

分子生理研究部門

○器官調節分野

林基治・目片文夫・大石高生・清水慶子

<研究概要>

A) 霊長類脳内生理活性物質—分布特性と発生・発達・加齢

林基治・森琢磨(大学院生)・託見健(大学院生)・
伊藤麻里子(日本学術振興会特別研究員) 清水慶子

1) マカクサル小脳における BDNF とその受容体 (TrkB) の発達動態を酵素免疫測定法とウエスタンブロット法で調べた。その結果、BDNF 量は胎生期から生後 2 ヶ月までに約 3 倍増加し、その後成熟期 (10 才) までほとんど変量しなかった。一方 TrkB の中でチロシンキナーゼを持つ TK+ と持たない TK- は新生児期から成熟期までほぼ同量存在し、さらに生後 3.5 ヶ月において TK+ と TK- 間のダイマー形成様式は成熟期と同じであった。従って BDNF と TrkB の観点から見ると、マカクサルの小脳は、生後約 3 ヶ月において成熟期と同程度に完成されていることが示唆された。

2) マカクサル小脳における BDNF, NT-4/5, NT-3 と NT-3 の受容体 TrkC の分布と発達を免疫組織化学法で調べた。その結果、生後から成熟期まで BDNF はほとんど全ての神経細胞に存在していた。従って BDNF は霊長類の小脳の発達にもっとも重要な神経栄養因子と考えられる。また、新生児期から生後 1 ヶ月のバグマングリア細胞線維に NT-3 の強い免疫活性が認められ、さらに一部の外顆粒層細胞が TrkC 陽性であることから、外顆粒層細胞の内顆粒層への移動に NT-3 と TrkC が関与することが示唆された。

B) イオンチャネルの開閉機構

目片文夫

細胞膜に存在し、細胞内外の電位差の保持の役割をするイオンチャネルの開閉がいかなる機構により行われるかは、現在の電気生理学上の最大の注目点である。本機構の解明のために、パッチクランプ法による平滑筋細胞膜 MaxiK チャネル単一電流の解析を行っている。

C) プロテインキナーゼ C 基質の遺伝子の脳内発現に関する研究

大石高生・林基治

脳の神経伝達に重要な役割を果たす酵素プロテインキナーゼ C の三種類の基質 (GAP-43, MARCKS, neurogranin) の遺伝子発現をマカク属サルの小脳で調べた。GAP-43 遺伝子は分子層、顆粒細胞層、下オリーブ核で強く発現していたが、プルキンエ細胞層や小脳核では発現していなかった。すなわち、小脳からの出力系では GAP-43 遺伝子が発現していなかった。MARCKS 遺伝子は上記全ての部位で発現しており、逆に neurogranin 遺伝子は幼若期の下オリーブ核を除くとほとんど発現していなかった。GAP-43 と MARCKS の遺伝子に関しては小脳皮質内の小葉間で発現量に差があり、前庭小脳に多く発現していた。この遺伝子発現の部域差は幼若期には見られず、成熟期でのみ顕著であった。プロテインキナーゼ基質の遺伝子発現の部域間、細胞間の違いは小脳の各部域、細胞の可塑性など、機能の違いと関わっている可能性がある。

D) MRI を用いた脳画像データベース作成

大石高生

ニホンザルは神経科学における重要な研究対象であるが、大脳皮質を記載した脳アトラスが出版されていない。我々は非侵襲的手法である MRI を用いて、装置やソフトウェアの開発を行いつつ、ニホンザルの大脳を含んだ電子的脳アトラスを作成中である。今年度は、2003 年に生まれた二頭を一ヶ月おきに霊長類研究所で、2001 年に生まれた二頭を三ヶ月おきに産業技術総合研究所で撮影し、データを蓄積した。撮影には、小型コイル用頭部固定装置を新たに開発し、使用した。

E) 霊長類の生殖リズムの発現に関する研究

清水慶子・伊藤麻里子（日本学術振興会特別研究員）・林基治

1) 各種霊長類の成長に伴う性腺系の変化および季節繁殖リズムの発現機構を知る目的で、視床下部-下垂体-性腺系に着目し、胎生期から性成熟に達するまでの血中生殖関連ホルモン動態を調べた。本年度はマカクザルにおいて、繁殖期、妊娠期のインヒビン A 及び B とアクチビンの血中動態を調べ、生殖リズムの発現への関わりについて調べた。さらにレプチンと季節繁殖との関連について検討をおこなった。また、併せて視床下部、下垂体、性腺、胎盤の組織学的解析を行った。

2) マカクザルおよび類人猿の尿、糞中プロゲステロン及びエストロゲン、テストステロン、コルチゾールに加え、尿中 mCG, FSH の測定系を開発した。ついでヒトとマカク、類人猿のホルモン動態を調べ、その比較を行った。

3) メスマカクザルの育児行動や母子間関係と生殖関連ホルモン動態、また、オスマカクザルの社会関係と生殖関連ホルモン動態を調べ、ホルモンと行動との連関を検討した。

4) マカクザル脳、性腺におけるステロイドレセプターの局在を免疫組織化学的に調べた。血中内分泌動態と合わせ、マカクザルの内分泌系の特徴を検討した。

5) マカクザルにおける血中グレリンの分泌動態およびその役割について内分泌学的、組織学的、分子生理学的に調べた。

F) 内分泌攪乱物質と生殖生理

清水慶子・伊藤麻里子（日本学術振興会特別研究員）・林基治

内分泌攪乱物質の一種といわれる植物性エストロゲン様物質がマカクザルの生殖リズムおよび胎児発育に及ぼす影響について内分泌学的、分子生理学的に調べた。

G) 内分泌攪乱物質によるインヒビン分泌の変化

伊藤麻里子（日本学術振興会特別研究員）・清水慶子・林基治・竹中修（遺伝子情報分野）

成熟アカゲザル（オス）に内分泌攪乱物質の 1 つであるジエチルstilbestrol を投与し、精子形成の指標となるインヒビン B の分泌について調べた。

H) 老齢ザルの認知機能に関する行動的評価と神経変性の検討

久保（川合）南海子（非常勤研究員）・林基治

加齢にともなう行動現象の変化とそれを担う脳神経などの変性について、老齢ザルと若齢ザルを対象に検討した。空間記憶や学習セットの形成、長期記憶などを調べる認知課題をおこなった後、灌流固定して大脳・小脳の標本を採取した。

<研究業績>

◇原著論文

- 1) Bardi, M., Shimizu, K., Barrett, G., Borgognini-Tarli, S., Huffman, M. (2003) Peripartum cortisol levels and mother-infant interactions in Japanese macaques. *American Journal of Physical Anthropology* 120(3): 298-304.
- 2) Bardi, M., Shimizu K., Barrett, G., Borgognini-Tarli, S.M., Huffman, M. (2003) Peripartum Sex Steroid Changes and Maternal Style in Rhesus and Japanese Macaques. *General and Comparative Endocrinology* 133: 323-331.
- 3) Bardi, M., Shimizu, K., Barrett, G., Huffman, M., Borgognini-Tarli, S. (2003) Differences in the endocrine and behavioral profiles during the peripartum period in macaques. *Physiology and Behavior* 80: 185-194.
- 4) Bardi, M., Shimizu, K., Borgognini-Tarli, S.M. (2003) Mother-infant relationships and maternal estrogen metabolites changes in macaques (*Macaca fuscata*, *M. mulatta*). *Primates* 44: 91-98.
- 5) Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., Hayashi, M. (2003) Cell type- and region-specific expression of protein kinase C-substrate mRNAs in the cerebellum of the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology* 467(2): 135-149.
- 6) Itoh, M., Kondo, M., Kojima, C., Jin, W., Watanabe, G., Taya, K., Hayashi, M., Shimizu, K. (2003) Inhibin B is the major form of inhibin secreted from testes in male Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primates* 44: 253-257.
- 7) Kondo, M., Kishi, H., Kojima, C., Jin, W., Suzuki, J., Shimizu, K., Itoh, M., Ohkura, S., Tsukamura, H., Maeda, K., Watanabe, G., Taya, K. (2003) Lactation-associated infertility in Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*) during the breeding season. *Zoo Biology* 22: 65-76.
- 8) Kondo, M., Kojima, C., Watanabe, G., Shimizu, K., Itoh, M., Udonon, T., Taya, K. (2003) Endocrinologic comparison of activin A secretion during pregnancy and early lactation in Japanese monkeys, Chimpanzees, and Humans. *Endocrine* 22(3): 239-243.
- 9) Matsumoto-Oda, A., Oda, R., Hayashi, Y., Murakami, H., Maeda, N., Kumazaki, K., Shimizu, K., Matsuzawa, T. (2003) Vaginal fatty acids produced by chimpanzees during menstrual cycles. *Folia Primatol* 74: 75-79.
- 10) Ohira, K., Hayashi, M. (2003) Expression of TrkB subtypes in the adult monkey cerebellar cortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 25: 175-183.
- 11) Ohira, K., Funatsu, N., Nakamura, S., Hayashi, M. (2004) Expression of BDNF and TrkB receptor subtypes in the postnatal developing Purkinje cells of monkey cerebellum. *Gene Expression Patterns* 4: 257-261.
- 12) Shimizu, K., Udonon, T., Tanaka, C., Narushima, E., Yoshihara, M., Takeda, M., Tanahashi, A., van Elsacker, L., Hayashi, M., Takenaka, O. (2003) Comparative study of urinary reproductive hormones in great apes. *Primates* 44: 183-190.

◇総説

- 1) 久保 (川合) 南海子 (2003) 老齡ザルにおける学習と記憶 老化によって失うものと現れてくること . *行動科学* 42 (2): 77-88.
- 2) 清水慶子 (2004) 野生動物の生殖内分泌学 「ニホンザルの生殖と内分泌」 . *アニテクス* 16 (2): 19-24.

◇分担執筆

- 1) 林基治 (2003) 霊長類の神経発達と可塑性. “新世紀の精神科治療 6 巻, 認知の科学と臨床” : pp.404, (松下正明等 編) 中山書店, 東京.

◇学会発表等

- 1) Bardi, M., Shimizu, K., Barrett, G., Borgognini-Tarli, S., Huffman, M. (2003) A comparative approach to assess changes in the peripartum sex steroid profiles and maternal behavior in macaques. American Primatological Society (Oct. 2003, Calgary, Canada).
- 2) Fujita, S., Shimizu, K. (2004) Activity, diet, fecal steroids and reproductive parameters in female chimpanzees: Comparisons between Mahale (Tanzania) and Bossou (Guinea). COE 類人猿シンポジウム (Mar. 2004, 京都).
- 3) Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., Hayashi, M. (2003) Developmental changes in the distribution of MARCKS mRNA in the cerebral cortex of the macaque monkeys: molecular basis of high plasticity in the infant brain. 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience (Nov. 2003, New Orleans, USA) Society for Neuroscience, 2003. Online (2003 Abstract Viewer): Program No. 459.6.
- 4) Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., Hayashi, M. (2003) Developmental changes of MARCKS mRNA in the cerebral cortex of the macaque monkeys. 第 26 回 日本神経科学大会 (Jul. 2003, 名古屋) Neuroscience Research 46(Supplement 1): S140.
- 5) Higo, N., Murata, Y., Takao, O., Yamashita, A., Matsuda, K., Hayashi, M. (2004) Rehabilitative training after brain injury induced GAP-43 mRNA expression in the monkey brain: a molecular basis of motor recovery. The 31st NIPS International Symposium: Multidisciplinary Approaches to Sensorimotor Integration — Old Questions Meet New Concepts — (Mar. 2004, 岡崎).
- 6) Kubo-Kawai, N. (2003) Age-related changes in cognition; Behavioral compensations in positional learning and memory by aged monkeys. COE International Symposium, (Sep. 2003, 京都).
- 7) Mori, T., Hayashi, M. (2003) Age-related changes in neurotrophins in the macaque brain. 第 80 回日本生理学会大会 (Mar. 2003, 福岡). The Japanese Journal of Physiology 53(Supplement): S298.
- 8) Mori, T., Hayashi, M. (2003) Quantitative analysis of neurotrophin in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of aged macaques. 第 26 回日本神経科学大会 (Jul. 2003, 名古屋). Neuroscience Research 46(Supplement 1): S171.
- 9) Oishi, T. (2004) Use for Scientific Research of Brains Retrieved from Chimpanzees Which Died in the Zoo. The first HOPE International workshop: Evolutionary neighbors: from genes to mind (Mar. 2004, 京都).
- 10) Shimizu, K., Uono, T., Tanaka, C., Narushima, E., Yoshihara, M., Takeda, M., Tanahashi, A., van Elsacker, L., Hayashi, M., Takenaka, O. (2003) Non-invasive measurements of reproductive cycle in non-human primates. 4th European Conference of Mammalogy (Jul. 2003, Brno, Czech Republic).
- 11) Shimizu, K., Itoh, M., Takumi, K., Mori, T., Hashida, S., Kimura, N., Katakami, H. (2003) Ghrelin in macaque monkeys: tissue localization, dynamics and source of circulating ghrelin in both plasma and cerebrospinal fluid. 8th International Pituitary Congress (Jun. 2003, New York, U.S.A.).
- 12) Takumi, K., Mori, T., Shimizu, K., Hayashi, M. (2003) Changes in distribution of neurotrophins in monkey cerebellum during development. 第 80 回日本生理学会大会 (Mar. 2003, 福岡). The Japanese Journal of Physiology 53(Supplement): S298.

- 13) Takumi, K., Mori, T., Shimizu, K., Hayashi, M. (2003) Developmental changes in concentrations and distributions of neurotrophins in the cerebellum of macaque monkeys. Society for Neuroscience (Nov. 2003, New Orleans, USA) Society for Neuroscience, 2003. Online (2003 Abstract Viewer): Program No. 38.8.
- 14) 足立幾磨, 桑畑裕子, 藤田和生, 石川悟, 友永雅己, 加藤朗野, 釜中慶朗, 清水慶子, 松沢哲郎 (2003) マカクザル乳児における生物的運動の知覚. 日本心理学会第 67 回大会 (2003 年 9 月, 東京). 発表論文集: 761.
- 15) 藤田志歩, 清水慶子 (2003) チンパンジーのメスにおける生殖生理学的特徴と活動パターン: マハレとボソウの比較. 第 19 回日本霊長類学会大会 (2003 年 6 月, 仙台).
- 16) 古市剛史, 橋本千絵, 清水慶子 (2003) ボノボの雌雄の交尾に対する態度の違いと性周期の関係について. 第 19 回日本霊長類学会大会 (2003 年 6 月, 仙台).
- 17) 伊藤麻里子, 清水慶子, 林基治, 児嶋千尋, 渡辺元, 田谷一善 (2003) オスマカクサル精巣における内分泌攪乱物質の影響. 第 19 回日本霊長類学会大会 (2003 年 6 月, 仙台).
- 18) 伊藤麻里子, 清水慶子, 託見健, 森琢磨, 林基治, 竹中修 (2003) 内分泌攪乱物質がオスマカクサル内分泌機能に及ぼす影響 その 1: 組織学的検索. 第 30 回日本神経内分泌学会 第 18 回日本下垂体研究会 (2003 年 9 月, 横浜).
- 19) 片上秀喜, 清水慶子, 奈須和幸, 橋本務, 大橋京子, 橋田誠一, 木村伯子 (2003) アカゲザルの Ghrelin の cloning, 組織濃度, 局在と成長ホルモンとの相関. 第 30 回日本神経内分泌学会・第 18 回下垂体研究会 (2003 年 9 月, 横浜).
- 20) 久保 (川合) 南海子, 中村克樹 (2003) 老齢ザルにおける位置探索課題の検討 反応系列と選択ルートからの分析から. 第 67 回日本心理学会大会 (Sep. 2003, 東京).
- 21) 久保 (川合) 南海子 (2003) 老齢ザルの位置再認における付加手がかりの効果. 日本動物心理学会第 63 回大会 (Nov. 2003, 筑波) 動物心理学研究 63(2): 90.
- 22) 清水慶子, 託見健, 橋田誠一, 大橋京子, 片上秀喜 (2003) ニホンザルにおける血中グレリンの分泌動態 (1): 食物投与による血中濃度の変化. 第 76 回日本内分泌学会学術総会 (2003 年 5 月, 横浜).
- 23) 清水慶子, 伊藤麻里子, 託見健, 森琢磨, 奈須和幸, 橋本務, 木村伯子, 片上秀喜 (2003) マカクザルにおける血中および髄液中グレリン分泌動態とその分泌源. 第 30 回日本神経内分泌学会・第 18 回下垂体研究会 (2003 年 9 月, 横浜).
- 24) 清水慶子, 鶴殿俊史, 田中ちひろ, 成島悦雄, 吉原正人, 竹田正人, 棚橋篤, van Elsacker, L., 林基治, 竹中修 (2003) 尿中ホルモン動態から見た類人猿の繁殖特性. 第 19 回日本霊長類学会大会 (2003 年 6 月, 仙台).
- 25) 清水慶子, 伊藤麻里子 (2003) 植物性エストロゲン様物質が霊長類の神経内分泌機能に及ぼす影響. 2003 年特定研究班会議 (2003 年 7 月, 札幌).
- 26) 劉成淑, 平井啓久, 平井百合子, 竹中修, 清水慶子, 伊藤麻里子, 野瀬俊明 (2003) ニホンザルの生殖細胞における VASA 発現. 分子生物学会大会 (2003 年 12 月).

◇講演

- 1) Hayashi, M. (2003) Neurotrophins and their receptors in the developing monkey cerebral cortex. 理化学研究所脳科学総合研究センターセミナー (Jun. 2003, 和光).
- 2) 林基治 (2003) 霊長類の脳にみる神経発達と加齢の分子基盤. 第 35 回 脳の医学・生物学研究会 (2003 年 7 月, 名古屋).

- 3) 林基治 (2003) 霊長類の脳にみる神経発達と加齢の分子基盤. 慶応義塾大学21世紀人文科学COEプログラム (2003年12月, 東京).

○遺伝子情報分野

竹中修・平井啓久・中村伸・浅岡一雄

<研究業績>

A-1) タンザニアに生息するチンパンジーの遺伝的変異の研究

田代靖子 (日本学術振興会特別研究員)・田中 (上野) 寛子 (非常勤研究員)・竹中修
タンザニアで採集したチンパンジーの非侵襲的資料を用いて, 個体群間・個体群内の遺伝的変異を分析した. また, ヒトDNAが混入した試料を分析する方法を開発した.

A-2) DNA分析による大型類人猿の地域変異性

竹中修・田中 (上野) 寛子 (非常勤研究員)・水野徳子 (技術補佐員)
体毛糞などの非侵襲的な試料を用いミトコンドリア D-Loop の解析を進めた. 対象はコンゴ民主共和国カフジ群とイテベロ群である. ハプロタイプからこれらの両群ではメスの遺伝的交流がまれであることが解った.

A-3) MHC 遺伝子解析によるニホンザルの繁殖構造の解明

田中 (上野) 寛子 (非常勤研究員)・竹中修
ニホンザルの配偶者選択と主要組織適合性抗原複合体 (MHC) 遺伝子型多型との関係を明らかにする目的で, MHC 遺伝子を分析した.

B-1) 霊長類の染色体進化に関する研究(1) チンパンジーのゲノム不毛地帯 (RCRO) の特性

平井啓久・松林清明 (人類進化モデル研究センター)
チンパンジーの染色体に, テロメア配列, 次端部反復配列, および転移性反復配列からなる種特異的な複合領域 (RCRO と命名) があることを発見した. 加えて, その領域が与える減数分裂の染色体行動への影響を解析した.

B-2) 霊長類の染色体進化に関する研究(2) ヒトとチンパンジーにおける核小体形成部位の不活性化機構

Zavala-Guillen, A.K. (大学院生)・平井百合子 (技能補佐員)・平井啓久
ヒトとチンパンジーの核小体形成部位 (NOR) の不活性化を比較したところ, ヒトでは rDNA を消失する変異が有意に多く, 一方チンパンジーでは遺伝子の発現抑制の変異が有意に多いことが明らかになった. 遺伝子抑制は DNA のメチル化とヘテロクロマチンの位置効果による遺伝子沈黙によるものであった.

B-3) 霊長類の集団遺伝学的研究(1) アジルテナガザルの亜種分化に関わる総合調査

平井啓久・田中洋之 (集団遺伝分野)・Hery Wijayanto, Dyah Perwitasari-Farajallah (ボゴール農科大学)・平井百合子 (技能補佐員)