別紙 11

「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成21年度終了研究課題－

研究総括 中西 重忠

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生命システムの動作原理の解明を目指して、新しい視点に立った解析基盤技術を創出し、生体の多様な機能分子の相互作用と作用機序を統合的に解析して、動的な生体情報の発現における基本原理の理解を目指す研究を対象とします。具体的には、近年の飛躍的に解析が進んだ遺伝情報や機能分子の集合体の理解をもとに、細胞内、細胞間、個体レベルの情報ネットワークの機能発現の機構、例えば生体情報に特徴的な非線形で動的な反応機構などを、新しい視点に立って解析を進めることによって生命システムの統合的な理解をはかる研究を対象とします。さらには、生体情報の発現の数理モデル化や新しい解析技術の開発など基盤技術の創成を目指した研究も対象としますが、生命現象の実験的解析と融合した研究を重視するものです。

2. 研究課題・研究者名
別紙一覧表参照

3. 選考方針
選考の基本的な考えは下記の通り。
1) 選考は「生命システムの動作原理と基盤技術」領域に設けた選考委員10名と研究総括で行う。
2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
3) 選考に当たっては、募集要項に示した選考基準を基本としたが、下記の点に特に留意した。
研究者は、論文数(過去の実績)ではなく、自らの研究であるかとか、将来性にかけることができそうな人を重視する。研究として同じレベルであれば女性研究者や地方大学・私立大学・企業に所属する研究者を採択したい。

4. 選考の経緯
一応募課題につき領域アドバイザー3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	303 名	29 名	15 名*

(* 採用者うち1名は、ライフイベントで、1年間延期)

5. 研究実施期間
平成 18 年 10 月～平成 22 年 3 月

6. 領域の活動状況
領域会議:7回
報告会:1回
研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:研究開始時に、研究総括と技術参事、事務参事が研究者を訪問し、指導教授への挨拶、協力を要請した。本人からは、研究内容、設備、施設の状況の説明を受け、動機付け、進路、注意事項などを助言、指導した。その後、技術参事、事務参事が、異動の際や知財相談や大型機器納品など具体的な要件の度に、適宜、訪問し、支援した。

7. 評価の手続き
研究総括が研究者の研究終了報告会での報告、質疑応答、そして報告書・自己評価表を基に、アドバイザーの意見も参考にして行った。

（評価の流れ）
平成 21 年 12 月　　研究報告会開催
平成 22 年 2 月　　研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 22 年 2 月　　研究総括による評価

8．評価項目
（1）研究開始時の研究構想を基準に研究の達成度
（2）外部発表（学術論文、口頭発表など）、特許など研究成果の発信状況
（3）学術賞、学会招待講演、新聞記事発表など外部からの評価状況
（4）得られた研究成果の科学技術への貢献

9．研究結果
研究者は、生命システムという新しい研究分野に、分子生物学、生体工学（ノックアウト、トランスジェニック）、電気生理学、行動科学、数理モデル解析、バイオイメージングなどの最新の基盤技術を駆使して、各課題の動作原理の探求とそれに用いる新しい基盤技術の開発を進めてきた。対象生物は、細胞（2）、ウイルス、単細胞生物、微生物（2）、線虫、マウス（3）、フェレット、サル(3)など、広範囲に及んでいる。議論がかみ合うか心配されたが、アドバイザーの適切な助言やCREST研究者やさきがけ研究者間での横断的で、自由な情報交流により、生命システム全体として、大きな成果を生む結果となった。基礎研究でありながら、特許出願計7件も評価できる。

池谷　裕二　イメージング性能の向上に関しては、(a)2000Hz の超高速撮影、(b)1 万以上のニューロンからの記録、(b)従来の約 10 倍のシグナル−ノイズ比を達成し単スパイクの検出が可能となったことが挙げられる。また得られたスパイク列を解析する過程で、自発活動のなかにベキ則を伴った時間精度の高い同期発火を見出した。同期発火が同期した共通入力を必要とすること、共通入力を与えるような回路トポロジが存在することを実証し、皮質回路の作動原理に迫ることができた。

河崎　洋志　視覚系神経回路のM細胞系とP細胞系とが相互作用をする神経回路的基盤の解析を進めてきた。そのために1）M細胞系に選択的に発現する遺伝子の単離、2）単離した遺伝子のプロモータによる GFP 発現コンストラクトの作成、3）フェレットへの遺伝子導入、を進めてきた。これらの成果により、視覚系神経回路の解析のみならず、フェレットを用いた高等哺乳動物の中枢神経系の研究への展開が可能となった。
さらに体性感覚系の感覚情報処理回路の解析も行った結果、マウスの体性感覚神経回路において、これまで見出されていなかった新しい皮質内局所投射経路を見出すことができた。

木村　幸太郎　*C. elegans* を用いて (1) 神経機能の重要な側面である学習（ノナノン忌避行動増強）の遺伝学的解析、(2)神経回路に対する入力（刺激）と出力（行動）の動的変化の定量的解析、などを進めた結果、忌避行動増強に関与するドーパミンシグナル伝達の遺伝学的解析はほぼ順調に進めることができた。膜電位イメージングによる *C. elegans* 神経細胞の可視化について大きな成果をあげることはまだできていないが、イメージング系の確立に加えて、定量的な匂い刺激の問題がほぼ解決されて、今後の解析への充分なメドが立った。匂い濃度変化の測定などの結果も含めて、「統合的解析」への環境が整った。

高坂　智之　異なる2つの微生物を共生させ、それぞれの微生物から経時的に転写解析を行うための RNA を抽出し、そしてそれ分析するためのマイクロアレイの構築を行うことができた。共生させる微生物のゲノム解析を行うことができ、共生微生物の情報基盤を強化することができた。

眞田　佳門　GPCR を介したシグナリングが神経前駆細胞の神経分化に必要であることを明らかにすることができ、当初の目的はおおむね達成できている。また、移動中の神経細胞では、核移動に先行して中心体が進行方向に移動するが、この中心体の移動に関する分子機構に関して、LKB1 を介したシグナリングが先導突起内で活性化され、微小管の制御を介して中心体を引っ張り上げるというモデルを提唱できた。また、in vivo において成熟中の神経細胞の極性を LKB1 がコントロールしていることを明らかにした。

新矢　恭子　ウイルスの RNA ポリメラーゼを in vitro の系で作動させ、変異率を計算する方法を確立し、ウイルス RNA ポリメラーゼの活性を評価する方法を確立した。ヒト由来のウイルス RNA ポリメラーゼは、トリ由来

のウイルスRNAポリメラーゼよりも変異率が高い傾向が見られ、ヒト由来ウイルスのRNAポリメラーゼの活性のほうが高い傾向があった。さらに、感染によって、A 型インフルエンザウイルスに人型変異が入るモデル動物を探索し、ダチョウがそのモデルになり得ることを発見した。

末次 志郎 細胞膜結合タンパク質であるIMD/I-BARドメインおよびEFC/F-BARドメインタンパク質について立体構造の解明と膜への相互作用の機序を明らかにした。脂質作用面は、I-BAR は凸面であり、F-BAR は凹面であって、それぞれの形成する細胞膜構造であるフィロポディア、ラメリポディア(I-BAR)およびはクラスリンおよびカベオラのエンドサイトーシス(F-BAR)で機能していることを見いだした。これらのタンパク質の立体構造から予測される脂質作用面の形態は、それぞれの細胞構造の持つ細胞膜の形態に、鋳型の様に対応していることを示すことができた。従ってこれらのタンパク質ドメインは、脂質膜の形態をそれぞれの細胞微細形態に応じて形成させるあるいは形成された後にその形態を認識するドメインであることを証明できた。

杉田 誠 苦味・甘味伝導路構成ニューロンの細胞体・樹状突起の脳内配置を明らかにし、ニューロン種の同定・細胞機能の解析を進めている。WGA-DsRed標識ニューロンをホールセルパッチクランプで解析していく方法は、確率が低く、また、同じ脳領域のWGA-DsRed標識ニューロンでも、異種混交であり、複数種からなるニューロン種の同定が難航しており、現在、ニューロン種の同定・細胞機能の解析中である。
他方、WGA-DsRed 標識ニューロンの選択的除去を行うためのツール、WGA-DsRed を標的とするImmunotoxinの系は構築できており、現在 Immunotoxin の大腸菌における発現と精製方法の改良を行っている。

田中 裕人 分子モーターの、システム化のアルゴリズム・構築原理の数理的解明(モデル構築)については、ポテンシャル駆動をベースとした運動モデルを構築し、1分子＆分子モーターシステムの運動を再現するモデルの構築を達成した。分子モーターシステム(in vitro motility assay 系のアクチンフィラメントやプローブ)の運動の高時間・高空間分解能測定システムの作製についても、高速CCDカメラと蛍光励起シャッター(EOM)を連動させた、蛍光標識分子の高速検出装置を作成することにより達成した。

田中 真樹 サル3頭にオドボール検出課題を訓練し、うち2頭の小脳外側核から単一ニューロン記録を行い、1頭からは前頭葉皮質からの集合電位(local field potential)記録を行った。小脳核からの記録では、繰り返し刺激によって増強する神経活動を発見した。また、大脳からは刺激の欠落に特異的な応答が記録された。小脳核の不活化によって、欠落オドボールの検出時間が延長することを見出した。また、別の行動課題を用いて、前頭葉皮質内側部の電気刺激実験を行った。手がかり刺激から一定の時間経過の後、自発的に眼球運動を開始させる際に同部位の信号が重要であることが明らかとなった。

中原 潔 3テスラMRI装置を用い、独自の装置を作製し、マカクサルの脳解析に必要な良好なEPI画像を取得することが出来るようにして、fMRI を行う実験系を新たに確立した。得られた時系列データに対して独立成分分析および相関解析を行い、DMN (default-mode network)と考えられる脳ネットワークが存在することを明らかにした。さらに小型霊長類マーモセットにおいて同様の解析を行い、マーモセットにおいても DMN が存在することを示した。

堀川 一樹 大規模多細胞ネットワークを対象に、細胞間情報伝達の時空間パターンを定量計測するため、ライブイメージング用指示薬を開発した。CaM-M13 間のリンカー部分を改良することで既存の cameleon に比べ、カルシウムイオンに対する感度を大幅に上昇させることに成功した。.得られた指示薬を用いて、最大 10万個の多細胞ネットワークにおける単一細胞レベルでのシグナル応答パターンを計測できるようになった。これまでに達成されたことのない大規模な空間スケールで定量イメージングと数理モデルの構築を行い、細胞内化学反応ゆらぎにトリガーされると想像される自発的なcAMP放出の間接的な証拠を見いだした。

守屋 央朗 出芽酵母での遺伝子の過剰発現の限界値を、酵母細胞周期の統合的なコンピュータモデル(Chen2004モデル)と比較することで、*CDC14* の過剰発現に対して細胞が著しく脆弱である理由が、その阻害因子 *NET1* との「遺伝子量の不均衡」から生じていることを予想し、これを2次元の gTOW と呼ぶ実験により検証することに成功した。モデルの予測に反し、実際の細胞は *ESP1* の過剰発現に対してロバストであった。このことから、*ESP1* の阻害因子である *PDS1* との量的な不均衡をさける機構が細胞内に存在していると考え、その機構を同定した。分裂酵母でもgTOW法を開発した。

山本　希美子　　ヒト肺動脈内皮細胞（HPAECs）に流れ刺激を 1 分間与えたときに灌流液中に放出されてくる ATP 量を定量することにより、膜表面の ATP 合成酵素が流れ誘発性の ATP 放出に中心的な役割を果たしていることが示唆された。剪断応力による ATP 放出が細胞膜カベオラ（脂質ミクロドメイン）付近から放出されることを明らかにした。さらに、剪断応力により放出したATPを可視化した細胞を caveolin-1 抗体で染色した所、局在がほぼ一致することが解った。

これらの成果を礎に、今後も、この領域のネットワークを活用し、さらに、大きな発展を期待する。アドバイザー共々関係者でこれからも見守っていく。

10.　評価者

研究総括　中西　重忠　　財団法人　大阪バイオサイエンス研究所　所長

領域アドバイザー氏名（五十音順）

岡田 清孝　　自然科学研究機構・基礎生物学研究所 所長
川人 光男＊1　　（株）国際電気通信基礎技術研究所　脳情報研究所　所長
郷 通子＊2　　お茶の水女子大学長
後藤 由季子　　東京大学分子細胞生物学研究所　教授
近藤 滋　　大阪大学　大学院生命機能研究科　教授
榊 佳之 国立大学法人　豊橋技術科学大学　学長
桜田 一洋　　（株）ソニーコンピュータサイエンス研究所シニアリサーチャー
笹井 芳樹　　理化学研究所　発生・再生科学総合研究センター　グループディレクター
武藤 誠 京都大学　大学院医学研究科　教授
垣生 園子＊3　　順天堂大学 医学部　客員教授
平野 俊夫　　大阪大学　大学院生命機能研究科　教授

＊1 平成 18 年 6 月～平成 22 年 3 月まで参画
＊2 平成 18 年 6 月～平成 18 年 12 月まで参画
＊3 平成 19 年 3 月～参画

（参考）

（1）外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	9	52	61
口 頭	84	55	139
その他	14	4	18
合 計	107	111	218

※平成22年2月現在

（2）特許出願件数

国 内	国 際	計
7	0	7

（3）受賞等

池谷　裕二
日本薬学会・奨励賞(H20.3)
文部科学大臣表彰・若手科学者賞(H20.4)
ニューロクリアティブ研究会・創造性研究褒賞（H21.3）

新矢　恭子
文部科学大臣表彰・若手科学者賞(H19.4)

田中　真樹
文部科学大臣表彰・若手科学者賞(H20.4)

堀川　一樹

文部科学大臣表彰・若手科学者賞（H19.4）

山本　希美子

第 15 回日本血管生物医学会　ポスター賞

IEEE, Best Paper Award in 2008 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (H20.8)

（4）招待講演

国際　11件

国内　17件

別紙

「生命システムの動作原理と基盤技術」領域　研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 （参加形態）	研　究　課　題　名 （研究実施場所）	現　職 （応募時所属）	研究費 （百万円）
池谷　裕二 （兼任）	多ニューロン活動を可視化して脳回路システムに迫る （東京大学　大学院薬学系研究科）	東京大学　大学院薬学系研究科 准教授 （同上　講師）	42
河崎　洋志 （兼任）	視覚情報の分解と統合の生体制御システム （東京大学医学部付属病院）	東京大学　医学部付属病院 特任准教授 （同上　特任助教授）	43
木村　幸太郎 （兼任）	脳・神経系における「情報の変換」の解明を目指して （大阪大学大学院理学研究科）	大阪大学大学院理学研究科 特任准教授 （情報・システム研究機構　国立遺伝学研究所　助手）	41
高坂　智之 （兼任）	モデル共生系における創発的機能発現メカニズムの解明 （山口大学農学部生物機能科学科）	山口大学農学部生物機能科学科 助教 （（株）海洋バイオテクノロジー研究所　研究員）	36
眞田　佳門 （兼任）	神経前駆細胞の非対称分裂に関与する分子装置の解析 （東京大学　大学院理学系研究科　附属遺伝子実験施設）	東京大学　大学院理学系研究科附属遺伝子実験施設 准教授 （東京大学大学院理学系研究科助手）	40
新矢　恭子 （兼任）	RNA ポリメラーゼの安定性に関わる宿主因子の探索 （神戸大学　医学部附属医学医療国際交流センター）	神戸大学　医学部附属医学医療国際交流センター 准教授 （鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症研究センター　助教授）	38
末次　志郎 （兼任）	細胞膜形態決定の動作原理の解明 （東京大学　分子細胞生物学研究所）	東京大学　分子細胞生物学研究所 准教授 （東京大学'医科学研究所　腫瘍分子医学　助手）	41
杉田　誠 （兼任）	味覚により惹起される行動と情動の神経回路基盤 （広島大学　大学院医歯薬学総合研究科）	広島大学　大学院医歯薬学総合研究科 講師 （広島大学大学院医歯薬学総合研究科助手）	35
田中　裕人 （兼任）	分子モーターシステムの制御理論構築とその実験的検証 （独立行政法人　情報通信研究機構）	独立行政法人　情報通信研究機構 主任研究員 （（独）科学技術振興機構ソフトナノマシンプロジェクト研究員）	29
田中　真樹 （兼任）	タイミングの予測に関与する脳ネットワークの検証 （北海道大学　大学院医学研究科）	北海道大学　大学院医学研究科 准教授 （北海道大学大学院医学研究科講師）	40

中原　潔 （兼任）	サル fMRI による視知覚機構の脳ネットワーク解析 （国立精神・神経センター　神経研究所　モデル動物開発部）	国立精神・神経センター　神経研究所　モデル動物開発部 室長 （東京大学大学院医学系研究科講師）	38
堀川　一樹 （兼任）	相互作用に支配される細胞集団の協調的振る舞い （北海道大学電子科学研究所ニコンバイオイメージングセンター）	北海道大学電子科学研究所ニコンバイオイメージングセンター 特任准教授 （東京大学大学院理学系研究科助手）	39
守屋　央朗 （兼任）	真核細胞の in vivo ロバストネス解析 （岡山大学異分野融合先端研究コア）	岡山大学異分野融合先端研究コア 特任助教 （（独）科学技術振興機構北野共生システムプロジェクト研究員）	43
山本　希美子 （兼任）	細胞の動的情報感知機構とナノバイオメカニクス （東京大学　大学院医学系研究科）	東京大学　大学院医学系研究科 講師 （東京大学大学院医学系研究科講師）	41

（採用者15名のうち1名は、ライフイベントで、1年間延期）

研究課題別評価書

1．研究課題名
多ニューロン活動を可視化して脳回路システムに迫る

2．氏名
池谷　裕二

3．研究のねらい
脳の理解には機能素子であるニューロンの大規模記録が必須である。本研究では、(1)多ニューロンCa^{2+}イメージング法（fMCI）を用いて数百のニューロン活動を高空間分解能で一斉に可視化し、かつて例がないほどの大規模なスパイク列データを再構築すること、(2)得られたスパイク列にデータマイニングを施すことで回路作動の原理を解き明かすこと、の 2 点を目指す。

4．研究成果
あらゆるシステムの作動は、ノード（節点）とエッジ（辺）で構成されるグラフ（回路）と、グラフ内部を流れる情報に帰着される。システムを対象とするとき、近現代科学は多分に還元的であり、対象を各要素に細分化してから分析するという戦略をとってきた。しかし、要素は集団になると予想を超えた非線形な挙動を示す。すなわちシステムを理解するためには、要素解体することなく実在の“総体性（entity）”を掌握する必要がある。
そこで私は本研究の究極目標を「神経回路のシステム作動を統合的なアプローチで探ることで、システムに普遍的な動作原理を明らかにすること」と定めた。具体的には、(1)生命システムを解明するための新しいツールや戦略を提供する、(2)システム生理学における“オミクス解析”的な戦略法を提唱し、神経回路の情報コードおよびデコードの作動原理を網羅的に理解すること、の2点を目指した。
ニューロンは回路システムの機能素子である。つまり脳を理解するためには同時に多数のニューロンからスパイク列をモニターする必要がある。私が開発を進めてきた「多ニューロンCa^{2+}画像法（functional multineuron calcium imaging, fMCI）」は、単一細胞の空間解像度で数百のニューロンからスパイク活動を一斉に再構築できるという点で、世界的にも例を見ない大規模なモニター法である。

(1) fMCI の改良と応用
ニポウ式共焦点ユニット CSU-X1 と高速背面照射型 CCD カメラ DU860 を採用することで 2000 Hz という超高速の画像取得を可能にした（Neurosci. Res., 58:219-225, 2007）（図１）。一方、広域 CCD カメラ DU888 と低倍率高開口数の対物レンズを併用することで、10,000 個以上のニューロンからの大規模記録も可能にした（Nature Precedings 2009.2893.1, 2009）。上記の撮影速度とニューロン数は現時点で世界最高である。

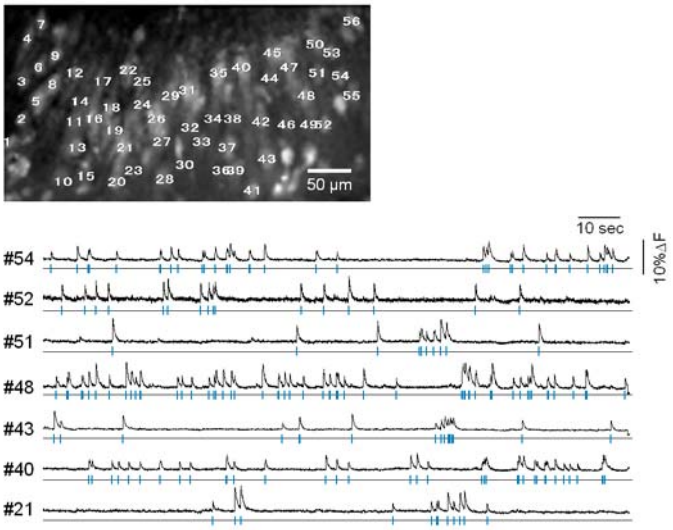


図1　高速 fMCI。海馬スライス培養標本に Oregon Green 488 BAPATA-1 を負荷し（上映像）、ニポウ式共焦点レーザー顕微鏡にて 500 Hz で撮影した。代表的な 7 個のニューロンについて映像の下に生トレースを示した。さらに各トレースから検出されたスパイク列をその下のラスタプロットに示してある。

fMCI で得られるデータは大規模であり、手動でスパイクを検出することは非効率であるばかりでなく、人為的なミスも避けられない。そこでカルシウム変動からスパイクタイミングを逆推定するアルゴリズムを考案した（J. Neurophysiol., 100:1668-1676, 2008.）。これは、シグナルを主成分分析によって低次元に圧縮した後、パターン認識アルゴリムであるサポートベクトルマシンによって自動検出する方法である。人為プロセスを一切経ないため、主観的要因を完全に排除できる。十分な学習を行ったのちの平均偽陰性率は 3%程度、偽陽性率は 1%であり、手動検出はもちろん、既存のアルゴリズムによる半自動検出法よりもはるかに精度の高い検出が可能となった。

fMCIの特長を活かし、シナプス結合を効率よく探索できるマッピング技法（Reverse Optical Trawling: ROTing）を考案した（J. Neurophysiol., 102:636-643, 2009）。海馬CA3-CA1 野間のシナプス結合を例に、以下ROTingの手順を解説する。ROTingは3ステップから形成される。ステップ1 シナプス前細胞の候補となるニューロンが存在するCA3 野の錐体細胞層にガラス電極を刺入し、空気圧によりカルシウム蛍光指示薬を局所的に注入する。この負荷方法は、従来のインキュベーション法による蛍光色素の導入に比べて、(i)実験時間が短縮できること、(ii)色素負荷の影響を導入部位のみに最小限に抑えることができる、などの利点がある。ステップ2　別の微小ガラス電極を用いて、グルタミン酸をイオントフォレシスによって局所的に適用し、CA3 野の細胞の発火活動パターンをfMCIによって記録する。また同時にCA1 野細胞に入力されるシナプス電流をパッチクランプ法により記録する。ステップ 3　カルシウム活動とシナプス電流のタイミングを統計的に比較することにより、fMCIで記録されたすべての細胞において、シナプス結合を有するか否かを検証する。なお、ROTingの基本アイデアは、2006 年にAaronとYusteによって考案された(Reverse Optical Probing（ROPing）から得た。ROPingはシグナル-ノイズ比が悪く、実用性は低かったため、(i)人工細胞外液の改良、(ii)局所的に細胞活動を誘発する方法の開発、などの工夫を処し、欠点を克服した。とくに変更点(i)は、自発的な細胞活動を大幅に抑制するのみならず、シナプス伝達効率を向上させるという利点を併せ持つ。その結果、シグナル-ノイズ比が向上し、結果として、平均偽陰性率は 4%以下、偽陽性率は 1%と高い確度でシナプス結合を同定することが可能となった。例を図2に示す。

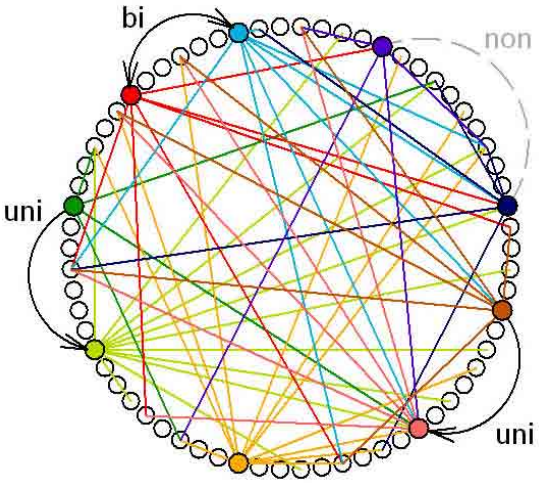


図2　ROTing で同定した CA3 野のシナプス結合パターン。丸印は各ニューロン（結合トポロジーを保持したまま円形空間にアレンジした）。色で塗りつぶされた丸はパッチプランプ記録を行ったニューロン。これら計９個のニューロンに対し投射するシナプス結合が６３個見つかった。

（2）神経スパイク同期のメカニズム

CA3 野回路の自発活動を高速 fMCI で撮影したところ、異なるニューロンが同時に発火する、つまり「同期スパイク」を発することが頻繁に観察された。この同期スパイクはミリ秒オーダーの時間精度を持ち、ポアソン発火を想定した場合よりも１０倍程度高い頻度で観察された。fMCI で自発活動を撮影した後に、ROTing によってシナプス結合を検出したところ、結合したニューロンペアは同期スパイクを高い頻度で示し、また親ニューロンの共有率も高いことがわかった。実際、ダブル標的パッチクランプ記録を行ったところ、同期スパイクを示すペアは類似した自発的 EPSC を受けていることが判明した。興味深いことに、自発的 IPSC に関しては、同期のしやすさに依存せず、常に相関が高かった。そこでランダム発火する２階層ニューラルネットワークを用いて高相関の EPSP を作成し、ダイナミッククランプ法を用いて、シナプス伝達を遮断した2つのニューロンに注入した。しかし、自然な回路で見られるような高頻度な同期スパイクは観察されなかった。そこで回路全体の活動に目を向けた。その結果、回路全体として同期の大きさがベキ分布していることを見出した。そこで再度、2階層ニューラルネットワークを用いて、第一層がベキ発火したときの下層の相関 EPSP を作成し、ダイナミッククランプ法で注入した。すると同じ入力相関値に対して高い出力相関が得られた、この結果はスパイク同期が CA3 野回路における再帰性に依存していることを示すものである。なお、回路同期活動の結合性を、グラフ理論によって探索したところ、スモールワールド性を有することが明らかとなった。以上のデータは、神経回路の自己組織的な機能発現における本質的な基底ルールに対して重要な示唆をもたらすものである。

５．自己評価

掲げた目標はおおむね達成できたと考えている。イメージング性能の向上に関しては、とりわけ、（a）2000Hzの超高速撮影、（b）1 万以上のニューロンからの記録、（b）従来の約 10 倍のシグナル−ノイズ比を達成し単スパイクの検出が可能となった、の 3 点を強調したい。また得られたスパイク列を解析する過程で、自発活動のなかにベキ則を伴った時間精度の高い同期発火を見出した。同期発火が同期した共通入力を必要とすること、共通入力を与えるような回路トポロジが存在することを実証し、皮質回路の作動原理に迫ることができた。反省点としては、（i）本研究のメインとなる発見に関して論文が未受理であること、（ii）Ca^{2+}感受性蛍光タンパク質をニューロン選択的に

発現するマウスの作成に失敗したこと、が挙げられる。とくに後者(ii)については、1200個もの卵に遺伝子導入を試みたが、マウス作成に至らず、たいへん落胆している。しかしマウス作成中はその成功を信じ、来るべき日のためにin vivo実験系を準備した。その結果、(1)スティック型対物レンズを用いてin vivoマウスからの観察を行い、血流の撮影、およびアストロサイトの活動記録に成功、(2)覚醒マウスからのパッチクランプ記録に成功(しかも2細胞からの同時記録)、などの副次的な成果を得ることができ、今後の展開につながる芽を得た。

6. 研究総括の見解

多ニューロンCa^{2+}イメージング法(fMCI)のイメージング性能の向上に関して、2000Hzの超高速撮影、1 万以上のニューロンからの記録、従来の約 10 倍のシグナル-ノイズ比を達成し、単スパイクの検出を可能にするなど、新しい技術の開発を積極的に行い、着実に成果を挙げている。また、海馬体の回路演算の解析においても、新しい知見を見出しており、さらに、興味深い研究へと発展している。このネットワークの作用機序の中から脳機能のメカニズムの解明に発展することを望む。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Tsukamoto-Yasui, M., Sasaki, T., Matsumoto, W., Hasegawa, A., Toyoda, T., Usami, A., Kubota, Y., Ochiai, T., Hori T., Matsuki, N. and Ikegaya, Y. Active hippocampal networks undergo spontaneous synaptic modification. PLoS One, 2(11):e1250, 2007.
2. Ikegaya, Y., Matsumoto, W., Chiou, H. Y., Yuste. R., Aaron, G. Statistical significance of precisely repeated intracellular synaptic patterns. PLoS ONE, 3(12):e3983, 2008.
3. Usami, A., Matsuki, N.and Ikegaya, Y. Spontaneous plasticity of multineuronal activity patterns in activated hippocampal networks. Neural Plascit., 108969, 2008.
4. Sasaki, T., Takahashi, N., Matsuki, N. Ikegaya, Y. Fast and accurate detection of action potentials from somatic calcium fluctuations. J. Neurophysiol., 100:1668-1676, 2008.
5. Sasaki, T., Minamisawa, G., Takahashi, N., Matsuki, N. and Ikegaya, Y. Reverse optical trawling for synaptic connections in situ. J. Neurophysiol., 102:636-643, 2009.

②受賞

1. 日本薬学会・奨励賞(2008 年 3 月)
2. 文部科学大臣表彰・若手科学者賞(2008 年 4 月)

③招待講演

1. Y.Ikegaya "Mesoscopic network dynamics revealed by high-speed multineuron calcium imaging." German-Japanese CNS workshop in Berlin.(2009.5)
2. Y.Ikegaya "Functioinal multineuron calcium imaging and large-scale spike trains" Neural Coding 2009 (NC2009)(台南) .(2009.5)
3. Y.Ikegaya "Functioinal multineuron calcium imaging and large-scale spike trains"Topical Problems of Biophotonics: Russian-Japanese Workshop "Neuroimaging and Neurodynamics"(2007.8)

研究課題別評価書

1．研究課題名
視覚情報の分解と統合の生体制御システム

2．氏名
河崎　洋志

3．研究のねらい
視覚や触覚などの感覚情報が、脳神経回路でどのように処理され、最終的な感覚受容に至るかという問題は、基礎神経科学的および医学的視点から重要な問題である。本研究では、感覚情報処理に重要となる解剖学的な神経回路基盤を分子生物学的技術を用いて明らかにすること、および神経回路を解析するための基盤技術開発を通じて、感覚情報の分解と統合のメカニズムへアプローチすることを目的とした。

網膜で受容された視覚情報は、網膜の段階ですでに、動作・空間情報や色彩・形態情報などといった異なる特性の視覚情報に分離されると考えられている（図1）。これらの異なる情報は、動作・空間情報は M 経路、色彩・形態情報は P 経路というようにそれぞれ異なる神経経路を使って大脳へと伝達される（図1）。また、視覚系と同様に体性感覚系でも情報の分離は行われており、異なる経路によって触覚情報は大脳皮質にまで伝達されている。例えば、マウスの代表的な体性感覚であるヒゲ感覚は、バレル回路とセプタ回路という異なる並列な神経回路により、大脳皮質へと伝達されている（図2）。

このようにいったん分離された異なる情報がどのように相互作用しているのかという点は、感覚受容のメカニズムを知るためには重要なポイントとなる。本研究では、分子生物学的技術を用いた神経回路の可視化技術の開発、感覚神経系に特異的な遺伝子発現の単離を通じて、異なる情報特性に対応する神経回路の相互作用の解析を行うことがねらいである。

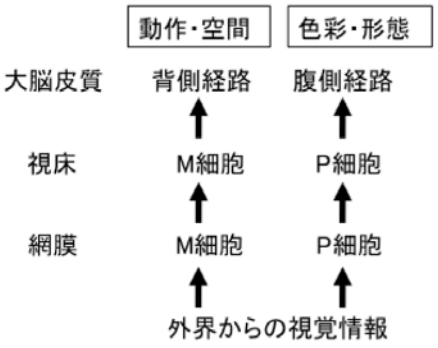


図1．　視覚系神経回路の模式図。視覚情報入力は二つの並列な M 細胞経路と P 細胞経路によって大脳まで伝達される。

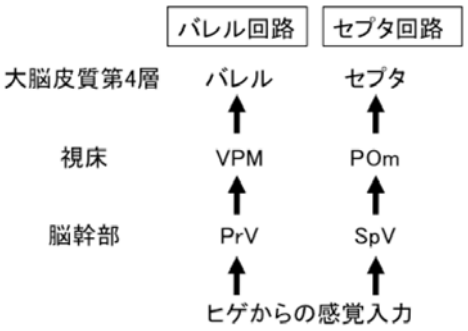


図2．　マウス体性感覚系神経回路の模式図。ヒゲからの入力は二つの並列なバレル回路とセプタ回路によって大脳まで伝達される。

4．研究成果
<u>視覚系神経回路のM細胞への遺伝子発現</u>
視覚情報はＭ経路とＰ経路とに分離されて、異なる並列な神経回路により大脳皮質へと伝達される（図 1）。しかしながら、視覚能力が劣るマウスではM／P経路への分離は不明確であることから、マウスを用いたこれらの解析は困難である。そこで我々は以前より、高等哺乳動物フェレットを用いた解析を進めてきた。フェレットは、発達した視覚能力を持ち、M／P経路が存在することが知られている（正式にはフェレットではそれぞれY／X経路と呼ばれるが、ここでは混乱を防ぐためにM／P経路と記載する）。我々はフェレット用の cDNA マイクロアレイを作成し、フェレットの遺伝子単離を実現してきた。

本研究ではフェレット用 cDNA マイクロアレイを用いて、視床の M 細胞に発現が見られる遺

伝子の単離を進めた結果、3つの遺伝子を同定することに成功した。*in situ* hybridization を行ったところ、これらの遺伝子はフェレット視床において M 細胞に発現している一方で、P 細胞には発現が見られないことがわかった。発現の経時変化を検討したところ、出生後、数日という非常に早期より遺伝子発現が見られ、従来想定されていたよりも発生過程早期にM・P細胞への分化方向が決定されていることが示唆された。

これらの分子のサル LGN における発現を検討したところ、サル LGN においても M 細胞に発現している遺伝子があることが分かり、この発現分布は種を超えて保存されていることが示唆された。M 細胞への選択的な遺伝子発現システムを構築するためには、適切なプロモータを使用する必要がある。そこでM細胞への発現が動物種を越えている保存されている遺伝子について、ヒト BAC クローンを入手し GFP の組み込みを行った。さらに脳内への遺伝子導入が行いやすいように、長さの短い DNA 断片を数種類作成した。これらの DNA 断片により誘導される GFP の発現分布が、M 細胞に対応するか検討を進めている。

<u>マウス触覚神経回路における情報の分解と統合</u>

視覚神経系と同様に体性感覚系においても、感覚情報の分解と統合が行われていると考えられている。マウスの代表的な感覚入力であるヒゲからの体性感覚（触覚）は、二つの並列な神経回路であるバレル回路とセプタ回路によって担われていることが知られている（図2）。これらの回路は脳幹部から大脳皮質第4層に至るまで並列に存在すると考えられているが、どこでこれらの二つの回路情報が統合されているかは不明な点が多い。

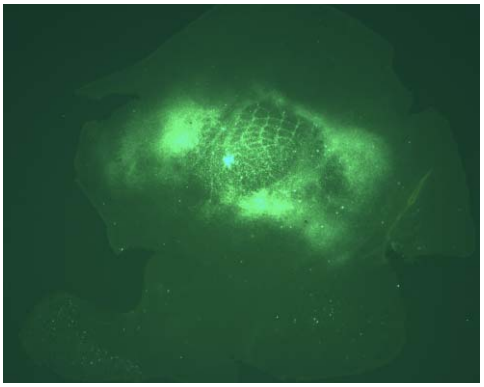


図3. マウス体性感覚野第 4 層にみられるバレルネット。大脳の接線方向断面。セプタ部分に GFP 陽性の 2/3 層神経細胞軸索が集積している。

この体性感覚系の情報の統合を司る神経回路を検討するために、マウス大脳皮質 2/3 層の神経細胞に GFP を導入し、2/3 層神経細胞の軸索投射経路の解析を行った。その結果、体性感覚野 2/3 層の神経細胞は、その軸索を 4 層のなかでは特にセプタ領域に集中して投射していることを見出し、この構造をバレルネットと命名した（図3）。

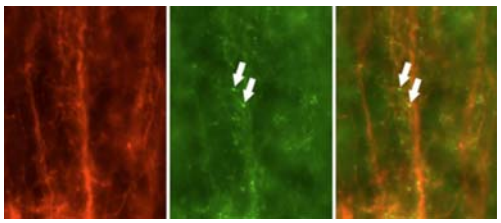


図4. バレルネットの拡大図。mCherry（左）とシナプトフィジン-GFP（中）とを共発現した。（右）mCherry とシナプトフィジン GFP を重ねた画像。バレルネットにはシナプトフィジン GFP が点状に分布している（矢印）

さらに、バレルネット内にある2/3層神経細胞の軸索は、バレルネット部分を単に通過しているだけなのか、それともシナプスを作り何らかの機能的情報処理を行っているのかを検討した。そのために、2/3層神経細胞にmCherryとシナプトフィジン-GFP を共発現させたところ、mCherry 陽性のバレルネット部分にはシナプトフィジン-GFP が点状に分布していることを見出した（図4）。この結果は、2/3 層神経細胞由来の軸索は、バレルネットに集積し、そこでシナプスを作っていることを示唆している。

これらの結果は、1）マウス大脳皮質体性感覚野において、2/3 層神経細胞の新たな軸索投射パターンを見出したこと、2）バレル回路とセプタ回路の情報は、2/3 層神経細胞からの軸索がバレルネットに集積することにより、バレルネット部分で情報の統合がなされている可能性があることを提起している。バレルネットは感覚情報統合の新たな構造的基盤かも知れない。

神経回路解析のための基盤技術開発

従来、神経回路の解析には脂溶性神経軸索トレーサーである DiI が広く用いられてきた。DiI は固定後の脳にも使用可能であるなど応用範囲が広く、簡便である半面、脂溶性物質であるために界面活性剤に触れると容易に拡散して回路解析が困難になるとの問題点があった。従って、DiI を用いた神経回路トレーシングと免疫組織染色法の組み合わせは困難であり、それゆえ、DiI 陽性軸索に発現するタンパク解析などが困難であった。

そこで我々は、DiI に対して免疫組織染色を行うことを可能とする技術の確立を行った。DiI が界面活性剤により洗い流されることが問題の原因であることから、通常の界面活性剤の代わりにジギトニンを用いることを試みた。ジギトニンは、脂質の中でもある特定の脂質にのみ反応する界面活性剤であり、多くの膜表面脂質は保存されると考えられることから、DiI のシグナルは保存されることが期待された。実際にジギトニンを用いることにより、DiI シグナルを維持するとともに抗体の組織浸透度を十分に上げうることが分かった（図5，6）。神経回路投射パターンとその免疫組織学的特徴の解析をすることを可能とする本手法は、統合回路の解析に有用である。

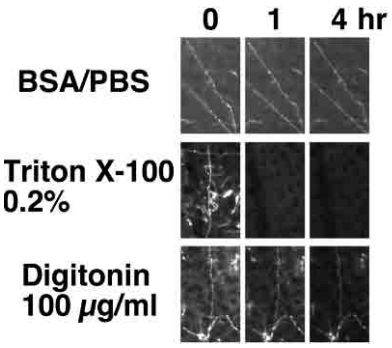


図5. DiI シグナルに対する界面活性剤の効果。TritonX−100 に比べて digitonin では DiI シグナルが拡散しにくい

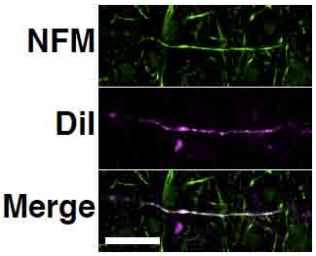


図6. digitonin を用いた DiI と抗 NFM 免疫染色の二重標識。digitonin を界面活性剤として用いることにより、DiI と免疫組織染色の二重染色が可能となった。

5. 自己評価

研究開始当初の目標は、視覚系神経回路のM細胞系とP細胞系とが相互作用をする神経回路的基盤の解析とした。そのために1）M細胞系に選択的に発現する遺伝子の単離、2）単離した遺伝子のプロモータによる GFP 発現コンストラクトの作成、3）フェレットへの遺伝子導入、を進めてきた。これらの成果により、視覚系神経回路の解析のみならず、フェレットを用いた高等哺乳動物の中枢神経系の研究への展開が可能となった。フェレットから得られる結果は、霊長類へも応用できる可能性があると考えている。

さらに当初の目標の枠を越えて、体性感覚系の感覚情報処理回路の解析も行った結果、マウスの体性感覚神経回路において、これまで見出されていなかった新しい皮質内局所投射経路を見出すことができた。この回路が体性感覚情報の統合に重要である可能性があると考えている。この神経回路がマウス体性感覚系にのみ見られる回路か、皮質全般に一般化できる回路かという点は興味深い。また、研究期間中に様々な神経回路解析に重要となる基盤技術開発も行うことができた。

さきがけ期間中に得られた研究成果、開発技術および多くの研究者と議論をできたことは非常に有意義であり、研究者として成長する上での大きな糧になった。お世話になった皆様に改めて御礼申し上げ、深謝いたします。

6. 研究総括の見解

視覚系神経回路のM細胞系とP細胞系とが相互作用をする神経回路的基盤の解明のために、M細胞系に選択的に発現する遺伝子の単離、単離した遺伝子のプロモータによる GFP 発現コンストラクトの作成などの成果を挙げ、さらにフェレットへの遺伝子導入法を確立させた。これらの成果により、視覚系神経回路の解析のみならず、フェレットを用いた高等哺乳動物の中枢神経系の研究への展開に活かされることを期待する。

さらに、マウスの体性感覚神経回路において、これまで見出されていなかった新しい皮質

内局所投射経路を見出したことを特筆しておく。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Sehara K., Toda T., Iwai L., Wakimoto M., Tanno K., Matsubayashi Y. and Kawasaki H., Whisker-related axonal patterns and plasticity of layer 2/3 neurons in the mouse barrel cortex. Journal of Neuroscience, 30, 3082-3092, 2010

2. Iwai L. and Kawasaki H., Molecular development of the lateral geniculate nucleus in the absence of retinal waves during the time of retinal axon eye-specific segregation. Neuroscience, 159, 1326-1337, 2009

3. Matsubayashi Y., Iwai L., Toda T., Lu Q.R. and Kawasaki H., Immunostaining for oligodendrocyte-specific galactosphingolipids in fixed brain sections using the cholesterol-selective detergent digitonin. J. Neurosci. Methods, 178,87-98, 2009

4. Toda T., Hayakawa I., Matsubayashi Y., Tanaka K., Ikenaka K., Lu Q.R., and Kawasaki H., Termination of lesion-induced plasticity in the mouse barrel cortex in the absence of oligodendrocytes. Mol. Cell Neurosci., 39, 40-49, 2008

5. Matsubayashi Y., Iwai L., and Kawasaki H., Fluorescent double-labeling with carbocyanine neuronal tracing and immunohistochemistry using a cholesterol-specific detergent digitonin. J. Neurosci. Methods, 174, 71-81, 2008

②特許

研究期間累積件数:3件

発　明　者:河崎洋志
発明の名称:組織内の脂質抗原の免疫染色方法
出　願　人:独立行政法人　科学技術振興機構
出　願　日:平成 20 年 10 月 21 日

発　明　者:河崎洋志、松林完
発明の名称:界面活性剤を使用した組織の染色方法
出　願　人:独立行政法人　科学技術振興機構
出　願　日:平成 20 年 6 月 18 日

未公開特許　1件

③著書

1. Toda T. and Kawasaki H., Regulation of the critical period for whisker lesion-induced barrel structural plasticity in the mouse somatosensory cortex, in Somatosensory Cortex: Roles, Interventions and Traumas, Johnsen N. and Agerskov R. eds., Nova Science Publishers, New York, 2009, p157-171

2. 河崎洋志、視覚系と体性感覚系を用いた神経回路形成メカニズム解析、ブレインサイエンスレビュー2009, 255-272、ブレインサイエンス振興財団、2009 年

④招待講演

1. 河崎洋志、大脳皮質の臨界期終了時期におけるオリゴデンドロサイトの機能解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月、神戸

2. 河崎洋志、フェレットを用いた視覚神経系の形成過程解析、第一回 Retina Research Meeting、2008 年 11 月、東京

3. 河崎洋志、フェレットを用いた感覚神経系の形成過程メカニズム解析、神経組織の成長・再生・移植研究会第 23 回学術集会、2008 年 5 月、幕張

研究課題別評価書

1．研究課題名
脳・神経系における「情報の変換」の解明を目指して

2．氏名
木村　幸太郎

3．研究のねらい
脳・神経系という複雑なネットワークが1つの情報処理システムとしてはたらき、時々刻々と変化する入力（刺激）に対して適切に出力（行動）を行うためのルールには、さまざまな不明な点が残されている。本研究では、わずか302個の神経細胞から構成される神経回路構造が全て明らかになっている線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動をモデルにして、脳・神経ネットワークの新たな動作原理を明らかにする事を目標とした。特に、以下の2点に重点を置いた。
〇脳・神経系の機能は、「遺伝子／神経回路／個体の行動」といった複数の階層における生命活動が密接に関わっているので、それぞれの階層に対する実験系を確立し、それらの結果を有機的に結びつけた統合的理解を目指す。
〇最終的には数理モデル化による理解も目標の一部とする事から、それぞれの解析において経時変化を定量的に測定する。

具体的には、以下の4つのプロジェクトを進めた。
1）【遺伝子】匂い忌避行動の学習（事前刺激による忌避行動の増強；後述）に関与するドーパミンシグナル伝達の遺伝学的解析
2）【神経回路】匂い忌避行動に関わる神経活動の光学的測定系の確立
3）【行動】行動の原理を明らかにするための、匂い忌避行動の数理解析
4）【刺激】匂い濃度変化の定量的測定

4．研究成果
背景：私はモデル動物*C. elegans*の見過ごされがちだった匂い忌避行動の可塑性を詳細に検討し、*C. elegans*に忌避匂い物質2-nonanone（以下ノナノン）を事前に経験させると、ノナノンへの忌避行動が増強され、その結果*C. elegans*が遠くまで逃げるようになるという興味深い現象を見いだした（図1）。またこの現象は、非連合学習として獲得される事を明らかにした（木村ら、投稿中）。事前刺激による特定の刺激への感覚応答の減少は「慣れ」と呼ばれ、これまでに様々な実験系において詳細な研究が行われている。これに対して刺激への応答の増強は、物理的侵害刺激である痛覚受容やアメフラシのエラ引き込み反射の「感作」に関しては詳しく研究されている。しかし、匂いや味といった化学刺激に対する応答増強は、行動レベル・電気生理学的解析レベルでの報告は散見されるものの、遺伝子レベルでの解析例は極めて少ない。従って、*C. elegans*の匂いに対する忌避行動増強を解析する事により、可塑的神経機能の新たな制御メカニズムを明らかにできると考えた。
本研究では、このノナノン忌避行動をモデルとして、遺伝子／神経回路／行動など異なる階層からの解析を行った。

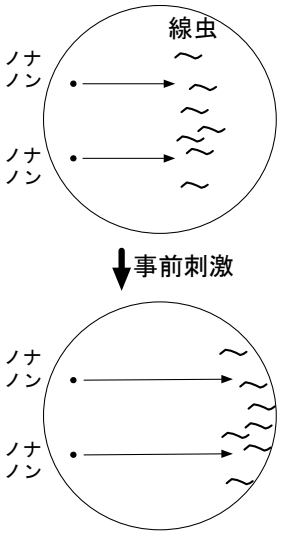


図1　*C. elegans* ノナノン忌避行動。1時間の事前刺激により、12 分のアッセイでより遠くまで逃げるようになる。

1）事前刺激による忌避行動増強に関与するドーパミンシグナ

ル伝達の遺伝学的解析

生命活動は遺伝子・細胞レベルのさまざまなネットワークに制御されている。その中でも、脳・神経ネットワークの最も大きな特徴は、経験によって入力に対する出力が変化する、すなわち学習するという点である。従って、学習においてどの遺伝子がネットワーク上のどの神経細胞の活動をどう変化させるか、またその変化がネットワーク全体の出力である行動にどのように影響するか、という問題は、脳・神経系の機能原理を明らかにする上で非常に重要である。以上の理由から、匂い忌避行動の経験依存的な変化に関わる遺伝子のはたらきを明らかにする事を目指した。

神経機能に関与すると考えられる遺伝子に異常を持つ突然変異体 50-60 系統の組織的な遺伝学的解析において、ドーパミン生合成が忌避行動増強に必要である結果が示唆された。そこで、ドーパミン生合成に特異的に必要とされるチロシン水酸化酵素 *cat-2*の点突然変異体および欠失型変異体の表現型を解析した所、ノナノン忌避行動の学習に顕著な異常を示した(図2)。

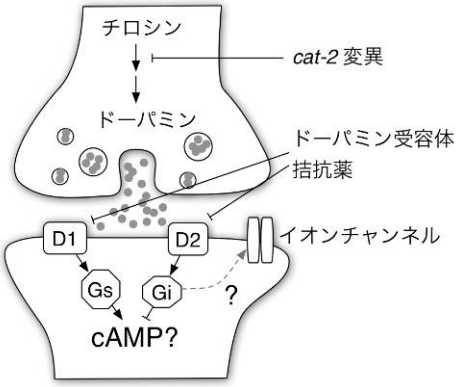


図2 ドーパミンシグナル伝達経路。ドーパミンシグナル伝達経路は、*C. elegans* と哺乳類で大部分が共通していると考えられている。*cat-2*変異やD2受容体拮抗薬は、忌避行動増強を特異的に阻害した。

なお、このプロジェクトの一部は、2007 年度から科研費基盤研究(C)「線虫 *C. elegans* の『忌避行動増強』に関する分子生物学的解析」として発展し、D2 型ドーパミン受容体 *dop-3*が忌避行動増強に関与すると解明するに至った(木村ら、投稿中)。

2)匂い忌避行動に関わる神経活動の光学的測定系の確立

*C. elegans*神経活動の生理学的解析では、我々もその立ち上げ期の研究に関わったCa^{++}イメージングが非常に有効である事が示されている(Kimura et al., Curr. Biol., 2004 など)。しかし、神経活動の本質は膜電位変化であるので、本研究では*C. elegans*神経活動に伴う膜電位変化を光学的に検出する系の確立を目指した。

研究開始当初は GFP 誘導体と低分子化合物を組み合わせた方法(Chanda et al., Nat. Neurosci., 2005)が報告されてたが、2008 年になってホヤの膜電位感受性脱リン酸化酵素 Ci-VSP を利用した膜電位センサータンパク質が相次いで報告された (Tsusui et al., Nat. Meth., 2008 など)。これらのタンパク質は、遺伝子導入が容易な *C. elegans* での解析に適していると考えられるので、開発元の Thomas Knopfel 博士および宮脇敦史博士(共に理研 BSI)と共同研究を開始した。これまでに膜電位センサータンパク質 Mermaid を *C. elegans* 感覚ニューロンで発現させたが、aggregation が生じており、活動に伴う蛍光変化が観察できていない。現在は、アミノ酸配列の最適化などによる aggregation 解消を検討している。

また、顕微鏡上で定量的な匂い刺激を与える事も問題の一つであった。将来的には *C. elegans* がプラスチックシャーレ内での忌避行動中に経験するノナノン濃度の変化を、顕微鏡での膜電位変化測定中に再現する事も目的の一つとしているため、適切な手段を検討し続けてきた。2009 年になって、*C. elegans* の研究者である de Bono 博士(英国 MRC)の研究室から、マイクロ流体装置を用いた顕微鏡上での *C. elegans* 匂い刺激装置が報告された(Persson et al., Nature, 2009)。そこで、de Bono 博士のグループと共同研究を開始し、そのマイクロ流体装置を当研究室で使用できるようにした。

なお、Ca^{++}センサーであるcameleonは、特定の感覚ニューロンで発現させ、液相刺激用のマイクロ流体装置で刺激することができた(木村ら、未発表)。

3)行動の原理を明らかにするための、匂い忌避行動の数理解析

動物(微生物を含む)の行動パターンには、その動物の刺激の検出方法や刺激に対する行動戦略が反映される。例えば、体長が μm オーダーであることから化学物質の空間勾配を検

出できないバクテリアは、biased random walk という手段で化学物質の時間勾配を検出し、誘引行動や忌避行動を行う。*C. elegans* の塩に対する誘引行動や温度走性行動も、これまでは基本的に biased random walk で説明されてきた。

従来の *C. elegans* の行動解析では、顕微鏡上での *C. elegans* の位置を画像から計算し、顕微鏡の視野から外れる場合に電動ステージで位置を調整する方法が用いられてきた。しかし、匂いの勾配を用いる本研究では電動ステージで *C. elegans* の位置を動かす事はできない。そこで、本研究では画像取得用の LED リング照明とハイビジョンを超える高解像度カメラ(2,000 x 2,000 画素)を組み合わせる事で、シンプルで安価な *C. elegans* 行動記録システムを開発した(図3)。なお、このシステムは関連研究者からの評価が高く、東京大学や米国 Rockefeller 大学の研究者からも問い合わせが来ている。この独自システムを用いた解析を行った結果、以下の事実が明らかになった。

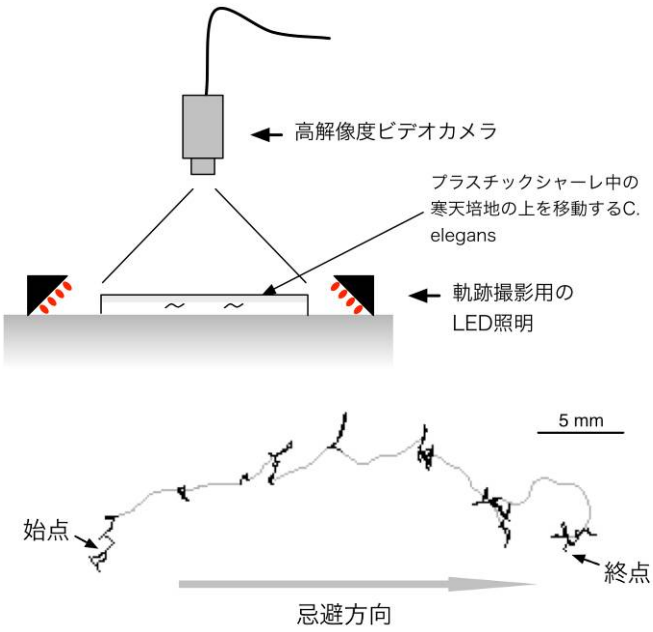


図3 (上) *C. elegans* の軌跡行動記録システム。(下) *C. elegans* のノナノン忌避行動の軌跡の例。灰色の部分が直進期(ラン)、黒色部分が方向転換期(ピルエット)。

(i) ノナノン忌避行動は、*C. elegans* の他の行動と同様に、直進期(ラン)と方向転換期(ピルエット)という2つの状態を繰り返す。ただし、他の行動と比べて、方向転換期の平均時間が大幅に長い(木村ら、投稿中)。

(ii) ノナノン忌避では、匂いの勾配に対する感受性が高い。アッセイに用いている 9cm のプラスチックシャーレ内における局所的なノナノン濃度変化のシミュレーションと測定(後述)の結果から推測すると、わずか 1%/mm 程度の濃度差を感知して匂い勾配の方向を検出していると考えられる(木村ら、投稿準備中)。

前述のように、*C. elegans* の行動は空間勾配を認識しない biased random walk であると考えられてきたが、本研究からノナノン忌避は空間勾配を認識した行動("taxis")である可能性が示唆された。動物個体が空間勾配を認識するためには、空間的に充分離れた複数の点で同時に刺激を感知する stereo-sensing が必要であるはずだが、*C. elegans* の匂い受容器はこの条件を満たさない。従って、*C. elegans* のノナノン忌避行動の制御基盤を明らかにするという事は、生物が刺激の勾配を認識するための新たな戦略の解明につながる可能性がある。

今後は、この空間勾配認識メカニズムの実体を、遺伝子および神経回路レベルで明らかにする事を目指す。

4)匂い刺激の定量的測定

行動の経時変化の定量的解析にあたっては、刺激であるノナノンの量がどのように変化するかを理解する事が重要である。プラスチックシャーレのような微小な環境で局所的匂い濃度を測定することは困難であるが、中本高道博士(東工大)のグループおよび岩崎唯史博士(茨城大)との共同研究により、プレート中におけるノナノン濃度変化の一端を明らかにすることができた(木村ら、投稿準備中)。まず、非常に微量な物質の濃度変化を測定する水晶振動子センサーをノナノン計測用に最適化した。次に、このセンサーをプラスチックシャーレ内3カ所に置き、ノナノンを揮発させた際の各センサーの応答変化を比較した。その結果、プレートの位置によるノナノンの濃度差は、拡散だけを考慮したシミュレーションモデルよりも大きい

事が分かった（図4）。なお、今後はガスクロマトグラフィーを組み合わせる事で、より定量性の高い測定を目指す予定である。

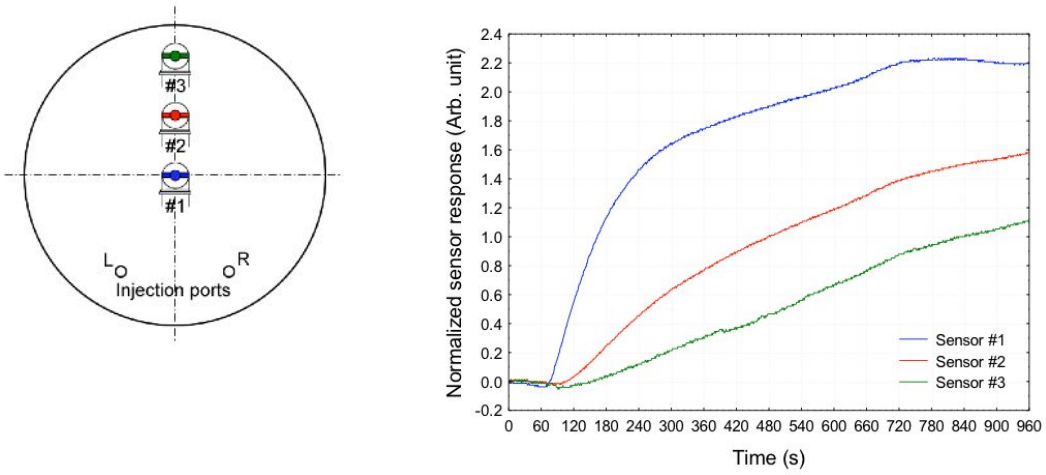


図4　9cmプラスチックシャーレ内におけるノナノン濃度変化の様子。（左）#1, 2, 3がセンサーの位置。LとRにノナノンをスポット。（右）センサー応答の様子。拡散だけに基づく当初の予想よりもセンサーの位置によるセンサー応答（すなわちノナノン濃度）の違いが大きい。

5．自己評価

研究提案時の目標は、*C. elegans* の神経回路における神経細胞活動の可視化であった。しかし領域会議でのアドバイスなどに基づき、遺伝学的解析や行動レベルの解析が容易である *C. elegans* を研究対象とする事のメリットを充分に活かすために、研究目標を「シンプルな神経回路機能の統合的理解」へと拡張することにした。具体的には、(1) 神経機能の重要な側面である学習（ノナノン忌避行動増強）の遺伝学的解析、(2)神経回路に対する入力（刺激）と出力（行動）の動的変化の定量的解析、などの目標を加えた。

結果として、忌避行動増強に関与するドーパミンシグナル伝達の遺伝学的解析はほぼ順調に進めることができた。膜電位イメージングによる *C. elegans* 神経細胞の可視化について大きな成果をあげることはまだできていないが、イメージング系の確立に加えて、定量的な匂い刺激の問題がほぼ解決されて、今後の解析への充分なメドが立った事は大きな収穫であった。また、行動レベルの解析は当初の予想を超えて、全く新たな見地から神経回路の機能、さらにこれを制御する遺伝子の機能の解析へとつながる大きな可能性を秘めていると考えている。匂い濃度変化の測定などの結果も含めて、全体的には当初の予測以上に「統合的解析」への環境が整ったと考えている。

6．研究総括の見解

神経機能の重要な側面である学習（ノナノン忌避行動増強）の遺伝学的解析、神経回路に対する入力（刺激）と出力（行動）の動的変化の定量的解析などの結果から、忌避行動増強に関与するドーパミンシグナル伝達の遺伝学的解析を順調に進め、目標を達成している。今後の方向を何にするのか期待と興味を持って見守っていきたい。

7．主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

現在再投稿準備中。

②特許

研究期間累積件数：1 件

発　明　者:木村幸太郎、桂勲
発明の名称:ドーパミンシグナル伝達阻害剤のスクリーニング法
出　願　人:JST
出　願　日:2009/1/23

③招待講演など

1. 木村幸太郎 「Enhancement of odor avoidance is regulated by dopamine signaling in the nematode *C. elegans*.」第7回国際シンポジウム―味覚嗅覚の分子神経機構　2009 年 11 月(招待講演)

2. 木村幸太郎 「Enhancement of odor avoidance by preexposure is regulated by dopamine in the nematode *C. elegans*.」総研大国際セミナー行動神経科学における進化研究　2008 年 6 月　(招待講演)

3. 木村幸太郎 「線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動の統合的解析～神経系が『系』として働くための原理解明を目指して」 生理研研究会―シナプス可塑性の分子基盤　2008 年 6 月 (招待講演)

4. 木村幸太郎 「事前刺激で増強される線虫 *C. elegans* の匂い忌避行動にはドーパミンが必要である」第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同学会 シンポジウム―新世代神経行動学のストラテジー　2007 年 9 月 (招待講演)

④外部発表

1. 木村幸太郎 「Enhancement of odor avoidance by preexposure in *C. elegans*.」Gordon Research Conference: Neural Circuits & Plasticity　2007 年 7 月

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Oishi A, Gengyo-Ando K, Mitani S, Mohri-Shiomi A, Kimura KD, Ishihara T, Katsura I. FLR-2, the glycoprotein hormone alpha subunit, is involved in the neural control of intestinal functions in *Caenorhabditis elegans*. Genes to cells. 14, 1141-1154 (2009)

2. Kuhara A, Okumura M, Kimata T, Tanizawa Y, Takano R, Kimura KD, Inada H, Matsumoto K, Mori I. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. Science. 320, 803-807 (2008)

3. Kodama E, Kuhara A, Mohri-Shiomi A, Kimura KD, Okumura M, Tomioka M, Iino Y, Mori I. Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in *C. elegans*. Genes & development. 20, 2955-2960 (2006)

研究課題別評価書

1．研究課題名
モデル共生系における創発的機能発現メカニズムの解明

2．氏名
高坂　智之

3．研究のねらい
本研究では、生命システムを理解する為に、実際の自然界の共生のモデルとなり得る嫌気的なプロピオン酸酸化共生系に着目し、この共生に関わる2つの微生物、プロピオン酸酸化共生細菌及び水素資化性メタン生成アーキアがどのように共生を構築して行くのかを分析する事により、異なる2つの生命システムが1つのシステムを作り上げ、そして一つのシステムとして新しい機能を獲得して行く過程を明らかにする事を目的とする。

4．研究成果

a. プロピオン酸酸化共生系の解析

我々はまず、プロピオン酸酸化共生細菌である *Pelotomaculum thermopropionicum* SI 株（SI 株）と水素資化性メタン生成アーキア *Methanothermobacter thermautotrophicus* delta H 株（delta H 株）をそれぞれ単独培養から再共生させる系の構築に取り組んだ。単独から共生させ、共生して行く過程を解析して行くことが重要であると考えたためである。しかし、様々な培養条件を試して実験を試みたが、我々の系では単独培養した SI 株と delta H 株を単純に混ぜあわせてもプロピオン酸を基質とした増殖が観察されないことが明らかとなった。また、我々が保有するプロピオン酸酸化共生系は凝集を形成するのに対し(Fig. 1A)、単独から混ぜあわせた共生系は凝集しないことが明らかとなった（Fig. 1B)。

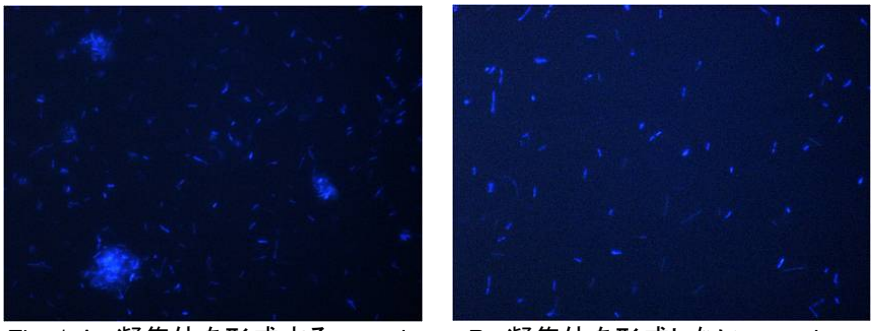


Fig. 1 A, 凝集体を形成する coculture; B, 凝集体を形成しない coculture

そこで我々は、プロピオン酸を基質に共生出来る共生系と単独培養の各菌株の違いを明らかにする為、共生系中のプロピオン酸酸化共生細菌及び水素資化性メタン生成アーキアの全ゲノム配列を解読した。その結果、SI 株をリファレンスとした解析では、得られた配列でリファレンス配列の全領域をカバーする結果が得られた（Fig. 2 左)。この事から、共生系のプロピオン酸酸化共生細菌は SI 株とほぼ同一のゲノム配列を持つ事が示された。一方、delta H 株をリファレンスとした解析では、ある程度の部分では配列と一致が見られたが、全領域をカバーする事が出来なかった。特にゲノムの複製に関わると考えられる ori 領域付近の配列が大きく異なっており、この領域に関してはほとんど塩基配列の一致が見られなかった（Fig. 2 右)。

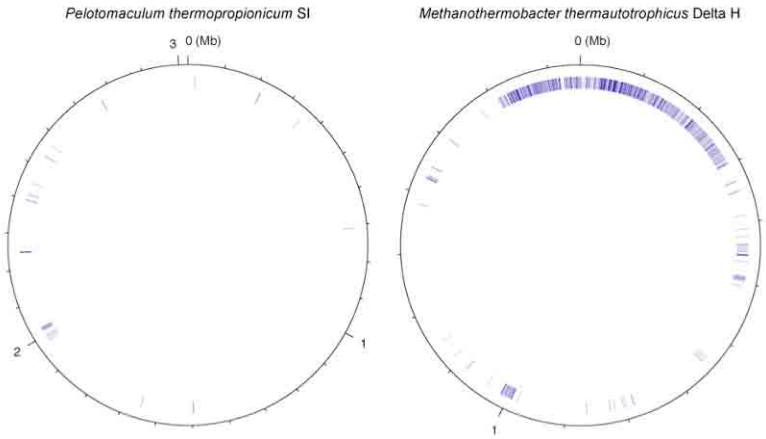


Fig. 2. 共生系の全ゲノム配列解析結果（左: プロピオン酸酸化共生細菌、右: メタン菌）
黒線で示す円が reference 配列。青線の部分が reference 配列と一致しなかった部分。

この結果から、プロピオン酸共生系のメタン菌はそのゲノムが delta H 株とは大きく異なる可能性が示唆された。我々はこの共生系よりメタン菌を分離し、その菌株の名前を *Methanothermobacter thermautotrophicus* CaT2 株（CaT2 株）と名付けた。この CaT2 株は delta H 株に比べ凝集体を形成しやすい事が明らかとなった（Fig. 3）。

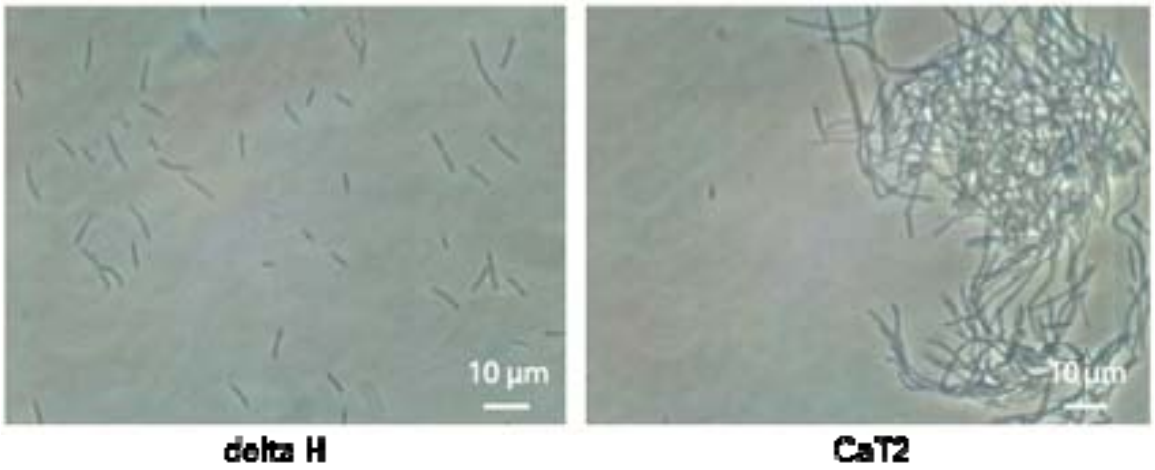


Fig. 3. メタン菌の光学顕微鏡観察

また、培養法を検討することによって、SI 株と CaT2 株及び SI 株と delta H 株を単独培養からプロピオン酸を基質に共生させることに成功した。

b. CaT2 株の全ゲノム解析

我々は、CaT2 株の分子基盤を強化し、プロピオン酸酸化共生細菌との共生過程を解析しやすくするために、CaT2 株の全ゲノムをコンプリートした。その後アノテーション解析を完了し、1.71 Mbp のゲノム配列上に 1759 の遺伝子を同定した。また、11 kbp のプラスミド上に 11 の遺伝子を同定した。このデータを基に、CaT2 株のゲノム情報と delta H 株のゲノム情報を比較した（**エラー! 参照元が見つかりません。**）。

Table 1. CaT2 株と delta H 株のゲノム比較

○ CaT2 と delta H のゲノム比較		**CaT2 株**	**delta H 株**
ゲノムサイズ		ca. 1.71 Mbp	ca. 1.75 Mbp
プラスミド		有	無
遺伝子数 (プラスミド内)		1759 (11)	1854
	特有遺伝子	88	212
	内 hypothetical protein (HP)	54	156
	HP 以外遺伝子	34	56

その結果、delta H 株と比較して CaT2 株に特異な遺伝子として 88 の遺伝子が見いだされ、その中には CaT2 株の特徴であるギ酸資化に関わるギ酸デヒドロゲナーゼの一群の遺伝子が含まれていた。この事から、CaT2 株の有するギ酸資化能が裏付けられた。また、特異的遺伝子の中には糖転移酵素が見いだされ、これら遺伝子の CaT2 株の凝集能への関与が示唆された。

5. 自己評価

この課題スタート時には単独の状態から共生させることができなかったが、共生状態の微生物のゲノム解析を行うことで、想定していた微生物とは異なる微生物が共生していたことや、培養法に問題があったことを明確にすることが出来、単独の状態からスムーズに再共生出来るようになった。また、共生微生物のゲノム解析を行うことができ、共生微生物の情報基盤を強化することができた。さらに、共生系から経時的に RNA の抽出を行い解析を行う一連の解析系が構築出来た。

6. 研究総括の見解

異なる2つの微生物を共生させ、それぞれの微生物から経時的に転写解析を行うための RNA を抽出し、そしてそれ分析するためのマイクロアレイの構築を行ない、共生させる微生物のゲノム解析を行うことができ、共生微生物の情報基盤を強化することができたことは、評価できる。これらのデータを活かし、今後の発展を期待したい。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Kosaka T, Kato S, Shimoyama T, Ishii S, Abe T, Watanabe K(2008) The genome of *Pelotomaculum thermopropionicum* reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota. Genome Research, 18, 442～448.

②学会誌への発表

1. 高坂智之、渡邉一哉 (2009)、ゲノム情報を基に微生物共生のメカニズムを探る、日本バイオインフォマティクス学会ニュースレター１９号p4-5

③学会発表

1．高坂智之、藤英博、豊田敦、藤山秋佐夫、花田智、織田雅直(2009). 高温性水素資化性メタン生成菌の凝集性に関する解析. 第23回日本微生物生態学会大会. 広島県東広島市.

2．高坂智之, 花田智(2009). 凝集性を示す高温の水素資化性メタン生成アーキア. 日本農芸化学会2009年度大会. 福岡県福岡市.

3．Kosaka T, Kato S, Watanabe K, Hanada S, Nakamura K(2008). The existence of coaggregates seriously affects on syntrophic propionate oxidation. The 12th International Symposium on Microbial Ecology. Cairns, Australia.

4．高坂智之, 加藤創一郎, 下山武文, 石井俊一, 阿部貴志, 渡辺一哉(2008). 生育環境に適応し進化した *Pelotomaculum thermopropionicum* のゲノム. 第2回日本ゲノム微生物学会. 大阪府吹田市

【 B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1．Kato S, Kosaka T, Watanabe K(2009). Substrate-dependent transcriptomic shifts in *Pelotomaculum thermopropionicum* grown in syntrophic co-culture with *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Microbial Biotechnology, 2, 575～584.

2．Habe H, Kobuna A, Hosoda A, Kosaka T, Endoh T, Tamura H, Yamane H, Nojiri H, Omori T, Watanabe K(2009) Identification of the electron transfer flavoprotein as upregulated enzyme in the benzoate utilization of *Desulfotignum balticum*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 73, 1647～1652.

3．Kato S, Kosaka T, Watanabe K(2008) Comparative transcriptome analysis of responses of *Methanothermobacter thermautotrophicus* to different environmental stimuli. Environmental Microbiology, 10, 893～905.

研究課題別評価書

1．研究課題名

神経前駆細胞の非対称分裂に関与する分子装置の解析

2．氏名

眞田　佳門

3．研究のねらい

大脳新皮質を構成する錐体神経細胞は神経前駆細胞から生み出される。神経前駆細胞は脳室を取り囲む領域（脳室帯）に存在し、大脳新皮質の発生の初期段階では、神経前駆細胞は対称分裂して自己増殖する。一方、発生が進むのに伴って、神経前駆細胞は非対称に分裂して神経細胞と神経前駆細胞という互いに異なる二つの細胞を生み出す。このようにして誕生した神経細胞はその後、脳表層側に移動して成熟する。一方、発生の後期においては、神経前駆細胞からアストロサイトなどのグリア細胞が誕生する。このように、神経前駆細胞の運命は発生時期に応じて厳密に規定されている。

従来の研究から、神経前駆細胞の運命決定に関与するシグナリングとして、チロシンキナーゼ型受容体を介したシグナリングやサイトカイン受容体を介したシグナリングが良く研究されている。他方、G 蛋白質共役受容体(GPCR)は膜受容体の中で最大のファミリーを構成するが、GPCR を介したシグナリングが神経前駆細胞の運命決定に寄与するのかについては、全く謎に包まれていた。本研究では、神経前駆細胞の運命決定に寄与する新規情報伝達機序の発見を目指して、神経前駆細胞に発現する GPCR を探索し、その生理的役割を解析した。

また、神経新生・神経細胞移動・神経細胞成熟のいずれの過程にも、細胞の極性化が重要な役割を果たす。このような知見のもと、上述した GPCR の解析と並行して、進化的に良く保存されている極性分子である LKB1 キナーゼに着目し、大脳新皮質の形成における役割を解析した。

4．研究成果

研究の方法

発生期のマウス大脳新皮質における様々な分子の役割を調べるため、神経前駆細胞に shRNA を発現する RNAi プラスミドを電気細胞法により in vivo 導入し、目的分子の発現を抑制した。さらに、遺伝子導入された神経前駆細胞および神経細胞の性状を発生期の様々な時期に解析した。

研究成果

（1）大脳新皮質の発生におけるLKB1 の役割解析

LKB1 は様々な細胞腫において極性形成に重要な役割を果たす Ser/Thr キナーゼである。発生期のマウス脳における LKB1 の発現を調べた結果、神経前駆細胞が存在する脳室帯、移動中の細胞が局在する中間帯、および成熟中の神経細胞が存在する皮質板に *Lkb1* 遺伝子の発現が認められた。そこで、LKB1 に対する shRNA 発現ベクターを構築し、神経前駆細胞において LKB1 をノックダウンした。その後、神経前駆細胞から誕生した神経細胞の分布を調べたところ、コントロール細胞の多くは脳表層側に移動するのに対して、ノックダウン細胞の多くは中間体に蓄積していた。このことから、LKB1 は神経細胞移動に必要不可欠であることが明らかになった。移動中の神経細胞は、移動方向に短い先導突起を持ち、その根元に中心体が局在する。移動する際は、先導突起が進行方向に伸長すると共に中心体が前方に移動し、その後に、核が中心体の方向に移動することが知られている（図1）。従来の研究から、この中心体と核との協調動作が神経細胞の移動に重要であることが知られていた。驚いたことに、LKB1 を発現抑制した神経細胞では、中心体の配置が異常を呈していた。このことから LKB1 は、中心体の

配置を制御することによって、神経細胞移動に大きく寄与していると推察できた（Asada et al., J. Neurosci. 2007）。

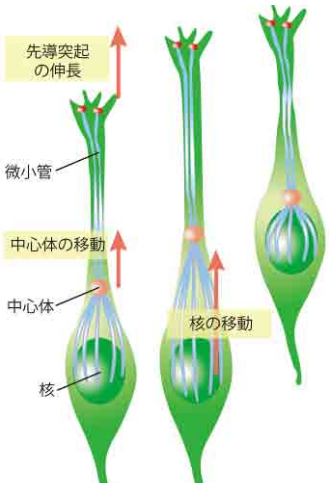


図1　神経細胞移動に伴うイベン

さらに、移動中の神経細胞における LKB1 の下流シグナリングを探索した。その結果、LKB1 は GSK3β の Ser9 のリン酸化を担い、GSK3β の不活性化に寄与することを見出した。興味深いことに、Ser9 リン酸化型の GSK3β は先導突起の先端に濃縮して存在し、Ser9 がリン酸化されない GSK3β 変異体を移動中の神経細胞に発現すると、中心体の移動が顕著に停滞した。このことから、LKB1 は GSK3β のリン酸化および不活性化を介して、中心体の移動および神経細胞の移動に貢献していることが示唆できた。また、GSK3β の標的分子を精査したところ、GSK3β の Ser9 リン酸化の阻害に伴って、(1)APC が微小管のプラス端から解離すること、さらに(2)先導突起内の微小管が不安定化すること、を見出した。APC は微小管のプラス端と結合して微小管の膜アンカーおよび安定化に寄与すること、さらに GSK3β によってリン酸化されるとプラス端に結合できなくなることが知られている。このことから、先導突起において、(1)GSK3β が LKB1 によってリン酸化されて不活性化し、(2)その結果として APC が微小管プラス端に結合でき、さらに（3）APC を介して微小管が膜にアンカーして安定化する、というモデルが得られた。加えて、これら一連の過程が中心体の移動に必須であることから、微小管が膜にアンカーすることによって進行方向に引っ張られていると推察できた（図2参照、Asada & Sanada 投稿中）。

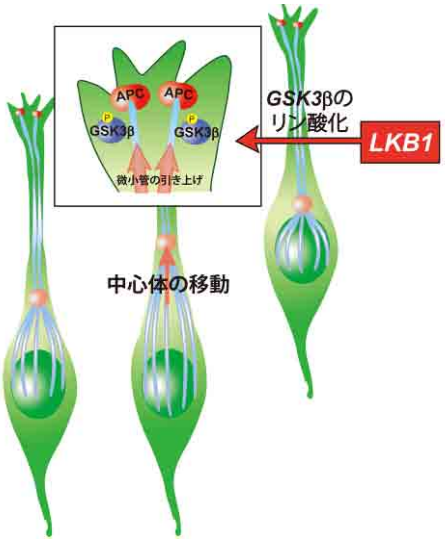


図2　LKB1 シグナリングの役割モデル

次に、神経細胞の成熟における LKB1 の役割を解析した。成熟過程にある神経細胞は皮質板に位置し、脳膜側に太い樹状突起を伸ばすと同時に、脳室側に細く長い軸索を伸ばす。興味深いことに、LKB1 に対する shRNA を導入した場合、多くの細胞が逆転した配向を呈し、脳室側に樹状突起を形成していた。さらに、中心体の位置を精査すると、逆転した配向を持つ神経細胞では、核に対して通常とは反対の位置に中心体が配置していた。これらの結果から、LKB1 は、中心体を適切な位置に配置することによって、樹状突起・軸索の形成方向を制御していることが示唆された（Asada et al., J. Neurosci. 2007）。

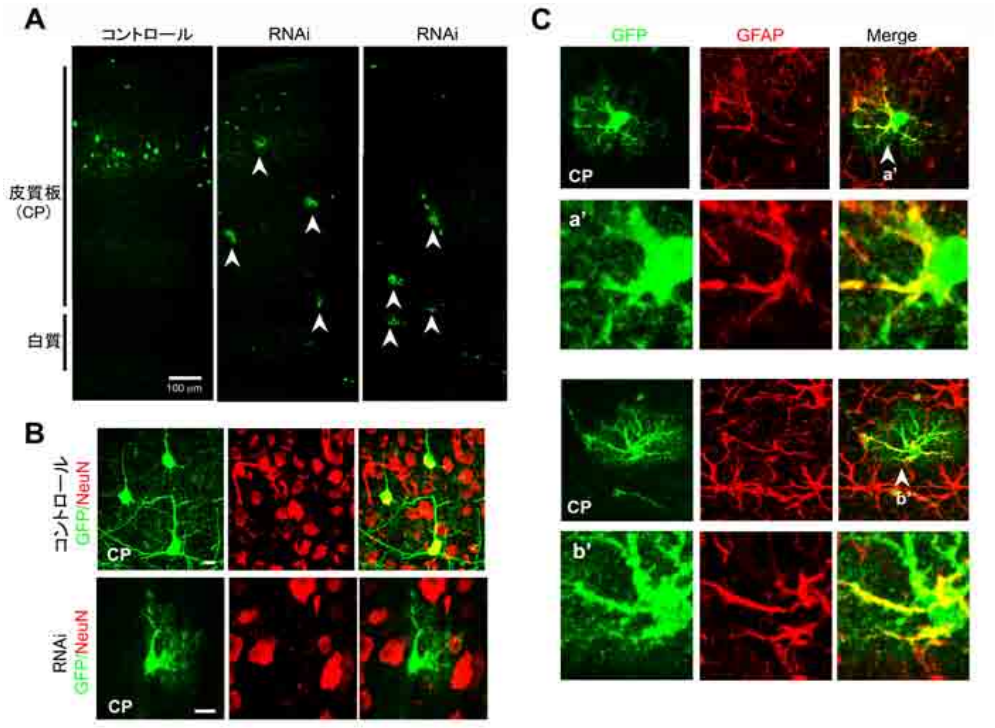
以上の解析から LKB1 は、中心体の局在やダイナミクスを空間的に制御することによって、神経細胞の移動および成熟に寄与すると考えられた。本研究は、微小管や中心体の方向性を持った制御に LKB1 が大きく寄与することを明らかにしたのと同時に、神経細胞の移動・成熟において中心体の位置制御が重要な鍵となるイベントであることを示している。これらの知見は、神経系の構築メカニズムを理解するうえで極めて重要な知見であると考えられた。

（2）神経前駆細胞の運命決定におけるオーファンGPCRの役割解析

神経前駆細胞の運命決定に関与する新規情報伝達機序に迫るため、リガンド未知の GPCR（オーファン GPCR）に焦点を絞り、神経前駆細胞に発現する受容体の探索およびその役割を解析した。神経前駆細胞に発現するオーファン GPCR を探索するため、マウス胎児の大脳新皮質由来の cDNA を用いた PCR およびマウス胎児の脳切片を用いた in situ ハイブリダイゼーションを実施した。その結果、神経前駆細胞に特異的に発現するオーファン G 蛋白質共役受容体

(oGPCR)を発見した。この分子の発生期前脳における発現パターンを詳細に解析した結果、神経前駆細胞の脳室壁に面した領域に強い発現が観察できた。そこで、生体内での役割を調べるため、この分子に対するshRNAを作製した。胎生13日目のマウス大脳新皮質にshRNAをin vivo 導入してノックダウンした結果、神経前駆細胞が減少するのと同時に、神経細胞への分化過程にある細胞が顕著に減少していた(胎生 15 日目に観察)。このことから、神経前駆細胞が神経細胞へと分化する際に、この G 蛋白質共役受容体を介したシグナリングが重要な役割を果たしていることが判明した。

さらに、これらノックダウン細胞の運命を様々な発生時期において精査した。胎生 14 日目の神経前駆細胞にRNAiを導入して、18日目にそれら細胞の運命を解析したところ、コントロール前駆細胞の大部分は神経細胞に分化しているのに対して、RNAi が導入された細胞は神経細胞ではなかった。さらに、出生後 4 日目で調べたところ、約半数のノックダウン細胞がMusashi1(アストロサイト前駆細胞のマーカー)を発現しており、さらに出生後 14 日目で調べると、多くの細胞がS100およびGFAP(いずれもアストロサイトのマーカー分子)を発現するようになった(図3)。以上の解析から、神経前駆細胞において、G 蛋白質共役受容体を介したシグナリングが神経細胞への分化に重要な役割を果たしていること、さらに、アストロサイトへの分化を抑制している可能性が考えられた。



(A) GFP(コントロール)もしくはGFP/RNAiプラスミド(RNAi)を胎生14日目の大脳新皮質の神経前駆細胞に導入し、出生後14日目に大脳新皮質の切片を作成した。GFP陽性細胞の像を示した。

(B) GFP陽性細胞を神経細胞マーカー(NeuN)を用いて蛍光免疫染色した。

(C) RNAiが導入された細胞をアストロサイトのマーカー (GFAP)を用いて蛍光免疫染色した。強拡大像 (a'およびb')も同時に示した。

図3 oGPCR ノックダウン細胞の運命

一般的に、三量体G蛋白質αサブユニットは$G\alpha_i$、$G\alpha_s$、$G\alpha_q$、および$G\alpha_{12/13}$のサブタイプに大別できる。このoGPCRと共役する三量体G蛋白質αサブユニットを精査したところ、$G\alpha_{12/13}$タイプとカップルする可能性が示唆できた。$G\alpha_{12/13}$のC末端断片を細胞内に過剰発現すると、GPCRから$G\alpha_{12/13}$へのシグナリングが阻害できることが知られる。この知見をもとに、神経前駆細胞に$G\alpha_{12/13}$のC末端断片をin vivo導入した結果、遺伝子導入された細胞の多くは、

神経細胞へと分化することなく、その代わりにMusashi-1 陽性であった。このことから、神経細胞の系譜からアストロサイトの系譜へと運命が変化していることが判明した。

本研究により、神経前駆細胞の運命決定に G 蛋白質共役受容体シグナリングが関与するという、極めて重要かつ新規性の高い現象を見出すことができた。このことは、神経前駆細胞の運命決定に関与する複雑な分子基盤を考える上で新たな一歩となりえる。現在、神経系の疾患や損傷に対する治療法として神経再生治療が注目されている。本研究で得られた知見は、神経幹細胞を神経細胞へと人為的に分化させる際に G 蛋白質共役受容体のリガンドが使用できる可能性を示唆するものであり、新たな治療戦略の確立に寄与する可能性がある。

5. 自己評価

『GPCR が神経前駆細胞の運命決定に寄与するのではないか』というきわめてチャレンジングな作業仮説をもとに、本研究をスタートした。本研究によって、GPCR を介したシグナリングが神経前駆細胞の神経分化に必要であることを明らかにすることができ、当初の目的はおおむね達成できた。その一方で、GPCR の作用機構、内因性リガンド、さらに発生時期に応じた制御機構など、解決すべき新たなる課題が残された。

また、移動中の神経細胞では、核移動に先行して中心体が進行方向に移動する。この中心体の移動に関する分子機構は長らく不明であった。本研究により、LKB1 を介したシグナリングが先導突起内で活性化され、微小管の制御を介して中心体を引っ張り上げるというモデルを提唱できた。また、in vivo において成熟中の神経細胞の極性を LKB1 がコントロールしていることを明らかにした。これらの知見は世界に先駆ける成果であり、神経細胞の移動および成熟に関する LKB1 の役割解析という目的は充分に達成できた。本研究から、LKB1 は神経前駆細胞にも発現していることが判明しており、神経前駆細胞においても何らかの役割を果たしていると考えられる。大脳新皮質の発生における LKB1 の生理的役割を考える上で、この点を明らかにすることは大きな課題として残された。

6. 研究総括の見解

GPCR を介したシグナリングが神経前駆細胞の神経分化に必要であることを明らかにしたことは、評価できる。また、移動中の神経細胞では、核移動に先行して中心体が進行方向に移動するが、この中心体の移動に関する分子機構に関して、LKB1 を介したシグナリングが先導突起内で活性化され、微小管の制御を介して中心体を引っ張り上げるというモデルを提唱するなど新しい分野を切り開いており、今後の展開が楽しみである。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Tamai S., Sanada K. *, & Fukada Y. * Time-of-day-dependent enhancement of adultneurogenesis in the hippocampus. PloS One 3, e3835. (2009). *corresponding authors.

2. Asada N., Sanada K.*, & Fukada Y.* (2007) LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. J. Neurosci. 27, 11769-75. *corresponding authors.

②総説

1. 眞田佳門 (2008). 神経前駆細胞の増殖と分化のコントロール ～細胞分裂軸の制御と非対称分裂～ 脳21 Vol.11, No.4 105-110.

③学会発表等

1. 眞田佳門 「成体脳の海馬におけるニューロン新生の日内変動」 頭部形成研究会 2008、

阿蘇、2008 年 4 月 15 日

2. 眞田佳門 「大脳新皮質における神経細胞の移動および分化におけるLKB1 の役割」 日本発生生物学会　秋季シンポジウム、岡崎、2007 年 11 月 6 日

3. 浅田直行、眞田佳門、深田吉孝 「大脳新皮質の発生過程で LKB1 は神経細胞移動と分化を制御する」 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会　合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日

4. 玉井総一、眞田佳門、深田吉孝 「海馬の神経新生部位における神経幹細胞の分裂の日内制御」 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会　合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日

5. Sanada K. : Control of Neuronal Progenitor Differentiation by Heterotrimeric G-proteins in the Developing Neocortex. The 5th Catholic International Stem Cell Symposium: Cutting Edges & Workshop, Seoul, South Korea, July. 13, 2007

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Kurabayashi N., Hirota T., Sakai M., Sanada K., & Fukada Y. DYRK1A and GSK-3・: A dual kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. (in press)

2. B: Shim S.Y., Wang J., Asada N., Neumayer G., Tran H.C., Ishiguro K., Sanada K., Nakatani Y., & Nguyen M.D. (2008) Protein P600 is a microtubule/endoplasmic reticulum-associated protein in CNS neurons. J. Neurosci. 28, 3604-14.

3. Xie Z, Moy LY, Sanada K, Zhou Y, Buchman JJ, & Tsai LH. (2007) Cep120 and TACCs control interkinetic nuclear migration and the neural progenitor pool. Neuron 4, 79-93.

研究課題別評価書

1．研究課題名
RNAポリメラーゼの安定性に関わる宿主因子の探索

2．氏名
新矢　恭子

3．研究のねらい
毎年冬になると人社会で流行するインフルエンザウイルスは長年にわたり鴨などの水禽類の体内で寄生生活を行ってきたウイルスを起源とします。インフルエンザウイルスの8本の遺伝子は、水禽類の体内では、あまり遺伝子変異が起こらず、比較的安定に保たれていますが、人で流行している人のインフルエンザウイルスの遺伝子配列には、多くの変異が観察される傾向があります。人のインフルエンザウイルスは、なぜ、遺伝子変異を起こしやすいのか、その謎を探ります。

4．研究成果
A 型インフルエンザウイルスは、ヒトを含む多くの動物から、病原体として分離されていますが、全ての A 型インフルエンザウイルスの起源は、自然宿主と考えられている水禽類がもっているウイルス集団にあると考えられています。つまり、自然宿主である水禽類の集団の中では、病気もおこさず静かに感染環がまわっているウイルスが、稀に、他の動物種の集団内に侵入をして病気をおこすようになったものとかんがえられています。
ヒトでの A 型インフルエンザウイルス感染症は、主に呼吸器病を引き起こします。病気を引き起こす「病原体」であることから、非常に恐ろしいイメージを抱きますが、実際は、核酸・蛋白質・脂質二重膜からなる小さな、そして単純な構造体です。その大きさは、約80～100ナノメートルと言われています。ヒトのゲノムがDNA から成っており、全ゲノム長が30億と言われるのに対し、A 型インフルエンザウイルスのゲノムは RNA から成り、全ゲノム長がたったの１万3千しかなく、そこから作られるウイルス固有の蛋白質は知られている範囲で１１種類のみです。ところが一旦、生きた細胞に感染が成立すると、強力な細胞ハイジャックシステムが働き始めます。ウイルスは感染細胞内で脱殻し、ウイルス遺伝子が細胞核へと移行します。細胞は、ウイルス蛋白質とウイルス遺伝子 RNA の生産を始めます。その後、細胞は子孫ウイルスを産生し、最終的には死に至ります。この強力な細胞ハイジャック成功の秘訣は、細胞への侵入後、速やかにウイルス固有の遺伝子産生をし、ウイルス固有の蛋白質を産生する点にあると考えられます。そして、実際にウイルスから細胞内に持ち込まれるウイルス側の物質のうち、これらの機能に関わっていると考えられるのが細胞核内に移行する部分（ウイルスの RNA ポリメラーゼユニット、核蛋白質、ウイルス RNA）です。したがって、ウイルスの RNA ポリメラーゼユニットは、ウイルスが細胞に感染し、動物個体に病気を発症させる過程で重要な役割を果たしているのではないかと考えています。
その様な大切な役割をしているウイルスの RNA ポリメラーゼですが、実は、ヒトの A 型インフルエンザウイルスに、ワクチンがすぐ効かなくなる、進化速度が速い、分離されるウイルスは多くの変異ウイルス集団である、などの特徴があることから、「インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、RNA 複製時のエラー率が高い」と考えられてきました。そのため、１９８０年代から、ヒトのインフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼの複製エラー率を計算する研究がおこなわれています。また、それらの研究のなかから、ウイルスは生きた細胞で増殖を繰り返しているうちにその子孫ウイルス集団のなかに変異を促進するウイルス、Mutator Mutants、が出現してくるという考え方も生まれてきました。
そこで、私は先ず、水禽群に保持されている A 型インフルエンザウイルスの遺伝子プールとヒトで保持されている季節性インフルエンザウイルスの遺伝子プール内で、現代に分離されたウイ

ルス遺伝子と相同性の高いウイルス遺伝子が、過去に分離されたウイルスの遺伝子配列に見つかるかどうかを調べてみました。その結果、水禽類のウイルス遺伝子プールでは、ヒトのウイルス遺伝子プールに比べて、比較的安定に遺伝子配列が保たれている様子がわかりました。そのため、私は今回の研究で、水禽由来およびヒト由来 A 型インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼの RNA 複製における正確性の違いがあるかどうか、を調べてみたいと考えました。また、それに関連して、それぞれの RNA ポリメラーゼに関わる宿主因子に違いがあるかどうかもしらべてみたいと考えました。

最初におこなったのは、ヒト由来ウイルスと水禽由来ウイルスの RNA ポリメラーゼのエラー率の計算です。ヒト由来のウイルス RNA ポリメラーゼは、トリ由来のウイルス RNA ポリメラーゼよりもエラー率が高い傾向が見られました。次に、各々のウイルスポリメラーゼの活性を測ってみると、ヒト由来ウイルスの RNA ポリメラーゼの活性のほうが高い傾向がありました。つまり、ヒト由来ウイルスの RNA ポリメラーゼは、水禽由来ウイルスのポリメラーゼよりも、RNA 複製時のエラー率が高く、かつ、RNA 複製の活性も高い傾向がみられました。したがって、今度は、その原因を探ってみることにしました。

実は、トリ由来の A 型インフルエンザウイルスが、種の域を超えてヒトに感染して増殖する時、よりヒトの細胞で増殖しやすくなる変異、ヒト型変異、が入る現象が多くみられます。その際、ポリメラーゼ遺伝子そのものにもいくつかのヒト型変異がみられることが知られています。そのため、ポリメラーゼ遺伝子そのものに入った変異が、RNA 複製時のエラー率の上昇に関わっている可能性があるのではないかと考えました。

そこで、A 型インフルエンザウイルスが感染すると、ウイルスのポリメラーゼにヒト型変異がおこる動物モデルを探しました。そして、感染モデル動物として、ダチョウが役立つことを発見しました（ダチョウは、見た目がトリの仲間のようですが、生物の進化系統樹では、鳥類とは異なる系統に属します。それでもウイルスにヒト型変異がおこる、ヒトとおなじ細胞内システムを、ダチョウという生物が持っていることに驚かされますが。）。私たちは2種類のトリ由来ウイルスをダチョウに感染させて、呼吸器組織（気管・肺）、脳、肝臓、腎臓、脾臓からウイルスを分離し、その分離ウイルス集団内の個々のウイルスの遺伝子配列を調べました。その結果、肺以外の殆どの臓器のウイルス集団に多くの割合でヒト型変異ウイルスが含まれていることがわかりました。この感染モデル動物でポリメラーゼ遺伝子に変異が入ったウイルスが見つかったので、各々の元のウイルスの RNA ポリメラーゼと変異を持ったウイルスの RNA ポリメラーゼとで、RNA 複製時のエラー率を比較することにしました。現在、一つ一つのポリメラーゼの変異とエラー率との関係をみるための実験を重ねています。

5. 自己評価

試行錯誤の結果、ウイルス RNA ポリメラーゼによるウイルス RNA 合成量を測定する系が確立されたため、同系を活用して測定を重ねています。また、トリ由来ウイルスがヒトへ感染した時にみられるウイルス遺伝子の人型変異を再現することができる、感染モデル動物が見つかったので、その部分については、Journal of Virology に発表をしました。現時点で、当初目標の70%位の達成位置にあると考えています。

6. 研究総括の見解

ウイルスの RNA ポリメラーゼを in vitro の系で作動させ、変異率を計算する方法を確立し、ウイルス RNA ポリメラーゼの活性を評価する独自の方法を確立したことは、評価する。ヒト由来のウイルス RNA ポリメラーゼは、トリ由来のウイルス RNA ポリメラーゼよりも変異率が高い傾向をつきとめ、ヒト由来ウイルスの RNA ポリメラーゼの活性のほうが高い傾向があることも発見した。さらに、感染によって、A 型インフルエンザウイルスに人型変異が入るモデル動物を探索し、ダチョウがそのモデルになり得ることを発見したことは、今後の感染予防研究を加速させることに繋がると思う。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Shinya K, Watanabe S, Ito T, Kasai N, Kawaoka Y. Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. J Gen Virol. 2007 88:547-53.

2. Shinya K, Makino A, Ozawa M, Kim JH, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Le QM, Kawaoka Y. Ostrich involvement in the selection of H5N1 influenza virus possessing mammalian-type amino acids in PB2. J Virol. 2009 83:13015-8.

②受賞

平成 19 年度科学技術分野、文部科学大臣表彰、若手科学者賞

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Watanabe T, Watanabe S, Shinya K, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 106:588-92.

2. Cillóniz C, Shinya K, Peng X, Korth MJ, Proll SC, Aicher LD, Carter VS, Chang JH, Kobasa D, Feldmann F, Strong JE, Feldmann H, Kawaoka Y, Katze MG. Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes. PLoS Pathog. 2009 5:e1000604.

3. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. Nature. 2009 460:1021-5.

研究課題別評価書

1．研究課題名

細胞膜形態決定の動作原理の解明

2．氏名

末次　志郎

3．研究のねらい

細胞は機能にあわせた特定の形態を持っているが、細胞の形態を決める基本原理は明らかではない。細胞の最も外層を構成している細胞膜は、脂質二重膜により構成されている。脂質二重膜はそれ自体では形をとることができず、別のものによって支えられることで形態を保っていることが知られている。本研究では、細胞の骨組みである細胞骨格と細胞膜をつなぐインターフェイスとなる分子群の同定、機能解析を行うことで、特定の細胞が特定の形態を形成するための分子基盤の解明を目指す。

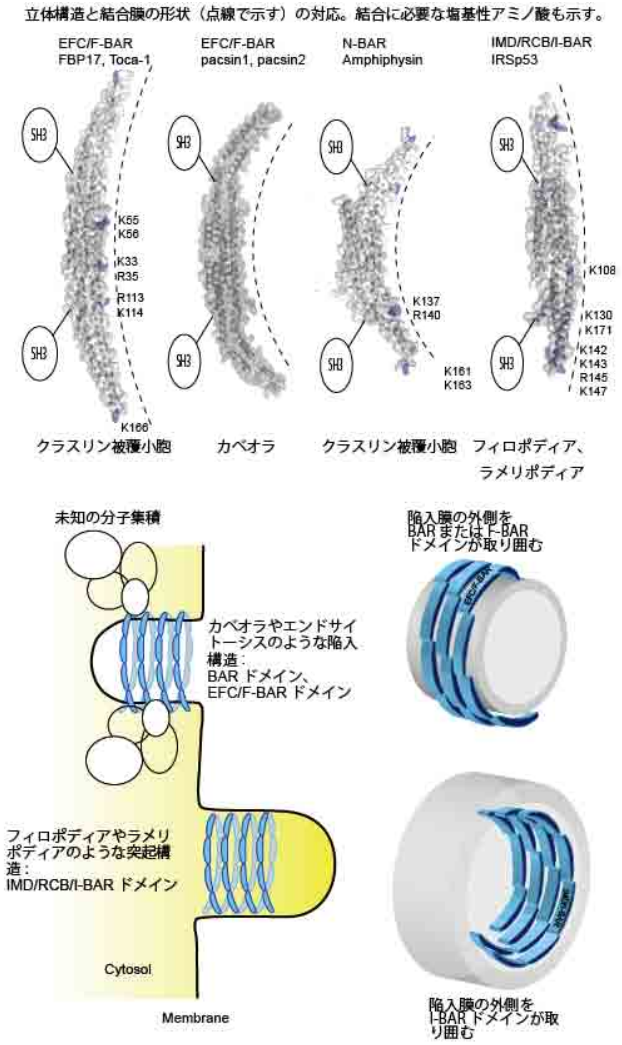
4．研究成果

細胞膜は脂質二重膜により構成されている。脂質二重膜は、それ自体では水溶液中では球体をとると考えられる。しかし、実際の細胞の形態はさまざまであり、細胞全体の形が球体でないものが多く存在するだけでなく、細胞表面も様々な微細構造が存在している。これらの微細構造は大きく分けて突起構造と陥入構造の2種類に分類される。突起構造の代表的な例は、繊維芽細胞や上皮細胞などの細胞移動先端や神経細胞の成長円錐で見られる糸状仮足（フィロポディア）や葉状仮足（ラメリポディア）である。これらの突起構造はともに3大細胞骨格の一つであるアクチン繊維の形成過程として知られるアクチン重合を駆動力として形成されると考えられている。細胞がアポトーシスを起こすときにはブレビングという突起形成を伴う現象が見られるが、こちらは細胞膜や裏打ち蛋白質が破綻することによって生じると考えられている。陥入構造にはエンドサイトーシスなどの輸送に関わるもの、コレステロール輸送やシグナル伝達の場とも考えら得るカベオラと呼ばれる構造が代表的である。エンドサイトーシスにおいては生じた陥入構造は、切断されて小胞となり輸送される。ある種の細胞に見られる構造としては、筋肉には T tubule （骨格筋横行細管）と呼ばれる長い陥入構造が細胞膜に存在し、カルシウムチャネルなどが集積している。

BAR ドメインは amphiphysin などのタンパク質の N 末端に多く見いだされるドメインである。Amphiphysin は骨格筋において細胞膜の陥入により形成される T 管に局在している。ショウジョウバエにおける amphiphysin 変異体解析により、T 管の陥入が正常に起こらないために、T 管のネットワーク構造が破綻し、T 管と筋小胞体の連携による筋収縮に異常を来すことが明らかにされた。Amphiphysin は N 末端に Bin-Amphiphysin-Rvs167 (BAR)ドメイン、C 末端に SH3 ドメインを持つアダプター分子である。BAR ドメインは脂質結合ドメインであり、SH3 はタンパク質－タンパク質相互作用を担うドメインである。興味深いことに BAR ドメインは in vitro で人工脂質二重膜を変形し、tubule を作ることができる。2004 年に McMahon らのグループによって BAR ドメインの立体構造が明らかにされた。興味深いことに BAR ドメインはバナナ型の構造をとるダイマーであった（図2）[9]。変異体の解析の結果、バナナ型のカーブの内側の正電荷と細胞膜の負電荷が相互作用し、膜を変形して tubule を作ると推察された。バナナ型の BAR ドメインの内側に膜が結合することから、BAR ドメインが、膜に巻き付くことで、tubule を形成するのではないかと考えられている。興味深いことに、立体構造から予想されるバナナ型のカーブの内側の半径と、in vitro でみられる tubule の半径はだいたい相関していると考えられている。

BARドメインは多数のタンパク質に見いだされる。私たちは BARドメインに弱い相同性を持つドメインとして、EFC (Extended FCH)あるいは F-BAR ドメインが見いだした。 FCH ドメインは、微小管結合ドメインとして見いだされたが、タンパク質ファミリー間の保存領域は FCHドメイン直

後に共通して見いだされるCoiled-coil 領域を含むことがわかった。この FCH+Coiled-coil 領域は、BAR ドメインと同じく、膜結合活性および膜変形(tubule 形成)活性を持っていた。従って、この領域全体で、EFC/F-BAR ドメインと名付けられた。しかしながら、膜変形の結果生じる tubule の半径は異なっていて、BAR と EFC ドメインは異なる膜形態に準拠して機能すると考えられる。タンパク質の局在は in vitro ではリポソーム(人工脂質二重膜)の外側であるのに対し、細胞におい手は細胞内(リポソームの内側)であるので過剰発現細胞ではチューブ形成が見られる。



EFC/F-BAR ドメインの立体構造を共同研究により明らかにしたところ、EFC/F-BAR ドメインも BAR ドメインと同様なαヘリックスからなる二量体でバナナ型の構造を取っていて、しかもバナナの内側の凹面は負に帯電していた。従って変異導入結果をあわせると立体構造上の凹面で膜に結合すると考えられる。EFC/F-BARドメインには、N-BARドメインで見られるような疎水性アミノ酸の膜への挿入はなさそうで、静電的相互作用によってのみ膜の変形が誘導されるようである。EFC/F-BAR ドメインは結晶中で、鎖を形成していた。しかも、鎖の部分の結合を担うアミノ酸に変異を導入すると膜変形能が消失することから、EFC/F-BARドメインはポリマーを形成しポリマーが膜を取り囲むようにして、膜変形を誘導するモデルが示唆された。このモデルは最近発表された膜に結合した状態のEFC/F-BARドメインの立体構造から支持される。膜変形に際して最初に平面膜にEFC/F-BARドメインが結合する際、立体構造上の凹面ではなく、側面が結合し、膜上でポリマー形成を行った後に膜が変形されると考えられている。

興味深いことに EFC および BAR ドメインを持つタンパク質のうち、FBP17、Toca-1、CIP4 や Pacsin/Syndapin など多数のタンパク質が SH3 ドメインを持ち、従って、Amphiphysin と同じようなドメイン構造を持っている。FBP17 などの SH3 ドメインもまた Amphiphysin の SH3 ドメインとおなじように、脂質膜チューブを切断するタンパク質である dynamin とアクチン重合を制御するタンパク質である N-WASP に結合する。EFC ドメインを持つタンパク質のうち FBP17 や CIP4 は EFC ドメインと SH3 ドメンンを持ち、エンドサイトーシスに関わっている。しかしながら、結合する膜の曲率の違いから Toca-1 や FBP17 などの EFC/F-BAR ドメインタンパク質はエンドサイトーシスの初期に、BARドメインタンパク質である amphiphysin などは、エンドサイトーシスの後期の小胞切断のあたりで関わると考えるのが自然である。

N-WASP は Arp2/3 の活性化を経てアクチン重合を促進することが知られているが、FBP17 や Toca-1 の存在下での膜の曲率とアクチン重合の関係性はこれまで議論されてこなかった。そこで、膜の曲率によるアクチン重合の制御機構を明らかにするため、FBP17 または Toca-1 と N-WASP をリポソームに作用させ、pyrene 標識アクチンによる actin polymerization assay を行

った。N-WASP とリポソーム、あるいは N-WASP と FBP17 の組み合わせでは、それほどアクチン重合の変化はもたらされなかったが、FBP-17 または Toca-1 を N-WASP 存在下で直径が0.5−1 μm の比較的大きなリポソームに作用させることで、アクチン重合の速度が大きく増加したのに対し、0．1−1 μm を作用させた場合ではほとんど変化しなかった。したがって、EFC/F-BAR タンパク質は細胞膜の形態に応じてアクチン重合を調節している可能性が示唆された。この知見は、FBP17 などはクラスリン被覆小胞の陥入膜の形態と N-WASP によるアクチン細胞骨格制御を結ぶ分子であることを示すと考えられる。

私たちはさらに IRSp53-Mim-homology domain (IMD)ドメインと呼ばれる、IRSp53 や MIM などのタンパク質のＮ末に見いだされるドメインを解析した。IRSp53 にはＣ末に SH3ドメインを持ち、MIM の場合は C 末部に単量体アクチンに結合する WH2 ドメインを持つ。IRSp53 の SH3 ドメインもまた、N-WASP や類似のタンパク質である WAVE2 に結合する。IRSp53 などの SH3 ドメインを持つ分子に中にも WH2 様のモチーフを持つものもある。IMD ドメインは、BAR や EFC と同じくαヘリックスで構成されるダイマーを形成するが、形はバナナ型でなく、ゆるい逆曲率を持った直線上で非常に興味深い。IMD ドメインもまた膜に結合する。詳細な膜結合アミノ酸マッピングから、IMD ドメインもまた塩基性アミノ酸を介して膜に結合する。塩基性アミノ酸の配置から IMD ドメインは凸型の膜結合面をタンパク質の立体構造表面におくことができ、この凸型の面を介して膜に結合することで BAR や EFC/F-BAR のような細胞における陥入構造、in vitro におけるチューブ構造ではなく、細胞における突起構造、in vitro における陥入構造を形成する。すなわちタンパク質の脂質結合面が凸型か凹型によって膜の変形の向きが決定されていると考えられる。また IRSp53 は突起構造において細胞膜と細胞骨格制御タンパク質である N-WASP や WAVE を結び付けていると考えられる。

本研究では、細胞膜結合タンパク質である IMD/I-BAR ドメインおよび EFC/F-BAR ドメインタンパク質について共同研究による立体構造の解明と膜への相互作用の機序を明らかにした．両ドメインは立体構造上の正電荷で形成される負電荷を持った細胞膜との相互作用面を持つことを見いだした。脂質作用面は、I-BAR は凸面であり、F-BAR は凹面であって、それぞれの形成する細胞膜構造であるフィロポディア、ラメリポディア(I-BAR)およびはクラスリンおよびカベオラのエンドサイトーシス（F-BAR）で機能していることを見いだした。これらのタンパク質の立体構造から予測される脂質作用面の形態は、それぞれの細胞構造の持つ細胞膜の形態に、鋳型の様に対応していることを示すことができた。従ってこれらのタンパク質ドメインは、脂質膜の形態をそれぞれの細胞微細形態に応じて形成させる、あるいは、形成された後にその形態を認識するドメインであることを証明できた。さらに細胞膜の形態がこの BAR ドメインスーパーファミリータンパク質を経由して直接的にアクチン重合のようなシグナル伝達を制御することを見いだし、形態そのものがシグナルの鍵となることを証明した。BAR ドメインスーパーファミリータンパク質は、このようにアクチン細胞骨格形成とフィロポディアやクラスリン被覆小胞などの細胞膜をそれぞれの形態学的な構造において結びつけるインターフェイスであることを示すことができた。

５．自己評価

細胞膜結合タンパク質である IMD/I-BAR ドメインおよび EFC/F-BAR ドメインタンパク質について立体構造の解明と膜への相互作用の機序を明らかにした．両ドメインは立体構造上の正電荷で形成される負電荷を持った細胞膜との相互作用面を持つことを見いだした。脂質作用面は、I-BAR は凸面であり、F-BAR は凹面であって、それぞれの形成する細胞膜構造であるフィロポディア、ラメリポディア(I-BAR)およびはクラスリンおよびカベオラのエンドサイトーシス（F-BAR）で機能していることを見いだした。これらのタンパク質の立体構造から予測される脂質作用面の形態は、それぞれの細胞構造の持つ細胞膜の形態に、鋳型の様に対応していることを示すことができた。従ってこれらのタンパク質ドメインは、脂質膜の形態をそれぞれの細胞微細形態に応じて形成させるあるいは形成された後にその形態を認識するドメインであることを証明できた。さらに細胞膜の形態が直接的に細胞骨格の形成過程の一つであるアクチン重合のようなシグナル伝達を制御することを見いだし、形態そのものがシグナルの鍵となることを証明した。このような研究は、細胞の形態形成に関して新しい概念的な要素を追加できたと考えら

れる。このように、本研究では BAR ドメインスーパーファミリータンパク質は、アクチン細胞骨格と細胞膜を結ぶインターフェイスであることを示すことができた。

６．研究総括の見解

細胞膜結合タンパク質である IMD/I-BAR ドメインおよび EFC/F-BAR ドメインタンパク質について立体構造の解明と膜への相互作用の機序を次々に明らかにしてきた。脂質作用面は、I-BAR は凸面であり、F-BAR は凹面であって、それぞれの形成する細胞膜構造であるフィロポディア、ラメリポディア(I-BAR)およびはクラスリンおよびカベオラのエンドサイトーシス（F-BAR）で機能していることを見いだしており、これらのタンパク質の立体構造から予測される脂質作用面の形態は、それぞれの細胞構造の持つ細胞膜の形態に、鋳型の様に対応していることを示すことができたことは、評価できる。今後、この分野の大きな発展が期待できる。

７．主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

１. Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T. and Yokoyama, S. (2006). "The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation." J Biol Chem 281(46): 35347-58.

２. *Shimada, A., *Niwa, H., *Tsujita, K., *Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., Liu, Z. J., Wang, B. C., Yamamoto, M., Terada, T., Miyazawa, A., Tanaka, A., Sugano, S., Shirouzu, M., Nagayama, K., Takenawa, T. and Yokoyama, S. (2007). "Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis." Cell 129(4): 761-72. (*equal contribution)

３. Takano, K., Toyooka, K. and Suetsugu, S. (2008). "EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization." EMBO J 27(21): 2817-28.

４. Suetsugu, S. (2009). "The direction of actin polymerization for vesicle fission suggested from membranes tubulated by the EFC/F-BAR domain protein FBP17." FEBS Lett 583(21): 3401-4.

５. Shimada, A., Takano, K., Shirouzu, M., Hanawa-Suetsugu, K., Terada, T., Toyooka, K., Umehara, T., Yamamoto, M., Yokoyama, S., and Suetsugu , S. "Mapping of the basic amino-acid residues responsible for tubulation and cellular protrusion by the EFC/F-BAR domain of pacsin2/Syndapin II" FEBS Lett in press (2010)

②招待講演

１. The second conference on F-BAR proteins （ストックホルム）"The EFC/F-BAR protein that is involved in caveolae formation" 2009年10月１日

２. Workshop on Cell Migration（ミラノ、Italy）"Connecting the membrane to the actin cytoskeleton by the BAR, EFC, and RCB domain proteins and WASP/WAVE proteins." 2007年5月

③学会発表

１. 日本分子生物学会シンポジウム「細胞膜と細胞骨格をつなぐ細胞形態機構」2006年12月

2. 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会　合同大会（福岡）口頭発表、シンポジウムオーガナイザー2007年5月31日

3.　BMB2007　日本分子生物学会年会・日本生化学会大会「The rearrangements of actin cytoskeleton dependent on the shapes of the plasma membrane.」2007年12月12日

研究課題別評価書

1．研究課題名

味覚により惹起される行動と情動の神経回路基盤

2．氏名

杉田　誠

3．研究のねらい

苦味感覚は嫌悪性の行動的反応と不快感を、甘味/うま味感覚は嗜好性の行動的反応と快的情動を惹起する。本研究ではそれらの対照的な行動と情動の惹起を可能にする脳内ニューロンの動作原理を明らかにすることを目的とする。

ヒトそして哺乳類は、塩味、酸味、甘味、苦味、うま味の5つを基本味として認識し、味覚は5基本味の組み合わせで、認知される。味覚刺激は味蕾中の味細胞で最初に感知される。味細胞特異的に発現する味覚受容体に、味物質が結合することにより惹起される味覚情報は、複数のニューロンを介し、脳内の各種ニューロンに投射され、受容・識別される。さらに味覚感覚は、特定の神経回路を活性化することで、対照的な、嫌悪性・嗜好性の行動的反射や、快・不快の情動を惹起する。味覚は単純な5味質の情報として脳内に送られ識別されること、また対照的な行動と情動を惹起することから、「感覚識別・認識」、「嫌悪性・嗜好性行動の惹起」、「快・不快情動の惹起」が、脳内のいかなる細胞機能・分子基盤のもとに遂行されているかを解明するために、非常に有効な感覚である。

苦味受容味細胞は GPCR に属する T2R ファミリー(マウスでは 35 種類、人では 25 種類)をいっせいに共発現して苦味を感知し、それとは異なる味細胞のうちで T1R3 を発現する味細胞が、甘味/うま味を感知する。異なる味細胞で感知される苦味と甘味/うま味情報はどのように脳内ニューロンに伝えられ、対照的な行動と情動が引き起こされるのかを明らかにするため、これまでの自身の研究で、苦味と甘味/うま味情報を伝導する神経回路網を可視化することを試みた。方法として、苦味受容体（T2R）もしくは甘味/うま味受容体(T1R3)を発現する味細胞に、それぞれ選択的に「味覚受容体−GFP 融合タンパク質」と「経シナプス性トレーサー（WGA−DsRed 融合タンパク質）」を発現するトランスジェニックマウスを作製した。そして味細胞から経シナプス性に輸送される WGA−DsRed により標識されたニューロンの脳内局在を追跡可視化することにより、苦味情報および甘味/うま味情報を伝導する神経回路網の、特に脳内での三次元空間配置を解析した。苦味伝導路を標識するマウス（mT2R5−WGA マウス）と甘味/うま味伝導路を標識するマウス(mT1R3−WGA マウス)の 2 系統において、トレーサー（WGA−DsRed）は味細胞から順行性に輸送され延髄弧束核、橋結合腕傍核、視床後内側腹側核、大脳皮質味覚野・扁桃体中の一部のニューロンで観察された。可視化された二種の神経回路の異なりによって、苦味と甘味/うま味は脳内で識別され、苦味感覚は嫌悪性行動と不快感を惹起し、甘味/うま味感覚は嗜好性行動と快的情動を惹起することが考えられた。

本研究では、可視化された二種の神経回路の異なりが、「嫌悪性/嗜好性行動の惹起」「不快/快情動の惹起」にいかに関与するか明らかにするため、第一に、味細胞から移行した WGA−DsRed により標識された苦味伝導路構成ニューロンと甘味伝導路構成ニューロンの細胞体・樹状突起の脳内配置を明らかにし、ニューロン種の同定・細胞機能の解析を行う。 第二に、WGA−DsRed により標識されたニューロンを選択的に除去する方法を確立し、特定の WGA−DsRed 標識ニューロンを選択的に除去した際に生じる味覚誘発行動の変化を解析することにより、味覚誘発行動・情動の惹起に関与するニューロン群を特定することを目指す。そして味覚伝導路構成ニューロンの中で、いかなるニューロンがいかに機能し、対照的な行動と情動を惹起するか、その動作原理を明らかにする。

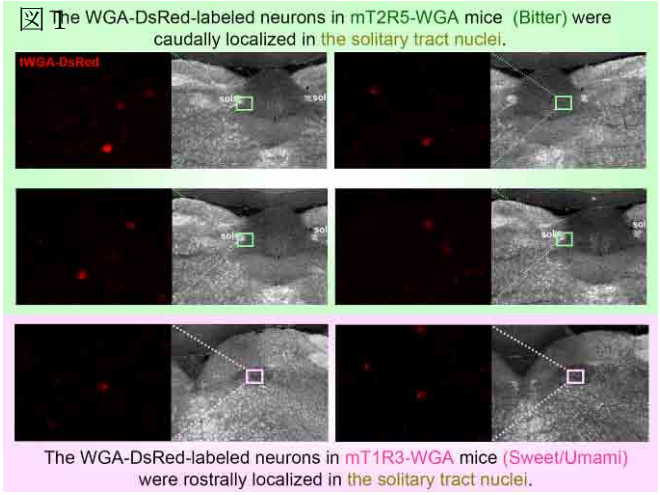
4. 研究成果

延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの細胞体の局在

苦味受容体（T2R）もしくは甘味/うま味受容体(T1R3)を発現する味細胞に、それぞれ選択的に経シナプス性トレーサー（WGA-DsRed）を発現する 2 系統のトランスジェニックマウス（苦味伝導路を可視化する mT2R5-WGA マウスと甘味伝導路を可視化する mT1R3-WGA マウス）において、特定味細胞から経シナプス性に移行した WGA-DsRed により蛍光標識されるニューロン細胞体の脳内局在を脳連続切片から蛍光検出し、それらの三次元的空間配置を単一ニューロンレベルで可視化した。

まず、すべての味覚情報を末梢から受け取る最初の脳部位である延髄孤束核に研究の焦点をあてた。延髄孤束核内において、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を保有する苦味伝導路構成ニューロンの細胞体は、甘味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を保有する甘味伝導路構成ニューロンの細胞体に比べ、後方に分離して集積した（図1）。

図 1

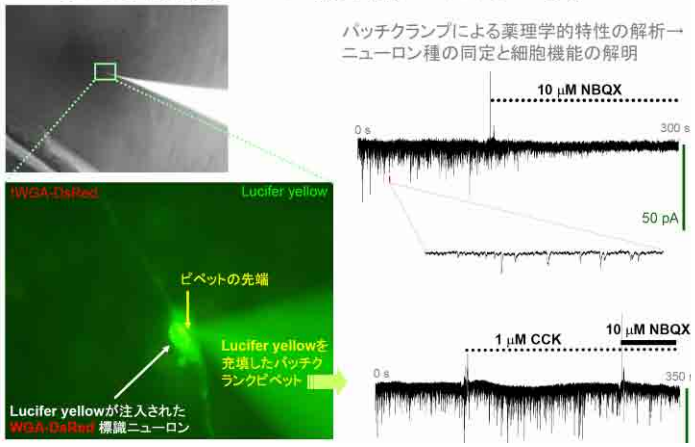


延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの樹状突起構造

味細胞から移行した WGA-DsRed により蛍光標識されるニューロンの中で WGA-DsRed は、その分泌タンパク質としての性質により、ER・ゴルジ体・分泌顆粒内に存在し、主に核周囲に観察される。ゆえに WGA-DsRed の蛍光検出のみでは、標識されたニューロンの樹状突起構造やスパイン構造を把握することができない。そこで WGA-DsRed により蛍光標識される味覚伝導路構成ニューロンの樹状突起構造・スパイン構造を可視化するために、そのニューロン内に、パッチクランプピペットを通して蛍光色素 Lucifer Yellow を注入した(図2)。延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロン 185 例中で、樹状突起を rostrolateral 側に伸張するニューロンは 46 例、rostral 側は 55 例 rostromedial 側は 75 例、medial 側は 22 例、caudomedial 側は 44 例、caudal 側は 32 例、caudolateral 側は 45 例、lateral 側は 17 例において観察された。rostral 側と caudal 側に区分した場合には 185 例中で、樹状突起を rostral 側に伸張するニューロンは 70 例、

図 2

苦味受容味細胞から移行したWGA-DsRedにより標識された延髄孤束核ニューロンの微小形態（樹状突起・スパイン構造）観察とパッチクランプ解析



caudal 側に伸張するニューロンは 21 例、rostral・caudal 両側に伸張するニューロンは 82 例観察された。medial 側と lateral 側に区分した場合には 185 例中で、樹状突起を medial 側に伸張するニューロンは 67 例、lateral 側に伸張するニューロンは 37 例、medial・lateral 両側に伸張するニューロンは 60 例観察された。延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロン 185 例中で 150 例 は、その樹状突起を 1 方向もしくは 2 方向に伸長する単純な形態を示していた(図2)。

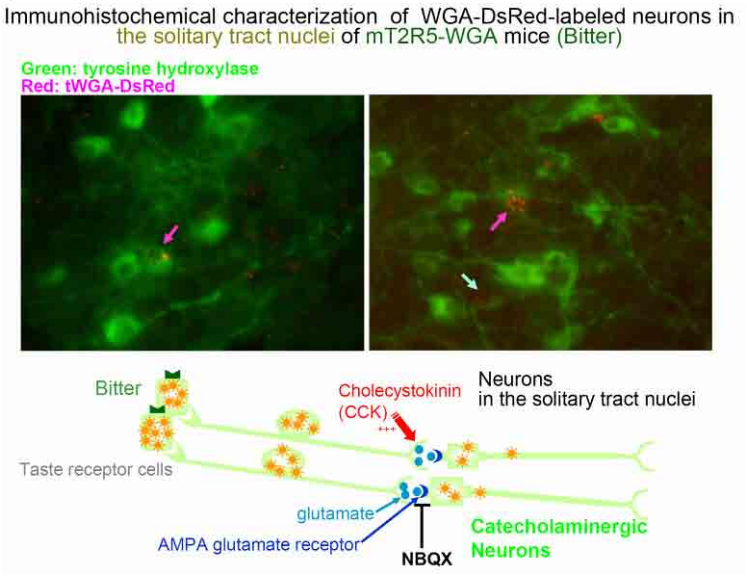
延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの電気生理学的性質・薬理学的特性

WGA-DsRed標識ニューロンが保有する電気生理学的性質を、ホールセルパッチクランプ法を用い解析し、その薬理学的特性より、どのような神経伝達物質による入力をいかなる受容体により受容するか、そしてそれらの入力パターンが、ホルモン・ペプチド等によりどのように修飾・制御されるかを解析した。ホールセルパッチクランプにおいては、ピペット内溶液は 128 mM K-gluconate, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 10 mM glucose, and 2 mM Na_2ATP, 0.5mM Na_2GTPを、細胞外溶液は 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM glucoseを使用し、-70mVでの膜電位固定下で、自発的なexcitatory postsynaptic current (EPSC)を記録し、解析した。延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンのホールセルパッチクランプ記録においては、図2のように、内向きのスパイク性電流(Na^+ influx current)が観察され、その内向き電流EPSCは、AMPAグルタミン酸受容体のブロッカーNBQXにより抑制された(図2)。ゆえに延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンは、神経伝達物質グルタミン酸の入力をAMPA受容体により受容することが示唆された。またCholecystokinin(CCK)を細胞外液中に添加すると、自発的EPSCの頻度が増加した(図2)。ゆえに、このグルタミン酸作働性のシナプス伝達は、CCKにより増強されることが示唆された。CCKは摂食後満腹時に、小腸から分泌され、ホルモン性に働くことが報告されている。満腹時には、CCKがホルモン性に延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンに作用し、苦味応答の一端を促進することが考えられる。

延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンのニューロン種の同定

延髄弧束核内で WGA-DsRed により標識された苦味伝導路構成ニューロンのニューロン種・発現分子を免疫組織化学的に解析した。延髄弧束核内の苦味伝導路構成ニューロンの多くは、抗 Tyrosine hydroxylase 抗体により認識された (図3上、赤矢印)。しかし、延髄弧束核内で WGA-DsRed により標識された苦味伝導路構成ニューロンの内で、少数のニューロンは抗 Tyrosine hydroxylase 抗体により認識されなかった(図3上、青矢印)。また substance P, somatostatin, neuronal nitric oxide synthase (nNOS)に対する抗体では、ともに認識されなかった。延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンの多くは Tyrosine hydroxylase を発現する Catecholaminergic ニューロンであることが示唆された。

図 3



すべての味覚情報を末梢から受け取る最初の脳部位である延髄孤束核において、苦味受容味細胞から移行したWGA-DsRedにより標識される苦味伝導路構成ニューロンの細胞体は、延髄孤束核内で後方に分離して集積し、それらニューロンの多くは双極性に樹状突起を伸長させていることが観察された。延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンは、一次ニューロン(ganglion neurons)からの神経伝達物質グルタミン酸を AMPA 受容体により受容し、そのグルタミン酸作動性のシナプス伝達は Cholecystokinin により増強されることが示唆された。また延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの多くは Catecholaminergic ニューロンである。

5. 自己評価

本研究では、「①苦味・甘味受容味細胞から移行したWGA-DsRedにより標識される苦味・甘味伝導路構成ニューロンの細胞体・樹状突起の脳内配置を明らかにし、ニューロン種の同定・細胞機能の解析を行うこと」、そして「②WGA-DsRed により標識されたニューロンを選択的に除去する方法を確立し、特定の WGA-DsRed 標識ニューロンを選択的に除去した際に生じる味覚誘発行動の変化を解析すること」により、味覚誘発行動・情動の惹起に関与するニューロン群を特定し、その動作原理を明らかにすることを目指した。①に関しては、数が限定されたWGA-DsRed 標識ニューロンをホールセルパッチクランプで解析していく成功確立が低かったこと、及び同じ脳領域の WGA-DsRed 標識ニューロンでも単一ニューロン種からなっているわけではなく、異種混交であり、複数種からなるニューロン種の完全な同定が困難であったことから、データの蓄積に時間を要し、現在、ニューロン種の同定・細胞機能の解析の途中段階です。パッチクランプ解析と免疫組織学的解析を用いて味覚伝導路構成ニューロンのニューロン種の同定を行っているが、ひとつのニューロン種が同定できればそれとシナプスを形成する次のニューロン種が予測しやすいという自身の実験系の特徴をより活かしつつ、神経回路を形成するシナプス前後のニューロンの発生・分化様式を考慮したり、バイアスのないスクリーニングを取り入れながら、ニューロン種同定のための独自の枠組みやストラテジーを築き、もう少し効率的にニューロン種・細胞機能を解明していかなければならないように感じています。②に関しては、WGA-DsRed 標識ニューロンの選択的除去を行うために、WGA-DsRed を標的とするImmunotoxin を構築した。現在 Immunotoxin の大腸菌における発現と精製方法の改良を行っている。Immuinotoxin を用いて、特定の WGA-DsRed 標識ニューロンを選択的に除去した際に生じる味覚誘発行動の変化を解析することを計画していたが、解析には達していない。

6. 研究総括の見解

苦味・甘味伝導路構成ニューロンの細胞体・樹状突起の脳内配置を明らかにし、ニューロン種の同定・細胞機能の解析を進めている。WGA-DsRed 標識ニューロンをホールセルパッチクランプで解析していく方法は、確率が低く、また、同じ脳領域の WGA-DsRed 標識ニューロンでも、異種混交であり、非常に難しい研究ですが、精力的に解析しているところは評価する。

他方、WGA-DsRed標識ニューロンの選択的除去を行うためのツール、WGA-DsRedを標的とするImmunotoxin の系を構築し、これを用いた成果を期待している。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①学会発表

1. Sugita, M. and Shiba, Y., Genetic tracing and characterization of the neurons in the nucleus of the solitary tract, receiving specific taste input. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009)(京都) (2009 年 7 月 28 日)

2. Sugita, M., Characterization of the neurons in the nucleus of the solitary tract, labeled by the transsynaptic tracer originating from specific taste receptor cells. 第 6 回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(福岡)(2008 年 12 月 6 日)

3. Sugita, M., The spatial distribution and the molecular characteristics of neurons in the nucleus of the solitary tract, labeled by the transsynaptic tracer originating from specific taste receptor cells. 第 5 回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(福岡)(2007 年 11 月 2 日)

研究課題別評価書

1．研究課題名
分子モーターシステムの制御理論構築とその実験的検証

2．氏名
田中　裕人

3．研究のねらい
近年の1分子計測技術の目覚ましい発展により、ミオシン生体分子モーターの、その機能の“揺らぎ”が明らかになってきた。 1個の分子モーターは、熱ノイズをうまく利用して確率的に前後に“揺らぎ”ながら前方向に動いて行くのである。 この確率的素子をシステムとして統合したものが筋肉であり、その機能は時空間的にダイナミックな制御をみごとに発現している（力、速度、正確さ、エネルギー効率などを自律的にバランスさせる）。 本研究では、この分子モーター1個を動作ユニットと捉え直し、筋肉（サルコメア）をシステム（分子モーターの非線形結合システム）として捉え直すことで、素子レベルの“揺らぐ”運動処理が、どのようにして生命システムのダイナミックな反応機構を実現するのか？ その設計アルゴリズムの解明・創出を目指す。研究対象にミオシンを選択することにより、これまで蓄積された膨大な研究結果を利用して数理モデルを構築すること、また、1分子測定技術を応用して、実験的にダイナミックな運動処理過程を実際に検証することにより、リアルな生体システム（広く応用の利く）の理解・構築を目指す。

4．研究成果
本研究においては、計算機シミュレーションと1分子測定実験を併用することで、分子レベルの生体システムの数理モデル構築とその実験的検証を目指した。 分子モーターシステムでは、骨格筋（筋肉）を最も大きなシステムとし、筋細胞、筋原線維、サルコメア、アクトミオシン分子、と階層構造を経て分子にまで至るが、本研究では、1個のミオシンを分子モーターユニット、数～数10個の分子モーターから構成される構造を分子モーターシステムとして研究を進めた。
分子モーターシステムの運動処理を分子レベルで理解するためには、ナノサイズの分子を捕まえ操作（マニピュレーション）し、その運動の詳細を測定する必要がある。 こうした詳細な測定に対して有力な手法の1つが1分子測定法であり、これまで様々な測定が行われてきた。本研究では、実験的検証の道具として、光ピンセット分子マニピュレーション法を用いた。 この光ピンセット法を、分子モーターユニット（ミオシン1分子）に応用した実験結果等も発表してきた（図1, Tanaka et al., JBC, 2008）。

こうした分子マニピュレーション法では、操作＆測定のためプローブ（測定プローブ）を分子モーターユ

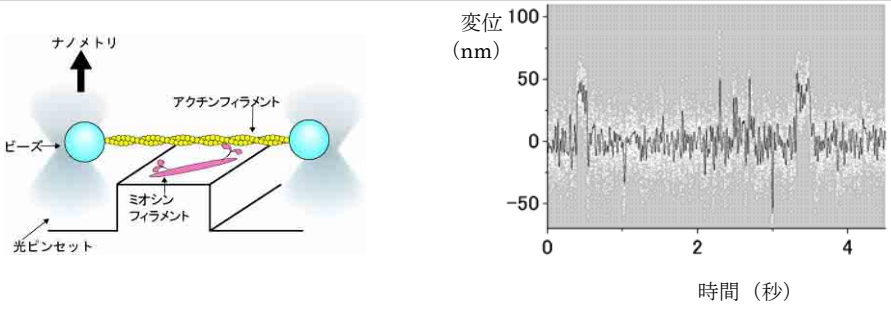


図1．光ピンセット分子マニピュレーション法の模式図（左）と分子モーターユニットの1分子運動測定の結果（右）
光ピンセットで捕捉したマイクロビーズをプローブとして分子モーターユニットの運動をナノメートル計測する。

ニットに結合させ計測を行う(図1参照)。 分子モーターの大きさは光学顕微鏡の解像度以下であるため直接観測することができず、その動きはこの結合させた測定プローブの動きとして観測する。 こうした分子モーターの動作機構を物理的に理解するためには、測定プローブの影響を考慮して分子モーターの運動を検討し、可観測なデータから、分子の運動を理解する必要があると考えられる。 つまり、分子モーターユニット&システムの運動がマニピュレーション(測定プローブ)によりどのような変調を受けるかを理解することは、分子モーターの運動の理解を目指した数理モデルの構築ならびに分子測定系のデザインにとって非常に重要となる。 そこで、測定プローブが連結された分子モーターの運動を、ランジュバン方程式を用いてシミュレーションした。 詳細は省くが、シミュレーションを使用して、分子マニピュレーションで使用される光ピンセット法とガラスマイクロニードル法を検討した。 測定プローブのサイズや分子モーターとの結合の強さには特性があり、それぞれの測定プローブ特性を加味してシミュレーションを行った。 その結果、光ピンセット法に比較して、ガラスマイクロニードル法では、分子モーターの滑り速度が減少する可能性があることが計算機シミュレーションで示された。 詳細は省くが、滑り速度以外の運動特性は、光ピンセット法、ガラスマイクロニードル法ともほぼ同じであることも示された。 このシミュレーション結果は、実際の測定結果と一致しており、マニピュレーションのための測定プローブにより、分子モーターの運動が変調されていることを示唆している。 これらのことは、要求される実験デザインに応じて測定プローブ特性を設計することで、分子モーターの運動を変調させ、その運動を高空間分解能で検出できる可能性を示している(Tanaka, Biophys. Soc. annual meeting, 2009, 2010)。この分子モーター運動変調(摂動)の可能性は、分子モーターユニット&システムの運動特性を調べて理解する上で、非常に重要と考えられる。 現在継続して測定プローブ条件の詳細検討を行っており、また、 この計算機シミュレーションを実証するための計測装置の作成を継続している。 この測定装置は、後述の分子モーターシステム特性測定への応用も視野に入れ、作成している。

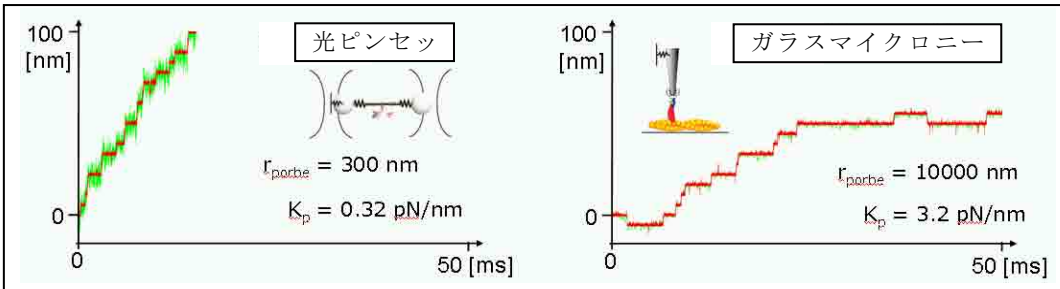


図2. 測定プローブの影響を考慮した分子モーターユニットの運動シミュレーション
光ピンセット法相当条件(左)とガラスマイクロニードル法相当条件(右)。 赤線は分子モーターユニット、緑線は測定プローブの位置を示す。 ガラスマイクロニードル法では、変位発生の傾きが小さくなる(運動速度の低下)が、その他の運動特性は変わらない。

次に、分子モーターユニットをベースとした分子モーターシステムのモデル構築を行った。モデル構築に際しては、これまで蓄積されてきた分子モーターユニットと分子モーターシステムの実験結果を参考に構築を行った。 本研究で扱う分子モーターシステムは骨格筋を最も大きなシステムとし、骨格筋を構成する最小ユニットであるミオシン分子を分子モーターユニットとみなす。 本研究では、分子モーターユニットを数～数10個システム化することで発現する、分子モーターユニットとは異なるシステムの特性に注目して、モデル構築を行った。注目した1つの特性は、「ステップサイズの可変性」である。 分子モーターのステップサイズとは、1個の分子モーターユニットが1個のATPを加水分解する間に動く距離である。 1分子測定により、1個で働く場合の分子モーターユニットのステップサイズが直接測定され、～

15nmと示された。 分子モーターシステムのステップサイズは間接的ではあるが≧～60nmにもなると見積もられている。 このように、分子モーターは環境に応じて（1個で働く or 複数で働く）自律的に調節する機能を分子（分子システム）レベルで有する可能性が示唆される。こうした分子ユニットと分子システムの機能を説明しうる数理モデルの構築を行った。 本研究で構築したモデルは、ラチェットモデルをベースとして、運動の発生機構に2つの経路を仮定したモデルを作成した。 この結果、分子モーターユニットと分子モーターシステムで異なるステップサイズを説明しうるモデルの構築を達成した（図3）。

このモデルを要約すると、分子モーターシステム中で分子モーターユニットが働く場合、分子モーターが1個で働く場合と異なり、システム中の他の分子モーターユニットから押されたり引かれたり（バネを介して相互作用）することで、自律的にエネルギーの無駄使いを省き、効率よく働くことが示される。 こうした結果は、“ゆらぎ”をベースとしたユニットでシステムを

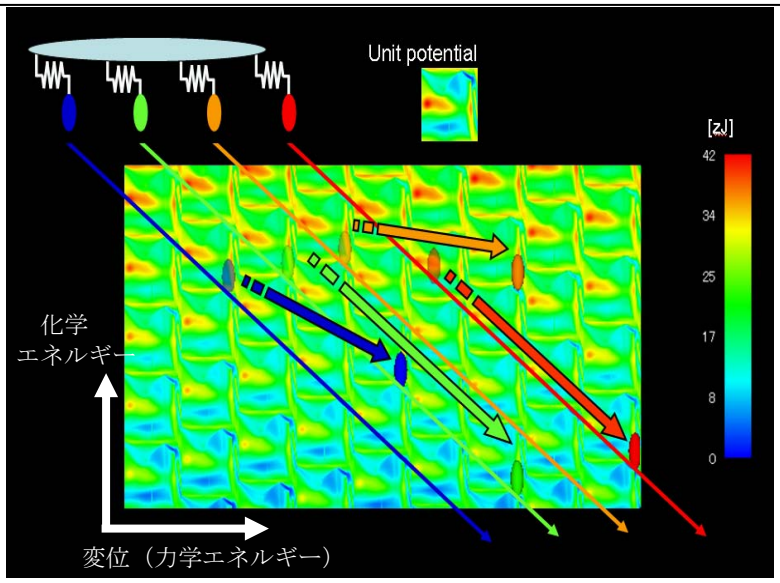


図3. 数理モデルを使った分子モーターの運動シミュレーション結果

4つの分子モーターユニットを連結した分子モーターシステムの運動。 ポテンシャルマップ上の遷移として分子モーターの運動を表現。 縦軸が化学エネルギー、横軸が変位（力学エネルギー）を表す。 分子モーターは化学エネルギーを消費しながら（上から下に移動）、ポテンシャルにドライブされて、変位を発生（左から右に移動）する。 細い矢印は、分子モーターユニットがそれぞれ1個で働いた場合の経路。 太い矢印は、システム中で働いた場合の経路。 このモデルでは、分子モーターが環境に応じて遷移経路を自律的に変えることが示される。

構成すると、自律的に機能を調節するシステムが実現できる可能性を示唆している。

このモデルから予想される、分子モーターシステムの運動特性は、ユニットステップのステッピングレート（ユニットステップの前後比）が、分子モーターユニットのそれと比較して、数倍低くなることである（Tanaka, Biophys. Soc. annual meeting, 2008, 2010）。 また、運動速度の分布も変化することが予想される。 こうした変化を直接測定しモデル実証を達成するため、分子モーターユニット＆システムの運動を高空間分解能で測定する計測装置が重要となる。これまでに装置の作成は終えており、現在、装置の調整・改良を行いつつ分子測定を継続中である。

5. 自己評価

研究課題1（数理モデル構築）

目標：分子モーターの、システム化のアルゴリズム・構築原理の数理的解明（モデル構築）

達成：ポテンシャル駆動をベースとした運動モデルを構築。1分子＆分子モーターシステムの運動を再現するモデルの構築を達成

問題点：モデル構築の手法にランダムサーチ過程を加えたため、モデル構築に時間がかかる。構築したモデルの特徴抽出手法の開発が必要

研究課題2（実験的検証）

目標：分子モーターシステム(in vitro motility assay 系のアクチンフィラメントやプローブ）の運動の高時間・高空間分解能測定システムの作製）

達成：高速CCDカメラと蛍光励起シャッター（EOM）を連動させた、蛍光標識分子の高速検出装置を作成

問題点：高精度、大量データの取得を行う必要があり、EOMからのレーザー出力の安定化（フィードバックシステム）と、自動解析システムの検討が必要

研究課題3（数理モデル構築）

目標：分子モーターの運動発生過程を変調するマニピュレーション手法の検討と開発

達成：1分子測定の実験結果をベースとして、計算機シミュレーションを用いて分子モーターの運動を変調するマニピュレーション手法（測定プローブ）の提案。 実験装置作成への提案を継続中。

問題点：計算に時間がかかるため、実験手法（マニピュレーション法）における細部の条件検討に時間がかかる。

研究課題4（実験的検証）

目標：分子モーターシステムの運動発生過程を高空間分解能で解析するための実験手法の作成と、測定によるモデルの実験的検証

達成：分子モーターシステム中の分子モーターの位置（運動）を高速検出するための、レーザー強度、シャッター速度、蛍光色素、溶液条件の選定を継続中

問題点：蛍光分子の位置を高精度で決定する操作(PC)に時間がかかり、蛍光色素の選定、溶液条件の検索、レーザー調整の条件検討に時間がかかる

6. 研究総括の見解

分子モーターの、システム化のアルゴリズム・構築原理の数理的解明（モデル構築）については、ポテンシャル駆動をベースとした運動モデルを構築し、1分子＆分子モーターシステムの運動を再現するモデルの構築したことは、評価する。また、分子モーターシステムの運動の高時間・高空間分解能測定システムの作製についても、高速CCDカメラと蛍光励起シャッター（EOM）を連動させた、蛍光標識分子の高速検出装置を完成させた。この装置を駆使し、今後、新しいナノバイオの原理が生まれることを期待する。

7. 今後の展開

さきがけ研究の期間を経て、開始当初の予定より遅れたが基礎となる部分（数理モデル構築、計測装置作成とも）の構築を達成した。 さきがけ研究機関中に、こうした数理モデル等の成果は学会での発表は行ってきたが、論文発表が間に合わなかった。 今後、まず、これらの数理モデルの研究成果を論文にて発表を行っていくこと予定している。

今後の発展として、本研究で取り扱った“ゆらぎ”をベースとした分子システムは、分子モーターシステムだけでなく、他の多くの生体（分子）システムに応用できることが期待される。 しかし、まだ残されている問題も多く、その問題解決と応用が今後の展開と考えている。 数理モデル研究での問題点は、①エネルギー入出力＆ポテンシャル概念の一般化、と②機能を実現する

必要条件の抽出、である。 今回構築した数理モデルは、分子モーターにある程度特化したものであるためエネルギー入出力やポテンシャルと言った概念が使用できた。 他の生体(分子)システムに応用する場合、そうした可観測物理パラメータ以外のパラメータをどのように数理モデルに取り込むか？がポイントとなる。 また、数理モデルにおける最も重要な要素(必要条件)をポテンシャル概念からどのように抽出するか？もまた重要なポイントとなる。 今後は、こうした残された問題に取り組みつつ、モデル構築の応用展開を行って行く予定である。

また、計測装置に関しては、モデルから予想される物理現象を捉える、より高感度な測定法と、高度なマニピュレーション法が期待される。 モデルからの予測と組み合わせて計測を進めることで、大きな展開が期待できる。 生体(分子)システムの理解に必要な情報を取得するため、モデルから最適な外部摂動(変調、マニピュレーション)を予測し、それを実験的に実行するための測定装置を作成・改良・調整し実験を行い検証する。

今後、数理モデルと分子計測を平行して進めて行くことで、生体システムの動作機構解明への展開を試みていく予定である。

8. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

① 論文

1. Tanaka H, Homma K, White HD, Yanagida T, Ikebe M.、 Smooth muscle myosin phosphorylated at single head shows sustained mechanical activity.、 *J. Biol. Chem.*、 vol.283(23)、 p.15611-8、 2008.

② 著書

1. 非侵襲・可視化技術ハンドブック、 株式会社エヌ・ティー・エス、 第7章第3節 生体1分子操作・計測、 石島秋彦、井上裕一、福岡創、田中裕人 (2007)

③学会発表

1. Biophysical society 54th annual meeting (2010) MATHEMATICAL MODEL OF MULTIPLE MYOSIN SYSTEM WITH MEASUREMENT PROBES, FOCUSING ON ENERGY EFFICIENCY. Hiroto Tanaka

2. 日本生物物理学会第 47 回年会 (2009) 多分子ミオシンシステムの運動モデル(測定プローブの影響を含めたエネルギー効率の視点から)Mathematical model of multiple myosin system with measurement probes, focusing on energy efficiency.Hiroto Tanaka

3. Biophysical society 53rd annual meeting (2009) Construction of myosin model explaining difference between experimental results observed with scanning probe and optical tweezers. Hiroto Tanaka

4. Joint meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress (2008) Mathematical Model Of Myosin Motor Focused On Interaction Length Of Single Myosin (stepsize) And Multiple Myosin System (sliding Distance). Hiroto Tanaka、 Akihiko Ishijima

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Okada T, Tanaka H, Iwane AH, Kitamura K, Ikebe M, Yanagida T.、 The diffusive search mechanism of processive myosin class-V motor involves directional steps along actin subunits.、 *Biochem Biophys Res Commun.*、 vol.354(2)、p.379-84、 2007.

研究課題別評価書

1．研究課題名

タイミングの予測に関与する脳ネットワークの検証

2．氏名

田中　真樹

3．研究のねらい

次に起こる出来事のタイミングを予測することは、生活する上でなくてはならない能力です。これに必要な時間の情報処理の神経機構には、大脳−基底核ループによるものと、小脳が関与するもののふたつがあると考えられています。本研究では、主に小脳が関与すると期待される、数百ミリ秒間隔の「リズム」の生成に関係した神経機構を中心に調べてきました。実験では内的リズムの生成を要する行動課題をサルに訓練し、小脳外側核の神経活動と同部の不活化、それらの出力先である大脳皮質前頭葉の集合電位記録などを行いました。また、健常成人を対象に類似の課題を用いた心理物理実験を行ない、時間の長短によるタイミング予測の特性の違いを調べてきました。さらには、これらと別の行動課題を訓練したサルを用いて、小脳・基底核から大脳への投射の中継核である運動性視床の神経活動の解析や、前頭葉内側部による自発運動のタイミング調節の神経機構を微小電気刺激を用いて調べてきました。研究成果の多くの部分はまだ学会発表の段階ではありますが、さきがけ研究によって、小脳がリズム学習に関与する神経細胞レベルでの証拠を得ることができ、運動性視床および前頭葉内側部が自発運動のタイミング制御に重要であることを示し、また、周期的な刺激の欠落を検出する際に2つの脳内メカニズムが使い分けられていることを行動実験から明らかにすることができました。

4．研究成果

1）小脳によるリズムの学習

小脳半球は霊長類でよく発達しており、橋核を介して大脳皮質からの入力を受け、その出力を小脳外側核（歯状核）と視床を介して大脳皮質に送り返しています。小脳による時間情報処理の神経機構を調べるため、サルに一定のリズムを学習させ、その際の小脳外側核の単一ニューロン活動を調べました。具体的には 100～600 ミリ秒の一定周期で視聴覚刺激を提示し、その逸脱（色・形や音程の変化）または欠落を検出すると眼球運動で答えるようにサルを訓練しました（オドボール検出課題）。刺激の欠落を検出するためには、次の刺激のタイミングを予測し、感覚入力と比較することで予測誤差を計算する必要があります。今回、我々は小脳核の一群のニューロンが、刺激を繰り返し提示することで感覚応答を増大させることを発見しました（図 1）。これはまるで刺激を繰り返すうちに、そのリズムにのってくるのに対応したような神経活動で、各種感覚経路でよく知られている感覚順応とは逆の現象です。この神経活動の増大は刺激間隔が長いほど明らかで、多くのニューロンでは 100～200 ミリ秒の短い間隔で刺激を与えたときにはひとつひとつの刺激に対応した明らかな応答は認められませんでした。

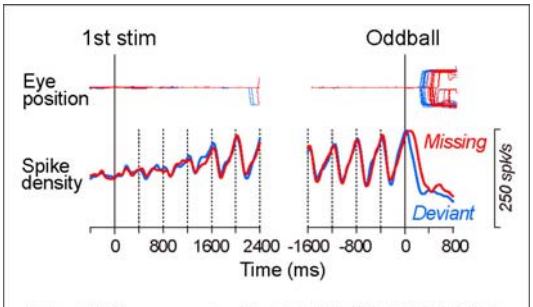


図1. 小脳核ニューロンの一例. 400ミリ秒ごとに繰り返し提示される視聴覚刺激(縦線)に対する応答が次第に増強している. サルは刺激の欠落(missing)か逸脱(deviant)を検出すると眼球運動で反応するように訓練されている. 刺激の欠落を検出するためには刺激タイミングの予測が不可欠となる.

こうした小脳核の信号が、本当に行動の制御に使われているのかどうか調べる目的で、これらのニューロンが記録された部位に抑制性伝達物質 GABA の作動薬（ムシモール）を微量注入し、行動の変化を調べました。ムシモールを注入することで、数ミリメートルの範囲の神経活動を一過性に抑制することができます。小脳核の不活化により、主に同側に向かう眼球運動の反応時間が延長しました（図2）。その効果は、タイミングの予測を必要とする欠落（missing）条件で逸脱（deviant）条件よりも大きく、小脳核の信号が刺激欠落の検出に寄与していることが明らかとなりました。

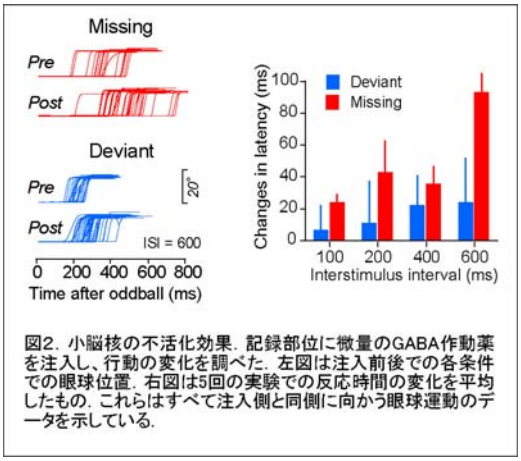


図2. 小脳核の不活化効果. 記録部位に微量のGABA作動薬を注入し、行動の変化を調べた. 左図は注入前後での各条件での眼球位置. 右図は5回の実験での反応時間の変化を平均したもの. これらはすべて注入側と同側に向かう眼球運動のデータを示している.

2）刺激欠落に特異的な大脳皮質活動

これら小脳の信号は最終的には大脳に送られ、行動の制御や認知に使われると考えられます。このとき、どのような情報が大脳にあるのか調べる目的で、上述のオドボール検出課題を行っているサルの前頭葉の様々な場所に電極を刺入し、集合電位（local field potential, LFP）を記録しました。前頭内側部からは刺激条件によらない運動関連の信号が記録され、その中で後部領域からは運動方向に非選択的で運動に先行した活動、前部からは運動方向に選択的な活動、さらにその前方からは運動に遅れた活動が記録されました。記録部位を外側に動かしていったところ、運動関連の活動のさらに外側部では、刺激条件によって異なる活動が記録されました（図3）。このことから、前頭外側には周期的な刺激の欠落を特異的に検出するシステムがあるものと考えられます。今後はこれらの様々な神経情報の大脳領野における詳細な分布と、小脳で記録された神経活動との関係を調べていく必要があります。

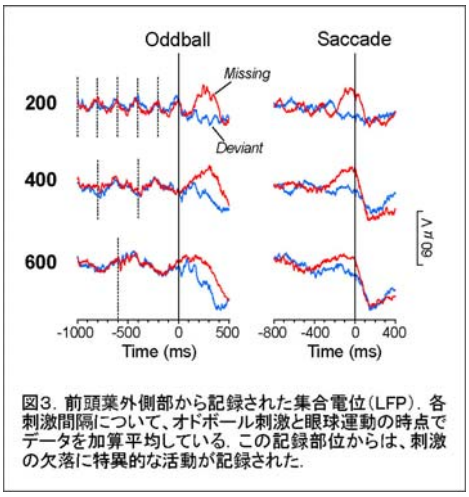


図3. 前頭葉外側部から記録された集合電位（LFP）. 各刺激間隔について、オドボール刺激と眼球運動の時点でデータを加算平均している. この記録部位からは、刺激の欠落に特異的な活動が記録された.

3）欠落オドボール課題を用いた心理物理実験

小脳核の感覚応答の増大は刺激間隔が長いほど明らかで、同部の不活化効果は刺激間隔が長いほど大きくなっていました（図2）。このことは、周期的な刺激の欠落を検出する際に、刺激間隔の長短によって異なった神経機構が関与している可能性を示唆しています。これを検証するために、健常成人で欠落オドボール課題での反応時間を調べました。被験者には周期的な聴覚または視覚刺激を提示し、ランダムなタイミングでこれが欠落したのをボタン押しで報告してもらいました。興味深いことに、刺激間隔が 200～300 ミリ秒以上のときは反応時間がほぼ一定となりましたが、それより刺激間隔が短くなると、反応時間は段階的に短くなりました。内観的には短い刺激

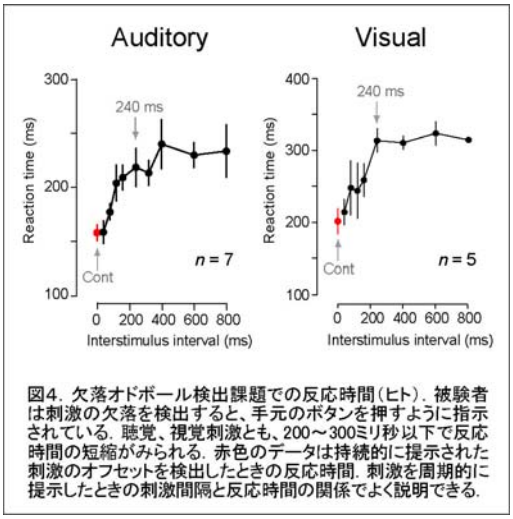


図4. 欠落オドボール検出課題での反応時間（ヒト）. 被験者は刺激の欠落を検出すると、手元のボタンを押すように指示されている. 聴覚、視覚刺激とも、200～300ミリ秒以下で反応時間の短縮がみられる. 赤色のデータは持続的に提示された刺激のオフセットを検出したときの反応時間. 刺激を周期的に提示したときの刺激間隔と反応時間の関係でよく説明できる.

間隔のときには一拍ごとのタイミングを予測することは困難で、周期的な音をひとつの連続音として処理している印象があります。このことは連続音の休止に対する反応時間が、先の刺激間隔と反応時間との関係でよく説明できることからも裏づけられます（図4）。これらの結果から、周期的な音列を時間的に統合（あるいは low pass filtering）し、連続音として扱うには200～300 ミリ秒の時間窓があることを示唆しており、この時間帯域を境にして、刺激の欠落を検出する神経機構が自動的かつ無意識に切り替わるものと考えられます。

4）運動タイミングの調節機構

手がかり刺激から一定の時間が経過した後に、自発的に眼球運動を開始するようにサルを訓練し、意思決定のタイミングの調節機構を調べました。さきがけ研究以前に、運動性視床の不活化によって、自発運動の開始が遅れることを見いだしていました。同部のニューロン活動を調べたところ、多くが運動に先行して発火率を漸増させていることが分かりました。同じニューロンから得られたデータを、自発運動のタイミングによって試行数が同じになるように5つに分け、それぞれについて多数のニューロンで集団活動を計算したところ、①運動の開始が早かったものほど準備期間に発火率が急激に上昇しており、②いずれのグループでも運動直前の神経活動はほぼ一定であることが分かりました（図5）。このことは、運動性視床の神経活動の上昇率は内的な経過時間を反映しており、神経活動が一定の閾値に達することがこの条件での意思決定に必要であると考えられます（Tanaka, 2007）。

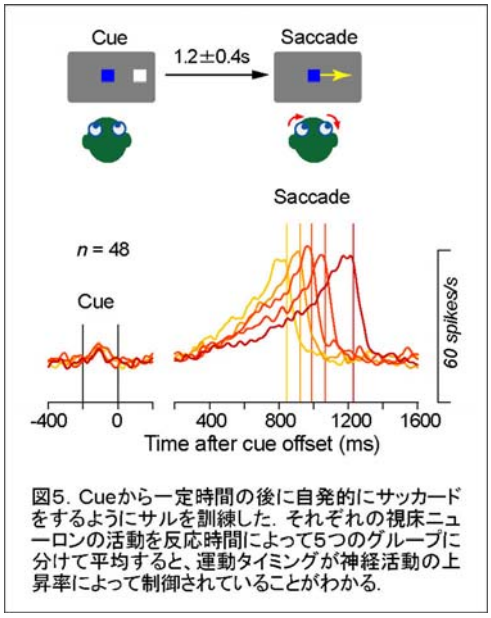


図5. Cueから一定時間の後に自発的にサッカードをするようにサルを訓練した．それぞれの視床ニューロンの活動を反応時間によって5つのグループに分けて平均すると、運動タイミングが神経活動の上昇率によって制御されていることがわかる．

これら視床の信号は大脳皮質に送られ、意思決定がなされるものと考えられます。とくに、運動性視床からの強い投射を受け、自発運動の開始に関与することが知られている前頭葉内側部が重要であると考えられます。実際、同じ自発眼球運動課題をおこなっているサルの前頭葉内側部からは強い運動準備電位が記録されます（図6A）。この神経活動が運動のタイミングの調節に関与していることを検証するために、同部に電気刺激を与えて自発運動のタイミングを人為的に操作することを試みました。その結果、運動準備期間に閾値以下の電気刺激を与えると、その数百ミリ秒後に起こる自発運動の開始が遅れることを発見しました（図6B左）。固視点が消えたときに運動を開始するように指示された課題では電気刺激は反応時間に影響せず（同右）、同部の準備期間活動は自ら運動を開始する際にそのタイミングを制御していることが示されました。

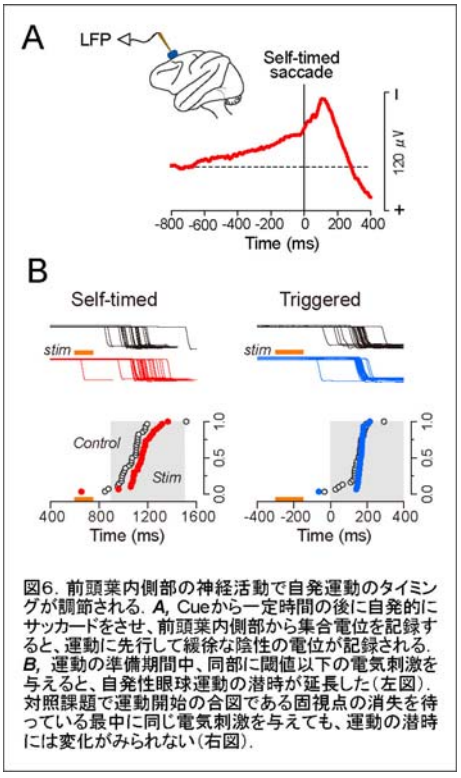


図6. 前頭葉内側部の神経活動で自発運動のタイミングが調節される．*A*, Cueから一定時間の後に自発的にサッカードをさせ、前頭葉内側部から集合電位を記録すると、運動に先行して緩徐な陰性の電位が記録される．*B*, 運動の準備期間中、同部に閾値以下の電気刺激を与えると、自発性眼球運動の潜時が延長した（左図）．対照課題で運動開始の合図である固視点の消失を待っている最中に同じ電気刺激を与えても、運動の潜時には変化がみられない（右図）．

5）皮質下信号による眼球運動の随意性調節

上述のタイミングを見計らって自発運動を開始する神経機構は、別の見方をすると大脳皮質下信号による随意運動の制御機構ということができます。

そうした観点から、運動性視床とそこに信号を送る大脳基底核による眼球運動の随意性制御機構をさきがけ期間中に調べてきました。具体的には前頭葉障害で異常が知られているanti-saccade（視覚刺激から目をそらす課題）と smooth pursuit（ゆっくり動く光点を追視する）について、その神経機構を運動性視床と大脳基底核（淡蒼球）で調べました。その一部は原著論文として発表済みです。これらの研究は時間の情報処理の神経機構とは直接には関係しませんが、さきがけ研究によって得られたアイデアと技術と支援がなければその遂行は困難であったと考えられます。

5．自己評価

主要テーマであった、小脳のリズム予測に関しては、意味のあるデータを得ることができ、当初の目的を果たしつつあると感じています。領域終了までには責任をもって論文発表したいと考えています。ただ、小脳核信号の生成機構や大脳での利用方法に関しては想像するしかなく、これからの研究で明らかにしていく必要があります。また、さきがけ期間中に行なった心理物理実験でも思わぬ発見があり、有意義であったと感じています。当初の予定であった数理モデルによる検討は、多くを進めることはできませんでしたが、その手がかりとなる諸現象を観察することができ、今後に期待がもてると考えています。

さきがけ研究の3年半の間は主要テーマである時間制御を中心に研究の幅を広げることができました。一緒に研究を進めてくれる学生たちに恵まれたことも幸いしたと思います。今後はこのまま失速しないよう、手がけたテーマをひとつひとつ形にしていく必要があると考えています。4年前、さきがけ研究の提案書の最後に、「（もし採択されたなら、）この先25年ほど残されている私自身の研究者生活の大半を費やすことになるような、発展性のある一連の研究の出発点にしたい」、と書きました。この間、時間感覚の研究に着手し、小脳核や淡蒼球などに初めて電極を刺して皮質下信号による高次脳機能制御に思いをめぐらせ、集合電位解析の有用性を知りました。また、さきがけ以前はほとんど一人で行なっていた研究をポスドク、学生とともに進めるようになり、その楽しさ（と大変さ）を覚えました。これらの経験は今後の研究テーマの選択と私自身の研究者生活に大きな影響を与えるであろうことは必至であり、さきがけ研究は大変よい契機を与えてくれたと感じています。

6．研究総括の見解

サルにオドボール検出課題を訓練し、小脳外側核から単一ニューロン記録と前頭葉皮質からの集合電位（local field potential）記録を行い、着実に成果を挙げている。小脳核からの記録では、繰り返し刺激によって増強する神経活動を発見し、小脳核の不活化によって、欠落オドボールの検出時間が延長することを見出した。大脳からは刺激の欠落に特異的な応答が記録されていることを見出した。さらに、前頭葉皮質内側部の電気刺激実験を行った結果、手がかり刺激から一定の時間経過の後、自発的に眼球運動を開始させる際に同部位の信号が重要であることが判明した。今後、これらの知見から脳全体の展開への仕組みに対する示唆を期待したい。

7．主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1．Tanaka, M. (2007) Cognitive signals in the primate motor thalamus predict saccade timing. *J. Neurosci.* 27: 12109-12118.

2．Yoshida, A. & Tanaka, M. (2009) Enhanced modulation of neuronal activity during antisaccades in the primate globus pallidus. *Cereb. Cortex* 19: 206-217.

3．Yoshida, A. & Tanaka, M. (2009) Neuronal activity in the primate globus pallidus during smooth pursuit eye movements. *NeuroReport* 20: 121-125.

4. Kunimatsu, J. & Tanaka, M. (2010) Roles of the primate motor thalamus in the generation of antisaccades. *J. Neurosci.* (in press)

②受賞

平成 20 年度　文部科学大臣表彰　若手科学者賞

③著書

1. Tanaka, M. & Kunimatsu, J. (in press) "Thalamic roles in eye movements" *In*: Oxford Handbook on Eye Movements (S.P. Liversedge, I.D. Glichrist, S. Everling, Eds.), Oxford University Press, UK (in press)

2. 河原純一郎、田中真樹(2010)「第7章　注意と眼球運動」*In*: イラストレクチャー認知神経科学(村上郁也編)　オーム社、東京 pp. 108-124.

④招待講演

1.「眼球運動を指標にした随意運動研究」:第36回脳のセミナー(オーガナイザー:篠本滋、河野憲二、金子武嗣、外山敬介　他)　京都大学医学研究科　2008.10.7

2. "Neuronal correlates of covert tracking of visual stimuli in the prefrontal cortex": The 19th Annual Meeting of Neural Control of Movement. Organized by Douglas P. Munoz. Waikoloa, Hawaii.　2009.5.2

3.「時間情報処理の神経生理学的研究」:視覚科学の学際的アプローチに向けて(東北大学共同プロジェクト講演会)オーガナイザー:塩入諭　東北大学電気通信研究所 2009.9.30

4. "Thalamic roles in voluntary eye movements": 第8回中国神経科学学会全国大会. Organized by Jufang He. 広州, 中国. 2009.11.8

5. "Roles of the thalamus in voluntary eye movements": International Symposium--New Perspectives on Neural Mechanisms of Cognition and Action. Organized by Eiji Hoshi. Machida, Tokyo. 2009.11.13

⑤学会発表

1. Yoshida, A. and Tanaka M. (2007) Antisaccade signals in the primate globus pallidus. Program No. 398.19. *2007 Neuroscience Meeting Planner.* San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2007.

2. Kunimatsu J. and Tanaka M. (2009.5.1) Effects of microstimulation in the primate dorsomedial frontal cortex on the timing of self-initiated saccades. 19th Annual Meeting of Neural Control of Movement. Poster #F-7. Waikoloa, Hawaii.

3. Matsushima A. and Tanaka M. (2009.7) Properties of top-down signals in the primate frontal cortex during covert tracking of a moving object. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) *J. Physiol. Sci.* (suppl) 59, 192.

4. 大前彰吾, 植松明子, 田中真樹(2009.9.12)欠落 oddball 課題における2種類の検出メカニズム. 日本生理誌 71: 347

５. Tanaka M., Ohmae S. and Uematsu A. (2009.9.17) Entrainment of neuronal activity to periodic stimuli in the primate deep cerebellar nuclei. (サル小脳核ニューロンにみられた引き込み現象) Neurosci. Res. Suppl. 65: S62 (O2-J1-6)

研究課題別評価書

1．研究課題名

サル fMRI による視知覚機構の脳ネットワーク解析

2．氏名

中原　潔

3．研究のねらい

ヒトにおける脳機能イメージングによって、認知課題を遂行しない休止状態においてむしろ活動が高まる脳領域群が存在することが見いだされた。これらの脳領域は同期した脳活動を示すネットワークを形成していることがわかり、default-mode network (DMN)と呼ばれている。DMN は休止状態において活動が高まること、アルツハイマー病などでは DMN の活動が低下することから、DMN は意識の“基底状態”を生成するのではないかとの仮説がある。DMN の機能を探るため、マカクサルをモデルとして、以下の目標を立てた。すなわち fMRI を用いてマカクサルにおいてDMNを同定すること、およびDMNを破壊あるいは阻害したとき、どのような認知的変化が生じるかを明らかとすることである。またこうした脳ネットワーク機能を解析するためには分子生物学的手法の導入が有用であると考え、その第一歩として霊長類脳への効率的な遺伝子導入法を開発することを目指した。

4．研究成果

本研究課題の開始直後、現所属に異動したため、マカクサルにおいて fMRI を行う実験設備を新たに確立する必要があった。このためにサル用の RF コイル、MRI 用チェア、反応用スイッチなどを設計、製作した。これによって 3 テスラ MRI 装置(Siemens Trio)を使ってマカクサルにおいて fMRI に必要な良好な EPI 画像を取得することが可能となった。

DMN は同期した脳活動を示すネットワークを形成していることから、もしこれがマカクサル脳に存在するならば、独立成分分析によって同期した脳活動ネットワーク成分として捉えられるはずである。そこで麻酔下マカクサルにおいて、EPI 撮像（繰り返し時間2秒、約１５０スキャン）を行った。得られた時系列データに対して独立成分分析を行ったところ、独立成分として再現性よく得られたもののうち、ヒトにおける DMN と類似した脳領域群があることが認められた（図1）。すなわち内側頭頂葉、側頭・頭頂接合部、内側前頭前野、海馬等である。さらに別の解析として、DMN に属する典型的な脳領域である内側頭頂葉から脳活動の時間成分を抽出し、これと有意な正の相関を示す脳領域を全脳にわたって探索したところ、やはり独立成分分析によって得られた結果と同様の脳領域が得られた。以上の解析結果はこれらの脳領域がサルにおける DMN であると示唆するものであり、サルにおいてもヒトと同様の意識基底状態が存在する可能性を示している。

また DMN の時間成分に対して負の相関を示す脳領域を探索したところ、前頭眼野および頭頂間溝が有意な領域として検出された。これらの領域は注意に関わる領域であることが知られている。意識の基底状態の生成が DMN の機能として想定されることを考えると、意識の基底状態を司る脳活動と注意を司る脳活動とは互いに拮抗している可能性がある。すなわち日常的な言葉で例えるならば、何かに注意を集中すると「我を忘れる」ことの神経的基盤であるのかも知れない。

我々はさらに小型の新世界ザルの一種であるコモンマーモセットにおいて同様の解析を行い、マーモセットにおいても DMN が存在する可能性を示した。より下等と考えられるマーモセットにおいても DMN が存在するならば、ヒトを含めた霊長類に普遍的な意識の基底状態が存在する可能性が高い。

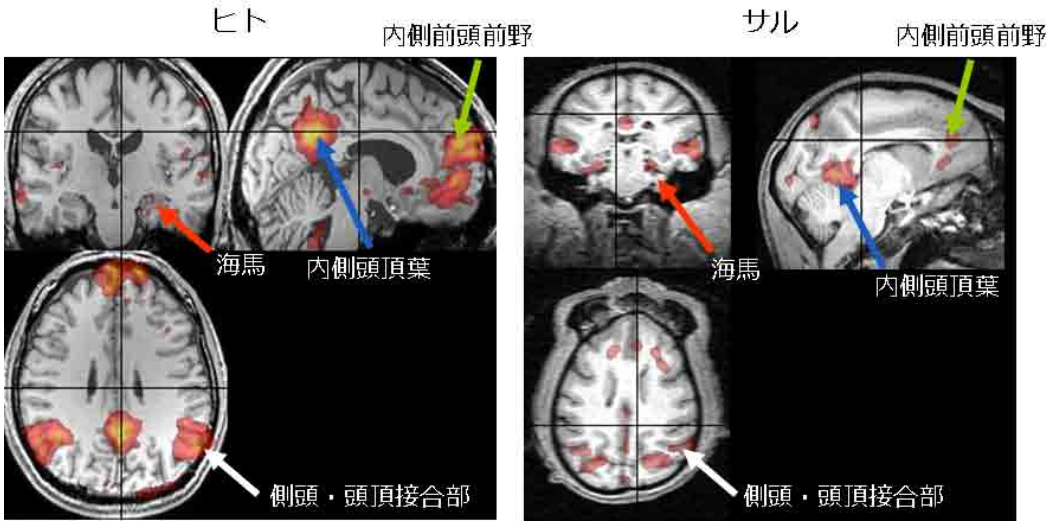


図1　Default-mode network (DMN)をサルにおいて同定した（右図）。ヒトにおける DMN（左図）との比較を示す。

DMN の機能をさらに解析するには、その活動を実験的に阻害し、それが認知機能に与える影響を調べることが有用である。脳機能を実験的に阻害する手法として、従来は GABA 受容体のアゴニストなどによる薬理学的手法がよく用いられてきたが、この手法は神経回路特異性および時間的分解能の点で難があった。近年、チャネル・ロドプシンなどの機能分子を用いた遺伝学的手法が導入され、その高時間分解能および神経回路特異性によって、神経活動と認知機能の因果関係を解明する手法として期待されている。これを霊長類脳研究に適用するには、有効な遺伝子導入法が必要だが、現時点で有望かつ実用的なのはウイルスベクターによる遺伝子導入である。我々はアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)によって、霊長類において高効率かつほぼ神経細胞特異的に遺伝子導入が得られることを明らかにした（図2）。

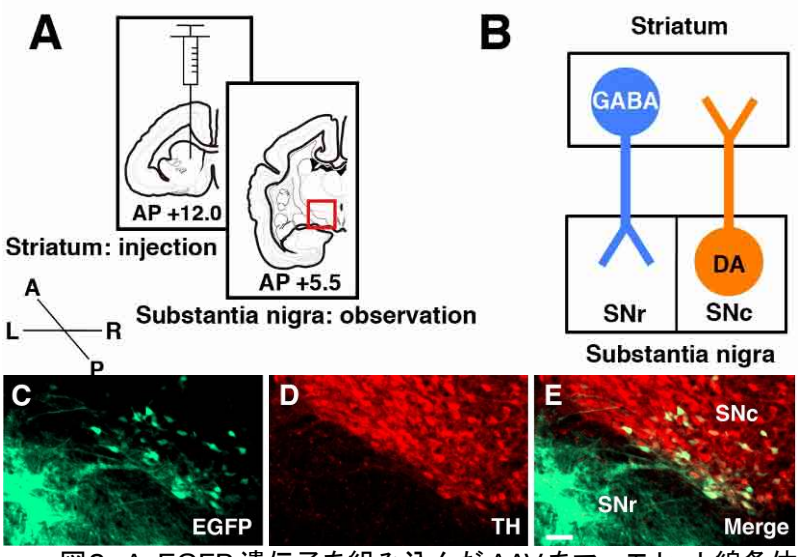


図2　A：EGFP 遺伝子を組み込んだ AAV をマーモセット線条体に注入し、黒質において共焦点顕微鏡により観察した。B：線条体と黒質との神経回路連絡を簡略化して示す。C-D：EGFP の黒質網様部(SNr)、緻密部(SNc)における発現。C: EGFP 蛍光（緑）、D: ドーパミン作動性神経細胞のマーカーであるチロシン水酸化酵素(TH)陽性細胞（赤）、E: それらの重ね合わせ(Merge)（黄）。SNr にみられる網状の EGFP 蛍光は、線条体から投射される GABA 作動性神経細胞の軸索終末である。一方 SNc にみられるドーパミン作動性神経細胞体の EGFP 蛍光は、

線条体に投射した軸索終末からの逆行性感染によるものである (Scale: 50μm) 。

AAV は神経細胞体や樹状突起から順向性に感染するだけでなく、軸索終末より逆行性に感染した（図2）。例えばマーモセット線条体に EGFP 遺伝子を組み込んだ AAV を注入すると、注入局所の GABA 作動性神経細胞に感染し EGFP を発現するだけでなく、この領域に投射する黒質緻密部のドーパミン作動性神経細胞の軸索終末より逆行性に感染し、黒質緻密部にある細胞体に EGFP 蛍光が認められた。このような逆行性の感染を利用することによって、霊長類脳の特定領域に投射する神経細胞にチャネル・ロドプシン等の機能分子を発現させ、神経回路レベルの解析を行うための手法となることが期待される。

5. 自己評価

マカクサルにおいて fMRI を行う実験系を新たに確立しなければならなかったのはやや時間をとられることとなったが、結果的には系を立ち上げることに成功した。この系を用いて、当初の目的どおり麻酔下マカクサルおよびマーモセットにおいて DMN の存在を示す証拠を得た。しかし覚醒下のサル fMRI によって課題遂行時と休止時の脳活動を比較するという、本来の定義に基づいた DMN の同定には至らず、従って DMN の活動を阻害したとき認知機能に与える影響を調べることは、研究期間内には達成できなかった。これらの結果は現在論文投稿準備中であるが、さらに本研究を今後も継続して発展させていく必要性を強く認識している。

また AAV による霊長類脳への遺伝子導入法を開発することに成功した。この方法による遺伝子導入は高効率かつほぼ神経細胞特異的である。この研究は開始当初の目標にはなかったものだが、短期間で有用な結果を得ることができ、in press の論文一報および準備中の論文一報となっている。

全体として見た場合、個人的にも、また認知神経科学全体の趨勢としても、研究の方向性を模索するような状況下にある。これは喜ばしくない状況であるかも知れないが、反面、次世代の認知神経科学へと飛躍を遂げるためには不可避なステップであるものと確信している。

6. 研究総括の見解

3テスラMRI装置を用い、独自の装置を作製し、マカクサルの脳解析の実験系を確立したことは評価できる。得られた時系列データに対して独立成分分析および相関解析を行い、DMN（default-mode network）と考えられる脳ネットワークが存在することを明らかにし、さらに小型霊長類マーモセットにおいても DMN が存在することを示したことで、今後、さらに、新たな局面が開かれることを期待する。

8. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Masamizu Y., Okada T., Ishibashi H., Takeda S., Yuasa S. & **Nakahara K**. Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. *Neuroreport* in press (2010).

2. **Nakahara K**., Adachi Y., Osada T. & Miyashita Y. Exploring the neural basis of cognition: multi-modal links between human fMRI and macaque neurophysiology *Trends in Cognitive Sciences* **11**, 84-92 (2007).

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Matsui T., Koyano K. W., Koyama M., **Nakahara K**., Takeda M., Ohashi Y., Naya Y. & Miyashita Y. MRI-based localization of electrophysiological recording sites within the cerebral cortex at single-voxel accuracy. *Nature Methods* **4**, 161-168 (2007).

②著書

1. Kimura H. M., **Nakahara K.** & Miyashita Y. (2008) Visual Associative Memory. In: Squire L. R. (ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*, volume **10**, pp. 233–242. Oxford: Academic Press.

研究課題別評価書

1．研究課題名
相互作用に支配される細胞集団の協調的振る舞い

2．氏名
堀川　一樹

3．研究のねらい
心臓の拍動や神経ネットワークにおける情報処理のように、細胞社会は、しばしば組織化することで高次機能を発現する。これらの高次生命機能が発揮される仕組みを理解するには、第一に、ネットワーク全体の活動パターンを構成単位である細胞レベルで詳細に計測し、次に細胞単位の活動パターンをもとに、ネットワーク全体の活動パターンが生成･維持される原理を抽出することが重要である。本研究では、生命システムの動作原理を理解する事を目的に、1.多細胞システムのネットワーク活動を大規模に計測するためのイメージングツールの開発ならびに、2.自己組織化する多細胞ネットワークの秩序化過程にシグナル伝達のノイズが果たす積極的な役割を明らかにするためのモデル構築と検証を行った。

4．研究成果
心臓の拍動や脳における情報処理においては、細胞単独でその機能が発揮されるのではなく、多数の細胞が複雑なネットワークを構築することで初めてその機能が発現される。これらの高次生命機能の発現機構、つまり動作原理の解明を試みる研究が注目を集めている。この目的のためには、ネットワークの活動パターンを生きたまま大規模に計測することが必須であり、カルシウムイメージングは最も有効な手法の一つである。神経や筋肉細胞における電気的な活動に限らず、ほとんどの細胞はホルモンなどの細胞外シグナルに応答しセカンドメッセンジャーとして利用される細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる。したがって細胞内カルシウムイオン濃度の変化を計測することで、多細胞ネットワークの活動パターンをモニターすることが可能となる。しかしながら、この方法にも技術的なハードルが残されており、ネットワーク活動の大規模計測はいまだ容易な手法ではない。本研究では様々な種類の多細胞集団について、その自発的なネットワーク活動の大規模イメージングを可能にするため、超高感度カルシウムプローブの開発を行った。

[方法．超高感度Ca^{2+}指示薬の開発]
cameleonは遺伝子にコードされたCa^{2+}プローブの代表例で、比較的大きなシグナル変化量を有すること、遺伝子操作により任意の回路にだけ局在化させることができるなど、多細胞ネットワークの活動パターンを計測する上で欠かせない利点をもつ。ところが、cameleonを利用することで人為的に刺激した細胞や小規模な細胞集団においては大きなシグナル変動を検出できる一方で、自発活動に伴う細胞内カルシウム変動の検出は困難で、仮にシグナルが得られてもその変化量は非常に小さいものであるという問題点があった。これは、細胞内カルシウム濃度の変動レンジが人為刺激応答時と自発活動時とで異なっているためと推測された。つまり、人為的な刺激応答時には細胞内カルシウム濃度が 100nM以下からμM程度まで大きく変動するのでその検出は容易であるが、自発活動時にはせいぜい数百nM程度にしか上昇していない可能が示唆された。そこでnMレンジにおける微少なカルシウム濃度変動を高感度に検出できるようにするため、cameleonの感度特性の改良を試みた。cameleonはカルシウム結合タンパク質であるカルモジュリン(CaM)とその標的タンパク質であるM13 との融合ペプチドを骨格にもつカルシウム指示薬である。この骨格の両端に位置するドナーおよびアクセプター蛍光タンパク質から発せられる蛍光シグナル比は骨格部分の立体構造、つまりはカルシウムイオン濃度に応じて変化する。したがってより低濃度のカルシウムイオンの存在下でCaM-M13 部分の立体構造変

化をもたらすような改変が有効と推測された。いくつかの改変を試みた結果、CaM-M13 間のリンカー部分を改良することで既存のcameleonに比べ、カルシウムイオンに対する感度を大幅に上昇させることに成功した。つまり、既存のcameleonのカルシウムイオンとの解離定数の最小値が 100nM (yellow cameleon 2.60)であったものが、60、 40 そして 20nMと段階的に減少したものが得られ、これらをyellow cameleon Nano60、 Nano40、 Naon20 と命名した(図1)。

[結果　自発的ネットワーク活動の検出]

得られた高感度指示薬の性能を生細胞内で検討するため社会性アメーバを材料に用いた。社会性アメーバは自らが細胞外に放出するcAMPの濃度勾配に対して正の走化性を示すが、このとき細胞内応答の一つとしてCa^{2+} transientを生じる。まずは対照実験として人為的cAMPの投与に対する応答を検出するため、yellow cameleon2.60 (Kd=100nM)とyellow cameleon Nano20 (Kd=20nM) を遺伝子導入した社会性アメーバを得、終濃度 10μMのcAMPを投与したときのCa2+応答を計測した。その結果両方の指示薬で非常に大きな応答を検出できた(図 2a)。次いで、自発的な細胞間cAMPリレーに対応するCa^{2+} transientの計測を試みた。集合期にある社会性アメーバの集団では 5-10 分の周期で同心円ないし回転螺旋波状の走化的集合流が形成されるが、これに対応する周期的な細胞内カルシウム濃度上昇はYC Nano20 でのみ十分大きなシグナル変化として検出することができた(図 2b)。YCNano20 により得られる大きなシグナル変化は大規模ネットワークを対象にしたイメージングも可能にし、最大10万個の細胞が回転螺旋波状に自発的に集合する過程を詳細に観察できることも明らかになった(図3)。

高感度指示薬を用いたカルシウム濃度変化の検出が神経細胞のネットワークにおいても有効でることを確かめるため以下の実験も行った。YCNano20 を導入した大脳皮質第4層のスライス標本において、活動電位にトリガーされる細胞内カルシウム上昇の検出を試みた。その結果、単一の活動電位にトリガーされる微少なカルシウムスパイクを再現性よく検出する事がわかった。また、ゼブラフィッシュ胚においても最大 1000 個の神経細胞における自発的なネットワーク活動をモニターできることが明らかになった(図 4)。以上の結果から、生体内での自発活動にともなうカルシウム濃度の変動は nM レンジにおいて微少な変化しかしていないことが確かめられ、その検出にあたっては、新規に開発した高感度カルシウム指示薬は非常に有用であることが明らかになった。本研究成果により、さまざまな多細胞ネットワークの自発活動パターンの計測が加速されることが期待される。

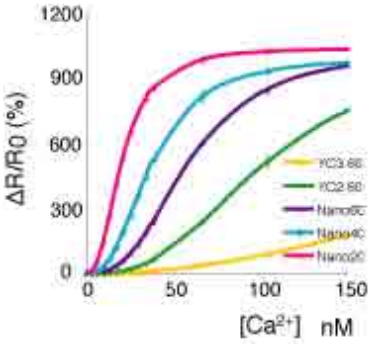


図 1. 改変 cameleon 分子のカルシウム親和性 FRET シグナルの変化量をカルシウム濃度に対してプロットした図

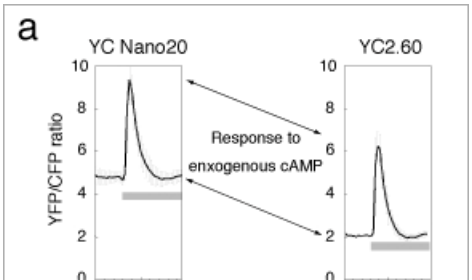


図 2. 改良型 cameleon (YC Nano20)と従来型の cameleon(YC2.60)により検出される社会性アメーバの細胞内 Ca2+応答。10μM cAMP の人為的刺激(a)と、自発的な cAMP リレーに対する Ca2+応答(b)。

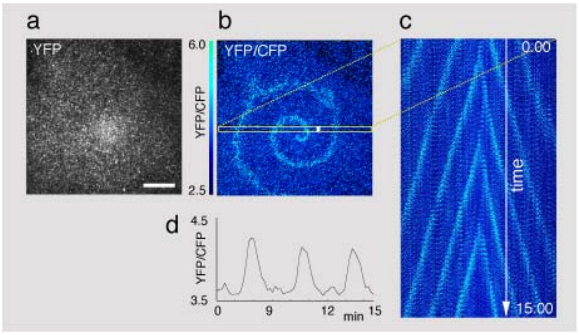


図 3. 社会性アメーバ細胞集団における自己組織的集合流のカルシウムイメージング

YC Nano20 で可視化された約 10 万個の細胞集団内を伝搬する回転螺旋波。(a)YFP 像, (b)FRET signal 像 (c) b の四角領域における signal の時空間プロット (d) および白四角内の時間変化 スケールバー 500 μ m

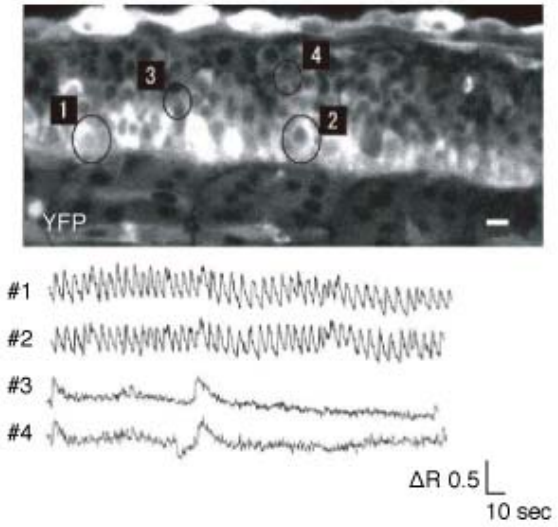


図 3. YC Nano60 で検出される zebrafish 胚 脊髄神経ネットワークの自発活動パターン

約 1000 個の神経細胞の活動パターンの長時間計測。運動神経(#1, #2)と介在神経の活動パターン(#3, #4)。

５．自己評価

本研究では、高次生命機能を生み出す多細胞ネットワークの動作原理を解明するために、その自発活動のイメージングを行い、さらに定量データを基にした数理モデル化を試みるというアプローチを採用した。イメージングツールの開発から、実験材料の選定、さらには数理モデル化までのすべてを自ら手がけ、かつ一定の成果にまで到達しつつあることは評価できる。数理モデルからはいくつかの興味深い予測が得られているが本研究を完結させるためには、モデルにより導かれた仮説を実験により検証することが必須である。研究期間内においてこれらの課題が完結しなかったことは物足りないが、今後さらに研究を飛躍させる大きな足がかりになることが期待される。

６．研究総括の見解

大規模多細胞ネットワークを対象に、細胞間情報伝達の時空間パターンを定量計測するための高感度のライブイメージング用指示薬を開発し、その結果、良質のデータが取れていることは、大きな成果と評価する。.最大 10 万個の多細胞ネットワークにおける単一細胞レベルでのシグナル応答パターンを計測できるようになり、シミュレーションによる検証を行い、非常に質の高い成果となっている。今後、このアプローチにより、多くの成果が期待できる。

７．主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①受賞

平成 19 年度科学技術分野、文部科学大臣表彰、若手科学者賞

②学会発表

１． The SSF/JST-PRESTO joint symposium “Noise reduction mechniasm in multicellular coupled oscillator” 2008.5.26

２． The 7th NIBB-EMBL Meeting: “Systems Biology and Functional Genomics” “Noise reduction mechniasm in multicellular coupled oscillator” 2008.4.18

３． Gordon research conference calcium signaling “Ca2+ dynamics in large-scale cellular networks visualized by ultra-sensitive Ca2+ probe, cameleon Nano” 2009.7.16

４． The Third q-bio Conference on Cellular Information Processing “Constructive role of noise in self-organized pattern formation in social amoeba” 2009.8.8

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

１. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, Horikawa K and Nagai T *Nature Methods*, 6: 351-353, (2009)

２. Functional role of a specialized class of spinal commissural inhibitory neurons during fast escapes in zebrafish. Satou C, Kimura Y, Kohashi T, Horikawa K, Takeda H, Oda Y, Higashijima S *J Neurosci*. 29(21):6780-93. (2009)

３. Tanimoto M, Ota Y, Horikawa K, Oda Y. Auditory input to CNS is acquired coincidentally with development of inner ear after formation of functional afferent pathway in zebrafish. *J Neurosci*. 29(9):2762-7. (2009)

研究課題別評価書

1．研究課題名
真核細胞の *in vivo* ロバストネス解析

2．氏名
守屋　央朗

3．研究のねらい
ロバストネスは生命現象に普遍的に見られるシステムとしての基本特性である。本研究では、出芽酵母を主要なモデル系として、私たちが開発したgTOW法を用いて、細胞のロバストネス発揮の基本原理の解明、ならびに高性能な細胞周期コンピュータモデルの開発を目指す。さらに、細胞種など個別のシステムに存在する脆弱点を明らかにするための一般的な研究の枠組みを確立し、長期的には癌などの疾患に対する新たな治療手段の開発への道をひらく。

4．研究成果
遺伝子綱引き（genetic Tug-Of-War: gTOW）法は、「標的遺伝子のコピー数をどこまであげたら細胞システムが破綻するか」を調べることができる。遺伝子のコピー数をあげるとその遺伝子が過剰に発現することから、gTOW では遺伝子の過剰発現に対する細胞システムのロバストネスを評価することができる。私たちは本さきがけ研究以前に、この実験手法を出芽酵母で開発し、30の細胞周期関連遺伝子のコピー数の限界を測定し、出芽酵母細胞周期のロバストネスを解析したり、Chen らが開発した酵母細胞周期の統合的なコンピュータモデルを評価している（*PLoS genetics* e111）。
本研究ではこの先行研究をさらに拡張し、出芽酵母細胞周期を gTOW により詳細に解析するとともに、このデータを用いて予測精度の高いコンピュータモデルを開発することを当初の目標とした。さらに gTOW を細胞のシステムレベルの解析の一般的な枠組みとして確立することを目的とした。
上記の目的をふまえて、私は本さきがけ研究期間で大きく以下に述べる3つの研究を行った。
（1）　出芽酵母細胞周期の gTOW によるより詳細な解析と、そのデータを用いたコンピュータモデルの改良
（2）　分裂酵母での gTOW の開発と細胞周期関連遺伝子の解析、ならびにそのデータを用いたコンピュータモデルの改良
（3）　出芽酵母のすべての遺伝子の gTOW による解析。
以下にそれぞれの詳細について述べる。

（1）　出芽酵母細胞周期の gTOW によるより詳細な解析と、そのデータを用いたコンピュータモデルの改良
上述の先行研究で私は、細胞周期システムが *ESP1*（セパレース遺伝子）の過剰発現に対してロバストである一方、*CDC14*（M 期フォスファターゼ遺伝子）の過剰発現に対して著しく脆弱であることを見いだしている。本研究では、それぞれの遺伝子の過剰発現の限界値を、酵母細胞周期の統合的なコンピュータモデル（Chen2004 モデル）と比較することで、*CDC14* の過剰発現に対して細胞が著しく脆弱である理由が、その阻害因子 *NET1* との「遺伝子量の不均衡」から生じていることを予想し、これを2次元の gTOW と呼ぶ実験により検証することに成功した。
ESP1 についても同様な遺伝子量の不均衡による脆弱性がコンピュータモデルで予測された。しかし、モデルの予測に反し、実際の細胞は *ESP1* の過剰発現に対してロバストであった。このことから、*ESP1* の阻害因子である *PDS1* との量的な不均衡をさける機構が細胞内に存在していると考え、その機構を同定した。遺伝子破壊株での gTOW 実験と文献の検索、ならびに部位特異的変異を用いた gTOW 実験により、*ESP1* の過剰発現に対する細胞周期のロバストネス発揮

の原理として、*Pds1* を *Esp1* に対して細胞内に大過剰存在させていること、その量を保障するためにサイクリン依存性キナーゼによりPds1 がリン酸化され安定化される機構が使われていることが明らかになった。さらにこの機構を組み込み Chen らのモデルを改良した。

私たちはこのようにして、「モデルの予想→gTOW による検証→ロバストネスを生み出す新たな分子機構の同定→モデルへのフィードバック」という、細胞システムのロバストネス発揮の原理の同定と統合的なコンピュータモデルの開発の一般的な枠組みを確立できたと考えている。この研究は、*PLoS genetics* 誌に投稿し、in press となっている。

なお、本研究の過程で、gTOW 実験の精度をあげたり、gTOW 実験の様子を一細胞レベルで観察するため gTOW 用プラスミドの改良し、特許を申請した。

（2） 分裂酵母での gTOW の開発と細胞周期関連遺伝子の解析、ならびにそのデータを用いたコンピュータモデルの改良

分裂酵母は出芽酵母と同様に真核細胞のモデル生物として確立した地位を持っているが、出芽酵母とは進化的に10億年の距離があるとされる。これら2つの酵母ならびにほ乳類などの高等真核生物の細胞周期は、サイクリン依存性キナーゼの制御についてシステムレベルでの共通性がみつかっている。私は、ロバストネスについても真核細胞間に共通性がみられるかを調べる目的で、本研究で分裂酵母でも gTOW 法を開発した。この過程で作られた gTOW 用のプラスミドについては、特許を出願した。

さらに開発した分裂酵母の gTOWにより、分裂酵母の細胞周期で働く約30の遺伝子についてその上限コピー数を測定し、出芽酵母の細胞周期遺伝子の上限コピー数と比較した。その結果、両酵母に共通した「脆弱なコア」が見つかった。さらにこのデータを用いて、Oxford 大学の Bela Novak 教授との共同研究により、分裂酵母細胞周期の統合的なコンピュータモデルを開発したこの結果は現在論文発表の準備を進めている。

なお、分裂酵母での gTOW 法の開発の過程で、出芽酵母で遺伝子の大規模な機能解析に利用されている遺伝子クローニング法（ギャップリペアー法）が分裂酵母でも有効に機能することを発見し、論文として発表した（Chino & Moriya, *PLoS One*, e9652）。

（3） 出芽酵母のすべての遺伝子の gTOW による解析（gTOW6000）

出芽酵母は約6000の遺伝子を持っている。本研究では、これらすべての遺伝子のコピー数の上限をgTOW法によって測定し、細胞システム全体のロバストネスについて議論することを試みた。この一連の研究を私達は gTOW6000と呼んでいる。この大規模な解析は、さきがけ研究のみの規模では実現がむずかしいことから、ERATO-SORST 北野共生システムプロジェクトと共同でおこなった。

ゲノム上のすべての遺伝子をPCRにより増幅しgTOW用のプラスミドに組み込み、これらのプラスミドを持つ酵母の増殖速度を測定するとともに、細胞が持つプラスミドのコピー数を測定した。現在までにプラスミドの構築とコピー数の測定は終了している。現在、細胞がその過剰発現に対して著しく脆弱であると考えられる一群の遺伝子について、さらに検証を進めている。

gTOW6000の解析は、それぞれの遺伝子をどこまで過剰発現できるのかについての基礎的なデータを提供すると考えている。また、gTOW6000でつくられたプラスミドコレクションは、遺伝子の過剰発現をベースとしたスクリーニング系にも広く利用可能であることから、National Bio-Resource Project（NBRP）酵母にこのプラスミドコレクションを寄託した。

現在までの gTOW6000の解析による最も大きな成果は、遺伝子がわずか2コピー程度になっただけで細胞のシステムが破綻してしまう遺伝子が20以上あるという発見である。私はこれを説明する分子機構として、上記（1）で発見した「遺伝子量の不均衡」を考えており、その検証のための実験を計画している。これらの研究結果は2010年度にインパクトの高い論文として発表したいと考えている。

その他

gTOW は、私自身が開発した実験手法であり、この実験系を用いた細胞システムのロバストネ

ス解析やコンピュータモデルの開発は、非常にオリジナリティの高い研究の枠組みであると考えている。そのため、社会への認知を高める努力も必要であると考え、本研究の枠組みについて、複数の一般的な出版媒体に解説を発表するとともに、多数の招待講演を行った。

用語解説

統合的なコンピュータモデル：細胞が持つ特定のシステム（例えば細胞周期制御システム）で働く分子とその相互作用を詳細に記述することで作られるコンピュータ（数理）モデル。究極的には、細胞内で起きているすべての事象を予測できるような、「細胞シミュレータ」に発展していくと期待されている。一方で、細胞内にはあまりにも未知な要素が多いために、統合的なモデルは「人の考えていることを再現する」以上のことはできず、（気象シミュレーターのように）細胞の未知の挙動を予測する能力を持たせることは難しいという考え方もある。

ロバストネスと脆弱性： ロバストネスとは、システムが内乱や外乱にあらがって機能を維持する特性のことをいう。本研究では、細胞（というシステム）が、細胞内で働く遺伝子の過剰発現に対してどの程度機能を維持できるかを、細胞のロバストネスの評価の指標としている。例えば、ある遺伝子が１００倍過剰に発現しても細胞が死なない場合、細胞はその遺伝子の過剰発現に対してロバストネスが高い（あるいはロバストである）という。一方、ある遺伝子が数倍過剰に発現しただけで細胞が死ぬ場合、細胞のシステムはその遺伝子の過剰発現に対してロバストネスが低い（あるいは、脆弱である）という。

５．自己評価

目標に掲げた、gTOW 法を基盤とした細胞のロバストネス解析、コンピュータモデルの開発の枠組みはほぼ完成できた。本研究期間を通じてこの枠組みを広く世界にアピールする機会に恵まれ認知度も高まったと考えている。一方で、原著論文の発表は遅れており、現在出版中の２報の論文のみとなったことについては残念に思っている。しかし、これらのテーマ以外にも論文発表の前段階まで来ている成果があるので、よりインパクトのある形での論文発表を行いたい。

６．研究総括の見解

出芽酵母での遺伝子の過剰発現の限界値を、酵母細胞周期の統合的なコンピュータモデル（Chen2004 モデル）と比較することで、*CDC14* の過剰発現に対して細胞が著しく脆弱である理由が、その阻害因子 *NET1* との「遺伝子量の不均衡」から生じていることを予想し、これを２次元の gTOW と呼ぶ実験により検証することに成功した。モデル系の検討から新たな予測が可能な系を構築してきたことは評価する。さらに、この理論を、検証を踏まえつつ、発展させて行って頂きたい。

７．主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

① 論文

1. Ayako Chino & Hisao Moriya*, Plasmid construction using recombination activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe. PLoS One*,Vol.5 No.3 e9652 (2010)

2. Kazukari Kaizu, Hisao Moriya*, and Hiroaki Kitano, Fragilities Caused by Dosage Imbalance in Regulation of the Budding Yeast Cell Cycle, *PLoS genetics*, in press.

*Corresponding author

②特許

研究期間累積件数：2件

発　明　者：守屋央朗、吉田由紀、北野宏明
発明の名称：サッカロミセス属微生物用プラスミドベクター
出　願　人：独立行政法人科学技術振興機構、特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構
出　願　日：平成19年11月8日

発　明　者：守屋央朗、吉田由紀、北野宏明
発明の名称：シゾサッカロミセス属微生物用プラスミドベクター
出　願　人：独立行政法人科学技術振興機構、特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構
出　願　日：平成19年11月8日

③著書・総説

1．守屋央朗 北野宏明「gTOW 法によるロバストネスの測定」 実験医学(2007) Vol.25 No.2 増刊「ゲノム情報と生命現象の統合的理解」 pp191-197, 2007

2．守屋央朗「頑健さを支えるしなやかさを計測する」 生命誌 58

3．守屋央朗「細胞システムのロバストネスの測定」「現代化学」2009 年 3 月号（No.456）pp26-32

4．守屋央朗「生命システムのロバストネスを探る・出芽酵母の研究を中心として」「化学と生物」2009年4月号 pp269-274

④学会発表

1．「Upper limit dosage of genes involved in cell division cycle in S. pombe.」 2007 年 6 月 12 日 Centre for Computational and Systems Biology （Trento, Italy）

2．「*In vivo* robustness analysis of eukaryotic cell division cycle using genetic tug-of-war method」 2008 年 2 月 4 日 International Workshop for Future Challenges of Systems Biology Workshop (FCSB) 2008 (Chiyoda-ku, Tokyo)

3．「Robustness analysis of cellular systems using genetic tug-of-war method」 2008 年 7 月 7 日 Surrey UK-Japan Systems Biology Workshop (Surrey, UK)

4．「In vivo robustness analysis of cellular systems using genetic tug-of-war method」2008年7月9日 Systems Biology Centre/Department of Biochemistry, Univ. of Oxford（Oxford, UK）

5．「In vivo robustness analysis of the yeast cell cycle」2010年2月25日 The 13th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference on Systems Biology in Cell Cycle Regulation（NIH, Bethesda, USA）

研究課題別評価書

1．研究課題名
細胞の動的情報感知機構とナノバイオメカニクス

2．氏名
山本　希美子

3．研究のねらい
血管内面を覆う内皮細胞には、血流に起因する流れずり応力が作用している。血流が増加すると血管内皮細胞がその変化を感知し、血管径を増大させると共に、組織での毛細血管数を増加させる等のリモデリング反応を起こし、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。しかし現在まで、内皮細胞が血流刺激をどの様に感知し応答するのか、その分子機構は明らかではない。本研究では、この問題を解明する為、血管で生じる力学現象をナノスケールで解析し、流体力学的に設計した装置を用いて、定量的な流れずり応力を作用させた血管細胞を最新の画像化技術を駆使して解析する。

4．研究成果
内皮細胞の血流センシング機構を理解するためには、内皮細胞が流れずり応力を最初に感知する機構とそれに関わる血流センサー分子の本体を明らかにすることが最も重要である。これまで血流センサー分子の候補としては細胞膜に存在するイオンチャネルや、細胞と細胞外マトリックス間の結合に関わるインテグリン分子、細胞の形態を維持しているアクチンフィラメントなどの細胞骨格分子などが挙げられているが、まだ確定していない。最近、我々は内皮細胞の流れずり応力感知にカルシウムイオンを介した機構が働いていて、流れずり応力の大きさに依存して細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる分子として ATP 作動性カチオンチャネル P2X4 が働いていることを見出した。そこで本研究では、このイオンチャネルに焦点をあて、内皮細胞の血流センシングの分子機構の解明を目指した。

流れずり応力依存的なカルシウム流入に関与するATP作動性カチオンチャネルのサブタイプであるP2X4 遺伝子をノックアウトしたマウスの内皮細胞では、流れずり応力によるカルシウム流入とそれに引き続くNO産生が起こらず、そのことが血圧の上昇や血流変化に対する血管の拡張反応やリモデリングの障害につながった。最近、我々はこの流れずり応力によるP2X4の活性化に流れずり応力依存的に内皮細胞から放出されるATPが重要な役割を果たしていることを見出した。内皮細胞に流れずり応力を作用させると、その強さ依存性に内因性ATPが放出されるが、これを阻害するとP2X4 を介するCa^{2+}流入反応が著明に抑制された。従って、流れずり応力によるATP放出の機構を探ることは流れずり応力の情報伝達の解明につながると考えた。

1）流れずり応力依存的な ATP 放出に ATP 合成酵素の働きが関与する。
ヒト肺動脈内皮細胞（HPAECs）に流れ刺激を 1 分間与えたときに灌流液中に放出されてくる ATP 量を luciferin-luciferase 法で定量した。流れずり応力の大きさに依存して細胞外に ATP が放出され。このとき、細胞内 ATP 濃度には変化が起きなかった。この流れ刺激による ATP 放出に寄与する分子を探索する為に各種の阻害剤を用いた所、ATP 合成酵素の阻害剤である angiostatin、piceatannol が流れずり応力に伴う ATP 放出を顕著に抑制することが確認された。同様に、ATP 合成酵素のβ-subunit に対する抗体（ATP synthase β Ab）によっても ATP 放出反応が有意に抑制された。一方、angiostatin、piceatannol、ATP synthase β Ab 共に細胞内 ATP 濃度に影響を及ぼさなかったことから、膜表面で ATP 合成酵素に作用し、その機能を抑制すると考えられる。これらの所見は HPAECs において膜表面の ATP 合成酵素が流れ誘発性の ATP 放出に中心的な役割を果たしていることを示唆している。

2）内皮細胞膜のカベオラに ATP 合成酵素が存在する。

ATP 合成酵素が HPAECs の細胞膜に存在するかについて、ATP synthase β Ab を用いた免疫蛍光染色で検討した。抗体が細胞膜を透過しない条件で得た染色写真から ATP 合成酵素は細胞表面に存在すること、その分布は細胞膜全体に局在するのではなく、細胞の一部の辺縁部分に集中することが示された。同様の分布は ATP 合成酵素のα-subunint に対する抗体を使った免疫染色でも確認された。一方、抗体が細胞膜を透過する様に、細胞を triton X-100 で処理する条件で行った免疫染色では、ATP 合成酵素がミトコンドリアの場所に一致して豊富に分布していた。HPAECs を細胞膜カベオラの構成蛋白である caveolin-1 及びコレステロールに富む脂質ラフトのマーカー蛋白である cholera toxin B の抗体で免疫染色を行った所、ATP 合成酵素は caveolin-1 および cholera toxin と共局在していることが判明した。これらの結果から ATP 合成酵素が細胞膜の脂質ラフトに caveolin-1 と共存していると考えられる。この事実を更に確認するため、a detergent-free sucrose density gradient method で細胞膜の caveolae rich fraction 得て、ATP synthase β Ab と抗 caveolin-1 抗体を使った immunoblot analysis を行った。その結果、ATP 合成酵素が細胞膜の caveolae rich fraction に特異的に分布していることが示された。

3）細胞膜の ATP 合成酵素は ATP 産生能を有している。

膜表面に存在するATP合成酵素の機能を調べるため、HPAECsに^{3}H-labeled ADPを作用させ、上清中のヌクレオチド誘導体の相対量を薄層クロマトグラフィ（TLC）で定量した。作用後 1 分以内で上清中に^{3}H-labeled ATPが出現し、5分後に最大となり、その後減少した。このとき細胞内には^{3}Hの放射活性がほとんど検出されなかったことから、^{3}H-labeled ADPは細胞内では代謝されず、細胞表面で反応していると考えられる。細胞をATP合成酵素の阻害薬であるangiostainで処理すると、細胞表面での^{3}H-labeled ADP から^{3}H-labeled ATPへのconversionが著明に抑制された。これらの結果はHPAECsの細胞膜に存在するATP合成酵素はADPからATPを合成する機能を有していることを示している。

4）カベオラ・ラフトの破壊は流れ誘発性 ATP 放出反応を消失させた。

ATP 合成酵素がラフトに局在することが流れ誘発性 ATP 放出にどのような意味があるかを検証した。細胞膜のコレステロールを除去する作用がある methyl-β cyclodextrin（MβCD）で HPAECs を処理した所、脂質ラフトが消失し、ATP 合成酵素が細胞膜全体に広く分布するようになった。これにコレステロールを添加すると再びラフトが現れ、ATP 合成酵素も細胞辺縁の一部に集積して分布するようになった。Western blot による定量から、MβCD とコレステロールによる細胞処理は細胞全体と膜に存在する ATP 合成酵素や caveolin-1 の量には影響を及ぼさないことが示された。HPAECs を MβCD で処理すると流れ刺激依存性の ATP 放出は有意に抑制された。この MβCD の ATP 放出抑制効果はコレステロールの添加で回復した。このことは流れ誘発性の ATP 放出に細胞膜 ATP 合成酵素が関わるためにはラフトに分布することが必須であることを示唆している。

更に、ATP 合成酵素が caveolin-1 と共存することが流れ誘発性 ATP 放出にどのような意味があるかを検証した。HPAECs に caveolin-1 の siRNA を導入した所、細胞膜の ATP 合成酵素の分布に大きな変化は見られなかったが、caveolin-1 の発現が明らかに減少した。一方、ATP 合成酵素の発現には変化が認められなかった。Caveolin-1 の細胞膜における発現を siRNA で抑制すると、流れ誘発性の ATP 放出が明らかに抑制を受けた。このことは流れ誘発性の ATP 放出に細胞膜 ATP 合成酵素が働く上で、caveolin-1 との関係が重要であることを示している。

5．自己評価

本研究課題では、血管内皮細胞の血流センシング機構を解明するという目標に対して、既存の実験方法に加えて、イメージングを中心とした新たな手法を試行錯誤の基に立ち上げることに挑戦した。研究期間内に結論に到達した課題もあったが、実験系の樹立に時間を有した為結論にまで至っていない系もある。しかし、研究成果②に記載した通り、主な課題の解決に必要な基礎の準備と検討は既に終了しており、今後も引き続き研究課題を推進することで、当初の目標を更に発展させようと考えている。

6．研究総括の見解

血管内皮細胞の血流センシング機構を解明するため、装置の開発から細胞生物学、薬理学的手法、さらにイメージング手法を取り入れて、独自の実験系を綿密に構築した。特に、ヒト肺動脈内皮細胞（HPAECs）に流れ刺激を与えたときに灌流液中に放出されてくる ATP 量を定量することにから、膜表面の ATP 合成酵素が流れ誘発性の ATP 放出に中心的な役割を果たしていることを見出し、剪断応力による ATP 放出が細胞膜カベオラ付近から放出されることを明らかにしたことは、大きな成果である。これらの知見をさらに発展させ、血管の老化と予防への足がかりに貢献することを期待する。

7．主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1．K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Obi, S. Kumagaya, Y. Taketani, A. Kamiya, and J. Ando. Involvement of cell-surface ATP synthase in flow-induced ATP release by vascular endothelial cells. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 293: H1646-H1653 (2007).

2．M. Toda, K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Obi, S. Kumagaya, T. Igarashi, A. Kamiya, and J. Ando. Differential gene responses in endothelial cells exposed to a combination of shear stress and cyclic stretch. J. Biotechnol. 133: 239-244 (2008).

3．J. Ando and K. Yamamoto. Vascular Mechanobiology: Endothelial Cell Responses to Fluid Shear Stress. Cir. J. 73: 1983-1992 (2009).

②特許

研究期間累積件数：1件 （出願公開前）

発 明 者：グン チェンピン（34%）、陳 咏梅（33%）、山本 希美子（33%）
発明の名称：足場材料
出 願 人：国立大学法人 北海道大学
出 願 日：平成 21 年 1 月 6 日

③受賞

1． IEEE, Best Paper Award in 2008 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2008) for the paper entitles “Cyclic strain induced ES cell differentiation into vascular smooth muscle cells via PDGF receptor β activation”, 8 November, 2008, Nagoya.

2． 第 15 回日本血管生物医学会 ポスター賞 2007 年 11 月 29-30 日 福岡

④学会発表

1． K. Yamamoto, T. Masumura, N. Shimizu, and J. Ando, ″Shear stress induces differentiation of arterial endothelial cells from murine embryonic stem cells″ Medical Physics and Biomedical Engineering, World Congress 2009, Munich, September 8, 2009.
2． 山本希美子、神谷瞭、安藤譲二、「流れずり応力が惹起する内皮細胞膜特性の変化」第48回日本生体医工学学会大会 2009年4月23日 東京
3． K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Obi, and J. Ando, “Caveola ATP synthase mediates ATP release in vascular endothelial cells exposed to shear stress” The 6th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, Kanazawa, 3 December, 2008.
4． K. Yamamoto and J. Ando, “Cell surface ATP synthase-mediated shear-stress mechanotransduction in vascular endothelial cells” The Joint Biophysics Society 52nd Annual Meeting and 16th IUPAB International Biophysics Congress, Long Beach, 6 February, 2008.
5． 山本希美子、熊谷晋一郎、安藤譲二、「二光子レーザー顕微鏡による血管内皮細胞膜の脂質ラフトの画像化」 第15回日本血管生物医学会 2007年11月30日 福岡

⑤招待講演
1． 山本希美子、安藤譲二、「血管内皮のカルシウムシグナリングを介した血流感知機構」第83回日本薬理学会年会 2010年3月28日 岡山
2． 山本希美子、安藤譲二、「血管内皮細胞における血流感知機構」第83回日本薬理学会年会 2010年3月16日 大阪
3． 山本希美子、安藤譲二、「内皮細胞のシェアストレス応答と循環機能調節」第32回日本分子生物学会年会 2009年12月10日 横浜
4． K. Yamamoto, and J. Ando, ″Fluid-mechanical force-induced differentiation of murine ES cells towards vascular cells″ The Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics 2009, Engelberg, September 4, 2009.
5． K. Yamamoto and J. Ando, “Endothelial P2X4-mediated shear-stress-mechano-transduction and its roles in the control of vascular functions” Fukuoka Purine 2009, Joint with JSPS Core-to-Core Program, A Satellite Symposium for IUPS 2009, Fukuoka, July 23, 2009.

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】
①論文
1. N. Shimizu#, K. Yamamoto#, S. Obi, S. Kumagaya, T. Masumura, Y. Shimano, K. Naruse, J. K. Yamashita, T. Igarashi, and J. Ando. (# These authors contributed equally to this work.) Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor β. J. Appl. Physiol. 104: 766-772 (2008).

2. T. Masumura#, K. Yamamoto#, N. Shimizu, S. Obi, and J. Ando. (# These authors equally contributed to this work.) Shear Stress Increases Expression of the Arterial Endothelial Marker EphrinB2 in Murine ES Cells via the VEGF-Notch Signaling Pathways. Arteioscler. Throm. Vasc. Biol. 29: 2125-2131 (2009).