

## 分子生理研究部門

### 器官調節分野

林基治 (教授), 大石高生 (助教授),  
清水慶子 (助手)  
國枝匠 (技術補佐員)  
伊藤(大塚)麻里子 (日本学術振興会特別研究員)  
託見健 (大学院生)

### <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, 託見健, 伊藤麻里子, 清水慶子

1) アカゲザル大脳新皮質各領域における BDNF, NT-3, NT-4 の mRNA とタンパク質の発達動態を調べた。その結果, BDNF と NT-3 の発達は一次視覚野, 一次体性感覚野, 一次運動野の方が前頭連合野, 側頭連合野, 頭頂連合野より早かった。一方 NT-4 の遺伝子発現は検出できなかった。以上, ニューロトロフィンの観点から見ると, 学習, 記憶に重要な連合野皮質の発達は, 感覚, 運動皮質よりゆっくりしていることが明らかになった。

2) ニホンザル各脳領域におけるアミロイドタンパク質 (A $\beta$ 40) の免疫陽性構造を調べた。その結果, 29歳の老齢期においては, 前頭連合野, 側頭連合野, 頭頂連合野, 帯状回皮質, 島, 扁桃体に陽性構造が観察されたが, 一次視覚野, 一次体性感覚野, 一次運動野, 海馬体には観察されなかった。一方9歳では調べた脳領域において陽性構造は検出されなかった。近年, A $\beta$ 40 は興奮性シナプス構造タンパク質の分解を引き起こすことが報告されているので, サル脳老化に伴う学習記憶能力の低下は, A $\beta$ 40 による興奮性シナプス伝達の阻害によることが予想された。

3) BDNF 受容体の一種でチロシンキナーゼ欠損型 T1 の機能について, C6 グリオマ細胞を用いて解析した。その結果, BDNF は T1 に結合後, RhoA を介してグリア細胞の形態変化を引き起こすことを発見した。

4) GnRH ニューロンへのシナプス性入力 of 発達にともなう変化を解析するため, 幼若期, 成体のメスアカゲザルの視床下部を用いて, GnRH と各種シナプスマーカーを免疫二重染色し, 共焦点レーザー顕微鏡による撮影, 画像解析を進めた。

#### B) 大脳基底核におけるプロテインキナーゼ C 基質の遺伝子の発現の研究

大石高生, 林基治

プロテインキナーゼ C は脳の神経伝達に重要な役割を果たす酵素である。脳内での発現が知られている代表的な基質は GAP-43, MARCKS, ニューログラニンで, いずれも細胞骨格の調節に関わっている。これら三種のプロテインキナーゼ C 基質の遺伝子発現を大脳基底核で調べた。尾状核, 被殻では MARCKS, ニューログラニンの遺伝子発現が GAP-43 遺伝子発現よりも強く, MARCKS 遺伝子発現細胞の一部でのみ GAP-43 遺伝子発現が見られた。MARCKS 遺伝子は淡蒼球でも強く発現していた。黒質緻密部や大脳皮質の V 層のニューロンと線条体の有棘ニューロン間のシナプスは, GAP-43 がシナプス前部に, ニューログラニンがシナプス後部にあり, 可塑性が高いと推測できる。

#### C) リハビリテーションの脳内機構に関する基礎研究

大石高生, 林基治

中枢神経系に損傷を負った場合には, 損傷の部位と程度に応じて機能が損なわれる。しかし, 適切なリハビリテーションを施せば, 機能はある程度回復する。この現象の脳内メカニズムを明らかにするため, 大脳皮質運動野の限局的損傷による指の麻痺の回復過程を定量的に解析した。精密把握の訓練を行った個体では, 損傷部の大きさによって時間は異なったが, 訓練後 1, 2 ヶ月で運動機能の回復が見られた。回復は示指が先行し, 拇指はそれに遅れた。示指端と拇指端を用いる正常な精密把握が回復するまでには, 示指端と拇指の近位部を用いた代替的な把握が数種類観察された。代替的把握を行っている時期には, 餌を取る成功率は上昇と一時的な下降を繰り返した。一時的な下降は, より精密把握に類似した代替的把握の種類の切替にともなうものであった。脳内の運動皮質以外のどこかに, 精密把握の原型があり, それが再賦活することが回復の基盤になっていると考えられる。

#### 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。我々是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, 2003-5 年に生まれた計六頭を一ヶ月おきに, 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。頭部のサイズか

ら脳のサイズを精度よく推定する指標が作成できた。また、ソフトウェアの改良、撮影データの定量解析を進めた。

#### 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, 託見健, 林基治

##### 1) 「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」

視床下部-下垂体-性腺系に着目し, 各種霊長類の胎生期から性成熟までと閉経期以降の血中生殖関連ホルモン動態を調べた。本年度はレプチンと季節繁殖や性成熟との関連について精査し, 血中レプチン動態には種差, 性差, 季節差および年齢差があることが分かった。また, レプチンの局在を免疫組織化学的に調べたところ, マカクザルの脂肪細胞に多くみられた。

##### 2) 「尿・糞を用いたホルモン動態測定」

これまでに開発した尿・糞中プロゲステロン, エストロゲン, テストステロン, コルチゾールおよび尿中ゴナドトロピンの測定法により, マカクおよびチンパンジーのホルモン動態を調べた。その結果, 尿・糞中ホルモン動態は血中のそれと良く相関し, 本法は野生霊長類や大型類人猿のホルモン測定法として有用であることが分かった。本年は餌付け群ニホンザルおよび類人猿を用い, ストレスと糞および尿中コルチゾール量の関連を調べた。その結果, ストレス負荷により尿中・糞中コルチゾール量が増加することが明らかとなった。

##### 3) 「マカクザルの性腺機能調節における成長因子の役割」

成長ホルモンの内因性分泌促進物質として単離・同定されたグレリンの分泌動態とその分泌源について, 免疫組織化学法および real-time PCR 法を用いて調べた。また, 視床下部 GHRH 産生 neuron と比較検討した。グレリン産生細胞は視床下部には存在せず, 末梢中グレリンの主な分泌源は胃体部であること, グレリンの一次構造は GHRH と同様に種差があることが明らかになった。本年はこれに加え, 成長・発達と末梢血中グレリン量の関係を調べた。

#### F) 霊長類の脳の形態的および機能的性分化の特性

清水慶子, 伊藤麻里子, 託見健, 林基治

様々なステージの妊娠マカクザルに性ステロイドホルモンを投与し, その後に生まれた新生児の脳および性腺の形態的变化を調べた。本年はマカクザルの脳におけるステロイドホルモンレセプターの局在を免疫組織化学法により調べ, さらに血中内分泌動態と合わせ, マ

カクザルの性分化の特性を検討した。

#### G) 内分泌攪乱物質と生殖生理

伊藤麻里子, 林基治, 清水慶子

内分泌攪乱物質の一種である合成エストロゲンや植物エストロゲンが, 成熟期および胎児期のマカクザルの視床下部-下垂体-性腺系にどのような影響を及ぼすかについて, 内分泌学的, 組織学的, 分子生理学的に検討した。

#### < 研究業績 >

##### 原著論文

- 1) Barrett, G.M., Bardi, M., Zavala Guillen, A.K., Mori, A., Shimizu, K. (2006) Regulation of sexual behaviour in male macaques by sex steroid modulation of the serotonergic system. *Experimental Physiology* 91: 445-456.
- 2) Fukuda, T., Shimizu, J., Furuhashi, H., Abe, T., Shimizu, K., Oishi, T., Ogihara, M., Kubota, J., Sasaki, A., Sasaki, K., Azuma, T., Umemura, S. (2005) Overexpression of heat shock proteins in pallido-nigral axonal spheroids of nonhuman aged primates. *Acta Neuropathol* 110: 145-150.
- 3) Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Murata, Y., Matsuda, K., Hayashi, M. (2006) Northern blot and in situ hybridization analyses for the neurogranin mRNA in the developing monkey cerebral cortex. *Brain Research* 1078(1): 35-48.
- 4) Jin, Wz., Arai, K., Shimizu, K., Kojima, C., Itoh, M., Watanabe, G., Taya, K. (2006) Cellular localization of NGF and its receptors trkA and p75LNGFR in male reproductive organs of the Japanese monkey, *Macaca fuscata fuscata*. *Endocrine* 29(1): 155-160.
- 5) Karasawa, N., Hayashi, M., Katayama, K., Mori, T., Shimizu, K., Yamada, K., Nagatsu, I., Iwasa, M., Takeuchi, T., Onozuka, M. (2005) Immunohistochemical analysis of monoaminergic neurons in the brain of the common marmoset, *Callithrix jacchus*. *Acta Histochem. Cytochem.* 38(6): 353-366.
- 6) Mori, T., Takumi, K., Shimizu, K., Oishi, T., Hayashi, M. (2006) Heterogeneity of the developmental patterns of neurotrophin protein levels among neocortical areas of macaque monkeys. *Experimental Brain Research* 171: 129-138.
- 7) Menetti, F., Tohno, S., Tohno, Y., Azuma, C., Moriwake, Y., Satoh, H., Minami, T., Mahakkanukrauh, P., Oishi, T., Hayashi, M. (2005) Age-dependent decreases of

- calcium, phosphorus, sulfur, and zinc in the cardiac valves of monkeys. *Biological Trace Element Research* 106(3): 231-245.
- 8) Murata, Y., Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., Hayashi, M. (2005) Developmental changes in the expression of growth-associated protein-43 mRNA in the monkey thalamus: northern blot and in situ hybridization studies. *Neuroscience* 136(2): 497-507.
  - 9) Nagano, M., Saitow, F., Haneda, E., Konishi, S., Hayashi, M., Suzuki, H. (2005) Distribution and pharmacological characterization of primate NK-1 and NK-3 tachykinin receptors in the central nervous system of the rhesus monkey. *British Journal of Pharmacology* 147: 316-323.
  - 10) Ohira, K., Kumanogoh, H., Sahara, Y., Homma, K.J., Hirai, H., Nakamura, S., Hayashi, M. (2005) A truncated tropo-myosin-related kinase B receptor, T1, regulate glia cell morphology via rho GDP dissociation inhibitor 1. *Journal of Neuroscience* 25: 1343-1353.
  - 11) Ohira, K., Homma, K.J., Hirai, H., Nakamura, S., Hayashi, M. (2006) TrkB-T1 regulates the Rho A signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 867-874.
  - 12) Ohira, K., Shimizu K., Yamashita A., Hayashi M. (2005) Differential expression of the truncated TrkB receptor, T1, in the primary motor and prefrontal cortices of the adult macaque monkey. *Neuroscience Letters* 385: 105-109.
  - 13) Satoh, H., Tohno, S., Azuma, C., Minami, T., Ohishi, T., Hayashi, M., Tohno, Y. (2005) Age-related attenuation in the elements in monkey sino-atrial node. *Biological Trace Element Research* 107: 43-51.
  - 14) Takumi, K., Mori, T., Shimizu, K., Hayashi, M. (2005) Developmental changes in concentrations and distributions of neurotrophins in the monkey cerebellar cortex. *Journal Chemical Neuroanatomy* 30: 212-220.
  - 15) Tohno, S., Tohno, Y., Hayashi, M., Mahakkanukrauh, P., Comsung, R., Azuma, C., Moriwake, Y., Minami, T., Araki, T. (2005) Comparison of calcium accumulation between the arteries of human and monkey. *Biological Trace Element Research* 106: 211-217.
  - 16) Wang, C., Medan, M.S., Shimizu, K., Kojima, C., Itoh, M., Watanabe, G., Taya, K. (2005) Secretion of leptin throughout pregnancy and early postpartum period in Japanese Monkey. *Endocrine* 27(1): 75-81.
  - 17) 大石高生 (2005) 脳の可塑性 (基礎の立場から) サルを使った大脳運動野の破壊後の回復に関する研究. *認知神経科学* 7(3): 206-210.
- 総説
- 1) 大石高生 (2005) 脳の形態と遺伝子. *分子精神医学* 5(4): 386-390.
- 報告
- 1) 林基治 (2006) ドイツ霊長類センター訪問. *NBR Newsletter* 2(3): 5-8.
- 分担執筆
- 1) Hayashi, M. (2006) Spindle neurons in the anterior cingulate cortex of humans and great apes. "Cognitive Development in Chimpanzees" : 64-74, (eds. Matsuzawa, T.et al.) Springer-Verlag Tokyo, Tokyo.
- 学会発表等
- 1) Fujita, S., Sugiura, H., Mitsunaga, F., Shimizu, K. (2005) Hormonal profiles and mating strategy in wild female Japanese macaques. Satellite Symposium of IX International Mammalogical Congress (Aug. 2005, Otaru, Japan).
  - 2) Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Murata, Y., Matsuda, K., Hayashi, M. (2005) EXPRESSION OF PROTEIN KINASE C SUBSTRATE (GAP-43, MARCKS, AND NEUROGRANIN) mRNAs IN THE MONKEY BASAL GANGLIA. 35th annual meeting, Society for Neuroscience (Nov. 2005, Washington D.C., U.S.A.) Abstract for Society for Neuroscience : 517.13.
  - 3) Itoh, M., Takumi, K., Kojima, C., Watanabe, G., Taya, K., Hayashi, M., Takenaka, O., Shimizu, K. (2005) Changes of plasma levels of reproductive hormones in adult macaque male monkeys after oral administrations of Diethylstilbestrol (DES). 38th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (Jul. 2005, Quebec, Canada).
  - 4) Murata, Y., Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., Hayashi, M. (2005) THE RECOVERY OF PRECISION GRIP FOLLOWING THE PRIMARY MOTOR CORTEX DAMAGE IN MONKEY. 35th annual meeting, Society for Neuroscience (Nov. 2005, Washington D.C., U.S.A.) Abstract for Society for Neuroscience : 334.15.
  - 5) Oishi, T., Higo, N., Murata, Y., Yamashita, A., Matsuda, K., Hayashi, M., Nishimura, Y., Seki, K., Isa, T. (2005) EXPRESSION OF GAP-43 AND ITS mRNA IN THE MONKEY MOTOR CORTEX AND SPINAL CORD AFTER DORSOLATERAL LESION OF SPINAL CORD AT C4/C5 LEVEL. 35th annual meeting, Society for Neuroscience (Nov. 2005, Washington D.C.,

- U.S.A.) Abstract for Society for Neuroscience : 784.6.
- 6) Shimizu, K., Itoh, M., Takumi, K., Watanabe, G., Hayashi, M., Taya, K. (2005) Circulating levels of leptin during puberty in Japanese macaques: sex differences and relationship to changes in reproductive hormones. 38th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction (Jul. 2005, Quebec, Canada).
  - 7) Shimizu, K. (2005) Monitoring gonadal functions in non-human primates by means of urinary and fecal steroids. International Symposium on Southeast Asian Primate Research (Oct. 2005, Bangkok, Thailand) The Natural History Journal of Chulalongkorn University Supplement 1: 107.
  - 8) Watanabe, G., Wang, C., Medan, M., Shimizu, K., Kojima, C., Itoh, M., Taya, K. (2005) Secretion of leptin throughout pregnancy and the early postpartum period in the Japanese Monkey (*Macaca fuscata*): Placenta as another potential source of leptin. International Symposium on Southeast Asian Primate Research (Oct. 2005, Bangkok, Thailand) The Natural History Journal of Chulalongkorn University Supplement 1: 113.
  - 9) Karasawa, N., Iwasa, M., Takeuchi, T., Yamada, K., Nagatu, I., Katayama, K., Mori, T., Shimizu, K., Hayashi, M., Onozuka, M. (2005) マーモセット脳内モノアミンニューロンの分布: 免疫組織学的解析. 第28回日本神経科学大会 (2005年7月, 横浜).
  - 10) Hayashi, M., Itoh, M., Shimizu, K., Takumi, K., Mori, T. (2005) マカクサル海馬体における脳由来神経栄養因子(BDNF)免疫構造の発達と老化. 第21回日本霊長類学会大会 (2004年7月, 倉敷) 霊長類学研究 21(Supplement): S8.
  - 11) 伊藤麻里子, 託見健, 森琢磨, 児嶋千尋, 渡辺元, 田谷一善, 林基治, 竹中修, 清水慶子 (2005) 合成エストロゲンがオス成熟マカクサルの内分泌機能に及ぼす影響について. 第21回日本霊長類学会大会 (2005年7月, 倉敷) 霊長類研究 21: S-35.
  - 12) Ohira, K., Funatsu, N., Homma, K., Hayashi, M., Nakamura, S. (2005) 成熟期ラット大脳皮質スライスにおけるチロシンキナーゼ欠損型 TrkB によるアストロサイトの形態制御. 第28回日本神経科学大会 (2005年7月, 横浜).
  - 13) 大石高生 (2005) 脳の可塑性 (基礎の立場から) サルを使った大脳運動野の破壊後の回復に関する研究. 第10回認知神経科学学術集会 (2005年7月, 京都) 認知神経科学 7(2): 118.
  - 14) 大石高生, 松田圭司, 肥後範行, 杉田陽一, 鈴木樹理, 高橋俊光 (2005) ニホンザルの発達にともなう Horsley-Clarke 座標系における脳の移動と成長. 第21回日本霊長類学会 (2005年7月, 倉敷) 霊長類研究 21, suppl.: 100.
  - 15) 清水慶子, 伊藤麻里子, 託見健, 佐藤慎佑, 渡辺元, 田谷一善, 林基治 (2005) マカクザルにおける血中レプチン動態(1)季節繁殖ザルと非季節繁殖ザルの比較. 第21回日本霊長類学会大会 (2005年7月, 倉敷) 霊長類研究 21: S-7.

#### 講演

- 1) Hayashi, M. (2005) Molecular mechanisms of the development and aging in the primate brain -from the viewpoint of neurotrophins-. ドイツ霊長類センターセミナー (Sep. 2005, ゲッチンゲン, ドイツ).