

### シナプス：構造，機能とその破綻 (S2)

シナプス前部から放出されたグルタミン酸は、シナプス後部の神経細胞の樹状突起上の「神経棘」という特徴的な形態をもった構造物上に存在するグルタミン酸受容体に結合する。シナプスにおけるこのようなグルタミン酸信号伝達とその変化こそが、われわれの日常生活におけるさまざまな記憶・学習の基盤であると考えられている。したがって解剖学的にも生理学的にもシナプスは長く注目を集め続けている。近年では多光子レーザー顕微鏡によるイメージングや新しい遺伝子改変動物の作成などのさまざまな手法により、シナプスの形態、機能の理解が進んでいる。今回、生理学会学術研究委員会・解剖学会連携シンポジウムのテーマとして、最新のシナプスの形態学的、生理学的研究さらにはシナプス形成の破綻の例として精神発達障害やてんかんをとりあげた。

広島大の内匠らは、自閉症の細胞遺伝的異常としてもっとも頻度が高いヒト染色体 15q11-13 重複モデルマウスを開発し、その生物学的異常所見および行動異常について詳細な報告を行った。一方、生理研の深田らは AMPA 受容体制御タンパク質として同定した分泌タンパク質 LGII について研究をすすめ、LGII の受容体として同定した ADAM22、ADAM23 の変異がある種の家族性てんかんの原因を引き起こすことを報告した。一方、東京大の岡部ら、慶應大の柚崎ら、韓国延世大学の Ko らは double cortin-like kinase、Clq ファミリー、ロイシンリッチリピートタンパク質 (LRRTM、SLITRK) などの分子にそれぞれ焦点をあて、近年明らかになってきたシナプス形成分子・樹状突起形成機構について紹介した。

シナプス形成機構・改変・除去機構を理解することはまさにヒトの精神・神経疾患の理解を深めるということと、そして将来の新しい治療法の開発に繋がりをうめるのだということを実感することができたシンポジウムであったと信じる。今後も生理学・解剖学を含め多くの領域の研究者との交流を含めるシンポジウムを続けていきたいと考える所以である。

オーガナイザー：内匠 透 (広島大・医・統合バイオ)  
柚崎 通介 (慶應大・医・生理)

#### シナプスの破綻としての発達障害

岸本恵子，内匠 透 (広島大学医学部統合バイオ)

自閉症 (autism) は、社会的相互作用の障害や言語的、非言語的コミュニケーションの障害、また活動や興味の著しい限局性、そして反復的、常同的行動などの症状に基づき特徴付けられる広汎性発達障害である。また、自閉症は環境要因が原因で発症すると示唆されてきたが、近年発達してきた遺伝子解析技術により、自閉症の原因は先天的な遺伝子異常であることが強く示唆されている。その中でも、ヒト 15 番染色体 15q11-13 領域の重複は ASD (Autism spectrum disorders) 患

者において、最も頻繁に生じている染色体異常である。近年、このような ASD の原因領域の網羅的探索は数多く行われてきたものの、自閉症患者の症状や原因は様々であり、その詳細はほとんどわかっていない。我々は、染色体工学を用い、ASD 患者の中でもっとも多い 15q11-13 領域の重複をもつゲノム改変マウスの作製に成功した。また、このマウスは自閉症様の行動異常を示した [1]。

このモデルマウスを用いて、HPLC により脳内領域におけるセロトニン量を調べた。その結果、成体では中脳、嗅球においてセロトニンの減少が見られ、また発達期には脳内領域のほぼ全てで減少していることがわかった [2]。また、ASD 患者

[オリジナルのカラー図版は学会ホームページ <http://physiology.jp/> を参照ください]

におけるセロトニンシグナルの異常について多数報告されており、さらにセロトニントランスポーター遺伝子欠損マウスでは本モデルマウスと類似した表現型を示すことも報告されている [3].

セロトニン受容体がスパインの形態形成に関与しているという報告もあり [4], セロトニンが減少した本モデルマウスにおいてシナプス, さらにはスパインの変化が着目される. スパインはふたつとして同じ形のものがないほど様々な形態をとっており, この形態がシナプス, そして神経回路ネットワークの多様性を生んでいると考えられる. 脳内伝達物質であるセロトニンの異常とこのスパインの関係性を解明することは自閉症をはじめ精神疾患の謎に迫ることを可能にすると思われる. また, 15q11-13 領域に遺伝子が存在している Ube3A などのタンパク質の変異によってスパイン形態異常が生じるという報告もある [5]. さらには, 多光子共焦点レーザー顕微鏡システムを利用することで, 生きたままマウス脳内のスパインの可視化を行うことも可能である. 本ゲノム改変マウスを用いた分子的解析, さらにはイメージングといった網羅的な研究が今後自閉症とスパイン, スパインが形成しているシナプス異常の関係性の解明につながると考えられる.

1. Nakatani J et al: Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell* **137**: 1235-1246, 2009
2. Tamada K et al: Decreased exploratory activity in a mouse model of 15q duplication syndrome; implications for disturbance of serotonin signaling. *PLoS One* **5**: e15126, 2010
3. Lira A et al: Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry* **54**: 960-971, 2003
4. Jones KA et al: Rapid modulation of spine modulation of spine morphology by the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor through kalirin-7 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 19575-19580, 2009
5. Dindot SV et al: The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Hum Mol Genet* **17**: 111-118, 2008

## 樹状突起の形態形成とシナプス形成の doublecortin-like kinase (DCLKs) による制御機構

岡部繁男 (東京大学大学院医学系研究科神経細胞生物学分野)

神経細胞は脳の発達過程で複雑な樹状突起の形態を分化させ, それと同時に並行して多数のシナプスを樹状突起上に形成する. 樹状突起の形態形成とシナプス形成の過程は相互に関連しており, 樹状突起の成長・安定化とシナプスの形成・安定化の間をつなぐ分子シグナルが存在すると考えられるが, その詳細については不明の点が多い. これまでの研究から, 大脳皮質や海馬の錐体細胞ではシナプス形成の際に樹状突起側から形成されるフィロポディアが軸索に接触することで急速にシナプス形成が開始し, フィロポディアがスパインへと形態を変化させることでシナプスの成熟過程が始まると考えられている [1]. 一方で大脳皮質や海馬の抑制性神経細胞の樹状突起上に形成されるシナプスでは普通のフィロポディアとは異なる突起がシナプス形成に重要な役割を果たし [2], また小脳のプルキンエ細胞・平行線維間のシナプスでは軸索側に形成される突起がシナプス成熟を制御しており [3], 樹状突起・軸索両者の多様な形態変化がシナプス形成の際には重要であることが明らかになりつつある. 大脳皮質および海馬の錐体細胞の形態形成の過程では, 樹状突起遠位のシナプス密度は低く, 樹状突起形態の活発なモデリングを妨げないための機構が存在することを示唆する. 今回我々は N 末端側に微小管結合ドメイン, C 末端側にキナーゼドメインを持つ分子である DCLK1 および 2 が, 成長過程の樹状突起の遠位側に集積すること, 更に微小管の伸長を促進して樹状突起の成長を促進し, 一方で微小管結合ドメインおよびキナーゼドメインの機能により興奮性シナプス後部の発達を抑制し, スパインの成長を阻害することを発見した [4]. このような樹状突起の形態形成を正に制御し, シナプス形成を負に制御する分子が樹状突起の遠位側に集積して, 樹状突起の活発な形態変化を妨げないためにシナプス形成を抑制する仕組みが神経細胞には内在的に備わっていると考えられる.

1. Okabe S et al: *Journal of Neuroscience* **21**: 6105-6114, 2001
2. Kawabata I et al: *Nature Communications* **3**: 722, 2012
3. Ito-Ishida A et al: *Neuron* **76**: 549-564, 2012
4. Shin E et al: *Nature Communications in press*

## 1S2C-3 C1q タンパク質によるシナプスの制御機構

柚崎通介 (慶應大・医・生理)

補体が属する C1q ファミリータンパク質は、C 末端に存在する球状 C1q ドメインを使って三量体を形成し、多くの場合分泌されることによってシグナル伝達分子や細胞外基質としてさまざまな機能を発揮する。C1q ファミリーにはマウスでは 29 種類の分子が属し、その中で Cbln サブファミリー (Cbln1-Cbln4) と C1qL サブファミリー (C1qL1-C1qL4) が特に中枢神経系に高発現している。私たちは近年、Cbln1 が小脳顆粒細胞から分泌され、顆粒細胞軸索である平行線維とプルキンエ細胞間のシナプス形成・維持に必須の役割を果たすことを明らかにした [1]。さらに Cbln1 は平行線維終末に存在する Neurexin と結合するとともに、プルキンエ細胞樹状突起に発現している δ2 型グルタミン酸受容体 (GluD2) と結合し、シナプス前部と後部にそれぞれ双方向性に作用する、ユニークな新しいシナプス形成分子であるという概念を提唱した [2, 3]。興味深いことにシナプス形成分子の一つである LRRTM2 はスプライスサイト 4 (S4) を持たない Neurexin (S4-) に結合するのに対して Cbln1 は S4 を持つ Neurexin (S4+) に特異的に結合する [4]。Neurologin は多くの場合 Neurexin (S4-) と (S4+) に結合する。しかし Cbln1 が他のシナプス形成分子とどのように相互作用してシナプスを形成するのか、そして Cbln1 の関連分子にはどのような機能があるのか、など残された疑問点は多い。本シンポジウ

ムではこれらの話題について予備的実験結果を含めて紹介した。

Cbln1 や、そのサブファミリーメンバーである Cbln2, Cbln4 は小脳以外の様々な脳部位にも発現している。これらの脳部位においてはシナプス前部受容体である Neurexin (S4+) は発現しているが GluD2 は小脳プルキンエ細胞に限局している。*in vitro* 実験では Cbln1, Cbln2, Cbln4 は GluD2 のファミリー分子である GluD1 に結合し、かつシナプス形成能を持つ。今回、GluD1 は海馬歯状回分子層や CA1 野網状分子層に発現し、Cbln1 タンパク質の染色パターンと一致することが分かった。すなわち、小脳以外の部位における Cbln サブファミリーに対するシナプス後部受容体は GluD1 であることが強く示唆された。

C1qL サブファミリーは Cbln サブファミリーとは全く異なった発現パターンをもつ。特に C1qL1 は下オリブ核に、C1qL2, C1qL3 は海馬歯状回に特異的に発現する [5]。その機能については未だに未解明な点が多いが、やはりこれらの部位でシナプス形成過程に関与していることが示唆されている。

1. Hirai H et al: Nat Neurosci **8**: 1534-1541, 2005
2. Matsuda K et al: Science **328**: 363-368, 2010
3. Yuzaki M: Curr Opin Neurobiol **21**: 215-220, 2011
4. Matsuda K et al: Eur J Neurosci **33**: 1447-1461, 2011
5. Iijima T et al: Eur J Neurosci **31**: 1606-1615, 2010

## 脳内神経炎症と疲労 (S8)

オーガナイザー：片岡 洋祐 (理化学研究所分子イメージング科学研究センター  
細胞機能イメージング研究チーム)  
片岡 俊彦 (九州大学大学院医学研究院統合生理学分野)

### 脳内神経炎症と疲労のオーバービュー

片岡洋祐<sup>1</sup>, 片岡俊彦<sup>2</sup> (<sup>1</sup>理化学研究所分子イメージング科学研究センター・細胞機能イメージング研究チーム, <sup>2</sup>九州大学大学院医学研究院統合生理学分野)

#### イントロダクション

わが国では 3 人に 1 人が 6 ヶ月以上断続的に続く慢性疲労を感じているという。「疲労」はさまざ

まな疾患のみならず、日常生活でも引き起こされ、誰もが経験する現象である。しかしながら、疲労や疲労感が惹起される分子メカニズムや、疲労が他の生理機能へ及ぼす影響に関して、これまでに単発的な研究は見受けられるものの、系統的・統合的研究はほとんどなされてこなかった。そうした中、わが国では文部科学省振興調整費生活者ニーズ対応研究「疲労および疲労感の分子神経メ

カニズムとその防御の研究」(1999-2005年, 代表: 渡辺恭良) など, 医学・神経科学・免疫学・社会学など分野を超えた研究者が参加した疲労科学の系統的研究が行われ, 疲労度の定量的評価法の開発・慢性疲労症候群の分子・神経メカニズムの研究・疲労病態を模擬した動物モデルの開発などが行われた。特に, 齧歯類を対象とした疲労モデル研究では, 水を張ったプールで一定時間遊泳させて作製される筋肉疲労モデル, 中枢神経の過剰興奮を惹起して作製される中枢神経疲労モデル, 末梢へのウイルス擬感染状態を作成した感染・炎症性疲労モデル, 5日間水を張ったケージで飼育することでREM睡眠と休息姿勢を剥奪して作製された複合疲労モデル等が開発され, エネルギー代謝や神経-免疫-内分泌系の異常, 各炎症性サイトカインの産生など, 疲労病態の詳細な分子・神経メカニズム研究が現在も継続して行われている。

一方, 神経炎症は, 脳内のグリア細胞の活性化とそれに伴うサイトカインやラディカル分子などの産生による炎症反応で, モノアミン系神経細胞を始めすべての神経細胞の機能異常から最終的には神経細胞死にまでいたる病態として, これまでアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症機序との関わりを中心に多くの研究が報告されてきた。また, 最近, 末梢における感染やその他種々のストレス刺激によって脳内神経炎症が惹起され, うつや気分障害など機能性精神疾患の発症にも関与している可能性が示唆され始めている。本シンポジウムでは, このように近年進展著しく, 種々の中枢神経疾患との関連が注目されている神経炎症と疲労との関わりについて議論いただいた。特に, 疲労動物モデルを用いた基礎研究からPETイメージング技術を用いたヒト試験研究までを脳内神経炎症という一つの軸で統合的に展開することをねらいとした。

#### シンポジウムの成果

本シンポジウムでは, ラット腹腔内への人工二本鎖RNAであるpoly I:C (Polyriboinosinic: Polyribocytidylic acid) を投与して炎症を惹起したモデルにおいて, 脳内でも炎症性サイトカインが産生され, 疲労・抑うつ様症状として動物自発行動が低下する現象やその回復機構, 妊娠中の母体へのpoly I:C投与が胎児のセロトニン神経系の発達へ与える影響について報告され, これらのモデル動物における神経炎症の意義と病態解明への手がかりが示された。また, 原因不明の強い疲労を長期間訴える慢性疲労症候群患者においても, 脳内神経炎症が引き起こされていることを陽電子放射断層撮影法(PET)で初めて確認した研

究が報告された。すなわち, 動物モデルから実際の疲労を訴える患者にいたるまで, 脳内神経炎症病態が浮き彫りにされたシンポジウムであった。病態生理として重要な疲労に関する研究を脳内神経炎症に絞って議論したことで, 会場と発表者との間で実験系や病態に関する非常に具体的な討論が活発に取り交わされ, 有意義な意見交換の場となった。

#### Poly I:C 誘発性疲労モデル動物におけるグリア細胞の活性化

井福正隆, 片渕俊彦(九州大学・医・統合生理)

神経-内分泌-免疫系連関における共通の情報伝達物質の一つとして, 末梢および中枢神経系で産生されるサイトカインがある。脳内で産生されるサイトカインは, 様々な脳機能を修飾し, さらに免疫系の機能に影響を与えることが知られている。ヒトの慢性疲労症候群(chronic fatigue syndrome: CFS)では, 極度の疲労とともに, 自律神経系, 内分泌系, 集中力や認知などの高次脳機能, および免疫系にも変調がみられる。すなわち, CFSは神経-内分泌-免疫系連関の異常を伴い, 疲労の発現や持続において脳内サイトカインが何らかの役割を担っている可能性が考えられる。一方, 中枢神経系において免疫を司るミクログリアはサイトカイン産生細胞としての役割を担っていることから, 疲労の発症や持続に関与している可能性が十分考えられる。そこで, 本研究では免疫学的疲労動物を用いてグリア細胞の疲労への関与を検討した。

合成二重鎖RNAであり, toll-like receptor3のアゴニストであるpoly I:Cをラット腹腔内に投与すると, 投与後1日目はホームゲージ内の回転かごの回転数が投与前の約40%まで減少し, その後も7日目まで約70~80%の運動量で経過した。この時, 前頭前野におけるセロトニン(5-HT)トランスポーター(5-HTT)の発現増加および, 5-HT濃度低下が観察された(Katafuchi et al., 2005)。次にpoly I:C投与24時間後の脳内を観察したところ, 前頭前野においてミクログリアが活性化しIL-1 $\beta$ を産生していること, またミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリンの前投与によって, ミクログリアの活性化, IL-1 $\beta$ , 5-HTTの発現増加が抑制され, さらに回転かごの回転数が回復することが明らかとなった。次に, 5-HTT発現機構について検討した。通常, 神経細胞に発現する5-HTTは細胞外5-HTを取り込み, その後再利用するために, 再び細胞外に放出する。しかし, アストロサイトに発現する5-HTTは5-HTを

細胞内に取り込み、その後代謝する。そのために細胞外 5-HT 濃度変化に寄与しているのは神経細胞よりむしろ、アストロサイトに発現する 5-HTT である可能性が高い。そこで初代培養アストロサイトを使用し、5-HTT 発現を検討したところ、IL-1 $\beta$  により 5-HTT の発現が増加することが明らかとなった。以上から、poly I:C 投与によってミクログリアで産生された IL-1 $\beta$  が、アストロサイトでの 5-HTT の発現を誘導し、その結果細胞外 5-HT の濃度が低下し、慢性的な回転カゴの回転数の低下が起こった可能性が強く示唆された。グリア細胞の活性化による脳内神経炎症において、アストロサイトの 5-HTT の発現が増強することが明らかになった本研究は、慢性疲労症候群だけではなく、5-HT が関与する多くの精神疾患における神経炎症機序の関与や、それらの治療薬の開発にも大きく貢献する新しい知見である。

#### Endogenous IL-1 $\beta$ and IL-1 receptor antagonist in the brain regulate poly I:C-induced immunological fatigue in rats

大和正典<sup>1</sup>、奥山香里<sup>1</sup>、金光華<sup>1</sup>、江口麻美<sup>1</sup>、片岡洋祐<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>独立行政法人理化学研究所分子イメージング科学研究センター細胞機能イメージング研究チーム、<sup>2</sup>大阪市立大学大学院医学研究科システム神経科学)

われわれはインフルエンザなどのウイルスに感染した時、一過性に発熱が起こるのみならず、しばしば数日間持続する疲労倦怠感を経験する。この疲労倦怠感のメカニズムを解明するため、ウイルス構造を模倣した合成二本鎖 RNA である poly I:C (3-10 mg/kg) をラットの腹腔内に投与することにより感染疲労動物モデルを作成した。このラットは、poly I:C 投与 5 時間後をピークとした一過性の発熱を引き起こすが、翌朝までには正常体温に戻る。一方、夜間自発行動量は poly I:C 投与日に健常時の約 40% まで減少した後、徐々に回復し、約 7 日後に健常時まで回復する、疲労様の行動を示した。さらに、脳内では広い領域で抗 OX-42 抗体陽性活性化ミクログリアの増加や、炎症性サイトカインである Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) などの発現増強が認められたことから、この動物が脳内炎症を引き起こしていることがわかった。そこで、われわれはまず、一過性の発熱が自発行動におよぼす影響を調べるため、Cyclooxygenase-2 阻害薬である NS-398 (4 mg/kg) を poly I:C 投与 5 分前と 4 時間後に腹腔内に投与したところ、発熱はほぼ完全に抑制することができたが、自発行動の抑制に対してはほとんど影響しなかつ

た。このことから、poly I:C 投与による自発行動の抑制は、発熱により引き起こされるものではないことが示唆された。

次に、脳内炎症が自発行動に及ぼす影響を明らかにするため、われわれは脳内 IL-1 $\beta$  に着目した。脳内の IL-1 $\beta$  の作用を抑制するため、poly I:C 投与 24 時間前から rat recombinant IL-1 receptor antagonist (IL-1ra; 1  $\mu$ g/day) を脳室内に持続投与しておいたところ、poly I:C 投与による自発行動の抑制は完全に抑制されたことから、脳内の IL-1 $\beta$  が行動抑制の重要な因子であることが分かった。ところで、IL-1ra は IL-1 の受容体への結合を競合的に阻害する内因性の物質である。われわれは脳内の IL-1 $\beta$  と IL-1ra の作用バランスが感染疲労における活動度を制御していると予想し、脳内の IL-1ra の発現を調べたところ、IL-1 $\beta$  と同様に発現が増強されていることを確認した。さらに、内因性 IL-1ra の影響を確認するため、抗 IL-1ra 中和抗体を脳室内に持続投与しておくことと poly I:C 投与による自発行動抑制からの回復が延滞した。これらの結果より、Poly I:C 誘起感染疲労における脳内の IL-1 $\beta$  が重要なファクターとなり、脳内に誘導される IL-1ra が IL-1 $\beta$  の作用に対して拮抗的に作用していることが示された。感染疲労時の活動度の低下とその後の回復は、IL-1 $\beta$  と IL-1ra の拮抗作用によって制御されていると考えられる。

#### 母体感染における胎仔脳セロトニン神経発達の異常

##### —poly I:C 投与による胎内感染モデルラットを用いた検討—

大河原剛、大藪明子、江藤みちる、葛山貴士、櫻本 新、太城康良、成田正明 (三重大学・医・発生再生医学)

胎内感染は、胎児に様々な発達上の問題を起こし得る。私たちの研究室では、妊娠中のサリドマイドやバルプロ酸投与で、生後、自閉症様行動を呈するラットを観察し、自閉症モデルラットとして報告してきた (Ped. Res. **52**: 579; 2002, Neurosci. Res. **66**: 2; 2010, Neurosci. Lett. **505**: 61; 2011)。一方、自閉症患者の脳や脳脊髄液において、ミクログリアやアストロサイトの活性化やサイトカインの上昇といった免疫系の活性化が報告されている。即ち、妊娠時の母体感染は、胎児脳の発生に影響を与え、その結果、神経発達疾患などを惹起する可能性がある。しかし、その発生メカニズムに関しては、ほとんど解っていない。

合成二本鎖 RNA である poly I:C は、ウイル

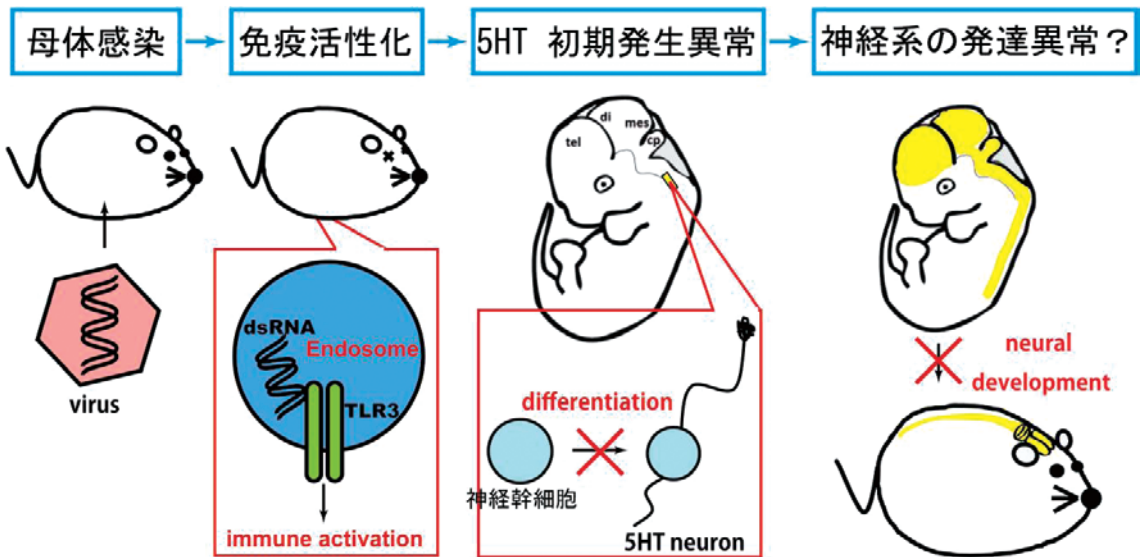


図. 母体感染による神経系発達異常の模式図

1) 母体にウイルスが感染する。2) 母体の中で免疫の活性化が起こる。3) 免疫が活性化されることによって、胎仔脳の中でセロトニン神経系の発生異常が起こる。4) 胎仔期のセロトニン神経系の異常によって、生後の神経系の発達も異常をきたす。dsRNA：二本鎖RNA

ス感染モデルとして頻繁に用いられ、母体感染の研究、疲労研究や脳内炎症の研究にもしばしば用いられている。本研究では、胎生9日目と10日目の妊娠ラットに10 mg/kgのpoly I:Cを腹腔内投与し、情動・認知行動に関わる神経であるセロトニン神経系の発生を評価した。

その結果、胎生15日目の吻側の縫線核において、poly I:C投与群のセロトニン神経細胞の数が、対照群に対し有意に増加していた [1]。さらに生後では、海馬におけるセロトニン量 (HPLC

で測定)は、poly I:C投与群において有意に減少していた (生後50日目)。以上の結果から、母体感染は胎仔のセロトニン神経系の発生に長期の影響を与えることがわかった。母体感染により惹起されたセロトニン神経系の発達異常によって、生後の神経発達障害が起こる可能性が示唆される。

1. Ohkawara T et al: The influence of maternal immune activation by injection of poly I:C in the developing serotonergic neuron. Society for Neuroscience Abstract 2011. 151.07

## 新しい視点で脳のエネルギー代謝調節系を考える (S13)

古典的な糖定常説 (Mayerら)からはじまり、大村らにより糖受容ニューロンや糖感受性ニューロンが同定され、話はおわったように思っていた。しかし、レプチンの発見以降 (Friedmanら)、脂肪定常説が唱えられ、新たな時代の幕開けとなったが、摂食行動調節の神経基盤の解明は混迷を極めていようにも思える。複雑なこの系を新たな視点から考える機会になればとこのシンポジウムを企画した。

シンポジウムのオーガナイザーの福井大学樋口隆先生からなぜ肥満が蔓延するのか、という素朴な疑問からシンポジウムはスタートした。ラットには、摂取と消費のカロリー量を一定にする調節があり、ヒトが太りやすいのは、体重を一定にする調節機構が無いからであろう、という話

であった。次に、群馬大学生体調節研究所・代謝シグナル解析分野の佐々木努先生に、POMCニューロンやAGRPニューロンの選択的なSirt1 knockoutマウスの解析結果と摂食における役割について解説してもらった。ついで、高知大学医学部の福島篤先生に、糖代謝の調節、ひいては食欲の制御に脱リン酸化の過程がどうかかわるのか、従来のリン酸化の過程とは異なった切り口で解説してもらった。さらに、岡山大・医歯薬・膜蛋白質機能科学の表弘志先生に、これまであまり知られてこなかったグルタミン酸伝達の代謝制御について、最新の知見をもとに話してもらった。特にケトン食（超高脂肪食）がてんかんに効果がある機序について講演頂いた。ケトン食が体重を減少させることを考えると、高脂肪食との対比が興味深い。最後に、立命館大学・スポーツ健康科学部の後藤一成先生に、ヒトの場合を例にとり、エネルギー状態が運動機能をどう調節するのか、従来とは異なる考えから解説してもらった。生理学、代謝学、解剖学、薬学、そしてスポーツ医学のそれぞれ異なった分野で研究している研究者の英知を集結することにより、摂食調節の神経基盤に関しての知見を整理して、次のステージへつなげる興味深いシンポジウムになったことを、この場をかりて感謝いたします。

オーガナイザー：樋口 隆（福井大学医学部 現所属：福井医療短期大学）  
船橋 利也（聖マリアンナ医科大学）

### 摂食調節に関する定説の再検討

樋口 隆（福井医療短期大学）

1994年に脂肪組織から食欲を抑制するホルモンのレプチン（lep）が発見されて、体重を一定にする仕組みとしてlipostatic theoryが確立されたかと思われた。この説によれば、摂取エネルギーが消費エネルギーより多ければ、太って血中lep濃度が上昇するので、食欲が減って痩せるはずである。このLepを介するネガティブフィードバック機構があるにもかかわらず、なぜ肥満が蔓延するのか？体重が増えると、lepの食欲抑制作用が減弱するので（lep抵抗性）、肥満になると説明されている。

我々はラットに高脂肪食（HFD, 5.2 kcal/g）を与えてlep抵抗性にすると、摂食量が増すかを調べた [1] (図)。餌を通常食（C, 3.49 kcal/g）からHFDに替えると、摂食量は増加する。しかしそれは徐々に低下して、10日目頃には摂取カロリー量がCラットと同じになる（摂取重量は有意に減る）。その後両群は同じカロリー摂取量を維持するが、HFDラットはCラットより有意に体重が重くなる。この時期にHFDラットはlep抵抗性になっている。この結果から、1) lep抵抗性のラットは摂食量が増えていない、2) 同じ摂取カロリーでも、HFDラットはCラットより太る、が明らかになった。2)の現象は卵巣を摘出した雌ラットに、エストロゲン（E）を投与する実験でも確かめられた。E投与せず+HFD, E投与せず+C, E投与+HFD, E投与+Cの4群で、E投与とHFDで一過性に摂食量が減少或いは増加するが、やがて摂取カロリー量に差が無くなる。しかし4群間にはそれぞれ有意な体重差があった。

次にエネルギー消費が増加した場合を、回転カ

ゴ運動で調べた。運動量が増えると体重が減少する。それを元に戻そうとして、食欲が亢進するとされている。しかしラットの実験では、回転できない状態から回転可能にすると、摂食量は減少する [2, 3]。しかも、CとHFDの両方食べられる状況では、回転運動できないラットでは90%以上HFD食べるが、回転運動を開始するとHFDの摂取量が大きく減り、Cの摂取は増加して、嗜好の差がなくなる。この摂食量の減少は徐々に回復して、10日ほどで回転運動開始前のレベルに回復する。

以上の結果から1) ラットには摂取と消費のカロリー量を一定にする調節はあるが、その調節機構が機能するには数日の時間がかかる、2) 体重は一定になるように調節されていない、ことが示唆される。lep抵抗性の仮説を持ち出すまでもなく、ヒトが太りやすいのは、体重を一定にする調節機構が無いからであろう。

1. Higuchi T et al: J Physiol Sci **62**: 45, 2012
2. Scarpace PJ et al: Physiol Behav **100**: 173, 2010
3. Higuchi T（第90回日本生理学会抄録、印刷中）

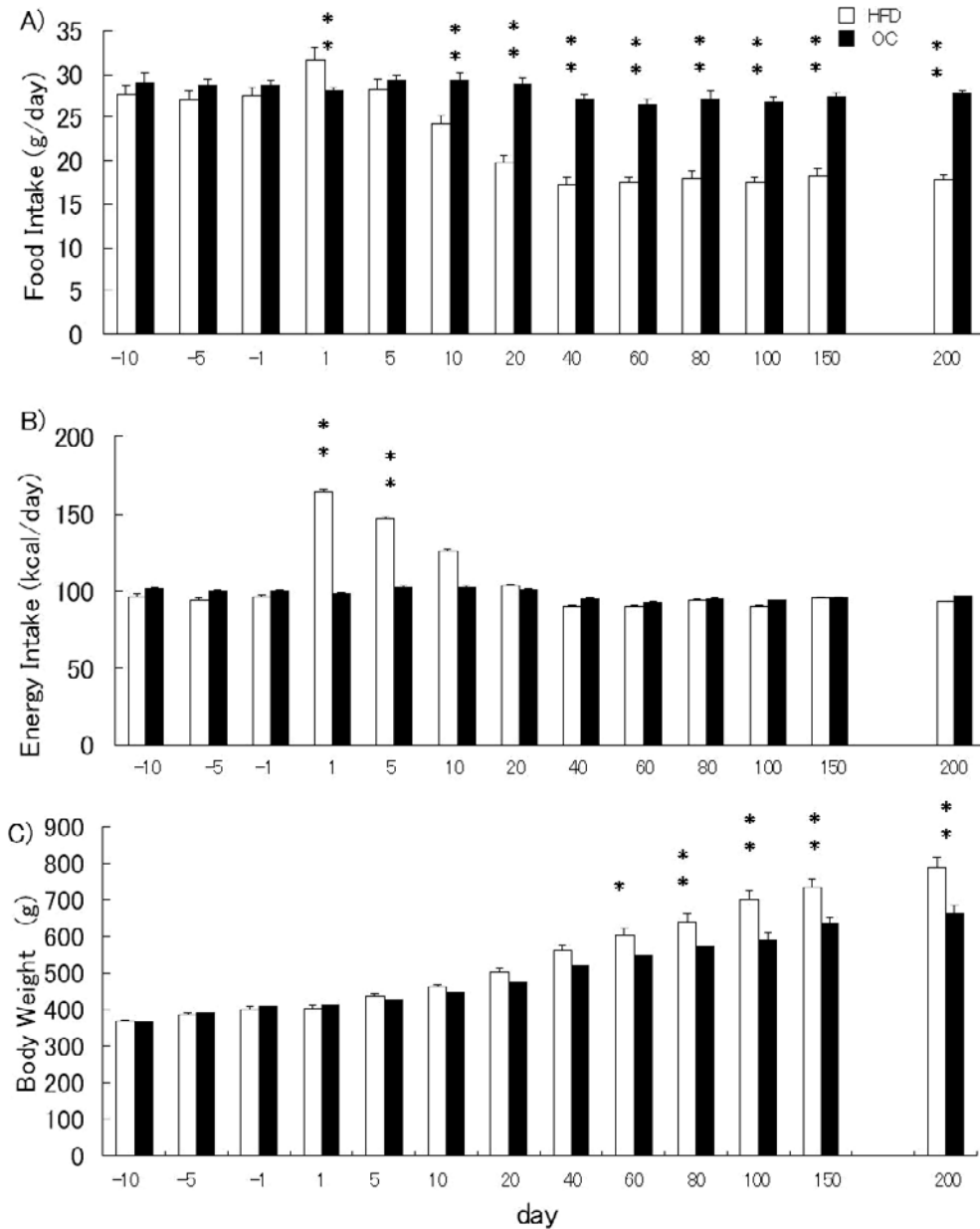


図. Day0 に餌を通常の餌 (OC) から高脂肪食 (HFD) に替えた. その後の摂食量 ((A) 餌の重量, (B) カロリー量で示す) と (C) 体重の変化 (□) を示す. 通常の餌を食べ続けたラット (■) との有意差 (\*, \*\* はそれぞれ危険率 5%, 1% を示す).

**POMC・AgRP ニューロンでの Sirt1 過剰発現マウスの摂食・エネルギー消費調節機構**

佐々木努, 新福摩弓, 菊池 司, 橋本博美, 小林雅樹, 北村忠弘 (群馬大学生体調節研究所代謝

**シグナル解析分野)**

【イントロダクション】長寿遺伝子 Sirt1 は NAD<sup>+</sup> 依存性タンパク脱アセチル化酵素をコードする. 全身のエネルギーバランス調節の 1 次中枢

は視床下部弓状核に存在し、摂食抑制性のPOMCニューロンと摂食促進性のAgRPニューロンが存在する。これらのニューロンが2次中枢(室傍核、視床下部外側野、腹内側核など)に神経投射し、標的ニューロンの活性を拮抗的に制御する。本研究では、視床下部 Sirt1 による POMC・Agrp ニューロンを介した全身のエネルギーバランス制御機序を検討した。

【方法】Sirt1 コンディショナルノックイン (KI) マウスを作成し、Pomc-Cre または Agrp-Cre マウスと交配し、摂食量・体重変化・呼吸代謝・遺伝子発現を検討した。これらのマウスを、普通食もしくは高脂肪高シヨ糖食(食事性肥満モデル)で飼育し、抗肥満効果を検討した。

【結果】オスの Pomc-Sirt1-KI マウスは普通食飼育下でコントロールに比べて体重が有意に低下しており、精巣周囲白色脂肪は軽く、脂肪細胞が小型化していた。摂食量は変わらなかったが、基礎代謝亢進と血漿甲状腺ホルモン (T4) の軽度の上昇傾向を認めた。また、寒冷刺激時の直腸温の有意な上昇、褐色脂肪組織でのミトコンドリア関連遺伝子の発現上昇、および絶食もしくは  $\beta 3$  刺激薬により誘導される脂質分解の亢進を認めた。これらは、脂肪組織への交感神経活動の亢進を示唆する。すなわち、POMC ニューロンでの Sirt1 過剰発現は、エネルギー消費亢進により抗肥満効果を示す。

それに対し、オスの Agrp-Sirt1-KI マウスでは、基礎代謝と自発運動に変化はなく、摂食量の抑制による体重減少を認めた。これらのマウスの雌では有意な変化は認められなかった。一方、酵素不活性型の Sirt1 (H355Y) を発現するメスの Agrp-Sirt1 (H355Y)-KI マウスは、摂食量の増加を伴った体重増加を認めた。Agrp-Sirt1-KI マウスでは基礎代謝の亢進は認められなかった。すなわち、AgRP ニューロンでの Sirt1 過剰発現は、摂食抑制により抗肥満効果を示す。

しかしながら、Pomc-Sirt1-KI および Agrp-Sirt1-KI マウスに高脂肪高シヨ糖食負荷を行うと、普通食飼育下で認められた抗肥満効果が消失した。

【結論】Sirt1 は、POMC ニューロンではエネルギー消費を調節し、AgRP ニューロンでは摂食を調節し、エネルギーバランスを負に制御する。食事性肥満はこれらの抗肥満効果を抑制する。

### 脱リン酸化酵素による摂食行動の調節

福島 篤<sup>1,3</sup>、ロー キム<sup>2</sup>、由利和也<sup>1</sup>、ティガニ ス トニー<sup>2</sup> (1高知大学・医学部・解剖学、<sup>2</sup>モナ

シユ大学、<sup>3</sup>現：聖マリアンナ医科大学・生理学)

インスリンやレプチンに対する抵抗性の亢進は、2型糖尿病や肥満の原因となるばかりでなく、血圧や脂質の異常も含めたメタボリックシンドロームの成因としても重要である。インスリンの細胞内シグナル伝達系においてチロシン残基のリン酸化等は主要な経路であり、研究も日進月歩である。一方で、リン酸化を元に戻す脱リン酸化酵素に関する研究は遅れている。チロシン残基のリン酸化を元に戻す脱リン酸化を媒介する酵素の一群である T-cell Protein Tyrosine Phosphatase (TCPTP) は、インスリンシグナルの負の主要な調節因子で、最近注目されている。TCPTP は肝臓において、インスリンや IL-6 の下流の STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) の抑制因子として働き、肝臓の糖新生を調節する (Diabetes 2010)。この肝糖代謝への関与から、視床下部の摂食関連ペプチドの発現調節を介したエネルギー代謝調節機構に TCPTP が重要な役割を演じていると考えた。TCPTP の脳特異的な欠損は、体重減少であり、恐らく POMC (pro-opiomelanocortin) ニューロンの活動亢進による (Cell Metab 2011)。特に興味深かったのは、このマウスは、レプチンの作用に顕著な性差があったことである。POMC ニューロンはレプチン受容体を発現しており、その下流は STAT3 である。現在、エストロゲンと TCPTP の関わりに関して、研究をすすめている。

### 小胞型グルタミン酸トランスポーターの代謝による制御

表 弘志<sup>1</sup>、宮地孝明<sup>2</sup>、樹下成信<sup>1</sup>、森山芳則<sup>1,2</sup> (1岡山大学・医歯薬・膜蛋白質機能科学、<sup>2</sup>岡山大学・自然生命研究支援センター)

化学伝達では神経末端にあるシナプス小胞に蓄積された伝達物質が細胞外に放出される事でシグナルが伝達される。小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) は主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸をシナプス小胞へ輸送・蓄積するトランスポーターであり、グルタミン酸化学伝達に必須な因子である。

私達はこのトランスポーターの分子メカニズムを探るため、精製トランスポーターの再構成系を用いたアプローチで解析してきた [1]。このシステムでは昆虫細胞やバクテリアに大量発現させた VGLUT を界面活性剤で可溶化後、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで精製し、これをリボソームに再構成する事でグルタミン酸輸送活性を測定している。このリボソームに小胞の内側が正の膜

電位をかけると、時間依存的なグルタミン酸の取り込み活性を示す。この系を用いてVGLUTの特性を解析したところ興味深い事が明らかになった。

シナプス小胞を用いた報告から、グルタミン酸輸送には塩素イオンが必要である事が知られていた。しかし、シナプス小胞には塩素イオンチャンネルがあるために、VGLUTの活性制御の詳細は不明なままであった。精製したVGLUTを用いて解析したところ、グルタミン酸輸送は数mMの塩素イオンで強く活性化された[2]。この時のヒル係数は約3と、強い正の協同性を持っていた。この事は塩素イオンによってVGLUTが厳密に制御されている事を示す。また、VGLUTは塩素イオンを輸送しなかった事から、アロステリックな活性化因子である事が明らかになった。興味深い事に、ケトン体の一種であるアセト酢酸は塩素イオンと拮抗する事でVGLUTを阻害した。さらに、アセト酢酸は培養神経細胞からのグルタミン酸放出および、ラットのでんかんを抑制した。この事はケトン体が生体レベルでもグルタミン酸化学伝達を制御している事を示している。

飢餓やケトン食はでんかん治療に効果がある事は昔から知られていたが、その理由は不明であった。我々の発見は飢餓やケトン食によって生じるアセト酢酸がVGLUTの活性制御を通じて、でんかん時の過剰な神経興奮を抑制している事を示している。このことは、化学伝達と代謝が思いがけないつながりを持っている事を示している。

1. Juge N et al: J Biol Chem **281**: 39499-39506, 2006
2. Juge N et al: Neuron **68**: 99-112, 2010

## 新エネルギー消費論と運動

後藤一成 (立命館大学スポーツ健康科学部)

運動はエネルギー消費量を増大させるだけでなく、糖代謝や脂質代謝を亢進させる。たとえば、一過性の有酸素運動(自転車ペダリングやランニングなど)を30分程度実施すると、運動中に血中グリセロール濃度が増加し(脂肪分解の促進を反映)、運動終了後は数時間にわたり安静時の脂肪利用の増加が認められる。これに対して、筋力ト

レーニングを実施した場合には、運動中に脂肪分解や脂肪利用の目立った増加はみられないが、アドレナリンや成長ホルモンといった脂肪分解作用をもつホルモンの分泌が著しく増加する。このことから、運動後に脂肪分解が亢進し、安静時での脂肪利用も増加する。また、このような脂質代謝の亢進は、運動後24時間まで持続することもある。

上述のような生理応答をふまえて、筋力トレーニングの20分後または120分後に有酸素運動を実施したところ、有酸素運動のみを実施した場合に比較して、いずれも有酸素運動中の脂肪利用が有意に増加することが確認された(Goto et al. 2007)。これらの知見は、「筋力トレーニング」と「有酸素運動」という特性の異なる2種類の運動を適切に組み合わせることによって、体脂肪量の減少に対してより大きな効果を期待できることを示している。

標高の高い高地や人工的に室内の酸素濃度を低下させた低酸素室内で行う身体トレーニングは「低酸素トレーニング」と総称され、特に、持久性競技(陸上長距離種目など)のスポーツ選手の持久力強化に利用されている。一方、疫学調査によると、高地に在住する者は平地に在住する者に比較して、HDLコレステロール(善玉コレステロール)が有意に高値を示す(Dominguez et al. 2000)。また、近年では、低酸素環境での有酸素トレーニングは通常酸素環境で行う同様のトレーニングに比較して、体脂肪量の減少に対する効果の大きいことが報告されている(Wiesner et al. 2010)。また、我々のグループにおいても、週3回・4週間の有酸素トレーニング(1回あたり60分間の自転車ペダリング)に伴うインスリン感受性(食後血糖値の経時変化をもとに評価)の改善の程度は、低酸素環境でトレーニングを行った群が通常酸素環境でトレーニングを行った群に比較して有意に大きいことを認めている(Morishima and Goto, 2011)。今後は、低酸素環境での長時間滞在の効果や、エネルギー代謝や食欲調節に関わる内分泌指標への効果を合わせて検討することが必要であろう。

## ケミカルニューロバイオロジー： 新たな分子ツールによる神経研究の新戦略（S37）

光遺伝学の急速な進展を例にあげるまでもなく、新たな分子ツールの開発は研究のブレークスルーにつながる事が多い。GFPに代表される蛍光タンパクを用いるイメージング解析や、チャネルロドプシンなどの光感受性チャンネルを用いる光操作のように、遺伝子工学的な新規分子ツールの開発は従来不可能であった様々な細胞機能を直接的に可視化ないし解析することを可能にし、神経研究にも大きなインパクトを与えてきた。しかしながら、これらの分子はいずれも高分子のタンパク質であり、ニューロンにこれらの「外来性」分子を異所性に発現させる研究から得られた結論を一般化するためには、より生体内に近い条件で「内在性」分子のふるまいを解析する他の研究結果と組み合わせ、慎重に議論する必要がある。本シンポジウムでは、新たな解析手法、とりわけ低分子化合物を用いたケミカルバイオロジーの神経機能解析への応用に焦点をあて、神谷（北大）、尾藤（東大）、山口（理研）、大久保（東大）、野口（東大）の5人のシンポジスト（敬称略）が、それぞれ独自の的方法論に基づいた最新の研究成果を報告した。前半の神谷、尾藤、山口は、いずれもシナプス可塑性におけるAMPA型グルタミン酸受容体（AMPA受容体）輸送に関する解析結果を発表した。細胞膜上のAMPA受容体を標識あるいは不活化する手法や、cagedペプチドの光分解により細胞内プールからの膜移行を阻害する手法により光学的にAMPA受容体の時空間ダイナミクスを解析するこれらの研究は、GFPイメージングから得られた従来からの結論を補完する意味で重要と考えられた。大久保は蛍光グルタミン酸センサーを用いた興奮性伝達物質グルタミン酸のイメージング解析の結果を紹介した。高頻度の入力があるとグルタミン酸がシナプス外にも拡散することを可視化し、その時間的・空間的範囲を明らかにすることに成功した。神経活動依存的なグルタミン酸のシナプス外への漏出は興奮性シナプス間の協働性の一因として重要だが、新手法により初めて定量的な情報が得られた点は意義深い。野口は、二光子励起共焦点顕微鏡を用いたcagedグルタミン酸の光分解法について、特にin vivoへの適用の実際と有用性について紹介した。全プログラムを通じて、予定時刻をオーバーしてしまうほどの白熱した質疑応答が続き、次の一手、を待望する研究現場からの、新規解析法に対する関心の深さが感じられた。ケミカルバイオロジーと神経生理学の融合による新たな研究領域の現在の到達点を理解し、今後の方向性と展開を期待させる、充実した実り深いシンポジウムになった。改めて全てのシンポジストや参加者のご協力に感謝したい。

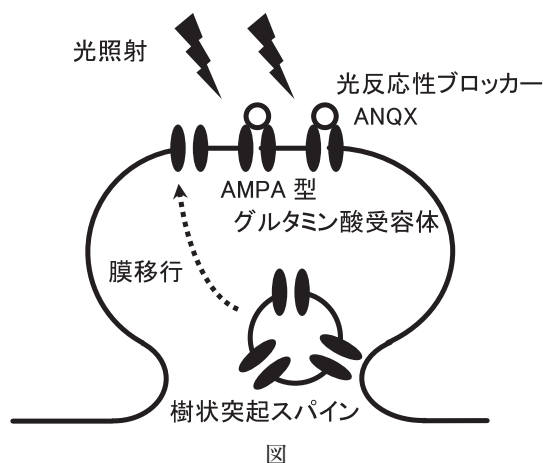
オーガナイザー：神谷 温之（北海道大・医・神経生物）

尾藤 晴彦（東京大学大学院医学系研究科神経生化学分野）

### 光反応性グルタミン酸ブロッカーを用いたグルタミン酸受容体動態のシナプス「その場」解析

神谷温之（北海道大学医学研究科神経生物学分野）

AMPA型グルタミン酸受容体（AMPA受容体）のシナプス発現は極めて動的に制御されている。GFPで分子標識をしたAMPA受容体のイメージング解析の結果から、細胞内プールである小胞体膜上に存在するAMPA受容体が開口放出により細胞膜表面に移行してシナプス後部の受容体が補給されると考えられているが、定常的な膜移行の速度や、神経活動依存的な膜移行のタイミングなど、AMPA受容体動態の詳細については不明な点が多い。そこで、光反応性ブロッカー ANQX によるAMPA受容体の光不活化法（Chambers et



al., 2004) をマウス海馬スライス標本に適用し、シナプス後部の AMPA 受容体を光照射で不活化した後のシナプス応答の回復の時間経過を測定することで、海馬シナプスでの「内在性」AMPA 受容体の生理的な分子動態の解析を試みた。入力線維に高頻度刺激を与えて長期増強を誘発した後に、様々なタイミングで光照射による不活化を行い、神経活動依存的な膜移行の加速が長期増強の時間経過のどの時点で見られるかについて検討したところ、細胞内プールの AMPA 受容体は高頻度刺激の直後に膜移行し、シナプス後部に補給されることが確認された (Kamiya, 2012)。光操作法を用いる利点として、照射時間と照射部位をコントロールすることで、時間的・空間的な制御が可能になる点があげられる。今回の研究は、時間的コントロールを活かして「内在性」AMPA 受容体の膜移行のタイミングを明らかにしたものと位置づけることができる。今後は、照射部位を限局することで入力特異的に興奮伝達をブロックする実験に応用し、神経回路の機能的意義の探求につながる事が期待される。

1. Chambers J et al: J Am Chem Soc **126**: 13886-13887, 2004
2. Kamiya H: J Neurosci **32**: 6517-6524, 2012

### ケージ化阻害ペプチドを用いた受容体トラフィックのキネティック解析とシナプス可塑性のモデル

山口和彦 (理研・脳センター・運動学習制御)

記憶・学習のメカニズムの一つとして、シナプス膜における AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) 発現数の可塑的調節がある。平常時、シナプス膜の AMPA-R 発現数は、エキソサイトーシスを介したシナプス膜への受容体挿入とエンドサイトーシスを介した受容体内在化により一定に保たれている。テタヌス刺激等により平衡が、エキソサイトーシス優位にずれた場合、シナプス伝達の長期増強 (LTP) が生じ、あるいはエンドサイトーシス優位にずれた場合、長期抑圧 (LTD) が生じる。受容体エンド/エキソサイトーシスの速度定数、受容体のシナプス膜安定化等のパラメータの活動依存性変化により、受容体トラフィックが制御され、シナプス可塑性が生じている。特異的阻害剤によりエキソ/エンドサイトーシスの一方を止めることにより、シナプス膜の受容体密度の減少、あるいは増加が EPSC 振幅の変化として観察できる [1]。しかし、阻害剤の拡散時間等と区別し純粋に受容体トラフィックの速度定数を測定する方法がなかった。我々は達博士(産

総研) との共同研究により、AMPA-R のサブタイプ GluA2 のシナプス挿入を阻害するペプチドのケージ化合物を作製した。このケージ化阻害ペプチドをホールセルパッチ電極より神経細胞内に投与し、充分拡散した後アンケーシングすることにより、瞬時にエキソサイトーシスを介した受容体シナプス挿入を阻害することが可能になった。

ラット小脳スライスのプルキンエ細胞内にケージ化阻害ペプチドを投与し、約 20 分後に光分解によりアンケーシングした結果、平行線維刺激によって生じる EPSC の振幅が急激に減少した。この振幅の減少は、あらかじめダイナミン阻害剤の投与によりエンドサイトーシスを阻害した場合には全く生じず、側方拡散ではなく、エンドサイトーシスによると考えられた。AMPA 受容体エンドサイトーシスの速度定数は約  $0.8\text{min}^{-1}$  であった。これをもとに、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおける AMPA 受容体トラフィックのキネティックモデルを作製し、これを用いて実験結果を解析したところ、LTD において受容体エンドサイトーシス速度定数は変わらず、受容体の脱安定化だけでは LTD を定量的に説明できず、細胞内受容体プールの減少が LTD の基礎にあることが強く示唆された。本研究におけるケージ化阻害ペプチドによる速度定数の測定とキネティックモデルの開発により、シナプス可塑性の基礎にある受容体トラフィックの制御を、物理化学的な反応として理解する可能性が示された。

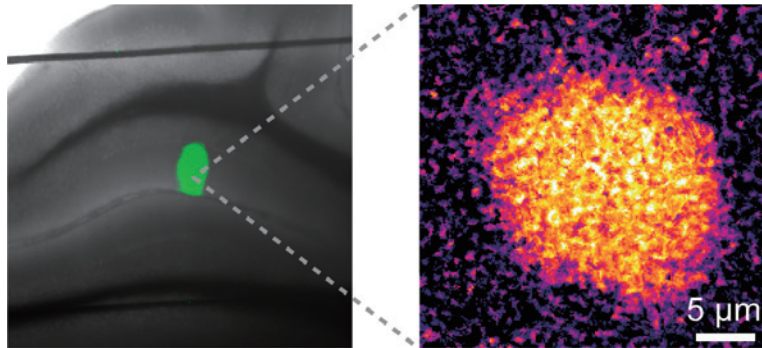
1. Tatsukawa et al.: J. Neurosci **26**: 4820-4825, 2006

### グルタミン酸スピルオーバーの時空間動態

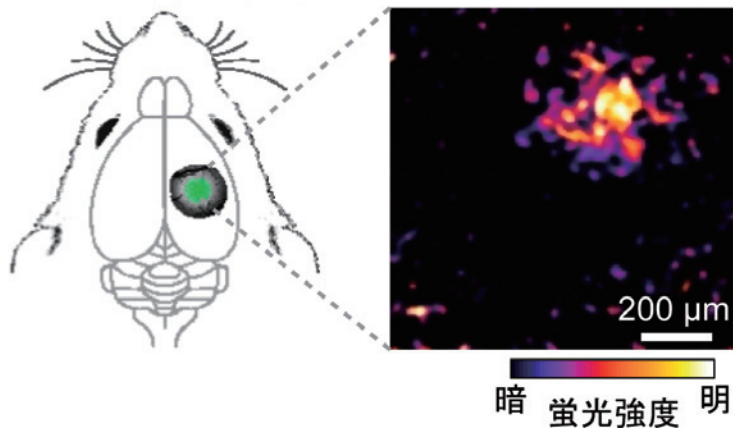
大久保洋平, 飯野正光 (東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学)

グルタミン酸は脳における代表的な興奮性神経伝達物質である。従来からの考え方では、前シナプス終末から放出されたグルタミン酸は、シナプス間隙の中に限局して「点と点」のシナプス伝達を担うものとされてきた。しかしながら近年、グルタミン酸はシナプス間隙から漏れ出し、周囲のシナプス外領域に存在するグルタミン酸受容体を活性化することで、シナプス可塑性から脳血流制御に至るまで様々な神経およびグリア細胞機能に関与していることが示唆されるようになった。グルタミン酸スピルオーバーと呼ばれるこの現象については、従来は電気生理学的手法等により間接的に推定する他なく、研究の進展が阻まれていた。

そこで本研究では、グルタミン酸を検出する蛍光プローブを新規に開発し、それを用いてグルタ



### ラット大脳皮質 後肢刺激



図

ミン酸スピルオーバーの動態を直接観察することを目指した。プローブについては、グルタミン酸結合タンパク質に小分子の蛍光色素を標識するハイブリッド型蛍光プローブを設計した。蛍光色素の環境感受性により、グルタミン酸の結合に依存して蛍光強度が大きく上昇するプローブを作成することに成功し、これをEOSと命名した (Namiki 2007; Okubo 2010)。このEOSをビオチン-ストレプトアビジン結合を用いてシナプス外領域に固定し、二光子顕微鏡等を用いて蛍光強度変化を詳細に観察した。

脳スライス標本において、神経線維刺激に依存して局所的なEOSの蛍光強度上昇が観察された (図)。つまりグルタミン酸スピルオーバーを直接観察することに成功した。そしてこのグルタミン酸スピルオーバーの動態は、NMDA 受容体や代謝

型グルタミン酸受容体を活性化するのに十分な濃度および滞留時間を示した。またこのようなグルタミン酸スピルオーバー動態は、近接した神経線維の同期発火により局所で惹起されるものであり、拡散等による急速な希釈のため周囲への伝搬はほとんど見られなかった。さらに麻酔下のラット脳内で観察を行い、後肢からの体性感覚入力により、大脳皮質の対応領域でグルタミン酸スピルオーバーが惹起されることを明らかにした (図)。

以上の成果は、グルタミン酸スピルオーバーの時空間動態を生理的条件下で初めて明らかにしたものであり、今後の研究の基盤となる知見である (Okubo 2010; Okubo 2011)。また *in vivo* の脳内で興奮性シナプス活動を直接可視化できることを示しており、脳機能イメージングの新たなモダリティを提供することが期待される。

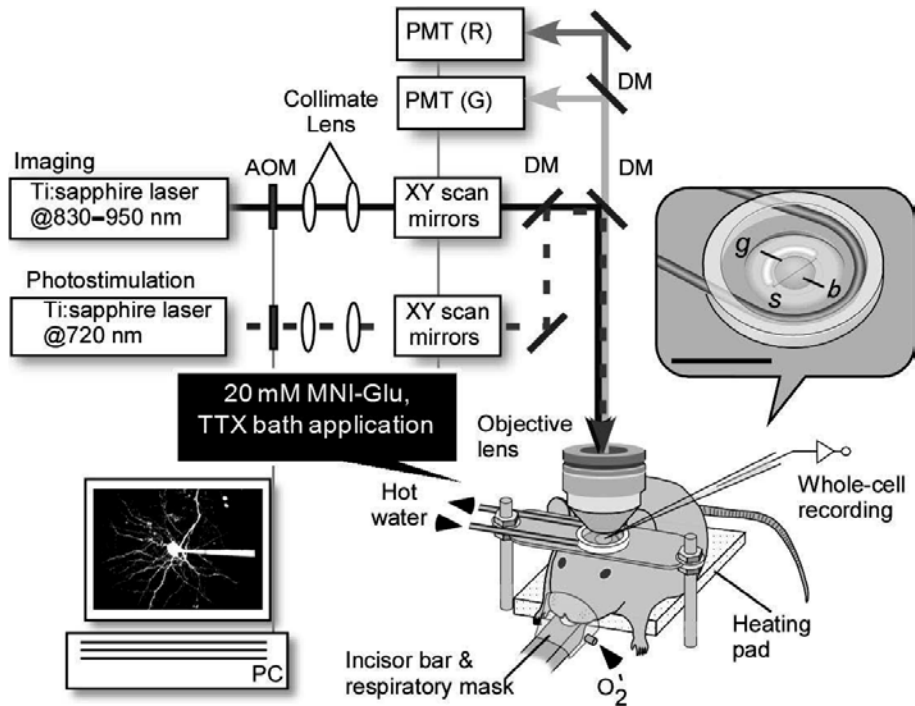


図1. In vivo uncaging システム. ケイジドグルタミン酸 (MNI-Glu) は頭蓋骨と硬膜を除去した後、脳表面から脳内に投与した. 脳の拍動を抑制するため、脳表面をカバーガラスで抑えることが必要であった. g, カバーガラス. s, 頭蓋骨. b, 脳表面. AOM, acousto-optic modulator. PMT, フォトマルチプライヤ (赤色と緑色検出用の2本). DM, ダイクロイックミラー. MNI-Glu, ケイジドグルタミン酸 (参考文献1参照).

1. Namiki S et al: Eur J Neurosci **25**: 2249-2259, 2007
2. Okubo Y et al: Proc Natl Acad Sci USA **107**: 6526-6531, 2010
3. Okubo Y et al: J Physiol **589**: 481-488, 2011

## 2 光子アンケージングの in vitro ならびに in vivo 応用による神経機能解析

野口 潤, 葉山達也, 長岡 陽, 河西春郎 (東大院・医・構造生理)

海馬や大脳皮質などの神経細胞樹状突起において、シナプス後部を構成するトゲ状の構造を樹状突起スパインと呼ぶ. 任意の単一スパインを刺激するため、2光子励起法によるケイジドグルタミン酸の光分解 (uncaging) によって低侵襲的にグルタミン酸を投与する技術が報告された [1, 2]. この技術を用いることにより、海馬スライスを標本として、スパイン頭部体積とそのスパインの機能的な AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA)

の発現量は強い正の相関があることが示された [1]. さらに uncaging によるグルタミン酸類回刺激によって培養海馬 CA1 錐体細胞のスパイン体積の増加とそれともなうシナプス電流の長期増強が起こることが報告された [3]. これらにより、中枢神経系興奮性神経細胞機能とシナプス後部構造であるスパイン形態との強い相関が明らかになってきた.

今回我々は、培養海馬スライス標本における CA1 錐体細胞樹状突起のスパイン収縮がケイジド神経伝達物質を用いた可塑性刺激で誘導できるかを調べた. そのために、我々はグルタミン酸投与の波長 720 nm とは異なる波長 458 nm を用いてケイジド GABA の uncaging も樹状突起の任意の位置で独立に行うシステムを開発した. この新しい3波長 (1-imaging/2-uncaging) システムを用いて、スパイクタイミング依存可塑性刺激 (長期抑圧誘導) 条件を探索した. その結果、グルタミン酸刺激単独では収縮がほとんど生じない

が、GABA 投与を組み合わせることによりスパインの収縮とそれに伴う長期抑圧を効率的に誘導できることを見出した。驚いたことに、このスパイン収縮は近隣のスパインに影響を与え、近隣のスパインも収縮させた。

一方、筆者らは *in vivo* (生体マウス) においてこのケイジド化合物の 2 光子アンケイジング法を適用する方法論をも世界で初めて開発した (図 1) [4]。我々はこの *in vivo* uncaging 法を用いて、young adult マウス大脳皮質 2/3 層錐体細胞の樹状突起のスパインにおいても、スパイン頭部体積と機能的な AMPAR の発現は正に強く相関することを見出した。今回この方法を用いて *in vivo* に

おいてシナプス可塑性が誘導できるか否かを調べたところ、成体マウス大脳皮質 5/6 層錐体細胞の 1 層樹状突起タフトのスパイン収縮を誘導することが成功した。

このように *in vitro* 海馬培養スライスにおいても、*in vivo* マウス大脳皮質においても、任意のシナプスにおいて可塑性の誘導と解析を実施することが可能となった。

1. Matsuzaki M et al: Nat Neurosci 4: 1086-1092, 2001
2. Noguchi J et al: Neuron 46: 609-622, 2005
3. Matsuzaki M et al: Nature 429: 761-766, 2004
4. Noguchi J et al: J Physiol 589: 2447-2457, 2011

## さまざまな脳計測法を用いた脳機能研究の新展開 (S45)

オーガナイザー：竹林 浩秀 (新潟大・医・解剖 2)

柴崎 貢志 (群馬大・医・分子細胞生物学)

### 安定度定数が中程度のマンガンキレートを用いたマンガン造影脳機能画像法

瀬尾芳輝, 佐藤慶太郎, 森田啓之, 鷹股 亮, 渡辺和人, 荻野孝史, 村上政隆 (獨協医大・医・生理 (制御), 岐阜大学院・医・生理, 奈良女子大・生活環境・生活健康, 生理研)

マンガン造影脳機能画像法 (MEMRI) は、脳神経細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活動を捉える functional MRI 法である。血液あるいは脳脊髄液に  $\text{Mn}^{2+}$  を投与すると、脳実質に浸透し脳神経細胞に達する。神経細胞活動に伴い  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルは  $\text{Mn}^{2+}$  を細胞内に取り込む。 $\text{Mn}^{2+}$  は常磁性である。細胞内液の  $T_1$  緩和時間を短縮させ、 $T_1$  強調 MRI 法で神経活動部位を高信号に検出できる。しかし、Koretsky らの原法は、 $\text{MnCl}_2$  溶液を投与するため、循環や脳神経活動を抑制する。 $\text{Mn}^{2+}$  濃度を抑制しつつ、取り込み効率を高めるために、中程度の安定度定数の Mn キレートの利用を検討した。pH 7.4 での安定度定数 ( $\text{pK}_a'$ ) が 2.9 から 6.4 の Mn キレートについて、 $\text{Mn}^{2+}$  濃度を推定した (図 1)。血漿アルブミン (0.7 mM) は  $\text{Mn}^{2+}$  と結合 ( $\text{pK}_B=4.4$ ) するので、血中濃度 0.5-1 mM の Mn-HIDA および Mn-citrate は、生理的範囲内に血中  $\text{Mn}^{2+}$  濃度を押さえられると推定した。

$\text{MnCl}_2$ , Mn-bicine, Mn-citrate, Mn-HIDA を、ラット静脈内に連続投与 ( $8.3 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) し

循環動態への影響を比較検討した。 $\text{MnCl}_2$  では血圧は 90% 程度を保ったが、心拍数は 2/3 に、腎交感神経活動は半減した。3 種のキレートでは大きな変化はみられなかったが、Mn-bicine では腎交感神経活動が増加した。さらに、Mn-citrate, Mn-HIDA では血液脳関門 (BBB) 破壊後も大きな変化は認められなかった。正常な脳では、静脈投与した Mn キレートは BBB をほとんど透過できないが、脳室脈絡叢血管から脳脊髄液に出て、脳室上衣を通り脳実質に入ることを確認した。浸透圧刺激による視索上核 (直径 300  $\mu\text{m}$ ) の神経活動は、Mn-citrate および Mn-HIDA を使い、 $\text{MnCl}_2$  や Mn-bicine と同様に検出できた。

以上より、Mn-citrate と Mn-HIDA は循環系および自律神経系にほとんど影響を及ぼさず、脳室周囲の神経核活動を検出できることが明らかとなった。

1. Lin, Koretsky: Magn Reson Med 38: 378-388
2. Seo et al: Magn Reson Med 65: 1005-1021
3. Seo et al: Contrast Media Mol Imaging (in press)

### 脳内温度依存的な神経活動調節の分子機構解明；局所脳内温度可変装置の開発

柴崎貢志 (群馬大院・医・分子細胞生物学)

温刺激センサーに属する・TRPV4 は 34°C 以上

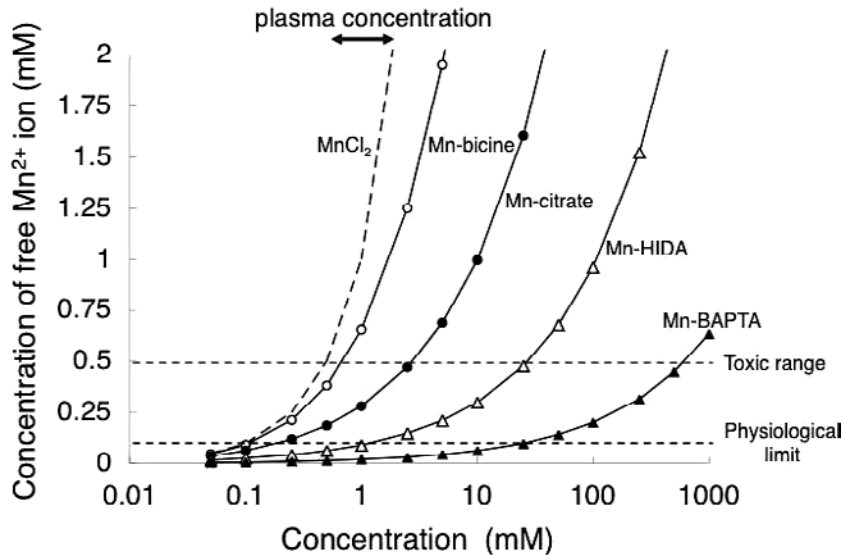
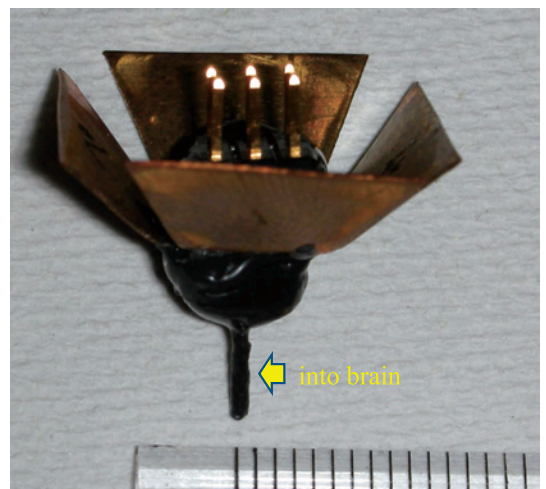


図1. Mn-bicine ( $pK_a' = 2.9$ ), Mn-citrate (4.0), Mn-HIDA (5.0), Mn-BAPTA (6.4) の溶液 (pH 7.4) の  $Mn^{2+}$  イオン濃度。

で活性化する温度センサーであり、我々の皮膚において温刺激を感知していると考えられている。発表者は、脳における TRPV4 発現を詳細に調べ、海馬にも高発現をしていることを発見し、その結果、 $37^{\circ}C$  近傍に保たれている脳内温度により海馬 TRPV4 が恒常的に活性化し、神経興奮性を向上させていることを見いだした (Shibasaki et al., J. Neurosci. 2007)。このことは、脳内温度に依存した神経細胞の興奮性調節機構が存在することを示しており、鳥類・哺乳類が高度な知能を有し得る分子機構のひとつだと考えられる。実際に、TRPV4KO マウスの行動実験をした場合に、解剖形態学的な脳の異常は全く認められないものの、神経活動に異常をきたし、行動異常が観察された (投稿中)。

しかしながら、上記の実験だけでは、脳内において TRPV4 が脳内温度エネルギーにより活性化しているのか、あるいはその他の内在性リガンドにより活性化しているのかが不明である。TRPV4 が脳内温度エネルギーにより活性化していることを示すには、*in vivo* で脳を冷却し、TRPV4 の活性化温度閾値 ( $34^{\circ}C$ ) 以下の環境を作り出した場合に神経興奮性がどのように変化するかを調べる他はない。既存の実験機器ではこの実験が不可能であったため、発表者は民間企業と共同で脳内埋め込み型の温度可変システムを開発した (柴崎ら、特許出願中)。この機器を野生型と TRPV4KO



柴崎貢志ら、特許出願中 (特願2010-225210)

図. 脳内埋め込み型の局所温度可変プローブ  
柴崎貢志ら、特許出願中 (特願 2010-225210)

マウスの脳内に埋め込み、脳内温度を  $37^{\circ}C$  から  $32^{\circ}C$  へと冷却したところ、野生型マウスの神経活動は著しい低下を示した。一方、TRPV4KO ではそのような著しい低下を示さないことが分かった。つまり、正常時には TRPV4 が脳内温度エネルギーを電気信号に変換し、これにより神経活動

がポジティブな制御を受けていることがクリアーに証明された。

新たに開発した脳内温度可変システム (図) は、病態時の神経活動を正常化することに役立つ可能性が高い。そこで、部分てんかんモデルマウスを用いて、てんかん発作に対する脳内冷却効果を検討したところ、この装置を用いた冷却でてんかん発作が完全に抑制出来ることが明らかになった。現在、民間企業と医療機器としての開発を進行中である。産学官連携により、生理学の知見を応用した次世代医療器具を開発予定である。

### 急性および慢性的病態生理揺動における体性感覚野大脳皮質のインビボ形態と微小循環の経時的計測

菅野 巖 (放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター)

二光子レーザー顕微鏡はインビボで脳表から深さ約1ミリ程度までの3次元画像を測定できる方法である。我々は慢性的に安定する閉塞法を開発し、スルフォローダミン101 (SR101) を腹腔投与後の計測と見合わせることでマウス大脳皮質内の血管とグリア細胞の病態生理を慢性的に追跡できる方法を開発した。この方法を使って慢性的に低酸素に暴露したマウスの大脳皮質の血管形態と賦活刺激への反応性を経時的に測定すると、脳実質部の毛細血管は低酸素暴露1週間で拡張していたが、LDFで測定したひげ刺激による脳血流反応性は暴露前の20%程度から低酸素暴露期間とともに低下して1か月で5%以下に低下した。この原因を探るため、CO<sub>2</sub>に対する脳血流反応性の測定では血管拡張性が保たれており血流増加能は低下していないこと、また一方、膜電位に反応して蛍光を発するVSDで染色して観察するとひげ刺激時の神経活動は保たれていることを確認し、これらのことから賦活に対する血管反応性の低下は神経賦活の信号が脳血管に伝達されないためだと解釈できた。また、APP23 遺伝子改変マウスを追跡測定するとアミロイドの動脈への沈着は月齢に応じて増加した。ひげ刺激による神経血管反応性は、15~17か月齢でアミロイド沈着に対応して低下し、アミロイドの沈着と脳血管反応性の低下に優位な関係があると考えられたが、その機序についてはまだ詳細は今後の研究によっている。二光子顕微鏡は正常マウスの毛細血管経の変化を測定できるので大脳皮質におけるひげ刺激に対する脳表血管および穿通枝血管の血管拡張反応性の時間的・空間的分布を検討した。穿通枝動脈ではひげ刺激に対する反応領域は500 $\mu$ mの範囲にとどまっ

ていたが、脳表動脈は2mm以上の広い領域まで広がって拡張していることが示された。時間的には穿通枝動脈が最初に拡張し、その後、少し遅れて脳表動脈が拡張した。レーザードプラー血流量計 (LFD) で測定される血流反応性は毛細血管および広範囲の血管の血流を反映していると考えられるが、脳表動脈よりさらに遅延した。これらの研究から、刺激賦活時の神経活動と血管拡張のカブリングは神経活動信号が血管に伝達することにより起こるが、その信号伝達メカニズムが途切れた時に反応性が低下する。その仕組みはこれからの研究に依存する。

### マクロ共焦点顕微鏡によるマウス単一皮質ニューロン活動のフラビン蛋白蛍光イメージング

澁木克栄 (新潟大学脳研究所システム脳生理学分野)

脳機能の光学イメージングには、色素や蛍光蛋白質を用いる方法があるが、外来物質を均一に再現性よく脳に導入することは簡単ではない。さらに退色が生じ、光学信号と脳活動が比例しなくなる。また、外来物質で何らかの異常が生じる可能性もある。一方、内因性信号を用いるイメージング法もある。例えば脳活動により酸素代謝が亢進すると、血中ヘモグロビンが還元型になり、その色調変化を吸光変化として測定できる。しかし血液由来の信号では、単一ニューロン活動を可視化できない。

酸素代謝は内因性蛍光の変化も起こす。ミトコンドリア電子伝達系のフラビン蛋白は酸化状態になった時のみ、青い励起光の下で緑色蛍光を発する。神経細胞が興奮すると、細胞内のCa濃度が高まり、ミトコンドリアの電子伝達系が活性化され、酸化型のフラビン蛋白が増加し、緑色蛍光が増加する。この蛍光変化を記録すれば、脳機能イメージングが可能となる [1]。フラビン蛋白蛍光はニューロンに由来するので、単一ニューロン活動を可視化できるはずである。しかも光変性したフラビンは新たに生合成された分子と置換されるので [2]、退色に強い。

微弱なフラビン蛋白蛍光シグナルを記録するには冷却 CCD カメラが使われる。しかし、通常のカメラは深さ方向の分解能がないため、重なり合ったニューロン由来の信号を分離できない。しかし、最近焦点深度の深いマクロレンズと共焦点ユニットを組み合わせたマクロ共焦点顕微鏡が開発された。マクロ共焦点顕微鏡で経頭蓋的にマウス体性感覚野の皮膚振動刺激に対する応答を解析したところ、フラビン蛋白蛍光応答を断層的に記

録できた。また浅い層で倍率を上昇させていくと、単一ニューロンの細胞体に相当する大きさの粒子状応答パターンを観察した。この一個一個の粒子がニューロンの細胞体由来かどうかは、各粒子が単一ニューロン由来の応答特異性を示すかどうかで判定できる。

体性感覚野では刺激の始まりと終わりに応答する ON-OFF ニューロンと刺激の持続中応答する持続ニューロンとが存在する。冷却 CCD カメラでは、両者を分離することはできないが、マクロ共焦点光学系で記録した粒子状の応答では、ON-OFF 応答パターンと持続応答パターンとを明確に区別することが出来た。また視覚野ニューロンは方位選択性を示すことが知られているが、これまで冷却 CCD カメラでは視覚野応答の方位選択性を示すことができなかった。しかしマクロ

共焦点顕微鏡で記録した粒子状の応答は、明確な方位選択性を示した。

フラビン蛋白蛍光イメージングは、ヒトの摘出脳組織の解析 [3] や、交差神経移植後2か月経過したマウス体性感覚野応答の解析 [4] などにも使われているが、確実にデータを得たい実験において、特別な染色を必要としないで単一ニューロンレベルのイメージングができる本方法は大きな価値があると思われる。

1. Shibuki K et al: J Physiol (Lond) **549**: 919-927, 2003
2. Kubota Y et al: Neurosci Res **60**: 422-430, 2008
3. Kitaura H et al: Neuroimage **58**: 50-59, 2011
4. Yamashita H et al: PLoS ONE **7**: e35676, 2012