

『研究方法論基礎』 A-8-1

題 目 遺伝子解析 I Gene Analysis I

担当教員 伊藤佐智夫・大内田 守

講義目標

遺伝子，特にヒトの遺伝子を中心としてその分離法，解析法全般，遺伝子発現解析法，遺伝子異常解析法などを講義する。学部学生時代の講義内容からかなり進展していることや多くを忘れていないかを考慮して，基本的な事項から概説的に解説する。具体例を紹介して実的な応用力や他分野の専攻生でも理解できるだけの知識を体得できることを目指す。

講義内容

(Isolation; Analyses of Structure, Expression and Genetic Alterations)

- ヒト遺伝子のクローニング法，遺伝子ライブラリー構築
- 遺伝子異常の解析法 (Southern 法)
- PCR を用いた遺伝子単離法，RT-PCR による cDNA 単離法
- 遺伝子の塩基配列決定法
- 遺伝子の点突然変異解析法
- 遺伝子多型解析法
- マイクロサテライト遺伝子解析法 (ヘテロ接合性消失-LOH)
- 遺伝子発現量の定量解析法 (Northern 法，定量 PCR 法)
- 遺伝子発現の差異検定法 (Microarray 法)
- 遺伝子発現制御法

予習事項

遺伝子とは何か，クローニングや PCR はなぜ必要か，ヒトゲノムの全容が解明されて何が判ると期待されるか，又その後医学はどうなるか，等について考えておいて欲しい。

参考文献

- ・ 遺伝子の分子生物学 (J. D. Watson et al.,) 第4版, 1987
- ・ Essential 細胞生物学 (B. Alberts et al.,) 中村, 藤山, 松原, 監訳 南江堂, 2011

『研究方法論基礎』 A-8-2

題 目 : 遺伝子解析 II

担当者 : 佐野訓明

講義目標 :

現代医学は多くの分野で遺伝子に基づく知識体系に移行しつつあるため、すべての医療従事者が遺伝子に関する最低限の理解をもつことが求められている。この講義では、遺伝情報の解析に用いられるバイオインフォマティクスの初歩について解説し、受講者に遺伝子の基本概念を理解してもらう。

講義内容 : バイオインフォマティクスの初歩

予習事項 : 生化学, 分子生物学, 細胞生物学の教科書の該当箇所を読んで, 記憶を新たにしておくことが望ましい。

参考文献 :

○Essential 細胞生物学 中村桂子/藤山秋佐夫/松原謙一 監訳 (南江堂) 1999

○ 東京大学バイオインフォマティクス集中講義 高木利久 監修 (羊土社) 2004

インターネット :

○ NCBI HomePage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

GenBank, dbEST, dbSTS など基本的な配列データベースを BLAST, その他のツールで検索できるほか, PubMed, OMIM, UniGene などのデータベース間に有機的なリンクが作っており, BankIt により配列の登録もできる有用なサイト。

○UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>)

解読されている真核生物ゲノムのアノテーション (注釈) をグラフィカルなインターフェイスを用いて公開しているデータベースである。ゲノムの探索を直感的に行う事が可能である。類似のゲノムブラウザとしては, Map Viewer (NCBI, National Center of Biotechnology Information, 米国), Ensembl (EMBL・European Bioinformatics Institute (EBI) and the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), 欧州) などがある。

○ExPASy HomePage (<http://www.expasy.ch/>)

多数のタンパク質構造解析用ツールが用意されている。

できればこれらのサイトにアクセスして, 概略を把握しておいてほしい。

『研究方法論基礎』 A-8-4

題 目 遺伝子工学

担当教員 田澤 大・藤原俊義

講義目標

遺伝子工学的手法を用いた遺伝子の機能解析、遺伝子診断、遺伝子治療の基礎を学び、癌などの疾患に対する新たな診断法・治療法の開発への応用力を身につける。

講義内容

分子生物学的手法の急速な進歩に伴い、全世界的なヒトゲノム計画によってヒトゲノムの全塩基配列が明らかとなった。近年、癌などの疾患における遺伝子の機能異常やタンパク質をコードしない低分子 RNA の関与が次第に明らかとなり、遺伝子や低分子 RNA を標的とした新たな診断・治療技術の開発が進められている。In vitro や in vivo における遺伝子の機能解析、臨床検体を用いた遺伝子異常の検出、遺伝子導入技術を用いた遺伝子治療の基礎的手法を理解し、新たな遺伝子診断や遺伝子治療につながる開発能力を養成する。

予習事項

特になし

参考書籍

よくわかるゲノム医学（菅野純夫/監、水島-菅野純子、服部成介/著）、羊土社、2011.

『研究方法論基礎』 A-8-5

題 目 変異動物

担当教員 大橋俊孝

講義目標

遺伝子改変動物を作ることが可能となっている。また動物実験のレベルで、目的の遺伝子発現を、他の遺伝子の発現を変化させることなく、停止することが現実化されている。このようなトランスジェニック動物の方法論の概略を把握し、この方法論がどのように利用され、遺伝子の機能、病態の把握、疾患モデル作成その他と関連づけることができるかについて、その倫理性を含めて概念的に理解することを目的とする。

講義内容

- 遺伝子の役割
- 組み替え DNA 技術の発展
- ゲノムと遺伝子
- 細胞への遺伝子導入
- トランスジェニックマウスの作成
- ジーンターゲティングの原理
- ターゲティングベクターの作製
- ES 細胞への遺伝子導入と相同遺伝子組み換え
- 変異マウスの作製
- ジーンターゲティングの実際
- 病気の発症の遺伝的機序

予習事項

遺伝子の構造と転写，翻訳，組み換え，ゲノムのもつ遺伝情報，複製，個体，形質変化

参考文献

- ・ マウスからみた分子医学－遺伝子導入と標的組み換え 山村研一 南江堂，1993
- ・ Guide to techniques in mouse development Wasserman, DePamphilis
Methods in Enzymology, Vol 225, 1992
- ・ 疾患モデルマウス 病因病態解析遺伝子治療へのアプローチ 山村，勝木，相沢編
中山出版，1994
- ・ 考える遺伝学 山村研一 南山堂，1996
- ・ トランスジェニック動物 蛋白質核酸酵素 Vol. 40, No. 14, 1995
- ・ ジーンターゲティングファイル～'97 野田哲生編 実験医学 Vol.40, No. 20, 1996
- ・ マウス胚の操作マニュアル山内，豊田，森，岩倉訳 近代出版 1993
(Manipulating the mouse embryo A laboratory Manual Eds. Hogan, Constantini,
Lacy, Cold Spring Harbor Lab 1986)

『研究方法論基礎』 A-9-1

題 目 細胞機能測定法

担当教員 鵜殿平一郎

講義目標

免疫担当細胞特にT細胞の機能を説明し、その機能解析に必要な検査法を紹介する。

講義内容

1. T細胞の抗原認識機構の解説
2. T細胞, B細胞及び抗原提示細胞の相互作用の解説
3. T細胞機能解析に必要な検査法の解説

予習事項

免疫学の基礎知識が講義を理解する上で必要である。参考文献の指定した章を講義の前に読む事を勧める。

参考文献

免疫生物学。笹月健彦 監訳。南江堂。第1部 1. 免疫学の基礎概念

『研究方法論基礎』 A-9-2

題 目 フローサイトメトリー

担当教員 榮川伸吾・鶴殿平一郎

講義目標

細胞表面には、抗体に認識される多数の抗原蛋白分子が存在する。免疫学の進歩はこれら抗原分子の多様な機能を明らかにしてきた。たとえば、免疫細胞、血液細胞にはその発達過程において個別に発現される特異な抗原分子が多数あり、CD (Cluster of Differentiation) として分類されるこれらの抗原は今や 100 を越える。これらの分子は、はじめは単に細胞の標識分子にすぎなかったが、ここ数年の間にその大部分が細胞固有の機能や細胞間相互作用に重要な機能を持っていることが次々に明らかになって来た。分子生物学にとっても大切な分野である。フローサイトメーターは、抗体を用いてこれらの抗原分子を個別に識別、解析できるように開発された、免疫学、分子生物学の研究に必須の機器である。この講義はこの機器の原理と応用について理解を深める。

講義内容

- ・ フローサイトメーターの原理
- ・ CD 抗原の種類と機能
- ・ 抗体を用いた染色方法
- ・ フローサイトメーターの応用
細胞内蛋白、サイトカインの測定
DNA 染色による細胞周期の測定

予習事項

MHC, TCR, Co-signal receptor, 細胞接着因子などの代表的細胞表面抗原分子について予習しておく。

参考文献

- ・ フローサイトメトリー自由自在：中内啓光 監修，細胞工学別冊，秀潤社，1999
- ・ 現代免疫学（第二版，山村雄一・多田富雄 編）：医学書院，1992
- ・ 免疫学研究法ハンドブック：藤原大美・淀井淳司 編著，中外医学舎，1996
- ・ CD 抗原ハンドブック：右田俊介・高橋信弘 共著，別冊医学のあゆみ，医歯薬出版，1999

『研究方法論基礎』 A-11-1

題 目 心機能解析論

担当教員 入部玄太郎

講義目標

心臓の機能は、循環ポンプ、体液量センサー、内分泌、心理的機能など様々であるが、ここではそのポンプ機能についての歴史的背景、マイルストーン的概念、現状、残された問題点などの理解を深め、心機能を評価する際に計測すべき循環動態変数とそれらの相互連関を良く理解する事を目的とする。

講義内容

Frank の心室圧容積関係、Starling の心臓法則、Sarnoff の心室機能曲線、Guyton の循環平衡、Sonnenblick の V_{max} 、菅の E_{max} と PVA などのマイルストーン的概念の説明、さらに心仕事量、心拍出量曲線、一回仕事量、静脈還流量、収縮期末圧容積関係とその負荷からの独立性、収縮期圧容積面積、前負荷、後負荷などの説明、それらの相互関係等を通じて、心機能を統合的に理解できるように説明する。

予習事項

生理学あるいは循環器病学教科書などの心機能の項を予習しておくこと、講義が分かり易い。

参考文献

- ・ 本郷利憲ほか：標準生理学（第4版）．医学書院，東京，1996 のD．心筋の機械的性質．481－501頁
- ・ 菅弘之，後藤葉一：心臓エネルギー -生理と病態-．中外医学社，東京，1994

『研究方法論基礎』 A-11-2

題 目 神経情報伝達

担当教員 竹居孝二

講義目標

神経細胞は神経終末から神経伝達物質を分泌することによりシナプス伝達を行う。神経研究、特にシナプスの機構を解明するためのさまざまな細胞生物学的な方法について、その多様性と有用性を理解することが本講義の目標である。

講義内容

- ・ 蛍光抗体法
- ・ 免疫電顕法
- ・ 細胞分画法
- ・ 神経培養法
- ・ 単離シナプス（シナプトソーム）を用いた研究方法

予習事項

- ・ 軸索，樹状突起，シナプスなど神経細胞の基本的組織構造
- ・ シナプス伝達機構
- ・ 細胞分画法

参考文献

- ・ 脳・神経研究の進め方（編集・真鍋俊也ほか，羊土社）
- ・ 神経生化学マニュアル（編集・御子柴克彦ほか，羊土社）
- ・ Whittaker, V.P. (1993) Thirty years of synaptosome research. J. Neurocytol.22:735-42.

『研究方法論基礎』 A-11-3

題 目 電気生理学実験法・パッチクランプ法

担当教員 西木禎一

講義目標

【一般目標】

神経細胞あるいは神経回路における神経シグナルの電気生理学的研究手法を理解する。

【到達目標】

- 1) 生体電気信号の発見の歴史的背景を概説できる。
- 2) 膜電位固定法の原理の概要を説明できる。
- 3) パッチクランプ法の概要を説明できる。
- 4) 電気生理学実験法によって得られたデータが解釈できる。

講義内容

- ・ 生体電気の見つけと測定歴史的背景
- ・ 膜電位固定法の原理
- ・ 膜電位固定法による活動電位発生機構の解明
- ・ パッチクランプ法の原理
- ・ パッチクランプ法によるイオンチャネルの解析
- ・ パッチクランプ法によるシナプス伝達機構の解明

予習事項

- ・ 細胞膜を挟んだ物質の能動輸送と受動輸送について理解しておく。
- ・ イオンチャネルの構造と機能について理解しておく。
- ・ 神経細胞の構造と機能について理解しておく。
- ・ 静止電位が発生する仕組みについて理解しておく。
- ・ 活動電位が発生する仕組みについて理解しておく。
- ・ シナプス伝達の機序について理解しておく。

参考文献

- ・ Neuroscience (4th edition, Purves D et al., eds,) Sinauer Associates Inc, 2008
- ・ Single-channel recording (2nd edition, Sakmann B and Neher E eds) Springer, 2009
- ・ パッチクランプ実験技術法 (岡田泰伸編) 吉岡書店, 1996
- ・ 最新パッチクランプ実験技術法 (岡田泰伸編) 吉岡書店, 2011

『研究方法論基礎』 A-11-4

題 目 シミュレーション研究法
Title Method for Simulation Study

担当教員 高橋 賢・成瀬恵治
Lecturer Ken Takahashi・Keiji Naruse

講義目標 医学・生物学分野におけるシミュレーションの事例を概観し、シミュレーションの基本的原理を理解する。

Goal Overview the examples of simulation in medicine and biology, and understand the basics of theoretical principles for each example.

講義内容 シミュレーション事例として外科手術シミュレーターなどに応用される有限要素解析、薬物の効果や蛋白質相互作用の解析に用いられる分子動力学シミュレーション、蛋白質立体構造予測などを挙げ、それぞれの基本的原理や実行方法を概説する。

Contents Examples that will be mentioned are finite element analysis applied for surgical simulator, molecular dynamics used for analyzing drug effect and protein interaction, and protein structure prediction. Basic principles and execution methods of each simulation will be discussed.

参考文献

References

Friedel Hartmann, Casimir Katz. Structural Analysis with Finite Element.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.

Available on <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-49702-8> (internal access only)

Michael Griebel, Gerhard Zumbusch, Stephan Knapek. Numerical Simulation in Molecular Dynamics: Numerics, Algorithms, Parallelization, Applications.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007

Available on <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-68095-6> (internal access only)

『研究方法論基礎』 A-11-5

題 目 薬物を用いた生体機能の解析法

担当教員 西堀正洋

講義目標

細胞機能解析のための手段として、種々の受容体作用薬、拮抗薬、酵素阻害薬が実験研究に用いられている。また、プローブとして用いられるものも増えてきている。これらの薬物を有効に利用することの重要性と薬物効果の特異性の問題を、具体例を通じて理解できるようにする。高親和性リガンド(薬物)の標的蛋白について、アフィニティを利用した精製法について述べ、このようにして精製された組換え体蛋白質のX線結晶構造解析による高次構造決定の具体例を紹介する。蛋白-リガンド複合体の結晶構造解析から特異的阻害薬創薬にいたる考え方について理解できるようにする。さらに、中和抗体を用いた疾患標的分子バリデーシオンの例を紹介する。

講義内容

1. 生体機能調節物質としての薬物と実験プローブとしての薬物
2. *in vitro*, *in vivo* 実験における薬物特異性、選択性および使用上の注意点
3. 高親和性リガンド(薬物)を用いた組換え体蛋白質の精製
4. X線結晶構造解析によるヒスタミンNメチル基転移酵素の高次構造決定：阻害薬結合部位と阻害様式の関連性に関する考察
5. 中和抗体を用いた疾患標的分子のバリデーション

予習事項

- ・ 受容体作用薬、拮抗薬の作用様式に関する基本理解
- ・ 可溶性蛋白質の基本構造

参考文献

- ・ 最先端創薬：戦略的アプローチと先端的医薬品，長尾・成宮・加藤・宮本編，蛋白質核酸酵素，45巻，6号増刊，共立出版，2000年
- ・ Introduction to Protein Structure, Branden & Tooze, 蛋白質の構造入門，勝部・松原・松原監修，教育社1996年

『研究方法論基礎』 A-12-1

題 目 神経細胞標識法

担当教員 杉本朋貞

講義目標

神経細胞（ニューロン）は、顕微鏡の視野におさまらない長大な神経突起（軸索）によって、遠く隔たった部位を連絡している。神経解剖学の重要な研究方法に逆行標識法や順行標識法がある。これらの神経標識法（トレーシング法）は、ニューロンの一端から化学物質（トレーサー）を取り込ませ、軸索内をとおって当該ニューロンの他部位に輸送されたトレーサーを組織学的に検出する方法である。ニューロンはその生化学的性質から多様に分類され、その種類によって利用可能なトレーサーが異なる。本講義では、これらトレーサーを使い分けての標識実験を中心に、実例をあげて講義を行う。

講義内容：

1. ニューロンの構造からみたトレーシング法の分類
2. 1次知覚ニューロンの分類
3. 細胞膜表面の構造とトレーサーの選択

予習事項

組織学などの教科書で、ニューロンの構造を理解しておく。

参考文献：

Trigeminal primary projection to the rat brain stem sensory trigeminal nuclear complex and surrounding structures revealed by anterograde transport of cholera toxin B subunit-conjugated and Bandeiraea simplicifolia isolectin B4-conjugated horseradish peroxidase.

Neurosci. Res., 28: 361-371, 1997.

『研究方法論基礎』 A-12-2

題 目 神経組織における細胞タイプの同定法
Detection of Neuronal and Glial Markers

担当教員 寺山隆司

講義目標

神経組織でタンパクや mRNA の発現変化等を検討する際には、その変化が起こっている細胞タイプを同定する必要がある。ニューロンやグリア細胞を標識するには、それぞれ異なる標識物質を使用する。本講義ではこの同定法について具体例をもとに解説する。

講義内容：

- 1 ニューロンとグリア細胞について
- 2 細胞タイプ同定法の具体例

予習事項

特になし

参考文献

Terayama R, Omura S, Fujiwara N, Yamaai T, Ichikawa H, Sugimoto T. Activation of microglia and p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal column nucleus contributes to tactile allodynia following peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 2008; 153: 1245-1255.

Terayama R, Bando Y, Takahashi T, Yoshida S. Differential expression of neuropeptide Y and protease M/neurosin in oligodendrocytes after injury to the spinal cord. *Glia*, 2004; 48:91-101

『研究方法論基礎』 A-12-3

題 目 中枢神経機能の解析法

担当教員 松尾龍二

講義目標

講義目標：中枢神経の機能を理解するためには電気生理学的な解析が不可欠である。電気生理学的手法は絶えず改良されている。とくに本講義では細胞外記録法，細胞内記録法，パッチクランプ法を紹介し，それぞれの方法の適用範囲や将来の可能性について考察する。また，得られたデータの解析法や電気生理学的方法に付随する神経細胞の同定法についても解説する。講義をとおして実験目的に適合する実験デザインを作成するノウハウを養っていただきたい。

講義内容：

1. 中枢神経に適用できる電気生理学的手法の解説
2. 細胞膜の電気生理学的特性とシナプス入力の解析法
3. 蛍光色素を利用した記録細胞の同定法

予習事項

中枢神経の解剖学と神経インパルスの発生機構を理解しておくこと。

参考文献

Principles of neural science, 3rd ed. edited by Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell New York/Tokyo : Elsevier, 1991

『研究方法論基礎』 A-12-4

題 目 自律神経機能の解析法

担当教員 小橋 基

講義目標

自律神経系は、外部環境の変化に適応するために生体の内部環境を一定に維持するよう調節する機能を持つ。これら自律神経の機能を知る上で生きた動物を用いた実験が必要不可欠となる。

本講義では動物実験による解析法と得られた現象の解析・解釈等を、食物の嚥下から胃に貯留されるまでの過程に関与する外来神経と神経ペプチドの中樞作用を実例として講義する。

講義内容

1. 摂食調節中枢と神経ペプチド
2. 胃運動の外来神経調節
3. 摂食亢進ペプチドと食物受入能
4. 嚥下を誘発する神経機構
5. 嚥下と摂食亢進ペプチド

予習事項

自律神経系の解剖と機能について理解しておくこと。

参考文献

内分泌・自律機能調節の生理学，廣重力，佐藤昭夫編，医学書院，1990