

分子生理研究部門

器官調節分野

林基治 (教授), 大石高生 (准教授), 清水慶子 (助教), 國枝匠 (技術補佐員), 毛利恵子 (技術補佐員), 託見健, 檜垣小百合 (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, 檜垣小百合, 清水慶子

1) マカクサル的大脑皮質では, 加齢に伴いソマトスタチンの遺伝子発現が減少することをすでに報告している (Hayashi, 1997). 今回 32, 35 歳と 8 歳ニホンザルの前頭連合野について, ソマトスタチン免疫活性構造の変化を調べた. その結果, 老齡ザルの前頭連合野において, 変性したソマトスタチン陽性細胞と凝集したソマトスタチン線維構造を観察した. 一方, 8 歳のニホンザルには観察されなかった. 同様の変性したソマトスタチン免疫活性構造は, 8 歳の老齡ツバイの前頭連合野にも認められた.

2) 従来, 老齡ラット, マウス, ウサギの脳内には老人斑は観察されることが知られている. 今回比較神経解剖学的見地から, 老齡 (7-9 歳) のツバイについて, アミロイド β 42 の免疫活性構造が存在するかどうか調べた. その結果, 老齡期では梨状皮質, 海馬台, 中隔野等においてアミロイド β 42 の免疫活性構造が観察されたが, 2 歳の若年期では観察されなかった. ツバイは系統的に霊長類に最も近いほ乳類であり, 1), 2) の研究より, 霊長類の脳老化で認められた現象が, ツバイにも認められることが明らかとなった. このことはまたツバイが, 脳老化研究において有用なモデル動物となることを示唆している. これらの研究は, エバーハルト・フックス教授 (ゲッティンゲン大学) と山下晶子氏 (日本大学) との共同研究である.

3) 免疫組織化学の手法を用いて, GnRH ニューロン周辺のアストロサイトの発達変化を解析した. その結果, GnRH ニューロンの近傍のみならず視床下部後部全体において, 発達にともない GFAP 陽性構造の密度が減少することがわかった. また, GnRH ニューロンの主な投射先である正中隆起においても, 発達にともない GFAP 陽性構造の密度の減少がみとめられた.

4) 閉経にともなう内分泌変化と情動・認知機能に重要な脳部位の組織学的変化の関連を明らかにするため, 閉経モデルとして卵巣摘出处置を施した成熟メスニホンザルの経時採血と脳組織採取をおこなった. 免疫組織化学法により, 海馬や前頭前野 46 野を統制群と比較したところ, 閉経老齡ザルと同様にエストロゲン受容体 ER β の高い発現上昇がみられた. またこれら組織部位における遺伝子発現プロファイルと比較することを目的として, 固定組織切片からの総 RNA の抽出方法を検討した.

B) 大脳皮質運動野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 は脳の情報処理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成体および生後発達期のマカクの大脳皮質運動関連領域で調べた. 発現細胞種に関しては, 三種類全ての遺伝子について錐体細胞で強い発現が見られた. また, 層ごとの発現を比較したところ, 三種類全ての遺伝子について VI 層で最も強く, II 層で最も弱かった. 錐体細胞の多い III 層と V 層を比較したところ, GAP-43 と MARCKS の遺伝子発現は V 層の方が強く, ニューログラニンの遺伝子発現の強度は同程度であった. いずれの遺伝子発現も生後減少したが, GAP-43 とニューログラニンの遺伝子発現は生後発達期に一過性の上昇があった. この結果は, GAP-43 とニューログラニンが皮質脊髓路の遅い発達に関わっていることを示唆する.

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, 精密把握の回復には訓練が必要なこと, 訓練をしないと示指端と拇指の近位部を用いた代替的な把握までしか回復しないことが明らかになった. 精密把握と, 運動野損傷後の機能回復に関わる脳部位を決定するために PET を用いた研究を行っている.

これとは別に, 損傷後の運動機能回復に関する脳内分子メカニズムを明らかにするため, 損傷個体と正常個体で脳内各領域の遺伝子発現にどのような差が出るかの解析に着手している. 手始めに, まず正常個体でマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現解析を行い, 一次運動野, 運動前野背側部および腹側部, 前頭前野の遺伝子発現プロファイルを比較した.

領域間で発現差があった遺伝子が 500 種類弱あり, 一次運動野で最も強く発現している遺伝子が 327 種, 前頭前野で最も強く発現している遺伝子が 146 種であった. 発現プロファイルが最も遠いのは一次運動野と前頭前野で, 運動前野の背側部と腹側部はその中間に位置し, しかもお互いに類似していた.

D) MRI を用いた脳画像データベース作成 大石高生

MRI を用いた, ニホンザル的大脑を含んだ電子的脳アトラスを作成中である. MRI データの三次元化と閲覧のためのソフトウェアをウェブアプリケーション化した. インタフェース, 表示法を大幅に改善したことにより, 同一個体の発達データの比較, 脳内の特定の二点間の距離の測定が容易に行えるようになった.

E) 霊長類の生殖リズムの発現に関する研究

清水慶子, 託見健, 檜垣小百合, 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。本年度はホルモン動態と季節繁殖や性成熟との関連について、さらに性差、種差、年齢差について精査した。また、飼育環境による差を調べるために、屋内個別飼育群、屋外放飼群、野生群での比較をおこなった。その結果、末梢血中レプチン動態には性差、季節差および年齢差があることが分かった。さらに、マカク属サルの中でカニクイザルとニホンザルとで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、マカクザルの脂肪組織にレプチン免疫陽性細胞が多くみられた。また、飼育環境により差のあることが分かった。

2) 「尿・糞を用いたホルモン動態測定」その①: 生殖関連ホルモン

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。本年はこれらに加え、DHEAS の測定法を開発した。本法を用い、野生群、放飼群、屋内個別飼育群のニホンザルの DHEAS 値を比較した。

3) 「尿・糞を用いたホルモン動態測定」その②: ストレス関連ホルモン

より正確な尿・糞中ストレス関連ホルモン測定法を開発した。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ところ、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。

4) 「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、ニホンザルの末梢血中グレリン量を測定し、成長と正の相関が認められることを明らかにした。

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、託見健、檜垣小百合、國枝匠、毛利恵子、林基治

妊娠マカクザルに性ステロイドホルモンを投与し、その後生まれた新生児の脳の発達およびステロイドホルモンレセプターの局在について組織学的に調べた。また同様の方法により生まれた子ザルの母子間行動について出生直後よりビデオ観察をおこない解析した。これらの結果を血中内分泌動態と合わせ、マカクザルマカクザルの性分化の特性を検討した。性ステロイドホルモン投与ザルから生まれた子ザルは対照群のコザルと比較して、一部のサルの脳に形態的な差が認められた。また、行動に有意な差が認められた。

G) 野生動物のホルモン測定法の開発

清水慶子、毛利恵子

糞、尿を用いた生殖関連ホルモンおよびストレス関連ホルモン測定法を開発した。本年度は野生イノシシ、シベットキャット、センザンコウの糞および尿を用いた測定に成功した。現在、同時に収集した行動記録とともに結果を考察している。

<研究業績>

原著論文

- 1) Higo N, Oishi T, Yamashita A, Murata Y, Matsuda K, Hayashi M. (2007) Expression of protein kinase-C substrate mRNA in the motor cortex of adult and infant macaque monkeys. *Brain Research* 1171: 30-41.
- 2) Karasawa N, Hayashi M, Yamada K, Nagatsu I, Iwasa M, Takeuchi T, Uematsu M, Watanabe K, Onozuka M. (2007) Tyrosine hydroxylase (TH)- and aromatic-L-amino acid decarboxylase (AADC)-immunoreactive neurons of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) brain: an immunohistochemical analysis. *Acta Histochemistry and Cytochemistry* 40: 83-92.
- 3) Muroyama Y, Shimizu K, Sugiura H. (2007) Seasonal variation in fecal testosterone levels in free-ranging male Japanese macaques. *American Journal of Primatology* 69(6): 603-610.
- 4) Sato A, Nishimura Y, Oishi T, Higo N, Murata Y, Onoe H, Saito K, Tsuboi F, Takahashi M, Isa T, Kojima T. (2007) Differentially expressed genes among motor and prefrontal areas of macaque neocortex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362(3): 665-669.
- 5) Sato I, Yoshikawa A, Shimizu K, Ishiwari A, Mukai T. (2007) Urinary Prostate-Specific Antigen Is a Noninvasive Indicator of Sexual Development in Male Children. *Journal of Andrology* 28: 150-154.
- 6) Murata Y, Higo N, Oishi T, Yamashita A, Matsuda K, Hayashi M, Yamane S. (2008) Effects of motor training on the recovery of manual dexterity after primary motor cortex lesion in macaque monkeys. *Journal of Neurophysiology* 99: 773-786.
- 7) Nishimura T, Oishi T, Suzuki J, Matsuda K, Takahashi T. (2008) Development of the superlaryngeal vocal tract in Japanese macaques: Implications for the evolution of the descent of the larynx. *American Journal of Physical Anthropology* 135(2): 182-194.

著書 (分担執筆)

- 1) 林基治 (2007) 進化的視点からみた霊長類脳の発達と老化. 「霊長類進化の科学」(京都大学霊長類研究所編) p.271-282 京都大学学術出版会.
- 2) 大石高生 (2007) 中枢損傷によって失われた運動機能の回復. 「霊長類進化の科学」(京都大学霊長類研究所編) p.282-293 京都大学学術出版会.
- 3) 清水慶子 (2007) 霊長類の生殖内分泌現象の特性. 「霊長類進化の科学」(京都大学霊長類研究所編) p.346-360 京都大学学術出版会.

著書 (翻訳)

- 1) 大石高生, 泰羅雅登, 中村克樹 訳 (2007) 第2版 カールソン神経科学テキスト脳と行動. (Carlson

NR.著, Physiology of Behavior, ninth edition) p.757
(第2章担当, 29-69) 丸善株式会社.

その他の執筆

- 1) 清水慶子 (2007) 合成黄体ホルモン製剤を用いたニホンザルの避妊. 大分市高崎山管理委員会 p.19-29.

学会発表

- 1) Funahashi S, Shimizu K. (2007) Primate model of attention deficit/hyperactivity disorders (ADHD). Neuro 2007 (2007/09, yokohama).
- 2) Higaki S, Takumi K, Shimizu K, Hayashi M. (2007) Menopause-related changes in the ER β in the hippocampal formation and entorhinal cortex of aged female Japanese macaques. 第37回北米神経科学学会 (2007/11, San Diego, California).
- 3) Murata Y, Higo N, Oishi T, Yamashita A, Matsuda K, Hayashi M. (2007) Effects of motor training on the recovery of hand movement after lesion of primary motor cortex: what can be recovered and what cannot be recovered. 第37回米国神経科学学会 (2007/11, San Diego).
- 4) Oishi T, Higo N, Yamashita A, Murata Y, Matsuda K, Hayashi M. (2007) Characterization of GAP-43 immunoreactive structures from the viewpoint of neurotransmitters in the anterior horn of the monkey spinal cord. 第37回北米神経科学学会 (2007/11, San Diego, USA).
- 5) Shimizu K, Asaba S, Takenoshita Y. (2007) Contraception for population control in nonhuman primates. The Joint Meeting of the 3rd Meeting of Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP), Association of Asian Veterinary Schools (AAVS), and the 2nd Asian Conservation Medicine/Wildlife Pathology Workshop (ASZWM) (2007/08, Taipei, Taiwan).
- 6) Higaki S, Takumi K, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M. (2008) Menopause-related changes of the ER β immunoreactivity in the hippocampal formation of aged female Japanese macaques. The 1st International Symposium of the Biodiversity Global COE Project (2008/03, Kyoto).
- 7) 林基治, 山下晶子, 泰羅雅登, Fuchs E. (2007) 成熟期と老齢期のツパイ海馬体における BDNF と TrkB の免疫陽性構造. 第23回日本霊長類学会大会 (2007/07, 彦根).
- 8) 檜垣小百合, 託見健, 清水慶子, 林基治 (2007) 閉経ニホンザルの海馬体におけるエストロゲン受容体 ER β の発現変化. 第23回日本霊長類学会大会 (2007/07, 彦根).
- 9) 岩永飛鳥, 王光敏, 杉原一司, 託見健, 檜垣小百合, 清水慶子, 林基治, 浅野雅秀, 善岡克次 (2007) 精子形成過程における足場タンパク質 JLP の機能解析. 第30回日本分子生物学会年会 (2007/12, 横浜).
- 10) 唐沢延幸, 林基治, 森琢磨, 清水慶子, 山田敬喜, 小野塚実 (2007) マーモセット GABA ニューロンの免疫組織化学的解析. 第30回日本神経科学大会 (2007/09, 横浜).
- 11) 川村誠輝, 藤田志歩, 竹ノ下祐二, 安藤智恵子, 清水慶子, 中尾敏彦, 西田利貞 (2007) 野生ゴリラお

よびチンパンジーにおける定量的ストレス評価としての糞中コルチゾール濃度測定系の検討. 第23回日本霊長類学会大会 (2007/07, 彦根).

- 12) 松田圭司, 大石高生, 肥後範行 (2007) Web アプリケーションを用いた MRI 脳画像データベース. 第30回日本神経科学大会 (2007/09, 横浜).
- 13) 大石高生, 肥後範行, 山下晶子, 村田弓, 西村幸男, 松田圭司, 林基治, 伊佐正 (2007) 脊髄運動系における GAP-43 免疫陽性構造. 第1回 Motor Control 研究会 (2007/06, 岡崎).
- 14) 清水慶子, 伊藤麻里子, 託見健, 檜垣小百合 (2007) マカクザル胎生期のアンドロゲン曝露. 特定領域研究「性分化機構の解明」第4回領域会議 (2007/10, 掛川).
- 15) 清水慶子, 伊藤麻里子, 託見健, 渡辺元, 林基治, 田谷一善 (2007) マカカ属サルにおける生殖関連ホルモン動態の季節変動. 第23回日本霊長類学会大会 (2007/07, 彦根).
- 16) 下嶋典子, Garhwan H, 清水慶子, 羽竹勝彦, Geraghty DE, 石谷昭子 (2007) 旧世界ザルにおける HLA-G, HLA-F ホモログの発現. 第16回日本組織適合性学会大会 (2007/09, 京都).
- 17) 託見健, 伊藤麻里子, 清水慶子, 林基治 (2007) メスニホンザルにおける血中 IGF-1 の季節変動. 第23回日本霊長類学会大会 (2007/07, 彦根).
- 18) 山下晶子, 清水慶子, Fuchs E, 林基治, 泰羅雅登 (2007) 老齢マカクサルとツパイ前頭皮質におけるソマトスタチン陽性変性構造. 第30回日本神経科学大会 (2007/09, 横浜).
- 19) 藤田志歩, 杉浦秀樹, 清水慶子 (2008) 野生ニホンザルの交尾行動—メスの配偶者選択とオス間競合—. 日本生態学会第55回全国大会 (2008/03, 福岡).
- 20) 村田弓, 肥後範行, 西村幸男, 大石高生, 塚田秀夫, 伊佐正, 尾上浩隆 (2008) 第一次運動野損傷後にみられる巧緻動作中の脳活動の変化-PET を用いた成体サルにおける研究-. 第85回日本生理学会大会 (2008/03, 東京).

講演

- 1) 林基治 (2007) 霊長類脳の発達老化を分子レベルから探る. 第18回作業療法関連科学研究会学会特別講演 (2007/06, 金沢).
- 2) 大石高生 (2007) 神経系の進化と発達. 岡山理科大学生物地球システム談話会 (2007/04, 岡山).
- 3) 大石高生 (2007) サルからヒトを考える-ヒトの脳, サルの脳, コンピュータ-. わくわくおとな塾 (2007/09, 可児).
- 4) 清水慶子 (2008) 母と私の先の見えない日々-. 第58回京都大学女性教員懇話会研究会・講演会 (2008/03, 京都).