泌を抑制し，膵B細胞のブドウ糖による分泌刺激関連にこの酵素が関与していることが示唆された。

さらにMLCKが膵B細胞内で働くステップを検討するため，ニワトリ砂嚢から精製したMLCKを抗原として，抗MLCKモノクローナル抗体を産生するいくつかの細胞株を確立した。また，細胞内にこれらの抗体を導入する目的でラットの膵島の細胞膜透過性をストレプトリシンO処理によって高めた実験系を用いて分泌実験を行った。Ca^{2+}による透過性膵島からのインスリン分泌は抗MLCKモノクローナル抗体により抑制された。異なるモノクローナル抗体はCa^{2+}によるインスリン分泌に対して異なる程度の分泌抑制を示したが，その抑制の強さは抗体のin vitroでのMLCK阻害作用に平行していた。この分泌抑制はCa^{2+}のみならず，刺激濃度以下のCa^{2+}が共存する状態でのTPAやGTP-γSなど広範な分泌刺激に対して観察された。これらの結果から，MLCKが分泌顆粒の開口放出よりも近位，すなわち分泌顆粒のトランスロケーションなどのステップに働くものと考えられる。すなわち，MLCKはブドウ糖によるインスリン分泌において，その最終過程よりもむしろ分泌の準備状態あるいはブドウ糖による分泌幅機構の形成に関与している可能性が示唆される。

(9) Glucagon-like peptide-1 (7-37) の膵B細胞 Ca^{2+}電流に対する作用

泉井　亮，菅世智子（弘前大・医・第一生理）

単離ラット膵B細胞を，外液 glucose がなく，K^+電流を極力減少させる条件下に電位固定すると，膜電位 -20 ～ 0mV で最大値を示す内向き電流が記録された。この電流は dbcAMP 投与で増大し，nifedipine で抑制された（Ca^{2+}電流）。Glucagon-like peptide 1 (7-37) (GLP-1) (20nM) の投与によって最大 Ca^{2+}電流は 109.3 ± 15.3pA から 146.5 ± 18.8pA (n = 24) に増大した。この効果は細胞内に GDPβS や Rp-cAMPS を予め投与しておくと消失した。GLP-1 は膵B細胞において，外液 glucose とは無関係に，G-protein, adenylate cyclase の活性化を介して cAMP 濃度を高め，この結果 L-type Ca^{2+} channel に促進性に作用することが示唆される。

(10) ラット膵島におけるグルコースからのグリセルアルデヒドの生成

三輪一智，谷口繁生，村田富保（名城大・薬・病態生化）

私共は，単離ラット膵島にグリセルアルデヒド (GA) を作用させると，解糖系律速酵素の１つであるグルコキナーゼ (GK) が阻害され，グルコース (Glc) 刺激インスリン分泌が低下することを見出した。(Diabetes 42, 1003-1009, 1993)。もし，膵島内で GA が生成すれば，GA の蓄積によるインスリン分泌の低下が起こりうると考えられる。

単離ラット膵島を培養すると，時間（10時間まで）および Glc 濃度（20mM まで）依存的に GA が蓄積した。GA の生成はアルドースレダクターゼ阻害剤により抑制されなかった。一方，GK の阻害剤であるマンノヘプロツロースにより著明に抑制された。また，GK の基質となるマンノースからも Glc からと同様な GA 蓄積が見られた。

以上により，ラット膵島において Glc から GA が生成し，GA は GK の関与した経路により生成すると考えられた。生成 GA によりインスリン分泌低下が起こるか否かは今後検討したい。

(11) 新しい膵ペプチド PACA-P によるグルコース誘発インスリン分泌の調節

矢田俊彦，中田正範，八重倉和朗（鹿児島大・医・第一生理）
井樋田香織（鹿児島大・医・第二解剖）
桜田正也，菊池方利（朝日生命成人病研）

【目的】 Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は膵に局在する。そこで，インスリン分泌における PACAP の役割を検討した。

【結果】 (1) PACAP は 10^{-13}M の低濃度にてラット膵島からのグルコース誘発インスリン分泌を増強した。(2) PACAP は 10^{-13}M にて膵 β 細胞 $[Ca^{2+}]_i$ を増加させた。(3) $[Ca^{2+}]_i$ 増加の抑制条件はインスリン分泌を抑制した。(4)免疫組織化学的に，PACAP と I 型 PACAP 受容体が膵島に局在した。(5) PACAP (10^{-13}M) はグルコース不応答性 β 細胞に $[Ca^{2+}]_i$ 増加応答を誘導した。

【結論】 (1) PACAP は膵島に局在する。(2) PACAP は極めて強力なグルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチドである。(3)分泌は膵 β 細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 増加により仲介される。(4) PACAP は，グルコース応答性 β 細胞の応答の増強と，グルコース不応答性 β 細胞への応答の導入の二つの機構によって作用する。(5)その際 PACAP 選択的 I 型受容体が関与する。

(12) 膵 β 細胞内ブドウ糖代謝機構と糖尿病におけるその異常

石田　均，清野　裕（京都大・医・臨床代謝栄養）

インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) のブドウ糖に対するインスリン分泌不全の成因を明らかにする目的で，GK ラットより得た膵 β 細胞を用いて以下の検討を加えた。K_{ATP} チャネル活性を patch clamp 法により測定したとこ，ATP に対する感受性には変化を認めなかったものの，ブドウ糖に対する抑制不全を認めた。したがって膵 β 細胞内でのブドウ糖代謝機構に障害が存在するものと考えられた。さらにブドウ糖の中間代謝産物である glyceraldehyde による抑制には差を認めなかったが，dihydroxyacetone (DHA) に対する抑制率は GK ラットで明らかな低下を示した。この DHA は解糖系とミトコンドリア内での代謝機能を直接結び付ける特異な代謝系である glycerol phosphate shuttle (G-P shuttle) に入り代謝されることが知られている。したがって NIDDM の膵 β 細胞にはブドウ糖代謝障害が存在し，その障害部位の少なくとも一つは G-P shuttle 内に存在する可能性が考えられた。

9．細胞内シグナルのプロセシングと細胞機能の調節

1995年10月26日～27日

代表者：小島　至（群馬大）

世話人：岡田泰伸（生理研）

(1) 受精と Ca^{2+} -IP_3 感受性小胞体の分布と核内 Ca^{2+} 動態

宮崎俊一，白川英樹，白石浩一（東女医大・第2生理）

(2) IP_3 受容体の構造・機能・発現

古市貞一（東京大・医科研・化学研究）

(3) リアノジン受容体：1型と3型の分子薬理学

飯野正光（東京大・医・第1薬理）

(4) in situ 血管内皮・平滑筋細胞の Ca^{2+} シグナリングと機能調節エンドセリンの作用について

金出英夫（九州大・心臓血管研究施設）

(5) Cキナーゼと細胞膜 Ca^{2+} 輸送制御

重川宗一（循環器病センター・循環分子生理）

(6) 心血管系における遺伝子発現とシグナル伝達機構

伊奈田宏康，西村有平，林　正晃，中村智昭，田中利男（三重大・医・薬理）

(7) 細胞外カルシウムによる遺伝子発現の調節機構

岡崎具樹，鄭　雄一，西下聡英，石川敏夫，五十嵐徹也（東京大・医・第4内科）

(8) CキナーゼをPを介して糖蛋白は容積感受性 Cl^- チャネルを制御するか？

岡田泰伸，富永真琴，三輪晃子，富永知子（生理研）

(9) 腫瘍細胞のアドリアマイシン耐性株と非耐性株カルシウムシグナル

菅野富夫（北海道大・獣医・生理）

(10) 乳腺細胞における Ca^{2+} 波伝播の機序と役割

古家喜四夫（生理研）

榎本浩一（島根医大・生理）

(11) インスリン分泌機構における膵β細胞内シグナルと糖尿病におけるその破綻

清野　裕，石田　均（京都大・医・病態栄養）

(12) 脳損傷由来神経栄養因子とその部分ペプチドの神経細胞維持作用

小倉明彦（大阪大・理・生物）

(13) 受容体による Ca^{2+} 透過性チャネル CD20 の活性調節

神崎　展，小島　至（群馬大・生体調節研）

(14) 酵母の細胞分化における Ca^{2+} と MAP キナーゼカスケード

飯田秀利，奥村万樹子，小野智子（基生研）

⑮ インスリンの細胞内シグナル

的崎　尚，春日雅人（神戸大・医・第2内科）

⑯ インスリンの糖取り込み促進作用における rab4 の関与

柴田　宏，小俣和香，小島　至（群馬大・生体調節研）

参加者氏名

白川英樹，尾田正二，本多祥子，宮崎俊一（東女医大・第2生理），水野秀昭，吉川文生，古市貞一（東京大・医科研・化学研究），門脇嗣郎，飯野正光（東京大・第1薬理学），暮石泰子，金出英夫（九州大・医・第1薬理学），重川宗一（循環器病センター・循環分子生理），伊奈田広康（三重大・医・薬理），石川敏夫，西下聡英，五十嵐徹也（東京大・医・第4内科），浅田尚登，菅野富夫（北海道大・獣医・生理），石田　均，清野　裕（京都大・医・病態栄養），小倉明彦（大阪大・理・生物学），柴田　宏，真嶋浩聡，神崎　展，張　有青，聶　　琳，小島　至（群馬大・生体調節研），飯田秀利（基生研），的崎　尚（神戸大・医・第2内科），中野春男，古家喜四夫，老木成稔，挾間章博，森島　繁，岡田泰伸（生理研）

研究会概要

細胞外からの様々な刺激が惹起する細胞内シグナルの産生機構，細胞内におけるシグナルの伝播，さらにその細胞内シグナルにより最終的な効果発現に至までのプロセスをテーマとしていろいろな細胞系を対象にしている研究者が集まり発表・討論と情報交換を行った。内容的には受容体，イオンチャネル，トランスポーター，G蛋白などのシグナル産生系，Ca^{2+}やサイクリックAMP，イノシトール三燐酸などのセカンドメッセンジャー，さらにそれらにより活性化される蛋白キナーゼや転写因子に至るまでの多彩な発表が行われた。時間的にも余裕があり，質疑応答などが活発に行われ，きわめて有意義な討論が行われた。特に普段接することの少ない他の領域の研究者による発表が聞けたことから，その知見が大いに刺激となった。懇親会も和気あいあいと行われ，若手研究者の交流も行われた。

(1) 受精と Ca^{2+}-IP_3 感受性小胞体の分布と核内 Ca^{2+}動態

宮崎俊一，白川英樹，白石浩一（東女医大・第二生理）

動物種に普遍的に受精時の卵で細胞質 Ca^{2+}濃度の上昇が起こり，卵活性化の引き金になる。核内の Ca^{2+}上昇も重要であると考えられるため，ハムスター未成熟卵で共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。核内或は核近傍の細胞質に Ca^{2+}をガラスマイクロピペットから電気泳動的に注入した際，核膜は弱い拡散障壁となるが，核内外の Ca^{2+}濃度は約2秒で同程度になる。核

内に IP_3 を注入すると，Ca^{2+}はまず核に接した細胞質で上昇し，遅れて核内で上昇する。予めcaged IP_3 を注入した卵に紫外線を照射して，細胞全体で同時に IP_3 濃度を上昇させると，Ca^{2+}の上昇はやはり細胞質→核となる。従って核内 Ca^{2+}は細胞質からの Ca^{2+}流入によって上昇し，核膜から核内への IP_3 誘発性 Ca^{2+}遊離は関与していないと結論される。一方，小胞体の分布は未成熟卵では均一ではなく，細胞膜に接して幾つかのクラスターとして存在しており，そのうち1ないし2個は核に近接している。これらの小胞体クラスターは他の部分に比べて IP_3 に対する感受性が高く，一種のトリガーゾーンとして働くと考えられる。卵成熟に伴い小胞体は劇的に分布を変えて卵内で均一な網目構造となり，受精時の反復性の Ca^{2+} wave の伝播を担うことになる。

(2) IP_3 受容体の構造・機能・発現

古市貞一，宮脇敦史，道川貴章，門川俊明，山田麻紀，廣田順二，
吉川文生，米島宏幸，安富大祐，御子柴克彦（東京大・医科研）

3タイプの IP_3 受容体の構造・機能・発現を解析した。IP_3 結合領域の Arg-265, Lys-508, Arg-511 は IP_3 結合に必須であった。タイプ1，2はカルモジュリンと結合するタイプ3はせず，制御機構の違いが示唆された。精製受容体／人工脂質リポソーム系で fluo-3 を用いて IP_3 誘導 Ca^{2+}放出 (IICR) を解析した。新規アゴニストのアデノホスチンは IICR とよく似たキネティクスを示したが，IICR よりも高い協同性を示した。脳においてニューロンに特異的なタイプ1とは対照的に，タイプ3は小脳の Bergman グリアやアストロサイトに発現することを示した。複数のタイプが共発現する細胞・組織ではヘテロ4量体を形成することを明らかとし，4量体構成による IICR の多様性を示唆した。タイプ1遺伝子 promoter/lacZ 融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。

(3) リアノジン受容体：1型と3型の分子薬理学

飯野正光（東京大・医・薬理学第一）

リアノジン受容体 (RyR) には，遺伝子を異にする3種のサブタイプが存在する。このうち1型と2型は，それぞれ主として骨格筋と心筋に発現しており，これまで詳細な機能解析が行われてきた。脳で cDNA クローニングが行われたため，脳型とも言われる3型 RyR は，実は全身に発現していることが明かになってきたが，その機能は明かでなかった。我々は，1型 RyR 欠失マウスの骨格筋細胞には3型 RyR のみが発現していることを明かにした。そこで，この細胞を用

いて3型RyRの機能を解析している。この結果，3型RyRは(1)骨格筋の興奮収縮連関を構成することはできず，(2)高閾値型Ca^{2+}によるCa^{2+}放出チャネルとして機能すること，(3)カルモジュリンの抑制作用を強く受けるなどの特徴が明かになってきた。このような差異を生じる分子機構と3型RyRの機能的役割は，今後に残された重要な問題である。

(4) in situ 血管内皮・平滑筋細胞のCa^{2+}シグナリングと機能調節エンドセリンの作用について

金出英夫（九州大・心臓血管研究施設）

内皮細胞由来弛緩因子の産生や平滑筋の緊張はCa^{2+}シグナリングによって制御されている。内皮細胞によって産生されるEndothelin (ET)-1は細胞内Ca^{2+}の放出と細胞外Ca^{2+}の流入によって内皮細胞（オートクリン作用・血管弛緩）や平滑筋細胞（パラクリン作用・血管収縮）の$[Ca^{2+}]_i$上昇を引き起こす。豚大動脈内皮細胞においては，ET-1による細胞外Ca^{2+}の流入に関与するG蛋白は百日咳毒素感受性であった。内皮細胞のET受容体は，従来，ET_Bとされてきたが，ET-1の引き起こす$[Ca^{2+}]_i$上昇はET_Aの選択的阻害薬BQ123によって部分的に阻害された。豚ET_AのcDNAをPCR法を用いて決定し，ET_Aのprimerと豚内皮細胞から得た総RNAを用いてRTPCRを行ったところ，内皮細胞にはET_Bに加えて，ET_AのmRNAも発現していることが明かとなった。

(5) Cキナーゼと細胞膜Ca^{2+}輸送制御

重川宗一（循環器病センター・循環分子生理）

細胞膜Na^+/Ca^{2+}アンチポーターは，興奮性細胞を含む多くの細胞からのCa^{2+}汲み出しに関わる。最近我々は，血管平滑筋及び心筋細胞のNa^+/Ca^{2+}アンチポーターが，PDGFやエンドセリンなどの生理活性因子刺激によりCキナーゼを介してリン酸化され，同時に，その活性を増大させることを明らかにした。そこで，アンチポーターcDNAに変異を導入して，リン酸化がこの輸送系の活性化に不可欠であるかどうか，この活性増大がどのような反応機序で起こるか検討するため，心筋アンチポーターcDNAをアンチポーター活性の低い培養細胞に発現させ，高度発現細胞を選別する方法を開発した。今回の発表では，アンチポーター自体のリン酸化とこの輸送系の活性化との関係，並びに，アンチポーターを過剰発現した細胞における種々の細胞機能の変化について報告した。

(6) 心血管系における遺伝子発現とシグナル伝達機構

伊奈田宏康，西村有平，林　正晃，中村智昭，田中利男（三重大・医・薬理）

従来より我々は，血管平滑筋細胞におけるシグナル伝達経路について，カルポニンのリン酸化による平滑筋収縮の調節を，in vitro および in vivo において解析し，カルポニンは，アクトミオシンの ATPase 活性を抑制するが，PKC によりリン酸化されると，その抑制が外れ収縮反応が生じることを明らかにした。一方，種々の刺激に対して生ずるシグナルは，細胞質での情報伝達経路を経て核内へもその情報を伝え，転写調節介し細胞増殖，分化などの細胞応答への調節的役割を担っている。核へ至るこの様なシグナル伝達経路は最終的に転写調節因子の活性化につながり，その中でもリン酸化カスケードは遺伝子発現制御の重要な機構の一つであり，そのメカニズムが明らかにされつつある。また，最近は特に転写活性を修飾する蛋白質の発見に精力が集まり，蛋白－蛋白の機能解明に関心が集まっている。そこで我々は，c-Jun と結合することでその転写活性を調節する QM/Jif-1 に焦点をあて，QM/Jif-1 の機能調節を解析した。その結果，QM/Jif-1 は PKC によりリン酸化さること，および亜鉛が選択的に結合することを新たに見出した。さらに，この新しい亜鉛結合性転写調節因子 QM/Jif-1 と c-Jun の結合は，PKC によるリン酸化および亜鉛によって調節されている可能性が示唆された。

(7) 細胞外カルシウムによる遺伝子発現の調節機構

岡崎具樹，鄭　雄一，西下聡英，石川敏夫，五十嵐徹也（東京大・医・第 4 内科）

ヒト副甲状腺ホルモン (PTH) 遺伝子上流には本遺伝子が細胞外液 Ca によって転写抑制を受ける際に必要な DNA エレメント (nCaRE) が 2 種類存在する。その一つオリゴＡは，ATTTGTGTATGCAGAA というオクタマー (ATTTGCAT) 類似配列の逆向き繰り返し，もうひとつのオリゴＢは TGAGACAGGGTCTCA という中央の AGG をはさんで TGAGAC のパリンドローム構造をとる。いずれの DNA エレメントも種々の遺伝子上流に存在する。これらは副甲状腺細胞以外にも広い範囲の培養細胞中の核蛋白とそれぞれの配列特異的に結合し，しかもこの核蛋白は両者に共通でその結合は細胞外液 Ca 濃度依存的に増強する。中でもオリゴＢは，ANP, バゾプレッシン等の遺伝子に保存され，我々は *in vivo* の持続灌流実験でこれらの遺伝子が細胞外液 Ca 濃度の上昇によって抑制されることを確かめた。さらに，オリゴＢの一部の相補的配列 GAGACC は，PDGF やエンドセリンなどの遺伝子がずり応力 (shear stress) によって発現調節されるのに必要なエレメント SSRE (GAGACC) と同一であり，nCaRE が媒介する遺伝子転写現象が細胞外 Ca 以外の刺激にも関わる可能性が示唆された。そこで我々はこの nCaRE 配列をプロー

ブとしたサウスウェスタン法及びnCaREアフィニティーカラムによる精製を試み，HeLa細胞からnCaRE結合蛋白(nCaREB)をクローニングすることに成功した。nCaREBはredox factor (ref1, またはHAP1)とKu抗原という少なくとも2個の核蛋白から構成され，両者の蛋白－蛋白結合がnCaREとの結合及びnCaREを介する外液Caによる転写抑制に必要であることを見出した。現在我々は，最近クローニングされたCaセンサー蛋白がこの核内情報処理系に至る細胞膜の第一関門となりうる可能性を検討している。

(8) Cキナーゼを介してP糖蛋白は容積感受性Cl^-チャネルを制御するか？

岡田泰伸，富永真琴，三輪晃子，富永知子（生理研）

MDR1遺伝子導入細胞を用いての実験結果から，その遺伝子産物P糖蛋白(PGP)がCキナーゼによる蛋白燐酸化反応を介して細胞容積感受性Cl^-チャネル(VSCC)活性化が制御されるという仮説が提出された(Hardyら，1995)ので，この点を外来性のみならず内在性PGPについても検討した。KB細胞にPGPを強制発現させた場合もそうでない場合も，TPAやOAGなどのCキナーゼ・アクチベータによるVSCCの活性化への影響になんら差は見られなかった。内在性にPGPを発現しているIntestine 407細胞のVSCC活性化もTPAやOAGによって影響を受けなかった。従って，P糖蛋白のCキナーゼ仲介性チャネル制御因子仮説を支持する結果は得られなかった。

(9) 腫瘍細胞のアドリアマイシン耐性株と非耐性株カルシウムシグナル

菅野富夫（北海道大・獣医・生理）

ヒト肺小細胞癌株細胞であるSBC-3とそのアドリアマイシン耐性株細胞であるSBC3/ADMの細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_c$)を，Fura-2蛍光光度を指標として画像解析顕微鏡によって測定した。細胞外液にアドリアマイシンを添加（最終濃度20μM）すると，SBC-3細胞では，その添加前$[Ca^{2+}]_c$濃度53mMから次第に緩やかに上昇した。細胞ごとに上昇経過は異なり，平均すると添加後20分で300nMに上昇した。SBC3/ADM細胞では，この濃度のアドリアマイシンを添加しても変化はみられなかった。SBC-3細胞のあるものでは，$[Ca^{2+}]_c$濃度が自発的に動揺し，その頻度，振幅と波形は細胞ごとに異なっていた。SBC3/ADM細胞では$[Ca^{2+}]_c$濃度が自発的に動揺する細胞はすくなかった。G蛋白を活性化するNaF (10mM)をSBC-3細胞に投与すると，多彩な$[Ca^{2+}]_c$濃度変動が現れた。これらの結果は，耐性株の成立機構にも癌化の機構にも$[Ca^{2+}]_c$濃度変動が関与する可能性を示唆している。

(10) 乳腺細胞における Ca^{2+} 波伝播の機序と役割

古家喜四夫（生理研）
榎本浩一（島根医大・生理）

培養マウス乳腺上皮細胞を機械的に刺激すると，細胞間を約 10μm/sec で 2-300μm 伝わって消えるカルシウム波が観測された。この伝播は離れたコロニー間でも起こり，外液を介した液性因子によっていると考えられ，乳癌細胞のピペッティング上清液の分析からこの因子がヌクレオチド (ATP, UTP, UDP) であることをすでに明らかにした。またこの受容体としてヌクレオチド（プリン P_{2U}）受容体が存在することを遺伝子クローニングによって明らかにした。

このカルシウム波の伝播は時間に対してリニアであったが，2 次元の単純拡散方程式で考えると，ヌクレオチド程度の分子の拡散はもっと速く，またリニアでもなく，その時間差の原因は不明であった。ヌクレオチドによるカルシウム上昇はセカンドメッセンジャーが関与した細胞内ストアからの遊離であり，受容体への結合とカルシウム上昇の間にはかなりの時間的な delay がある。その delay はアゴニストの濃度が薄くなると長くなり，濃くなると短くなり一定値に近づいた。この delay を考慮すると，単純拡散でもカルシウム波の伝播の様相は説明できた。又温度を 24℃から34℃に上げるとその delay の濃度依存性は少なくなり，カルシウム波の伝播速度も増大した。

分泌上皮細胞に与える生体内での機械的刺激としては筋上皮細胞の収縮が考えられるが，それを明らかにするために筋上皮細胞を含んだ培養乳腺細胞系を確立した。オキシトシン投与によって筋上皮細胞のカルシウム上昇と収縮に引き続き，分泌上皮細胞でのカルシウム上昇が観測された。また筋上皮細胞は P2Y 受容体を持っており ATP によっても収縮することを見いだした。これらのことは分泌上皮と筋上皮細胞が機械的刺激と ATP を介して相互作用しているという新しい細胞間情報伝達系の存在を示している。

(11) インスリン分泌機構における膵 β 細胞内シグナルと糖尿病におけるその破綻

清野　裕，石田　均（京都大・医・病態栄養）

グルコースによる β 細胞内のカルシウムの増加は GK ラットの β 細胞では極めて不良であったが，GK ラットの VDCC 活性はむしろ亢進しており，この機能低下によってカルシウム流入が低下することは否定された。一方，GLUT2 については減少が認められたが，グルコース流入に影響を及ぼす程度ではなく，グルコキナーゼの活性も保たれていた。そこで KATP チャネル活性を指標に β 細胞内グルコース代謝について検討を加えたところ，KATP チャネルそのものの機

能は正常であったが，グルコースに対する感受性は低下していた。しかも解糖系のうち G-6-P から glyceral-dehyde までに障害が存在する可能性が示唆された。さらに解糖系から分岐する glycerol phosphate シャトルの活性は著明に低下していた。

(12) 脳損傷由来神経栄養因子とその部分ペプチドの神経細胞維持作用

小倉明彦（大阪大・理・生物）
浜登希子（三菱化学生命科学研）

ラット新生仔大脳皮質の一部を吸引除去し，そこに gel-foam を挿入して 7 日後に取出し，含まれる蛋白のうち神経栄養因子活性のあるものを，培養中隔野神経細胞の生存を指標にして精製した。分子量 15kD の蛋白は，その trypsin 分解ペプチド断片で見るかぎり新規物質で，これを脳損傷由来神経栄養因子 (BINF) と名づけた。ペプチド断片を培養中隔野細胞に与えたところ，うち一つ (13mer) が BINF 同様の生存維持作用を示した。このペプチド (BINP) に対する抗体は，初代培養 astrocyte と反応し，培養上清中の 30kD 蛋白を認識した。したがって BINF は reactive astrocyte が産生する神経栄養因子で，BINP はその活性部位に当たると想定される。BINP は，中隔野神経細胞ばかりでなく，中脳黒質神経細胞や高濃度グルタミン酸暴露後の海馬神経細胞の生存をも支持した。BINP 受容体は未同定だが，その細胞内シグナリングを知る試みを行ったところ，細胞内 Ca 濃度には影響はなかったが，cAMP 濃度の急速な上昇が見られた。現在 cAMP 以降の経路について解明をめざしている。

(13) 受容体による Ca^{2+} 透過性チャネル CD20 の活性調節

神崎　展，小島　至（群馬大・生体調節研）

Ca^{2+} 透過性チャネルである CD20 を発現させると Balb/c 3T3 細胞の増殖様式は変化し，G0 期細胞においても IGF-I の増殖促進作用が観察される。このことは CD20 が細胞増殖に関与しうるチャネルであることを示唆している。今回は IGF-I による CD20 チャネルの活性調節機構について電気生理学的に検討した。その結果 1）IGF-I は CD20 を活性し，$[Ca^{2+}]_c$ を上昇させた。2）cell-attached patch clamp 法では IGF-I に反応する約 7pS の CD20 チャネル活性が観察された。3）百日咳毒素 (PTX) 処理により IGF-I の CD20 活性化作用は完全に消失した。4）G 蛋白を直接活性化する Mastparan により CD20 は強く活性化された。5）Excised patch clamp 法において CD20 の活性化には ATP, GTP と Mg^{2+} が必須であった。以上の結果から CD20 は IGF-I 受容

体刺激によりPTX感受性G蛋白を介して活性化されることが明らかとなり，CD20は増殖因子作動性Ca^{2+}透過性チャネルの一つであると考えられた。

(14) 酵母の細胞分化におけるCa^{2+}とMAPキナーゼカスケード

飯田秀利，奥村万樹子（基生研）
小野智子（基生研，東大院・理系）

酵母の性フェロモンによって開始される性接合過程は細胞分化におけるシグナル伝達の研究の良いモデル系であり，分子生物学的研究が盛んになされている。我々は先に，性接合過程の後期にCa^{2+}が細胞の生命維持に必須の役割をすることを明らかにした。また，この過程におけるCa^{2+}シグナルの発生と伝達の分子機構に欠損を持つため，性フェロモンの作用により死に至る突然変異株 *(mid1 ～ mid5)* を単離し，解析した。前年までの本研究会では，Ca^{2+}流入活性を持つ *MID1* 遺伝子産物とCa^{2+}結合能を持つ *MID2* 遺伝子産物について報告した。今回は，*MID5* 遺伝子について報告する。*mid5* 変異株は，Ca^{2+}流入に関しては正常なので，Ca^{2+}シグナルの伝達経路に異常をもつと予想され。遺伝子解析の結果，*MID5* 遺伝子産物はMAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)と同じであった。興味深いことに，MAPキナーゼカスケードを構成する，MAPKKKの下流ではたらくキナーゼ(MAPKKおよびMAPK)の変異株も *mid5* 変異株と同じ表現型を示した。さらに，これらすべての変異は培地中の高濃度の$CaCl_2$によって抑圧された。この結果は，MAPキナーゼカスケードがCa^{2+}に依存した機構を制御していることを示唆する。

(15) インスリンの細胞内シグナル

的崎　尚，春日雅人（神戸大・医・第2内科）

インスリンはIRS-1のチロシンリン酸化を惹起し，PI-3キナーゼやチロンホスファターゼ，SH-PTP2が，IRS-1にSH2ドメインを介して結合する。我々は，dominant negativeタイプのこれらシグナル分子を用いることにより，PI-3キナーゼはインスリン刺激による糖の取り込みに，SH-PTP2はRasの活性化に関与していることを明らかにしている。SH-PTP2が，いかにしてインスリンによるRas活性化経路に機能するかのメカニズムを明らかにするために，インスリン受容体及びSH-PTP2を過剰発現するCHO細胞を用いてSH-PTP2に結合するタンパク質について検討した。その結果，SH-PTP2は膜分画に存在する分子量約120KDaのチロシンリン酸化タンパク質(pp120)に結合していた。PTPase活性一の変異型SH-PTP2発現細胞ではインスリン非

刺激状態でも，pp120 のチロシンリン酸化が観察され，SH-PTP2 は SH2 ドメインを介して pp120 と結合すると考えられた。pp120 は SH-PTP2 の直接の標的タンパク質であり，インスリンによる Ras 活性化に関与する可能性が示唆された。

(16) インスリンの糖取り込み促進作用における rab4 の関与

柴田　宏，小俣和香，小島　至（群馬大・生体調節研）

インスリンのグルコース取り込み促進作用における低分子量G蛋白 Rab4 の関与について検討した。

【方法】 Rab4 のC端ペプチド ($Rab4^{191-210}$)，および Rab4 のC端ペプチドに対するモルモット抗体を作製し，これらをエレクトロポレーション法によりラット脂肪細胞内に投与し，インスリン作用に対する影響を検討した。

【結果】 Rab4 C端ペプチドの細胞内投与によりインスリンによるグルコース取り込みは約50％抑制された。Rab3C あるいは Rab3D のC端ペプチドは無効であった。一方抗 Rab4 抗体の投与によってもインスリン作用は約60％抑制された。non-immune IgG には抑制作用はみられなかった。また Rab4 C端ペプチドおよび抗 Rab4 抗体によりインスリンによる GLUT4 のトランスロケーションは抑制された。

【結論】 インスリンのグルコース取り込み促進作用に Rab4 が関与することが示唆された。

10. 心血系イオン・チャネルの機能と病態

1996年1月29日～30日

代表者：平岡昌和（東医歯大）

世話人：岡田泰伸（生理研）

(1) 蛙心室筋 Na チャネルの制御機構に関する研究

住居晃太郎，瀬山一正（広島大・医・第1生理）

(2) BHK 細胞へ発現させた心筋 Ca チャネルクローンの調節機構：α_1 受容体とのカップリング

平野裕司，張　社団，吉永貴志，平岡昌和（東医歯大・難研）

(3) 心筋 Ca チャネルの活動維持と細胞質タンパク

亀山亜砂子，郝　朋英（鹿児島大・医・第2生理）

(4) 心筋ヒスタミン H_2 受容体刺激における Gs 直接性 Ca チャネル活性化経路の欠如

當瀬規嗣，長島雅人，薮　英世（札幌医大・医・生理第1）

(5) Effect of PDE inhibitors on L-type Ca current in cardiac myocytes

梶本克也，萩原誠久，平畠由美，笠貫　宏（東女医大・心研）

(6) 血管平滑筋細胞の細胞周期における Ca^{2+} チャネルの特性

空閑　毅，小林　誠，金出英夫（九州大・医・心研）

(7) ヒト大動脈内皮細胞における細胞内 Ca^{2+} 排出機構

飯島俊彦（秋田大・医・薬理）

(8) 単一心室筋細胞の厚さ測定

光家　保，王　鋳人，野間昭典（京都大・医・第2生理）

(9) アンジオテンシンによる心筋イオンチャネルの調節とその病態

大林和彦，堀江　稔，綿貫正人，鷲塚　隆，

謝東　孝，Andrew F. James, 篠山重威（京都大・医・第三内科）

(10) 心筋 cAMP 活性化クロライドチャネルに対する 9-AC の相反性二重効果

周　士勝，富永真琴，岡田泰伸（生理研）

(11) 細胞接着型パッチクランプ法による心室筋および血管内皮細胞の膜電位

大地陸男（順天堂大・医・第2生理）

(12) 冠動脈における内皮依存性過分極因子

鈴木　光（名市大・医・第1生理）

(13) ラット大動脈平滑筋における ATP 及びエンドセリンにより活性化される振動性内向き電流について

村木克彦，今泉祐治，渡辺　稔（名市大・薬・薬品作用）

(14) 動脈硬化血管における NO と活性酸素

大原郁一，江頭健輔，竹下　彰（九州大・医・循環器内科）

(15) ムスカリン性カリウムチャネルの分子多様性の解析

磯本正二郎，近藤千香子，高橋尚彦，松本重人，田　充彦，
内匠　透，堀尾嘉幸，倉智嘉久（大阪大・医・第2薬理）
森重健一郎（大阪大・医・産婦人科）
稲野辺厚（山形大・医・細胞情報解析）

(16) ラット心筋Kチャネルの分化と低酸素の影響

郭　為農，神谷香一郎，本荘晴朗，児玉逸雄，外山淳治（名古屋大・環研）

(17) アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた内向き整流 K^+チャネル (IRK1) に対するリゾフォスファチジルコリンの作用

清末達人，高橋尚彦，有田　眞（大分医大・生理第2）

(18) 心筋アセチルコリン感受性 K^+チャネルの PI 代謝系による制御

中谷晴昭，原　幸男（千葉大・医・薬理）

(19) ウサギ脳底動脈 Ca チャネルに対するエストラジオールの効果

北村憲司，緒方りか，伊東祐之（福岡歯大・薬理）

(20) 血管の収縮弛緩機構と血管平滑筋 K^+チャネル

中屋　豊，南　和志，岩本昌子，黒川孝史（徳島大・医・特殊栄養）

(21) QT 間隔の time & spacial dispersion に及ぼす群抗不整脈薬の影響

斉藤寛和，大野則彦，加藤貴雄，早川弘一（日本医大・第1内科）

(22) 心室内層と外層の電気生理学的差異―K_{ATP}チャネルと伸展活性化チャネル

宮崎利久，三好俊一郎，高木俊介（慶應大・医・内科）

(23) Preconditioning による虚血心筋細胞壊死の抑制とKチャネル

三浦哲嗣，小川　孝，後藤真彦（札幌医大・第2内科）

(24) Ischemic Preconditioning におけるアデノシンの役割―5' ヌクレオチダーゼの意義

北風政史，堀　正二（大阪大・医・第1内科）

参加者氏名

平岡昌和（東医歯大・難研），住井晃太郎，瀬山一正（広大・医・第1生理），平野裕司，張　社団，吉永貴志，沢登　徹（東医歯大・難研），亀山亜砂子，郝　朋英（鹿児島大・医・第2生理），當瀬規嗣（札幌医大・医・生理第1），梶本克也，萩原誠久，笠貫　宏（東女医大・心研），空閑毅，小林　誠，金出英夫（九州大・医・心研），飯島俊彦（秋田大・医・薬理），光家　保，王鋳人，野間昭典（京都大・医・第2生理），大林和彦（京都大・医・第三内科），周　士勝，岡田泰伸，老木成稔，挾間章博，森島　繁（生理研），大地陸男（順天堂大・医・第2生理），鈴木光（名市大・医・第1生理），村木克彦，今泉祐治（名市大・薬・薬品作用），大原郁一，江頭健

輔，竹下　彰（九州大・医・循環器内科），磯本正二郎，倉智嘉久（大阪大・医・第２薬理），郭為農，神谷秀一郎，本荘晴朗，児玉逸雄，外山淳治（名古屋大・環研），清末達人，有田　眞（大分医大・生理第２），中谷晴昭，原　幸男（千葉大・医・薬理），北村憲司（福岡歯大・薬理），中屋　豊，南　和志，岩本昌子，黒川孝史，久保雅宏（徳島大・医・特殊栄養），斉藤寛和，大野則彦，加藤貴雄，野村敦宣（日本医大・第１内科），宮崎利久，三好俊一郎，高木俊介（慶應大・医・内科），三浦哲嗣，小川　孝，後藤真彦（札幌医大・第２内科），北風政史，堀　正二（大阪大・医・第１内科），菅野盛夫（北海道大・医・第２薬理）

研究会概要

本研究会には，25施設から70余名の参加を得て活発な議論が交わされた。今回は心筋細胞のみでなく，血管平滑筋細胞，血管内皮細胞でのチャネル機能と病態への関与について臨床上の問題も含んだ発表など，幅広い内容が討議された。心筋のCaチャネルについては多くの演題が集まり，クローンチャネルを用いたα受容体との共役，固有のチャネルについて活動維持機構に関与する蛋白成分の分離，G蛋白との共役の有無，フォスフォヂエステラーゼ抑制薬による調節，さらに血管平滑筋細胞での二種類のCaチャネルの細胞周期による発現変化，などが注目された。その他ホルモン作用時の細胞容積変化，血管内皮細胞での膜電位を決めるKチャネルや過分極因子，Na-Ca交換機構の役割，アンジオテンシン，NOの作用，など病態に関連する問題にも熱心な質疑が交わされた。

もう一つの中心議題はKチャネルに関してであり，クローンチャネルから臨床の不整脈や心筋保護に関する演題まで取り上げられた。膜二回貫通型Kチャネルの分子多様性，発生分化に伴う電位依存型Kチャネルの変化，血管の弛緩に寄与するKチャネルの役割，さらに，短い虚血発作後のさらに大きな発作時における心筋保護効果発現におけるアデノシンやKチャネル開口の関与など，現在注目されている問題についての内容の濃い，幅広い討議が交わされた。今後これらの分子機序を含めた詳しい検討が基礎研究で進み，これが臨床研究に反映されることを期待したい。そのためにも，本研究会のような基礎系の研究会に一部の臨床研究者を取り込むことは意義のある試みと考えられた。

(1)　蛙心室筋 Na チャネルの制御機構に関する研究

住居晃太郎，瀬山一正（広島大・医・生理学第一）

蛙心室筋Naチャンネルの細胞内情報伝達系による制御につきパッチクランプ法で検討した。保持電位 -80mV では遅い不活性化はなく，定常不活性化曲線の左方へのシフトも微小で，Na電流が安定して記録されることが確かめられた。蛋白キナーゼA刺激剤はCa電流を増加させたが

Na 電流は変化せず，定常不活性化曲線にも影響を及ぼさなかった。蛋白キナーゼC刺激剤もホールセル法及び細胞環境を維持したナイスタチン法によっても Na 電流に影響しなかった。αアドレナリン，ドパミン，ヒスタミンの各レセプターのアゴニスト刺激も同様に Na 電流に影響しなかった。以上より，カエル心室筋 Na チャンネルは細胞内情報伝達系により制御を受けない。活動電位発生の主役である Na 電流が修飾制御を受けないことは，信号伝達の安定性からみて合目的と考えられた。

(2) BHK 細胞へ発現させた心筋 Ca チャネルクローンの調節機構 : α_1 受容体とのカップリング

平野裕司，張　社団，平岡昌和（東医歯大・難研・循環器）
吉永貴志（エーザイ筑波研）

ハムスター腎由来の BHK 細胞に心筋 Ca チャネルの $\alpha 1$ サブユニット，骨格筋の $\alpha 2/\delta, \beta, \gamma$ サブユニットを導入すると，心筋 type のL型 Ca チャネルが安定かつ高密度に発現する（BHKC12 細胞）。このクローンチャネルは 8Br-cAMP や pholbor ester による増強を受け，BHK 細胞には燐酸化による Ca チャネル調節系が内在していることが示唆される。このシステムが外因性の受容体刺激によっても機能しうるかを検討するため，BHK 細胞に新たに交感神経 $\alpha 1$ 受容体（type $\alpha 1$c; Lefkowitz 教授より供与）を組み込み，$\alpha 1$ アゴニストの Ca 電流に対する効果を検討した。1μM の phenylephrine は nystatin による perforated patch 法での全細胞電流を増強し，cell attach 法での単一電流の開口確率を増加させた。BHK 細胞は細胞情報伝達系の研究にも有用である。

(3) 心筋 Ca チャネルの活動維持と細胞質タンパク

亀山亜砂子，ハオ　リイン，西　孝子，大園清信，亀山正樹（鹿児島大・医・第2生理）

心筋L型 Ca チャネルはAキナーゼにより活性が調節されているが，チャネルの活性維持には，Aキナーゼではなく，他の細胞内因子が重要であり，この因子は inside-out パッチクランプで，rundown したチャネルの活性を再び回復させることが知られている。我々は，細胞内因子の精製過程から複数のタンパクが関与している事をみいだした。また，これらの因子とAキナーゼとの関係を調べた。

細胞内因子の精製は牛心筋から DEAE セルロースカラム，硫安分画，ゲル濾過等を用いて行った。ゲル濾過から推定される見かけ上の分子量は 200 ～ 300k, SDSPAGE では，およそ 100k,

pI4.8, 比較的熱に強いが，トリプシンで活性を失う，等の性質を持っている。しかし，精製を重ねると，この物質，P分画だけでは，Caチャネル活性維持効率が下がることから，他の因子が必要と考え，ゲル濾過の溶出液の分画に，新たな物質（H分画）を見い出した。このH分画は，トリプシンや熱に弱く，単独では，Caチャネルを活性化せず，co-factorと考えられる。

PとH分画の存在下で，チャネル活性は，80～100％維持できるが，さらに，Aキナーゼを加えると，活性は2，3倍上昇する。Aキナーゼによるリン酸化部位の一つは，再構成の実験からα_1サブユニットであることも判明した。

(4) 心筋ヒスタミン H_2 受容体刺激における Gs 直接性 Ca チャネル活性化経路の欠如

當瀬規嗣，長島雅人，藪　英世（札幌医大・医・生理第1）

近年，アドレナリンβ受容体と共役するG_s蛋白質がアデニル酸シクラーゼを介さずに，直接的に心筋L型Caチャネルを活性化することが報告された。一方，他のcAMPを増加する受容体に共役するG_sに関しては報告がない。そこで，G_sに共役するヒスタミンH_2受容体を介してcAMPを増加するHistamine (HIS)と，β作働薬であるisoproterenol (ISO)のCaチャネル活性化作用を比較した。Caチャネル活性化の最高濃度である1μMのISOにより増加したCaチャネル電流は，同じく最高濃度である10μMのHISにより増加しなかった。一方，10μMのHISにより増加したCaチャネル電流に対し1μMのISOはさらなる増加を惹起した。この増加はG_sによる直接的活性化によると考えられた。本研究結果により，H_2受容体と共役するG_sはCaチャネルを直接的に活性化できず，β受容体共役とG_sと異なる性質を持つと考えられた。

(5) Effect of PDE inhibitors on L-type Ca current in cardiac myocytes

梶本克也，萩原誠久，平畠由美，笠貫　宏，細田瑳一（東女医大・日本心臓血圧研・内科）

近年，様々な心筋ホスホジエステラーゼアイソザイムの研究およびその選択的阻害剤（PDE阻害薬）が開発されており，実際に臨床治療薬として応用されつつある。我々は，兎およびヒト心房筋細胞にパッチクランプ法を応用してPDE阻害薬の標的の一つである$I_{Ca,L}$に対する，各種PDE inhibitorの効果を検討した。その結果，選択的PDE III阻害薬は兎心筋と比較してヒト心房筋細胞の$I_{Ca,L}$を著明に増大した。これに対して，非特異的なPDE阻害薬であるIBMXの効果は兎，ヒト心筋細胞共に差が認められなかった。これらの結果から，ヒト心筋細胞は兎および他の動物種と比較して，PDEアイソザイムの質，量およびその分布に種差が認められる可能性が示唆

された。

(6) 血管平滑筋細胞の細胞周期における Ca^{2+} チャネルの特性

空閑　毅，小林　誠，金出英夫（九州大・医・心研臨床細胞科学）

【背景・目的】 細胞分化・増殖に伴う $[Ca]_i$ 制御機構の変化を検討した研究は少ない。本研究は，血管平滑筋細胞の細胞周期回転に伴う電位依存性 Ca チャネルの発現様式や特性変化を検討した。

【方法】 ラット大動脈初代培養平滑筋細胞の 2 種類（L 型，T 型）Ca 電流を whole cell voltage clamp 法を用いて記録し，その後それぞれの細胞について細胞周期特異的核抗原の蛍光染色を行った。

【結果】 ① G0 期，M 期の細胞はすべて L 型 Ca 電流のみが記録された。G1 期の37%，S 期の86%に T 型 Ca 電流が記録された。②単位面積あたりの電流密度は L 型 Ca 電流：G1 ＞ S ＞ G0 ＞ M，T 型 Ca 電流：S ＞ G1 ≫ G0 ＝ M。③ L 型 Ca 電流の電流電圧曲線，活性化曲線，不活性化曲線や BayK8644 による L 型 Ca 電流増強効果は各細胞周期で差はなかった。④各細胞周期の細胞において各種セカンドメッセンジャーの L 型 Ca 電流に対する効果に差はなかった。

【総括】 細胞周期依存性に 2 種類の電位依存性 Ca チャネルの発現様式が異なることが明らかとなった。しかしながら，各細胞周期の細胞において L 型 Ca チャネルの電気生理学的特性やセカンドメッセンジャーによる制御様式に有意差はなかった。

(7) ヒト大動脈内皮細胞における細胞内 Ca^{2+} 排出機構

飯島俊彦（秋田大・医・薬理）

血管内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）制御における Na/Ca 交換機構と形質膜 Ca^{2+} ポンプの関与を明らかにするために，ヒト大動脈内皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を fura-2/AM 用いて測定した。外液 Ca^{2+} 除去下 histamine (100μM) は一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をひきおこし，Low-Na^+ 溶液下で histamine の下降相は有意に遷延した。また，Ni^{2+} (5mM), Vanadate (2μM) 存在下でも下降相は軽度遷延し，La^{3+} (1mM) 処置下では更に著明な遷延が認められた。次に，thapsigargin (TG; 100nM) で小胞体 Ca^{2+} ポンプを抑制すると一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められ，下降相に low-Na^+ 溶液，Ni^{2+} (5mM), Vanadate (2μM) を作用させると下降相が遷延した。La^{3+} (1mM) 処置下では更に著明に遷延した。以上の結果より，ヒト大動脈内皮細胞の形質膜には，Na/Ca 交換機能と Ca^{2+} ポンプの両者が存在し，受容体刺激でも小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害でも Na/Ca 交換機構が優位に機能

していることが示唆された。

(8) 単一心室筋細胞の厚さ測定

光家　保，王　錚人，野間昭典（京都大・医・生体制御医学）

モルモット心室筋細胞上に微小なマーカー（炭素粉）を載せ，視野絞りをこのマーカー像の一部に絞ってこの部分の光強度を測定しながら，フォーカスを X-Y プロッターで上下移動させた。光強度とフォーカス位置はオンラインで取り込み，光強度最小となるフォーカス位置をモニター上にプロットし細胞容積変化を連続記録した。この測定方法を用いて神経伝達物質の細胞容積調節への関与を検討した。正常タイロード液中でイソプロテレノール (10^{7} ～ 10^{6}M) は細胞容積を（10～20%）増大した。この増大はアセチルコリン (10^{5}) で拮抗された。一方低浸透圧負荷により膨化した細胞ではイソプロテレノールは細胞容積を減少させ，この効果もやはりアセチルコリンで拮抗された。

(9) アンジオテンシンによる心筋イオンチャネルの調節とその病態

堀江　稔，大林和彦，鷲塚　隆，藍　智彦，謝　来華，篠山重威（京都大・医・第三内科）

現在，アンギオテンシン II (A-II) の心筋細胞内情報伝達経路としては PLC を活性化し IP3, PKC を増加させることが知られている。我々は A-II がモルモット心房筋遅延整流K電流を増加させることを認めたが，phenylephrine も同様の作用を認めたことから，この作用も PKC を介している可能性が示唆された。また心筋における PKA 系に対する A-II の作用に関しては意見の一致を見ておらず，モルモット心室筋における PKA 依存性 Cl チャネルに対する A-II の作用も検討した。A-II は isoproterenol (ISO), histamine, forskolin にて増加した電流を抑制した。AT-1 受容体に選択的な拮抗薬 CV11974 は ISO に対する AT-II の作用を抑制した。カルバコール，A-II とも ISO にて増加した電流を抑制したが細胞を PTX 処理すると，両者ともその効果が消失した。細胞内をあらかじめ cAMP で灌流すると大きな Cl 電流の活性化を認めるが A-II はこの電流は抑制出来なかった。以上より A-II は AT-1 受容体／百日咳毒素感受性G蛋白を介しアデニレート・サイクラーゼを抑制し細胞内 cAMP 濃度を減少させ PKA 依存性 Cl チャネルを抑制すると考えられた。さらに ISO により増加したL型 Ca 電流も A-II は抑制し，同じ経路を介している可能性が示唆された。

(10) 心筋 cAMP 活性化クロライドチャネルに対する 9-AC の相反性二重効果

周　士勝，富永真琴，岡田泰伸（生理研）

Cl^-チャンネルブロッカーである anthracene-9-carboxylic acid (9-AC) のモルモット心室 cAMP 活性化 Cl^-チャネルに対する効果を全細胞型パッチクランプ法に細胞内灌流法を併用して検討した。9-AC は，細胞内から作用してこの Cl^-チャネル電流を増大させ，細胞外から作用してその内向き成分のみを減少させることが明らかとなった。この作用機序についても検討する。

(11) 細胞接着型パッチクランプ法による心室筋および血管内皮細胞の膜電位

大地陸男（順天堂大・医・第二生理）

血管内皮細胞において，膜電位は電位非依存性カチオンチャネルを通る Ca^{2+}流入を過分極によって促進し，脱分極によって抑制する。ホールセルクランプ法を適用すると細胞内環境が不可避的に正常状態からずれるので，新たに細胞接着型パッチクランプ法で電流固定 ($I = 0$) を行い膜電位を測定することを試みた。培養ヒト大動脈血管内皮細胞の正常タイロード液中での -23.5 ± 6.6 ($n = 26$) の静止電位と，その細胞外 K^+, Cl^-, Na^+濃度の増減による変化は $P_{Na}/P_K = 0.4$, $P_{Cl}/P_K = 1.0$ でおよそ説明された。ATP (10μM) による -47.4 ± 13.3mV ($n = 6$) への過分極は P_K の 5 倍への増大によった。モルモット心室筋の静止電位は -75.0 ± 2.9mV ($n = 9$) であり $[K^+]_o$ の変化によって，Nernst の式で予測される変化を示した。期待される膜電位がえられたのは，パッチ膜の抵抗が，心筋では I_{K1} チャネル，内皮細胞ではさらに Cl チャネルの存在によって，パッチ膜と並列にあるシャント抵抗により格段に小さいことを意味する。

(12) 冠動脈における内皮依存性過分極因子

鈴木　光（名市大・医・第一生理）

モルモット冠動脈における内皮由来過分極因子の性質を微小電極による平滑筋細胞の膜電位変化を指標にしらべた。アセチルコリンで筋組織を刺激すると，内皮依存性に膜は直ちに 10 ～ 20mV 過分極し，アセチルコリン除去後に振幅の小さい (1 ～ 5mV) 緩やかな過分極が 5 ～ 8 分続いた。後者はインドメタシンで抑制されたのでシクロオキシゲナーゼ系代謝産物のプロスタノイドの関与を推定したが，前者は抑制薬の酵素選択性が乏しく物質の特定は困難であった。再現

性のある過分極反応を得るにはアセチルコリンによる刺激間隔が20～30分以上必要で，プロスタノイドの産生抑制によりこの間隔は短縮したので，このプロスタノイドはオートクリン作用により内皮細胞に抑制作用をもたらし，平滑筋作動物質の産生あるいは遊離を減弱させていると考えた。

(13) ラット大動脈平滑筋における ATP 及びエンドセリンにより活性化される振動性内向き電流について

村木克彦，今泉祐治，渡辺　稔（名市大・薬・薬品作用）

単一大動脈平滑筋細胞にニスタチン穿孔法を適用し，ATP 及びエンドセリン (ET) の効果について検討した。カリウム電流を抑制した条件下，ATP を投与したところ，一過性の内向き電流 (I_{cati}) とそれに続く振動性の内向き電流 (I_{osci}) が活性化された。両電流の逆転電位の測定から，I_{cati} にはカチオン電流が I_{osci} にはクロライド電流 (I_{Cl}) が関与していることが示唆された。また P_{2X}, 及び P_{2U} 受容体活性薬である α,β-mATP 及び UTP 投与によっても，それぞれ I_{cati}, I_{osci} が活性化された。I_{osci} は ET 投与の際にも観察された。以上の結果から，収縮薬による大動脈平滑筋細胞の収縮制御に I_{Cl} が関与している可能性が示唆された。

(14) 動脈硬化血管における NO と活性酸素

大原郁一，江頭健輔，竹下　彰（九州大・医・循環器内科）

動脈硬化血管においては，内皮依存性血管弛緩反応が減弱しているが，その分子生物学的な機序について充分には解明されていない。近年，内皮由来血管弛緩因子の本体とされる一酸化窒素 (NO) の合成酵素 (eNOS) の cDNA がクローニングされた。われわれは，高コレステロール食による動脈硬化を有する家畜ブタの，大動脈内皮細胞の eNOS の発現を正常ブタと比較したところ，mRNA レベルでは約 2 倍の発現が認められたのに対し，蛋白レベルでは eNOS はほとんど消失していた。一方，動脈硬化血管の内皮では，一酸化窒素の半減期を短縮させる活性酸素の産生量が，正常内皮に比し増加していることが知られており，動脈硬化血管の内皮依存性血管弛緩反応の減弱の機序は単一ではないことが示唆された。

(15) ムスカリン性カリウムチャネルの分子多様性の解析

磯本正二郎，近藤千香子，高橋尚彦，松本重人，森重健一郎，
稲野辺厚，山田充彦，内匠　透，堀尾嘉幸，倉智嘉久（大阪大・医・第2薬理）

ムスカリン性K^+チャネルの性質をもつクローンとしてGIRK1～4が報告されている。我々もマウス脳cDNAライブラリーからGIRK1およびGIRK2Bを単離した。m2受容体とともにGIRK1とGIRK4をアフリカツメガエル卵母細胞に共発現させると，アセチルコリンで誘発されるK^+電流はそれぞれの単独での発現時に比べて著明に増大した。GIRK2BとGIRK1との共発現でも同様の所見を示した。以上の所見からGIRKは異なるサブタイプが重合して多量体を形成していると考えられる。免疫学的手法を用いた検討ではGIRK1には組織によって異なる結合蛋白が存在しており，GIRKのヘテロ重合体の形成は臓器によって多様性のあることが示唆された。

(16) ラット心筋Kチャネルの分化と低酸素の影響

郭　為農，神谷香一郎，本荘晴朗，児玉逸雄，外山淳治（名古屋大・環研）

「目的」ラット心室筋細胞の活動電位波形は，生後急に短縮する。本研究では，新生児ラット心室筋細胞を培養し，活動電位持続時間(APD)や各種K電流の経日変化と低酸素の影響について検討した。

「方法」生後1日目のラットより心室筋細胞を単離し，15日間培養した。培養6日目から酸素分圧を10%，7.5%にさげて15日目まで培養した。

「結果」培養5日目の細胞に比して15日目では，APDは約44%に短縮し，I_{to}の電流密度は2.9倍，I_Kは2.1倍に増加した。APDは，10%O_2培養時にも短縮したが，7.5%O_2では変化しなかった。7.5%O_2培養にて，I_{to}の増加が抑制され，不活性化からの回復過程も遅延したが，I_Kの増加には影響なかった。

「総括」以上の結果より，心筋イオンチャネルの発育分化に対し，低酸素環境はチャネル毎に異なる影響を及ぼすことが明らかになった。

(17) アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた内向き整流 K^+ チャネル (IRK1) に対するリゾフォスファチジルコリンの作用

清末達人，高橋尚彦，有田　眞（大分医大・生理学第二）

膜燐脂質由来の両親媒性物質リゾフォスファチジルコリン (LPC) の内向き整流 K^+ チャネルファミリーに対する作用を明らかにする研究の一環として，アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたマウス由来の内向き整流 K^+ チャネル (IRK1) に対する LPC の作用を 2 本微小電極による膜電位固定法とパッチ電極による単一チャネル電流記録法を用いて検討した。IRK1 の cRNA 注入により，強い内向き整流作用を示す Ba^{2+} 感受性電流が出現し，その単一チャネルコンダクタンスは細胞外 150mM K^+ 存在下において 24pS であった。LPC 10μM/L の作用により，90mM K^+ 存在下における細胞全体のコンダクタンスは，対照の 46 ± 16μS から 33 ± 8μS に減少，40μM/L では逆に 60 ± 19μS に増加した。このことから，(1) LPC の IRK1 チャネル阻害作用は比較的僅少であること。(2) しかし，これは LPC の膜傷害作用によるリーク電流の増大により IRK1 チャネル電流の減少がマスクされた結果である可能性があることなどが示唆された。

(18) 心筋アセチルコリン感受性 K^+ チャネルの PI 代謝系による制御

中谷晴昭，原　幸男，山口浩史，坂本直哉（千葉大・医・薬理）

モルモット心房筋細胞のアセチルコリン感受性 K^+ チャネルに対するイノシトールリン脂質 (PI) 代謝回転亢進系と共役する受容体，すなわちプリン (P_2) 受容体，エンドセリン (ET) 受容体，ブラジキニン (B_2) 受容体刺激の影響をパッチクランプ法を用い検討した。ムスカリン (M_2) 受容体あるいはアデノシン (A_1) 受容体刺激によって活性化したアセチルコリン感受性 K^+ 電流 ($I_{K.ACh}$) を ATP, ET-1, ET-3 は一過性に増強した後持続的に抑制した。ブラジキニンは $I_{K.ACh}$ を増強せずに抑制作用のみを示した。この様に PI 代謝回転亢進系と共役する受容体の刺激は，共通して $I_{K.ACh}$ を抑制し，これらの受容体を介する変時，変力作用に一部寄与するものと思われる。

⑲ ウサギ脳底動脈 Ca チャネルに対するエストラジオールの効果

北村憲司（福岡歯大・薬理）
緒方りか，伊東祐之（九州大・医・薬理）

エストラジオールはウサギ脳底動脈（内皮除去）のK収縮を濃度依存性に抑制した。この収縮抑制は Ca 除去溶液内でカフェインやヒスタミンで誘発させた収縮では起こらなかった。パッチクランプ法により測定した電位依存性 Ca 電流を濃度依存性に抑制し，この抑制はニカルジピンを前処置すると増強した。L型 Ca チャネルが優位な細胞で誘発される Ca 電流に対する抑制はT型 Ca チャネル優位な細胞で誘発される電流よりも抑制されにくかった。このエストラジオールによる Ca 電流抑制は細胞内に GTPgS を投与すると増強され，GDPbS 投与により消失した。また PTX 前処置細胞ではエストラジオールの電流抑制は観察されなかった。以上の結果から，エストラジオールは細胞膜状の受容体を介してL型及びT型 Ca チャネルを抑制する作用を有し，収縮を抑制することが示唆された。またこのエストラジオールの作用は PTX 感受性の GTP 結合蛋白を介するものである可能性が強く示唆された。

⑳ 血管の収縮弛緩機構と血管平滑筋 K^+チャネル

中屋　豊，南　和志，岩本昌子，黒川泰史（徳島大・医・特殊栄養）

血管平滑筋における Ca^{2+}感受性Kチャネル (K_{Ca}) の制御機構について検討した。cGMP および cAMP は，K_{Ca} チャネルを活性化させた。また，エンドセリンなどはイノシトール3燐酸 (IP_3) およびヂアシルグリセロール (DG) を産生し，血管を持続的に収縮させる。この際 Ca^{2+}は上昇しているにもかかわらず K_{Ca} チャネルの抑制がみられた。A23187 により細胞内 Ca^{2+}を上昇させ，K_{Ca} の活性化させた細胞において，ホルボールエステル (1μM) を投与することにより K_{Ca} はほぼ完全に抑制された。Inside-out パッチでも，K_{Ca} チャネルは IP_3 により抑制されなかったが，Cカイネース分画投与により抑制された。これらの抑制作用はスタウロスポリン (1nM) 投与により軽減した。以上の結果より K_{Ca} チャネルは血管作動物質の細胞内標的器官の一つで，収縮弛緩に関与する事が示唆された。また，収縮物質による血管の持続収縮の維持にCカイネースによる K_{Ca} チャネルの抑制が重要な役割を果たすことが考えられた。

(21) QT 間隔の time & spacial dispersion に及ぼす群抗不整脈薬の影響

斉藤寛和，大野則彦，横山真也，坏　宏一，野村敦宣，新　博次，加藤貴雄，早川弘一
（日本医大・第一内科）

Ⅲ群抗不整脈薬の QT dispersion (QT-d) 及び APD restitution に対する影響から催不整脈作用の機序を考察。

【対象及び方法】心室期外収縮に対する MS551, E4031 投与例の12誘導心電図から QT-d を計測。また，EPS 中の MAPD restitution 及び心房細動 (AF) 中の先行 RR-QT 関係に対する E4031, Dofetiride の影響を検討。

【結果】 MS551 投与中に Torsades de pointes を発症した例では QT-d の増大無く，E4031 有効例での QT-d はむしろ減少した。EPS 中の MAPD restitution は E4031 により急峻化し，心房細動中の先行 RR-QT 関係も同様に急峻化し，QT の time dispersion は増大。

【総括】 Ⅲ群抗不整脈薬の催不整脈作用機序として QT 間隔の time dispersion 増大の重要性が示唆された。

(22) 心室内層と外層の電気生理学的差異—K_{ATP} チャネルと伸展活性化チャネル

宮崎利久，三好俊一郎，高木俊介，小川　聡（慶應大・医・呼吸循環器内科）

【目的】心室内層 (Endo), 外層 (Epi) の電気生理学的反応を麻酔開胸犬において比較した。

【方法・結果】（Ⅰ）LAD 5分間閉塞時の単相性活動電位 (MAP) の短縮程度は Epi ＞ Endo であった。K_{ATP} チャネル遮断薬 5-hydroxydecanoate の静脈内前投与により短縮は抑制され，両層間の差は縮小した。一方，開口薬 nicorandil (NCR) は Epi の短縮を選択的に促進し，両層間の差を増強した。側副血行を遮断したモデルにおいて，Epi の細胞外 K^+ 濃度 ($[K^+]_o$) 上昇は glibenclamide (GLIB) 前投与により抑制，NCR で促進されたが，Endo-$[K^+]_o$ は影響を受けなかった。心表面単極誘導心電図の ST 上昇・T 波増高は GLIB により抑制，NCR で促進された。

（Ⅱ）上行大動脈の5秒間クランプによる急性圧負荷時，Epi で MAP 短縮を認めたが，Endo では変化がなかった。Epi の短縮は伸展活性化チャネル遮断薬 Gd^{3+} の左房内投与 (500μM; 2500μM) により用量依存的に抑制された。

【総括】冠閉塞時および急性圧負荷時の Endo, Epi の電気生理学的反応に差異が認められ，両層間のイオン・チャネル機能の差が推測された。この差異が心電図 ST-T 変化の一因となる可能性が示唆された。

(23) Preconditioningによる虚血心筋細胞壊死の抑制とKチャネル

三浦哲嗣（札幌医大・第二内科）

Preconditioning (PC) において，アデノシン受容体活性化以降の機序にATP感受性Kチャネル (K_{ATP}) ならびにCキナーゼが寄与する可能性を検討した。家兎の実験的心筋梗塞において，5分虚血5分再灌流によるPCは梗塞サイズを対照群の約40%に抑制した。K_{ATP} 拮抗薬であるグリベンクラミドは麻酔補助薬としてxylazineを用いた条件ではPCの梗塞抑制を阻害したが，ペントバルビタールのみの麻酔下や，$\alpha\beta$遮断薬を用いてxylazineによると同様のレベルに心拍数，血圧を低下させた条件においてもPCを遮断しなかった。A1受容体作働薬 (R-phenylisopropyl-adenosine) はPCをmimicし，その効果はPKC阻害薬により遮断されたが，グリベンクラミドには影響を受けなかった。従って，PCによるアデノシン受容体刺激以降の機序としてCキナーゼの活性化が重要である一方，K_{ATP} はむしろ修飾因子として関与している可能性があり，K_{ATP} の役割は麻酔薬により修飾されると考えられた。

(24) Ischemic Preconditioningにおけるアデノシンの役割 —5'ヌクレオチダーゼの意義

北風政史（大阪大・医・第1内科）

先行する一過性短時間心筋虚血は，ひきつづき生じる長時間心筋虚血・再灌流障害を軽減する (ischemic preconditioning, IP)。この作用がアデノシン受容体遮断剤にて抑制されることから，IPによる心筋保護効果がアデノシン産生酵素（5'-ヌクレオチダーゼ）活性化によるのではないかと考え，麻酔開胸犬において冠動脈左前下行枝を5分間・4回・5分間隔に結紮した。このIP操作により，膜上5'-ヌクレオチダーゼ活性は約60%増大し，さらに膜上5'-ヌクレオチダーゼ阻害剤 (AOPCP) にてIPによる心筋梗塞縮小効果は消失した（梗塞サイズ：IP群7±4%，IP＋AOPCP群36±3%，対照群：42±5%）。このとき，IP群では再灌流中のアデノシン産生量は対照群に比し約3倍に増大した。さらに，このIPによる膜上5'-ヌクレオチダーゼ活性化には，内因性カテコラミン刺激による α_1 アドレナリン受容体刺激－protein kinase C活性化によるリン酸化が重要な役割を果たすことが示された。以上の結果より，ischemic preconditioningによる心筋保護効果には，protein kinase Cによる膜上5'-ヌクレオチダーゼ活性化・アデノシン産生増大が関与することが示された。

11. ミエリンとミエリン形成細胞に関する研究会

1995年 7 月10日
代表者：植村慶一
世話人：池中一裕

(1) Phenotypic expression of oligodendrocyte lineage cells in human brain cell cultures.
S.U. Kim and J.-I, Satoh (Univ. British Columbia)

(2) Changing repertoire of FGF receptors and putative coreceptors during oligodendrocyte development regulation by ligand.
R. Bansal, M. Kumar, K. Murray and S.E. Pfeiffer (Univ. Connecticut School of Medicine)

(3) Localization of mRNA for UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase in the brain during mouse development.
T. Kagawa, A. Oba and K. Ikenaka (NIPS)

(4) DM-20 as an embryonic marker of the oligodendrocyte lineage. J.L. Thomas, S. Timsit, S. Martinez*, R.M. Alvarado-Mallard** and B. Zalc (INSERM U-134 and *U-106, Hôpital de la Salpêtrière, **Univ. of Murcia)

(5) Oligodendrocyte development in normal and transgenic rodents.
Hall, A.C., Calver, A. R., Giese, N.A and W.D. Richardson
(Univ. College London, *UMDS)

(6) Oligodendrocytes express and regulate neurosecretory vesicle "SNARE" complex proteins.
D.L.Madison and S.E. Pfeiffer (Univ. of Connecticut Medical School)

(7) CNS myelination in culture visualized by video microscopy.
H. Asou, Y. Takeda and K. Uyemura (Keio Univ.)

(8) Calmodulin inhibitors and VGCC blockers disrupt oligodendroglial membrane sheets.
J.A. Benjamins and L. Nedelkoska (Wayne State Univ.)

(9) Myelin impaired fyn-deficient mice had emotional abnormalities and were susceptible to audiogenic seizure.
T. Yagi, T. Miyakawa*, H. Aso** and H. Niki* (NIPS, *Univ. Tokyo, **Keio Univ.)

(10) Initial events of myelination involve fyn tyrosine kinase signaling. H. Umemori, S. Sato*, T. Yagi**, S. Aizawa***, K. Mikoshiba and T.Yamamoto (Univ. Tokyo, *Niigata Univ., **NIPS, ***Kumamoto Univ.)

(11) Restoration of functional myelin in the PLP/DM20-transgenic rumpshaker mouse, An exact model for human X-linked spastic paraplegia (SPG-2). A. Schneider, I. Griffiths, C. Readhead, M. Schwab, M. Klugmann and K.-A. Nave (Univ. Heidelberg)

(12) Evidence for inflammation of the bowel in transgenic mice expressing a myelin basic protein-specific T cell receptor-A link between multiple sclerosis and colitis?

C. Readhead, D. Zaller and S. Targan (Cedars Sinai Medical Center, Merck Research Laboratories)

（討論参加者）

植村慶一，阿相　晃（慶應大），糸山泰人（東北大），松村喜一郎，山本　雅（東京大），衛藤義勝（慈恵医大），小林卓郎（九州大），大西晃生（産業医大），田平　武（国立精神・神経センター）

（研究会概要）

細胞生物学と分子生物学の進歩によって，最近ミエリンとミエリン形成細胞の研究は著しい進展を遂げつつある。さらに研究を発展させるために各分野の研究者が集い，新しいアイディアを出し合い深い討論を行うことが重要である。今回，ミエリン形成細胞の発生，分化とミエリン関連遺伝子の遺伝子操作に焦点をあてた研究会を開いた。実施内容は，７月10日午前「ミエリン形成細胞の発生，分化」，午後「ミエリン遺伝子のノックアウトとトランスジェニック動物」について講演及びポスター発表を行った。なお，本研究会は国際神経化学会のサテライトシンポジウムに引き続いて行われた。

(1) PHENOTYPIC EXPRESSION OF OLIGODENDROCYTE LINEAGE CELLS IN HUMAN BRAIN CELL CULTURES

S.U.Kim and J.-I. Satoh, Division of Neurology, Department of Medicine, University of British Columbia, Vancouver, B.C., Canada

Previous studies in neonatal rat optic nerve cultures have identified glial precursor cells termed *oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitor (O-2A) cells*, which can differentiate into either oligodendrocytes or astrocytes, depending on the culture environment. The *O-2A progenitor cells* express $A2B5^+$ /$GD3^+$ /galactocerebroside$^-$/$GFAP^-$ phenotype and proliferate in response to platelet-derived growth factor (PDGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF).

To determine if a specific cell type equivalent to *O-2A progenitor cells of rat* exists in the human central nervous system, dissociated cell cultures were established from fetal human brains of 12-15 weeks' gestation, and the phenotypic expression and proliferative capacity of oligodendrocyte lineage cells in these cultures were investigated. Cultured cells of oligodendrocyte lineage consisted of a major population of Ranscht antibody (R-mAb)$^+$ $O4^-$ cells (68%) and minor populations of R-mAb$^-$$O4^+$ cells (16%) and R-mAb^+ $O4^+$ cells (16%). Most of the R-mAb^+ $O4^-$ cells exhibited

a bipolar or tripolar immature morphology, while the majority of the R-mAb$^+$ O4$^+$ cells exhibited a multipolar mature morphology. R-mAb$^-$O4$^+$ cells contained a mixture of immature and mature cell types. When incubated in serum-free culture medium containing bromodeoxyuridine (BrdU) for 4 days, 42% of oligodendrocytes expressed nuclear BrdU immunolabeling. R-mAb$^+$ cells exhibited a higher degree of BrdU immunolabeling, indicating that they have a greater capacity for proliferation than O4$^+$ cells. The large majority of BrdU$^+$ cells exhibited an immature morphology. Inclusion of insulin, insulin-like growth factor (IGF)-I, bFGF, or fetal bovine serum in culture medium did not stimulate proliferation of oligodendrocytes, while PDGF or PDGF plus bFGF increased the number of R-mAb$^+$ BrdU$^+$ and O4$^+$ BrdU$^+$ cells over control. In addition, insulin and IGF-I induced a 3-fold increase in the number of R-mAb$^+$ O4$^+$ cells, indicating that they promote differentiation of oligodendrocytes. The present study indicates that fetal human oligodendrocytes in culture exhibit a considerable degree of proliferative capacity without the requirement of exogenous growth factors.

Expression of ganglioside markers GD3 and A2B5 (specific for GT3 ganglioside) was also investigated in fetal human brain cultures. A small population of GFAP$^+$ astrocytes expressed GD3 (3%) or A2B5 (2%) and Showed a large flat or process-bearing morphology. Most of the GD3$^+$ cells (94 $\pm$ 5%) were GFAP$^+$ astrocytes. A great majority of A2B5$^+$ cells (95-99%) were NSE$^+$ neurons, while a small population of A2B5$^+$ cells were GFAP$^+$ astrocytes. None of the GD3$^+$ or A2B5$^+$ cells observed in human brain cultures exhibited bipolar-tripolar morphology which is characteristic of the *O-2A progenitor cells of rat.* Our results suggest that both GD3 and A2B5, putative markers for *O-2A progenitor cells of rat*, could not be utilized as cell-type specific markers for identification of glial precursor cells in the developing human CNS.

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and the Multiple Sclerosis Society of Canada.

References

1. Kim S.U. J.Neurosci Res 27, 712-728 (1990).
2. Satoh J-I, Kim S.U. J.Neurosci Res 39, 260-272

(2) CHANGING REPERTOIRE OF FGF RECEPTORS AND PUTATIVE CORECEPTORS DURING OLIGODENDROCYTE DEVELOPMENT: REGULATION BY LIGAND.

Bansal R., Kumar M., Murray K. and Pfeiffer S.E. (Univ. of Conn. Sch. of Med., Dept. of Microbiol., Farmington, CT 06030, USA)

FGF-2 (basic FGF) is a potent regulator of oligodendrocyte (OL) proliferation and differentiation. Two types of FGF receptors are required for mediation of its response: high affinity, tyrosine-kinase signal transducing receptors and endogenous, heparan sulfate proteoglycans (HSPG) co-receptors. We are investigating (a) the expression of these receptors by OL as they progress through developmental stages, and (b) the regulation of receptor expression by FGF-2. Our approach uses northern analyses of highly purified, developmentally synchronized populations of early prgenitors (O2A), late progenitors (Pro-OL) and Mature OL. The data demonstrate that during OL lineage progression, multiple FGF-receptors (FGFR-1,-2,-3) and putative co-receptors (Syndecan-1,-2,-3,-4, Glypican, Cerebroglycan) are expressed in a developmentally regulated manner, leading to a changing repertoire of these signalling molecules, providing a molecular basis for the changing response of developing OL to the common ligand, FGF-2. The data also demonstrate that FGF-2 regulates the mRNA levels of certain FGF-receptors and HSPGs at specific stages of OL development, further providing a means of stringently controlling OL development (NIH NS 10861).

(3) Localization of mRNA for UDP-glactose: ceramide galactosyltransferase in the brain during mouse development.

Tetsushi, Kagawa, Akio Oba, and Kazuhiro Ikenaka (National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, JAPAN)

O-2A progenitor cells (common progenitors of oligodendrocytes and type-2 astrocytes) in brain are known to have migratory potential in vitro. Transplanted O-2A progenitors can migrate large myelin deficient brain (Vijnais et al. (1993) Int. J. Dev, Neurosci., 11, 603-612). In situ hybridization tequnique showed that of early oligodendrocyte progenitors migration in vivo and showed O-2A progenitors arise from some specific regions in the brain, using cRNA probe for PDGF α receptor (PDGF-αR) (Pringle and Richardson (1993) Development, 117, 252-533) , 2', 3'-cyclic-nuc-

leotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) (Yu et al, (1994) Neuron, 12, 1353-1362) or DM-20 (Timsit et al. (1995) Neurosci., 15, 1012-1024). However, there is no direct evidence showing that these markers are exclusively produced by these oligodendrocyte progenitor cells at early development, although they are proven to be a good markers for the ceils of the late oligodendrocyte lineage. UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase (CGT) is a key enzyme in the biosynthesis of galactocerebroside (GalC), which is the most frequently used marker of oligodendrocyte. Thus, CGT mRNA should be detectable earlier GalC during oligodendrocyte development. We applied quantitative RT-PCR tequnique to determine the CGT gene expression in developming mouse brain. It was detectable as early as embryonic day 15 (E15). We then applied in situ hybridization technique to localize the CGT mRNA in the brain during mouse development. Comparative analysis of CGT and myelin proteolipid protein (PLP) revealed a quite similar pattern in brain at postnatal 20 days (P20). We could detect expression of the CGT gene in developing brain and spinal cord at E17, at which time localization of CGT massages were restricted to a longitudinal column of cells in the basal half of ventricular zone around the ventriculus quartus. The strongest signals were observed at the most caudal level of medulla oblongata. After birth, they were distributed in caudal to rostral and ventral to dorsal gradient.

(4) DM-20 AS AN EMBRYONIC MARKER OF THE OLIGODENDROCYTE LINEAGE

Thomas J.L., Timsit S., Peyron F., *Martinez S., °Alvarado-Mallard R.M., and Zalc-B. INSERM U-134 and °U-106, Hopital de la Salpetriere, 75651 Paris cedex 13, and *University of Murcia, Murcia, Spain.

In the adult, proteolipid protein (PLP) and its isoform DM-20, accounts for 50% of total myelin proteins. While PLP is expressed only in myelinating oligodendrocytes, several observations suggest that DM-20 might be expressed earlier and thus serve as a marker of the oligodendroglial lineage during embryonic development: i) *DM-20*, but not *plp*, has been detected in E10.5 mouse and rat embryonic brain; ii) product of the *plp* gene has been detected in oligodendrocyte progenitors purified from new born rats; iii) comparison of various *plp* mutants shows that in mild forms of the disease, the only defect concerns a poor compaction of the myelin sheath (rumpshaker), while in other alleles, such as jimpy, there is, in addition, a defect in the differentiation of the oligodendrocyte lineage. On the basis of these observations we have undertaken the analysis of DM-20 pattern of expression during embryonic development in two vertebrate species: the mouse and

the chicken.

In the CNS of the mouse embryo, DM-20 was first detected at E9.5 in the latero-basal plate of the diencephalon. At E12.5, this inital territory extended rostrally to the ventral hypothalamus and in the cells forming the interparencephalic boundary. Caudally to the diencephalon, DM-20$^+$ cells appeared in the latero-ventral plate of the rhombencephalon. At E14.5, the hypothalamic signal remained unchanged and in the diencephalon DM-20$^+$ cells were seen in the basal mantle layer. The number of DM-20$^+$ cells in the rhombencephalon had increased and extended all along the spinal cord forming a double column of positive cells on either side of the central canal. From E9.5 till E14.5, no DM-20 signal was detected in the mesencephalon. Between E14.5 to birth, in the prosencephalon, the number of DM-20$^+$ cells increased and progressively colonized the future major white matter tracts. In the rhombencephalon and spinal cord, the DM-20 signal extended first ventrally and then dorsally.

In the chicken embryo, the overall pattern of expression of DM-20 was similar to the mouse. The first DM-20$^+$ cells were seen at E2 in the germinal neuroepithelium and were localized in the baso-lateral plate in the mesodiencephalic sulcus and the rhombencephalon, but no DM-20 cells were seen in the mesencephalic curvature. At E3, the DM-20 transcript was detected in the ventral hypothalamus. From E5, the DM-20$^+$ cells were seen in the ventral mantle layer, then there number progressively increased and they localized mostly in the future white matter tracts.

Double labeling experiments failed to show any colocalisation of DM-20 with neuronal markers. In addition, culture and grafting experiments showed that DM-20$^+$ neuroepithelial territory generated oligodendrocytes.Altogether, these data suggest that DM-20 is an early marker of the glial lineage and that embryonic DM-20$^+$ cells have a restricted potentiality to differentiate into oligodendrocytes.

(5) OLIGODENDROCYTE DEVELOPMENT IN NORMAL AND TRANSGENIC RODENTS

(Hall, A.C., Calver, A.R., Giese, N.A[1]. and Richardson, W.D. MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London, Gordon Street, London WCIE 6BT, UK and [1]COR Therapeutics Inc., 256 Grand Avenue South San Francisco, CA 94080, USA.)

Oligodendrocyte precursors express the platelet-derived growth factor alpha-receptor (PDGFRα) and synthesize DNA in vitro in response to PDGF. Using an antibody against the extracellular domain of PDGFRα to label cultures of embryonic rat spinal cord cells, we found that PDGFRα^+

glial progenitors are first generated in the ventral half of the embryonic day 14 (E14) cord and subsequently spread to the dorsal half The number of PDGFRα^+ cells in the starting cultures correlated with the number of oligodendrocytes that developed subsequently in vitro. PDGFRα^+ cells, purified from E17 rat spinal cord by immunoselection, were all able to differentiate into oligodendrocytes in vitro. Complement-mediated lysis of PDGFRα^+ cells indicated that all spinal cord oligodendrocytes are generated from PDGFRα^+ cells. Thus, it appears that there is a single cell lineage that generates oligodendrocytes in the rat spinal cord. This lineage originates from a small number of dedicated PDGFRα^+ neuroepithelial precursors in the ventricular zone in the ventral half of' the E14 cord.

Analogous experiments, using cells derived from either developing cerebral cortex or ventral hypothalamus, support the idea that PDGFRα^+ oligodendrocyte progenitors are generated in the ventral hypothalamus and migrate dorsally into all parts of the developing forebrain, including the cerebral cortex, between E15 and E17.

PDGF-A is expressed by neurons and astrocytes in the developing CNS, suggesting that PDGF-A might stimulate proliferation and/or survival of oligodendrocyte lineage cells in vivo, but up to now there has been no direct evidence for this. We therefore examined the spinal cords of postnatal PDGF-A knockout mice. We found very few PDGFRα^+ oligodendrocyte progenitors (about 1% of wild-type) and a corresponding decrease in the number of differentiated oligodendrocytes. Conversely, when PDGF-A was over-expressed in transgenic mice under control of the neuron-specific enolase (NSE) gene promoter. there were twice the normal number of progenitor cells in the postnatal spinal cord. These experiments demonstrate that PDGF-A is important for development of the oligodendrocyte lineage in vivo, and that PDGF-A is normally present in sub-saturating amounts in the developing CNS.

(6) Oligodendrocytes express and regulate neurosecretory "SNARE" complex proteins.

Dana L. Madison and Steven Pfeiffer, Dept. of Microbiology, MC-3205 (University of Connecticut School of Medicine, Farmington, CT. 06030, USA)

The molecular mechanisms that direct targeting of newly synthesized lipids and proteins in oligodendrocytes during myelinogenesis are largely unknown. We have proposed that components of the vesicular trafficking pathways, such as small GTP-binding proteins, are involved in myelinogenesis (Huber et al., 1994. *FEBS Letts.* 347, 273-278). We now report that key proteins in-

volved in neurosecretory vesicle targeting are also present. Synapsin, synaptophysin and Rab3A are developmentally regulated in oligodendrocytes while in contrast, the putative t- and v-SNAREs for synaptic vesicles, synaptobrevin/VAMP-2 and syntaxin, are constitutively expressed. The synaptic vesicle negative regulatory proteins synaptotagmin I and Rabphilin-3A were not detected. As oligodendrocyte progenitors differentiate into mature, myelinating oligodendrocytes, synapsin and synaptophysin expression are down-regulated, whereas Rab3A expression is up-regulated five-fold from that of the progenitor stages. PCR analysis with Rab3 specific primers followed by cloning and sequencing has shown that oligodendrocytes exclusively express *rab3a*, whereas astrocytes exclusively express *rab3b*. Interestingly, the syntaxin isoform primarily expressed in oligodendrocytes is *syntaxin-2*, rather than the brain specific *syntaxin-1*, The presence of these "synaptic vesicle" proteins in oligodendrocytes argues for the existence of a regulated secretory system in oligodendrocytes whose mechanisms are based on synaptic vesicle trafficking. It is also possible that the oligodendrocyte utilizes the available secretory trafficking framework, where Rab3a would play a key role in this pathway, for myelinogenesis by targeting myelin lipid and protein containing vesicles to the evolving myelin membrane.

(7) CNS MYELINATION IN CULTURE VISUALIZED BY VIDEO MICROSCOPY

H. ASOU, Y. TAKEDA and K. UYEMURA (Department of Physiology, Keio University School of Medicine, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan.)

We studied on the initial events of interaction between an oligodendrocyte process and an axon in culture utilizing video time-lapse microscopy. Myelination of an axon by the lamellipodium of an oligodendrocyte was achieved in several developmental steps of cellular process and coordinated i axon and oligodendrocyte. The initial stage of contact included the formation of a lamellipodium process at the end of an oligodendrocyte process. This process appeared contact with and retract from the axon several times. The filopodia and lamellipodia underwent morphological changes prior to the onset of the myelination. In the second stage, the lamellipodium appeared to thicken and to anchor to the axon. Finally, when rippling of the I ruffling occurred, the angle between the anchoring filopodium and the axon changed depending on the direction of lamellipodial movement. The lamellipodium, which was folded in layers, wrapped around the axon like a transverse wave in one motion as observed on the video screen. Thereafter the lamellipodium assumed "bursting" form within minutes in real time. This is the fir CNS myelination by an oligodendrocyte plasma membrane.

(8) CALMODULIN INHIBITORS AND VGCC BLOCKERS DISRUPT OLIGODENDROGLIAL MEMBRANE SHEETS

Benjamins, Joyce A. and Nedelkoska Liljana Department of Neurology, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI 48201 USA

We have previously shown that microtubule turnover and Golgi transport are required for maintenance of the myelin-like membrane sheets elaborated by murine OLs in culture (Neurochem. Res. 19:631, 1994). Sustained increases in intracellular Ca^{++} elicited by ionophores or antibodies to galactocerebroside cause retraction of these membrane sheets. To further investigate the role of Ca^{++}, we have examined the effects of calmodulin antogonists and blockers of voltage-gated Ca^{++} channels (VGCC's). Cultures enriched in mature OLs were treated for 3 hours with the calmodulin inhibitors W7 (10μM) or chlorpromazine (10μM). Membrane sheets coalesced into multiple bead-like processes, which re-extended if the agents were removed. Verapamil (10μM) or nifedipine (20μM), blockers of VGCC's, caused a different pattern of disruption, with fragmentation of the membrane sheets. At the concentrations used, no effects on viability or morphology of immature OLs or astroglia were observed, indicating mature OLs were uniquely sensitive to these agents. Calcium imaging in cells loaded with Indo-1 showed that none of the agents elicited the large increase in intracellular Ca^{++} associated with membrane disruption by ionophores or antibodies to galactocerebroside. Comparison of cell viability, microtubule organization and immediate early gene expression in these various models of OL injury indicate that different pathways mediate the membrane sheet disruption in each case. (Supported by NIH NS13143)

(9) MYELIN IMPAIRED FYN-DEFICIENT MICE HAD EMOTIONAL ABNORMALITIES AND WERE SUSCEPTIBLE TO AUDIOGENIC SEIZURE.

Takeshi Yagi[1], Tsuyoshi Miyakawa[2], Hiroaki Aso[3], and Hiroaki Niki[2]. ([1]Laboratory of Neurobiology and Behavioral Genetics, National Institute for Physiological Sciences, Myodaiji, Okazaki 444., [2]Department of Psycology, Faculty of Letters, University of Tokyo, Tokyo 113., [3]Department of Physiology, Keio University School of Medicine, Shinanomachi, Tokyo 160, Japan.)

Fyn-deficient mice were reported to have defects in suckling behavior and in spatial learning and had undulated Cell layers in the CA3 of hippocampus and in the dentate gyrous. We also observed

that Fyn was extensively expressed in the white matter during myelination. To further determine the problem of Fyn-deficient mice, we examined the abnormalities of myelination. We confirmed a less amount of the myelin basic protein and the morphological abnormalities of the myelin sheats in the Fyn-deficient mice. On the other hand, it is reported that seizure associated with myelin defects were found in several mutant mice, for example, the hypomyelinating quaking mutants have spontaneous myoclonic seizures and ducky mutant mice have seizures similar to those seen in tottering mice. We confirmed that the Fyn-deficient mice were susceptible to audiogenic seizures rather than those of the heterozygous deficient mice. In the Fyn-deficient mice, the mothers apparently have emotional defects in their maternal behavior caused by environmental stressor. We also confirmed the other emotional abnormalities in the Fyn-deficient mice by their hypersensitivity to light, novelty environment, and electrical shock. The Fyn-deficient mice were one of the best animal model for analyzing the relationships between seizure, emotional behaviors or learning and myelin or hippocampal formations.

T. Yagi, et al. (1993) Nature 366, 742-745.
T. Yagi, et al. (1993) Oncogene 8, 3343-3351.
H. Umemori, et al. (1994) Nature 367, 572-576.
T. Miyakawa, et al. (1994) Mol. Brain Res. 27, 179-182.
T. Miyakawa, et al. (1995) Mol. Brain Res. 28, 349-352.
T. Yagi (1994) Develop. Growth & Differ. 36, 543-550.

(10) INITIAL EVENTS OF MYELINATION INVOLVE FYN TYROSINE KINASE SIGNALING

Hisashi Umemori[1], Shuzo Sato[2], Takeshi Yagi[3], Shinichi Aizawa[4], Katsuhiko Mikoshiba[1], and Tadashi Yamamoto[1] ([1]Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, [2]Niigata University, Niigata, [3]National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, [4]Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto.)

Accumulating data reveal that protein-tyrosine kinases play important roles in signaling for cellular proliferation, differentiation and other biological phenomena. Among protein-tyrosine kinases, Src-like kinases including Fyn form a unique family and are shown to be associated with various surface proteins. They, thereby, mediate extracellular signals received by their interacting receptors. Typical examples are the physical and functional interactions of Src family kinases with

the B- and T-cell antigen receptors.

We found that Fyn is also expressed in the central nervous system. Interestingly, Fyn was expressed in neurons and oligodendrocytes which elaborate myelin. Myelin is the lipoprotein multimembrane that functions as an insulator facilitating conduction velocity of nerve impulses. It is synthesized by oligodendrocytes in the central nervous system at about the time of birth of mammals. During initial stages of myelination, several proteins including Fyn are phosphorylated on tyrosine. Fyn kinase is activated in the initial stages of myelination and it is associated with the large myelin-associated glycoprotein (L-MAG), an adhesion molecule that has been implicated in myelinogenesis. The Fyn-L-MAG association requires amino-terminal domains of Fyn that include SH2 and SH3 (Src homology domains 2 and 3). Crosslinking of L-MAG with antibody induces a rapid increase in the specific activity of Fyn kinase. These findings suggest that Fyn participates in the initial events of myelination as a signaling molecule downstream of L-MAG. In fact, fyn-deficient mice exhibit impaired myelination. In addition, our preliminary evidence suggests that Fyn delivers the signal to Suggests that encoding the myelin basic protein.

(11) RESTORATION OF FUNCTIONAL MYELIN IN THE PLP/DM20-TRANSGENIC *RUMPSHAKER* MOUSE, AN EXACT MODEL FOR HUMAN X-LINKED SPASTIC PARAPLEGIA (SPG-2).

Schneider, A., Griffiths, I., Jung, M., Readhead, C., Schwab, M, Klugmann, M, and Nave, K.-A. Center for Molecular Biology (ZMBH), University of Heidelberg, Germany.

Mutations of the PLP/DM-20 gene underlie abnormal oligodendrocyte differentiation and CNS dysmyelination in mouse and man. In humans, Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) has been subdevided into 'classical' and 'connatal' forms with respect to clinical severity and age of onset. Recently, it has become clear that PMD is allelic to X-linked Spastic Paraplegia (SPG-2), a clinically milder hypomyelination of cortico-spinal and spinocerebellar tracts with late onset and slow progression. The mouse mutant rumpshaker has become an exact model for SPG-2 since it is defined by the identical point mutation (I186T) as the original index family of SPG-2 (McKusick et al.,1962; Schneider et al., 1992; Kobayashi et al.,1994). To further investigate the role of mutant PLP in the etiology of this disease, we have generated rumpshaker mice which express an autosomal transgene for wildtype PLP/DM-20 in addition to the X-linked mutant gene. These mice show a significant improvement of motor functions and are behaviourally "rescued". At the cellular level, a major transgene effect is the myelination of virtually all large caliber axons in white matter

tracts. In contrast, non-transgenic rumpshaker litter mates show a large number of unmyelinated axons. This suggests that elaborating thin myelin sheaths around large caliber axons may be sufficient to prevent most of the behavioural deficits associated with dysmyelination (threshold effect). Moreover, these findings contrast with our previous observation that the same PLP transgene combination was unable to rescue the behavioural defect of jimpy mice (Schneider et al., 1995, PNAS, in press). Thus, the mouse models for SPG-2 (rumpshaker) and PMD jimpy) emerge with features of genetically 'recessive' and 'dominant' disorders, respectively. Supported by grants from BMFT and DFG (SFB3 17) to K.A.N.

(12) EVIDENCE FOR INFLAMMATION OF THE BOWEL IN TRANSGENIC MICE EXPRESSING A MYELIN BASIC PROTEIN-SPECIFIC T CELL RECEPTOR - A LINK BETWEEN MULTIPLE SCLEROSIS AND COLITIS?

Carol Readhead*, Dennis Zaller** and Stephan Targan* (*Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, California 90048 and **Merck Research Laboratories, Rahway, New Jersey 07065.)

Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) is a T- cell mediated demyelinating disease in rodents. Although it has aspects in common with multiple sclerosis (MS), EAE has some linitations as a disease model because it is experimentally induced by immunization with myelin proteins whereas MS arises spontaneously in patients. A transgenic model has been developed which undergoes spontaneous autoimmune demyelination in some environments but not others (Goverman et al., 1993). This transgenic model may provide us with insights as to the environmental agents which trigger an autoimmune response. The transgenic mice developed by Goverman et al. are homozygous for the rearranged a and b chains of the MBP specific T-cell receptor (TCR) in B10.PL mice (H-2u , an EAE susceptible strain). All of the splenic CD3 + T-cells express the TCR b chain transgene and 71% of the cells express the TCR a chain transgene. Twenty eight of these transgenic mice were shipped from Taconic Farms Inc., a commercial specific pathogen free animal facility, where the animals rarely develop paralysis. On arrival the transgenic mice were housed in Cedars-Sinai's specific pathogen free animal facility in filtered cages which were placed laminar flow hoods. The animals were monitored daily from time of arrival for the following 4 months. By the end of 4 months all the animals had developed spontaneous paralysis. The transgenic mice at CMSC fell into two categories; 1) those which developed spontaneous paralysis within one month of arrival and 2) those which developed spontaneous paralysis only after several months at CSMC.

The animals which survived as long as 4 months had fecal occult blood. Histopathology of the bowl and large intestine from these mice showed; thinning of the mucus layer, edema of the gut tissue and some pockets of lymphocyte infiltration. The significance of these observations are not understood although there is known to be a higher incidence of ulcerative colitis amongst multiple sclerosis patients than would be expected. These mice are currently being crossed with T-cell receptor alpha-chain knockout mice in order to eliminate the small percentage of T-cells which do not express the MBP specific T-cell receptor a chain transgene and thus preclude the possibility that the immune response in the gut is due to T-cells with specificity's for molecules other than MBP.

Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L.P., Hood, L and Zaller, D.M. (1993) Cell 72,551-560.

12. 神経回路の成立と維持の分子機構

1995年10月12日～14日
代表者：工藤佳久
世話人：池中一裕

(1) 微小アレイ電極基板への神経回路の形成
川名明夫（NTT 基礎研）

(2) シナプスにおけるプロテオグリカン (Synapotophoscan/MAP1b) のリン酸化とシナプス形成
黒田洋一郎，村本和世（東京都神経研）

(3) 神経伝達物質の開口放出の素過程とその分子機構
西木禎一（三菱化学生命研）

(4) 神経伝達物質の放出の調節機構
高橋正身（三菱化学生命研）

(5) ATP 刺激による神経伝達物質放出に対する Zn イオンの作用
井上和秀（国立衛生試験所）

(6) 神経伝達物質放出機構におけるシナプトタグミンの役割—シナプトタグミン・ニューレキシン間相互作用—
吉田　明（早稲田大）

(7) 抑制性グリシンレセプターチャネルサブタイプの発現様式
赤木宏行（群馬大）

(8) 長期増強現象と遺伝子発現：海馬 LTP に伴い誘発される新規遺伝子群の解析
井ノ口馨（三菱化学生命研）

(9) Microexplant culture を用いた小脳顆粒細胞発生の免疫細胞化学的および電気生理学的解析
若園佳彦（生理研）

(10) 骨格筋分化に伴う筋特異的イオンチャンネル・レセプターの発現
中村　健（東京薬大）

(11) CaMKII 活性の可視化解析とその神経系機能解析への応用
工藤佳久，東　秀好（東京薬大）

(12) GABA による視床下部ニューロンの修飾
山下　博（産業医大）

（討論参加者）

工藤佳久，中村　健（東京薬大），赤木宏行（群馬大），川名明夫（NTT 基礎研），井ノ口馨，西木禎一，高橋正身，小島正己（三菱化学生命研），御園生裕明，熊倉鴻之助（上智大），黒田洋一

郎（東京都神経研），井上和秀（国立衛生試験所）

（研究会概要）

神経系機能を担う神経回路の形成には遺伝子のプログラムによる過程と活動に依存する可塑性過程が関与する。こうして成立した回路が維持され，状況に応じて調節されることが高次脳機能の発現の基本的であると理解されている。シナプス前からの神経伝達物質の遊離とそれに対するシナプス後の受容体の反応における微調節が大きなシステムとしての脳機能の主な調節過程と考えられる。しかし，この過程にはさらにシナプス周辺に存在するグリア細胞由来の因子や神経細胞膜の内外に表現されている機能性タンパク質の相互作用などが関与していることもまた確かなことであり，一面的な研究では全貌を明らかにすることは困難であることは言うまでもない。本研究会は生理学，薬理学，生化学，分子生物学，形態学など同一の目的をもつ異分野の研究者の最近の研究成果を披瀝しあい，互いに理解を深めながら共通の問題の解決の糸口を求めようとしたものである。

(1) 微小アレイ電極基板への神経回路の形成

川名明夫（NTT 基礎研）

神経回路の形成，発達に細胞の電気的活動が大きな役割を果たしていることはよく知られている。しかし，実際に神経回路の形成，発達時に電気活動を非侵襲，多点同時に測定する手段がなかったため，その詳細は必ずしも明らかになっていなかった。最近，非侵襲で多点同時に細胞の電気活動を観測する方法として，電位依存性色素を用いた光学的方法が良く用いられているが，神経回路の発生，発達に伴う電気活動の変化を測定するためには必ずしも有効な手段ではない。本講演では，現在私たちが進めている非侵襲で多点同時測定が可能な微小アレイ電極基板を用いた神経回路の形成，発達に関する研究から以下の４つ項目について紹介する。

（１）培養大脳皮質神経回路の発達に伴う電気活動の変化
（２）電気刺激による回路の活動状態の変化
（３）視床－大脳皮質間神経回路の形成
（４）微小アレイ電極基板上への脳切片培養

(2) シナプスにおけるプロテオグリカン (synaptophoscan/MAP1b) のリン酸化とシナプス形成

黒田洋一郎，村本和世（東京都神経研）

記憶に関わるシナプスの可塑性変化を引き起こすには繰り返し刺激が重要である。このとき神経終末から分泌されるATPのシナプス間隙の濃度は上昇する。近年，細胞外のATPを用い細胞膜の外側でリン酸化を行う酵素，エクト・プロテインキナーゼがニューロン系の細胞で報告されている。K-252bはこのエクロ・プロテインキナーゼを阻害してシナプス形成を抑制しているものと考えられた。すなわち軸索先端の成長円錐や神経終末より放出されたATPが一定濃度以上になったときのみ，シナプス膜表面の特定の機能蛋白質が，特異的にリン酸化され，シナプス形成，成長もしくは安定化が行われることになる。この細胞外ドメインがリン酸化される機能蛋白質の同定を試みた。もっとも分子量の大きなもの (synaptophoscan) は微小管結合蛋白質MAP1bとしてcDNA配列が登録されている蛋白質で，膜貫通部位を持ち，配列の相同性からプロテオグリカンのコア蛋白質と考えられ，シナプス膜にあって，細胞内骨格と細胞外マトリックスを結び，細胞外ドメインのリン酸化を介してシナプス形成に関与している可能性が考えられた。

海馬LTPの形成維持もK-252bで抑制されること，MAP1bのノックアウトマウスではLTPの維持ができないなどの報告とあわせると，演者は，刺激頻度に応じてシナプス間隙に放出されるco-transmitterとしてのATPは，シナプス使用頻度，またはその集積量を示す，生理学的指標となり，リン酸化される基質であるシナプトフォスカンは活動依存的なシナプスの可塑性を起こす重要な情報伝達分子として役立っているのではないかと考えている。

(3) 神経伝達物質の開口放出の素過程とその分子機構

西木禎一，関口真理子，高橋正身（三菱化学生命研）
御園生裕明，今泉美佳，熊倉鴻之助（上智大）
鎌田洋一，小崎俊司（大阪府大・農）

神経伝達物質は神経終末のシナプス小胞に蓄えられており，小胞の開口分泌によって放出される。神経伝達物質の開口放出の機構を分子レベルで理解するためには，どのようなタンパク質がどのような役割で関与しているのかを明らかにする必要がある。シナプス小胞タンパク質VAMPと，シナプス膜タンパク質SNAP-25そしてsyntaxinは，神経伝達物質の遊離を阻害するボツリヌス毒素の標的タンパク質であることから，伝達物質遊離機構の中心的な役割を果たしていると考えられている。しかし，その細胞内機能は明らかにされていない。また，これら3つの

タンパク質は，細胞内小胞輸送に必須な可溶性タンパク質 NSF および a/b-SNAPs と in vitro で複合体を形成することから，SNAP receptor (SNARE) と呼ばれている。NSF による ATP の加水分解にともない，この複合体は解離することが知られている。現在，このような SNARE 複合体の会合・解離がシナプス小胞の開口放出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，その生理的意義付けはされていない。

副腎髄質クロマフィン細胞は発生学的に神経細胞と同じ外胚葉由来の細胞で，脱分極刺激に応答し Ca^{2+} 依存性にカテコールアミンを分泌する。クロマフィン細胞をジギトニンで処理した高透過性細胞を用いた解析から，分泌小胞の開口放出が起こるまでに，いくつかのステップを経ることが示されている。MgATP 依存性のステップの後，分泌小胞は開口放出可能な状態（プライミング）になり，Ca^{2+} が存在すると膜融合が起こるステップへと移行する。私たちは，ボツリヌス毒素を用いて，高透過性クロマフィン細胞からのカテコールアミン放出における SNARE タンパク質の役割，および MgATP 依存性のプライミング過程と SNARE 複合体の関係について調べた。

(4) 神経伝達物質放出の調節機構

高橋正身，島崎洋次，西木禎一，関口真理子（三菱化学生命研）
小崎俊司（大阪府大・農）

シナプスでの情報伝達はシナプス小胞に蓄えられた神経伝達物質がシナプス前部から放出され，シナプス後部の受容体に結合することによって行われている。神経伝達物質はシナプス小胞膜とシナプス前膜の結合（ドッキング）と融合（フュージョン）を伴ういわゆる開口放出機構によって放出されるが，この数年の急激な研究の進展の結果その分子機構が明らかにされつつある。シナプス小胞の開口放出は基本的にはすべての真核細胞で行われている細胞内小胞輸送と同じ機構が用いられている。その過程には NSF と SNAP と呼ばれる細胞質タンパク質と SNARE と総称される膜タンパク質が ATP に依存した複合体の形成，解離を起こすことが必須である。最近脳の SNARE タンパク質が同定され，シナプス前部に発現しているシンタキシン，SNAP-25 およびシナプトブレビン (VAMP) であることが明らかにされた。これらの SNARE タンパク質が神経伝達物質の放出に必須であることは，Zn 依存性のタンパク質分解酵素である破傷風毒素やボツリヌス毒素の軽鎖がこれらの SNARE タンパク質を特異的に切断し，神経伝達物質の放出を阻害することからも示されている。

記憶や学習などの脳の機能が発現するためには，神経回路の性質は絶えず変化することが必要である。シナプスの伝達効率を変化させることは，神経回路に可塑性を与える上で重要な機構として考えられ，神経伝達物質の放出がどのようにして制御されているかを明らかにすることは現

在の大きな課題となっている。神経伝達物質の放出制御に様々なタンパク質リン酸化酵素が関与していることが示唆されている。その中でCキナーゼは，様々な神経由来の標本で神経伝達物質の放出を促進的に制御していることが示されている。我々はCキナーゼを介した神経伝達物質放出の制御機構を明らかにするため，ラット副腎髄質細胞腫由来の株細胞であるPC12細胞を用いて解析を進めてきた。PC12細胞はCa依存性の開口放出機構によってカテコールアミンを放出するが，フォルボールエステルであるTPAで前処理しCキナーゼを活性化すると，その分泌は著しく促進された。この作用はCキナーゼを活性化しない不活性フォルボールでは認められず，Cキナーゼの阻害剤であるカルフォスチンCによって抑制された。これと平行して細胞内のSNAP-25が特異的にリン酸化され，SNAREタンパク質間の相互作用が大きく影響されることが見出された。これらの結果はCキナーゼを介した神経伝達物質の放出制御に，SNAREタンパク質の中のSNAP-25のリン酸化が関わっていることを示唆している。

(5) ATP刺激による神経伝達物質放出に対するZnイオンの作用

井上和秀（国立衛生試験所）

亜鉛は生体に必須の微量元素であるが，ほとんどは蛋白と強力に結合しているため，Zn^{2+}としての濃度はきわめて低い(Magneson et al., 1987)。ところが脳内の亜鉛含量は比較的多く，特に海馬(Crawford & Connor, 1972)，大脳皮質，嗅球(Friedman & Price, 1984)及び扁桃体(Fredrickson, 1989)などの部位では非常に高く，mMの濃度に達する。脳内亜鉛は，その約90％がcysteine及びhistidineなどに富む比較的低分子の蛋白と結合しているが，残りのおよそ10％は亜鉛含有神経終末の小胞内に存在している(Fredrickson, 1989)。このZn^{2+}は，興奮性の刺激によりシナプス間隙に放出される(Assaf & Chung, 1984; Howell et al., 1984)。一方，ATP（アデノシン3リン酸）も同様に神経終末に貯蔵されていて，刺激に応じて放出される。従って，きわめて狭いシナプス間隙に高濃度のATPとZn^{2+}が共存する可能性は非常に高い。細胞外ATPはラットpheochromocytoma PC12細胞においてATP受容体を刺激し，非選択性のカチオンチャネルを活性化し，そのチャネルからのCa流入を引き起こし，結果的にドパミンの放出を促す。この一連の反応に寄与しているATP受容体はP2Xと考えられる。また，最近PC12細胞にはIP3生成とカップルしたP2U受容体が存在していることも明らかになった。そこでATP受容体機能に対するZnイオンの影響を，細胞内Ca濃度変化，電気生理学的パラメター，および神経伝達物質放出能の3点を指標として検討した。細胞内Ca濃度($[Ca^{2+}]_i$)変化は既報(J. Pharmacol. Exper. Thera. 1991; 259: 484-489)に従いfura-2法により，電気生理学的パラメターは既報(J. Physiol. (London). 1990; 428: 257-272)に従いwhole cell patch法により，また神経伝達物質放出能は既報(J. Pharmacol. Exper. Thera. 1991; 259: 484-489)に従いバッチ法により検出した。

Zn^{2+}は，Ca^{2+}チャネルをはじめNa^+，K^+及びCl^-チャネルなど，ほとんどのチャネルに対して抑制性に働く(Frederickson, 1989)が，PC12細胞においてATPによって惹起されるDA放出，$[Ca^{2+}]_i$上昇及び内向き電流をいずれも非常に強く増強した。ラット手綱核のスライス標本(Edwards & Gibb, 1993; Edwards et al., 1992)及びラット海馬の培養神経細胞(Inoue et al., 1992a)においてATPが神経伝達を行っていることが示唆されていることから，これらの部位では，Zn^{2+}がATPによるシグナル伝達をより強力にすることにより，様々な神経応答の調節に関与し，LTPや神経細胞死と深く関与している可能性がある。

(6) 神経伝達物質放出機構におけるシナプトタグミン —シナプトタグミン・ニューレキシン間相互作用—

吉田　明（早稲田大・人間総合研究センター）

近年シナプスに存在する様々なタンパク質が同定され，それらのタンパク質が相互作用し，複雑な複合体を形成しうることが示されてきた。シナプス小胞の主要タンパク質の一つであるシナプトタグミンは，ωコノトキシン受容体（N-型Caチャンネルサブユニット），HPC-1/シンタキシン，ニューレキシン（αラトロトキシン受容体構成蛋白質）等と複合体を形成する。αラトロトキシンはクモ毒の一種で，細胞外のCa非存在下に神経伝達物質の放出を引き起こすことができるが，この作用にシナプトタグミンの関与があるかどうかについて，シナプトタグミン及びを欠失しているPC12細胞を用いて検討を行った。その結果この欠失細胞では，αラトロトキシンによるCa依存的伝達物質放出が抑制されていた。さらにこの欠失細胞にラットのシナプトタグミン遺伝子を導入，発現させることにより，αラトロトキシンに対する応答が回復した。以上の結果から，αラトロトキシンによるCa非依存的な神経伝達物質放出に，シナプトタグミンが必須であることが示された。また，シナプトタグミンはCa/CaM-kinase IIによりリン酸化されるが，このリン酸化部位がニューレキシンとの相互作用に関わるカルボキシル末端領域であることを明らかにした。このリン酸化が両者の相互作用にどのような影響があるか現在検討中である。

(7) 抑制性グリシンレセプターサブタイプの発現様式

赤木宏行（群馬大・医・薬理）

抑制性グリシンレセプターチャネルを構成するαサブユニットのうち，主要なサブタイプであるα1とα2についてラット脊髄における発現様式をin situ hybridizationにより検討した。α1

サブユニット mRNA の発現量は胎児・幼若期には少なく，動物の成長に伴って増加するのに対し，α2 mRNA は胎児・幼若期に多量に発現し，加令とともに発現量が減少する傾向を示した。これらの結果は Northern blot により得られたものとよく一致していた。しかし，顕微鏡画像を詳細に観察したところ，成熟ラット脊髄の一部の細胞（特に脊髄後角表層の細胞）は強い α2 mRNA シグナルを持つことがわかった。成熟期においても α2 サブユニットがこれらの領域で機能しうる事を示唆している。これと逆に胎児中期 (E13-15) の脊髄神経管胚芽細胞（マトリックス細胞）が α1 様の mRNA を発現していることも明らかになった。α1 サブユニットが神経分化になんらかの役割を担っている可能性が示唆される。

(8) 長期記憶と遺伝子の発現：海馬 LTP に伴い誘導される新規遺伝子群の解析

井ノ口馨，小澤史子，平井啓子，村山明子，加藤明彦（三菱化学生命研）

長期記憶の成立・維持は新たな遺伝情報の読みだしを必要とする点で短期記憶と異なる。ところが記憶研究のモデルとして最もよく研究されている海馬の長期増強 (LTP) でさえ，細胞内の分子機構として作業仮説が立てられているのは蛋白質のリン酸化反応までであり，その後の核内における遺伝子の発現調節，さらには発現遺伝子産物の働きはよくわかっていない。そこで，長期記憶形成の分子機構を理解する手始めとして，海馬の神経細胞の活動に依存して誘導される遺伝子群を RT-PCR をベースとした mRNA differential display 法で探索した。

ペンチレンテトラゾールあるいはカイニン酸投与で痙攣が誘発されたラットの海馬から調製した RNA を，104組の異なるプライマーセットで表示し，発現誘導の度合いが大きい14種の異なる cDNA クローンを単離した。次に，麻酔下のラット海馬の LTP に伴うこれら未知遺伝子の発現誘導を Northern blot,in situ hybridization 及び RT-PCR で検討した。反復テタヌス刺激を海馬の貫通繊維に与え，歯状回の顆粒細胞層で電気記録をとった。LTP を誘発するテタヌス刺激を与えると，Ag2, Ti3, Cf1, Af2, Cr5, Cr8 の 6 種の mRNA の強い誘導が認められた。塩基配列の解析から，いずれも未知の遺伝子であると思われた。

単離された cDNA の一つ Ag2 について更に調べ，以下の結果を得た。1．Ag2 は既知のものとの類似性を持たない新規な遺伝子であった。2．痙攣誘発剤ペンチレンテトラゾール投与により，海馬歯状回で強い発現誘導がみられた。この誘導は一過的なものであり，また蛋白合成阻害剤のシクロヘキシミド存在下でも誘導が認められたことから，Ag2 は最初期遺伝子であることがわかった。3．海馬歯状回の LTP 誘導後，45分でピークに達し 3 時間後にはコントロールレベルに戻る一過的な発現誘導を示した。4．10時間以上持続する LTP を誘導する反復テタヌス刺激を与えると，常に強い発現誘導が認められた ($n = 5$)。このことは Ag2 の発現と LTP の持続に相関関係があることを示唆している。5．反復テタヌス刺激による発現誘導は，NMDA 受

容体のアンタゴニスト MK801 により阻害された。6．脳以外では肺にのみ発現が認められた。7．Genomic Southern の結果，シングルコピーの遺伝子であった。

今後，これらの遺伝子の発現と LTP・記憶の維持の関係を調べることにより，記憶の固定化の分子機構の理解が進むことが期待される。

(9) microexplant culture を用いた小脳顆粒細胞発生の免疫細胞化学的および電気生理学的解析

若園佳彦（生理研）

我々は，小脳顆粒細胞の発生における電位依存性チャネルの発現について解析するため，マウス小脳 microexplant culture (Nagata et al. 1990) を用いている。この培養系における小脳顆粒細胞は，explant から放射状に移動しクラスターを形成することを特異的マーカーである抗 zic 抗体により直接的に証明した。また，パッチクランプ下に GABA に対する応答性を記録することにより，この培養系における顆粒細胞を電気生理学的に同定することが可能であることも見いだした。この GABA 応答性により同定される外向き電流について，培養経過を追って記録したところ，ゆっくりと不活性化されるものから急速に不活性化されるものへと変化するのが観察された。

(10) 骨格筋分化に伴う筋特異的イオンチャンネル・受容体の発現

中村　健，工藤佳久（東京薬大・生命科学・生体高次機能）
高橋　滋，三浦　卓（東京薬大・生命科学・環境生理生態）
大地陸男（順天堂大・医・第二生理）

骨格筋分化能を有する樹立培養細胞において，筋分化に伴うＬ型 Ca^{2+} チャネルおよびリアノジン受容体の発現を fura-2 による細胞内 Ca^{2+} 濃度測定と patch clamp 法による電流記録を用いて調べた。筋分化能を有する細胞株として L6 細胞と C3H10T1/2 の skeletal myogenic subclone を用いた。10T1/2 の skeletal myogenic subclone は，3μM 5-aza-cytidine で24時間処理した後，筋分化能を獲得したものを subcloning することにより確立した。fura-2 による細胞内 Ca^{2+} 濃度測定では，L6 細胞および 10T1/2 の skeletal myogenic subclone のいずれの cell line においても多核筋管細胞のみで 20mM caffeine による Ca^{2+} 上昇が観察された。単核の筋芽細胞では Ca^{2+} 上昇は生じなかった。一方 10T1/2 の skeletal myogenic subclone における whole-cell clamp recording では，多核筋管細胞において活性化・不活性化速度の遅い (τact = 8-15msec, $\tau inact$ =

1500-2000msec), dihydropyridine 感受性のＬ型 Ca^{2+} 電流が記録された。cell-attached patch clamp による single channel recording では，100mM Ba^{2+} 存在下で 12pS の unit conductance をもつ活性化速度の遅い Ca^{2+} チャネル電流が記録された。これらの電流記録の結果より筋管細胞で発現しているＬ型 Ca^{2+} チャネルが骨格筋型のサブタイプであることが示された。以上の結果から，興奮・収縮連関に関係する骨格筋型Ｌ型 Ca^{2+} チャネルやリアノジン受容体は，筋分化の過程において，筋芽細胞では発現しておらず多核筋管細胞の形成に伴い発現してくることが示唆された。

(11) CaMKII 活性の可視化解析とその神経系機能解析への応用

工藤佳久（東京薬大・生命科学・生体高次機能）
東　秀好（三菱化学生命研）

我々は最近，カルモジュリン依存性キナーゼⅡ型 (CaMKII) の活性状態を画像化することに成功した。これは CaMKII の特異的合成基質，syntide-2 に蛍光試薬 acrylodan を結合させたものであり，基質が燐酸化されると，蛍光強度の変化が生ずることを期待して合成したものである。AS-2 と名付けたこの試薬の励起波長は 360nm 付近にあり，蛍光のピークは 520nm にある。面白いことに，AS-2, カルモジュリン，ATP, Mg および CaMKII を加えた反応試薬に Ca を添加すると，470nm に極大のある大きな蛍光が生ずるのである。この蛍光は時間が経つにつれて，減衰し，やがて，ほとんど消失する。470nm の蛍光は CaMKII を加えなくても生ずるが，この場合は減衰しない。また，Ca のカルモジュリンのどちらを除いても生じない。予め AS-2 の燐酸化部位を燐酸化した試薬，P-AS-2 を代わり用いると 470nm の蛍光はほとんど生じない。一方，520nm の蛍光は燐酸化が進につれて上昇するという特徴的な挙動を示した。これらの結果から，AS-2 は Ca／カルモジュリンと結合し，その際に 470nm の蛍光を生ずるが，AS-2 が燐酸化されると，その結合能が低下し，再び，470nm の蛍光も減衰するものと考えられる。したがって，470nm の蛍光の上昇で，活性化カルモジュリンの生成状態が検出でき，さらに，その減少で燐酸化過程が検出できることになる。一方，520nm 蛍光の上昇は Ca の有無に関わらず燐酸化が生ずる過程を示すことになる。AS2 は細胞外に適用するだけで，細胞内に浸透して行くので，海馬初代培養細胞を染色して，グルタミン酸で刺激し，画像処理によって解析することができた。その結果，CaMKII が細胞膜付近の限局された部位で活性化されていることを検出することができた。この方法は今後，さらに多くの生理活性検出試薬の調整に役立つものと考えている。

(12) ペプチド・サイトカインによる視床下部ニューロンの調節

山下　博（産業医大・第一生理）

視床下部の視索上核 (SON) および室傍核 (PVN) には vasopressin (AVP) ならびに oxytocin (OXT) を産生する神経内分泌細胞の細胞体が多数存在する。これらの細胞は下垂体神経葉に軸索を延ばし，循環血中に vasopressin と oxytocin を分泌するが，その分泌量は主に視索上核および室傍核の細胞体へのシナプス入力により調節されている。最近の我々の研究室における電気生理学的手法を中心とした研究によりこれらのニューロンの興奮性が Glutamate および GABA により促進性，および抑制性の調節を受ける以外に，種々の循環関連ペプチドやサイトカインによっても修飾されることが明らかとなってきた。

Angiotensin II (AII) は脳室内投与により AVP 分泌を増加させ，脳内において体液浸透圧恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている神経ペプチドであるが，SON のスライス標本において，特徴的な間欠型放電を示す AVP ニューロンおよび非間欠型放電を示す OXT ニューロンの両者の放電頻度を濃度依存性に増加させた。この作用機序を解析する目的で SON スライスを用いた Whole-cell patch-clamp 法により SON ニューロンのK電流に対する AII の作用を検討したところ，AII は一過性K電流 (I_A) を可逆的に抑制 した。さらにシナプス入力に及ぼす AII の効果を解析する目的でスライスパッチクランプ法により膜電位固定下で興奮性シナプス後電流 (EPSCs) を観察した。測定された EPSCs は非 NMDA 型の glutamate 受容体の拮抗剤である CNQX によりほぼ完全に抑制され，AII により増強された。これらの結果により AII はシナプス前性に glutamate の分泌を増強し，シナプス後性にK電流の抑制を引き起こして SON ニューロンを興奮させることが示唆された。

ナトリウム利尿ペプチド (ANP, BNP, CNP) も視床下部に多く分布し，脳室内投与により飲水行動の抑制，AVP 分泌の抑制を示すことが知られている。興味深い点はその多くの作用に於いて AII と拮抗する点である。SON スライス標本において ANP および BNP の作用を検討したところ，間欠型放電パターンを示すニューロンにのみに作用して放電の抑制を引き起こした。ANP および BNP はこの他にスライス標本において cGMP 濃度を増加される作用があり，さらに cGMP アナログが同様の放電の抑制を起こしたことから，NP 受容体を介した cGMP 上昇が SON ニューロンの抑制を引き起こすことが示唆された。

炎症反応の中心的役割をになうサイトカインが末梢循環血から上向性に脳内にシグナルを伝達する可能性が以前から指摘されていたが，その作用の経路や機序については不明な点が多い。種々の中枢神経作用を有するサイトカインである Interleukin 1b (IL-1b) は脳室内投与により AVP 分泌を促進することが知られている。SON スライスを用いた我々の実験では IL-1b が SON ニューロンを脱分極させ，放電頻度を濃度依存性に増加させることが観察された。さらにこの作用は Prostaglandins の産生阻害物質である Sodium salicilate によって消失した。また IL-1b は放電の

抑制を伴うことがしばしば観察されたが，この抑制作用はGABAA受容体の拮抗剤であるBicuculline の前投与によって反転し，純粋な促進作用となった。これらの結果からIL-1b はSON に直接作用し，Prostaglandins の産生を介して神経分泌ニューロンに促進的に作用する一方，SON 周囲に細胞体を有するGABA ニューロンにも促進的に作用する可能性が示唆された。

13. 網膜における視覚情報処理の新しい展開
—定性的理解から定量的理解へ—

1995年7月27日～29日

代表者：臼井支朗（豊橋技科大・工・情報）

世話人：金子章道

(1) 網膜における色の受容と生理

金子章道（慶應大・医・生理）

(2) 中枢における色覚生理

小松英彦（生理研）

(3) 色覚の心理物理とモデル

江島義道（京都大）

(4) 色覚の計算論モデル

中内茂樹（豊橋技科大・工・情報）

(5) ヤツメウナギ光受容細胞の形態保存の改良と免疫電顕の試み

森　慶二，吉田美香，外崎　昭（山形大・医・第1解剖）

(6) 電子顕微鏡写真からの神経細胞立体像の構築

吉田伸成，宍戸　修，海野　修（東邦大・理・情報科学）

橋本葉子（東京女子医大・第1生理）

(7) メダカ網膜における視物質遺伝子発現の成長に伴う変化

佐藤卓至，久富　修（大阪大・理・生物）

徳永史生（同・宇宙地球科学）

(8) RCSラット網膜における主要組織適合性複合体 class Ⅱ陽性細胞の出現

赤石佳子，ドウルユスフケマル，石黒誠一，玉井　信（東北大・医・眼科）

(9) イモリ網膜再生過程における神経節細胞のアミノ酸受容体の発現と発達

千葉親文，斉藤建彦（筑波大・生物）

(10) 肝由来神経活性化因子(LDNA)による視神経再生促進

堀江秀典，高野雅彦（横浜市大・医・第1生理）

(11) パターン反転ERGによるネコ網膜神経節細胞の機能評価

—視神経切断後と坐骨経移植後の経時的変化—

大出尚郎（慶應大・医・眼科，大阪大・医・第2生理）

三好智満，福田　淳（大阪大・医・第2生理）

渡部眞三（発達障害研・生理）

小口芳久（慶應大・医・眼科）

⑿ 末梢神経移植ラットにおける脳波の脱同期反応と行動的覚醒

佐々木仁（大阪大・医・第2生理）

⒀ 第一次視覚中枢における Reorganized ニューロンの生理機能的特性

佐々木勇二，八田史郎，浜本順次，玉井嗣彦（鳥取大・医・眼）
Y. M. Chino （ヒューストン大・視覚神経生理）

⒁ コイ錐体入力型水平細胞への UV 感受性錐体入力

山田雅弘（電総研・分子機能）
S. P. Fraser (Inprerial College)
片野和彦，下川和郎，宮崎勝彦（電総研・分子機能，筑波大）

⒂ プロテインキナーゼ阻害剤を用いた水平細胞ギャップ・ジャンクション調節機構の解析

宮地栄一，西川千恵子（藤田保健衛生大・医・生理）

⒃ H1 水平細胞の分光感度調節：順応信号としての NO とドーパミン

古川徹生，安井湘三（九州工大・情報）
片野和彦（筑波大）
山田雅弘（電総研・分子機能）

⒄ 双極細胞シナプス前終末部における細胞膜直下の遊離 Ca イオン濃度の推定

坂場武史，石金浩史，立花政夫（東京大・心理）

⒅ ネコ網膜視神経細胞の周辺受容野の情報機能

塚本吉彦（兵庫医大・解剖）
Robert G. Smith, Peter Sterling (University of Pennsylvania, Dept of Neuroscience)

⒆ 時空間受容野測定装置の製作および網膜水平細胞への適用

海野　修，牛尾友美（東邦大・理・情報科学）

⒇ 網膜双極細胞のイオン電流モデル

石原彰人，臼井支朗（豊橋技科大・工・情報）
神山斉己（同・知識情報）

(21) イオン電流モデルによる杆体双極細胞と杆体水平細胞の光応答の解析

小椋俊彦，石原彰人，臼井支朗（豊橋技科大・工・情報）
石井宏幸（同・情処セ）
神山斉己（同・知識情報）

(22) 虚血，再灌流ラット網膜における低親和性 NGF レセプターの変化

富田浩史，阿部俊明，石黒誠一，玉井　信（東北大・医・眼科）

(23) ラット網膜に出現する $GABA_A$ 受容体

小栗太郎，新貝鉚蔵（岩手大・工・情報）

(24) 代謝型グルタミン酸受容体 mGluR6 ノックアウトマウスの視覚機能

三好智満，佐々木仁（大阪大・医・第２生理）

広井佳野（京都大・医・眼科）

(25) A 及び B 型ネコ網膜水平細胞におけるグルタミン酸受容体 subunit の発現

森際克子（大阪大・医・第２生理）

ノガ・ヴァルディ（University of Pennsylvania, Department of Neuroscience）

(26) 網膜２次ニューロンにおける代謝型グルタミン酸受容体と共役する GTP 結合蛋白質の検討

吉川知志，大熊真人，津田基之（姫路工大・理・生命科学）

(27) ウサギ角膜上皮細胞の２種類の stretch-activated channel

渡辺修一，谷崎みゆき，金子章道（慶應大・医・生理）

(28) 網膜視細胞における一酸化窒素合成酵素

吉田晶子（東北大・医・眼科）

(29) 色順応過程における輝度系と赤・緑反対色系の相互関係

山本洋紀，江島義道（京都大・人間環境学）

【参加者】

橋本葉子（東京女子医大），安井湘三，八木哲也，古川徹生，林田祐樹（九州工大），藤本正昭（島根大），塚本吉彦（兵庫医大），宮地栄一（藤田保健衛生大），斉藤建彦，千葉親文，佐々隆寿，辻　久利，辻村誠一（筑波大），立花政夫，岡田　隆，石金浩史，松井　広，南　尚利，坂場武史（東京大），江島義道，山本洋紀，郷田直一（京都大），金子章道，渡辺修一，桑田　治，三輪尚史，青木香織，Takase Emilio, 前田多章，谷崎みゆき，松永真哉，佐藤直樹（慶応大），外崎昭，森　慶二（山形大），高橋広（産業医大），宍戸　修，牛尾友美，海野　修，吉田伸成（東邦大），吉川知志，津田基之（姫路工大），堀江秀典，高野雅彦（横浜市大），渡部眞三（発達障害研），石黒誠一，吉田晶子，赤石佳子，富田浩史（東北大），福田　淳，森際克子，佐々木　仁，三好智満，大出尚郎，徳永史生，久富　修，佐藤卓至（大阪大），田内雅規（岡山県立大），玉井嗣彦，浜本順次，佐々木勇二，遠藤　実（鳥取大），新貝鉚蔵（岩手大），山田雅弘（電総研），小松英彦，河合房夫（生理研），保　智己（浜松医大），臼井支朗，中内茂樹，小椋俊彦，石原彰人，大木和美，小森正美，山本将生，青山俊弘，藤川智博，神山斉己，石井宏幸（豊橋技科大）

【研究会の概要】

本研究会の従来からのメインテーマである視覚，特に，網膜の情報処理機構に関しては，過去数10年にわたり膨大な知見が集積されており，今や，こうした知見を基に，視覚システムとしての網膜全体の機能を定量的に理解すべき段階に達している。そこで，今回の研究会では，「色の受容から知覚まで」というタイトルで特別講演を行い，視覚，特に，色覚に関する様々な分野（網

膜生理，中枢における視覚生理，心理物理，計算論モデル）の研究成果を４名により発表して頂いた。また，一般講演においても，形態，発現・再生，受容体，細胞内メカニズム，イオンチャンネル，光応答特性など，視覚（網膜）についての総合的理解につながる多くの分野からの発表があり，様々な視点から関連研究を捉えることのできる絶好の機会であった。

なお，演題は特別講演を含め29題で，参加者数は80名程度であり，特に若手の研究者，大学院生，学生の参加が多く，活発な討論が行われた。

(1) 網膜における色の受容と生理

金子章道（慶應大・医・生理）

(2) 中枢における色覚生理

小松英彦（生理研）

(3) 色覚の心理物理とモデル

江島義道（京都大）

(4) 色覚の計算論モデル

中内茂樹（豊橋技科大・工・情報）

(5) ヤツメウナギ光受容細胞の形態保存の改良と免疫電顕の試み

森　慶二，吉田美香，外崎　昭（山形大・医・第１解剖）

ヤツメウナギの網膜には，ミオイドの長さが異なる長，短２型の光受容細胞がある。外節に反応する抗体を用いた光顕レベルの免疫組織化学などにより，長い光受容細胞が錐状体細胞に，短い光受容細胞が桿状体細胞に，それぞれ類縁であることが明らかにされた。免疫電顕法による，

より詳細な研究を進めるためには，反応部位の正確な同定を期する必要がある。摘出した眼球を分割した後の固定処理法では，方向性を持つ桿体および錐状体外節と色素上皮細胞との相対的位置関係が乱され，観察が不正確になる例のあることを，我々はしばしば経験した。

1．光顕レベルの試みとして，摘出した眼球を氷冷した2.5％グルタールアルデヒドに浸漬し，マイクロウエーブ照射を行なった。その際，固定液の温度上昇を30°以下に保つことにより，外節の形態が良好に保存されることが明らかになった。このマイクロウエーブ照射法により，４％パラフォルムアルデヒド，0.05％グルタールアルデヒド混合液の浸漬固定法に併用し，免疫電顕用試料の作製に応用することを試みた。

2．固定された眼球を分割し，アクリル系 LR-White 樹脂に包埋，超薄切片を作製し，１次抗体（ヤツメウナギ光受容細胞外節に反応する３種類の抗体：H16, L31, S70）と反応させた後，15nm —金コロイド標識２次抗体と反応させ，日立 H-7100 により観察した。

以上，１および２の方法により，外節の形態保存を改良し，特に網膜の接線方向の超薄切片を作製することにより，長，短細胞外節と色素上皮細胞の構造を確保し，免疫抗体結合部位を，比較的正確に観察することができた。

(6) 電子顕微鏡写真からの神経細胞立体像の構築

吉田伸成，宍戸　修，海野　修（東邦大・理・情報科学）
橋本葉子（東京女子医大・第一生理）

はじめに

神経細胞の形態は機能と密接に関連している。神経細胞は突起を３次元に広げているので，その立体像を得ることは重要ではあるが，有効な方法が特に電子顕微鏡レベルではないのが現状である。そこで本研究では，網膜双極細胞の樹状突起野を対象とし，その連続超薄切片の電子顕微鏡写真から，計算機を用いてその立体像構築を試みた。

方法および結果

データには，計算処理速度，メモリ容量などの関係で，網膜双極細胞の樹状突起野の連続超薄切片（厚さ 80nm,300枚）の内80枚を用いた。最初に，細胞の輪郭像をスキャナで計算機に取り込み，突起断面の位置，重心，大きさなどを計算した。次に，これらのデータを基に，異なる切片の突起断面同士のつながりを求め，AVS station-Vistra800ex （クボタ㈱）を用い，ボクセルモデル及びワイヤフレームモデルを作成した。電子顕微鏡の試料は 80nm の薄さで切断し作成していることもあり，切断面を組織面に精確に合わせるのは技術的に困難である。その結果，ボクセルモデルによる立体画像は歪んだものとなる（図１）。ワイヤフレームモデルでは立体像の変形が容易に行えるので，このような歪みを補正できる（図２）。しかしながら，構築した立体像

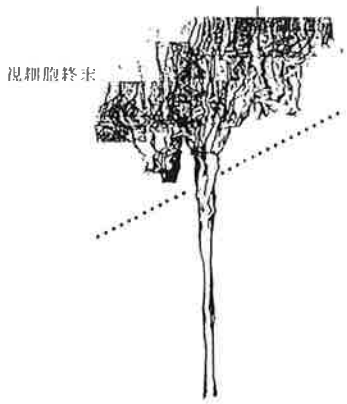


図1

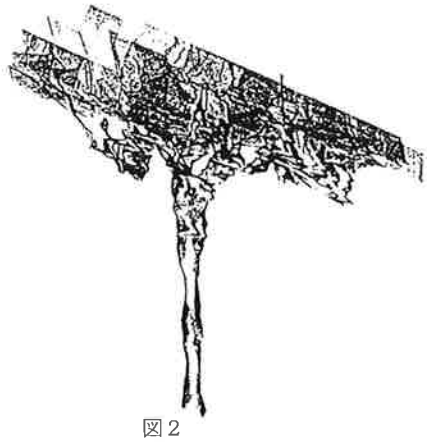


図2

には元の神経細胞には存在しない“はね”状の像が生じる。これは，隣接する切片の形状が大きく異なることによる。そこで次に，切片の形状を徐々に変形させた補間面を新たに生成し，この“はね”は取り除いた。以上の処理により，構築した双極細胞立体像は実際の組織に近いものとなった。

参考文献

Unino O., Maehara M., Hidaka S., Kita S. & Hashimoto Y. (1994) Visual Neuroscience, 11, 533-548.

宍戸，海野，前原，橋本(1994)　電子情報通信学会，MBE94-73: 129-136.

坂本，宍戸，海野，橋本(1995)　電子情報通信学会，MBE94-129: 47-53.

(7)　メダカ網膜における視物質遺伝子発現の成長に伴う変化

佐藤卓至，久富　修（大阪大・理・生物）
徳永史生（同・宇宙地球）

魚類の網膜では，錐体視細胞が規則的に配列したモザイク構造を形成している。我々は5種類のメダカ視物質遺伝子をクローン化し，*in situ* ハイブリダイゼーション法により網膜における発現を解析した。その結果，メダカ成魚の網膜では4種類の錐体視細胞（複錐体の主体・副体，長単錐体，短単錐体）及び桿体に，それぞれの視物質（赤，緑，青，紫及びロドプシン）が発現していることと，それらの細胞が規則的に配列していることを示した。また，メダカ網膜における視細胞の形態と発現する視物質遺伝子の一次構造との関係は，キンギョのそれと良く対応していた。

我々はさらに，メダカ幼魚の網膜を用いて，網膜の発達段階に伴った視物質遺伝子発現の変化を観察した。メダカ幼魚においても，成魚のそれと同様なモザイク状の錐体視細胞の配列が存在

するが，青視物質遺伝子は発現していなかった。成魚で青視物質遺伝子が発現している長単錐体には，複錐体主体と同じく赤視物質の発現が認められた。メダカ幼魚の網膜の外周部では，細胞分裂を伴う網膜の成長が起こっており，網膜細胞の分化・成熟過程が観察される。そこで，幼魚網膜の外周部における視細胞の発達と，視物質遺伝子発現の変動を観察した。メダカ幼魚の外顆粒層は，単層の上皮として形成され，視物質遺伝子の発現が始まった後に，錐体層と桿体層に分離し，内外節を伸長することがわかった。各視物質の発現開始時期に大きな差はなかったが，幼魚の視細胞では発現しない青視物質も外周部では一過的に発現していた。また，外周部では，特定の視物質遺伝子を発現する視細胞の割合が異常に多く，複数の視物質が一つの細胞に同時に発現している可能性が考えられた。

これらの結果から，視物質は視細胞サブタイプの分化に伴って現れる特異的なマーカーであるが，その発現特異性は視物質の発現が開始する時点では確定しておらず，網膜の発達に伴って変化し得ると考えられた。

(8) RCS ラット網膜における主要組織適合性複合 class Ⅱ陽性細胞の出現

赤石佳子・ドウルユスフケマル・石黒誠一・玉井信（東北大・医・眼科）

目的： RCS ラットは，遺伝性に網膜変性を起こす動物として知られている。RCS ラットでは変性の過程においてマクロファージの遊走が認められるが，その遊走因子は不明である。今回我々は，RCS ラットの網膜変性の過程における，免疫反応の一端として，脈絡膜及び網膜の主要組織適合性複合体，class Ⅱ (MHC class Ⅱ) 陽性細胞につき免疫組織化学的検索を行った。
方法： 変性の過程において，異なる stage の RCS ラット (rdy/rdy) 眼に対し，MHC class Ⅱに対する免疫組織化学を行った。コントロールは同じラット（＋／＋）を用いた。ラット眼球を摘出，凍結切片を作製し，モノクロナール抗ラット Ia 抗体 (MRC OX6) を用いて，免疫組織化学を行った。
結果： 生後20，28，35，42，63日の (rdy/rdy) ラットにおいて網膜の外網状層に MHC class Ⅱ陽性細胞が認められた。変性の過程において，class Ⅱ陽性細胞の数は変動した。脈絡膜に MHC class Ⅱ陽性細胞が認められた。（＋／＋）ラットでは，網膜に MHC class Ⅱ陽性細胞は認められなかったが，(rdy/rdy) ラットと同様に，脈絡膜に MHC class Ⅱ陽性細胞が認められた。
結論： RCS ラット (rdy/rdy) に認められた MHC class Ⅱ陽性細胞は，網膜変性の過程で何らかの影響を受け，遊走してきた細胞，もしくは網膜の細胞が抗原提示能力を持ったものと考えられた。

(9) イモリ網膜再生過程における神経節細胞のアミノ酸受容体の発現と発達

千葉親文，斎藤建彦（筑波大・生物科学系）

網膜を含む脊椎動物の中枢神経系は損傷を受けると発生の初期を除いてその機能を回復できないとされている。ところが有尾両生類のイモリは成体においても完全な網膜再生能力を保持している。網膜の機能が再生する機構を研究することは，再生現象や神経発生に関わる問題を明らかにするだけでなく，脳神経組織の可塑性を調べる上での有益な情報を提供する。

成体イモリの網膜を外科的に除去すると残された色素上皮細胞が脱分化，増殖し再生網膜細胞の前駆細胞となる。網膜再生過程においてまず神経節細胞が，次いで視細胞がシナプス層形成前に出現し，双極細胞，アマクリン細胞がシナプス層形成途中またはその後に出現する。各種神経細胞は分化に伴って細胞間に機能的なシナプス連絡を確立し最終的に光応答を回復する。

我々は網膜再生における色素上皮細胞から神経細胞への分化の過程を生理学的に明らかにしている。しかし，分化しつつある神経細胞間にどのようにして機能的なシナプスが形成されるのかについては全く明らかでない。そこで今回，再生過程で最初に分化してくる神経節細胞に着目し，いつ頃どの様な神経伝達物質受容体が発現するかを調べたので報告する。

実験は再生過程の異なる網膜から神経細胞を単離し，伝達物質候補に対する細胞の応答性をホールセルパッチクランプ法で調べることによって行った。得られた結果は，正常網膜から単離した神経節細胞の受容体の特性と比較した。

正常網膜から単離した神経節細胞はグルタミン酸に対しては興奮性，GABA, グリシンに対しては抑制性の応答を示した。グルタミン酸のアナログを作用させる実験から神経節細胞には少なくとも２つのタイプのグルタミン酸受容体：AMPA／カイニン酸タイプ，NMDA タイプが存在することがわかった。一方 GABA, グリシンの受容体としては A タイプの GABA 受容体と一般的なグリシン受容体を持つことがわかった。

網膜の再生過程においてこれらの受容体はシナプス層が形成される前に発現した。グルタミン酸受容体の発現はシナプス層形成に伴って一過的に高まる傾向がみられた。一方 GABA, グリシンの受容体発現は網膜再生過程を通じて単調に増加した。このように興奮性と抑制性で受容体の発現様式に違いがあることから，網膜再生におけるこれらの受容体の機能的な違いについて考察する。

⑽　肝由来神経活性化因子 (LDNA) による視神経再生促進

堀江秀典（横浜市大・医・生理）
高野雅彦（同・眼科）

肝臓はタンパク質合成工場と言われるように既知のタンパク質のみでなく多くの機能の確定していない未知のタンパク質も産生していると考えられている。我々は成熟ラットの肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流することにより肝細胞を単離し，精製後無血清培養液中で培養を行った。肝細胞培養上清液 (HCM) をまず末梢神経系に作用させた。コラーゲンゲルを用いた 3 次元培養法を導入し単離神経細胞から生体中に近い神経線維を伴った神経組織までの様々な形態の脊髄後根神経節 (DRG) を培養し HCM を作用させた。その結果肝由来神経活性化因子 (LDNA) は以下の特徴があることが判明した。⑴神経線維を伴った DRG の神経線維の切断端からの神経再生を促進する。神経細胞そのものには直接作用しない。⑵神経線維の中枢端及び末梢端の両端から神経再生を促進する。⑶再生神経突起の生存維持効果を示す。⑷老化した神経組織からの神経再生促進・生存維持機能を発現する。こうした LDNA と同様の機能を発現する既知因子がないことから肝由来神経活性化因子は既知の神経栄養因子とは異なる新規の因子ではないかと考えられる。

次に網膜からの視神経再生に対する肝由来神経活性化因子の効果を検討した。成熟ラットの視神経を切断し 7 日間飼育後網膜を摘出し一辺が約 0.5mm 網膜片に細切し，末梢神経と同様コラーゲンゲル内で 3 次元培養を行った。この系に HCM を作用させ網膜片からの神経再生促進効果を検討した。培養 3 日目には神経突起の数はコントロールに比べ1.7倍にまで増加した。HCM を限界膜で< 5K, 5K << 100K, 100K <の 3 つの分画に分けそれぞれの分画の活性を調べると 5K << 100K に活性が認められた。95℃・5 分の熱処理により失活することから HCM 中の神経再生促進因子は 5K << 100K の間にある熱変性を伴う蛋白質であると推定される。更にゲル濾過法により活性分画を分離すると 10KD と 20KD の間の活性が見られた。末梢神経再生を促進する分画と一致することから同一の肝由来因子が網膜からの神経再生を促進していると考えられる。今まで生体内で肝臓が脳・神経系に対し積極的に働きかけているという研究結果は全く報告されていない。しかし，肝細胞から中枢神経系に直接作用する因子が分泌されているという事実は，肝臓が脳・神経系の機能に直接関わっていることを強く示唆している。現在この因子の分離精製を進めてきており，この因子が新規である可能性が極めて濃厚となった。今後この因子を同定し遺伝子クローニングを確立するとともに，その作用機序を解明していく計画である。

(11) パターン反転 ERG によるネコ網膜神経節細胞の機能評価
—視神経切断後と坐骨経移植後の経時的変化—

大出尚郎（慶應大・医・眼科，大阪大・医・第二生理）
三好智満，福田　淳（大阪大・医・第二生理）
渡部眞三（愛知県発達障害研・生理）
小口芳久（慶應大・医・眼科）

大型哺乳動物であるネコの視神経においても切断後坐骨神経を自家移植することにより再生が可能である事は，本研究会においてすでに報告した。現在までの我々の研究により，坐骨神経移植によって軸索再生した網膜神経節細胞の多くが移植手術後2カ月の時点で形態学的にも電気生理学的にもほぼ正常な機能を保っている事がわかった。しかし，移植後の時間とともに網膜神経節細胞の空間分解能，時間分解能など mass としての機能がどの様に変化するのかは明らかでない。そこで我々はパターン反転網膜電図 (P-ERG) に注目した。

1981年に L. Maffei らは，ネコの視神経切断実験から P-ERG の起源が，網膜神経節細胞にあると報告した。以来多くの研究がなされ現在では網膜神経節細胞を主体とした網膜内層とするのが一般的であろう。

今回我々はまず時間的，空間的に正弦波変調が可能な縦縞のパターン反転刺激装置を用い，時間周波数 1Hz, 2Hz, 4Hz, 6Hz, 8Hz, 空間周波数0.1~10cycle/degree の広範囲にわたり正常な成ネコの P-ERG を記録しその波形を解析した。解析には高速フーリエ変換を用いて刺激周期成分と反転周期成分に分けて解析し P-ERG の振幅特性グラフを作成した。刺激周期成分の振幅は比較的時間周波数の早い領域で大きく，空間周波数との関係は比較的線形な関係にあったのに対して，反転周期成分の振幅は逆に時間周波数の遅い領域で大きく空間周波数では0.5～ 1Hz 付近をピークに非線形性のカーブを示していた。また，反転周期成分の振幅特性グラフは従来の網膜のコントラスト感度の報告などから予想される MTF カーブと良く相関しており反転周期成分が最も良く網膜神経節細胞の機能を反映すると予想された。

現在，視神経切断ネコと坐骨神経移植ネコにて P-ERG の記録を行っており，一部のデータについて経過報告を行いたい。

(12) 末梢神経移植ラットにおける脳波の脱同期反応と行動的覚醒

佐々木　仁（大阪大・医・第2生理）

目的：視神経切断後，末梢神経移植によって網膜—上丘路を再形成させたラットの視覚行動に

ついて検討した。ラットの徐波睡眠時に視覚刺激を提示することにより高振幅徐波が低振幅速波に変わることが知られている。この脱同期反応は視覚皮質の損傷によっては影響を受けないが上丘の損傷によって消失することが報告されている (Dean et al. 1984)。この皮質脳波の脱同期反応を指標として，末梢神経移植動物の光に対する反応性について調べた。

方法：ラット (Long-Evans) を用い，末梢神経移植手術は切断後の網膜神経節細胞軸索と上丘および視蓋前域とを架橋した。前述の移植手術後 6 － 7 カ月でスクリュー電極を感覚運動野，視覚野上の頭蓋および前頭洞 (Frontal Sinus) に慢性的に植え込み，1 週間の回復期間をおいて脳波記録を開始した。慢性電極をつけた動物をテスト箱（幅 50cm, 奥行き 25cm, 高さ 25cm）に入れて安静に放置し，2-4Hz の徐波が連続している徐波睡眠時に光刺激を提示した。光刺激はテスト箱上 60cm に位置するハロゲンランプ (500W) で，持続は第 1 試行では 20ms とし，もし光刺激に対して脱同期反応が生じなかった場合には，3 分以上の試行間間隔をおき，持続を 40ms 長くして第 2 試行を行った。以上の操作を脱同期反応が生ずるまで，あるいは持続が 780ms になるまで繰り返した。光刺激を用いたテスト後，音刺激（白色雑音，背景雑音レベル上 20dB）を用いて同様のテストを繰り返した。脳波記録と共に，動物の行動をビデオカメラで監視，録画して光刺激に対する行動的覚醒反応を分析した。

結果：徐波睡眠時に光刺激提示すると，正常動物では 8 例の全例で光刺激後 10sec 以内に脱同期反応が生じた。3 例で両側視神経切断後，再び同様のテストを繰り返すと光刺激に対する脱同期反応は消失したが，音刺激によっては明瞭な脱同期反応が認められた。移植動物では10例中 8 例で正常動物と同様の脱同期反応が認められた。光刺激に対する脱同期反応が生ずるための閾値は移植群では 402.9ms と正常群の 172.5ms に比べ有意に高かった。さらに，光刺激に対する脱同期反応が生じた場合，単に脳波上の変化だけでなく，行動的覚醒が認められる場合があった。この行動的覚醒反応は動物の身体の一部あるいは全体の動きとして観察された。

結論：以上の結果は末梢神経移植動物において，再形成された網膜一上丘路が視覚情報を伝達したことおよび視覚情報が上丘で処理されたことを示している。

(13) 第一次視覚中枢における Reorganized ニューロンの生理機能的特性

佐々木勇二，八田史郎，浜本順次，玉井嗣彦（鳥取大・医・眼科）
Yuzo M. Chino （ヒューストン大・視覚神経生理）

哺乳動物の感覚系は，特に大人において確立されたもので，何らかの求心性入力遮断 (deafferentiation) が起こっても非可塑的であると考えられていた。しかし，最近の研究によって，限局性の感覚野障害の後に topographic map reorganization が出現することが発見された。視覚系においても，限局性の視野障害後に，その障害部位に受容野を持つ大脳皮質視覚野のニューロン

が新たな受容野を獲得すること (reorganization) が報告された。この時，reorganization が起こるためには反対眼の障害部位に視野上で一致した部位の deafferentiation が必要であり，新しい受容野は障害部に接した健常網膜上に存在していた。今回我々は，その reorganize されたニューロンの機能的性質を知るために実験を行い，その結果を定量的に解析し，reorganization 発現のメカニズムについて検討した。

実験には，成ネコ4匹を用い，麻酔下に右眼の網膜に限局性（5°以内）のレーザー障害部位を作成し，左眼は眼球摘出または広範囲のレーザー障害によって完全 deafferentiation の状態にした。6カ月以上経過した後，麻酔下に細胞外単一ニューロン記録法を用い，障害部位を含む電極トラックの視覚野ニューロンの受容野をマッピングした。その中で，良好に分離されたニューロンを用い，正弦波格子状視覚刺激に対する反応を記録しオリエンテーション特性，空間周波数特性およびコントラスト感度に関して分析を行った。また，正常コントロールとして網膜障害を有さない正常成ネコ2匹を用いた。

刺激に対する選択性 (selectivity) として orientation bandwidth, direction selectivity, spational resolution, spatial frequecy bandwidth について，反応性 (responsiveness) としては contrast threshold, maximum response amplitude について，それぞれを reorganized ニューロン，reorganized 領域以外の normal ニューロンおよび正常コントロール動物より得られたニューロンの3群に分けて比較検討した。

その結果，selectivity について reorganized ニューロンは他の2群に類似して，ほぼ正常であったが，responsiveness は有意に低下していることが分かった。特に contrast threshold は reorganized 領域で著明に上昇していた。以上の結果より，reorganized ニューロンは responsiveness の低下を除いて，ほぼ正常の反応様式を示した。すなわち，このニューロンは高コントラストの条件下で，より高位の中枢に機能的な視覚情報を伝達し得ることが示唆された。また，reorganization の機序については，stimulus selectivity が正常であること，reorganized ニューロンの受容野の大きさがほぼ正常に近いこと，さらにもともとの受容野と新しく獲得された受容野の皮質における距離が最大 6-8mm に達することにより，皮質内の long-range horizontal connection がその発現に主要な役割を果たしていると思われた。

(14) コイ錐体入力型水平細胞への UV 感受性錐体入力

山田雅弘（電総研・分子機能）
S. P. Fraser (Imperial College)
片野和彦，下川和郎，宮崎勝彦（電総研・分子機能，筑波大）

鯉網膜の錐体視細胞には，赤，緑，青の3種があり，分光感度最大値はそれぞれ 620, 530,

460nm にある。その入力を受ける鯉の錐体入力型水平細胞には，H1, H2, H3 型の 3 つがある。分光応答は H1 型ではすべての可視光に対し過分極応答をし，H2 型では短波長領域で過分極，長波長領域で脱分極応答を示し，H3 型では中間波長領域で脱分極で他は過分極応答する。

しかしウグイ等の表層魚において，さらに UV（紫外線）感受性錐体の存在が知られており (Harosi & Hashimoto, 1983)，4 種の錐体視細胞に対応して 4 種の錐体入力型水平細胞が見出されている (Fukurotani & Hashimoto, 1984)。鯉については UV 錐体の存在が顕微分光で明らかになっているが (Harosi, 1985; Hawryshyn & Harosi, 1991)，その機能については不明である。

一酸化窒素 NO は，H1 型水平細胞の空間受容野，分光特性，細胞入力抵抗において，明順応と同様の作用を示すことが知られるようになった (Yamada et al., 1995; Yasui et al., 1995; 今回の本研究会の古川らの発表)。この NO の発生部位については，不明である。

NO を吸着し，特異的消去剤である haemoglobin (Hb) を含んだリンゲル液で剝離網膜を灌流して，分光応答特性に対する効果を調べた。その結果，次のことが分かった。

1．Hb は，すべての水平細胞において青色光 (460nm) と比較して，紫色光 (421nm) に対する応答を減少させ，時には完全に紫応答を消失させた。

2．Hb 投与による紫と青応答振幅の時間経過は，異なっており，紫応答の方がより Hb に敏感であった。

3．緑あるいは黄色の強い色順応光で，青または緑錐体を抑制した状態で分光応答を調べることにより，Hb の UV 錐体入力抑制効果は，より明白に示された。

4．UV 光（400nm 以下の短波長光）に対する応答は，Hb 投与により減少した。

これらのことは，UV 錐体が鯉網膜に存在し，すべての錐体入力型水平細胞に対して入力していること，そして NO が錐体入力型水平細胞の紫領域における UV 錐体入力による過分極光応答を増大させ，Hb がそれを減少させることを示唆している。

Fukurotani, K. & Hashimoto, Y. (1984) Invest. Ophthal. Vis. Sci. (Suppl.), 24 118.

Harosi, F. I. (1985) The visual system (New York: Liss) (eds., Fein, A. & Levine, J. S.)

Harosi, F. I. & Hashimoto, Y. (1983) Science, 222: 1021-1023.

Hawryshyn, C. W. & Harosi, F. I. (1991) Vision Research, 31: 567-576.

(15) プロテインキナーゼ阻害剤を用いた水平細胞ギャップ・ジャンクション調節機構の解析

宮地栄一，西川千恵子（藤田保健衛生大・医・生理）

網膜水平細胞間の gap junction は水平細胞内 cAMP 濃度の上昇により閉じることが知られてい

る。水平細胞内の cAMP は，interplexiform cell から放出された dopamine が水平細胞の D1 receptor に結合し G-protein を介して adenylate cyclase を活性化することにより増加すると考えられている。われわれは水平細胞間 gap junction は cAMP と同様 cGMP によっても閉じること，そして水平細胞内の NO 合成酵素により産生された NO や arachidonic acid の lipoxygenase 代謝産物が，soluble guanylate cyclase を活性化することで水平細胞内 cGMP を増加させ gap junction を調節している可能性を示唆してきた (Miyachi et al. (1990) NeuroReport 1, 107-110; Miyachi et al. (1994) NeuroReport 5, 485-488)。本研究では cAMP-dependent protein kinase 阻害剤および cGMP-dependent protein kinase 阻害剤を用いて gap junction 調節機構を調べた。

コイ網膜の水平細胞内へ cAMP-dependent protein kinase 阻害剤 Arg-Gly-Tyr-Ala-Leu-Gly (M. W. 635.82) を cAMP と共に注入したところ，Lucifer Yellow CH の隣接水平細胞への色素拡散 (dye-coupling) がみられ，cAMP による gap junction 遮断が抑制された。一方 cGMP による gap junction 遮断は本阻害剤によっても抑制されなかった。

次に cGMP による gap junction の遮断が cGMP-dependent protein kinase を介しているか否かを調べるために，cGMP-dependent protein kinase の阻害剤 Arg-Lys-Arg-Ala-Arg-Lys-Glu (M. W. 942.59) を cGMP と共に水平細胞内に注入した。本阻害剤により dye-coupling がみられ，cGMP による gap junction 遮断が抑制された。一方 cAMP による gap junction 遮断は本阻害剤によっても抑制されなかった。

また，G-protein を活性化する目的でコイ網膜水平細胞内への GTP-γS 注入実験を行った。GTP-γS の注入により dye-coupling は著明に抑制され，gap junction の遮断がみられた。次に上記 cAMP-dependent protein kinase 阻害剤を GTP-γS と共に水平細胞内に注入した。本阻害剤の注入によっても dye-coupling がみられ，GTP-γS による gap junction 遮断は抑制されなかった。これらの結果は dopamine/cAMP 系の他にも G-protein を介して gap junction を遮断する系が存在することを示唆する。

(16) H1 水平細胞の分光感度調節：順応信号としての NO とドーパミン

古川徹生，安井湘三（九州工大・情報工）
片野和彦（筑波大）
山田雅弘（電総研・分子機能）

コイ網膜の H1 型水平細胞は全波長領域に感受性を持ち，光刺激に対して過分極応答を示す。この分光感度は順応によって変化する。暗順応時は波長による感度の差は少なく，分光感度曲線は全体的に鈍った形状をしているが，明順応時には短波長領域が長波長側に比べて相対的に抑えられた尖った形状になる（図１）。H1 への入力は赤感受性錐体が優位であるが，われわれはこ

のほかに短波長感受性錐体からの APB 感受性・符号反転・抵抗増大型のシナプスを見出し，これが明順応および NO によって活性化されることを報告してきた。今回，順応に伴う H1 分光感度変化に対する APB レセプタの関与を明らかにするとともに，外網膜における順応信号であるドーパミン (DA) との関係をも明らかにするため以下の実験を行い，ある程度の結論を得た。

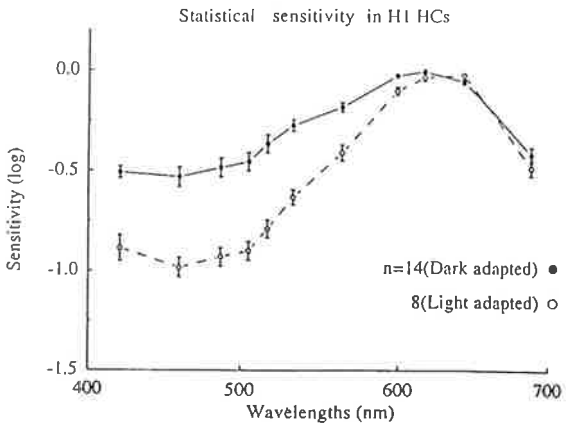


図 1．H1 水平細胞の規格化分光感度曲線

1）DA の効果。暗順応網膜に DA を投与したところ，長波長領域の感度が上昇し，結果として分光感度曲線は尖った。また明順応網膜に DA ブロッカー (halpoeridol) を投与したところ，長波長感度が落ち，分光感度曲線は鈍った。これは DA が赤錐体→ H1 のカイニン酸レセプタを増強したためと考えられる。

2）APB の効果。APB は明順応時に H1 の短波長感度を増大させ，分光感度曲線を鈍らせた。これは符号反転型 APB レセプタのチャネルが常に閉じた状態になったため，短波長光刺激に対する脱分極成分が消失して感度が上昇したものと考えられる。

3）NO の効果。NO 供与体 (SNP, SNOG) は暗順応時に H1 の短波長感度を相対的に減少させ，分光感度曲線を尖らせた。これか NO が APB レセプタに活性化することで短波長の感度が抑えられたためと考えられる。一方 NO 除去剤（ヘモグロビン： Hb）は明順応に短波長感度を増大させ，APB と同様に分光感度を鈍らせた。このことから NO は明順応時に網膜自体から放出されていることが示唆される。

4）haloperidol で DA レセプタをブロックした状態下で Hb を投与した。その結果は Hb は明順応状態の H1 の短波長感度を減少させた。

以上の結果から NO は明順応時に放出されており，外網膜における順応シグナルとして働いていると考えられる。また H1 に対して NO は DA と独立して働きかけ，おもに DA は長波長，NO は短波長側に効果を及ぼすことがわかった。

(17) 双極細胞シナプス前終末部における細胞膜直下の遊離 Ca イオン濃度の推定

坂場武史・石金浩史・立花政夫（東京大・大学院・人文社会系・心理学）

化学伝達物質は Ca^{2+} 依存性に放出されることが知られている。蛍光性 Ca^{2+} 指示薬等による細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度測定法では細胞質における緩やかな濃度変化を計測することはできても，

開口放出が生じる active zone での局所的かつ急激な濃度変化を捉えることは困難である。キンギョ網膜の ON 型双極細胞のシナプス前終末部には，Ca^{2+}チャネルと共に Ca^{2+}依存性 K^{+}チャネルが存在する。そこで，Ca^{2+}依存性 K^{+}チャネルの活性化を指標として，シナプス前終末部における細胞膜直下の Ca^{2+}濃度の推定をおこなった。

網膜から単離した双極細胞を whole-cell clamp 法で膜電位固定した。膜電位を-60mV から 0mV へ脱分極すると，内向き電流に引き続いて，大きな外向き電流が流れた。この外向き電流は，TEA (60mM) あるいは Charybdotoxin (200nM) でほぼ完全に抑制されたが apamin (200nM) では阻害されなかったので，BK 型の Ca^{2+}依存性 K^{+}電流（BK 電流）と固定した。

細胞内での遊離 Ca^{2+}濃度の上昇を抑えるためにパッチ電流から BAPTA を終末部に導入し，脱分極パルスによって BK 電流がどの程度活性化されるかを検討した。その結果，BK 電流の抑制には 30mM もの高濃度の BAPTA が必要とされた。したがって，BK チャネルは Ca^{2+}チャネルの近傍に位置していることが示唆された。

脱分極パルス（-60mV から 0mV）を繰り返し与え，Ca^{2+}電流の活性化に引き続き生じる BK 電流を計測した。BK 電流に集合ノイズ解析法を適用した結果，単一チャネルコンダクタンスは約 50pS, チャネルの開確率は0.6程度であると推定した。Ca^{2+}電流を Co^{2+}などで阻害した状態で，パッチ電極から Ca^{2+}と蛍光性 Ca^{2+}指示薬である Furaptra を細胞内に導入し，脱分極によって活性化される BK 電流と細胞内遊離 Ca^{2+}濃度との対応関係を調べた。その結果，細胞内遊離 Ca^{2+}濃度が 10μM 程度の時に BK チャネルの開確率は0.5となった。したがって，膜電位を－60mV から 0mV に脱分極した場合，BK チャネル近辺の遊離 Ca^{2+}濃度は 10 ～ 20μM にも上昇することが明らかになった。Ca^{2+}電流の活性化に伴う細胞内遊離 Ca^{2+}は，蛍光性 Ca^{2+}指示薬の Fura-2 で測定した場合，せいぜい 1.5μM にしかならないのと大きく異なっている。

双極細胞にパッチ電極から高濃度の BAPTA (10 ～ 20mM) を導入した状態で，伝達物質の放出をアメリカナマズの網膜から単離した水平細胞を用いて検出した。双極細胞を脱分極した直後，Ca^{2+}電流の活性化は始まっているが BK 電流の活性化は BAPTA によって遅らされている状態でも，伝達物質は放出されることが明らかとなった。この結果から，「Ca^{2+}チャネル－高濃度の Ca^{2+}を必要とする伝達物質放出部位－ BK チャネル」という位置関係か，或いは「Ca^{2+}チャネル－ BK チャネル－低濃度の Ca^{2+}しか必要としない伝達物質放出部位」という位置関係が考えられる。

(18) ネコ網膜視神経細胞の周辺受容野の情報機能

塚本吉彦（兵庫医大・解剖）

Robert, G. Smith and Peter Sterling (University of Pennsylvania, Dept of Neuroscience)

背景） 網膜における情報機能の最適性を定量的に検討する研究が最近行われてきた。1）予測符号は抑制効果によって作られ，直流成分を除去し，振幅を圧縮する (Srinivasan et al, '82)。2）中心受容野の錐体信号の集約符号は S/N 比を改善し，低減濾波特性をもつ（塚本，Smith & Sterling, '90)。3）低周波域の白色化と高周波域の雑音除去を仮定すれば，中心周辺拮抗受容野に似た重み関数が最適なものとして導かれる (Atick, et al, '92)。4）雑音が多く動作範囲の限られた神経は帯域濾波特性をもつとき最大情報量を伝送できる (Hateren, '92)。

しかし，最適性を計る基準は多くあって，しばしばたがいに矛盾するから，一面だけの評価では不十分である。たとえば，完全な予測は起こらないし，完全な白色化も起こらない。そこで，多くの側面がいかに調整されているかを注意深く評価するための定量的方法が必要となる。そのような試みの一つが本研究である。

序論） 自然画像における 2 点間の相関は距離の指数関数で近似される。それゆえ，中心受容野に寄与する錐体視細胞の信号はたがいに強く相関するが，周辺受容野に寄与するそれらの信号は概して弱く相関する。中心野において信号が加算される集約符号は単一の錐体信号に比べて S/N 比が改善される。しかし周辺野における信号が減算される情報機能上の効果は十分に調べられていない。

方法） 中心野のみの信号を中心周辺拮抗両野の信号の S/N 比の改善率 (SNI) を比較した。この改善率は錐体数の平方根と入力パタンと重み関数の類似度 (Similarity) に比例するものである。網膜の各偏心度における錐体および β 型細胞の密度や，広狭 2 つのガウス関数による受容野モデルの感度および半径 (Linsenmeier, et al, '82) については，報告されている実測値を用いた。いろいろな空間周波数の COSINE 波成分が重畳した指数的自己相関関数を入力モデルに使い，空間定数 (λ) によって成分比率を変化させた。

結果） 高い周波数が豊富なとき（$\lambda < 0.1$mm, 網膜上），中心野のみと比較して中心周辺両野では SNI がわずかに増加し，また β 型細胞間の相関も極めてわずかながら増した。このような性質は輪郭の検出に役立つものと考えられる。

低い周波数が豊富なとき（$\lambda > 0.1$mm），中心—周辺両野による SNI は顕著に減少し，また隣接 β 型細胞間の相関も減った。これは冗長な低周波数成分の除去による振幅圧縮の効果である。中心野のみの SNI に対する中心—周辺両野の SNI の比は偏心度によらずほぼ一定であった。その一定性は周辺野の中心野に対する半径の比が網膜の中央(5)から辺縁（2.5）にかけて変化することによってもたらされる。また，SNI そのものは網膜の中央より辺縁にある β 型細胞の方がつねに大きかった。中央の β 型細胞が高い周波数を効率よく符号化し，辺縁の β 型細胞が低い周波数を効率よく符号化するように設計されている。

考察） 目標の像が網膜の中央部に固定するように追跡的な眼球運動がネコでも起こることから，入力画像の高周波数成分が中央部では保存され，辺縁部では運動によるボケから低周波数成分が生成するものと考えられる。

⑲ 時空間受容野測定装置の製作および網膜水平細胞への適用

海野　修，牛尾友美（東邦大・理・情報科学）

はじめに：　受容野は神経細胞に影響を与える網膜面上の領域として定義される。受容野の測定は主に，網膜面上を小さなスポットあるいはスリット光で走査し，生じた応答振幅を光の網膜面上の位置に対してプロットすることにより行われる。一方，我々のまわりの光景は固定されたものでなく，時間の推移とともに変化していく。したがって，受容野を時間，空間双方で同時に求めた方が，より生理的に意味のある結果が得られる可能性がある。これまでも時空間で受容野（以下，時空間受容野）を記述する試みが行なわれているがそのためには，時空間でランダムに変化するパターンを網膜に照射するための特殊な装置，方法が必要である。このような理由などにより，時空間受容野の研究はNakaらによって精力的に行なわれているものの，他の研究者によってはほとんど行なわれていないのが現状である。

今回，CRTディスプレイ組込み型光刺激装置を用い，網膜水平細胞の時空間受容野を調べたので報告する。

測定装置：　本装置では，光パターンをCRTディスプレイ上に表示し，レンズを介して網膜に結像する。はく離網膜を視細胞側を上にしてガラス上に置き，下側（すなわち硝子体側）から光パターンを投影する。光パターンの大きさ，位置，強度などの種々のパラメータはC言語で記述されたプログラムで制御される。本装置では，14・14の格子状パターンあるいは196本のスリット状のパターンを，CRTディスプレイの画面切換えに対応する17msecで切換えることが可能である。

実験および解析結果：　実験はコイ網膜のL型水平細胞を対象として行なった。時空間でランダムに変化するパターンに対する水平細胞応答の1例を図1，相関計算から得られた時空間受容野を図2に示す。時空間受容野を解析することにより現在，次の様な結果が得られている。(1)振幅が増大しても受容野はあまり変化しない（従来のスリット光刺激などでは，応答振幅の増大にしたがい受容野が大きく評価されることが知られている）。(2)時空間受容野では時間ラグの経過とともに受容野が，特に周辺部位で縮小する。

（文献）宮地，小野，牛尾，吉田，海野(1995)　電子情報通信学会，MBE-94-128, 39-46.



図1．スリットランダムパターン光に対する水平細胞応答

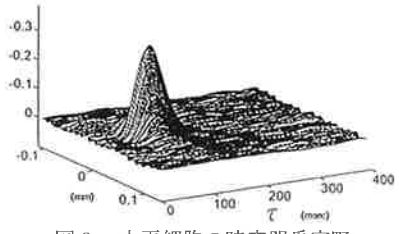


図2．水平細胞の時空間受容野

(20) 網膜双極細胞のイオン電流モデル

石原彰人，臼井支朗（豊橋技科大・工・情報）
神山斉己（豊橋技科大・工・知識情報）

視細胞，水平細胞および双極細胞からなる網膜外網状層において，双極細胞は外網状層で処理された信号をアマクリン細胞や神経節細胞に伝達する役割を担う重要な細胞である。また，その光応答特性や形態的特徴により，オン型，オフ型のサブタイプが，また主に錐体から入力を受ける錐体型，主に杆体から入力を受ける杆体型のサブタイプが存在することが知られている。

双極細胞は形態的には樹状突起，細胞体，シナプス終末の３つの部分に大別でき，各部位にはこれまでの単離細胞やスライス標本を用いた生理実験によって表１に示すイオン電流が存在することが報告されている。また，双極細胞の樹状突起に存在する伝仏物質作動性電流の相違によりオン型，オフ型のサブタイプが決定されると考えられている。さらに，錐体型と杆体型では膜電流に違いがみられることも報告されている。こうしたイオン電流が，双極細胞の光応答形成にどのように関与しているかを明らかにするためには，イオン電流機構に基づくモデルを用いたシミュレーション解析が有効と考えられる。

そこで本研究では網膜双極細胞のイオン電流モデル（図１）を構築した。これまでに単離双極細胞の細胞体で観測された５種類の膜電位依存性イオン電流は，活性化係数と不活性化係数により決定される Hodgkin-Huxley 型方式により記述した。細胞内カルシウム機構に関しては，細胞内を細胞膜近傍と細胞深部の２つの領域に分割したコンパートメントモデルを構築し，細胞内カルシウム濃度変化を表現した。各イオン電流記述，カルシウム機構のパラメータは単離双極細胞における生理実験結果[2][4]に基づき推定した。

以上のようにして構築したモデルの妥当性は，膜電位固定シミュレーションにより検証した。また膜電流固定シミュレーションにより，各々のイオン電流が電位応答の形成にどのように寄与しているかを解析した。さらに本モデルを用いて，杆体双極細胞および錐体双極細胞における膜電位固定実験時の膜電流応答を解析した結果，それらは双方の細胞体に存在するイオン電流特性の相違により表現できることが示唆された。

表１：双極細胞各部のイオン電流

部位	イオン電流	文献
樹状突起	グルタミン酸感受性電流 APB 感受性電流	[3][9] [5][6][9]
細胞体	膜電位依存性カリウム電流 (I_{Kv}) カルシウム電流 (I_{Ca}) Ca 依存性カリウム電流 ($I_{K(Ca)}$) 内向き整流性電流 (I_h) 一過性外向きカリウム電流 (I_A)	[2][4]
シナプス終末	GABA 感受性電流 glycine 感受性電流 カルシウム電流	[3][8] [7]

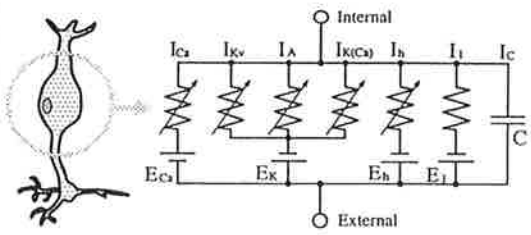


図１：単離双極細胞のイオン電流モデル

参考文献

[1] Hodgkin, A. L & Huxley, A. F. (1952) *J.Physiol.* 117, 500-544

[2] Kaneko, A. & Tachibana, M. (1985) *J.Physiol.* 358, 131-152

[3] Attwell, D., Mobbs, P., Tessier-Lavigne, M. (1987) *J.Physiol.*387 125-161

[4] Lasater, E. M. (1988) *J.Neurophysiol.* 60 1460-1480.

[5] Nawy, S., Jahr, C. E. (1990) *Nature* 346 269-271.

[6] Nawy, S., Jahr, C. E. (1991) *Neuron* 7 677-683.

[7] Tachibana, M., Okada, T. (1991) *J.Neurosci.* 11 2199-2208.

[8] Lukasiewicz, P. D., Maple B. R., Werblin, F. S. (1994) *J.Neurosci* 14 1202-1212.

[9] Shiells, R. A., Falk G. (1994) *Visual Neurosci.* 11 1175-1183.

(21) イオン電流モデルによる杆体双極細胞と杆体水平細胞の光応答の解析

小椋俊彦，石原彰人，石井宏幸，臼井支朗（豊橋技科大・工・情報）
神山斉己（豊橋技科大・工・知識情報）

1．はじめに

杆体水平細胞 (RHC) と杆体双極細胞 (RBC) は，それぞれ Rod より入力を受けるが，その光応答特性は大きく異なる。強い光照射時の RHC の応答は，図 1 のように数秒間 plateau な特性が見られるのに対して，RBC では光照射直後に一過性の脱分極応答が生じ，その後 plateau な応答が見られる。こうした違いは，RHC, RBC のイオン電流特性の違い，あるいは他の細胞からの入力の存在が考えられる。本研究では，こうしたメカニズムについて，コイ網膜を用いた生理実験とイオン電流モデルを用いたシミュレーション解析を行った。

2．生理実験とシミュレーション解析

生理実験はコイの剝離網膜を用い RHC, RBC から細胞内記録を行った。こうして得られた生理実験データと，水平細胞および双極細胞のイオン電流モデルを用いることにより RHC と RBC の入力電流の測定を行った。その結果，RHC と RBC の光応答の違いは，入力電流のレベルで生じていることが示唆された。

また RHC が Rod のみから入力を受けると仮定すると，Rod からのグルタミン酸濃度変化を推定することができる。さらに，RBC が RHC と同じグルタミン酸入力を Rod から受けていると仮定することで，RBC の入力電流は RHC より求めたグルタミン酸の濃度変化を用いて推定することが可能である。ここで，RBC が Rod のみから入力を受けるとすると，RHC のグルタミン酸濃度変化より推定された入力電流と RBC の光応答から直接推定した入力電流のダイナミクスは一

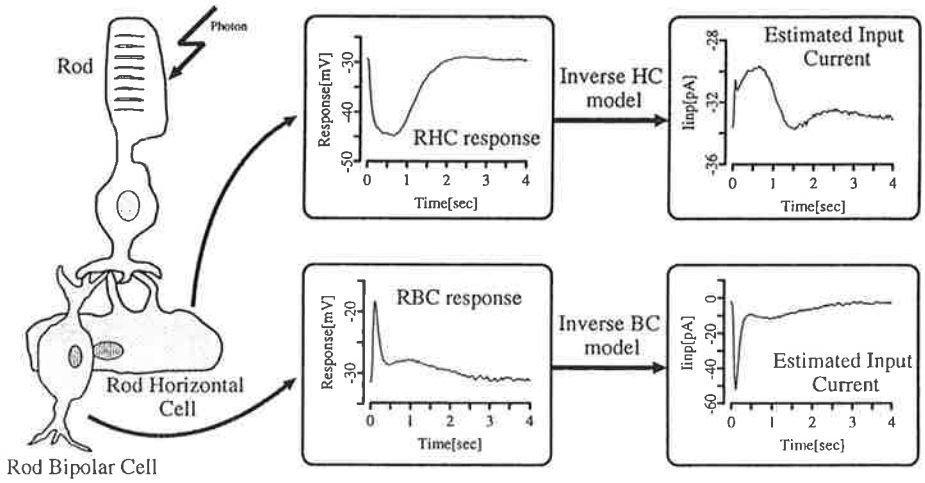


図１：杆体双極細胞と杆体水平細胞の光応答と推定された入力電流

致することが予想される。しかし，実際にこれらの入力電流を求めたところ，二つのダイナミクスは大きく異なった。そこで，RHC から求めた入力電流と RBC から推定した入力電流の差として Rod 以外からの入力電流成分を求めた結果，RHC の光応答に近い成分が確認された。この結果は，RBC が何らかの抑制入力を RHC よる受けている可能性を示唆するものと考えられる。

参考文献

[1] Kamiya Y., Ishii H., and Usui S. : "Reconstruction of retinal horizontal cell responses by the ionic current model". *Vision Res.,* Submitted, (1995).

[2] Kaneko A. and Tachibana M. : "A voltage-clamp analysis of membrane currents solitary bipolar cells dissociated from carsssius auratus". *J. Physiol,* 358, pp. 131-152, (1985).

[3] Qian H and Ripps H. : "Receptive field properites of rod-diriven horizontal cells in the skate retina". *J. Gen. Physiol,* Vol. 100, pp. 457-478, (1992).

[4] Saito T., Kondo H., and Toyoda J. : "Ionic mechanisms of two types of on-center bipolar cells in the carp retina". *J. Gen. Physiol,* Vol. 73, pp. 73-90, (1979).

(22) 虚血，再灌流ラット網膜における低親和性 NGF レセプターの変化

富田浩史，阿部俊明，石黒誠一，玉井信（東北大・医・眼科）

目的： NGF レセプターには，高親和性レセプター (trk A) と低親和性レセプター ($p75^{NGFR}$) があることが知られている。NGF が存在しない条件では，PC12 細胞において $p75^{NGFR}$ の発現は，アポトーシスを誘導することが報告されている。虚血網膜においてもアポトーシス様の細胞死が

報告されていることから，今回，我々はラット虚血網膜における $p75^{NGFR}$ の変化を調べた。

方法： SD ラット（約 300g）を麻酔下にて，左眼結膜輪部を切開し，眼球の直後をクリッピングすることにより，90分間の虚血を負荷した。対側眼はコントロールとし，同様の処置を行った。再灌流直後，3，6，72時間後に眼球を摘出し，全 RNA を抽出した。全 RNA から一本鎖 cDNA を合成し，半定量的 PCR により虚血網膜における $p75^{NGFR}$ mRNA の発現を調べた。コントロールとして G3PDH を用い，$p75^{NGFR}$ mRNA の発現を G3PDH mRNA の発現量で補正した。また，抗 $p75^{NGFR}$ 抗体を用いた免疫組織化学により，その分布を調べた。

結果： 虚血再灌流 6，72時間後において，$p75^{NGFR}$ の発現増加が認められた。免疫組織化学では，虚血再灌流 6，72時間後ミューラー細胞と思われる外境界膜部位および外網状層に強い免疫反応性が認められた。

結論： 虚血網膜におけるアポトーシス様の細胞死は，内顆粒層および神経節細胞において報告されており，これらの $p75^{NGFR}$ の発現部位と異なっているため，アポートシス誘導ではなく，むしろミューラー細胞による虚血障害保護に何らかの役割をもつものと考えられた。

(23) ラット網膜に出現する $GABA_A$ 受容体

小栗栖　太郎，新貝　鋤蔵（岩手大・工・情報工学）

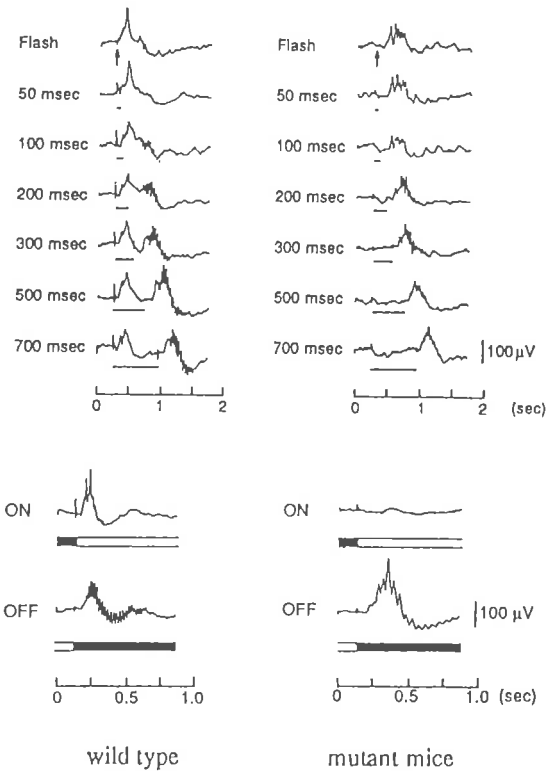
網膜の情報処理に於ける $GABA_A$ 受容体の役割を知る目的で，$GABA_A$ 受容体のクローニングをおこなった。ラット網膜から抽出した poly (A ＋) RNA を基に avian myeloblastosis virus 逆転写酵素を用いて cDNA を作成した。現在知られているリガンド結合陰イオンチャネル（$GABA_A$ 受容体およびグリシン受容体）cDNA 配列の中で相同性の高い部分を 2 個所選び出し（1 つは M1 膜貫通領域，もう 1 つは M3 領域），それらのセンス及びアンチセンス合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR 法により 2 つの部分に挟まれた部分を cDNA から増幅し，その産物をサブクローニングして塩基配列を決定した。98個のクローンを解析したところ，リガンド結合陰イオンチャネルの M2 領域に共通するアミノ酸配列が見いだされたものは 7 種類に分類された。これらの配列の内 5 種類はすでに報告されている $GABA_A$ 受容体 $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$ およびグリシン受容体 $\alpha 1$ サブユニットのものと同一であった。しかし残り 2 種類は $GABA_A$／グリシン受容体と38－55％の相同性しか示さないが，ヒト ρ サブユニットと82－84(clone72) または90－92％(clone29) の相同性を示した。従ってラット網膜にもヒト ρ サブユニットに似たリガンド結合陰イオンチャネルが存在するものと考えられる。ラット網膜の cDNA ライブラリーを作成し clone29 に対応する cDNA をスクリーニングして，全長 (1.8kb) を含む 1 つのクローンを得た。アミノ酸配列はヒト $\rho 1$, $\rho 2$ サブユニットとそれぞれ74，91％の相同性があった。細胞外領域に 3 個の N-glycosylation sites を持つのはヒト $\rho 2$ サブユニットと同じである。しかし M3 と M4 膜

貫通領域に挟まれた細胞内部分に2個所Cキナーゼによるリン酸化部位と考えられる部位があることがヒトρ2サブユニットとは異なっている。リン酸化部位は細胞内からの機能修飾に用いられている可能性がある。ノーザンブロットの結果および*in situ*ハイブリダイゼーションの予備的な結果についても報告する。

(24) 代謝型グルタミン酸受容体 mGluR6 ノックアウトマウスの視覚機能 —電気生理学的，行動学的解析—

三好智満，佐々木仁（大阪大・医・第二生理）
広井佳野（京都大・医・眼科）

mGluR6 (metabotropic glutamate receptor subtype 6) は，中西重忠らのグループによってクローニング・同定された APB に親和性の高い受容体である。mGluR6 は網膜桿体双極細胞のシナプス後膜部に限局して発現しており，外網状層における ON 経路の情報伝達に関与すると考えられている。



今回我々は，mGluR6 のノックアウトマウスの視覚機能を調べるため，網膜電図と定常光の ON/OFF 刺激によって誘発される上丘の集合電位を記録し，wild type のマウスでの記録と比較した。フラッシュによって誘発される網膜電図では，ノックアウトマウスで b 波が完全に消失していた。上丘の集合電位の場合には，定常光刺激の OFF 反応は，wild type の動物と同様であったが，ON 反応は全く検出されなかった（右図）。さらに mGluR6 ノックアウトマウスでの視覚機能を行動学的に解析するため，シャトルボックスを用いて，光を手がかりとした回避反応の学習を調べた。その結果，予想に反して，ノックアウトマウスでも wild type の動物と同様の学習曲線が得られた。この結果は OFF 経路だけでも単純な光弁別学習行動は形成されることを意味している。

いずれにせよ，今回の電気生理学的研究とこれまでに知られている mGluR6 の局在の研究から，この受容体が哺乳動物の外網膜における ON 情報の伝達に不可欠であることが明らかにされた。

なお，本研究は，京都大学医学部・中西重忠研究室及び，九州大学生体防御医学研究所・勝本元也研究室との共同研究である。

(25) A 及び B 型ネコ網膜水平細胞におけるグルタミン酸受容体 subunit の発現

森際克子（大阪大・医・第二生理）
ノガ・ヴァルディ（University of Pennsylvania, , Department of Neuroscience）

グルタミン酸は網膜における主な興奮性の神経伝達物質としてシナプス伝達に重要な役割を担っている。現在その受容体として ionotropic（イオンチャンネル： AMPA, カイニン酸, NMDA）型，及び G 蛋白と共役してセカンド・メッセンジャー系代謝回転を引き起こす metabotropic（代謝： mGluR）型の各サブユニットが分子生物学的手法で明らかにされている。各サブユニット構成による受容体特性（感度，脱感作，開閉のタイム・コースなど）が異なる事から，各細胞型に特有の受容体サブユニット構成を明らかにする事によって，光情報伝達におけるその細胞型の機能的役割の理解をより深める事ができる。

ネコ網膜では A, B 型の 2 種類の水平細胞が分化し，A 型は錐体終末膨大部 cone pedicle とシナプスし，B 型は cone pedicle 以外に，さらに軸索を伸ばして杆体小膨大部 rod spherule ともシナプスする。この 2 種類の水平細胞がどのような機能的役割を担い，それぞれ受容野周辺部の形成，並びに gain control に関与しているのかいまだ明らかにされていない。そこで本研究は光学顕微鏡的に免疫組織化学法を用いて，ネコ網膜 A, B 型水平細胞におけるグルタミン酸受容体サブユニットの発現様式の相違を検討した。

ネコ網膜の凍結及びヴィブラトーム切片を用いて，一次抗体 AMPA (GluR2/3, 2/4,4), カイニン酸 (GluR6/7), NMDA (NMDAR1) , mGluR (1 α) の抗グルタミン酸受容体サブユニットを HRP-DAB 反応抗体法で発色させた後，抗カルバインデイン一次抗体を蛍光抗体法で処理することによって，二重染色を行い，A, B 型水平細胞を同定した上でグルタミン酸受容体サブユニットの染色パターンを検討した。

その結果，A 型水平細胞及びその cone pedicle シナプス終末部では主に GluR4 と GluR6/7 が，B 型及びその rod spherule シナプス終末部では主に GluR2/3, 2/4, cone pedicle 部では GluR4 と 6/7 が染まった。

グルタミン酸受容体サブユニット・チャンネル特性，特にカイニン酸系 GluR6/7 及び GluR4 の特性に焦点をあて，それぞれの水平細胞の機能的役割との関連性を考察する。時間の余裕があ

れば他の網膜細胞におけるグルタミン酸受容体サブユニットの発現様式についても触れる予定である。

(26) 網膜2次ニューロンにおける代謝型グルタミン酸受容体と共役するGTP結合蛋白質の検討

吉川知志，大熊真人，津田基之（姫路工大・理・生命科学）

視細胞の光応答は化学シナプスを介して第2次ニューロンである水平細胞や双極細胞に伝達される。現在，視細胞の神経伝達物質としてはL-グルタミン酸が第1候補に挙げられている。網膜にL-グルタミン酸を投与すると水平細胞および双極細胞は応答するが，水平細胞およびオフ型双極細胞のそれは脱分極性であるのに対しオン型双極細胞は過分極性の応答を示すことから，両者の応答における分子機構は異なっていると考えられている[1)]。特に後者におけるグルタミン酸の作用は，APB感受性代謝型グルタミン酸受容体(mGluR6)およびcGMP作動性イオンチャネルを介することが示されており，GTP結合蛋白質，ホスホジエステラーゼを介する視細胞の光応答に類似の機構が存在する可能性がある[2)]。そこで我々は，ウシ網膜2次ニューロンに存在するGTP結合蛋白質を検索し，グルタミン酸受容体との共役の可能性について検討した。その結果，ウシ網膜膜標品中にAPB刺激によって活性化される百日咳毒素感受性のGTP結合蛋白質が存在することを明らかにした[3)]。

今回は，我々が見いだしたGTP結合蛋白質がどのサブタイプであるか，また実際にmGluR6蛋白質と共役しているかどうかについて検討を行った。まず，膜標品中の各GTP結合蛋白質を2次元電気泳動により分離し，サブタイプに特異的な抗血清により検出した。その結果，GoおよびGiの発現が確認された。次にGoとGiの網膜内での局在を，各抗血清を用いた免疫組織染色法により検討した。Goは外網状層および内網状層に局在していたのに対し，Giは外顆粒層に反応が見られた。視細胞と2次ニューロンのシナプスが外網状層に形成されていることおよびこの層にmGluR6の発現が限定されていること[4)]を考え合わせると，オン型双極細胞の光応答はGoを介している可能性が高い。mGluR6は発現系ではGiとの共役が報告されているがGoと共役するという報告はなく，Goによって制御されるエフェクターの同定等が今後の課題となる。

1）Kaneko, A. and Shimazaki, H. (1976) *Cold Spring Harb. Quant. Biol.* 40, 537-546
2）Nawy, S. and Jahr, C. E. (1990) *Nature* 346, 269-271
3）Kikkawa, S., *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 374-379
4）Nomura, A., *et al.* (1994) *Cell77,* 361-369

(27) ウサギ角膜上皮細胞の2種類の stretch-activated channel

渡辺修一，谷崎みゆき，金子章道（慶應大・医・生理）

角膜上皮の基底部細胞には stretch で活性化される K^+ チャネルの存在が報告されている (Rae *et al.*, 1990)。ウサギ角膜から trypsin によって単離した上皮細胞を用いて cell-attached および inside-out patch で実験を行った結果，この細胞の stretch-activated channel には少なくとも2種類あることが明らかになった。これらのチャネルは inside-out patch でも stretch によって活性化された。第1のものは前述の K^+ チャネルである。このチャネルは速い kinetics（平均開口時間約 0.1-0.4ms）を示し，単一チャネルコンダクタンスは約 180pS（電極内液および灌流液は 150mMKC1 を主に含むとき）であった。開口確率は電極に与える陰圧（約 -10 ～ 80mmHg）の強さに依存し，これは主に開口頻度の変化によるものであった。このチャネルには膜電位依存性があり，脱分極で開口確率の増加を示した。第2のチャネルは Na^+ と K^+ の両方に透過性をもつ単一チャネルコンダクタンス約 20pS のものであった。

両チャネル共，patch 毎に stretch 感受性は異なり，また時間と共に stretch 感受性が変化することが多く観察された。このことから両チャネル共に感受性を制御する機構が存在することが示唆される。

異なるイオン選択性を持つチャネルが，膜電位依存性をもち，また感受性の制御を受けていることは，浸透圧刺激などで膜に stretch が加わるときの膜電位変化が複雑に制御されていることを示唆している。したがってこれらのチャネルは角膜上皮細胞の機能上重要な働きをしていると考えられる。

[Reference]

Rae, J. L., Dewey, J., Rae, J. S., Nesler, M., & Cooper, K. (1990) Single potassium channels in corneal epithelium. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 31: 1799-1809.

(28) 網膜視細胞における一酸化窒素合成酵素

吉田晶子（東北大・医・眼科）
Ari Sitaramayya（オークランド大学）

目的：一酸化窒素は様々な組織において一酸化窒素合成酵素によって合成され，水溶性のグアニレートサイクレースを介してサイクリック GMP を増加させる。サイクリック GMP は網膜の visual transduction において重要な役割を果たしている。このため，網膜視細胞外節において一酸化窒素合成酵素活性の存在を生化学的に明らかにすることを試みた。

方法：新鮮な牛眼より得た網膜をホモゲナイズし，ナイロンメッシュを通した後に，Schnetkamp らの方法に従って ficoll gradient を用い，網膜視細胞外節を精製した。等張液で洗浄した視細胞外節は酵素活性を測定する直前まで−80度で保存した。活性測定前に外節を解凍し，膜性分画とサイトゾル分画に分けた。一酸化窒素合成酵素の活性は，0.3μM の L-[2,3-^{3}H] arginine と 1mM の NADPH の存在下で，生成した [^{3}H] citrulline 量を測定することによった。

結果：膜性分画，サイトゾル分画ともにカルシウム／カルモジュリンの存在下で一酸化窒素合成酵素活性があり，それぞれ 110 fmol/min/mg of protein, 350 fmol/min/mg of protein であった。両分画の酵素活性とも，この酵素の cofactor である FAD, FMN, tetrahydrobiopterin によって活性が刺激され，L-arginine のアナログである L-monomethyl arginine によって抑制された。L-arginine に対する *Km* 値は，両分画の酵素で等しく 5μM であった。しかし，膜性分画の酵素がカルシウム／カルモジュリンが存在しなくても，酵素活性を示すのに対し，サイトゾル分画の酵素はカルシウム／カルモジュリンがないと活性が認められなかった。

結論：視細胞外節においては，一酸化窒素合成酵素が，膜およびサイトゾル両分画に存在しその性質がそれぞれ異なっていることが生化学的に確かめられた。視細胞外節の生理に，一酸化窒素がどのような影響を与えているかについては，今後さらに研究が必要とされる。

(29) 色順応過程における輝度系と赤・緑反対色系の相互関係

山本洋紀，江島義道（京都大・大学院・人間環境）

［目的］色順応過程における明暗知覚と色知覚の相互関係を，心理学的実験により検討した。光情報は，明所視では，まず光受容器である 3 種類の錐体によって受容され，強度情報に変換された後（錐体過程），重みつきの和（輝度信号）および差（反対色信号）の信号に変換される（反対色過程）。錐体信号から輝度信号と反対色信号が形成される視覚経路の特性はこの重みの大きさで表わされる。従来の色順応の解釈では，色の見えの変化は錐体過程の感度変化に起因し，反対色過程での錐体信号の重みは不変はとされていた（重み不変仮説）。しかし，重みが変化する可能性があるとする報告がされ，新たな順応解釈として注目されている。本研究では反対色過程の重み変化の色順応条件依存性を詳細に検討することで，色順応過程における輝度系と赤・緑反対色系の相互関係を明らかにした。

［方法］反対色過程の重み変化を決定するために，色順応による錐体過程の応答変化と反対色過程の応答変化を 3 つの実験手法，2 色増分閾法（L, M 錐体の感度変化の測定），色相打ち消し法（赤・緑反対色系への L, M 錐体信号の寄与の比の測定），交照法（輝度系への L, M 錐体信号の寄与の比）を用いて測定し，これらの結果を相互に比較した。

［結果］赤色順応事態において，色順応に伴う輝度系，赤・緑反対色系の応答変化は錐体過程の

応答変化から予測されるものと異なる特性を示し，重み不変仮説は棄却された。さらに，輝度系と赤・緑反対色系の錐体信号への相対的な重み（M 信号への重み／L 錐体信号への重み）は反対の方向に共変した（図1）。

［結論］この結果は，色順応過程における輝度系と赤・緑反対色系の相互作用を強く示唆するものであり，両系の独立性という従来の色覚モデルの基本概念に再考を促すものである。

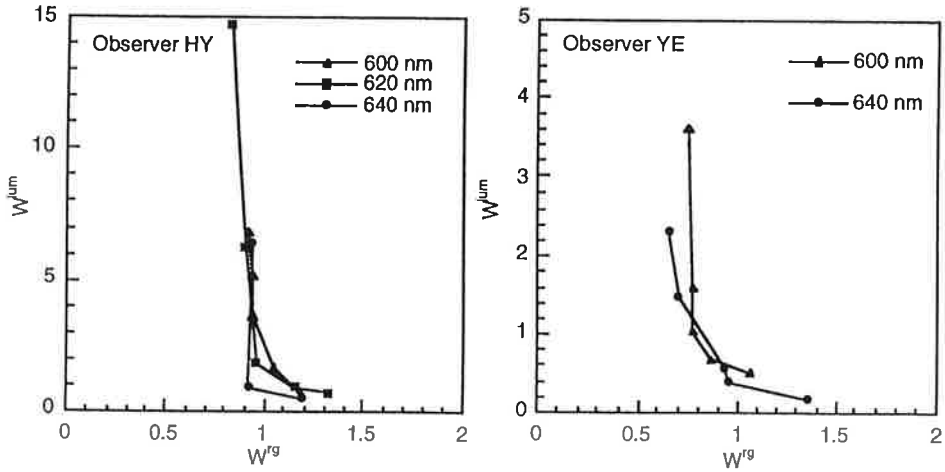


図1．色順応過程における輝度系と赤・緑反対色系の相互関係

横軸は赤・緑反対色系の，縦軸は輝度系の錐体信号への相対的重み（M 錐体信号への重み／L 錐体信号への重み）を示す。両軸とも暗順応事態での重みを1.0としている。シンボルの違いは順応光の波長の違いを示す。パネルの違いは被験者の違いである。

14. 運動及び行動発現のストラテジー
：感覚認知，自律神経／情動及び運動各系の相互連関

1996年１月11日～12日
代表者：西野仁雄（名古屋市大・医）
世話人：森　茂美

(1) 小脳長期抑圧機構と長期抑圧欠損ミュータントマウス
平野丈夫（京都大・医）

(2) サル頭頂間溝腹側部における体性感覚と視覚の統合
入来篤史（東邦大・医）

(3) 頭頂連合野における視覚認知と運動制御の機構
泰羅雅登（日本大・医）

(4) 霊長類側頭葉における物体像のコーディング
藤田一郎（大阪大・医）

(5) 小脳による追跡眼球運動 (Smooth Pursuit) の学習制御
永雄総一（自治医大）

(6) 滑動性眼球運動と前庭動眼反射の干渉により誘発された前庭動眼反射の適応性変化
福島菊郎（北海道大・医）

(7) 不飽和脂肪酸のアミノ酸受容体応答に対する修飾作用の検討
鍋倉淳一（九州大・医）

(8) ネコ赤核脊髄路の前肢遠位筋運動ニューロンへの単シナプス性接続
藤戸　裕（札幌医大）

(9) 線条体細胞の脆弱性
西野仁雄（名古屋市大・医）

(10) 網様体脊髄路の微細構造と作動様式
松山清治（生理研）

(11) 脳幹の睡眠関連ニューロンへのコリン性，モノアミン性入力
小山純正（福島医大）

(12) 交感神経活動にみられる周期的活動
照井直人（筑波大・医）

(13) 行動を指標にした視覚機能評価―視覚路障害と移植による回復―
福田　淳（大阪大・医）

(14) 3-NPA によるラット培養アストログリア細胞（大脳皮質，線条体）$[Ca^{2+}]_i$ 上昇のメカニズム
福田敦夫（名古屋市大・医）

⑮ 情動発現と発声運動

坂本尚志（旭川医大）

⑯ ラット扁桃体―視床背内側核における情動・記憶の神経機構

西条寿夫（富山医薬大・医）

⑰ ストレス時の行動選択と情動：視床下部カルシウム代謝調節機構の行動学的意義

粟生修司（九州大・医）

⑱ 海馬神経可塑性に対する情動的ストレスの影響

丸　栄一（日本医大）

［討論参加者］

平野丈夫，入来篤史，泰羅雅登，藤田一郎，永雄総一，福島菊郎，鍋倉淳一，藤戸　裕，西野仁雄，松山清治，小山純正，照井直人，福田　淳，福田敦夫，坂本尚志，西条寿夫，粟生修司，丸栄一，藤本一朗，岡部明仁，森　茂美

［研究会概要］

個体が外界に対して一つの運動あるいは行動を表出するためには，感覚情報の認知，自律神経機能の変化と情動の発動，各運動システムの駆動の相互連関が必要となる。生命現象を機能的立場から解析する生理学では，この相互連関のメカニズムを理解し，明らかにする必要があるが，これは仲々困難な作業である。本研究会では，上記の各分野で，現在活発に研究を展開している若手研究者（主に助教授，講師）が集い，それぞれの分野における課題と今後の研究のアプローチについて自由な討議を行った。分野の異なる人々の集まりであったため，新鮮で，熱心な討論が行われ，非常に有意義な研究会となった。

(1) 小脳長期抑圧機構と長期抑圧欠損ミュータントマウス

平野丈夫（京都大・大学院・医学研究科）

小脳シナプスの長期抑圧は運動学習の細胞レベルでの一基礎過程と考えられている。これまでの培養系・切片標本での細胞・分子レベルの研究により，長期抑圧に関与する分子が明らかになってきた。なかでもイオノトロピックグルタミン酸受容体デルタ２サブユニットはプルキンエ細胞のみで特異的に発現しており，長期抑圧発現に必要であることが示された。ジーンターゲティング法により作製したデルタ２欠損ミュータントマウスは長期抑圧を示さず，明らかな運動障害を示した。また片側内耳破壊による前庭代償機能にも欠陥があることがわかり，運動学習能力も障害されていることが明らかとなった。デルタ２欠損ミュータントマウスは，小脳シナプスの可

塑性と運動学習の関係や小脳の運動制御機構の解析に有用な手段を提供すると考えられる。

(2) サル頭頂間溝前壁／腹側部における体性感覚と視覚の統合

入来篤史（東邦大・医・第一生理）

ニホンザル一次体性感覚野の後方に隣接する頭頂間溝前壁／腹側部には，体性感覚刺激と視覚刺激の両方に応じるニューロンが存在した。これらのニューロンは手および上肢の皮膚あるいは深部に受容野を持ち，そこに向かって，あるいはその近傍の空間内を動く刺激をサルが見たときに応答した。すなわち，これらのニューロンは，体性感覚と視覚を統合して，特定の身体部位とその近接空間の関係をコードしているものと考えられる。長さ 30cm の熊手状の道具を用いて，手の届かない遠方の餌を引き寄せて取るようにサルを訓練したところ，手首／前腕部の皮膚や深部に体性感覚受容野を持つニューロンは，素手のときにはその受容野に向かう視覚刺激に応じていたが，道具の使用を繰り返している最中には，道具に向かう視覚刺激にも応答するようになることが見いだされた。

(3) 頭頂連合野における視覚認知と運動制御の機構

泰羅雅登（日本大・医・第一生理）

ヒトやサルで頭頂連合野と呼ばれる領域が傷害されると，操作運動に障害が現れることがよく知られている。サルの頭頂間溝後壁の前方部（AIP 野）では操作運動に関連したニューロン群が見つかっている。これらのニューロンは対象物の傾きや形状によって選択的に活動し，運動性信号の入力と視覚性信号の入力を受けており，操作運動の視覚性制御において，運動，視覚情報の統合に関係している可能性が示唆されている。一方，AIP 野と神経線維連絡のある LIP 野の後部には純粋な視覚刺激にだけ反応するニューロン群がある。3D コンピュータグラフィックスを使い，立体視覚刺激で調べると，この中に物体の長軸方向や面の傾き，さらには物体の三次元的な形に選択的と思われるニューロンが見つかった。おそらくこの領域は対象物の三次元的構造の認識に関連した領域であり，この視覚情報は操作運動関連ニューロンに出力され操作運動の視覚的制御に利用されると考えられる。

(4) 霊長類側頭葉における物体像のコーディング

藤田一郎（大阪大・医・認知脳科学）

霊長類の脳において，「見ているものが何であるか」を知るために必要な視覚経路の最終ステップである下側頭葉皮質 TE 野では，似た物体特徴に応答する細胞が皮質表面から底に向かって並び，平均幅 0.4-0.5mm の機能的コラム構造を形成している。一つの TE 野には，1300-2000個のコラムが存在するが，似た図形特徴に反応するコラムが複数存在し，異なった図形群に反応するコラムの種類は，この数より一桁少ないと見積もられる。この図形特徴コラムにおける情報処理ひいては物体像の脳内処理に関する理解を進める上で重要な戦略的課題が何であるかを議論し，覚醒サルにおけるコラム構造，刺激ではなく知覚を反映する TE 活動，TE 野内在性水平軸索の機能的意義，長期増強や長期抑圧の霊長類脳における誘発および TE 野における記憶の書き込みとの因果関係，TE 野とそれをとりまく側頭葉の他領野との機能連関を候補として提案した。

(5) 小脳による追跡眼球運動 (Smooth Pursuit) の学習制御

永雄総一（自治医大・第一生理）

動く視標を眼で追跡する Smooth Pursuit は，霊長類によく発達している随意眼球運動であるが，その発現に小脳腹側傍片葉が特異的に関与していることが，筆者らの微小電極法による生理実験や軸索流を用いた解剖学的研究から示唆されている。Smooth Pursuit の発現に傍片葉がどのような役割を演じているかを実験的に検討するために，日本猿慢性標本を用いて，傍片葉が関与する運動学習パラダイムを開発した。ステップーランプ状に 400ms 動く視標を Pursuit させる際，運動の開始直後の 80-200ms 間視標の速度に外乱を与えると，Pursuit の開始直後の眼球速度に，50-200トライアル（5 -15分）で顕著な適応が生じた。この Smooth Pursuit の適応は，前庭動眼反射の特性には影響しないことから，前庭動眼反射の適応に関与する小脳片葉よりも傍片葉の方がより強く関与していると結論した。

(6) 滑動性眼球運動と前庭動眼反射の干渉により誘発された前庭動眼反射の適応性変化

福島菊郎（北海道大・医・生理学第二）

視覚入力を適切に取り込むために脳は種々の眼球運動サブシステムを使い分け，実験室条件ではこれらは個別に研究されてきた。しかし実際の運動を理解するためには個々のサブシステムの解析に加えて，これらがどのように干渉し合うかの理解が必要になる。またサブシステムが不適切な指令を出す場合，脳は視覚入力取り込みのための適応性変化をサブシステムに起こさせる。更に正常では眼球運動を直接発現させる脳幹小脳機構は水平系と垂直系が解剖学的にも機能的にも分かれているため，水平或いは垂直前庭動眼反射時には頭部回転平面と直交平面の応答は生じない。

以上の問題点を踏まえ，本研究は霊長類で高度に発達した滑動性眼球運動と前庭動眼反射系との干渉とその適応機構を調べるため，前庭刺激と視標刺激とを直交する座標軸で加えて視標追跡訓練をサルで行い，その前後で，前庭刺激単独で誘発される応答を解析した。その結果，頭部回転平面と直交平面の応答は訓練前は生じないが，約30分の訓練後から生じ始め，それは訓練刺激の周波数及び振幅に依存する適応性応答であった。

(7) 不飽和脂肪酸のアミノ酸受容体応答に対する修飾作用の検討

鍋倉淳一（九州大・医・第二生理）

不飽和脂肪酸は，細胞膜構成成分であり，膜流動性や膜内蛋白質の機能に重要な役割を果たしている。これらはPLA2によって細胞膜から容易に遊離される。ドコサヘキサエン酸(DHA)およびアラキドン酸(AA)摂取不足ラットは記憶低下が認められ，これら脂肪酸と記憶学習能との関連性が示唆される。

急性単離した海馬神経細胞にパッチクランプ法を適用し，不飽和脂肪酸のGABA応答修飾作用を検討した。不飽和脂肪酸であるDHA, AAおよびリノレン酸が，$GABA_A$受容体応答をC1チャネルブロッカーとして可逆的に抑制した。さらに，グルタミン酸投与に引き続くDHA投与は，$GABA_A$受容体応答の抑制を長期に持続させることを見いだした。一方，NMDA応答はDHAによって増強された。

グルタミン酸やGABA作動性入力が多数存在する部位において，不飽和脂肪酸は，局所的に神経回路内伝達様式の可塑性に関与している可能性が示唆される。

(8) ネコ赤核脊髄路の前肢遠位筋運動ニューロンへの単シナプス性接続

藤戸　裕（札幌医大・医・第二生理）

ネコをネンブタールで麻酔しガラミンで不動化した。対側赤核の単発刺激により頚髄 Mn に誘発された EPSP の髄節内潜時と 2 発刺激による EPSP の促通を比較した。赤核単発刺激により誘発された EPSP は C8-T1 に分布する前肢遠位筋支配 Mn では50％（23／46）で髄節潜時が 1ms 未満であった。それに対し C6-7 の前肢 Mn では赤核性 EPSP は 3／42でのみ髄節潜時が 1ms 未満であった。赤核と前肢遠位筋 Mn 間の接続の，相当部分は単シナプス性であることを示唆する。髄節内潜時 1ms 未満の赤核性 EPSP の促通 (V2-V1)/V1 は0.5以下 (n ＝ 14) であり，単シナプス接続を裏付けている。前肢末梢神経の交叉縫合後の大脳赤核シナプス発芽現象と赤核—前肢遠位 Mn 単シナプス接続と関連が議論された。

(9) 線条体細胞の脆弱性

西野仁雄（名古屋市大・医・第二生理）

ハンチントン病，dentatorubral pallidoluysian atrophy あるいは spinocerebellar ataxia の患者は，CAG repeat の異常に長い遺伝子をもつことが報告され，これらの疾患のベースに polyglutamine の産生が関与する可能性が指摘されている。しかし各疾患の phenotype が，何故それぞれ特有のパターンをとるのかはまだ不明である。コハク酸脱水素酵素を非可逆性に阻害する 3-nitropropionic acid (3-NPA) をラットに投与すると，線条体が特異的に傷害され，ハンチントン病様の運動過多が生じる。この線条体特異傷害のメカニズムを解析し，i) 外側線条体動脈領域のアストログリア end-feet の傷害と内皮細胞の傷害，ii) これに基づく血液・脳関門の破綻，があることを明らかにした。

(10) 網様体脊髄路の微細構造と作動様式

松山清治，森　茂美（生理研）

脳幹網様体から脊髄へ下行性軸索を出す網様体脊髄路細胞は，運動に際して様々な活動様式を示す。本研究ではネコの網様体脊髄路細胞の脊髄内微細構築と作動様式の関連について解明を試みた。はじめに PHA-L 法を用いて網様体脊髄路軸索の単一軸索レベルにおける脊髄内支配様式

を頚膨大・腰膨大部において解析した。この結果，軸索の多くは多髄節にわたり複数の軸索側枝を分枝し，脊髄介在細胞層を中心に終末線維を投射していた。軸索は脊髄灰白質に対する支配様式により，一側性または両側性支配をする2つのタイプに分類された。次に除脳ネコを用いて単一網様体脊髄路細胞の自発発射活動を腰膨大部で軸索内記録し，さらに軸索内に neurobiotin を電気泳動的に注入した。この結果，同時記録した下肢筋支配神経の ENG 活動相に一致した発射活動を示す軸索の中に，下肢筋支配運動細胞層の分布する髄節でより多くの軸索側枝を分枝するものが認められた。

(11) 脳幹の睡眠関連ニューロンへのコリン性，モノアミン性入力

小山純正（福島医大・第二生理）

中脳から橋にいたる橋被蓋部位は，レム睡眠の調節に関与すると考えられており，レム睡眠中に特異的に活動の上昇する PS-on ニューロンや，レム睡眠と覚醒時に活動の上昇する Type I-S ニューロン，レム睡眠時に現れる PGO wave に先行してバースト発火する PGO-on ニューロンなどが存在する。今実験では，無麻酔で頭部のみを無痛固定したネコを用い，睡眠・覚醒サイクルに関連するニューロンを記録し，それらのニューロンに電気泳動的に種々の神経伝達物質を投与し，その結果を調べた。カルバコールは，TypeI-S ニューロンと PGO-on ニューロンの持続性発火を抑制したが，PGO-on ニューロンのバースト発火には効果がなかった。ヒスタミン，ノルアドレナリン，アドレナリンは，Type I-S, PGO-on ニューロンの持続性発火を増強し，PGO-on ニューロンのバースト発火を抑制した。PS-on ニューロンには，カルバコールによって興奮するものと，抑制されるものがあった。

(12) 交感神経活動にみられる周期的活動

照井直人（筑波大・基礎医学系・生理）

心臓—血管を支配する末梢交感神経の自発活動は，幾つかの規則的な周期を持った成分に分けることができる。心周期，呼吸周期に一致した周期的活動と約 10Hz の活動にその発生源についてまとめた。

心周期，呼吸運動に一致した周期的活動は，吻側の延髄腹外側 (RVLM) の網様体に，脊髄に軸索を投射し交感神経節前線維を興奮性に支配する自発的に活動しているニューロン（RVLM ニューロン）と，この RVLM ニューロンの活動を抑制する尾側の延髄腹外側野 (CVLM) に存在

するCVLMニューロンの周期的活動で説明できることを示した。

交感神経活動を記録すると，約10Hzで出現する群放電が観察される。この約10Hzの活動の発生起源が，脳幹の幾つかのニューロングループで構成されるネットワークにあるとする説（Gebber説）と，脊髄の交感神経節前線維の性質にある（照井説）という2つの説を紹介した。

⑬ 行動を指標にした視覚機能評価—視覚路障害と移植による回復—

福田　淳・佐々木仁（大阪大・医・第二生理）

成熟哺乳動物の視神経を切断しても末梢神経を架橋移植することにより網膜－上丘路を再構築できる。この末梢神経架橋移植ハムスターで，我々はすでに視覚刺激に反応する上丘ニューロンの活動を報告してきた。今回，この再構築された網膜－上丘伝導路の視覚機能を行動学的に評価することを試みた。その結果，(1)光を手がかりとした回避条件行動では，9例の移植ハムスターのうち5例で学習が成立した。(2)視覚刺激による皮質脳波の脱同期性覚醒反応は，6例の移植ラットのうち5例で確認できた。(3)視覚刺激による体動を指標とした覚醒行動の観察では，6例の移植ラットのうち3例でそれが認められた。これらの視覚刺激による行動反応は，いずれも正常動物では全例で確認され，両側視神経切断動物では全く認められなかった。従って，1），2），3）で用いた行動学的指標はいずれも視覚障害及び移植による視覚機能回復を評価するのに有用であるといえる。

⑭ 3-NPAによるラット培養アストログリア細胞（大脳皮質，線条体）$[Ca^{2+}]_i$上昇のメカニズム

福田敦夫（名古屋市大・医・第二生理）

ミトコンドリア毒素3-NPAのグリア毒性のメカニズムを知るため培養グリアにfura-2を負荷し$[Ca^{2+}]_i$をモニターした。3-NPA投与開始後約20-40分の潜時で$[Ca^{2+}]_i$上昇が起こり天井値に到達後持続した。この$[Ca^{2+}]_i$上昇は細胞外Ca^{2+}除去により完全かつ可逆性に阻害されたが，glutamate receptor遮断薬は無効であった。$[Ca^{2+}]_i$上昇の潜時は大脳皮質グリアにおいて線条体グリアよりも短く，両部位の感受性に差が認められた。また，クレアチン前処置によりこの潜時は延長し，$[Ca^{2+}]_i$上昇にATP減少の関与が示唆された。細胞外Na除去前処置や，Ni^{2+}，amiloride により$[Ca^{2+}]_i$上昇が抑制された事からNa-Ca exchangerによる細胞外Ca^{2+}流入が示唆された。

⑮ 情動発現と発声運動

坂本尚志（旭川医大・生理学第二）

ヒトの発声運動は，大脳皮質言語中枢および運動野を介した運動司令により発現する。一方，動物において，発声は情動発現の一部としてとらえられ，大脳辺縁系から入力を受ける中脳中心灰白質が最も下位に存在する発声中枢として知られている。中心灰白質からの下行性線維は内喉頭筋運動細胞および喉頭呼吸ニューロン群の存在する延髄にその線維を投射している。そこで，除脳ネコ中心灰白質刺激による発声運動中の，延髄呼吸中枢の後顔面神経核，後擬核，弧束核の単一呼吸ニューロンの活動を記録した。その結果，中心灰白質からの運動司令は，まず延髄の後顔面神経核に働きかけ，この部位を介する脱抑制により，弧束核に存在する吸息ニューロンの活動を増大させることが明らかとなった。情動運動発現の際，上位中枢からの運動司令と，脳幹に存在する呼吸運動制御のための運動のサブシステムの関係を単一呼吸ニューロンレベルで明らかにしたことを報告した。

⑯ ラット扁桃体―視床背内側核における情動・記憶の神経機構

西条寿夫（富山医薬大・医・第二生理）

ラット扁桃体および視床背内側核より単一ニューロン活動を記録し，感覚条件刺激―報酬（蔗糖溶液，脳内自己刺激）連合学習課題に対するニューロンの応答を解析した。その結果，ラット扁桃体には各感覚種に応答するニューロンが局在し，とくに基底外側核には，複数の感覚刺激に応答する多種感覚応答ニューロンが存在することが判明した。一方，扁桃体基底外側核から投射を受ける視床背内側核内側部にも，多種感覚応答ニューロンが存在し，消去および再連合学習で学習に伴い応答が可塑的に変化することが明らかになった。以上から，扁桃体－視床背内側核は感覚刺激－報酬連合学習において重要な役割を果たしていることが示唆される。

⑰ ストレス時の行動選択と情動：視床下部カルシウム代謝調節機構の行動学的意義

粟生修司（九州大・医・第１生理）

視床下部外側野及び腹内側核には迷走神経胃枝を介する血液カルシウム低下機構が存在し，拘束ストレス時の低カルシウム血症の発生には後者が主たる役割を果たしている。また室傍核には

迷走神経甲状腺／副甲状腺枝を介する血液カルシウム低下機構が存在する。ストレス性低カルシウム血症と胃潰瘍の重症度は，強制水泳試験における immobility 時間（うつ反応の指標）と正の相関を示し，struggling 行動（攻撃性の指標）と負の相関を示す。視床下部腹内側核破壊ラットでは，struggling 時間が延長し，ストレス性低カルシウム血症及び胃粘膜病変がともに軽症化する。一方，室傍核破壊ラットでは，immobility 時間が延長し，低カルシウム血症及び胃粘膜病変が重症化する。視床下部に存在するカルシウム代謝調節機構はストレス時の行動及び身体反応と密接な関連があり，ストレス時のカルシウム代謝応答，胃病変および抑うつ反応に対して，視床下部腹内側核は促進／増悪的に，室傍核は抑制的に関与している。

(18) 海馬神経可塑性に対する情動的ストレスの影響

丸　栄一（日本医大・第２生理）

海馬におけるシナプス伝達の可塑性，特に long-term potentiation (LTP) は学習や記憶など行動の変容に重要な役割を果たしているものと推測されている。われわれは，無麻酔で自由に行動しているラットの貫通路にテタヌス刺激を与え，海馬歯状回における LTP 誘発の程度を検討した結果，麻酔下に比べて無麻酔・覚醒状態では LTP の誘発は極めて困難であることを見出した。現在，LTP の誘発は，NMDA 受容体の賦活と細胞内への Ca^{2+} 流入から始まる細胞内情報伝達系の賦活により引き起こされることが知られている。われわれは，無麻酔・覚醒状態でテタヌス刺激を与えた場合，麻酔下と同程度に NMDA 受容体の賦活と細胞内への Ca^{2+} 流入が起こっていることを明らかにした。したがって，無麻酔・覚醒状態では，NMDA 受容体の賦活以降の細胞内情報伝達系で何らかの LTP 誘発抑制作用が働いているものと考えられる。その抑制機構の候補として情動的ストレスの可能性を検討した。

15. 運動性神経回路の機能特性：大脳皮質から脊髄の機能と形態

1995年9月7日～8日
代表者：山本哲朗
世話人：松山清治，山本哲朗

1）脳幹・脊髄の運動制御の神経機構

a）歩行運動および姿勢制御

(1) ネコ前肢の歩行リズムを形成する脊髄神経機構

山口峻司（筑波大・基礎医学系）

(2)脊髄運動性回路への脳幹下行性制御―網様体脊髄路投射について―

松山清治，森　茂美（生理研）

b）頭部・眼球運動の制御

(3) ラット小脳核から脊髄への投射

池田美智子，杉本哲夫（関西医大）

(4) 視覚識別・指向運動の中枢機序

佐々木成人（東京都神経研）

(5) 基底核―視床―皮質投射の随意運動への関与

陣内皓之祐（滋賀医大）

2）小脳―視床，大脳基底核―視床投射と運動制御

(6) 大脳皮質および大脳基底核から下位脳幹への投射

安井幸彦（島根医大）

(7) 大脳基底核―視床投射系 loops ―視床運動系中継核の関与―

中野勝磨（三重大・医）

(8) 視床運動核群のシナプス機構

中村泰尚，佐藤二美（東京医歯大・医）

(9) 視床―皮質投射の情報処理機構

山本哲朗，浅原俊弘，林　民（三重大・医）

3）大脳皮質の情報処理と機能構築

(10) ネコ運動野ニューロンの半球間相互作用

松波謙一，川島　卓，小西朝隆（岐阜大・医）

(11) 運動野の局所神経回路

金子武嗣（京都大・医）

(12) 大脳皮質前頭運動野ニューロンの機能

三上章允（京都大・霊長研）

［参加者］

山口峻司（筑波大・基礎医学系），松山清治，森　茂美，宮下英三，中隣克己，浅野目充，小倉光博，浅井明代（生理研），杉本哲夫（関西医大），佐々木成人，南部　篤，内藤公郷，岡　美恵子（東京都神経研），陣内皓之祐（滋賀医大），安井幸彦（島根医大），中野勝磨，山本哲朗，朝原俊弘，林　民，伊藤邦三（三重大・医），中村泰尚（東京医歯大・医），松波謙一（岐阜大・医），金子武嗣（京都大・医），三上章允（京都大・霊長研）

［研究会概要］

本研究会では，高次中枢である大脳皮質から，大脳基底核・小脳さらに，脳幹・脊髄などの運動制御に関係する神経系の回路特性を，脳幹・脊髄での反射・出力機構，大脳基底核および視床での運動制御機構と形態学的背景，大脳皮質の情報処理機構と構造の３つのテーマに分け，シナプスレベルを中心とした電気生理学的所見や，その微小形態の光顕・電顕レベルでの解析を中心に発表・討議した。２日間の討論の中で，最高中枢たる大脳皮質，そこへの情報入力源としての，大脳基底核，小脳―視床投射系，さらにこれらの統合された出力結果を受け，下位の運動出現を分担する脳幹，脊髄までの神経系全体を，運動制御装置としてとらえながら，最近の解析結果を討議し，単にそれぞれの領域の研究結果の発表に終わらず，お互いの考え方に対する活発な討議が行われたと考える。以下に各発表演題の抄録を示す。

(1)　ネコ前肢の歩行リズムを形成する脊髄神経機構

山口峻司（筑波大・基礎医学系）

下位胸髄を切断した除脳ネコを筋弛緩剤で非動化し，中脳歩行野あるいは上部頸髄側索を電気刺激して前肢の Fictive Locomotion を誘発させ，歩行の中枢パタン発生器 (CPG) を解析した。歩行司令入力に対する CPG の出力応答を速い時間軸で調べると，歩行司令と運動ニューロンの間に，ニューロン１ヶを介する興奮性経路が CPG と並行して存在することが見いだされた。更に，この Feedforward 回路の介在ニューロンは，並行して存在する CPG からリズミックな入力を受けた。このような並行する多シナプス経路から入力を受ける Feedforward 回路は，脊髄反射系でも脊髄下行路経でも見られた。並行する多シナプス経路から入力を受ける Feedforward 回路は，CPG を含む脊髄運動中枢の重要な構成要素と考えられる。

(2) 脊髄運動性回路への脳幹下行性制御—網様体脊髄路投射について—

松山清治，森　茂美（生理研）

本研究では橋・延髄網様体の巨大細胞性(FTG)および大細胞性被蓋野(FTM)の網様体脊髄路の基本的構築原理の解明を試みた。このためPHA-L法を用いてネコのFTG・FTM由来の網様体脊髄路線維について走行・分枝・終末様式を頸髄部・腰膨大部について解析した。FTG網様体脊髄路は頸髄部で前索・前側索を下行する直径1～8μmの軸索群で構成されていた。3μm以上の太い軸索は尾側まで下行し，一部は腰膨大部にまで到達した。太い軸索は一髄節あたり1～4本の軸索側枝を多髄節にわたり分枝し，VII-VIII層を中心に投射していた。FTM網様体脊髄路は脊髄全長にわたり前索・前側索・後側索を下行する直径1～4μmの細い軸索群で構成されていた。これらの軸索は一髄節あたり平均1本程度の軸索側枝を分枝するのみであった。また終末線維はV-VIII層を中心に投射し，一部はIX層にも投射した。FTGおよびFTMは脊髄支配様式に関して異なる構築原理を示すことが明かとなった。

(3) ラット小脳核から脊髄への投射

池田美智子，杉本哲夫（関西医大）

私どもは，アミノ酸伝達物質アスパルテート(Asp)，オピオイドペプチド(Enkephalin)などの免疫組織化学に基づき，ラット小脳核神経細胞が特定の形態・大きさに分類される点に注目し，脊髄投射細胞の同定を試みた。

結果

1．脊髄投射細胞（室頂核に多数分布，中位核・歯状核に少数分布）の大多数がEnkephalin陽性を呈した。

2．室頂核や中位核のAsp陽性細胞の一部が脊髄に投射することが判明した。更に，室頂核の中型Enkephalin陽性細胞のうちAspを共存するものがかなりの数を占めることもわかった。

3．順行性標識の結果，室頂核線維終末は反対側上位頸髄の前核運動神経細胞領域，中間帯，中心頸核に分布し，電顕像から，ほとんどの終末ブトンがGray　I型のシナプスを樹上突起に形成していることが判明した。

(4) 視覚識別・指向運動の中枢機序

佐々木成人（東京都神経研）

視覚識別・指向運動は視野内に現れた複数の識別物体に頭と眼球を向け（指向運動），それぞれが何であるかを判断し，そのうち一つを選び，それに再指向する運動である。我々はこれまでに，頸の指向運動の脳幹の中枢は上丘であること，頸の指向運動は基本的には水平と垂直方向の運動に分けて制御され，水平運動は上丘－橋延髄網様体－頸筋，垂直運動は上丘－ Forel 野－頸筋の経路により制御されることを明らかにした。更に無拘束ネコで指向運動中の細胞活動を調べ橋・延髄網様体細胞は活動様式から，頭の位置と回転速度に関係して発火するタイプ，頸の回転速度に関係してバースト発火するタイプなどの多数のタイプに分類されることを明らかにした。視野内に現れた２つの物体を識別するように訓練したネコの両側の視覚領17-19野を破壊しても識別は可能でるが，上シルビウス溝外側堤 (PLLS) を破壊すると障害されることから，識別には上丘－視蓋前野－ PLLS を介する経路が重要であることを明らかにした。

(5) 基底核―視床―皮質投射の随意運動への関与

陣内皓之祐（滋賀医大）

４野から線条体への出力は淡蒼球内節の尾側部に，６野（APA を除く）からの出力は，同吻側部に到るが，両部はそれぞれ，視床 VLo, VApc 核を介して，４野と６野に投射する。前頭前野主溝腹側部からの出力は，黒質網様部の中央－外側部に達するが，同部は視床 MDpl と VAmc 核を通じて主溝腹側部に投射する可能性が高い。従って，ある皮質領野から線条体への出力は，基底核－視床－皮質投射を通じて，主にもとの領野に興奮性入力を与えると思われる。基底核－視床－皮質投射は１層に投射する場合が多く，皮質出力ニューロンの多くはその尖樹状突起末端でこの入力を受ける。基底核からの出力を，弱く保てば，他の皮質や線条体への出力ニューロン（浅層に細胞体を持つ）を選択的に発射させる事もでき，強くすれば，上記のどの領野からも，脳幹に（橋核－小脳系などにも）出力を出させる可能性がある。

(6) 大脳皮質および大脳基底核から下位脳幹への投射

安井幸彦（島根医大）

大脳皮質口腔顔面運動野は口腔顔面運動核の premotor neuron pool である三叉神経運動核周囲の網様体や延髄の小細胞性網様体に直接投射するのに加えて，大脳基底核出力系の要所にも投射線維を送っていた。また，大脳基底核はその出力部位の一つである黒質網様部から直接または上丘や赤核を介して間接的に口腔顔面運動核の premotor neuron pool へ投射していた。これらの投射系における黒質網様部からの投射線維の終末は GABA 陽性であることを免疫電顕により明らかにした。さらに，蛍光二重標識法により，口腔顔面運動核の premotor neuron pool への投射線維を送る黒質ニューロンの一部は少なくとも軸索側枝でもって上丘に投射していることが明らかとなった。以上のように，口腔顔面運動の発現や調節には大脳皮質とともに大脳基底核からの下行性出力系が関与していることを形態学的に示唆した。

(7) 大脳基底核—視床投射系 loops —視床運動系中継核の関与—

中野勝磨（三重大・医）

高等な動物では，視床の運動系中継核は各亜核に分けられる。これらの核が大脳基底核—視床—皮質系 loop でどのように関与するか，サルを用いて軸索流法による実験的観察を行なった。主な所見は，1）淡蒼球内節 (GPm) の尾側腹外側部のニューロンが視床の VLo を介して単シナプス性に運動野に投射することを光顕・電顕的に明らかにした。これらのシナプス結合は axo-somatic synapse が多い。2）GPm の吻側背内側部のニューロンは VApc の内側部を介して運動前野へ，GPm の中間部のニューロンは VApc の外側部を介して補足運動野 (SMA) に投射する。3）VLm は GPm，黒質，小脳から入力を受け，前頭連合野に投射するが，GPm からの入力は GPm の内側縁から受けるものが多い。VAmc は黒質網様部の吻側部全域と尾側外側部から入力を受け，前頭眼野及びその近傍に投射する。以上の基底核－視床皮質投射系はすべて大脳皮質の表層にも投射しており，一方小脳系の入力は深層のみに投射する。

(8) 視床運動核群のシナプス機構

中村泰尚，佐藤二美（東京医歯大・医）

運動制御に関わる，基底核と小脳系の二つの神経回路内の視床中継核 (VA と VL) におけるシナプス構築を，超薄連続切片を用いて比較検討した。VA では主入力である脚内核からの終末は，視床－大脳皮質投射細胞 (TCN) の細胞体，一次と二次の樹状突起，介在ニューロンのシナプス前樹状突起 (PSD) にシナプスしていた。皮質からの入力は TCN の二次以下の細い樹状突起上に見られた。VL では主入力である小脳核からの終末は，TCN と一次と二次の樹状突起，それに上記のように PSD にシナプスしていた。多形性の小胞を持ち，対称性のシナプスを作る終末が両核に観察でき，少なくともその一部は視床網様核由来であることが考えられた。二系統で異なった所見は，VA の TCN 細胞体に主入力があること，VA の PSD に非対称性のシナプスを作る終末があることであった。この終末の由来と，軸索細胞体性シナプスの意義について有意義な討論があった。

(9) 視床―皮質投射の情報処理機構

山本哲朗，浅原俊弘，林　民（三重大・医）

ネコ大脳皮質運動関連領野として，運動野，頭頂連合野，体性感覚野での視床―皮質応答の解析を細胞内染色法を併用して解析した。これら 3 つの領野は視床投射にそれぞれ特徴があり，比較検討することにより皮質構成細胞の情報処理機構への解析の足がかりを得ることが出来る。錐体細胞では，皮質第Ⅲ層の錐体細胞が早く興奮し，第Ⅳ層の細胞は必ずしも早い興奮を示さないことが分かった。ただ，運動野のみが皮質最終出力経路としての特殊化を示し，速錐体路細胞が非常に早い興奮を起こす。一方，非錐体細胞は各皮質で共通して短潜時で興奮し，皮質内での feed forward inhibition が情報伝達に重要であることを示唆した。

(10) ネコ運動野ニューロンの半球間相互作用

松波謙一，川島　卓，小西朝隆（岐阜大・医）

目的：ネコ体性感覚野の四肢末梢を再現する部位は，半球間を連繋する交連線維を欠くとされたが，最近の新しいトレーサ法では，これらの領域でも多くの交連線維の投射が認められた。そ

こで今回は，両半球3a野からのニューロン活動を同時に記録し，相互関係法を用いて機能的連絡について研究し，以下の結果を得た。

結果：210ニューロン対のうち，約15％において，相互相関図を求める事ができた。これら多くのニューロンは3ミリ秒以内の短潜時で脳梁刺激に応じた。相互相関図の解析から以下の結果が得られた。

1）相互相関法により興奮性結合の存在が示された。
2）抑制結合の存在が示されたが，少数であった。
3）共通入力を受ける例が多数あった（約2/3）。
4）10Hzの周期で相互相関を及ぼすニューロンがあった。
5）興奮性，抑制性の大きさの程度は時間と共に変動した。この事は，左右大脳の機能的連繋は非常にダイナミカルである事を示している。

(11) 運動野の局所神経回路

金子武嗣（京都大・医）

最近，我々の研究室では運動野を含む大脳皮質の局所回路を形態学的に解析する仕事を進めている。今回は運動野浅層の錐体細胞から深層の錐体細胞への結合に的を絞って報告させていただいた。

1）ネコの体性感覚野の微小刺激に対する運動皮質浅層錐体細胞のシナプス反応を3種類に分類し，運動皮質の局所的神経結合を推測した。さらに，こうした浅層の錐体細胞から運動皮質の運動出力細胞に対する情報の流れを2重染色法を用いて明らかにした。

2）ラットのスライス標本を用いて逆行性トレーサー法，細胞内記録・染色法と免疫組織化学法を組み合わせる方法を開発した。運動野Ⅲ層のグルタミン酸作動性錐体ニューロンから，皮質脊髄路投射ニューロンへの豊富な入力が証明された。現状では錐体細胞間の結合を調べているが，次の段階では抑制性の介在ニューロンと錐体細胞の間あるいは介在ニューロン間の結合を調べていきたい。

(12) 大脳皮質前頭運動野ニューロンの機能

三上章允（京都大・霊長研）

ヒトやサルの前頭連合野は運動前野，補足運動野の前方にあり，行動計画の立案，行動の選択，

行動の決定や行動の発現などにかかわっている。弓状溝の後方にある前頭眼野（8野）は，眼球運動のコントロールに直接関与し，いわば，眼球運動の運動野ともいうべき働きをしている。前頭眼野の前方，主溝の周辺に位置する46野とその内側にある9野の背側面は，空間情報処理とその記憶の関係が深く，眼球運動における運動前野の役割も果たしている。46野の外側にある12野，と腹側の眼窩面にある11野は，形態情報処理と形態情報の記憶との関係が深い。これまでに記録した学習課題遂行中のニューロン活動のデータもこうした見方を大筋で支持するものである。一方，前頭連合野の先端部分と内側面の機能についてはほとんどデータがなく今後の研究が待たれる。

16. 腸管における電解質水代謝と体液調節

1996年1月12日

代表者名：鈴木裕一（静岡県大・食品栄養科学・生理）
世話人：尾崎　毅

(1) 自律神経と体液・塩バランス

細見　弘（香川医大・二生理）

(2) 腸分泌調節機構の解剖学的背景

岩永敏彦（北海道大・獣医・解剖）

(3) 大腸イオン輸送の神経調節

桑原厚和（生理研）

(4) 腸管と水チャネル

石橋賢一（東医歯大学・二内）

(5) 唾液分泌機構の比較動物学的考察と将来への展開

村上政隆（生理研）

(6) 大腸切除後の糞便 Na 排泄増大は小腸アミロライド感受性起電性 Na 吸収活性化により代償される

児山　香（東北大・一外）

(7) 血液量変化によるラット腸管水吸収の検討

森本武利（京都府立医大・一生理）

(8) 腸管内電解質による渇き（飲水行動）の調節

安藤正昭（広島大・総合科学）

(9) モルモット遠位大腸粘膜イオン輸送に対するバゾプレッシンの作用とカルシウムシグナリング

佐藤嘉彦（浜松医大・一内）

(10) 自律神経系腸管吸収調節の中枢経路

森田啓之（香川医大・二生理）

(11) 胃 H, K-ATPase の発現調節

前田正知（大阪大・薬・生物薬品化学）

〔参加者名〕

安藤正昭（広島大・総合科学），飯島貴之（浜松医大・一内），伊熊睦博（静岡県大・食品栄養科学・生理），石黒　洋（名古屋大・内科），石橋賢一（東医歯大学・二内），岩田譲司（京都府立

医大・生理)，岩永敏彦（北大・獣医・解剖)，角岡　潔（香川医大)，桑原厚和（生理研)，児山香（東北大・一外)，佐藤嘉彦（浜松医大・一内)，新保　斉（静岡県大・生活健康科学研究科・人体生理)，鈴木裕一（静岡県大・食品栄養科学・生理)，成瀬　達（名古屋大・医・内科)，野垣敦宏（浜松医大・一内)，花井洋行（浜松医大・一内)，細田佳佐（浜松医大・一内)，細見弘（香川医大・二生理)，前田正和（大阪大・薬学・生物薬品化学)，村上政隆（生理研)，森田啓之（香川医大・二生理)，森本武利（京都府立医大・一生理)，矢島高二（明治乳業・栄養科学)，山本　武（静岡県大・生活健康科学研究科・人体生理)

〔研究会概要〕

まず，腸管 Na センサーを介する腸腎反射をもとに Negative Feedforward Control という新概念が提出され，触発された（細見)。腸内分泌細胞と壁内神経の相互作用につき，形態的／生理学的検討から提案が成された（岩永，桑原)。水チャネルの分子生物学的成果に関する詳細な報告があった（石橋)。唾液腺の比較生理学的側面から挑戦的考察がなされ，この面の問題意識の大切さも再認識した（村上)。大腸切除モデル動物で，下痢による体液喪失と残存小腸の代償作用に関する講演があった（児山)。血液量変化と腸管吸収性に関する発表は，腸管内水電解質 dynamics の重要性を認識した（森本)。魚の飲水行動に関する新知見が紹介され，陸上生物と体液調節機序の違うとの指摘もなされた（安藤)。バソプレッシンの大腸イオン輸送効果について発表があった（佐藤)。自律神経性吸収調節の中枢経路に関する発表があり，生体の電解質代謝に於ける腸管の意味づけが明らかになるものと期待された（森田)。最後に胃壁細胞のプロトンポンプの遺伝子転写調節蛋白に関する講演があり，腸管細胞の分化の問題の解決にも結びつくものと期待された（前田)。

全体を通して幅広く知識を整理でき，大胆な仮説も出され，未解決の問題点についても討論される中でかなり明らかになり，実り多いものであった。参加者は消化管研究に新たなる魅力を感じたことと信じている。

(1)　自律神経と体液・塩バランス

細見　弘（香川医大・二生理)

自律神経による体液調節系としてのネガティーブ・フィード　フォワード調節系と腸管の役割，さらにその研究法について考察する。腸管内を高張の NaCl または KCl 溶液で灌流すると，灌流腸管からの求心性神経活動が増加した。この求心性神経を電気刺激すると腎臓からの Na 排泄が増加した。この時，血漿 Na 濃度はまだ上昇していないので，この反射はネガティーブ・フィード　バック調節系ではなく，ネガティーブ・フィード　フォワード調節系と考えられ，「腸腎反射」と名付けた。ネガティーブ・フィード　フォワード調節系を研究するためには，調

節系への入力（生体への外乱）と出力を測定し，その比より調節力を求めなければならない。ネガティーブ・フィード　フォワード調節系は，予測制御であり，調節力は大きく，調節速度は速く，体液交換速度を高めるという特徴がある。一方，調節誤差は大きく，外環境と内環境の橋渡しをするので，外環境の影響を受けやすいという欠点がある。予測制御系のさらなる研究が待たれる。

(2) 腸分泌調節機構の解剖学的背景

岩永敏彦（北海道大・獣医・解剖）

消化管の分泌を調節する系には，内分泌細胞と壁在神経叢がある。前者では，消化管を通して最も広範囲にかつ大量に存在するセロトニン細胞（EC 細胞）が重要であろう。腸粘膜を刺激すると粘膜の分泌が亢進するが，セロトニンはこの反射に深く関係している。EC 細胞は化学的に刺激ばかりでなく，機械的な刺激によっても興奮するようである。そう考えると，肛門の直前まで EC 細胞が密に分布することは合点がいく。EC 細胞は，神経と密接な位置関係にあり，VIP あるいは substance P 含有神経と常に接近して存在する。腸の上皮細胞にはセトロニンの受容体はないが，EC 細胞の興奮が壁在神経叢で増幅されて上皮細胞に伝わるしくみになっているようである。

腸粘膜の神経系で一番多いのは，VIP 含有神経である。ついで多いのは，SP・CGRP 含有神経で，ガラニン，GRP 神経が続く。VIP 産生腫瘍がコレラ様の激しい下痢をひき起こすことから分かるように，分泌には VIP 神経が最も重要である。VIP と構造および作用が類似する PHI は VIP と共存するが，PACAP は VIP と異なる分布を示す。

(3) 5-HT ACTIVATES NITRIC OXIDE GENERATING NEURONS TO STIMULATEFLUID SECRETION IN THE GUT.

桑原厚和（生理研），門脇　真（藤沢薬品）

This study was undertaken to test the hypothesis that nitric oxides (NO) generating neurons participate in the mediation of 5-HT-induced fluid secretion. 5-HT-induced increase in short circuit current (Isc) of guinea-pig distal colon is abolished by tetrodotoxin but not by atropine. The maximum response to 5-HT (10^{-5}M) was inhibited by ~ 65% by N^{G}-nitro-L-Arg (L-NNA, 10^{-4}M) and L-Arg (10^{-3}M) reversed L-NNA-induced inhibition. The NO donor, sodium nitroprusside

(NaNP, 10^{-4}M) increased the basal Isc; however neither tetrodotoxin, atropine nor indomethacin significantly reduced the response to NaNP. 5-HT (1mg/kg) -caused diarrhea in fasted mice was dose-dependently inhibited by N^{G}-nitro-L-Arg methyl ester (1-32mg/kg). The maximum inhibitory effect (~47%) at 32mg/kg was counteracted by L-Arg (600mg/kg). These data suggest that at least, part of the non-cholinergically mediated effect of 5-HT is due to the activation of NO generating and cyclooxygenase-independent neurons.

(4) 腸管と水チャネル

石橋賢一（東医歯大学・第二内科）

生理的には腸管に水チャネルは証明されていないが，蛋白の存在は明らかにされている。

AQPI は小腸ではリンパ管上皮に，大腸では陰窩上皮細胞の基底側 (BL) 膜に局在する。AQP3 は食道，胃の上皮細胞の BL 膜，遠位結腸の表層円柱上皮の BL 膜に局在する。AQP4 は胃壁細胞と遠位結腸の表層円柱上皮細胞の BL 膜に局在する。AQP5 は唾液腺などの腺房の上皮細胞の管腔膜に局在し，アセチルコリンの刺激で増加する。水の吸収に重要な刷子縁膜には水チャネルは存在しないが水を比較的よくとおす脂質二重層になっており，接触時間の長い腸管では腎臓とはちがい水チャネルは必要でないのかもしれない。それに対して tight な上皮細胞の BL 膜には水チャネルが存在し volume regulation に関与していると考えられ。ヒトで AQP1 の先天的欠損症例が知られているが（Colton 血液型）生理的に異常は認められていない。

(5) 唾液分泌の比較動物学的考察と将来への展開

村上政隆（生理研）

食物が消化管を通過し栄養が吸収される過程で，その入口において唾液分泌により水と消化酵素を食物に加える。摂取する食物の種類は動物種により多様であり，食物の種類により，唾液腺に要求される機能が異なり，唾液腺の機能・形態に多様性が生じる。これまで上皮細胞の水電解質輸送モデルとしてラット唾液腺を用いてきたが，最適のモデルであるか否かの点検のため視野を広げ，唾液分泌の比較動物学的考察を行なった。顎下腺の形態の種による多様性，食性による分泌顆粒形態の多様性を紹介し，ツパイ，ヒツジで行なった灌流実験結果を報告した。

(6) 大腸全摘後小腸上皮におけるアミロライド感受性起電性 Na 吸収機構の発現

児山　香（東北中央病院）

大腸全摘後においては，頻回の下痢が経時的に改善することが臨床的に観察されている。大腸全摘後の残存小腸における電解質吸収機構の変化を引き起こす機序を明らかにする目的でラット大腸全摘モデルを作成し，残存小腸での起電性 Na 吸収活性の変化を短絡電流法で測定し，さらに Na チャンネル (rENaC) の mRNA の発現を Northern Blot 解析により検討した。大腸全摘術後の下部小腸において，通常小腸では存在しないアミロライド感受性起電性 Na 吸収機構と rENaC の mRNA の発現を認めた。また，術後 2 週から 4 週にかけて rENaC の mRNA の発現量の著明な増大，およびアミロライド感受性起電 Na 吸収活性の分布がより口側域まで達したことを認めた。また，術後経過に従う血清アルドステロン値の著明な上昇と，便中 Na 濃度の減少も認められた。

(7) 血液量変化によるラット腸管水吸収の検討

森本武利（京都府立医大・第一生理）

ラットを用いて，腸管へ各種溶液を投与し血液量の変化から腸管における水分吸収に及ぼす溶液組成の影響を検討した。動静脈カテーテルを γ カウンターを含む体外循環回路に接続し，^{51}Cr でラベルした赤血球の希釈法にて血液量を連続的に測定した。試験溶液は水道水，0.9%, 0.45%, 1.8% NaCl, 0.45% NaCl + 2% glucose および 0.13% NaCl + 6% glucose とし，胃ないしは十二指腸起始に 1ml/100 g body wt. /10min で投与した。その結果 0.45% NaCl + 2% glucose が最も速やかに血液量の増加を示し，低張液では吸収速度の増加，高張液では一過性の血液量の減少を示した。すなわち血液量変化からみた腸管での吸収には塩および糖の co-transport の他，浸透圧勾配による水の移動の存在が示唆される。

(8) 腸管内電解質による渇き（飲水行動）の調節

安藤正昭（広島大・総合科学）

哺乳類と同様に，海水ウナギの飲水は，血中のアンギオテンシンⅡ・ヒスタミン・セロトニン・カルバコール・イソプロテレノールによって促進され，ANP によって抑制される。しかし水中に棲む海水ウナギの飲水行動は哺乳類より単純で，実験系としては優れていると考えられる。今

回，海水ウナギの腸管内を等張のマニトール液(10ml/h)で灌流すると飲水が起こるが，等張の NaCl 液に置換すると飲水が抑えられることを見つけた。この飲水抑制効果は腸管内 Cl^- に依るものであり，Na^+ は Cl^- の存在しないときには逆に飲水を促進した。食道通過後の Na^+ と Cl^- の濃度と飲水速度との関係から，腸管内電解質濃度による飲水調節機構を論じる。最後に，Cl^- によって腸管より放出された飲水抑制物質と思われる物質と，Na^+ によって放出された飲水促進物質と思われる物質のクロマトグラムを示す。

(9) モルモット遠位大腸粘膜輸送に対するバソプレシンの作用とカルシウムシグナリング

佐藤嘉彦，花井洋行，金子榮藏（浜松医大・第一内科）
林　久由，鈴木裕一（静岡県大・食品栄養科学）

水・電解質代謝維持に重要なバソプレシンの，消化管特に大腸の粘膜輸送に対するバソプレシンの効果は明らかにされていない。我々は大腸粘膜イオン輸送に対するバソプレシンの作用を電気生理学的に検討し，その細胞内情情報伝達機構について検討した。モルモット遠位大腸粘膜を用いユッシング型のチェンバーにて短絡電流 (Isc) と経上皮伝導度 (Gt) を測定し，バソプレシンによる Isc と Gt の変化をチャンネルや共輸送担体の阻害剤を用いて検討した。バソプレシンは濃度依存的に起電性のナトリウム吸収の抑制，カリウム及びクロライドの分泌の刺激作用を示した。これらはバソプレシン V1 レセプター拮抗剤により強く抑制された。分泌反応には細胞外液カルシウム濃度依存性が認められた。大腸粘膜上皮細胞の細胞内カルシウム濃度を fura-2 を用いて測定したところバソプレシンは V1 レセプターを介して細胞内カルシウム濃度を上昇させた。

(10) 自律神経性吸収調節（肝—腸反射）の中枢経路

森田啓之，細見　弘（香川医大・生理）

1）肝—腸反射：

空腸ループを作成した麻酔下のイヌにおいて，肝門脈内に高張 NaCl 溶液を投与すると，ループでの Na の吸収が抑制された。この応答は肝臓除神経，あるいはアトロピン投与により完全にブロックされることにより，求心路は肝臓神経，遠心路はコリン作動性神経であると推測される。

2）肝臓求心神経の中枢への投射：

麻酔下のラットを用い，NaCl 濃度の変化に応答する肝臓求心神経を電気刺激し，Fos の発現

を延髄～視床下部にかけて調べた。最後野，弧束核，迷走神経背側運動核，延髄腹外側部，外側脚傍核，室旁核，視索上核などにFos陽性細胞が確認された。意識下のラットを用いた肝門脈内高張NaCl溶液投与実験でも，電気刺激と同様の部位にFos陽性細胞が確認された。従って，これらの部位にNaCl濃度の変化に応答する肝臓求心神経が投射していると考えられる。

3）弧束核内カイニン酸注入：

弧束核内にカイニン酸を注入し，破壊した後，肝門脈内に高張NaCl溶液を投与しても，ループでのNaの吸収は抑制されなかった。従って，肝—腸反射の中枢経路に弧束核が含まれていることが分かる。

以上の結果から，肝門脈内のNaCl濃度が増加すると，肝臓求心神経を介し弧束核に投射し，迷走神経背側運動核，迷走神経を経て，空腸のNa吸収が抑制されると考えられる。

(11) GENE EXPRESSION OF H^+K^+-ATPase: ROLES OF GASTRIC GATA DNA-BINDING PROTEINS

前田正知（大阪大・薬）

The H^+/K^+-ATPase is a P-type ATPase that is specifically expressed in gastric parietal cells and is responsible for acid secretion into the stomach. We have found one or more gastric mucosal nuclear proteins that recognize a sequence motif in the 5'-upstream regions of the H^+/K^+-ATPase α-and β-subunit genes. This gastric motif, (G/C) PuPu (G/C) NGAT (A/T) PuPy, may be a binding site for a positive transcriptional regulator that functions specifically in parietal cells. We further demonstrated by cDNA cloning and *in situ* hybridization that novel zinc-finger proteins (GATA-GT1 and GATA-GT2) are present in the gastric parietal cells and bind to this motif. The proteins activate the transcription of the reporter gene with the 5'-upstream region of the H^+/K^+-ATPase β-subunit gene. These results suggest that gastric GATA DNA-binding proteins have important roles in transcriptional activation of H^+/K^+-ATPase genes in the parietal cells.

17. 生殖細胞の構造と機能発現の解明

1995年11月17日～18日
代表者：年森清隆（宮崎医大）
世話人：有井達夫

(1) 成熟精子における頚部の比較微細形態
浜崎正雄（久留米大）

(2) マウス精巣上体管上皮細胞における糖質の分泌と吸収―レクチン染色による組織学的研究
高野広子，阿部和厚（北海道大）

(3) 精子核の脱凝縮について
薄井紀子（帝京大）

(4) 着床期におけるトロホブラストの浸潤
舘　澄江（東京女子医大）

(5) マウス胚におけるコンパクションおよび核の移動へのプロテインキナーゼCの関与
大杉万美，大澤卓郎（三重大学）
山村秀樹（名古屋大・環境医研）

特別講演

電子顕微鏡による精子形成に関する私の研究
永野俊雄（千葉大）

(6) Leydig細胞の再生：Ethanedimethane sulfonate投与後のLeydig細胞の消失と再出現
森　浩志（大阪医大）

(7) 生殖細胞の分化に特異的に発現する遺伝子の解析
西宗義武（大阪大・微研）

(8) 蛋白質脱リン酸化酵素と精子形成及び骨形成
羽地達次（九州歯大）

(9) マウス精巣で発現する新しい熱ショック蛋白apg-1の特異な温度反応性
金子嘉志，藤田　潤（京都大）

(10) ラット精子鞭毛細胞膜MC31抗原の発現
年森清隆，谷井一郎，荒木早苗（宮崎医大）

参加者氏名

年森清隆，谷井一郎，大浦親善（宮崎医大），永野俊雄，鈴木二美枝，外山芳郎，前川眞見子，出沢真理（千葉大・医），阿部和厚，高野広子（北海道大・医），西宗義武（大阪大・微生物研），

森　浩志（大阪医大），藤田　潤，金子嘉志（京都大・医），山村英樹（名古屋大・環境医研），舘　澄江（東京女子医大），薄井紀子（帝京大・医），羽地達次（九州歯大），浜崎正雄（久留米大・医），有井達夫（生理研）

研究会概要

本研究会は，哺乳動物生殖細胞の分化・成熟から受精・初期発生に至るまでの微細構造変化と分子認識を含めた機能発現に関して，種々の形態学的手法，生理学的手法そして分子生物学的手法を駆使して解明していくことを目的としている。

本会の研究発表は，生殖細胞の分化過程における特異的遺伝子や分子発現の例（蛋白質脱リン酸化酵素，熱ショック蛋白 apg-1, 26-35K 蛋白等），異常環境条件でのラディッヒ細胞の変化，成熟精子頚部の微細形態，精巣上体各部における糖鎖発現の変化，受精における精子核脱凝縮のメカニズム，初期胚子におけるプロテインキナーゼ C の役割，着床過程における初期胚と子宮内膜との関係に関するものであった。2 日間を通して，各人の実験結果の発表と討論を充分に行なった。討論は，結果に対してだけでなく，研究の背景や実験方法にも及び，総合的かつ多角的な意見交換であった。

(1)　成熟精子における頚部の比較微細形態

浜崎正雄（久留米大・医・二解剖）

成熟精子の頚部を構成する成分のうち，小頭，近位中心子及び余剰核膜は，その形態と消長との観点から三種動物（ラット，ハムスター及びサル）間で著名に異なっている。そこで，三種動物の構成成分を微細構造レベルで比較検討した。方法：成熟ラット (Ra), ハムスター (Hm) 及びニホンザル (Mo) の精巣上体尾部より各々の成熟精子を採り，一部を常法に従い，他に，グルタール固定標本を10% H_2O_2 溶液で常温下10分間処理し，透過電顕と走査電顕用に供した。結果：Ra の近位中心子は完全に消失し，その部に壁ガンを作ったが，Hm では近位端のみが残存，Mo では近位端から遠位端まで存在し，それらは共に右腹側下方を向いていた。小頭は近位中心子の屋根を構成し，多分ムコ蛋白であり，Ra や Hm で洋ナシ形を示したが，Mo では欠如していた。余剰核膜は両成分の外側に位置し，Mo で痕跡的，Ra で中程度，Hm でよく発達し，小頭形成に一部寄与しているかも知れない。

(2) マウス精巣上体管上皮細胞における糖質の分泌と吸収 —レクチン染色による組織学的研究

高野広子，阿部和厚（北海道大・医）

精子は精巣上体から分泌される糖蛋白によって成熟する。精巣上体における糖蛋白の分泌部位と吸収部位を知るために糖質と特異的に結びつくレクチン (UEA-I, PNA, SBA, RCA-I, DBA, WGA) を用い，無処置および精巣輸出管結紮あるいは精巣上体を頭体境界部で結紮して4週後のマウス精巣上体を組織化学的に調べた。

マウス精巣上体は組織学的部位差により5部（Ⅰ－Ⅴ部）に分けられる。Ⅰ－Ⅲ部は頭部に，Ⅳ部は体部に，Ⅴ部は尾部に含まれる。精巣上体管上皮は主細胞と明細胞からなる。レクチンの種類および部位により主細胞ゴルジ装置，管腔内容物，明細胞が染色された。管を結紮すると結紮部位よりも遠位部のレクチン染色性に変化がみられた。観察結果は，1）糖蛋白は主として頭部主細胞から分泌され，体・尾部の明細胞によって吸収される，2）各部は通常，異なる糖蛋白を分泌するが，精巣からの分泌物がこないとⅠ部はⅡ部と同様の糖蛋白を分泌するようになる，ことを示していた。

(3) 精子核の脱凝縮について

薄井紀子（帝京大・医・解剖）

成熟卵子との膜融合により卵形質内にとり込まれた精子核は，一連の変化を経て雄性前核へと発達する。これらの変化の殆どのものは未成熟卵子や受精卵内でも観察されるが，精子染色質の脱凝縮だけは成熟卵子や第1有糸分裂期の卵などM期の卵子および卵以外では認められない。

さて，ハムスターの卵核胞期の未成熟卵子，成熟卵子，第2成熟分裂後期の卵，前核期の卵を媒精15分後に検索したところ，すべての卵子および卵内で，精子核膜崩壊直後に，これまで報告されたことのない核物質の放出像が観察された。更に，その放出像の卵子および卵の細胞周期による違いも明らかになった。しかも，卵核胞期と前核期では全く同じ放出像が，そして受精中の卵では未成熟卵子と成熟卵子内両方の放出像が認められた。核物質放出後，精子核の脱凝縮が起こるのは，M期である成熟卵子のみということを考慮すると，精子核脱凝縮に関わる卵形質性因子のM期と他の時期との違いは，単にその有無というより，一部の不足または欠損と考えるのが妥当と思われる。

精子核脱凝縮の際，核の中のプロタミン分子間および分子内のS-S結合の還元に関与するグルタサイオン，プロタミンのヒストンによる置換に関わると示唆されているヌクレオプラスミン，

およびヌクレオプラスミンの活性に関係があると考えられるMPFなどの卵形質因子について考察する。

(4) 着床期におけるトロホプラストの浸潤

舘　澄江（東京女医大・解剖・発生生物）

血漿膜性胎盤を形成する動物のトロホプラストは，極めて強い内膜組織侵襲性を示し，癌細胞との対比において興味深いが，従来，侵襲過程を微細構造レベルで解析した仕事は少ない。マウス胚盤胞のトロホプラストによる内膜の浸潤は妊娠第5日目に開始され，約12時間後，内膜上皮の除去を完了し，脱落膜組織の浸潤へと進む。妊娠第4日目の接着期から，内膜支質の細胞群は大型の細胞に変化し，細胞間質の少ない，いわゆる脱落膜組織形成を行うが，妊娠第5日目には，胚子を取り囲む数層の脱落膜細胞は，紡錘形のやや濃染する細胞に変化して一次脱落膜域を形成し，その外側に囲む二次脱落膜域と区別されるようになる。一次脱落膜域は血管を欠く。卵筒期に達した胚子のトロホプラストは，ほぼ1日かけて一次脱落膜域を浸潤し，妊娠第6日目に二次脱落膜域の血管に到達した。血管侵襲開始後，母体の血液はトロホプラストとライヘルト膜間を満たすようになり，妊娠第7～8日目には，一過性に血小板数の増加，及び脱顆粒を伴う血小板の凝集が認められた。血小板由来成長因子の胎盤形成並びに胚子発生への関与が示唆された。

(5) マウス胚におけるコンパクションおよび核の移動へのプロテインキナーゼCの関与

大杉万美，大澤卓郎（三重大・医）
山村英樹（名古屋大・環境医研）

マウス胚では，8細胞期後半にコンパクション（胚細胞の凝縮）と胚細胞の核の移動が起こる。この胚細胞の凝縮および核の移動とプロテインキナーゼC (PKC) との関係を2細胞期のマウス胚で調べた。なお，マウス着床前胚におけるPKCの存在は証明されている。胚をPKCの活性化作用を有する膜透過性合成ジアシルグリセロール (DG) およびホルボールエステルで処理すると，胚細胞の凝縮と核の移動が用量依存的に起こった。また，DGによる胚細胞の凝縮と核の移動は，PKCの阻害剤であるスフィンゴシンによって用量依存的に抑制された。一方，胚をコルヒチンで前処理すると，DGによる核の移動は阻止されたが，胚細胞の凝縮には影響がみられなかった。胚をDGとカルモデュリン阻害剤 (W-7, W-5) で同時に処理すると，胚細胞の凝縮は起こらず，

核の移動も抑制された。

以上のことから，コンパクションと胚細胞の核の移動にはPKCが関与すること，また，核の移動には正常な微細管が必要であることがわかった。

電子顕微鏡による精子形成に関する私の研究

永野俊雄（千葉大・医・解剖）

1959年大学院卒論としてニワトリの精子形成に関する電子顕微鏡による研究を発表した。その直後に，ワシントン大学に留学しさらにそれを続行した。その間に，造精細胞分裂時の細胞間橋，べん毛構造等に関する事を行った。1961年帰国後，べん毛の細胞化学，停留精巣，ヒトのセルトリ細胞，ラインケ結晶，モルモットの自己免疫による無精子症等を研究した。1970年代に凍結レプリカ法が可能となり，セルトリ細胞と精巣上体細胞の結合装置，精子細胞膜を研究した。また樹脂注入による精巣血管，SI系キメラマウスの精子形成，精細管のアクチン分子のハイブリダイゼイション，アクチン細糸について光学顕微鏡による研究を行った。

(6) Leydig細胞の再生
: EDS (ethanedimethane sulfonate) 投与後のLeydig細胞の消失と再出現

森　浩志，宮野正雄，伊藤裕啓（大阪医大・病理）

EDSは成熟ラットのLeydig細胞 (LC) を選択的に壊死に陥らせるが，約1月後にはLCが無処置ラットと同程度に再出現する。再出現するLCの源が前駆細胞ならば，EDS反復処置によって遂にはLCは枯渇するはずであり，幹細胞からの分裂ならばLCは再出現し続けると予想される。LCの源を知る目的で，EDSを7適齢のF344ラットに30日間隔で75mg/kg, i. p. 4回反復投与した。2回投与2～4日後には血中テストステロン濃度は著明に低下し，LCの数も激減したが，その程度は一回投与後の変化に比べてやや軽度だった。少数残存するLCの大きさ，微細構造に変化はなかった。2回，4回投与，それぞれ30日後には，無処置ラットと同程度までLCの数密度・体積密度が回復し，血中テストステロン濃度も回復した。また4回投与後にもLCの細胞分裂が認められた。以上の結果はLCの幹細胞の存在を示唆している。しかし，再生LCがEDSに対する抵抗性を獲得した可能性や，EDSに非感受性の胎児型LCだったためにEDS反復処置によっても全てが殺されず，見かけ上，幹細胞が存在しているようにみえた可能性もある。なお，EDSによるLCの変化は従来，壊死と表現されてきたが，アポトーシスであることが解った。

(7) 生殖細胞の分化に特異的発現をする遺伝子の解析

西宗義武（大阪大・微生物研）

複雑な精細胞分化過程には，それぞれ特異的に発現する様々な遺伝子とその産物が複雑に関与している。これらを系統的にクローニングし整理し，その働きを明らかにすることは，精細胞の増殖と分化機構を理解する有効な手段であると考えられる。しかもこの分化過程は，精原細胞の増殖と分化，精母細胞の減数分裂，精子細胞の形態形成といづれも生物学的に重要な過程を含んでいる。精細胞分化過程の解析を通じて，これらの減数分裂を始めとした生物学的に重要な現象の理解が進むものと期待される。

精細胞の各分化段階に特異的に発現する遺伝子のクローニングを

1）各分化段階に特異的に反応するモノクローン抗体を用いて，

2）全ての分化段階にある精細胞を特異的に認識するポリクローン抗体を用いて，

3）精巣 cDNA ライブラリーから精細胞欠損変異マウス精巣 cDNA ライブラリーを差し引く事により行なう。

(8) 蛋白質脱リン酸化酵素と精子形成及び骨形成

羽地達次（九州歯大）

我々は，プロテインホスファターゼ-1型の触媒サブユニットの4種類のアイソザイムの cDNA (PP-1α, PP-1γ1, PP-1γ2, PP-1δ) を単離した。今回 PP-1γ1, PP-1γ2, PP-1α, PP-1δ に対する抗体を新たに作製し，精子形成及び骨形成に対するこれらのホスファターゼの関係をノーザンブロット法に加えてイムノブロット法，免疫蛍光抗体法で検討した。PP-1γ1 mRNA の発現は生後10日のラット精巣においてすでに認められ25日以降漸次減少する傾向が認められたが反応は陽性であった。また PP-1γ1 抗体はその遺伝子産物と考えられる 38kDa の蛋白を認識した。PP-1γ2 抗血清は生後25日以降のラット精巣の後期精母細胞と初期精子細胞の核に存在する分子量 39kDa の蛋白と反応した。PP-1δ 抗血清は分裂期骨芽細胞の核，特に核小体に存在する分子量 38kDa の蛋白と反応し，PP-1α 抗血清は骨芽細胞の核に存在する分子量 37kDa の蛋白と反応した。このことは蛋白質脱リン酸化酵素が精子形成及び骨形成に関与することを示唆する。

(9) マウス精巣で発現する新しい熱ショック蛋白 apg-1 の特異な温度反応性

金子嘉志，藤田　潤（京都大・医）

雄性生殖細胞の分化に関与する遺伝子を単離する目的で，cDNA サブトラクション法を用いて，成熟マウス（８週齢）精巣に発現し未成熟（７日齢）な精巣に発現しない転写産物をスクリーニングした。この中に熱ショック蛋白質 (hsp)110 類似の新しい遺伝子，apg-1 を見いだした。ノザン法で apg-1 の各臓器での発現を解析した結果，精巣に恒常的に発現することが明らかになった。apg-1 はパキテン精母細胞及び円形精子細胞に発現することが In situ hybridization により確認された。セルトリ及び線維芽細胞株に32℃から39℃の熱刺激を加えると，apg-1 の発現は誘導されたが hsp70 の発現は誘導されなかった。apg-1 の発現は雄性生殖細胞では分化に対応して変化し，体細胞では低温からの熱ストレスに反応して誘導されるため，apg-1 は精子形成過程及び新たな熱ストレス応答に関与することが示唆された。

(10) ラット精子鞭毛細胞膜 MC31 抗原の発現

年森清隆，谷井一郎，荒木早苗（宮崎医大）

ラット精子鞭毛細胞膜表面に存在する MC31 抗原は，鞭毛から主部へ局在移動する26,000－35,000ダルトン (26-35K) の糖蛋白である。この 26-35K 蛋白に対する特異的単クローン抗体 MC31 を用いて，精巣内における発現動態を調べた。精巣内では，26-35K 蛋白は 35-40K 蛋白として発現していた。同定できる最初の細胞は，減数分裂前のレプトテン期精母細胞であった。ステージⅠ～Ⅱ頃の初期パテキン細胞では，ゴルジ装置が強く陽性であった。その後，ゴルジ装置の染色性は弱まり，小胞体が弱く陽性となったが，ステップ９－10精子細胞ではゴルジ装置が再び強く陽性であった。この時期以後の精子細胞の鞭毛部分の細胞質では，種々の大きさの小胞が免疫反応陽性であり，主部細胞膜に融合する像が頻繁に見られた。このように，MC31 抗原は，減数分裂前後で発現に強弱があり，精子発生過程におけるゴルジ装置と鞭毛蛋白合成の関係を解析する良いモデルであると思われた。

【 国際シンポジウム 】

生理研コンファレンス

生理学研究所コンファレンス

第21回生理研コンファレンスは平成８年２月７日から９日までの３日間開催された。今回は脊椎動物の神経系の発生・分化をテーマとして，海外から15人，国内から67人を集めて行った。口頭発表23題とポスター発表31題の多くの演題数があり，活発な討論がなされた。コンファレンス前夜の Get together パーティー，１日目の懇親会，また新たな試みとして始めた Wine and Poster （２日目）などの時間を利用して，充分な意見交換をすることができた。会の進行も極めて順調に行われ，なごやかな雰囲気のうちに全行程を終了した。プログラムは以下のようである。

THE 21st SEIRIKEN CONFERENCE

Development and Differentiation of the Nervous System

OKAZAKI, JAPAN

FEBRUARY 7-9 1996

ORGANIZER:

Kazuhiro Ikenaka (National Institute For Physiological Sciences)

Kunihiko Obata (National Institute For Physiological Sciences)

Fujio Murakami (Osaka University)

FEBRUARY 6 (TUE)

18：00～　Get together (at SEIRIKEN)

FEBRUARY 7 (WED)

9：00～9：10　Opening remarks

Hama, Kiyoshi

(Director-General, National Institute For Physiological Sciences)

9：10～10：30　‹Miki, Naomasa (Discussion Leader)›

＊ *Levitt, Pat R.*

Department of Neuroscience & Cell Biology, Robert Wood Johnson Medical School-UMDNJ, USA

Signaling pathways that regulate specification of neurons in developing cerebral cortex.

＊ *Okano, Hideyuki*

Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, JAPAN

Intrinsic and extrinsic factors regulating cell fate decisions in developing nervous system.

11 : 00～12 : 20　‹Kawamura, Koki (Discussion Leader)›

* *Takahashi, Takao*

Department of Pediatrics, Keio University School of Medichine, JAPAN

A mathematical model of neocortical neuronogenesis.

* *Ogawa, Masaharu*

Department of Physiology, Kochi Medical School, JAPAN

Inside-out organization of cortical plate neurons in relation to the reeler gene associated antigen on the Cajal-Retzius neurons.

12 : 20～15 : 00　Poster

15 : 00～16 : 20　‹Tsumoto, Tadaharu (Discussion Leader)›

* *Okamura, Yasushi*

National Institute of Bioscience & Human-technology, JAPAN

Regulation of voltage-gated ion channels during ascidian embryogenesis.

* *Eggen, Bart*

Department of Neurobiology and Behavior, State University of New York at Stony Brook, USA

Regulation of sodium channel gene expression by transcriptional silencing.

17 : 00～18 : 20　‹Okamoto, Harumasa (Discussion Leader)›

* *Lee, Jacqueline E.*

Department of Pediatrics Oncology, University of Colorado Health Sciences Center, USA

NeuroD and neurogenesis.

* *Gu, Xiaonan*

Biology Department at the University of California at San Diego, USA

Spontaneous calcium transients in embryonic neurons: signaling systems for differentiation.

FEBRUARY 8 (THU)

8 : 20～10 : 20　‹Shirao, Tomoaki (Discussion Leader)›

* *Goldman, James E.*

Columbia University, USA

Fate determination and migration of progenitors in the postnatal mammalian CNS.

* *Baba, Hiroko*

National Institute for Physiological Sciences, JAPAN

GFAP gene expression during development of astrocyte.

* *Richardson, William D.*

MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London, ENGLAND

The oligodendrocyte lineage-from birth to death.

11：00～12：20 ‹Uyemura, Keiichi (Discussion Leader)›

* *Bernard, Claude C. A.*

La Trobe University, Neuroimmunology Laboratory, AUSTRALIA

Regulation of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in different species throughout development.

* *Thomas, Jean-Leon*

INSERM U-134, FRANCE

Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity.

12：20～14：00 Poster

14：00～15：20 ‹Murakami, Fujio (Discussion Leader)›

* *Bernard, Ora*

The Walter & Eliza Hall Institute of Medical Research, Royal Melbourne Hospital, AUSTRALIA

The role of Bcl-2 in the development and maintenance of neurons.

* *Takeichi, Masatoshi*

Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, JAPAN

Cadherins in brain development.

* *Hatta, Kohei*

Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, Institut Pasteur, France

Genetic control of pattern formation in the zebrafish nervous system.

16：00～17：20 ‹Yamamori, Tetsuo (Discussion Leader)›

* *Shimamura, Kenji*

University of California-San Francisco, Langley Porter Psychiatric Institute, Nina Ireland Laboratory, USA

Genetic studies of the organization and development of the embryonic forebrain.

* *Wanaka, Akio*

Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical College, JAPAN

LIM/homeodomain gene family in neural development.

19：00～21：00 Wine and Poster

FEBRUARY 9 (FRI)

8：20～10：20 ‹Noda, Masaharu (Discussion Leader)›

* *O'Leary, Dennis D. M.*

Molecular Neurobiology Laboratory, Salk Institute, USA

Axonal guidance and target selection in the developing vertebrate brain.

* *Fujisawa, Hajime*

Department of Molecular Biology, School of Science, Nagoya University, JAPAN

Roles of a cell adhesion molecule, plexin, in neuron network formation.

* *Tanaka, Hideaki*

Department Neurobiology, Kumamoto University Graduate School, JAPAN

Commitment of motoneuron progenitors along the A-P axis.

11：00～12：20 ‹Kubota, Kisou (Discussion Leader)›

* *Tamamaki, Nobuaki*

Department of Anatomy, Fukui Medical School, JAPAN

Do IS neurons work as pioneer neurons for layer V pyramidal cells in rats?

* *Obata, Kunihiko*

National Institute for Physiological Sciences, JAPAN

Unconventional action and expression of GABA in the rodent CNS.

12：20～ Concluding remarks

Hama, Kiyoshi

【セミナー報告】

セ ミ ナ ー 報 告

＜生理研セミナー＞

1．電位依存性カルシウムチャネルの分子的多様性

森　泰生 (Department of Molecular Pharmacology and Biophysics, Universty of Cincinnati)

(1995年4月6日)

脳には数種類のカルシウムチャネルが存在することが知られている。分子生物学的な研究によりに，このカルシウムチャネルの多様性が明らかにされつつある。カルシウムチャネルの主要部分を構成する α_1 には，少なくとも6つの遺伝子の存在が明らかとなった。またカルシウムチャネルには，α_2, β, γ などのサブユニットが含まれ，特に β サブユニットはカルシウムチャネルの機能的多様性に大きくかかわっていることが明らかとなった。　(担当：井本敬二)

2．The German university and research system/Lasers in geoscience and environmental science

Reinhard Ho"pfl (Electrotechnik, FH Regensburg)

(1995年4月21日)

ヘッフェル教授は，ドイツ国レーゲンスブルグ単科大学電子工学科に属する応用物理学者です。1995年3月までの一年間，超高圧電顕室で，画像処理の研究に従事していたクリスチーヌ・ブッツェルのドイツでの先生です。レーザーの国際会議に関連して来日されたので，ドイツでの大学周辺の研究体制および地球環境とレーザー技術についてのセミナーを，お願いしました。

(担当：有井達夫)

3．視覚誘導性頚運動発現の神経機構

伊佐　正（群馬大学　生理学第二講座）

(1995年6月1日)

動物が視野周辺に現れた視覚対象を注視するために頚を向ける際，中枢神経系は網膜に2次元情報として入力された対象の位置情報を多数の頚筋の活動パターンに変換するという作業を行っ

ている。この指向頚運動発現に関わる上丘－脳幹網様体－頚筋運動ニューロンという神経回路の解析結果をもとに視覚情報がどのような過程を経て筋活動に変換されていくかを論じる。

（担当：森　茂美）

4．"Intracortical generators of the auditory event-related potentials: animal models"

Dr. George Karmos (Institute for Physiology of the Hungarian Academy of Sciences)

（1995年7月3日）

George Karmos 博士は Institute for Physiology of the Hungarian Academy of Sciences の所長です。今回沖縄で開催される第11回 International Event Related Potentials in the Brain 学会に Animal Models セクションの座長として参加された機会に，上記のセミナーをお願いしました。

（担当：濱　　清）

5．Role of the motor cortex in the control of movement and posture during voluntary gait modification.

Dr. Trevor Drew, Professor, Department of Physiology, University of Montreal, Montreal, Canada.

（1995年7月6日）

There is now abundant evidence that the motor cortex plays an important role in the control of locomotion under circumstances in which there is a need for fine control of the limb and for placement of the foot. In my own work, I have examined the discharge characteristics of identified pyramidal tract neurons (PTNs) recorded from the motor cortex of unrestrained cats during a task in which the animals must voluntarily modify their gait in order to step smoothly over obstacles attached to a moving treadmill belt. The results have shown that a large proportion of the PTNs (circa 64%) show an increase in their discharge frequency during these gait modifications. The pattern of discharge in these PTNs suggests that these cells specify the duration, amplitude and temporal coupling of the flexor muscle activity that is required to bring the leg above and over the obstacle. It is suggested that these signals form part of the descending signal responsible for these gait modifications and that these signals act through the spinal central pattern generator for locomotion.

As each leg in turn is brought over the obstacle, the cat must also make appropriate, dynamic,

postural adjustments in the three supporting limbs. I suggest that the integration of these postural adjustments with the modification of limb trajectory is mediated, at least in part, by the corticoreticular pathway that projects from the motor areas of the pericruciated cortex to the pontomedullary reticular formation. In experiments in which we have recorded the activity of identified corticoreticular neurons during these gait modifications we have been able to show that a similar signal is sent from the motor cortex to both the spinal cord and to the brainstem. It is suggested that this signal to the reticulospinal neurons in the brainstem triggers the postural responses observed during the gait modification. This latter hypothesis is currently being tested in experiments in which we are recording the activity of reticulospinal neurons that receive afferent input from the motor cortex.

(担当：森　茂美)

6. Effects of Dextran Sulfate, Cytoskeleton Affectors and Cell Binding on Mobility of Sendai Virus Surface Proteins & its Effect on Virus-Cell Fusion

大木新平（ニューヨーク州立大学教授）

(1995年7月7日)

Sendai virus と erythrocyte ghosts の fusion は温度依存性である：低温（15℃）では殆ど fusion は起こらず，温度を上げると20℃前後で急に fusion が起こるようになる (Fusion Threshold Temperature)。このような fusion は Sendai virus の surface proteins の mobility と conformational change に関係がある様に思われる。ここでは Viral surface proteins の mobility とその conformational change を fluorescence method で，温度の関数として調べた。Anionic polymer の dextran sulfate を外部に apply すると20℃近くで始まる proteins の mobility が，suppress され，又，virus と erythrocyte ghosts の fusion も suppress される。Viral surface proteins が erythrocyte ghosts と bind すると mobility は少し suppress されるが20℃以上で conformational change も起る。又，surface proteins の mobility は cytoskeleton protein affectors によって影響をうける。特に fusion threshold point での surface proteins の mobility に従って virus fusion は virus の matrix protein によって作用されていることが実験結果から推測される。

付記（講演は日本語で行われます）

大木新平教授は京都大学理学部物理学科（1956年卒）同大学院を経て渡米された。一貫してニューヨーク州立大学（バッファロー）において膜の研究を続けられ，1986年より現職，今回理科大学大島広行教授と共同研究の為来日されたのを機に講演をお願いした。

(担当：濱　　清)

7．聴覚系における相互相関算法

小西正一（カリフォルニア工科大学教授）

（1995年7月15日）

両耳にイヤフォンをつけて音を聞くと頭の中心に音源がある感じがする。音源は両耳で二つあるが，脳がこれを融合して一つのイメージにするのである。同じ音を両耳に流すと，このイメージがはっきりと出るが，違った音を流すと，イメージが現れない。両耳間に時差を与えると，イメージが音が先に着く方の耳に移動する。このような実験から，人間の聴覚系は両耳からくる情報を相互相関するという説が提唱された。メンフクロウもイヤフォンから両耳間に時差のある音を流すと，時差から予期した方向に顔を向ける。両耳間の相関が小さくなると，顔を向ける方向の偏差が大きくなる。メンフクロウでは時差を測る神経経路がわかっていて，そこで相互相関算法で両耳間の時差が検出される。神経細胞の時差に対する反応を記録しながら，両耳間の相関を徐々に小さくすると，細胞の反応が弱くなる。このほか，メンフクロウの聴覚系が各周波数帯で行う相互相関の結果を，どのようにして集め，広周波数相互相関に同等化する算法で時差を検出するかを述べる。

付記（講演は日本語で行われます）

鋭敏な聴覚を持つ動物（こうもり等）を用いた神経行動学的な研究によって，聴覚の中枢プロセスに目覚しい進歩がもたらされた。これまでの中枢機構の研究は感覚系としては視覚を中心としたものが多かったが，聴覚研究の進歩により脳科学に新しい観点が生まれつつある。この進展は，米国で活躍中の，小西教授の努力に負うところが大きい。

このように小西教授は，聴覚研究について学界をリードしつつある世界の権威で，米国で活躍する日本人の代表ともいうべき方である。今回，IBRO 国際会議の招待講演者として来日されたのを機に講演をお願いした。なお，小西教授は第6回国際生物学賞・F.O. シュミット賞・ニューカム・クリーブランド賞等を受賞しておられる。

（担当：濱　　清）

8．Neuronal mechanisms for acquisition of new skilled movements in mammals.

浅沼　廣（米国 Rockefeller 大学教授）

（1995年7月18日）

Acquisition of new skilled movement is of utmost concern to many individuals because of its conspicuous nature. We studied the mechanisms of this learning process by examining the characteristics of long term potentiation (LTP) in the motor cortex (MCx).

A skilled movement consists of a series of movement patterns, called movement segments. Each segment consists of simultaneous contraction of a group of muscles. Creation of new movement segments constitutes the basis of motor learning.

The MCx consists of cortical efferent zones that produce contraction of individual muscles. These efferent zones are innervated by the ventrolateral nucleus (VL) of the thalamus as well as by the somatosensory cortex (SCx). The former input is diffuse, a small area of the VL innervates many efferent zones while the latter is specific, each sensory column innervates only very few efferent zones. We found that tetanic stimulation of a sensory column produced LTP at the target efferent zone and simultaneous stimulation with the VL produced associative LTP at the VL terminals in the same efferent zone, resulting in the increased efficiency of synaptic transmission at selected cortical efferent zones. The results suggest that during repeated practice of a particular movement, sensory input related to the movement is send back to the SCx which is then transferred to the MCx to produce increased excitability of a selected group of efferent zones. We propose that this is the basis for creation of new movement segments.

(担当：森　茂美)

9. The neurophysiological basis for the assessment of nociceptive pathways with laser evoked potentials.

Professor Rolf-Detlef Treede, M. D., Ph. D., Institute for Physiology and Pathophysiology, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

(1995年10月23日)

Treede 教授は痛覚の電気生理学的研究の第１人者の一人であり，特にレーザー光線を刺激源として大脳で記録される痛覚関連脳電位の研究で知られています。今回，京都で行われる国際臨床神経生理学会議に出席のため来日されましたので，その帰途，岡崎に来ていただくことになりました。欧米では日本に比し痛覚の研究が極めて盛んであり，最先端の研究成果を紹介していただけることと存じます。

(担当：柿木隆介)

10. 見えるようにすることと測ること—染色体運動と輸送を例として—

佐藤英美博士（名古屋大学名誉教授）

（1995年11月８日）

佐藤英美先生は，アメリカのプリンストン大学のS. Inoue先生のもとで，細胞分裂機構の研究を長年されてきました。特に，その目的のために特殊な光学顕微鏡を開発されました。細胞分裂機構の世界的権威であります。今回は，この光学系を用いた細胞分裂の動態解析のお話を聞かせていただけると思います。

（担当：濱　　清，熊田竜郎）

11. Neural Substrate of the Vestibulocollic Reflex: Role of the Vestibulospinal Tracts

Dr. Victor J. Wilson, Professor (The Rockefeller University, New York)

（1995年11月14日）

Movement of the head in space reflexly activates the muscles of the neck. This is the vestibular reflex acting on the neck, or vestibulocollic reflex. The most direct pathway from the receptors in the vestibular labyrinth to neck muscle motoneurons consists of the link from receptors to the vestibular nuclei, and from the vestibular nuclei to motoneurons via the vestibulospinal tracts. Over the years, work in many laboratories has provided a wealth of information about these tracts, but their precise role, and that of parallel pathways, remains uncertain. In this talk I will discuss various experiments, some old and some new, on the properties of the vestibulocollic reflex, vestibulospinal neurons, and reticulospinal neurons in the decerebrate cat.

It was shown some years ago that the reflex evoked by stimulation of the horizontal semicircular canals survives interruption of the relevant vestibulospinal tract essentially unchanged. More recent work has focused on the reflex evoked by sinusoidal tilts in vertical planes, which stimulate both the utricular otoliths and the vertical semicircular canals. Experiments show that the vestibulospinal neurons carry signals that are adequate to produce the dynamics of the reflex, but not all of its spatial properties. The same problem arises with one likely parallel pathway consisting of reticulospinal neurons.

One must conclude that, although under normal circumstances the vestibulospinal tracts are an important part of the neural substrate of the vestibulocollic reflex, they do not play a unique role. Important parallel pathways that can replace them when they are transected have not yet been fully identified.

（担当：森　茂美）

12. Thomas Henry Huxley: a grandson's view

Sir Andrew Huxley, O. M., F.R.S. (Univ. Cambridge)

（1995年11月17日）

Huxley 教授がこのたびの勲一等瑞宝賞受賞のため来日された機会に，岡崎にお迎えして，セミナーを開いて頂きました。Huxley 教授は Hodgkin 教授とともに神経興奮のイオン説 (1952) を打ち樹てたことにより，1963年ノーベル医学生理学賞を受賞され，さらに1952年以降は筋収縮のメカニズムの研究に移って，筋収縮のスライディング説を提唱された生理科学分野で最高峰の研究者です。また価値ある科学研究に対する公正無私な態度で日本の研究者，例えば，名取，江橋，勝木教授らの研究成果を高く評価し，国際的に広く紹介されると共に，数十名に及ぶ日本人研究者に指導，助言をして来られました。我が国の生理科学の研究のレベルを高めることができた上で大恩人ともいうべき方です。日本への訪問も今回が6度目（岡崎へは3度目）です。

講演の主題である Thomas H. Huxley (1825-1895) は Huxley 教授の祖父にあたる人で，英国の生命科学・海洋学の発展や科学教育に大きな情熱を傾け，Charles Darwin を助け進化論を確立，普及させた人として知られています。Plymouth 臨海実験所の初代の所長や王立協会の会長を務めた人です。Huxley 家は英国きっての学者の名門で，A. F. Huxley 教授の兄，Sir Julian Huxley は生物学者・科学思想家，Aldous Huxley は文明批評家・小説家として著名です。Huxley 教授ご自身はケンブリッジ・トリニティカレッジ卒業後，ケンブリッジ大学生理学準教授，ロンドン大学教授，王立協会の会長，トリニティカレッジ学長，国際生理科学連合会長などを務めて来られました。

Huxley 教授から，祖父 Thomas H. Huxley と Huxley 家に関して，系図やエピソードを交えながら，めったに聞くことのできない内容のストーリーを伺うことができました。

（担当：山岸俊一）

13. Synaptic Connections of Expiratory Bulbospinal Neurons: Anatomical and Electrophysiological Approaches

Dr Timothy Webber Ford, Institute of Neurology, London.

（1995年12月13日）

Expiratory bulbospinal neurones from the caudal Ventral Respiratory Group (cVRG) make extensive connections to internal intercostal motoneurones and premotor interneurones in the thor-

acic spinal cord of the cat. In this seminar I will describe the results of some recent experiments, the aims of which were to determine the pattern of synaptic connections made by these neurones with the particular purpose of establishing how these connections change following disruption of their descending axons at the thoracic level.

The first series of experiments used spike-triggered averaging of extracellular field potentials to map the occurrence and distribution of terminal potentials (TPs) and focal synaptic potentials (FSPs) within the thoracic cord. Further evidence for direct synaptic projections to intercostal motoneurones was obtained using cross-correlation analysis of intercostal nerve activity with that of the bulbospinal expiratory neurone. The results of these studies were compared in normal (control) animals, and in those in which a partial section of the left spinal cord had been attempted 2 and 16 weeks prior to the terminal experiment. The intention was thus to determine whether axotomy provokes changes in connectivity above the lesion and, if so, to see whether sprouting of axons occurs in line with that observed in normal animals, or whether a different pattern can be discerned.

The second series of experiments was directed at providing an anatomical framework for the above studies by showing direct morphological evidence of changes in the innervation of the thoracic cord by bulbospinal expiratory neurones. This series can be divided into two complementary studies, both of which are still in their preliminary stages. The first uses the intra-axonal microinjection of an axonal marker such as HRP or Neurobiotin® into identified expiratory bulbospinal axons and allows the trajectories of their axon collaterals and the pattern of their terminal ramifications to be characterized. The second study, and the main purpose of my visit to Japan, uses the PHA-L technique to label the full extent of the axonal projection of bulbospinal expiratory neurones of the cVRG. It is potentially very powerful, in that a number of neurones can be labelled in a single experiment and their axonal trajectories plotted over many segments of the cord. With a combination of careful localization and controlled microinjections into the cVRG, labelling of non-expiratory bulbospinal axons can be minimized. The technique appears ideally suited to the study of anatomical reorganization of axon terminals following axotomy.

Besides discussing the results of the electrophysiological studies in lesioned animals, I hope to show some recent data obtained in normal (unlesioned) animals using intra-axonal labelling of identified expiratory bulbospinal neurones with Neurobiotin® as well as preliminary data from the PHA-L study.

(担当：森　茂美)

14. Breathing and the inferior olive. (work by T.A. Sears, S. Magzoub and C. Seers)

Dr. T.A. Sears, Professor (Institute of Neurology, University of London)

(1996年 3 月 7 日)

It has been proposed by Oscarsson and investigated by several workers that the inferior olive acts as a `comparator', signalling to the cerebellum differences (errors) between signals representing the command for movement from higher centres and signals from the spinal levels comprising peripheral inputs and also ones generated there by the higher commands themselves. The verification of this hypothesis in awake, behaving animals has been hampered by the lack of access to the command signals and indeed, some earlier workers thought that these might even originate in the inferior olive. Thus knowledge about its proposed role as a comparator has only been inferred from the olivary activity evoked under circumstances in which a highly practiced movement has been perturbed by an unexpected change in mechanical load such as to create, for example, a `missed step' or an obstruction to the movement. In the case of locomotory movements these have been extensively automated through lifelong practice and once initiated they proceed essentially without attention until terminated volitionally or because of a perturbation. Similarly, although the performance of discrete finger movements in three dimensional space requires the coordinated activity of many proximal muscles to position the limb, those movements barely intrude into consciousness during their execution, unless specifically attended to. This automation has many of the attributed of eupnoeic breathing, those respiratory movements which occur without `effort' in the awake state but which immediately become the object of close attention when perturbed by an unexpected mechanical disturbance or, for example, in disease simply by a change of posture. Breathing movements have the unique property of continuing in a controlled manner during sleep and anaesthesia (and also after decerebration) so they offer the opportunity of investigating the central command for natural, centrally initiated movements in the olive. We have therefore sought evidence for peripheral and central respiratory related activities in the inferior olive, particularly in relation to movement of the rib cage as much is known about its proprioceptive inputs and their interaction with the central respiratory drive to the respiratory motoneurones, the `respiratory command' I will describe what we believe represents a central mapping of the respiratory movements in the dorsal accessory olive, the relevant region both receiving proprioceptive inputs, which we presume arise from intercostal muscle spindle, and a replica of the central inspiratory and expiratory drives. Further studies are clearly needed to define whether the olive does actually function as a `comparator' but the results thus far seem to indicate that the respiratory system may have distinct advantages for investigating this problem.

(担当：森　茂美)

15. What can electrical impedance tomography tell us about physiological function?

Dr. R. H. Smallwood (Department of Medical physics and Clinical Engineering, University of Sheffield, UK)

(1996年3月18日)

My aim, in this presentation, is to convince listeners that the measurement of electrical impedance changes within the body can provide useful physiological information. The structure and composition of tissue determines its impedance, but there is no adequate model available which allows us to predict the impedance associated with particular structures or physiological events. We have used a simple and widely used model consisting of intra-and extra-cellular impedance (determined essentially by electrolyte composition) and membrane capacitance to model our data. I will demonstrate that this model is too simple to explain some of our measurements.

I will outline the methods that we have used to produce impedance images of the body in two and three dimensions, and explore briefly the advantages and limitations of impedance techniques. I will discuss the additional information provided by measurements over a range of frequencies (the impedance spectrum), and how this can be used to characterize tissue.

We are running two clinical trials on the measurement of lung impedance in adults with left ventricular failure, and in neonates with respiratory distress. I will present some of our very recent results from these trials. In adults, we believe that we can monitor pulmonary oedema, and produce quasi-absolute measurements of the impedance of lung tissue. The neonatal trial is at an earlier stage, and I will present images showing the progressive change in the lungs over the first few hours after birth. As a final example, I will discuss some of the problems associated with measurements in the esophagus and stomach. In particular, I will consider the effect of the ionic composition of the gastric contents, and in particular the pH, on impedance measurements.

In conclusion, I will briefly mention some of the outstanding problems, and how our current programme of research is addressing them.

(担当：桑原厚和)

16. マウスのフェロモン記憶のメカニズム

桃　秀人教授（鹿児島大学農学部獣医学科）

（1996年3月29日）

学習記憶という高次の脳機能が，脳のどこでどういうメカニズムによって担われているのかという問題は，脳科学の重要問題である。ところが，脳の複雑さやアプローチの難しさのため，記憶痕跡を突き止め，その実体を明らかにすることは容易なことではない。そこで，一つの戦略は，できるだけ単純で，しかもシナプスの変化が学習行動と直接対応している系を選ぶことである。このような観点に立って，われわれが学習記憶の研究に用いてきたモデルは，交尾刺激を引き金として雌マウスに形成される雄の匂い（フェロモン）の記憶である。

フェロモン記憶のメカニズム，とりわけシナプス・分子メカニズムの解析が可能になったのは，この記憶の座（副嗅球）が判明したことによる。このシナプス・分子メカニズムに関する知見を紹介したい。

（担当：八木　健）

＜昼食セミナー＞

1．視知覚における充填とその神経機構

小松英彦

（1995年 6 月12日）

視知覚における充填とは，視野の刺激が存在しない場所にあたかもその近辺に存在するのと同じような刺激が知覚される現象のことである。例えば視野の盲点には視覚情報が入力されないのに，周りと同じ色や模様が知覚される。類似の現象は様々な視知覚において見られ，私たちの視覚系が足りない情報を補間する働きを持っていることを示している。サルの大脳皮質の視覚領には盲点に対応する場所が存在する。充填が起こるときにそのような場所において，どのように神経細胞が活動しているかを調べた研究について話す。

2．神経細胞のカルシウム濃度を測る

井本敬二

（1995年 6 月26日）

細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の測定にはいろいろな Ca^{2+}感受性色素が用いられるが，これらの色素は測定に大きな影響を与える。低濃度の Ca^{2+}感受性色素 Fura-2 でも測定が可能な高感度冷却 CCD カメラを用い，ラット大脳皮質錐体細胞の樹状突起における Ca^{2+}代謝を測定した。その結果，単一活動電位にともなう Ca^{2+} transient は，Fura-2 のない状態で amplitude が 200-300nM, time constant が 100ms 以下であと推測された。この結果は，$[Ca^{2+}]_i$ の測定上，Ca^{2+}感受性色素の濃度が測定に大きな影響を与える事を示すとともに，神経細胞樹状突起において，Ca^{2+}は速い情報伝達を担うことを示唆する。

3．２種類の視覚的運動成分に対するマカクザルの知覚および MT 野ニューロンの応答

花澤明俊

（1995年 9 月11日）

動く物を見てその動きの方向がわかるのは，我々の視覚系にそれを検出するためのメカニズムが存在するからである。人間では，それぞれ異なった方略で運動検出を行う２種類のメカニズムの存在が示唆されている。

このような観点から，マカクザルの運動視知覚およびMT野ニューロンの運動方向選択性について調べた。

4．特異的遺伝子の転写活性を指標としたグリア細胞の発生分化機序の解析

馬場広子

（1995年9月25日）

GFAPは中枢神経系ではグリア細胞の一つであるアストロサイトに特異的に発現する蛋白質である。我々はこのGFAP遺伝子の転写活性を指標にして，いろいろな分化段階のアストロサイトの不死化細胞株を樹立した。未分化アストロサイトの細胞株では，不死化に用いた温度感受性SV40T抗原の機能を抑制して分化誘導を行ったときにのみ，GFAPの発現を認めた。今後この未分化アストロサイト細胞株を用いて，機能的スクリーニング法によってGFAP遺伝子を活性化させる調節因子のクローニングを行う予定である。

5．感覚情報処理神経ネットワークにおける電気生理学的研究および数理モデルによる検証

河合房夫

（1995年10月9日）

本セミナーでは，以前から行ってきた視覚情報処理に関する研究，及び現在行っている嗅覚の研究内容とその将来に関して発表する。

網膜の光順応には，視細胞外節における生化学的な機構が関与することが知られている。一方，網膜神経回路には，脱感作といったシナプス順応機構が存在するが，その光順応への影響は明らかではない。

そこで本研究ではこの点に着目し，電気生理学的手法とシミュレーションにより解析した。その結果シナプス伝達機構のダイナミックスが網膜神経細胞の光強度に対する応答レンジをダイナミックスに修飾することを明らかにした。

また現在はイモリ嗅細胞の電位依存性チャネルをパッチクランプ法により解析しており，各チャネルのモデリング，シミュレーションを含めた今後の研究計画についても紹介する。

6．新生仔ラットの心室筋細胞における一過性外向き電流

森島　繁

（1995年10月23日）

哺乳類等の心筋細胞には，脱分極により活性化される K^+ チャネルがいくつか存在することが知られている。そのうちでも，Ito と呼ばれるものは Neuron における I_A と類似しており，Shaker channel とも構造が似ていることがわかっている。しかし，今回の新生仔ラットにおける Ito 類似の電流は，Ito とはいくつかの点で異なっており，最近我々はそれを明らかにしたので，その点を発表する。

7．無脊椎動物の筋弾性蛋白質

川村勇樹

（1995年11月13日）

脊椎動物の connectin/titin は，横紋筋に存在する分子量300万にも及ぶ巨大な筋弾性蛋白質である。これらの筋弾性蛋白質は，横紋筋のサルコメアにおいてZ線とミオシンフィラメントを連結し，ミオシンフィラメントをサルコメアの中央部に位置づけており，同様の機能を果たす巨大蛋白質の存在が，無脊椎動物の横紋筋でも必要であると考えられた。そこで，無脊椎動物の筋肉における筋弾性蛋白質の局在を免疫電顕法により観察した。

8．網膜水平細胞層の時空間機構に関する生理工学的研究

石井宏幸

（1995年11月27日）

Hodgkin-Huxley 型の細胞膜イオン電流モデルを用いて，生理実験により記録した神経細胞の膜電位応答からその神経細胞への入力電流を推定する手法を提案した。その手法を用いて，網膜水平細胞の光応答時における水平細胞間のギャップジャンクションの特性や振舞い，各水平細胞へのシナプス入力を推定し，水平細胞の時空間応答特性の生成機構に関して検討した。

9．大脳基底核と不随意運動

金桶吉起

（1995年12月11日）

大脳基底核の障害で種々の不随意運動が起こることは古くから知られているが，そのメカニズムはいまだに解明されていない。我々は不随意運動患者の定位脳手術時に淡蒼球内節の運動感覚領域同定のためその神経活動を記録し，解析した。パーキンソン病患者の手指振戦及びヘミバリスム患者の不随意運動の筋電図と淡蒼球内節の神経活動には強い相関がみられた。また，淡蒼球内節の感覚運動領域の破壊により，それらの不随意運動を軽減または消失させることができた。これらの結果は，大脳基底核の出力系である淡蒼球内節が直接的にこれらの不随意運動発現に関与していることを示す。（この研究は米国エモリー大学の Dr M. DeLong の研究施設に発表者が所属している時（92/7～95/8）に行われた。）

10．視覚誘導性上肢到達運動ならびに頚の指向運動の中枢神経機構

伊佐　正

（1996年１月29日）

視覚対象物に対して腕を伸ばす，目と頚を向けるといった運動を遂行する際に，中枢神経系は視覚空間における物体の位置情報を多数の筋肉の活動パターンに変換しなくてはならない。今回のセミナーでは，大脳皮質や上丘での運動のベクトルを符号した情報がどのような経路でどのような変換を受けて運動ニューロンに伝えられるかについて論じる。

11．カルシウム透過型 AMPA 受容体をめぐる諸問題について

伊佐　正

（1996年２月19日）

中枢神経系において主に速い興奮性シナプス伝達に関与する AMPA 型受容体は，当初は Ca^{2+} 透過性は低いとされてきたが，一部の細胞においては著明な内向き整流特性を示し，高い Ca^{2+} 透過性を持つ受容体が発現することが明らかになってきた。今回のセミナーでは，この Ca^{2+} 透過型 AMPA 受容体の分布様式，RT-PCR 法によるサブユニット構成の解析，内向き整流特性の発現機構，選択的ブロッカーの作用について報告する。

12. Structure-functional Analysis of an Inward Rectifier K Channel (IRK1).

Ravshan Z. Sabirov

(1996年3月11日)

Pore region of cloned inward rectifying K channel (IRK1) expressed in *Xenopus* oocytes is studied using site-directed mutagenesis and probing with small cationic blockers such as protons, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+} and Cs^{+} ions. It has been shown that a conserved Arg^{148} residue is located between the external binding site for Mg^{2+} and Ca^{2+} and the inner blocking site for Cs^{+} and Ba^{2+} in the IRK1 channel, forming a barrier for cationic blockers and keeping Mg^{2+} and Ca^{2+} out from the electric field of the membrane.

生理学研究所年報　第17巻

発　　行　1996年9月1日

編 集 者　井 本 敬 二

発 行 者　岡崎国立共同研究機構
生 理 学 研 究 所

〒444　岡崎市明大寺町字西郷中38
電話　〈0564〉55-7700
FAX　〈0564〉52-7913