

東京大学大学院医学系研究科 教授

飯野 正光

「カルシウムシグナル研究の先端的手法による展開」

1. 研究実施の概要

1.1 基本構想

カルシウムは、収縮、分泌、発生・分化、細胞増殖、免疫から学習・記憶まで極めて多彩でかつ重要な細胞機能を制御するシグナル分子である。細胞外から流入したり、あるいは細胞内ストアから放出されるカルシウムの細胞内濃度は、精緻な制御機構によって目的に応じた空間分布と時間変化をするように調節される。カルシウムシグナリングに關与する分子群については断片的な情報が得られているが、それらがどのように協同的に働くか、また生理的な構築を維持した細胞系における機能については未知の領域が広がっている。

本研究では、二光子励起法、カルシウムストア内腔のカルシウムイメージング、ケージド化合物法、ジーンターゲット法などの先端的研究方法を組み合わせることにより、シナプス可塑性、分泌、免疫および収縮制御といった重要な生理機構におけるカルシウムシグナルを細胞と組織レベルで追究する。これによりカルシウムシグナル研究を飛躍的に発展させる先駆的・独創的なプロジェクトである。(初年度申請書より)

1.2 研究成果の概要

カルシウム放出チャネルの分子機構を様々な観点から明らかにするとともに、カルシウムシグナルに關わる新たな分子群を発見した。また、画期的な研究法として、細胞内 IP_3 濃度の実時間測定法と、二光子励起顕微鏡法を用いた分泌機構観測系を確立して、新たな発見を行った。以上の成果により、中枢神経細胞、筋細胞、B細胞、外分泌腺細胞などにおけるカルシウムシグナル機構の分子メカニズムの理解を格段に進め、カルシウムシグナルと生理機能との関連を明らかにした。

このように、当初の基本構想に沿って成果をあげることができた。その結果 Science 3報、Cell 1報、EMBO J. 5報を初めとして一流誌へ多数の論文を発表した。また、 IP_3 濃度測定法を新たに開発するなど初期には予測しなかった展開もあり、シグナル伝達機構に新たな研究分野の展望を提供した。

1.3 研究成果のまとめ

IP_3 受容体機能：サブタイプ特異性、カルシウムセンサー部位の解明

IP_3 濃度イメージング法の開発、 IP_3 オシレーション/ウエーブの発見

B細胞のカルシウム流入経路抑制メカニズムの解明

血管組織におけるカルシウムリプルの発見

リアノジン受容体のノックアウトマウスによる機能解析

新規分子ジャンクトフィリンの発見

二光子励起法による開口放出の逐次充填機構の発見

インスリン放出のキス&ラン機構

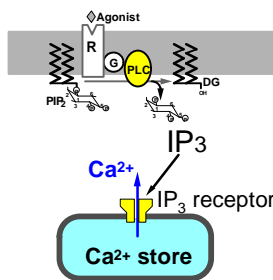
樹状突起スパイン上のグルタミン酸受容体濃度の三次元マッピング

小脳プルキンエ細胞の長期抑圧へのリアノジン受容体と IP_3 受容体の関与

グルタミン酸受容体の機能に対する細胞外カルシウムの影響

1.4 サブグループ毎の研究実施の概要

(1) 飯野サブグループ



カルシウムシグナルが、様々な細胞機能制御に関与する理由には、このシグナルが、細胞内で多様な時間的・空間的な分布をつくり出すことが可能であることが挙げられる。このようなカルシウムシグナル形成に“IP₃・IP₃受容体系”は重要な役割を果たしている。その分子基盤の追究を中心課題に据えて研究を進めた。

IP₃受容体は3つの遺伝子に由来するサブタイプが存在し、組織依存性に発現パターンが異なる。我々は、初めてサブタイプ毎のカルシウム放出機能を比較することに成功し、IP₃受容体サブタイプ間に重要な機能的差異が存在しており、組織ごとに異なるカルシウムシグナルをつくり出す分子基盤となることを突き止めた。また、IP₃受容体はカルシウムによるフィードバック制御を受けるが、そのカルシウムセンサー部位をIP₃分子上に同定することに成功した。さらに、単一アミノ酸置換によってカルシウムセンサー機能を低下させることにより、カルシウムシグナル形成に著しい影響が生じることを明らかにした(図1)。これは、カルシウムセンサーを介するフィードバック制御により、IP₃受容体を介するカルシウムシグナルが様々な細胞機能制御に適応できるようになることを示している。

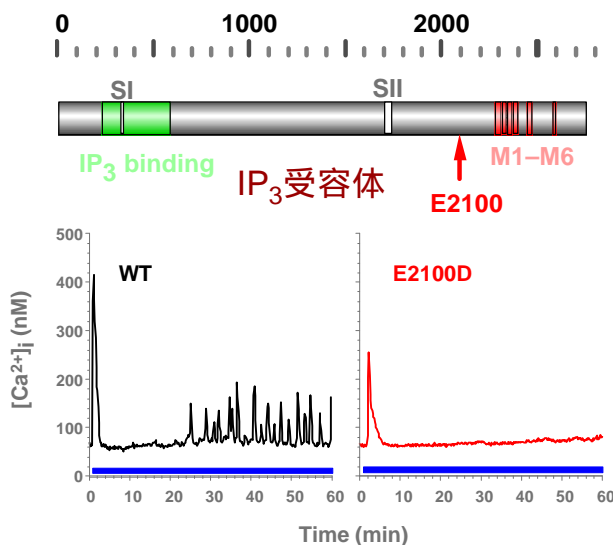


図1.(上) IP₃受容体1型の構造の模式図。グルタミン酸2100がカルシウムセンサーとして機能する。(下)カルシウムセンサー部位にアミノ酸置換をいれることによって、カルシウムセンサー機能を低下させると、B細胞受容体を介するカルシウムオシレーションが消失する。

IP₃受容体上流のシグナル伝達機構についても解明するため、細胞内IP₃濃度の変動を単一細胞レベルで実時間測定できるシステムを開発することに成功した。これにより、IP₃自身も時間的・空間的分布をすることを初めて明らかにした(図2)。現在、この方法を中枢神経細胞に適用しており、新たなIP₃シグナル系の存在を示唆する結果を得ている。また、細胞内シグナル可視化法の先鞭をつけるこの研究は、シグナル伝達機構研究に強い影響を与えている。

カルシウムシグナルのダイナミクスがどのような生理的意義を持つかについても解析を進め、血管平滑筋において自発的なカルシウムオシレーション(カルシウムリップル)を発見した。また、B細胞においてB細胞受容体刺激に引き続くカルシウムシグナルが、SHIPやLynを介して、負のフィードバック制御を受けていることを明らかにした。さらに、悪性高熱症の

原因となるリアノジン受容体遺伝子上の変異を発見した。

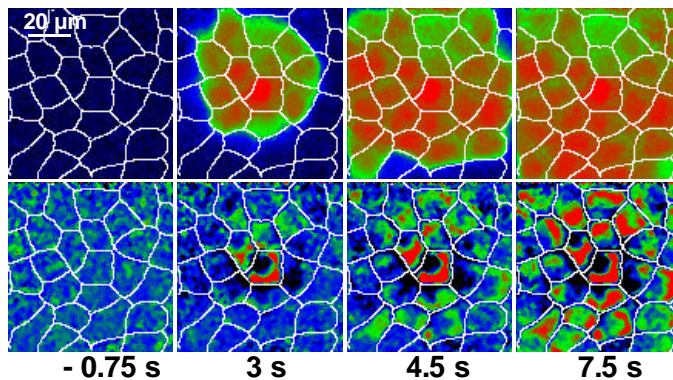
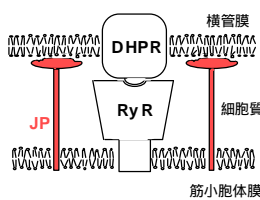


図2 .(上) 視野中央の細胞の機械刺激に応じた細胞間カルシウムウエーブ。(下) カルシウムウエーブに対応した、細胞内 IP_3 濃度変化の細胞間ウエーブ。

(2) 竹島サブグループ



興奮性細胞のカルシウムシグナリングでは、リアノジン受容体を介する細胞内ストアからのカルシウム放出が重要な役割を有する。我々は、リアノジン受容体の生理機能及びその細胞内局在を規定する分子の同定に関する研究を遂行した。主要な研究成果として、(1)心筋・骨格筋においてリアノジン受容体のカルシウム放出は細胞障害を引き起こす細胞内

ストアのカルシウム過剰貯留を抑制する生理機能を有すること、(2)シナプトフィジンファミリーに属するミツグミン 29 は、骨格筋において三つ組構造(表層膜と筋小胞体膜が近接する骨格筋の結合膜構造)周囲の精巧な膜構築の形成を規定すること、(3)ジャンクトフィリン(JP)は表層膜と特異的に結合し小胞体膜を貫通することにより、結合膜構造の形成に寄与する分子であることなどを明らかにした。

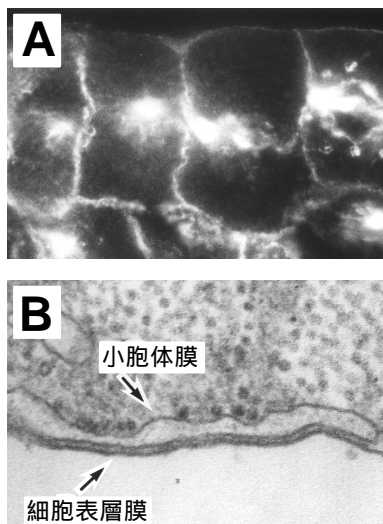
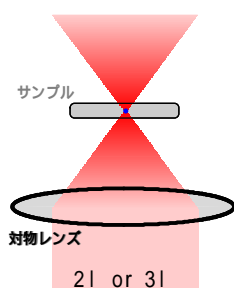


図3 . 両性類初期胚での JP-1 の機能発現
A 試験管内合成した mRNA を注入後、発現した JP-1 の細胞内分布を抗体を用いて観察した。細胞膜近傍に特異的に発現していることが示されている。B これらの細胞の電子顕微鏡観察では細胞膜と小胞体膜が近接した結合膜構造を形成していることが示された。

(3) 河西サブグループ



二光子励起顕微鏡法はまだ多くの新しい可能性を秘めた21世紀の顕微鏡法であり、我々のグループは、この顕微鏡法を新しいアプローチで新しい標本に適用して、カルシウム依存性細胞機能研究のブレークスルーとなる研究を行うことを企画した。実際、こうして外分泌腺のカルシウム依存性開口放出が初めて可視化された結果、開口放出した分泌顆粒の構造が極めて安定で、逐次充填という機構で、開口放出が、腺腔を拡張しながら細胞内に進むことを解明した(図4)。

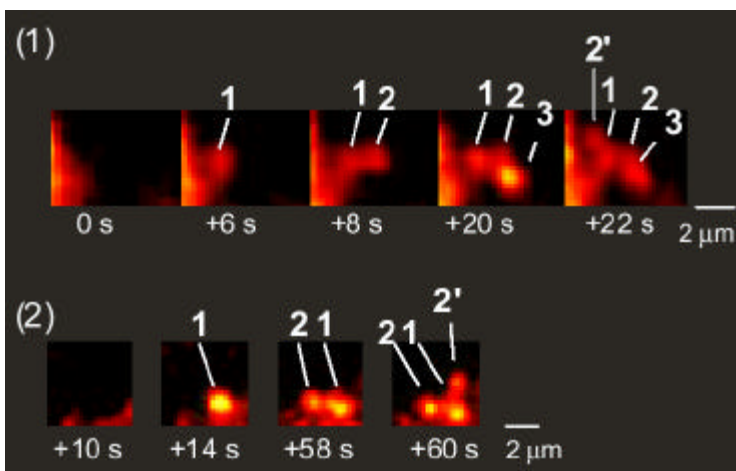


図4 . 二光子励起顕微鏡法による、膵外分泌腺細胞の逐次開口放出の可視化。

一方、膵臓ランゲルハンス島においてベータ細胞のインスリン顆粒の開口放出が初めて可視化された結果、開口放出は血管に面した細胞膜だけでなく、ほぼ細胞全周囲で起きること、開口放出した構造は極めて不安定で2-3秒で細胞膜に平滑化するなど、細胞表面を最も有効に利用した様式をとることが明らかとなった。この様な開口放出様式の多様性はアクチン細胞骨格が維持している可能性が高い。

また、二光子励起法をケイジドグルタミン酸に応用することにより、脳スライス標本内の中枢神経細胞樹状突起に、シナプス前終末がするのとほぼ同等な時間的空間的分布で、グルタミン酸を投与することに初めて成功した。この手法を用いて得られた機能的なグルタミン酸受容体の分布(図5)はスパインの種類により異なり、シナプスの重みは樹上突起スパインの形態に蓄積される可能性が示唆された。

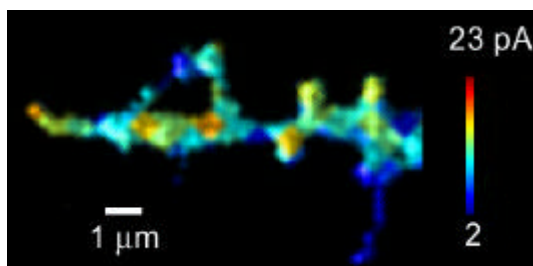
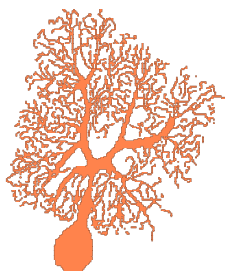


図5 . 海馬錐体細胞樹状突起のグルタミン酸感受性の空間的分布の三次元構築

(5) 狩野サブグループ



中枢神経系のニューロンは樹状突起、細胞体、軸索、シナプス終末から成る複雑な構造をしており、それぞれが伝達物質の受容とシナプス電位の発生、興奮性の決定と活動電位発生、活動電位の伝導、伝達物質放出など高度に機能分化している。細胞内カルシウムはこれらのすべてにおいてきわめて重要な役割を演じている。したがって、これらの機能を解明するためには、ニューロンのそれぞれの部位における局所カルシウムシグナルの性質とその制御機構を明らかにすることが不可欠である。本研究においては、シナプス伝達の修飾と可塑性の機構を明らかにするために、小脳プルキンエ細胞をモデルとして、樹状突起における局所カルシウムシグナルについて調べた。

樹状突起の細胞内カルシウムストアは、興奮性シナプス活動に伴う細胞外から流入するカルシウムによって充填され、リアノジン受容体を介する細胞質への漏出によって調節されることが分かった。また、小脳のシナプス可塑性(長期抑圧)誘発には、プルキンエ細胞樹状突起スパイン内部における局所カルシウム放出が不可欠であることが明らかになった(図6)。また、培養プルキンエ細胞を用いてニューロンの生存とカルシウムシグナルとの関係を調べた。培養中枢ニューロンの生存にとって、アミノ酸のセリン/グリシンが培地に存在することが不可欠である。その作用のひとつとして、AMPA型グルタミン酸受容体活性化による脱分極を抑制しプルキンエ細胞の過剰なカルシウムオシレーションを抑制することが明らかになった。さらに、細胞内カルシウム放出を引き起こすことで知られる代謝型グルタミン酸受容体タイプ1(mGluR1)のグルタミン酸に対するdynamic rangeが細胞外カルシウムによる影響を受け、生理的細胞外カルシウム濃度では、これが非常に広く、シナプス間隙の広い範囲のグルタミン酸濃度の変化に反応できることが判明した。

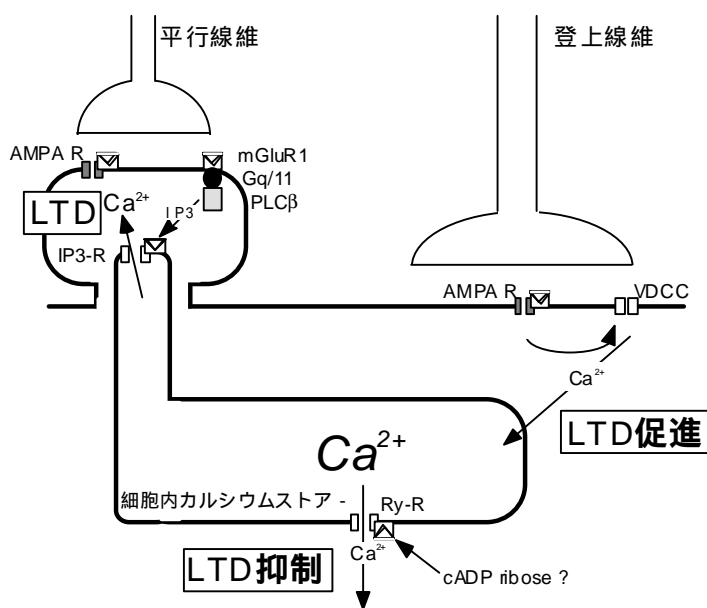


図6 . 小脳プルキンエ細胞における長期抑圧(LTD)のカルシウムによる制御機構。カルシウムストアからのカルシウム放出、ストア内のカルシウム充填量の調節によって、LTDは制御される。

2 . 主な研究成果

(1)論文発表 (海外61件, 国内5件)

英文原著論文

1. Yamazawa, T., Takashima, H., Shimuta, M. and Iino, M., A region of ryanodine receptor critical for excitation-contraction coupling in skeletal muscle., **Journal of Biological Chemistry**, 272:8161-8164, (1997)
2. Ikemoto, T, Komazaki, S., Takeshima, H., Nishi, M., Noda, T., Iino, M. and Endo, M., Functional and morphological features of skeletal muscle from mutant mice lacking both type 1 and type 3 ryanodine receptors., **Journal of Physiology**, 501:305-312, (1997)
3. Kasai, Y., Yamazawa, T., Sakurai, T., Taketani, Y. and Iino, M., Endothelium-dependent frequency of Ca^{2+} signalling in individual vascular smooth muscle cells of the rat., **Journal of Physiology**, 504:349-357, (1997)
4. Offermanns, S., Hashimoto, K., Watababe, M., Sun, W., Kurihara, H., Thompson, R.F., Inoue, Y., Kano, M. and Simon, M.I., Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking Gαq., **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 94:14089-14094, (1997)
5. Kurihara, H., Hashimoto, K., Kano, M., Takayama, C., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y. and Watanabe, M., Impaired parallel fiber Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor $\delta 2$ subunit., **Journal of Neuroscience**, 17:9613-9623, (1997)
6. Ito, K., Miyashita, Y. and Kasai, H., Micromolar and submicromolar Ca^{2+} spikes regulating distinct cellular functions in pancreatic acinar cells., **EMBO Journal**, 16:242-251, (1997)
7. Ninomiya, Y., Kishimoto, T., Yamazawa, T., Ikeda, H., Miyashita, Y. and Kasai, H., Kinetic diversity in the fusion of exocytotic vesicles., **EMBO Journal**, 15:929-934, (1997)
8. Takahashi, N., Kadowaki, T., Yazaki, Y., Miyashita, Y. and Kasai, H., Multiple exocytotic pathways in pancreatic β cells., **Journal of Cell Biology**, 138:55-64, (1997)
9. Hirose, K., Kadowaki, S. and Iino, M., Allosteric regulation by cytoplasmic Ca^{2+} and IP_3 of the gating of IP_3 receptors in permeabilized guinea pig vascular smooth muscle cells., **Journal of Physiology**, 506:407-414, (1998)
10. Takeshima, H., Shimuta, M., Komazaki, S., Ohmi, K., Nishi, M., Iino, M., Miyata, A. and Kangawa, K., Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle., **Biochemical Journal**, 331:317-322, (1998)
11. Takeshima, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T. and Iino, M., Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2., **EMBO Journal**, 17:3309-3316, (1998)
12. Watase, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Sakagawa, T., Ogawa, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. and Tanaka, K., Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice., **European Journal of Neuroscience**, 10:976-988, (1998)
13. Hashimoto, K. and Kano, M., Presynaptic origin of paired-pulse depression at climbing fibre-Purkinje cell synapses in the rat cerebellum., **Journal of Physiology**, 506:391-405, (1998)
14. Shimuta, M., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., Nakagawara, K. and Takeshima, H., Structure and expression of mitsugumin29 gene., **FEBS Letters**, 431:263-267, (1998)
15. Nishi, M., Komazaki, S., Iino, M., Kangawa, K. and Takeshima, H., Mitsugumin23, a novel transmembrane protein on endoplasmic reticulum and nuclear membranes., **FEBS Letters**, 432:191-196, (1998)
16. Watanabe, M., Nakamura, M., Sato, K., Kano, M., Simon, M.I. and Inoue, Y., Patters of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase C β in mouse brain., **European Journal of Neuroscience**, 10:2016-2025, (1998)
17. Ikemoto, T., Takeshima, H., Iino, M. and Endo, M., Effect of calmodulin on Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release of skeletal muscle from mutant mice expressing either ryanodine receptor type1 or type 3., **Pflügers Archiv**, 437:43-48, (1998)
18. Watanabe, D., Inokawa, H., Hashimoto, K., Suzuki, N., Kano, M., Shigemoto, R., Hirano, T., Toyama, K., Kaneko, S., Yokoi, M., Moriyoshi, K., Suzuki, M., Kobayashi, K., Nagatsu, T., Kreitman, R.J., Pastan, I. and Nakanishi, S.,

- Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination., **Cell**, 95:17-27, (1998)
19. Kano, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., Kurihara, H., Offemans, S., Jiang, H., Wu, Y., Jun, K., Shin, H., Inoue, Y., Simon, M.I. and Wu, D., Phospholipase C 4 is specifically involved in climbing fiber synapse elimination in the developing cerebellum., **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 95:15724-15729, (1998)
 20. Okada, H., Bolland, S., Hashimoto, A., Kurosaki, M., Kabuyama, Y., Iino, M., Ravetch, J.V. and Kurosaki, T., Cutting edge: role of the inositol phosphatase SHIP in B cell receptor-induced Ca^{2+} oscillatory response., **Journal of Immunology**, 161:5129-5132, (1998)
 21. Tsubokawa, H., Miura, M. and Kano, M., Elevation of intracellular Na^+ induced by hyperpolarization at the dendrites of pyramidal neurones of mouse hippocampus., **Journal of Physiology**, 517:135-42, (1999)
 22. Maeda, H., Ellis-Davies, G.C.R., Ito, K., Miyashita, Y. and Kasai, H., Supralinear Ca^{2+} Signaling by Cooperative and Mobile Ca^{2+} Buffering in Purkinje Neurons., **Neuron**, 24:989-1002, (1999)
 23. Kasai, H. and Takahashi, N., Multiple kinetic components of the Ca^{2+} requirements of exocytosis., **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B**, 354:331-335, (1999)
 24. Takahashi, N., Kadowaki, T., Yazaki, Y., Ellis-Davies, G.C.R., Miyashita, Y. and Kasai, H., Post-priming actions of ATP on Ca^{2+} -dependent exocytosis in pancreatic β -cells., **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 96:760-765, (1999)
 25. Kasai, H., Kishimoto, T., Liu, T., Miyashita, Y., Podini, P., Grohovaz, F. and Meldolesi, J., Multiple and diverse forms of regulated exocytosis revealed in wild-type and defective PC12 cells., **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 96:945-949, (1999)
 26. Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., Akanuma, Y., Aizawa, S., Kasai, H., Yazaki, Y. and Kadowaki, T., Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion., **Science**, 283:981-985, (1999)
 27. Miyakawa, T., Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T. and Iino, M., Encoding of Ca^{2+} signals by differential expression of IP_3 receptor subtypes., **EMBO Journal**, 18:1303-1308, (1999)
 28. Hashimoto, A., Hirose, K., Okada, H., Kurosaki, T. and Iino, M., Inhibitory modulation of B cell receptor-mediated Ca^{2+} mobilization by Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP)., **Journal of Biological Chemistry**, 274:11203-11208, (1999)
 29. Miyata, M., Okada, D., Hashimoto, K., Kano, M. and Ito, M., Corticotropin-releasing factor plays a permissive role in cerebellar long-term depression., **Neuron**, 22:763-775, (1999)
 30. Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H. and Iino, M., Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca^{2+} mobilization patterns., **Science**, 284:1527-1530, (1999)
 31. Hirabayashi, T., Kume, K., Hirose, K., Yokomizo, T., Iino, M., Itoh, H. and Shimizu, T., Critical duration of intracellular Ca^{2+} response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2., **Journal of Biological Chemistry**, 274:5163-5169, (1999)
 32. Asada, Y., Yamazawa, T., Hirose, K., Takasaka, T. and Masamitsu, I., Dynamic Ca^{2+} signaling in rat arterial smooth muscle cells under the control of local renin-angiotensin system., **Journal of Physiology**, 521:497-505, (1999)
 33. Hirose, K., Takeshima, H. and Iino, M., Fluorescent indicators for inositol 1,4,5-trisphosphate based on bioconjugates of pleckstrin homology domain and fluorescent dyes., **Analytical Communications**, 36:175-177, (1999)
 34. Inoue, T., Kikuchi, K., Hirose, K., Iino, M. and Nagano, T., Synthesis and elevation of 1-position-modified inositol 1,4,5-trisphosphate analogs., **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 9:1697-1702, (1999)
 35. Nishi, M., Komazaki, S., Kurebayashi, N., Ogawa, Y., Noda, T., Iino, M. and Takeshima, H., Abnormal features in skeletal muscle from mice lacking Mitsugumin 29, **Journal of Cell Biology**, 147:1473-1480, (1999)
 36. Ito, K., Miyashita, Y. and Kasai, H., Kinetic control of multiple forms of Ca^{2+} spikes by inositol trisphosphate in pancreatic acinar cells., **Journal of Cell Biology**, 146:405-413, (1999)
 38. Eto, K., Suga, S., Wakui, M., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Taka, J., Aizawa, S., Noda, M., Kimura, S., Kasai, H. and

- Kadowaki, T., NADH shuttle system regulates KATP channel-dependent pathway and steps distal to cytosolic Ca²⁺ concentration elevation in glucose-induced insulin secretion., **Journal of Biological Chemistry**, 274:25386-25392, (1999)
37. Hashimoto, K., Fukayama M., Qiao, X., Sakimura, K., Watanabe, M. and Kano, M., Impairment of AMPA receptor function in cerebellar granule cells of ataxic mutant mouse Stargazer., **Journal of Neuroscience**, 19:6027-6036, (1999)
 38. Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M. and Kangawa, K., Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins., **Molecular Cell**, 6:11-22, (2000)
 39. Kobayashi, K., Yukihiro, N., Matsushita, N., Nishi, K. Sawada, H., Nagatsu, T., Nakahara, D., Fukabori, R., Yasoshima, Y., Yamamoto, T., Miura, M., Masanobu, K., Mamiya, T., Miyamoto, Y. and Nabeshima, T., Modest neuro-psychological deficits caused by reduced noradrenaline metabolism in mice heterozygous for a mutated tyrosine hydroxylase gene., **Journal of Neuroscience**, 20:2418-2426, (2000)
 40. Ohno-Shosaku, T., Sawada, S. and Kano, M., Heterosynaptic expression of depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in rat hippocampal cultures., **Neuroscience Research**, 36:67-71, (2000)
 41. Ichise, T., Kano, M., Hashimoto, K., Yanagihara, D., Nakano, K., Shigemoto, R., Katsuki, M. and Aiba, A., mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination and motor coordination., **Science**, 288:1832-1835, (2000)
 42. Kakizawa, S., Yamasaki, M., Watanabe, M. and Kano, M., Critical period for activity-dependent synapse elimination in developing cerebellum., **Journal of Neuroscience**, 20:4954-4961, (2000)
 43. Tsubokawa, H., Offermanns, S., Simon, M. and Kano, M., Calcium-dependent persistent facilitation of spike backpropagation in the CA1 pyramidal neurons., **Journal of Neuroscience**, 20:2878-2884, (2000)
 44. Furuya, S., Tabata, T., Mitoma, J., Yamada, K., Yamasaki, M., Makino, A., Yamamoto, T., Watanabe, M., Kano, M. and Hirabayashi, Y., L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons., **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 97:11528-11533, (2000)
 45. Miyata, M., Finch, E.A., Khiroug, L., Hashimoto, K., Hayasaka, S., Oda, S., Inouye, M., Takagishi, Y., Augustine, G.J. and Kano, M., Local calcium release in dendritic spines required for long-term synaptic depression., **Neuron**, 28:233-244, (2000)
 46. Nemoto, T., Kimura, R., Ito, K., Tachikawa, A., Miyasita, Y., Iino, M. and Kasai, H., Sequential Replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini., **Nature Cell Biology**, 3:253-258, (2001)
 47. Hashimoto, A., Hirose, K., Kurosaki, T. and Iino, M., Negative control of store-operated Ca²⁺ influx by B cell receptor cross-linking., **Journal of Immunology**, 166:1003-1008, (2001)
 48. Miyakawa, T., Mizushima, A., Hirose, K., Yamazawa, T., Bezprozvanny, I., Kurosaki, T. and Iino, M., Ca²⁺-sensor region of IP₃ receptor controls intracellular Ca²⁺ signalling., **EMBO Journal**, 20 : 1674-1680, (2001)
 49. Kishimoto, T., Liu, T., Ninomiya, Y., Takagi, H., Yoshioka, T., Ellis-Davies G.C.R., Miyashita, Y., Kasai, H., Ion selectivities of the Ca²⁺ sensors for exocytosis in rat pheochromocytoma cells, **Journal of Physiology**, in press.
 50. Takahashi, N., Nemoto, T., Kimura, R., Tachikawa, A., Miwa, A., Okado, H., Miyashita, Y., Iino, M., Kadowaki, T. and Kasai, H., Two-photon excitation imaging of pancreatic islet with various fluorescent probes, **Diabetes**, in press,

英文総説

1. Kasai, H., Comparative biology of Ca²⁺ dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function., **Trends in Neurosciences**, 22:88-93, (1999)
2. Iino, M., Dynamic regulation of intracellular calcium signals through calcium release channels., **Molecular and Cellular Biochemistry**, 190:185-190, (1999)
3. Hashimoto, K., Offermanns, S., Simon, M.I. and Kano, M., Electrophysiological evidence that Gα_q is required for climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development., **Keio University Symposia for Life Science and Medicine** Vol. 2, Springer-Verlag, Tokyo, 394-398, (1999),
4. Iino, M., Molecular aspects of the excitation-contraction coupling in skeletal muscle., **Japanese Journal of**

Physiology, 82:15-20, (2000)

5. Iino, M., Molecular basis of spatio-temporal dynamics in inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} signalling., **Japanese Journal of Pharmacology**, 82:15-20, (2000)
6. Miyata, M. and Kano, M., Corticotropin releasing factor (CRF) induces persistent depression of parallel fiber to Purkinje cell synaptic transmission., **Slow Synaptic Responses and Modulation**. K. Kuba & H. Higashida,(eds), Springer-Verlag, Tokyo, 315-317, (2000),
7. Hashimoto, K. and Kano, M., Paired-pulse depression of and mGluR-mediated modulation of cerebellar climbing fiber synapses., **Slow Synaptic Responses and Modulation**. K. Kuba & H. Higashida, (eds), Springer-Verlag, Tokyo, 268-270, (2000),
8. Kano, M. and Hashimoto, K., Signal transduction cascade from mGluR1 to PKC γ is involved in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development., **Slow Synaptic Responses and Modulation**. K. Kuba & H. Higashida,(eds), Springer-Verlag, Tokyo, 333-340, (2000),
9. Kano, M., Miyata, M., Hashimoto, K. and Ito, M., Endogenous corticotropin-releasing factor(CRF) is required for the induction of cerebellar long-term depression., **Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia**. T. Kato,(ed), Excerpta Medica International Congress Series 1200, Elsevier, 11-14, (2000),
10. Iino, M., Regulation of IP $_3$ receptor Ca^{2+} release channels., **Handbook of Experimental Pharmacology**, 147:605-623, (2000),
11. Kasai, H., Suzuki, T., Kishimoto, T., Liu, T., Takahashi, N., (2001). Fast and cAMP-sensitive mode of Ca^{2+} -dependent exocytosis in pancreatic β cells. **Diabetes**, in press.

和文総説

1. 狩野 方伸、橋本 浩一、小脳の運動学習とシナプス可塑性、**神経精神薬理**, 19:1137-1143, (1997)
2. 狩野 方伸、シナプスに関するトピックスと今後の方向性、**無敵のバイオテクニカルシリーズ/脳・神経研究の進め方** 羊土社, 124-127, (1998)
3. 狩野 方伸、小脳登上線維シナプス成熟に關与するシグナル伝達系、**小脳/神経科学の基礎と臨床 VII** プレーン出版, 21-37, (1999)
4. 根本 知己、河西 春郎、細胞内 Ca^{2+} 濃度・開口分泌の同時蛍光観察、**細胞機能、顕微鏡活用術フルイラス** トレイティッド(細胞工学別冊) 秀潤社、 p137-141, (2001)
5. 高橋倫子、門脇 孝、河西春郎、A-キナーゼとインスリン分泌、**分子糖尿病学の進歩** 金原出版, 20-27, (2001)

(2)口頭発表
招待、口頭講演（国際学会 12 件、国内学会 32 件）

国際学会

1. Iino, M., Amplification of Ca^{2+} signals by intracellular Ca^{2+} release channels., Toyobo Symposium, Tokyo, Japan, 1997 年 3 月 18 日
2. Iino, M., Subtype specificity in intracellular calcium release channels., Gordon Research Conference on Muscle, New London, USA, 1997 年 6 月 12 日
3. Iino, M., Ca^{2+} signalling in vascular smooth muscle cells and its regulation by endothelium., FASEB Summer Research Conference (Fred Fay Smooth Muscle Conference), Copper Mountain, Colorado, USA, 1997 年 6 月 26 日
4. Iino, M., Neuronal and endothelial modulation of internal Ca^{2+} in individual vascular smooth muscle cells., International Society for Autonomic Neuroscience, Cairns, Australia, 1997 年 9 月 18 日
5. Iino, M., Molecular approaches to excitation-contraction coupling in muscle., Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies, Brisbane, Australia, 1998 年 9 月 28 日
6. Kakizawa, S., Watanabe, M., Inoue, Y. and Kano, M., Neural activity is required for climbing fiber synapse elimination in developing cerebellum., Annual Meeting Society for Neuroscience, Los Angeles, 1998 年 11 月 10 日
7. Kakizawa, S., Watanabe, M., Inoue, Y. and Kano, M., Activation of NMDA receptors in mossy fiber-granule cell synapses is required for climbing fiber synapse elimination in developing cerebellum., Neuropharmacology Conference, Glendale, CA, 1998 年 11 月 5 日
8. Matsuzaki, M., Tachikawa, A., Ellis-Davies, C.C.R., Miyashita, Y., Iino, M. and Kasai, H., Two-photon functional mapping of glutamate receptors in living hippocampal neurons., Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, New Orleans, La, 2000 年 11 月 4 日
9. Kasai, H., Maeda, H. and Ellis-Davies G.C.R., High-affinity cooperative Ca^{2+} buffering and its role in cerebellar Purkinje cells., World Congress of Neuroscience, Jerusalem, Israel, 2000 年 6 月 11 日
10. Iino, M., Monitoring intracellular Ca^{2+} and IP_3 dynamics in neurons., FASEB Summer Research Conference, Copper Mountain, USA, 2000 年 7 月 11 日
11. Takahashi, N., Two-photon excitation imaging of glucose induced exocytotic events in pancreatic islet of Langerhans, The 4th Conference on ABC proteins and Ion Channels -from Gene to Disease-, 2001 年 1 月 27 日
12. Takahashi, N., Nemoto, T., Kimura, R. and Kasai, H., Two-photon excitation imaging of glucose-induced insulin exocytotic events in pancreatic islets, Servier-IGIS symposia kinetics of insulin resistance in health and type 2 diabetes, 2001 年 3 月 23 日

国内学会

1. 河西 春郎、二宮 靖典、岸本 拓哉、宮下 保司、分泌小胞の膜融合速度定数と Ca^{2+} 結合速度定数の測定、日本生理学会 浜松, 1997 年 3 月 28 日
2. 高橋 倫子、門脇 孝、矢崎 義雄、宮下 保司、河西 春郎、腓 細胞に存在する 3 つの開口放出路、日本生理学会 浜松, 1997 年 3 月 28 日
3. 伊藤 公一、宮下 保司、河西 春郎、腓外分泌腺細胞の低親和性 Ca^{2+} 指示薬である BTC を用いた Ca^{2+} 画像解析、日本生理学会 浜松, 1997 年 3 月 28 日
4. 前田 仁士、伊藤 公一、宮下 保司、河西 春郎、低親和性 Ca^{2+} 指示薬 BTC を用いた培養小脳プルキンエ細胞の Ca^{2+} 画像解析、日本生理学会 浜松, 1997 年 3 月 28 日
5. 飯野 正光, Calcium signalling in vascular smooth muscle cells., 日本生理学会 浜松, 1997 年 3 月 28 日
6. 飯野 正光, 血管平滑筋細胞内 Ca^{2+} ダイナミックスの交感神経制御, 日本自律神経学会, 1997 年 11 月 27 日
7. 宮川 知也、山澤 徳志子、廣瀬 謙造、飯野 正光、前田 明人、黒崎 知博、ストア内 Ca^{2+} 濃度のリアルタイムイメージング法による IP_3 受容体の機能解析、日本薬理学会 京都, 1998 年 3 月 24 日
8. 廣瀬 謙造、竹島 浩、田辺 麻央、飯野 正光、ホスホリパーゼ $\text{C} \delta 1$ 蛍光プローブとしての GFP-プレクスト

- リン相同ドメイン融合蛋白, 日本薬理学会 京都, 1998年3月24日
9. 山澤 徳志子、飯野 正光, マウス消化管平滑筋における律動性の可視化, 日本薬理学会 京都, 1998年3月24日
 10. 飯野 正光, カルシウムシグナル形成とカルシウム放出チャンネル, 日本生化学会 名古屋, 1998年10月16日
 11. 廣瀬 謙造, 単一細胞における IP₃ 動態の可視化, 日本生化学会 名古屋, 1998年10月14日
 12. 河西 春郎、根本 知己、早川 泰之、高橋 倫子、前田 仁士、立川 光、松崎 政紀、飯野 正光、宮下 保司, 多光子励起断層法の細胞生物学への応用, 日本神経科学・神経化学合同大会 東京, 1998年9月21日
 13. 柿澤 昌、渡辺 雅彦、井上 芳郎、狩野 方伸, マウス小脳登上線維の生後発達の神経活動依存性と臨界期, 日本神経科学・日本神経化学合同大会 東京, 1998年9月23日
 14. Kano, M. and Hashimoto, K., mGluR-mediated modulation of synaptic transmission and plasticity in the cerebellum., 日本生理学会 サテライトシンポジウム 金沢, 1998年3月30日
 15. Kano, M., Signal transduction cascade involved in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development., 日本生理学会 金沢, 1998年3月28日
 16. 根本 知己、高橋 倫子、門脇 孝、宮下 保司、飯野 正光、河西 春郎, 多光子励起による膵島単一ミトコンドリアのイメージング, 日本生物物理学会年会 福岡・九州大学, 1998年10月2日
 17. 根本 知己、立川 光、伊藤 公一、木村 良一、飯野 正光、宮下 保司、河西 春郎, 2光子励起法による膵臓外分泌腺標本の Ca²⁺波動の定量的解析, 日本生理学会 長崎, 1999年3月28日
 18. 根本 知己、木村 良一、立川 光、宮下 保司、飯野 正光、河西 春郎, モード同期 Ti:Sapphire レーザを用いた膵臓外分泌標本の Ca²⁺動態の蛍光イメージング, 日本物理学会 広島, 1999年3月29日
 19. 橋本 彰子、廣瀬 謙造、岡田 英孝、黒崎 知博、飯野 正光, B細胞におけるストア作動性カルシウム流入の SHIP 非依存性防御, 日本薬理学学会年会、札幌市, 1999年3月25日
 20. 廣瀬 謙造、橋本 彰子、飯野 正光, B細胞におけるストア作動性カルシウム流入, 日本薬理学学会年会、札幌市, 1999年3月23日
 21. 根本 知己、早川 泰之、高橋 倫子、木村 良一、松崎 政紀、立川 光、宮下 保司、飯野 正光、河西 春郎, 多光子顕微鏡の刺激 分泌連関の研究への応用, レーザ顕微鏡研究会 小金井市, 1999年5月14日
 22. 柿澤 昌、狩野 方伸, マウス小脳登上線維、生後発達に及ぼすインターロイキン-6 の影響, 日本生理学会、長崎, 1999年3月29日
 23. 柿澤 昌、渡辺 雅彦、井上 芳郎、狩野 方伸, マウス小脳生後発達期における登上線維シナプス除去の臨界期, 日本神経科学会、大阪, 1999年7月8日
 24. 飯野 正光, カルシウムと IP₃ の細胞内ダイナミックス, 細胞生物学会、東京, 1999年8月29日
 25. Oguchi, K., Saito, N., Oyamada, H., Oguchi, K., Kawana, Y., Hirose, K., Yamazawa, T. and Iino, M., Point mutations in the ryanodine receptor gene in malignant hyperthermia patients., 日本薬理学会、横浜, 2000年3月24日
 26. Hirose, K., Visualizing IP₃ dynamics in living cells., 日本薬理学会、横浜, 2000年3月23日
 27. 高橋 倫子、門脇 孝、木村 哲、河西 春郎, インスリンのカルシウム非依存的分泌と Ca²⁺/PKA センサー機構, 日本糖尿病学会、名古屋, 2000年5月27日
 28. 松崎 政紀、立川 光、Ellis-Davies G.C.R., 宮下 保司、飯野 正光、河西 春郎, 2光子励起法による中枢神経細胞のグルタミン酸感受性のマッピング, 日本神経科学、大阪, 1999年7月6日
 29. 松崎 政紀、根本 知己、Graham C.R. Ellis-Davies, 立川 光、宮下 保司、飯野 正光、河西 春郎, 2光子励起法による小脳プルキンエ細胞のグルタミン酸感受性のマッピング, 日本神経科学会、横浜, 2000年9月4日
 30. 根本 知己、河西 春郎, 高速ゲートイメージングシステムを用いた多光子蛍光寿命顕微鏡システムの構築とその応用, 日本生物物理学会、仙台, 2000年9月11日
 31. 河西 春郎、木村 拓哉、劉 テイテイ、根本 知己、高橋 倫子、木村 良一、住吉 克彦、加シム依存性開口放

出機構の多様性, 第 78 回日本生理学会大会、京都, 2001 年 3 月 30 日

32. 高橋倫子、根本知己、飯野正光、宮下保司、河西春郎, 二光子励起法を用いた腓島開口放出の可視化解析, 第 78 回日本生理学会大会、京都, 2001 年 3 月 31 日

(3)特許出願

発明者： 大口恵子、斎藤直人、飯野正光
発明の名称： 悪性高熱症の遺伝子診断法
出願番号： 特願平11 296606
出願日： 1999年10月19日

発明者： 竹島浩、竹島美幸、飯野正光
発明の名称： 新規タンパク質分子ジャンクトフィリン (Junctophilin)
出願番号： 特願2000 137595
出願日： 2000年5月10日

発明者： 根本知己、河西春郎
発明の名称： 多光子励起蛍光寿命画像化システム
出願番号： 特願2000 226758
出願日： 2000年7月27日