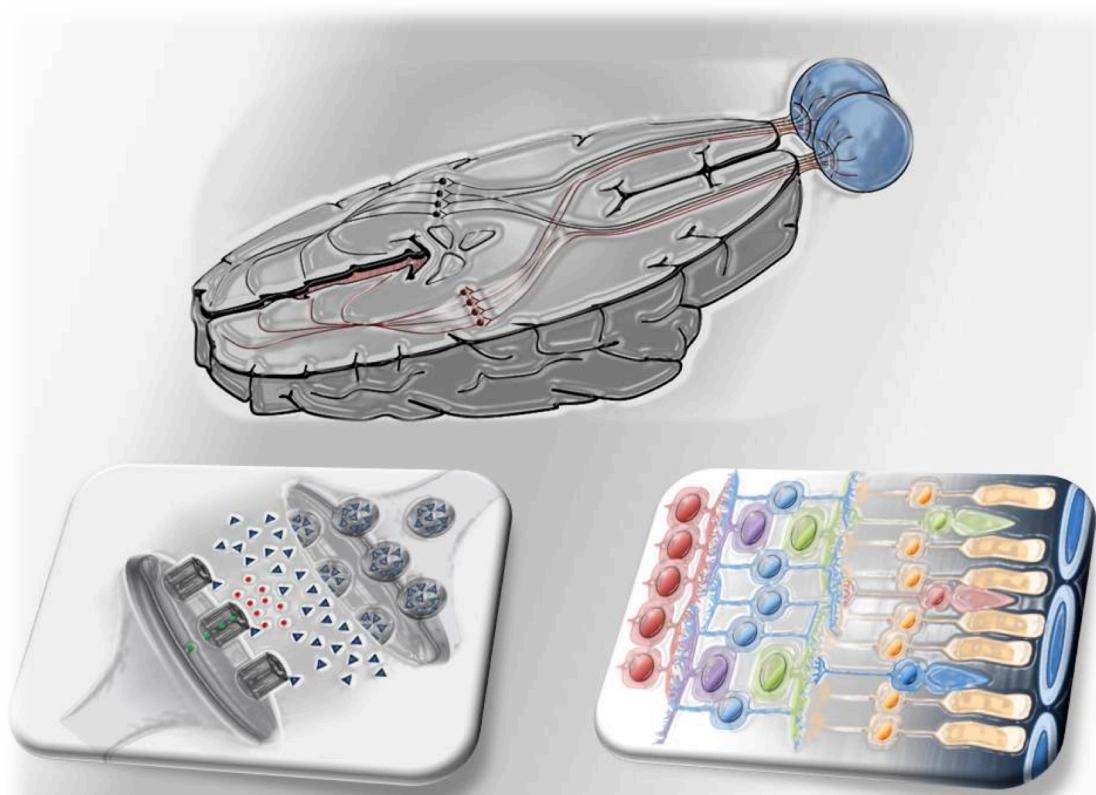


# 視覚科学フォーラム

## 第 18 回 研究会



日時：2014 年 8 月 18 日～19 日  
会場：前橋工科大学 1 号館 5 階 151 教室  
司会者代表：今村一之 前橋工科大学

## 第 18 回視覚科学フォーラム

開催日 : 2014 年 8 月 18 日(月)~19 日(火)

会場 : 前橋工科大学 1 号館 5 階 151 教室

連絡先 : 今村一之(世話人) または 本村信一

前橋工科大学 工学部 システム生体工学科

〒371-0816 群馬県前橋市上佐鳥町 460 番地 1

TEL : 027-265-0111 内線 670(今村)、 027-265-7319(本村)

FAX : 027-265-3837(今村)、 027-265-3837(本村)

E-mail : [imamurak@maebashi-it.ac.jp](mailto:imamurak@maebashi-it.ac.jp)(今村)

[motomura@maebashi-it.ac.jp](mailto:motomura@maebashi-it.ac.jp)(本村)

[jarvo2014@maebashi-it.ac.jp](mailto:jarvo2014@maebashi-it.ac.jp) (第 18 回視覚科学フォーラム専用)

### 発表に関する注意事項

- 1 会場での口頭発表のみとします。
- 発表時間は 15 分(口演 12 分、質疑応答 3 分)です。
- プロジェクタを用意しております。ご自身の PC をお持ちいただくようお願い致します。会場の備え付け PC は、Windows 7 Pro 32 bit で Microsoft Office 2013 使用可です。このスペックでよろしければ、発表ファイルを USB メモリーでご持参いただいても結構です。
- 各セッションが始まる前に各自のパソコンを切替機に接続し、動作確認を行ってください。

### 懇親会

8 月 18 日(月)の夕方に立食形式の懇親会を行います。基本的に全員参加でお願い致します。

日時 : 8 月 18 日(月) 17:30 ~ 19:30

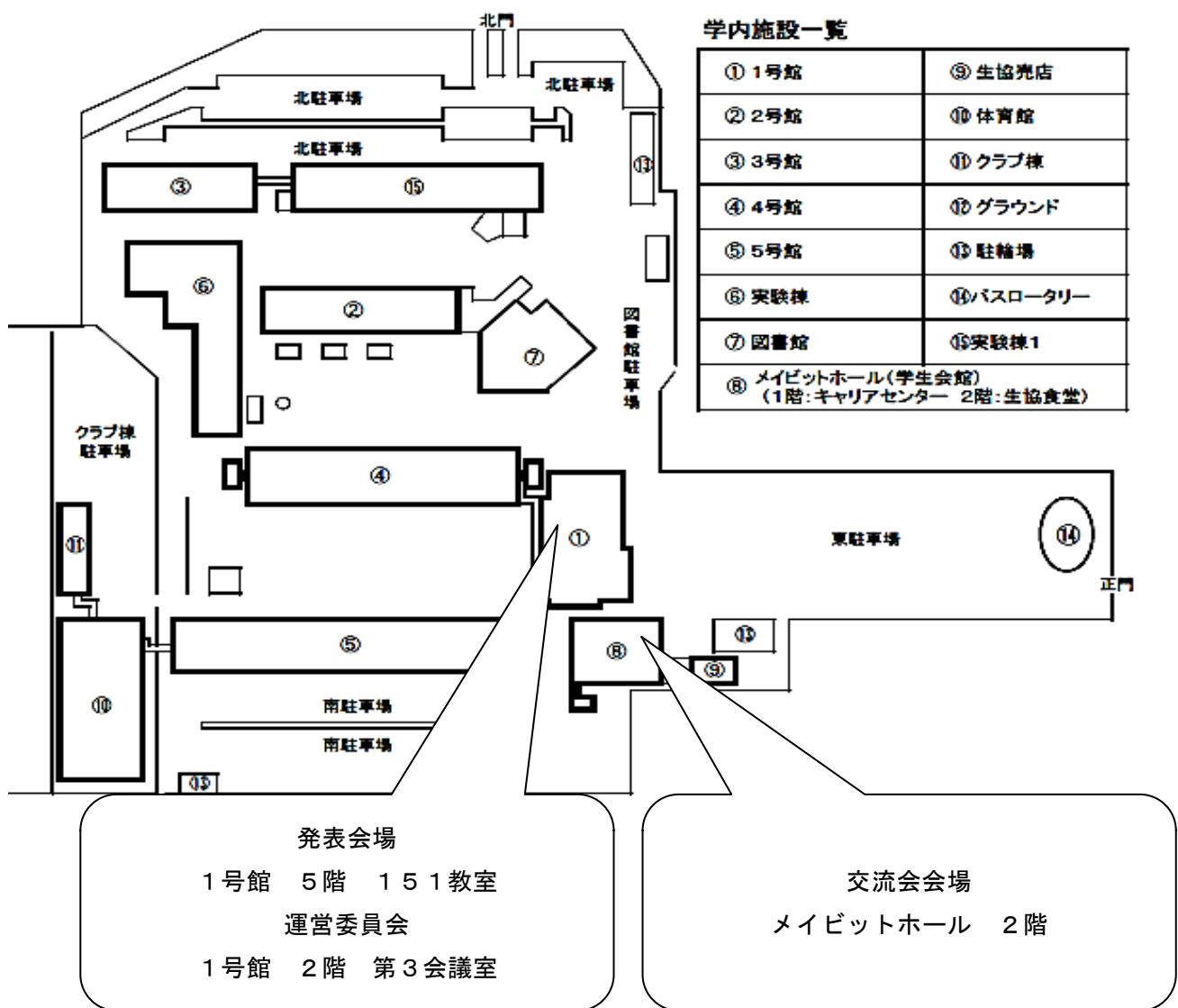
会場 : メイビットホール 2 階 生協食堂(前橋工科大学敷地内)

[前橋工科大学施設案内図](#) (次ページ図中の⑧の建物)

### 運営委員会

11:50-13:25 会議室 3 にて行います。

## キャンパス地図

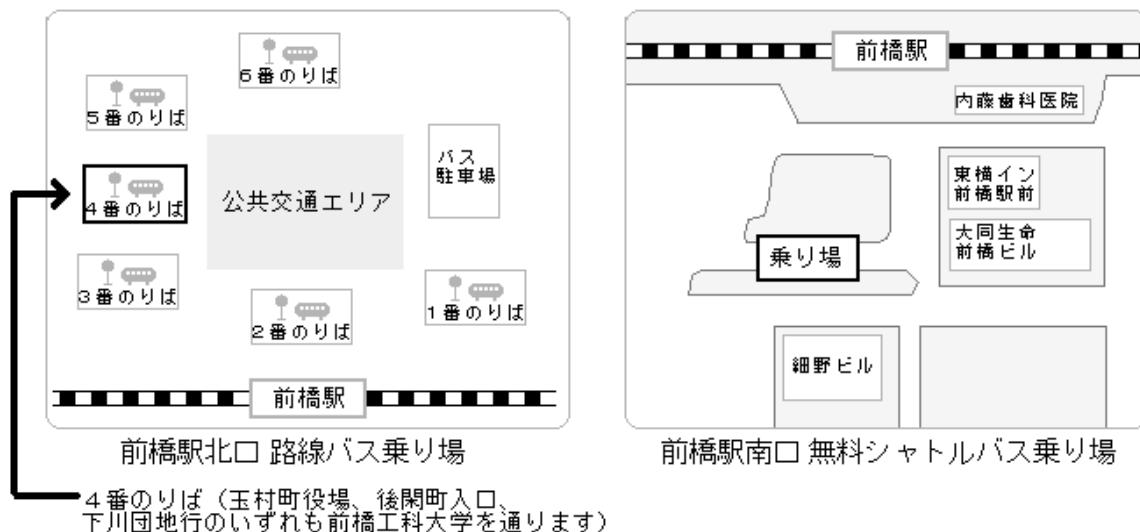


## 前橋駅から前橋工科大学までの移動方法

前橋駅から前橋工科大学への移動方法についてご案内いたします。

- ★ お急ぎの場合、タクシーで約7～8分（運賃は1000円程度）
- 路線バスで約10分～15分（運賃は片道200円）
- ◎ 無料シャトルバスで約10分

本大会のために無料シャトルバスをご用意しております。路線バスのりばと無料シャトルバスのりばを下図に示します（のりばが異なりますのでご注意願います）。また、路線バスの出発時刻と無料シャトルバスの出発時刻を掲載いたします。



4番のりば（玉村町役場、後閑町入口、下川団地行のいずれも前橋工科大学を通ります）

### 【前橋駅⇒前橋工科大学】

路線バス	18日無料バス	19日無料バス
08:10	09:00	08:30
08:35	09:30	09:00
09:00	10:00	09:30
10:00	10:30	10:00
10:40	11:00	10:30
11:05	11:30	
11:40	12:00	
11:55	12:30	
12:15	13:00	
12:45		
12:50		
13:48		

### 【前橋工科大学（正門入口に停留所あり）⇒前橋駅】

路線バス	18日無料バス	19日無料バス
11:25	17:00	12:30
12:06	18:00	13:00
12:55	20:00	15:30
13:45	20:30	16:00
14:25		
14:50		
15:10		
16:25		
17:05		
17:55		
18:55		
19:40		

# プログラム

## プログラム

8月18日(月) -----

10:00-10:10 視覚科学フォーラム研究会 開催挨拶(会長:佐藤宏道)

### Session I 座長:小池千恵子(立命館大学)

10:10-10:30

1. 網膜ON型運動方向選択性細胞の応答形成機構

○雁木美衣<sup>1</sup>・高田昌彦<sup>2</sup>・立花政夫<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京大学大学院人文社会系研究科・<sup>2</sup>京都大学靈長類研究所)

10:30-10:50

2. 眼球運動を模した光刺激に対する網膜神経節細胞応答の解析

○松本彰弘・立花政夫

(東京大学 大学院人文社会系研究科 心理学研究室)

10:50-11:10

3. 網膜神経節細胞における拡大運動の情報表現

○石金浩史<sup>1,2</sup>・松崎みどり<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>専修大学大学院文学研究科心理学専攻・

<sup>2</sup>専修大学人間科学部心理学科)

11:10-11:30

4. マウス網膜双極細胞の周辺応答の極性反転に関する因子

○尹成珠・金田誠

(日本医科大学・システム生理学講座)

11:30-11:50

5. 網膜ON型双極細胞視覚伝達チャネルTRPM1ノックアウトマウス網膜の電気生理学的解析

○瀧澤伸剛<sup>1,2</sup>・古藤諒<sup>2</sup>・谷田祐樹<sup>7</sup>・川島桐吾<sup>3</sup>・大下陽介<sup>2</sup>・

谷原明子<sup>2</sup>・多賀駿<sup>1</sup>・吉田圭佑<sup>2</sup>・石金浩史<sup>4</sup>・古川貴久<sup>5</sup>・天野晃<sup>1,3</sup>・

下ノ村和弘<sup>6</sup>・北野勝則<sup>7,8</sup>・坪泰弘<sup>7,8</sup>・小池千恵子<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>立命館大学大学院生命科学研究科・<sup>2</sup>立命館大学薬学部・  
<sup>3</sup>立命館大学生命科学部・<sup>4</sup>専修大学人間科学部・  
<sup>5</sup>大阪大学蛋白質研究所・<sup>6</sup>立命館大学理工学部・  
<sup>7</sup>立命館大学大学院情報理工学研究科・<sup>8</sup>立命館大学情報理工学部)

11：50－12：00 休憩-----

11：50－13：25 運営委員会（会議室3）

12：00－13：00 ランチョンセミナー I

共催：視覚科学フォーラム研究会  
参天製薬株式会社

座長：佐藤 拓（群馬大学大学院医学系研究科）

「糖尿病網膜症で失明しないために」

大谷 優裕（群馬大学大学院医学系研究科 眼科学）

13：00－13：30 休憩-----

13：30－14：30 特別講演

座長：白尾 智明（群馬大学）

「網膜の生体組織学」

岸 章治（群馬大学大学院医学系研究科）

14：30－14：40 休憩-----

## Session II 座長：澤井 元（大阪大学）

14：40－15：00

6. Enzyme-linked photo-assay system を用いたマウス網膜グルタミン酸動態の解析  
○大熊 真人<sup>1</sup>、堀尾 佳世<sup>1</sup>、吉田 祥子<sup>2</sup>、福田 敦夫<sup>3</sup>、  
宮地 栄一<sup>1</sup>、金田 誠<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>藤田保健衛生大学医学部生理・  
<sup>2</sup>豊橋科学技術大学環境生命工学系生命機能科学・  
<sup>3</sup>浜松医科大学医学部神経生理、<sup>4</sup>日本医科大学生理)

15:00-15:20

7. マウス網膜 OFF型コリン作動性ニューロン P2X型プリン受容体陽イオンチャネルを介したコリン取り込み機構  
○金田 誠<sup>1</sup>、石井 俊行<sup>1</sup>、本間 耕平<sup>1</sup>、重松 康秀<sup>2</sup>、霜田 幸雄<sup>2</sup>、井上 浩義<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>日本医科大学生理・<sup>2</sup>東京女子医科大学総合研究所・  
<sup>3</sup>慶應義塾大学医学部化学)

15:20-15:40

8. ゼブラフィッシュ桿体の分化・成熟過程を制御する転写調節機構  
白木 知也（東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻）

15:40-16:20 -----コーヒーブレイク・富岡製糸場ビデオ上映-----

### Session III 座長：金田 誠（日本医科大学）

16:20-16:40

9. 網膜杆体・錐体視細胞光電位変換機構モデル  
○細木ゆかり<sup>1</sup>・小池千恵子<sup>1</sup>・竹田有加里<sup>1</sup>・天野晃<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>立命館大学大学院生命科学研究科)

16:40-17:00

10. 転写因子Raxは網膜の初期形成から視細胞の運命決定や成熟までを制御する  
○入江彰一<sup>1,2,3</sup>、茶屋太郎<sup>1,3</sup>、名定優<sup>1,3</sup>、佐貫理佳子<sup>1,3</sup>、古川貴久<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>大阪大学蛋白質研究所分子発生学、  
<sup>2</sup>京都大学大学院医学研究科医学専攻、<sup>3</sup>JST, CREST)

17:00-17:20

11. ヒト培養誘導網膜視細胞の光応答について  
○世古裕子<sup>1,2</sup>・東 範行<sup>2</sup>・石井俊行<sup>3</sup>・小牟田 縁<sup>1</sup>・金田 誠<sup>3</sup>・  
梅澤明弘<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>国立障害者リハビリテーションセンター研究所・  
<sup>2</sup>国立成育医療研究センター・<sup>3</sup>日本医科大学システム生理学)

17：20－17：30 -----休憩・移動-----

17：30－19：30 交流会（場所：マイビットホール2階）

8月19日（火）-----

#### Session IV 座長：山下 勝幸（国際医療福祉大学）

9：30－9：50

12. 初期視覚系の受容野周囲抑制に関する神経機構  
○七五三木聰<sup>1,2</sup>・木村晃大<sup>1</sup>・相馬祥吾<sup>1</sup>・末松尚史<sup>2</sup>・佐藤彰典<sup>2</sup>・  
水上遼<sup>2</sup>・佐藤宏道<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科・<sup>2</sup>大阪大学大学院生命機能研究科)

9：50－10：10

13. 生理学的に同定した脳深部領域への in vivo 電気穿孔法による遺伝子導入  
大村菜美<sup>1</sup>、川崎一葉<sup>1</sup>、佐藤武正<sup>2</sup>、○畠義郎<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>鳥取大学大学院医学系研究科生体高次機能学・  
<sup>2</sup>鳥取大学医学部神経生物学)

10：10－10：30

14. 眼球運動学習前後のシナプス密度変化と定量的 SDS-FRL 法を用いた AMPA 受容  
体動態解析  
○中舘和彦<sup>1</sup>・重本隆一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>明治薬科大学・<sup>2</sup>Science and Technology Austria institute)

10：30－10：50 -----コーヒーブレイク-----

## Session V 座長：今村 一之（前橋工科大学）

10：50－11：10

15. 網膜色素変性モデル動物におけるコントラスト感度の経時的評価

○佐藤彰典<sup>1</sup>・相馬祥吾<sup>2</sup>・末松尚史<sup>2</sup>・七五三木聰<sup>2</sup>（会員）

（<sup>1</sup>大阪大学理学部・<sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科）

11：10－11：30

16. マウスオペラント行動システムを用いた視覚時間特性の評価手法の確立

○横田理<sup>1,3</sup>・三田純平<sup>2,3</sup>・生田昌平<sup>2,3</sup>・野村悠一郎<sup>3</sup>・内田大地<sup>3</sup>・

竹内昌平<sup>5</sup>・天野晃<sup>2,4</sup>・下ノ村和弘<sup>5</sup>・小池千恵子<sup>2,3</sup>

（<sup>1</sup>立命館大学総合科学技術研究機構・

<sup>2</sup>立命館大学大学院生命科学研究科・<sup>3</sup>立命館大学薬学部・

<sup>4</sup>立命館大学生命科学部、<sup>5</sup>立命館大学理工学部）

11：30－11：50

17. 両眼相関に基づく奥行き知覚は相対視差に依存する

○青木俊太郎<sup>1</sup>・塩崎博史<sup>1</sup>・藤田一郎<sup>1,2</sup>

（<sup>1</sup>大阪大学大学院生命機能研究科、

<sup>2</sup>脳情報通信融合研究センター・大阪大学および情報通信研究機構）

11：50－12：00 -----休憩-----

## 12：00－13：00 ランチョンセミナー II

共催：視覚科学フォーラム研究会

バイエル薬品株式会社

座長：橋本 英明（群馬大学大学院医学系研究科）

「ゆがんで見えたたら要注意 加齢黄斑変性」

佐藤 拓（群馬大学大学院医学系研究科）

13：00－15：00 特別企画シンポジウム

「眼優位可塑性：分子から個体までを多面的に理解する」

オーガナイザー：侯賀 宣子・宮本 浩行（理化学研究所 BSI）

13：00－13：30

臨界期の時期を制御する分子たち

○杉山清佳・侯旭濱

（新潟大学大学院・医歯学総合研究科）

13：30－14：00

マウス大脳皮質視覚野の眼優位可塑性における興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの違い

○惣谷和広<sup>1,2</sup>

（<sup>1</sup>理化学研究所 BSI・大脳皮質回路可塑性研究チーム，

<sup>2</sup>科学技術振興機構・さきがけ）

14：00－14：30

睡眠による視覚野機能的神経結合の促進と抑制性制御

○宮本浩行<sup>1,2</sup>・梶本佳子<sup>1</sup>・ヘンシュ貴雄<sup>1,3</sup>

（<sup>1</sup>理化学研究所 BSI・<sup>2</sup>科学技術振興機構さきがけ・

<sup>3</sup>ハーバード大学）

14：30－15：00

弱視患者における一次視覚野の反応とヒトにおける視覚野の可塑性 -ボジトロン断層法でみるヒトの視覚野

○鈴木幸久<sup>1,2,3</sup>・清澤源弘<sup>2,4</sup>

（<sup>1</sup>三島総合病院・眼科、<sup>2</sup>東京医科歯科大学・眼科学教室、

<sup>3</sup>東京都健康長寿医療センター研究所・神経画像研究チーム、

<sup>4</sup>清澤眼科医院）

15：00－15：10 閉会挨拶（代表世話人：今村一之）

# 特別企画シンポジウム 抄録

## <分子レベルからのアプローチ>

### 臨界期の時期を制御する分子たち

○杉山清佳・侯旭濱

(新潟大学大学院・医歯学総合研究科)

[sugiyama@med.niigata-u.ac.jp](mailto:sugiyama@med.niigata-u.ac.jp)

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/research/shinryou/shinkei.html>

Key words: 抑制性介在ニューロン、ホメオタンパク質、細胞外基質

幼年期の脳には、個々の体験や経験に適応しながら神経回路が機能的に形成される「臨界期」が存在する。なぜ臨界期は子どもの脳にだけ現れ、大人の脳には現れないであろうか。臨界期の分子メカニズムの探究には、視覚の発達が良いモデルとなる。大脳皮質視覚野には、マウスからヒトまで、視覚経験に依存してどちらの眼からの入力を強く受けとるか（眼優位性）を決める臨界期がある。この臨界期に片眼を塞ぎ入力を制限すると、開いた眼からの入力を多く受けるよう回路網が可塑的に変化し、閉じた眼の視力は弱くなる（弱視）。臨界期を過ぎた大人では、回路網の変化は観察されず、治療をしても弱視は完治しない。

臨界期の誘導には、大脳の抑制性介在ニューロンの発達が必要である。これまでの研究から、胎生期に脳を作るホメオ蛋白質 Otx2 が、幼年期には脳を発達させることを明らかにした。Otx2 は、視覚経験とともに視覚野の特定の抑制性介在ニューロンに取り込まれ、この細胞を発達させて臨界期を誘導する。面白いことに、Otx2 は介在ニューロンの周囲に、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを豊富に含む細胞外基質 perineuronal net の構築を促す。一方で、コンドロイチン硫酸と Otx2 の結合が、このホメオ蛋白質の特異的な細胞内取り込みに必要である。細胞外基質の成熟は臨界期の終わりを導くことが示唆されているが、コンドロイチン硫酸が減少する糖転移酵素 K0 マウスを解析することにより、コンドロイチン硫酸と Otx2 の相互作用が、臨界期の始まりと終わりの双方を誘導することが明らかになってきた。

Otx2 を含め、臨界期を誘導する遺伝子は Parvalbumin を発現する介在ニューロン (PV 細胞) の機能発達に寄与する事が示してきた。Otx2 蛋白質や抑制性の機能を高める薬剤を未熟な視覚野に投与すると、臨界期が早期に活性化される。一方で、大人の視覚野に抑制性の機能を弱める薬剤を投与すると、一度終了した臨界期が再度活性化される。すなわち、臨界期の始まりと終わりの双方に抑制性介在ニューロンが関与しており、臨界期の活性化に対して双方向性の役割を果たすことが推測される。介在ニューロンの作用が幼い脳と大人の脳で正反対の方向性を持つのはなぜであろうか。この疑問の答えが、Otx2 とコンドロイチン硫酸の変異マウスの解析から分かってきた。これらの変異マウスでは、抑制性を高める薬剤の投与により、臨界期の始まりが誘導されるが、誘導された臨界期はそのままでは終わらずに大人まで続いてしまう。再度の薬剤投与により、ようやく臨界期を終了させることができる。すなわち、Otx2 とコンドロイチン硫酸は介在ニューロンの機能発達に必要であり、臨界期の始まりと終わりは、抑制機能の発達の過程で起こることが示唆される。そのために、Otx2 やコンドロイチン硫酸を大人の脳から除去すると、抑制機能の発達がリセットされて、大人においても臨界期が再活性化されると考えられる。当初、臨界期の始まりと終わりの時期の決定は、別々の分子機構によって制御されると考えられていたが、近年の研究から、両者が密接に関連することが示唆されている。

## <細胞レベルからのアプローチ>

### マウス大脳皮質視覚野の眼優位可塑性における興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの違い

○惣谷和広<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>理化学研究所 BSI・大脳皮質回路可塑性研究チーム, <sup>2</sup>科学技術振興機構・さきがけ)

sohya@brain.riken.jp, [http://tsumoto.brain.riken.jp/index\\_j.html](http://tsumoto.brain.riken.jp/index_j.html)

Key words: 抑制性ニューロン (GABA ニューロン)、二光子励起脳機能 Ca<sup>2+</sup>イメージング、チャネルロドプシン

生後発達初期の感受性期（臨界期）の大脳皮質一次視覚野で、片目遮蔽後に見られる眼優位可塑性は、経験依存的な発達脳の可塑性の代表的なモデルとして知られている。この可塑性は、弱視治療などの医学的な観点から多くの研究がされており、LTP や LTD といったシナプス可塑性が基礎メカニズムであると考えられている。しかしながら、経験依存的な発達脳の可塑性がなぜ生後発達初期の感受性期（臨界期）に限局されているのか？発達脳の可塑性能獲得のメカニズムの解明が今まで求められてきた。

その中で、近年、大脳皮質神経回路網内の抑制性神経伝達物質の阻害は、感受性期の出現を阻害するところから、GABA ニューロンの活動が、発達脳の可塑性能獲得に重要な役割を果たすことが示唆された(1)。しかしながら、脳神経回路網の活動を抑制すること以外、具体的な GABA ニューロンの機能は解明されていない。また一方、眼優位可塑性の誘発には脳の覚醒が必要であることも示唆されている(2)が、発達脳の可塑性能獲得を引き起こすための脳の覚醒の機能は明らかになっていない。

よって、発達脳の可塑性能獲得のメカニズムの解明に向けて、まずは、「GABA ニューロン自身の眼優位性と眼優位可塑性を明らかにすること」と「脳の覚醒制御機構を理解すること」が非常に重要であると考えられる。

そこで、本研究では、二光子励起脳機能 Ca<sup>2+</sup>イメージング法(3)と GABA ニューロン特異的に蛍光タンパク質 Venus を発現する遺伝子改変マウスを利用して、幼弱脳と成熟脳における興奮性ニューロンと GABA ニューロンの眼優位可塑性の違いについて解析した。その結果、従来いわれてきた生後発達初期の感受性期（臨界期）は、GABA ニューロンの場合は存在しないことが明らかになった(4)。また、本研究では、麻酔下と覚醒状態の脳の活動の違いについても解析を行った。さらにコリン作動性ニューロン特異的にチャネルロドプシンを発現する遺伝子改変マウスを利用して、視覚応答に対する脳の覚醒の作用のメカニズムについて検討した。その結果、脳の覚醒作用は、前脳基底部 (the Basal Forebrain: BF) のコリン作動性ニューロンが、直接的に GABA ニューロンの活動に作用することによって、興奮性ニューロンの視覚応答特性を修飾するものであるということが明らかとなった(5)。

## 参考文献

1. Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF. (1998). Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science*, 282, 1504-1508.
2. Singer W, Rauschecker JP. (1982). Central core control of developmental plasticity in the kitten visual cortex: II. Electrical activation of mesencephalic and diencephalic projections. *Exp. Brain Res.*, 47, 223-233.
3. Sohya K, Kameyama K, Yanagawa Y, Obata K, Tsumoto T. (2007). GABAergic neurons are less selective to stimulus orientation than excitatory neurons in layer II/III of visual cortex, as revealed by *in vivo* functional Ca<sup>2+</sup> imaging in transgenic mice. *J Neurosci*, 27, 2145-2149.
4. Kameyama K, Sohya K, Ebina T, Fukuda A, Yanagawa Y, Tsumoto T. (2010). Difference in binocular and ocular dominance plasticity between GABAergic and excitatory cortical neurons. *J Neurosci*, 30, 1551-1559.
5. Kimura R, Safari MS, Javad MZ, Kimura R, Ebina T, Yanagawa Y, Sohya K, Tsumoto T. (2014). Curtailing effect of awakening on visual responses of cortical neurons by cholinergic activation of inhibitory circuits. *J Neurosci*, 30, July 23rd.

<個体レベルからのアプローチ>  
睡眠による視覚野機能的神経結合の促進と抑制性制御  
○宮本浩行<sup>1,2</sup>・樋本佳子<sup>1</sup>・ヘンシュ貴雄<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>理化学研究所 BSI・<sup>2</sup>科学技術振興機構さきがけ・<sup>3</sup>ハーバード大学)  
miyamoto@brain.riken.jp

Key words: 睡眠、可塑性、抑制系

睡眠はシナプス可塑性を通じて記憶の定着・組織化や脳の発達などに積極的に関与すると考えられているが、その神経回路メカニズムは未だ明らかになっていない。視覚系-視床皮質回路は覚醒時には視覚情報を処理し徐波睡眠時では同期した神経活動パターンを生み出すとともに視覚経験依存的な可塑性を有している。視覚可塑性のひとつ眼優位可塑性の発現は一定の抑制性入力によって開始され (Fagiolini & Hensch, 2000)、かつ徐波睡眠を必要としている (Frank et al., 2001)。徐波睡眠時には抑制性入力が増強されることも示されている (Kurotani et al., 2008)。これらをふまえ私たちは抑制性 GABA 合成酵素欠損 (GAD65KO) マウスを用い視覚野での睡眠中の視覚情報処理、機能的神経結合の特性、眼優位可塑性との関係を調べた。

行動するマウス視覚皮質から睡眠・覚醒時のマルチニューロン活動を記録し視覚応答を計測した。睡眠中の視覚入力応答の減弱が報告 (Livingstone & Hubel 1981) されているが、覚醒時とは異なる、off 反応が顕著な視覚応答が睡眠中で見出された。意外にも局所回路における神経細胞間の神経活動相互関係から推定された単シナプス性の機能的結合の強さは徐波睡眠中に促進されていた。一方抑制系が減弱した GAD65KO マウスの覚醒時の視覚応答性 (ベースライン/視覚応答の比) は野生型に比し有意に低下していたが、use-dependent に抑制伝達を強化する diazepam を投与することにより視覚応答性が上昇した (Toyoizumi et al., 2013)。同様に GAD65KO マウスでは睡眠時の機能的結合の促進も阻害されていたが、抑制伝達を薬理的に強化することで機能的結合も回復した。

眼優位性可塑性を示さない GAD65KO マウスが抑制系を強化されると可塑性を回復する事実 (Fagiolini & Hensch, 2000) や実験結果から、抑制系によって制御される視覚応答と睡眠時の機能的結合の促進が可塑性の発現や神経回路の成熟・安定化に寄与している可能性が考えられた。睡眠の機能が覚醒時に上昇したシナプス伝達を再び低下させ可塑性を戻すことにあるというシナプスホメオスタシス仮説が近年支持を得ているが、対照的に本研究は回路レベルでの睡眠の積極的役割を示唆する。さらに抑制系伝達の強化による神経回路網の変化を NMDA 受容体やパルアルブミン陽性細胞の変化と関連づけて討論したい。

<臨床からのアプローチ>  
弱視患者における一次視覚野の反応とヒトにおける視覚野の可塑性  
-ポジトロン断層法でみるヒトの視覚野

○鈴木幸久<sup>1, 2, 3</sup>・清澤源弘<sup>2, 4</sup>

( <sup>1</sup>三島総合病院・眼科, <sup>2</sup>東京医科歯科大学・眼科学教室,

<sup>3</sup>東京都健康長寿医療センター研究所・神経画像研究チーム, <sup>4</sup>清澤眼科医院)

suzuki@f8.dion.ne.jp

Key words: 一次視覚野、同名半盲、ポジトロン断層法

弱視は、器質的な眼疾患がないにも関わらず、良好な矯正視力がえられない機能的疾患である。ポジトロン断層法（PET）を用いて、弱視眼と健常眼を片眼ずつ視覚刺激したときの一次視覚野の反応の違いについて調べた。弱視症例6例（男性1例、女性5例、平均年齢44.8歳）において、健常眼および弱視眼へのフリッカ一片眼刺激時の一次視覚野の脳血流を測定した。刺激光は、小細胞系視神経経路を反映する6Hzと大細胞系視神経経路を反映する25Hzの単色フリッカー刺激を用いた。弱視眼への6Hzフリッカーストímにには、対側の一次視覚野の脳血流が健常眼と比較して低下していた。弱視では対側の一次視覚野へ投射する小細胞系視神経経路が抑制されていると推測された。

従来、ヒトの視覚野の可塑性は幼少期でのみみられると考えられてきたが、近年、成人においても視覚野の神経細胞に変化がおこりうることがわかつてきた。脳血管障害などの頭蓋内疾患により片側の視覚野が傷害されると対側の同名半盲がおこるが、その視野障害は徐々に改善する場合と改善しない場合がある。PETを用いて、半盲患者の安静時脳糖代謝、脳内中枢性ベンゾジアゼピン受容体（cBZR）密度およびアデノシンA1受容体（A1R）密度を測定し、視野が改善するメカニズムについて調べ、視野の予後の推定を試みた。発症後1か月から7か月経過した半盲症例10例（男性6例、女性4例、平均年齢56.7歳）に対し、<sup>18</sup>F-フルオロデオキシグルコース（FDG）により安静時脳糖代謝、<sup>11</sup>C-フルマゼニール（FMZ）によりcBZR密度を測定し、さらにそのうち4例に対して、[1-メチル-<sup>11</sup>C]8-ジサイクロプロピルメチル-3-プロピルキサンチン（MPDX）によりA1R密度についても測定した。健常人15例に対しても同様に3種類のPET撮影をおこなった。全例の両側一次視覚野、視覚連合野、楔状回に関心領域を設定し、それぞれの部位において傷害側と健常側の比（I/C比）を求めた。発症2年後までに10例中6例で視野の改善がみられたが、それらの症例において、一次視覚野のI/C比は脳糖代謝0.76以上かつcBZR密度0.85以上であった。また、一次視覚野の傷害側のA1R密度は視野が改善した2例で健常側以上に亢進していた。cBZR密度は残存する神経細胞数を反映していると考えられ、A1R密度は今後の機能改善に関係していると推測された。PETを用いることにより、半盲患者の視野の予後を推定することは可能であると考えられた。

# 抄 錄

# 網膜 ON 型運動方向選択性細胞の応答形成機構

○雁木美衣<sup>1</sup>・高田昌彦<sup>2</sup>・立花政夫<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京大学大学院人文社会系研究科・<sup>2</sup>京都大学靈長類研究所)

gangi@l.u-tokyo.ac.jp

Key words: 網膜、運動方向選択性、アマクリン細胞

## 目的

初期視覚システムでは、網膜に投影された外界の情景から色、方位、運動など様々な特徴が抽出される。運動方向の検出はすでに網膜の段階から行われており、網膜にも運動方向選択性を示す神経節細胞 (Direction selective ganglion cell: DSGC) が存在する<sup>1</sup>。この DSGC の運動方向選択性の形成メカニズムについてはこれまで様々な知見が積み重ねられてきたが、ON-OFF 型 DSGC も ON 型 DSGC も、starburst アマクリン細胞 (SAC) が重要な役割を果たすと考えられてきた<sup>1</sup>。DSGC 周辺の SAC を刺激した研究では、SAC から DSGC への抑制性シナプス入力が運動方向によって異なることが DSGC の運動方向選択性の形成に重要であると示唆されている<sup>1</sup>。本研究では、ON 型 DSGC において、SAC からの直接的な抑制性シナプス入力が運動方向選択性の形成に寄与しているのかどうかを検討した。

## 方法

ON 型 DSGC は副視索系の 3 つの終止核 (medial, dorsal and lateral terminal nucleus) に投射している。この特性を利用して、3 つの終止核のうち最も大きい medial terminal nucleus (MTN) に逆行性の越シナプス性 (シナプスを越えることができる) トレーサーである狂犬病ウイルスを注入し、ON 型 DSGC と SAC がシナプス結合しているかどうかを検討した。実験には、抑制性神経細胞が Venus によってラベルされた遺伝子変換ラットを用いた<sup>2</sup>。SAC は、抗 ChAT 抗体を用いて免疫染色した。また、あらかじめ、MTN に逆行性のトレーサーを注入した野生型ラットの剥離網膜標本にホールセルクランプ法を適用して ON 型 DSGC から光応答を記録し、薬理学的手法でシナプス入力の性質を検討した。

## 結果

MTN に狂犬病ウイルスを注入した結果、神経節細胞層に感染した細胞が多数見つかった。これらは、神経節細胞と異所性アマクリン細胞であると考えられる。抗 ChAT 抗体で SAC を染色した結果、SAC はほとんど狂犬病ウイルスに感染していないことが分かった。狂犬病ウイルスに感染していたのは、ほとんどが ChAT 陰性のアマクリン細胞であった。ラット網膜には軸索様のプロセスをもち、Na<sup>+</sup>スパイクを発生する異所性

アマクリン細胞が存在する。そこで、狂犬病ウイルスに感染したアマクリン細胞が Na<sup>+</sup>スパイクを発生するかどうかを検討するために、ON 型 DSGC の光応答に対する Na<sup>+</sup>チャネルの阻害剤 tetrodotoxin (TTX) の効果を検討した。まず、ON 型 DSGC に Na<sup>+</sup>チャネルの阻害剤 QX314 を詰めた電極を押し当て、cell-attached mode で 8 方向に動くバー刺激に対するスパイク応答を記録し、選好方向と非選好方向を決定した。次に whole-cell clamp mode にしてこの細胞の Na<sup>+</sup>スパイクを阻害し、バー刺激に対するシナプス電流応答を記録したところ、選好方向では EPSC が大きく IPSC が小さいが、非選好方向では EPSC が小さく IPSC が大きかった。TTX を灌流投与して網膜の Na<sup>+</sup>チャネルを阻害した結果、EPSC は運動方向による非対称性が保たれていたが、IPSC では運動方向による非対称性が消失することを見いただした。

## 考察

以上の結果から、ON 型 DSGC は、刺激方向によって非対称な興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力を受けており、TTX によって抑制性シナプス入力の非対称性が消失することが分かった。狂犬病ウイルスを用いた実験結果と合わせて考えると、ON 型 DSGC は SAC ではない、Na<sup>+</sup>スパイクを発生する異所性アマクリン細胞から直接入力を受けている可能性が示唆される。しかし、双極細胞にも Na<sup>+</sup>スパイクを発生させるものが存在する<sup>3</sup>ので、さらなる検証が必要である。

## 引用文献

1. Vaney, D. I., Sivyer, B. & Taylor, W. R. (2012) Direction selectivity in the retina: symmetry and asymmetry in structure and function. *Nat Rev Neurosci.* 13, 194–208.
2. Uematsu, M. et al. (2008) Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic Venus-expressing rats. *Cereb Cortex.* 18, 315–30.
3. Cui, J. & Pan, Z. H. (2008) Two types of cone bipolar cells express voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in the rat retina. *Vis Neurosci.* 25, 635–45.

# 眼球運動を模した光刺激に対する網膜神経節細胞応答の解析

○松本彰弘<sup>1</sup>・立花政夫<sup>2</sup>

(東京大学 大学院人文社会系研究科 心理学研究室)

<sup>1</sup>toma@grace.ocn.ne.jp, <sup>2</sup>tchbn2ms@l.u-tokyo.ac.jp

Key words: 網膜神経節細胞、同期的発火、視覚情報の符号化

## 目的

身体や眼球の動きに伴う網膜像の揺動は、皮質視覚野や眼球運動の制御に関連する中枢神経系によって打ち消され、安定した視覚世界が構築されると考えられている。しかし、感覚器官である網膜において、眼球運動時、どのように視覚情報が処理されるのか、明らかではない。また、スパイク発火によって視覚情報を脳へと伝送する網膜神経節細胞には複数のサブタイプが存在するが、それらは視覚情報を独立に処理しているのか、協同して処理しているのか不明である。本研究では、剥離したキンギョ網膜に、眼球運動を模した非静止画像刺激を提示し、神経節細胞の光応答を解析した。

## 方法

### 1: 電気生理

キンギョの剥離網膜標本（腹側）に、マルチ電極法あるいはホールセル・クランプ法を適用して、網膜神経節細胞の応答を記録した。マルチ電極法では、複数の神経節細胞から非静止画像刺激に対するスパイク発火応答を記録し、細胞間でのスパイク発火のタイミングや相互の関係性について解析した。ホールセル・クランプ法では、膜特性、非静止画像刺激に対する膜電位応答、細胞形態などを解析した。

### 2: 光刺激（非静止画像刺激）

刺激は、背景刺激（ランダムドット）とテスト刺激（1.6 mm 角：視角 26 度に対応）から構成された。キンギョの眼球運動を計測した研究（Mensh et al., 2004）を参考にして、背景刺激とテスト刺激は、網膜上で、それぞれ微動運動（≈固視運動 : 8 μm/83.35 ms）あるいは急速運動（=サッカード : 80 μm/16.67 ms）させた。

## 結果

神経節細胞のサブタイプは、逆相関法によって推定された受容野の時間特性に基づき、6 種類（Fast / Medium / Slow × transient / sustained）に分類した。

### 1: マルチ電極法による多細胞同時記録の解析

非静止画像刺激に対する複数の神経節細胞のスパイク発火応答を分析した結果、Fast transient (Ft) 型は、眼球運動を模した非静止画像刺激条件下では、テスト刺激が受容野に到達する前に発火した（“運動予測的”な発火）。また、近隣

の Ft 型細胞群は、それぞれの受容野位置が異なっているにも関わらず、“同期的”に発火した。このような特徴的な発火は、静止画像刺激では生じなかった。

同時記録した神経節細胞群のスパイク発火応答を相互相関解析した結果、非静止画像刺激下では、Ft 型細胞は、近隣の Ft 型細胞のみならず、Medium sustained 型 (Ms 型) 細胞や Slow sustained 型 (Ss 型) 細胞と強い相関性を示した。このような相関性は、静止画像刺激では生じなかった。つまり、特定のサブタイプ群は、光刺激パターンに依存して、細胞間の機能的結合性を変化させた。

### 2: ホールセル・クランプ法による電気生理学的解析

ホールセル・クランプ法を適用し、膜特性、画像刺激に対する応答、受容野の時空間特性を調べ、蛍光色素によって細胞内染色を行い、形態を分析した。Ft 型細胞は、非静止画像刺激に対し運動予測的なスパイク発火をした。細胞形態は、樹状突起が狭く分布し、細胞体近傍から密に枝分かれしていた。また、脱分極性電流によって発生するスパイク発火は、Ft 型では、高頻度で強い順応性を示した。また、Ms 型は低頻度で強い順応性を示し、Ss 型は低頻度で弱い順応性を示した。

## 考察

以上の結果から、網膜に眼球運動を模した画像刺激を提示すると、神経節細胞は、従来の古典的受容野概念では説明することができないような応答を発生することが明らかになった。Ft 型細胞群は、視野に出現する外界オブジェクトについての視覚情報を、運動予測的な同期的発火によって、視覚中枢に伝送している可能性がある。また、Ft 型細胞群は、近隣の Ms 型細胞や Ss 型細胞と「機能的なサブグループ」を形成し、協同的に視覚情報を符号化することが示唆された。さらに、受容野の時間特性に基づいて分類された神経節細胞サブタイプは、それぞれ膜特性や細胞形態も異なっていると考えられる。

## 引用文献

Mensh, et al. (2004) *Vis. Res.* 44, 711–726.

# 網膜神経節細胞における拡大運動の情報表現

○石金浩史<sup>1,2</sup>・松崎みどり<sup>2</sup>（非会員）

(<sup>1</sup>専修大学大学院文学研究科心理学専攻・<sup>2</sup>専修大学人間科学部心理学科)

ishikane@psy.senshu-u.ac.jp, http://www3.psy.senshu-u.ac.jp/~ishikane/index-j.html

Key words: 網膜、拡大運動、逃避行動

## 目的

動物は接近する物体に対して回避行動をとる。この回避行動は昆虫からヒトにいたるまで、幅広い動物種にわたって観察される。マウスでは、網膜神経節細胞のサブタイプに接近感受性を持つニューロンが存在することが示されている<sup>1</sup>。また、接近する物体やモニタ上に表示された拡大運動刺激に対して、逃避行動やフリージング (freezing) が観察されるが、接近感受性ニューロンはこれらの視覚誘発性行動に必要な神経基盤の候補の1つに挙げられている<sup>2</sup>。カエルでも拡大運動刺激に対して、逃避行動が誘発される。その行動の誘発に必要な視覚情報処理において、網膜神経節細胞のサブタイプである class-4 ニューロン間の周期的同期発火が重要な役割を果たしていることが示されている<sup>3</sup>。逃避行動は刺激が一定のサイズを超えて大きく、連続していると誘発される。周期的同期発火の強度は呈示された刺激の大きさと連続性とに依存しており、それらを符号化していることが示唆されている<sup>3,4</sup>。しかしながら、逃避行動を誘発する刺激の拡大運動がどのような神経基盤により情報処理されているかは不明である。

そこで本研究では、ウシガエルの逃避行動を誘発する視覚刺激の条件を詳細に調べた上で、拡大運動や他の運動刺激に対する網膜神経節細胞の応答を調べた。

## 方法

本研究における全ての実験は専修大学動物実験管理規程に基づき実施された (#2013-9)。

被験体：被験体としてウシガエル (*Rana catesbeiana*) の成体を用いた。

行動実験：液晶モニタにより視覚刺激を呈示し、被験体の視覚誘発性行動を記録した。透明なアクリルドームの中に被験体を置き、赤外光照明下にてビデオカメラにより行動を記録した。

電気生理実験：ウシガエルを2時間以上暗順応させ、安樂死後に眼球を摘出して網膜を剥離した。作製した剥離網膜標本は、神経節細胞側を下側にして平面型多点電極上に設置した。

視覚刺激を液晶モニタ上に表示し、光学系を介して剥離網膜標本上に呈示し、網膜神経節細胞群から活動電位を記録した。

視覚刺激：行動実験と電気生理実験のいずれにおいても視覚

刺激を MATLAB (Mathworks 社) および Psychtoolbox を用いて作成した。

## 結果

ウシガエルの逃避行動は、暗いスポットが拡大運動し、ある程度の大きさになると誘発される。ランダムピクセルの継時呈示後に暗く連続した大きな刺激を呈示したり、周辺から中心へ暗い領域が埋め尽くされる大きな刺激を呈示しても逃避行動は観察されなかった。従って、運動刺激と連続する大きな暗い刺激の組み合わせだけでは逃避行動を誘発することはできず、運動に「拡大」が必要であることが示唆された。そこで、カエル網膜に存在する4種類の神経節細胞 (class-1, 2, 3, 4) から、拡大運動する刺激と、周辺から中心へ暗い領域が埋め尽くされる運動刺激に対する応答を記録した。その結果、class-1, 2, 4 ニューロンでは、どちらの刺激に対しても同様の強度の応答が観察されたが、class-3 ニューロンでは、拡大運動する刺激に対する応答に比べ、周辺から中心へ暗い領域が埋め尽くされる運動刺激に対して相対的に弱い応答が観察された。

## 考察

本研究の結果から、カエルの視覚誘発性逃避行動に拡大運動が必要であることが示唆された。また、4種あるカエル網膜神経節細胞のうち、class-3 ニューロンのみにおいて、逃避行動を誘発する「拡大運動刺激」に対する応答に比べ、逃避行動を誘発しない「周辺から中心へ暗い領域が埋め尽くされる刺激」に対して弱い応答が観察された。従って、逃避行動に必要な条件と考えられる拡大運動の情報は、class-3 ニューロンの応答強度によって符号化されている可能性が示唆された。

## 引用文献

- [1] Münch et al., *Nat. Neurosci.*, **8**, 1308–1316, 2009.
- [2] Melis & Meister, *Curr Biol.*, **23**, 2011–2015, 2013.
- [3] Ishikane et al., *Nat. Neurosci.*, **8**, 1087–1095, 2005.
- [4] Ishikane et al., *Vis. Neurosci.*, **16**, 1001–1014, 1999.

# マウス網膜双極細胞の周辺応答の極性反転に関する因子

尹 成珠・金田 誠

(日本医科大学・システム生理学講座)

yincz@nms.ac.jp

Key words: GABA 受容体・双極細胞・Cl<sup>-</sup>イオン

## 目的

マウス網膜双極細胞の周辺部応答の形成には、水平細胞から放出される GABA が重要な関与をしている。周辺部応答の極性は ON 型と OFF 型で反転しており、現在その反転のメカニズムは GABA 受容体を介して流れる Cl<sup>-</sup>電流の平衡電位が異なることで説明されている。すなわち ON 型、OFF 型それぞれの双極細胞の樹状突起に存在する Cl<sup>-</sup>トランスポーター (NKCC1 と KCC2) の分布の差異が Cl<sup>-</sup>濃度の違いを生み、GABA 応答の極性が反転するというものである<sup>1) 2)</sup>。しかしながら報告されている Cl<sup>-</sup>濃度勾配は、錐体入力型 ON 型双極細胞の周辺受容野応答を説明するには十分ではなく、また実験溶液が HEPES で行われているため、生体内での HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の Cl<sup>-</sup>チャネル透過性を考慮した Cl<sup>-</sup>の平衡電位解析も必要である。

網膜双極細胞では、GABA<sub>A</sub>受容体と GABA<sub>C</sub>受容体の発現パターンが双極細胞のサブタイプによって異なっている<sup>3)</sup>。従って GABA<sub>A</sub>受容体と GABA<sub>C</sub>受容体の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>に対する透過性に差異が存在すると GABA<sub>A</sub>受容体と GABA<sub>C</sub>受容体の逆転電位が異なることになる。本研究では、GABA<sub>A</sub>受容体と GABA<sub>C</sub>受容体の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>に対する透過性の違いが存在しているのかどうか、また GABA 受容体の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>に対する透過性を考慮した時にも ON 型と OFF 型の間で応答極性の反転を説明するのに十分な Cl<sup>-</sup>の平衡電位の違いが存在しているのかどうかについてパッチクランプ法を用いて検討した。

## 方法

マウス (C57BL, 3-8w) 網膜桿体入力型双極細胞を単離して実験に供した。実験にはホールセルパッチクランプ法または gramicidin 穿孔パッチクランプ法を用いた。GABA 応答の逆転電位の記録は ramp 波を用いた。GABA<sub>A</sub>受容体応答と GABA<sub>C</sub>受容体応答の分離には GABA<sub>A</sub>受容体 antagonist の bicuculline と GABA<sub>C</sub>受容体 antagonist の TPMPA を用いた。

細胞外液と細胞内液の組成は以下の通りである。

HEPES 溶液 (mM) : NaCl 135, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, glucose 10, HEPES 5 (pH 7.4)

NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (mM) : NaCl 115, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, glucose 10, NaHCO<sub>3</sub> 24 (pH 7.4)

細胞内液 (mM) : CsCl<sub>2</sub> 135, CaCl<sub>2</sub> 0.5, EGTA 5, ATP-2Na

5, GTP-3Na 1 (pH 7.2)

## 結果

ホールセル記録法で記録した、GABA<sub>A</sub>受容体と GABA<sub>C</sub>受容体応答の逆転電位応答の間には HEPES 溶液中 (GABA<sub>A</sub> : -4.2 ± 3.9 (n=10), GABA<sub>C</sub> : -3.8 ± 2.8 (n=8))、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>溶液中 (GABA<sub>A</sub> : -3.1 ± 2.7 (n=10), GABA<sub>C</sub> : -5.2 ± 2.7 (n=8)) のいずれの条件でも差が認められなかった。

次に gramicidin 穿孔パッチクランプ法を用いて、双極細胞細胞体と軸索終末における GABA 応答の逆転電位を計測した。air puff により投与した GABA 応答の逆転電位は、細胞体 (-18 ± 7.5 mV (n=6)) と、軸索終末 (-42 ± 6.2 mV (n=6)) で違いがみられた。この違いは NKCC1 の阻害剤である bumetanide (50 μM) 添加で消失した。この時の Cl<sup>-</sup>の逆転電位は両者とも -57 ± 4.3 mV (n=3) になった。

## 考察

GABA<sub>A</sub>受容体と GABA<sub>C</sub>受容体の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>に対する透過性に差は認められなかった。このことから双極細胞サブタイプ間で見られる GABA<sub>A</sub>受容体と GABA<sub>C</sub>受容体の発現量比の違いは、双極細胞の周辺部応答の形成に関与していないものと考えられる。

gramicidin 穿孔パッチクランプ法の結果から、桿体入力型双極細胞では細胞内に Cl<sup>-</sup>濃度勾配が存在し、濃度勾配が NKCC1 によって維持されていると考えられる。今後錐体入力型 ON 型双極細胞における Cl<sup>-</sup>トランスポーターの役割について検討を進めていく予定である。

## 引用文献

- 1) Vardi N et al., Neuroscience, 2000 (20) : 7657-7663.
- 2) Satoh H et al., Neuroscience Lett, 2001 (310) : 161-164.
- 3) Euler T et al., Neurophysiology, 1998 (79) : 1384-1395.

# 網膜 ON 型双極細胞視覚伝達チャネル TRPM1 ノックアウトマウス網膜の電気生理学的解析

○ 瀧澤伸剛<sup>1,2</sup>・古藤諒<sup>2</sup>・谷田祐樹<sup>7</sup>・川島桐吾<sup>3</sup>・大下陽介<sup>2</sup>・谷原明子<sup>2</sup>・多賀駿<sup>1</sup>・吉田圭佑<sup>2</sup>・石金浩史<sup>4</sup>・古川貴久<sup>5</sup>・

天野晃<sup>1,3</sup>・下ノ村和弘<sup>6</sup>・北野勝則<sup>7,8</sup>・坪 泰宏<sup>7,8</sup>・小池千恵子<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>立命館大学大学院生命科学研究科・<sup>2</sup>立命館大学薬学部・<sup>3</sup>立命館大学生命科学部・<sup>4</sup>専修大学人間科学部・<sup>5</sup>大阪大学蛋白質研究所・<sup>6</sup>立命館大学理工学部・<sup>7</sup>立命館大学大学院情報理工学研究科・<sup>8</sup>立命館大学情報理工学部)

sc0014hh@ed.ritsumei.ac.jp, koike@fc.ritsumei.ac.jp, <http://www.ritsumei.ac.jp/pharmacy/koike/koikelab/Home.html>

Key words: 網膜、自発発火、シミュレーション

## 目的

網膜は電磁波である光シグナルを神経シグナルに変換するほ乳類唯一の組織である。網膜は5種類のニューロンと1種類のグリア細胞が整然とした層構造を形成している。網膜の双極細胞は明刺激に対し脱分極応答する ON 型双極細胞と、過分極応答する OFF 型双極細胞が存在する。この ON-OFF 経路の構築により、光のコントラストを明確に捉え、ものの輪郭を正確に把握することが可能となっている。この視覚的に重要な明刺激に対する ON、OFF 型双極細胞応答の差異は、各双極細胞に発現する受容体およびチャネルの違いにより生じる。ON 型双極細胞ではグルタミン酸受容体である metabotropic glutamate receptor 6 (mGluR6) と G protein (G<sub>o</sub>) を介した Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1 (TRPM1) チャネル制御が行われている[1]。

網膜機能を解析する方法には様々なものがあるが、その一つとして Multi Electrode Array (MEA) が挙げられる。剥離網膜の神経節細胞側を MEA 電極に密着させ、光刺激を与えることにより、神経節細胞の活動電位を測定し、網膜の回路形成解析を行うことが出来る。先行研究として、mGluR6 ノックアウト (KO) マウスを使用した MEA 解析が行われており、ON-OFF 経路の新しい知見が得られている[2]。

我々は mGluR6 KO マウスと同様の ON 型双極細胞機能欠損マウスである TRPM1 KO マウス網膜の MEA 解析を通して、網膜 ON-OFF 経路の新しい知見獲得を目指した。

## 方 法

暗室（赤色光下）で生後 28 日齢以上のマウス網膜 (129Sv/ev) を摘出し、神経節細胞側を MEA 電極に吸着させ、神経節細胞の Spike 検出を行った。また網膜回路網の結合様式が神経節細胞の活動に与える影響を調べるために、イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体アンタゴニスト (CNQX, D-AP5)、GABA<sub>A</sub> 受容体アンタゴニスト (Picrotoxin, Bicuculline)、GABA<sub>C</sub> 受容体アンタゴニスト (TPMPA)、Glycine 受容体アンタゴニスト (Strychnine)、Gap 結合阻害薬

(18 $\beta$ -GA, MFA) を bath application により投与した。

## 結 果

TRPM1 KO マウス網膜では野生型 (WT) や mGluR6 KO マウスには見られない光刺激に非依存性の自発的な発火が観測された。解析の結果、この TRPM1 KO マウス網膜の神経節細胞から観測された自発発火は、周期性と、近傍の細胞との同期性を示した。次に薬剤を用いた実験により、自発発火の発生メカニズムについて検証した。自発発火が神経節細胞で自励的に発生しているかどうか特定するため、イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体を介した興奮性入力を遮断するために CNQX と D-AP5 を投与した結果、自発発火は消失した。また、抑制性入力に関しては、GABA<sub>A,C</sub> 受容体のアンタゴニストである Bicuculline と TPMPA の投与により自発発火（周波数、形態）に変化が、Glycine 受容体の阻害薬である Strychnine の投与では変化が見られなかった。Gap 結合阻害薬である MFA を投与した場合、自発発火の消失が観測された。

網膜神経回路のシミュレーションにより、ON 型双極細胞に注入電流を入れることで双極細胞とアマクリン細胞が自発発火に関与しているかを検討した。その結果、ON 型双極細胞と GABAergic アマクリン細胞間の一定のシナプス入力と、双極細胞の脱分極レベルに依存して自発発火が発生することが確認された。

## 考 察

本研究の実験結果とシミュレーション結果から、TRPM1 KO マウス網膜で観測された自発発火の発生メカニズムについて、ON 型双極細胞と GABAergic アマクリン細胞間のシナプス入力および、双極細胞の脱分極レベルに依存し、誘発されているのではないかというシナリオが考えられる。この点については、今後検討ていきたい。

## 引用文献

- [1] Koike, C et al. (2010) PNAS, 107, 332–337
- [2] Renteria, R. C. et al. (2006) J Neurosci, 26, 11857–11869.

# Enzyme-linked photo-assay system を用いたマウス網膜グルタミン酸動態の解析

○大熊 真人<sup>1</sup>、堀尾 佳世<sup>1</sup>、吉田 祥子<sup>2</sup>、福田 敦夫<sup>3</sup>、宮地 栄一<sup>1</sup>、金田 誠<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>藤田保健衛生大学医学部生理・<sup>2</sup>豊橋科学技術大学環境生命工学系生命機能科学・

<sup>3</sup>浜松医科大学医学部神経生理、<sup>4</sup>日本医科大学生理)

m-ohkuma@fujita-hu.ac.jp

Key words: グルタミン酸、網膜、光学測定

## 目的

網膜内の情報伝達は、視細胞から双極細胞または双極細胞から神経節細胞への情報伝達に代表される、グルタミン酸により行われる縦方向の情報伝達と、水平細胞やアマクリン細胞から放出される GABA 等のグルタミン酸作動性ニューロン軸索終末への修飾によって代表される水平方向の情報伝達の組み合わせで行われている。この情報伝達過程でコントラスト、明暗などの視覚情報が抽出される。こうした情報抽出は独立した神経回路で行われ、それぞれの特徴に対応する多様な網膜神経細胞サブタイプが存在していると考えられている。したがって特徴的な情報抽出に関する神経回路の活動を独立に可視化することができれば、網膜神経回路の理解が大きく進むと考えられる。

Enzyme-linked photo-assay system は、ガラスにコートした glutamine dehydrogenase (GDH) 上でグルタミン酸と NAD<sup>+</sup> の酵素反応で生成される NADH の蛍光強度変化を指標として、組織からのグルタミン酸放出量をモニターする手法として開発された。現在 enzyme-linked photo-assay system は、神経細胞から放出されるグルタミン酸を可視化する手法として、小脳をはじめとする脳組織で、脳の各層におけるグルタミン酸作動性シナップスの活動をモニターする手法として応用されている (Jimbu *et al.*, 2011)。本研究では enzyme-linked photo-assay system をマウス網膜に適用し、網膜各層におけるグルタミン酸作動性シナップスの活動を観察した。その結果について報告する。

## 方法

8週令マウス (c57BL) 網膜薄切片標本を用いた。GDH でコートしたカバーガラス上にマウス網膜薄切片標本を固定し、5 mM NAD<sup>+</sup> と 50 μM DL-threo-β-benzyloxyaspartic acid (グルタミン酸トランスポーター阻害剤) を含む Ringer 液を満たした実験用チャンバー内で実験を行った。刺激用の薬物投与はチャンバーの一角に固定した専用チューブを用いて行った。

NADH の蛍光強度 (励起波長 360 nm、フィルター波長 470 nm) は、ARGUS/AC system (Aqua Cosmos, Hamamatsu photonics) を用いて計測し、解析に用いた。また計測開始後の 5 分間は強い自家蛍光の消褪過程と重なり安定的な記録が行えな

かつたため、計測開始 6 分後より実験を開始した。また実験開始前に行った予備実験では、GABA、グリシン、ACh、KCl を投与しても、蛍光強度の上昇が観察されなかった。

## 結果

脱分極刺激として KCl (チャンバー内最終濃度 30 mM) 刺激を行うと、網膜の全層で蛍光強度の上昇が観察された。蛍光強度の上昇は、外節では KCl 刺激後 3 分まで蛍光強度の上昇が持続したが、外節以外の網膜各層では蛍光強度の上昇が KCl 刺激後 1 分でピークに達した後、徐々に減弱し 3 分でほぼ消褪した。また KCl 刺激による蛍光強度の上昇は網膜全層で Cd<sup>2+</sup> によりブロックされた。次にグルタミン酸以外の網膜内神経伝達物質が、網膜内のグルタミン酸作動性シナップスにどのような影響を与えているかを観察するため、GABA、グリシン、ACh (各 100 μM) を投与し、網膜各層の蛍光強度の変化を観察した。これらの神経伝達物質はいずれも蛍光強度の変化を引き起こさなかった。

## 考察

網膜薄切片標本を用いた enzyme-linked photo-assay system は、マウス網膜におけるグルタミン酸シナップス活動をモニターする手法として有用であると考えられる。しかしながら現在のシステムは、時間分解能や空間解像度が低く、網膜各層における詳細なグルタミン酸作動性シナップスの活動を観察する手法として応用するには、時間分解能と空間解像度をあげる工夫が必要である。また KCl 刺激では、外節と外節以外の網膜各層で観察される蛍光強度の上昇パターンに違いが認められた。外節では光受容のために常に多くのエネルギーが産生され供給されている。このことは外節で見られる蛍光強度の上昇は、グルタミン酸作動性シナップスの活動を反映したものではなく、外節に存在する NADH のシグナルを検出している可能性を示すものと考えられる。この点については今後詳細な検討が必要と考えられる。

## 引用文献

Jimbu, T., Itoh, S., Hozumi, N., Fukuda, A., Yoshida, S. Neuroscience Res. 71S: e214, 2011.

# マウス網膜 OFF 型コリン作動性ニューロン P2X 型プリン受容体陽イオンチャネルを介したコリン取り込み機構

○金田 誠<sup>1</sup>、石井 俊行<sup>1</sup>、本間 耕平<sup>1</sup>、重松 康秀<sup>2</sup>、霜田 幸雄<sup>2</sup>、井上 浩義<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>日本医科大学生理・<sup>2</sup>東京女子医科大学総合研究所・<sup>3</sup>慶應義塾大学医学部化学)

mkaneda@nms.ac.jp

Key words: ATP, cholinergic amacrine cell, choline

## 目的

P2X 型プリン受容体陽イオンチャネルは、受容体に対する ATP の作用時間が長くなるとチャネルポアが拡大し、巨大陽イオンに対する透過性を有することが報告されている(Virginio et al., 1999)。また *Xenopus laevis* 卵細胞を用いた発現実験で、P2X2 型陽イオンチャネルは、P2X2 型プリン受容体の発現密度が低いときは通常の陽イオンチャネルとして働くが、発現密度が高くなると N-methyl-D-glucamine などの巨大陽イオン分子に対する透過性を有する巨大陽イオンチャネルを形成することが報告されている(Fujiwara & Kubo, 2004)。

我々はマウス網膜 OFF 型コリン作動性アマクリン細胞(OFF-SAC)特異的に P2X2 型プリン受容体が高密度に発現していることを報告してきた(Kaneda et al., 2004 & 2008)。このことは OFF-SAC の P2X2 型プリン受容体イオンチャネルが巨大陽イオンに対する透過性を有する可能性を示唆するものである。

コリン作動性ニューロンにおいて、コリンは高親和性コリントラントンスポーターを使って取り込まれ、アセチルコリン合成に使われる。しかしながら、チャネルを介したコリン取り込み経路は報告されていない。本研究では OFF-SAC 特異的に存在している P2X2 型プリン受容体が、チャネルを介した細胞内へのコリン取り込み経路として機能するのかどうかについて検討した。

## 方法

SAC が選択的に EGFP で標識されている、トランジジェニックマウス(IL-2R/GFP マウス)(Yoshida et al., 2001) の網膜薄切切片標本または単離細胞標本にパッチクランプ法を適用し、ATP に対する応答を SAC から記録した。本研究では、蛍光顕微鏡(BX51WI; Olympus)下で GFP 陽性細胞として観察された細胞を SAC と判断して実験に用いた。ATP の投与は、bath application を用いて実施した。単離細胞での実験は、通常リングル溶液中で ATP により内向き電流応答(保持電位-70mV)が認められた単離 SAC(主に OFF-SAC)を用いた。網膜薄切切片標本を用いた実験では GFP 陽性の細胞体の位置を指標として ON-SAC と OFF-SAC を区別し、それぞれから応答を記録した。実験には主に通常 Ringer 液中の塩化ナトリウムを等モルの塩化コリンに置換したコリン Ringer 液を用いた。

また ON-SAC と OFF-SAC それぞれの高親和性コリントラントン

ポーター発現量の定量は、免疫組織化学染色を行った標本を用いて実施した。定量には ON-SAC と OFF-SAC それぞれの GFP シグナル強度と高親和性コリントラントンスポーターのシグナル強度の比を用いた。

## 結果

単離細胞標本にコリン Ringer 液中で ATP を投与したところ、小さな内向きのコリン電流が観察された。コリン Ringer 液中で観察される内向き電流応答の最大値( $I_{max}$ )は、通常 Ringer 液中で観察される応答の  $I_{max}$  の 30% であった。またコリン電流は、P2X2 型プリン受容体のアゴニストで誘発され、アンタゴニストでブロックされた。次に網膜薄切切片標本にコリン Ringer 液中で ATP を投与したところ、OFF-SAC ではコリン電流が観察されたが ON-SAC ではコリン電流は観察されなかった。また ON-SAC における高親和性コリントラントンスポーターの発現量は、OFF-SAC における高親和性コリントラントンスポーターの発現量より多かった。

## 考察

本研究からマウス網膜 OFF-SAC の P2X2 型プリン受容体はコリンに対する透過性を有していることが明らかとなった。また高親和性コリントラントンスポーターの発現量は ON-SAC のほうが OFF-SAC より多かった。このことは OFF-SAC の P2X2 型プリン受容体がアセチルコリン合成前駆体としてのコリン取り込み経路として働いている可能性を示唆するものである。

## 引用文献

1. Virginio, C., A. MacKenzie, F.A. Rassendren, R.A. North, and A. Surprenant. 1999. *Nat Neurosci.* 2:315-321.
2. Fujiwara, Y., and Y. Kubo. 2004. *J Physiol.* 558:31-43.
3. Kaneda, M., K. Ishii, Y. Morishima, T. Akagi, Y. Yamazaki, S. Nakanishi, and T. Hashikawa. 2004. *J Comp Neurol.* 476:103-111.
4. Kaneda, M., T. Ishii, and T. Hosoya. 2008. *Eur J Neurosci.* 28:128-136.
5. Yoshida, K., D. Watanabe, H. Ishikane, M. Tachibana, I. Pastan, and S. Nakanishi. 2001. *Neuron.* 30:771-780.

# ゼブラフィッシュ桿体の分化・成熟過程を制御する転写調節機構

○白木知也・小島大輔・深田吉孝

(東京大学 大学院理学系研究科)

shirakit@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp, <http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/>

Key words: 視細胞、転写因子、ゼブラフィッシュ

## 目的

脊椎動物の視細胞は、薄暗い環境で機能する桿体と明るい環境で働く錐体の二種類に大別される。その光応答特性はそれぞれが担う視機能と符合し、桿体は高感度であり、錐体は高い時間分解能をもつ。桿体と錐体には異なる光シグナリング蛋白質が発現しており、この各光シグナリング蛋白質の性質の違いが足し合わされ、全体として桿体と錐体の大きな光応答特性の差異が生み出されている（白木と深田、2013）。光シグナリング蛋白質の桿体型・錐体型サブタイプは、脊椎動物の進化初期のゲノム重複により生じ、その後に機能特性と発現細胞が変化したと考えられる。

硬骨魚類では他の脊椎動物との分歧後にゲノム重複が起きたことが知られている。この硬骨魚類のゲノム重複により生じた *pdc* 遺伝子 (*pdca* と *pdcb*) では、*pdca* が桿体に、一方 *pdcb* が錐体に発現するように分化した (Kobayashi *et al.*, 2001)。私達はこれまでに、桿体と錐体の機能差異を生み出す分子基盤を明らかにするため、ゼブラフィッシュにおいて桿体あるいは錐体特異的に発現する遺伝子をマイクロアレイ解析により網羅的に同定した。このマイクロアレイ解析から私達は、*rgs9*, *ptgs2* および *kcnv2* の 3 遺伝子においても *pdc* 遺伝子と同様の機能分化が生じていることを見出した。このように、脊椎動物の進化初期に起こった光シグナリング遺伝子の機能分化と同様の現象は硬骨魚類のゲノム重複後にも観察された。このことから、視細胞において強く発現する遺伝子では、ゲノム重複後に桿体あるいは錐体特異的に発現するという機能分化が生じやすいのではないかと考えられた。本研究ではこれらの遺伝子の転写調節機構を理解するために、桿体の遺伝子発現制御に関わることが哺乳類において良く知られている転写因子 *nr2e3* (Haider *et al.*, 2000; Akhmedov *et al.* 2000; Swaroop *et al.* 2010) の機能をゼブラフィッシュにおいて解析した。

## 方法

桿体特異的な転写因子である *nr2e3* に注目し、その機能を解析するため、TAL effector nucleases (TALENs; Cermak *et al.*, 2011) を用いて遺伝子欠損ゼブラフィッシュ系統の作製を行った。この変異系統において、quantitative RT-PCR と *in situ* hybridization を用いて桿体マーカー遺伝子の発現を解析した。

## 結果

*nr2e3* 変異体の眼球ではロドプシンを始めとした桿体型の光シグナリング遺伝子の発現が顕著に低下することを見出した。また、硬骨魚類において桿体特異的に発現するように機能分化した桿体型の遺伝子 *pdca*, *rgs9a* および *kcnv2a* の発現も *nr2e3* 変異体において顕著に低下していた。このことから、ゼebraフィッシュにおいてはこれら桿体型の遺伝子の発現に *nr2e3* が必須であると考えられた。

## 考察

マウスやヒトなどの哺乳類では、桿体型の遺伝子の発現には *nrl* と *nr2e3* の二つの転写因子が主に関わることが知られている。哺乳類の *nr2e3* 変異体では、*nrl* が正常に機能しているために桿体型の光シグナリング遺伝子の発現にはほとんど影響がみられない。一方、ゼebraフィッシュでは *nr2e3* の変異により桿体マーカーの顕著な発現低下が観察された。ゼebraフィッシュの成熟した桿体では *nrl* の発現が観察されないこと (Nelson *et al.*, 2008) から、ゼebraフィッシュにおいては *nr2e3* が単独で桿体型の遺伝子の発現制御を担っていると考えられる。

## 引用文献

- 白木 知也、深田 吉孝. 光受容ニューロンの応答性を特徴づける光受容体キナーゼ GRK の活性 生物物理 53:145-148. (2013)
- Kobayashi, Y., Hisatomi, O., Satoh, T., Tokunaga, F. Identification of rod- and cone-specific phosducins in teleost retinas. *FEBS Lett.* 502:117–21. 2001.
- Haider, N. B. *et al.* Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nat. Genet.* 24: 127–31. 2000.
- Akhmedov, N. B. *et al.* A deletion in a photoreceptor-specific nuclear receptor mRNA causes retinal degeneration in the rd7 mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5551–6. 2000.
- Swaroop, A., Kim, D., Forrest, D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 11:563–76. 2010.
- Cermak, T. *et al.* Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 39:e82. 2011.
- Nelson, S. M., Frey, R. A., Wardwell, S. L. & Stenkamp, D. L. The developmental sequence of gene expression within the rod photoreceptor lineage in embryonic zebrafish. *Dev. Dyn.* 237:2903–17. 2008

## 網膜杆体・錐体視細胞光電位変換機構モデル

○細木ゆかり<sup>1</sup>・小池千恵子<sup>1</sup>・竹田有加里<sup>1</sup>・天野晃<sup>1</sup>（非会員）

（<sup>1</sup>立命館大学大学院生命科学研究科）

sj0004xf@ed.ritsumei.ac.jp

Key words: 視細胞光電位変換機構, シミュレーションモデル, 杆体・錐体反応速度定数比

### 目的

視細胞内の光電位変換機構では、光量子の吸収により活性化した視物質によって、Gタンパク質、ホスホジエステラーゼ(PDE)が順に活性化され、cyclic-GMP(cGMP)濃度が低下することで、cGMP依存性チャネルが閉口する。その後、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度低下に伴うcGMP生成が生じ、再びチャネルが開口する。光電位変換機構の構造は、杆体視細胞と錐体視細胞でほぼ同様であるが、光感受性や応答時間は異なり、速度定数等の差異が詳細に報告されている<sup>1</sup>。これまで、cGMP依存性チャネル電流の再現を目的とした杆体の光電位変換機構モデルは存在していたが、その根底となるメカニズムにおける生化学反応の定量的な再現を可能とするものではなかった。そこで、本研究では、それら生化学反応およびチャネル電流を正確に再現する杆体・錐体視細胞光電位変換機構モデルを提案する。

### 方 法

本研究では、Hamerらのモデル<sup>2</sup>を基に開発した杆体・錐体視細胞光応答機構初期過程モデルに、後段の生化学反忬である、Gタンパク質によるPDE活性化反応部分、Gタンパク質不活性化反応部分、およびcGMP分解生成反応部分を加えた包括

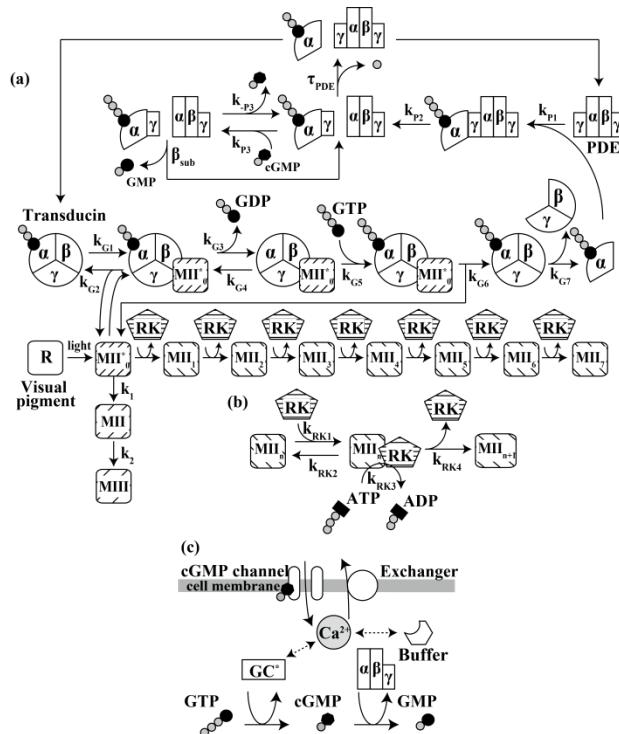


図1. 提案モデル (a) 視物質活性化～PDE活性化反応部分  
(b) リン酸化反応詳細図 (c) cGMP濃度変化部分

的光電位変換機構モデル(図1)を構築し、cGMP依存性チャネル電流を計算した。本モデルにおける各分子濃度や反応速度比は実験データを用いたが、Gタンパク質不活性化速度は、測定値より速い速度を用いて計算を行った(考察参照)。

### 結 果

本錐体モデルを用いて、光強度依存性の活性化Gタンパク質濃度変化(図2(a))、視物質リン酸化反応の時間経過(図2(b))、Gタンパク質活性化反応の時間経過(図2(c))、また杆体・錐体のcGMP依存性チャネル電流の時間経過(図3)の再現を行った。錐体モデルは各反応過程を良好に再現でき、杆体モデルも生理実験結果を良好に再現できることを確認した。

### 考 察

速いGタンパク質不活性化速度が必要であった理由は、生化学実験における不活性化因子の減少などが考えられる。

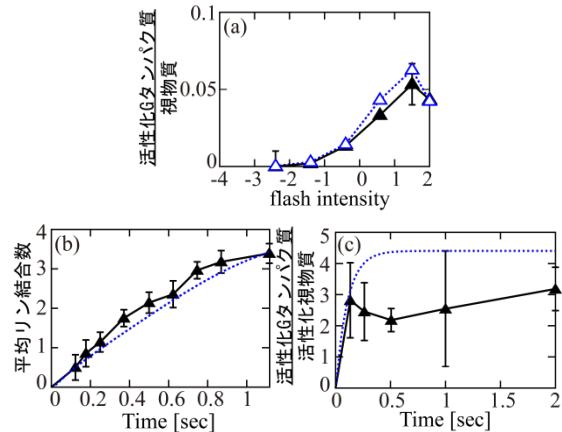


図2. 錐体における各反応過程の再現結果

実線は生理実験結果<sup>1,3</sup>、破線は本モデルの結果

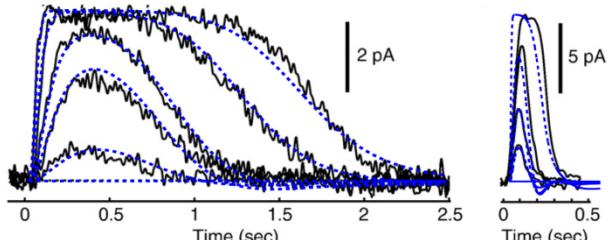


図3. cGMP依存性チャネル電流の時間経過(左: 杆体、右: 錐体)実線は生理実験結果<sup>1</sup>、破線は本モデルの結果

### 引用文献

- [1] Furukawa, T., et al., Vertebrate Photoreceptors, Springer Japan, 2014.
- [2] Hamer, R. D., et al., JGP, 122, 419-444, 2003.
- [3] Tachibanaki, S., et al., PNAS, 98, 14044-14049, 2001.

# 転写因子Raxは網膜の初期形成から視細胞の運命決定や成熟までを制御する

○入江彰一<sup>1,2,3</sup>、茶屋太郎<sup>1,3</sup>、名定優<sup>1,3</sup>、佐貴理佳子<sup>1,3</sup>、古川貴久<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>大阪大学蛋白質研究所分子発生学、<sup>2</sup>京都大学大学院医学研究科医学専攻、<sup>3</sup>JST、CREST)

shoichi.irie@protein.osaka-u.ac.jp

Key words: Rax、網膜視細胞、遺伝子発現制御

## 目的

網膜は将来間脳になる領域が膨出して形成される中枢神経系由来の組織で、整然とした層構造を形成する。脊椎動物の網膜形成には、前神経板の領域化、腹側前脳からの眼胞形成、網膜前駆細胞の運命決定及び細胞の成熟といった多くの発生段階を必要とする。Rax 遺伝子 (Retina and anterior neural fold homeobox gene) は、ホメオボックス型転写因子をコードし、脊椎動物の網膜と間脳の形成に必要不可欠な機能を有する。Rax 欠損マウスでは眼杯の無形成及び間脳の形成異常が起こり、ヒト少眼球症や無眼球症において Rax の変異が報告されている。さらに我々は以前、Rax が網膜前駆細胞の最後の細胞周期において Notch シグナルの不活性化に伴い転写因子 Otx2 の発現を活性化することを見出し、Rax がマウス網膜の視細胞運命決定の制御因子であることを明らかにした (Muranishi *et al.*, 2011, *J Neurosci.*)。

今回、我々は生後しばらくの期間、マウス網膜視細胞前駆細胞において Rax が発現していることを見出した。しかし、細胞周期を出た視細胞前駆細胞における Rax の機能はほとんど明らかにされていない。そこで我々は、生後の網膜視細胞における転写因子 Rax の機能解析を行った。

## 方法

### ① Rax コンディショナルKO マウスの作製

Rax<sup>flox/flox</sup>;Crx-CreERT2 マウスを得た。生後 4 日目にタモキシフェンを投与 (0.2 mg) することで時期特異的に視細胞のみで Rax を欠損させ、Rax コンディショナルノックアウトマウス (Rax iCKO) を作製した。

### ② 網膜電図検査(ERG)

杆体反応は、暗順応下で -4.0~1.0 log cd s m<sup>-2</sup> の 4 種類の刺激光で測定した。錐体反応は、背景光 31.6 cd m<sup>-2</sup> で明順応させた後、-1.0~1.0 log cd s m<sup>-2</sup> の 4 種類の刺激光で測定した。

### ③ 免疫染色

生後 8 日、20 日、2 ヶ月の Rax iCKO マウス網膜切片を用いた。視細胞マーカーである S-オプシン、M-オプシン、ロドプシンの免疫染色を行い、各マーカーの発現を解析した。

### ④ ルシフェラーゼアッセイ

ヒト由来のロドプシン、S-オプシン、M-オプシンのプロモーター領域に対する Rax の転写活性能を測定した。

## 結果

我々は Rax iCKO マウスの網膜で、視細胞特異的に Rax が欠失していることを確認した。網膜電図検査の結果から、Rax iCKO マウスの網膜では錐体及び杆体視細胞由来の応答が減弱していることを見出した。さらに Rax が制御する遺伝子を同定するために、Rax iCKO マウス網膜を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果から、Rax は出生後のマウス網膜において錐体および杆体視細胞の遺伝子発現を活性化させることを明らかにした。また Rax iCKO 網膜の成熟過程において、錐体視細胞が消失することを明らかにした。

## 考察

転写因子 Rax は、網膜前駆細胞において視細胞運命決定を制御するだけでなく、生後網膜において視細胞の遺伝子発現を活性化することが明らかとなった。このことは、Rax が細胞周期を出た網膜視細胞前駆細胞の成熟と生存にも必須な転写因子であることを示唆している。

Rax iCKO マウスの網膜において、ロドプシンの発現を主に活性化する転写因子 Crx (Cone-rod homeobox) 及び Nrl (Neural retina leucine zipper) の発現は変化しなかった。しかしながら、Rax を欠損させることでロドプシンの発現量は低下した。これはロドプシンの発現が Crx や Nrl だけでなく Rax によっても調節されることを示唆している。またルシフェラーゼアッセイの結果より、Rax が Crx や Nrl と協調して視細胞の遺伝子発現を活性化することを示したが、同時に Rax 単独では、各標的遺伝子の発現を活性化する能力はほとんど見られなかった。このことは、Rax が生後マウス網膜において視細胞の遺伝子発現を直接活性化するのではなく、間接的に発現調節に寄与することを示している。今後は Rax が生後網膜においてどのようなメカニズムで遺伝子発現の活性化に寄与しているのか検討したい。

## 引用文献

- Furukawa *et al.*, 1997, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94(7), 3088–93.
- Muranishi *et al.*, 2011, *J. Neurosci.*, 31(46), 16792–807
- Mathers *et al.*, 1997, *Nature.*, 387(6633), 603–7

# ヒト培養誘導網膜視細胞の光応答について

○世古裕子<sup>1、2</sup>・東 範行<sup>2</sup>・石井俊行<sup>3</sup>・小牟田 縁<sup>1</sup>・金田 誠<sup>3</sup>・梅澤明弘<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>国立障害者リハビリテーションセンター研究所・<sup>2</sup>国立成育医療研究センター・

<sup>3</sup>日本医科大学システム生理学)

sekoyuko@rehab.go.jp

Key words: パッチクランプ、ヒト誘導網膜視細胞

## 目的

ヒトES細胞から視細胞<sup>1</sup>や網膜組織<sup>2</sup>がつくられることが報告されている。一方で、多能性幹細胞ではなく線維芽細胞などの体細胞に数種類の転写因子遺伝子をミックスして導入するとiPS細胞を経ることなく比較的短期間で必要な細胞を得ることができる“ダイレクト・リプログラミング”と呼ばれる技術も開発され、心臓、肺臓、神経、血小板、軟骨などがつくられている。我々は、この“ダイレクト・リプログラミング”によって幼若なヒト眼球由来虹彩細胞から網膜視細胞の作製を試み、作製した誘導視細胞様細胞に光応答があることを電気生理学的手法によって明らかにしてきた<sup>3</sup>。

哺乳類の光応答は、光刺激に対して過分極応答を示す視細胞型と、光刺激に対して脱分極応答を示すipRGC型の2種類が存在し、視細胞型ではオプシン分子が、ipRGC型ではメラノプシン分子が光応答に関与している。ヒト体細胞の一種である虹彩細胞は分化誘導に必要な3因子(CRX、NEUROD、RX)を導入することで網膜視細胞様の細胞に分化誘導することができる。しかしながら分化誘導した細胞は、光刺激に対して脱分極応答を示し、過分極応答は見られなかった<sup>2</sup>。これは培養虹彩細胞が通常の培養条件でもメラノプシン分子をある程度発現し、分化誘導の結果オプシン分子とメラノプシン分子の両方が発現してしまうこと、また分化誘導した細胞が外節を欠いていたことから、オプシン分子を介した過分極応答がメラノプシン分子を介した脱分極応答にマスクされ、光刺激に対して脱分極応答が生じたものと考えられる。本研究では、通常の培養条件ではメラノプシン分子を発現しないヒト皮膚線維芽細胞から、類似の方法で網膜視細胞の作製を試みたので報告する。

## 方 法

市販されているヒト皮膚線維芽細胞を用いた。虹彩細胞から網膜視細胞への分化における運命決定に必要であった転写因子遺伝子ミックス(CRX、RAX、NEUROD)にOTX2遺伝子を追加し、培養皮膚線維芽細胞にレトロウィルスベクターを用いて導入した。視細胞への分化の程度は、網膜に特異的に発現するオプシンや光トランスタクションに関わる遺伝子についてRT-PCR法と免疫染

色で評価し、網羅的遺伝子発現解析によるプロファイリングと電気生理学的手法(パッチクランプ)による機能的評価を行った。

## 結 果

培養皮膚線維芽細胞に転写因子遺伝子ミックスを導入することによって、2週間以内でオプシンと光トランスタクションに関わる遺伝子を発現する視細胞様の細胞に分化した。この細胞は光トランスタクションに関わる遺伝子を多数発現した。しかしながらメラノプシン分子の発現量は低値であった。さらにこの細胞に青色光を照射すると、網膜視細胞に特徴的な光応答がみられた。RT-PCRと網羅的遺伝子発現解析の結果、CRX、RAX、NEURODの3因子よりも、OTX2を加えた4因子の方が、視細胞特異的遺伝子の発現を著明に増加させることができた。

## 考 察

今回検討した培養皮膚線維芽細胞由来誘導視細胞様細胞では、視細胞型の光応答に關係する遺伝子発現が認められたが、ipRGC型で働くメラノプシン分子の発現は低く抑えられていた。また光刺激に対して光応答を示すことを検出することができ、より視細胞に近い性質をもった細胞を分化誘導することができた。この細胞は、網膜変性疾患の病態解明や治療に用いる薬剤のスクリーニング等に有用なモデルとなる可能性がある。(本研究の内容は既に論文発表されている。Seko et al. Genes Cells. 19(3):198-208. 2014)

## 引用文献

- 1、Osakada F, et al. Nat Biotechnol. 26: p. 215-224. 2008
- 2、Nakano T, et al. Cell Stem Cell 10: p. 771-785. 2012
- 3、Seko Y, et al. PLoS One. 7(4): e35611. 2012

# 初期視覚系の受容野周囲抑制に関する神経機構

○七五三木聰<sup>1,2</sup>・木村晃大<sup>1</sup>・相馬祥吾<sup>1</sup>・末松尚史<sup>2</sup>・佐藤彰典<sup>2</sup>・水上遼<sup>2</sup>・佐藤宏道<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科・<sup>2</sup>大阪大学大学院生命機能研究科)

shimegi@vision.hss.osaka-u.ac.jp, http://homepage.address.co.jp

Key words:

## 目的

初期視覚系ニューロンの視覚応答は刺激サイズ依存的である。通常、刺激サイズが大きいほど視覚応答も増大するが、あるサイズ以上に刺激が大きくなると、視覚応答はむしろ抑制され減弱する。この刺激サイズと応答の関係を表したグラフをサイズチューニング曲線と呼ぶ。最大応答を生じる視野領域は受容野として定義され、その外側の視野領域で、それ単独の刺激ではスパイク応答を引き起こさないが、受容野刺激とともに呈示されることで受容野応答を修飾する領域は受容野周囲領域と呼ばれる。受容野周囲刺激による受容野応答の抑制性修飾効果は受容野周囲抑制と呼ばれ、ニューロンレベルにおける広域視野情報の統合モデルとして注目を集めてきた。興味深いのは、受容野周囲抑制の程度が刺激コントラストに依存的であることで、これにより受容野の大きさも変化することが知られている。高コントラストの縞刺激で得られたサイズチューニング曲線に比べ、低コントラストで得られた曲線では受容野周囲抑制が弱く、受容野が大きくなる現象が観察されている。しかしながら、受容野周囲抑制およびそのコントラスト依存性の神経機序は明らかになっていない。

そこで本研究では、麻酔したネコの外側膝状体および一次視覚野から单一神経活動記録を行い、縞刺激に対する応答の時間解析やGABA受容体アンタゴニスト（薬物）の局所投与により、ニューロンの受容野周囲抑制に関する神経回路およびそのコントラスト依存性の形成メカニズムを検討した。

## 方法

麻酔したネコの外側膝状体および一次視覚野から单一神経活動記録を行った。外側膝状体ニューロンの記録にはGABA受容体アンタゴニストを入れた薬物管を糊付した微小ガラス管記録電極を用いた。薬物投与前、中、後において、ドリフトする縞刺激に対する応答のサイズチューニング曲線を作成し、その変化を検討した。薬物投与は電気泳動的に行った。一次視覚野ニューロンの記録にはガラスコートされたタンゲステン電極を用い、ドリフトしない縞刺激に対する視覚応答の時間解析により受容野周囲領域の時空間特性を検討した。

## 結果と考察

外側膝状体ニューロンのサイズチューニング特性として、受容野より少しだけ大きめの刺激によりほぼ最大の応答抑制が起こることが知られており、本研究でも同様なサイズチューニング特性が得られた。そこで、GABA受容体アンタゴニストの効果を検討すると、受容野周囲抑制に対する阻害効果は、刺激サイズに依存することがわかった。受容野近傍の周囲刺激により誘起された抑制は薬物により解除され、それとともに受容野サイズが拡大した。一方、さらに大きな刺激を呈示すると再び受容野周囲抑制が観察された。このことより、受容野近傍刺激で生じる受容野周囲抑制にはGABA作動性抑制性入力の増加が、受容野から遠い周囲領域刺激で生じる反応抑制には興奮性入力の減少が関与することがわかった。

次に、縞刺激のコントラストを下げた時のサイズチューニング曲線を検討すると、高コントラスト時に比べて受容野サイズが増大すること、しかし薬物投与による受容野サイズの拡大は起こらないことがわかった。このことから、受容野近傍刺激で生じるGABA抑制はコントラスト依存性を有し、そのGABA抑制が低コントラスト条件で十分に機能しなくなることが受容野サイズ拡大の原因となることが明らかになった。

最後に、一次視覚野ニューロンにおける受容野周囲抑制について、空間特性（周囲領域の大きさや刺激方位選択性）の時間変化を検討した。その結果、受容野周囲領域の経時的な拡大と、それと対応した刺激方位選択性も強くなることが明らかになった。応答の早い時間に狭い範囲から生じる方位非選択性抑制効果は外側膝状体の受容野周囲抑制の空間特性とよく一致していたが、時間とともにそれでは説明がつかない性質へと変化した。このことから一次視覚野の受容野周囲抑制には、外側膝状体で生じた応答抑制を反映したものと、一次視覚野内あるいはそれ以後の神経回路で生じた応答抑制の両方が関与していることが明らかになった。

以上の事から、初期視覚系ニューロンにおける受容野周囲抑制には複数の神経回路が関与し、それらの神経機構は相加的あるいは相乗的に働くのではなく、むしろ相補的に働く重層的な応答ゲイン調節システムであると結論づけられる。

# 生理学的に同定した脳深部領域への in vivo 電気穿孔法による遺伝子導入

大村菜美<sup>1</sup>、川崎一葉<sup>1</sup>、佐藤武正<sup>2</sup>、○畠義郎<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>鳥取大学大学院医学系研究科生体高次機能学・<sup>2</sup>鳥取大学医学部神経生物学)

yhata@med.tottori-u.ac.jp

Key words: 電気穿孔法、外側膝状体、遺伝子導入

## 目的

電気穿孔法は、培養細胞や生体の様々な臓器への遺伝子導入技術として広く使われている。哺乳類の脳では、胎生期の齧歯類の脳に遺伝子導入を行う子宮内電気穿孔法が主流である。出生後の脳への電気穿孔法は、そのほとんどが出生直後の動物で行われており、発達期や成熟後の動物での報告は少ない。またそれらの報告でも、遺伝子導入できる脳領域が大脳皮質、海馬、脳室に面した部位と限定されており、視床のような脳深部にある構造を標的にすることは難しいとされてきた。本研究では、生後の動物において電気生理学的に同定した脳深部領域の少数の細胞への遺伝子導入を可能にする新しい in vivo 電気穿孔法を開発した。

## 方法

### 電気生理学的記録が可能なオートインジェクター

(Recording Nanoject II) にプラスミド液を充填したガラスピペットを装着した。プラスミドは、CAG プロモータ下で EGFP を発現するプラスミド (pCAG-EGFP) を用いた。プラスミド濃度は 0.2 - 2.0 µg/µl とし、場合により、順行性神経トレーサー (mini-Ruby) や核膜孔を拡張する試薬 (trans-1,2-cyclohexanediol, TCHD) を混合した。

生後 27 から 405 日齢のマウス、あるいは生後 34 から 38 日齢のネコを用いた。プラスミド液を充填したガラスピペットを用いて麻酔下でマルチユニット活動を記録し、視覚反応を手がかりに標的とする視床外側膝状体の位置を同定した。その後、ガラス管の位置をそのまま変えず、オートインジェクターに接続されている配線を記録用のものから電気パルスを与えるものへつなぎかえた。そして、プラスミド液を 150 - 250 nl 圧注入し、すぐにガラス管の先端から電気パルス (50 msec, 50 - 200 V, 5 times at 1 Hz) を与えた。数日から数週間後に動物を灌流固定して、脳を取り出し、凍結脳切片を作成した。必要に応じて EGFP の免疫組織化学染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

## 結果

電気穿孔法を行ってから 2 週間後に標的とした視床外側膝

状体を観察すると、プラスミド溶液に混合した神経トレーサーで標識された部位付近に EGFP 発現ニューロンを確認できた。また、外側膝状体ニューロンの投射先である一次視覚野に EGFP 発現軸索が見られ、軸索膨大部や軸索末端等、微細な構造も確認できた。電気穿孔のパラメーターの影響を調べるために、電圧、プラスミド濃度を変えて調べたが、成功率に変化は無く、約 36% であった。また、核輸送効率を増加させる試薬である TCHD を併用しても成功率は変化しなかった。しかし、TCHD を用いた場合、EGFP 発現細胞の蛍光強度が高くなる傾向が見られ、免疫組織化学染色無しでも標識ニューロンの樹状突起や軸索を観察することができた。さらに、この方法をネコに適用したところ、外側膝状体の特定の層を標的として少数の細胞に遺伝子導入し、皮質において投射軸索を確認することができた。

## 考察

今回開発した電気穿孔法を用いると、電気生理学的に同定した脳領域において、少数のニューロンのみに遺伝子導入できるため、標的とする領域の個々のニューロンの詳細な形態解析が可能である。生後動物における少数のニューロンへの遺伝子導入法としてこれまでに単一ニューロン電気穿孔法が報告されているが、それらはパッチクランプ法や二光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージング法、juxtacellular 記録法のような高度な技術を必要とする。今回開発した方法は一般的な細胞外記録法の技術があれば可能であり、比較的短時間で処置が完了する。さらに、この方法を他の薬理学的あるいは遺伝的な操作と組み合わせることで、神経回路の発達や可塑性に関する分子メカニズムの解明に大いに役立つと期待できる。

Ohmura N., Kawasaki K., Satoh T. and Hata Y. "In vivo electroporation to physiologically identified deep brain regions in postnatal mammals." *Brain Structure and Function* (in press) doi:

10.1007/s00429-014-0724-x.



# 眼球運動学習前後のシナプス密度変化と定量的 SDS-FRL 法を用いた AMPA 受容体動態解析

○中館和彦<sup>1</sup>・重本隆一<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>明治薬科大学・<sup>2</sup>Science and Technology Austria institute)

nakadate@my-pharm.ac.jp

Key words: シナプス可塑性、水平性視機性眼球運動、適応学習

## 目的

我々は、外来の刺激に対し適応し生命活動を行っている。そして刺激に対し学習を行い、適応反応を記憶している。眼球運動の1つである水平性視機性眼球運動においては、運動の学習が行われる過程で長期記憶の定着が、小脳片葉に起こることがこれまでに明らかにされている。さらに小脳片葉内顆粒細胞の平行線維とプルキンエ細胞間のシナプスの長期抑圧現象が、水平性視機性眼球運動学習に必須であることが報告されている。しかし、学習した動物において、短期適応から長期適応に至る過程でどのような構造的变化が起こるのか明らかにされていない。本研究は、水平性視機性眼球運動の短期適応から長期適応への時間経過において、シナプス自体の変化と AMPA 受容体がどのような変化をするのかを定量的に解析した結果を報告する。

## 方法

### 1) 水平性視機性眼球運動学習前後のシナプス内 AMPA 受容体密度変化の解析

水平性視機性眼球運動を用い、毎日1時間のトレーニングを施し、眼球運動の短期学習前後そして長期の学習前後状態における AMPA 受容体密度変化を凍結割断レプリカ標識法を用いて解析。AMPA 受容体に対する標識を行い、単位面積あたりの個数をカウントし、単位面積あたりの密度変化を解析。

### 2) 水平性視機性眼球運動学習前後の分子層内シナプス密度変化の解析Ⅰ

水平性視機性眼球運動学習の適応に関する小脳片葉の平行線維-プルキンエ細胞シナプスの形態変化を透過型電子顕微鏡を用いて解析。

### 3) 水平性視機性眼球運動学習前後の分子層内シナプス密度変化の解析Ⅱ

水平性視機性眼球運動学習の適応に関する小脳片葉のプルキンエ細胞の樹状突起スパインの密度を超高圧電子顕微鏡を用いて解析。

## 結果

これまでの電気生理学的検討同様、我々はマウスを用いて水平性視機性眼球運動トレーニングを毎日1時間施し、1時間の学習で引き起こされるものを短期適応、日々の学習によ

り加重される学習を長期適応とした。本研究により、1時間の学習で引き起こされる短期適応が、小脳片葉の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおける AMPA 受容体密度の減少を伴っていることを凍結割断レプリカ標識法によって明らかにした。さらに5から14日間にわたって長期の視覚訓練を受けた群の小脳片葉の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの数を電子顕微鏡の連続切片を用いて計測した結果、1日の視覚訓練ではシナプスの密度は変化しないが、3日の訓練後には減少し、5日程で飽和状態に達することが確認された。すなわち5日間以上連続の1日1時間の学習によって引き起こされる長期適応は、AMPA 受容体ではなく平行線維-プルキンエ細胞間シナプス自体の減少を伴っていることを明らかにした。このシナプスの密度の減少の時間経過と電気生理学的解析から得られてきた水平性視機性眼球運動の利得の時間経過はほぼ一致していた。

## 考察

運動の学習が行われる過程で小脳における、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの長期抑圧現象が関与することが知られている。しかし、実際に学習した動物において、このシナプスに存在する AMPA 受容体数やシナプスの構造にどのような変化が起こるのかは知られていなかった。我々は、マウスの水平性視機性眼球運動をモデルとして1時間の学習で引き起こされる短期適応が、小脳片葉の平行線維-プルキンエ細胞間シナプスにおける AMPA 受容体密度の減少を伴っていること、長期適応は、AMPA 受容体ではなく平行線維-プルキンエ細胞間シナプス自体の減少を伴っていることを明らかにした。これらの結果は、脳内に短期的に刻まれる記憶の痕跡が、長期的に安定化されるに従って、構造的な変化へと変換されることを示している。今後、さらにこの変換に関わる分子メカニズムを解明することを目指している。

## 引用文献

- 1) Ito, et. al., Neurosci Lett. 33(3):253-8. 1982.
- 2) Wang, et. al., PNAS. 111(1):E188-93. 2014.

# 網膜色素変性モデル動物におけるコントラスト感度の経時的評価

○佐藤彰典<sup>1</sup>・相馬祥吾<sup>2</sup>・末松尚史<sup>2</sup>・七五三木聰<sup>2</sup>（会員）

（<sup>1</sup>大阪大学理学部・<sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科）

satoa0820@bio.sci.osaka-u.ac.jp, shimegi@vision.hss.osaka-u.ac.jp

Key words: RCSラット、2AFC視覚刺激検出課題、階段法

## 目的

Royal College of Surgeons (RCS) ラットは遺伝性網膜色素変性を自然発症するヒト網膜色素変性症の最初のモデル動物である。RCSラットは網膜色素上皮に障害が現れ、これにより錐体・杆体細胞が死滅することで生後数か月以内に視覚機能を失う。この動物モデルは、遺伝子治療実験や網膜色素上皮細胞の移植実験<sup>1</sup>などの視覚機能回復のための基礎研究に用いられてきた。さらに、RCSラットの視覚機能は上丘の視覚応答を記録することで調べられ、その視覚応答はラットの週齢が進むにつれて、減衰していくことが知られている<sup>2</sup>。しかしながら、これまでにRCSラットがどの程度の視覚機能を有するのか心理物理学的に測定されてこなかった。これは、自由行動下のRCSラットに視覚刺激検出課題を学習させる前に、その視覚機能が失われてしまうからである。そこで、本研究では、短期間で効率的に視覚刺激検出課題を学習させる方法を確立し、RCSラットの視覚感度がどのような時間スケールで減衰していくのかを検討する。

## 方法

行動実験ボックスの前面に設置した液晶モニターの左右領域のどちらかに視覚刺激（輝度がサイン波状に変化する縞刺激）を呈示し、刺激に対応するレバーをラットが操作（Hit）することで報酬が得られるtwo-alternative forced-choice (2AFC) の視覚刺激検出課題を訓練した。Hitする毎に刺激のコントラストを段階的に下げる階段法を2AFC課題と組み合わせることで検出閾（コントラスト感度）を測定した<sup>3</sup>。有色ラットであるLong-Evansラットを用いて、短期間で効率的に課題を学習させる方法の確立を試みた。学習を促進するために、オペランダムにはレバー操作と報酬供給が一体化したspout-leverを採用した<sup>4</sup>。さらに、訓練を3つのステップで構築し、①動物の注意を引くための“salient stimulus”，②モチベーションを保つための“reward-guaranteed trial”，③誤って学習した行動パターンを修正させるための“behavior-corrective trial”および“reward-guaranteed trialからnon-guaranteed trialへの変換”を導入した。これらのプロトコールを各訓練ステップに適切に導入することで、全てのラットに2AFC視覚刺激検出課題を1週間以内で学習させることができた。

## 結果

新たに考案した学習プログラムにより、Long-Evansラットは1週間で、2AFC視覚刺激検出課題を学習することができた。さらに、階段法を組み合わせることで、低コントラスト視覚刺激を用

いた訓練をすることなしに、コントラスト感度を測定することができた。この学習プロトコールをRCSラットに応用することで、自由行動下のRCSラットに視覚刺激検出課題を学習させることができた。

学習後（4週齢）から6週間にわたって視覚機能を調べた結果、RCSラットの視覚感度の経時変化を測定することができた。学習直後は、Long-Evansラットに類似した低空間周波数通過型のコントラスト感度曲線を示したが、RCSラットの感度は有意に低かった ( $F_{rat(4,45)} = 8.7, P < 0.001$ ; two-way ANOVA)。さらに、5-6週齢において、縞刺激の検出能力は急激に低下し、これに伴い、コントラスト感度曲線も減衰していった。

## 考察

今回、我々が考案した学習プロトコールにより、自由行動下のRCSラットのコントラスト感度の経時変化を測定することができた。RCSラットの縞刺激の検出能力は5-6週齢において急激に減衰し、これに伴い、コントラスト感度曲線も平らに変化していった。先行研究により、RCSラットの網膜は7-9週齢には萎縮しており、網膜電位もほとんど誘発されないことが報告されている<sup>5</sup>。この研究と比較すると、縞刺激検出能力の低下が早い時期に生じているが、これは、網膜の萎縮が進行する過程で、まず、形態視（例えば、縞刺激を検出する視覚機能）が障害されたと推測できる。今後、明暗視がどのような時間経過で減衰していくのか、縞刺激を明暗刺激に変化させて学習させることで検討していく予定である。また、脳視覚領野における視覚応答の減衰過程を調べることで、形態視と明暗視を維持するのに必要な視覚情報処理についても明らかにしていきたい。

## 引用文献

1. Girman SV, Wang S & Lund RD. (2003). Cortical visual functions can be preserved by subretinal RPE cell grafting in RCS rats. *Vis. Res.* 43, 1817-1827.
2. Sauve Y, Girman SV, Wang S, Lawrence JM & Lund RD. (2001). Progressive visual sensitivity loss in the Royal College of Surgeons rat: perimetric study in the superior colliculus. *Neuroscience* 103, 51-63.
3. Soma S, Suematsu N & Shimegi S. (2013). Cholinesterase inhibitor, donepezil, improves visual contrast detectability in freely behaving rats. *Behav. Brain. Res.* 256, 362-367.
4. Kimura R, Saiki A, Fujiwara-Tsukamoto Y, Ohkubo F, Kitamura K, Matsuzaki M, Sakai Y & Isomura Y. (2012). Reinforcing operandum: rapid and reliable learning of skilled forelimb movements by head-fixed rodents. *J. Neurophysiol.* 108, 1781-1792.
5. Morimoto T, Fujikado T, Choi J-S, Kanda H, Miyoshi T, Fukuda Y & Tano Y. (2007). Transcorneal electrical stimulation promotes the survival of photoreceptors and preserves retinal function in royal college of surgeons rats. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 48, 4725-4732.

# マウスオペラント行動システムを用いた視覚時間特性の評価手法の確立

○横田理<sup>1,3</sup>・三田純平<sup>2,3</sup>・生田昌平<sup>2,3</sup>・野村悠一郎<sup>3</sup>・内田大地<sup>3</sup>・竹内昌平<sup>5</sup>・天野晃<sup>2,4</sup>・下ノ村和弘<sup>5</sup>・小池千恵子<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>立命館大学総合科学技術研究機構・<sup>2</sup>立命館大学大学院生命科学研究科・<sup>3</sup>立命館大学薬学部・<sup>4</sup>立命館大学生命科学部、<sup>5</sup>立命館大学理工学部)

[s-yokota@fc.ritsumei.ac.jp](mailto:s-yokota@fc.ritsumei.ac.jp), [koike@fc.ritsumei.ac.jp](mailto:koike@fc.ritsumei.ac.jp), <http://www.ritsumei.ac.jp/pharmacy/koike/koikelab/Home.html>

Key words: 視覚時間特性、マウス、オペラント行動

## 目的

私たちは、光が ON-OFF を繰り返す不連続光を見ると、「ちらつき」として認識する。このちらつきの頻度が多くなっていくと、ついには融合して、もはやちらつきを感じることができなくなる。このときの頻度をフリッカーフォーカス（Critical fusion frequency: CFF）と呼び、CFF を測定することにより時間分解能を簡便に評価することができる。

視覚系の時間特性を評価する方法としては CFF や時間周波数特性の測定が挙げられる。時間周波数特性は、各周波数において、視標を正弦波でちらつかせ、コントラスト（振幅）を変化させ、ちらつきが認識できなくなる最小のコントラストを求める方法である（DeLange, 1958）。しかしながら、複雑な装置と時間を要するため、一般的な臨床応用までには普及していない。一方で、CFF は、一般的に矩形波にて測定される。CFF では、フリッカーライトを形成する視標の輝度は最大か 0 であるため、コントラストは常に 1 に固定された状態で時間特性が評価される。CFF の測定は簡便で、短時間に施行できることが大きな利点である。これら時間特性の評価は視神経障害や緑内障などの眼疾患の早期診断、経過観察に応用されることが期待される。

網膜は、視細胞、双極細胞、神経節細胞などから構成され、整然とした層構造を形成している。網膜には ON 型経路と OFF 型経路が存在し、コントラスト強調に重要な役割を担っている（Wässle, 2004）。一方で、マウスは、遺伝的操作が容易な哺乳動物で網膜の様々な機能欠損モデルが存在する。マウスで視覚時間特性に関する評価手法を構築することができれば、網膜 ON-OFF 経路が視覚時間特性にどのように寄与するのか、そのメカニズムを解明することが可能となる。また、様々な眼疾患モデルマウスを用いて時間特性を評価することで、医療応用への貢献も期待される。しかしながら、マウスで時間特性を評価する手法は確立されていない。そこで本研究では、マウスがちらつきを認識しているか否かを評価する手段として、オペラント行動に着目して評価系の構築を行った。

## 方 法

マウスを 8 週齢で、立命館大学薬学部動物室に搬入し、1 週間の馴化を経て、9 週齢から水制限を開始した。水制限は、1 日 2 時間、水を自由摂取できる環境をマウスに提供した。10 週齢から Pre-Training 1（2 つの視覚刺激のうち、両方とも点灯刺激で両方とも正解とした。正解の際、報酬として水 10  $\mu\text{L}$  をマウスに与えた。）を 3 日間 30 分間実施し、その後、40-60 試行/1 セッションで Pre-Training 2（一方は点灯刺激で正解、他方は消灯で不正解とした）を行った。この段階で、オペラント行動を正常に行える（正答率 80 % を 3 日連続で超えることができる）マウスを Visual Discrimination Task に供した。Visual Discrimination Task として、点灯刺激を正解、4 Hz の点滅刺激を不正解として、マウスが学習できるかを検討した。

なお、本研究における全ての実験は立命館大学動物実験管理者規定に基づき実施された。

## 結 果

水制限を行ったマウスの体重は、制限していないマウスと比較しておよそ 90 % 程度であった。Pre-training を学習できたマウスに点灯と点滅（4 Hz）の識別を学習させたところ、数日間の学習を経て、2 日間以上正答率を 80 % 超えることができた。

## 考 察

Visual Discrimination Task の結果より、正答率が 40 % 付近から 80 % に上昇したことから、マウスが点灯刺激と点滅刺激（4 Hz）の識別（ちらつきの認識）を行える可能性が示唆された。本研究の成果を基に、遺伝子欠損マウスを用いて、視覚時間特性への寄与を詳細に評価していきたいと考えている。

## 引用文献

- DeLange, H (1958) *J Opt Soc Amer.* 48: 777-784.  
Wässle H (2004) *Nat Rev Neurosci.* 5(10): 747-757.

# 両眼相関に基づく奥行き知覚は相対視差に依存する

○青木俊太郎<sup>1</sup>・塩崎博史<sup>1</sup>・藤田一郎<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>大阪大学大学院生命機能研究科、<sup>2</sup>脳情報通信融合研究センター・大阪大学および情報通信研究機構)

s\_aoki@bpe.es.osaka-u.ac.jp, http://cogni.fbs.osaka-u.ac.jp/

Key words: 奥行き知覚、両眼視差、絶対視差と相対視差

## 目的

ヒトは左右の網膜像の位置ずれ（両眼視差）を用いて奥行きを知覚する。脳には多様な視差情報表現が存在する。一次視覚野では、ある視対象が注視点に対して持つ視差（絶対視差）が、両眼網膜像の相関に基づいて符号化されている。高次の視覚野において、ふたつの視対象間の絶対視差の差（相対視差）の表現や、両眼間で輝度コントラスト極性の一致する視対象（対応）に基づく視差符号化が実現される（Review: Parker, 2007）。絶対視差から相対視差への、そして相間にに基づく表現から対応に基づく表現への変換において、どちらの変換が先に行なわれるのか、またそうした変換の中間段階で生じる視差表現が奥行き知覚に寄与しているのかについては、明らかではない。

両眼相関に基づいた視差表現は、片眼像の輝度コントラストを反転させて負の両眼相関を持たせたランダム・ドット・ステレオグラム（輝度反転ランダム・ドット・ステレオグラム：aRDS）の視差を符号化し、視差から定義される奥行きと反対の方向に奥行き知覚を引き起こす（Tanabe et al., 2008）。本研究では、aRDSに対する反転奥行き知覚が絶対視差と相対視差のどちらに依存しているのかを心理物理学実験により検証することにより、両眼相関に基づく視差表現が相対視差を符号化しているのかを検討した。

## 方法

被験者に、中心部分と周辺部分の2領域で構成されたダイナミックRDSを提示し、周辺部分に対する中心部分の奥行き（手前または奥）を弁別させた。RDSの中心部分はcRDS（左右網膜像の対応するドットが等しい輝度コントラスト極性を持つRDS）かaRDSのいずれかであり、常に0°の絶対視差をあたえた。周辺部分はcRDSで、交差視差（手前視差）と非交差視差（奥視差）のいずれか（-0.32°～0.32°）をあたえた（図1A）。aRDSの絶対視差は0°に固定されているため、奥行き知覚の反転が絶対視差に依存している場合、知覚される奥行きは中心部分の両眼相間に依らないことが予測される。一方、中心・周辺部分間の相対視差は非ゼロであり、中心・周辺部分間に手前・奥の奥行きが定義されるため、奥行き知覚の反転が相対視差に依存している場合、aRDSに対して反転

した奥行きを知覚することが予測される。

## 結果

被験者の奥行き判断は、中心aRDS条件のとき、中心cRDS条件と比べて逆転する傾向を示した。すなわち、中心aRDS条件のとき被験者は、周辺部分に交差視差があたえられた刺激に対して中心が周辺よりも手前であると判断し、また周辺部分に非交差視差があたえられた刺激に対して中心が周辺よりも奥であると判断した。中心aRDS条件において、8人中7人の被験者はチャンス・レベルより低い正答率、つまり視差から定義されるのとは反対の奥行き判断を示した（図1B）。

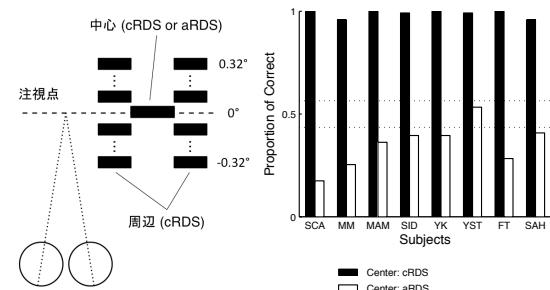


図1: (A) 刺激の構成。(B) 各被験者の正答率。

## 考察

隣接する面の相対的な奥行きを弁別する際、絶対視差で定義される奥行きの反転が生じないような条件においても、ヒトはaRDSに対する反転奥行き知覚を示した。したがって、aRDSに対して知覚される奥行きの反転は相対視差に依存していると考えられる。初期視覚野にある両眼相間にに基づく絶対視差の表現が、両眼対応に基づく視差表現に変換される前に、相対視差の表現へと変換されること、そしてその結果生じる両眼相間にに基づいた相対視差の表現が奥行き知覚に寄与していることが示唆される。

## 引用文献

- Parker (2007) Binocular depth perception and the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8:379-391.  
Tanabe, Yasuoka, Fujita (2008) Disparity-energy signals in perceived stereoscopic depth. *J Vis* 8(3):22.1-10.

## **主催**

視覚科学フォーラム

## **当番校**

前橋工科大学

## **ランチョンセミナー共催**

バイエル薬品株式会社

参天製薬株式会社

## **後援**

群馬県眼科医会

NPO 法人 バイオフォーラム

NPO 法人 ワイアレス・ブレイン・ネットワーク

公益財団法人 前橋観光コンベンション協会

前橋発明協会

## **プログラム委員会**

委員長 前橋工科大学 今村 一之

委員 前橋工科大学 本村 信一

委員 明治薬科大学 中館 和彦