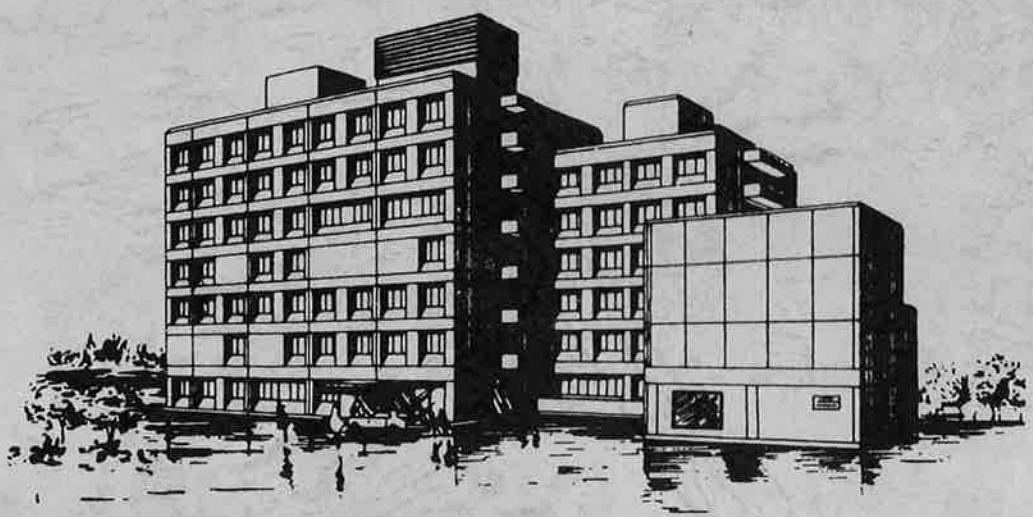
岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 20 巻



1999

主な職員（1998年度）

所　　長　佐々木　和　夫

分子生理研究系

神経化学研究門

教　　授	小　幡　邦　彦
助 教 授	丸　山　　敬（～1998.9.30）
〃	柳　川　右千夫（1998.12.1～）
助　　手	児　島　伸　彦（～1998.8.31）
〃	山　肩　葉　子
外国人研究員	Stork, Oliver
特別協力研究員	Stork, Simone
〃	久　米　秀　明
大学院学生	篠　崎　幸　喜
〃	季　　鳳　雲

細胞内代謝研究部門

客員教授	宮　崎　俊　一
客員助教授	矢　田　俊　彦
助　　手	毛　利　達　磨
特別協力研究員	獄　本　和　久
非常勤研究員	佐　藤　真　則
大学院学生	松　川　　浩

超微小形態生理研究部門

教　　授	永　山　國　昭
助 教 授	村　上　政　隆
〃	村　田　昌　之
客員助教授	Kralchevsky, Peter
助　　手	東　　晃　史
〃	大　橋　正　人
〃	高　橋　卓　也
〃	村　田　和　義（1998.6.1～）
非常勤研究員	佐　野　浩　樹（1998.6.15～）
大学院学生	近　藤　明　子
〃	森　　誠　之
〃	Danev, Radostin
特別共同利用研究員	石　堂　美和子
〃	岩　下　　潤
〃	魚　住　拓　也
〃	小田原　成　優
〃	杉　谷　正　三
〃	広　田　　毅

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
〃	筒　井　泉　雄
非常勤研究員	中　野　春　男（～1999.1.31）

能動輸送研究部門

客員教授	中　西　重　忠
客員助教授	横　田　義　史（1998.12.1～）
助　　手	中　嶋　善　明

機能協関研究部門

教授	岡田泰伸	大学院学生	清水貴浩
助教授	老木成稔（～1998.8.16）	〃	前野恵美
助手	挟間章博	〃	范海天
〃	富永真琴	特別共同利用研究員	森信一郎
〃	森島繁	科学技術振興事業団招聘研究員	Zhou Shi-Sheng
〃	樫原康博	科学技術振興事業団研究員	赤塚結子
非常勤研究員	謝安（～1998.6.30）	〃	三好毅志
〃	山田克幸（1998.8.1～）	〃	金関憲
特別協力研究員	周士勝	客員教授	Andrew James（1998.5.1～7.31）

生体情報研究系

神経情報研究部門

教授	池中一裕	招聘外国人研究員	Menon,Krishna K
助教授	八木健	特別研究員	安田利栄
助手	中平健祐	大学院学生	和田圭樹
〃	鹿川哲史	〃	柴崎貢志
〃	馬場広子（～1998.7.31）	〃	熊田竜郎（1998.6.1～1998.9.30）
〃	南木浩二（～1999.1.15）	〃	柴田理一（1998.6.1～）
〃	岩崎靖乃（1998.9.1～）	特別共同利用研究員	佐々木学
非常勤研究員	米増知子（～1998.6.30）	〃	大竹洋介
〃	Ivanova, Anna	〃	平原幸恵（～1998.4.15）

液性情報研究部門

教授	井本敬二	大学院学生	松下かおり
助教授	森泰生	〃	岡田峯陽
助手	中井淳一	特別共同利用研究員	山田久信
〃	若森実	〃	松本信幸
リサーチ・アソシエイト	山崎由紀子	〃	木下英司
〃	松山善次郎	外国人研究員	Joahim Grammer
日本学術振興会特別研究員	宍戸恵美子		

高次神経機構研究部門

客員教授	三品昌美	大学院学生	先崎浩次
客員助教授	千坂修	受託研究員	谷口雅彦
助手	藤本一朗	〃	須藤文和
非常勤研究員	安田昌弘（～1998.9.30）	〃	杉野英彦
〃	濱田香世子（1998.5.11～）	〃	濱田俊
〃	竹井豊（1998.10.1～）	特別共同利用研究員	牧野初音
大学院学生	武藤哲司	受託技術員	三寶千秋

情報記憶研究部門

助手　河合房夫

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

教授	小松英彦
助教授	伊藤南
助手	花澤明俊
〃	小川正
ﾘｻｰﾁ・ｱｿｼｴｲﾄ	木下正治
大学院学生	杉原弘記
〃	近藤秀樹
特別協力研究員	Shenoy,Krishna V
大学院学生	谷利樹

高次液性調節研究部門

客員教授	宮下保司
客員助教授	櫻井芳雄（～1999.9.30）
助手	納家勇治
特別協力研究員	吉田正俊
〃	柴田愁子
特別共同利用研究員	伊原毅

生体システム研究部門

教授	森茂美
助教授	松山清治
客員助教授	Skup Malgorzata（1998.9.18～12.18）
〃	Nikolai Gantchev（1999.1.8～5.9）
助手	宮下英三
〃	中陳克己
〃	森大志
非常勤研究員	Dobolyi, Arpad（1998.10.19～）
特別協力研究員	伊藤壽一
特別共同利用研究員	久世文也
大学院学生	奥村哲
受託研究員	長谷川瑞江

大脳皮質機能研究系

脳形態解析研究部門

教授	重本隆一（1998.12.1～）
助手	木下彩栄（1999.2.1～）

大脳神経回路論研究部門

教授　川口泰雄（1999.1.1～）

心理生理学研究部門

教授　定藤規弘（1999.1.1～）

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト

教　授	伊佐　正
助　手	斎藤康彦
〃	小林　康（1998.6.1～）
大学院学生	遠藤利朗

自律機能研究プロジェクト

客員教授	橋本　勲
助　手	佐久間研司

感覚・運動機能研究プロジェクト

教　授	柿木隆介
助教授	金桶吉起
助　手	小山幸子
〃	寶珠山稔
〃	中大輔
非常勤研究員	大岩昌子（1998.8.16～）
〃	山崎浩（1998.5.11～）
〃	大草知裕（～1998.4.24）
外国人研究員	Arendt,Nielsen,Lars（～1998.4.24）
〃	Taylor,Margot Jane（～1998.4.21）
外国人研究員	Wang, Yuping（1998.4.28～8.31）
大学院学生	下条素子
〃	渡邉昌子
〃	向敬
〃	Lam Khanh
〃	軍司敦子
特別共同利用研究員	前田多章
〃	糸見和也（1998.9.1～）
特別協力研究員	川上治

脳機能計測センター

形態情報解析室

助教授	有井達夫
助　手	古家園子

機能情報解析室

助　手	今野卓

生体情報処理室

助　手	石井宏幸

動物実験施設

助教授	尾崎毅
特別協力研究員	Wang,You－xue
〃	魏睦新

技術課

課　長	大庭明生

研究系技術班

分子生理研究系技術係

係　長	大河原浩
技　官	高木正浩
〃	神原叙子
〃	吉友美樹

細胞器官研究系技術班

係　長	小原正裕
技　官	佐藤茂基
〃	神谷絵美
〃	山本友美

生体情報研究系技術係

技	官	水谷（秋田）裕美
〃		斎藤久美子
〃		関口直美
〃		三寳誠

生体調節研究系技術係

係	長	伊藤昭光
技	官	戸川森雄
〃		森将浩
〃		高須千慈子
〃		高橋直樹

大脳皮質機能研究系技術室

主	任	伊藤嘉邦
技	官	葛目博子

研究施設技術班

班	長	市川修

統合生理技術係

主	任	永田治
技	官	竹島康行
〃		鈴木千香

脳機能計測技術係

主	任	山口登
技	官	吉村伸明
〃		村田安永

動物実験技術係

主	任	佐治俊幸
技	官	小木曽昇
〃		廣江猛

電子顕微鏡技術係

係	長	前橋寛

工作技術係

係	長	加藤勝己

研究支援推進員	村瀬伸江
〃	伊藤磯子
〃	深津恵子
〃	成瀬雅子
〃	土屋勝代
〃	山本淳子
〃	朝倉幸孜
〃	福田阿由子

1998年度　生理学研究所年報

目　　次

はじめに

主な職員（1998年度）

研究活動報告

分子生理研究系 …… 12
細胞器官研究系 …… 21
生体情報研究系 …… 30
生体調節研究系 …… 41
統合生理研究施設 …… 50
脳機能計測センター …… 64
動物実験施設 …… 70
技術課 …… 73

研究発表

発表論文 …… 90
学会発表 …… 126

一般共同研究報告 …… 163

計画共同研究報告 …… 192

磁気共鳴装置共同利用実験報告 …… 202

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告 …… 222

生体磁気計測装置共同利用実験報告 …… 246

研究会報告 …… 257

国際シンポジウム

COE 国際シンポジウム …… 513

セミナー報告

生理研セミナー …… 523
昼食セミナー …… 549

【研究活動報告】

分子生理研究系

神経化学研究部門 …… 12

概　要

GABA 合成酵素 GAD の役割

（小幡邦彦，Oliver Stork，季　鳳雲）

アルツハイマー病の分子生物学

（丸山　敬，篠崎幸喜，魚住拓也）

神経特異的遺伝子 norbin，kw 8 の解析

（丸山　敬，篠崎幸喜，久米秀明）

キンドリング動物における誘導型 CRE 転写調節因子 ICER の発現変化

（児島伸彦，小幡邦彦）

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

（山肩葉子，小幡邦彦）

超微小形態生理研究部門 …… 14

概　要

複素電子顕微鏡の開発

（Radostin Danev，杉谷正三，村田和義，永山國昭）

電子顕微鏡による骨格筋Ｌ型カルシウムチャネルの単分子構造解析

（村田和義，小田原成優，永山國昭，中山　仁，國安明彦）

細胞極性形成・維持と細胞内オルガネラのトポバイオジェネシス

（村田昌之，加納ふみ，永山國昭）

エンドサイトーシス後期過程の体細胞遺伝学的解析

（大橋正人，石堂美和子，永山國昭，山本章嗣）

溶媒環境と蛋白質１分子の安定性，機能および構造形成問題

（高橋卓也，永山國昭）

潅流ラット耳下腺のアミラーゼ分泌と水輸送

（村上政隆，大河原浩，高木正浩，前橋　寛，吉村啓一，瀬川彰久，Felice Loffredo,Alessandro Riva）

細胞内代謝研究部門 …… 18

概　要

精子細胞質因子の卵細胞内Ca^{2+}動員機序

（毛利達磨，尾田正二，宮崎俊一）

精子の卵細胞内注入によるCa^{2+}増加反応の時・空間的解析

（佐藤真則，吉友美樹，毛利達磨，宮崎俊一）
膵β細胞Ca^{2+}オシレーションのチロシンキナーゼ受容体ホルモンによる抑制
（松川　浩，橋口鈴子，矢田俊彦）
食欲中枢弓状核neuropeptide Y神経のグルコース感受性とレプチンによる抑制
（矢田俊彦，室屋真二，浦村一秀，塩田清二）

細胞器官研究系

生体膜研究部門 …… 21
概　要
アルコールで破壊して見えるＮａチャネルの階層構造
（久木田文夫）
神経細胞に発現するCl^-チャネルとその遺伝子クローニングの試み
（山岸俊一，神谷絵美，筒井泉雄，古家喜四夫，榎本浩一）
細胞内Ca^{2+}貯蔵部位の進化的役割
（筒井泉雄）
乳腺筋上皮細胞においてオキシトシン受容体とＡＴＰ受容体により活性化される細胞内シグナリング
（中野春男，山岸俊一，古家喜四夫）
機能協関研究部門 …… 23
概　要
細胞容積調節メカニズムと容積感受性クロライドチャネル
（岡田泰伸，老木成稔，挾間章博，森島　繁）
スルホニル尿素剤グリベンクラミドによる容積感受性クロライドチャネルの抑制メカニズム
（劉　艶，清水貴浩，老木成稔，津村剛彦，岡田泰伸）
新しく開発したバイオセンサー法による単一β細胞からのインスリン分泌時のＡＴＰ放出の検出
（挾間章博，林　誠治，岡田泰伸）
モルモット小腸パネト細胞のＣＦＴＲ分子発現を伴わないＣＦＴＲ型クロライドチャネル機能発現
（津村剛彦，上田俊二，三好毅志，挾間章博，岡田泰伸）
肝線維化に関する活性化肝星細胞におけるNa^+／Ca^{2+}交換トランスポータの強発現

（中村敏夫，有井滋樹，富永真琴，岡田泰伸）
能動輸送研究部門 …… 28
概　要

生体情報研究系

神経情報研究部門 …… 30
概　要
小脳顆粒細胞の成熟
（中平健祐，柴田理一，柴崎貢志，池中一裕）
ヒトグリオーマの遺伝子治療に用いるための特異的かつ強力なプロモーターの開発～SAGE（Serial Analysis of Gene Expression）法を用いたアプローチ～
（佐々木学，中平健祐，池中一裕）
視神経軸索におけるカリウムチャネルの局在化の発達段階における変化
（池中一裕，馬場広子，秋田裕美）
glial cells missing（gcm）遺伝子のマウスホモログの解析
（岩崎靖乃，池中一裕）
グリア細胞の発生機序の解明
（熊田竜郎，馬場広子，中平英子，岩崎靖乃，池中一裕）
レトロウイルスを用いた細胞系譜解析および遺伝子治療
（南木浩二，河野真子，岩崎靖乃，池中一裕）
中枢神経系ミエリン形成細胞オリゴデンドロサイトの発生分化の機序
（Anna Iva nova，和田圭樹，鹿川哲史，池中一裕）
自動化糖鎖解析システムを用いた特異的糖鎖の研究
（大竹洋介，藤本一朗，Kris hha Kumar Menon，田中文啓，伊藤磯子
池中一裕）
液性情報研究部門 …… 34
概　要
レセプター活性型カルシウムチャネルの同定と機能解析
（森　泰生，岡田峯陽）
電位依存性カルシウムチャネルの分子的機能解析
（若森　実，森　泰生）
電位依存性カルシウムチャネルの異常により起こる神経変性疾患の病態解明

（若森　実，森　泰生，松山善次郎，井本敬二）
興奮収縮連関の分子機構
（中井淳一）
電位依存性L型カルシウムチャネルの単一チャネルコンダクタンスの決定部位
（中井淳一）
高次神経機構研究部門 …… 36
概　要
Ｆｙｎ欠損マウスの哺乳行動異常の解析
（浜田香世子，三寶千秋，八木　健）
ＮＭＤＡ受容体（ＮＲ２Ｂ）のチロシンリン酸化による行動制御機構の解析
（浜田香世子，八木　健）
Ｆｙｎ・ＮＭＤＡ受容体の二重遺伝子欠損マウスでの子殺し行動異常の解析
（浜田香世子，三寶千秋，八木　健）
Ｆｙｎ結合新規カドヘリン（ＣＮＲ）ファミリーの脳形成過程での機能解析
（先崎浩次，八木　健）
ＣＮＲファミリーのシナプス膜局在化の分子メカニズムの解析
（武藤哲二，八木　健）
マウスにおける新たなＣＮＲファミリーの単離と分子機能の解析
（竹井　豊，八木　健）
ＣＮＲファミリーのマウス脳形成過程での発現様式の解析
（牧野初音，八木　健）
ＣＮＲファミリーのゲノミックＤＮＡ構造の解析
（杉野英彦，浜田　俊，八木　健）
コンディショナルターゲティング法の開発
（三寶　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，森　　寿，八木　健，三品昌美）

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門 …… 41
概　要
大脳皮質Ｖ４野における三次元テクスチャの表現
（花沢明俊，小松英彦）

視覚一次元における面の明るさの表現
（木下正治，小松英彦）
ＭＳＴ野における運動刺激による面の傾きの表現
（杉原弘記，小松英彦）
メタコントラスト条件下でのＶ４野ニューロン活動
（近藤秀樹，小松英彦）
生体システム研究部門 …… 43
概　要
歩行リズム生成・制御に関わる網様体－脊髄神経機構の作動様式と構築様式
（松山清治，森　大志，森　茂美）
サル皮質－網様体路系の構築様式
（松山清治，森　大志，高須千慈子，森　茂美，小川　尚，伊藤真一
井福裕俊）
障害物を置いたトレッドミル上の歩行時におけるサル直立二足歩行運動の特徴
（森　大志，Nikolai Gantchev，松山清治，高須千慈子，森　将浩，森
茂美）
サル視覚誘導性上肢到達運動における脳内情報処理機構
（宮下英三）
HISTOLOGICAL ANALYSIS OF SEROTONERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEMS IN THE DEVELOP INS SPINAL CORD
（Arpad Dobolyi,Tetsu Okumura,Kiyoji Matsuyama,Futoshi Mori and Shigemi Mori）
外側前庭神経核由来の単一前庭脊髄路軸索の頚・胸・腰髄レベルにおける髄節特異的支配様式の解析
（久世文也，松山清治，松井利浩，森　茂美）
ネコ新線条体におけるコリン作動性神経細胞とセロトニン含有線維の分布様式の比較
（奥村 哲，Arpad Dobolyi，森 将浩，松山清治，森 茂美）
高次液性調節研究部門 …… 47
概要
対連合記憶課題遂行中の霊長類側頭葉皮質での単一ニューロン記録：ＴＥ野，36野間の比較
（納家勇治，吉田正俊，伊原　毅，櫻井芳雄，伊藤昭光，柴田愁子，宮下保司）
機能的磁気共鳴画像法によるヒト大脳前頭葉機構の解析

（宮下保司，小西清貴，納家勇治，吉田正俊）
長期記憶想起の基礎となる前頭葉―側頭葉間相互作用の研究
（宮下保司，長谷川 功，納家勇治，吉田正俊）

統合生理研究施設

感覚・運動機能研究プロジェクト …… 50
概　要
体性感覚誘発脳磁図に対する視覚及び聴覚刺激の影響
（Lam Khanh，中　大輔，柿木隆介）
体性感覚誘発脳電位（ＳＥＰ）を用いた運動・感覚連関
（宝珠山稔，柿木隆介）
第２次体性感覚野の体部位局在的再現
（前田多章，柿木隆介）
脳磁図・脳波による痛覚認知に対する注意の効果についての研究
（山崎　浩，柿木隆介，渡辺昌子，宝珠山稔，中 大輔）
仮現運動知覚程度と脳磁場反応
（川上 治，金桶吉起，関口貴裕，山崎 浩，柿木隆介）
脳磁図を用いた顔認知機構の研究
（渡辺昌子，小山紗智子，柿木隆介）
脳磁図（ＭＥＧ）を用いたヒト大脳視覚連合野の神経生理学的研究
（大草知裕，金桶吉起，柿木隆介）
睡眠中の聴覚誘発脳磁図の変化
（中　大輔，柿木隆介）
視覚的単語認知に伴う左側頭葉の活動：繰り返し効果の検討
（関口貴裕，小山紗智子，柿木隆介）
微小磁界計測装置による末梢神経活動磁界の計測
（宝珠山稔，柿木隆介）
随意運動と経頭蓋的大脳磁気刺激による誘発反応
（宝珠山稔，柿木隆介）
高次脳機能研究プロジェクト …… 57
概　要
上丘中間層局所神経回路の非線形的活性化機構について
（斎藤康彦，遠藤利朗，伊佐　正）

視覚誘導性サッカード課題遂行時のサル脚橋被蓋核の単一ニューロン活動記録
（小林　康，相澤　寛，山本　優，伊佐　正）
上丘浅層における$GABA_B$受容体の作用について
（遠藤利朗，伊佐　正）
自律機能研究プロジェクト …… 59
概　要
ＳＥＦ20m信号源は3b野を外方に移動する
（橋本　勲，木村友昭，佐久間研司，井口義信，斉藤泰彦，福島達臣）
Air-puff閾値刺激によるSEP_Sは閾上・閾下知覚を反映する
（橋本　勲，吉川一義，木村友昭）
多点Air-puff閾値刺激による感覚Funnelingの神経メカニズム
（橋本　勲，吉川一義，木村友昭）
ヒト１次体性感覚野における周波数再現の再評価
（橋本　勲，斉藤泰彦，井口義信，木村友昭，福島達臣，佐久間研司）
ヒト１次体性感覚野における遠位－近位体部位局在の再評価
（橋本　勲，井口義信，斉藤泰彦，木村友昭，福島達臣，佐久間研司）
高周波振動は体性感覚皮質すべてに共通する活動である
（橋本　勲，佐久間研司，中野修治）
注意・干渉による高周波振動のモジュレーション
（橋本　勲，井口義信，寺崎太洋，佐久間研司，木村友昭，斉藤泰彦，
福島達臣）
電位および磁界計測による計算作業中の脳活動の検討
（井口義信，橋本　勲）
脳磁場計測によるアルファ波回転現象の検証
（寺崎太洋，井口義信，橋本　勲）

脳機能計測センター

形態情報解析室 …… 64
概　要
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
（有井達夫）
ET_B受容体一部欠損ラットにおける小腸絨毛上皮下線維芽細胞とアストロサイトの形態変化

（古家園子，尾崎　毅，古家喜四夫）
機能情報解析室 …… 67
概　要
アミロイド凝集を含む蛋白質凝集体形成機構の総合的解析
（今野　卓，永山國昭）
アルコール溶液中における蛋白質鎖の構造解析
（今野　卓，岩下　潤，鎌足雄司，永山國昭）
カルパイン・カルパスタチン系の溶液構造・物性解析
（今野　卓，鎌足雄司，牧　正敏）
X線溶液散乱法を用いた非天然状態蛋白質鎖の構造解析
（今野　卓，田中直毅，橘　秀樹，上久保裕生，片岡幹雄）
生体情報処理室 …… 69
概　要

動物実験施設 …… 70

概　要
脳研究におけるモデル動物開発の試み
（山崎由紀子）

技術課 …… 73

概　要
（大庭明生）
施設の運営状況
1．統合生理研究施設
（1）生体磁気計測装置室
（永田　治，竹島康行）
2．脳機能計測ｾﾝﾀｰ
（1）形態情報解析室
（山口　登，伊藤嘉邦）
（2）機能情報解析室
（市川　修）

（３）生体情報処理室

（吉村仲明，村田安永）

３．動物実験施設

（１）陸生動物室

（２）水生動物室

（３）伊根実験室

（佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛）

４．共通施設

（１）電子顕微鏡室

（前橋　寛）

（２）機器研究試作室

（加藤勝己）

（３）低温・冷凍実験室

（大庭明生）

分子生理研究系

神経化学研究部門

【概要】

神経化学研究部門は脳の構築と機能を物質レベルで総合的に理解することをめざしている。本年度は以下に述べるように，抑制性神経伝達物質GABA，アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリン，神経活動で誘導される特異的遺伝子，タンパク質リン酸化酵素の発現，動態，脳内分布とそれにともなう脳機能変化について研究した。本年度後半から以下の異動があった。丸山　敬助教授が東京都精神医学研究所に転出した。後任に柳川右千夫が東北大学加齢医学研究所より着任した。児島伸彦助手が理化学研究所脳科学研究センターへ転出した。後任として兼子幸一が東京医科歯科大学医学部より転入の予定である。総合研究大学院生の篠崎幸喜，季　鳳雲が本年度をもって課程を終了し，学位を授与された。

GABA合成酵素GADの役割

小幡邦彦，Oliver Stork，季　鳳雲

グルタミン酸脱炭酸酵素GADにはGAD65とGAD67の２型があり，役割分担は不明である。またGABAには神経伝達作用のほかに，神経分化・栄養作用があるが，生体内での神経発生への関与は不明である。これらの問題を明らかにするため，GAD65およびGAD67の遺伝子ノックアウトマウスを作成した。本年度はつぎのことがわかった。１）両マウスの交配により GADの完全欠損マウスを作成した。GABAはほぼ完全に消失したが，脳の組織形成に異常はなかった。２）GAD67ノックアウトマウスは生存できないので，死亡前の海馬，小脳をスライス培養した。GAD65が増加してGABAを合成した。３）GAD65ノックアウトマウスは成熟にともなうGABAの増加が起こらず，不安・恐怖を示す情動行動がみられた。すなわち，両 GADアイソフォームはGABA合成と脳機能に必須であるが，GABA欠損は神経発生を障害しない。

アルツハイマー病の分子生物学

丸山　敬，篠崎幸喜，魚住拓也

アルツハイマー病の原因遺伝子として特定されたプレセニリン（ＰＳ）の機能を検討するため，two-hybrid法によって結合蛋白質を検索，ＰＳのループ領域とμカルパインのＣ末側が結合することを見いだした。本年度は，カルパイン活性に及ぼすＰＳ効果やカルパインによるＰＳのプロセシングを検討した。ＣＯＳ細胞でカルパインを過剰発現して，カゼインの分解を指標に，その蛋白質分解活性測定したところ，カルパイン活性が抑制される傾向が見られた。ＰＳ結合タンパク質として，βカテニンが報告され，最近では新規のカルシウム結合性タンパク質calsenilinが見いだされ，カルシウム制御機構とＰＳの関係が示唆されている。カルパインも細胞内の重要なカルシウム受容タンパク質であり，本研究の結果から，ＰＳの生理機能やアミロイド形成に関する分子機構の解明への寄与が期待される。

神経特異的遺伝子norbin，kw8の解析

丸山　敬，篠崎幸喜，久米秀明

ラットスライスをtetraethylammonium処理による長期増強状態で発現が誘導される新規の神経特異的遺伝子norbin，ならびに，basic helix-loop-helix転写因子kw8の機能の解明を目指している。

norbinのノックアウトマウスの作成を目指している。ゲノムクローンを得て，ノックアウト用のコンストラクトを作成した。現在，相同組換えＥＳ細胞をスクリーニング中である。免疫組織的観察により，norbinは中枢神経のみならず，末梢神経のneuronでも発現していることが明らかになった。kw8はリン酸化修飾されており，その転写活性との関連を検討中である。神経の可塑性は，新しい神経回路の形成という観点から，成体になってからの再分化ともいえ，両者に共通の遺伝子が関与していることが考えられる。norbinもkw8も発生の極初期から発現しており，この候補遺伝子として機能の解明を目指したい。

キンドリング動物における誘導型CRE転写調節因子ICERの発現変化

児島仲彦，小幡邦彦

キンドリングはけいれんを引き起こさない程度の電気刺激を脳の特定部位に連日与えることで発展してくるてんかん様けいれん発作であり，長期記憶獲得の基盤となる神経可塑性変化の実験モデルである。キンドリングけいれん準備性は生涯にわたって保持され，その獲得は新たなタンパク質合成に依存している。われわれはキンドリングけいれん準備性の分子メカニズムを解明する目的で，キンドリング刺激後の脳における遺伝子発現変化を調べている。その過程でICER (inducible cAMP early reppressor) とよばれるCRE転写調節因子の発現がキンドリングけいれん後一過性に増加することを見い出した。ICERは一般に負の転写調節因子としてはたらくと考えられており，キンドリングけいれん準備性の獲得に必要な遺伝子の発現制御に重要な役割を持つ可能性がある。

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

山肩葉子，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 (CaMKII) は，中枢神経系に豊富に存在する多機能型のプロテインキナーゼで，神経活動の制御やシナプス可塑性に深く関わると考えられている。我々はこれまでに，生体内における神経活動と CaMKII の活性状態との関連を明らかにしてきた。本研究においては，αCaMKII 遺伝子を不活性型に変異させたマウスの作製を試み，その解析によって，生体内における CaMKII の果たす役割について新たな知見の獲得をめざしている。本年度はまず，ES 細胞が由来する TT2 細胞株の遺伝子 DNA ライブラリーから，マウス αCaMKII 遺伝子断片のスクリーニングを行い，目的とする exon 2 を含む遺伝子断片を獲得し，その詳細な制限酵素地図を作製した。今後これらの情報を元に，ターゲッティングベクターの作製に取りかかる予定である。

超微小形態生理研究部門

【概要】

「構造と機能」という分子生物学のパラダイムは生物の機能が生体高分子，特に蛋白質の独自

の構造によって支えられていることを明かにして来た。一方細胞より上の階層では組織，器官を見ると構造が機能と直結しているのはむしろ自明である。しかし生体高分子と組織・器官の中間に位置する細胞にはそのレベル独自の「構造と機能」が明確でない。細胞は一見オルガネラと各種小胞のランダムな集まりのように見える。しかし私達はこれら微小器官の集積の背後に，実は明確に細胞構造を規定する実体があると考える。特に細胞骨格構造を通して見た「細胞の形と働き」に興味がある。それは細胞の色々な現象の背後には活動維持や，形態維持のための骨格系による巧妙な情報と物質の輸送機構があると考えるからである。この細胞骨格による物質，情報の非拡散輸送の結果としてオルガネラ編成と骨格系自体の編成が行われ，さらに情報伝達経路が確定すると考える。こうした方針のもとに行われた具体的報告を以下に記す。

複素電子顕微鏡の開発

Radostin Danev，杉谷正三，村田和義，永山國昭

従来の顕微鏡の限界を破る新しい原理として，量子現象の波動関数を直接観察する複素観測法を見出した。この方法を電子顕微鏡の分解能とコントラスト向上に応用するため，平成9，10年度に導入した分析型極低温電子顕微鏡の一部改良を行った。複素観測は同一試料に対し，2回もしくは3回の測定を行い，波動関数の振幅と位相を複素数として再生するもので，従来の確率（波動関数の2乗）観測に比べ，情報量が2倍に拡大する。今年度は方法論の正しさを見るシミュレーションと各種デバイス作成のための基礎的研究を行った。

電子顕微鏡による骨格筋L型カルシウムチャネルの単分子構造解析

村田和義，小田原成優，永山國昭，
中山　仁，國安明彦（熊本大）

骨格筋L型カルシウムチャネルは筋細胞のT管膜にあり，神経からの興奮を受け取って筋小胞体にあるリアノジン受容体からのカルシウムの放出を促す。我々は，骨格筋L型カルシウムチャネルの構造および各サブユニットの配置を調べるために，ウサギ骨格筋から精製，可溶化した分散の良いL型カルシウムチャネルの全複合体と α 1- β 複合体のネガティブ染色像を電子顕微鏡で撮影し，個々の粒子を分類，平均化して分解能約25Aの平均分子像を得た。また，この膜タンパク質の膜内配向を調べるために，α 1 サブユニットの細胞外側に結合するモノクロナール抗体を反応させて，同様にネガティブ染色像を撮影した。その結果，骨格筋L型カルシウムチャネルは，

その一次構造から推定されるようにα1-βサブユニットが4つのドメインでチャネルのポア領域を形成し，それ以外のα2，γ，δサブユニットが主にその上下および直径約6nmの分子より突出したドメインを形成すると推定できた。またこの特徴的な6nmの突起は細胞外側に位置していることがわかった。

細胞極性形成・維持と細胞内オルガネラのトポバイオジェネシス

村田昌之，加納ふみ，永山國昭

上皮細胞やニューロンなどの極性細胞の形態形成や分化過程を，核一中心体一ゴルジ体などの細胞内オルガネラが作る極性軸の形成過程として捉えている。この軸の形成・維持に関わるオルガネラの生成，消滅の「位置（topo)」と「時間（temporal)」を決定する細胞内因子や，その維持のための蛋白質・脂質の細胞内（選別）輸送を，部分的に形質膜を透過性にした培養細胞（セミインタクト細胞）を用いて生化学的に探索し，極性形成・維持の分子メカニズムを単一細胞の「発生学」として明らかにすることを目的としている。今年度は，(1) 緑色蛍光蛋白質（Green fluorescence protein: GFP）技術を駆使し，細胞内オルガネラ（ゴルジ体，中心体，核，輸送小胞等）や細胞骨格系（微小管，アクチンフィラメント）を可視化することに成功した。(2) GFP標識されたオルガネラ（ゴルジ体，輸送小胞）の細胞内動態を，セミインタクトMDCK, CHO細胞内で再構成した。その動態を，共焦点レーザー顕微鏡，超高感度ビデオ付き蛍光顕微鏡を用い定量的に解析し，それに関わる因子探索のための「一細胞計測システム」を確立した。具体的には，細胞分裂時のゴルジ体の小胞化，再構築過程や小胞体 ↔ ゴルジ体間の蛋白質輸送過程を再構成し，キナーゼ（cdc2やMEK）やその他の細胞質因子（NSF等），微小管の関与などを明らかにした。

エンドサイトーシス後期過程の体細胞遺伝学的解析

大橋正人，石堂美和子，永山國昭
山本章嗣（関西医大）

エンドサイトーシス経路は，さまざまな生理現象の基礎となっている膜動輸送系である。我々は，フローサイトメトリーにより表現型を解析し，この経路の変異株を分離する方法を開発し，体細胞遺伝学的アプローチを加えている。変異株の分取過程を数理的にシミュレートすることで条件を最適化して，それにしたがって変異株の分離を進め，後期エンドソーム過程に変異を持つ

表現型の異なる複数のCHO株を得た。そして，薬剤耐性選択遺伝子を利用したハイブリッド細胞選択法を新たに工夫して，フローサイトメトリーにより優性試験および相補性試験を行った。その結果，これらの変異株は，すべて劣性の変異を持ち，複数の相補群に分類されることがわかった。異なる相補群に属する変異細胞は，異なる膜動過程に障害を持っていた。これらの結果は，後期エンドソーム過程が，複数の相補群遺伝子によって規定される他段階の膜動過程によって進行することを示唆した。

溶媒環境と蛋白質1分子の安定性，機能および構造形成問題

高橋卓也，永山國昭

生体高分子の安定性は溶媒組成を変化することにより，その安定性を変化させることが可能であるが，その物理化学的説明はいまだ不十分であり，定量的な説明はほとんど行われていない。そこでアミノ酸移相自由エネルギーを各種溶媒に対して測定し，あわせて蛋白質の熱，変性剤等に対する安定性を測定する。それらを基にして安定性を予測できる理論及び計算手法を開発する。これを敷衍することにより膜チャンネル蛋白質の機能メカニズムなど生理機能の調節機構を理解する。

現在，安定化溶媒である重水等の効果を溶解度実験，統計力学的理論及び分子動力学シミュレーションで研究している。また蛋白質の構造形性原理や各種溶媒環境における誘電応答などの物性を明らかにしている。

潅流ラット耳下腺のアミラーゼ分泌と水輸送

村上政隆，大河原浩，高木正浩，前橋　寛
吉村啓一（北大歯・口腔生理）瀬川彰久（北里大医・解剖）
Felice Loffredo，Alessandro Riva（カリアリ大・解剖）

水輸送と開口分泌の関係を明らかにするため，摘出血管潅流ラット耳下腺を用い，アミラーゼ分泌と水分分泌速度を同時測定した。イソプロテレノール(Isp)1 μM単独では，水分分泌は殆ど誘発されず，唾液が採取されず，アミラーゼ分泌の測定が不可能であった。一方，カルバコール(CCh)1 μM単独投与で，アミラーゼ分泌速度は急速に上昇30秒でピークの後急速に低下，1.5分～2分でプラトーとなりピークの1/10程度で持続した。水分泌速度は2-3分で40-120 μl/g-minの最大値をとりその後プラトーを維持した。CCh刺激開始5分にIspを潅流液に重畳するとアミラーゼ

分泌は急速に上昇し，1-2分で最大値となりその後プラトーレベルを保った。水分分泌はIsp重量による影響は観察されなかったが酸素消費増加が測定された。本実験により，CCh/Isop刺激系で水分泌と開口分泌が独立に制御されることが示唆された。高分解SEMとTEMによる形態観察ではIsop単独で開口分泌像を観察したがCCh単独では開口分泌像は稀であった。CCh/Isop同時投与では細胞間分泌細管に沿って開口分泌と空胞が出現した。

細胞内代謝研究部門

【概要】

細胞内代謝部門では，生物活性物質や細胞－細胞間刺激に対する細胞の刺激受容機構，細胞内情報伝達機構，細胞機能発現機構を対象とし，特に細胞内カルシウムイオン（Ca^{2+}）の動態を画像解析装置でとらえ詳細に解析して，これらのメカニズムの解明を目指している。毛利と宮崎は尾田正二（東京女子医大）とともに，卵内注入によって反復性のCa^{2+}増加反応（Ca^{2+}オシレーション）を誘発する精子抽出物の作用機序を解析した。また佐藤真則（非常勤研究員），吉友，宮崎はマウス精子の卵内注入後のCa^{2+}オシレーションの時・空間的画像解析を行った。矢田は松川浩，橋口鈴子（鹿児島大）とともに，膵β細胞Ca^{2+}オシレーションがレプチン（脂肪ホルモン）・インスリン・インスリン様成長因子１（IGF-1）により抑制されることを見いだしその機序を解析した。さらに矢田は，室屋真二（鹿児島大），浦村一秀（鹿児島大），塩田清二（昭和大）とともに，食欲中枢の一つである視床下部弓状核について，単一ニューロンのグルコース感受性やホルモン応答性を含有伝達物質と関係づけて解析した。

共同研究については，宮崎は生殖細胞の活性化機構に関する研究グループを編成し共同実験を行った。また，河原克雅（北里大医学部生理学教授）と核内Ca^{2+}調節機構と遺伝子発現について実験を行った。矢田は塩田清二（昭和大医学部教授）と細胞傷害抑制因子としてのPACAPとシグナル伝達に関する共同実験を行った。また飯野正光（東京大医学部教授）を代表者として「細胞機構制御とカルシウムシグナル」，松沢祐次（大阪大医学部教授）を代表者として「インスリン分泌と糖・脂質代謝の組織間クロストークによる制御」と題する研究会を開催した。

精子細胞質因子の卵細胞内Ca^{2+}動員機序

毛利達磨，尾田正二（東京女子医大），宮崎俊一

動物種に普遍的に，受精時には卵細胞内Ca^{2+}増加反応がおこり，卵活性化の引き金になる。哺乳動物卵ではCa^{2+}オシレーションがおこるが，精子抽出物の卵内注入によっても同様のCa^{2+}

オシレーションが誘発されることから，受精時に精子細胞質因子が卵細胞内に移行し，Ca^{2+}増加反応を誘発すると考えられる。我々は既にCa^{2+}増加反応はイノシトール3リン酸レセプター（IP_3R）を介する小胞体からのCa^{2+}遊離によることを明らかにしている。今回の研究では，精子因子が細胞外からのCa^{2+}流入をおこす作用を有するかどうかを解析した。マウス卵にCa^{2+}結合性蛍光色素Fura-2を予め注入し，細胞外液にMn^{2+}を添加したのち精子抽出物を注入し，Ca^{2+}流入系を介して流入したMn^{2+}によるFura-2の蛍光の減少（quenching）を測定した。精子抽出物の注入により誘発されるCa^{2+}遊離の直後に著明なMn^{2+}流入がおこり，Ca^{2+}遊離にカップルしたCa^{2+}流入（capacitative Ca^{2+} entry あるいはstore-operated Ca^{2+} influx）が観察された。さらにIP_3R抗体を予め注入してCa^{2+}遊離をブロックしておくと，精子因子が上記以外のCa^{2+}流入系を活性化することが明らかにされた。

精子の卵細胞内注入によるCa^{2+}増加反応の時・空間的解析

佐藤真則，吉友美樹，毛利達磨，宮崎俊一

近年，精子の卵細胞内注入（Intracytoplsmic Sperm Injection; ICSI）が男性不妊の有力な治療として適用されている。マウス卵周辺部細胞質に精子を１個注入した際のCa^{2+}増加反応を高速レーザー顕微鏡を用いて詳細に観察した。精子注入により一過性のCa^{2+}増加（artifact）が起こり，5-10分間持続した。Artifact がおさまってから15-20分後にCa^{2+}濃度が徐々に上昇し，あるレベルに達すると１回目の大きなCa^{2+}増加反応が発生した。Artifact は１回目のCa^{2+}増加反応に影響し，artifactが大きいとCa^{2+}増加速度を促進し，持続時間を短縮させた。しかし空間パターンはいずれも卵全体でほぼ同期的に上昇した。２回目以降のCa^{2+}増加反応ではCa^{2+}波を形成し，これは注入精子付近からでなく，任意の表層細胞質から起こりはじめた。注入精子から漏出した精子細胞質因子が卵細胞質に広く拡散し，IP_3Rを感作して卵全体でCa^{2+}遊離を起こすこと，さらに感作されるとより感受性が高い卵表層細胞質からCa^{2+}遊離が始まることが示唆された。

膵β細胞Ca^{2+}オシレーションのチロシンキナーゼ受容体ホルモンによる抑制

松川　浩，橋口鈴子（鹿児島大），矢田俊彦

グルコース刺激で誘発される膵β細胞内Ca^{2+}オシレーションはパルス状インスリン分泌を生みだし，その選択的障害は２型糖尿病の成因の一つと考えられている。Ca^{2+}オシレーションがチロシンキナーゼ型受容体リガンドであるレプチン，インスリン，インスリン様成長因子１

(IGF-1)， HGF刺激によって抑制されることを見いだした。一方第1相Ca^{2+}増加反応，第0相Ca^{2+}低下反応は影響を受けなかった。Ca^{2+}オシレーション抑制の強度は IGF-1＞レプチン＞インスリン＞HGF の順であった。抑制の機序としてチロシンキナーゼとPI_3キナーゼの関与が薬理学的実験により示された。レプチンとインスリンは肥満に伴って上昇するホルモンであり，これらのオシレーション抑制作用は，肥満を起点とした糖尿病発症に関与する可能性が示唆される。またインスリンの作用については，β細胞インスリン分泌のnegative feedback の生理的意義が示唆される。

食欲中枢弓状核 neuropeptide Y 神経のグルコース感受性とレプチンによる抑制

矢田俊彦，室屋真二（鹿児島大），浦村一秀（鹿児島大），塩田清二（昭和大）

食欲の中枢性調節機構について単離ニューロンの細胞内Ca^{2+}濃度の画像解析と機能分子の局在を組み合わせて解析した。食欲中枢の一つ視床下部弓状核ニューロンの約20%はグルコース濃度の低下により活性化されるグルコース感受性神経であった。一方，弓状核神経細胞の約半数は摂食亢進ペプチドneuropeptide Y (NPY) 含有神経であった，グルコース感受性神経はほぼ全てがNPY 神経であった。脂肪細胞から分泌されて強力な摂食抑制作用を示すレプチンの受容体が弓状核に密に局在した。レプチンは生理的濃度で（10^{-12} M），グルコース感受性神経を抑制した。これらの結果より，弓状核のグルコース感受性NPY 神経が低血糖を感受して興奮し，摂食ペプチドNPYを分泌して摂食を亢進する機構が示唆される。

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，細胞内シグナル分子，および発現遺伝子を解析し，細胞固有の生理的活動の機構解明を目指す研究を進めてきた。

神経の活動については，イカ巨大神経標本を用い，イオンチャネルのゲート機構の研究を進めた。また細胞内Ca^{2+}によって発現する大きなCl^-コンダクタンスの生理的性質の検討とCl^-チャネル遺伝子クローニングを試みた。

筋収縮メカニズムにおける細胞内オルガネラの果たす役割について種々の海生生物を用い，比較進化学的研究を進めた。

乳腺組織からの乳分泌のメカニズムについて研究し，乳腺上皮細胞のオキシトシン受容体とATP受容体の役割を検討した。

一般共同研究としては，中西（愛知県コロニー研），古家（京都工繊大），榎本（島根医大）グループとの共同研究を進めた。研究会は「ATP受容体の生理機能と分子機構に関する総合的基礎研究」（代表：桂木猛（福岡大））を担当した。

平成10年度COE国際シンポジウムを担当し，1999年1月27日－29日の3日間，第25回生理研国際シンポジウム "Ion channels and receptors in cell physiology" のタイトルで開催，講演およびポスター発表，国外14名，国内44名，参加者120名を得て実施され盛況であった。

アルコールで破壊して見えるNaチャネルの階層構造

久木田文夫

Naチャネルは沢山の膜貫通セグメントが脂質膜内での相互作用やそれに繋がる親水性部位の会合により高次構造が出来上がり，生理機能を示す。この構造は階層的であり，アルコールを作用させると，先ず弱い部分が壊れ，次々に構造が壊れることが予想される。本研究では，アルコールをイカ巨大神経線維Naチャネルに作用させた際の，イオン電流とゲート電流の変化を定量的に調べることにより，この階層構造を明らかにする。脂溶性の化学物質は膜の流動性を上げることが多く，脂質膜の流動性の増加とゲート電流の増大が相関するというHodgkin-Huxleyの初期の仮説の下で実験が行われ，否定的な結果が得られてたという歴史的な経緯がある。この定性的な実験の結果を丁寧に見ると，ゲート電流はイオン電流よりこれらの物質に抵抗性があるように

見える。特に，アルコールは脂質二重膜での膜貫通セグメント間の水素結合を切り，Naチャネル蛋白質を壊す作用が顕著であるので，このような実験に適した化学物質である。実験結果は低濃度ではイオン電流の減少が顕著でゲート電流は殆ど変化しない濃度範囲が存在する。4量体構造で説明できる反応曲線が得られる。側鎖の長さが異なるアルコールを用いると，大凡脂質膜への分配係数で説明できる濃度範囲でアルコールの作用は出るが，ゲート電流に対する作用には定量的な差が見られる。詳細な解析は進行中であるが，階層構造との関連で面白い結果が得られつつある。

神経細胞に発現するCl^-チャネルとその遺伝子クローニングの試み

山岸俊一，神谷絵美，筒井泉雄
古家喜四夫（京都工繊大），榎本浩一（島根医大）

神経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。通常，Cl^-イオンはじめ各アニオンは静止電位，活動電位に殆ど影響を与えない。正常条件では細胞内外のK^+イオン濃度変化により膜電位が大きく変り，高いK^+選択性を示す。このとき，細胞内のCa^{2+}レベルを増加させるとK^+コンダクタンスを大きく上回るCl^-コンダクタンスが発現する。P_{Cl}/P_K値は通常の0.28から13.5まで変化した。このCl^-コンダクタンスは 10^{-7} M Ca^{2+}投与の範囲までは可逆的であるが，それ以上のCa^{2+}濃度では増大したままとなる。

イカ神経におけるCl^-チャネルの遺伝子クローニングを進めてきた。イカ神経節，視索，脳から抽出したmRNAを鋳型にしてRT-PCRを行い，これまで推定塩基数2400のうち2200の塩基配列を解読できた。アミノ酸配列はラットのClC-3チャネル(Kawasaki et al 1994) と95%が一致した。ClC-3チャネルは生物種を通じて極めて保存性の高いチャネルと見られる。

細胞内Ca^{2+}貯蔵部位の進化的役割

筒井泉雄

筋収縮と弛緩は細胞内オルガネラ（ＳＲ，ＥＲ，Ｔ管）でのCa^{2+}移動によって制御されている。骨格筋においてＳＲはＴ管の脱分極による分子の動きを直接リアノジンレセプターで感受してCa^{2+}放出を行い，筋収縮を制御している。この筋収縮に伴いCa^{2+}放出をつかさどるＳＲの機構は，脊椎動物の無顎類以降の生物によって初めて獲得された機構であり，原索動物から無脊椎動物にいたるほかの動物種においては，ＳＲはむしろ細胞内に蓄積したCa^{2+}を積極的にくみ出

す働きを担っている。しかし，ＳＲにおけるCa^{2+}の利用形態は進化的に突然変化したと考えるより，むしろ，今まで使われていなかった機構が，わずかな変化を起こし結果的に，Ca^{2+}利用形態の変化を導き出したと考える方が自然である。今回，原索動物であるホヤ（*Ciona intestinalis*）を用い，本来Ca^{2+}放出を担わないＳＲから，脱分極に伴うCa^{2+}放出を誘導することができた。このことは，原索動物において筋細胞がすでに骨格筋様の機能を未発現ながら有していることを示していて，Ca^{2+}放出機構の突然の獲得ではなくＳＲの機能の変化が骨格筋の発現を誘導したことを示している。現在この変化の要因，因子を追求検討中である。

乳腺筋上皮細胞においてオキシトシン受容体とATP受容体により活性化される細胞内シグナリング

中野春男，山岸俊一
古家喜四夫（京都工繊大）

乳腺筋上皮細胞においては，オキシトシンおよびATPによって細胞内Ca^{2+}濃度が上昇し，収縮を引き起こす。このカルシウム反応は，細胞内ストアからカルシウムが遊離することによる。イノシトール1,4,5-3リン酸（IP_3）をパッチピペットで細胞に注入すると細胞内Ca^{2+}増加が見られたことから，細胞内ストアはIP_3感受性を持つことが明らかとなった。ホスホリパーゼCの阻害剤であるU73122で処理すると，オキシトシンおよびATPによる細胞内Ca^{2+}反応が消失した。また，百日咳毒素を細胞に処理するとATPによる細胞内Ca^{2+}反応が著明に抑制されたが，オキシトシンによる細胞内Ca^{2+}反応には影響を与えなかった。

筋上皮細胞における細胞内Ca^{2+}濃度の上昇は，百日咳毒素感受性（ATP）及び非感受性（オキシトシン）のGタンパク質に共役したホスホリパーゼCの活性化によって産生されたIP_3により，細胞内ストアからカルシウムが遊離することによって引き起こされる。

機能協関研究部門

【概要】

機能協関研究部門では，容積調節や吸収・分泌機能や環境情報受容などのように最も一般的で基本的な細胞活動のメカニズムを，チャネル，トランスポータ，レセプター，メッセンジャーなどの機能分子の働きとして細胞生理学的に解明し，それらの異常と疾病や細胞死との関係についても明らかにしようとしている。また，チャネルやトランスポータの多機能性や，両者間の構造的・機能的相関についても分子生理学的に研究している。

主たる研究テーマは次の通りである。

①「細胞容積調節機構と細胞死機序」：細胞は（たとえ異常浸透圧環境下においても）正常容積を維持する能力を持ち，その破綻は細胞死（アポトーシスやネクローシス）に深く関与する。これらのメカニズムの研究を分子レベルで行い，その破綻防御の方策を探求する。

②「イオンチャネルの多機能性分子機構」：イオンチャネルはイオン輸送や電気信号発生のみならず，環境因子に対するバイオ分子センサーや，他チャネル／トランスポータ制御にも関与する多機能性蛋白である。そのメカニズムの分子的研究および細胞機能への統合的研究を行う。

これらの他に，③「消化管上皮細胞の分泌・吸収機能と分子メカニズム」，④「心筋細胞機能とチャネル」，⑤「腎密集斑細胞NaClセンサー機能と分子メカニズム」，⑥「運動神経細胞生存維持シグナル因子」などについても研究している。

細胞容積調節メカニズムと容積感受性クロライドチャネル

岡田泰伸，老木成稔，挾間章博，森島　繁

殆どの細胞は異常浸透圧環境下に置かれ続けても一時的に浸透圧性膨張や収縮を強いられはするが，その後比較的速やかに元の正常容積へと復帰する[1)]。このような容積調節は，Regulatory Volume Decrease (RVD) 及びIncrease (RVI) と呼ばれ，このメカニズムには各種チャネルやトランスポータの働きが関与している（図1)。従って，細胞はある種の容積センサーを持っている（図1)。

容積センサーの1つに容積感受性Cl^-チャネルがある。その分子実体の候補蛋白として挙げられてきたものに，P糖蛋白，pI_{Cln}, ClC2, ClC3などがあるが，前3者は誤りで[1)]，後者とも性質上大きな違いがある[2)]。そこで私達は，この分子同定を行うためのクライテリアを提出した[3)]。

1) Okada Y (ed.) (1998) "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanizm and Volume Sensing Machinery" Elsevier, Amsterdam

2) Okada Y (1998) Cell volume-sensitive chloride channel. In "Cell Volume Regulation" (ed. Lang F) (Contrib. Nephrol. vol. 123) pp 21-33, Karger, Basel.

3) Okada Y, Oiki S, Hazama A & Morishima S (1998) Criteria for the molecular identification of the volume-sensitive outwardly rectifying Cl^- channel. J Gen Physiol 112: 1-3.

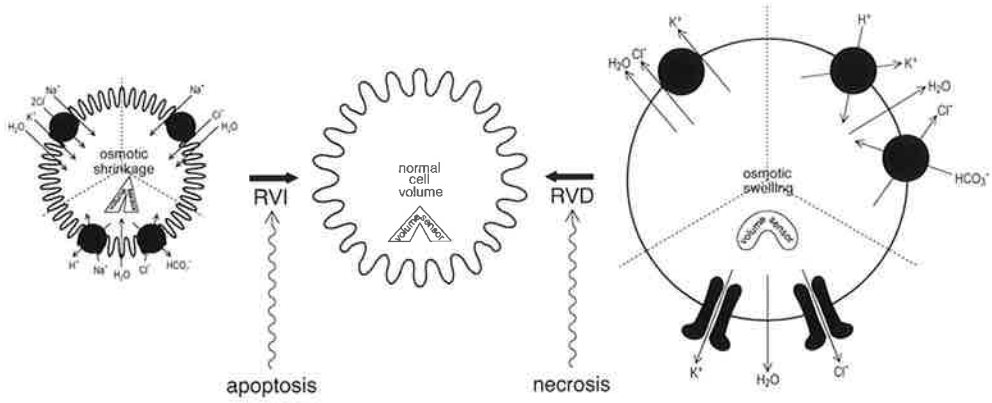


図1：RVD, RVIのメカニズムと容積センサーと細胞死

スルホニル尿素剤グリベンクラミドによる容積感受性クロライドチャネルの抑制メカニズム

劉　艶，清水貴浩，老木成稔，津村剛彦，岡田泰伸

経口糖尿病薬スルホニル尿素剤グリベンクラミドはATP感受性K^+チャネルの阻害剤として知られているが，いくつかのCl^-チャネルの活性をも抑制することが最近明らかとなった。そこで私達は，この薬物の容積感受性Cl^-チャネルの抑制メカニズムを明らかにするために，種々のpH条件でパッチクランプ実験を行った。その結果，①グリベンクラミドは細胞内からではなく，細胞外から作用すること，②非荷電体は電位非依存的に本チャネル活性を抑制すること，③その陰性荷電体はオープンチャネルブロック作用によって本チャネルの電位依存性不活性化を亢進させるが，チャネル活性そのものは抑制しないこと，などが明らかとなった[4]。

4) Liu Y, Oiki S, Tsumura T & Okada Y (1998) Glibenclamide blocks volume-sensitive Cl^-channels by dual mechanisms. Am J Physiol 275: C343-C351.

新しく開発したバイオセンサー法による単一β細胞からのインスリン分泌時のATP放出の検出

挾間章博，林　誠治，岡田泰伸

種々の刺激によって細胞外へのATP放出が発生することが最近知られるようになった。しかし，放出ATPが細胞外表面でいかなる濃度となるかについては，その定量的測定法がなかったために，詳しく知られていなかった。そこで私達は，ATPレセプターチャネル (P2X) を発現しているPC12細胞にwhole-cell recording (WCR) 法を適用し，これを調べたい細胞の表面に接着させてATP依存性カチオン電流を測定するという，新しいバイオセンサー法を開発した（図2）[5]。それを膵β細胞に適用したところ，インスリン分泌時にATPが放出され，その細胞外表面濃度は25 μMにも達することが明らかとなった（図2）[5]。

5) Hazama A, Hayashi S & Okada Y (1998) Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic β cells using a novel biosensor technique. Pflugers Arch Eur J Physiol 437: 31-35.

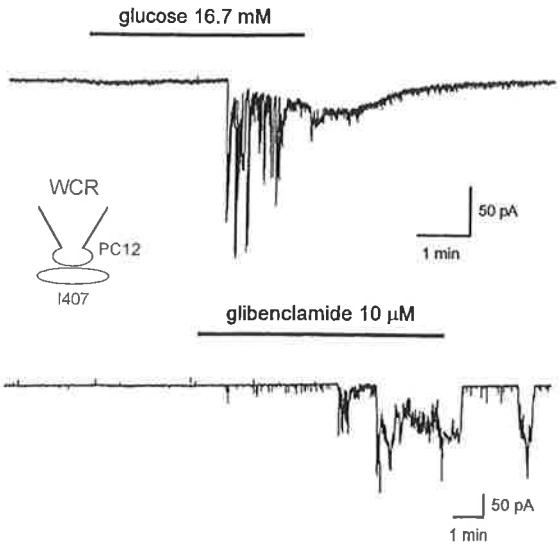


図2：グルコースやグリベンクラミドによる単一ラット膵β細胞からのATP放出のPC12バイオセンサー法による検出。

モルモット小腸パネト細胞のCFTR分子発現を伴わないCFTR型クロライドチャネル機能発現

津村剛彦，上田俊二（京大・医）
三好毅志，挾間章博，岡田泰伸（生理研）

モルモット小腸から機械的振動法によって単離した腺上皮の底部に免疫組織的・形態学的にパネト細胞を同定し，これにパッチクランプ全細胞記録法を適用したところ，CFTRチャネル類似のサイクリックATP依存性Cl^-電流が記録された[6]。しかし，単一細胞RT-PCR法を適用して検討したところ，パネト細胞にはCFTR mRNAの発現は確認できなかった[6]。蛍光抗体法を用いてCFTR蛋白の発現を調べたが，パネト細胞にはみられなかった[6]。

6) Tsumura T, Hazama A, Miyoshi T, Ueda S & Okada Y (1998) Activation of cAMP-dependent Cl- currents in guinea-pig Paneth cells without relevant evidence for CFTR expression. J Physiol (London) 512: 765-777.

肝線維化に関する活性化肝星細胞におけるNa^+/Ca^{2+}交換トランスポータの強発現

中村敏夫，有井滋樹（京大・医）
富永真琴，岡田泰伸（生理研）

肝線維化の過程には活性化した肝星細胞（伊東細胞）が重要な役割を果たしている（図3)。肝星細胞は培養条件下でも活動化を示すが，これに伴いNa^+/Ca^{2+}交換トランスポータ（Na^+/Ca^{2+}アンチポータ：NCX）のmRNA及び蛋白の発現を示すことを見出した[7]。fura-2法で細胞内Ca^{2+}の測定を行うことにより，機能的にもこのNCXが発現していることが判明した[7]。NCX mRNA発現化は四塩化炭素による肝硬変モデルラットの線維化肝組織でも検出され[7]，細胞分画法によって星細胞に特異的であることが明らかとなった[7]。

7) Nakamura T, Arii S, Monden K, Furutani M, Takeda Y, Imamura M, Tominaga M & Okada Y (1998) Expression of the Na/Ca exchanger emerges in hepatic stellate cells after activation in association with liver fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA 95: 5389-5394.

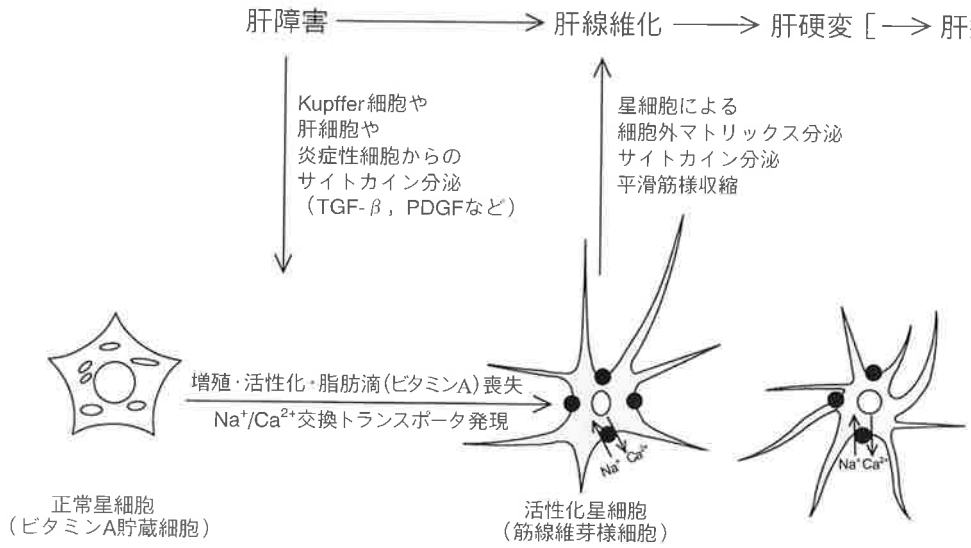


図３：肝線維化過程における星細胞活性化とNa^+/Ca^{2+}交換トランスポータの役割

能動輸送研究部門

【概要】

本部門では神経情報伝達機構の解明を細胞の極性という視点から分子生物学的な手法を主として用いて行おうとしている。

細胞を構成する分子は決して細胞内に均一に分布するものではなく，こうした極性を持った分子の分布こそが細胞の機能的特性を与える。生体を構成する細胞のうち，最も顕著な分子的および機能的極性を示すものが神経細胞であり，この極性なしには神経情報伝達という機能は存在しない。たとえば，中枢神経系において重要な役割を果たすグルタミン酸受容体は同じグループに属する一次配列上高い相同性を示す受容体間においても，神経情報伝達の場であるシナプスにおける分布は前シナプス後シナプスというように異なる。そしてこの特異的な極性を持った分布こそが高次脳機能の基礎となる。核に存在する遺伝情報が，発生の各段階または記憶の形成の様な外的な因子に対応して転写，翻訳されて受容体等の蛋白質が作られる。作られた蛋白質のうち膜蛋白および分泌蛋白は小胞輸送によりER， Golgi 体，trans Golgi networkと輸送されて細胞膜へ至る。各コンパートメント間の輸送のうちtrans Golgi networkから細胞膜への輸送が細胞極性の形成に深く関与すると考えられる。いかにして各分子が極性を持って輸送されるかに関しては，分子自体に信号が備わっている場合，小胞上に信号がある場合，小胞と細胞内骨格との相互作用などが考えられていて，これら過程に関与する分子も徐々に明かとなりつつある。しかしながら

現在のところ，これらだけで複雑な分子分布を説明することはできない。また適当な部位に輸送された受容体が脂質膜上を拡散またはエンドサイトーシスによる細胞内への取り込みなどにより移動すると大切な極性が維持されない。こうした極性を破壊する力に対抗する極性維持機構が細胞には存在するはずで，最近では細胞膜骨格に関係する分子が関与するのではないかと考えられているが，やはり極性形成の場合と同様多くの点が不明である。それゆえ我々は神経細胞の極性を決定する遺伝子の同定と機能解析を分子生物学的，生理学的に行う。これにより記憶形成，痴呆症，てんかん，神経発生などの医学，生物学的に極めて重要な課題の解明に寄与するものと考える。

生体情報研究系

神経情報研究部門

【概要】

神経系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。神経情報究部門では，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。

グリア細胞はその系譜が未だに定かになっておらず，免疫組織学的手法やin situ hybridization法並びにレトロウイルスによる細胞系譜解析を駆使してその分化・移動様式を明らかにしている（岩崎，鹿川，Ivanova，和田，秋田，馬場，池中）。また，われわれ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とともに，転写因子や分化因子からも発生・分化機構を解明している（岩崎，熊田，秋田，中平（英），河野，中平（健），米増，馬場，池中）。

小脳の顆粒細胞の分化過程を解析し，その成熟に及ぼすカリウムチャネル遺伝子発現の重要性を検討している（中平（健），柴田，柴崎，池中）。

脳の発達段階や肺癌組織，担癌患者血清などにおける糖蛋白質糖鎖構造の解析も行っている（Kumar，大竹，伊藤，藤本，池中）。

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（南木，佐々木，中平，池中）。

小脳顆粒細胞の成熟

中平健祐，柴田理一，柴崎貢志，池中一裕

神経細胞の分化成熟の過程における電気的活動の役割を検討するため，小脳顆粒細胞の電位依存性K＋チャンネルの発現と活動電位の発現について解析をおこなった。小脳では成熟の過程でKv3.1，Kv4.2，Kv1.1の各チャネル遺伝子が順に発現する。培養系を用いて，形態変化に伴って出現するA-type電流成分がKv4ファミリーのチャネルに担われていることを示した。このA-type電流の出現とほぼ同じタイムコースでNa+電流が現れ，それに伴い活動電位が観察されるようになる。活動電位は細胞の成熟にあわせて，シングルスパイク・減衰を伴う反復発火・反復発火と変化した。Kv4.2の変異体遺伝子を細胞に導入してA-type電流のみを阻害すると，電流注入から

最初のスパイクが生じるまでの時間が短縮された。このことから，活動電位の出現と共に現れるA-type電流は活動電位の発火を抑制するように働くことがわかった。

ヒトグリオーマの遺伝子治療に用いるための特異的かつ強力なプロモーターの開発 ～SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いたアプローチ～

佐々木学，中平健祐，池中一裕

SAGE 法とは，細胞で発現している多種類のmRNAを一括して同定，定量する技術である。この方法の特徴は，mRNAより作成したcDNAのある１つの特定部位から14bpのfragment（tagと呼ぶ）を作るところにある。tagは個々のmRNA種に特異的であるため，tagを集めて一括してシークエンスすれば1個のクローンから複数のmRNA由来の塩基配列が得られる。この塩基配列で個々の遺伝子が同定でき，同じtagの出現回数で発現量が分かる。我々はSAGE法を当研究室でも立ち上げることに成功し，マウスの全脳の遺伝子発現プロファイルを得た。またグリオーマと正常中枢神経の遺伝子発現を比較するため，外科的に摘出したグリオーマサンプルとアストロサイトの培養細胞にSAGEを行った。現在，グリオーマに特異的に強く発現している未知の遺伝子の解析を行っている。

視神経軸索におけるカリウムチャネルの局在化の発達段階における変化

池中一裕，馬場広子，秋田裕美

カリウムチャネル抗体Kv1.1,Kv1.2,Kv β2を用いてカリウムチャネルの発達段階における局在を観察した。また，ミエリン特異的抗体としてMBP, PLPに対する抗体を用いてミエリンとカリウムチャネルの発達における関係を観察し，以下の所見を得た。１）カリウムチャネルは生後４週以前は軸索上に拡散しており，生後４週以降にランビエ絞輪周囲に局在化する，２）カリウムチャネルの局在化はミエリンの成熟が完了してから開始する。これらのことを踏まえてカリウムチャネルの局在化に関する分子の研究を試みている。

glial cells missing (gcm)遺伝子のマウスホモログの解析

岩崎靖乃，池中一裕

哺乳類において脳神経系を形成している神経細胞とグリア細胞は脳室壁近傍にある共通の前駆細胞から生まれるが，どのようにして分化決定が行われるかについてはまだ明らかになっていない。遺伝研の堀田らは，ショウジョウバエにおいて神経細胞とグリア細胞の分化決定を行う遺伝子としてgcmを単離し，続いてgcmのマウスホモログ，mGCMaとmGCMbを単離した。本研究は彼らとの共同研究であり，gcmホモログの哺乳類中枢神経系における役割の解明を目的としている。まず，両遺伝子が中枢神経系で発現していることを，RT-PCRにより確認した。次にin vivoにおける発現パターンを調べ，胎生14日のマウス脳組織において広く発現細胞が分布し，そのパターンが既知のグリア細胞とは異なる事を明らかにした。現在，発現細胞を同定するために脳初代培養系を用い各種抗体との二重染色による解析を進めている。

グリア細胞の発生機序の解明

熊田竜郎，馬場広子，中平英子，岩崎靖乃，池中一裕

グリア細胞の発生機序については，どのような遺伝子が細胞分化カスケードをコントロールしているのか全くわかっていない。我々はアストロサイト前駆細胞を用い，GFAP（アストロサイト特異的な遺伝子）のプロモーターを活性化する遺伝子の探索を行い，システインプロテアーゼの内因性インヒビターであるシスタチンCを単離した。in situ hybridization法による解析からシスタチンC がマウス胎生14日という比較的早い時期から脳室壁の限局した領域に発現し始める事が明らかになった。また，新生後の発現パターンはアストロサイトの細胞系譜と完全に一致していた。以上の結果は，シスタチンCが胎生期におけるアストロサイトの発生に関わっている可能性を示唆している。本研究は，プロテアーゼの内因性インヒビターがグリア細胞の分化を制御するという新たな発生機序の解明を目指している。

レトロウイルスを用いた細胞系譜解析および遺伝子治療

南木浩二，河野真子，岩崎靖乃，池中一裕

レトロウイルスによる遺伝子導入では安定した遺伝子発現が世代を越えて恒常的に得られる。

このため，細胞系譜の解析においてレトロウイルスによる標識は非常に有用である。しかしながら，神経系に対しては従来のレトロウイルスの感染効率は極めて低く，満足のいく遺伝子導入効率は得られなかった。そこで，我々はパッケージング細胞の改良に加え，低速遠心濃縮法（N. E. Bowles, 1996）によって1010〜1012 cfu/ml という高力価のレトロウイルスを作製し，神経系への遺伝子導入を試みた。

その結果，オリゴデンドロサイト前駆細胞株（CG4），アストロサイト前駆細胞株（HB108-10），褐色細胞腫由来細胞株（PC12h），マウス大脳初代培養細胞に対して８割以上の遺伝子導入が可能であった。さらに胎生14日齢マウスの側脳室内に高力価レトロウイルスを注入することで，２日後には脳室壁の多くの神経上皮細胞がLacZで標識された。さらに生後４日になると前脳部の広い領域にわたって標識細胞の分裂・移動が確認された。GFAPによる免疫染色を行い，多くの細胞がアストロサイトに分化していることが分かった。この方法により，先天性脳神経系疾患の遺伝子治療も可能であると思われる。

中枢神経系ミエリン形成細胞オリゴデンドロサイトの発生分化の機序

Anna Ivanova，和田圭樹，鹿川哲史，池中一裕

マウス大脳皮質の発生段階を追って中枢神経系ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの発生様式を詳細に調べた。生後約一週目の大脳には，PDGF受容体（aサブユニット）を発現しているオリゴデンドロサイト前駆細胞と，PLP遺伝子を発現している前駆細胞の，少なくとも２つのオリゴデンドロサイト前駆細胞のサブポピュレーションの存在が示唆された。

このようなオリゴデンドロサイト前駆細胞は胎生期に中枢神経系腹側の非常に限局された領域に出現し，徐々に全体に広がることが観察された。そこで，オリゴデンドロサイトの細胞移動を再現できるマウス延髄及び頸部脊髄の小片培養系を確立し，背側部分の切除実験や腹側部分の移植実験を小片培養上で行った。この結果，我々は，新たに脊髄延髄背側部にオリゴデンドロサイトの分化抑制因子活性があることを見いだした。すなわち，オリゴデンドロサイトの発生位置は，神経管腹側から放出されるオリゴデンドロサイト分化促進因子と背側からの分化抑制因子のバランスによって決定されていることが示唆された。

自動化糖鎖解析システムを用いた特異的糖鎖の研究

大竹洋介，藤本一朗，Krishna Kumar Menon，田中文啓，伊藤磯子，池中一裕

大阪大学理学部，長谷教授らのグループと共同開発した「化学的糖鎖スクリーニング法」に全自動糖鎖切断精製装置，蛍光標識PA化装置を組み入れ，当研究室独自の自動化糖鎖解析システムを確立し報告した。この方法を応用して脳組織，肺組織，癌組織，血清などの糖蛋白糖鎖を解析研究を進めている。

脳組織に関しては，脳特異的糖鎖BA2の働きをその合成に関与するガラクトース転移酵素Ｉをグリア細胞の細胞株に遺伝子導入して解明しつつある。

肺組織，癌組織，血清蛋白における糖鎖解析では，明らかに癌組織に特異的な糖鎖構造を解明するには至っていないが，喫煙により肺組織はその発現糖鎖を変化させている事を示唆する所見が得られている。

これらの組織における糖鎖の生理機能の解明や，環境，疾患による発現糖鎖構造の変化は，脳神経疾患を始めとするあらゆる病態の診断治療に貢献するものと思われる。

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機構およびその可塑性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，これらの分子自体の機能を検討してきたが，最近では特に神経系のカルシウムシグナリングを中心的な課題とし，新たなカルシウムチャネルファミリーの同定と機能解析をすすめるとともに，これら機能分子の生理機能の検討を行っている。これらの機能分子の異常により変性性神経疾患が起こることが知られてきており，その病態解明も目指している。

分子生物学的手法は神経生物学の分野に大きな進歩をもたらしたが，チャネル蛋白など機能的素子の研究で得られた知識と，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いまだに大きなギャップがある。そのギャップを狭めるためには，神経情報伝達に関る蛋白の機能を生体であるいは生体に近い条件で観察することが重要となって来ている。生体機能を分子のレベルで解析していくためには，種々の技術的開発が必須であり，われわれのグループでも生体センサーの開発，測定機器の開発に取り組んでいる。

レセプター活性型カルシウムチャネルの同定と機能解析

森　泰生，岡田峯陽

レセプター活性型カルシウムチャネルであるTRPチャネルの哺乳類ホモローグのcDNAクローニングとその機能解析を行った。マウスには数種類のTRPチャネルホモローグがあり，それらは主に脳に発現している。これらのチャネルを培養細胞に発現させ機能的性質を検討したところ，マウスTRPチャネルのサブタイプはおのおのに特有の性質を有することが明らかとなってきている。これらのチャネルの生理的機能は現在のところ不明であるが，神経系では，情報の増幅あるいは統合に関与し，長期的なシナプス結合変化の引き金として作用してるまずすることが予想される。

電位依存性カルシウムチャネルの分子的機能解析

若森　実，森　泰生

脳には少なくとも数種の電位依存性カルシウムチャネルが混在する。それぞれのタイプは固有の性質を有しているが，混在しているため，固有の性質を検討することは困難であった。クローン化されたcDNAから発現させたNタイプの電位依存性カルシウムチャネルのカドミウムイオンによるブロックとブロックからの回復の解析を行った。カドミウムイオンによるブロックの速度が拡散限界速度に近い値であったことから，カドミウムイオンはopen channelブロックを起こし，その結合部位はチャンネルポアの外側の開口部付近にある事が示唆された。

電位依存性カルシウムチャネルの異常により起こる神経変性疾患の病態解明

若森　実，森　泰生，松山善次郎，井本 敬二

P/Qタイプの電位依存性カルシウムチャネルの遺伝子の異常により，小脳失調症などの神経疾患が起こる。その分子的メカニズムを明らかにするために，モデルマウスであるtottering，leanerマウスなどを入手し，急性単離した小脳プルキンエ細胞のカルシウムチャネル電流を測定した。また失調症マウスと同じ変異を導入した組換えカルシウムチャネルを発現させそれらの機能を検討した。その結果，失調症マウスプルキンエ細胞ではカルシウムチャネル電流が減少しており，また開閉のキネティックスも変化していた。組換えチャネルでもほぼ同様の変化が見られ

たことから，カルシウムチャネル遺伝子の変化が直接的にチャネルの変化を引き起こしていること，またカルシウムの流入現象が発病に寄与することが示された。

興奮収縮連関の分子機構

中井淳一

興奮収縮連関の分子的本体は，骨格筋カルシウムチャネルとリアノジン受容体という巨大な蛋白間の相互作用である。この実験ではRyR-1とRyR-2の機能の差に着目し，キメラリアノジン受容体を作製して，興奮収縮連関におけるリアノジン受容体とDHPRの相互の活性化機構を明らかにすることを目的とした。実験の結果，L型カルシウムチャネルとリアノジン受容体（RyR-1）との蛋白蛋白相互作用がリアノジン受容体のfoot領域を介して行われることが明らかになった。さらにリアノジン受容体の少なくとも2か所の異なる部位がこの相互作用に関係することが明らかとなった。

電位依存性L型カルシウムチャネルの単一チャネルコンダクタンスの決定部位

中井淳一

骨格筋と心筋の電位依存性L型カルシウムチャネルはポア領域にほとんど同じであるにもかかわらず，単一チャネルコンダクタンスが異なる。この違いの分子的基盤を明らかにするため，骨格筋型，心筋型のキメラチャネルを作製し単一チャネル活動を測定した。その結果，リピートIのセグメント5と6の間の領域（IS5-IS6 linker）が単一チャネルコンダクタンスを決める事が明らかとなった。また単一チャネルコンダクタンスと活性化速度と独立したものであった。

高次神経機構研究部門

【概要】

本研究部門ではヒトを含む哺乳動物の行動がどの様な分子メカニズムにより形成・制御されているかを解明する目的で，神経回路の形成・脳機能に関わる分子を探索するとともに，関連分子の遺伝子ターゲティング法によりマウス個体レベルでの機能解析を行っている。特に，Fyn欠損マウスでは，情動行動に異常が認められることより，情動行動と記憶の分子メカニズムに焦点を

当てている。

Fyn欠損マウスの哺乳行動異常の解析

浜田香世子，三宝千秋，八木　健

Fyn欠損母とFyn欠損子の状態では，Fyn欠損マウスは哺乳行動異常を示し，子供が死滅することが明らかになっている（Nature, 1993）。この哺乳行動異常は，オートクレーブをかけた北米産樅材を床敷きとして使った時におこり，飼育環境の状態でFyn欠損マウスの哺乳行動が影響を受ける。この環境要因を探る目的で，床敷きより発生する匂い分子をガスクロマトグラフィーにより解析したところ，ヘキサナールの量が約10倍発生していることが明らかとなった。このヘキサナールがFyn欠損マウスの哺乳行動に影響を与えるかどうかの検討を行った結果，予想通り，ヘキサナール存在下でFyn欠損マウスの哺乳行動異常が再現された。また，ヘテロ欠損マウスではヘキサナールによる哺乳行動異常が認められないことより，ヘキサナールがFyn欠損マウスの哺乳行動の異常に関連する環境因子として同定された。この結果は，Fyn欠損マウスの匂い分子に対する反応性の異常を示唆するとともに，匂いに対する反応と哺乳行動との関係がFynの分子機能により正常化されていることを示すものである。遺伝子欠損マウスが環境の影響を受けやすくなる本結果は，脳の機能発現における環境因子と遺伝子との関係を探る上でも興味深い結果である。

NMDA受容体（NR2B）のチロシンリン酸化による行動制御機構の解析

浜田香世子，八木　健

FynがNMDA受容体のNR2Bサブユニットを直接リン酸化し，NMDA受容体の機能の制御をしていることが，エタノール存在下でのFyn欠損マウス海馬体を用いた実験より明らかになっている（Science, 1997）。我々は，シナプスにおけるFynのNR2Bサブユニットのチロシンリン酸化の生理的意義をより明確にする目的で，NR2Bのチロシンリン酸化部位の決定を行い，そのチロシンリン酸化部位をフェニルアラニンに変換した点変異導入マウスの作製を行っている。

Fyn・NMDA受容体の二重遺伝子欠損マウスでの子殺し行動異常の解析

浜田香世子，三宝千秋，八木　健

エタノール投与によりFynがNMDA受容体のNR2Bサブユニットを直接リン酸化していることが明らかになっている（Science, 1997）。我々は，このFynのNR2Bサブユニットのチロシンリン酸化が，神経回路の形成・発達・可塑性に関わるのではないかと考え，NMDA受容体のサブユニット欠損マウスとFyn欠損マウスの掛け合わせにより，２重遺伝子欠損マウスの解析を行っている。その結果，生後脳で徐々に発現が増大するNR2Aサブユニット単独での遺伝子欠損マウスでは認められなかった攻撃行動の異常がNR2A・Fynの２重遺伝子欠損マウスにより認められた。この異常は，生後2週で特に顕著におこり，攻撃性が増大した２週令の２重遺伝子欠損マウスはほとんど母親マウスにより食殺されていた。この異常はNR2Dサブユニットととの２重遺伝子欠損マウスではおこらないことより，NR2A特異的に引き起こされる現象である。NR2Aは終脳領域でNR2Bサブユニットと重複して発現しているものであり，NR2A欠損では，生後の終脳領域のNMDA受容体の機能はNR2Bにより行われている。よって，本実験で得られた結果は，Fyn欠損状態でのNR2Bの機能制御の異常が反映されたものである可能性が高く，FynによるNR2Bの機能制御が脳の発達や攻撃行動の抑制に関わることを示唆するものである。

Fyn結合新規カドヘリン（CNR）ファミリーの脳形成過程での機能解析

先崎浩次，八木　健

我々は本年度，Fynと結合する新たなカドヘリン（CNR）ファミリーの単離に成功し，このCNR1がシナプスに局在していることを明らかにした（Neuron, 1998）。このCNRファミリーが脳神経系でどの様に局在化しているかをin situハイブリダイゼーション法により明らかにした。その結果，CNR1から８はFynと一致した脳領域で発現しており嗅球，海馬，小脳で発現が認められた。また，この各種CNRの発現は，単独の細胞レベルでは別々の細胞に異なる組み合わせにより発現していた。このことより，CNRファミリーは神経回路形成において各細胞レベルでの多様化に関連している可能性が考えられた。現在，CNRファミリーの神経回路形成過程での発現様式を解析することにより，CNRファミリーの神経回路形成における役割について検討している。

CNRファミリーのシナプス膜局在化の分子メカニズムの解析

武藤哲二，八木　健

Fyn結合型受容体分子として同定されたCNRファミリーはシナプス膜に存在している。このCNRファミリーを培養細胞下で発現させたところ，他のカドヘリン分子と異なり，細胞形質膜での局在が認められず，細胞内膜系に凝集が認められた。また，神経突起を細胞分化により形成する細胞株を用いた実験では，CNR分子は細胞円錐に濃縮して存在することより，CNRファミリーには細胞内での特別な輸送システムが存在している可能性が想定される。我々は，この輸送システムを明らかにする目的で，種々の細胞株における細胞形質膜上へのCNR分子の輸送の検討を行っている。

マウスにおける新たなCNRファミリーの単離と分子機能の解析

竹井　豊，八木　健

現在までにCNRファミリーはマウスで８種がcDNAとして単離同定されている。マウスのゲノミックサザン法を用いた解析により，CNRファミリーは約20分子あることが想定されている。そこで，我々は新たなCNR分子の単離を試みた。その結果，他に5種のcDNAが新たに単離された。現在，構造解析を行うとともに，各CNR分子の分子機能の解析を進めている。

CNRファミリーのマウス脳形成過程での発現様式の解析

牧野初音，八木　健

CNRファミリーはカドヘリンファミリーに属する。カドヘリンは脳形成段階においてそれぞれ特徴的な発現パターンをもち，脳の領域化に関わることが想定されている。我々は，CNRファミリーの胎生での発現様式を明らかにする目的で，Whole mount in situハイブリダイゼーション法を行った。その結果，CNRはそれぞれ特異的な脳の領域に発現が認められた。この結果は，CNRファミリーが脳の形成段階でも機能している可能性を示唆するものである。

ＣＮＲファミリーのゲノミックＤＮＡ構造の解析

杉野英彦，浜田　俊，八木　健

ＣＮＲファミリーは約20種に多様化していることがしられている。この分子種の多様化がどの様なメカニズムでおこったかを解析するには，ゲノミックＤＮＡの構造を明らかにする必要がある。そこで，我々はマウス及びヒトのＣＮＲファミリーをプローブとして用いて，ＢＡＣライブラリーのスクリーニングを行った。その結果，全ての領域をコードするＢＡＣクローンをマウスとヒトで単離することに成功し，ＣＮＲファミリーが染色体の一部の約200－300kbに存在していることを明らかにした。

コンディショナルターゲティング法の開発

三宝　誠，八木　健

欠損遺伝子の効果を脳領域や時期特異的に解析する方法として，コンディショナルターゲティング法が開発されている。我々は，この方法をより洗練されたものにする目的で，Creリコンビナーゼとテトラサイクリンによる遺伝子発現誘導系の双方を用いることができるトランスジェニックマウスの作製を行った。その結果，現在までにマウス終脳領域で特異的にCreリコンビナーゼが発現し，機能する３ラインのトランスジェニックマウスの作製に成功した。

NMDA受容体サブタイプ欠損マウスの解析

崎村建司，森　　寿，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。

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

【概要】

我々が目で見て知覚する世界は脳内の複雑な視覚情報処理の結果生じている。視覚神経系は数多くの領域から構成される複雑な並列分散システムであり，異なる種類の視覚情報は違う場所で処理されていると考えられている。一方知覚にのぼる世界は全体として統一のとれたものであり，分散処理された視覚情報を統合する何らかの仕組があると考えられる。また二次元の網膜像から世界の三次元構造を理解できる事実が示すように，視覚情報処理はさまざまの拘束条件を用いた計算過程とみなすことができる。当部門では視知覚におけるこれらの基本的問題に関する神経機構を解明するために，大脳皮質を中心とするニューロン活動記録とその解析，及び心理学的方法による行動の解析を行っている。研究テーマも上のような目的に到達するため，（1）要素的情報の表現と（2）情報の統合過程の解明という2つの大きな柱を立ててそれらをめぐる問題を取り扱っている。具体的なテーマとして（1）に関しては三次元テクスチャの脳内表現，および運動視における三次元的な面の表現を，（2）に関しては一様な面の明るさの表現，メタコントラストを用いた視野地図上での面の表現と知覚の関係に関する研究を行った。

大脳皮質V4野における三次元テクスチャの表現

花沢明俊，小松英彦

われわれは石や布などの表面の微小な凹凸を3次元テクスチャとして知覚し，ざらざら，ごつごつなどといった印象を受ける。このような3次元テクスチャは物体識別に重要であり，ある程度の広さの視野の情報の統合が必要と考えられることから，腹側経路の中間に位置してある程度広い受容野をもつV4野の関与が疑われる。そこで陰影による3次元テクスチャを視覚刺激として用い，V4野からニューロンの応答を記録した。刺激には明と暗が対になった要素パターンをその明暗の方向を揃えてランダムな位置に配置したものを用いた。このような刺激は，1つ1つの要素パターンが微小な凹または凸として知覚され，刺激全体としては，それらがたくさん集まったテクスチャとして知覚される。そして，その3次元構造の手がかりは陰影だけである。スリットのような単純な刺激に応答しないV4野細胞の多くがこのようなテクスチャ刺激に応答し，要素刺激の大きさ，密度に対し選択性を示した。このことはV4野が三次元テクスチャの処理に関与していることを示唆する。

視覚一次野における面の明るさの表現

木下正治，小松英彦

視野のある場所に現れた面の明るさの知覚は，そこから視野の上で離れた場所に現れた刺激の明るさの影響を受けて大きく変化することが知られており，このような知覚現象は明るさ誘導と呼ばれる。一次視覚野（Ｖ１）には面刺激の輝度そのものに応じるニューロンと，明るさ誘導の知覚に対応して活動が変化するニューロンが存在することを昨年報告した。異なる種類のニューロンがＶ１内でどのように分布するかを調べた結果，面の輝度そのものに反応するニューロンは入力層である４層に多く，誘導刺激の影響をうけるニューロンは深層に多いことがわかった。この結果はV1内の回路において面の局所的な輝度情報と周辺の輝度情報との対比の計算が行われる可能性を示唆する。

MST野における運動刺激による面の傾きの表現

杉原弘記，小松英彦

動きは物体の形状や面の傾きに関する重要な情報源となることが知られている。MST野ニューロンが回転面の三次元的な傾きに選択的に反応することを昨年報告した。このような選択性は運動刺激に含まれる何らかの単眼手掛かりを検出することにより実現されている。どのような単眼手掛かりが用いられているかを調べるため，刺激を単純化して直線運動のみから作られる剪断運動の刺激を用いてMST野ニューロンの応答を調べた。その結果回転面の傾きに選択性を示すニューロンの一部は剪断運動にも反応し，回転面の傾きに対する選択性が剪断運動に含まれる速度勾配への選択性で説明できることが明らかになった。

メタコントラスト条件下でのＶ４野ニューロン活動

近藤秀樹，小松英彦

メタコントラストは視野のある場所に現れたテスト刺激とそれと空間的に隣接するマスク刺激をある範囲の時間間隔で呈示した時にテスト刺激が知覚されなくなる現象である。Ｖ４野ニューロンは受容野の内外に側抑制のメカニズムをもつことが知られている。メタコントラストの一つの可能なメカニズムは，このような側抑制が時間的な幅をもつことであると考えられる。そこで

ごく短時間呈示したテスト刺激に対するV４野ニューロンの活動を記録し，さまざまな時間間隔でテスト刺激と空間的に隣接して呈示したマスク刺激が活動にどのような影響を及ぼすかについて調べた。その結果V４野ニューロンの側抑制は平均約±100msにおよぶ時間的な幅をもつことが明らかになった。

生体システム研究部門

【概要】

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，多角的な観点からのシステマティックな研究を展開している。

歩行リズム生成・制御に関わる網様体ー脊髄神経機構の作動様式と構築様式

松山清治，森　大志，森　茂美

本研究では，①網様体脊髄路の腰髄内多髄節支配様式および②網様体脊髄路から興奮性網様体脊髄路入力を受ける脊髄介在細胞の歩行リズム生成時における作動様式とその構築様式の解明を目的とした。このため，第１にPHA-L順行性神経標識法を用いてネコ網様体脊髄路単一軸索の腰膨大内多髄節支配様式を解析した。単一軸索21本の解析から，網様体脊髄路軸索は軸索側枝を多髄節にわたり分枝することが明らかとなった。また，80%の軸索は一側性支配を示すのに対し，20%は両側性支配を示した。第２に無動化除脳ネコを用い，網様体刺激で興奮性応答を示す腰髄介在細胞の軸索から軸索内記録を行なった。さらに同一微小電極より neurobiotinを軸索内注入し介在細胞および軸索を標識した。記録細胞の多くは歩行リズム生成時にリズム発射を示した。またNB標識細胞の多くはVIII･VII層に細胞体が存在し，反対側に軸索を伸ばす交連細胞であった。とくにVIII層の交連細胞は反対側前索で軸索側枝を2-17本分枝し，反対側脊髄前角を強く支配していた。これより，脊髄介在細胞の髄節性リズム形成と，網様体脊髄路による歩行リズムの髄節間協調作用が示唆された。

サル皮質－網様体路系の構築様式

松山清治，森　大志，高須千慈子，森　茂美（生理研）
小川　尚，伊藤真一（熊本大・医），井福裕俊（熊本大・教）

本研究ではサルの皮質－網様体投射様式の解明を目的とした。Ketamin麻酔下で大脳皮質一次運動野に皮質内微小電気刺激（5-30 μA；10-30 pulses at 330Hz, 0.2 ms pulse duration）を加え，誘発される運動・筋収縮の観察から，一次運動野内の上肢・下肢・体幹領域を同定し，これらの領域に神経標識物質BDAを微量圧注入した。3-5週間の生存期間後に動物を灌流固定し脳組織を摘出した。大脳・脳幹部の厚さ50 μm連続横断切片を作製し，BDA陽性線維および終末を標識した。これらの切片標本をもとに，BDA標識線維・終末の脳幹における走行および投射様式について解析した。この結果，一次運動野の各注入領域からは注入側と同側の錐体路を下行するBDA標識軸索（直径0.5-8 μm）が多数観察された。さらに，脳幹内では同側の橋核に密な線維投射を認めた。また分布密度は希薄であったが，橋・延髄網様体の広範な領域に標識線維および終末の分布が観察された。

障害物を置いたトレッドミル上の歩行時におけるサル直立二足歩行運動の特徴

森　大志，Nikolai Gantchev，松山清治，高須千慈子，森　将浩，森　茂美

ニホンサル(*M. Fuscata*)は水平，傾斜トレッドミル上での直立二足歩行運動を学習できる。このようなサルがどのようなストラテジーを用いてトレッドミル上に設置した障害物につまずくことなく直立二足歩行運動を遂行するかを検討した。水平トレッドミル上に高さ2.4cmまたは5cm，幅2cm，長さ25cmの障害物をサル左後肢側に設置し，トレッドミル速度は0.7，1.0，1.3m/sに設定した。歩容を解析するため，体幹軸，股，膝，足関節角度の変化などを記録した。障害物の有無，高さに関わらず，サルは1歩行周期中に体幹軸をほぼ一定に維持し，下肢関節特に膝関節を屈曲させて十分な障害物上の空間を獲得して障害物を避けた。着地相は障害物の有無，高さに関わらず，速度の増加に伴い短縮したが，遊脚相はほぼ一定であり，高い障害物を避ける時にのみ延長した。これらの結果から，サルは外的環境を視覚情報等から統合し，予測制御機構を駆動させ，障害物を避けるためにknee flexion strategyを導入し，体幹姿勢軸の動揺を最小限にして直立二足歩行を遂行していることが明らかになった。

サル視覚誘導性上肢到達運動における脳内情報処理機構

宮下英三

本研究は，視覚誘導性上肢到達運動に際して視覚情報から運動命令への変換過程がどの様に神経細胞活動に表現されているのか解明することを目的とする。昨年度に引き続き，新しく開発した運動課題遂行中の上肢運動パラメータと共に神経細胞活動をサル一次運動野から記録した。

手の動きに関連した合計61個の神経細胞活動を運動パラメータの時間プロファイルとの相関性に基づいて解析すると次の3種類のグループに分類できることが判明した。（1）主に手の加速度を表現しているグループ（n = 9），（2）主に手の速度を表現しているグループ（n = 28），（3）手の加速度と速度の両方を表現しているグループ（n = 24）である。各グループの神経細胞活動は平均して，104 (±63) ms，46 (±39) ms，88 (±47) ms 各々手の動きに先行していた。

これらの神経細胞活動が手の加速度，速度および位置の線形和として表現されているのではないかとの仮説の基にさらに解析を進めている。

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF SEROTONERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEMS IN THE DEVELOPING SPINAL CORD

Arpad Dobolyi, Tetsu Okumura, Kiyoji Matsuyama, Futoshi Mori and Shigemi Mori

It has long been known that motoneurons use acetylcholine as their neurotransmitter and that their cholinergic nature can be visualized by use of choline-acetyltransferase immunhistochemical and acetylcholinesterase histochemical techniques. We have improved the currently used acetylcholinesterase techniques to such a degree that cholinergic interneurons like the so-called partition cells can also be visualized, even in developing animals.

Motoneurons are influenced strongly by the serotonergic system descending from the lower brainstem raphe nuclei. No information has been available, however, on interactions between the descending serotonergic system and spinal cholinergic interneurons. By combining our newly developed acetylcholinesterase technique with serotonin immunhistochemistry, we found close apposition between serotonergic fiber terminals and partition cells as early as the 1st postnatal day in newborn rats. To further address the extent to which the serotonergic system can influence the development of the spinal cholinergic system, we applied chronically the serotonin synthesis blocker, para-

chlorophenylalanine, to pregnant mother rats. This treatment lead to a disturbance of swimming movements in newborn rats. The pups overcame this disturbance when they were ~ 2 weeks of age. In the para-chlorophenylalanine exposed pups, histological analysis revealed that at birth, the spinal serotonergic fibers were absent, the size of cholinergic neurons was decreased, and the axonal and dendritic processes of the latter were less developed. By the age of 15 days, the serotonergic fibers appeared and no differences were evident in the cholinergic system of control vs. treated pups.

Our results suggest that serotonergic innervation affects both motoneurons and cholinergic interneurons. Furthermore, we hypothesize that partition cells, whose axons span several spinal segments, are positioned optimally to play a key role in the intersegmental coordination of motor output. Therefore, interactions between the descending serotonergic system and the spinal cholinergic system for the control of posture and movement are much more complex than those of its aspects that have a direct effect on motoneurons. Clearly, the serotonergic/cholinergic control and modulation of spinal interneurons, including the partition cells, must also be taken into account.

外側前庭神経核由来の単一前庭脊髄路軸索の頚・胸・腰髄レベルにおける髄節特異的支配様式の解析

久世文也，松山清治，松井利浩，森　茂美

本研究では頚・胸・腰髄レベルにおける前庭脊髄路軸索の分枝支配様式の髄節特異性を明らかにすることを目的とした。このためネコの右Deiters核にPHA-L(5%, 0.3 μl)を注入し，2-12週の生存期間の後，頚・胸・腰髄部の厚さ50μmの連続前額断切片を作製した。PHA-L標識線維は生存期間2-3週，6-7週，10-12週のネコにおいて，それぞれ頚髄(C1-T2)，頚・胸髄(C3-T11)，胸・腰髄(T7-S1)に認められた。連続切片上より直径2.4 μm以上の単一標識軸索(n=28)の走行を最長8髄節にわたり追跡できた。それぞれの軸索は複数の軸索側枝を分枝し，終末線維は灰白質のVII層とVIII層に分布した。頚髄レベルでは支配領域は軸索によって異なるのに対し胸髄では比較的均一であった。腰髄ではL3からL4において支配領域は著しく増大する傾向があった。L6からL7ではVIII層の内側部に限局していた。

ネコ新線条体におけるコリン作動性神経細胞とセロトニン含有線維の分布様式の比較

奥村　哲，Arpad Dobolyi，森　将浩，松山清治，森　茂美

本研究では，新線条体におけるコリン作動性神経細胞とセロトニン（5-HT）含有線維の分布様式を比較した。その為に，前者に特異的に分布するcholine acetyltransferase (ChAT)と5-HTに対する免疫組織化学法を用いて，同一ネコ脳から得られた連続する切片上で両者の分布を比較した。大型（20～50 μm）でaspinyなChAT陽性細胞は尾状核全体に分布していたが，そのNeuropilの分布はモザイク様であり，分布が疎な部分（Patch）がそれ以外の基質（Matrix）に囲まれて散在した。それに対して，多くのvaricosityをもつ5-HT線維の分布は腹側/尾側で密度が高い傾向を示したものの，モザイク様の分布は示さなかった。両者に対する２重免疫染色の結果，5-HT線維のvaricosityのほとんどはChAT陽性細胞と離れて存在したが，一部はその細胞体と樹状突起に近接して観察された。尾状核の神経のほとんどは投射神経であるので5-HT線維は尾状核に存在する介在神経と投射神経の両方の活動を修飾していると考えられた。

高次液性調節研究部門

【概要】

本研究部門では，高次認知機能がどのような多層的調節システムによって発現してくるかの解明を目的としている。現在は，霊長類における認知記憶の大脳メカニズムを，電気生理学的・形態学的・分子生物学的方法を総合して研究している。サルを用いた研究においては，臨床テスト(WMS-R)に類似した「対連合記憶課題」を開発し，大脳下部側頭回皮質において図形間連合をコードするニューロン群を同定し，この記憶情報が貯蔵される過程・想起される過程のニューロン機構を研究している。ことに，前交連と後部脳梁を外科的に切断した部分分離脳標本という新しい標本を開発し，側頭葉内に貯蔵された記憶情報が，前頭葉との相互作用によって活性化される機構の研究に成果を挙げている。また，本研究部門では東京大学医学部生理学教室との共同研究で，ヒト大脳皮質の活動を機能的磁気共鳴画像法（functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI）を用いて非侵襲的に解析している。ことに最近，事象関連fMRI法（event-related fMRI）と呼ばれる方法を開発して，時間分解能・空間分解能の大幅な向上に成功した。ウィスコンシン式カード分類課題のように，臨床的には大脳前頭葉症状の診断に最も良く使われているが責任病巣の正確な部位さえ不明であった課題も，この方法によって解明が進み，下前頭回後部（ＢＡ44/45）が認知的シフトおよび行動抑制機構一般に重要な役割を果たす事を明らかにした。

対連合記憶課題遂行中の霊長類側頭葉皮質での単一ニューロン記録：ＴＥ野，36野間の比較

納家勇治，吉田正俊，伊原　毅，櫻井芳雄，伊藤昭光，柴田愁子，宮下保司

最近の破壊実験により嗅周野が刺激間連合記憶に重要な部位であることが示された。嗅周野，特に36野はＴＥ野から投射を受ける。ＴＥ野は視覚野の中でも物体知覚の最終段階であり，記憶にも関係することが知られている。本研究部門ではＴＥ野と36野の視覚記憶表現を比較するために，対連合記憶課題遂行中のニホンザルにおいて両領野での神経応答を記録した。ニューロンの対符号化を評価するために対符号化指標(PCI)を，記憶の想起との関係を評価するために対想起指標(PRI)をそれぞれ相関係数を用いて定義した。TE野と36野の細胞群が示すPCIとPRIは各領野で有意に正の値をとり，さらに36野が示すPCIとPRIの値はＴＥ野に比べて有意に大きかった。この結果，36野とTE野の視覚記憶表現に機能分化が存在することが示唆された。

機能的磁気共鳴画像法によるヒト大脳前頭葉機構の解析

宮下保司，小西清貴，納家勇治，吉田正俊

The Wisconsin Card Sorting Test, which probes the ability to shift attention from one category of stimulus attributes to another (shifting cognitive sets), is the most common paradigm used to detect human frontal lobe pathology. However, the exact relationship of this card test to prefrontal function and the precise anatomical localization of the cognitive shifts involved are controversial. By isolating shift-related signals using the temporal resolution of functional magnetic resonance imaging, we reproducibly found transient activation of the posterior part of the bilateral inferior frontal sulci. This activation was larger as the number of dimensions (relevant stimulus attributes that had to be recognized) were increased. These results suggest that the inferior frontal areas play an essential role in the flexible shifting of cognitive sets.

長期記憶想起の基礎となる前頭葉—側頭葉間相互作用の研究

宮下保司，長谷川功，納家勇治，吉田正俊

A perceptual image can be recalled from memory without sensory stimulation. However, the neural origin of memory retrieval remains unsettled. To examine whether memory retrieval can be regulated by top-down processes originating from prefrontal cortex, a visual associative memory task was introduced into the partial split-brain paradigm in monkeys. Long-term memory acquired through stimulus-stimulus association did not transfer via anterior corpus callosum, a key part interconnecting prefrontal cortices. Nonetheless, following presentation of a visual cue to one hemisphere, the anterior callosum could instruct the other hemisphere to retrieve the correct stimulus specified by the cue. Thus, while visual long-term memory is stored in temporal cortex, memory retrieval is under the executive control of prefrontal cortex.

統合生理研究施設

感覚・運動機能研究プロジェクト

【概要】

本研究室の研究内容は，(1)大型脳磁計を用いたヒト脳機能の研究，(2) 超小型磁場計測装置（microSQUID）を用いた研究，(3) 脳波および経頭蓋磁気刺激を用いた研究，の３つに大別される。体性感覚系では，これまでヒトでは明確にされていなかった第２次体性感覚野の受容野分布を明確にすることができた。また，体性感覚誘発反応が，同時に与えられた視覚あるいは聴覚刺激により影響されることを明らかにした。また痛覚認知が注意効果によって明瞭に変化することを示した。聴覚系では，聴覚誘発反応が睡眠中には振幅が増大することを明らかにし，聴覚受容の抑制系が睡眠中には抑制されるのではないかと考察した。視覚系では，仮現運動の認知メカニズムを詳細に検討し，ヒトにおけるV5/MT野の活動を解析した。また「顔」に対する認知過程を解析し，下側頭葉の重要性と右半球の優位性を明らかにした。さらにランダムドットを利用した新しい刺激法 (Random dots blinking) を開発し，「形態視」に関する研究を行った。「言語認知」に関する研究では「単語の繰り返し呈示」を行い，左聴覚野付近に活動が見られることを明らかにした。MicroSQUIDはようやくセッティングが終了し，先ず末梢神経での活動磁場を詳細に解析した。脳波では「右利き者と左利き者の運動時の脳活動の相違」を解析した。また経頭蓋磁気刺激を用いて，運動準備及び遂行中の脳活動を解析した。

体性感覚誘発脳磁図に対する視覚及び聴覚刺激の影響

Lam Khanh，中　大輔，柿木隆介

正中神経を刺激して体性感覚誘発脳磁図を記録する時に，同時に視覚（アニメーションあるいはランダムドット運動）あるいは聴覚（ショパンのピアノ曲）刺激を与えて，何も与えない時（コントロール）と比較検討した。刺激対側半球では，初期成分には変化は無かった。刺激後35-60msecの中潜時成分は視覚刺激により有意に振幅が増大したが，聴覚刺激では有意差は無かった。頭頂葉のpolymodal neuronsの活動が影響を与えているのではないかと推測した。刺激同側半球では，刺激後80-100msecの後期成分 (第２次感覚野起源)が，視覚，聴覚のいすれの刺激に対しても有意に振幅低下した。同様にpolymodal neuronsの活動の影響が考えられる。あるいは，第２次感覚野では注意効果の影響が大きいことが知られており，これによるものである可能性も考えられた（Clinical Neurophysiology, 110: 295-304, 1999)。

体性感覚誘発脳電位（SEP）を用いた運動・感覚連関

宝珠山稔，柿木隆介

運動時の感覚情報処理過程を明らかにするために，体性感覚誘発脳電位（SEP）と運動企図，運動の拙劣さ，との関連について研究した。Go/No-go 課題を用いた運動企図との関連では，No-go ではN30 とN33 の振幅が低下し，Go ではそれらに加えてN20, P25 が減衰した。N20 減衰は実際の運動に伴う皮質感覚野の活動に由来し，N30, N33は運動準備や企図でも影響されると考えられる。運動の拙劣さとの関連では，非利き手での書字課題を用い，左右の正中神経の電気刺激によるSEP を記録した。利き手書字中では，書字手刺激によるSEP 減衰が認めらたが，非利き手書字では，安静手の刺激でも同様な SEP 減衰が認められた。SEP の変化は電気刺激による信号と運動による感覚運動野活動との干渉によると考えられるが，非利き手書字では両側感覚運動野の活動が関与していることが推察された（Brain Research, 833: 10-19, 1999,）。

第 2 次体性感覚野の体部位局在的再現

前田多章，柿木隆介

体性感覚刺激による，ヒトの第 2 次体性感覚野（以下，SIIと略）の投射野分布を脳磁図を用いて検討した。電気刺激により，被験者14名に対し，上唇，下唇，手親指，手中指および足首を刺激し，SIIの反応を脳磁計を用いて計測し，体部位局在的再現を確認するとともに，対側反応と同測反応のそれぞれで比較検討した。体表上の各部位から情報を受けるSIIの投射野の分布は，第 1 次体性感覚野の体部位局在的再現ほど明確ではなかったが，一定の傾向が認められた（図 1 ）。すなわち，SIIにおける投射位置は，

（1）前方から後方へ：口唇，手親指，手中指，下肢
（2）内側から外側へ：下肢，手中指，手親指，口唇
（3）下方から上方へ：口唇，手親指，手中指，下肢

となった。サルでは体表上の各部位から情報を受けるSIIの体部位局在的再現が報告されているが，これを支持するものであり，脳磁図を用いた非侵襲的実験によってヒトのSIIの体部位局在的再現の傾向を見出した。(NeuroReport, 10: 301-306, 1999)

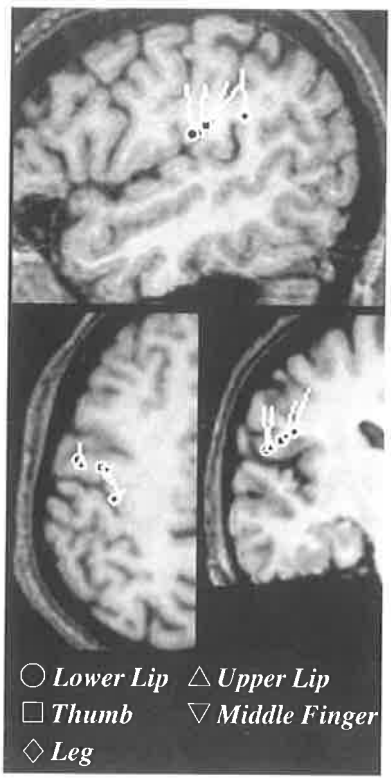


図１：　体性感覚刺激による，ヒトの第２次体性感覚野（以下、SIIと略）の投射野分布をMRI上に投影したもの。第１次体性感覚野の体部位局在的再現ほど明確ではなかったが，一定の傾向が認められた。すなわち，SIIにおける投射位置は，
（１）前方から後方へ：口唇，手親指，手中指，下肢
（２）内側から外側へ：下肢，手中指，手親指，口唇
（３）下方から上方へ：口唇，手親指，手中指，下肢　となった。

脳磁図，脳波による痛覚認知に対する注意の効果についての研究

山崎　浩，柿木隆介，渡辺昌子，宝珠山稔，中　大輔

自覚的な痛みの強さは心理状態によって変化し，実際注意をそらすことにより痛みが軽減することが報告されているが，その生理学的機構は明らかでない。本研究では，CO_2レーザー光線刺激によって誘発される痛覚関連脳磁場，脳波を測定し，同時に計算，記憶課題を課し大脳活動への影響を調べ，次の所見を得た。1）CO_2レーザー光線刺激により潜時約165msecに明瞭な脳磁図が記録されたが，課題による振幅の変化はなかった．2）脳磁図の電流双極子は両側第2次体性感

覚野に推定された．3）潜時約240msec，340msecに記録された脳波の振幅は有意に減少した．4）自覚的な痛みの強さは課題負荷時に明らかに減少した．以上より，痛覚認知に対する注意の効果は，短潜時（潜時約165msec）の大脳活動には影響を与えず，200msec以降の中潜時以降に影響を及ぼすと考えられた．(Brain Research Cognitive Brain Research 8: 73-76, 1999)

仮現運動知覚程度と脳磁場反応

川上　治，金桶吉起，　関口貴裕，山崎　浩，柿木隆介

視覚性仮現運動を誘発する刺激条件を変えることで，運動知覚の程度を変化させ，脳磁場反応とどう対応するか検討した。対象は健常男子5名。仮現運動刺激には，2本のLEDを用い刺激間隔(ISI)を-140msから+250msまで変化させ呈示した。同じ刺激を用いて心理物理実験を行い，ISI変化に対する運動知覚程度を評価した。脳磁場反応のRMSの最大振幅と単一双極子モデルで推定された電流強度は，ISI=0ms付近で最大となり，心理物理実験における知覚程度とよく相関していた。この反応の電流双極子は，ISIに関係なくヒトのMT/V5付近に推定され，同部位の神経活動は運動知覚の質にも関係する可能性が示された。今後は実際の運動刺激と仮現運動刺激とでの反応の違いについて検討していく予定である。

脳磁図を用いた顔認知機構の研究

渡邊昌子，小山紗智子，柿木隆介

顔認知に関する情報処理過程に関しては，動物を対象とした研究の他，ヒトを対象とする脳波，PET，fMRI等を用いた研究が報告されている。本研究では脳磁図及び脳波を用いてヒトの「顔認知過程」の時間的空間的解析を行った。脳磁図では1Mと2Mの二つの成分が認められ，2Mは顔刺激に対して特異的に（右半球では全被験者から，左半球では半数の被験者で）記録された。1Mは両側第一次視覚野，2Mは紡錘状回が活動源であった（図２）。脳波では顔刺激に特異的な成分が認められ，右後側頭部で記録された成分の振幅は左で記録されたものより有意に大きかった。以上より，ヒトの顔認知には紡錘状回が重要な役割を果たしており右半球が左半球より優位であることが示唆された。脳波反応の潜時は脳磁図の2M潜時より有意に延長していた。脳磁界が紡錘状回における「顔特異的反応」を純粋に反映しているのに対し，脳波は他の部位での活動を包含していると考えられた。(Brain Research Cognitive Brain Research 8: 125-142, 1999) (Neuroreport 10: 2193-2198, 1999)

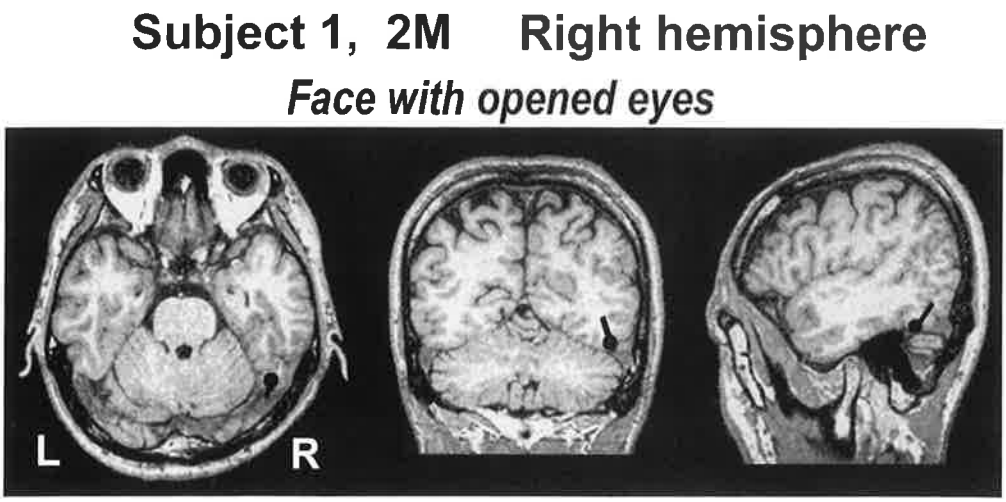


図２： Face with opened eyes刺激に対する顔特異的成分(2M)について単一双極子モデルにより推定された電流双極子の位置。右半球紡錘状回付近に位置推定された (右半球からの記録)。

脳磁図(MEG)を用いたヒト大脳視覚連合野の神経生理学的研究

大草知裕，金桶吉起，柿木隆介

脳内の視覚情報処理のうち，物体の形状に関しては，大脳皮質の視覚連合野，下側頭領域における活動が重要であることが報告されている。我々は上記皮質領域の活動についてMEGを用いて以下のような研究を行っている。(1) 呈示時に輝度変化が生じない文字刺激を用いて，上記皮質領域の活動を記録解析し，被験者の主観的識別成績と比較した。その結果，潜時300msに被験者の識別成績と関連した振幅を持つ脳磁場が記録され，活動源は下側頭葉紡錘状回近辺に推定された。(2) 輝度やテクスチャーなどの様々な視覚的手がかりを用いて図形を被験者に呈示し上記皮質領域の活動を記録解析した。その結果，視覚的手がかりの違いに関わらず共通した活動が下側頭領域に見られ，またその活動潜時と被験者の心理物理学的な反応時間との間に関連が見られた。これらの結果より上記皮質領域の活動と形状の視知覚との関連が示唆された。(NeuroReport, 9: 3961-3965, 1998)

睡眠中の聴覚誘発脳磁図の変化

中　大輔，柿木隆介

睡眠中の聴覚誘発脳磁図の変化を解析することにより，聴覚受容と意識の関係を考察した。潜時50, 100, 150, 200msecの各成分をM50, M100, M150, M200と命名した。各成分の潜時は睡眠中では延長する傾向が見られたが有意差は無かった。初期成分（M50, M100）は睡眠中には振幅が減少する傾向が見られたが有意差は無かった。逆に後期成分（M150, M200）は睡眠中には振幅が有意に増大した。これは，睡眠中には聴覚認知を抑制する系が抑制されるために，逆に振幅が増大したものと考察した。いずれの成分も第1次聴覚野が発生源であった。初期成分の活動位置は睡眠中には有意に上方に移動したが，後期成分には有意な変化は見られなかったことより，両者の発生機序には相違があることが示唆された(Neuroscience, 93: 573-583, 1999)。

視覚的単語認知に伴う左側頭葉の活動: 繰り返し効果の検討

関口貴裕，小山紗智子，柿木隆介

刺激の反復提示によって生じる神経活動の変化は記憶表象の変化に関与すると想定されている。繰り返し効果に関与する脳部位を検索するため，左右の側頭部から脳磁場の計測を行った。健常被験者14名を対象に四文字のカタカナ単語（例，アイロン，228語）および偽単語（例，ユナヘチ，228語）を提示し，単語，偽単語それぞれ120語を8語間隔で2回提示した。単語および偽単語提示後300～500msに明確な誘発脳磁場成分が出現したが，左側頭部のほうが右側頭部よりも有意に大きかった。また，反復提示による磁場強度の減衰は単語に対してのみ左側頭部で認められた。左大脳半球側の成分の活動源は聴覚野近傍に推定され，その推定強度は単語の繰り返しによって減少した。偽単語には繰り返しによる活動の変化が認められなかったことから，左側の聴覚近傍は語彙処理に関与していると推察した。(Japanese Journal of Psychological Research, in press)

微小磁界計測装置による末梢神経活動磁界の計測

宝珠山稔，柿木隆介

末梢神経など小領域の磁界計測には小径のコイルを測定対象に近接させることが必要である。

これまでの末梢神経活動磁界は，単チャンネル磁界計測装置や脳磁計により測定されてきたが，本研究では，コイル直径約 3 mm，対象ーコイル間距離 3.8 mm の12チャンネル微小磁界計測装置（Micro-SQUID）を用いて，末梢神経活動磁界の詳細を記録することができた（図 3 ）。示指の電気刺激により生じる正中神経の感覚神経活動磁界を手首掌側に配置した12のセンサー（3 × 4 列を2.16 cm^2 内に等間隔に配置）により計測した。記録された磁界は，2 組の双極子が相反する方向で向き合う 4 極子を形成し伝導していく状況を明瞭に描出した。Micro-SQUID によるヒトの小領域での磁界計測により，末梢組織での病態，中枢神経への伝達経路・過程を明らかにすることを目指している。(Neuroscience Letters, 272: 199-202, 1999)

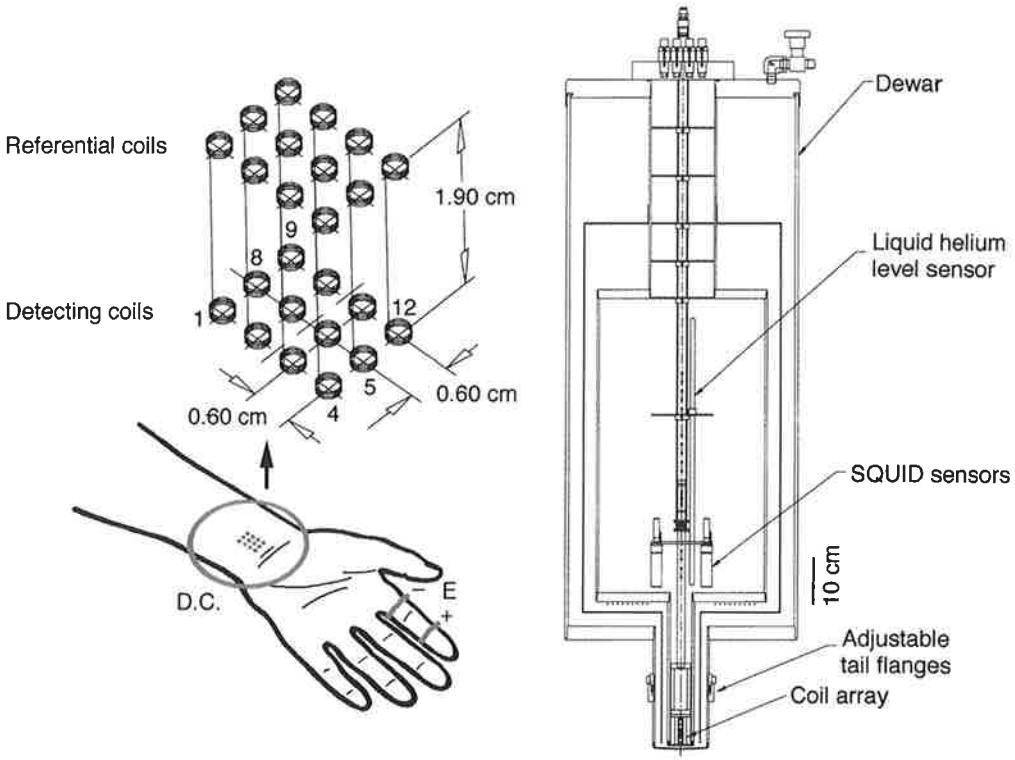


図 3 ： 右図：12チャンネル-微小磁気計測装置（CONDUCTUS, San Diego, CA）．下部のセンサーコイル（Coil array）は周囲を液体ヘリウムで充填・冷却された超伝導量子干渉素子（SQUID）に接続されている．
左図：下；正中神経活動磁界の記録時の検出コイル（D.C.）の配置と刺激電極（E）、上；検出コイル，参照コイルの実寸を示す．

随意運動と経頭蓋的大脳磁気刺激による誘発反応

宝珠山稔，柿木隆介

経頭蓋磁気刺激（TCMS）は，非侵襲的にヒトの大脳皮質刺激が可能であり，錐体路周辺の神経活動を検索するのに有用な手法である。TCMS により誘発される反応の生理学的変化を明らかにするため，運動企図時の錐体路の興奮性と，その後に生じる Cortical silent period (CSP) について検討した。正常被験者に，予告信号（S１）と反応信号（S２）を呈示し，右手の押しボタン課題を行わせた。S1-S2 間にTCMSを左手の運動野に与え，左手第１骨間筋から誘発筋電図（MEP），CSPを記録した。CSPはTCMS刺激時期がS２に近づくにつれ短縮したが，MEPの変化は認められなかった。CSPの変化は，課題中，特に運動準備に関連して，大脳抑制系の機能的変化を反映する所見と考えられた（Clinical Neurophysiology, 110: 1394-1398, 1999）。さらに誘発反応を皮質機能を反映する指標として，その変化を種々の課題中に検討している。

高次脳機能研究プロジェクト

【概要】

統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクトは1996年１月に伊佐が赴任して以来３年目を迎えた。これまで，眼球のサッカード運動の反応時間が注意によって修飾を受けることに着目して，サッカードの制御中枢である上丘の神経回路の信号伝達を修飾するシステムとして，「注意」の脳内機構をボトムアップ式に捉えて研究を進めてきた。伊佐と助手の斎藤，総研大博士課程の遠藤はラット上丘のスライス標本を用いて上丘局所神経回路の研究を進め，助手の小林，特別共同利用研究員の山本は共同研究員の相澤寛（前当研究室の助手，現弘前大学助教授）とともに注意の状態を課題によって変えたときの上丘および上丘にコリン作動性線維を送る脚橋被蓋核の神経活動をニホンザルにおいて解析し，両者の研究を総合的に捉えることで注意の脳内機構の理解に挑戦している。

上丘中間層局所神経回路の非線形的活性化機構について

斎藤康彦，遠藤利朗，伊佐　正

上丘スライスにおいて浅層(SGS)，視神経層(SO)及び中間層(SGI)のニューロンからホールセル記録を行い，視神経束(OT)に対する電気刺激の効果を調べると，いずれの場合も興奮性シナプス電

位（EPSP）はbicuculline存在下において増大するが，特にSGIニューロンにおいて増大の程度は顕著で，単発の刺激に対して1s以上に及ぶ長い脱分極と20－30発の活動電位を生じるようになる。そして生成する活動電位の数は刺激強度との間に顕著な非線形的な関係が見られた。これらのSGIのニューロンは細胞内通電に対しては通電期間中のみに規則的な発火を示すだけなので，このような長時間持続する脱分極はSGIニューロンに内在する性質によるのではなく，神経回路の構造に起因すると考えられた。そして，SGIを上丘から単離し，その中で電気刺激を行っても多くのSGIニューロンにおいて長時間持続するEPSPと非線形的入出力関係が見られたので，このような性質は上丘中間層に内在する興奮性結合によるものと推察された。

視覚誘導性サッカード課題遂行時のサル脚橋被蓋核の単一ニューロン活動記録

小林　康，相澤　寛，山本　優，伊佐　正

ニホンザル２頭に以下の２種類の視覚誘導性サッカード課題を訓練した。（１）NO GAP 課題：注視点の消灯と同時に周辺に指標が提示され，正しく注視すると報酬が与えられる。（２）GAP課題：注視点の消灯後数百ミリ秒のGAP期間の後，指標が点灯する。このような遂行中に脚橋被蓋核ニューロンの活動を記録すると，サッカード直前の活動については，活動を増加させる細胞と減少させる細胞が見られた。そしてサッカード直前に活動を増加させる細胞の多くはGAP期間中にも活動を増加させ，サッカード直前に活動を減少させる細胞の多くはGAP期間中にも活動を減少させた。以上の結果から脚橋被蓋核はサッカード運動の開始及びその準備に促進的・抑制的双方に関わる可能性が示唆された。

上丘浅層における$GABA_B$受容体の作用について

遠藤利朗，伊佐　正

上丘スライス標本において浅層ニューロンからホールセル記録を行い，近傍の電気刺激に対するシナプス電流を膜電位固定したにて記録した。Bicuculline存在下で記録される興奮性シナプス電流(EPSC)とCNQXとAPV存在下で記録される抑制性シナプス電流(IPSC)はいずれも$GABA_B$受容体のアゴニストである10 μMのbaclofen投与により，抑制された。そしてその抑制は$GABA_B$受容体の拮抗薬であるCGP55845Aの投与により回復した。そしてbaclofenはbath applicationされたAMPA受容体のアゴニストのカイニン酸や$GABA_A$受容体のアゴニストであるmuscimolによって誘発される電流は抑制しなかった。以上結果から上丘浅層において$GABA_B$受容体はシナプス前

性に興奮，抑制性伝達のいずれをも抑制することが明らかになった。

自律機能研究プロジェクト

【概要】

皮膚感覚には，周波数情報，空間情報及び強度情報が含まれている。自然環境の中でヒトが体験する体性感覚はこのような要素的刺激が複雑に組み合わされた複合感覚であり，更には視覚・聴覚入力が体性感覚認知に影響を与えることはよく知られている。これらの情報がヒトの脳でどのように処理されて知覚されているのか，大脳皮質の神経活動を電位・磁場として観測し，これを解析してその神経メカニズムを探るのが本研究部門の主な目的である。特に複合感覚の情報処理についての体性感覚誘発電位(SEPs)，体性感覚誘発磁界(SEFs)の研究は全く未開の分野であり今後の課題として残されている。このような感覚生理学における基礎的研究は例えば盲人の皮膚感覚を介するパターン認知や文字認知（触読）などの生理学的メカニズムと大脳皮質の可塑性の解明にも道を開くものと期待できる。以上の目的を達成するため多方面からアプローチし多くの研究成果を上げることができた。その第一は現在臨床神経生理学の分野でのトピックである体性感覚野からの高周波振動である。その生理学的成因については数年前に抑制介在ニューロン仮説を発表した。この高周波振動は睡眠－覚醒サイクル，注意，干渉により変化する。さらに加齢とともにその振幅が増大することを明らかにした。第二はSEFsの初期成分(N20m)が従来の定説であった体性感覚皮質3b野の点ではなく，面の活動を表現しその活動がダイナミックに移動することを発見したことである。この新知見は体性感覚皮質の微小回路網とその機能について（特に水平線維の機能について）重要な示唆を与える。抑制介在ニューロンと水平線維は大脳皮質の可塑性に中心的役割を担っており，高周波振動とN20mの観測により非侵襲的に大脳皮質可塑性の神経メカニズムの開明に貢献できる可能性がでてきた。

SEF20m信号源は3b野を外方に移動する

[1]都精神研・精神生理，[2]岡崎生理研・統合生理，[3]筑波技術短大・鍼灸科
[4]足利工大・人間情報工学，[5]市原市民病院・内科
橋本　勲[1,2]，木村友昭[3]，佐久間研司[2]，井口義信[1]，斉藤泰彦[4]，福島達臣[5]

正中神経電気刺激による体性感覚誘発電位(SEPs)のN20一次応答は3b野における接線方向等価電流双極子(ECD)で近似され，その発生源は固定したものと考えられてきた。しかし3b野の活動パターンは点ではなく面でありしかもダイナミックに移動することを，体性感覚誘発磁場

(SEFs)N20m成分の解析から見出した。N20mピーク前後のECDは伝播速度3.6 m/sで，前，外，下方に8.7±3.1 mm移動した（mean±S.D.)。この移動方向は，ECDすなわち3b野の錐体細胞尖端樹状突起の方向と直交していた。これらのSEFs所見から3b野錐体細胞の興奮が皮質内を外方に伝播し，この伝播は錐体細胞の水平線維を介していることが示唆された。

Air-puff閾値刺激によるSEPsは閾上・閾下知覚を反映する

[1]都精神研・精神生理，[2]岡崎生理研・統合生理，[3]筑波技術短大・鍼灸科
橋本　勲[1,2]，吉川一義[1]，木村友昭[3]

ほぼ50%検出確率を有する閾値強度のair-puff刺激を右手掌に与え，体性感覚誘発電位(SEPs)を頭皮上6カ所から記録するとともに，各試行に対する検出の有無を左示指の伸展により答えさせた。SEPsは閾上，閾下知覚の試行に分け，それぞれを加算平均した。SEPs記録とは別に反応時間(RT)を測定した。P300 SEP成分は閾上刺激に対してのみ記録され，閾下刺激に対しては記録されなかった。P300ピーク潜時は316±29 ms (mean±S.D.)でRT(390±43 ms)より早かった。これらの所見はSEPsが閾上，閾下知覚を正確に反映することを示唆している。

多点air-puff閾値刺激による感覚funnelingの神経メカニズム

[1]都精神研・精神生理，[2]岡崎生理研・統合生理，[3]筑波技術短大・鍼灸科
橋本　勲[1,2]，吉川一義[1]，木村友昭[3]

多点air-puff閾値刺激による感覚funnelingの神経メカニズムを明らかにする目的で，SEPs，反応時間(RT)と主観的検出閾値を調べた。10 mm間隔の直線上に配置したノズルよりair-puffを噴出させ，1点，2点，3点の刺激とした。多点刺激のonsetは同期させた。1点刺激の閾値強度と同一強度の2点，3点刺激によりfunneled sensationが誘発され，検出閾値は多点刺激で低下した。P300 SEP成分は多点刺激で潜時が短縮し，振幅は低下する傾向がみられたが，統計学的には有意ではなかった。しかしRTは多点刺激により有意に短縮した。これらの所見から閾値強度の感覚funnelingはP300には影響が少なく，したがってP300の発現以後で運動指令以前の神経プロセスを促進することを示唆する。

ヒト１次体性感覚野における周波数再現の再評価

[1]都精神研・精神生理，[2]岡崎生理研・統合生理，[3]足利工大・人間情報工学
[4]筑波技術短大・鍼灸科，[5]市原市民病院・内科
橋本　勲[1,2]，斉藤泰彦[3]，井口義信[1]，木村友昭[4]，福島達臣[5]，佐久間研司[2]

ヒト１次体性感覚野(SI)における周波数再現について再検討を行った。37チャネル軸方向１次微分型SQUIDグラジオメータ(BTi Magnes)を用いて体性感覚誘発磁場(SEFs)を計測した。周波数50，100，200，400 Hzで持続20 msの振動刺激を右示指の先端に与えた。単一双極子モデルを用いてSEFsの初期成分M50の信号源推定を行った。各周波数刺激によるM50の信号源は3b野に推定され，その位置に差は認められなかった。これらの所見は122チャネル平面型１次微分グラジオメータ(Neuromag)を用いた実験結果(Hashimoto et al. 1998, EEG. J.)を支持するものであり，ヒトSIにおける規則的な周波数再現は存在しないことを示唆する。

ヒト１次体性感覚野における遠位－近位体部位局在の再評価

[1]都精神研・精神生理，[2]岡崎生理研・統合生理，[3]足利工大・人間情報工学
[4]筑波技術短大・鍼灸科，[5]市原市民病院・内科
橋本　勲[1,2]，井口義信[1]，斉藤泰彦[3]，木村友昭[4]，福島達臣[5]，佐久間研司[2]

ヒト１次体性感覚野(SI)における遠位－近位体部位局在について再検討を行った。37チャネル軸方向１次微分型SQUIDグラジオメータ(BTi Magnes)を用いて体性感覚誘発磁場(SEFs)を計測した。周波数200 Hzで持続20 msの振動刺激を右示指の先端から手掌にかけて3 cm間隔で５カ所に与えた。単一双極子モデルを用いてSEFsの初期成分M50の信号源推定を行った。各刺激部位によるM50の信号源は3b野に推定され，その位置に差は認められなかった。これらの所見は122チャネル平面型１次微分グラジオメータ(Neuromag)を用いた実験結果を支持するものであり，ヒトにおいてはサルで記載されているような手指における規則的再現は不明瞭なことを示唆する。

高周波振動は体性感覚皮質すべてに共通する活動である

[1]岡崎生理研・統合生理，[2]都精神研・精神生理
橋本　勲[1,2]，佐久間研司[1]，中野修治[2]

これまでの高周波振動に関する研究は，正中神経刺激によるSEPsと体性感覚誘発磁場(SEFs)を中心として行われてきた(Curioら 1994; Hashimotoら 1996)。しかし，高周波振動が他の神経刺激に対しても誘発されるかどうかについての研究は少ない。古くはEisenら(1984)による総腓骨神経刺激による高周波SEPsの報告があり，最近ではNakano & Hashimoto (1998)による後脛骨神経刺激による高周波SEPsの研究がある。一方磁場計測ではCurioら(1997)の尺骨神経刺激による高周波SEFs，Sakuma & Hashimoto (in press)とSakumaら(in press)の後脛骨神経刺激による高周波SEFsの報告がみられる。これらの研究から，高周波振動は正中神経だけでなく他の上下肢の神経刺激によっても誘発される，体性感覚皮質に共通の活動であることが明らかにされた。

注意・干渉による高周波振動のモジュレーション

[1]都精神研・精神生理，[2]岡崎生理研・統合生理，[3]筑波技術短大・鍼灸科
[4]足利工大・人間情報工学，[5]市原市民病院・内科
橋本　勲[1,2]，井口義信[1]，寺崎太洋[1]，佐久間研司[2]，木村友昭[3]
斉藤泰彦[4]，福島達臣[5]

正中神経電気刺激によるN20皮質１次応答が手の持続的触刺激により減衰することはよく知られている。正中神経を電気刺激し，同時に手に触刺激を与えたときと与えないときのSEFsを記録した(Hashimotoらin press)。この原波形を，低域(< 300 Hz)および高域(> 300 Hz)通過フィルタを用いて，N20mと高周波振動に分離した。触刺激を同時に加えることによりN20m振幅は著明に減少し，逆に高周波振動はそのピーク数が増加し，半数で振幅が有意に増加した。これらの所見は，N20mと高周波振動が触刺激に対して逆方向の振る舞い，言い換えれば相反性の関係にあることを示している。N20mが皮質錐体細胞の集合EPSPを反映するとすれば，これと相反性の関係にあるのは，抑制介在ニューロンの活動である。皮質４層の抑制介在ニューロンは持続的触刺激により緊張性促通を受けて，正中神経電気刺激に対して反応が促進される（これを仮にボトムアップ機構と呼ぶ)。この触刺激には注意効果も含まれるので，前頭葉を介する注意による介在ニューロン活動の促進も考えられる（これをトップダウン機構と呼ぶ)。他方，持続的触刺激によりもたらされた錐体細胞の不応状態とともに，介在ニューロンからの増大したフィードフォワード抑制が，N20m振幅の著明な減少を生じさせると考えられる。

電位および磁界計測による計算作業中の脳活動の検討

[1]都精神研・精神生理，[2]岡崎生理研・統合生理
井口義信[1]，橋本　勲[1,2]

計算作業中の脳活動を電位，および磁界計測によって検討した。健常成人10名について3種類の作業を課し，脳活動を比較した。1桁の数字を一定間隔で継続的に呈示し，1)数字の継続的加算2)呈示数のカウント，および3)数字を変形した無意味図形の呈示数カウント，を行った。電位計測では，計算課題に特異的な陽性緩電位の賦活（450-800 ms：両側前頭，左側中心～頭頂～側頭，800-1200ms：両側前頭）があった。脳磁界計測でも，特に450-800 msで計算課題に対する反応が顕著であった。その電流双極子源は両側の頭頂～側頭に推定されたが，被験者間の再現性は左側9名，右側6名と，左側の方がより強かった。450-800 msの陽性緩電位は計算処理のための脳活動を反映すると考えられ，脳磁界計測でもこれに対応した脳活動がみられた。一方，800 ms以降の陽性緩電位は計算結果の記憶保持を示唆したが，これに対応した脳活動は脳磁界計測では観測されなかった。

脳磁場計測によるアルファ波回転現象の検証

[1]都精神研・精神生理，[2]岡崎生理研・統合生理
寺崎太洋[1]，井口義信[1]，橋本　勲[1,2]

安静閉瞼時の頭皮上のアルファ波電位分布の動態解析から，電位頂点が矢状断面内で回転しているという仮説を提唱した。この仮説の脳磁図（MEG）による検証を行った。回転現象を単純化して後頭葉に位置の固定したダイポールが矢状断面内で回転していると考えると，MEGではダイポールの半径方向成分は計測されないから，回転現象はMEGでは，1)左右半球の磁場の位相反転および2)左右半球の磁場と後頭部電位との位相差として計測されるはずである。健常成人7例（電位計測3例）で検討したところ，予想された結果が確認された。回転現象は少なくとも2つの方向と位相の異なった発生源の存在を示唆する。脳波のダイポール解析からアルファ波の主要な発生源は視覚野と考えられるから，回転現象のメカニズムとして一次視覚野の順次走査または一次視覚野から高次視覚野への電気的興奮の伝達が考えられる。

脳機能計測センター

形態情報解析室

【概要】

平成10年４月初めまで超高圧電子顕微鏡室は，生理機能研究施設に所属していたが，生理機能研究施設が脳機能計測センターとして再編成された時に，生理機能研究施設の組織培養標本室と合体して，形態情報解析室の名のもとに統一された。

ここでは，まず旧超高圧電子顕微鏡室に関係する部分を記述する。

医学生物学用超高圧電子顕微鏡（Ｈ－1250M型）が昭和57年３月に導入されて，同年11月よりこれを用いての共同利用実験が開始された。平成10年度は共同利用実験計画が17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10年度は最終的に18課題が採択され，17課題が実施された。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。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。また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（2.5日間）を，行っており，今年度は若手の研究者２名の参加があった。

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，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。また　浜生理研前所長（平成９年３月まで）を代表とする平成6-8年度の国際共同研究の一環として，米国カルフォルニア大サンヂエゴ校の　NCMIR(National Center for Microscopy and Imaging Research：　エリースマン教授代表）と提携して，超高圧電子顕微鏡像に対するトモグラフィー解析用プログラム（suprim）を導入している。さらに360度傾斜可能な回転ホルダーを，新たに導入し，トモグラフィー手法の精度の向上を目指して実験を進めている。本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は，共同利用実験等　157日，修理調整等79日である（技術課脳機能計測センター形態情報解析室報告参照)。電顕フィルム使用枚数は 6,770枚，　フィラメン点灯時間は 511.6 時間であった。装置は，平均 95 %の高い稼働率で利用されており，試料位置で10^{-6}Pa台の高い真空度のもとに，安定に運転されている。

なお，トモグラフィー解析用プログラム（suprim）の導入およびこれを用いた解析等に貢献した伊藤嘉邦技官は，平成11年１月から，大脳皮質研究系に移動した。

次に旧組織培養標本室に関係する部分を記述する。平成10年度は光学顕微鏡の明視野像ならびに蛍光像の記録システムとして高解像度，高感度の冷却型カラーCCDカメラシステムを導入した。平成10年度の常時利用者は，所内８部門２施設45名，所外4名の合計49名であった。

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

有井達夫

画素サイズ25 μm 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）を用いて，測定しフィルムと比較検討してきた。これまでに，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電子線検出量子効率 η' [2] において，優ることを報告している。このとき電子に対する検出量子効率 η' としては，照射電子の少ない領域において，電子線のばらつき効果のみを取り出す次式[2] を用いた。

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

ここで I_E，I_0:平均強度，N:画素あたりの平均照射電子数，σ_E，σ_0:強度の標準偏差である。I_0 と σ_0 は，未照射時の平均強度とその標準偏差であり，読みとり機からの出力値のraw dataから強度に変換する時に伴うカットオフ効果を除去できる領域において，照射電子が少ない場合に，平均強度 I_E および σ_E^2 の値がそれぞれ電子線の平均個数に比例している領域から求めた。

今回，さらに，イメージングプレートの検出量子効率 η' を，250kV, 500kVにおいても，測定を行なった。250kV においては，最高感度で測定したときに基本画素で 3.2 であり，画素サイズの増大とともに減少し 0.72 程度で一定となる。500kVにおいても，基本画素で 2.2 であり画素サイズの増大とともに減少し 0.54 程度で一定となる。隣接する画素間の相関をほとんど無視できる画素サイズでの一定値となったDQE：η' の加速電圧依存性を，図1に示す。この値が，真の意味での電子線検出量子効率 η' に対応すると考えられる。このときイメージングプレートにおいては，σ_0^2 をグラフ上から演繹して求めると，どの加速電圧においても，ほぼ0となり電子線が少ない領域において検出感度が高いことがわかる。これは，電顕フィルムから求められる σ_0^2 の値に比較して優位な点である。一方，イメージングプレートでは，乳剤の膜厚による点像分布関数の拡がりと乳剤の分布と個数の影響をより強く受けるので，空間分解能と像質はフィルムと比較して劣っている。電子の個数変動のみに起因する電子線検出量子効率（DQE：η'）と σ_0 および一様照射における強度値の標準偏差，点像分布関数，X-線の影響等を測定することで，2次元検出器としての検出特性を議論できる。イメージングプレートにおける加速電圧 1,000kVにおける出力は，100kVにおける出力の約 1/6に，減少するが，DQE：η' の値は，約 1/2.5 であり，この特性を，有効に応用することにより，加速電圧 1,000kV においても，イメージングプレートは，有効に利用できることが分かる。

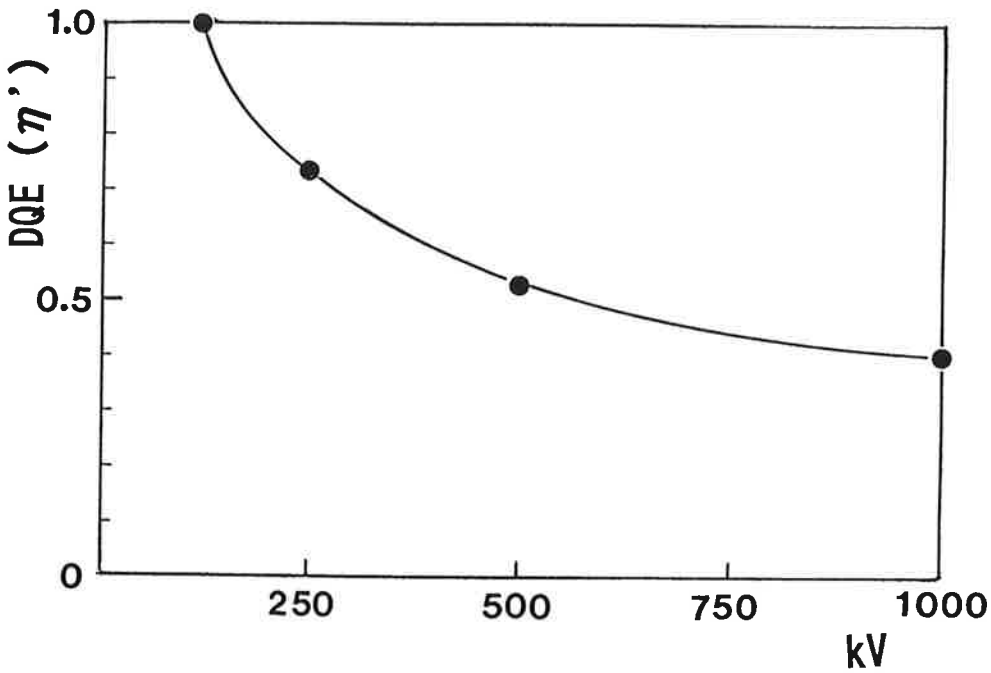


図1. IPに対するDQE：η' の加速電圧依存性

1)N. Ogura, K. Yoshida, Y. Kojima and H. Saito: ICEM 13-Paris, 219-220(1994)
2) T. Arii, N. Yoshimura and Y. Kamiya: J. Electron Microsc. 42, 55-63(1993)

ET_B受容体一部欠損ラットにおける小腸絨毛上皮下線維芽細胞とアストロサイトの形態変化

古家園子[1]，尾崎毅[1]，古家喜四夫[2]（[1]生理学研究所，[2]京都工芸繊維大・応用生物）

小腸絨毛上皮下でネットワークを形成している線維芽細胞はサブスタンスPやセロトニン，アンギオテンシン，エンドセリンなどの種々の生理活性物質に反応して細胞内のCa^{2+}濃度が一過性に上昇し，またアストロサイトと同様に細胞内のcAMP濃度に応じて形態を変える。今回，ET_B受容体が一部欠損したaganglionosisラット(*sl/sl*)の小腸絨毛上皮下線維芽細胞とアストロサイトを培養し，これらの細胞の形態変化の機構を検討した。又，ET_B受容体の局在が報告されている小脳の形態をwild とmutant ratsについてゴルジ染色や免疫組織化学にて比較観察した。1）wild typeと*sl/sl*ラットの小腸絨毛上皮下線維芽細胞とアストロサイトともに，同一の培養条件下

においては形態上の違いは認められなかった。2）*sl/sl*ラットではET-3 に対する細胞内Ca^{2+}の反応性が2桁低かった。ET-1, substance-P, ATP, bradykininに対する反応性はwild typeと差はなかった。3）小腸絨毛上皮下線維芽細胞とアストロサイトともに，sl/slラットでは，ETA受容体を介して星状からフラットへ形態変化した。wild typeではET$_B$受容体および ET$_A$受容体，共に関与していた。4）*sl/sl* ラットの小脳ではwild typeよりPurkinje 細胞のstem dendrite が細かった。Bergmann gliaや髄質のアストロサイトでは光学顕微鏡では明瞭な差異を判別できず，電子顕微鏡での解析を必要とする。

機能情報解析室

【概要】

機能情報解析室では，従来から活用されている磁気共鳴装置，人工気候室，音響実験室が共同利用として引き続き稼働した（磁気共鳴装置共同利用実験の項を参照)。一方，分子レベルでの生理・病理機能発現の基礎となる蛋白質構造物性の研究が今野により進められた。研究内容は，1）溶液環境の変化に応答する蛋白質分子構造変化の解析，2）細胞内蛋白質分解系に関与する蛋白質群の構造・物性解析，3）アミロイド凝集体の形成機構の解析，等である。これらの研究のために，遺伝子工学・蛋白質工学・諸分光法・X線散乱法・電子顕微鏡法・その他の物理測定法が総合的に適用されている。

アミロイド凝集を含む蛋白質凝集体形成機構の総合的解析

今野　卓，永山國昭

アミロイド形成を含む蛋白質凝集機構の解明に1998年度より着手した。他の多くの研究が病理的に重要な特定のアミロイド凝集体形成機構の解明にのみ向かいつつある現状下で，我々は，より一般的な蛋白質凝集現象の中に，この特異ケースを適切に位置づけるという観点から，体系的解析を進めている。この研究途上で，病理とは無関係な植物蛋白質がアミロイド様凝集体を形成することを見出し，アミロイド凝集は決して特殊なカテゴリーの蛋白質にのみ出現する現象ではなく蛋白質が広く共有する特性の帰結であることが示唆され，我々の研究方針の妥当性が指示された。この新たに見出されたアミロイド様凝集体の構造物性解析は，CD分光，熱量測定，ゲル濾過，電子顕微鏡法等で総合的に解析された。

アルコール溶液中における蛋白質鎖の構造解析

今野　卓，岩下　潤（東京大），鎌足雄司（Oxford大），永山國昭

数年来，アルコール溶液中での蛋白質・ポリペプチド鎖の構造変化の研究を体系的に進めている。1998年度は，メタノール溶液中での蛋白質構造変化の記述を一般化するために，アポミオグロビンを含む多くの蛋白質をメタノール溶液中で構造解析し，さらに計算機シミュレーションを行った成果を，まとめて公表した（1999年３月掲載）。さらに，以前の研究で見出された特異的現象を手がかりに，ハロゲン化アルコール溶液中での蛋白質鎖の構造特性をアルキル化アルコールの場合と体系的に比較し，さらに塩添加による効果と両アルコールによる効果の相関関係を詳細に検討した。

カルパイン・カルパスタチン系の溶液構造・物性解析

今野　卓，鎌足雄司（Oxford大），牧 正敏（名大・農）

カルパイン・カルパスタチン系は細胞内での蛋白質処理機構の中枢の一つを担う。従来より多核NMR法などを用いてカルパスタチン側の溶液構造解析を進めているが，この研究の続行に加えて，カルパイン側及びカルパイン・カルパスタチン会合体の構造物性解析に研究対象を広げた。まず，カルパイン部分ドメイン２種類を遺伝子から大量発現・精製する系の確立を行い，その分子の溶液構造解析はCD分光法・X線散乱法などで実施された。この分子とカルパスタチン分子の会合現象の解析も，同様に現在進行中である。さらに，カルパイン及びカルパイン・カルパスタチン会合体全体の構造解析への電子顕微鏡法の適用を企図し，現在は陰染色したカルパインサンプルの単粒子像の同定を進めつつある。

X線溶液散乱法を用いた非天然状態蛋白質鎖の構造解析

今野　卓，田中直毅（京都工繊大），橘　秀樹（神戸大）
上久保裕生（高エネ機構），片岡幹雄（奈良先端大）

蛋白質の非天然状態の構造解析への小角Ｘ線散乱法(SAXS)の適用を発展させるため，複数の所外研究者と数年来共同研究を進めている。強X線源としてシンクロトロン放射光を用いた測定を定期的に維持するため，今野を研究代表者とする共同利用課題が高エネルギー加速器研究機構

（つくば）で採択されている。1998年度の研究対象は，リゾチーム変異体，中性領域でのペプシン，及びカルパスタチンであった。これらの測定結果は，他の物性測定結果と組み合わされ，蛋白質フォールディング過程，分子シャペロンとの相互作用機構，変性鎖の残余構造などの解明に資されている。

生体情報処理室

【概要】

生体情報処理室では，中央設備である「生体情報解析システム」と各種ネットワーク・サーバ，所内ローカルエリアネットワーク(LAN)の維持・管理を行うとともに，新たな研究対象，手法に対応したデータ解析，画像処理，モデリング・シミュレーション環境の開発を行っている。

一方，視覚神経系のニューロン活動に対する研究を，計算論的立場から進めている。これまで，視覚センサーとしての網膜の構造と機能を明らかにすることを目的として，網膜を構成するニューロンの１つである水平細胞の光応答特性を生成するために必要な視細胞－水平細胞間の機能的な回路構成の解析を行ってきた。

また，最近では，大脳皮質初期視覚野における情報表現について，マルチニューロン活動の相互干渉，同期に関する研究を進めている。これは神経科学において最近注目されている分野の１つであり，実験技術，データ解析手法などの開発，計算理論の構築が精力的に進められている。ここでは，特に，データ解析手法（理論）に重点を置いた研究を行っている。

動物実験施設

【概要】

生理学研究所動物実験施設は，生理学並びに基礎生物学の研究に用いる実験動物を供給するとともに動物実験を行うための施設であるが，基礎医学及び生物学領域のみを対象とした動物実験施設の中ではユニークな存在である。施設は設立以来19年を経過し，この間に生理学，基礎生物学両研究所の研究体制の充実ぶりはめざましく，研究人口も当初の予想を上回って増加の一途をたどってきた。動物実験施設は生命科学の研究の場であるとともに，動物実験に必要な技術，情報の提供のほか，実験に付随する諸々のサービスが期待される組織であり様々な取り組みを行なっている。

生命科学の研究におけるトランスジェニックマウス，あるいはノックアウトマウスなどのいわゆる遺伝子導入動物を用いた動物実験は，ますます広範な領域で用いられるようになり，実験動物の施設間の移送も頻繁に行われるようになった。施設間の動物の移送を行う上で考慮すべきことの一つに，微生物学的統御のレベルの異なる動物の持ち込みよるトラブルの防止がある。動物実験施設では平成９年度における他施設から搬入されたマウスの汚染事故の経験から，搬入出時の微生物検査を徹底するとともに，汚染の疑いのある動物については「隔離」を原則として，事故の防止につとめた。その後この種の汚染事故は起こっていないがラット，マウス飼育室を含む当施設の大部分の飼育室のバリアーシステムはきわめて不十分な仕様であるため，単に取り扱いを慎重にするだけで汚染を防止できるかどうかについては不安がある。汚染の程度や頻度を把握することを目的とした微生物モニタリング体制について検討する必要がある。なお，平成10年度には国立大学動物実験施設協議会の「実験動物の授受に関するガイドライン（案）－（マウス・ラット編）－」が一部改訂され，動物施設間におけるラット・マウスの授受に関する指針として示されているので，当施設もこの指針を遵守する方針である。

遺伝子導入動物の飼育スペースの問題は依然として深刻で，一部に施設への搬入が出来ないケースが見られるようになった。動物実験施設では，増え続ける系統維持マウスを減らすために，受精卵の凍結を行うべく技術の導入を進め，平成10年度には実用化にこぎ着け，マウス受精卵凍結事業を開始した。利用者の積極的な協力を得て，これまでに約20系統のマウス初期胚の凍結保存を行い，スペース不足の緩和をはかった。しかしながら，今後の研究の動向によってはなお飼育室の需要が受精卵凍結によって生み出されるスペースの余剰を上回る可能性もあり予断を許さない情勢である。

生理学研究所動物実験施設に期待されるもう一つのテーマは，ネコ，サル等の安定供給体制の確立である。学習能力に優れたニホンザルの入手は脳研究の成否を決める言っても良いほど重要であるが，入手源としては野猿公園や動物園からの払い下げに頼らざるを得ないのが実状で，数量，品質ともに不安定である。取扱業者や利用者との情報交換を密にして安定供給に努めている

ところである。なお，ニホンザルのＢウイルス汚染に関しては，動物業者の間においても安全性に対する意識の向上がみられ，Ｂウイルス抗体の他，結核，赤痢，サルモネラのチェックを業者側でも実施しつつあることは評価できる。

脳研究に用いられる実験動物としては，サル類と並んでネコの果たす役割も貴重であるが，平成10年度はネコの供給に大きな転機が訪れることとなった。これまで実験用のネコは自治体から研究用に払い下げされるいわゆる「学術譲渡」に大きく依存してきたが，平成10年度末をもって愛知県は学術研究用へのイヌ，ネコの払い下げを廃止することを各研究機関に通告した。我々は主としてイヌの払い下げを受けてきた名古屋大学と共同して「学術譲渡」の継続を陳情したが聞き入れられず，平成11年度より自治体からの研究用へのイヌ，ネコの払い下げの道は閉ざされることとなった。医学，生物学の教育，研究にとって欠かすことが出来ないこれらの実験動物を，自治体からの払い下げに依存することに問題のあることは識者より指摘されてきたことではあるが，供給体制が十分整備されない段階での突然の譲渡廃止による影響は，単に２～３のユーザーや，すでに実施が予定されている共同研究，大学院教育にとどまらず，今後の研究活動にとってきわめて大きく愛知県の決定は大変遺憾であるが，決定が覆らない限り我々は当面の実験計画への影響を出来るだけ回避するための方策を模索する以外にないことも明らかである。海外からの輸入を含めて，必要動物数の確保に向けて全力を傾注して事態の打開をはかって行く決意である。

動物実験を行う際の憲法とも言える「動物実験指針」を遵守するために動物実験施設が果たすべき役割は多岐にわたり様々な内容のものがあるが，その一つに実験動物の健康管理の問題がある。実験中の実験動物の健康管理は実験者の責にあることは基本であるが，ニホンザルを用いた脳研究においては，学習や記憶を課す慢性実験で動物の飼育は長期にわたり，その間に体調を崩す個体も少なくない。サルを用いる実験の特殊性を考慮して，サルについては平成10年度より，サンプルの提供があれば血液生化学検査や微生物学的検査の要望に応えることを検討している。サル以外の動物についても獣医学的なケアーが行われることが望ましいが，現在の組織体制では限界があり今後の課題である。

様々な種類の水生動物の飼育設備を有する生理学研究所動物実験施設の水生動物室は，全国の動物実験施設の中にあってユニークな位置をしめている。海岸線に近いとは言え内陸部で海産動物の長期飼育を行うことには当初大きな不安があったが，道路や輸送手段の発達により最近は機器の故障以外には大きなトラブルもなく安定している。

設備のほうは設立後20年を経過したためいくつかの重要な問題が出ている。第１は水槽本体の老朽化の問題で，樹脂の硬化が進んでひび割れや接着部の剥離が起きやすくなっていることである。また，加熱冷却ユニットやポンプも更新の時期に来ているが，代替フロンの問題やエネルギーの効率，メンテナンス等を考慮すると，個別に交換するよりも集中熱源方式にするのが望ましい。財政状況の厳しい中ではあるがよりよい飼育環境の構築に向けて地道な努力を傾けていきたい。

このほか動物実験に関わる大きな問題として心配された「動物の保護及び管理に関する法律」

の改正の動きは，当初より遅れて今秋の国会に上程ではないかと観測されている。現在のところ，動物実験の規制を主張してきた動物愛護団体の要望は容れられていないが，今後どのような形での巻き返しがあるか分からないので注意深く見守る必要があり，また動物実験の必要性についてさらに社会のコンセンサスを得る努力をして行かねばならない。

脳研究におけるモデル動物開発の試み

山崎由起子

脳研究において最も重要な実験動物のひとつであるラットでは，個体レベルでの解析が進み，多くの知見が蓄積されているにもかかわらず，分子遺伝学的研究が未だ十分には成されていない。このような生理学的研究と遺伝学的研究とのギャップを克服し，相互理解できるような新たなモデル動物を開発することは，今後の脳研究の展開において必須と考えられる。我々は遺伝子変換ラットの開発を最終目的として，今回，ラットにおける発生工学および遺伝子操作に関わる基本的技術の確立を試みた。すなわち，卵子および受精卵の効率的な採取条件，培養方法，仮親への胚移植法を確立した。現在，DNAマイクロインジェクションおよび核移植のためのマニピュレーション技術の導入を図っている。

技　術　課

大庭明生

1. 概要

技術課にとつて，今年度も大きな変革の年であった。研究所に大脳皮質機能研究系が新設されたが，技術係の設置は見送られたことにより，課内に技術係に準ずる大脳皮質機能研究系技術室を内部措置として設け，市川修班長を心理生理学部門，伊藤嘉邦主任を大脳神経回路論部門，葛目博子係員を脳形態解析部門へそれぞれ出向替えを行い，技官増員の難しいなかでの研究支援体制の整備に努めた。そうした中，課は研究支援体制専門委員会の点検評価（生理研点検評価と将来計画，1997年，5号参照）の報告を受け，なかでも，特に重要と考えられる技官研修の考案の提言に対応するために，これまでの技術課ミーティングのあり方を見直した。すなわち，研究所の研究活動に対応した新技術の修得と技術課題を遂行する場として5技術部会（サル部会，顕微鏡部会，危険物部会，語学部会，応用ソフト部会）を設け，その分野の最新の技術情報の収集と



（機構長招聘三技術課合同セミナーの開催　平成10年12月22日）

実用テキストの作成を目指して活動をスタートさせた。また，課内業務報告会にその報告のねらいや表現の工夫等をみる報告評定制を導入し，報告の向上をめざした。さらに課の自主研鑽事業であるプロジェクト活動は三件（胚操作実験班，細胞画像計測班，回路解析班）を実施した。

こうした課内のみの活動にとどまらず，機構レベルの研究活動の連携の中，三技術課（生理学研究所，基礎生物学研究所，分子科学研究所）の合同セミナーを，『光技術と生体計測法』をテーマに，初めて行い，三技術課の技術的連携の足掛かりを構築した。また全国レベルの生理学技術研究会を，『顕微鏡で探る細胞の内と外』をテーマに，第21回を開催し，技術系職員の技術交流を，一層深めた。これらの活動は『機構長招聘三技術課合同セミナー報告集』『生理学技術研究会報告』『生理学研究所技術課報告』にまとめた。

2. 施設の運営状況

① 統合生理研究施設

（1）生体磁気計測装置室

永田　治，竹島康行

センサ感度レベルは，上下とも導入当初に比してジョセフソン素子の劣化は見られない。ただし，上部センサにおいて計測中にトラップし易いチャネルがあり，バイアス電流等を多少変更し感度を抑えて使用しているが，実用上問題はない。LHeフローレベルは，平均で各8.5l/day及び4.8l/day程度で，安定した状態にあるので真空層の劣化は進行していないと思われる。解析装置は現在使用しているRAIDディスクサーバにおいて2000年問題に対応できないことが確実となったため，発生の可能性があるトラブルと回避策について調査中である。基本的にはタイムスタンプによるデータベースではないため，ディスクサーバとしての機能には支障はないが，時間によるバックアップ機能が動作不能になる可能性が高い。解析用ワークステーションはSUN OSが2000年問題に対応しない可能性が高いが処理機能そのものには影響ないと思われる。稼働率は，年末年始の休日を除いて連日使用されており，休日に実験予定を入れざるを得ない状況もあって客員と共同研究の使用時間を含め100%を越える稼働率である。稼働日数はセンサ維持のため原則として休日の使用を禁止しているので実働は5日／周である。また，LHe充填で使用できない時間はセンサの真空度と利用状態により充填回数が変動することもあるため一定ではないが，3時間／周程度である。ちなみに真空引等による長期の運用停止はなかった。

② 脳機能計測センター

（1）形態情報解析室

山口　登，伊藤嘉邦

超高圧電子顕微鏡利用状況

今年度における超高圧電子顕微鏡共同利用実験は合計18課題が採択され，その内17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。

1998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
1998年 4月	30	9	11	10	5	2	7	70%	修理7日
5月	31	12	3	16	11	4	15	94%	
6月	30	8	8	14	5	9	14	100%	改良4日
7月	31	9	5	17	7	6	13	76%	改良2日
8月	31	10	7	14	6	6	12	86%	改良2日
9月	30	10	18	2	2	1	3	150%	修理17日
10月	31	9	5	17	7	4	11	65%	修理1日
11月	30	11	4	15	3	5	8	53%	
12月	31	12	4	15	6	9	15	100%	
1999年 1月	31	12	4	15	11	6	17	113%	
2月	28	9	6	13	7	14	21	162%	修理2日
3月	31	9	4	18	2	19	21	117%	
計	365	120	79	166	72	85	157	95%	

フィラメント点灯時間　　511.6時間

使用フィルム枚数　　6,770枚

(2) 機能情報解析室

市川　修

設備機器整備状況

生理動態画像解析装置：定期点検，

レシーバーユニット：画像アーチファクト－部品交換調整修理，

傾斜磁場電源：Tr. Bank基盤－交換，

MRIヘリウム冷凍機：ディスプレッサー部のヒッティング発生－修理，

操作室の空調機：室外ユニットのファンコントローラ故障－修理，

MRI傾斜磁場電源：保護抵抗焼損－部品交換修理，

ＩＤＣ光ディスク装置：ディスク挿入不可－修理，

EX90：起動不能－インターフェースボード交換，プロッター不調－修理，

Biospec47／40用システム：アップグレード，

同メンテ：傾斜磁場調整，ファンモータ交換，X32ボード清掃，

ＨＰ725W．Ｓ：アプリケーション（ODC，Dr．View）－共存化，

ユーザー用ＰＣ（NEC製PC9821Xa）：H．D増強など

当室では，蛋白質・核酸等の生体分子の種々の環境における形態・物性や生体内での挙動に関する基礎研究が行なわれている。超微小形態部門や機能協関部門と蛋白分子の形態観察や細胞膜の水分子拡散に関した共同研究も行われており，これらを支援するための実験環境整備やデータ処理環境の構築，蛋白質安定性定量化への基礎データの収集（アミノ酸溶解度測定）なども行った。7月の支援体制の見直しの結果，事務補佐員の配置と業務内容が変更され，MR装置の予約業務は私の担当となった。平成10年度のＭＲ装置利用実績を別表に示す。

平成10年度　生理動態画像解析装置月別利用率

年　月	総日数	保　守	使用可能日　数	所内利用	所外利用	計	利用率	備　考
1998年　4月	30	4	26	0	1	1	4	修理
5月	31	0	31	1	4	5	16	
6月	30	1	29	6	4	10	34	
7月	31	9	22	1	2	3	14	保守修理
8月	31	0	31	3	6	9	29	
9月	30	0	30	1	3	4	13	
10月	31	2	29	4	3	7	24	停電
11月	30	1	29	2	3	5	17	保守
12月	31	0	31	4	4	8	26	
1999年　1月	31	14	17	0	2	2	12	定期点検
2月	28	0	28	0	4	4	14	
3月	31	2	29	2	3	5	17	修理
計	365	31	334	24	39	63	19	

平成10年度　リアルタイム装置月別利用率

年　月	総日数	保　守	使用可能日　数	所内利用	所外利用	計	利用率	備　考
1998年　4月	30	0	30	0	16	16	53	
5月	31	0	31	0	18	18	58	
6月	30	0	30	0	15	15	50	
7月	31	0	31	0	19	19	61	
8月	31	0	31	0	17	17	55	
9月	30	0	30	0	11	11	37	
10月	31	2	29	0	19	19	66	停電
11月	30	1	29	0	17	17	59	Verup
12月	31	9	22	0	18	18	82	Verup
1999年　1月	31	0	31	0	7	7	23	
2月	28	2	26	0	7	7	27	保守点検
3月	31	0	31	2	9	11	35	
計	365	14	351	2	173	175	50	

＊保守以外の日祝祭日は，使用可能日数に含めた。

(2)　生体情報処理室

吉村伸明，村田安永

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

生体情報解析システムは，平成11年1月末にレンタル期間を終了し2月より新システムを稼働させている。新システムは，導入にあたり研究部門・施設にアンケート調査を行い，研究の現状に即した仕様を検討し，研究に直結したソフトウェアの導入に重点をおいた。新システムではメール等のネットワークサーバの導入やネットワークの拡充は行わないため，既設システムで行っていたこれらのサービスをレンタル以外の機器に移行した。

生理研のメール利用者は約300名，LANには約750台の端末が接続され，これらは増加の一途をたどっている。WWWは平成10年度中に約19,000の端末からアクセスがあり，総アクセス数は45万回であった。所内向けのダイヤルアップサービスは平均40回／週，9時間／週の利用がある。

③ 動物実験施設

(1) 陸生動物室

佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛

平成10年度における飼育室利用は，27研究部門（生理研17部門，基生研10部門）と例年通りの利用数であったが，部門・施設単位のスタッフ数が顕著に増加傾向であった。そのため脳研究の材料としてマウス（遺伝子導入動物，疾患モデル動物）やサル，抗体作製を目的としたウサギ等の飼育数が増加傾向にあることから，施設における飼育スペースの確保が課題となっている。そこでマウスでは飼育管理の省力化を目的として10月より受精卵凍結事業を始めるとともに配偶子（精子，未受精卵）凍結保存を試みている。またマウスにおける胚操作（胚の採取，体外受精等）やウサギの取り扱い手技（保定や固定，麻酔の投与，採血等）の技術指導が増えつつある。

今年度で自治体からネコの供給が廃止されることから，サルとともに供給先の確保が今後の大きな課題となっている。

(2) 水生動物室

平成10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，45件の利用があった。加熱冷却ユニットの動作不良が3件あり，内2件は業者に依頼して修理したが，1件はコンプレッサーの交換が必要であり，代替えフロンを用いる小型コンプレッサーの入手が困難なために修理不能となっている。早急にフロン対策を講じないと，加熱冷却ユニットが使用不能となる。

プレハブ恒温室の床の腐食と冷凍機の老朽化が進んでいるため，更新を予算化したい。

室利用状況（平成10年度）

月 / 室名	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
手術室	6	7	9	7	3	4	0	1	0	4	0	9	50
生理実験室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
培養実験室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
測定室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
胚操作室1・2	0	0	8	9	24	0	4	0	7	15	1	15	83
手術実験室＊	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	13
解剖室	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	7
新館手術室	4	4	4	2	1	0	16	9	15	19	5	7	86
計	14	15	26	23	32	8	26	15	27	42	11	36	275

＊は長期使用も含む

(3) 伊根実験室

平成10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100日，21名の利用があった。従来は，冬期の利用が中心であったが，一年を通して利用されるようになり，利用効率が上がっている。実験手法の多様化により，実験スペースが手狭になってきたため，事務室及び水槽室の一部を実験室に改装予定である。

陸生動物　部門別・動物種別搬入数（平成10年度）

動物種 / 部門名	マウス	TGマウス	SPFマウス	ハムスター	ラット	ウサギ	モルモット	ネコ	イヌ	サル	リスザル	ニワトリ	合計
神経化学	167	750	11	0	130	0	0	0	0	0	0	0	1,058
超微小形態生理	0	0	0	0	131	10	0	0	0	0	0	1,970	2,111
細胞内代謝	508	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	520
生体膜	106	0	0	0	14	0	23	0	0	0	0	0	143
機能協関	0	0	0	0	102	41	72	0	0	0	0	0	215
能動輸送	6	0	0	0	27	6	0	0	0	0	0	0	39
神経情報	611	99	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	718
液性情報	119	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	123
高次神経機構	290	59	1,356	0	50	0	0	0	0	0	0	0	1,755
高次神経性調節	0	0	0	0	2	0	0	0	0	6	0	0	8
生体システム	0	0	0	0	44	0	0	31	0	4	0	0	99
高次液性調節	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
統合生理－高次脳機能	5	0	0	0	53	0	0	1	0	5	18	0	82
統合生理－感覚・運動機能	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
脳形態解析	1	56	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	61
形態情報解析室	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6
動物実験施設	1,147	0	3	0	496	0	0	0	0	0	0	0	1,646
細胞機構	3	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	24
細胞情報	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
生殖	68	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	85
細胞分化	452	409	0	0	14	3	0	0	0	0	0	0	878
形態形成	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6
感覚情報処理	246	870	0	0	163	7	0	0	0	0	0	0	1,286
行動制御	0	0	0	0	81	0	0	0	0	0	0	0	81
種分化第一	122	0	0	0	403	7	0	0	0	4	0	0	536
細胞器官培養室	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
大型スペクトログラフ室	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
合計	3,871	2,246	1,370	12	1,724	126	95	32	0	23	18	1,970	11,507

陸生動物　月別・動物種別搬入数（平成10年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
マウス	255	305	288	359	405	382	343	289	391	287	210	357	3,871
TGマウス	243	345	271	89	244	102	22	119	51	228	224	305	2,246
マウス(SPF)	167	146	115	125	84	89	109	130	95	121	84	105	1,370
ハムスター	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	4	12
ラット	122	232	207	225	159	116	79	108	99	184	95	98	1,724
ウサギ	2	5	0	18	8	31	10	11	2	9	24	6	126
モルモット	11	6	7	12	0	0	5	5	5	6	18	20	95
ネコ	3	8	5	2	0	4	2	1	9	6	3	9	52
イヌ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
サル	1	0	0	0	0	0	0	0	16	0	2	4	23
リスザル	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18
ニワトリ	260	200	220	0	0	0	0	400	180	300	180	230	1,970
月合計	1,064	1,247	1,131	838	900	724	570	1,063	851	1,141	840	1,138	11,507

水生動物　月別・動物種別搬入数（平成10年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ゼノパス	0	0	20	40	0	20	19	28	0	0	20	0	147
ワキン	1,050	550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,600
メダカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,000	0	0	1,000
ウナギ	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50
ゼブラフィッシュ	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
アユ	0	0	0	0	650	0	500	0	0	0	0	0	1,150
タイ	0	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	200
ウニ	100	0	58	0	0	0	0	0	61	50	10	0	279
ヒトデ	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150
月合計	1,270	600	128	240	650	20	519	28	61	1,050	30	0	4,596

④　共通施設

(1) 電子顕微室

前橋　寛

（A）電子顕微鏡室の状況

今年度は，初めての試みとして，室の利用を高める目的で電子顕微鏡講習会を行った。1日コース（電子顕微鏡の取扱い）3名と3日コース（超薄切片作製法と電子顕微鏡観察）12名の参加があった。

新たに設置された実験機器として，2光子レーザ走査蛍光顕微鏡（バイオラド，MRC-1024/2P）がある。この装置は長波長レザー（720nm以上）を光源として用いる為試料へのダメージが少なく，紫外線励起の蛍光色素を用いることができる。

また，電子顕微鏡の装置維持費が大幅に削減され，維持費がかかるイオンポンプ，ターボポンプ仕様の120kV透過型電子顕微鏡（日本電子，JEM-1200EX）を山口大学医学部へ移管し，老朽化した125kV透過型電子顕微鏡（日立，H500H），走査型電子顕微鏡（日立，S－450）を整理した。

作画室（B－42号室），写真室（B－41号室）が一時的に研究部門実験室に転用されることとなり，そこに設置されていたフィルムレコーダー，カラープリンター等を研究室（B－31号室）へ移動した。

（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31件であった。機構内では25件あり，機構外は，国内で7件，国外ではイタリアの研究者による利用が1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）

所外（国内）

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
京都大学	米村重信	ERM結合性膜タンパク質の微絨毛伸長効果の確認
北海道大学	西山宣明	真性粘菌のフラグメント化に伴う細胞骨格動態の観察
広島大学	本田宏明	鱗翅目昆虫の翅における気管系の観察
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
名城大学	新居直祐	葉緑体の観察
北里大学	瀬川彰久	外分泌における水電解質輸送と開口分泌の協調機構

利用内容一覧表（2）

所外（国外）

国名・大学・研究所	研究代表者名	研究内容
イタリア・カリアリ大学	Felice Loffredo,Alessandro Riva	外分泌における水電解質輸送と開口分泌の協調機構

利用内容一覧表（3）

三研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	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	・浸透圧調節に伴う培養細胞容積変化の微細構造的解析 ・分泌刺激に応じた上皮細胞膜の形態変化の観察 ・発生過程における標的細胞依存の運動神経細胞の形態学研究
	超微小形態生理	・エンドサイトーシス変異細胞の解析 ・タンパク質の2次元結晶化と構造解析 ・外分泌における水電解質輸送と開口分泌の協調機構
	脳形態解析	・受容体・チャネルの免疫電顕
	組織培養標本室	・小腸絨毛上皮細胞下繊維芽細胞の免疫組織学的研究
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・脊髄前角ニューロン細胞体の3次元解析
基生研	形態形成	・ショウジョウバエを用いた成長因子の機能解析 ・ショウジョウバエを用いたSignal因子の機能解析
	生殖	・キンギョ卵母細胞核マトリクス内に存在するアクチン繊維の構造解析
	細胞分化	・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	・高等動物におけるオルガネラの形態観察と免疫電顕 ・Arabidopsisのhydathodeにおける液胞の機能 ・カタラーゼ輸送機構の解析
	大型スペクトログラフ	・EaglenaのPFBの観察
	細胞増殖	・脳標本撮影
	細胞融合	・細胞質分裂の分子メカニズムについて
	発生生物系	・鱗翅目昆虫の翅の形態形成 ・マウス脳で発現するパルミトイル化酵素の機能解析
分子研	機器センター	・金属微粒子の観察

（２）機器研究試作室

加藤勝己

機器研究試作室は、1998年度に3部門新設と１施設の改組拡充が生理学研究所に認可されたのに伴い，東側半分を脳形態解析部門に供出することになり，スペースが今までの約半分に縮小された。それに伴い，①古くなった機器類の廃棄，②使用頻度の極めて低い機器類の倉庫での保管，③生理学研究所細胞器官研究系工作室の機器研究試作室の分室としての供出，④工作機器類の移動及び試運転調整が行われた。スペースが狭くなったことで，機器間の距離が狭くなったり，今まで別々の部屋で行っていた各種工作を一つの部屋で行うことになり，危険度が増加し，利用者に迷惑をかけることになった。本年度も，昨年同様大きな事故の発生はなかったが，工作機械の大半は刃物あるいは被削材が高速回転し，誤った使用方法をすると大きな事故につながる可能性があるため，今後も工作機械の使用方法，注意事項などの周知徹底に努力して行きたいと考えている。

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

なお，機器研究試作室の平成10年度の利用状況は，以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表（件数）

月	ボール盤	コンターマシン	横切盤	フライス盤	旋盤	グラインダー	切断機	その他	合計
4	17	16	19	12	3	4	5	38	114
5	19	15	10	9	7	2	7	49	118
6	25	17	13	21	10	4	4	59	153
7	23	17	10	13	4	7	4	38	116
8	4	8	5	3	11	0	3	22	56
9	8	9	9	6	11	6	4	27	80
10	13	11	12	9	17	2	5	31	100
11	7	3	4	1	1	0	3	13	32
12	12	8	8	6	6	7	3	22	72
1	11	8	3	10	7	4	0	21	64
2	11	4	9	7	2	5	0	22	60
3	22	15	8	9	9	5	6	38	112
合計	172	131	110	106	88	46	44	380	1077

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	48	11	0	59	66
5	46	16	0	62	59
6	64	13	0	77	93
7	46	8	0	54	84
8	28	5	0	33	51
9	31	15	0	46	68
10	42	7	0	49	87
11	15	3	0	18	14
12	23	10	0	33	80
1	23	2	0	25	43
2	26	5	0	31	71
3	56	7	1	64	167
合計	448	102	1	551	889

機器研究試作室部門別利用状況

高次神経性調節	87名	液性情報	78名	超高圧電顕室	66名
超微小形態生理	58名	統合生理研究施設	49名	生体システム	30名
動物実験施設	19名	電子顕微鏡室	13名	機能協関	11名
脳形態解析	9名	生体膜	7名	技術課	5名
神経化学	4名	高次液性調節	4名	磁気共鳴装置室	3名
細胞内代謝	2名	高次神経機構	2名	神経情報	1名
大型スペクトロ	25名	所長付研究室	19名	RI実験施設	17名
生殖	8名	技術課	7名	種分化機構第一	5名
発生生物学	5名	細胞情報	3名	形態形成	3名
遺伝子発現統御第二	2名	感覚情報処理	2名	情報制御	2名
細胞器官培養室	1名	細胞分化	1名	電子計算機室	1名
人工気象室	1名				
分子研その他	1名				

(3) 低温・冷凍実験室

大庭明生

この室は変質しやすい実験材料，試料，試薬等の長期保存や蛋白質やペプチド等の生理活性物質の抽出，分離，精製等の低温実験に活用されている。現在，電力の節約や新センターの受け入れを考慮し，室の見直しが進められている。

【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 …… 90
超微小形態生理研究部門 …… 92
細胞内代謝研究部門 …… 95
生体膜研究部門 …… 97
機能協関研究部門 …… 98
神経情報研究部門 …… 100
液性情報研究部門 …… 102
高次神経機構研究部門 …… 105
高次神経性調節研究部門 …… 106
生体システム研究部門 …… 106
高次液性調節研究部門 …… 109
感覚・運動機能研究プロジェクト …… 112
高次脳機能研究プロジェクト …… 117
自律機能研究プロジェクト …… 117
形態情報解析室 …… 121
機能情報解析室 …… 123
生体情報処理室 …… 123
動物実験施設 …… 123
江橋研究室 …… 124

発　表　論　文

《神経化学研究部門》

1. Shinozaki K, Maruyama K, Kume H, Tomita T, Saido TC, Iwatsubo T & Obata K (1998) The presenilin 2 loop domain interacts with the μ-calpain C-terminal region. Int J Mol Med 1: 797-799.

2. Tokuhiro S, Tomita T, Iwata H, Kosaka T, Saido TC, Maruyama K & Iwatsubo T (1998) The presenilin 1 mutation (M146V) linked to familial Alzheimer's disease attenuates the neuronal differentiation of NTera 2 cells. Biochem Biophys Res Commun 244: 751-755.

3. Yamagata Y & Obata K (1998) Dynamic regulation of the activated, autophosphorylated state of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II by acute neuronal excitation in vivo. J Neurochem 71: 427-439.

4. Ding RG, Asada H & Obata K (1998) Changes in extracellular glutamate and GABA levels in the hippocampal CA_3 and CA_1 areas and the induction of glutamic acid decarboxylase-67 in dentate granule cells of rats treated with kainic acid. Brain Res 800: 105-113.

5. Kume H, Maruyama K, Shinozaki K, Kuzume H & Obata K (1998) Phosphorylation and spatiotemporal distribution of KW8 (NDRF/NeuroD2), a NeuroD family basic helix-loop-helix protein. Mol Brain Res 60: 107-114.

6. Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Kawashima-Morishima M, Kuramochi T, Io M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grueburg J, Ueyama Y, Haass C & Ihara Y (1998) Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid β-protein 42 in the brain. J Neurochem 71: 313-322.

7. Tomita T, Tokuhiro S, Hashimoto T, Aiba K, Saido TC, Maruyama K & Iwatsubo T (1998) Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of amyloidogenic forms of amyloid β peptides. J Biol Chem 273: 21153-21160.

8. Kojima N, Ishibashi H, Obata K & Kandel ER (1998) Higher seizure susceptibility and enhanced tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in fyn-

transgenic mice. Learning Memory, 5: 429-445.

9. Maruyama K, Shinozaki K, Kume H, Kuzume H, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC, Obata K (1998) Binding of μ-calpain to presenilin 2. Neurobiol Aging 19: S190.

10. Obata K, Ji FY, Stork O & Stork S (1998) Reduction of brain GABA contents and changes in emotional behavior in mice lacking glutamic acid decarboxylase 65kDa isoform. Neurosci Res Suppl 22: S72.

11. Kojima N, Stork O, Ishibashi H, Stork S & Obata K (1998) Enhanced tyrosine phosporylation of the NMDA receptor subunit 2B and abnormal emotional response in fyn-transgenic mice. Neurosci Res Suppl 22: S122.

12. Yamagata Y & Obata K (1998) Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II in relation to continuous seizure activity. Neurosci Res Suppl 22: S123.

13. Suzue T, Shinoda Y & Obata K (1998) Effects of neurotransmitter antagonists on the spontaneous movements on in vitro mouse fetuses at early fetal stages. Neurosci Res Suppl 22: S294.

14. Iwatsubo T, Tomita T, Tokuhiro S, Hashimoto T, Koyama A, Takasugi N, Aiba K, Saido TC & Maruyama K (1998) Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of Aβ42. Soc Neurosci Abstr 24: 6.

15. Maruyama K, Shinozaki K, Kume H, Kuzume H, Kanbara N & Obata K (1998) A novel neural tissue specific gene, norbin, increased by treatment of tetraethlammonium in rat hippocampus slice and accompanied with neurite-outgrowth in Neuro 2A cells. Soc Neurosci Abstr 24: 331.

16. Ji FY, Kanbara N, Asada H & Obata K (1998) GABA contents and histogenesis of fetal and newborn mice lacking two isoforms of glutamic acid decarboxylase. Soc Neurosci Abstr 24: 347.

17. Tomita T, Koyama A, Takasugi N, Aiba K, Tokuhiro S, Saido TC, Maruyama K & Iwatsubo T (1998) Differential effects of truncation of aino- and carboxyl-terminal domains of presenilin

2. Soc Neurosci Abstr 24: 471.

18. Stork O, Stork S, Ji FY, Celio M, Kanbara N, Ruelicke T, Schwaller B, Hunziker W, Berchtold M & Obata K (1998) Roles of glutamate decarboxylase 65 and parvalbumin in control of emotional behavior. Soc Neurosci Abstr 24: 1428.

19. 児島伸彦，井ノ口馨（1998）神経活動によって発現変化する遺伝子のクローニング法　日本生理学雑誌 60：301-318.

20. 小幡邦彦（1998）学習記憶と神経伝達物質　CLINICAL NEUROSCIENCE 16：82-84.

21. 川村光毅，小幡邦彦（1998）情動の機構と歴史的考察　脳の科学 20：709-716.

22. 丸山　敬（1998）データで見る医学論文　Molecular Medicine 35: 272-274, 390-392, 534-536, 664-666, 788-790, 910-912, 1042-1044, 1168-1170.

23. 魚住拓也，丸山　敬（1998）知能・行動・こころを左右する遺伝子　Molecular Medicine 35: 1440-1450.

24. 山肩葉子，小幡邦彦（1998）急性神経活動とMAPキナーゼによるシナプシンIのリン酸化　生化学 70: 871.

《超微小形態生理研究部門》

1）原著論文

1．Dushkin C Miwa T & Nagayama K (1998) Gravity effect on the electric field deposition of two-dimensional particle arrays. Chem Phys Lett: 285 259-265.

2．Adachi E & Nagayama K (1998) Contribution of convective flux to uniform apoferritin film formation on a liquid gallium surface. Chem Phys Lett: 284 440-445.

3．Takano N, Takahashi T & Nagayama K (1998) Helix-coil transition and 1/f fluctuatioin in a polypeptide. Phys Rev Lett 80: 5691-5694.

4．Kagiwada S, Hosaka K, Murata M, Nikawa J & Takatsuki A (1998) The Saccharomyces cerevisiae SCS2 gene product, a homolog of a synapyobrevin-associated protein, is an integral membrrane protein of teh endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. J Bacteriol 180: 1700-1708.

5．Yoshimura K, Hiramatsu Y & Murakami M (1998) Cyclic AMP potentiates substance P-induced amylase secretion byaugmenting the efrect of calcium in the rat parotid acinar cells. Biochim Biophys Acta 1402: 170-187.

6．Furuyama F, Murakami M, Oiwa T & Nashino H (1998) Differences in thermal salivation between the FOK rat (a model of genotypic heat adaptation) and three other rat strains. Physiology & Behavior 63: 787-793.

7．Fukuoka M, Matsui N, Otsuka T, Murakami M, Seo Y (1998) Magnetic resonance imaging of experimental subacute spinal cord compression. SPINE 23: 1540-1549.

2）総説

1．Seki Y, Naruse S, Seo Y, Murakami M, Ozaki T, Kitagawa M, Ishiguro H, Nakae Y, Hayakawa T (1998) Fast MR imaging of esophageal motility. "Spatially Resolved Magnetic Resonance (eds. Bluemler P, Bluemich RB, Fukushima E)", Weiley-VCH, Weinheim, 395-401.

2．Nagayama K (1998) Self-assembly: Nature's way. Proc Roy Inst GB 69: 195-214.

3）学会抄録

1．Seo Y & Murakami M (1998) NMR studies of salivary glands: from energy metabolism to morphology. Eur J Morphology 36 Suppl: 98-102

2．Steward MC, Seo Y, Murakami M, Larcombe-McDouall JB & Case RM (1998) Cell volume regulation and diffusion of intracellular water in salivary acinar cells. Eur J Morphology 36 Suppl: 103-106

3．Murakami M & Seo Y (1998) Energy consumption associated with fluid and electrolyte transport in the mandibular and parotid glands. Eur J Morphology 36 Suppl: 128-131.

4．永山國昭 (1998) 複素電子顕微鏡－1分子構造解析への道　バイオイメージング　7: 131-132.

Topo-biogenesis of the Golgi apparatus and nuclear membranes　第36回日本生物物理学会年会（博多）

8．加納ふみ，永山國昭，村田昌之（1998. 10）ブレフェルジンAが誘起するゴルジ体のチューブ構造の形成機構　第36回日本生物物理学会年会（博多）

9．広田　毅，鍵和田聡，笠原和起，岡野俊行，深田吉孝，村田昌之（1998. 10）ニワトリ松果体細胞におけるメラトニン分泌に対するブレフェルジンAの効果　第36回日本生物物理学会年会（博多）

10. Murata M　(1998. 12) Caveolim is a cholesterol-binding protein. International Symposium Lipoprotein Metabolism and Atherogenesis (Kyoto)

11. 村田昌之，加納ふみ，永山國昭（1998.12）セミインタクトMDCK細胞を用いたゴルジ体再構築系の確立-イリマキノン依存的ゴルジ体の形態変化の研究　第21回日本分子生物学会年会（横浜）

12. 加納ふみ，竹中克也，永山國昭，西田栄介，村田昌之　セミインタクトMDCK細胞を用いた細胞周期依存的ゴルジ体の形態形成機構　第21回日本分子生物学会年会（横浜）

13. 石堂美和子，大橋正人，山本章嗣，村田昌之，永山國昭 (1998･10)　エンドサイトーシスされた低密度リポタンパク質の細胞内輸送変異株を用いた後期エンドソーム，リソゾーム過程の解析　第71回日本生化学会大会（名古屋）

14. Miwako I, Yamamoto A, Nagayama K and Ohashi M (1998. 8) Characterization of LEX2, a Chinese hamster ovary cell mutant defective in intracellular transport of endocytosed low density lipoprotein. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology (Osaka)

15. Ohashi M, Miwako I, Yamamoto A and Nagayama K (1998. 8) Isolation and classification of Chinese hamster ovary cell mutants defective in endosome-lysosome processing of low density lipoprotein. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology (Osaka)

16. Takahashi T, Tanaka A, Sugiura J & Nagayama K (1998.3) Study of unfolding process of a protein. through 50 MD simulations. 53rd Anual Meeting of the Physical Society of Japan (Narashino)

17. Takahashi T, Sugiura J & Nagayama K (1998.10) Electrostatic interaction in protein: Validity of dielectric approximation. 49th Forum for Protein Structure & 10th Anual Meeting of the Protein Society of Japan (Nagaoka)

18. Takahashi T, Sugiura J & Nagayama K (1998.10) Solvation effect on charge-charge interaction in protein. 36th Anual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Hakata)

19. Takahashi T & Nagayama K (1998.12) Unfolding MD simulations of protein. G B1 domain. 5th Workshop "Principles of Protein Architecture" (Tokoy)

20. Murakami M (1998.3) Role of Cl- and bicarbonate transport in fluid secretion by the salivary gland. The 75th Annual Meeting of Physiological Society of Japan (Kanazawa)

21. Yoshimura K, Murakami M (1998.3) CCh stimulates parotid amylase secretion mainly by Ca^{2+}-activated fusion, while PDBu potentiates CCh-effect by priming the granules. The 75th Annual Meeting of Physiological Society of Japan (Kanazawa)

22. Murakami M (1998.9) Fluid secretion and oxygen consumption associated with activity of parallel antiports in the mandibular salivary gland. The 4th Congress of FAOPS (Brisbane)

23. 瀬川彰久，吉村啓一，村上政隆（1998.10）共焦点レーザー顕微鏡による単一顆粒開口分泌過程の動的解析-生理・生化学的解析との接点　日本電子顕微鏡学会第43回シンポジウム（千葉）

24. 村上政隆，吉村啓一（1998.10）潅流ラット耳下腺のアミラーゼ分泌と水輸送　第45回中部日本生理学会（浜松）

25. 萩池昌信，山口　修，藤木通弘，李　　憲，森田啓之，村上政隆，瀬尾芳輝，荻野孝史（1998.10）肝門脈領域Na感受性機構の中枢投射：fMRIによる検討　第45回中部日本生理学会（浜松）

《細胞内代謝研究部門》

1. Mohri T, Miyazaki S, Shirakawa H & Ikegami S (1998) Sperm-induced local $[Ca^{2+}]_i$ rise

separated from the Ca^{2+} wave in sea urchin eggs in the presence of a gamete fusion inhibitor, jaspisin. Development 125: 293-300

2. Kyozuka K, Deguchi R, Mohri T & Miyazaki S (1998) Injection of sperm extract mimics spatiotemporal dynamics of Ca^{2+} responses and progression of meiosis at fertilization of ascidian oocytes. Development 125: 4099-4105

3. Sato Y, Miyazaki S, Shikano T, Mitsuhashi N, Takeuchi Y, Mikoshiba Y & Kuwabara Y (1998) Adenophostin, a potent agonist of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, is useful for fertilization of mouse eggs injected with round spermatids leading to normal offspring. Biol. Reprod. 48: 867-873

4. Yaekura K & Yada T (1998) Cytosolic Ca^{2+}-reducing action of cAMP in rat pancreatic β-cells: involvement of thapsigargin-sensitive stores. Am. J. Physiol. (Cell Physiol.) 274: C513-C521

5. Shioda S, Hunahashi H, Nakajo S, Nakaya K, Yada T, Maruta O & Nakai Y(1998) Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. Neuroscience Lett. 243: 41-44

6. Yada T, Sakurada M, Nakata M, Shioda S, Yaekura K & Kikuchi M (1998) Autocrine action of PACAP in islets augments glucose-induced insulin secretion. Ann. New York Acad. Sci. 865: 451-457

7. Shioda S, Yada T, Nakajo S, Nakai Y & Arimura A (1998) PACAP increases cytosolic calcium in vasopressin neurons: synergism with noradrenaline. Ann. New York Acad. Sci. 865: 427-430

8. Muroi M, Shioda S, Yada T, Zhou CJ, Nakai Y, Nakajo S & Arimura A (1998) Distribution and ultrastructural localization of PACAP receptors in the rat pancreatic islets. Ann. New York Acad. Sci. 865: 438-440

9. 宮崎俊一 (1998) 受精のメカニズム『不妊の基礎』 吉村泰典, 星 和彦, 武谷雄二編, pp. 112-120, メディカルビュー社

10. 宮崎俊一（1998）卵子の活性化 － 特にCa^{2+}との関連 Medical Reproductive Medicine 第1巻『卵子と精子』 鈴木秋悦，久保春海，宮川勇生，神崎秀陽編 pp. 140-149，メディカルビュー社

11. 宮崎俊一（1998）キラー細胞の標的細胞死：Fas 受容体を介するアポトーシス Circulatory Regulating Factor 3: 7-8

12. 宮崎俊一（1998） 受精 『カルシウムイオンとシグナル伝達』 御子柴克彦，遠藤 實， 宮本英七編 蛋白質核酸酵素 43: 294-300

13. 宮崎俊一（1998）受精とカルシウム Hormone Frontier in Gynecology 5: 247-253

14. 宮崎俊一，桑原慶紀（1998）受精 日本医師会雑誌 120: 677-680

15. 矢田俊彦，加計正文，中田正範 (1998) HMG-CoA還元酵素阻害剤による膵 β 細胞 Ca^{2+} シグナリング インスリン分泌の抑制 Progress in Medicine 18 (5): 80-87

《生体膜研究部門》

1．Hirono C, Sugita M, Furuya K, Yamagishi S & Shiba Y (1998) Potentiation by isoproterenol on carbachol-induced K^+ and Cl^- currents and fluid secretion in rat parotid. J Membrane Biol 164:197-203

2．Nakanishi K & Kukita F (1998) Functional synapses in synchronized bursting neocortical neurons in culture. Brain Res 795: 137 - 146

3．Furuya K, Nakano H & Enomoto K (1998) Cause and roles of mechanical stress in mammary gland. In: Cell volume regulation: The molecular mechanism and volume sensing machinery. Ed. Okada Y, Elsevier, ICS#1160, 85-91

4．久木田文夫 (1998) 専用ディジタイザー（オートニクスAPC204）とPC9800を用いたシステム In: データ処理法技術講座. 日本生理学雑誌 60: 171-186

5．Nakano H, Furuya K & Yamagishi S (1998) Properties of calcium signalling in mammary myoepithelial cells. Jpn J Physiol 48: S44

6. Kukita F (1998) Thermodynamic properties of the final transition to open state in voltage-gated ion channels. Jpn J Physiol 48: S108

7. Yamagishi S, Kamiya E, Tsutsui I, Furuya K & Enomoto K (1998) Properties of Cl^- channels in squid giant axons. Jpn J Physiol 48: S108

8. Tsutsui I & Inoue I (1998) Ca^{2+} activated K^+ channels in the Schwann cell membrane of the squid giant axon. Jpn J Physiol 48: S115

9. Nakanishi K & Kukita F (1998) Inhibitory neurons in synchronized bursting of cultured neocortical neurons. Neurosci Res Suppl 22: S116

10. 中野春男，古家喜四夫，古家園子，山岸俊一（1998）乳腺上皮細胞の単離培養とカルシウムシグナリング　日本生理学雑誌 60：99

11. 中西圭子，久木田文夫（1998）培養ニューロン間に同期したバーストの解析
日本生理学雑誌 60：100

12. 筒井泉雄，井上　勲（1998）イカSchwann細胞のシングルチャネルの解析
日本生理学雑誌60：105

《機能協関研究部門》

1. Nakamura T, Arii S, Monden K, Furutani M, Takeda Y, Imamura M, Tominaga M & Okada Y (1998) Expression of the Na/Ca exchanger emerges in hepatic stellate cells after activation in association with liver fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA 95: 5389-5394.

2. Liu Y, Oiki S, Tsumura T, Shimizu T & Okada Y (1998) Glibenclamide blocks volume-sensitive Cl^- channels by dual mechanisms. Am J Physiol 275: C343-C351.

3. Okada Y, Oiki S, Hazama A & Morishima S (1998) Criteria for the molecular identification of the volume-sensitive outwardly rectifying Cl^- channel. J Gen Physiol 112: 1-3.

4. Tsumura T, Hazama A, Miyoshi T, Ueda S & Okada Y (1998) Activation of cAMP-

dependent Cl^- currents in guinea-pig Paneth cells without relevant evidence for CFTR expression. J Physiol (London) 512: 765-777.

5. Zhou S-S, Hazama A & Okada Y (1998) Tyrosine kinase-independent extracellular action of genistein on the CFTR Cl^- channel in guinea pig ventricular myocytes and CFTR-transfected mouse fibroblasts. Jpn J Physiol 48: 389-396.
6. Hazama A, Hayashi S & Okada Y (1998) Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic (cells using a novel biosensor technique. Pflugers Arch Eur J Physiol 437: 31-35.

7. Higuchi T, Suga S, Tsuchiya T, Hisada H, Morishima S, Okada Y & Maeshima M (1998) Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isomers of radish vacuolar aquaporin. Plant Cell Physiol 39: 905-913.

8. Sabirov RZ, Morishima S & Okada Y (1998) Probing the water permeability of ROMK1 and amphotericin B channels using Xenopus oocytes. Biochim Biophys Acta 1368: 19-26.

9. Okada Y (ed.) (1998) "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery" Elsevier, Amsterdam

10. Okada Y, Tominaga M, Tominaga T, Hazama A, Tsumura T, Morishima S, Oiki S, Ueda K, Miyoshi T & Miwa A (1998) Volume sensor anion channel. In "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery" (ed. Okada Y) pp 15 - 22, Elsevier, Amsterdam.

11. Hazama A, Miwa A, Miyoshi T, Shimizu T & Okada Y (1998) ATP release from swollen or CFTR-expressing epithelial cells. In "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery" (ed. Okada Y) pp 93 - 98, Elsevier, Amsterdam.

12. Oiki S, Kubo M & Okada Y (1998) Electrophysiological properties of volume-regulated Cl-channels in intestinal epithelial cells. In "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery" (ed. Okada Y) pp 125-129, Elsevier, Amsterdam.

13. Morishima S, Kida H, Ueda S, Chiba T & Okada Y (1998) Water movement during cell volume regulation. In "Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume

Sensing Machinery" (ed. Okada Y) pp 209 - 212, Elsevier, Amsterdam.

14. Okada Y (1998) Cell volume-sensitive chloride channel. In "Cell Volume Regulation" (ed. Lang F) (Contrib. Nephrol. vol. 123) pp 21-33, Karger, Basel.

15. 岡田泰伸，小島　至 (1998) チャネルとトランスポータの構造と疾患　Molecular Medicine 35: 4-17.

16. 岡田泰伸 (1998) チャネル／トランスポータの構造・機能と疾病　内分泌学の進歩　16: 33-35.

17. 森島　繁，岡田泰伸 (1998) イオンチャネルの構造と機能　Mebio 15: 12-24.

18. 岡田泰伸 (1998) Clチャネルと細胞容積調節および細胞死　Mebio 15: 61-68.

19. 挾間章博 (1998) CFTR蛋白の多機能性と嚢胞性線維症　Mebio 15: 69-76.

20. 老木成稔 (1998) Kチャネルの結晶構造に至る道：K選択性透過を担うポア構造. 蛋白質 核酸 酵素 43: 1990-1997.

21. 岡田泰伸 (1998) Cl^-チャネルの機能・構造と疾患. 神経研究の進歩 42: 263-278.

22. 挾間章博 (1998) 電気生理学. In「脳・神経研究の進めかた」 真鍋俊也・森　寿・片山正博 編　羊土社刊 41-52.

《神経情報研究部門》

1. Kuriyama, S., Masui, K., Sakamoto, T., Nakatani, T., Kikukawa, M., Tsujimoue, H., Mitoro, A.,Yamazaki, M., Yoshiji, H., Fukui, H., Ikenaka, K., Mullen, Craig A. and Tsujii, T. (1998) Bystander effect caused by cytosine deaminase gene and 5- fluorocytosine in vitro is substantially mediated by generated 5-fluorouracil. Anticancer Res 18: 3399-3406

2. Spassky, N., Goujet-Zalc, C., Parmantier, E., Olivier, C., Martinez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K.,Macklin, W., Cerruti, I., Zalc, B. and Thomas, J.-L. (1998) Multiple restricted origin of oligodendrocytes. J. Neurosci. 18(20): 8331-8343

3. Kuriyama, S., Sakamoto, T., Kikukawa, M., Nakatani, T., Toyokawa, Y., Tsujinoue, H., Ikenaka, K., Fukui, H. and Tsujii, T. (1998) Expression of a retrovirally transduced gene under control of an internal housekeeping gene promoter does not persist due to methylation and is restored partially by 5-azacytidine treatment. Gene Therapy 5: 1299-1305

4. Tamura, M., Ikenaka, K., Tamura, K., Yoshimatsu, T., Miyao, M., Kishima, H., Mabuchi, E. and Shimizu, K. (1998) Transduction of glioma cells using a high titer retroviral vector system and their subsequent migration in brain tumors. Gene Therapy 5: 1698-1704

5. Nakakita, S., Natsuka, S., Ikenaka, K. and Hase, S. (1998) Development-dependent expression of complex-type sugar chains specific to mouse brain. J. Biochem 123(6): 1164-1168

6. Yonemasu, T., Nakahira, K., Okumura, S., Kagawa, T., Espinosa de los Monteros, A., de Vellis, J. and Ikenaka, K. (1998) The proximal promoter region is sufficient to regulate the tissue-specific expression of UDP-galactose: Ceramide galactosyltransferase gene J. Neurosci. Res 52: 757-765

7. Miyamura, T., Morita, N., Baba, H., Hase, S., Kajimoto, T., Tsuji, S., Kawata, M., Kato, I., Mikoshiba, K. and Ikenaka, K. (1998) Metabolic labeling of a subset of glial cells by UDP-galactose: Implication for astrocyte lineage diversity. J. Neurosci. Res 52: 173-183

8. Yamada, M. Nakagawa, H., Fukushima, M., Shimizu, K., Hayakawa, T. and Ikenaka, K. (1998) In vitro study on intrathecal use of 5-fluoro-2'-deoxyuridine(FdUrd) for meningeal dissemination of malignant brain tumors. J.Neuro-Oncology 37: 115-121

9. Mori, Y., Takada, N., Okada, T., Wakamori, M., Imoto, K., Wanifuchi, H., Oka, H., Oba, A., Ikenaka, K. and Kurosaki, T. (1998) Differential distribution of TRP Ca^{2+} channel isoforms in mouse brain. NeuroReport 9: 507-515

10. Yoshimatsu, T., Tamura, M., Kuriyama, S. and Ikenaka, K. (1998) Improvement of retroviral packaging cell lines by introducing the polyomavirus early region. Human Gene Therapy 9: 161-172

11. 中川秀光，山田正信，前田暢彦，岩月幸一，都築　貴，平山　東，山本弘志，池中一裕 (1998) 悪性脳腫瘍の髄腔内播種に対する5-fluoro-2'-deoxyuridine(FdUrd) による髄腔内治療：

臨床応用とその効果　NEUROLOGICAL SURGERY 26: 969-977

12. 中川秀光，山田正信，福島正和，清水恵司，池中一裕 (1998) 5-fluoro-2'-deoxyuridine(FdUrd) の髄腔内治療への応用に関する研究：髄腔内治療の可能性に関して in vitro での検討 NEUROLOGICAL SURGERY 26: 787-794

13. 中川秀光，山田正信，福島正和，清水恵司，池中一裕 (1998) 5-fluoro-2'-deoxyuridine(FdUrd) の髄腔内治療への応用に関する研究：髄腔内治療の可能性に関してin vivo での検討 NEUROLOGICAL SURGERY 26: 873-879

14. 岩崎靖乃，池中一裕 (1998) 脳と遺伝子　グリア細胞の遺伝子発現と脳機能　遺伝子医学, 2: 28-32

15. 佐々木学，池中一裕 (1998) ＊小児のがん　遺伝子治療，小児科診療Q&A　第27号，六法出版社，1718-1721

16. 南木浩二，若園佳彦，池中一裕 (1998) 2章　基礎知識・基礎技術　2）基礎技術　b) 細胞培養法，真鍋俊也・森　　寿・片山正寛編集，「脳・神経研究の進め方」羊土社，53-62

17. 小泉克久，池中一裕，(1998)　ウイルスベクターを用いた遺伝子導入　日本生理学会誌, 60: 319-330

18. 池中一裕，熊田竜郎，南木浩二 (1998) グリアを中心とした脳の分子生物学 NEUROLOGICAL SURGERY 26: 297-301

19. 中平健祐，藤本一朗，岩崎靖乃，池中一裕 (1998) Neuron-glia の細胞系譜　脳の科学 20: 353-359

《液性情報研究部門》

1）英文原著論文

1．Wakamori M, Strobeck M, Niidome T, Teramoto T, Imoto K & Mori Y (1998) Functional characterization of ion permeation pathway in the N-type Ca^{2+} channel. J Neurophysiol 79: 622-634.

2. Mori Y, Takada Y, Okada T, Wakamori M, Imoto K, Wanifuchi H, Oka H, Oba A, Ikenaka K & Kurosaki K (1998) Differential distribution of TRP Ca^{2+} channel isoforms in mouse brain. NeuroReport 9: 507-515.

3. Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Takada N, Imoto K & Mori Y (1998) Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca^{2+} channel from mouse brain. J Biol Chem 273: 10279-10287.

4. Wakamori M, Yamashita M & Ikemoto Y (1998) Halothane increases open probability of glycine-activated channel current in rat central neurones. Br J Anaesth 80: 840-842.

5. Nakai J, Sekiguchi N, Rando TA, Allen PD & Beam KG (1998) Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca^{2+} channels. J Biol Chem 273: 13403-13406.

6. Furukawa T, Nukada T, Mori Y, Wakamori M, Fujita Y, Ishida H, Fukuda K, Kato S & Yoshii M (1998) Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca^{2+} channels with G-protein α and $\beta\gamma$ subunits. I. molecular determination. J Biol Chem 273: 17585-17594.

7. Furukawa T, Miura R, Mori Y, Strobeck M, Suzuki K, Ogihara Y, Asano T, Morishita R, Hashii M, Higashida, H, Yoshii M, Nukada T (1998) Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca^{2+} channels with G-protein α and $\beta\gamma$ subunits. II. Evidence for direct binding. J Biol Chem 273: 17595-17603

8. Yamazaki K, Okada T, Mori Y & Tanaka I (1998) Genetic mapping of mouse transient receptor potential (Trrp) genes responsible for capacitative calcium entry channels to chromosomes 3,7,9, and X. Genomics 51: 303-305.

9. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikkath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett II FS, Mori Y, Campbell KP & Frankel WN (1998) The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca^{2+} channel γ subunit. Nature Genetics 19: 340-347.

10. Nakai J, Tanabe T, Konno T, Adams BA & Beam KG (1998) Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. J Biol Chem 273: 24983-24986.

11. Wakamori M, Yamazaki K, Matsunodaira H, Teramoto T, Tanaka I, Niidome T, Sawada K, Nishizawa Y, Sekiguchi N, Mori E, Mori Y & Imoto K (1998) Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel. J Biol Chem J Biol Chem 273, 34857-34867, 1998

12. Matsuyama Z, Wakamori M, Mori Y, Kawakami H, Nakamura S, and Imoto K. Direct alteration of the P/Q type Ca^{2+} channel property by polyglutamine expansion in spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). J Neurosci (in press).

13. Boccaccio A, Moran O, Imoto K, and Conti F. Tonic and phasic TTX-block of sodium channels with point mutations in the outer pore region. Biophys J (in press).

14. Yamazaki Y, Yagi T, Ozaki T, and Imoto K. In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. J Exp Zoology (in press).

2）総説，その他

1．松山善次郎，川上秀史，村田芳夫，中村重信 (1998) Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). 神経内科 49: 238-242.

2．森 泰生 (1998) Ca^{2+} チャネルの構造・機能とその病態. Mebio 6:44-53.

3．森 泰生，井本 敬二 (1988) 受容体活性化されるCa^{2+}流入機構 容量性Ca^{2+}流入とTRP蛋白質. 蛋白質核酸酵素 43: 1567-1576.

4．井本敬二 (1998) 神経から筋肉へ興奮伝達. “岩波講座 現代医学の基礎 第6巻 脳・神経の科学Ⅰニューロン”（久野 宗，三品 昌美 編）pp. 25-42，岩波書店，東京.

5．宍戸恵美子 (1998) ショウジョウバエのシナプス形成を制御する新しいタンパク質 Capricious. 実験医学 16: 1917-1920.

6．Kobayashi T & Mori Y (1998) Ca^{2+} channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. Eur J Pharmacol 363: 1-15 .

7．森 泰生 (1998) イオンチャネル. “脳と神経：分子神経生物科学入門 (金子章道，川村光毅，

植村慶一　編) 共立出版，東京 (in press).

8．Imoto K (1998) Structure and function of voltage-dependent Na+ channel. "Handbook of Experimental Pharmacology, Pharmacology of ionic channelfunctions: activatiors and inhibitors" (ed. Endo M) Springer Verlag,Heidelberg (in press).

《高次神経機構研究部門》

1）原著論文

1．Takahashi S, Ujihara H, Huang G-Z, Sanbo M, Yagyu K, Kaba H & Yagi T (1999) Reduced hippocampal LTP in mice lacking a presynaptic protein: complexin II. Eur J Neurosci (in press).

2．Yanagawa Y, Kobayashi T, Ohnishi M, Kobayashi T, Tamura S, Tsuzuki T, Sanbo M, Yagi T, Tashiro F, & Miyazaki J (1999) Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. Transgenic Research (in press).

3．Yagi T (1999) Molecular mechanisms of Fyn-tyrosine kinase for regulating mammalian behaviors and an ethanol sensitivity. Biochemical Pharmacology 57: 845-850.

4．Mori H, Manabe T, Watanabe M, Satoh Y, Suzuki N, Toki S, Nakamura K, Yagi T, Kushiya E, Takahashi T, Inoue Y, Sakimura K, & Mishina M (1998) Role of the carboxy-terminal region of the GluR2e2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. Neuron 21: 571-580.

5．Kohmura N, Senzaki K, Hamada S, Kai N, Yasuda R, Watanabe M, Ishii H, Yasuda M, Mishina M, & Yagi T (1998) Diversity Revealed by a Novel Family of Cadherins Expressed in Neurons at Synaptic Complex. Neuron 20: 1137-1151.

6．Taniguchi M, Sanbo M, Watanabe S, Naruse I, Mishina M, and Yagi T (1998) Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, pac: a transient gene-integration marker for ES cells. Nucleic Acids Res 26: 679-680.

7．Kitazawa H, Yagi T, Miyakawa T, Niki H, & Kawai N (1998) Abnormal synaptic transmission in the olfactory bulb of Fyn-kinase deficient mice. J. Neurophysiol. 79(1): 137-142.

2）総説

1．八木　健，(1998) 脳の機能と遺伝情報，脳の科学，20：555-558.

2．湯浅茂樹，八木　健，(1998) 情動に関わる遺伝子とそのノックアウトマウス，脳の科学 20：

3．八木　健，(1998) さまざまな環境の変化に対応して，遺伝子は行動を支配している，ニュートン　10月号：94-95

《高次神経性調節研究部門》

1．Komatsu, H. (1998) Surface representation by population coding. Behavioral and Brain Sciences 21: 761-762.

2．Komatsu, H. (1998) Mechanisms of central color vision. Current Opinion in Neurobiology 8: 503-508.

3．Komatsu, H. (1998) The physiological substrates of color constancy. In: "Perceptual Constancy" (ed. by Walsh, V. and J. Kulikowski, J.) Cambridge University Press, pp 352-372.

4．小松英彦 (1998) 視知覚における脳のダイナミクス　日本神経回路学会誌 5(4): 178-184.

5．小松英彦 (1998) 視覚情報処理のメカニズム　数理科学 36(1): 14-21.

《生体システム研究部門》

1）原著論文

1．Asanome M, Matsuyama K & Mori S (1998) Augmentation of postural muscle tone induced by the stimulation of the descending fibers in the midline area of the cerebellar white matter in the acute decerebrate cat. Neurosci Res 30: 257-269

2．Matsuyama K & Mori S (1998) Lumbar interneurons involved in the generation of fictive locomotion in cats. In: Neural Mechanisms for Generating Locomotor Activity. Ann New York Acad Sci 860: 441-443

3．Mori S, Matsui T, Kuze B, Asanome M, Nakajima K & Matsuyama K (1998) Cerebellar induced locomotion: Reticulospinal control of spinal rhythm generating mechanisms in cats. In: Neural Mechanisms for Generating Locomotor Activity. Ann New York Acad Sci 860: 94-105

4．Nakajima K, Matsuyama K & Mori S (1998) Prenatal administration of para-chlorophenylalanine results in suppression of serotonergic system and disturbance of swimming movements in newborn rats. Neurosci Res 31: 155-169

2）総説

1．森　茂美 (1998) 歩行のバランス J Otolaryngology Head and Neck Surgery 14: 860-865

2．宮下英三 (1998)「一次運動野による手の運動制御」神経研究の進歩 42: 68-77

3）学会抄録

1．Hamada Y, Miyashita E and Tanaka H (1998) Preceding neuronal activities in the barrel cortex to exploratory whisking of rats. International Institute for Advanced Studies Reports vol 7 p 1-8.

2．Kuze B, Matsui T, Matsuyama K, Kakigi R & Mori S (1998) Similarity and difference in innervation patterns of vestibulospinal axons at the cervical, thoracic and lumbar segments in the cats: PHA-L tracing study. Soc Neurosci Abstr 24: 915

3．Kuze B, Matsui T, Matsuyama K & Mori S (1998) Innervation pattern of single vestibulospinal axons at the cervical, thoracic and lumbar segments in the cat. Neurosci Res Suppl 22: S160

4．Matsui T, Kuze B, Matsuyama K & Mori S (1998) Reticulospinal contribution to cerevellar-evoked locomotion in a decerebrate cat. Jpn J Physiol Supple 48: S157

5．Matsui T, Kuze B, Matsuyama K & Mori S. (1998) Stimulation of the crossed fastigiofugal

fibers (Hook bundle of Russell) evokes locomotion on a moving treadmill in the decerebrate cat. Neurosci Res Suppl 22: S160

6. Matsuyama K, Nakajima K, Kuze B, Mori F, Matsui T & Mori S (1998) Lumbar commissural neurons receiving reticulospinal inputs in cats: morphology and activity during fictive locomotion. Soc Neurosci Abstr 24: 915

7. Matsuyama K, and Mori S. (1998) Lumbar interneurons involved in the generation of fictive locomotion in cats. Abstract for A New York Academy of Sciences Conference, I-P5

8. Matsuyama K, Mori F, Kuze B, Okumura T & Mori S (1998) Intraspinal projections of locomotor-related lumbar commissural neurons receiving excitatory reticulospinal inputs in cats. Neurosci Res Suppl 22: S160

9. Miyashita E (1998) Movement kinematic parameters and neural activity in the monkey motor cortices during visually guided planar arm movements. Soc Neurosci Abstr 24: 2108

10. Miyashita E (1998) Firing profiles of monkey motor cortical neurons during visually guided arm movements: in relation to movement parameters. Neurosci Res Suppl 22: S157

11. Mori F, Nakajima K, Okumura T, Matsuyama K & Mori S (1998) Bipedal locomotion of Japanese monkeys (*M. Fuscata*) on an inclined treadmill: Characteristic control of body axis and joint angles. Neurosci Res Suppl 22: S159

12. Mori F, Nakajima K, Okumura T, Matsuyama K & Mori S (1998) Bipedal locomotion of Japanese monkeys (*M. Fuscata*) on an inclined treadmill : joint angle analyses. Soc Neurosci Abstr 24: 1155

13. Mori F, Nakajima K, Okumura T, Matsuyama K & Mori S (1998) Bipedal locomotor movement of Japanese monkeys (*M. Fuscata*) on an inclined treadmill: Postural and kinematic analyses. Jpn J Physiol Supple 48: S158

14. Mori S, Matsui T, Kuze B & Matsuyama K (1998) Comparison of driving mechanisms of locomotor programs induced by cerebellar and MLR stimulation in cats. Soc Neurosci Abstr 24: 1155

15. Mori S, Matsui T, Kuze B, Matsuyama K & Nakajima K (1998) Stimulation of a restricted region within the midline cerebellar white matter in cats evokes locomotion on a moving treadmill. Jpn J Physiol Supple 48: S163

16. Mori S & Matsuyama K (1998) Cerebellar induced locomotion: reticulospinal control of spinal rhythm generating mechanism in cats. Abstract for A New York Academy of Sciences Conference pp6

17. Mori S, Matsuyama K, Matsui T, Kuze B & Mori F (1998) Cerebello-reticulo-interneuronal system involved in the generation of locomotion in cats. Abstract for symposium "Peripheral and Spinal Mechanism in the Neural Control of Movement " pp55

18. 森　茂美，松山清治，森　大志，奥村　哲，久世文也　筋トーヌスの制御と脚橋被蓋核・網様体脊髄路系 瀬川小児神経学クリニック25周年記念シンポジウム 抄録集 S25

19. Okumura T, Matsuyama K & Mori S (1998) Effect of carbachol perfusion of the caudate nucleus on extracellular monoamine levels in the brain of freely moving cats. Jpn J Physiol Supple 48: S154

《高次液性調節研究部門》

1）発表論文リスト

1. Hasegawa I, Fukushima T, Ihara T & Miyashita Y (1998) Callosal window between prefrontal cortices : cognitive interaction to retrieve long-term memory. Science 281 : 814-818

2. Konishi S, Nakajima K, Uchida I, Kameyama M, Nakahara K, Sekihara K & Miyashita Y (1998) Transient activation of inferior prefrontal cortex during cognitive set shifting. Nature neuroscience 1 : 80-84

3. Sekihara K, Koizumi H & Miyashita Y (1998) MEG covariance difference analysis: A method to extract source activities by using task and control measurements. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 45 : 87-97

4. Miyashita Y, Kameyama M, Hasegawa I & Fukushima T (1998) Consolidation of visual

associative long- term memory in the temporal cortex of the primate. Neurobiology of Learning and Memory 70 : 197-211

5. Konishi S, Nakajima K, Uchida I, Sekihara K & Miyashita Y (1998) No-go dominant brain activity in human inferior prefrontal cortex revealed by functional magnetic resonance imaging. Eur. J. Neurosci.10, 1209-1213,.

6. Tokuyama W, Hashimoto T, Li Y-X, Okuno H & Miyashita Y (1998) Highest trkB mRNA expression in the entorhinal cortex among hippocampal subregions in the adult rat: contrasting pattern with BDNA mRNA expression. Molecular Brain Res. 62 : 206-215

7. Miyashita Y, Morita M, Naya Y., Yoshida M & Tomita H (1998) Backward signal from medial temporal lobe in neural circuit reorganization of primate inferotemporal cortex. C.R. Acad. Sci. 321 : 185-192

8. Sekihara K, Poeppel D, Marantz A, Koizumi, H & Miyashita Y (1998) Comparison of covariance-based and waveform-based subtraction methods in removing the interference from button-pressing finger movements. Brain Topography 11, 95-102

9. Nakahara K, Ohbayashi M, Tomita H & Miyashita Y (1998) The neuronal basis of visual memory and imagery in the primate: A neurophysiological approach. Adv. Biophys. 35, 103-109

10. Konishi S, Nakajima K, Uchida I, Kikyo H, Kameyama M, Kawazu M, Sekihara K & Miyashita, Y. (1998) "Event-related functional MRI": strategic use of the temporal resolution of functional magnetic resonance imaging in human brain mapping and its application to cognitive tasks. Jpn J Physiol 48 (Suppl) S18

11. Tokuyama W, Hashimoto T, Okuno H, Li X-Y & Miyashita Y (1998) Opposing patterns of expression of BDNF and trkB mRNA in The entorhinal cortex and the dentate gyrus of adult rats. Jpn J Physiol 48 (Suppl) S194

12. Konishi S & Miyashita Y (1998) Strategic use of temporal resolution of functional MRI (event-related fMRI) and its application to frontal-lobe tasks. Neurosci Res 22 (Suppl) S16

13. Tokuyama W, Okuno H, Li Y-X, Hashimoto T & Miyashita Y (1998) Induction of homer mRNA during visual paired associate learning in the anterior temporal lobe of split-brain macaques. Neurosci Res 22 (Suppl) S223

14. Okuno H, Tokuyama W, Li Y-X, Hashimoto T & Miyashita Y (1998) Detection of transcriptional activation during visual paired associate learning in split-brain macaques. Neurosci Res 22 (Suppl) S223

15. Uchida I, Kikyo K, Nakajima K, Konishi S, Sekihara K & Miyashita Y (1998) A functional MRI study of orthographic processing of Kanji. Neurosci Res 22 (Suppl) S265

16. Konishi S, Kawazu M, Uchida I, Nakajima K, Kikyo H, Kameyama M, Sekihara K & Miyashita Y (1998) An fMRI study of wisconsin card sorting test: decomposition into shift-related and sort-related areas. Neurosci Res 22 (Suppl) S268

17. Hashimoto T, Tokuyama W, L, Y-X, Okuno H & Miyashita Y (1998) Quantitative analysis of BDNF and trkB mRNA expression levels along the trisynaptic circuit in rat hippocampal formation. Soc. Neurosci Abstr 24 : 36

18. Konishi S, Kawazu M, Uchida I, Nakajima K, Kikyo H, Kameyama M, Sekihara K & Miyashita Y (1998) An fMRI study of wisconsin card sorting test: role of abstract reasoning in shift-related activity. Soc. Neurosci Abstr 24 : 258

19. Hasegawa I, Fukushima T, Ihara T, Hayashi T & Miyashita Y (1998) Interhemispheric transfer between prefrontal cortices: cognitive interaction for retrieval of long-term memory. Soc. Neurosci Abstr 24 : 1688

20. Tokuyama W, Okuno H, Hashimoto T, Li Y-X & Miyashita Y (1998) Detection of immediate early gene activation during visual paired associate learning in "split-brain" monkeys. Soc. Neurosci Abstr 24 : 1906

21. Sekihara K, Poeppel D, Marantz A, Koizumi H & Miyashita Y (1998) MEG spatio-temporal analysis using a covariance matrix calculated from non-averaged multiple-epoch data. NeuroImage 7 : S672

22. Sekihara K, Nagarajan S, Poeppel D, Miyauchi S, Takino R, Fujimaki N & Miyashita Y (1998) Estimating neural sources from each time-frequency component of MEG data. NeuroImage 7 : S673

23. Sekihara K, Kikyo H, Nakajima K, Koizumi H, & Miyashita Y (1998) True and false positive probability estimation of magnitude crosscorrelation coefficient by using the Rayleigh distribution. NeuroImage 7 : S747

24. Konishi S, Nakajima K, Uchida I, Kameyama M, Nakahara K, Sekihara K & Miyashita Y (1998) An fMRI study of Wisconsin Card Sorting Test : Translent activetion in inferior prefrontal cortex time-locked to dimension shift, and its laud dependent increase. NeuroImage 7 : S891

《感覚・運動機能研究プロジェクト》

1）原著論文

1．Koyama S, Kakigi R, Hoshiyama M, Kitamura Y (1998) Reading of Japanese Kanji (morphograms) and Kana (syllabograms) : a magnetoencephalographic study, Neuropsychologia 36: 83-98

2．Brecelj J, Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M (1998) Visual evoked magnetic responses to central and peripheral stimulation: simultaneous VEP recordings. Brain Topogr 10: 227-237

3．Naka D, Kakigi R (1998) Simple and novel method for measuring conduction velocity of A δ fibers in humans. J Clin Neurophysiol 15: 150-153

4．Naka D, Kakigi R, Koyama S, Xiang J & Suzuki H (1998) Effects of tactile interference stimulation on somatosensory evoked magnetic fields following tibial nerve stimulation Electroencephalogr Clin Neurophysiol 109: 168-177

5．Kaneoke Y, Bundou M, Kakigi R (1998) Timing of motion representation in the human visual system. Brain Res 790: 195-201

6．Watanabe S, Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M & Kaneoke Y (1998) Pain processing traced

by magnetoencephalography in the human. Brain. Brain Topogr 10: 255-264

7. Kakigi R & Watanabe S (1998) Pain-related somatosensory-evoked potentials following CO_2 laser stimulation. Pain Forum, 7: 1-4.

8. Hoshiyama M, Sheean G (1998) Changes of somatosensory evoked potentials preceding rapid voluntary movement in Go/No-go choice reaction time task. Brain Res Cogn Brain Res 7: 137-142

9. Nakamura A, Yamada T, Goto A, Kato T, Ito K, Abe Y, Kachi T & Kakigi R (1998) Somatosensory homunculus as drawn by MEG. Neuroimage 7: 377-386

10. Okusa T, Kaneoke Y, Koyama S & Kakigi R (1998) Random dots blinking : a new approach to elucidate the activities of the extrastriate cortex in humans. Neuroreport 9: 3961-3965.

2）総説

1. 柿木隆介, 渡辺昌子 (1998) CO_2レーザー光線刺激による痛覚関連誘発脳磁図 臨床脳波 40:361-366

2. 柿木隆介 (1998) 痛覚認知の非侵襲的研究 神経研究の進歩 42: 396-405

3. 柿木隆介 (1998) MEGによる大脳誘発反応の観察 Brain Medical 10 : 137-144

4. 柿木隆介 (1998) 皮質体性感覚受容の生理学的検査 最新医学 53: 1690-1696

5. 柿木隆介 (1998) 皮質性ミオクローヌス KINESIS 3 : 9-11

6. 小山紗智子, 柿木隆介 (1998) 脳磁場からみた文字・単語認知 基礎心理学研究 17: 52-56

3）著書

1. Hoshiyama M, Kakigi R, Berg P, Koyama S, Shimojo M, Watanabe S & Nakamura A (1998) Spatio-temporal source analysis of movement associated magnetic fields. "Brain Topography Today." (Eds. Koga Y, Nagata K & Hirata K) Elsevier. Amsterdam, pp. 57-63

2. Xiang J, Hoshiyama M, Koyama S, Kaneoke Y, Suzuki H, Watanabe S, Naka D & Kakigi R

(1998) Somatosensory evoked magnetic fields following passive finger movement. "Brain Topography Today." (Eds. Koga Y, Nagata K & Hirata K) Elsevier. Amsterdam, pp92-96

3. Watanabe S, Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Naka D, Suzuki H, Xiang J & Kaneoke Y (1998) Dipole source modelling of pain-related brain responses: a magnetoencephalographic study. "Brain Topography Today." (Eds. Koga Y, Nagata K & Hirata K) Elsevier. Amsterdam, pp.97-102

4. Koyama S, Kakigi R, Hoshiyama M, Naka D, Watanabe S, Nakagawa K, Takeshima Y, & Nagata O (1998) The cortices involved in Japanese character (Kanji and Kana) recognition. a magnetoencephalographic study. "Brain Topography Today." (Eds. Koga Y, Nagata K & Hirata K) Elsevier. Amsterdam, pp.197-201

5. Naka D, Maeshima S, Itakura T, Koyama S, Watanabe S & Kakigi R (1998) Identification of the motor area in paralytic patients with a brain tumor. "Brain Topography Today." (Eds. Koga Y, Nagata K & Hirata K) Elsevier. Amsterdam, pp.642-646

6. Brecelj J, Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M & Xiang J (1998) The origin of the 100m visual evoked magnetic response to central and peripheral stimulation. ECCN 98 9th European Congress of Clinical Neurophysiology, (Eds: Stalberg E V, De Weerd A W, Zidar J) Monduzzi Editore, Bologna Italy, pp.225-230

7. Kakigi R, Xiang J & Hoshiyama M (1998) Somatosensory evoked magnetic fields following passive finger movement. ECCN 98 9th European Congress of Clinical Neurophysiology, (Eds: Stalberg E V, De Weerd A W, Zidar J) Monduzzi Editore, Bologna Italy, pp.481-489

8. Kaneoke Y, Bundo M & Kakigi R (1998) Neural correlate of motion perception in the human visual system. "Recent Advances in Human Neurophysiology: Proceedings of the 6th International Evoked Potentials Symposium held in Okazaki, Japan on 21-25 March, 1998" (Eds. Hashimoto I & Kakigi R), Elsevier, Amsterdam, pp.401-407

9. Lam K, Kakigi R, Kaneoke Y, Naka D, Maeda K & Suzuki H (1998) Does continuous visual and auditory stimulation affect somatosensory evoked magnetic fields? "Recent Advances in Human Neurophysiology: Proceedings of the 6th International Evoked Potentials Symposium held in Okazaki, Japan on 21-25 March, 1998" (Eds. Hashimoto I & Kakigi R), Elsevier,

Amsterdam, pp.866-878

10. Naka D, Maeda K & Kakigi R (1998) Simple and novel method for measuring conduction velocity of A δ fibers. "Recent Advances in Human Neurophysiology: Proceedings of the 6th International Evoked Potentials Symposium held in Okazaki, Japan on 21-25 March, 1998" (Eds. Hashimoto I & Kakigi R), Elsevier, Amsterdam, pp.73-78

11. Naka D, Maeda K, Kakigi R (1998) Effects of tactile stimulation on SEFs following tibial nerve stimulation. "Recent Advances in Human Neurophysiology: Proceedings of the 6th International Evoked Potentials Symposium held in Okazaki, Japan on 21-25 March, 1998" (Eds. Hashimoto I & Kakigi R), Elsevier, Amsterdam, pp. 65-72

12. Okusa T, Kaneoke Y, Koyama S & Kakigi R (1998) Visual awareness of characters with various visibility concealed in random dots. "Recent Advances in Human Neurophysiology: Proceedings of the 6th International Evoked Potentials Symposium held in Okazaki, Japan on 21-25 March, 1998" (Eds. Hashimoto I & Kakigi R), Elsevier, Amsterdam, pp.389-394

13. Osaka N, Koyama S & Kakigi R (1998) Neural correlates of motion after effect using evoked magnetic fields. "Recent Advances in Human Neurophysiology: Proceedings of the 6th International Evoked Potentials Symposium held in Okazaki, Japan on 21-25 March, 1998" (Eds. Hashimoto I & Kakigi R), Elsevier, Amsterdam, pp.445-449

14. Sekiguchi T, Koyama S & Kakigi R (1998) The repetition effect on evoked magnetic responses in word recognition. "Recent Advances in Human Neurophysiology: Proceedings of the 6th International Evoked Potentials Symposium held in Okazaki, Japan on 21-25 March, 1998" (Eds. Hashimoto I & Kakigi R), Elsevier, Amsterdam, pp.395-400

15. Xiang J, Kakigi R, Maeda K, Hoshiyama M, Kaneoke Y, Koyama S & Naka D (1998) Magnetic fields and potentials evoked by passive toe movement in humans. "Recent Advances in Human Neurophysiology: Proceedings of the 6th International Evoked Potentials Symposium held in Okazaki, Japan on 21-25 March, 1998" (Eds. Hashimoto I & Kakigi R), Elsevier, Amsterdam, pp.145-150

16. 柿木隆介 (1998) 脛骨神経電気刺激による体性感覚誘発電位 (SEP) 臨床誘発電位ハンドブック 中外医学社, 東京 pp.138-151

17. 柿木隆介 (1998) CO_2レーザー刺激による体性感覚誘発電位 (SEP)　臨床誘発電位ハンドブック 中外医学社，東京　pp.162-168

4）学会抄録

1．川上　治，金桶吉起，関口貴裕，山崎　浩，柿木隆介 (1998.5) 仮現運動知覚と脳磁場反応 日本生体磁気学会誌　11 : 212-213

2．大草知裕，金桶吉起，小山紗智子，柿木隆介 (1998.5)　視覚性形態認知の脳磁図を用いた研究　日本生体磁気学会誌　11 : 214-215

3．渡辺昌子，小山紗智子，桐野衛二，柿木隆介 (1998.5)　ヒトの顔認知に関する脳磁図を用いた研究 日本生体磁気学会誌　11 : 216-217

4．山崎　浩，柿木隆介，中　大輔 (1998.5)　痛覚認知に対する注意効果　日本生体磁気学会誌 11 : 266-267

5．柿木隆介 (1998.5)　これが分かれば研究が進む？　日本生体磁気学会誌 11 : 24-25

6．竹内文也，栗城真也，柿木隆介（1998.5）遅延照合課題における遅延前，後刺激に対する誘発脳磁界応答の計測と解析　日本生体磁気学会誌　11 : 208-209

7．小山紗智子，柿木隆介，中　大輔，大草知裕，渡辺昌子，関口貴裕　(1998）脳磁場 (MEG) を指標とした認知機能の研究：現状と問題点　脳波と筋電図 26: 71-72

8．柿木隆介（1998）ヒト体性感覚の皮質受容機構　脳波と筋電図 26:86-89

9．向　　敬，柿木隆介，宝珠山稔，金桶吉起，中　大輔，小山幸子（1998）右第二趾受動運動による体性感覚誘発脳磁場　脳波と筋電図　26:116

10. 中　大輔，柿木隆介，小山紗智子，渡辺昌子，向　　敬，Lam Khanh ，金桶吉起（1998）後脛骨神経刺激体性感覚誘発脳磁界に与える触覚刺激の影響　脳波と筋電図　26: 116

11. 中川和美，小山紗智子，柿木隆介，中　大輔，古賀良彦，武正建一（1998）両耳分離聴課題による脳磁場の検討　脳波と筋電図　26: 117

12. 佐久間研司，柿木隆介，金桶吉起，小山紗智子，中　大輔，渡辺昌子，中島健二（1998）多双極子モデル (BESA) を用いた嗅覚刺激誘発脳磁界の検討　脳波と筋電図　26: 117

13. Lam Khanh ，柿木隆介，中　大輔，金桶吉起，小山幸子，向　　敬（1998）体性感覚誘発脳 磁界に対する視覚及び聴覚刺激の影響　脳波と筋電図 26: 120

14. 小山紗智子，中　大輔，柿木隆介，中川和美，渡辺昌子，前田多章（1998）視覚oddball課題時の誘発脳磁場　脳波と筋電図　26: 126

15. 中　大輔，柿木隆介（1998）　電気刺激を用いた末梢神経（A δ線維）伝導速度の計測　脳波と筋電図　26: 148

《高次脳機能研究プロジェクト》

1）原著論文

1．Isa T, Endo T, Saito Y (1998) The visuo-motor pathway in the local circuit of the rat superior colliculus. J Neurosci 18: 8496-8504.

2．Kobayashi Y, Kawano K, Takemura A, Inoue Y, Kitama T, Gomi & Kawato M (1998) Temporal firing patterns of Purkinje cells in the cerebellar ventral paraflocculus during ocular following responses in monkeys II. Complex spikes. J Neurophysiol 80: 832 - 848.

《自律機能研究プロジェクト》

1．原著論文

1．Hashimoto I, Mashiko T, Kimura T & Imada T (1998a) Human somatosensory evoked magnetic fields to vibratory stimulation of the index finger: Is there frequency organization in SI? Electroenceph clin Neurophysiol 109: 454-461

2．Hashimoto I (1998b) Physiological mechanisms and functional significance of high-frequency oscillations from human somatosensory cortex. In: I. Hashimoto & R. Kakigi (Eds), Recent Advances in Human Neurophysiology, Elsevier Science, Amsterdam, pp 3-19

3. Hashimoto I, Mashiko T, Kimura T & Imada T (1998c) Are there discrete distal-proximal representations of the index finger and palm in the human somatosensory cortex? A neuromagnetic study. Electroenceph clin Neurophysiol (in press)

4. Hashimoto I (1998d) From input to output in the somatosensory system for natural air-puff stimulation of the skin. In: C Barber, G Celesia, I Hashimoto & R Kakigi (Eds), Functional Neuroscience: Evoked Potentials and Magnetic Fields (EEG Suppl.). Elsevier Science, Amsterdam (in press)

5. Hashimoto I, Mashiko T & Imada T (1998e) Magnetic detection of activity of presumed inhibitory interneurons in the human somatosensory cortex. In: C Aine, YC Okada, G Stroink, S Swithenby & CC Wood (Eds), Advances in Biomagnetism Research: Biomag 96 International Conference. Springer, Berlin (in press)

6. Hashimoto I, Mashiko T, Kimura T & Imada T (1998f) Distal-proximal somatotopy of the human hand somatosensory cortex: An MEG study. In: T Yoshimoto, M Kotani, S Kuriki, N Karibe & N Nakasato (Eds), Advances in Biomagnetism, Tohoku University Press, Sendai (in press)

7. Hashimoto I, Mashiko T, Kimura T & Imada T (1998g) Frequency organization in the human somatosensory cortex: An MEG study. In: T Yoshimoto, M Kotani, S Kuriki, N Karibe & N Nakasato (Eds), Advances in Biomagnetism, Tohoku University Press, Sendai (in press)

8. Ozaki I, Suzuki C, Yaegashi Y, Suda T, Baba M, Matsunaga M & Hashimoto I (1998h) High frequency oscillations in early cortical somatosensory evoked potentials. Electroenceph clin Neurophysiol 108: 536-542

9. Nakano S & Hashimoto I (1998i) Somatosensory evoked high-frequency oscillations after posterior tibial nerve stimulation. In: I Hashimoto & R Kakigi (Eds), Recent Advances in Human Neurophysiology, Elsevier Science, Amsterdam, pp 27-31

10. Iwase Y, Kurosawa H, Ochiai N, Mashiko T, Imada T & Hashimoto I (1998j) Computer simulation of action potentials compared with measured magnetic action fields in peripheral nerve lesions: interpretation of an oscillating phenomenon. In: I Hashimoto & R Kakigi (Eds),

Recent Advances in Human Neurophysiology, Elsevier Science, Amsterdam, pp 54-60

11. Saito Y, Iguchi Y, Nakano S & Hashimoto I (1998k) Comparison of late event-related potentials (ERPs) to somatosensory, auditory and visual stimulation. In: I Hashimoto & R Kakigi (Eds), Recent Advances in Human Neurophysiology, Elsevier Science, Amsterdam, pp 857-861

12. Fukushima T & Hashimoto I (1998l) Neuromagnetic study of bimodal somatosensory and auditory interaction. In: I Hashimoto & R Kakigi (Eds), Recent Advances in Human Neurophysiology, Elsevier Science, Amsterdam, pp 862-865

13. Terasaki O, Iguchi Y & Hashimoto I (1998m) Rotation phenomenon of human alpha activity-an MEG approach. In: I Hashimoto & R Kakigi (Eds), Recent Advances in Human Neurophysiology, Elsevier Science, Amsterdam, pp 1057-1062

14. Ozaki I, Suzuki C, Yaegashi Y, Baba M, Matsunaga M & Hashimoto I (1998n) High frequency oscillations in early cortical somatosensory EPs. In: C Barber, G Celesia, I Hashimoto & R Kakigi (Eds), Functional Neuroscience: Evoked Potentials and Magnetic Fields (EEG Suppl.). Elsevier Science, Amsterdam (in press)

15. Iguchi Y & Hashimoto I (1998o) Event-related potentials reflecting sequential information processing during a mental arithmetic task. In: C Barber, G Celesia, I Hashimoto & R Kakigi (Eds), Functional Neuroscience: Evoked Potentials and Magnetic Fields (EEG Suppl.). Elsevier Science, Amsterdam (in press)

16. Kimura T, Nishijo K & Hashimoto I (1998p) Somatosensory evoked potentials elicited by motor point stimulation. In: C Barber, G Celesia, I Hashimoto & R Kakigi (Eds), Functional Neuroscience: Evoked Potentials and Magnetic Fields (EEG Suppl.). Elsevier Science, Amsterdam (in press)

17. Kimura T, Nishijo K & Hashimoto I (1998q) Somatosensory evoked magnetic fields following motor point stimulation. In: T Yoshimoto, M Kotani, S Kuriki, N Karibe & N Nakasato (Eds), Advances in Biomagnetism, Tohoku University Press, Sendai (in press)

18. Fukushima T & Hashimoto I (1998r) Somatosensory and auditory interaction under

threshold condition. In: T Yoshimoto, M Kotani, S Kuriki, N Karibe & N Nakasato (Eds), Advances in Biomagnetism, Tohoku University Press, Sendai (in press)

19. Nakano S & Hashimoto I (1998s) Comparison of somatosensory evoked high-frequency oscillations after posterior tibial and median nerve stimulation. Electroenceph clin Neurophysiol (in press)

20. Sakuma K & Hashimoto I (1998t) High-frequency magnetic oscillations evoked by posterior tibial nerve stimulation. NeuroReport (in press)

21. 中野修治，辻　貞俊，橋本　勲 (1998u) 慢性呼吸不全は事象関連電位後期成分(N200, P300)の潜時を延長させる. 脳波と筋電図 26: 17-21

22. 福島達臣, 橋本　勲 (1998v) 感覚域値条件での体性感覚と聴覚とのinteraction. 日本生体磁気学会誌 11: 218-219

23. 木村友昭, 西條一止, 橋本　勲 (1998w) 運動点刺激による体性感覚誘発脳磁界. 日本生体磁気学会誌 11: 258-261

24. 中野修治，橋本　勲 (1998x) 視覚疲労が各種P300に与える影響：Visual Display Terminal (VDT)データ入力作業での検討. 臨床脳波 40: 645-648

25. 佐久間研司，橋本　勲 (1998y) 後脛骨神経刺激一次応答におけるHigh-frequency magnetic oscillations. 脳波と筋電図（印刷中）

26. 中野修治，橋本　勲 (1998z) 後脛骨神経体性感覚誘発電位高周波成分(> 300 Hz)の検討. 脳波と筋電図（印刷中）

27. 木村友昭，西條一止，橋本　勲 (1998 a) 手三里への通電刺激に対する体性感覚誘発電位の検討. 全日本鍼灸学会雑誌（印刷中）

2）総説

1．橋本　勲，中野修治，尾崎　勇，益子拓徳，今田俊明 (1998a) 体性感覚系における高周波脳電位・磁界振動の生理学的基礎. 臨床脳波 40: 233-239

2．橋本　勲 (1998b) 脳磁図による脳の活動の非侵襲的観測. 脳機能のイメージング－基礎から臨床まで－(「脳の科学」増刊), 81-87, 星和書店, 東京

3）編著

1．Hashimoto I & Kakigi R (1998a) Recent Advances in Human Neurophysiology. Elsevier Science, Amsterdam

2．Barber C, Celesia G, Hashimoto I & Kakigi R (1998b) Functional Neuroscience: Evoked Potentials and Magnetic Fields. Electroenceph clin Neurophysiol (Suppl.) Elsevier Science, Amsterdam (in press)

4）訳書

1．橋本　勲 (1998) Hereditary motor neuropathy affecting the arms (403)-Hexosaminidase deficiency (411), 伊藤直樹，河村　満，厚東篤生，田代邦雄，辻　省次，彦坂興秀監訳，神経学辞典 (Companion to clinical neurology)　医学書院（印刷中）

《形態情報解析室》

1．有井達夫（1998）超高圧電顕によるイメージングプレート像の特性 IV　日本物理学会第５３回年会講演概要集　2, 344.

2．有井達夫（1998）　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Ⅳ　電子顕微鏡　33, Supple. 1, 106.

3．T. Ohno, M. Sengoku, T. Arii (1998) Dependence of electron beam damage in organic crystals on accelerating voltage. Electron Microscopy 1998, Vol. 2, 835-836.

4．仙石昌也，大野　完，有井達夫 (1998) 超高圧電子顕微鏡における有機物結晶の電子照射損傷 -イメージングプレートを用いた定量測定 -　日本物理学会　1998年秋の分科会 講演概要集　２，417.

5．一海孝光，有井達夫(1998) アクチンの構造変化の解析　生物物理 38, S63.

6．有井達夫(1998) 電子線二次元検出器としてのイメージングプレートおよびフィルムの感度と

分解能　日本電子顕微鏡学会　電子顕微鏡の周辺機器の活用・開発とその応用に関する研究部会 平成10年度研究会講演概要集 pp.17-22.

7．Furuya S, Naruse S & Hayakawa T (1998) Intravenous injection of guanylin induces mucus secretion from goblet cells in rat duodenal crypts. Anat Embryol 197: 359-367

8．Hideaki Ieda, Satoru Naruse, Sonoko Furuya, Tsuyoshi Ozaki, Eiji Ando, Kiyoshi Nokihara, Shinichiro Hori, Motoji Kitazawa, Tetuo Hayakawa (1998) Coexistence of proguanylin (1-15) and somatostatin in the gastrointestinal tract. J. Gastroenterology, Hepatology 13: 1225-1233

《超高圧電子顕微鏡共同利用実験（除アブストラクト）》

1．N. Fujise, Y. Lie, N. Hori, T. Kosaka (1998) Distribution of calfetinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus: II. Mossy cells, with special reference to their dorsoventral difference in calretinin immunoreactivity. Neuroscience, 82, 181-200.

2．K. Toida, K. Kosaka, C.W. Heizmann, T. Kosaka (1998) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. J. Comp. Neurol. 392, 179-198.

3．T. Ohno, M. Sengoku, T. Arii (1998) Dependence of electron beam damage in organic crystals on accelerating voltage. Electron Microscopy 1998, Vol.2, 835-836.

4．野田　亨(1998) 超高圧電子顕微鏡による酵素組織化学（1）細胞　30, 367-369.

5．野田　亨(1998) 超高圧電子顕微鏡による酵素組織化学（2）細胞　30, 418-421.

6．野田　亨(1998) 超高圧電子顕微鏡による組織細胞化学　組織細胞化学1998 (日本組織細胞化学会編) pp.77-84.

《機能情報解析室》

1）原著論文

1．Konno T (1998) Conformational diversity of acid-denatured cytochrome c studied by a matrix analysis of far-UV CD spectra. Protein Sci. 7: 975-982.

2．Kamatari, YO, Konno T, Kataoka M & Akasaka K (1998) The methanol-induced transition and the expanded helical conformation in hen -lysozyme. Protein Sci. 7: 681-688.

3．Tanaka N, Takemura M, Konno T & Kunugi S (1998) Pressure-induced chain collapse of polyvinylpyrrolidone observed through complexation with a fluorescence hydrophobic Probe. Macromolecules 31, 8840-8844.

4．Nakai J, Tanabe T, Konno K, Adams B, Beam KG. (1998) Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling J. Biol. Chem. 273, 24983-6.

2）総説，その他

1．Konno T & Kataoka M. (1998) Solution X-ray scattering study of calpastatin domain I Photon Factory Activity Report 1997 15 part B, 57.

《生体情報処理室》

1）総説，その他の著書

1．石井宏幸 (1998) 脳研究における情報. 細胞工学 17(4) : 506-507

《動物実験施設》

1．Ceregryzyn M, Ozaki T, Kuwahara A. & Wieechetek M.(1998) Sodium nitrate, a potent relaxant of rat stomach fundus: in vitro evidence.Can.J.Physiol.Pharmacol.76: 989-999

2．Wei M, Naruse S, Nokihara K, Ozaki T, Ando E, Chen D, Shun Z. & Wray V. (1998) Structure-activity relationship of VIP-PACAP hybrid peptides. In " Molecular Diversity-

Peptide Libraries" Kluwer Academic Publishers: 81-85

3. Yamazaki Y, Fujimoto H, Ando H, Ohyama T, Hirota Y, Noce T. (1998) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells by deoxyribonucleic acid injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. Biol Reprod: 1439-44.

4. Hagino-Yamagishi K, Saijoh Y, Yamazaki Y, Yazaki K, Hamada H. (1998) Trascriptional regulatory region of Brn-2 required for its expression in developing olfactory epithelial cells. Dev Brain Res 109: 77-86.

5. Yamazaki Y, Yagi T, Ozaki T, Imoto K. (1999) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. J Exp Zool (in press)

6. Osada T, Ikegami S, Takiguchi-Hayashi K, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, Higashinakagawa T, Sasaki Y, Takeuchi T. (1999) Increased anxiety and impaired pain response in puromycin-sensitive aminopeptidase gene-deficient mice obtained by a gene-trap method. J Neurosci (in press)

《江橋研究室》

1. Ebashi, S., Kuwayama, H. & Nanko, C. (1998) Bovine stomach myosim light chain kinase with a marked discrepancy between its enzyme activity and actomyosin activating effect. Proc. Japan Acad. 74, B, 142-144.

b．学会発表

〔目　　次〕

神経化学研究部門 …… 126
超微小形態生理研究部門 …… 128
細胞内代謝研究部門 …… 130
生体膜研究部門 …… 132
機能協関研究部門 …… 133
神経情報研究部門 …… 134
液性情報研究部門 …… 138
高次神経機構研究部門 …… 139
高次神経性調節研究部門 …… 140
生体システム研究部門 …… 141
高次液性調節研究部門 …… 143
感覚・運動機能研究プロジェクト …… 144
高次脳機能研究プロジェクト …… 149
自律機能研究プロジェクト …… 151
形態情報解析室 …… 154
機能情報解析室 …… 156
生体情報処理室 …… 156
動物実験施設 …… 156

学　会　発　表

《神経化学研究部門》

1．丸山　敬，久米秀明，岩坪　威，富田泰輔，西道隆臣，篠崎幸喜，小幡邦彦（1998.3）カルパインとプレセニリンの相互作用　第71回日本薬理学会（京都）

2．鈴江俊彦，篠田義一，小幡邦彦（1998.3）マウス胎仔の初期の周期的自発運動形成に対するGABAの関与　第75回日本生理学会大会（金沢）

3．小幡邦彦，季　鳳雲（1998.3）GAD67遺伝子ノックアウトマウスの小脳および海馬スライスカルチャーにおけるGABAニューロンの発達　第75回日本生理学会大会（金沢）

4．Iseki S, Ishii-Suzuki M, Maruyama K, Kuroda K, Obata K & Eto K (1998.6) GAD67 in secondary palate development. International Association of Dental Research (Nice)

5．Maruyama K, Shinozaki K, Kume H, Kuzume H, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC, Obata K (1998.7) Binding of μ-calpain to presenilin 2. 6th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (Amsterdam)

6．児島伸彦，Oliver Stork，石橋英俊，Simone Stork，小幡邦彦（1998.9）Fyn過剰発現マウスにおけるNMDA受容体サブユニット2Bチロシンリン酸化の亢進と情動行動変化　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

7．小幡邦彦，季　鳳雲，Oliver Stork，Simone Stork (1998.9) GAD65遺伝子ノックアウトマウスにおける脳内GABA量の生後変化と行動変化　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

8．山肩葉子，小幡邦彦 (1998.9) 持続性けいれん活動とCa^{2+}カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

9．篠崎幸喜，丸山　敬，久米秀明，葛目博子，小幡邦彦（1998.9）TEA-LTP 時に発現が上昇する新規の神経特異的遺伝子norbin　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

10. 鈴江俊彦，篠田義一，小幡邦彦　(1998.9)　In vitro経胎盤灌流法を用いた胎仔運動に対する神経伝達物質遮断薬の作用の解析　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

11. 岩坪　威，富田泰輔，小山彰比古，高杉展正，西道隆臣，丸山　敬（1998.9）プレセニリン2変異によるAβ42分泌増加機序の検討　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

12. 山肩葉子，小幡邦彦（1998.10）急性神経活動とMAPキナーゼによるシナプシンIのリン酸化　第71回日本生化学会（名古屋）

13. Maruyama K, Shinozaki K, Kume H, Kuzume H, Kanbara N & Obata K (1998.11) A novel neural tissue specific gene, norbin, increased by treatment of tetraethlammonium in rat hippocampus slice and accompanied with neurite-outgrowth in Neuro 2A cells. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

14. Ji FY, Kanbara N, Asada H & Obata K (1998.11) GABA contents and histogenesis of fetal and newborn mice lacking two isoforms of glutamic acid decarboxylase. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

15. Stork O, Stork S, Ji FY, Celio M, Kanbara N, Ruelicke T, Schwaller B, Hunziker W, Berchtold M & Obata K (1998.11) Roles of glutamate decarboxylase 65 and parvalbumin in control of emotional behavior. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

16. Iwatsubo T, Tomita T, Tokuhiro S, Hashimoto T, Koyama A, Takasugi N, Aiba K, Saido TC & Maruyama K (1998.11) Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of Aβ42. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

17. Tomita T, Koyama A, Takasugi N, Aiba K, Tokuhiro S, Saido TC, Maruyama K & Iwatsubo T (1998.11) Differential effects of truncation of aino- and carboxyl-terminal domains of presenilin 2. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

18. 児島伸彦，陸　雲飛，松井秀樹，小幡邦彦（1998.11）　Fynチロシンキナーゼの神経可塑性における役割　第7回海馬と高次機能学会（宇都宮）

《超微小形態生理研究部門》

1．永山國昭（1998.10）複素電子顕微鏡－1分子構造解析への道　第7回バイオイメージング学会（浜松）

2．魚住卓也，丸山　敬，篠崎幸喜，久米秀明，富田泰輔，岩坪　威，西道隆臣，永山國昭，小幡邦彦（1998.10）プレセニリン結合タンパク質の検索　第71回日本生化学会大会（名古屋）

3．Topo-biogenesis of the Golgi apparatus in polarized cells　第8回ATI国際シンポジウム・第2回細胞膜研究フォーラム（名古屋）

4．Kano F, Uozumi T, Nagayama K & Murata M (1998. 8) Reconstitution of the reasembly Prosesses of vesiculated Golgi apparatus in the SLO-permeabilized MDCK cells. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology (Osaka)

5．加納ふみ，永山國昭，村田昌之（1998. 10）セミインタクト細胞を用いたゴルジ体の位置決定機構の研究　第71回日本生化学会大会（名古屋）

6．村田昌之，加納ふみ（1998. 10）セミインタクト細胞を用いた細胞内メンブレンダイナミクスとオルガネラ・細胞骨格系相互作用の研究　第71回日本生化学会大会（名古屋）

7．村田昌之（1998. 10）Topo-biogenesis of the Golgi apparatus and nuclear membranes　第36回日本生物物理学会年会（博多）

8. 加納ふみ，永山國昭，村田昌之（1998. 10）ブレフェルジンAが誘起するゴルジ体のチューブ構造の形成機構　第36回日本生物物理学会年会（博多）

9．広田　毅，鍵和田聡，笠原和起，岡野俊行，深田吉孝，村田昌之（1998. 10）ニワトリ松果体細胞におけるメラトニン分泌に対するブレフェルジンAの効果　第36回日本生物物理学会年会（博多）

10. Murata M　(1998. 12) Caveolim is a cholesterol-binding protein International Symposium Lipoprotein Metabolism and Atherogenesis (Kyoto)

11. 村田昌之，加納ふみ，永山國昭（1998.12）セミインタクトMDCK細胞を用いたゴルジ体再構築系の確立-イリマキノン

依存的ゴルジ体の形態変化の研究-第21回日本分子生物学会年会（横浜）

12. 加納ふみ，竹中克也，永山國昭，西田栄介，村田昌之セミインタクトMDCK細胞を用いた細胞周期依存的ゴルジ体の形態形成機構　第21回日本分子生物学会年会（横浜）

13. 石堂美和子，大橋正人，山本章嗣，村田昌之，永山國昭 (1998･10)　エンドサイトーシスされた低密度リポタンパク質の細胞内輸送変異株を用いた後期エンドソーム，リソゾーム過程の解析　第71回日本生化学会大会（名古屋）

14. Miwako I, Yamamoto A, Nagayama K and Ohashi M (1998. 8) Characterization of LEX2, a Chinese hamster ovary cell mutant defective in intracellular transport of endocytosed low density lipoprotein. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology (Osaka)

15. Ohashi M, Miwako I, Yamamoto A and Nagayama K (1998. 8) Isolation and classification of Chinese hamster ovary cell mutants defective in endosome-lysosome processing of low density lipoprotein. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology (Osaka)

16. Takahashi T, Tanaka A, Sugiura J & Nagayama K (1998.3) Study of unfolding process of a protein. through 50 MD simulations. 53rd Anual Meeting of the Physical Society of Japan (Narashino)

17. Takahashi T, Sugiura J & Nagayama K (1998.10) Electrostatic interaction in protein: Validity of dielectric approximation. 49th Forum for Protein Structure & 10th Anual Meeting of the Protein Society of Japan (Nagaoka)

18. Takahashi T, Sugiura J & Nagayama K (1998.10) Solvation effect on charge-charge interaction in protein. 36th Anual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Hakata)

19. Takahashi T & Nagayama K (1998.12) Unfolding MD simulations of protein. G B1 domain. 5th Workshop "Principles of Protein Architecture" (Tokoy)

20. Murakami M (1998.3) Role of Cl- and bicarbonate transport in fluid secretion by the salivary gland. The 75th Annual Meeting of Physiological Society of Japan (Kanazawa)

21. Yoshimura K, Murakami M (1998.3) CCh stimulates parotid amylase secretion mainly by

Ca^{2+}-activated fusion, while PDBu potentiates CCh-effect by priming the granules. The 75th Annual Meeting of Physiological Society of Japan (Kanazawa)

22. Murakami M (1998.9) Fluid secretion and oxygen consumption associated with activity of parallel antiports in the mandibular salivary gland. The 4th Congress of FAOPS (Brisbane)

23. 瀬川彰久，吉村啓一，村上政隆（1998.10）共焦点レーザー顕微鏡による単一顆粒開口分泌過程の動的解析-生理・生化学的解析との接点　日本電子顕微鏡学会第43回シンポジウム（千葉）

24. 村上政隆，吉村啓一（1998.10）潅流ラット耳下腺のアミラーゼ分泌と水輸送　第45回中部日本生理学会（浜松）

25. 萩池昌信，山口　修，藤木通弘，李　　憲，森田啓之，村上政隆，瀬尾芳輝，荻野孝史（1998.10）肝門脈領域Na感受性機構の中枢投射：fMRIによる検討　第45回中部日本生理学会（浜松）

《細胞内代謝研究部門》

1．Mohri T, Ikegami S & Miyazaki S (1998) Separation of sperm fusion-induced local Ca^{2+} rise in the sea urchin egg. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl: S28

2．Deguchi R, Kyozuka K, Mohri T & Miyazaki S (1998) Ca^{2+} wave and meiosis-correlated Ca^{2+} oscillations induced by injection of sperm factor in ascidian eggs. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl: S25

3．Oda S, Mohri T, Deguchi R, Shikano T & Miyazaki S (1998) Spatiotemporal analysis of intracellular calcium increase in mouse eggs induced by microinjection of hamster sperm extract. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl: S25

4．Oshimi,Y, & Miyazaki S (1998) Human monocytes and macrophages show $[Ca^{2+}]_i$ rises in response to ATP and antibody against the CD14 receptor. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl: S43

5．Miyazaki S, Oshimi Y, Honda Y & Oda S (1998) Ca^{2+} responses in Fas-mediated apoptosis

and human natural killer cell cytotoxicity. Symposium on Pathophysiology of Ca^{2+} Signaling. 3rd Internatl. Congr. Pathophysiol. Abstr. P133

6. Yada, T, Matsukawa, H & Yaekura K (1998) Control of insulin secretion by gap junctional and autocrine/paracrine interaction between pancreatic islet cells. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl 1: S16

7. Yada T, Muroya S, Arahira S, Kusao, M & Matsukawa H (1998) Establishment of a method for selecting and analyzing single α-cells among islet cells. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl 1: S37

8. Arahira S, Muroya S, Kusao M, & Yada T (1998) PACAP : a potent regulator of pancreatic α-cells. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl 1: S41

9. Matsukawa H, Yada T, Yaekura K, & Muroya S (1998) The mechanism of cytosolic Ca^{2+} oscillation in rat pancreatic β-cells : the role of endoplasmic reticulum Ca^{2+} pump and protein kinase C. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl 1: S41

10. Kusao M, Muroya S, Takigawa M & Yada T (1998) PACAP activates and GABA inhibits glucose-sensitive neurons in the arcuate nucleus. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl 1: S169

11. Muroya S, Yada T, & Takigawa M (1998) Regulators of glucose-sensitive neuropeptide Y neurons in hypothalamic arcuate nucleus, a feeding center. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl 1: S164

12. Kakei M, Nakazaki M, Yaekura K, Koriyama N & Yada T (1998) Impairment of mitochondrial function and insulin secretion. Jpn. J. Physiol. 48, Suppl 1: S36

13. 矢田俊彦，室屋真二，草尾優美，荒平聡子 (1998) グルカゴン分泌 α 細胞の機能解析方法の確立とグルコースによる調節，第41回日本糖尿病学会学術集会，和歌山

14. 荒平聡子，草尾優美，室屋真二，矢田俊彦 (1998) PACAP：膵島 α 細胞の新しい制御物質，第41回日本糖尿病学会学術集会．和歌山

15. 草尾優美，室屋真二，矢田俊彦 (1998) 摂食中枢視床下部弓状核ニューロンのグルコース・インスリン・レプチンによる制御．第41回日本糖尿病学会学術集会，和歌山

16. 八重倉和朗，櫻田正也，中田正範，加計正文，菊池方利，矢田俊彦 (1998) サブピコモルPACAPはいかにしてインスリン分泌を刺激するか：膵 β 細胞受容体－シグナル伝達機序．第41回日本糖尿病学会学術集会，和歌山

17. 矢田俊彦，荒平聡子，草尾優美，塩田清二 (1998) 膵島ホルモンPACAPの第二の機能：α 細胞の制御．第26回グルカゴン研究会，東京

18. 塩田清二，舟橋久幸，中井康光，矢田俊彦，室屋真二，滝川守国 (1998) レプチン受容体の脳内分布．第51回日本自律神経学会総会，東京

19. 矢田俊彦，室屋真二，塩田清二，滝川守国 (1998) 弓状核 Neuropeptide Y 神経のグルコース，レプチン，インスリンによる制御．第19回日本肥満学会大会，松山

《生体膜研究部門》

1．久木田文夫（1998.3）膜電位依存性イオンチャネルの開過程最終転移の熱力学的性質．第75回日本生理学会大会（金沢）

2．中野春男，古家喜四夫，山岸俊一（1998.3）乳腺筋上皮細胞におけるカルシウム応答と収縮のメカニズム．第75回日本生理学会大会（金沢）

3．山岸俊一，神谷絵美，筒井泉雄，古家喜四夫，榎本浩一（1998.3）神経に発現するClチャネルの性質とその同定．第75回日本生理学会大会（金沢）

4．筒井泉雄，井上　勲（1988.3）イカシュワン細胞のシングルKチャネル．第75回日本生理学会大会（金沢）

5．中西圭子，久木田文夫（1988.9）培養大脳皮質ニューロンの同調発火における抑制性ニューロンの影響．日本神経科学・日本神経化学合同大会（東京）

6．久木田文夫（1998.10）ナトリウムチャネルにおける透過性ポア形成の熱力学的性質．日本生物物理学会第36回年会（福岡）

《機能協関研究部門》

1. Tsumura T, Ueda S, Hazama A & Okada Y (1998) Do Paneth cells express the CFTR Cl^- channel? Gastroentelologie 36, 342 (ノルウェー)

2. Liu Y, Tsumura T, Oiki S & Okada Y (1998) Mechanism of inhibition by glibenclamide of volume-sensitive Cl^- channels in cultured human epithelial cells. 日本生理学雑誌. 60, 105 (岡崎)

3. Kida H, Morishima S, Ueda S, Miyoshi T, Chiba T & Okada Y (1998) The role of water channels in osmotic water flow and cell volume regulation in a human small intestinal epithelial cell line. Jpn. J. Physiol. 48 (Suppl) S49 (金沢)

4. Hazama A, Miwa A, Shimizu T, Yamamoto T & Okada Y (1998) ATP release from cultured intestinal epithelial cells under hypotonic conditions. Jpn. J. Physiol. 48 (Suppl) S51 (金沢)

5. Zhou J, Xie A & Okada Y (1998) Inhibitory effects of external Mg^{2+} on inward-rectifier potassium channel (Kir2.1). Jpn. J. Physiol. 48 (Suppl) S100 (金沢)

6. Zhou S-S, Takai A & Okada Y (1998) Intracellular Mg^{2+} dependence of cardiac CFTR Cl^- channel currents in guinea pig ventricular myocytes. Jpn. J. Physiol. 48 (Suppl) S104 (金沢)

7. Tsumura T, Hazama A, Ueda S & Okada Y (1998) Extracellular ATP accelerates cell volume regulation after osmotic swelling in human intestinal epithelial cells. Jpn. J. Physiol. 48 (Suppl) S108 (金沢)

8. Shimizu T, Oiki S, Tsumura T & Okada Y (1998) Effects of extracellular divalent cations on the volume-sensitive Cl^- current in human epithelial cells. Jpn. J. Physiol. 48 (Suppl) S109 (金沢)

9. Takai A, Koyasu M, Zhou S-S & Okada Y (1998) Enhancement of guinea-pig cardiac CFTR Cl^- channel by anthracene-9-carboxylate is mediated by a Mg^{2+}-dependent phosphatase distinct from PP2C. Jpn. J. Physiol. 48 (Suppl) S109 (金沢)

10. 清水貴浩, 岡田泰伸 (1998) 容積感受性Cl^-チャネルの細胞外カチオン依存性. 日本生理学雑

誌. 60, 106 （岡崎）

11. 津村剛彦，三好毅志，挾間章博，岡田泰伸 (1998) モルモット小腸上皮および単一パネト細胞におけるCFTR発現の分子生物学的検討． 日本生理学雑誌. 61, 39 （浜松）

《神経情報研究部門》

1．池中一裕 (1998.1) ウィルスベクターを用いた癌の遺伝子治療，第29回弘前癌治療懇話会（弘前）

2．Baba, H., Akita, H. and Ikenaka, K. (1998.2) K^+ channel clusteringis controlled by attachment of myelin sheath. Gorden Research Conference on Myelin (Ventura)

3．池中一裕 (1998.3) 神経発生研究の新しいアプローチ，名古屋免疫・神経・エンドクリン研究会（名古屋）

4．Nanmoku, K., Yoshimatsu, T., Tamura, M. and Ikenaka, K. (1998.5) Gene transfer to the nervous system using high titer retroviral vector. American Society of Gene Therapy (Seattle)

5．Baba, H., Akita, H. and Ikenaka, K. (1998.6) K^+ channel clustering is controlled by attachment of myelin sheath. The Fourth Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry The Annual Meeting of the Korean Society of Neruoscience (Seoul)

6．Nakahira, K., Wakazono, Y., Shibata, R., Kurahashi, T., Kaneko, A. and Ikenaka, K. (1998.6) Developmental expression of voltage-gated potassium channels in mouse brain.The Fourth Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry The Annual Meeting of the Korean Society of Neruoscience (Seoul)

7．Menon, K. K., Fujimoto, I. and Ikenaka, K. (1998.6) Effect of overexpression of human Galactosyltransferase (GalTase) on brain enriched sugar chain (BA2) in cultured CG4 cells. The Fourth Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry The Annual Meeting of the Korean Society of Neruoscience (Seoul)

8．Miyao, Y., Nanmoku, K., Yoshimatsu, T., Tamura, M., Tamura, K., Shimizu, K. and Ikenaka, K. (1998.6) Gene transfer to the nervous system using high titer retroviralvector. The 11th INTERNATIONAL SYMPOSIUM MOLECULAR BIOLOGY OF HEMATOPOIESIS (Bormio, Italy)

9．池中一裕 (1998.6) 中枢神経系髄鞘形成機構とその遺伝子疾患，第１回小児神経発達研究会（岐阜）

10. Nanmoku, K. Yoshinatsu, T., Tamura, M. and Ikenaka, K. (1998.7) Highly efficient gene transfer into the nervous system using High-titer retroviral vector in vitro and in vivo. The fourth annual meeting The Japan Society of Gene Therapy (Tokyo)

11. Tamura, M., Shimizu, K., Tamura, K., Mabuchi, E., Miyao, Y., Kishima, H., Yoshimatsu, T. and Ikenaka, K. (1998.7) Migration of transduced glioma cells by high titer retroviral vector in brain tumors. The fourth annual meeting The Japan Society of Gene Therapy (Tokyo)

12. 南木浩二，奥村俊一郎，熊田竜郎，馬場広子，池中一裕 (1998.7) 高力価レトロウィルスベクターの応用，第２１回東海遺伝子医療研究会（岐阜）

13. Ikenaka, K., Wada, T., Yamada, M. and Ivanova, A. (1998.8) Functions of PLP gene products and their relevance to oligodendrocyte cell lineage. 12th Biennial Meeting International Society for Developmental Neuroscience. (Vancouver)

14. Nakahira, K., Wakazono, Y., Shibata, R., Kurahashi, T., Kaneko, A. and Ikenaka, K. (1998.8) Expression of voltage-gated potassium channels in developing mouse cerebellar granule cells.12th Biennial Meeting International Society for Developmental Neuroscience. (Vancouver)

15. 池中一裕 (1998.8) 高力価レトロウィルスベクターを用いた遺伝子導入とその応用，平成１０年度文部省特定領域研究(A)「がん遺伝子治療ベクターの基礎研究」第一回班会議（東京）

16. 馬場広子，池中一裕 (1998.9) グリア細胞によるイオンチャンネルの発現と局在の調節機構，第４１回日本神経化学会大会（東京）

17. 柴田理一，若園佳彦，中平健祐，池中一裕 (1998.9) マウス小脳顆粒細胞における電位依存性

K^+チャネルの発現変化，第41回日本神経化学会大会（東京）

18. 吉田敏，宮崎真理，張勤増，酒井久美子，藤本一朗，池中一裕，池本　敦，奥山治美 (1998.9) 学習と摂取脂肪酸による脳ミクロソーム膜糖鎖の構造変化の分析，第41回日本神経化学会大会（東京）

19. Ivanova, A.，和田圭樹，大庭明生，池中一裕 (1998.9) マウス脳発生におけるPLP/DM-20陽性細胞の分析，第41回日本神経化学会大会（東京）

20. 和田圭樹，Ivanova, A.，白崎竜一，村上富士夫，池中一裕 (1998.9) マウスオリゴデンドロサイト初期発生の細胞生物学的解析，第41回日本神経化学会大会（東京）

21. 秋田裕美，馬場広子，Ivanova, A.，池中一裕 (1998.9) マウス視神経におけるオリゴデンドロサイトの発生・分化とミエリン形成，第41回日本神経化学会大会（東京）

22. 南木浩二，岩崎靖乃，馬場広子，池中一裕 (1998.9) 高力価レトロウィルスを用いた神経系への遺伝子導入とアストロサイト細胞系譜の解析，第41回日本神経化学会大会（東京）

23. 藤本一朗，Menon, K. K.，大竹洋介，長谷純宏，高橋　均，辻　省次，池中一裕 (1998.9)ヒト病理標本における組織間糖蛋白質糖鎖パターンの解析，第41回日本神経化学会大会（東京）

24. 奥村俊一郎，馬場広子，中根恭司，日置紘士郎，池中一裕 (1998.9) レトロウィルスベクターを用いた胃癌関連遺伝子の機能発現クローニング，第57回日本癌学会総会横浜）

25. 田村雅一，清水恵司，田村和義，吉松忠憲，宮尾泰慶，池中一裕 (1998.9) mouse glioma model に対するretroviral vector を用いた遺伝子治療の著効因子の検討，第57回日本癌学会総会（横浜）

26. 日浅厚則，渡辺正人，池中一裕，岡田秀親，兼松隆之，珠玖　洋 (1998.9) 補体制御因子ヒトCD55(DAF)発現ウィルス産生細胞によるレトロウィルスのヒト血清中での感染効率，第57回日本癌学会総会（横浜）

27. 栗山茂樹，池中一裕，美登路昭，富永謙太郎，吉治仁志，辻本達寛，豊川泰勲，浅田　潔，福井　博 (1998.9) CEA産生ヒト大腸癌および近傍正常粘膜より分離したCEAプロモーター領域の比較検討，第57回日本癌学会総会（横浜）

28. 豊川泰勲，栗山茂樹，菊川政次，中谷敏也，増井一弘，阪本たけみ，池中一裕，福井　博 (1998.9) 自殺遺伝子を用いた癌性腹膜炎に対するin vivo 遺伝子治療の検討，第57回日本癌学会総会（横浜）

29. 池中一裕 (1998.9) ミエリン形成不全および脱随時における伝導障害機構，生理学研究所研究会（岡崎）

30. 森　泰生，岡田峯陽，清水俊一，高田尚幸，若森　実，井本敬二，池中一裕，前田明人，黒崎知博 (1998.10) 電位作動性及び受容体作動性Ca流入機構の分子・機能解析，第71回日本生化学会大会（名古屋）

31. 南木浩二，岩崎靖乃，馬場広子，池中一裕 (1998.10) 高力価レトロウィルスを用いた神経系への遺伝子導入，第71回日本生化学会大会（名古屋）

32. 中北慎一，Menon, K. K.，長束俊治，池中一裕，長谷純宏，(1998.10) 脳型ガラクトシルトランスフェラーゼと脳特異的糖鎖，第71回日本生化学会大会（名古屋）

33. Menon, K. K., Fujimoto, I., Hase, S. and Ikenaka, K. (1998.10) Effect of overexpression of human Galactosyltransfase (GalTase I) on brain enriched sugar chain (BA2) in culrured CG4 cells，第71回日本生化学会大会（名古屋）

34. 福原俊介，大道　薫，池中一裕，長谷純宏 (1998.10) マウス脳特異的糖鎖のレセプターの検索，第71回日本生化学会大会（名古屋）

35. 大竹洋介，藤本一朗，田中文啓，Menon, K. K.，和田洋巳，池中一裕 (1998.10) ヒト血清糖蛋白糖鎖の解析，第71回日本生化学会大会（名古屋）

36. 柴田理一，若園佳彦，中平健祐，池中一裕 (1998.10) マウス小脳顆粒細胞における電位依存性K^+チャネルの発現変化，第45回中部日本生理学会（浜松）

37. 池中一裕 (1998.10) 遺伝子治療における遺伝子導入技術，第71回日本生化学会大会（名古屋）

38. 池中一裕 (1998.11) 神経系細胞への遺伝子導入，日本癌学会シンポジウム（熊本）

39. 佐々木学，中平健祐，池中一裕 (1998.12) SAGE法を用いたマウス全脳mRNAの発現プロファ

イルの解析，第21回日本分子生物学会年会（横浜）

40. 池中一裕，岩崎靖乃 (1998.12) マウスgcmホモログの発現および機能，研究領域「脳を知る」のシンポジウム（大阪）

《液性情報研究部門》

1. Nakai J (1998・2) Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca^{2+} channels. The 42nd Biophysical Society Annual Meeting (Kansas City).

2. Nakai J (1998・3) Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca^{2+} channels. 第71回薬理学会総会（京都）

3. 若森　実，森　泰生，井本敬二 (1998・10) "Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel." (第45回中部日本生理学会（浜松），1998年10月16日

4. 中井　淳一 (1998・10) 電位依存性L型カルシウムチャネルの単一チャネルコンダクタンスの決定部位　第71回生化学会総会（名古屋）

5. Okada T, Shimizu M, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Imoto K, Mori Y (1998・11) Molecular/functional identification of a novel receptor-activated Ca^{2+} channel from mouse CNS. Society for Neuroscience, the 28th Annual Meeting (Los Angels)

6. Mori Y, Takada N, Okada T, Wanifuchi H, Oka H, Ikenaka K, Imoto K (1998・11) Colocalizaiton of receptor-activated Ca^{2+} channel subtypes in mouse CNS. Society for Neuroscience, the 28th Annual Meeting (Los Angels)

7. Iizuka M, Nishimura S, Akiba I, Wakamori M, Imoto K, Barsoumian EL (1998・11) Characterization of the lethal expression of AMPA receptor in HEK cells. Society for Neuroscience, the 28th Annual Meeting (Los Angels)

《高次神経機構研究部門》

1．中村和裕，森　　寿，城山優治，八木　健，真鍋俊也，高橋智幸，渡辺雅彦，市川量一，井上芳郎，三品昌美（1998）テレンセファリン遺伝子にCreリコンビナーゼ遺伝子を挿入した変異マウスの作製と解析，第21回日本神経科学　第41回日本神経化学合同大会，東京

2．湯浅茂樹，先崎浩次，安田昌弘，八木　健（1998）Fyn欠損マウスの脳発生過程における神経細胞の移動傷害，第21回日本神経科学　第41回日本神経化学合同大会，東京

3．宮川　剛，八木　健，二木宏明（1998）Fyn欠損マウスの攻撃性，第21回日本神経科学　第41回日本神経化学合同大会，東京

4．清和千桂，井口泰泉，八木　健，阿相皓晃（1998）Fyn欠損マウスにおける中枢ミエリン膜形成異常について，第21回日本神経科学　第41回日本神経化学合同大会，東京

5．中本百合江，八木　健，二木宏明，吉井光信（1998）Fyn欠損マウスのβ-カルボン誘導体に対する痙　誘発感受性の異常，第21回日本神経科学　第41回日本神経化学合同大会，東京

6．服部功太郎，八木　健，久保田統，佐藤　夫，湯浅茂樹（1998）fyn遺伝子欠損マウスにおける情動傷害の機能解剖学的解析，第21回日本神経科学　第41回日本神経化学合同大会，東京

7．八木　健（1998）Fynとシナプスでタンパク質複合体を形成する新たなカドヘリン(CNR)ファミリーの解析，第71回日本生化学会シンポジウム，名古屋

8．谷口雅彦，八木　健（1998）末梢神経系の神経回路形成過程におけるコラプシンの分子機能解析，第71回日本生化学会シンポジウム，名古屋

9．島　孝樹，八木　健，磯島康史，岡田雅人，永井克也（1998）概日時計機構におけるチロシリン酸化の意義；Fyn欠損マウスのリズムと視交叉上核におけるリン酸化の解析，第71回日本生化学会，名古屋

10．柳川右千夫，小林隆司，大西泰子，田村真理，績　輝久，三宝　誠，八木　健，田代　文，宮崎純一（1998）標的遺伝子組換え体の濃縮と効果的選別法，第71回日本生化学会，名古屋

11. 八木　健（1998）遺伝子ターゲティング法を用いた情動形成に関わる新たな遺伝子の探索　第75回日本生理学会シンポジウム，金沢

12. 八木　健（1998）CNRファミリー：シナプスに局在するFyn結合型カドヘリン　第21回日本分子生物学会シンポジウム，横浜

13. 八木　健（1998）哺乳類での新たなシナプス機能分子の解析　戦略的基礎研究推進事業「脳を知る」のシンポジウム，大阪

14. Takeshi Yagi, (1998) Ethanol, NMDA receptors and fyn-kinase function in the CNS.the ISBRA satellite meeting on "Ethanol and Intracellular Signaling: from Molecules to Behavior" in Lund, Sweden, 1998

15. Takeshi Yagi, (1998) Genetics: Nature vs. Nurture, First Annual Symposium on Japanese-American Frontiers of Science, Irvine, California, USA

16. Takeshi Yagi, (1999) Fyn can regulate NMDA-receptor activity and couple a novel cadherin (CNR) family in the mammalian synapse. Thirty-Second Annual Winter Conference on Brain Research, Snowmass Village, Colorado, USA

《高次神経性調節研究部門》

1．小松英彦 (1998.6)　脳内視覚情報処理研究の新展開．　第４回画像センシングシンポジウム（横浜）

2．木下正治，小松英彦 (1998.8)　サル一次視覚野ニューロンにおける面の輝度および明るさ情報の表現．　第２回視覚科学フォーラム（岡崎）

3．杉原弘記，村上郁也，小松英彦，　Shenoy KV. & Andersen RA.(1998.9)　回転面の傾きに対するサルMSTd神経細胞の選択性．　第21回日本神経科学学会（東京）

4．木下正治，小松英彦 (1998.9)　サル第一次視覚野ニューロンにおける一様な面の輝度および明るさの表現．　第21回日本神経科学学会（東京）

5．近藤秀樹，小松英彦 (1998.10) サル視覚前野ニューロンのマスキング刺激に対する応答. 第45回中部日本生理学会（浜松）

6．Kinoshita M., & Komatsu H.(1998.11) The representation of the surface luminance and brightness in the macaque striate cortex (V1). 28th Society for Neuroscience Meeting (Los Angeles, U.S.A.)

7．Sugihara H., Murakami I., Komatsu H., Shenoy KV. & Andersen RA.(1998.11) Selectivity of neurons to the 3D orientation of a rotating plane in area MSTd of the monkey. 28th Society for Neuroscience Meeting (Los Angeles, U.S.A.)

《生体システム研究部門》

1．Kuze B, Matsui T, Matsuyama K, Kakigi R & Mori S (1998.11) Similarity and difference in innervation patterns of vestibulospinal axons at the cervical, thoracic and lumbar segments in the cats: PHA-L tracing study. 28th Annual meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

2．Matsuyama K, and Mori S. (1998.3) Lumbar interneurons involved in the generation of fictive locomotion in cats. New York Academy of Sciences Conference (New York)

3．Matsuyama K, Nakajima K, Kuze B, Mori F, Matsui T & Mori S (1998.11) Lumbar commissural neurons receiving reticulospinal inputs in cats: morphology and activity during fictive locomotion. 28th Annual meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

4．Miyashita E (1998.11) Movement kinematic parameters and neural activity in the monkey motor cortices during visually guided planar arm movements. 28th Annual meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

5．Mori F, Nakajima K, Okumura T, Matsuyama K & Mori S (1998.11) Bipedal locomotion of Japanese monkeys (*M. Fuscata*) on an inclined treadmill : joint angle analyses. 28th Annual meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

6．Mori S, Matsui T, Kuze B & Matsuyama K (1998.11) Comparison of driving mechanisms of

locomotor programs induced by cerebellar and MLR stimulation in cats. 28th Annual meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

7. Mori S & Matsuyama K (1998.3) Cerebellar induced locomotion: reticulospinal control of spinal rhythm generating mechanism in cats. New York Academy of Sciences Conference (New York)

8. Mori S, Matsuyama K, Matsui T, Kuze B, and Mori F. (1998.11) Cerebello-reticulo-interneuronal system involved in the generation of locomotion in cats. International symposium "Peripheral and Spinal Mechanism in the Neural Control of Movement " (Tucson, Arizona)

9. 久世文也，松山清治，宮田英雄，森　茂美　ダイテルス核を起始核とする前庭脊髄路軸索の微小形態：頚・胸・腰髄レベルにおける比較　第99回日本耳鼻咽喉科学会総会（札幌）

10. 久世文也，松井利浩，松山清治，森　茂美 (1998.9) 前庭脊髄路単一軸索の頚・胸・腰髄レベルにおける支配様式　日本神経科学・化学合同大会（東京）

11. 松井利浩，久世文也，松山清治，森　茂美 (1998.3) 小脳刺激により誘発される歩行運動と網様体脊髄路線維　第75回日本生理学会（金沢）

12. 久世文也，松山清治，宮田英雄，森茂美 (1998.11) 順行性標識法による前庭脊髄路線維の脳幹および脊髄内走行および分枝様式」　日本平衡神経科学学会（岐阜）

13. 松井利浩，久世文也，松山清治，森　茂美 (1998.9) ネコ歩行標本のhook bundle of Russell刺激で誘発される歩行運動とその実行系　日本神経科学・化学合同大会（東京）

14. 松山清治，中溝克己，久世文也，森　大志，松井利浩，森　茂美 (1998.9) ネコの後肢歩行リズム形成に関わる腰髄介在細胞の支配様式　日本神経科学・化学合同大会（東京）

15. 宮下英三 (1998.9) 視覚誘導性運動課題遂行中のサル運動野ニューロンの発火特性：運動パラメータとの関連性　日本神経科学・化学合同大会（東京）

16. 森　大志，中溝克己，奥村　哲，松山清治，森　茂美 (1998.3) 斜トレットミル上でのサルの歩行運動：運動力学的解析　第75回日本生理学会（金沢）

17. 森　茂美，松井利浩，久世文也，松山清治，中溝克己 (1998.3) 除脳ネコ歩行標本の小脳白質部に同定できた歩行誘発野　第75回日本生理学会（金沢）

18. 森　大志，中溝克己，奥村　哲，松山清治，森　茂美 (1998.9) 傾斜トレッドミル上でのサルの歩行運動：体幹軸と関節角度の変化　日本神経科学・化学合同大会（東京）

19. 森　茂美 (1998.11) 運動と姿勢の統合機序　日本平衡神経科学学会（岐阜）

20. 森　茂美 (1998.12) 筋トーヌスの制御と脚橋被蓋核・網様体脊髄路系　瀬川小児神経学クリニック25周年記念シンポジウム（東京）

21. 奥村　哲，松山清治，森　茂美 (1998.3) 尾状核カルバコール微小化学刺激による脳内モノアミン・アミノ酸レベルの変動　第75回日本生理学会（金沢）

22. 奥村　哲，松山清治，森　茂美 (1998.10) 無拘束ネコの尾状核カルバコール刺激による行動変化と脳内神経伝達物質の変動」　第45回中部日本生理学会（浜松）

《高次液性調節研究部門》

1．小西清貴，河津正人，内田以大，中嶋京一，桔梗英幸，亀山征史，関原謙介，宮下保司 (1998・9) 機能的磁気共鳴画像法によるウイスコンシンカード分類テストの機能マッピング. 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会 (東京)

2．小西清貴，宮下保司 (1998・9)　事象関連fMRIを用いたヒト認知機能解析：前頭葉課題への応用. 第21回日本神経科学・第４１回日本神経化学合同大会 (東京)

3．徳山　宣，橋本隆紀，奥野浩行，李　悦欣，宮下保司 (1998・9) 大脳半球分離ザルにおける視覚記憶課題によるHomer mRNAの発現誘導. 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会(東京)

4．内田以大，桔梗英幸，中嶋京一，小西清貴，関原謙介，宮下保司 (1998・9)　文字認識に伴うヒト視覚野活動のfMRIによる計測. 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会(東京).

5．奥野浩行，徳山　宣，李　悦欣，橋本隆紀，宮下保司 (1998・9) 大脳分離ザルを用いた視覚記憶課題によるmRNA活性化の検出．第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会 (東京)

6．小西清貴，中嶋京一，内田以大，桔梗英幸，亀山征史，河津正人，関原謙介，宮下保司 (1998・3) 機能的磁気共鳴画像法の時間分解能を用いた脳活動解析：認知課題への応用．第75回日本生理学会大会 (金沢市)

7．徳山　宣，橋本隆紀，奥野浩行，李　悦欣，宮下保司 (1998・3) ラット海馬—内嗅野領域におけるBDNFとtrkBmRNA発現の逆相関．第75回日本生理学会大会 (金沢市)

8．関原謙介，Marantz, A., Poeppel, D., Phillips, C., 小泉英明，宮下保司(1998・5) 共分散行列差分法を用いた脳磁界の解析．第13回日本生体磁気学会 (東京)

9．Konishi S, Kawazu M, Uchida I, Nakajima K, Kikyo H, Kameyama M, SekiharaK & Miyashita Y (1998・11)　An fMRI study of wisconsin card sorting test: role of abstract reasoning in shift-related activity. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience, (Los Angeles)

10. Tokuyama W, Okuno H, Hashimoto T, Li Y-X & Miyashita Y (1998・11) Detection of immediate early gene activation during visual paired associate learning in "split-brain" monkeys. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

11. Hashimoto T, Tokuyama W, Li Y-X, Okuno H and Miyashita Y (1998・11) Quantitative analysis of bdnf and trkB mRNA expression levels along the trisynaptic circuit in rat hippocampal formation. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

12. Hasegawa I, Fukushima T, Ihara T, Hayashi T & Miyashita Y (1998・11) Interhemispheric transfer between prefrontal cortices: cognitive interaction for retrieval of long-term memory. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Los Angeles)

《感覚・運動機能研究プロジェクト》

1．Koyama S, Naka D & Kakigi R (1998.3) Evoked magnetic responses during a word

recognition task. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

2. Kuriki S, Isahai N, Takeuchi F & Kakigi R (1998.3) Where do perception and recognition of words take place in the brain : a neuromagnetic approach. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

3. Nakamura A, Yamada T, Abe Y, Kachi T , Kato T, Ito k, Yanagisawa N & Kakigi R (1998.3) Modification of ipsilateral somatosensory evoked magnetic fields by hand posturing. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

4. Nakagawa K, Koyama S, Kakigi R, Naka D, Koga Y & Takemasa K (1998.3) Selective attention effect on the auditory evoked magnetic fields. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

5. Xiang J, Kakigi R, Hoshiyama M, Kaneoke Y, Naka D, Takeshima Y & Koyama S (1998.3) Somatosensory evoked magnetic fields and potentials folowing passive toe movement in humans. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

6. Berg P, Kakigi R, Scherg M, Dobel C & Zobel E (1998.3) Source modeling of the EEG and Oddball response in a subject with a large P300. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

7. Kakigi R, Watanabe S, Kitamura Y & Yamasaki H (1998.3) Pain-related brain activities: magnetoencephalographic studies. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

8. Okusa T, Koyama S, Kaneoke Y & Kakigi R (1998.3) Visual awareness of characters of various visibilities concealed in random dots. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

9. Naka D, Koyama S, Xiang J & Kakigi R (1998.3) Effects of tactile interference stimulation on somatosensory evoked magnetic fields following tibial nerve stimulation. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

10. Nakamura A, Yamada T, Goto A, Kato T, Ito K, Abe Y, Kachi T, Yanagisawa N & Kakigi R

(1998.3) The somatosensory homunculus as drawn by MEG. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

11. Kaneoke Y, Bundou M & Kakigi R (1998.3) Neural correlate of motion perception in the human visual system. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

12. Osaka N, Osaka M, Okusa T, Naito T, Koyama S & Kakigi R (1998.3) Neural correlates of motion after-effect using evoked magnetic fields. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

13. Naka D & Kakigi R (1998.3) A simple and novel method for measuring conduction velocity of as fibres using electirical stimulation in humans. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

14. Lam K, Kakigi R, Kaneoke Y, Naka D & Suzuki H (1998.3) Effects of visual and auditory interference stimulation on somatosensory evoked magnetic fields. The 6th International Evoked Potentials Symposium (Okazaki, Japan)

15. Kakigi R (1998.6) Magnetoencephalographic study of pain perception in humans. Symposium: Clinical Psychophysiology of Pain (Tubingen, Germany)

16. Kakigi R, Xiang J & Hoshiyama M (1998.6) Somatosensory evoked magnetic fields following passive finger movement. 9th European Congress of Clinical Neurophysiology (Ljubljana, Slovenia)

17. Maeda K, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Naka D & Xiang J (1998.6) Activities in peri-Sylvian areas following stimulation of various sites : Magnetoencephalographic studies. 9th European Congress of Clinical Neurophysiology (Ljubljana, Slovenia)

18. Kakigi R, Naka D, Lam K (1998.8) MEG evidence of gating mechanisms in somatosensory evoked response, 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

19. Takeuchi F, Kuriki S & Kakigi R (1998) Neuromagnetic responses to a pre- and post-delay time stimulus in a delayed matching task, 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

20. Sekiguchi T, Koyama S, Naka D & Kakigi R (1998.8) The Neural Correlates of the Word Repetition Effect : A Magnetoencephalographic Study. 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

21. Maeda K, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Naka D, Xiang J, Watananabe S, Shimojo M, Yamasaki H & Sekiguchi T (1998.8) Activities in peri-Sylvian areas following various kinds of stimulation : Magnetoencephalographic studies. 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

22. Lam K, Kakigi R, Kaneoke Y, Naka D & Suzuki H (1998.8) Effects of visual and auditory interference stimulation on somatosensory evoked magnetic Fields. 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

23. Okusa T, Kaneoke Y & Kakigi R (1998.8) Magnetoencephalographic study on visual perception of objects. 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

24. Sakuma K, Kakigi R, Kaneoke Y, Koyama S, Naka D & Watanabe S (1998.8) Odorant evoked magnetic fields using spatio-temporal source analysis. 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

25. Isahai N, Takeuchi F, Kuriki S & Kakigi R (1998.8) Neuromagnetic responses associated with visual words processing measured over the temporal region. 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

26. Kawakami O, Kaneoke Y, Sekiguchi T, Yamasaki H & Kakigi R (1998.8) Perception of apparent motion is related to the magnetic response from the human extrastriate cortex. 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

27. Watanabe S, Koyama S, Kirino E McCarthy G & Kakigi R (1998.8) Human face perception - magnetoencephalographic study. 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

28. Yamasaki H, Naka D & Kakigi R (1998.8) Effects of attention on pain perception. 11th International Conference on Biomagnetism : Biomag98 (Sendai, Japan)

29. 竹内文也，栗城真也，柿木隆介（1998.5）遅延照合課題における遅延前，後刺激に対する誘発脳磁界応答の計測と解析　第13回日本生体磁気学会大会（東京）

30. 川上　治，金桶吉起，関口貴裕，山崎　浩，柿木隆介 (1998.5) 仮現運動知覚と脳磁場反応　第13回日本生体磁気学会大会（東京）

31. 大草知裕，金桶吉起，小山紗智子，柿木隆介 (1998.5)　視覚性形態認知の脳磁図を用いた研究　第13回日本生体磁気学会大会（東京）

32. 渡辺昌子，小山紗智子，桐野衛二，柿木隆介 (1998.5)　ヒトの顔認知に関する脳磁図を用いた研究　第13回日本生体磁気学会大会（東京）

33. 山崎　浩，柿木隆介，中　大輔 (1998.5)　痛覚認知に対する注意効果　第13回日本生体磁気学会大会（東京）

34. 柿木隆介 (1998.5) これが分かれば研究が進む？　第13回日本生体磁気学会大会（東京）

35. 金桶吉起，柿木隆介 (1998.5)　視覚運動刺激に対する反応時間と脳磁場反応　第39回日本神経学会（京都）

36. 宝珠山稔 ，柿木隆介，Murray, N.M.F. (1998.5)　正常人，高齢者および末梢神経障害患者におけるSegmental digital nerve SAP　第39回日本神経学会（京都）

37. 前田多章，柿木隆介 (1998.9)　各種刺激に対するシルヴィウス裂周辺の活動：脳磁図を用いた研究　第13回生体・生理工学シンポジウム（金沢）

38. 小山紗智子，関口貴裕，中　大輔，　柿木隆介，渡辺昌子 (1998.9)　単語認知に伴う誘発脳磁場 (MEG)：意味的プライミング効果と反復プライミング効果は脳のどこで生じるのか？第13回生体・生理工学シンポジウム（金沢）

39. 竹内文也，砂盃尚子，栗城真也，柿木隆介 (1998.9)　文字の読みに関連した脳磁界応答の計測と解析，第13回生体・生理工学シンポジウム（金沢）

40. 金桶吉起，文堂昌彦，川上　治，柿木隆介 (1998.11)　仮現運動刺激に誘発される脳波と脳磁場反応，第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

41. 宝珠山稔，柿木隆介 (1998.11) 随伴陰性電位（CNV）課題におけるCortical silent periodの変化，第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

42. 川上　治，金桶吉起，関口知裕，山崎　浩，柿木隆介 (1998.11) 仮現運動刺激による脳磁場反応と知覚程度の関係　第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

43. 文堂昌彦，金桶吉起，柿木隆介，稲尾意秀，吉田　純 (1998.11) 仮現運動刺激による視覚誘発電位 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

44. 大草知裕，金桶吉起，小山紗智子，柿木隆介 (1998.11) 視覚的形態の知覚に関する脳磁場 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

45. 渡辺昌子，小山紗智子，柿木隆介，桐野衛二 (1998.11) ヒトの顔認知に関する脳磁図と脳波を用いた研究, 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

46. 前田多章，柿木隆介，宝珠山稔，小山紗智子，中　大輔，向　　敬　(1998.11) 脳磁図を用いた第2次体性感覚野受容野分布の研究　第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

47. 宝珠山稔，柿木隆介 (1998.11) 随意運動前の体性感覚誘発脳電位（SEP）：Go／No-go反応課題での検討, 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

48. 山崎　浩，柿木隆介，中　大輔 (1998.11) 痛覚認知に対する注意効果　第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

《高次脳機能研究プロジェクト》

1．小林　康，山本　優，伊佐　正，相澤　寛（1998.3）コリン作動性薬物のサル上丘への微量注入がサッカードに及ぼす影響　第75回日本生理学会大会（金沢）

2．伊佐　正，遠藤利朗，斎藤康彦（1998.3）視神経―上丘浅層―中間層信号伝達経路の構成素子について　第75回日本生理学会大会（金沢）

3．遠藤利朗，伊佐　正（1998.3）ラット上丘浅層ニューロンの電気生理学的特性　第75回日本生理学会大会（金沢）

4．伊佐　正，遠藤利朗，斎藤康彦（1998.9）上丘中間層におけるニコチン受容体の活性化が局所神経回路に及ぼす作用　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

5．相澤　寛，小林　康，山本　優，伊佐　正（1998.9）サッカード反応時間遂行課題に対するサル上丘へのニコチン微量注入の影響　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

6．小林　康，山本　優，伊佐　正，相澤　寛（1998.9）視覚誘導性サッカード時のサル脚橋被蓋核ニューロンの活動　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

7．山本　優，伊佐　正（1998.9）脚橋被蓋核から上丘へのコリン作動性投射の空間的特異性の検討　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

8．斎藤康彦，伊佐　正（1998.9）上丘中間層の異なる発火特性を示すニューロン群における一過性外向き電流の解析　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

9．山本憲司，小林　康，竹村　文，河野憲二，川人光男（1998.9）追従眼球運動の獲得のコンピューターシミュレーション　第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会（東京）

10. Aizawa H, Kobayashi Y, Yamamoto M, Isa T (1998.4) Modification of the initiation of saccadic eye movements by micro-injection of acetylcholine-related substances into monkey superior colliculus. Neural Control of Movement Meeting (Key West, USA)

11. Kobayashi Y, Isa T, Yamamoto M, Aizawa H (1998.11) Relationship of pedunculopontine tegmental nucleus neuron activity to saccade initiation in monkeys. 28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Los Angeles, USA)

12. Isa T, Endo T, Saito Y (1998.11) Nicotinic facilitation of signal transmission in the local circuits of the rat superior colliculus. 28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Los Angeles, USA)

13. Saito Y, Isa T (1998.11) Voltage-gated transient outward currents in neurons with different firing properties in the intermediate layer of rat superior colliculus. 28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Los Angeles, USA)

14. Endo T, Isa T (1998.11) Electrophysiological and morphological properties of neurons in the superficial layer of the rat superior colliculus. 28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Los Angeles, USA)

《自律機能研究プロジェクト》

1. Hashimoto I (1998・2) From input to output in the somatosensory system for natural air-puff stimulation of the skin. The Sixth International Evoked Potentials Symposium, (OKAZAKI) (会長講演)

2. Hashimoto I (1998・3) Physiological mechanisms and functional significance of high-frequency oscillations (HFOs) from human somatosensory cortex. The Sixth International Evoked Potentials Symposium (OKAZAKI)

3. Hashimoto I (1998) High-frequency oscillations from the human somatosensory cortex: Neural mechanisms and functional significance. In: O.V. Lounasmaa (Ed), The Proceedings of the Finnish-Japanese Symposium on "Temporal Aspects of Human Cortical Information Processing", pp 7 (Finish Graduate School of Neuroscience Special Lecture) (FINLAND)

4. Hashimoto I, Mashiko T, Kimura T & Imada T (1998・8) Somatic evoked magnetic fields to vibratory stimulation of the index finger: is there frequency organization in human SI? 11th International Conference on Biomagnetism (SENDAI)

5. Hashimoto I, Mashiko T, Kimura T & Imada T (1998・3) Somatic evoked magnetic fields to mechanical stimulation of the index finger and palm: is there discrete distal-proximal representation of the hand in human area 3b? 11th International Conference on Biomagnetism (SENDAI)

6. Fukushima T & Hashimoto I (1998・3) Neuromagnetic study of bimodal somatosensory and auditory interaction. The Sixth International Evoked Potentials Symposium (OKAZAKI)

7. Ozaki I, Suzuki C, Yaegashi Y, Baba M, Matsunaga M & Hashimoto I (1998・3) High frequency oscillations in early cortical somatosensory EPs. The Sixth International Evoked Potentials Symposium (OKAZAKI)

8. Saito Y, Iguchi Y, Nakano S & Hashimoto I (1998・3) Comparison of late event-related potentials (ERPs) to somatosensory, auditory and visual stimulation. The Sixth International Evoked Potentials Symposium (OKAZAKI)

9. Iguchi Y & Hashimoto I (1998・3) Event-related potentials reflecting sequential information processing during a mental arithmetic task. The Sixth International Evoked Potentials Symposium (OKAZAKI)

10. Kimura T, Nishijo K & Hashimoto I (1998・3) Somatosensory evoked potentials elicited by motor point stimulation. The Sixth International Evoked Potentials Symposium (OKAZAKI)

11. Nakano S & Hashimoto I (1998・3) Somatosensory evoked high-frequency oscillations (HFOs) after posterior tibial nerve stimulation. The Sixth International Evoked Potentials Symposium (OKAZAKI)

12. Iwase Y, Kurosawa H, Ochiai N, Mashiko T, Imada T & Hashimoto I (1998・3) Computer simulation of action potentials compared with measured magnetic action fields in peripheral nerve lesions: interpretation of an oscillating phenomenon. The Sixth International Evoked Potentials Symposium (OKAZAKI)

13. Fukushima T & Hashimoto I (1998・8) Somatosensory and auditory interaction under somatosensory threshold condition. 11th International Conference on Biomagnetism (SENDAI)

14. Kimura T, Nishijo K & Hashimoto I (1998・8) Somatosensory evoked magnetic fields following motor point stimulation. 11th International Conference on Biomagnetism (SENDAI)

15. 橋本　勲 (1998・11) MEGによる体性感覚皮膚可塑性の研究（シンポジウム）. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

16. 橋本　勲，益子拓徳，今田俊明，木村友昭 (1998・11) ヒト手指１次体性感覚野の遠位・近位再現はあるか；脳磁図による検討. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

17. 橋本　勲，井口義信，寺崎太洋，佐久間研司，木村友昭，斉藤泰彦，福島達臣 (1998・11) 注意・干渉による体性感覚高周波磁場振動(>300 Hz)の変化. 第28回日本脳波・筋電図学会学術

大会（神戸）

18. 岩瀬嘉志，黒澤　尚，落合尚之，益子拓徳，今田俊明，橋本　勲 (1998・11) 末梢神経障害における活動磁界のコンピュータ・シミュレーション（第２報）:電流四重極子消失現象と磁界滞留現象の発生メカニズム. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

19. 木村友昭，西條一止，橋本　勲 (1998・11) Motor point刺激による脳磁場反応の信号源推定. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

20. 寺崎太洋，井口義信，橋本　勲 (1998・11) 脳磁場計測によるアルファ波回転現象の検証.第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

21. 斉藤泰彦，井口義信，中野修司，橋本　勲 (1998・11) 体性感覚，聴覚，視覚刺激によって誘発された後期陽性成分の比較. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

22. 斉藤泰彦，井口義信，中野修司，橋本　勲 (1998・11) 右手第二指と第四指のair-puff皮膚刺激による事象関連電位(ERPs)成分. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

23. 木村友昭，西條一止，橋本　勲，益子拓徳，今田俊明 (1998・11) 点字使用者の初期体性感覚誘発脳磁界反応(N20m)の検討. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

24. 井口義信，橋本　勲 (1998・11) 電位および磁界計測による計算作業中の脳活動の検討. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

25. 尾崎　勇，田野崎真人，馬場正之，八重樫裕幸，橋本　勲 (1998・11) 体性感覚刺激に伴う皮質高周波振動の選択的注意による変化について. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

26. 佐久間研司，橋本　勲 (1998・11) 後脛骨神経刺激一次応答におけるHigh-frequency magnetic oscillations. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

27. 中野修治，橋本　勲 (1998・11) 後脛骨神経体性感覚誘発電位高周波成分(> 300 Hz)の検討. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

28. 中野修治，橋本　勲 (1998・11) 体性感覚誘発電位高周波成分(> 300 Hz)に加齢が与える影響

の検討. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

29. 福島達臣，橋本　勲 (1998・11) 刺激強度による聴覚と体性感覚のinteraction:脳磁図による検討. 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会（神戸）

30. 岩瀬嘉志，黒沢尚，落合直之，益子拓徳，今田俊明，橋本　勲 (1998・12) 単一神経線維活動磁界のコンピュータ・シミュレーション：正常神経線維と障害神経線維についての検討. 生理学研究所脳磁図研究会「脳磁場計測によるヒト脳機能の解析」（岡崎）

31. 佐久間研司，橋本　勲，関原謙介，井口義信，木村友昭，斉藤泰彦 (1998・12) 後脛骨神経刺激一次応答における高周波応答：time-frequency domain MUSIC algorithmによる解析. 生理学研究所脳磁図研究会「脳磁場計測によるヒト脳機能の解析」（岡崎）

《形態情報解析室》

1．有井達夫（1998.3）超高圧電顕によるイメージングプレートの特性 IV　日本物理学会第53回年会（習志野）

2．有井達夫（1998.5）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 IV　日本電子顕微鏡学会第54回学術講演会（仙台）

3．T. Ohno, M. Sengoku, T. Arii (1998.9) Dependence of electron beam damage in organic crystals on accelerating voltage. 14th Int. Confer. Elect. Microsc. (Cancun)

4．仙石昌也，大野　完，有井達夫 (1998.10) 超高圧電子顕微鏡における有機物結晶の電子照射損傷ーイメージングプレートを用いた定量測定ー　日本物理学会　1998年秋の分科会（沖縄）

5．一海孝光，有井達夫(1998.10) アクチンの構造変化の解析　第36回日本生物物理学会年会（福岡）

6．有井達夫 (1998.12) 電子線二次元検出器としてのイメージングプレートおよびフィルムの感度と分解能　日本電子顕微鏡学会　電子顕微鏡の周辺機器の活用・開発とその応用に関する研究部会（名古屋）

7．古家園子，尾崎　毅，古家喜四夫　(1998. 3 － 4) ETB受容体一部欠損ラットにおける小腸絨毛上皮下線維芽細胞とアストロサイトの形態変化　第103回日本解剖学会全国学術集会（大阪）

8．古家喜四夫，古家園子，尾崎　毅 (1998.3) ETB受容体変異ラットにおける小腸絨毛下線維芽細胞とアストロサイトの形態変化。第75回日本生理学会大会（金沢）

《超高圧電子顕微鏡共同利用実験》

1．K. Matsuno, N. Miyanari, S. Kudo, T. Saki, T. Ezaki (1998.3) Alloantigen presentation by dendritic cells in situ. Keystone symposia on cellular and molecular biology of dendritic cells. (New Mexico)

2．宮地栄一，日高　聡，橋本葉子 (1998.3) 網膜ニューロンにおけるギャップ結合の機能と調節機構　第75回日本生理学会大会（金沢）

3．日高　聡，西川千恵子，宮地栄一 (1998.3) 網膜ニューロン間ギャップ結合の細胞内調節　第75回日本生理学会大会（金沢）

4．追手　巍，森岡哲夫(1998.4) 腎糸球体における内皮細胞とメサンギウム細胞の相互作用　日本腎臓学会　第41回学術総会（東京）

5．T. Ohno, M. Sengoku, T. Arii (1998.9) Dependence of electron beam damage in organic crystals on accelerating voltage. 14th Int. Confer. Elect. Microsc. (Cancun)

6．日高　聡，山内理充，西川千恵子，宮地栄一 (1998.9) 網膜で発現するギャップ結合チャネル蛋白質の探索　第21回日本神経科学第41回日本神経化学合同大会（東京）

7．仙石昌也，大野　完，有井達夫 (1998.10) 超高圧電子顕微鏡における有機物結晶の電子照射損傷ーイメージングプレートを用いた定量測定ー　日本物理学会　1998年秋の分科会（沖縄）

8．一海孝光，有井達夫 (1998.10) アクチンの構造変化の解析　第36回日本生物物理学会年会（福岡）

9．S. Hidaka, C. Nishikawa, E. Miyachi (1998. 11) Cyclic AMP suppresses permeability of homotypic gap junctions between amacrine cells in retina from carp and goldfish. 28th Annual Meeting of Soc. Neuroscience (Los Angeles)

《機能情報解析室》

1．Kamatari YO, Ohji S, Konno T, Kataoka M, Soda K & Akasaka K. (1998.03.25) "The alcohol-induced compact and expanded conformations of proteins". EMBO Workshop "Protein Folding and Misfolding inside and outside the Cell", Oxford

2．Tanaka T, Takemura M, Konno T & Kunugi K. (1998.08.30-0903) "Pressure-effect on the chain-shrinkage of polyvinylpyrrolidone induced by complexation with hydrophobic compound in aqueous solution". International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Heidelberg, Germany.

3．今野　卓，永山國昭（1998.11）「チトクロームｃの円二色性スペクトルの線形成分解析」第36回日本生物物理学会年会（福岡）.

4．Konno T & Nagayama K.（1998.12）"Conformational diversity of acid-denatured cytochrome c studied by matrix analysis of far-UV CD spectra" The 5th Workshop "Principle of Protein Architecture"（東京）

《生体情報処理室》

1．石井宏幸，藤川智博，神山斉已，臼井支朗 (1998.9) 網膜水平細胞のダブルフラッシュ応答解析，第13回生体・生理工学シンポジウム (金沢)

《動物実験施設》

1．石川一志，尾崎　毅（1998.9）モルモット結腸粘膜筋板の収縮に及ぼすNAdrの効果とadrenergic neuronの分布について　第78回北海道医学大会生理系分科会（旭川）

2．山崎由起子，尾崎　毅，井本敬二，八木　健（1998.7）マウス精子形成細胞への遺伝子導入法の検討　第20回日本分子生物学会年会（京都）

3．Yamazaki Y., Noce T., Fujimoto H., Imoto K., Ozaki T. & Yagi T. (1998.10) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells by DNA injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. (New York)

1．Yamazaki Y, Noce T, Fujimoto H, Imoto K, Ozaki T, Yagi T. (1998.7) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells by DNA injection into seminiferous tubules and the following electroporation. JAACT/ESACT Joint Meeting (Kyoto)

2．Yamazaki Y, Noce T, Fujimoto H, Imoto K, Ozaki T, Yagi T. (1998.10) In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells by DNA injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. Gametogenesis in Cold Spring Harbor Laboratory (NewYork)

【一般共同研究報告】

一般共同研究報告

〔目　　次〕

1．極低温電子顕微鏡の基礎的性能研究（藤吉好則 他）…… 163
2．分子分光法による血清アルブミンの高次構造に関する研究
（惠良聖一 他）…… 165
3．唾液腺における水輸送と開口分泌の協調機構（村上政隆 他）…… 167
4．生殖細胞の活性化機構（宮崎俊一 他）…… 168
5．核内Ca^{2+}の調節機構と遺伝子発現（河原克雅 他）…… 168
6．細胞傷害抑制因子としてのPACAPとシグナル伝達（塩田清二 他） 169
7．培養ニューロンネットワークにおける可塑性（中西圭子 他）…… 170
8．外分泌腺細胞におけるカルシウムシグナリングとその機能
（古家喜四夫 他）…… 172
9．神経および乳腺細胞に発現するCl^-チャネルの一次構造とその性質
（榎本浩一 他）…… 173
10．ヒト胎児小腸上皮由来培養細胞（Intestine407）における水チャネル遺伝子発現の検討（上田俊二 他）…… 175
11．アポトーシス細胞における容積調節性収縮能の亢進（石崎泰樹 他）…… 176
12．正常発達及び病態における糖鎖構造の解析（和田洋巳 他）…… 177
13．哺乳類神経発生を制御する遺伝子群の機能解析（岡野栄之 他）…… 178
14．悪性グリオーマ特異的レトロウイルスベクターの開発と臨床治療への基礎的検討（清水惠司 他）…… 179
15．神経細胞膜の脂肪酸組成変動および神経活動による協同的細胞表面糖鎖修飾の機能解析（吉田　敏 他）…… 180
16．NaチャネルおよびCaチャネル制御の分子メカニズム（瀬山一正 他）‥ 182
17．サルのセントラルパターンジェネレータの作動様式（山口峻司 他）‥ 182
18．脳高次機能と運動制御（南部　篤 他）…… 184
19．サルの味覚弁別行動に関与する大脳皮質諸領野間の結合（小川　尚 他）185
20．アデノウィルスベクターによる神経伝達物質受容体分子の強制発現を用いた中枢神経局所回路の機能解析（伊佐　正 他）…… 185
21．視覚－運動変換過程の高次神経機構（蔵田　潔 他）…… 186

22. 霊長類皮質脊髄路から上肢筋運動神経細胞への興奮伝達経路について（大木　紫 他） …… 187
23. ラット上丘におけるニコチン受容体の機能解析（岡部繁男 他） …… 187
24. 新規カドヘリン型受容体CNRの機能解析およびヒト相同遺伝子の単離（濱田　俊 他） …… 188

1．極低温電子顕微鏡の基礎的性能研究

藤吉好則（京都大・理学研究科）
永山國昭（生理研）

生物電顕において電子顕微鏡本来の性能を達成できない最大の理由は電子線によるダメージである。金属試料に比べ，有機分子でできた生物試料はその構造が電子線により簡単に破壊する。顕微鏡で分解能およびコントラストを向上させる最良の方法は，強い照射を行うことだが，生物の場合ダメージのためこの方策がとれない。一般に重金属による染色を生物試料に対し行うと，ダメージに対する抵抗とコントラスト向上が同時に図れる。しかし染色は生物の構造そのものを反映せず，ある種の作為構造を作り出す。従って染色なしに高コントラスト像を得るには試料を極低温に保ち，電子線ダメージを極小化する方法が残された唯一の選択である。

現在こうした方向で開発された極低温電子顕微鏡が世界で数台稼働しているが，全て藤吉が10年前に日本電子と共同で開発したヘリウムステージを用いている。生理研の装置も藤吉タイプのヘリウムステージを用いている。本研究では藤吉の過去10年の経験を総括し，電子顕微鏡による1分子構造解析への道を探った。

1）顕微鏡の場合分解能とコントラストは相関し，一般にその性能は両者の積で評価される。

$$\delta C = K \qquad \text{（装置および電子線照射量に依存）}$$

ここでは分解能（Å），Cはコントラスト（C＜1）であり対象の物質で定まる。一般にコントラストの大きい金属ではKが一定ならが小さくなり，分解能が上がる。

2）上記Kと照射量（D）との間にはほぼ以下の関係がある。

$$K = \frac{5}{\sqrt{D}} \qquad (D：\text{electron}／\text{Å}^2)$$

すなわち照射量を大きくとれれば（すなわち壊れなければ）Kは小さくなり，したがって同じコントラストの物質ならが小さくなり，分解能が上がる。

3）ここで生物試料につきCとDを見積もって見る。コントラスト（C）は生物試料のような軽元素ではまず0.1を越えない。またDは常温の場合，以下が知られている。

	蛋白質	tRNA	DNA	低分子環式化合物	
D＝	0.5	3	10	10^2	$(e／\text{Å}^2)$

	蛋白質	tRNA	DNA	低分子環式化合物	
δ_{max} (300K) =	75	30	15	5	(Å)

4）以上より常温では最高分解能は以下となる。
1分子構造解析には～2Åの分解能がいるのでどの分子に対しても常温では1分子構造解析は望めない。

5）試料ダメージが低温でどの程度減少するかを次に検討する。藤吉の実験から低温によるダメージ保護率（P）は次が得られている。

	300K	100K	10K	4K	
P =	1	4	10	20	(Å)

この結果を用いれば以下の表が得られる。

到達分解能（Å）

	蛋白質	tRNA	DNA	低分子環式化合物
300K	75	30	15	5
100K	38	15	7.5	2.5
10K	24	9.5	4.7	1.6
4K	17	6.7	3.3	1.1

6）これらを総合すると低分子環式化合物では窒素温度で1分子構造解析が可能。
DNAはヘリウム温度4Kで1分子構造解析が可能。
蛋白質はヘリウム温度4Kでも1分子構造解析は困難という結果になった。

7）蛋白質の場合は結晶を用いたり，同一分子を数多く撮影し平均化を行い，分解能向上が可能である。たとえば100個の分子を平均化しればダメージは等価的に1/10に減るので窒素温度で1分子構造解析が可能となる。

2．分子分光法による血清アルブミンの高次構造に関する研究

惠良聖一，中村浩二，桑田一夫，林　知也（岐阜大・医・第２生理）
永山國昭，村上政隆（生理研）

血清アルブミンは，生体流血中において約50%を占める血清タンパク質であり，様々な重要な機能を営んでいる特徴的なタンパク質である。このような生理機能の発現は，血清アルブミンの高次構造が示す「構造の柔軟性」に由来しているが，その詳細については不明である。従って，我々は血清アルブミンの立体構造について，レーザー・ラマン分光光度計を用いて研究した。

ヒト血清アルブミン（HSA）のタンパク濃度を2.80%とし，0.10 M NaCl中でN，F，E型になるように調整した。レーザー・ラマン分光光度計は，日本分光社製R-800を用い，Ar^+レーザーによって，514.5 nmで励起した。

タンパク質の二次構造に関しては，そのマーカー・バンドとして，ヘリックス含量に対しては$R_\alpha = I_{940}/I_{1003}$を，不規則構造に対しては$R_R = I_{1246}/I_{1340}$を指標としてそれぞれ見積もることができる。図１より，HSAの二次構造はN→F→E型へと構造転移するに伴って，ヘリックス含量は明らかに減少し，不規則構造は増加した。しかしこのpHプロフィールをBSAの結果と比較すると，BSAは明らかな２段階の変化を示した[1]が，HSAはそのような２段階の構造転移を示さなかった。これらの結果は，CDで求めた二次構造含量の変化[2) 3)]によく対応していた。

チロシン残基の側鎖の微環境は，I_{850}/I_{826}がマーカー・バンド（チロシンダブレット）として，その挙動が観測される。図２より，HSAではN→F→E型への二次構造変化にほぼ一致して，その変化が観測された。しかしこのpHプロフィールをBSAの結果と比較すると，BSAは明らかな２段階の変化を示した[1]が，HSAの場合は，はっきりとした２段階の変化を示さなかった。

アルブミンのこのような変化は，通常の（球状）タンパク質で観測される変化とは大きく異なっており，血清アルブミンにおけるチロシン残基の存在状態は，通常のタンパク質とはかなり異なった環境にあるものと考えられた。またBSAとHSAにおいて，二次構造変化や側鎖の微環境にこのような相違が認められたのは，両者におけるミクロな不均一性の相違によるものと考えられた。

文献

１）惠良聖一，中村浩二，林　知也　他．生理研年報. (1997) 18, 190.
２）S. Era, H. Ashida, S. Nagaoka et al. Int. J. Peptide Protein Res. (1983) 22, 333.
３）S. Era, M. Sogami J. Peptide Res. (1998) 50, 465.

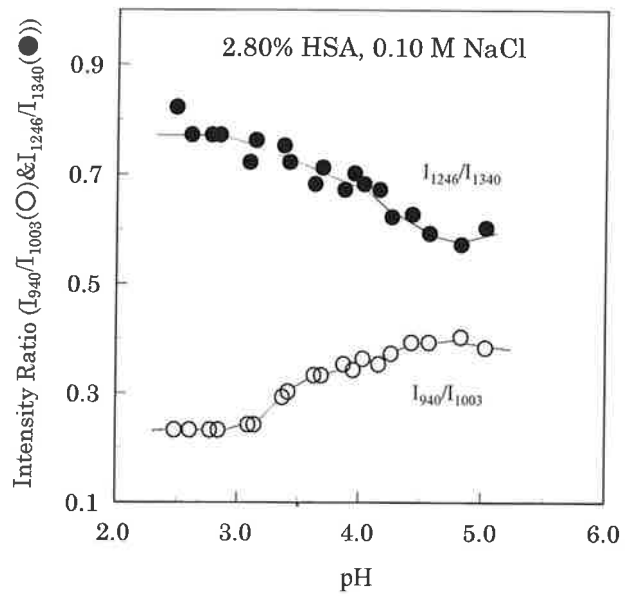


図1　I_{940}/I_{1003}（○）とI_{1246}/I_{1340}（●）のpHプロフィール

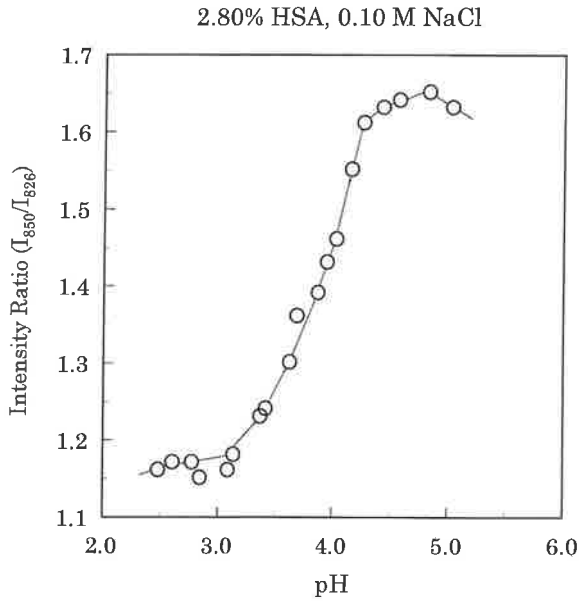


図2　チロシンダブレットの強度比（I_{850}/I_{826}）のpHプロフィール

3．唾液腺における水輸送と開口分泌の協調機構

村上政隆（生理研）吉村啓一（北大・歯）
杉谷博士，横山三紀，吉垣純子，三井由香，小方頼昌，古山俊介（日大松戸・歯）
瀬川彰久（北里大・医）瀬尾芳輝（京都府立医大）
赤川公朗（杏林大・医）MC Steward （Manchester大）

本共同研究では，水分泌測定の可能な唾液腺を材料に分泌経過に沿って水輸送と開口分泌を計測し両システム間の協調機構を検討した。

1）血管潅流耳下腺標本を分泌刺激し，腺房細胞の形態変化を光顕・電顕観察した。イソプロテレノール (Isop) 単独刺激では開口分泌像があらわれ，これにカルバコール (CCh) 刺激をくわえると開口分泌像が巨大になった。CCh単独刺激では著明な形態変化は認められなかったが，これにIsop刺激をくわえると多数の巨大な開口分泌像があらわれた。いずれの場合も，分泌刺激を除去して１０分後には開口分泌像は縮小し，腺房細胞内には多数の二次ライソソームが出現した。以上の変化と水分泌量との相関から，Isopによって誘導される開口分泌は，CChによる最大量の水分泌を増大させることはないものと推定された。CChによる開口分泌については，遊離細胞を用い検討した。

2）耳下腺遊離細胞環流系を用い，Isop刺激中　CCh短時間刺激あるいはCa^{2+}freeでCCh刺激を行うと，Isopでの分泌レベル以上にアミラーゼを分泌させた後，転じて分泌を一時的に減少させた。この結果から，アミラーゼ開口分泌における細胞内Ca^{2+}信号系と cAMP信号系の相違を以下のように考察した。IsopはcAMPを介してprimingを増加，それにより顆粒のfusionのprobabilityを高めexocytosisを促進する。一方，CChは急激に細胞内Ca^{2+}の増加を起こし，そのときprimeされた顆粒はもちろんまだ十分にprimeされていない顆粒までもfusionさせることができる。このように考えるとCch刺激後の一時的な分泌の谷間はfusion可能な顆粒プールの減少として説明できる。またCchの刺激後Isopを加えたときは，大きなCaの増加が起こらないためIsopによりprimingが促進されCa^{2+}と協調してexocytosisの高いレベルが保たれる。

3）ムスカリン性受容体の活性化による細胞内[Ca^{2+}]の上昇と共役した細胞内反応をウサギ耳下腺腺房細胞を用いて検討した。その結果，ムスカリン性受容体刺激は細胞内 [Ca^{2+}]上昇に引き続きサイクリックGMP(cGMP)産生をひきおこした。cGMP産生はカルシウム／カルモジュリン依存性ＮＯ合成酵素の活性化を介しており，ムスカリン性受容体活性化に共役したCa^{2+}/NO/cGMPシグナルが明らかとなった。

4）ラット耳下腺腺房細胞における低分子量GTP結合タンパク質の役割を明らかにする目的で研究を行ったところ，可溶性画分にArf1タンパク質の存在を見いだした。さらに，GTP依存性にArf１は分泌顆粒膜に移行することが明らかとなった。この生理的意義については，現在検討中である。

4．生殖細胞の活性化機構

経塚啓一郎（東北大浅虫臨実）池上晋（広島大生物生産）
宮崎俊一，尾田正二，白川英樹，淡路健雄（東京女子医大第二生理）
黒田英世，黒田律，嶽本和久（富山大生物）森沢正昭（東京大三崎臨実）
桑原慶紀，桜井明弘（順天堂大産婦人科）
出口竜作（宮城教育大），高田達之（国立小児医療センター）
毛利達磨，佐藤真則（生理研）

精子ー卵相互活性化機構について，種々の実験系の利点を生かして実験を行った。1）原索動物ホヤの精子抽出物の卵内注入により，受精時と極めて類似したCa^{2+}オシレーションが誘発され，さらにCa^{2+}オシレーションは細胞周期依存性であることを明らかにし，Developmentに発表した。2）ウニ卵受精時の精子による局所的Ca^{2+}増加の分離・記録に成功し，Developmentに発表した。3）ウニ卵内に注入したcaged IP_3, caged cADP ribose を紫外線照射により瞬時に活性型に変換して卵を刺激した場合，Ca^{2+}波が発生するか否かを観察した。4）ウニ卵受精時の膜電位変化を細胞内電極で記録し，精子に付加した膜電位感受性蛍光色素の蛍光変化で，精子ー卵融合時点を同定することに成功した。5）マウス卵に未熟な円形精子細胞を（成熟）精子抽出物とともに注入することによって受精させ，胚移植後産仔を得ることに成功し，Mol. Human Reprod. に発表した。6）ハムスター精子抽出物をマウス卵内に局所注入した際の卵細胞内Ca^{2+}上昇を時・空間的解析し，卵皮質は中心部に比べてIP_3レセプターに対する感受性が高いことを明らかにし，Dev. Biol. に発表した。7）マウス卵受精時の細胞内Ca^{2+}増加を高速Ca^{2+}画像解析装置（ARGUS/HiSCA, 浜松ホトニクス）を用いて詳細に解析し，最初のCa^{2+}増加は精子結合部位から発するCa^{2+}波を形成し二段式に増加すること，2回目以降のCa^{2+}増加反応もいずれもCa^{2+}波を形成するが，精子結合部ではない卵表層部から発生し時間とともに植物半球から発生すること，Ca^{2+}オシレーションは前核形成時期に消失することを明らかにした。

5．核内Ca^{2+}の調節機構と遺伝子発現

河原克雅（北里大），白川英樹（東京女子医大第二生理）
毛利達磨，宮崎俊一（生理研）

脱水時に分泌される脳下垂体-抗利尿ホルモン（ADH: antidiuretic hormone）により腎臓は高張尿を生成し体液浸透圧の恒常性を維持する。この時腎髄質部先端の浸透圧は1200-1400 mOsm/kgH_2O（ヒト），2500 mOsm/kgH_2O（ラット）の高値になる。腎髄質内層集合管

(IMCD) 細胞は，細胞外液の高浸透圧による物理的変形（細胞容積縮小）や高イオン強度に対抗するために細胞膜にさまざまな輸送体を発現させている。$Na^+/K^+/2Cl^-$輸送体（rNKCC1）とNa^+/H^+輸送体（NHE1, NHE4）は一過性（数時間～1日）の高浸透圧に対する細胞内へのNa^+流入路として機能し，ADH調節性尿素輸送体（rUT1）は細胞膜の尿素透過性を増加させ細胞内外の有効浸透圧差を軽減している。IMCD細胞のrNKCC1蛋白発現は，高浸透圧とADHの二元的支配によることが推定されるので，rNKCC1遺伝子，蛋白レベルの発現量の変化を経時的に調べた。ラットIMCD細胞（初代培養）にADH（10^{-8} M）を投与すると，rNKCC1 mRNA発現量は30分後に小さなピーク（x1.7）を迎え，6時間後に初期値に復し，24時間まで増加しなかった（10^{-11} M ADHは，rNKCC1 mRNA発現量を全く増加させなかった）（ノーザンブロット解析）。これに対し高浸透圧（500 mOsm/kgH_2O）の誘導効果は遅く，6-12時間後に大きなピーク（x 5-7）を実現し，24時間後に初期値に近づいた。高浸透圧とADH刺激には相乗性はなかった。dBcAMP（1 mM）はrNKCC1 mRNA発現量増加の有効な刺激にならなかった（rUT1 mRNAの発現誘導には有効）。rNKCC1蛋白の発現量は浸透圧刺激18時間後に大きな増加を示したが，ADH投与は無効であった（ウエスタンブロット解析）。以上の結果から，$Na^+/K^+/2Cl^-$輸送体の蛋白発現にはADH (10^{-8} M)による早期の rNKCC1 mRNA発現量の増加は無効で，対向流増幅系（ヘンレループ）により形成される髄質部高浸透圧による遅い誘導効果が必要であることが証明された。ADH（$>10^{-6}$ M）により誘発される核内のCa^{2+}増加がどのようにrNKCC1 mRNA発現量に影響するかについては引き続き検討する。

6．細胞障害抑制因子としてのPACAPとシグナル伝達

塩田清二，舟橋久幸（昭和大・医・第一解剖）
中条茂男（昭和大・薬・生物化学）
平林敬浩（昭和大学・DNA組換え実験）
室屋真二（鹿児島大・医・第一生理）
加計正文（鹿児島大・医・第一内科）
稲垣暢也（秋田大・医・第一生理）
矢田俊彦，小幡邦彦，八木　健（生理研）

心停止モデルラットを用いて，PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) による海馬CA1の虚血性神経細胞死とその分子機構を機能形態学的にしらべた。正常動物では，脳虚血2－3日後に海馬ＣＡ1領域の神経細胞は細胞変性をおこしはじめ，虚血7日もするとほとんどの神経細胞は遅発性細胞死をおこす。PACAPを虚血直後から脳室内に7日間ミニオスモルポンプを用いて持続注入すると，虚血による神経細胞死は有意に抑制された。1時間あたり 1pmol/hr

のPACAPを7日間持続的に脳室内に注入すると，神経細胞死抑制が最も顕著にみられた。また，樹状突起の標識タンパクであるMAP2抗体を用いて神経細胞の損傷を免疫組織化学的に観察すると，PACAP投与により神経細胞の樹状突起の消失が有意に抑制された。さらに，PACAPの細胞死抑制効果は脳室内投与のみならず静注でも有効であり，虚血24時間後から少量(160 pmol/hr)のPACAPを持続注入しても神経細胞死が有意に抑制された。静注したPACAPは脳血液関門を通過し（およそ0.1-0.2%）脳実質内に速やかに移行する。虚血後の海馬を経時的に観察すると，神経細胞死と並行して反応性のアストロサイトの増殖がCA1領域に顕著にみられ，このアストロサイトにはPACAPレセプターの遺伝子発現とそのレセプタータンパクの出現が顕著に認められた。神経細胞死によって活性化あるいは産生される未知の因子によってアストロサイトのPACAPレセプターの発現が起きたものと推定される。海馬におけるPACAPの含量は少なく，またPACAPを含量する神経細胞体および線維もきわめて少ないことから，外から投与されたPACAPがアストロサイトのレセプターのリガンドとして作用し，その結果アストロサイトからの神経細胞生存因子の放出が刺激された可能性が考えられる。海馬CA1の虚血性神経細胞死の過程のシグナル伝達系を生化学的に調べたところ，細胞死の起きるのに先立ちMAPキナーゼカスケードのうちとくにJNK/SAPK活性およびp38活性の上昇が認められた。PACAP投与により，海馬領域のJNK/SAPK活性およびp38活性の上昇は顕著に抑制された。PACAPレセプターは虚血早期から星状膠細胞に強く発現することから，PACAPはこの細胞を刺激して種々のサイトカインを誘導し，これらサイトカインと共同して神経細胞死を抑制するのではないかと示唆される。

7．培養ニューロンネットワークにおける可塑性

中西圭子（愛知県コロニー研究所），久木田文夫（生理研），山岸俊一（生理研）

培養した大脳皮質ニューロンの電気的活動をパッチ電極を用いて測定したところ，高[Cl^-]電極内液を用いて観察された同調した頻回放電（burst）は，低[Cl^-]電極内液を用いて測定すると，閾値下の脱分極あるいは過分極の集合として観察された（図1A）。これらのニューロンに電位固定法を行いニューロンのシナプス性自発電流を測定したところ，1）興奮性ニューロンのみならず抑制性ニューロンも同調して発火しており，2）5種類の[Cl^-]電極内液を用いてWhole-cell法で測定したニューロンの自発電流の逆転電位は[Cl^-]o/[Cl^-]iの対数に比例し，その傾きは-53.5であった（図1B）。また電流固定法にて，3）GABA-A受容体の拮抗剤であるbicuculline により，脱分極の振幅は増大し周期は減少すること，4）細胞内外のCl^-濃度を変化させることによって，自発活動のパターンが変化すること，がわかった。実際に抗GABA抗体で免疫染色を行ったところ，約10%のニューロンで陽性であった（図2）。中枢神経系において主な抑制性伝達物質であるGABAの受容体はCl-透過性をもち，幼若ニューロンでは細胞内Cl^-濃度が高いためGABAは脱分極に作

用することが最近報告されている。以上の実験結果から，ニューロンへの入力のほとんどがGABAによるものであること，また細胞内外のCl^-濃度変化により，ニューロンの自発活動が強く制御されていることが推察された。さらに，自発電流がCl^-濃度依存性であることを応用して，細胞内Cl^-濃度を変えずに電流測定できるGramicidin perforated-patch法で測定した自発電流の逆転電位とWhole-cell法で求めた標準曲線（図１B）と比較することにより，ニューロンの細胞内Cl^-濃度を推定した。14個のニューロンでGramicidin perforated patch法を行い，その逆転電位は-73.9mVから-44.5mV（平均-60.4mV）であり，細胞内Cl^-濃度は6.8mMから24.0mM（平均12.2 mM）と推定された。各々のニューロンについて逆転電位と静止電位を比較したところ，GABAは脱分極にも過分極にも作用していることがわかった（図１C)。GABAが両極性に作用していることが，ニューロンの同調活動に大きく影響を与えていることが示唆された。

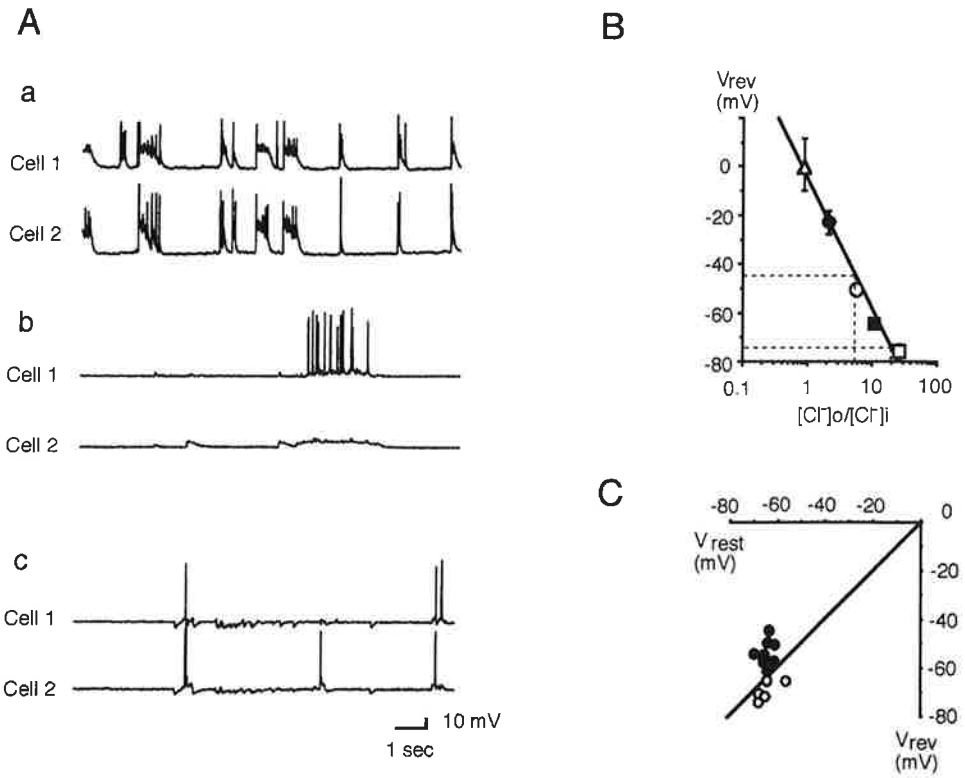


図1，A; 高[Cl^-]電極内液（Aa; 147mM）で観察された同調した頻回放電（burst）は，低[Cl^-]電極内液（Ab;12 mM，Ac; 5 mM）を用いて測定すると，閾値下の脱分極あるいは過分極の集合として観察された。B; 電圧固定法で調べた自発電流の逆転電位は[Cl^-]o/[Cl^-]iの対数に比例していた。点線は，Gramicidin Perforated-patch法にて調べた逆転電位。C; 逆転電位と静止電位の比較から，GABAにより脱分極するニューロン（黒丸）と過分極するニューロン（白丸）が混在していることがわかった。

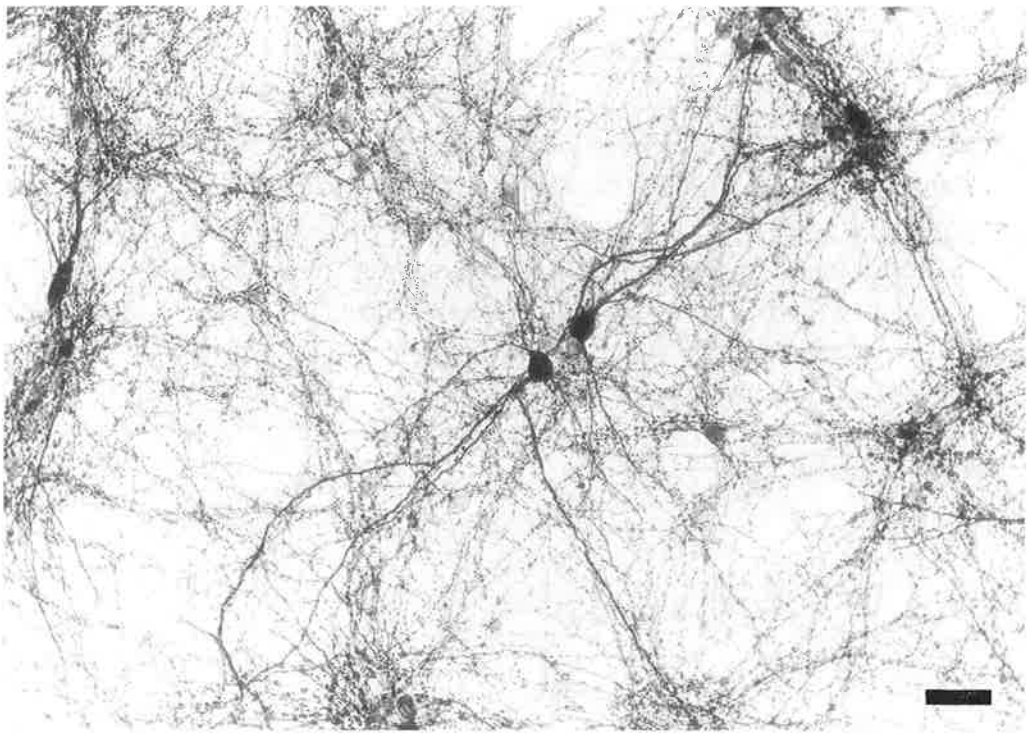


図2，抗GABA抗体による免疫染色。

8．外分泌腺細胞におけるカルシウムシグナリングとその機能

古家喜四夫，奥田晃子（京都工繊大・繊維・応用生物）
柴　芳樹，広野　力（広島大・歯）山岸俊一（生理研）

マウス授乳期乳腺の培養細胞を用いた実験から，分泌上皮細胞は$P2Y_2$型ATP受容体を，また筋上皮細胞は別のタイプである$P2Y_1$型のATP受容体を持ち，分泌上皮細胞の機械的刺激（筋収縮による）によって放出されたATPがカルシウム波を起こすとともに筋上皮細胞の収縮を誘発することをすでに明らかにしている。しかし今まで組織標本を用いた実験ではATPによる腺胞の収縮がほとんどみられずATPが腺胞組織で本当に働くかどうか疑問があった。

本研究ではマウスの妊娠期あるいは授乳期の乳腺組織を切り出し，リン酸緩衝液中で酸素のバブリングを行いながら１時間インキュベートすることにより組織のダメージの回復と洗浄を行った。その組織をカミソリでスライスし水浸レンズx60倍付きの正立ノマルスキー顕微鏡でＴＶカ

メラ，画像処理装置を介して観察及びビデオ記録した。この条件で視野中には数個の腺胞がみられる。そこに各種薬剤を灌流することによりその腺胞収縮に対する効果を観察した。

Oxytocin(0.01nM～10nM)投与により腺胞の収縮と収縮が繰り返し起こる振動がみられ，中身のミルクが出ていくのが観察されることもあった。実際授乳時に血中で測定されるOxytocin濃度は約0.1nMであることから，このサンプルがかなり良く生体内の状態を保持していることを示唆している。これにATP(10-100microM)を投与したところOxytocin同様収縮と時として振動がみられた。これからATPは確かに腺胞の組織レベルでも作用することが明らかとなった。

この測定系で一波長励起一波長蛍光の色素であるカルシウムグリーンを用いて細胞内カルシウム変化の測定を試みたが，腺胞収縮時の動きのため差分が取れず同時測定はうまくいかなかった。同時カルシウム測定には別の蛍光色素の強度との比を取るなどの工夫が必要であるが，この測定系が乳腺などの組織レベルの観察に用いうることが確かめられた。

今後この系を用い妊娠時期を追った各種受容体の発達の様子や腺胞収縮に対するATPやOxytocinの相互作用などを明らかにする予定である。

9．神経および乳腺細胞に発現するCl^-チャネルの一次構造とその性質

榎本浩一（島根医大・生理）古家喜四夫（京都工芸繊維大・応用生物）
神谷絵美，山岸俊一（生理研）

多くの細胞系において多様なCl^-チャネルの存在が報告され，またその役割についても容積調節等の重要な働きをしていることが知られつつある。たとえば乳腺上皮細胞には機械的刺激によって開くCl^-チャネルがあり，ATPの細胞外への放出に関係するらしい。また，神経細胞の細胞膜で静止電位を形成する原因は細胞内外のK^+イオン濃度差と細胞膜のK^+イオン透過性であり，細胞外液のアニオンを変化させても，静止電位，活動電位にほとんど影響しないと考えられてきたけれども，ヤリイカ神経細胞には細胞内Ca^{2+}により賦活されるCl^-チャネルがあり，静止電位形成に関与していることが判明した。　本研究は乳腺上皮細胞とイカ神経細胞のCl^-チャネルのcDNAをクローニングし，その性質を明らかにすることを目的とした。

われわれは神経細胞に発現し，細胞容量調節に関係するといわれるClC-3チャネルに注目した。ClC-3チャネルのアミノ酸配列はラット（Kawasaki et al, 1994），マウス(Borsani et al, 1994)，モルモット(Duan et al, 1997)，ヒト(Hillier et al,1997)が知られており，それらには高い相同性がある。マウス乳癌のClC-3チャネルの構造遺伝子cDNA全長をクローニングし，真核細胞蛋白合成プロモーターをもつベクターと連結し，プラスミドを作成した。これを神経グリア腫瘍雑種細胞（NG108-15）に導入した後，ホールセルクランプでCl^-電流を計測した。細胞内外液はCl^-電流のみ流れるように調整した。脱分極により活性化する時定数約0.5msecの外向き電流と減衰のない外

向き電流が観察できたけれども，現在のところ細胞内Ca^{2+}やClC-3チャネル発現による変化を認めていない。NG108-15は未分化，分化にかかわらずCIC-3チャネルを発現しているので，強制発現による解析は困難かもしれない。

```
RATCLC3 MTNGGSINSSTHLLDLLDEPIPGVGTYDDFHTIDWVREKCKDRERHRRINSKKKESAWEMTKSLYDAWSG  70
SQUCLC3 MTNGGSIYSSTHLLDLLDEPIPGVGTYDDFHTIDWLREKCKDRERHRRINSKKKESAWEMTKSLYDAWSG  70

RATCLC3 WLVVTLTGLASGALAGLIDIAADWMTDLKEGICLSALWYNHEQCCWGSNETTFEERDKCPQWKTWAELII 140
SQUCLC3 WLVVTLTGLASGALAGLIDIAADWMPDLMEGICLSALWYNHEQCCWGSNETTFEERDKCSQWKIWAELII 140

RATCLC3 GQAEGPGSYIMNYIMYIFWALSFAFLAVSLVKVFAPYACGSGIPEIKTILSGFIIRGYLGKWTLMIKTIT 210
SQUCLC3 GQAEGPGSYIMNYILYIFWALSFGFLGVSLVKVFAPYACGSGIPEIKTILSGFIIRGYLGKWTLMIKTIT 210

RATCLC3 LVLAVASGLSLGKEGPLVHVACCCGNIFSYLFPKYSTNEAKKREVLSAASAAGVSVAFGAPIGGVLFSLE 280
SQUCLC3 LVLAVASGLSLGKEGPLVHVACCCGNIFSYLFPKYSTNEAKKREVLSAGSAA?????????????????? 263

RATCLC3 EVSYYFPLKTLWRSFFAALVAAFVLRSINPFGNSRLVLFYVEYHTPWYLFELFPFILLGVFGGLWGAFFI 350
SQUCLC3 ???????LKTLWISFFAALVAAFVLRSINPFGNSRLVLFYVEYHTPWYLFELFPFILLGVFGGLWGAFFI 326

RATCLC3 RANIAWCRRRKSTKFGKYPVLEVIIVAAITAVIAFPNPYTRLNTSELIKELFTDCGPLESSSLCDYRNDM 420
SQUCLC3 IAWCRRRKSTKFGKYPVLEVMIVAAITAVIAFPNPYTRLNTSELIKELFTDCGPLESSSLCD?RNDM    396

RATCLC3 NASKIVDDIPDRPAGVGVYSAIWQLCLALIFKIIMTVFTFGIKVPSGLFIPSMAIGAIAGRIVGIAVEQL 490
SQUCLC3 NASKIVDDIPVRPAGVGV?SAIWQLCLA?IFKIIMTVFT??IKV?SGLFIPSMAI??IAGRIVGIGVEQ? 466

RATCLC3 AYYHHDWFIFKEWCEVGADCITPGLYAMVGAAACLGGVTRMTVSLVVIVFELTGGLEYIVPLMAAVMTSK 560
SQUCLC3 AYYHHERF?FKEP??MGLDCITPGLYAMVGAAACLGGVTRMTVSLVVIVFELTGGLEYIVP?MAAVMTSK 530

RATCLC3 WVGDAFGREGIYEAHIRLNGYPFLDAKEEFTHTTLAADVMRPRRSDPPLAVLTQDNMTVDDIENMINETS 630
SQUCLC3 WVGDAFGREGIYEAHIRLNGYPFLDAKEEFTHTTLAADVMRPRRSDPPLAVLTQDNMTVDDIENMINETS 606

RATCLC3 YNGFPVIMSKESQRLVGFALRRDLTIAIESARKKQEGVVGSSRVCFAQHTPSLPAESPRPLKLRSILDMS 700
SQUCLC3 YNGFPVIMSKESQRLVGFALRRNLTIAIESARKKQEGIVGSSRVCFAQHTPSLPAESPRPLKLRSILDMS 676

RATCLC3 PFTVTDHTPMEIVVDVFRKLGLRQCLVTHNGRLLGIITKKDILRHMAQTANQDPASIMFN          760
SQUCLC3 PFTVTDHTPMEIVVDIFRKLGLRQCLVTHNGRLLGIITKKDILRHMAQTANQDPASIMFD          736
```

図1　ラット（RAT）とヤリイカ（SQU）のCIC－3チャネルのアミノ酸配列の比較。アミノ酸736残基のうち699が一致した。263－287と439等未決定の残基がある。

イカのClC-3チャネルの塩基配列は未知なので，哺乳類ClC-3チャネルの構造遺伝子の塩基配列をもとに複数の領域のプライマを作成し，イカ視葉神経節，視索，脳から抽出したmRNAを鋳型にしてRT-PCRを行っている。現在，推定塩基数約2400のうち2200の塩基配列を解読したところである。アミノ酸配列はラットのClC-3チャネルと95%が一致した（図1)。脊椎動物のClC－3チャネルに対しきわめて保存的な蛋白がヤリイカの神経系にも存在することになる。このことは，ClC-3チャネルが細胞生存に必須の蛋白であることを示唆する。

10. ヒト胎児小腸上皮由来培養細胞(Intestine407)における水チャネル遺伝子発現の検討

上田俊二，木田　肇，津村剛彦（京都大・医）
中川　清（京都大・人間環境学）
岡田泰伸，挾間章博，森島　繁（生理研）

ほとんどの細胞は細胞内外の浸透圧性変化に対し，一時的にその細胞容積が変化するが，間もなく元の容積に復帰しようとする。これまでこの機構に関するイオンチャネルやトランスポータの性質が広く調べられてきたが，水の移動に関しては系統的に調べられた研究はほとんどなかった。我々は昨年度，ヒト胎児小腸上皮由来培養細胞(I407)において低浸透圧刺激下での（1）浸透圧性膨張時および（2）調節性収縮(regulatory volume decrease; RVD)過程におけるそれぞれの水のpathwayに水チャネルが重要な役割を果たしていることを生理学的，薬理学的に証明した。最近，アクアポリン(aquaporin; AQP)と呼ばれる水チャネルのファミリーが発見され，哺乳類において１０種類のアクアポリン (AQP0-9)がクローニングされている。

今回の本研究での目的は，I407細胞においていかなる水チャネル遺伝子が発現しているかを明らかにすることである。そのために，まず，既知のヒトアクアポリン(hAQP1-9)，それぞれ２種類のプライマーを用いRT-PCR法によって検討した。その結果，hAQP3に対する特異的なバンドを認め，sequenceの結果，AQP3と一致することを確認した。よって，I407細胞において，AQP3が細胞容積調節過程の水のpathwayに深く関与している可能性が考えられた。

今後，同定された遺伝子のアンチセンス遺伝子をI407細胞に導入しその発現を抑制し，この水チャネルの発現が細胞容積調節過程にとって必須のものであることを証明したいと考えている。

11. アポトーシス細胞における容積調節性収縮能の亢進

石崎泰樹（神戸大・医）
金関悳（科技団・CREST）
前野恵美，挾間章博，岡田泰伸（生理研）

多くの細胞は異常浸透圧環境下に置かれ続けても，一時的に浸透圧膨張や収縮を強いられはするが，もとの正常容積へと復帰する能力をもっている。しかし，アポトーシスは持続性の細胞収縮を伴うので，細胞容積調節機能の破綻がその進行に大きく関与する可能性がある。そこで本研究では，アポトーシス細胞における細胞容積調節能を検討した。

様々な細胞（U937，PC12，NG108-15，HeLa細胞）にプロテインキナーゼ阻害剤であるスタウロスポリンで処理してアポトーシスを誘導し，RVD（浸透圧性膨張後調節性容積減少；Regulatory Volume Decrease) 能，caspase-3 activity，cell viability，DNA degenerationそして電子顕微鏡的形態変化を調べた。その結果，アポトーシス誘導細胞においては低浸透圧（200 mosM）処理後のRVD能が正常細胞より著しく亢進していることが分かった（図１）。また，RVDメカニズムに関与する Kチャネルまたは Clチャネルをチャネルブロッカーで阻害したり，細胞外高KCl条件によって KCl流出を阻止すると，アポトーシスは抑制された（図２）。すなわち，スタウロスポリンのみで処理した細胞はcell viabilityが減少し，caspase-3 activityが上昇して，DNA degradationを始めとする大きな核変化が見られたのに対して，KCl流出阻止処理をした細胞はスタウロスポリン処理を施してもコントロール細胞と差異はなかった。これらの事実からアポトーシスのプロセスにはRVD亢進がカップルしていることが結論された。

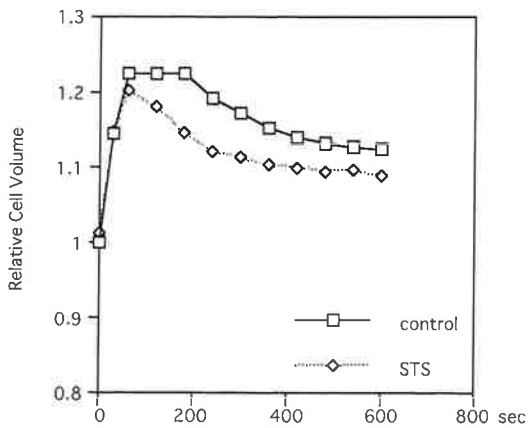


図１：U937細胞のRVD変化。スタウロスポリン（STS）処理（4時間）でアポトーシスが誘導された細胞はRVDの亢進がみられる。しかし、スタウロスポリン処理中にチャネルブロッカーを投与しておくとRVD亢進はみられなくなる。

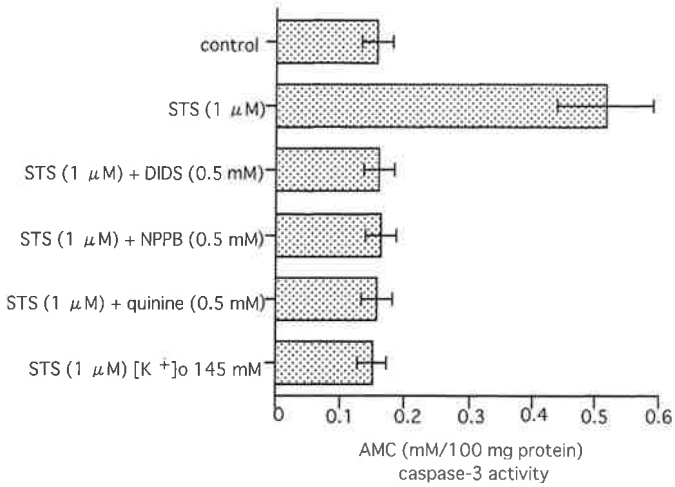


図２： U937細胞のcaspase-3活性測定によるアポトーシス検出。スタウロスポリン（STS）処理（8時間）した細胞は、caspase-3活性の上昇がみられるが、チャネルブロッカー、高KCl条件によりその上昇はみられなくなる。

12. 正常発達及び病態における糖鎖構造の解析

田中文啓，和田洋巳（京都大・胸部疾患研・胸部外科）
池中一裕（生理研）

平成８年度より，多検体の糖蛋白糖鎖の糖鎖構造の迅速かつ簡便なスクリーニング方法として糖鎖自動解析システムの構築を目指し，これを確立してきた。本自動解析システムを用いて，正常発達モデルとして脳を，病態モデルとして肺癌を取り上げ，これらを例として解析を行ってきた。

その結果，胎生から各発達段階におけるマウス脳における糖鎖構造は極めて厳格に制御されており，個体間の相違はほとんどなかった。更に，胎生期脳に特異的に出現する糖鎖構造BA1, BA2を見いだした。今後，これら糖鎖構造発現の生物学的意義，その制御機構について検討を進める予定である。

一方，肺癌手術患者における摘出標本からの糖蛋白糖鎖構造の解析を行うと，同時に摘出された正常肺部分の糖鎖も，その基本骨格が個体間によって大きく異なり，マウス脳モデルとは全く異なった結果が得られた。このことは，周囲環境，特に喫煙や大気汚染の影響を強く受ける肺組織に於いて，その糖鎖構造も環境によって変化する可能性を示唆した。今後，糖鎖構造が周囲環境によっており，癌組織のそれは発生母地である各個体の正常肺部分に類似した。

ところが糖鎖基本骨格に対する修飾を検討すると，正常肺組織に比較して肺癌部分では陰性荷電の付加が強く認められた。この陰性荷電の原因を更に検討すると，その一因は多数のシアル酸がα2-8結合により結合したポリシアル酸であることが判明した。ポリシアル酸は胎生期の脳神経細胞に強く発現が認められ，その強い陰性荷電のために細胞間の結合が弱められる。癌におけるポリシアル酸の発現は，細胞が離れやすくなり，結果的に極めて高率に遠隔転移を起こす一因であると推定される。ついでこれらポリシアル酸合成を制御する遺伝子の発現について検討した。現在までに2つのポリシアル酸合成酵素（STXおよびPST-1）が同定されているが，今回の検討においてはこのうちSTXが腫瘍組織特異的に発現していることを示した。

13. 哺乳類神経発生を制御する遺伝子群の機能解析

岡野栄之（大阪大・医・神経機能解剖学）
池中一裕（生理研）

哺乳類神経系の発生・分化を制御すると考えられる遺伝子産物の中で，神経系に強く発現しているRNA結合性蛋白質であるMusashi1（神経幹細胞に選択的に発現）とHu（ニューロンに選択的に発現）につき，生理学研究所の池中らが，開発したレトロウイルスベクターを用いて，機能解析を行うことを目的として共同研究をおこなった。

以下の組み換えレトロウイルスの作成を行った。

1．Musashi1蛋白質強制発現用ウイルス：pDL+/FLAG-msi1, pTY2/IRES-E/lacZ/msi1, MSV-IRES-GFP/ FLAG-msi1。

2．Musashi2遺伝子のantisense RNA強制発現用ウイルス：pLXSG/msi2A1, pLXSG/msi2A2.

3．Hu蛋白質およびそのドミナントネガティブ変異体強制発現用ウイルス：pMx-hygro/HuC-DN-Myc, pDL+/FLAG-HuC.

現在，これらのウイルスをマウス胎児の中枢神経系の初代培養系へと導入し，表現型を解析している。

14. 悪性グリオーマ特異的レトロウイルスベクターの開発と臨床治療への基礎的検討

清水惠司（大阪大・大学院医学系研究科・神経機能制御外科学）
池中一裕（生理研）

原発性脳腫瘍の約10%を占めるグリオブラストーマ患者の平均寿命は一年から一年半であり，今後とも既存の治療法を繰り返す限り飛躍的な治療効果は期待できない。そこで我々は，脳特異的遺伝子関連プロモーターで殺細胞遺伝子を制御したレトロウイルスベクターによる遺伝子治療法の開発をめざしてきた。

本研究では，ミエリン塩基性蛋白(MBP)遺伝子発現プロモーターで殺細胞遺伝子herpes simplex thymidine kinase (HTK)を制御したレトロウイルスベクターを用いることで脳特異的遺伝子治療を確立した(J Neurosci Res, 1993)。レトロウイルスベクターの低感染効率に関しては，Polyoma ori 発現遺伝子をPA317パッケージング細胞に導入することで高力価なレトロウイルスベクターを容易に入手することが可能となった (Hum Gene Ther, 1998)。グリオーマ細胞は腫瘍塊内を自由に移動できるので，bystander効果を十分に期待できる時期にGanciclovir (GCV)を投与することが治療効果を得る最大のポイントとなる (Gene Ther, 1998)。グリオーマ細胞にHTK遺伝子が25%導入されると，GCVの腹腔内投与にてほぼ完治することから，少なくともグリオーマ細胞の25%にHTK遺伝子を導入する事が治療目標となる (Hum Gene Ther, 1997)。これらの予備実験に基づき，濃縮した10^{11}cfu/mlという高力価な脳特異的レトロウイルスベクター溶液を3 μl脳内に注入し，2日後よりGCVを5日間腹腔内投与した。そして，この治療を3回繰り返すことでマウスグリオーマモデルを完治せしめた(Hum Gene Ther投稿中)。今後，この高力価脳特異的レトロウイルス産生細胞株を米国FDAに認可されているベンチャービジネス会社等に委託して，レトロウイルスの大量培養と各種安全試験のチェックを受けた後，このレトロウイルスベクターの投与方法やGCVの投与時期や回数等について詳細に検討し，悪性グリオーマ患者に臨床応用する予定である。

また基礎的共同研究としては，グリオーマ細胞の中で最も普遍的に発現している遺伝子およびそのプロモーター領域をserial analysis of gene expression (SAGE)法を用いて同定し，このプロモーターでHTK遺伝子を制御する新たなグリオーマ特異的遺伝子治療の開発を試みている。

参考文献

1）Yoshimatsu T, Tamura M, Kuriyama S, Ikenaka K: Improvement of retroviral packaging cell lines by introducing the polyoma virus early region. Hum Gene Ther 9: 161-172, 1998

2）Tamura M, Ikenaka K, Tamura K, Yoshimatsu T, Miyao Y, Kishima H, Mabuchi E, Shimizu K: Transduction of glioma cells using a high titer retroviral vector system and their Subsequent migration in brain tumor. Gene Ther 5: 1698-1704, 1998

15. 神経細胞膜の脂肪酸組成変動および神経活動による協同的細胞表面糖鎖修飾の機能解析

吉田　敏（大分医大・実験実習機器センター）
池中一裕（生理研）

ラット脳の脂肪酸組成を食餌中の脂肪酸組成のバランスを変えることで変化させると，ラットの学習能に有意な影響を与えることを明らかにしてきた。この機構としてこれまで，我々は脳海馬でのシナプス小胞の代謝回転に影響があり，そのことが学習と記憶に影響を与えているのではないか，との報告をしてきた。さらに，脂肪酸組成の変化だけでなく，ミクロソーム膜の糖鎖にも変化があることを赤外分析などにより明らかにしてきた。この糖鎖の変化には，シアル酸の反応性の変化も伴っていることを報告しており，N-CAMなど膜表面の糖タンパク質のシナプス活動に伴う変化との関係も考えられ，今後脂肪酸組成と学習行動などの神経活動との協同的な作用による糖鎖変化のメカニズムの解明が必要である。

共同研究としては，池中研究室にある自動糖鎖抽出装置と蛍光ラベル化装置を用いて，効率良く上記糖鎖の構造変化の化学的解析を目指して開始した。

学習前後での脂肪酸組成の異なるラットの群（P群とS群；S群ではαリノレン酸が非常に少ない）の脳ミクロソームを精製し凍結乾燥したのち，ピリジルアミノ（PA)化糖鎖を調整し，HPLCにて分析した。カラムとしては，アミドカラム，ODSカラム，ゲルろ過カラム，セロトニン結合カラムを用いた。その結果，学習前では両群とも高マンノース糖鎖が多いが，学習後では顕著に三～四分岐糖鎖が増大していることが判った。また学習前の両群で，M8高マンノース糖鎖がS群で相対的に低下していることが示されたが，学習後では両群で高マンノースの量的な差は小さかった。さらに，アミドカラムとODSカラムによる2次元HPLC糖鎖マッピングとの比較で，学習後にP群よりもS群で増大している糖鎖の構造を解析したところ，番号410.1と推定される糖鎖の変化が顕著であった。このことは，学習後のS群でのGlcNAcTransferaseやFucosylTransferase酵素の変化を示唆しており，Golgi体でのそれらの糖代謝酵素の調節と脂肪酸組成変化および神経活動との相互作用が示唆された。

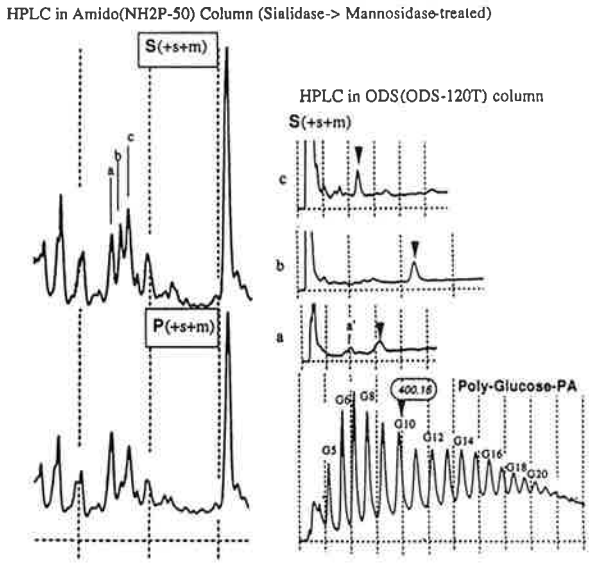


Fig.1. The left panel shows the HPLC patterns on Amido(NH2P-50) column of the sialidase- and mannosidase-treated PA-glycans prepared from rat brain microsomes in S-group(the safflower oil-dietary group; upper) and P-group(the perilla oil-dietary group; lower). The peak fractions as denoted by a, b, and c were further applied on ODS-column(ODS-120T), as shown in the right panel. The HPLC pattern in the right bottom panel is obtained from the authentic poly-glucose PA derivatives.

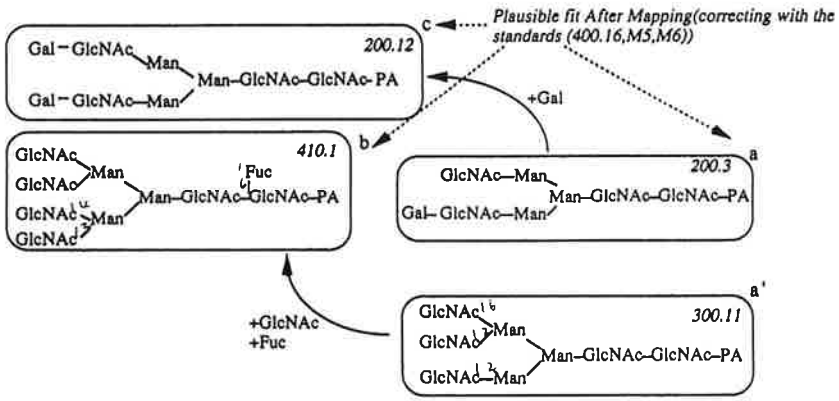


Fig.2. Proposed structures of PA-glycans for a, b, and c fractions on Amido column in Fig.1. These structures were deduced by the 2-D HPLC mapping of PA-glycans reported.

16. NaチャネルおよびCaチャネル制御の分子メカニズム

瀬山一正（広島大・医・生理）
森　泰生（生理研）

ナトリウムチャネル多様性がどのような生理学的意義をもつかを明らかにすることは，興奮性細胞における活動電位伝播のメカニズムを明らかにする上で非常に重要である。ナトリウムチャネル多型性をみわける上で，最も有効な手段が薬剤感受性である。グラヤノトキシン阻害におけるナトリウムチャネルタイプ選択性の構造的基盤を明らかにするために，グラヤノトキシン感受性，及び非感受性ナトリウムチャネルタイプのcDNAクローン化を行った。さらには，それらの間のキメラナトリウムチャネルを作製し，グラヤノトキシン感受性を賦与する構造因子を解明した。

17. サルのセントラルパターンジェネレータの作動様式

山口峻司，熊谷守宏（山形大・工）
関　和彦（国際武道大・体育）
森　茂美，松山清治（生理研）

歩行運動には，リズミックな肢運動による推進力の形成と，バランス調節による動的立位姿勢の保持が必要となる。リズミックな肢運動は，脊髄に存在するセントラルパターンジェネレータ（CPG）によって基本的に形成される。動的姿勢は各種反射系とCPGの統合によって維持される。これらは，歩行運動の制御の基本原理である。この基本原理が，ヒトを含め個々の動物で，どのように具体化されているか。進化による歩行様式の変遷に伴い，その神経機構は大きく変貌をとげてきたと考えられる。特に，ヒトの二足歩行は直立姿勢という不安定な状態を維持しつつ，しかも，効率よく長時間移動できることから進化の頂点の一つに位置すると言えよう。脊椎動物のCPGの構造と機能，姿勢反射系との統合については，ヤツメウナギにおいてかなり詳細に明らかにされてきた。ネコなど四肢動物についても研究は進んでいるが未だ十分な解明がなされていない。ヒト，サルの二足直立歩行の神経機構に関する研究は圧倒的に遅れている。ヒト二足直立歩行の神経機構の解明は，高齢化社会に向けて臨床応用や福祉の点からも社会的要請となっている。ヒト二足直立歩行の機構解明を目指して，我々は，サルのセントラルパターンジェネレータの作動様式の分析を課題として設定した。前年度は，リズム形成の機構に着目しネコを用いて解析を進めた。ネコ等四肢動物では，頭部が前肢ガードルの上に位置するという点からヒトの二足直立歩行と類似の構造的特徴を有する。この研究を通して，二足歩行のリズム形成回路に関する示唆

が得られると考えた。今年度は，もう一方の機構すなわち，平衡を維持するニューロン機構について検討を加えた。ヒト・サルの直立姿勢と二足直立歩行では，足指から踵部に至る足底部を地面に着けたplantigrade型である。同様の直立姿勢はラットでも見られる。ヒト二足歩行では重心の鉛直投射点は支持脚の足底面内に存在することは少なく，いわゆる動歩行である。このときの起立姿勢制御も動的である。動的起立姿勢制御は曲芸の玉乗りと類似している。そこで，ヒト・ラットを種々の曲率半径を持ったロッキングプラットフォームに乗せてその起立姿勢と下肢筋の筋活動を解析した。ロッキングプラットフォームの半径が小さくなるほど玉乗り状態になり，半径が無限大になると静止床面に対応する。ヒトの足関節の伸筋，屈筋群の筋活動を表面筋電図法により調べた。　ロッキングプラットフォーム上では，主として，内側腓腹筋と前脛骨筋の活動により重心位置が動的に制御されていた。この制御は静止床面上でも，玉乗り状態でも同様であった。ラットがロッキングプラットフォーム上に二足で起立するためには，学習を必要とする。この学習過程で，伸張反射に由来すると考えられる速い（10-15 Hz）振動が出現した。学習が進み安定な起立姿勢が獲得されるとこの振動は著しく抑制された。ヒトの場合にも同様な振動が見られた。ロッキングプラットフォームに不慣れな被験者が曲率半径の小さなロッキングプラットフォームに乗るとき伸張反射に由来する振動が見られ，慣れるに従ってそれが消失することが観察された。振動消失後の安定な起立姿勢では，重心位置が最前方に来るのに先行する内側腓腹筋の活動と最後方に先行する前脛骨筋の活動が見られた。これらの筋活動は時間関係から単純な反射に由来するとは考えにくく「随意的」筋活動の可能性がある。歩行時にはこの「随意的」筋活動がCPGの出力と重畳し直立姿勢が保持されるものと考えられる。「随意的」筋活動とＣＰＧの出力が重畳するためには，一部はCPGを経由して，また一部はCPGと独立した経路を通って最終共通路である運動単位を励起すると考えられた。この制御機構の相互作用を解明するために，ネコ前肢歩行リズム誘発時の前庭反射を調べた。除脳ネコを非動化し頚髄側索に連続電気刺激を加え前肢Fictive Locomotionを誘発させた。前庭神経を単発電気刺激し前肢肘伸筋運動ニューロンより反射性EPSPを記録した。Fictive Locomotion中，対側前庭神経由来の反射性EPSPは歩行周期中伸筋活動相で促通を受けた。同側前庭神経由来の反射性EPSPのリズミックな変調ははっきりしなかった。左右の前庭器官由来の反射が動的姿勢制御にどのように機能するのかさらに研究を進める必要がある。

18. 脳高次機能と運動制御

南部　篤（東京都神経研）
稲瀬正彦（電総研）
森　茂美，松山清治，森　大志（生理研）

直立二足歩行運動はヒトに特徴的な歩行様式であり，その発現・制御には高次脳レベルにおける運動制御の関与が強く示唆されている。このため二足歩行運動の中枢制御機序を明らかにするには，二足歩行をする実験動物モデルを確立することが重要である。森らはニホンザル（*M. fuscata*）にトレッドミル歩行運動のタスクを課し，覚醒・非拘束下で直立二足歩行運動をする実験モデルを完成した。現在，森らはこの実験モデルを用いて，サル直立二足歩行運動時における体幹・下肢の運動様式について詳細な運動力学的解析を行なっている。さらに直立二足歩行の中枢制御機序を解明するには，高次脳機序の関与が示唆されることから，従来の歩行運動の基礎的神経機構である脳幹・脊髄レベルの解析に加えて，大脳皮質・大脳基底核などの高次中枢レベルにおける歩行制御機序の解明が必要である。南部らはこれまで覚醒下のサルで一次運動野・補足運動野をはじめとする大脳皮質運動関連領野および大脳基底核などを電気生理学的手法により刺激マッピングし，これらの領域内における詳細な機能分化およびその神経連絡について解析を行なってきた。

本研究では大脳皮質運動関連領野の二足歩行運動制御への関与を明らかにすることを目的としている。このため本年度は大脳皮質運動関連領野と皮質下運動関連領域との神経連絡の解析を行なった。実験には成ニホンサルを用いた。ケタミン軽麻酔下で，サルの大脳皮質一次運動野および補足運動野を皮質内微小電気刺激法によりマッピングし下肢領域を同定した。それぞれの領域に神経標識物質BDAおよびWGA-HRPを注入し，4週間後にサルを潅流固定し脳組織を摘出した。この脳組織の凍結切片を作製し，BDAおよびWGA-HRP標識線維・終末の分布について解析した。この結果，一次運動野下肢領域からは，大脳基底核から脳幹に至る広範な領域で運動関連領域に対する神経投射が観察された。しかし，補足運動野からは注入したWGA-HRPが微量であったため，充分な線維投射が観察されなかった。一次運動野および補足運動野下肢領域から皮質下運動関連領域への投射様式の違いを明らかにするには，さらに追加実験を行なう必要がある。

19. サルの味覚弁別行動に関与する大脳皮質諸領野間の結合

小川　尚，伊藤真一（熊本大・医学部）
森　茂美，松山清治，森　大志（生理研）

目的：サルの大脳皮質では味覚野（内側前頭弁蓋部）以外でも味応答がみられるが，中でも特に第一次体性感覚野舌領域（外側前頭弁蓋部）の一部は視床味覚野から直接の投射を受ける点で他の味覚関連領野とは異なる。この領野の入出力を皮質味覚野のそれと比較する目的でこれら2皮質野にそれぞれ異なるトレーサーを注入して，1）相互の線維結合，及び2）視床味覚野内における起始細胞分布の差異，を調べた。方法：3頭のニホンザルを用い，ケタラール麻酔下でユニット活動を記録して4基本味に対する応答をマッピングし，外側弁蓋部と内側弁蓋部の応答中心にそれぞれ蛍光色素DY（ディアミジノ・イエロー）とFB（ファスト・ブルー）を注入した。一ヶ月後灌流固定し凍結切片にして逆行性にラベルされた細胞体を検索した。

結果及び検討：現在1頭で得られた結果について解析中であり，その結果をのべると以下の通りである。1）注入部位と別にDY（+）細胞が内側弁蓋部に，FB（+）細胞が外側弁蓋部にそれぞれクラスターをなして出現した。このことは前頭弁蓋部の外側と内側とで双方向の投射があることを示す。検索済みの一例では注入部位と逆行性標識の部位に重なりはなかったが，前頭弁蓋部内外の相互結合のトポグラフィについてさらに系統的に調べる必要がある。2）視床味覚野ではFB(+)細胞が明瞭に認められ，皮質味覚野への起始細胞があることが確かめられた。DY(+)細胞の分布については検討中である。DYの調整法や注入法に問題がありそうであるので，次年度においてはこの点を改善して，もっと良好な結果を出したい。

20. アデノウィルスベクターによる神経伝達物質受容体分子の強制発現を用いた中枢神経局所回路の機能解析

小澤瀞司（群馬大・医）
都筑馨介（群馬大・医）
岡戸晴生（東京都神経研）
伊佐　正（生理研）
斎藤康彦（生理研）

中枢神経系において速い興奮性シナプス伝達に関与するAMPA型グルタミン酸受容体は2種類の異なる機能を持つ受容体に分類される。Type I受容体はGluR2サブユニットを含み，カルシウム透過性は低く，外向き整流特性を持つ。それに対してType II受容体はGluR2サブユニットを欠

き，高いカルシウム透過性と内向き整流特性を示す。最近小澤と岡戸らによって開発されたGluR2サブユニットを強制発現することができるアデノウィルスベクターによってニューロンのAMPA受容体のカルシウム透過性を操作し，神経回路の機能に及ぼす影響を調べるため，上丘浅層ニューロンのAMPA受容体のカルシウム透過性を調べた。すると形態学的に同定された5種類のニューロンのうち，水平方向に長い樹状突起を持ち，おそらく側方抑制に関与すると考えられるhorizontal cellのみにおいてカイニン酸のpressure applicationによって誘発されるAMPA受容体を介する電流は内向き整流特性と高いカルシウム透過性を示し，Type II受容体を多く含むことが明らかにできた。

21. 視覚—運動変換過程の高次神経機構

蔵田　潔（弘前大・医）
相澤　寛（弘前大・医）
伊佐　正（生理研）

指標を注視するための眼球のサッカード運動の反応時間は被験者の注意の状態を反映する。すなわち注意が注視対象に集中している状況では，周辺に現れた指標に対するサッカードが抑制され，反応時間には通常150－250ミリ秒を要する。それに対して注視点の消灯から数百ミリ秒のGAP期間をおいてから指標を呈示すると，反応時間が約100ミリ秒と極端に短いexpress saccadeが頻繁に起きるようになる。このことはGAP期間中に注意がそれまでの注視点から周囲に移動することを反映するとされている。さらに被験者が指標の現れる場所について予め持っている確信の度合い，また繰り返し練習の回数に応じてexpress saccadeの頻度はさらに増加する。このサッカード運動の反応時間の調節機構に関して，ニホンザルの上丘中間層にニコチンを注入するとexpress saccadeの発現頻度が増加すること，またその増加はニコチンのdoseに依存すること，またexpress saccadeの頻度は増加するが，サッケード運動の速度はほとんど変化しないことを明らかにした。以上のことから上丘へのコリン作動性入力がサッカード運動の開始の制御には関与するが，ダイナミクスの制御には関与しないことが明らかになった。

22. 霊長類皮質脊髄路から上肢運動神経細胞への興奮伝達経路について

大木　紫（杏林大・医）
伊佐　正（生理研）

α-クロラロースで麻酔し，人工呼吸下で非動化した3頭のニホンザルの上肢筋運動ニューロン80個から細胞内記録を行い，反対側延髄の錐体路電気刺激の効果を調べた。すると単シナプス性のEPSPと2シナプス性のIPSPが記録され，それ以上長い潜時のEPSPは記録されなかったが，1mg/kgのストリキニンを静注するとIPSPは消失し，より潜時の長い巨大なEPSPが出現した。これらの髄節内潜時はおおむね1-2msの範囲に入り，2シナプス性であることが示唆された。C5髄節で側索背側部を切断し，皮質脊髄路の伝導を遮断してもこの2シナプス性EPSPは残ったが，C2髄節で切断するとほぼ全例において消失した。これらの結果は，C3-C4髄節に存在する脊髄固有ニューロン（C3-C4PNs）が皮質脊髄路から上肢筋運動ニューロンに至る興奮の伝搬に寄与していることを示している。従って，近年発表されたMaierらの，マカクザルにおいては皮質脊髄路から上肢筋運動ニューロンに至る興奮性経路は単シナプス性経路が主要な役割を果たしており，C3-C4PNsの寄与はごくわずかであるという主張とは異なり，マカクザルにおいてもC3-C4PNsは上肢筋の制御に主要な貢献をしていることが明らかになった。

23. ラット上丘におけるニコチン受容体の機能解析

岡部繁男（生命工学工業技術研究所）
栗生俊彦（生命工学工業技術研究所）
伊佐　正（生理研）

上丘中間層には多くのアセチルコリン作動性入力が入力することが知られている。そこでラット上丘スライス標本において中間層ニューロンからホールセル記録を行い，アセチルコリンのpressure applicationを行うと速い内向き電流が誘発された。この電流は顕著な内向き整流性を示し，mecamylamineとdihydro-β-erythroidineによって抑制されたのでニコチン受容体の活性化によることが明らかになった。

24. 新規カドヘリン型受容体CNRの機能解析およびヒト相同遺伝子の単離

濱田　俊（筑波大・基礎医），濱田香世子（生理研），八木　健（生理研）

（マウス大脳皮質におけるCNR蛋白質の局在）CNRファミリーは非受容体型チロシンリン酸化酵素Fynと共役するカドヘリン型の膜タンパク質ファミリーとして同定された。CNRはマウス中枢神経系に発現しており，細胞分画法を用いた生化学的検討ではCNR1蛋白質はシナプス後肥厚部分画に濃縮されてくることからシナプス部に存在することが予想された。

CNR1に対するモノクロナール抗体6-1Bを用い，共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察と金コロイド法を用いた包埋後免疫電子顕微鏡法によりCNR1蛋白質の微細構造レベルでの局在を検討した。2ないし3週齢のマウス大脳皮質を共焦点レーザ顕微鏡を用いて観察したところ，点状ないしvaricose fiber様の染色像が第一層で多数認められ，深層の神経細胞の樹状突起も中等度に標識された。点状の染色像が認められた第一層を免疫電子顕微鏡法で観察したところ，シナプス部に一致して免疫陽性反応が認められた。免疫陽性反応が認められるシナプスは概して小型であり，シナプス小胞の数も少なくないことから，CNR1蛋白質は主として幼弱なシナプスに局在することが示唆された。一方，成体マウスにおいては幼弱期のマウスで認められた第一層の点状の染色像は減少し，主として深層の神経細胞の樹状突起が標識された。また免疫電子顕微鏡法ではシナプス部に免疫陽性反応を見いだすことは困難であった。

CNR蛋白質が主として幼弱なシナプスに認められることから，CNRはシナプス形成に何らかの形で関与していることが示唆された。今後はCNR標的組み換えマウスのシナプス形成過程の観察，CNR機能阻害抗体を添加した神経細胞培養系におけるシナプス形成過程を検討し，CNRのシナプス形成に果たす役割を検討したい。

（ヒト相同遺伝子の単離）マウスCNR1の5'非翻訳領域と3'非翻訳領域にPCRプライマーを設定し，ヒト相同遺伝子の単離をRT-PCR法を用いて行った。得られた複数の増幅産物の塩基配列を決定したところ，マウスCNR1と高い相同性を有するヒトCNR1相同cDNAを得ることができた。また，塩基配列の解析結果からヒトおよびマウスのCNR1には少なくとも2種類のsplice variantsが存在することが明らかになった。現在これらのsplice variantsの機能を明らかにしてくために，抗体および標的組み換えマウスの作製を開始した。

【計画共同研究報告】

計画共同研究報告

〔目　　次〕

1．ドレプリン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） …… 192
2．コンディショナルジーンターゲティングによるGnRHニューロンの
機能解析（佐久間康夫 他） …… 193
3．Chimeric mice to map inducible gene expression in the brain
（Saffen, D 他） …… 193
4．コンディショナル・ノックアウト法を用いた脳高次機能の分子機
構解析（森　　寿 他） …… 195
5．グルタミン酸受容体欠損マウスの作成と機能解析（崎村建司 他） …… 196

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，木村光宏，関野祐子（群馬大・医・行動分析学）
児島伸彦，小幡邦彦（生理研）

我々は，これまで樹状突起スパインにおけるドレブリン結合型アクチン細胞骨格系の機能という観点から中枢シナプス可塑性の研究に取り組んできた。ドレブリンは我々が世界に先駆けて発見したスパインの代表的アクチン結合蛋白であり，アイソフォーム及び神経細胞内局在の変換がシナプス成熟期に一致して起こることや，アクチン細胞骨格系の構築を制御することによりスパインの形態を変化させることを，これまでに明らかにしてきた。

以上より，ドレブリンは樹状突起スパインアクチン細胞骨格系の制御を介してシナプスの形態及び機能にとって重要な役割を果たしている可能性が高い。そこで本研究では，標的組み換え法あるいは遺伝子導入法によりドレブリンEとAあるいはドレブリンAのみを欠失するマウスおよび，ドレブリンEあるいはA発現トランスジェニックマウスを作製し，これらのマウスを用いてドレブリンの役割を解明することを目指した。

（1）ドレブリン遺伝子の構造解析

昨年度クローニングした全長約14kbのクローンDmg308の解析を行った。 Dmg308はDmg14より5' 端に約6.4kb先までのびていた。Dmg308の全遺伝子配列を決定し，ドレブリン遺伝子の5'領域には特徴的な繰り返し構造があることを発見した。

（2）トランスジェニックマウスの作製

昨年度作製したドレブリンE及びドレブリンA発現トランスジェニックマウスの解析を行うためにドレブリンcDNAの種々の部位をプライマートしてディゴギシゲニン標識プローブを作製し，in situ ハイブリダイゼーションを行った。まず，PCRにて386-1960,986-1130,986-1330,1007-1130,1007-1330,386-1330,386-1130の7種のプローブの作製を行った。最長の386-1960は増幅されなかったが，その他のものでは，プローブとしては386-1330が最も適していることがわかった。

（3）ドレブリン完全欠失マウスの作製

ドレブリンのnull mutantを作製するために，まず，ドレブリンの第2エクソンから第5エクソンまでをネオマイシン耐性遺伝子に置き換えた。この遺伝子に現在ジフテリアトキシン遺伝子のカセットを連結させている。

（4）ドレブリンA欠失マウスの作製

昨年度までの研究において作製済みのドレブリンA欠失ノックアウトマウス作製用のターゲッティングベクターを，エレクトロポレーション法によりES細胞に導入し，500クローンの中から相同組み換え体と思われるものを，これまでに1クローン同定した。一過性にCreリコンビナーゼを作用させ，loxP遺伝子に挟まれた領域を除去した。

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

佐久間康夫（日本医大・生理学第一）
小幡邦彦（生理研）

性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロンは脳における生殖内分泌機能の最終共通路として，思春期・更年期といった個体の生涯における生殖機能の転機を司るとともに，生殖年齢期の日常的な内分泌・行動調節に関与するが詳細はなお不明である。日本医科大学生理学第一講座では，性ホルモンによるGnRHの転写発現調節やGnRHの行動調節作用について，形態学的，生理学的研究を進めている(総説はPahar & Sakuma, 1997)。生理学研究所・神経化学部門では，マウス遺伝子ライブラリーの作成を始め，変異遺伝子の導入によるトランスジェニック動物の作成に多くの成果を挙げてきた。そこで，GnRH遺伝子を任意の時期にコンディショナルノックアウトを行うため，導入遺伝子コンストラクトの作成に取りかかった。第一年度の本年では遺伝子ライブラリーをもとに，ほぼ10kbのGnRH遺伝子を単離し，塩基配列を決定した。現在複数のコンストラクトの作成を行っている。GnRHコンディショナルノックアウトにより，思春期や更年期をもたらす脳機構の理解を期している。

Pahar IS, Sakuma Y (eds) GnRH Neurons: Gene to Behavior, 486pp, Brain Shuppan, Tokyo, 1997.

3．Chimeric mice to map inducible gene expression in the brain

David Saffen and Julie Geng (Dept. of Neurochem., Faculty of Medicine, Tokyo Univ.)
Kunihiko Obata and Takeshi Yagi (National Institute for Physiological Sciences, Okazaki)

The purpose of the proposed research is to create chimeric mice that will allow inducible gene expression in the brain to be visualized. Our plan is to use homologous recombination to place a beta-galactosidase reporter gene downstream from the promoter of the endogenous zif268 gene. The zif268 gene encodes a transcription factor that is rapidly induced in neurons of the hippocampus following induction of long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus. This behavior suggests that visualizing zif268 gene expression may provide a means of marking neuronal cells that are undergoing long-lasting plastic changes. Specifically, visualization of zif28 gene expression may allow the mapping of neuronal networks that function in learning and memory.

In last year's report, we described the construction of a targeting vector for placing a beta-

galactosidase reporter gene downstream from the endogenous mouse zif268 promoter and the isolation of a single TT2 embryonic stem cell derivative (subline #90) that appeared to have stably acquired an integrated copy of this targeting vector. To show the targeting vector had become correctly integrated into the zif268 gene locus, we attempted to use southern blot analysis to compare the genomic DNA structures of clone #90 and the parent TT2 cells. For this purpose we cut parent and clone #90 genomic DNA with restriction enzymes (*Hind* III, *Bam*H I or *Eco*R I) predicted to generate distinct patterns of DNA fragments and analyzed these using ^{32}P-labeled DNA probes derived from a genomic fragment located downstream from the zif 3' sequences included in the targeting vector. For reasons that we still do not understand, each of 3 distinct probes hybridized non-specifically with the genomic DNA, resulting in a very high background signal, making it difficult to visualize specifically hybridizing bands. By contrast, southern analysis using a probe derived from the beta-galactosidase gene gave very clear results. To improve the signal to noise ratio in the southern blots using the 3' probe, we decided to try use PCR to amplify the entire zif268 locus from both the parent and recombinant prior to carrying out southern analysis. After testing several different kinds of Tac polymerases and combinations of primers, we were eventually successful in amplifying an approximately 13 kb fragment of clone #90 genomic DNA using LA-TAC polymerase (TaKaRa) in combination with a forward primer located just 5' of the zif268 coding region and a reverse primer located in the zif268 3' region downstream from the sequences included in the targeting vector. Digestion of the PCR product with *Hind* III, *Bam*H I, or *Eco*RI, yielded DNA fragments of the predicted size, and in each case one of these fragments specifically hybridized with ^{32}P-labeled 3' probe. Taken together, these data support the conclusion that the targeting vector has become stably integrated into the zif268 locus by homologous recombination. The analysis remains incomplete, however, since we have not yet been able to use PCR to amplify the endogenous zif268 locus, possible due to the high GC content of the 5' end of that locus.

Based upon our partially successful analysis, however, we decided to use the clone #90 cells for the production of chimeric mice. The first set of blastocyst injections carried out by Ms. Kanbara, Dr. Yagi and Prof. Obata working at Okazaki yielded two female and one male chimeric mice, the last showing a high percentage of TT2-derived tissue. These mice are currently being tested to determine if the modified zif268 locus is inherited.

4.コンディショナル・ノックアウト法を用いた脳高次機能の分子機構解析

森　　寿（東大院・医・分子神経生物学）
八木　健（生理研）

〔研究目的〕成体での記憶・学習に関わると考えられる分子が，発達期における神経回路形成にも関わることが，ノックアウトマウスの解析から明らかにされてきた。これらのノックアウトマウスは発達障害を示し，成体での十分な解析が不可能である。したがって本研究では従来のノックアウト法を発展・改良し，時期特異的に脳内特定部位での遺伝子ノックアウト法を実現させ，脳高次機能の分子機構を解析することを目的とした。

〔方法〕小脳プルキンエ細胞に特異的に発現するグルタミン酸受容体(GluR) δ2サブユニットは，通常の遺伝子ノックアウトにより神経回路形成，シナプス可塑性および運動学習に障害を示めした。GluR δ2を成体においてのみノックアウトし，シナプス可塑性と運動学習の機能評価を行うために，遺伝子内に組み換え酵素（Cre）の認識配列を導入したベクターを作成する。このベクターをES細胞に導入し，標的遺伝子組み換え細胞を選択し，得られたES細胞からGluR δ2遺伝子にCreの認識配列を持つf δ2マウスを作成する。一方，小脳プルキンエ細胞において薬剤投与依存的にCreの活性を誘導するトランスジェニックマウスを作成し，上記f δ2マウスと掛け合わせて，成体でGluR δ2遺伝子の欠損を誘導し，生理機能解析を行う。

〔成果〕今年度は，GluR δ2遺伝子内にCreの認識配列を導入したベクターを作成し，ES細胞に導入し，標的遺伝子組み換え細胞の選択を行った。現在までに標的遺伝子組み換えを起こした細胞が1クローン得られており，キメラマウスの作成を試みている。一方，小脳プルキンエ細胞において薬剤投与依存的にCreの活性を誘導するトランスジェニックマウスは，系統の解析を進めている。

〔考察および展望〕現在使用しているGluR δ2遺伝子内にCreの認識配列を導入したベクターでの標的遺伝子組み換え頻度が低いことから，ベクターの再構築を行い標的遺伝子組み換えマウスを作成する。一方，小脳プルキンエ細胞において薬剤投与依存的にCreの活性を誘導するトランスジェニックマウスは，系統の解析を行い，目的の遺伝子欠損が可能であることを確認する。その後，両系統のマウスの掛け合わせを進め両遺伝子を持ったマウスにおいてGluR δ2遺伝子の欠損を誘導し，シナプス可塑性，運動学習を解析する。

発表論文：本年度の研究成果は以下の論文として発表した。

1）Morikawa E. Mori H. Kiyama Y. Mishina M. Asano T. Kirino T. Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1(NR2A) subunit of NMDA receptor. J. Neurosci. 18, 9727-9732, 1998.

2）Mori H. Manabe T. Watanabe M. Satoh Y. Suzuki N. Toki S. Nakamura K. Yagi T. Kushiya E. Takahashi T. Inoue Y. Sakimura K. Mishina M. Role of the carboxy-terminal region of the

GluRepsilon2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. Neuron, 21, 571-580, 1998.

3) Kiyama Y. Manabe T. Sakimura K. Kawakami F. Mori H. Mishina M. Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor epsilon1 subunit. J. Neurosci.,18, 6704-6712, 1998.

5.グルタミン酸受容体欠損マウスの作成と機能解析

崎村建司，阿部　学，柿崎利和（新潟大・脳研・基礎神経科学）
八木　健（生理研）

グルタミン酸受容体チャネルは，速い興奮性シナプス伝達を担う主要な受容体チャネルである。この受容体チャネルには複数のサブタイプが知られているが，なかでもNMDA型受容体チャネルは，長期増強に代表されるシナプス伝達効率の変化や，発生期におけるシナプスの構築や安定化に深く関与することが示唆されている。我々はNMDA受容体チャネルが生体ではたす役割を解明する目的で，この受容体チャネルの機能的多様性を決定する4種類のεサブユニットを欠損したマウスを作成し，その生理機能の解析を進めてきた。このうちε2サブユニット欠損個体は，哺乳反射が消失しておりミルクが飲めないために生後24時間以内に死亡する。そのため，このサブユニットが成体で果たす生理的機能を解析することができなかった。そこで，成体でのみε2サブユニットを欠失するマウスの作成を2つの方法で進めてきた。

その1つは，発達初期より発現し生後その発現が減少するε4サブユニット遺伝子プロモーターを利用したε2サブユニットを発現するマウスの作成である。この遺伝子導入マウスとε2サブユニットノックアウトマウスとをかけ合わせることにより，新生仔期致死を回避させようと計画した。ε4サブユニットmRNAの3'非翻訳領域にIRES(Internal Ribosome Entry Site)とε2サブユニットのcDNAをつなぎ発現させるために，ε4サブユニット遺伝子座に相同組換えによってIRESとε2サブユニットのcDNAを導入したマウスを作成した。ヘテロにこの変異遺伝子を持つマウスでは，ε4-ε2融合mRNAが野生型ε4サブユニットmRNAと同程度発現していた。しかしε2サブユニット欠損マウスにε4-ε2融合遺伝子を持つマウスを交配したマウスでは，新生仔死を回避することはできなかった。これらマウスのウエスタンブロット解析の結果，ε2サブユニットタンパクは検出されたが，その量は野生型のものに比べると低いものであった。これは，融合mRNAからのε2サブユニットの翻訳効率が低いことが考えられる。現在，ε4-ε2融合遺伝子をホモに持つ個体を単離して生存の有無を検討している。

もう一つの方法は，cre-loxP組換え系を用いたノックアウトである。あらかじめε2サブユニット遺伝子領域にloxP配列を挿入したマウスをノックインにより作成し，生後creを発現するマ

ウスと交配させることにより，遺伝子欠損を引き起こすものである。この目的のために，ε2サブユニット遺伝子のエクソンをはさむイントロン領域にloxP配列とネオマイシン耐性遺伝子を挿入したベクターを作成した。このベクターを用いて，標的組換えによりloxP配列が導入された複数のES細胞株を単離した。それぞれの細胞株より生殖系列遺伝するキメラマウスを作成している。一方，creを発現するマウスは，生後小脳に発現するグルタミン酸受容体チャネルε3サブユニット遺伝子のプロモーターを利用して作成している。ノックインによりε3サブユニット遺伝子にcre遺伝子を挿入したES細胞株を複数得ており，それぞれの細胞株より作成したキメラマウスのうち生殖系列遺伝するものを選別中である。今後，それぞれのマウスを交配させ，新生仔期致死を回避し，ε2サブユニットの生理機能を解析する予定である。

【磁気共鳴装置
共同利用実験報告】

磁気共鳴装置共同利用実験報告

〔目　　次〕

磁気共鳴装置室　概要
1．マイクロイメージング法による脳機能画像法（fMRI）の基礎的研究と神経回路形成過程の三次元的構成に関する研究（荻野孝史 他）…… 202
2．超高速磁気共鳴画像法の生体応用（森本武利 他）…… 203
3．磁気共鳴イメージングによる門脈－肝臓領域Na感受性機構の中枢投射の同定（森田啓之 他）…… 206
4．超高速磁気共鳴画像法の生体応用（成瀬　達 他）…… 207
5．脊髄圧迫，脊髄損傷の研究（松井宣夫 他）…… 209
6．MRIによる内耳病変の検出（肥塚　泉 他）…… 210
7．MRIによるサル視覚皮質の観察と電極定位（小松英彦 他）…… 211
8．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）…… 212
9．MRIによるサル聴覚野の観察と電極定位（力丸　裕 他）…… 212
10．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）…… 213
11．サル大脳皮質前頭葉の脳定位イメージング（小川　尚 他）…… 216
第19回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ（代表者：永山國昭）…… 218
（1999．3．10）

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，断膚画像・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。1998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及びエネルギー状態の連続観察，の研究テーマのもとに11課題（採択共同実験者数37名）が採択され実施された。1998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52日，修理調整等17日，利用率20 %であった。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折装置は，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。l994年度は本装置の立ちあげを進め，l995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折，2）消化管運動の非破壊的動作解折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。l996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フオーマットに変換することが可能になった。

また共同利用実験計画の援助の一環として，磁気共鳴装置共同利用ワークショップを行った。第l9回ワークショップとしてl999年3月10日に開催し，l998年度及びl999年度共同利用実験研究者（所外9名，所内4名）を対象として，1998年度の利用報告，共同利用のガイダンス，今後の装置改善等について打ち合せが行われた。

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

荻野孝史，中村　俊（国立精神神経センター神経研）
瀬尾芳輝（京都府立医大）
永山國昭，村上政隆，大河原浩（生理研）
松永　是（東京農工大）

本研究は，高磁場磁気共鳴装置であるBruker BIOSPEC 4.7 Tesla動物用MR装置の特徴を最大限に活用し，1）脳機能の空間的，時間的発展を可視化，画像化することを可能とする高空間分解能，高速マイクロイメージング脳機能画像法を開発し，脳機能の無侵襲的解析を行うと共に，fMRI信号変化の機構を明かにすること，2）開発した高空間分解能マイクロイメージング法を用い，神経回路を形成しつつある神経細胞の移動を無侵襲的かつ三次元的に観察する技術を開発

し，神経回路形成過程を可視化，画像化することを目的としている。

平成10年度は，上記の研究課題を遂行するために不可欠なイメージング／スペクトロスコピー法における高感度化，高空間分解能化，高速化に関する技術的改良を推し進めると共に，ラット四肢の電気刺激モデルを用いたfMRI法に関する基礎的実験およびラット脳室潅流モデルを用いた脳脊髄液潅流測定実験を行い，以下の成果を得た。

脳脊髄液は，主に脈絡叢で能動的に産生され，脳脊髄の機械的な保護および脳の化学的な環境の維持に働いている。脈絡叢への血流量および脳脊髄液の産生は，各種のホルモンで影響される事が明らかになって来ている。また，各種のホルモンのレセプターが脈絡叢に存在することが明らかになって来た。低酸素負荷や脳圧上昇時に脈絡叢への血流量の低下や脳脊髄液の産生速度の低下が起こることが報告されているが，この現象における各種ホルモンの役割に関しては不明な点が多い。これまでは，髄液産生速度の測定はウサギやイヌ等の中・大型動物を用いて，色素ラベルしたデキストラン等を使った ventriculocisternal perfusion 法によるものがほとんどで，ラットのような小動物での測定は困難であった。そこで，ラットの側脳室内にカニューレを挿入し，陽性造影剤，Gd-DTPA（マグネビスト，100倍希釈）を 5ul bolus injection し，頭部のT1強調グラディエント・エコーMRI画像を ダイナミック測定し，関心領域の信号強度の 時間的変化より髄液産生を求めることを試みた（TR 100ms, TE 4.2ms, 1mm slice, 195x195um)。脳室内に投与したGd-DTPA により高信号化した関心領域の信号は，約30分で完全に減衰したが，ペントバルビタール大量投与により安楽死させたラットでは 信号の減衰が見られなかった。また，低酸素負荷時には減衰の時定数が低下した。これらの結果は，本ラット脳室潅流モデルによりラット脳脊髄液の産生過程を実測，画像化していることを意味する。今後，これらの結果を定量化すると共に，この測定システムを用いて低酸素負荷時の髄液産生低下に及ぼす各種ホルモンの役割について検討する予定である。

ラット脳室潅流実験は，京都府立医科大学の鷹股亮氏の実験協力を得て，実施された。

2．超高速磁気共鳴画像法の生体応用

瀬尾芳輝，鷹股　亮，日下義章，森本武利（京都府立医大・第一生理・整形）
Gil NAVON（テルアビブ大・化学）
村上政隆，永山國昭（生理研・分子生理）

本実験は，リアルタイム磁気共鳴画像解析装置を用い，生理活動に伴う代謝・拡散・血流・動き等のパラメータを測定し，画像化する新しい生理機能画像法を開発することを目的とした。平成10年度は以下の成果を得た。

1）ラット脳測定用表面コイルを用い，パルスシーケンス・磁場勾配パルスの最適化により，

GE-EPI画像の画質を大幅に向上させ，ほぼ，SE-EPI画像と同等，あるいは同じサンプリング周波数でのGE画像と同等の画像を得ることができた。FOV 2.56 cm，Data matrix 64x64，スライス厚 1mm，繰り返し時間１秒で，安定した測定を行うことができる。また，励起パルス角を小さくすることにより，毎秒30枚の連続測定においても画像の位置のズレや画質の劣化が生じないことを確認した。

三次元アンギオ法によりラット頭部の動静脈の描出を行った。少なくともボクセルサイズの血管まで測定できることを確認した。分解能100ミクロンは現在の最高レベルである。（第7回国際磁気共鳴医学会では，同等の分解能を達成した報告がバーゼルのグループによりなされた。ほぼ同一仕様の装置によるものであり，分解能100ミクロンは，現在の装置での性能限界と考えて良いと思われる。）本法により，脳機能画像により検出された活動部位と，その領域の支配血管との解剖学的位置関係を確認できるようになった。

２）ラット脳室潅流モデルにより，右側脳室からGdDTPA溶液をワンショットで注入し，脳脊髄液のT1緩和時間を指標として，脳脊髄液の産生速度を測定した。低酸素負荷による産生速度の減少を確認し，また，ラット死亡時には停止することを確認した。

３）家兎アキレス腱断裂モデルを用い，GE画像法を対照としてin vivo H-1 DQF画像の測定を行った。断裂後の修復過程の進行に伴い，修復部位アキレス腱のT2緩和時間が短縮し，GE画像法では6週から9週目で正常腱とほぼ同一の信号強度を示した。一方，H-1 DQF画像では，慢性期においても，修復部位は正常とは全く異なる信号強度を示した。以上より，アキレス腱断裂症において，従来，困難であった慢性期の病態把握が可能となると考えられる。

研究成果

【単行本】

1．Y. Seo, H. Takamiya, H. Ishikawa, T. Nakashima, Y. Sharf and G. Navon. NMR imaging of rigid biological tissues.
in: Spatially Resolved Magnetic Resonance (edited by P. Bluemler, B. Bluemich, R. Botto, E. Fukushima) Wiley-VCH, p. 445-457, 1998

2．H. Shinar, Y. Sharf, U. Eliav, Y. Seo and G. Navon.
2H double quantum filtered NMR histology and diffusion measurements in isolated nerves and blood vessels.
in: Spatially Resolved Magnetic Resonance (edited by P. Bluemler, B. Bluemich, R. Botto, E. Fukushima) Wiley-VCH, p. 307-321, 1998

【原著】

1．Mapping strain on blood vessel walls using deuterium double-quantum-filtered MRI. Y. Sharf, Y. Seo, U. Eliav, S. Akselrod, G. Navon, Proc. Natl. Acad. Soc. USA 95: 4108-4112, 1998

2．Magnetic resonance imaging of experimental subacute spinal cord compression. M. Fukuoka,

N. Matsui, T. Otsuka, M. Murakami, Y. Seo, Spine 23: 1540-1549, 1998

3．NMR studies of salivary glands: From energy metabolism to morphology. Y. Seo and M. Murakami, Europ. J. Morphol. 36 Suppl. 98-102, 1998

4．Selective detection of biexponential relaxation in isotropic solutions by mixed coherence filtering NMR. H. Yamada, J. Takeuchi, H. Nakamura, Y. Seo, A. Tasaki and T. Erata, J. Magn. Reson. 135: 99-103, 1998

5．Proton double-quantum filtered MRI: A novel method for imaging ordered tissues. L. Tsoref, H. Shinar, Y. Seo, U. Eliav, G. Navon, Magn. Reso. Med. 40: 720-726, 1998

【学会発表】

「国際学会（招聘）」

1．（発表）Y. Seo, Y. Kusaka, T. Ogino G. Navon and M. Murakami. NMR Micro-imaging as a New Tool for Histology. 18th International Conference of Magnetic Resonance in Biological Sciences. 1998. 8.23-28 (Tokyo, Japan)

「国際学会（一般発表）」

1．（発表）L. Tsoref, H. Shinar, Y. Seo, U. Eliav and G. Navon.Proton Double Quantum Filtered MRI - A Novel Modality for Imaging Ordered Tissues. 6th Scientific Meeting and Exhibition of International Society of Magnetic Resonance in Medicine. 1998. 4.20-4.24 (Sydney,Australia)

「国内学会（シンポジウム等）」

1．（シンポジウム）瀬尾芳輝，Gil Navon　生体中の水分子環境：H-2 DQF NMR・PFG NMR・DQF SIを用いた解析．　シンポジウム「磁気共鳴法が拓く21世紀への生理科学展望」第75回日本生理学会大会，1998. 3.27-3.29（金沢）

2．（教育講演）瀬尾芳輝　いろいろな磁気共鳴画像アーティファクト　第3回ＮＭＲマイクロイメージング研究会，1997. 7.19-7.20（京都）日本生物物理学会第35回年会，1998. 7. 17-18.（福岡）

「国内学会（一般発表）」

1．（発表）瀬尾芳輝，高宮尚武，Gil Navon　腱組織水の重水素核二量子フィルター化学シフト核磁気共鳴画像　第75回日本生理学会大会，1998. 3.27-3.29（金沢）

2．（発表）瀬尾芳輝，生駒和也，高宮尚武，Liat Tsoref，Haddsaah Shinar，Gil Navon，村上政隆　家兎アキレス腱のin vivo H-1 DQF Imaging.　第37回ＮＭＲ討論会，1998. 11. 17-19（横浜）抄録集 p.35-38

3．磁気共鳴イメージングによる門脈－肝臓領域Na感受性機構の中枢投射の同定

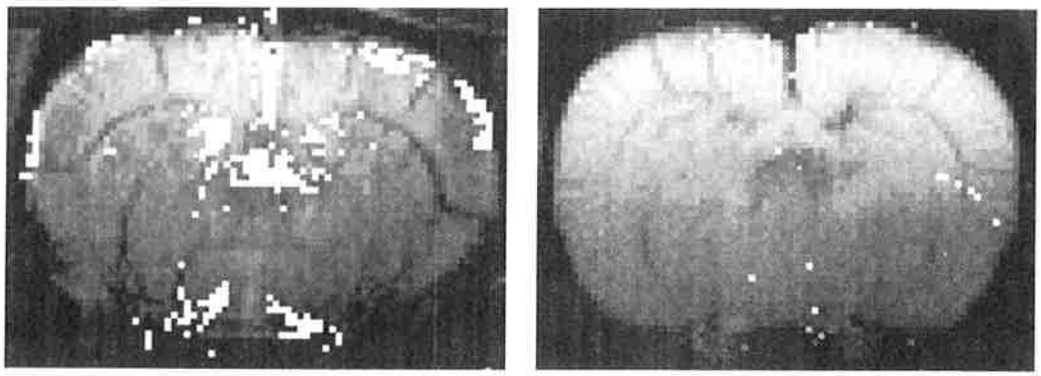
森田啓之（岐阜大・医・第１生理）
荻野孝史（国立精神神経センター・神経研）
瀬尾芳輝（京都府立医大・第１生理）
村上政隆（生理研）

【目的】

本研究の目的は，内蔵受容器からの中枢投射を，ニューロン活動に伴う血流増加としてMRI画像上に捉えることができるかどうかを確かめることである。内蔵受容器としては，門脈－肝臓領域のNa受容器を用いた。

【対象と方法】

全ての実験はWistar系雄ラット（体重320～450 g）を用いて行った。ペントバルビタール，α－クロラロース麻酔下で肝臓求心神経に刺激用の電極を装着の後，アクリル製頭部固定装置に固定し，O_2，N_2O混合ガスにて人工呼吸した。肝臓求心神経を20 Hz，0.5 ms，200 μ Aで5分間の繰り返し刺激を行った。磁気共鳴施設のABX Biospec 47/40（Bruker社，4.7 T）を用い，刺激前，刺激中，刺激後と連続してグラディエントエコー画像を撮影した：視野25x25 mm，データ画素数128x128，スライス厚1 mm，bregmaを中心に前後9スライス，パルスの繰り返し時間300 ms，エコー時間16 ms。合計90枚の画像（1～2刺激off，3刺激on，4 off，5 on，6 off，7 on，8 off，9 on，10 off）から，刺激off時の平均値を求め，on画像から平均値をサブトラクトした。対照実験として，中枢端を結紮した肝臓求心神経を同様の条件で電気刺激した。



図：肝臓神経中枢性電気刺激時（左）および中枢端結紮肝臓神経電気刺激時（右）の血流変化部位

【結果と考察】図に処理画像の結果を示す。肝臓神経を中枢性に電気刺激したラットでは，大脳皮質，脈絡叢，subfornical organ，paraventricular thalamic nu，supraoptic nu，preoptic areaと考えられる部位に有意な血流増加を認めた。これらの部位は，以前我々がFosタンパクの免疫染色を用いて確認した中枢投射部位とほぼ一致していた。一方，対照実験として行った中枢端を結紮して電気刺激したラットでは，これらの部位の血流増加は認められなかった。従って，内臓神経電気刺激による中枢興奮に伴う血流増加部位をMRI画像上に捉えることが可能であり，末梢神経の中枢投射のスクリーニングに有用な手段と考えられる。

4．超高速磁気共鳴画像法の生体応用

成瀬　達，関　泰長，汪　幼学，中江康之，石黒　洋，北川元二，早川哲夫
（名古屋大・医・第二内科）
瀬尾芳輝（京都府立医科大・第一生理）
村上政隆，佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛，尾崎　毅（生理研）

磁気共鳴画像法（Magnetic resonance imaging : MRI）による小動物の構像解析は，脳のように動きの少ない臓器に関しては微細構造を観察できるレベルに到達しつつある。しかし，胸部および腹部臓器の微細構造に関しては，呼吸ならび心収縮に伴う動きによるアーティファクトのために観察が困難な状況である。私どものこれまでの高速MRI法の研究により，ウサギやイヌでは無麻酔状態で呼吸停止せず，食道ならびに胃の動きを捉えることが可能となった。そこで，本年度はラットの膵を対象に高速MRI法の応用を試みた。

【方法】ラット急性膵炎モデルにおいて，急性膵炎の発症後の膵実質の炎症，浮腫などの時間経過を高速MRI法により連続的に記録し，膵炎進展の時間経過とその病態の把握を試みた。体重180-280 gのウィスター系雄性ラット（n＝20）を用い，既報のごとくトリプシン-タウロコール酸膵炎を作成した。膵炎作成3，24，48時間後にイミペネム10 mg/kgを皮下投与した。撮像には，Bruker社製MR装置Biospec 4.7Tを使用した。1.2%エンフルレン麻酔，自発呼吸下に同一個体において膵炎発症前，発症後24時間，7日，14日，21日，28日に以下の条件で水平，矢状，冠状断像をsnapshot法により撮像した。FOV 100 mm, data matrix 256^2, TR 6.8 ms, TE 3.5 ms, スライス厚3 mm，撮像間隔1 mm。得られた画像からNIH imageを用いて3次元画像を構築した。

【結果】1）自発呼吸下（30-60回／分）にて，撮像時呼吸停止をせずに正常膵の断層像が得られた［Fig. 1］。2）膵炎発症24時間後には膵の十二指腸部は腹水により識別できなかったが，腫大した脾部は明瞭に描出された［Fig. 2］。3）28日生存率は30%であった。いずれのラットも発症7日目から肝門部に嚢胞を認め，3次元構築した嚢胞像から計算された嚢胞内容量（平均値±SE）は，それぞれ0.3±0.1 ml（7日），0.8±0.3 ml（14日），2.1±0.6 ml（21日），6.5±1.3 ml（28日）であり，

実験終了後に得た実測値の平均は 6.4 ±1.4 mlであった。

【結論】高速MRI法により，膵炎発症後のラットの膵の構造変化を長期間観察することができた。本法は急性膵炎の病態生理の解明に有用な手段である。

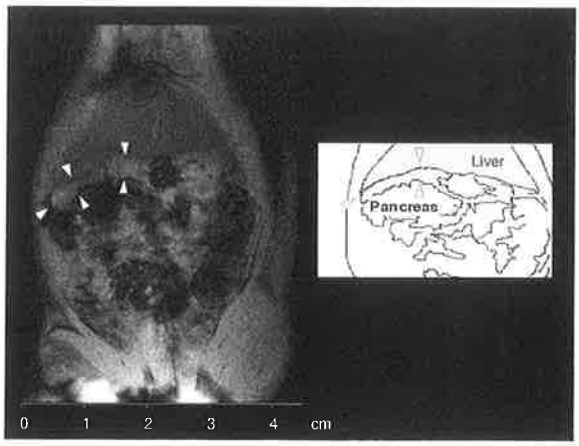


Fig. 1　自発呼吸下（30-60回/分）にて、撮像時呼吸停止をせずに
正常膵の断層像が得られた（△）

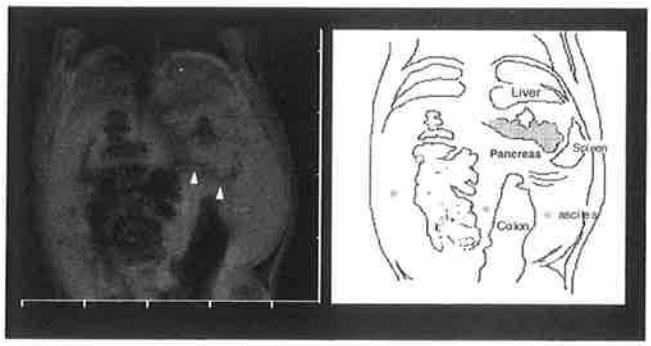


Fig. 2　膵の十二指腸部は腹水により識別できなかったが、
腫大した脾部は明瞭に描出された（△）

5．脊髄圧迫，脊髄損傷の研究

福岡宗良，柴山元英，松井宣夫（名古屋市立大・整形外科）
村上政隆，尾崎　毅（生理研）

【目的】急性損傷モデルにおいて，壊死・変性した脊髄の機能を回復させる目的で脊髄移植の試みがいくつかなされているが，神経機能の回復は満足できるものではない。圧迫性脊髄症または脊髄損傷モデルに対して神経移植を行ない，MRIを用いて非侵襲的に評価する。

【対象と方法】10週令雌ラットの椎弓切除後，胸髄または腰髄の右半分を切除し，胎生15日のラットの脊髄を移植し，これを脊髄移植モデルとした。術後下肢の麻痺の状態を観察するとともに，移植部の状態をMRIで経時的に評価した。MRI撮像は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，横断像および冠状断像を撮影し，移植部脊髄の輝度変化に注目した。最終観察後屠殺し，脊髄の病理標本を作製し，MRI所見と比較検討した。

【結果】脊髄移植術後は，いずれも右後肢の不全麻痺を呈した。9カ月の経過観察の間に麻痺は改善傾向であったが，最終観察時には軽度の麻痺が残存した。MRIで，移植部がT1強調像で等輝度，T2強調像で軽度高輝度を呈し，母床との境界が不鮮明なものは，病理組織でも移植脊髄と母床とがgapなく生着していた。しかし，移植脊髄部が白質線維のみで神経細胞をほとんど認めないものや，神経細胞を認めても線維方向の流れが，移植脊髄と母床で異なるものも存在した。T1強調像で等輝度から軽度低輝度，T2強調像で等輝度で母床との境界に低輝度領域を認めるものは，病理組織で移植脊髄部分は壊死にはなっていなかったが，母床との間にgapが存在していた。

【考察】移植神経組織の生着率を上げるために，移植組織と母床とをフィブリン糊で固めたり，各種 growth factor の併用などの報告があるが，やはり何らかの工夫が必要と考える。また，脊髄機能の回復には，移植組織を通しての neural connection の形成が不可欠と考えられ，そのためには移植組織を normal orientation で移植することが重要である。今回は慢性圧迫モデルでの実験はできなかったが，慢性モデルでは，さらに母床側の処理の問題があり，今後の課題である。

6．MRIによる内耳病変の検出

肥塚　泉，加藤　功（聖マリアンナ医科大・耳鼻咽喉科学）
瀬尾芳輝，（京都府立医科大・第１生理学）
尾崎　毅，村上政隆（生理研）

1938年，山川，HallpikeおよびCainesは，メニエール病症例に対し剖検を行い，その病因は内リンパ水腫であると報告した[1)]。現在，内リンパ水腫の存在を証明する目的で，蝸電図，脱水試験等が用いられている。しかしこれらの検査法はあくまでも内リンパ水腫の存在を間接的に証明しているにすぎない。内リンパ水腫の存在を，直接証明するには，蝸牛内に存在する，ライスネル膜（厚さ約10～20m）と呼ばれる薄い膜を描出することが必要となる。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[2)]。また最近，静磁場強度 7.05Tの NMR microscopy（AMX-300wb）を用いてモルモット摘出内耳のライスネル膜の描出に成功した[3)]。昨年度は静磁場強度4.7 TのBiospecを用いて，人側頭骨標本を対象としてライスネル膜の描出を試みたが，この試みは失敗に終わった。本年度はさらに各撮像パラメータについて検討を加え，再度，ライスネル膜の描出を試みた。

【対象および方法】

測定には正常ヒト側頭骨標本を用いた。撮影はBiospec (4.7 T，Bruker社)を用いた。パルスシーケンスはGradient Echo (TR：150.0 msec，TE：6.8 msec)，スライス厚は1.0 mm，撮影マトリックスは128 x 128あるいは256 x 256，field of view (FOV)は4.0 cm，加算回数は2回とした。コイルはスロットレゾネーターコイルを用いた。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Biospecを用いて撮影した正常ヒト側頭骨標本のMRI画像を示す。蝸牛内微細構造については，基底回転，第２回転の基底板についてはこれまでと同様，比較的良好に描出することが可能であった。今回の主目的であるライスネル膜については，蝸牛基底回転でその一部の描出が可能であった。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。今後さらに撮影シーケンスについて改良を加え，更なる高分解能を得ることが，ライスネル膜描出の重要なキーポイントになると思われる。

【参考文献】

1）Yamakawa K. Über die Pathologische Veranderungen bei einem Menierekranken. Zentral. Oto. Rhino. Laryngol. 33: 226-227, 1938
2）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
3）Koizuka I, Seo Y, Murakami M, Seo R, Kato I. Micro-magnetic resonance imaging of the

inner ear in the guinea pig. NMR in Biomedicine 10: 31-34, 1997

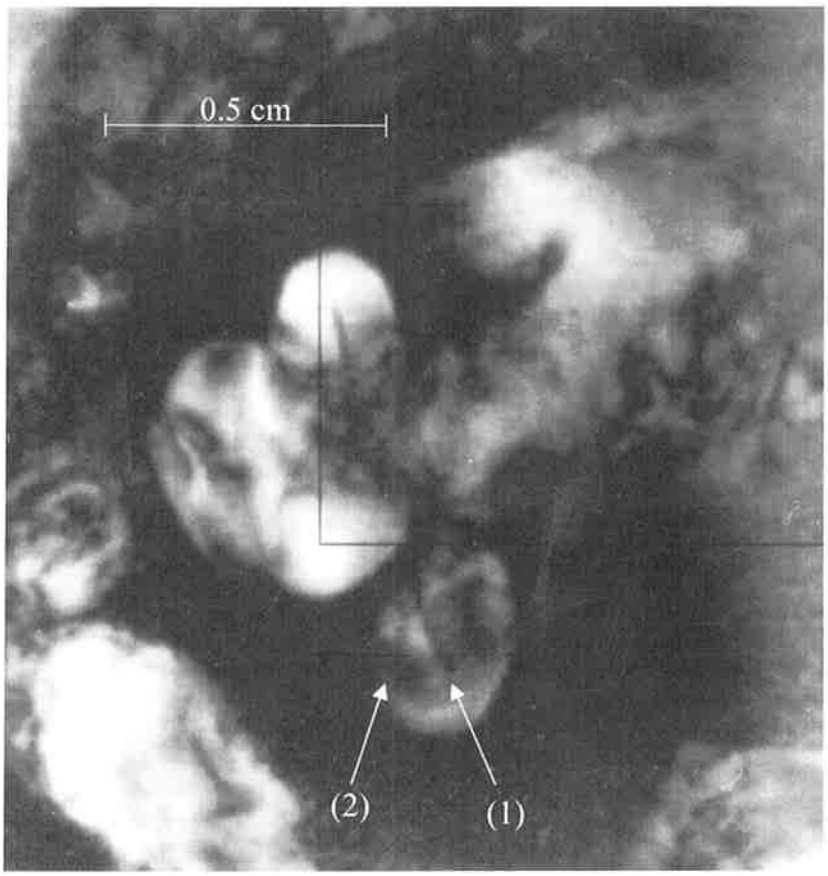


図１：Biospec（4.7T、Bruker社）を用いて撮影した正常ヒト側頭骨のMRI画像。基底板（１）、ライスネル膜（２）が描出されている。

７．ＭＲＩによるサル視覚皮質の観察と電極定位

小松英彦，花澤明俊，杉原弘記（生理研）

視知覚および視覚認知の神経機構を調べる目的で，サルの脳の視覚関連領野からニューロン活動の記録を行ない，刺激選択性や行動との関連を調べる実験を行なっている。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。マカクザルの大脳皮質には複雑な脳溝が多数存在し，また脳溝はその内部において複雑な折れ曲がりをもっている。さらにサルの脳は個体差が大きく，脳内の標的部位を精度良く同定することはステレオ座標からだけでは不可能である。今回の実験では運動立体視の研究のために上側頭溝深部に位置するMSTd野から，また色情報処理過程の研究のため視床の外側膝状体からニューロン活動の記録を行ったが，いずれの実験においても実験開始前にMRI撮影を行うことにより，極めて短時間で目的部位の同定に成功した。

8．ＭＲＩによるサル側頭葉の観察と微小電極定位への利用：下側頭葉皮質両眼視差選択性細胞の解析への応用

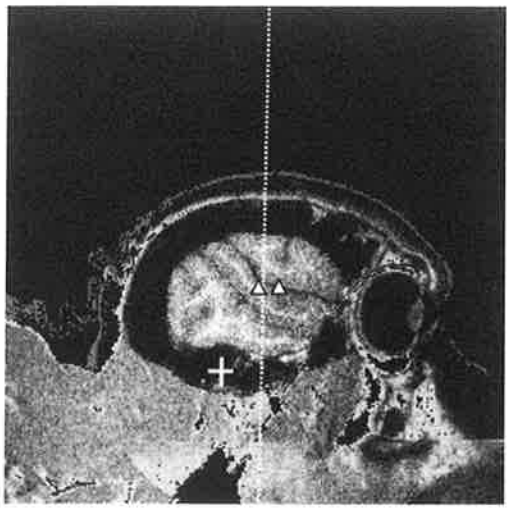
藤田一郎（大阪大・大学院基礎工学研究科）

注視課題を訓練したニホンザルの下側頭葉皮質（ＩＴ）から，単一または複数神経細胞活動を記録し，両眼視差選択性ＩＴ細胞の性質を調べた。ＩＴ細胞の視差選択性は，刺激図形の形や刺激提示位置によらず一定していた。

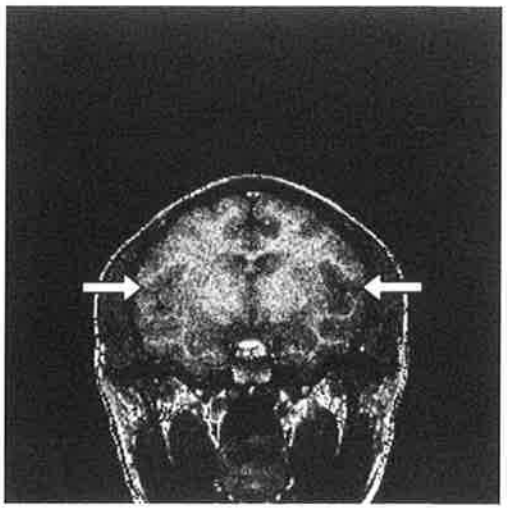
9．MRIによるサル聴覚野の観察と電極定位

力丸　裕（同志社大・工・知識工学科）
小松英彦（生理研）
山田恒仁，鳥山覚司，小畑宜久，石川高司（同志社大・工学研究科）

サルの中枢における聴覚情報処理機構を探求するために神経生理学的実験を行う。目標となる一次聴覚野は外溝内に存在し，正確な電極定位は直視では困難である。そこで，MRIにより脳構造の可視化を行った。



矢状断面の合成図



前頭断面図

正中線部分（0㎜）での輪郭が写った画像、右に眼球の写った画像（14㎜）そして一次聴覚野の写った画像（24㎜）の3枚を合成した。図中の白の十字は耳の穴の左図の破線での切断画像である。矢印は、目的とする外側溝を示している。

10. 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，泰羅雅登，田中裕二，筒井健一郎（日本大・医・第一生理）
森　茂美，森　大志（生理研）

頭頂連合野では対象物の空間内での位置や動きおよび三次元的な構造の視覚的情報が処理され，これらの空間情報は眼球運動，手の到達運動や手指による把握運動の制御に用いられていると考えられている。私達は，これまでにニホンザルの頭頂連合野から単一ニューロン活動を記録し，物体の軸の傾きや面の傾きに選択的に反応するニューロンは頭頂間溝後壁の尾側領域（cIPS），また手操作運動に関連したニューロンは頭頂間溝後壁の前部領域（AIP）に存在することを明らかにしてきた。今年度は手操作関連ニューロンについて，操作対象の三次元的形態と傾きに対する選択性について調べた。

サルに形の異なる７種類の単純な形態の操作対象（四角板，円環，立方体，球体，円錐体，円柱，角柱）と２種類の複雑な形態の操作対象（溝内ボタン，溝内小板）を手前に引く操作を訓練した。図１は操作対象の形態に高い選択性を示すニューロンの例で，溝内ボタンに強い反応を示した。明所では手操作に先行する注視期に活動の上昇があり，操作期にも持続的な活動がみられ

た（図１A左）。しかし対象が見えない暗所での操作では活動はみられなかった（図１A中）。手操作を伴わない対象注視課題では持続的な活動がみられた（図１A右）。このニューロンは図１Bに示した７種類の単純な形態の操作対象にはいずれも反応しなかった。また，溝と方位の同じ縦の角柱や，構造のよく似た溝内小板にも反応しなかった。したがって，縦の溝とその中のボタンという複合図形に特異的に反応する視覚優位型ニューロンと同定された。また，操作対象の方位を三次元的に変化させ，その選択性について調べた。図２はその１例で，垂直の角柱と円柱に強い反応を示し，溝内ボタンにも反応したが，溝内小板にはほとんど反応しなかった（図２A）。矢状面での方位選択性を円柱で調べてみると，垂直な軸（90度）に鋭いピークがみられたが（図２B），矢状方向（０度）の円柱には全く反応しなかった。したがって，このニューロンは形態によらず，長軸の方位が垂直な対象に選択的に反応するニューロンと考えられる。

以上の結果から，頭頂間溝外側壁の前部領域には対象の三次元的形態と傾き（方位）に手の形や傾きを合わせる上で必要な視覚情報を統合し，手操作運動の制御の過程で重要な役割を果たしていることが示された。

A．論　文

1．Sakata H, Taira M, Kusunoki M, Murata A, Tanaka Y & Tsutsui K (1998) Neural coding of 3D features of objects for hand action in the parietal cortex of the monkey. Philos Trans R Soc Lond B Biol Soc 353(1373):1363-1373

2．Taira M, Kawashima R, Inoue K & Fukuda H (1998) A PET study of axis orientation discrimination. NeuroReport 9(2):283-288

3．宮下有紀子，Win Nyi Shein，村田　哲，田中裕二，酒田英夫 (1998) サル頭頂葉の手操作関連ニューロンの視覚反応について：三次元形態と方位に対する選択性　リハビリテーション医学 35(12):926-935

B．学会発表

1．Endo K, Haranaka Y, Adams DL, Kusunoki M & Sakata H (1998) Effects of different types of disparity cues on the response of axis-orientation selective (AOS) cells in the monkey parietal cortex. Soc Neurosci Abstr 24, 1397

2．Tsutsui K, Yara K, Jiang M, Taira M & Sakata H (1998) Representation of surface orientation by texture gradient in neurons of the caudal intraparietal sulcus area of the monkey. Neurosci Res Suppl 22, S186

3．Sakata H, Taira M, Kusunoki M, Murata A, Tsutsui K, Tanaka Y, Win NS & Miyashita Y (1998) Neural representation of 3D features of objects for manipulation with stereopsis. Symposium "The neural basis of hand dexterity" Abstr., Monte Verita, Ascona, Switzerland

4．Murata A, Gallese V, Luppino G, Kaseda M & Sakata H (1998) Selectivity of hand manipulation task-related neurons in the anterior intraparietal (AIP) area of the macaque. Symposium "The neural basis of hand dexterity" Abstr., Monte Verita, Ascona, Switzerland

5．宮下有紀子，Win Nyi Shein，村田　哲，田中裕二，酒田英夫 (1998) サル頭頂葉の手操作関連ニューロンの視覚反応について：三次元形態と方位に対する選択性　第35回日本リハビリテーション医学会学術集会　プログラム／抄録集 324

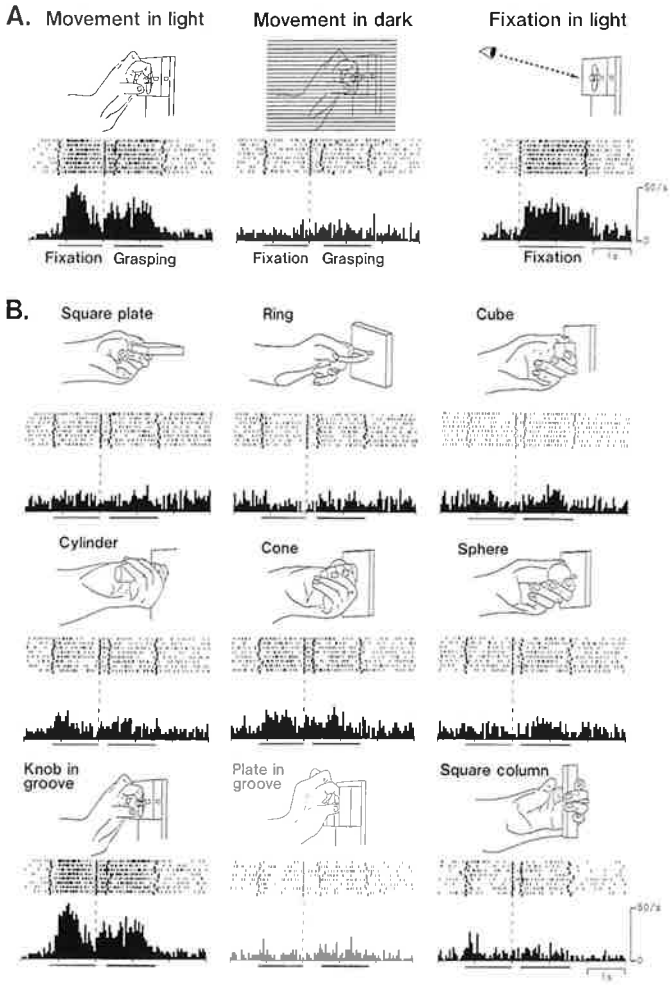


図1.複雑な形態に高い選択性を示すニューロン
A.各課題に対応する反応：このニューロンは暗所での手操作に反応のみられない視覚優位型ニューロンである。操作時だけでなく，対象の注視だけもニューロン活動がみられる対象型ニューロンである。
B．各操作対象に対する反応：このニューロンが反応を示すのは溝内小板だけであり，他の操作対象には有意な反応はみられない。

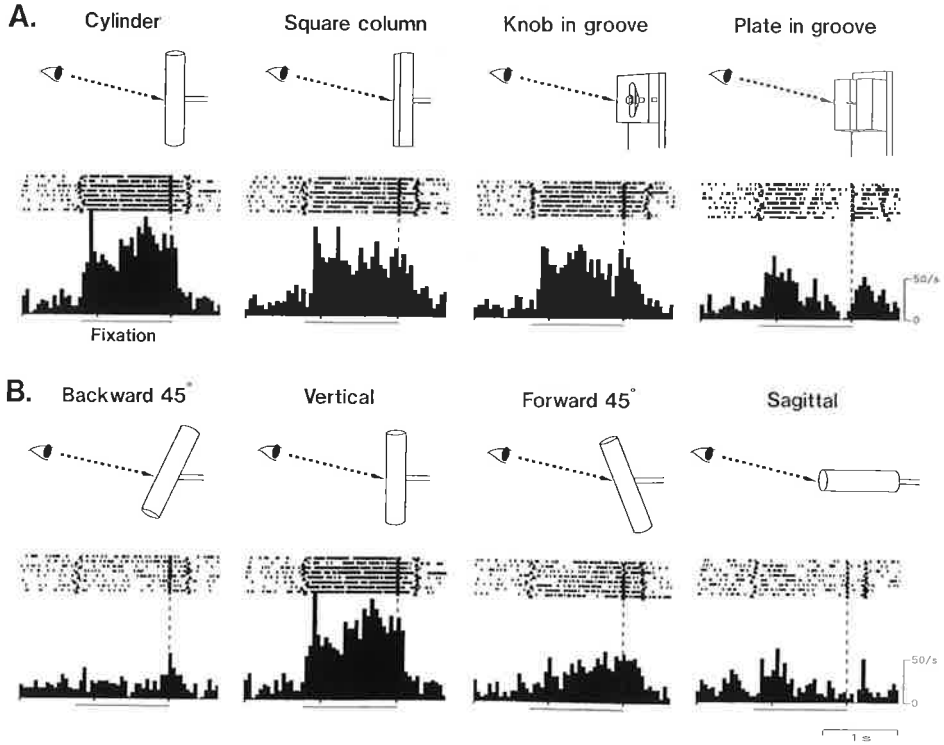


図２．方位に選択的なニューロン
A．各操作対象に対する反応：垂直の軸をもつ操作対象に反応した対象型ニューロンである。溝内小板に対する反応は低い。これらの操作対象以外には反応を示さなかった。
B．方位の変化に対する反応：円柱の方位を矢状面で変化させると，垂直の円柱に対する反応が最も高い。

11．サル大脳皮質前頭葉の脳定位イメージング

小川　尚（熊本大・医）
井福裕俊（熊本大・教育）
森　茂美・松山清治・森　大志（生理研）

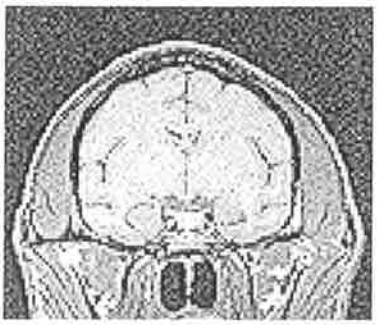
【目的】サルの味覚識別には前頭弁蓋部や前頭眼窩野が最も重要な働きをすることが示唆されている。しかし，前頭弁蓋部や前頭眼窩野を含むサルの前頭葉の脳定位地図は未だ作成されておらず，味覚識別の神経機序を明らかにする上での大きな障害となっている。

そこで本研究では，磁気共鳴装置を用いて非破壊的にサル大脳皮質前頭葉の脳定位地図を作製することにした。

【方法】実験には，生理学研究所・生体システム部門所属のニホンザル２頭（雄8.6kg，雌7.8kg）を用いた。全身麻酔したサルの頭部をアクリル製の脳定位固定装置に固定した後，磁気共鳴装置用プローベ（直径20cm）に装着し，前頭葉を中心とした領域の前額・水平・矢状断面のMRI画像を2〜3mm間隔で撮影した。これらのMRI画像をもとに大脳皮質前頭葉の脳定位地図を画像処理ソフト（Photoshop 5.0，Adobe社製）を用いて作成した。

【結果・考察】下図は前額断面のMRI画像の一例である。このように比較的解像度の高い画像が得られたため，AP０からA56まで２mm間隔で撮影することができた。これまで，ニホンザルの脳地図では前頭葉はA23までであった（Kusama and Mabuchi, 1970）ので，本研究ではかなり詳細な前頭葉の脳地図が作成されたことになる。

現在，食塩水-水弁別GO-NOGOタスク時のサル大脳皮質前頭弁蓋部および前頭眼窩野のニューロン活動を，カーボンファイバー・ウッズ合金封入ガラス管多連微小電極を用いて記録しているところである。今後，この記録部位の同定に，本研究で作成した脳定位地図を用いる予定である。



図：前額断面（A20）のMRI画像の一例（ニホンザル雄8.6kg）

第19回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ

（1999．3．10）

＜討論参加者＞

瀬尾芳輝（京都府立医大），成瀬　達，関　泰長（名古屋大・医），肥塚　泉（聖マリアンナ医大），田中裕二（日本大・医），藤田一郎（大阪大・医），森田啓之（岐阜大・医），福岡宗良（名古屋市大・医），山田恒仁（同志社大・工），小松英彦，村上政隆，今野　卓，永山國昭（生理研）

【概要】

1998年度の共同利用実験成果を検討し，1999年度の実験研究計画を打ち合わせるため，第19回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップを1999年3月10日開催し，1998年度及び1999年度共同利用実験研究者（所外9名，所内4名）を対象として，1998年度の利用報告，共同利用のガイダンス，今後の装置改善等について打ち合せが行われた。

【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

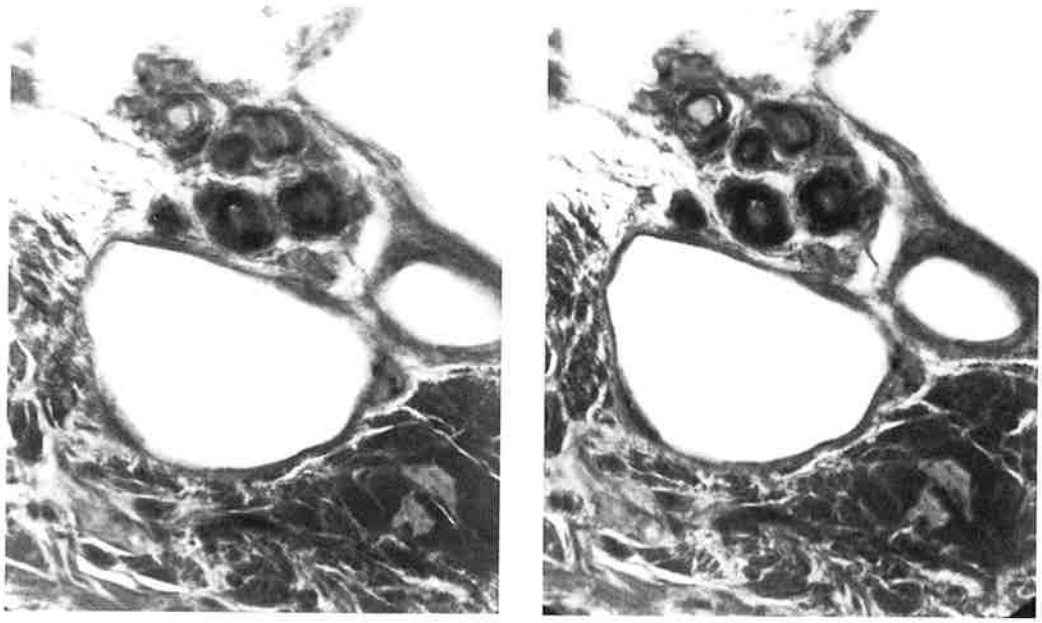
〔目　　次〕

1. 再植歯または再生歯根膜機械受容器の立体微細構造（野田坂佳伸 他）・ 222
2. 内部寄生性肉食菌類胞子の超高圧電顕的研究（犀川政稔 他）…… 223
3. *Acanthamoeba* の分化プロセスの超高圧電顕的研究（Ⅲ）
（鶴原　喬 他）…… 225
4. イソアワモチ類外套の筋線維の形態：厚切切片の超高圧電顕観察
（片桐展子 他）…… 226
5. ヒト腎糸球体メサンギウム細胞表面の機能分子の解析（追手　巍 他）‥ 228
6. 腎糸球体上皮細胞の細胞骨格及び細胞間接着装置（矢尾板永信 他）… 229
7. 分離培養破骨細胞における酸指向性アミンDAMPで可視化される
酸性領域の三次元解析（明坂年隆 他）…… 230
8. 骨格筋トロポミオシンの結晶構造の超高圧電子顕微鏡法による解析
（谷口美恵子 他）…… 231
9. アクチンの高分解能観察とアクチン複合体のクリスタルの電子線
回折（一海孝光 他）…… 232
10. 有機物結晶の電子線照射損傷（大野　完 他）…… 234
11. 網膜ニューロン間のギャップ結合様式：双極細胞の樹状突起
（日高　聡）…… 236
12. 超高圧電顕とエネルギーフィルター電顕とによる厚切り切片像の
比較（野田　亨）…… 237
13. 神経突起のバリコシティの三次元構造解析（遠藤泰久 他）…… 238
14. 神経系細胞におけるグルココルチコイド受容体の細胞内局在様式
とその変化 ー超高圧電子顕微鏡による免疫電顕的観察ー
（小澤一史 他）…… 239
15. カイコシスティンプロテアーゼ(BCP)前駆体の構造（高橋　進）…… 240
16. 精巣輸出管の頂部細管の三次元構造解析（石田哲也 他）…… 240
17. 超高圧電子顕微鏡によるastro-glia細胞突起の三次元定量解析
（濱　　清 他）…… 242

1．再植歯または再生歯根膜機械受容器の立体微細構造

野田坂佳伸，鎌田　勉（北海道大・歯）
有井達夫（生理研）

歯根膜機械受容器は神経終末にあって構造的に複雑な分岐を持った構造からなる。この受容器は歯にかかる圧受容に関与し，顎運動反射の調節に重要な働きを持つ。矯正歯科治療などにおいて外部的な力によって歯の移動を行った場合，歯根膜もまた組織学的変化を受ける。矯正力の負荷は数カ月から１年という長期に及ぶが，それに伴って各時期に相応する組織的変化がある。従って機械受容器の応答にも神経生理学的に変化する。ネコ犬歯に矯正力をかけた場合に負荷直後から10日までにおこる歯根膜機械受容器の応答の変化について検討したところ，負荷４日くらいの初期に応答閾値が上昇することがわかった。この変化に相応して受容器自身の微細構造の変化を明らかにしようとしたが，今までのところ見いだすことに成功していない。歯根膜機械受容器は歯を取りまいて縦（垂直）方向と横方向に分布するが，矯正力を負荷した場合にはその受容器の位置によって圧迫をうける場合と，牽引をうける場合がある。従って受ける影響も位置によって変わると思われる。また長い矯正の治療期間には歯槽骨や歯根膜など歯周組織に組織的な改変が起こるので，それに伴う機械受容器を含む神経組織にもおおまかな組織的改変が起こる。



図：ネコ犬歯歯根膜に観察された血管組織に隣接した神経組織　プラスマイナス8度傾斜、1500倍

他方，歯を一度，抜歯し，再植した場合には歯根膜機械受容器が歯とともに抜歯された場合，神経との連絡は絶たれ再植時に，新しく新生されるなどして，また歯根膜の機能が再生される。このような組織的改変に伴う歯根膜機械受容器の微細構造の変化は興味あるところであり，本研究テーマの意図するところであった。しかし本年度では矯正力負荷初期での微細構造の観察に留まり，上記のような大きな組織改変に伴う変化を見いだすまでに至らなかった。

方法的にはネコ犬歯に100ｇの矯正力をかけたのち，通法により灌流固定し，脱灰し，エポキシ包埋し普通透過電顕用には0.5ミクロン，超高圧電顕用には2ミクロンの切片を作成して，1000kV超高圧電顕（日立H-1250M）にて検鏡した。図に示すものは血管に隣接してみられた神経組織で，プラスマイナス８度に傾斜して立体写真として撮影したものである。

2．内部寄生性肉食菌類胞子の超高圧電顕的研究

犀川政稔（東京学大・生物）
有井達夫（生理研）

アオカビやコウジカビはとっくり形のフィアライドという細胞からフィアロスポアと呼ばれる胞子をつくる。微小動物に寄生する内部寄生菌類では，ワムシに寄生する*Rotiferophthora*とセンチュウに寄生する*Verticillium*の２属はフィアライドが輪生する点で互いによく似た菌類である。しかし，前者はフィアロスポアのほかに寒天中に多細胞で褐色をしたディクチオクラミドスポアをつくるという特徴をもち (Barron, 1991)，また，胞子がワムシに飲み込まれることによって感染する。それに対し，*Verticillium*は多細胞胞子をつくることはなく，フィアロスポアがセンチュウ体表に付着して感染する。

本研究では，２種のワムシ寄生種（*Rotiferophthora angustispora*と*Rotiferophthora sp.*）と２種のセンチュウ寄生種（*Verticillium balanoides*と*V. coccosporum*）のフィアロスポアを超高圧電顕で観察した。その結果*Rotiferophthora* sp.の胞子は，先端部に無数の，長い糸状の付属物をもっていたが(Fig. 1, 矢印)，*V. balanoides*と*V. coccosporum* (Fig. 2, 矢印)の胞子には長い糸状の付属物はなく，その代わり，胞子先端部全体に粘着層が存在した。この層は*Drechmeria coniospora*の場合 (Saikawa, 1982b)と同様に，細胞壁の外層の部分が一定の長さにのびてできていた。

センチュウ内部寄生菌で唯一飲み込まれタイプとして知られる*Harposporium*も胞子基部に糸状の付属物をもっていることが知られている (Saikawa, 1982a)。今回の観察では*R. angustispora*の胞子は外側に何もつけていなかったが，胞子は，飲み込まれタイプでは糸状の付属物を，付着タイプでは粘着層を感染直前にもつようになるのではないかと思われる。Gams (1988)は，ディクチオクラミドスポア形成を評価せず，両者とも*Verticillium*であるとしているが，以上述べたように明らかにそれと*Rotiferophthora*とは別の属である。

引用文献

1) Barron, G. L. 1991. A new genus, *Rotiferophthora*, to accommodate the *Diheterospora*-like endoparasites of rotifers. Can. J. Bot. 69: 494-502.

2) Gams. W. 1988. A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. Neth. J. Pl. Path. 94: 123-148.

3) Saikawa, M. 1982a. Ultrastructure of conidia of *Harposporium anguillulae* Lohde. J. Electron Microsc. 31: 90-92.

4) Saikawa, M. 1982b. Fixation of germinating conidia of *Meria coniospora* Drechsler with $KMnO_4$. J. Electron Microsc. 31: 276-277.



Fig. 1
A conidium of *Rotiferophthora* sp. bearing a fibrous appendage (arrows) on the apex. Bar, 1 μm.

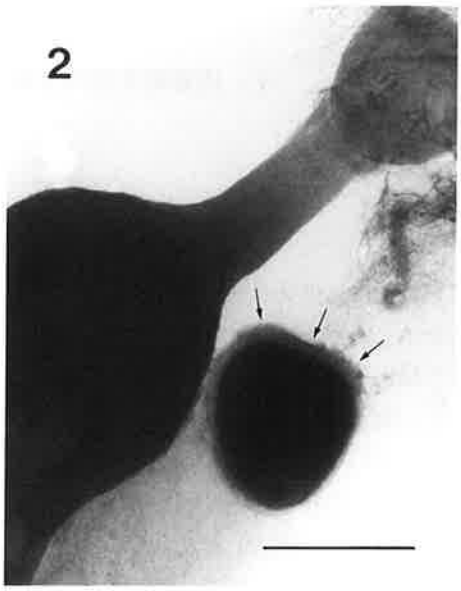


Fig. 2
Verticillium coccosporum conidium on which a thick mucous layer (Fig. 2) is seen after liberation from a phialide. Another conidium remains still on the mouth of the phialide. Bar, 1 μm.

3．*Acanthamoeba* の分化プロセスの超高圧電顕的研究（III）

鶴原　喬・笠原秀浩・加藤　高（東京学大・生物）
有井達夫（生理研）

Acanthamoeba の生活環は棘状擬足を有して運動性に富み分裂・増殖を行うアメーバ型（栄養型；trophozoite）と飢餓や乾燥などの悪条件下で生存可能な二重の壁に囲まれたシスト型（cyst：嚢胞）に分けられる。これらの分化の詳細なプロセスなど不明な点も数多く，従って興味あるところでもある[1)]。今実験では土壌より分離しクローン化した*A. comandoni*（GS89-1057株）をシスト化して試料として用いた。この*A. comandoni*は脱シストの際に使用する脱出孔に相当するostiole数が多く，細胞体と脱出孔との関連を形態学的に観察するのに非常に有効と考えられる。低真空走査型電子顕微鏡による簡便な試料作製法[2)]により金属などのcoatingなしに観察すると脱出孔と細胞体のつながりを容易に認めることが出来る（図１）[3)]。しかしながら微細な形態に関しては情報が得難く，透過型電子顕微鏡による切片像が不可欠である。図２に低倍率の超高圧電子顕微鏡像を示すが，今後は超高圧電子顕微鏡による内部構造の観察，特にステレオ像による３次元構築と低真空走査型電子顕微鏡の観察像を組み合わせることにより*Acanthamoeba* の２層のシスト壁の形成過程と ostiole との関連，脱シスト時の細胞体と脱出孔の蓋であるoperculum との関連などについて詳細な検討を進めたい。

引用文献

１）Nagata, M., et al.: Bulletin of Tokyo Gakugei Univ., Sect.IV, 50, 51-65, 1998.
２）Suzuki, T., et al.: Bulltein of Plankton Society of Japan, 42(1), 53-62, 1995.
３）笠原秀浩他：　日本電子顕微鏡学会　第55回学術講演会（名古屋）1999.

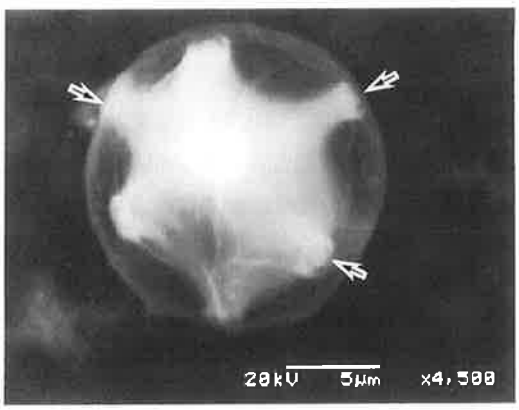


図１．低真空SEM像

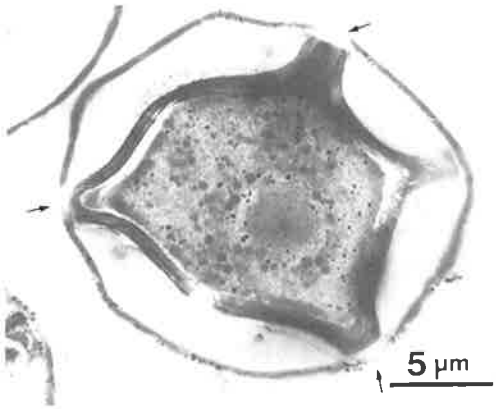


図２．超高圧TEM像（矢印：ostiole）

４．イソアワモチ類外套の筋線維の形態：厚切切片の超高圧電顕観察

片桐展子（東京女医大・総合研）
片桐康雄（東京女医大・看護・基礎科学）
有井達夫（生理研）

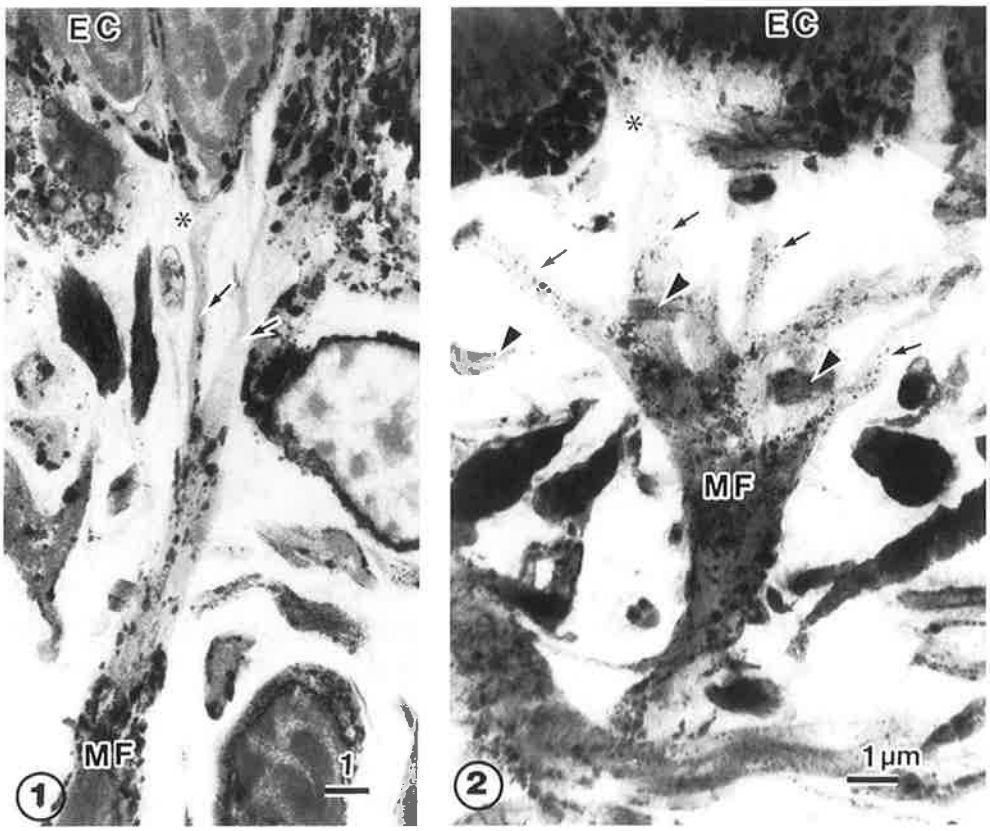
イソアワモチ類の外套背表は多数の小突起で覆われ，その中に背眼を有する担眼突起が分布する。動物は移動時に担眼突起を外套表面に垂直に伸ばしており，小さな陰影を与えるとその下の担眼突起や小突起が局所的に収縮し陰影反応がみられる。外套の結合組織内には多数の筋線維が縦横に分布し背眼に密接するものがある。外套の筋線維の基本的な形態と位置関係を明らかにするため，厚切り切片を超高圧電顕で観察した。

材料と方法：Onchidium sp. 類 (軟体動物，腹足類) の幼動物 (体長4mm 前後) を用いた。一個体を２％オスミウム酸水溶液で40℃，48時間加温処理，脱水過程で酢酸ウランでブロック染色，エポン樹脂に包埋した。0.5 μm と 1.0 μm 厚さに交互に準薄切し連続切片を作成，切片をグリッドに載せその上にホルムバール支持膜を貼った。0.1％トルイジン青液で染色して光顕で観察後，酢酸ウランと鉛染色し，超高圧電顕（H-1250M，1000kV）で観察した。一定倍率で撮影，同倍率に写真を引伸ばし筋線維を立体再構築した。

結果と考察：外套の皮下組織には多数の平滑筋線維が諸方向に走行する。筋線維（径0.4～3 μm，長さ約125 μm）は横断像では楕円形，縦断像では直線的に伸びる部分と波状の部分がみられ，各周囲部で最大径（約5 μm）を示す。多くは一端または両端で分岐し他の線維と交差する。筋線維はヘテロクロマチンに富んだ楕円形の核，細胞内部には電子密度の高い２種（太いと細い）

の細線維，細胞周囲に多数の小陰窩が特徴である。外套組織の下半部側では一群の筋線維が縦または横方向に互いに直交するように走行している。背眼の外側にある筋線維は背眼に向かって斜めに走行，上方にむけて２～３分し表皮細胞の下で終わる。外套組織を垂直に走行する筋繊維は表皮細胞の下で分岐し末端は基底膜で終わる（図１，２）。

イソアワモチ幼動物外套の筋繊維は長大な細胞で複雑な形態を示した。筋線維の存在部位や固定時の状況によると思われるが，外套上の小突起が局所的な収縮することに関係しているのかも知れない。



(図１)　外套の皮下組織を垂直に走行する筋線維 (MF)。上方で２分 (↓)し，末端は表皮細胞（EC）の下で終わる (*)。
(図２)　外套の皮下組織の筋線維 (MF)。表皮細胞（EC）側で多数の分枝 (↓)がみられ，横走する筋線維（▼）と交差する。筋線維の末端は表皮細胞の下で終わる (*)。

5．ヒト腎糸球体メサンギウム細胞表面の機能分子の解析

追手　巍，森岡哲夫（新潟大・医・腎研・機能制御）
有井達夫（生理研）

ヒト・メサンギウム細胞上の機能分子についてはアンギオテンシン Ⅱ レセプター，ある種の細胞接着分子などが知られているが，糸球体内皮細胞との接着部位に発現する機能分子についての研究は未開発である。今年度は，昨年度に引き続いて混合培養した両細胞の接着部位をレザー顕微鏡(MRC-1000,Bio-Rad)，超高圧電子顕微鏡(生理研）で観察した。また，ラット培養メサンギウム細胞上に存在する内皮細胞との接着部位に局在する Thy-1.1 分子の特異エピトープ（単クローン抗体 1-22-3 対応エピトープ）の分子内局在も GST融合蛋白法により決定した。

（方法）ヒト・メサンギウム細胞の培養：既報（生理学研究所年報 10:283,1989）のごとくラットの場合に準じて行った。ヒト糸球体内皮細胞の培養法：市販の細胞を継代6代目以内で用いた。第８因子関連抗原の存在，アセチル化 LDL の取り込みにより内皮細胞の特異性をチェックした[1]。両細胞の混合培養法は，既報[2] の方法を一部改変して行った[3]。培養細胞全載標本作製は以下のごとく行った。Formvar 膜被覆メッシュ上に両細胞を混合培養し，一定期間後37度Ｃに加温した 2.5 % グルタール溶液中で細胞を固定する。１% オスミウム酸で後固定，２%ウラニル水溶液中で30分染色する。段階的に濃度を上げてエチルアルコール溶液で脱水し，臨界点乾燥後，カーボン蒸着した。

（結果及び考察）１）1-22-3反応分子がメサンギウム細胞の内皮細胞との接着面に優位に発現している事が再確認された。　２）GST 融合蛋白法により，この対応エピトープは Thy-1.1 分子のＮ末から66番目までの特定部位を認識するもので，OX-7 の認識する部位とは明らかに異なる事が判明した。以上の事から超微形態学的局在及び蛋白分子的にも Thy-1.1 分子上，異なるエピトープを認識しうる単クローン抗体が得られた事が明らかになった。今後はこのエピトープと細胞機能との相関，細胞外への産生機構などの解析が焦点となる。

（参考文献）

1．Oite T, Suzuki Y, Morioka T, Saito M, Shimizu F. Efficient isolation of rat aortic endothelial cells by elimination of contaminating cells with a monoclonal antibody. Microvasc. Res. 50: 113-118, 1995.

2．Saeki T, Morioka T, Arakawa M, Shimizu F, Oite T. Modulation of mesangial cell proliferation by endothelial cells in coculture. Am. J. Pathol. 139:949-957, 1991.

3．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. 4: 350-360, 1996.

4．Narisawa-Saito M, Kimura S, Fujiwara N, Oite T, Shimoji K, Shimizu F. Thy-1-mediated phosphatidylinositol turnover in cultured rat glomerular mesangial cell. J. Cell. Physiol. 168:

705-710, 1996.
5．追手　巍，森岡哲夫　腎糸球体における内皮細胞とメサンギウム細胞の相互作用　日本腎臓学会誌　40: 75, 1998.（日本腎臓学会学術総会シンポジウム，演題抄録）

6．腎糸球体上皮細胞の細胞骨格及び細胞間接着装置

矢尾板永信（新潟大・医・腎研・構造病理）
追手　巍（新潟大・医・腎研・機能制御）
有井達夫（生理研）

腎糸球体の主要な役割は，血液ろ過である。この過程は，有窓内皮細胞，基底膜，糸球体上皮細胞より成る糸球体係蹄壁を通じて行なわれる。中でも，糸球体上皮細胞は係蹄壁の最外層をなし，糸球体透過性に大きく関わっていることが示されている。

糸球体上皮細胞は，タコ足細胞と呼ばれるごとく細胞突起を四方に伸ばし，その先端は細かい足突起となり糸球体基底膜を被っている。この形態学的位置関係から足突起形成消失，及び細胞間接着装置のスリット膜面積の増減は，糸球体ろ過に直接的な影響を与えうる。したがって，足突起とスリット膜の形態学的理解は，糸球体ろ過の調節機構を知る上で避けて通れない過程である。しかしながら，通常の透過型電子顕微鏡では，足突起中の細胞骨格であるミクロフィラメント及びスリット膜を観察し，他の構成成分との位置関係を検討することは，その三次元的広がりのために容易ではない。そこで超高圧電子顕微鏡で厚い切片を観ることによって，これらの組織構築の観察を試みた。

超高圧電子顕微鏡によって，走査型電顕と透過型電顕の双方の性質を合わせ持つ画像を得た。足突起の全体像を観察できると同時に，足突起の内部構造も観察できた。特に，ミクロフィラメントが，一次突起から突出する複数の足突起のうち隣り合う足突起同士をアーチ状に結び付ける様子を明確に認めることができた。また，内皮の窓，基底膜，足突起を重ねてみることができ，ろ過液の通る道筋の三次元的な位置関係を角度を変えて撮ったステレオ写真によって捉えることができた。以上のように超高圧電子顕微鏡による観察は，従来把握の困難だった糸球体係蹄壁，足突起の内部構造の三次元的観察を容易にした。残念ながらスリット膜及び一次突起内の細胞骨格構造は，鉛ウランの二重染色では通常の電子顕微鏡以上に示すことはできなかった。これらをよりよく観察するためには，対象物を特異的に染め出す方法が必要となると考えられた。

7．分離培養破骨細胞における酸指向性アミンDAMPで可視化される酸性領域の三次元解析

明坂年隆（朝日大・歯・解剖２）
有井達夫（生理研）

細胞内外の酸性化は必須の細胞活動であり骨を吸収する破骨細胞では液胞型プロトンポンプによって細胞内外の酸性環境が維持されることが知られている。ポドゾームによる強固な接着によって骨面と細胞の間に微小環境が形成されその部が酸性環境となりより能率よく骨基質崩壊が引き起こされる。いままでの破骨細胞の酸性領域の可視化はすべてpH指示薬が細胞が生存している間に取り込まれてその蛍光を観察する手法であるがin vitroでの破骨細胞による骨吸収像の再現には何十ミクロンの厚みをもった骨片上で行われるため骨のもつ自家蛍光によって細胞内に取り込まれた蛍光物質の局在が不明であった。今回用いた酸指向性アミン3-(2,4-dinitroanillino)-3'-amino-N-methyldipropylamine (DAMP) は生きた状態では細胞膜を自由に通過でき内外の酸性環境に集積し化学固定によりその場に捕捉され化合物にはハプテンの作用を示すdinitrophenol (DNP) 基を有することから一次抗体としてDNP抗体，さらに二次抗体としてIg-G-FITCをラベルすると顕微鏡下で酸性環境が蛍光像として可視化できるし，HRPでラベルしてDABで処理すると電子顕微鏡下で可視化できる。そこで今回我々は共焦点レーザー顕微鏡で蛍光像としてまた超

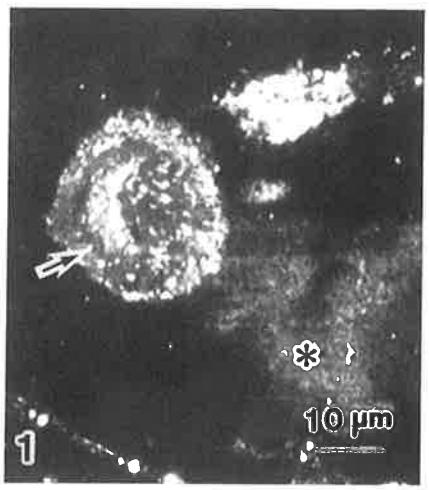


図１　骨面上で培養した破骨細胞で細胞内（arrow）の他に骨吸収窩（＊印）も低pH領域であること示した共焦点レーザー顕微鏡による所見。細胞内では吸収窩に面した部分に強いDAMP陽性領域が見られる。

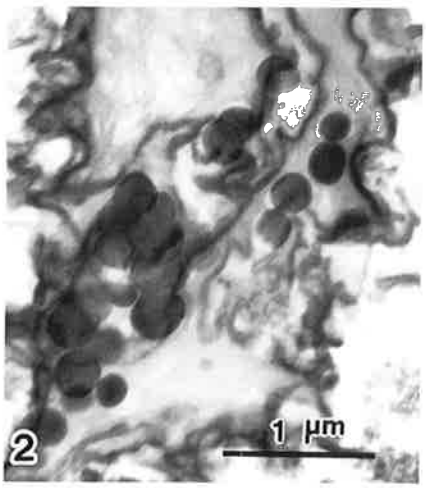


図２ 超高圧電子顕微鏡で見た厚切り切片による破骨細胞DAMP陽性領域。細胞内の小胞，細管系オルガネラにDAB陽性所見がみられる。

高圧電子顕微鏡により厚切り切片像として骨片上で分離培養した破骨細胞の骨吸収に関わる酸性環境を可視化し細胞機能との関連の検討を行った。分離破骨細胞の細胞質には広範囲にDAMP陽性領域が存在しGolgi装置とそれらに関連する小胞細管系オルガネラがそれに相当する。骨吸収を行う活発な破骨細胞では強いDAMP反応が細胞内と一部細胞外の骨吸収窩に相当する領域に認められそれらの部が低pHであることを示している。休止期の破骨細胞にもDAMP陽性領域が常に存在していたがその領域も細胞辺縁に限られたものであった。またガラスまた骨面上で培養した破骨細胞ではDAMPで可視化される領域は異なりガラス面上の細胞は核周囲の細胞質に限局していたが骨面上では多様な像を呈し骨吸収活性と破骨細胞内の低pH領域の分布とpHの指示薬としてのDAMP蛍光強度は同調していた。

8．骨格筋トロポミオシンの結晶構造の超高圧電子顕微鏡法による解析

谷口美恵子，山口卓男（名古屋大・理・物質理学）
有井達夫（生理研）

骨格筋トロポミオシンは筋肉中に多く存在するタンパク質であり，筋収縮の制御に関係していると考えられている。分子量は32758のサブユニット2分子で構成していて，長さは400Å，ほとんどがαヘリックスの2つのペプチド鎖が2重コイルを作っている。比較的容易に結晶化できるのでBailayをはじめとして多くの人々によって結晶構造解析されてきた。しかしながらトロポミオシンの結晶は90%以上の溶媒水を含んでいることからX線回折法による結晶構造解析は限界分解能は9Åにとどまつている。最近トロポミオシン分子の一部がNMRで明らかにされつつあるが(Geenfield et al.,1998)。一方Avila-SakarらはCryo-電子顕微鏡法でspot-scan image のフーリエ変換で7 Åまでの回折点を得ている。今回我々は透過性が高く厚い結晶の観察に有利な超高圧電子顕微鏡（H-1250M）を用いて実験を行なった。トロポミオシン結晶はBaileyの方法で作成した。無染色のまま及び抗体ーナノゴールドで染色しものを倍率5－6万倍で撮像した。超高圧電子顕微鏡の加速電圧は500kV と1000kVを使用した。露光時間は8sec，Filmはフジ FGで撮影した。撮った電子顕微鏡像及び回折像はスキャナー（POLASCAN 45）を用い1200-2000dpiモノクロ12bit(4096階調）でデジタル画像にした。取り込んだデータはNIH Imageでフィルタリング，フーリエ変換など画像処理をおこなった。 Fig. 1はトロポミオシンの結晶の電子顕微鏡像を示す。ユニットセルはa=156 Å, b=252 Å, c= 407 Å の斜方晶であることが分った。

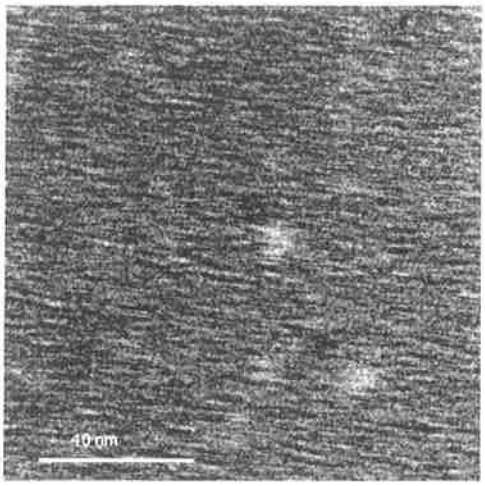


Fig. 1a　トロポミオシンの結晶の電子顕微鏡像



Fig. 1b　Fig. 1a のフーリエ変換像

9．アクチンの高分解能観察とアクチン複合体のクリスタルの電子線回折

一海孝光（愛知県芸大)
有井達夫（生理研）

低塩濃度の緩衝液中のアクチンは，モル比にしてATPがアクチンの2倍以上過剰に存在すると重合する。又このフィラメント状のアクチンはクリスタルをつくりやすい。このときに出来る微小なクリスタルの電子線回折を超高圧電子顕微鏡を使って調べた。超高圧電子顕微鏡はDQEが高く回折の観察に優れている。回折は最高1000kVに加速された電子線を使い，Low Dose の電子線照射法によって観察した。超高圧電子顕微鏡にはイメージングプレートを装着することが可能なので，これを用いると短い露光時間で回折像が得られ，試料への電子線照射が少なくてすむ。さらに超高圧電子顕微鏡では低温での観察が可能である。液体窒素を用いて試料を急速凍結し，-160℃で回折を見ることにより観測中に水がクリスタルから蒸発するのを防ぐことが出来る。今回の実験ではアクチンのみのクリスタルからの回折像を得ることはできなかったが，Acto-DNase1のクリスタルから(13.8オングストローム)$^{-1}$の反射が得られた(Fig.1)。アクチンのマイクロクリスタルは(13.5オングストローム)$^{-1}$の層線反射を生じると言われている（1)。電子線回折のコントロール実験としてリゾチームのクリスタルからの回折像をFig.2に示した。このリゾチームのクリスタルは染色することもなく，しかも室温で観察したが，はっきりとした回折像を示した。クリスタルが電子線照射のために壊れていくのを，連続な回折像として観察することもできた。

格子の間隔は以前に，谷口らによって報告されたものと一致している（2)。このような結果から考えて，(13.8オングストローム)$^{-1}$ の反射はActoDNase 1のクリスタルから来る回折像と考えられる。

（1）Curmi, P. M. G., Tulloch, A. V. D. P. A., and dos Remedios, C. G. (1983) Actin Structure and Function in Muscle and Non-Muscle Cells pp 45-52 Academic Press Australia (dos Remedios, C. G. and Barden, J. A. ed.)。

（2）谷口美恵子，荒金宏臣，谷 孝二，有井達夫（1996）生理学研究所年報 第17巻 280-281。

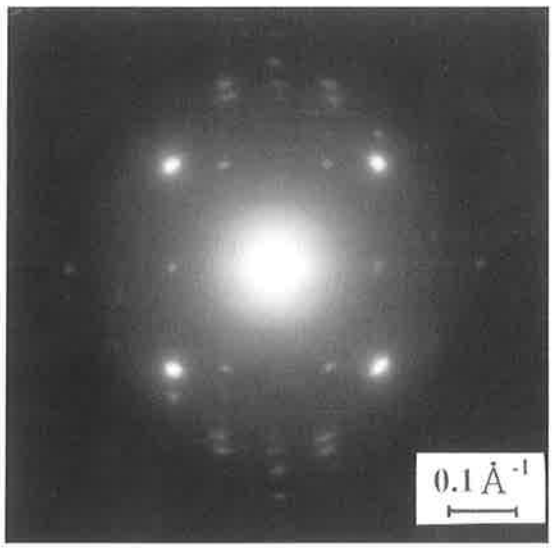


Fig. 1 Acto-DNase1のクリスタルからの回折像

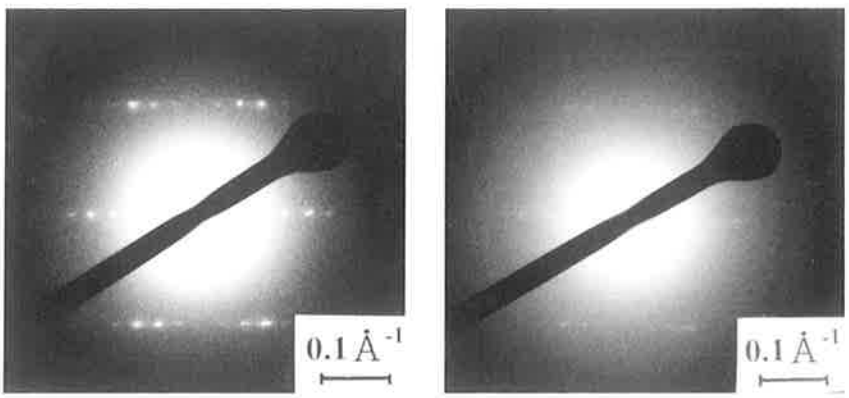


Fig. 2 リゾチームのクリスタルからの回折像 （1および2は連続して撮影された同一場所からの回折像）

10. 有機物結晶の電子線照射損傷

大野　完，仙石昌也（愛知医大）
有井達夫（生理研）

電子顕微鏡は，物質の結晶構造，結晶形などの解析には非常に有効な手段であり，金属微粒子に関しては，非常に多くの成果が得られてきた。しかしながら，有機物微粒子に関しては結晶構造，結晶形などの研究がほとんどなされていない。有効な有機物微粒子生成法がなかったことも一因ではあるが，金属微粒子に比べて，観察中における電子線照射による損傷が無視できないほど大きいことが，電子顕微鏡による有機物微粒子の結晶構造観察を非常に困難なものにしている。

前年度，生理研の超高圧電子顕微鏡を用いて，有機物結晶における電子線照射損傷の加速電圧依存性を研究した。ペヘン酸単分子膜を用いた電子回折像の消滅速度測定の結果，電子線の加速電圧が1,000kVのとき，電子回折像をイメージングプレートに記録すれば，電子線照射による損傷を受けやすい有機物結晶においても電子回折像の観察に有効であるという結論が得られた。

この結果に基づいて，今回有機物微粒子観察のための基礎データを測定した。まず，数種類の有機物薄膜結晶を試料に用いて電子線照射損傷の測定を行った。その結果，電子線加速電圧1,000kVにおいて電子回折斑点が消滅する臨界照射量として，バリン薄膜では2.5electrons/$Å^2$,ペリレン薄膜では97 electrons/$Å^2$という値が得られた。これらはいずれも，過去に行われた測定値，バリン薄膜の0.82 electrons/$Å^2$ (80kV)[1]，ペリレン薄膜の25 electrons/$Å^2$ (100kV)[2] を大きく上

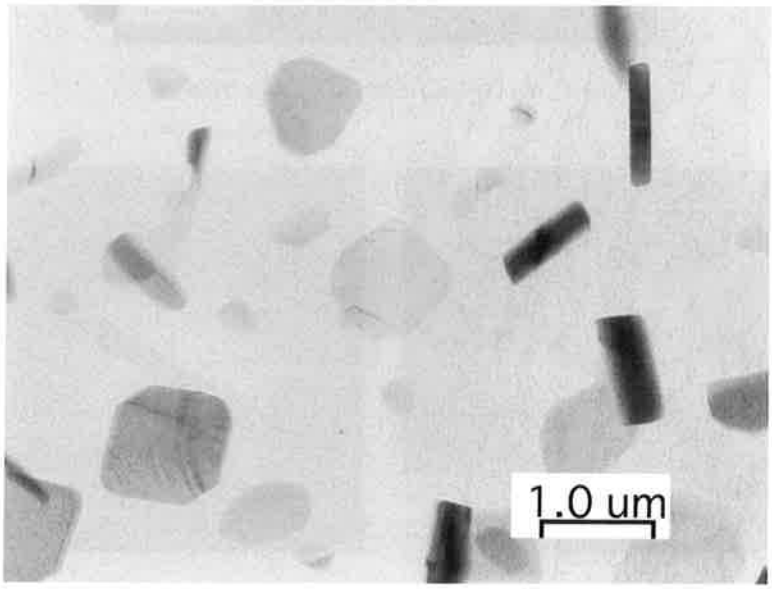


図1a　超高圧電子顕微鏡（H－1250）での電子線照射損傷後のペリレン微粒子像

回り，我々の観察方法が有効であることが確かめられた。以上の結果をもとに，より電子線照射に対して強いペリレンを，ガス中蒸発法で微粒子化して損傷の測定を行った。図１にペリレン微粒子の電子顕微鏡写真と電子線回折像を，図２に薄膜と比較した電子線照射強度のグラフを示す。微粒子にすると，薄膜の場合よりも電子線照射に対する強度が弱くなり，観察はより困難になる。ただし，ペリレン微粒子に関しては，超高圧電子顕微鏡を用いれば構造解析が十分可能であると考えられる。

１）R.M Glaeser,J.Ultrastructure Res. 36(1971) 466.
２）J.R.Fryer and F.Holland,Ultramicroscopy 11(1983) 67.

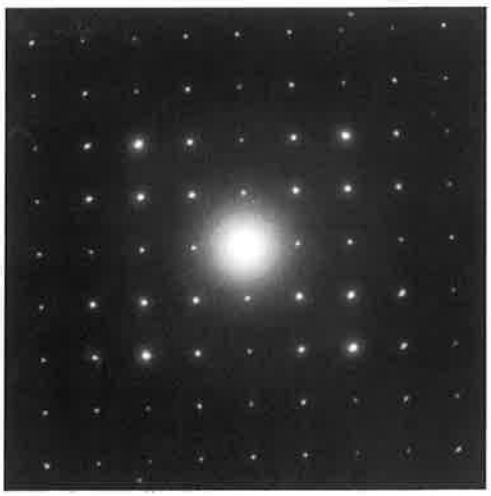


図１ｂ　照射初期の回折像

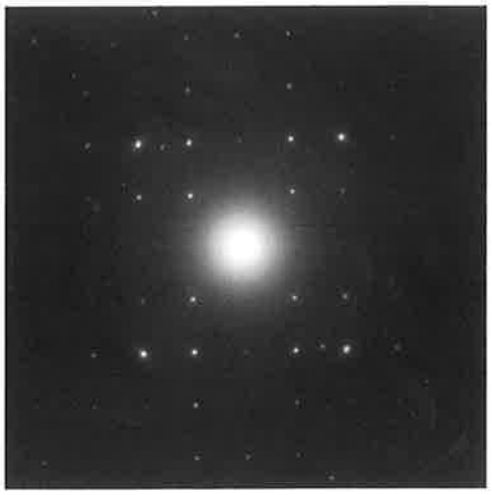


図１ｃ　損傷後の回折像

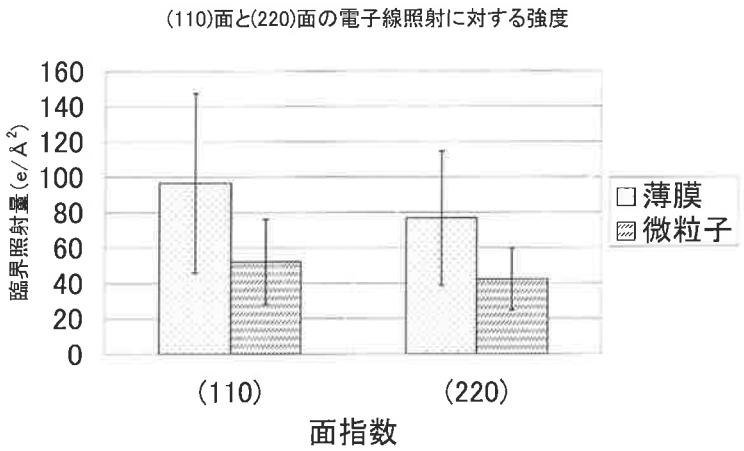


図２

11. 網膜ニューロン間のギャップ結合様式：双極細胞の樹状突起

日高　聰（藤田保衛大・医・生理）

網膜双極細胞は，視細胞で発生した光応答の情報を網膜神経節細胞に興奮性に転送する二次の介在ニューロンである。視細胞の光応答はすべて過分極性であるが，視細胞からのグルタミン酸作動性シナプスを経て，双極細胞では小さなスポット光に対して過分極性（OFF中心型）と脱分極性（ON中心型）の異なる二つの光応答を発生し，中心部と周辺部が拮抗する受容野を形成している。網膜内で縦方向に情報伝達する双極細胞も同じ機能型の間でギャップ結合で連結していることが最近になって証明された[1)]。昨年度からの研究を継続して行い，今年度は電気生理学的に同定したON中心型双極細胞に関して視細胞とシナプス結合する樹状突起の三次元の微細形態を超高圧電子顕微鏡で調べた。すでにゴルヂ法によって鍍銀した双極細胞の解析は終了しているが，本研究は双極細胞の光応答の性質の形態構造上の説明にとって重要である。

コイとキンギョ網膜から細胞内記録法を用いて，直径400 μmの白色のスポット光および内径1mm，外径2.5mmの環状光に対する応答を記録し，細胞の示した光応答から双極細胞を電気生理学的に同定した。ガラス管微小電極には，Lucifer YellowとbiocytinあるいはNeurobiotinを溶解し，電気泳動的にマーカーを細胞内に注入した。細胞のLucifer標識を確認後，ビオチン複合物の局在部位を同定するために，HRP標識-avidin-biotin複合物との反応を経て，反応産物の増強のためにNi^{2+}とCo^{2+}の存在下でdiaminobenzidineで可視化した[2)]。さらにnitroblue tetrazoliumを添加して光酸化によって反応産物を増強した[3)]。電子線密度の増強のために，重クロム酸カリウム，酢酸ウランとリンタングステン酸によるブロック染色を施し[4)]，エポキシ樹脂で包埋した。

ON中心型双極細胞は同一形態の周囲の双極細胞へビオチン複合物の拡散(tracer couplingの形成）を示した。光学顕微鏡での網膜縦切片の観察で，桿体視細胞入力型巨大双極細胞[5),6)]及びON中心型のI型双極細胞[7)]の特徴を示した双極細胞の形態を確認した後，厚さ3 μm の切片を作製して超高圧電子顕微鏡下で1,000kVで解析した。上記に記載した処理を施した今回のエポキシ樹脂標本では，視細胞桿体の軸索終末に貫入する双極細胞の樹状突起は観察できた。しかし，以前に解析したゴルヂ法によって鍍銀した標本では明瞭に観察できた視細胞のシナプスリボンに結合する中心突起や基底膜結合する樹状突起終末を区別しては観察できなかった。双極細胞の樹状突起終末を観察する場合には細胞内注入したビオチン複合物の反応産物をもっと増強する必要があるので，今後さらに方法を検討しなければならない。

文献

1．Umino O, Maehara M, Hidaka S, Kita S & Hashimoto Y (1994) Visual Neurosci 11: 533-548.
2．Adams JC (1981) J Histochem Cytochem 29: 775.
3．Vaney DI (1992) J Neurosci Methods 44: 217-223.
4．日高　聰，橋本葉子 (1993) 日本生理誌 55: 241-254.

5．Kaneko A (1970) J Physiol 207: 623-633.
6．Ishida AT, Stell WK & Lightfoot DO (1980) J Comp Neurol 191: 315-535.
7．Saito T & Kujiraoka T (1982) J Comp Neurol 205: 161-170.

12. 超高圧電顕とエネルギーフィルター電顕とによる厚切り切片像の比較

野田　亨（京都大・医・生体構造医・機能微細形態）

エネルギーフィルター電顕（EF-TEM）は電子線が試料を通過する際に生ずる種々のエネルギーレベルの電子線を電子線プリズムを通して分光し，ある一定のエネルギーレベルの電子線のみをエネルギースリットを用いて選び出し，画像化させることのできる電顕である。したがって特定の元素の細胞内分布を検索できるが，エネルギー損失を受けない電子のみで結像するゼロロス（0 eV-loss）像も観察することができ，厚切り切片を観察する際に生ずる色収差の影響を少なくすることができる。したがって厚い切片でも同じ加速電圧の電顕よりもよりコントラストの強い，ボケの少ない，立体的情報を含んだ像を得ることができるとされている。

そこで，我々はEF-TEMによるエネルギーフィルターの効果と超高圧電顕（HVEM）像を酵素細胞化学と免疫細胞化学によって染色した試料について比較，検討した。酵素細胞化学にはラット小腸上皮細胞を用い，Inosine diphosphatase 活性を検出したもの，酵素抗体法による免疫細胞化学には一次抗体として抗カルレティキュリン抗体を用い，DAB反応の反応産物を検出したものについて，それぞれ，100 kVの加速電圧のEF-TEM，および1000 kVの加速電圧のHVEM（H-1250M）で観察した。

酵素細胞化学で染色した0.5 μm厚の切片像はEF-TEMでもHVEMでも，酵素抗体で染色したものよりも反応産物がより明瞭に観察された。0 eV-loss像とEFをかけていない像を比較すると，0eV-loss像では収差が大きく減少し，HVEMと同様の所見が得られた。酵素抗体で染色した試料でも基本的に収差は改善され，像のコントラストが明瞭になる傾向が認められたが，酵素細胞化学で認められたほどのEFの効果は認められなかった。試料の厚さを1 μmに上げると，0 eV-loss電子線量が減り，観察が困難となり，収差も完全には除けなかった。ただし，吸収エネルギーレベルを上げると比較的像を観察しやすい領域が250 eV付近に存在したが，この像が意味するところは不明である。以上の結果より，0.5 μm程度の厚さの切片ではEF-TEMでもHVEMと同様の観察が可能であるが，1 μm 以上の切片の観察には100 kVの加速電圧を持つEF-TEMでは観察困難であり，やはりHVEMが適していると思われた。

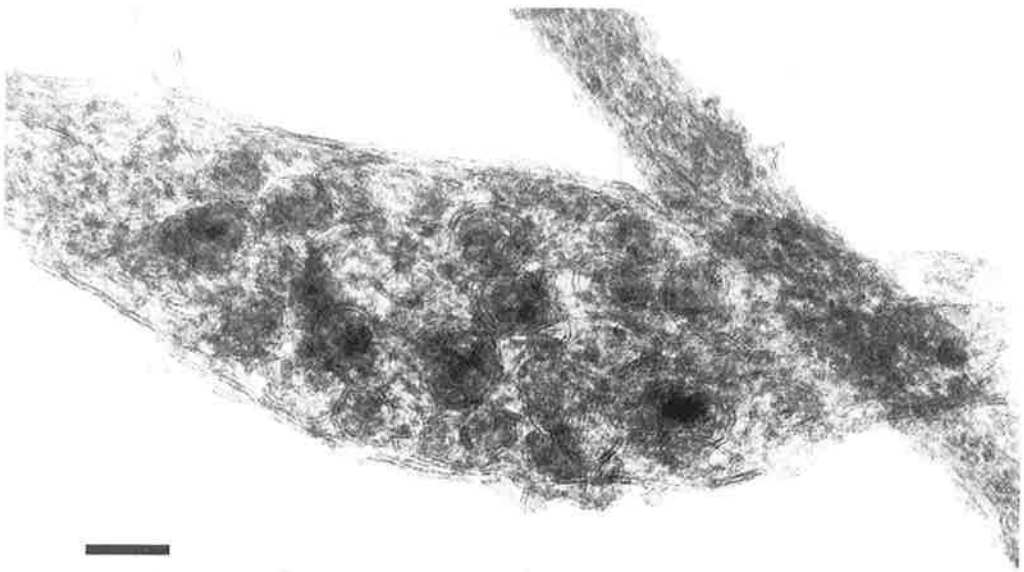
13. 神経突起のバリコシティの三次元構造解析

遠藤泰久（京都工繊大）
有井達夫（生理研）

神経突起の途中に形成される数珠状の膨らみ，varicosityは，末梢では神経終末として機能していると考えられているが，形成機構については不明な点が多い。神経突起の細胞骨格がバリコシティの構築にいかに関与しているか，通常の切片法だけでなく，メッシュ上に直接培養したニューロンを超高圧電子顕微鏡で観察し，細胞骨格の超微形態の観点から検討を加えた。

電顕用金メッシュにホルムバール支持膜を張り，コラーゲンでコーティングした後，カーボンで強化した。その上にPC12細胞を培養し，神経成長因子を50 ng/ml添加し神経突起を伸張させた。界面活性剤（トライトンX100）で細胞を処理して低分子の細胞骨格タンパクを抽出後，細胞をフォルムアルデヒドで固定し，チュブリン抗体を反応させ，アビヂン金コロイドで細胞骨格のコントラストを高めた。オスミウム酸で後固定後，臨界点乾燥を施し，超高圧電顕（H-1250)で観察した。

チュブリンの免疫染色を施したPC12細胞の神経突起の内部には，超高圧電顕で免疫陽性を示す多数のコロイド金が観察された。しかしその他の構造は判別できなかった。オスミウム酸固定後，



超高圧電子顕微鏡（H-1250)で観察した培養ニューロン（PC12）の神経突起。バリコシティ内部には有芯小胞の他、不規則に湾曲したマイクロチュブルがみられる。bar=100nm

酢酸ウラン溶液で電子染色を施した場合，細胞体やバリコシティ内部のミトコンドリア，小胞，マイクロチュブルの構造を識別が可能であった。バリコシティ内のマイクロチュブルは，他の神経突起内にみられるような整然とした直線状の配列とは異なり，不規則で湾曲したものが多く見られた。

この結果は，バリコシティ内では細胞骨格の中で，少なくともマイクロチュブルの配列に大きな違いが存在することを示している。光学顕微鏡によるこれまでのデータ及び通常の透過電顕による切片観察により，バリコシティ内にはフリーのチュブリンが多量に含まれていることが示唆されている。今後バリコシティ内のマイクロチュブルだけでなく，その関連タンパクや他の細胞骨格要素について解析することにより，バリコシティの三次元的構築機構が解明できると期待される。

14. 神経系細胞におけるグルココルチコイド受容体の細胞内局在様式とその変化 ー超高圧電子顕微鏡による免疫電子顕微鏡的観察ー

小澤一史，西　真弓，河田光博（京都府医大・第１解剖）

副腎皮質から分泌されるグルココルチコイド（主にコルチゾルおよびコルチコステロン）や性ホルモンの一つであるエストロゲンは生体の多くの細胞において，細胞質や核内の受容体と結合し，その細胞のDNAにおける転写活性調節因子として多岐にわたる作用を発現させるホルモンであり，生体の細胞レベルにおける機能発現に，非常に基礎的かつ重要な役目を有している。

我々は，グルココルチコイドと結合するグルココルチコイド受容体の生体内組織における発現様式について研究を進め，特に神経系におけるグルココルチコイド受容体の発現と神経細胞機能への影響に注目している。中枢神経系におけるグルココルチコイドの作用の存在は，生体の神経系における細胞機能発現や組織構築等の調節機構に大きく関わっている可能性を強く示唆するものであり，その作用機構の解明は必須の課題と考えられる。グルココルチコイドが核におけるクロマチンの構造に変化を導き，これによりその受容体がDNAと結合を起こすことが想定されている。この間に多くのco-activaterと称される蛋白質群がリガンドー受容体複合体に作用し，蛋白質間相互作用を引き起こし，DNAとの結合へつながることが解明されつつある。

我々は，グルココルチコイドと結合するグルココルチコイド受容体の抗体を作製し，免疫組織化学的に，生体内組織におけるグルココルチコイド受容体の分布を研究してきた。中枢神経系においても，多くの神経細胞，神経膠細胞においてグルココルチコイド受容体の存在が明らかになりつつある。通常，免疫電子顕微鏡的にグルココルチコイド受容体は神経細胞の核内においてクロマチンと結合するように存在することが明らかとなっているが，より三次元的な分布を観察する目的で，厚みのある切片観察が可能な超高圧電子顕微鏡を用いて観察を行っている。ステレオ

像を駆使することによってその目的はより効果的に観察できる可能性も出つつある。これまでに我々はpre-embedding 法にて免疫陽性産物をDABの沈着物として同定してきているが，より詳細な反応部位の解析には金コロイドを用いた法が良いことはいうまでもない。この場合にpost-embedding法を用いなければいけないが，post-embedding法の使用により，微妙な抗原性の維持に現在のところまだ問題があり，この点の改良を試みている。

15. カイコシステインプロテアーゼ（BCP）前駆体の構造

高橋　進（山口大・農）

カイコシステインプロテアーゼは，不活性な前駆体として，卵黄顆粒内に貯蔵されている。筆者らは，これまでに，この蛋白の精製およびcDNAのクローニング，および塩基配列の決定に成功した。その結果，本酵素はカテプシンLによく似たパパインスーパーファミリーに属するシステインプロテアーゼであることが判明した。これまでに，前駆体型システインプロテアーゼの活性化機構は不明であることから，本酵素はその解析のためきわめて都合のよい蛋白である。

筆者らは，現在その解明に取り組んでいる。本酵素は卵が発生を開始すると，活性化をうけて卵黄蛋白の分解を開始し，胚発生のプログラムに従って胚に養分を供給する。このプロセスは高度に調節をうけているはずであり，発生の進行にとってきわめて重要な調節点である。本酵素は，in vitro においては，酸性条件下でN－末端において限定分解を受け，活性化される。発生卵内においても卵黄顆粒の酸性化がおこっていることから，同様の活性化が卵内においても起こっているとおもわれる。しかしながら，本酵素は不活性なオクタマーとして存在しており，活性化の初期には，オクタマー　モノマーの変換がおこるはずである。この問題の解決のために，超高圧電子顕微鏡による観察を試みた。分子自体がきわめて高分子であること，温度感受性，pHによる制限など困難な諸問題を解決するための固定法の検討がおこなわれ，おおよそ適切な固定方法を確立することができ，これをもとに現在，構造，活性化の解析を行っている。

16. 精巣輸出管の頂部細管の三次元構造解析

石田哲也，荒木伸一，波多江種宣（香川医大・第二解剖）
有井達夫　（生理研）

精巣輸出管は精巣網と精巣上体管を結ぶ管で，その上皮は線毛細胞と無線毛細胞から構成されている。無線毛細胞は吸収上皮細胞であり，精巣網から送られてくる液に含まれているタンパク

質をそのレセプターを介したエンドサイトーシスにより再吸収している。この無線毛細胞の頂部細胞質には，頂部細管と呼ばれるエンドサイトーシスに関与している管状構造が多数みられる。しかし，その三次元構造は超薄切片による透過電顕での観察では解明されていない。そこで今回，無線毛細胞の頂部細管をconcanavalin A-HRP（Con A-HRP) でラベルし，厚切り切片が観察可能な超高圧電子顕微鏡でステレオ観察することによって，頂部細管のより詳細な三次元構造を調べることを目的として共同研究を行った。

ラットの精巣輸出管にCon A-HRPを投与し，10～60分後に1.5 %グルタールアルデヒドで灌流固定した。DAB 反応の後，1%四酸化オスミウムで後固定してから，常法に従い脱水，包埋した。0.5～1.5 μmの厚切り切片を超高圧電子顕微鏡（1000 kV）で観察し，ステレオ写真を撮影した。

Con A-HRP は頂部細胞膜に結合し，そのままエンドサイトーシスに伴って細胞内に取り込まれ，時間と共にエンドゾームや頂部細管内に達した。頂部細管を厚切り切片でステレオ観察すると，多数の頂部細管が細胞頂部に局在しているが，単独の細管として存在するものは少なく，その多くはお互いに結合して複雑に絡み合い，ネットワークを形成していることがわかった（写真1）。

私たちはエンドサイトーシスにおいて，頂部細管はエンドゾームから形成され，エンドゾームから頂部細胞膜へ膜を recycling する過程に関与していることを明らかにしている。したがって，頂部細管はエンドゾームから頂部細胞膜への膜の recycling において，レセプターなどを含む膜の貯蔵部位としてネットワーク構造をとっていることが推察される。

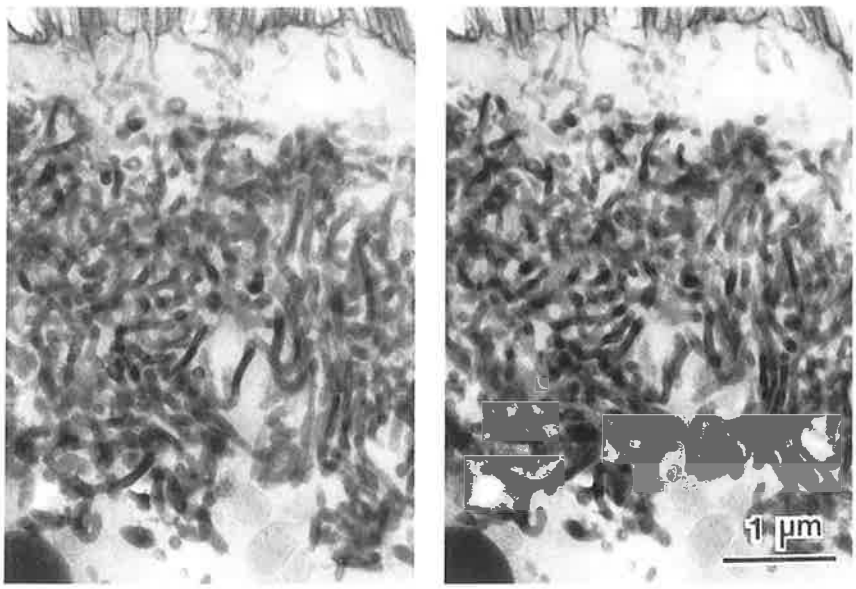


写真1　Con A-HRPで染色された頂部細管　頂部細管は随所で分枝吻合し、ネットワークを形成している。(投与後 30分、試料の厚さ750 nm 、試料傾斜角度± 8°)

17. 超高圧電子顕微鏡によるastro-glia細胞突起の三次元定量解析

濱　清（生理研）
Mark H. Ellisman, Maryann Malton (UCSD, Dep. of Neurosciences)

astrocyteはCNS内non-neuronal cellsの主要なメンバーであり，neuronにassociateしてneuronに対するnursing, supporting functionのほかにextracellular spaceの Kbuffering, Ksyphoning, neurotransmitters の取り込み，分解，放出などの重要な機能を果たしている。その機能を理解するためには，neuronとastrocyteの三次元構造の定量解析が必要である。我々はGolgi染色，注入-photo activation法によって同定したastrocyteの3－4ミクロンの切片を作成し，-60度から＋60度まで2度おきの超高圧電子顕微鏡連続傾斜写真セットを撮影，conputer tomography解析によって体積，表面積の算定を行っている。少数例での予備的な実験結果として，neuropile1000立方ミクロン中におけるastrocyteの突起の体積は約80立方ミクロン，表面積は約2000平方ミクロンの結果を得ている。この様に表面積と体積の比が大きいのはastrocyteの突起が極めて薄く広がってneuronにassociateして居る為であり，機能的に極めて大きな意味を持って居る。体積と表面積の値は脳内部位によるneuropile構成の差によって大きな差が見られるので，大脳皮質及び海馬内の各部位についての検討を行って居る。又隣接するastrocyte間でのsignal伝達を定量的に理解するためdomain接触部での三次元構造の解析を平行に進めている。（J. Electron Microscopy　投稿中）

【生体磁気計測装置
共同利用実験報告】

生体磁気計測装置共同利用実験報告

〔目　　次〕

1．視覚的に呈示された言語関連課題による脳磁界反応の解析
（栗城眞也 他） …… 246
2．Temporal windowに対応して記憶される auditory sceneの精度に
関する研究（矢部博興 他） …… 247
3．知的活動と情的興奮に伴う脳磁場の計測（達本　徹 他） …… 248
4．ニオイ刺激による嗅覚誘発反応の脳磁界計測（加藤寿彦 他） …… 249
5．感覚情報の脳内処理機構に関する研究（齊藤泰彦 他） …… 250
6．呼吸神経系の可塑性（本間生夫 他） …… 251

1．視覚的に呈示された言語関連課題による脳磁界反応の解析

栗城真也，竹内文也，砂盃尚子（北海道大・電子研）
柿木隆介（生理研）

はじめに

本研究では，「文字の読み」に関連する脳活動を調べるために4種類の課題（2種類のコントロール課題を含む）を構成し，これらの課題を用いて脳磁界反応の計測と信号源解析を行い，それぞれの結果を比較検討した。

方法

〔3文字課題〕意味をなさない文字列（ひらがな3～4文字）を呈示し，被験者には文字列を読み終わったらボタンを押すように指示した。コントロールでは課題と同じ文字列を呈示し，被験者には文字列が消えた時点でボタンを押すように指示した。文字列の呈示時間は，課題の反応時間と等しくなるように被験者ごとに調整した。

〔2文字課題〕ひらがな1文字とカタカナ1文字を同時に呈示し，被験者にはこれらの文字の読みが一致するか否かで，ボタンを押し分けるように指示した。コントロールでは，被験者が読めない文字（アラビア文字など）を2個呈示し，それらの形が一致するか否かでボタンを押し分けさせた。

脳磁界応答の計測には37ch SQUID磁束計を2基用い，左右側頭に1基ずつ配置して同時に計測を行った。各課題で100～200回試行し，文字の呈示開始に同期させて脳磁界反応を加算平均した。得られた反応に対して単一双極子による信号源の推定を行い，被験者毎のMR画像に重ね解剖学的な位置を調べた。被験者は右利きの女性5名，男性3名である。

結果と考察

潜時250ms以前の脳磁界反応から推定された信号源は，そのほとんどが後頭あるいは側頭後部に存在した。これらは視覚情報処理の初期の活動に関連すると考えられる。潜時250ms以降の反応から推定された信号源の解剖学的な位置を図1に示す。左右半球に共通した信号源位置として紡錘状回や鳥，下側頭回，中心溝付近があった。特に，後側頭の脳底部では，課題によらず信号源が推定された。一方，左半球では側頭外側部の信号源も多数推定され，特に外側溝や上側頭溝周辺では2文字課題と3文字課題に共通して信号源が推定された。

以上のことから，「読み」が必要な課題でみられて，コントロールではみられない特異的な信号源の位置として，左上側頭溝後部周辺が挙げられる。

F.Takeuchi, S.Kuriki, R.Kakigi (1998) Neuromagnetic Responses to a Pre- and Post-Delay Time Stimulus in a Delayed Matching Task., Biomag98 abstracts, 37.

N.Isahai, F.Takeuchi, S.Kuriki, R.Kakigi(1998) Neuromagnetic responses associated with visual words processing measured over the temporal region., Biomag98 abstracts, 219.

竹内文也，砂盃尚子，栗城真也，柿木隆介(1998)文字の読みに関連した脳磁界応答の計測と解析，第13回生体・生理工学シンポジウム論文集，51-54.

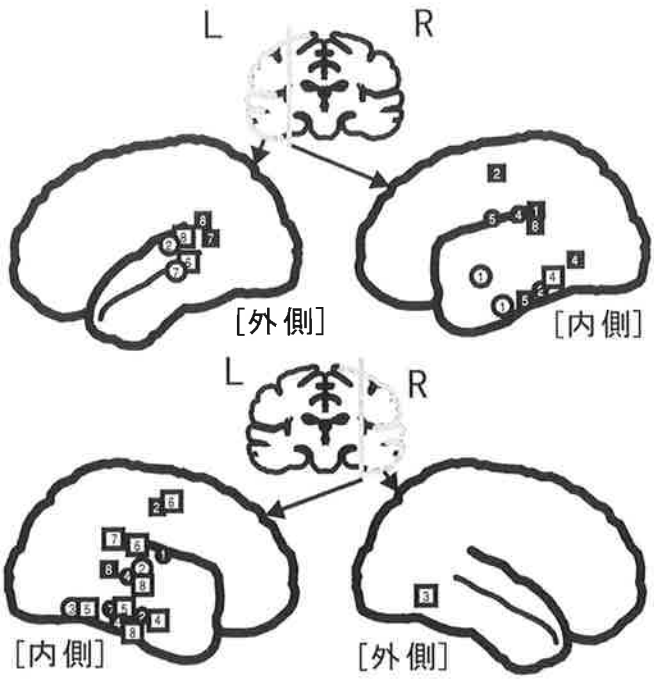


図1　潜時250m以降における脳磁界応答の信号源位置
□：2文字課題、○：3文字課題
■：2文字課題のコントロール
●：3文字課題のコントロール
シンボルの中の数値：被験者の違い

2．Temporal windowに対応して記憶されるauditory sceneの精度に関する研究

矢部博興，佐藤泰治，篠崎直子，須藤武行，晝間臣治，梨田忠良
（弘前大・医学部附属病院神経科精神科）
小山幸子，軍司敦子，柿木隆介（生理研）

MMN (Mismatch Negativity) は，一次聴覚野の近傍から誘発され，逸脱事象とsensory memory trace（感覚記憶痕跡）とのmismatchを反映し，単なる求心性入力の反映でない事から重要視されてきた。Näätänenは，聴覚事象の知覚に対するTemporal Window of Integration 説

(1992) を提唱し，感覚記憶には，auditory sceneを時間的に統合する機構があり，これが知覚の単位そのものを反映する可能性がある事を示唆した。提案代表者は，刺激の欠落は，推定されるTemporal Windowに含まれる時にだけMMN又はMMNm（磁気成分）を発生させる事から，この160-170msの統合機能を証明した(1998)。本研究は，Temporal Windowの起始から終了までの区間の逸脱の検出感度，つまり感覚記憶に記憶されたneural representationの精度の均一性を調査する事を目的とした。脳磁図MEGの使用は，優れた空間解像度やMMN成分と注意成分の鑑別の点で有用である事が知られている。＜対象＞健常被験者10名。＜方法＞防磁気・防音の室内の壁に映写される無音状態の映画に集中している被験者の左側耳に，連続した音刺激が500msの一定のSOAで呈示された。80%の確率で提示される標準音は，持続時間がTemporal Windowに相当する170msで，0-26ms，26-62ms，62-98ms，98-134ms，134-170msの５つのtone segment（周波数1000Hz，強度80dB）から構成されていた。逸脱音は，標準音の0-26msを除く４つのいずれかのtone segmentが各々5%の確率でランダムに欠落するもの（silent segment）であった。
＜結果＞各逸脱音に対するMMNm（発生源双極子は右側頭葉上部）は，silent segmentが逸脱音の後半部分にあればあるほど，各silent segmentの起始点からの潜時が延長し，その振幅が減衰した（$p<0.01$）。＜結論＞本研究により，MMNに反映されるような逸脱音の自動的検出の感度は，聴覚性感覚記憶にあるTemporal Windowの終末に向かって非線形的に減衰する事が明らかにされた。

3．知的活動と情的興奮に伴う脳磁場の計測

遠本　徹（京都大・認知行動脳科学）
南部　篤（東京都神経研）
柿木隆介，佐々木和夫（生理研）

1．目的

暗算や多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して推定されることが，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）。感情的興奮によってもシータ脳磁波が観察される (Sasaki et al. 1996) が，その本態は不明である。この点の理解を深めるため，本研究では昨年，一昨年に引き続き，種々の感情状態における脳磁場を，暗算中や安静状態などにおける脳磁場と比較検討する実験をおこなった。成人の結果と比較検討するために，小児を対象とする計測も行なった。

2．方法

いくつかの感情的興奮状態を閉眼で 維持する課題を被験者に与えた。感情は，喜怒哀楽それぞれの範疇に属するものを，被験者の個人的体験から想起再生するようにさせた。また，比較の

ため，各被験者が得意とする事柄に集中する課題や，暗算や音楽のイメージ演奏に集中する課題，なるべく無念無想の安静状態となる課題，色弁別性Go/Nogo運動課題も行わせた。それぞれの課題を遂行中の脳磁場を記録し，周波数分析によりその特徴を観察し，可能なものについては電流源推定を行った。

3．結果

暗算や音楽のイメージ演奏により以前の報告と同様に前頭知的シータ波が観察された。感情的興奮では，５－７Ｈｚのシータ脳磁波活動を生じる被験者が複数見い出された。周波数分析により，同一被験者においては前頭知的シータ波と感情的興奮によるシータ波は各々ほぼ一定の固有の周波数をもつが，この両者の周波数は同一ではないことが判明した。また，両者の空間的分布パターンも異なることが明らかになった。これらの電流相極子の位置推定を現在試みている。小児にも状況により成人と同様の活動が出現するようだが，例数がまだ少ない。

4．考察

感情的興奮の際に，前頭知的シータ波とは別の発生源をもつシータ波活動が惹起されうることが示された。このように，暗算課題と感情的興奮課題という異なる課題の際に，発生場所や周波数は異なるが，どちらもシータ波が発現しうる，という事実は，大脳皮質活動におけるシータ波の意義に何等かの示唆を与えるものであろう。小児の結果については，さらに例数を増やして検討考察を加える必要がある。

5.文献

Sasaki K, Tsujimoto T, Nambu A, Matsuzaki R, Kyuhou S (1994) Dynamic activities of the frontal association cortex in calculating and thinking. Neurosci Res. 19: 229-233

Sasaki K, Nambu A, Tsujimoto T, Matsuzaki R, Kyuhou S, Gemba H (1996) Studies on integrative functions of the human frontal association cortex with MEG. Cognitive Brain Res. 5: 165-174

4．ニオイ刺激による嗅覚誘発反応の脳磁界計測

加藤寿彦，白石君男，毛利毅，原田博文，周防屋祐司，力丸文秀
（福岡大・医・耳鼻咽喉科）
柿木隆介（生理研）

1991年にFreemanは動物実験の嗅球に多数電極を配置して脳電位図(EEG)より40Hzを中心とした高周波数信号（以下，γ波）を記録し，その平均振幅の空間的なパターンがニオイのかぎわけや学習に関わっていることを明らかにした。

当該年度では，ヒト（正常者）においても35Hz以上のγ波の磁界信号 (MEG) が，ニオイ刺激によって特異的に出現するかをSQUIDを用いて検討した。

対象は嗅覚正常，鼻疾患の既往のない28才から39才（平均32.1歳）の成人11名とした。ニオイ刺激の臭素は酢酸アミル（バナナ臭）を用いた。コントロールとして空気刺激を提示した。刺激は右鼻腔より行い，左鼻腔からのサーミスタにて呼吸同期式に刺激を与えた。刺激時間はそれぞれ１秒とし，空気・ニオイ刺激とも50%の頻度でランダムに刺激を提示した。脳磁図の記録はBTi社37ch.-2setを使用した。各デュワーを国際式10-20法のF3，F4付近に中心を当て，１刺激につき５秒間脳磁図をサンプリングレート520.8Hzで記録した。得られた脳磁図をさらに0.1Hz･200Hzのバンドパスフィルタで処理した。これを各チャンネルごとにFFT処理し計20回平均加算した。さらに空気刺激，ニオイ刺激各々の37ch.のパワーを合計した。このとき，パワー値は対数分布したため，対数変換後の値をunpaired *t*-testで統計的検討を行った。

γ波帯域においてニオイ刺激が空気刺激よりパワーが増大したのは，11名中１名の右半球で観察されたのみで，他の被験者では有意差は認められなかった。これは捉えられたMEGの信号が必ずしも嗅球などの深部の興奮を反映していないことも原因の一つと考えられた。今後MEGは個人差が大きいことが知られているので，絶対値の比較ではなく，無刺激時のMEGを基準として，空気刺激・ニオイ刺激のパワーを相対表示してさらに解析を行う必要があると思われた。

５．感覚情報の脳内処理機構に関する研究

斉藤泰彦（足利工大・経営工学科）
橋本　勲（生理研）
木村友昭（筑波技術短大・鍼灸学科）
寺崎太洋（東京都精神研・精神生理）
井口義信（東京都精神研・精神生理）
岩瀬嘉志（順天堂大・整形外科）

１）深部体性感覚に対する脳内情報処理の検討

Motor point(MP)刺激による誘発脳磁界(SEFs)を測定し，その信号源を推定した。健康成人被験者を対象に，ステンレス製絶縁鍼電極（直径約0.16mm）により短母指外転筋MPに対して，0.2 ms / 2 Hzの電気刺激を与え，37チャンネル脳磁計(Magnes,BTi)によりSEFsを記録し，等価電流ダイポール(ECD)を算出した。その結果，MP刺激によるSEFsでは，潜時約70 msの成分(M70)が最も早期の成分として記録された。M70のECDは，正中神経刺激のM20よりも後・内・下方に位置し，このことから本成分にはarea 3aないしはarea 2の活動が反映されている可能性が示唆された。

２）右手第２指及び第４指の体性感覚刺激による事象関連脳磁界の検討

電位計測でのP300成分誘発刺激条件と同様の刺激呈示をおこない，体性感覚刺激による事象関

連脳磁界を検討。刺激呈示にはピエゾ素子皮膚刺激装置を用い，第2指にターゲット刺激（発生確率40%，カウント），第4指に非ターゲット刺激（発生確率60%）を与えた。被験者は座位とし脳磁界計測にAセンサーのみを用い，測定部位を前頭，左側頭，右側頭，頭頂の順に記録した。前頭部を除き，どの測定部位でもM50成分が出現。左側頭，頭頂部に潜時160msの成分が顕著に出現。P300成分に該当する脳磁界成分は頭頂部で潜時240～350ms出現，事象関連脳磁界の存在を確認した。

3）数字の視覚呈示による計算作業中の脳活動の検討

計算作業中の脳活動を検討するために3種類の作業を課し，電位および磁界計測を行った。一桁の数字を継続的に呈示し，1)加算作業，2)呈示数カウント，および3)図形の呈示数カウントを行った。計算課題で観測された左後側頭の電流双極子源の早期出現と空間分布の縮小は，電位計測でのP180の位相前進に対応し，刺激に対する注意を示唆した。計算課題では300～850msに頭頂・側頭領域から縁上回近傍まで経時的に移動する双極子源が観測された。これらは電位計測でのP300，および陽性緩電位の振幅増加に対応し，数字の判読，計算処理を反映すると考えられた。

6．呼吸神経系の可塑性

本間生夫，金丸　新（昭和大・第二生理）
橋本　勲（生理研）
原　哲也（都立リハビリテーション病院）

大脳皮質運動野の機能局在はその神経細胞が脊髄の機能的に異なる運動神経細胞に特異的にシナプスしているという解剖学的特徴から普遍的なこととして認められている。腕神経引き抜き損傷患者においては肋間神経を筋皮神経に再縫合することにより，肘屈曲の再建が行われている。この患者では術後数年で呼吸を意識することなく肋間神経を肘関節屈曲の目的で使うことが可能となる。呼吸から肘屈曲への機能転換がどのように行われているのか。皮質運動野の局在が移動するかどうか生体磁気計測装置を用いて調べた。

被験者は腕神経引き抜き損傷により筋皮神経に肋間神経を移行した患者8名を対象とした。被験者は安静仰臥位あるいは座位とした。被験者の患側の上腕二頭筋上に表面筋電極を装着し，筋活動を測定した。4～5秒に1回上腕二頭筋を随意的に収縮させた。筋活動は積分し，その立ち上がりをトリガーとして，磁気計測を行い200回測定し加算平均した。健側の上腕二頭筋上でも同様の手技で200回加算平均した。またフォトカプラーにより運動の立ち上がりを計測しこれをトリガーとして磁気計測した。患側ならびに健側の運動により運動磁場を検出できた。

しかし上腕の運動により上半身ならびに頭部に動きが伝わり，このため運動磁場には動きのアーチファクトが混入した。実験上の工夫を種々試みたが，運動によるアーチファクトの問題を克

服できなかった。このため肋間神経に支配された上腕二頭筋の皮質運動野と筋皮神経に支配された健側上腕二頭筋の皮質運動野の局在を比較し，可塑性について明らかにする目的は達せられなかった。

【研　究　会　報　告】

研究会報告

〔目　　次〕

1．In situ biochemistry & biophysics
－「分子」～「細胞」計測システムの確立を目指して ―
（代表者：村田昌之）
（1998．5．20 ～ 5．21） …… 257
2．シナプス可塑性の分子的な実体
（代表者：高橋正身）
（1998．6．11 ～ 6．12） …… 264
3．X線、電子線、光によるナノイメージング
（代表者：木原　裕）
（1998．7．9 ～ 7．10） …… 284
4．ATP受容体の生理機能と分子機構に関する総合的基礎研究
（代表者：桂木　猛）
（1998．8．27 ～ 8．28） …… 292
5．情動・意欲をいかにとらえるか
（代表者：小幡邦彦）
（1998．9．24 ～ 9．25） …… 306
6．シナプス伝達機構に関する細胞生理学的研究
（代表者：小澤瀞司）
（1998．9．24 ～ 9．25） …… 319
7．神経科学研究の新しいアプローチ
（代表者：畠中　寛）
（1998．9．27 ～ 9．29） …… 333
8．哺乳類の中枢神経系における局所回路とその機能特性
（代表者：三上章允）
（1998．10．8 ～ 10．9） …… 344
9．糖・脂質代謝の組織間クロストークによる制御
（代表者：松澤佑次）
（1998．10．29 ～ 10．30） …… 351
10．糖鎖病態研究会

（代表者：辻　崇一）
（1998．10．30 ～ 10．31） …… 365
11. 細胞機能制御とカルシウムシグナル
（代表者：飯野正光）
（1998．11．12 ～ 11．13） …… 376
12. 生殖細胞の構造と機能発現
（代表者：年森清隆）
（1998．11．20 ～ 11．21） …… 386
13. 脳神経系幹細胞の発生と細胞移動　―幹細胞の発生・分化―
（代表者：中辻憲夫）
（1998．11．26 ～ 11．27） …… 393
14. ABC蛋白の多機能性と生命維持機構
（代表者：植田和光）
（1998．12．1 ～ 12．2） …… 407
15. 脳磁場計測によるヒト脳機能の解析
（代表者：柿木隆介）
（1998．12．2 ～ 12．4） …… 417
16. 機能的シナプスの形成とその維持
（代表者：玉巻伸章）
（1998．12．3 ～ 12．4） …… 445
17.「予測制御の生理学」研究会
（代表者：森田啓之）
（1998．12．4 ～ 12．5） …… 450
18. 消化管機能
（代表者：鈴木裕一）
（1998．12．10 ～ 12．11） …… 461
19. ニューロン・グリア細胞死の病態とその防御法の開発　―形態と機能の相関―
（代表者：西野仁雄）
（1999．1．7 ～ 1．8） …… 473
20. 脳の情報統合と行動発現のメカニズム　―感覚認知から生体反応形成まで―
（代表者：福田　淳）
（1999．1．7 ～ 1．8） …… 485
21. 病態における心筋イオンチャネルの異常化とその制御
（代表者：中谷晴昭）
（1999．1．25 ～ 1．26） …… 498

1．In situ biochemistry & biophysics
ー「分子」～「細胞」計測システムの確立を目指してー

1998．5．20－5．21

代表者・世話人：村田昌之（生理研）

（1）In situ biochemistry & biophysicsについての紹介

村田昌之（生理研）

（2）細胞骨格系蛋白質によるリポソーム膜の変形や穿孔

瀧口金吾（名古屋大・大学院理学研究科）

（3）オルガネラ間トポロジーのダイナミズム：ミクロオートファジーによるペルオキシソームの分解の分子機構

阪井康能（京都大・大学院農学研究科）

（4）膜リン脂質ダイナミクスと細胞機能：リン脂質結合を用いたアプローチ

梅田真郷（東京都臨床医学総合研）

（5）SDS処理フリーズフラクチャーレプリカ免疫電顕法による生体膜タンパク質・脂質分子の局在ならびに動態の解析

藤本　和（京都大・大学院医学研究科）

（6）単一チャネルタンパク質の電気的・光学的同時計測技術の開発

井出　徹（科学技術振興事業団・分子過程プロジェクト）

（7）時計細胞における概日リズムの光リセット機構とリズム可視化の試み

深田吉孝（東京大・大学院理学研究科）

（8）線虫C. elegansにおける神経細胞の遺伝学的及び構造的基盤

桂　勲（遺伝学研・構造遺伝学研究）

（9）一分子イメージング・一分子ナノ操作技術を使ってin vitroで判ったことin vivoでわかること

船津高志（早稲田大・理工・物理）

（10）細胞の伸展刺激受容機構

成瀬恵治（名古屋大・医・生理）

（11）細胞接着装置構成因子の細胞内局在決定機構

永渕昭良（京都大・大学院医学研究科）

（12）細胞膜の動的構造形成

佐甲靖志（大阪大・大学院医学研究科）

参加者名

深田吉孝，笠原和起（東京大・理研），佐甲靖志，宮本善一，岩根敦子，藤川和代，佐藤明子，志水英之（大阪大・理研），永渕昭良，藤本　和，伊藤雅彦，今村幸広（京都大・医研），阪井康能，堀内久徳（京都大・農研），寺川　進（浜松医大・光量子医研），成瀬恵治（名古屋大・医・生理），瀧口金吾，楠見明弘，飯野良太，村瀬琴乃，藤原敬宏，小屋迫光太郎，鳥羽　栞，実松史幸，玉田一生，渡辺紀信，小山郁子，笠井倫志，佐野浩樹，池　博司（名古屋大・理研），船津高志（早稲田大・理工・物理），井出　徹（科学技術振興事業団・分子過程プロジェクト），桂　勲（国立遺伝子研・構造遺伝学研），梅田真郷（東京都臨床医学総合研・炎症研），松本信幸（新潟大・自然科学），山内英美子，松原　守（藤田保健衛生大・総合医科研），鬼頭万里子（応用生化学研究所），村田昌之（生理研）

研究会概要

細胞の環境応答（情報の受信と発信）は形質膜・膜裏打ち・細胞骨格・オルガネラからなるタンパク質情報ネットワークによっておこなわれている。このネットワークが効率良くに働くためには，形質膜ー細胞骨格ー細胞内オルガネラ間の相対位置，つまり細胞の「トポロジーの保持」が非常に重要である。つまり，近い将来，タンパク質情報ネットワークの機能発現メカニズムの研究は，「それが本来機能する場所（in situ ）で行う」ことが必要不可欠となって来ることは必至である。特に神経系や免疫系などヘテロな細胞集団の中での特定の単一細胞をターゲットにする場合，「 in situ 」という条件とともに「細胞を一個の試験管」に見立て，顕微分光学，一分子操作・計測などの生物物理学的手法を駆使し，その中でタンパク質相互作用・膜動過程・生理反応などを定量的に検出し，新規の因子をスクリーニングする「一細胞計測システム」の確立が必ず必要となってくると思われる。この「一細胞計測システム」は将来的には，生きた細胞中の「一オルガネラ測定システム」「一分子測定システム」へ，あるいは細胞間相互作用を扱う「高次細胞システム」へ発展し，生物物理学を中心として，生化学，細胞生物学，分子生物学を巻き込んだ大きな研究領域に発展すると期待できる。

本研究会では，現在の分子細胞生物学の各分野において，この様な観点から細胞・個体内のタンパク質の生理機能研究を実際に行っている研究者の方々に「知りたい事・まだ知られていない面白そうな事」を紹介していただいた。加えて，実際に最新の顕微分光学，一分子操作・計測などの手法を駆使し細胞・個体内の蛋白質機能研究への応用の可能性を探っている研究者の方々に，「何を知ることができるか。何ができそうか」をビデオなどの視聴覚設備を駆使してできるだけ分かり易く紹介していただいた。

細胞内・個体内で，タンパク質は「様々な」機能を持つ。そして，その機能に応じた「様々な」機能解析法が必要になってきている。そのタンパク質の属性を反映し，講演内容は分子生物学・細胞生物学・生化学・生物物理学と広範な研究分野にわたった。興味深かったことは次の 2 点である。(1) 細胞内のタンパク質情報ネットワークの研究は，ますますそのダイナミクスを高時間分

解能・高空間分解能で追跡することが必要となってきていること，そして，(ii)蛍光法に定量性を付加した顕微分光学的計測法と，分析型高分解能電子顕微鏡の協調した開発がそのダイナミクス追跡に有効なツールとなってきていること，である。

細胞・個体レベルでの生理学研究に，遺伝子解析的手法が果たした役割は非常に大きいものがあるが，本研究会をとおし，「生体内の機能分子の主役であるタンパク質の細胞内・個体内での機能研究に新しい角度から目をむけることができるようになった」という意見も多く，分子レベルー個体レベルに分極しがちな生理学研究に新しい視点を与えたと思われる。

(1) In situ biochemistry & biophysicsについての紹介

村田昌之（生理研）

細胞の環境応答（情報の受信と発信）は形質膜・膜裏打ち・細胞骨格・オルガネラからなるタンパク質情報ネットワークによっておこなわれている。このネットワークが効率良くに働くためには，形質膜ー細胞骨格ー細胞内オルガネラ間の相対位置，つまり細胞の「トポロジーの保持」が非常に重要であり，タンパク質機能発現メカニズムの研究は，「それが本来機能する場所（in situ ）で行う」ことが必要不可欠となってきている。われわれは，細胞形質膜・骨格・オルガネラの「トポロジー」を保ったまま，細胞内を「操作できる」システムとして形質膜を連鎖球菌のstreptolysin O（SLO）により部分的に透過性にした「セミインタクト細胞」システムを開発した。それは，「細胞を一個の試験管」に見立て，細胞質成分・低分子阻害剤等を除去・添加することにより細胞内のタンパク質相互作用・メンブレントラフィック・生理反応等の細胞内イベントを細胞一個の中で再構成し，定量的に検出し，新規の因子をスクリーニングする「一細胞計測システム」の確立を目指すものである。

(2) 細胞骨格系蛋白質によるリポソーム膜の変形や穿孔

瀧口金吾（名古屋大・理）

蛋白質と生体膜との相互作用によって引き起こされる膜の変化を探るために，人口脂質膜小胞（リポソーム）生じる現象を工学顕微鏡で直接観察する実験系が開発されてきている。

今回，1：アクチンとその束化蛋白質を同時に封じ込められたリポソームが，アクチン繊維ネットワークの再構成によって起こす形態変化，2：タリンなどの膜近在性蛋白質によって生じるリポソームの開口（脂質2重膜の開放端形成），について報告する。

(3) オルガネラ間トポロジーのダイナミズム：ミクロオートファジーによるペルオキシソームの分解の分子機構

阪井康能（京都大・農）

メタノール資化性酵母のペルオキシソームは栄養環境に適応してドラマチックな変化を受ける。ペルオキシソームがその代謝に不要となった時に起こるミクロオートファジーによる分解は，ペルオキシソームと液胞の間のオルガネラ間トポロジーがダイナミックに変化する細胞内現象である。ミクロオートファジーの分子機構についてはまったく不明であった。ペルオキシソームと液胞膜を蛍光二重染色することにより，ミクロオートファジーの時間経過をin vivoで追跡する一方で，ペルオキシソーム・オートファジー突然変異株を分離した。このような蛍光顕微鏡下での観察により，ペルオキシソーム・ミクロオートファジーを，遺伝的各段階に解剖して得た新たに知見から，その分子機構について考察したい。

(4) 膜リン脂質ダイナミクスと細胞機能：リン脂質結合を用いたアプローチ

梅田真郷（東京都臨床総合研究所）

生体膜において脂質が二分子膜の内外で非対称に分布することが知られているが，その生物学的意義は明らかではない。我々は，膜リン脂質を特異的に認識するプローブ群を開発し，分裂終期の分裂溝において局所的にリン脂質の非対称分布が解除されることを見い出し，さらにリン脂質分子の局所的な配向性の変化が骨格系の動きを直接制御することを明らかにした。膜脂質動態と細胞骨格連について最近の知見を紹介したい。

(5) SDS処理フリーズフラクチャーレプリカ免疫電顕法による生体膜タンパク質・脂質分子の局在ならびに動態の解析

藤本　和（京都大・医）

本研究会では，フリーズフラクチャーレプリカ免疫電顕法の原理と実際の手技を概説し，膜チャネル，受容体，ポンプや膜リン脂質を含む種々の生体膜構成分子の膜上における二次元的な分布状態，機能変化にともなう動態，トポロジー解析やGFPなどのタグ分子の検出などの結果を供覧し，本法の生体膜構成分子の解析への可能性を議論したい。

(6) 単一チャネルタンパク質の電気的・光学的同時計技術の開発

井出　徹（科学技術振興事業団・分子過程プロジェクト）

近年の光学顕微鏡の進歩により，単一タンパク分子を生きたまま「見て，操作する」技術が確立されつつある。一分子を直視可能な顕微鏡と，単一チャネル電流記録系を組み合わせることにより，チャネルタンパク一分子の動きを直接見ながら，その機能を解析できる系の開発を行っている。具体的には，以下の方法を検討中である。①落射蛍光顕微鏡下に，人口膜系を構築する。②エバネッセント場を用いてパッチ膜を見る。

(7) 時計細胞における概日リズムの光リセット機構とリズム可視化の試み

深田吉孝（東京大・理）

約24時間の周期をもつ概日リズムを支配している概日時計は，動物では視交叉上核・松果体・網膜に存在する。生物時計の発振因子の同定と分子機構の解明は，現代生命科学における重要課題の一つといえる。私共は，ニワトリ松果体を実験材料に用いて，概日時計が外界の明暗周期に同調する光リセット機構を明らかにしようとしてきた。新しい光受容蛋白質ピノプシンと，その下流の分子カスケードに関する研究の現状を紹介する。

(8) 線虫C.elegansにおける神経細胞の遺伝学的及び構造的基盤

桂　勲（遺伝学研究所）

我々は，302個の神経細胞をもつ線虫C.elegansを材料として，行動に異常のある変異体の分離と解析を行っている。遺伝子の働きにより行動を説明するには，神経回路を考える必要があり，構造的な研究が必須となる。本講演では，GEP融合遺伝子が遺伝子発現の部位と時期の同定だけでなく，細胞移動や神経活動のマーカーとしてどの程度使えるかを研究の実例を引いて示す。

(9) 一分子イメージング・一分子ナノ操作技術を使って in vitroでわかったことin vivoでわかること

船津高志（早稲田大・理工）

1分子蛍光イメージング法が開発され，この数年の間にin vitroで様々な成果が得られている。例えば，1分子の生物分子モーターのATPase反応や，滑り運動を直接観察できるようになった。さらに，この技術と光ピンセットによる1分子操作技術を組み合わせて生物分子モーターの化学反応と力学反応を同時計測できるようになり，化学・力学共役に関する興味深い知見が得られた。本講演ではin vitro系での1分子直視・1分子操作技術を用いた生化学の有効性を紹介し，続いて共焦点顕微鏡法や2光子励起蛍光顕微鏡法を用いた細胞内1分子イメージングの現状を紹介する。

(10) 細胞の伸展刺激受容機構

成瀬恵治（名古屋大・医）

伸展刺激による情報伝達機構を解明するため伸展可能なシリコン膜からなるチャンバー上に血管内皮細胞を培養し一方周期的伸展刺激を与えると伸展方向とは垂直方向に内皮細胞が配向した。この反応には機械受容チャネル（SA channel)活性化→外液カルシウム流入→カルシニューリン活性化→src活性化→細胞接着斑蛋白質群チロシンリン酸化→細胞骨格・細胞接着斑のリモデリングというシグナルフローが関与していた。

(11) 細胞接着装置構成因子の細胞内局在決定機構

永渕昭良（京都大・医）

細胞接着分子カドヘリンの細胞間での局在は主にその接着能に依存していると考えられている。しかし最近，カドヘリン結合因子の一つであるαカテニンを介した細胞骨格系との総合作用が接着能とは独立にカドヘリンの局在を決定してることが示唆された。カドヘリンの細胞内局在決定機構を明らかにすることにより，カドヘリン・カテニン複合体が多細胞組織の構築・維持において果たす役割を考えたい。

(12) 細胞膜の動的構造形成

佐甲靖志（大阪大・医）

細胞膜上には，種々の膜機能を担うための特殊化した領域が存在しているが，それらの機能構造領域を形成・維持するには，膜タンパク質の輸送と局在を制御する必要がある。我々は，一粒子追跡法と光ピンセット法により膜タンパク質の一分子，ナノメートルレベルでの運動測定と操作を行った。その結果は，膜タンパク質の運動が細胞質側から，細胞膜骨格・細胞骨格系のネットワークによって制御されていることを示唆するものであった。

2．シナプス可塑性の分子的な実体

1998．6．11－6．12

代表者：高橋正身（三菱化学生命科学研究所）

世話人：森　泰生（生理研）

（1）興奮収縮連関の分子機構

中井淳一（生理研・液性情報）

（2）神経系における受容体活性化カルシウムチャネル：TRP

森　泰生（生理研・液性情報）

（3）脊髄膠様質ニューロンへのC線維入力で見られる可塑性と電位依存性カルシウムチャネルの関連

金子周司（京大院・薬理）

（4）代謝型受容体によるシナプス伝達の前シナプス性抑制

辻本哲宏（東大院・神経生理）

（5）G蛋白質によるCaチャンネルの調節機構

額田敏秀（都精神研・神経化学）

（6）細胞内カルシウムとLTP

加藤邦夫（ERATO）

（7）イノシトール三リン酸受容体Ca^{2+}チャネル；Ca^{2+}シグナル伝達のKey molecule

御子柴克彦（東大・医科研）

（8）海馬CA1錐体細胞におけるEPSPの伝播

宮川博義（東京薬科大・生体高次機能）

（9）神経活動応答性局所シグナルによるシナプス機能の修飾

尾籐晴彦（京大院・神経細胞薬理）

（10）メタボトロピックグルタミン酸受容体によるによる中枢シナプス伝達の修飾

狩野方伸（金沢大・医・生理、CREST）

（11）小脳シナプス伝達可塑性とNO・cGMP系：イメージングからのアプローチ

岡田大助（さきがけ21，理研・脳科学研究センター）

（12）海馬シナプス可塑性におけるノシセプチン受容体の役割

真鍋俊也（東大院・神経生理）

（13）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（生理研・神経化学）

（14）シナプス可塑性とMAPキナーゼ

福永浩司（熊大・医・薬理）

(15) シナプス前終末におけるC-キナーゼの作用メカニズム

八尾　寛（東北大院・生体情報）

(16) 神経伝達物質放出の制御機構の多様性

高橋正身（三菱化学生命研）

(17) 神経伝達物質の放出とシナプス可塑性における Doc2の役割と作用機構

佐々木卓也（阪大院・分子生理化学）

(18) 脳の抗原レセプター様分子 BITとそのチロシンリン酸化

佐野慎一郎（三菱化学生命研）

(19) 単一細胞への競合的RT-PCR法の応用：パッチクランプRT-PCR法を用いた受容体サブユニットmRNAの発現量の解析

都筑馨介（群馬大・医・生理）

(20) Fynを用いた動物行動を制御する遺伝情報の解析

八木　健（生理研・神経情報）

(21) 脳の可塑性に伴う遺伝子応答とシナプス特異性の発現

井ノ口馨（三菱化学生命研）

参加者名

八尾　寛（東北大・医・生体情報学），都筑馨介（群馬大・医・第二生理），真鍋俊也，辻本哲宏（東京大院・医・神経生理学），宮川博義（東京薬科大学生命科学部生体高次機能），額田敏秀（東京都精神医学総合研究所・神経化学研究部門），加藤邦夫（科学技術振興事業団創造科学推進事業），岡田大助（さきがけ21研究,理化学研究所・脳科学総合研究センター，細胞内情報研究チーム），井ノ口馨，佐野慎一郎，高橋正身（三菱化学生命科学研），狩野方伸（金沢大・医・第二生理），尾籐晴彦（京都大院・医・神経細胞薬理学），金子周司（京都大院・薬・医療薬理学分野），佐々木卓也（大阪大院・医・生化学，分子生物学），福永浩司（熊本大・医・第一薬理），森　泰生，八木　健，山肩葉子（生理研）

研究会概要

シナプス可塑性は学習・記憶の基礎を成す重要な細胞過程の一つである。現在，分子的にシナプス可塑性を解明しようという試みが，世界中でなされている。本研究会においては，短期から長期にいたるシナプス可塑性に関与する分子群に関する研究を，網羅的にとりあげた。特に，接着分子，リン酸化酵素，受容体，イオンチャネル等を対象にする研究者を中心に集まっていただき討議を行った。

(1) 興奮収縮連関の分子機構

中井　淳一（生理学研究所　液性情報研究部門）

骨格筋において細胞膜の電位依存性L型カルシウムチャネル（ジヒドロピリジン受容体，DHPR）と筋小胞体のリアノジン受容体は興奮収縮連関の中心的機能を果たしている。この2つの分子は蛋白どうしが結合して情報伝達を行っていると考えられているが，その分子機構は明らかになっていない。我々は興奮収縮連関の分子機構を明らかにするため，電位依存性 L型カルシウムチャネル（α1s）を先天的に欠損する dysgenic mouseおよび骨格筋型リアノジン受容体(RyR-1)遺伝子を人工的に破壊した Knockout mouse（dyspedic mouse）の培養骨格筋細胞に種々の cDNA発現させ，L型カルシウムチャネルの機能とリアノジン受容体の機能を測定した。

これまでの研究から DHPR（α1s）のリピートIIとリピートIIIの間の細胞内ループ（II-IIIループ）が骨格筋型興奮収縮連関に重要であることが明らかにされていた。そこでリピートIIとリピートIIIの間でさらにキメラ DHPRを作製し dysgenic mouseに発現させ検討を行った。その結果II-IIIループの中央からやや C末よりの 18アミノ酸が骨格筋型興奮収縮連関に重要であることが新たに明らかになった。また II-IIIループにあるセリン687は容易にリン酸化を受けることが知られていたので，セリン687をアラニンに置換して興奮収縮連関に及ぼす影響を調べたが，このS687Aミュータントでは骨格筋型興奮収縮連関は保たれていた。

次に RyR-1を欠く dyspedic mouseであるが，この培養骨格筋細胞のカルシウム電流を測定したところ，L型カルシウム電流は正常の約1／30に減少しており，RyR-1を発現させることによって L型カルシウム電流が顕著に増加する現象が見られた。この事は RyR-1が DHPRからの情報を受けて活性化され筋小胞体からカルシウムを遊離する順方向性の情報伝達と，逆にリアノジン受容体から L型カルシウムチャネルの機能を活性化する情報伝達があることを示しており，DHPRと RyR-1が直接分子同士結合して情報伝達を行っているという考えを示唆する結果を得た。また心筋型リアノジン受容体（RyR-2）を発現させても RyR-1に見られるような DHPRとの相互作用はしないことが見い出された。RyR-1とRyR-2のキメラリアノジン受容体を用いた実験からは L型カルシウムチャネルとリアノジン受容体（RyR-1）との蛋白蛋白相互作用がリアノジン受容体の foot領域を介して行われることが明らかになった。さらにリアノジン受容体の少なくとも2か所の異なる部位がこの相互作用に関係することが明らかとなった。

(2) 神経系における受容体活性化Caチャネル:TRP

森　泰生（生理学研究所・液性情報）

形質膜越のカルシウム流入は，活動電位の発生および細胞内Ca濃度調節を司るという，2重の意味において重要である。Ca流入を担うのがCaチャネルであり，電位作動性および非電位作動性のものが存在し，2つの経路がどのように分業しながら生理的な役割をはたしているかを知ることは非常に重要である。

非依存性Caチャネルには多様なチャネルが含まれる。中でもG蛋白共役型受容体やチロシンキナーゼ型受容体の活性化により作動する受容体活性化Caチャネル(RACC)は，免疫細胞等での増殖シグナルへの関与等が重要である。動物細胞におけるRACCを明らかにするために，ショウジョウバエ光受容細胞における光活性化電位を担う，TRPチャネルのマウスホモログの同定を行ってきた。マウスTRP蛋白質は，7つの遺伝子によりコードされている。また，TRP Caチャネルは神経系に非常に豊富に発現されており，Caストアに依存的なものと非依存的なものに分類されることも明らかになった。今回は中でもCaストア非依存性・Ca選択性カチオンチャネルを形成するTRP5に焦点をあて，その活性化機構に言及したい。

(3) 脊髄膠様質ニューロンへのC線維入力で見られる可塑性と電位依存性カルシウムチャネルの関連

金子周司，水上　潔，鴻海俊太郎，佐藤公道
（京都大学大学院・薬学研究科・薬理）

末梢組織への侵害刺激により発生した侵害情報は有髄Aδあるいは無髄C線維をもつ一次感覚神経により脊髄後角を介して中枢ニューロンへ伝達される。侵害受容性の一次感覚神経は上位中枢への伝達を担う後角第I層へ直接シナプスを形成する一方で，脊髄後角第 II層に位置するニューロンに対してもシナプスを形成するが，これら第 II層のニューロンは第I層のニューロンを興奮性ないし抑制性に制御することで，侵害受容応答の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。これまでに in vivoの研究で，C線維の反復刺激により脊髄後角における興奮性の増大が報告されており，この現象は wind-upと呼ばれ，二次性疼痛の基礎的現象と考えられている。本研究では，成熟ラットから作成した後根付き脊髄スライス標本を用いて，後根の単発ないし反復刺激によって誘発されるシナプス応答の可塑性とその調節について検討した。

【方法】SD系ラット（150-200 g）からウレタン麻酔下で脊髄を摘出後，L5または L6から後根を残したまま厚さ400～500μmの横断スライスを作成した。この脊髄スライスの膠様質ニューロン

からblind whole-cell patch-clamp記録をcurrent clamp modeで行った。後根刺激は duration 100 μ sec（Aδ線維の刺激）ないし400 μ sec（C線維の刺激）のパルスを 1回，あるいは反復刺激としては 100 Hz, 0.2 secの刺激を 2秒間隔で 10回与えた。

【結果】1. C線維の反復刺激は第II層ニューロンにおいてslow depolarization（SD）を誘発した。SDはAδ線維のシナプス応答では観察されなかった。薬理学的な検討から，SDはグルタミン酸受容体の各サブタイプ（NMDA, AMPA, mGluR）および NK1受容体を介さないものと考えられた。2. 電位依存性カルシウムチャネル阻害薬を用いた検討により，AδおよびC線維を介する通常の EPSPがシナプス前 N-typeチャネルを介しているのに対して，SDにはシナプス前 P-typeチャネルが主として関与していることが明らかになった。3. オピオイド受容体の関与について調べたところ，SDは μ オピオイドアゴニストによって選択的に抑制されたが，δ および κ アゴニストは作用を示さなかった。

【考察】現在，SDを媒介する神経伝達物質は同定されていないが，C線維に特異的であること，μオピオイド受容体を介する抑制を受けることから，脊髄において痛覚の制御に関連するシナプス可塑性のひとつの型ではないかと考えられる。

(4) 代謝型受容体によるシナプス伝達の前シナプス性抑制

辻本哲宏（東京大学大学院医学系研究科・神経生理学）

前シナプス終末に発現する代謝型受容体の伝達抑制の機構の機構には，①前シナプス終末でのCa^{2+}流入の抑制，② K^+チャンネルを開放することにより終末部位での脱分極抑制，③ Ca^{2+}流入後の伝達物質放出機構の直接的抑制が考えられる。我々はラットの聴覚伝導路に存在する巨大シナプス標本を用いてこれらの可能性を検討した。ラット（10-18日齢）の延髄の薄切片（厚さ150ミクロン）を作成し顕微鏡下に台形体内側核を同定しながら，巨大前シナプス（the Calyx of Held)と後シナプス細胞にホールセル記録をおこなった。前シナプス Ca^{2+}電流(IpCa)は，潅流液にテトロドトキシンとTEAを添加することで電位依存性Na^+電流とK^+電流を抑制して記録した。記録されたIpCaは低濃度のアガトキシンIVA (IC50 < 5 nM)で抑制されることからP型であることが判明した。代謝型グルタミン酸受容体のアゴニストである L-AP4を与えるとIpCaは抑制されが，脱分極作動性K^+電流には影響がなかった。ついで伝達物質放出機構への直接的作用を検討するため，前シナプスと後シナプス細胞からの同時ホールセル記録をおこなった。興奮性後シナプス電流 (EPSC)は L-AP4の投与によりIpCaと EPSCは同時に抑制され，washout期には両者とも並行して回復した。L-AP4投与時とwashout期のEPSCの大きさと IpCaの関係は，細胞外液のCa^{2+}濃度を低下させた時の IpCa（入力）とEPSC（出力）の関係と同様であることから，L-AP4はIpCaを抑制することにより前シナプス性伝達抑制をおこなうことが判明した。次にもう

一つの代謝型受容体としてGABAb受容体が知られている。巨大前シナプスには内向き整流性K^+電流は存在しBa^{2+}にて抑制されるが，GABAb受容体アゴニストである Baclofenはこの内向き整流性K+電流と脱分極作動性K^+電流には作用しなかった。BaclofenによってIpCaは抑制され，この抑制には G蛋白質か関与することが判った。Baclofen存在下での IpCa（入力）EPSC（出力）関係は細胞外Ca^{2+}濃度を低下させたときの入出力関係と同様であった。以上のことから代謝型グルタミン酸受容体，代謝型 GABA受容体は前シナプスの電依存性Ca^{2+}電流を抑制留守ことで伝達物質の放出を抑制することが解明された。

(5) G蛋白質によるCaチャンネルの調節機構

額田敏秀（東京都精神医学総合研究所・神経化学研究部門）

アフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いて，中枢神経に存在する電位依存性Caチャンネルに対するG蛋白質による調節機構を検討した。Caチャンネルを構成するサブユニット（α1B・α1Aあるいは α1C，α2，β1）に対するmRNAを卵母細胞に微量注入したとき， N型，P/Q型，L型Caチャンネルがそれぞれ機能的に発現した。これらに加えて，受容体（δオピオイド受容体，β2アドレナリン受容体），さらにG蛋白質|各種 αサブユニット（Gα）あるいは β1γ2サブユニット（Gβ1γ2）|を共発現させたとき，N型Caチャンネルは受容体刺激からGi3 α・Go1 α・Gz α・Gs αを介して，P/Q型Caチャンネルは受容体刺激からGi1 α・Gi2 α・Gi3 α・Go1 αを介して，それぞれ抑制性の制御を受けることが明らかとなった。一方，Gb1g2によるCaチャンネルの抑制は受容体刺激を必要をせず，しかも，P/Q型に比較して N型Caチャンネルにおいて強く認められた。L型CaチャンネルはG蛋白質の抑制性調節を受けなかった。

次に，CaチャンネルとG蛋白質との相互作用部位を決定する目的で，N型-L型間および P/Q型-L型間のキメラ Caチャンネル，さらには N型および P/Q型チャンネルの部分欠損変異 Caチャンネルを作製し，これらのチャンネルに対するGαおよびGβ1γ2の作用を検討した。その結果，N型Caチャンネルは，1）チャンネルC末端とGα内ループとGβγとの，双方の相互作用により抑制を受けることが明らかとなった。一方，P/Q型Caチャンネル活性の抑制は，チャンネルC末端とGαとの相互作用に大きく依存した。さらに，N型およびP/Q型 CaチャンネルのC末端がGαと結合し，リピートI−II間の細胞内ループがGβγと結合したため，GαおよびGβγによるCaチャンネルの抑制は，直接的な相互作用の結果であることが強く示唆された。

(文献)

1. Furukawa, T., Nukada, T. et al. J. Biol. Chem. 273, in press, 1988.
2. Furukawa, T., Miura, R. et al. J. Biol. chem. 273, in press, 1988.

(6) 細胞内カルシウムとＬＴＰ

加藤邦夫（科学技術振興事業団創造科学推進事業（ＥＲＡＴＯ）

長期増強（LTP）はシナプスにおける記憶の機構と考えられ，その誘導には細胞内のカルシウムの増加が必要条件と考えられている。細胞外からのカルシウムの流入にはNMDA受容体が重要で，細胞内のカルシウム貯蔵庫からの放出（IP3受容体：IICR，リアノヂン感受性受容体：CICR）が関与しているかどうかは従来薬理学的に調べられてきた。IICR，CICRそれぞれの阻害薬がLTP形成を阻止することからこれらのカルシウムもLTPの形成に必要と考えられたが，必要としないとする報告も多く，その意義は明らかではなかった。私達は，中枢神経系に多くその発現がみられるIP3-1型（IP3R1）受容体と海馬CA1領域に多く発現しているリアノジン受容体３型（RyR3）のノックアウトマウスを用いて海馬CA1領域でのLTP形成を調べてみた。IP3R1受容体欠損マウスは20-22日程度で死亡し，生育不良の傾向を示す。また歩行失調の他，けいれん発作，後弓反張といったてんかん様発作を表現型としてもつ (1)。IP3R1の欠損マウスではテタヌス刺激によりホモ接合型は野生型に比べてLTPの有意な増強が観察された。発生，成長段階での，失われた機能の代償作用を検討するために，IP3R1の特異的機能阻害抗体を記録電極につめて誘導刺激を与えると同様にLTPの増強が観察された。このことからLTPの増加はIP3R1欠損による直接的な効果であることがわかった。LTPの形成に重要な働きをするNMDA受容体の特性を調べると，Ｉ－Ｖ特性では比較的低い膜電位においてホモ型のNMDA電流の有意な増加がみられた (2)。また脱分極刺激によるスパイクのアダプテーションがホモ型において有意に低下していることがわかった。このことからポタシウムチャンネルの活性が低下していることが推測される。またFura2を指示薬として細胞内のカルシウムの濃度変化を調べると，高頻度入力刺激にともなって脱分極，カルシウムの上昇がみられる。この最大値は変わらないが，最大値に達したあとの再分極，またカルシウム濃度の減少が遅延していることがわかった。　一方，RYR3受容体欠損マウスは表現型を示さないが，学習行動の軽度の上昇が認められた。また海馬スライスを用いた実験で，野生型ではLTPが形成されない閾値付近の短い高頻度刺激を与えると，ホモ型ではLTPが形成された。またこのLTPはAP5で阻害されず，AP5とＬ型カルシウムチャンネル阻害薬のnimodipine存在下で阻害された。膜電位依存性カルシウムチャンネルの特性にはなんら目立つ変化は認められなかった。IP3受容体欠損マウスのLTPはNMDA依存性であることからIP3受容体欠損マウスとRYR3欠損マウスは同じLTPの増強を示すがその機構は異なり前者はカルシウムの細胞への流入を増加させ，後者はLTP形成に必要なカルシウムの閾値を低下させているものと推察される。

参考文献

(1)M. Matsumoto et al., Nature, 379, 168-171, 1996

(2)K. Kato et al., Abstract for 27th Annu. Neurosci. Meeting (1997)

(7) イノシトール三リン酸受容体 Ca^{2+}チャネル；Ca^{2+}シグナル伝達のKey molecule

御子柴克彦　（東京大学・医科学研究所・化学研究部）

IP3受容体は，IP3を認識して細胞内の Ca^{2+}ストアからCa^{2+}を細胞質へ放出させるCa^{2+}チャネルで，この IP3/Ca^{2+}シグナル変換を担うキー分子である。従って，IP3受容体ファミリーの基本構造と機能，および IP3/Ca^{2+}シグナル伝達の解明はCa^{2+}依存性の多彩な細胞機能を理解する上で重要である。我々は，cDNAクローニングによりIP3受容体ファミリーには３つのタイプが存在すること，各タイプは特異的な発現パターンを示すことを明らかにした。IP3受容体は 四量体でチャネルを形成する。我々はタイプ特異的な抗体を用いることにより，IP3受容体チャネルはホモ以外にヘテロ４量体形成も可能であることを証明した。Ca^{2+}ストア膜上のIP3受容体チャネル分子を電子顕微鏡で直接可視化することにより，その全体像を捉えることに成功した。急速凍結フリーズレプリカ法を用いて小脳プルキンエ細胞の樹状突起を観察し，IP3受容体はベシクル状構造物の表面に二次元結晶様の配列で正方形粒子として存在することを明らかにした。　いかにしてIP3シグナルが受容体により認識されるのかはシグナル変換機構を解明する上で重要である。我々は本来のIP3受容体とほぼ等しい高いIP3親和性をもつリガンド結合部位を大腸菌で発現する系を確立し，その構造機能解析を行った。その結果，IP3の結合に必須なアミノ酸とコア領域を同定した。ヒト由来の全長のタイプ１とタイプ３ IP3受容体を SF9昆虫細胞で特異的に発現する系を確立した。これにより，タイプ特異的な機能の分子レベルでの解析が可能となった。この系を用いることで，タイプ１とタイプ３の IP3結合親和性がCa^{2+}によって正反対の制御を受けることを明らかにした。IP3シグナルとCa^{2+}シグナルがIP3受容体のタイプ特異的にクロストーク制御することで，よりファインなCa^{2+}動態をもたらすことが示唆された。さらに，タイプ１とタイプ２がCa^{2+}依存的にカルモジュリン (CaM)と結合する部位を同定し，タイプ３にはCaM結合活性がないことを明らかにした。この結果は CaMがタイプ特異的な Ca^{2+}依存的制御をもたらすことを示唆する。抗タイプ１抗体を用いたイムノアフィニティーカラムでタイプ１特異的な精製法を確立した。これを人工リポソームに再構成してIP3誘導 Ca^{2+}放出をCa^{2+}蛍光プローブで測定する系も開発した。IP3受容体四量体チャネルは最大で４個の IP3を結合可能であり，そこに協同性があるか否かが論争になっていたが，この系を用いることでタイプ１受容体のIP3結合には協同性はなく Ca^{2+}放出には弱い協同性があることを示した。また，IP3誘導 Ca^{2+}放出の quantal release現象は異なった IP3感受性をもつ複数のタイプが混在するためのheterogeneityで説明しようとする考えがあったが，この系を用いて我々はタイプ１単独でもquantal releaseをすることを証明した。同じくこの系を用いて，新規作用薬として注目されているカビの代謝産物から単離されたアデノフォスチンは，IP3よりも強力な作用薬で，Ca^{2+}放出で強い正の協同性をもち，quantal release活性があることも明らかにした。

(8) 海馬ＣＡ１錐体細胞におけるEPSPの伝播

宮川博義，井上雅司，工藤佳久
（東京薬科大・生命科学・生体高次機能学）

神経細胞の樹状突起におけるシナプス入力の統合はケーブル特性と電位依存性チャネルの分布によって決定される。電位感受性蛍光色素で染色したラット海馬スライスを用い，光学的多点同時測定法によりシナプス入力の樹状突起に沿った伝播と減衰を直接測定し，海馬 CA1錐体細胞樹状突起のケーブル特性を調べたところシナプス入力部位ではEPSPのピークは刺激後 4.1±0.9 msecで，半減期 34.7±5.3 msecであった。細胞体部位では入力部位に比べ 13.6±1.4 msecのピークの遅延が観察された。コンパートメントモデルに基づく神経細胞のシミュレータ（NEURON）の樹状突起部に，電位感受性蛍光色素によって計測したシナプス入力部位における電位変動を電位固定のコマンドとして与え，シナプス電位の伝播と減衰を計算した。もっとも実験結果を忠実に再現する条件を求めたところ，Rmは5～10K ohm cm^2，Riは20～50 ohm cmであることがわかった。

(9) 神経活動応答性局所シグナルによるシナプス機能の修飾

尾藤晴彦（京都大学医学研究科　神経細胞薬理学教室）

高度に分化を遂げたニューロンでは，細胞内コンパートメントとしてのスパイン内や樹状突起内における local signalingが非常に発達しており，これを理解することが，シナプス可塑性の分子機構を解明する上でも極めて重要と考えられる[1) 2)]。われわれは，中でも Ca^{2+}，および低分子量 G蛋白を介した神経情報伝達機構が，すでに知られているグローバルな作用とは別個に，ローカルな調節にも重要な役割を果たしていると考え，Ca^{2+}，および低分子量 G蛋白の様々な作用点について探索を進めている。今回は，A）樹状突起に分布する様々な電位依存性カルシウム流入源[3)]が，カルシウム依存性 CREBシグナリング[4)]といかに選択的に共役しうるかという問題と，B）Rho標的蛋白 Citronは PSD-95を介して NMDA受容体と蛋白複合体を形成する[5)]，という新たな知見，の2点について現状報告を行いたい。

文献

1）尾藤晴彦　生化学 70, 466-471, 1998。
2）Bito, H. Cell Calcium 23, 143-150, 1998.
3）Kavalali, E., Zhuo, M., Bito, H., Tsien, R.W. Neuron 18, 651-663, 1997.
4）Bito, H., Deisseroth, K., Tsien, R.W. Cell 87, 1203-1214, 1996.
5）Furuyashiki, T., Bito, H., Narumiya, S., et al. submitted.

(10) メタボトロピックグルタミン酸受容体による中枢シナプス伝達の修飾

狩野方伸（金沢大・医・第二生理，CREST）

グループIメタボトロピックグルタミン酸受容体 (mGluR1/5)は Gqファミリーの3量体 Gタンパク (GqまたはG11) に couple し，中枢神経系の興奮性シナプス後部の active zoneの周囲に限局している。これに対し，グループ II (mGluR2/3)およびグループ III (mGluR4/6/7/8) メタボトロピックグルタミン酸受容体は Gi または Go に coupleしシナプス前部に存在する。グループIIがシナプスから離れた部分に存在するのに対し，グループIIIは synaptic cleftに面するシナプス前膜に存在するとされている。このようなシグナル伝達とシナプスにおける存在部位の違いは，3つのグループのメタボトロピックグルタミン酸受容体が興奮性シナプス伝達に異なった役割を担っていることを強く示唆している。私たちは小脳プルキンエ細胞への興奮性シナプスをモデルとして，グループIおよびグループIIによる興奮性シナプス修飾について調べた。

(1) mGluR2/3 によるシナプス前からのグルタミン酸放出の調節

ラット小脳スライスプルキンエ細胞からwhole-cell recordingを行い，登上線維を刺激して興奮性シナプス後電流(EPSC)を記録した。ACPDや DCG IV などのグループIIメタボトロピックグルタミン酸受容体アゴニストは登上線維 EPSCを容量依存的かつ可逆的に抑制し，この効果はアンタゴニストのMCPGによってブロックされた。この効果は，細胞外 Ca^{2+}濃度の影響を受け，2発刺激に対する応答 (paired-pulse depression; PPD)を変化させることなどから，シナプス前部のmGluR2/3を介する効果であると結論された。MCPGをバスに与えると登上線維 EPSCの振幅が15%程度増大した。また，グルタミン酸トランスポーター阻害剤の PDCを与えると，登上線維EPSCの振幅の減少と PPDの変化が起こったが，これは MCPGによってブロックされた。これらの結果は，シナプス前部の mGluR2/3が細胞外液中のグルタミン酸濃度に反応してグルタミン酸放出を調節していることを示唆している。

(2) mGluR1カスケードと小脳長期抑圧

プルキンエ細胞に強く発現している mGluR1，Gqのαサブユニット(Gαq)，およびフォスフォリパーゼC β4 (PLC β4)のノックアウトマウスと，プルキンエ細胞樹状突起スパインに滑面小包体と IP3 受容体が存在しない自然発生の dilute-opisthotonus dop ratを用いて，mGluR1シグナル伝達と小脳 LTDの関連について調べた。いずれの動物も，小脳，プルキンエ細胞および平行線維シナプスの形態に異常は認められず，電気生理学的にも，平行線維および登上線維からプルキンエ細胞への興奮性シナプス伝達の基本的性質や電位依存性 Ca^{2+}チャネルは正常であった。しかし，いずれにおいても LTDは欠如していた。これらの結果から，mGluR1-Gαq-PLCβ4を介して，プルキンエ細胞樹状突起スパイン内部で IP3受容体を介する Ca^{2+}遊離が起こることがLTD誘発に必要であることが示唆された。

(11) 小脳シナプス伝達可塑性とNO・cGMP系：イメージングからのアプローチ

岡田大助（科学技術振興事業団，さきがけ21研究，知と構成領域
理化学研究所，脳科学総合研究センター，細胞内情報研究チーム）

NOは，NO合成酵素（NOS）によりカルシウムカルモジュリン依存的に発生し，可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）を強力に活性化するので，NOS含有ニューロンの活動依存的に標的細胞内でサイクリックGMP（cGMP）合成を引き起こすシグナル分子である。小脳運動学習の基盤とされる平行線維シナプス伝達の長期抑圧にNO・cGMP系が必要であることは，NOS阻害剤・NOスカベンジャー・Gキナーゼ阻害剤を用いた阻害実験，NOドナー・cGMPドナーによる誘導実験によって，主にラット小脳切片で示されている。NO・cGMP系が運動学習に必要であることも主にウサギやネコを用いた阻害実験で示されている。一方，主に培養細胞では長期抑圧様の現象にNO・cGMPが不要であることが示されている。切片でもプロトコールによっては，NO・cGMP系が不要でカルシウム依存性の長期抑圧が観察される。長期抑圧にはNO依存性成分と非依存成分があると考えるのが妥当である。では，NO依存性と非依存性の長期抑圧は，運動学習にとってどのような意味を持つのだろうか。

NOは気体なので細胞膜を越えて拡散する可能性がある。活動依存的に発生したNOが周囲の活動していないシナプスに届けば，シナプス伝達によらずに神経活動を知らせることが可能になる。しかし，このNOに特徴的な情報伝達モードはいまだ充分に確認されていない。小脳プルキンエ細胞にはsGCが認められるが，NOSはここには認められず，周囲の星状細胞，籠細胞，顆粒細胞にある。周囲の細胞から到達したNOがプルキンエ細胞内でcGMPを作ると予想される。しかし，これまでプルキンエ細胞内にはNO依存性cGMP合成が検出されていない。このことが長期抑圧にNO・cGMPが不要であるとする説の根拠となっている。またこの結果，シナプスを越えたNO拡散の可能性やNO標的細胞が不明のまま混乱した状態にある。

拡散性シグナルであるNOに依存した長期抑圧は，長期抑圧のシナプス特異性と矛盾する可能性がある。カルシウムが上昇しない部分ではcGMPが長期増強を起しうることから，NOの拡散が可塑性の起きる範囲を規定し，その範囲内でカルシウムの増減に応じて可塑的変化にコントラストが形成されるという仮説をたてた。この検証には，NOがどこまで拡散するか，拡散した先の神経活動に応じて何を起こすのかを知ることが必要なので，NO，cGMP，神経活動を観察するイメージング法を開発している。

cGMP結合により活性化すると思われるタイプ5ホスホジエステラーゼ（PDE5）がプルキンエ細胞に存在する。同細胞内でNO依存性cGMP合成が検出されないのは，cGMP上昇がPDE5により関知され直ちに加水分解されるからと考えた。PDE5をcGMPセンサーとして利用し，蛍光基質アントラニルcGMPの加水分解に伴う蛍光変化でPDE5活性をモニタ

ーすることにより，プルキンエ細胞内のｃＧＭＰ上昇を検出することに成功した。平行線維終末，籠細胞がＮＯ発生源として有力である。

(12) 海馬シナプス可塑性におけるノシセプチン受容体の役割

真鍋俊也（東京大学大学院医学系研究科神経生理学）

オピオイド受容体と構造が類似するオーファンレセプターはその内在性のアゴニストが不明であったが，最近17個のアミノ酸からなるペプチドであるノシセプチン（オーファニンFQとも呼ばれる）が内在性アゴニストとして同定された。アゴニストと受容体のいずれもが海馬に豊富に存在することが明らかになったため，ノシセプチンの海馬ニューロンに対する効果やシナプス伝達とその可塑性における役割を検討した。

マウス海馬スライスを作製し，CA1あるいはCA3錐体細胞よりホールセル記録を行った。膜電位を-70mVに固定して膜電流を測定しながら，ノシセプチン（1 mM）を潅流投与したところ，時間経過の遅い，入力抵抗の減少を伴う外向き電流が観察された。この電流は，内向き整流特性を示し，反転電位はカリウムイオンの平衡電位にほぼ一致し，細胞外バリウムイオンにより著明に抑制されたことから，Ｇタンパクにより活性化される内向き整流性カリウムチャネルの活性化により生じると考えられた。

次に，生体におけるノシセプチン系の役割を詳しく検討するため，ノシセプチン受容体を欠損するマウスを遺伝子ターゲッティング法により作製し，まず海馬が関連するとされる記憶・学習能力の変化の有無を観察した。変異型マウスは，Morris water mazeおよび passive avoidanceのいずれのテストにおいても，野生型マウスに比べて，学習・記憶能力が優れているという結果を得た。一方，野生型および変異型のマウスから海馬スライスを作製し，細胞外記録法によりシナプス応答を記録して，CA1領域での長期増強（LTP）を解析したところ，変異型ではLTPが野生型の約2倍に増大していることが明らかになった。これらの結果は，これまでのノックアウトマウスでの報告とは異なり，個体レベルとスライスレベルのいずれにおいても機能が向上するという点で特徴的である。この変化がどのような分子機構によりもたらされているかを同定することは今後の課題であるが，ノシセプチン受容体が細胞内cAMP濃度やMAPキナーゼ活性を調節することから，タンパクリン酸化などの細胞内生化学過程の関与が予想される。

1）Ikeda, K., Kobayashi, K., Kobayashi, T., Ichikawa, T., Kumanishi, T., Kishida, H., Yano, R. and Manabe, T. (1997) Functional coupling of the nociceptin/orphanin FQ receptor with the G-protein-activated K+ (GIRK) channel Mol. Brain Res. 45:117-126

2）Manabe, T., Noda, Y., Mamiya, T., Katagiri, H., Houtani, T., Nishi, M., Noda, T., Takahashi, T., Sugimoto, T., Nabeshima, T. and Takeshima, H. (1998) Facilitation of LTP and memory in

mice lacking nociceptin receptors Nature (in press)

(13) 神経活動と Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナ-ゼ II

山肩葉子（生理学研究所·神経化学部門）

Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナ-ゼ II (CaMKII) は，シナプス可塑性をはじめとして，様々な神経機能への関与が示唆されている。生体内における急性の神経活動の賦活化とこのキナ-ゼの活性状態との関連を調べるために，ラットに電撃けいれん刺激を与えて，海馬，大脳皮質ホモジネ-ト中のキナ-ゼ活性と自己リン酸化状態の変動を，刺激後の時間経過に従って観察した。その結果，刺激直後 (30秒) に，Ca^{2+}/カルモジュリン非依存性活性と Thr-286 (α) / 287 (β) の自己リン酸化レベルの大幅な低下が認められ，5分後にはコントロ-ルレベルにまで回復した。抗けいれん剤の前投与によってけいれん活動を抑制した場合には，このような低下は認められなかった。また，ペンチレンテトラゾ-ルの投与によって誘発した急性けいれんの場合も，けいれん開始より30秒の時点で，同様の低下が認められた。さらに，電撃けいれんの刺激直後のサンプルについて超遠心による分画を行ったところ，可溶性画分から顆粒画分への CaMKII の部分的な移行を示唆する所見が得られ，この変化もまた，5分後のサンプルにおいては既に消失していた。

これまで，シナプトソ-ムや培養神経細胞，脳スライスを用いて，各種刺激による CaMKII の活性化が観察されてきたが，本実験においては電撃けいれんというモデルを用いて生体内での動態を調べることができた。その結果，急性の可逆的な神経活動の賦活化は，主要な自己リン酸化部位の脱リン酸化によって，活性化状態にある CaMKII の迅速かつ一過性の減少を引き起すことが判明した。このことから，CaMKII の活性化状態は，正の方向のみならず負の方向にも可逆的に調節されうることが証明され，この活性化状態を一定のレベルに調節·維持することは，脳が正常な機能を果たす上で生理的に重要であると考えられる。

参考文献:

Yamagata, Y. and Obata, K. Dynamic regulation of the activated, autophosphorylated state of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II by acute neuronal excitation in vivo. J. Neurochem. (in press)

(14) シナプス可塑性と MAP キナーゼ

福永浩司（熊本大学・医学部・第一薬理）

MAP (mitogen-activated protein) キナーゼ は細胞の増殖，分化や細胞周期制御のシグナル伝達において重要な役割を担っている。 その発現は神経細胞に高いにもかかわらず，その機能的役割は不明である。私達は培養海馬神経細胞においてグルタミン酸受容体刺激後の MAP キナーゼの活性化機構について調べた。グルタミン酸刺激による MAP キナーゼの活性化反応は，主に NMDA 受容体を介しており，プロテインキナーゼ C とカルモデュリン依存性キナーゼがその活性化機構に関与していた。活性型 MAP キナーゼを認識する抗体を用いて活性化部位を調べると，細胞体，神経突起さらに核において活性型 MAP キナーゼの存在が確認できた。 32P-無機燐酸でラベルした培養細胞を用いて， MAP キナーゼの標的分子を検索した。グルタミン酸刺激による持続的な MAP キナーゼの活性化反応によって MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) の燐酸化反応が亢進した。次に，シナプス伝達長期増強 (LTP) を誘発した海馬 CA1 領域において MAP キナーゼの活性化反応を調べた。 シェーファー側枝の高頻度刺激によって，CA1 領域の MAP キナーゼの活性は一過性に上昇した。しかしながら， MAP キナーゼキナーゼ (MEK) 阻害剤である PD098059 の前処理によって MAP キナーゼの活性化反応を阻害しても，同様の LTP が誘導された。これらの結果は MAP キナーゼの活性化反応が海馬 CA1 領域の LTP の発現に重要であるという English とSweatt の報告と矛盾している。さらに， MAP キナーゼの LTP 維持過程への関与を検討する必要がある。海馬 LTP においては MARCKS の燐酸化反応も持続的に亢進していた。MARCKS は MAP キナーゼの in situ における良好な基質であり，また神経回路形成に重要な蛋白質である。海馬 LTP における MAP キナーゼの活性化反応，MARCKS の燐酸化反応を解析することによって，シナプス可塑性における本酵素の役割を考察する。

Fukunaga K. and Miyamoto E., Role of MAP kinase in Neurons. Mol. Neurobiol. 16, 79-95 (1998)

(15) シナプス前終末におけるC-キナーゼの作用メカニズム

八尾　寛（東北大学大学院医学系研究科・生体情報学）

ニワトリ胚毛様体神経節巨大シナプス前終末からの伝達物質放出は，フォルボルエステル(PMA)により，C-キナーゼ (PKC)依存的に増強された。PMAは，シナプス前終末内 Ca^{2+}変動に影響しなかったので，Ca^{2+}流入以降の開口放出機序を修飾していることが示唆される。PMAの増強効果は，細胞外Ca^{2+}濃度に依存しており，Ca^{2+}が 10mMのときは，有意の増強が認められ

なかった。このことから，PMAは，開口放出のCa^{2+}感受性を増大させていることが示唆される。細胞外液 Ca^{2+}を Sr^{2+}に置き換えると，同期した早い成分と，同期しない遅い成分の伝達物質放出が識別された。PMAは，この 2成分をほぼ同じ時間経過で増強した。Sr^{2+}-分泌関係を解析すると，それぞれの成分のSr^{2+}感受性が亢進していたが，最大分泌能に対する作用は認められなかった。PKCの活性化は，それぞれの成分の開口放出過程における小胞融合確率のSr^{2+}感受性を増大させたことが示唆される。2成分の由来について考察する。

(16) 神経伝達物質放出の制御機構の多様性

高橋正身（三菱化学生命科学研究所）

シナプス終末からの神経伝達物質の放出は神経細胞の持つほぼ唯一の出力機構であり，神経伝達物質放出機能を，短期的あるいは長期的に制御することは，神経回路に可塑的な変化を引き起こすための重要な機構の一つであると考えられる。短期的な変化にはタンパク質リン酸化の関与が考えられているが，その詳細は明かにはされていない。この問題を解決するため，我々はPC12細胞や初代培養神経細胞を用いて，シナプス前部のリン酸化基質タンパク質の探索を行っている。役割を果たしている。PC12細胞にフォルボールエステルわ作用させ細胞内の PKCを活性化すると，神経伝達物質放出に不可欠な SNAREタンパク質の一種であるSNAP-25のSer187がリン酸化されることが明かとなった。しかしPMA処理によるSNAP-25のリン酸化量と，脱分極依存的な神経伝達物質放出の促進作用の度合いとを比較したところ両者の間には相関は見られなかった。さらに一般的なセリンスレオニンキナーゼの阻害剤であるスタウロスポリン（1 μ M）を作用させた場合，PKCによるSNAP-25のリン酸化は完全に抑制されるのに対し，PMAによるカテコールアミン放出の促進は部分的にしか抑制されなかった。PMAによる神経伝達物質放出の促進に対するスタウロスポリンの作用は用いる細胞間で大きく異なっており，培養した小脳神経細胞からのPMAによる GABA放出の促進は1 μ Mのスタウロスポリンによって完全に抑制された。PC12細胞では，大型の有芯顆粒に貯蔵されているカテコールアミンの放出ばかりではなく，シナプス小胞様の小型の小胞に含まれるアセチルコリン放出の PMAによる促進もスタウロスポリンによって部分的にしか抑制されないことから，PC12細胞と小脳のGABA作動性神経細胞とで見られた差は分泌小胞の違いによるものではなく，細胞間での差異に基づくものと考えられた。以上の結果から，PMAによる神経伝達物質放出の促進機構にはPKCによるリン酸化を介するものと，リン酸化を介さずPKC以外のC1タンパク質を介す機構があるものと考えられた。

神経伝達物質放出能の長期的な変化には，シナプスの構造やタンパク質構成に変化が生じると考えられる。Complexinは成体の脳ではシナプス前部に局在する 18-19 kDaのタンパク質で，ラットでは Iおよび IIの２種類のアイソフォームが知られている。リコンビナントタンパク質を用

いた in vitroの実験からは complexinは αSNAPと競合的にSyntaxinに結合すると報告されているがその機能的な役割については明らかにされていない。シナプス前部でのcomplexinの役割を明らかにするため，アメフラシのBuccal ganglion細胞を用いて解析を行った結果，complexin IIは抑制的な制御因子として働いていることが示唆された。培養したラット海馬神経細胞を用いcomplexinの局在分布を調べたところ，神経伝達物質放出に不可欠な synaptotagminのシナプスへの局在化は培養開始後1週間で見られるのに対し，complexinの局在化は3週目以降にならないと見られなかった。Complexin Iはほぼ全ての神経細胞が発現しているのに対し，Complexin IIは75%程度の神経細胞にしか発現していなかったが，興味深いことに神経終末での局在を比較するとcomplexin IIのみを発現している終末が数多く見られた。Complexin Iと IIにどの様な機能的な差があるかはまだ明かではないが，これらの結果はシナプス終末でのcomplexin のアイソフォームの発現パターンを変化させることによって個々のシナプスの性質が独立に制御されている可能性を示唆している。

(17) 神経伝達物質の放出とシナプス可塑性における Doc2の役割と作用機構

佐々木卓也[1]，織田　聡[2]，阪口　岳[2]，高井義美[1]
([1]大阪大・医・分子生理化学，[2]シオノギ医科学研究所)

Doc2は Ca^{2+}とリン脂質に結合する C2ドメインを2個有する蛋白質で，Doc2aと-bの2個のアイソフォームから構成されている。Doc2bは種々の細胞に普遍的に発現しているのに対して，Doc2aは神経細胞に特異的に発現し，シナプス小胞上に局在している。私共は，Doc2aが Ca^{2+}依存性の神経伝達物質の放出に関与していることを明らかにしていたが，最近，Doc2aが，Ca^{2+}依存性の神経伝達物質の放出に関与することがすでに明らかになっている Munc13と，ホルボールエステルあるいはジアシルグリセロール依存性に結合することを見い出すと共に，東京医大の持田博士のラット上頚交感神経節細胞を用いた実験系により，この結合がシナプス小胞をプレシナプス形質膜にドッキングさせる機構のひとつになっていることも明らかにしている。さらに，最近，私共は，Doc2aを欠失させたノックアウトマウスの作製に成功し，東京大学の真鍋，高橋両博士との共同研究で，ノックアウトマウスの海馬 CA1を用いた電気生理学的解析を行い，Doc2aはシナプス小胞のプレシナプス形質膜へのドッキング効率を促進することによってシナプスの可塑性に関与していることを明らかにしている。本研究会では，神経伝達物質の放出とシナプス可塑性におけるDoc2の役割と作用機構について論議したい。

(18) 脳の抗原レセプター様分子ＢＩＴとそのチロシンリン酸化

佐野慎一郎（三菱化学生命科学研究所）

ＢＩＴ (brain immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based activation motifs)は，モノクローナル抗体１Ｄ４が認識する脳特異的膜蛋白質として，ラット脳に見出された約９万の糖蛋白質である[1) 2)]。この分子は，生後脳の成熟とともに増加し，成熟した脳に多く，海馬，大脳皮質，小脳分子層などのシナプスリッチな部分に強く発現している。ＢＩＴは，Ｉ型の膜蛋白質であり，細胞外にＶ，Ｃ１，Ｃ１というイムノグロブリン様ドメインを持ち，細胞内にＴＡＭ (tyrosine-based activation motif)という情報伝達モチーフを2つ持つ[3) 4)]。ＢＩＴの細胞外イムノグロブリン様ドメインは抗体，Ｔ細胞レセプター，ＭＨＣ分子と高いホモロジーを持ち，これらの免疫系の抗原レセプター分子と進化的に近いと考えられる非常にユニークな分子である。また，情報伝達モチーフＴＡＭは，最初抗原レセプターの情報伝達モチーフとして報告されたもので，情報伝達の際に細胞内チロシンキナーゼにより2カ所がチロシンリン酸化される。ＢＩＴのＴＡＭは，２つのＳＨ2ドメインを持つチロシンフォスファターゼＳＨＰ－2と結合し，ＳＨＰ－2を強く活性化する[3)]。このように，細胞内部分を含めＢＩＴは，抗原レセプター分子と高い類似性を示す。進化的には，脊椎動物になって免疫系に抗原レセプター分子が現れ高度な適応免疫が出てきたことを考えると，ＢＩＴが脳に現れ脊椎動物における高次な神経機能が出てきた可能性は興味深い。また，ＢＩＴは脳の主要なチロシンリン酸化蛋白質の一つであり，ＳＨＰ－２チロシンフォスファターゼの脳における主要な上流分子の一つであると考えられる。ＢＩＴのチロシンリン酸化とそれに続くＳＨＰ－2の結合は，細胞外リガンドの結合を模した細胞外からの抗ＢＩＴ抗体刺激で起こすことが出来る。ＳＨＰ－2は，一般的には増殖因子セプターの下流で働くポジティブな情報伝達分子として考えられているが，強い発現の見られる脳の神経細胞における役割はほとんど明らかになっていない。ところで，ＢＩＴは細胞接着分子としても機能し，プレートにコートしたＢＩＴは，神経細胞を結合し，突起を伸ばさせることが出来る[4)]。以上ように，ＢＩＴは成熟した脳のシナプスリッチな部域で，細胞接着とチロシンリン酸化を介した情報伝達に関与する分子であると考えられる。未同定の細胞外リガンドとの相互作用とそれから起こるＢＩＴ－ＳＨＰ－2シグナル伝達は，神経細胞の可塑性を含む脳の高次機能と関わる可能性が高いと考えている。

1） Sano, S., Matsuda, Y. and Nakagawa, H.: J. Biochem. 105, 457-460 (1989)
2） Sano, S., Ito, S., Nakamura, M. and Nakagawa, H.: J. Neurochem. 55, 1252-1257 (1990)
3） Ohnishi, H., Kubota, M., Ohtake A., Sato, K. and Sano, S.: J. Biol. Chem. 271, 25569-25574 (1996)
4） Sano, S., Ohnishi, H., Omori, A., Hasegawa, J. and Kubota, M.: FEBS Lett. 411, 27-334 (1997)

(19) 単一細胞への競合的RT-PCR法の応用：パッチクランプRT-PCR法を用いた受容体サブユニットmRNAの発現量の解析

都筑馨介（群馬大・医・第二生理）

個体のもつ mRNAは全部で十万種類で，一個の細胞にはそのうちの一万種類が発現していると言われている。この mRNAの発現様式の違いが，タンパク質の種類や量に反映して，その細胞の個性を決定付けている。筆者らは，ホールセルパッチクランプ実験の後，mRNAを含む細胞質をパッチ電極に回収し，逆転写-遺伝子増幅を行うパッチクランプ RT-PCR法を用いて単一ニューロンに発現する mRNAの種類を調べてきた。本研究では単一ニューロンに発現する mRNAの分子数を測定することを試みた。

RT-PCR法を用いて最初に存在した mRNAの量を求めるために，人工的に作製した内部標準物質を用いた。一定の分子数の内部標準物質を mRNAに加える。これが天然に存在する mRNAと等しい効率で RTならびに PCRされ，かつ，標準物質由来の増幅産物と天然の mRNA由来の増幅産物が正しく分別されるならば，増幅産物の量比を調べることにより最初に存在した mRNAの分子数を求めることができる。

そこで AMPA型受容体サブユニット cDNAの GluR2の Bsp1286I制限酵素部位を壊し，新たにStuI制限酵素部位を導入した R2(B/S)を作成し，cRNAを in vitro合成して内部標準物質とした。まず，ラットの脳から抽出した RNAに 6段階に希釈したR2(B/S) cRNAを加えて RT-PCRを行った。PCRは^{32}P標識したプライマーを用いて行い，Bsp1286Iによって切断される天然の GluR2 mRNA由来の増幅産物とStuIによって切断される R2(B/S) cRNA由来の増幅産物の量を BAS2000用いて測定した。この両者の量比をとった結果，前脳 RNA 1ng中には 1x10(5)分子の GluR2 mRNAが存在することがわかった。

次に，この競合的 RT-PCR法をパッチクランプ RT-PCR法に適用した。分散培養したラット海馬ニューロンにホールセル膜電位固定を行い，膜容量と AMPA受容体電流を測定した後，パッチ電極に mRNAを回収し，400分子ないしは 100分子の R2(B/S) cRNAを加えて RT-PCRを行った。培養 5日目以後の三角形をしたニューロンは約1000分子の GluR1と GluR2 mRNAを発現していた。また，mRNAの発現は受容体チャネルの発現に先立って起こっていた。

最後に，Ca^{2+}透過型 AMPA受容体を発現している Type II細胞に発現する AMPA受容体サブユニット mRNA量を調べた。GluR2の発現量は，調べた 9個の細胞のうち 8個では検出限界 (40分子ないしは 10分子)に達せず，GluR2が検出された一個でも 14分子しか検出されなかった。

（20）Fynを用いた動物行動を制御する遺伝情報の解析

八木　健（岡崎・生理学研究所）

動物の行動は種ごとに環境に適応しており，多様化している。この行動の適応，多様化には遺伝情報が関与していることが明らかであり，動物種に特異的な行動パターンが遺伝することが知られている。我々は，環境に適応し，動物種により多様化してきた行動を制御する遺伝情報の実体を明らかにすることを目的として研究を行っている。まず始めに，行動の制御が神経回路に依存していることより，神経回路形成の基盤となる細胞間相互作用に関わる遺伝情報を細胞形質膜の裏打ちに存在する非レセプター型チロシンリン酸化酵素に求めた。遺伝子ターゲティング法を開発し，非レセプター型チロシンリン酸化酵素の1種の Fynを欠損したマウスは，興味深いことに哺乳行動，空間学習，情動行動に異常が認められ，新たに NMDA受容体のチロシンリン酸化による機能制御機構が明らかとなった。更に，Fynと哺乳類の脳形成過程で共役する分子群を解析したところ，マウスで約 20種存在する新たなカドヘリンファミリーとの相互作用が明らかとなった。これらの結果をもとに行動を制御する遺伝情報について考察したい。

（21）脳の可塑性に伴う遺伝子応答とシナプス特異性の発現

井ノ口馨（三菱化学生命科学研究所）

長期記憶の形成は，シナプスの形態変化やシナプス結合の新生などを含む神経ネットワークのダイナミックな変化を伴うと考えられる。これらの変化を担う機能タンパク質は，記憶の固定化に伴い核内の遺伝子から新たに読まれ，標的のシナプス部位に輸送されると考えられる。ところが，これらのタンパク質が，１つのニューロンに存在する数多くのシナプスのうちの特定のアクティブシナプスに特異的に輸送される機構には不明の点が多い。

我々は，海馬歯状回の LTPに伴い発現が誘導される遺伝子を，PCR-differential display 法で探索し，数多くのシナプス可塑性関連遺伝子を単離した[1) 2) 3)]。得られた遺伝子の一つ vesl-1S がコードする Vesl-1S/Homer タンパク質は，代謝調節型グルタミン酸受容体１ (mGluR1) 及び mGluR5 と相互作用するPDZ ドメインタンパク質である[4) 5)]。我々は，海馬歯状回の LTPにともない発現誘導された Vesl-1S/Homerタンパク質が，アクティブシナプス層のシナプス後部側に特異的に局在していることを示唆する結果を得た。Vesl-1S/Homer タンパク質は，「核に貯えられている遺伝情報を，長期的な可塑的変化の起きている特定のシナプスにのみどの様な機構で選択的に発現させるのか」という問題を解く良きツールであると思われる。本研究会では，この点についてのわれわれのデータをお示しし，討論のネタとしたい。

(文献)

1) Inokuchi, K., Kato, A., Hiraia, K., Hishinuma, F., Inoue, M. and Ozawa, F. Increase in activin β A mRNA in rat hippocampus during long-term potentiation. FEBS Lett., 382, 48-52 (1996).

2) Inokuchi, K., Murayama, A. and Ozawa, F. mRNA differential display reveals Krox-20 as a neural plasticity- regulated gene in the rat hippocampus. Biochem. Biophys. Res. Commun., 221, 430-436 (1996).

3) Matsuo, R., Kato, A., Sakaki, Y. and Inokuchi, K. Comprehensive scanning of altered gene expression during hippocampal long-term potentiation by means of mRNA differential display. Neurosci. Lett., 244, 173-176 (1998).

4) Kato, A., Ozawa, F., Saitoh, Y., Hirai, K. and Inokuchi, K. vesl, a gene encoding VASP/Ena family related protein, is upregulated during seizure, long-term potentiation and synaptogenesis. FEBS Lett., 412, 183-189 (1997).

5) P.R.Brakeman, A.A.Lanahan, R.O'Brien, K.Roche, C.A.Barnes, R.L.Huganir & P.F.Worley, Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. Nature, 386, 284-288 (1997).

3．X線，電子線，光によるナノイメージング

1998．7．9－7．10
代表者：木原　裕（関西医大）
世話人：永山國昭（生理研）

（1）X線顕微鏡：introduction

木原　裕（関西医大・物理）

（2）軟X線スペクトロマイクロスコピー

伊藤　敦（東海大・工・原子力）
篠原邦夫（東京大・医）

（3）立命館大学SRセンターにおける結像型X線顕微鏡の現状

平井敦彦（立命館大・理工）

（4）テーブルトップ型X線顕微鏡

清水秀明（電総研）
眞島利和（電総研）

（5）投影型X線顕微鏡における位相コントラスト

吉村英恭（明治大・理工・物理）

（6）X線顕微鏡による細胞内膜系の観察

山本章嗣（関西医大・第一生理）

（7）Complex Optics: Phase Retrieval in Electron Microscopy, Optical Microscopy and X-ray Crystallography

永山國昭（生理研）

（8）位相コントラストX線イメージング

百生　敦（日立・基礎研）

（9）X線顕微鏡によるガン化細胞観察の試み

竹本邦子（関西大・物理）

(10) 電子顕微鏡による微細構造解析

村田和義（生理研）

(11) 高分解能光学レンズ：微分干渉法，共焦点法，エバネッセンス法への応用

寺川　進（浜松医大・光量子医研センター）

(12) 共焦点顕微鏡による心筋細胞内Ca^{2+}動態の観察とX線顕微鏡への期待

石田英之（東海大・医・生理）

(13) 光で見る生体分子モーターの仕組み

石渡信一（早稲田大・理工・物理）

(14) 原索動物ホヤの脳の発生分化とイメージング

津田基之（姫路工大・理）

参加者名

木原　裕，竹本邦子，山本章嗣，篠原邦夫，石田英之，伊藤　敦，石渡信一，清水秀明，眞島利和，寺川　進，百生　敦，吉村英恭，谷口恵美子（名古屋大・理），山本容正（昭和大・医・細菌），田口武慶（理学電機・X線研），平井敦彦，中西　守，古野忠秀，平嶋尚英（名古屋市立大・薬），津田基之，篭島　靖（姫路工大・理），大澤文夫，井上　卓，大庭　昌（浜松ホトニクス），遠藤久満（京繊大・工芸・電子情報），仁木　登（徳島大・工・光応用工），田代　裕（関西医大），大久保欣哉（高度職業能力開発促進センター），金城康人（都立産業技研・放射線），片岡博尚（東北大・遺伝生態研），渡辺正勝（基生研），三好憲雄（福井医大・第一病理），永山國昭，村田和義，今野　卓（生理研），久木田文夫（生理研）

研究会概要

1990年にドイツとアメリカで，初めてウェットな染色体像が50nmの分解能で観測されて以来，X線顕微鏡は着実な発展を遂げてきた。現在の到達分解能は30nmで，DANと蛋白質を別々にイメージできる加納性，細胞内カルシウム原子のマッピング等，多くの成果が出ている。また位相差によるイメージング，3D観察の可能性も討論されている。一方この間に光学顕微鏡も大きな進歩を遂げてきた。電子顕微鏡も位相差の可能性など新たな展開を見せている。こうした発展を背景にX線，光，電子をプローブとしたナノイメージング法が，細胞生物額を中心とした生物学・医学などに名にを寄与できるか，集中した議論を展開した。今回解くに焦点をあてたのは，(1) X線顕微鏡の最近の発展と将来の可能性，(2) X線，光，電子顕微鏡による位相差の比較，(3) 2つの方法により得られる情報の比較，である。2日間の研究会は参加総勢30数名を数え，活発な討論が行われた。

(1) X線顕微鏡：Introduction

木原　裕（関西医大・物理学）

X線顕微鏡は，50nmの分解能で数ミクロンの厚さのウェットな大気中の試料を観察するユニークな方法である。特に細胞をまるごと観察する場合などに適している。原理的には昔から知られていたが，シンクロトロン放射光と微細加工技術の発達により，近年急速に分解能が向上してきた。良く用いられる方法には，透過結像型と走査型がある。前者はGottingen大学のSchmahlらが，後者はNew York州立大学のKirzらが中心になって開発を進めてきた。講演では，その概略の話

と，併せて最近のトピックスを話したい。すなわち，(i)位相コントラスト法による観察，(ii)クライオ条件での観察と立体画像への応用，(iii)時間分解測定，(iv)硬X線の利用と位相コントラスト，(v)ミクロスペクトロスコピーによる蛋白質，核酸のイメージの分離など。

(2) 軟X線スペクトロマイクロスコピー

伊藤　敦（東海大・工）
篠原邦夫（東大・医学部）

密着型X線顕微鏡を用いた軟X線領域のスペクトロマイクロスコピー（分光顕微法）システムを開発し，動物培養細胞観察を行った。スペクトロマイクロスコピーとは，X線領域に存在する元素特有の吸収端，吸収端近傍に存在する分子特有のXANES共鳴ピークといった原子・分子の波長特性を利用して，それらのイメージングを行う手法である。装置は生体分子の吸収スペクトルを測定するための部分と引き続く乾燥生体試料のイメージング部分から成る。2次元検出器は視野のズーミングが可能で，かつ広い波長範囲に感度を有する電子ズーミング管を用いた。空間分解能は現在0.2μm程度であるが，主要生体元素の吸収端をすべてカバーする点から，最適な検出器と考えられる。本システムを用いて，細胞内のC，N，O，Ca分布を独自に開発したプログラムを利用して求めた。また細胞内のDNAの画像化にP-KおよびN-K吸収端のXANESピークが有効であることを示した。

(3) 立命館大学SRセンターにおける結像型X線顕微鏡の現状

平井敦彦（立命館大・理工学部）

立命館大学のSRセンター（575MeV，300mA）は1996年4月に開設され，現在11本のビームラインが稼働している。その中で日本で最初のSR-X線顕微鏡ステーションはBL-12に設置されている。

BL-12のX線顕微鏡は2枚のゾーンプレート（ZP）を使用した結像型で，光学系は光源から平面ミラー（SiC），集光ZP（直径9mm，ゾーン数41,890，最外輪帯幅53.7nm），対物ZP（直径50μm，ゾーン数277，最外輪帯幅45nm），CCDカメラ（背面照射型，512×512ピクセル，1ピクセル24μm×24μm）で構成される。試料は大気中に設置でき，光学顕微鏡でも試料の観察ができる。

昨年，現在の集光ZPを導入したことにより，大幅な分解能の向上を達成した。＃2000メッシュを用いたナイフエッジテストでは50nmの分解能が得られ，テストパターンの観察では52nmの線幅を確認できた。講演ではその他撮像結果と合わせて報告する。

(4) テーブルトップ型X線顕微鏡

清水秀明，眞島利和，富江敏尚（電子技術総合研究所）

X線顕微鏡では，生体試料を無固定，無染色で観察することができ，その空間分解能は，光学顕微鏡を上回ることが期待されている。我々は，レーザプラズマをX線源とし，原子間力顕微鏡を読みとり手段とする密着型X線顕微鏡システムを提案[1]しているが，レーザ光源として巨大レーザを使っているため，使用には，大きな制限が避けられなかった。

このたび，実験室内での使用を目的として，X線露光の最中を含めて，光学顕微鏡でのモニターが可能な，超小型密着型X線顕微鏡システムを開発した[2]。本システムは，市販のYAGレーザ，超小型X線露光装置，モニター用光学顕微鏡，原子間力顕微鏡で構成され，実験机上に収納することができる。今までのようにSR施設，巨大レーザが不要である。

イモリの精子やクラミドモナスなど単細胞藻類のX線像を得ることで装置の評価を行った。

1）T. Tomie et al. :Science, 252, 691 (1991)
2）H. Shimizu et al. ;International Conference on X-ray Microscopy and Spectromicroscopy (XRM 96), Wurzberg, 1996.

(5) 投影型X線顕微鏡における位相コントラスト

吉村英恭（明治大・理工学部）

ここで使用した投影型X線顕微鏡は，数十ナノメートルに絞った電子ビームを金属の薄膜に照射し，そこから広がるX線を使って拡大された投影像を得る方法である。電子ビームを絞るには市販の走査型電子顕微鏡を利用しているので操作性がよく，またX線光学系にレンズを使用していないので，煩雑な光軸調整や焦点合わせが不要で，簡単に1000倍程度の透過X線像を得ることができる。拡大倍率は線源と試料の距離（R_1）と線源とフイルムの距離（R_2）により（R_2/R_1）で決まる。発生するX線は連続X線（特性X線を含む）であり，干渉性はないがR_1を大きく（＞1mm）とることにより，空間的干渉性が大きくなり，得られる投影像の境界線が干渉性により強調される。この性質を使ってコントラストの低い生物試料をコントラストよく得る方法を示す。また，電子顕微鏡の機能を使って電子ビームの照射位置を変え，ステレオX線顕微鏡像から立体構造を調べる方法も紹介する。

(6) X線顕微鏡による細胞内膜系の観察

山本章嗣（関西医大学，第一生理）
木原　裕（関西医大，物理）

X線顕微鏡は細胞内部の微細構造を電子顕微鏡に準じた高い解像力で，しかも，生理的条件に近い環境下（大気下，水中）で観察できる可能性を持っている。我々は，ゲッチンゲン第学のGuttmannとSchmahlと共同し，彼らの解像型X線顕微鏡を用いて細胞内膜系の観察を試み，以下の結果を得た。1）Mn染色した細胞の観察。細胞内膜系の観察を容易にするため，過マンガン酸カリウム固定法によって生体膜をMnで染色したCOS細胞（アフリカミドリサル肝臓由来培養細胞）をX線顕微鏡下で観察した。その結果，核，仁，ミトコンドリア，細胞膜に加えて小さい胞体のネットワークを明瞭に観察することができた。また，水中で観察した細胞内膜系は乾燥後のそれに比べて，表面が滑らかであった。2）ライソゾーム／エンドーム系の多胞体（multivesicular body）が非常に高いX線コントラストを示すことが明らかになった。

(7) "Complex Optics: Phase Retrieval in Electron Microscopy, Optical Microscopy and X-ray Crystallography"

永山國昭（生理研・超微小）

顕微鏡画像は観察される物体の光学情報を記録するものだが，レンズ系の使用により種々の情報の歪が含まれる。この歪はたとえばレンズの収差や不適切なピント合わせとして知られている。電子顕微鏡の場合，特にこれが著しく，その分解能は物質波から考えられる波長限界0.04 Åにはるかに及ばない。とくにこの電子顕微鏡の相対的低分解能性は球面収差から来ている。この歪を除くことは収差のため本質的な光学情報喪失があり完全でなかった。これはコントラスト伝達関数（CTF）の問題として知られている。このCTFを像関数から除くことにより分解能と感度を向上できる。そのために画像の持つ複素振幅自体を通常の2乗検出ではなく，線形検出を行うことを行った。複素観測法と呼ばれるこの新しい方法をまず説明し，その結果CTFがどのように除かれ，電子顕微鏡の高分解能化が図れるか，理論的展開を行った。

(8) 位相コントラストX線イメージング

百生　敦（(株) 日立製作所基礎研究所）

硬X線を用いれば厚い物体内部を透視することができ，この特長は医療分野を中心に広く利用されている。しかし，生体軟部組織はX線吸収係数が小さい軽元素を主体に構成されているので，従来法では十分な濃淡（吸収コントラスト）を得ることができないという問題がある。

一方，軽元素であっても十分な大きさの位相変化を引き起こす。被写体による位相シフトから画像の濃淡（位相コントラスト）を形成することができれば，吸収コントラストを用いる場合より約千倍高い感度が得られることがわかっている。

最近になってX線領域における位相コントラストX線イメージングの研究が活発になりつつある。我々が進めているX線干渉計を用いる方法では，がん等の軟部組織が無造影で三次元観察できるようになってきた。講演では現在の研究動向を紹介する。

(9) X線顕微鏡によるガン化細胞観察の試み

竹本邦子（関西医大・物理）

現在，関西医科大学，ゲッチンゲン大学の共同研究により，X線顕微鏡による細胞レベルでのガン化した細胞の形態学的観察法について，実験的，理論的な検討がなされている。

抗がん剤は，正常細胞とガン化した細胞で与える影響は有意に異なる。そこで抗がん剤をガン化した細胞のマーカーとして用い，形態学的観察に利用した。マーカー用の抗がん剤として重金属プラチナ製剤であるシスプラチンを選んだ。これは，(1) 臨床で広く使われている，(2) シスプラチン分子は細胞内のDNAの同鎖内の隣接するグアニンどうしを架橋して結合すると考えられている，(3) 重金属である白金を含み強いコントラストが期待できる，からである。

X線の吸収・位相コントラストのシュミレーション計算からは，X線顕微鏡による良好なイメージが期待される。現在，X線顕微鏡による良好なイメージを得る努力が続けられている。

(10) 電子顕微鏡による微細構造解析

村田和義（生理研・超微小）

光駆動型プロトンポンプ，バクテリオロドプシン（bR）の構造解析を極低温電子顕微鏡を使

って3Å分解能で行った。試料にはbRの2次元結晶を用い，これを4.2Kに冷却し70°まで傾斜させて得た339枚の電子線回折像と181枚のイメージから振幅と位相情報を抽出し，これをP3の対称性でマージした。そして，このポテンシャルマップから原子座標をフリーR因子が33.4%で決定した。今回の構造回折ではレチナールが配位する付近で6本のヘリックスにキンク構造が見られた。このことはプロトン輸送に，レチナールの異性化に伴うヘリックスの構造変化が関係していることを示唆する。さらに，電子線の電荷した電子に対する原子散乱因子の振る舞いを利用してアミノ酸側鎖の電荷の状態を調べた。その結果，レチナールからプロトン受容基である85番のアスパラギン酸は基底状態ではプロトンが解離していることが確認出来た。

(11) 高分解能光学レンズ：微分干渉法，共焦点法，エバネッセンス法への応用

寺川　進（浜松医大・光量子医学研究センター）

開口数が1.65の光学顕微鏡用対物レンズを開発した（オリンパス光学工業・阿部勝行氏との共同）。このレンズは倍率100倍の無限遠補正系で，屈折率が1.78のオイルと同じ屈折率のカバーガラスとともに用いる。カバーガラスに接して水中に置いたジーメンスの星を微分干渉観察を初めとする明視野法で観察したところ，分解能はこれまで開口数1.30の対物レンズに比べて約20%程度改善した（コンデンサーにも同じレンズを使用）。しかし，カバーガラスと標本の距離が大きくなると改善の効果はなかった。ニプコーディスク走査型の共焦点顕微鏡にこれを装填して，カバーガラスに固定した蛍光性マイクロビーズ（直径0.2 μm）の観察をしたところ，ビーズの像は約50%明るくなり，Z軸方向の光学的切断能も20%改善して0.5 μmになった。対物レンズからレーザービームをカバーガラスに導入し，水との界面にて全反射を引き起こさせるタイプのエバネッセンス照明法によってロダミン色素の分子像を観察したところ，レーザーの光強度を1／5に落としても，開口数1.40の対物レンズの場合と同じ明るさの像が得られた。このレンズは蛍光法において明るい像を得るのに有用であることがわかった。

(12) 共焦点顕微鏡による心筋細胞内Ca^{2+}動態の観察とX線顕微鏡への期待

中澤博江，広田有希，源河朝広，石田英之（東海大・医学部・生理科学）

現行のガルバノ式共焦点顕微鏡では，1光源をX，Y軸にミラーで走査するため1画面を得るのに1～2秒を要する。ニポウ式共焦点顕微鏡は，高速で1画面を得ることができるが，多点光源方

式のため光学的改善が必要である。2万個のピンホールの前に2万個のマイクロレンズを付加し，光利用効率を約20倍改善した。このマイクロレンズ付きニポウ式共焦点顕微鏡を用い単離心筋の細胞内Ca^{2+} waveを1画面／33ミリ秒と1画面／4ミリ秒の高速で観察した。多くのCa^{2+} waveは筋小胞対からのCa^{2+}放出により成長してplanar Ca^{2+} waveとなる。しかし，核の近傍で発生したCa^{2+} waveは，Ca^{2+}放出を持たない核内にCa^{2+}が拡散するため成長できず，核に沿って伝播するspiral Ca^{2+} waveとなることがわかった。

(13) 光で見る生体分子モーターの仕組み

石渡信一（早大・理工・物理）

光学顕微鏡を用いた「生体分子ﾓｰﾀｰの仕組」に関する研究を紹介する。まず蛍光画像を通してｱｸﾄﾐｵｼﾝ分子ﾓｰﾀｰの動きを見る。ﾐｵｼﾝ分子の発生する滑り力にはｱｸﾁﾝﾌｨﾗﾒﾝﾄを右回転させるようなﾄﾙｸ成分が存在することを，ｱｸﾁﾝﾌｨﾗﾒﾝﾄの超らせんの形から示唆する。更に，蛍光分子の1分子偏光画像を通して，ｱｸﾁﾝﾌｨﾗﾒﾝﾄがその長軸のまわりに回転しつつ滑り運動していることを示す。次に，ﾚｰｻﾞｰ光ﾋﾟﾝｾｯﾄを用いて，ﾐｵｼﾝ1分子とｱｸﾁﾝﾌｨﾗﾒﾝﾄとの間に形成される硬直結合の破断力（平均9pN）を計測した結果と，結合の寿命（約1000秒）に対する負荷の作用を定量化した結果をまとめる。最後に，最近開発しつつある温度ﾊﾟﾙｽ顕微鏡法について述べ，それを用いて（ﾐｵｼﾝ，ｷﾈｼﾝ）分子ﾓｰﾀｰの運動機能を熱励起した結果をまとめる。蛋白質上での温度分布やpH分布の蛍光画像化など，将来細胞機能の顕微解析法として発展させたい技術についてもｺﾒﾝﾄしたい。

(14) 原索動物ホヤの脳の発生分化とイメージング

津田基之（姫路工大・理学部）

ホヤは最も原始的な脊索動物で我々ヒトの祖先ともいえる。その幼生は脳は300個程度の細胞からなっており，特に中枢のニューロンは40個程でと簡単であるが，ここにヒトの脳の基本設計組み込まれていると言われている。ホヤの特徴の一つはその細胞系譜が明らかにされていることである。このことは脳に分化する割球に金属イオンを注入することにより発生した幼生の脳を染色してニューロンの回路の発達過程をX線顕微鏡等で実時間で観察出来る可能性がある。また脳の情報伝達遺伝子に金属レポーターサイを融合して，特定の蛋白質の幼生のニューロンにおける局在が観察出来るである。我々はレチナール蛋白質の蛍光イメイジング法を開発し，ホヤ幼生の眼，ホヤ成体の頭神経節のレチナール蛋白質の局在を明らかにした。

4．ATP 受容体の生理機能と分子機構に関する総合的基礎研究

1998．8．27－8．28

代表者：桂木　猛（福岡大・医・薬理）
世話人：山岸俊一（生理研）

（1）Overview

井上和秀（国立衛研・薬理）

（2）痛みに関与する ATP 受容体の電気生理学的研究

上野伸哉，津田　誠，喜多　彩，井上和秀（国立衛研・薬理）

（3）痛みに関与する ATP 受容体の行動薬理学的研究

津田　誠，上野伸哉，井上和秀（国立衛研・薬理）

（4）ラット培養大脳皮質神経細胞におけるATP受容体の生理学的特性，及びその細胞内情報伝達経路

西崎知之，森　正弘，岡田安弘（神戸大・医・一生理）

（5）腎上皮細胞株 (A6) における P2Y 受容体を介した細胞内ストアからのカルシウム放出に対する蛋白燐酸化酵素Cの効果

森　正弘，西崎知之，岡田安弘（神戸大・医・一生理）

（6）視床下部視索上核の P2X 受容体を介した調節機構の解析

澁谷　泉，野口　淳（産業医大・一生理）

（7）骨盤内副交感神経節内プリン作動系とシナプス伝達

西村俊彦，時政孝行（東海大・医・生理二）

（8）ATP 受容体による網膜神経層細胞の増殖制御

山下勝幸（大阪大・医・情報生理）

（9）ヒト骨芽細胞様細胞 MG-63 における ATPの細胞増殖作用とその細胞内機序の解析

中村英一郎，上園保仁（産業医大・薬理）

(10) 神経細胞のアポトーシスに及ぼす細胞外 ATP の効果

藤田典久，垣見守彦（立命館大・理工・生物工学）

(11) ラット脳ミクログリアにおけるTNF-α産生・遊離に対するATP受容体の関与

田中将也，仲田義啓（広島大・医・総合薬学科・薬効解析）

(12) 血管平滑筋細胞における $P2Y_6$ 受容体を介する遺伝子発現

多久和陽（国際科学振興財団・東京大・医・細胞分子生理）

(13) P3 プリン受容体様アデノシン結合タンパクの機能とリガンド特異性の解析

中田裕康（東京都神経科学総合研究所・神経生化学）

(14) ラット耳下腺腺房細胞におけるアセチルコリンによる Ca^{2+} 放出に及ぼす細胞外 ATPの効果

福士靖江（東北大・医・細胞生理）

(15) 褐色脂肪細胞における ATP 受容体を介する細胞内カルシウムの調節

尾松万里子，松浦　博，丁　維光，真田　充（滋賀医大・二生理）

(16) ATP 受容体を介したカルシウム信号とミトコンドリア機能のイメージング

太田善浩（東京農工大・工・生命工学）

(17) 乳腺組織における ATP 受容体の働き

古家喜四夫，市川　純，奥田晃子（京都工繊大・繊維・応用生物），
中野春男，山岸俊一（生理研・生体膜）

(18) 副腎髄質細胞からのカテコールアミンと ATP 放出の on-line 同時測定

伊藤茂男（北大大学院・獣医・比較形態・薬理）

(19) 各種平滑筋の収縮と ATP 放出における P2-アゴニストの効果の再検討

桂木　猛，松尾勝一，藤木　園（福岡大・医・薬理）
佐藤千江美（同・病態機能系総研）

(20) ATP による腸管イオン輸送の制御

鈴木裕一，山本　武（静岡県立大・食品栄養科・生理）

(21) 膵導管細胞の HCO_3^- 分泌における細胞外 ATP の作用

石黒　洋，成瀬　達，水野伸匡，鈴木　厚（名古屋大・医・二内科）

(22) NG108-15 細胞に発現するアデニル酸シクラーゼに連関した ATP 受容体の薬理学的性質

大久保 聡子，松岡　功（福島医大・薬理）

(23) ウシ副腎皮質細胞のホスフォリパーゼCおよびアデニル酸シクラーゼを刺激する 2 種の P2受容体

西　晴久，川村将弘（慈恵医大・薬理一）

参加者名

井上和秀，上野伸哉，津田　誠，喜多　彩（国立衛研・薬理），森　正弘，西崎知之（神戸大・医・一生理），澁谷　泉，野口　淳（産業医大・一生理），時政孝行，西村俊彦（東海大・医・生理科学），山下勝幸（大阪大・医・情報生理），上園保仁，中村英一郎（産業医大・薬理），藤田典久，垣見守彦（立命館大・理工・生物工学），仲田義啓，田中将也，重本ゆかり（広島大・医・総合薬学科・薬効解析），多久和陽（国際科学振興財団・東京大（医）細胞分子生理），中田裕康（東京都神経科学総合研究所・神経生化学），福士靖江（東北大・医・細胞生理），松浦　博，尾松　万里子，丁　維光，真田　充（滋賀医大・二生理），太田善浩（東京農工大・工・生命工学），古家喜四夫，市川　純（京都工繊大・繊維・応用生物），中野春男（生理研・生体膜），伊藤茂男（北大大学院・獣医・比較形態・薬理），桂木　猛，原田直明（福岡大・医・薬理），佐藤

千江美（福岡大・医・病態機能系総研），鈴木裕一，山本　武（静岡県立大・食品栄養科・生理），石黒　洋，成瀬　達，水野伸匡，鈴木　厚（名古屋大・医・二内科），松岡　功，大久保聡子（福島医大・薬理）川村将弘，堀　誠治，西　晴久，正木英二，加藤総夫（慈恵医大・薬理一），篠塚和正（武庫川女子大・薬・第二薬理），山岸俊一（生理研・生体膜）

研究会概要

2年目を迎えた「ATP 受容体の生理機能と分子機構」に関する研究会では，48名の参加者を集めて23題の研究発表が行われた。その内容は，overviewに続き，P2受容体とその生理機能，特に痛みの伝達，節のシナプス伝達，副腎髄質からの ATP放出，乳腺，耳下腺などの腺分泌，腸管イオン輸送，網膜神経および MG-63の細胞増殖，アポトーシスなどの研究が11題で最も多く，P2受容体刺激と遺伝子発現調節を含む細胞内シグナリングに関し，A6および NG-108-15細胞，褐色脂肪細胞，副腎皮質細胞ミトコンドリア，大脳皮質および視索上核，血管および内臓平滑筋細胞，脳ミクログリアを用いた研究が8題であった。また，新規ATP受容体の探索に関する報告が3題出された。いずれも細胞外情報伝達物質としての ATPの重要性を強く印象づける発表であり，これに対して活発な質疑応答が行なわれた。昨年に比べ研究の領域も多彩になり益々拡散の一途の感がするが，これが将来どのような方向に収束していくかということは今のところ全く不明である。本研究会の設立の目的であったわが国のATP研究者が領域を超えて一堂に会し，情報交換を行なうための基盤づくりの役割はこれで充分に果たせたと思われる。ATP受容体に関する生理研研究会はここで一応幕を閉じるが，来年からは，また新たな形で再スタートされる予定である。

(1) Overview

井上和秀（国立衛研・薬理）

ATP受容体は，イオンチャネル内蔵型(P2Xn)とG蛋白共役型(P2Yn)の2つに大別される。P2Xnは膜2回貫通型ファミリーに属し，いくつかがホモあるいはヘテロに会合し非選択性のカチオンチャネルを形成し，早いシナプス伝達を担うと考えられている。現在7種類のサブタイプがクローニングされている。P2Ynは膜7回貫通型ファミリーに属し，いずれもGq/11と共役し，PLCβ活性化，イノシトールリン脂質代謝亢進による細胞内Ca^{2+}動員ならびに蛋白質キナーゼC活性化に関与する。また，Aキナーゼに正あるいは負にカップルしたタイプも報告されているがクローニングはまだである。いずれのサブタイプに関しても，特異的なアゴニストおよびアンタゴニストは，研究が進んでいるが，現在まだ見つかっていない。昨年までの分類法は特にP2Yn型で大きく変化した。その変更点，問題点についてふれる。

(2) 痛みに関与するATP受容体の電気生理学的研究

上野仲哉，津田　誠，喜多　彩，井上和秀（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部）

後根神経節の侵害受容細胞において，$P2X_3$受容体の特異的発現が示され，痛みとATP受容体との関連が注目されている。しかしながら，後根神経節でのP2X受容体発現とその細胞群との関連はいまだ明確ではない。我々は，これまで発現系細胞を用い，後根神経節で主に機能していると考えられてきた$P2X_2$と$P2X_3$のヘテロ受容体の性質を明らかにした。今回，パッチクランプ法を用い電位固定下に急性単離した後根神経節細胞におけるATP惹起電流を観察し，細胞群と機能しているP2X受容体の関係を探索した。すると，2つの特徴的な反応が存在することが明らかとなった。すなわち，カプサイシン感受性の小型細胞では早い脱感作を示すもの（$P2X_3$様）と，カプサイシン非感受性の中型細胞では遅い脱感作を示す（$P2X_2$,$P2X_3$のヘテロタイプ様）ものである。これらの結果からは，従来の報告とは異なり，ヘテロ受容体はむしろ機械受容細胞に発現していることが示唆された。

(3) 痛みに関与する ATP 受容体の行動薬理学的研究

津田　誠，上野仲哉，井上和秀（国立衛研・薬理）

【緒言】痛覚伝達系における ATP 受容体の存在および電気生理学的反応性に関する最近の研究報告により，痛覚における ATP 受容体の生理的役割が想定されている。しかし，その役割について行動薬理学的に検討された報告は未だ数少ない。そこで，本研究では数種疼痛反応に対する ATP (P2) 受容体拮抗薬 PPADS の効果について検討した。

【方法】実験には ddY 系雄性マウスを使用した。疼痛反応は，2% formalin，capsaicin 1.6 mg をマウスの左足蹠へ皮下投与することで誘発させ，疼痛反応持続時間を測定した。PPADS は，疼痛誘発物質処置の 10 分前にそれぞれ髄腔内投与した。

【結果】2% Formalin 処置により 2 相性の疼痛反応が出現し，これらの疼痛反応はPPADS 髄腔内前処置により共に有意に抑制された。また，capsaicin 誘発疼痛反応も PPADS 髄腔内前処置により用量依存的に抑制された。

【結論】本研究の結果より，脊髄内の内因性 ATP による PPADS 感受性 P2 受容体の活性化が formalin および capsaicin 誘発疼痛反応に一部関与していることが示唆された。また，formalin 疼痛反応における capsaicin 感受性感覚神経の関与が報告されていることから，capsaicin 感受性感覚神経経路における PPADS 感受性 P2 受容体が疼痛反応発現に起因している可能性も示唆された。

(4) ラット培養大脳皮質神経細胞におけるATP受容体の生理学的特性，及びその細胞内情報伝達経路

西崎知之，森　正弘，岡田安弘（神戸大学．医．第一生理）

本研究は，ラット培養大脳皮質神経細胞においてATP，UTP，及び2-Methylthio ATP (2-MeSATP)に反応する細胞内情報伝達経路をパッチクランプ電流，細胞内カルシウム濃度を測定することにより明らかとした。これらP2受容体アゴニストは百日咳毒素非感受性G蛋白質活性化によりK^+電流を誘発し，細胞内カルシウム濃度を上昇させていた。UTP受容体はフォスフォリパーゼCを介したPKC活性化によりK^+電流を誘発し，IP_3受容体活性化により細胞内カルシウム濃度を上昇させていた。2-MeSATP受容体は，UTP受容体とは異なる機序によって，即ち，共役したG蛋白質bgサブユニットによってK^+チャネルを活性化し，細胞内カルシウム濃度を上昇させている可能性が強く示唆された。また，ATPによるK^+チャネル，細胞内カルシウム濃度調節は，UTPと2-MeSATPによる両方の調節機構をもっており，ATPはこれら二つの受容体に結合する可能性が示唆された。

(5) 腎上皮細胞株(A6)におけるP2Y受容体を介した細胞内ストアからのカルシウム放出に対する蛋白燐酸化酵素Cの効果

森　正弘，西崎知之，岡田安弘（神戸大・医・第一生理）

アフリカツメガエル腎遠位尿細管由来細胞株(A6)には，GTP結合蛋白質と共役するATP受容体(P2Y)が発現しており，細胞外ATPによりホスホリパーゼCの活性化，イノシトール三燐酸(IP_3)の産生，IP_3感受性細胞内ストアからのカルシウム放出，更には，細胞膜カルシウム依存性イオンチャネルの活性化へ至る細胞内情報伝達経路が明らかにされている。今回，ホスホリパーゼCの活性化によりIP_3と共に産生されるジアシルグリセロールにより活性化されることが予測される蛋白燐酸化酵素C(PKC)の，細胞外ATPにより惹起される細胞内ストアからのカルシウム放出に対する効果をfura-2, AMを用いた細胞内カルシウム濃度測定法及びパッチクランプ法により検討を行なった。その結果，A6細胞において，PKCはP2Y受容体活性化による細胞内ストアからのカルシウム放出を抑制し，細胞内情報伝達経路におけるその標的部位はIP_3受容体活性化よりも上位にある可能性が示唆された。

(6) 視床下部視索上核におけるP2X受容体による調節機構の解析

澁谷　泉，田中敬子，服部幸雄，原山信也，野口　淳，上田陽一，山下　博
（産業医大・第一生理）
上園保仁，泉　　太（薬理学）

視床下部視索上核(SON)のRT-PCRにより，P2X2, P2X3, P2X4, P2X6およびP2X7受容体のmRNAが確認された。P2X3, P2X4のmRNAはSONの神経内分泌ニューロンを含む領域全体に発現していた。ATP はSONニューロンの細胞内Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)を上昇させた。P2X7 agonistであるBzATPも10^{-4} Mでは非ニューロン細胞で顕著な$[Ca^{2+}]_i$上昇を引き起こした。ATPの$[Ca^{2+}]_i$上昇作用はP2アンタゴニストであるPPADSおよびsuraminにより抑制されたがP2X7の選択的アンタゴニストであるoxidized ATPには影響を受けなかった。またATPの$[Ca^{2+}]_i$上昇作用は細胞外のCa^{2+}除去により消失し，Na^+置換により抑制された。Ca^{2+}ストアの阻害剤であるcyclopiazonic acidはATPの$[Ca^{2+}]_i$上昇作用に効果がなかった。ATPの$[Ca^{2+}]_i$上昇作用には速やかなdesensitizationと緩やかなdesensitizationの異なる様式が観察された。これらの結果はSONニューロンにおいてP2X3を含む複数種のP2X受容体が機能的に発現することを示しており，非ニューロン細胞に発現していることが示唆されるP2X7受容体を含めてSONの機能調節に関与していることを示唆している。

(7) 骨盤内副交感神経節のプリン作動系とシナプス伝達

西村俊彦，時政孝行（東海大学・医・生理科学１）

コリン作動シナプスにおけるATP作動系の役割をウサギ等の膀胱を支配する副交感神経節(VPG) を用い in vivo (36°C)にて，細胞内微小電極法により検討した。VPG コリン作動シナプスはハイパス・フィルターとして機能しており，低頻度 (0.1 Hz) の節前線維発火では fast EPSPは閾下に止まり，高頻度発火 (>3 Hz) により初めて順行性活動電位が発生する。0.1Hzで閾下の fast EPSP (EPSC)を記録し，P2受容体阻害剤のsuramin, reactive blue2, PPADS を投与すると fast EPSP 振幅が増大し，ついには順行性活動電位が発生し，ハイパス・フィルターとしての機能が失われた。P2アゴニスト， ATP や ATPγS を投与すると fast EPSC 振幅が用量依存性に抑制された。これらの薬物はニコチン性受容体の感受性には作用しなかった。以上の結果は内因性 ATP とシナプス前P2 受容体がロウカット・フィルターとして機能し，VPG のハイパス・フィルターに関与することを示唆する。

(8) ATP受容体による網膜神経層細胞の増殖制御

山下勝幸，杉岡美保，周　文良　（大阪大・医・情報生理）

発生初期の鶏胚網膜神経層細胞において，増殖期に特異的にP2型ATP受容体を介してCa^{2+}動員が起こる。そこで，P2型ATP受容体が網膜神経層細胞の増殖制御に関与しているかを検討した。

孵卵3日目の鶏胚網膜神経層を無血清培養液で2日間器官培養し，培養液にP2アンタゴニストのスラミン，及び，PPADSを添加すると，濃度依存的にトリチウムチミジンの取り込みが抑制された。逆に，ATPの添加によりトリチウムチミジンの取り込みが増大した。一方，培養液中のATP濃度は，培養開始後1時間で初期レベルの25倍に増加した。

以上の結果から，オートクライン/パラクライン的に放出されたATPによりP2型ATP受容体が活性化され，この活性化がDNA合成の制御に関与していることが示唆された。

(9) ヒト骨芽細胞様細胞MG-63におけるATPの細胞増殖作用とその細胞内機序の解析

中村英一郎，上園保仁　（産業医大・薬理）

ヒト骨芽細胞様細胞MG-63を用い，細胞外ATPの細胞増殖作用に及ぼす効果について検討した。ATP，並びにIGF-1，PDGF等の成長因子はDNA合成を促進し，ATPは成長因子の作用を相乗的に増強させた。ATP受容体のagonist, antagonistを用いた結果から，細胞外ATPによる細胞増殖作用はP2X受容体を介していることが示唆された。RT-PCR法により，この細胞には$P2X_4$,$P2X_5$,$P2X_7$受容体が発現していることがわかった。Ca^{2+} imagingの結果より，ATPのDNA合成促進作用には細胞内Ca^{2+}の上昇は必須ではないことが示された。また，各種protein kinase阻害剤を用いた結果から，ATPのDNA合成促進作用には細胞内 tyrosine kinase，並びにMAP kinaseが関与することが示唆された。さらにATPによる成長因子のDNA合成の相乗的促進作用はMAP kinase活性の増強によることが示された。

（10）神経細胞のアポトーシスに対する細胞外ＡＴＰの効果

藤田典久，垣見守彦，岡　元（立命館大・理工・生物工学）
松本光比古（弘前大・医療短大）
新貝鉚蔵（岩手大・工・情報）

アポトーシスは，動物の成長・発達のための重要な細胞機能であり，近年，アポトーシスの細胞内メカニズムを解明するための研究が積極的に展開されている。また，一方では，アポトーシスを制御する細胞外のシグナルについても，種々のものが同定されつつある。しかしながら，プリン受容体を介して，ATPやアデノシンなどの伝達物質が，神経細胞のアポトーシスにどのような影響をもたらすかを報告した例は少ない。そこで演者等は，分化したPC12細胞を神経細胞のモデルとして用い，ATPのアポトーシスに及ぼす効果を検討した。その結果，ATPは培養時間により，抑制と促進の二相性の作用を及ぼすことが明らかとなった。さらに種々の薬物の効果から，前者はP2X受容体を介した作用であり，後者はATPの代謝産物のアデノシンがA2受容体を介して惹起した結果であることが推察された。神経細胞の生存には，このような，ATPによるオートクリン的な制御が重要であると考えられる。

（11）ラット脳ミクログリアにおけるTNF-α産生・遊離に対するATP受容体の関与

田中将也，空真由美，久岡一恵，重本由香里，井上敦子，秀　和泉，仲田義啓
（広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学講座）
井上和秀　（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部）

ミクログリアはマクロファージ系の細胞がその起源と考えられ，脳の免疫反応を起動する役割が注目されている。一方，ミクログリアにはイオンチャネル型$P2X_7$とG蛋白質共役型$P2Y_2$の２種類のATP受容体の存在が報告されているが，細胞機能における役割は明らかではない。そこでラット新生児脳の培養ミクログリアを用いて，ATP受容体を介するTNF-α産生遊離の制御について検討を行った。その結果，$P2X_7$活性化に必要とされる濃度(1mM)のATPによりTNF-α遊離が引き起こされるが，$P2Y_2$を活性化する100μM ATPでは無影響であった。また，１mM ATPはpore形成と持続的なCa^{2+}流入，およびTNF-α mRNA発現を引き起こした。これらのATPの効果はいずれも$P2X_7$アンタゴニスト(oATP，KN-04)により抑制され，さらにMAPキナーゼおよびp38阻害剤により抑制された。以上の結果からミクログリアにおいてATPは$P2X_7$活性化を介してCa^{2+}を流入させ，TNF-α の転写，遊離を引き起こすこと，さらにこのシグナル経路には

MAPキナーゼとp38が関与する可能性が示唆された。

(12) 血管平滑筋細胞における$P2Y_6$受容体を介する遺伝子発現

多久和陽（国際科学振興財団・東大・医・細胞分子生理）

血管平滑筋細胞に発現する$P2Y_6$受容体は，百日咳毒素(PTX)非感受性G蛋白質を介して，ホスホリパーゼCを活性化し細胞内Ca^{2+}濃度の上昇をひきおこす。$P2Y_6$受容体の活性化は，この他にERK，JNK，p38の各MAPKを活性化することをみいだしている。血管平滑筋細胞における$P2Y_6$受容体の活性化は，血小板由来成長因子(PDGF)B鎖の遺伝子発現を誘導する。同じく血管平滑筋に発現する$P2Y_2$受容体にはこの作用はない。PDGF-B鎖の遺伝子発現には，ERK，JNKの両者が関与している。これに対して，p38の関与は明らかではない。興味深いことに，PDGFB鎖遺伝子の発現には持続的なERKの活性化が必要である。血管壁で産生されるPDGFB鎖は，動脈硬化，バルーン拡張術後の狭窄などの病態に関与している。しかし，PDGFB鎖の遺伝子の発現がどのような因子によって調節を受けているのかは，充分に明らかとなっていなかった。本研究は血管壁細胞から放出されるウリジンヌクレオチドが増殖因子の遺伝子発現調節に関わっている可能性を示唆する。

(13) P 3プリン受容体様アデノシン結合タンパクの機能とリガンド特異性の解析

中田裕康 （東京都神経研・神経生化学）

我々はラット脳の膜画分にアデノシンのみならずＡＴＰ類にも親和性を持つ，いわゆるP3プリン受容体と似た特異性を持つアデノシン結合タンパク質（P3LP）を見出し，その機能を追求している。このタンパク質は非特異的アデノシン受容体アゴニスト5'-N-ethylcarboxamidoadenosine(NECA)に最も強い親和性を持つが，その生理的役割をはじめとする詳細な研究を更に進める上でP3LPに対する特異的リガンドが是非必要であることは言うまでもない。予備的スクリーニングからアデノシン５' 位の置換が親和性に重要であることを見出し，最終的に9-(6,7-dideoxy-(β–Dallo-hept-5-inofuranosyl)adenineが最も強いP3LP結合活性の阻害剤であることを明らかにした。この化合物は高濃度でＡ１アデノシン受容体を少し阻害するがA2A，A2B，A3アデノシン受容体には影響を与えず，P3LPの特異的かつ強力なリガンドと考えられる。

（14）ラット耳下腺腺房細胞におけるAChによるCa^{2+}放出に及ぼす細胞外ATPの効果

福士靖江　（東北大・医・細胞生理）

自律神経伝達物質の作用は，生体内ではATPによって調節をうけている可能性がある。AChのCa^{2+}反応に対して細胞外ATPが如何に作用するかを検討した。ラット耳下腺腺房細胞を酵素処理にて単離し，顕微蛍光測定法により細胞内Ca^{2+}濃度を測定した。ATPはAChの細胞内ストアからのCa^{2+}放出を急速に短縮化し，その大きさを抑制した。BzATPは無Na^{+}，無Ca^{2+}の外液下ではそれ自身はCa^{2+}反応を起さないが，無Na^{+}，無Ca^{2+}の外液下で，AChの反応を短縮かつ抑制した。PKC阻害剤はATPのAChに対する作用を無効にし，逆にPKC促進剤は促進した。低濃度のアトロピンはATPと同じ効果を示した。以上の結果から，ATPはP2Z受容体と結合することにより，Ca^{2+}非依存性のPKCを活性化し，ムスカリン受容体を急速に脱感作し，反応の短縮化と抑制を示すことが示唆された。

（15）褐色脂肪細胞におけるATP受容体を介する細胞内カルシウムの調節

尾松万里子，松浦　博，丁　維光，真田　充（滋賀医大・第二生理）

褐色脂肪組織は哺乳類における非ふるえ熱産生の場であり，その機能は交感神経によって支配されている。ATPはノルアドレナリンと同様に交感神経末端から放出されると考えられる。本研究では，初代培養細胞を用いて細胞外ATPによる細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)の調節について検討した。ATP(10 μM)はpurinergic P2受容体を介して細胞内ストア(ER)からのカルシウム放出を促進し，一過性の$[Ca^{2+}]_i$上昇を引き起こした。同様の反応は他のadenine nucleotidesでも見られたが（ATP > ADP >> adenosine），AMPは$[Ca^{2+}]_i$を上昇させなかった。一方，ATPはノルアドレナリン刺激による細胞外からのカルシウム流入およびタプシガルジン刺激による容量性カルシウム流入によって定常的に上昇した$[Ca^{2+}]_i$を静止状態レベルまで減少させた。これらのことから，ATPはERからのカルシウム放出を引き起こすとともに何らかの原因で上昇した$[Ca^{2+}]_i$を静止レベルに戻す役割を果たし，ノルアドレナリンと共に細胞内カルシウムの共調節をしている可能性があると考えられた。

(16) ＡＴＰ受容体を介したカルシウム信号とミトコンドリア機能のイメージング

太田善浩（東京農工大・工・生命工学）

副腎皮質細胞の培養液にATPを添加すると，細胞では細胞質のカルシウム濃度変動とミトコンドリアの膜電位変動が観察された。これらの現象はＡＴＰ添加後３分以内に生じており，ATPによる刺激がミトコンドリアの機能，すなわち，エネルギー産生やステロイドホルモン合成に，短時間の内に影響を及ぼす可能性が示唆された。

細胞内ミトコンドリアの機能を制御する機構を検討するために，単離した単一ミトコンドリアでATP合成過程を測定した。ミトコンドリアにクエン酸回路の基質であるリンゴ酸を加えると，集団では平均化されて測定できない膜電位の激しい時間的変動が起きることがわかった。

(17) 乳腺組織におけるATP受容体の働き

古家喜四夫，市川　純，奥田晃子（京都工芸繊維大学・応用生物）
中野春男，山岸俊一（生理学研究所・生体膜）

授乳期の乳腺では腺胞のまわりを筋上皮細胞がかごのように取り囲み，脳下垂体後葉からのオキシトシンによって収縮することにより，腺胞内に蓄えられたミルクが放出される。これまでの私たちのマウス乳腺の培養細胞を用いた研究から，筋上皮細胞の収縮が分泌上皮細胞への機械的刺激となりATPなどのヌクレオチドが放出され，両細胞の持つ異なった種類（$P2Y_1$と$P2Y_2$）のATP受容体を介して相互作用していることを明らかにした。この事を培養系ではなく実際の乳腺組織において明らかにするため，乳腺組織の細切試料の共焦点顕微鏡（倒立型）観察とスライス標本の水浸対物顕微鏡（正立型）観察を行った。その結果，実際の組織においてもATPによって腺胞の収縮が起こること，また0.1nM以下の低濃度のオキシトシンによっても収縮と振動が起こることを明らかにした。この組織標本観察システムは乳腺組織におけるカルシウム波の発生と伝播および腺胞の収縮の同時観察もでき，これを用いることによりそれらの関連を明らかにすることが可能になると考えられる。

(18) 副腎髄質細胞からのカテコールアミンとATP放出のon-line同時測定

伊藤茂男，葛西洋平，太田利男，中里幸和
（北大大学院・獣医学・薬理）

副腎髄質細胞の分泌顆粒に含まれるカテコールアミン（CA）とATPの濃度比を推定するために，培養ブタ副腎髄質細胞から放出されるCAとATPをそれぞれ電気化学検出器と蛍の発光酵素を用いてon-lineで同時測定した。CAとATPの検出感度はそれぞれ10nMと2nMであった。AChと高濃度KClは副腎髄質細胞からCAとアデニンヌクレオチド放出を起こし，アデニンヌクレオチドの約1/3はATPであった。AChは濃度依存性に同じ時間経過でCAとATP放出を増加させた。高濃度KClによっても同様なCAとATP放出が観察された。溶液中に放出されたATPとCAのモル比（CA/ATP）はおよそ10であった。塩化バリウムの4分間適用は持続的なCAとATP放出を起こしたが，放出のモル比は変化しなかった。高濃度KClを繰り返し適用するとCAとATP放出を起こしたが，そのモル比は変化しなかった。この方法は副腎髄質細胞の放出可能な分泌顆粒中のCAとATPの含量比を簡便に推定できると考えられる。

(19) 各種平滑筋の収縮とATP放出におけるP2-アゴニストの効果の再検討

桂木　猛，松尾勝一，藤木　園（福岡大・医・薬理）
佐藤千江美（同・機能研）

モルモットの異なる平滑筋標本を用い，P2-アゴニストによる収縮およびATP放出を指標として，P2-受容体反応について比較検討した。α,β-methylene ATPによる回腸の収縮はsuraminやTTX，atropineで拮抗されたことより，副交感神経上のP2X-受容体によるACh遊離を介したものであり，精管におけるそれはsuramin，PPADSで拮抗され，RB-2，TTXによって抑制されないので平滑筋側のP2X-受容体を介したものと考えられる。一方，このアゴニストによる回腸からのATP放出は既に報告の通り，P2Y-受容体を介したIP_3-sensitiveなERからのCa^{2+}遊離，さらにこのシグナルのミトコンドリアへの伝播によるものであるが，同じく精管からのATP放出はP2X-受容体を介し，nifedipine，ryanodine，RR，さらにrotenoneなどで拮抗されたことより，CICRによりERからCa^{2+}が遊離し，ERとミトコンドリアとのシグナル連関によってATPがミトコンドリアより放出されると思われる。従って，回腸と比べ，ERより上流でのシグナルの違いが示唆された。

(20) ATPによる腸管イオン輸送の制御

鈴木裕一，山本　武（静岡県立大学・食品栄養科・生理）

モルモット大腸起電性Na吸収に対するATPの効果をUssing-Chamberを用いた短絡電流測定により検討したところ，以下の結果を得た。

1）管腔側ATPは大腸アミロライド感受性起電性Na吸収を抑制した。

2）Na吸収抑制の強さは，ATP＝UTP＞ADP≫adenosineの順であった。

3）管腔側Ca^{2+}-Mg^{2+}除去はATPの抑制効果のPotencyを増大した。

4）SuraminはATPのNa^{+}吸収抑制効果をわずかに阻害した。

5）AOPCP（ecto-ATPase 阻害剤）前処理によりATPによる抑制効果はわずかに増強した。

6）細胞内Ca^{2+}濃度上昇を抑えた条件下においても，ATPによる起電性Na^{+}吸収抑制はほとんど影響を受けなかった。

【結論】

1）管腔側にecto-ATPaseの存在が示唆された。

2）ATPによる起電性Na^{+}吸収抑制効果には，Ca^{2+}イオンが関与していないようである。

(21) 膵導管細胞のHCO_3^-分泌における細胞外ATPの作用

石黒　洋，成瀬　達，水野伸匡，鈴木　厚（名古屋大・医・第二内科）

モルモット膵から単離した小葉間膵管（径100-150 nm）を用いて，膵導管細胞の細胞内Ca^{2+}濃度とHCO_3^-および水分泌に対する細胞外ATPの作用を検討した。fura-2を負荷した膵管の表層と管腔内をそれぞれ別個に灌流した。基底膜側あるいは管腔膜側からATP(0.1，1，10 mM)を加えるとATPの濃度依存性に細胞内Ca^{2+}濃度の上昇がみられた。両端が閉じた膵管の管腔内pHを測定し，さらに管腔内容積をモニターして単位上皮表面積当たりの水分泌量を測定した。Cl^-非存在下では，水分泌量は0.47 ± 0.17 nl/min/mm^2(mean ± S.E.M., n = 5)であった。管腔内にATPを注入すると分泌量は有意に増加し(1.54 ± 0.43 nl/min/mm^2, n = 4, $p < 0.05$)，管腔内pHの上昇速度も増加した。基底膜側からATPを加えると分泌は抑制され(52 ± 8 %，n = 4)，管腔内pHの上昇速度も低下した。膵導管細胞では，基底膜側，管腔膜側の両方にプリン受容体が存在し，それぞれHCO_3^-分泌に対して抑制，刺激という相反する作用を担っていると考えられる。

(22) NG108-15 細胞に発現するアデニル酸シクラーゼに連関した ATP 受容体の薬理学的性質

大久保聡子，松岡　功（福島医大・医・薬理）

我々は NG108-15 細胞において ATP が著明なサイクリック AMP 産生をもたらすことを見出し，これが新規 ATP 受容体 (P2AC) を介する可能性を報告してきた。P2AC 受容体アゴニスト β,γ-methylene ATP の反応はアデノシン受容体アンタゴニスト，ATP 受容体アンタゴニストいずれによっても抑制される。特徴的な点としてアデノシン受容体アンタゴニストはアデノシン A2A 受容体と比べ，P2AC 受容体に対し約10倍程度の高い阻害活性を有することが分かった。更に，adenosine 2'-monophosphate，adenosine 3'-monophosphate 及び adenosine 5'-phosphosulfate は P2AC 受容体特異的アゴニストとして作用することを見出した。

(23) ウシ副腎皮質細胞のホスフォリパーゼCおよびアデニル酸シクラーゼを刺激する2種のP2受容体

西　晴久，川村将弘　（慈恵医大・薬理一）

細胞外ATPおよびUTPはウシ副腎皮質細胞（BA細胞）のステロイド産生（コルチゾル産生）を促進する。この反応は細胞外のP2受容体を介して起こると考えられた。また両ヌクレオチドは細胞内Ca^{2+}イオン濃度の上昇を惹起し，イノシトールリン酸の産生を引き起こすことから，BA細胞に存在するP2受容体はGタンパクと連関した，いわゆるP2Yタイプの受容体であると考えられた。一方で我々は，細胞外ATPによりBA細胞内のサイクリックAMP（cAMP）濃度の上昇が起こることにも着目した。UTPはcAMP上昇をほとんど起こさなかったことから，BA細胞にはアデニル酸シクラーゼに連関しATPのみのが作用する受容体も存在することが考えられた。以上よりBA細胞には，一方はホスフォリパーゼCを，もう一方はアデニル酸シクラーゼを刺激する，ステロイド産生に連関した2種のP2受容体が存在することが強く示唆された。

5．情動・意欲をいかにとらえるか

1998．9．24－9．25

代表者・世話人：小幡邦彦（生理研）

（1）変異マウスの情動行動

小幡邦彦，Oliver Stork（生理研・神経化学）

（2）"脳を創る"立場からの情動・意欲

松本　元（理研・脳科学ｾﾝﾀｰ）

（3）情動に影響を及ぼす遺伝子変異

石浦章一，笹川　昇，高橋展弘，小池　恒，周防　諭（東大・院・総合文化）

（4）不安発現と脳内ノルアドレナリン神経系

田中正敏（久留米大・医）

（5）Conditioned fear stress における neurosteroids の役割

鍋島俊隆（名古屋大・医）

（6）ストレスと視床下部サイトカイン

神庭重信，久保田正春，杉山仁視，丹羽政信（山梨医大）

（7）潜在性脳梗塞に伴ううつ病の発症機序に関する研究

山脇成人（広島大・医）

（8）情動の機構

川村光毅，池島宏子，竹内京子（慶応大・医）

（9）辺縁系とくに側坐核の神経回路

池本桂子，永津郁子（藤田保衛大・医）

(10) セロトニンによるシナプス可塑性調節機構：グルタメート受容体

岡戸信男（筑波大・医）

(11) 扁桃体－視床下部－下垂体系のオリゴペプチドトランスポーター

久野節二（筑波大・医）

(12) Fyn遺伝子から見た情動制御の分子メカニズム

八木　健（生理研・神経情報）

(13) 躁うつ病の分子遺伝学的アプローチについて

吉川武男（東京医歯大・医）

(14) 視床下部・下垂体の窓から覗き見た恐怖・不安の脳

八木欽治，尾仲達史（自治医大）

(15) 恐怖条件づけ学習における扁桃体・海馬の機能

柴田重信，神津康子（早稲田大・人間科学）

(16) サル扁桃体における価値評価機構

西条寿夫，小野武年，上野照子，田村了以（富山医薬大・医）

(17) PETによる覚醒剤依存者におけるドーパミントランスポーターの測定

伊豫雅臣（浜松医大）

参加者名

岡戸信男，久野節二（筑波大），西条寿夫，上野照子，田村了以（富山医薬大），川村光毅，池島宏子，竹内京子，坪川達也（慶応大），鍋島俊隆（名古屋大），松本　元（理研），湯浅茂樹（千葉大），三國雅彦，井田逸朗，間島竹彦（群馬大），山脇成人，加賀谷有行，竹林　実，後藤信一郎，田原信孝，稲垣正俊（広島大），伊豫雅臣，武井教使，関根吉統（浜松医大），神庭重信，竹内潤一（山梨医大），西川　徹（国立精神神経センター），石塚典生（東京都神経研），本多祥子（東京女子医大），吉川武男，豊田倫子（東京医歯大），石浦章一，周防　諭（東京大），田中正敏（久留米大），八木欽治，尾仲達史（自治医大），柴田重信，神津靖子（早稲田大），池本桂子（藤田保衛大），伊藤拓哉（帯広畜産大），山森紀美子，冨田良平，木津川尚史（基生研），八木　健，浜田香世子，Oliver Stork，竹井　豊，先崎浩次，牧野初音，小幡邦彦（生理研）

研究会概要

脳機能を情報，物質，エネルギーの変化として考えると，認知や思考・判断には情報処理の面がつよく，情動や意識レベル・意欲には物質・分子面からのアプローチも有効であろう。情動・意欲のメカニズムを理解するには，われわれにおこる感情障害，薬物依存から扁桃体を中心とする脳内神経回路，モノアミンを中心とする神経伝達物質，向精神薬・精神変容物質の作用について，臨床医学から分子遺伝学までさまざまな領域の研究者の共同作業が必要である。

昨年，生理研研究会「情動・記憶・意欲をいかにとらえるか」を川村教授に企画，実施していただき，その成果は「脳の科学」20巻7号における特集としてまとめられた。今回もさいわい，多数のご参加を得ることができたので，昨年同様のみのりある研究会になることを期待している。17題の発表のうち7題は今回はじめて参加の方にお願いした。

(1) NCAM-180 involved in 5-HT$_{1A}$ receptor function and control of emotional behavior

O. Stork, H. Welzl, C.T. Wotjak, D. Wolfer, D. Hoyer, N. Mantei,
T. Schuster, M. Delling, H. Cremer, H.P. Lipp, K. Obata and M. Schachner
Center for Mol. Neurobiol. Hamburg, Novartis Pharma AG Basel,
Swiss Fed.Tech. Univ. and Univ. Zurich, Devel. Biol. Inst. Marseille,
and Nat. Inst. for Physiol. Sci. Okazaki

Behavioral analysis of NCAM deficient (NCAM$^{-/-}$) mice revealed learning deficits in a Morris water maze and in both contextual and cued fear conditioning, supporting the proposed role of NCAM in neural plasticity. Furthermore, the null mutants showed increased intermale aggression, altered anxiety-like behavior and reduced forced-swimming-induced immobility. Re-expression of transgenic NCAM-180 in NCAM$^{-/-180+}$ mice restored normal emotional behavior, but not learning performance, in spite of persistent disturbances in the development of olfactory bulb and hippocampus. Changes in emotional behavior were accompanied by increased sensitivity to the anti-anxiety effects of 5-HT$_{1A}$ agonists in NCAM$^{-/-}$ mice and a recovery of normal 5-HT$_{1A}$ response in NCAM$^{-/-180+}$ animals. These observations strongly suggest an involvement of 5-HT function in the abnormal behavior of NCAM mutants. However, we did not find evidence for altered 5-HT synthesis or release, or expression and ligand affinity of 5-HT$_{1A}$ receptors. It remains to be clarified how NCAM mutations affect 5-HT$_{1A}$ response and whether such interaction is causal to the observed changes in emotional behavior.

(2)”脳を知る”立場からの情動・意欲

松本　元（理研・脳科学センター）

脳の目的は，情報を選択し，その選択した情報の処理の仕方（アルゴリズム）を獲得することである。平たく言うと，脳は思えばその事をなす為のアルゴリズムを自動獲得する。この事は，例えば，われわれが脳に言語野を獲得し得たのは，われわれが人とコミュニケートしたい，という思いに依っている。従って，”脳を創る”という視点からの言語野の研究の中心課題は，何故人はコミュニケートしないと生きられない存在であるのかを解明することである。これに対し，”脳を知る”という視点からの言語野の研究では，言語野の構造とそこでの活動がどの様に表現されているかの解明が主であろう。

脳が脳の目的を遂行する為の情報原理（脳の情報処理システムとしての特徴を貫く原理）はメモリーベースアーキテクチャであり，その構成原理（脳を構成する為の原理）は先読みと階層構造化であることを，ここではまず明らかにした。

これらの原理に基づき，脳のアルゴリズム自動獲得の為のアルゴリズムがどの様に脳，神経系，神経細胞に表現されているかを，実際の脳について実時間光イメージングなどにつき研究解明すると共に，脳と同じ原理の脳型コンピュータを研究開発することで，脳のアルゴリズム自動獲得の原理解明を目指している。この中で情動・意欲の捉え方を得ているので，報告した。

（3）情動に影響を及ぼす遺伝子変異

石浦章一，笹川　昇，高橋展弘，小池　恒，周防　諭（東京大・院・総合文化）

単一の遺伝子変異によって，衝動性，短気，気まぐれ，などを指標とする情動の閾値が決定されているのではないかという報告があるが，分子生物学的に細胞機能と関連して追求されている例は少ない。私たちは，トリプレットリピート伸長を材料に，遺伝子変異が細胞の生理機能をどのように変化させているか，という点について研究を行っている。

材料は筋緊張性ジストロフィー(DM)という疾患で，ここではトリプレットCTGから成るリピートが責任遺伝子ミオトニンキナーゼ(MtPK)の3'非翻訳領域に入っており，正常リピート数30を越えて50以上になると前変異段階となり，100以上で発病する。この疾患は，世代を経るごとにリピート数が伸長し，発病も早くなって重篤になるという特徴を持つ。

私たちは，人工的にリピート数を増幅する方法を開発し，MtPKの当該領域に挿入したcDNAを筋細胞株C2C12に安定形質発現させた。現在，リピートは190にまで伸びている。リピート伸長細胞株は，分化が抑制されていること，酸化ストレスによる細胞死が起きやすいこと，などDMに認められる症状が再現できており，リピート伸長病のモデルとして適していることが示された。

最後に，遺伝子変異が情動に影響を及ぼす例を総括したい。

（4）不安発現と脳内ノルアドレナリン神経系

田中正敏（久留米大・医）

演者らは従来からラットを対象として種々のストレス状況における脳内各部位のノルアドレナリン放出の特性や抗不安薬の神経化学的作用機序について報告してきた。不安の神経化学的機序

について研究する場合に問題となることは，どのようにして不安に近い情動を動物に喚起するかということと，それをどのような生化学的手段でとらえるかということである。実験的に不安を喚起するための手段としてストレスはきわめて有効であるが，同じストレス状況であってもヒトの不安との類似性を考慮するとできるだけ身体的侵襲が少ないストレス状況がよいと考えられる。そのためストレスとして他のラットが電撃を受けて示す情動反応にさらされる心理的ストレスと条件づけされた箱に入れられる恐怖条件づけを用いた。不安を喚起するその他の方法として薬物を使用する方法がある。ヒトで不安を引き起こすことが知られているヨヒンビンやβ-カルボリン系薬物を用いた。このようにして喚起された不安状況下での変化をとらえるために脳内ノルアドレナリンの放出を指標とした。さらにこれらと不安との関連性について検証するために不安が喚起された状況で生じた脳内ノルアドレナリン放出の変化が抗不安薬で減弱されるかを検討するとともに，それらの変化に対応した行動学的変化がみられるかについても検討した。このような検討の結果，視床下部，青斑核，扁桃核のノルアドレナリン放出の亢進が不安の発現に関与することが示唆された。

(5) Conditioned fear stress における neurosteroids の役割

鍋島俊隆（名古屋大・医・附属病院薬剤部）

一度，電気ショック (ES) を経験した動物を再び電気ショックを与えた場所に戻すと，動物の行動量は著しく低下する（conditioned fear stress; CFS)。このCFSは，シグマ受容体リガンドの(+)-SKF- 10,047 (SKF) により緩解されることから，CFSの緩解には シグマ受容体が重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方，中枢神経系が異常興奮あるいは抑制した時，このインバランスを調節している内因性物質に neurosteroids があり，この物質は，シグマ受容体に作用することが知られている。そこで，CFSにおけるneurosteroids の作用を検討した。

実験には 7～8 週齢の ddY系雄性マウスを用い，第 1 日目にマウスを透明アクリル樹脂製の装置に入れ，床グリッドを通して ES（1 mA, 200 msec, 0.1 Hz）を 6 分間負荷した。第 2 日目にマウスを再び同一装置に戻し，ES を与えることなく，行動量を 6 分間測定した（CFS 群)。薬物はすべて第 2 日目の行動量を測定する前に投与した。

CFS による行動量の減少は，SKF，dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) および pregnenolone sulfate (PREGS) により用量依存的に緩解されたが，progesterone (PROG) では緩解されなかった。SKF (6 mg/kg s.c.)，DHEAS (50 mg/kg s.c.) 及び PREGS (50 mg/kg s.c.) の緩解作用は，シグマ受容体アンタゴニストの NE-100 (5 mg/kg i.p.) および PROG (5 mg/kg i.p.) により有意に拮抗された。以上の結果より，DHEASおよびPREGS による CFS の緩解作用は，シグマ受容体を介して発現しており，PROGはシグマ受容体アンタゴニスト作用を有していることが

示唆される。

(6) ストレスと視床下部サイトカイン

神庭重信，久保田正春，杉山仁視，丹羽政信（山梨医大・精神神経医学）

ストレス応答においては，HPA系（視床下部－下垂体－副腎皮質系）が大きな役割を担っていることがよく知られている。このHPA系を構成する物質の中でもバソプレッシン（AVP）は傍室核や視索上核，視交叉上核，扁桃核などの脳内のさまざまな部位に存在し，ストレス応答のみならず，生体時計機能や記憶などに関与していることが知られている。

我々はHPA系とHNS系（視床下部―下垂体後葉系）で，同じAVPでも異なった制御がなされている可能性を報告した。さらにAVPに対して，最近脳内でもさまざまな作用を起こす事が知られているサイトカインがどのような影響を与えるかを検討してきた。その結果，脳内で産生の確認されているインターロイキン１（IL-1）や腫瘍壊死因子（TNF）により傍室核でAVPの分泌が促進されることが確認された。一方で，インターフェロンによってはAVPの分泌は影響を受けていなかった。視床下部では，これまでに拘束ストレスによってIL-1の分泌が促進され，CRHやモノアミンの分泌を亢進させることなどを報告してきた。これらの結果と今回の新たな結果を合わせると，免疫系の物質として考えられてきたサイトカインが視床下部傍室核においてAVP，CRH，モノアミンを介してストレス応答に関与していることが示唆される。脳内情報伝達ネットワークの中でサイトカインがどのような役割を担っているのか今後の研究が期待される。

(7) 潜在性脳梗塞に伴ううつ病の発症機序に関する研究

山脇成人（広島大・医・神経精神医学）

情動の障害であるうつ病の病因研究は内因性うつ病を主に対象としてきたが，未だその病因は解明されておらず，その責任脳部位も解明されていない。そこで我々は発症要因が明確である脳血管性うつ病を対象として，うつ病の発症機序や責任脳部位の解明を目的として，臨床的，基礎的研究を試みているのでその結果および現在計画している研究内容について報告する。

神経学的には無症候であるがMRI画像上に脳梗塞病変が認められる潜在性脳梗塞とうつ病の発症の関係について調べた結果，老年期発症のうつ病には潜在性脳梗塞が高率に認められ，これがうつ病発症に関与することが示唆された。我々は，うつ病の発症に細胞内カルシウムが重要な役割を演じていることを報告してきたが，脳虚血による海馬の遅発性細胞死における細胞内カルシ

ウムの役割を考えあわせると，微小脳梗塞による神経細胞内の情報伝達機構の変化が，うつ病発症に関与している可能性が推測される。微小脳梗塞を発生させたモデルラットを用いてうつ病発症に関する細胞内情報伝達系の異常について現在検討中である。また，SPECTや脳磁図などの画像診断装置を用いて，潜在性脳梗塞を伴ううつ病患者の脳機能局在を測定することにより，うつ病の責任脳部位を解明することを計画しているので，それについても報告した。

(8) 情動の機構

川村光毅，大山恭司，池島宏子，竹内京子（慶応大・医・解剖）

大脳皮質を除去した動物でも，情動反応が起きることが示された（Goltz，1892）後，情動の中枢を皮質下に求める実験が行われた。Canon（1927）は皮質下組織（とくに視床）が情動の座であり，視床から「情動の衝動」が起こり，それを大脳皮質が制御すると考えた（後に視床下部と修正）。

Papez（1937）は，臨床データも考慮して，視床下部乳頭体→視床前核→帯状回→海馬傍回→海馬→脳弓→乳頭体という情動回路のモデルを提唱した。

MacLean（1967）は，辺縁皮質およびそれと神経結合している皮質下組織を辺縁系と呼び，情動および内蔵機能に関与する一つの機能系とする概念を提唱した。また，彼は恒温動物の脳に3型のシステムから構成される階層性（ヒエラルキー）を考えた。いわゆる三位一体脳説（a triune brain）と言われるもので，原始爬虫類脳，旧哺乳類脳と新哺乳類脳である。

われわれは，情動・意欲に関わる神経細胞と神経回路の発達形成の研究の一環として，前脳に特異的に発現するホメオボックス遺伝子Nkx2.1の遺伝子欠損マウス（共同研究者のKimura，NIH，らにより作製）の解析を行っている。Nkx2.1遺伝子は視床下部，扁桃体，梨状葉などに発現するが，大脳辺縁系およびこれに関連する神経回路に異常が認められている。また，NIHの症例報告によるとヒトNkx2.1遺伝子に関しヘテロ(+/-)の患者において，精神発育の遅延，甲状腺刺激ホルモンの分泌異常が観察されている。

(9) 辺縁系とくに側坐核の神経回路

池本桂子，永津郁子（藤田保衛大・医・第二解剖）

側坐核は，情動と運動のインターフェイスであると考えられている。ラットの側坐核は，組織化学的にcore（中心部）とshell（辺縁部）に分けられ，両者は線維連絡が多少異なる。shellは特

に大脳辺縁系と密接な関係がある。側坐核へは，大脳皮質の前頭前野，嗅内野（サルでは主に帯状皮質），腹側淡蒼，視床，視床下部外側部と後部，扁桃体，海馬C3，海馬支脚，中脳腹側被蓋野，黒質，縫線核，延髄腹外側部などからの入力線維があり，中脳腹側被蓋野，黒質，赤核後部などへ出力線維を送っている。

coreへは視床の正中核群と髄板内核から入力線維を受ける一方，室傍核は，shellとcoreの両方に線維を送っている。側坐核内側へは，扁桃体の基底核小細胞部および大細胞部後部と副基底核から，外側へは大細胞部前部から入力する。分界条床核，extended amygdala，視床下部外側部，扁桃体中心核，中心灰白質へは，shellからのみ，黒質網様部にはcoreからのみ出力する。

神経伝達物質として，中脳からはドーパミン，視床（おそらく大脳皮質，海馬も）からはグルタミン酸，縫線核からはセロトニン，視床下部後部からはヒスタミン，延髄腹外側部と青斑核からと思われるノルアドレナリンの線維が入力する。線維連絡や神経活性物質の分布などから，shell背側部（サルでは内側亜核）が情動との関連において重要であると考えている。

(10) セロトニンによるシナプス可塑性調節機構：グルタメート受容体

岡戸信男（筑波大・医）

シナプス数を調節する因子としてセロトニンが機能しており，セロトニンはシナプス数を維持することにより，シナプス可塑性をもたらしていることを明らかにしてきた。今回はセロトニンが大脳皮質のグルタメート受容体の維持にいかに関わっているのかを知るために研究を行った。生後6週の雄ラットに体重1キログラム当たり100ミリグラムのp-chlorophenylalanine（pCPA）を1週間に4回投与してセロトニンを除去した。pCPA投与から1週目のラット大脳皮質の前頭部，頭頂部，後頭部におけるNMDA，kainateおよびAMPA受容体結合量の変化を調べた。NMDA受容体結合量はpCPA投与と生理的食塩水投与群の間には変化がなかった。pCPA投与群でkainate受容体最大結合量は低下したが，AMPA受容体最大結合量は上昇した。イムノブロットによりAMPA受容体サブユニットの変化を調べたところ，GluR1はpCPA投与群で約25%低下，GluR2はpCPA投与群で約30%増加していた。セロトニンを除去するとシナプス数が低下することに加え，GluR2サブユニットは細胞内へのCa流入を抑制することから，グルタメート受容体の側でもシナプス可塑性が低下していることが明らかになった。

（11）扁桃体ー視床下部ー下垂体系のオリゴペプチドトランスポーター

久野節二（筑波大・医・解剖）

神経ペプチドが扁桃体－視床下部－下垂体系においてホルモン分泌（情動表出反応）の制御に重要な働きをすることが示唆されている。我々は，ほ乳類の小腸で食餌性ペプチド吸収に与るオリゴペプチドトランスポーターとして最近発見され，脳での遺伝子発現が報告されたPepT1に注目し，情動表出の制御・実行系における局在と発現調節について免疫組織化学的に解析し，そこでの神経ペプチドの働きとの関連を調べている。PepT1の抗C末端ペプチド抗体による免疫染色の結果，陽性反応が脳では神経の軸索線維と脈絡叢上皮細胞に，下垂体では前葉内分泌細胞に認められた。陽性軸索線維は，視床下部神経核群と正中隆起，扁桃体中心核，分界条床核に豊富に存在するが，大脳皮質，海馬体および視床などでは非常に少ない。２重免疫染色の観察から，正中隆起の陽性線維の多くはＣＲＦ含有線維であり，下垂体の陽性細胞は性腺刺激ホルモン（ＬＨ）分泌細胞であることが判明した。去勢雄ラットではPepT1陽性反応が下垂体ＬＨ細胞，正中隆起および扁桃体中心核の軸索線維で減弱し，雄性ホルモン（テストステロン）投与により回復した。以上のことから，ラット脳においてPepT1が情動表出の制御・実行系の神経細胞と内分泌細胞で発現しており，その発現が性ホルモンの影響下に調節されることが示唆される。

（12）Fyn遺伝子から見た情動制御の分子メカニズム

八木　健（生理研・生体情報系）

非レセプター型チロシンリン酸化酵素のFynは，細胞膜の裏打ちに存在し細胞外から細胞内への情報伝達に重要な役割を果たしている。このFynを欠損したマウスを作製したところ，脳の細胞構築異常とともに’恐がり’となる情動行動制御の異常が明らかとなった。また，このFyn欠損マウスは特殊な環境下で保育行動の異状も認められる。Fynは神経細胞においてシナプス後膜に存在し，NMDA受容体のNR2Bをチロシンリン酸化することも明らかとなり，扁桃体においても高発現している分子である。この様に，Fynは情動制御に関わる分子であり，神経細胞の構築，シナプスでのNMDA受容体のNR2Bとの関与などが考えられることより，何らかのヒトの神経疾患との関連性も考えられる。fynはヒトの染色体６番の短腕に存在する。この染色体の位置は家族性の精神分裂病に関わる遺伝子座であることが指摘されており，Fyn欠損マウスの脳に関する障害を考えるに興味深い。また，我々はFynとシナプスで結合している新たなカドヘリン（CNR:cadherin-related neural receptor）ファミリーの単離に成功した。このファミリー分子はマウス染色体上で遺伝子のクラスターを形成しており，個々のファミリー分子は神経細胞レベルで

は異なった発現をしていることが明らかとなった。これらの知見を踏まえ情動制御の新たな分子メカニズムについて考えてみたい。

(13) 躁うつ病の分子遺伝学的アプローチについて

吉川武男（東京医歯大・医・神経精神医学）

2大内因性精神病の1つである気分障害の成因に関しては，1）家族内集積の観察，2）養子研究，3）一卵性双生児と二卵性双生児の発症率のちがいなどから遺伝要因の関与が強く示唆されてきた。しかしその病態生理を説明できるはっきりした候補遺伝子は知られていないため，病因遺伝子同定のためには家系を用いた系統的な連鎖解析が必要である。そして実際気分障害とりわけ双極性気分障害（躁うつ病）に関してはこれまで世界中で家系を用いた連鎖解析が試みられてきているが，二重の困難が指摘されている。一つは躁うつ病のような複雑遺伝形質疾患の解析にあたっては，最初の報告で有意でも追認された染色体領域は少ないということ（再現性の問題），さらに複雑遺伝形質疾患の解析に有効とされるノンパラメトリック法ではポジショナルクローニング可能な範囲にまでに染色体領域を絞り込むことが困難ということである。そこで我々は実際的な戦略として次のように考える。それは複数のグループの連鎖解析によって追認された染色体領域に注目し，その領域に位置する機能上重要な遺伝子を見いだし，疾患群に関連したその遺伝子の変異を探究・解析することである。我々は，アメリカNIMH-CNGの躁うつ病家系を用いたゲノムスクリーニングから，ヒト染色体18番の動原体周辺部（約40cM）にaffective sib pair(ASP)法で有意なシグナルを得た。その後の解析で，とくに18p11.2領域（約6cM）で最も高いallele sharingを認めた。18p11.2を含む部位は他の研究グループからも躁うつ病との連鎖が指摘されている。本研究会では，18p11.2にコードされている遺伝子のあるものについては，相関解析の結果まで含めて報告した。

(14) 視床下部・下垂体の窓から覗き見た恐怖・不安の脳

八木欽治，尾仲達史（自治医大・第二生理）

視床下部の視索上核と室旁核に細胞体をもつ神経分泌ニューロンは下垂体神経葉内にある軸索末端からバゾプレシン（VP）とオキシトシン（OT）を血中に放出する。もし，VPやOTニューロンの活動が脳の恐怖・不安の状態を反映して特異的に変化するならば，VPやOTニューロンの活動を通して脳内の情動メカニズムを解析できる。

Verney (1947)は，皮膚の電気刺激により尿量が減少することから侵害刺激が抗利尿ホルモン（VP）の分泌を促進すると想像した。この考えを支持する生物検定法を用いたデータが発表された。しかしその後発表されたラジオイムノアッセイ法により血中のVP濃度を測定したデータによると，侵害刺激は必ずしもVP放出を変化させない。

我々は，侵害刺激はVP放出を促進するが，侵害刺激によって誘発される恐怖ストレスおよび条件恐怖刺激はVP放出を抑制すること，不安誘発性の新奇環境刺激もVP放出を減弱することを発見した。VPニューロンが，恐怖・不安の脳の状態と情動記憶の動態を覗き見，これらを解析するための特異的な窓であることを示すデータを紹介した。

次に，恐怖・不安の脳の情動状態をもたらす神経伝達物質受容体について，VPニューロンの窓を通して調べた結果をまとめて報告する。我々はこれまで薬理学的な方法を用いてドーパミンのD1とD2受容体，ヒスタミンのH1とH2受容体，アドレナリン作動性 α1，β1および β2受容体，セロトニンの5HT-1A，5HT-2および5HT-3受容体，オピオイド（μ，δ，κ）受容体，バゾプレシンV1受容体，CRF41受容体，CCK-B受容体，ベンゾジゼピン/GABA-A受容体，NMDA受容体について調べた。

(15) 恐怖条件づけ学習における扁桃体・海馬の機能

柴田重信[1]，神津靖子[1]，守屋孝洋[1]，吉岡　亨[2]
（早稲田大・人間科学・[1]薬理，[2]分子神経生物）

恐怖条件学習は恐怖という情動表出を指標とした連合学習のひとつとして考えられている。一般的にはcontextual fear conditioning学習とauditory fear conditioning学習に分けることができる。前者はフットショック（無条件刺激）をかけられた場所（条件刺激）を記憶する学習で海馬が重要であり，後者は音（条件刺激）とフットショック（無条件刺激）による連合学習で，扁桃体の外側核が重要であると考えられている。このような恐怖発現にどのような細胞内情報伝達系がかかわっているかを明らかにするために，CaMKIIの燐酸化に焦点を当てた研究を行った。auditory fear conditioning学習が成立したマウスは24時間後に音を提示しただけですくみ行動が現れ，不動化状態がおこる。この恐怖条件づけの成立直後，24時間後に音提示する前，24時間後に音提示した後の3条件下で，扁桃体外側核，扁桃体内側核，auditory 皮質の各部位でのCaMKIIの燐酸化をインゲルアッセイで調べたところ，恐怖条件づけ直後ならびに24時間後の音提示直後にのみ，扁桃体外側核のCaMKIIの燐酸化が高進することがわかった。他の脳部位ではこのような変化は見られなかった。したがって，CaMKIIの燐酸化は恐怖反応の表出過程に重要な役割を果たしているものと考えられる。NMDA2A受容体やNMDA2A/2C受容体のノックアウトマウスでは学習行動上も，CaMKIIの燐酸化も障害されたが，NMDA2C受容体ノックアウト動物はいず

れの指標でも野生型と何ら変わらなかった。本研究会では他の酵素や受容体をノックアウトした動物の恐怖反応表出と海馬や扁桃体のCaMKIIの燐酸化との関係についても述べる予定である。さらに，躁うつ病の生体リズム異常仮説を検証する目的で，視床下部—下垂体系における時計遺伝子Perの関わりについても言及したい。

(16) サル扁桃体における価値評価機構

西条寿夫，小野武年，上野照子，田村了以（富山医薬大・医・第二生理）

辺縁系にはすべての感覚情報が収束し，辺縁系はこれらの情報を統合して視床下部や下位脳幹に出力している。これら神経ネットワークにおいて，扁桃体は感覚情報の生物学的価値評価に重要な役割を果たしており，扁桃体の障害により様々な情動異常が起こる。扁桃体破壊による最も顕著な症状は，情動性（情動発現）の低下であり，対象物の生物学的価値評価の障害された状態である。すなわち，扁桃体を破壊された動物は，感覚刺激の価値評価ができなくなり，Kl殻er-Bucy症候群を代表とする種々の情動異常を示す。本研究では，扁桃体の価値評価機構を明らかにするため，レバー押しによる感覚刺激の意味認知学習を行っているサル扁桃体からニューロン活動（インパルス放電）を記録し，学習に伴うニューロン活動の変化を解析した。その結果，サル扁桃体より1500個以上のニューロン活動を記録し，そのうちの約1/4のニューロンが生物学的価値を有する様々な物体に識別的に応答した。これら扁桃体ニューロンは，1）対照物は変化しないが，自己（サル）の状態が変化したために対象物の生物学的価値が低下したとき，および2）自己は変化しないが対象物の状態が直接変化したために対象物の価値が変化したときのいずれの条件においてもニューロン活動が変化した。以上の結果は，扁桃体における対照物の生物学的な価値は，対象物と自己との関係に基づいて評価されることを強く示唆する。

(17) PETによる覚醒剤依存者におけるドーパミントランスポーターの測定

伊豫雅臣（浜松医大・精神神経医学）

覚せい剤はその反復使用により，精神依存や精神病を惹起する。また，使用中断により精神運動制止や抑うつなどの離脱症状を引き起こす。さらに，使用中断後も精神病への脆弱性（逆耐性現象）は長期に継続し，近年では精神病の遷延化も問題となっている。

覚せい剤の主な作用部位は脳内ドーパミントランスポーター（DAT）であり，上記の症状はドーパミン神経の変化と密接な関わりがあることが示唆されている。しかしながら，精神症状とド

ーパミン神経系の変化との直接的な関連は証明されていない。さらに遷延化した精神病は精神分裂病が誘発されたと考えられることも多い。このようなことから，われわれは，覚せい剤乱用者における脳内DATの変化と精神症状について，ポジトロンCT検査を用いて調べている。

本研究会では予備的知見であるが現在までの結果を報告する。覚せい剤乱用者において線条体DAT結合能（受容体数を反映するindex）は，健常者に比較して有意に低下していた。その低下は覚せい剤中断後も長期に継続していた。さらにその低下はBrief Psychiatric Rating Scaleの陽性症状尺度と有意な負の相関がみられた。これらから，覚せい剤反復使用により，長期に継続するDAT数の減少が引き起こされ，それは精神病症状と密接に関係しており，精神病の遷延化も覚せい剤の後遺症であることが強く示唆された。

6．シナプス伝達機構に関する細胞生理学的研究

1998．9．24－9．25

代表者：小澤瀞司（群馬大・医）

世話人：伊佐　正（生理研）

（1）代謝型グルタミン酸受容体の細胞外Ca^{2+}感知機能の構造基盤

久保義弘，宮下知之，村田喜理（都神経研・神経生理）

（2）アデノウイルスベクターを用いたNMDA受容体の遺伝子発現

山田伸明，須藤　亮，飯野昌枝，小澤瀞司（群馬大・医・第二生理）

（3）グルタミン酸受容体遺伝子の発現制御

岡戸晴生，近藤真啓，三輪昭子（都神経研・病態神経生理）

（4）単一ニューロンのmRNA発現量の定量化の試み

宋　文杰（大阪大・生物工学）

（5）神経系細胞におけるCa^{2+}流入機構の分子生理学

森　泰生（生理研）

（6）受容体とカップルするADP-リボシルサイクレースによるCaシグナリング

東田陽博（金沢大・医・細胞遺伝子）

（7）プレシナプスCa電流

高橋智幸（東京大・医・神経生理）

（8）cAMPによるシナプス伝達の調節機序：ショウジョウバエ突然変異体を用いた解析

吉原基二郎，鈴木一弘，城所良明（群馬大・医・行動生理）

（9）シナプス前終末伝達物質放出のC－キナーゼによる修飾メカニズム

八尾　寛，本田　泉（東北大・医・生体情報）

（10）リボンシナプスにおける速いグルタミン酸放出

立花政夫，坂場武史，バークランド健，H. von Gersdorff（東京大・心理）

（11）網膜双極細胞と神経節細胞からの同時記録によるシナプス伝達の解析

松井　広，細井延武，立花政夫（東京大・心理）

（12）シナプス前終末の細胞内Ca^{2+}遊離による短期可塑性の発現

成田和彦，（川崎医大・生理）

秋田天平，越知和典，久場健司（名古屋大・医・第一生理）

（13）神経筋接合部シナプス前末端Ca^{2+}動態と短期可塑性

鈴木直哉，鈴木慎一，村瀬雅樹，伊藤幸民，木島博正（名古屋大・物理）

（14）小脳長期抑圧の時間経過

平野丈夫（京都大・生物物理）

(15) 海馬錐体細胞におけるNMDA受容体サブユニットのシナプス特異的分配

伊藤　功，川上良介，杉山博之（九州大・生物）

(16) キンドリングラット扁桃体細胞におけるてんかん様発火の発生機序

田中永一郎，小路純央，東　英穂（久留米大・医・第一生理）

(17) 三叉神経刺激によって発現する二次ニューロンのシナプス増強作用

小野寺加代子，半場道子，高橋智幸（東京大・医・神経生理）

(18) ラット大脳中隔核におけるセロトニン作用の光学的測定

蓮尾　博，赤須　崇（久留米大・医・第二生理）

(19) 光学的多点同時測定法による海馬錐体細胞樹状突起ケーブル特性の解析

井上雅司，宮川博義，工藤佳久（東京薬科大・生命科学）

(20) 上丘中間層におけるニコチン型アセチルコリン受容体の機能

伊佐　正（生理研）

参加者名

小澤瀞司，吉原基二郎，神谷温之，須藤　亮，小池真紀（群馬大・医），宮下知之，村田喜理，久保義弘，岡戸晴生，近藤真啓（都神経研），蓮尾　悟，田中永一郎（久留米大・医），松本信幸（新潟大・自然科学研究科），藤井洋彰，山川義徳（京都大・理），森　泰生（生理研），高橋智幸，小野寺加代子（東京大・医），八尾　寛，本田　泉（東北大・医），立花政夫，バークランド健，松井　広，細井延武，南　尚利（東京大・人文），原田節夫（科学技術振興事業団），伊藤　功（九州大・医），成田和彦（川崎医科大），井上雅司，榎木亮介，阿部佳代（東京薬科大），久場健司，秋田天平，中山晋介，徳納博幸，陸　芳民（名古屋大・医），村瀬雅樹，木島博正，竹内友康，鈴木直哉，鈴木慎一（名古屋大・理），東田陽博（金沢大・医）宋　文杰（大阪大・基礎工），田中暢明（基生研），川口真也，土田　洋，平野丈夫，村島美穂（京都大・理），

研究会概要

平成10年度生理学研究所研究会「シナプス伝達機構に関する細胞生理学的研究」は平成10年9月24，25日の2日間にわたり開催された。中枢シナプス機能解明を目指す最新の電気生理学的，分子生物学的研究に関する20演題（1演題30分）の発表が行われ，密度の高い情報交換が行われた。主な研究成果は以下の通りである。

（1）グルタミン酸受容体の分子生理学的研究：代謝型グルタミン酸受容体mGLuR1の細胞外Ca^{2+}による調節機構。アデノウィルスベクターを用いた変異型NMDA受容体のニューロンへの発現による機能変化。AMPA受容体の発現制御の構造基盤。

（2）シナプス伝達の分子生理学的研究：シナプス前終末においてシナプス伝達を媒介するCa^{2+}チャンネルの同定。N-syb-cAMP系による伝達物質放出の調節機構。C-キナーゼによるシナプス前伝達物質放出修飾機構。網膜双極細胞リボンシナプスにおけるCa^{2+}流入と伝達物質放出時間

の関連。シナプス前終末でのCa^{2+}流入と短期可塑性の関連。
（３）神経伝達可塑性の研究：培養小脳プルキンエ細胞においてmEPSCを指標とする長期抑圧の時間経過の解析。キンドリングラットにおけるグルタミン酸作動性シナプスの機能変化。三叉神経脊髄路核の痛覚２次ニューロンにおけるシナプス増強作用のシナプス前性起源。

(1) 代謝型グルタミン酸受容体の細胞外Ca^{2+}感知機能の構造基盤

久保義弘，宮下知之，村田喜理（都神経研・神経生理）

我々は，代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)が，細胞外Ca^{2+}濃度を0mMから2mM程度 に上昇させると活性化されることを見い出し，またその構造基盤としてSer166を同定した。さらに，mGluR1が細胞外Ca^{2+}によっても活性化されることの生理的意義を知るために，下記の可能性を考え実験を行なった。
(1) この受容体は，脳脊髄液中の1-2 mM程度のCa^{2+}によって，絶えず刺激されていることになる。その結果，種々の細胞内情報伝達系が恒常的に活性化している可能性がある。実際，CHO細胞にmGluR1wt遺伝子を導入し，グルタミン酸(-)，細胞外Ca^{2+} 1.8mM下で培養すると，CHO細胞の形態はspindle shapeへと劇的に変化したのに対し，細胞外Ca^{2+}に対する感受性の低いmGluR1の点変異体，S166Dを遺伝子導入した場合には，その変化は軽度であった。この結果から，mGluR1受容体の活性化がCHO細胞の形態変化をひきおこすこと，恒常的に細胞外に存在する1.8 mM程度のCa^{2+}がmGluR1wtに対しては細胞応答を引き起こす有効な刺激となっていることが明らかになった。
(2)細胞外Ca^{2+}濃度は体全体では生理的にはあまり変動しないが，シナプス間隙は非常に狭い空間なので，シナプス間隙部のCa^{2+}濃度は1 mMから1.5mMといったレンジで変動しうるということが報告されている。このdynamicな細胞外Ca^{2+}濃度の変動が，有効な受容体刺激となる可能性がある。実際，卵母細胞の系で，細胞外Ca^{2+}の1mMから1.5mMというminorな変動を与えたときもこの受容体が活性化されることを確認した。

(2) アデノウイルスベクターを用いたNMDA受容体の遺伝子発現

山田　伸明、須藤　亮、飯野昌枝、小澤瀞司
（群馬大・医・第二生理、科学技術振興事業団CREST）

アデノウイルスベクターを用いた外来性遺伝子導入により、中枢シナプスにおけるNMDA受

容体の機能的性質を変化させることを試みた。このために、NMDA受容体サブユニットのNR1、NR1(N598R)、NR2B のcDNAを組み込んだ組換えアデノウイルスを作製した。NR1(N598R)はNR1のいわゆるN siteのアスパラギン（N）をアルギニン（R）に変異させたものであり、NR1(N598R)/NR2受容体はNMDA受容体の特徴であるMg^{2+}感受性、Ca^{2+}透過性を完全に失うことが知られている。PC12細胞にこれらのウイルスを共感染させ、NR1/NR2BおよびNR1(N598R)/NR2Bの機能発現をホールセルパッチクランプ法により確認した。NR1(N598R)とNR2Bの組換えアデノウイルスを培養海馬ニューロンに感染させたところ、NMDA受容体のMg^{2+}感受性、Ca^{2+}透過性が著しく低下した。またEPSCのNMDA成分のMg^{2+}感受性も著しく低下した。従って、アデノウイルスにより導入されたNR1(N598R)/NR2Bがシナプス後ニューロンに発現し、シナプス伝達に関与するようになることが結論された。本研究は、東京都神経科学総合研究所・病態生理部門の岡戸晴生博士、三輪昭子氏と共同で行われた。

(3) グルタミン酸受容体遺伝子の発現制御

岡戸晴生、近藤真啓、三輪昭子（都神経研・病態神経生理）

ラット前脳領域のAMPA型グルタミン酸受容体の発現を細胞レベルで解析し、GluR1+/GluR2-細胞、GluR1++/GluR2+細胞はparvalbumin あるいは calbindinD28K と共存する傾向にあることを、３重染色法によって明らかにした。GluR1+/GluR2-細胞、GluR1++/GluR2+細胞いずれもカルシウム透過性型AMPA受容体を有すると推定される細胞であることから、AMPA受容体チャネルからのカルシウム透過と細胞内カルシウム結合蛋白の発現が特異的に相関することが示唆される。今回、初代培養神経細胞において、AMPA受容体を介した細胞内カルシウム濃度上昇を検出したところ、実際に細胞によって明らかな差異があることがわかった。このようなAMPA型グルタミン酸受容体の特異的発現制御機構を明らかにするために、GluR2遺伝子のゲノム上流6Kbpとさらに第一エクソンの一部、第一イントロン、第二エクソンの一部を含んだコンストラクトでトランスジェニックマウスを作製したところ、後者ではじめて内在性の発現パターンが再現されることがわかった。したがって、第一エクソンの一部、第一イントロン、第二エクソンがGluR2の内在性の発現に必要であることが示唆された。

(4) 単一ニューロンのmRNA発現量の定量化の試み

宋　文杰（大阪大・基礎工・生物工学）

単一ニューロンRT-PCR法はパッチクランプ法とRT-PCR法を組み合わせた方法で、蛋白分子の発現と機能を同一の神経細胞において検討できるので、可塑性を始めとする多くの神経機能の分子機構の解明に役立つと期待されるが、その応用においてしばしば問題となるのはmRNAの発現量の定量化である。mRNAの検出に逆転写（RT）とPCRの二つの反応が必要なため、厳密な（絶対値の同定）定量を行うには複雑な実験が必要となる。我々の最近の結果によって、順番のレベルでは簡単な方法で定量可能であることが示唆された。発現量の少ない分子はある確率でしか検出されないが、その検出確率が逆に定量化の指標に利用することができる。また、一部の分子は単一細胞における発現量でも連続希釈法を適用するには十分で、その分子の検出閾値で相対的な定量ができる。これらの方法は電気生理の設備以外にPCR装置さえあれば出来る方法なので、多くのラボにおいて多種の問題への応用を期待したい。

(5) 神経系細胞おけるCa^{2+}流入機構の分子生理学

森　泰生（生理研）

形質膜越のCa^{2+}流入は、膜電位を脱分極(活動電位)させ、細胞内Ca^{2+}濃度上昇を司るという、2重の意味において重要である。Ca^{2+}流入を担うCa^{2+}チャネルは活性化機構及び、イオン透過性において非常に多様である。我々は膜電位の脱分極により活性化する電位作動性Ca^{2+}チャネル(VDCC)及び、 G蛋白共役型受容体等の活性化により作動する受容体作動性Ca^{2+}チャネル(RACC)に焦点をあて、分子・機能解析及び、生理的意義を探究してきた。

VDCCの枢要性は神経伝達物質の放出、活動電位の発生、シナプス可塑性等に知られている。VDCCのどの機能的側面がどのように神経諸機能を惹起するかを検討すべく、VDCC変異マウス神経細胞におけるCa^{2+}電流及び、組み換えVDCC変異体の電気生理学的解析を行った。まず、Absence epilepsyに特徴的な癲癇症状を示すstargazerマウスの変異遺伝子を検索したところ、36 kDa stargazin 蛋白を発見した。 stargazin は神経細胞におけるVDCC γ サブユニットに対応し、その効果は不活性化の電位依存性を過分極側に維持することであった。このようにγは他の副サブユニットと共に、主サブユニットα1の有するVDCC活性を微調整し、生理的に正しく機能させると思われる。

一方、RACCは免疫細胞の増殖シグナル等を制御するが、その分子的実体は謎であった。

RACCの一翼を担うTRP蛋白質の７つの遺伝子を単離した。TRPは神経系に非常に豊富に発現されており、Ca^{2+}ストア依存的及び非依存的RACCに分類されることが明らかになった。今回は、TRPファミリーの中でもユニークな活性化機構を有する、高Ca^{2+}透過性のTRP5チャネルを中心に論じたい。

(6) 受容体とカップルするADPリボシルサイクレースによるCaシグナリング

東田陽博、横山　茂、橋井美奈子、A. Egorova、張　家生
（金沢大・大学院医学研・分子情報・細胞遺伝子学）

cyclic ADP ribose (cADPR) はNAD を基質としてADP-ribosyl cyclaseにより作られ、リアノジン受容体を介して細胞内のCa濃度をモジュレートする。cADPRをセカンドメッセンジャーと言うためには、古典的な受容体、例えばムスカリン受容体(mAChR)などによるコントロールを証明することが待たれていた。私達はこの点に関して、一つの直接的証拠を得た。脳型M1に対応するm1 mAChR を大量発現するNG108-15 細胞では、カルバミルコリンの投与により活性上昇が生じた。さらにm2 とm4 サブタイプの大量発現により抑制、m3 サブタイプの発現により活性化を観察した。活性の上昇と抑制は、GTPにより再現されたので、GTP結合タンパク質の関与が考えられた。

(7) プレシナプスCa電流

高橋智幸（東京大・大学院医学研・機能生物学専攻・神経生理学）

電位依存性Caチャネルは詳細な生物物理学的研究がなされている一方、個々の性質の生理的意義は多くの場合明らかでない。延髄の台形体内側核ニューロンとの間に聴覚中継シナプスを形成する巨大軸索終末端the calyx of Heldにおいて伝達物質グルタミン酸の放出を担うCaチャネルは薬理学的に専らP型と同定されるが、シナプス形成の初期にはN型R型が混在する(Iwasaki & Takahashi, 1998 J. Physiol. 509,419)。このP型Caチャネルは静止状態不活性化がほとんどなく、Caの流入に伴って電流依存性不活性化を生じるが、この性質がテタヌス刺激後シナプス抑制(post-tetanic depression)の主な原因であることが明らかになった（Forsythe et al.1998 Neuron 20,797)。また、高頻度刺激直後にCa電流が一過性に促進する現象が見出され、このメカニズムに神経終末端内のCa濃度の上昇が関与することが明らかになった（Cuttle et al., 1998 J. Physiol. In press)。生後発達に伴うCaチャネルのN型からP/Q型への移行は、神経接合部においても知ら

れるが、さらに小脳、視床のシナプスにおいても認められた（Iwasaki et al. In preparation)。成熟温血動物シナプス伝達を媒介するCaチャネルは主としてP/Q型と結論される。

（8）cAMPによるシナプス伝達の調節機序；ショウジョウバエ突然変異体を用いた解析

吉原基二郎、鈴木一弘、城所良明（群馬大・医・行動医学研究施設）

cAMPは、シナプス前終末において伝達物質の放出を調節するmodulatorとして良く知られている。我々は既に、シナプス小胞タンパク質である神経型シナプトブレビン（n-syb）突然変異体の微小シナプス電流の解析によって、(1) 伝達物質の放出は、 n-sybに依存した経路と、n-sybに依存しない経路の、共にCa^{2+}に依存する２種類の経路に分解できること、また、(2) cAMPはCa^{2+}非存在下でも伝達物質放出を促進するが、n-syb完全欠損型突然変異体ではこの効果が欠失していること、を明らかにしている（論文投稿中)。このことは（1）cAMPは細胞内Ca^{2+}の増加を介さずに伝達物質の放出を促進できること、(2) このcAMPによる細胞内Ca^{2+}を介さないシナプス伝達の調節はn-syb依存性の経路のみを介して行われることを意味する。そこで、n-syb完全欠損型突然変異体でCa^{2+}存在下ではcAMPが伝達物質放出を促進するかを調べる実験を行うと、n-syb非依存性の経路だけが働く状態、即ち、細胞内Ca^{2+}を介さずにcAMPが放出を促進する経路を断った条件で、cAMPによるK+ channelの不活化→脱分極→Ca^{2+} channelの活性化というカスケードで細胞内Ca^{2+}濃度の上昇が起こり、放出が促進されるという一連の反応が起こっているのかが検証できる。その結果、n-syb突然変異体においても促進は起こり、cAMPは、Ca^{2+}の増加を介する効果とCa^{2+}の増加を介さない効果の両方をひき起こして伝達物質の放出を促進していることがわかった。

（9）シナプス前終末伝達物質放出のC-キナーゼによる修飾メカニズム

八尾　寛、本田　泉（東北大（院）・医・生体情報）

ニワトリ胚毛様体神経節巨大シナプス前終末からの伝達物質放出は、フォルボルエステル(PMA)により、C-キナーゼ(PKC)依存的に増強された。細胞外液Ca^{2+}をSr^{2+}に置き換えると、同期した早い成分と、同期しない遅い成分の伝達物質放出が識別された。短い時間間隔で2発刺激をすると、速い伝達物質放出成分が抑制されたのに対し、遅い成分が促進された。それぞれの成分について、放出される小胞の総量と$[Sr^{2+}]_o$の関係を求めた。速い成分の方が見かけの$[Sr^{2+}]_o$

感受性が高く、予想される最大放出量が少なかった。これらの性質は、速い成分と遅い成分、それぞれが異なる小胞プールからの開口放出であるとするtwo-releasable pool仮説と矛盾しない。PMAは、この2成分をほぼ同じ時間経過で増強した。PMAの効果は$[Sr^{2+}]_o$に依存し、10 mM以上では有意の増強は認められなかった。PMAは、シナプス前終末内Sr^{2+}変動に影響しなかったので、PKCの活性化は、それぞれの成分の開口放出過程における小胞融合確率のSr^{2+}感受性を増大させたことが示唆される。哺乳動物の中枢神経系におけるPKCの作用メカニズムを解析する目的で、マウス海馬苔状線維終末のCa^{2+}動態を測定する新しい手法を確立した。

(10) リボンシナプスにおける速いグルタミン酸放出

立花政夫、坂場武史、バーグランド健、H. von Gersdorff（東京大・人文・心理）

網膜双極細胞は、リボンシナプスを介して神経節細胞に情報を伝達する。双極細胞は光刺激で緩電位応答を発生するため、伝達物質の放出も持続的で緩やかなものであると考えられてきた。本研究では、双極細胞の伝達物質（グルタミン酸）放出が緩やかなものであるか否かを検討した。キンギョ網膜から単離したON型双極細胞の軸索終末部を膜電位固定し、Ca電流と膜容量を測定すると同時に、アメリカナマズの水平細胞に存在するAMPA受容体を利用して伝達物質の放出を検出した。AMPA受容体の脱感作はcyclothiazideで抑制した。双極細胞のCa電流が活性化されると、約1 msの遅延でAMPA応答が記録できた。この遅延時間から、開口放出部位におけるCa濃度は約0.1 mMに達すると推定される。AMPA応答の積分値は膜容量増加のピーク値と一致したので、膜容量増加はexocytosisを反映していると考えられる。また、脱分極パルス終了後、AMPA応答は300 ms以内に消失したので、非同期性の伝達物質放出は微量であると結論した。脱分極パルス終了後に膜容量は1 - 2秒の時定数で減衰したが、これはendocytosisを反映していると考えられる。以上の結果から、双極細胞はCaの流入量に応じて、伝達物質を一過性にも持続性にも放出できることが明らかになった。

(11) 網膜双極細胞と神経節細胞からの同時記録によるシナプス伝達の解析

松井 広、 細井 延武、 立花 政夫（ 東京大・大学院人文社会系研究科・心理学）

網膜に投影された視覚情報は、視細胞から双極細胞を介して神経節細胞へと伝えられる。双極細胞は光刺激に対して緩電位応答し、一方、神経節細胞は視覚経路の中で初めて活動電位を発生することが知られている。双極細胞－神経節細胞間のシナプス伝達特性が、活動電位を発生する

他の中枢神経細胞間のシナプスとどのように異なるかは、非常に興味深い点である。これらの細胞間のシナプス伝達を調べた従来の研究の多くは、神経節細胞の光応答を調べたものであった。ところが神経節細胞が光刺激に対して応答するまでには、視細胞-双極細胞間および双極細胞-神経節細胞間の少なくとも2段階のシナプスを介しており、両者を切り分けるのが困難である。そこで本研究では、イモリ網膜スライス標本を作製し、双極細胞および神経節細胞の両者に同時にホールセルパッチクランプ法を適用し、双極細胞から神経節細胞への興奮性シナプス伝達を直接測定することにした。双極細胞に脱分極パルスを与えると、双極細胞からCa電流が記録され、神経節細胞からはEPSCが記録された。誘発性EPSCは非NMDAおよびNMDA型受容体を介する2つの成分からなることが明らかになった。一方、自発性EPSCには非NMDA成分しか観察されなかった。この結果より、非NMDA型受容体はシナプス小胞放出部位直下にあり、NMDA型受容体はやや離れた位置に存在することが示唆された。

(12) シナプス前終末の細胞内 Ca^{2+} 遊離による短期可塑性の発現

成田 和彦、越智 和典（川崎医大・生理）
秋田 天平、久場健司（名古屋大・医・第一生理）

カエル運動神経を低Ca^{2+}(0.2mM)、高Mg^{2+}(10mM)溶液中で持続的に刺激(50Hz)すると、神経終末ライアノジン受容体を介する CICR 機構が、流入した Ca^{2+}により数10秒から数分の経過で徐々に活性化準備(priming)され、活性化された後、不活性化される。この結果、細胞内 Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)が一過性に上昇し、それに伴い微小終板電位(mepp)の頻度も一過性に増大する。刺激を停止すると CICR機構は脱不活性化されるが、また、数～数十分のゆっくりとした経過で刺激前の静止状態に戻る(de-priming)。この priming は、CICRに顕著な活性化が見られないような低頻度の刺激(2-10Hz,conditioning)でも進み、引き続いて 50Hz で刺激すると、CICR機構は急激に活性化されて $[Ca^{2+}]_i$ 及び mepp頻度は急激に上昇する。今回、この可塑的に活性化されるCICR機構のインパルスによる伝達物質放出に於ける役割を検討した。0.5mM Ca^{2+},5-10mM Mg^{2+} 溶液中で 10Hz, 6-10分の conditioning pulse を与えた後の5-20発の刺激(50Hz)に伴う終板電位振幅は conditioning前に比べ数-10倍の増強を示した。この増強は conditioning直後が最も大きく、30分以上たって元の振幅に戻り、ライアノジンや TMB-8で抑制された。Oregon Green を負荷した神経終末で 50Hz,10-30発の刺激に伴う蛍光変化も conditioningにより増大し、ライアノジンで抑制された。従って、Ca^{2+}依存性に活性化準備される CICRがインパルス誘発性の伝達物質放出の可塑的促進に関与することが示唆される。

(13) 神経筋接合部シナプス前末端内Ca^{2+}動態と短期可塑性

鈴木直哉、鈴木慎一、村瀬雅樹、伊藤公民、木島博正 (名古屋大学・理・物理)

カエルの神経筋接合部シナプスにおける連続刺激後の伝達物質放出増大の短期可塑性はシナプス前由来であり、連続刺激の周波数や回数に依存して数10ミリ秒から数分間持続する(減衰時定数の小さいものより速い促通、遅い促通、増進、増強と呼ばれる)。シナプス前末端内Ca^{2+}がこれらの短期可塑性の各成分に対してどのように関与しているのか。我々は、シナプス前末端内Ca^{2+}に変化を与えるような操作をした時に短期可塑性の各成分がどのように変わるかを電気生理学的に、また、その時の前末端内Ca^{2+}動態の変化を光学的に測定した。その結果、Ca^{2+} 結合・解離のキネティクスの速いCa^{2+}キレート剤BAPTAの前末端内への負荷は速い促通に対して、キネティクスの遅いEGTA負荷は遅い促通に対してにより減少させる効果を持っていた。Ca^{2+}動態の測定では、BAPTAは速いCa^{2+}濃度変化を無くしてゆっくりとした変化に変えたが、EGTAは変化幅を大幅に小さくはするものの、速い変化を残した。このことから、これらの促通は末端内のCa^{2+}と直接的に関係していることが示唆される。また、増進・増強を誘起する刺激時のCa^{2+}動態を、EGTA負荷は大きく変化させたのに対して、電気生理学的測定では増進・増強成分の大きさや減衰時定数が大きく変化するということは無かった。このことは増進・増強成分が末端内のCa^{2+}と直接的には関係していないことを示している。

(14) 小脳長期抑圧の時間経過

平野丈夫、村島美穂(京都大・理学研究科・生物物理)

小脳の顆粒細胞・プルキンエ細胞間シナプスは、顆粒細胞刺激またはグルタミン酸投与と脱分極の組み合わせにより、長期抑圧を起す。この長期抑圧は、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。私たちは長期抑圧の発現機構を、主として 培養系を用いて、細胞・分子レベルで解析してきた。これまで長期抑圧の測定は2時間程度が限界であったが、私たちは培養系において、1日以上にわたって長期抑圧を測定する方法を開発した。mEPSCをシナプス後プルキンエ細胞の伝達物質に対する感受性の指標とし、それが長期抑圧を引き起こす条件刺激(グルタミン酸と高濃度のカリウムイオンの同時投与)により、どのように変化するかを一週間くらいまで調べた。この方法により、プルキンエ細胞の伝達物質に対する感受性は、長期抑圧から元のレベルに戻ることが明らかになった。さらに、長期抑圧には持続時間が数時間の初期相と、強い条件刺激によってのみ誘導されmRNAおよび蛋白質合成に依存し1〜2日程持続する後期相、が存在することが明らかになった。

(15) 海馬錐体細胞におけるＮＭＤＡ受容体サブユニットのシナプス特異的分配

伊藤功、川上良介、杉山博之　（九州大学・理・生物）

海馬ＣＡ３錐体細胞にはＮＭＤＡ受容体依存型の長期増強（LTP）を示すシナプスがそれぞれ頂上樹上突起および基底樹上突起に存在する。我々は、海馬ＣＡ３ 錐体細胞のこれら二つのシナプスで機能しているＮＭＤＡ受容体のサブユニット構造が異なっている可能性を、ＮＭＤＡ受容体ε１およびε２サブユニットのノックアウトマウスを用いて報告した。今回我々は、上記の観察が遺伝子のノックアウトに伴う二次的影響によるものでないことを、ワイルドタイプマウスを用いた薬理学的解析 、および各サブユニットの海馬における発現量とシナプス可塑性の週齢依存的変化の解析からこれを確認した。したがって、我々の観察は、細胞の極性または入力に依存して、εサブユニットが単一細胞内でソーティングされている可能性を示唆している。そこで、このソーティングの様式を明らかにする端緒として、まず海馬ＣＡ１野シナプスのＮＭＤＡ受容体応答およびLTPに対するε１サブユニットのノックアウト効果を解析し、ＣＡ３野のそれと比較した。 その結果、ＣＡ１錐体細胞ではその頂上樹上突起のシナプスおよび基底樹上突起のシナプスにおけるＮＭＤＡ受容体応答およびLTPがともにε１サブユニットのノックアウトにより減少した。ＣＡ３錐体細胞と異なり、ＣＡ１錐体細胞は、その頂上樹上突起および基底樹上突起にともに同種類の入力を受けていることから、εサブユニットは入力に依存して、特定のシナプスに配置されている可能性が示唆された。

(16) キンドリングラット扁桃体細胞におけるてんかん様発火の発生機序

田中永一郎、小路純央、東　英穂（久留米大・第一生理）

ラット扁桃体キンドリング完成後４週以降に扁桃体を含む冠状断スライス標本（キンドリング群）を作成し、刺激部位と反対側の基底外側核細胞の whole-cellpatch-clamp,細胞内記録を行い、電気的膜特性とシナプス応答を記録し、健常ラットスライス標本（対照群）のそれと比較検討した。キンドリング群では静止および活動時の膜特性には有意な変化を認めなかった。Non-NMDA-type と NMDA-type の evoked EPSCsはその振幅が著明に増大したが、$GABA_A$-type と $GABA_B$-type の evoked IPSPsは変化しなかった。また、non-NMDA-type EPSCの立ち上がり時間と減衰時間は有意に短縮した。一方、潅流投与による AMPAおよび muscimol 誘起電流には変化がなく、NMDA誘起電流は抑制された。テトロドトキシン（TTX）含有液または TTX /低 Ca^{2+}含有液中の non-NMDA-type の自発性 EPSCsは発現頻度と振幅が著明に増加した。以上の結果は、キンドリングラットでは神経終末部からの glutamate放出確率が増加し、さらに、細

胞体近傍部でのシナプス活動が優位になるか、シナプスが新しく発芽している可能性を示唆すると共に、局所電気刺激誘起ならびに自発性EPSCs の増大がてんかん様発火の原因となることが明らかになった。

(17) 三叉神経刺激によって発現する二次ニューロンのシナプス増強作用

小野寺加代子、高橋智幸（東京大・医・神経生理）
半場道子（東京医科歯科大・歯・神経機講制御）

痛覚過敏、痛覚異常といった痛みにおける可塑的な変化の機序を知るために、三叉神経脊髄路核尾側亜核のニューロンのシナプス応答を下顎神経—脳幹スライス標本から記録した。尾側亜核表層（I 、II相）のニューロンには下顎神経から Aδ 及びC線維の入力を受けている。Bicuculline, strychnine存在下で、下顎神経刺激によるシナプス応答はグルタミン酸作動性の小さなmonosynaptic EPSCと非常に大きなpolysynaptic EPSCから成っている。低頻度反復刺激によりAδ 及びC線維由来と考えられるmonosynaptic EPSCを記録する事ができる。C線維由来のmonosynaptic EPSCは低頻度刺激によりactivity-dependentな増強を示した。この増強はCNQXあるいはAPV存在下、または-80mVから+45mVまで膜電位を変化させても同様に発現するのでpresynapticに誘発されると考えられる。C線維を刺激する強度で高頻度刺激（100Hz、10発を1秒ごと10回）を与えるとEPSCにLTPが起こる。APV, キヌレイン酸存在下で高頻度刺激を与えてもLTPは発現するので、presynapticに誘発されると考えられる。

(18) ラット大脳中隔核におけるセロトニン作用の光学的測定

蓮尾　博、赤須　崇（久留米大・医・第二生理）

中隔核においても5-HTによりKコンダクタンス増大を伴う過分極電位を発生する。今回海馬・中隔核間の情報の流れに対する5-HTの作用を電位感受性色素（RH482）と二次元光量差分測定装置（HR Deltaron1700 system）を用いて光学的測定を行った。海馬采の電気刺激により外側中隔核領域で海馬采側から外側中隔核辺縁に向かう光学的応答が記録され、この大部分は低Ca^{2+}溶液で抑制された。5-HT灌流投与によりこの光学的応答は抑制されず、むしろ増強された。増強作用は1μM程度から認められ、10μMでほぼ最大に達した。 5-HT_{1A}受容体選択的アゴニストである8-OH-DPATにより軽度増強がみられたが、5-HT_2受容体アゴニストであるDOIや5-HT_4受容体アゴニストであるRS67333ではみられなかった。一方過分極を阻害する濃度のNAN-190（5-

HT_{1A}受容体のアンタゴニスト）存在下でも5-HTによる増強は認められた。 Phorbol esterは効果なく、forskolinでは光学的応答のピークのみの増強がみられた。5-HTは海馬－中隔間の興奮伝播に対しては促進的に働いていることが示唆された。

（19）光学的多点同時測定法による海馬錐体細胞樹状突起ケーブル特性の解析

宮川博義、井上雅司、工藤佳久 （東京薬大、生命科学）

中枢神経細胞のシナプスにおいて発生したシナプス電位は、減衰を受けながら樹状突起を伝播して細胞体・初節に達し、統合されて活動電位の発生に寄与する。我々は電位感受性色素によって染色した海馬スライス標本に閾値下シナプス入力を与え、フォトダイオードアレイを用いてＣＡ１領域から膜電位応答を検出し、樹状突起におけるEPSPの伝播を観察した。更に、その結果を解析し、樹状突起のケーブル特性を決定する因子を求めた。

APVによってNMDA受容体依存性伝達を阻止し、non-NMDA受容体依存性伝達のEPSPを樹状突起に沿った各層から単離した。EPSPのピークは細胞体では入力部位（str. Lac-mol)に比べ約13msec遅れていた。樹状突起膜を受動的とみなし、シナプス入力部位の電位応答を実際のCA1細胞の形態に基づいたコンパートメントモデルの入力として与え、他の部位における電位応答を計算によって求め、実験結果を再現するパラメータを求めた。膜比抵抗は27.8±2.1kWcm^2、細胞内比抵抗は81.2±4.2Wcmであった。これらの値は、これまで細胞体からの電気的記録に基づいて推定されていた値よりも小さい。膜からの電流の漏れが大きいためにピークの時間遅れは大きいが、細胞内抵抗も低いためにEPSPは樹状突起内をあまり減衰せずに伝播することになる。 神経細胞内における情報の伝播に、これほど長い時間を要するとは考えにくい。膜の能動的特性が神経細胞における情報統合の高速化に重要な寄与をしている可能性があると考えられる。

（20）上丘中間層におけるニコチン型アセチルコリン受容体の機能

伊佐　正（生理研）

ニコチン型アセチルコリン受容体は中枢神経系において、注意・記憶・学習などの様々な機能に関わっているとされているが、その詳細は明らかでない。我々は、眼球のサッケード運動などの、視覚入力に対する行動反応を制御するとされている上丘の中間層に強く入力することが知られているアセチルコリン作動性システムの機能を調べた。ラット上丘スライスにおいて、多数の中間層ニューロンからwhole cell 記録を行い、アセチルコリン(ACh) 1 mMをpressure application

したところTTX, CNQX, D-APV, bicuculline, strychnine存在下で、速い内向き電流が記録された。この内向き電流は顕著な内向き整流特性を示し、dihydro-β-erythroidineとmecamylamineによって抑制されたが、α-bungarotoxinやmethyllycaconitineに対して抵抗性を示したことから、中間層ニューロンに存在する非α7型subunitから構成されるニコチン型アセチルコリン受容体(nAChRs)の活性化によることが明らかになった。そして、還流液中へのニコチン(Nic)の持続投与も同じ種類のnAChRSを活性化し、内向き電流を生じさせ、中間層ニューロンを脱分極させた。その結果、視神経からの視覚入力を受ける浅層の刺激によって中間層ニューロンに誘発されるEPSPは閾値を超えて、活動電位を生成させ、そのことにより、視神経－浅層－中間層－橋網様体という、視覚－運動変換過程の最短経路の信号伝達が促進されることとなった。このことの行動学的意義を眼球運動課題を訓練したニホンザルで調べた。すると上丘中間層へのニコチン注入は、反応時間が極めて短い（70-100ms）サッケード運動（express saccade）の出現頻度を顕著に増加させた（通常のサッケード運動の反応時間は150-200ms)。また、上丘にアセチルコリン作動性線維を送る脚橋被蓋核ニューロンは動物の注意の移動に伴って変化することが明らかにできたので、注意の動いた場所に対してサッケード運動の反応時間を早める過程に、上丘中間層のニコチン受容体の活性化が関与する可能性が示された。

7．神経科学研究の新しいアプローチ

1998．9．27－9．29

代表者：畠中　寛（大阪大・蛋白研）

世話人：池中一裕，中平健祐（生理研）

（1）培養神経細胞系におけるシナプス形成と維持

田口隆久（工業技術院大阪工業技術研）

（2）脳の可塑性に伴う遺伝子応答とシナプス特異性の発現

井ノ口馨（三菱化学生命研）

（3）クロマフィン細胞における2つの開口放出パターンとその解析

坪井貴司[1,2]，菊田敏輝[2]，櫻井孝司[2]，寺川　進[2]

（[1]日本学術振興会特別研究員，[2]浜松医科大・光量子医学研究センター）

（4）GFPを用いたSNARE蛋白質の細胞内局在変化の可視化

片岡正和，高橋正身（三菱化学生命研）

（5）シナプス小胞の開口放出制御機構の分子生物学的解析法

板倉　誠[1,2]，三澤日出巳[3]，関口真理子[1]，高橋正身[1]

（[1]三菱化学生命研，[2]東工大・生命理工，[3]都神経研）

（6）ＣＡＬＩ法による開口分泌の分子機構研究の試み

熊倉鴻之助（上智大・生命研）

（7）新規機能発現クローニング法によるアストロサイト分化誘導因子の同定

熊田竜郎，馬場広子，秋田裕美，池中一裕（生理研）

（8）培養中枢ニューロンを用いたニューロトロフィンによる神経伝達物質放出作用および細胞内カルシウム動態の解析

沼川忠広，松本智也，畠中　寛（大阪大・蛋白研）

（9）DNA傷害に伴う中枢ニューロンのアポトーシス－色素乾皮症原因遺伝子欠損マウスを用いた解析－

安達直樹，畠中　寛（大阪大・蛋白研）

(10) 遊離されたグルタミン酸の画像処理による計測法

工藤佳久（東京薬科大・生命科学）

(11) 神経幹細胞の分化制御機構の研究とその神経疾患への応用

岡野栄之（大阪大・医）

(12) 脊髄インターニューロンの新しい解析法

鹿川哲史（生理研，The Salk Institute for Biological Studies）

(13) IP3が開閉を制御する視細胞Naチャネル

榊原　学（東海大・開発工学）

(14) 海馬ＬＴＰによる信号伝達特性の変化

小谷　進[1]，高木　博[2]，榊原　学[1]（[1]東海大・開発工学，[2]信州大・医）

(15) 視覚順応調節蛋白質Ｓ－モジュリンの作用機構

河村　悟（大阪大院・理学研究科）

参加者名簿

畠中　寛，沼川忠広，松本和也，安達直樹（大阪大・蛋白研），岡野栄之（大阪大・医），河村悟（大阪大院・理学研究科），井ノ口馨，深澤有吾，林　文彦，高橋正身，片岡正和，板倉　誠（三菱化学生命研），田口隆久，工藤　卓（大阪工業技術研），熊倉鴻之助（上智大・生命研），榊原　学，小谷　進（東海大・開発工学），坪井貴司，菊田敏輝（浜松医科大・光量子センター），工藤佳久（東京薬科大・生命科学），白井良寛，畑　克介，田中暢明（基生研），牧野初音（生理研）

研究会概要

脳の形成とその機能を明らかにする上で，近年の技術の進歩と研究方法の多様化が重要な役割を果たしていることは論を持たない。分子生物学的手法による分子レベルの解析から，光学的測定，電気生理学的手法を用いた細胞レベルの解析，組織培養を用いた組織レベルの解析等，様々なレベルで多様な方法によりアプローチが行われ，新しい展開が行われている。したがって，このような異なった角度からのアプローチをとる研究者が会して情報を交換し，成果の位置付けと今後の展開を討議することが重要である。

本研究会では，このような様々な角度から研究を行っている研究者がそれぞれの最新の成果に基づいて発表討議を行い，一層の発展を計った。

(1) 培養神経細胞系におけるシナプス形成と維持

田口隆久（工業技術院大阪工業技術研究所）

神経回路動態特性を決める重要な部位であるシナプスの機能変化を分子レベル・細胞レベルで解析するためには，培養細胞系の活用が有効である。我々は，ニワトリ大脳神経細胞の初代培養系を開発し，このような研究に活用してきた。本講演では，この系を用いて得られた結果の概要を紹介する。この培養系においては胚令等価日数に応じてシナプス形成が進行し，定量的な解析が可能である。神経細胞の活動依存的なシナプス形成，シナプス形成初期におけるサイレントシ

ナプスの存在，マグネシウム除去による神経伝達増強の誘導，この誘導を導く蛋白質の発見，さらに，神経回路形成に関与する可能性の高い，神経突起伸長活性をもつ新しい蛋白質の同定と構造解析について述べる。

(2) 脳の可塑性に伴う遺伝子応答とシナプス特異性の発現

井ノ口馨（三菱化学生命研）

長期記憶の形成は，シナプスの形態変化やシナプス結合の新生などを含む神経ネットワークのダイナミックな変化を伴うと考えられる。これらの変化を担う機能タンパク質は，記憶の固定化に伴い核内の遺伝子から新たに読まれ，標的のシナプス部位に輸送されると考えられる。ところが，これらのタンパク質が，１つのニューロンに存在する数多くのシナプスのうちの特定のアクティブシナプスに特異的に輸送される機構には不明の点が多い。

我々は，海馬歯状回のLTPに伴い発現が誘導される遺伝子を，PCR-differential display で探索し，数多くのシナプス可塑性関連遺伝子を単離した。得られた遺伝子の一つ vesl-1Sがコードする Vesl-1S/Homer タンパク質は，代謝調節型グルタミン酸受容体１ (mGluR1) 及び mGluR5 と相互作用するPDZ ドメインタンパク質である。我々は，海馬歯状回のLTPにともない発現誘導された Vesl-1S/Homer タンパク質が，アクティブシナプス層のシナプス後部側に特異的に局在していることを見出した。Vesl-1S/Homer タンパク質は，「核に貯えられている遺伝情報を，長期的な可塑的変化の起きている特定のシナプスにのみどの様な機構で選択的に発現させるのか」という問題を解く良きツールであると思われる。本研究会では，この点についてのわれわれのデータをお示しし，討論のネタとしたい。

(3) クロマフィン細胞における２つの開口放出パターンとその解析

坪井貴司[1,2]，菊田敏輝[2]，櫻井孝司[2]，寺川　進[2]
([1]日本学術振興会特別研究員，[2]浜松医科大学光量子医学研究センター)

ウシ副腎髄質クロマフィン細胞の分泌顆粒をアクリジンオレンジ(3 μ M)を用いて5分間蛍光染色し，開口放出反応を高開口数（X100,N.A.=1.65)対物レンズを用いて構築したエバネッセンス顕微鏡で観察を行った。電気刺激後，蛍光染色した分泌顆粒が消失する反応をリアルタイムで観察できた。反応には，蛍光輝点が広がりながら消失するもの（フラッシュ型）と蛍光輝点が1ビデオフレーム（33 msec）で単に消失するもの（単純型）が存在した。以上から，単一顆粒の開口

放出のダイナミクスを考察する。

(4) GFPを用いたSNARE蛋白質の細胞内局在変化の可視化

片岡正和，高橋正身（三菱化学生命研）

GFPはレーザー共焦点顕微鏡との組み合わせによって，融合蛋白質として発現させることで，改変遺伝子産物の挙動変化を簡便に解析でき，また生細胞で時系列に従う蛋白質の局在変化が解析できる。我々はこの利点に着目し，様々な蛋白質をGFP融合遺伝子として発現させ，神経研究に有効利用しようと試みている。本研究会では，シナプス小胞蛋白質であるシナプトタグミンとGFPとの融合遺伝子を用いたシナプトタグミンの細胞内での特異的局在に関与するドメインの探索，および高カリウム刺激による制御性エンドサイトシスの可視化の試みを中心に，SNARE蛋白質であるSNAP-25のリン酸化と局在変化の関連についての研究を紹介する。

(5) シナプス小胞の開口放出制御機構の分子生物学的解析法

板倉　誠[1,2]，三澤日出巳[3]，関口真理子[1]，高橋正身[1]
([1]三菱化学生命研，[2]東工大生命理工，[3]都神経研)

神経細胞は，形態学的に異なる二種類の分泌小胞を持っている。一つはGlu, GABAなどの伝達物質を含むシナプス小胞（SSVs），そしてもう一つはペプチド性の伝達物質を含む有芯顆粒（LDCVs）である。これらの小胞は，分泌のCa^{2+}感受性の違いなどは報告されているがそれぞれの開口放出の分子機構の違いはほとんどわかっていない。LDCVsについては，ヒト成長ホルモンと興味のある蛋白質を一過的に共発現させ，成長ホルモンの分泌を測定することで蛋白質の分泌に及ぼす効果を解析する系が非常に有用なツールとなっている。しかし，成長ホルモンはLDCVsに蓄積されるためSSVsにおける分泌をそのまま反映しているのか，わからない。そこでPC12細胞にコリンアセチルトランスフェラーゼを共発現させ，アセチルコリンを合成させることによりLDCVsではなくSSVsの分泌に各蛋白質が与える影響を解析する系を構築した。

(6) CALI法による開口分泌の分子機構研究の試み

熊倉鴻之助（上智大・生命研）

これまでに我々は，ジギトニン処理によって膜透過性を高めた高透過性クロマフィン細胞を用いて，特異抗体による標的分子の機能不活性化がカルシウム依存性開口分泌におよぼす作用を測定解析して，（1）ATP依存性プライミング機構における細胞骨格系蛋白質等の役割，（2）ATP依存性プライミングにおけるVAMP－2とSNAP－25複合体の変遷と，その調節因子，（3）シナプトタグミンのC2Bドメイン／イノシトールポリリン酸共役によるクランプ機能，ならびにC2Aドメインのカルシウム・センサー機能を明らかにしてきた。本研究では，これらの分子群の機能阻害を時空的にさらに限局し，且つその影響を正常な細胞からの生理的な開口分泌機能の変化を指標として解析するために，レーザー分子機能不活性化法（CALI）による解析を進める。CALI法は，レーザー照射の標的となるクロモフォア（マラカイト・グリーン／MCG）から34オングストローム以内という極限微小範囲での分子機能破壊が可能であり(ref. J.C.Liao et al., Proc.Natl.Acad. Sci.USA, 91;2659-2663, 1994)生体分子の生理的機能を解析する上で非常に有効な研究方法であるが，伝達物質放出機構の研究に適応した報告は無いため，現在までにCALI法の応用に必要な実験条件の設定を進めて，以下の結果を得ている。

（1）抗体のクロモフォア（MCG）標識の至適条件を設定した。

（2）抗体を多数の細胞に効率よく導入する方法としてスクレープ・ローディング法を行い，およそ90%の細胞に効率よく導入出来ること，導入後の生存率，及び生理的刺激（ACh）に対する分泌応答能ともに障害を受けないことを確認した。

（3）SNAP－25抗体を標識して導入した後にCALIを行い，分泌機能を傷害するレーザー照射の照射面積ならびに熱量の至適条件を検索している。現在までに，0,32cm2のスポットに 160 mJ/cm2の熱量のレーザーを10Ｈｚ，5分間照射しても分泌機能は傷害されないという結果を得た。

(7) 新規機能発現クローニング法によるアストロサイト分化誘導因子の同定

熊田竜郎，馬場広子，秋田裕美，池中一裕（生理研）

中枢神経系では，共通の前駆細胞である神経上皮細胞から，各々の細胞系譜に特異的な遺伝子発現が行われることによって，多種多様な細胞が発生・分化する。グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）遺伝子の発現は，アストロサイトの分化過程を追跡する上で，非常に有効な指標となる。そこで，GFAP遺伝子の発現を指標とする新規機能発現クローニング法を開発し，アストロサイトへと分化を誘導する因子をコードする遺伝子を単離することを試みた。

当部門では，温度感受性SV40T抗原を持つトランスジェニックマウスであるイモートマウスより未分化なアストロサイト前駆細胞株，HB108-10株が樹立されている。この細胞株は，GFAPプロモーターの下流にレポーター遺伝子であるlacZ遺伝子を持つ融合遺伝子が組み込まれており，32℃ではlacZ遺伝子の発現は認められないが，分化誘導条件（39℃）に培養することで初めてGFAPプロモーターの活性化によるlacZ遺伝子の発現が行われる。このアストロサイト前駆細胞株に対し，分化因子をコードするcDNAを導入すれば，分化を誘導させない条件下（32℃）においても，lacZ遺伝子の発現が認められるものと考えられる。そこで，この細胞株にマウス大脳のcDNAライブラリーを導入し，b-ガラクトシダーゼ（b-Gal）陽性となる細胞を選別し，選別された細胞からcDNAを単離した。

cDNAライブラリーは，レトロウイルスを用いて受容細胞へ導入した。レトロウイルスは，障害性を示さずに受容細胞に対して，目的の遺伝子を1コピーのみゲノム上に組み込むことができる。しかし，一般に様々な受容細胞への遺伝子導入効率が著しく低かった。我々は，高力価ウイルスを調製することに成功し，分化の一過程にある細胞においてもライブラリーのスクリーニングを可能にした。

b-Gal陽性細胞は，b-Galの蛍光基質であるFDGを用いてFDG陽性の細胞を検出し，セルソーター（FDG-FACS）を用いて細胞の分別を行った。cDNAの単離法は細胞の増殖に合わせて選択することで，増殖が著しく遅い細胞よりもRT-PCR法によりcDNAの単離を行うことができた。

この新たに確立した方法を用いてアストロサイト分化因子のクローニングを行ったところ，シスタチンCをコードするcDNAが得られた。

(8) 培養中枢ニューロンを用いたニューロトロフィンによる神経伝達物質放出作用および細胞内カルシウム動態の解析

沼川忠広，松本智也，畠中　寛（大阪大・蛋白研）

我々は，培養ラット中枢ニューロンを用いて，BDNF の神経伝達物質放出作用の解析を行い，BDNF 添加後 1 分内に小脳，海馬，大脳皮質および線条体ニューロンからグルタミン酸の放出がみられることを既に報告した。この放出は Trk の特異的阻害剤であるK252a で処理することで完全に抑えられた。また，TrkB IgG で放出が完全に抑制されたことから，BDNF による放出は，TrkB を介していると思われる。

一方，大脳皮質では，観察されなかった NGF によるグルタミン酸の放出が小脳顆粒細胞ではみられることが今回明らかになった，小脳顆粒細胞では TrkA の発現がなく，p75の発現がみられること，および NGF による放出が，BDNF によるものと比べて，ニューロトロフィンを高濃度必要とするものであることなどから，p75 の関与の可能性が考えられる。そこで C2-ceramide

によるグルタミン酸の放出をみたところ，有意な放出を観察した。これら TrkB を介した BDNF と，p75 を介した NGF によるグルタミン酸の放出作用は，共に外液から Ca を除去しても観察され，BAPTA-AM および thapsigargin 処理で放出が完全に抑制された。C2-ceramide による放出もニューロトロフィンによるものと同じく細胞内カルシウムに高い依存性を示した。

共焦点レーザー顕微鏡下でカルシウム感受性色素 Fluo-3 を用いた解析では，ニューロトロフィンおよび C2-ceramide を添加する事で有意な細胞内 Ca の上昇を確認した。これらの結果により，ニューロンによるグルタミン酸放出は，細胞内 Ca に高い依存性があると考えられる。また，FM-1-43 を用いた exocytosis assay の結果は，このニューロトロフィンによる放出が外液 Ca に高い依存性を持つ通常の exocytosis と異なる可能性が高いことを示している。

(9) ＤＮＡ障害に伴う中枢ニューロンのアポトーシス
ー色素乾皮症原因遺伝子欠損マウスを用いた解析ー

安達直樹，畠中　寛（大阪大・蛋白研）

脳神経系におけるニューロン死の細胞内メカニズムは，その原因も含め未だ明らかでない点が多い。これまで，神経系の形態形成および高次脳機能を保障する上でゲノムの安定化が極めて重要な意味を持つことが指摘されていたが，DNA修復遺伝子群がニューロンの生存と死の調節に直接関わっていることを示す実験結果は得られていなかった。本研究ではがん抑制遺伝子p53およびA群色素性乾皮症遺伝子XPAのノックアウトマウスの中枢ニューロンをin vitroで初代培養し，様々な刺激によって誘導されるポストマイトーティックな中枢ニューロン死への関与を検討する。

その結果，DNA鎖切断によって誘導される中枢ニューロンアポトーシスに関与する。XPA欠損により，ニューロンのUVによるアポトーシスが促進された。γ線によるものについては関与していなかった。XPA欠損に対する脳特異的なredundancyは無かった。また，このXPA欠損によるアポトーシスは神経活動低下（脱分極刺激除去）に伴うアポトーシスには関与していない。また，NGFやBDNF等の神経栄養因子では抑えられない。

以上の結果から，p53およびXPAがDNA障害によって誘導される非分裂性の小脳ニューロンのアポトーシス誘導経路に関与していることが明らかとなった。一方，これらは脱分極刺激除去によるアポトーシスとは異なる経路を持つことから，その細胞内機構についても興味が持たれる。それぞれの遺伝子がin vivoのどの様な状況において発現・機能するかを明らかにすることが今後重要であろう。

本研究は，中枢ニューロンの機能ならびに生存維持に極めて重要な，ゲノム安定化機構の解析にとっての貴重な実験系を提供するものである。今後，神経系の発達および老化過程においても

DNA修復系がどの様な役目を演じているか，組織切片培養等と組み合わせたin vitroの実験系を中心に解析を行っていく予定である。

（10）遊離されたグルタミン酸の画像処理による測定法

工藤佳久（東京薬科大・生命科学）

興奮性伝達物質グルタミン酸の計測法の確立は可塑性などの生理学的研究および神経障害などの病理学的研究の分野からも求められている。現在最もよく使われているのが，マイクロダイアリシスを用いた研究であり，グルタミン酸の検出には酵素法，酵素電極法，蛍光法等が用いられている。これらは特に虚血性脳障害発症機序の解明の際に利用されているが，検出感度や検出時間等の点で充分な方法とは言えない，さらに位置情報が限られており，脳内での部位特異性を検討することは不可能である。我々は，現在，遊離されたグルタミン酸を二次元的に計測する方法を二種類考慮し応用している。その一つは電位感受性色素で染色した脳スライス標本においてグリア細胞のグルタミン酸トランスポーターを計測し，その大きさを遊離されたグルタミン酸の量の指標にしようとするものである。もう一つはCHO細胞にNMDA受容体を発現させ，この細胞のグルタミン酸による細胞内カルシウム濃度の上昇を指標として遊離されたグルタミン酸量を計測するものである。この細胞にはマウスのNMDAのサブユニット，GluR e(the fifth subfamily or NR2)とGluR z(the sixth subfamily or NR1)を同時発現させたものであるが，安定した株化細胞にするために，GluR eの遺伝子の上流にHSP70の遺伝子をプロモーターとして組み込んであり，必要なときに43Cで2時間処理することによって発現させた。熱処理後約6時間から発現が顕著になり，ほぼ12時間でピークに達する。この細胞にfura-2を負荷し，その上に海馬スライスを載せて倒立蛍光顕微鏡でCHO細胞の画像処理を行うと海馬スライスからのグルタミン酸の遊離を二次元画像として捉えることが出来た。CHO細胞は虚血に抵抗性なので，この方法は虚血時のグルタミン酸遊離の計測に有効であった。

（11）神経幹細胞の分化制御機構の研究とその神経疾患への応用

岡野栄之（大阪大・医）

神経幹細胞は，多分化能と自己再生能力をもつ細胞であり，その神経変性疾患や脳損傷の神経機能再建を目指した治療法開発への応用が大変注目されている。又，神経幹細胞は非対称的な分裂を行い，様々な細胞系譜を形成することが知られている。この非対称性分裂と細胞系譜に携わ

る新しい遺伝子産物を同定するために，モデル系であるショウジョウバエの外感覚器の発生制御機構の研究を行い，同過程に異常を示す変異体であるmusashi を同定した。musashi遺伝子は神経系に強く発現し，種間で極めて保存されたRNA結合蛋白質である。現在，哺乳類のMusashiの機能解析を，ジーンターゲッティングや標的RNAの同定などを通して進めている。同分子は脊椎動物の神経幹細胞のすぐれたマーカーとして現在多くの研究者により用いられており，これを用いて成人脳にも神経幹細胞が存在することを明かにした。この将来的な臨床応用についても議論したい。

(12) 脊髄インターニューロンの新しい解析法

鹿川哲史（生理研，The Salk Institute for Biological Studies）

脊髄はもっとも単純な中枢神経系で，神経細胞の数も限られており，神経回路形成メカニズム解析のモデルとして非常に有用である。ところが，神経解剖学的に調べられた脊髄神経細胞の形態と，生化学，分子生物学からの情報の接点はきわめて少ない。例えば，脊髄の95%の神経細胞は，感覚神経と運動神経を仲介するという意味から介在神経細胞（interneurons）とよばれ，ゴルジ染色等の古典解剖学的手法により少なくとも20種以上が同定されている。しかし，未だに，細胞特異的マーカー分子，神経伝達物質，軸索伸長ガイダンス分子との対応はついていない。

ホメオドメインを持つ転写因子Evx1は，一群の介在神経細胞の発生過程に特異的に発現することが報告された。in situ hybridization解析でEvx1陽性神経細胞の細胞体の位置は示されたが，その細胞の形状や機能についての報告はない。そこで，今回，CreとloxPのシステムを用いたevx1遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作成した。この際，Creによる組み換えが起きると，微小管結合蛋白質であるtauとcMyc抗原の融合蛋白質が発現して，Evx1陽性神経細胞の軸索が標識できるように工夫した。cre遺伝子を発現させるために，Evx1陽性神経細胞の前駆細胞に発現しているdbx遺伝子プロモーター領域にcre遺伝子を連結して，トランスジェニックマウスを作製した。Evx1コンデイショナルノックアウトマウスとdbxCreトランスジェニックマウスを交配し，解析したところ，Evx1陽性細胞は反対側に軸索をのばすコミッシュアーニューロンであり，軸索は床板を通過した後は上行に向きを変え，脊髄中の運動ニューロンもしくは後脳領域に投射しているであろうことが示唆された。

（13）IP3が開閉を制御する視細胞Naチャネル

榊原　学（東海大・開発工学）

無脊椎動物視細胞にある光感受性Naチャネルの開閉は何によって制御されているか不明である。これまでCa，IP3，cGMPなどがその候補として考えられてきたが，前２者はCaの濃度上昇が光応答に比べて著しく遅く，Caをキレートしても応答することから，cGMPは光刺激に対応して充分な濃度変化があるのか疑問視されており，いずれもセカンドメッセンジャとして決め手を欠いていた。今回ウミウシB型視細胞を材料として，これらセカンドメッセンジャ候補を再検討した結果，IP3がCa放出する前に直接Naチャネルをあける可能性を見出したのでこれを報告する。

（14）海馬LTPによる信号伝達特性の変化

小谷　進[1]，高木　博[2]，榊原　学[1]（[1]東海大・開発工学，[2]信州大医学部）

海馬CA3からCA1へ投射するシェーファー側枝と，CA1顆粒細胞樹状突起の間に形成するシナプスにおいて，CA3側から高頻度刺激を与えるとシナプス伝達に長期増強（LTP）を起こすことが知られている。このLTPは“学習”，“記憶”のモデルであると考えられることから，これを分子生物学的，行動学的に証明しようと精力的な検討がなされているが，未だ明確ではない。我々はこの問題を解決する方法の一つとして，多点同時記録法により神経回路レベルでの検討をしている。この多点電極記録法を用いて海馬CA1領域でのLTP誘導前後で神経回路の信号伝達特性の変化を詳細にした。電気刺激に対する応答は8×8（間隔250 μ m）の格子状に配置した電極基板より行った。ラット海馬スライスはCA1錐体細胞の樹状突起に電極が沿うように配置した。テスト刺激及びLTP誘導を起こすテタヌス刺激（100Hz,1s）は，CA3からCA1領域へ投射するシェーファー側枝から与えた。テスト刺激に対する応答を，集合EPSPと集合スパイクとしてCA1錐体細胞の樹状突起，細胞体に位置した合計6箇所から記録した。集合EPSPの傾きと，集合スパイクの振幅はテタヌス刺激投与後に40分以上に渡り増加した。集合スパイクの増加率は記録位置に関係なくほぼ一定であったが，集合EPSPの傾きの増加率は刺激位置の近位より遠位で顕著であった。この結果はLTP誘導により，樹状突起での信号伝達効率に変化が生じることを示唆するものであった。

(15) 視覚順応調節蛋白質S－モジュリンの作用機構

河村　悟（大阪大大院・理学研究科）

視細胞は単に光のON-OFFを検出するだけでなく，その時々の光環境に合わせて順応し，100万倍以上の光強度の範囲で機能できる。視細胞の順応は細胞内カルシウム濃度の変化によって調節されている。S－モジュリンは，カルシウム濃度依存的に視細胞の電位発生機構を調節する因子として見いだされた。視細胞では光受容蛋白質が光によって活性化され，光の停止に伴ってリン酸化され，不活性化する。S－モジュリンはこのリン酸化酵素をカルシウム濃度依存的に阻害する。このことから，S－モジュリンは活性型光受容蛋白質の寿命を調節する事により順応を調節していると考えている。現在，S－モジュリンの機能部位について検討を進めている。

8．哺乳類の中枢神経系における局所回路とその機能特性

1998．10．8－10．9

代表者：三上章允（京都大・霊長研）

世話人：松山清治（生理研）

（1）サル淡蒼球単一細胞の軸索投射様式

佐藤二美，中村泰尚（東京医歯大・医）

（2）小脳皮質の介在ニューロン: シナプス結合と興奮性の調節

根東　覚，川口泰雄（理化研・運動回路網）

（3）正中縫線核ニューロンの電気生理学的特性とその生後発達

西村嘉洋，吉村一実，山本哲朗（三重大・医）

（4）黒質ー脚橋被蓋核投射系と運動制御

高草木薫，幅口竜也，杉本純子，斎藤和也（旭川医大・第二生理）

（5）上丘へのコリン作動性入力によるサッカード運動開始の制御

小林　康，山本　優，相澤　寛，伊佐　正（生理研）

（6）視床下核ニューロンのCaチャネルとその活動への寄与

宋　文杰（大阪大・基礎工）

（7）指向運動制御の神経機構

佐々木成人（(財）東京都神経研・神経生理）

（8）哺乳類大脳皮質神経細胞の由来とその機能的相違を求めて

玉巻伸章（福井医大・第一解剖）

（9）大脳皮質錐体細胞におけるバースト後発射の誘引とそのメカニズム

姜　英男（京都大・医）

(10) 学習課題遂行中に記録された大脳皮質細胞の分類（予備的報告）

三上章允，海野俊平，加藤啓一郎（京都大・霊長研），姜　英男（京都大・医）

参加者名簿

伊佐　正，小林　康，山本　優，相澤　寛（生理研），金子武嗣（京都・医），川口泰雄，根東覚（理化研），松波謙一，K.Huda（岐阜大・反射研），高草木薫（旭川医大），姜　英男（京大・医），陣内皓之祐（滋賀医大），山本哲朗，西村嘉洋（三重大・医），安井幸彦（島根医大），中村泰尚，佐藤二美（東京医歯大・医），玉巻伸章（福井医大），浜田生馬（神経研），川島　卓（岐阜大・医），宋　文杰（大阪大・基礎工），三上章允，田仲祐介，海野俊平，加藤啓一郎（京都大・霊長研），佐々木成人，内藤公郷，吉村和也（(財)東京都神経研・神経生理），山口峻司（山形大・工），村越隆之，兼子幸一（東京医歯大・医），山根ゆか子（北大），森　茂美，松山清治，

森　大志，久世文也，奥村　哲（生理研）

研究会概要

感覚から運動に至る神経系制御の解明を目指すとき，関与する神経回路を構成する個々の神経素子は一様ではない。異なる機能特性を持つ比較的（中枢神経系における膨大な神経細胞するに比べれば）少数の神経細胞の構成する規則的で局所的な神経回路が重要な役割を果たしている。局所的な神経回路は機能単位を構成し，この機能単位相互の情報交換と，さらに，遠方との神経結合による情報交換が中枢神経系における高次の情報処理の基礎となっている。このような過程を解明するためには，分子レベルから個体レベルまでに至る重層的な対象の形態と機能を，組織学，神経化学，生理学など多様な手法を駆使して解明する必要がある。こうした総合的研究は１人の研究者，１つの研究室で取り組むには膨大すぎる。そこで，本研究会では，分子から個体に至る異なった研究レベル，異なった手法による各研究室の取り組みを持ち寄り，哺乳類の中枢神経系における局所回路とその機能特性について討議した。

(1) サル淡蒼球単一細胞の軸索投射様式

佐藤二美，中村泰尚（東京医歯大・医）

サルの淡蒼球外節に，biocytin, biotinylated dextran amine を電気泳動法により微量注入し，単一細胞レベルで形態解析を行った。標識細胞は主として紡錘形を呈し，樹状突起は２－５本で，吻尾側方向に長く伸びて円盤状の樹状突起域を呈するものと，ほぼすべての方向に向かって広がり，球状を呈するものがあった。軸索投射は，その投射部位により，１）淡蒼球内節，視床下核，黒質網様部に投射するもの，２）淡蒼球内節，視床下核に投射するもの，３）視床下核，黒質網様部に投射するもの，４）線条体に投射するものの４タイプに分類できた。病態生理学的に，淡蒼球外節はindirect pathwayの中継核として注目されているが，以上の結果から，淡蒼球外節が基底核を構成するほとんどすべての神経核に，同一の情報を伝えていることが明らかになり，これまで考えられていたよりも複雑で重要な役割を果たすことが示唆された。

(2) 小脳皮質の介在ニューロン：シナプス結合と興奮性の調節

根東　覚，川口泰雄（理化研・運動回路網）

小脳皮質の神経細胞は，グルタミン酸を伝達物質とする興奮性の細胞である顆粒細胞と，

GABAを伝達物質とする抑制性の細胞から主として構成されている。抑制性の細胞には，小脳皮質からの唯一の出力細胞であるプルキニエ細胞と局所的に細胞間の連絡を介している介在神経細胞とがある。介在神経細胞の局所神経回路内での役割に関しては分かっていないことが多いが，介在神経細胞によるシナプス伝達の時間的，空間的変化が局所神経回路の活動の制御に重要な役割を担っていることが示唆されている。今回，小脳皮質の介在神経細胞のうち星状細胞間の抑制性シナプス伝達に関してノルアドレナリンによる変化を調べた。ミニアチュアIPSC（mIPSC）は，その大きさが変化することなく伝達頻度が上昇し，さらにこれはシナプス終末におけるノルアドレナリンによるAキナーゼの活性化と関係していることが分かった。また，シナプス結合を持った二つの星状細胞からの同時記録により活動電位に依存したシナプス伝達（eIPSC）もその頻度が上昇することが分かったが，これはノルアドレナリンによるシナプス前細胞の興奮性の上昇と関係していた。これらのことからこのシナプスではmIPSC，eIPSCともにノルアドレナリンにより正の制御を受けるが，その機構は各々異なり分離していることを示唆している。

(3) 正中縫線核ニューロンの電気生理学的特性とその生後発達

西村嘉洋，吉村一実，山本哲朗（三重大・医）

生後0－28日のラットスライス標本を用いて，正中縫線核細胞（MRN）の電気的特性の生後変化を細胞内電位記録・whole-cell パッチクランプ法で解析した。4-aminopyridine（4AP, 500 μ M）とTetraethyl ammonium（TEA, 20 mM）は活動電位持続時間延長効果が異なりTEAは脱分極（-50m V）でのみ持続時間を延長した。Caチャネル阻害，apamin(60 nM)は後過分極電位（AHP）を低下し放電頻度を上昇させた。4-AP感受性K電流は-50 mVで完全に不活化し，TEA感受性成分は0mVでも完全には不活化しなかった。apamin 感受性K電流は不活化せず持続性であった。活動電位持続時間短縮・入力抵抗低下・細胞体増大の生後変化は約20日で完了した。過分極電位応答のsag及びAHPの出現率は20日で成熟レベルまで上昇した。放電様式は生後10日から持続放電が優位となった。

MRNでは電位依存性並びにCa依存性Kチャネルの20日までの発達により正確で迅速な情報処理が可能になると考えられる。

(4) 黒質ー脚橋被蓋核投射系と運動の制御

高草木薫，幅口竜也，杉本純子，斎藤和也（旭川医大・第二生理）

基底核疾患では運動量と筋緊張の異常が認められる。この事実は基底核が運動量と筋緊張レベルをパラレルに制御することを示している。基底核はその出力核（黒質網状部や淡蒼球内節）からの GABA 作動性出力を介して視床大脳投射系の活動を修飾し運動量を制御すると考えられている。しかし，基底核はどの様に筋緊張を制御するのか？その実験的証拠や理論的裏付けは得られていない。そこで我々は「基底核出力は脳幹・脊髄に存在する筋緊張制御システムの活動を修飾し筋緊張を調節する」という作業仮説を立てた。そして，除脳ネコ標本を実験に用いてその正否を検討した。その結果，黒質網状部からの GABA 作動性出力は脚橋被蓋核のコリン作動性細胞の活動を制御し，この細胞から始まる網様体脊髄路系の活動を調節し筋緊張レベルを制御する可能性を見い出した。

(5) 上丘へのコリン作動性入力によるサッカード運動開始の制御

小林　康，山本　優，相澤　寛，伊佐　正（生理研）

上丘中間層に対するコリン作動性入力がサッカードの開始時間に及ぼす影響について調べるため，上丘にアセチルコリン作動性入力を送っている脚橋被蓋核ニューロンの電気活動を視覚誘導性サッカードを行っている覚醒サルより記録した。サルには注視点が消えると同時にターゲットが現れるサッカード課題と注視点が消えてからターゲットが現れるまで170msのギャップがある課題を行わせた。ギャップ課題ではサッカードの反応時間の短縮が見られ，さらに，脚橋被蓋核において，1）ギャップ期間中に活動を徐々に増加させ，サッカード遂行直前から遂行中にかけてバースト状に発火するニューロン群と，2）指標を凝視しているときに一定の発火頻度で持続的に発火し，ギャップ期間中からからサッカード遂行中にかけて発火頻度を急激に減少させるニューロン群が見出された。さらに，サッカード課題遂行中にターゲットが現れる可能性があるスクリーン上の場所を限定するとサッカードの反応時間が短縮されることが観察された。この反応時間の短縮に伴って，ギャップ期間での活動を増加させるニューロン群が見出された。これらの結果は，脚橋被蓋核ニューロンのギャップ期間中の活動がサッカードの反応時間に関与していることを示唆している。

(6) 視床下核ニューロンのCaチャネルとその活動への寄与

宋　文杰（大阪大・基礎工）

視床下核（STN）は大脳基底核の出力核に投射し，その活動を直接制御していることから，STN細胞の活動を理解することは大脳基底核の運動制御においての働きを解明することに重要である。本研究では，STN細胞の活動に対し，膜の性質，特にCa^{2+}コンダクタンスの影響を調べた。

現在，Ca^{2+}チャネルは高閾値型と低閾値型に分けられるが，高閾値型はさらに，N, L,P, Q, とRタイプに分けられる。STNを酵素処理によって急性に分離し，ホールセルクランプ法で記録し，STN細胞はどのようなサブタイプのCa^{2+}チャネルを発現しているかを調べた。その結果，STN細胞体には高閾値型の発現が見られたが，低閾値型が認められなかった。一方，スライス標本を用いてSTN細胞に低閾値型が見られたので，STN細胞の樹状突起に低閾値型が局在することが示唆された。

これらのCa^{2+}チャネルがSTN細胞の発火活動にどのような影響を及ぼすかを調べた結果，低閾値型チャネルとL−タイプチャネルが電位依存的にSTN細胞にプラトー電位を発生させることを見い出した。

本研究の結果から，STN細胞は単なる中継作用をするのでなく，その膜の性質によって入出力関係を電位依存的に変化させることが示唆された。

(7) 指向運動制御の神経機構

佐々木成人，吉村和也（(財) 東京都神経研・神経生理）

ネコを前方のパネル上に投射した光点を注視させる。この光点をステップまたはランプ状に移動させ，追跡させる（指向運動）。この時の眼球と頭の運動の制御様式の相違をを調べ，以下の点を明らかにした。1）頭の運動制御は頭の最大速度が刺激速度に依存して変化するdynamic pathwayと速度には依存せず対象物の位置に依存するstatic pathway の2経路で行われるが，眼球運動はstatic pathwayで主に行われる。2）dynamic pathwayの方がstatic pathwayより感受性が高く，且つ潜時が約20msが短い。 3）頭と眼球運動の振幅を比較すると，ターゲット光の位置によらず，眼球は頭の約半分の振幅でしか動かない。4）この関係は頭を固定しても同じことから，上丘はgazeではなく，頭の振幅をコードしていることを示唆する。

(8) 哺乳類大脳皮質神経細胞の由来とその機能的相違を求めて

玉巻伸章（福井医大・第一解剖）

これまで哺乳類の全ての大脳皮質神経細胞細胞は，大脳皮質上衣層に由来すると考えられてきたが，私はこれまでにその一部が大脳基底核原器（ganglionic eminence）に由来することを示した。大脳皮質構成神経細胞の由来が異なれば，機能も異なり，違った役割を担っていると考えられる。大脳基底核原器由来の細胞が大脳皮質のどのような細胞になるかを研究することは，大脳皮質の機能を理解するために欠くことができない。大脳基底核原器に由来する細胞には，大脳皮質板に入らず，神経回路形成に働いた後，中間層で生後死滅する細胞群もある。皮質板に入る細胞は，多くの抑制性神経細胞になると考えられるが，一部の錐体細胞になる可能性もある。

(9) 大脳皮質錐体細胞におけるバースト後発射の誘引とそのメカニズム

姜　英男（京都大・医）

錐体細胞のスパイク後電位は，パッチ電極内液が CsCl の場合，持続の長い脱分極型 (DAP) になり，この DAPの増強によりバースト後発射が生じる。DAPの速成分及び遅成分は，それぞれ，Ca^{2+} 流入及びCICRによる細胞内Ca^{2+}上昇により活性化されるCa^{2+} 依存性カチオン電流により担われていた。カフェイン投与により，カチオン電流の時間経過は非常に緩徐なものになるが，この効果はルテニウムレッドの細胞内注入或いはCaM-KII 阻害剤の細胞外投与により抑圧された。さらに，Ca^{2+}測光を行い，細胞内Ca^{2+}上昇に伴うカチオン電流の活性化を，CaM-KII 阻害剤存在下及び非存在下で比較した。その結果，CaM-KII 阻害剤は，Ca^{2+}上昇を阻害せずカチオン電流の緩徐化を阻害した。これらの実験結果より，カフェインによる CICRの増強がCaM-KIIの活性化を誘引し，さらに，CaM-KIIがカチオン電流の時間経過を緩徐なものにしたと考えられた。

(10) 学習課題遂行中に記録された大脳皮質細胞の分類（予備的報告）

三上章允，海野俊平，加藤啓一郎（京都大・霊長研）
姜　英男（京都大・医）

学習課題遂行中に前頭葉から細胞外記録したニューロン活動が示すバースト発射の特徴から，

皮質内局所回路におけるニューロン・タイプの分類を試みた。その結果，バースト内の個々のスパイクの振幅，スパイク間隔，スパイク数の計測値，および，スパイク間隔の安定性，比較的短い時間間隔でのバーストの繰り返しの有無などの特徴により，FS（Fast Spiking），FRB（Fast Rhythmic Bursting），および，IB（Intrinsically Bursting）の各ニューロン・タイプを同定することができた。FSニューロンの一部は，課題内のイベントと時間的に相関してバースト発射を示した。このようなバースト発射は皮質内情報処理において課題遂行に大きなインパクトを持つと推定される。一方，FRBニューロンは，その活動パターンの特徴から，皮質内で同期的発射のトリガーとなるチャタリング・セルの候補と考えられるが，今回解析対象としたニューロンの中には学習課題の条件と対応して同期発射を示す細胞はなかった。この点についてはデータ数を増やしてさらに検討する。

9．糖・脂質代謝の組織間クロストークによる制御

1998．10．29－10．30

代表者：松澤佑次（大阪大・医・分子制御内科）

世話人：矢田俊彦（生理研）

（1）レプチンの臨床的意義

小川佳宏，中尾一和（京都大・大学院医学研・臨床病態医科学）

（2）オレキシンの生理活性の解析

桜井　武（筑波大・基礎医学系・薬理）

（3）Neuropeptide Y の摂食促進作用とその受容体

乾　明夫，春日雅人（神戸大・医・第二内科）

（4）弓状核神経細胞のグルコース感受性機構とNeuropeptide Y

室屋真二（鹿児島大・医・第一生理，神経精神科）

矢田俊彦（生理研）

塩田清二（昭和大・医・第一解剖）

滝川守国（鹿児島大・医・神経精神科）

（5）レプチン受容体の脳内における分布局在と機能：特に視床下部ニューロンについて

舟橋久幸，塩田清二，中井康光（昭和大・医・第一解剖）

室屋真二，滝川守國（鹿児島大・医・精神科）

矢田俊彦（生理研）

（6）エネルギー調節機構に於ける内在性摂食調節物質レプチンとオレキシンの役割

白石武昌（東海大・医・生体構造機能系・生理科学1）

（7）レプチンの学習記憶促進作用

大村　裕（日本臓器製薬（株）・生物活性科学研）

白石武昌（東海大・医・生理）

堀　信顕（九州大・歯・薬理）

佐々木和夫（富山大・工・生物情報）

（8）アルツハイマー病と血中レプチンの変動

三浦久幸，井口昭久（名古屋大・医・老年科学）

（9）レプチンの膵内分泌細胞機能への影響

島　健二（徳島大・医・臨床検査医学）

(10) レプチンと膵β細胞機能

奥屋　茂，岡　芳知（山口大・医・第三内科）

(11) 門脈血中ソマトスタチンと自律神経との連関

中林　肇（金沢大・大学院自然科学研究科・生命科学・動態生理学）
中林逸子（金沢大・医・第一生理）
西澤　誠（金沢医科大・内分泌内科）
中川　淳（金沢大・医・第二内科）
新島　旭（新潟大・医・生理）

(12) 栄養素欠乏による食欲抑制と脳機能

鳥居邦夫（味の素（株）中央研・基礎研）

(13) 視床下部ヒスタミン神経系による糖・脂質代謝の中枢ー末梢間クロストーク

坂田利家（大分医大・医・第一内科）

(14) 末梢組織でのグルコース代謝に及ぼすレプチンの中枢性調節作用

箕越靖彦，Haque, Mohammad Shahidul，嶋津　孝（愛媛大・医・医化学第一）

(15) 脂肪細胞発現遺伝子と生体における意義

松澤佑次（大阪大・医・分子制御内科学（第二内科））

(16) Adipocytokine と生体防御システム

高木厚司，栗生修司（九州大・医・第一生理）

(17) 脂肪細胞とインスリン抵抗性

門脇　孝，戸部一之，山内敏正（東京大・医・糖尿病・代謝内科（第三内科））

(18) 脂質代謝制御因子としてのPPAR

河田照雄（京都大・大学院農学研・応用生命科学・ 食品生命科学・栄養化学）

(19) beta3-アドレナージック受容体の機能と褐色脂肪

木村和弘，斉藤昌之（北海道大・大学院獣医学研究科・比較形態機能学）
河田照雄（京都大・大学院農学研・応用生命科学専攻 食品生命科学・栄養化学）
吉田俊秀（京都府立医大・第一内科）

(20) 褐色脂肪細胞における容量性カルシウム流入とその調節

尾松万里子，真田　充（滋賀医大・医・第二生理）

参加者名

松澤佑次（大阪大・医），桜井　武（筑波大・基礎医学系），乾　明夫（神戸大・医），室屋真二，浦村一秀（鹿児島大・医），中尾一和（京都大・医学研究科），塩田清二，舟橋久幸（昭和大・医），白石武昌（東海大・医），大村　裕（日本臓器製薬(株)・生物活性科学研），井口昭久，三浦久幸，梅垣宏行，服部文子，上田　宗，玉谷典華（名古屋大・医），島　健二（徳島大・医），奥屋　茂（山口大・医），中林　肇（金沢大・自然科学研究科），喜多尾浩代（金沢大・教育），鳥居邦夫（味の素㈱・中央研），坂田利家（大分医大・医），箕越靖彦，嶋津　孝（愛媛大・医），高木厚司（九州大・医），門脇　孝（東京大・医），河田照雄（京都大・農学研究科），小川佳宏（京都大・

医学研究科），木村和弘（北海道大・獣医学研究科），尾松万里子，真田　充（滋賀医大・医），矢田俊彦，毛利達磨，佐藤真則，嶽本和久（生理研）

研究会概要

糖・脂質代謝の過程は，食欲に基づく摂食，栄養吸収，膵インスリン分泌，脂肪細胞レプチン分泌，グルコース・脂肪の輸送／合成／分解，グルコース・レプチンなどの摂食／代謝中枢神経への作用，自律神経を介した遠心性・求心性情報伝達などの各種過程により巧みに調節されている。この際，各種臓器は固有の液性・神経性情報を発すると共に相互に密接にクロストークしながら機能し，その結果生体として合目的的な糖・脂肪代謝が営まれている。本研究会では，これに関係する諸分野において優れた研究を行っている研究者が一堂に会し，最新の研究成果を発表し，活発な討論を行い，学問的・人的交流を深めた。特に，新しい脂肪細胞分泌ホルモンや摂食調節物質を学び，また Molecullar & Cellular Biology から Integrated Physiology への視点の重要性を再認識した。

(1) レプチンの臨床的意義

小川佳宏，中尾一和　（京都大・医学研究科・臨床病態医科学・第二内科）

レプチンは，脂肪組織より分泌され，視床下部に存在するレプチン受容体を介して，体重増加や肥満の制御に関与すると考えられている。最近，ヒト肥満においてもレプチンあるいはレプチン受容体遺伝子変異が同定され，レプチン/レプチン受容体系が肥満の原因遺伝子になることが明らかになった。通常の肥満者では，血中レプチン濃度は上昇しており，レプチン欠損が肥満の原因となるのは稀であり，“レプチン抵抗性”が肥満の発症・進展に関与すると考えられている。

発見当初より，レプチンの肥満及び関連疾患の治療薬としての可能性が注目されている。血中濃度が著しく上昇するレプチン過剰発現トランスジェニックマウスを作製したところ，全身の脂肪組織を欠損する程の痩せとともに，糖代謝亢進とエネルギー代謝亢進が認められた。以上より，レプチンの持続的なエネルギー代謝調節作用が証明され，肥満や糖尿病の治療薬としてのレプチンの有用性が示唆される。

(2) オレキシンの生理活性の解析

桜井　武（筑波大・基礎医学系）

われわれは，ヒトのESTとして見いだされたあるorphan receptorに対するリガンドとして生理活性ペプチド2種を同定し，オレキシン（orexin）AおよびBと名づけた。cDNAクローニングの結果これらは，同一の前駆体から切り出されることがわかった。これらは，既存のどのペプチドとも類似性を持たなかった。

さらに哺乳類には二種のオレキシンに対する親和性序列の異なる2種のオレキシン受容体が存在することが明らかになった。組織化学的手法により，オレキシンは摂食中枢として知られる視床下部外側野に存在する特定のニューロンにきわめて特異的に発現していることが明らかになった。合成したオレキシンAおよびBをラットの側脳室に投与すると，4時間で摂食量が6倍程度に増加した。また，ラットを絶食させると，視床下部におけるprepro-orexinのmRNAレベルが2.5倍に増加した。以上の事からオレキシンは視床下部外側野において，摂食行動を制御する内因性因子であると考えられる。抗オレキシン抗体による免疫染色により，オレキシン含有神経を染色すると神経末端は，視床下部の中だけでなく，大脳皮質，視床，辺縁系，脳幹など，広範な領域に投射していた。また，これらの領域にはオレキシン受容体mRNAの発現がみとめられた。これらの結果から，オレキシンは視床下部内で統合された摂食行動に関する情報を最終的に脳の様々な領域へ伝える働きをしていると考えられる。

(3) Neuropeptide Yの摂食促進作用とその受容体

乾　明夫，春日雅人（神戸大・医・第二内科）

Neuropeptide Y（NPY）は強力な摂食促進物質であり，脳内反復投与により肥満動物を作製することが可能である。しかし，近年，NPYノックアウトマウスは摂食行動に大きな異常を示さないと報告され，その生理的及び病態生理的意義に関しては，なお不明な点が多い。我々が作製したNPYトランスジェニックマウスもヘテロでは明らかな食行動異常を示さなかったが，ホモマウスはショ糖負荷により，特に雄マウスで体重の増加が認められた。

NPYの食欲をつかさどる受容体は，Y_1及びY_5受容体と考えられている。NPYのY_1及びY_5アゴニストは，摂食促進作用を発現し，Y_1及びY_5ノックアウトマウスも摂食行動に一部異常が認められる。我々は，最近滋賀医大藤宮助教授及び宇部興産井藤先生との共同研究によりラットの胃・十二指腸運動を測定し，NPYが食後期の運動パターンを空腹期のパターンに変更し，この作用はY_2受容体を介することを証明した。NPYはY_1及びY_5受容体を介し摂食行動を促進するのみ

ならず，胃腸運動や消化酵素分泌の脳相にY_2をはじめとする複数の受容体を介し作用するものと考えられる。

(4) 弓状核神経細胞のグルコース感受性機構とNeuropeptide Y

室屋真二，浦村一秀（鹿児島大・医・第一生理，神経精神科）
塩田清二（昭和大・医・第一解剖）
滝川守国（鹿児島大・医・神経精神科）
矢田俊彦（生理研）

視床下部弓状核のNeuropeptide Y（NPY）ニューロンは摂食亢進に関与しており，一方食欲中枢によるグルコース濃度低下の関知にはグルコース感受性ニューロンが重要な役割をしていると考えられている。そこで本研究では，(1) 弓状核にグルコース感受性ニューロンが存在するか，(2) そのグルコース感受機構は，(3) Neuropeptide Y（NPY）ニューロンとの関係は，の解明を目的とした。単離弓状核ニューロンの20%は細胞外グルコース濃度低下により細胞内Ca^{2+}の上昇を示すグルコース感受性ニューロンであった。このグルコース感受性ニューロンのほとんど（90%以上）はNPYを含有していた。 このグルコース感受性NPYニューロンにおいて，グルコース濃度を低下させるとNADHレベルが低下し，Na^+-K^+ポンプの活性を阻害するとグルコース濃度を低下させた時と同様に細胞内Ca^{2+}の上昇反応がみられた。細胞内Ca^{2+}上昇はL, N, T, P/Qタイプの電位依存性Ca^{2+}チャネル阻害剤によって部分的に抑制された。以上の結果より，弓状核グルコース感受性ニューロンはNPYニューロンであること，《グルコース濃度低下→NADH減少→ATP減少→Na^+-K^+ポンプの機能低下→膜電位上昇→電位依存性Ca^{2+}チャネル活性化→細胞内Ca^{2+}濃度上昇》という細胞活性化機構が存在することが明らとなった。

(5) レプチン受容体の脳内における分布局在と機能 ：特に視床下部ニューロンについて

舟橋久幸，塩田清二，中井康光（昭和大・医・第一解剖）
室屋真二，滝川守國（鹿児島大・医・精神科）
矢田 俊彦　（生理研）

レプチンは脂肪細胞でつくられ脳に作用し，食物摂取と代謝を制御することにより体重の調節に関わる重要なペプチドホルモンであることが最近の研究で明らかになってきた。レプチンの作

用部位は視床下部の満腹中枢や摂食中枢にあると考えられているが，その受容体の脳内の分布・局在については不明の点が多く，またレプチンによる細胞内の代謝調節機構についての詳細な研究報告は殆どなされていない。そこで，本研究ではラット脳内のレプチン受容体の分布・局在および超微局在を光顕および電顕を用いて免疫組織細胞化学的に観察し，さらに視床下部の特定部位のニューロンを単離して細胞内カルシウム濃度を測定し，レプチンの作用を調べた。弓状核には摂食量を増加させ，エネルギー消費を減少させ，さらに高インスリン血症と高コルチコステロン血症を招くことが知られているニューロペプチドY (NPY)含有ニューロンが存在することから，レプチン受容体がNPYニューロンに発現しているか否かを二重免疫組織化学法で調べた。

レプチン受容体免疫陽性神経細胞体は，視床下部の弓状核，腹内側核，室傍核，外側視床下部のほか，新皮質，海馬，扁桃，小脳，延髄の各部位と脈絡叢に広く分布しているのが明らかになった。レプチン受容体が海馬・大脳皮質などの高次中枢にも分布していることから，レプチンは摂食調節以外に学習・記憶などの調節にも関与している可能性が示唆される。免疫電顕的にレプチン受容体陽性細胞を観察した結果，免疫陽性反応を示すDABの発色反応は細胞膜の他に粗面小胞体やゴルジ装置にも検出された。このレセプター蛋白は，粗面小胞体で産生されゴルジ装置を経て細胞膜に輸送されるものと考えられる。二重免疫染色法により，弓状核のNPY含有ニューロンはレプチン受容体を発現しており，さらにドーパミン産生細胞にもレプチン受容体の発現がみられた。

弓状核，腹内側核，外側視床下部のニューロンを単離し，fura-2を用いた蛍光画像解析により細胞内Ca^{2+}濃度を測定し，一部の細胞は抗NPY抗体を用いて細胞同定を行った。弓状核のNPY含有ニューロンおよび外側視床下部のニューロンは，細胞外液のグルコース濃度を低下させると細胞内Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]_i$)が上昇し，グルコース濃度を上昇させると$[Ca^{2+}]_i$が低下した。グルコース濃度低下による$[Ca^{2+}]_i$の上昇反応は，レプチン0.1-1nMにより抑制された。一方，腹内側核のニューロンは，細胞外液のグルコース濃度を上昇させると$[Ca^{2+}]_i$が上昇し，グルコース濃度を低下させると$[Ca^{2+}]_i$が低下した。グルコース濃度低下による$[Ca^{2+}]_i$の低下反応はレプチン0.1-1nMにより抑制された。以上の実験・観察結果から，レプチン受容体は脳内に広く分布し，レプチンは弓状核のNPYニューロンおよび外側視床下部の低濃度グルコース刺激に対するCa^{2+}応答を抑制し，一方腹内側核ニューロンの高濃度グルコース刺激に対するCa^{2+}応答を促進することにより摂食抑制調節に直接関与していることが明かとなった。

(6) エネルギー調節機構に於ける内在性摂食調節物質レプチンとオレキシンの役割

白石武昌（東海大・医・生体構造機能系生理科学1）
佐々木和男（富山大・工・生体情報工学科）
新島　旭（新潟大・医・生理）
大村　裕（日本臓器製薬株式会社生物活性研）

肥満遺伝子の産物であるレプチンのラットの摂食行動に対する作用を，最近報告された内在性摂食促進物質オレキシンと共に 検討した。

行動実験は個々（n=8）の各濃度（2種類×2用量+生食）および全例（n=8×10）での解析の結果，摂食量（および体重）はレプチン，オレキシン共に用量依存性にそれぞれ生食投与（群）に比して，抑制・促進された。就中，オレキシンの摂食促進効果は低濃度（300 μmol/0.1ml）投与では投与時期での差は大きくなかった（$p=0.083$）が，高濃度（3 μmol/0.1ml）では空腹時よりも満腹時投与の方が明らかであった（$p<0.05$）。オレキシンは多くのブドウ糖感受性LHAニューロン活動を促進させたが，しかしレプチンによって一旦抑制された活動はオレキシンによっては回復しなかった。内在性摂食調節物質としてのレプチンとオレキンの重要な役割について考察した。

(7) レプチンの学習記憶促進作用

大村　裕（日本臓器製薬・生物活性科学研）
白石武昌（東海大・医・生理）
堀　信顕（九州大・歯・薬理）
佐々木和夫（富山大・工・生物情報）
武田　宏（東京医大・薬理）

ラットの摂食により脳内に分泌された10^{-6}M aFGFは満腹物質であるとともに海馬に作用して学習記憶を促進させる。同じく摂食により脂肪細胞から分泌されるレプチンも満腹物質である。学習記憶を促進させるかどうかの検討を行った。

【方法】AM10時にラットにレプチン0.5, 5, 50 μg/Kgをそれぞれ静注し，受動回避学習テストを30分後に，24時間後にその保持テストを行う。水迷路学習テストも同様に行う。長期増強および抑圧（LTP, LTD）テストには海馬脳切片標本を用い，シャファー側枝を電気的に刺激してCA1のシナプス電位を記録した。

受動回避および水迷路学習では初日は無効であったが2日目は有意に促進した。その濃度は5 μg～50 μgでラット血漿を10 mlとすると3×10^{-8}および3×10^{-7}Mである。脳に1/1000 が入るとすると

$3x10^{-11}-10^{-10}$ である。LTPは $10^{-14}-10^{-12}$ Mレプチンで量一反応的に促進され 10^{-10} Mで抑制された。LTDは $10^{-14}-10^{-12}$ Mで量一反応的に減弱されたが，10^{-10}Mではなかった。Paired pulse facilitation（50 msの間隔で2発（a, b）刺激し，シナプス電位（as, bs）の比（bs/as））の増大は伝達物質放出減少を，その低下は放出増加である。$10^{-14}-10^{-12}$ Mレプチンでは減少で，10^{-10} Mでは増加であった。従って，LTP促進は後シナプス膜の感度上昇を考えなければならない。CA1細胞の樹状突起へのNMDA，GABAおよびAMPA投与で発生するシナプス電位は$10^{-14}-10^{-12}$ Mレプチンで変化無く，10^{-10} Mでわずかに低下した。

レプチンの生理学的濃度($10^{-14}-10^{-12}$ M)は学習記憶を促進する。記憶の電気生理学的基盤であるLTPとLTDもこれを支持する。しかし低濃度での伝達物質放出の低下と，後シナプス膜での無変化はLTPの促進効果を説明できない。これからの課題である。

(8) アルツハイマー病と血中レプチンの変動

三浦久幸，井口昭久（名古屋大・医・老年科）

【目的】われわれは，これまでラットを用いた実験で，中枢のコリン作動性神経が脂肪細胞の肥満遺伝子の発現を制御する可能性のあることを報告してきた。今回，アルツハイマー病（AD）患者において早朝空腹時血清レプチン値とBMI，MMSE及び血中ホルモンとの相関について検討した。さらに，AD患者における血清レプチン値の日内変動について検討した。

【対象・方法】福祉村病院入院中のAD患者計40名を対象として早朝空腹時血清レプチン値を測定し，BMI，MMSE，血中ホルモン値との相関を検討した。さらに，女性AD患者3名を対象として1日8回採血を行い，血清レプチン値の日内変動を観察した。

【結果】AD患者において血清レプチン値とＢＭＩは男女とも有意な相関を示さなかった。MMSEが低いAD患者は男女とも低レプチン血症を示した。AD患者では血清レプチン値の日内変動は非AD患者と異なるパターンを示した。

【考察】AD患者では脳内コリン作動性神経の機能不全により脂肪細胞におけるレプチンの発現制御機構が障害されている可能性がある。

(9) レプチンの膵内分泌細胞機能への影響

島　健二（徳島大・医・臨床検査医学）

レプチンの膵β細胞機能への影響について種々検討されているが，その成績は必ずしも一致し

ていない。我々はラット遊離ラ氏島を用い，80nMレプチンが，基礎状態（5.5mMブドウ糖）でのインスリン分泌を有意に抑制するが，ブドウ糖（11.1mM）刺激状態では抑制しないことを明らかにした。今回は，さらにレプチンの自律神経系を介しての間接的な膵α，β細胞機能に及ぼす効果について検討した。迷走神経切除ラットにおいて，レプチン（20nM）投与は静脈内ブドウ糖負荷に対する，血中インスリン反応を有意に抑制した。しかし，迷切に6-hydroxydopamineで交感神経活性を抑えておくと，レプチンのブドウ糖によるインスリン分泌抑制効果は消失した。一方，インスリン低血糖に対する血中グルカゴン反応をレプチンは増大させたが，6-hydroxydopamine前処理で，前述のレプチン効果は消失した。レプチンは自律神経系を介して，膵内分泌細胞機能に影響していることが示唆された。

（10）レプチンと膵β細胞機能

奥屋　茂，田部勝也，谷澤幸生，岡　芳知（山口大・医・第三内科）

【目的】我々はレプチンが膵β細胞へ直接作用を及ぼすことを想定し，シグナルを伝えるとされる受容体（Ob-Rb）が膵β細胞に存在することや，肥満者血中レベルのレプチンがインスリン基礎分泌を促進するとともに，STAT・MAPKを活性化することを明らかにしてきた。そこで，レプチンが肥満の際に認められる膵ラ氏島過形成（膵β細胞増殖）に関与する可能性があるか否かを検討した。

【方法】MIN6細胞を0-10 nMレプチンと24時間培養し，DNA合成・生細胞数の指標としてそれぞれ[^{3}H]-thymidine uptake・MTT assayを行った。一方，ラット単離膵ラ氏島を5 nMレプチンと24時間培養後，MTT assay・trypan blue exclusion testを行った。

【成績】1-10 nMレプチンは，5 nMをピークとして用量依存性にMIN6細胞のDNA合成・生細胞数を増加させた。この促進効果は，MAPKK特異的阻害剤のPD98059により有意に阻害された。さらに5 nMレプチンは，単離膵ラ氏島の生細胞数も増加させた。

【結論】肥満者血中レベルのレプチンは，MAPKを介してMIN6細胞の増殖を促進し，また単離膵ラ氏島の生細胞数を増加させることが示され，肥満に伴う膵ラ氏島過形成にレプチンが関わっている可能性が示唆された。

(11) 門脈血中ソマトスタチンと自律神経との連関

中林　肇（金沢大・大学院自然科学研究科・生命科学・動態生理学）
中林逸子（金沢大・医・第一生理）
西澤　誠（金沢医科大・内分泌内科）
中川　淳（金沢大・医・第二内科）
新島　旭（新潟大・医・生理）

栄養素の経口摂取時には，消化管からの栄養素吸収に伴って種々の消化管・膵ホルモン（液性因子）が門脈血中に放出される。その中のsomatostatin (S)についてはprosomatostatinを前駆体として， somatostatin-14 (S-14) が主に膵，胃，消化管神経叢より，somatostatin-28（S-28）が主に小腸，大腸，（一部胃）より放出されることが知られている。我々は既に，このS-14 が門脈血中に出現すると迷走神経肝臓枝の求心性電気活動は有意に増加することと，その際肝内門脈の内皮直下に存在する神経小体（Krause小体様でS受容体を発現する神経終末を含む）が関与する事実を見出した。そこで今回は，迷走神経肝臓枝がはたして門脈血中S-28 にも応答するか否かを検討した。その結果，ラットを用い麻酔下に，(1) 門脈内に生理学的量のS-14（0.2 ng）を注入すると迷走神経肝臓枝の求心性電気活動は有意に増加し，さらに薬理学的量注入により用量依存性を示す。(2) 同様に生理学的量のS-28（0.4 ng）を注入すると同神経枝の求心性電気活動は全く変化せず，しかも薬理学的量注入によってもわずかな増加を示すにすぎない，などの成績を得た。以上の一連の成績は，同一prohormone由来でありながら臓器特異的に生ずる門脈内液性情報（S-14 とS-28）が，一方はその構造特異的受容体を介し肝門脈領域で神経性情報に変換され中枢神経に到達する（S-14），他方は循環ホルモン（液性情報）として標的器官に到達する（S-28）という，ユニークな内分泌・神経連関を成立させることを示唆する。

(12) 栄養素欠乏による食欲抑制と脳機能

鳥居邦夫（味の素㈱・中央研・基盤研）

食事で摂取する食物を視覚，嗅覚および味覚より判断し，好ましければ食が進む，好ましくなければ摂取しないか摂取しても中断する。個々の食物の特有な形や色，匂い，味そして含まれる栄養素の組成をすでに情報として脳に記憶し，毎日の食事によりこの記憶は強化される。又，「食べる」という行為は，単に空腹感を満足させる喜びにとどまらず，健康な生活を営むうえで栄養バランスをとりつつ生体恒常性も維持する必要である。各栄養素に対する生理的要求を正確

に満足させるには，何をどれだけ選択して食べるかという点が重要で，脳による高度な食行動の調節が必要である。蛋白質や必須アミノ酸欠乏に伴う食欲抑制は良く知られた現象である。そこで脳による栄養バランスと生体恒常性の維持の仕組みを解明すべく，リジン欠乏ラットをモデルに必須栄養素の欠乏の認知と欠乏栄養素の定量的摂取の機序について述べてみたい。

(13) ヒスタミン神経系によるエネルギ-代謝調節：中枢と末梢間のクロストークにおける新たなる役割

坂田利家，吉松博信，黒川　衛（大分医科大・医・第一内科）

視床下部の神経ヒスタミンを特異的に操作することで，ヒスタミン神経系の脳機能，とくに種々な調節系を介したエネルギー代謝に及ぼす作用について説明した。これまでにわかったHA神経機能の結果を総合すると，エネルギー代謝の恒常性維持，この点だけは各系に共通した所見といえる。その意味では，H1受容体ノックアウトマウスが，平時ではほとんど異常を表さず，一方では肥満症患者の脳脊髄液中ヒスタミン濃度が低く，神経性食欲不振症患者のそれが上昇しているのも，この視点で解釈すると納得しやすい。末梢の脂肪組織から分泌されたレプチンの視床下部作用には，脳内ヒスタミン神経系の賦活化がそのターゲットの一つとして組み込まれており，一部はこの機序を介して摂食行動や脂肪代謝，それにUCPファミリーを制御している。つまり，ヒスタミン神経系と脂肪組織の間ではエネルギー代謝に関する情報が密に交換され，生体の恒常性は維持されている。

(14) 末梢組織でのグルコース代謝に及ぼすレプチンの中枢性調節作用

箕越靖彦，Haque, Mohammad Shahidul，嶋津　孝（愛媛大・医・医化学第一）

ラットの視床下部腹内側核（VMH）にレプチンを投与し，末梢組織でのグルコース代謝に及ぼす影響を無麻酔・非拘束の条件下で調べた．その結果，血糖値や血中インスリン値に変化は無いにもかかわらず，褐色脂肪組織，心臓，骨格筋，脾臓においてグルコースの取り込みが選択的に促進することが判明した。このレプチンによる促進作用は，交感神経の作用遮断剤であるグアネチジンや外科的な交感神経切除によって抑制された。また，インスリンを大量に投与して，インスリンの効果を最大とした時のグルコースの取り込みをレプチンはさらに増強した。以上の実験結果から，レプチンは，VMH-交感神経系を活性化することによって末梢組織でのグルコースの利用を強く促進することが明らかとなった。

(15) 脂肪細胞発現遺伝子と生体における意義

松澤佑次，船橋　徹（大阪大・医・分子制御内科学（第二内科））

私達は，脂肪細胞の分子生物学的特性を明らかにする目的で脂肪細胞に発現する遺伝子の同定を行いつつある。既知のものについては，発現の意義を明らかにし，未知の遺伝子についてはクローニングし，その機能を検討している。脂肪組織cDNAライブラリーに最も高頻度に出現した遺伝子はコラーゲン様蛋白をコードしており，アディポネクチンと名付けたが，この分子は血中に高濃度に存在するが，予想に反し体脂肪量の多いものほど血中濃度は低下していた。また，脂肪細胞において初めて水チャネル（aquaporin family)が同定されたが，これが，グリセロールの転送に重要な役割を示すことも明らかにした。脂肪組織は従来単なるエネルギー備蓄臓器と考えられていたが，多彩な生理活性物質（Adipocytokine）を分泌する分泌臓器と捉えることが可能であり，その増減と病態の関連を明らかにすることがCommon Diseaseの予防医学に大きく貢献するものと考える。

(16) Adipocytokine と生体防御システム

高木 厚司（九州大・医・第一生理）

Gelatin-Binding-Protein (GBP) 28 は，1996 年に中野・富田らによってヒトの血漿から抽出・同定された脂肪細胞由来の補体様活性物質である。今回，この GBP 28 に，（1）兜蟹血球 Lysate 中の clotting enzyme 賦活化作用（リムルス反応）および（2）ラット腹腔マクロファージの賦活化作用（IL-6 産生・遊離）（LPS の 1/1,000-10,000 程度）があることを突き止めた。しかし，この GBP28 は，（3）LPSとの同時投与により LPS のマクロファージ賦活化作用を減弱化する事もわかり，生体内においては，体外から侵入してくる LPS の生物活性を中和している可能性が示唆された。また，GBP28 は，障害を受けた組織の細胞外基質に吸着したり，貪食系や内皮系の細胞に取り込まれることもわかり，生体侵襲時の生体防御に重要な役割を果たしていることが強く推測された。

(17) β3アゴニストによるインスリン抵抗性改善のメカニズム —白色脂肪細胞への作用

門脇　孝（東京大・大学院医学系糖尿病・代謝内科）

β3-アドレナリン受容体（β3-AR）は，生体のエネルギー代謝調節に重要な役割を果たしている。肥満糖尿病マウスKK-Ay/Taに選択的β3-ARアゴニストAJ-9677を反復経口投与（0.1mg/kg）した。血中のグルコース，インスリン，FFAおよび中性脂肪（TG）は3日間投与で有意に低下した。次に，副睾丸周囲白色脂肪組織では，AJ-9677の投与によりTG含有が低下し小型化しTNF-αおよびレプチンのmRNA発現量が減少した。

以上より，AJ-9677はサイズの大きな脂肪細胞で脂肪分解を促進し，TNF-αの発現の少ない小さな脂肪細胞へと質的変化を引き起こしインスリン抵抗性を改善するものと考えられる。これは，チアゾリジン系化合物が小さな脂肪細胞を分化誘導することによりインスリン抵抗性を改善する（Okuno A. et al., J.Clin.Invest. 101: 1354-1361, 1998）ことと考え合わせると興味深い。

(18) 脂質代謝制御因子としてのPPAR

河田照雄（京都大・大学院農学研究科・応用生命科学）

peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)は，レチノイド/サイロイド/ビタミンDレセプターと同類の核内レセプターファミリーのひとつである．PPARは発見当初リガンドが不明ないわゆるオーファンレセプターであった。しかし，そのリガンドが脂肪酸やその誘導体，さらにはチアゾリジン誘導体のごとくインスリン抵抗性の改善による糖質代謝にまで広範で顕著な効果を示すことから脂質代謝，ひいては糖質代謝調節に関わるきわめて重要なレセプターとして位置づけられるようになってきた。PPARには現在3種類のサブタイプが知られており，その作用は組織および細胞特異的なサブタイプの発現により規定される。PPARαは主に肝臓や心臓で，PPARγは脂肪細胞と消化管で，またPPARδは普遍的に発現している。脂質代謝の異化作用の制御においてはPPARαが，一方同化作用においてはPPARγが主要な遺伝子制御因子として機能していると考えられる。

(19) β3-アドレナージック受容体の機能と褐色脂肪

木村和弘，斉藤昌之（北海道大・大学院獣医学研究科・比較形態機能学）
河田照雄（京都大・大学院農学研・応用生命科学専攻 食品生命科学・栄養化学）
吉田俊秀（京都府立医大・第一内科）

β3-アドレナージック受容体（β3R）は脂肪細胞での脂肪分解に重要な役割をもち，疫学的研究でヒトβ3Rのミスセンス変異（Trp64Arg）と肥満やインスリン抵抗性との関連性が報告されている。変異β3Rと正常β3Rを前駆脂肪細胞3T3- L1細胞に発現させ機能を調べたところ，変異β3Rではアゴニストによるc AMP産生が正常β3Rに比べ抑制されていた。一方，肥満犬にβ3R選択的アゴニスト，CL316,243を連続投与すると体重の減少を認め，脱共役蛋白質UCP1の発現を伴って白色脂肪組織の褐色脂肪への化生が見られた。遺伝性肥満Yellow KKマウスにおいてもCL316,243の投与は褐色脂肪の活性化と骨格筋での脱共役蛋白質UCP2,UCP3の発現を増加させた。以上の結果から，β3Rの活性化は脂肪分解とともに熱産生分子UCPの発現を誘導し，エネルギー消費を促進して肥満を軽減すると考えられた。

(20) 褐色脂肪細胞における容量性カルシウム流入とその調節

尾松万里子（滋賀医大・第二生理）

容量性カルシウム流入は，細胞内のカルシウムストアが枯渇したことを感知して起こる細胞外からのカルシウム流入であり，非興奮性細胞における種々の生理機能発現に重要である。本研究では，ラット褐色脂肪組織から得られた初代培養細胞を用いて容量性カルシウム流入と細胞外ATPによるその調節について検討した。ATP(10^{-5}M)はpurinergic P_2受容体を介して細胞内ストア(ER)からのカルシウム放出を促進して一過性の細胞内カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の上昇を引き起こすとともに，ノルアドレナリン刺激による細胞外からのカルシウム流入およびタプシガルジン刺激による容量性カルシウム流入によって定常的に上昇した$[Ca^{2+}]_i$を静止状態レベルまで減少させた。一方，ADPやUTPは$[Ca^{2+}]_i$の上昇のみ引き起こし，細胞外からのカルシウム流入を抑制する効果は見られなかった。これらのことから，ATPはERからのカルシウム放出を引き起こすとともに容量性カルシウム流入によって上昇した$[Ca^{2+}]_i$を静止レベルに戻す役割を果たし，ノルアドレナリンと共に細胞内カルシウムの共調節をしている可能性があると考えられた.

10. 病態糖鎖研究会

1998. 10. 30－10. 31
代表者：辻　崇一（理化研）
世話人：池中一裕，鹿川哲史（生理研）

（1）ゼブラフィッシュα1-3フコシルトランスフェラーゼの遺伝子クローニングと活性測定
長谷純宏（大阪大・理）

（2）脳および腎臓でLewisx抗原を生合成する新規alpha, 3-フコース転移酵素遺伝子（mFUC-TIX）の発現クローニング
工藤　崇（創価大・生命研）

（3）胃粘膜病変の腸上皮化生と共に出現してくるヒトST6GalNAcI 遺伝子のクローニングとその発現およびSTn抗原合成について
池原　譲（愛知県がんセンター，創価大・生命研）

（4）B細胞分化におけるシアリル-ルイス-x抗原発現制御
中村　充（自治医大・分子病態治療研究センター）

（5）アミロイドb蛋白凝集におけるGM1ガングリオシドの役割
柳澤勝彦（国立長寿医療研）

（6）予期に反した二つのリソソーム系b-ガラクトシダーゼの相互機能関係
鈴木邦彦（ノースカロライナ大・神経科学センター）

（7）VIP36の糖鎖認識と細胞内輸送における役割
山下克子（(財) 佐々木研）

（8）ST6Gal I のゴルジ装置局在に幹領域が果たす役割
川口しのぶ（理研フロンティア）

（9）PlatycodinDの膵外分泌促進作用および活性発現における糖鎖部分の必要性について
平井康昭（昭和大・薬）

(10) 脳内糖蛋白質糖鎖の発現と生理学的意味
池中一裕（生理研）

参加者名簿

辻　崇一（理化研），長谷純広，長束俊治，岡田　卓，柳田寛太，島崎淳行，山岸　舞（大阪大・理），鈴木邦彦（ノースカロライナ大），山下克子（(財) 佐々木研），工藤　崇，成松　久，西原祥子（創価大・生命研），一色聡一郎（慶應大），梶本哲也，平井康昭（昭和大・薬），宮村毅（宝酒造㈱），楠　　進（東京大・神経内科），金森審子，池原　譲，平岩　望（愛知県がんセンター），和田洋巳（京都大・胸部疾患研），柳澤克彦（国立長寿医療研），中村　充（自治医大）

研究会概要

複合糖質糖鎖が直接あるいは間接的に病態に関与していることを示す知見は多い。この研究会は，糖鎖の微量解析法を駆使することにより，特定の疾患を診断あるいは治療経過の観察が可能か否か，もしも，可能ならばそこに潜在する問題点は何かを見極め，今後の新しい診断治療の道を模索しようとするものであった。本研究会は糖鎖関連の研究に携わり広範な各分野の第一線で活躍している研究者・医師で構成し，それぞれの分野での研究の現状と問題点を論議し，情報交換を行った。

(1) ゼブラフィッシュα1-3フコシルトランスフェラーゼの遺伝子クローニングと活性測定

長谷純宏（大阪大大院・理学研究科）

SSEA-1糖鎖は，胚発生過程において，限られた時期，限られた部位にしか発現せず胚発生に重要な分子と考えられることから，その生理的機能について興味が持たれている。この糖鎖は，その非還元末端部分にルイスX構造を持っていることが知られている。ルイスX糖鎖の発現制御はα1-3フコシルトランスフェラーゼによって司られていると考えられる。このことから胚時期に発現してルイスX糖鎖の発現制御を担うα1-3フコシルトランスフェラーゼを同定することが重要視されてきた。我々の研究室では，胚時期に発現するα1-3フコシルトランスフェラーゼを調べ，この酵素が発現する時期に，細胞表面に現れる糖鎖を詳細に調べることによりその役割の解析するため，以下の研究を始めた。

ヒトのα1-3フコシルトランスフェラーゼは，Loweらのグループなどによって，現在までに5種類の酵素が単離されており，それぞれについて性質が詳しく報告されているが，胚時期のルイスX構造の生合成に関与している酵素は未だ同定されていない。この胚型の酵素の単離が遅れている原因を，哺乳類では遺伝子の多様性が進んでおり，ファミリー間の遺伝子の相同性が低いためであると推定した。そこで，胚が手に入りやすいなど発生の研究に便利で，かつ進化的にマウスよりも下等で遺伝子の多様性が低いと期待できるゼブラフィッシュを用い，ルイスX構造を生合成するα1-3フコシルトランスフェラーゼの同定を試みた。

まず，ジェノミックサザンブロット解析によって，ゼブラフィッシュに哺乳類のα1-3フコシルトランスフェラーゼと相同性のあるような遺伝子が存在する可能性を確認した後，PCR法を利用してゼブラフィッシュDNAライブラリーからα1-3フコシルトランスフェラーゼに相同性のあるような遺伝子をスクリーニングした。その結果，哺乳類のα1-3フコシルトランスフェラーゼと相同性のある遺伝子2種類が得られた。一方をゼブラフィッシュα1-3フコシルトランスフェラーゼ1（zFT1），他方をゼブラフィッシュα1-3フコシルトランスフェラーゼ2（zFT2）と名付け，

それぞれ全塩基配列を決定した。その結果，zFT1はアミノ酸レベルでhFuc-TIIIと34.3%，hFuc-TIVと29.6%，hFuc-TVIIと32.9%の相同性があった。またzFT2はアミノ酸レベルでhFuc-TIIIと28.7%，hFuc-TIVと27.1%，hFuc-TVIIと29.5%の相同性があった。また，得られたこれらの遺伝子配列を哺乳類細胞で発現させたところ，zFT1，zFT2ともにα1-3フコシルトランスフェラーゼ活性が確認され，実際にルイスxを合成することができた。zFT1，zFT2がSSEA-1の生合成に関与しているかどうかは未だ不明であるが，その有力な候補であると思われる。

(2) 脳および腎臓でLewisx抗原を生合成する新規a1,3-フコース転移酵素遺伝子 (mFuc-TIX) の発現クローニング

工藤　崇（創価大・生命研）

Lewis x（CD15, SSEA-1）抗原(Galb1,4(Fuca1,3)GlcNAc-R)は，様々な組織で発現しており，マウス脳などにおいては発生段階特異的な発現が見られ，細胞接着に関与していると考えられている。現在まで，ヒトで5種類のa1,3フコース転移酵素遺伝子（Fuc-TIII,IV, V, VI,VII）がクローニングされている。また，マウスではmFuc-TIVとVIIがクローニングされているが，ヒトFuc-TIII,V,VIのマウス相同遺伝子は，偽遺伝子になっている。成体マウス脳において，Lewis x抗原はアストロサイトおよびニューロンで発現しているが，mFuc-TIVとVIIは，ほとんど発現していない。このことから脳では新規なa1,3フコース転移酵素遺伝子の存在が示唆され，われわれはその遺伝子のクローニングをExpression cloning法を用いておこなった。成体マウス脳よりcDNAライブラリーを作製し，pAMoベクターに組み込んだ。マウス脳cDNAライブラリーをNamalwa細胞（ヒトBurkitt lymphoma cell line）に遺伝子導入し，セルソーターにより，Lewis x抗原を発現するクローンを分離した。遺伝子配列の決定した結果，そのクローンは新規な遺伝子であり，N末端側よりアミノ酸10個の細胞質尾部，20個の膜貫通部位，329個の酵素活性部位，計359個のアミノ酸で構成される典型的な糖転移酵素のトポロジーをもっていた。アミノ酸レベルでは，既知のa1,3-フコース転移酵素遺伝子との相同性は40～50%しかなかったが，a1,3-フコース転移酵素に共通であるアミノ酸配列のモチーフは保存されていた。この遺伝子をa1,3-フコース転移酵素IX（mFuc-TIX, mFUTIX）と命名した。Fuc-TIX遺伝子を再度Namalwa細胞に遺伝子導入してフローサイトメーター解析をおこなったところ，Lewis x およびLewis y 抗原の発現がみられた。しかし，sialyl Lewis x抗原の発現は見られなかった。また，Fuc-TIX遺伝子導入COS-1細胞では，Lewis a抗原の発現はみられなかった。mFuc-TIX導入細胞抽出液を酵素源としてPA化オリゴ糖を用いたa1,3-フコース転移酵素活性測定では，mFuc-TIXはLewisx 抗原合成能をもっており，sialyl Lewis x 抗原およびLewis a抗原合成能のない酵素であった。Competitive RT-PCR法によるmFuc-TIXの臓器発現分布を検討したところ，脳と腎臓で最も強い発現が見られ，胃，大腸，子

宮，精巣上体でも発現していた。また，mFuc-TIVの発現は，胃，大腸，精巣上体，脾臓，腎臓などに発現しており，mFuc-TIXのものとは異なる発現分布を示した。成体マウス脳でmFuc-TIXのin situハイブリダイゼーションをおこなったところ，海馬のCA1，CA3および歯状回の錐体細胞に強い発現が見られた。

(3) 胃粘膜病変の腸上皮化生と共に出現してくるヒトST6GalNAc Ⅰのクローニングとその発現およびSTn抗原合成について

池原　譲（愛知県がんセンター，創価大・生命研）

胃癌などの腫瘍マーカーとして利用されているSialyl Tn (STn) 抗原は，胃癌などで予後と相関する事が知られている。その発現は胃癌だけでなく，胃癌の発生母地となる腸上皮化生粘膜でGoblet cellにつよく発現している。このSTn抗原を合成するシアル酸転移酵素遺伝子はまだクローニングされていなので，なぜ予後と相関するのか，なぜ腸上皮化生や胃癌で高発現するかと言うことを明らかにするためにまず，遺伝子を単離し，腸上皮化生粘膜と胃癌における発現を検討した。[方法] STn抗原を高発現することが知られているヒト腸上皮化生性胃粘膜からのcDNAを材料としシアリルモチーフを利用したdegenerate primerによるPCRを行い，新たなシアル酸転移酵素遺伝子をコードするDNAフラグメントをクローニングした。これをプローブとして，ヒト腸上皮化生性胃粘膜のcDNAライブラリーから，全長をコードするcDNAをクローニングした。新たに得られた遺伝子がSTn抗原合成酵素であるかどうか調べるために，全長cDNAを発現ベクターに組み込み，STn抗原陰性の大腸癌細胞株HCT15にトランスフェクションし，安定導入株を作成した。Western blotting 解析及び flow cytometryにより安定導入株を解析した。この安定導入株から得たリコンビナント酵素を用いて，酵素の基質特異性とin vitro におけるSTn抗原合成活性を解析した。またin situ hybrid ization 法と免疫染色により切除胃粘膜における酵素mRNAとSTn 抗原の局在を検討することで，得られた酵素が胃粘膜病変におけるSTn抗原合成酵素であることを明らかにした。[結果] 単離した遺伝子は600アミノ酸残基をコードしており，ニワトリ由来のST6GalNAc Ⅰに最も高い相同性（アミノ酸レベルで55%）を示し，かつ同様の基質特異性を示した。flow cytometry 及びWestern blotting 解析の結果，安定導入株細胞はムチンタンパク質上に STn 抗原を発現していた。リコンビナント酵素を用いたIn vitro asssayでもSTn抗原をムチン上に合成した。さらにmRNAとSTn抗原の局在は腸上皮化生粘膜や胃癌等の組織で一致した。[結語] 病理組織学的に示されてきた癌化および腸上皮化生に伴って出現する STn 抗原は，今回我々がクローニングした酵素により合成されていることを強く示唆した。

(4) B細胞分化におけるシアリルルイス-X抗原発現制御

中村　充（自治医大・分子病態治療研究センター）

【緒言】これまでセレクチンリガンド糖鎖の発現制御メカニズムは，精力的に研究が進められてきた。今回我々は，ヒトプレB細胞株表面のシアリルルイス-X (sLeX)抗原とコア2GlcNAc転移酵素（C2GnT）発現の強い相関について報告する[1)]。またホルボールエステルによるプレB細胞株分化誘導のシステムを用い，細胞表面sLeX発現レベルが，その生合成に関与する複数の糖転移酵素による複雑なコントロールというよりむしろ，一つの糖転移酵素C2GnT遺伝子による非常に単純なメカニズムによる制御を受けている可能性を報告する[2)]。

【方法】各種ヒトB細胞株と，ホルボールエステル（TPA）によりCD10強陽性CD22陰性からCD10弱陽性CD22陽性のより成熟した形質へと分化するヒトプレB細胞株KM3を材料として用いた。細胞接着はE-selectin遺伝子を導入したCOS1細胞並びにBCECF-AM蛍光ラベル法による標識B細胞株を用いるLow-shear-force細胞接着実験によった。

【結果と考察】各種プレB細胞株では，sLeX抗原がほぼ唯一分子量150kDaの糖蛋白質（gp150）に，しかもO-結合型糖鎖上に発現していた。成熟形質を持つB細胞ではsLeX抗原が発現せず，細胞表面sLeX抗原レベルと相関した発現を示す糖転移酵素はC2GnTのみであった。プレB細胞株KM3をTPAで分化させたときsLeX抗原陽性率は著しく低下し，gp150上の糖鎖もsLeX抗体による反応性が著しく低下・消失した。このときのsLeX発現のダウンレギュレーションに伴って，パラレルな発現量変化を示す糖転移酵素は，やはり末端のフコース転移酵素でもシアル酸転移酵素でも，中間体を合成するb1^4ガラクトース転移酵素でもb1^GlcNAc転移酵素でもなく，C2GnT遺伝子であった。C2GnT遺伝子のダウンレギュレーションが決定的な役割を果たすことは，遺伝子導入により糖鎖生合成のマシナリーを人工的に改変することを通して証明した。即ち，C2GnTの各全長cDNAを組み込んだヴェクターを導入した遺伝子導入株を調製し，細胞表面sLeX発現を解析したところC2GnT遺伝子導入株でTPAによるsLeX発現のダウンレギュレーションがブロックされた。このことから，sLeX抗原発現とC2GnT発現は強く相関しているだけでなく，プレB細胞の分化の系では細胞表面sLeX発現レベルの調節はC2GnTによる単独支配を受けている可能性が強く示唆された。

【文献】

1）Nakamura M, et al., UDP-GlcNAc:Galb1^3GalNAc (GlcNAc to GalNAc) b1^6N-acetylglucosaminyltransferase Holds a Key Role on the Control of CD15s Expression in Human pre-B Lymphoid Cell Lines. Glycobiology, 9: (January issue), 1999.

2）Nakamura M, et al., Single Glycosyltransferase, Core 2 b1^6N-acetylglucosaminyltransferase, Regulates Cell Surface Sialyl-LeX Expression Level in Human Pre-B Lymphocytic Leukemia Cell Line KM3 Treatedwith Phorbolester. J.Biol.Chem., 273: 26779-26789, 1998.

(5) アミロイドb蛋白凝集におけるGM1ガングリオシドの役割

柳澤勝彦（国立長寿医療研）

我々はAlzheimer病脳内において病初期に沈着するアミロイドb蛋白A分子を求めた結果，早期のAlzheimer病の病理所見であるびまん性老人斑と量的相関をもって，GM1ガングリオシド結合型AbGM1/Aを見い出した。この異常Ab分子は特異な免疫反応性および著しい自己凝集性を示すことから，何らかの構造変化を獲得していること，またこの分子は脳内において可溶性Abの凝集を促進するseedとしてアミロイド形成に寄与している可能性を我々は指摘した。我々の仮説はその後in vitroの実験により検討され，AbはGM1ガングリオシドとの結合によりその二次構造を変化させること，また合成Abの重合はGM1ガングリオシドの存在下において著しく促進されることが確認された。GM1/Abの産生機構に関しては，Abの生理的産生／細胞外排出およびGMガングリオシドの細胞表面への発現にもかかわらず，この異常Ab分子が正常脳においては検出されないことから，細胞表面において形成されるのではなく細胞内におけるAbの産生異常あるいは輸送変異によって形成されている可能性を考えている。その形成部位としてはGM1ガングリオシドに富んだlipid microdomainを想定しているが，膜上において形成されるGM1/Abが細胞外におけるアミロイド形成とどのような分子レベルでの関連を有しているのかは不明である。最近，我々はコレステロール依存性に，上皮細胞の頂端部のみから極性をもってアミロイド原性に富む特異なAb分子（apicalAb）が細胞外に排出されることを見い出した。コレステロールはGM1ガングリオシドとともに，前述のlipid microdomainの主要な構成成分をなすことから，apicalAbはGM/Abをtemplateとして可溶性Abから産生される可能性を検討中である。

脳内に生理的に発現する蛋白が何らかの要因によって異常構造を獲得し自己凝集し，病的蓄積物を細胞内外に形成した結果，神経細胞が死滅するという仮説が幾つかの中枢性変性疾患に共通する発症病態として提唱されている。ConformationalDiseaseと呼ばれるこれらの疾患群のなかで，Alzheimer病，prion病，CAGリピート病（Huntington舞踏病，ある種の脊髄小脳変性症）に共通しているのは，それぞれ蓄積する蛋白がアミロイド構造を示すことであり，またこれらの蛋白の凝集にあたり他の分子はmolecularchaperoneとして凝集蛋白の構造変化を促進している可能性が議論されている点である。今回の講演では，我々のこれまでの研究成果をもとに，GM1ガングリオシドがAbの構造変化／凝集におけるmolecular chaperoneである可能性を議論する。

(6) 予期に反した二つのリソソーム系β-ガラクトシダーゼの相互機能関係

鈴木邦彦（ノースカロライナ大・神経科学センター）

リソソーム系のβ-ガラクトシダーゼには，遺伝学的には各々独自と考えられている酸性β-ガラクトシダーゼ(GM1 β-ガラクトシダーゼ) とガラクトシルセラミダーゼの二つがある。前者は基質としてGM1-ガングリオシド，GA1, keratan sulfate, 糖蛋白等を分解し，後者は，ガラクトシルセラミド，サイコシン，モノガラクトシルジグリセリド等を基質とする。ラクトシルセラミドだけは，生理学的に，両方の酵素で分解されると考えられている。ヒトでは前者の遺伝性欠損はGM1-ガングリオシドーシスまたはモルキオ病B型の原因となり，クラベ病は後者の遺伝性欠損によって起こる。この二つの疾患は，各々の酵素の基質特性の結果，臨床，病理，生化学的に全く異なったものであるが，どちらの疾患でもラクトシルセラミドの蓄積は起こらない。各々のヒト疾患に対応するマウスモデルとして自然に起こるtwitcherマウス（ガラクトシルセラミダーゼ欠損）と最近人工的に作られたGM1-ガングリオシドーシスマウスが存在する。我々は，最近この二つの欠損したマウス系を掛け合わせることによって両方のガラクトシダーゼが同時に欠損したマウスを作製し，それと共に，片方の不活性化された遺伝子がホモ結合体で他方はヘテロ結合体であるマウスも生まれて来るのでこれらのマウスの表現型を検討した。

これまでに知られている事実から，まず両方の遺伝子が欠損したいわゆるdouble knockout では，当然，クラベ病とGM1ガングリオシドーシスの両方の特徴を同時に持ったより重症な疾患でそれに加えてこのどちらにも見られないラクトシルセラミドの蓄積が起こる表現型が予想された。又，各々の欠損症で，もう一つの方の遺伝子がヘテロ結合体のマウスでは単なるtwitcher 及びGM1ガングリオシドーシスのマウスと同様の所見を呈するはずだとも予想された。しかしながら，実際の所見は，この予想に全く反するものであり，この二つのβ-ガラクトシダーゼの間には今までに知られていない機能上の相互関係があることが示唆された。

まずduoble knockout の場合であるが，予想通りラクトシルセラミドの著明な蓄積が脳でも肝臓でも見られたが，全く予期に反して臨床症状は単なるtwitcher より軽症で，神経症状も少なく生存期間も長いことが判った。しかもdouble knockout では，典型的なtwitcher の病理所見であるグロボイド細胞，脱髄などは中枢神経系からは消えており，末梢神経系のみに残っている。その上さらにGM1ヘテロのtwitcher では，逆に単なるtwitcher より，重症で，生存期間が短いだけでなくtwitcher ではほとんど見られない全身痙攣が限られた期間に起こる。その病理的裏付けとして大脳皮質，海馬などに単なるtwitcher やGM1ガングリオシドーシスでは見られない著明な神経細胞の変性が広範に見られた。つまり，単純にまとまると両方の遺伝子が同時に全く欠損していると，中枢のtwitcher の病変がなくなり，単なるtwitcher より軽症の疾患になる。逆にGM1ヘテロだけのマウスには，何事も起こらないのに，twitcher と共存するとどのgenotype にも見られない神経細胞の変性が起こって，単なるtwitcher より重症になる，ということである。

この，予想に全く反する，一見，矛盾した結果がどういう機序によって起こるのか，我々には全く説明不可能だけでなく，推定もつかない，というのが正直なところで，現在，まず現象としての病理，生化学を正確にとらえることが先決と考え，詳細な検索を始めている。

(7) VIP36の糖鎖認識と細胞内輸送における役割

山下克子（(財) 佐々木研）

極性化された上皮細胞における極性輸送の選別機構はいまだ不明な点が多く残されている。我々は，TGNからapical側へ向かう輸送小胞の膜タンパク質のひとつとしてMDCK細胞よりcDNAクローニングされたVIP36がマメ科レクチンと高いホモロジーを示すことに注目した。

まずVIP36のうち膜貫通部分を除くC末側の糖結合部位を含む約600個のアミノ酸をGSTとの融合タンパク質として大腸菌に発現させ，リコンビナントGST/Vip36を精製した。そしてメタボリックラベルしたMDCK細胞より調製したポストヌクレアー画分および分泌タンパク質にGST/Vip36のVip36部分と特異的に結合するタンパク質が存在することを見いだした。この結合は2価イオンを要求せず，最適条件はpH6.0，37℃である。このアッセイ系に各種高マンノース型糖鎖を加え，阻害活性を比較した結果，VIP36はMan6-9GlcNAc2-peptideを認識しておりMana1→2残基がVIP36との結合に重要であることが明らかとなった。なお，VIP36内に存在する糖結合部位，およびカルシウム結合部位に変異を導入した変異体VIP36を作製して行なった，VIP36の構造と糖結合機能との関連についても合わせて紹介する。

(8) シアル酸転移酵素，ST6Gal Ⅰ のゴルジ装置局在に幹領域が果たす役割

川口（北爪）しのぶ（理研フロンティア）

b-ガラクトシドa2,6-シアル酸転移酵素（ST6Gal Ⅰ）は，糖タンパク質のN-型糖鎖にシアル酸残基を転移するタイプⅡ型の膜タンパク質である。ST6Gal Ⅰは，癌化の際に発現量が増加することからも，その発現機構の解析が望まれている。ラットの肝臓では，この酵素はゴルジ装置内のトランス嚢，及びトランスゴルジネットワークに局在する。糖転移酵素がどのようなメカニズムで機能発現の場であるゴルジ装置の特定の部位に局在するかは重要な問題であるが，未だ不明の点が多い。以前に私達は，遺伝子操作により作製した可溶型ST6Gal Ⅰは速やかに細胞から分泌されるのに対し，酵素活性部位及び幹領域から成る可溶型ST6Gal Ⅰは一時的にゴルジ装置に停留することを見出している。一方，細胞質尾部及び幹領域を除去して活性部位及び膜貫通領域のみ

を残したST6Gal I，DtailDstemは効率的にゴルジ装置に停留することを見出した。これらの研究結果は，ST6Gal Iの幹領域，及び膜貫通領域がそれぞれ独立に酵素のゴルジ装置停留に関与していることを示唆している。本研究では，ST6Gal I の幹領域がゴルジ停留に果たす役割を調べる目的で，幹領域及びその近傍の膜内腔領域を削除した一連のST6Gal I 変異体を作製し，これら変異体の性質を調べた。間接抗体蛍光法，及び細胞表面ビオチン化実験の結果，一部の ST 変異体は細胞表面及びゴルジ装置の両者に局在することが分かった。これらの結果は，幹領域が酵素のゴルジ装置停留に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。次に，各ST 変異体の細胞外への切断・分泌の割合を調べた。その結果，細胞表面の発現量が最大であったST変異体は，野生型ST とは異なり，切断・分泌が観察されなかった。これらの結果は，ST の切断・分泌量の調節により，ゴルジ装置及び細胞表面のST の発現量，そして細胞外へのST の分泌量が制御されている可能性を示唆しており，大変興味深い。

(9) Platycodin Dの膵外分泌促進作用および活性発現における糖鎖部分の必要性について

平井康昭，伊田喜光（昭和大・薬）

難治性疾患の１つに指定されている慢性膵炎は，膵液の鬱滞が病態悪化に関与するといわれている。最近，膵外分泌促進作用をもつセクレチンを患者に投与することによって膵液の鬱滞を改善し，病態悪化を防ぐ試みがなされている。しかしセクレチンは注射剤であることから，その長期投与は患者に大きな苦痛を与える。

田口らは慢性膵炎治療薬の開発を目標に種々の漢方方剤についてスクリーニングを行い，桔梗湯（構成生薬：桔梗2, 甘草3）が覚醒条件下でラットの膵外分泌を促進することを見いだした.1,2) また，長期加療にもかかわらず病状の改善が認められなかった慢性膵炎患者（２名）が桔梗湯を服薬したところ，腹痛・下痢などの諸症状が著く改善した。

そこで，本来咽頭炎の治療に用いられる桔梗湯が慢性膵炎治療薬として極めて有望と考え，桔梗湯の膵外分泌促進活性の本体を明らかにする目的で覚醒条件下ラットの膵外分泌促進作用を指標としてスクリーニングを行った。

桔梗湯の膵外分泌促進作用についてはその構成生薬である桔梗と甘草両者の成分の関与が考えられることから，両者の主配糖体成分である platycodin Dおよび glycyrrhizinのラット膵外分泌能および血中CCK濃度に及ぼす影響を検討した。その結果，platycodin Dが膵液量と蛋白分泌量をともに用量依存的に増大させ，血漿CCK濃度も上昇させた。この作用CCK受容体拮抗剤のloxiglumideにより抑制されたが，アトロピン前投与による影響は受けなかった。したがって，その作用機序はCCKを中心とした消化管ホルモンの分泌亢進を介したもので，神経系の関与は少ない

ものと考えられる。一方，glycyrrhizinは膵外分泌にほとんど影響を与えなかった。

次にplatycodin Dの膵外分泌促進作用に対する糖鎖部分の必要性について検討する目的で，platycodigenin (aglycone)，platycodigenin3-O-b-D-glucopyranoside (platycodin Dの C-28の糖鎖が脱離した化合物),methyl b-D-apiofuranosyl (1 (I.3)-b-D-xylopyranosyl (1 (I.4)-a-L-rhamnopyranosyl (1 (I.2)-L-arabinopyranoside (platycodin Dの C-28の糖鎖)，des-apioplatycodin D (platycodin DのC-28糖鎖末端のapioseが脱離した化合物)，des-glucoplatycodin D (platycodin D のC-3のglucoseが脱離した化合物)，platycodin D2およびplatycodin D3 (共にplatycodin Dの C-3のglucoseに更にglucoseが1分子結合した化合物) を調製し，platycodin D10mg/kg対応量で膵外分泌に対する作用を比較した。その結果，膵液分泌量の顕著な増加を示したのplatycodin Dのみで，platycodin Dの構造から糖が増えても減っても膵液分泌量の増加を示さなかった．したがって，作用の発現にはPlatycodin Dの構造全てが必要であると結論された。

1）新井一郎，小松靖弘，山浦　常，山本俊憲，黒岩幸雄，佐々木勝己，田口　進　膵臓，11, 435-442 (1996).

2）新井一郎，小松靖弘，山浦　常，田口　進　日本東洋医学雑誌，48, 31-36(1997).

（10）脳内糖蛋白質糖鎖の発現と生理学的意味

池中一裕（生理研）

糖蛋白質の糖鎖構造はある特定の糖鎖結合部位に付いているものでも不均一で多様であるため，糖蛋白質糖鎖は厳密な合成調節を受けているようには思われていない。しかし，ある細胞集団や組織の特定領域全体で糖鎖パターンを解析すると極めてよく一致していることがマウスの各組織の解析から明らかとなった。今回，マウスよりもっと遺伝学的に不均一なヒト脳内糖蛋白質糖鎖を解析したところ，ヒトにおいても糖鎖パターンは極めて良好な一致を示した。このことは，糖鎖生合成過程における各糖転移酵素の遺伝子発現が厳密に制御されていることを示している。

なぜこのように厳密な制御が必要なのか明らかにするために，われわれは脳特異的に発現している糖鎖「ＢＡ２」に着目して研究を行った。ＢＡ２はbiantenna骨格にbisecting GlcNAc とcore fucose の結合した構造をしており，非還元末端はGlcNAcで終わり，Galは付加していない。脳より抽出したガラクトース転移酵素はこのＢＡ２にガラクトース付加することができないが，牛ミルクガラクトース転移酵素（GalTase I）は付加することができる。そこで，われわれはＢＡ２産生細胞であるＣＧ４（オリゴデンドロサイト前駆細胞株）にヒトGalTase Ｉ cDNA（成松先生から供与していただいた）を強制発現させ，ＣＧ４におけるＢＡ２発現量を減少させようとした。トランスフォーマント内の１クローンは実際ＢＡ２の発現が認められなくなり，しかも増殖速度が極めて遅くなり形態異常も示した。このクローンの糖蛋白質糖鎖を解析したところ，Ｂ

Ａ２がガラクトシル化されたのではなく，もっと大きく糖鎖パターンが変動していた。このことは，生体にとって糖転移酵素活性を厳密に制御し，一定の糖蛋白質糖鎖パターンを保つことが極めて重要な意味を持つことを意味している。

11. 細胞機能制御とカルシウムシグナル

1998. 11. 12－11. 13
代表者：飯野正光（東京大・医）
世話人：宮崎俊一（生理研）

（1）小脳シナプス形成，可塑性とカルシウムシグナル
狩野方伸（金沢大・医・第二生理）

（2）神経伝達物質放出の制御機構
高橋正身（三菱化学生命科学研）

（3）代謝型グルタミン酸受容体の細胞外Ca^{2+}感知機能の構造基盤
久保義弘，宮下知之，村田喜理（東京都神経研・神経生理）

（4）内向き整流カリウムチャネルKAB-2/Kir4.1の分布と機能
堀尾嘉幸，松下賢治，倉智嘉久（大阪大・医・第二薬理）

（5）増殖因子により調節されるカルシウム透過性チャネル
小島　至，神崎　展，長澤雅裕（群馬大・生体調節研）

（6）リンパ球に於けるカルシウム動員機構
黒崎知博（関西医大・肝研・分子遺伝）

（7）カルポニン遺伝子と血管平滑筋の病態生理
高橋克仁，山村倫子，菅谷洋一，淡田修久
（大阪府立成人病センター，大阪大・大学院薬学研究科）

（8）卵にCa^{2+} oscillationを誘発する精子因子の生理学的解析
尾田正二，鹿野朝秀（東京女子医大・医・第二生理）
出口竜作（宮城教育大・生物）
毛利達磨，宮崎俊一（生理研・細胞内代謝）

（9）カルシウムイメージング革命－新規Ca^{2+}蛍光指示蛋白質の開発と応用
宮脇敦史（東京大・医科研・化学研究部）

（10）インスリンの開口放出機構，および二光子励起顕微鏡を用いた膵島カルシウムシグナルの研究
高橋倫子，河西春郎（東大・医・統合生理）
根本知己，立川　光，門脇　孝（東大・医・糖尿代謝科）
飯野正光（東大・医・薬理）

（11）IP_3受容体多様性の機能的意義
飯野正光（東京大・ 大学院医学系研究科・細胞分子薬理）

(12) カルシウムシグナリングの多様性とその異常

井本敬二（生理研・液性情報）

(13) Spatiotemporal Ca^{2+} Signaling and Caveolin Distribution in Endothelial Cells

一色政志，藤田敏郎（東大・医・分院内科）

安藤譲二，神谷　瞭（東大・医・医用生体工学システム生理）

(14) 乳腺組織におけるカルシウムシグナリング

古家喜四夫，市川　純，奥田晃子（京都工芸繊維大・応用生物）

中野春男（生理研・生体膜）

榎本浩一（島根医科大・生理）

(15) 高浸透圧環境下における培養腎髄質内層集合管細胞のCaシグナル

森口昌彦，泉田いぶき，安西尚彦，河原克雅（北里大・医・生理）

参加者名

飯野正光，一色政志，廣瀬謙造，井上尊生，高橋倫子，橋本彰子，並木繁行，門脇嗣郎，瀧澤あずさ，浅田行紀（東京大・医），内山　剛，横山　玲，宮脇敦史（東京大・医科研），小島　至，張　有青，最上秀夫，長澤雅裕，聶　　琳，李　　鹿，小和瀬貴律（群馬大・生体調節研），水野秀昭，浜田耕造（理化学研究所・脳研），廣田順二，宮川知也，斎藤直人（科学技術振興事業団），狩野方伸（金沢大・医），高橋正身（三菱化学生命研），黒崎知博（関西医科大・肝臓研），堀尾嘉幸（大阪大・医），高橋克仁（大阪府立成人病センター），河原克雅，森口昌彦（北里大・医），古家喜四夫，市川　純，奥田晃子（京都工芸繊維大），久保義弘（東京都神経研），尾田正二，白川英樹，淡路健雄，鹿野朝秀（東京女子医大），井本敬二，中野春男，宮崎俊一，毛利達磨，佐藤真則，嶽本和久（生理研）

研究会概要

広範な細胞機能を制御しているカルシウム（Ca^{2+}）シグナル機構について，異なる分野で異なる研究手法を用いている研究者を横断的に集めるという理念のもとに，今年度も研究会を開催した。昨年度と同様，発表および討論時間をゆったりととり，discussion主体の会合となるようにし，Ca^{2+}シグナル機構の第一線で活躍中の研究者に出席していただいた。昨年度と若干出席者を入れ替え，新しいCa^{2+}測定法（2光子励起法，カミーリアン），細胞外Ca^{2+}受容体，カベオラなどについて最新の展開を聞くことができた。また昨年度から出席の参加者もこの一年で大きな進展があり，新規Ca^{2+}チャネルの発見も行われた。非常に高密度でレベルの高い討論が行われ，出席者は十分刺激を受けた。

(1) Group I代謝型グルタミン酸受容体カスケードによる海馬CA1のLTP の促進

狩野方伸，三浦正巳（金沢大・医・第二生理）

Group I代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）は3量体G蛋白質Gqを介してPKC活性化とIP_3産生をおこすと考えられている。この経路と海馬CA1のLTP誘導の関係を検討した。mGluR阻害薬MCPG，PKC阻害薬chelerythrineは弱いtheta burstでのLTPを阻止した。このPKCの効果はG αqノックアウトマウスではみられなかった。theta burst による細胞内カルシウム濃度上昇はノックアウトでも正常にみられた。これらの結果よりmGluR - Gq - PKCの経路がLTP誘導に促進的効果を持つことが示唆された。

(2) 神経伝達物質放出の制御機構

高橋正身（三菱化学生命科学研）

シナプスが可塑的な変化を起こす上で，神経伝達物質の放出機能が短期的，あるいは長期的に制御されることは一つの重要な機構である。短期的な制御には様々なタンパク質リン酸化酵素によるタンパク質リン酸化が，長期的な制御にはシナプス前部に存在する機能タンパク質の生合成や局在化などが関わっていると考えられているが，その詳細はまだ明らかではない。我々は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PC12細胞や，培養したラット中枢神経細胞を用いて解析を行ってきた，その結果，短期的な制御機構としてタンパク質リン酸化を介する機構の他に，リン酸化に依存しない制御機構が存在することを見いだした。また長期的な制御機構として，様々な神経伝達物質放出の制御因子を，神経終末に様々な量比で局在させることによって，シナプス前部の機能を制御している可能性を見いだした。

(3) 代謝型グルタミン酸受容体の細胞外Ca^{2+}感知機能の構造基盤

久保義弘，宮下知之，村田喜理（東京都神経研・神経生理）

代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）は，シナプスの可塑的変化等に重要な役割を果たすことが知られている，G蛋白質結合型の受容体である。mGluRが副甲状腺にある細胞外Ca^{2+}に対する代謝型受容体（CaR）と一次構造上類似性を示すことはすでに知られていたが，mGluRが細胞外Ca^{2+}によって活性化されるかどうかについてはこれまで知られていなかった。我々はまず

mGluR1がグルタミン酸のみならず，生理的濃度の細胞外Ca^{2+}によっても活性化されるということを見い出した。次に他のmGluRファミリーメンバーについても解析し，1,3,5型は生理的濃度の細胞外Ca^{2+}によって活性化されること，2型は感受性が低いことを明らかにした。さらにこれら分子のキメラおよび点変異体を作成することにより，細胞外Ca^{2+}に対する感受性の差異を決定している構造基盤（mGluR1ではSer166）を同定した。

（4）内向き整流カリウムチャネルKAB-2/Kir4.1の分布と機能

堀尾嘉幸，松下賢治，倉智嘉久（大阪大・医・第二薬理）

グリアに発現している内向き整流カリウムチャネルのKAB-2/Kir4.1は胃の酸分泌細胞である壁細胞ではH^+K^+-ATPaseと共存しており，壁細胞においても細胞外K^+濃度の調節に関与していると考えられた。K^+が移動する際，浸透圧の差によって水も共に移動すると考えられている。そこでKAB-2/Kir4.1と水チャネル（AQP）が共存しているかを検討した。網膜グリアのミュラー細胞も壁細胞もAQP4が発現していたが，ミュラー細胞では多くの場合，両者が共存していたが，一部ではその分布を異にしていた。一方胃においは両者の局在は全く異なっていた。AQP4もKAB-2/Kir4.1もともにPDZドメインを持った蛋白質に結合しうる配列を持っている。ミュラー細胞にも壁細胞にもPDZドメインを持った蛋白質としてSAP97が発現しているが，SAP97にはKAB-2/Kir4.1は結合できるが，AQP4は結合できず，両蛋白質の共存は単純にSAP97がおこなっているわけではないことが判明した。

（5）増殖因子によって活性化されるCa^{2+}透過性チャネル

小島　至，神崎　展，長澤雅裕（群馬大・生体調節研）

細胞増殖にはCa^{2+}流入の増加が必須であるが，増殖因子によって活性化されるCa^{2+}透過性チャネルの分子実体は不明である。我々は最近インスリン様成長因子（IGF-I）により調節されるCa^{2+}透過性チャネルcDNAをクローニングした。このチャネルgrowth factor-regulated channel（GRC）は，756個のアミノ酸からなるTRPに類似した構造をもち，6個の膜貫通部位をもつ。CHO細胞に発現するとGRCは一価および二価のイオンを透過するが，生理的な外液Ca^{2+}存在下には一価イオンの透過性は抑制される。非刺激時のGRCチャネル電流はわずかであるが，IGF-Iを添加するとGRCチャネル電流が著明に増加する。GRCは非刺激時には主に細胞内プールに存在し，IGF-I添加により細胞膜上に移動する。IGF-IによるGRCチャネル電流の増加は主にこのトラ

ンスローケーションによると考えられる。

(6) リンパ球に於けるCa^{2+}動員機構

黒崎知博（関西医大・肝研・分子遺伝）

B細胞抗原受容体（BCR）複合体を介して生じるCa^{2+}シグナルは，B細胞の転写制御，ひいてはB細胞の活性化・増殖の制御に重要な役割を担っている，事実私たちの樹立したIP$_3$R欠損B細胞では，BCR刺激依存性JNK, NFAT活性化，アポトーシス誘導に阻害が認められる。B細胞においてCa^{2+}シグナルを担っている分子群の同定，さらにはこれらの分子の制御機構を明らかにする目的で，1) PLC-γ$_2$の活性化に必要な分子の同定，2) 細胞内Ca^{2+}プール枯渇から細胞外Ca^{2+}流入に関与している分子群の同定，に的を絞り解析を行ってきた。

既に，BCR刺激依存性PLC-γ$_2$活性化にはSyk, Btkという2種類のチロシンキナーゼが要求されることを明らかにしていたが，今回Sykによってチロシン燐酸化されるアダプター分子BLNKがPLC-γ$_2$を細胞質から膜分画へリクルートした後，PLC-γ$_2$がSyk, Btkによりチロシン燐酸化され活性化されることを明らかにした。BCR→Syk/Btk→PLC-γ$_2$→IP$_3$→IP$_3$R→ Ca^{2+}という経路がCa^{2+}シグナルに必須であるが，PLC-γ$_2$経路のみならずPI$_3$-K経路も重要であり，細胞内プールからのCa^{2+}枯渇を誘導することにより，結果的に細胞外からのCa^{2+}流入を促進することが示唆された。BCRを介するCa^{2+}グナルを阻害する抑制性レセプター（Fcγ RIIBとPIR-B）は，その作用機序として，Syk/Btkに働きPLC-γ$_2$経路阻害（PIR-B），SHIPによるPI$_3$-K経路阻害（FcγRIIB）と全く異なった機構を用いていることが明らかになった。

(7) カルポニン遺伝子と血管平滑筋の病態生理

高橋克仁（大阪府立成人病センター，大阪大大学院・
環境病因病態学，さきがけ研究21・科学技術振興事業団）

【目的】カルポニンは1986年に平滑筋のアクチン結合蛋白としてはじめて単離・精製された。その後，蛋白および遺伝子の構造と発現の研究，生化学的手法による*in vitro*の機能解析によって，同遺伝子が平滑筋の分化のマーカーであり，ミオシンATPaseを抑制することが明らかになった。我々はカルポニン遺伝子の*in vivo*での機能を明らかにするために，遺伝子欠失マウスを作成し，血管平滑筋の病態生理，特にフェノタイプ変換と張力発生に対する作用を検討した，

【方法・結果】マウスカルポニン（h1）遺伝子のアクチン結合領域を含むexon 5-7をターゲッティ

ングし，ホモ型欠失マウスを得た。4週齢マウス大動脈の長さステップを用いた収縮活性状態の測定によって，等尺性収縮時に短縮速度が低下するlatch現象がホモ型欠失マウスでは消失しており，カルポニンがミオシン架橋の回転速度を抑制して血管トーヌスを維持する機構に関与していることが推定された。一方，ホモ型欠失マウスにおいて血清アルカリホスファターゼ（ALP）の高値，骨の横径成長の促進，骨形成因子BMPに対する異所性骨形成の亢進を認めたため，6-10週齢マウスより大動脈を摘出し，BMP存在下で2日間器官培養を行った。カルポニン欠失マウスでは，血管壁中膜全層の平滑筋細胞がALP陽性の骨芽細胞様細胞に誘導分化され，ALP mRNAの発現が誘導された。

【結論】Virchowは1863年に動脈の石灰化が，骨形成過程に類似した骨化であると指摘したが，血管壁の骨芽細胞様細胞の起源や骨化の機構については手掛かりが得られていなかった。我々の研究結果は，カルポニン遺伝子が血管壁の張力発生のみならず平滑筋の分化状態の維持にも重要な役割を果たしていることを示唆している。

(8) 卵にCa^{2+} oscillationを誘発する精子因子の生理学的解析

尾田正二，鹿野朝秀（東京女子医大・医・第二生理）
出口竜作（宮城教育大・生物）
毛利達磨，宮崎俊一（生理研・細胞内代謝）

ハムスター精子から粗精製したsperm factor（SF）のマウス卵内注入により，Ca^{2+} oscillationが誘発される。卵表層部への注入により数秒後にCa^{2+} waveが起こり，中央部への注入ではより長いdelayの後卵全体で同期的なCa^{2+}増加が起こる。SFを希釈するとdelayは延長し，Ca^{2+}濃度の上昇率・Ca^{2+}waveの伝播速度は減少する。SFに対する感度は表層部の方が高い。Ca^{2+} oscillationはIP_3受容体抗体18A10で阻害される。IP_3を表層部・中央部に注入した場合，ともにdelayなしでCa^{2+} waveが誘発される。IP_3感度も表層部の方が高いが，抗体染色によるとIP_3受容体は卵全体にほぼ均一に分布していた。SFは間接的にIP_3受容体を介するCa^{2+}遊離を誘発し，卵表層部にはSFに高感度で反応する機構が備わっていると考えられる。この機構は，受精時に精子－卵融合に際してSFが卵内に移行してCa^{2+}増加反応を誘発するという考えに適合する。

(9) 新世代のCa^{2+}指示薬cameleon

宮脇敦史（東大・医科研・化学研究部）

我々のCa^{2+}イメージング技術は向上しているにも拘らず，細胞内Ca^{2+}動態の我々の理解はまだ大して深くない。例えば小胞体内腔の遊離Ca^{2+}濃度や，核内Ca^{2+}の自律的制御の有無などといった基本的問題がほとんど片付いていない。論争の中でデータの食い違いは，解析した細胞の異質性，或いは用いたCa^{2+}指示薬の特性の違いに帰することがたびたびである。我々は従来のCa^{2+}指示薬の問題点を鑑み，GFP（green fluorescent protein）の蛍光利用および分子内FRET（蛍光エネルギー移動）の実現によって，新世代のCa^{2+}指示薬cameleonを作製した。cameleonはその分子すべてがcDNAにコードされているため，細胞内のあらゆる部位にターゲットできる。核と小胞体のCa^{2+}動態についていくつかデータを報告した。また遺伝子導入が可能な細胞，或いは個体でCa^{2+}イメージングができる。線虫喉頭筋に発現したcameleonを2光子励起顕微鏡で観察した結果を紹介した。

(10) 膵β細胞開口放出機構と二光子励起顕微鏡による膵島Ca^{2+}シグナリングの研究

高橋倫子，河西春郎（東大・医・統合生理）
根本知己，立川　光，門脇　孝（東大・医・糖尿代謝科）
飯野正光（東大・医・薬理）

膵β細胞はインスリン分泌を担う唯一の内分泌細胞であり，その機能不全は糖尿病の主たる成因と考えられている。細胞内Ca^{2+}濃度の上昇以降の開口放出機構を，高い時間分解能のもとに定量的に検討した。ケイジドカルシウム試薬を用いて3 μM以上のCa^{2+}上昇を細胞内に急激に与えると，膜容量は三相性に増大した。セロトニン・アンペロメトリーを併用して検討した結果，これはシナプス小胞様顆粒の開口放出路と，二種類のインスリン顆粒の開口放出路を反映していると解釈された。さらに，この内インスリン分泌の9割を占める主要な経路は細胞内ATP濃度に強く依存し，Aキナーゼによるりん酸化を最終的なスイッチとして必要とする事が判明した。また，二光子励起顕微鏡を膵島に用いて，生理的条件下でCa^{2+}シグナルを調べたところ，高濃度ブドウ糖刺激のもとに数十 μMに達するCa^{2+}上昇が腺腔側に生じているのが初めて可視化された。

(11) IP_3受容体多様性の機能的意義

飯野正光（東大・大学院医学系研究科・細胞分子薬理）

IP_3受容体には遺伝子が異なる3種のサブタイプが存在し，組織によって発現パターンが異なっている。Ca^{2+}シグナルパターンとIP_3受容体サブタイプの発現パターンの関係を明らかにするため，遺伝子相同組換え法を用い，特定のサブタイプのみを発現するB細胞セルラインを作成して各サブタイプの機能を比較した。IP_3感受性は2型＞1型＞3型の順で高いほか，Ca^{2+}感受性とATP必要性にもサブタイプ間の相違が検出された。さらに，複数のサブタイプを発現する細胞では，サブタイプ間の機能的相互作用が観測された。また，単一のIP_3受容体サブタイプのみを発現する細胞においてB細胞受容体を刺激すると，2型発現細胞では活発なCa^{2+}オシレーションが観察されるが，1型発現細胞ではオシレーションが起こりにくくなり，3型発現細胞では一過性のCa^{2+}濃度上昇がみられるのみであった。このように，IP_3受容体サブタイプ間には大きな機能的相違が存在し，それがCa^{2+}シグナルパターンの違いを形成するのに極めて重要であることが示された。

(12) Ca^{2+}シグナリングの多様性とその異常

井本敬二（生理研・総合研究大学院大学・生命科学研究科生理科学専攻）

細胞内のCa^{2+}代謝には，細胞外からのCa^{2+}の放出が関与していることはよく知られている。しかしながら，古典的なCa^{2+}透過性である電位依存性Ca^{2+}チャネルやNMDA受容体チャネル以外にも細胞内のCa^{2+}代謝に関与するイオンチャネルが明らかとなってきている。我々のグループでは，ショウジョウバエの眼の変異であるtrpがコードするイオンチャネルの哺乳類ホモログファミリーをクローニングし，それらの構造・分布・機能に関して研究を進めてきた。研究会ではTRPチャネルに関する研究の進捗状況を報告するとともに，それらの機能的意義について討論した。また，Ca^{2+}代謝の分子メカニズムが明らかにされるにしたがって，その異常による疾患が発見されてきている。我々のグループでは，P/Qタイプの電位依存性Ca^{2+}チャネルの異常による小脳失調症の発生機序を研究しており，これまでに得られた結果を報告した。

(13) Spatiotemporal Ca^{2+} Signaling and Caveolin Distribution in Endothelial Cells

一色政志，藤田敏郎（東大・医・分院内科）
安藤譲二，神谷　瞭（東大・医・医用生体工学システム生理）

内皮細胞膜付近にはカベオラという膜陥入構造が存在し，そこには様々な情報伝達分子が集中している事が近年明らかとなり注目されている。本研究では，ATP刺激によって生じる内皮細胞Ca^{2+} waveの開始点とカベオラとの関連を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。Indo1を負荷した培養ウシ大動脈内皮細胞におけるCa^{2+}イメージングの後，カベオラのマーカー蛋白であるカベオリンに対する免疫蛍光染色を行った。カベオリンは細胞辺縁の一部に集中しており，そこからCa^{2+} waveが発火して細胞全体へと伝搬した。このカベオリン集中部位およびCa^{2+} wave発火部位はコルセミド処置により細胞中央へとシフトした。さらに，流れ存在下での細胞培養によりカベオリンとCa^{2+} wave発火部位は流れの上流側の辺縁へとシフトした。以上より，カベオラはCa^{2+} waveの発火に関連する細胞構成要素である事が示唆された。

(14) 乳腺組織におけるCa^{2+}シグナリング

古家喜四夫，市川　純，奥田晃子（京都工芸繊維大・応用生物）
中野春男（生理研・生体膜）
榎本浩一（島根医科大・生理）

授乳期の乳腺では腺胞のまわりを筋上皮細胞がかごのように取り囲み，脳下垂体後葉からのオキシトシンによって収縮することにより，腺胞内に蓄えられたミルクが放出される。マウス乳腺の培養細胞を用いたこれまでの研究から，筋上皮細胞の収縮が分泌上皮細胞への機械的刺激となりATPの放出と拡散によるCa^{2+}波が発生し，両細胞の持つ異なった種類（P2Y1とP2Y2）のATP受容体を介して相互作用していることを明らかにした。これが実際の乳腺組織においても起こっているかを確かめるため，乳腺組織のスライス標本を用いて顕微鏡観察した。その結果，組織の腺胞においては0.1nM以下の低濃度のオキシトシンによっても収縮と振動が起こること，そしてATPによって腺胞の収縮が起こることを明らかにした，またATP受容体の阻害剤であるスラミンはそれ以外の作用を持ち培養乳腺上皮細胞に細胞内Ca^{2+}振動を誘発した。その機序についても報告した。

(15) 高浸透圧環境下における培養腎髄質内層集合管細胞のCa^{2+}シグナル

森口昌彦，泉田いぶき，安西尚彦，河原克雅（北里大・医・生理）

ラット腎髄質内層集合管（IMCD）の初代培養細胞を作成した。高浸透圧（500 mOsm/kgH_2O）で約24時間培養した細胞において，細胞外ATPおよびAVPにより誘発される細胞内Ca^{2+}シグナルを，Fura2の蛍光強度を測定することにより調べた。AVP投与による細胞内Ca^{2+}増加は，NaCl，マニトール，尿素高浸透圧群において有意に抑制された。細胞外ATP投与による細胞内Ca^{2+}増加は，すべての群において抑制されなかった。細胞内pH調節能は，細胞内BCECFの蛍光強度を測定することにより調べた。高浸透圧で培養した群は等張液で培養した群に比べ，NH_4Cl投与-除去による酸負荷からの回復過程（細胞外Na^+依存性）が早かった。酸負荷の前にATPを投与すると酸排出能は大きくなり，イオノマイシン前投与でも同様の結果を得た。細胞外ATPは細胞内Ca^{2+}増加により，Na/H輸送体を活性化し，高浸透圧で培養されたIMCD細胞と同等の細胞内pH調節能を発揮させた。

12. 生殖細胞の構造と機能発現

1998. 11. 20－11. 21
代表者：年森清隆（宮崎医大）
世話人：有井達夫（生理研）

（1）精子鞭毛蛋白MC31/CE9の遺伝子発現と蛋白発現
若山友彦，年森清隆（宮崎医大・解剖第1）

（2）マウス精子形成過程におけるFynチロシンキナーゼの機能解析
前川眞見子，湯浅茂樹（千葉大医・解剖第二）
安田昌弘，八木　健（生理研・高次神経機構）
甲斐信行（理化学研・脳科学センター）

（3）*Hsp70-2* knockout mouse における減数分裂と先体形成の関係について
森　千里（京都大・医・生体構造医）

（4）免疫性造精障害における組織反応
伊藤正裕（香川医大・第一解剖）

（5）先体内部抗原 MN7（acrin1）の輸送と局在変化
吉永一也，谷井一郎，年森清隆（宮崎医大・解剖第一）

（6）半数体精子細胞特異的核蛋白質(Haspin)の同定と解析
田中宏光（大阪大微研・動物実験）

（7）精細胞移植による変異マウスの解析
蓬田健太郎，大田　浩，西宗義武（大阪大微生物病研・感染動物）
岡部　勝（大阪大・遺伝情報・遺伝子組替）

（8）低温ショック蛋白rbm3の精巣における発現
檀野祥三（京都大・医・分子病診療，関西医大・泌尿器），
藤田　潤（京都大・医・分子病診療）

（9）マウス精巣上体管基底面からみた基底細胞：定性ならびに定量組織学的研究
高野広子（北海道大・医・生体機能構造）

(10)「遺伝子改変動物を使用した受精現象の解明」
岡部　勝（大阪大・遺伝情報実験施設）

(11) ほ乳類精子染色質の脱凝縮について
薄井紀子（帝京大・医・解剖第一）

(12) 着床と脱落膜形成
舘　澄江（東京女医大・解剖発生生物）

参加者名

高野広子（北海道大医），前川眞見子，湯浅茂樹（千葉大医），舘　澄江（東京女医大），薄井紀子（帝京大医），森　千里，藤田　潤（京都大医），檀野祥三（関西医大，京都大医），金子善興，大西正剛，大田　浩，田中宏光，蓬田健太郎，野崎正美（大阪大微研），岡部　勝（大阪大遺伝情報），伊藤正裕（香川医大医），若山友彦，吉永一也，年森清隆（宮崎医大医），佐藤真則，中野春男，山崎由起子，有井達夫（生理研）

研究会概要

本研究会では，精細胞の発生から初期発生に至る過程に起こる生殖細胞と体細胞の形態変化やその過程で発現する特異蛋白と遺伝子の発現の解析を目的として，2日間にわたり次のような観点からの発表と議論がなされた。精巣内あるいは精子発生過程で特異的に発現する蛋白とその遺伝子（免疫グロブリンスーパーファミリーMC31/CE9, SrcファミリーFyn チロシンキナーゼ，熱ショック蛋白Hsp70.2，半数体特異的核蛋白Haspin，低温ショック蛋白rbm3），免疫性造精障害における精巣間質の反応性，変異マウス精巣への精細胞移植法による精細胞と支持細胞の関係，精巣上体内成熟を行う先体内蛋白MN7(acrin1)，精巣上体基底細胞，遺伝子改変動物を用いた先体反応現象，精子核の脱凝縮因子と細胞周期，そして着床期の脱落膜形成と内膜の細胞分裂。

これらの研究発表を通して新しい解析例や研究アプローチが示された。研究会では，十分な議論の時間を得ることができ，研究発表のみならず最近の生殖生物学の研究の動向や方法についても活発な議論がなされた。

（1）精子鞭毛蛋白MC31/CE9の遺伝子発現と蛋白発現

若山友彦，年森清隆（宮崎医大・解剖第１）

ラット精子鞭毛の細胞膜に局在する糖蛋白であるMC31/CE9の遺伝子発現と蛋白発現を比較検討した。遺伝子発現はノーザンハイブリダイゼーション法とin situハイブリダイゼーション法により検索した。MC31/CE9のmRNAは精子発生過程において精母細胞以前の細胞から発現が認められた。その発現は精母細胞において恒常的に認められ，減数分裂に引き続きstep13の伸長精子細胞まで認められた。一方，蛋白発現は免疫組織化学法によって検索した。MC31/CE9の蛋白発現では，異なる２つの時期（早期厚糸期の精母細胞とstep10前後の伸長精子細胞）においてゴルジ装置に強く免疫反応が認められた。mRNAと蛋白質の発現のパターンの違いから，mRNAの転写調節のほかに，転写後の調節によりMC31/CE9の発現がコントロールされていることが示唆された。

(2) マウス精子形成過程におけるFynチロシンキナーゼの機能解析

前川眞見子，湯浅茂樹（千葉大医・解剖第二）
安田昌弘，八木　健（生理研・高次神経機構）
甲斐信行（理化学研・脳科学センター）

Srcファミリーの一員であるFynチロシンキナーゼは，マウス精巣においてセルトリ細胞に局在する。Fynはセルトリ細胞が後期精子細胞の頭部と接するectoplasmic specializationに強く局在し，アクチンフィラメントと共存していた。またマウス精巣からTriton X-100可溶分画と不溶分画とを調製し，電気泳動後immunoblottingを行った結果，Fynは大部分が不溶分画（細胞骨格分画）に回収された。またFynは，生後一週齢精巣ですでに検出され，三週齢精巣で増加することがわかった。以上の結果から，Fynは精巣において細胞骨格と結合し，セルトリ細胞-生殖細胞の相互作用に関与することが示唆される。さらに，*fyn*ノックアウトマウスと野生型マウス精巣を用いて，リン酸化チロシン蛋白についてimmunoblottingを行い，比較検討した。

(3) *Hsp70-2* knockout mouse における減数分裂と先体形成の関係について

森　千里（京都大・医・生体構造医）

精子形成過程に特異的に発現し，減数分裂期の相同染色体の遺伝子交換に必要なsynaptonemal complexに関与する*Hsp70-2* 遺伝子（heat shock protein の gene family の一種）をノックアウトしたマウスにおける精子形成に対し，詳細な検討を加えた。*Hsp70-2* ノックアウトマウス（*Hsp70-2* KOマウス）では，大多数の精子形成細胞は精母細胞段階で apoptosis が誘発され，精子細胞へ発生分化しないことをすでに報告してある。しかし，今回の検討により，Hsp70-2 KOマウスにもごく僅かであるが精母細胞段階で apoptosisを免れる精子形成細胞が存在し，その細胞は減数分裂終了前の段階で，精子細胞の形態形成過程（spermiogenesis）に起こる先体形成や核の凝縮が起こっていることが判明した。

(4) 免疫性造精障害における組織反応

伊藤正裕（香川医大・第一解剖）

異種組織片が精巣間質に移植されると拒絶されにくくなることは以前より知られている。また

強い自己免疫源性を持つ精子も血液ー精巣関門（Blood-Testis Barrier；BTB）により守られている。そのため精巣は免疫学的に保護された臓器（Immune Privileged Organ；IPO）であると言われている。ところが同系精巣細胞の皮下注射されたマウスにおいて容易に自己免疫性の炎症細胞浸潤が精巣に惹起されることを観察した。精巣細胞の皮下注射により胚細胞抗原に対する自己免疫反応が生じるのは以前より知られていたが，それだけでは精巣炎を引き起こすには十分でないためCFAや百日咳死菌などと混ぜて注射するのが従来の方法であった。（アジュバント処置は免疫能を高めるだけでなくBTBをゆるめ精巣抗原を用いなくても精巣細胞に対するキラー細胞が誘導されたり，また精巣抗原とともに注射するとBTB外の細胞成分に対する自己免疫も誘導されるという報告がある。）しかし同系精巣細胞のみの免疫で精巣炎が簡単に誘導されるということは精巣は本当にIPOなのかという疑問を想起させる。本研究ではこの精巣炎モデルを通して精巣マクロファージの発達・分布を中心に精巣の免疫学的環境について改めて考えてみた。

（5）先体内部抗原 MN7 (acrin1) の輸送と局在変化

吉永一也，谷井一郎，年森清隆（宮崎医大・解剖第一）

MN7（acrin1）は，ヒトを含めた哺乳動物成熟精子の赤道部を除く前先体内部に存在する糖蛋白である。acrin1を特異的に認識する単クローン抗体 mMN7を用いて，その輸送と局在について調べた。免疫沈降－ウェスタンブロット法により，モルモットの精子細胞および精巣上体内精子では，他の動物と同様に，acrin1は 90,000ダルトン蛋白として発現した。acrin1の先体への輸送は，小胞輸送阻害剤 Brefeldin A の添加で遮断されたことから，ゴルジ装置経由であることを確認した。acrin1の局在は，先体のサイズが大きくユニークな形態を有するモルモットについて免疫電顕レベルで解析した。その結果，先体内に輸送された acrin1は，その後の精子形成および精巣上体内成熟過程における先体の形態分化に伴ってダイナミックに変化し，成熟精子では前先体背側部に局在することが判明した。

（6）半数体精子細胞特異的核蛋白質(Haspin)の同定と解析

田中宏光（大阪大・微生物病研・動物実験）

精巣cDNA ライブラリーから精細胞欠失マウス精巣 cDNA ライブラリーを差し引いたサブトラクション法により，精子細胞特異的に発現する遺伝子群を得た。その中の一つhaspin のcDNAは，コンピューター解析の結果，分子量 84 KDaのタンパク質をコードし，アミノ酸配列には，

ロイシンジッパー，核移行シグナル，塩基性領域，プロテインカイネースカタリティックドメインの一部（I, II, III）を含んでいた。解析の結果，Haspinは，半数体精子細胞核に特異的に発現し，半数体精子細胞の細胞分裂停止に関与する，DNAに結合能をもつSer/Tyr protein kinaseであることが明らかとなった。また，Haspinのゲノムのクローニングを行った結果，シングルコピーの遺伝子であり，イントロンを持たないイントロンレス遺伝子で，インテグリン遺伝子のイントロン中に存在することが明らかとなった。

(7) 精細胞移植による変異マウスの解析

蓬田健太郎，大田　浩，西宗義武（大阪大・微生物病研・感染動物）
岡部　勝（大阪大・遺伝情報・遺伝子組替）

哺乳類の生殖細胞の分化と増殖の調節機構には，その支持細胞との相互作用が重要であることが，精子形成過程に異常を示す変異マウスの解析から明らかにされてきた。この相互作用を直接解析できる系として，我々は精細胞移植法の応用を試みた。また，ドナーとしてeGFP遺伝子を導入したグリーンマウスを用いることにより，その生着状況がリアルタイムで観察可能となった。

精子形成がその第1波のみでその後観察されなくなるSI^{17H}/SI^{17H}変異マウスに精原細胞移植を行ったところ，生着するがその分化は観察されなかった。一方，同様の表現型を示すjsd/jsd変異マウスでは，生着後その分化が確認された。これらの結果から前者では支持細胞に，後者では精原細胞に異常があることが示唆された。グリーンマウスをドナーとして用いた精細胞移植法により，生殖細胞と支持細胞の機能連関の解明が進むものと期待される。

(8) 低温ショック蛋白rbm3の精巣における発現

檀野祥三（京都大・医・分子病診療，関西医大・泌尿器）
藤田　潤（京都大・医・分子病診療）

【背景，目的】陰嚢内は体温に比較し3-4℃前後の低い温度に保たれており，精子形成にはこの低温環境が重要である。我々は最近マウス精巣から32℃で誘導されるRNA結合蛋白（Cirp）を単離，報告した。今回我々はCirpと相同性の高いヒトRBM3のマウスホモログであるrbm3を単離した。rbm3の発現にたいする低温ショックの影響，精巣における発現について検討した。

【方法】温度変化を加えた種々のマウス培養細胞におけるrbm3の発現量をノーザンブロット法を用い検討した。rbm3に対するポリクローナル抗体を用い，マウス精巣における発現部位を免疫

染色法にて検討した。また実験的停留精巣のrbm3発現への影響についても検討した。
【結果】rbm3は培養細胞において32℃で強く誘導された。精巣においてセルトリ細胞に特異的に発現を認めた。実験的停留精巣では発現の減少を認めた。
【考察】rbm3は精子形成の温度感受性に関与している可能性が示唆された。

(9) マウス精巣上体管基底面からみた基底細胞：定性ならびに定量組織学的研究

高野広子（北海道大・医・生体機能構造）

精巣上体管は精子の成熟と貯溜に関与し，近位部で細く遠位部で太い。管上皮は主細胞と基底細胞からなる。主細胞は精子成熟に関して多くの研究があるが，基底細胞の研究は少なく，その機能も不明である。基底細胞の機能を考えるために，NaOH 消化法によって管の基底面を露出し，基底細胞を基底側から走査電子顕微鏡で観察し，精巣上体における部位差を検討した。さらに，各部位で管を拡張させ，基底細胞基底面に与える形態学的な影響を調べた。

基底細胞基底面は一般に細長い形態を示し，管基底面を広く占めていた。基底面にヒダを示すものがみられ，その出現頻度には部位差がみられた。さらに細胞基底面の面積・長軸の方向にも部位差がみられた。拡張管では基底面にヒダをもつものは減少して，基底面の面積は増大し，長軸の方向が変わった。このようなことから基底細胞は管の拡張・縮小に伴う管基底面の変化に応じてその形を受動的にかえてこれに対応していると考える。

(10) 遺伝子改変動物を使用した受精現象の解明

岡部　勝（大阪大・遺伝情報実験施設）

遺伝子改変動物を用いることにより通常の実験系では得られない重要な情報をもたらすことができる。種々の遺伝子をノックアウトしたマウスを作製することにより受精機構の分子生物学的解明が進みつつある。われわれのカルメジンノックアウトマウスの例ではこれまでに知られるZP 3 結合因子など以外に精子上に透明帯に結合する因子が存在することが示唆された。またトランスジェニックマウスを用いた研究により，先体反応を検討した。アクロシンプロモーターの制御下にアクロシンのシグナルペプチドとEGFPの融合蛋白質を発現するコンストラクト（acr-EGFP）を合成し，トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの精巣内では，先体が形成されるにしたがって先体部分にEGFPの蛍光が局在する様子が観察された。そのため先体反応によるエキソサイトーシスをリアルタイムでモニターすることに成功した。

(11) ほ乳類精子染色質の脱凝縮について

薄井紀子（帝京大・医・解剖）

卵形質内に取り込まれたほ乳類精子の染色質は直ちに脱凝縮を開始するが，これはM期の卵細胞／卵内に限られる。ほ乳類精子染色質の凝縮は形成過程でのDNA結合蛋白の置換（ヒストンからプロタミンへ）と成熟過程におけるプロタミン分子内および分子間S－S架橋によって生じ，脱凝縮は逆にS－S結合の還元とプロタミンのヒストンによる置換によるといわれている。脱凝縮に関わる因子として，S－Sの還元にはグルタチオン（GSH）が示され，蛋白の置換にはヌクレオプラスミン（NP）が示唆されている。両因子のうちNPは卵核胞に局在するため，両者が卵形質に存在するのはM期のみで，染色質脱凝縮の時期と一致する。

演者らは先に卵核胞期及び前核期の卵細胞／卵内の精子核に同様の放出像を示し，両時期の卵形質に同じ脱凝縮因子が存在することを示唆した。卵核胞由来のNPは前核期に入って失活したか，または自身の持つ核局在化シグナルによって前核内に移動したかという問題が生じた。

今回，マウスの間期核（卵核胞，前核，二細胞期の核）に精子核を注入したところ，ある程度の脱凝縮が認められた。NPの間期核への再局在化が示唆された。不完全な脱凝縮が因子の不足によるものか，ヒストンなどの不足によるものか，単に物理的な理由かという問題が残された。

(12) 着床と脱落膜形成

舘　澄江（東京女医大・解剖発生生物）

胚子及び母体組織の同種間細胞相互作用である着床は，子宮内膜組織の脱落膜形成を伴う。マウス胚盤胞は妊娠4日目に子宮内膜上皮に接着し，ほぼ１日を経過した後，トロホブラストによる内膜上皮の侵襲が始まる。着床期の脱落膜形成と内膜の細胞分裂との関係を明かにする目的で，妊娠第2～8日目まで10:00或いは18:00にコルヒチンを投与し，4時間プールした分裂像及び２核細胞の分布を，トルイジンブルー染色を施した樹脂切片を用いて描画装置で記録し解析を行った。胚盤胞が子宮腔の着床部位に定位する妊娠 4日目には支質細胞に限定された一次脱落膜形成のための分裂像が観察される。トロホブラストによる内膜浸潤は脱落膜周辺部の支質細胞の急激な増殖を伴い妊娠６日目に分裂頻度は盆宛に達する。この間に一次脱落膜外側に二次脱落膜が形成される。妊娠６日目に多数認められる２核細胞は，脱落膜細胞とその外側に分布する分裂像との間に形成されており，核分裂後細胞質分裂を省略し大型の細胞のまま速やかに脱落膜形成を行う必然性があり，それに合致した現象の一つと推測された。

13. 脳神経系幹細胞の発生と細胞移動ー 幹細胞の発生・分化ー

1998. 11. 26－11. 27

代表者：中辻憲夫（遺伝研）

世話人：池中一裕，岩崎靖乃（生理研）

（1）神経分化におけるNotch-Hes経路について

影山龍一郎（京都大・ウィルス研）

（2）ニューロン誘導能の獲得にはrasシグナルを抑制することが必要である

広海　健（遺伝研）

（3）Neuronal Identity決定に関わる転写因子

斎藤哲一郎（遺伝研）

（4）神経幹細胞の自己複製と分化を制御する分子メカニズム

中福雅人（東京大院・医学系研究科）

（5）神経板の形成とパターン化におけるZicファミリーの役割

有賀　純（理化研）

（6）新規functional cloningを用いたグリア分化因子の単離

池中一裕（生理研）

（7）未成熟型オリゴデンドロサイトにおける神経接着分子L1について

阿相皓晃（東京都老人研）

（8）オリゴデンドロサイトの移動と細胞表面分子

小野勝彦（島根医大）

（9）ミクログリアの発生学的起源と新規な性質

澤田　誠（藤田保健衛生大・総合医科学研）

(10) 神経初期分化の制御機構

笹井芳樹（京都大・医学研究科）

(11) 神経幹細胞の同定と濃縮について

岡野栄之（大阪大・医）

(12) ショウジョウバエgcm遺伝子の発現とグリア・ニューロンの分岐

秋山（小田）康子（京都大・医）

(13) 視蓋の誘導・分化・極性

仲村春和（東北大・加齢医学研）

(14) 僧帽細胞軸索をガイドするlot細胞

平田たつみ（名古屋大・理）

（15）小脳皮質構築におけるReelinおよびmDabの役割　－ 細胞移動と葉形成 －

小川正晴（高知医大）

参加者名簿

中辻憲夫，広海　健，斎藤哲一郎，細谷俊彦（遺伝研），澤田　誠（藤田保健衛生大），有賀　純（理化研），榊原伸一，澤本和延，岡野栄之，川口綾乃，今井貴雄，村上祥子（大阪大・医），秋山康子（京都大・医），影山龍一郎（京都大・ウィルス研），小川正晴，牧田亨介，宮下英行（高知医大），仲村春和（東北大・加齢研），小野勝彦（島根医大），野村　真，富岡直美，平田たつみ，須藤文和（名古屋大・理），河相皓晃（東京都老人研），中福雅人（東京大・医），上野直人，熊田竜郎，畠中由美子，三枝智香，清水美穂，谷口弘樹，加藤　彰，西田弥生，野田昌晴，山本隆正，鈴木亮子（基生研），先崎浩次，牧野初音，宍戸恵美子（生理研）

研究会概要

中枢神経系の発生において，幹細胞の発生分化と誕生した神経細胞の移動パターンの制御機構は中心的な問題といえる。これら二つの問題は互いに密接に関連しながら脳神経系の形成過程の前半を代表する重要な研究対象であり，世界的には現在極めて注目されているにも関わらず，国内では未だに比較的少数の研究者が取り組んでいる状況である。この研究会では哺乳類の脳神経系発生におけるこれらの問題について，国内で活発に研究を行っている研究者を集めて，焦点を絞った研究交流と活発な論議を行い，これらの研究分野の一層の発展を計った。

（1）神経分化におけるNotch-Hes経路について

影山龍一郎（京都大学・ウイルス研）

膜蛋白Notchが活性化されると細胞分化が抑制されるが，哺乳動物Notchの細胞内経路はよくわかっていない。我々は哺乳動物Notchの細胞内経路を明らかにする目的で，bHLH型転写因子Hesの役割を検討した。まず，活性型Notchによってどの Hesプロモーターが活性化されるかをしらべたところ，Hes1とHes5のプロモーターが活性化されることがわかった。そこで，Notchの機能にHes1やHes5が必要かどうかをしらべるために，活性型Notchを発現させるレトロウイルスを作製し，野生型やHes1・Hes5ノックアウトマウスから調製した神経前駆細胞に感染させた。その結果，活性型Notchによって野生型やHes1ノックアウトあるいはHes5ノックアウトマウス由来の神経前駆細胞はニューロンへの分化が抑制されたが，Hes1-Hes5ダブルノックアウトマウス由来の神経前駆細胞はニューロンへの分化が抑制されなかった。以上の結果から，Notchの下流ではHes1とHes5が必須の役割を担っていることが示された。

(2) ニューロン誘導能の獲得には ras シグナルを抑制する事が必要である。

山田琢磨，岡部正隆，広海　健（国立遺伝研）

In the developing nervous system, the determination of neurons occurs in a stepwise fashion. For example, two classes of adult photoreceptor cells (R1-R8) and of embryonic chordotonal organ precursors (COPs: C1-C8) can be discerned in Drosophila. Class I (founder cells) comprises the R8 cells in the eye and five of the eight COPs (C1-C5), determined by the bHLH class transcription factor Atonal. Atonal directs expression of the rhomboid gene, whose product is required for the production of the inducer, an EGF-like factor Spitz protein. Spitz then acts on the Class II cells (R1-R7 and C6-C8) through activation of the ras signaling and its nuclear target Pointed, an ETS transcription factor, to induce their neuronal differentiation. Although requirement of ras signal activation in Class II cells has been well documented, its role in the founder cells is largely unknown.

To test the function of ras signaling in the founder cells, we overexpressed Pointed in the region including the founder cells. In both the retina and the chordotonal system, this caused a reduction in the number of neuronal cells surrounding the founder cells rather than production of extra neurons. This unexpected finding suggests that the expression of Pointed in the founder cells resulted in their decreased ability to induce Class II cells. As all the molecular components of the ras signaling pathway are also expressed in the founder cells, there must be a mechanism to inhibit ras signaling in these cells. Here we describe a novel gene, edl, a candidate inhibitor of the ras signaling in the founder cells. edl product is present in the founder cells, can inhibit the transcriptional activity of Pointed in tissue culture cell transfection assay, and directly binds Pointed protein in vitro. Loss of edl function results in the down regulation of rhomboid expression in founder cells and causes reduction in the number of photoreceptor cells and COPs, resembling the effect of overexpression of Pointed. These results suggest that the inhibition of ras signaling by edl is required in the founder cells for their neural inducing ability.

(3) Neuronal Identity 決定に関わる転写因子

斎藤哲一郎（国立遺伝研）

哺乳動物の神経系には極めて多種多様な神経細胞があるが，神経細胞の多様性を生み出す機構

には不明な点が多い。この機構を解析するため，まず特定の神経細胞のみで特異的に発現する遺伝子をdifferential PCR 法で解析し，ショウジョウバエのPairedに類似のホメオドメイン（PHD）をコードする遺伝子とETS遺伝子のファミリーが神経細胞種に特異的であることを示した。PHD遺伝子としては，PHD1，Phox2，DRG11をクローニングした。PHD1とPhox2は，ヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) 型転写因子のMASH1の下流で発現し，それぞれ嗅覚神経と自律神経の特異性決定に働くことが示されてきている。また，DRG11は，HLH因子のNeurogeninやNeuroDの下流，体性感覚神経で発現し，感覚神経とその標的細胞との相互作用に必須であることが示されつつある。以上のように，神経分化の初期には，HLH因子からPHD因子への転写因子のカスケードが働き，細胞の性質決定を制御すると考えられる。一方，ETS遺伝子のPEA3やER81は，さらに分化の進んだ段階の感覚神経や運動神経細胞のsubsetで発現し，その発現には伸展した神経突起周辺の環境が影響を与える。さらに，PEA3やER81は特定のmotor poolで発現すると同時に，そのmotor poolの標的筋肉に末端を持つ感覚神経でも発現し，運動神経から筋肉，筋肉から感覚神経へ至る一連の神経回路網の形成を制御すると期待される。このように，MASH1やNeurogenin等のHLH因子で神経分化を開始した細胞は，PHD因子等で性質決定を行い，続いて環境因子の影響下ETS因子等を発現するという様に，他段階の過程を経て特異的な神経回路網を形成すると考えられる。

（4）神経幹細胞の自己複製と分化を制御する分子メカニズム

中福雅人（東京大学大学院・医）

我々は，脳の発生過程において多様な細胞群が生み出される分子メカニズムを明らかにしていくために，神経幹細胞に着目した研究を行っている。発生初期に存在する幹細胞は，まず未分化な状態で自己複製を繰り返すことによってその数を爆発的に増加させる。その後幹細胞は，特定の部位において特定の時期に分化を開始し，多様なニューロンおよびグリア細胞を生み出す。従って，幹細胞の増殖と分化の運命選択は極めて厳密な遺伝プログラムによる制御を受けているものと考えられる。我々は，幹細胞の試験管内培養系ならびに遺伝子欠損マウスの解析から，転写制御因子Mash -1およびProx-1が幹細胞の分化の開始過程に重要な機能を担うことを見出した。一方，細胞膜受容体分子であるNotchが複数のシグナル伝達系路を介して幹細胞の分化を負に制御しており，そのひとつの標的がMash-1であることを示唆する知見を得ている。今回の研究会では，神経幹細胞の自己複製と分化の運命選択に関わる正ならびに負の制御機構について，我々の最近の研究結果をもとに議論したい。

(5) 神経板の形成とパターン化におけるZicファミリーの役割

有賀　純（理化学研）

Zicファミリーは発生過程の中枢神経系に発現するzincフィンガー型の転写因子をコードしている。我々はこの遺伝子ファミリーの神経発生における役割を明らかにするために，マウス，ツメガエル，ニワトリ胚を用いたloss-of-function, gain-of-function解析を進めてきた。その結果，Zicファミリーは神経外胚葉・神経提の形成，神経管の背側・小脳の発生制御など，中枢神経系のパターン形成においてさまざまな役割を持つことが明らかになった。一方，最近，ヒトZIC2が全前脳症の原因遺伝子となっていることも報告されている。神経発生を制御する遺伝子ネットワークでのZicファミリーの位置を明らかにするために，現在，Zicファミリーの発現，機能を制御する因子，下流標的遺伝子について検討している。

(6) 新規 functional cloning 法を用いたグリア分化因子の単離

熊田竜郎，馬場広子，秋田裕美，岩崎靖乃，池中一裕（生理研）

中枢神経系では，共通の前駆細胞である神経上皮細胞から，各々の細胞系譜に特異的な遺伝子発現が行われることによって，多種多様な細胞が発生・分化する。グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)遺伝子の発現は，アストロサイトの分化過程を追跡する上で，非常に有効な指標となる。そこで，GFAP遺伝子の発現を指標とする新規機能発現クローニング法を開発し，アストロサイトへと分化を誘導する因子をコードする遺伝子を単離することを試みた。

当部門では，温度感受性SV40T抗原を持つトランスジェニックマウスであるイモートマウスより未分化なアストロサイト前駆細胞株，HB108-10株が樹立されている。この細胞株は，GFAPプロモーターの下流にレポーター遺伝子であるlacZ遺伝子を持つ融合遺伝子が組み込まれており，32℃ではlacZ遺伝子の発現は認められないが，分化誘導条件（39℃）に培養することで初めてGFAPプロモーターの活性化によるlacZ遺伝子の発現が行われる。このアストロサイト前駆細胞株に対し，分化因子をコードするcDNAを導入すれば，分化を誘導させない条件下（32℃）においても，lacZ遺伝子の発現が認められるものと考えられる。そこで，この細胞株にマウス大脳のcDNAライブラリーを導入し，b-ガラクトシダーゼ（β-Gal）陽性となる細胞を選別し，選別された細胞からcDNAを単離した。

cDNAライブラリーは，レトロウイルスを用いて受容細胞へ導入した。レトロウイルスは，障害性を示さずに受容細胞に対して，目的の遺伝子を１コピーのみゲノム上に組み込むことができ

る。しかし，一般に様々な受容細胞への遺伝子導入効率が著しく低かった。我々は，高力価ウイルスを調製することに成功し，分化の一過程にある細胞においてもライブラリーのスクリーニングを可能にした。

β-Gal陽性細胞は，β-Galの蛍光基質であるFDGを用いてFDG陽性の細胞を検出し，セルソーター（FDG-FACS）を用いて細胞の分別を行った。cDNAの単離法は細胞の増殖に合わせて選択することで，増殖が著しく遅い細胞よりもRT-PCR法によりcDNAの単離を行うことができた。

この新たに確立した方法を用いてアストロサイト分化因子のクローニングを行ったところ，シスタチンCをコードするcDNAが得られた。

(7) 未成熟型オリゴデンドロサイトにおける神経接着分子 L1について

河相皓晃（東京都老人研）

中枢神経系の発達は内外部環境のさまざまなシグナルによって調節を受けて行なわれ，例えばニューロン特有の神経電気活動によるインパルスの伝達機構によって正確な神経回路網が形成されたり，神経の可塑性が起こる。このような神経インパルス伝達機構には軸索とそれを支持するミエリン膜が大変重要な役割を担っている。中枢神経系におけるミエリン形成担当細胞はオリゴデンドロサイトであることからオリゴデンドロサイトの発生・分化とミエリン膜形成期が神経活動に及ぼす影響を調べることは単に神経回路網の形成を理解するだけでなく，広く脱髄を伴った神経疾患に至ることが期待できる。一方，神経電気活動に調節される分子はこれまでによくわかっていなかったが，最近，神経接着分子の発現及び機能が神経活動により調節されることが報告され，ミエリン形成初期過程におけるオリゴデンドロサイトと軸索の認識機構に関与していることが示唆された。そこで今回私達は神経インパルス伝達に関与するオリゴデンドロサイトの機能分化と神経系における多機能接着分子Ｌ１との関係について調べた。

【結果と考察】

神経接着分子Ｌ１の発現は細胞の種類・発達の時期により正確に制御されていることが知られている。Ｌ１は神経細胞やシュワン細胞び特異的に発現しているが，Ｌ１には２種類の選択的スプライシングが存在し，オリゴデンドロサイトにもＬ１が存在することが判明した。

ミエリン膜形成は未成熟オリゴデンドロサイトと未成熟神経細胞の軸索が出会うことから始まり絶縁体ができ神経活動を活発にするが，これまでミエリン膜形成の初期過程における分子機能解明のための手掛かりを得るような情報は少なかったことから，本研究ではオリゴデンドロサイトにおけるＬ１の機能を検討した。

オリゴデンドロサイトのプロジェニター細胞は胎生早期（E9,10）に脳室周囲の神経上皮細胞層に認められ妊娠経過に伴って脳内に広く分布し，生後の新生仔期から成熟期に至るまで白室と

灰白室を含む脳の広い範囲に認められた。このプロジェニター細胞はさまざまな因子の影響下でin vitroで未成熟オリゴデンドロサイトへと分化誘導することが可能であり，このO^{4+}未成熟型オリゴデンドロサイトをさらにミエリン塩基性タンパク（MBP）の細胞内発現分布の違いによって初期O^{4+}未熟オリゴデンドロサイトと後期O^{4+}未熟オリゴデンドロサイトに分類した後にそれぞれRT-PCR法及びウェスタンブロット法によってＬ１の発現パターンの違いを調べた。初期O^{4+}未熟型ではＬ１のスプライシング型が発現しており，後期O^{4+}未熟型では全長型のＬ１が発現していた。さらに興味深いことに，後期O^{4+}未熟型ではmRNAとタンパクレベルでＬ１が増加していた。これらの結果は，後期O^{4+}未熟型オリゴデンドロサイトに発現する全長型のＬ１と軸索に発現している全長型のＬ１が互いにホモフィリックな結合を介してミエリン膜形成開始のシグナル伝達に関与している可能性を強く示唆した。

オリゴデンドロサイトは胎生期のかなり早い時期から発生し，成熟期においてもミエリンを形成していない未熟なO^{4+}オリゴデンドロサイトが多数存在しているというin vivoの所見と合わせて考えるとミエリン膜形成の初期過程におけるL1を介した相互作用が巻くためのシグナルを次にどの系に伝えることが重要なのかなどについて現在検討している。

(8) オリゴデンドロサイトの移動と細胞表面分子

小野勝彦（島根医科大）

中枢神経系が形成される過程において，神経細胞やグリア細胞は脳室層および脳室下層（ventricular layer, subventricular layer）で分化し，その後，機能する部位に向かって移動することが知られている。グリア細胞のひとつであるオリゴデンロサイトは，神経系の発生の初期には脳室層の限局した領域に起源を持ち，白質へ移動し髄鞘形成をするものと考えられている。神経系の細胞が移動する際にはガイドラインとなる構造とともに，細胞表面分子が重要な働きをすることが，さまざまな実験より明らかにされている。本研究では，オリゴデンドロサイトの移動に関与する細胞表面分子を探索する目的で，ニワトリ胚神経組織の培養に細胞接着分子等に対する抗体を用いて，その移動や形態に対する影響を調べた。　実験には，ふ卵6日目（HH stage 28-30）のニワトリ胚の後脳や脊髄を用い，これをラミニンでコートした基質の上で2－6日間培養した。まず，単クローン抗体O^4（オリゴデンドロサイトを前駆細胞の段階から認識する）に陽性を示す細胞（O^{4+}細胞）が発現する細胞表面分子を免疫組織化学的に調べた。その結果，O^{4+}細胞の90%のものがNCAMやHNK-1エピトープを発現していた。また，60～80%のO^{4+}細胞がβ1インテグリンやN－カドヘリンを発現していた。これに対して，L1様分子（8D9抗原）やaxonin-1はこの手法ではO^{4+}細胞にはほとんど認められなかった。次に，組織片培養を行い，抗NCAM抗体（5e，約60μg/ml IgG）または抗β1インテグリン抗体（CSAT，約8μg/ml IgG）を加え

て，組織片から遊走して出てくる細胞の数や移動距離を調べた。その結果，抗NCAM抗体を培養液中に加えた場合には，なにも加えなかったものと比べて，組織片から出てくるO^{4+}細胞の数にはほとんど影響がなく，その移動距離もわずかに減少したにすぎなかった。これに対して，抗β１インテグリン抗体を加えた場合には，培養組織片からの細胞の遊走は，数・距離ともに減少し非常に強く阻害された。培養液中から抗体を除去すると，組織片からは対象群と同じように多くのO^{4+}細胞が遊走して出てきた。さらに，これらの抗体を分散培養に加えて細胞の形態に対する影響を観察した。その結果，抗NCAM抗体を加えた場合には，何も加えなかった場合と同じように細胞は紡錘形，多極形，卵円形などさまざまな形を示したが，抗β１インテグリン抗体を加えた場合には，ほとんどすべての細胞の細胞体は卵円形もしくは円形を示した（N－カドヘリンやHNK-1に関しては現在検討中）。以上の結果は，培養系においてβ１インテグリンは神経系の細胞の移動や形態変化に強くかかわっていることを示している。今後はFabを作成して，この抗体が生体内（ニワトリ胚内）においても同様の阻害効果を示すかどうか，すなわち，生体内でもβ１インテグリンが細胞移動に関与しているかどうかを調べる予定である。

(9) ミクログリアの発生学的起源と新規な性質

澤田　誠（藤田保健衛生大）

ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つ中枢神経系細胞で，炎症反応やウイルス感染において免疫担当細胞として働いたり変性した細胞を取り除く貪食細胞として働くほか，脳内サイトカインネットワークの中心的な細胞である。また最近では学習や記憶といった高次の脳機能の発現にも不可欠であることが示され，脳に特異的な役割を持った特殊化した細胞であると考えられている。現在までのところミクログリアの起源は周産期に脳内に侵入した単球が特殊化して分化すると考えられている。しかし我々はマクロファージが欠損しているop/opマウス脳にミクログリアが存在することを見いだした。op/opマウス脳に存在するミクログリアは骨髄未分化細胞細胞特異抗体（ER-MP12）で染色されることがわかった。また，正常マウス脳にはER-MP12陽性のミクログリアとMac1陽性の２種類のサブタイプが存在し，op/opマウスでは後者が欠損することがわかった。ER-MP12が認識する抗原は単球に分化した細胞や組織マクロファージには発現していないことから，ミクログリアは他の臓器で見られる組織特異的マクロファージとは異なる性質を持つこともわかった。胎仔脳切片をER-MP12で染色して，抗体陽性細胞がe13で存在することが確認できた。したがってミクログリアは骨髄で造血が起こるより早い発生の段階から脳内に存在することになり，その細胞起源はこれまでのミクログリアが骨髄で分化した単球-マクロファージに由来すると考える説では説明できなくなる。我々はミクログリアの細胞起源として，発生の早い段階で造血細胞が肝臓から骨髄に移行する時期（あるいはもっと前の卵黄嚢から肝臓

に移る時期）に骨髄より脳に親和性を持った造血系幹細胞の未分化な細胞群が存在しそれが脳に移行して骨髄とは独立して分化したのではないかと仮定した。この仮定に基づくと，ミクログリアは脳に親和性が高いことになるが，我々は単離したミクログリアとマクロファージを蛍光色素で標識し末梢血管に注入してその配向性を検討し，ミクログリアは脳に侵潤できるがマクロファージはできないことを示した。さらに脳に侵潤したミクログリアは脳内で長期に渡って生存しうることをGFP安定発現ミクログリアを用いて示した。

これまではミクログリアは周産期に脳内に侵入するため，胎仔期に形成される脳の構造の構築や神経連絡には関与せず，また高次の脳機能発現にもまったく関与しないと考えられてきた。しかし脳の発生のかなり早い時期からミクログリアが脳内に存在しているため，何らかの役割を果たしていると考えられる。その一例として神経の可塑性を調節している可能性を考えてみた。我々は新生ラット由来大脳皮質スライス培養に培養ミクログリアを添加すると持続的なevoked potentialの増大が見られることを見いだした。この系ではテタヌス刺激を加えることなく大きなLTP形成が生じる。一般にLTPやLTDなどの可塑性を調べる実験においてテタヌス刺激と呼ばれる高頻度の強い刺激を与えたのちに単回刺激に対する応答を調べる。しかしこのテタヌス刺激は生理的にはほとんどあり得ないと考えられており，実際に脳内ではテタヌス刺激に代わる何らかのメカニズムが神経可塑性を発現させていると考えられている。今回の結果はミクログリアの機能亢進がそのメカニズムに何らかの役割を果たしているように思われる。

（10）神経初期分化の制御機構

笹井芳樹（京都大学再生医科学研究所）

脊椎動物の神経系は発生初期に外胚葉から分化するがその際オーガナイザーから分泌される神経誘導因子が分化誘導を促す。最近分子生物学的方法により神経誘導因子が同定されたが，我々の単離したChordin もその一つである。Chordin は神経分化を抑制する因子BMP-4に拮抗して働き，アフリカツメガエルの未分化外胚葉細胞より神経を分化させる。こうした神経誘導因子研究の最新の知見に加え，この演題では我々が最近同定した神経誘導因子Chordin の下流因子として働く複数の遺伝子について紹介し，神経の初期パターン形成の制御について討論したい。

脊椎動物の神経系がオーガナイザーから分泌される神経誘導因子がコントロールされていることは70年前にドイツの発生学者ハンス・シュペーマンによってオーガナイザーの移植実験によって初めて示された。長年の間この因子の単離が試みられてきたが成功しなかった。数年前からの分子生物学的研究によりようやくその分子実体が明らかになってきた。現在３つ以上の神経誘導因子（Chordin, Noggin,Follistatin) が知られている。

神経誘導因子の単離とともにいくつかの面白い事実が明らかになってきた。（１）神経誘導因

子は未分化外胚葉に働くと神経を分化させるが，未分化中胚葉に働くと脊椎の基になる脊索や筋肉などの基になる体節を分化誘導する。（2）神経誘導因子に拮抗する働きを持つ因子BMP-4 が胚の中に存在し，神経分化や脊索・体節の分化を阻害している。（3）ショウジョウバエにもChordin やBMP-4 に対応する遺伝子が存在し，やはりハエの神経系の分化を制御していることがわかった。

神経誘導因子が働いて神経を分化させるときに働くスイッチの役割をする遺伝子がいくつかわかってきた。我々は神経誘導因子Chordinを作用させた未分化外胚葉とさせていないものとを用いてデファレンシャル・スクリーニングを行い，Chordinで誘導される多数の神経特異的遺伝子を単離した。そのうち3つの転写因子（Zic-related 1, Sox-2, Sox-D）はこれらはごく初期の神経板全体に発現していた。アフリカツメガエルで微量注入法の解析の結果，Zic-related 1, Sox-Dは単独で外胚葉の神経分化を誘導することが明らかとなった。これらは神経分化のごく早い時期にChordinの下流で働くエフェクターとして働き，proneural genesの上流で働くことが示唆された。一方，Sox-2は単独では働かず，FGFと協同的に働いて神経分化を誘導し，コンピテンスを変化させる因子と考えられた。現在，これらの因子とともに，さらに他の多くの単離された因子の活性を詳しく検討中である。

（11）神経幹細胞の同定と濃縮

岡野栄之，榊原伸一，今井貴雄，川口綾乃，澤本和延（大阪大・医）

Mammalian CNS stem cells are multipotential progenitor cells that have self-renewal activities. A single CNS stem cell is capable of generating various kinds of cells within CNS. This process is often mediated by generation of cell-lineage restricted intermediate progenitor cells including neuronal progenitor cells and glial progenitor cells. The underlying mechanisms of these cell-lineage restrictions, however, remain obscure. Another important feature of mammalian CNS stem cells is that they undergo asymmetric cell division at various points. Drosophila external sensory organ is an excellent model system to study the regulatory mechanisms of asymmetric cell division of neural precursor cells and its subsequent cell lineage restriction. Thereare number of Drosophila mutations affecting the development of external sensory organ. musashi is a mutant we identified that show a defect in the development of external sensory organ, which encodes an RNA-binding protein highly enriched in thc nervous system. Our further studies have indicated thetmusashi is regulating the expression of other genes that required for the asymmetric cell division of neural precursor cells at the post-transcriptionallevel.In order to elucidate the functions of Musashi family in mammalian CNS, a gene encoding its mouse

homologue (Musashi1) was isolated. In the developing CNS, mouse Musashi1 expression was highly enriched in the CNS stem cells in asimilar way as Nestin. Single-cell culture experiments indicated that Musashi1 expression is associated with multipotential progenitor cells that are capable of generating neurons and glia. In order to elucidate its function, we performed detrmination of Musashi1 target RNA sequence by SELEX method. Using recombinant Musashi1 protein (two RRMs fused with His tag), the RNAs interacting with Musashi1 were amplified and concentrated exponentialy by repetition of reverse transcription and polymerase chain reaction. SELEX experiments have revealed that the consensus binding sequence of mouse-Musashi-1 is (G/A)UnAGU (n=2 or 3). Based on their expression pattern and putative functions, mRNAs of m-Numb (a membrane-associated protein putatively required for the asymmetric cell division of neural precursor cells) are possible targets of the mouse Musashi1 protein. In vivo functions of Musashi1 are currently being pursued by gene targetting and misexpression using recombinant viruses.Apart from its function, Musashi has been shown to be a versatile marker forCNS stem cells or neural progenitro cells. Since its primary sequence and expression pattern are highly conserved among species, the antibody to mouse Musashi1 can be used as a universal marker for CNS stem cells or neural progenitro cells in the vertebrate animals. So far this is true for song birds, newt, Xenopus, mouse, rat and human. In colaboration with Dr. Steven Goldman in Cornell Medical School, we could identify CNS stem cells in the subependyma facing the lateral ventricle within the adult human brain by using immunoreactivity to Musashi1 and in vitro culture. Adult human brain was shown to contain Musashi1-positive CNS stem cells/neuronal progenitor cells that are capable of generating neurons in some special conditions in vitro, the neuronal outgrowth of which are likely to be tonically inhibited by some environmental factors in vivo. These finding should have strong benefits to thetherapeutics of human neurodegenerative diseases and structural brain damages. Today, we will also mention about our recent strategies to purify the CNSstem cells for future therapeutic applications.

(12) ショウジョウバエgcm遺伝子の発現とグリア・ニューロンの分岐

秋山（小田）康子（京都大学・医）

ショウジョウバエの神経系の幹細胞である神経芽細胞から，神経・グリアの2種類の細胞がどのようにして作られるのか，解析を行っている。まずその第一段階として，神経芽細胞のひとつであるNB6-4Tに注目し，この細胞の分裂と，分裂によって作られる子孫細胞を観察した。NB6-

4Tの最初の分裂はmedio-lateralの方向に起こる。この分裂で作られた娘細胞のうちmedial側に位置する細胞はその後グリア細胞を作り，lateral側の細胞はganglion mother cell（神経母細胞）を生むことが分かった。つまりNB6-4Tの最初の分裂は，神経・グリアという異なる運命をもつ細胞を作り出す非対称な分裂であることが明らかとなった。続いて，NB6-4Tの非対称性がどの時点で生じるかを知るために，glial cells missing（gcm）の発現を観察した。gcmは神経系の細胞の運命をグリアへと決定する遺伝子である。gcm mRNAは，この分裂前にはNB6-4Tの細胞質全体で検出されたが，分裂後にはmedial側の娘細胞だけで発現し，またGCMタンパク質は分裂後にこの娘細胞だけで検出された。分裂の際にgcmの発現が転写，転写後，翻訳などさまざまなステップで制御を受け，異なる運命の細胞が作り出されると考えられる。現在，この非対称な細胞分裂が起こる機構に関して解析を行っている。

（13）視蓋の誘導・分化・極性

仲村春和（東北大学加齢医学研究所）

鳥類の視蓋は視覚の中枢として機能するが，そのためにまず中枢神経系の中で視蓋としての決定を受け，その後視蓋の中で位置特異性が決まり，それに応じて網膜線維の標的認識に関わる分子の発現があると思われる。

中脳後脳境界部（峡部）にはたくさんの分子の発現が見られるが，実験発生学的研究により峡部は中脳の形成中心として働くことが示された。すなわち，間脳胞を中脳胞の後ろに移植すると移植片は視蓋として分化し，峡部を間脳胞に移植すると移植片の周りの組織は視蓋として分化した。その後，Fgf8をしみこませたビーズを間脳に移植する実験により，Fgf8がそのシグナル分子であると思われている。

私たちは峡部で発現している遺伝子Pax5に注目し，最近開発されたin ovoエレクトロポレーションにより中脳から間脳にかけて異所的に発現させたところ，視蓋の領域が大きくなった。組織学的に検索した結果，間脳が視蓋に分化転換していることがわかった。Pax5強制発現後下流遺伝子に対する影響を調べてみると，Wnt-1,En-2など峡部で発現している遺伝子の発現が誘導されていた。視蓋後ろで発現し，標的選択と関わりのあるephrin-A2遺伝子の発現も誘導された。さらに視蓋の誘導物質であるFgf8の発現も誘導されていた。そこで，マウスのFgf8をエレクトロポレーションで強制発現させ，Pax5とニワトリFgf8のプローブを使ってinsituhybridizationを行った結果Fgf8とPax5は互いにその発現を誘導しあうようなポジティブなフィードバックループを作っていることがわかった。 Engrailed（En）も峡部で強く発現し，視蓋原基の前に来るほど弱いという勾配を持って発現しているが，Enをレトロウイルスベクターを用いて強制発現させたところ，視蓋の後ろに投射する，網膜鼻側線維は至る所で，分枝し，耳側線維は視蓋に進入できな

いことがあった。その後，Enにより，ephrinA2やephrinA5が誘導されることが明らかになったので，網膜耳側線維が視蓋に侵入できなかったのは，これら分子が誘導されたためと結論づけられた。網膜鼻側線維に対する吸引物質はまだ見つかっていない。このようにEnは視蓋に後ろとしての性質を付与することが明らかにされた。

Otx2とGbx2遺伝子は発生の早い時期から発現が見られ，Otx2遺伝子は吻側，Gbx2遺伝子は尾側に発現している。10体節基頃になると，峡部で両者は境を接し，もはや重複して発現されることはない。この発現境界が視蓋の後ろ境界に相当するという報告がある。これら遺伝子をエレクトロ歩レションで強制発現させた。後脳にOtx2を強制発現させるとGbx2の発現が抑えられ，Fgf8の発現は誘導される。そして，Otx2の強制発現部位は視蓋として分化した。Gbx2を中脳で強制発現させると，Otx2の発現が抑制され，異所的なGbx2発現部位の周りにFgf8の発現が見られた。これらのことより，Otx2とGbx2の発現境界部にFgf8の誘導があることがわかった。正常発生でもGbx2とOtx2の発現境界部にFgf8の発現部位すなわち形成中心の位置が決まるものと思われる。

まとめると，Otx2とGbx2の発現により視蓋の形成中心が決まり視蓋としてのコンパートメントの決定が起こると考えられる。その活性にはFgf8とPax5の相互作用が重要である。その後視蓋内でEnなどの働きにより，位置特異性が決まり，それによって標的選択に関係のある分子の発現が起こると考えられた。

(14) 僧帽細胞軸索をガイドするlot細胞

平田たつみ（名古屋大学大学院・理）

終脳の吻側端には嗅球という突出した構造がある。僧帽細胞はこの嗅球の主要な出力神経細胞で，軸索を終脳の尾側へと伸長させ嗅索（lateral olfactory tract）と呼ばれる軸索束を形成する。我々はモノクローナル抗体作製を通して，発生時に僧帽細胞の軸索をガイドし嗅索領域に導く役割を果たすと考えられる特殊な神経細胞群を発見し，lot細胞と名づけた（Sato, et. al, 1998）。lot細胞はマウス胚終脳で最も早く分化する神経細胞で，胎生9.5-10.5日目に最終分裂を終える。形態的にはCajal-Retzius細胞に類似しており終脳表層に分布するが，興味深いことにReelinはほとんど発現していない。lot細胞は胎生12.5日目で初めて抗体により識別できるようになるが，この時にはすでに予定嗅索領域上に配向して将来伸長してくる僧帽細胞軸索を待ち受けるかのような分布をとっている。そのためこの細胞がどこの神経上皮からからどのようにして発生し，予定嗅索領域に選択的に分布するようになるのかについては不明であった。本研究会では，lot細胞の発生および移動過程に関する最近の我々の解析結果も交えて紹介したい。 Sato, et al., J. Neurosci. 18, 7800-7810 (1998)

（15）小脳皮質構築におけるReelinおよびmDabの役割ー細胞移動と葉形成ー

小川正晴（高知医大）

小脳皮質は多数の横に並んだ細い小葉から構成され，その内部は表面から分子層，Purkinje細胞層，顆粒細胞層からなる層構造をしている。ミュータントマウスのreelerの小脳では，このような層構造が異常になると同時に小葉が形成されない。私たちは，reelerをモデルに，小脳の規則的な層構造と葉形成の機構の解析を行っている。これまでに，顆粒細胞から特異的に一過性に分泌される糖蛋白質Reelin，reelerの原因遺伝子Relnの翻訳産物，がPurkinje細胞の位置配列に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。一方，reelerにほぼ一致したphenotypeを示す新たなミュータントマウス，yotari, scramblerが近年見いだされた。これらは，Purkinje細胞などに発現する（顆粒細胞には発現しない）mdab1のmutationによるmDab1蛋白の欠損による。mDab1は細胞質蛋白で，リン酸化されて非受容体型チロシンキナーゼ（Src, Abl, Fyn）等に結合し，シグナルtransductionのアダプター因子と考えれている。Reelinを中心に，Purkinje細胞の位置配列，葉形成の機構について，実験と考察を紹介したい。

14. ABC蛋白の多機能性と生命維持機構

1997. 12. 1－12. 2

代表者：植田和光（京都大・農・応用生命）

世話人：岡田泰伸（生理研）

（1）ATP依存性酵素の動力学的X線結晶構造解析

加藤博章（京都大学化学研究所）

（2）シャペロンによる基質認識とシャペロン・基質共発現機構

永田和宏（京都大学再生医科学研究所）

（3）ABC蛋白スーパーファミリーによる異物排出機構の解析

鈴木 洋史（東京大学薬学部）

（4）ヒトcMOATの遺伝疾病と癌への関与

内海　健（九州大学医学部）

（5）ペルオキシソーム膜ABC 蛋白の構造・機能と遺伝病

今中常雄（富山医科薬科大学）

（6）植物の ABC 蛋白によるアルカロイド輸送制御と生体機能維持機構

矢崎一史（京都大学大学院農学研究科）

（7）酵母の多剤耐性における多様なABC 蛋白の機能および発現制御ネットワーク

宮川都吉（広島大学工学部）

（8）ATP感受性カリウムチャネルの分子制御機構と生理作用

堀尾嘉幸（大阪大学医学部）

（9）ABC蛋白によるイオンチャネルの制御機構

稲垣暢也（秋田大学医学部）

(10) 多機能蛋白としてのCFTRとその調節

大谷秀夫（京都大学大学院医学研究科）

(11) CFTRクロライドチャネル蛋白の多機能性と細胞容積調節機構

岡田泰伸（生理学研究所）

(12) ABC蛋白の機能の多様性の分子基盤

植田和光（京都大学大学院農学研究科）

(13) 酵母液胞膜の膜融合機構

佐藤　健（名古屋大学理学部）

(14) 蛋白質の相互認識とシャペロン型Nucleoside Diphosphate Kinase活性

— HSP70 からProteasomeにかけて—

木戸　博（徳島大学酵素化学研究センター）

(15) F1ATPaseの回転触媒機構

吉田賢右（東京工業大学資源化学研究所）

(16) 分子モーターにおける化学力学共役

柳田敏雄（大阪大学医学部）

参加者名

植田和光，木岡紀幸，松尾道憲，天知輝夫，田邊公一，小峰　淳，西谷真人，田中亜路，三木絵里加，矢崎一史，土反伸和，左海匡子，山中奈緒（京都大・農・応用生命），加藤博章（京都大・化学研），永田和宏（京都大・再生研），岡田泰伸（生理研），佐藤　健（名古屋大），稲垣暢也（秋田大・医），堀尾嘉幸（大阪大・医），大谷秀夫（京都大・医），木戸　博（徳島大），吉田賢右（東京工大），内海　健（九州大・医），柳田敏雄（大阪大・医），中田正範（鹿児島大・医），石川智久，水谷真由美（ファイザー中研），鈴木洋史（東京大・薬），堀江　稔（京都大・医・循環病態学第3内科），今中常雄，守田雅志（富山医薬大），宮川都吉（広島大・工）

研究会概要

ABC蛋白は，細胞内ATPをエネルギーとして利用するだけでなく，細胞環境をモニターするシグナル分子として利用し，細胞の生命維持に重要な役割を果たしている。たとえば膵β細胞では，ABC蛋白であるSURが細胞内ATP/ADP濃度をモニターし，Kチャネルを開閉することによって，結果としてインスリン分泌を制御している。同じくABC蛋白であるCFTRは生理的に重要なクロライドチャネルであり，MDR1やMRPは抗癌剤耐性にかかわる薬剤排出ポンプである。このようにABC蛋白の機能はポンプ，チャネル，レセプターと多様であるとともに，1つのタンパク質が2つ以上の機能を持つという報告が次々に出されている。本研究会では，それぞれのABC蛋白の機能と生理的重要性について発表があった。それぞれのABC蛋白の研究がさらに深まるとともに，相互に比較されることによって，ABC蛋白がポンプ，チャネル，レセプターという多様性および多機能性を持ち得る秘密と，ABC蛋白による生命維持機構についての理解が深まった。さらに，ABCタンパク質以外で細胞内ATPで制御されている生理的に重要なタンパク質でしかも日本において最先端の研究が展開されている酵母液胞膜膜融合機構，分子シャペロン，F1ATPase，分子モーターなどに関して報告され，ABC蛋白との機能の相違に関して討論があった。

(1) ATP依存性酵素の動力学的X線結晶構造解析

加藤博章（京都大学化学研究所）

酵素の優れた性質は，その構造変化に秘密がある。したがって，酵素の仕組みを探るためには，実際に働いている状態の構造を直接見なければならない。そのためには，三次元構造に時間軸を加えた「四次元構造」を求めることが必要になる。本講演では，四次元構造研究の絶好の手段として期待されている新しいX線結晶学の手法，動力学的結晶解析（kinetic crystallography）あるいは，時分割X線結晶解析（time-resolved crystallography）と呼ばれる手法を用いて行ったATP依存性酵素の反応機構解析について紹介する。酵素反応のkinetic crystallographyとは，反応途中に生じる寿命の短い分子種を酵素ともどもX線結晶解析で捉え，立体構造の動き（時間変化）を原子レベルで明らかにすることである。我々は，グルタチオン合成酵素が触媒するリン酸化反応について，解析に適した反応系を構築し，第三世代放射光をX線源とするラウエ法と迅速冷却法を用いて四次元構造の解析を試みてきた。そこで，その取り組みについて述べるとともに，本法の可能性について論じる。

(2) シャペロンによる基質認識とシャペロン・基質共発現機構

永田和宏（京都大学再生医科学研究所）

ストレス蛋白質 HSP47 は，小胞体に存在するコラーゲン特異的分子シャペロンである。コラーゲンに特異的に結合する基質特異性をもった分子シャペロンであることに加えて，その発現が常にコラーゲンの発現と共役している点が大きな特徴である。

最近われわれは，HSP47 の発現調節機構を明らかにするためにプロモーター解析を行い，HSP47 のコラーゲンとの共発現には，上流のプロモーターの他に，第１イントロン中のエレメントが重要であることを明らかにした。ＨＳＰ47遺伝子をノックアウトすると，10.5日目に胎生致死となり，HSP47 が発生に必須の遺伝子であること，ホモノックアウトマウスではコラーゲンのmaturation に異常が起き，プロコラーゲンのまま蓄積することによって，細胞外にコラーゲン繊維の蓄積が見られず，細胞がアポトーシスによって死ぬことが明らかになった。また，ＨＳＰ47によって認識されるコラーゲンの構造を合成ペプチドを用いることによって検討したところ，ＨＳＰ47はコラーゲンのモデルペプチドである（Gly-Pro-Pro)ｎ が7回以上繰り返す配列を認識すること，さらに，３番目のProの水酸化によって HSP47 が基質から遊離することが明らかになった。分子シャペロンが基質から遊離する機構としては初めてものである。

(3) ABC蛋白スーパーファミリーによる異物排出機構の解析
ークローン化されたラットMRP3の機能解析ー

鈴木洋史（東京大学薬学部）

我々はすでにラットおよびヒトmultidrug resistance associated protein 3（MRP3）のcDNAクローニングを行ってきている。今回，ラットMRP3 cDNAの安定発現系を，HeLaおよびLLC-PK1細胞を基に作成し，その膜ベシクルを用いた輸送実験を行った。その結果，MRP3は17b estradiol-17b-D-glucuronideや，種々異物のグルクロン酸抱合体，methotrexate等を良好な基質とするものの，グルタチオン抱合体（2,4-dinitrophenyl-S-glutathione, leukotriene C4）をpoor substrateとしてしか認識しない点で，MRP1およびMRP2と大きく異なることが示された。本研究結果は，MRP間での基質特異性の差異を示した始めての例であり，今後MRP1とのキメラ作成等により基質認識機構が明らかにされることが期待される。

(4) ヒトcMOATの遺伝疾病と癌への関与

内海　健（九州大学医学部）

肝，腎，膵，腸管粘膜や血液脳関門は，様々な異物を解毒，抱合し排泄するという極めて重大な機能を持つ。輸送体の分子的実体については，MDR1とcanalicular multispecific organic anion transporter（cMOAT）が明らかにされ，また，これらの分子輸送体は多くの坑がん性薬剤を排出することにより，哺乳類細胞の薬剤耐性の獲得に深く関与している。我々は，新規のABC蛋白cMOAT1とMRP 3 を単離したcMOAT1,MRP 3 はそれぞれアミノ酸1545，1527からなり，MRPに類似の蛋白であった。cMOAT1,cMOAT2は特に，肝臓での発現が強く，小腸においても，中程度の発現が見られた。cMOAT1遺伝子のアンチセンス，及び，強制発現株の実験より，cMOAT1はシスプラチンやヴィンクリスチンを基質として，排出することが示唆された。cMOATがヒトDubin-Johnson syndromeの原因遺伝子であるとことをあきらかにした。これらのD－Jにおける変異はでATP結合領域にあることを明らかにした。

(5) ペルオキシソーム膜ABC 蛋白の構造・機能と遺伝病

今中常雄（富山医科薬科大学）

ペルオキシソーム膜上には，4種のABC蛋白が局在している。PMP70は，脂肪酸β酸化系酵素ならびにペルオキシソーム数の増加する条件下，顕著に誘導される特性をもつ。前回，PMP70はposttranslationalにペルオキシソーム膜にアセンブルすること，長鎖acyl-CoAに特異性を示す輸送担体である可能性を指摘した。今回，EAA-like，Walker A motifの部位特異的変異，Walker B motifを含むC末端を欠失したPMP70をCHO細胞に安定発現し，その機能変化を解析した。3種の変異型PMP70発現細胞において，対照細胞に比べPMP70発現量が約2倍増加した。また3種変異型PMP70ともペルオキシソームに局在化した。Palmitateのβ酸化についてみると，変異型PMP70発現細胞では，対照に比べそのβ酸化が50-70%抑制された。一方，ペルオキシソームの数やサイズは，対照，野生型ならびに変異型PMP70過剰発現細胞間で差がなかった。PMP70は長鎖acyl-CoAを認識する輸送担体であること，ペルオキシソームの形成，増殖には関与しないことが強く示唆される。

(6) 植物の ABC 蛋白によるアルカロイド輸送制御と生体機能維持機構

矢崎一史（京都大学大学院農学研究科）

植物は，自身の生産する生理活性二次代謝産物の毒性を回避するため，これら代謝産物を細胞外へ排出，ないしは液胞内へ隔離する機構を有する。我々は，アルカロイド生産性のオウレン培養細胞をモデル実験系として用い，この植物細胞の物質輸送機構を解析している。このアルカロイド輸送は，ATP に依存的であること，液胞膜のΔpHに非依存的であること，P-糖蛋白質阻害剤に感受性であることが示された。そこで我々は，ABC蛋白をクローニングすべく，既知の保存配列からプライマーを作製し，オウレン培養細胞のRNAを用いてnested RT-PCR，5'-及び3'-RACEを行い，約4kbのcDNAを得てその全塩基配列を決定した。本クローン（Cjmdr1）は，Mdr サブファミリーに属しArabidopsisから得られているAtPGP1 ～ 3と42～64%のアミノ酸相同性を有していた。

(7) 酵母の多剤耐性における多様なABC 蛋白の機能および発現制御ネットワーク

宮川都吉（広島大学工学部）

酵母はゲノム全塩基配列が明らかにされたことにより，動物細胞のＰ糖タンパク様あるいはMRP様ABCタンパクと相同性の高いタンパクをコードする遺伝子が合計12個も存在することが明らかになった。機能が知られているのは，5個に過ぎない。機能未知なABCタンパクの生理機能の解析を行っている。zds1破壊株はCa^{2+}感受性を示し，Ca^{2+}存在下に細胞周期G2期が遅延すると共に，芽が異常形態（極性生長）する。Ca^{2+}はカルシニューリンおよびMpk1 MAPキナーゼ両経路の活性化によりこのような異常を引き起こしていることを明らかにした。私たちはこの機構を解析するうち，機能未知なPDR15遺伝子における変異により，Ca^{2+}シグナル伝達に欠陥を生じることを見出した。実際PDR15を破壊することにより，zds1破壊株のCa^{2+}感受性は抑圧され，形態も正常化した。Ca^{2+}ホメオスタシスへのPdr15の関与を検討している。

(8) ATP感受性カリウムチャネルの分子制御機構と生理作用

堀尾嘉幸（大阪大学医学部）

KATPチャネルはABC蛋白質の１つのスルフォニルウレア受容体（SUR）サブユニットと内向き整流K^+チャネルサブユニット(Kir)から構成されている。KATPチャネルのK^+透過性（コンダクタンス）はKirがKir6.1であれば約40pS，Kir6.2であれば80pSとなる。どの領域がコンダクタンスの違いをもたらすかをキメラチャネルを用いて検討した。その結果，いずれも細胞外領域にあるS113とV138（Kir6.2）が大切で，この２アミノ酸をKir6.2でKir6.1型に変えるとコンダクタンスが小さくなり，Kir6.1でKir6.2型にすると逆に大きくなった。S113に相等するアミノ酸残基はチャネルポアにあるR136の立体的な位置を変化させ，一方，V138はチャネルのK^+入口部にあって，その側鎖の長さがK^+とチャネルの相互作用に影響することが想定された。

(9) ABC蛋白によるイオンチャネルの制御機構

稲垣暢也（秋田大学医学部）

KATPチャネルは，心筋や神経細胞では特に虚血時における細胞保護作用や虚血耐性に関与することが示唆されているが，今なおその役割は不明である。従来より，KATPチャネルは脳に広

く分布し，特に黒質に多量に発現することが，放射線標識グリベンクラミドの結合実験や電気生理学的研究から知られている。最近では，in situ hybridizationにより神経細胞にSUR1とKir6.2が共在するという報告もあり，神経細胞においては膵b細胞型（SUR1/Kir6.2）KATPチャネルの発現が示唆されているが詳細は不明である。そこで，膵b細胞型と心筋・骨格筋型（SUR2/Kir6.2）のKATPチャネルに共通なKir6.2のノックアウト（KO）マウス（千葉大学清野教授より提供）ならびに対照マウスの黒質神経細胞を単離し，パッチクランプ法を用いて電気生理学的ならびに薬理学的を行った。対照マウスの黒質神経細胞には膵b細胞型のKATPチャネル（SUR1/Kir6.2）電流が観察されたが，KOマウスの黒質神経細胞においてはそれが認められなかった。今後，このKOマウスを用いることにより，脳の代謝レベル変動時におけるKATPチャネルの役割を明らかにしたい。

（10）多機能蛋白としてのCFTRとその調節

大谷秀夫，堀江　稔，鷹野　誠（京都大学大学院医学研究科）

心筋では，先行する短時間虚血がその後の強い虚血に対する耐性を誘導する。これには虚血によるATP 欠乏で活性化する KATP チャネルの関与が示唆されている。KATP チャネルのポア蛋白（Kir6.x）にはATP 結合モチーフがなく，他の ABC 蛋白との共役が必要である。その候補としてのCFTR遺伝子を培養細胞で Kir6.1 と共発現させると，Kir6.1 のチャネル特性には変化がないものの KATP チャネルの特徴である sulfonylurea（SU）感受性が出現した。しかし，ATP 感受性は見られなかった。SU 受容体（SUR）を共発現させると，SU 感受性，ATP 感受性が見られるようになった。ラットでは心筋虚血刺激後 Kir6.1 のmRNAレベルは遅延性に数倍増加するが，Kir6.2, SUR に変化はない。心筋の虚血保護には細胞膜よりミトコンドリアの KATP チャネルが重要とされる。GFP をトレーサーとして共焦点レーザー顕微鏡で Kir6.x の細胞内分布を検索すると，Kir6.2は SUR の共発現下で細胞膜へ移行するが，Kir6.1 はミトコンドリアに分布する。これに関してはさらに詳細に検討中である。

（11）CFTRクロライドチャネル蛋白の多機能性と細胞容積調節機構

岡田泰伸，挾間章博，赤塚結子，清水貴浩（生理学研究所）

嚢胞性線維症原因遺伝子の産物であるCFTRは，cAMP依存性Cl^-チャネルとして機能すると共に，他のいくつかのイオンチャネルのレギュレータとして働く。最近，CFTRが細胞外ATP放出

にも関与することが報告されたが，我々も浸透圧性細胞膨張によって引き起こされるATP放出はCFTR強制発現細胞においてより著しい事を見出している。容積感受性Cl^-チャネルがATPアニオンを通し，これをCFTRが制御する可能性をまず想定し，本Cl^-チャネルの各種阻害剤のATP放出への影響やATP放出抑制抗体の本Cl^-チャネル活性への影響を検討した結果，その可能性は否定された。今後，CFTR自身によるATP透過の可能性や放出ATPの容積調節における役割などを調べて行きたい。

(12) ABC蛋白の機能の多様性の分子基盤

植田和光（京都大学大学院農学研究科）

ABCタンパク質は，よく保存されたATP結合ドメイン(ATP-binding cassette)を1機能分子あたり2つもつ膜タンパク質の総称である。いづれも細胞内ATPによって駆動あるいは制御されているが，トランスポーター，チャネル，受容体（レギュレーター）という多様な機能もった膜タンパク質に分化している。さらに，P糖タンパク質やCFTRは多機能性を示し，2つ以上の機能をあわせもつ。生物はABCタンパク質をさまざまな活性をもつ膜タンパク質に進化させ，外界の有害物や環境変化に対応している。我々は，トランスポーターであるMDR1と，チャネルレギュレーターであるSUR1のATP，ADPとの相互作用を生化学的に解析し，その相違を明らかにすることによって，なぜABCタンパク質が多様な機能を発揮するのかを解明しようとしている。

(13) 酵母液胞膜の膜融合機構

佐藤　健（名古屋大学理学部）

生体内での膜融合は普遍的な膜融合装置を介して行われる。講演者は，酵母の液胞と液胞の融合過程をその制御系も含めた形で可溶化・再構成することに成功した。小胞輸送におけるターゲティングは，輸送小胞上のv-SNAREとターゲット膜上のt-SNAREとの間の相互作用によって行われるという，いわゆる「SNARE仮説」が広く受け入れられている。ところが，講演者らはこの再構成系を用いた実験などから液胞どうしの融合過程にはv, t-SNARE間の相互作用よりも前に，Rab/Ypt7p(低分子量GTPase)に依存してお互いを認識するステップがあるという結果を得た。このターゲティングはSNAREを欠損した液胞においても見られることから，「SNARE仮説」は大きな修正を迫られることとなった。これら一連の研究は膜融合の分子機構を解明する上で画期的なものであり，今後の進展が注目される。

(14) 蛋白質の相互認識とシャペロン型Nucleoside Diphosphate Kinase活性 —HSP70 から Proteasome にかけて—

木戸　博（徳島大学酵素化学研究センター）

分子シャペロンの代表的な蛋白質の１つHsp70は，弱いATPase活性を持ち蛋白質のRefoldingに関与している。一方蛋白分解酵素のいくつかは，その分子内あるいはコファクターとして分子シャペロン蛋白質を持ち，蛋白質の立体構造を解きほぐしながら，基質を分解すると推定されている。我々は，Hsp70の持つ酵素活性が，ATPaseではなくATPとADP間でリン酸基を交換するNucleoside Diphosphate（NDP）Kinaseとして作用することを見い出した。しかも従来報告されていたNDP Kinaseとは基質特異性を異にすることから，この酵素活性を"シャペロン型 NDP Kinase"と名付けている。このシャペロン型NDP Kinase活性は多機能蛋白分解酵素の20SプロテアソームのZサブユニットに組み込まれている事を見い出した。これ等に共通するシャペロン型NDP Kinaseは，ATPの分解エネルギーをほとんど消費することなく，ATPとADPの結合を切り変えによるAllosteic modulationを誘導すると推定される。

(15) F1ATPaseの回転触媒機構

吉田賢右（東京工業大学資源化学研究所）

ATP合成酵素は，分子量約50万の巨大な膜タンパク質であり，ヒトや植物から大腸菌にいたるまで生体が必要とするATPの大部分を合成している重要な酵素である。私たちは，昨年，この酵素の中央にあるγサブユニットが，触媒作用に伴って物理的に回転する様子を撮影することに成功した。ATP合成酵素は地上最小，史上最初のモーターだった。この回転について詳細に研究した結果，現在までに，以下のことがわかってきた。

（1）ATP 濃度を1mM 以下にすると，γサブユニットは，120度ごとのステップで回転する。すなわち，120度すばやく回転し，そこでしばらく休み，また120度すばやく回転する。ATP合成酵素は，ステッピングモーターである。

（2）120度の回転をするときのトルクを，回転のスピードと水中の抵抗から計算してみると，約40pN nm となる。これを1モルに換算してエネルギーを計算すると，約50 KJ/mol となる。ATP１モルの加水分解で生じるエネルギーは，実験条件下でやはり50 KJ/mol 程度である。したがって，ATP1モルの加水分解で120度回転すると考えると，ATP合成酵素は，エネルギー変換効率がほとんど100%となる。100%のエネルギー変換効率というのは，（熱機関ではないので，熱力学に背馳しないとはいえ）驚くべき効率である。ATP合成酵素は，史上最高の効率のよいモータ

ーであるらしい。

(16) 分子モーターにおける化学力学共役

柳田敏雄（大阪大学医学部）

15. 脳磁場計測によるヒト脳機能の解析

1998. 12. 2－12. 4

世話人：柿木隆介，橋本　勲（生理学研究所統合生理研究施設）
栗城真也（北海道大学電子科学研究所）

（1）脳機能研究のためのREALTIME脳磁場測定システム

岡村昇一[1]，荒川　彰[1]，梶原茂樹[1]，冨田　定[1]，冨田　司[1]，大谷芳夫[6]，吉川健治[2]
大嶋英之[4]，谷川昌司[5]，平野哲夫[7]，吉田佳一[1]，江島義道[5]，高梨芳彰[3]，外山敬介[2]
([1]株式会社島津製作所基盤技術研究所，[2]京都府立医大第2生理学教室
[3]京都府立医大神経内科，[4]京都府立医大脳神経外科
[5]京都大学大学院人間・環境学研究科，[6]京都工芸繊維大学工芸学部
[7]京都府立心身障害者福祉センター附属リハビリテーション病院）

（2）Multi modalityの中のMEG　－PET, fMRIとの共存，自己主張－

中村昭範[1]，加藤隆司[1]，伊藤健吾[1]，永野敦子[1]
山田孝子[2]，阿部祐士[2]，堀部賢太郎[2]，加知輝彦[2]
([1]長寿医療研究センター生体機能研究部，[2]国立中部病院神経内科）

（3）Time-Frequency MEG-MUSIC アルゴリズム

関原謙介（科学技術事業団「心表象」プロジェクト）

（4）Movement-related desynchronizationの脳磁界計測

谷口理章[1]，平田雅之[1]，加藤天美[1]，Robinson　SE[2]，Cheyne　D[2]
二宮宏智[1]，丸野元彦[1]，吉峰俊樹[1]
([1]大阪大学脳神経外科，[2]CTF Systems Inc）

（5）発声関連脳磁場の検討

軍司敦子，宝珠山稔，柿木隆介（生理学研究所）

（6）単一神経線維活動磁界のコンピュータ．シミュレーション：正常神経線維と障害神経線維についての検討

岩瀬嘉志[1]，黒沢　尚[1]，落合直之[2]，益子拓徳[3]，今田俊明[3]，橋本　勲[4]
([1]順天堂大学整形外科，[2]筑波大学整形外科，[3]NTT基礎研究所情報科学研究部
[4]東京都精神医学総合研究所精神生理，生理学研究所）

（7）後脛骨神経刺激一次反応における高周波応答：Time-frequency domain MUSIC algorithmによる解析

佐久間研司[1]，　橋本　勲[1,2]，　関原謙介[3]，　井口義信[2]，　木村友昭[4]，斎藤泰彦[5]
([1]生理学研究所，[2]東京都精神医学総合研究所 精神生理研究部門
[3]科学技術事業団「心表象」プロジェクト，[4]筑波技術短期大学・鍼灸学科，[5]足利工業大学）

（8）体性感覚誘発磁界の時空間・周波数解析

平田雅之[1]，加藤天美[1]，谷口理章[1]，二宮宏智[1]
丸野元彦[1]，Robinson SE[2]，Cheyne D[2]，吉峰俊樹[1]
([1]大阪大学脳神経外科，[2]CTF Systems Inc.)

（9）嗅覚情報処理に関わる脳内部位推定

綾部早穂[1,2]，小早川達[2]，後藤なおみ[2]，斉藤幸子[2]
([1]学術振興会特別研究員・筑波大心理，[2]生命工学工業技術研究所)

(10) ニオイの脳磁図計測－オドボール実験，並びにsniffing実験について－

外池光雄[1]，浜田隆史[1]，山口雅彦[1]，岩木　直[1]，嘉悦　勲[2]
([1]電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター
[2]近畿大学理工学部原子炉工学科)

(11) 味覚脳磁場計測：異なる味濃度と味質への応答

小早川達[1]，斉藤幸子[1]，金田弘挙[1,2]，綾部早穂[1,3]，小川尚[4]
([1]生命研，[2]サッポロビールKK，[3]筑波大，[4]熊本大医)

(12) 脳磁場計測によるヒト味覚関連中枢応答特性の解析

高橋佳代[1]，永井　元[2]，吉村真一[4]，山口雅彦[3]，外池光雄[3]，山本　隆[1]
([1]大阪大人間科学行動生理，[2]サントリー（株）商品開発研
[3]電総研大阪LERC，[4]飛鳥電機製作所)

(13) MEGによる機能診断を正確に手術に応用する工夫

落合真人，大平貴之，大泉太郎，金子康生，木村重仁，河瀬　斌（慶応大学脳外科）

(14) 格子点移動法のてんかん外科への臨床応用

大嶋英之[1]，高梨芳彰[2]，岡村昇一[3]，梶原茂樹[3]，松本圭吾[1]，岩本一秀[4]，峯浦一喜[1]
([1]京都府立医科大学脳神経外科，[2]京都府立医科大学神経内科
[3]株式会社島津製作所基盤技術研究所，[4]大阪鉄道病院神経内科)

(15) Synthetic aperture magnetometry (SAM) を用いたてんかん性異常波の解析

二宮宏智[1]，谷口理章[1]，加藤天美[1]，平田雅之[1]
丸野元彦[1]，新居康夫[1]，Robinson SE[2]，吉峰俊樹[1]
([1]大阪大学医学部脳神経外科，[2]CTF Systems Inc.)

(16) 難治性てんかん症例のMEGによる発作間歇期異常波の伝播解析

中里信和[1]，菅野彰剛[2]，畑中啓作[3]，永松謙一[1]
石飛真美子[4]，社本　博[1]，大槻泰介[1]，吉本高志[1]
([1]東北大学医学部脳神経外科，[2]広南病院療護センター
[3]エレクタ（株），[4]東北大学医学部小児科)

(17) MEGを用いたてんかん発作性の失語症状を有する症例の検討

山田康一郎，白石秀明，渡辺裕貴，八木和一
（国立療養所静岡東病院（てんかんセンター））

(18) 頭蓋内病変症例における体性感覚誘発磁界の信号源偏位の評価

永松謙一[1]，中里信和[1]，井上　敬[1]，大友　智[1]
菅野彰剛[2]，畑中啓作[3]，隈部俊宏[1]，嘉山孝正[4]，吉本高志[1]
（[1]東北大学医学部脳神経外科，[2]広南病院療護センター
[3]エレクタ（株），[4]山形大学医学部脳神経外科）

(19) 脳磁図による遷延性意識障害患者の残存脳機能評価

菅野彰剛[1]，中里信和[2]，藤原　悟[1]，永松謙一[2]，畑中啓作[3]，吉本高志[2]
（[1]広南病院療護センター，[2]東北大学脳神経外科，[3]エレクタ（株））

(20) 聴覚誘発電位と磁場に対する刺激間隔と休憩の効果

鬼塚俊明[1,2]，二宮英彰[1]，佐藤栄剛[1]，山本智矢[3]，田代信維[1]
（[1]九州大学医学部神経精神医学教室，[2]白十字病院，[3]九州大学医学部耳鼻咽喉科学教室）

(21) 絶対音感を持つ音楽家の聴覚皮質の活動

平田恵啓[1]，栗城真也[1]，クリスト・パンテフ[2]
（[1]北海道大学電子科学研究所，[2]ミュンスター大学）

(22) 四重複合音課題による集中力の誘起した聴性脳場応答解析

岩橋正國[1]，吉田秀樹[1]，浜田隆史[2]，山口雅彦[2]，外池光雄[2]
（[1]東和大学電気工学科，[2]電子技術総合研究所大阪ライフエレクトロニクス研究センター）

(23) 言語音（「あ」）と非言語音（ホワイトノイズ，純音1kHz)刺激による聴覚誘発脳磁場の検討；Lateralizationを中心に

平野哲雄[1]，高梨芳彰[2]，吉川健治[3]，岩本一秀[2]
山本孝徳[2]，大嶋英之[4]，広田明人[5]，馬場俊輔[5]，中島健二[2]
（[1]京都府立心身障害者福祉センター附属リハビリテーション病院
[2]京都府立医科大学神経内科，[3]京都府立医科大学第二生理学教室
[4]京都府立医科大学脳神経外科，[5]京都府立医科大学歯科）

(24) 刺激純音の属性とoffset反応増強

渡辺昌洋，今田俊明（NTT 基礎研究所）

(25) 周辺刺激による明暗コントラスト抑制現象の解析

大谷芳夫[1]，岡村昇一[2]，谷川昌司[3]，吉田佳一[2]
吉川健治[4]，高梨芳彰[5]，江島義道[3]，外山敬介[4]
（[1]京都工芸繊維大学工芸学部，[2]株式会社島津製作所基盤技術研究所
[3]京都大学大学院人間・環境学研究科
[4]京都府立医大第2生理学教室，[5]京都府立医大神経内科）

(26) パターンリバーサル刺激および文字オンセット刺激による視覚誘発脳磁図の比較

畑中啓作[1]，奥田次郎[2]，鈴木匡子[2]，大塚祐司[2]
中里信和[3]，菅野彰剛[4]，永松謙一[3]，吉本高志[3]
([1]エレクタ㈱，[2]東北大学医学部高次機能障害学
[3]東北大学医学部脳神経外科，[4]広南病院療護センター)

(27) 運動による輪郭と立体運動視のMEGによる研究

吉川健治[1]，外山敬介[1]，大谷芳夫[2]，山本洋紀[3]
江島義道[3]，岡村昇一[4]，福永雅喜[4]，田中忠蔵[5]
([1]京府医大・２生理，[2]京工繊大・工芸，[3]京大・人間・環境学
[4]島津製作所，[5]明治鍼灸大・脳外)

(28) 脳磁（MEG）計測によるヒトの視差検出過程の解析

谷川昌司[1]，山本洋紀[1]，大谷芳夫[2]，岡村昇一[3]
吉田佳一[3]，吉川健治[4]，高梨芳彰[5]，江島義道[1]，外山敬介[4]
([1]京都大学大学院人間・環境学研究科，[2]京都工芸繊維大学工芸学部
[3]株式会社島津製作所基盤技術研究所
[4]京都府立医大第2生理学教室，[5]京都府立医大神経内科)

(29) 脳磁計による乳児の一次体性感覚野の発達的変化の検討

權藤健二郎[1]，飛松省三[2]，吉良龍太郎[1]，徳永洋一[1]，原　寿郎[1]
([1]九州大学医学部小児科，[2]同　脳研　臨床神経生理)

(30) ヒトの第二次体性感覚野における体部位局在的再現

前田多章，柿木隆介（生理学研究所）

(31) ＳＥＰ皮質generatorsの解析（MEG，EEG　dipoleの比較）

大平貴之，落合真人，金子康生，木村重仁，河瀬　斌（慶応大学脳外科）

(32) 痛覚関連誘発脳磁場と脳電位：Transcutaneous electrical nerve stimulation（TENS）による変化

宝珠山稔，柿木隆介（生理学研究所）

(33) 視覚性運動知覚の質と脳磁場反応

川上　治[1,2]，金桶吉起[1]，関口貴裕[1,3]，山崎　浩[1]，柿木隆介[1]
([1]生理学研究所，[2]小山田温泉記念病院，[3]大阪大学人間科学部)

(34) ランダムドット刺激によるヒト運動視中枢の反応特性の検討

Lam Khanh[1]，金桶吉起[1]，軍司敦子[1]，山崎　浩[1]，松本絵理子[2]，内藤智之[3]，柿木隆介[1]
([1]生理学研究所，[2]京都大学人間環境学，[3]京都大学文学部)

(35) Ramdom dots blinking:視覚連合野反応の新しい検出方法

大草知裕，金桶吉起，柿木隆介（生理学研究所）

(36) 注意が視聴覚情報処理に及ぼす影響のMEGによる評価

岩木　直，外池 光雄，山口 雅彦，浜田 隆史
（電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター）

(37) Fm θ の位相差を持つ複数の発生源

篠崎和弘，石井良平，鵜飼　聡，石原　務，井上　健，武田雅俊
（大阪大学医学部精神医学教室）
水野由子（同機能画像診断学） 吉峰俊樹（同脳神経外科）平吹度夫（同放射線科）

(38) ルール照合的タスクとフリーイマジネーションタスクによる記憶想起活動源の経時的運動経路の比較

嘉悦　勲[1]，森　高之[1]，飯田大介[1]，須谷康一[3]，内田熊男[1]，外池光雄[2]
([1]近畿大学理工学部，[2]電総研大阪ライフエレクトロニクス研，[3](株) シード

(39) 単語および無意味語に誘発された脳磁場に対する刺激反復の効果

関口貴裕[1,2] 小山紗智子[1] 柿木隆介[1]
([1]生理学研究所，[2]大阪大学人間科学部)

(40) ヒトの顔認知に関する脳磁図と脳波を用いた研究

渡辺昌子，小山紗智子，柿木隆介（生理学所）

(41) 顔の認知及びその加齢変化

中村昭範[1]，山田孝子[2]，阿部祐士[2]，堀部賢太郎[2]
加藤隆司[1]，伊藤健吾[1]，加知輝彦[2]
([1]長寿医療研究センター生体機能研究部，[2]国立中部病院神経内科)

参加者名

飛松省三(九州大学医学部)，重藤寛史（国立精神神経センター武蔵病院)，石井良平（大阪大学医学部)，篠崎和弘（大阪大学医学部)，谷口理章（大阪大学医学部)，吉峰俊樹(大阪大学医学部)，二宮宏智（大阪大学医学部)，平田雅之（大阪大学医学部)，加藤天美（大阪大学医学部)，山口佳子（工業技術院生命工学工業技術研究所)，斉藤幸子（工業技術院生命工学工業技術研究所)，高梨芳彰（京都府立医科大学付属脳・血管系老化研究センター)，岩本一秀（大阪鉄道病院)，大嶋英之（京都府立医科大学)，山本孝徳（京都府立医科大学付属脳・血管系老化研究センター)，平野哲雄（京都府立心身障害者福祉センター付属リハビリテーション病院)，長峯　隆（京都大学医学研究科)，當間圭一朗（京都大学医学研究科)，大賀辰秀（京都大学医学研究科)，外池光雄(通商産業省工業技術院電子総合研究所)，中里信和（東北大学医学部)，白石秀明（国立療養所静岡東病院)，渡辺裕貴（国立療養所静岡東病院)，山田康一朗（国立療養所静岡東病院)，今田俊明（NTT基礎研究所)，加藤和美（NTT基礎研究所)，渡辺昌洋（NTT基礎研究所)，中村昭範（国立長寿医療研究センター)，加藤隆司（国立長寿医療研究センター)，栗城真也（北海道大学電子科学研究所)，水野由子（大阪大学医学部附属バイオメディカル教育研究センター)，関

原謙介（科学技術振興事業団），木原泰三（アロカ株式会社），大平貴之（慶應義塾大学医学部），持田　潔（東京医科歯科大学），定藤規弘（福井医科大学高エネルギー医学研究センター），吉田秀樹（東和大学），嘉悦　勲（近畿大学理工学部），ホヴァギム・ヴァカルジアン（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所），内田　公（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所），原田暢善（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所），平田恵啓（北海道大学電子科学研究所），山口雅彦（通商産業省工業技術院電子総合研究所），岩木　直（通商産業省工業技術院電子総合研究所），永松謙一（東北大学医学部），畑中啓作（エレクタ株式会社），関口貴裕（大阪大学人間科学部），松本理器（京都大学医学研究科），落合真人（済生会宇都宮病院），金子庸生（慶應大学），高橋佳代（大阪大学人間科学部），菅野彰剛（広南病院療護センター），鵜飼　聡（大阪大学医学部），岡村昇一（㈱島津製作所基盤技術研究所），鬼塚俊明（九州大学医学部），芝崎俊幸（京都工芸繊維大学工芸学部），大谷芳夫（京都工芸繊維大学工芸学部），小早川達（工業技術院生命工学工業技術研究所），綾部早穂（工業技術院生命工学工業技術研究所），北島愛子（工業技術院生命工学工業技術研究所），広田明人（京都府立医科大学），馬場俊輔（京都府立医科大学），藤原直仁（京都大学医学研究科），丸野元彦（大阪大学医学部），岩瀬嘉志（順天堂大学），野瀬　出（日本大学文理学部），權藤健二郎（九州大学医学部），町井克行（三重大学医学部），橋本　勲（(財）東京都精神医学総合研究所），石飛真美子（東北大学医学部），藤田　智（㈱関西新技術研究所），大久保修（東京医科歯科大学），川端茂徳（東京医科歯科大学），杉本亨（国立長寿医療研究センター），堀部賢太郎（国立療養所中部病院），野介武史（㈱関西新技術研究所），橋詰　顕（済生会広島病院），大脇崇史（東京大学大学院工学系研究科），下川原正博（金沢工業大学），竹下和秀（東京大学医学部），奥村彰久（名古屋大学医学部），柴田忠彦（千葉大学医学部），Tran Tuan Diep（東京大学医学部）

研究会概要

ヒト脳機能の非侵襲的計測は，現在の脳神経科学の分野の中でも最も高い注目が寄せられている研究領域の１つである。PET, fMRI等種々の手法があるが，脳磁図（MEG）は，高い時間分解能（msec単位）と空間分解能（mm単位）を共に有するという特徴がある。生理学研究所は1991年に日本で初めて大型脳磁計を導入し，以後日本における脳磁図研究のパイオニアとして研究を進めてきた。日本における脳磁図研究の最新の発表を生理学研究所研究会で行ってほしいという要望が強く，昨年より研究会を開始し，本年は２回目にあたる。計41題の演題が発表され，所内を含めれば100名近い参加者が３日間にわたって脳磁図研究の最先端のデータを発表し議論した。セッションは「方法論」，「運動と体性感覚」，「味覚，嗅覚」，「医学応用」，「視覚」，「聴覚」，「高次脳機能」に分類した。各演題の持ち時間は30分と十分な余裕があり，通常の学会では得られないような詳細かつ率直な質疑応答が行われた。また朝食，昼食はいずれもコンファレンスセンターの中で一緒にとり，また，懇親会も全員参加し，あたかも3日間合宿をして勉強した感すらあった。PET, fMRIに比し，脳磁図研究は世界的には未だマイナーなものにとどまっており，方法

論，計測法など解決すべき問題点は多い。しかし，日本とヨーロッパ（特にフィンランドとドイツ）ではこの数年，急激に研究が進んできている。特に「高次脳機能」と「可塑性」に関する基礎的研究と，「てんかん」を初めとする神経疾患に対する「臨床応用」の研究の進展が目立ってきた感がある。「日本が世界をリードする」という気概をもって参加者一同，熱い議論を戦わせていたのが印象的であった。

（1）脳機能研究のためのREALTIME脳磁場測定システム

岡村昇一[1]，荒川　彰[1]，梶原茂樹[1]，冨田　定[1]，冨田　司[1]，大谷芳夫[6]，吉川健治[2]
大嶋英之[4]，谷川昌司[5]，平野哲夫[7]，吉田佳一[1]，江島義道[5]，高梨芳彰[3]，外山敬介[2]
([1]株式会社島津製作所基盤技術研究所，[2]京都府立医大第2生理学教室
[3]京都府立医大神経内科，[4]京都府立医大脳神経外科
[5]京都大学大学院人間・環境学研究科，[6]京都工芸繊維大学工芸学部
[7]京都府立心身障害者福祉センター附属リハビリテーション病院)

MEGを用いた脳機能研究において，測定効率向上を目的とするREALTIME脳磁場測定システムを開発した。

本REALTIMEシステムは，脳磁場測定中に，・トリガによる自動切り出し，・磁場波高値/眼電/その他外部入力による加算除外，・刺激種/反応スイッチなどイベントに応じた選択的加算平均，・ディジタルフィルタ処理，・測定時点までの等磁場図/処理後波形表示，を行ない，島津製作所製129チャネルベクトル脳磁計SBI-100の一機能として動作する。

本REALTIMEシステムを，体性感覚認知，明暗/色彩/奥行きの視覚情報処理，言語音認知に関する各研究に適用し，スループットの高い測定環境が実現できた。また，特に研究初期段階での刺激パラダイムの最適条件検索において効果が大きいと思われた。

（2）Multi modalityの中のMEG　—PET, fMRIとの共存，自己主張—

中村昭範[1]，加藤隆司[1]，伊藤健吾[1]，永野敦子[1]
山田孝子[2]，阿部祐士[2]，堀部賢太郎[2]，加知輝彦[2]
([1]長寿医療研究センター生体機能研究部，[2]国立中部病院神経内科)

MEG, PET, fMRI等有力な脳機能計測機器の発達する中でMEGがどのように共存し，また自己主張していくべきか，いくつか検討を行ってきたので中間報告を行う。

1）$O_{15}H^2O$-PET activation studyとMEGの相補的利用

MEGの併用により時間解像度の低いPETのデータに時間的情報を付加できる。一方PETのデータはMEGの電源推定に説得力を加え，多電源推定のモデル作成にも役立つ。

2）MEG-guided ROI Analysis

脳の機能地図により厳密に対応した部位の代謝情報の比較検討ができることを期待して，MEGのdipoleの位置を元にROI（region of interest）を設定して，FDG－PETのデータ分析を行うことを試みた。これにより非常に限局した部位の電気的なfunctionとglucose代謝からみたfunctionの対応を検討することが可能で，本方法は脳機能のより詳細な解明にもしかしたら役立つかも知れない。

3）MEG推定電源の標準脳への投影

ヒトの脳の形態は個人差が大きく，またMEGのデータも個人差が大きいため，個人間でのデータの比較は困難なことも多い。PETやfMRIのデータ分析では，脳の解剖学的標準化という手法を用いて個人間のデータを比較することが広く用いられるようになってきている。今回SPM96（Statistical Parametric Mapping）を用いて脳の標準化を行い，その標準脳にMEG推定電源を投影して個人間の比較ができるか否か検討を行った。Dipoleを標準脳上に投影することは可能であり，標準脳上の座標を用いれば個人間の比較も可能となりそうである。

（3）Time-Frequency MEG-MUSIC アルゴリズム

関原謙介（科学技術事業団「心表象」プロジェクト）

MEG信号は本質的に非定常であるにもかかわらず，通常用いられるスペクトル解析などは定常性を前提としており，誤差を含む。われわれは，MEG信号の非定常さを考慮した信号源推定法を提案する。提案法では，各time-frequency成分から対応する信号源を推定でき，自発脳磁界やgamma-bandの信号解析に有効である。提案法の理論と自発・誘発脳磁界解析への応用例について述べる。

（4）Movement-related desynchronizationの脳磁界計測

谷口理章[1]，平田雅之[1]，加藤天美[1]，Robinson SE[2]，Cheyne D[2]
二宮宏智[1]，丸野元彦[1]，吉峰俊樹[1]
（[1]大阪大学脳神経外科，[2]CTF Systems Inc）

随意運動にともなう脳活動は電気生理学的には電位の変化，および特定周波数におけるパワーの変化の両側面から観察することができる。前者は随意運動に伴う神経活動の亢進を直接とらえるのに対し，後者は活動に伴うidling stateからの脱同期によるパワーの減少（event-related desynchronization=ERD）をとらえると考えられる。

従来の脳磁界計測においては主に随意運動にともなう神経活動の亢進をダイポール（Equivalent current dipole=ECD）推定によりとらえてきた。これに対しsynthetic aperture magnetometry（SAM）では，計測された脳磁界をもとに任意のターゲットにおける電流密度を算出することができるため，ERDの３次元的解析が可能となった。今回，正常被験者で示指伸展運動にともなうERDを解析し，ECD推定により同定された活動部位と比較検討した。

（5）発声関連脳磁場の検討

軍司敦子，柿木隆介，寶珠山稔（生理学研究所）

健常者８名に対して，単音(/u/)を自発的に発声しているときの発声関連脳磁場（vocalization related cortical fields: VRCF）について検討した。発声前150msから発声後150 msの間について，複数双極子モデル（BESA）を用いて位置推定したところ，6双極子モデル（両側運動野の発声関連部位と体幹部位，両側一次聴覚野）が最も良好な結果を示した。両側運動野における4つの双極子は，発声前から発声中にかけて認められ，発声には口周囲，舌，咽喉頭等の筋と横隔膜を主とする体幹筋の活動が必要であると考えられた。一次聴覚野における2つの双極子は発声開始後に認められ，自分の声に対する反応を示していると考えられた。

（6）単一神経線維活動磁界のコンピュータ．シミュレーション：正常神経線維と障害神経線維についての検討

岩瀬嘉志[1]，黒沢　尚[1]，落合直之[2]，益子拓徳[3]，今田俊明[3]，橋本　勲[4]
([1]順天堂大学整形外科，[2]筑波大学整形外科，[3]NTT基礎研究所情報科学研究部
[4]東京都精神医学総合研究所精神生理，生理学研究所）

【目的】健常成人，末梢神経障害患者より計測された末梢神経活動磁界の発生メカニズムに関する基礎的理解のために，単一神経線維モデルを使って刺激によって発生する神経活動磁界のコンピュータ・シミュレーションを行う。

【方法】Hodgikin－Huxleyの式を用いて刺激によって生じる正常単一神経線維のイオン電流，活

動電位を計算した。またMcNealのモデルを使って活動電位伝播の時間的変化と，それによって発生する神経活動磁界のシミュレーションを行った。次に末梢神経障害を想定したパラメータを用いて計算した。

【結果】正常単一神経線維のコンピュータ・シミュレーションでは電流四重極子の伝播がみられた。また末梢神経障害を想定したコンピュータ・シミュレーションでは伝播障害部位で電流四重極子消失現象が，神経線維の変性で磁界振動現象を認めた。

【考察】コンピュータ・シミュレーションの結果は実際に計測された健常成人，末梢神経障害患者の活動磁界とよく一致した。このことより，Hodgikin－Huxleyの式をもちいたシミュレーションは神経活動磁界の理解のために有効であると考えられた。

(7) 後脛骨神経刺激一次反応における高周波応答 ：Time-frequency domain MUSIC algorithmによる解析

佐久間研司[1]，橋本　勲[1,2]，関原謙介[3]，井口義信[2]，木村友昭[4]，斎藤泰彦[5]
([1]生理学研究所，[2]東京都精神医学総合研究所 精神生理研究部門
[3]科学技術事業団「心表象」プロジェクト，[4]筑波技術短期大学・鍼灸学科，[5]足利工業大学)

健常成人10名を対象とし，後脛骨神経一次応答における高周波信号（High-frequency oscillations; HFOs）を脳磁図を用いて記録し，その信号源推定を行った。Wide bandで測定された体性感覚誘発脳磁場は500-800 Hzのdigital filterを用い足の体性感覚一次反応であるP37mに重畳する高周波応答（HFOs）の同定をした。Wide-band記録における加算波形では，P37mが10例全例に明瞭に記録された。500-800 Hzのフィルターをかけると，P37mに重畳して低振幅のHFOsが10例中5例にて認められた。Time-frequency spectrogramを用いるとHFOsはより明瞭に同定し得た。Time-frequency domain MUSIC algorithm（TF-MUSIC）による信号源推定でもsingle moving dipole method（SMD）と同様，HFOsとP37mの双極子位置に統計学的な有意差はなかった。しかし，TF-MUSIC algorithmは，SMDで推定し得ない信号源推定を可能とした。

(8) 体性感覚誘発磁界の時空間・周波数解析

平田雅之[1]，加藤天美[1]，谷口理章[1]，二宮宏智[1]
丸野元彦[1]，Robinson SE[2]，Cheyne D[2]，吉峰俊樹[1]
([1]大阪大学脳神経外科，[2]CTF Systems Inc)

Synthetic aperture magnetometry (SAM) では，開口合成フィルタリングにより，計測された脳磁界から任意の位置，時間における電流密度を抽出できる。そのため，脳表電極や深部電極をおくことなく頭蓋内の指定した部位で脳波形を推定したり (SAM-virtual channel)，電流密度変化の空間分布の時間的推移をとらえられる (SAM-movie)。また異った時間帯における電流密度の統計学的有意差を検定することもできる (SAM-SPM)。この際，指定した任意の周波数帯域における解析が可能であるため，脳活動の同期，脱同期を時空間的にとらえることもできる。今回正常被験者で正中神経電気刺激による体性感覚誘発磁界 (SEF) の時空間的解析およびその周波数特性変化の空間分布を検討した。

(9) 嗅覚情報処理に関わる脳内部位推定

綾部早穂[1,2]，小早川達[2]，後藤なおみ[2]，斉藤幸子[2]
([1]学術振興会特別研究員・筑波大心理，[2]生命工学工業技術研究所)

ニオイ刺激提示後の両半球の梨状葉と右眼窩前頭皮質の血流量増加がPETやfMRIを用いた研究から報告されている。しかしこれらの代謝法では嗅覚情報処理の時間経過を追うことは難しい。一方MEGとEEGでは刺激提示直後からミリ秒単位で脳の活動の様子を知ることが出来る。我々はニオイ刺激に応答する脳活動の様子をMEGとEEGの同時計測から検討した。ニオイは常時鼻腔内に供給する空気中にパルス状に取り込むKobal式オルファクトメータで提示し，ニオイだけを吹き付けることで生じる三叉神経系への刺激を除外できた。これによって嗅覚系だけをモノモダルに刺激することができた。MEG計測には全頭型SQUIDシステムを利用し，EEGはCz，C3，C4から単極導出しMEGと同時に計測した。EEGのP1 (潜時約330ミリ秒)，N1 (潜時約430ミリ秒)，P2 (潜時約560ミリ秒) 成分に対応した潜時でMEGの信号も大きくなり，この活動源はいずれの場合も両側の鳥皮質，外側溝，上側頭溝，下側頭回に推定された。

(10) ニオイの脳磁図計測ーオドボール実験，並びにsniffing実験についてー

外池光雄[1]，浜田隆史[1]，山口雅彦[1]，岩木　直[1]，嘉悦　勲[2]
([1]電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター
[2]近畿大学理工学部原子炉工学科)

我々は122チャンネル全頭型脳磁計 (Neuromag-122) を用いて嗅覚刺激に対する脳磁場計測を行い，人間の嗅覚機能の解析に関する研究を実施している。我々はこれまでに，嗅覚誘発電位計

測で行ってきたのと同様な呼吸同期式の吹き付け法（blast　method）により，一種類のニオイをランダムな提示で被験者の左右どちらかの鼻腔内に注入刺激し，脳磁図応答の記録，脳内の信号源解析を行ってきた。他方，二種類のニオイを用いたオドボール課題実験を新たに実施し，稀に刺激されるターゲットのニオイに被験者が注目し刺激回数を数えた時の脳磁図応答について計測を行ってきた。これらの解析から，現在，ニオイ吹き付けの効果によると推定される三叉神経応答（latency: 約270ms），左右の前頭葉眼窩野のやや非対称な２ケ所の部位に推定される嗅覚神経応答（latency: 約350ms），及びオドボール課題実験により側頭葉の少なくとも２ケ所（上側頭部，及び島皮質周辺）から得られるニオイ認知応答（latency: 約570ms）を得ている。一方，最近これらのニオイ刺激法とは異なり，被験者自身がニオイを嗅ぐsniffing法を用いてactive olfactionに対する脳磁図計測の実験を開始した。これまでのニオイ刺激法とその脳内活動部位に対し，sniffing法によるニオイ応答との比較・検討を行い，人間のニオイの知覚・認知機構について考察する。

（11）味覚誘発脳磁場計測：異なる味濃度と味質への応答

小早川達[1]，斉藤幸子[1]，金田弘挙[1,2]，綾部早穂[1,3]，小川　尚[4]
（[1]生命研，[2]サッポロビールKK，[3]筑波大，[4]熊本大医）

我々は味刺激によって生じる脳磁場の計測を行い，ヒトの大脳皮質第１次味覚野（area　Gを明らかにしてきた。今回は，異なる濃度及び味質の違いの対する味覚誘発磁場の特徴について，これまで報告したものに，被験者および濃度段階を増やして検討を行った。被験者は５人，濃度段階は0.03，　0.1，0.3，　1 M のNaCl の４段階とした。64チャンネルのホールヘッド型の脳磁場計測装置を用い，被験者の舌先端中央部に味刺激と洗浄用の純水を交互に提示した。その結果，0.1，0.3，　1 M のNaCl の間ではarea G の活動が生じ始める潜時は変わらないが，濃度が増すにつれて磁場応答とダイポールの大きさが有意に大きくなることがわかった。味質の検討では，3 mM Na-saccharin （または３mM　saccharin ）を用い，その甘味強度に類似した強さの塩味強度を感じる食塩を実験に用いた濃度段階の中から被験者毎に選び，主観的に等強度の甘味と塩味による誘発磁場を比較した。その結果，潜時に有意な差がみられ，甘味の方が塩味より長いことがわかった。

(12) 脳磁場計測によるヒト味覚関連中枢応答特性の解析

高橋佳代[1]，永井　元[2]，吉村真一[4]，山口雅彦[3]，外池光雄[3]，山本　隆[1]
([1]大阪大人間科学行動生理，[2]サントリー㈱商品開発研
[3]電総研大阪LERC，[4]飛鳥電機製作所)

味覚とは，いわゆる化学物質を介する化学感覚であるため，刺激方法を厳密に規定することは難しい。そのため末梢の感覚受容機構のみならず，その中枢応答様式も未だ明らかにされていない。我々はヒトの中枢における味覚の情報処理機構の解明を目的として，122チャンネル全頭型脳磁計を用いた計測を行った。

味覚刺激としては，基本味である甘味（ショ糖），酸味（クエン酸）を用いた。　また，この２つの味質の違いが中枢でどのように知覚されているのかという事を調べる目的で，味覚修飾物質であるミラクリンを含むミラクルフルーツを利用した．ミラクリンには酸味を甘味に変換させる効果があることが知られている。

その結果，クエン酸の応答潜時はショ糖のそれより速く，信号源の推定部位には大きな違いは認められなかった。また，ミラクルフルーツ摂取後のクエン酸刺激による応答はショ糖と近い潜時を示した。なお，１次味覚野以降の応答についても比較し考察したのであわせてその結果も報告する。

(13) MEGによる機能診断を正確に手術に応用する工夫

落合真人，大平貴之，大泉太郎，金子康生，木村重仁，河瀬　斌（慶応大学脳外科）

【目的】ＣＴ，MRI，３－D画像は形態診断法として確立されている。また，機能診断はこれまで主に電気生理学的手法でしか評価できなかったものが，ここ数年 functional MRIやMEGにより形態と機能を同時に評価することが可能になってきている。特にMEGはてんかん焦点の同定や術前の機能 mapping に有用であり，mm単位で機能同定ができるとされる。この正確な機能位置情報を手術中に正確に応用するために，MEG画像の Navigation への応用を試みた。

【方法】CT，MRIを1.5mm程度のthin sliceで撮影し，データをUGWサーバ（ＧＥＹＭＳ社製）にオンラインで転送する。MEG検査を施工しSEF，AEFのdipole信号源を推定しこの結果を転送されたMRI上に表示し，さらにこのMRI画像をNavigation装置に応用している。MEG装置は横河電機社製，Navigation装置は三鷹光器社製Brain Pointerである。

【結果】MRI画像の転送に使用しているUGWサーバはオンラインであり枚数の多い画像情報も容易に転送可能であり精度も劣化しない，またACR－nemaのファイル形式で保存されているため

利用も容易である。Navigation装置であるBrain Pointerは，Macintoshのパソコンでコントロールされているため MEGによる機能画像（Windows NT）を容易に取り込むことが可能であり有用である。

【結論】Neuronavigation装置，MEGの利用により機能画像をmm単位で手術に応用することが可能になり非常に有効であった.

（14）格子点移動法のてんかん外科への臨床応用

大嶋英之[1]，高梨芳彰[2]，岡村昇一[3]，梶原茂樹[3]，松本圭吾[1]，岩本一秀[4]，峯浦一喜[1]
([1]京都府立医科大学脳神経外科，[2]京都府立医科大学神経内科
[3]株式会社島津製作所基盤技術研究所，[4]大阪鉄道病院神経内科)

我々はこれまで電源の広がり，分布を推定できる格子点移動法の有用性をシミュレーション，ファントム実験において確認し，生体での誘発磁場に応用してきた。今回，外科治療を行ったてんかん患者に適応し，ダイポール推定とも比較してその優位点，問題点を考察する。

症例は7歳女児，レノックス-ガストー症候群の患者でしばしば失立発作を起こし受傷していた。術前脳磁図，脳波では速波律動と徐波が見られ，これを経時的に格子点移動法で解析すると，一側の前頭葉から活動が始まり対側に移ったり両側が活動したりし，最終的に徐波の時には両側前頭葉の広い範囲に活動領域が求められた。脳梁離断術を施行し術中の皮質脳波で離断前には左右より同期してspikeが記録されていたが，離断後は左にばかりspikeがみられるようになった。術後脳磁図では格子点移動法で，速波律動のときには左半球ばかりに活動が求められ，右には電源推定されなかった。徐波においては両側に活動が求められた。

（15）Synthetic aperture magnetometry (SAM) を用いたてんかん性異常波の解析

二宮宏智[1]，谷口理章[1]，加藤天美[1]，平田雅之[1]
丸野元彦[1]，新居康夫[1]，Robinson SE[2]，吉峰俊樹[1]
([1]大阪大学医学部脳神経外科，[2]CTF Systems Inc.)

開口合成法に基づく空間フィルターリングを行うSynthetic aperture magnetometry（SAM）を用い，てんかん性異常波を解析した。難治性てんかん9例において，発作間歇期の脳波上または脳磁図上の棘波をトリガーとして脳磁波を記録した。各症例の頭蓋内の目的とする空間に多数の仮想格子点を設定した（SAM virtual channel)。SAMにより計算された各channelにおける電

流密度をグラフおよびカラースケール化し，てんかん性異常波の起始から伝播をsingle dipoleとともに解析した。内側型側頭葉てんかんでは，海馬近傍からの起始と対側への波及，外側型では側頭葉後部からの起始と側頭葉内部への波及が見られた。前頭葉てんかん例では起始部が複雑であることが，また，腫瘍性てんかん例では腫瘍近傍からの起始と周辺脳への波及やmirror focusを見い出すことができた。Single dipoleでは把握し難い，てんかん性異常波の脳内異常活動領域の起始と空間的広がり，およびその時間的推移をSAMで明らかにすることができた。本法はてんかんの病態の解明に大きな役割を果たすと思われる。

(16) 難治性てんかん症例のMEGによる発作間歇期異常波の伝播解析

中里信和[1]，菅野彰剛[2]，畑中啓作[3]，永松謙一[1]
石飛真美子[4]，社本　博[1]，大槻泰介[1]，吉本高志[1]
([1]東北大学医学部脳神経外科，[2]広南病院療護センター
[3]エレクタ㈱，[4]東北大学医学部小児科)

我々は難治性てんかん外科治療プログラムの一環として，脳波・脳磁図の同時記録による発作間歇時異常波の信号源解析を行っている。てんかん自発脳磁図では，背景脳活動の重畳，異常波の低い再現性，複数の信号源，拡がりを持った信号源，脳深部由来の信号源などの可能性があり，短潜時誘発脳磁図に比べて信号源の推定精度は一般に低いと考えらる。

我々は発作間歇時異常波であっても，発作時脳波の解析と同様，信号伝播の時間経過を考慮に入れて解析している。信号源推定位置の時間的推移と，症例の臨床像や画像診断との関連から，脳磁図解析結果の妥当性と現時点での限界を間接的に評価する。本法は棘徐波の連続したバーストや，数秒間隔の連発例において特に有用であった。

(17) MEGを用いたてんかん発作性の失語症状を有する症例の検討

山田康一郎，白石秀明，渡辺裕貴，八木和一
(国立療養所静岡東病院（てんかんセンター))

失語症状はBrocaに端を発した脳損傷者の研究以来多くの症例検討や脳機能マッピングあるいは画像診断の発達とともに病巣の部位との関係が明らかになってきた。我々てんかん医療に従事する立場では臨床上失語症状を呈するてんかんの症例はしばしば経験するところであるが，てんかん患者の失語症状は大きく分けると発作性の失語と発作後の欠落症状としての失語に分けられ

るであろう。今回我々は発作症状としての失語（すなわち単純部分発作ということになるが）を呈する症候性部分てんかんの症例についてMEGを用いてECDの局在とその症状について検討を行ったので報告する。

（18）頭蓋内病変症例における体性感覚誘発磁界の信号源偏位の評価

永松謙一[1]，中里信和[1]，井上　敬[1]，大友　智[1]
菅野彰剛[2]，畑中啓作[3]，隈部俊宏[1]，嘉山孝正[4]，吉本高志[1]
（[1]東北大学医学部脳神経外科，[2]広南病院療護センター
[3]エレクタ㈱，[4]山形大学医学部脳神経外科）

頭蓋内病変を有する症例でMEGにて脳機能局在を調べると，患側では健側に比べ信号源位置が偏位する場合がある。その原因としては，脳機能局在の可塑性による可能性と，圧排病変による移動の可能性の両面からの評価が必要である。われわれがこれまで経験した症例を提示し考察する。

症例１：50才女性。小児期脳損傷による上肢麻痺からの回復例。生後1か月時に発熱後，右半身麻痺が出現したが放置。成人となった現在は，上肢に強い右半身の脱力と知覚鈍麻を認める。今回，偶然CTにて左前頭葉から頭頂葉にかけての孔脳症を認めたため精査となった。正中神経刺激による体性感覚誘発磁界（SEF）では，患側半球反応の信号は微弱でかつ潜時の延長を認めた。患側の信号源位置は，病変を避けるように上内側方向に偏位していた。

症例２：50才男性。脳悪性リンパ腫。左下肢の脱力と軽度知覚低下にて発症。MRIにて右前頭頭葉ー頂葉境界部の半球間裂寄りに浸潤性の脳内腫瘍病変を認めた。後脛骨神経刺激SEFでは患側半球反応の振幅減弱と潜時延長を認めた。信号源位置は通常の下肢領域よりも外側よりで手の領域に近接して推定されたが，腫瘍による圧排所見は軽度であった。

症例３：68才男性。右前頭葉神経膠腫。術中覚醒下に脳表電気刺激機能マッピングを行い，顔面の運動・感覚野を切除した。術後一過性の強い左半身麻痺が出現したが，その回復過程で正中神経刺激SEFを計測したところ，その信号源は健側に比べて大きく上内側方に偏位した。

いずれの３症例も圧排病変のみでは機能局在の偏位を説明できず，機能局在可塑性の存在を示唆する。

(19) 脳磁図による遷延性意識障害患者の残存脳機能評価

菅野彰剛[1]，中里信和[2]，藤原　悟[1]，永松謙一[2]，畑中啓作[3]，吉本高志[2]
([1]広南病院療護センター，[2]東北大学脳神経外科，[3]エレクタ㈱)

遷延性意識障害患者の治療では，脳の残存機能を正しく評価した上で，それぞれの患者に適したリハビリテーションを計画できれば理想的である。そこで，MEGを用いて，体性感覚・聴覚・視覚それぞれに対応した大脳皮質活動を時空間的に評価した。症例は交通外傷後の遷延性意識障害患者16例で，減圧開頭術による頭蓋の広範な部分欠損例を3例含む。誘発磁界の計測にはヘルメット型脳磁計（Neuromag 122）を用い，信号源はMR解剖画像との比較で解析した。各誘発反応ごとに，正常の反応潜時や磁界分布パターンを認めた症例がある一方で，多くの症例では障害に応じた一側もしくは両側性の異常所見が認められた。これまでは遷延制意識障害症例の重傷度を臨床的スコアを用いるなどして評価してきたが，MEGを用いることにより感覚種別ごとの脳機能の客観的な評価が可能である。さらにMEGは，頭蓋骨欠損や広範な脳損傷による頭部導電率の著しい不均一性によっても，高い空間分解能が保たれるのが特徴で，頭部外傷例の評価に特に適している。またヘルメット型脳磁計は短時間での全頭部計測が可能であり，高度意識障害患者にも適する。今後は症例ごとの脳残存機能評価に基づき，具体的なリハビリテーション計画を行いたい。

(20) 聴覚誘発電位と磁場に対する刺激間隔と休憩の効果

鬼塚俊明[1,2]，二宮英彰[1]，佐藤栄剛[1]，山本智矢[3]，田代信維[1]
([1]九州大学医学部神経精神医学教室，[2]白十字病院
[3]九州大学医学部耳鼻咽喉科学教室)

聴覚P50は重畳電位である可能性があると思われる。この仮説を検証するため，刺激間隔と休憩を操作し，P50，P50m，N100，N100mを同時記録した。健常右利き成人12名（平均25歳，男性6名，女性6名）を対象とした。4条件で聴覚誘発反応を記録した：(1) 1.5 s/rest，(2) 1.5 s/successive，(3) 0.5 s/rest，(4) 0.5 s/successive。各条件とも聴覚刺激を880回呈示した。P50，N100，P50m，N100mの潜時と振幅，それらの双極子を調べた。P50振幅には刺激間隔の有意な効果を認めなかったが，P50m振幅は刺激間隔が0.5sの条件で減少した。一方，N100とN100m振幅は刺激間隔が0.5sの条件で減少し，休憩を入れた場合，増大した。P50mの双極子はN100mの前方で若干深部に推定され，両方とも聴覚一次皮質に推定された。これらの結果はP50の電位に両側側頭葉上面以外の電位，central structureの電位がP50に関与し，P50は重畳電位であること

を示唆している。

(21) 絶対音感を持つ音楽家の聴覚皮質の活動

平田恵啓[1]，栗城真也[1]，クリスト・パンテフ[2]
([1]北海道大学電子科学研究所，[2]ミュンスター大学)

絶対音感を持つ音楽家の側頭平面は左側が有意に大きいが，この解剖学的な違いが聴覚野の機能面にも現れるのかを，脳磁界計測により評価した。刺激はピアノ音のC4，C6，E6とピアノ音の包絡線を模倣した純音（C5p）とノイズバート（NB）とした。被験者は絶対音感を有する音楽大学生11名（AP）と，音楽経験のない女子大学生11名（NAP）で，全員右利きであった。実験はE6を数えるoddball課題とした。被験者の片耳に音刺激を与え，反対側から聴覚誘発脳磁界を記録した。E6を除く4刺激音の応答の信号源推定を行った。

全被験者からピアノ音と純音に対する脳磁界応答が観測された。N100mのピーク潜時は最高音のC6で顕著に短かく，NBに対するN100mの振幅は他の刺激に比べて小さかった。左右半球を比較すると，NAPは活動位置の中心が前後方向でほぼ同位置であるのに対し，APでは左側頭で右よりも約8mm後方に推定された。NBの推定位置は，APの左右ともに他の音に比べ約6mm後方に推定された。

(22) 四重複合音課題による集中力の誘起した聴性脳場応答解析

岩橋正國[1]，吉田秀樹[1]，浜田隆史[2]，山口雅彦[2]，外池光雄[2]
([1]東和大学電気工学科，[2]電子技術総合研究所大阪ライフエレクトロニクス研究センター)

脳の認識過程は一瞬にして呈示情報の細部に迄及ぶのではなく，情報の輪郭抽出に始まり，時間の経過と共に，より詳細な内容の理解へと進行していくことが考えられる。脳内に局在した電流源が情報処理過程自身であると仮定すれば，より判別の困難な課題はダイポールパターンを自己誘起するはずである。そこで熟考が必要な程，難度は高くないものの，呈示刺激に対して集中せざるを得ない状況下での情報処理過程を評価することにした。本研究では聴性オドボール課題で使用される刺激として四重複合音を使用し，標的刺激は両耳で異なる構成の複合音が呈示された時とした。複合音として呈示された並列情報分析の影響は，後潜時に計測脳磁図の強度を有意に増大させ，両側に持続性のあるダイポールパターンを形成した。電源推定部位はN100源より有意に内側の横側頭回と考えられ，横側頭回から辺縁系へ向かう情報処理の帰還伝搬路の存在が

示唆された。

(23) 言語音(「あ」)と非言語音(ホワイトノイズ，純音1kHz)刺激による聴覚誘発脳磁場の検討；Lateralizationを中心に

平野哲雄[1]，高梨芳彰[2]，吉川健治[3]，岩本一秀[2]
山本孝徳[2]，大嶋英之[4]，広田明人[5]，馬場俊輔[5]，中島健二[2]
([1]京都府立心身障害者福祉センター附属リハビリテーション病院
[2]京都府立医科大学神経内科，[3]京都府立医科大学第二生理学教室
[4]京都府立医科大学脳神経外科，[5]京都府立医科大学歯科)

言語音(母音「あ」)と2種類の非言語音(ホワイトノイズ，純音1kHz)の3音を刺激音として，健常者のAEFを検討した。

刺激音の長さは140ms，70HLの音圧で，イヤチューブを介して片耳刺激した。3音は，刺激間隔を2.5から3.5秒の間でランダムに呈示した。島津製作所製SBI-100(129チャンネル，ベクトル型)により，側頭部にデュアを当て，それぞれ100回加算した。左耳刺激と右耳刺激を，それぞれ反対側記録，同側記録した。閉眼で音を聞く(コントロール)，閉眼で母音を数える(タスク)の二つの条件で行った。被験者は，正常成人男子3名である。

3音とも，N50m，N100mと潜時200ms前後の，3つのMEGpowerpeakが観察された。左半球記録で，3番目のピークでは「あ」のpowerが最も大きい傾向があり，右半球記録ではこの傾向は一定ではなかった。この傾向について，音の種類，利き手，音への注意などとの関連から考察する。

(24) 刺激純音の属性とoffset反応増強

渡辺昌洋，今田俊明(NTT 基礎研究所)

前回，我々は，1kHz純音で呈示時間が2.2，1.2，0.2sの音(長音)と0.2sの音(短音)の2種類を，ランダムな順番，等確率，interstimulus interval 1 s一定で呈示し，脳磁界反応を計測した。その結果，直前音の長音の呈示時間が長いほど，短音のoffsetに対するN1m反応のピーク振幅が大きくなること(offset反応増強)を示した。今回，前回と同じように長音(2.2s)，短音(0.2s)を呈示し，長音の属性(周波数，音圧)を変えて，122チャネル全頭型脳磁界測定装置を用いて誘発磁界反応を計測した。その結果，長音に続いて呈示された1kHz短音のoffset反応増強は，長

音と周波数が等しいとき，また，音圧が等しいときに，起きることがわかった。

(25) 周辺刺激による明暗コントラスト抑制現象の解析

大谷芳夫[1]，岡村昇一[2]，谷川昌司[3]，吉田佳一[2]
吉川健治[4]，高梨芳彰[5]，江島義道[3]，外山敬介[4]
([1]京都工芸繊維大学工芸学部，[2]株式会社島津製作所基盤技術研究所
[3]京都大学大学院人間・環境学研究科
[4]京都府立医大第2生理学教室，[5]京都府立医大神経内科)

明暗刺激（テスト刺激）に対するコントラスト感は周辺の他の刺激（マスク刺激）の影響を受けて変化する。一般に，高コントラストのマスク刺激と共に提示されたテスト刺激は，単独提示された場合に比べコントラストがより低いように知覚される。本研究ではこの現象に寄与する脳内過程を解明するために，脳磁測定と精神物理学的測定の結果を比較検討した。脳磁測定では，単独提示に比べマスク刺激を付加した条件で第１次視覚野に見られるon反応が小さくなるが，単独提示とは異なり反応の減少に伴う潜時の増大は見られないことが示された。精神物理学的測定では，単独提示及びマスク刺激（コントラスト80%）を付加した条件でテスト刺激のコントラストを変化させ，見かけのコントラストを測定した。その結果，抑制効果は低コントラスト領域で大きく，コントラストの上昇と共に減少することが明らかとなった。これらの結果は，周辺抑制が局所的なコントラスト情報抽出過程の特性では説明されないことを示唆するものである。

(26) パターンリバーサル刺激および文字オンセット刺激による視覚誘発脳磁図の比較

畑中啓作[1]，奥田次郎[2]，鈴木匡子[2]，大塚祐司[2]
中里信和[3]，菅野彰剛[4]，永松謙一[3]，吉本高志[3]
([1]エレクタ㈱，[2]東北大学医学部高次機能障害学
[3]東北大学医学部脳神経外科，[4]広南病院療護センター)

視覚誘発反応の研究で重要な要素のひとつはどのような視覚刺激を使用するかである。われわれはパターンリバーサル刺激による中長潜時N75-P100-N145成分の信号源同定，刺激色による誘発反応の変化，後頭葉病変の症例の検討から，これらの成分は，視覚情報が高次視覚野で処理された後，再度一次視覚野に戻った際生じるという新しいモデルを提唱した。しかしながら，高次

視覚野の活動そのものは観測できなかった。今回，視覚刺激として，単一文字（かな，漢字，数字，記号）のオンセット刺激（1 Hz，持続時間0.1s）を使用して視覚誘発脳磁図を測定した。その結果，文字刺激の場合には刺激後約100ms以降に，一次視覚野－高次視覚野－視覚連合野と時系列的に同定されるいくつかの誘発反応を観測することができた。これら2種類の視覚刺激による誘発反応の違いをもとに視覚信号がどのように処理されるかについて考察する。

(27) 運動による輪郭と立体運動視のMEGによる研究

吉川健治[1]，外山敬介[1]，大谷芳夫[2]，山本洋紀[3]
江島義道[3]，岡村昇一[5]，福永雅喜[5]，田中忠蔵[5]
([1]京府医大・2生理，[2]京工繊大・工芸，[3]京大・人間・環境学
[4]島津製作所，[5]明治鍼灸大・脳外)

運動による輪郭の認知は複数の運動により起動される単眼運動立体視の原型と考えられる。5人の正常被検者の右視野にランダムドットの一様（HM）運動と運動による輪郭認知を生じる分割運動（SM）刺激を与え，視覚領野の反応を3次元脳磁計ー空間フィルターシステムで計測した。運動による輪郭認知の信号はSMとHM反応の差分として得られると想定されるが，この差分信号はV2/3でSM反応の後半（潜時，120ms）に生じた。SMに雑音として反対方向の動きを入れると輪郭認知は困難となり，差分信号も減少した。HM刺激に3分順応させた後には輪郭認知は完全に消失し，HMに対するV5の活動は著名に抑制されたが，V1，V2/3の抑制は軽度であった。このとき差分信号は完全に消失した.これらの結果は複数の運動があるとき，単眼運動立体視機構がV5で起動され，その指示信号に基づいてV2/3で単眼運動立体視が行われることを示す。

(28) 脳磁（MEG）計測によるヒトの視差検出過程の解析

谷川昌司[1]，山本洋紀[1]，大谷芳夫[2]，岡村昇一[3]
吉田佳一[3]，吉川健治[4]，高梨芳彰[5]，江島義道[1]，外山敬介[4]
([1]京都大学大学院人間・環境学研究科，[2]京都工芸繊維大学工芸学部
[3]株式会社島津製作所基盤技術研究所
[4]京都府立医大第2生理学教室，[5]京都府立医大神経内科)

2次元網膜画像から3次元視空間を復元する手がかりの1つとして両眼視差情報がある。本研究ではこの視差情報検出過程を解明するために，ランダムドットステレオグラム（RDS）を刺激

として，奥行き面出現時のONSET反応をMEGを用いて測定した。刺激は右視野に密度50%，ドットサイズ0.2degで下記の順序で呈示された。先行刺激として一様な（視差のない）RDSを500msec呈示し，次に（1）視差あり条件：振幅が視差12arcminで奥行き方向に変調された空間周波数0.5 cpdの矩形波横縞のRDS，（2）視差なし条件：一様なRDS，のどちらかを呈示した。全センサー（129チャンネル）の誘発磁場エネルギーの波形解析から，潜時200-300msecの応答に条件間で顕著な差異が見られることが示された。この応答について単一電源推定および空間フィルタ解析を行った結果，視差あり条件で背側前線条皮質に電源が推定された。このことから，視差検出は背側前線条皮質において潜時200-300msecの間に行われていると推測される。

(29) 脳磁計による乳児の一次体性感覚野の発達的変化の検討

権藤健二郎[1]，飛松省三[2]，吉良龍太郎[1]，徳永洋一[1]，原　寿郎[1]
([1]九州大学医学部小児科，[2]同　脳研　臨床神経生理)

【目的】乳児における体性感覚野の発達は未だに不明な点が多い。私共は正常乳児において触圧覚刺激による体性感覚誘発脳磁界（SEF）を測定し，電流源の位置の推定，体部位局在の有無，運動－感覚連関について検討した。

【方法】対象は正常発達の乳児12人で，検査は手掌把握の時期とピンセットつまみの時期以降の二期に分けて行った。睡眠II-III段階に鎮静した乳児の母指と薬指をair-puff刺激装置で900-1100msecでランダムに刺激し加算平均した。

【結果】刺激後約20 msec（W1），60 msec（W2），100 msec（W3）に反応を認め，電流源の位置推定が可能であった。ピンセットつまみの時期にMRI検査を施行した例では電流源は中心後回上に推定され，成人と同じ体部位局在を呈した。またW3は発達に伴い振幅が大きくなり，相関係数も高くなる傾向を示した。

【考察】 SEFにより乳児期に明瞭な体部位局在が形成されることが判明した。また予想に反して長潜時皮質反応（W3）が最も安定していたが，これは刺激が生理的かつ選択的であったことと，脳磁図が誘発電位よりS/N比が高いためと考えられた。

(30) ヒトの第二次体性感覚野における体部位局在的再現

前田多章，柿木隆介（生理学研究所）

体性感覚刺激に対する，ヒトの第2次体性感覚野（以下，SIIと略）の体表上受容野分布を脳

磁図を用いて検討した。電気刺激により，健常被験者に対し上唇，下唇，手親指，手中指および足首を刺激し，各受容野の刺激に対する同側および対側SIIの反応を脳磁計を用いて計測した。SIIの各領域と受容野との投射関係は，第1次体性感覚野ほど明確ではなかったが，一定の傾向が認められた。すなわち，手親指を受容野に持つSIIの領域を基準にすると，手中指を受容野とする領域はその近傍の内側後方に存在し，下肢を受容野とする領域はさらに内側後方，口唇を受容野とする領域は外側前方に存在した。脳磁図を用いた非侵襲的実験により，刺激両側のSIIの活動領域と体表上受容野分布との関係を明らかにすることができた。

（31）SEP質generatorsの解析（MEG，EEG dipoleの比較）

大平貴之，落合真人，金子康生，木村重仁，河瀬文武（慶応大学脳外科）

（32）痛覚関連誘発脳磁場と脳電位 ：Transcutaneous electrical nerve stimulation（TENS）による変化

宝珠山稔，柿木　隆介（生理学研究所）

経皮的神経電気刺激（TENS）の痛み関連誘発脳磁場（Pain-related evoked cortical magnetic fields, PRMF）および脳電位（Pain-related evoked potential, PREP）への影響を観察した。

【方法】左右の示指への電気による痛み刺激に対する脳反応を，右前腕への TENS の前後で記録した。

【結果】Czから導出されたPREP成分（N150，P220）は TENS の後に振幅の漸減を認めたが，PRMF に変化は認められなかった。

【考察】TENS は PREFの反映する皮質成分には影響を与えず，PREFの発生源はPREPの発生源と異なると考えらた。TENSの前後で自覚的な痛みの感覚は変らず，減衰したPREPの成分は痛み感覚に直接関連しないと推察された。

(33) 視覚性運動知覚の質と脳磁場反応

川上　治[1,2]，金桶吉起[1]，関口貴裕[1,3]，山崎　浩[1]，柿木隆介[1]
([1]生理学研究所，[2]小山田温泉記念病院，[3]大阪大学人間科学部)

視覚性仮現運動を誘発する刺激条件を変えることで，運動知覚の程度を変化させ，脳磁場反応とどう対応するか検討した。対象は健常男子5名。仮現運動刺激には，2本のLEDを用い刺激間隔（ISI）を-140msから+250msまで変化させ呈示した。同じ刺激を用いて心理物理実験を行い，ISI変化に対する運動知覚程度を評価した。脳磁場反応のRMSの最大振幅は，ISI=0ms付近で最大となり，心理物理実験における知覚程度とよく相関していた。この反応の電流双極子は，ISIに関係なくヒトのMT/V5付近に推定され，同部位の神経活動は運動知覚の質にも関係する可能性が示された。

(34) ランダムドット刺激によるヒト運動視中枢の反応特性の検討

Lam Khanh[1]，金桶吉起[1]，軍司敦子[1]，山崎　浩[1]，松本絵理子[2]，内藤智之[3]，柿木隆介[1]
([1]生理学研究所，[2]京都大学人間環境学，[3]京都大学文学部)

Smooth motion of the visual stimuli created by the random dot kinematograms (RDK) evokes magnetic fields from the human extrastriate cortex. We investigated whether the speed of RDK affects the peak latency of the magnetic responses from five healthy subjects. Speed of random and coherent motion consisted of three levels; low (L): 0.6° s^{-1}, medium (M): 9.6° s^{-1} and high (H): 25° s^{-1}. The magnetic responses to all stimulus conditions were composed of one to four components depended on the subjects and stimulus conditions. In this study we concentrated on only the peak latencies of the first components. The speed of the random or coherent motion of the RDK after the trigger pulse did not affect the latencies when these stimuli were followed by the stationary random dots. The latencies, however, were inversely related to the speed of the random motion of RDM before the trigger pulse no matter what the stimulus condition of RDK after the trigger pulse. Estimated origins of the first components were always in the same area, around the meeting point of the ascending limb of the inferior temporal sulcus and the lateral occipital sulcus. The results suggest that the random motion of the RDK is most effective stimulus to the neural activities in the visual motion area. The physiological significance of the results will be discussed with recent studies with mokeys and humans.

(35) Ramdom dots blinking:視覚連合野反応の新しい検出方法

大草知裕, 金桶吉起, 柿木隆介（生理学研究所）

視覚的形態の知覚にかかわる皮質領域を特定するため，被験者に瞬間呈示される文字の識別課題を課して，右後頭葉付近から誘発脳磁場を測定した。呈示時の輝度変化の無い新しい刺激方法（Random Dot Blinking，RDB）を用いた。呈示時間の長さで視認性を変え，誘発磁場と識別成績とを比較した。

その結果，刺激呈示後300ms付近に最大振幅を持つ反応が全被験者から得られた。最大振幅時の磁場強度は呈示時間の増加に伴って大きくなった。また識別成績も同様に向上し，磁場強度と識別成績との間には関連性が見られた。電流双極子は紡錘状回近辺に推定された。皮質の第一次視覚野からの反応は検出できなかったが，これは脳磁場が加算平均により打ち消されたと考えられる。以上により，この領域の活動が形態情報処理に関わっていることが示唆された。

(36) 注意が視聴覚情報処理に及ぼす影響のMEGによる評価

岩木 直，外池光雄，山口雅彦，浜田隆史
（電子技術総合研究所 大阪ライフエレクトロニクス研究センター）

我々は，視覚ー聴覚間での注意の分割が，それぞれの脳内情報処理に及ぼす影響の評価を目的として，全頭型SQUID磁束計を用いた脳磁界計測実験を行った。

視聴覚間における選択的注意については，これまでに，EEG/MEGあるいはfMRIやPETを用いた実験が行われており，ERPにおけるnegative displacement（Nd）や，一次感覚野におけるrCBFの増加等が報告されている。

本研究では，被験者に (i) 視覚刺激への選択的注意，(ii) 聴覚刺激への選択的注意，(iii) 視覚・聴覚への注意の分割，の3条件下での，視覚あるいは聴覚刺激に対する弁別課題を課して，課題遂行中の脳磁界の計測と解析を行い，視覚あるいは聴覚への選択的注意条件における，視覚野あるいは聴覚野近傍でのMEG信号強度の増大を確認した。さらに，それぞれの注意条件下における測定結果から，信号源分布の推定を行い，注意による脳内活動の修飾の定量的な評価を行う。

(37) Fmθの位相差を持つ複数の発生源

篠崎和弘，石井良平，鵜飼　聡，石原　務，井上　健，武田雅俊
（大阪大学医学部精神医学教室）
水野由子（同機能画像診断学）吉峰俊樹（同脳神経外科）平吹度夫（同放射線科）

Fmθの主たる電流発生源は前部帯状回を含む内側前頭葉に推定されることを等価電流双極子，SAMで確認し報告したが，これとは別に左右前頭前野にも電流発生源が推定され前者に対して90度の位相差を持っていた。

連続して暗算を遂行時の4名の被験者でFmθを脳波と同時記録した。上記の現象は視察，FFTによる位相差マッピング，ゼロ・クロスを基準にしたFmθ波形の加算平均波形のコントール・マップのダイポール・パターンなどで確認できた。

Freeman らが嗅皮質で同様の振動現象を確認し，90度の位相差を持つとき興奮性，抑制性神経回路間のフィード・バック・システムが安定作動すると考察している。このモデルがFmθについて妥当性がある。

背景活動のθは機能低下とrCBFの低下に関係する。ワーキング・メモリ課題では前頭前野，前部帯状回のrCBF増加が報告されている。そこでFmθではrCBFが増加し，機能的には低下すると推定すると，頭頂連合野，側頭連合野からの入力を遮断し注意の集中を持続させているという解釈が成立する。

(38) ルール照合的タスクとフリーイマジネーションタスクによる記憶想起活動源の経時的運動経路の比較

嘉悦　勲[1]，森　高之[1]，飯田大介[1]，須谷康一[3]，内田熊男[1]，外池光雄[2]
([1]近畿大学理工学部，[2]電総研大阪ライフエレクトロニクス研，[3]㈱シード)

ペンフィールドの侵襲的研究によって，側頭葉に記憶想起の起源が存在すると推察される。また，佐々木教授の go－nogo 実験などによって，前頭葉に記憶を統合，判断して意志決定を行う中枢があると推定される。今世紀初の作家マルセル・プルーストは，「失われた時を求めて」において我々が意志的に記憶を想起しようとすると，常に記憶の必要 "断片" しか得られないが，偶然の感覚（例えばお茶に浸したマドレーヌの味）に誘発されて無意志的に想起された記憶は，過去のある "全体" をよみがえらせ，創造的な喜びを与えると結論した。

ダルヴィングは，記憶をエピソード記憶と意味記憶に分類したが，我々の記憶の特徴はすべての記憶が刻々エピソード的文脈として形成，貯蔵されることである。プルーストのいう "全体"

とは，この文脈のことであろう。我々は，暗算，しりとりのように意志的にルールを照合しつつ行う想起タスクと，フリーイマジネーションのように選択判断が介入しにくい想起とを被験者に行わせてMEGを測定，解析し，前者ではダイポールの経時的運動が，前頭葉と側頭葉の間を比較的単調に往復するのに対し，後者ではダイポールが常に広範囲に分散することを観測したので報告する。

(39) 単語および無意味語に誘発された脳磁場に対する刺激反復の効果

関口貴裕[1,2] 小山紗智子[1] 柿木隆介[1]
([1]生理学研究所，[2]大阪大学人間科学部)

一度提示した単語を反復提示すると，その単語はより早く認知される。この現象は単語反復効果と呼ばれており，心的辞書の状態変化を反映したものと考えられている。我々は先行研究において，単語に誘発された脳磁場の振幅が反復により減衰すること，その信号源がシルビウス裂周辺にあることを明らかにした。本研究では，反復による脳磁場の減衰が単語に特異的な現象かを調べるため，単語と無意味語で反復の効果を比較した。被験者は右利き健常者13名。刺激には120語のカタカナ単語と120語の無意味語を用い，これらを8語間隔で2回提示した。単語・無意味語ともに両半球で明瞭な脳磁場を誘発した。単語に対する脳磁場は，刺激提示から300－500msの潜時帯において反復により減衰した（左のみ)。この反復効果は無意味語では得られなかった。したがって，脳磁場における反復効果は，単語に特異的な処理を反映したものと考えられる。当日は信号源推定の結果を合わせて報告する。

(40) ヒトの顔認知に関する脳磁図と脳波を用いた研究

渡辺昌子[1]，小山紗智子[1]，柿木隆介[1]，桐野衛二[2]
([1]生理学研究所，[2]Neuropsychology Lab，VA Medical center，West Haven)

10名の右利き被験者について顔認知過程を脳磁図と脳波を用いて検討した。刺激は S-I；開眼顔， S-II；閉眼顔， S-III；目（S-Iから目の部分を切り抜きS-IVの上に置く)， S-IV；平均輝度をS-I と等しくした無意味図形， S-V；手の5種類。

全ての条件で潜時 130－170msec に 1M 成分が認められた。『顔』及び『目』に対して特異的に潜時180－220msecに 2M 成分が認められその双極子は紡錘状回付近に位置推定された。『目』に対する反応のピーク潜時は『顔』に対する反応より有意に延長していた。BESA を用いた多双

極子解析では両側半球の第1次視覚野（source1と2）と紡錘状回付近（source 3）の3双極子モデルが最も良好な結果を示し，1Mはsource 1,2と，2Mはsource 3に対応していた。脳波では『顔』及び『目』に対して特異的に明瞭な反応が見られ，その潜時は2M成分より約10msec有意に延長していた。

（41）顔の認知及びその加齢変化

中村昭範[1]，山田孝子[2]，阿部祐士[2]，堀部賢太郎[2]
加藤隆司[1]，伊藤健吾[1]，加知輝彦[2]，中村克樹[3]，佐藤暢哉[3]
（[1]長寿研生体機能研究部，[2]国立中部病院神経内科，[3]京都大学霊長類研究所）

顔の認知過程についてMEGを用いて分析し，その加齢変化についても併せて検討した。
【対象及び方法】対象は若年成人15名（男11，女4名，19－38才），及び中高齢者7名（男2，女5名，51－75才）。視覚刺激として，ヒトの顔，顔を格子状にスクランブルしたもの，果物の写真をそれぞれ30%の頻度で，緑色の十字架を10%の頻度でランダムに呈示し，緑色の十字架に対してボタンを押すように指示した。誘発磁界はBti社製74 channel脳磁計を用い，sensorを前頭部と後頭部，または両側側頭部にあてて記録した。
【結果】1）刺激の種類に関係なく潜時約100ms前後に誘発される磁界成分100mと，顔刺激に特異的に強く誘発される磁界成分160mを認め，100mは一次視覚野に電源が推定され，160mは紡錘状回およびその近傍に電源が推定され，多くの被検者で右側有意であった。2）100mの潜時は若年成人群では102.5±7.0ms，中高齢者群では100.9±7.4msであり，両群間に有意差は認められなかった。3）160m潜時は，若年成人群では161.7±5.3msであったのに対し中高齢者群では172.5±11.6msであり，中高齢者群で有意に（$p<0.05$）延長していた。3）100m－160m間潜時は10才年をとるごとに約4.16ms遅延する傾向が認められた。

16. 機能的シナプスの形成とその機構

1998. 12. 3－12. 4
代表者：玉巻伸章（福井医大）
世話人：小幡邦彦（生理研）

（1）シナプス結合の分子メカニズム－カドヘリンの研究から分かったこと
内田直滋（理研・脳研究ｾﾝﾀｰ）

（2）前シナプスのアクティブゾーン周縁部に局在する Still life - Rac 経路の役割
曽根雅紀（精神神経ｾﾝﾀｰ・神経研）

（3）小脳登上線維－プルキンエ細胞シナプス伝達機構の素量解析
籾山明子（長崎大・医・生理）

（4）シナプス可塑性の新しい解析法－神経終末内カルシウム測定を用いたアプローチ
神谷温之（群馬大・医・第二生理）

（5）運動の適応を担うシナプス長期増強
小田洋一（大阪大・院・基礎工学）

（6）歩行の適応制御と小脳の可塑性
柳原　大（理研・脳研究ｾﾝﾀｰ）

参加者名

金子武嗣（京都大・院・医・高次脳形態），真鍋俊也（東京大・医・脳研），五味不二也（東京都老人研），森本高子（東大・理），曽根雅紀（精神神経ｾﾝﾀｰ・神経研），籾山明子（長崎大・医・生理），小田洋一，山本亘彦，高橋正治，中山寿子，花村健次（大阪大・院・基礎工学），畠義郎，一坂吏志（大阪大・医・神経生理），内田直滋，柳原　大，保賀宣子，児島伸彦（理研・脳科学センター），玉巻伸章（福井医大），武内恒成（奈良先端科学技術大），平田たつみ，須藤文和，川崎能彦（名古屋大・院・理），時田義人（愛知県コロニー・発達障害研），狩野方伸（金沢大・医・生理），石　龍徳（順天堂大・医），山口和彦（杏林大・医），小山内実（東京医歯大・医），武井延之（新潟大・脳研），神谷温之（群馬大・医・生理），白尾智明，関野祐子，木村光宏，山崎博幸（群馬大・医・行動分析学），五十嵐道弘（群馬大・医・分子病態），木津川尚史（基生研），伊佐　正，松下かおり，小幡邦彦，山肩葉子（生理研）

研究会概要

生理学研究所研究会「機能的シナプスの形成とその維持」を1998年12月３日，４日岡崎国立共同研究機構コンファレンスセンターで開催した。全体として３つのセッションを設け，機能的シナプスの形成とその維持の研究における分子生物学的アプローチに関する話題を内田直滋先生

（理化学研究所）曽根雅紀先生（国立精神神経センター）に提供してもらった。内田直滋先生には，「シナプス結合の分子メカニズム～カドヘリンの研究から分かったこと」と題して，シナプスにおけるカドヘリンとその関連蛋白の役割について発表された。曽根雅紀先生は，前シナプスのアクティブゾーン周縁部に局在する Still life - Rac 経路の役割を中心に話していただき，両話題提供により，シナプスのアクティブゾーンでの蛋白分子の分布様式について，議論が盛り上がった。

次のセッションでは，機能的シナプスの形成とその維持の研究における電気生理学的アプローチとして，籾山明子先生（長崎大学医学部生理学）には「小脳頭上線維－プルキンエ細胞シナプス伝達機構の素量解析について，また神谷温之先生（群馬大学医学部生理学）には「シナプス可塑性の新しい解析法－神経終末内カルシウム測定を用いたアプローチ」と題して，最新の研究成果を披露頂いた。

第3のセッションでは，野心的な試みとして，機能的シナプスの形成とその維持のメカニズムを，システムとしての神経回路から考えてみた。演者は，小田洋一先生（大阪大学基礎工学部生物工学）と柳原大先生（理化学研究所）にお願いし，シナプス長期増強が，如何に運動の適応を担うか，また小脳の可塑性が歩行の適応制御に関わりうるかの話題を頂き，議論が白熱する会となった。今回の生理学研究所研究会も，上記のように有意義なものであり，研究会後のアンケートからも，会の成功が，読み取れた。

(1) シナプス結合の分子メカニズム～カドヘリンの研究から分かったこと

内田直滋（理研・脳研究センター）

最近，我々（京都大学理学部，竹市研）は，細胞接着分子カドヘリンがシナプスに存在していることを明らかにした。さらに複数のカドヘリンがそれぞれ神経回路に対応して発現されていることが分かった。カドヘリンは，細胞に選択的接着能を与えることができる，アクチンなどの細胞骨格系と相互作用するなどの特徴的な性質を持っている。これらのことから，神経回路形成において標的の認識あるいはシナプスの構造形成に関与している可能性が考えられている。また，最近はシナプスの可塑性に関与していることが明らかにされつつある。以上のことをふまえ，カドヘリンの研究から明らかになったこと，および今後の課題について議論した。

(2) 前シナプスのアクティブゾーン周縁部に局在するStill life - Rac経路の役割

曽根雅紀（精神神経センター・神経研・遺伝子工学）

我々がショウジョウバエにおいて行動異常変異株から同定した still life（sif）遺伝子は，Rho類似低分子量G蛋白質の一員である Rac に対する活性化因子であるグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）をコードする。 SIF 蛋白質は，シナプスに特異的に局在し，神経筋接合部においては前シナプスのアクティブゾーンを取り囲む領域に網目状に局在していた。この局在パターンはシナプスの形態的可塑性に関わる細胞接着因子ファシクリンIIやインテグリンと類似していた。活性化型SIFを神経細胞で強制発現させるとシナプス形成などに異常が見られた。以上のことから， SIF が Rac を活性化する領域は，シナプスの形態変化の調節に特殊化した領域である可能性がある。

(3) MPFA 法による小脳登上線維－プルキンエ細胞シナプス伝達機構の素量解析

籾山明子（長崎大・医・生理）

素量解析法は，シナプス伝達機構をモデル化する有効な手段であるが，中枢神経系においては，シナプス素量サイズ（q）や伝達物質放出確率（Pr）のばらつきが大きく，単純な確率論的モデルの適用が困難である。我々は，単一の入力線維から強力な興奮性シナプス応答が得られる小脳登上線維－プルキンエ細胞シナプスにおいて，q や Pr にばらつきが存在する場合でもこれらのパラメータを推定できる，新しい素量解析法（multiple-probability fluctuation analysis，MPFA 法）を開発した。

登上線維性 EPSCs をプルキンエ細胞から記録し，外液 $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$ 変化時の EPSC 振幅平均とばらつきを測定した。また Sr^{2+} 存在下に，登上線維シナプスの素量シナプス電流を記録した。多項分布モデルへの適合結果から，q，Pr 機能的な放出部位数（N）を推定した。このシナプスにおける顕著な刺激頻度依存性の伝達抑制は， Pr の変化に起因することが明らかになった。

(4) シナプス可塑性の新しい解析法－神経終末内カルシウム測定を用いたアプローチ

神谷温之（群馬大・医・第二生理）

スライス標本において神経終末部に選択的に蛍光 Ca^{2+} 指示薬を負荷する方法を開発し，海馬

CA1 野および CA3 野シナプスでの神経終末内 Ca^{2+} 動態と EPSP の同時測定を可能にした。このうち，大型の神経終末を持つ CA3 野苔状線維シナプスでは単一刺激による Ca^{2+} 上昇が単一神経終末レベルで測定可能であった。現在，この手法を用いてCA3野苔状線維シナプスでみられるシナプス前性 LTP・LTD の発現機構の解析を試みている。本研究会では，これまでに行ったグルタミン酸自己受容体を介したシナプス前抑制機序の解析をあわせて紹介し，この方法で何がわかるのか，結果を解釈する際に注意すべき点，他の電気生理的測定で得られるデータとの関連などを述べ，シナプス可塑性研究におけるこの方法の有用性について考察した。

(5) 運動の適応を担うシナプス長期増強

小田洋一（大阪大・院・基礎工学）

硬骨魚の後脳第4セグメントに左右1対存在するマウスナー（M-）細胞は，最大の網様体脊髄路（RS）ニューロンであり，単一のM-細胞のわずか1発のスパイクが魚の俊敏な逃避運動をトリガーする。このニューロン活動と運動との1：1対応を利用して，我々はシナプス伝達の長期増強（Long-term potentiation, LTP）によって逃避運動の適応が起こることを示した。

一方，単純に見える逃避運動も誘発する侵害刺激（敵）位置の応じた体の屈曲角を実現するが，M-細胞の1発の活動電位ではその多様性を説明できない。我々は，第5-6セグメントのRSニューロンが M- 細胞とは大きく異なる電気生理学的特性を持ち，M- 細胞から強力なシナプス結合受けることを見出した。進化の過程でホモログニューロンとして生まれた後脳 RS ニューロン群の間の機能分化と機能結合によって敏速で適応的な運動が発現すると考えている。

(6) 歩行の適応制御と小脳の可塑性

柳原　大（理研・脳研究ｾﾝﾀｰ・記憶学習機構）

リズムの引き込みはいわゆる自己組織化現象の一つであり，歩行における walk, trot, gallop などの異なる時間的秩序を示すリズムパターンは脊髄にある中枢パターン発生器（CPG）によって生成される。歩行運動の自己組織化の一つの例として，除脳したネコのトレッドミル歩行中，その一側前肢に外乱を毎歩加えると，ネコは最初のうちうまく歩くことができないが，やがて新たな歩行パターンを創発するという適応現象を示す。四足動物の歩行パターンは，数学的に4つの非線形振動子（発振器）を相互作用させたパターン発生器によってシミュレーションできるが，この自己組織化現象は発振器間の相互作用を考慮した適応のダイナミクスを導入することで，モ

デル化できる。一方，小脳長期抑圧の発現に必須な一酸化窒素の関与を薬理学的に調べると，この適応に必要であることが判明している。講演では，実験データと数学的モデルを基に，運動の適応制御における自己組織性と小脳のシナプス可塑性との相関について議論した。

17. 第4回「予測制御の生理学」研究会

1998. 12. 4－12. 5
代表者：岐阜大学　森田啓之
所外世話人：大阪大学　彼末一之
所内世話人：生理研　村上政隆

（1）レム睡眠と血圧とドーパミン神経
勢井宏義（徳島大・医・生理）

（2）心拍変動の非線形解析
久保　豊（東京女子医科・第二病院内科）

（3）延髄血管運動中枢の機能分化
照井直人（筑波大・基礎医学系）

（4）意識下ラットにおける先手必勝法の交感神経調節
國武孝人，河南　洋（宮崎医科大・生理）

（5）門脈 - 肝臓領域Na^+，K^+受容器
森田啓之（岐阜大・医・生理）

（6）指向運動時の姿勢調節
佐々木成人，吉村和也（東京都神経研・神経生理）

（7）手の運動と発声運動における中枢神経機序の差異
玄番央恵（関西医大・生理）

（8）概日振動を介する食事時刻の予測：ノルアドレナリンとNPYの関与
本間研一（北海道大・医・統合生理）

（9）自発歩行開始と循環調節コマンドの発生
松川寛二，村田　潤，和田哲也（広島大・医・保健）

(10) ニホンサル (Macaca fuscata) の四足および直立二足歩行運動：運動力学的解析
森　茂美（生理研・生体システム）

(11) 人工心臓の生理的制御
阿部裕輔（東京大大学院・医・医用生体工学）

(12) 寒冷曝露時の交感神経反応と核温の相互作用
岩瀬　敏，澤崎直規，間野忠明（名古屋大・環境研・高次神経・自律神経）

(13) 一日一定時間帯の暑熱負荷に馴化したヒトの深部体温の下降と体温調節系の予測制御
櫻田惣太郎，紫藤　治，杉本直俊（金沢大・医・生理）

参加者名

勢井宏義（徳島大・医・生理），本間研一（北海道・医・生理），森田啓之，藤木通弘，山口　修，萩池昌信，宮原太郎（岐阜大・医学・生理），河南　洋，國武孝人（宮崎医科大・生理），川田徹，西中知博（国立循環器病センター），照井直人（筑波大・医），佐々木成人（東京都神経研），玄番史恵（関西医大・生理），松川寛二（広島大・医・保健），櫻田惣太郎（金沢大・医・生理），井街　宏，阿部祐輔，望月　修，斎藤免郎（東大院・医・医用生体工学），磯山　睦（東京大・先端研），彼末一之，田中睦美，丸山めぐみ（大阪大・医・保健），久保　豊（東京女子医大・第２病院内科），岩瀬　敏（名古屋大・環境研），古山富士弥（名古屋市大・医），森　茂美，村上政隆，尾崎　毅（生理研）

研究会概要

ネガティブ・フィードバック調節機構は，これまで生体の恒常性維持機構の主役として理解されてきた。この調節機構は外乱により引き起こされる変量の変化を感知し，その変化を打ち消すように働く。従って，この調節機構が働くためには生体の変量が変化する必要があり，生体は一旦危機に曝されることになる。一方，予測制御あるいは広義のネガティブ・フィードフォワード調節機構は外乱により引き起こされるであろう変量の変化を予測し，予測した変化を打ち消すように予め生体を制御する。従って，予測制御機構が健在であれば，生体の恒常性は真に維持される。この意味で，予測制御は生体にとって重要な調節機構であり，さらなる研究が待たれる。第１回研究会は平成７年香川医科大学において開催。本会は第４回目を迎え，運動系，自律系，循環系，生体リズム，人工臓器・工学系および臨床医学の研究者が会し，各々の立場から，予測制御的調節機構について最新の研究成果を発表した。他に同種の研究会がなく，また種々の研究分野の人が集ったため，新しい考え方を他分野に見出そうとする積極的興味で盛り上がり，ざっくばらんで活発な討論が行われ，多くの参加者は有意義であったとの印象を持った。

(1) レム睡眠と血圧とドーパミン神経

勢井宏義（徳島大学・医学部・第二生理）

REM 睡眠は，急速眼球運動・覚醒類似脳波・筋緊張消失を３大特徴とする睡眠期である。脳内モノアミン神経群のうちノルアドレナリン（青斑核），セロトニン（背側縫線核）神経群などは後部視床下部のヒスタミン神経群と共に，REM-off ニューロンと呼ばれ，REM 睡眠期にその活動を完全に停止するが，ドーパミン神経群は活動を維持する。橋背側被蓋野には REM-on ニューロンが存在し，多くはアセチルコリン作動性・受容性である。この部位の一部を破壊すると筋緊張消失を伴わない REM 睡眠が観察され，それに伴って夢幻様行動が表出する。REM 睡眠

期において循環など自律神経系は「自律神経系の嵐」と呼ばれる特異的な変動を示す。血圧・心拍数・呼吸は大きく揺らぎ，一過性の高血圧や不整脈，無呼吸などが頻発する。また，体温調節機能も覚醒時に見られる環境温度に対する反応が消失する。しかし，これら REM 睡眠期における「自律神経系の嵐」の脳内メカニズムはほとんど解明されていない。最近我々は，ラットの中脳腹側被蓋野（A10）にカテコールアミン神経毒である 6-hydroxydopamine（6-OHDA）を注入すると，REM 睡眠期の血圧・心拍数の上昇が特異的に抑制されることを見いだした。このことは，中脳ドーパミン神経群が，レム睡眠期の循環動態に何らかの役割を有することを示唆している。さらに，A10ドーパミン神経群の支配領域である，前頭前野，側坐核，視床下部などへ6-OHDA を注入し，REM 睡眠期の血圧・心拍数への効果を観察した。これまでの結果，REM 睡眠期の血圧・心拍数の上昇に対し，前頭前野・側坐核への 6-OHDA 注入は影響なく，視床下部の腹内側部への 6-OHDA 注入は促進を，視床下部の外側部への 6-OHDA 注入は抑制を引き起こすことが分かってきた。

（2）心拍変動の非線形解析

久保　豊（東京女子医科大学附属第二病院　内科）

心拍変動解析は胎児や糖尿病患者から始まり，心臓自律神経機能の評価や心疾患患者の予後の指標として有用性が報告されてきた。解析法としては，まず統計的手法を用いた 1）時間領域の解析が行われ，その後 2）周波数領域の解析（スペクトル解析）や 3）幾何学的手法も用いられるようになり，非侵襲な自律神経検査法として盛んに臨床応用されている。心拍は心拍出量の重要な規定因子であり，血圧を安定させ，組織の還流量を保つ上で重要な働きを呈する。そのため，心拍は呼吸運動や圧反射をはじめとする自律神経を介する調節の他，内分泌系や体液量などの直接或いは間接的な影響を受けている。それぞれの循環調節機構は空間的・時間的な階層構造を持ちそのため複雑なネットワークを形成している。心拍の揺らぎはこのネットワークの振動を垣間見ているものと考えられる。数理モデルから循環調節機構のような相互作用を有するネットワークは一般的に非線形な振る舞いを呈することが知られている。従って，従来の線形解析法では非線形な変動を呈するとされる心拍変動解析には限界があると思われる一方，非線形解析法により心拍の揺らぎから様々な生体情報が取り出せる可能性があると考えられる。我々は，まず相関次元や 1/f 揺らぎ，Box counting 次元といったフラクタル解析に取り組み，次いで Approximate entropy（ApEn）や Hurst 指数を用いて，健常者や心不全患者，虚血性心疾患患者の心拍変動に関して，日内変動や加齢・疾患の影響を検討してきた。本会ではカオス，フラクタルといった非線形変動の性質について触れ，我々の非線形解析データを紹介する。非線形解析はノイズの影響を受けやすいと考えられるが，この点に注意を払った報告は以外と少ない。その

ため，次に数値的シミュレーションや実データと surrogate data を用いて，ノイズの影響や非線形性の検定について検討し，現在の非線形解析法の限界や問題点について考察する。

(3) 延髄血管運動中枢の機能分化

照井直人（筑波大学基礎医学系）

吻側延髄腹外側網様体（RVLM）の自発活動を有する動脈圧感受性網様体—脊髄路ニューロン（RVLM ニューロン）が血管運動中枢を構成することが確立している。このようなニューロンは全身血圧の維持・調節に必須である。しかしながら，皮膚血管のように体温調節に関る血管の運動もこれらのニューロンによって調節されているか否かについては明確でない。皮膚血管運動はしばしば全身血圧に関係する筋・内臓血管とちがった活動を示すことが知られている。血管運動中枢に皮膚血管運動を調節するニューロンが存在するならば，このようなニューロンはこれまで知られてきた RVLM ニューロンとはちがった活動様式を示すはずである。そこで，血管運動中枢の機能分化を明らかにするため，皮膚血管運動に相関のある延髄網様体—脊髄路ニューロンの同定を試みた。麻酔非動化ウサギの耳介血流を測定し，血圧にほとんど影響を与えず耳介血流を変化させる視床下部背内側部（DMH）の電気刺激に応答するニューロンを吻側延髄の腹側網様体内で検索し，その応答様式とさらに動脈圧受容器刺激に対する応答を解析した。その結果，吻側延髄の腹側網様体の血管運動に関る網様体—脊髄路ニューロンは少なくとも２つのグループに別れていることが明らかとなった。１）動脈圧受容器から抑制性入力を受け DMH 刺激に応答しないニューロン群と２）動脈圧受容器から入力を受けず DMH 刺激に応答するニューロン群である。前者は従来から記録解析されてきた RVLM ニューロンであり，吻側延髄の腹外側網様体に存在した。後者は，DMH 刺激によって耳介血流が減少（血管収縮）するとき興奮性に応答するニューロンがほとんど（13例中12例）であった。存在部位は前者より内側の腹側網様体であった。以上の結果は，延髄の血管運動中枢は延髄腹側の異なる場所に存在する機能的に異なるニューロン群によって構成されていることを示している。

(4) 意識下ラットにおける先手必勝法の交感神経調節

國武孝人・河南　洋（宮崎医科大学・第一生理）

本来，血圧などを制御するために交感神経は常に休むことなくその活動を効果器に伝えていると考えられており，それは sympathetic tone と呼ばれている。また以前より交感神経活動には

群発放電（burst）が見られることが知られており，この burst は複数の神経線維が同時に発火した結果出現すると考えられている。また単一交感神経活動についての報告によれば，いずれも放電頻度が burst の頻度に比べて低いことが示唆されている。この burst 出現の引きがねとなる神経メカニズムは現在のところ明確に説明されていないが，この出現の有無が神経束で記録した活動の指標として利用可能であると考えられる。更には，振幅を無視した burst 出現パターンのみにより sympathetic tone を評価することも可能であるかも知れない。そこで我々は意識下ラットから記録した腎臓交感神経活動（multi fiber recording）の積分値より burst の出現様式を心電図R波からの時間と inter-burst interval について調べてきた。その結果，殆ど全ての burst はR波から約30 msec（early phase; EP）と約100msec（late phase; LP）後に限局して出現しており，心拍ごとに見ると 1）EPとLPの両者，2）LPのみが出現，3）両者を認めない，のいずれかであることが分かった。またこの LP は一つ前の burst からの interval で更に細かく分類することが可能であることが明らかになった。これらの burst が出現した心拍から過去 6 心拍に遡って心拍毎血圧を調べた結果，それぞれに分類した burst ごとに有意な違いが見られ，特に 3）が最大で 1）が最低であることが判明した。これらの結果から特に数心拍前の血圧により sympathetic tone が "beat-to-beat baroreflex" として制御されている可能性が示唆された。

(5) 門脈 - 肝臓領域Na^+，K^+受容器

森田啓之（岐阜大学医学部生理学第 1 講座）

門脈 - 肝臓領域の Na^+ 濃度が増加すると濃度依存性に求心神経活動が増加する肝臓神経が存在する。この神経は肝門脈内高張 NaCl および $NaHCO_3$ 溶液投与に対し用量依存性に興奮するが，高張 LiCl およびマンニトール溶液に対しては全く応答しない。従って，浸透圧ではなく Na-sensitive であると考えられる。高張 NaCl 溶液投与に対する応答は肝門脈内 amiloride 投与により影響されなかったが，bumetanide 投与により濃度依存性に抑制された。また，この神経は K^+ 濃度増加に対しても濃度依存性に活動が増加し，その増加はやはり bumetanide 投与により濃度依存性に抑制された。従って，門脈 - 肝臓領域に bumetanide-sensitive Na^+ $2Cl^-$ K^+ cotransporter が存在し，この領域の Na^+，K^+ 濃度の感知に関与していると推測される。門脈 - 肝臓領域にこれらの受容器が存在する利点として，以下の 2 点が挙げられる：

1. 経口摂取された物質は，腸管で吸収され，体循環系に回る前にまず門脈 - 肝臓領域を通過する。従って，この領域の受容器は体循環系の血流により約 5 倍に希釈される前の高い濃度の物質を感知することが出来る。

2. この情報に基づき，体循環系の状態が変化する前に，体循環系の未来の状態を予測して現在の状態を制御することが出来る。すなわち，広義の予測制御あるいはネガティブ・フィードフォ

ワード的制御が可能になる。

これらの点を考慮に入れ，門脈 - 肝臓領域 Na^+，K^+ 受容器を介する予測制御的体液恒常性維持機構の生理学的意義について報告する。

(6) 指向運動時の姿勢調節

佐々木成人，吉村和也（東京都神経科学総合研究所 神経生理学部門）

ネコを前方のパネル上に投射した光点を注視させる。この光点をステップまたはランプ状に移動させ，これを追跡させる指向運動における，眼球，頭と四肢（荷重）の運動の関係を調べ，以下の点を明らかにした。

1）眼球と頭の運動の関係

a）頭の運動は最大速度が刺激速度に依存して変化する dynamicpathway と速度には依存せず対象物の位置に依存する staticpathway の2経路で制御されるが，眼球運動は static pathway で主に制御される。

b）dynamic pathway の方が static pathway より感受性が高く，且つ潜時が約20ms が短い。

c）頭と眼球運動の振幅を比較すると，ターゲット光の位置によらず，眼球は頭の約半分の振幅でしか動かない。

d）この関係は頭を固定しても同じことから，上丘は gaze ではなく，頭の振幅をコードしていることを示唆する。

2）眼球・頭の運動と四肢の運動の関係　頭の運動は常に重心の移動を起す。指向運動時の四肢に加わる荷重の変化を調べた。頭の運動と同時に対側の前，後肢の荷重が増大し，同側の前，後肢に加わるの荷重は減少した。その後，頭がターゲットに到達する直前から同側の前，後肢の荷重が増大，対側の前，後肢の荷重は減少した。これは頚筋に投射する網様体脊髄路ニューロンが下部頚髄の前肢領域に直接投射すること，上丘入力を受け，後肢領域まで投射する網様体脊髄路ニューロンの活動による，また潜時から，最初の荷重変化は dynamic pathway によると考えられた指向運動において，上丘からの入力は眼球・頚の運動だけでなく，重心の調節など体幹・四肢の運動を同時に制御していることが明らかになった。

(7) 手の運動と発声運動における中枢神経機序の差異

玄番央恵（関西医科大学・第二生理）

サルに手の運動をさせ，大脳皮質表面と表面から 2.0-3.0 mm 深部に埋め込んだ電極を用いて大脳皮質フィールド電位を記録，分析して，運動前野，運動野および体性感覚野の上肢領野から表面－陰性，深部－陽性の運動準備電位を記録した。右側小脳半球切除により，左側運動野の運動準備電位が消失した。一方サルに視覚或いは聴覚刺激を与え，刺激に応じて迅速，的確に手の運動を行うようになるまでの電位と行動を分析すると，学習初期に刺激と運動の連合に関連する表面－陰性，深部－陽性電位が前頭前野で記録され，学習後期には運動野の表面－陰性，深部－陽性電位の潜時が漸次短縮し，振幅が増大するにつれ，刺激から運動開始までの反応時間が漸次短縮して規則化した。運動野の表面－陰性，深部－陽性電位は手と同側の小脳半球切除により消失し，反応時間が長くなり，不規則化した。一方，サルに自発性発声をさせ，手の運動の場合と同様の電極を用いて記録，分析すると，運動前野，運動野および体性感覚野の顔面領野において表面－陰性，深部－陽性の運動準備電位が記録された。右側小脳半球切除により，左側運動野と運動前野腹側部の準備電位が消失し音声構造が変った。他方サルに聴覚刺激に応じて発声（聴覚始動性発声）させ，自発性発声と同様の方法で記録，分析したところ，刺激と運動の連合に関連する表面陰性－深部陽性電位が手の運動の場合と同様，前頭前野で記録された。が，運動に先行する運動野の表面陰性－深部陽性電位と反応時間は発声と手の運動の間で著明に異なった。右小脳核切除により，術前左側運動野に出現していた表面陰性－深部陽性の運動前電位がほぼ消失し，音声構造が変ったが，反応時間に変化はなかった。以上から小脳－大脳皮質投射の神経回路が手の運動及び発声運動の際に作動するが，小脳の発声運動における作用様式が手の運動の場合と異なる事が示唆される。

(8) 概日振動を介する食事時刻の予測：ノルアドレナリンとNPYの関与

本間研一（北海道大学・医学部・統合生理学講座）

ラットの食餌時刻を一日の一定時刻のみに制限する周期的制限給餌（RF）を行うと，行動，体温，血漿コルチコステロンなどが食餌時刻前に上昇する予知性ピークが出現する。こ予知性ピークは，１．単なる絶食では生じない，２．RFを２週間ほど持続すると出現する，３．一旦形成されると，給餌時刻に餌を与えなくても給餌時刻がすぎると消失し，翌日給餌前に出現する，４．給餌の周期が24時間を大きくこえると出現しない，４．自由摂食に戻すと消失するが，絶食にすると，もとの給餌時刻にピークが出現する，５．絶食下でのピーク再現はRFをやめて２ヶ

月ほど持続する，などの実験事実から，単に食後一定時間を経たエネルギー代謝や空腹感に伴って生じるものではなく，サーカディアン振動機構を介する時間記憶と考えられる。しかも，哺乳動物の生物時計が存在する視床下部視交叉上核を破壊した動物でも予知性ピーク出現と持続が観察されることから，視交叉上核外のサーカディアン振動機構の関与が考えられる。予知性ピークは，中枢ノルアドレナリン枯渇で抑制される。そこで，視床下部室傍核（PVN）に投射するノルアドレナリンと NPY 神経に注目して周期的食餌予知のメカニズムを検討した。in vivo microdialysis 法にて無麻酔無拘束のラット PVN でのノルアドレナリン放出を調べると，夜間に上昇するリズムがみられるが，RF 2 週目では，給餌前に放出が上昇する。また push-pull 法で PVNのNPY 放出を調べると，RF により給餌時刻前ピークと絶食下でのリズム持続が認められた。6-hydroxydopamine の PVN への注入で，絶食による NPY 上昇と再摂食による低下は影響を受けないが，RF による予知性ピークが出現しなくなることから，PVN に投射するノルアドレナリン・NPY 共存神経とその起始核である孤束核がこの予知行動に関与していると考えられる。

(9) 自発歩行開始と循環調節コマンドの発生

松川寛二，村田　潤，和田哲也（広島大学医学部保健学科）

心拍数，心拍出量ならびに動脈血圧は運動中増加する。運動と平行して起こるこのような心臓・血管系適応の調節機序として，従来 1）高位中枢コマンドによる見込み制御と 2）運動筋受容器からの反射性制御という 2 つの仮説が考えられている。運動筋からの反射（exercise pressor reflex，muscle chemoreflex あるいは muscle meta boreflex と呼ばれる）は麻酔下においても筋収縮の誘発より発現するため，筋求心性線維活動，交感神経活動ならびに中枢経路に関する研究が近年進んだ。一方，高位中枢コマンドによる見込み制御は確かに存在するという証拠が報告されつつあるが，その中枢コマンドの発生部位や下降経路については脳全体が Black-Box として扱われ，その詳細は全く不明であるのが現状である。今回，動物の自発的な床歩行運動をモデルとして，循環調節を行う高位中枢コマンドの発生部位に関する我々の仮説を示したい。

(10) ニホンサル (Macaca fuscata) の 四足および直立二足歩行運動：運動力学的解析

森　茂美（岡崎国立共同研究機構　生理学研究所）

運動の制御にかかわる上位神経機構からの下行系としては背外側系と腹内側系がある。背外側

系を構成する下行路は皮質脊髄路・赤核脊髄路であり，腹内側系を構成する主たる下行路は網様体脊髄路・前庭脊髄路である。背外側系と腹内側系の選択的な部分切断実験から，サルやネコでは腹内側系が歩行運動の発動・制御に重要な役割を果すことが明らかにされている。さらに除脳したサルを用いた研究から，すでにネコで同定された中脳歩行誘発野 mesencephalic locomotor region MLR や視床下部歩行誘発野 subthalamic locomotor region SLR に相当する部位がサルの脳幹・外側視床下部に位置していることなども明らかにされている。これら MLR そして SLR の連続微小電気刺激で誘発される歩行運動信号は網様体脊髄路系を介して脊髄の central pattern generator CPG に伝達される。我々は歩行運動の制御にかかわる中枢神経系の動態を解明するため，無拘束の中枢無傷サルが流れベルト上での四足および直立二足歩行運動を学習できるか新しい実験モデルの確立を目的として研究を進めてきた。そして体重 4 Kg 程度の幼若サルに早期からの連続したトレーニングを課することにより，流れベルト上での四足および直立二足歩行運動そして四足歩行運動への再度の変換など歩行運動の新しい課題を学習・習得させることに成功した。サルは流れベルトの速度変化や歩行面の角度変化に巧みに対応して歩行運動を遂行する。日常的な歩行運動の遂行に際してはフィードバック・フィードフォワード制御系を含めて複雑な適応制御系が関与する。本研究発表では予測制御を含めて運動力学的観点から解析したサルの歩容 locomotor pattern とその制御様式を考察する。

（11）人工心臓の生理的制御

阿部裕輔（東京大学大学院医学系研究科医用生体工学講座）

心臓を切除し，完全人工心臓を接続する場合，その制御は，ハードウエアの制御，左右心のバランス制御，生理的制御の 3 つが必要となる．ハードウエアの制御は，人工心臓のハードウエアを動作させるために必要な制御であり，左右心のバランス制御は，肺へのうっ血を防止し，生体を生存させるために必要な制御であり，生理的制御は，時々刻々と変化する生体の要求量に合った心拍出量を拍出するための制御である。いずれも重要な制御ではあるが，前 2 者が割と容易であるのに反して，生理的制御は，生体の要求量を検出する良い方法がなかったため，長い間実現が困難な課題であった。1／R 制御は，長期生存が可能な唯一の生理的制御法として，1990年に開発された。1／R（コンダクタンス）は末梢血管抵抗の逆数であり，中枢の要求が末梢血管抵抗に反映されることを利用し，末梢血管抵抗の変化から人工心臓を中枢につなぐフィードバックループを作り，生体に人工心臓を制御させようとしたものである。制御形態からは，Conductance- and arterial pressure-based control であるが，制御関数を，コンダクタンスの並列回路モデルから作成したためにこの略称をとる。この制御法を用いると，自然心臓の制御に非常に近似した結果が得られ，かつ，静脈圧の上昇や軽度高血圧といった完全人工心臓に特有の病態

も見られなくなった．しかし，なぜ 1／R 制御がうまく働くのかということが，疑問点として残った．そこで，自然心臓を残したまま人工心臓を装着し，人工心臓で心拍出量を制御しながら自然心臓の心拍数変動を観察する実験を行った．その結果，安静時のみのデータではあるが，1／R 制御関数が，生体の心拍出量の全体的な制御ロジックを近似的に表現した生理的関数であることがわかってきた．このことは，中枢の循環制御ロジックのブラックボックスを解く上で非常に重要なヒントとなると考えられ，また，1／R 制御関数は，心拍出量の絶対値を記述する関係式として，重要な意味を持つ可能性を示すものである．

(12) 寒冷曝露時の交感神経反応と核温の相互作用

岩瀬　敏，澤崎直規，間野忠明
（名古屋大学・環境医学研究所・高次神経統御部門・自律神経分野）

寒冷に曝露された際のヒトの交感神経反応と核温との相互作用について解析した．ヒトが寒冷に曝露された時，その寒さを感ずる感覚は神経性に視床下部を刺激し，血管収縮性交感神経活動の賦活化を促す。その結果として核温は上昇する。同時に寒冷曝露された血液が対流により視床下部を冷却すると，同様に血管収縮性交感神経活動を賦活化する。10名の健康成人男女（男８名，女２名）において，脛骨神経から皮膚交感神経活動を導出し，効果器反応（発汗および血管収縮）により血管収縮神経活動を分離した。同時に皮膚温，鼓膜温（核温）をサーミスターにより記録した。26℃に保った人工気候室内において，両手を手関節までドライアイスの冷気を満たした発泡スチロール性の冷却箱の中に挿入し，血管収縮神経賦活化と核温の上昇との関係を解析した。その後，室温を25℃から15℃に0.2℃／分の速度で緩徐全身冷却を行い，核温の低下と血管収縮神経賦活化との関係を解析した。急激局所寒冷曝露により前者の時間関係を，緩徐全身寒冷曝露により後者の相互関係，時間関係を解析したところ，局所寒冷曝露により交感神経賦活化の優れた被験者ほど多くの核温上昇を観察し，緩徐全身曝露により核温低下を来す被験者ほど交感神経活動の多くの賦活化を認めた。また，前者の相互相関による潜時は10分に認められ，後者の潜時は１分以内であった。寒冷曝露により血管収縮性交感神経活動は賦活化するが，その賦活化は核温の低下に相関し，その一方で，血管収縮神経賦活化の程度により核温を保持する機能に影響を与えることが判明した。

(13) 一日一定時間帯の暑熱負荷に馴化したヒトの深部体温の下降と体温調節系の予測制御

櫻田惣太郎，紫藤　治，杉本直俊（金沢大学・医学部・医学科・第一生理）

一日のうち一定時間帯に限り（午後2時から6時までの4時間）ヒトを高温環境に置く暑熱負荷を10日間程度繰り返すと，これに馴化したヒトでは深部体温の日内変動パターンが変化し，かつての暑熱暴露時間帯に一致して深部体温が下降するようになった。この時間帯に一致したヘマトクリット，血中の浸透圧・電解質・エネルギー基質・代謝に関するホルモン等の特徴的な変化は認められなかった。しかし，かつての暑熱暴露時間帯では発汗反応発現の閾値深部体温の低下や選択的環境温度の変化が起こった。したがってこの深部体温の下降は中枢により調節されたものであり，上述の体温調節機能の変化は暑熱負荷に備える手段として有効であると考えられる。これら結果から，ヒトに一日のうち一定時間帯に限る様式で暑熱負荷を与えると，暑熱負荷時間帯に対する記憶が形成され，その結果，かつての暑熱暴露期間において暑熱負荷に対処するよう自律性・行動性の体温調節機能が，実際の暑熱負荷がないにもかかわらず発現するものと推察される。体温調節機構には温熱負荷に対する時間記憶を介した予測制御機構がある可能性がある。

18. 消化管機能

1998. 12. 10－12. 11

代表者：鈴木裕一（静岡県立大学）

世話人：岡田泰伸

プログラム

（1）モルモット小腸上皮細胞に存在する K^+/HCO_3^- 依存性細胞内pH調節機序

林　久由，鈴木裕一（静岡県立大学食品栄養）

（2）パネト細胞における CFTR 分子発現と cAMP 依存性 Cl チャネル機能発現の検討

岡田泰伸，津村剛彦，挾間章博，三好毅志（生理学研究所）

（3）腸管上皮細胞における栄養素トランスポーターの調節

清水　誠（東京大学農学生命科学研究科）

（4）栄養素による小腸糖質消化吸収関連遺伝子の発現調節

合田敏尚（静岡県立大食品栄養）

（5）膵アミラーゼ活性の生後発達におよぼすミルク中インスリンの役割

木ノ内俊，矢島高二（明治乳業株式会社栄養科学研究所）

（6）胃粘液代謝

石原和彦（北里大学大学院医療系研究科）

（7）胃粘膜上皮細胞のストレス応答と病態

六反一仁（徳島大学医学部）

（8）消化管内NO代謝特性と生体防御戦略

井上正康（大阪市立大学医学部）

（9）オリゴペプチドトランスポーターを介する吸収と adsorptive-mediated endocytosis

辻　　彰（金沢大学薬学部）

(10) ペプチドトランスポーター（PepT1）の機能と発現調節

武田英二，白神俊幸，宮本賢一（徳島大学医学部）

(11) Subepithelial myofibroblast の構造と機能

古家園子（生理学研究所）

(12) 水・電解質代謝調節ペプチド uroguanylin の消化管における病態生理学的意義の検討

中里雅光（宮崎医大）

(13) 5HT と NO による腸管分泌活性化

桑原厚和，門脇　真（静岡県立大学環境研　奈良県立医科大学）

(14) 腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒による腸管上皮細胞細胞膜イオン輸送の変化

高橋　章，佐藤義久，潮海淑応，飯田哲也，本田武司（大阪大学微生物病研）

(15) Caco^{-2} 細胞を用いたアレルゲンの小腸透過機構の解析

南　久則，神田知子（大阪府立看護大学医療技術短大）

(16) 海水ウナギの腸におけるイミダゾリン受容体とその役割

安藤正昭（広島大学総合科学部）

(17) 胃内分泌現象の可視化

片倉　隆，比留間弘美，川上　倫（北里大医学部）

(18) ラット回腸での外来神経性抑制性伝達におけるATPの関与

門脇　真（奈良県立医科大）

(19) 小腸Na吸収に対するaldosteroneの効果

鈴木裕一，児山　香，佐々木巌，松野正紀（静岡県立大学食品栄養，東北大学医学部）

参加者名

清水　誠（東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻），武田英二，宮本賢一，白神俊幸，六反一仁（徳島大学・医学部），合田敏尚，林　久由，鈴木裕一，山本　武，土谷　庸，池原　修，梅田　譲，川俣幸一，野垣敦宏（静岡県立大学・食品栄養科学部），井上正康，三好真美，大西康代（大阪市立大学・医学部），石原和彦（北里大学大学院医療系研究科生体制御），片倉　隆（北里大学・医学部），中里雅光（宮崎医科大学），矢島高二，木の内俊，中村吉孝（明治乳業・栄養科学研究所），辻　　彰（金沢大学・薬学部），岡田泰伸，古家園子（生理学研究所），桑原厚和，細田　豊，鈴木睦昭，下田由紀子，中島　香（静岡県立大学・環境科学研究所），高橋　章（大阪大学・微生物病研究所），南　久則，神田知子（大阪府立看護大学医療技術短期大学部臨床栄養学科），門脇　真（奈良県立医科大学），安藤正昭（広島大学・総合科学部），佐藤嘉彦，平沢弘毅，細田佳佐（浜松医科大学）

研究会概要

消化管上皮機能に関し，臓器生理，細胞生理，生化学，分子生物学の様々な分野の研究者が集まり，討論した。特に，遺伝子発現調節に関して興味深い発表が多くあった。栄養素の消化吸収機序は栄養素の種類により upregulation を受けるものと downregulation を受けるものがあり，興味が持たれた。また腸管での転写調節因子に関して大きな一歩が踏み出されつつあることがうかがわれた。また分子生物学的手法が細胞生理学的問題解決にも一般的に広く応用される様になったことに印象づけられた。幾つかの研究は互いに協力しあって行われたものであったが，今後ともそれぞれの得意分野方法論を持ち寄り協力し会うことが大事であろう。この研究会がその一歩になることが期待される。

(1) モルモット小腸上皮細胞におけるK^+,HCP_3^-依存性細胞内pH調節機序

林　久由，鈴木裕一（静岡県立大学・食品栄養科学・生理学）

モルモット回腸上皮細胞において pH 感受性の蛍光色素である BCECF を用いて細胞内 pH (pHi) を蛍光顕微測定法により測定した。アンモニアパルスによる酸負荷からの pHi 回復機序を検討した。重炭酸イオンを含まない HEPES 緩衝系では酸負荷からの pHi 回復は代用液の主要陽イオンが Na^+, Ni^+ の時は観察されたが，K^+，Rb^+，Cs^+では観察されなかった。しかし重炭酸緩衝系では酸負荷からのpHiの回復は，Na^+，Li^+，更にK^+，Rb^+でも観察された。この K^+，HCO_3^- 依存性の機序はアミロライド，SITS では抑制されなかった。グリシルグリシンによる pHi の酸性化並びにグリシルグリシン除去後の pHi の回復は主要陽イオンが Na^+ のみの時だけでなく K^+ の時も観察された。次に基線の pHi 維持機構について検討した。代用液の Na^+ を有機陽イオンである $NMDG^+$ に置換すると重炭酸イオンの存在の有無にかかわらず pHi の酸性下が観察された。しかし，重炭酸系では Na^+ を K^+ に置換すると pHi の低下が観察されなかった。以上より K^+，HCO_3^- 依存性の機序は恐らく K^+，HCO_3^- 共輸送担体により，この輸送体は栄養素吸収細胞にあると考えられた。

(2) パネト細胞における CFTR 分子発現と cAMP 依存性 Cl^- チャネル機能発現の検討

岡田泰伸，津村剛彦，挾間章博，三好毅志（生理研・機能協関）

モルモット小腸より単離した腺上皮組織の底部にパネト細胞を同定し，これにパッチクランプ全細胞電流記録法を適用したところ，cAMP 刺激で活性化される Cl^- 電流を見出した。この電流は細胞内 ATP 除去やAキナーゼ阻害剤投与によって消失した。その直線的電流・電圧特性，アニオン選択性，DIDS 非感受性は CFTR Cl^- チャネル電流によく似ていた。CFTR mRNA の発現は，全腺組織レベルでの RT-PCR では確認されたが，パッチクランプ後に単一パネト細胞から採取した細胞質においては検出されなかった。免疫染色陽性細胞は腺上部には見られたが，パネト細胞が存在する腺底部では見られなかった。従って，パネト細胞は CFTR には似ているが，分子実体は異なる cAMP 依存性 Cl^- チャネルを発現していることが結論された。

(3) 腸管上皮細胞における栄養素トランスポーターの調節

清水　誠（東大院・農学生命科学）

我々は，ヒト腸管由来上皮細胞 Caco-2 を用いて，食品因子や内因性物質などと腸管機能の関わりを調べている［1］。ここでは，特にタウリントランスポーター（Tau-T）を中心に，トランスポーターの細胞レベルでの活性調節について報告したい。細胞外の基質濃度を変化させると，その変化に応答して Tau-T は up- または down-regulate される。このように細胞へのタウリン取り込みは細胞レベルで微妙に調節されることがわかった。Tau-T は基質濃度変化のみならず，浸透圧ストレスに対応して調節されることも確認され，またこれらの調節は遺伝子の転写レベルで起こっていることも明らかになった。さらに，このようなトランスポーターの細胞レベルでの微妙な調節は，他のアミノ酸の取り込みにおいても行われていることを，Lys, Leu について明らかにした。

［1］栄養と健康のライフサイエンス, 3(3), 74-80 (1998)

(4) 栄養素による小腸糖質消化吸収関連遺伝子の発現調節

合田敏尚，田中竹美，岸　和廣，高瀬幸子（静岡県立大学 食品栄養科学部 栄養生理）

ラット小腸のラクターゼ・フロリジン水解酵素（LPH）とスクラーゼ・イソマルターゼ（SI）の遺伝子発現は，糖質の摂取により転写レベルで増大することを明らかにしてきた。本研究では，この転写調節に共通の核内因子が関与する可能性について検討した。ラットの SI 遺伝子および LPH 遺伝子の転写開始点上流の転写調節領域には，いずれも TATA box のすぐ上流に TTTAC/T の共通配列を有する領域が存在していた。この領域はマウスやヒトの SI では SIF1，ブタ LPH では CE-LPH1 と呼ばれてきた転写調節領域に対応しており，腸管に特異的に発現するホメオドメインタンパク質 Cdx-2 が結合できることが明らかになった。ラット空腸について，これらの転写調節領域に結合している核内タンパク質の量を測定したところ，グルコース投与群に比べて，フルクトース投与群では SIF1 へのその二量体の結合量が増大した。また，高糖質食群では低糖質食群よりも SIF1 および CE-LPH1 に結合する核内タンパク質量が増大した。Cdx-2 mRNA量は高糖質食群の方が増大していた。従って，糖質摂取に伴う LPH および SI 遺伝子の発現増大は，遺伝子の転写調節領域への Cdx-2 などの核内因子の結合を介してもたらされていると推察される。

(5) 膵アミラーゼ活性の生後発達におよぼすミルク中インスリンの役割

矢島高二，木ノ内俊　明治乳業株式会社（栄養科学研究所）

哺乳動物にとって離乳期の消化機能の発達，変化は摂取する栄養物の急激な変化に対応するために重要である。本研究では離乳期ラットの膵アミラーゼ活性増加が何によって誘導されているか解明を試みた。仔ラットが飼料を摂取できない構造の特殊ケージを用いた検討により離乳初期の膵アミラーゼ増加に食餌成分の変化は作用していないことが示唆された。また膵アミラーゼ発現を促進するインスリンの血中濃度がアミラーゼ活性の変化に一日先行する変化をしていることが示された。通常の人工乳（STD）を17日齢のラットに投与したところ血中インスリン濃度が低下したが，母乳と同レベルのインスリン添加乳（INS）の投与で血中インスリン濃度は上昇した。インスリンとトリプシンインヒビターを同時添加した人工乳（INS/TI）の投与により血中インスリン濃度は母乳哺育ラットと同レベルまで上昇した。これらの人工乳でラットを人工哺育したところ，STD 群，INS 群では母乳哺育ラットで見られる離乳初期の血中インスリン濃度，膵アミラーゼの増加が起こらなかったが，INS/TI 群では離乳初期の血中インスリン濃度，膵アミラーゼの増加が誘導された。離乳初期の膵アミラーゼ増加はトリプシンインヒビター共存下の母乳中インスリンが血中インスリン濃度上昇を介して誘導していることが示唆された。

(6) 胃粘液代謝

石原和彦（北里大学大学院医療系研究科生体制御生化学）

胃粘膜には表層粘液細胞（SMC）と粘膜深部の腺粘液細胞（GMC）の少なくとも 2 種類の粘液産生細胞があり，これらは異なった性質をもつ粘液を産生・分泌している。我々は，胃粘液の主要成分であるムチン（粘液糖タンパク質）に着目し，主として生化学的手法による研究を行なっている。今回は，産生細胞の異なるラット胃ムチンを特異的に認識するモノクローナル抗体の開発とその若干の性状について報告するとともに，これらの抗体を用いたいくつかの研究結果を報告する。得られた抗体は殆どが，ムチンの糖鎖を認識するもので，ラット SMC，GMC およびこれらが分泌するムチンと特異的に反応するものがあった。特に HIK1083 は，哺乳類のみならず両棲類，爬虫類の GMC と特異的に反応する抗体で，特殊な結合様式を持つ糖鎖をエピトープとしていた。また，胃酸分泌刺激剤として知られている，ガストリン，ヒスタミン，カルバコールなどが，胃ムチンの生合成を亢進することが明らかになっているが，これらがそれぞれ独特の様式でムチンの合成に関与することが分かりはじめたので，その結果を報告する。

(7) 胃粘膜上皮細胞のストレス応答と病態

六反一仁（徳島大学医学部栄養生理）

ストレス潰瘍に代表されるように，胃粘膜は生体のストレス応答を端的に表現する組織である。初代培養胃粘膜細胞は，胃粘膜の特性を備えており，種々のストレッサーに対して，短時間で熱ショック蛋白質（HSP）をはじめとする多くのストレス関連遺伝子を発現する。これらの遺伝子発現を中心に，胃粘膜細胞のストレス応答の特徴について明らかにする。次に，in vivo ストレス潰瘍モデルを用いて，急性ストレス時の胃粘膜における HSPs の誘導とその生理的役割，さらに， HSP を誘導する生体内での情報伝達ネットワークについて述べる。また，我々が初めて報告したシャペロン誘導剤の臨床応用について紹介する。最後に，胃粘膜細胞の新たな機能として，上皮系の細胞で初めて報告した強力なスーパーオキシド産生系を紹介し，胃粘膜細胞由来のスーパーオキシドアニオンを介した胃粘膜細胞のストレス応答についても紹介する。

(8) 消化管内 NO 代謝特性と生体防御戦略

井上正康（大阪市立大学医学部生化学教室）

多彩な生理作用を示す一酸化窒素（NO）は体内で酵素的にも非酵素的にも産生される。消化管上皮細胞や壁内神経叢にも NO 合成酵素が存在し，これに由来する NO が消化管の運動をはじめとする様々な機能に関与している。消化管潰瘍や感染症では浸潤白血球に由来する NO が病態を左右することが示唆されているが，不安定なガス状ラジカルであるためにその体内動態や病態機能は不明な点が多い。NO はヘム蛋白質，SH 蛋白などと可逆的に結合して代謝を制御すると同時に，酸素とも反応して速やかに酸化される。NO や食品添加物の亜硝酸は胃内の低い pH では SH 化合物と反応してニトロソチオール（RS-NO）を形成する。NO の寿命や病態生理活性は局所酸素分圧やレドックス状態に強く依存し，特に嫌気性菌が生息する消化管内や腹腔などの低酸素空間ではその作用が極めて大きいと考えられる。演者等は，NO がミトコンドリアや大腸菌（E. coli）の呼吸を可逆的に抑制すること，その作用が低酸素分圧下で著しく増強すること，および腸内細菌では種類によりその感受性が著しく異なることを見いだした。今回，分子状酸素，NO，および活性酸素間のクロストークが，血液循環，組織エネルギー代謝，臓器抗腫瘍機能，あるいは感染防御機能を総合的に制御し，生命機構を維持するスーパーシステムを構築している様相を述べる。また，このシステムが消化管機能のみならず，腸内細菌のエネルギー代謝，増殖，ホストとの共生関係，あるいは感染病態成立に極めて重要な役割を担っている様相も紹介する。

(9) オリゴペプチドトランスポーターを介する吸収と adsorptive-mediated endocytosis

辻　彰（金沢大学薬学部）

小腸上皮細胞刷子縁膜に発現するH^+/オリゴペプチドトランスポーターは，天然のジ・トリペプチドのみならず，β－ラクタム抗生物質，ACE 阻害薬，ベスタチンおよび L-ドーパーのL-フェニルアラニンプロドラッグを輸送する。最近に至り，この PepT1 はペプチド構造を有しないアシクロビルのバリールエステルプロドラッグ（valacyclovir），4－アミノフェニル酢酸，アミノアルキル酸をも認識・輸送することが報告され，PepT1 は驚くほど幅広い基質特性を示すことが明らかとなった。しかし，PepT1 はテトラペプチド以上のペプチドは認識も輸送もしない。

では，比較的大きなペプチドの経口デリバリーにはどのような吸収ルートが利用できるか？既に演者らは，血液脳関門（BBB）を形成する脳毛細血管内皮細胞（BCEC）において塩基性ペプチドが adsorptive-mediated endocytosis 機構を利用した輸送されることを報告し，生理活性ペプチドの脳デリバリー戦略に利用できることを示した。抗痴呆薬エビラタイドはこの機構で BBB を透過して脳に移行することを明らかにした。小腸上皮細胞においても adsorptive-mediated endocytosis 機構による塩基性ペプチドの輸送が起こるかどうかを，ヒト大腸癌由来培養細胞 Caco-2 を用い共焦点レザー顕微鏡による細胞内動態解析による検討により，BCEC と同様にこの機構が存在し，両細胞における輸送速度が良く対応していることが分かった。比較的安定で脂溶性の塩基性ペプチドがラット小腸から約８％も吸収されることを示すことができた。

以上の結果は，比較的小さいものから大きなペプチドも，輸送機構を変換させることにより経口デリバリーさせることができることを示唆している。

(10) ペプチドトランスポーター（PepT1）の発現調節

武田英二，白神俊幸，宮本賢一（徳島大学医学部病態栄養）

腸管を介した窒素補給経路としてアミノ酸輸送系に比してペプチド輸送系の方が，吸収効率およびアミノ酸補給バランスが良いことから，ペプチドによる補給が優れていることが指摘されている。近年，腸管ペプチド輸送担体（PepT1）がクローニングされ，ジおよびトリペプチドを広く認識して輸送すること，およびペプチド態の薬剤も輸送することが明らかになった。ラットに高蛋白食を投与すると，ペプチド輸送活性，PepT1 mRNA および蛋白量は増加した。また，ジペプチドやアミノ酸を投与しても同様に増加した。PepT1 遺伝子のプロモーターを解析したところ転写開始点上流に TATA 様および GC ボックス配列が認められた。転写開始点上流の -97

から -50 および -351 から -171 領域が腸管特異的な発現に関与し，-295 から -271 領域の AP-1 結合部位およびアミノ酸反応領域がペプチドおよびアミノ酸により反応する領域と考えられた。以上，PepT1 の分子特性および発現調節機構の解明により，ペプチド吸収の栄養学的意義が明らかとなった。

（11）Subepithelial myofibroblasts の構造と機能

古家園子（生理学研究所・形態情報解析室）

腸管絨毛上皮細胞の基底膜下でネットワークを形成している subepithelial myofibroblasts（絨毛上皮下線維芽細胞 ）は星状でアクチンに富み，ギャップ結合で細胞間結合している。絨毛上皮下線維芽細胞には毛細血管が近接して，また開放型の神経終末がしばしば存在することから，絨毛上皮下線維芽細胞は神経および毛細血管からのシグナルを受けていることが推察される。

我々は絨毛上皮下線維芽細胞を培養し，この細胞が細胞内 cAMP の上昇で扁平から星状に変化すること，エンドセリンB（ETB）受容体に富むこと，substance-P, serotonin, ATP, bradykinin, angiotensin II など，神経伝達物質や血管作働性物質に反応して，細胞内 Ca^{2+} が一過性に上昇することを見いだした。また， ETB 受容体の一部欠損ラットである sl/sl rat を用いた実験より， sl/sl rat ではETA受容体を通して絨毛上皮下線維芽細胞の形態変化が起こることを明らかにした。

最近，絨毛上皮下線維芽細胞が TGF-β やエピモルフィンを産生し，発生の過程で上皮細胞の villus構造形成を誘導していること， また， IL-1 刺激により，プロスタグランジン E2 を産生することが報告された。絨毛上皮下線維芽細胞の形態変化は物質の産生およびギャップ結合を介した細胞間 Ca^{2+} シグナリングを制御している可能性がある。

（12）水・電解質代謝調節ペプチド uroguanylin の消化管における病態生理学的意義の検討

中里雅光（宮崎医大第三内科）

uroguanylin (UG) は，腸と尿から単離された15 アミノ酸よりなるペプチドで，腸と腎尿細管の上皮に存在する guanylate cyclase 結合C型受容体（GC-C）を活性化し，細胞内 cyclic GMP を増加させ，消化管では水・Na^+ の吸収抑制と CFTR Cl^- チャネルを介する Cl^- 分泌を，また腎では NaCl 排泄と利尿を齎らす。エンテロトキシンはUGと50%のアミノ酸相同性を有し，その分子共

通性からエンテロトキシンは GC-C に結合後，UG と同様のメカニズムを介し，分泌性下痢をきたす。我々は UG の遺伝子クローニング，染色体上の位置決定と細胞局在，分泌動態を解析した。ヒトで経口２％食塩水負荷により，尿中UGは約2.5倍に増加したが，経静脈的 NaCl 投与では変化なかった。NaCl 10g/日の食事摂取では NaCl 7g/日に比べ尿中 UG の有意な増加を認めた。ラット経口 NaCl 負荷で負荷15分後に UG 遺伝子発現の増強を認めた。ラット腸灌流では，管腔内 NaCl に反応して管腔性と血行性に UG 分泌が促進された。セロトニン陽性の腸内分泌細胞（ECcell）の管腔側と血管側に UG は染色された。胃では，UG は ECL 細胞で産生される。ラットへのプロトンポンプインヒビターの投与により，UG の遺伝子発現の抑制を認めた。胃癌患者，萎縮性胃炎患者の血中UG濃度は健常者（5.0±0.3 fmol/ml）と差がなかったが，ECL 細胞の過形成をきたす Zollinger-Ellison 症候群患者の血中 UG 濃度は，95.1fmol/ml と高値で，Omeprazole 投与後 7.8 fmol/ml と低下した。

【結論】ウログアニリンは腸管内NaCl濃度に反応して遺伝子発現と分泌が亢進し，尿中ウログアニリン排泄量も増加することから，腸－腎連関を介して水・NaCl 代謝調節に関与する腸管性ナトリウム利尿ペプチドと考えられる。また胃酸分泌におけるウログアニリンの作用についても推察を加える。

（13）5-HT と NO による腸管分泌活性化

桑原厚和（静岡県立大学・大学院/環境科学研究所）
門脇　真（奈良県立医科大学・第２生理）

セロトニンは消化管の EC 細胞や壁内神経に存在し，各種消化管機能の調節に関与していることが知られている。例えば，セロトニンはモルモット下部大腸で，セロトニン３および４受容体を介してクロライドイオン分泌を誘発する。さらに，このセロトニンによるクロライドイオン分泌には，コリン作動性及び非コリン作動性神経が関与していることが知られている。

最近の免疫組織化学的研究により，消化管壁内神経叢には NO 含有神経が存在することが明らかにされてきた。NO は消化管において，消化管運動や粘膜上皮でのイオン輸送調節などに関与していることが報告されている。例えば，NO はラットの腸管で電解質分泌を誘発し，さらに，NO 合成阻害剤である L-NAME は castor-oil により誘発される下痢を止めることが知られている。また，セロトニンにより誘発される腸管平滑筋の弛緩反応に NO が関与していることも報告されている。このようなことから，モルモット下部大腸でもセロトニンと NO との機能的連関が存在してることが示唆される。

本研究では，上述した観点から，モルモット下部大腸でのセロトニンによるイオン分泌誘発機構への NO の関与を Ussing chamber を用いて検討した。その結果，NO はセロトニンにより誘

発されるクロライドイオン分泌において，非コリン作動性のmediatorであることが示唆された。

(14) 腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒による腸管上皮細胞細胞膜イオン輸送の変化

高橋　章，佐藤義久，潮海淑応，飯田哲也，本田武司（大阪大学微生物病研究所）

腸炎ビブリオ感染症の主要な病状として下痢が挙げられるが，その発症機序はいまだ明らかでない。耐熱性溶血毒（TDH）は，腸炎ビブリオの主要な病原因子といわれており，ウサギ腸管ループ実験より TDH 単独で液体貯留を認めることから，TDH が下痢を引き起こすことが示唆されている。そこで本実験では，ヒト腸管上皮細胞を用いて TDH がイオン輸送に与える影響を解析した。$CaCo^{-2}$ 細胞だけを培養したものでは，TDH により Trans－epithelial の短絡電流は変化しなかったが，ブチル酸またはヒト平滑筋筋芽細胞との共培養により分化を促進した $CaCo^{-2}$ 細胞では，TDH により Trans－epithelial の短絡電流が増加した。この短絡電流の増加は，Cl^- 電流の増加であると考えられた。さらに，分化を促進した $CaCo^{-2}$ 細胞では，TDH により Ca^{2+} が細胞外から流入することによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を認めた。

(15) $Caco^{-2}$ 細胞を用いたアレルゲンの腸管透過機構の解析

南　久則，神田知子（大阪府立看護大学医療技術短期大学部）

【目的】腸管粘膜バリアは，アレルゲンの体内移行を制限しているが，バリア機構の破綻時には，アレルゲンの体内侵入が亢進する。しかしながら，アレルゲンの腸管透過機構には不明な点が多い。そこで $Caco^{-2}$ 細胞を用いアレルゲン（OVA,Gly m Bd 30K 大豆抗原タンパク質）の腸管透過性を観察した。

【方法】$Caco^{-2}$ 細胞を，透過性膜上で培養した。粘膜透過性は，ルシファ－イエロ－(LY)，アレルゲンを粘膜側に添加し，一定時間後に漿膜側のLY，アレルゲン量を定量し判定した。

【結果】粘膜側に OVA を添加し，漿膜側に出現する OVA をウエスタンブロット分析すると intact のまま通過していることが示された。IFN-γを添加し 72時間培養すると，LY，OVA の透過性は増大した。このことは OVAは intact な状態で腸管を通過し，INF-γがその腸管透過を亢進させることを示している。一方，Gly mBd 30K は分子量が OVA より小さいにもかかわらず，ほとんど透過しなかった。アレルゲンの腸管透過性が分子量に依存しないことを示唆し今後の検討課題である。

(16) 海水ウナギの腸におけるイミダゾリン受容体とその役割

安藤正昭（広島大学総合科学部）

海水ウナギの腸上皮細胞膜には [3H]clonodine の特異的結合部位がある。この部位に対する clonidine の結合は，adrenaline（AD），dopamine, yohimbine, rauwolscine 等の AD 受容体アゴニストやアンタゴニストによって競合阻害を受けない。しかし guanabenz 等のイミダゾリン系薬物によって強い競合阻害を受ける。Ussing chamber にセットした腸上皮組織の粘膜側に guanabenz を加えると，漿膜側陰性の経上皮電位，短絡電流は増加した。この結果は濃度依存的であり，RX821002 や efaloxan いった他のイミダゾリン系薬物で完全にブロックされた。以上の結果は，海水ウナギの腸上皮細胞にイミダゾリン受容体が存在し，イオンの輸送を調節していることを示唆している。事実，粘膜側に与えた guanabenz は腸における NaCl と水の吸収を高めた。また海水ウナギの腸内腔液は guanabenz 様活性を示した。

(17) 胃内分泌現象の可視化

片倉　隆，比留間弘美，川上　倫（北里大・医・生理学）

我々は，ビデオ増感光学顕微鏡システムを用いて，マウス胃体部粘膜組織の内分泌細胞からの開口放出現象を視覚化することに成功した。開口放出のビデオ画像をデジタル化し，画像フレーム間の差分をとり，開口放出頻度を定量解析した。開口放出の頻度はアセチルコリンやそのニコチン受容体，ムスカリン受容体両アゴニストによってただちに増加すること，ガストリンによって比較的ゆっくりと持続性に増加することが判明した。この開口放出が，胃体部粘膜漿膜側で起こること，神経性（アセチルコリン）・内分泌性（ガストリン）に調節を受けることから，開口放出を観察した細胞は enterochromaffin-like（ECL）細胞であり，この小胞からの分泌物質は，ヒスタミンであると推定した。更に，Forskolin 及び dbcAMP 投与により開口放出頻度は 2 分から 4 分の潜時を経て有意に増加することから，この開口放出は，cAMP／A-Kinase 系を介して促進されることが示唆された。

(18) ラット回腸での外来神経性抑制性伝達における ATP の関与

門脇　真（奈良県立医科大学・医・第二生理）

腸管運動は主に内因性の腸管壁内神経系に支配されているが，外来性の神経である交感神経，副交感神経および知覚神経にも大きな影響を受けている。そこでラット回腸で腸間膜神経刺激（2-20Hz，0.5msec，30sec）を行うと，guanethidine 感受性の弛緩反応が見られ，この反応は atropine（1μM），C6（100μM），capsaicin（1μM），L-NAME（100μM）により影響を受けなかったが，ATP 脱感作（100μM×4）により有意に抑制された。さらに，P2 受容体拮抗薬であるsuramin(100μM) および small conductance Ca2+-activated K+ channels 選択的阻害薬 apamin（0.5μM）によっても有意に抑制された。従って，交感神経性ノルアドレナリン神経が腸管神経叢でATP神経にシナプスする抑制性伝達機構が存在する可能性が示唆された。

(19) 小腸 Na 吸収に対する aldosterone の効果

鈴木裕一，林久　由，児山　香，佐々木巌，松野正紀
（静岡県立大学食品栄養科学部，東北大学医学部）

回腸 Na 吸収に対するアルドステロンの直接的な効果を，in vitro の系で検討した。

【方法】ラット回腸を切り出し，筋層を剥離後，Ussing 型のチャンバーに装着した。イオン輸送活性を短絡電流（Isc）測定から求めた。

【結果】アルドステロン存在下で回腸を incubate すると，4 時間以上後に，amiloride 感受性の Isc 成分が観察された。アルドステロンなしではそのような Isc 成分は 8 時間の incubate でも見られなかった。アルドステロンによる amiloride 感受性の Isc の発現は，遺伝子転写活性阻害剤や，翻訳阻害剤存在下では消失した。さらに，アルドステロンによる amiloride 感受性の Isc の発現は，Mineralocorticoid 受容体阻害剤の Spironolactone によっても，Glucocorticoid 受容体阻害剤の RU38486 によっても阻害された。

【考察】アルドステロンは回腸上皮に直接作用し，amiloride 感受性起電性 Na 吸収を活性化する。この作用には遺伝子転写ー蛋白合成の活性化が含まれる。さらに，この効果発現には，Mineralocorticoid 受容体と Glucocorticoid 受容体の両者の受容体が同時に活性化される必要があることが示唆された。

19. ニューロン・グリア細胞死の病態：その形態と機能の相関

1999. 1. 7－1. 8

代表者：西野仁雄（名古屋市大・医・生理）

世話人：岡田泰伸（生理研）

（1）ラット脳梗塞モデルにおける学習行動障害

田村　晃（帝京大・医・脳神経外科）

（2）脳梗塞に伴う遠隔部の変性 — MRI による観察

中根　一（帝京大・医・脳神経外科）

（3）霊長類海馬のイメージング — 微小脳梗塞と神経細胞死

山嶋哲盛（金沢大・医・脳神経外科）

（4）脳虚血と Na/Ca-exchanger

山本悟史（久留米大・医・生理）

（5）低酸素，虚血，高酸素と脳障害

宮本　修，Roland N Auer（香川医大・生物，カルガリー大・医・病理）

（6）内因性神経毒と中枢神経変性疾患

香月博志（京都大・薬・薬理）

（7）副甲状腺ホルモンの神経毒性とその防御

工藤佳久（東京薬大・生命科学部）

（8）グリア・ニューロンにおけるカルシニューリン依存性細胞死

浅井昭雄（東京大・医・脳神経外科）

（9）脳虚血における HB-EGF の発現

川原信隆，三島一彦，田村　晃，東山繁樹，桐野高明

（東京大・医・脳神経外科，帝京大・医・脳神経外科，大阪大・医・生化）

(10) ラット脳における XIAP の発現

斉藤延人，川原信隆，川合謙介，浅井昭雄，桐野高明

（東京大・医・脳神経外科）

(11) グリア細胞由来の新規ストレス蛋白の ORP150 は低酸素による細胞死を抑制する

小澤健太郎，小川　智，遠山正彌（大阪大・医学研究科・機能形態）

(12) ラットミクログリアにおけるカイニン酸応答

野田百美，中西　博，鍋倉淳一，赤池紀生（九州大・医・生理，歯・薬理）

(13) 血清によるミクログリア活性化増強

中村洋一（愛媛大・医・生理）

(14) SAH 患者に対する Indomethacin（COX阻害剤）療法について

土肥謙二（昭和大・医・脳神経外科）

(15) Bcl-2 の虚血性神経細胞死抑制と作用機序

島崎久仁子（自治医大・生理）

(16) PACAP による神経細胞死の防御とその分子機構

塩田清二（昭和大・医・解剖）

(17) アポトーシス細胞における容積調節性収縮能の亢進

前野恵美，挾間章博，石崎泰樹，金関　悳，岡田泰伸（生理研）

(18) ミトコンドリア toxin による線条体特異細胞死

西野仁雄，飛田秀樹，熊崎路子，櫻井輝美（名古屋市大・医・生理）

参加者名

野田百美（九州大・医），山本悟史，内門久明（久留米大・医），中村洋一（愛媛大・医），宮本修（香川医大），小川　智（大阪大・医），赤池昭紀，香月博志，久米利明（京都大・薬），工藤佳久（東京薬大），山嶋哲盛，長谷川光広（金沢大・医），島崎久仁子（自治医大），浅井昭雄，斉藤延人，成田善孝，川原信隆，秋　建華，川合謙介，伊地俊介，桐野高明（東京大・医），田村　晃，中根　一（帝京大・医），塩田清二，舟橋久幸，大滝博和，土肥謙二，池田幸穂（昭和大・医），岡田泰伸，前野恵美，赤塚結子，范　海天，清水貴浩，森島　繁，森信一郎，池中一裕，林　誠治（生理研），西野仁雄，馬場広子，飛田秀樹（名古屋市大・医），松井三枝（富山医薬大・医），田中達郎（味の素）

研究会概要

虚血・梗塞，低酸素・高酸素，エネルギー不足，内因性・外因性神経毒，過興奮，ホルモン異常などの種々のストレス下で中枢神経細胞，末梢神経細胞及びグリア細胞が死に至る病態過程が形態，機能両面より解析された。ニューロン・グリア細胞死のメカニズムの一端が明らかにされるとともに，これらの細胞死に対する防御法の開発が進みつつあることが報告され，将来の本分野の研究のさらなる進展が望まれた。

(1) ラット脳梗塞モデルにおける学習行動障害

田村　晃（帝京大学医学部脳神経外科）

ラットの中大脳動脈凝固切断モデルでは大脳皮質と線条体外側部が梗塞となり海馬・視床には虚血は生じない。このモデルで，明暗箱の受動的回避反応，レバー押し型能動的回避反応，モリ

ス型水迷路及び八方向迷路による空間認知反応による学習行動障害を術後３～６ヶ月にわたり観察した。受動的回避反応，能動的回避反応で長期間にわたる保持および再獲得障害が認められた。水迷路試験では保持及び獲得障害が，八方向迷路学習でも保持及び再獲得障害が長期間持続した。これら学習行動障害と梗塞巣との相関をみると，受動的回避反応では相関は認められなかったが，能動的回避反応及び迷路反応では大脳皮質梗塞巣と有意の相関が認められ，特に前部皮質梗塞巣との相関が有意であった。一般的に空間認知障害は両側の海馬損傷で生じるが，海馬の直接損傷を伴わない一側の皮質・線条体損傷で空間認知の獲得及び保持の障害が長期間にわたり持続することが明らかになった。

(2) 脳梗塞に伴う遠隔部の変性　— MRI による観察—

中根　一（帝京大学医学部脳神経外科）

われわれは，線状体梗塞後の同側黒質の変性，皮質梗塞後の視床の変性に注目し，MRI を用いて観察した。黒質の変性は，脳梗塞後１週間ほどで観察され，Ｔ２ 強調画像で高信号に描出される。ラットでも同様の所見が観察され，その時期の組織所見で，血管周囲の astrocytic endfeet の腫脹が主な病態であることがわかった。この変性は，GABA の低下に基づく transsynaptic degeneration と考えられている。視床の変性は，２つのタイプがあり，いずれも逆行性変性と考えられている。外側核群は Ｔ２ 強調画像で低信号として描出され，鉄の蓄積に起因すると考えている。背内側核群の変性は齧歯類では観察されないと言われており，MRI でも所見は得られなかった。臨床例では，拡散強調画像で，検出力が高く高信号に描出された。この変性は，prefrontal cortex との神経路の損傷によってもたらされると考えられている。

(3) 霊長類海馬のイメージング—微小脳梗塞と神経細胞死

山嶋哲盛（金沢大学医学部脳神経外科）

近年，側頭葉の内側部に位置する海馬は，新しい記憶の形成と一定期間の保持に重要な役割を果たすこと，および一過性脳虚血に対して最も脆弱性を示す脳領域の一つであることが明らかにされた。わが国においては他の西欧諸国と比較して，多発性脳梗塞などの虚血性脳血管性障害に起因する痴呆症や加齢に伴う健忘症・記憶障害の頻度が高いとされている。したがって，これらの主要な原因である海馬の加齢性病変のメカニズムを明らかにしその診断法を確率することは21世紀の超高齢化社会を目前に控えたわが国の重要課題であると言える。本研究では，40歳以上の

壮年および老年者の剖検脳および近時記憶障害患者を対象として，前者には海馬の病理学的検索と MRI 診断，後者には神経心理テストを行った。その結果，１）剖検脳50例中13例26%の割で組織学的に生み馬の微小梗塞が見られること，２）海馬の微小梗塞は MRI で的確に診断し得ること，および，３）海馬に微小梗塞を持つ患者は神経心理テストを行うと近時記憶障害を呈することの３点が明らかになった。したがって，近時記憶障害を主訴とする壮年，老年の患者においては，可及的海馬にターゲットをあてた MRI 診断を行うことで海馬の萎縮のみならず微小脳梗塞の存在にも注目すべきである。

(4) 脳虚血とNa／Ca－exchanger

山本悟史（久留米大学医学部第一生理）

ラット海馬スライスに虚血負荷（無酸素・無グルコース液灌流）を行うと，CAI 錐体細胞では約６分後に急峻脱分極電位が発生し，この時点で酸素・グルコースを再投与しても脱分極は持続し，５分後には膜電位が消失してしまうことが細胞内記録法で観察された。

一方，細胞外記録法で同様の実験を行うと，急峻脱分極電位に一致して急峻陰性 DC 電位が記録できたが，酸素・グルコース再投与の際細胞内記録法では観察されない電位変化，すなわち，緩徐陰性 DC 電位が発生した。この緩徐陰性 DC 電位振幅は錐体細胞層に近い放線層において最大で，その発生に一致して細胞内 Ca^{2+} 濃度の急激な低下を伴った。さらに，この電位のイオン依存性，薬理学的特性などについて調べた結果，神経細胞膜上に存在する Na／Ca－exchanger の活性化によって発生し，この活性化には酸素・グルコース再投与による Na，K－ATPase の再活性化が必須であることが判明した。以上の結果は，Na／Ca－exchanger が虚血再灌流時の細胞内 Ca^{2+} 除去機構に重要な役割を担っていることを示唆する。

(5) 低酸素，虚血，高酸素，と脳障害

宮本　修（香川医科大学生物学）
Roland N Auer（カルガリー大学医学部病理学）

従来，虚血と低酸素による脳障害は，臨床的にも病理学的にもはっきりとした区別はなされて来なかった。本研究では，低酸素と虚血の脳障害の違い，および，虚血中の酸素濃度の影響について検討した。ラットをハロセン麻酔下に挿管し低酸素のみ（$PAO_2$25㎜Ｈｇ），虚血のみ（右総頸動脈の結紮と脱血による低血圧），低酸素＋虚血の３群にわけ，低酸素＋虚血群はさらに

PAO_2 と平均血圧を変動させた各組み合わせの群に分けた。1週間後，組織学的検討を行った。また，各群の脳血流を ^{14}C－iodo－antipyrine を用いたオートラジオグラフィにて測定した。さらに，ラットの右中大脳動脈を 3－0 ナイロン糸を用いて80分間閉塞し（MCAO），閉塞中に，正常酸素（$PAO_2$120㎜Hg），低酸素（$PAO_2$45㎜Hg）あるいは高酸素（$PAO_2$210㎜Hg）の各負荷を行った。低酸素のみの群では全く神経細胞死はみられなかったが，虚血のみ群では 33% のラットに細胞死がみられた。また，低酸素＋虚血群ではすべてのラットに細胞死がみられ，その程度は酸素濃度および血圧に依存していた。虚血群の脳全体の平均血流は 30 ml／100 g ／minを示し，低酸素群では 80 ml／100g／min であった。MCAO ラットにおいてはその梗塞巣の体積は，低酸素で増加し，高酸素により，大脳皮質の梗塞巣が有意に減少した。以上のことより，血流が保たれていれば低酸素のみでは脳障害は生じないが，PAO_2 は虚血性脳障害に影響を与え，特に大脳皮質においてその影響が強い。

(6) 内因性神経毒と中枢神経変性疾患

香月博志（京都大・薬・薬理）

トリプトファン代謝経路の中間産物である 3 －hydroxykynurenine (3-HK) は種々の神経変性疾患において脳内レベルが上昇することが知られている。我々は 3-HK が内因性神経毒として働く可能性を考え，主にラット由来培養線条体細胞を用いて検討を行った[1) 2)]。3-HK は 1 μ M という低濃度から細胞毒性を発揮し，これはカタラーゼや種々の抗酸化物質により抑制された。3-HK（1～10 μ M）による細胞死および細胞内 H_2O_2 レベルの上昇は allopurinol により抑制され，また毒性が過剰の中性アミノ酸の共添加によっても抑制されたことから，3-HK の毒性発現にはアミノ酸輸送系を介した細胞内への取り込み，および細胞内での xanthine oxidase との interaction が関与することが示唆された。さらに細胞死の様子がアポトーシス様の特徴を示すことや，in vivo 線条体内投与によっても障害を起こした[3)] ことなどからも，3-HK が神経変性疾患の病態形成に関与する可能性が支持された。

1）Okuda S et al . , Proc.Natl . Acad.Sci . USA93 (1996) 12553 - 12558.
2）Okuda S et al . , J . Neurochen . 70 (1998) 299 - 307.
3）Nakagami Y et al . , Jpn . j . Pharmacol. (1996) 183 -1 86.

(7) 副甲状腺ホルモンの神経毒性とその防御

工藤佳久（東京薬科大学・生命科学部）

中枢神経系に血中 Ca^{2+} 濃度調節ホルモン，副甲状腺ホルモン（Parathyroid hormone : PTH）受容体の発現が確認されており，そのリガンドとして，PTH 関連ペプチド（PTHrP）が存在していることが明らかにされている。我々は末梢の PTH が中枢組織内に侵入し，中枢内 PTH 受容体に作用して細胞内 Ca^{2+} 濃度を高めて神経毒性を発現する可能性を検討した。

海馬培養細胞の約30%において，PTH 1 －84（10－7M）はゆっくりとした持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こした。この作用は，PTH 1 －34 でも見られたが，中枢におけるリガンドと考えられている PTHrP や不活性断片 PTH39－84 では見られなかった。PTH による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の作用は，L－型 Ca^{2+} チャネル阻害薬，ニフェジピン（10－5M）で抑制された。PTH を約一週間適用すると，海馬スライス培養標本 CA1 領域に顕著な細胞死が生ずることを認めた。その最低有効濃度は10－10M であった。この細胞死もニフェジピンによって抑制された。

以上のように PTH が海馬のCA1細胞に特異的な神経細胞死を誘発することを確認した。老齢化により血液脳関門が脆弱化すると，末梢 PTH が脳内に移行し，中枢に発現している PTH 受容体に作用して毒性を発現することが考えられる。

(8) グリア・ニューロンにおけるカルシニューリン依存性細胞死

淺井昭雄（東京大学医学部脳神経外科）

【目的】海馬 CA1 神経細胞は，虚血，てんかん，変性疾患に際して，きわめて脆弱であり，また，calcineurin(CaN) が高発現していること，CaN の阻害剤である FK506やcyclosporin A により虚血による神経細胞死が軽減されることなどが知られている。我々はこれら２つの事実から，海馬 CA1 細胞での脆弱性は CaN の高発現に起因しているとの仮説を立てた。

【方法および結果】ラット大脳皮質神経細胞の初代培養細胞および PC12 細胞にアデノウィルスベクターを用いて CaN を遺伝子導入して高発現させたときの現象を観察した。ウィルスの力価を調節して，海馬神経細胞と同程度の中等度の CaN を発現させると，正常状態では細胞死を誘導できない程度の血清濃度減少，calucium ionophore への短時間被曝等の sublethal な刺激で，容易に細胞死が誘導された。また，さらに高度に CaN を発現させるとそれだけで細胞死が誘導された。さらに，これらの細胞死は形態学的にアポトーシスであり，cytochrome C/caspase-3 を介入し，cyclosporin A,FK506 によって軽減され，bcl-2,crmA 遺伝子発現によって抑制されることも明らかになった。

【結論】CaN は神経細胞死を増強する方向に作用し，selective vulnerability の一因となっている可能性が示唆された。

(9) 脳虚血における HB−EGF の発現

川原信隆，三島一彦，桐野高明（東京大学脳神経外科）
田村　晃（帝京大学脳神経外科）
東山繁樹（大阪大学生化学講座）

【目的】本研究では，一過性全脳虚血後の EGF family(EGF,TGF-α,HB-EGF) 及びその receptor (EGFR) の変化を mRNA in situ hybridization を用いて調べ，虚血における各々の変化の意義を検討した。
【方法】ラットの一過性心停止モデル（10分）を用い，in situ hybridization にて mRNA の発現を検討し，HB-EGF については免疫組織学的検討を加えた.
【結果】1）EGF の発現は認めず，また TGF-α の発現は広範囲に認めたが，虚血後の変化は生じなかった。3）一方 HB-EGF は，虚血後には皮質，視床，海馬CA3，歯状回，小脳顆粒細胞，Purkinje 細胞などで発現亢進が認められた。しかし，CA1 細胞での発現亢進は弱く，虚血障害を受けた部位の glia 細胞に強い発現の亢進を認めた。4）EGFR の発現は，glia が主であり，虚血後は，皮質，海馬 CA3，顆粒細胞で極軽度の発現亢進を認めた。
【結論】今回検討した EGF family の中では，HB-EGF のみが虚血後に広範な領域で発現が亢進し，虚血stressによって誘導される成長因子であることが判明した。特に海馬では，CA1 錐体細胞で細胞障害発生前の HB-EGF の発現亢進が非常に弱かったことから，HB-EGF 発現と虚血脆弱性との関連が示唆された。

(10) ラット脳における XIAP の発現

斉藤延人，川原信隆，川合謙介，淺井昭雄，桐野高明（東京大学医学部　脳神経外科）

バキュロウィルスの細胞死抑制因子ドメインをもつ XIAP は，カスパーゼ$^{-3}$やカスパーゼ$^{-9}$などに結合し，その機能をブロックすることでアポトーシスを抑制する。しかしながら中枢神経系における発現部位や時期，役割については詳細は不明である。神経系における XIAP の発現を確認する目的で in situ hybridization 法により mRNA の発現部位を解析した。XIAP の発現は naturally occurring cell death の起こる胎仔脳や生後早期では脳に広く分布していた。発現レベ

ルは成獣になっても低下せず，成熟神経細胞でも XIAP が機能していることが示唆された。生後脳では分化の続小脳顆粒細胞や嗅脳でもっとも高い発現がみられた。ストレス状況下で XIAP の発現の変化がおこるのかを調べる目的で，6分間の前脳虚血後の XIAP mRNA の発現を調べた。虚血後24時間に海馬 CA1 で有意なmRNA の発現増加がみられた。また，proteasome inhibitor による U251 glioma 細胞のアポトーシスを防ぐことができるのかどうかを解析した。アデノウィルスベクターによる XIAP の過剰発現で U251 の細胞死は抑制された。 XIAP は神経系細胞の生死のコントロールに関与していると考えられた。

(11) グリア細胞由来の新規ストレス蛋白 ORP150 は低酸素による細胞死を抑制する。

小澤健太郎，小川　智，遠山正彌（大阪大学大学院医学系研究科機能形態学講座）

我々は，ラットのアストログリア培養細胞より単離・クローニングを行った新規ストレス蛋白 ORP150 の低酸素環境における細胞保護機作を明確とするため，我々は HEK（human embrio kidney）細胞を用いて，ORP150 の antisense stable transformant cell line を作成した。この ORP150 permanent antisense transformant(ORP150(-)cell) では，他の小胞体のストレス蛋白が野生株同様に誘導されるのに対し，ORP150 の誘導はまったく見られなかった。また，ORP150(-)細胞は，正常酸素分圧下の細胞増殖，過酸化水素や熱ショックなどの環境ストレスには wild type と同様の抵抗性を示すのに反して，遷遠した低酸素環境に対する抵抗性が著しく低下する。さらにこの細胞死は，1）蛋白合成阻害によって抑制される，2）細胞死の直前に DNA の ladder formation が見られる，3）電顕的に核に分断が引き起こされる，など，apoptosis と共通した特徴を有していた。以上の事実は，ORP150 が低酸素ストレスに対する必須の細胞内ツールであることを示している。

(12) ラットミクログリアにおけるカイニン酸応答

野田百美，鍋倉淳一，赤池紀生（九州大学・医・第二生理）
中西　博（九州大学・歯・薬理）

グリア細胞のうち，オリゴデンドロサイトおよびアストロサイトにはグルタミン酸受容体が存在することが報告されているが，ミクログリアにグルタミン酸受容体が存在するかどうか，まだわかっていない。これは，単にグルタミン酸をミクログリアに作用させても，なかなか反応が見られないからであると思われる。

今回，ホールセルパッチクランプ法を用いて，K チャネル，Na-K ポンプを阻害し，グルタミン酸トランスポーターが働かない状態で，カイニン酸による電流を測定することができた。カイニン酸による電流は，CNQX により阻害され，電流の大きさは，カイニン酸の濃度に依存し，サイクロサイアザイド（0.1mM）で顕著に増大した。AMPA 単独では，1mM の高濃度を作用させても，なんら電流は観察されなかったが，サイクロサイアザイド（0.1mM）存在下では，AMPA（0.1mM）は，カイニン酸（0.1mM）よりも大きな電流を誘発した。カイニン酸による電流はサイクロサイアザイドで顕著に増大され，コンカナバリンAでは変化がなかったことから，主に AMPA 受容体によるものと推測される。カイニン酸およびサイクロサイアザイド存在下 AMPA によって誘発される電流の電流－電圧関係は，ほぼ直線かわずかに外向き整流を示した。また，外液を高 Na 液から高 Ca 液に変えると，電流－電圧関係は約 40mV 過分極側へ移動したことから，この受容体チャネルは Ca の透過性が低いことが示唆された。共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内 Ca 濃度測定を行ったところ，サイクロサイアザイド存在下，AMPA によって，ミクログリアでは Ca 濃度増大が見られなかったのに対し，同時培養したオリゴデンドロサイト・タイプ2アストロサイト（O－2A）細胞では，有意な Ca 濃度増大が見られた。Ca の透過性が低いことから，ミクログリアの AMPA 受容体チャネルは GluR2 サブユニットを発現していることが示唆されたので，GluR2&3 の特異的抗体とミクログリア特異的抗体を用いて二重免疫染色を行ったところ，O-2A 細胞に比べると弱いが，ミクログリアも GluR2&3 を発現していることが示された。

(13) 血清によるミクログリア活性化増強

中村洋一（愛媛大学医学部第一生理学講座）

血液脳関門が存在する故に，中枢の細胞は通常種々の血清成分には曝されていない。しかしながら虚血・再灌流のような刺激でおこる局所的なあるいは一過性の血液脳関門の破綻により，血液成分に出会う可能性は高い。リポポリサッカライド（LPS）による刺激で培養ミクログリアは TNFa や NO を放出するが，その活性は血清により増強され，0.1%の低濃度の血清存在下では刺激に必要な LPS 濃度が数百分の一に減少した。この血清に存在する増強因子は分子量約 60KDa の蛋白で，急性期血清にその濃度が10倍以上に増加することから，LBP（LPS結合蛋白）であることが強く示唆される。一方，ホルボールエステル添加でCキナーゼを活性化することにより，ミクログリアは活性酸素を放出するが，この反応も0.1%の血清存在下で数倍に増強された。この場合の増強因子は分子量約 67KDa の蛋白であり，市販の純度の異なる3種類のアルブミン全てにほぼ同等な増強作用が見られること，0.1%の血清と同等な増強作用を示すアルブミン濃度が約 50 μg／ml であることから，アルブミン分子そのものが増強活性を持っていることが強く示

唆された。以上の結果は，脳実質内に血清成分が漏出することがミクログリア活性化を増強し，神経細胞障害を増悪していることを強く示唆している。

（14）SAH患者に対するIndomethacin（COX阻害剤）療法について
Use of Indomethacin for Subarachnoid Hemorrhage

土肥謙二（昭和大学医学部脳神経外科）

【目的】Indomethacin は強力な COX 阻害剤である。SAH 患者に対する効果としては脳損傷に対して①脳圧降下作用，②脳浮腫予防，③神経細胞死抑制，④異常脳温上昇抑制などの脳保護作用があり，脳血管攣縮に対しては①脱水予防（抗利尿効果），②低ナトリウム血症予防（腎における Na の再吸収），③TXA2 阻害，④PG12／TXA2 の適正化，⑤ヘマトクリットの減少などの作用を持っている。我々は SAH 患者における Indomethacin 療法を行い有用な結果を得たので報告する。

【対象と方法】対象は SAH 患者，全15例で WFNS；G2－3例，G3－1例，G4－3例，G5－8例である。基本的には早期手術を行い，術後は脱水に注意し normo-volume,normo-tension としてCPP＞90mmHg，脳温＜37.5℃，脳圧＜30mmHg，Hb＞12g/dl に維持した。Indomethacin は可能な限り搬送時から 6mg/day/kg の経直腸的投与を行った。

【結果】全15例における GOS は WFNS；G2,3（全例G.R），G4（G.R 2例，M.D 1例），G5（G.R 1例，M.D 1例，S.D 3例，V.S 1例，D 2例）であった。

【考案】Indomethacin は一般的に使用している COX 阻害剤であり，SAH 患者において直接的あるいは間接的に作用し予後を向上させる非常に有効な薬剤と考えられる。

（15）Bcl-2の虚血性神経細胞死抑制と作用機序

島崎久仁子（自治医科大学 第一生理）

スナネズミに短時間の前脳虚血をかけると海馬 CA1 での遅発性神経細胞死が見られる。一方，虚血前に非致死的な虚血を与えておくと 3 分～5 分の虚血負荷による遅発性神経細胞死が著しく軽減されることが知られている。この現象は虚血耐性と呼ばれ，Bcl-2 の関与が考えられている。我々は遅発性神経細胞死過程への Bcl-2 作用機序について，transgenicmouse での虚血負荷後の細胞内カルシウム濃度上昇を wild type と比較したが有意差は認められなかった。次にアデノ随伴ウィルスに bd-2 を組み込んだベクターを作成し，スナネズミ海馬で in vivo transfectionを時

間差で行い，虚血負荷による遅発性神経細胞死抑制効果を検討した。遅発性神経細胞死の指標としては TUNEL 法で組織化学的に CA1 錐体細胞の DNAfragmentation 率を測定した。3 分虚血負荷では通常49% の CA1 錐体細胞が TUNEL 陽性になるのに対し，虚血 3 日前にベクター投与したスナネズミでの虚血負荷 TUNEL 陽性は17% であった。さらに，虚血負荷 1 時間後のベクター投与でも CA1 錐体細胞の TUNEL 陽性は29% であった。これらの結果から以下の結論を得た。

1） 虚血負荷 3 日前のベクター投与による Bcl-2 過剰発現部位での虚血負荷後の遅発性神経細胞死は有意に抑制され，虚血耐性との直接関係が確認された。

2） 虚血負荷 1 時間後のベクター投与も Bcl-2 過剰発現による遅発性神経細胞死抑制効果が認められ，これより Bcl-2 は遅発性神経細胞死過程の後期にも作用している可能性が考えられる。

(16) PACAPによる神経細胞死の防御とその分子機構

塩田清二（昭和大・医・第一解剖）

心停止モデルラットを用いて，Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide（PACAP）による海馬 CA1 の虚血性神経細胞死とその分子機構を機能形態学的にしらべた。超微量の PACAP は海馬の神経細胞死を抑制し，脳室内投与のみならず静注でも細胞死を抑制した。海馬 CA1 の虚血性神経細胞死の過程のシグナル伝達系を生化学的に調べたところ，細胞死の起きるのに先立ち MAP キナーゼカスケードの JNK/SAPK 活性および p38 活性の上昇が認められた。PACAP 投与により，海馬領域の JNK/SAPK 活性および p38 活性の上昇が顕著に抑制された。PACAP レセプターは虚血早期から星状膠細胞に強く発現し，脳脊髄液中の IL-6 含量は PACAP 投与により顕著に亢進した。IL-6 は ERK を活性化しさらに JNK／SAPK 活性を抑制することから，PACAP は IL-6 をはじめとするサイトカインを誘導し，これらと共同して神経細胞死を抑制するのではないかと示唆される。

(17) アポトーシス細胞における容積調節性収縮能の亢進

前野恵美，挾間章博，岡田泰伸（生理研・機能協関，科技団・CREST）
石崎泰樹（神戸大・医）
金関　憙（科技団・CREST）

多くの細胞は異常浸透圧環境下に置かれ続けても，一時的に浸透圧膨張や収縮を強いられるは

ずが，もとの正常容積へと復帰する能力をもっている。細胞外低浸透圧または細胞内高浸透圧下では，細胞は一過性に膨張するが，やがて KCL と水を流出させて Regulatory Volume Decrease（RVD）とよばれる容積調節を行うことができるものが多い。逆に，細胞外高浸透圧または細胞内低浸透圧条件下では，多くの細胞は収縮後に細胞外より NaCl と水を流入させて Regulatory Volume Increase（RVI）を示す。アポトーシスには持続性の細胞収縮が伴われるので，細胞容積調節機能の破綻がその原因に関与する可能性がある。そこで本研究では，アポトーシス細胞における RVD 能を調べた。様々な細胞（U937，PC12，NG108-15，HeLa細胞）にスタウロスポリン処理してアポトーシスを誘導し，cell viability，DNA degradation そして形態変化を検討した。その結果，アポトーシス誘導細胞においては RVD 能が正常細胞より著しく亢進していることが分かった。また，RVD メカニズムに関与するKチャネルまたは Cl チャネルを阻害すると，アポトーシスは抑制されることが分かった。このことから，アポトーシスのプロセスは RVD 亢進とカップルしていることを示唆した。

(18) ミトコンドリアtoxinによる線条体特異細胞死

西野仁雄，飛田秀樹，熊崎路子，櫻井輝美（名古屋市立大・医・生理）

ミトコンドリア呼吸鎖 toxin(3-nitropropionic acid，3-NPA) をラットに全身投与すると線条体の外半部が選択的に傷害され，ハンチントン病様の異常運動が出現した。3-NPAはBBB を通過しないので，全身投与した 3-NPAのfirst target は内皮細胞と考えられた。3-NPA 投与後，外側線条体動脈の内皮細胞で特異的に eNOS 活性が高まり，その後，同領域の BBB の破綻（IgGの漏出）がおこった。メッセージレベルから解析すると，3-NPA の 2 回投与後（運動症状の発現と対応して）線条体で eNOS mRNA の発現が認められたが大脳皮質，小脳，海馬では変化はなかった。ではなぜ線条体外半部（外側線条体動脈）で eNOS mRNA の選択的な上昇がおこるのだろうか？考えられる可能性として，1）外側線条体動脈の内皮細胞（内皮細胞のミトコンドリア）の脆弱性，2）NO 代謝の特異性，3）NO センサーの特異性などがあろう。外側線条体動脈は窄通動脈でヒトでは被殻動脈に相当し，最も脳出血，脳梗塞の起こしやすい血管の一つである。その脆弱性のメカニズムが明らかになれば，脳血管障害の予防，治療にもつながると考えられる。

20. 脳の情報統合と行動発現のメカニズム
ー感覚認知から生体反応形成までー

1999. 1. 7－1. 8
代表者名：福田　淳
所内世話人：森　茂美

（1）てんかん発作発現におけるプロスタグランジンの役割
須藤孝子（東京女子医科大学・第一生理）

（2）海馬神経細胞における5-HT1A受容体を介したシナプス開口放出制御機構
山口和彦（杏林大学・第二生理）

（3）サル海馬体における空間・課題（文脈）の再現機構
西条寿夫（富山医科薬科大学・第一生理）

（4）脳と環境：環境因子による行動変容
栗生修司（九州大学・第一生理）

（5）発達期および神経傷害時における細胞内Cl^-調節機構の変化
鍋倉淳一（九州大学・第二生理）

（6）麻酔薬（benzodiazepine）のシナプス後性及びシナプス前性作用
藤戸　裕（札幌医科大学・第二生理）

（7）上丘へのアセチルコリン作動性入力によるサッカード運動開始の制御
相澤　寛（生理学研究所・総合生理，弘前大学・第二生理）

（8）胎仔脳の in vivo 電気活動
中村彰治，坂田義行（山口大学・第二生理）

（9）第二体性感覚野の可塑性が脊髄前角運動ニューロンの興奮性与える影響
川上順子（東京女子医科大学・第一生理）

(10) ネコ視索核・副視索核の投射ニューロン：免疫電顕法による解析
車田正男（新潟大学・第二解剖）

(11) 三次元眼球運動の発現機構－脳内座標系から運動出力座標系への変換様式
鈴木康弘（北海道大学・第二生理）

(12) 意図行動における非特殊系入力の役割
玉井靖彦（和歌山県立医科大学・第一生理）

(13) 下側頭葉皮質ニューロンによる面構造の表現
藤田一郎（大阪大学・院・医・認知能科学）

(14) 三次元世界を見る
泰羅雅登（日本大学・第一生理）

(15) 色パターン刺激による視覚誘発電位の頭皮上電流密度分布解析

中村孝文（静岡大学・電子科学研究科）

(16)「刷り込み」と基底核

松島俊也（名古屋大学・院・生命農学研究科）

(17) ニホンザル道具使用習熟度の定量化

入来篤史，石橋英俊（東邦大学・第一生理）

(18) ネコ外側前庭脊髄路繊維の頸随・胸随・腰随支配様式

久世文也（生理学研究所・生体システム）

参加者名

西条寿夫（富山医科薬科大学・医学部・第一生理学），泰羅雅登（日本大学・医学部・第一生理学），鍋倉淳一（九州大学・医学部・第二生理学），中村彰治（山口大学・医学部・第二生理学），坂田義行（山口大学・医学部・第二生理学），藤田一郎（大阪大学・院・医学系研究科・認知脳科学），山口和彦（杏林大学・医学部・第二生理学），大木　紫（杏林大学・医学部・第一生理学），入来篤史（東邦大学・医学部・第一生理学），石橋英俊（東邦大学・医学部・第一生理学），日原さやか（東邦大学・医学部・第一生理学），伊佐　正（生理学研究所・統合生理学），相澤　寛（生理学研究所・統合生理学／弘前大学・第二生理学），小林　康（生理学研究所・統合生理学），山本　優（生理学研究所・統合生理学），車田正男（新潟大学・医学部・第二解剖学），星野嘉恵子（新潟大学・医学部・第二解剖学），福島菊郎（北海道大学・医学部・第二生理学），鈴木康夫（北海道大学・医学部・第二生理学），新明康弘（北海道大学・医学部・眼科学），丸　栄一（日本医科大学・第二生理），川上順子（東京女子医科大学・第一生理），須藤孝子（東京女子医科大学・第一生理），藤戸　裕（札幌医科大学・第二生理学），松島俊也（名古屋大学・院・生命農学研究科），玉井靖彦（和歌山県立医科大学・第一生理学），堂西倫弘（和歌山県立医科大学・第一生理学），木村晃久（和歌山県立医科大学・第一生理学），栗生修司（九州大学・医学部・第一生理学），福田敦夫（浜松医大学・第一生理学），内田勝久（浜松医大学・第一生理学），鮫島道和（浜松医大学・第一生理学），中村孝文（静岡大学・院・電子科学研究科），金子武嗣（京都大学・院・高次脳形態学），三好智満（大阪大学・院・医学系研究科・情報生理学），福田　淳（大阪大学・院・医学系研究科・情報生理学），久世文也（生理学研究所・生体システム），松山清治（生理学研究所・生体システム），森　茂美（生理学研究所・生体システム）

研究会概要

平成11年１月７日午後１時から１月８日午後３時30分まで１泊２日で，生理学研究所一階会議室で，18題の口演，39名の参加者をえて，平成10年度生理学研究会『脳の情報統合と行動発現のメカニズム－感覚認知から生体反応形成まで－』を開催した。特に脳の生理学，機能形態学の分野で情報統合と行動発現のメカニズムに関して精力的に研究を展開している，全国の中堅，若手

研究者が集まり，最新の研究成果をお互いに披露しあい，感覚，運動，行動に係わる研究上の諸問題について討議を深めた。一般に，日本生理学会大会や日本神経科学会大会などの大型の学会では，感覚，運動，行動などのセッションは違った会場で並列に口演発表が行われるため，お互いに意見交換や討論を深める機会が少ない。それに対して，本研究会のような小規模で的を絞った研究会では，異なった分野の中堅，若手研究者が一会場に集まり，全ての演題に十分な討論ができ，活発な学問的・人的交流が出来た。

(1) てんかん発作発現におけるプロスタグランジンの役割

須藤孝子[1]，丸　栄一[2]，川上順子[1]
([1]東京女子医大・第一生理学，[2]日本医大・第二生理学)

てんかん発作により海馬におけるシクロオキシゲナーゼ2（COX2）mRNA の発現やプロスタグランジン（PG）の合成が促進されることから，てんかん発作の発現において PG が何らかの役割を果たしているものと推測されてきた。われわれは，COX2 遺伝子欠損マウスまたは COX2 の特異的阻害剤であるニメスリドを用いて，てんかん発作発現における PG の役割を検討した。COX2 遺伝子欠損マウスおよび野性型マウスを用いて，COX2 遺伝子の有無が発作誘発閾値および発作後抑制に如何なる影響を及ぼすか検討した。実験第1日目に，20Hz，10秒間の刺激を貫通路線維束に与えて発作誘発閾値を測定した。その2日後，20Hz，10秒間の貫通路刺激を発作重積状態に達するまで40秒間隔で与える急性キンドリング実験を行った。初回発作誘発閾値および発作重積状態に達するまでの刺激回数に関しては，両群間に有意差は認められなかった。しかし，COX2 マウスでは発作重積状態までの平均発作持続時間が有意に短く，発作が誘発されない刺激回数は有意に多かった。また，ニメスリドを投与した野性型マウスも，COX2 遺伝子欠損マウスと同様の結果を示した。これらの結果は，PG の合成阻害が発作後抑制を有意に増強することを示している。すなわち，脳内 PG は初回の発作誘発には関与せず，その後の発作後抑制を減弱する作用を持つものと考えられる。

(2) 海馬神経細胞における5-HT1A受容体を介したシナプス開口放出制御機構

山口和彦（杏林大・医・第二生理学）

中枢神経系におけるシナプス可塑性のうち，シナプス前末端部からの伝達物質放出が変化する例として，苔状線維－海馬 CA3 錐体細胞間シナプスが知られているが，cAMP-PKA 系以降の

分子メカニズムについてはよく判っていない。そこで我々は歯状回神経細胞のマイクロアイランド培養系を用いて，cAMP 系増強によるシナプス開口放出増強のメカニズムを調べた。ホールセルパッチクランプ法により自己回帰性シナプス，オータプスによる EPSC を記録した。このEPSC振幅はフォルスコリン灌流によりcAMP 系を増強することで2倍に増大した。この時，自発性微小EPSCの振幅分布は影響を受けず，放出頻度は増加したことから，フォルスコリンの作用点はシナプス前末端であることがわかった。次に細胞外Caイオン濃度 －EPSC 振幅関係に及ぼす cAMP-PKA 系活性化の効果を調べた。Ca イオン濃度ー振幅関係はヒルの式でフィトでき，フォルスコリンにより EPSC 振幅の最大値は約2倍に増大したが Ca 感受性に変化は見られなかった。また，ペアドパルス修飾比もフォルスコリンによって影響を受けず，cAMP 系の活性化は放出確率ではなく即時放出可能プールを増大させていることが示唆された。一方，cAMP 系をダウンレギュレートさせる5HT1A受容体がこの系で強く発現していた。8-OH-DPAT によりこの系を活性化させたところ，シナプス開口放出は抑制された。この受容体は抗うつ作用に関与する可能性もあり興味が持たれる。

(3) サル海馬体ニューロンの実空間および仮想空間移動課題に対する応答性

西条寿夫（富山医科薬科大・医・第一生理学）

液晶パネルを備えた特殊駆動装置にサルを乗せ，ジョイスティックの操作することにより，室内を移動する実空間移動（RN）課題（2課題），および液晶パネル上のポインターを移動させる仮想空間移動（VN）課題（2課題）の合計4課題を遂行中のサル海馬体ニューロンの応答性を比較・解析した。その結果，記録した総数389個のニューロンのうち，166個が室内あるいは画面上の特定の位置を通過するときにニューロン活動が上昇した(場所識別ニューロン)。これら場所識別ニューロンは，非識別ニューロンと比較して平均インパルス放電頻度が有意に低く，錐体細胞であると考えられた。さらに，1）場所識別ニューロンは VN 課題よりも RN 課題によく応答する，2）場所識別ニューロンの場所フィールド（ニューロン活動が上昇する領域）が，VN 課題では RN 課題と比較して有意に小さいことなどから，認知的処理能力がより必要とされる課題では海馬体ニューロンの応答特性が良くなることが示唆された。また，ほとんどの場所識別ニューロンは，4課題のうち1課題だけに選択的に応答するか，あるいは 2課題以上に応答した場合は各課題で異なる場所フィールドを有し，課題識別性が非常に高いことが判明した。これらの結果は，各課題(状況や環境)ごとに異なる特性を有するニューロン集団が海馬体内に形成され，各課題を符号化していることを示唆する。

(4) 脳と環境：環境因子による行動変容

粟生修司（九州大・医・第一生理学）

近年，外因性の環境化学因子がエストロゲン様の作用を有し，内分泌撹乱物質として生殖機能や免疫機能に影響を及ぼす可能性が指摘され，社会的にも大きな問題になっている。本研究では，代表的な内分泌撹乱物質のひとつであるビスフェノールＡを 5mg／l の濃度（溶出基準の２倍）で飲料水中に溶解し，妊娠中および授乳期の母ラットに投与し，仔ラットの生後発達および行動に及ぼす影響を調べた。その結果，ビスフェノールＡの胎内および授乳期曝露は，１）授乳中の体重増加の促進と開眼時期の促進，２）雄の肛門－生殖突起間距離の短縮（雄の性分化の抑制），３）雌の腟開口時期の促進（雌の性成熟の促進），ならびに４）離乳後の雌の体重増加の抑制が認められ，５）回避条件づけ反応で認められる性差が消失した。本研究により環境化学因子により性成熟が修飾され，行動の性差が消失することが明らかになった。

(5) 細胞内 Cl^- 調節機構の発達変化に対する神経回路活動の修飾作用

鍋倉淳一（九州大・医・第二生理学）

GABA やグリシンは未熟動物においては興奮性として働き，成熟動物においては抑制性に変化することが報告されている。この発達にともなう興奮性から抑制性へのスィッチのメカニズムを明らかにするために聴覚の中継核である外側上オリーブ核神経細胞（LSO）において細胞内 Cl^- 濃度調節機構の発達変化をグラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いて検討した。未熟ラット（生後１週以内）においては Na^+, K^+, Cl^-cotransporter（NKCC）による Cl^- 取り込みによって細胞内 Cl^- は高濃度に維持されているため，グリシンは活動電位をともなう脱分極を引き起こす。発達とともに NKCC の機能的減弱と K^+-Cl^-cotransporter（KCC）による Cl^- の細胞外への汲みだし機構の発現のため細胞内 Cl^- 濃度は減少し，結果としてグリシンは過分極応答を引き起こすようになる（J.Neurosci, 1999)。細胞内 Cl^- 濃度調節機構の変化が単に日齢とともに変化するのか，または細胞の置かれている環境（特に神経回路活動）に依存しているのか検討した。発達早期に両側内耳破壊をおこなうと発達後期においても細胞内 Cl^- 濃度の高い細胞が多く残存した。ストリキニン慢性投与または対側内耳破壊によって LSO に対するグリシン作動性入力を障害した群においても細胞内 Cl^- 濃度の発達変化の障害が観察された。LSO 細胞におけるグリシン応答の発達に音入力およびグリシン作動性入力が重要な役割をしていることが示唆された。

(6) 麻酔薬 (benzodiazepine) のシナプス後性作用とシナプス前性作用

藤戸　裕（札幌医大・第二生理学）

ラット海馬スライス標本を用いて，一般的な benzodiazepine 系麻酔薬である midazolam の CA1 領域と歯状回でのシナプス伝達抑制作用を比較した。midazolam の CA1 領域錐体細胞の順行性発火の抑圧作用は歯状回顆粒細胞に対するものより強かった。GABAA 受容体拮抗薬の bicuculline は，この順行性発火の抑圧作用を錐体細胞では拮抗したが顆粒細胞では拮抗しなかった。GABAA受容体作動薬 muscimol の入力コンダクタンス増加作用は錐体細胞と顆粒細胞とで差異はなかった。midazolam の順行性発火抑圧効果の海馬領域差は錐体細胞と顆粒細胞間でのシナプス後性 GABAA 受容体の密度の差ではなく，GABAA 受容体のサブタイプの差異が要因とみられた。CA1 領域と歯状回におけるフィールド EPSP（fEPSP）および錐体細胞と顆粒細胞での EPSP を midazolam は一様に一時的に抑圧した。fEPSP を減弱させる midazolam の作用は bicuculline により拮抗されなく，アデノシン受容体拮抗薬の aminophylline 投与により完全に拮抗された。またアデノシン吸収阻害剤の dipyridamolはmidazolam と同様の fEPSP 抑圧効果を示した。midazolam は CA1 領域と歯状回において，アデノシン再吸収を阻害することによりアデノシン修飾系を介して伝達物質放出を抑圧するとみられた。

(7) 上丘へのアセチルコリン作動性入力によるサッカード運動開始の制御

相澤　寛（生理学研究所・統合生理学，弘前大・医・第二生理学）

ラット上丘スライスにおいて，視神経束から浅層ニューロンを介して中間層ニューロンに至る多シナプス性短絡経路の存在と，nicotine によるこの経路での信号伝達増強とを確かめた。サッカード課題遂行中のサル上丘中間層へニコチン注入を行い，反応時間が70－90ミリ秒の超短潜時サッカードの頻度増加を観察した。これらの結果は上丘へのアセチルコリン作動性入力がニコチン受容体を活性化して上丘内短絡経路を促通し，サッカード反応時間短縮をもたらすことを強く示唆する。続いて視覚誘導性サッカード課題遂行中のサルにおいて，上丘へのアセチルコリン作動性入力の起源である脚橋被蓋核ニューロンの活動記録を行った。注視点消灯からサッカード標的点灯までに170ミリ秒のギャップ期間を設ける時，1）ギャップ期間中に活動が徐々に増加する群，2）注視点を注視中に持続的に発火して，ギャップ期間中からサッカード遂行にかけて発火頻度を急激に減少させる群，の2種類を見出した。さらに，サッカード標的が現れる可能性があるスクリーン上の場所を限定するとサッカードの反応時間が短縮されること，この反応時間の短縮に伴ってギャップ期間中に活動を変化させるニューロン群が存在すること，を示した。これ

らより，脚橋被蓋核由来のアセチルコリン作動性入力が上丘中間層の出力細胞の活動を修飾してサッカード運動開始の制御，反応時間決定に関与する可能性が示された。

(8) 胎仔脳 in vivo 電気活動

中村彰治，坂田義行（山口大・医・第二生理学）

1）Asphyxia における胎仔脳幹ニューロンの電気活動の変化

母体と臍帯でつながった胎仔ラットを用いて，asphyxia における脳幹ニューロンの電気活動とグルタミン酸の感受性変化について検討を行った。Asphyxia は臍帯を結紮することによって作製した。Asphyxia においてニューロンの放電頻度は振幅減少をともなって，著しく減少あるいは消失した。臍帯血流再開後，多くの場合，放電頻度と振幅は徐々に回復した。さらに，ニューロンのグルタミン酸に対する反応は著しく抑制された。これらの結果から，asphixia において胎仔脳幹ニューロンの電気活動とグルタミン酸感受性は抑制を受けることが明らかとなった。この抑制反応はエネルギー消費の減少とグルタミン酸による脳の損傷を防ぐことに関与していると考えられる。

2）ラット胎仔上丘の電気活動の光学的測定

胎仔上丘において，視神経から上丘への視覚入力による興奮伝搬の時間的・空間的変化を解析するために膜電位感受性色素による in vivo 光学測定を行った。上丘局所の電気刺激によって上丘に明瞭な興奮と抑制反応が生じた。これらの興奮・抑制反応は TTX の上丘表面への滴下によって消失した。CNQX は早い興奮反応に対して阻害作用を示した。AP-5 は遅い興奮反応を減弱し早い反応には阻害作用を示さなかった。また，抑制反応は bicuculline の投与によって阻害された。これらの結果は，妊娠末期の胎仔ラットの上丘において NMDA や non-NMDA 受容体を介する興奮性と GABA 受容体を介する抑制性シナプス伝達がすでに機能していることを示唆している。

(9) 第二体性感覚野の可塑性が脊髄前角運動ニューロンの興奮性に与える影響

川上順子（東京女子医大・第一生理学）

第二体性感覚野（SII）の体性感覚認知に果たす役割については単純に感覚の識別というよりは感覚学習や記憶を含むより複雑な機能が示唆されている。我々は，SIIのII III層における長期な興奮性増強（LLP）が視床後外側腹側核（VPL）の高頻度刺激により誘導され，そのLLP成立

には第一感覚野（SI）からの入力が必要であることを報告した。さらに，LLPは末梢皮膚への繰り返す機械的振動刺激でも誘発が可能であり，SIに比較してSIIにおいて高率に観察される。次に，このSIIにおけるLLPはどのように他の部位の機能に影響を与えるかを検索する目的で，脊髄前角運動ニューロン（MN）の興奮性を指標とした実験を行った。SIIはMNに直接下行性の投射があることが報告されており，SIIの電気刺激により対側の支配領域の筋収縮が観察され，MN核でc-fosが染色されることを確認した。 MNの興奮性は筋電図のH波の振幅にて計測し，SIIの電気刺激がH波の振幅に与える影響を記録した。H波の振幅はSII刺激の直後から30 msでは増強し，30 - 300 msでは逆に減少した。SIIにLLPが誘導されると，30 - 300 msの振幅の減少が阻止され，SIIのMNに対する抑制効果は減弱する結果が得られた。以上よりSIIは，感覚学習に必要なsensory-motor integrationを調節する役割を持つことが示唆される結果を得た。

（10）ネコ視索核・副視索核の投射ニューロン　ー免疫電顕法による解析 ー

車田正男（新潟大・医・第二解剖学）

視蓋前域視索核（NOT）および副視索核（AON）は，網膜と大脳皮質視覚域から視覚入力を受け，視運動性反応（OKR）に深く関る諸領域に投射することが知られている。ネコのNOT/AONの相互連絡，ならびにNOT/AONからOKRに関る領域への上行性・下行性投射ニューロンの形態・分布を，WGA-HRPおよびGABA免疫組織化学的法で光顕・電顕的に調査した。NOTへのトレーサー注入により，AON（同側）とNOT（対側）に多くの逆行性標識ニューロンならびに順行性標識終末が認められた。同様の方法で，NOTから外側膝状体，NOT/AONから上丘，NOT/AONから前庭神経核・舌下神経前位核・下オリーブ核への投射ニューロンも観察された。これらNOT/AONにおける各標識ニューロンは主にGABA陰性であったが，かなりの数のGABA陽性ニューロンも観察された。これら標識ニューロンの多くは網膜からの入力を受けており，さらにGABA陽性終末も受けていた。同側AONと対側NOTでかなりの数のNOTからの投射終末を観察したが，その大部分がGABA陰性であった。以上から，（1）NOT/AONからの投射ニューロンにシナプスしているGABA陽性終末はおそらく介在型ニューロン由来であること，（2）NOT/AONはOKR発現に際し，興奮性・抑制性投射により重要な影響を与えていること，が示唆された。

(11) 三次元眼球運動の発現機構ー脳内座標系から運動出力座標系への変換様式ー

鈴木康夫[1]，新明康弘[2]，福島菊郎[1]
([1]北海道大・院・医学研究科・統合生理学，[2]北海道大・医・眼科学)

視覚誘導性眼球運動は，視覚入力が，前庭覚などの他の感覚入力と脳内で統合，処理され運動出力となることで発現する。感覚空間の脳内座標系から解剖学的な外眼筋の作用方向により規定されると考えられる眼球運動座標系への変換様式を頭部を固定した覚醒サルの視覚誘導サッケード，滑車神経微小電気刺激により誘発された眼球運 動の三次元解析により検討した。Listingの平面上の2点間のサッケードに際しては，眼位に相関しないListing の平面からの一過性偏倚(blip) が生じた。上斜筋の単 独収縮より生じる眼球運動の回転軸方向は上斜筋の解剖学的な作用方向にほぼ一致しており，刺激強度，刺激持続時間とは相関しなかった。回旋-垂直平面での回転軸方向は，刺激開始時の回旋，垂直眼位に対し下転時に下転成分が，内旋時に内旋成分が減少する有意の相関 ($p<0.01$) を示したが，刺激開始時の水平眼位に対しては2頭では有意の相関を示さず ($p>0.05$)，1頭でのみ傾き0.231～0.338で有意に相関した。このことは，誘発眼球運動の回転軸が，作用平面内では眼球よりも眼窩に対して良く固定されていることを示している。この結果は，これまでの外眼筋の作用方向に対するConventional modelと水平眼位に相関してその位置が移動する軟性滑車を仮定するpulley modelで説明可能であった。

(12) 意図行動における非特殊系入力の役割

玉井靖彦 (和歌山県立医科大・第一生理学)

地球上に生存する生物はそれぞれ特定の環境に住んでおり，その生物は環境に影響を受けると同時にその環境に働きかけている。この生物の環境への働きかけが行動と考えられているが，実体はなかなか難しい。脳が能動的な行動を起こす状態 (動因) はどこで起こるのか。その行動を起こす共通の出力系があるのか。なぜ，合目的になるのか。これらの疑問は，生理学的にいずれも解決されていない。そこでこの疑問に答えらる次のような脳のモデルを提唱したい。即ち，大脳皮質は感覚器を通して入ってくる情報 (Sensor system) の解析とその解析結果の出力に関与し (Imaging system)，その時の大脳皮質全体の出力信号群 (イメージ) が脳幹および脊髄の運動系 (Image acting system) を通じて運動を引き起こす。発育の初期では出力信号群は完全でなく，その運動はでたらめである。脳はこの行動したことによって変化した外界 (external world) の新たな情報から新しいイメージを形成し再びそのイメージに基づいて運動を起こす。これを繰り返すことによって，その運動がもたらす新たな情報が生体にとって気に入ったもの

（合目的）であれば，その時の*情報と出力信号群が大脳皮質に蓄積される。この最後の判断作業が最も重要で，視床，基底核，大脳辺縁系で行われる（Image forming system)。非特殊系入力は情報の質にかかわりなく，この脳のサイクル形成に関与している。

（13）下側頭葉皮質の内在性水平軸索の構成とその個体発生

藤田一郎（大阪大学・院・基礎工および医・認知脳科学）

哺乳類大脳皮質では，２，３層の錘体細胞の軸索水平側枝が，起始細胞と同じ領野内で数ミリに渡り走行し，軸索終末の集団（水平軸索パッチ）を，複数，形成する。サル腹側視覚系路の初段である一次視覚野（V1）と最終段である下側頭葉皮質（TE）の水平軸索を比較すると，後者は前者にくらべ，個々のパッチが大きく，より広い間隔で分布し，最長分布域が広く，分布がより異方的であった。これらの水平軸索の特徴は，V1 が刺激位置や刺激線分の傾きなどの視覚情報パラメータをなめらかにかつ連続的に表示している（「連続地図」）のに対し，TE 形や形・色または形・テクスチャーの組み合わせという高次元情報を２次元皮質表面に表示するために「パッチ状地図」を採用していることに対応していると推察した。生後１週令のサルで，すでに，V1，TE とも水平軸索は明確なパッチを形成しており，両領域とも，サイズ，パッチ間距離，最長分布域，異方性は，それぞれ成体のものと差はなかった。しかし，パッチ内の軸索 varicosity の分布は，個体発生に伴い，継続的でしかもV1，TE に特有の変化が見られた。軸索のおおまかな投射様式は誕生以前に確定するものの，どの投射領域との結合を強くしていくかは，生後に決定され，最終的な成体タイプのV1，TE 特有の解剖構築が完成すると考えられる。

（14）三次元世界を見る

泰羅雅登（日本大・医・第一生理学）

我々の目に最初に入って来る映像はピンホールカメラのすりガラスに映し出された映像と同じく平板な２次元の世界でしかない。しかし我々は外界を奥行きのある世界としてとらえ，目の前の机の上の本や文房具を立体的な形を持った物としてとらえることができる。これは２次元的な視覚情報から３次元的な世界を再構成する仕組みが我々の脳にはそなわっているからである。三次元的な対象物を見たとき生じる右目と左目の網膜上の像の位置にずれ，すなわち視差は奥行き知覚の重要な手掛かりである。しかし近年のテレビゲームなどで使われる３Ｄコンピュータグラフィクスは透視画法，陰影，表面のきめといった情報（絵画的手掛かり）を利用して立体感を表

現しており，両眼視差信号を利用していないにもかかわらず，我々はリアルな立体感を感じる。サルの頭頂連合野，頭頂間溝外側壁の尾側部には三次元情報を特異的に処理している領域（cIPS領域）がある。この領域で面の三次元的な傾きを識別するニューロンがみつかる。これらのニューロンは基本的には両眼視差信号を手掛かりとして面の奥行き方向の傾きを識別しているが，詳しく調べると，先に述べた絵画的奥行き手掛かり使かって，面の傾きの識別をしている事がわかってきた。このことは，三次元形態を識別するための種々の手掛かり情報がこの領域で統合されており，この領域が三次元形態情報処理の高次中枢である可能性を示唆している。

(15) 色パターン刺激による視覚誘発電位の頭皮上電流密度分布解析

中村孝文[1]，高橋勲[1]，森田之大[2]，横山徹夫[1,3]，福田敦夫[1,4]
([1]静岡大・院・電子科学研究科，[2]聖隷クリストファー看護大)
([3]浜松医大・脳神経外科，[4]浜松医大・第一生理学)

中枢における色情報と明暗情報の処理の違いが脳波にどの様に反映されるのかについて，正常色覚者11名，第1及び第2色盲各1名を対象に，空間的に高密度に記録した誘発電位をもとに調べた。刺激は色対比型(赤-緑，青-黄)及び明暗対比型(白-黒)の市松パターン反転刺激で（市松幅1°，刺激野12°円，輝度16cd/m2（赤・緑・白）又は8 cd/m2（青・黄），0.5 Hz反転，円中心部を左眼固視)，全頭部160部位より視覚誘発電位を同時記録し，Laplacian解析にて頭皮上電流密度分布を求めた。正常者の場合，潜時約120ms前後では両刺激に対してOz付近で電流の湧き出しが観察された。潜時約150～200 msではOz付近において電流の吸込みが両刺激に対してみられたが，その程度は色対比型刺激の方が明暗対比型刺激よりも顕著に大であった。第1及び第2色盲の被検者の色対比型刺激に対する電流密度分布は，明暗対比型と類似していた。輝度差のある赤-緑パターン刺激に対しては，正常者では輝度対比型と色対比型が混在する分布を示したが，第2色盲では明暗対比型分布であった。これらの結果から，潜時約150～200 msでの後頭部における電流の吸込みは色情報処理に関係していると結論された。また，サルV1野VEPのN80成分は前有線野由来であることが報告されているが(Schroeder他, 1991, 1994, Vision Res)，N80成分はヒト17野VEPのN145成分に相等することからこの吸込みには舌状回や紡錘状回の活動が反映されていると推察された。

(16) 雛鳥の受動的回避学習と大脳基底核

松島俊也（名古屋大学・院・生命農学研究科）

家禽類雛鳥の一回性受動的回避学習（one-trial passive avoidance learning）の記銘痕跡は，学習後1時間ほどでIMHV領域（哺乳類の視覚連合野と相同）からLPO領域（caudate-putamenと相同）に転座すると考えられている。「この転座に際してIMHV領域のニューロンが何を送信し，LPO領域が何を受信してそれを定着するか」，これは記憶の細胞表現を明らかにすることと等価である。我々はまず一連の行動実験から，（1）記銘直後の雛鳥は忌避すべき対象のスナップショット記憶を所有しているが，（2）1ないし24時間後には忌避手がかりが般化すると共に，（3）色・形など部分特徴の結びつき（cue-binding）が変化しAND-gatedかOR-gatedに変わることを見いだした。記銘内容は転座に伴い著しい変質を遂げるらしい。他方，LPO領域の急性スライス標本にパッチ電極を適用しシナプス応答を吟味した結果，LPOニューロンに収束する2群の入力を時間的に一致させた場合，背側入力（cortico-striatal input）には長期増強が，腹側入力（IMHV領域からの入力を仲介するもの）には長期抑圧がそれぞれ生じた。長期増強はSCH-23390（dopamine D1angtagonist）の投与によって抑制された。以上の結果に基づき，「IMHV領域からの入力が，黒質ニューロンの作動を条件に，時間構造を保存量としてcortico-striatal シナプス入力に転写される」とする仮説を提出した。現在，その検証のため，自由行動下の雛鳥のLPO領域から単一ニューロン活動を導出し，記銘後に特徴的な活動を示すユニットを検索している。

(17) ニホンザル道具使用習熟度の定量化

石橋英俊・日原さやか・入来篤史（東邦大・医・第一生理学）

ニホンザルを訓練すると，約2週間で熊手状の道具を使って手の届かない遠方の餌をとるようになる。本研究では，訓練中の道具先端の空間内運動パタンを解析することによって，道具使用習熟の程度の定量化を試みた。その結果，道具使用学習は以下の3段階を経て達成されることが判明した。

第一段階（0～6日目）：道具の先端にエサが固定されていれば，すべてのサルは訓練開始から数分のうちに，道具を引っ張ってエサをとることを覚えた。しかし，エサと道具とが離れているときには，道具の先端でエサをとるように道具を操作することはほとんどできなかった。

第二段階（6～11日目）：道具を横に動かしたり押したりすることで，離れているエサをとることができるようになった。この時期はまだ，まず道具の先端をエサに近づけ，次にそこから道具を手元に引く，という様に二つの動きが分離していた。

第三段階（11～16日目）：前段階で見られた二つの独立した動きが融合して一つの滑らかな動きとなり，学習が完成した。

上記のうち，第二段階は道具先端とエサの位置関係を把握する知覚性の学習と二つの運動をそれぞれ学習する運動性の学習とが混在する時期，第三段階は道具をセットされた場所からエサの置かれた点を通って手元に引いてくるまでの運動を一連のパターンとして習得する運動学習が進行する時期であると推定される。

（18）ネコ外側前庭脊髄路線維の頸髄・胸髄・腰髄支配様式

久世文也・松山清治・森　茂美（生理学研究所・生体システム）

本研究では順行性神経標識物質PHA-Lをもちいて，前庭脊髄路線維の脳幹から頸・胸・腰髄レベルにおける走行と分枝様式を解析することを目的とした。ネコの右Deiters核にPHA-L（5%, 0.3 μl）を注入し，4日-12週の生存期間の後，橋・延髄，頸・胸・腰髄部の厚さ50 μmの連続前額断切片を作製した。PHA-L標識線維は生存期間4-7日（N=3）fontfamily>，2-3週（N=2），6-7週（N=2），10-12週（N=2）のネコにおいて，それぞれ橋・延髄，頸髄（C1-T2），頸・胸髄</fontfamily>（C5-T11），胸・腰髄（T10-L7）に認められた。脳幹における注入部位はDeiters核に限局していた。脳幹内の標識軸索は，右延髄腹側部で下オリーブ核の背外側部を下行した。一部の軸索は両側の内側縦束を下行した。頸髄では右前索と前側索を中心に下行した。胸髄および上部腰髄では右前索を中心に下行し，下部腰髄では右前索の正中縁近くを下行した。脊髄内のそれぞれのレベルで21本の単一軸索の走行を追跡できた。それぞれの単一軸索から複数の軸索側枝が異なる髄節で分枝していた。分枝する軸索側枝は胸・腰髄に比較して頸髄では多く，それぞれの吻尾方向の広がりは頸髄に比較して腰髄で大きかった。これらの軸索は脊髄灰白質内で分枝を繰り返し，いずれのレベルでも主として灰白質のVII層とVIII層に終末線維を分布していた。

21. 病態における心筋イオンチャネルの異常化とその制御

1999. 1. 25－1. 26
代表者：中谷晴昭（千葉大・医・薬理）
世話人：岡田泰伸（生理研）
共催：財団法人・日本心臓財団

（1）発作性心房細動におけるイオンチャネルのリモデリング
山下武志，村川裕二，速水紀幸，矢崎義雄，小俣政男（東京大・循環器内科）

（2）心筋細胞における Endothelin-1 (ET-1) による電位依存性 K チャネルのリン酸化機構の解析
小玉博明，福田恵一，村田光繁，小川　聡（慶應義塾大・医・内科）

（3）抗不整脈薬によるラット心筋Na, Caイオンチャネルの mRNAの発現変化についての検討
山浦正幸，相澤義房（新潟大・医・第一内科）
山本　格，木原　達（新潟大・医・腎研究施設・構造病理）

（4）心肥大に伴う細胞間電気結合のリモデリング
本荘晴朗，李　鍾国，安井健二，神谷香一郎，児玉逸雄（名古屋大・環境医学）

（5）ATP 感受性カリウムチャネルの薬理
片山祐介，堀尾嘉幸，倉地嘉久（大阪大・医・情報薬理第二薬理）

（6）脂肪酸代謝中間物質 L-palmitoylcarnitineによる ATP感受性 Kﾁｬﾈﾙ活動の制御
春名徹也，堀江　稔，藍　智彦，西本紀久，河野　裕，吉田秀忠，
久保田友之，篠山重威（京都大院・医学研究科・循環病態）

（7）心筋細胞膜 K_{ATP} チャネルの役割　— 遺伝子欠損マウスを用いた検討—
坂本直哉，中谷晴昭（千葉大・医・薬理）
三木隆司，清野　進（千葉大院・医・分子機能制御）

（8）ミトコンドリア ATP 感受性 K チャネル開口による虚血心筋保護：preconditioning における関与
三浦哲嗣，北　宏之，三木隆幸，島本和明（札幌医大・医・第二内科）

（9）ブタ冠状動脈平滑筋細胞の large-conductance Ca^{2+}-activated K^{+} channel に対するアシドーシスの影響
早淵康信，森　一博，黒田泰弘（徳島大・医・小児科）
中屋　豊（同　特殊栄養）

(10) ベプリジルの心室筋活動電位持続時間（APD）に対する効果
森島　繁，王　海昌，岡田泰伸（生理研・機能協関部門）

(11) マクロパッチ法による心筋 Na^{+}- Ca^{2+} 交換電流の解析

松岡　達，藤岡靖忠，野間昭典（京都大・医・生理）

(12) ウサギ洞結節細胞における 4AP 感受性外向き K 電流の性質

上勢敬一郎，萩原誠久，関　明子，網代洋一，長崎陽子，笠貫　宏（東京女子医大・心研内科）

(13) Herg S6 変異体について

石井邦明，高橋昌宏（山形大・医・薬理）

(14) LQT 2 における HERG 電位センサー・S4 領域内 R534C 変異の機能異常

中島　忠，平岡昌和（東京医歯大・難治研・循環器病）

古川哲史（東京医歯大・難治研・自律生理）

高橋玉奈，桜田春水（都立広尾病院循環器内科）

永井良三（群馬大・医・第二内科）

(15) Brugada 症候群における Na チャネル α-β1 サブユニット協関異常

蒔田直昌，白井信正（北海道大・医・循環器内科）

菅野盛夫（北海道大・医・薬理）

北畠　顕（北海道大・医・循環器内科）

(16) 欠損変異心筋 Na^{+} チャネルの不活性化障害と局所麻酔薬による開閉調節

小野克重，有田　眞（大分医大・第二生理）

(17) 心筋の電気的膜穿孔のリゾホスファチジルコリンによる促進

大地陸男，立山美幸，立山充博，王　　偉，渡邉マキノ（順天堂大・医・第二生理）

(18) バゾプレッシンによる ICa.L 増加作用

飯島俊彦，倉田修一，藤沢　進（秋田大・医・薬理）

(19) 心室分化時期での内向き整流性 K チャネルの増大について

當瀬規嗣，長島雅人，山田陽一（札幌医大・医・第一生理）

木村浩一，藤井暢弘（札幌医大・医・微生物）

参加者名

蒔田直昌，白井信正（北海道大），三浦哲嗣，土田哲人，鵜野起久也，當瀬規嗣（札幌医大），飯島俊彦（秋田大），石井邦明，高橋昌宏，木村美奈子（山形大），相澤義房，山浦正幸（新潟大），村川裕二，山下武志，速水紀幸（東京大），小玉博明，福田恵一，村田光繁（慶應義塾大），大地陸男，王　　偉（順天堂大），平岡昌和（東京医歯大），中島　忠（群馬大），笠貫　宏，萩原誠久，上勢敬一郎，長崎陽子（東京女医大），児玉逸雄，本荘晴朗，安井健二，李　鍾国（名古屋大），岡田泰伸，森島　繁，赤塚結子，三好毅志，清水貴浩，范　海天，森信一郎（生理研），松岡　達，藤岡靖忠，堀江　稔，春名徹也（京都大），倉地嘉久，片山祐介（大阪大），中屋　豊，早渕康信，堤　保夫（徳島大），小野克重，賀来俊彦（大分医大），中谷晴昭，小倉武彦，坂本直哉，坂下育美（千葉大）

研究会概要

本研究会では心房細動，心肥大における心筋イオンチャネルおよび細胞間電気的結合のリモデリングとその病態生理学的意義の検討，抗不整脈薬や受容体刺激による修飾等についての発表がなされた。また，先天性 QT 延長症候群，Brugada 症候群のイオンチャネルの分子構造と機能の関連性，抗不整脈薬の作用点等についての発表がなされた。心筋梗塞急性期における心筋保護という観点から重要な ATP 感受性 K^+ チャネルについてはその分子構造，薬物の作用点，細胞膜脂質による制御機構，ATP 感受性 K^+ チャネルノックアウトマウスの心筋細胞を用いた研究，そしてミトコンドリア ATP 感受性 K^+ チャネル開口薬の心筋保護作用に関する発表があり，活発な討論が行われた。今回の研究会も，全国から多数の基礎および臨床研究者が集い，十分な時間をとって率直で活発な討論が展開された。それによって病態におけるイオンチャネルの異常化についての理解が深まり，今後の新たな治療手段の開発を考える上で重要な情報交換の場となったと思われる。

(1) 発作性心房細動によるイオンチャネルのリモデリング

山下武志，村川裕二，速水紀幸，矢崎義雄，小俣政男（東京大·循環器内科）

心房細動はそれ自身が進行的な特徴を有する（心房細動のリモデリング）。この心房細動悪循環の機序を知る目的で，ラット心房で高頻度心房興奮が心房筋に及ぼす影響を分子生物学的に検討した。高頻度刺激により頻度依存的に Kv1.5，Kv4.2，Kv4.3 の 3 つのチャネル mRNA レベルに有意な変化を認めた。灌流心での検討では，Kv1.5mRNA 増加の初期相（0.5時間）には心房筋伸展が，一方後期相（2 時間）は高頻度興奮が密接に関与し，さらに伸展による変化は Ca/CaM キナーゼ，及び p38/MAPK による情報伝達系を介していると考えられた。このようなことから心房細動では持続数時間という非常に早い段階から心房筋に生化学的な電気的リモデリングが生じうることが明らかとなった。

(2) 心筋細胞におけるEndothelin-1（ET-1）による電位依存性 Kチャネルのリン酸化機構の解析

小玉博明，福田恵一，村田光繁，小川　聡（慶應義塾大·呼吸循環器内科）

電位依存性 K チャネル（Kv）は細胞内領域のリン酸化により電流量が調節される。我々は心肥大や陽性変力作用を持つ ET-1 の Kv1.2 に対するチロシンリン酸化とこれに至る経路を明かに

し，心肥大経路との関連を検討した。ラット新生児培養心筋細胞を ET-1 により刺激すると Gq，PLC を介して Pyk2，EGFR がリン酸化された。Pyk2 リン酸化は細胞内 Ca の上昇，PKC の活性化，細胞骨格の構築を必要としたが，EGFR 活性化は必要としなかった。Pyk2 活性化に伴い Pyk2 と Kv1.2 の会合，Kv1.2 のリン酸化を認めた。活性化 Pyk2 は in vitro で GST-Kv1.2（C末端）をリン酸化した。EGFR は PKC 依存性だが Ca 非依存性に活性化され，ERK 活性化に強く寄与したが Kv1.2 のリン酸化には関与しないことが示された。ET-1 による Kv1.2 リン酸化経路は細胞増殖に寄与する主たる経路とは異なることが示唆された。

（3）抗不整脈薬によるラット心筋Na, Caイオンチャネル mRNA の発現変化についての検討

山浦正幸，相澤義房（新潟大･医･第一内科）
山本　格，木原　達（新潟大･医･腎研究施設･構造病理）

【目的】Vaugham Williams 分類 Ia，Ib，Ic，IV 群抗不整脈，ジゴキシン投薬によるラット心筋 Na，Ca チャネルの発現変化を検討した。

【対象と方法】Sprague-Dawley rat を Disopyramide（Diso.）200 mg/kg/d，Mexiletine（Mex.）200 mg/kg/d，Flecainide（Flec.）40 mg/kg/d，Verapamil（Ver.）50 mg/kg/d，Digoxin（Dig.）0.1 mg/kg/d，control（cont.）の各群に分け，3日間投薬後 ribonuclease protection assay 法で左室筋，心房筋の Na channel α subunit，Ca channel α 1 subunit mRNA の発現変化を定量した（Flec. 群は心室のみ）。

【結果】cont. と比較し Diso 群で心房 Ca channel は 2.2 倍，心室 Ca channel は 1.7 倍，Mex. 群で心房 Na channel は 1.9 倍，心室 Ca channel は 1.6 倍，Ver. 群で心房 Na channel は 2.5 倍，心房 Ca channel は 2.3 倍増加した。Flec. 群，Dig. 群は不変であった。同一薬剤でも心房筋，心室筋の Na channel, Ca cahnnel mRNA の発現変化は一様でなく，それぞれ異なった機序で調節されている可能性がある。

（4）心肥大に伴う細胞間電気結合のリモデリング

本荘晴朗，李　鍾国，安井健二，神谷香一郎，児玉逸雄（名古屋大･環境医学）

肥大心における心室頻拍・細動の多くはリエントリーによるものであり，不応期の不均一性増大に加えて伝導遅延がその成立を促すと考えられる。本研究ではモノクロタリン（MCT）誘発

右室肥大ラットを用い，心肥大に伴うギャップ結合蛋白 connexin43（Cx43）分布の変化と心室筋異方向性伝導特性の変化を解析した。心室筋を Cx43 抗体で免疫染色すると対照ラットでは Cx43 が介在板に局在していた。MCT ラットの肥大した右心室筋では介在板の Cx43 が有意に減少し，介在板以外の細胞膜上にも Cx43 が散在していた。MCT ラット右心室の心筋線維走行に垂直方向（T）の伝導速度(θ)は対照との間に有意差を認めなかったが，心筋線維走行に沿う方向（L）の伝導速度は有意に低下し，伝導のanisotropic ratio（θ_L/θ_T）も有意に低値であった。肥大心筋におけるギャップ結合の異常な分布は異方向性伝導特性を変化させ，リエントリー性不整脈発生の基質となると考えられる。

(5) ATP 感受性カリウムチャネルの薬理

片山祐介，堀尾嘉幸，倉智嘉久（大阪大･医･情報薬理第二薬理）

【目的・方法】ATP 感受性カリウムチャネル（KATPチャネル）の薬剤反応性は SUR のサブタイプによって決定されるが，KATP チャネルのポア構成サブユニットの一つであるKir6.2 と SUR1，2A，及び 2B を HEK293T 細胞に共発現させ，それぞれ膵臓型，心臓型，平滑筋型 KATP チャネルの薬剤の臓器特異性をパッチクランプ法ホールセルモードによって検討した。
【結果】3 種類の SUR と Kir6.2 の組み合わせによって再構築されたチャネルは薬剤の臓器特異性を再現していた。即ち，膵 β 細胞 KATP チャネルの開口薬であるジアゾキシドはSUR1/Kir6.2 を，心筋細胞 KATP チャネル開口薬であるピナシジルは SUR2A 及び2B/Kir6.2 をそれぞれ完全開口させたが，他のチャネルには無効であるか，より高濃度を必要とした。血管拡張薬であるニコランジルは SUR2B/Kir6.2 をそれぞれ完全開口させたが，SUR2A/Kir6.2 に対しては部分アゴニストであり，SUR1/Kir6.2 には無効であった。新しく開発された血管拡張薬である MCC-134 は，SUR2B/Kir6.2 チャネルに対しては完全アゴニストであったが，SUR2A/Kir6.2チャネルに対しては部分アゴニストであった。さらにこの薬剤はSUR1/Kir6.2 チャネルに対しては逆アゴニストであった。従ってこの薬剤は膵臓の KATP チャネルと心血管系の KATP チャネルで全く逆の作用を持っていた。
【総括】以上により KATP チャネルの特性を分子薬理学的に解析し，さらに新しい血管拡張薬である MCC-134 の特徴的な作用を明らかとした。この薬剤の特性は，新しいタイプの糖尿病治療薬の開発の可能性を示唆すると同時に，KATPチャネル活性調節の分子機構の解明において重要な情報を提供すると考えられた。

(6) 脂肪酸代謝中間物質 L-palmitoylcarnitine によるATP 感受性 K ﾁｬﾈﾙ活動の制御

春名徹也，堀江　稔，藍　智彦，西本紀久，河野　裕，吉田秀忠
久保田友之，篠山重威（京都大院・医学研究科・循環病態）

L-palmitoylcarnitine（l-PC）は，虚血等の脂肪酸代謝抑制時に，細胞膜に蓄積し，脂質二重層を改築することで，イオンチャネル，トランスポータ機能を修飾し，催不整脈に働いているとされている。しかしながら，心筋虚血時に，心筋保護に働くとされる ATP 感受性 K チャネル（KATP）に関しては，l-PC の作用は明らかでない。l-PC による膜構造の変化は，膜リン脂質 phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP2) のKATP チャネル活性化作用に影響を与え，KATP チャネル活動を制御している可能性がある。そこで，l-PC の KATP ﾁｬﾈﾙ活動に対する直接的な作用と，PIP2 の KATP チャネル活性化作用に対するl-PC の影響を，ﾓﾙﾓｯﾄ心室筋細胞を用いて，電気生理学的に検討した。inside-out モードにて，膜の内側から投与された l-PC は，unitary current を変化させず，KATP 電流を濃度依存的（0.1～10 μ M）に抑制した（IC50 = 2.7±0.1 μ M)。l-PC は KATP チャネルの ATP 抑制曲線を左にシフトし，ATP IC50も63.3±2.0 μ M から 23.3±8.1 μ M に低下させ，チャネルの ATP 感受性を増強した（n=6)。PIP2 は，前もって Ca（1mM）にて run-down させた KATP 電流を，ほぼ run-down 前まで（% reactivation: run-down 前電流に対する PIP2 投与後再活性化電流の平均パッチ電流比率；95.3±6.3 %, n=11）回復させた。しかしながら，PIP2 投与前に，l-PC をパッチへ前投与しておくと，PIP2 の再活性化作用は減弱した（% reactivation；35.3±12.3 %, n=8)。同様に，l-PC の前投与により，run-down に対する，MgATP（2 mM）の refreshment 効果も減弱する傾向がみられた。

以上のことから，l-PC は，膜リン脂質構成に変化をもたらし，KATP チャネル活動に対して抑制的に働く物質と考えられた。

(7) 心筋細胞膜 K_{ATP} チャネルの役割　—遺伝子欠損マウスを用いた検討—

坂本直哉，中谷晴昭（千葉大・医・薬理）
三木隆司，清野　進（千葉大院・医学研究科・分子機能制御）

虚血時の活動電位短縮における K_{ATP} チャネルの役割を再検討する目的で，Kir6.2 knockout（KO）マウスの単離心室筋細胞を用いて虚血類似条件下の活動電位幅の変化と K_{ATP} 電流活性化の有無についてパッチクランプ法により検討した。

KO マウスの心室筋細胞膜においては単一 K_{ATP} チャネル電流は記録できず，野生型マウスの細胞で観察される cromakalim 誘発外向き電流も認められなかった。同様に代謝阻害薬を用いた

虚血類似状態においても KO 細胞では外向き電流は活性化しなかった。current clamp mode で記録した活動電位は，野生型細胞では cromakalim，代謝阻害薬で短縮したが，KO 細胞ではその短縮は認められなかった。

以上より，虚血時の活動電位幅短縮には細胞膜 K_{ATP} チャネルが最も重要な役割を果しており，その機能の発現にはKir6.2が必須である。

(8) ミトコンドリアATP感受性 K チャネル開口による虚血心筋保護：preconditioning における関与

三浦哲嗣，北　宏之，三木隆幸，島本和明（札幌医大・医・第二内科）

アデノシン（Ado）A_1 受容体を介する preconditioning（PC）機構におけるミトコンドリア ATP 感受性 K チャネル（mitoK_{ATP}）の関与を検討した。PC により心筋間質 Ado レベルは約 1 μ M に上昇し，PKC は活性化した。A_1 受容体作動薬（R-PIA）は PC と同様に虚血心筋細胞壊死を抑制し，この効果は PKC 阻害薬，mitoK_{ATP} 阻害薬（5-hydroxydecanoate, 5-HD）により遮断された。一方，mitoK_{ATP} を選択的に開口する用量である 100 μ M diazoxide は虚血・再灌流時のミトコンドリア機能障害を抑制し，細胞壊死を抑制した。この効果は 5-HD で阻害されたが PKC 阻害薬や心筋細胞膜 K_{ATP} の選択的阻害薬である HMR1883 に影響を受けなかった。以上の成績から，A_1 受容体刺激は PKC の活性化を介して mitoK_{ATP} を開口させ，PC 効果をもたらすと考えられた。

(9) ブタ冠状動脈平滑筋細胞の large-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channel に対するアシドーシスの影響

早淵康信，森　一博，黒田泰弘（徳島大・医・小児科）
中屋　豊（同　特殊栄養）

ブタ冠状動脈平滑筋細胞の large-conductance Ca^{2+}-activated K^+ channel（K_{Ca} channel）に対するアシドーシスの影響を検討した。冠状動脈リング標本のアシドーシスによる弛緩反応では，charybdotoxinで前処置した標本において，pH 7.0 から 6.8 で有意な弛緩反応抑制を示した。patch clampの実験では，inside-out patchにおいて，細胞外アシドーシスは，K_{Ca} channel に，直接の影響は与えなかった。細胞内 Ca^{2+} 濃度を一定に保った場合には，細胞内 H^+ は K_{CA} channel を抑制した。cell-attached patch で，細胞内 Ca^{2+} 濃度が pH によって変化する状態で

は，K_{Ca} channel は活性化され，BAPTA-AM で前処置した場合には，H^+ によって，K_{Ca} channel は抑制された。アシドーシスにおける K_{Ca} channel は，細胞内 H^+ 上昇による抑制と細胞内 pH 低下に伴う Ca^{2+} 上昇による活性化によって制御され，血管拡張に関与していると考えた。

(10) ベプリジルの心室筋活動電位持続時間（APD）に対する効果

森島　繁，王　海昌，岡田泰伸（生理研・機能協関部門）

ベプリジルは，L 型 Ca^{2+} チャネルをブロックするのみならず，電位依存性 Na^+ チャネルをもブロックする作用を有した比較的新しい抗狭心薬である。これらの複合作用により従来の抗狭心薬が無効の症例に関しても有効である半面，APD を延長することにより臨床的に QT 延長症候群をきたし，重篤な不整脈に陥る症例が報告されている。APD の延長のメカニズムに関しては，これまで K^+ チャネルの関与が示唆されてきたが，未だに心室筋単離細胞での APD をベプリジルがどのように変化させるかは明らかでない。そこで我々はモルモット心室筋細胞を用いて，いかなる条件下でベプリジルが APD を延長させるかを検討した。まず，ナイスタチン法を用いた電流固定法にて，5 Hz以上で刺激時，0.1 μMのベプリジルは APD_{90} を延長した。3 Hz以下で刺激されたときは明らかな延長を示さなかった。また，3 μMよりも高濃度では，APD は短縮した。全細胞電圧固定法にて，ベプリジルは早期活性型（I_{Kr}）及び緩徐活性型（I_{Ks}）遅延整流性 K^+ 電流を共に抑制した。しかし，その濃度依存性は大きく異なり，I_{Ks} のIC_{50} が1.2 μMであったのに対し，I_K 全体のそれは 0.12 μMであった。I_{Kl} は 20 μM以上にても全く抑制されなかった。これらの事実より，APD の延長効果は主として I_{Kr} の抑制によるものであることが示唆された。

(11) マクロパッチ法による心筋 Na^+-Ca^{2+} 交換電流の解析

松岡　達，藤岡靖忠，野間昭典（京都大・医・生理）

生理的細胞質膜における Na^+-Ca^{2+} 交換の制御機構を解析するために，inside-out patch 法を改良し，先端内径3-7 μm のガラス管を用いてモルモット心室筋細胞から直接にパッチ膜（マクロパッチ）を作成することが可能となった。細胞質側 Na^+ で誘発された外向き Na^+-Ca^{2+} 交換電流（$I_{Na\text{-}Ca}$）は時間とともに減衰（Na^+ 依存性不活性化）し，細胞質側マイクロモル程度の Ca^{2+} により活性化された。特異的阻害剤である XIP を用いて $I_{Na\text{-}Ca}$ を単離したところ，逆転電位は $3Na^+ : 1Ca^{2+}$ 交換から大きく異なり，$4Na^+ : 1Ca^{2+}$ 交換を強く支持した。マクロパッチ

法は細胞質膜 Na^{+}-Ca^{2+} 交換の解析に有用な方法であると結論された。

(12) ウサギ洞結節細胞における4AP感受性外向きK電流の性質

上勢敬一郎，萩原誠久，関　明子，網代洋一，長崎陽子
笠貫　宏（東京女子医大・心研内科）

ウサギ洞結節細胞の 4AP 感受性一過性外向き電流（Ito）について検討した。電流電圧曲線では，-30 mV 付近から活性化され，電位依存性に増加する Ito が確認された。4AP の濃度依存性について IC50 値は 0.28 mM であった。定常状態の不活性化については Slope Factor は -8.4 mV，V0.5 は -35.0 mV でウサギ心房筋 Ito に比べてやや脱分極よりの傾向を示した。Ito の電流密度は，洞結節細胞が 6.3±0.5 pA/pF，心房筋が 12.3±1.2 pA/pF で，心房筋 Ito が約 2 倍の電流密度であった。Ito の不活性化の時定数は心房筋では τf=9.7 ms，τs=44.8 msで，洞結節細胞はそれに比べて τf=4.2 ms，τs=26 msと速かった。不活性化からの回復過程の時定数は，洞結節細胞で 44.7±9.0 ms で，心房筋が平均で約 1 秒であった。洞結節細胞と心房筋 Ito では電流密度のみならず，その kinetic が特に大きく異なっており，Ito を構成しているチャンネルの構造も両部位では異なる可能性が考えられた。

(13) Herg S6 変異体について

石井邦明，高橋昌宏（山形大・医・薬理）

HergチャネルのS6領域の変異体を作製し，それらに対する抗不整脈薬の影響ならびに野生型との電流キネティクスの違いを検討した。S6の中間領域である第647番目のアミノ酸の変異によって抗不整脈薬の作用が減弱し，同時に電流キネティクスの変化が認められた。野生型のその部位のアミノ酸（I）をFにかえたI647Fに対しては，検討した2種類の抗不整脈薬キニジン，E-4031の作用ともに減弱した。しかしその部位をAにかえたI647Aではキニジンの作用は野生型と全く同じになったのに対し，E-4031の作用は減弱したままであった（I647Fの場合よりはその程度は弱くなった）。キネティクスに関してはI647Fにおけるdeactivationの遅延が特徴的であったが，この変化はI647Aにおいては認められなかった。またI647Fにおいて，inactivationの大きな変化などは認められなかった。

(14) LQT2におけるHERG電位センサー・S4領域内 R534C 変異の機能異常

中島　忠，平岡昌和（東京医歯大・難治疾患研究所・循環器病）
古川哲史（東京医歯大・難治疾患研究所・自律生理）
高橋玉奈，桜田春水（都立広尾病院循環器内科）
永井良三（群馬大・医・第二内科）

【目的・方法】最近，HERG の電位センサー・S4 領域に R534C 変異が発見され，新たな電流抑制機構が予想された。そこで，R534C 変異の電流特性をアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用い検討した。

【結果】野生型 cRNA と R534CcRNA をそれぞれ単独で注入した場合（WT, R534C）の発現電流値の総和は，混合し注入した場合（R534C/WT）とほぼ同等であり，dominant-negative suppression（DNP）を認めなかった。R534C, R534C/WT ともに WT と比べ活性化曲線は負電位側に有意シフトし，活性化速度，脱活性化速度はともに有意に促進していた。また，不活性化曲線は正電位側に有意にシフトしていた。

【総括】R534C 変異はこれまでに検討されたミスセンス変異とは異なり DNP を来さなかった。R534C 変異における HERG 電流の抑制は脱活性化の促進が主因と考えられた。

(15) Brugada症候群における Na チャネル α-β1サブユニットの協関異常

蒔田直昌，白井信正（北海道大・医・循環器内科）
菅野盛夫（北海道大・医・薬理）
北畠　顕（北海道大・医・循環器内科）

最近，心電図 V1-3 の ST 上昇・右脚ブロックを特徴とする特発性心室細動（Brugada 症候群）の原因遺伝子が，心筋 Na チャネル α サブユニット（SCN5A）であることが判明した。しかし，in vitro で示された Brugada 変異 Na チャネル（T1620M）の機能異常は軽微で，心電図異常や心室細動発生の機序を必ずしも十分に説明できない。

【目的】Na チャネルの機能修飾蛋白であるβ1サブユニット（β1）が，T1620M 変異 α サブユニットのチャネル特性をどのように変化させるかを検討すること。

【方法】正常心筋 Na チャネル（WT），T1620M をアフリカツメガエル卵母細胞にそれぞれ単独またはβ1 と共発現させ，膜電位固定法およびマクロパッチで Na 電流を測定した。

【結果】チャネル活性化は各群に差はなかった。β1 の共発現によって WT のチャネル特性は変化しなかったが，T1620M の不活性化の膜電位依存性は脱分極側へ約 10 mV変位し，その結果 window currentが増加した。不活性からの回復はβ1 の存在下で有意に加速され，T1620M ではチャネルの不活性化状態が不安定化していることが示された。
【総括】T1620M は，β1 の共発現によってαサブユニット単独よりも重篤な機能異常を呈した。Brugada 症候群の病態の分子機構として Na チャネルα-β1サブユニットの機能協関異常が考えられた。

(16) 欠損変異心筋 Na^+ チャネルの不活性化障害と局所麻酔薬による開閉調節

小野克重，有田　眞（大分医大･第二生理）

遺伝性 III 型 QT 延長症候群の患者は，心筋 Na^+ チャネル サブユニット遺伝子（SCN5A）の変異により Na^+ 電流異常が生じていることが判明している。この内，Na^+ チャネル サブユニットの第 3 ドメイン-第 4 ドメイン連結部の 3 つのアミノ酸（リジン K，プロリン P，グルタミン Q）欠損変異チャネルを CHW 細胞に発現させ，膜電位固定法を用いてバースト状開閉形成と孤立性開閉に対する局所麻酔薬の作用を比較した。両剤とも，低濃度（1 μM）では瞬時性電流に対する作用はきわめて弱く，0 mVにおいて10%程度の電流振幅の抑制であったが，1 μMの Lidocaine は，主にバースト持続中の平均開時間を減少させ，平均閉時間の延長をきたしたがバースト持続時間に対する作用は微小であった。一方，同濃度の Pilsicainide はバースト持続中の平均開閉時間に対する作用は弱いが，バースト持続時間を著明に短縮させた。

(17) 心筋の電気的膜穿孔のリゾホスファチジルコリンによる促進

大地陸男，立山美幸，立山充博，王　　偉，渡邉マキノ（順天堂大・医・第二生理）

膜の脂質二重層（BLM）は親水性物質に対する拡散バリアーであり，また膜容量としてチャネル電流を積分して膜電位を形成する。心室筋の細胞外 K^+ 濃度を 0.1 または 0 mM に減少すると，膜電位が -150 mV 近くに過分極し，これによって不規則な脱分極がと活動電位が誘発された。また -150 mV 近くへの膜電位固定による過分極ではノイズ状の内向き電流（I_{in}）が発生した。不規則な脱分極も I_{in} も 0.1 mM La^{3+} で抑制された。I_{in} はイオン非選択的なポアを透過することから，膜の電気的穿孔 (electroporation) によると推定された。10 μM リゾホスファチジ

ルコリン（LPC）を細胞外に適用すると，I_{in} の誘発電位は時間とともに正の方向にシフトし，この I_{in} もLa^{3+}で抑制された。これらの結果は BLM がチャネル電流の変化がもたらす過分極によって一過性に破壊されることを示す。心臓の血流障害時に生成される両親媒性の LPC は，電気的膜穿孔を促し，異常な電気的活動の原因になりうる。

(18) バゾプレッシンによる I Ca·L 増加作用

飯島俊彦，倉田修一，藤沢　進（秋田大·医·薬理）

Arginine Vasopressin（AVP）の心室筋細胞 ICa·L に対する直接作用を，nystatine 穿孔パッチ法を用いて検討した。モルモット心室筋を酵素処理により単離し，37℃ にて実験を行った。細胞内外の K^+ を Cs^+ に置換し，-40 mV に膜電位固定して ICa·L を記録した．nystatine 穿孔パッチ法では run-down は殆ど認められず，AVP は用量依存的に ICa·Lを0.01-0.1 μ M で増加し，0.3-1 μ M では減少させた。AVP のこのような作用はV1 受容体拮抗薬の OPC-21268 によって有意に抑制され，Staurosporine 10 nM によっても有意に抑制された。また，Isoproterenol で最大作用を引き起こした後でも認められた。さらに，ICa·Lの増加作用は Ryanodine の前投与では影響されず，Cyclopiazonic acid によって抑制された。

以上の結果から，AVP は PKC を介して ICa·Lを増加し，その作用には細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの遊離による濃度の変化が関与していることが示唆された。

(19) 心室分化時期での内向き整流性 K チャネルの増大について

當瀬規嗣・長島雅人・山田陽一（札幌医大·第一生理）
木村浩一・藤井暢弘（札幌医大·微生物）

ラットの発生中期の心室筋は自動能を有しているが，発達に連れ自動能は失われる。この変化に関わるイオンチャネルの性質をパッチクランプ法を用いて検討した。胎生12日の心室筋細胞の大部分に自動能が認められ，内向き整流性K電流（I_{Kl}）をわずかに観測した。一方，胎生後半である18日の心室筋細胞では静止膜電位は -70 mV 前後であり，I_{Kl} の電流量は12日に比較して2倍程度であった。単一チャネル活動の観察では，12日では 22 pSのチャネルのみが観察されたが，18日では 22 pSに加えて，58 pSや 37 pSのチャネルが多数観察されるようになった。発生期の膜電位の変化は大きい伝導度の I_{Kl} チャネルの出現によると考えられた。そこで，I_{Kl} チャネルをコードする Kir 2 ファミリーの遺伝子を検索したところ，Kir 2.1 とKir 2.2が発現していた。

定量的 PCR カイネティクス分析法を用いて，12日と18日の遺伝子を比較すると，Kir2.1 は18日で 2 倍になるのに対し，Kir2.2 は17倍に増大し，これが，大きい伝導度のチャネルをコードしていると考えられた。

【国際シンポジウム】

第25回 生理研

国際シンポジウム(COE)

第25回生理研国際シンポジウム（COE 国際シンポジウム）
“Ion Channels and Receptors in Cell Physiology”

第25回生理研国際シンポジウム “Ion Channels and Receptors in Cell Physiology” は 第３回 COE 国際シンポジウムとして1999（H11）年1月27日～29日の3日間，岡崎コンファレンスセンターで開催された。

COE 国際シンポジウムは第１回森教授，第２回柿木・橋本教授担当に続き，第３回目となるが，生理研としてはこれまでのSEIRIKENコンファレンスの伝統を受け継ぎ，The 25th SEIRIKEN International Symposium（COE）というシリーズ名で開くことになったものである。

本シンポジウムは日英国際共同シンポジウム（第20回生理研コンファレンス：1995年）の流れを受け，細胞生理学の分野での最新の知見を討議すべく，山岸俊一教授が会長を務め，生体膜部門のスタッフおよび瀬山（廣島大），井上（徳島大），老木（福井大）のメムバーにより，企画，運営された。

国外からは，英国からの参加者は英国からDrs. Bone, Messenger, Williamson, Abbott, Lima, Kato，米国からDrs. Bezanilla, Begenisich, Narahashi, Spires，フランスからDrs.Coles, Shimahara, ドイツからDr. Stühmer，中国からDr. Xuの計14名，国内からはこの分野の第一線の研究者84名が参加し，講演35題，ポスター22題の発表が行われた。参加者総数は120名であった。

発表の内容はチャネル，リセプター分子の構造と機能の新しい発見，細胞，組織における局在，いろいろな細胞，たとえば神経細胞，グリア細胞，筋細胞，上皮細胞，色素細胞，卵細胞，プランクトンなどでの生理機能発現とその制御機構，そして行動にわたって，バライエティに富んだ新知見の報告があり，多くの参加者から大変内容の濃い，高いレベルのシンポジウムであったとの感想が寄せられた。以下に講演とポスター発表のプログラムを掲載する。

The 25th SEIRIKEN International Symposium (COE)
Ion Channels and Receptors in Cell Physiology

January 27 - 29, 1999

Okazaki Conference Center

January 26 Tuesday

16:00 - 18:00　Registration at Okazaki Conference Center

18:00 -　Get-together party

January 27 Wednesday

9:00 - 9:20　Yamagishi S (National Institute for Physiological Sciences (NIPS))

Opening remarks

Chairperson: Narahashi T (Northwestern Univ)

1) 9:20 - 9:45 Bone Q (MBA, Plymouth)

A zoologist's view of ion channels and receptor physiolog

2) 9:45 - 10:10 Takahashi K and Tanaka-Kunishima M (Med Physiol, Meiji Pharmaceu Univ)

Ion channels and early neuronal development

3) 10:10 - 10:40 Bezanilla F^{1}, Cha A^{1}, Starace D^{1}, Selvin P^{2} and Ruben P^{3}(^{1}Physiol and Anesth, UCLA Sch Med, ^{2}Physics, Univ Illinois-Urbana Champ, ^{3}Biol, Utah State Univ)

Structure and function of voltage dependent channels

10:40 - 11:00 —— Coffee ——

Chairperson: Begenisich T (Univ Rochester)

4) 11:00 - 11:25 Inoue I^{1} and Tsutsui I^{2} (^{1}Inst Enzyme Res, Tokushima Univ, ^{2}NIPS)

Modulation of potassium channel inactivation by Ca^{2+}-calmodulin in the squid giant axon

5) 11:25 - 11:50 Seyama I, Kimura T, Kinoshita E, Yakehiro M, Ishii H and Yamaoka K (Physiol, Hiroshima Univ)

An analysis of the variations in potency of grayanotoxin in modifyin different sodium channel isoforms

11:50 - 13:30 —— Photography & Lunch ——

Chairpersons: Bezanilla F (UCLA),
Inoue I (Tokushima Univ)

6) 13:30 - 13:55 Matsumoto G^{1}, Ichikawa M^{1} and Hanyu Y^{2} (^{1}RIKEN Brain Sci Inst, ^{2}Supermolec Div, Electrotech Lab)

Far-from-equilibrium study on electrical excitability and its transmission in squid giant axons

7) 13:55 - 14:25 Begenisich T (Physiol, Univ Rochester Med Center)

The multi-ion nature of ion selectivity and permeation in potassium channels

8) 14:25 - 14:55 Stühmer W (Max-Planck-Inst Exp Med)

The role of ether-a-go-go potassium channel in cell cycle and proliferation

9) 14:55 - 15:20 Ishii T (Physiol, Fac Med, Kyoto Univ)

Function-structure relationship and molecular characterization of calcium-activated potassium channels

10) 15:20 - 15:45 Kurachi Y (Pharmacol, Osaka Univ)

Control of subcellular localization and function of inwardly rectifying K^+ channel by PSD-Anchoring proteins

15:45 - 16:05 —— Coffee ——

Chairpersons: Stühmer W (Max-Planck-Inst), Oiki S (Fukui MedSch)

11) 16:05 - 16:35 Coles J A[1] and Marcaggi P[2] ([1]INSERM U394, Inst François Magendie, Bordeaux, [2]INSERM U438, CHU)

Separate route for uptake of NH_4^+ and K^+ by glial cells in bee retina

12) 16:35 - 17:00 Mitsuiye T and Noma A (Physiol, Fac Med, Kyoto Univ)

Cardiac Na^+ channel gating as revealed by both oil-gap and single channel recording methods

13) 17:00 - 17:25 Kukita F (NIPS)

Solvent-dependent gating process in squid Na^+ channels

14) 17:25 - 17:50 Oiki S[1], Goshima S[2], Muto S[2] and Uozumi N[2] ([1]Physiol, Fukui Med Sch, [2]Biosci Center, Nagoya Univ)

Pore properties of a potassium channel (KAT1) from plant

18:00 - 20:00 —— Reception Party ——

January 28 Thursday

Chairperson: Coles J A (INSERM)

15) 9:00 - 9:30 Narahashi T, Aistrup G L and Marszalec W (Molec Pharmacol and Biol Chem, Northwestern Univ)

Chemical modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels

16) 9:30 - 9:55 Kawai N (Physiol, Jichi Med Sch)

Neurotoxins from arthropod venoms

17) 9:55 - 10:25 Messenger J B (Animal and Plant Sci, Univ Sheffield)

Glutamate and glutamate receptors in cephalopod *molluscs*

10:25 - 10:45 —— Coffee ——

Chairpersons: Messenger J (Univ Sheffield),

Kidokoro Y (Gunma Univ)

18) 10:45 - 11:10 Zhang D, Kuromi H and Kidokoro Y (Gunma Univ School of Med)
Metabotropic glutamate receptors at the Drosophila neuromuscular junction

19) 11:10 - 11:35 Kubo Y[1,2], Miyashita T[1,2] and Murata Y[1,3,4]([1]Neurophysiol, Tokyo Metropolitan Inst Neurosci, [2]CREST, [3]Med Physiol, Meiji College Pharmacy, [4]Physiol, Fac Med ,Tokyo Med Dent Univ)
Structural basis for a Ca^{2+}- sensing function of the metabotropic glutamate receptors

20) 11:35 - 12:00 Kuba K[1], Narita K[2], Fang S-M[1], Akita T[1] and Hachisuka A[1]
([1]Physiol, Nagoya Univ Sch Med, [2]Kawasaki Med Sch)
Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release in presynaptic nerve terminals and exocytosis

21) 12:00 - 12:25 Sugiyama H, Ito I, Kato A and Minakami R (Biol, Kyusyu Univ)
Synaptic activity and glutamate receptor localization in the hippocampus

12:25 - 14:30 ------ Lunch and Poster Session ------

Chairperson: Kuba K (Nagoya Univ)

22) 14:30 - 14:55 Mochida S[1] and Catterall W A[2] ([1]Physiol, Tokyo Med Univ, [2]Univ Washington)
Presynaptic calcium channels : Role in transmitter release

23) 14:55 - 15:20 Ozawa S (Physiol, Gunma Univ Sch Med)
Postsynaptic expression of recombinant NMDA receptors in CNS neurons by adenovirus-mediated gene transfer

24) 15:20 - 15:50 Xu K (Shanghai Inst Physiol, Chinese Acad Sci)
Presynaptic slow potassium channel and myasthenia gravis

15:50 - 16:10 ------ Coffee ------

Chairpersons: Williamson R (Plymouth Univ),
Kanno Y (Hiroshima Univ)

25) 16:10 - 16:40 Abbott N J, Nobles M and Easton A S (Physiol, King's Coll London)
Role of receptors and ion channels in modulation of blood-brain barrier function

26) 16:40 - 17:05 Oomura Y[1], Hori N[2], Shiraishi T[3], Sasaki K[4], Takada H[5] ([1]Inst Bio-Active

Sci, Nippon Zoki, [2]Pharmacol Dent, Kyushu Univ, [3]Physiol, Tokai Univ, [4]Bioinform Eng, Toyama Univ, [5]Pharmacol, Tokyo Med Univ)

Leptin suppresses food intake through the hypothalamus and facilitates learning memory through the hippocampus

27) 17:05 - 17:30 Kijima H and Murakami M (Physics, Nagoya Univ)

Sugar-gated transduction ion channels in the insect taste cell

28) 17:30 - 17:55 Okada Y, Tsumura T, Hazama A and Miyoshi T (NIPS)

cAMP-dependent Cl^- channel currents in intestinal Paneth cells : Relation to VIP receptor and CFTR expression

29) 17:55 - 18:20 Furuya K[1] , Nakano H[2], Enomoto K[3], Ichikawa J[1], Okuda A[1] and Yamagishi S[2]

([1] Kyoto Inst Technol, [2]NIPS, [3]Shimane Med Univ)

Paracrine signaling via ATP receptors in mammary gland

January 29 Friday

Chairperson: Bone Q (MBA, Plymouth)

30) 9:00 - 9:30 Bournaud R[1], Mellili K[1], Bastide B[1], Hidalgo J[2] and Shimahara T[1]

([1]Neurobiol Cell et Molecul, CNRS, [2]ICBM, Univ Chile)

Dihydropyridine receptor (DHPr) in Purkinje cells from mouse cerebellum

31) 9:30 - 9:55 Kasai M and Yamaguchi N (Biophys Eng, Osaka Univ)

Intrinsic proteins which regulate ryanodine receptor Ca^{2+} release channel in skeletal muscle

32) 9:55 - 10:20 Imoto K, Wakamori M and Mori Y (NIPS)

Calcium channel diseases

10:20 - 10:40 ------ Coffee ------

Chairperson: Abbott N J (King's College)

33) 10:40 - 11:10 Williamson R and Chrachri A (Univ Plymouth & MBA)

G protein modulation of Ca^{2+} channel activity in cephalopod cardiac and neural tissues

34) 11:10 - 11:35 Kameyama M, Kameyama A, Hao L-Y and Kuroki S (Physiol, Fac Med, Kagoshima Univ)

Run-down and stabilization of cardiac L-type Ca^{2+} channel

35) 11:35 - 12:00 Tsutsui I[1], Inoue I[2] and Brown E[3] ([1]NIPS, [2]Tokushima Univ, [3]MBA

Plymouth)

Do squid giant axons signal to Schwann cells ?

12:00 Narahashi T (Northwestern Univ)

Closing remarks

12:50 Excursion: (choice)

1) Daijuji（大樹寺）- Haccho-Miso Processing Museum（八丁みそ蔵）(Okazaki city)

2) Museum of Chinaware（陶磁資料館） (near Seto city)

POSTER SESSION (January 28)

P1 Matsuura H (Physiol, Shiga Univ Med Sci)

Two components of delayed retifier K^+ current in guinea-pig sino-atrial node cells

P2 Morishima S, Wang H-C and Okada Y (NIPS)

Effects of bepridil on the delayed rectifier potassium currents and the action potential duration in guinea pig ventricular myocytes

P3 Shindo M, Sohma Y and Imai Y (Osaka Medical College)

A novel type of ATP block on a bullfrog erythrocyte K^+ channel

P4 Nakahira K, Shibata R, Shibasaki K and Ikenaka K (NIPS)

Developmental expression of voltage-gated potassium channels in mouse cerebellum

P5 Saito Y and Isa T (NIPS)

Properties of voltage-gated transient outward currents in neurons with different firing properties in the intermediate layer of rat superior colliculus

P6 Zhou W and Yamashita M (Physiol, Osaka Univ Med Sch)

Lysophosphatidic acid increases intracellular calcium concentration in the early embryonic chick retina

P7 Lima P A[1,2], Messenger J B[2] and Brown E R B[1]

([1]MBA Lab Plymouth, [2]Univ of Sheffield)

Calcium dynamics in squid chromatophore muscle

P8 Yamaguchi N and Kasai M (Biophys Engineering, Osaka Univ)

In vitro study of depolarization-induced Ca^{2+} release from skeletal muscle triads

P9 Wakamori M, Okada T, Yamada H, Shimizu S, Imoto K and Mori Y (NIPS)
Regulation of TRP-5 channel by Ca^{2+}

P10 Narita K^1, Hung S-M^2, Hachisuka J^2, Akita T^2 Ochi K^1 and Kuba K^2
(^{1}Physiol, Kawasaki Med Sch, ^{2}Physiol, Nagoya Univ Sch Med)
Ca^{2+} induced Ca^{2+} release and short term plasticity in frog motor nerve terminals

P11 Nakano H^1, Furuya K^2, Furuya S^1 and Yamagishi S^1 (^{1}NIPS, ^{2}Kyoto Inst Tech)
Characterization of myoepithelial cells in mammary gland: intracellular Ca^{2+} signalling and ATP receptors

P12 Omatsu-Kanbe M (Physiol, Shiga Univ Med Sci)
Receptor-mediated regulation of intracellular calcium in rat brown adipose cell

P13 Nakai J (NIPS)
Molecular analysis of a critical determinant of L-type calcium channel conductance

P14 Sugita M^1, Hirono C^1, Tanaka S^1, Nakahari T^2 Nakamura A^2, Imai Y^2, Kanno Y^1 and Shiba Y^1(^{1}Physiol, Hiroshima Univ Sch Dentistry, ^{2}Physiol, Osaka Medical College)
Anion channel activity involved in two phases of Ca^{2+}-activated fluid secretion from rat submandibular glands, visualized by the fluorescent dye, calcein

P15 Tanaka S^1, Hirono C^1, Nakamoto T^2, Sugita M^1 and Shiba Y^1
(^{1}Oral Physiol, ^{2}Removal Prosthod, Hiroshima Univ Sch Dent)
Modulation of muscarinically induced ionic currents and fluid secretion by β-adrenergic action in salivary glands

P16 Maeno T^1, Enomoto K^1, Narita K^2, Ochi K^2 and Hirota A^1
(^{1}Shimane Med Univ, ^{2}Kawasaki Med Sch)
Botulinum toxins reveal novel actions of SNAP-25 and syntaxin on neuromuscular transmission

P17 Kato K and Kozlowski R Z (Pharmacol, Univ Oxford)
Niflumic acid and NPPB have a non-specific relaxation effect on agonist and A23187 -induced constriction, independent of Cl^- channel block in rat small pulmonary arteries

P18 Shimizu T^1, Oiki S^2, Morishima S^1 and Okada Y^1 (^{1}NIPS, ^{2}Physiol, Fukui Med Sch)
Effects of extracellular divalent cations on the volume-sensitive Cl^- currents in human epithelial cells

P19 Murata K^1, Hirai T^2, Walz T J^3, Heymann B^3, Engel A^3, Smith B L^4, Agre P^4, Mitsuoka K^5 and Fujiyoshi Y^5 (^{1}NIPS, ^{2}IIAR, Matsushita Elec Indust, ^{3}Univ Basel,

[4]Johons Hopkins Univ Sch of Med, [5]Biophys, Kyoto Univ)

Three-dimensional structure of water channel, Aquaporin 1

P20 Ohkawa T[1], Oshima N[1], Nosaka S[2] and Tsutsui I[3]

([1]Biol Sci, Shimane Univ, [2]Shiga Univ Med Sci, [3]NIPS)

Early ionic processes in the excitable algae *Chara corallina* after receptions of stimuli

P21 Oosawa Y and Imada C (Int'l Inst Advanced Res, Matsushita Elec Ind Co. Ltd)

Ca^{2+} channels in the thermoresponse of *Paramecium*

P22 Shirao T and Sekino Y (Neurobiol and Behav, Gunnma Univ Sch Med)

Activation of NMDA receptors changes the localization of drebrin in dendritic spine

【セミナー報告】

生理研セミナー

昼食セミナー

セ　ミ　ナ　ー　報　告

〈生理研セミナー〉

1．ニコチン性アセチルコリン受容体の構造と機能

宮澤淳夫（MRC,ケンブリッジ）

（1998.5.28）

ニコチン性アセチルコリン受容体はその１次構造が日本で最初に明らかにされた。また世界で最初に構造解析された受容体蛋白質である。本セミナーではRMC,ケンブリッジでUnwinと共同研究を行い，電子顕微鏡で構造解析した結果を報告した（A.Miyazawa,Y.Fujiyoshi,M.Stowell and N.Unwin(1999)Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. J.Mol.Biol., in press.)。構造生物学の新しい流れ-結晶へのリガンドスプレー法を用いてリガンド結合に伴う受容体の構造変化をミリ秒で追求し、構造と機能のギャップを埋めた。

（担当：永山國昭）

2．グルタミン酸受容体の機能制御メカニズム

岡部繁男（工業技術院　生命工学工業技術研究所）

（1998.6.24）

哺乳類中枢神経細胞の主要な興奮性伝達物質受容体であるグルタミン酸受容体は，神経細胞の分化，シナプス形成とその維持，および可塑性に重要な役割を果たしている。グルタミン酸受容体のうち，NMDA受容体は，NR1とNR2とよばれる二つのサブユニットから形成されるカルシウム透過性チャネルであり，８種のNR1 splice variantおよび４種のNR2遺伝子産物が存在することが知られている。

NR1遺伝子からは，C末端のsplicingにより４種類の異なったsplice variantが形成されるが，これらの分子を単独で線維芽細胞に発現された場合，細胞膜表面への蛋白質の発現量はsplice formごとに異なっていた。また，NR2分子を同時に発現させることで，細胞膜表面へのNMDA受容体の発現量は増強された。従って，各NR1 splice variantおよびMR2分子の存在する比率によって，神経細胞膜表面での受容体発現量は大きく変化すると考えられる。

一方NR2A-NR2D 各サブユニットは脳の発生過程で異なった発現パターンを示すことが知られている。これらNR2分子の内，特に胎児期に強く発現するNR2D分子を成熟脳の神経細胞に発現させたところ，海馬CA1領域での錐体細胞でのシナプスの可塑性に障害が見られた。この結果は，

時期特異的な各NR2分子の発現が，受容体機能の制御に重要であり，発現パターンを人為的に変化させることで，正常なシナプス機能が障害されることを示している。

以上の実験より，8種類のNR1 splice form と4種類のNR2 遺伝子産物によって種々の生理活性を持った分子複合体が形成されることが，NMDA受容体の機能の多様性の基盤となっていることが示唆される。

（担当：伊佐　正）

3．遺伝子欠損マウスの行動異常：Fyn欠失マウスの行動解析からわかったこと

宮川　剛（理化学研究所・脳科学総合センター・情動機構研究チーム）

（1998.8.7）

Fynは非レセプタータイプのチロシンキナーゼの一種であり、中枢神経系に強く発現している。Fynは神経細胞間の情報伝達に重要な役割を果たしていると考えられていたが，行動発現おける役割についてはよくわかっていなかった。このFynの機能を解明する目的で、Fyn欠失マウスの行動を詳細に検討した。この結果，Fyn欠失マウスには，学習・記憶行動の障害はほとんど認められず，恐怖反応や攻撃行動などの情動行動に選択的な異常を持っていることがわかった。また，Fyn欠失マウスは，情動行動に影響を与えるような各種薬物に対する感受性に異常を持つことも明らかになった。Fynは中枢神経系に比較的広範に発現していること，Fyn欠失マウスには中枢神経系で様々な組織学的・電気生理学的異常を示すことを考慮すると，行動レベルでかなり選択的な異常が見られたことは意外である。これらの結果をもとに，遺伝子欠損マウス行動解析について議論したい。

（担当：八木　健）

4．"Using eye movements to probe brain function and dysfunction"

Dr.Douglas P.Munoz（Associate Professor Physiology and Psychology MRC Group in Sensory Motor Meuroscience Queen's University, Canada）

（1998.8.22）

眼球運動（特にサッケード運動系）の研究分野において新進気鋭で著名なMounz博士が来日されるのを機にセミナーをお願いすることにしました。

（担当：伊佐　正）

5．非侵襲的脳機能画像による高次脳機能へのアプローチ
手指の運動感覚制御から可塑性へ

定藤規弘（福井医科大学高エネルギー医学研究センター）

（1998.9.3）

神経活動の空間的分布とその連関状態をヒト脳で非侵襲的に観測することは，脳を理解するうえで不可欠である。ポジトロン断層画像，機能的磁気共鳴画像による，脳血流を用いた脳賦活検査では，局所脳血流の増加と神経活動によるエネルギー消費の増大が連関している，という事実に基づき，課題遂行時に脳血流の増大している領域の分布を全脳にわたり描出するという方法を用いる。近年，計測器の感度は向上し，脳血流変化の統計的評法にも進歩がみられるが，脳賦活検査においては，適切な課題の作成が本質的に重要である。ある要素をとりあげ他の要素をコントロールした課題設計には，動物実験や人脳におけるlesion studyの知見を統合する必要がある。例えば，手指の感覚運動制御の課題では，運動の頻度，自発性，学習，習熟度などの要素への分解を要する。また，ある課題を遂行中に脳血流の上昇している領域が，その課題を遂行するのに本質的であるのか否かは，この検査のみからでは判断できない点も重要である。この点でも，他のアプローチとの総合が必須であり，そのような例が，視覚喪失による可塑性の研究で見られる。点字読に熟達した盲人を対象に，点字列の弁別課題を用いた脳賦活検査を行ったところ，一次視覚野を含む後頭葉が賦活された。また，一次運動感覚野から頭頂葉，後頭葉背側部にかけての賦活もみられた。盲人と晴眼者に対し，同一の非点字性触覚弁別課題を遂行させると，盲人では，一次視覚野を含む後頭葉腹側が賦活化される一方，二次体性感覚野は抑圧された。晴眼者では後頭葉腹側が抑制，二次体性感覚野が賦活化された。さらに，点字読を行っている盲人の後頭葉を，経頭蓋的磁気刺激装置を用いて連続的に電気刺激すると，他の領域を刺激した場合に比べ点字読の正確さが落ちた。これらのことから，長期の視覚入力遮断にもかかわらず，視覚野が機能性を保っており，触覚弁別処理が行われうることが示された。さらに，早期視覚喪失群と晩期群を比較したところ，この可塑的変化は，12歳までに視覚を喪失した場合にみられることが明らかになった。脳賦活検査は，実際のヒト脳の活動を直接に捉えるという利点を生かし，構造解析，損傷研究，シュミレーションといった，脳科学における他のアプローチによる知見を総合する“場”となることが期待される。

（担当：柿木隆介）

6．二次元結晶化による膜蛋白の構造解析

藤田至彦（松下電器産業株式会社　国際研究所）

（1998.9.4）

二次元結晶化による膜蛋白の構造解析について，基礎的な知識が乏しい人にもわかるように，一般的操作方法や今まで知られている具体的な例を紹介していただくとともに，現在進められて

いる大腸菌アスパラギン酸受容体の結晶化についても話していただきます。

（担当：井本敬二）

7．ヒト脳機能のマッピング

川島隆太（東北大学加齢医学研究所）

（1998.9.4）

脳によるヒトの行動の制御の研究は従来実験心理学的手法を中心に行われてきた。近年，脳機能イメージング法の発展により，行動や思考，認知，学習と言った高次脳機能の発現と関連する脳の領野の特定や，それらの領野によって作られるネットワークの特定が可能となってきている。これらの研究を遂行するためには，神経生理学的知識・心理学的知識に加えて，統計学的知識や画像処理の知識が必須であり，また各脳機能検査法の特徴を生かした検査パラダイムを設定する必要がある。我々は，これまで主にポジトロンCTを用いて，神経生理学的知見を検証するボトムアップ的な研究，心理学的知見を検証するトップダウン的な研究の双方向から，ヒトの脳機能のマッピングを行ってきたので，その成果の一部を供覧する。運動制御機構の研究として，片側の手指運動施行時には，運動が利き手で行われるか非利き手か，運動の要素が単純か複雑か，の違いにより大脳運動領野の活動に差が認められること、自発的な運動には前補足運動野の活動を伴うことを発見した。また，視覚運動協応においては，頭頂葉の活動が重要であること，変換視野条件下で視覚運動協応の学習を行わせると前頭前野・補足運動野・頭頂間溝領域でダイナミックな活動の変化が起こることを発見した。ワーキングメモリーに関わる研究としては，様々な視覚性のサブモダリティーを用いた遅延見本合わせ課題遂行中の脳活動を比較した結果右半球外側前頭前野にサブモダリティー非特異的活動を観察し，この領域がワーキングメモリーのcentral executive機能又はcontrol機能を持つ領野である可能性を示唆した。また，頭頂葉には角度情報や立体構築の形の情報，側頭葉には二次元パターン情報，側頭－後頭葉移行部に動きの情報に関連した活動を認め，視覚性サブモダリティーに特異的な活動を示す領野が存在することを発見した。心理学的研究として，記憶・感情・意志などの「心」と脳の関連を科学的に解明すること目標として研究を開始しており，これまでに顔の表情の認知には右半球のブローカ領域の，視線の向きの同定には扁桃核の活動が重要であること，自己に意識をむけると島皮質を中心とした辺縁系の神経活動が高まることなどを発見した。これらの研究成果を統合してデータベース化しヒト脳の動作原理を解明することが脳機能マッピング研究の目標である。

（担当：柿木隆介）

8. Abolishment of G-protein-induced calcium current facilitation in dorsal root ganglions and altered pain perception in mice lacking the beta3 subunit beta3 of the voltage-dependent calcium channnel

村上学（東北大学医学部）

（1998.9.11）

Voltage-dependent calcium channels play pivotal roles in the control of calcium-linked cellular functions,like neurotransmitter release. Beta subunits(beta1,2,3,and 4 are known)accelerate activation and inactivation of calcium current,increase channel population and are involved in the G-protein-mediated inhibition. The beta3 subunit,abundanty expressed in brain,is copurified with the N-type calcium channel(alpha 1B),which participates in neurotransmitter release at the presynapse. Here we report gene targenting of beta3 subunit of voltage dependent calcium channel. The beta3 deficient mice are viable and not sterile. Ther are no compensatory increases of other beta subunits. They show impaired locomotor activity(Open field study)and spatial working memory(Radial-Maze study),increased threshold to pain(Tail-flick test)and no response to a potent analgesic substance,Baclofen,which acts through G-protein. Cells isolated from dorsal-root ganglion (DRG)of the beta3-deficient mice show reduced high voltage-gated Ca^{2+} currents(probably N type currents),positive shift of the I-V relationships(+20 mV)and no prepulse-induced facilitation in response to GTPgS. Omega-conotoxinGVIA binding study also showed some reduction(ca.35%). Together,we conclude that beta3 gene targeting considerably changed the function of N type channels and reduced channel population at some degree. The changed function reduces neurotensmitter release at the presynapse resulting in increased pain thresshold,unresponsiveness to Baclofen and other behavioral phenotypes.

The beta3 knockout mouse will be an interesting model to study the role of beta3 subunit in neurotransmitter regulation and pain recognition.

（担当：井本敬二）

9. Apical and Basolateral Na:H Exchangers in Macula Densa Cells: Identification,Characterization and Regulation by Angiotensin Ⅱ

Dr.P.Darwin BELL（米国・アラバマ大・バーミングハム校・医学部・教授）

（1998.9.21）

Kidney macula densa cells are involved in the transmission of tubuloglomerular feedback signals which help renal autoregulation and homeostasis of body fluid and electrolytes.

Pharmacological and immunofluorescence studies indicate that the apical and basolateral exchangers are the NHE2 and NHE4 isoforms,respectively. The isoform NHE4 is exquisitely sensirive to changes in basolateral osmolality. The isoform NHE2, which is involved in the response to changes in luminal Na concentration,can be upregulated by angiotensin Ⅱ,a specific modulator of tubuloglomerular feedback responses, suggesting that this hormone might affect feedback signal transmission by stimulating Na:H exchange which would increase Na transport and alter the pH of macula densa cells.

（担当：岡田泰伸）

10. The Structure-Function Analysis of Human Na-Glucose Cotransporter(hSGLT1)

Dr.Jean-Yves LAPOINTE（カナダ・モントリオール大・生理学教室・準教授）

（1998.9.21）

The intestinal Na-glucose cotransporter,which play an essential role in active sugar absorption,was among the first transporters to be cloned and since then(1987), it has been extensively studied after expression in oocytes. The present seminar focuses on the determination of the principal biophysical characteristics of the cotransporter(stoichiometry,binding order and multimeric state of the functional unit) using a series of electrophysiological experiments involving two microelectrode voltage clamp and internally perfused oocytes. Initial attempt to identify functional domains within the protein is briefly described.

（担当：岡田泰伸）

11. 神経伝達物質受容体の微小形態と機能

重本隆一（京都大学大学院・医学研究科）

（1998.9.24）

神経伝達物質受容体は，その機能に応じて，神経細胞膜上でそれぞれ異なった局在を示す。例えば，中枢神経系における速い伝達を主に担うイオノトロピック型のグルタミン酸受容体，およびGABA$_A$受容体は，伝達物質放出部位直下の後シナプス部に多くが集積している。一方，これらの伝達物質にはメタボトロピック型の受容体も数多く存在し，神経細胞の興奮性の調節，シナプス可塑性の誘導，伝達物質の放出の調節など，多様な機能を持っている。本日は，これらのメタボトロピック型受容体について，小脳，海馬皮質，および梨状葉皮質における特徴的な微小局在と，それらの持つ機能的な意味について考えてみたい。

メタボトロピック型グルタミン酸受容体，mGluR1は，小脳プルキンエ細胞に強く発現し，平行線維終末が作るシナプスの周辺部に集積している。このmGluR1の活性化が，後シナプス部に存在するAMPA受容体の反応性を長期にわたって低下させるシナプス長期抑圧現象の誘導に必須であることが，活性化阻害抗体により証明された。また，mGluR1の活性化が，シナプス可塑性のみならず，おそらくプルキンエ細胞の興奮性の調節を通じた小脳の協調運動の発現に必要であることが，mGluR1に対する自己抗体を持つ患者2症例の解析により明らかになった。

次に，海馬皮質の神経線維においては，mGluRのサブグループによって，シナプスすなわちグルタミン酸放出部位に対する位置関係が異なる。すなわち，グループⅡのmGluRが，グルタミン酸放出部位から離れた神経線維軸索部に主に存在するのに対し，グループⅢに属するmGluRは，主に神経線維終末部のグルタミン酸放出部位（active zone）に局在する。このことは，前シナプス神経要素の中でも，グループⅡとグループⅢに属するmGluRでは，効果器となるチャンネル分子などが異なっていること，および受容体を活性化するグルタミン酸の由来が異なる可能性を示唆する。また、グループⅢ mGluRの局在には，標的細胞依存性がある。つまり，錐体細胞の一本の軸索によって作られるシナプスが特定の介在細胞を相手とする場合のみ，mGluR7を高度にactive zoneに集積させているのに対し，それ以外の神経細胞を相手とする場合には，mGluR7が少ないということが明らかとなった。これは，同じ前シナプス神経要素が形成するシナプスでも，シナプス後部の神経細胞（つまり標的細胞）のタイプによって異なる放出の調節を受けていることを示唆している。

最後に，メタボトロピック型グルタミン酸受容体や$GABA_B$受容体が，異なるシナプス間における相互作用を担っている，と考えられる局在を示す例を示し，梨状葉皮質におけるheterosynaptic interaction に関する実験を紹介する。また，これらの受容体の微小形態を出発点とし，神経細胞，神経回路，システム，さらには個体に至る情報伝達のあり方を探る今後の戦略を提示したい。

（担当：佐々木和夫）

12. 細菌のイオン輸送系（動・植物と微生物の接点）

中村辰之介（千葉大学・薬学部）

（1998.10.2）

細菌は独立して生育する生物の中でも最も小さく単純である。細菌は細胞が個体なので，動物の個体と外界の関わり及び，動植物細胞の外に対する細胞内の関係を，細菌の培地と細菌細胞内との関係に置き換えて，単純化できるかもしれない。そのような見方が可能ならば，細菌の研究からも，複雑な動植物のイオン濃度調節を総合して理解するのにはなんらかの寄与ができるであろう。さらに，カチオン輸送系の中には，動植物と細菌の種を越えた，共通する構造と機構があ

る。

我々は，海洋細菌のカチオン輸送系に焦点を絞って研究してきた。これまでに，耐塩性に関与する２種類のNa^+排出系と，３種類のK^+取り込み系の遺伝子を選択し，浸透圧調節や，細胞内pH調節に関与するイオン輸送系に関する実験を行ってきた。今回は，細菌のイオン輸送系の成果を動植物のイオン輸送系を理解するための手段にできるか？という視点を持って，報告したい。

（担当：井本敬二，森　泰生）

13. 高等植物K^+輸送体の実体

魚住信之（名古屋大学　生物分子応答研究センター）

（1998.10.2）

高等植物にはK^+取り込み系として，Low affinity transporterとHigh affinity K^+ transpoterが存在する。特に動物細胞にみられるNa^+/K^+-ATPaseが存在しない植物にとって，これらの輸送体は重要なK^+吸収装置としても機能している。

Low affinity の内向き整流性Shaker-type K^+ channel(KAT1,KAT2,AKT1,AKT2)と，High affinity のHKT1とAtKUP1の輸送体遺伝子がクローン化され解析が進められている。

本セミナーでは，これらのK輸送体を概説するとともに，K^+ channelのイオン選択性，トポロジーについて考察する。

（担当：井本敬二，森　泰生）

14. 大脳皮質・線条体のGABA作動性介在ニューロンの機能的構成

川口泰雄（理科学研究所・バイオミメティックコントロール研究センター）

（1998.10.8）

大脳皮質や線条体のニューロンには，樹状突起上のスパインが多数ある投射ニューロンとスパインがあまり見られない介在ニューロンがある。投射ニューロンの一様な形態に比べて，介在ニューロンの方は非常に多様な形をしている。従って，投射ニューロン以上に，機能分化していると思われるが，その多様性の意味は殆どわかっていない。私たちは大脳におけるGABA作動性介在ニューロンの機能分化を明らかよしようと思い，ラットの前頭皮質や線条体で，それらの形態的・生理的・化学的特徴や神経結合の規則性などを調べ，それらをもとに，いくつかのグループに分けてみた。グループごとの回路網での役割分担を明らかにするために，それぞれのシナプス結合の特徴を定量的に検討している。また，局所回路の活動性に影響を与える脳幹からの入力（モノアミンやアセチルコリン）がグループごとにどのように作用するかなどを調べている。こ

れらの形態的・生理的な観察から，皮質局所回路の機能的構成を理解したいと思っている。

（担当：森　茂美）

15. NONSELECTIVE CATION CHANNELS IN SMOOTH MUSCLE

井上隆司（九州大学・医学部）

(1998.10.13)

Nonselective cation channels (NSCCs) are the channel conducting cations in preference to anions. This definition is however cpnfounding because the channels pertaining to this class show a high degree of diversity in their biophysics, physiology and pharmacology. In most types of NSCC,little infotmation has yet been provided about their molecular structure,except for the fast extracellular ligand-gated and cyclic uncleotide-gated NSCCs. Thus, one tentative criterion to sub-classify NSCCs is the mode of activation. Based on this, more than 10 subclasses of NSCC can be distinguished, including ligand-gated, Ca^{2+}-activatde, cyclic nucleotide-gated, mechanosensitive, hyperpolarization-activated, store-related, intracellular, intercellular, background leak and other as-yet-to-be-classifiable NSCCs. Biophysical and pharmacological investigations of these NSCCs suggest that varying extents of structural similarity may exist. Such a duality, i.e. diversity vs. similarity, is on one hand, an obstacle to exploiting selective blockers of activators,but on the other hand, may be a main basis for a broad repertoire of functions that NSCCs subserve under various patho-physiological conditions.

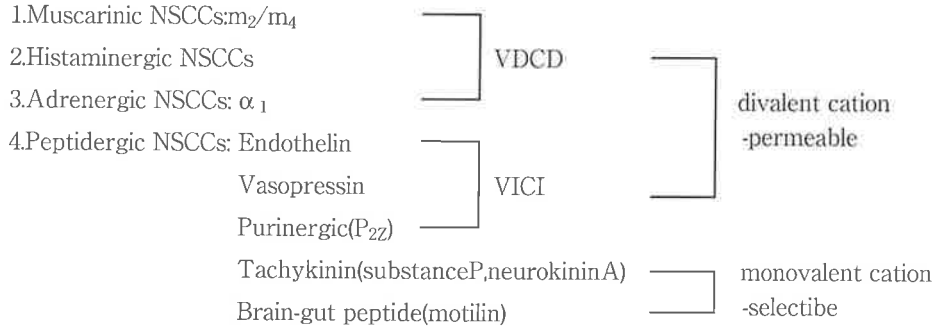
In smooth muscle(SM),in addition to the P_{2X} purinoceptor NSCC (a member of fast ligand-gated NSCCs), the most frequently observed class of NSCC is the receptor-operated, G-protein coupled NSCCs※※※, the importance of which has only recently been recognized. The G-protein coupled NSCCs can further be divided into two subclasses; voltage-dependent, $[Ca^{2+}]_i$-dependent (VDCD)- and voltageindependent, $[Ca^{2+}]_i$-independent (VICI)-NSCCs. VDCD-NSCCs distribute preferentially on highly excitable SM membranes which gemerate action potentials (APs) spontaneously(e.g.gut SM),and their main role seems to finely control the rate of Ca^{2+} entry across the plasma membrane during AP cycles. In contrast, VICI-NSCCs would serve as a non-inactivating,highly Ca^{2+}-conductive route during the receptor stimulation, particularly in electrical quiescent SMCs such as vascular SM. It is likey that these differences contribute in part to the genesis of two characteristic patterns of contraction in smooth muscle, i.e. the phasic and tonic contractions.

VDCD-NSCCs show conciderable similarity in biophysice and pharmacology, to Ca^{2+}-activated NSCCs(CANs)which have been found in a broad range of tissues. For instance, in both types of

NSCCs, the unitary conductance is about 30pS under the normal ionic conditions, and some of CANs, like VDCD-NDCCs, exhibit clear dependence on membrane potential and inhibited by a free form of ATP but requires the MgATP complex to prevent their activities from rundown. The latter two properties are reminiscent of those of ATP-sensitibe K^+ channels and partly of L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels. In addition, fenamates (flufenamate and mefenamate),quinine (or quinidine) and 4-Aminopyridine (and other K^+ channel blockers in some cases) have been reported to inhibit both types of NSCCs effectively. These results,together with their similar postulated roles in physiological circumstances,may suggest a high degree of structural similarity present in these two distinct classes of NSCCs.

The activity of DVCD-NSCCs (in guinea-pigileum SM)appears to be maintained preferentially by the glycolytically produced ATP. Thus,removal of extemal glucose or selective inhibition fo glycolytic enzymes such as glyceraldehyde-3-phosphate dehy drogenase result in a matked suppression of the current reflecting these channel activities. Moreover,tyrosine kinase inhibitors,but not those for A,G,C-kinases and calmodulin-dep endent kinases, potently inhibit the activation of these channels, which are potentiated by mechanical forces such as hypotonic cell swelling and shear stress.

1) G-protein coupled NSCCs(membranc-delimited?)



2) In some SMs,mechanosensitive and hyperpolarization-activated cation channels have also been reported.

(担当：森　泰生，若森　実)

16. 哺乳動物におけるクローン技術

今井　裕（京都大学大学院　農学研究科）

（1998.10.13）

脊椎動物においては，個体を構築する能力（全能性：totipotency）は細胞の分化にともなって順次消失することが核移植技術を使って証明されてきた。特に哺乳動物では，全能性を再獲得できる細胞は受精後間もない未分化細胞に限られる，という概念は多くの実験データによって支持された事実であると考えられていた。しかし，1997年の成体の乳腺細胞から作出されたクローンヒツジ“ドリー”，今夏卵管上皮細胞や耳の繊維芽細胞から作出されたクローン牛の誕生は，従来の常識をうち破り，分化細胞は未受精卵内で可逆的に脱分化・リプログラムされ，全能性を再獲得することを示しているように思われる。体細胞クローン技術は，産業的にも家畜の改良や遺伝子組換え家畜の効率的生産などへの応用に期待がかけられているが，なぜ体細胞からのクローン動物の作出が可能になったのか，リプログラミングとは具体的にどのような現象を指しているのか，これまでに謎であったものが解かれたわけではなく，いっそう謎は深まって来たと考えた方がよい。

今回，核移植の技術的内容を紹介するとともに，なぜ体細胞クローン技術が可能となり，現在どのような問題点があるのかを整理して紹介したい。

（担当：山崎由起子）

17. Molecular Characterization of Capsaicin Receptors

Dr.David JULIUS（米国・カリフォルニア大・サンフランシスコ校）

（1998.10.14）

Capsaicin is the main pungent ingredient in 'hot'chili peppers. Capsaicin and other vanilloid compounds elicit a sensation of burning pain by selectively activating a subset of sensory neurons(nociceptors)that detect noxious chemical, mechanical, and thermal stimuli in our environment and transmit this information to the spinal cord. Thus, sensitivity to capsaicin is an important functional 'signature' of nociceptors and understanding the molecular basis of this phenomenon has been a central goal in the pain field. We have used an expression cloning strategy to isolate a functional cDNA encoding the capsaicin,or vanilloid, receptor from rodent dorsal root ganglia. The recepttor(VR1)is an ion channel that bears structural similarity with members of the TRP ion channel family, first identified in the Drosophia photo-transduction pathway. We have determined that VR1 is also activated by heat at temperatures that fall within the noxious range. We have also explored the relationship of protons to VR1 activation by

vanilloid compound or heat because acidification of injured tissue is believed to be an important factor contributing to pain.

Ref.1)Caterina,Schumacher,Tominaga,Rosen,Levin & Julius(1997)Nature 389,816
2)Tominaga,Rosen,Caterina & Julius(1998)Neuron 21,531

（担当：岡田泰伸・森島　繁）

18. Regulation of the Ryanodine Receptor/Ca^{2+} Release Channel by Calsequestrin and Other Associated Proteins in Sarcoplasmic Reticulum Lumen

大倉正道（North Carolina大学）

（1998.10.14）

Calsequestrin(CS),the Ca^{2+} buffering protein in the lumen fo skeletal muscle sarcoplasmic reticulum(SR),coordinately binds and releases Ca^{2+} to cause muscle contraction. it is found in the terminal cisternae and believed to interact with the ryanodine receptor(RyR)/Ca^{2+} release channel. CS binds Ca^{2+} with moderate affinity(Kd=1 mM)and high capacity(40-60 mol Ca^{2+}/mol).CS stimulates Ca^{2+} release from SR via a direct or indirect interaction with RyR. The latter may involve other SR junctional proteins (triadin(TRN)and junctin(JTN).CS is a highly acidic protein two-thirds of the negatively charged amino acids localized in the C-terminus, which may form pocket for high capacity Ca^{2+} binding. During Ca^{2+} release,CS dissociates Ca^{2+} from the high capacity binding state, becoming Ca^{2+}-unloaded. In this seminar,we would like to discuss about how CS regulates RyR together with other SR junctional proteins, sensing the SR lumenal Ca^{2+} concentration.

（担当：井本敬二）

19. Plural origin of oligodendrocytes

Bernard Zalc博士（INSERM U-495(France)）

（1998.10.20）

オリゴデンドロサイト（ODC）は中枢神経系ミエリン形成細胞であり，神経細胞やアストロサイトと同じ脳室壁近傍にある神経上皮細胞から発生する。しかし，ODCは神経細胞やアストロサイトと異なり，ある限定された脳室壁領域で生産され，移動を伴い脳全体に分布することが明らかになってきたが，まだまだその発生様式には不明な点が多い。Zalc博士はODCには２種類以上の異なった細胞系譜が存在することを提唱している。本セミナーではODCの細胞系譜研究の現状

につき最新の知見を交えて講演していただく。

（担当：池中一裕）

20. マウスGli遺伝子群の神経管，消化管発生における機能

元山　純（Programsin Developmental Biology Research instirute The Hospital for Sick Children, Canada）

（1998.11.5）

分泌蛋白質であるsonic hedgehogは脊椎動物の中枢神経系，四肢，消化管，皮膚，肺の正常な発生に必須であることが知られている。マウスGli遺伝子は転写調節因子をコードしており，scnic hegdehogのシングルの細胞内伝達に関わっていることが解ってきた。人でのGli遺伝子での突然変異は先天性の発生異常を起こすことが報告されており正常発生過程での機能解明が待たれてきた。私たちはこのGli遺伝子の変異体マウスを使って，神経管，消化管発生における機能を調べたので報告する。

（担当：八木　健）

21. クローンマウス誕生まで

若山照彦（ハワイ大学医学部研究員）

（1998.11.17）

これまで，いったん分化してしまった体細胞からクローン個体を作ることは不可能であると考えられていた。ところが1997年，ついに成体体細胞由来のクローン羊ドリーの誕生に至った。ドナー細胞の細胞周期をG0期にしたことが決め手だった。

今回，我々は体内でG0あるいはG1期として存在している３種類の細胞（卵丘細胞，セルトリ細胞，神経細胞）を選び，核移植を行った結果，卵丘細胞由来のクローンマウス作出に成功した。

未受精卵の細胞質には初期化因子があると考えられている。しかし未受精卵は第二減数分裂中期（MⅡ）で止まっており，この中へドナーとなる核を移植すると，MⅡ期細胞質内に存在する分裂期促進因子（MPF）により，ドナー核の細胞周期に関わらず，凝縮した染色体を形成してしまう（Premature Chromosome Condensation; PCC）。PCCは核に不可逆的なダメージを与えると考えられており，従来は，核移植のあとすぐに卵子を活性化させ，PCCを避けていた。いかしこの方法では，移植した核が初期化因子に触れる時間が短く，初期化が十分なされていない可能性がある。特にマウスでは，受精卵由来の遺伝子発現が他の動物種に比べてごく早い時期に起こってしまうため，不十分な初期化状態に陥りやすいと考えられる。そこで我々は，移植した核を未受精卵の中の初期化因子に十分長くさらして，完全に初期化することを試みた。未受精卵にさ

らす時間を長くするとPCCによるダメージで発生できなくなる，というジレンマが生じるが，あえてそれを無視することにした。その結果，卵丘細胞をドナーとしたクローンマウスが誕生した。成功率２％と低いものの，現在までに80匹以上が産まれていて，さらに産まれたクローンマウスから細胞を取って再びクローンを作ることに４世代にわたって成功している。

マウスは遺伝的バックグラウンドが明らかで，妊娠，性成熟期間も短く，発生生物学の研究には最適の動物である。今後体細胞の初期化，核のインプリンティングや初期胚遺伝子の活性化など，細胞の基礎的研究が急速に進展することが期待される。

（担当：山崎由起子）

22. 海馬錐体細胞の樹状突起における興奮性調節機構

坪川　宏（自治医科大学生理学第一講座）

(1998.11.24)

大脳皮質や海馬の錐体細胞，小脳プルキンエ細胞，黒質緻密部のドーパミンニューロンなどでは，興奮性が細胞体と樹状突起とで独立に調節されているらしいことが近年わかってきた。特に錐体細胞では，活動電位が軸索を下行するのみならず樹状突起へと逆伝播し，樹状突起内にCa^{2+}濃度上昇をもたらす現象が見つかった。旧来受動的であると考えられてきた樹状突起は，実は能動的に活動しており，多彩なシナプス入力の統合の場を形成していると考えられる。

この樹状突起の興奮性がどのように調節されているかを調べるため，演者はマウスの海馬スライス標本を用いて，単一錐体細胞の樹状突起から直接パッチクランプ記録を行なった。逆行性に伝播されてきた活動電位を興奮性の指標とし，電気生理学的性質を調べるとともに，細胞内にCa^{2+}，Na^{+}等のイオンに感受性のある蛍光色素を導入して，その動態を解析した。

樹状突起への逆伝播は，アセチルコリン受容体のうちのムスカリン性受容体の活性化によって促進され，逆伝播によって惹起される樹状突起での細胞内Ca^{2+}濃度増加も大きくなる。このことは，Gタンパクを介する細胞内情報伝達系が逆伝播の調節を行っていることを示唆する。今回，三量体GタンパクGθのαサブユニット欠損マウス等を用いた実験の結果から，ムスカリン性受容体への刺激は，主にPKCの活性化を介して樹状突起に分布するK^{+}チャネル活性を抑え，伝播を促進すると考えられた。Na^{+}イメージングの実験からは，non-selective cationチャネルの一つであるIhチャネルが，細胞体より樹状突起に密に分布しているという結果を得た。PKAは，Ihチャネルの活性を制御することにより，樹状突起の局所的Na^{+}濃度や膜抵抗を変化させて伝播を調節していると思われる。

一方，樹状突起への逆伝播は，樹状突起への大きなCa^{2+}流入が引き金となってCaMKⅡが活性化すると，比較的長期にわたり促進することがわかった。上記の結果と考え合わせると，ムスカリン性受容体の活性化はPKCを介して一過性に逆伝播を促進させ，樹状突起へのCa^{2+}流入を

増やすが，それがある程度以上大きいとCaMKⅡが活性化し，増強された逆伝播が長く続く，という図式が予想される。

活動電位の樹状突起への伝播にどのような生理的意義があるのかは，未だ不明である。しかしながら，シータ・バーストによる海馬CA1野の長期増強の発現に必須であるという報告を始め，記憶・学習のメカニズムに関係ありとする伝説が２－３発表されている。また細胞内Ca^{2+}の制御に関しては，上記の結果から今のところpositive feedback の系しかわかっておらず，これが正しいとすると，てんかんや虚血侵襲時の過興奮が引き金となって起こる細胞死にかかわる現象かも知れない。今後，電気生理学的な性質とともに，各種のイオンや細胞内機能分子の動態に注目して解析を進めることにより，樹状突起の興奮性制御メカニズムを調べ，生理的機能や病態との関連を明確にして行きたいと考えている。

（担当：伊佐　正）

23. グルタミン酸神経毒性：虚血性ニューロン死におけるグルタミン酸トランスポーターとグルタミン酸レセプターの役割

三谷　章（愛媛大学医学部生理学第二）

（1998.11.30）

各種の神経変性疾患に伴うニューロン死の発生原因としてグルタミン酸の興奮神経毒作用が示唆され，このグルタミン酸神経毒性の発生過程においてはグルタミン酸トランスポーターとグルタミン酸レセプターが重要な役割を担っていると考えられている。本セミナーでは虚血性ニューロン死の発生過程におけるグルタミン酸トランスポーターとグルタミン酸レセプターの役割について（１）虚血性細胞外グルタミン酸濃度上昇は虚血中にシナプス前神経終末から大量放出されるグルタミン酸によるという従来の説は不適切であること，（２）虚血性細胞外グルタミン酸濃度上昇にはグルタミン酸トランスポーターが関与していること，（３）脳虚血に対して脆弱なニューロンでは虚血中にグルタミン酸レセプター等を介した細胞内カルシウムイオンの大量流入が発生していること，（４）脳虚血に対して脆弱なニューロンでは一過性脳虚血後にグルタミン酸受容体の機能変化が起こっていること，（５）発達期にみられるグルタミン酸受容体サブユニットの組み合わせの変化により脆弱性が変化すること，を話題として取りあげ考察した。

（担当：小幡邦彦）

24. サル側頭連合野下部（TE）における内因性光学的信号　性質と細胞機能構築研究への応用

王　　鋼（鹿児島大学医学部生理学第二講座）

（1998.12.7）

in vivo 光計測法による研究は，脳，特に視覚系領野の細胞機能構築に関して多くの知見をもたらした。計測する光信号は電位感受性色素による外因性（extrinsic signal）と内因性信号（intrinsic signal）に分けられる。内因性光計測は色素を使わず細胞活動に伴う脳組織の代謝の変化を反映した組織そのものの反射光信号を計る方法である。内因性信号は，脳の部位によって異なる性質を示している。サル側頭連合野における内因性光信号の性質と，細胞機能構築との関連を中心に筆者らが行った研究を紹介したい。

（担当：小松英彦）

25. プログラム細胞死の生理機能

石崎泰樹（神戸大医学部）

（1998.12.9）

細胞死は動物の個体発生においてしばしば認められる基本的な現象であり，多くの成体組織においても認められることは長い間知られていたが，これまでは，細胞死が細胞の普遍的な性質の一つであるとは考えられていなかった。しかしながら近年殆ど全ての高等動物細胞が細胞死を実行するプログラムを持ち，細胞死が個体発生時のみならず成体にみいても生理的に重要な役割を果たしてしることが明らかになってきている。プログラム細胞死の生理機能を概説すると共にこのプログラムを担う分子機構に関する最新の知見を紹介する。また小脳顆粒細胞・細胞系譜の発生におけるプログラム細胞死について演者が最近得た知見を紹介する。

（担当：岡田泰伸）

26. 脳の高次機能の研究

達本　徹（京都大学大学院医学研究科高次脳科学）

（1998.12.11）

脳の高次機能を司る神経機構の解明を目的としして，サルとヒトを対象とした実験研究を相互に関連させながら行ってきた。結果の一部を紹介する。

（1）サルの大脳皮質のフィールド電位記録電極を長期間設置して行う，随意運動制御の神経機

構の解明を目的とした研究。

(a)色弁別Go/No-go運動課題において，前頭前野の主溝背側部が報酬を伴わない刺激に対する運動を制御する"No-go"活動の中枢として重要な働きをすることを示した。

(b)小脳核の一時的冷却による可逆的障害の際の大脳皮質活動と運動の変化を解析し，反応時間運動の開始時に運動命令が小脳核経由で大脳皮質運動野へ到達することを示唆する結果を得た。

（2）サルの脳活動をポジトロンCT法で計測する，（1）と同じ目的の研究。

(a)色弁別Go/No-go運動課題遂行時に，弁別を要しない課題に比べ，前頭前野主溝部や色覚中枢（V4）が活性化することを示した。

(b)自発性運動の際に，光刺激始動性運動に比べ，前頭葉の腹側・内側の領野が強く活性化し，辺縁系と前頭葉内側の運動関連領野の協調活動が運動の自発的開始機構に重要であることを示唆する結果を得た。

(c)前頭葉内側と側頭葉内側領域の活性が，課題遂行への「意欲」の程度を反映することを示唆する結果を得た。

（3）脳磁図を用いてヒトの大脳皮質活動を計測する研究。

(a)No-go活動がヒトの前頭葉にも存在することを示した。

(b)暗算や他の「抽象的」思考に集中する際に，前頭前野を中心とする領域に特徴的な神経活動が出現することを見い出した。

電気生理学的手法およびポジトロンCT法によるサルの脳機能研究とヒトを対象とした脳磁図による研究の結果の関連性や整合性について考察する。

（担当：柿木隆介）

27. 神経変性疾患の機能画像

谷脇考恭（九州大学医学部脳神経病研究施設）

（1998.12.11）

【目的】神経変性疾患，特に純粋アキネジア（Pure Akinesia:PA），皮質基底核変性症（Cortico-Basal Degeneration:CBD），Machado-Joseph病（MJD）の患者にPositron Emission Tomography（PET）を行い，その病態生理を明らかにする。

【方法】上記疾患の患者に 1）18F-FDGを用いて脳糖代謝を，2）18F-Fluoro-DOPAを用いて黒質一線状体系のドーパミン代謝を測定した。

【結果】1）PAはパーキンソニズム（振戦，筋固縮，無動）のうち無動のみ認める特殊型である。一方PAの剖検例で進行性核上性麻痺(PSP)と同様の所見があるとの報告もある。そこで我々はPA3例にPETを行い，PSPとパーキンソン病(PD)と比較した。ドーパミン代謝はPA，PSP，PDとも低下を認めた。脳糖代謝はPDでは変化ないが，PA，PSPでは前頭葉，および線状体で低下

を認めた。以上より，PAとPSPは同様の病態であることが示唆された。

2）CBDもパーキンソニズムに大脳皮質症状を伴う特殊型であり，臨床的にはPSPとの区別が難しい。以前の報告では前頭葉，視床にて脳糖代謝の左右差が報告されていた。我々がCBD6例において脳糖代謝を検討したところ，3例では頭頂葉，視床にて脳糖代謝の左右差を認めたが，2例では両側の前頭葉，および線状体で低下を認め，1例では大脳全般に脳糖代謝の低下を認めた。以上よりCBDのPET所見はheterogenousであることが示唆された。

3）MJDは遺伝性の脊髄小脳変性症であるが，小脳失調症以外にパーキンソニズム，筋萎縮症，錐体路症状も伴う特殊型である。我々は遺伝子診断されたMJD3例にPETを行った。脳糖代謝は小脳，脳幹のみならず，基底核，大脳皮質全体で低下を認めた。これは以前に報告された小脳皮質萎縮症や遺伝性オリーブ橋小脳萎縮症(Olivo-Ponto-Cerebellar Atrophy:OPCA)とは異なるが，弧発性OPCAと類似していた。一方，ドーパミン代謝はMJDは被殻にて低下するが尾状核で保たれる点が弧発性OPCAと異っていた。

【まとめ】以上のPET studyより1）PAはPSPと似る，2）CBDはheterogenousである，3）MJDは広範に病変があり，他の脊髄小脳変性症とは異なることが解明され，疾患の機序解明や診断に有用である。

（担当：柿木隆介）

28. Recent Studies on Tottering Locus Mutants,Natural Calcium Channel Mutans

Dr.Im Joo Rhyu (Department of Anatomy, Korea University College of Medicine,)

(1999.1.26)

The rolling mouse of Nagoya(tg-rol)is neurologic mutant mouse exhibiting ataxia and paroxysmal movement disorder. The rolling mouse carries an autosomal recessive single gene mutation on chromosome 8. The tottering(tg)and leaner(tg-la)are other two alleles of the rolling mouse of Nagoya. The genetic etilogy of the tottering and leaner mutant mice was identified to be a mutation in voltage-dependent calcium channel(VDCC) α1A subunit. Recent studies revealed that mutations of VDCC α1A subunit were responsible for human autosomal dominant cerebellar ataxia(SCA6),familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2. Nagoya rolling is also expected to have VDCC α1A subunit mutation.

Considering its ataxic phenotype and known calcium channel muation,it is interesting that previous investigators failed to find specific pathology of these mutant mice cerebellum. To elucidate the cerebellar morphology of these mutant mice, we have analyzed the cerebellum with various morphologic methods; including thin sections, immunohistochemistry, Golgi staining,

NADPH-d histochemistry and in situ hybridization with IP3 kinase,IP3 receptor and n-NOS probes.

In all mutants, we found abnormal synaptic pattern between parallel fiber varicosity and dendritic spines of Purkinje cell in the cerebellum. Immunohistochemistry and Golgi studies revealed altered Purkinje cell morphology. The IP3 Kinase,IP3 receptor, and NOS mRNA was expressed differentially observed according to the phenotype.

The three tottering locus mutant with varying degree of atxaia showed a common ultrastructural abnormality as well as differential second messenger genes expression according to phenotype. This mutant mouse group provide us not only with interesting parameters to analyze the pathophysiology of the disease but also a possible animal model of some human diseases.

（担当：森　泰生）

29. Macula Densa Cell Signaling: Intracellular[Ca^{2+}]and[Na^{+}]dynamics.

Dr.Janos PETI-PETERDI（米国・アラバマ大学医学部・バーミングハム校）

（1999.2.15）

The macula densa(MD)plaque is a unique group of 10-15 renal tubular epithelial cells located in the cortical thick ascending limb(cTAL)in close contact with the glomerulus. These cells can sense changes in luminal NaCl concentration($[NaCl]_L$)through specific transport processes and send signals to preglomerular vascular elements(tubuloglomerular feedback,TGF),thus control intraglomerular blood flow and filtration rate. The exact mechanism of the TGF signal transmission process is unknown. It is generally accepted that the initial signaling step involves the apical Na:2Cl:K cotransporter. Secondary changes in the cytosolic[Cl^-],via increased cotransporter activity and basolateral Cl^- conductance,result in depolarization of the basolateral membrane.

Recently, using fura-2 fluorescence microscopy in the isolated perfused cTAL-MD preparation,we found evidence that increases in$[NaCl]_L$ cause elevations in MD cytosolic[Ca^{2+}].This Ca^{2+} response was blocked by luminal addition of furosemide,basolateral administration of NPPB and nifedipin. Based on these findings we established a model that MD cells might detect variations in tubular fluid composition through a cytosolic Ca^{2+} signaling pathway which involves apical Na:2Cl:K cotransport,basolateral membrane depolarization via Cl-channels,and basolateral Ca^{2+}entry through voltage-gated Ca^{2+} channels.

Other work examined the cytosolic[Na^+]dynamics under various experimental conditions

using the sodium-sensitive fluorescent dye SBFI.We found that MD cells are unique,having high resting intracellular[Na^+]and large[NaCl]$_L$-dependent changes in intracellular[Na^+]compared to cTAL cells. Further experiments are necessary to examine the nature and functional significance of an apical ouabain-sensitive Na efflux pathway.

(担当：岡田泰伸，森島　繁)

30. Dr.D.Denny-Brown's and Dr.E.Eiderberg's neurological lesion studies in primates: Implications for understanding locomotor control mechanisms.

Dr.JoelA.Vilensky (Indiana University School of Medicine)

(1999.3.2)

During the earlier parts of this century experimental neurologists conducted many different types of neurological lesion studies in primates. In some cases these scientists took films of the animals after surgery in order to better characterize the resulting changes in behavior. These films contain a large amount of information that was not always presented in the published descriptions of the experiment. Thus, I suggest and will present examples showing that it is possible to use these films today to investigate particular aspects of locomotor control mechanisms in primates. It is important to note that, because of current restrictions on primate research,it is very difficult and expensive to replicate most of the studies conducted by these scientists.

Dr.Denny-Brown conducted lesion studies on approximately 450 monkeys and filmed and kept detailed records on the behavior of each animal. The lesions were made in virtually every part of the central nervous system. I have used these films for a variety of studies including comparing the recovery of stepping movements of the fore- and hind limbs after three types of unilateral cerebral ablations: pre/post-central gyrus, decortication, and hemispherectomy(decerebration). The results of this study indicated that hind limb recovery occurs before that of the forelimb in adolescent and adult primates, but not in infants. This suggests that there is an underlying physiologcal basis to the widely held belief that in human patients lower limb recovery after stroke is generally more complete than that of the upper limb.

Dr.E.Eiderberg studied the recovety of stepping behavior in macaques after complete and incomplete spinal cord lesions. Although he published descriptions of the behavior of these animals, he did not perform a kinematic analysis of the films of the amimals. Therefore, we used his films to study such parameters as cycle duration and interlimb phase relationships in the animals after these lesions. The analysis revealed that five of the six animals initially exhibited

unilateral hind limb stepping, had increased hind limb and decreased forelimb cycle durations compared to preoperative values, and had inconsistent ipsilateral interlimb phase values.

One of Dr.Eiderberg's most important conclusions was that, in contrast to other mammals, primates after complete spinal cord transection are incapable of generating hind limb stepping movements. In order to further investigate this question, we transected the spinal cord of three squirrel monkeys that had been trained to locomote on a motor-driven treadmill. After surgery, the animals developed many health problems that necessitated sacrifice of two of them before stepping could develop. However, at 38 days after surgty, the third animal, after very intensive re-training, showed good stepping movements. Thus, it is possible that Eiderberg was incorrect and that the detached primate spinal cord is capable of generating stepping movement. However, it is also possible that, whereas New World monkeys are capable of stepping after complete spinal cord transection, Old World primate, including humans, are not. This question is very important for evaluating whether human patients with large injury to their spinal cord will ever be able to step again. Therefore, I suggest that further research into this question should be conducted despite the cost and difficulty in maintaining such animals.

（担当：森　茂美）

31. 前頭連合野のワーキングメモリ過程：仮説的モデルの提唱

澤口俊之（北海道大学文学部心理システム科学講座）

（1999.3.4）

前頭連合野がワーキングメモリに関与することはよく知られている。しかし，この領域で実際に進行している「ワーキングメモリ過程」がいかなるものなのかは，十分にわかっていない。そこで，サルといくつかの行動課題を用いた最近の研究成果をもとに，前頭連合野のワーキングメモリ過程の仮説的モデルを提起したい。このモデルでは「選択的注意による情報の選択→選択結果の保持→保持情報の緻密化・統合化→行動制御用情報の生成」という一連の過程が前頭連合野で進行すると考える。そして，前頭連合野におけるワーキングメモリ過程の本質が「情報の“整理”による行動制御用情報の生成」にあると主張する。このモデルは前頭連合野におけるワーキングメモリ過程のみならず，前頭連合野の本質的な機能を研究・理解する上で意味のあるものだと思われる。

（担当：小松英彦）

32. Adaptation of locomotion after central and peripheral lesions of the nervous system in the cat.

Dr.Serge Rossignol (Center for Research in Neurological Sciences, Universite de Montreal)

(1999.3.9)

In this lecture, I intend to illustrate the remarkable adaptation of locomotion after various types of chronic pathways or peripheral nerves in cats in order to better understand the normal locomotor control mechanisms.

After massive lesions, at T13, of the ventral and ventrolateral parts of the spinal cord, which carry important vestibulo-spinal and reticulo-spinal pathways, cats can recuperate quadrupedal locomotion over ground and on the treadmill. The degree and the time course of recovery depend on the severity of the lesion as evaluated by retrograde labeling of brain stem and cortico-spinal cells with HRP. Although it is likely that remaining brain stem pathways can participate in this recovery of locomotion, we also have some suggestive evidence that other pathways, such as the cortico-spinal, may undergo plastic changes. In the most severe cases, the locomotor pattern remains inconsistent in part due to a decreased weight support of the hindquarters, poor lateral stability and a variable coupling between homolateral fore- and hindlimbs. Serotoninergic agonists (except DPAT, a 5-HT1a agonist) as well as alpha-1 noradrenergic agonists, in isolation or in combination, can remarkably improve the walking stability and the ability to sustain walking at a given speed and reach at higher treadmill speeds.

After a complete section of the spinal cord at T13, adult cats show minimal locomotor activity during the first week post lesion. Alpha-2 noradrenergic agonists, such as clonidine, can initiate hind limb locomtion over a treadmill belt during that period and can also speed up the recovery of weight-supported plantigrade locomotion if an intensive daily locomotor training is also provided. In the following weeks, cats recover spontaneous hind limb locomotion on the treadmill. Kinematic and EMG analyzes show that the pattern generated colsely resemble the hindlimb locomotor patten recorded in the same animals prior to spinalization. Injection of noradrenergic, serotoninergic and glutamateric drugs can modulate rather specifically the characteristics of the locomotor pattern through changes of EMG amplitude or duration as well as changes in reflex excitability. Quantitative autoradiographic studies of the receptors of the major neurotransmitter systems revealed that an up-regulation occurred within the first few weeks post spinalization but that the number and distribution of receptors returned to control values within 3 months. This suggests again that plastic changes occur in the spinal cord below the lesions.

We have addressed more specifically the question of locomotor spinal plasticity using models

of peripheral nerve lesions. We first wanted to know whether adaptive changes seen in normal cats are maintained after spinalization and second, if already spinalized cats can still display adaptive capabilities. We have investigated adaptation of locomotion after a complete or progressive cutaneous denervation of the feet. Intact cats adapt their locomotion within hours. If the animal is then spinalised, it is incapable of placing the foot on the plantar surface. However, if a cat is spinalised prior to the progressive denervation, there is a progressive adaptation up to the point where no cutaneous input subsists leading to a misplacement of the foot. Thus, even in the spinal state, a further reduction of sensory input or an alteration of motor output can be compensated for up to a certain extent suggesting again that the spinal cord has a significant potential for adaptive functional plasticity of locomotion.

Altogether, these adaptive changes ensure that biologically important functions such as locomotion can be optimally expressed despite structural and/or functional modifications of some of the controlling structures. Furthemore, this suggests that there are great hopes for procedures aimed at training spinal functions after spinal injuries using various therapeutic approaches.

（担当：森　茂美）

33. Regulation of the CFTR Chloride Channel by Phosphorylation

Dr.Hohn W.HANRAHAN（カナダ・モントリオール・McGill大学）

（1999.3.11）

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR)Cl^-channels are tightly regulated by multiple protein kinases and by a membrane-bound phosphatase activity. The first part of this talk will review molecular aspects of CFTR regulation by kinases. PKA and PKC consensus sequences are highly conserved in CFTR homologues from cartilaginous fishes to humans. Nevertheless, the regulatory domain of CFTR can also be phosphorylated in vitro on tyrosines that ate far remote from any PKA and PKC sites. These results suggest that activity of CFTR may be enhanced by physiological stimuli other than PKA, and encourage the search for potent pharmacological activators. The second part of the talk will discuss CFTR regulation by phosphatases, which are also essential components of signaling pathways. Our previous studies of CHO and epithelial cells from the airways and colon revealed that CFTR is regulated by an okadaic acid-insensitive phosphatase which is independent of Ca and calmodulin. Evidence from our labotatory and from others has implicated a PP2C-like phosphatase. I present recent co-immunoprecipitation and immunoblotting results, chemical crosslinking experiments and pull-

down assays which indicate that CFTR is physically associated with a from of PP2C,perhaps as part of a regulatory complex.

（担当：岡田泰伸）

34. Touching Sensitive Issues of Touch Sensitive Channel

Dr.Iskander ISMAILOV（米国・アラバマ大・バーミングハム校・医学部）

（1999.3.11）

Polypeotides encoded by the three recently colned homologous subunits(α-, β-,and γ-ENaCs, Epitelial Na^+Channels),homologous to degenerin proteins that are thought to confer touch sensitivity to Caenorhabditis elegans, from Na^+-selective,amiloride-sensitive channels similar to those found in native Na^+reabsorbing epithelia, and were found to display prominent sensitivity to mechanical stimulation by the imposition of a hydrostatic pressure gradient in bilayers (Awayda et al.,1995; Ismailov et al.,1996) and in LM(TV)cells (Kizer et al,1997). The results of experiments perfotmed in search fot the mechanism underlying these findings,and addressing four issues, namely, 1) Is ion conduction in ENaC different in flat and bulged membranes? 2) What is(are)a mechano-sensitive domain(s)of ENaCs? 3) Can mechano-sensitivity of ENaCs be modulated? 4) What is the energy source fot mechano-electrical transduction?

（担当：岡田泰伸）

35. The developing spinal cord: Early specification of interneurons and their connections

Dr.Martyn D.Goulding（The Salk Institute for Biological Studies,La Jolla,California）

（1999.3.25）

ニュージーランド出身のMartyn D.Goulding博士はドイツのPeter Gruss博士のもとポストドクトラルフェローとしてPax3転写因子のクローニング等の業績を上げた。その後，イギリスのAndrew Lumsden博士と共同研究を進めた後，独立し，現在はアメリカカリフォルニア州のソーク研究所において若手のAssistant Professorとして活躍している。現在のGoulding博士の研究概略を以下に紹介する。

脊髄は脊椎動物の中枢神経系の中でもっとも単純な組織の一つであるが，未だ，その回路形成のしくみや神経伝達物質など未知の部分が多い。脊髄の細胞のうち95%の細胞は介在神経細胞（interneuron）と総称されているが，その局在や形態の違いから少なくとも10数種類以上あると

考えられる。演者はこの介在神経細胞の同定・分類とそれぞれに特異的な回路形成のしくみを，神経解剖学的及び分子生物学的手法を用いて解明を試みている。

Pax転写因子遺伝子ファミリーは脊髄介在神経細胞の特異性を決める一つの重要な因子であると考えられている。演者らはPax2転写因子が一群の介在神経細胞発生過程にのみ特異的に発現していることを見いだし，この細胞の回路形式をDiIによるretrograde labeling法やレトロウイルスを用いた細胞標識により解析した。調べていくうち，Pax2陽性細胞は，En1やEvx1転写因子の発現の有無によりさらに細分類できることがわかった。現在，En1陽性細胞，Evx1陽性細胞の軸索を遺伝子ターゲティング法によって標識し，それぞれの特異的回路形成の仕組みをnetrinやPax6などのミュータントマウスを使って精力的に解析を進めている。

今回の講演では，博士の未発表のデータを含め，これら介在神経の発生及び回路形成に関わる遺伝子について考察していただく予定である。

（担当：池中一裕，鹿川哲史）

36. Receptor tyrosine kinase signaling in neural development and plasticity

Rudiger Klein（Developmental Biology Programme, EMBL, Germany）

（1999.3.31）

Cell-cell communication in the nervous system is controlled in part by signals that bind to and activate receptor tyrosine kinases. Among thoseare neurotrophins,hepatocyte growth factor(HGF), and ephrins which bind Trk, Met and Eph receptors, respectively, and regulate diverse processes such as neuron survival and differentiation, neutite outgrowth, axonguidance, synaptic plasticity and neuronal function. Little is not known about the intracellular signalling pathways that control these processes in vivo. Current reseatch in the lab is aimed at solving these questions.

（担当：八木　健）

37. EAVESDROPPING ON THE BRAIN: WHAT ASPECTS OF NEURONAL RESPONSES CARRY INFORMATION?

BarryJ.Richmond（Laboratory of Neuropsychology,NIMH/NIH）

（1999.3.31）

Over the past decade there has been an intense debate about the aspects of neuronal responses carry information. It is obvious that the strength (over some relatively broad time span) of a neuronal response codes information about experimental conditions. However, the

possibility that temporal response features carry other information about experimental or cognitive conditions tantalizes both experimentalists and theoreticians. We have recently shown that response latency is almost independent of response strength. It has also been shown that the slow variations of neuronal responses embodied in peristimulus time histograms carry information. The most provocative hypothesis about spike timing has been that specific exactly timed patterns (such as specific triplets) and exactly timed synchronous spikes represent information about higher brain functions such as binding features from neurons with different receptive fields. This idea predicts that if the timing of spikes carries such additional information, then neurons process more, and perhaps other, information than the response strength itself allows. Thus, it is important to identify which response features code information, and how precisely they must be specified. Ideally we want to identify the smallest number of response parameters that are needed to specify all of the response features that we measure. Our recent work has focused on identifying the response features needed to specify the neuronal resposes, including precisely timed spike patterns. By specifying only the spike count distrbution (not Poisson, approximately truncated Gaussian), the perievent spike density (thus incorporating the latency and having bandwidth<20Hz), and the spike interval distribution (almost not needed), we have formed a simple stochastic model that generates spike trains that are indistinguishable from the experimentally recorded ones for neurons throughout the visual system and the motor system. The same stochastic model provides the basis for predicting exactly the number of synchronous spikes and other exactly timed spike patterns seen across motor cortical neuronal pairs during motor preparation and movement. Thus, it appears that precisely timed response structures are directly related to few relatively simple, traditionally-measured parameters of the responses.

（担当：小松英彦）

〈昼食セミナー〉

1. 極低温電子顕微鏡による水チャネルアクアポリン１の構造解析

村田和義

(1998.7.13)

水チャネルは広く生物界に存在し，細胞膜上で水だけを選択的に透過させるチャネル蛋白質です。その主な役割は，細胞における効率的な水の給排水で，腎臓の細尿管や目の水晶体，赤血球膜，植物の液胞膜などに特に多く存在します。

今回は人の赤血球膜から精製した分子量28Kの水チャネルアクアポリン１（AQP1）を，リン脂質と混ぜて透析することにより直径２ミクロンのAQP1の２次元結晶を作製し，極低温電子顕微鏡を用いてその立体構造を６オングストローム分解能で解析しました。

AQP1の２次元結晶は，生体膜中に存在するときと同じ４量体構造をしており，各分子は大きく傾斜した６本のαフリックスが右巻きに並んだ構造をしていました。また，分子内に疑似的な２回回転対称軸を含んでいて，これはこの蛋白が属するMIPファミリーに特有なアミノ酸配列の２回繰り返し構造を反映していると思われます。そして，その６本のαヘリックスの内側には細胞質側と外側からそれぞれペプチドループが分の中心付近まで入り込んで会合し，安定な構造体を形成していました。このペプチドループの会合部とAQP1の４量体の中心側に並ぶフリックス群との間には直径約３オングストロームの穴が形成されており，水分子は穴を通るのではないかと考えています。

参考文献

T.Walz et al. Nature 387, 624-627 (1997)

2. 初期視覚系における文脈依存性の形成と注意や学習との相互作用

伊藤　南

(1998.9.7)

第一次視覚野は大脳皮質視覚路の最初の部分で，主に線成分の検出を行っていると考えられてきましたが，最近になってより高次の領域で行われると思われていた情報処理にも関与することが次第に明らかになってきました。私たちは輪郭線の強調という現象を手がかりに従来考えられていた以上に複雑な第一次視覚野での情報処理を調べました。

輪郭線の強調とは，複雑な背景の中に連続した線成分の列がある時，それはあたかも背景から浮き上がるようにして容易に見つけだすことができることを言います。私たちは二本の線分間での相互作用に絞って調べました。ヒトによる心理実験で，注視点から４度外側にターゲット線分

を100ミリ秒間呈示します。線分の輝度をいろいろ変えて線分を検出できる輝度の閾値を測ります。別の線分をターゲット線分に直列な位置に同時に呈示すると閾値が減少，つまりターゲット線分の見かけの明るさが増大しました。

次に同じ刺激を用いて注視課題遂行中のサルの第一次視覚野のⅡ／Ⅲ層のニューロンから記録を行いました。連続した線成分を一つは受容野の中心に，一つは受容野の外側に提示して反応を比較しました。受容野の外側に提示した線はそれ単独では反応を引き起こしませんが、受容内に提示された線に対する反応を増強することが明らかになりました。このようにニューロンの対応が受容野に呈示された刺激に対してのみならず，その周囲の状況，つまり背景との関係によってもきまることを文脈依存性と言います。このことは第一次視覚野においてすでに受容野の範囲を越えた情報の空間統合が起きていることを示します。増強の程度は受容野の内外に提示された二本の線の相対的位置関係に依存し，直列方向に間隔を詰めた時にもっとも増強されることが判りました。このような性質は心理物理実験のデータとよく一致します。以上のような結果は第一次視覚野ニューロンの反応の増強が知覚レベルにおいておこる輪郭線の強調の神経メカニズムであることを示します。

以上述べたような文脈依存性の形成（具体的には直列な線分間で働く増強作用）は，視覚系の初期段階で起こるボトムアップの作用と考えられます。視覚系には膨大なフィードバック結合が存在します。そこで私たちはトップダウンの作用として注意の効果と知覚学習の効果を心理実験で調べました。

私たちは二本の線分間に働く明るさの増大に対する注意の効果を調べる為にヒトとサルで心理実験を行いました。注視点を中心に4カ所にターゲット線分を配置，呈示し，中心には比較対照線分を呈示しました。ターゲット線分のうちどれか一つの明るさを変え，残る3本は対照線分と同じ明るさとしました。被験者は明るさの違う線分が対照線分より明るいか暗いかを判断します。ターゲットの線分に直列な位置に線分を追加表示すると，やはり見かけの明るさが増大しました。あらかじめキューを出して明るさの違う線分が呈示される位置を考えておくと被験者はその位置に注意を集中することができます。一方位置を教えないままでおくと刺激の呈示時間が短いので被験者は注意を4カ所に分散させることが必要になります。注意を分散させた場合には明るさの弁別が悪くなりましたが，見かけの明るさの増強は大きくなりました。一方注意を一カ所に集中させると明るさに弁別がよくなるとともに見かけの明るさの増大は減少しました。弁別課題を被験者に数ケ月にわたり繰り返し続けさせたところ，弁別がよくなるとともに，直列な線分による見かけの明るさの変化は減少しました。この学習の効果は注意を分散している場合に顕著で，数カ月後注意による違いはほとんどみられなくなりました。このことは注意の向け方や学習による修飾作用が視覚の初期段階，たぶん第一次視覚野に及ぶことを示します。心理実験と同じ明るさの弁別課題を実行中のサルの第一次視覚野から記録すると，個々のニューロンでの文脈依存性の出現が注意の向け方に依存することが判りました。

このように一次視覚野において，古典的受容野枠を越えた情報の統合がすでに始まっているこ

とが明らかになりました。このことは，低次，高次といった従来の区分がもはや意味を持たないことを強く示します。

3. ヒトの随意運動前後の脳活動：経頭蓋的大脳磁気刺激法による研究

宝珠山稔

(1998.11.30)

大脳磁気刺激法（Transcranial magnetic cortical stimulation, TCMS）は，コイルから出力される磁場の誘導電流により，経皮・経頭蓋的に脳の比較的限局した部位を刺激する方法である。TCMSは被験者の苦痛なく大脳皮質を刺激できる，基本的には非侵襲的な実験・検査手法として基礎的，臨床的な研究に用いられている。ヒトを対象にしたこのTCMS法を概説し，大脳運動野の刺激により末梢の筋から誘発される，誘発筋電図（Magnetic evoked potential,MEP）およびCortical silent period（CSP）について述べる。MEPやCSPは末梢から固有感覚によってのみならず，運動の種類（動員される筋）によってあるいは，運動の遂行や中止の企図によっても変化する。この変化は大脳皮質から錐体路を経て末梢に至る系全体の活動性変化を反映していると考えられる。これらの実験結果を呈示し，MEP，CSPによって明らかにされる随意運動の発現機構，特に運動遂行・中止企図，運動共同筋・拮抗筋との関連を考察する。

4. ヒトの痛覚認知に及ぼす注意効果の影響：脳波と脳磁図を用いた研究

山崎　浩

(1999.2.15)

ヒトの痛覚認知の生理学的研究は他の触覚等に比し極めて困難である。その最大の理由は，皮膚の侵害受容器だけを選択的に刺激できる適当な方法が少ないことである。CO2レーザー光線は，皮膚の侵害受容器だけを選択的にmsecのオーダーで刺激できる最も良い方法として近年広く用いられるようになってきた。既に脳波を用いて，基礎的な実験のみならず臨床応用も広く行っており，この刺激が末梢神経小径線維（A-delta）一脊髄視床路を上行する事を明らかにしてきた。近年は脳磁図を用いて，痛覚刺激に対する脳内部位の同定を行っており，両側の第２次感覚野から島にかけての領域が先ず始めに活動することを明らかにした。

痛覚認知の主観的程度は，痛覚刺激に対してどのくらい意識を集中しているかによって左右される。我々は「痛覚認知」に対する「注意効果」について脳波と脳磁図を用いて研究を行った。CO2レーザー光線刺激は正常被験者の右前腕に3-5秒の間隔でランダムに与えた。２桁の数字が縦横５列，計25個書かれた紙を用意し，実験の間（刺激を与えている間），被験者の前方に呈示し

た。被験者には縦あるいは横１列の数字を順に暗算していくか（calculation課題），あるいはその紙の数字を全て覚えるように努力する（memorization課題）ように指示し，そのような精神負荷の無い場合（Control）との脳波及び脳磁図の波形変化を解析した。
また課題負荷時の主観的痛覚程度も申告させた。

Control時には，脳磁図では刺激対側では頂点潜時約165msec，同側では約190msecの成分が認められた（1M成分）。脳波では潜時約240msecと340msecの陰性－陽性の２相波が認められた（N240-P340）。暗算課題，記憶課題時ともに脳磁図の1M成分の潜時，振幅には変化が見られなかったが，脳波のN240-P340は有意に振幅が低下した（$P<0.01$）。これは暗算時により著明であった。また主観的痛覚程度の低下は脳波のＮ240-Ｐ340の振幅低下と高い正相関を示した。脳磁図の1M成分の活動源は，Control時も各課題遂行時も共に両側の第２次感覚野から島にかけての領域に位置推定され，有意な位置の相違は見られなかった。また第１次感覚野には活動は認められなかった。

潜時の相違及び注意効果の相違より，1M成分とN240-P340成分の発生源は異なっていることが推測される。脳波あるいは脳磁図検査では，刺激の種類に関わらず初期成分が「認知」に関連するためと考えられている。したがって，ヒトでは痛覚刺激に対し，先ず刺激対側ついで同側の第２次感覚野から島にかけての領域が活性化されると考えられる。次いで，おそらく大脳辺縁系を中心とする広範な領域に情報が伝搬され，主観的痛覚程度はこの時間帯にこの領域で行われるものと推測された。

5. グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子のGABAニューロン特異的発現制御機構

柳川右千夫

（1999.3.8）

γ－アミノ酪酸（GABA）は，神経系における主要な伝達物質として神経の電位活動の制御に加えて，覚醒，睡眠，概日リズムや学習，運動，感覚情報処理など脳の機能を構築する上で中心的役割を果たしている。さらに，GABAはてんかん病やアルコール精神病をはじめとする精神神経疾患，不安や抑うつなどの精神症状との関連が知られている。

グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）は，L-グルタミン酸からGABAを合成する酵素であり，分子量の違うGAD65，GAD67の２種類のアイソザイムの存在が明らかにされている。これらのアイソザイムは異なる遺伝子にコードされ，生化学的性質や細胞内局在が異なることが報告されている。GADの発現様式については，GAD65及びGAD67が脳においてはGABAニューロン特異的に発現しており，脳以外の組織では膵臓と精巣に発現している。また，てんかん発作やcAMP，MK801，オカダ酸などの薬物，BDNFなどの成長因子等によりその発現が変動することが，我々を含めて複数の研究グループから報告されている。これらの発現制御機構を明らかにする目的に

て，マウスGAD（mGAD65，mGAD67）遺伝子を単離し，構造を明らかにするとともにプロモーター機能について検討を行った。

（1）（遺伝子構造）mGAD65遺伝子のコードされる領域は80kb以上であり，16個のエクソンから構成されている。一方mGAD67遺伝子は全長約45kbで，翻訳領域は17個のエクソンから構成されていた。また，mGAD67遺伝子では2個の非翻訳領域のエクソン（OA及びOB）が存在しており，これらの発現様式について解析した結果，脳ではエクソンOA及びOBのいずれも発現しているのに対して，膵臓と精巣ではエクソンOAのみの発現が認められた。

（2）（プロモーターの構造と機能）mGAD65及びmGAD67遺伝子プロモーター領域の塩基配列を決定した結果，神経系の発現に関与するneuron-restrictive silencer element（NRSE）やCCAGGAG配列に加え，Krox-24やSp1の結合配列の存在を明らかにした。mGAD65或いはmGAD67遺伝子プロモーター領域の下流にlacZレポーター遺伝子を融合したコンストラクトを導入したトランスジェニックマウスを作成して解析した結果，上記プロモーターが，GAD遺伝子の組織およびGABAニューロン特異的発現に寄与していることを明らかにした。

生理学研究所年報　第20巻

発　　行　1999年12月１日

編 集 者　永 山 國 昭

発 行 者　岡崎国立共同研究機構
生 理 学 研 究 所
〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中38
電話 〈0564〉55-7700
FAX 〈0564〉52-7913