神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム

課題番号　11183101

平成11年度～平成16年度

科学研究費補助金　(特定領域研究)研究成果報告書

京都大学図書
1050571061
大森治紀氏寄贈
附属図書館

平成17年5月

研究代表者　大森治紀

(京都大学医学研究科)

目次

はしがき ---- 1
研究組織 ---- 3
交付決定額 ---- 9

研究発表
学会誌への発表総数および主要雑誌別集計 ---- 11
学会誌など ---- 13
口頭発表など ---- 87
出版物など ---- 141

研究成果による工業所有権の出願・取得状況 ---- 154

共同研究 ---- 157

研究成果の報告
研究成果の概要
A01 班 ［神経回路による特徴抽出のメカニズム］(班長：大森治紀) ---- 159
A02 班 ［シナプス可塑性による回路調節］ (班長：澁木克栄) ---- 161
A03 班 [神経回路網形成の分子基盤] (班長：野田 亮) ---- 163
A04 班 [学習と行動の分子メカニズム] (班長：山森哲雄) ---- 165

班員の研究成果報告
研究項目 A01
計画研究
大森 治紀 ---- A01-01
小松 由紀夫 ---- A01-02
立花 政夫 ---- A01-03
小田 洋一 ---- A01-04
平田 たつみ ---- A01-05
公募研究
岡 良隆 ---- A01-06
坪井 昭夫 ---- A01-07
金子 武嗣 ---- A01-08
畠 義郎 ---- A01-09
稲垣 直之 ---- A01-10
川口 泰雄 ---- A01-11
伊佐 正 ---- A01-13
佐藤 宏道 ---- A01-14
大澤 五住 ---- A01-15
宋 文杰 ---- A01-16
佐藤 真(A03) ---- A03-51
辰巳 仁史 ---- A01-18
船橋 新太郎 ---- A01-19
佐々木 成人 ---- A01-21

鍋倉　淳一----A01-22
渡邉　裕二----A01-23
藤田　一郎----A01-24

研究項目 A02
計画研究

澁木　克栄----A02-01
松木　則夫----A02-02
小坂　俊夫----A02-03
狩野　方伸----A02-04
伊藤　誠二----A02-05

公募研究

蔵田　潔----A02-06
田中　光一----A02-07
玉巻　伸章----A02-08
神谷　温之----A02-09
久保　義弘----A02-10
吉村　恵----A02-11
遠藤　昌吾----A02-12
富永　真琴(班友)----A02-13
竹居　孝二----A02-14
八尾　寛----A02-15
久本　直毅----A02-16
岩本　義輝----A02-17
中嶋　義明----A02-18
井上　貴文----A02-19
木村　文隆----A02-20
姜　英男----A02-21
宮田　麻理子----A02-22
井本　敬二----A02-23
高田　昌彦----A02-25
宮本　英七(班友)----A02-26
福田　光則----A02-27
金子　鋭----A02-30
古江　秀昌----A02-31
松崎　政紀----A02-32

研究項目　A03
計画研究

野田　亮----A03-01
白尾　智明----A03-02
能瀬　聡直----A03-03
塩見　健輔----A03-04
広海　健----A03-05
山形　要人----A03-06

公募研究

五十嵐道弘----A03-07
谷口　雅彦（班友）----A03-08
根岸　学----A03-09
山本　亘彦----A03-10
金保　安則----A03-11
崎村　建司----A03-12
齋藤　哲一郎----A03-13
見学　美根子(班友)----A03-14
横田　義史----A03-15
祖父江　憲治----A03-16
加藤　伸郎----A03-17
小椋　利彦----A03-18
竹島　浩----A03-19
広瀬　進----A03-20
野田　昌晴(班友)----A03-21
柳　茂----A03-22
稲垣　忍----A03-23
服部　光治----A03-24
杉原　泉----A03-25
中越　英樹----A03-26
富永　知子----A03-27
中井　淳一----A03-28
岩里　琢治----A03-29
高木　新----A03-30
饗場　篤----A03-31
玉田　篤史----A03-32
東海林　亙----A03-33
水野　健作----A03-34
畑　裕----A03-35
川上　厚志----A03-37
上村　匡(班友)----A03-38
井ノ口　馨(班友)----A03-39
黒田　俊一----A03-40
福嶋　伸之----A03-41
八田　公平----A03-42
中川　真一----A03-43
一色　孝子----A03-44
中村　真----A03-45
塩見　美喜子----A03-46
仲嶋　一範----A03-47
佐甲　靖志----A03-48
一條　裕之----A03-49
栗崎　健----A03-50
佐藤　真(A01)----A03-51

研究項目　A04

計画研究

山森　哲雄----A04-01
八木　健----A04-02
真鍋　俊也----A04-03
尾藤　晴彦----A04-04
森　郁恵----A04-05

公募研究

山口　瞬----A04-06
石原　健----A04-07
岡戸　晴生----A04-08
程　肇----A04-09
塩坂　貞夫----A04-10
渡邉　和忠----A04-12
浜　千尋----A04-13
森　寿----A04-14
萩原　正敏(班友)----A04-15
澤口　俊之----A04-16
飯野　雄一----A04-17
窪田　芳之----A04-18
白澤　卓二----A04-20
曽良　一郎----A04-21
上野　照子----A04-22
少作　隆子----A04-23
加藤　啓子----A04-24
奥谷　文乃----A04-25
西　真弓----A04-26

班友

影山　龍一郎----H-01
椛　秀人----H-02
櫻井　芳雄----H-03
永雄　総一----H-04
長野　哲雄----H-08
後藤由季子----H-14
井ノ口　馨----A03-39
上村　匡----A03-38
宮本　英七----A02-26
富永真琴----A02-13
見学美根子----A03-14
萩原　正敏----A04-15
谷口　雅彦----A03-08
野田　昌晴----A03-21

はしがき

特定領域「神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム」（略称　神経回路）は、平成１１年度に総括班が発足し、実質的には平成１２年度から５年間の研究を行いました。この間、幸いにも多くの先生方の協力を得て、特定領域研究を進めて来る事ができました。今回、この報告書をまとめるに際して、我々がどのようにこの研究領域を捉えて、「神経回路」という特定領域をスタートさせ、現実に研究班を運営して来たのかを記録に残したいと思います。

神経回路は脳の働きを実現している機能単位であると考えられています。従って、特定領域「神経回路」では機能単位としての、神経回路の働きを具体的に理解する事が１つの目標であります。具体的にとは申しましても、一言で説明出来る事ではありませんが、われわれは、神経回路を、様々な分子の機能発現の場である、と捉える事から始めました。すなわち、神経回路は遺伝情報に基づき分子の働きによって形成されますが、１つ１つの神経回路は個体の発達に伴い分化し機能的にも成熟し、特異性が実現され、特異的な機能を持つ多くの神経回路が統合される結果として、システムとしての脳の働きが実現されると考えました。このことは、神経回路を研究の場あるいは研究領域とすることによって、分子的な領域の研究からはじまり、より生理学的なシステムとしての脳の高次機能の理解に至る研究が、連続した流れとして実現出来るのでは無いかと考えて、我々は特定領域「神経回路」を進めて来ました。神経回路に対する、このような考え方を表現したのが、「神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム」という本領域名であります。従いまして、特定領域「神経回路」の理念および目標は、神経回路の働きを理解することによってシステムとしての脳の働きを、分子のメカニズムとして具体的に明らかにしたいということであります。さいわい、多くの研究者の参加を得て、我々が当初予想した以上にさまざまな視点からの研究が加わり、神経回路の働きを明らかにする特定領域研究としての役割を果たすことができたと考えます。

特定領域「神経回路」は A01-A04 の研究項目で構成されています。計画班員は A01, A02, A04 が５名、A03 が６名ですので、計画班員の総数は２１名です。ここに、年度によって異なりますが、６０名ないし７０名の公募研究者に加わって頂き、非常に活発な研究活動を展開してきました。しかしながら、これは当初の予想を遙かに超えた大きな組織でもあり、班会議の運営などに、支障を来した事も事実です。我々は、後でも述べますように、特定領域としてのグループ研究を進める上で、何が最も重要かを考えましたときに、それは研究者相互がお互いのサイエンスに対する理解を深める事であろうと考えました。相互に理解する事で、共同研究を進める場合でもスムースな協力関係が実現できるのに違いないと考えました。そこで、大きな組織をそのままのサイズで運営するのではなく、研究者相互の関心が行き届きやすい、より小さなサブグループを作りました。本来、特定領域内の研究項目がこうしたサブグループに相当する機能を持つのかも知れません。しかし、我々は「神経回路」を構成する４つの研究項目とは無関係に、もっと小さく、標本を同じにする人たちあるいは研究の

手法を同じにするような人たちを小さなグループとしてまとめ、１９のサブグループを作りました。このサブグループを中心に班会議を運営しましたし、多くの共同研究もこうしたサブグループを核に進められてきたものと考えています。
特定領域「神経回路」内では多数の共同研究が行われ、多くの論文が発表されました。具体的な共同研究はこの後の報告書本文中に個々の班員が記載しております。大まかには、マウス、抗体、クローンの提供を始めとして、様々な情報交換、実験手技の伝授などの面で、連携した研究が行われてきました。そうした結果を含めて、特定領域「神経回路」からは、大変に多くの、優れた研究成果が出されましたし、今後大きく展開するような新しい研究の芽生えもありました。たとえば、A01 項目では、行動に密接に関係した神経回路の働きが詳細に解析されました。A02 項目では、新しい脳機能の画像化技術が確立し、これからの様々な応用が楽しみです。A03 項目では、神経回路形成に関わる新しい分子が多数発見されました。A04 項目では、学習と行動の分子メカニズムの解析が進められて来ました。さらに、研究期間内に昇任した研究者も多く、教授への昇任が１６名、助教授への昇任が１０名、沖縄大学院大学先行的研究事業の研究代表者１名等であり、「神経回路」は多くの若手研究者を支援し養成する上でも充分な機能を果たしてきたと思います。
ところで、我々は、「神経回路」という特定領域を、研究費を配分する手段として捉える以上に、オープン・フォーラムとして考えました。すなわち、異なったバックグラウンドを持つ研究者間の情報交換および研究協力を促進することを目的とするオープン・フォーラムであります。こうしたフォーラムを特定領域「神経回路」を中心として形成したいと考えました。そのためには、先に記載しましたように、構成員である班員が相互に研究内容を深く理解する事が大切であると考え、毎年の班会議を運営しました。班会議は、非常にタイトなスケヂュールになりましたが、毎回の班会議では、１つの会場に全班員が集まり、全ての研究発表を聞くというスタイルを続けて参りました。５年が経過した現在では、分野の離れた研究であっても、研究内容を相当に理解出来るようになったのは私だけではないと思います。こうした、研究の相互理解からはじまり、お互いの信頼関係、友好関係も構築されて、我々の求めたオープンフォーラムが有形無形の形で実現されているのが、現在の特定領域「神経回路」であります。こうした、形のない相互理解および信頼がこれからも、個々の班員の研究および人生に大きな財産となる事を確信しております。

平成１７年５月

特定領域「神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム」
領域代表　大森治紀

研究組織

総括班班員

大森治紀	（京都大学・医学研究科・教授）	研究 A01 の計画、領域代表
渋木克栄	（新潟大学・脳研究所・教授）	研究 A02 の計画
野田　亮	（京都大学・医学研究科・教授）	研究 A03 の計画
山森哲雄	（自然科学研究機構・基礎生物学研究所・教授）	研究 A04 の計画
白尾智明	（群馬大学・医学部・教授）	事務担当

評価委員

堀田凱樹	（国立遺伝学研究所・所長）	研究の評価
中西重忠	（京都大学・生命科学研究科・教授）	研究の評価
藤沢　肇	（名古屋大学・理学研究科・教授）	研究の評価
青木　清	（上智大学・理工学部・教授）	研究の評価
三品昌美	（東京大学・医学研究科・教授）	研究の評価
清水孝雄	（東京大学・医学研究科・教授）	研究の評価
吉岡　亨	（早稲田大学・人間科学部・教授）	研究の評価
御子柴克彦	（東京大学・医科学研究所・教授）	研究の評価
津本忠治	（大阪大学・医学研究科・教授）	研究の評価
村上富士夫	（大阪大学・基礎工学研究科・教授）	研究の評価

研究班

研究項目　A01　神経回路による特徴抽出のメカニズム

計画研究

大森　治紀	京都大学医学研究科神経生物学	教授
小松　由紀夫	名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学	教授
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	教授
小田　洋一	名古屋大学大学院生命理学研究科	教授
平田　たつみ	国立遺伝学研究所　脳機能研究部門	助教授

公募研究　平成 12-16 年度班員

岡　良隆	東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻（動物科学）生体情報学研究室	教授
坪井　昭夫	東京大学大学院・理学系研究科・生物化学専攻	助手
金子　武嗣	京都大学大学院医学研究科高次脳形態学	教授
畠　義郎	鳥取大学大学院医学系研究科　機能再生医科学専攻　生体高次機能学分野	教授
稲垣　直之	奈良先端科学技術大学院大学　バイオサイエンス研究科　細胞内情報学講座	助教授
川口　泰雄	自然科学研究機構　生理学研究所	教授

平成 12-14 年度班員

金子　章道	慶応義塾大学医学部生理学	教授
伊佐　正	自然科学研究機構　生理学研究所　認知行動発達機構	教授

	平成 13-14 年度班員	
佐藤　宏道	大阪大学健康体育部	教授
	平成 13-16 年度班員	
大澤　五住	大阪大学大学院生命機能研究科　脳神経工学講座	教授
	平成 12,15-16 年度班員	
宋　文杰	大阪大学大学院工学研究科電子工学専攻	助教授
	平成 12 年度班員	
佐藤　真	福井大学医学部形態機能医科学講座　組織細胞形態学・神経科学領域（平成 14-15 年度 A03）	教授
辰巳　仁史	名古屋大学医学部第二生理（大学院医学研究科細胞科学）	助教授
船橋　新太郎	京都大学大学院人間・環境学研究科認知・行動科学講座認知科学分野	教授
宮川　博義	東京薬科大学 生命科学部 生体高次機能学研究室	助教授
佐々木　成人	(財)東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所・システム生理	参事研究員
鍋倉淳一	自然科学研究機構　生理学研究所　生体恒常機能　発達機構	教授
渡邉　裕二	東北大学大学院生命科学研究科脳構築分野	助手
	平成 15-16 年度班員	
藤田　一郎	大阪大学大学院生命機能研究科	教授

研究項目　A02　シナプス可塑性による回路調節

計画研究

澁木　克栄	新潟大学脳研究所システム脳生理学分野	教授
松木　則夫	東京大学大学院薬学系研究科・薬品作用学教室	教授
小坂　俊夫	九州大学大学院医学研究院基礎部門	教授
狩野　方伸	金沢大学大学院　医学系研究科　シナプス発達・機能学　研究分野	教授
伊藤　誠二	関西医科大学医化学教室	教授

公募研究

	平成 12-16 年度	
蔵田　潔	弘前大学医学部生理学教室	教授
田中　光一	東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究部分子神経科学	教授
玉巻　伸章	熊本大学大学院医学薬学研究部脳回路構造学	教授
神谷　温之	北海道大学大学院医学研究科・神経機能学講座分子解剖学分野	教授
久保　義弘	自然科学研究機構・生理学研究所・神経機能素子研究部門	教授
	平成 12-14 年度	
吉村　恵	九州大学大学院医学研究科統合生理学	教授
遠藤　昌吾	独立行政法人　科学技術振興機構　沖縄大学院大学先行的研究事業　記憶と学習の分子神経生物学ユニット	研究代表者
富永　真琴	自然科学研究機構　岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 細胞生理部門	教授
	平成 13-14 年度	
竹居　孝二	岡山大学大学院医歯学総合研究科生体制御科学専攻脳神経制御学講座	教授
八尾　寛	東北大学大学院生命科学研究科脳機能解析構築学講座脳機能解析学分野	教授
久本　直毅	名古屋大学大学院理学研究科	助教授
岩本　義輝	筑波大学人間総合科学研究科　感性認知脳科学専攻　システム脳科学分野 神経生理学研究室	講師
中嶋　義明	京都大学医学研究科生体情報科学講座	助教授
	平成 13-16 年度	

井上　貴文	東京大学医科学研究所 基礎医科学大部門 脳神経発生・分化分野	助教授
木村　文隆	大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻組織再生医学講座神経統合機能分野	助教授
姜　英男	大阪大学大学院歯学研究科高次脳口腔機能学講座・口腔生理学教室	教授
宮田　麻理子	自然科学研究機構　生理学研究所　神経シグナル部門	助教授
井本　敬二	自然科学研究機構　生理学研究所	教授
籾山　明子	自然科学研究機構・生理学研究所・脳形態解析部門	助手
高田　昌彦	（財）東京都医学研究機構　東京都神経科学総合研究所　統合生理研究部門	副参事研究員
	平成 12-13 年度	
宮本　英七	熊本大学医学部薬理学	教授
	平成 12 年度	
福田　光則	理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット	独立主幹研究員
伊藤　憲一	山形大学医学部生理学第二講座	助教授
武地　一	京都大学大学院医学研究科臨床生体統御医学講座（加齢医学）	助手
金子　鋭	財団法人田附興風会　医学研究所第４研究部	主任研究員
	平成 15-16 年度	
古江　秀昌	九州大学大学院　医学研究院　統合生理学	助手
松崎　政紀	自然科学研究機構　生理学研究所　生体膜研究部門	助手

研究項目　A03　　神経回路網形成の分子基盤

計画研究

野田　亮	京都大学医学研究科分子腫瘍学領域	教授
白尾　智明	群馬大学大学院医学系研究科高次細胞機能学分野	教授
能瀬　聡直	東京大学大学院理学系研究科・物理学専攻	助教授
塩見　健輔	筑波大学・大学院人間総合科学研究科	助手
広海　健	国立遺伝学研究所・発生遺伝 総合研究大学院大学・遺伝学専攻	教授
山形　要人	（財）東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・神経薬理研究部門	部門長

公募研究　平成 12-16 年度

五十嵐道弘	新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能学	教授
谷口　雅彦	東京大学大学院医学系研究科生化学分子生物学講座細胞情報（平成１６年度は班友）	助手
根岸　学	京都大学大学院生命科学研究科・生体システム学分野	教授
山本　亘彦	大阪大学大学院生命機能研究科脳神経工学講座	教授
金保　安則	（財）東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所	部長
崎村　建司	新潟大学脳研究所基礎神経科学部門細胞神経生物学分野	教授
齋藤　哲一郎	京都大学・再生医科学研究所・発生分化研究分野	助教授
	平成 12-14 年度	
見学　美根子	理化学研究所　脳科学総合研究センター神経細胞極性研究チーム	ﾁｰﾑﾘｰﾀﾞｰ
横田　義史	福井大学医学部生命情報医科学講座分子遺伝学領域	教授
祖父江　憲治	大阪大学大学院医学系研究科	教授
	平成 13-14 年度	
加藤　伸郎	京都大学大学院医学研究科認知行動脳科学	助教授
小椋　利彦	東北大学　加齢医学研究所　神経機能情報研究分野	教授
竹島　浩	東北大学大学院医学系研究科医化学分野	教授

		教授
広瀬　進	国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門	教授
野田　昌晴	自然科学研究機構基礎生物学研究所統合神経生物学研究部門	
	平成 13-16 年度	
	神戸大学　大学院医学系研究科　ゲノム科学講座　機能ゲノム学分野	助教授
柳　茂	大阪大学医学系研究科保健学専攻	教授
稲垣　忍	名古屋市立大学大学院薬学研究科病態生化学分野	助教授
服部　光治	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・システム神経生理学分野	助教授
杉原　泉	岡山大学大学院・自然科学研究科	助教授
中越　英樹	岡崎統合バイオサイエンスセンター　生命環境研究領域細胞生理部門	助教授
富永　知子	理化学研究所　脳科学総合研究センター神経回路ダイナミクス研究チーム	副ﾁｰﾑﾘｰﾀﾞｰ
中井　淳一	理化学研究所　脳科学総合研究センター　行動遺伝学技術開発チーム	副ﾁｰﾑﾘｰﾀﾞｰ
岩里　琢治	名古屋大学　理学研究科　生命理学専攻　神経発生グループ	助教授
高木　新	(平成 12-14 年度は A04)	
饗場　篤	神戸大学医学系研究科分子細胞生物学講座細胞生物学分野	教授
	(平成 12-14 年度は A04)	
	平成 12 年度	
玉田　篤史	自然科学研究機構基礎生物学研究所制御機構研究系行動制御研究部門	助手
東海林　亙	東北大学加齢医学研究所　分子発生研究分野	助手
水野　健作	東北大学大学院生命科学研究科分子生命科学専攻情報伝達分子解析分野	教授
畑　裕	東京医科歯科大学医歯学総合研究科病態代謝解析学分野	教授
下濱 俊	京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学	助教授
川上　厚志	東京大学大学院理学系研究科　生物科学専攻	助手
上村　匡	京都大学ウイルス研究所	教授
井ノ口　馨	三菱化学生命科学研究所	主任研究員
	平成 13 年度	
黒田　俊一	大阪大学産業科学研究所生体触媒科学研究分野	助教授
	平成 15-16 年度	
福嶋　伸之	近畿大学理工学部生命科学科分子神経生物学	助教授
八田　公平	理化学研究所　発生・再生科学総合研究センター ボディプラン研究グループ	研究員
中川　真一	理化学研究所発生再生化学総合研究センター	研究員
一色　孝子	国立遺伝学研究所　系統生物研究センター	助教授
中村　真	自然科学研究機構　基生研	助手
塩見　美喜子	徳島大学 ゲノム機能研究センター 分子機能解析分野	助教授
仲嶋　一範	慶應義塾大学医学部解剖学教室	教授
佐甲　靖志	大阪大学大学院生命機能研究科	助教授
一條　裕之	筑波大学・大学院人間総合科学研究科・ 感性認知脳科学専攻基礎医学系解剖学	助教授
粟崎　健	東京大学　分子細胞生物学研究所	助手
佐藤　真	福井大学医学部形態機能医科学講座　組織細胞形態学・神経科学領域	教授

研究項目　A04　学習と行動制御の分子メカニズム

計画研究		教授
山森　哲雄	自然科学研究機構　基生研	教授
八木　健	大阪大学大学院生命機能研究科	

真鍋　俊也	東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク分野	教授
尾藤　晴彦	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻　神経生化学分野	助教授
森　郁恵	名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻分子神経生物学	教授
公募研究	平成 12-16 年度	
山口　瞬	神戸大学大学院医学系研究科脳科学講座分子脳科学分野	助教授
石原　健	九州大学大学院　理学研究院　生物科学部門　分子遺伝学研究室	教授
岡戸　晴生	（財）東京都医学研究機構、東京都神経科学総合研究所、分子神経生理	副参事研究員
程　肇	三菱化学生命科学研究所　ゲノム時間生物学グループ	ｸﾞﾙｰﾌﾟﾘｰﾀﾞｰ
	平成 12-14 年度	
塩坂　貞夫	奈良先端科学技術大学院大学ﾊﾞｲｵｻｲｴﾝｽ研究科細胞構造学講座	教授
小幡　邦彦	自然科学研究機構　生理学研究所　神経化学部門	教授
渡邉　和忠	長岡技術科学大学生物系神経機能工学	教授
浜　千尋	理化学研究所発生再生科学総合研究センター神経回路発生研究チーム	ﾁｰﾑﾘｰﾀﾞｰ
森　寿	富山医科薬科大学　大学院医学系研究科　認知・情動脳科学専攻 分子神経科学	教授
萩原　正敏	東京医科歯科大学難治疾患研究所形質発現分野 （平成１５－１６年度は班友）	教授
	平成 13-16 年度	
澤口　俊之	北海道大学 大学院医学研究科 脳科学専攻 神経機能学講座 高次脳機能学分野	教授
飯野　雄一	東京大学遺伝子実験施設	助教授
窪田　芳之	自然科学研究機構　生理学研究所　大脳神経回路論研究部門	助教授
	平成 12 年度	
北澤　宏理	理化学研究所　脳科学総合研究センター　運動学習制御研究チーム	研究員
白澤　卓二	(財）東京都老人総合研究所　分子遺伝学部門	室長
	平成 15-16 年度	
曽良　一郎	東北大学大学院医学系研究科神経科学講座精神神経生物学分野	教授
上野　照子	富山医科薬科大学医学部第二生理学	助手
少作　隆子	金沢大学大学院　医学系研究科　シナプス発達・機能学	助教授
加藤　啓子	大阪府立大学大学院・農学生命科学研究科・獣医学講座・ 実験動物医学研究室	助教授
奥谷　文乃	高知大学医学部　神経統御学講座　統合生理	助教授
西　真弓	京都府立医科大学大学院医学研究科・生体構造科学	講師

班友

	平成 12-16 年度	
影山　龍一郎	京都大学ウイルス研究所	教授
椛　秀人	高知大学医学部神経統御学講座統合生理学教室	教授
櫻井　芳雄	京都大学大学院文学研究科心理学研究室	教授
永雄　総一	理化学研究所　脳科学総合研究センター　運動学習制御研究チーム	ﾁｰﾑﾘｰﾀﾞｰ
那波　宏之	新潟大学　脳研究所	教授
河西　春郎	自然科学研究機構・生理学研究所	教授
	平成 12-14 年度	
二木　宏明	理化学研究所脳科学総合研究センター情動機構研究チーム	ﾁｰﾑﾘｰﾀﾞｰ
長野　哲雄	東京大学大学院薬学系研究科分子薬学専攻薬品代謝化学教室	教授
	平成 13-14 年度	

井ノ口　馨	三菱化学生命科学研究所	主任研究員
	平成 13-16 年度	
上村　匡	京都大学生命科学研究科	教授
	平成 14-16 年度	
Hensch　TK	RIKEN Brain Science Institute	ｸﾞﾙｰﾌﾟﾃﾞｨﾚｸﾀｰ
宮本　英七	早稲田大学大学院理工学研究科	客員教授
	平成 12 年度	
岡野栄之	慶応義塾大学生理学	教授
後藤由季子	東京大学分子細胞生物学研究所細胞工学研究室	助教授
	平成 15-16 年度	
河野　憲二	京都大学大学院医学研究科　認知行動脳科学	教授
金子章道	星城大学ﾘﾊﾋﾞﾘﾃｰｼｮﾝ学部生理学	教授
富永真琴	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	教授
見学美根子	理化学研究所　脳科学総合研究センター神経細胞極性研究チーム	ﾁｰﾑﾘｰﾀﾞｰ
萩原　正敏	東京医科歯科大学難治疾患研究所形質発現分野	教授
谷口　雅彦	東京大学大学院医学系研究科生化学分子生物学講座細胞情報 （平成１６年度のみ）	助手
	平成 12、15-16 年度	
野田　昌晴	自然科学研究機構基礎生物学研究所統合神経生物学研究部門	教授

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成１１年度	3,800	0	3,800
平成１２年度	468,000	0	468,000
平成１３年度	535,500	0	535,500
平成１４年度	476,500	0	476,500
平成１５年度	499,000	0	499,000
平成１６年度	482,200	0	482,200
総計	2,465,000	0	2,465,000

研 究 発 表

-学会誌への発表総数および主要雑誌別集計

-学会誌など

-口頭発表など

-出版物など

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

共同研究

学会誌への発表総数および主要雑誌別集計

Peer Review 英文誌への発表総数；1331 編　(in press を含み総説は除く；2005 年 3 月末調査)。

主要雑誌別・研究項目別の出版数（1028 編）	A01	A02	A03	A04	小計
Biochemical and Biophysical Research Communications	1	6	14	8	29
Biochemical Journal		5			5
Brain Research	6	7	8	7	28
British Journal of Pharmacology		4	1		5
Cell		2	4	4	10
Cell and Tissue Research	4		1	1	6
Cerebral Cortex	5	2	1	3	11
Current Biology			7	4	11
Development	1	1	24	5	31
Developmental Biology			6	4	10
Developmental Brain Research	1	1	4	2	8
Developmental Cell		2	4	1	7
EMBO Journal	1	1	7	1	10
EMBO Reports		2	1	2	5
European Journal of Neuroscience	12	29	17	21	78
FEBS letters		1	9	2	12
Gene	1	1	1	4	7
Genes & Development			5	2	7
Genes to Cells	1	3	6	5	15
Genetics			3	2	5
Genomics			1	5	6
Journal of Biological Chemistry	3	27	40	25	95
Journal of Cell Biology	1	5	1	4	11
Journal of Cell Science	1	1	4		6
Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism		3	2		5
Journal of Comparative Neurology	17	17	8	6	48
Journal of Neurobiology	1	1	2	2	6
Journal of Neurochemistry	4	13	10	7	34
Journal of Neurophysiology	28	16	1	4	49
Journal of Neuroscience	26	42	38	19	125
Journal of Neuroscience Research		3	5	8	16
Journal of Physiology	8	15		1	24
Mechanisms of Development	1		4	1	6
Molecular and Cellular Biology		1	10	3	14
Molecular and Cellular Neurosciences	1	2	4	5	12
Molecular Brain Research	1		1	7	9
Nature		2	5	2	9

Nature Genetics			4	1	5
Nature Neuroscience	4		1	2	7
Neuron	1	11	7	8	27
Neuropharmacology	2	5	3	1	11
NeuroReport	7	7	3	7	24
Neuroscience	14	25	15	3	57
Neuroscience Letters	20	6	5	12	43
Neuroscience Research	21	20	12	11	64
Oncogene			4	1	5
Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.	1	17	5	7	30
Progress in Brain Research	4	1			5
Science		4	4	5	13

学会誌発表など

A01-01 大森 治紀

1. Nao Chuhma, Konomi Koyano and Harunori Ohmori (2001). Synchronisation of NeurotransmitterRelease during Postnatal Development in a Calyceal Presynaptic Terminal. **Journal of Physiology** 530.1, 93-104.
2. Nao Chuhma and H.Ohmori (2001). Postnatal development of the capacity of Ca2+ clearance at the synapse on MNTB principal neuron. **Brain Research** 904, 341-344.
3. Takahiro M Ishii, Makoto Takano and Harunori Ohmori (2001). Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels **Journal of Physiology** 537: 93-100.
4. Nao Chuhma and H.Ohmori (2002). Role of Ca2+ in the synchronization of transmitter release at calyceal synapse in the auditory system of rat. **Journal of Neurophysiology** 87: 222-228.
5. H Kuba, K Koyano, H Ohmori (2002) Development of Membrane Conductance Improves Coincidence Detection in the Nucleus Laminaris of the Chicken. **Journal of Physiology** 540.2,529-542.
6. Hiroshi Kuba, Konomi Koyano, Harunori Ohmori(2002) Synaptic Depression Improves the Coincidence Detection at Nucleus Laminaris in Brainstem Slices of the Chick Embryo. **Eur. J. Neurosci** 15,984-990.
7. Iwao Fukui & Harunori Ohmori (2003). Developmental changes in membrane excitability and morphology of neurons in the nucleus angularis of the chicken. Journal of Physiology 548.1, 219-232.
8. Hiroshi Kuba, Rei Yamada & Harunori Ohmori (2003) Evaluation of the limiting acuity of coincidence detection in nucleus laminaris of the chicken. **Journal of Physiology** 552.2,611-620.
9. Iwao Fukui & Harunori Ohmori (2004). Tonotopic Gradients of membrane and synaptic properties for neurons of the chicken nucleus magnocellularis. **Journal of Neuroscience** 24(34):7514-7523.
Hiroshi Kuba, Rei Yamada, Iwao Fukui and Harunori Ohmori (2005). Tonotopic specialization of auditory coincidence detection in nucleus laminaris of the chick. **Journal of Neuroscience** 25(8), 1924-1934.

A01-02 小松 由起夫

1 Takada, N., Yanagawa, Y. and Komatsu, Y., Activity-dependent maturation of excitatory synaptic connections in solitary neuron cultures of mouse neocortex. **Eur. J. Neurosci.** 21, 422-430.
2 Liu, H.N., Kurotani, T., Ren, M., Yamada, K., Yoshimura, Y. and Komatsu, Y., Presynaptic activity and Ca^{2+} entry are required for the maintenance of NMDA receptor-independent LTP at visual cortical excitatory synapses. **J. Neurophysiol.** 92: 1077-1087, 2004.
3 Mizuno, T., Kurotani, T., Komatsu, Y., Kawanokuchi, J., Kato, H., Mitsuma, N. and Suzumura, A., Neuroprotective role of phosphodiesterase inhibitor ibudilast on neuronal cell death induced by activated microglia. **Neuropharmacology**, 46: 404-411, 2004.
4 Yoshimura, Y., Ohmura, T. and Komatsu, Y., Two forms of synaptic plasticity with distinct dependence on age, experience and NMDA receptor subtype in rat visual cortex. **J. Neurosci.**, 23: 6557-6566, 2003.
5 Ohmura, T., Ming, R., Yoshimura, Y. and Komatsu, Y., Age and experience dependence of N-methyl-D-aspartate receptor-independent long-term potentiataion in rat visual cortex. **Neurosci. Lett.**, 341: 95-98, 2003.
6 Kurotani, T., Yoshimura, Y. and Komatsu, Y., Postsynaptic firing produces long-term depression at inhibitory synapses of rat visual cortex. **Neurosci. Lett.**, 337: 1-4, 2003.
7 Ishida, Y., Shirokawa, T., Miyaishi, O., Komatsu, Y. and Isobe, K., Age-dependent changes in noradrenergic innervations of the frontal cortex in F344 rats. **Neurobiology of Aging**, 22: 283-286, 2001.
8 Ishida, Y., Shirokawa, T., Komatsu, Y. and Isobe, K., Changes in cortical noradrenergic axon terminals of locus coeruleus neurons in aged F344 rats. **Neurosci. Lett.**, 307: 197-199, 2001.
9 Komatsu, Y. and Yoshimura, Y., Activity-dependent maintenance of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. **J. Neurosci.**, 20: 7539-7546, 2000.
10 Ishida, Y., Shirokawa, T., Miyaishi, O., Komatsu, Y. and Isobe, K., Age-dependent changes in projections from locus coeruleus to hippocampus dentate gyrus and frontal cortex. **Eur. J. Neurosci.**, 12: 1263-1270, 2000.

A01-03 立花 政夫

1) Yoshida, K., Watanabe, D., Ishikane, H., Tachibana, M., Pastan, I., Nakanishi, S. (2001) A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement. **Neuron**, 30: 771-780.

2) Matsui, K., Hasegawa, J., Tachibana, M. (2001) Modulation of excitatory synaptic transmission by $GABA_c$ receptor mediated feedback in the mouse inner retina. **Journal of Neurophysiology**, 86: 2285-2298.

3) 石金 浩史、立花 政夫 (2001) カエル網膜神経節細胞群における並列的光情報表現 **電気学会学会誌**, LAV-01-1, 1-6.

4) Berglund, K., Midorikawa, M., Tachibana, M. (2002) Increase in the pool size of releasable synaptic vesicles by the activation of protein kinase C in goldfish retinal bipolar cells. **Journal of Neuroscience**, 22: 4776-4786.

5) Ishikane, H., Gangi, M., Tachibana, M. (2002) Synchronous Oscillations in Frog Retinal Ganglion Cells. **The Japanese Journal of Psychonomic Science**, 21(1), 47-48.

6) 立花政夫、石金浩史(2004)「網膜における同期的・周期的スパイク発火の生成と機能」**蛋白質 核酸 酵素** 49:478-485.

7) Arai, I., Yamada, Y., Asaka, T., and Tachibana, M. (2004) Light-evoked oscillatory discharges in retinal ganglion cells are generated by rhythmic synaptic inputs. **Journal of Neurophysiology**, 92: 715-725.

Hosoi, N., Arai, I and Tachibana, M. Group III metabotropic glutamate receptors and exocytosed protons inhibit L-type calcium currents in cones but not in rods. **Journal of Neuroscience**(2005) in press

A01-04 小田 洋一

1. Nakayama, H. and Oda, Y. Common inputs and differential excitability of segmentally homologous reticulospinal neurons in hindbrain. **J. Neurosci**. 24: 3199-3209, 2004.
2. Takahashi, M., Narushima, M. and Oda, Y. *In vivo* imaging of functional inhibitory networks on the Mauthner cell of larval zebrafish. **J. Neurosci**. 22: 3929-3939, 2002
3. Komatsu, H., Murayama, Y., Iwaki, T., Tsukamoto, I. Ogli, K. and Oda, Y. Effects of enflurane on the long-term potentiation in the hippocampus. **Prog. Anesth. Mech.**, 6: 515-518, 2000

A01-05 平田 たつみ

1. Yamatani H, Sato Y, Fujisawa H and Hirata T. Chronotopic organization of olfactory bulb axons in the lateral olfactory tract. **J. Comp. Neurol**. 475, 247-260, 2004.
2. Tozaki H, Tanaka S and Hirata T. Theoretical consideration of olfactory axon projection with an activity-dependent neural network model. **Mol. Cell. Neurosci**. 26, 503-517, 2004.
3. Kawasaki T, Takagi Y, Yamatani H and Hirata T. Systematic screening and identification of the antigens recognized by monoclonal antibodies raised against the developing lateral olfactory tract . **J. Neurobiol**. (in press), 2004.
4. Aizawa H, Sato Y, Maekawa M, Fujisawa H, Hirata T and Yuasa S. Development of the amygdalohypothalamic projection in the mouse embryonic forebrain. **Anat. Embryol**. 208, 249-264, 2004.
5. Hirata T, Nomura T, Takagi Y, Sato Y, Tomioka N, Fujisawa H and Osumi N. Mosaic development of the olfactory cortex with Pax6-dependent and -independent components. **Dev. Brain Res**. 136, 17-26, 2002.
6. Tozaki H, Kawasaki T, Takagi Y and Hirata T. Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. **Mol. Brain Res**. 104, 111-119, 2002.
7. Hirata T, Fujisawa H, Wu JY and Rao Y, Short-range guidance of olfactory bulb axons is independent of repulsive factor slit. **J. Neurosci**. 21, 2373-2379, 2001.
8. Tomioka N, Osumi N, Sato Y, Inoue T, Nakamura S, Fujisawa H and Hirata T. Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. **J. Neurosci**. 20, 5802-5812, 2000.
9. 平田たつみ 終脳における神経細胞の移動と領域特異化 **細胞工学** 20, 508-512, 2001.
10. 平田たつみ 終脳における神経細胞の接線方向の移動 **実験医学** 3月増刊号 20, 738-743, 2002.
11. 平田たつみ 嗅覚二次神経細胞の軸索投射機構 **日本味と匂学会誌** 別冊 9, 57-65, 2002.

12. 平田たつみ 中枢嗅覚神経系の発生機構 **脳の科学** 24, 729-737, 2002.
13. 川崎能彦 平田たつみ 嗅索ガイドポスト細胞（lot 細胞）の発生機構と移動様式 **蛋白質核酸酵素** 47, 1989-1993, 2002.
14. 平田たつみ 脳の領域特異化と軸索束形成 **神経研究の進歩**（印刷中）, 2004.
15. 平田たつみ 川崎能彦 lot 細胞一嗅球軸索をガイドする神経細胞 **生体の科学** 55, 494-495, 2004.

A01-06 岡 良隆

Amano, M., Takahashi, A., Yamanome, T., Oka, Y., Amiya, N., Kawauchi, H., and Yamamori, K. (2005) Immunocytochemical localization and ontogenic development of α-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH) in the brain of pleuronectiform fish, Barfin Flounder. **Cell and Tissue Research**, in press

Tanaka H., and Oka, Y (2005) Chaotropes and multi-valent cations activate guppy sperm motility. **Biochimica et Biophysica Acta**, in press

(1) Haneda, K., and Oka, Y. (2004) Selective modulation of voltage-gated calcium channels in the terminal nerve gonadotropin-releasing hormone (TN-GnRH) neurons of a teleost, the dwarf gourami (*Colisa lalia*). **Endocrinology** 145: 4489-4499.

(2) Ishizaki, M., Iigo, M., Amano, M., and Oka, Y. (2004) Different modes of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from multiple GnRH systems as revealed by radioimmunoassay using brain slices of a teleost, the dwarf gourami (*Colisa lalia*). **Endocrinology** 145: 2092-2103.

(3) Ishikawa, M., Tsutsui1, H., Cosson, J., Oka, Y., and Morisawa, M. (2004) Strategies for sperm chemotaxis in the siphonophores and ascidians: a numerical simulation study. **Biological Bulletin** 206: 95-102.

(4) Amano, M., Okubo, K., Yamanome, T., Oka, Y., Kawaguchi, N., Aida, K., and Yamamori, K. (2004) Ontogenic development of three GnRH systems in the brain of a pleuronectiform fish, barfin flounder. **Zoological Science** 21: 311-317.

(5) Amano, M., Takahashi, A., Yamanome, T., Oka, Y., Amiya, N., Kawauchi, H., and Yamamori, K. (2004) Immunocytochemical localization and ontogenic development of α-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH) in the brain of pleuronectiform fish, Barfin Flounder. **Cell and Tissue Research.**

(6) Kiya, T., and Oka, Y. (2003) Glutamate receptors in the terminal nerve gonadotropin-releasing hormone neurons of the dwarf gourami (teleost). **Neuroscience Letters** 345: 113-116

(7) Amano, M., Oka, Y., Yamanome, T., Takahashi, A., and Yamamori, K. (2003) Immunocytochemical localization and ontogenic development of melanin-concentrating hormone in the brain of a pleuronectiform fish, the barfin flounder. **Cell and Tissue Research** 311: 71-77.

(8) Tsutsui, H. and Oka, Y. (2002) Slow removal of Na^+ channel inactivation underlies the temporal filtering property in the teleost thalamic neurons. **Journal of Physiology** 539: 743-753.

(9) Oka, Y. (2002) Physiology and release activity of GnRH neurons. **Progress in Brain Research** 141: 259-281.

(10) Oka, Y. (2002) What are the functional roles of non-hormonal peptides in the brain? **Comparative Physiology and Biochemistry** 19: 120-127.

(11) Abe, H. and Oka, Y. (2002) Mechanisms of the modulation of pacemaker activity by GnRH peptides in the terminal nerve-GnRH neurons. **Zoological Science** 19: 111-128.

(12) Amano, M., Oka, Y., Yamanome, T., Okuzawa, K., and Yamamori, K. (2002) Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, barfin flounder, *Verasper moseri*. **Cell and Tissue Research** 309: 323-329.

(13) Wirsig-Wiechmann, C.R., and Oka, Y. (2002) The terminal nerve ganglion cells project to the olfactory mucosa in the dwarf gourami brain. **Neuroscience Research** 44: 337-341.

(14) Kim, M., Kobayashi, M., Oka, Y., Amano, M., Kawashima, S., and Aida, K. (2001) Effects of olfactory tract section on the immunohistochemical distribution of brain GnRH in the female goldfish, Carassius auratus. **Zoological Science** 18: 241-248.

(15) Tsutsui, H., Yamamoto, N., Ito, H., and Oka, Y. (2001) Encoding of different aspects of afferent activities by two types of cells in the corpus glomerulosum of a teleost brain. **Journal of Neurophysiology** 85: 1167-1177.

(16) Ishizaki, M., and Oka, Y. (2001) Amperometric recording of gonadotropin-releasing hormone release activity in the pituitary of the dwarf gourami (teleost) brain-pituitary slices. **Neuroscience Letters**: 299: 121-124.

(17)Tsutsui, H. and Oka, Y. (2001) Effects of characteristic dendritic tip geometry on the electrical properties of teleost thalamic neurons. **Journal of Neurophysiology** 85: 2289-2292.
(18)Kho, K.-H., Tanimoto, S., Inaba, K., Oka, Y., and Morisawa, M. (2001) Transmembrane cell signaling for the initiation of trout sperm motility: roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. **Zoological Science** 18: 919-928.
(19)Tsutsui, H. Wolf, A.M., Knöpfel, T., and Oka, Y. (2001) Imaging postsynaptic activities of teleost thalamic neurons at single cell resolution using a voltage-sensitive dye. **Neuroscience Letters** 312: 17-20.
(20)Tsutsui, H. and Oka, Y. (2000) Light-sensitive voltage responses in the neurons of the cerebral ganglion of *Ciona savignyi* (Chordata: Ascidiacea). **Biological Bulletin** 198: 26-28.
(21)Abe, H. and Oka, Y. (2000) Modulation of pacemaker activity by salmon gonadotropin-releasing hormone (sGnRH) in terminal nerve (TN)-GnRH neurons. **Journal of Neurophysiology** 83: 3196-3200.

A01-07 坪井 昭夫

1. Serizawa, S., Ishii, T., Nakatani, H., Tsuboi, A., Nagawa, F., Asano, M., Sudo, K., Sakagami, J., Sakano, H., Ijiri, T., Matsuda, Y., Suzuki, M., Yamamori, T., Iwakura, Y. and Sakano, H.: Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. **Nature Neurosci.** 3: 687-693 (2000)
2. Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A. and Sakano, H.: Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. **Genes Cells** 6: 71-78 (2001)
3. Sengoku, S., Ishii, T., Serizawa, S., Nakatani, H., Nagawa, F., Tsuboi, A. and Sakano. H.: Axonal projection of olfactory sensory neurons during the developmental and regeneration processes. **NeuroReport** 12: 1061-1066 (2001)
4. Nagawa, F., Yoshihara, S., Tsuboi, A., Serizawa, S., Itoh, K. and Sakano. H.: Genomic analysis of the murine odorant receptor *MOR28* cluster: a possible role of gene conversion in maintaining the olfactory map. **Gene** 292: 73-80 (2002)
5. Kobayakawa, K., Hayashi, R., Morita, K., Miyamichi, K., Oka, Y., Tsuboi, A. and Sakano. H.: Stomatin-related olfactory protein, SRO, specifically expressed in the murine olfactory sensory neurons. **J. Neurosci.** 22: 5931-5937 (2002)
6. Oka, Y., Kobayakawa, K., Nishizumi, H., Miyamichi, K., Hirose, S., Tsuboi, A. and Sakano, H.: O-MACS, a novel member of the medium-chain acyl-CoA synthetase family, specifically expressed in the olfactory epithelium in a zone-specific manner. **Eur. J. Biochem.** 270: 1995-2004 (2003)
7. Tsuboi, A., Nishizumi, H., Miyazaki, T., Kato, H., Oroku, K., Nagawa, F. and Sakano, H.: Sub-areal expression of the murine odorant receptor genes in the most ventro-lateral zone of the olfactory epithelium and its correlation to the projection sites on the olfactory bulb. (submitted)

A01-08 金子 武嗣

98. Nakamura K., Kaneko T., Yamashita Y., Hasegawa H., Katoh H., Negishi M., Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, vol. 421 (no. 4), pp.543-569, June 12, 2000.
99. Li J.-L., Wang D., Kaneko T., Shigemoto R., Nomura S., Mizuno N., The relationship between neurokinin-1 receptorand substance P in the medullary dorsal horn A light and electron microscopic immunohistochemical study inthe rat. **Neuroscience Research**, vol. 36 (no. 4), pp. 327-334, April, 2000.
100. Taki K., Kaneko T., Mizuno N., A group of cortical interneurons expressing mu-opioid receptor-like immunoreactivity: a double immunofluorescence study in the rat cerebral cortex. **Neuroscience**, vol. 98 (no. 2), pp.221-231, June, 2000.
101. Kaneko T., Cho R.-H., Li Y.-Q., Nomura S., Mizuno N., Predominant information transfer from layer III pyrami -dal neurons to corticospinal neurons. **The Journal of Comparative Neurology**, vol. 423 (no. 1), pp. 52-65, July 17,2000.
102. Li J.-L., Xiong K.-H., Li Y.-Q., Kaneko T., Mizuno N., Serotonergic innervation of mesencephalic trigeminalnucleus neurons: a light and electron microscopic study in the rat. **Neuroscience Research**, vol. 37 (no. 2) , pp. 127-140, June, 2000.
103. Li Y.-Q., Wu S.-X., Li J.-L., Li J.-S., Kaneko T., and Mizuno N., Co-existence of calcium-binding proteins in neuronsof the medullary dorsal horn of the rat. **Neuroscience Letters**, vol. 286 (no. 2), pp. 103-106, June 2, 2000.

104. Wang D., Li Y.-Q., Li J.-L., Kaneko T., Nomura S., Mizuno N., g-Aminobutyric acid- and glycineimmunoreactiveneurons postsynaptic to substance P-immunoreactive axon terminals in the superficial layers of therat medullary dorsal horn. Neuroscience Letters, vol. 288 (no. 3), pp. 187-190, July 21, 2000.
105. Li Y.-Q., Li H., Yang K., Kaneko T., Mizuno N., Morphologic features and electrical membrane properties of projectionneurons in the marginal layer of the medullary dorsal horn of the rat. The Journal of Comparative Neurology, vol. 424 (no. 1), pp. 24-36, August 14, 2000.
106. Furuta T., Mori T., Lee T., Kaneko T., Third group of neostriatofugal neurons: neurokinin B-producing neuronsthat send axons predominantly to the substantia innominata. The Journal of Comparative Neurology, vol. 426 (no.2), pp. 279-296, October 16, 2000.
107. Tamamaki N., Nakamura K., Furuta T., Asamoto K., and Kaneko, T., Neurons in Golgi-stain-like images revealed by GFP-adenovirus infection in vivo. Neuroscience Research, vol. 38 (no. 3), pp. 231-236, November, 2000.
108. Beuckmann C.T., Lazarus M., Gerashchenko D., Mizoguchi A., Nomura S., Mohri I., Uesugi A., Kaneko T.,Mizuno N., Hayaishi O., Urade Y., Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (b-trace) in thecentral nervous system of the adult rat. The Journal of Comparative Neurology, vol. 428 (no. 1), pp. 62-78, Decem -ber 25, 2000.
109. Li Y.-Q., Li H., Yang K., Wang Z.-M., Kaneko T., Mizino N., Intracellular labeling study of neurons in the super -ficial part of the magnocellular layer of the medullary dorsal horn of the rat. The Journal of Comparative Neurology,vol. 428 (no. 4), pp. 641-655, December 25, 2000.
110. Ino T., Kaneko T., Mizuno N., Projections from the hippocampal and parahippocampal regions to the entorhinalcortex. An anterograde and retrograde tract-tracing study in the cat. Neuroscience Research, vol. 39 (no. 1), pp. 51-69, January, 2001.
111. Li Y.-Q., Kaneko T., Mizuno N., Collateral projections of nucleus raphe dorsalis neurones to the caudate-putamenand region around the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis pars a in the rat. NeuroscienceLetters, vol. 299 (no. 1-2), pp. 33-36, February 16, 2001.
112. Tamamaki N., Nakamura K., Kaneko T., Cell migration from the corticostriatal angle to the basal telencephalon in rat embryos. Neuroreport , vol. 12 (no. 4), pp. 775-780 , March 26,2001.
113. Nakamura K., Li Y.-Q., Kaneko T., Katoh H., and Negishi M., Prostaglandin EP3 Receptor protein in serotoninand catecholamine cell groups: A double immunofluorescence study in the rat brain, Neuroscience, vol. 103 (no. 3),pp. 763-775, March 21, 2001.
114. Li Y.-Q., Li H., Kaneko T., Mizuno N., Morphological features and electrophysiological properties of serotonergicand non -serotonergic projection neurons in the dorsal raphe nucleus. An intracellular recording and labeling studyin rat brain slices. Brain Research, vol. 900 (no. 1), pp. 110-118, May 4, 2001.
115. Fujiyama F., Furuta T., Kaneko T., Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate trans -porters in the rat cerebral cortex. The Journal of Comparative Neurology, vol. 435 (no. 3), pp. 379-387, July 2,2001.
116. Li J.-L., Kaneko T., Mizuno N., Colocalization of neuronal nitric oxide synthase and neurokinin-1 receptor in stri -atal interneurons in the rat. Neuroscience Letters, vol. 310 (no. 2-3), pp. 109-112, September 14, 2001.
117. Li Y.-Q., Li J.-L., Li H., Kaneko T., Mizuno N., Protein kinase C gamma-like immunoreactivity of trigeminothalamic neurons in the medullary dorsal horn of the rat. Brain Research, vol. 913 (no. 2), pp. 159-164,September 21, 2001.
118. Tamamaki N., Nakamura K., Okamoto K., Kaneko T., Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in thedeveloping cerebral cortex. Neuroscience Research, vol. 41 (no. 1), pp. 51-60, September, 2001.
119. Mizoguchi A., Eguchi N., Kimura K., Kiyohara Y., Qu W.-M., Huang Z.-L., Mochizuki T., Lazarus M.,Kobayashi T., Kaneko T., Narumiya S., Urade Y., Hayashi O., Dominant localization of prostaglandin D receptorson arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eyemovement sleep. Proceedings of National Academy of Sciences U. S. A., vol. 98 (no. 20), pp. 11674-11679, September25, 2001.
120. Kobayashi T., Kida Y., Kaneko T., Pastan I., Kobayashi K., Efficient ablation by immunotoxin -mediated cell tar -geting of the cell types that express human interleukin-2 receptor depending on the internal ribosome entry site. The journal of GENE Medicine, vol.3 (no. 5), pp. 505-510, September -October,2001.
121. Li J.-L., Li Y.-Q., Nomura S., Kaneko T., Mizuno N., Protein kinase C gamma-like immunoreactiveity in thesubstantia gelatinosa of the medullary dorsal horn of the rat. Neuroscience Letters, vol. 311 (no. 3), pp. 185-188,October 5, 2001.

122. Li J.-L., Shigemoto R., Kulik A., Chen P., Nomura S., Kaneko T., Mizuno N., Immunocytochemical localizationof GABA? receptors in mesencephalic trigeminal nucleus neurons in the rat. Neuroscience Letters, vol. 315 (no. 1-2), pp. 93-97, November 23, 2001.
123. Furuta.T., Tomioka R., Taki K., Nakamura K., Tamamaki N., Kaneko T., In Vivo Transduction of central neuronsusing recombinant Sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrance-targeted fluorescentproteins. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, vol. 49 (no. 12), pp.1497-1507, December, 2001.
124. Sallo C., Fischer J., Franzoni F-M., Mackle K., Kaneko T., Conrath M., CB1-cannabinnoid and m-opioid receptorcolocalization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. Neuro Report, vol.12 (no. 17), pp. 3689-3692, Decem -ber 4, 2001.
125. Li J.-L., Dong Y.-L., Kaneko T., and Mizuno N., Direct projections from substance P-containing neurons to nitricoxide synthase-containing interneurons in the rat striatum. Neuroscience Letters, vol.318(no.3), pp.133-136, February1, 2002.
126. Kaneko T., Fujiyama F., and Hioki H., Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamatetransporters in the rat brain. The Journal of Comparative Neurology, vol. 444 (no.1), pp.39-62, February 25, 2002.
127. Sakata S., Kitsukawa T., Kaneko T., Yamamori T., and Sakurai Y., Task-dependent and cell-type-specific Fosenhancement in rat sensory cortices during audio-visual discrimination. European Journal of Neuroscience,vol.15(no.4), pp.735-743,2002.
128. Li J.-L., Kaneko T., Mizuno N., Synaptic association of dopaminergic axon terminals and neurokinin-1 receptorexpressingintrinsic neurons in the striatum of the rat. Neuroscience Letters, vol.324(no.1),pp9-12, May 10, 2002.
129. Nakamura K., Matsumura K., Kaneko T., Kobayashi S., Katoh H., and Negishi M., The rostral raphe pallidusnucleus mediates pyrogenic transmission from the preotic area. The Journal of Neuroscience, vol. 22(no. 11),pp.4600-4610, June 1, 2002.
130. Li Y.-Q., Tao F.-S., Okamoto K., Nomura S., Kaneko T., and Mizuno N., The supratrigeminal region of the ratsends GABA/ glycinecocontaining axon terminals to the motor trigeminal nucleus on the contralateral side. NeuroscienceLetters, vol. 330(no.1), pp.13-16, September 13, 2002.
131. Furuta T., Zhou L., Kaneko T.,Preprodynorphin-, preproenkephalin-, preprotachykinin A- and preprotachykinin Bimmunoreactiveneurons in the accumbens nucleus and olfactory tobercle: Double- immunofluorescence analysis.Neuroscience, vol. 114(no.3), pp.611-627, October 11, 2002.
132. Aoyagi T., Kang Y., Terada N, Kaneko T., and Fukai T., The role of Ca 2+ -dependent cationic current in generat -ing gamma frequency rhythmic bursts: modeling study. Neuroscience, vol.115(no.4) pp.1127-1138, Dicember 16,2002.
133. Tamamaki N., Fujimori K., Nijyo Y., Kaneko T., and Takauji R., Evidence that Sema3A and Sema3F regulate themigration of GABAergic neurons in the developing neocortex. The Journal of Comparative Neurology, vol. 455(no.2), pp-238-248, January 6, 2003.
134. Ichinohe N., Fujiyama F., Kaneko T., and Rockland S. K., Honeycomb-Like mosaic at the border of layers 1 and 2in the cerebral cortex. The Journal of Neuroscience, vol 23(no.4), February 15, 2003.
135. Li J.-L., Fujiyama F., Kaneko T., and Mizuno N., Expression of vesicular glutamate transporters, VGluT1 andVGluT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinaldorsal horns of the rat. The Journal of Comparative Neurology, vol 457(no.3), pp. 236-249, March 10, 2003.
136. Hioki H., Fujiyama F., Taki K., Tomioka R., Furuta T., Tamamaki N., and Kaneko T., Differential distribution ofvesicular glutamate transporters in the rat cerebellar cortex. Neuroscience, vol. 117 (no. 1), pp. 1-6, March 17,2003.
137. Pompolo S, Pereira A, Kaneko T, and Clarke IJ, Seosonal changes in the inputs to gonadotropin releasing hor -mone in the ewe brain; an assessment byconventional fluorescence and confocal microscopy. The Journal of Neuroendocrinology,vol. 15(no. 5), pp. 538-545, May, 2003.
138. Lin L.-H., Agassandian K., Fujiyama F., Kaneko T., Talman W .T., Evidence for a glutamatergic input to pontinepreganglionic neurons of the superior salivatory nucleus in rat. Journal of Chemical Neuroanatomy, vol. 25 (no.4),July, 2003.
139. Li J.-L., Xiong K.-H., Dong Y.-L., Fujiyama F., Kaneko T., and Mizuno N., Vesicular glutamate transporters,VGluT1 and VGluT2, in the trigeminal ganglion neurons of the rat, with special reference to the co-expression.The Journal of Comparative Neurology, vol. 463 (no.2), pp. 212-220, August 18, 2003.

140. Zhou L., Furuta T., and Kaneko T., Chemical organization of projection neurons in the rat accumbens nucleus andolfactory tubercle. Neuroscience, vol. 120 (no.3), pp. 783-798, September 1, 2003.
141. Sano H., Yasoshima Y., Matsushita N., Kaneko T., Kohno K., Pastan I., Kobayashi K., Conditional ablation ofstriatal neuronal types containing dopamine D2 receptor disturbs coordination of basal ganglia function. The jour nal of Neuroscience, vol. 23(no.27), pp.9078-9088, October 8, 2003.
142. Fujiyama F., Hioki H., Ryohei T., Taki K., Tamamaki N., Nomura S., Okamoto K., Kaneko T., Changes of immu -nocytochemical localization of vesicular glutamate transporters in the rat visual system after the retinofugal dener -vation. The Journal of Comparative Neurology, vol.4 65 (no.2), pp. 234-249, October 13, 2003.
143. Van der Gucht E, Jacobs S, Kaneko T, Vandesande F, Arckens L. Distribution and morphological characterizationof phosphate-activated glutaminase-immunoreactive neurons in cat visual cortex. Brain Research, vol. 988 (no. 1-2), pp. 29-42, October 24, 2003.
144. Oliveira L.R. A., Hydling F., Olsson E., Shi T., Edwards H. R., Fujiyama F., Kaneko T., Hofelt T., Cullheim S.,Meister B., Cellular localization of three vesicular gulutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cordand dorsal root ganglia. Synapse, vol. 50 (no.2), pp. 117-129, November, 2003 (online; July 23).
145. Arimatsu Y., Ishida M., Kaneko T., Ichinose S., Omori A., Organization and development of corticocortical associativeneurons expressing the orphan nuclear receptor Nurr1. The Journal of Comparative Neurology, vol. 466(no.2), pp. 180-196, November 10, 2003.
146. Tamamaki N., Yanagawa Y., Tomioka R., Miyazaki J., Obata K., Kaneko T., Green fluorescent protein expressionand colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. The Jour nal of Comparative Neurology, vol. 467(no. 1), pp.60-79, December 1, 2003.
147. Lin L.-H., Edwards R-H., Fremeau R.-T.-J., Fujiyama F., Kaneko T., Talman W.-T., Localization of vesicularglutamate transporters and neuronal nitric oxide synthase in rat nucleus tractus solitarii. Neuroscience,vol.123(no.1), pp.247-255, 2004 (online; December 3, 2003).
148. Tsubo Y., Kaneko T., Shinomoto S., Predicting spike timings of current-injected neurons. Neural Networks, vol.17 (no.2), pp. 165-173, March, 2004 (online; December 29, 2003).
149. Nakamura K., Wu S.-X., Fujiyama F., Okamoto K., Hioki H., Kaneko T., Independent inputs by VGLUT2-andVGLUT3-positive glutamatergic terminals onto rat sympathetic preganglionic neurons. NeuroReport, vol. 15(no.3), pp. 431-436, March 1, 2004.
150. Furuta T., Koyano K., Tomioka R., Yanagawa Y., Kaneko T., GABAergic basal forebrain neurons which expressreceptor for neurokinin B and send axons to the cerebral cortex. The Journal of Comparative Neurology, vol. 473(no.1) , pp. 43-58, May 17, 2004 (online; March 30).
151. Nakamura K, Matsushima K, Hubschle T, Nakamura Y, Hioki H, Fujiyama F, Boldogkoi Z, Konig M, Thiel H-J,Gerstberger R, Kobayashi S, Kaneko T, Identification of sympathetic premotor neurons in medullary rapheregions mediating fever and other thermoregulatory functions. The Journal of Neuroscience, vol. 24 (no. 23), pp.5370-5380, June 9, 2004.
152. Wu S.-X., Koshimizu Y., Fenf Y.-P., Okamoto K., Fujiyama F., Hioki H., Li Y.-Q., Kaneko T., Mizuno N., Vesicularglutamate transporter immunoreactivty in the central and peripheral ending of muscle-spindle afferents. BrainResearch, vol. 1011 (no. 2), pp. 247-251, June 18, 2004 (online; May 6).
153. Hioki H., Fujiyama F., Nakamura K., Wu S.-X., Matsuda W., Kaneko T., Chemically specific circuit composed byvesicular glutamate transporter 3- and preprotachykinin B-producing interneurons in the rat neocortex. CerebralCortex, vol. 14 (no. 11), pp. 1266-1275, November, 2004 (online; May 13).
154. Cho R.-H., Segawa S., Mizuno A., Kaneko T., Intracellularly labeled pyramidal neurons in the cortical areas pro -jecting to the spinal cord. I. Electrophysiological properties of pyramidal neurons. Neuroscience Research, vol. 40 (no. 4), pp. 381-394, December, 2004 (online; October 20).
155. Cho R.-H., Segawa S., Okamoto K., Mizuno A., Kaneko T., Intracellularly labeled pyramidal neurons in hte corti -cal areas projecting to the spinal cord. II. Intra- and juxta-columnar projection of pyramidal neurons to corticospi -nal neurons. Neuroscience Research, vol. 40 (no. 4), pp. 395-410, December, 2004 (online; October 20).
156. Zhou L., Furuta T., Kaneko T., Neurokinin B-producing projection neurons in the lateral stripe of the striatum andcell clusters of the accumbens nucleus in the rat. The Journal of Comparative Neurology vol 480 (no. 2), pp. 143-161, December 6, 2004 (online; October 28).
*. Fujiyama F., Kuramoto E., Okamoto K., Hioki H., Furuta T., Zhou L., Nomura S., Kaneko T., Presynaptic localiza -tion of an AMPA-type glutamate receptor in corticostriatal and thalamostriatal axon terminals. European Journal of Neuroscience, in press, 2004.
**. Li J.-L., Tomioka R., Okamoto K., Nakamura K., Wu S.-X., Kaneko T., Mizuno N., Efferent and

afferent connec -tions of GABAergic neurons in the supratrigeminal and the intertrigeminal regions. An immunohistochemicaltract-tracing study in the GAD67-GFP knock-in mouse. Neuroscience Research, in press, 2004.
R Tomioka et al. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. European Journal of Neuroscience 2005, in press

A01-09 畠 義郎

1. Katoh-Semba R., Ichisaka S., Hata Y., Tsumoto T., Eguchi K., Miyazaki N., Matsuda M., Takeuchi I.K. & Kato K. Neurotrophin-4 is distributed in limited regions of the nervous system in embryonic and adult rats. J. Neurochem. 86, 660-668 (2003)
2. Jiang B., Akaneya Y., Hata Y. & Tsumoto T. Long-term depression is not induced by low frequency stimulation in rat visual cortex in vivo: A possible preventing role of endogenous BDNF. J. Neurosci. 23, 3761-3770 (2003)
3. Yasuda H., Higashi H., Kudo Y., Inoue T., Hata Y., Mikoshiba M. & Tsumoto T. Imaging of calcineurin activated by long-term depression-inducing synaptic inputs in living neurons of rat visual cortex. Eur. J. Neurosci. 17, 287-297 (2003)
4. Ichisaka S., Katoh-Semba R., Hata Y., Ohshima M., Kameyama K. & Tsumoto T. Activity-dependent change in the protein level of brain-derived neurotrophic factor but no change in other neurotrophins in the visual cortex of young and adult ferrets. Neuroscience 117, 361–371 (2003)
5. Ohshima M., Hata Y., Ichisaka S., Wakita M., Fukuda M., Kameyama K. & Tsumoto T. Chronic, electrical stimulation of afferents from one eye changes ocular dominance of visual cortical neurons in kittens. J. Neurophysiol. 88, 2147-2151 (2002)
6. Jiang B.-J., Akaneya Y., Ohshima M., Ichisaka S., Hata Y. & Tsumoto T. Brain-derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex in vivo in young rats, but does not in the adult. Eur. J. Neurosci. 14, 1219-1228 (2001)
7. Katoh-Semba R., Takeuchi I.K., Inaguma Y., Ichisaka S., Hata Y., Tsumoto T., Iwai M., Mikoshiba K. & Kato K. Induction of brain-derived neurotrophic factors by convulsant drugs in the rat brain: Involvement of voltage-dependent calcium channels. J. Neurochem. 77, 71-83 (2001)
8. Hata Y., Ohshima M., Ichisaka S., Wakita M., Fukuda M. & Tsumoto T. BDNF expands ocular dominance columns in visual cortex in monocularly deprived and non-deprived kittens, but does not in adult cats. J. Neurosci. 20:RC57 (1–5) (2000)
9. 一坂吏志、畠 義郎 脳の神経回路形成の臨界期. 生体の科学 55, 26-32 (2004)
10. 一坂吏志、畠 義郎 眼優位可塑性における神経栄養因子の役割. 脳の科学 増刊「神経の再生」81, 81-88 (2003)
11. Ohshima M., Hata Y., Ichisaka S., Kameyama K. and Tsumoto T. Effects of brain-derived neurotrophic factor on morphology of individual geniculo-cortical axons in kitten visual cortex. Soc. Neurosci. Abst. 28: 332.6. (2002)
12. Jiang B, Akaneya Y, Ichisaka S, Hata Y, Tsumoto T Endogenous bdnf prevents low frequency stimulation from inducing ltd in in vivo visual cortex of young rats. Soc. Neurosci. Abst. 28: 647.10.(2002)
13. Ichisaka S, Katoh-Semba R, Hata Y, Ohshima M, Kameyama K & Tsumoto T Activity-dependent changes in the level of bdnf protein in the visual cortex of young and adult ferrets. Soc. Neurosci. Abst. 26: 221.16 (2000)
14. Jiang B, Ohshima M, Ichisaka S, Hata Y, Tsumoto T BDNF induces a long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex in vivo in young but not adult rats. Soc. Neurosci. Abst. 26: 283 (2000)

A01-10 稲垣 直之

1) Inagaki, N., Nishizawa, M., Arimura, N., Yamamoto, H., Takeuchi, Y., Miyamoto, E., Kaibuchi, K., Inagaki, M., Activation of Ca2+/calmodulin-dependent Protein Kinase II within Post-synaptic Dendritic Spines of Cultured Hippocampal Neurons, **J. Biol. Chem.** 275, 27165-27171 (2000).
2) Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Menager, C., Nakamura, N., Amano, M., Iwamatsu, A., Goshima, Y., Kaibuchi, K., Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein-2 by Rho-kinase: Evidence for Two Separate Signaling Pathways for Growth Cone Collapse, **J. Biol. Chem.**, 275, 23973-23980 (2000).
3) Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., and Kaibuchi, K., CRMP-2 Induces Axons in Cultured Hippocampal Neurons, **Nature Neurosci.** 4, 781-782 (2001).

4) Taya, S., Inagaki, N., Sengiku, H., Makino, H., Iwamatsu, A., Urakawa, I., Nagano, K., Kataoka, S., and Kaibuchi, K., Direct Interaction of Insulin-like growth factor-1 receptor with leukemia-associated RhoGEF, **J. Cell Biol.** 155, 809-819 (2001).
5) Canossa, M., Gartner, A., Campana, G., Inagaki, N., and Thoenen, H., Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI)- and Trk-receptor activation is mediated via phospholipase C signaling pathways, **EMBO J.** 20, 1641-1650 (2001).
6) Oguri, T., Takahata, I., Katsuta, K., Nomura, E., Hidaka, M., and Inagaki. N., Proteome analysis of rat hippocampal neurons by multiple large gel two-dimensional electrophoresis, **Proteomics** 2, 666-672 (2002).
7) Fukata Y., Itoh T.J., Kimura T., Menager C., Nishimura T., Shiromizu T., Watanabe H., Inagaki, N., Iwamatsu A., Hotani H., Kaibuchi K., CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly, **Nature Cell Biol.** 4, 583-591 (2002).
8) Inagaki, N., Katsuta, K., Nomura, E., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T., High resolution large gel two-dimensional electrophoresis for proteomics, **BIOforun Int.** 6, 324-325 (2002).
9) Inagaki, N., Katsuta, K., Nomura, E., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T., Electrophorese bidimensionnelle haute resolution sur gel extra large pour la proteomique, **BIOforun Europe Edition Francaise** 1, 28-29 (2003)
10) Suzuki, Y., Nakagomi, S., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Aizawa, H., Kikuchi, K., and Kiyama, H., Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured moter neurons of rat, **J. Neurochem.** 86, 1042-1050 (2003).
11) Nomura, E., Katsuta, K., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T. and Inagaki, N., Acid-labile surfactant Improves In-solution dodecyl sulfate polyacrylamide gel protein digestion for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping, **J. Mass Spectrometry** 39, 202-207 (2004).
12) Inagaki, N. and Katsuta, K. Large gel two-dimensional electrophoresis: improving recovery of cellular proteome, **Curr. Proteomics** 1, 35-39 (2004).

A01-11 川口 泰雄

1. Kubota Y, Kawaguchi Y (2000) Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. **J Neurosci** 20: 375-386.
2. Kawaguchi Y (2001) Distinct firing patterns of neuronal subtypes in cortical synchronized activities. **J Neurosci** 21: 7261-7272.
3. Kondo S, Kawaguchi Y (2001) Slow synchronized bursts of inhibitory postsynaptic currents (0.1~0.3 Hz) by cholinergic stimulation in the rat frontal cortex in vitro. **Neuroscience** 107: 551-560.
4. Kawaguchi Y., Kondo S. (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. **J Neurocytol** 31: 277-287.
5. Karube F., Kubota Y., Kawaguchi Y. (2004) Axon branching and synaptic bouton phenotypes in GABAergic nonpyramidal cell subtypes. **J Neurosci** 24: 2853-2865.

A01-13 伊佐 正

1. Saito Y, Isa T (2000) Voltage-gated transient outward currents neurones with different firing properties in rat superior colliculus. **Journal of Physiology** (London), 528: 91-105.
2. Tsuzuki K, Isa T, Ozawa S (2000) Subunit composition of AMPA receptors expressed by single hippocampal neurons. **Neuroreport** 11:3583-3587.
3. Endo T, Isa T (2001) Functionally different AMPA-type glutamate receptors in morphologically identified neurons in superficial layer of rat superior colliculus. **Neuroscience**, 108: 129-141.
4. Kobayashi Y, Saito Y, Isa T (2001) Facilitation of saccade initiation by brainstem cholinergic system. **Brain Development**, 23 S24-S27.
5. Isa T, Saito Y (2001) The direct visuo-motor pathway in mammalian superior colliculus; novel perspective on the interlaminar connection. **Neuroscience Research**, (update article) 41: 107-113.
6. Kobayashi Y, Inoue Y, Yamamoto M, Isa T, Aizawa H (2002) Contribution of pedunculopontine tegmental nucleus neurons to performance of visually guided saccade tasks in monkeys. **Journal of Neurophysiology**, 88:715-731.
7. EndoT, Isa T (2002) Postsynaptic and presynaptic $GABA_B$ receptor-mediated inhibition in rat

superficial superior colliculus neurons. **Neuroscience Letters** 322: 126-130.
8. Isa T, Sasaki S (2002) Brainstem control of head movements during orienting; organization of the premotor circuits. **Progress in Neurobiology**, 66: 205-241.
9. Kobayashi Y, Isa T (2002) Sensory-motor gating and cognitive control by the brainstem cholinergic system. **Neural Networks** 15:731-741.
10. Isa T (2002) Intrinsic processing in the mammalian superior colliculus. **Current Opinion in Neurobiology**, 12:668-677.
11. Saito Y, Isa T (2003) Local excitatory network and NMDA receptor activation generate a synchronous and non-linear bursting command from the superior colliculus. **Journal of Neuroscience**, 23:5854-5864.
12. Katsuta H, Isa T (2003) Release from $GABA_A$ receptor-mediated inhibition unmasks interlaminar connection within superior colliculus in anesthetized adult rats. **Neuroscience Research**, 46:73-83.
13. Yamashita T, Isa T (2003) Fulfenamic acid sensitive, Ca_{2+}-dependent inward current induced by nicotinic acetylcholine receptors in dopamine neurons. **Neuroscience Research**, 46:463-473.
14. Endo T, Yanagawa Y, Obata K, Isa T (2003) Characteristics of GABAergic neurons in the superficial superior colliculus. **Neuroscience Letters**, 346:81-84.
15. Yamashita T, Isa T (2003) Ca_{2+}-dependent inward current induced by nicotinic receptor activation depends on Ca_{2+}/calmodulin-CaMKII pathway in dopamine neurons. **Neuroscience Research**, 47: 225-232.
16. Saitoh K, Hattori S, Song W-J, Isa T, Takakusaki K (2003) Nigral GABAergic inhibition upon cholinergic neurons in the rat pedunculopontine tegmental nucleus. **European Journal of Neuroscience**, 18: 879-886.
17. Alstermark B, Ogawa J, Isa T (2004) Lack of monosynaptic corticomotoneuronal excitation in the adult rat: fast disynaptic excitation is mediated via reticulospinal neurones and slow polysynaptic excitation via segmental interneurons. **Journal of Neurophysiology**, 91:1832-1839.
18. Yamashita T, Isa T (2004) Enhancement of excitatory postsynaptic potentials by preceding application of acetylcholine in mesencephalic dopamine neurons. **Neuroscience Research** 49: 91-100.
19. Sakatani T, Isa T (2004) PC-based high-speed video-oculography for measuring rapid eye movements in mice. **Neuroscience Research**, 49:123-131.
20. Tanaka H, Ono K, Shibasaki H, Isa T, Ikenaka K (2004) Conduction properties of identified neural pathways in the central nervous system of mice in vivo. **Neuroscience Research**, 49:113-122.
21. Saitoh K, Isa T, Takakusaki K (2004) Nigral GABAergic inhibition upon mesencephalic dopaminergic cell groups in rats. **European Journal of Neuroscience**, 19:2399-2409.
22. Sasaki S, Isa T, Pettersson L-G, Alstermark B, Naito K, Yoshimura K, Seki K, Ohki Y (2004) Dexterous finger movements in primate without monosynaptic corticomotoneuronal excitation. **Journal of Neurophysiology**, 92:3142-3147.
23. Saito Y, Isa T (2004) Laminar specific distribution of lateral excitatory connections in the rat superior colliculus. **Journal of Neuophysiology**, 92:3500-3510.
24. Li F, Endo T, Isa T (2004) Presynaptic muscarinic acetylcholine receptors suppress GABAergic synaptic transmission in the intermediate gray layer of mouse superior colliculus. **European Journal of Neuroscience**, 20:2079-2088.
25. Sasaki S, Naito K, Yoshimura K, Isa T, Seki K, Pettersson LG, Alstermark B & Ohki Y (2004) Cortico-motoneuronal system and dexterous finger movements. **Journal of Neurophysiology** 92:3601-3603.
26. Watanabe M, Kobayashi Y, Inoue Y, Isa T (2005) Effects of local nicotinic activation of the superior colliculus on saccades in monkeys. **Journal of Neurophysiology**, 93: 519-534.
27. Saito Y, Isa T (2005) Organization of interlaminar interactions in the rat superior colliculus. **Journal of Neurophysiology**, in press.

A01-14 佐藤 宏道

1. Akasaki, T., Sato, H., Yoshimura, T., Ozeki, H. and Shimegi, S. Suppressive effects of receptive field surround on neuronal activity in the cat primary visual cortex. **Neurosci. Res.** 43: 207-220. (2002)
2. Ozeki, H., Sadakane, O., Akasaki, T., Naito, T., Shimegi, S. and Sato, H. Relationship between excitation and inhibition underlying size tuning and contextual response modulation in the cat primary visual cortex. **J. Neurosci.** 24: 1428-1438. (2004)

A01-15 大澤 五住

1. Freeman RD, Ohzawa I, Walker G. Beyond the classical receptive field in the visual cortex. Prog Brain Res. 134:157-170. (2001)
2. Peterson M, Ohzawa I, Freeman R. Neural and perceptual adjustments to dim light. Vis Neurosci. 18(2):203-208. (2001)
3. Anzai A, Ohzawa I, Freeman RD. Joint-encoding of motion and depth by visual cortical neurons: neural basis of the Pulfrich effect. Nat Neurosci. 4(5):513-518. (2001).
4. Walker GA, Ohzawa I, Freeman RD, Disinhibition outside receptive fields in the visual cortex, J Neurosci., 22(13), 5659-5668, (2002)
5. 大澤五住：「視覚高次機能のニューロインフォマティクス」,脳の科学, 24,53-59, (2002)
Nishimoto, S., Arai, M., Ohzawa, I., Accuracy of subspace mapping of spatiotemporal frequency domain visual receptive fields, Journal of Neurophysiology. (2005) in press

A01-16 宋 文杰

1. Maeda S, Song W-J, Ishii S, Nonlinear and noisy extension of independent component analysis: theory and its application to a pitch sensation model. Neural Computation (in press).
2. Otsuka T, Abe T, Tsukagawa T, Song W-J, Conductance-based model of the voltage-dependent generation of a plateau potential in subthalamic neurons. J Neurophysiol 92(2004)255-264.
3. Hattori S, Murakami F, and Song W-J, Rundown of a transient potassium current is attributable to change in channel voltage-dependence. Synapse 48(2003)57-65.
4. Hattori S, Murakami F, and Song W-J, Quantitative relationship between between Kv4.2 mRNA and A-type potassium current in rat striatal cholinergic interneurons during postnatal development. J Neurophysiol 90(2003)175-183.
5. Saitoh K, Hattori S, Song W-J, Isa T and Takakusaki K, Nigral GABAergic inhibition upon cholinergic neurons in the rat pedunculopontine tegmental nucleus. Eur J Neuroscience 18(2003)879-886.
6. Inagaki S, Katura T, Kawaguchi H, and Song W-J, Isolation of neural activity from respiratory and heartbeat noises for in vivo optical recordings using independent component analysis. Neurosci Lett 352 (2003)9-12.
7. Shin R-M, Masuda M, Miura M, Sano H, Shirasawa T, Song W-J, Kobayashi K, and Aosaki T, Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons. J Neurosci 23(37) (2003) 11662-11672.
8. Song W-J, Genes responsible for native depolarization-activated K+ currents in neurons. Neurosci. Res., 42:7-14, 2002.
9. 宋文杰、大塚岳、 大脳基底核のリズムと視床下核。脳の科学 23:1061-1067, 2001。
10. Maeda S, Inagaki S, Kawaguchi H, and Song W-J, Separation of signal and noise from in vivo optical recordings using independent component analysis. Neurosci Lett, 302(2001)137-140.
11. Otsuka T, Murakami F, and Song W-J, Excitatory postsynatic potentials trigger a plateau potential in rat subthalamic neurons at hyperpolarized states. J Neurophysiol 86(2001)1816-1825.
12. Song W-J, Tkatch T, Surmeier DJ, Adenosine receptor expression and modulation of Ca2+ channels in rat striatal cholinergic interneurons. J Neurophysiol 83(1):322-332, 2000.
13. Foehring RC, Mermelstein PG, Song W-J, Ulrich S, Surmeier, DJ, Unique properties of R-type calcium currents in neocortical and neostriatal neurons. J Neurophysiol 84(2000)2225-2236.
14. Song W-J, Baba Y, Otsuka T, Murakami F, Characterization of Ca2+ channels in rat subthalamic nucleus neurons. J Neurophysiol 84(2000)2630-2637.

A01-18 辰巳 仁史

1.Hoshino,M., Tatsumi,H., Nakashima,T., Sokabe,M., In vitro reconstitution of signal transmission from a hair cell to the growth cone of a chick vestibular ganglion cell, Neuroscience, 120 (2003) 993-1003.
2.Kawakami K, Tatsumi H, Sokabe M. Dynamics of integrin clustering at focal contacts of endothelial cells studied by multimode imaging microscopy. J Cell Science 2001; 114:3125-313.
3.Miyashita T, Tatsumi H, Furuta H, Mori N, Sokabe M. Calcium-senseitive nonselective cation channel idetified in the epithelial cells isolated from the endolymphtic sac of guinea pigs. J. Membrane Biology 2001; 182:113-122.
4.Soeda H, Tatsumi H, Kozawa Y, Mishima H, Imai K, Katayama Y. Functional characterization of calcium channels localized on the growth cones of cultured art dorsal root ganlion cells. Neurosci Lett 2002; 325:5-8.

A01-19　船橋 新太郎

1. Funahashi, S. and Inoue, M. (2000) Neuronal interactions related to working memory processes in the primate prefrontal cortex revealed by cross-correlation analysis. Cerebral Cortex, 10: 535-551
2. 船橋新太郎 (2001) 「前頭連合野とワーキングメモリ」神経研究の進歩、45 (2): 223-234.
3. Funahashi, S. (2001) Neuronal mechanisms of executive control by the prefrontal cortex. Neuroscience Research, 39: 147-165.
4. Takeda, K. and Funahashi, S. (2002) Prefrontal task-related activity representing visual cue location or saccade direction in spatial working memory tasks. Journal of Neurophysiology, 87: 567-588.
5. Funahashi, S. and Takeda, K. (2002) Population-vector analysis by primate prefrontal neuron activities. Journal of Biological Physics, 28: 527-537.
6. Inoue, M. and Funahashi, S. (2002) Prefrontal delay-period activity is affected by visual cues presented outside the memory field. NeuroReport, 13: 2079-2101.
7. Funahashi, S. and Takeda, K. (2002) Information processes in the primate prefrontal cortex in relation to working memory processes. Reviews in the Neurosciences, 13: 313-345.
8. Funahashi, S. and Takdea, K. (2003) What information is represented by prefrontal neuronal activities? In: "Cognition and Emotion in the Brain," T. Ono, G. Matsumoto, R.R. Llinas, A. Berthoz, R. 9. Norgren, H. Nishijo, R. Tamura (eds.), Excerpta Medica International Congress Series 1250, Elsevier, p. 93-104.
10. 竹田和良、船橋新太郎 (2003)「霊長類を用いた研究を通して精神疾患の病態にせまる　ー統合失調症とワーキングメモリ」実験医学　21: 1309-1314.
11. Funahashi, S. (2004) Information processing in the primate prefrontal cortex. In: "Prefrontal Cortex: From Synaptic Plasticity to Cognition," S. Otani (ed.), Kluwer Academic Publisher, Boston, p. 201-218.
12. Watanabe, Y. and Funahashi, S. (2004) Neuronal Activity Throughout the Primate Mediodorsal Nucleus of the Thalamus during Oculomotor Delayed- Responses. I. Cue-, Delay-, and Response-Period Activity. Journal of Neurophysiology, 92: 1738-1755.
13. Watanabe, Y. and Funahashi, S. (2004) Neuronal Activity Throughout the Primate Mediodorsal Nucleus of the Thalamus during Oculomotor Delayed- Responses. II Activity Encoding Visual versus Motor Signal. Journal of Neurophysiology, 92: 1756-1769.
14. Funahashi, S., Takeda, K., and Watanabe, Y. (2004) Neural mechanisms of spatial working memory: contributions of the dorsolateral prefrontal cortex and the thalamic mediodorsal nucleus. Cognitive, Affective, and Behavioral Neuroscience, in press.
15. Takeda, K. and Funahashi, S. (2004) Population vector analysis of primate prefrontal activity during spatial working memory. Cerebral Cortex, in press.

A01-21　佐々木 成人

1. Sasaki S., Hongo T., Hirai N., Naito K., Petropavlovskaya E. Eye-head-hand coordination in food taking movements using forceps in monkeys. **Nerosci. Res.** 50: S70 (2004)
2. Sasaki S., Isa T., Pettersson LG., Alstermark B., et. al. Dexterous finger movements in primate without monosynaptic corticomotoneuronal excitationJ. **J. Neurophysiol.** 92: 3142-3147 (2004)
3. Sasaki S., Yoshimura K., Naito K. The neural control of orienting: role of multiple branching reticulospinal neurons. **Prog. Brain Res.** 143: 383-389 (2003)
4. Isa T., Sasaki S. Brainstem control of head movements during orienting; organization of premotor circuits. **Prog. in Neurobilogy** 66: 205-241 (2002)
5. Perfiliev S., Pettersson LG., Sasaki S. Updating of ongoing reaching movement in cats. **Jpn. Neurosc Res. Suppl** 26: S9 (2002)
6. Sasaki S., Yoshimura K., Naito K., Takeuchi HA. Neural control mechanisms of velocity guided orienting in cats. **Jpn. J. Physisol.** 52: S159 (2002)
7. Yoshimura K., Naito K., Takeuchi HA., Sasaki S. Visually guided and velocity facilitated orienting in unrestrained cats. **Jpn. J. Physisol.** 51: S225 (2001)
8. Yoshimura K., Naito K., Takeuchi HA., Sasaki S. Subtypes of visually guided orienting in unrestrained cats. **Jpn. J. Physisol.** 50: S156 (2000)
9. Sasaki S., Yoshimura K., Naito K., Takeuchi HA. Velocity and position guided orienting in

unrestrained cats. **Neurosci. Res. Suppl** 24: S53 (2000)

A01-22 鍋倉 淳一

1,Witt MR, Poulsen CF, Lukensmejer B, Westh-Hansen SE, Nabekura J, Akaike N, Nielsen M
Structural requirements for the interaction of unsaturated free fatty acids with recombinant human GABAA receptor complex. Annals of the New York Academy of Sciences 868: 697-700, 1999

2,Uki M, Nabekura J, Akaike N. Inhibitory action of steroid on nicotinic ACh response in rat superior cervical ganglionic neurons. Journal of Neurochemistry 72:808-814, 1999

3,Nabekura J, Xu TL, Rhee JS, Li J , Akaike N Alpha2 adrenoceptor mediated enhancement of glycine response in rat sacral commisural neurons. Neuroscience 89: 29-41, 1999.

4,Kakazu Y, Akaike N, Komiyama S, Nabekura J Regulation of intracellular Cl^- by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. Journal of Neuroscience 19: 2843-2851, 1999

5,Omura T, Nabekura J, Akaike J Intracellular pathways of V1 and V2 receptors activated by arginine vasopressin in rat hippocampal neurons. Journal of Biological Chemistry 274: 32762-32770, 1999

6,Noda M, Nakanishi H, Nabekura,J, Akaike N (2000) AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. Journal of Neuroscience 20: 251-258, 2000

7,Uchida S, Akaike N, Nabekura J. D2 Dopamine receptor activation of inward rectifying K^+ channel in rat substantia nigra neurons. Neuropharmacology, 39: 191-201, 2000

8,Rhee JS. Wang JM, Nabekura J, Inoue K, Akaike N. ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSCs frequency at dissociated dorsal horn interneurone synapses. Journal of Physiology 524: 471-483, 2000

9,Furukawa Y, Okada M, Akaike N, Hayashi H, Nabekura J. Reduction of voltage dependent Mg^{2+} block of NMDA receptor mediated response after in vivo axonal injury. Neuroscience 96: 385-392, 2000

10,Kakazu H, Uchida S, Nakagawa H, Akaike N, Nabekura J. Reversibility and ion Selectivity of K^+-Cl^- cotransport in the CNS neurons. Journal of Neurophysiology 84: 281-288, 2000

11,Morishita H, Makishima T, Kaneko C, Lee Y-S, Segil N, Takahashi K, Kuraoka A, Nakagawa T, Nabekura J, Nakayama J, Nakayama K -I (2001)Deafness due to degeneration of cochlear neurons in caspase-3-deficient mice. Biochemical and Biophysical Research Communication 285: 142-149, 2001

12,Nabekura J, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Shibata S, Matsubara A, Jinno S, Mizoguchi Y, Sasaki A & Ishibashi H (2004). Developmental Switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals. Nature Neuroscience, 7: 17-23, 2004

13,Shibata S, Kakazu Y, Okabe A, Fukuda A, Nabekura J. Experience-dependent changes in intracellular Cl- regulation in developing auditory neurons. Neurosci enceResearch, 48(2):211-220, 2004.

A01-23 渡邉 裕二

1.Watanabe, Y., Toyoda R., Nakamura, H. Navigation of trochlear motor axons along the midbrain-hindbrain boundary by neuropilin 2. **Development** 131, 681-692, 2004.

2.Nakamura H, Katahira T, Watanabe, Y., Funahashi, J.-i. Gain- and loss-of-function in chick embryos by electroporation. **Mech. Dev.** 121, 1137-1143, 2004.

3.Watanabe, Y., Katahira, T., Sato, T. Nakamura, H. Molecular mechanisms for defining tectum territory in chick embryogenesis. Acta Histchem. **Cytochem.** 33, 1-4, 2000.

4.Nakamura, H., Watanabe, Y., Funahashi, J.-I. Misexpression of the genes in the brain vesicles by in ovo electroporation. **Dev. Growth Differ.** 42, 199-201, 2000.

A01-24 藤田 一郎

1. Tanigawa H., Wang QW, Fujita I (2005) Organization of horizontal axons in the inferior temporal cortex and primary visual cortex of the macaque monkey. **Cerebral Cortex**, in press.

2. Tamura H, Kaneko H, Kawasaki K, Fujita I. (2004) Presumed inhibitory neurons in the macaque inferior temporal cortex: visual response properties and functional interactions with adjacent neurons. **J Neurophysiol** 91: 2782-2796.

3. Wang Y, Fujita I, Murayama Y (2003) Coding of visual patterns and textures in monkey inferior temporal cortex. NeuroRep 14: 453-457.

4. Xu L, Tanigawa H, Fujita I (2003) Distribution of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate -type glutamate receptor subunits (GluR2/3) along the ventral visual pathway in the monkey. **J Comp Neurol** 456: 396-407.

Tanigawa, H. et al. Organization of horizontal axons in the inferior temporal cortex and primary visual cortex of the Macaque Monkey. **Cerebral Cortex** (2005) in press
Shinomoto, S. et al. Regional and laminar differences in in vivo firing patterns of primate cortical neurons. **Journal of Neurophysiology** (2005) in press

A02-01 澁木 克栄

1. Kudoh M, Seki K, Shibuki K: Learning of sound sequence discrimination dependent on cholinergic inputs to the rat auditory cortex. **Neurosci. Res.** 50: 113-123, 2004.
2. Murakami H, Kamatani D, Hishida R, Takao T, Kudoh M, Kawaguchi T, Tanaka R, Shibuki K: Short-term plasticity visualized with flavoprotein autofluorescence in the somatosensory cortex of anesthetized rats. **Eur. J. Neurosci.** 19: 1352-1360, 2004.
3. Kitaura H, Hishida R, Kudoh M, Shibuki K: Activity-dependent persisting modification of polysynaptic neural circuits involving layer V pyramidal neurons in rat auditory cortex *in vitro*. **Eur. J. Neurosci.** 19: 356-364, 2004.
4. Maffei A, Prestori F, Shibuki K, Rossi P, Taglietti V, D' Angelo E: NO enhances presynaptic currents during cerebellar mossy fiber-granule cell LTP. **J. Neurophysiol.** 90: 2478-2483, 2003.
5. Seki K, Kudoh M, Shibuki K: Polysynaptic slow depolarization and spiking activity elicited after induction of long-term potentiation in rat auditory cortex. **Brain Res.** 988: 114-120, 2003.
6. Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M, Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T, Tanaka R: Dynamic imaging of somatosensory cortical activities in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. **J. Physiol. (Lond.)** 549: 919-927, 2003.
7. Ono K, Kudoh M, Shibuki K: Relational discrimination learning between amplitude-modulated sounds in the rat. **Neurosci. Lett.** 342: 171-174, 2003.
8. Hishida R, Hoshino K, Kudoh M, Norita M, Shibuki K: Anisotropic functional connections between the auditory cortex and area 18a in rat cerebral slices. **Neurosci. Res.** 46: 171-182, 2003.
9. Kudoh M, Sakai M, Shibuki K: Differential dependence of LTD on glutamate receptors in the auditory cortical synapses of cortical and thalamic inputs. **J. Neurophysiol.** 88: 3167-3174, 2002.
10. Ohnishi K, Hokari S, Shutou H, Kanbe D, Ohshima M, Sawamura H, Furuichi N, Shibuki K, Goda M: Neural-network-like biomachinogenesis via semeiogenesis : a unified theory on the origins and evolution of genetic codes and other semeiotic systems. **Viva Origino** 30: 63-78, 2002.
11. Watanabe S, Kudoh M, Ohnishi K, Shibuki K: Long-lasting memory of sounds combined with reward in rats. **Neurosci. Lett.** 311: 25-28, 2001.
12. Seki K, Kudoh M, Shibuki K: Sequence dependence of posttetanic potentiation after sequential heterosynaptic stimulation in the rat auditory cortex. **J. Physiol. (Lond.)** 533: 503-518, 2001.
13. Kimura S, Watanabe K, Yajiri Y, Uchiyama S, Hasegawa K, Shibuki K, Endo N: Cerebrospinal fluid nitric oxide metabolites are novel predictors of pain relief in degenerative lumbar diseases. **Pain** 92: 363-371, 2001.
14. Shibuki K, Kimura S, Wakatsuki H: Suppression of the induction of long-term depression by carbon monoxide in rat cerebellar slices. **Eur. J. Neurosci.** 13: 609-616, 2001.

A02-02 松木 則夫

1. Nakagami, Y., K. Abe, N. Nishiyama and N. Matsuki. Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation. J. Neurosci., 20, 2003-2010, 2000.
2. Itokazu, N., Y. Ikegaya, M. Nishikawa and N. Matsuki. Bidirectional actions of docosahexaenoic acid on hippocampal neurotransmission in vivo. Brain Res., 862, 211-216, 2000.
3. Ikegaya, Y., Y. Itsukaichi-Nishida, M. Ishihara, D. Tanaka and N. Matsuki. Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 μm. Neuroscience, 97, 215-217, 2000.
4. Fujita, S., Y. Ikegaya, N. Nishiyama and N. Matsuki. Ca^{2+}-independent phospholipase A_2 inhibitor impairs spatial memory of mice. Jpn. J. Pharmacol., 83, 277-278, 2000.
5. Ikegaya, Y., N. Nishiyama and N. Matsuki. L-type Ca^{2+} channel blocker inhibits mossy fiber sprouting and cognitive deficits following pilocarpine seizures in immature mice. Neuroscience, 98, 647-659, 2000.
6. Fujita, S., Y. Ikegaya, M. Nishikawa, N. Nishiyama and N. Matsuki. Docosahexaenoic acid improves long-term potentiation attenuated by phopholipase A2 inhibitor in rat hippocampal slices. Brit. J. Pharmacol., 132, 1417-1422, 2001.

7. Arai, K., N. Nishiyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Neuroprotective effects of lipoxygenase inhibitors against ischemic injury in rat hippocampal slice cultures. Brain Res., 904:167-172, 2001.
8. Mizuhashi, S., N. Nishiyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Cyclic nucleotide-mediated regulation of hippocampal mossy fiber development: a target-specific guidance. J. Neurosci., 21, 6181-6194, 2001.
9. Nakao, K., Y. Ikegaya, M. Yamada, N. Nishiyama and N. Matsuki. Spatial performance correlates with long-term potentiation of the dentate gyrus but not of the CA1 region in rats with fimbria-fornix lesions. Neurosci. Lett., 307, 159-162, 2001.
10. Arai, K., Y. Ikegaya, Y. Nakatani, I. Kudo, N. Nishiyama and N. Matsuki. Phospholipase A_2 mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability. Eur. J. Neurosci., 13, 2319-2323, 2001.
11. Arai, K., N. Matsuki, Y. Ikegaya and N. Nishiyama. Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice. Jpn. J Pharmacol., 87, 195-201, 2001.
12. Ikegaya, Y., R. Koyama, M-K Yamada, N. Nishiyama and N. Matsuki. Rapid regrowth of hippocampal mossy fibers and preceding maturation of NMDA receptor-mediated neurotransmission. Eur. J. Neurosci., 15, 1859-1862, 2001.
13. Koyama, R., M. Kobayashi-Yamada, N. Nishiyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Group II metabotropic glutamate receptor activation is required for normal hippocampal mossy fibre development in the rat. J. Physiol.(Lond.), 539, 157-162, 2002.
14. Kim, J-A., K. Mitsukawa, M. K. Yamada, N. Nishiyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Cytoskeleton disruption causes apoptotic degeneration of dentate granule cells in hippocampal slice cultures. Neuropharmacol., 42, 1109-1118, 2002.
15. Ueno, S., M. Tsukamoto, T. Hirano, K. Kikuchi, M. K. Yamada, N. Nishiyama, T. Nagano, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Mossy fiber Zn^{2+} spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. J. Cell Biol. 158, 215-220, 2002.
16. Ikegaya, Y. and N. Matsuki. Regionally selective neurotoxicity of NMDA and colchicine is independent of hippocampal neural circuitry. Neuroscience, 113, 253-256, 2002
17. Ikegaya, Y., Y. Ishizaka, and N. Matsuki. BDNF attenuates hippocampal LTD via activation of phospholipase C: Implications for a vertical shift in the frequency-response curve of synaptic plasticity. Eur. J. Neurosci., 16, 145-148, 2002.
18. Yamada, M. K., K. Nakanishi, S. Ohba, T. Nakamura, Y. Ikegaya, N. Nishiyama and N. Matsuki. Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. J. Neurosci., 22, 7580-7585, 2002.
19. Ikegaya, Y., S. Matsuura, S. Ueno, A. Baba, M. K. Yamada, N. Nishiyama and N. Matsuki. βAmyloid enhances glial glutamate uptake activity and attenuates synaptic efficacy. J. Biol. Chem., 277, 32180-32186, 2002.
20. Nakao, K., Y. Ikegaya, M. K. Yamada, N. Nishiyama and N. Matsuki. Hippocampal long-term depression as an index of spatial working memory. Eur. J. Neurosci., 16, 970-974, 2002.
21. Ikegaya, Y., I. Delcroix, Y. Iwakura, N. Matsuki and N. Nishiyama. Interleukin-1β abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission. Synapse, 47, 54-57, 2003.
22. Nakao, K., Y. Ikegaya, M. K. Yamada, N. Nishiyama and N. Matsuki. Fimbrial control of bidirectional synaptic plasticity of medial perforant path-dentate transmission. Synapse, 47, 163-168, 2003.
23. Baba, A., M. K. Yamada, N. Nishiyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Different Ca^{2+} dynamics between isolated hippocampal pyramidal cells and dentate granule cells. J. Neurocytol., 31, 41-48, 2003.
24. Tsukamoto, M., T. Yasui, M. K. Yamada, N. Nishiyama, N. Matsuki and Y.Ikegaya. Mossy fibre synaptic NMDA receptors trigger non-Hebbian long-term potentiation at entorhino-CA3 synapses in the rat. J. Physiol. (Lond.), 546, 665-675, 2003.
25. Kim, J.-A., M. K. Yamada, N. Nishiyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Mossy fiber pathfinding in multilayer organotypic cultures of rat hippocampal slices. Cell. Mol. Neurobiol., 23, 115-119, 2003.
26. Baba, A., T. Yasui, S. Fujisawa, R. X. Yamada, M. K. Yamada, N. Nishiyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Activity-evoked capacitative Ca^{2+} entry: Implications in synaptic plasticity. J. Neurosci., 23, 7737-7741, 2003.
27. Fujisawa, S., M. K. Yamada, N. Nishiyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya. BDNF Boosts Spike Fidelity in Chaotic Neural Oscillations. Biophys J., 86, 1820-1828, 2004.
28. Koyama, R., M. K. Yamada, S. Fujisawa, R. K.-Semba, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Hyperexcitable Reentrant Circuits in the Dentate Gyrus. J. Neurosci. 24: 7215-7224, 2004.
29. Akimoto M., Y. Ikeda-Matsuo, M. K. Yamada, A. Baba, R. Itamura, N. Nishiyama, Y. Ikegaya and N. Matsuki.

Hepatocyte growth factor as an enhancer of NMDA current. Neuroscience, 128:155-162, 2004.
30. Nakao, K., K. Matsuyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya. Amygdala stimulation modulates hippocampal synaptic plasticity. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 14270-14275, 2004.
31. Fujisawa, S., Matsuki, N. and Ikegaya, Y.: Chronometric readout from a memory trace: Gamma-frequency field stimulation recruits timed recurrent activity in the rat CA3 network. J. Physiol. (Lond.), 560:123-131, 2004.
32. Ohba, S., Ikeda, T., Ikegaya, Y., Nishiyama, N., Matsuki N. and Yamada, M. K. BDNF locally potentiates GABAergic presynaptic machineries: Target-selective circuit inhibition. Cereb. Cortex, in press.
33. 松木則夫 シナプス可塑性における細胞接着因子の役割 脳21, 3(4), 37-41, 2000.
34. 松木則夫、柄本昌子、中尾和人、上野さやか、池谷裕二 海馬CA3野におけるヘテロシナプス可塑性調節 蛋白質核酸酵素 49, 373-377, 2004.

A02-03 小坂 俊夫

1. T. Fukuda and T. Kosaka (2000) Gap junctions linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus. **J Neurosci** 20; 1519-1528.
2, S. Jinno and T. Kosaka (2000) Colocalization of parvalbumin and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical disector. **J Comp Neurol** 428:;377-388.
3. T. Fukuda and T. Kosaka (2000) The dual network of GABAergic interneurons linked by both chemical and electrical synapses: a possible infrastructure of the cerebral cortex. **Neurosci Res** 38; 123-130.
4. K. Toida, K. Kosaka, Y. Aika and T. Kosaka (2000) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. **Neuroscience** 101; 11-17.
5. R. Murakawa and T. Kosaka (2001) Structural features of mossy cells in the hamster dentate gyrus, with special reference to somatic thorny excrescences. **J Comp Neurol** 429; 113-126.
6. K. Kosaka and T. Kosaka (2001) Nidus and Tasseled cell: Distinctive neuronal organization of the main olfactory bulb of the laboratory musk shrew (*Suncus murinus*). **J Comp Neurol** 430; 542-561
7. S. Jinno, N. Kinukawa and T. Kosaka (2001) Morphometric multivariate analysis of GABAergic neurons containing calretinin and neuronal nitric oxide synthase in the mouse hippocampus. **Brain Res** 900; 195-204.
8. K. Kosaka, K. Toida, Y. Aika and T. Kosaka (2001) Structure of intraglomerular dendritic tufts of mitral cells and their contacts with olfactory nerve terminals and calbindin-immunoreactive type 2 periglomerular neurons. **J Comp Neurol** 440; 218-235.
9. A. Doi, H. Ishibashi, S. Jinno, T. Kosaka and N. Akaike (2002) Presynaptic inhibition of GABAergic miniature currents by metabotropic glutamate receptor in the rat CNS. **Neuroscience** 109; 299-311.
10. S. Jinno and T. Kosaka (2002) Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. **J Comp Neurol** 449; 1-25.
11. K. Ogata and T. Kosaka (2002) Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. **Neuroscience** 113; 221-233.
12. S. Jinno, A. Jeromin, J. Roder, and T. Kosaka (2002) Immunocytochemical localization of neuronal calcium sensor-1 in the hippocampus and cerebellum of the mouse, with special reference to presynaptic terminals. **Neuroscience** 113; 449-461.
13. S. Jinno and T. Kosaka (2002) Immunocytochemical characterization of hippocamposeptal projecting GABAergic nonprincipal neurons in the mouse brain: a retrograde labeling study. **Brain Res** 945; 219-231.
14. K. Toida, K. Kosaka, Y. Aika and T. Kosaka (2002) Catecholaminergic neurons in the olfactory bulb. (in) "Catecholamine Metabolism: From Molecular Understanding to Clinical Diagnosis and Treatment" (T. Nagatsu, T. Nabeshima, R. McCarthy, D. Goldstein eds.)Kluwer Academic/Plenum Publishers; 289-292.
15. T. Kosaka and K. Kosaka (2003) Neuronal gap junctions in the rat main olfactory bulb, with special reference to intraglomerular gap junctions. **Neurosci Res** 45; 189-209.
16. S. Jinno, A. Jeromin, J. Roder, and T. Kosaka (2003) Compartmentation of the mouse cerebellar cortex by neuronal calcium sensor-1. **J Comp Neurol** 458; 412-424.

17. S. Jinno, S. Ishizuka, and T. Kosaka (2003) Ionic currents underlying rhythmic bursting of ventral mossy cells in the developing mouse dentate gyrus. **Eur J Neurosci** 17; 1338-1354.
18. S. Jinno and T. Kosaka (2003) Patterns of Expression of Neuropeptides in GABAergic Nonprincipal Neurons in the Mouse Hippocampus: Quantitative Analysis with Optical Disector. **J Comp Neurol** 461; 333-349.
19. T. Fukuda and T. Kosaka (2003) Ultrastructural study of gap junctions between dendrites of parvalbumin-containing GABAergic neurons in various neocortical areas of the adult rat. **Neuroscience** 120; 5-20.
20. S. Jinno and T. Kosaka (2003) Heterogeneous expression of the cholecystokinin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus, with special reference to the dorsoventral difference. **Neuroscience** 122; 869-884.
21. K. Kosaka and T. Kosaka (2004) The organization of the main olfactory bulbs of some mammals; musk shrews, moles, hedgehogs, tree shrews, bats, mice and rats. **J Comp Neurol** 472; 1-12.
22. S. Jinno and T. Kosaka (2004) Patterns of colocalization of neuronal nitric oxide synthase and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: Quantitative analysis with optical disector. **Neuroscience** 124; 797-808.
23. S. Jinno, A. Jeromin and T. Kosaka (2004) Expression and possible role of neuronal calcium sensor-1 in the cerebellum. **The Cerebellum** 3; 83-88.
24. T. Kosaka and K. Kosaka (2004) Neuronal gap junctions between intraglomerular mitral/tufted cell dendrites in the mouse main olfactory bulb. **Neurosci Res** 49; 373-379.
25. S. Jinno and T. Kosaka (2004) Parvalbumin is expressed in glutamatergic and GABAergic corticostriatal pathway in mice. **J Comp Neurol** 477; 188-201.
26. T. Kosaka and K. Kosaka (2004) Structural organization of the glomerulus in the main olfactory bulb. **Jpn J Taste Smell Res** (in press).
27. K. Kosaka and T. Kosaka (2004) The synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: the compartments of the glomerulus and the heterogeneity of the periglomerular cells. **Anat Sci Int** (in press).
T. Kosaka and K. Kosaka (2005). Intraglomerular dendritic link connected by gap junctions and chemical synapses in the mouse main olfactory bulb: electron microscopic serial section analyses. **Neuroscience** 131, 611-625.

A02-04 狩野 方伸

1. Ichise, T., Kano, M., Hashimoto, K., Yanagihara, D., Nakao, K., Shigemoto, R., Katsuki, M. and Aiba, A.: mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination and motor coordination. **Science** 288: 1832-1835, (2000年6月9日).
2. Tsubokawa, H., Offermanns, S., Simon, M.I. and Kano, M.: Calcium-dependent persistent facilitation of spike backpropagation in the CA1 pyramidal neurons. **J. Neurosci.** 20: 4878-4884, (2000年7月1日).
3. Kakizawa, S., Yamasaki, M., Watanabe, M. and Kano, M.: Critical period for activity-dependent synapse elimination in developing cerebellum. **J. Neurosci.** 20: 4954-4961, (2000年7月1日).
4. Furuya, S., Tabata, T., Mitoma, J., Yamada, K., Yamasaki, M., Makino, A., Yamamoto, T., Watanabe, M., Kano, M. and Hirabayashi, Y.: L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97: 11528-11533, (2000年10月1日).
5. Miyata, M., Finch, E.A., Khiroug, L., Hashimoto, K., Hayasaka, S., Oda, S., Inouye, M., Takagishi, Y., Augustine, G.J. and Kano, M.: Local calcium release in dendritic spines required for long-term synaptic depression. **Neuron** 28: 233-244, (2000年10月).
6. Ohno-Shosaku, T., Maejima, T. and Kano, M.: Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. **Neuron** 29: 729-738, (2001年3月).
7. McGee, A.W., Topinka, J.R., Hashimoto, K., Petralia, R.S., Kakizawa, S., Kauer, F., Aguilera-Moreno, A., Wenthold, R.J., Kano, M. and Bredt, D.S.: PSD-93 knock-out mice reveal that neuronal MAGUKs are not required for development or function of parallel fiber synapses in cerebellum. **J. Neurosci.** 21: 3085-3091, (2001年5月1日).

8. Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A. and Kano, M.: Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. **Neuron** 31: 463-475, (2001年8月16日).
9. Hashimoto, K., Ichikawa, R., Takechi, H., Inoue, Y., Aiba, A., Sakimura, K., Mishina, M., Hashikawa, T., Konnerth, A., Watanabe, M. and Kano, M.: Roles of GluRδ2 and mGluR1 in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. **J. Neurosci.** 21: 9701-9712, (2001年12月15日).
10. Tabata, T. and Kano, M.: Heterogeneous intrinsic firing properties of vertebrate retinal ganglion cells. **J. Neurophysiol.** 87: 30-41, (2002年1月).
11. Yoshida, T., Hashimoto, K., Zimmer, A., Maejima, T., Araishi, K. and Kano, M.: The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.** 22: 1690-1697, (2002年3月1日).
12. Ohno-Shosaku, T., Shosaku, J., Tsubokawa, H. and Kano, M.: Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. **Eur. J. Neurosci.** 15: 953-961, (2002年3月22日).
13. Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Mizushima, I., Yoneda, N., Zimmer, A. and Kano, M.: Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. **J. Neurosci.** 22: 3864-3872, (2002年5月15日).
14. Tabata, T., Aiba, A. and Kano, M.: Extracellular calcium controls the dynamic range of neuronal metabotropic glutamate receptor responses. **Mol. Cell. Neurosci.** 20: 56-68, (2002年6月).
15. Watase, K., Weeber, E.J., Xu, B., Antalffy, B., Yuva-Paylor, L., Hashimoto, K., Kano, M., Atkinson, R., Sun, Y., Armstrong, D.L., Sweatt, D., Orr, H.T., Paylor, R. and Zoghbi, H.Y.: A long CAG repeat in the mouse *Sca1* locus replicates SCA1 features and reveals the impact of mutant protein solubility on selective neuronal vulnerability. **Neuron** 34: 905-919, (2002年6月13日).
16. Miura, M., Watanabe, M., Offermanns, S., Simon, M.I. and Kano, M.: Group I mtabotropic glutamate receptor signaling via Gαq/Gα11 secures the induction of long-term potentiation in the hippocampal area CA1. **J. Neurosci.** 22: 8379-8390, (2002年10月1日).
17. Ichikawa, R., Miyazaki, T., Kano, M., Hashikawa, T., Tatsumi, H., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y. and Watanabe, M.: Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor GluRδ2. **J. Neurosci.** 22: 8487-8503, (2002年10月1日).
18. Kakizawa, S., Yamada, K., Iino, M., Watanabe, M. and Kano, M.: Effects of insulin-like growth factor I on climbing fiber synapse elimination during cerebellar development. **Eur. J. Neurosci.** 17: 545-554, (2003年1月31日).
19. Fukudome, Y., Tabata, T., Miyoshi, T., Haruki, S., Araishi, K., Sawada, S. and Kano, M.: Insulin-like growth factor-I as a promoting factor for cerebellar Purkinje cell development. **Eur. J. Neurosci.** 17: 2006-2016, (2003年5月29日).
20. Hashimoto, K. and Kano, M.: Functional differentiation of multiple climbing fiber inputs during synapse elimination in the developing cerebellum. **Neuron** 38: 785-796, (2003年6月5日).
21. Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Yuko Fukudome, Y., Shosaku, J., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Manabe, T. and Kano, M.: Postsynaptic M_1 and M_3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. **Eur. J. Neurosci.** 18: 109-116, (2003年7月).
22. Kitao, Y., Hashimoto, K., Matsuyama, T., Iso, H., Tamatani, T., Hori, O., Stern, D.M., Kano, M., Ozawa, K. and Ogawa, S.: ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: A role for ER stress in cerebellar development. **J. Neurosci.** 24: 1486-1496, (2004年2月11日).
23. Miyazaki, T., Hashimoto, K., Shin, H-S., Kano, M. and Watanabe, M.: P/Q-type Ca^{2+} channel α1A regulates synaptic competition on developing cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.** 24: 1734-1743, (2004年2月18日).
24. Fukudome, Y., Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Omori, Y., Fukaya, M., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Watanabe, M., Manabe, T. and Kano, M.: Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M_2-mediated direct suppression and M_1/M_3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signaling. **Eur. J. Neurosci.** 19: 2682-2692, (2004年5月18日).
25. Hartmann, J., Blum, R., Kovalchuk, Y., Adelsberger, H., Kuner, R., Durand, G.M., Miyata, M.,

Kano, M., Offermanns, S. and Konnerth, A.: Distinct roles of $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ for Purkinje cell signaling and motor behavior. **J. Neurosci.** 24: 5119-5130 (2004年6月2日).

26. Tabata, T., Araishi, K., Hashimoto, K., Hashimotodani, Y., van der Putten, H., Bettler, B. and Kano, M.: Ca^{2+} activity at $GABA_B$ receptors constitutively promotes metabotropic glutamate signaling in the absence of GABA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101: 16952-16957, (2004年11月30日).

Hashimotodani Y, Ohno-Shousaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, Araishi K, Shin HS & Kano M. (2005) Phospholipase Cbeta serves as a coincidence detector through its Ca2+ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. **Neuron.** 2005 Jan 20;45(2):257-68.

Tabata T, Haruki S, Nakayama H & Kano M (2005). GABAergic activation of an inwardly rectifying K+ current in mouse cerebellar Purkinje cells. **J Physiol.** 2005 Mar 1;563(Pt 2):443-57.

※その他、英文原著論文：7編

A02-05 伊藤 誠二

Tatsumi S, Mabuchi T, Katano T, Matsumura S, Abe T, Hidaka H, Suzuki M, Sasaki Y, Minami T & Ito S. (2005). Involvement of Rho-kinase in inflammatory and neuropathic pain through phosphorylation of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS). **Neuroscience.** 2005;131(2):491-8

1. Mabuchi T, Shintani N, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Hashimoto H, Muratani T, Minami T, Baba A and Ito S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain. **J. Neurosci. 24**, 7283-7291, 2004.
2. Mabuchi T, Kojima H, Abe T, Takagi K, Sakurai M, Ohmiya Y, Uematsu S, Akira S, Watanabe K and Ito S. Membrane-associated prostaglandin E synthase-I is required for neuropathic pain. **Neuroreport** 15, 1395-1398, 2004.
3. Tatsumi S, Mabuchi T, Matsumura S, Minami T, Sasaki Y and Ito S. Inhibition of inflammatory and naturopathic pain by H-1152, a novel and specific Rho-kinase inhibitor. **Neuroscience**, in press, 2004.
4. Unezaki S, Nishizawa M, Okuda-Ashitaka E, Masu Y, Mukai M, Kobayashi S, Sawamoto K, Okano H and Ito S. Characterization of isoforms of MOVO zinc finger protein, a mouse homologue of *Drosophila* Ovo, as a transcription factor. **Gene** 336, 47-58, 2004.
5. Otsuji T, Okuda-Ashitaka E, Kojima S, Akiyama H, Ito S and Ohmiya Y. Monitoring for dynamic biological processing by intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer system using secreted luciferase. **Anal. Biochem.** 329, 230-237, 2004.
6. Kitano T, Matsumura S, Seki T, Hikida T, Sakimura K, Nagano T, Mishina M, Nakanishi S and Ito S. Characterization of *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits involved in acute ammonia toxicity. **Neurochem. Int.** 44, 83-90, 2004.
7. Minami T, Matsumura S, Nishizawa M, Sasaguri Y, Hamanaka N and Ito S. Acute and late effects on induction of allodynia by acromelic acid, a mushroom poison related structurally to kainic acid. **Br. J. Pharmacol.** 142, 679-688, 2004.
8. Nishimura W, Muratani T, Tatsumi S, Sakimura K, Mishina, M, Minami T and Ito S. Characterization of *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits responsible for postoperative pain. **Eur. J. Pharmacol.** 503, 71-75, 2004.
9. Tatsumi S, Mabuchi T, Abe T, Xu L, Minami T and Ito S. Analgesic effect of extracts of Chinese medicinal herbs Moutan cortex and Coicis semen on neuropathic pain in mice. **Neurosci. Lett.** 370, 130-134, 2004.
10. Koda N, Tsutsui Y, Niwa H, Ito S, Woodward DF and Watanabe K. Synthesis of prostaglandin F ethanolamide by prostaglandin F synthase and identification of Bimatoprost as a potent inhibitor of the enzyme: new enzyme assay method using LC/ESI/MS. **Arch. Biochem. Biophys.** 424, 128-136, 2004.
11. Furuta K, Wang GX, Minami T, Nishizawa M, Ito S and Suzuki M. A simple acromelic acid analogue potentially useful for receptor photoaffinity labeling and biochemical studies. **Tetrahedron Lett.** 45, 3933-3936, 2004.
12. Kitagawa K, Hamada Y, Kato Y, Nakai K, Nishizawa M, Ito S and Okumura T. Epidermal growth factor and interleukin-1β synergistically stimulate the production of nitric oxide in rat intestinal epithelial cells. **Am. J. Physiol.** 287, G1188-G1193, 2004.
13. Minami T, Matsumura S, Mabuchi T, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya

S and Ito S. Functional evidence for interaction between prostaglandin EP3 and κ-opioid receptor pathways in tactile pain induced by human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) glycoprotein gp120. **Neurophamacology** 45, 96-105, 2003.
14. Muratani T, Nishizawa M, Matsumura S, Mabuchi T, Abe K, Shimamoto K, Minami T and Ito S. Functional characterization of prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor in the spinal cord for tactile pain (allodynia). **J. Neurochem.** 86, 374-382, 2003.
15. Mabuchi T, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Kitano T, Kojima H, Nagano T, Minami T and Ito S. Attenuation of neuropathic pain by the nociceptin/orphanin FQ antagonist JTC-801 is mediated by inhibition of nitric oxide production. **Eur. J. Neurosci.** 17, 1384-1392, 2003.
16. Nakauchi T, Ando A, Ueda-Yamada M, Yamazaki Y, Uyama M, Matsumura M and Ito S. Prevention of ornithine cytotoxicity by nonpolar side chain amino acids in retinal pigment epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 44, 5023-5028, 2003.
17. Muratani T, Minami T, Enomoto U, Sakai M, Okuda-Ashitaka E, Kiyokane K, Mori H and Ito S. Characterization of nociceptin/orphanin FQ-induced pain responses by the novel receptor antagonist *N*-(4-amino-2-methylquinolin-6-yl)-2-(4-ethylphenoxymethyl) benzamide monohydro chloride. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 303, 424-430, 2002.
18. Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, Kojima M, Ito S and Watanabe K. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 291, 884-889, 2002.
19. Doi Y, Minami T, Nishizawa M, Mabuchi T, Mori H and Ito S. Central nociceptive role of prostacyclin (IP) receptor induced by peripheral inflammation. **Neuroreport** 13, 93-96, 2002.
20. Kitano T, Okumura T, Nishizawa M, Liew FY, Seki T, Inoue K and Ito S. Altered response to inflammatory cytokines in energy metabolism in inducible nitric oxide synthase knockout mice. **J. Hepatol.** 36, 759-765, 2002.
21. Ito S, Okuda-Ashitaka E and Minami T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neurosci. Res.** 41, 299-332, 2001.
22. Minami T, Nakano H, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S and Ito S. Characterization of EP receptor subtypes responsible for prostaglandin E_2-induced pain responses by use of EP_1 and EP_3 receptor knockout mice. **Br. J. Pharmacol.** 133, 438-444, 2001.
23. Minami T, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Shimamoto K, Sakimura K, Mishina M, Mori H and Ito S. Characterization of the glutamatergic system for induction and maintenance of allodynia. **Brain Res.** 895, 178-185, 2001.
24. Minami T, Bakoshi S, Nakano H, Mine O, Muratani T, Mori H and Ito S. The effects of capsaicin cream on prostaglandin-induced allodynia. **Anesth. Analg.** 93, 419-423, 2001. 126
25. Okuda-Ashitaka E and Ito S. Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. **Peptides** 21, 1101-1109, 2000.
26. Nishizawa M, Nakajima T, Yasuda K, Kanzaki H, Sasaguri Y, Watanabe K and Ito S. Close kinship of human 20α-hydroxysteroid dehydrogenase gene with three aldo-keto reductase genes. **Genes to Cells** 5, 111-125, 2000.
27. Minami T, Okuda-Ashitaka E, Mori H, Sakimura K, Watanabe M, Mishina M and Ito S. Characterization of nociceptin/orphanin FQ-induced pain responses in conscious mice: neonatal capsaicin treatment and NMDA receptor GluRε subunit knockout mice. **Neuroscience** 97, 133-142, 2000.
28. Ito S, Okuda-Ashitaka E, Imanishi T and Minami T. Central roles of nociceptin/orphanin FQ and nocistatin: allodynia as a model of neural plasticity. **Prog. Brain Res.** 129, 205-218, 2000.

A02-06 蔵田 潔

1. Kurata, K., Tsuji, T., Naraki, S., Seino, M., and Abe, Y.: Activation of the dorsal premotor cortex and the pre-supplementary motor area of humans during an auditory conditional motor task. **J. Neurophysiol.**84: 1667-1672, 2000.
2. Kurata, K. and Hoshi, E.: Movement-related neuronal activity reflecting the transformation of coordinates in the ventral premotor cortex of monkeys. **J. Neurophysiol.** 88: 3118-3132, 2002.
3. Kurata, K. and Aizawa, H.: Influences of motor instructions on the reaction times of saccadic eye movements. **Neurosci. Res.** 48: 447-455, 2004.

Kurata, K. : Activity properties and location of ventral thalamic neurons projecting to the cortical motor areas in monkeys. J. Neurophysiol. (2005) in press

A02-07 田中 光一

Sarthy VP, Pignataro L, Pannicke T, Weick M, Reichenbach A, Harada T, Tanaka K & Marc R (2005). Glutamate transport by retinal Muller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. Glia. 2005 Jan 15;49(2):184-96.

1. Sarthy, V.P., Pignataro, L., Marc, R., Tanaka, K. The contribution of a glial glutamate transporter to GABA synthesis in the retina. NeuroReport 15. 1895-1898, 2004

2. Sarthy, V.P., Pignataro, L., Pannicke, T., Weick, M., Reichenbach, A., Harada, T., Tanaka, K., Marc, R. Glutamate transporter in retinal Muller cells from glutamate/aspartate transporter (GLAST) knockout mice. Glia in press

3. Sarthy, V.P., Dudley, V.J., Tanaka, K. Retinal glucose metabolism in mice lacking the L-glutamate/aspartate transporter. Vis. Neurosci. in press

4. Huang, Y.H., Tanaka, K., Rothstein J.D., Bergles D.E. Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. J. Neurosci. 24. 4498-4509, 2004.

5. Chen, W., Mahadomrongkul, V., Berger, U.V., Bassan, M., DeSilva, T., Tanaka, K., Irwin, N., Aoki, C., Rosenberg, P.A. The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. J. Neurosci. 24. 1136-1148, 2004

6. Huang, Y., Dykes Hoberg, M., Tanaka, K., Rothstein J.D., Bergles D.E. Climbing fiber activation of EAAT4 transporters and kainite receptors in cerebellar Purkinje cells. J. Neurosci. 24. 103-111, 2004

7. Harada, T., Harada, C., Wang, Y-L., Osaka, H., Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M., Wada, K. Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury in vivo. Am. J. Pathol. 164. 59-64, 2004

8. Maekawa, F., Quah, H.-M.A., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. Leptin resistance and enhancement of feeding facilitation by melanin-concentrating hormone in mice lacking bombesin receptor subtype-3. Diabetes 53. 570-576, 2004.

9. Maekawa, F., Tsukahara, S., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. Distributions of two chicken bonbesin receptors, bombesin receptor subtype-3.5 (chBRS-3.5) and gastrin-releasing peptide receptor (chGRP-R) mRNA's in chicken telencephalon. Neuroscience 125. 569-582, 2004.

10. Harada, C., Harada, T., Mitamura, Y., Quah, H-M.A., Ohtsuka, K., Kotake, S., Ohno, S., Wada, K., Takeuchi, S., Tanaka, K. Diverse NF-kB expression in epiretinal membranes after human diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopaty. Mol. Vision 10. 31-36, 2004

11. Voutsinos-Porche, B., Bonvento, G., Tanaka, K., Welker, E., Chatton, J.-Y., Magistretti, P.J., Pellerin, L. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. Neuron 37. 275-286, 2003.

12. Mitani, A., Tanaka, K. Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: An in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and of mutant mice lacking GLT-1. J. Neurosci. 23. 7176-7182, 2003

13. Jin, Z.H., Kikuchi, T., Tanaka, K., Kobayashi, T. Expression of GLAST in the developing mouse cochlea. Tohoku J. Exp. Med. 200. 137-144, 2003

14. Harada, C., Harada, T., Quah, H.-M. A., Maekawa, F., Yoshida, K., Ohno, S., Wada, K., Parada, L. F., Tanaka, K. Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration. Neuroscience 122. 229-235, 2003

15. Voutsinos-Porche, B., Knott, G., Tanaka, K., Quairiaux, C., Welker, E., Bonvento, G. Glial glutamate transporters and maturation of the mouse somatosensory cortex. Cereb. Cortex 13. 1110-1121, 2003

16. Iwabuchi, M., Ui-Tei, K., Yamada, Y., Matsuda, Y., Sakai, Y., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. Molecular cloning and characterization of avian bombesin-like peptide receptors: New tools for investigating molecular basis for ligand selectivity. Brit. J. Pharmacol. 139. 555-566, 2003

17. Mitamura, Y., Harada, T., Harada, C., Ohtsuka, K., Kotake, S., Ohno, S., Tanaka, K., Takeuchi, S., and Wada, K. NF-kB in epiretinal membranes after human diabetic retinopathy. Diabetologia 46.

699-703, 2003
18. Okada, T., Yamada, N., Tsuzuki, K., Horikawa, PM., Tanaka, K., and Ozawa, S. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentategyrus plays different roles in spatial learning. **Eur. J. Neurosci.** 17. 341-349, 2003
19. Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H. Tanaka, K., Parada L.F., and Wada, K. Microglia-Muller glia interactions control neurotrophic factor productions during light-induced retinal degeneration. **J. Neurosci.** 22. 9228-9236, 2002.
20. Nishizaki, T., Nagai, K., Nomura, T., Tada, H., Kanno, T., Tozaki, T., Li, X., Kondoh, T., Kodama, N., Takahashi, E., Sakai, N., Tanaka, K., and Saito, N. A new neuromodulator pathway with a glial contribution mediated via A_{2a} adrenergic receptors. **Glia** 39. 133-147, 2002.
21. Katagiru, H., Tanaka, K. and Manabe, T. Requirement of appropriate glutamate concentrations in the synaptic cleft for hippocampal LTP induction. **Eur. J. Neurosci.** 14. 547-553, 2001.
22. Sugiyama, T., Sadzuka, Y., Tanaka, K. and Sonobe, T. Inhibition of glutamate transporter by theanine enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin. **Toxicolgy Lett.** 121. 89-96, 2001.
23. Gray, C., Marie, H., Arora, M., Tanaka, K., Boyde, A., Jones, S. and Attwell, D. Glutamate does not play a major role in controlling bone growth. **J. Bone Miner. Res.** 16. 742-749, 2001.
24. Yamada, K., Fukaya, M., Shibata, T., Kurihara, H., Tanaka, K., Inoue, Y. and Watanabe, M. Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth of cerebellar Purkinje cells. **J. Comp. Neurol.** 418. 106-120, 2000.
25. Hakuba, N., Koga, K., Gyo, K., Usami, S. and Tanaka, K. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. **J. Neurosci.** 20. 8750-8753, 2000.

A02-08 玉巻 伸章

Tomioka, R. et al. and Tamamaki N. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. **Eur J Neurosci.** (2005) in press
Xu, Y., Tamamaki, N. et al. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. **Exp Neurology** (2005) 192, 251-264
1. Tamamaki N. Origin of the neocortical subependymal cells speculated by Emx1 and GAD67 expression. Chemical Sense (2005), 111-112.
2. Tamamaki N., Yanagawa Y., Tomioka Y., Miyazaki J., Obata K., Kaneko T. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. J Comp Neurol 467, 60-79 (2003).
3. Tamamaki N., Fujimori K., Nojyo Y., Kaneko T., and Takauji R. Evidence that Sema3A and 3F regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. J. Comp. Neurol. 455, 238-248. (2002).
4. Fujimori K, Takauji R, and Tamamaki N. Differential localization of high- and low-molecular-weight variants of MAP2 in the developing rat telencephalon. J. Comp. Neurol. 449, 330-342 (2002).
5. Tamamaki N. Radial glias and radial fibers: What is the function of radial fibers? Anatomical Sci International 77: 9-17 (2002).
6. Tamamaki N. *Response*: Glial cell migration directed by axon guidance cues. Trends in Neurosci. 25: 175-176 (2002).
7. Tamamaki N., Nakamura K., and Kaneko T. Cell migration from the corticostriatal angle to the basal telencephalon in rat embryos. Neuroreport 12, 775-780 (2001).
8. Sugimoto Y., Taniguchi M., Yagi T., Akagi Y., Nojyo Y., and Tamamaki N. Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. Development 128: 3321-3330 (2001).
9. Tamamaki N., Nakamura K., Okamoto K., and Kaneko T. Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. Neurosci. Res. 41, 51-60 (2001).
10. Fujimori K., Takeuchi K., Yazaki T., Uemura K., Nojyo Y., and Tamamaki N. Expression of L1 and TAG-1 in the corticospinal callosal, and hippocampal commissural neurons in the developing rat telencephalon as revealed by retrograde and in situ hybridization double labeling. J. Comp. Neurol. 417, 275-288 (2000).
11. Tamamaki N., Nakamura K., Furuta T., Asamoto K., and Kaneko T. Neurons in Golgi-stain-like images revealed by GFP-adenovirus infection in vivo. Neurosci Res. 38, 21-236 (2000).

A02-09 神谷 温之

1. H. Kamiya and S. Ozawa. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fiber synapse. J. Physiol. (Lond.), 523(3): 653-665, 2000.
2. I. Honda, H. Kamiya and H. Yawo. Re-evaluation of phorbol ester-induced potentiation of transmitter release from mossy fiber terminals of the mouse hippocampus. J. Physiol. (Lond.), 529(3): 763-776, 2000.
3. H. Ishizaki, J. Miyoshi, H. Kamiya, A. Togawa, M. Tanaka, T. Sasaki, K. Endo, A. Mizoguchi, S. Ozawa and Y. Takai. Role of Rab GDP dissociation inhibitor α in regulating plasticity of hippocampal neurotransmission. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97(21): 11587-11592, 2000.
4. 神谷温之, 真鍋俊也. 海馬シナプス伝達可塑性の分子機構. 遺伝子医学 5(3): 1108-1110, 2001.
5. H. Kamiya, K. Umeda, S. Ozawa and T. Manabe. Presynaptic Ca^{2+} entry is unchanged during hippocampal mossy fiber long-term potentiation. J. Neurosci., 22(24): 10524-10528, 2002.
6. H. Kamiya, S. Ozawa and T. Manabe. Kainate receptor-dependent short-term plasticity of presynaptic Ca^{2+} influx at the hippocampal mossy fiber synapses. J. Neurosci., 22(21): 9237-9243, 2002.
7. H. Kamiya. Kainate receptor-dependent presynaptic modulation and plasticity. Neurosci. Res., 42(1): 1-6, 2002.
8. 神谷温之, 真鍋俊也. 学習・記憶と海馬シナプス伝達の可塑性. 総合リハビリテーション 30(10): 915-919, 2002.
9. 神谷温之. 脳の可塑性を支える分子機構. Computer Today 110(7): 24-28, 2002.
10. Tabata, Y., Ouchi, Y., Kamiya, H., Manabe T., Arai, K. and Watanabe, S. Specification of the retinal fate of mouse embryonic stem cells by ectopic expression of Rx/rax, a homeobox gene. Mol. Cell Biol., 24(10): 4513-4521, 2004.
11. Nakatsu, F., Okada, M., Mori, F., Kumazawa, N., Iwasa, H., Zhu, G., Kasagi, Y., Kamiya, H., Harada, A., Nishimura, K., Takeuchi, A., Miyazaki, T., Watanabe, M., Yuasa, S. Manabe, T., Wakabayashi, K., Kaneko, S., Saito, T. and Ohno, H. Defective function of GABA-containing synaptic vesicles in mice lacking the AP-3B clathrin adaptor. J. Cell Biol., in press.

A02-10 久保 義弘

1. Miyashita, T. and Kubo, Y. Extracellular Ca^{2+} sensitivity of mGluR1a associated with persistent glutamate response in transfected CHO cells. **Receptors and Channels** 7, 25-40 (2000)
2. Miyashita, T. and Kubo, Y. Extracellular Ca^{2+} sensitivity of mGluR1a induces an increase in the basal cAMP level by direct coupling with Gs protein in transfected CHO cells. **Receptors and Channels** 7, 77-91 (2000)
3. Abe, H., Misaka, T., Tateyama, M. and Kubo, Y. Effects of co-expression with Homer isoforms on the function of metabotropic glutamate receptor1a. **Molecular and Cellular Neuroscience** 23, 157-168 (2003)
4. Abe, H., Tateyama, M. and Kubo, Y. Functional identification of Gd3+ binding site of metabotropic glutamate receptor1a. **FEBS letters** 545, 233-238 (2003)
5. Tateyama, M., Abe, H., Nakata, H., Saitoh, O and Kubo, Y. Ligand-induced rearrangement of the intracellular dimeric conformation of metabotropic glutamate receptor1a. **Nature Structural & Molecular Biology** 11, 637-642 (2004)

A02-11 吉村 恵

1. Okamoto M, Baba H, Goldstein P A, Higashi H, Shimoji K and Yoshimura M: Functional reorganization of sensory pathways in the rat spinal dorsal horn following peripheral nerve injury. **Journal of Physiology** (London) 532: 241-250, 2001.
2. Luo C, Kumamoto E, Furue H, Yoshimura M: Nociceptin-induced outward current in substantia gelatinosa neurones of the rat spinal cord. **Neuroscience** 109: 349-358, 2001
3. Nakatsuka T, Furue H, Yoshimura M and Gu J: Activation of central terminal VR1 receptors and αβmATP-sensitive P2x receptors reveals a converged synaptic activity onto the deep dorsal horn neurons of the spinal cord. **Journal of Neuroscience** 22(4): 1228-1237, 2002
4. Luo C, Kumamoto E, Furue H, Chen J. Yoshimura M: Nociceptin inhibits excitatory but not

inhibitory transmission to substantia gelatinosa neurones of adult rat spinal cord. **Neuroscience** 109, 349-358, 2002

5. Kawasaki Y, Kumamoto E, Furue H, Yoshimura M. ・2 adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition of primary-afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. **Anesthesiology** 98, 682-689, 2003

6. Yang K, Furue H, Fujita Tsugumi, Kumamoto E, Yoshimura M. Alteration of primary afferent inputs in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord after neonatal capsaicin treatment. Journal of **Neuroscience Research** 74, 928-933, 2003.

7. Sonohata M, Furue H, Katafuchi T, Yasaka T, Doi A, Kumamoto E and Yoshimura M. Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. **Journal of Physiology** 555.2, 515-526, 2004

A02-12 遠藤 省吾

1. H. Nishiyama, T. Knopfel, S. Endo and S. Itohara. Glial protein S100B modulates long term neuronal synaptic plasticity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99**, 4037-4042, 2002.

2. S. Endo, A.C. Nairn, P. Greengard, and M. Ito. Thr123 of rat G-substrate contributes to its action as a protein phosphatase inhibitor. **Neuroscience Research. 45**, 79-89, 2003.

3. M. Michishita, T. Ikeda, T. Nakashiba, M. Ogawa, K. Tashiro, T. Honjo, K. Doi, S. Itohara, and S. Endo. A novel gene, Btcl1, encoding CUB and LDLa domains is expressed in restricted areas of mouse brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 306**, 680-686, 2003.

4. S. Endo and T. Launey. ERKs regulate PKC-dependent synaptic depression and declustering of glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. **Neuropharmacol.45**, 863-872, 2003a.

5. S. Endo and T. Launey. Nitric oxide activates ERK1/2 and enhances declustering of GluR2/3 in cerebellar Purkinje cells. **Neurosci. Lett. 350**, 122-126, 2003b.

6. Q.B. Tian, A. Okano, K. Nakayama, S. Miyazawa, S. Endo, and T. Suzuki. A novel ubiquitin-specific protease, synUSP, is localized at the postsynaptic density and postsynaptic lipid raft. **J. Neurochem. 87**, 665-675, 2003

7. M. Michishita, T. Ikeda, T. Nakashiba, M. Ogawa, K. Tashiro, T. Honjo, K. Doi, S. Itohara, and S. Endo. Expression of Btcl2, a novel member of Btcl gene family, during development of the central nervous system. **Developmental Brain Research 153**, 135-142, 2004

8. T. Launey, S. Endo, R. Sakai, J. Harano, and M. Ito. Protein phosphatase 2A inhibition induces cerebellar long-term depression and declustering of synaptic AMPA receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci USA 101**, 676-681, 2004.

9. T. Suzuki, W. Li, J.-P. Zhang, Q.-B. Tian, H. Sakagami, H. Kondo, T. Fujii, and S. Endo. A novel scaffold protein, TANC, possibly a rat homolog of Drosophila rolling pebbles (rols), forms a multi protein complex with various post synaptic density proteins. **Eur.J.Neurosci.** in press.

10. X. Wang, Q.-B. Tian, A. Okano, H. Sakagami, I.S. Moon, H. Kondo, S. Endo and T. Suzuki. BAALC1-6-8 protein is targeted to postsynaptic lipid rafts by its N-terminal myristoylation and palmitoylation, and interact with α, but not β, subunit of Ca2+/Calmodulin-depenent protein kinase II. **J. Neurochem.** in press

A02-13 富永 真琴

1. Tominaga M, Jordt S-E and Julius D: Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97: 8134-8139, 2000.

2. Tominaga M and Julius D: Capsaicin receptor in the pain pathway. **Jpn. J. Pharmacol** 83: 20-24, 2000.

3. Tominaga M: Capsaicin receptor and its homologue in nociception. **Pain Reviews** 7: 97-104, 2000.

4. Tominaga M, Wada M and Masu M: Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2001 98: 6951-6956, 2001.

5. Itoh M, Takasaki I, Andoh T, Nojima H, Tominaga M and Kuraishi Y: Induction by carrageenan inflammation of prepronociceptin mRNA in VR1-immunoreactive neurons in rat dorsal root ganglia. **Neurosci. Res.** 40: 227-233, 2001.

6. Isoda H, Han J, Tominaga M and Maekawa T: Effects of capsaicin on human intestinal cell line Caco-2. **Cytotechnology** 36: 155-161, 2001.

7. Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan J-L, Wang Q-P, Tominaga M, Goto K, Shioda S and Sakurai T: Orexion Activate Histaminergic neurons via the Orexion 2 Receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 290: 1237-1245, 2002.
8. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H and Tominaga M: Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by PKCε and identification of two target serine residues. **J. Biol. Chem.** 277: 13375-13378, 2002.
9. Sugiua T, Tominaga M, Katsuya H and Mizumura K: Bradykinin lowered the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. **J Neurophysiol.** 88: 544-548, 2002.
10. Güler A, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M and Caterina M: Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. **J. Neurosci.** 22: 6408-6414, 2002.
11. Tominaga T, Meng W, Togashi K, Urano H and Tominaga M: Rho GTPase effector protein, mDia, inhibits the DNA-binding ability of the transcriptional factor Pax6 and changes the pattern of neurite extension in cerebellar granule cells through its binding to Pax6. **J. Biol. Chem.** 277: 47686-4769, 2002.
12. Amaya F, Oh-hashi K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, Tominaga M, Tanaka Y, Tanaka M. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. **Brain Res.** 963: 190-196, 2003.
13. Iida T, Moriyama T, Kobata K, Morita A, Murayama N, Hashizume S, Fushiki T. Yazawa S, Watanabe T and Tominaga M: TRPV1 Activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. **Neuropharmacology** 44: 958-967, 2003.
14. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M,Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T Hypothalamic Orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. **Neuron** 38: 701-7123, 2003.
15. Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H and Tominaga M: Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100: 8002-8006, 2003.
16. Moriyama T, Iida T, Kobayashi K, Higashi T, Fukuoka T, H. Tsumura, Leon C, Suzuki N, Inoue K, Gachet C, Noguchi K and Tominaga M. Possible involvement of P2Y2 metabotripic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. **J. Neurosci.** 23: 6058-6062, 2003.
17. Meng W, Numazaki M, Takeuchi K, Uchibori Y, Ando-Akatsuka Y, Tominaga M and Tominaga T. DIP (mDia interacting protein) is a key molecule regulating Rho and Rac in a Src-dependent manner. **EMBO J.** 23: 761-771, 2004.
18. Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ and Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium dependent desensitization of TRPV1 ion channels. **Cell Calcium** 35: 471-478, 2004.
19. Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K. PAR2-mediated potentiation of TRPV1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. **J. Neurosci.** 24: 4293-4299, 2004.
20. Tominaga M, Caterina MJ: Thermosensation and pain. **J. Neurobiol.** 61: 3-12, 2004.
21. Numazaki M, Tominaga M: Nociception and TRP channels. **Current Drug Target** 2004 (in press)

A02-14 竹居 考二

1. A. Kamitani, H. Yamada, M. Kinuta, M. Watanabe, S-A. Li, T. Matsukawa, M. McNiven, H. Kumon and K. Takei: Distribution of dynamins in testis, and their possible relation to spermatogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *294*, 261-267, 2002
2. H. Yamada, M. Hayashi, M. Kinoshita, S. Uehara, M. Watanabe, K. Takei, and Y. Moriyama: Norepinephrine-evoked 5-Hydroxytryptamine secretion is Ca^{2+} dependent and mediated through exocytosis in rat pinealocytes. J. Neurochem. *81*, 533-540, 2002
3. K. Tomizawa, J. Ohta, M. Matsushita, A. Moriwaki, S-T. Li, K. Takei, and H. Matsui: Cdk5/P35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. J. Neuroscience *22*, 2590-2597, 2002
4. M. Kinuta, H. Yamada, T. Abe, M. Watanabe, S-A. Li, A. Kamitani, T. Matsukawa, T. Yasuda, H. Kumon, and K. Takei: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate stimulates vesicle formation from liposomes by brain cytosol. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. *99*, 2842-2847, 2002
5. K. Farsad, N. Ringstad, K. Takei, S. R. Floyd, K. Rose, and P. De Camilli: Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin-bilayer interactions. J. Cell Biol. *155*, 193-200, 2001
6. Y. Nemoto, M. R. Wenk, M. Watanabe, L. Daniel, T. Murakami, T. Nemoto, N. Ringstad. H. Yamada, K. Takei, and P.

De Camilli: Characterization of synaptojanin 2B isoforms expressed in brain and tests. J. Biol. Chem. *276*, 41133-41142, 2001
7. M. Kinuta, J. Ohta, H. Yamada, K. Kinuta, T. Abe, S-A. Li, A. Otsuka, A. Nakanishi, K. Takei: Determination of S-[2-carboxy-1-(1H-imidazol-4-yl)ethyl] glutathione, a novel metabolite of L-histidine, in tissue extracts from sunlight-irradiated rat by capillary electrophoresis. Electrophoresis *22*, 3365-3370, 2001
8. M Kinuta and K. Takei: Utilization of liposomes in vesicular transport studies. Cell Structure and Function. *27*, 63-69, 2002
9. K. Takei and V. Haucke: Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. Trends in Cell Biol. *11*, 385-391, 2001
10. K. Takei, V. I. Slepnev, and P. De Camilli: Interactions of dynamin and amphiphysin with liposomes. Methods in Enzymol. *329*, 478-486, 2001

A02-15 八尾 寛

1. Kamada M., Li R-Y., Hashimoto M., Kakuda M., Okada H, Koyanagi Y., Ishizuka T., Yawo H. (2004) Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. Eur. J. Neurosci.,20(10) 2499-2508.
2. Tokunaga, T, Miyazaki, K, Koseki, M. Mobarakeh, JI, Ishizuka, T, Yawo, H (2004) Pharmacological dissection of calcium channel subtype-related components of strontium inflow in large mossy fiber boutons of mouse hippocampus. Hippocampus 14(5), 570-585.

A02-16 久本 直毅

1. Sakamoro R, Bird DT, Brown HM, Hisamoto N, Matsumoto K, Jin Y. The C.elegans UNC-14 RUN domain protein binds to the Kinesin-1/UNC-16 complex and regulates synaptic vesicle localization. Mol. Biol. Cell, in press.
2. Kim DH, Feinbaum R, Alloing G, Emerson FE, Garsin DA, Inoue H, Tanaka-Hino M, Hisamoto N, Matsumoto K, Tan MW, Ausubel FM. A Conserved p38 MAP Kinase Pathway in Caenorhabditis elegans Innate Immunity. Science. 297(5581):623-626, Jul 2002.
3. Tanaka-Hino M, Sagasti A, Hisamoto N, Kawasaki M, Nakano S, Ninomiya-Tsuji J, Bargmann CI, Matsumoto K. SEK-1 MAPKK mediates Ca2+ signaling to determine neuronal asymmetric development in Caenorhabditis elegans. EMBO Rep. 3(1):56-62, Jan 2002.
4. Byrd DT, Kawasaki M, Walcoff M, Hisamoto N, Matsumoto K, Jin Y. UNC-16, a JNK-signaling scaffold protein, regulates vesicle transport in C.elegans. Neuron. 32(5):787-800, Dec 2001.
5. Suzuki N, Buechner M, Nishiwaki K, Hall DH, Nakanishi H, Takai Y, Hisamoto N, Matsumoto K. A putative GDP-GTP exchange factor is required for development of the excretory cell in Caenorhabditis elegans. EMBO Rep. 2(6):530-5, Jun 2001.
6. Sagasti A, Hisamoto N, Hyodo J, Tanaka-Hino M, Matsumoto K, Bargmann CI. The CaMKII UNC-43 activates the MAPKKK NSY-1 to execute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates. Cell. 105(2):221-32, Apr 2001.
7. Ono K, Ohtomo T, Sato S, Sugamata Y, Suzuki M, Hisamoto N, Ninomiya-Tsuji J, Tsuchiya M, Matsumoto K. An evolutionarily conserved motif in the TAB1 C-terminal region is necessary for interaction with and activation of TAK1 MAPKKK. J Biol Chem. 276(26):24396-400, Jun 2001.

A02-18 中嶋 義昭

1. Tamalin, a PDZ Domain-Containing Protein, Links a Protein Complex Formation of Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors and the Guanine Nucleotide Exchange Factor Cytohesins. Kitano, J., Kimura, K., Yamazaki, Y., Soda, T., Shigemoto, R., Nakajima, Y. and Nakanishi, S. J. Neurosci. 22: 1280-1289 (2002)
2. Tamalin Is a Scaffold Protein That Interacts with Multiple Neuronal Proteins in Distinct Modes of Protein-Protein Association. Kitano, J., Yamazaki, Y., Kimura, K., Masukado, T., Nakajima, Y. and Nakanishi, S. J. Biol. Chem. 278: 14762-14768
3. Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated HCN2 cation channel forms a protein assembly with neuronal scaffold proteins in distinct mode of protein-protein interaction. Kimura, K., Kitano, J., Nakajima, Y. and Nakanishi, S. Genes Cells 9: 631-640 (2004)
4. Phosphorylation and recruitment of Syk by ITAM-based phosphorylation of tamalin. Hirose, M., Kitano, J., Nakajima, Y., Moriyoshi, K., Yanagi, S., Yamamura, H., Muto, T., Jingami, H. and Nakanishi , S. J. Biol. Chem. 279: 32308-32315 (2004)
Kudo C et al Expression profiles of EphA3 at both the RNA and protein level in the developing mammalian forebrain

J. Comp. Neurol. (2005) in press

A02-19 井上 貴文

1. K. Otsu, A. Kuruma, E. Yanagida, S. Shoji, T. Inoue, Y. Hirayama, H. Uematsu, Y. Hara, S. Kawano. Na+/K+ ATPase and its functional couplings with Na+/Ca2+ exchangers in mouse embryonic stem cells during differentiation into cardiomyocytes. **Cell Calcium**, in press.

2. H. Bannai, K. Fukatsu, A. Mizutani, T. Natsume, S. Iemura, T. Ikegami, T. Inoue, K. Mikoshiba. An RNA-interacting protein SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. **J. Biol. Chem.**, 279: 53427-53434 (2004).

3. K. Fukatsu, H. Bannai, S. Zhang, H. Nakamura, T. Inoue, K. Mikoshiba. Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is regulated by actin filaments and 4.1N in neuronal dendrites. **J. Biol. Chem.**, 279: 48976-48982 (2004).

4. I. Ismailov, D. Kalikulov, T. Inoue, M. J. Friedlander. The kinetic profile of intracellular calcium predicts LTP and LTD. **J. Neurosci.**, 24: 9847-9861 (2004).

5. K. A. Kohlmeier, T. Inoue, C. S. Leonard. Hypocretin/Orexin peptide signaling in the ascending arousal system: Elevation of intracellular calcium in the mouse dorsal raphe and laterodorsal tegmentum. **J. Neurophysiol.**, 92:221-235 (2004).

6. W. Cai, C. Hisatsune, K. Nakamura, T. Nakamura, T. Inoue, K. Mikoshiba. Activity-dependent expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in hippocampal neurons. **J. Biol. Chem.**, 279:23691-23698 (2004).

7. C. Hisatsune, Y. Kuroda, K. Nakamura, T. Inoue, T. Nakamura, T. Michikawa, A. Mizutani, K. Mikoshiba. Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, 279:18887-18894 (2004).

8. M. Hattori, A. Z. Suzuki, T. Higo, H. Miyauchi, T. Michikawa, T. Nakamura, T. Inoue, K. Mikoshiba. Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca2+ signaling. **J. Biol. Chem.**, 279:11967-11975 (2004).

9. T. Nakayama, M. Hattori, K. Uchida, T. Nakamura, Y. Tateishi, H. Bannai, M. Iwai, T. Michikawa, T. Inoue, K. Mikoshiba. The regulatory domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is necessary to keep the channel domain closed: Possible physiological significance of specific cleavage by caspase 3. **Biochem. J.**, 377:299-307 (2004).

10. H. Bannai, T. Inoue, T. Nakayama, M. Hattori, K. Mikoshiba. Kinesin dependent, rapid, bidirectional transport of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor containing particles in the dendrite of hippocampal neurons. **J. Cell Sci.**, 117:163-175 (2004).

11. A. Kuruma, T. Inoue, K. Mikoshiba. Dynamics of Ca2+ and Na+ in the dendrite of mouse cerebellar Purkinje cells evoked by parallel fiber stimulation. **Eur. J. Neurosci.**, 18:2677-2689 (2003).

12. K. Fukami, M. Yoshida, T. Inoue, M. Kurokawa, R. A. Fissore, N. Yoshida, K. Mikoshiba, T. Takenawa. Phospholipase C□4 is required for Ca2+-mobilization essential for acrosome reaction in sperm. **J. Cell Biol.**, 161:79-88 (2003).

13. Y. Minoshima, T. Kawashima, K. Hirose, Y. Tonozuka, A. Kawajiri, Y. C. Bao, X. Deng, M. Tatsuka, S. Narumiya, W. S. May Jr., T. Nosaka, K. Semba, T. Inoue, T. Satoh, M. Inagaki, T. Kitamura. Phosphorylation by Aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. **Dev. Cell**, 4:549-560 (2003).

14. T. Nagase, K-I. Ito, K. Kato, K. Kaneko, K. Kohda, M. Matsumoto, A. Hoshino, T. Inoue, S. Fujii, H. Kato, K. Mikoshiba. Long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 neurons of mice lacking the IP3 type 1 receptor. **Neuroscience**, 117:821-830 (2003).

15. H. Yasuda, H. Higashi, Y. Kudo, T. Inoue, Y. Hata, K. Mikoshiba, T. Tsumoto. Imaging of calcineurin activated by long-term depression-inducing synaptic inputs in living neurons of rat visual cortex. **Eur. J. Neurosci.**, 17:287-297 (2003).

16. Y. Aihara, T. Inoue, T. Tashiro, K. Okamoto, Y. Komiya, K. Mikoshiba. Movement of endoplasmic reticulum in the living axon is distinct from other membranous vesicles in its rate, form, and sensitivity to microtubule inhibitors. **J. Neurosci. Res.**, 65:236-246 (2001).

17. K. Fukami, K. Nakao, T. Inoue, Y. Kataoka, M. Kurokawa, R. A. Fissore, K. Nakamura, M. Katsuki, K. Mikoshiba, N. Yoshida, T. Takenawa. Requirement of phospholipase C□4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. **Science**, 292:920-923 (2001).

18. T. Inoue, X. Lin, K. A. Kohlmeier, H. T. Orr, H. Y. Zoghbi, W. N. Ross. Calcium dynamics and electrophysiological properties of cerebellar Purkinje cells in SCA1 transgenic mice. **J. Neurophysiol.**,

85:1750-1760 (2001).

A02-20 木村 文隆

1) Yanagisawa, T., Tsumoto, T. and Kimura, F. Transiently higher release probability during critical period at thalamocortical synapses in the mouse barrel cortex: Relevance to differential short-term plasticity of AMPA- and NMDA-EPSCs and possible involvement of silent synapses. European Journal of Neuroscience 20, 3006-3018 (2004)

2) Palizvan, M.R., Sohya, K., Kohara, K., Maruyama, A., Yasuda, H., Kimura, F. and Tsumoto, T. Brain-Derived Neurotrophic Factor increases inhibitory synapses revealed in solitary neurons cultured from rat visual cortex. Neuroscience 126: 955-966 (2004)

3) Itami, C, Kimura, F., Kohno, T., Matsuoka, M., Ichikawa, M., Tsumoto, T. and Nakamura, S. BDNF-dependent unmasking of "silent" synapses in developing mouse barrel cortex. Proceedings of National Academy of Science 100: 13069-13074 (2003)

4) Salami, M., Itami, C., Tsumoto, T. and Kimura, F. Change of conduction velocity by regional myelination yields constant latency irrespective of distance between thalamus and cortex. Proceedings of National Academy of Science 100: 6174-6179 (2003)

A02-21 姜 英男

1. Kang, Y., Notomi, T., Saito, M., Zhang, W., and Shigemoto, R. Bidirectional interactions between h-channels and Na^{+}-K^{+} pumps in mesencephalic trigeminal neurons. Journal of Neuroscience, 22(14): 3694-3702, April 7, 2004.

2. Minami, M., Endo, T., Hirafuji, M., Hiroshige, T., Fukushi, E., Kang, Y., Saito, H., and Parvez, S.H. The involvement of 5-HT_3 and 5-HT_4 receptors in anticancer drug-induced emesis. Biogenic Amines, 17: 251-269, 2003.

3. Aoyagi, T., Kang, Y., Terada, N., Kaneko, T., and Fukai, T. The role of Ca^{2+}-dependent cationic current in generating gamma frequency rhythmic bursts: modeling study. Neuroscience, 115: 1127-1138, 2002

4. Ishii, H. and Kang, Y. Molecular basis underlying $GABA_A$ responses in rat mesencephalic trigeminal neurons. Neuroreport, 13: 2265-2269, 2002.

5. Terasawa, H., Hirai, T., Ninomiya, T., Ikeda, Y., Ishijima, T., Yajima, T., Hamaue, N., Nagase, Y., Kang, Y., and Minami, M. Influence of tooth-loss and concomitant masticatory alterations on cholinergic neurons in rats: immunohistochemical and biochemical studies. Neuroscience Research, 43: 373-379, 2002.

A02-22 宮田 麻理子

1. Hartmann J, Blum R, Kovalchuk Y, Kuner R, Durand G, Miyata M, Kano M, Offermanns S, Konnerth A: Distinct roles of Gα(q) and Gα11 for Purkinje cell signaling and motor behavior. J. Neurosci. (2004) 22: 5119-30.

2. Zang R, Nagata T, Hayashi T, Miyata M, Kawakami Y: ICV injection of trazodone produces 5HT receptor mediated anti-nociception at supraspinal and spinal level. Eur. Neuropsychopharmacol. (2004) 14: 419-424.

3. Miyata M, Kashiwadani H, Fukaya M, Hayashi T, Wu D, Suzuki T, Watanabe M, Kawakami Y: Contribution of Thalamic Phospholipase C β 4 mediated by Metabotropic Glutamate Receptor Type 1 to Inflammatory Pain in Mice. J. Neurosci. (2003) 23: 8089-8108.

4. Kawakami Y, Miyata M, Oshima T: Mechanical vibratory stimulation of forepaw skin induces long-lasting potentiation in the secondary somatosensory cortex. Eur. J. Neurosci. (2001) 12: 171-178.

5. Miyata M, Kim HT, Hashimoto K, Lee TK, Cho SY, Jiang H, Wu Y, Jun K, Wu D, Kano M, Shin HS: Deficient long-term synaptic depression in the rostral cerebellum correlated with impaired motor learning in phopholipase Cβ4 mutant mice. Eur. J. Neurosci. (2001) 13:1945-1954.

6. Hashimoto K, Miyata M, Watanabe M, Kano M: Role of phopholipase C β4 in synapse elimination and plasticity in developing and mature cerebellum. Molecular Neurobiology (2001) 23: 69-82.

7. Imaki T, Katsumata H, Miyata M, Naruse M, Imaki J, Minami S: Expression of corticotropin releasing factor (CRF), urocortin,and CRF type 1 receptors in hypothalamic-hypophyseal system under osmotic stimulation. J. Neuroendocrinology (2001) 13: 328-338.

8. Imaki T, Katsumata H, Miyata M, Naruse M, Imaki J, Minami S: Expression of corticotropin releasing hormone type 1 receptor in paraventricular nucleus after acute stress. Neuroendocrinology (2001) 73: 293-301.

A02-23 井本 敬二

1. Ino M, Yoshinaga T, Wakamori M, Miyamoto N, Takahashi E, Sonoda J, Kagaya T, Oki T, Nagasu T, Nishizawa Y, Tanaka I, Imoto K, Aizawa S, Koch S, Schwartz A, Niidome T, Sawada K, Mori Y (2001) Functional disorder of sympathetic nervous system in mice lacking α1B subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channel. Proc Natl Acad Sci USA 98:5323-5328.
2. Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, Ito M, Fukuma G, Mazaki-Miyazaki E, Nagafuji H, Noda M, Imoto K, Wada K, Mitsudome A, Kaneko S, Montal M, Nagata K, Hirose S, Yamakawa K (2001) A missense mutation of the Na^+ channel alphaII subunit gene Nav1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. Proc Natl Acad Sci USA 98:6384-6389.
3. Hatakeyama S, Wakamori M, Ino M, Miyamoto N, Takahashi E, Yoshinaga T, Sawada K, Imoto K, Tanaka I, Yoshizawa T, Nishizawa Y, Mori Y, Niidome T, Shoji S (2001) Differential nociceptive responses in mice lacking the α1B subunit of N-type Ca^{2+} channels. NeuroReport 12:2423-2427.
4 .Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T. Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y (2002) LTRPC2 Ca^{2+}-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. Molecular Cell 9:163-173.
5. Morii T, Sato S, Hagihara M, Mori Y, Imoto K, Makino K (2002) Structure-based design of a leucine zipper protein with new DNA contacting region. Biochemistry 41:2177-2183.
6. Morii T, Sugimoto K, Makino K, Otsuka M, Imoto K, Mori Y (2002) A new fluorescent biosensor for inositol trisphosphate. J Am Chem Soc 124:1138-1139.
7. Matsushita K, Wakamori M, Rhyu I.-J, Arii T, Oda S, Mori Y, Imoto K (2002) Bidirectional alterations in cerebellar synaptic transmission of tottering and rolling Ca^{2+} channel mutant mice. J Neurosci 22:4388-4398.
8. Kato K, Wakamori M, Mori Y, Imoto K, Kitamura K (2002) Inhibitory effects of cilnidipine on peripheral and brain N-type Ca^{2+} channels expressed in BHK cells. Neuropharmacology 42:1099-1108.
9. Ichida S, Abe J, Sugimoto W, Uematsu M, Komoike K, Imoto K, Mori M, Wada T, Minami T, Kakutani K (2003) Antigen selectivity characteristic of polyclonal antibodies against omega-conotoxin GVIA and N-type voltage-dependent calcium channels. Neurochem Res 28:789-796.
10. Akiba I, Seki T, Mori M, Iizuka M, Nishimura S, Sasaki S, Imoto K, Barsoumian EL (2003) Stable expression and characterization of human PN1 and PN3 sodium channels. Receptors Channels 9:291-299.
11. Mori M, Konno T, Morii T, Nagayama K, Imoto K (2003) Regulatory interaction of sodium channel IQ-motif with calmodulin C-terminal lobe. Biochem Biophys Res Comm 307:290-296.
12 .Ichida S, Abe J, Sugimoto W, Uematsu M, Komoike K, Imoto K, Mori M, Wada T, Minami T, Kakutani K (2003) Antigen selectivity characteristic of polyclonal antibodies against ω-conotoxin GVIA and N-type voltage-dependent calcium channels. Neurochem Res 28:789-96.
13 .Matsuyama Z, Yanagisawa NK, Aoki Y, Black JL 3rd, Lennon VA, Mori Y, Imoto K, Inuzuka T (2004) Polyglutamine repeats of spinocerebellar ataxia 6 impair the cell-death-preventing effect of CaV2.1 Ca^{2+} channel --- loss-of-function cellular model of SCA6. Neurobiol Dis 17:198-204.
14. Itoh H, Shimizu M, Mabuchi H, Imoto K (2004) Clinical and electrophysiological characteristics of Brugada syndrome caused by a missense mutation in the S5-pore site of SCN5A. J Cardiovasc Electrophysiol (in press)
Itoh H, Shimizu M, Tanaka S, Mabuchi H, Imoto K. A novel missense mutation in the SCN5A gene associated with Brugada syndrome bidirectionally affecting blocking actions of antiarrhythmic drugs. J Cardiovasc Electrophysiol (in press)

A02-25 高田 昌彦

Miyachi S, Lu X, Inoue S, Iwasaki T, Koike S, Nambu A, Takada M (2005). Organization of multisynaptic inputs from prefrontal cortex to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of rabies virus. J Neurosci 25(1) 2547-2556.
1. Isomura Y, Takada M (2004) Neural mechanisms of versatile functions in primate anterior cingulate cortex. Rev

Neurosci 15:279-291.
2. Kita H, Nambu A, Kaneda K, Tachibana Y, Takada M (2004) Role of ionotropic glutamatergic and GABAergic inputs on the firing activity of neurons in the external pallidum in awake monkeys. J Neurophysiol 92:3069-3084.
3. Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y, Kaneda K, Takada M (2004) Synaptic interactions between pyramidal cells and interneurone subtypes during seizure-like activity in the rat hippocampus. J Physiol 557.3:961-979.
4. Takada M, Nambu A, Hatanaka N, Tachibana Y, Miyachi S, Taira M, Inase M (2004) Organization of prefrontal outflow toward frontal motor-related areas in macaque monkeys. Eur J Neurosci 19:3328-3342.
5. Tachibana Y, Nambu A, Hatanaka N, Miyachi S, Takada M (2004) Input-output organization of the rostral part of the dorsal premotor cortex, with special reference to its corticostriatal projection. Neurosci Res 48:45-57.
6. 高田昌彦 (2004) 大脳基底核の機能解剖学. 脳の科学 増刊号「Parkinson 病のすべて」26:35-45.
7. Isomura Y, Fujiwara-Tsukamoto Y, Takada M (2003) Glutamatergic propagation of GABAergic seizure-like afterdischarge in the hippocampus in vitro. J Neurophysiol 90:2746-2751.
8. Isomura Y, Ito Y, Akazawa T, Nambu A, Takada M (2003) Neural coding of "attention for action" and "response selection" in primate anterior cingulate cortex. J Neurosci 23:8002-8012.
9. Kaneda K, Imanishi M, Nambu A, Shigemoto R, Takada M (2003) Differential expression patterns of mGluR1α in monkey nigral dopamine neurons. NeuroReport 14:947-950.
10. Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y, Nambu A, Takada M (2003) Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA1 pyramidal cells. Neuroscience 119:265-275.
11. Hatanaka N, Tokuno H, Hamada I, Inase M, Ito Y, Imanishi M, Hasegawa N, Akazawa T, Nambu A, Takada M (2003) Thalamocortical and intracortical connections of monkey cingulate motor areas. J Comp Neurol 462:121-138.
12. Akazawa T, Takada M, Nambu A (2003) Activity and distribution patterns of monkey pallidal neurons in response to peripheral nerve stimulation. Neurosci Lett 339:161-165.
13. Nambu A, Kaneda K, Tokuno H, Takada M (2002) Organization of corticostriatal motor inputs in monkey putamen. J Neurophysiol 88:1830-1842.
14. Kaneda K, Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Differential processing patterns of motor information via striatopallidal and striatonigral projections. J Neurophysiol 88:1420-1432.
15. Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. Neurosci Res 43:111-117.
16. Kitano K, Câteau H, Kaneda K, Nambu A, Takada M, Fukai T (2002) Two-state membrane potential transitions of striatal spiny neurons as evidenced by numerical simulations and electrophysiological recordings in awake monkeys. J Neurosci 22:RC230 (1-6).
17. Isomura Y, Fujiwara-Tsukamoto Y, Imanishi M, Nambu A, Takada M (2002) Distance-dependent Ni^{2+}-sensitivity of synaptic plasticity in apical dendrites of hippocampal CA1 pyramidal cells. J Neurophysiol 87:1169-1174.
18. 高田昌彦、南部 篤 (2002) 皮質—視床下核投射の機能的意義. 脳の科学「特集 視床下核と刺激療法」24:437-444.
19. Takada M, Tokuno H, Hamada I, Inase M, Ito Y, Imanishi M, Hasegawa N, Akazawa T, Hatanaka N, Nambu A (2001) Organization of inputs from cingulate motor areas to basal ganglia in macaque monkey. Eur J Neurosci 14:1633-1650.
20. Hatanaka N, Nambu A, Yamashita A, Takada M, Tokuno H (2001) Somatotopic arrangement and corticocortical inputs of the hindlimb region of the primary motor cortex in the macaque monkey. Neurosci Res 40:9-22.
21. Takada M, Kang Y, Imanishi M (2001) Immunohistochemical localization of voltage-gated calcium channels in substantia nigra dopamine neurons. Eur J Neurosci 13:757-762.
22. 高田昌彦 (2001) 大脳基底核：謎に満ちた運動中枢. 脳の科学「特集 大脳皮質—大脳基底核ループと運動制御」23:1029-1032.
23. Matsumura M, Nambu A, Yamaji Y, Watanabe K, Imai H, Inase M, Tokuno H, Takada M (2000) Organization of somatic motor inputs from the frontal lobe to the pedunculopontine tegmental nucleus in the macaque monkey. Neuroscience 98:97-110.
24. Takada M, Matsumura M, Kojima J, Yamaji Y, Inase M, Tokuno H, Nambu A, Imai H (2000) Protection against dopaminergic nigrostriatal cell death by excitatory input ablation. Eur J Neurosci 12:1771-1780.
25. Tokuno H, Hatanaka N, Takada M, Nambu A (2000) B-mode and color Doppler ultrasound imaging for localization of microelectrode in monkey brain. Neurosci Res 36:335-338.
26. Akazawa T, Tokuno H, Nambu A, Hamada I, Ito Y, Ikeuchi Y, Imanishi M, Hasegawa N, Hatanaka N, Takada M

(2000) A cortical motor region that represents the cutaneous back muscles in the macaque monkey. Neurosci Lett 282:125-128.
27. Hatanaka N, Tokuno H, Nambu A, Takada M (2000) Direct projections from the magnocellular division of the basal nucleus of the amygdala to the principal part of the cortical masticatory area in the macaque monkey. Brain Res 854:220-223.
28. 高田昌彦（2000）免疫蛍光染色の感度を上げる．脳の科学「ニューロサイエンスの研究法」22:893-899.
29. 高田昌彦（2000）大脳基底核をめぐる神経回路．脳 21「特集　大脳基底核の神経回路、機能、病態」3:291-298.

A02-26 宮本 英七

1. K. Fukunaga, D. Muller, M. Ohmitsu, E. Bak*, A.A. DePaoli-Roach and E. Miyamoto: Decreased protein phosphatase 2A activity in hippocampal long-term potentiation. J. Neurochem., 74, 807-817 (2000)
2. J. Kasahara, K. Fukunaga and E. Miyamoto: Activation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase IV in cultured rat hippocampal neurons. J. Neurosci. Res., 59, 594-600 (2000)
3. Y. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Miyakawa and E. Miyamoto: Increase of brain-derived neurotrophic factor gene expression in NG108-15 cells by the nuclear isoforms of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II. J. Neurochem., 74, 1913-1922 (2000)
4. Y. Takeuchi, H. Yamamoto, K. Fukunaga, T. Miyakawa and E. Miyamoto: Identification of the isoforms of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II in rat astrocytes and their subcellular localization. J. Neurochem., 74, 2557-2567 (2000)
5. H. Tabuchi, H. Yamamoto, K. Matsumoto, K. Ebihara, Y. Takeuchi, K. Fukunaga, H. Hiraoka, Y. Sasaki, M. Shichiri and E. Miyamoto: Regulation of insulin secretion by overexpression of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II in insulinoma MIN6 cells. Endocrinology, 141, 2350-2360 (2000)
6. S. Ohmori, N. Sakai, Y. Shirai, H. Yamamoto, E. Miyamoto, N. Shimizu and N. Saito: Importance of protein kinase C targeting for the phosphorylation of its substrate, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. J. Biol. Chem., 275, 26449-26457 (2000)
7. N. Inagaki, M. Nishizawa, N. Arimura, H. Yamamoto, Y. Takeuchi, E. Miyamoto, K. Kaibuchi and M. Inagaki: Activation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II within post-synaptic dendritic spines of cultured hippocampal neurons. J. Biol. Chem., 275, 27165-27171 (2000)
8. T. Moriya, Y. Kouzu, S. Shibata, H. Kadotani, K. Fukunaga, E. Miyamoto and T. Yoshioka: Close linkage between calcium/calmodulin kinase II a/b and NMDA-2A receptors in the lateral amygdala and significance for retrieval of auditory fear conditioning. Eur. J. Neurosci., 12, 3307-3314 (2000)
9. S.-I. Yokota, M. Yamamoto, T. Moriya, M. Akiyama, K. Fukunaga, E. Miyamoto and S. Shibata: Involvement of calcium-calmodulin protein kinase but not of mitogen-activated protein kinase in light-induced phase delay and Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus of hamster. J. Neurochem., 77, 618-627 (2001)
10. S. Yano, M. Morioka, K. Fukunaga, T. Kawano, T. Hara, Y. Kai, J. Hamada, E. Miyamoto and Y. Ushio: Activation of Akt/Protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. J. Cereb. Blood Flow Metab., 21, 351-360 (2001)
11. J. Kasahara, K. Fukunaga and E. Miyamoto: Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region. J. Biol. Chem., 276, 24044-24050 (2001)
12. M. Nakai, S. Tanimukai, K. Yagi, N. Saito, T. Taniguchi, A. Terashima, T. Kawamata, H. Yamamoto, K. Fukunaga, E. Miyamoto and C. Tanaka: Amyloid β protein activates PKC-δ and induces translocation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) in microglia. Neurochem. Int., 38, 593-600 (2001)
13. T. Kawano, K. Fukunaga, Y. Takeuchi, M. Morioka, S. Yano, J. Hamada, Y. Ushio and E. Miyamoto: Neuroprotective effect of sodium orthovanadate on delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. J. Cereb. Blood Flow Metab., 21, 1268-1280 (2001)
14. Y. Takeuchi, K. Fukunaga and E. Miyamoto: Activation of nuclear Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II and brain-derived neurotrophic factor gene expression by stimulation of dopamine D2 receptor in transfected NG108-15 cells. J. Neurochem., 82, 316-328 (2002)
15. T. Kawano, M. Morioka, S. Yano, J. Hamada, Y. Ushio, E. Miyamoto and K. Fukunaga: Decreased Akt activity is associated with activation of Forkhead transcription factor following transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. J. Cereb. Blood Flow Metab., 22, 926-934 (2002)
16. Uezu, K. Fukunaga, J. Kasahara and E. Miyamoto: Activation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase I in

cultured rat hippocampal neurons. J. Neurochem., 82, 585-593 (2002)
17. Y. Takeuchi, E. Miyamoto and K. Fukunaga: Analysis on the promoter region of exon IV-BDNF in NG108-15 cells. J. Neurochem., 83, 67-79 (2002)
18. Y. Takeuchi, E. Miyamoto and K. Fukunaga: Activation of the rat dopamine D2 receptor promoter by mitogen-activated protein kinase and Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II pathways. J. Neurochem., 83, 784-796 (2002)
19. H. Yamamoto, E. Yamauchi, H. Taniguchi, T. Ono and E. Miyamoto: Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II its tubulin binding sites. Arch. Biochem. Biophys., 408, 255-262 (2002)
20. T. Yonehara, Y. Yamada, H. Kanasaki, H. Yamamoto, K. Fukunaga, K. Miyazaki and E. Miyamoto: Characterization of alphaT3-1 cells stably transfected with luteinizing hormone beta-subunit complementary deoxyribonucleic acid. Endocrine Journal 50, 341-354 (2003)
21. Y. Yamada, H. Yamamoto, T. Yonehara, H. Kanasaki, H. Nakanishi, E. Miyamoto and K. Miyazaki: Differential activation of the luteinizing hormone beta-subunit promotor by activin and gonadotropin-releasing hormone: A role for mitogen-activated protein kinase signaling pathway in LbetaT2 gonadotrophs. Biology of Reproduction, 70, 236-243 (2004)

A02-27 福田 光則

1. Mizutani, A., Fukuda, M., Ibata, K., Shiraishi, Y. and Mikoshiba, K. (2000) SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. J. Biol. Chem. 275, 9823-9831
2. Fukuda, M. and Mikoshiba, K. (2000) Distinct self-oligomerization activities of synaptotagmin family. J. Biol. Chem. 275, 28180-28185
3. Kida, Y., Sakaguchi, M., Fukuda, M., Mikoshiba, K. and Mihara, K. (2000) Membrane topogenesis of a type I signal-anchor protein, mouse synaptotagmin II, on the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. 150, 719-730
4. Fukuda, M., Moreira, J. E., Liu, V., Sugimori, M., Mikoshiba, K. and Llinás, R. R. (2000) Role of the conserved WHXL motif in the C terminus of synaptotagmin in synaptic vesicle docking. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 14715-14719
5. Fukuda, M. and Mikoshiba, K. (2001) Characterization of KIAA1427 protein as an atypical synaptotagmin (Syt XIII). Biochem. J. 354, 249-257
6. Fukuda, M., Ibata, K. and Mikoshiba, K. (2001) A unique spacer domain of synaptotagmin IV is essential for Golgi localization. J. Neurochem. 77, 730-740
7. Fukuda, M. and Mikoshiba, K. (2001) Mechanism of the calcium-dependent multimerization of synaptotagmin VII mediated by its first and second C2 domains. J. Biol. Chem. 276, 27670-27676
8. Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y. and Mikoshiba, K. (2001) Mechanism of the SDS-resistant synaptotagmin clustering mediated by the cysteine cluster at the interface between the transmembrane and spacer domains. J. Biol. Chem. 276, 40319-40325
9. Fukuda, M., Yamamoto, A. and Mikoshiba, K. (2001) Formation of crystalloid endoplasmic reticulum induced by expression of synaptotagmin lacking the conserved WHXL motif in the C terminus. J. Biol. Chem. 276, 41112-41119
10. Fukuda, M., Kowalchyk, J. A., Zhang, X., Martin, T. F. J. and Mikoshiba, K. (2002) Synaptotagmin IX regulates Ca^{2+}-dependent secretion in PC12 cells. J. Biol. Chem. 277, 4601-4604
11. Zhang, X., Kim-Miller, M. J., Fukuda, M., Kowalchyk, J. A. and Martin, T. F. J. (2002) Ca^{2+}-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca^{2+}-triggered exocytosis. Neuron 34, 599-611
12. Fukuda, M., Ogata, Y., Saegusa, C., Kanno, E. and Mikoshiba, K. (2002) Alternative splicing isoforms of synaptotagmin VII in the mouse, rat and human. Biochem. J. 365, 173-180
13. Saegusa, C., Fukuda, M. and Mikoshiba, K. (2002) Synaptotagmin V is targeted to dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. J. Biol. Chem. 277, 24499-24505
14. Ibata, K., Hashikawa, T., Tsuboi, T., Terakawa, S., Liang, F., Mizutani, A., Fukuda, M. and Mikoshiba, K. (2002) Non-polarized distribution of synaptotagmin IV in neurons. Neurosci. Res. 43, 401-406
15. Fukuda, M., Katayama, E. and Mikoshiba, K. (2002) The calcium-binding loops of the tandem C2 domains of synaptotagmin VII cooperatively mediate calcium-dependent oligomerization. J. Biol. Chem. 277,

29315-29320
16. Fukuda, M. (2002) Vesicle-associated membrane protein-2/synaptobrevin binding to synaptotagmin I promotes *O*-glycosylation of synaptotagmin I. **J. Biol. Chem.** 277, 30351-30358
17. Fukuda, M. (2002) The C2A domain of synaptotagmin-like protein 3 (Slp3) is an atypical calcium-dependent phospholipid-binding machine. **Biochem. J.** 366, 681-687
18. Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y., Saegusa, C., Kim, T., Peng Loh, Y. and Yamamoto, A. (2003) NGF-dependent sorting of synaptotagmin IV protein to mature dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. **J. Biol. Chem.** 278, 3220-3226
19. Fukuda, M. (2003) Distinct Rab binding specificity of Rim1, Rim2, rabphilin, and Noc2. **J. Biol. Chem.** 278, 15373-15380
20. Fukuda, M. (2003) Slp4-a/granuphilin-a inhibits dense-core vesicle exocytosis through interaction with the GDP-bound form of Rab27A in PC12 cells. **J. Biol. Chem.** 278, 15390-15396
21. Fukuda, M. (2004) RNA interference-mediated silencing of synaptotagmin IX, but not synaptotagmin I, inhibits dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. **Biochem. J.** 380, 875-879
22. Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O. and Haydon, P. G. (2004) Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101, 9441-9446
23. Fukuda, M. and Yamamoto, A. (2004) Effect of forskolin on synaptotagmin IV protein trafficking in PC12 cells. **J. Biochem.** 136, 245-253
24. Fukuda, M., Kanno, E., Satoh, M., Saegusa, C. and Yamamoto, A. (2004) Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their Ca^{2+}-dependent exocytosis in PC12 cells. **J. Biol. Chem.** 279, in press
25. 福田光則：シナプトタグミンファミリーの分子種多様性とその機能，**生化学**，74，1472-1475 (2002)
26. 福田光則：シナプトタグミンによる調節性分泌の制御，**蛋白質核酸酵素**，印刷中

A02-30 金子 鋭

1. Satoshi Kaneko, Takatoshi Hikida, Dai Watanabe, Hiroshi Ichinose, Toshiharu Nagatsu, Robert J. Kreitman, Ira Pastan, Shigetada Nakanishi Synaptic Integration Mediated by Striatal Cholinergic Interneurons in Basal Ganglia Function Science 289 (5479): 633-637, 2000
2. Takatoshi Hikida, Satoshi Kaneko, Tomohiro Isobe, Yasuji Kitabatake, Dai Watanabe, Ira Pastan, Shigetada Nakanishi Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens Proc Natl Acad Sci U S A 98(23):13351-13354, 2001

A02-31 古江 秀昌

1. Yoshimura M, Doi A, Mizuno M, Furue H, Katafuchi T. In vivo and in vitro patch-clamp recording analysis of the process of sensory transmission in the spinal cord and sensory cortex. **Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science.** 2004 (in press)

2. Kato G, Furue H, Katafuchi T, Yasaka T, Iwamoto Y, Yoshimura M. Electrophysiological mapping of the nociceptive inputs to the substantia gelatinosa in rat horizontal spinal cord slices. **Journal of Physiology** (London) 560.1:303-315, 2004. 10. 1

3. Moriyama M, Furue H, Katafuchi T, Teranishi H, Sato T, Kano T, Kojima M, Yoshimura M. Presynaptic modulation by neuromedin U of Sensory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons. **Journal of Physiology** (London) 559.3:707-13, 2004. 9. 15

4. Ito A, Takeda M, Furue H, Shibata K, Hori M, Sagai H, Sakurada T, Yoshimura M. Administration of estrogen shortly after ovariectomy mimics the anti-nociceptive action and changes in 5-HT(1A)-like receptor expression induced by calcitonin in ovariectomized rats. **Bone** 35(3):697-703, 2004. 9.

5. Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M. Sensory processing and functional reorganization of sensory transmission under pathological conditions in the spinal dorsal horn. **Neuroscience Research** 48:361-368, 2004. 4.

6. Yoshimura M, Furue H, Nakatsuka T, Katafuchi T. Analysis of receptive fields revealed by in vivo patch-clamp recordings from dorsal horn neurons and in situ intracellular recordings from dorsal root ganglion neurons. **Life Sciences** 74:2611-2618, 2004. 4.

7. Sonohata M, Furue H, Katafuchi T, Yasaka T, Doi A, Kumamoto E and Yoshimura M. Actions of

noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. **Journal of Physiology** (London) 555.2:515-526, 2004. 3. 1

8. 吉村　恵、古江　秀昌、加藤　剛、土井　篤、水野　雅晴、片渕　俊彦　In vivo パッチクランプ記録法の薬理学への応用.　日本薬理学雑誌　124:111-118, 2004. 8.

9. Matsumoto N, Kumamoto E, Furue H and Yoshimura M : GABA-mediated inhibition of glutamate release during ischemia in substantia gelatinosa of the adult rat. **Journal of Neurophysiology** 89:257-264, 2003

10. Yang K, Furue H, Fujita T, Kumamoto E and Yoshimura M : Alterations in primary afferent input to substantia gelatinosa of adult rat spinal cord after neonatal capsaicin treatment. **Journal of Neuroscince Research** 74(6):928-933, 2003. 12. 15

11. Jiang N, Furue H, Katafuchi T and Yoshimura M : Somatostatin directly inhibits substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal dorsal horn in vitro. **Neuroscience Research** 47:97-107, 2003. 9.

12. Yang K, Furue H, Kumamoto E, Dong Y-X and Yoshimura M : Pre- and postsynaptic inhibition mediated by GABAB receptors in rat ventrolateral periaqueductal gray neurons. **Biochemical and Biophysical Research Communication** 302:233-237, 2003. 4.

13. 古江秀昌、園畑素樹、吉村　恵：マウスおよびラット脊髄後角細胞からの in vivo パッチクランプ記録法.　日本生理学雑誌　65(10):315-321, 2003. 10. 1

14. 土井　篤、水野雅晴、古江秀昌、吉村　恵：ラット大脳皮質体性感覚野からの in vivo パッチクランプ記録法.　日本生理学雑誌　65(10):322-329, 2003. 10. 1

A02-32 松崎 政紀

Tanaka J, Matsuzaki M, Tarusawa E, Momiyama A, Molnar E, Kasai H & Shigemoto R (2005) Number and density of AMPA receptors in single synapses in immature cerebellum. J Neurosci. 2005 Jan 26;25(4):799-807.

1. Sakai N., Tsubokawa H., Matsuzaki M., Kajimoto T., Takahashi E., Ren Y., Ohmori S., Shirai Y., Matsubayashi H., Chen J., Duman RS., Kasai H. and Saito N. Propagation of gammaPKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in gammaPKC-GFP transgenic mice. **Genes to Cells.** 9. 945-957, 2004.

2. Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies, G.C.R. and Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. **Nature** 429. 761-766 2004.

3. Kasai H., Matsuzaki M., Noguchi J., Yasumatsu N. and Nakahara H. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. **Trends in Neurosciences** 26. 360-368, 2003.

A03-01 野田 亮

1. T. Matsumoto, N. Akiyama, S. Kizaka-Kondoh and M. Noda: Transient overexpression of NGFI-A gene suppresses NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. NeuroReport 11, 1001-1005 (2000)

2. N. Akiyama, Y. Matsuo, H. Sai, M. Noda and S. Kizaka-Kondoh: Identification of a series of TGF-beta-responsive genes by retrovirus-mediated gene trap screening. Mol. Cell. Biol. 20, 3266-3273 (2000)

3. H. Izumi, C. Takahashi, J. Oh and M. Noda: Tissue factor pathway inhibitor-2 suppresses the production of active matrix metalloproteinase-2 and is down-regulated in cells harboring ativated ras oncogenes. FEBS Lett. 481, 31-36 (2000)

4. A. Kinoshita, M. Noda and M. Kinoshita: Differential localization of septins in the mouse brain. J. Comp. Neurol. 428, 223-239 (2000)

5. Y. Imamura, H. Inokawa, A. Ito, H. Kadotani, K. Toyama, M. Noda, S. Nakanishi and T. Hirano: Roles of GABAergic inhibition and NMDA receptor subunits in the spatio-temporal integration in the cerebellar cortex of mice. Neurosci. Res. 38, 289-301 (2000)

6. K. Furumoto, S. Arii, A. Mori, H. Furuyama, M. J. Gorrin Rivas, T. Nakao, N. Isobe, T. Murata, C. Takahashi, M. Noda and M. Imamura: RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Hepatology 33, 189-195 (2001)

7. T. Ueda, N. Akiyama, H. Sai, N. Oya, M. Noda, M. Hiraoka and S. Kizaka-Kondoh: c-IAP2 is induced by ionizing radiation through NF-kB binidng sites. FEBS Lett. 491, 40-44 (2001)
8. Y. Matsuo, N. Akiyama, H. Nakamura, J. Yodoi, M. Noda and S. Kizaka-Kondoh: Identifiaction of a novel thioredoxin-related transmembrane protein. J. Biol. Chem. 276, 10032-10038 (2001)
9. M. Kinoshita, T. Nakamura, M. Ihara, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, K. Tashiro and M. Noda: Identification of human endomucin-1 and -2 as membrane-bound O-sialoglycoproteins with anti-adhesive activity. FEBS Lett. 499, 121-126 (2001)
10. M. Ihara, H. Tomimoto, M. Kinoshita, J. Oh, M. Noda, H. Wakita, I. Akiguchi and H. Shibasaki: Chronic cerebral hypoperfusion induces MMP-2 but not MMP-9 expression in the microglia and vascular endothelium of white matter. J. Cereb. Blood Fl. Met. 21, 828-834 (2001)
11. G. Joberty, R. R. Perlungher, P. J. Sheffield, M. Kinoshita, M. Noda, T. Haystead and I. G. Macara: Septin organisation is controlled by Borgs and negatively regulated by Cdc42. Nature Cell Biol. 3, 861-866 (2001)
12. J. Oh, R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R. M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D. B. Alexander, C. Ide, T. P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itohara, C. Takahashi and M. Noda: The membrane-anchored MMP-inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. Cell 107, 789-800 (2001)
13. H. Kitasato, M. Noda, T. Akahoshi, R. Okamoto, T. Koshino, Y. Murakami, M. Inoue and S. Kawai: Activated Ras modifies the proliferative response of rheumatoid synovial cells to TNF-α and TGF-α. Inflamm. Res. 50, 592-597 (2002)
14. N. Matsumoto, H. Kitayama, M. Kitada, K. Kimura, M. Noda and C. Ide: Isolation of a set of genes expressed in the choroid plexus of the mouse using suppression subtractive hybridization. Neuroscience 117, 405-415 (2003)
15. T. Masui, R. Doi, T. Koshiba, S. Tsuji, S. Nakajima, H. Kobayashi, M. Koizumi, E. Toyoda, S. Tulachan, D. Ito, K. Kami, T. Mori, R. Hosotani, M. Noda and M. Imamura: RECK expression in pancreatic cancer: Its correlation with lower invasiveness and better prognosis. Clin. Cancer Res. 9, 1779-1784 (2003)
16. M. Ihara, H. Tomimoto, H. Kitayama , Y. Morioka, I. Akiguchi, H. Shibasaki, M. Noda and M. Kinoshita: Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. J. Biol. Chem. 278, 24095-24102 (2003)
17. C. Takahashi, R. T. Bronson, M. Socolovsky, B. Contreras, K. Y. Lee, T. Jacks, M. Noda, R. Kucherlapati and M. E. Ewen: Rb and N-ras function together to control differentiation in the mouse. Mol. Cell. Biol. 23, 5256–5268 (2003)
18. Y. Imamura, N. Matsumoto, H. Kitayama, S. Kondo and M. Noda: Possible involvement of Rap1 and Ras in the regulation of glutamatergic synaptic transmission. NeuroReport 14, 1203-1207 (2003)
19. J. Oh, R. Takahashi, E. Adachi, S. Kondo, S. Kuratomi, A. Noma, D. B. Alexander, H. Motoda, A. Okada, M. Seiki, T. Itoh, S. Itohara, C. Takahashi and M. Noda: Overlapping functions between two distinct matrix metalloproteinases, MMP-2 and MT1-MMP, in mouse. Oncogene 23, 5041-5048 (2004)
20. K. Takenaka, S. Ishikawa, Y. Kawano, K. Yanagihara, R. Miyahara, Y. Otake, Y. Morioka, C. Takahashi, M. Noda, H. Wada and F. Tanaka: Expression of a novel MMP regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. Eur. J. Cancer 40, 1617-1623 (2004)
21. Y. Imamura, N. Matsumoto, S. Kondo, H. Kitayama and M. Noda: Effects of Rap1 and Ras on voltage-gated sodium current in cultured neuronal cells. Neuroscience 127, 973-981 (2004)
22. T. Takeuchi, M. Hisanaga, M. Nagao, N. Ikeda, H. Fujii, F. Koyama, T. Mukogawa, H. Matsumoto, S. Kondo, C. Takahashi, M. Noda, and Y. Nakajima: The Membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. Clin Cancer Res. 10, 5572-5579 (2004)
23. H. Kanda, T. Tanaka, M. Matsumoto, E. Umemoto, Y. Ebisuno, M. Kinoshita, M. Noda, R. Kannagi, T. Hirata, T. Murai, M. Fukuda and M. Miyasaka: Endomucin, a sialomucin expressed in high endothelial venules, supports L-selectin-mediated rolling. Int. Immunol. (in press)
24. S. Shi, M. Noda and H. Kitayama: Rap1 mutants with increased affinity for the guanine-nucleotide exchange factor C3G. Oncogene (in press)
25. M. Ihara, A. Kinoshita, S. Yamada, H. Tanaka, A. Tanigaki, A. Kitano, M. Goto, K. Okubo, H. Nishiyama, O. Ogawa, C. Takahashi, S. Itohara, Y. Nishimune, M. Noda and M. Kinoshita: Cortical

organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. Developmental Cell (in press)
26. J. Oh, D. Seo, T. Diaz, B. Wei, Y. Ward, J. M. Ray, Y. Morioka, S. Shi, H. Kitayama, C. Takahashi, M. Noda and W. G. Stetler-Stevenson: TIMP-2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. Cancer Res. (in press)

総説
1. M. Kinoshita and M. Noda: Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. Cell Struct. Funct. 26, 667-670 (2002)
2. I. G. Macara, R. Baldarelli, C. M. Field, M. Glotzer, Y. Hayashi, S. -C. Hsu, M. B. Kennedy, M. Kinoshita, M. Longtine, C. Low, L. J. Maltais, L. McKenzie, T. J. Mitchison, T. Nishikawa, M. Noda, E. M. Petty, M. Peifer, J. R. Pringle, P. J. Robinson, D. Roth, S. E. H. Russell, H. Stuhlmann, M. Tanaka, T. Tanaka, W. S. Trimble, J. Ware, N. J. Zeleznik-Le, B. Zieger: Mammalian septins nomenclature. Mol. Biol. Cell 13, 4111-3 (2002)
3. R. M. Sasahara, S. M. Brochado, C. Takahashi, J. Oh, S. S. Maria-Engler, J. M. Granjeiro, M. Noda and M. C. Sogayar: Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. Cancer Det. Prev. 26, 435-443 (2002)
4. M. Noda, J. Oh, R. Takahashi, S. Kondo, H. Kitayama and C. Takahashi: RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. Cancer Metastasis Rev. 22, 167-175 (2003)

A03-02 白尾 智明

1. Mizui, T., Sekino, Y., Takahashi, H., Yamazaki, H. and Shirao, T. "Overexpression of drebrin A in immature neurons induces the accumulation of F-actin and PSD-95 into dendritic filopodia, and the formation of large abnormal protrusions." Exp. Cell Res. (submitted)
2. Aoki, C., Sekino, Y., Hanamura, K., Fujisawa, S., Mahadomrongkul, V., Ren, Y., and Shirao, T. "Drebrin A is a Postsynaptic Protein that Localizes in vivo to the Submembranous Surface of Dendritic Sites Forming Excitatory Synapses" J. Comp. Neurol. (2005). Mar 21; 483(4), 383-402.
3. Kobayashi,R., Sekino,Y., Shirao,T., Tanaka,S., Ogura,T., Inada,K., and Saji,M. "Antisense knockdown of drebrin A, a dendritic spine protein, causes stronger preference, impaired pre-pulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant." Neurosci. Res. 49:205-217 (2004)
4. Butkevich, E., Huelsmann,S., Wenzel, D., Shirao,T., Duden, R., Majoul, I., "Drebrin is a novel Connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton." Curr. Biol. 14:650-658 (2004)
5. Hanaoka, R., Ohmori Y., Uyemura, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Shirao, T., Okamoto, H ."Zebrafish gcmb is required for pharyngeal cartilage formation" Mech Dev. 121:1235-1247 (2004)
6. Pingle SC, Mishra S, Marcuzzi A, Bhat SG, Sekino Y, Rybak LP, Ramkumar V. "Osmotic diuretics induce adenosine A1 receptor expression and protect renal proximal tubular epithelial cells against cisplatin-mediated apoptosis." J Biol Chem. 279: 43157-43167 (2004)
7. Ferhat, L., Esclapez, M., Represa, A., Fattoum, A., Shirao ,T., and Ben-Ari, Y. "Upregulation of acidic calponin during dendritic spine plasticity following pilocarpine-induced seizures" Hippocampus 13:845-858 (2003)
8. Takahashi, H., Sekino, Y., Tanaka S., Mizui, T., Kishi, S, and Shirao, T., "Drebrin-dependent Actin Clustering in Dendritic Filopodia Governs Synaptic Targeting of Postsynaptic Density-95 and Dendritic Spine Morphogenesis" J. Neurosci. 23:6586-6595 (2003)
9. Tezuka, M., Oda, O., Shirao, T., Inoue, HK., "Microglia/macrophage reactions and cell proliferation during the repair of spinal cord injuries in infant rats" Neurotrauma Res, 15: 17-20 (2003)
10. Beraudi A, Traversa U, Villani L, Sekino Y, Nagy JI, Poli A. "Distribution and expression of A1 adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain." Neurochem. Int. 42: 455-464. (2003)
11. Jin, Mi., Tanaka,S., Sekino,Y., Ren,Y., Yamazaki,H., Kawai-Hirai,R., Kojima,N. and Shirao,T. "A Novel Brain-Specific Mouse Drebrin: cDNA Cloning, Chromosomal Mapping, Genomic Structure, Expression, and Functional Characterization" Genomics 79:686-692 (2002)
12. Shirao,T. and Sekino,Y. "Clustering and anchoring mechanisms of molecular constituents of postsynaptic scaffolds in the spine" Neurosci. Res. 40: 1-7 (2001)
13. Yamazaki H., Takahashi H., Aoki T., Shirao T. "Molecular Cloning and Dendritic Localization of rat SH3P7"

Eur. J. Neurosci. 14: 998-1008 (2001)
14. Ikeda, M., Segara,M., Sekino,Y., Shirao,T., Honda,K., Yoshioka,T., Allen,CN. and Inoue,S."The sulphydryl reagent, N-ethylmaleimide, disrupts sleep and blocks A1 adenosine receptor-mediated inhibition of intracellular calcium signaling in the in vitro ventromedial preoptic nucleus." Neuroscience 106: 733-743 (2001)
15. Kobayashi,S., Shirao,T., and Sasaki,T. "Drebrin expression is increased in spinal motoneurons after axotomy." Neuorsci. Lett. 311: 165-168 (2001)
16. Tomidokoro,Y., Harigaya,Y., Matsubara,E., Ikeda,M., Kawarabayashi,T., Shirao,T., Ishiguro,K., Okamoto,K., Yonkin,S.G. and Shoji,M. " Brain Aß amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-I and tau." J. Pathol. 193: 500-506 (2001)
17. Tezuka, M., Oda, O., Nishi, H., Nagaseki, Y., Nishimatsu, T., Kobayashi, S., Shirao, T., Inoue, HK, "Vimentin-expressing astorcytes and dendrite regeneration during spinal cord repair in infant rats." Neurotrauma Res, 13: 59-62 (2001)
18. Oda,O., Tezuka, M., Nishi, H., Nishimatsu, T., Kobayashi, S., Shirao, T., Inoue, HK., "Cellular responses and cavity formation after brain injury in infant and adult rats" Neurotrauma Res, 13 11-15 (2001)
19. Cheng,X-T., Hayashi,K. and Shirao,T. "Non-muslcle myosin IIB-like immunoreactivity is present at the drebrin -binding cytoskeleton in neurons" Neurosci. Res. 36: 167-173 (2000).
20. Tanaka,S., Sekino,Y. and Shirao,T. "NT-3 inhibits cerebellar granule cell migration in vitro." Neuroscience 97: 727-734 (2000)
21. Saji M, Kobayashi S, Ohno K, Sekino Y. "Interruption of supramammillohippocampal afferents prevents the genesis and spread of limbic seizures in the hippocampus via a disinhibition mechanism." Neuroscience 97:437-445. (2000)
22. Tezuka,M., Oda,O., Nishi,H., Nagaseki,Y., Nishimatsu,T., Kobayashi,S., Shirao,T. and Inoue,H.K. "Cellular and molecular changes during the process of repair of spinal cord injury in infant rats." Neurotrauma Res. 12: 57-60 (2000)
23. Toda,M., Shirao,T. and Uyemura,K. "Suppression of a actin-binding protein, drebrin, by antisense transfection inhibits neurite outgrowth in neuroblastoma B104 cells" Devl. Brain Res. 114: 193-200 (1999)
24. Hayashi K., Shirao T. "Change in the shape of dendritic spines caused by overexpression of drebrin in cultured cortical neurons" J. Neurosci. 19: 3918-3925 (1999)
25. Ochiishi,T., Saitoh,Y., Yukawa,A., Saji,M., Ren,Y., Shirao,T., Miyamoto,H., Nkakta,H. and Sekino,Y. "High level of adenosine A1 receptor-like immunoreactivity in the CA2/CA3a region of the adult rat hippocampus" Neuroscience 93:955-967(1999)
26. Hatanpaa,K., Isaacs,K.R., Shirao,T., Brady,DR. and Rapoport,S.I." Aging of the human brain: Loss of synaptic proteins regulating plasticity." J. Neuropathol. and Exp. Neurol. 58: 637-643 (1999)
27. Hayashi,K., Ishikawa,R., Kawai-Hirai,R., Takagi,T., Taketomi,A. and Shirao,T. "Domain analysis of the actin-binding and actin-remodeling activities of drebrin." Exp. Cell Res. 253: 673-680 (1999).
28. Ochiishi T, Chen L, Yukawa A, Saitoh Y, Sekino Y, Arai T, Nakata H, Miyamoto H. "Cellular localization of adenosine A1 receptors in rat forebrain: immunohistochemical analysis using adenosine A1 receptor-specific monoclonal antibody." J Comp Neurol. 411: 301-16 (1999)
29. Matsuoka Y, Okazaki M, Takata K, Kitamura Y, Ohta S, Sekino Y, Taniguchi T. "Endogenous adenosine protects CA1 neurons from kainic acid-induced neuronal cell loss in the rat hippocampus." Eur J Neurosci. 11:3617-3625 (1999)

A03-03 能瀬 聡直

1 Tabuchi, K., Sawamoto, K., Suzuki, E., Ozaki, K., Sone, M., Hama, C., Tanifuji-Morimoto, T., Yuasa, Y., Yoshihara, Y., Nose, A.,Okano, H. GAL4/UAS-WGA system as a powerful tool for tracing Drosophila transsynaptic neural pathways. J Neurosci Res 59, 94-99 (2000).
2 Taniguchi, H., Shishido, E., Takeichi, M.,Nose, A. Functional dissection of drosophila capricious: its novel roles in neuronal pathfinding and selective synapse formation. J Neurobiol 42, 104-116 (2000).
3 Umemiya, T., Takasu, E., Takeichi, M., Aigaki, T.,Nose, A. Forked end: a novel transmembrane protein involved in neuromuscular specificity in drosophila identified by gain-of-function screening. J Neurobiol 51, 205-214 (2002).
4 Kazama, H., Morimoto-Tanifuji, T.,Nose, A. Postsynaptic activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase ii promotes coordinated pre- and postsynaptic maturation of drosophila neuromuscular junctions(1). Neuroscience 117, 615-625 (2003).
5 Morimoto-Tanifuji, T., Kazama, H.,Nose, A. Developmental stage-dependent modulation of synapses by

postsynaptic expression of activated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. **Neuroscience 128**, 797-806 (2004).
6 Tanaka, H., Takasu, E., Aigaki, T., Kato, K., Hayashi, S.,Nose, A. Formin3 is required for assembly of the F-actin structure that mediates tracheal fusion in Drosophila. **Dev Biol 274**, 413-425 (2004).

A03-04 塩見 健輔

Shiomi K, Kanemoto M, Keino-Masu K, Yoshida S, Soma K, Masu M. Identification and differential expression of multiple isoforms of mouse Coiled-coil-DIX1 (Ccd1), a positive regulator of Wnt signaling **Molecular Brain research** (2005) In press
1. Sumazaki R, Shiojiri N, Isoyama S, Masu M, Keino-Masu K, Osawa M, Nakauchi H, Kageyama R, Matsui A. Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. Nature Genet. 36, 83-87, 2004.
2. Shiomi K, Uchida H, Keino-Masu K, Masu M. Ccd1, a novel protein with a DIX domain, is a positive regulator in the Wnt signaling during zebrafish neural patterning. **Curr. Biol.** 13 73-77, 2003.
3. Ohto T, Uchida H, Yamazaki H, Keino-Masu K, Matsui A, Masu M. Identification of a novel non-lysosomal sulphatase expressed in the floor plate, choroid plexus and cartilage. **Genes Cells** 7, 173-186, 2002.
4. Tsukada S, Keino-Masu K, Masu M, Fukuda J. Activation of protein kinase A by nitric oxide in cultured dorsal root ganglion neurites of the rat, examined by a fluorescence probe, ARII. **Neurosci. Lett.** 318, 17-20, 2002.
5. Sato H, Tamba M, Okuno S, Sato K, Keino-Masu K, Masu M, Bannai S. Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system xc-, in the mouse brain. **J. Neurosci.** 22, 8028-8033, 2002.
6. Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98, 6951-6956, 2001.
7. Cooke J, Moens C, Roth L, Durbin L, Shiomi K, Brennan C, Kimmel C, Wilson S, Holder N. Eph signaling functions downstream of Val to regulate cell sorting and boundary formation in the caudal hindbrain. **Development** 128, 571-580, 2001.

A03-05 広海 健

1. Kramer, S., Okabe, M., Hacohen, N., Krasnow, M. A. and Hiromi, Y. (1999). Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in Drosophila. **Development** 126, 2515-2525.
2. Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E. and Hotta, Y. (2000). The *Drosophila* Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. **Nature** *406*, 886-889.
3. Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Hiromi, Y. and Okano, H. (2001). Translational repression determines a neuronal potential in Drosophila asymmetric cell division. **Nature** *411*, 94-98.
4. Umesono, Y., Hiromi, Y., and Hotta, Y. (2002). Context-dependent utilization of Notch activity in Drosophila glial determination. **Development** *129*, 2391-2399.
5. Liu, Q-X, Jindra, M. Ueda, H., Hiromi, Y. and Hirose, S. (2003). Drosophila MBF1 is a coactivator for Tracheae Defective and contributes to the formation of tracheal and nerous systems. **Development** *130*, 719-728.
6. Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong, W.-C., Hiromi, Y. and Okano, H. (2003). Drosophila homeodomain protein REPO contrls glial differentiationby cooperating with ETS and BTB transcription factors. **Development** *130*, 2419-2428.
7. Yamada, T., Okabe, M., and Hiromi, Y. (2003). EDL/MAE regulates EGF-mediated induction by antagonizing Ets transcription factor Pointed. **Development** *130*, 4085-4096.
8. Niwa, N., Hiromi, Y. and Okabe, M. (2004). A conserved developmental program for sensory organ formation in *Drosophila melanogaster*. **Nat. Genet.** *36*, 293-297.
9. Jindra, M., Gaziova, I., Uhlirova, M., Okabe, M., Hiromi, Y. and Hirose, S. (2004). Coactivator MBF1 preserves the redox-dependent AP-1 activity during oxidative stress in Drosophila. **EMBO J.** *23*, 3538-3547.
Kanai, MI., Okabe, M. and Hiromi, Y. (2005) Seven-up controls switching of transcription factors that specify temporal identities of Drosophilaneuroblasts. **Developmental Cell** 8, 203-213.

A03-06 山形 要人

Makarenkova H, Sugiura H, Yamagata K & Owens G (2005). Alternatively spliced variants of protocadherin 8 exhibit distinct patterns of expression during mouse development. **Biochim Biophys Acta.** 2005 Jan 11;1681(2-3):150-6.

1) Sugiura H, Iwata K, Matsuoka M, Hayashi H, Takemiya T, Yasuda S, Ichikawa M, Yamauchi T, Mehlen P, Haga T, Yamagata K. Inhibitory role of endophilin 3 in receptor-mediated endocytosis. J Biol Chem. 279(22):23343-8, 2004.
2) Makarenkova H, Sugiura H, Yamagata K, Owens G. Alternatively spliced variants of protocadherin 8 exhibit distinct patterns of expression during mouse development. Biochim Biophys Acta, in press.
3) Sasaki T, Kitagawa K, Yamagata K, Takemiya T, Tanaka S, Omura-Matsuoka E, Sugiura S, Matsumoto M, Hori M. Amelioration of hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in cyclooxygenase-2-deficient mice. J Cereb Blood Flow Metab. 24(1):107-13, 2004.
4) Takemiya T, Suzuki K, Sugiura H, Yasuda S, Yamagata K, Kawakami Y, Maru E. Inducible brain COX-2 facilitates the recurrence of hippocampal seizures in mouse rapid kindling. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 71(3-4):205-16, 2003.
5) Matsuoka M, Yoshida-Matsuoka J, Yamagata K, Sugiura H, Ichikawa M, Norita M. Rapid induction of Arc is observed in the granule cell dendrites in the accessory olfactory bulb after mating. Brain Res. 975(1-2):189-95, 2003.
6) Nishimura M, Yamagata K, Sugiura H, Okamura H. The activity-regulated cytoskeleton-associated (Arc) gene is a new light-inducible early gene in the mouse suprachiasmatic nucleus. Neuroscience 116(4):1141-7, 2003.
7) Matsumura K., Yamagata K, Takemiya T, Kobayashi S. Coinduction of microsomal-type PGE synthase with COX-2 in brain endothelial cells; its possible pathophysiological role during infection and inflammation. Curr. Med. Chem. 1; 161-166, 2002.
8) Matsuoka M, Yoshida-Matsuoka J, Sugiura H, Yamagata K, Ichikawa M and Norita M. Mating behavior induces differential Arc expression in the main and accessory olfactory bulbs of adult rats. Neurosci. Lett. 111:251-258, 2002.
9) Inoue W, Matsumura K, Yamagata K, Takemiya T, Shiraki T, Kobayashi S. Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. Neurosci Res. 44(1):51, 2002.
10) Matsuoka M, Yamagata K, Sugiura H, Yoshida-Matsuoka J, Norita M, Ichikawa M. Expression and regulation of the immediate-early gene product Arc in the accessory olfactory bulb after mating in male rat. Neuroscience 111(2):251-258, 2002.
11) Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S, Sugiura H, Cao C, Watanabe Y, Kobayashi S. Coexpression of microsomal-type prostaglandin e synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. J. Neurosci. 21(8), 2669-77, 2001.
12) Uwai K, Ohashi K, Takaya Y, Oshima Y, Furukawa K, Yamagata K, Omura T, Okuyama S. Virol A, a toxic trans-polyacetylenic alcohol of Cicuta virosa, selectively inhibits the GABA-induced Cl(-) current in acutely dissociated rat hippocampal CA1 neurons. Brain Res. 889(1-2), 174-80, 2001.
13) Yamagata K, Suzuki K, Sugiura H, Kawashima N, Okuyama S. Activation of arc by methamphetamine in the rat brain. Ann. N. Y. Acad. Sci. 914, 22-32, 2000.
14) Irie Y, Yamagata K, Gan Y, Miyamoto K, Do E, Kuo CH, Taira E, Miki N. Molecular cloning and characterization of Amida, a novel protein which interacts with a neuron-specific immediate early gene product arc, contains novel nuclear localization signals, and causes cell death in cultured cells. J. Biol. Chem. 275:2647-2653, 2000.

A03-07 五十嵐 道弘

Togano T, Kurachi M, Watanabe M, Grenningloh G, Igarashi M Role of Ser50 phosphorylation in SCG10 regulation of microtubule depolymerization. J Neurosci Res (2005) in press
1) Togano T, Kurachi M, Kato K, Grenningloh G, Igarashi M (2004) Significance of the phosphorylation sites in SCG10, a growth cone protein depolymerizing microtubules. Jpn Neurochem Soc 43(2-3) 525. (2004年9月15日)
2) Nomura K, Ohyama A, Komiya Y, Igarashi M (2003) Minimal residues in linker domain of syntaxin 1A reruired for binding affinity to Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II. J Neurosci Res 72 (2): 198-202. (2003年4月15日)
3) Igarashi M, Togano T, Niikawa T, Isobe T (2003) Proteomic approach of the growth cone functions. Bull Jpn

Neurochem Soc 42(3) 218. (2003年9月1日)
4) Togano T, Niikawa T, Isobe T, Igarashi M (2003) The protein composition of the growth cone membrane by the proteomic analysis. **Neurosci Res 46** (*Suppl. 1*), S154. (2003年7月1日)
5) Ohyama, A Hosaka K, Komiya Y, Akagawa K, Yamauchi E, Taniguchi H, Sasakawa, N Kumakura K, Mochida S, Yamauchi T, Igarashi M (2002) Regulation of exocytosis through Ca^{2+}/ATP-dependent binding of autophosphorylated CaMKII to syntaxin 1A. **J Neurosci 22**(9): 3342-3351. (2002年5月1日)
6) Nagashima K, Torii S, Yi Z, Igarashi M, Okamoto K, Takeuchi T, Izumi T (2002) Melanophilin directly links rab27a and myosin Va. **FEBS Lett 517**(2): 233-238. (2002年3月15日)
7) Ohyama A, Komiya Y, Igarashi M (2001) Globular tail of myosin-V is bound to VAMP. **Biochem Biophys Res Commun 280**(3): 988-991. (2001年3月1日)
8) Lutjens R, Igarashi M, Pellier V, Blasey H, Di Paolo G, Ruchti E, Pfulg C, Staple JK, Catsicas S, Grenningloh G (2000) Localization and targeting of SCG10 to growth cone vesicles. **Eur J Neurosci 12**(8): 2224-2234. (2000年8月1日)
9) Igarashi M, Ohyama A, Ohbayashi K, Kozaki S, Komiya Y (2000) The mechanism of the transmitter release in growth cones. **J Neurosci Res 60**(5): 743-753. (2000年3月15日)
10) Fukura H, Kitani Y, Komiya Y, Igarashi M (2000) Nitrous oxide, but not xenon, affects the signaling in the neuronal growth cone. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr 24(8)**:1357-1368. (2000年8月1日)
総説
1) 五十嵐 道弘 (2004) シナプス終末形成の機構. 蛋白質核酸酵素 49(3): 263-269. (2004年3月31日)
2) 五十嵐道弘 (2003) SNARE 複合体と開口放出制御. Clinical Neuroscience 21(12):358. (2003年3月1日)
3) 五十嵐 道弘 (2002) 開口放出関連蛋白質による軸索伸長制御. 脳の科学 24(12): 1157-1161. (2002年12月10日)
4) 五十嵐 道弘 (2000) 成長円錐からシナプス終末への変化の分子機構. 蛋白質核酸酵素 45 (3): 425-435. (2000年2月15日).

A03-08 谷口 雅彦

1. Q. Schwarz, C. Gu, H. Fujisawa, K. Sabelko, M. Gertsenstein, A. Nagy, M. Taniguchi, A.L. Kolodkin, D.D. Ginty, D.T. Shima and C. Ruhrberg, Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve. Genes Dev., 18, 2822-2834, 2004.
2. M. Taniguchi and T. Shimizu, Characterization of a novel member of murine semaphorin family. Biochem. Biophys. Res. Commun., 314, 242-248, 2004.
3. S.P. Niclou, E.H.P. Franssen, E.M.E. Ehlert, M. Taniguchi and J. Verhaagen, Meningeal cell-derived semaphorin 3A inhibits neurite outgrowth. Mol. Cell. Neurosci., 24, 902-912, 2003.
4. G. Serini, D. Valdembri, S. Zanivan, G. Morterra, C. Burkhardt, F. Caccavari, L. Zammataro, L. Primo, L. Tamagnone, M. Logan, M. Tessier-Lavigne, M. Taniguchi, A.W. Puschel, and Federico Bussolino, Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. Nature, 424, 391-397, 2003.
5. M. Taniguchi, H. Nagao, Y.K. Takahashi, M. Yamaguchi, S. Mitsui, T. Yagi, K. Mori and T. Shimizu, Distorted odor maps in the olfactory bulb of Semaphorin 3A-deficient mice. J. Neurosci., 23, 1390-1397, 2003.
6. T. Masuda, H. Tsuji, M. Taniguchi, T. Yagi, M. Tessier-Lavigne, H. Fujisawa, N. Okado and T. Shiga, Differential non-target-derived repulsive signals play a critical role in shaping initial axonal growth of dorsal root ganglion neurons. Dev. Biol., 254, 289-302, 2003.
7. H. Usui, M. Taniguchi, T. Yokomizo and T. Shimizu, Plexin-A1 and plexin-B1 specifically interact at their cytoplasmic domains. Biochem. Biophys. Res. Commun., 300, 927-931, 2003.
8. Y. Sasaki, C. Cheng, Y. Uchida, O. Nakajima, T. Ohshima, T. Yagi, M. Taniguchi, T. Nakayama, R. Kishida, Y. Kudo, S. Ohno, F. Nakamura and Y. Goshima, Fyn and Cdk5 mediate Semaphorin 3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. Neuron, 35, 907-920, 2002.
9. Y. Mukouyama, D. Shin, S. Britsch, M. Taniguchi and D.J. Anderson, Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. Cell, 109, 693-705, 2002.
10. T. Kawasaki, Y. Bekku, F. Suto, T. Kitsukawa, M. Taniguchi, I. Nagatsu, T. Nagatsu, K. Itoh, T. Yagi and H. Fujisawa, Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. Development, 129, 671-680, 2002.
11. Y. Sugimoto, M. Taniguchi, T. Yagi, Y. Akagi, Y. Nojyo, and N. Tamamaki, Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. Development, 128, 3321-3330, 2001.

12. S. Løes, P. Kettunen, I.H. Kvinnsland, M. Taniguchi, H. Fujisawa and K. Luukko, Expression of class3 semaphorins and neuropilin receptors in the developing mouse tooth. Mech. Dev., 101, 185-188, 2001.
13. T. Ito, M. Kagoshima, Y. Sasaki, C. Li, N. Udaka, T. Kitsukawa, H. Fujisawa, M. Taniguchi, T. Yagi, H. Kitamura, and Y. Goshima, Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. Mech. Dev., 97, 35-45, 2000.

A03-09 根岸 学

Harada A, Katoh H, Negishi M Direct interaction of Rndl with FRS2β regulates Rndl-induced downregulation of RhoA activity and is involved in FGF-induced neurite. **The Journal of Biological Chemistry** (2005) in press
1, Oinuma I, Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M: The semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. Science 305: 862-865, 2004
2, Kakimoto T, Katoh H, Negishi M: Identification of splicing variants of Rapostlin, a novel Rnd2 effector that interacts with N-WASP and induces neurite branching. J Biol Chem 279: 14104-14110, 2004
3, Ishikawa Y, Katoh H, Negishi M: A role of Rndl GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. J Neurosci 23: 11065-11072, 2003
4, Katoh H, Negishi M: RhoG activates Racl by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. Nature 424: 461-464, 2003
5, Oinuma I, Katoh H, Harada A, Negishi M: Direct interaction of Rndl with Plexin-B1 regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho activation by Plexin-B1 and induces cell contraction in COS-7 cells. J Biol Chem 278: 25671-5677, 2003
6, Yamaguchi Y, Katoh H, Negishi M: N-terminal short sequences of a subunits of the G12 family determine selective coupling to receptors. J Biol Chem 278: 14936-14939, 2003
7, Fujita H, Katoh H, Ishikawa Y, Mori K, Negishi M: Rapostlin is a novel effector of Rnd2 GTPase inducing neurite branching. J Biol Chem 277: 45428-45434, 2002
8, Yamaguchi Y, Katoh H, Mori K, Negishi M: G・12 and G・13 interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. Curr Biol 12: 1353-1358, 2002
9, Nakamura K, Matsumura K, Kaneko T, Kobayashi S, Katoh H, Negishi M: The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. J Neuosci 22: 4600-4610, 2002
10, Katoh H, Harada A, Mori K, Negishi M: Socius is a novel Rnd GTPase-interacting protein involved in disassembly of actin stress fibers. Mol Cell Biol 22: 2952-2964, 2002
11, Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K, Negishi M: RhoA inhibits the NGF-induced Racl activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. J Biol Chem 276: 18977-18983, 2001
12, Yasui H, Katoh H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, Negishi M: Differential responses to NGF and EGF in neurite outgrowth of PC12 cells are determined by Racl activation systems. J Biol Chem 276: 15298-15305, 2001
13, Katoh H, Yasui H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, Negishi M: Small GTPase RhoG is a key regulator for neurite outgrowth in PC12 cells. Mol Cell Biol 20: 7378-7387, 2000

A03-10 山本 亘彦

1. Uesaka N, Hirai S, Ruthazer ES, Yamamoto N (2005) Activity-dependence of cortical axon branch formation: A morphological and electrophysiological study using organotypic slice cultures. **J Neurosci** 25(1) 1-9.
2. Zhong Y, Takemoto, M, Fukuda T, Hattori Y, Murakami F, Nakajima D, Nakayama M, Yamamoto N (2004) Identification of the genes that are expressed in the upper layers of the neocortex. **Cerebral Cortex** 14:1144-1152.
3. Hanamura K, Harada A, Katoh-Semba R, Murakami F, Yamamoto N (2004) BDNF and NT-3 promote thalamocortical axon growth with distinct substrate and temporal dependency. **Eur J Neurosci** 19:1485-1493.
4. Yamamoto N, Tamada A, Murakami F (2003) Wiring of the brain by a range of guidance cues. **Prog Neurobiol.** 68: 393-407.
5. Molnár Z, Kurotani T, Higashi S, Yamamoto N, Toyama K (2003) Development of functional thalamocortical synapses studied with current source-density analysis in whole forebrain slices

in the rat. Brain Res Bull 60:355-371.
6. Takemoto N, Fukuda T, Murakami F, Tanaka H, Yamamoto N (2002) Role of ephrin-B3 in the formation of region- and lamina-specific thalamocortical projections. Eur J Neurosci 16:1168-72.
7. Yamamoto N (2002) Cellular and molecular basis of axonal targeting in the formation of lamina-specific thalamocortical projections. Neurosci Res 42. 167-173.

A03-11 金保 安則

1. Watanabe, and Y. Kanaho. Inhibition of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-stimulated phospholipase D2 activity by Ser/Thr phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 1495, 121-124, 2000
2. Y. Zhang,O. Redina, Y.M. Altshuller, M. Yamazaki, J. Ramos, H. Chneiweis, Y. Kanaho, and M.A. Frohman. Regulation of expression of phospholipase D1 and D2 by PEA-15, a novel protein that inteacts with them. J. Biol. Chem. 275, 35224-35232, 2000
3. Y. Kanaho, and T. Suzuki. Phosphoinositide kinases as enzymes that produce versatile signaling lipids, phosphoinositides. J. Biochem. (Tokyo) Review 131, 503-509, 2002
4. K. Oishi, M. Takahashi, H. Mukai, Y. Banno, S. Nakashima, Y. Kanaho, Y. Nozawa, and Y. Ono. PKN regulates phospholipase D1 through direct interaction. J. Biol. Chem. 276, 18096-18101, 2001
5. M. Yamazaki, H. Miyazaki, H. Watanabe, T. Sasaki, T. Maehama, M.A. Frohman, and Y. kanaho. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is essential for ROCK-mediated neurite remodeling. J. Biol. Chem. 277, 17226-17230, 2002
6. N. Ito, T. Yokomizo, T. Sasaki, H. Kurosu, J. Penninger, Y. Kanaho, T. Katada, K. Hanaoka, and T. Shimizu. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and Ca influx for leukotriene B_4-induced enzyme release. J. Biol. Chem. 277, 44898-44904, 2002
7. M. Nogami, M. Yamazaki, H. Watanabe, Y. Okabayashi, Y. Kido, M. Kasuga, T. Sasaki, T. Maehama, and Y. Kanaho. Requirement of autophosphorylated tyrosine 992 of EGF receptor and its docking protein phospholipase C□1 for membrane ruffling formation. FEBS Lett. 536, 71-76, 2003
8. H. Watanabe, M. Yamazaki, H. Miyazaki, K. Itoh, T. Sasaki, T. Maehama, M.A. Frohman, and Y. Kanaho. Phospholipase D2 functions as a downstream signaling molecule of MAP kinase pathway in L1-stimulated neurite outgrowth of cerebellar granule neurons. J. Neurochem. 89, 142-151, 2004
9. Y. Zhang, G. Du, Y. Kanaho, M.A. Frohman, and S.E. Tsirka. Increased expression of two phospholipase D isoforms during experimentally induced hippocampal mossy fiber outgrowth. Glia 46, 74-83, 2004
10. T. Maehama, N. Kosaka, F. Okahara, K. Takeuchi, M. Umeda, J.E. Dixon, Y. Kanaho. Suppression of a phosphatidylinositol 3-kinase signal by a specific spliced variant of Drosophila PTEN. FEBS Lett. 565, 43-47, 2004
11. H. Watanabe, T. Yokozeki, M. Yamazaki, H. Miyazaki, T. Sasaki, T. Maehama, K. Itoh, M.A. Frohman, and Y. Kanaho. Essential role of phospholipase D2 activation downstream of ERK MAP kinase in the signaling pathway of NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. J. Biol. Chem. 279, 37870-37877, 2004
12. F. Okahara, H. Ikawa, Y. Kanaho, and T. Maehama. Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein. J. Biol. Chem. in press 2004
13. F. Okahara, K. Itoh, M. Ebihara, M. Kobayashi, H. Maruyama, Y. Kanaho, and T. Maehama: Production of research-grade antibody by in vivo electroporation of DNA encoding target protein. Anal. Biochem. in press 2004
14. K. Itoh, M. Watanabe, K. Yoshikawa, Y. Kanaho, L.J. Berliner, and H. Fujii: Magnetic resonance and biochemical studies during pentylenetetrazole-kindling development -the relationship between NO, nNOS and seizures-. Neurosci. In press 2004
15. C. Kojima, A. Hashimoto, I. Yabuta, M. Hirose, S. Hashimoto, Y. Kanaho, H. Sumimoto, T. Ikegami, and H. Sabe. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. EMBO J. in press 2004
Zhang Y, Kanaho Y, Frohman MA, Tsirka SE (2005). Phospholipase D1-promoted release of tissue plasminogen activator facilitates neurite outgrowth.J Neurosci. 25(7):1797-805.

A03-12 崎村 建司

1. Yamazaki, M., Ohno-Shosaku, T., Fukaya, M., Kano, M., Watanabe, M., Sakimura, K.: A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity. Neurosci. Res. 50: 369-374, 2004.
2. Abe, M., Fukaya, M., Yagi, T., Mishina, M., Watanabe, M., Sakimura, K.: NMDA receptor GluR ε/NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluRζ1/NR1 subunit. J. Neurosci. 24: 7292-7304, 2004.
3. Petrenko, A.B., Yamakura, T., Fujiwara, N., Askalany, A.R., Baba, H., Sakimura, K.: Reduced

sensitivity to ketamine and pentobarbital in mice lacking the *N*-methyl-D-aspartate receptor GluR ε 1 subunit. Anesth. Analg. 99: 1136-1140, 2004.
4. Kitano, T., Matsumura, S., Seki, T., Hikida, T., Sakimura, K., Nagano, T., Mishina, M., Nakanishi, S., Ito, S.: Characterization of *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits involved in acute ammonia toxicity. Neurochem. Int. 44: 83-90, 2004.
5. Petrenko, A.B., Yamakura, T., Baba, H., Sakimura, K.: Unaltered pain-related behavior in mice lacking NMDA receptor GluR ε 1 subunit. Neurosci. Res. 46: 199-204, 2003.
6. Honma, D., Uenishi, H., Hiraiwa, H., Watanabe, S., Tang, W., Kiyokawa, N., Fujimoto, J., Yasue, H., Sakimura, K.: Cloning and characterization of porcine common γ chain gene. J. Interferon Cytokine Res. 23: 101-111, 2003.
7. Ichikawa, R., Miyazaki, T., Kano, M., Hashikawa, T., Tatsumi, H., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y., Watanabe, M.: Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor δ 2. J. Neurosci. 22: 8487-8503, 2002.
8. Hashimoto, K., Ichikawa, R., Takechi, H., Inoue, Y., Aiba, A., Sakimura, K., Mishina, M., Hashikawa, T., Konnerth, A., Watanabe, M., Kano, M.: Roles of glutamate receptor δ 2 subunit (GluR δ 2) and metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1) in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. J. Neurosci. 21: 9701-9712, 2001.
9. Ikeno, K., Yamakura, T., Yamazaki, M., Sakimura, K.: The Lurcher mutation reveals Ca^{2+} permeability and PKC modification of the GluR δ channnels. Neurosci. Res. 41: 193-200, 2001.
10. Takeuchi, T., Kiyama, Y., Nakamura, K., Tsujita, M., Matsuda, I., Mori, H., Munemoto, Y., Kuriyama, H., Natsume, R., Sakimura, K., Mishina, M.: Roles of the glutamate receptor ε 2 and δ 2 subunits in the potentiation and prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. Eur. J. Neurosci. 14: 153-160, 2001.
11. Yamada, K., Fukawa, M., Shimizu, H., Sakimura, K., Watanabe, M.: NMDA receptor subunits GluR ε 1, GluR ε 3 and GluR ζ 1 are enriched at the mossy fibre-granule cell synapse in the adult mouse cerebellum. Eur. J. Neurosci. 13: 2025-2036, 2001.
12. Yamazaki, M., Fukaya, M., Abe, M., Ikeno, K., Kakizaki, T., Watanabe, M., Sakimura, K.: Differential palmitoylation of two mouse glutamate receptor interacting protein 1 forms with different N-terminal sequences. Neurosci. Lett. 304: 81-84, 2001.
13. Minami, T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Shimamoto, K., Sakimura, K., Mishina, M., Mori, H., Ito, S.: Characterization of the glutamatergic system for induction and maintenance of allodynia. Brain Res. 895: 178-185, 2001.
14. Kitayama, K., Abe, M., Kakizaki, T., Honma, D., Natsume, R., Fukaya, M., Watanabe, M., Miyazaki, J., Mishina, M., Sakimura, K.: Purkinje cell-specific and inducible gene recombination system generated from C57BL/6 mouse ES cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 281: 1134-1140, 2001.
15. Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Mori, H., Sakimura, K., Watanabe, M., Mishina, M., Ito, S.: Characterization of nociceptin/orphanin FQ-induced pain responses in conscious mice: Neonatal capsaicin treatment and *N*-methyl-D-aspartate receptor GluR ε subunit knockout mice. Neuroscience 97: 133-142, 2000.
16. Tanaka, J., Nakagawa, S., Kushiya, E., Yamasaki, M., Fukaya, M., Iwanaga, T., Simon, M.I., Sakimura, K., Kano, M., Watanabe, M.: Gq protein α subunits Gαq and Gα11 are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. Eur. J. Neurosci. 12: 781-792, 2000.
17. Yamakura, T., Sakimura, K., Shimoji, K.: *N*-methyl-D-aspartate receptor channel block by meperidine is dependent on extracellular pH. Anesth. Analg. 90: 928-932, 2000.
18. Ito, I., Kawakami, R., Sakimura, K., Mishina, M., Sugiyama, H.: Input-specific targeting of NMDA receptor subtypes at mouse hippocampal CA3 pyramidal neuron synapses. Neuropharmacology 39: 943-951, 2000.
19. Yamakura, T., Sakimura, K., Shimoji, K.: The stereoselective effects of ketamine isomers on heteromeric *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. Anesth. Analg. 91: 225-229, 2000.
Takeuchi T, Miyazaki T, Watanabe M, Mori H., Sakimura K & Mishina M. Control of synaptic connection by glutamate receptor delta2 in the adult cerebellum. J. Neuroscience 2005 Feb23; 25(8) 2146-2156.

A03-13 斉藤 哲一郎

1. Zhenyoung Huang, Masaru Tamura, Takayuki Sakurai, Shinichiro Chuma, Tetsuichiro Saito and Norio Nakatsuji: In vivo transfection of testicular germ cells and transgenesis by using the mitochondrially localized jellyfish fluorescent protein gene. **FEBS lett.** 487, 248-251 (2000)
2. Masaru Tamura, Yasuhiko Kanno, Shinichiro Chuma, Tetsuichiro Saito and Norio Nakatsuji: Pod-1/Capusulin shows a sex- and stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF-1. **Mech. Dev.** 102, 135-144 (2001)
3. Tetsuichiro Saito and Norio Nakatsuji: Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. **Dev. Biol.** 240, 237-246 (2001)
4. Atsushi Mikami, Sharon H. Tynan, Taro Hama, Katherine Luby-Phelps, Tetsuichiro Saito, James E. Crandall, Joseph C. Beshare and Richard B. Vallee: Molecular structure of cytoplasmic dynein 2 and its distribution in neuronal and ciliated cells. **J. Cell Sci.** 115, 4801-4808 (2002)
5. Rie Saba, Norio Nakatsuji and Tetsuichiro Saito: Mammalian *BarH1* confers commissural neuron identity on dorsal cells in the spinal cord. **J. Neurosci.** 23, 1987-1991 (2003)
6. Chiung-Wen Chang, Chi-Wei Tsai, Hsiao-Fang Wang, Hsiu-Chao Tsai, Huei-Ying Chen, Ting-Fen Tsai, Hiroshi Takahashi, Hui-Yun Li, Ming-Ji Fann, Chu-Wen Yang, Yoshihide Hayashizaki, Tetsuichiro Saito and Fu-chin Liu: Identification of a developmentally regulated striatum-enriched zinc-finger gene, *Nolz-1*, in the mammalian brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101, 2613-2618 (2004)
7. Satoru Miyagi, Tetsuichiro Saito, Ken-ichi Mizutani, Norihisa Masuyama, Yukiko Gotoh, Atsushi Iwama, Hiromitsu Nakauchi, Shinji Masui, Hitoshi Niwa, Masazumi Nishimoto, Masami Muramatsu and Akihiko Okuda: The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct multipotent stem cells. **Mol. Cell. Biol.** 24, 4207-4220 (2004)
Mizutani K & Saito T. (2005) Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. **Development.** Mar;132(6):1295-304

A03-14 見学 美根子

1. Shima Y, Kengaku M, Hirano T, Takeichi M and Uemura T., Regulation of Dendritic Maintenance and Growth by a Mammalian 7-pass Transmembrane Cadherin. **Developmental Cell** 7, 205-216, (2004).
2. Kawaji K, Umeshima H, Eiraku M, Hirano T and Kengaku M., Dual modes of migration of
cerebellar granule cells guided by axonal and dendritic leading processes. **Mol. Cell Neurosci.** 25, 228-240, (2004).
3. Minami I, Kengaku M, Smitt PS, Shigemoto R, Hirano T., Long-term potentiation of mGluR1 activity by depolarization-induced Homer1a in mouse cerebellar Purkinje neurons. **Eur. J.Neurosci.** 17(5), 1023-32, (2003).
4. Eiraku M, Hirata Y, Takeshima H, Hirano T and Kengaku M., Delta/Notch-like EGF-relatedReceptor (DNER), a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. **J. Biol. Chem.** 277, 25400-25407, (2002).
5. Yamasaki T., Kawaji K., Ono K., Bito H., Hirano T., Osumi N. and Kengaku M., Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing erebellum. **Development** 128, 3133-3144, (2001).

A03-15 横田 義史

1. Lasorella, A., Noseda, M., Beyna, M., Yokota, Y. and Iavarone, A.: Id2 is a Retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. **Nature**, 407(6804): 592-598, 2000, Oct.
2. Wang, S.L., Sdrulla, A., Johnson, J. E., Yokota, Y. and Barres, B.A.: A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development. **Neuron**, 29(3): 603-614, 2001, Mar.
3. Yokota, Y., Mori, S., Narumi, O. and Kitajima, K.: In vivo function of a differentiation inhibitor, Id2. **IUBMB Life**, 51(4): 207-214, 2001, Apr.
4. Yokota, Y.: Id and development. **Oncogene**, 20(58): 8290-8298, 2001, Dec.

5. Gleichmann, M., Buchheim, G., El-Bizri, H., Yokota, Y., Klockgether, T., Koehler, S., Baehr, M., Weller, M. and Schulz, J.B.: Identification of inhibitor-of-differentiation 2 (Id2) as a modulator of neuronal apoptosis. J. Neurochem., 80(5): 755-762, 2002, Mar.
6. Lasorella, A., Boldrini, R., Dominici, C., Donfrancesco, A., Yokota, Y., Inserra, A. and Iavarone, A.: Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma. Cancer Res., 62(1): 301-306, 2002, Jan.
7. Yokota, Y. and Mori, S.: The role of Id family proteins in growth control. J. Cell. Physiol., 190(1): 21-28, 2002, Jan.

A03-16 祖父江 憲治

1. Hori K. Konno D. Maruoka H. Sobue K. MALS is a binding partner of IRSp53 at cell-cell contacts. FEBS Lett. 554, 30-34, 2003
2. Usui S, Konno D, Hori K, Maruoka H, Okabe S, Fujikado T, Tano Y, Sobue K. Functional and regional compartmentation of PSD proteins, PSD-Zip45 (Homer 1c), Shank, PSD-95 and GKAP, in dendritic spines. *J. Biol. Chem.* 278, 10619-10628, 2003
3. Ebihara T, Kawabata I, Usui S, Sobue K, and Okabe S. Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with green fluorescent protein. *J. Neurosci.* 23, 2170-2181, 2003
4. Konno D, Ko JA, Usui S, Hori K, Maruoka H, Inui M, Fujikado T, Tano Y, Suzuki T, Tohyama K, Sobue K. The postsynaptic density and dendritic raft localization of PSD-Zip70, which contains an N-myristoylation sequence and leucine-zipper motifs. *J Cell Sci.* 115, 4695-706, 2002
5. Hiroaki Y, Nishikawa K, Mitsuoka K, Tachibana T, Sobue K, Doi T, Fujiyoshi Y. A new technique to co-localise membrane proteins with Homer/vesl. *Biochem Biophys Res Commun.* 295, 756-765. 2002
6. Yamada Y, Iwamoto T, Watanabe Y, Sobue K, Inui M. PSD-95 eliminates Src-induced potentiation of NR1/NR2A-subtype NMDA receptor channels and reduces high-affinity zinc inhibition. *J. Neurochem.* 81, 758-764, 2002
7. Irie K, Nakatsu T, Mitsuoka K, Miyazawa A, Sobue K, Hiroaki Y, Doi T, Fujiyoshi Y, Kato H. Crystal structure of the Homer 1 family conserved region reveals the interaction between the EVH1 domain and own proline-rich motif. *J. Mol. Biol.*, 318, 1117-1126. 2002
8. Okabe S. Urushido T. Konno D. Okado H., and Sobue K. Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. J. Neurosci. 21, 9561-9571, 2001

A03-17 加藤 伸郎

1. Yamamoto K, Hashimoto K, Isomura Y, Kato N: An IP3-assisted form of Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release in neocortical neurons. NeuroReport 11: 535-539, 2000
2. Kato N, Isomura Y, Tanaka T: Intracellular calcium releases facilitate induction of long-term depression. Neuropharmacology 39: 1107-1110, 2000
3. Isomura Y, Kato N: A possible regulatory role of dendritic spikes in induction of long-term potentiation at hippocampal Schaffer collateral-CA1 synapses. Brain Res 883: 119-124, 2000
4. Yoshimura H, Sugai T, Onoda N, Segami N, Kato N Synchronized population oscillation of excitatory synaptic potentials dependent on calcium-induced calcium release in rat neocortex layer II/III neurons. Brain Res 915: 94-100, 2001
5. Yamamoto K, Hashimoto K, Nakano M, Shimohama, Kato N: A distinct form of calcium release downregulates membrane excitability in neocortical pyramidal cells. Neuroscience 109: 665-676, 2002
6. Yamamoto K, Nakano M, Hashimoto K, Shimohama, Kato N: Emergence of a functional coupling between inositol-1,4,5-trisphosphate receptors and calcium channels in developing neocortical neurons. Neuroscience 109: 677-85, 2002
7. Yoshimura H, Sugai T, Onoda N, Segami N, Kato N: Age-dependent occurrence of synchronized population oscillation of excitatory synaptic potentials in the visual cortex. Dev Brain Res 136: 63-68, 2002
8. Yoshimura H, Kato N, Sugai T, Segami N, Onoda N: Age-dependent appearance of an insulo-parietal cortical signal propagation that elicits a synchronized population oscillation in the parietal cortex in rats. Dev Brain Res. 143:245-251, 2003

9. Yoshimura H, Kato N, Sugai T, Segami N, Onoda N : Age-dependent emergence of oscillatory signal flow between the primary and secondary visual cortices in rat brain slices. Brain Res 990:172-181, 2003
10. Yoshimura H, Kato N, Honjo M, Sugai T, Segami N, Onoda N: Age-dependent emergence of a parieto-insular corticocortical signal flow in developing rats. Dev Brain Res 149:45-51, 2004
11. Yoshimura H, Kato N, Sugai T, Honjo M, Sato J, Segami N, Onoda N:
To-and-fro optical voltage signal propagation between the insular gustatory and parietal oral somatosensory areas in rat cortex slices. Brain Res 1015: 114-121, 2004
12. Nakano M, Yamada S, Udagawa R, Kato N: Frequency-dependent requirement for calcium store-operated mechanisms in induction of homosynaptic long-term depression at hippocampus CA1 synapses. Eur J Neurosci 19: 2881-2887, 2004
13. Yamada S, Takechi H, Kanchiku I, Kita T, Kato N : Small conductance Ca^{2+}-dependent K^+ channels are the target of spike-induced Ca^{2+} release in a feedback regulation of pyramidal cell excitability. J Neurophysiol 91: 2322-2329, 2004

A03-18 小椋 利彦

1. Shigeki Nishihara, Leo Tsuda and Toshihiko Ogura The canonical Wnt pathway directly regulates NRSF/REST expression in chick spinal cord. **Biocheminal and Biophysical Research Communications** 311, 55-63 (2003)
2. Toshihiko Ogura In vivo electroporation:a new frontier for gene delivery and embryology. **Differentiation** 70(4-5), 163-171 (2002)
3. Rui Sakuma, Yu-ichiro Ohnishi, Chikara Meno, Hideta Fujii, Hou Juan, Jun Takeuchi, Toshihiko Ogura, En Li, Kohei Miyazono and Hiroshi Hamada. Inhibition of Nodal signaling by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion. **Genes to Cells** 7(4), 401-412 (2002)
4. Daisuke Kobayashi, Makoto Kobayashi, Ken Matsumoto, Toshihiko Ogura, Masato Nakafuku and Kenji Shimamura Early Subdivisions in the Neural Plate Define Distinct Competence for Inductive Signals. **Development** 129, 83-93 (2002)

A03-19 竹島 浩

1. Higgins, G. A., Grottick, A. J., Ballard, T. M., Richards, J. G., Messer, J., Takeshima, H., Pauly-Evers, M., Jeck, F., Adam, G. & Wichmann, J. Influence of the selective ORL1 receptor agonist, Ro64-6198, on rodent neurological function. **Neuropharmacol.** 41, 97-107, 2001.
2. Ito, K., Komazaki, S., Sasamoto, K., Yoshida, M., Nishi, M., Kitamura K. & Takeshima, H. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. **J. Cell Biol.** 154, 1059-1068, 2001.
3. Inoue, M., Matsunaga, S., Reshid, M. H., Yoshida, A., Mizuno, K., Sakurada, T., Takeshima, H. & Ueda, H. Pronociceptive effects of nociceptin/orphaninFQ (13-17) at peripheral and spinal level in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 299, 213-219, 2001.
4. Yang, D., Pan, Z., Takeshima, H., Wu, C., Nagaraj, R. Y., Ma, J. & Cheng, H. RyR3 amplifies RyR1-mediated Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release in neonatal mammalian skeletal muscle. **J. Biol. Chem.** 276, 40210-40214, 2001.
5. Mamiya, T., Noda, Y., Ren, X., Nagai, T., Takeshima, H., Uki, M. & Nabeshima, T. Morphine tolerance and dependence in the nociceptin receptor knockout mice. **J. Neural. Transm.** 108, 1349-1361, 2001.
6. Kakimoto, S., Houtani, T., Sato, K., Ueyama, T., Sakuma, S., Munemoto, Y., Ohishi, H., Kase, M., Yamashita, T., Takeshima, H. & Sugimoto, T. Brainstem auditory regions in mice: expression of nociceptin/orphanin FQ precursor mRNA in select neurons. **Neurosci Lett.** 314, 37-40, 2001.
7. Yoshida, M., Sugimoto, A., Ohshima, Y. & Takeshima, H. Important role of junctophilin in nematode motor function. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 289, 234-239, 2001.
8. Komazaki, S., Nishi, M., Takeshima, H. & Nakamura, H. Abnormal formation of sarcoplasmic reticulum networks and triads during early development of skeletal muscle cells in mitsugumin29-deficient mice. **Develop. Growth Differ.** 43, 717-723, 2001.
9. Yamazaki, T., Takeda, K., Gotoh, K., Takeshima, H., Akira, S. & Kurosaki, T. Essential immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function. **J. Exp. Med.** 195, 535-545, 2002.

10. Higgins, G. A., Kew, J. N. C., Richards, J. G., Takeshima, H., Jenck, F., Adam, G., Wichman, J., Kemp, J. A. & Grottick, A. J. A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. **Eur. J. Neurosci.** 15, 911-922, 2002.
11. Nishi, M., Hashimoto, K., Kuriyama, K., Komazaki, S., Kano, M., Shibata, S. & Takeshima, H. Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 292, 318-324, 2002.
12. Uehara, A., Yasukouchi, M., Imanaga, I., Nishi, M. & Takeshima, H. Store-operated Ca^{2+} entry irrelevant to Ca^{2+} release channel and junctional membrane complex in heart muscle cells. **Cell Calcium** 31, 89-96, 2002.
13. Pan, Z., Yang, D., Nagaraj, R. J., Nosek, T. A., Nishi, M., Takeshima, H., Cheng, H. & Ma, J. Dysfunction of store-operated Ca^{2+} channel in muscle cells lacking mg29 gene. **Nature Cell Biol.** 4, 379-383, 2002.
14. Komazaki, S., Ito, K., Takeshima, H. & Nakamura, H. Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1. **FEBS Lett.** 524, 225-229, 2002.
15. Eiraku, M., Hirata, Y., Takeshima, H., Hirano, T. & Kengaku, M. Delta/Notch-like EGF-related receptor (DNER), a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. **J. Biol. Chem.** 277, 25400-25407, 2002.

A03-20 広瀬 進

1. Liu, Q.-X., Jindra, M., Ueda, H., Hiromi, Y., and Hirose, S. Drosophila MBF1 is a co-activator for Tracheae Defective and contributes to the formation of tracheal and nervous systems. **Development** 130, 719-728(2003).
2. Shimojima, T., Okada, M., Nakayama, T., Ueda, H., Okawa, Iwamatsu, A., Handa, H. and Hirose, S. Drosophila FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor. **Genes Dev.** 17, 1605-1616(2003).
3. Saunders. A., Wener, J., Andrulis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Rinberg, D. and Lis, J. T. Tracking of FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. **Science** 301, 1084-1096(2003).
4. Hamada, K., Kohno, S., Iwamoto, M., Yokota, H., Okada, M., Tagawa, M., Hirose, S., Yamasaki, K., Shirakata, Y., Hashimoto, K. and Ito, M. Identification of the human IA1.3B promoter element and its use in the construction of a replication-selective adenovirus for ovarian cancer therapy. **Cancer Res.** 63, 2506-2512(2003).
5. Aihara, H., Nakagawa, T., Yasui, K., Ohta, T., Hirose, S., Muramatsu, M., Ito, T. Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early Drosophila embryo. **Genes Dev.** 18, 877-888(2004).
6. Jindra, M., Gaziova, I., Uhlirova, M., Okabe, M., Hiromi, Y. and Hirose, S. Coactivator MBF1 preserves the redox-dependent AP-1 activity during oxidative stress in Drosophila. **EMBO J.** 23, 3538-3547 (2004)
7. Matsumoto, K. and Hirose, S. Visualization of unconstrained negative supercoils of DNA on polytene chromosomes of *Drosophila*. **J. Cell Sci.** 117, 3797-3805(2004).

A03-21 野田 昌晴

1. Sakuta, H., Suzuki, R., Takahashi, H., Kato, A., Shintani, T., Iemura, S., Yamamoto, T.S., Ueno, N. & Noda, M. (2001) Ventroptin: A novel BMP-4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina. **Science** 293, 111-115.
2. Shintani, T., Maeda, N. & Noda, M. (2001) Receptor-like protein tyrosine phosphatase γ (RPTPγ), but not PTPζ/RPTPβ, inhibits NGF-induced neurite outgrowth in PC12D cells. **Dev. Neurosci.** 23, 55-69.
3. Qi, M., Ikematsu, S., Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Sakuma, S., Noda, M., Muramatsu, T. & Kadomatsu, K. (2001) Haptotactic migration induced by midkine: Involvement of protein-tyrosine phosphatase ζ, mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. **J. Biol. Chem.** 276, 15868-15875.
4. Thomaidou, D., Coquillat, D., Meintanis, S., Noda, M., Rougon G. & Matsas, R. (2001) Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification

of protein tyrosine phosphatases ζ/β as the putative F3 receptors on Schwann cells. **J. Neurochem.** 78, 767-778.
5. Kawachi, H., Fujikawa, A., Maeda, N. & Noda, M. (2001) Identification of GIT1/Cat-1 as a substrate molecule of protein tyrosine phosphatase ζ/β by the yeast substrate-trapping system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98, 6593-6598.
6. Sugawara, T., Tsurubuchi, Y., Agarwala, K. L., Ito, M., Fukuma, G., Mazaki-Miyazaki, E., Nagafuji, H., Noda, M., Imoto, K., Wada, K., Mitsudome, A., Kaneko, S., Montal, M., Nagata, K., Hirose, S. & Yamakawa, K. (2001) A missense mutation of the Na^+ channel α_{II} subunit gene *$Na_v1.2$* in a patient with febrile and afebril seizures causes channel dysfunction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98, 6384-6389.
7. Zubair, M., Watanabe, E., Fukada, M. & Noda, M. (2002) Genetic labelling of specific axonal pathways in the mouse central nervous system. **Eur. J. Neurosci.** 15, 807-814.
8. Fujikawa, A., Shirasaka, D., Yamamoto, S., Ota, H., Yahiro, K., Fukada, M., Shintani, T., Wada, A., Aoyama, N., Hirayama, T., Fukamachi, H. & Noda, M. (2003) Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. **Nature Genet.** 33, 375-381.
9. Tanaka, M., Maeda, N., Noda, M. & Marunouchi, T. (2003) A chondroitin sulfate proteoglycan PTPζ/RPTPβ regulates the morphogenesis of Purkinje cell dendrites in the developing cerebellum. **J. Neurosci.** 23, 2804-2814.
10. Yuasa-Kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., Ohkawara, T., Murata, M. & Noda, M. (2003) Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. **Eur. J. Neurosci.** 17, 2329-2343.
11. Takahashi, H., Shintani, T., Sakuta, H. & Noda, M. (2003) CBF1 controls the retinotectal topographical map along the anteroposterior axis through multiple mechanisms. **Development** 130, 5203-5215.

A03-22 柳 茂

1. Hotta, A., Inatome, R., Yuasa-Kawada, J., Qin, Q., Yamamura, H., and Yanagi, S. Critical role of CRMP-associated molecule CRAM for filopodia and growth cone development in neurons. **Mol. Biol. Cell** (2005) Jan; 16(1) 32-39.
2. Hirose, M., Kitano, J., Nakajima, Y., Moriyoshi, K., Yanagi, S., Yamamura, H., Muto, T., Jingami, H., and Nakanishi, S. Phosphorylation and recruitment of Syk by ITAM-based phosphorylation of tamalin. **J. Biol. Chem.** 279(31), 32308-32315 (2004)
3. Takahashi, S., Inatome, R., Hotta, A., Qin, Q., Hackenmiller , R., Simon, M. C., Yamamura H., and Yanagi, S. Role for Fes/Fps Tyrosine Kinase in Microtubule Nucleation through Its FCH Domain. **J. Biol. Chem.** 278(49), 49129-49133 (2003)
4. Takahashi, S., Inatome, R., Yamamura H., and Yanagi, S. Isolation and expression of a novel mitochondrial septin that interacts with CRMP/CRAM in the developing neurons. **Genes Cells** 8(2), 81-93 (2003)
5. Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., Goshima, Y., Yamamura H., and Yanagi, S. Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in Semaphorin3A signaling. **EMBO J.** 21(13), 3296-3306 (2002)

A03-23 稲垣 忍

Yamada T, Ohoka Y, Kogo M, Inagaki S. Physical and functional interactions of the lysophodphatidic acid receptors with PDZ domain-containing RhoGEFs. **J Biol. Chem** (2005) in press

1. Masuda, K, Furuyama, T, Takahara, M, Fujioka, S, Kurinami, H, Inagaki,S, Sema4D stimulates axonal outgrowth of embryonic DRG sensory neurons. **Genes Cells**, *9*, 821- 829 (2004).

2. Fujioka S, Masuda K, Toguchi M, Ohoka Y, Sakai T, Furuyama T, Inagaki S Neurotrophic effect of semaphorin 4D in PC12 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** *301*, 304-310 (2003)

3. Hirotani M, Ohoka Y, Yamamoto T, Nirasawa H, Furuyama T, Kogo M, Matsuya T Inagaki S, Interaction of plexin-B1 with PDZ domain-conatianing Rho guanine nucleotide exchange factors. **Biochem.Biophys. Res. Commun**, 297: 32 - 37 (2002) .

4. Inagaki, S, Ohoka, Y, Sugimoto, H, Fujioka, S, Amasaki, M, Kurinami, H, Miyazaki, N., Furuyama, T Sema4C,

a transmembrane semaphorin, interacts with a post synaptic density protein, PSD-95. J. Biol Chem., 276, 9174-9181 (2001).

5. Ohoka, Y, Hirotani M, Fujioka, S., Sugimoto, H, Furuymama, T, Inagaki, S. Sema4C, a transmembrane semaphorin, associates with a neurite-outgrowth-related protein, SFAP75. Biochem. Biophys. Res. Commun., 280, 237 - 243 (2001)

A03-24 服部 光治

Morimura T, Hattori M, Ogawa M & Mikoshiba K Disabled1 regulates the intracellular trafficking of reelin receptors.J Biol Chem. (2005) in press

1. Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. Subtype-specific and ER-lumenal-environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. Cell (2005) 120(1) 85-98.

2. Suetsugu, S., Tezuka, T., Morimura, T., Hattori, M., Mikoshiba, K., Yamamoto, T., and Takenawa, T. Regulation of actin cytoskeleton by mDab1 through N-WASP and ubiquitination of mDab1. Biochem. J. 384, 1-8 (2004).

3. Hattori M, Suzuki, A.Z., Nakamura, T., Miyauchi, H., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in calcium signaling. J. Biol. Chem. 279, 11967-11975 (2004).

4. Bannai H, Inoue, T., Nakayama, T., Hattori, M., and Mikoshiba, K. Kinesin dependent, rapid, bi-directional transport of ER sub-compartment in dendrites of hippocampal neurons. J. Cell Sci. 117, 163-175 (2004).

5. Nakayama, T., Hattori, M., Uchida, K., Nakamura, T., Tateishi, Y., Bannai, H., Iwai, M., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. The regulatory domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is necessary to keep the channel domain closed. Biochem. J. 377, 299-307 (2004).

6. Koizumi, H., Yamaguchi, N., Hattori, M., Ishikawa, O., Aoki, J., Taketo, M.M., Inoue, K., and Arai, H. Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. J. Biol. Chem. 278, 12489-94 (2003).

7. Zhang, S., Mizutani, A., Hisatsune, C., Higo, T., Bannai, H., Nakayama, T., Hattori, M., and Mikoshiba, K. Protein 4.1N is required for translocation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 to the basolateral membrane domain in polarized MDCK cells. J. Biol. Chem. 278, 4048-56 (2003).

8. Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. Dev. Cell 3, 645-58 (2002).

A03-25 杉原 泉

Sugihara I. Microzonal projection and climbing fiber remodeling in single olivocerebellar axons of newborn rats at postnatal days 4-7. J. Comp. Neurol. (2005) in press

1. Sugihara, I. and Shinoda, Y. (2004) Molecular, topographic and functional organization of the cerebellar cortex: a study with combined aldolase C and olivocerebellar labeling. J. Neurosci. 24:8771-8785.

2. Sugihara, I., Ebata S. and Shinoda, Y. (2004) Functional compartmentalization in the flocculus and the ventral dentate and infracerebellar nuclei: an analysis of single olivocerebellar axonal morphology. J. Comp. Neurol. 470:113-133.

3. Sugihara, I., Lohof A.M., Letellier M., Mariani J. and Sherrard R.M. (2003) Post-lesion transcommissural growth of olivary climbing fibres creates functional synaptic microzones. Eur. J. Neurosci. 18: 3027-3036.

4. Sugihara, I., Wu, H.-S., and Shinoda, Y. (2001) The entire trajectories of single olivocerebellar axons in the cerebellar cortex and their contribution to cerebellar compartmentalization. J. Neurosci. 21: 7715-7723.

5. Sugihara, I. (2001) Efferent innervation in the goldfish saccule examined by acetylcholinesterase histochemistry. Hear. Res. 153: 91-99.

A03-26 中越 英樹

1. Nakagoshi,H., Shirai,T., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F. Refinement of *wingless* expression by

a Wingless- and Notch-responsive homeodomain protein, Defective proventriculus. Dev. Biol. 249 (1), 44-56 (Sep. 1, 2002)

2. Hayashi, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi,H., Tanimura, T., Ueda, R., Uemura, T., Yoshihara, M. and Goto, S. GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. Genesis 34 (1, 2), 46-50 (Sep.-Oct., 2002)

3. Takamatsu, Y., Nakagoshi, H., Rachidi, M., Lopes, C., Nishida, Y. and Ohsako, S. Characterization of the dCaMKII-GAL4 driver line whose expression is controlled by the *Drosophila* Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II promoter. Cell Tissue Res. 310(2), 237-252 (Nov., 2002)

4. Shirai, T., Maehara, A., Kiritooshi, N., Matsuzaki, F., Handa, H. and Nakagoshi, H. Differential requirement of EGFR signaling for the expression of *defective proventriculus* gene in the *Drosophila* endoderm and ectoderm. Biochem. Biophs. Res. Commun. 311 (2), 473-477 (Nov.14, 2003)

A03-27 富永 知子

1. Meng, W., Numazaki, M., Takeuchi, K., Uchibori, Y., Ando-Akatsuka, Y., Tominaga, M., and Tominaga, T. DIP (mDia interacting protein) is a key molecule regulating Rho and Rac in a Src dependent manner. **EMBO J.**, 23, 760-771, 2004.

2. Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., and Tominaga, M. Structural determinat of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA**, 100, 8002-8006, 2003.

3. Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H. and Tominaga, M. Direct Phosphorylation of Capsaicin Receptor VR1 by PKCε□and Identification of Two Target Serine Residues. **J. Biol. Chem.** 277, 13375-13378, 2002.

4. Tominaga, T., Meng, W, Togashi, K., Urano,H., Alberts, AS., and Tominaga, M
mDia inhibits the DNA-binding ability of Pax6 and changes the pattern of neurite extension in cerebellar granule cells through its binding to Pax6. **J. Biol. Chem.**, 277, 47686-47691, 2002.

5. Satoh, S., and Tominaga, T. Mouse Diaphanous Interacting Protein acts downstream Rho- mDia and modifies Src activation and stress fiber formation. **J. Biol. Chem.**, 276, 39290-39294, 2001.

6. Tominaga, T., Sahai, E., Chardin, P., McCormick, F., Courtneidge, SA. and Alberts, AS. Mouse diaphanous-related formines bridge rho GTPases and Src tyrosine kinase. **Mol. Cell**, 5, 13-25. 2000.

（和文）

1.ミニレビュー 細胞骨格制御における mDia の役割 富永知子 生化学 2005 2月号 (in press)

2.特集 "生命科学の New Key Word" Rho- mDia- Src 系 富永知子 生体の科学 55 巻5号, 2004

A03-28 中井 淳一

1. Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*, Imamura, M., Nakai, J., Inoue, S., Quan, G. X., Kanda, T. and Tamura, T. **Geneticus** 165: 1329-1340, 2003.

2. Degeneration of the Amygdala/Piriform Cortex and Enhanced Fear/Anxiety Behaviors in Sodium Pumpa2 subunit(Atp1a2)-Deficient Mice, Ikeda, K., Onaka, T., Yamakado, M., Nakai, J., Ishikawa, T., Taketo, M.M. and Kawakami, K. **J. Neurosci.** 23: 4667-4676, 2003.

3. Ca^{2+}-Sensing Transgenic Mice: Postsynaptic Signaling in Smooth Muscle, Ji, G., Feldman, M., Deng, K.-Y., Green, K. S., Wilson, J., Lee, J., Johnston, R., Rishniw, M., Tallini, Y., Zhang, J., Weir, W. G., Blaustein, M. P., Xin, H.-B., Nakai, J. and Kotlikoff, M. I. **J. Biol. Chem.** 279: 21461-21468, 2004.

4. Probing calcium ions with biosensors, Nakai, J. and Ohkura, M. **Biotechnol. and Genetic Engineering Reviews** 20: 3-21, 2003.

A03-29 岩 里 琢 治

Lee, L.-J., Iwasato, T. Itohara, S., Erzurumlu, R. Exuberant Thalamocortical Axon Arborization in Cortex-Specific NMDAR1 Knockout Mice. **J. Comp Neurol** (2005) in press

1. Iwasato, T.+, Nomura, R., Ando, R., Ikeda, T., Tanaka, M and Itohara, S.+ Dorsal Telencephalon-Specific Expression of Cre Recombinase in PAC Transgenic Mice. **Genesis** 38, 130-138 (2004) +The corresponding authors

2. Yuhki, M., Yamada, M., Kawano, M., Iwasato, T., Itohara, S., Yoshida, H., Ogawa, M., Mishina, Y. BMP Receptor Signaling is Necessary for Hair Follicle Cycling and Hair Shaft Differentiation in Mice. **Development** 131, 1825-1833 (2004)
3. Inoue, H., Tsukita, K., Iwasato, T., Suzuki, Y., Tomioka, M., Tateno, M., Nagao, M., Misawa, H., Saido, T.C., Miura, M., Itohara, S., Takahashi, R. The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. **EMBO J.** 22, 6665-6674 (2003)
4. Datwani, A.*, Iwasato, T.*+, Itohara, S., and Erzurumlu, R.S.+, Lesion-induced thalamocortical axonal plasticity in the S1 cortex is independent of NMDA receptor function in excitatory cortical neurons. **J. Neurosci.** 22, 9171-9175 (2002). ** The first two authors contributed equally to this work. + The corresponding authors*
5. Datwani, A., Iwasato, T., Itohara, S., and Erzurumlu, R.S. NMDA receptor-dependent pattern transfer from afferents to postsynaptic cells and dendritic differentiation in the barrel cortex. **Mol Cell Neurosci**; 21: 477-92 (2002).
6. Metzger, F., Repunte-Canonigo, V., Matsushita, S., Akemann, W., Diez-Garcia, J., Ho, C.S., Iwasato, T., Grandes, P., Itohara, S., Joho, R.H., and Knöpfel, T. Transgenic mice expressing a pH and Cl-sensing yellow-fluorescent protein under the control of a potassium channel promoter. **Eur. J. Nerosci.** 15, 40-50 (2002).

A03-30 高木 新

1. Yukimasa Shibata, Takashi Fujii, Joseph A. Dent, Hajime Fujisawa & Shin Takagi. EAT-20, a novel transmembrane protein with EGF motifs, is required for efficient feeding in *C. elegans.* **Genetics**, 154, 635-646 (2000)
2. Asahiko Takahashi, Hisako Muramatsu H, Shin Takagi, Hajime Fujisawa, Yozo Miyake & Takashi, Muramatsu. A splicing factor, Prp8: preferential localization in the testis and ovary in adult mice. **J. Biochem.** 129(4):599-606. (2001)
3. Go Shioi, Michinari Shoji, Masashi Nakamura, Takeshi Ishihara, Isao Katsura, Hajime Fujisawa & Shin Takagi. Mutations affecting nerve attachment of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, 157, 1611-1622 (2001)
4. Takashi Fujii, Fumi Nakao, Yukimasa Shibata, Go Shioi, Eiji Kodama, Hajime Fujisawa & Shin Takagi, Caenorhabditis elegans PlexinA, PLX-1, interacts with transmembrane semaphorins and regulates epidermal morphogenesis. **Development**. 129 2053-2063. (2002)
5. Claire Y. Bénard, Hania Kébir, Shin Takagi, and Siegfried Hekimi. *mau-2* acts cell-autonomously to guide axonal migrations in *Caenorhabditis elegans*. **Development** 131, 5947-5958

A03-31 饗場 篤

1. Manabe, T., Aiba, A., Yamada, A., Ichise,T., Sakagami, H., Kondo, H., and Katsuki, M. Regulation of long-term potentiation by H-Ras through NMDA receptor phosphorylation. **J. Neurosci.**, 20(7), 2504-2511, 2000.
2. Ise, K., Nakamura, K., Nakao, K., Shimizu, S., Harada, H., Ichise, T., Miyoshi, J., Gondo, Y., Ishikawa, T., Aiba, A., and Katsuki, M. Targeted deletion of the H-*ras* gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. **Oncogene**,19(26), 2951-2956, 2000.
3. Ichise, T., Kano, M., Hashimoto, K., Yanagihara, D., Nakao, K., Shigemoto, R., Katsuki, M., and Aiba, A. mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. **Science**, 288(5472), 1832-1835, 2000.
4. Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., and Kano, M. **Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. Neuron**, 31(3), 463-475, 2001.
5. Hashimoto, K., Ichikawa, R., Takechi, H., Inoue, Y., Aiba, A., Sakimura, K., Mishina, M., Hashikawa, T., Konnerth, A., Watanabe, M., and Kano, M. Roles of glutamate receptor δ2 subunit (GluR δ2) and metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1) in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. **J. Neurosci.**, 21(24), 9701-9712, 2001.
6. Shutoh, F., Katoh, A., Kitazawa, H., Aiba, A., Itohara, S., and Nagao, S. **Loss of adaptability of horizontal optokinetic response eye movements in mGluR1 knockout mice. Neurosci. Res.**, 42(2), 141-145, 2002.
7. Tabata, T., Aiba, A. and Kano, M. Extracellular calcium controls the dynamic range of neuronal metabotropic glutamate receptor responses. **Mol. Cell. Neurosci.**, 20(1), 56-68, 2002.
8. Muto, S., Aiba, A., Saito, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Tomita, K., Kitamura, T., Kurabayashi, M., Nagai, R.,

Higashihara, E., Harris, P.C., Katsuki, M., and Horie, S. Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted *Pkd1* mutant. **Hum. Mol. Genet.**, 11(15), 1731-1742, 2002.
9. Kishimoto, Y., Fujimichi, R., Araishi, K., Kawahara, S., Kano, M., Aiba, A., and Kirino, Y. mGluR1 in cerebellar Purkinje cells is required for normal association of temporally contiguous stimuli in classical conditoning. **Eur. J. Neurosci.**, 16(12), 2416-2424, 2002.
10. Chida, K., Hara, T., Hirai, T., Konishi, C., Nakamura, K., Nakao, K., Aiba, A., Katsuki, M., and Kuroki, T. Disruption of protein kinase Cη results in impairment of wound healing and enhancement of tumor formation in mouse skin carcinogenesis. **Cancer Res.**, 63(10), 2404-2408, 2003.
11. Kuwajima, M., Hall, R. A., Aiba, A., and Smith, Y. **Subcellular and subsynaptic localization of group I metabotropic glutamate receptors in the monkey subthalamic nucleus. J. Comp. Neurol.**, 474(4), 589-602, 2004.
12. Tomemori, Y., Ichiba, M., Kusumoto, A., Mizuno, E., Sato, D., Muroya, S., Nakamura, M., Kawaguchi, H., Yoshida, H., Ueno, S., Nakao,K., Nakamura,K., Aiba, A., Katsuki, M., and Sano, A. A gene-targeted mouse model for chorea-acanthocytosis. **J. Neurochem.**, 2005 Feb;92(4):759-66.
13. Nkamura, M., Sato, K., Fukaya, M., Araishi, K., Aiba, A., Kano, M. and Watanabe, M. Signaling complex formation of phospholipase Cβ4 with mGluR1α and IP3 receptor at perisynapse and endoplasmic reticulum in the mouse brain. **Eur. J. Neurosci.**, in press.

A03-33 東海林 亙

1. Halloran M. C., Sato-Maeda M., Warren J. T., Su F., Lele Z., Krone P. H., Kuwada J. Y., Shoji W., Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. Development, 127 p1953-1960, 2000
2. Inoue, T., Shoji, W., Obinata, M. An Id-associated protein, MIDA1, is a sequence specific DNA binding protein with novel DNA binding properties. Gene to Cells, 5 p699-709, 2000
3. Xiao, T., Shoji, W., Zhou, W., Su, F., and Kuwada, J.Y. Transmembrane Sema4E guides branchiomotor axons to their targets in zebrafish, J Neurosci. 23 p4190-4198, 2003
4. Shoji,W., Isogai, S., Sato-Maeda M., Obinata M., and Kuwada, J. Y., Semaphorin 3A1 regulates angioblast migration and vascular development in zebrafish embryos, Development, 130 p3227-3236, 2003
5. Oyaizu, T., Okada, Y., Shoji,W., Matsumura, Y., Shimada,K., Sado, T., Sato, M. and Kondo, T., Reduction of recipient macrophages by gadolinium chloride prevents development of obliterative airway disease in a rat model of heterotopic tracheal transplantation, Transplantation, 76 p1214-1220 2003
6. Liu, Y., Berndt, J., Su, F., Tawarayama, H., Shoji, W., Kuwada, J. Y. and Halloran, M. C., Semaphorin3D guides retinal axons along the dorsal-ventral axis of the tectum., J Neurosci., 24 p310-318, 2004
7. Ober EA, Olofsson B, Makinen T, Jin SW, Shoji W, Koh GY, Alitalo K, Stainier DY., Vegfc is required for vascular development and endoderm morphogenesis in zebrafish., EMBO Rep. 1 p78-84, 2004
8. Yoshida, M., Inoue, T., Shoji, W., Ikawa, S., and Obinata, M., Reporter gene stimulation by MIDA1 through its DnaJ homology region, Biochem Biophys Res Commun., 324 p326-332, 2004
9. Wolman, M. A., Liu, Y., Tawarayama, H., Shoji, W., and Halloran, M. C. Repulsion and Attraction of Axons by Sema3D are Mediated by Different Neuropilins in vivo, J Neurosci, 24 p8428-8435, 2004

A03-34 水野 健作

1. Bito H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. Neuron, 26, 431-441 (2000).
2. Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Mizuno, K. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine-508 within the activation loop. J. Biol. Chem., 275, 3577-3582 (2000)
3. Toshima, J., Toshima, J. Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S., and Mizuno, K. Cofilin phosphorylation by protein kinase TESK1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. Mol. Biol. Cell, 12, 1131-1145 (2001).
4. Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y.,

Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., and Yahara, I. Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. Nature Neurosci., 4, 367-373 (2001).
5. Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., and Uemura, T. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. Cell, 108, 233-246 (2002)
6. Nishita, M., Aizawa, H., and Mizuno, K. Stromal cell-derived factor-1alpha activates LIM-kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T cell chemotaxis. Mol. Cell. Biol., 22, 774-783 (2002)
7. Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. Control of growth cone motility and morphology by LIM-kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. J. Neurosci., 23, 2527-2537 (2003).
8. Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., and Inokuchi, K. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. Neuron, 38, 447-460 (2003).
9. Ohta, Y., Kousaka, K., Nagata-Ohashi, K., Ohashi, K., Muramoto, A., Shima, Y., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. Differential activities, subcellular distribution, and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. Genes Cells, 8, 811-824 (2003).
10. Nishita, M., Wang, Y., Tomizawa, C., Suzuki, A., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. J. Biol. Chem., 279, 7193-7198 (2004).
11. Nagata-Ohashi, K., Ohta, Y., Goto, K., Chiba, S., Mori, R., Nishita, M., Ohashi, K., Kousaka, K., Iwamatsu, A., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. J. Cell Biol., 165, 465-471 (2004).

A03-35 畑 裕

1. Nishimura, W., Yao, I., Iida, J., Tanaka, N., Hata, Y. (2002) Interaction of synaptic scaffolding molecule and β-catenin. J. Neurosci. 22, 757-765
2. Iida, J., Nishimura, W., Yao, I., Hata, Y. (2002) Synaptic localization of membrane-associated guanylate kinase-interacting protein mediated by the pleckstrin homology domain. Eur. J. Neurosci. 15, 1493-1498
3. Yao, I., Iida, J., Nishimura, W., Hata, Y. (2002) Synaptic and nuclear localization of brain-enriched guanylate kinase-associated protein. J. Neurosci. 22, 5354-5364
4. Yao, I., Iida, J., Nishimura, W., Hata, Y. (2003) Synaptic localization of SAPAP1, a synaptic membrane-associated protein. Genes Cells 8, 121-129

A03-37 川上 厚志

1. Sawada, A., Shinya, M., Jiang, Y.-J., Kawakami, A., Kuroiwa, A. and Takeda, H. (2001) Fgf/MAPK signaling is a crucial positional cue in somite boundary formation. Development 128, 4873-4880.

2. Nikaido, M., Kawakami, A., Sawada, A., Furutani-Seiki, M., Takeda H. and Araki K. (2002) *Fused somites* is a novel T-box gene required for somite segmentation. Nature Genetics 31, 195-199.

3. Yabe, T., Shimizu, T., Muraoka, O., Bae, Y.-K., Hirata, T., Nojima, H., Kawakami, A., Hirano, T., and Hibi, M. (2003) Ogon/Secreted Frizzled functions as a negative feedback regulator of BMP signaling. Development 130, 2705-2716.

4. Karlstrom, R. O., *Tyurina, O. V., *Kawakami, A., Nishioka, N., Talbot, W. S., Sasaki, H. and Schier, A. F. (2003) Genetic analysis of zebrafish *gli1* and *gli2* reveals divergent requirements for *gli* genes in vertebrate development. Development 130, 1549-1564.(*equal contribution)

5. Nakano, Y., Kim, H. R., Kawakami, A., Roy, S., Schier, A. F. and Ingham, P. W. (2004) Inactivation of *dispatched 1* by the *chameleon* mutation attenuates Hedgehog signaling in the zebrafish embryo. Developmental Biology 269, 381-392.

6. Sekimizu, K., Nishioka, N., Sasaki, H., Takeda, H. and Karlstrom, R. & *Kawakami, A. (2004) The zebrafish *iguana* locus encodes Dzip1, a novel zinc finger protein required for proper regulation of hedgehog signaling. Development 131, 2521-2532. *Corresponding author

7. Kawakami, A.*, Fukazawa, T. and Takeda, H. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar

growth control mechanism with adult regeneration. **Developmental Dynamics** (in press) *Corresponding author

8. Kawakami, A.*, Nojima, Y., Toyoda, A., Ishida-Takahoko, M., Satoh, M., Tanaka, H., Wada, H., Masai, I., Terasaki, H., Takeda, H. and Okamoto, H.* Zebrafish *you* Gene Encodes Scube2 Protein that is Required for Attenuating the Long-Range Influence of Dorsal Bmp. *Corresponding authors (Submitted)

A03-38 上村 匡

1. Yasuyuki Shima, Neal G. Copeland, Debra J. Gilbert, Nancy A. Jenkins, Osamu Chisaka, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. Differential expression of the seven-pass transmembrane cadherin genes Celsr1- 3 and distribution of the Celsr2 protein during mouse development. **Developmental Dynamics**, 223: 321-332 (2002).
2. John E. Reuter, Timothy M. Nardine, Andrea Penton, Pierre Billuart, Ethan K. Scott, Tadao Usui, Tadashi Uemura, and Liqun Luo. A mosaic genetic screen for genes necessary for Drosophila mushroom body neuronal morphogenesis. **Development**, 130: 1203-1213 (2003).
3. Kaoru Sugimura, Misato Yamamoto, Ryusuke Niwa, Daisuke H. Sato, Satoshi Goto, Misako Taniguchi, Shigeo Hayashi, and Tadashi Uemura. Distinct developmental modes and lesion-induced reactions of dendrites of two classes of Drosophila sensory neurons. **J. Neuroscience**, 23:3752-3760 (2003).
4. Kirsten-André Senti, Tadao Usui, Urs Greber, Tadashi Uemura, and Barry J. Dickson. Flamingo regulates R8 axon-axon and axon-target interactions in the Drosophila visual system. **Current Biology**, 13:828-832 (2003).
5. Kaoru Sugimura, Daisuke Satoh, Patricia Estes, Stephen Crews, and Tadashi Uemura. Development of morphological diversity of dendrites in Drosophila by the BTB-zinc finger protein Abrupt. **Neuron**, 43: 809-822 (2004).
6. Yasuyuki Shima, Mineko Kengaku, Tomoo Hirano, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. Control of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin, Celsr2. **Developmental Cell**, 7:205-216 (2004).

A03-39 井ノ口 馨

1. Matsuo, R., Murayama, A., Saitoh, Y., Sakaki, Y. and Inokuchi, K. Identification and cataloging of genes induced by long-lasting long-term potentiation in awake rats. **J. Neurochem.**, 74, 2239-2249 (2000).
2. Ikegami, S. and Inokuchi, K. Antisense DNA against calcineurin facilitates memory in contextual fear conditioning by lowering the threshold for hippocampal long-term potentiation induction. **Neuroscience**, 98, 637-646 (2000).
3. Saitoh, Y. and Inokuchi, K. A triphasic curve characterizes the retention of lever-pressing behavior rewarded by lateral hypothalamic stimulation during the immediate-posttrial period in rats: implications for a transient intermediate stage between short and long-term memory. **Neurosci. Res.**, 37, 211-219 (2000).
4. Yamazaki, M., Matsuo, R., Fukazawa, Y., Ozawa, F. and Inokuchi, K. Regulated expression of an actin-associated protein, synaptopodin, during long-term potentiation. **J. Neurochem.**, 79, 192-199 (2001).
5. Matsuo, R., Asada, A., Fujitani, K. and Inokuchi, K. LIRF, a gene induced during hippocampal long-term potentiation as an immediate-early gene, encodes a novel RING finger protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 289, 479-484 (2001).
6. Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K and Inokuchi. K. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance *in vivo*. **Neuron**, 38, 447-460 (2003).

A03-40 黒田 俊一

1. Kuroda, S. Novel Intracellular Signal Transduction Machineries Mediated by Protein Kinase C-Interacting Proteins. 日本農芸化学雑誌 75 (2001), 1191-1199.
2. Miyoshi, K., Honda, A., Baba, K., Taniguchi, M., Oono, K., Fujita, T., Kuroda, S., Katayama, T., and Tohyama, M. *Disrupted-in-Schizophrenia 1*, a Candidate Gene for Schizophrenia, Participates in Axonal Outgrowth. **Mol. Psychiatry** 8 (2003) 685-694.

3. Honda, A., Miyoshi, K., Baba, K., Taniguchi, M., Koyama, Y., Kuroda, S., Katayama, T., and Tohyama, M. Expression of Fasciculation and Elongation Protein Zeta-1 (FEZ1) in the Developing Rat Brain. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 122 (2004) 89-92.
4. Fujita, T., Ikuta, J., Hamada, J., Okajima, T., Tatematsu, K., Tanizawa, K., and Kuroda, S. Identification of a Tissue-non-specific Homologue of Axonal Fasciculation and Elongation Protein Zeta-1 (FEZ1). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 313 (2004) 738-744.
5. Fujita, T., Ikuta, J., Maturana, A., Okajima, T., Tatematsu, K., Tanizawa, K., and Kuroda, S. UNC-76/FEZ Family Is Essential for Axonal Guidance **Recent Res. Devel. Biophys. Biochem.** 4 (2004), in press.

A03-41 福嶋 伸之

1. Sun, B., Nishihira, J., Suzuki, M., Fukushima, N., Ishibashi, T., Kondo, M., Sato, Y. and Todo, S. Induction of macrophage migration inhibitory factor by lysophosphatidic acid: relevance to tumor growth and angiogenesis. **Int. J. Mol. Med.** 12. 633-641, 2003.
2. 福嶋伸之　リゾフォスファチジン酸と神経系細胞のダイナミクス制御. **神経化学** 42: 61-74, 2003.
3. 福嶋伸之　リゾホスファチジン酸. **生体の科学** 55 : 478-479, 2004.
4. Fukushima, N. LPA in neural cell development. **J. Cell. Biochem.** 92, 993-1003, 2004.
5. Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X. and Chun, J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. **Annu. Rev. Biochem.** 73, 321-354, 2004.

A03-43 中川 真一

1. Kubo, F., Takeichi, M., and Nakagawa, S. Wnt2b inhibits differentiation of retinal progenitor cells in the absence of Notch activity by downregulating the expression of proneural genes. Submitted, in the process of revision.
2. Tanabe, K., Takeichi, M., and Nakagawa, S. (2004). Identification of a nonchordate-type classic cadherin in vertebrates: chicken Hz-cadherin is expressed in horizontal cells of the neural retina and contains a nonchordate-specific domain complex. Dev Dyn 229, 899-906.
3. Nakagawa, S., Takada, S., Takada, R., and Takeichi, M. (2003). Identification of the laminar-inducing factor: Wnt-signal from the anterior rim induces correct laminar formation of the neural retina in vitro. Dev Biol 260, 414-25.
4. 中川真一、網膜の組織形成とWntの活性、**細胞工学** 2004年6月号、651-654
5. 中川真一、眼の器官形成におけるWntの役割、**生化学** 2004年12月号、印刷中

A03-44 一色 孝子

1. Takako Isshiki, Chris Q Doe. Maintaining Youth in Drosophila Neural Progenitors. **Cell Cycle.** 2004 Mar: 3 (3): 296-299
2. 一色孝子　「神経幹細胞システムによる神経細胞特異化の分子機構」　**蛋白質 核酸 酵素** 2004 Feb: 49(3): 228-233

A03-45 中村 真

1. DPR, a member of the immunoglobulin superfamily required for the gustatory response to salt. Makoto Nakamura, David Baldwin, Susan Hannaford, John Palka and Craig Montell, **Journal of Neuroscience** 2002, 22(9): 3463-3472.
2. Expression and characterization of the Drosophila X11-like/Mint protein during neural development. Momoko Hase, Yoshimasa Yagi, Hidenori Taru, Susumu Tomita, Aiko Sumioka, Kazuya Hori, Kanako Miyamoto, Takashi Sasamura, Makoto Nakamura, Kenji Matsuno and Toshiharu Suzuki, **Journal of Neurochemistry** 2002, 81(6):1223-32.
3. Overproduction of Eukaryotic SUMO-1- and SUMO-2-conjugated Proteins in Escherichia coli. Yasuhiro Uchimura, Makoto Nakamura, Kaoru Sugasawa, Mitsuyoshi Nakao and Hisato Saitoh, **Analytical Biochemistry** 2004 , 331(1):204-6

A03-46 塩見 美喜子

M. C. Siomi Identification of components of RNA pathway using the Tandem Affinity Purification methods. **Methods in Molecular biology** (2005) in press

1. K. Okamura, A. Ishizuka, H. Siomi, and M.C. Siomi. Distinct roles for Argonaute proteins in the small RNA gene silencing mechanism. **Genes Dev.** 18:1655-1666. 2004.
2. H. Siomi, A. Ishizuka, and M.C. Siomi. RNA interference: a new mechanism by which FMRP acts on the normal brain? What can Drosophila teach us? **MRDD Research Reviews.** 10:68-74. 2004.
3. M.C. Siomi, K. Higashijima, A. Ishizuka, and H. Siomi. Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. **Mol. Cell. Biol.** 22:8438-8447. 2002.
4. A. Ishizuka*, M.C. Siomi* (*equal contribution), and H. Siomi. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. **Genes Dev.** 16:2497-2508. 2002.
5. S.B. Inoue, M. Shimoda, I. Nishinokubi, M.C. Siomi, M. Okamura, A. Nakamura, S. Kobayashi, N. Ishida, and H. Siomi. A role for the Drosophila fragile X-related gene in circadian output. **Curr. Biol.** 12:1331-1335. 2002.

A03-47 仲嶋 一範

1. Takao Honda, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima. Cellular and molecular mechanisms of neuronal migration in neocortical development. **Sem. Cell & Develop. Biol.**, 14, 169-174 (2003).
2. Takeshi Soda, Ryo Nakashima, Dai Watanabe, Kazunori Nakajima, Ira Pastan, and Shigetada Nakanishi. Segregation and coactivation of developing neocortical layer 1 neurons. **J. Neurosci.**, 23, 6272-6279 (2003).
3. Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. **J. Neurosci.**, 23, 9996-10001 (2003).
4. Yee Ping Yip, Christine Capriotti, Susan Magdaleno, David Benhayon, Tom Curran, Kazunori Nakajima, and Joseph W. Yi Components of the Reelin signaling pathway are expressed in the spinal cord. p. **J. Comp. Neurol.**, 470, 210-219 (2004).
5. Yusuke Hirabayashi, Yasuhiro Itoh, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima, Tetsu Akiyama, Norihisa Masuyama and Yukiko Gotoh. The Wnt/b-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. **Development**, 131, 2791-2801 (2004).
6. Masato Yozu, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima. Birth-date dependent alignment of GABAergic neurons occurs in a different pattern from that of non-GABAergic neurons in the developing mouse visual cortex. **Neurosci. Res.** 49, 395-403 (2004).
7. Shigeaki Kanatani, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima. Neuronal migration in cortical development. **J. Child Neurology**, *in press*

A03-48 佐甲 靖志

1. Hibino, K., Watanabe, T., Kozuka, J., Iwane, A. H., Okada, T., Kataoka, T., Yanagida, T., and Sako, Y., Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to c-Raf1 visualized on the plasma membrane of living cells. **Chem. Phys. Chem.**, 4, 748-753 (2003)
2. Sako, Y. and Yanagida, T., Single-molecule visualization in cell biology. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 4, SS1-5 (2003)
3. Murai, T., Miyazaki, Y., Nshinakamura, H., Sugahara, K. N., Miyauchi, T., Sako, Y., Yanagida, T., and Miyasaka, M., Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration. **J. Biol. Chem.**, 279, 4541-4550 (2004)
4. Ichinose, J. and Sako, Y., Single-molecule measurement in living cells. **Trend. Anal. Chem.** 23. 587-594 (2004)
Tani,T., Miyamoto,Y., Fujimori,K., Sako,Y., Yanagida,T. and Harada,Y. Trafficking of ligand-receptor complex on the growth cones as an essential step for the uptake of nerve growth factor at the distal end of axon: a single-molecule analysis. **J. Neuroscience** (2005) in press

A03-49 一條裕之

1. Ichijo H., Roles of Proteoglycans in Neuronal Circuit Formation of Retinotectal Projections. **Connective Tissue** 35 (2003) 11-17
2. Ichijo H., Proteoglycans as Cues for Axonal Guidance in Formation of Retinotectal or Retinocollicular Perojections. **Molecular Neurobiology** 30 (2004) 22-33

A03-50 粟崎 健

1. 粟崎健、伊藤啓 Engulfing action of glial cells is required for programed axon pruning during

Drosophila metamorphosis. **Current Biology** 14巻 8号 668-677頁 2004年4月20日
2. 田中暢明、栗崎健、嶋田尚、伊藤啓 Integration of chemosensory information in the second-order olfactory centers of Drosophila. **Current Biology** 14巻 6号 449-457頁 2004年3月23日
3. 伊藤啓、岡田龍一、田中暢明、栗崎健 Cautionary observations on preparing and interpreting brain images using molecular biology-based staining techniques. **Microscopy Research and Technique** 62巻 2号 170-186頁 2003年10月1日

A03-51 佐藤 真

1. Yagi, H., Takamura, Y., Yoneda, T., Konno, D., Akagi, Y., Yoshida, K., and Sato, M. Vlgr1 knockout-mice show audiogenic seizure susceptibility. **J. Neurochem.** (in press)
2. Nagano, T., Morikubo, S. and Sato, M. Filamin A and FILIP (Filamin A-interacting protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. **J. Neurosci.** 24: 9648-9657; doi:10.1523/JNEUROSCI.2363-04.2004 (2004)
3. Kubota, C., Nagano, T., Baba, H. and Sato, M. Netrin-1 is crucial for the establishment of the dorsal column-medial lemniscal system. **J. Neurochem.** 89: 1547-1554. (2004)
4. Enomoto, R., Kinebuchi, T., Sato, M., Yagi, H., Shibata, T., Kurumizaka, H. and Yokoyama, S. Positive role of the mammalian TBPIP/Hop2 protein in Dmc1-mediated homologous pairing. **J. Biol. Chem.** 279(34): 35263-35272. (2004)
5. Nagano, T., Yoneda, T., Hatanaka, Y., Kubota, C., Murakami, F. and Sato, M. Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. **Nature Cell Biol.**, 4(7): 495-501 (DOI: 10.1038/ncb808) (2002)
6. Takamura, Y., Kubo, E., Tsuzuki, S., Yagi, H., Sato, M., and Akagi, Y. Increased expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ in the lens epithelium of rat sugar cataract. **Exp. Eye Res.** 74: 245-254. (2002)
7. Suzuki, F., Taniguchi, T., Nakamura, S., Akagi, Y., Kubota, C., Sato, M. and Muramatsu, M. Distribution of alpha-1 adrenoceptor subtypes in RNA and protein in rabbit eyes. **Br. J. Pharmacol.**, 135: 600-608. (2002)
8. Takamura, Y., Yagi, H., Hase, K., Yoneda, T., Maeda, M., Akagi, Y. and Sato, M. JDD1, a novel member of Dna J family, expressed in the germinal zone of the rat brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 285(2):387-392. (2001)
9. Tanaka, M., Miyoshi, J., Ishizaki, H., Togawa, A., Endo, K., Matsubara, K., Mizoguchi, A., Nagano, T., Sato, M., Sasaki, T. and Takai, Y. Role of Rab3 GDP/GTP exchange protein in synaptic vesicle trafficking at the mouse neuromuscular junction. **Mol. Biol. Cell**, 12(5):1421-1430. (2001)
10. Suzumori, N., Sato, M., Ikuta, K. and Suzumori, K. Decreased expression of secretory leukocyte protease inhibitor in ovarian endometriomas with GnRH agonist therapy. **Obstet. Gynecol.**, 97(4):561-566. (2001)

A04-01 山森 哲雄

(1) Sakata S, Komatasu Y, Yamamori T. (2005) Local design principles of mammalian cortical networks. **Neurosci Res.** 51, 309-315.
(2) Komatsu Y, Watakabe A, Hashikawa T, Tochitani S, Yamamori T. (2004) Retinol-binding Protein gene is Highly Expressed in Higher-order Association Areas of the Primate Neocortex. **Cereb Cortex.** 15, 96-108
(3) Sakata S, Yamamori T, Sakurai Y. (2004) Behavioral studies of auditory-visual spatial recognition and integration in rats. **Exp Brain Res**, 159, 409-417
(4) Ichinohe N, Watakabe A, Miyashita T, Yamamori T, Hashikawa T, Rockland KS. (2004) A voltage-gated potassium channel, Kv3.1b, is expressed by a subpopulation of large pyramidal neurons in layer 5 of the macaque monkey cortex. **Neuroscience**, 2004;129, 179-185.
(5) Nakayama T, Mikoshiba K, Yamamori T, Akagawa K. (2004) Activation of syntaxin 1C, an alternative splice variant of HPC-1/syntaxin 1A, by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) suppresses glucose transport into astroglioma cells via the glucose transporter-1 (GLUT-1). **J Biol Chem**, 279, 23728-23739.
(6) Tochitani, S., Hashikawa, T. and Yamamori, T. (2003) occl mRNA reveals a characteristic feature in the hippocampal CA2 field of adult macaques. **Neurosci Lett**, 346, 105-108.
(7) Hata, K., Araki, M. and Yamamori, T. (2003) Ciliary neurotrophic factor inhibits differentiation

of photorecptor-like cells in rat pineal glands in vitro. **Dev Brain Res**, 143, 179-187.
(8) Suga, K., Yamamori, T. and Akagawa, K. (2003) Identification of the carboxyl-terminal membrane-anchoring gegion of HPC-1/Syntaxin 1A with the substituted-cysteine-accessibility method and monoclonal antibodies. **J Biochem**, 133, 325-334.
(9) Nakayana, T., Mikoshiba, K., Yamamori, T. and Akazawa, K. Expression of syntaxin 1C, an alternive splice variant of HPC-1/syntaxin 1A, is activaed by phorbol-ester stimulaton in astrglioma. (2003) **FEBS Lett**, 536, 209-214.
(10) Tochitani, S., Hashikawa, T. and Yamamori, T. (2003) Expression of occl mRNA in the visual cortex during postnatal development in macaques. **Neurosci Lett**, 337, 114-116.
(11) Hata, K., Arakai, M. and Yamamori, T. (2002) CNTF is specifically expressed in the developing rat pineal gland and eyes. **NeuroReport**, 13, 735-739.
(12) Sakata, S., Kitsukawa, T., Kaneko, T., Yamamori, T. and Sakurai, Y. (2002) Task-dependent and cell-type-specific Fos enhancement in rat sensory cortices during audio-visual discrimination. **Eur J Neurosci**, 15, 735-743.
(13) Onishi, A., Koike, S., Ida-Hosonuma, M., Imai, H., Shichida, Y., Takenaka, O., Hanazawa, A., Komatsu, H., Mikamai, A., Goto., S., Suryobroto, B., Farajallah, A., Varavudhi, P., Ekavhibata, C., Kitahara, K. and Yamamori, T. (2002) Variations in ling-term and middle-wavelength-sensitive opsin loci in crab-eating monkeys. **Vision Res**, 42, 281-292.
(14) Vigot, R., Batini, C., kado, R.T. and Yamamori. T. (2002) Synaptic LTD in vivo recorded on the rat cerebellar cortex. **Arch Ital Biol**, 140, 1-12..
(15) Hanazawa, A., Mikamai, A., Angelika, P.S., Takenaka, O., Goto, S., Onishi, A., Koike, S., Yamamoi, T., Kato, k., Kondo, A., Suryobroto, B., Farajallah, A., Komatsu, H. (2001) Electroretinogram analysis of relative spectral sensitivity in genetically identified dichromatic macaques. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98, 8124-8127..
(16) Karachot, L., Shirai, Y., Vigot, R., Yamamori, T. and Ito, M. Induction of long-term depression in cerebellar Purkinje cells requires a rapidly turned over protein. **J Neurophysiol**, 86, 280-289 (2001).
(17) Fujiwara, T., Yamamori, T. and Akagawa, K. Suppression of transmitter release by Tat HPC-1/syntaxin 1A fusion protein. (2001) **Biochimica et Biophysica Acta**, 1539, 225-232.
(18) Watakabe A. , Sugai T., Nakaya N., Wakabayashi K., Takahashi H., Yamamori T. and Nawa H. (2001) Similarity and Variation in Gene Expression Among Human Cerebral Cortical Subregions Revealed By DNA Macroarrays: Technical Consideration of RNA Expression Profiling from Postmortem Samples. **Mol Brain Res**, 88, 74-82.
(19) Watakabe, A., Fujita, H., Hayashi, M. and Yamamori T. (2001) GDF7, a BMP/TGF beta family member, is enriched in the primary motor area of monkey neocortex. **J Neurochem**, 76, 1455-1464.
(20) Tochiani, S., Liang, F., Watakabe, A., Hashikawa, T., and Yamamori, T. (2001) occl is preferentially expressed in the primary visual cortex in an activity-dependent manner: a pattern of gene expression related to the cytoarchitectonic area in adult macaue neocortex. **Eur J Neurosci**, 13, 297-307.
(21) Karachot, L., Shirai, Y., Vigot, R., Yamamori, T. and Ito, M. (2000) Rapidly turned over protein maintains metabotropic synaptic transmission. **NeuroReport**, 11, 2903-6.
(22) Serizawa S, Ishii T, Nakatani H, Tsuboi A, Nagawa F, Asano M, Sudo K, Sakagami J, Sakano H, Ijiri T, Matsuda Y, Suzuki M, Yamamori T, Iwakura Y. and H. Sakano. (2000) Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. **Nature Neurosci**, 3, 687-93.
(23) Liang, F., Hatanaka, Y., Saito, H., Yamamori, T. and Hashikawa, T. (2000) Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor-1a and 1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. **J Comp Neurol**, 416, 475-495.
(24) Onishi, A., Koike, S., Ida, M., Imai, H., Shichida, Y., Takenaka, O., Hanazawa, A., Komatsu, H., Mikamai, A. Goto, S., Suryobroto, B., Kitahara, K. and Yamamori, T. (1999) Dichromatism in macaque monkeys. **Nature** 402, 139-140.
(25) Komine, Y., Tanaka, N., Yano, R., Takai, S., Yuasa, S., Shiroishi, T., Tsuchiya, K. and Yamamori, T. (1999) A novel type of non-coding RNA expressed in the rat brain. **Mol Brain Res**, 66, 1-13.
(26) Matsuzawa, M., Muramatsu, T., Yamamori, T., Knoll, W. and Yano, R. (1999) Novel neuronal effects of midkine on embryonic cerebellar neurons examined using a defined culture system. Cellul Mol

Neurobiol, 19, 209-221.

A04-02 八木 健

Miki R, Hattori K, Taguchi Y, Tada M, Isosaka T, Hidaka Y, Hirabayashi T, Hashimoto R, Fukuzako H & Yagi T Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the CNR/Protocadherin-□ gene cluster in single neurons. **GENE** (2005) in press

Ohsawa S, Hamada S, Kakinuma Y, Yagi T & Miura M A Novel Function of Neuronal PAS Domain Protein 1 (NPAS1) in Erythropoietin Expression in Neuronal Cells. **J. Neurosci. Res.** (2005) 79, 451-458.

1. Esumi S, Kakazu N, Taguchi Y, Hirayama T, Sasaki A, Hirabayashi T, Koide T, Kitsukawa T, Hamada S, & Yagi T :Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the CNR/Protocadherin-α gene cluster in single neurons : **Nature Genet.** (2005) 37(2) 171-176.
2. Miki R, Hattori K, Taguchi Y, Tada M, Isosaka T, Hidaka Y, Hirabayashi T, Hashimoto R, Fukuzako H & Yagi T : Identification and characterization of coding single-nucleotide polymorphisms within human protocadherin-α and -β gene clusters : **GENE** ;in press (2004)
3. Ohsawa S, Hamada S, Kakinuma Y, Yagi T & Miura M : A Novel Function of Neuronal PAS Domain Protein 1 (NPAS1) in Erythropoietin Expression in Neuronal Cells : **J. Neurosci. Res.** ; in press (2004)
4. Morishita H, Kawaguchi M, Murata Y, Seiwa C, Hamada S, Asou H, & Yagi T : Myelination triggers down-regulation of axonal CNR/Protocadherin α family expression : **Eur. J, Neurosci.** ;in press (2004)
5. Morishita H, Murata Y , Esumi S, Hamada S, & Yagi T : CNR/Pcdh α family in subplate neurons, and developing cortical connectivity : **Neuroreport** ;in press (2004)
6. Kubota O, Hattor K, Hashimoto K, Yagi T, Sato T, Iyo M, & Yuasa S:Auditory -conditioned-fear-dependent c-Fos expression is altered in the emotion-related brain structures of Fyn-deficient mice : **Mol. Brain Res.** 130:149-160 (2004)
7. Murata Y, Hamada S, Morishita H, Mutoh T & Yagi T: Interaction with Protocadherin-α regulates the cell-surface expression of Protocadherin-α: **J. Biol. Chem.** ; in press (2004)
8. Abe M, Fukuya M, Yagi T, Mishina M, Watanabe M, & Sakimura K: NMDA receptor GluRepsilon/NR2 subunits are essentil for postsynaptic localization and protein stability of GluRzeta 1/NR1 subunit: **J. Neuroscei.** 24(33):9292-9304 (2004)
9. Tada T, Senzaki K, Tai Y, Morishita H, Tanaka Y, Murata Y, Ishii Y, Asakawa S, Shimizu N, Sugino H & Yagi T: Genomic organization and transcripts of the zebrafish Protocadherin genes: **Gene** 340:197-211 (2004)
10. Hamaguchi-Hamada K, Hamada S & Yagi T: Exposure to hexanal odor induces extraordinary Fos expression in the medial preoptic area and amygdala of Fyn tyrosine kinase-deficient mice: **Mol. Brain Res.** ;in press (2004)
11. Ishi Y, Asakawa S, Taguchi Y, Ishibashi S, Yagi T & Shimizu N. :Construction of BAC library for the amphibian, *Xenopus tropicalis* : **Genes & Genetic Systems** 79:49-51 (2004)
12. Yuasa S, Hattori K, & Yagi T : Defective neocortical development in Fyn-tyrosine-kinase-deficient mice : **Neuroreport** 15(5):819-822 (2004)
13. Sugino H , Yanase H, Hamada S, Kurokawa K, Asakawa S, Shimizu N & Yagi T. : Distinct genomic sequence of the CNR/Pcdh α genes in chiken : **Biochem. and Biophys. Res. Commun.** 316(2):437-445 (2004)
14. Mutoh T , Hamada S, & Yagi T: Cadherin-related Neuronal Receptor 1(CNR1) has cell-adhesion activity with β1 integrin mediated through the RGD site of CNR1: **Exp. Cell Res.** 294:494-508 (2004)
15. Yanase H, Sugino H, & Yagi T: Genomic sequence and organization of the family of *CNR /Pcdh α* genes in Rat:**Genomics** 83(4):717-726(2004)
16. Sugino H, Miyazaki M , & Yagi T : Intron-less processed cadherin-related neuronal receptor (CNR/Pcdha) genes in the central nervous system : **Biochem. and Biophys. Res. Commun.** 313:775-783 (2004)
17. Hamaguchi-Hamada K, Sanbo C, Hamada S, & Yagi T : Exposure to hexanal odor influences maternal behavior and induces neonatal death in Fyn tyrosine kinase-deficient mice: **Neurosci. Res.** 48:259-267 (2003)
18. Nakahara J, Tan-Takeuchi K, Seiwa C, Gotoh M, Kaifu T, Ujike A, Inui M, Yagi T, Ogawa M, Aiso S, Takai T, & Asou H: Signaling via Immunoglobulin Fc Receptors Induces Oligodendrocyte Precursor Cell Differentiation : **Dev. Cell** 4, 841-852 (2003)
19. Cowen MS, Schumann G, Yagi T & Spanagel R : Role of Fyn tyrosine kinase in ethanol consumption by mice: **Alcohol Clin. Exp. Res.** Aug; 27(8): 1213-1239 (2003)
20. Masuda T, Tsuji H, Taniguchi M, Yagi T, Tessier-Lavigne M, Fujisawa H, Okado N, & Shiga T:Differential non-target-derived repulsive signals play a critical role in shaping initial axonal growth of dorsal root ganglion neurons: **Dev Biol.** 15;254(2):289-302 (2003)

21. Taniguchi M, Nagao H, Takahashi Y, Yamaguchi M, Mitsui S, Yagi T, Mori K & Shimizu T : Distorted Odor Maps in the Olfactory Bulb of Semaphorin 3A-Deficient Mice: **J. Neurosci.** 3 (4)1390-1307 (2003)
22. Fukumoto E, Sakai H, Fukumoto S, Yagi T, Takagi O & Kato Y : Cadherin-related Neuronal Receptors in Incisor Development : **J. Dent. Res.** 82 (1),17-22 (2003)
23. Yagi T : Diversity of the cadherin-related neuronal receptor/protocadherin family and possible DNA rearrangement in the brain : **Genes to Cells** 8, 1-8 (2003)
24. Yasuda K, Nagafuku M, Shima T, Okada M, Yagi T, Yamada T, Minami Y, Kato A, Tani-Ichi S, Hamaoka T & Kosugi A:Cutting edge: Fyn is essential for tyrosinase phosphorylation of Csk-binding protein /phosphoprotein associated with glycolipid-enriched microdomains in lipid rafts in resting T cells : **J. Immunol.** 15 ; 169 (6) : 2813-2817 (2002)
25. Kanda H, Igaki T, Kanuka H, Yagi T & Miura M : Wengen, a member of the *Drosophila* TNF receptor superfamily, is required for Eiger signaling : **J. Biol. Chem.,** 9 ; 277 (32) : 28372-28375 (2002)
26. Maekawa M, Toyama Y, Yasda M, Yagi T, & Yuasa S: Fyn Tyrosinase in Sertoki Cells Is Involved in Mouse Spermatogenesis : **Biology of Reproduction** 66, 211-221 (2002)
27. Sasaki Y, Cheng C, Uchida Y, Nakajima O, Ohshima T, Yagi T, Taniguchi M, Nakayama T, Kishida R, Kudo Y, Ohno S, Nakamura F & Goshima Y : Fyn and Cdk5 Mediate Semaphorin-3A Signaling, Which is Involved in Regulation of Dendrite Orientation in Cerebral Cortex : **Neuron** 35, 907-920 (2002)
28. Kawasaki T, Bekku Y, Suto F, Kitsukawa T, Taniguchi M, Nagatsu I, Nagatsu T, Itoh K, Yagi T & Fujisawa H : Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system : **Development** ,129, 671-680 (2002)
29. Hironaka N, Yagi T & Niki H : Light-potentiation of acoustic startle response (ASR) and monoamine efflux related to fearfulness in Fyn-deficient mice : **Mol. Brain Res.** 98, 102-110 (2002)
30. Osada T, Kusakabe H, Akutsu H, Yagi T & Yanagimachi R : Adult murine neurons: their chromatine and chromosome changes and failure to support embryonic development as revealed by nuclear transfer : **Cytogenet. Genome Res.** 97(1-2) 7-12 (2002)
31. Yagi T, Tada M, Tanaka Y, Senzaki K, Hirayama T, Hamada S & Sugino H : Diversity of the cadherin-related neuronal receptor family in the nervous system, "Genome Science-Towards a New Paradigm?" : **International Cpngress Series** 1246:127-136(2002)
32. Shima T, Okumura N, Takao T, Satomi Y, Yagi T, Okada M & Nagai K : Interaction of the SH2 domain of Fyn with a cytoskeletal protein, β-aducin : **Biol. Chem.** , 276 ; 42233-42240 (2001)
33. Hamada S & Yagi T : The cadherin-related neuronal receptor (CNR) family: a novel diversified cadherin family at the synapse : **Neurosci. Res.** 41,207-215 (2001)
34. Yamazaki Y, Makino H, Hamaguchi-Hamada K, Hamada S, Sigino H, Kawase E, Miyata T, Ogawa M, Yanagimachi R & Yagi T : Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer : **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98:14022-14026 (2001)
35. Sugimoto Y, Taniguchi M, Yagi T, Akagi Y, Nojyo Y & Tamamaki N : Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve : **Development** 128 :,3321-3330 (2001)
36. Miyakawa T, Yagi T, Takao K & Niki H : Differential effect of Fyn tyrosine kinase deletion on offensive and defensive aggression : **Behavioral. Brain Res.** 122, 51-56 (2001)
37. Hattori K, Yagi T, Maekawa M, Sato T & Yuasa S : *N*-Methyl-d-aspartate-induced c-Fos expression is enhanced in the forebrain structures related to emotion in Fyn-deficient mice : **Brain Res.** 905, 188-198 (2001)
38. Hoffmn PL, Yagi T, Tabakoff B, Phillips TJ, Kono H, Messing RO & Choi D-S:Transgenic and gene "knockout" models in alcohol research : **Alcohol. Clin. Exp. Res.** 25, 60S-66S (2001)
39. Takei Y, Hamada S, Senzaki K, Mutoh T, Sugino H & Yagi T : Two novel CNRs from the CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR1 to 8 : **Genomics** 72: 321-330 (2001)
40. Hirayama T, Sugino H & Yagi T : Somatic mutations of synaptic cadherin (CNR family) transcripts in the nervous system : **Genes to Cells** 6: 151-164 (2001)
41. Nakahara J, Tan-Takeuchi K, Seiwa C, Yagi T, Aiso S, Kawamura K & Asou H : Myelin basic protein is necessary for the regulation of myelin-associated glycoprotein expression in mouse oligodendroglia : **Neurosci. Lett.** 298:163-166 (2001)
42. Nakamura K, Manabe T, Watanabe M Mamiya T, Ichikawa R, Kiyama Y, Sanbo M, Yagi T, Inoue Y, Nabeshima T, Mori H & Mishina M : Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule : **Eur. J. Neurosci.**13: 179-189 (2001)

43. Yagi.T:Signaling cascade of CNR cadherins (Reelin receptors) in the mammalian brain : **Symp. Soc. Expo. Biol.** 53:51-57 (2001)

A04-03 真鍋 俊也

1. Manabe, T., Aiba, A., Yamada, A., Ichise, T., Sakagami, H., Kondo, H. and Katsuki, M. Regulation of long-term potentiation by H-Ras through NMDA receptor phosphorylation. **J. Neurosci.** 20:2504-2511, 2000.
2. Manabe, T., Togashi, H., Uchida, N., Suzuki, S. C., Hayakawa, Y., Yamamoto, M., Yoda, H., Miyakawa, T., Takeichi, M. and Chisaka, O. Loss of cadherin-11 adhesion receptor enhances plastic changes in hippocampal synapses and modifies behavioral responses. **Mol. Cell. Neurosci.** 15:534-546, 2000.
3. Noda, Y., Mamiya, T., Manabe, T., Nishi, M., Takeshima, H. and Nabeshima, T. Role of nociceptin systems in learning and memory. **Peptides** 21:1063-1069, 2000.
4. Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune C., Umemori, H., Semba, K., Mishina, M., Manabe, T. and Yamamoto, T. Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluRε2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. **J. Biol. Chem.** 276:693-699, 2001.
5. Nakamura, K., Manabe, T., Mamiya, T., Watanabe, M., Mori, H., Yagi, T., Ichikawa, R., Kiyama, Y., Inoue, Y., Nabeshima, T. and Mishina, M. Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule. **Eur. J. Neurosci.** 13:179-189, 2001.
6. Shimuta, M., Yoshikawa, M., Fukaya, M., Watanabe M., Takeshima, H. and Manabe, T. Postsynaptic modulation of AMPA receptor-mediated synaptic responses and LTP by the type 3 ryanodine receptor. **Mol. Cell. Neurosci.** 17:921-930, 2001.
7. Katagiri, H., Tanaka, K. and Manabe, T. Requirement of appropriate glutamate concentrations in the synaptic cleft for hippocampal LTP induction. **Eur. J. Neurosci.** 14:547-553, 2001.
8. Yamamoto, S., Oka, S., Inoue, M., Shimuta, M., Manabe, T., Takahashi, H., Miyamoto, M., Asano, M., Sakagami, J., Sudo, K., Iwakura, Y., Ono, K. and Kawasaki, T. Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. **J. Biol. Chem.** 277:27227-27231, 2002.
9. Kamiya, H., Ozawa, S. and Manabe, T. Kainate receptor-dependent short-term plasticity of presynaptic Ca^{2+} influx at the hippocampal mossy fiber synapses. **J. Neurosci.** 22:9237-9243, 2002.
10. Kamiya, H., Umeda, K., Ozawa, S. and Manabe, T. Presynaptic Ca^{2+} entry is unchanged during hippocampal mossy fiber long-term potentiation. **J. Neurosci.** 22:10524-10528, 2002.
11. Matsui, M., Motomura, D., Fujikawa, T., Jiang, J., Takahashi, S.-i., Manabe, T. and Taketo, M. M. Mice lacking M_2 and M_3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. **J. Neurosci.** 22:10627-10632, 2002.
12. Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Fukudome, Y., Shosaku, J., Tsubokawa, H., Taketo, M. M., Manabe, T. and Kano, M. Postsynaptic M_1 and M_3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. **Eur. J. Neurosci.** 18:109-116, 2003.
13. Nakazawa, T., Watabe, A. M., Tezuka, T., Yoshida, Y., Yokoyama, K., Umemori, H., Inoue, A., Okabe, S., Manabe, T. and Yamamoto, T. p250GAP, a novel brain-enriched GTPase-activating protein for Rho family GTPases, is involved in the NMDA receptor signaling. **Mol. Biol. Cell** 14:2921-2934, 2003.
14. Griffin, M. T., Matsui, M., Shehnaz, D., Ansari, K. Z., Taketo, M. M., Manabe, T. and Ehlert, F. J. Muscarinic agonist-mediated heterologous desensitization in isolated ileum requires activation of both muscarinic M_2 and M_3 receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 308:339-349, 2004.
15. Tabata, Y., Ouchi, Y., Kamiya, H., Manabe, T., Arai, K.-i. and Watanabe, S. Specification of the retinal fate of mouse embryonic stem cells by ectopic expression of Rx/rax, a homeobox gene. **Mol. Cell. Biol.** 24:4513-4521, 2004.
16. Fukudome, Y., Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Omori, Y., Fukaya, M., Taketo, M. M., Watanabe, M., Manabe, T. and Kano, M. Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M_2-mediated direct suppression and M_1/M_3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signaling. **Eur. J. Neurosci.** 19:2682-2692, 2004.
17. Nakamura, T., Matsui, M., Uchida, K., Futatsugi, A., Kusakawa, S., Matsumoto, N., Nakamura, K., Manabe, T., Taketo, M. M. and Mikoshiba, K. M_3 muscarinic acetylcholine receptor plays critical

role in parasympathetic control of salivation in mice. **J. Physiol.** 558.2:561-575, 2004.
18. Matsui, M., Yamada, S., Oki, T., Manabe, T., Taketo, M. M. and Ehlert, F. J. Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice. **Life Sci.** 75:2971-2981, 2004.
19. Kitamura, H. W., Hamanaka, H., Watanabe, M., Wada, K., Yamazaki, C., Fujita, S. C., Manabe, T. and Nukina, N. Age-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation in knock-in mice expressing human apolipoprotein E4 instead of mouse apolipoprotein E. **Neurosci. Lett.** 369:173-178, 2004.
20. Nakatsu, F., Okada, M., Mori, F., Kumazawa, N., Iwasa, H., Zhu, G., Kasagi, Y., Kamiya, H., Harada, A., Nishimura, K., Takeuchi, A., Miyazaki, T., Watanabe, M., Yuasa, S. Manabe, T., Wakabayashi, K., Kaneko, S., Saito, T. and Ohno, H. Defective function of GABA-containing synaptic vesicles in mice lacking the AP-3B clathrin adaptor. **J. Cell Biol.** 167:293-302, 2004.
21. Oki, T., Takagi, Y., Inagaki, S., Taketo, M. M., Manabe, T., Matsui, M. and Yamada, S. Quantitative analysis of binding parameters of [^{3}H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Brain Res.** (2004, in press)
Niisato, K., Fujikawa, A., Komai, S., Shintani, T., Watanabe, E., Sakaguchi, G., Katsuura, G., Manabe, T. and Noda, M. Age-dependent enhancement of hippocampal LTP and impairment of spatial learning through the ROCK pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice. **J. Neurosci.** 25, 1081-1088, 2005
Bando, T. et al. Neuronal leucine-rich repeat protein 4 functions in hippocampus-dependent long-lasting memory. **Mol. Cell. Biol.** (2005) in press

A04-04　尾藤 晴彦

1. Kuriu T., Inoue A., Bito H., Sobue K., and Okabe S. Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and independent mechanisms. submitted.
2. Matsuoka Y., Furuyashiki T., Yamada K., Bito H., Tanaka Y., Nagai T., Ushikubi F., Kitaoka S., Kayahara T., Kimura K., Shichi H., Mizoguchi A., Nabeshima T., Narumiya S. Prostaglandin E receptor EP1 regulates behavioral stress responses. submitted.
3. Nemoto T, Kojima T, Oshima A, Bito H, Kasai H. Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. **J. Biol. Chem.**, 279: 37544-37550, 2004.
4. Bito H. Dynamic control of neuronal morphogenesis by Rho signaling. **J. Biochem.** 134, 315-319, 2003..
5. Bito H, Takemoto-Kimura S. Ca^{2+}/CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival. **Cell Calcium**, 34: 425-430, 2003.
6. Takemoto-Kimura S, Terai H, Takamoto M, Ohmae S, Kikumura S, Segi E, Furuyashiki T, Arakawa Y, Narumiya S, Bito H. Molecular cloning and characterization of CLICK-III /CaMKIγ, a novel membrane-anchored neuronal Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK). **J. Biol. Chem.** 278: 18597-18605, 2003.
7. Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Kimura K, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S. Control of axon elongation via an SDF-1α / Rho / mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. **J. Cell Biol.**, 161: 381-391, 2003.
8. Furuyashiki T, Arakawa Y, Takemoto-Kimura S, Bito H (corresponding author), Narumiya S. Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated Ca^{2+}-channels. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 99: 14458-14463, 2002.
9. Yamasaki T, Kawaji K, Ono K, Bito H, Hirano T, Osumi N, Kengaku M. Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. **Development** 128: 3133-3144, 2001.
10. Yamamoto M, Hilgemann DH, Feng S, Bito H, Ishihara H, Shibasaki Y, Yin HL. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. **J. Cell Biol.**, 152: 867-876, 2001.
11. Sée V, Boutillier AL, Bito H, Loeffler JP. Calcium-calmodulin dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. **FASEB J.**, 15: 134-144, 2001.
12. Madaule P, Furuyashiki T, Eda M, Bito H, Ishizaki T, Narumiya S. Citron, a Rho target that affects contractility during cytokinesis. **Microsc. Res. Tech.**, 49: 123-126, 2000.

13. Bito H (corresponding author), Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S. A critical role for a Rho-associated kinase p160ROCK in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. **Neuron**, 26: 431-441, 2000.
14. 尾藤晴彦。ROCK インヒビター−神経再生ならびに神経変性防止におけるあらたな創薬標的。**医学のあゆみ**。208: 469-473, 2004
15. 奥野浩行、竹本-木村さやか、大前彰吾、岡村理子、石原奈津実、尾藤晴彦。シナプス活動による遺伝子発現制御。(蛋白質核酸酵素　増刊号) **蛋白質核酸酵素** 49: 411-418, 2004.
16. 尾藤晴彦、竹本-木村さやか、大前彰吾、古屋敷智之、奥野浩行。Ca^{2+}とCaMキナーゼによるシナプス可塑性制御。(実験医学増刊号no.102「脳神経研究２００４」pp.119-124) **実験医学** 21: 2393-2398, 2003.
17. 尾藤晴彦。Open Access Publishingによる変革。**日本薬理学雑誌** 122: 557-558, 2003.
18. 尾藤晴彦、荒川芳輝。中枢神経細胞における突起形態制御機構。**脳神経外科速報** 13: 845-850, 2003.
19. 尾藤晴彦。CREBの脳神経系における役割-長期記憶とアポトーシスの制御。**医学のあゆみ**, 203: 538-540, 2002.
20. 荒川芳輝、尾藤晴彦。Rho/ROCKと神経細胞形態。**BioClinica** 17: 1154-1158, 2002.
21. 尾藤晴彦、古屋敷智之、竹本-木村さやか、荒川芳輝、成宮周.マウス海馬錐体細胞初代培養法。**実験医学**、20: 2247-2252, 2002.

A04-05 森 郁恵

1. Gomez, M., DeCastro, E., Guarin, E., Sasakura, H., Kuhara, A., Mori, I., Bartfai, T., Bargmann, C. I. and Nef, P. (2001). Ca2+ signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learningand memory in C. elegans. **Neuron** 30, 241-248.
2. Satterlee, J. S., Sasakura, H., Kuhara, , A., Berkeley, M., Mori, I. and Sengupta, P. (2001). Specification of thermosensory neuron fate in C. elegans requires ttx-1, a Homolog ofotd/Otx. **Neuron** 31, 943-956.
3. Kuhara, A., Inada, H., Katsura, I. and Mori, I. (2002). Negative regulation and gain controlof sensory neurons by the C. elegans calcineurin TAX-6. **Neuron** 33, 751-763.
4. Ishihara, I., Iino, Y., Mohri, A., Mori, I., Gengyo-Ando, K., Mitani, S. and Katsura, I. (2002). HEN-1, a secretory protein with a LDL receptor motif, regulates sensory integrationand learning in Caenorhabditis elegans. **Cell** 109, 639-649.
5. Shimozono, S., Fukano, T., Kimura, K. D., Mori, I. Kirino, Y. and Miyawaki, A. (2004). Slow Ca2+ dynamics in pharyngeal muscles in Caenorhabditis elegans during fast pumping. **EMBO Rep.** 5, 521-526.
6. Kimura, D. K., Miyawaki, A., Matsumoto, K. and Mori, I. (2004). A C. elegans thermosensory neuron responds to warming. **Curr. Biol.** 14, 1291-1295.
7. Mohri, A., Koike, M., Kodama, E., Mizuno, T. and Mori, I. (2005). Genetic control oftemperature preference in the nematode C. elegans. **Genetics** (in press).
Sasakura, Inada, Kuhara et al Maintenance of neuronal positions in organized ganglia by SAX-7, a Caenorhabditis elegans homologue of L1 **The EMBO Journal** (2005) in press

A04-06 山口 瞬

1. Yagita K., Yamaguchi S., Tamanini F., van der Horst G. T. J., Hoeijmakers J. H., Yasui A., Loros J. J., Dunlap J. C., Okamura H.: Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. **Genes Dev.** 14(11), 1353-1363, 2000 Jun 1
2. Yamaguchi S., Mitsui S., Yan L., Yagita K., Miyake S., Okamura H.: Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. **Mol Cell Biol.** 20(13), 4773-4781, 2000 Jul
3. Yamaguchi S., Mitsui S., Miyake S., Yan L., Onishi H., Yagita K., Suzuki M., Shibata S., Kobayashi M., Okamura H.: The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. **Curr Biol.** 10(14), 873-876, 2000 Jul 13
4. Miyake S., Sumi Y., Yan L., Takekida S., Fukuyama T., Ishida Y., Yamaguchi S., Yagita K., Okamura H.: Phase-dependent responses of Per1 and Per2 genes to a light-stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat. **Neurosci Lett.** 294(1), 41-44, 2000 Nov 10
5. Yamaguchi S., Kobayashi M., Mitsui S., Ishida Y., van der Horst G. T. J., Suzuki M., Shibata S., Okamura H.: View of a mouse clock gene ticking. **Nature** 409, 684, 2001 Feb 8

6. Yamamoto S., Shigeyoshi Y., Ishida Y., Fukuyama T., Yamaguchi S., Yagita K., Moriya T., Shibata S., Takashima N., Okamura H. : Expression of the Per1 gene in the hamster : Brain atlas and circadian characteristics in the suprachiasmatic nucleus. **J Comp Neurol**. 430, 518-532, 2001 Feb 19
7. Nakamura T., Shigeyoshi Y., Maebayashi Y., Yamaguchi S., Yagita K., Okamura H.: Different developmental profiles of the expression of preprosomatostatin and preprotachykinin-A mRNAs in rat SCN neurons. **Brain Res Dev Brain Res**. 127(1), 81-86, 2001 Mar 29
8. Mitsui S., Yamaguchi S. (the first two authors are equal contributors to this work), Matsuo T., Ishida Y., Okamura H.: Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. **Genes Dev**. 15, 995-1006, 2001 Apr 15
9. Ishida Y., Yagita K., Fukuyama T., Nishimura M., Nagano M., Shigeyoshi Y., Yamaguchi S., Komori T., Okamura H.: Constitutive expression and delayed light response of casein kinase Iepsilon and Idelta mRNAs in the mouse suprachiasmatic nucleus. **J Neurosci Res**. 64(6), 612-6, 2001 Jun 15
10. Asai M., Yamaguchi S. (the first two authors are equal contributors to this work), Isejima H., Jonouchi M., Moriya T., Shibata S., Kobayashi M., Okamura H.: Visualization of mPer1 transcription in vitro: NMDA induces a rapid phase shift of mPer1 gene in cultured SCN. **Curr Biol**. 11 (19), 1524-1527, 2001 Oct 2
11. Sumi Y., Yagita K., Yamaguchi S., Ishida Y., Kuroda Y., Okamura H.: Rhythmic expression of ROR beta mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus. **Neurosci Lett** 320(1-2), 13-16, 2002 Mar 1
12. Ishida Y., Yokoyama C., Inatomi T., Yagita K., Dong X., Yan L., Yamaguchi S., Nagatsu I., Komori T., Kitahama gene expression and decarboxylating activity in clock oscillating cells. **Genes Cells** 7(5), 447-459, 2002 May
13. Onishi H., Yamaguchi S., Yagita K., Ishida Y., Dong X., Kimura H., Jing Z., Ohara H., Okamura H.: Rev-erb alpha gene expression in the mouse brain with spatial emphasis on its circadian profiles in the suprachiasmatic nucleus. **J Neurosci Res**. 68, 551-557, 2002 Jun 1
14. Sujino M., Masumoto K., Yamaguchi S., van der Horst G. T. J., Okamura H., Inouye SI.: Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. **Curr Biol**. 13(8), 664-668, 2003 Apr 15
15. Nomura K., Takeuchi Y., Yamaguchi S., Okamura H., Fukunaga K.: Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of mPer1. **J Neurosci Res**. 72(3), 384-392, 2003 May 1
16. Terazono H., Mutoh T., Yamaguchi S., Kobayashi M., Akiyama M., Udo R., Ohdo S., Okamura H., Shibata S.: Adrenergic regulation of clock gene expression in the mouse liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 100(11), 6795-6800, 2003 May 27
17. Matsuo T., Yamaguchi S. (the first two authors are equal contributors to this work), Mitsui S., Emi A., Shimoda F., Okamura H.: Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. **Science** 302, 255-259, 2003a Oct 10
18. Yamaguchi S., Isejima H., Matsuo T., Okura R., Yagita K., Kobayashi M., Okamura H.: Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. **Science** 302, 1408-1412, 2003b Nov 21

A04-07 石原 健

1. Aoki,H., Sato,S., Takanami,T., Ishihara,T., Katsura,I., Takahashi,H., and Higashitani,A. "Characterization of Ce-atl-1, an ATM-like gene from Caenorhabditis elegans." **Molecular and General Genetics** 264, 119-126 (2000)
2. Asahina,M., Ishihara,T., Jindra,M., Kohara,Y., Katsura,I. and Hirose,S. "The conserved nuclear receptor Ftz-F1 is required for embryogenesis, moultingand reproduction in Caenorhabditis elegans." **Genes to Cells** 5, 711-723 (2000)
3. Okuda,T., Haga,T., Kanai,Y., Endou,H., Ishihara,T., and Katsura,I. "Identification and characterization of the high-affinity cholinetransporter." **Nature Neuroscience** 3, 120-125 (2000)
4. Shioi,G., Shoji,M., Nakamura,M., Ishihara,T., Katsura,I., Fujisawa,H., and Takagi,S. "Mutations affecting nerve attachment of Caenorhabditis elegans." **Genetics** 157, 1611-1622 (2001).
5. Ishihara,T. Iino,Y. Mohri,A., Mori,I., Gengyo-Ando,K., Mitani,S., Katsura,I. "HEN-1, a secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in Caenorhabditis elegans." **Cell** 109, 639-49 (2002)
6. Ohkura,K, Suzuki,N., Ishihara,T., Katsura,I. "SDF-9, a protein tyrosine pshophatse-like

molecule, regulates the L3/dauer developmental decision through hormonal signaling in C.elegans." **Development** 130, 3237-3248 (2003)
7. Miyahara,K., Suzuki,N., Ishihara,T., Tsuchiya,E., Katsura,I. "TBX2/TBX3 transcriptional factor homolog controls olfactory adaptation in Caenorhabditis elegans." **Journal of Neurobiology**, 58, 392-402 (2004)
8. 石原 健 "高次脳機能の発現：線虫 C.elegans における学習の分子機構" **実験医学**、21、2399-2404 (2003)
9. 石原 健 "線虫 C.elegans における感覚情報の統合と学習に関わる分子メカニズム" **生物物理**、43、287-290 (2003)
10. 石原 健 "線虫学習行動の分子遺伝学：連合学習制御遺伝子" **蛋白質・核酸・酵素**、49、450-455(2004)
11. 石原 健"モデル動物を用いた記憶・学習にかかわる制御機構の解析"**Molecular Medicine**、Vol.41 No.9、1073-1079(2004)
Take-Uchi M, Kobayashi Y, Kimura KD, Ishihara T & Katsura I FLR-4, a Novel Serine/Threonine Protein Kinase, Regulates Defecation Rhythm in Caenorhabditis elegans. **Mol Biol Cell**. 2005 Mar;16(3):1355-65. Epub 2005 Jan 12.
Murayama T. The dyf-3 gene encodes a novel protein required for sensory cilium formation in Caenorhabditis elegans. **J.Mol.Biol** (2005) 346, 677-687.

A04-08 岡戸 晴生

1. Hiyama,T., Watanabe,E., Okado,H., Noda,MT, The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Nax sodium channels for the control of salt-intake behavior., **J Neurosci**, 24, 9276-9281. (2004)
2. Zenzai K, Shibata M, Okado H, Endo N, Hirano S. Newly-formed axonal branches of rat sciatic neurons sprouting in the spinal cord after peripheral axotomy. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg** 38, 129-34. (2004)
3. Tagawa K, Hoshino M, Okuda T, Ueda H, Hayashi H, Engemann S, Okado H, Ichikawa M, Wanker EE, Okazawa H. Distinct aggregation and cell death patterns among different types of primary neurons induced by mutant huntingtin protein. **J Neurochem**. 89, 974-87. (2004)
4. Takahashi N, Hatakeyama H, Okado H, Miwa A, Kishimoto T, Kojima T, Abe T, Kasai H. Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25. **J Cell Biol**. 165, 255-62. (2004)
5. Yamashita S, Mita S, Kato S, Okado H, Ohama E, Uchino M. Bcl-2 expression using retrograde transport of adenoviral vectors inhibits cytochrome c-release and caspase-1 activation in motor neurons of mutant superoxide dismutase 1 (G93A) transgenic mice. **Neurosci Lett**. 350:17-20. (2003)
6. Kikkawa S, Yamamoto T, Misaki K, Ikeda Y, Okado H, Ogawa M, Woodhams PL, Terashima T Missplicing resulting from a short deletion in the reelin gene causes reeler-like neuronal disorders in the mutant shaking rat Kawasaki. **J Comp Neurol**. , 463:303-15. (2003)
7. Saito Y, Tsuzuki K, Yamada N, Okado H, Miwa A, Goto F, Ozawa S. Transfer of NMDAR2 cDNAs increases endogenous NMDAR1 protein and induces expression of functional NMDA receptors in PC12 cells. **Brain Res Mol Brain Res**. 110:159-68. (2003)
8. Yamashita S, Mita S, Kato S, Okado H, Ohama E, Uchino M. Related Effect on motor neuron survival in mutant SOD1 (G93A) transgenic mice by Bcl-2 expression using retrograde axonal transport of adenoviral vectors. **Neurosci Lett**. , 328:289-93. (2002)
9. Matsumoto J, Okada T, Ohtsuka Y, Chen L, Okado H, Okamura Y Regulation of synaptotagmin gene expression during ascidian embryogenesis. **Dev Biol**. 244:293-304. (2002)
10. Takahashi N, Nemoto T, Kimura R, Tachikawa A, Miwa A, Okado H, Miyashita Y, Iino M, Kadowaki T, Kasai H. Two-photon excitation imaging of pancreatic islets with various fluorescent probes. **Diabetes, 51 Suppl** 1:S25-8. (2002)
11. Ishida, R., Okado, H., Sato, H., Shionoiri, C., Aoki, K., and Kasai, M. A role for the octameric ring protein, Translin, in mitotic cell division. **FEBS Lett**. 525, 105-110 (2002)
12. 近藤真啓、岡戸晴生 Ca2+透過型 AMPA 受容体と Ca2+結合蛋白の機能連関。**医学のあゆみ**。202:1017-1022。(2002)
13. Ishiuchi S, Tsuzuki K, Yoshida Y, Yamada N, Hagimura N, Okado H, Miwa A, Kurihara H, Nakazato Y, Tamura M, Sasaki T, Ozawa S. Blockage of Ca(2+)-permeable AMPA receptors suppresses migration

and induces apoptosis in human glioblastoma cells. **Nat Med.** 8: 971-8. (2002)
14. Katsuyama Y, Matsumoto J, Okada T, Ohtsuka Y, Chen L, Okado H, Okamura Y. Regulation of synaptotagmin gene expression during ascidian embryogenesis. **Dev Biol.** 244:293-304. (2002)
15. Okabe, S., Urushido, T., Konno, D., Okado, H. and Sobue, K. Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. **J. Neurosci.** 21: 9561-71. (2001)
16. Miaw, H., Shibata, M., Okado, H. and Hirano, S. Ttracing axons in the peripheral nerve using LacZ gene recombinant adenovirus and its application to regeneration of the periferal nerve. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 60: 671-675. (2001)
17. Okabe, S., Miwa, A. and Okado, H. Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. **J. Neurosci.**, 21: 6105-6114. (2001)
18. Iino M, Goto, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, Miwa A, Takayasu Y, Saito I, Tsuzuki K, Ozawa S. Glia-synapse interaction through Ca2+-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. **Science.** 292(5518):926-9. (2001)
19. Namikawa, K., Honma, M., Abe, K., Takeda, M., Mansur, K., Obata, T., Miwa, A., Okado, H., Kiyama, H., Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerate axonal regeneration., **J Neurosci**, 20(8) 2875-2886(2000)
20. Kondo, M., Okabe, S., Sumino, R., Okado, H., A high GluR1: GluR2 expression ratio is correlated with expression of Ca2+ -binding proteins in rat forebrain neurons., **Eur JNeurosci**, 12, 2812-2822 (2000)
21. Brene, S., Messer. C., Okado, H., Hartley, M., Heinemann, S. F., Nestler, E. J. Regulation of GluR2 promoter activity by neurotrophic factors via a neuron-restrictive silencer element., **Eur J Neurosci**, 12 1525-1533 (2000)
22. Tamatani, M., Mitsuda, N., Matsuzaki, H., Okado, H., Miyake, S., Vitek, M. P., Yamaguchi, A. and Tohyama, M., A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: Roles of Neclear Factor-kB and Bcl-2., **J Neurochem**, 75(2) 683-693(2000)
23. Kondo, M., Sumino, R., Okado, H., Expression of AMPA receptors in rat superior colliculus and effect of orbital enucleation., **Brain Res**, 883(2) 238-242 (2000)

A04-09 程　肇

1. Hida, A., Koike, N., Hirose, M., Hattori, M., Sakaki, Y., Tei, H. The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription. **Genomics 65, 224-233, (2000).**
2. Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. **Science 288, 682-685, (2000).**
3. Stokkan, K-A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. **Science 291, 490-493, (2001).**
4. Abe, M., Herzog, ED., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki ,Y., Menaker, M., Block, G. D.
Circadian rhythms in isolated brain region. **J Neuroscience 22, 350-356, (2002).**
5. Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., Block, G. D. Effects of aging on the circadian rhythms of central and peripheral mammalian clocks. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10801-10806, (2002).**
6. Constance, C. M., Green, C. B., Tei, H., Block, G. D. Bulla gouldiana period exhibits unique regulation at the mRNA and protein levels. **J. Biol. Rhythms 17, 413-427, (2002).**
7. Kojima, S., Hirose, M., Tokunaga, K., Sakaki, Y., Tei, H. Structural and functional analysis of 3'-untranslated region of mouse Period1 mRNA. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 301, 1-7, (2003).**
8. Herzog, ED., Aton, SJ., Numano, .R, Sakaki, Y., Tei, H. Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. **J. Biol. Rhythms. 19, 35-46, (2004).**

A04-10 塩坂 貞夫

[1] Horinouchi, K., Nakamura, Y., Yamanaka, H., Watabe, T. and Shiosaka, S., Distribution of L1-cam mRNA in the adult mouse brain: in situ hybridization and northern blot analysis, **J Comp Neurol** in

press (2004).
[2] Shiosaka, S., Serine proteases regulating synaptic plasticity, **Anat Sci Int,** 79 137-44 (2004).
[3] Kirihara, T., Matsumoto-Miyai, K., Yukiko Nakamura, Sadayama, T., Yoshida, S. and Shiosaka, S., Prolonged Recovery of UVB-irradiated Skin in Neuropsin (KLK8)-Deficient Mice, **Bri.J.Dermatol.,** 149 700-706 (2003).
[4] Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y. and Shiosaka, S., NMDA-Dependent Proteolysis of Presynaptic Adhesion Molecule L1 in the Hippocampus by Neuropsin, **J. Neurosci.,** 23 7727-7736 (2003).
[5] Munakata, H., Nakamura, Y., Matsumoto-Miyai, K., Itoh, K., Yamasaki, H. and Shiosaka, S., Distribution and densitometry mapping of L1-CAM Immunoreactivity in the adult mouse brain - light microscopic observation, **BMC Neurosci,** 4 7. (2003).
[6] Kuwae, K., Matsumoto-Miyai, K., Yoshida, S., Sadayama, T., Yoshikawa, K., Hosokawa, K. and Shiosaka, S., Epidermal expression of serine protease, neuropsin (KLK8) in normal and pathological skin samples, **Mol Pathol,** 55 235-241. (2002).
[7] Matsumoto-Miyai, K., Kitagawa, R., Ninomiya, A., Momota, Y., Yoshida, S. and Shiosaka, S., Decidualization induces the expression and activation of an extracellular protease neuropsin in mouse uterus, **Biol Reprod,** 67 1414-8. (2002).
[8] Oka, T., Hakoshima, T., Itakura, M., Yamamori, S., Takahashi, M., Hashimoto, Y., Shiosaka, S. and Kato, K., Role of loop structures of neuropsin in the activity of serine protease and regulated secretion, **J Biol Chem,** 277 14724-30 (2002).
[9] He, X.P., Shiosaka, S. and Yoshida, S., Expression of neuropsin in oligodendrocytes after injury to the CNS, **Neurosci Res,** 39 455-62. (2001).
[10] Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Yoshida, N. and Shiosaka, S., Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin- deficient mice, **Mol Cell Neurosci,** 17 600-10. (2001).
[11] Kato, K., Kishi, T., Kamachi, T., Akisada, M., Oka, T., Midorikawa, R., Takio, K., Dohmae, N., Bird, P.I., Sun, J., Scott, F., Miyake, Y., Yamamoto, K., Machida, A., Tanaka, T., Matsumoto, K., Shibata, M. and Shiosaka, S., Serine proteinase inhibitor 3 and murinoglobulin I are potent inhibitors of neuropsin in adult mouse brain, **J Biol Chem,** 276 14562-71. (2001).
[12] Kato, K., Masa, T., Tawara, Y., Kobayashi, K., Oka, T., Okabe, A. and Shiosaka, S., Dendritic aberrations in the hippocampal granular layer and the amygdalohippocampal area following kindled-seizures, **Brain Res,** 901 281-95. (2001).
[13] Oka, T., Akisada, M., Okabe, A., Sakurai, K., Shiosaka, S. and Kato, K., Extracellular serine protease neuropsin (KLK8) modulates neurite outgrowth and fasciculation of mouse hippocampal neurons in culture, **Neurosci Lett,** 321 141-4. (2001).
[14] Okabe, A., Tawara, Y., Masa, T., Oka, T., Machida, A., Tanaka, T., Matsuhashi, H., Shiosaka, S. and Kato, K., Differential expression of mRNAs for sialyltransferase isoenzymes induced in the hippocampus of mouse following kindled seizures, **J Neurochem,** 77 1185-97. (2001).
[15] Shimizu-Okabe, C., Yousef, G.M., Diamandis, E.P., Yoshida, S., Shiosaka, S. and Fahnestock, M., Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain, **Neuroreport,** 12 2747-51. (2001).
[16] Tani, N., Matsumoto, K., Ota, I., Yoshida, S., Takada, Y., Shiosaka, S. and Matsuura, N., Effects of fibronectin cleaved by neuropsin on cell adhesion and migration, **Neurosci Res,** 39 247-51. (2001).
[17] Diamandis, E.P., Yousef, G.M., Clements, J., Ashworth, L.K., Yoshida, S., Egelrud, T., Nelson, P.S., Shiosaka, S., Little, S., Lilja, H., Stenman, U.H., Rittenhouse, H.G. and Wain, H., New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family, **Clin Chem,** 46 1855-8. (2000).
[18] Hashimoto, R., Nakamura, Y., Komai, S., Kashiwagi, Y., Matsumoto, N., Shiosaka, S. and Takeda, M., Phosphorylation of neurofilament-L during LTD, **Neuroreport,** 11 2739-42. (2000).
[19] Hashimoto, R., Nakamura, Y., Komai, S., Kashiwagi, Y., Tamura, K., Goto, T., Aimoto, S., Kaibuchi, K., Shiosaka, S. and Takeda, M., Site-specific phosphorylation of neurofilament-L is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the apical dendrites during long-term potentiation, **J Neurochem,** 75 373-82. (2000).

[20] Komai, S., Matsuyama, T., Matsumoto, K., Kato, K., Kobayashi, M., Imamura, K., Yoshida, S., Ugawa, S. and Shiosaka, S., Neuropsin regulates an early phase of Schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus, **Eur J Neurosci**, 12 1479-86. (2000).
[21] Shiosaka, S. and Yoshida, S., Synaptic microenvironments--structural plasticity, adhesion molecules, proteases and their inhibitors, **Neurosci Res**, 37 85-9. (2000).
[22] Yoshida, S., Hirata, A., Inoue, N. and Shiosaka, S., Assignment of the neuropsin gene (Prss19) to mouse chromosome band 7B4 by in situ hybridization, **Cytogenet Cell Genet**, 88 97-8 (2000).

A04-12 渡邉 和忠

1. Miyata, S., Akagi, A.,Hayashi, N., Watanabe, K. & Oohira, A.: Activity-dependent regulation of a chondroitin sulfate proteoglycan 6B4 phosphacan/RPTPbeta in the hypothalamic supraoptic nucleus. **Brain Res.**, 1017, 163-171 (2004).
2. Cui, X.-Y. et al., Hu, Q.-D., Tekaya, M., Shimoda, Y., et al., Watanabe, K., Arsenijevic, Y. & Xiao, Z.-C.: NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. **J. Biol. Chem.** 279, 25858-25865 (2004).
3. Masuda, T., Fukamauchi, F., Takeda, Y., Fujisawa, H., Watanabe, K., Okado, N. & Shiga, T.: Developmental regulation of notochord-derived repulsion for dorsal root ganglion axons. **Mol. Cell. Neurosci.**, 25, 217-227 (2004)
4. Hu, Q.-D. et al., Watanabe, K. & Xiao Z.-C. (24名) : F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. **Cell**, 115, 163-175 (2003).
5. Nie, D.-Y. et al., Watanabe, K., Pallen, C., Tang, B. L. & Xiao, Z.-C. (19名): Nogo-A at CNS paranodes is a ligand of Caspr/paranodin: possible regulation of K^+ channel localization. **EMBO J.**, 22, 1-13 (2003).
6. Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., Girault, J. A. & Karagogeos, D.: Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. **J. Cell Biol.**, 162, 1161-1172 (2003).
7. Li, H., Takeda, Y., Niki, H., Ogawa, J., Kobayashi, S., Kai, N., Akasaka, K., Asano, M., Sudo, K., Iwakura, Y. & Watanabe, K.: Aberrant responses to acoustic stimuli in mice deficient for neural recognition molecule NB-2. **Eur. J. Neurosci.**, 17, 929-936 (2003).
8. Takeda, Y., Akasaka, K., Lee, S., Kobayashi, S., Kawano, H., Murayama, S., Takahashi, N., Hashimoto, K., Kano, M., Asano, M., Sudo, K., Iwakura, Y. & Watanabe, K.: Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup. **J. Neurobiol.**, 56, 252-265 (2003).
9. Sakamoto, T., Kawazoe, Y., Shen, I.-S., Takeda, Y., Arakawa, Y., Ogawa, J., Oyanagi, K., Ohashi, T., Watanabe, K., Inoue, K., Eto, Y. & Watabe, K.: Adenoviral gene transfer of GDNF, BDNF and TGFβ2, but not CNTF, Cardiotrophin-1 or IGF1, protects injured adult motoneurons after facial nerve avulsion. **J. Neurosci. Res.**, 72, 54-64 (2003).
10. Kasahara, K., Watanabe, K., Kozutsumi, Y., Oohira, A., Yamamoto, T. and Sanai, Y.: Association of GPI-anchored protein TAG-1 with Src-family kinase Lyn in lipid rafts of cerebellar granule cells. **Neurochem. Res.**, 27, 823-829 (2002).
11. Ando, S., Kobayashi, S., Waki, H., Kon, K., Fukui, F., Tadenuma, T., Iwamoto, M., Takeda, Y., Izumiyuama, N., Watanabe, K. & Nakamura, H. : Animal model of dementia induced by entorhinal synaptic damage and partial restoration of cognitive deficits by BDNF and Carnitine. **J. Neurosci. Res.**, 70, 519-527 (2002).
12. Nagata, S., Saito, R., Yamada, Y., Watanabe, K. & Fujita, N.: Multiple variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase β are expressed in the central nervous system of Xenopus. **Gene**, 262, 81-88 (2001).
13. Fukamauchi, F., Aihara, O., Wang, Y. J., Akasaka, K., Takeda, Y., Sudo, K., Asano, M., Kawano, H., Watanabe, K. & Iwakura, Y.: TAG-1 deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the hippocampus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 281, 220-226 (2001).
14. Miyata, S., Takamatsu, H., Maekawa, S., Matsumoto, N., Watanabe, K., Kiyohara, T. & Hatton, I. G.: Plasticity of neurohypophysial terminals with increased hormonal release during dehydration: Ultrastructural and biochemical analyses. **J. Comp. Neurol.**, 434, 413-427 (2001).

15. Ogawa, J., Lee, S., Itoh, K., Nagata, S., Machida, T., Takeda, Y. & Watanabe, K.: Neural recognition molecule NB-2 of the contactin/F3 subgroup in rat: Specificity in neurite outgrowth-promoting activity and restricted expression in the brain regions. J. Neurosci. Res., 65, 100-110 (2001).
16. Fujita, N., Saito, R., Watanabe, K. & Nagata, S.: An essential role of the neuronal cell adhesion molecule contactin development of the Xenopus primary sensory system. Dev. Biol., 221, 308-320 (2000).
17. Lee, S., Takeda, Y., Kawano, H., Hosoya, H., Nomoto, M., Fujimoto, D., Takahashi, N. & Watanabe, K.: Expression and regulation of a gene encoding neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup in mouse brain. Gene, 245, 253-266 (2000).
18. Kamei, Y., Takeda, Y., Tsutsumi, O., Taketani, Y. & Watanabe, K.: Human NB-2 of the contactin/F3 subgroup molecules: Chromosomal localization of the gene and distinct expression pattern from the other subgroup members. Genomics, 69, 113-119 (2000).
19. Kasahara, K., Watanabe, K., Takeuchi, K., Kaneko, H., Oohira, A., Yamamoto, T. & Sanai, Y.: Regulation of GPI-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 signaling by gangliosides in lipid rafts. J. Biol. Chem., 275, 34701-34709 (2000).

A04-13 浜 千尋

1. Awasaki, T., Saito, M., Sone, M., Suzuki, E., Sakai, R., Ito, K., and Hama, C. The *Drosophila* Trio Plays an Essential Role in Patterning of Axons by Regulating Their Directional Extension. (2000) Neuron *26*, 119-131.
2. Sone, M., Suzuki, E., Hoshino, M., Hou, D., Kuromi, H., Fukata, F., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Nabeshima, Y. and Hama, C. Synaptic development is controlled in the periactive zones of *Drosophila* synapses. (2000) Development *127*, 4157-4168.
3. Saito, M., Awasaki, T., Hama, C. Genetic analyses of essential genes in cytological region 61D1-2 to 61F1-2 of *Drosophila melanogaster*. (2002) Mol Gen Genomics 268: 446-454.

A04-14 森 寿

1) Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor ε1 subunit. Miyamoto Y. Yamada, K. Noda, Y. Mori H. Mishina M. Nabeshima, T. J. Neurosci. 21 : 750-757, 2001.
2) Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule. Nakamura K. Manabe T. Watanabe M. Mamiya T. Ichikawa R. Kiyama Y. Sanbo M. Yagi T. Inoue Y. Nabeshima T. Mori H, Mishina M. Eur. J. Neurosci., 13 : 179-189, 2001
3) Classical eyeblink conditioning in glutamate receptor subunit δ2 mutant mice is impaired in the delay paradigm but not in the trace paradigm. Kishimoto Y. Kawahara S. Suzuki M. Mori H. Mishina M. Kirino Y. Eur. J. Neurosci., 13 : 1249-1253, 2001.
4) Long-trace interval eyeblink conditioning is impaired in mutant mice lacking the NMDA receptor subunit ε1. Kishimoto Y. Kawahara S. Mori H. Mishina M. Kirino Y. Eur. J. Neurosci., 13 : 1221-1227, 2001.
5) Roles of the glutamate receptor ε2 and δ2 subunits in the potentiation and prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. Takeuchi T. Kiyama Y. Nakamura K. Tsujita M. Matsuda I. Mori H. Munemoto Y. Kuriyama H. Natsume R. Sakimura K. Mishina M. Eur. J. Neurosci., 14 : 153-160, 2001.
6) Impairment of eyeblink conditioning in GluRδ2 mutant mice depends on the temporal overlap between conditioned and unconditioned stimuli.Kishimoto Y. Kawahara S. Fujimichi R. Mori H. Mishina M. Kirino Y. Eur. J. Neurosci., 14 : 1515-1521, 2001.
7) Scopolamine impairs eyeblink conditioning in cerebellar LTD-deficient mice. Takatsuki K. Kawahara S. Mori H. Mishina M. Kirino,Y. NeuroReport 13 : 159-162, 2002.
8) Lower sensitivity to stress and altered monoaminergic neuronal function in mice lacking the NMDA receptor ε4 Subunit. Miyamoto Y. Yamada K. Noda Y. Mori H. Mishina M. Nabeshima T. J. Neurosci. 22 : 2335-2342, 2002.
9) Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting. Takeuchi T. Nomura T. Tsujita M. Suzuki M. Fuse T. Mori H. Mishina M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 293 :

953-957, 2002.

10) Isolation and characterization of Golgi apparatus-specific GODZ with the DHHC zinc finger domain. Uemura T. Mori H. Mishina M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 296 : 492-496, 2002.

A04-15 萩原 正敏

1. Wada, K., Sakaguchi, H., Jarvis, E., and Hagiwara, M. (2004) Differential expression of glutamate receptors in avian neural pathways for learned vocalization. **J. Comp. Neurol.** 476, 44-64.

2. Muraki, M., Ohkawara, B., Hosoya, T., Onogi, H., Koizumi, J., Koizumi, T., Sumi, K., Yomoda, J., Murray, M. V., Kimura, K., Furuichi, K., Shibuya, H., Krainer, A. R., Suzuki, M. and Hagiwara, M. (2004) Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. **J. Biol. Chem.** 279, 24246-24254.

3. Takano, M., Koyama, Y., Ito, H., Hoshino, S., Onogi, H., Hagiwara, M., Furukawa, K. and Horigome, T (2004) Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in Xenopus egg extracts. **J. Biol. Chem.** 279, 13265-13271.

4. Suzuki, H., Wu, JH, , Hossain, K., Ohhata, T., Du, J., Akhand, AA., Hayakawa, A., Kimura, H., Hagiwara , M., &Nakashima, I. (2003) Involvement of MKK6 in TCRa beta(int)CD69(lo):a target population for apoptotic cell death in thymocytes. **FASEB J.** 17-1538-40

5. Katsu, R., Onogi, H., Wada, K., Kawaguchi, K. & Hagiwara, M. (2002) Novel SR-related protein Clasp specifically interacts with inactivated Clk4 and induces the exon EB inclusion of Clk. **J. Biol. Chem.** 277, 44220-44228.

6. Suzuki, T., Yamakuni , T., Hagiwara, M. , & Ichinose, H. (2002) Identification of ATF-2 as a Transcriptional Regulator for the Tyrosine Hydroxylase Gene. **J. Biol. Chem.** 277, 40768-40774.

7. Kimura, Y., Corcoran, E.E., Eto K., Gengyo-Ando, K., Muramatsu, M., Kobayashi, R., Freedman, J.H., Mitani, S., Hagiwara, M., Means, A.R., & Tokumitsu H. (2002) A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of Caenorhabditis elegans. **EMBO Rep.** 3, 962-966.

8. Zama, Z., Aoki, R., Kamimoto, T., Inoue, K., Ikeda, Y. & Hagiwara M. (2002) A novel dual-specificity phosphatase SKRP1 interacts with the MAPKK MKK7 and inactivates the JNK MAPK pathway: Implication for the precise regulation of the particular MAPK pathway. **J. Biol. Chem.** 277, 23909-23918.

9. Zama, Z., Aoki, R., Kamimoto, T., Inoue, K., Ikeda, Y. & Hagiwara M. (2002) Scaffold role of a MAP linase phosphatase, SKRP1 for the JNK signaling pathway. **J. Biol. Chem.** 277, 23919-23926.

10. Kamimoto, T., Zama, T., Aoki, R., Muro, Y. & Hagiwara, M. (2001) Identification of a novel kinesin-related protein, KRMP1, as a target for mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1. **J. Biol. Chem.** 276, 37520-37528.

11. Kojima, T., Zama, T., Wada, K., Onogi, H. & Hagiwara, M. (2001) Cloning of Human PRP4 Reveals Interaction with Clk1. **J. Biol. Chem.** 276, 32247-32256.

12. Aratani, S., Fujii, R., Oishi, T., Fujita, H., Amano, T., Ohshima, T., Hagiwara, M., Fukamizu, A. & Nakajima, T. (2001) Dual roles of RNA helicase A on CREB-dependent transcription. **Mol. Cell. Biol.**, 21, 4460-4469.

13. Muro, Y., Kamimoto, T., Tomita, Y., and Hagiwara, M., (2000) Spectrum of autoantibodies against a dynamin-related protein, dymple. **Arthritis Rheumatism** 43, 7, 1516-1519.

14. Inoue, K., Mizuno, T., Wada, K. & Hagiwara, M. (2000) Novel RING finger proteins, Airlp and 2p interact with Hmtlp and inhibit the arginine methylation of Np13p. **J. Biol. Chem.** 275, 32793-32799.

15. Nagai, Y., Miyazaki, M., Aoki, R., Zama, T., Inoue, S., Hirose, K., Iino, M. & Hagiwara, M, (2000) A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo. **Nat. Biotechnol.** 18, 313-316.

A04-16 澤口 俊之

Tsujimoto, S. and Sawaguchi, T. Neuronal activity representing temporal prediction of reward in the primate prefrontal cortex. **Journal of Neurophysiology** (2005) in press

1) Tsujimoto, S. and Sawaguchi, T. Context-dependent Representation of Response-outcome in Monkey Prefrontal Neurons. **Cerebral Cortex**, (2005) in press

2) Tsujimoto, S. and Sawaguchi, T. Properties of delay-period neuronal activity in the primate prefrontal cortex during memory-and sensory-guided saccade tasks. **European Journal of Neuroscience**, 19:447-457(2004)

3) Tsujimoto, S. and Sawaguchi, T. Neuronal representation of response-outcome in the primate

prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, 14:47-55(2004)
4) Iba, M. and Sawaguchi, T. Involvement of the dorsolateral prefrontal cortex of monkeys in visuospatial target selection. **Journal of Neurophysiology**, 8:587-599(2003)
5) Iba, M. and Sawaguchi, T. Neuronal activity representing visuospatial mnemonic processes associated with target selection in the monkey dorsolateral prefrontal cortex. **Neuroscience Research**, 43:9-22(2002)
6) Sawaguchi, T. and Iba, M. Prefrontal cortical representation of visuospatial working memory in monkeys examined by local inactivation with muscimol. **Journal of Neurophysiology**, 86:2041-2053(2001)

A04-17 飯野 雄一

1. Saeki, S., Yamamoto, M., Iino, Y.
"Plasticity of chemotaxis revealed by the paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*" **J. Exp. Biol.**, 204, 1757-1764 (2001)
2. Hanazawa, M., Mochii, M., Ueno, N., Kohara, Y., Iino, Y.
"Use of cDNA subtraction and RNA interference screens in combination reveals genes required for germ-line development in *Caenorhabditis elegans*" **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98, 8686-8691 (2001)
3. Ishihara, T., Iino, Y., Mori, I., Gengyo-Ando, K., Mitani S. and Katsura, I. "HEN-1, a secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*" **Cell**, 109, 639-649 (2002)
4. Hanazawa, M., Kawasaki, I., Kunitomo, H., Gengyo-Ando, K., Bennett, K. L., Mitani, S. and Iino, Y. "The *Caenorhabditis elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1" **Mech. Dev.**, 121, 213-24 (2004)
Kunitomo, H., Uesugi, H., Kohara, Y. and Iino, Y. Identification of ciliated sensory neuron-expressed genes in *Caenorhabditis elegans* using targeted pull-down of poly(A) tails. **Genome Biology** 6(2) R17 (2005)
Hirotsu, T. and Iino, Y. Neural circuit-dependent odor adaptation in *C. elegans* is regulated by the Ras-MAPK pathway. **Genes to Cells** (2005) in press

A04-18 窪田 芳之

1. Kubota Y and Kawaguchi Y Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneurons type and target size. **J. Neuroscience** 20 (2000) 375-386
2. Karube F, Kubota Y and Kawaguchi Y Axon Branching and Synaptic Bouton Phenotypes in GABAergic Nonpyramidal Cell Subtypes J. Neuroscience 24 (2004) 2853-2865

A04-20 白澤 卓二

1. Yan, J., Kuroyanagi, H., Tomemori, T., Okazaki, N., Asato, K., Matsuda, Y. i., Suzuki, Y. i., Ohshima, Y., Mitani, S., Masuho, Y., Shirasawa, T., and Muramatsu, M. (1999). Mouse ULK2, a novel member of the UNC-51-like protein kinases: unique features of functional domains. Oncogene 18, 5850-5859.
2. Yan, J., Kuroyanagi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Tokumitsu, H., Tomoda, T., Shirasawa, T., and Muramatsu, M. (1998). Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to C. elegans UNC-51. Biochem Biophys Res Commun 246, 222-227.
3. Tomoda, T., Bhatt, R. S., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., and Hatten, M. E. (1999). A mouse serine/threonine kinase homologous to C. elegans UNC51 functions in parallel fiber formation of cerebellar granule neurons. Neuron 24, 833-846.
4. Kuroyanagi, H., Yan, J., Seki, N., Yamanouchi, Y., Suzuki, Y., Takano, T., Muramatsu, M., and Shirasawa, T. (1998). Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of Caenorhabditis elegans: cDNA cloning, expression, and chromosomal assignment. Genomics 51, 76-85.

A04-21 曽良 一郎

1. Murphy DL, Uhl GR, Holmes A, Ren-Patterson R, Hall FS, Sora I, Detera-Wadleigh S, Lesch KP. Experimental gene interaction studies with SERT mutant mice as models for human polygenic and epistatic traits and disorders. **Genes Brain Behav** 2(6): 350-364 (2003)

2. Hall FS, Sora I, Uhl GR. Sex-dependent modulation of ethanol consumption in vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and dopamine transporter (DAT) knockout mice. **Neuropsychopharmacology** 28: 620-628 (2003)
3. Hall FS, Li XF, Goeb M, Roff R, Hoggatt H, Sora I, Uhl GR. Congenic C57BL/6 mu opiate receptor (MOR) knockout mice: baseline and opiate effects. **Genes Brain Behav** 2: 114-121 (2003)
4. Yuyama K, Yamamoto H, Nakamura K, Nrshizaki I, Yamakuni T, Si-Young Song, Sora I, Nagatsu T, Yamamoto T. Overexpression of V-1 prevents NO-induced cell death: involvement of enhanced tetrahydrobiopterin (BH_4) biosynthesis. **J Neurosci Res** 72(6): 716-725 (2003)
5. Yuyama K, Yamamoto H, Nishizaki I, Kato T, Sora I, Yamamoto T. Caspase-independent cell death by low concentrations of nitric oxide (NO) in PC12 cells: involvement of the inhibition of cytochrome C oxidase and the production of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria. **J Neurosci Res** 73(3): 351-363 (2003)
6. Itokawa M, Arai M, Kato S, Ogata Y, Furukawa A, Haga S, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T. Association between a novel polumorphism in the promoter region of the neuropeptide Y gene and schizophrenia in humans. **Neurosci Lett** 347: 202-204 (2003)
7. Ujike H, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Sekine Y, Sora I, Iyo M, Katsu T, Nomura A, Nakata K, Ozaki N. Nine-or fewer repeat alleles in VNTR polymorphism of the dopamine transporter gene is a strong risk factor for prolonged methamphetamine psychosis. **Pharmacogenomics J** 3(4): 242-247 (2003)
8. Mizoguchi H, Wu HE, Narita M, Sora I, Hall FS, Uhl GR, Loh HH, Nigase H, Tseng F. Lack of the mu-opioid receptor-mediated G-protein activation in the mouse spinal cord lacking exon1 and exon 2 & 3 of MOR-1 gene. **J Pharmacol Sci** 93: 423-429 (2003)
9. Hall FS, Goeb M, Li XF, Sora I, Uhl GR. Mu opioid receptor knockout mice display reduced cocaine conditioned place preference but enhanced sensitization of cocaine-induced locomotion. **Brain Res Mol Brain Res** 121(1-2): 123-130 (2004)
10. Koizumi H, Hashimoto K, Kumakiri C, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Takei N, Iyo M. Association between the glutathione S-transferase M1 gene deletion and female methamphetamine abusers. **Am J Med Genet** 126B(1): 43-45 (2004)
11. Yamamoto T, Nishizaki I, Nukada T, Kamegaya F, Furuya S, Hirabayashi Y, Ikeda K, Hata H, Kobayashi H, Sora I, Yamamoto H. Functional identification of ASCT1 neutral amino acid transporter as the predominant system for the uptake of L-serine in rat neurons in primaryculture. **Neurosci Res** 49(1): 101-111 (2004)
12. Mansikka H, Zhao C, Sheth RN, Sora I, Uhl GR, Raja SN. Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice. **Anesthesiology** 100(4): 912-921 (2004)
13. Arai M, Itokawa M, Yamada K, Toyota T, Arai M, Haga S, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T. Association of neural cell adhesion molecule 1gene polymorphisms with bipolar affective disorder in Japanese individuals. **Biol Psychiatry** 55(8): 804-810 (2004)
14. Kockelkorn TT, Arai M, Matsumoto H, Fukuda N, Yamada K, Minabe Y, Toyota T, Ujike H, Sora I, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M. Association study of polymorphisms in the 5' upstream region of human DISC1 gene with schizophrenia. **Neurosci Lett** 16 368(1): 41-45 (2004)
15. Shen H, Hagino Y, Kobayashi H, Shinohara-Tanaka K, Ikeda K, Yamamoto H, Yamamoto T, Lesch KP, Murphy DL, Hall FS, Uhl GR, Sora I. Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by in vivo microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. **Neuropsychopharmacology** 29(10): 1790-1799 (2004)
16. Ide S, Minami M, Satoh M, Uhl GR, Sora I, Ikeda K. Buprenorphine antinociception is abolished, but naloxone-sensitive reward is retained, in mu-opioid receptor knockout mice. **Neuropsychopharmacology** 29(9): 1656-1663 (2004)
17. Yamamoto H, Imai K, Takamatsu Y, Kamegaya E, Hara Y, Shimada K, Yamamoto T, Shen HW, Hagino Y, Kobayashi H, Ide S, Sora I, Koga H, Ikeda K. Changes in expression of the mouse homologues of KIAA genes after subchronic methamphetamine treatment. **Ann New York Acad Sci** 1025: 92-101 (2004)
18. Han W, Ide S, Sora I, Yamamoto H, Ikeda K. A possible genetic mechanism underlying individual and interstrain differences in opioid actions: focus on the mu opioid receptor gene. **Ann New York Acad Sci** 1025: 370-375 (2004)

19. Ide S, Kobayashi H, Tanaka K, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Ikeda K, Sora I. Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers. **Ann New York Acad Sci** 1025: 315-324 (2004)
20. Hironaka N, Ikeda K, Sora I, Uhl GR, Niki H. Food-reinforced operant behavior in dopamine transporter knockout mice: enhanced resistance to extinction. **Ann New York Acad Sci** 1025: 140-145 (2004)
21. Kobayashi H, Ide S, Hasegawa J, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Shen HW, Ikeda K, Sora I. Study of association between alfa-synuclein gene polymorphism and methamphetamine psychosis/ dependence. **Ann New York Acad Sci** 1025: 325-334 (2004)
22. Numachi Y, Yoshida S, Yamashita M, Fujiyama K, Naka M, Matsuoka H, Sato M, Sora I. Psychostimulant alters expression of DNA methyltransferase mRNA in the rat brain. **Ann New York Acad Sci** 1025: 102-109 (2004)
23. Hall FS, Sora I, Drgonova J, Li XF, Goeb M, Uhl GR. Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. **Ann New York Acad Sci** 1025: 47-56 (2004)
24. Ide S, Kobayashi H, Tanaka K, Ujike H, Ozaki N, Sekine Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Iwata N, Shen H, Iwahashi K, Itokawa M, Minami M, Satoh M, Ikeda K, Sora I. Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers. **Pharmacogenomics J** *in press*

A04-22 上野 照子

Tran AH. Tamura R. Uwano T. Kobayashi T. Katsuki M. Ono T. Dopamine D1 receptors involved in locomotor activity and accumbens neural responses to prediction of reward associated with place. **Proc Natl Acad Sci USA** (2005) 102, 2117-2122.
1. Kuriwaki J. Nishijo H. Kondoh T. Uwano T. Torii K. Katsuki M. Ono T. Comparison of brain activity between dopamine D2 receptor-knockout and wild mice in response to dopamine agonist and antagonist assessed by fMRI. **NeuroSignals** 13:227-40, 2004.
2. Kurimoto H. Nishijo H. Uwano T. Yamaguchi H. Zhong YM. Kawanishi K. Ono T. Effects of nonsaponin fraction of red ginseng on learning deficits in aged rats. **Physiol Behav.** 82:345-55, 2004.
3. Nishijo H. Uwano T. Zhong YM. Ono T. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: effects of red ginseng on learning and memory deficits in an animal model of amnesia. **J Pharmacol Sci** 95:145-52, 2004.
4. Fukuda, Y., Yamamura, J., Uwano, T., Nishijo, H., Kurokawa, M., Fukuda, M., Ono, T. and Shiraki K. Regulated transgene delivery by ganciclovir in the brain without physiological alterations by a live attenuated herpes simplex virus vector. **Neurosci Res.** 45:233-41, 2003.

A04-23 少作 隆子

1. T. Ohno-Shosaku, M. Matsui, Y. Fukudome, J. Shosaku, H. Tsubokawa, M. M. Taketo, T. Manabe, M. Kano Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus, Eur. J. Neurosci. 18: 109-116, 2003年7月
2. M. Kano, T. Ohno-Shosaku, T. Maejima, T. Yoshida, K. Hashimoto, Retrograde modulation of synaptic transmission mediated by endogenous cannabinoids, Curr. Neuropharmacol. 2: 49-57, 2004年
3. Y. Fukudome, T. Ohno-Shosaku, M. Matsui, Y. Omori, M. Fukaya, H. Tshubokawa, M. M. Taketo, M. Watanabe, T. Manabe, M. Kano, Two distinct classes of muscarinic action on hipppocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signaling, Eur. J. Neurosci. 19: 2682-2692, 2004年5月
4. 少作隆子, 狩野方伸, マリファナ類似物質の逆行性伝達物質としての役割, Molecular Medicine 41: 1087-1094, 2004年8月
5. M. Yamazaki, T. Ohno-Shosaku, M. Fukaya, M. Kano, M. Watanabe & K. Sakimura, A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity. Neurosci. Res. 2004年12月
Hashimotodani Y, Ohno-Shousaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, Araishi K, Shin HS & Kano M. (2005) Phospholipase Cbeta serves as a coincidence detector through its Ca2+ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. **Neuron.** 2005 Jan 20;45(2):257-68.

A04-24 加藤 啓子

1. Matsuhashi, H., Horii Y., and Kato, K. (2002) Region-specific and epileptogenic-dependent expression of six subtypes of ・2, 3-sialyltransferase in the adult mouse brain. **J Neurochem**, 84:

53-66..
2. Kishi T., Matsuhashi H., Bird, P. I., and Kato, K. (2002) Distribution of serine proteinase inhibitor, clade B, member 6 (*Serpinb6*) in the adult mouse brain. **Gene Expression Patterns**, 1: 175-180.
3. Oka T., Hakoshima, T., Itakura, M., Yamamori, S., Takahashi, M., Hashimoto, Y., Shiosaka S., and Kato K. (2002) Role of loop structures of neuropsin (KLK8) in activity of serine protease and regulated secretion. **J Biol Chem**, 277: 14724-14730
4. Oka, T., Akisada, M., Okabe, A., Sakurai, K., and Shiosaka, S., and Kato, K. (2002) Extracellular serine protease neuropsin (KLK8) modulates neurite outgrowth and fasciculation of mouse hippocampal neurons in culture. **Neurosci. Lett**, 321:141-144.
5. Kato, K., Kishi, T., Kamachi T., Akisada, M., Oka, T., Midorikawa, R., Takio, K., Dohmae, N., Bird, P. I., Sun, J., Scott, F., Miyake, Y., Yamamoto, K., Machida, A., Tanaka, T., Matsumoto, K., Shibata, M., and Shiosaka, S. (2001) Serine proteinase inhibitor 3 and murinoglobulin I are potent inhibitors of neuropsin in adult mouse brain. **J Biol Chem**, 276:14562-14571.
6. Okabe, A., Tawara, Y., Masa, T., Oka, T., Machida, A., Tanaka, T., Matsuhashi, H., Shiosaka, S., and Kato, K. (2001) Differential expression of mRNAs for sialyltransferase isoenzymes induced in the hippocampus of mouse following kindled-seizures. **J Neurochem**, 77:1-14.
7. Kato, K., Masa, T., Tawara, Y., Kobayashi, K., Oka, T., Okabe, A., and Shiosaka, S. (2001) Dendritic aberrations in the hippocampal granular layer and the amygdalohippocampal area following kindled-seizures. **Brain Res**, 901:281-95.

A04-25 奥谷 文乃

1. Okutani F, Zhang J-J, Ohtsuka T, Yagi F, Kaba H: Modulation of olfactory learning in young rats through intrabulbar $GABA_B$ receptors. **European Journal of Neuroscience, 18,** 2031-2036, 2003
2. Zhang J-J, Okutani F, Inoue S, Kaba H: Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway leading to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation is required for the long-term facilitation process of aversive olfactory learning in young rats. **Neuroscience, 121,** 9-16, 2003
3. Zhang J-J, Okutani F, Inoue S, Kaba H: Activation of the cyclic AMP response element-binding protein signaling pathway in the olfactory bulb is required for the acquisition of olfactory aversive learning in young rats. **Neuroscience, 117,** 707-713, 2003

A04-26 西 真弓

1. Tanaka M, Nishi M, Morimoto M, Kawata M: Nuclear import of glucocorticoid receptor in association with importin α and importin β: Analysis with real-time fluorescence imaging and fluorescence resonance energy transfer in living cells. **Endocrinology** 144: 4070-4079, 2003
2. Sunaguchi M, Nishi M, Mizobe T, Kawata M: Real-time imaging of β2 adrenergic receptor in living cell. **Brain Res** 984: 21-32, 2003
3 Ochiai I, Matsuda K, Nishi M, Ozawa H, Kawata M: Imaging analysis of subcellular correlation of androgen receptor and estrogen receptor α in single living cells using GFP color variants. **Mol Endocrinol** 18: 26-42, 2004
4. Kumar S, Chaturvedi NK, Nishi M, Kawata M, Tyagi RK: Shuttling components of nuclear import machinery involved in nuclear translocation of steroid recptors exit nucleus via exportin-1/CRM-1 independent pathway. **Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res** 1691: 73-77, 2004
5. Nishi M, Tanaka M, Matsuda K, Sunaguchi M, Kawata M: Visualization of Glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor interactions in living cells with GFP-based fluorescent resonance energy transfer (FRET). **J Neurosci** 24: 4918-4927, 2004
6. Lu H, Nishi M, Matsuda K, Kawata M: Estrogen reduces the neurite growth of serotonergic cells expressing estrogen receptors. **Neurosci Res** 50: 23-28, 2004
7. Tanaka M, Nishi M, Morimoto M, Sugimoto T, Kawata M: Imaging analysis of mineralocorticoid receptor and importins in single living cells using GFP color variants. **Cell Tissue Res** In press
8. 河田光博、西真弓、松田賢一、落合育夫、田中政幸、宇宿智裕、韓芳、中内博夫：神経系における核内レセプターの動態、**ホルモンと臨床** 52: 98-102, 2004

口頭発表など

A01-01 大森 治紀

1. 大森治紀　神経回路による特徴抽出のメカニズム　78回日本生理学会大会　2001年3月29-31日、京都
2. 大森治紀　神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム　79回日本生理学会大会　2002月28-30日、広島
3. 大森治紀　マイクロ秒オーダーの時間差を検出するトリ聴神経核の機構　81回日本生理学会大会 2004年6月2-4日、札幌
4. Ohmori, H. Development of auditory system, 17th Winter Conference on Neural Plasticity, Feb 19-26, 2005, Guadeloupe

A01-02 小松 由起夫

1　黒谷亨，小松由紀夫：視覚野抑制性シナプス伝達の長期抑圧、及び長期増強は異なるCa^{2+}チャネルサブタイプに依存する．生理学研究所研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」2004.11.26-27（岡崎）

2　Komatsu, Y., Liu, H.N., Kurotani, T., Ren, M., Yamada, K. and Yoshimura, Y.: Presynaptic but not postsynaptic activity is required for the maintenance of NMDA receptor-independent LTP at visual cortical excitatory synapses. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004.10. 23-27 (San Diego)

3　劉紅年，黒谷亨，任鳴，山田和政，吉村由美子，小松由紀夫：視覚野興奮性シナプスにおけるNMDA受容体非依存性長期増強の活動依存的維持．第8回視覚科学フォーラム，2004.7.30-31（米子）

4　小松由紀夫：視覚野抑制性シナプスにおける長期増強とレトログレードメッセンジャー．第81回日本生理学会大会，2004.6.2-4（札幌）

5　小松由紀夫：大脳皮質視覚野における機能発達とシナプス可塑性．平成15年度名古屋工業大学計測分析センター講演会，2003.11.19（名古屋）

6　Yoshimura, Y. and Komatsu, Y.: NMDA receptor-dependent forms of excitatory LTP and inhibitory LTD depend differently on age, experience and NR2 subunits in rat visual cortex. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, 2003.11.8-12 (New Orleans)

7　Kurotani, T. and Komatsu, Y.: Postsynaptic $GABA_a$ receptor internalization underlies the expression of voltage-gated calcium channel-dependent long-term depression at inhibitory synapses in rat visual cortex. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, 2003. 11.8-12 (New Orleans)

8　小松由紀夫：大脳皮質視覚野におけるシナプス可塑性の年齢と経験依存性．第13回神経科学の基礎と臨床「後頭葉・視覚とそのネットワーク」2003.12.13 （大阪）

9　黒谷亨，吉村由美子，小松由紀夫：視覚野細胞の脱分極によりシナプス後性に発現する抑制性伝達の長期抑圧．第79回日本生理学会大会，2002.3.27-3.30 （広島）

10　吉村由美子，小松由紀夫：視覚野における２種類のNMDA受容体依存性シナプス可塑性．生理学研究所研究会「シナプス伝達制御の分子機構」2002.9.27-28（岡崎）

11　Komatsu, Y.: Activity-dependent maintenance and noradrenergic regulation of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapse. 2001年度COE国際シンポジウム" Inhibitory Neural Transmission in Development and Plasticity", 2002.2.26-28 (Okazaki)

12　吉村由美子，小松由紀夫：視覚野の興奮性と抑制性シナプスの可塑性には異なるNMDA受容体サブタイプが関与する．第24回日本神経科学会・第44回日本神経化学合同大会，2001.9.26-28（京都）

13　小松由紀夫，吉村由美子：視覚野抑制性シナプスにおける長期増強の活動依存的維持機構．第78回日本生理学会大会，2001.3.29-31（京都）

14　Yoshimura, Y., Ohmura, T. and Komatsu, Y.: Dark rearing delays age-dependent decline in NMDA receptor-independent long-term potentiation and T-type Ca^{2+} channel currents in rat visual cortex. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, 2000.11.4-9 (New Orleans)

15　Komatsu, Y. and Yoshimura, Y.: Necessity for presynaptic activity to maintain long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, 2000.11. 4-9 (New Orleans)

A01-03 立花 政夫

1）石金 浩史、立花 政夫（2000）カエル網膜神経節細胞群の周期的・同期的発火．第77回日本生理学会大会（横浜）3月．

2）立花 政夫、石金 浩史（2000）カエル網膜神経節細胞における同期的・周期的スパイク発火の神経機構．第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会大会合同大会（横浜）9月．

3） 松井広、立花政夫 （2000）マウス網膜アマクリン細胞に対するグルタミン酸作動性シナプス入力の制御. 第23回日本神経科学会大会（横浜）9月.
4） 石金浩史、雁木美衣、立花政夫（2000）マウス網膜神経節細胞における運動方向選択性の形成機構. 日本基礎心理学会第19回大会（京都）12月.
5） 松井広、長谷川淳、立花政夫 （2001）$GABA_C$受容体による網膜双極細胞―アマクリン細胞間のシナプス伝達の制御. 第78回日本生理学会大会（京都）3月.
6） 石金浩史、雁木美衣、立花政夫（2001）カエル網膜ディミング検出器における周期的発火の生起と刺激依存性. 日本動物心理学会第61回大会・日本基礎心理学会第20回大会合同大会（西宮）9月.
7） 細井延武、洪鍾哲、立花政夫 （2001）代謝型グルタミン酸受容体による網膜神経節細胞光応答の調節. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会.（京都）9月.
8） バーグランド健、塚本吉彦、緑川光春、立花政夫（2001）網膜双極細胞におけるシナプス小胞の配置に対するフォルボール・エステルの効果. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会（京都）9月.
9） 河北友克、石原彰人、臼井支朗、立花政夫（2001） 網膜双極細胞シナプス終末の二相性放出現象を再現するモデル. 電気関係学会東海支部連合大会（豊橋）11月.
１０）石金浩史、吉田和道、雁木美衣、中西重忠、立花政夫(2002)網膜における運動方向選択性の形成にStarburst Amacrine Cellは必須である. 第79回日本生理学会大会（広島）3月.
１１）荒井格、杜久林、浅香知光、立花政夫（2002）カエル網膜オフ持続型神経節細胞の周期的光応答の生成機構. 第79回日本生理学会大会（広島）3月.
１２）雁木美衣、石金浩史、立花政夫(2002)カエル網膜神経節細胞の同期的周期的スパイク発火はgap junctionを阻害すると消失する. 第25回日本神経科学大会（東京）7月.
１３）立花政夫、石金浩史、雁木美衣、荒井格、浅香知光（2002）網膜神経節細胞群における空間情報のコーディング. 第25回日本神経科学大会（東京）7月.
１４）長谷川淳、諸冨浩一、立花政夫（2002）グルタミン酸トランスポーターによる網膜情報伝達の修飾. 第25回日本神経科学大会（東京）7月.
１５）細井延武、洪鍾哲、立花政夫 （2002）グループⅢ代謝型グルタミン酸受容体による視細胞電位依存性膜電流の修飾. 第25回日本神経科学大会.（東京）7月.
１６）Masao Tachibana, Hiroshi Ishikane, Mie Gangi, Itaru Arai, Tomomitsu Asaka and Jiulin Du (2002) “ Neural mechanisms of synchronous oscillations in retinal ganglion cells” The 21th Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine （東京）9月.
１７）Nobutake Hosoi, Jeongchul Hong, and Masao Tachinana (2002) “ Activation of groupⅢ metabotropic glutamate receptor suppresses the hyperpolarization-activated current in newt photoreceptors” The 12th Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine （東京）9月.
１８）Tomokatsu Kawakita, Akito Ishihara, Shiro Usui, and Masao Tachibana (2002) “ Mathematical model study of continuous transmitter release in the synaptic terminal of goldfish retinal bipolar cells” The 12th Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine（東京）9月.
１９）Masao Tachibana, Hiroshi Ishikane, Mie Gangi, Itaru Arai, Tomomitsu Asaka and Jiulin Du (2002) “ Neural Mechanisms of Synchronous Oscillations in Retinal Ganglion Cells” Vision2002-Shanghai Shanghai, China, 9月.
２０）河北友克、石原彰人、臼井支朗、立花政夫（2002）網膜双極細胞シナプス終末の伝達物質放出モデル. 電子情報通信学会ニューロコンピューティング研究会（名古屋）12月.
２１）長谷川淳、諸冨浩一、立花政夫（2003）マウス網膜におけるグルタミン酸トランスポーターのサブタイプ特異的関与. 第80回日本生理学会大会（福岡）3月.
２２）荒井格、浅香知光、杜久林、立花政夫（2003）網膜におけるオシレーション生成機構. 第80回日本生理学会大会（福岡）3月.
２３）緑川光春、浅香知光、塚本義彦、立花政夫.（2003）キンギョMb1型双極細胞におけるCaチャネル、シナプスリボンの分布. 第26回日本神経科学大会.（名古屋）7月.
２４）雁木美衣、石金浩史、堀内靖大、立花政夫（2003）光刺激の時空間的特性がカエル神経節細胞の同期的周期的発火へ及ぼす影響. 第26回日本神経科学大会（名古屋）7月.
２５）細井延武、洪鍾哲、立花政夫 （2003）グループIII代謝型グルタミン酸受容体によるL型Ca^{2+}電流の視細胞サブタイプ特異的調節. 第26回日本神経科学大会.（名古屋）7月.
２６）緑川光春、浅香知光、塚本義彦、立花政夫.（2003）キンギョMb1型双極細胞におけるCaチャネル、シナプスリボンの分布. 第26回日本神経科学大会.（名古屋）7月.
２７）雁木美衣、石金浩史、堀内靖大、立花政夫(2003)カエルの視覚誘発性逃避行動と網膜におけるSynchronous Oscillationの関係. 日本心理学会第67回大会（東京）9月.

２８）雁木美衣、堀内靖大、本田祥子、石金浩史、立花政夫（2003）カエル網膜における同期的周期的発火の阻害が視覚誘発性逃避行動に与える影響．日本動物心理学会 63 回大会・日本基礎心理学会 22 回大会合同大会（つくば）11 月．
２９）Masao Tachibana (2004) " Oscillatory synchronization in retinal ganglion cells is essential for escape behavior in frogs" FASEB Summer Conference, Vermont, USA, 7 月.
３０）雁木美衣、石金浩史、堀内靖大、本田祥子、立花政夫（2004）網膜神経節細胞における周期的同期発火は視覚誘発性逃避行動に重要な役割を果たす．第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会（大阪）9 月．
３１）緑川光春、浅香知光、立花政夫（2004）キンギョMb1 型双極細胞におけるCa^{2+}マイクロドメインと開口放出部位．第 27 回日本神経科学大会、第 47 回日本神経化学会大会合同大会（大阪）9 月．
３２）長谷川淳、立花政夫 (2004) マウス網膜外網状層におけるグルタミン酸取り込みによる信号調節．第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会（大阪）9 月．
３３）山田義之、荒井格、立花政夫 (2004) カエル網膜における周期的発火生成機構．第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会（大阪）9 月．
３４）Masao Tachibana (2004) " Retinal oscillatory synchronized discharges carry information essential for escape behavior" Shanghai ICPB' 04, Shanghai, China 1 1 月.
３５）本田祥子、雁木美衣、堀内靖大、石金浩史、立花政夫（2004）網膜神経節細胞群の周期的同期発火による視覚誘発性逃避行動の誘発．日本基礎心理学会第 23 回大会（新潟）11 月．

A01-04 小田 洋一

1. Nakayama, H. and Oda, Y. Common sensory inputs and different excitability of segmentally homologous reticulospinal neurons in teleost hindbrain. Soc. Neurosci. Abstr. 78.8, 2003
2. Oda, Y. and Nakayama, H. Common synaptic drive from Mauthner cell to segmentally homologous reticulospinal neurons in teleost hindbrain. Soc. Neurosci. Abstr. 78.9, 2003
3. Takahashi, M., Narushima, M., and Oda, Y. Monitoring of the synaptic inhibition of Mauthner cell network with in vivo Ca^{2+} imaging Soc. Neurosci. Abstr. 816.1, 2001 他 6 題

A01-06 岡 良隆

(1) Ishizaki, M., M. Iigo, and Y. Oka: Physiological analysis of GnRH release from the brain slice of the dwarf gourami (*Colisa lalia*). Zool. Sci. 17: 105, 2000.
(2) Oka, Y.: Action potentials, fertilization potentials, and intracellular Ca2+ in echinoderm eggs. Zool. Sci. 17: 102, 2000.
(3) Oka, Y.: Fish brain as a model for the neurobiological study of peptidergic neurons. ORI Symposium " Perspectives in fish Neurobiology". Abstr. p. 4, 2000.
(4) Oka, Y.: Electrophysiology and release activity of GnRH neurons. Brain Nose and Pituitary International Symposium. Proc. p. 43, 2000.
(5) Abe, H., and Y. Oka: The modulation mechanisms of pacemaker activity of terminal nerve GnRH neurons by GnRH peptide. Brain Nose and Pituitary International Symposium. Proc. p. 83, 2000.
(6) Ishizaki, M., and Y. Oka: Electrochemical recording of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from the pituitary of the dwarf gourami (Colisa lalia). Brain Nose and Pituitary International Symposium. Proc. p. 86, 2000.
(7) Oka, Y.: Physiology of GnRH neurons and their modulation by GnRH. US/Japan International Symposium: Neuroplasticity, Development and Steroid Hormone Action (Honolulu). Program and Abstracts p. 33, 2000.
(8) Oka, Y.: Terminal nerve GnRH system as a model system for the study of peptidergic neurons. Neurosci. Res. Suppl. 24: S10., 2000.
(9) Ishizaki, M., M. Iigo, and Y. Oka: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from multiple GnRH systems in the brain of the dwarf gourami, Colisa lalia. Neurosci. Res. Suppl. 24: S162, 2000.
(10) Tsutsuil, H., W. Alexander, K. Thomas, and Y. Oka: Electrophysiological properties and optical imaging of membrane voltage in the teleost corpus glomerulosum slice. Neurosci. Res. Suppl. 24: S84, 2000.
(11) Yoshikawa, A. and Y. Oka: Dissociation of gonadotropin-releasing hormone neurons and their electrophysiology. Zool. Sci. 17: 105, 2000.
(12) Abe, H., T. Oya, and Y. Oka: Involvement of Ca^{2+} currents in the modulation of pacemaker activity of terminal nerve GnRH neurons by GnRH peptide. Zool. Sci. 17: 105, 2000.

(13)Tsutsui, H., M. Ishikawa, J. Cosson, Y. Oka, and M. Morisawa: Two strategies for sperm chemotaxis in Ciona and siphonophores: numerical simulation study. Zool. Sci. 17: 62, 2000.
(14)Ishizaki, M., M. Iigo, and Y. Oka: Physiological analysis of GnRH release from the brain slice of the dwarf gourami (Colisa lalia). Zool. Sci. 17: 105, 2000.
(15)Oka, Y.: Action potentials, fertilization potentials, and intracellular Ca^{2+} in echinoderm eggs. Zool. Sci. 17: 102, 2000.
(16)Oka, Y.: Fish brain as a model for the neurobiological study of peptidergic neurons. ORI Symposium " Perspectives in fish Neurobiology" . Abstr. p. 4, 2000.
(17)Oka, Y.: Electrophysiology and release activity of GnRH neurons. Brain Nose and Pituitary International Symposium. Proc. p. 43, 2000.
(18)Abe, H., and Y. Oka: The modulation mechanisms of pacemaker activity of terminal nerve GnRH neurons by GnRH peptide. Brain Nose and Pituitary International Symposium. Proc. p. 83, 2000.
(19)Ishizaki, M., and Y. Oka: Electrochemical recording of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from the pituitary of the dwarf gourami (*Colisa lalia*). Brain Nose and Pituitary International Symposium. Proc. p. 86, 2000.
(20)Yamamoto, N., H. Ito, and Y. Oka: Glutamate may be a co-transmitter of GnRH-peptidergic terminal-nerve neurons. Neurosci. Res. Suppl. 25: S145, 2001.
(21)Tsutsui, H., and Y. Oka: Slow removal of Na^{+} channel inactivation is a putative mechanism for the temporal filtering property in the teleost thalamic neurons. Neurosci. Res. Suppl. 25: S103, 2001.
(22)Ishizaki, M., M. Iigo, and Y. Oka: RIA and electrochemical measurements of GnRH peptide release from GnRH systems in a teleost brain and pituitary. Symposium on the Nervous System of Aquatic Animals, 2001
(23)Ishizaki, M., M. Iigo, N. Yamamoto, and Y. Oka: RIA and electrochemical measurement of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from multiple GnRH systems in a teleost brain and pituitary. Proceedings of Japan Society for Comparative Endocrinology. 17, 2001.
(24)Oka, Y. and H. Tsutsui: Characteristics and ionic mechanisms of neuronal components in a teleost thalamic nucleus, corpus glomerulosum. Proceedings of MEXT grant group, neural circuits. 2001.
(25)Ishizaki, M., M. Iigo and Y. Oka: RIA and electrochemical measurement of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from multiple GnRH systems in a teleost brain and pituitary. Soc. Neurosci. Abstr. 30.5, 2001.
(26)C. R. Wirsig-Wiechmann and Y. Oka: Peripheral projections of the terminal nerve in dwarf gourami. Soc. Neurosci. Abstr. 511.30, 2001.
(27)Oka, Y., R. Nakane, and O. Koizumi: Immunohistochemical and electrophysiological analyses of peptidergic neurons in the jellyfish. Zool. Sci. 18: 107, 2001
(28)Oya, T., H. Abe, and Y. Oka: Involvement of Ca^{2+} entry mechanisms in the generation and modulation of pacemaker activities in the TN-GnRH neurons. Zool. Sci. 18: 107, 2001
(29)Amano, M., A. Takahashi, T. Yamanome, Y. Oka, K. Okuzawa, K. Okubo, S. Tokumo, K. Fujishiro, K. Aida, and K. Yamamori: Three GnRH systems in the brain of pleuronectiform fish, barfin flounder, *Verasper moseri*. Proceedings of Japan Society for Comparative Endocrinology. 16, 2001.
(30)Ishizaki, M., M. Iigo, and Y. Oka: RIA and electrochemical measurements of GnRH peptide release from GnRH systems in a teleost brain and pituitary. Symposium on the Nervous System of Aquatic Animals, Abstr. 2001
(31)Yamamoto, N., H. Ito, and Y. Oka: Glutamate may be a co-transmitter of GnRH peptidergic terminal-nerve neurons. Symposium on the Nervous System of Aquatic Animals, Abstr. 2001
(32)Tsutsui, H., N. Yamamoto, Wolf, A.M., T. Knöpfel, H. Ito, and Y. Oka: Physiology of thalamic neurons in the corpus glomerulosum. Symposium on the Nervous System of Aquatic Animals, Abstr. 2001
(33)Oka, Y.: RIA and electrochemical measurement of GnRH release from multiple GnRH systems in a teleost brain and pituitary. Proceeding of the 2nd international symposium on the comparative biology of GnRH: molecular forms and receptors. 27. 2001.
(34)Yamamoto, N., H. Ito, and Y. Oka: Glutamate may be a co-transmitter of terminal nerve GnRH neurons. Proceeding of the 2nd international symposium on the comparative biology of GnRH: molecular forms and receptors. 51. 2001.
(35)Ishizaki, M., M. Iigo and Y. Oka: RIA and electrochemical measurement of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from multiple GnRH systems in a teleost brain and pituitary. Soc. Neurosci. Annual Meeting, San Diego, 2001.

(36)C. R. Wirsig-Wiechmann and Y. Oka: Peripheral projections of the terminal nerve in dwarf gourami. Soc. Neurosci. Annual Meeting, San Diego, 2001.
(37)Oka, Y.: RIA and electrochemical measurement of GnRH release from multiple GnRH systems in a teleost brain and pituitary. 2nd International Symposium on the Comparative Biology of GnRH: molecular forms and receptors. Penang. 2001.
(38)Yamamoto, N., H. Ito, and Y. Oka: Glutamate may be a co-transmitter of terminal nerve GnRH neurons. 2nd International Symposium on the Comparative Biology of GnRH: molecular forms and receptors. Penang. 2001.
(39)Kiya, T., and Y. Oka: Identification of a novel type of glutamate receptor in the terminal nerve (TN)-GnRH neurons. Zool. Sci. 19: 1470, 2002
(40)Yamamoto, N., H. Ito, and Y. Oka: Glutamate may be a co-transmitter of GnRH-peptidergic neurons of the terminal-nerve. Zool. Sci. 19: 1470, 2002
(41)Ishizaki, M. M. Iigo, N. Yamamoto, and Y. Oka: Different modes of GnRH release from multiple GnRH systems of teleost brain-pituitary slices. Zool. Sci. 19: 1470, 2002
(42)Wirsig-Wiechmann, C.R., and Y. Oka: The terminal nerve GnRH/FMRFamide neurons project to the olfactory mucosa in the dwarf gourami. Zool. Sci. 19: 1470, 2002
(43)Oka, Y. , N. Yamamoto, and U. Takashima: Quantitative analysis of behavioral motivation and neuromodulatory GnRH peptidergic system. Zool. Sci. 19: 1470, 2002
(44)Amano, M., A.Takahashil, T. Yamanome, Y. Oka, K. Okuzawa, K. Okubo, K. Aida, and K. Yamamori: Three GnRH systems in the brain of barfin flounder. Zool. Sci. 19: 1487, 2002
(45)Oka, Y.: Control of behavioral motivation and the peptidergic neuromodulatory system. Neurosci. Res. Suppl. 26: S18-1, 2002.
(46)Y. Oka: Terminal-nerve (TN) GnRH system; a peptidergic neuromodulatory system. Department of Biophysics and Cell Biology, University of Debrecen, Debrecen, 2002.
(47)Y. Oka: Neurobiology of peptidergic neurons using a fish brain as a model system. Department of Cell Biology, University of Oklahoma Health Science Center, Oklahoma, 2002
(48)Y. Oka: Neurobiology of peptidergic neurons using a fish brain as a model system. Program in Human Biology, Neuroscience Program/Psychology Department, Stanford University, Stanford, 2002
(49)Kiya, T., and Oka, Y. " A Novel type of GluR in the TN-GnRH neurons" Neuroscience Research 46, S89. 2003.
(50)Ikemoto, T., Oka, Y. and Park, M. K. " Existence of multiple isoforms of GnRH ligand and receptor in the Dwarf gourami, Colisa lalia" The 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Ise-Shima, Japan (18-23, May 2003)
(51)Haneda, K. and Y. Oka " N- and R-type Calcium channels are involved in the increase of pacemaker potentials of GnRH neurons by GnRH peptide" Zool. Sci. 20 : 1588, 2003
(52)Haneda, K. and Y. Oka " Voltage-gated Ca2+ channels in terminal-nerve GnRH neurons" Fifth Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Nara, Japan (26-30, March 2004)
(53)Haneda, K. and Y. Oka " Voltage-gated Ca2+ channels of Terminal Nerve (TN) Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons and its modulation by GnRH" Neurosci. Res.50: S59, 2004
(54)Oka, Y. " Physiological properties of neuromodulatory GnRH peptidergic neurons. Neurosci. Res. 50: S8, 2004

A01-07 坪井 昭夫

国際学会

1. Tsuboi, A., Oka, Y., Kobayakawa, K., Nishizumi, H., Nagawa, F. and Sakano, H.: Differential display screening of genes expressed in a zone-specific manner in the olfactory epithelium or in the olfactory bulb. Gordon Research Conference on "Chemical Senses: Taste & Smell", Newport, Rhode Island, USA, July 1-6 (2001)
2. Tsuboi, A., Nishizumi, H., Miyazaki, T., Kato, H., Oroku, K. and Sakano, H.: Sub-areal expression of the murine odorant receptor genes in the conventional zone of the olfactory epithelium and its correlation to the projection sites on the olfactory bulb. The XIV International Symposium on "Olfaction and Taste", Kyoto, Japan, July 5-9 (2004)

国内学会

1. 仙石愼太郎、石井智浩、芹沢尚、中谷洋子、坪井昭夫、名川文清、坂野仁：二重標識した嗅覚受容体トラン

スジーンとその内在性遺伝子に対する投射先の分離. 第23回日本神経科学会大会(横浜)9月4-6日(2000)

2. 岡雄一郎、小早川高、小松円香、広瀬哲史、西住裕文、坪井昭夫、名川文清、坂野仁：ラット嗅上皮でゾーン特異的に発現する新規遺伝子群の同定. 第23回日本神経科学会大会（横浜）9月4-6日（2000）
3. 森田賢治、小早川高、岡雄一郎、臼田定和、西住裕文、坪井昭夫、名川文清、坂野仁： Isolation of cDNA clones that are expressed in a region-specific manner in the olfactory bulb. 第23回日本神経科学会大会（横浜）9月4-6日（2000）
4. 石井智浩、芹沢尚、中谷洋子、坪井昭夫、名川文清、坂野仁： Expression and projection of odorant receptor transgenes. 第23回日本神経科学会大会（横浜）9月4-6日（2000）
5. 中谷洋子、芹沢尚、石井智浩、仙石慎太郎、坪井昭夫、名川文清、坂野仁： Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. 第73回日本生化学会大会（横浜）10月11-14日（2000）
6. 吉原誠一、芹沢尚、石井智浩、中谷洋子、坪井昭夫、名川文清、坂野仁：マウス嗅覚受容体遺伝子*MOR28*クラスターのゲノム解析. 第73回日本生化学会大会（横浜）10月11-14日（2000）
7. 坪井昭夫、吉原誠一、芹沢尚、石井智浩、中谷洋子、名川文清、坂野仁：マウス嗅覚受容体遺伝子*MOR28*クラスターの発現制御. 第23回日本分子生物学会年会（神戸）12月13-16日（2000）
8. 小早川高、林令子、坪井昭夫、坂野仁：嗅神経細胞の繊毛に局在して発現する新奇遺伝子SROの解析. 第23回日本分子生物学会年会（横浜）12月9-12日（2001）
9. 宮道和成、岡雄一郎、小早川高、坪井昭夫、坂野仁：嗅上皮におけるプロトカドヘリン遺伝子の領域特異的な発現. 第24回日本分子生物学会年会（横浜）12月9-12日（2001）
10. 坪井昭夫、吉原誠一、芹沢尚、名川文清、坂野仁：嗅神経細胞の嗅球への投射における軸索の選別と収束. 第24回日本分子生物学会年会（横浜）12月9-12日（2001）
11. 坪井昭夫、吉原誠一、名川文清、坂野仁: Genomic analysis of the murine odorant receptor *MOR28* cluster: a possible role of gene conversion in maintaining the olfactory map. 第25回日本分子生物学会年会（横浜）12月11-14日（2002）
12. 西住裕文、坪井昭夫、坂野仁：マイクロダイセクション法を用いた糸球と嗅覚受容体の対応付け. 第25回日本分子生物学会年会（横浜）12月11-14日（2002）
13. 坪井昭夫、宮崎隆明、西住裕文、坂野仁：マウスClass I 嗅覚受容体に関する発現と投射の解析. 第26回日本神経科学大会（名古屋）7月22-25日（2003）
14. 西住裕文、坪井昭夫、坂野仁：嗅球上の匂い地図形成の分子機構. 第26回日本神経科学大会（名古屋）7月22-25日（2003）
15. 来住美和子、坪井昭夫、廣野順三、浜名洋、坂野仁、佐藤孝明：いくつかのカルボン応答レセプターの局在ゾーンの同定と発現細胞数の比較. 第37回日本味と匂学会大会（岡山）9月24-26日（2003）
16. 岡雄一郎、林令子、小早川高、西住裕文、坪井昭夫、坂野仁：O-MACS, a novel member of the medium-chain acyl-CoA synthetase family, specifically expressed in the olfactory epithelium in a zone-specific manner. 第76回日本生化学会大会（横浜）10月15-18日（2003）
17. 西住裕文、坪井昭夫、宮崎隆明、加藤紘之、伊藤円、小祿和希、坂野仁：嗅覚受容体遺伝子をパラメータとしたマウス匂い地図の構成. 第26回日本分子生物学会年会（神戸）12月10-13日（2003）
18. 宮崎隆明、西住裕文、坂野仁、坪井昭夫：マウス嗅覚受容体遺伝子の嗅上皮におけるゾーン特異的な発現制御. 第77回日本生化学会大会（横浜）10月13-16日（2004）
19. 坪井昭夫、加藤紘之、宮崎隆明、西住裕文、坂野仁：嗅覚受容体特異的に嗅細胞の軸索投射位置を規定する因子. 第27回日本分子生物学会年会（神戸）12月8-11日（2004）
20. 西住裕文、坪井昭夫、宮崎隆明、名川文清、坂野仁：嗅覚受容体遺伝子の嗅上皮における領域特異的発現制御. 第27回日本分子生物学会年会（神戸）12月8-11日（2004）

招待講演

1. 坪井昭夫：嗅覚系におけるニューラルネットワーク形成の分子機構　文部科学省科学研究費　基盤(C)企画調査　公開シンポジウム　「多角的アプローチによる嗅覚情報伝達の総合的研究：今、嗅覚研究がおもしろい！　神経から脳へ行動へ」　東京大学農学部弥生講堂（東京）2月23日（2002）
2. 坪井昭夫：マウス嗅覚系における神経回路形成の分子機構　岡崎国立共同研究機構・生理学研究所研究会「シナプス可塑性と丸ごとの脳機能」　岡崎コンファレンスセンター（岡崎）5月23-24日（2002）
3. 坪井昭夫：嗅覚系における神経回路の形成と再生の分子基盤　文科省科学研究費　特定領域研究「神経回路」冬のシンポジウム「神経回路の形成と働きの分子メカニズム」　学術総合センター・一ツ橋記念講堂（東京）1月29-30日（2003）
4. 坪井昭夫：嗅覚神経回路の形成と再生の分子基盤　戦略的創造研究推進事業・さきがけタイプ「認識と形成」領域　Symposium' 03「生物の形づくりの原理に挑む」　東京ガーデンパレス（東京）12月14-15日（2003）

A01-09 畠 義郎

1. 畠 義郎、「Effects of brain-derived neurotrophic factor on structures of developing visual cortex」第76回日本生化学会大会 シンポジウム「分子から精神機能へ－神経栄養因子研究の新展開 2003/10/18

2. 畠 義郎、「electric optic nerve stimulation induces ocular dominance plasticity in kitten visual cortex」第26回日本神経科学大会 シンポジウム「Restoration of Vision Function in Mammals - From Plasticity to Prosthesis」2003/7/25

A01-10 稲垣直之

1) Inagaki, N., Analysis of the mechanisms of neuronal network formation : Polarity formation and axon guidance, 1st NAIST-IMA Joint Symposium, 2002, Nara.
2) Inagaki, N., High resolution two-dimensional gel electrophoresis for Proteomics, NAIST Bio-COE International Symposium, 2003, Nara.
3) Inagaki, N., Katsuta, K., Nomura, E., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T., High resolution two-dimensional gel electrophoresis with huge gels, Proteomic Forum 2003, Munich, Germany (Plenary session).
4) Inagaki, N., Proteome analysis of molecules enriched in growing axons of the rat developmental brain, HUPO 3rd Annual World Congress, 2004, Beijing, China (Invited speaker).
5) 稲垣直之、貝淵弘三、CRMP-2による神経細胞の軸策形成およびガイダンス機構, 第７４回 日本生化学会大会シンポジウム、(2001)、京都
6) 稲垣直之、神経軸索と神経極性形成のメカニズム、 第６回「神経科学領域における分子モニタリング」シンポジウム、(2001)、松山
7) 稲垣直之、高解像ラージゲルを用いた二次元電気泳動法による細胞内発現タンパク質の網羅的検出、第52回日本電気泳動学会シンポジウム「プロテオミクスの最前線」、(2002)、東京

A01-11 川口 泰雄

1. 根東覚、川口泰雄 大脳皮質抑制性神経回路におけるシナプス電流の同期化 第23回日本神経科学大会(横浜) 2000年9月
2. Kondo S, Kawaguchi Y. Slow synchronized bursts of inhibitory postsynaptic currents in the rat frontal cortex in vitro. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans) 2000年11月
3. 川口泰雄 単一神経活動から見た脳波律動 第３０回日本臨床神経生理学会学術大会（京都） 2000年12月
4. 川口泰雄、根東覚 大脳皮質介在ニューロンの多様性とアセチルコリンの作用 第７８回日本生理学会大会(京都) 2001年3月
5. Kawaguchi Y. Distinct firing patterns of neuronal subtypes in cortical synchronized activities. 31stAnnual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego) 2001年11月
6. 苅部冬紀、窪田芳之、川口泰雄 大脳皮質非錐体細胞における軸索形態の定量的解析 第２５回日本神経科学大会（東京） 2002年7月
7. 根東覚、川口泰雄 ラット前頭皮質における高頻度発火型介在神経細胞と線条体投射錐体細胞の神経結合 第２６回日本神経科学大会（名古屋） 2003年7月
8. 森島美絵子、川口泰雄 前頭皮質における線条体投射錐体細胞の皮質内結合選択性 第２７回日本神経科学大会（大阪） 2004年9月21日
9. 苅部冬紀、窪田芳之、川口泰雄 大脳皮質非錐体細胞の軸索・樹状突起の分岐パターン 第２７回日本神経科学大会（大阪） 2004年9月
10. Kawagcuhi Y, Karube F, Kubota Y. Dendritic branching and spine formation patterns of cortical nonpyramidal cell subtypes. Society For Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego) 2004年10月

A01-14 佐藤 宏道

1. Ozeki, H. et al. Possible mechanisms underlying the contextual response modulation in the cat primary visual cortex. Soc. Neurosci. Abstr. 27. 北米神経科学会議 (2001)
2. Akasaki, T. et al Spatial frequency-dependent response modulation by stimulus outside of the classical receptive field in cat area 17. Soc. Neurosci. Abstr. 27. 北米神経科学会議 (2001)
3. Ozeki, H., Akasaki, T., Sadakane, O. and Sato, H. Possible mechanisms underlying the contextual response modulation in the cat primary visual cortex. Jpn. J. Physiol. 51 (Suppl.), S36. 第78回日本生理学会大会 (2001)
4. Akasaki, T., Ozeki, H., Shimegi, S. and Sato, H. Spatial frequency dependent response modulation by

stimulus outside of the classical receptive field in cat area 17. Jpn. J. Physiol. 51 (Suppl.) 457. 第78回日本生理学会大会 .(2001)
5. Kida, H., Shimegi, S. and Sato, H. Neuronal mechanisms underlying the directionally-tuned response interaction in the rat barrel cortex. Jpn. J. Physiol. 51 (Suppl.) 472. 第78回日本生理学会大会 (2001)
6. Sadakane, O., Ozeki, H., Akasaki, T., Naito, T. and Sato, H. Possible cortical mechanisms underlying the contextual modulation in the cat primary visual cortex. Neurosci. Res. 25 (Suppl.), S115. 第24回日本神経科学大会 (2001)
7. Kida, H., Shimegi, S. and Sato, H. neuronal mechanisms underlying the directionally-tuned response interaction in the rat barrel cortex. Neurosci. Res. 25 (Suppl.), S64. 第24回日本神経科学大会 (2001)
8. Sato, H. Properties and possible mechanisms of response modulation by the receptive field surround in the cat primary visual cortex. The 12th Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine. "The Neural Basis of Early Vision" (2002)
9. Naito, T., Ozeki, H., Sadakane, O., Akasaki, T. and Sato, H. Cross-correlation study of network dynamics in the cat primary visual cortex. The 12th Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine. "The Neural Basis of Early Vision"Keio J. Med. 51(Suppl. 1) : 84. (2002),
10. Sadakane, O., Ozeki, H., Naito, T., Akasaki, T. and Sato, H. Contrast dependent gain control of the contextual response modulation in the cat primary visual cortex. The 12th Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine. "The Neural Basis of Early Vision" Keio J. Med. 51(Suppl. 1) : 85. (2002),
11. Ozeki, H., Akasaki, T., Sadakane, O., Naito, T and Sato, H. Excitatory and inhibitory mechanisms underlying the contextual modulation of neuronal activity in the cat primary visual cortex. The 12th Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine. "The Neural Basis of Early Vision"Keio J. Med. 51(Suppl. 1) : 86. (2002),
12. Akasaki, T., Ozeki, H., Shimegi, S. and Sato, H. Spatial-frequency-dependent surround suppression in the cat primary visual cortex. Soc. Neurosci. Abstr. 619.28 (2002)
13. Ozeki, H., Sadakane, O., Akasaki, T., Naito, T. and Sato, H. (2002) Excitatory and inhibitory mechanisms underlying the contextual response modulation in the cat primary visual cortex. Soc. Neurosci. Abstr. 619.22 (2002)
14. Naito, T., Ozeki, H., Sadakane, O., Akasaki, T. and Sato, H. Cross-correlation study of network dynamics in the cat primary visual cortex. Soc. Neurosci. Abstr. (2002)
15. 木田裕之、七五三木聡、佐藤宏道 ラット体性感覚野における刺激運動方向表現の神経メカニズム、第25回日本神経科学大会 (2002)
16. 内藤智之、尾関宏文、定金理、赤崎孝文、佐藤宏道 一次視覚野におけるニューロン活動相関の刺激依存性の変化、第25回日本神経科学大会 (2002)
17. 定金理、尾関宏文、内藤智之、赤崎孝文、佐藤宏道 一次視覚野における受容野周囲刺激による反応修飾のコントラスト依存性、第25回日本神経科学大会 (2002)
18. 尾関宏文、赤崎孝文、定金理、内藤智之、佐藤宏道 ネコ一次視覚野ニューロンの刺激文脈依存的反応調節における興奮と抑制の変化の関係、第25回日本神経科学大会 (2002)
19. 赤崎孝文、尾関宏文、七五三木聡、佐藤宏道 一次視覚野ニューロン活動の受容野周囲刺激による反応修飾の空間周波数依存性、第25回日本神経科学大会 (2002)
20. 佐藤宏道「一次視覚野における広視野情報の統合処理」、生理学研究所研究会「視知覚のメカニズム-生理、心理物理、計算論的アプローチ」(2003)
21. Sato, H. Excitatory and Inhibitory Contribution to Contextual Modulation in Cat V1. Salk Institute (San Diego) (2003)
22. Naito, T., Ozeki, H., Sadakane, O., Akasaki, T. and Sato, H. Cortical networks underlying the response modulation by the receptive field surround in the cat primary visual cortex. Soc. Neurosci. Abstr. (2003)
23. Shimegi, S., Fischer, Q.S., Yang, Y., Sato H. and Daw, N.W. Blockade of cyclic AMP-dependent protein kinase does not prevent the reverse ocular dominance shift in kitten visual cortex. Soc. Neurosci. Abstr. (2003)
24. 定金理、尾関宏文、内藤智之、赤崎孝文、佐藤宏道、一次視覚野における文脈依存的反応修飾の刺激コントラスト依存性、第26回日本神経科学大会、(2003)
25. 内藤智之、尾関宏文、定金理、佐藤宏道、 Neural networks underlying the length tuning properties in the cat V1. 第26回日本神経科学大会、(2003)
26. Sato, H. Functional Organization of Early Visual System. COE International Symposium on Development

of Neural Network and Emergent Behavior. (2004)
27. Naito, T. Sadakane, O., Ozeki, H., Akasaki, T., and Sato, H. Comparison of contextual modulation by the receptive field surround between V1 and LGN in the cat. 第27回日本神経科学大会, (2004)
28. Sadakane, O., Ozeki, H., Naito, T. ,Akasaki, T., and Sato, H. Contrast-dependency of contextual modulation in the cat visual cortex. 第27回日本神経科学大会, (2004)

A01-15 大澤 五住

1. S.Nishimoto, I.Ohzawa. Linear and non-linear temporal interactions of spatial frequency tunings in the cat areas 17 and 18. Program No. 368.1. 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004.10.25
2. T.Sanada, I.Ohzawa. Origin of surface slant selectivities in area 17 and 18 neurons. Program No. 865.13. 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004.10.27
3. 大澤五住、Additional receptive field properties of neurons in the early visual cortex／初期視覚野における神経細胞の受容野、シンポジウム：Leading edge of the research on early visual sys、SY-12-03、日本神経科学学会、大阪、2004.9.22
4. 眞田 尚久、大澤 五住、3-D surface orientation sensitivity in area 18 of the cat.／両眼受容野解析による面の傾き感受性、 P1-252、日本神経科学学会、大阪、2004.9.21
5. 木村 塁、岸本 知之、大澤 五住、 Spatial pooling of subunits in complex receptive fields in the cat area 18／ネコ18野における複雑型細胞受容野構成の解析、 P1-253、日本神経科学学会、大阪、2004.9.21
6. 西本 伸志、大澤 五住、Looming selectivity of cells in the early visual cortex／初期視覚野細胞における奥行き方向への運動選択性、 P1-266、日本神経科学学会、大阪、2004.9.21
7. Izumi Ohzawa and Hiroki Tanaka Higher order information processing beyond simple and complex cells, Melbourne Australia, Sattelite Simposium "Visual Cortex: Variety of Viewpoints" for Australian Neuroscience Society metting, 2004.1.26
8. Izumi Ohzawa Representation of visual information in simple and complex cells in the primary visual cortex, Tokyo, Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine "The Neural Basis of Early Vision", 2002.9.2
9. H. Tanaka, T. Akasaki, I. Ohzawa Encoding of interocular phase difference of envelope stimuli in cat area 18., New Orleans U.S.A., Soc. Neurosci. Annual Meeting, 2003.11.11
10. S. Nishimoto, M. Arai, I. Ohzawa A comparison of tuning characteristics of visual neurons between subspace mapping and drifting sinusoidal gratings., New Orleans U.S.A., Soc. Neurosci. Annual Meeting, 2003.11.10
11. 大澤五住、臼井支朗 Visiome Platform の紹介, 大阪, 視覚科学フォーラム, 2003.7.29
12. Hiroki Tanaka and Izumi Ohzawa Binocular mechanisms for 2-nd order stimuli in cat area 18. ,名古屋, 日本神経科学学会, 2003.7.24
13. Shinji Nishimoto, Miki Arai and Izumi Ohzawa A comparison of tuning characteristics of visual neurons between subspace mapping and drifting sinusoidal gratings. ,名古屋, 日本神経科学学会, 2003.7.24
14. 苗加咲子, 大澤五住：「ステレオ画像における両眼位相視差分布」,鳥取,日本神経回路学会, 2002.9.20
15. 幾山武, 大澤五住, Cascaded Energy Model によるテクスチャー分析機構と神経回路モデル, 鳥取,日本神経回路学会, 2002.9.20
16. 西本伸志、G.C. DeAngelis, 大澤五住、R.D. Freeman, 大脳一次視覚野における運動方向選択性細胞の時空間受容野の形成について。京都、日本神経科学学会 PA2-116 p.295, 2001.9.27

A01-16 宋 文杰

1. Song W-J, Kawaguchi H, Totoki S, Inoue Y, Katura T, Maeda S, Inagaki S, Propagation of electrically-evoked activity in guinea pig primary auditory cortex. Neuroscience Res. 50(2004)suppl. 1, s66.
2. 松田宙倫、白澤寛司、宋文杰、モルモット一次聴覚野の機能構造。信学技報、103(2004)67-70.
3. Song W-J, Hattori S and Murakami F, Quantitative relationship between Kv4 mRNAs and A-type potassium current in rat striatal cholinergic interneurons during postnatal development. Neurosci Res, 46(2003)s60.
4. Saitoh K, Hattori S, Song W-J, Isa T and Takakusaki K, Nigral GABAergic inhibition upon mesopontine cholinergic neurons. Neurosci Res, 46(2003)s101.
5. Song W-J, Inagaki S, Katura M, Kawaguchi H, Isolation of neural activities from respiratory and

heartbeat noises for in vivo optical recording using independent component analysis. Soc Neurosci Abstr, 2002 (CD Rom).
6. Song W-J, Abe T, System identification for compartmental models of neurons. Neurosci Res suppl. 26(2002)s96.
7. Hattori S, Murakami F, Song W-J, Postnatal development of delayed rectifier K+ channels in rat striatal cholinergic interneurons. Neurosci Res suppl. 25 (2001)s103.
8. Otsuka T, Abe T, Tsukagawa T, Song W-J, Oscillatory burst activities in a modeled network of the subthalamic nucleus and the globus pallidus. Soc Neurosci Abstr. 31(2001)66.
9. 前田新一、稲垣眞司、時岡良、川口英夫、宋文杰、独立成分解析による in vivo 光計測データのノイズ除去。第15回生体生理工学シンポジウム論文集、(2000)13-14.
10. Song W-J, Hattori S and Murakami F, Physiological and molecular characterization of postnatal development of the a-type potassium current in rat striatal cholinergic interneurons. Soc Neurosci Abstr, 26(2000)556.
11. Song W-J, Hattori S, Murakami F, Postnatal development of the A-type potassium current in rat striatal cholinergic interneurons. Neurosci Res suppl. 24 (2000)s81.
12. Otsuka T, Abe T, Tsukagawa T, Song W-J, A single compartment model of the voltage-dependent generation of a plateau potential in subthalamic neurons. Neurosci Res suppl. 24 (2000)s81.
他３編

A01-18 辰巳 仁史

1. 辰巳仁史、片岡正和、曽我部正博　（２０００）　ＧＦＰシナプトタグミンの神経成長円錐でのダイナミクス　生理学会抄録　１Ｇ１４４５　横浜　３月
2. 辰巳仁史　岩井和子　松島正哉　井上　陽介　曽我部正博（２０００）　神経成長円錐における制帽接着とベシクルの共局在　生物物理抄録　１Ｂ１１００　仙台　９月

A01-23 渡邉 裕二

1. 渡邉裕二，仲村春和：「中脳の領域化と脳神経の形成」
第２３回日本神経科学大会・第１０回日本神経回路学会大会　合同大会シンポジウム「神経系の形作りの原理を求めて」，横浜　2000年9月4-6日
2. 渡邉裕二　‘ Axon Guidance of Trochlear Nerve along Midbrain-Hindbrain Boundary.’ CDB Meeting on Head Development (II),神戸理研　2002年９月１２日
3. Yuji Watanabe, Harukazu Nakamura：「Axon Guidance of Trochlear Motor Axons In Vivo by Sema3F and neuropilin-2」第２５回日本分子生物学会年会　２００２年１２月１１−１４日（１２／１４発表），横浜
4. 渡邉裕二、荒田智裕、豊田礼子、仲村春和：「中脳後脳境界部での滑車神経軸索誘導」第２６回日本分子生物学会年会　２００３年１２月１０−１３日（１２／１３），神戸

A02-03 小坂 俊夫

1. K. Toida, K. Kosaka, Y. Aika, T. Kosaka : Structural features of interneurons in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: 2. intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons.
30th Annual meeting of the Society for Neuroscience, November 4−9, 2000, at New Orleans, USA.
2. S. Jinno, T. Kosaka : Spatial Distributions of GABAergic neurons containing calcium binding proteins parvalbumin, calretinin andcalbindin D28K in the mouse hippocampus: a quantitative study with stereological techniques. 31th Annual meeting of the Society for Neuroscience, November 10−15, 2001, at San Diego, USA.
3. K. Ogata, S. Jinno, T. Taniwaki, T. Kosaka : Structural and quantitative analyses of astrocytes in the mouse hippocampus. 31th Annual meeting of the Society for Neuroscience, November 10−15, 2001, at San Diego, USA.
4. A. Doi, H. Ishibashi, S. Jinno, T. Kosaka, N. Akaike : Presynaptic inhibition of GABAergic mIPSCs by the mGluR agonist in the mechanically dissociated rat nucleus basalis of Meynert neurons. 31th Annual meeting of the Society for Neuroscience, November 10−15, 2001, at San Diego, USA.
5. K. Toida, K. Kosaka, Y. Aika, T. Kosaka : Catecholaminergic neurons in the olfactory bulb. 9th International Catecholamine Symposium. April 1-5, 2001, Kyoto, Japan.
6. S. Jinno, T. Kosaka : Patterns of expression of neuropeptides in hippocampal GABAergic neurons in

mice. 32th Annual meeting of the Society for Neuroscience, November 2－7, 2002, at Orlando, USA.

7. S. Jinno, T. Kosaka : Infrequent colocalization of neuronal nitric oxide synthase and somatostatin in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical disector. 33th Annual meeting of the Society for Neuroscience, November 8－13, 2003, at New Orleans, USA.
8. T. Kosaka, K. Kosaka : Structural organization of the glomerulus in the main olfactory bulb. 14th International Symposium on Olfaction and Taste. July 5-9, 2004, Kyoto, Japan.
9. T. Fukuda and T. Kosaka: A correlated CLSM-EM study on gap junctions between GABAergic interneurons in the neocortex. 16th International Congress of the IFAA and 109th Annual Meeting of Japanese Association of Anatomists. August 22-27, 2004, Kyoto.
10. S. Jinno and T. Kosaka: Parvalbumin is expressed in glutamatergic and GABAergic corticostriatal pathway in mice. 16th International Congress of the IFAA and 109th Annual Meeting of Japanese Association of Anatomists. August 22-27, 2004, Kyoto.
11. K. Toida, K. Kosaka, Y. Aika and T. Kosaka: Synaptic organization of the rat olfactory bulb constructed by chemically-defined neurons. 16th International Congress of the IFAA and 109th Annual Meeting of Japanese Association of Anatomists. August 22-27, 2004, Kyoto.
12. 秋鹿祐輔、小坂克子、樋田一徳、小坂俊夫「ラット嗅球糸球体におけるニューロン間の接触関係の共焦点レーザー顕微鏡像による三次元的解析」第105回日本解剖学会総会．2000年3月29–31日　横浜
13. 神野尚三、小坂俊夫「マウス海馬GABAニューロンのdisector定量解析；parvalbumin含有ニューロン及びsomatostain含有ニューロン」第105回日本解剖学会総会．2000年3月29–31日　横浜
14. 福田孝一、小坂俊夫「海馬のparvalbumin含有GABAニューロンが化学シナプスと電気シナプスを介して形成する二重のネットワーク」第105回日本解剖学会総会．2000年3月29–31日　横浜
15. 神野尚三、小坂俊夫「Colocalization of neuronal nitric oxide synthase and calretinin in the mouse hippocampus」第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会大会合同大会．2000年9月4–6日　横浜
16. 福田孝一、小坂俊夫「視覚野をはじめとする大脳皮質の広い領域においてGABAニューロンがgap junctionを介して形成する樹状突起ネットワーク」第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会大会合同大会．2000年9月4–6日　横浜
17. 福田孝一、小坂俊夫「大脳新皮質のGABAニューロンがギャップ結合を介して形成する樹状突起ネットワーク」第106回日本解剖学会総会．2001年4月2–4日　高知
18. 神野尚三、小坂俊夫「マウス海馬における３種のカルシウム結合蛋白を含むGABAニューロンの細胞構築」第106回日本解剖学会総会．2001年4月2–4日　高知
19. 緒方勝也、神野尚三、小坂俊夫「マウス海馬astrocyteのoptical disector法を用いた共焦点レーザー顕微鏡による定量解析、および構造解析」第106回日本解剖学会総会．2001年4月2–4日　高知
20. 神野尚三、小坂俊夫「内側中隔に投射するマウス海馬GABAergic neuronの免疫細胞化学的解析」第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会．2001年9月26–28日　京都
21. 神野尚三、小坂俊夫、Andreas Jeromin、John Roder「マウス海馬と小脳におけるneuronal calcium sensor-1の免疫細胞化学的局在」第107回日本解剖学会総会．2002年3月29–31日　浜松
22. 神野尚三、石塚智、小坂俊夫「マウス腹側歯状回のmossy cellはpacemaker activityを有する」第25回日本神経科学大会．2002年7月7–9日　東京
23. 小坂克子、小坂俊夫「食虫類、ツパイ、こうもりの主嗅球の構成」第108回日本解剖学会総会．2003年4月1–3日　福岡
24. 神野尚三、Andreas Jeromin、John Roder、小坂俊夫「Compartmentation of the mouse cerebellar cortex by neuronal calcium sensor-1」第108回日本解剖学会総会．2003年4月1–3日　福岡
25. 神野尚三、小坂俊夫「海馬主細胞におけるコレシストキニンの発現には長軸方向による差が存在する。」第26回日本神経科学大会．2003年7月23–25日　名古屋
26. 福田孝一、Ralf Aw Galuske、Wolf Singer、小坂俊夫「光学的記録を行った一次視覚野におけるGABAニューロンのトポロジー解析」第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学大会合同大会2004年9月21–23日　大阪

A02-04　狩野方伸

Kano, M.: Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of central synapses, Japan-UK Workshop "From Molecules to Memory 2002", (2002年8月29日).

※その他、招待講演：　5回、学会発表：63回

A02-06 蔵田 潔

a) 国際シンポジウム

1. Kurata K. Involvement of premotor and primary motor cortex in planning and controlling movements: what are differences? Neural Control of Movement, 2001. Seville, Spain.
2. Kurata K.: Dynamic visuo-motor transformation in the ventral premotor cortex of monkeys 生理学研究所COEシンポジウム2004 年3 月16－18 日岡崎
3. Aizawa H. and Kurata K.: LATER model with two threshold levels explains bimodal saccadic reaction time distribution in cue gap saccade task with NoGo trials. 生理学研究所COEシンポジウム2004 年3 月16－18 日岡崎
4. Kurata K., Strick P.L., Miall R.C., and Imamizu H.: what do we know about cerebro-cerebellar communication system after allen and tsukahara? Neural Control of Movement, 2004. Sitges, Spain.

b) 国内シンポジウム

1. 蔵田潔： 日本大学・学術フロンティア推進事業「認知と記憶の脳内メカニズム」シンポジウム. 運動前野腹側部における到達運動学習の神経機構2003年1月17日東京・日本大学医学部
2. Kurata, K.: Short-term conpensation for behavioral deficits following premotor cortex inactivation. Neurosci. Res. 46 Suppl. 1: S32, 2003.
3. Kurata, K.: Advances in system neuroscience of learning and memory in brain. Functional roles of the cerebro-cerebellar communication system. Jpn. J. Physiol. 54 Supple.: S50, 2004.
4. 蔵田潔： 日本生理学会2004年度生理学若手サマースクール「運動制御のシステム的理解－脳内指令構築から末梢への伝達－」Applied Course 1. 運動制御における脳内情報変換機構2004年8月1日（日） 東京医科歯科大学.

c) 国際学会一般演題

1. Kurata, K.: Specific postsynaptic facilitation of neurons in the ventral premotor cortex of monkeys during prism adaptation. Society for Neuroscience 31st Annual Meeting, 2001, San Diego. (Soc. Neurosci. Abstr. 27, 2001).
2. Kurata, K.: Neural representation of visual space in movement-related activity in the ventral premotor cortex of monkeys. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, 2003, New Orleans, 2003.
3. Kurata, K. and Aizawa, H.: LATER model explains bimodal reaction time distributions of ordinary and express saccades in an instructed gap saccade task with NoGo trials. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004, San Diego, 2004.

d) 国内学会一般演題

1. Kurata, K.: Dynamic changes of information transmission in the ventral premotor cortex of monkeys during prism adaptation. Neurosci. Res. Suppl. 24: S34, 2000.
2. Kurata, K.: Comparison of neuronal activity between the ventral premotor and primary motor cortex of monkeys during prism adaptation. Neurosci. Res. Suppl. 25: S85, 2001.
3. 蔵田潔： プリズム適応における大脳皮質運動関連領野のニューロン活動特性. 日本生理学雑誌64:69, 2002.
4. Kurata, K. and Aizawa, H.: Systematic bistable switching of saccadic eye movements by instruction signals. Neurosci. Res. Suppl. 26: S35, 2003.
5. 蔵田潔、相澤寛： 急速眼球運動の反応時間の脳内切り替え機構. 日本生理学雑誌65: 83, 2003.
6. 蔵田潔： 運動前野の不活化後に生じる機能障害の短期代償機構. 日本生理学雑誌(in press)
7. Kurata, K.: Bilateral activation of movement-related neurons in the ventral premotor cortex reflecting coordinate transformation in reaching. Neurosci. Res. Suppl. 50: S42, 2004.

A02-09 神谷 温之

1. 神谷温之, 小澤瀞司 フォルスコリンによる海馬苔状線維シナプス伝達促進機構 第 77 回日本生理学会大会（横浜） 2000 年 3 月 27 日
2. 神谷温之, 小澤瀞司 海馬苔状線維終末におけるカルシウム流入の促通 第 23 回日本神経科学学会大会(横浜) 2000 年 9 月 5 日
3. 神谷温之 海馬シナプス前終末におけるカルシウム流入の可塑的変化 第 78 回日本生理学会大会（京都） 2001 年 3 月 29 日

4. 梅田和昌，神谷温之，清原壽一，真鍋俊也　forskolin によるマウス海馬苔状線維の興奮性の増強　第 94 回日本生理学会近畿生理学談話会（神戸）　2001 年 9 月 8 日
5. 神谷温之，真鍋俊也　海馬苔状線維終末カルシウム流入促通へのカイニン酸受容体の関与　第 79 回日本生理学会大会（広島）　2002 年 3 月 28 日
6. 梅田和昌，神谷温之，清原壽一，真鍋俊也　マウス海馬苔状線維の興奮性に対する forskolin の作用　第 79 回日本生理学会大会（広島）　2002 年 3 月 28 日
7. 神谷温之，真鍋俊也　シナプス前カイニン酸受容体を介する海馬苔状線維の後脱分極応答　第 94 回日本生理学会近畿生理学談話会（和歌山）　2002 年 8 月 24 日
8. 神谷温之，真鍋俊也　カフェインによる海馬苔状線維シナプス伝達の促進　第 80 回日本生理学会大会（福岡）　2003 年 3 月 25 日
9. H. Kamiya　Facilitation of presynaptic Ca^{2+} influx at hippocampal mossy fiber synapse. Gunma University First COE International Symposium" Molecular mechanisms of vesicle trafficking and membrane fusion" (Maebashi)　2003 年 11 月 21 日
10. 神谷温之　リアノジン受容体による海馬苔状線維終末内カルシウム動態の調節　第 12 回海馬と高次機能学会（東京）　2003 年 11 月 23 日
11. 神谷温之　軸索標識法によるシナプス前終末内カルシウム動態の解析　第 77 回日本薬理学会年会（大阪）　2004 年 3 月 8 日
12. H. Kamiya　Expression mechanism underlying hippocampal short- and long-term presynaptic plasticity. Systems Neurobiorogy Spring School SNSS 2004 (Shijonawate)　2004 年 3 月 22 日
13. 神谷温之　カイニン酸受容体を介するシナプス伝達・可塑性調節　第 81 回日本生理学会大会（札幌）　2004 年 6 月 3 日

A02-10 久保 義弘

<u>シンポジウム、招待講演</u>

1. 久保義弘 代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構 第 24 回東京都神経科学総合研究所シンポジウム「神経伝達機構の分子的記述とそれからの展開」東京 (2001, 11. 30)
2. 久保　義弘、阿部　秀樹 代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構 CREST「脳を知る」シンポジウム　脳神経科学の最先端 2002、京都 (2002, 11. 25)
3. Yoshihiro Kubo and Hideki Abe Effects of co-expression with Homer isoforms on the function of metabotropic glutamate receptor.　IUPS symposium " Trafficking and clustering of channels and receptors" 第 80 回日本生理学会大会、福岡 (2003, 3. 26)
4. Yoshihiro Kubo Regulation mechanisms and structural rearrangements of metabotropic glutamate receptor. Young Researcher Umami Forum, Tokyo (2004, 7.2)

<u>学会一般演題</u>

5. 阿部秀樹、久保義弘　Homer 分子が代謝型グルタミン酸受容体の応答特性に及ぼす作用
第 24 回日本神経科学大会、京都　(2001, 9.26)
6. 阿部秀樹、久保義弘 Homer の共発現が mGluR1α の多価陽イオンに対する応答に及ぼす作用
第 79 回日本生理学会大会、広島　(2002, 3.28)
7. 立山充博、阿部秀樹、久保義弘 代謝型グルタミン酸受容体のガドリニウム結合部位の機能解析
第 26 回日本神経科学大会、名古屋 (2003, 7.24)
8. 立山　充博、阿部秀樹、久保　義弘 FRET 法による代謝型グルタミン酸受容体の動的構造変化の解析
第 81 回　日本生理学会大会、札幌 (2004, 6.2)
9. 立山　充博、阿部秀樹、中田康裕、斉藤修、久保　義弘 リガンド結合による代謝型グルタミン酸受容体の二量体構造変化 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会　合同大会、大阪 (2004, 9.21)

A02-12 遠藤 省吾

1.　遠藤昌吾、中川宏治、鈴木真佐子、角真理子、横沢秀吉、伊藤正男、cGMP 依存性キナーゼ基質 G-substrate のクローニングと特徴付け、第２３回日本分子生物学会年会、２０００年１２月１５日
2.　遠藤昌吾、Thomas Launey、ERK はプルキンエ細胞のグルタミン酸受容体クラスターの崩壊に関与する、第２４回日本分子生物学会年会、２０００年１２月１５日
3.　遠藤昌吾、　Molecular dissection of cerebellar long-term depression、第２５回日本神経科学大会、２００２年７月９日
4.　遠藤昌吾、Thomas Launey、ERK はグルタミン酸受容体クラスター崩壊を介して小脳 LTD に関与する、第２５回日本神経科学大会、２００２年７月７日

5. 鈴木真佐子、池田敏男、糸原重美、Nick Hartell、伊藤正男、遠藤昌吾、PKG 基質 G-substrate 遺伝子欠損マウスの作出とその解析、第２５回日本神経科学大会、２００２年７月７日
6. 道下正貴、池田敏男、仲柴俊昭、田代啓、本庶佑、土井邦雄、糸原重美、遠藤昌吾、脳特異的に発現する BTCL1/2 cDNA の解析、第２５回日本神経科学大会、２００２年７月８日
7. 中澤徹、志村雅彦、玉井信、遠藤昌吾、鈴木真佐子、近藤峰生、上野真治、G-substrate はアマクリン細胞と網膜神経節細胞の一部に発現している、第２６回日本神経科学大会、２００３年７月２３日
8. 児島伸彦、池田敏男、糸原重美、遠藤昌吾、二木宏明、CRE 結合型転写調節因子 ICER 欠失の情動記憶と遺伝子発現に及ぼす効果、第２６回日本神経科学大会、２００３年７月２３日
9. 鈴木真佐子、遠藤昌吾、Translocation of G-substrate, a PKG substrate in cerebellar Purkinje cells、第２６回日本神経科学大会、２００３年７月２３日
10. 本山由美子、遠藤昌吾、Characterization of G-substrate interacting protein in cerebellum、第２６回日本神経科学大会、２００３年７月２３日
11. 道下正貴、池田敏男、小川正晴、土井邦夫、遠藤昌吾、Characterization of BTCL1, a novel marker of subplate in cerebral cortex、第２６回日本神経科学大会、２００３年７月２３日
12. 遠藤昌吾、鈴木真佐子、小脳プルキンエ細胞に存在する PKG 基質 G-substrate の核–細胞質間移行機構、第２６回日本分子生物学会年会、２００３年１２月１３日
13. 遠藤昌吾、小脳依存性記憶を担う分子機構の解析、Neuro2004、２００４年９月２１日

A02-13 富永 真琴

1. 「カプサイシン受容体の研究進展」第 21 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム（長崎） 2000 年 8 月 24, 25 日
2. 「カプサイシン受容体の発現と機能の制御」第 23 回日本神経科学大会シンポジウム（横浜） 2000 年 9 月 4-6 日
3. 「辛味受容体の構造と機能」日本生物物理学会第 38 回年会シンポジウム（仙台）2000 年 9 月 11-13 日
4. 「Capsaicin receptor: its function and regulation mechanism」1st Asian Pain Symposium（京都）2000 年 12 月 1 日
5. 「痛み刺激受容の分子機構-カプサイシン・Vanilloid receptor と疼痛制御-」日本ペインクリニック学会第 35 回大会学術講演（岐阜） 200 1 年 7 月 12-14 日
6. 「Capsaicin receptor: structure, function and regulation」I.U.P.S. Satellite Symposium " " Pain Mechanisms" (Sydney) 2001 年 8 月 19-22 日
7. 「代謝型受容体によるカプサイシン受容体機能制御」第 24 回日本神経科学大会シンポジウム（京都）2001 年 9 月 26-28 日
8. 「Molecular Biology of Capsaicin Receptors」2001 Erlangen Auyum School in Pain Research (Erlangen, Germany) 2001 年 10 月 11-13 日
9. 「痛み刺激受容とカプサイシン受容体 VR1 及びそのホモログ VRL-1」第 24 回日本分子生物学会年会ワークショップ（横浜）2001 年 12 月 9-12 日
10. 「Regulation Mechanism of Capsaicin Receptor VR1 by PKC」International Symposium on Plasticity of Pain System（福岡）2002 年 5 月 9-10 日
11. 「Regulation Mechanism of Capsaicin Receptor VR1」10th IASP World Congress on Pain, Symposium (San Diego) 2002 年 8 月 17-22 日
12. 「Regulation Mechanism of Capsaicin Receptor VR1」3rd FAONS Congress, Symposium (Seoul) 2002 年 9 月 28 日-10 月 1 日
13. 「炎症性疼痛の分子メカニズム」第 24 回日本疼痛学会シンポジウム（名古屋）2002 年 12 月 7-8 日
14. 「Regulation Mechanism of Capsaicin Receptor TRPV1」5th Conference on ABC Proteins and Ion Channels（京都）2003 年 1 月 25-26 日
15. 「温度センサーとしての TRP チャネル」第 80 回日本生理学会大会、第 76 回日本薬理学会大会合同大会シンポジウム（福岡）2003 年 3 月 24-26 日
16. 「侵害刺激受容体の構造機能と発現」第 108 回日本解剖学会総会シンポジウム（福岡）2003 年 4 月 1-3 日
17. 「炎症性疼痛とカプサイシン受容体」第 47 回日本リウマチ学会総会シンポジウム（東京）2003 年 4 月 24-26 日
18. 「Regulation Mechanism of Capsaicin Receptor TRPV1」Satellite Symposium to the 6th IBRO Arold Congress of Neuroscience (Prague) 2003 年 7 月 7-9 日
19. 「Molecular Mechanisms of Heat Sensation」第 26 回日本神経科学大会シンポジウム（名古屋）2003 年 7 月 23-25 日

20. 「Regulation Mechanism of Capsaicin Receptor TRPV1」IASP Research Symposium (Erlangen, Germany) 2003年9月6-9日
21. 「Regulation Mechanisms of Vanilloid Receptors」Novartis Foundation Symposium261 (筑波) 2003年9月30日-10月2日
22. 「Regulation Mechanism of Capsaicin Receptor TRPV1」第76回日本生化学会大会シンポジウム (横浜) 2003年10月15-18日
23. 「温度受容の分子機構：TRP チャネル温度センサー」第77回日本薬理学会シンポジウム (大阪) 2004年3月8-10日
24. 「カプサイシン受容体の構造と機能」2004年度日本農芸化学会大会シンポジウム (広島) 2004年3月29-31日
25. 「Modulation of Capsaicin Receptor (TRPV1) Function by Prostaglandins」第81回日本生理学会大会シンポジウム (札幌) 2004年6月2-4日
26. 「Capsaicin Receptor Regulation by P2Y Receptors」4th International Symposium of Nucleosides and Nucleotides (Chapel Hill, USA) 2004年6月7-9日
27. 「Molecular Mechanisms of Trigeminal Nociception and Sensation of Pungency」14th International Symposium on Olfaction and Taste (京都) 2004年7月5-9日
28. 「Molecular Mechanisms of Detecting Physical Stimuli: Focusing on Thermosensation」14th International Symposium of Itch (東京) 2004年9月25日
29. 「Capsaicin Receptor Regulation by Prostaglandins」第26回日本疼痛学会シンポジウム (東京) 2004年7月17日
30. 「侵害刺激受容の分子機構」第19回日本整形外科学会基礎学術集会教育研修講演 (東京) 2004年10月20-21日
31. 「Thermosensation and Pain」2nd Asian Pain Symposium (Seoul) 2000年11月26-27日

A02-14 竹居 孝二

1.『シナプスにおけるエンドサイトーシスの分子機構とカルシニューリンによる脱リン酸化』竹居ら、第７８回日本生理学会大会（２００１年３月２９～３１日、京都、同志社大学）
2.『エンドサイトーシスにおけるPtdIns(4,5)P_2 の分解』絹田ら、第５４回日本細胞生物学会（２００１年５月３０日～６月１日、岐阜、長良川国際会議場）
3.『Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is degraded prior to vesicle formation in endocytosis. 』竹居ら、Gordon Research Conference, Molecular and Cellular Biology of Lipids （２００１年７月１５～２０日、アメリカニューハンプシャー州 Kimball Union Academy 大学）
4.『AMPA型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスの分子機構」竹居ら、特定領域研究A「神経回路」班会議（２００１年８月２１～２３日、札幌、 札幌サンプラザ）
5.『PtdIns(4,5)P2 の分解とエンドサイトーシス』山田ら、第４４回日本神経化学会（２００１年９月２６～２８日、京都、国立国際会議場）
6.『Klotho マウスの脳及び精巣におけるエンドサイトーシス機能タンパクの発現』李ら、Klotho 研究会（２００１年１２月２２日、東京、経団連会館）
7.『シナプス小胞リサイクルにおける膜脂質の機能と動態』竹居ら、第26回シナプトロジストの会（２００２年3月28日、広島、ホテル法華クラブ広島）
8.『脳及び精巣における Klotho タンパクの発現と Klotho 変異マウスのエンドサイトーシス機能タンパクの発現』李ら、第55回日本細胞生物学会（２００２年5月21～23日、横浜、パシフィコ横浜）
9.『Arf6 による PI(4) 5-kinase の活性化機構』芝ら、第55回日本細胞生物学会（２００２年5月21～23日、横浜、パシフィコ横浜）

A02-15 八尾 寛

● 徳永太，八尾寛　Ca^{2+}チャンネルの各型は神経伝達物質放出とどれほど強く結びついているか？第２４回日本神経科学第４４回日本神経化学合同大会（2001年9月，京都）
● 八尾寛，徳永太，宮崎憲一，南宏美，石塚徹，梅宮正志　海馬苔状線維終末におけるCa^{2+}チャネルサブタイプ発現の生後発達．第２４回日本神経科学第４４回日本神経化学合同大会（2001年9月，京都）
● 鎌田真希，南宏美，八尾寛　ラット海馬培養スライス標本における歯状回顆粒細胞新生の検討．第２４回日本神経科学第４４回日本神経化学合同大会（2001年9月，京都）
● 八尾寛，宮崎憲一，徳永太，南宏美，石塚徹，柳川右千夫，小幡邦彦　海馬苔状線維終末に発現するCa^{2+}チャネルの多様性．第79回日本生理学会大会（2002年3月，広島）

● 徳永太，八尾寛　Caチャンネルの各サブタイプは神経伝達物質放出にどれほど強く結びついているか？第 79 回日本生理学会大会（2002 年 3 月，広島）
● 八尾寛，徳永太，宮崎憲一，南宏美，石塚徹　RタイプCa^{2+}チャネルを介するCa^{2+}流入速い伝達物質放出と連関しているか．第 25 回日本神経科学大会（2002 年 7 月，東京）
● 鎌田真希，南宏美，八尾寛　ラット海馬培養スライス内で神経細胞死は神経新生を促進するか？第 25 回日本神経科学大会（2002 年 7 月，東京）
● 宮崎憲一，古関誠，徳永太，南宏美，石塚徹，柳川右千夫，小幡邦彦，八尾寛　単一海馬苔状線維終末に置ける 4 種類のCa^{2+}チャネルサブタイプ発現の多様性．第 25 回日本神経科学大会（2002 年 7 月，東京）
● 徳永太，八尾寛　シナプス前終末のカルシウム流入と神経伝達物質放出との機能的な結びつきを定義する．第 25 回日本神経科学大会（2002 年 7 月，東京）
● 八尾寛　シナプス前終末におけるCa^{2+}チャネルの多様性．第 45 回日本神経化学会（2002 年 7 月，札幌）
● Tokunaga T. & Yawo H., ARE R-TYPE CALCIUM CHANNELS INVOLVED IN NEUROTRANSMITTER RELEASE FROM HIPPOCAMPAL MOSSY FIBER TERMINALS? Third Forum of European Neuroscience, Paris, July 13-17, 2002.
● Yawo, H., T. Tokunaga, K. Miyazaki, H. Minami, T. Ishizuka, Y. Yanagawa and K. Obata. FUNCTIONAL VARIETY OF CA^{2+} CHANNEL SUBTYPES EXPRESSED IN HIPPOCAMPAL MOSSY FIBER TERMINALS. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, Orlando, Nov. 2-7, 2002.
● 徳永太，八尾寛　シナプス前終末のカルシウム流入と神経伝達物質放出の機能的な結びつきを定義する．第 25 回日本神経科学大会（2002 年 7 月，東京）
● 八尾寛，徳永太，宮崎憲一，南宏美，石塚徹　RタイプCa^{2+}チャネルサブタイプを介するCa^{2+}流入は早い伝達物質放出と連関しているか．第 25 回日本神経科学大会（2002 年 7 月，東京）
● 鎌田真希，南宏美，八尾寛　ラット海馬培養スライス内で神経細胞死は神経新生を促進するか？第 25 回日本神経科学大会（2002 年 7 月，東京）
● 宮崎憲一，古関誠，徳永太，南宏美，石塚徹，柳川右千夫，小幡邦彦，八尾寛　単一海馬苔状線維終末に置ける 4 種類のCa^{2+}チャネルサブタイプ発現の多様性．第 25 回日本神経科学大会（2002 年 7 月，東京）
● 宮崎憲一，古関誠，徳永太，南宏美，石塚徹，柳川右千夫，小幡邦彦，八尾寛　単一海馬苔状線維終末のデキストラン結合Ca^{2+}感受性色素投与による蛍光量変化の測定．第 80 回日本生理学会大会（2003 年 3 月，福岡）
● 徳永太，宮崎憲一，八尾寛　カルシウムチャンネルの機能的多様性についての一考察．第 80 回日本生理学会大会（2003 年 3 月，福岡）
● 鎌田真希，南宏美，八尾寛　神経細胞の数的恒常性の維持に関わる神経新生の役割．第 80 回日本生理学会大会（2003 年 3 月，福岡）
● 荒木力太，石塚徹，八尾寛　シナプトフローリンを用いた開口放出の光学計測．第 80 回日本生理学会大会（2003 年 3 月，福岡）
● 八尾　寛，石塚　徹　シナプス前終末の機能を可視化する．第１０８回 日本解剖学会総会・全国学術総会（2003. 4. 3. 福岡）
● Yanagawa Y, Kaneko K, Tamamaki N, Minami H, Yawo H, Kanbara N, Totsuka M, Yagi T, Obata K Characterization of GABAergic neurons in the basolateral amygdala using GAD67-GFP knock-in mouse. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, July 2003.
● Arki R, Ishizuka T, Hashimoto M, Yawo H. Direct measurement of exocytosis in the hippocampal mossy fiber terminals of synaptopHluorin-transfected mice. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, July 2003.
● Kamada M, Hashimoto M, Kakuda M, Minami H, Ishizuka T, Okada H., Koyanagi Y, Yawo H. Evidences of neurogenesis in the hippocampal slice culture. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, July 2003.
● Miyazaki K, Tokunaga T, Koseki M, Minami H, Ishizuka T, Yawo H. Varigation of N-Type Ca^{2+} channel distribution among individual mossy fiber terminal. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, July 2003.
● Tokunaga T, Miyazaki K, Araki R, Izadi J, Yawo H. A fundamental model of the mossy fiber-CA3 pyramidal cell network in hippocampus based on the synaptic properties determined by voltage-dependent calcium channel distributions. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, July 2003.
● 和地　恵，奈良　諭，石塚　徹，仲井邦彦，佐藤　洋，八尾　寛，空間学習成立マウス海馬における苔状線維の新しい投射の解析．海馬と高次機能学会（2003. 11. 23. 東京）．
● 鎌田真希，橋本美香，角田雅昭，八尾　寛，新生神経の機能解析モデルとしての海馬スライス培養．第２６回 日本神経科学大会（2003. 7. 25. 名古屋）
● 八尾　寛，宮崎憲一，真鍋友則，徳永太，石塚徹，マウス海馬苔状線維終末におけるN-およびR-タイプカルシウムチャネルのヘテロな発現－1．生理学的検証．第 81 回日本生理学会大会（2004. 6. 3. 札幌）
● 真鍋友則，八尾　寛，宮崎憲一，徳永太．マウス海馬苔状線維終末におけるN-およびR-タイプカルシウムチャ

ネルのヘテロな発現－1. 形態学的検証. 第81回日本生理学会大会（2004. 6. 3. 札幌）
● 李仁勇，橋本美香，角田雅昭，鎌田真希，岡田広司，小柳義夫，石塚徹，八尾　寛. 海馬スライス培養における内在的ニューロン新生. 第81回日本生理学会大会（2004. 6. 3. 札幌）
● 八尾　寛，和地恵，奈良諭，鎌田真希，石塚徹，仲井邦彦，佐藤洋. 空間学習マウスにおける海馬苔状線維シナプス新生の形態計測解析. 第27回日本神経科学大会第47回日本神経化学会大会合同大会（2004. 9.21，大阪）
● 荒木力太，石塚徹，柳川右千夫，阪上洋行，小橋雄一，明石馨，平林敬浩，宮崎純一，崎村建司，八尾　寛. 遺伝子ターゲッティング法を用いたシナプトフローリンによる開口放出の測定. 第27回日本神経科学大会第47回日本神経化学会大会合同大会（2004. 9.21，大阪）
● 鎌田真希，李仁勇，橋本美香，角田雅昭，岡田広司，小柳義夫，石塚徹，八尾　寛. 生後海馬由来培養スライスにおける新生細胞の形質. 第27回日本神経科学大会第47回日本神経化学会大会合同大会（2004. 9.21，大阪）

A02-16 久本 直毅

1. 久本直毅、川崎正人、日野未歩、坂本リエ、松本邦弘 線虫 *C. elegans* をモデル動物とした JNK/p38 MAP キナーゼカスケードの神経系における役割　日本分子生物学会，Dec 2001.
2. Sakamoto R, Kawasaki M, Bird DT, Jin Y, Hisamoto N, Matsumoto K. A JNK/UNC-16 signaling complex regulates synaptic vesicle localization through a conventional kinesin in *C. elegans*. 第３回 *C. elegans* 日本集会，Aug 2002.
3. Sakamoto R, Bird DT, Hisamoto N, Matsumoto K, Jin Y. A conventional kinesin and UNC-14regulate synaptic vesicle localization in *C. elegans*. 14th international *C. elegans* meeting Jun 2003.
4. Sakamoto R, Bird DT, Hisamoto N, Matsumoto K, Jin Y. The UNC-116 and KLC-2 conventional kinesin requires UNC-16 and UNC-14 to regulate synaptic vesicle localization. East Asia *C. elegans* Meeting, Jun. 2004.

A02-17 岩本 義輝

1. IwamotoY, KojimaY, YoshidaK (2004) Adaptation of oblique saccades following adaptation of horizontal and vertical saccades. Soc Neurosci Abstr 30:378.2.
2. KojimaY, IwamotoY, YoshidaK (2004) Changes in saccade metrics associated with amplitude adaptation and recovery in monkey. Soc Neurosci Abstr 30:990.3.
3. KojimaY, IwamotoY, YoshidaK(2004)Spatialcharacteristicsoffacilitatedsaccadicadaptationinthemonkey. The Japanese Journal of Physiology 54
4. Kojima, Y., Iwamoto, Y. andYoshida., K. Motor learning facilitation for saccades occurs predominantly in the learned component. The 31st NIPS International Symposium, Multidisciplinary approaches to sensorimotor integration. P-55, Okazaki, 2004
5. Kojima, Y., Iwamoto, Y. and Yoshida., K. Erasure of memory trace responsible for facilitation of saccade adaptation. Soc. Neurosci. Abstr., 79.1, 2003
6. Kojima Y, Iwamoto Y, Yoshida K (2003) Facilitation of saccade adaptation. The Japanese Journal of Physiology 53
7. Kojima, Y., Iwamoto, Y. and Yoshida., K. Saccadic adaptation is accelerated by transient reversal of gain change direction. Soc. Neurosci. Abstr., 465.2 2002
8. Iwamoto Y, Inaba N, Kojima Y, Yoshida K (2002) Adaptive modification of saccade size by the cerebellum. International workshop Cognitive Impact on Sensory Motor Integration Abstr, National Institute for Physiological Sciences Okazaki.
9. Iwamoto Y, Kojima Y, Yoshida K Adaptation of oblique saccades following adaptation of horizontal and vertical saccades. Society for Neuroscience 34rd Annual Meeting, San Diego, Carifornia. 2004.10
10. Kojima Y, Iwamoto Y, Yoshida K Changes in saccade metrics associated with amplitude adaptation and recovery in monkey. Society for Neuroscience 34rd Annual Meeting, San Diego, Carifornia. 2004.10
11. 小島奉子，岩本義輝，　吉田薫 サッケード適応促通の空間的特性.　第８１回日本生理学会.　札幌. 2004.6
12. Kojima Y, Iwamoto Y, Yoshida K Motor learning facilitation for saccades occurs predominantly in the learned component. International workshop Multidisciplinary Approaches to Sensorimotor Integration Old questions Meet New Concepts, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki. 2004.3
13. Kojima Y, Iwamoto Y, Yoshida K Erasure of memory trace responsible for facilitation of saccade adaptation. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans, Louisiana. 2003.11
14. 小島奉子，　岩本義輝，　吉田薫 運動学習の促通.　第１９回運動調節の神経機序とその病態生理研究会.　茨

城. 2003.11
15.小島奉子, 岩本義輝, 吉田薫 サッケード運動学習の促通. 第２３９回生理学東京談話会. 東京. 2003.10
16.小島奉子, 岩本義輝, 吉田薫 サッケードゲイン適応の促通に関与する学習痕跡の保存と消去. 第２６回日本神経科学会. 名古屋. 2003.7
17.小島奉子, 岩本義輝, 吉田薫 サッケード適応の促通. 第８０回日本生理学会. 福岡. 2003.3
18.Iwamoto Y, Inaba N, Kojima Y, Yoshida K Adaptive modification of saccade size by the cerebellum. International workshop Cognitive Impact on Sensory Motor Integration, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 2002.12
19.Kojima Y, Iwamoto Y, Yoshida K Saccadic adaptation is accelerated by transient reversal of gain change direction. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, Orlando, Florida. 2002.11

A02-19 井上 貴文

1. 深津和美, 坂内博子, 張松柏, 中村秀樹, 井上貴文, 御子柴克彦. アクチン、4.1NによるIP_3受容体タイプ１の拡散制御. 日本生物物理学会第42回年会, 京都, 12月13-15日 (2004).
2. 坂内博子, 深津和美, 水谷顕洋, 夏目徹, 家村俊一郎, 池上徹, 井上貴文, 御子柴克彦. 神経細胞樹状突起における微小管依存的なRNA結合タンパク質SYNCRIPの輸送 -mRNA顆粒の構成要素として-. 日本生物物理学会第42回年会, 京都, 12月13-15日 (2004).
3. C. Hisatsune, Y. Kuroda, T. Torashima, H. Hirai, T. Inoue, K. Mikoshiba. Implication of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type 1-mediated signaling in the regulation of dendritic outgrowth of Purkinje cells. 34th Annual Meeting of the Society of Neuroscience, San Diego, 10月 23-27日 (2004).
4. 井上貴文, 坂内博子, 中山智博, 服部光治, 御子柴克彦. 神経細胞樹状突起におけるキネシン依存的な高速, 両方向性のER輸送. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
5. 深津和美, 坂内博子, 張松柏, 中村秀樹, 井上貴文, 御子柴克彦. 神経細胞樹状突起におけるアクチン骨格、4.1NタンパクによるIP_3受容体タイプ１拡散制御機構の解明. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
6. 立石陽子, 服部光治, 中山智博, 岩井美和子, 坂内博子, 中村健, 道川貴章, 井上貴文, 御子柴克彦. イノシトール1,4,5-三リン酸受容体のクラスター形成機構の解析. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
7. 岩井美和子, 立石陽子, 服部光治, 水谷顕洋, 二木啓, 井上貴文, 古市貞一, 道川貴章, 御子柴克彦. 新規２型イノシトール３リン酸受容体スプライシングアイソフォームの受容体細胞内局在における役割. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
8. 久恒智博, 黒田有希子, 寅島崇, 平井宏和, 井上貴文, 御子柴克彦. IP3 type 1 受容体を介したPurkinje細胞樹状突起伸展の制御. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
9. 坂内博子, 深津和美, 水谷顕洋, 夏目徹, 家村俊一郎, 池上徹, 井上貴文, 御子柴克彦. RNA結合タンパク質SYNCRIPはmRNA granuleの構成要素である. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
10. 御子柴克彦, 道川貴章, 濱田耕造, 安東英明, 藤本一朗, 中村健, 坂内博子, 深津和美, 井上貴文, 松浦徹, 水谷顕洋, 張松柏, 山崎美佳. IP_3レセプター・その構造と生理機能. 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月13-16日 (2004).
11. K. Otsu, A. Kuruma, E. Yanagida, T. Inoue, S. Shoji, Y. Hirayama, H. Uematsu, M. Hiraoka, Y. Hara, S. Kawano. Functional development of Na^+/Ca^{2+} exchanger during cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. 第81回日本生理学会大会, 札幌, 7月2-4日 (2004).
12. 立石陽子, 服部光治, 坂内博子, 岩井美和子, 内田敬子, 中村健, 道川貴章, 井上貴文, 御子柴克彦. イノシトール1,4,5-三リン酸受容体のクラスター形成の分子機構. 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月10-13日 (2003).
13. P.E. Pomata, T. Inoue, D.J. Calvo, L.D. Pozzo-Miller. Ih blockade increases dendritic calcium transients evoked by backpropagating action potentials. 33rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, 11月8-12日 (2003).
14. 井上 貴文. 記憶をカルシウムで語る. 第6回 若手研究者のための薬理学セミナー 「脳と記憶 –その謎を解くいくつかの試み–」. 福岡, 10月31日 (2003).
15. K. Mikoshiba, K. Hamada, H. Bannai, K. Fukatsu, H. Ando, T. Matsu-ura, K. Uchida, T. Michikawa, T. Nakayama, Y. Tateishi, S. Zhang, A. Mizutani, M. Hattori, T. Inoue. Molecular imaging of the intracellular signal transduction. 日本神経化学会・日本生物物理学会合同年会, 新潟, 9月24-26日 (2003).
16. 坂内博子, 井上貴文, 中山智博, 服部光治, 御子柴克彦. 神経細胞樹状突起におけるvesicle状小胞体の

輸送メカニズムと機能の解析. 日本神経化学会・日本生物物理学会合同年会, 新潟, 9月24-26日 (2003).
17. 深津和美, 坂内博子, 張松柏, 井上貴文, 御子柴克彦. 細胞骨格によるIP_3受容体の動態の制御機構の解明. 日本神経化学会・日本生物物理学会合同年会, 新潟, 9月24-26日 (2003).
18. W. Cai, C. Hisatsune, T. Nakamura, K. Nakamura, A. Mizutani, T. Inoue, K. Mikoshiba. Activity-dependent expression of the type 1 inositol trisphosphate receptor in hippocampal neurons. 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月11-14日 (2002).
19. 久恒智博, 黒田有希子, 中村京子, 井上貴文, 中村健, 道川貴章, 水谷顕洋, 御子柴克彦. Tyrosine phosphorylation of TRPC channels by Fyn tyrosine kinase. 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月11-14日 (2002).
20. 中山智博, 服部光治, 立石陽子, 中村健, 内田敬子, 岩井美和子, 道川貴章, 井上貴文, 御子柴克彦. イノシトール-1,4,5-三リン酸受容体タイプ1の調節領域のチャネル開閉に対する機能と、caspase-3による分解の意義. 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月11-14日 (2002).
21. 坂内博子, 井上貴文, 中山智博, 服部光治, 御子柴克彦. 神経細胞樹状突起における高速, 両方向性, 微小管依存的な小胞体輸送. 日本生物物理学会第40回年会, 名古屋, 11月2-4日 (2002).
22. K. Mikoshiba, K. Hamada, T. Michikawa, T. Inoue, S. Fujii, H. Kato. Ca^{2+} oscillation and Ca^{2+} wave in life system. International Symposium on Bio-Trace Elements (BITREL) 2002, Wako and Fujiyoshida, Japan, 10月28日-11月2日 (2002).
23. M. Yoshida, K. Fukami, T. Inoue, K. Mikoshiba, T. Takenawa. Mechanisms of sustained calcium increase during acrosome reaction in mouse sperm. 9th International Symposium on Spermatology, Cape Town, South Africa, 10月6-11日 (2002).
24. 立石陽子, 服部光治, 中山智博, 中村健, 坂内博子, 岩井美和子, 内田敬子, 道川貴章, 井上貴文, 御子柴克彦. GFPを利用したIP3受容体の細胞内動態の解析. 第45回日本神経化学学会大会, 札幌, 7月17-19日 (2002).
25. 来馬明規, 井上貴文, 御子柴克彦. 小脳プルキンエ細胞樹状突起におけるCaとNa動態. 第25回日本神経科学大会, 東京, 7月7-9日 (2002).
26. 黒倉あゆ子, 井上貴文, 山田麻紀, 御子柴克彦. マウス小脳顆粒細胞に発現するイノシトール3リン酸受容体サブタイプの同定. 第25回日本神経科学大会, 東京, 7月7-9日 (2002).
27. 後藤純一, 井上貴文, 来馬明規, 御子柴克彦. マウス小脳プルキンエ細胞樹状突起における平行線維刺激によるCa^{2+}動態の生後発達に伴う変化. 第25回日本神経科学大会, 東京, 7月7-9日 (2002).
28. A. Kuruma, T. Inoue, K. Mikoshiba. Dynamics of parallel fiber-induced Ca^{2+} transient in cerebellar Purkinje cells. 2002 FASEB Summer Research Conferences "Calcium and Cell Function", Salt Lake City, Utah, 6月22-27日 (2002).
29. 来馬明規, 井上貴文, 御子柴克彦. 小脳プルキンエ細胞樹状突起における平行線維刺激時のカルシウム動態. 第79回日本生理学会大会, 広島, 3月28-30日 (2002).
30. H. Bannai, T. Inoue, T. Nakayama, M. Hattori, K. Mikoshiba. Microtubule dependent fast, bidirectional movement of ER vesicles in dendrites of mouse hippocampal neuron. 46th Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, 2月23-27日 (2002).
31. A. Kuruma, T. Inoue, K. Mikoshiba. Dynamics of Ca^{2+} and Na^{+} in cerebellar Purkinje cells. 46th Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, 2月23-27日 (2002).
32. Y. Takiyama, K. Kato, T. Inoue, F. Sakai, K. Mikoshiba. Imaging synchronization and propagation of intracellular calcium oscillation during non-synaptic seizure-like neuronal activity in rat. "Brain Activation & CBF Control", A Satellite Symposium of Brain 01, Tokyo, 6月5-8日 (2001).

A02-20 木村 文隆

1)F. Kimura, C. Itami, K. Kameyama, T. Tsumoto Nicotinic activation induced enhancement followed by layer specific suppression in thalamocortical transmission studied in the mouse barrel cortex 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience 2004年10月27日
2)Kimura, F., Yanagisawa, T., Tsumoto Release probability at the thalamocortical transmission is transiently higher during critical period: possible association with postsynaptic silent synapse 第81回生理学会大会 2004年6月3日
3)Kimura, F., Yanagisawa, T., Tsumoto Release probability at the thalamocortical synapse is transiently higher during critical period: possible relevance to postsynaptic silent synapses 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience 2003年11月11日
4)Kimura, F. Cholinergic control of cortical circuits: nicotinic effects on thalamocortical transmission

studied in mouse barrel system " Imaging the Brain: Neurons, Networks and Behaviour" at New York University, 2003年9月5-7日
5)Kimura, F. Salami, M. Itami. C. and Tsumoto, T. Constant conduction time between thalamus and cortex due to change of conduction velocity resulting from regional myelination IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE (Prague, Czech Republic) 2003年7月10-15日
6)Itami, C., F Kimura, T Tsumoto, S Nakamura. BDNF regulates activation of postsynaptically silent synapses in developing mouse barrel cortex IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE (Prague, Czech Republic) 2003年7月10-15日
7)木村文隆 Cholinergic control of cortical circuits: nicotinic effects on thalamocortical transmission studied in mouce barrel system 第80回生理学会大会 2003年3月24-26日
8)Yanagisawa, T., Tsumoto, T., Kimura, F. Developmental decrease in release probability at mouse thalamocortical synapses and discrepancy in paired pulse ratio between AMPA and NMDA receptor-mediated EPSCs. 32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience 2002年11月5日
9)Kimura, F., M. Salami, C. Itami, T. Tsumoto Distance-independent constant latency yielded by a change of conduction velocity due to a selective myelination from thalamus to white matter. 15th Barrel Meeting 2002年10月31日
10) Kimura, F., Salami, M., Itami, C., Tsumoto, T. Developmental changes in the conduction velocity of thalamocortical pathway in the mouse somatosensory system. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience 2001年11月11日

A02-21 姜 英男

1.Kang, Y., Saito, M., Takada, M., and Shigemoto, R. Mechanisms underlying trafficking of impulses in T-junctions of pseudounipolar primary sensory neurons of rat mesencephalic trigeminal nucleus. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, October 24, 2004.
2.Kobayashi, M., Hamada, T., and Kang, Y. Developmental profile of $GABA_A$-mediated synaptic transmission in murine barrel cortex. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, October 25, 2004.
3.Kang, Y., Kobayashi, M., Hamada, T., Shimanuki, Y., and Saito M. Coherence of inhibitory synaptic inputs involved in modulation of inter- and intra-columnar excitatory synaptic connections. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, November 10, 2003.
4.Saito, M. and Kang, Y. Calcium-dependent currents responsible for spike afterpotentials in trigeminal motoneurons. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, November 9, 2003.
5.Dempo, Y., Sudo, E., Shigenaga, Y., Hirai, T., and Kang, Y. Electrophysiological examination of the effects of nitric oxide on neurons in the basal forebrain. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, November 3, 2002.
6.Ishii, H., Saito, M., Masuda, Y., and Kang, Y. Molecular basis for $GABA_A$ responses in rat mesencephalic trigeminal neurons. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, November 5, 2002.
7.Fukushi, E., Endo, T., Hamaue, N., Hirafuji, M., Minami, M., and Kang, Y. Two types of neurons in the nucleus tractus solitarius characterized electrophysiologically in slice preparations of rats. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, November 5, 2002.
8.Murai, Y., Akaike, T., and Kang, Y. A role of A-type K^+ channels in regulation of spike generation in rat mesencephalic trigeminal neurons. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, November 5, 2002.
9.Kang, Y., Ishii, H. and Saito, M. Cooperative action of h-channel and Na^+-K^+ pump in rat mesencephalic trigeminal neurons. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, November 6, 2002.
10.Inoue, T., Saito, M., Usui, M., Tsuruoka, M., Kang, Y., Yamamoto, M., Ohata, H., and Momose, K. Firing properties of jaw-closing motoneurons are different from those of jaw-opening motoneurons. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, November 7, 2002.

A02-22 宮田 麻理子

1. 宮田麻理子、林隆之、矢島義議、柏谷英樹、成田年、鈴木勉、川上順子：Phopholipase C・4 遺伝子欠損マウスを用いた疼痛関連行動の解析 第78回日本生理学会 (京都) 2001年3月
2. 今城俊浩、笠木陽子、勝俣晴美、小西敏一郎、宮田麻理子、南史郎：ストレス伝達におけるCRF受容体の役割 第78回日本生理学会 (京都) 2001年3月
3. 宮田麻理子：小脳神経可塑性の分子メカニズム 第237回生理学会東京懇話会 (東京) 2001年10月
4. 宮田麻理子 林隆之 矢島義議、成田年、鈴木勉、川上順子：炎症性疼痛に於ける視床phospholipase C ・4

の役割　（京都）　第24回　日本神経科学合同大会　2001年9月
5. 柏谷英樹、宮田麻理子、川上順子：末梢カプサイシン刺激に対する視床ニューロンのスパイク応答はPLC・4によって修飾される（京都）　大24回日本神経科学合同大会　2001年9月
6．小西敏一郎、勝俣晴美、笠木陽子、宮田麻理子、今城俊浩：脳損傷に置けるCRF受容体の発現　第28回神経内分泌学会　（東京）　2001年10月
7．狩野正信、宮田麻理子　橋本浩一：小脳プルキンエ細胞受容突起の局所カルシウムシグナルとシナプス可塑性　第７5回日本薬理学会 2001年3月
8．柏谷英樹、宮田麻理子、川上順子：PLCβ4による視床VPLニューロンの炎症性頭痛刺激に対する応答の調節　第25回日本神経科学大会　（東京）　2002.7
9. J. Hartmann, Kovalchuk Y., Kuner R., Durand G.M., Miyata Mariko, Kano Masanobu: Gq-dependence of mGluR-mediated synaptic signaling in cerebellar purkingje cells 32nd. Annual Meeting of Society for Neuroscience (Orland) 2002.11
10. Kashiwadani Hideki, Miyata Mariko, Kawakami Yoriko: Thalamic PLCβ4 modulates nociceptive response induced by peripheral formaline injection in VPL neurons 32nd. Annual Meeting of Society for Neuroscience (Orland) 2002.11
11. Miyata Mariko, Hayashi Takayuki, Kashiwadani Hideki, Naraba Emiko, Kawakami Yoriko: Contribution of thalamic PLCβ4 to inflammatory pain behavior of the mouse formalin test. 32nd. Annual Meeting of Society for Neuroscience (Orland) 2002. 11
12. Mariko Miyata: Contribution of thalamic phospholipase C beta 4 mediated by metabotropic glutamate receptor type 1 to inflammatory pain in mice. Pfyzer 1st Science Research Symposium ' Central Mechanism of Neuropathic Pain7' (Nagoya, Japan)2003.6
13. Mariko Miyata: Phospholipase C beta 4 mediated signal in synaptic and brain functions. Second JSPS forum in France ' Post genome' (Strasboug, France) 2003.11
14. Mariko Miyata: Essential role of phospholipase C beta 4 mediate signals in synaptic and brain function' International collaborative symposium ' Neuroscience from molecule to Human' (Seoul, Korea) 2004.1
15. Mariko Miyata: Role of phospholipase C beta 4 in synaptic and brain function. 日米科学技術協力事業「脳研究分野」交換セミナー（岡崎市）2003年3月.
16. 宮田麻理子　炎症性疼痛に於ける視床mGluR1-PLC・・カスケードの役割　日本学術会議主催　「脳のシンポジウム」（東京）2003年5月
17. 宮田麻理子、井本敬二：マウス視床VB核の興奮性シナプス伝達に対するkainate 受容体の制御機構　第27回日本神経科学大会　（大阪）2004年9月
18. Mariko Miyata: Physiological role of thalamic PLCβ 4 metabotropic glutamate receptor type 1 in inflammatory pain. 16th International federation of association of anatomists (Kyoto) 2004. 8
19. Mariko Miyata, Keiji Imoto: Postsynaptic and presynaptic kainate receptors regulate dynamic properties of the corticothalamic synapses. 34th Society for neuroscience annual meeting (CA, San Diego) 2004.10
20. Sachie Sasaki, Mariko Miyata, Keiji Imoto: Network mechanism of absence epilepsy in Ca channel mutant tottering mice. 34th Society for neuroscience annual meeting (CA, San Diego) 2004.10

A02-23　**井本 敬二**

Matsushita K, Wakamori M, Mori Y, Imoto K (2001. 11) Paradoxical enhancement of cerebellar synaptic transmission in rolling calcium channel mutant mice. Society for Neuroscience 31st Annual Meeting (San Diego, USA).

Huda K, Imoto K (2001. 11) Defective feedforward inhibition of thalamocortical integration in tottering epileptic mice. Society for Neuroscience 31st Annual Meeting (San Diego, USA).

Itsukaichi Y, Mori E, Imoto K, Mori Y (2002.11) Rocker mutation alters P/Q-type calcium channel properties in cerebellar Purkinje cells and the recombinant expression system. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA).

Matsushita K, Imoto K (2002.11) Unplugged synaptic transmission in cerebellar nuclei of Ca^{2+} channel mutant mice. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA).

Sasaki S, Miyata M, Shimoto K, Imoto K (2004.10) A network mechanism of absence epilepsy in Ca channel mutant tottering mice. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting (San Diego, USA).

A02-26 宮本 英七

1. Eishichi Miyamoto, Jie Liu, Kohji Fukunaga, Jiro Kasahara and Hideyuki Yamamoto: Role of

Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II and mitogen-activated protein kinase in LTP. International Symposium on Neuronal Signaling and Protein Phosphorylation-Dephosphorylation, June 3-5, 2000, Fukuoka, Japan

2. Eishichi Miyamoto, Kohji Fukunaga, Hideyuki Yamamoto, Yusuke Takeuchi, Jiro Kasahara and Jie Liu: Regulation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinases thorough protein phosphorylation and dephosphorylation in neuronal cells. 4th International Conference on Protein Phosphatases: Roles of Protein Phosphatases in Intracellular Signaling Systems, Nov. 10-12, 2000, Sendai, Japan
3. Eishichi Miyamoto: Activation of CaM kinase II and IV and mitogen-activated protein kinase in neuronal plasticity of the hippocampus. XIVth World Congress of Pharmacology. The New Century of Pharmacology, July 7-12, 2002, San Francisco, USA
4. 宮本英七: カルシウムシグナリングに関する研究：CaM キナーゼカスケードを中心に（特別講演）
第 75 回日本薬理学会年会　平成 14 年 3 月 13 日～15 日　熊本
5. 宮本英七：脳におけるカルシウムシグナル伝達（特別講演）
第 26 回日本医学会総会（The 26th General Assembly of the Japan Medical Congress 2003 Fukuoka）
平成 15 年 4 月 4 日～6 日　福岡

A02-30 金子 鋭

1. 平成１３年３月３０日 第 78 回日本生理学会大会 同志社大学　今出川・新町キャンパス
線条体コリン作働性インターニューロンによる基底核神経回路の可塑性の解析 金子　鋭
2. 平成１３年５月１１日 第 42 回日本神経学会総会 東京　有明国際会議場 線条体コリン作働性インターニューロンによる基底核神経回路の可塑性の解析 金子　鋭
3. 平成１３年９月２６日 第２４回日本神経科学，第４４回日本神経化学合同大会 京都　国立京都国際会館
Synaptic Integration Mediated by Striatal Cholinergic Interneurons in Basal Ganglia Function
Satoshi Kaneko

A02-31 古江 秀昌

1. Nakatsuka T, Shiokawa H, Fujita T, Furue H, Yoshimura M and Kumamoto E : Functional role of ATP P2X receptors in deep dorsal horn neurons of the spinal cord. Neuro2004　2004.9.21-23 大阪国際会議場
2. Moriyama M, Furue H, Teranishi H, Kano T, Kojima M and Yoshimura M : The effect of Neuromedin U on excitatory synaptic transmission in the rat spinal cord. Neuro2004　2004.9.21-23 大阪国際会議場
3. Tamae A, Nakatsuka T, Koga K, Kato G, Furue H and Yoshimura M : Anti-nociceptive action of dopamine in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. Neuro2004　2004.9.21-23 大阪国際会議場
4. 中塚映政、労　力軍、藤田亜美、古江秀昌、熊本栄一、吉村　恵：脊髄後角における ATP およびアデノシン受容体の相互作用.　日本疼痛学会大会　2003.12.1　東京
5. 吉村　恵、古江秀昌：ラット体性感覚野皮質ニューロンからの in vivo patch clamp 記録法の開発.　日本疼痛学会大会　2003.12.1　東京
6. 古江秀昌、吉村　恵：ラット脊髄痛覚シナプス伝達に対する鍼鎮痛効果の解析.　日本疼痛学会大会 2003.12.1　東京
7. 宮川　礎、古江秀昌、吉村　恵：Action of neuropeptide Y on nociceptive transmission in substantia gelatinosa of the adult rat spinal dorsal horn.　第 54 回西日本生理学会　2003.10.17-18　久留米
8. 玉江昭裕、中塚映政、古江秀昌、吉村　恵：脊髄後角細胞におけるドーパミン受容体の役割.　第 54 回西日本生理学会　2003.10.17-18　久留米
9. 古江秀昌、加藤　剛、八坂敏一、吉村　恵：In vivo パッチクランプ法を用いた脊髄後角抑制性シナプス応答の解析.　第 54 回西日本生理学会　2003.10.17-18　久留米
10. 水野雅晴、土井　篤、八坂敏一、古江秀昌、栗生修司、吉村　恵：In vivo patch clamp 記録法を用いたラット体性感覚野バレル皮質ニューロンのヒゲ刺激応答解析.　第 54 回西日本生理学会　2003.10.17-18　久留米
11. 中塚映政、Gu JG、古江秀昌、吉村　恵：てんかん患者の歯状回におけるカンナビオイド受容体の役割.　第 54 回西日本生理学会　2003.10.17-18　久留米
12. 吉村　恵、伊藤彰敏、古江秀昌：骨粗鬆症モデルにおける痛覚過敏とエルカトニンの鎮痛作用機序.　第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会　2003.10.16　北九州　ランチョンセミナー
13. 古江秀昌、又吉　達、中塚映政、吉村　恵：末梢炎症に伴う慢性疼痛発現機序の解析−脊髄痛覚回路の可塑性と神経栄養因子−.　第 24 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム　2003.9.5-6　東京
14. 中塚　映政、園部秀樹、古江秀昌、吉田宗人、吉村　恵：脊髄後角深層細胞におけるサブスタンス P の抑制系神経伝達に対する賦活化作用．生理学研究所研究会「痛みの基礎と臨床−その接点から新しい展望を探る−」

2003.9.4-5　愛知
15. 古江秀昌、加藤　剛、八坂敏一、吉村　恵：非侵害性刺激によって誘起される脊髄後角表層の抑制性シナプス応答の解析.　生理学研究所研究会「痛みの基礎と臨床−その接点から新しい展望を探る」2003.9.4-5　愛知
16. 水野　雅晴、土井　篤、八坂敏一、古江秀昌、栗生修司、吉村　恵：ラット大脳皮質第一次体性感覚野(S1)における in vivo patch clamp 法を用いたシナプス応答の解析.　生理学研究所研究会「痛みの基礎と臨床−その接点から新しい展望を探る」　2003.9.4-5　愛知
17. 吉村　恵、古江秀昌、又吉　達、中塚映政、伊藤彰敏：脊髄後角における痛覚過敏の発生機序.　第２回九州ミエロパチー研究会　2003.7.4　福岡　特別講演
18. 吉村　恵、古江秀昌、中塚映政、伊藤彰敏：痛覚の統御機構.　日本医学会総会　2003.4.4-6　福岡　シンポジスト

A02-32 松崎 政紀

1. Matsuzaki M, Ellis-Davies G.C.R. and Kasai H. Structure-function plasticity of single spines of hippocampal CA1 pyramidal neurons induced by two-photon uncaging of a caged-glutamate compound. 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA). 2003. 11.10.
2. Matsuzaki M. Structural plasticity of dendritic spines associated with short- and long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA). 2004.10.27.

A03-02 白尾 智明

1. T. Shirao, H. Takahashi, Y. Sekino and T. Mizui. " Activity-dependent regulation of drebrin-actin cluster formation during spine development." In the Minisymposium on " Mechanisms of structural plasticity of dendritic spines" Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004.
2. Kobayashi, C., Sasagawa, Y., Sekino, Y., Yamazaki, H., Shirao, T. " Morphological and electrophysiological analysis of transgenic mice overexpressing GFP-drebrin A" Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004.
3. Ito, M., Doya, K., Shirao, T., Sekino, Y. " Fos imaging reveals that the supramammillary nucleus enhances hippocampal activity of rats placed in a novel open field" Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004.
4. Takahashi, H., Mizui, T., Sekino, Y., Yamazaki, H., Shirao, T. " Bidirectional regulation of dendritic spine morphogenesis during development by AMPA and NMDA receptor activities via postsynaptic actin organization" Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004.
5. Shirao, T., Takahashi, H.; Sekino, Y.; Hanamura, K " Expression of Drebrin A Induces Drebrin-dependent Actin Clustering and Synaptic Targeting of Postsynaptic Density-95" First ISN special Neurochemistry Conference " Changes in neuronal gene expression and CNS drug responses" May 13-16, 2004, Avignon, France.
6. Shirao, T. "Genetic and activity-dependent control of drebrin clustering in spine formation" Gordon Research Conferences " Cell Biology Of The Neuron". June 20-25, 2004 New London, NH
7. Shirao, T. " Drebrin A plays a key role in cluster formation of F-actin and PSD-95 at postsynaptic site" Workshop on " Molecular Basis of Synaptic Plasticity " June 27 - June 30, 2004 New York, NY
8. Yamazaki H., Shirao, T. " A novel drebrin binding protein, Drapl, is localized in synaptic site, nucleus and non-clathrin-coated vesicle." The 6th biennial meeting of the Asian-Pacific Society, Hong Kong, China. February 2004
9. Takahashi, H., Mizui, T., Sekino, Y., Yamazaki, H., Shirao, T. " Bidirectional regulation of dendritic spine morphogenesis during development by AMPA and NMDA receptor activities via postsynaptic actin organization." 14th Neuropharmacology Conference: The Cytoskeleton and Synaptic Function October 20-22, 2004, San Diego, CA.
10. Sekino, Y., Mizui, T., Takahashi, H. , Shirao, T. " Dynamics of drebrin A in the dendritic spine of cultured hippocampal neuron" 14th Neuropharmacology Conference: The Cytoskeleton and Synaptic Function October 20-22, 2004, San Diego, CA.
11. Sekino, Y. Shirao T. and Obata, K. " Adenosine A1 Receptor Activity Regulates Signal Processing in the Hippocampus" Sixth IBRO World Congress o Neuroscience, Prague, Czech Republic. July 10-15, 2003.
12. Shirao T, Takahashi H, Sekino Y, and Obata K. " Drebrin Clustering with Actin Filaments is a first Essential Step of Dendritic Spine Morphogenesis." Sixth IBRO World Congress o Neuroscience, Prague, Czech Republic. July 10-15, 2003.

13. Shirao T, Takahashi H, and Sekino Y. " Drebrin Clustering with Actin Filaments is an Essential Step of Dendritic Spine Morphogenesis" International Synaptogenesis Meeting, Vienna, Austria Jun 5-7, 2003.
14. Shirao, T., Takahashi H., Sekino Y., Mizui T. " Cluster formation of drebrin in filopodia is an essential step for dendritic spine morphogenesis." Society for Neuroscience 33th Annual Meeting, 2003.
15. Ito, M., Doya, K., Shirao, T., Sekino, Y. " Spatial distribution of Fos-positive neurons in the supramammillary nucleus and the hippocampus of rats placed in a novel environment" Society for Neuroscience 33th Annual Meeting, 2003.
16. Kobayashi, C., Shirao, T. " Establishment of drebrin A transgenic mice lines and their transgene expression analysis". First COE International Symposium, Maebashi, Japan. October 21-22, 2003.
17. Mizui, T., Shirao, T., Sekino, Y. " Activation of glutamate receptors translocates drebrin from dendritic spines to the parent dendrite in hippocampal neurons." First COE International Symposium, Maebashi, Japan. October 21-22, 2003.
18. Takahashi, H., Shirao, T " Cluster Formation of Drebrin in Dendritic Filopodia is an Essential Step for Dendritic Spine Morphogenesis." First COE International Symposium, Maebashi, Japan. October 21-22, 2003.
19. Sekino Y., Shirao T. " Tonic activity of adenosine A1 receptors regulates the signal flow at the CA2 region in rat hippocampus: Optical recording analysis" The 28th NIPS International Symposium " Inhibitory Neural Transmission in the Brain Structure and Function", Okazaki, Japan, February 26-28, 2002.
20. Takahashi, H., Tanaka S., Sekino Y., Shirao T.. " Two distinct developmental states of dendritic filopodia based on the cluster formation of actin-binding protein drebrin." Society for Neuroscience 32th Annual Meeting, 2002.
21. Tanaka, S., Sekino, Y., Shirao. T. " Suppression of drebrin A expression blocks alfa-actinin disappearance induced by glutamate in cortical neuronal cultures." Society for Neuroscience 32th Annual Meeting, 2002.
22. Shirao, T., Sekino Y " Inhibition of drebrin-A expression blocked the postsynaptic actin specialization in the dendritic filopodia" INMED Conference 2002, 2002.
23. Shirao T. Sekino Y. " Developmentally-regulated and activity-dependent translocation of drebrin within the neuron." Keystone Symposia: The Synapse, Taos, USA, March 1-6, 2001.
24. Sekino Y., Shirao T. " Adenosine A1 receptor regulate, " the signal flow in rat hippocampus: Optical imaging analysis." Keystone Symposia: Hippocampus: The Integration of Molecular Mechanisms and cognitive function, Taos, USA, March 1-6, 2001.
25. Shirao, T. Sekino, Y. .Takahashi H, .Tanaka S " Metaplasticity and regulation of the spine-neck length in dendrite." CREST Workshop on Metalearning and Neuromodulation (2001.4.6～7)
26. Tanaka, S., Sekino Y., Shirao, T.. " Morphological analysis of the dendritic spines induced by drebrin A knockdown using antisense oligonucleotides in the cultured cortical neurons" The 11th Neuropharmacology Conference: Molecular mechanisms of synaptic function. San Diego, CA November 8-10, 2001.
27. Takahashi, H., Tanaka, S Sekino Y., Shirao. T. " Activity-dependent redistribution of actin-binding protein drebrin in synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons." The 11th Neuropharmacology Conference: Molecular mechanisms of synaptic function. San Diego, CA November 8-10, 2001.
28. Takahashi H., Sekino Y., Shirao. T. " Reversible translocation of actin-binding protein drebrin by glutamate receptor activity in cultured hippocampal neurons" Society for Neuroscience 31th Annual Meeting, 2001
29. Tanaka S., Sekino Y., Shirao T. " Change of dendritic spine length induced by drebrin A knockdown using antisense oligonucleotide in vitro." Society for Neuroscience 31th Annual Meeting, 2001.
30. Zhang J., Shirao T., Sekino Y.. " Regulation of the synaptic transmission through adenosine A1 receptors and adenylyl cyclase in the CA2 region of rat hippocampus." Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, 2000
31. Ren Y. Sekino Y., Tanaka S., Shirao T. " Translocation of drebrin-like immunoreactivity from cell soma to dendritic spines is parallel with the rapid increase in the expression level of drebrin A. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, 2000.
32. Yamazaki H., Kojima N., Shirao T. " Immunohistochemical analysis of SH3P7 in the rat brain." Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, 2000.
33. Y. Sekino " The mechanism of synaptic inhibition in the CA2 region of rat hippocampal slices studied

by optical recording." Smith-Kettlewell Colloquia. San Francisco, USA, November 13, 2000
34. Noda K., Iwakuma M., Shirao T., Kaneda Y, Saji M.. "Knockdown of transmitter release related-protein by HVJ-liposome mediated gene transfer regulates ischemic brain damage." Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, 1999
35. Shirao T., Sekino Y., Kawai-Hirai R. "Translocation and localization of drebrin within dendritic spines and parent dendrites" Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, 1999

A03-03 能瀬 聡直

1 T.-Morimoto, T., Kazama, H. and Nose, A.: Retrograde signaling in the development of synapses: involvement of CaMKII in the maturation of presynaptic function. 2001 meeting on "Neurobiology of Drosophila" (Cold Spring Harbor, U.S.A., October, 2001).
2 Kohsaka, H. and Nose, A.: The target recognition molecule CAPRICIOUS clusters at the tip of myopodia. 2002 meeting on " Axon guidance and neural plasticity" (Cold Spring Harbor, U.S.A., September, 2002).
3 Shinza-Kameda, M. and Nose, A.: Drosophila Capricious regulates R8 photoreceptor axon target specificity in the visual system. 2002 meeting on " Axon guidance and neural plasticity" (Cold Spring Harbor, U.S.A., September, 2002).
4 Tanaka, H., Takasu, H., Umemiya, T., Aigaki, T., and Nose, A.: A novel formin homology protein implicated in tracheal formation in Drosophila, The 44th Annual Drosophila Research Conference (Chicago, U.S.A.., March 2003)
5 Hiroshi Kohsaka and Akinao Nose: Clustering of the target recognition molecule Capricious at the tips of myopodia. 2003 international congress of genetics: a Drosophila conference (Cairns, Australia, July 2003)
6 Hiroshi Kohsaka and Akinao Nose: Concentration of the target recognition molecule Capricious at the tips of myopodia and the nascent synapse in Drosophila. EMBO workshop on " The assembly of neural circuits" (Varenna, Italy, September 2003)
7 Hiroshi Kohsaka and Akinao Nose: Postsynaptic dynamism and neural specificity: Concentration of the target recognition molecule Capricious at the tips of myopodia. FMI conference on " Formation and function of neuronal circuits" (Ascona, Swiss, September 2003)
8 Makiko Shinza-Kameda and Akinao Nose: Control of photoreceptor targeting by layer-specific expression of the LRR protein Capricious. 2003 meeting on " Neurobiology of Drosophila" (Cold Spring Harbor, U.S. A., October, 2003)
9 Takako Morimoto-Tanifuji, Hiroaki Nakayama, Hokto Kazama and Akinao Nose: Activity-dependent mechanisms for synaptic growth matched with postsynaptic muscle volume in Drosophila neuromuscular junctions. 2003 meeting on " Neurobiology of Drosophila" (Cold Spring Harbor, U. S. A., October, 2003)
10 Takako Morimoto-Tanifuji, Hiroaki Nakayama, Hokto Kazama and Akinao Nose : Activity-dependent synaptic maturation matched with the size of postsynaptic cells in Drosophila neuromuscular junctions. 33th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, November, 2003)
11 Kazama, H., Morimoto-Tanifuji, T and Nose, A.: Molecular components necessary for retrograde signaling triggered by postsynaptic activation of CaMKII. 2004 meeting on " Axon Guidance & Neural Plasticity" (Cold Spring Harbor, U.S.A., September, 2004)
12 Kohsaka, H., Sakurai, K., Hayashi, S., Nose, A.: Postsynaptic dynamism and synaptic specificity - Localization and function of target recognition molecule capricious at the tip of myopodia. 2004 meeting on " Axon guidance and neural plasticity" (Cold Spring Harbor, U.S.A., September, 2004)
13 Kohsaka, H., Sakurai, K., Hayashi, S., Nose, A.: Long-distance communication by the target recognition molecule Capricious: implication for the role of myopodia in synaptic matchmaking of Drosophila NMJ. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience. (San Diego, U.S.A., October, 2004)
14 Morimoto-Tanifuji, T., Kazama, H., and Nose, A.: Developmental stage-dependent effects of postsynaptic activation of CaMKII on synapse formation at Drosophila neuromuscular junctions. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience. (San Diego, October, 2004).

A03-04 塩見 健輔

1. 岡田拓也、桝和子、塩見健輔、桝正幸、マイクロアレイ法を用いた側枝形成因子の解析、日本神経科学学会、平成１６年９月２３日
2. 桝和子、塩見健輔、兼元みずき、吉田さちね、相馬克徳、桝正幸、マウスCcd1アイソフォームの同定と神経

系での発現解析、日本神経科学学会、平成１６年９月２１日
3.　塩見健輔、内田博、桝和子、桝正幸、ゼブラフィッシュ sulfataseFP 遺伝子の機能解析、日本神経科学学会、平成１６年９月２１日
4.　塩見健輔、兼元みずき、吉田さちね、内田博、桝和子、桝正幸.　Cloning of mouse ccd1(coiled-coil-DIX1), a novel protein with a DIX domain involved in Wnt signal activation.　日本神経科学大会、平成１５年７月２３日

A03-05 広海 健

1.山田琢磨, 岡部正隆, 広海健 : 細胞の誘導能獲得に関与するショウジョウバエ遺伝子 trv, 日本発生生物学会第 32 回大会, 1999 年 5 月.
2.Yamada, T., Okabe, M., Hiromi, Y.: Regulation of homeogenetic induction by a novel ets-related factor EDL, 8th Meeting on Neurobiology of Drosophila, 1999 年 9 月.
3.丹羽尚, 岡部正隆, 広海健：ショウジョウバエにおける複眼形成の分子的基盤, 第７２回日本生化学会大会, 1999 年 10 月.
4.Niwa, N., Okabe, M. and Hiromi, Y. : Relationships between sensory organ formation and positional information in Drosophila imaginal discs. International Symposium "Evolution 2000", Biodiversity in Network of Bioinformation from standpoint of Devo-Evo View, 2000 年 3 月.
5.Niwa, N., Okabe, M. and Hiromi, Y.: Relationships between organogenesis and positional information in Drosophila imaginal discs. Swiss-Japanese Scientific Seminar, Progress in developmental biology; Development of the nervous system and pattern formation, 2000 年 3 月.
6.Hiromi, Y.: Regulation of homeogenetic induction by Sprouty and EDL. Swiss-Japanese Scientific Seminar., Progress in developmental biology; Development of the nervous system and pattern formation, 2000 年 3 月.
7.Okabe, M.: The relationship between sensory organ identity and positional information. EMBO Workshop "Master Contorl Genes in Development and Evolution", 2000 年 3 月.
8.丹羽尚, 岡部正隆, 広海健: ショウジョウバエ感覚器官形成の分子的基盤, 第 36 回日本節足動物発生学会, 2000 年 6 月.
9.Hiromi, Y.: Mechanism of action of a nuclear receptor, Seven-up, The 12th International Workshop on the Molecular and Developmental Biology of Drosophila, 2000 年 6 月.
10. Hosoya, T., Hiromi, Y.: GCM-motif transcription factors and Runt-domain transcription factors in cell-fate dtermination in the Drosophila blood system, International Workshop on the Runt-domain Transcription Factors, 2000 年 7 月.
11. 丹羽尚, 岡部正隆, 広海健: 感覚器官形成の共通分子基盤, 第 60 回日本昆虫学会, 2000 年 9 月.
12. Hiromi, Y.: Neuronal specification in Drosophila: it's good to be inhibited, The 16th International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology, 2000 年 11 月.
13. 丹羽尚, 岡部正隆, 広海健：感覚器官形成の共通分子基盤と多様性, 総研大共同研究 人間理解の科学的基礎：「脳活動の物質的および非物質的側面」第２回研究発表会, 2001 年１月.
14. 広海健, 丹羽尚, 岡部正隆：感覚器官の原点をショウジョウバエで探る, 遺伝研・理研　合同公開シンポジウム, 2001 年 6 月.
15. Hiramoto, M., Hiromi, Y. and Hotta, Y.: A new model for positional information, 14th International Congress of Developmental Biology, 2001 年 7 月.
16. 広海健：核内リセプターSeven-up/COUP と細胞運命決定, 転写研究会 2001, 2001 年 10 月 .
17. 丹羽尚, 広海健, 岡部正隆：ショウジョウバエ複眼形成誘導に必要とされる分子環境, 第２４回日本分子生物学会年会, 2001 年 12 月.
18. 広海健：ショウジョウバエの遺伝的スクリーニング−理論と実際, 第２４回日本分子生物学会年会, 2001 年 12 月.
19. Hiramoto, M.: The second function of receptors in patterning: receptors that present ligands and the chemotropic hypothesis. Prize for Young Scientists, 2001 年 12 月.
20. Hiromi, Y.: Common developmental signals for eye and ear: derivation of segment-specific sensory organs from an atonal-dependent proto-sensory organ Gordon Conference on Visual System Development, 2002 年 6 月.
21. 梅園良彦, 広海健, 堀田凱樹: ショウジョウバエ胚における Notch シグナルを介したグリア細胞分化の制御機構, 日本動物学会第 73 回大会, 2002 年 9 月.
22. Hiromi, Y.: A common molecular basis required for Drosophila sensory organ formation , The 1st

Korea-Japan Drosophilists' Symposium, 2002年10月.
23. Yuasa, Y., Okabe, M., Hiromi, Y., Okano, H: Glial terminal differentiation in Drosophila, The 1st Korea-Japan Drosophilists' Symposium, 2002年10月.
24. ョウバエ中枢神経系における神経細胞の多様性生成機構特定領域研究「神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム」, シンポジウム：神経回路の形成と働きの分子メカニズム, 2003年1月.
25. Kanai, M., Okabe M., and Hiromi, Y.: Function of seven-up in the development of Drosophila CNS, 44th Annual Drosophila Reserch Conference, 2003年3月.
26. Hiromi, Y: Building the neural network through intra-cellular patterning, 第26回日本神経科学会大会, 2003年7月.
27. Hiromi, Y.: Constructing the nervous system through intra-axonal patterning, The 7th Membrane Research Forum, 2003年8月.
28. Hiromi, Y.: Constructing an organ through intracellular patterning, Swiss-Japan Meeting " Progress in Developmental Biology: Genes, Cells and Body Plan", 2003年11月.
29. Asaoka, M. : The establishment of the stem cell fate in the Drosophila germline, Swiss-Japan Meeting " Progress in Developmental Biology: Genes, Cells and Body Plan", 2003年11月.
30. 広海健: 細胞内パターニングによる組織構築, CREST研究領域「生物の発生・分化・再生」第2回公開国際シンポジウム, 2003年5月
31. 湯浅喜博, 広海健: ショウジョウバエのグリア細胞における dead ringer/retained の役割, 日本発生生物学会第36回大会, 2003年6月
32. Hiromi, Y.:Constructing an organ through intracellular patterning. Princeton University, Dept. Molecular Biology, 2004年3月.
33. Hiromi, Y.: Constructing an organ through intracellular patterning. RIKEN CDB, 2004年4月.
34. Hiomi, Y.: Intra-axonal patterning. The 14th International Workshop on the Molecular and Developmental Biology of Drosophila. 2004年6月.
35. Hiromi, Y.: Intra-axonal patterning: its mechanism and implications. Neuro 2004, 2004年9月.
36. Suto, F., Tsuboi, M., Mizuno, H., Sanbo, M., Yagi, T., Mitchell, K., Chedotal, A., Hiromi, Y., and Fujisawa, H.: Plexin/Semaphorin signals regulate laminated mossy fiber projections in the hypocampus. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting 'Axon Guidance & Neural Plasticity', 2004年9月.
37. 広海健, 軸索内パターニング：その機構と意義,「生物の発生・分化・再生」シンポジウム, 2004年11月.
38. Hiromi, Y.: Intra-axonal patterning: its mechanism and implications. The 8th Membrane Research Forum, 2004年11月.
39. Asaoka, M.: The establishment of the stem cell fate in the Drosophila germline. The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Sperm- Coats, 2004年11月.

A03-06 山形 要人

1) 山形要人, 竹宮孝子、鈴木香子 神経活動によるプロスタグランジン合成酵素の調節, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 吹田 (2004, 10.21)
2) Takemiya, T., Kawakami, Y., Yamagata, K., Epileptic seizure and prostaglandins., 第77回日本薬理学会年会シンポジウム, 大阪 (2004, 3.10)
3) Yamagata, K., Sugiura, H., Yasuda, S., Suzuki, K., Takemiya, T., Synaptic plasticity and immediate-early genes., The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong (2004, 2.5)
4) 山形要人, 神経活動による脳内遺伝子発現制御, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 吹田 (2003, 10.31)
5) 山形要人, シナプス活動によって発現制御される神経接着分子 arcadlin, 第 75 回日本生化学会大会シンポジウム, 京都 (2002, 10.17)
6) 三木直正、市川久詞、甘業華、藤本崇宏、入江康至、山形要人、平英一, メタンフェタミンによるArcの誘導機構とArcと相互作用するAmidaの機能解析, 第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会, 国立京都国際会館 (2001, 9.28)
7) 山形要人, 神経活動による脳内遺伝子発現制御, 神経研創立30周年記念行事, 第25回神経研シンポジウム, 脳の基礎過程から高次機能まで, 東京 (2002, 11.26)
8) 田中秀和、藤本崇宏、施虹、溝口明、山形要人、三木直正, カドヘリンのシナプス接着構造におけるダイナミズム, 第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会, 国立京都国際会館 (2001, 9.27)
9) 山形要人, シナプス活動による神経接着分子の発現調節, 第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同大会, 国立京都国際会館 (2001, 9.26)

10) Sugiura,H., Tanaka,H., Suzuki,K., Yamagata,K., Arcadlin: a novel activity-regulated cadherin involved in synaptic plasticity., The NIBB International COE Symposium., 岡崎 (2000, 3.16)

A03-07 五十嵐 道弘

1) 五十嵐 道弘「ミオシンVの新規Ca^{2+}依存性相互作用による開口放出の調節」日本分子生物学会大会、ワークショップ、2004年12月11日
2) 五十嵐 道弘「シナプス伝達のCa^{2+}依存性の分子基盤」岡山大学脳研究セミナー、2004年7月26日
3) 五十嵐 道弘「Ca^{2+}依存性蛋白質間相互作用による開口放出の調節機構」生理学研究所シンポジウム、2004年5月27日
4) 五十嵐 道弘 " The novel Ca^{2+}-dependent protein interactions with syntaxin and their roles in regulated exocytosis" 、日本生化学会大会、シンポジウム、2003年10月16日
5) 五十嵐 道弘「開口放出の調節機構：Ca^{2+}依存性蛋白質間相互作用の役割」特定領域研究「神経回路」公開シンポジウム、2004年1月15日
6) Igarashi M:" Proteomics of the neuronal growth cone" 日本神経化学会・日本生物物理学会合同大会、シンポジウム、2003年9月25日
7) Igarashi M:" Regulation of exocytosis by novel Ca^{2+}-dependent protein interactions with syntaxin-1A." 日本神経科学学会大会、シンポジウム、2003年7月25日
8) Igarashi M: " Regulation of exocytosis mediated by Ca^{2+}-dependent interaction between the autophosphorylated CaMKII and syntaxin-1A." 北陸神経科学シンポジウム、2003年1月11日
9) 五十嵐 道弘「SNARE機構を調節する新しいCa^{2+}依存性蛋白質間相互作用」日本生化学会大会、シンポジウム、2002年10月16日
10) 五十嵐 道弘「自己リン酸化型CaMKIIとsyntaxinのCa^{2+}依存性結合の意義」大阪大学蛋白質研究所セミナー、2001年11月26日
11) Igarashi M: Ca^{2+}-dependent SNARE interaction that regulates exocytosis" 日本神経科学学会、日仏合同神経科学シンポジウム、2001年9月25日

A03-08 谷口 雅彦

1. M. Taniguchi Semaphorin 3A is required for formation of olfactory sensory map. New Horizons in Molecular Sciences and Systems: An Integrated Approach, Okinawa, 2003.
2. M. Taniguchi Semaphorin 3A is essential for formation of olfactory sensory map. A decade of research on Semaphorins: Semaphorin function and mechanism of action, Corsica, France, 2003.
3. 谷口雅彦. 嗅覚系感覚地図の形成とセマフォリン3A. 平成14年シナプス研究会, 岡崎, 2002.
4. 谷口雅彦. 匂い地図形成におけるセマフォリンの機能. 第13回高次脳機能障害シンポジウム, 東京, 2002.
5. 谷口雅彦. 匂い地図形成におけるセマフォリンの機能解析. 多角的アプローチによる嗅覚情報伝達の総合的研究 公開シンポジウム, 東京, 2002.
6. 谷口雅彦. Function analysis of Semaphorin on olfactory sensory map formation. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会, 京都, 2001.

A03-10 山本 亘彦

2001.9. 山本亘彦 大脳皮質における層特異的な神経回路形成の分子基盤. 第24回日本神経科学大会（京都）
2002.6. 山本亘彦, 上阪直史, 平井聡Activity-dependent branch formation of cortical axons: A morphological and electrophysiological study using organotypic slice cultures. 第45回日本神経化学会（北海道）
2002.10 山本亘彦 大脳皮質における層特異的な入出力回路の分子基盤. 第75回日本生化学大会（京都）
2003.8. Yamamoto N. Molecular mechanisms for lamina-specific cortical connections. International Symposium " Dynamics of Neural Development", Osaka.
2003.11. Yamamoto N. Molecular basis of lamina-specific thalamocortical projections. SFN Satellite symposium " Development and Plasticity in the Sensory Thalamus and Cortex". New Orleans.
2004.8. Yamamoto N. Molecular basis of the formation of layer-specific cortical connections. 16th International Congress of the International Federation of Associations of Anatomists. Kyoto.

一般講演

2001.9. 花村健次, 原田昭子, 福田剛, 村上富士夫, 山本亘彦. 視床ニューロンにおけるBDNFとNT3の基質依存性の軸索伸長活性. 第24回日本神経科学大会（京都）
2001.9. Yun Zhong, 竹本誠, 福田剛, 村上富士夫, 山本亘彦 発生期大脳皮質で発現するプロトカドヘリン分

子の軸索伸長活性. 第24回日本神経科学大会（京都）

2002.7. 山崎信介，井上直樹，村上富士夫，山本亘彦. 大脳皮質5層に特異的に発現する分子の探索と解析. 第25回日本神経科学学会（東京）

2002.7. 上阪　直史，平井　聡，大波　壮一郎，山本　亘彦. 大脳皮質における水平軸索の分枝形成における電気的活動の役割. 第25回日本神経科学学会（東京）

2003.7. 丸山拓郎，上阪直史，山本亘彦. 大脳皮質神経回路網における軸索分枝のダイナミクス　第26回日本神経科学大会（名古屋）

2003.7. 大波壮一郎，平井聡，上阪直史，畠中由美子，山本亘彦. 大脳皮質水平軸索の分枝形成に対するRhoファミリーGTPaseの役割. 第26回日本神経科学学会（名古屋）

2003.11. Uesaka N, Hirai S, Maruyama T, Yamamoto N. Activity-dependent branch formation of upper cortical neurons studied in organotypic slice cultures. Society for Neuroscience, New Orleans.

2003.11. Zhong Y, Takemoto M, Fukuda T, Murakami F, Yamamoto N. The genes that are expressed specifically in layer 4 of the developing neocortex. Society for Neuroscience, New Orleans

2004.9. 服部祐紀，乾佳代，小林久美子，小林裕明，武内恒成，乗岡茂巳，山本亘彦 大脳皮質の神経回路形成におけるＴ－カドヘリンの発現. 第27回日本神経科学，第47回日本神経化学大会合同大会(大阪)

2004.9. 米島宏幸，山崎信介，Courtney CJ Voelker，Zoltan Molnar，藤田一郎，山本亘彦. ER81はげっ歯類と霊長類の大脳皮質第５層の投射神経細胞の一部に発現している. 第27回日本神経科学，第47回日本神経化学大会合同大会（大阪）

A03-11 金保 安則

1. 金保安則、山崎正和、宮崎秀幸、渡辺寛：PLDとPIP-5kinの神経突起リモデリングへの関与. 第54回日本細胞生物学会大会（シンポジウム)、2001, 5.31, 岐阜
2. Kanaho, Y., and Watanabe, H.; Neurite remodeling by phospholipase D2. 2001 FASEB Summer Research Conferences on Phospholipase D. 2001, 8.1, Omni Tucson, AZ, USA (invited)
3. Y. Kanaho, T. Suzuki, H. Miyazaki, and M. Yamazaki: PI4P-5 kinase is a downstream effector of Rho/ROCK in neurite remodeling signaling in N1E-115 cells. Keystone Symposia: Cell Migration and Invasion. 2001, 3.13, Tahoe City, CA, USA
4. Y. Kanaho, H. Miyazaki, and M. Yamazaki: Activation of PI4P 5-kinnase by small G proteins. 43rd International Symposium on Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues. 2002, 9.23-24, Indianapolis (USA)
5. M. Yamazaki, H. Miyazaki, H. Watanabe, and Y. Kanaho: Role of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in axonal guidance. 第76回日本生化学会大会（シンポジウム), 2003. 10.16, 横浜
6. M. Yamazaki, H. Miyazaki, H. Watanabe, and Y. Kanaho: Involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in axonal outgrowth and chemorepulsion of DRF neurons. 33rd Annual Meeting of Neuroscience, 2003. 11.8, New Orleans (USA)
7. Y. Kanaho: Regulation of neurite remodeling by PIP5-kinase. The 3rd Japanese Biochemical Society Biofrontier Symposium: New Aspect of Phospholipid Biology 2004, 2004. 5.10-12, Kamakura (Japan).
8. M. Yamazaki, H. Miyazaki, H. Watanabe, and Y. Kanaho: Involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in axonal outgrowth and chemorepulsion of DRG neurons. The 3rd Japanese Biochemical Society Biofrontier Symposium: New Aspect of Phospholipid Biology 2004, 2004. 5.10-12, Kamakura (Japan)
9. Y. Kanaho: Regulation of neurite remodeling by phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase. FASEB Summer Research Conferences on Phospholipases. 2004. 7.17-22, Atlanta (USA) (Invited)
10. H. Miyazaki, M. Yamazaki, H. Watanabe, and Y. Kanaho: ARF6 regulates spine morphogenesis via activation of PIP5K・. 第77回日本生化学会大会（ワークショップ), 2004. 10.15, 横浜

●その他、本特定領域研究の参加年度中に８０回の口頭発表を行った。

A03-12 崎村 建司

1.崎村建司、山崎真弥、少作隆子、深谷昌弘、狩野方伸、渡辺雅彦：AMPA型受容体チャネルの活性調節機序とその機能.　第７７回日本薬理学会年会：大阪国際会議場（グランキューブ大阪), 平成１６年３月８日－10日.

2. Sakimura, K.: Development of a temporal and cell-specific gene knockout mouse and its application to brain research.　第46回日本神経化学会：朱鷺メッセ（新潟コンベンションセンター), 平成15年９月24日－26日.

A03-13 斉藤 哲一郎

1. 浜太郎、佐波理恵、中辻憲夫、斎藤哲一郎：神経分化における MBH ファミリー遺伝子の解析。日本発生生物学会第 33 回大会（2000 年 5 月 高知）

2. Tetsuichiro Saito, Taro Hama, Rie Saba and Norio Nakatsuji: Mammalian Bar-class homeobox genes. Gordon Research Conference on Neural Development (2000 年 7 月 米国 Newport)

3. 斎藤哲一郎、佐波理恵、浜太郎、中辻憲夫：転写因子によるneuronal identity決定の機構。日本生化学会第73回大会シンポジウム「神経特異的な遺伝子発現制御から見た神経の分化と機能制御」(2000年10月 横浜)

4. Tetsuichiro Saito, Taro Hama, Rie Saba and Norio Nakatsuji: Mammalian Bar-class homeobox genes and functional analysis using in vivo electroporation. Society for Neuroscience 30th annual meeting (2000年11月 米国 New Orleans)

5. Tetsuichiro Saito: Transcriptional cascades to regulate neuronal differentiation. 9th International Catecholamine Symposium " Transcription factors and Development" (2001 年 4 月 京都)

6. Tetsuichiro Saito, Rie Saba, Taro Hama, Junko Kutsuna and Norio Nakatsuji: Mammalian Bar-class homeobox genes and their function. 14th International Congress of Developmental Biology (2001年7月 京都)

7. Tetsuichiro Saito, Rie Saba, Junko Kutsuna and Norio Nakatsuji: Efficient gene transfer into mouse embryonic brains and functional analysis of genes using in vivo electroporation. Society for Neuroscience 31th annual meeting (2001年11月 米国 San Diego)

8. 佐波理恵、浜太郎、中辻憲夫、斎藤哲一郎：Mammalian BarH Homologue (MBH)1遺伝子の発現制構。日本分子生物学会第24回年会（2001年12月 横浜）

9. 斎藤哲一郎：神経細胞の多様性を生み出す機構。日本バイオマテリアル学会シンポジウム (2002年2月 京都)

10. Tetsuichiro Saito, Rie Saba, Kenichi Mizutani and Norio Nakatsuji: Mammalian Bar-class homeobox gene, MBH1, confers commissural neuron identity in the spinal cord. Society for Neuroscience 32th annual meeting (2002年11月 米国 Orland)

11. 水谷健一、中辻憲夫、斎藤哲一郎：in vivo electroporation法によるマウス神経系での遺伝子機能の解析。日本分子生物学会第25回年会（2002年12月 横浜）

12. 佐波理恵、中辻憲夫、 斎藤哲一郎：脊髄交連性ニューロン運命決定の分子機構。日本分子生物学会第25回年会ワークショップ「神経系の成り立ちをさぐる一新規因子の探索から」 (2002年12月 横浜)

13. 斎藤哲一郎：脊髄交連ニューロンの運命決定機構。特定領域研究「神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム」シンポジウム (2003年1月 東京)

14. Satoru Miyagi, Tetsuichiro Saito, Norihisa Masuyama, Yukiko Goto, Masazumi Nishimoto, Masami Muramatsu and Akihiko Okuda: The Sox-2 regulatory region 2 specifies multipotent state specific expression in both ES and neural stem cells. International Society for Stem Cell Research 1st annual meeting (2003年6月 米国 Washington)

15. 斎藤哲一郎：交連ニューロンの運命決定機構。特定領域研究「先端脳」主催ワークショップ「神経発生生物学の先端的研究」 (2003年8月 東京)

16. Tetsuichiro Saito and Rie Saba: Mammalian Bar-class homeobox gene, MBH1, specifies commissural neuron identity downstream of Math1. Society for Neuroscience 33th annual meeting (2003年11月 米国 New Orleans)

17. 宮城聡、斎藤哲一郎、水谷健一、岩間厚志、中内啓光、増山典久、後藤由季子、升井伸治、丹羽仁史、西本正純、村松正美、奥田晶彦：複数の多能性幹細胞におけるSox-2エンハンサー、SRR2の機能とその分子メカニズムの共通性。日本分子生物学会第25回年会（2003年12月 神戸）

18. 川内大輔、斎藤哲一郎、村上富士夫：小脳前核細胞群の核の起源は片側菱脳唇由来か、それとも両側菱脳唇由来か。神経科学会第 27 回大会（2004 年 9 月大阪）

19. 水谷健一、斎藤哲一郎：Notch 機能の応用による大脳皮質神経発生機構の解析。日本分子生物学会第 26 回年会（2004 年 12 月 神戸）

A03-14 見学 美根子

招待講演

1. Eiraku M, Yokoyama S, Fujishima K and Kengaku M: " Contact-deprndent regulation of process arborization of neurons and glia involves Delta/Notch-like EGF-related Receptor

(DNER)", The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, 2004.2.4
2. Kengaku, M. :" DNER Signaling Regulates Branching Formation of Dendrites and Glial Fibers", International Symposium " Dynamics of Neural Development", 2003.8.11
3. 永楽元次、藤島和人、見学美根子:「神経細胞樹状突起に局在する膜タンパク質DNER の機能解析」, 第25 回日本分子生物学会大会ワークショップ「形態形成における細胞の移動・分化のシグナルとその制御機構」, 2002.12.12
4. 見学美根子、永楽元次、藤島和人:「小脳顆粒細胞の方向転換期に発現する新規膜タンパク質DNER の機能解析」, 第25 回日本神経科学学会大会シンポジウム「神経細胞移動のメカニズム」、2002.7.7
5. 永楽元次、河路光介、見学美根子:「小脳顆粒細胞の移動と形態の極性を司る分子の探索」, 第24 回日本分子生物学会大会シンポジウム「神経細胞の形態と運動制御から見たネットワーク形成」, 2001.12.10
6. 見学美根子、山崎崇生、永楽元次、河路光介:「小脳顆粒細胞の形態分化と移動を制御する内在性極性化因子の探索」, 第54 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「神経細胞の移動とかたち作りのメカニズム」, 2001.5.29
応募・主催講演等
7. 永樂元次、平野丈夫、見学美根子: Functional analysis of DNER in the developing CNS neurons. 第７６回日本生化学会大会シンポジウム「神経ネットワークの分子的実体に迫る」, 2003.10.7
永楽元次、平野丈夫、見学美根子:「膜タンパク質DNER の神経回路網形成における機能解析」, 日本発生生物学会大会, 2003.6.12
8. 梅嶋宏樹、河路光介、平野丈夫、見学美根子:「小脳顆粒細胞の移動メカニズムの解析」, 日本発生生物学会大会, 2003.6.12
9. 藤島和人、永楽元次、平野丈夫、見学美根子:「小脳顆粒細胞の極性転換期に発見するマウス septin３の性質」, 日本発生生物学会大会, 2003.6.12
10. 横山斉輔、平野丈夫、見学美根子:「膜タンパク質DNER の樹状突起特異的輸送メカニズム」, 日本発生生物学会大会, 2003.6.12
11. Eiraku M., Fujishima K. and Kengaku M.: Delta/Notch-like EGF-related receptor (DNER), a novel dendritic transmembrane protein possibly involved in neuronal polarization. Cold Spring Harbor Laboratories Meeting Axon Guidance & Neural Plasticity. 2002.9.26
12. 永楽元次、藤島和人、平野丈夫、見学美根子:「新規膜タンパク質DNER の神経細胞における選択的輸送機構の解析」, 日本発生生物学会大会, 2002.5.22
13. 河路光介、平野丈夫、見学美根子:「小脳顆粒細胞の細胞移動と形態分化のダイナミクスの解析」, 日本発生生物学会大会, 2002.5.22
14. 永楽元次、平野丈夫、見学美根子:「小脳顆粒細胞の極性形成に関与する新規候補分子の同定」, 第24 回日本神経科学学会大会, 2001.9.26

A03-19 竹島 浩

1. 吉田守克、竹島浩、" 無脊椎動物のジャンクトフィリンに関する研究" (筋生理の集い、慈恵医科大学、2001年２月２日)
2. 竹島浩、" 心筋細胞とCaP^{2+P}放出" 、生理学会年会シンポジウム 心収縮と心肥大のメカニズム (京都 2001年3月30日)
3. 竹島浩、" CaP^{2+P}放出と結合膜構造" 、特定領域研究(B)分子ベクトル輸送公開シンポジウム (東京 東大山上会館 2001年7月23日)
4. 竹島浩、" ジャンクトフィリンと結合膜構造" 、日本生化学会大会 (京都 国際会議場 2001年10月27日)
5. Hiroshi Takeshima " Ryanodine Receptor and Junctophilin in Cardiac Myocytes" International Symposium on Receptors and Ion Transporters in Cardiovascular System (大阪 阪大銀杏会館 2002年2月5日)
6. 竹島浩、" 結合膜構造とジャンクトフィリン" 、日本薬理学会大会 (熊本 2002年3月13日)
7. 竹島浩、" 筋収縮とジャンクトフィリン" 、日本生理学会大会 (広島 2002年3月25日)
8. Hiroshi Takeshima, " Junctophilins and muscle E-C coupling", Gordon Research Conference; Muscle Excitation-Contraction Coupling (Jun 11, 2002 in New London, USA.)
9. 竹島浩、" 心筋細胞の容量依存性CaP^{2+P}流入機構"、生理学研究所研究会" 興奮性組織のイオン調律性制御メカニズム" (岡崎 2002年8月1日)

A03-21 野田 昌晴

1. 湯浅純一、鈴木亮子、加納ふみ、大河原剛、村田昌之、野田昌晴
「CRMP ファミリーの新規アイソフォームの同定と機能解析」第25回日本神経科学会 (2002.7.7-9)
2. 湯浅純一、野田昌晴

「新規 CRMP バリアントの同定と機能解析」第 25 回日本分子生物学会（2002.12.11-14）（口頭発表）
3. 湯浅純一、鈴木亮子、加納ふみ、大河原剛、村田昌之、野田昌晴
「CRMP1-4 ファミリーの新規サブタイプの同定と機能解析」第 26 回日本分子生物学会（2003.12.13）

A03-22 柳 茂

1. Shigeru Yanagi : Molecular mechanism for semaphoring-mediated singalling 第 76 回日本生化学会. 2004, 10/13, 横浜.
2. Shigeru Yanagi, Hirohei Yamamura : Elucidation of molecular signaling mechanism of axonal guidance 第 75 回日本生化学会. 2003, 10/17, 横浜.
3. Yanagi, S. Signaling mechanism of Semaphorin-mediated axon guidance. Symposium Signal Cascades in Tissue Remodeling 2003, Jan 9, Geneva, Switzerland.
4. 高橋秀典, 稲留涼子, 山村博平, 柳 茂：新規のミトコンドリア局在蛋白質 M-septin の同定と機能解析 第 75 回日本生化学会. 2002, 10/16, 京都.
5. Shigeru Yanagi, Norihiro Mitsui, Ryoko Inatome, Shuusuke Takahashi, Hirohei Yamamura : Involvement of Fes tyrosine kinase in semaphorin-3A signaling 第 74 回日本生化学会. 2001, 10/25, 京都.

A03-23 稲垣 忍

1. 山田武史、大岡嘉治、古郷幹彦、稲垣 忍, 細胞運動制御に関わる LPA 受容体シグナル解析、第 80 回日本解剖学会近畿支部学術集会、11 月 27 日（2004）
2. Sakai Manabu, Ohoka Yoshiharu, Kobayashi Chie, Matsumoto Hiroshi, Inagaki Shinobu, Anti-apoptotoc action of brain-specofoc, SemaF (Sema4C)-associating protein, SFAP75, involves inhibition of caspasse activity, 第 77 回日本生化学会大会、10 月 15 日（2004）.
3. Matsumoto Hiroshi, Ohoka Yoshiharu, Kogoh Mikihiko, Inagaki Shinobu, Characterization of Rho guanine-nucleotide exchange factor lacking typical pleckstrin homology (PH) domain, 第 77 回日本生化学会大会、10 月 15 日、(2004) .
4. Yamada Takeshi, Ohoka Yoshiharu, Kogoh Mikihiko, Inagaki Shinobu, Characterization of lysophophatiic receptor and PDZ doamin-mediated signaling in CHO cells. 第 77 回日本生化学会大会、10 月 15 日、(2004).
5. Ohoka Yoshiharu, Inagaki Shinobu, Characterization of brain specific transmembrane semaphorin, Sema4C and identification of Sema4C and identifization of Sema4C dimer: changes during brain development. 第 77 回日本生化学会大会、10 月 15 日、(2004).
6. Matsumoto Hiroshi, Ohoka Yoshiharu, Inagaki Shinobu, Characterization of Rho guanine-nucleotide exchange factor impliecated in peripheral nervous disease. 第 27 回日本神経科学大会、9.21-23, (2004).
7. Ohoka Yoshiharu, Inagaki Shinobu, Characterization of brain specific transmembrane semaphorin, Sema4C. 第 27 回日本神経科学大会、9.21-23, (2004).
8. Sakai Manabu, Kobayashi Chie, Matsumoto Hiroshi, Ohoka Yoshiharu, Inagaki Shinobu, Characterization of inhibitory effects of brain-specific, SemaF (Sema4C)-associating protein, SFAP75, on serumdeprivation-induced apoptosis in CHO cells. 第 27 回日本神経科学大会、9.21-23, (2004).
9. Taniguchi Yoshitaka, Matsuyama Tomohiro, Yoshikawa Hiroo, Kogo Mikihiko, Furuyama Tatsuo, Inagaki Shinobu, Sema 4D deficiency up-regulates myelination in mouse brain. . 第 27 回日本神経科学大会、9.21-23, (2004).
10. Sakai Manabu, Kobayashi Chie, Matsumoto Hiroshi, Ohoka Yoshiharu, Inagaki Shinobu, Anti-apoptotoc action of brain-specofoc, SemaF (Sema4C)-associating protein, SFAP75, involves inhibition of caspasse activity, International Congress of the IFAA, 8.26 (22-27), (2004).
11. Kobayashi Chie, Nirasawa Hiromi, Kogo Mikihiko, Inagaki Shinobu, 16th International Congress of the IFAA, 8.26 (22-27), (2004)
12. Inagaki Shinobu, 神経再生の促進機構、脳を見るシンポジウムin 三原、2 月 19 日（2004).
13. Chie Kobayashi, Hiromi Nirasawa, Kenta Masuda, Yoshiharu Ohoka, Mikihiko Kogo, Shinobu Inagaki Bidirectional signaling of plexin B1, 第 26 回日本神経科学会 7 月 24 日（2003).
14. Taniguchi Yoshitaka, Matsuyama Tomhiro, Yoshikawa Hiroo, Kogoh mikihiko, Furuyama Tatsuo, Inagaki Shinobu, Sema 4D increases in the ischemic brain. 第 26 回日本神経科学会 7 月 24 日（2003).
15. Takahara Mizue, Kuramoto Eriko, Inagaki Shinobu, Glial cell responses after peripheral nerve injury, 第 46 回日本神経化学会 9 月 24 日（2003).
16. Kobayashi Chie, Nirasawa Hiromi, Mikihiko Kogo, Shinobu Inagaki, Plexin mediates bifunctional signals 第 46 回日本神経化学会 9 月 24 日（2003).

17. Inagaki Shinobu, Plexin can mediate bifunctional signals; lamellipodia/extending and collapse/compaction signals Plexin can mediate bifunctional signals; lamellipodia formation and compaction Regulation of growth cone behavior by semaphorin-dependent signaling (五十嵐)第46回日本神経化学会シンポジウム「Molecular and Cellular Mechanisms of Growth Cone Functions: Signaling in Axonal Growth. 9月25日 (2003).

18. Ohoka Yoshiharu, Kobayashi chie, Matsumoto Hiroshi, Sakai Manabu and Inagaki Shinobu, Characterization of brain specific, SemaF (Sema4C)-associating protein SFAP75. 第76回日本生化学会大会、10月15-18日 (2003).

19. Matsumoto Hiroshi, Ohoka Yoshiharu, Inagaki Shinobu, Identification and characterization of a novel brain-enriched RhoGEF, p125-RhoGEF. 第76回日本生化学会大会、10月15-18日 (2003).

20. 稲垣 忍、高原瑞恵, 神経突起伸長・抑制スイッチング機構, 第四回ORIGIN神経科学研究会, 7月31日 (2003).

21. 谷口佳孝, 稲垣 忍 Sema4Dのオリゴデンドロサイトの分化と髄鞘形成への関与 第79回日本解剖学会近畿支部学術集会, 11月29日 (2003).

22. 稲垣 忍, 増田健太, 藤岡しほ, 大岡嘉治, 稲垣 忍 セマフォリン分子Sema4Dの神経作用の解析 第75回日本生化学大会, 10月15日 (2002).

23. 大岡嘉治, 山本貴啓, 韮澤宏美, 廣谷 睦, 稲垣 忍 Sema4D-プレキシンB1 シグナル伝達系におけるPDZ-RhoGEF分子の機能解析 第75回日本生化学大会, 10月17日 (2002).

24. 廣谷 睦, 大岡嘉治, 韮澤宏美, 古郷幹彦, 松矢篤三, 古山達雄, 稲垣 忍, Sema4D-プレキシンB情報伝達系の解析 第25回日本神経科学大会, 7月7日 (2002).

25. 山本貴啓, 大岡嘉治, 韮澤宏美, 廣谷 睦, 稲垣 忍, M-Sema4D-プレキシンB1 細胞内情報伝達系におけるPDZ-RhoGEFの機能解析, 第25回日本神経科学大会, 7月8日 (2002)年.

26. 山本貴啓, 大岡嘉治, 韮澤宏美, 廣谷 睦, 稲垣 忍, M-Sema4D-プレキシンB1 細胞内情報伝達系におけるPDZ-RhoGEFの機能解析, 第25回日本神経科学大会, 7月8日 (2002).

27. 廣谷 睦, 大岡嘉治, 韮澤宏美, 古郷幹彦, 松矢篤三, 古山達雄, 稲垣 忍, Sema4D-プレキシンB情報伝達形の解析 第25回日本神経科学大会, 7月7日 (2002).

28. Takeda Y, Furuyama T, Matsuyama T, Miyacaki J, Matsuya T, Inagaki S, SemaG protects neural cells from injury 第77回日本解剖学会近畿地方会, 12月1日 (2001).

29. 大岡嘉治, 廣谷 睦, 増田健太, 稲垣 忍 マウスセマフォリン4D (M-Sema-4D)-プレキシンB細胞内情報伝達系の解析第74回日本生化学大会 4P-730, 10月28日 (2001)

30. 増田健太, 藤岡しほ, Marcia Toguchi, 大岡嘉治, 宮崎信雄, 稲垣 忍, 神経系におけるセマフォリン4D作用の解析, 第74回日本生化学大会 4P-738, 10月28日 (2001).

31. 稲垣 忍, 大岡嘉治, 廣谷 睦, 増田健太 神経回路・シナプス形成におけるセマフォリン/プレキシンシグナル, シンポジウムS32, 神経接着のダイナミズム, 第24回日本神経科学第44回日本神経化学合同大会, 9月27日 (2001)

32. 廣谷 睦, 大岡嘉治, 山本貴啓, 古郷幹彦, 松矢篤三, 稲垣 忍, セマフォリン4Dとその受容体プレキシンB1の細胞内情報伝達系の解析, PA1-046, 第24回日本神経科学第44回日本神経化学合同大会, 9月26日 (2001)

33. 増田健太, 藤岡しほ, 大岡嘉治, Marcia Toguchi, 宮崎信雄, 稲垣 忍, 後根神経節ニューロンにおけるセマフォリン4Dの生理作用の検討, PA1-054, 第24回日本神経科学第44回日本神経化学合同大会, 9月26日 (2001)

34. 竹田雄一, 天崎真由美, 古山達雄, 宮崎純一, 丹羽仁史, 田代文, 倉本恵梨子, 松山知弘, 古郷幹彦, 松矢篤三, 稲垣 忍, Sema4D欠損マウス作製とSema4D機能の解析, PA1-055, 第24回日本神経科学第44回日本神経化学合同大会, 9月26日 (2001)

A03-26 中越 英樹

1. 北郡秀晃, 中本雅也, 中越英樹 ショウジョウバエ視覚系における *dve* 遺伝子の解析 日本分子生物学会第25回年会, 横浜, 2002年12月

2. Nakagoshi, H., Shirai, T., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F. Refinement of *wingless* expression by a Wingless- and Notch-responsive homeodomain protein, Defective proventriculus 44th Annual Drosophila Research Conference, Chicago, USA, March, 2003.

3. Ibuki, I., Sone, M., Hoshino, M., Nakagoshi, H. and Nabeshima, Y. Involvement of the synaptic molecules for the formation of arousal consciousness in *Drosophila*. The 6th Meeting of Japanese Drosophila Research Conference, Tokyo, July, 2003

4. 北郡秀晃, 中本雅也, 木村沙江, 中越英樹 ショウジョウバエ視覚系における *dve* 遺伝子の解析 日本分子生

物学会第 26 回年会，神戸，2003 年 12 月
5. 竹内将人，北郡秀晃，中越英樹 ショウジョウバエ光受容細胞の機能分化における *dve* 遺伝子の解析 日本分子生物学会第 27 回年会，神戸，2004 年 12 月
6. 中本 雅也，土手内 智絵，中越 英樹 ショウジョウバエ脳における *dve* 遺伝子の機能解析 日本分子生物学会第 27 回年会，神戸，2004 年 12 月

A03-28 中井 淳一

1. Targeted gene expression using the Gal4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*, Imamura M, Nakai J, Inoue S, Xing GX, Kanda T, Tamura T, Fourth international workshop on transgenesis and genomics on invertebrate organisms, Asilomar, 2003.
2. Measurements of $[Ca^{2+}]i$ in cells and tissues of transgenic mice expressing the calcium sensitive GFP analogue G-CaMP restricted to smooth muscle, Kotlikoff M, Nakai J, Su K, Deng K-Y, Lee JC, Wilson J, Feldman ME, Ji, G-J, Biophysical society 47th annual meeting, San Antonio, 2003.
3. Development and application of a Ca^{2+} sensitive-fluorescent protein based on GFP (G-CaMP), Nakai J, 4th Forum of European Neuroscience, Workshop: Neuronal imaging using genetically encoded sensors, Lisbon, 2004.
4. Biophysical properties of fluorescent proteins, Nakai J, Workshop on voltage-sensitive probes in Neuroscience, Saitama, 2004.
5. GFPを用いた蛍光カルシウムプローブ（G-CaMP）の改良とその応用，中井淳一，第26回神経科学会総会，ランチョンセミナー「光技術が拓く神経情報のダイナミク」2003.
6. GFP を用いたカルシウムセンサーG-CaMP，中井淳一，平成１５年度生理学研究所研究会バイオ分子センサー，2003.
7. GFPを用いたカルシウムプローブG-CaMPによる平滑筋カルシウムの解析，中井淳一，平成１6年度生理学研究所研究会バイオ分子センサー，2004.
8. GFPを用いた改良型カルシウムプローブG-CaMP２による細胞内局所Ca^{2+}の可視化，大倉正道，井本敬二，中井淳一，第77回日本薬理学会年会，2004.

A03-29 岩 里 琢 治

1． 岩里 琢治 マウス体性感覚野の発達とNMDA受容体機能（NMDA receptor function in the development of the mouse somatosensory cortex） ２４回日本分子生物学会年会（2001 年 12 月 9-12 日： 横浜）ワークショップ
2. Takuji Iwasato Genetic Dissection of Activity-dependent Development of the Mouse Somatosensory Cortex: Roles of NMDA receptor in the barrel formation. 特定領域A 神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズム 冬の公開シンポジウム（2002年1月30日： 東京）（英語発表）
3. Takuji Iwasato, Ryochi Nomura, Reiko Ando, Shigeyoshi Itohara. Cerebral Cortex-Specific Gene Manipulation by PAC Trangenic Mouse. 32nd Annual Meeting, Society for Neuroscience (2002 年 11 月 7 日： 米国)
4. 岩里 琢治 体性感覚野マップ精緻化の分子機構：マウス逆遺伝学的解析 平成１４年シナプス研究会（2002 年 12 月 5-6 日：生理研１階会議室）シンポジウム
5. 岩里 琢治 背測終脳特異的遺伝子操作法の開発と体性感覚野神経回路発達研究への応用 Dorsal telencephalon-specific gene manipulation and neural circuit development in the somatosensory cortex. 2003 年神経化学学会（新潟）シンポジウム
6. Takuji Iwasato Genetic Dissection of Barrel Formation in the Rodent Somatosensory System. Workshop on " the Molecular Basis of Synaptic Plasticity: Synaptogenesis, Receptor Trafficking and Cytoskeletal Proteins at the Center for Neural Science" (2004 年 7 月 1-2 日：米国、New York University)

A03-30 高木 新

1. T. Fujii, F. Nakao, Y. Shibata, G. Shioi, F. Sutoh, H. Fujisawa and S. Takagi. *C. elegans* Plexin A, CEP-2, interacts with transmembrane semaphorins and regulates epidermal morphogenesis. Conference of International Society for Developmental Biologinst 2001年７月９日
2. Shin Takagi, Takashi Fujii, Akira Nukazuka, Yukimasa Shibata, Go Shioi, Hajime Fujisawa. Involvment of PlexinA in vulval morphogenesis. International *C. elegans* Meeting 2001年６月
3. Takashi Fujii, Fumi Nakao, Zhicen Liu, Fumikazu Suto, Hajime Fujisawa, Shin Takagi. Regulation of the ray position by two Plexin/Semaphorin systems. International *C. elegans* Meeting 2001年６月

4. Zhicen Liu, Rie Kurokawa, Takashi Fujii, Yuji Kohara, Hajime Fujisawa, Shin Takagi. PLX-1 plays an essential role in Vulva Precursor Cell positioning. Japanese Worm Meeting 2002年8月
5. Roles of *C. elegans* Rac proteins in the epidermal morphogenesis. Akira Nukazuka, Liu Zhicen, Mie Chikuma, Rie Kurokawa, Takashi Fujii, Hajime Fujisawa, Shin Takagi. Japanese Worm Meeting 2002年8月
6. 高木 新 藤井 崇 劉 致岑 糠塚 明 藤澤 肇、 *C. elegans* プレキシンの表皮形態形成における役割。第２５回日本分子生物学会 2002年12月12日
7. 黒河 理絵 藤井 崇 中尾 文 藤澤 肇 高木 新、セマフォリンとの結合におけるプレキシン細胞外領域の役割 第２５回日本分子生物学会 2002年12月13日
8. 糠塚 明 筑間 稔江 藤澤 肇 高木 新、 線虫C. elegansにおけるPlexinシグナリング機構の解析 2003年6月11日
9. Akira Nukazuka, Mie Chikuma, Hajime Fujisawa, Shin Takagi. Analysis of plexin signaling events in *C. elegans*. International Worm Meeting 2003年6月
10. Zhicen Liu, Rie Kurokawa, Hajime Fujisawa, Shin Takagi. PLX-1 mediates a cell contact-dependent stop signal in elongating vulval precursor cells. International Worm Meeting 2003年6月
11. Shin Takagi, Zhicen Liu, Akira Nukazuka, Hajime Fujisawa. *C. elegans* PlexinA PLX-1 mediates a cell contact-dependent stop signal in vulval precursor cells. East Asia Worm Meeting 2004年6月
12. Akira Nukazuka, Mie Chikuma, Hajime Fujisawa, Shin Takagi. A mutation in gcn-1, a gene coding for a regulator of translation initiation, suppresses the ray defect of plx-1 mutants. East Asia Worm Meeting 2004年6月
13. 糠塚 明 筑間 稔江 藤澤 肇 高木 新, 線虫*C. elegans*におけるSemaphorin-Plexinシグナリングの解析. ３７回日本発生生物学会 ２００４年６月５日
14. 高木 新 劉 致岑 糠塚 明 藤澤 肇、 *C. elegans* 陰門形成におけるセマフォリン・プレキシン系の役割。３７回日本発生生物学会 ２００４年６月５日

A03-31 饗場 篤

1. 中村健司, 山田篤, 饗場篤, 中尾和貴, 勝木元也 H-ras遺伝子導入マウスを用いたRasコンディショナル欠損マウスの解析 第59回日本癌学会総会, 横浜, 2000年10月4～6日
2. 武藤智, 堀江重郎, 山田篤, 中尾和貴, 中村健司, 饗場篤, 勝木元也 DMBA/TPA誘発皮膚発がんにおけるH-ras遺伝子の役割 第59回日本癌学会総会, 横浜, 2000年10月4～6日
3. 饗場篤, 山田篤, 小西知江子, 中村健司, 中尾和貴, 勝木元也 NMDA受容体-Ras蛋白質情報伝達系の解析 第23回日本分子生物学会年会（ワークショップ）, 神戸, 2000年12月13～16日
4. 山田篤, 中尾和貴, 堀江重郎, 武藤智, 饗場篤, 勝木元也 誘導可能な活性型H-rasトランスジェニックマウスによるRasの機能解析 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 2000年12月13～16日
5. Aiba, A. and Katsuki, M. Mutant mice lacking dopamine receptor genes 第9回国際カテコールアミンシンポジウム, 京都, 2001年4月2日
6. 饗場篤 代謝型グルタミン酸受容体の遺伝学的解析 第24回日本神経科学大会・第44回日本神経化学会大会合同大会（シンポジウム）, 京都, 2001年9月26日
7. 饗場篤 遺伝子操作マウスを用いた脳研究 第24回日本分子生物学会年会（シンポジウム）, 横浜, 2001年12月9～12日
8. 野田朝男, 大河原弘達, 中尾晴美, 饗場篤 Rac1コンディショナルノックアウトマウスによる発癌および転移機構の解析 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 2002年12月11～14日
9. 中尾晴美, 野田朝男, 大河原弘達, 饗場篤 低分子量Gタンパク質Rac1の神経細胞特異的ノックアウトマウスの作製 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 2002年12月11～14日
10. Atsu Aiba, Yoshiaki Otani, Kouichi Hashimoto, Kenji Araishi, Masanobu Kano Role of scaffold proteins interacting with the carboxyl-terminal domain of mGluR1a. 第46回日本神経化学会大会（シンポジウム）, 新潟, 2003年9月24～26日
11. A. Aiba ; Y. Ohtani ; K. Hashimoto ; K. Araishi ; M. Kano. Generation of mGluR1b - rescue mice. Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting, NEW ORLEANS, USA, 2003/11/8-12
12. 大谷善昭, 橋本浩一, 深谷昌弘, 中尾和貴, 新石健二, 渡辺雅彦, 狩野方伸, 饗場篤 mGluR1bレスキューマウスの作製および解析 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003年12月10～13日
13. 松田育雄, 中尾晴美, 深谷昌弘, 渡辺雅彦, 中尾和貴, 饗場篤 セマフォリン 3F ノックアウトマウスの作製と解析 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003年12月10～13日
14. 饗場篤 ノックアウトマウスに対する部位特異的発現トランスジェニックマウスによる脳機能解析 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会（シンポジウム）, 大阪, 2004年9月21日～23日

15. 大谷善昭，橋本浩一，深谷昌弘，中尾和貴，新石健二，渡辺雅彦，狩野方伸，饗場篤 mGluR1b レスキューマウスの作製および解析 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会，大阪，2004年9月21日～23日
16. 松田育雄，中尾晴美，深谷昌弘，渡辺雅彦，中尾和貴，饗場篤 セマフォリン3Fノックアウトマウスの作成と解析 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会，大阪，2004年9月21日～23日
17. 反町洋之，川畑順子，中尾晴美，尾嶋孝一，小野弥子，小山傑 Christian Witt，Siegfried Labeit，川原裕之，阿部啓子，鈴木 紘一，饗場篤 遺伝子改変マウスを用いた骨格筋特異的カルパインの新規生理機能の解析 第77回日本生化学会大会，横浜，2004年10月13日～16日
18. 松田育雄，中尾晴美，深谷昌弘，渡辺雅彦，中尾和貴，饗場篤 セマフォリン3F ノックアウトマウスの作成と解析 第27回日本分子生物学会年会，神戸，2004年12月8日～11日
19. 中尾晴美，新石健二，深谷昌弘，渡辺雅彦，中尾和貴，饗場篤 代謝型グルタミン酸受容体1型を時期特異的に発現するマウスの作製 第27回日本分子生物学会年会，神戸，2004年12月8日～11日
20. 坂原瑞穂，浅原俊一郎，新石健二，中尾晴美，中尾和貴，饗場篤 Rac コンディショナルノックアウトマウスによる発がんおよび転移機構の解析 第27回日本分子生物学会年会，神戸，2004年12月8日～11日

A03-33 東海林 亙

1. Shoji, W., Sato-Maeda, M., Kuwada, J.Y.: Roles of a semaphorin on spinal motor neurons in zebrafish larva. Zebrafish Development & Genetics in Cold Spring Harbor Laboratory, 2000
2. 東海林亙、前田美香、帯刀益夫、Kuwada, J.Y.: ゼブラフィッシュ脊髄運動神経の軸索ガイドにおけるセマフォリンの役割. 第23回日本神経科学学会・第10回日本神経回路学会，2000年（講演）
3. 東海林亙、前田美香、帯刀益夫、Kuwada, J.Y.: 顕微鏡レーザーで誘導する遺伝子発現. 日本電子顕微鏡学会第57回学術講演会，2001年 （シンポジウム）
4. 東海林亙: 神経軸索ガイドと血管形成における細胞外シグナル因子の相互干渉. 第24回日本神経科学学会・第44回日本神経化学学会，2001年 （シンポジウム）
5. 東海林亙: 血管形成と神経軸索ガイドにおける細胞外シグナル因子の相互干渉. 第24回日本分子生物学年会，2001年 （ワークショップ）
6. Shoji, W., Isogai, S., Sato-Maeda, M., Obinata, M., Kuwada, J.Y.: Semaphorin3A1 regulates angioblast migration and vascular development in zebrafish embryos. 3rd European Conference on Zebrafish and Medaka Genetics and Development, Paris 2003
7. 東海林亙： ゼブラフィッシュ脊髄運動神経の軸索ガイド機構， 第26回日本神経科学大会， 2003年 （シンポジウム）

A03-37 川上 厚志

1. Kawakami, A., Karlstrom, R. O., Talbot, W. S. and Schier, A. F. “ Genetic dissection of midline signaling using zebrafish chameleon (con) mutants” The 4th International Conference on Zebrafish Development & Genetics (May, 2000)
2. Kawakami, A., Talbot, W. S. and Schier, A. F. “ Role of chameleon in midline signaling” The 59th Annual Meeting of Society for Developmental Biology (June, 2000)
3. 川上厚志「ゼブラフィッシュミッドラインミュータントの解析」第6回 小型魚類研究会（2000年9月）
4. Kawakami, A., Takeda, H., Talbot, W. S. and Schier, A. F. “ Genetic dissection of midline signaling using zebrafish chameleon (con) mutants” 第２３回日本神経科学大会（2000年9月）
5. Kawakami, A., Karlstrom, R. O., Takeda, H., Talbot, W. S. and Schier, A. F. “ Molecular analysis of zebrafish midline mutant chameleon (con)” The 2nd European Conference on Zebrafish Genetics and Development (April, 2001):
6. 関水康伸、武田洋幸、川上厚志 「ゼブラフィッシュミュータントの表現型比較によるミッドラインシグナル伝達経路の解析」 第３５回日本発生生物学会大会（2002年5月）
7. Sekimizu, K., Takeda, H. and OKawakami, A.“ Comparative analysis of zebrafish midline mutants; Regional regulation of signal transduction in vivo” The 5th International Conference on Zebrafish Development & Genetics (July, 2002)
8. 野島康弘，松山剛暢，李 海昌，前田 龍，田中英臣，和田浩則，川上厚志，岡本 仁 「側線神経に異常を示す突然変異体の単離および解析」第３６回日本発生生物学会大会(2003年６月)
関水康伸、西岡則幸、佐々木洋、武田洋幸、Schier, A. F.、0川上厚志 「ヘッジホッグシグナル伝達の新しい調節因子 iguana」第３６回日本発生生物学会大会(2003年６月)
9. Kim, H. R., Nakano, Y., Kawakami, A., Schier, A. F. and Ingham, P. W. “ Cloning and characterization

of dispatched in zebrafish" - The 3rd European Conference on Zebrafish Genetics and Development (June, 2003)
10. 川上厚志「PKA レベルで作用するヘッジホッグシグナルの新規調節因子 iguana」第６回 小型魚類研究会（2003 年９月）
11. 野島康弘、李 海昌、前田 龍、田中英臣、和田浩則、西脇優子、政井一郎、川上厚志, 岡本 仁 「側線神経に異常を示す変異体の解析および原因遺伝子のマッピング」第６回 小型魚類研究会（2003 年９月）
12. 中野芳朗、Kim, R.、川上厚志、Roy. S.、Schier, A.、Ingham, P.「chameleon 変異体の原因遺伝子は dispatched1 である」第６回 小型魚類研究会（2003 年９月）
13. Kawakami, A., Sekimizu, K., Noriyuki Nishioka, Hiroshi Sasaki, Hiroyuki Takeda and Alexander F. Schier " Regulation of the hedgehog signaling pathway by a novel zinc-finger protein" The 32th Annual meeting of Society for Neuroscience (Nov., 2003)
14. 関水康伸、西岡則幸、佐々木洋、武田洋幸０川上厚志 「ゼブラフィッシュ変異体から明らかになった新規ヘッジホッグシグナル伝達コンポーネント」第 26 回 日本分子生物学会（2003 年１２月）
15. 中野芳朗、Kim, R.、川上厚志、Roy. S.、Schier, A.、Ingham, P. 「Sterol sensing domain (SSD)を持ったタンパク質ゼブラフィッシュの Dispatched の解析」 第 26 回 日本分子生物学会 （2003 年１２月）:
16. 川上厚志、深澤太郎 、武田洋幸 「細胞の脱分化・再分化を伴わない幼若組織の修復も再生と定義できる」第 37 回日本発生生物学会大会（2004 年６月）
17. Kawakami, A., Fukazawa, T and Takeda, H. " Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration" The 59th Annual Meeting of Society for Developmental Biology (July, 2004)
18. Kawakami, A., Fukazawa, T and Takeda, H. " Growth control mechanism of fin regeneration in early zebrafish larvae" - The 6th International Conference on Zebrafish Development & Genetics (Aug., 2004)
19. 川上厚志、野島康弘、田中英臣、豊田敦、石田（鷹架）美賀子、佐藤美紀、和田浩則、政井一郎、寺崎晴美、武田洋幸、岡本仁 「背側神経に発現する細胞表面タンパク Scube2 による長距離のヘッジホッグシグナル制御機構」第２７回日本分子生物学会大会 ワークショップ：高次生命現象を支える ECM 環境と細胞のクロストーク」（2004 年 12 月）

A03-38 上村 匡

1. Tadashi Uemura, Regulation of axon and dendrite patterning by the seven-pass transmembrane cadherin, Gordon Research Conference " Molecular and Cellular Neurobiology", Hong Kong, June 2000.
2. 上村匡、神経細胞の single-cell patterning：７回膜貫通型カドヘリンによる調節、第 22 回日本神経科学大会シンポジウム「神経系の形作りの原理を求めて」、 2000 年９月.
3. Tadashi Uemura, Control of epithelial and neuronal cell patterning by the seven-pass transmembrane cadherin, 41th Annual Society of Cell Biology Conference, San Francisco, December 2000.
4. 上村匡、Control of epithelial and neuronal cell patterning by the seven-pass transmembrane cadherin Flamingo、第 54 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「神経細胞の移動と形作りのメカニズム」、岐阜、５月 30-6 月１日, 2001.
5. 稚井理夫、Flamingo Regulates R8 Axon-Axon and Axon-Target Interactions in the *Drosophila* Visual System、ショウジョウバエ研究会第６回研究集会／日韓シンポジウム、東京、７月 29 日-８月１日, 2003.
6. 木村宏史、Structure-functional analysis of Flamingo in dendritic morphogenesis、ショウジョウバエ研究会第６回研究集会／日韓シンポジウム、東京、７月 29 日-８月１日, 2003.
7. Tadashi Uemura, Analysis of roles of a seven-pass transmembrane cadherin in dendrite patterning by biolistic transfection of DNA vectors expressing siRNA, The 10th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research, Kyoto, Nov. 18 and 19, 2003.
8. Kaoru Sugimura, Molecular basis of morphological diversity of dendritic trees, The 10th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research, Kyoto on Nov. 18 and 19, 2003.
9. Tadashi Uemura, Towards understanding the basis of morphological diversity of dendritic trees. 6th IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE, Prague, Czech, July 10-15, 2003.
10. 上村匡、Towards understanding the basis of morphological diversity of dendritic trees、ショウジョウバエ研究会第６回研究集会／日韓シンポジウム、東京、７月 29 日-８月１日、2003.
11. 上村匡、樹状突起のパターン形成：その多様性を生みだす基盤、平成１５年生理学研究所研究会「神経可塑性の分子的基盤」、岡崎、５月 29 日、2003.
12. 上村匡、Intrinsic and extrinsic control of shaping dendrites、スイスとの学振共同セミナー「発生生物学の進歩：遺伝子、細胞そしてボディープラン」、大仁、静岡、11 月 23-26 日、2003.

13. 上村匡、感覚細胞のクラス特異的な樹状突起のパターン形成. 第56回日本細胞生物学会大会、大津、滋賀、5月14-16日、2003.
14. 上村匡、神経細胞の入力受容装置・樹状突起のパターン形成、広 島 大 学・自然科学研究支援開発センター 第１８回公開学術講演会 遺伝子科学のフロンテイア、広島、10月17日、2003.
15. 島康之、樹状突起形成・維持において7回膜貫通型カドヘリンが果たす役割—脳スライス培養と RNAi を組み合わせた解析—、第26回日本分子生物学会、神戸、12月10-13日、2003.
16. 杉村薫、樹状突起のパターン形成の多様性を支える分子機構. 第 26 回日本分子生物学会、神戸、12 月 10-13 日、2003.
17. Tadashi Uemura, Extrinsic and intrinsic control of dendritic shaping, Neuro2004, Osaka, September 21-23, 2004.
18. 上村匡、樹状突起のパターン形成の調節、徳島大学ゲノム機能解析センター、6月8日、2004.
19. 上村匡、Intrinsic and extrinsic control of dendritic shaping、理化学研究所脳科学研究センター、11月10日、2004.

A03-40 黒田 俊一

1. 黒田俊一 プロテインキナーゼC結合タンパク質を介する新しい細胞内情報伝達機構 日本生化学会 ゲノム創薬シンポジウム 2001年10月27日
2. 藤田敏次 哺乳類由来UNC-76 オルソログFEZ1が関する神経軸索誘導機構の解明 日本分子生物学会 一般講演 2001年12月9日
3. 立松健司 神経軸索誘導関連タンパク質FEZ1, FEZ2と神経冠由来細胞分化誘導因子 NELL1, NELL2の概要並びに進捗状況 タンパク３０００プロジェクト 個別的解析プログラム「脳・神経系」第1回ワークショップ 2002年10月25日
4. 藤田敏次 神経軸索誘導関連タンパク質FEZ1と同ホモログFEZ2の比較 日本分子生物学会 一般講演 2002年12月14日
5. 生田潤子 神経軸索誘導関連タンパク質FEZ1と同ホモログFEZ2の構造および機能の比較 日本生化学会 一般講演 2003年10月 16日
6. 生田潤子 神経軸索誘導関連タンパク質FEZ1と同ホモログFEZ2の構造と機能に関する研究 日本分子生物学会 一般講演 2004年12月10日

A03-41 福嶋 伸之

1. 孫白龍、小橋重親、近藤正男、佐藤祐二、藤堂省、鈴木正己、福嶋伸之、西平順、石橋輝雄；リゾフォスファチジン酸のシグナル伝達経路におけるマクロファージ遊走阻止因子の機能. 第45回日本脂質生化学研究会、仙台、2003年6月
2. Fukushima, N. Regulation of cytoskeletal interactions by LPA in neuronal cell dynamics. FASEB 2003 Summer Research Conferences, Snowmass, Colorado, 2003年7月（招待）
3. Fukushima, N. Regulation of neuritogenesis through interactions between microfilaments and microtubules by Lysophosphatidic acid. Sixth IBRO World Congress of Neuroscience. Prague, Czech Republic 2003年7月
4. 福嶋伸之 Coordinated cytoskeletal interactions in neuritogenesis. 第46回日本神経化学会大会、新潟、2003年9月
5. 福嶋伸之 リゾフォスファチジン酸による細胞骨格相互作用の調節、第 76 回日本生化学会大会、横浜、2003年10月（シンポジウム）
6. 孫白龍、西平順、近藤正男、佐藤祐二、藤堂省、福嶋伸之、石橋輝雄;The role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in tumor invasion and metastasis: Relevance to the signal transduction of Rho-dependent pathway. 第76回日本生化学会大会、横浜、2003年10月
7. 福嶋伸之；リゾフォスファチジン酸による神経突起退縮反応時の微小管再編成の解析、第77回日本生化学会大会、横浜、2004年10月
8. Fukushima, N.; Lysophosphatidic acid induces neurite remodeling without microtubule depolymerization. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 2004年10月
9. Ye, X., Aihara, M., Birgbauer, E., Cho, J., Fukushima, N. and Chun, J.; Potential roles of lysophosphatidic acid in mouse ocular development. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego 2004年10月.

A03-42 八田 公平

1. Kohei Hatta. Changes in the neighbor relation between neural anlage and underlying midline mesoendoderm during gastrulation. 3rd European Conference on zebrafish and medaka genetics and development. Paris, France. June 11th -14 th, 2003.
2. 八田公平、辻井仁美。マウスナー細胞軸索ガイダンス変異体の研究。 第９回小型魚類研究会、理化学研究所和光本所、和光、平成１５年９月２９日。
3. 八田公平、辻井仁美。Kaede とケージド蛍光色素を用いた脊椎動物の神経ネットワーク形成及び大局的形態形成運動の研究。 第２６回日本分子生物学会、神戸、平成１５年１２月１２日。
4. Kohei Hatta, Hitomi Tsujii. Germ layer tectonics: dynamic neighbor relation between neural anlage and underlying mesendoderm during early vertebrate morphogenesis. CDB symposium" Beauty in embryology. -Patterning and shaping of the body-" CDB, Riken, Kobe. February 4 th, 2004.
5. 八田公平、辻井仁美。胚葉テクトニクス：Kaede とケージド蛍光色素を用いた脊椎動物の大域的形態形成運動の研究。 日本発生生物学会第３７回大会、名古屋、平成１６年６月５日。
6. Kohei Hatta, Hitomi Tsujii. Germ layer tectonics and co-ordinate transformation during the brain formation in zebrafish. 2004 Kobe meeting on vertebrate brain development. Awaji-shima. July 20th-23 th, 2004.
7. Kohei Hatta, Hitomi Tsujii. Germ layer tectonics: large scale morphogenesis and network formation analyzed by using a photoconvertible coral fluorescent protein. 6th International conference on zebrafish development & genetics. Wisconsin-Madison, U.S.A. July 30th, 2004.
8. 八田公平、辻井仁美。脊椎動物における形態形成と神経回路形成の Kaede とケージド蛍光色素を用いた研究。Neuro2004、第２７回日本神経科学会大会、第４７回日本神経化学会大会、合同大会、大阪、平成１６年９月２３日。
9. Kohei Hatta, Hitomi Tsujii. Systematic analysis of patterning and network formation by using photoconversion. The 10th Japanese medaka and zebrafish meeting. Kobe, November 14th, 2004.
10. Shinsuke Aramaki, Kohei Hatta. Study on the vertebrate neural network formation using the zebrafish Mauthner cell as a model. The 10th Japanese medaka and zebrafish meeting. Kobe, November 14th, 2004.
11. Hitomi Tsujii, Kohei Hatta. Use of Kaede to study dynamic neighbor relation between tissue primordial during the vertebrate morphogenesis. The 10th Japanese medaka and zebrafish meeting. Kobe, November 14th, 2004.
12. 八田公平、仲矢由起子、高橋淑子、辻井仁美。脊椎動物（魚・鳥類）器官・神経発生における大域的形態形成運動の光転換法によるライヴイメージング。第２７回日本分子生物学学会年会、ワークショップ「発生現象の再発見」、神戸、平成１６年１２月９日。
13. 辻井仁美、八田公平。Kaede を用いたゼブラフィッシュにおける器官・神経原基の隣接関係の研究。第２７回日本分子生物学学会年会、神戸、平成１６年１２月９日。
14. 竹内雅貴、辻井仁美、荒巻真介、八田公平。脊索・神経底板形成における細胞分化と細胞識別。第２７回日本分子生物学学会年会、神戸、平成１６年１２月９日。
15. 荒巻真介、辻井仁美、竹内雅貴、八田公平。ゼブラフィッシュ Mauthner 細胞を用いた脊椎動物の神経回路形成に関する研究。第２７回日本分子生物学学会年会、神戸、平成１６年１２月１０日。

A03-43 中川 真一

1. 中川真一、Wnt2b による網膜幹細胞の維持と層形成の誘導、日本再生医療学会総会、2004 年 3 月 24 日
2. 中川真一、網膜の再集合実験から見えてきた Wnt2b の役割、日本発生生物学会大会、2004 年 6 月 5 日
3. Nakagawa, S., Histogenesis of the laminated structures of the retina *in vitro*, 16th International Congress of IFAA, Aug 24th, 2004.
4. 中川真一、Notch シグナルと独立な Wnt シグナルによる網膜前駆細胞の分化抑制機構、第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月 10 日

A03-44 一色 孝子

草野亜弓 「ショウジョウバエ神経幹細胞系譜形成に関与する因子の探索」 日本発生生物学会第３７回大会 ２００４年６月５日

A03-45 中村 真

1. Identification and functional characterization of novel SP-RING finger protein Scad67
Makoto Nakamura , Fumio Tanabe, Yayoi Nishida, Naoto Ueno 日本発生生物学会・札幌・2003 年 6 月

2. NAT1 はショウジョウバエにおいて細胞死シグナルの調節に関与するのか？
吉兼奈美、上野直人、山中伸弥、中村　真 日本分子生物学会・神戸・2003 年 12 月
3. Drosophila NAT1 遺伝子の変態期における機能解析 吉兼奈美、上野直人、山中伸弥、中村　真 日本分子生物学会・神戸・2004 年 12 月

A03-47 仲嶋一範

1. 田畑秀典、宮田卓樹、小川正晴、仲嶋一範 ″大脳皮質神経細胞の新規移動様式″ 日本解剖学会第 108 回総会・全国学術集会、福岡、2003 年 4 月
2. 味岡逸樹、仲嶋一範 ″発生時期依存的な大脳皮質神経細胞の選択的凝集機構″ 日本解剖学会第 108 回総会・全国学術集会、福岡、2003 年 4 月
3. 仲嶋一範、田畑秀典 " Dynamics of cerebral cortical development" 日本細胞生物学会第 56 回大会 シンポジウム：「*in vivo* あるいは organotypic culture における神経細胞の追跡」、大津、2003 年 5 月
4. 仲嶋一範" 大脳皮質形成のメカニズム" BNM (Brain Nuclear Medicine) 研究会 教育講演、東京、2003 年 6 月
5. 工藤千加子、味岡逸樹、仲嶋一範" 発生期大脳皮質における EphA3 の発現パターンの解析" 日本発生生物学会第 36 回大会、札幌、2003 年 6 月
6. 田畑秀典、仲嶋一範 ″大脳皮質形成過程における初期と後期の神経細胞移動様式の違い″ 日本神経科学学会第 26 回大会、名古屋、2003 年 7 月
7. 味岡逸樹、仲嶋一範" 大脳皮質神経細胞の発生時期依存的な凝集機構の解析" 日本神経科学学会第 26 回大会、名古屋、2003 年 7 月
8. 久保健一郎、御子柴克彦、仲嶋一範" Reelin による効果的な Dab1 リン酸化の解析" 日本神経科学学会第 26 回大会、名古屋、2003 年 7 月
9. 本田岳夫、田畑秀典、仲嶋一範" 大脳皮質形成に於ける髄膜の役割" 日本神経科学学会第 26 回大会、名古屋、2003 年 7 月
10. 仲嶋一範（山本亘彦先生とともにシンポジウムオーガナイザー）シンポジウム「大脳皮質の発生・進化と機能構築」日本神経科学学会第 26 回大会、名古屋、2003 年 7 月
11. Kazunori Nakajima and Hidenori Tabata" Visualization of neuronal migration using *in utero* electroporation" Symposium " Evolving roles of radial glia" 6th IBRO (International Brain Research Organization) World Congress of Neuroscience, Prague, Czech Republic, 2003 年 7 月
12. Kazunori Nakajima" Dynamics of cerebral cortical development" International Symposium " Dynamics of Neural Development" , Osaka, 2003 年 8 月
13. 四津真人、田畑秀典、仲嶋一範" 大脳皮質形成過程における抑制性神経細胞の配置機構" 第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本生物物理学会合同大会、新潟、2003 年 9 月
14. 本田岳夫、田畑秀典、仲嶋一範" 大脳皮質形態形成における髄膜の役割" 第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本生物物理学会合同大会、新潟、2003 年 9 月
15. 味岡逸樹、田畑秀典、仲嶋一範" 大脳皮質における移動神経細胞の細胞接着性の解析" 第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本生物物理学会合同大会、新潟、2003 年 9 月
16. 仲嶋一範" 大脳皮質神経細胞の動きを観る" 第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会 シンポジウム「バイオイメージング技術による神経・血管機能のシステム生物学的解析」、横浜、2003 年 10 月
17. Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima ″Phase of the multipolar cell is the fundamental process during the migration of cortical neurons″ Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting, New Orleans, LA, U.S.A., 2003 年 11 月
18. Ken-ichiro Kubo, Katsuhiko Mikoshiba, and Kazunori Nakajima ″Analysis of the mechanisms that mediate efficient Reelin-induced tyrosine phosphorylation of Dab1 ″ Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting, New Orleans, LA, U.S.A., 2003 年 11 月
19. Kazunori Nakajima" Developmental dynamics of mammalian cerebral cortex" International Symposium of 21st Century COE Program, Keio University " Understanding and Control of Life' s Function *via* Systems Biology" 、Yokohama、2003 年 11 月
20. 前田卓哉、味岡逸樹、仲嶋一範" 大脳皮質層形成の基盤となる細胞選別機構の解明に向けた *in silico* 実験の試み" 日本分子生物学会第 26 回年会、神戸、2003 年 12 月
21. 平林祐介、伊藤靖浩、田畑秀典、仲嶋一範、秋山徹、増山典久、後藤由季子" 神経系前駆細胞における Wnt シグナルの役割" 日本分子生物学会第 26 回年会、神戸、2003 年 12 月
22. Itsuki Ajioka and Kazunori Nakajima" Cerebral cortical neurons are segregated in vitro depending on their birth-dates" The American Society for Cell Biology, 43rd Annual Meeting, San Francisco, California, U.S.A., 2003 年 12 月

23. Kazunori Nakajima and Hidenori Tabata“ Neuronal Migration in the Cerebral Cortical Development” International Symposium on “ Development and Regeneration of the Nervous System” 、Okazaki、2003 年 12 月
24. 田畑秀典、仲嶋一範“ 大脳皮質神経細胞の移動様式” 日本再生医療学会第 3 回総会 シンポジウム：「中枢神経系の組織構築機構」（オーガナイザー：仲嶋一範、見学美根子）、幕張、2004 年 3 月
25. Kazunori Nakajima“ Visualization of neuronal migration in the developing cerebral cortex”, International Symposium on Neuronal Migration Disorders and Childhood Epilepsies, The 7th Annual Meeting of the Infantile Seizure Society, Tokyo, 2004 年 4 月
26. 前田卓哉、味岡逸樹、仲嶋一範“ 細胞選別機構の解明に向けた *in silico* 実験の試みと大脳皮質層形成への適用について” 日本発生生物学会第 37 回大会、名古屋、2004 年 6 月
27. 四津真人、田畑秀典、仲嶋一範“ マウス大脳皮質視覚野における抑制性神経細胞の配置機構” 日本発生生物学会第 37 回大会、名古屋、2004 年 6 月
28. 仲嶋一範“ 大脳皮質発生のダイナミクス” 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科セミナー、東京、2004 年 7 月
Kazunori Nakajima“ Neuronal migration and meninges in the developing cerebral cortex” Kobe Meeting on Vertebrate Brain Development, Awaji and Kobe, 2004 年 7 月
29. Kazunori Nakajima“ Dynamics of neuronal migration in the developing cerebral cortex” Special Presentation, The Inaugural Pacific Rim Brain Conference, Kailua-Kona, Hawaii, U.S.A., 2004 年 8 月
30. Kazunori Nakajima“ Dynamics of neuronal migration in the developing cerebral cortex” Symposiun “ Molecular and cellular principals of cerebral cortical development” 16th International Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA), Kyoto, 2004 年 8 月
31. Itsuki Ajioka and Kazunori Nakajima“ Molecular mechanism of the cell adhesion properties of the cortical neurons” 16th International Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA), Kyoto, 2004 年 8 月
32. Hidenori Tabata, Takaki Miyata, and Kazunori Nakajima“ The phase of multipolar cells as a fundamental process of radial neuronal migration during cortical development” 16th International Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA), Kyoto, 2004 年 8 月
33. Masato Yozu, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima“ Comparison of birth-date dependent alignment of GABAergic interneurons and non-GABAergic neurons in the developing mouse visual cortex” 16th International Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA), Kyoto, 2004 年 8 月
34. 仲嶋一範“ 中枢神経系の細胞構築機構” ステムセル研究所セミナー、東京、2004 年 9 月
35. Masato Yozu, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima ″Birth-date dependent alignment of GABAergic interneurons in the developing mouse visual cortex″ 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (Neuro2004)、大阪、2004 年 9 月
36. Itsuki Ajioka, Takuya Maeda, and Kazunori Nakajima ″Screening of the ventricular zone-specific secretory or cell surface molecules in the developing cerebral cortex″ 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (Neuro2004)、大阪、2004 年 9 月
37. Takuya Maeda, Itsuki Ajioka, and Kazunori Nakajima ″Attempt of computational approach toward understanding the neural cell segregation during the cortical layer formation″ 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (Neuro2004)、大阪、2004 年 9 月
38. Takao Honda, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima ″Action of neuroprotective factor derived from cerebral hemispheres″ 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (Neuro2004)、大阪、2004 年 9 月
39. Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima ″The behavior of multipolar cells in the developing cortex″ 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (Neuro2004)、大阪、2004 年 9 月
40. Kazunori Nakajima, Itsuki Ajioka, and Hidenori Tabata ″Dynamics of cerebral cortical development″ Symposium “ Cellular principles of neocortical development (大脳皮質の細胞構築制御) ” (Organizers: Kazunori Nakajima and Makoto Sato) 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会 (Neuro2004)、大阪、2004 年 9 月
41. Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima“ Multipolar migration as the third mode of radial neuronal migration during cortical development” Neuronal Migration Meeting, Elba, Italy, 2004 年 9 月
42. Takao Honda, Hidenori Tabata, and Kazunori Nakajima ″Supportive function of meninges in cortical development″ Society for Neuroscience, 34th Annual Meeting, San Diego, CA, U.S.A., 2004 年 10 月

43. Chikako Kudo, Itsuki Ajioka, and Kazunori Nakajima "Expression profiles of EphA3 at RNA and protein levels in the developing mammalian brain" Society for Neuroscience, 34th Annual Meeting, San Diego, CA, U.S.A., 2004年10月
44. Atsushi Kamiya, Toshifumi Tomoda, Ken-ichiro Kubo, Richard Youn, Yuji Ozeki, Una Park, Masako Okawa, Christopher A. Ross, Mary E. Hatten, Kazunori Nakajima and Akira Sawa "Role of Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) in microtubular dynamics and cerebral cortical development provides evidence for neurodevelopmental origin of schizophrenia" Society for Neuroscience, 34th Annual Meeting, San Diego, CA, U.S.A., 2004年10月
45. Takehiko Sunabori, Yumi Matsuzaki, Takeharu Nagai, Akinori Tokunaga, Takaki Miyata, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima, Atsushi Miyawaki, Hideyuki Okano" Visualizing neural progenitor cells with a destabilized fluorescent reporter: Nestin-d4-Venus" Society for Neuroscience, 34th Annual Meeting, San Diego, CA, U.S.A., 2004年10月
46. 仲嶋一範 "大脳皮質形成のダイナミクス" 横浜市立大学大学院医学最先端セミナー、横浜、2004年11月
Itsuki Ajioka, Takuya Maeda, Masatoshi Sakurai, Kazunori Nakajima "Screening of secretory or cell surface molecules that are expressed in the developing cerebral cortical ventricular zone but not in the cortical plate" The American Society for Cell Biology, 44th Annual Meeting, Washington, D.C., U.S.A., 2004年12月
47. 仲嶋一範" 大脳皮質組織構築のダイナミクス" 京都府立医科大学大学院セミナー、京都、2004年12月
櫻井政寿、味岡逸樹、仲嶋一範" 大脳皮質の発生において脳室帯特異的に発現する因子のスクリーニング" 第110回日本解剖学会全国学術集会、富山、2005年3月

A03-48 佐甲 靖志

1. 佐甲靖志、細胞内情報伝達システムの1分子計測 第21回麻酔メカニズム研究会 特別講演 (2003.7.12)
2. 佐甲靖志、細胞内情報分子と情報分子システムの機能計測 広島大学数理分子生命理学専攻第1回公開シンポジウム「生命科学の新展開－生命と数理の融合－」(2003.8.28)
3. Sako, Y. Single molecule analysis of cell signaling in living cells using total internal reflection fluorescence microscopy "Japan-France coference on molecular photonics and biophotonics at micro and nano-scale JFC2003" (2003.10.29)
4. 佐甲靖志、全反射レーザー顕微鏡による細胞内1分子計測 第24回日本レーザー医学会総会 シンポジウム「レーザー顕微鏡の最近の進歩」(2003.11.15)
5. Sako, Y. Single molecule imaging of cell signaling "The 19th international symposium in conjunction with award of the international prize for biology" (2003.12.3)
6. Sako, Y., Single molecule visualization of cell signaling. "16th international congress of the International Federation of Associations of Anatomists" (2004.8.25)
など計18件

A03-49 一條 裕之

1. Ichijo, H. Telencephalic cells and their chondroitin sulfate proteoglycans delimit the anterior border of the retinal pathway. RIKEN CDB symposium 2003.
2. 一條裕之、前田信明 網膜軸索路形成における chondroitin sulfate glycosaminoglycans の役割。第36回日本発生生物学会 2003.
3. Ichijo, H. Chondroitin sulfate proteoglycans in formation of the retinotectal pathway. 第26回日本神経科学大会 2003.
4. Ichijo, H. Telencephalic chondroitin sulfate proteoglycans delimiting an anterior border of the retinal pathway. 16th International congress of the IFAA 2004 (Kyoto)[第16回国際解剖学会議]
5. 一條裕之 網膜軸策ガイダンスに及ぼす chondroitin sulfate の構造多様性の効果。(Efffects of structural diversity in chondroitin sulfateds on retinal axon guidance) 第27回日本神経科学大会 2004.

A03-50 栗崎 健

1. 栗崎健、伊藤啓 ショウジョウバエ変態期における神経回路再編成の制御機構 第 36 回日本発生生物学会 2003年6月11日
2. 栗崎健、伊藤啓 Remodeling of neural circuits during metamorphosis of Drosophila 第26回日本神経科学大会 2003年7月25日
3. 栗崎健、伊藤啓 REQUIREMENT OF GLIAL CELLS IN THE PROGLAMMED AXON PRUNING OF MUSHROOM BODIE: GLIAL

CELLS EAT AXON BRANCHES? Cold Spring Horbor Laboratory 2003 Meeting, Neurobiology of Drosophila 2003年10月2日

4. 粟崎健、伊藤啓 変態期のショウジョウバエにおいて神経回路崩壊を制御する機構 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月12日

5. 粟崎健、伊藤啓 PHAGOCYTOTIC ACTION OF GLIAL CELLS IS REQUIRED FOR PROGRAMED AXON PRUNING IN DROSOPHILA METAMORPHOSIS CDB Symposium 2004, Developmental Remodeling 2004年3月30日

6. 粟崎健、伊藤啓 ショウジョウバエ変態期における神経-グリア相互作用による軸策分岐除去 第37回日本発生生物学会 2004年6月5日

7. 粟崎健、巽 良子、高橋 邦明、上田 龍、伊藤啓 ショウジョウバエ変態期における神経-グリア相互作用による軸策分岐除去の機構 第26回日本分子生物学会年会 2004年12月10日

A03-51 佐藤 真

1. 佐藤 真：新規遺伝子ノックアウトマウスを用いた聴原性てんかん原性解明へのアプローチ、第38回日本てんかん学会シンポジウム、2004、9、静岡、S-7
2. 佐藤 真、永野 隆：アクチン結合タンパクフィラミンによる移動細胞の形態制御、Neuro2004シンポジウム、2004、9大阪、SY13-02
3. 佐藤 真：Molecular mechanism of controlling the start and migratory cell shape during the radial migration in the developing neocortex、第16回国際解剖学会議シンポジウム、2004、8、京都、S02-1
4. 佐藤 真：神経細胞の移動と形態制御の分子基盤：大脳皮質形成と脊髄形成の類似と相違、第19回日本脊髄学会外科学会特別講演、2004、6、福井、B-04
5. 佐藤 真：脳形成の基本原理；脳室帯からの細胞移動開始の新しい制御の仕組み、第19回形態科学シンポジウム「神経系の発生・形成・再生—その分子メカニズム—」、2003、10、和歌山
6. 佐藤 真：脳形成・発達とけいれん、第46回日本神経化学会、オープンシンポジウム（学会主催）、2003、9、新潟、OS-3
7. 佐藤 真：Molecular mechanism of directed migration start out of the cortical ventricular zone, 第26回日本神経科学大会シンポジウム、大脳皮質の発生・進化と機能構築、2003、7、名古屋、S23-1
8. 佐藤 真：大脳皮質形成；脳室からの細胞移動開始を司る新たな分子基盤、第108回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム，ポストゲノムの形態学的再認識、2003、4、福岡、S02-4
9. 佐藤 真：フィラミンA結合分子FILIPによる大脳皮質脳室帯からの細胞移動開始調節の分子メカニズム、第75回日本生化学学会大会シンポジウム、2002、10、京都、4S85-1
10. 佐藤 真：大脳皮質脳室帯からの細胞移動開始を司る新しい分子機構、「脳神経科学の最先端2001」戦略的基礎研究推進事業（CREST）「脳を知る」シンポジウム，2001，11，東京
11. T. Nagano, S. Morikubo, H. Yagi, M. Sato: Filamin A-Interacting Protein FILIP regulates cell shape prior to radial migration In the cortical ventricular zone. 33rd Society for Neuroscience. 2003,11, New Orleans, LA
12. H. Yagi, K. Yoshida, H. Yoshikawa, M. Sato: Disruption of neurepin resulted in high susceptibility to audiogenic seizures. 33rd Society for Neuroscience. 2003,11, New Orleans, LA
13. K. Ando, M. Sato: Otx1 plays an important role for the specification of the caudal neocortex. 33rd Society for Neuroscience. 2003,11, New Orleans, LA

A04-01 山森 哲雄

２００４年北米神経科学会

1. T. TakahataY、 Komatsu, A. Watakabe, T. Yamamori. Comparative analysis of transcription patterns of occ1/frp in mammalian brains.
2. A. Watakabe、S. Ohsawa、T. Hashikawa、Y. Komatsu、T. Yamamori. A comparative analysis of layer specific genes in mammalian neocortex.
3. Y. Komatsu、A. Watakabe、K. Miki, T. Hashikawa、S. Tochitani T. Yamamori. Retinol - binding protein gene is highly expressed in higher - order association areas of the primate neocortex
4. T. Kitsukawa, D. Yanagihara, T. Yamamori. Bilaterally projecting cortico - striatal pathway is activated on the stepping - pattern learning in mice
5. Y. Komine, K. Nakamura, M. Katsuki, T. Yamamori. A novel transcription factor ZFH - 5, which functions in differentiating neurons, receives negative regulation by its own antisense transcripts
6. S. Sakata, T. Yamamori, Y. Sakurai. Brain - state - dependent synchronized oscillation in prefrontal cortex

２００４年日本神経科学・日本神経化学合同大会
１、坂田秀三、山森哲雄、櫻井芳雄　前頭前野における脳の状態に依存した周期的同期的活動
２、小峰由里子。中村健司、勝木元也、山森哲雄　分化途上のニューロンに発現している新規転写因子 ZFH-5 は，内在性アンチセンス RNA により負の制御を受けている
３、渡我部 昭哉、大澤 園子、小松 勇介、端川 勉、山森 哲雄　哺乳類新皮質において層特異的発現をする遺伝子の種間比較解析
＜他省略＞

A04-02 八木 健

1. 八木 健 : 「脳神経系における多様化分子群：CNR/プロトカドヘリンファミリー」，神戸国際会議場，第 26 回日本分子生物学会，2003/12/13
2. 八木 健 : 「Diversity of CNR/protocadherin genes in the brain」，パシフィコ横浜，第 76 回日本生化学会大会，2003/10/18
3. 八木 健 : 「Diversity of cadherin-related neuronal receptor (CNR) genes in the brain」，新潟コンベンションセンター(新潟市万代島 6-1)，第 46 回神経化学会大会　シンポジウム「ヒトはなぜその行動をとるか」，2003/9/25
4. 八木 健 : 「脳に存在する多様化分子群 CNR/protocadgerin ファミリー」，基礎生物学研究所平成 14 年度基礎生物学研究所共同利用研究会[動物行動プログラムの遺伝・生物学的基盤]，2002/12/20
5. 八木 健 : 「Protocad h erins in brain development」，Max-Planck-Institute for Experimental Medicine GOttingen, Germany "Molecular genetics of morphoregulatory process-From stem cells to complex cellular networks"，2002/10/12
6. 八木 健 : 「Diversity of CNR Family Genes in the Brain」，京王ﾌﾟﾗｻﾞｲﾝﾀｰｺﾝﾁﾈﾝﾀﾙﾎﾃﾙ，UEHARA MEMORIAL FOUDATION SYMPOSIUM-2002 "Genomic Science -Towards a New Paradigm"2002/6/4
7. 八木 健 : 「Genome structure of CNR family」，基礎生物学研究所，Tentative meeting program "Genome-Wide Approaches for Developmental Biology using Xenopus"，2002/2/23
8. 八木 健 : 「脳神経系形成におけるダーウィニズム」，京都大学，2002/2/5
9. 八木 健 : 「動物行動とゲノム」，パシフィコ横浜，第 24 回日本分子生物学会，2001/12/11
10. 八木 健 : 「シナプスに存在するカドヘリン分子群：CNR ファミリー」，国立京都国際会館第 74 回日本生化学大会，2001/11/28
11. 八木 健 : 「脳神経系で発現する CNR / protocadherin ファミリーの解析」，日本科学未来館，研究領域「脳を知る」のシンポジウム" 脳神経科学の最先端 2001"，2001/11/22
12. 八木 健 : 「CNR ファミリーとその脳の機能進化における意味」，国立京都国際会館 Neuro 2001（第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 2001/9/26
13. 八木 健 : 「Somatic mutations of synaptic cadherins(CNR family) in the brain」Buenos Aires, Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry and American Society for the Neurochemistry, 2001/8/26
14. 八木 健 : 「Somatic mutations of synaptic cadherins(CNR family) in the brain」Salve Regina University, Newport, RI, USA, GRC on Neural Plasticity2001/7/16
15. 八木 健 : 「Development of Gene-Converting Animals for Physiological Sciences」，同志社大学/今出川・新町キャンパス，第 78 回日本生理学会大会　シンポジウム" 遺伝子改変動物研究の概要と展開"，2001/3/29

A04-03 真鍋 俊也

1. 真鍋俊也　海馬シナプス伝達可塑性の分子機構　日本神経化学会シンポジウム「選択的シナプス強化・除去の分子機構」，2000.
2. 手塚徹、中澤敬信、駒井章治、真鍋俊也、山本雅　Src型キナーゼによるNMDA受容体のチロシンリン酸化の意義付け　日本分子生物学会年会，2000.
3. Shimuta, M and Manabe, T. The type 3 ryanodine receptor regulates the properties of postsynaptic AMPA receptors in the hippocampal CA1 region. Jpn. J. Physiol. 50:S133, 2000.
4. Manabe, T. Molecular mechanisms for hippocampal synaptic plasticity. Neuroscience Function Research Group Workshop 2001 at BSI, RIKEN " Cellular Interactions in Neuronal Networks"
5. Manabe, T. The role of NMDA receptor channels in synaptic plasticity and the regulation of their functions. Jpn. J. Physiol. 51:S99, 2001.
6. Manabe, T. Frequency dependency of hippocampal synaptic plasticity. Neurosci. Res. Suppl. 25:S7, 2001.

7. 中澤敬信ら　NMDA型グルタミン酸受容体GluR・2サブユニットチロシンリン酸化の生理的意義の解析　日本分子生物学会年会, 2001.
8. Nakatsu, F., Okada, M., Kamiya, H., Iwasa, A. Harada, A., Manabe, T., Yuasa, S., Hirose, S., Saito, T. and Ohno, H. Establishment of neuron-specific ・3B-deficient mice. Society for Neuroscience, 2002.
9. Oka, S., Yamamoto, S., Inoue, M., Shimuta, M., Manabe, T. and Kawasaki, T. Characterization of mice lacking of a glucuronyltransferase responsible for the HNK-1 carbohydrate biosynthesis. Society for Neuroscience, 2002.
10. Nakazawa, T., Watabe, A. M., Tezuka, T., Umemori, H., Manabe, T. and Yamamoto, T. p250GAP, a novel Rho GTPase-activating protein, interacts with NMDA receptor. Society for Neuroscience, 2002.
11. Kamiya, H. and Manabe, T. Involvement of kainate receptors in facilitation of presynaptic Ca^{2+} influx at the hippocampal mossy fiber synapse. Jpn. J. Physiol. 52:S27, 2002.
12. Umeda, K., Kamiya, H., Kiyohara, T. and Manabe, T. Enhancement of hippocampal mossy fiber excitability by forskolin. Jpn. J. Physiol. 52:S128, 2002.
13. Oka, S., Yamamoto, S., Inoue, M., Shimuta, M., Manabe, T., Asano, M., Iwakura, Y. and Kawasaki, T. Generation and analysis of mice deficient in the glucuronyltransferase GlcAT-P involved in biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. Neurosci. Res. Suppl. 26:S70, 2002.
14. Manabe, T. Molecular mechanisms for hippocampal synaptic transmission and plasticity. Japan-UK Workshop in Nara, 2002" From Molecules to Memory"
15. 真鍋俊也　記憶－シナプス機能強化と分子　日本医学会総会　シンポジウム「神経回路網の形成とシナプス伝達の分子機構」, 2003.
16. Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Matsui, M., Fukudome, Y., Shosaku, J., Taketo, M.-M., Manabe, T. and Kano, M. Enhancement of retrograde endocannabinoid signaling through postsynaptic M_1 and M_3 muscarinic receptors. Neurosci. Res. 46 Suppl. 1:S53, 2003.
17. Niisato, K., Komai, S., Shintani, T., Noda, M. and Manabe, T. Regulation of synaptic plasticity by PTP・. Neurosci. Res. 46 Suppl. 1:S116, 2003.
18. Miwa, H. and Manabe, T. Electrophysiological characterization of excitatory synaptic inputs to principal neurons in the lateral amygdala of the mouse. Neurosci. Res. 46 Suppl. 1:S117, 2003.
19. Kamiya, H. and Manabe, T. Caffeine-induced synaptic enhancement at the hippocampal mossy fiber synapse. Jpn. J. Physiol. 53:S214, 2003.
20. Niisato, K., Komai, S., Shintani, T., Noda, M and Manabe, T. Regulation of synaptic plasticity by PTP・. Society for Neuroscience, 2003.
21. Griffin, M. T., Matsui, M., Shehnaz, D., Ansari, K. Z., Taketo, M. M., Manabe, T. and Ehlert, F. J. Role of M_2 and M_3 muscarinic receptors in short-term desensitization of the contractile response in isolated ileum. Society for Neuroscience, 2003.
22. Manabe, T. The role of NMDA receptor tyrosine phosphorylation in molecular and cellular mechanisms of selective synaptic potentiation in the central nervous system. Neurosci. Res. 50 Suppl. 1:S27, 2004.
23. Fukudome, Y., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Matsui, M., Omori, Y., Fukaya, M., Taketo, M. M., Watanabe, M., Manabe, T. and Kano, M. Two distinct mechanisms of muscarinic receptor-mediated suppression of hippocampal inhibitory synapses. Jpn. J. Physiol. 54:S150, 2004.
24. Niisato, K., Komai, S., Shintani, T., Noda, M. and Manabe, T. Age-dependent modulation of LTP by PTP・. Jpn. J. Physiol. 54:S153, 2004.
25. Nakazawa, T., Komai, S., Kiyama, Y., Watabe, A. M., Fukaya, M., Tezuka, T., Watanabe, M., Manabe, T. and Yamamoto, T. NMDAR2B tyrosine-phosphorylation modulates synaptic plasticity and memory formation in amygdala. Neurosci. Res. 50 Suppl. 1:S52, 2004.
26. Watanabe, S., Tabata, Y., Ouchi, Y., Kamiya, H., Manabe, T. and Arai, K.-i. Retinal fate specification of mouse embryonic stem cells by ectopic expression of Rx/rax, a homeobox gene. Neurosci. Res. 50 Suppl. 1:S55, 2004.
27. Kumazawa, N., Kato, E., Takeuchi, T., Mishina, M. and Manabe, T. Roles of presynaptic TrkB receptors in the hippocampal CA1 region. Neurosci. Res. 50 Suppl. 1:S76, 2004.
28. Shinoe, T., Matsui, M. and Manabe, T. Cholinergic regulation of hippocampal synaptic plasticity via M1 muscarinic receptors. Neurosci. Res. 50 Suppl. 1:S130, 2004.
29. Nakazawa, T., Komai, S. Kiyama, Y., Fukaya, M., Watabe, A. M., Tezuka, T., Watanabe, M., Manabe, T. and Yamamoto, T. NR2B phosphorylation at Tyr-1472 modulates fear-related learning and NMDAR localization at synapses. Program No:49.1, Society for Neuroscience, 2004.

30. Kato, E., Kumazawa, N., Takeuchi, T., Manabe, T., Matsushiro, H., Mori, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Akashi, K., Sakimura, K. and Mishina, M. Roles of presynaptic TrkB receptors in short-term plasticity at the hippocampal CA3-CA1 synapses. Program No:403.2, Society for Neuroscience, 2004.

A04-04　尾藤 晴彦

海外国際会議招待講演３件、海外一般演題抄録 13 件、
国内国際会議招待講演４件、その他国内会議・研究会招待講演１０件
国内学会等抄録３９件
　招待講演 20 件（受賞講演２件、シンポジウム１８件)、
　一般演題 19 件

A04-06 山口 瞬

1. Okamura H., Yamaguchi S., Yagita K.: Molecular networks of circadian clock in mice. 第 24 回日本神経科学第 44 回日本神経化学合同大会 Neuro2001, 2001 年 9 月 27 日
2. Okamura H., Yamaguchi S., Yagita K.: International Symposium on Molecular Clock Kobe-awaji 2001, 2001 年 9 月 29 日
3. Yamaguchi S.: Visualization of biological clock and control mechanism of the circadian clock for timing of cell division. Symposium on Peptides and Biological System, 2004 年 3 月 20 日

A04-07 石原 健

1. Ishihara T., Iino Y. & Katsura I. " The ut236 mutant in C. elegans has defects in the interaction of two sensory signals and in associative learning." West Coast Worm Meeting Los Angeles, U. S. A., June, 2000.
2. Ishihara T., Iino Y. & Katsura I. " The ut236 mutant in C. elegans has defects in the interaction of two sensory signals and associative learning." The Second Japanese C. elegans Meeting, Tokyo, August, 2000.
3. 石原 健, 飯野 雄一, 桂 勲 " C. elegans において二つの感覚情報の選択と連合学習能力に異常を持つ ut236 変異体の解析" 第 23 回日本神経科学大会第 10 回日本神経回路学会大会合同大会, 横浜, 2000 年 9 月 4-6 日.
4. Ishihara T., Iino Y., Mohri A., Mori I. & Katsura I. " A novel secretory protein, HEN-1, regulates integration of sensory signals and behavioral plasticity." The 13th International C. elegans Meeting, Los Angeles, CA, U.S.A., June, 2001.
5. Ishihara T., Iino Y., Mohri A., Mori I. & Katsura I. " HEN-1, a novel secretory protein, regulates sensory integration and learning in Caenorhabditis elegans." Gordon Research Conference. "Neural Plasticity", Newport, RI, U.S.A., July, 2001.
6. Ishihara T., Gengyo-Ando K., Mitani S., Iino Y., Mohri A., Mori I. & Katsura I. " Searching for a protein interacting with HEN-1, which regulates sensory integration and learning in Caenorhabditis elegans." The Third Japanese C. elegans Meeting, August, 2002.
7. Ishihara, T. " Molecular mechanisms for sensory integration and associative learning in Caenorhabditis elegans" Les Treilles, Symposium "Learning and memory, from molecule to mind" Tourtours, France, August, 2003.
8. 石原 健、飯野 雄一、毛利 亮子、森 郁恵、安藤 恵子、三谷 昌平、虎山 一郎、桂 勲 " 線虫 C. elegans の行動変異体を用いて感覚情報処理機構を探る. "
日本分子生物学会第 3 回春期シンポジウム、2003 年 5 月
9. 石原 健 " 線形動物：線虫 C. elegans を用いた行動制御の分子機構の解析. " シンポジウム"神経行動学研究における実験動物". ニューロエソロジー談話会、2003 年 9 月
10. 石原 健、虎山 一郎、桂 勲 "Molecular mechanisms involved in sensory integration and learning in Caenorhabditis elegans."シンポウジウム"神経ネットワークの分子的実体に迫る". 第 76 回日本生化学会大会、2003 年 10 月
11. 石原 健 " 線虫における感覚情報処理の分子機構. " 特定領域「神経回路」冬のシンポジウム、2004 年 1 月
12. 石原 健 " 線虫 C. elegans における感覚情報処理の分子機構. " 平成 15 年度生理学研究所研究所シナプス研究会、2004 年 12 月
13. 石原 健、池田 大祐、田畑 孝、飯野 雄一、桂 勲 " 線虫 C. elegans における感覚情報の統合と連合学習の分子機構. " 第 27 回日本分子生物学会年会、2004 年 12 月.

A04-08 岡戸 晴生

1. 高橋亜紀代、近藤真啓、三輪昭子、岡戸晴生，カルビンデイン D-28k の共発現はカルシウム透過型 AMPA 受容体の細胞膜上発現を増加させる，第８１回日本生理学会大会，札幌（2004，6.2）
2. 近藤真啓、三輪昭子、岡戸晴生，AMPA 受容体の機能発現における calbindin-D28k の役割，第 79 回日本生理学会大会，広島（2002，3.28）
3. 岡戸晴生、三輪昭子、山田伸明、本多芳子、児玉亨、小澤瀞司、大島知一，線条体ニューロンへのカルシウム透過型 AMPA 受容体サブユニットの過剰発現，第 79 回日本生理学会大会，広島（2002，3.29）
4. Kondo, M., Miwa, A., Okado, H., Nuclear translocation of calbindin-D28k regulates AMPA receptor-dependent CREB phosphorylation in cortical neurons., 第 32 回北米神経科学学会，Orlando，USA（2002，11,14）
5. 近藤真啓、三輪昭子、岡戸晴生，AMPA 受容体刺激によるカルシウム結合蛋白の細胞内局在の変化，第 23 回日本神経科学学会，横浜（2000，9.4）

A04-09 程　　肇

1. 小池宣也、肥田昌子、榊佳之、程　肇 哺乳類時計分子の分子間相互作用の解析 第２３回日本分子生物学会年会（２０００年１２月１６日）
2. 小島志保子、沼野利香、徳永勝士、榊佳之、程　肇 哺乳類視交叉上核（SCN）及び末梢組織における Perl 発現日周振動の解析 第２３回日本分子生物学会年会（２０００年１２月１６日）
3. 佐藤陽子、肥田昌子、武田健、榊佳之、程　肇 哺乳類時計遺伝子 Perl の光転写誘導に必要なシス領域の解析 第２３回日本分子生物学会年会（２０００年１２月１６日）
4. 沼野利佳、山崎晋、高橋利一、木村萌、Michael Menaker、榊佳之、程　肇 概日時計遺伝子 Periodl のトランスジェニックラットの作製とその解析 第２３回日本分子生物学会年会（２０００年１２月１６日）
5. 程　肇、肥田昌子、沼野利佳、小池宣也、小島志保子、佐藤陽子、塩塚聡美、広瀬松美、島田美由紀、榊佳之 哺乳類の概日時計遺伝子 Periodl の発現制御機構と機能 第２４回日本分子生物学会年会（２００１年１２月１２日）．
6. 小池宣也、肥田昌子、榊佳之、程　肇 Perl 発現制御に必要な蛋白質とその相互作用の解析 第２４回日本分子生物学会年会（２００１年１２月１１日）．　．
7. 小島志保子、広瀬松美、島田美由紀、徳永勝士、榊佳之、程　肇 哺乳類時計遺伝子 Perl mRNA の 3' 非翻訳領域の機能解析 第２４回日本分子生物学会年会（２００１年１２月１１日）．
8. 沼野利佳、梅田奈苗、佐村知紀、山崎晋、高橋利一、Michael Menaker、榊佳之、程　肇 Tg ラットを用いた時計遺伝子 periodl の概日リズムにおける機能解析 第２４回日本分子生物学会年会（２００１年１２月１１日）．
9. 肥田昌子、沼野利佳、小池宣也、佐藤陽子、榊佳之、程　肇 視交叉上核におけるグルタミン酸に対する Perl 発現リズムの位相反応曲線(PRC)の解析 第２４回日本分子生物学会年会（２００１年１２月１１日）．
10. 佐藤陽子、肥田昌子、武田健、榊佳之、程　肇 哺乳類時計遺伝子 Periodl の光転写誘導の分子機構の解明 第２４回日本分子生物学会年会（２００１年１２月１１日）．
11. 肥田昌子、佐藤陽子、榊佳之、程　肇 Perl 転写誘導に必要な Perl プロモータ上 CRE 配列の解析 第２５回日本分子生物学会年会（２００２年１２月１１日）．
12. 小島志保子、広瀬松美、島田美由紀、徳永勝士、塩見春彦、武井延之、赤松和土、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、榊佳之、程　肇 時計遺伝子 Periodl mRNA の 3' UTR による発現制御機構の解析 第２５回日本分子生物学会年会（２００２年１２月１１日）．
13. 小池宣也、肥田昌子、島田美由紀、榊佳之、程　肇 Perl 発現制御に関わるタンパク質複合体の解析 第２５回日本分子生物学会年会（２００２年１２月１１日）．
14. 塩塚聡美、肥田昌子、徳永勝士、榊佳之、程　肇 プロモータトラップ法を用いた概日リズム遺伝子群の大規模検索 第２５回日本分子生物学会年会（２００２年１２月１１日）．
15. 沼野利佳、須山本比呂、影山一巳、鈴木誠司、中尾和貴、勝木元也、山崎晋、高橋利一、Michael Menaker、榊佳之、程　肇 Perl::luc トランスジェニック動物の視交叉上核を用いた Perl 発現の画像解析 第２６回日本分子生物学会年会（２００３年１２月１１日）．
16. 篠崎敦基、川口荘史、古久保哲朗、榊佳之、程　肇 哺乳類概日時計中枢であるラット視交叉上核(SCN)由来細胞株の樹立 第２６回日本分子生物学会年会（２００３年１２月１１日）．
17. 川口荘史、篠崎敦基、榊佳之、程　肇 ラット視交叉上核由来細胞株を用いた哺乳類概日時計形成機構の遺伝学的解析 第２６回日本分子生物学会年会（２００３年１２月１１日）．
18. 小島志保子、広瀬松美、島田美由紀、徳永勝士、榊佳之、程　肇 哺乳類時計遺伝子 Periodl の 3' 非翻訳領域を介した転写後調節機構の解析 第２６回日本分子生物学会年会（２００３年１２月１１日）．
19. 小池宣也、島田美由紀、榊佳之、程　肇 哺乳類時計遺伝子 Per2 の発現制御機構の解析 第２６回日本分子生物学会年会（２００３年１２月１１日）．

A04-12 渡邉 和忠

1. Takeda, Y., Lee, S., Lemmon, V., Futagawa, T., S. Oiso, S., Shibayama, Y., Watanabe, K. and Yamada, K.: Involvement of GPI-anchored adhesion molecules in lipd raft derived from central synaptosome. 33st Annual Meeting: Society for Neuroscience, Washington, DC (2003).
2. Yamasaki, K., Nakamura, Y., Yoshida, S., Watanabe, K., Shiosaka, S.: Localization of the immunoglobulin superfamily molecules L1, contactin, TAG-1, NB-2 and NB-3 in the adult mouse hippocampus. 33st Annual Meeting: Society for Neuroscience, Washington, DC (2003).
3. Masuda, T., Fukamauchi, F., Takeda, Y., Fujisawa, H., Watanabe, K., Okado, N. and Shiga, T.: Different roles for condroitin sulfate proteoglycans in Notchord-derived repulshion of dorsal root ganglion axons. 33st Annual Meeting: Society for Neuroscience, Washington, DC (2003).
4. Tomoyuki Masuda, Fumihiko Fukamauchi, Kazutada Watanabe, Nobuo Okado, Takashi Shiga: Contribution of chondroitin sulfates to notochord-derived chemorepulsion for dorsal root ganglion axons. 第２６回神経科学会大会、名古屋 (2003)
5. 藤澤哲也、笠間由里、落合大輔、奥野聖、霜田靖、武田泰生、渡邉和忠：発生過程の小脳における神経認識分子 NB-2 の短冊状発現. 第４６回日本神経化学会、新潟 (2003).
6. 山崎浩誠、中村雪子、渡邉和忠、塩坂貞夫：成熟マウス海馬における細胞接着分子群の分布（光学顕微鏡および電子顕微鏡観察）. 第４６回日本神経化学会、新潟 (2003).
7. 落合大輔、奥野聖、武田泰生、霜田靖、渡邉和忠: 神経認識分子 NB-2 の細胞内局在の解析. 第２６回日本分子生物学会、神戸 (2003).
8. Denaxa, M., Kyriakopoulou, K., Iwakura, Y., Fukamauchi F., Watanabe, K., Wassef, M. and Karagogeos, D.: The adhesion molecule TAG-1 is involved in tangential migrations in the developing central nervous system. Federation of European Neuroscience Societies, Paris (2002).
9. Xiao, Z.-C., Hu, Q., Cui, X., Duka, T. Ang, B.-T., Ng, Y.-K. and Watanabe, K.: Distinct members of F3/contactin family interact specifically with Notch and APP. 第２５回日本神経科学会大会、東京 (2002).
10. 武田泰生、李順姫、V. Lemmon、渡邉和忠: GPI-アンカー型分子コンタクチン及び NB-3 を介するシグナル伝達機構. 第２５回日本神経科学会大会、東京 (2002).
11. 赤木明生、大平敦彦、渡邉和忠、宮田清司：オキシトシン、バゾプレッシン神経における形態学的可塑性とプロテオグリカン Phosophacan. 第２５回日本神経科学会大会、東京 (2002).
12. Takeda, Y., Lee, S., Lemmon, V. and Watanabe, K.: GPI-anchored neural adhesion molecules contactin and NB-3 localized in post synaptic density. 第４５回日本神経化学会大会、札幌 (2002).
13. 笠原浩二、渡邉和忠、大平敦彦、小堤保則、佐内豊：小脳顆粒細胞膜ラフトを介する GPI アンカー型神経細胞接着分子 TAG-1 の機能発現. 第７５回日本生化学会大会、京都 (2002).
14. Takeda, Y., Lee, S., Lemmon, V. & Watanabe, K.: Localization of GPI-anchored adhesion molecule NB-3 to post-synaptic density of rat cerebral coretex. 32nd Annual Meeting: Society for Neuroscience, Orlando (2002).
15. 武田泰生、李順姫、丸谷小百合、南淳一、渡邉和忠：後シナプス肥厚部における GPI-アンカー型神経接着分子の局在と機能の解析. 日本薬学会 (2002).
16. Masuda, T., Fukamauchi, F., Takeda, Y., Fujisawa, H., Watanabe, K., Okado, N. and Shiga, T.: Different Roles for Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Notochord-Derived Repulsion of Dorsal Root Ganglion Axons. 32nd Annual Meeting: Society for Neuroscience, Orlando (2002).
17. Nagata, S., Saito, R., Yamada, Y., Fujita, N. and Watanabe, K.: Differential spatiotemporal expression patterns of Xenopus RPTPbeta isoforms indicate diverse roles in the nervous system development. 4th International Congress of Developmental Biology, Kyoto (2001).
18. 渡部和彦、坂本剛、武田泰生、川添陽子、荒川義弘、沈勁松、小柳清光、大橋十也、渡邉和忠、井上聖啓、衛藤義勝: 成体ラット運動ニューロン損傷に対する神経栄養因子組み換えアデノウイルス・ベクターの保護効果. 第４２回日本神経病理学会、東京 (2001).
19. Li, H., Ogawa, J., Akasaka, K., Niki, H., Asano, M., Sudo, K., Iwakura, Y., Takeda, Y. and Watanabe, K.: Generation and functional analyses of mice deficient in the neural recognition molecule NB-2. 31st Annual Meeting: Society for Neuroscience, San Diego (2001).
20. Ogawa, J., Lee, S., Itoh, K., Nagata, S., Machida, T., Takeda, Y., Kawano, H., Seki, T., and Watanabe, K., Neural recognition molecule NB-2 of the contactin/F3 subgroup in rat: Specificity in neurite outgrowth-promoting activity and restricted expression in the brain regions. 31st Annual Meeting: Society for Neuroscience, San Diego (2001).

21. Ang, B. T., Karsak, M., Lee, S., Takeda, Y., Lendahl, U., Rougon, G., Israel, A., Schachner, M., Watanabe, K. and Xiao, Z. C.: Notch is a receptor for F3 and NB-3: a paranodal axon-glial signalling mechanism during myelination. 31st Annual Meeting: Society for Neuroscience, San Diego, (2001).
22. 小川順子、李　順姫、伊藤康一、永田三郎、町田武生、武田泰生、渡邉和忠：contactin サブグループに属する神経接着分子 NB-2: 神経突起伸長活性の特異性とその発現部位の解析.　第２４回日本神経科学・第４４回日本神経化合同大会 東京 (2001).
23. 李　順姫　武田泰生、V. Lemmon、高橋信弘、安藤進、渡邉和忠: GPI-アンカー型神経認識分子 NB-3 を介するシグナル伝達機構の解析. 第２４回日本神経科学・第４４回日本神経化合同大会 東京 (2001).
24. Li Hong、小川順子、赤阪啓子、二木宏明、浅野雅秀、須藤カツ子、岩倉洋一郎、武田泰生、渡邉和忠: 神経認識分子 NB-2 欠損マウスの作製と解析. 第２４回日本神経科学・第４４回日本神経化合同大会 東京 (2001).
25. 坂本剛、渡部和彦、川添陽子、武田泰生、荒川義弘、沈頸松、大橋十也、小柳清光、渡邉和忠、井上聖啓、衛藤義勝：成体ラット運動ニューロン損傷に対する神経栄養因子組換えアデノウイルス・ベクターの保護効果. 第２４回日本神経科学・第４４回日本神経化合同大会 東京 (2001).
26. 細矢博子、渡邉和忠、古川清: ラット脳の発達に伴う神経認識分子 Nr-CAM の発現および糖鎖修飾の変化.　第７４回日本生化学会大会、京都 (2001)
27. 赤阪啓子、武田泰生、李　順姫、小林　悟、高橋直樹、浅野雅秀、須藤カツ子、岩倉洋一郎、渡邉和忠: 神経認識分子 NB-3 欠損マウスにおける運動協調性障害.　第２３回日本神経科学大会、横浜 (2000).
28. 武田泰生、赤阪啓子、李 順姫、小林 悟、浅野雅秀、須藤カツ子、岩倉洋一郎、渡邉和忠: GPI-アンカー型神経接着分子 NB-3 の遺伝子欠損マウスの解析. 第４３回日本神経化学大会、金沢 (2000).
29. Takeda, Y., Akasaka, K., Lee, S., Kobayashi, S., Asano, M., Sudo, K., Iwakura, Y. and Watanabe, K.: Defect of motor abilities in neural adhesion molecule NB-3 deficient mice. 30th Annual Meeting: Society for Neuroscience, New Orleans (2000).
30. Lee, S., Takeda, Y., Kawano, H., Hosoya, H., Nomoto, M., Takahashi, N. and Watanabe, K.: Expression, regulation and distribution of neuralrecognition molecule NB-3 in the contactin/F3 subgroup in mouse brain. 30th Annual Meeting: Society for Neuroscience, New Orleans (2000).
31. Fukamauchi, F., Aihara, O., Wang, Y.J., Kurumaji, A., Akasaka, K., Takeda, Y., Sudo, K., Asano, M., Kawano, H., Watanabe, K. and Iwakura, Y.: Upregulation of adenosine A1 receptors in TAG-1 deficient mice. 30th Annual Meeting: Society for Neuroscience, New Orleans (2000).
32. Kamei, Y., Takeda, Y., Lee, S., Ogawa, J., Lemmon, V. and Watanabe, K.: Characterization of recognition molecule NB-3 of the contactin subgroup: Neurite outgrowth-promoting activity and distict expresseion pattern from other subgroup members. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cold Spring Harbor (2000).
33. 齋藤理佳、 藤田尚子、渡邉和忠、永田三郎: Xenopus 神経系の形態形成におけるコンタクチンと Fyn チロシンキナーゼの役割.　発生生物学会第 33 回大会、高知 (2000).
34. 笠原浩二、渡邉和忠、大平敦彦、山本雅、佐内豊: GPI アンカー型神経細胞接着分子 TAG-1 の細胞膜ラフトを介するシグナル伝達.　日本膜学会２２年会（シンポジウム)、東京 (2000).
35. 笠原浩二、渡邉和忠、大平敦彦、山本雅、佐内豊: GPI アンカー型神経細胞接着分子 TAG-1 の細胞膜ラフトにおけるシグナル伝達とスフィンゴ糖脂質.　第７３回日本生化学会大会、横浜 (2000).
36. 笠原浩二、渡邉和忠、大平敦彦、山本雅、佐内豊: GPI アンカー型神経細胞接着分子 TAG-1 のラフトを介するシグナル伝達におけるスフィンゴ糖脂質の役割.　第２３回日本分子生物学会年会（ワークショップ)、神戸 (2000).

A04-13 浜 千尋

1. 浜　千尋、曽根雅紀、栗崎　健、齋藤麻衣、酒井良子、伊藤啓、鈴木えみ子 神経細胞の形態分化を制御する Rho ファミリーGTPase 活性化因子 第３３回日本発生生物学会大会シンポジウム 「神経発生のメカニズム～神経細胞の分化から回路形成へ～」　　2000 年 5 月 26 日　高知
2. Chihiro Hama　Roles for activators of Rho family GTPases in brain development The 16th International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology.　November 28-29, 2000.　Tokyo
3. 浜　千尋
神経細胞の形態分化を制御する Rho ファミリーGTPase 活性化因子 第２３回日本分子生物学会年会シンポジウム「細胞の接着と運動」2000 年 12 月１４日　神戸

A04-16 澤口 俊之

1)　Amemori, K. and Sawaguchi, T. Different motivational effects to neuronal activities for sensory memory

and saccade preparation in the primate frontal eye field. Program No. 438.12. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner.* Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004. Online.

2) Kuboshima-Amemori, S. and Sawaguchi, T. Prospective and retrospective coding of rules in the primate prefrontal cortex during a rule-shifting task. Program No. 82.15. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner.* Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004. Online.

3) Kuwajima, M. and Sawaguchi, T. Neuronal activity Representing active suppression of gaze shift in the monkey lateral prefrontal cortex. Program No. 87.4. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner.* Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004. Online.

4) Hirata, Y. and Sawaguchi, T. $GABA_A$ receptor-mediated oscillatory activity in the monkey prefrontal cortex revealed by optical recording *in vitro*. Program No. 272.25. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner.* Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004. Online.

5) Tsujimoto, S and Sawaguchi, T. Temporal prediction of reward delivery in monkey prefrontal neurons. Program No. 550.3. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner.* Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004. Online.

6) Amemori, K. and Sawaguchi, T. Functional differences between primate prefrontal and frontal eye field neurons in a memory-guided sensorimotor transformation. *Neuroscience Research Supplement*, 50:S201 (2004)

7) Kuboshima-Amemori, S. and Sawaguchi, T. Retrospective and prospective coding of rules in the monkey prefrontal cortex during a rule-shifting task. *Neuroscience Research Supplement*, 50:S206 (2004)

8) Wajima, K. and Sawaguchi, T. The role of GABAergic inhibition in suppressing perseverative response in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience Research Supplement*, 50:S204 (2004)

9) Kuwajima, M. and Sawaguchi, T. Involvement of the monkey lateral prefrontal cortex in active suppression of gaze shift: a local inactivation study with muscimol. *Neuroscience Research Supplement*, 50:S205 (2004)

10) Hirata, Y. and Sawaguchi, T. $GABA_A$ receptors shape columnar activity in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience Research Supplement*, 50:S116 (2004)

11) Tsujimoto, S. and Sawaguchi, T. Retrospective monitoring of behavioral context in monkey prefrontal neurons. *Neuroscience Research Supplement*, 50:S203 (2004)

12) Hirata, Y. and Sawaguchi, T. The relationship between anatomical and functional columns in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience Research Supplement*, 46:S116 (2003)

13) Amemori, K. and Sawaguchi, T. Different motivational effects on the neuronal activities in the primate prefrontal cortex during a sensorimotor transformation task. *Society for Neuroscience abstract*, 29:90.4 (2003)

14) Tsujimoto, S. and Sawaguchi, T. Functional maturation of the prefrontal cortex in preschool children measured by optical tomography. *Society for Neuroscience abstract*, 29:196.15 (2003)

15) Hirata, Y. and Sawaguchi, T. Enhancement of columnar activity induced by activation of D1-dopamine receptors in the monkey prefrontal cortex. *Society for Neuroscience abstract*, 28:336.3 (2002)

16) Tsujimoto, S. and Sawaguchi, T. Neuronal activity representing directional response-outcome in the primate prefrontal cortex. *Society for Neuroscience abstract*, 28:464.9 (2002)

17) Wajima, K. and Sawaguchi, T. Local injection of bicuculline into the dorsolateral prefrontal cortex induce irrepressible saccades. *Society for Neuroscience abstract*, 28:464.8 (2002)

A04-17 飯野 雄一

1. Yuichi Iino, Timothy Doyle, Takaaki Hirotsu "A screen for suppressors of the *let-60* chemotaxis defect" International Worm Meeting abstract 399 (2001)
2. Takaaki Hirotsu, Yuichi Iino "The Ras-MAPK signal transduction pathway is important for olfactory plasticity" Japanese Worm Meeting abstract 5132 (2002)
3. Takeshi Ishihara, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Yuichi Iino, Akiko Mohri, Ikue Mori, Isao Katsura "Searching for a protein interacting with HEN-1, which regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*" Japanese Worm Meeting abstract 5127 (2002)
4. Hirofumi Kunitomo, Hiroko Uesugi, Yuji Kohara, Yuichi Iino "Identification of ciliated sensory neuron-expressed genes in *C. elegans* using targeted pull-down of poly(A) tails" International Worm Meeting abstract 1115 (2003)
5. Masahiro Matsuki, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino "GOA-1 participates in odorant avoidance and olfactory adaptation in *C. elegans*" International Worm Meeting abstract 444 (2003)
6. Masahiro Tomioka, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino "The insulin-like signaling pathway participates

in learning in salt chemotaxis"International Worm Meeting abstract 457 (2003)
7. Eriko Kage, Takaaki Hirotsu, Yu Hayashi, Yoshihisa Mita, Hideaki Takeuchi, Takao Inoue, Hiroyuki Arai, Masayuki Yamamoto, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, Takeo Kubo "Interneuron-selective transcription factor MBR-1 is involved in olfactory plasticity"International Worm Meeting abstract 430 (2003)
8. Takeshi Ishihara, Yuichi Iino, Isao Katsura "Receptor tyrosine kinase, SCD-2, regulates sensory integration and behavioral plasticity"East Asia Worm Meeting abstract 141 (2004)
9. Masahiro Matsuki, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino "The Go and Gq signaling pathways modulate olfactory responses in *C. elegans*"East Asia Worm Meeting abstract 55 (2004)
10. Hiroshi Kagoshima, Yuichi Iino, Takeshi Ishihara, Hideto Kuroyanagi, Shohei Mitani, Yukiko Yamazaki "A *C. elegans* Promoter/Marker Database"East Asia Worm Meeting abstract 116 (2004)
11. Yu Hayashi, Eriko Kage, Takaaki Hirotsu, Hirofumi Kunitomo, Hideaki Takeuchi, Yuichi Iino, Takeo Kubo "MBR-1, a novel helix-turn-helix transcription factor, is involved in olfactory plasticity and elimination of excessive neurites in *C. elegans*"East Asia Worm Meeting abstract 33 (2004)
12. Masahiro Tomioka, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino "The insulin-like signaling pathway regulates the plasticity of salt chemotaxis in *C. elegans*"East Asia Worm Meeting abstract 48 (2004)
13. Daisuke D. Ikeda, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino "Isolation and analysis of mutants abnormal in the plasticity of salt chemotaxis in *C. elegans*"East Asia Worm Meeting abstract 49 (2004)

A04-18　窪田 芳之

1. Y. Kubota, F. Karube, K. Suzuki, Y Kawaguchi Three dimensional analysis for synaptic connections of physiologically identified non-pyramidal cells. (poster) 30th annual meeting of Society for Neuroscience, New Orleans USA, 2000
2. 窪田芳之、川口泰雄 大脳皮質の非錐体細胞のシナプス結合様式（ポスター）第24回日本神経科学大会、横浜、2000年9月
3. 鈴木和美、窪田芳之、苅部冬紀、川口泰雄 大脳皮質のCRF陽性細胞の形態とシナプス結合様式（ポスター）第24回日本神経科学大会、横浜、2000年9月
4. Yasuo Kawaguchi, Fuyuki Karube, Yoshiyuki Kubota Axonal arborization patterns of identified subtypes of cortical nonpyramidal cells (poster) the Cajal Club/Cajal Institute Joint International meeting on Changing View of Cajal Neuron, Madrid Spain, 2001
5. Yoshiyuki Kubota, Fuyuki Karube, Yasuo Kawaguchi Synaptic connection patterns of identified subtypes of cortical nonpyramidal cells (poster) the Cajal Club/Cajal Institute Joint International meeting on Changing View of Cajal Neuron, Madrid Spain, 2001
6. Y. Kubota, Y. Kawaguchi Postsynaptic structures characteristic of axon terminals of cortical interneuron subtypes 31st annual meeting of Society for Neuroscience, SanDiego USA, 2001 (poster)
7. 窪田芳之、川口泰雄 大脳皮質GABA細胞のシナプス構造 岡崎国立共同研究機構生理研研究会「定量的高分解能電子顕微鏡法」（シンポジウム岡崎、2001年12月
8. 苅部冬紀・窪田芳之・川口泰雄 大脳皮質非錐体細胞における軸索形態の定量的解析（ポスター） 第25回日本神経科学大会、東京、2002年7月
9. Kubota Y. Kawaguchi Y. **Charactersitics of postsynaptic target structures for axon terminals of cortical interneuron subtypes (poster)** 28th NIPS International Symposium Inhibitory Neural Transmission in the Brain Structure and Function Okazaki 2002 2.26-28
10. 窪田芳之 大脳新皮質の局所神経回路構築 - 形態的解析 - 岡崎機構コンファレンス 脳のバイオインフォマティクス（シンポジウム） 岡崎、2002年3月
11. 窪田 芳之、川口 泰雄 大脳皮質ダブルブーケ細胞の選択的シナプス結合 （ポスター）Postsynaptic structures of axon terminals of cortical double bouquet cells 第２６回日本神経科学大会 名古屋 2003.7.23-25
12. 窪田 芳之 大脳皮質ダブルブーケ細胞の形態的解析 生理研研究会 大脳皮質の神経回路（シンポジウム） 岡崎 2003.10.9,10
13. Y.Kubota Postsynaptic structures of axon terminals of cortical double bouquet cells Neuroscience-from Molecules to Human (symposium) Seoul 韓国 2004.1.15-18
14. Y.Kubota
大脳皮質GABA作働性ダブルブーケ細胞のシナプス構築（シンポジウム）第８１回日本生理学会大会
札幌 2004.6.2-4
15. Y.Kubota Postsynaptic structures of axon terminals of cortical double bouquet cells 16th International

Congress of the IFAA Anatomical Science 2004 From Gene to Body (symposium) 京都　2004.8.22-27
16. Y.Kubota　Local connections formed by nonpyramidal neurons The Cortical Pyramidal Neuron in 2004 (symposium) 理研　2004.8.20
17. 窪田芳之　畑田小百合　根東覚　川口泰雄　VGLUT2含有興奮性終末入力のある皮質棘突起の抑制性支配　(ポスター)　第２７回日本神経科学大会　大阪　2004.9.21-23 PosterP2-045
18. Y.Kubota, F.Karube, Y.Kawagcuhi Postsynaptic structures of axon terminals of cortical double bouquet cells (Poster) Society For Neuroscience 34th Annual Meeting San Diego(USA) 2004 10.23-27
19. Y. Kawagcuhi, F .Karube, Y. Kubota DENDRITIC BRANCHING AND SPINE FORMATION PATTERNS OF CORTICAL NONPYRAMIDAL CELL SUBTYPES Society For Neuroscience 34th Annual Meeting (Poster) San Diego(USA) 2004 10.23-27

A04-20　白澤　卓二

１．黒柳秀人、金岩、関直彦、山内泰子、鈴木陽一、高野貴子、大島靖美、三谷昌平、村松正明、白澤卓二(1998). ヒトULK1 -線虫Caenorhabditis elegansUNC-51 類似新規セリン・スレオニンキナーゼ- ：cDNAクローニング、発現解析と遺伝子マッピング第21 回日本分子生物学会年会. 横浜市1998.12.16-12.26
２．Kuroyanagi, H., Yan, J., Seki, N., Yamanouchi, Y., Suzuki, Y.-i., Shimizu, T.,Takano, T., Muramatsu, M.-a., and Shirasawa, T. (1998). HUMAN ULK1, A NOVEL SERINE/THREONINE KINASE RELATED TO UNC-51 KINASE OF Caenorhabditis elegans: cDNACLONING, EXPRESSION AND CHROMOSOMAL ASSIGNMENT. In Society for Neuroscience 28thAnnual Meeting, Los Angeles, U.S.A. 1998.11.07-11.12
３．黒柳秀人，金岩，留守卓也，黒岩麻人，松田洋一，鈴木陽一，増保康彦，大島靖美,三谷昌平，村松正明，白澤卓二(1999). マウスULK2 (UNC-51-like kinase 2)遺伝子の単離と解析：軸策伸展におけるキナーゼドメインの保存された機能第22 回日本神経科学大会大阪1999.07.06-08
４．Kuroyanagi, H., Jin, Y., Tomemori, T., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Suzuki, Y.,Ohshima, Y., Mitani, S., Muramatsu, M. and Shirasawa T. (1999). Molecular Cloning and Functional Analysis of Mouse ULK2, UNC-51 (C. elegans)-like kinase 2. In Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, Miami Beach, U.S.A.1999.10.22-10.28

A04-21　曽良　一郎

1. Sora I. Microdialysis studies of dopamine/serotonin interactions in transporter KO mice. Symposium: Serotonin and dopamine: Interactive contributions to psychostimulant reinforcement and aversion, NIDA Technical Review, Rockville, USA [2003/9/29]
2. Sora I, Shen H, Kobayashi H, Hall FS, Uhl GR. Molecular netics of monoamine transporter psychostimulant and extracellular monoamins. Symposium: the molecular basis of drug reward: Gene knockout studies, Sixth Annual Meeting of International Behavioural and Neural Genetics Society(IBANGS), New Orleans, LA, USA [2003/11/6]
3. Sora I, Kobayashi H, Ikeda K, Ujike H, Ide S. Opioid gene variants in human individuals. Symposium: Gene Regulation and Human Genetics, The 35th meeting of the International Narcotics Research Conference (INRC), Kyoto [2004/7/18-23]

A04-22　上野　照子

1.Tran, A. H., 田村了以, 上野照子, 小林恒之, 勝木元也, 松本元, 小野武年.　空間学習および報酬予期におけるドパミンD1およびD2受容体の役割.　第81回日本生理学会大会, 2004, 6, 札幌.
2.Tran, A.H., Tamura, R., Uwano, T., Kobayashi, T., Katsuki, M. and Ono, T.　Dopamine D1 receptor knockout altered accumbens neural response to prediction of reward contrarily to D2 receptor knockout.　34th Ann. Meet. Neurosci., 2004, 11, San Diego.
3.田村了以, 上野照子, 北村貴志, 川越　隆, 小野武年.　ラット島皮質味覚領野ニューロンの味覚応答性.　第50回中部日本生理学会, 2003, 10, 犬山.
4.田村了以, 上野照子, 北村貴志, 川越隆, 小野武年.　覚醒下ラット島皮質における味覚ニューロンの応答特性.　第26回日本神経科学大会, 2003, 7, 名古屋.
5.西条寿夫, 上野照子, 小野武年.　海馬体破壊および老齢ラットの学習障害に対する紅参の改善作用.　第80回日本生理学会大会, 2003, 3, 福岡.
6.田積徹, 堀悦郎, 種部恭子, 梅野克身, 田渕英一, 上野照子, 小野武年, 西条寿夫.　仔ラットの行動に及ぼす胎生期母体ストレスの影響：雌雄差の検討.　第80回日本生理学会大会, 2003, 3, 福岡.
7.Komura, Y., Tamura, R., Uwano, T., Nishijo, H. and Ono, T.　Cross-modal coding in the posterior sensory

thalamus during auditory and visual spatial discriminative task. 33rd Ann. Meet. Neurosci., 2003, 11, New Orleans.
8. Sakai, S., Umeno, K., Hori, E., Tabuchi, E., Uwano, T., Ono, T. and Nishijo, H. EEGs and autonomic changes during acupuncture stimulation. 33rd Ann. Meet. Neurosci., 2003, 11, New Orleans.

A04-23 少作 隆子

1. 狩野方伸、少作隆子、内因性カンナビノイド（マリファナ類似物質）による逆行性シナプス伝達、第26回日本神経科学大会、2003年7月
2. 少作隆子、坪川宏、松井稔、福留優子、少作純平、武藤誠、真鍋俊也、狩野方伸、M1およびM3ムスカリン受容体を介する内因性カンナビノイド放出の促進。第26回日本神経科学大会、2003年7月
3. 狩野方伸、少作隆子、前島隆司、内因性カンナビノイドによるシナプス伝達の逆行性調節、第81回日本生理学会大会、2004年6月
4. 福留優子、少作隆子、橋本谷祐輝、松井稔、大森優子、深谷昌弘、武藤誠、渡辺雅彦、真鍋俊也、狩野方伸、ムスカリン受容体活性化による海馬抑制性シナプス伝達の2つの抑圧機構、第81回日本生理学会大会、2004年6月
5. 橋本谷祐輝、少作隆子、福留優子、狩野方伸、海馬ニューロンにおけるホスホリパーゼC活性の脱分極による促進、第27回日本神経科学大会、2004年9月
6. 山崎真弥、少作隆子、深谷昌弘、狩野方伸、渡辺雅彦、崎村建司、Stargazinファミリーは AMPA 型受容体のサブユニットか？、第27回日本神経科学大会、2004年9月

A04-24 加藤 啓子

1. Keiko Kato, Masao Iwamori, and Yoshio Hirabayashi Increase of GQ1b gangliosides in the adult mouse hippocampus following kindled-seizures Glyco2004 Hawaii, USA 11/17-21, 2004
2. 加藤啓子、岩森正男、平林義雄 神経可塑性獲得に連動したポリシアル酸化ガングリオシドの増加 Increase of polysialylation on gangliosides following kindled-seizures 第７７回日本生化学会 横浜 10/13-16, 2004
3. Keiko Kato, Masao Iwamori, and Yoshio Hirabayashi 神経可塑性に関わるシアル酸付加の役割 Effect of sialylation on acquiring neural plasticity. Neuro2004（第２７回日本神経科学会・第４７回日本神経化学会 合同大会） 2004, 9/21-23 大阪
4. 加藤啓子 てんかん獲得過程に連動したポリシアル酸化ガングリオシドの増加 第138回日本獣医学会学術集会 北海道 9/10-12, 2004
5. 加藤啓子 近畿バイオ第１２回「技術シーズ公開会」 A-2 脳内物質の回収装置 平成１６年９月１３日(月) 大阪科学技術センター
6. Keiko Kato Region-specific and epileptogenic-dependent expression of ・2,3-sialyltransferase in the adult mouse brain. The 5th SLB-KRIBB-NAIST Joint Symposium 11/14 (2003) Korea University.
7. Keiko Kato and Yoshio Hirabayashi. Region-specific and epileptogenic-dependent expression of ・2,3-sialyltransferase in the adult mouse brain. Annual Conference of the Society for Glycobiology 2003, 12/3-6 2003, San Diego, USA.
8. 加藤啓子 てんかん獲得過程に連動したα２、３-シアル酸転移酵素（ST3Gal IV）の発現変動について 第１３６回日本獣医学会 平成１５年１０月３-５日
9. Kato K., Matsuhashi, H., Horii, Y., and Hirabayashi, Y. Neural plasticity-dependent increase of ・2,3-sialyltransferase end-product in the adult mouse brain. 第76回日本生化学会 10/15-18, 2003
10. 岡卓也、箱嶋敏雄、板倉誠、山森早織、高橋正身、塩坂貞夫、加藤啓子（発表）日本語 セリンプロテアーゼ活性と調節性分泌に与えるループ構造の役割 第75回日本生化学会 10/14-17, 2002.
11. Keiko Kato and Hitomi Matsuhashi Different patterns of induction of α-2,3-sialyltransferase mRNAs during kindling epileptogenesis in the mouse. Society for Neuroscience 32nd annual meeting 11/2-7, 2002 Orland, Florida.
12. Kato K. and Matsuhashi H. Distribution of six subtypes of alpha2,3-sialyltransferase mRNAs in the adult mouse brain w/o stimulation. GlycoT2002, 9/19-22, 2002 Stockholm, Sweden.
13. 加藤啓子 てんかん形成とシアル酸転移酵素遺伝子の脳内発現分布 第１３４回日本獣医学会 10/19-21, 2002.
14. 岡卓也、箱嶋敏雄、板倉誠、山森早織、高橋正身、塩坂貞夫、加藤啓子（発表）セリンプロテアーゼ活性と調節製分泌に与える糖鎖の役割 第２３回日本糖質学会 8/22-24, 2002.
15. 加藤啓子、松橋瞳、塩坂貞夫 ・2,3-シアル酸転移酵素の脳内分布とてんかん形成過程に連動する発現変動

第25回神経科学会2002 7/7-9
学会シンポジウム企画
オーガナイザー：平林義雄・加藤啓子　糖鎖修飾と神経可塑性（Glycobiology and Plasticity of Nervous System）
Neuro2004（第２７回日本神経科学会・第４７回日本神経化学会合同大会）　2004, 9/21-23 大阪

A04-25 奥谷 文乃

1. 奥谷文乃・張敬姫・椛秀人：BDNF合成は幼若ラットのにおいの学習成立に必要である．第80回日本生理学会大会（福岡，2003年3月24～26日）
2. 張敬姫・奥谷文乃・椛秀人：におい嫌悪学習に重要であるCREBリン酸化におけるPI-3キナーゼの役割．第80回日本生理学会大会（福岡，2003年3月24～26日）
3. 奥谷文乃・張敬姫・椛秀人：BDNFの増加は幼若ラットのにおいの学習成立に関連がある．第26回日本神経科学学会大会（名古屋，2003年7月23～25日）
4. 張敬姫・奥谷文乃・椛秀人：Effect of intrabulbar infusion of a PP1 inhibitor on olfactory memory formation and forgetting in young rats. 第26回日本神経科学学会大会（名古屋，2003年7月23～25日）
5. 奥谷文乃・張敬姫・椛秀人：においの嫌悪学習には嗅球内アドレナリンβ受容体が関与する．日本味と匂学会第37回大会（岡山，2003年9月24～26日）
6. 奥谷文乃・張敬姫・椛秀人：アドレナリンβ受容体作動薬の嗅球内注入がにおいの嫌悪学習に及ぼす効果．第５５回日本生理学会中国四国地方会（倉敷，2003年10月31日）
7. 奥谷文乃・椛秀人：子宮内発育不全ラットの学習障害は妊娠母へのメラトニン経口投与によって予防できる．第81回日本生理学会大会（札幌，2003年6月2～4日）
8. Okutani F, Zhang J-J, Kaba H: Correlation between the mechanisms of olfactory learning and LTP. 14th International Symposium on Olfaction and Taste/ 38th Japanese Association for Taste and Smell （京都，2004年7月5～9日）
9. Zhang J-J, Okutani F, Huang G-Z, Kaba H: β-Adrenoceptors play a critical role in induction of LTP in the main olfactory bulb. 14th International Symposium on Olfaction and Taste/ 38th Japanese Association for Taste and Smell （京都，2004年7月5～9日）
10. Okutani F, Zhang J-J, Kaba H: Common properties of aversive olfactory learning and LTP in the OB. 第27回日本神経科学学会大会（大阪，2003年9月21～23日）
11. Zhang J-J, Okutani F, Huang G-Z, Kaba H: Inhibition of PI 3-kinase impairs LTP in the main olfactory bulb. 第27回日本神経科学学会大会（大阪，2003年9月21～23日）

A04-26 西 真弓

1. 西真弓、田中政幸、河田光博. Dynamics of corticosteroid receptors in living cultured hippocampal neurons and non-neural cells. 第 56 回日本細胞生物学会.　ワークショップ 3 細胞情報のイメージング技術～滋賀. 5.14-16. 2003
2. Nishi M, Tanaka M, Kawata M: Real-time imaging of corticosteroid receptor dynamics in living cells with GFP. Symposium IX: Targeting pathways in signaling networks. The Second Annual Meeting of Molecular Imaging, San Francisco, USA, 8. 15-18. 2003
3. 西真弓、宇宿智裕、河田光博:コルチコステロイドレセプターの海馬培養神経細胞内における動態の解析. 第12回海馬と高次脳機能学会、東京、11.23-24, 2003
4. 西真弓:コルチコステロイド受容体と転写共役因子の神経細胞内におけるダイナミクス
第81回日本生理学会大会．シンポジウム「核内ホルモン受容体-転写共役因子と脳機能」　札幌 6.2-4. 2004
5. 西真弓、河田光博：GFPを用いて分子の動態をみる　第29回組織細胞化学講習会．山梨 8.3-4. 2004

出版物など

A01-01 大森 治紀

神経回路の機能発現のメカニズム　編集　大森治紀、澁木克栄、野田亮、山森哲雄、蛋白質核酸酵素49巻3号、2004、共立出版社

A01-02 小松 由起夫

1　小松由紀夫，吉村由美子：大脳皮質視覚野におけるシナプス可塑性の年齢と経験依存性.「神経回路の機能発現のメカニズム」大森治紀・渋木克栄・野田亮（編）蛋白質核酸酵素2004年2月号増刊.

2　Komatsu, Y. and Yoshimura, Y., Long-term modification at visual cortical inhibitory synapses. In "Excitatory-Inhibitory Balance: Synapses, Circuits and Systems" ed. by Hensch T. K., Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 75-87, 2003.

3　小松由紀夫：海馬皮質の可塑性. 甘利俊一，外山敬介（編）：脳科学大辞典. 朝倉書店，2000. pp 358-369.

A01-03 立花 政夫

1）立花政夫（2003）「哺乳類の網膜における視覚情報処理」 pp. 642-649　『脳神経科学』 伊藤正男監修 三和書店

2）立花政夫（2003）「網膜の情報処理」 pp. 99-106. 『眼の事典』 三島済一総編集　朝倉書店

A01-04 小田 洋一

小田洋一　後脳の分節構造に基づいたニューロン回路の機能構築　蛋白質　核酸　酵素(増刊号)「神経回路の機能発現のメカニズム」49(3): 486-492, 2004

小田洋一，中山寿子　聴覚　脳・神経入門講座（渡辺雅彦編）下巻　pp. 117-130,　羊土社，2002

小田洋一　脳の可塑性のメカニズム　認知科学の新展開（乾敏郎・安西祐一郎編）第1巻「認知発達と進化」pp. 144-163, 岩波書店 2001　他9点

A01-06 岡 良隆

(1) Oka, Y. (2002) GnRH peptide as a neuromodulator and its release mechanisms. In: "Neuroscience of Fishes" (ed. by K. Uematsu, Y. Oka, and H. Ito), Koseisha-Koseikaku, Tokyo, pp. 160-177.

(2) Oka, Y. and Abe, H. (2002) Physiology of GnRH neurons and modulation of their activities by GnRH. In: "Neuroplasticity, Development, and Steroid Hormone Action" (ed. by R.J. Handa, S. Hayashi, E. Terasawa, and M. Kawata), CRC Press, Boca Raton, pp. 191-203.

(3) Morisawa, M., Izumi, H., Yoshida, M., and Oka, Y. (2001) Cell signaling for activation of motility and chemotaxis in the sperm of Ciona. In: "The Biology of Ascidians" (ed. By H. Sawada, H. Yokosawa, and C.C. Lambert), Springer Verlag, Tokyo, 86-91.

Oka, Y. (2000) Tropical fish brain as a model system for the neurobiological study of peptidergic neurons. 生物物理 40: 254-257.

A01-07 坪井 昭夫

1. 坪井昭夫、仙石愼太郎、坂野仁：嗅覚神経系の発生と再生
   実験医学（増刊）第18巻　第9号　p185-192（2000）
2. 坪井昭夫：嗅覚受容体の発現に依存した嗅神経回路形成のメカニズム
   日本味と匂学会誌　第9巻　第1号　p43-50（2002）
3. 坪井昭夫、岡雄一郎、坂野仁：嗅覚神経系の発生と分化
   実験医学（増刊）第23巻　第1号　印刷中（2004）

A01-10 稲垣 直之

1)稲垣直之、貝淵弘三、CRMP-2は海馬神経細胞の軸索形成を誘導する、細胞工学　20、1408-1409（2001）.

2）稲垣直之、貝淵弘三、神経細胞の軸索および極性形成の分子機構、生体の科学　52、230-234（2001）.

3）深田優子、稲垣直之、貝淵弘三、神経細胞の極性：神経軸索と樹状突起の運命決定、細胞工学　20（4）、520-529（2001）.

4）有村奈利子、稲垣直之、貝淵弘三、CRMP-2による神経極性形成の制御機構、実験医学. 19（17）、2309-2311（2001）.

5) 稲垣直之、細胞内の空間シグナル、細胞工学 21 (4) 345 (2002) .
6) 稲垣直之、高解像度ラージゲルを用いた二次元電気泳動法による細胞内発現蛋白質の網羅的検出、実験医学 20 (1) 85-88 (2002) .
7) 稲垣直之、ポストシナプス・樹状突起スパインにおけるCaMKIIの空間的シグナリング、生体の科学 54 (2)、90-96 (2003) .
8) 勝田和大、野村英子、稲垣直之、Multiple Large gel two-dimensional electrophoresis for proteomics, J. Electrophresis 47, 27-31 (2003) .
9) 稲垣直之、稲垣昌樹、動くシナプスと神経ネットワーク (塩坂貞夫 編)、金芳堂、p103-110、2003.

A01-11 川口 泰雄

1．川口泰雄　ホールセル記録神経細胞の形態学的・組織化学的解析．　”新パッチクランプ実験技術法” (岡田泰伸　編) pp. 118-131、吉岡書店、京都、2001.
2．Kawaguchi Y. (2003) Local circuit neurons in the frontal cortico-striatal system. In Excitatory-Inhibitory Balance: Synapses, Circuits and Systems Plasticity (ed Hensch T, Fagiolini M), pp 125-148. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

A01-13 伊佐 正

1. Alstermark B, Isa T (2002) Premotoneuronal and direct corticomotoneuronal control in the cat and macaque
monkey. In “Movement and Sensation” (eds. Gandevia S, Proske U), Adv Exp Med Biol. 2002;508:281-297.
2 Isa T, Kobayashi Y, Saito Y (2003) Dynamic modulation of signal transmission in the local circuit of mammalian
superior colliculus. In “The Superior Colliculus: New Approaches for Studying Sensorimotor Integration.” (eds. W.C.
Hall & A. K. Moschovakis), CRC Press, pp159-171.
3. Isa T & Kobayashi Y (2004) Switching between cortical and subcortical sensorimotor pathways. In Progress in
Brain Research “Brain Mechanisms for the integration of posture and movement”. (eds. Mori S, Stuart DG,
Wiesendanger M) 143:295-301.
4. Kobayashi Y, Inoue Y & Isa T (2004) Pedunculo-pontine control of visually guided saccades. In Progress in Brain Research “Brain Mechanisms for the integration of posture and movement”. (eds. Mori S, Stuart DG, Wiesendanger M) 143:439-445.
5. Isa T, Inoue Y, Kobayashi Y (2004) Cognitive function of the brainstem cholinergic system. In International Congress Series 1250 “Cognition and Emotion in the Brain” (eds. Ono t, Matsumoto G, Llinás R, Berthoz A, Norgren R, Nishijo H, Tamura R), pp397-406.
6. Isa T & Sparks D (2004) Microcircuit of the Superior Colliculus: A Neuronal Machine that Determines Timing and Endpoint of Saccadic Eye Movements. Background paper for 93rd Dahlem Workshop on Microcircuits; The interface between Neurons and Global Brain Function, in press.

A01-14 佐藤 宏道

1. Sadakane, O., Ozeki, H., Naito, T., Akasaki, T., and Sato, H. Contrast-dependent gain control of the contextual response modulation in the cat primary visual cortex. In: A. Kaneko (Ed.) The Neural Basis of Early Vision pp. 205-208, Springer-Verlag, Tokyo. (2003)
2. Ozeki, H., Sadakane, O., Akasaki, T., Naito, T. and Sato, H. Contribution of excitation and inhibition to the stimulus size- and orientation-tuning of response modulation by the receptive field surround in the cat primary visual cortex. In: A.Kaneko (Ed.), The Neural Basis of Early Vision pp. 209-212, Springer-Verlag, Tokyo. (2003)

A01-18 辰巳 仁史

1．辰巳仁史：近接場光顕微鏡。船津高志編．光生物学会編：*光が拓く生命科学７巻” 生命科学を拓く新しい光学技術*” 共立出版, 93-106, 1999.
2．曽我部正博、成瀬恵治、河上敬介、辰巳仁史　２０００年 機会刺激による細胞のリモデリング：ＳＡチャネルと接着蛋白質チロシンりん酸化　生体の科学　５１　ｐ５４９―５５５

３．辰巳仁史、2002年 近接場顕微鏡による細胞膜のダイナミクスと接着形成の研究、ナノ光学ハンドブック p342-349 朝倉書店　(分担)
４．Yanagida, T.　Tamiya, E.　Muramatsu, H,　Degenaar, P. Ishii, Y.　Sako, Y.　Saito, K.　Ohta-Iino, S.　Ogawa, S. Marriott, G.　Kusumi, A.　and Tatsumi,　H.　Near field microscopy for biomolelular systems. Kawata, S.; Ohtsu, M.; Irie, M. (Eds.): (2002)　Nano-Optics　ISBN 3-540-41829-6　Springer-Verlag Heidelberg
５．辰巳仁史、２００2年 近接場顕微鏡 p180-191感覚器官と脳内情報処理　御子柴克彦、清水孝雄編　分担、共立出版
６．辰巳仁史　２００３年　近接場光を用いたバイオイメージング　ナノバイオ特集　日本分光学会誌
７．辰巳仁史　２００３年　3次元顕微鏡とその応用　生物工学ハンドブック　分担生物工学ハンドブック Ⅰ編4章「生物工学を支える機器分析・計測技術」コロナ社
８．曾我部正博、河上敬介、早川公英、成瀬恵治、辰巳仁史　内皮細胞の伸展依存性リモデリング-分子から硬いへのインターフェースを見る。血管医学、4巻237-244　　2,003年

A01-19 船橋 新太郎

１．船橋新太郎 (2002) 「ワーキングメモリの神経回路」、松本元、小野武年共編『情と意の脳科学　人とは何か』、培風館、p. 68-90.
２．船橋新太郎 (2002) 「前頭葉と記憶」、久保田競編『記憶と脳』、サイエンス社、p. 69-132.

A02-01 澁木 克栄

1. Shibuki K, Hishida R, Kitaura H, Takahashi K, Tohmi M: Coupling of brain function and metabolism: Autofluorescence imaging of neural activities by local changes in energy metabolism. In Handbook of Neurochemistry & Molecular Neurobiology. Vol. 5, Neural Energy Utilization. Plenum, New York (In press).
2. Shibuki K, Hishida R: Flavoprotein autofluorescence: an underestimated signal for functional brain imaging. Physiology News 54: 18-19, 2004.
3. 澁木克栄（２００４）脳のシナプス活動と高次機能。脳の神秘と疑問（ブックレット新潟大学)、３３－５１頁、新潟日報事業社
4. 澁木克栄（２００４）シナプス可塑性と神経回路形成：概説。「蛋白質 核酸 酵素」増刊号、４９巻、３６４－３６６頁、共立出版
5. 工藤雅治、澁木克栄（２００４）聴覚野音順序弁別におけるケミカルメディエータの機能。「蛋白質 核酸 酵素」増刊号、４９巻、３６７－３７２頁、共立出版
6. 菱田竜一、工藤雅治、澁木克栄（２００２）聴覚野神経活動の内因性酸化還元蛍光によるイメージング、日本生理学雑誌、６４巻、１５－１７頁
7. 関健二郎、工藤雅治、澁木克栄（２００１）ＬＴＰに伴う興奮性反響回路形成と記憶・学習：聴覚野スライス標本を用いた反響回路の解析、Brain　Medical、１３巻、３３７－３４２頁、メディカルレビュー社

A02-04 狩野 方伸

Kano, M., Ohno-Snosaku, T., Maejima, T. and Yoshida, T.: Endocannabinoid-mediated modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission. In: *EXCITATORY-INHIBITORY BALANCE. Synapses, Circuits, Systems.* T.K. Hensch and M. Fagiolini, (eds), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York/Boston/Dordrecht/London/Moscow, 99-107, (2004年1月).
※その他、英文著書（分担）：5編、英文総説：6編、和文著書（分担）：6編、和文総説：7編

A02-06 蔵田 潔

1. 蔵田潔： 脳科学大辞典（分担執筆）　朝倉書店2000.
「高次脳機能の研究手法」pp. 67-70
「運動プログラミング」pp. 355-357
2. 蔵田潔： 大脳皮質運動野.　脳･神経科学入門講座（下）、渡辺雅彦編著羊土社pp. 182-190, 2002
3. 蔵田潔： 認知科学辞典（日本認知科学会編、分担執筆）　共立出版2002
4. 蔵田潔： 医学大辞典（分担執筆）　医学書院2003

A02-09 神谷 温之

1．H. Kamiya. Presynaptic glutamate receptors in the hippocampus. In: Slow synaptic responses and modulation (Kuba, Higashida, Brown and Yoshioka eds). Tokyo: Springer-Verlag, pp 154-157, 2000.

2．神谷温之，真鍋俊也． 神経の可塑性と記憶・学習．「分子生物学イラストレイテッド」（田村隆明，山本雅編）羊土社，pp319-323，2002.

A02-10 久保 義弘

1．宮下知之、阿部秀樹、久保義弘
細胞外カルシウムが神経細胞の機能におよぼす作用　特集「神経疾患とカルシウム」
Clinical Calcium 11(11) 1425-1431 (2001)
2．久保義弘
代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構　特集「神経伝達機構の分子的記述」
医学のあゆみ 202(13) 1023-1026 (2002)
3．立山充博、久保義弘
リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の二量体構造の動的変化
細胞工学 23 (9) 1062-1063 (2004)

A02-11 吉村 恵

1．吉村　恵、古江　秀昌（2001） In vivo パッチクランプ法，新パッチクランプ法，pp 140-146，岡田泰伸　編，吉岡書店，京都
2．Furue H, Sonohata M, Ito Akitoshi, Kawasaki Y, Baba H, and Yoshimura M. In vivo patch-clamp analysis of norepinephrine effects on nociceptive transmission in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. Proceedings of the 10th World Congress on Pain. Progress in Pain research and Management. Vol. 24, eds J. O. dostrovsky, D. B Carr and M. Kotzenburg, IASP Press, Seattle, pp 245-250, 2003

A02-12 遠藤 省吾

1. 遠藤昌吾、無脊椎動物アメフラシのシナプス可塑性（西野仁雄、柳原大編集、運動の神経科学)、(有)ナップ、２０００年１１月２４日
2. 遠藤昌吾、記憶と学習（森寿、真鍋俊也、渡辺雅彦、岡野栄之、宮川剛編集、脳神経科学イラストレイテッド)、羊土社、２０００年７月１０日

A02-13 富永 真琴

1. 富永真琴：熱受容体のクローニング　医学のあゆみ　2000 (Aug); 194 (9): 698-699.
2. 富永真琴：辛味のリセプター　日本味と匂学会誌　2000 (Aug); 7 (2): 191-196.
3. 富永真琴：多刺激痛み受容体としてのカプサイシン受容体の構造と生理機能　実験医学 2000 (Nov); 18 (17): 2325-2330.
4. 富永真琴：辛味成分カプサイシンと痛み　食の科学　2001 (May); No. 279: 34-38.
5. 富永真琴：痛み受容体研究の進歩　脳の科学　2001 (Oct); 23 (10): 829-835.
6. 富永真琴：痛覚　アエラムック「人間科学がわかる」 2001; No. 73: 26-29.
7. 富永真琴：痛み刺激受容の分子機構　カプサイシン vanilloid receptor と疼痛制御　日本ペインクリニック学会誌 2001; 9: 57-61
8. 富永真琴：Vanilloid 受容体 医学のあゆみ　2002; 200 (13): 1068
9. 沼崎満子、富永真琴：カプサイシン受容体　医学のあゆみ　2002; 201 (13): 1071-1075.
10. 富永真琴：ホットなトウガラシとクールなミント　現代化学　2002; No. 376: 42-46.
11. 飯田陶子、富永真琴：カプサイシン受容体　CLINICAL NEUROSCIENCE 2002 (Oct); 20 (10): 1111-1114.
12. 飯田陶子、富永真琴：痛み・温度を感じる　細胞工学　2002 (Dec.); 21 (12): 1420-1424.
13. 富永真琴：TRP チャネルと痛み　脳 21　2003; 6 (1) 11-15.
14. 富永真琴、沼崎満子、飯田陶子、富永知子：痛み受容の分子メカニズム　日本神経精神薬理学雑誌 2003; 23: 139-147
15. 沼崎満子、富永真琴：痛み受容・温度受容の分子機構：カプサイシン受容体とそのホモログの構造・発現と機能　生化学　2003; 75 (5): 359-371.
16. 富永真琴：生体はいかに温度をセンスするか-TRP チャネル温度受容体-　生理学雑誌　2003; 65

(4,5): 130-137.
17. 富永真琴：物理刺激応答の分子機構-温度受容を中心として- アレルギーの臨床 2003 (July); 23 (8): 592-595.
18. 富永真琴：炎症性疼痛とカプサイシン受容体 リウマチ科 2003 (Dec); 30 (6): 556-563.
19. 富永真琴：炎症性疼痛の分子メカニズム-カプサイシン受容体の発現と機能制御- ペインクリニック 2004 (Feb.); 25 (2): 150-157.
20. 冨樫和也、富永真琴：温度受容の分子機構 CLINICAL NEUROSCIENCE 2004 (March); 22 (3): 344.
21. 森山朋子、富永真琴：カプサイシン受容体とTRPチャネル Molecular Medicine 2004 41: 642-649.
22. 富永真琴：カプサイシン受容体ファミリー (TRPVファミリー) 皮膚アレルギーフロンティア 2004 (June) 2 (2): 48-49.
23. 富永真琴：温度受容の分子機構-TRPチャネル温度センサー- 日本薬理学雑誌 2004 (October) 124: 219-227.
24. Tominaga M and Julius D: The cloned capsaicin receptor is a heat- and proton-activated ion channel. In "Control and Diseases of Sodium Dependent Transport Proteins and Ion Channels", edited by Y. Suketa et al. Amsterdam: Elsevier Science, p. 119-122, 2002.
25. Makoto Tominaga, Mitsuko Numazaki, Tohko Iida, Tomoko Moriyama, Kazuya Togashi, Tomohiro Higashi, Namie Murayama and Tomoko Tominaga: Regulation Mechanisms of Vanilloid Receptors. In "Pathological Pain: from molecular to clinical aspects" edited by Chadwick DJ and Goode J, John Wiley & Sons, p. 4-12, 2004.
26 Makoto Tominaga, Mitsuko Numazaki, Tohko Iida, Tomoko Moriyama, Takeshi Sugiura, Kazuya Togashi, Tomohiro Higashi, Namie Murayama, Tomoko Tominaga and Kazue Mizumura: Molecular Mechanisms of TRPV1-Mediated Thermal Hypersensitivity. In "Hyperalgesia: Molecular Mechanisms and Clinical Implications" edited by Kay Brune and Hermann Handwerker, IASP Press, Seatle, p. 37-47, 2004.
27. 富永真琴：痛み発生に関わる新しい分子「カプサイシン受容体」 オピオイド治療 課題と新潮流 鎮痛薬・オピオイドペプチド研究会 (編) エルゼビア・サイエンス ミクス p. 233-239, 2000.
28. 富永真琴：Regulation Mechanism of Capsaicin Receptor VR1 脳機能の解明-生命科学の主潮流- 赤池紀扶、東英穂、阿部康二、久保千春 (編) ガイア出版会 p. 533-539, 2002
29. 富永真琴:痛覚(カプサイシン受容体) 脳神経科学入門講座 下巻 渡辺雅彦(編)羊土社 p. 104-116, 2002
30. 富永真琴：急性炎症性疼痛の分子メカニズム 痛みの基礎と臨床 緒方宣邦・柿木隆介 (編) 真興交易 (株) p. 18-28, 2003

A02-15 八尾 寛

八尾 寛, 鍋倉淳一 (岡田泰伸 編), 新パッチクランプ実験技術法, 吉岡書店, 2001年7月5日

A02-16 久本 直毅

1. 日野未歩、久本直毅、松本邦弘：線虫 *C. elegans* における神経の非対称的分化を制御するMAPキナーゼカスケード：実験医学 19, 1829-1833, Sep 2001.
2. 坂本リエ、久本直毅、松本邦弘：モデル動物 *C. elegans* におけるシナプス小胞の局在を制御するMAPキナーゼカスケード：蛋白質核酸酵素 47, 1362-1367, Sep 2002.

A02-19 井上 貴文

1. K. Mikoshiba, K. Hamada, H. Ando, T. Michikawa, S. Zhang, A. Kuruma, T. Inoue. Structure and function of IP_3 receptor. Nova Acta Leopoldina, 89:27-31 (2004).
2. K. Mikoshiba, T. Inoue, A. Futatsugi, S. Fujii, H. Kato. Role of IP_3 receptor in neural plasticity. in Cognition and Emotion in the Brain (Ono, T., Matsumoto, G., Llinas, R., Berthoz, A., Norgren, R., Nishijo, H. & Tamura, R. Eds) International Congress Series, 1250:461-472 (2003).
3. T. Inoue. Dynamics of calcium and its roles in the dendrite of cerebellar Purkinje cell. The Keio J. Med., 52:244-249 (2003).
4. K. Fukami, T. Inoue, M. Kurokawa, R. A. Fissore, K. Nakao, K. Nagano, Y. Nakamura, K. Takenaka, N. Yoshida, K. Mikoshiba, T. Takenawa. Phospholipase C・4: from genome structure to physiological function. Adv. Enzyme Regul., 43:87-106 (2003).
5. 井上貴文, 上間匡, 相原優子, 甲斐知恵子. 遺伝子銃による導入法. 実験医学別冊・必ず上手くいく遺伝子導入と発現解析プロトコール 56-62, 仲嶋一範, 北村義浩編, 羊土社 (2003)

6. 井上貴文. 神経細胞におけるカルシウム動態（流入排出機構）. CLINICAL CALCIUM 11:1409-1416 (2001)

A02-22 宮田 麻理子

1．宮田麻理子　共著 言霊社会とサイエンス　井沢元彦の未来講座　（徳間書店）2002年
2．宮田麻理子　総説molecular medicine 小脳のシナプス伝達と可塑性（中山書店）2004年 vol. 41, pp1102-1108
3．宮田麻理子　総説　神経研究の進歩　炎症性疼痛における視床mGluR1-PLC beta 4　カスケードの役割（医学書院）2004年　印刷中

A02-23 井本 敬二

Imoto K (2003) Voltage-dependent Na^+ channel. in "Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology" (ed. Offermanns S, Rosenthal W), Springer-Verlag, Heidelberg.

A02-25 高田 昌彦

1. Takada M, Hamada I, Tokuno H, Inase M, Ito Y, Hasegawa N, Ikeuchi Y, Imanishi M, Akazawa T, Hatanaka N, Nambu A (2003) Corticostriatal projections from the cingulate motor areas in the macaque monkey. In: The Basal Ganglia VI (Graybiel AM, DeLong MR, Kitai ST, eds), pp 419-428. New York: KA/PP.
2. Yamaji Y, Matsumura M, Kojima J, Tokuno H, Nambu A, Inase M, Imai H, Takada M (2003) Differential reductions in dopaminergic innervation of the motor-related areas of the frontal lobe in MPTP-treated monkeys. In: The Basal Ganglia VI (Graybiel AM, DeLong MR, Kitai ST, eds), pp 159-167. New York: KA/PP.
3. Nambu A, Kaneda K, Tokuno H, Takada M (2002) Partly converging but largely segregated corticostriatal projections from the primary motor cortex and the supplementary motor area. In: The Basal Ganglia VII (Nicholson LFB, Faull RLM, eds), pp 147-153. New York: KA/PP.
4. Takada M, Matsumura M, Kojima J, Yamaji Y, Inase M, Tokuno H, Nambu A, Imai H (2002) Protection against nigrostriatal dopamine cell death by pedunculopontine tegmental nucleus lesions. In: The Basal Ganglia VII (Nicholson LFB, Faull RLM, eds), pp 67-76. New York: KA/PP.

A02-31 古江 秀昌

1. 古江　秀昌：大脳皮質からの in vivo パッチクランプ法開発、(伊藤正男、川合述史編) ブレインサイエンスレビュー、クバプロ、東京、印刷中
2. Yoshimura M, Furue H, Nakatsuka, T, Matayoshi S and Katafuchi T. Functional reorganization of the spinal pain pathways in developmental and pathological conditions. Pathological Pain: From molecular to clinical aspects. Novartis Foundation Symposium 261, 116-131, 2004. 7. 20
3. Furue H, Sonohata, Ito A, Kawasaki Y, Baba H and Yoshimura M : In vivo patch-clamp analysis of norepinephrine effects on nociceptive transmission in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. Progress in Pain Research and Management Proceedings of the 10th World Congress of Pain IASP Press 24:245-250, 2003. 5. 1

A03-02 白尾 智明

1. 関野祐子、高橋秀人、白尾智明「スパインアクチン細胞骨格は興奮生シナプス成熟を制御する」蛋白質・核酸・酵素４９：２７０－２７５（２００４）
2. 白尾智明、田中聡一「神経細胞樹状突起発達とアクチン細胞骨格系」蛋白質・核酸・酵素 45: 255-261 (2000)
3. Shirao T "Drebrin" in Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. T Kreis and R Vale eds. Oxoford University Press, N Y pp. 76-77 (1999)
4. Shirao T, Yong R., Hayashi K, Sekino Y. "Time-lapse video microscopic analysis of cell process formation from drebrin A expressing fibroblast." in Neural Development, K Uyemura, K. Kawamura, T. Yazaki eds. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 381-385 (1999)
5. Hayashi K., Shirao, T. "Visualization of dendritic spine formation with GFP-fusion proteins." in Neural Development, K Uyemura eds. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 399-403 (1999)

A03-06 山形 要人

1) 山形要人、竹宮孝子, COX-2 とアルツハイマー病との関係は？、 アラキドン酸カスケードQ＆A, 医薬ジャーナル社, (2002)115-117
2) 山形要人, シナプス可塑性の分子機構, 神経化学, 日本神経化学会, 40(2001)26-38
3) 山形要人, アルツハイマー病, 現代化学増刊 38 プロスタグランジン研究の新展開, 東京化学同人, (2001)93-95
4) Yamagata K, Sugiura H, Irie Y, Maru E, Matsumura K, Kato H, Worley P.F. Activity-regulated gene expression in the brain. in *"Slow synaptic responses and modulation"*, Kuba K, Higashida H, Brown DA, Yoshioka T, Eds. Springer-Verlag Press, pp341-348, 2000.
5) 山形要人、鈴木香子、杉浦弘子, COX-2 と中枢神経系, 「COX-2 の理論と実証ー基礎と臨床」, メディカルレビュー社, (2000)72-77

A03-07 五十嵐 道弘

1) 五十嵐 道弘 (2004): シンタキシンの新規結合蛋白質の機能解析.「ﾌﾞﾚｲﾝｻｲｴﾝｽﾚﾋﾞｭｰ2004」(伊藤正男・川合述史編)、クバプロ、pp. 135-144. (2004 年 3 月 31 日)
2) 五十嵐 道弘 (2002):成長円錐機能を支える分子装置. シリーズバイオサイエンスの新世紀第 11 巻「脳の発生・分化・可塑性」(御子柴克彦、清水孝雄 編)、共立出版、pp. 121-132. (2002 年 5 月 10 日)
3) 五十嵐 道弘、田代 朋子 (2000) 脳シナプトソーム、成長円錐及び関連構造. 基礎生化学実験法第 2 巻「生体試料」(日本生化学会編)、東京化学同人、pp. 157-162. (2000 年 10 月 10 日)

A03-08 谷口雅彦

1.谷口雅彦. 軸索ガイダンス分子セマフォリンの分子機構. 宮坂信之・宮島 篤編, 別冊・医学のあゆみ「サイトカイン」, 131-134, 2004.
2.谷口雅彦. セマフォリンの機能. 生化学, 76 : 50-54, 2004.
3.谷口雅彦. 匂い地図形成におけるセマフォリンの機能. AROMA RESEARCH, 4 : 224-228, 2003.
4.谷口雅彦. 神経回路形成とセマフォリン・ニューロピリン. 御子柴克彦・清水孝雄編, 脳の発生・分化・可塑性, 日本生化学会 : 共立出版, 112-120, 2002.
5.谷口雅彦, 八木 健. ES 細胞と支持細胞. 日本生化学会編, 基礎生化学実験法 第２巻 生体試料, 日本生化会 : 東京化学同人, 96-102, 2000.
6.谷口雅彦. 神経回路形成における反発性軸索ガイダンス分子セマフォリンの分子機構. 実験医学, 18 : 2142-2147, 2000.

A03-11 金保安則

1. M.A. Frohman, Y. Kanaho, Y. Zhang, and A.J. Morris. Regulation of phospholipase D1 activity by rho GTPases. *Methods Enzymol.* 325, 177-189, 2000
2. 金保安則、本田晶:フォスファチジルイノシトール４-リン酸５-キナーゼの活性化機構と生理的役割. *細胞工学* 19, 526-529, 2000
3. 金保安則、野上真宏、本田晶：細胞膜リン脂質代謝と細胞運動. *タンパク質核酸酵素* 45, 1219-1228, 2000
4. Y. Kanaho, H. Miyazaki, and M. Yamazaki. Activation of PI(4)P 5-kinase by small G protein. *Adv. Enzyme Regul.* 43, 107-119, 2003
5. 金保安則、宮崎秀幸、中野亜希子、山崎正和：ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼの活性調節機構と生理機能. *細胞工学* 22, 1360-1365, 2003
6. T. Maehama, F. Okahara, Y. Kanaho. The tumor suppressor PTEN: involvement of a tumore suppressor candidate in the PTEN turnover. *Biochem. Soc. Trans.* 32 (Pt 2). 343-347, 2004

A03-13 斉藤哲一郎

Tetsuichiro Saito: Transcriptional cascades to regulate neuronal differentiation by mammalian Barhl (MBH1). in "Catecholamine Research" edited by Nagatsu et al. pp213-216. Kluwer Academic/Plenum Press (2002)

A03-14 見学美根子

1.見学美根子、梅嶋宏樹；小脳顆粒細胞の移動. 蛋白質核酸酵素増刊号vol.49「神経回路の機能発現のメ

カニズム」, 255-260, (2004).
2. 見学美根子； 神経細胞の移動. 三輪書店「脳神経科学」（分筆）, 177-188, (2003).
3. 見学美根子； 小脳の層形成と顆粒細胞の移動. 実験医学増刊号「脳のパターン形成、神経ネットワーク、神経再生と臨床応用」（分筆）, 97-104, (2002).

A03-18 小椋 利彦

遺伝子医学別冊 分子生物学実験シリーズ 図・写真で見る発生・再生実験マニュアル
ニワトリ網膜視蓋投射解析法 134-144 (2002) 小柴和子・竹内純・小椋利彦

A03-24 服部 光治

服部光治、御子柴克彦(2002) 「リーリンによる神経細胞移動の制御」 Springer 社 細胞骨格と細胞運動 p202-206

A03-27 富永 知子

1. ダイナミックなアクチン繊維の再編を制御するシグナル分子 mDia 富永知子
Springer Reviews シリーズ “ダイナミックな細胞骨格再編 細胞運動はどのようにして 起こるのか -その制御のシグナル-” (竹縄忠臣編) Springer-Verlag Tokyo, Inc. 2002

A03-29 岩 里 琢 治

1．岩里琢治 大脳皮質神経回路のメカニズムをタンパク質、遺伝子レベルで探る-マウス体性感覚(バレル)野をモデル系として 「運動とタンパク質・遺伝子」柳原大、内藤久士編 有限会社ナップ 50-65頁〔2004年〕
2．岩里琢治 神経活動依存的メカニズムによる脳回路発達 「みる見るわかる脳・神経科学入門講座 下巻」 渡辺雅彦編 株式会社羊土社 73頁-87頁 (2002年)
3. 岩里琢治 げっ歯類バレル構造の活動依存的発達 蛋白質酵素増刊「神経回路の機能発現のメカニズム」大森治紀、澁木克栄、野田亮、山森哲雄編 49巻3号 351-357頁 (2004年)
4. 岩里琢治、糸原重美 マウス遺伝学による神経回路網精緻化の研究 生体の科学 54巻2号 138-145頁 (2003年)

A03-31 饗場 篤

1. 松田育雄, 饗場篤, 注目のプロテオミクスの全貌を知る！, 羊土社, 2003年1月1日
2. 松田育雄, 饗場篤, 脳・神経研究2004, 羊土社, 2003年11月25日
3. 饗場篤, Molecular Medicine, Vol.41, No.9, 中山書店, 2004年8月25日
4. Ikuo Matsuda and Atsu Aiba, Methods in Molecular Biology, vol.259, 379-390, 2004年.

A03-33 東海林 亙

1. 東海林亙, 軸索ガイド因子としてのセマフォリン・ファミリー,「蛋白質・核酸・酵素」45 p2798-2802, 2000
2. 東海林亙・前田美香, レーザーで誘導する遺伝子発現, 細胞工学 20 428-433, 2001
3. 東海林亙, 側線神経の成長円錐ガイド機構, 実験医学 20 p764-769, 2002
4. 東海林亙, 神経軸索のガイダンス, Brain Medical, 14 p339-407, 2002

A03-38 上村 匡

1. 上村匡、7回膜貫通型カドヘリンによる樹状突起伸長、p145-156、ブレインサイエンスレビュー2004、2004.
2. 杉村薫、木村宏史、上村匡、樹状突起のパターンの多様性を支える機構の解明に向けて、蛋白質核酸酵素（臨時増刊「神経回路の機能発現のメカニズム」)、49: 310-316、2004.
3. 上村匡、細胞の突起形成を調節するシグナル伝達経路 -平面内細胞極性と神経突起の伸長-、シリーズ・バイオサイエンスの新世紀・第9巻・シグナル伝達 -細胞運命と細胞機能を制御する仕組み-（東京化学同人、編集：西田栄介、大野茂男）第12章 p172-184、2001.

A03-39 井ノ口 馨

1. 井ノ口馨、シナプス可塑性における遺伝子制御とシナプス選択的な機能発現、蛋白質 核酸 酵素、2000年2月号増刊、45, 331-337 (2000)
2. 井ノ口馨、可塑性関連遺伝子とシナプス tagging、BRAIN MEDICAL, 12, 262-268 (2000)

3. 深澤有吾、井ノ口馨、選択的シナプス改変機構：シナプティックタギングと局所蛋白質合成、脳２１、3, 438-445 (2000)
4. 池上司郎、井ノ口馨、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた神経機能の解析、CLINICAL NEUROSCIENCE, 19, 10-11 (2001)
5. 加藤明彦、井ノ口馨、シナプス伝達の過疎的変化に伴い発現調節される遺伝子群：ポストシナプス部位で機能するVesl/Homerの解析を中心に、医学の歩み、199, 527-530 (2001)
6. 井ノ口馨、斎藤喜人、スパインアクチンの動態とシナプス形態の可塑性、蛋白質 核酸 酵素、４９，２８２-２８６，２００４
7. Ehrengruber, M., Kato, A., Inokuchi, K., Hennou, S. Homer/Vesl proteins and their roles in CNS neurons. Mol. Neurobiol., 29, 213-228 (2004).

A03-40 黒田 俊一

1. Tatematsu, K., Okajima, T., Tanizawa, K., and Kuroda, S. Novel Intracellular Biosignaling Machineries Involving Protein Kinase C-Interacting Proteins and Its Application. マテリアルインテグレーション 15 (2002), No. 7, 18-22.
2. 黒田俊一（分担） ナノバイオ辞典（山根恒夫・松永是監修）(2004)；株式会社テクノシステム（東京）
3. 黒田俊一（分担） タンパク質科学―構造・物性・機能（後藤祐児・桑島邦博・谷澤克行編集）(2005)；化学同人（京都）

A03-45 中村 真

未分化神経細胞特異的 RNA 結合タンパク MUSASHI 中村 真、 Clinical Neuroscience, 21(10)、1115-1118、2003

A03-46 塩見 美喜子

1. 塩見美喜子、九十九裕子 small RNA が引き起こす遺伝子発現制御機構 実験医学増刊「躍進するRNA研究」 21:153-160 2004.
2. 塩見美喜子、影山裕二 改訂 RNAi 実験プロトコール ２章２）ショウジョウバエ 羊土社 56-67. 2004.
3. 三好啓太、塩見美喜子 RNAiとmiRNAによる翻訳制御機構 ゲノム医学 4:35-44. 2004.
4. 塩見美喜子、東あすか RNAiの作用機序 Molecular Medicine 41:14-21. 2004.
5. 岡村勝友、塩見春彦、塩見美喜子 RNAiと疾患 実験医学 21:1662-1668. 2003.
6. 塩見美喜子、石塚明 RNAi：オーバービュー 蛋白質核酸酵素増刊号「化学と生物学接点がつくるNEWバイオテクノロジー」 48:1632-1637. 2003.
7. 塩見美喜子 RNAの運命 実験医学 わかる実験医学シリーズ「RNAがわかる」49-58. 2003.
8. 塩見美喜子 様々な生物種における RNAi 実験プロトコール ２章２）ショウジョウバエ「RNAi実験法」羊土社 48-56. 2003.
9. 塩見美喜子、塩見春彦 RNA 結合蛋白質の発現異常による疾患「脆弱 X 症候群」蛋白質核酸酵素 48:480-486. 2003.

A03-48 佐甲 靖志

1. 佐甲靖志 細胞内情報処理過程の１分子観察 生理学会誌 65, 277-282. (2003)
2. 上田昌宏、佐甲靖志 １分子と細胞 「ナノテクノロジーハンドブック IV編 バイオ・化学へ使う」ナノテクノロジーハンドブック編集委員会編 pp. 123-127 オーム社 (2003)
3. 森松美紀、佐甲靖志１分子計測法による細胞内分子システムの解析 BME 18, 19-26. (2004)
4. 佐甲靖志、細胞内情報処理システムを１分子計測する 「<１分子>生物学 生命システムの新しい理解」合原一幸、岡田康志編 pp. 43-82 岩波書店 (2004)

A03-50 粟崎 健

1. 粟崎健、伊藤啓 グリア細胞の貪食作用と軸索分岐の再編成 Clinical Neuroscience 23巻2号 2005年1月28日
2. 粟崎健、伊藤啓 神経系の形成と機能を制御する遺伝情報 「もうひとつの脳-微小脳の研究入門」(分担執筆) 培風館 (印刷中)

A03-51 佐藤 真

1. 佐藤　真、細胞運動と神経回路網形成「大脳皮質脳室帯細胞の運動・形態制御」、CLINICAL NEUROSCIENCE vol. 22 No. 9、2004. 9. 1
2. 佐藤　真、分子脳・神経機能解剖学 遠山正彌（編）、金芳堂、2004. 6. 2

3. 佐藤　真、大脳皮質脳室帯からの細胞移動-移動開始とFILIPによる負の制御、蛋白質 核酸 酵素1月号 vol. 49 No. 1　2004. 1. 1
4. 永野　隆、佐藤　真：神経細胞移動の分子機構-大脳皮質神経細胞の誕生から移動まで. 御小柴克彦、真鍋俊也、三浦正幸（編）：実験医学 Vol. 21 No. 17（増刊）「脳・神経研究 2004」. 羊土社 61-68（2335-2342）、2003、11
5. 和中明生、小野勝彦、佐藤　真、河合良訓：神経系. 遠山正彌、大槻勝紀、中島裕司（編）：人体発生学. 南山堂、335-375、2003、6
6. 佐藤　真，交叉の分子メカニズム，脳 21，5(1)，36-41，2002.

A04-01 山森 哲雄

１、山森哲雄　脳回路を作る遺伝子制御　生体の科学　５５、　４３－４９、(財) 金原一郎記念医学医療進行財団／医学書院２００４年２月１５日発行
２、山森哲雄　活動依存的遺伝子発現を指標とした学習行動のメカニズムの解明　蛋白質核酸酵素　(増刊号、神経回路の機能発現のメカニズム、大森治紀、渋木克栄、野田亮、山森哲雄編) ４９、433-438、共立出版、２００４年２月１０日発行
3、山森哲雄　遺伝子発現　「脳神経科学」(伊藤正男、金沢一郎、篠田義一、広川信隆、御子柴克彦、宮下保司編)、２５３—２５９、三輪書店　２００３年５月２０日発行
４、山森哲雄　「記憶と遺伝子発現研究の最近の進歩：小脳 LTD 初期過程への蛋白合成の関与」蛋白質核酸酵素　４６、１９６２—１９６９、共立出版　２００１年１０月１日発行

A04-02 八木 健

１．武藤哲司，八木　健　：　「脳機能形成メカニズムに関与する多様化した接着分子群-シナプスに存在する接着分子の多様性と分子間相互作用について-」　㈱星和書店：**脳の科学**　24:747-754 (2002)
２．八木　健：「生命の知恵　多様性をもたらす無駄」岩波書店：科学 Vol. 72 No. 3：323-329 (2002)
３．平山晃斉，杉野英彦，八木　健　：　「脳の獲得的性質を支える分子メカニズムの探索　CNR／プロトカドヘリンファミリーの遺伝子構造と機能」　**蛋白質　核酸　酵素**　Vol. 46 No. 6: 698-705 (2001)
４．八木　健　：「脳機能形成メカニズムにかかわる多様化膜分子群」　中山書店: ポストシーケンスのゲノム科学④　ゲノムから固体へ　生命システムの理解に向けて第３章　高次機能・高次生命現象へのゲノム科学からのアプローチ 148－163 (2001)
５．濱田　俊，八木　健　：　「シナプス形成とカドヘリンスーパーファミリー　選択的シナプス結合形成の分子基盤か？」　金芳堂：脳 21　Vol. 3 No. 4　2 3: 419－426　(2000)
６．先崎浩次，小川正晴，八木　健　：　「マウス大脳皮質層構造形成機構における新たな分子メカニズムの解明－CNR ファミリーは Reelin の多重受容体である－」　㈱羊土社　**実験医学**　Vol. 18　No. 6：4月号 (2000)

A04-03 真鍋 俊也

1. 真鍋俊也　遺伝子ノックアウトマウスの電気生理学的解析「脳・神経研究のための分子生物学技術講座」小幡邦彦、井本敬二、高田明和（編）（文光堂）pp. 164-178, 2000.
2. 西崎知之、真鍋俊也　シナプス可塑性「脳神経科学イラストレイテッド」森寿、真鍋俊也、渡辺雅彦、岡野栄之、宮川剛（編）（羊土社）pp. 166-173, 2000.
3. 真鍋俊也　海馬シナプス伝達可塑性の分子メカニズム　－ノックアウトマウスを用いた解析を中心に－脳の科学（星和書店）２２巻１号 pp. 91-94, 2000.
4. Manabe, T.　Molecular mechanisms for plasticity of hippocampal synaptic transmission. In: Frontiers of the mechanisms of memory and dementia, edited by Kato, T. (Elsevier, Amsterdam) pp. 7-10, 2000.
5. 真鍋俊也　グルタミン酸受容体と記憶のシグナル伝達「情報伝達研究の最前線」医学のあゆみ（医歯薬出版）１９４巻５号 p. 377-382, 2000.
6. 真鍋俊也　神経可塑性の新展開「神経可塑性の新展開－動くシナプス」脳２１（金芳堂）３巻４号 pp. 9-15, 2000.

7. 真鍋俊也　記憶の分子機構「脳の動態を見る　記憶とその障害の分子機構」高田明和、加藤武、中原大一郎、野村正彦（編）（医学書院）pp. 8-24, 2001.
8. 真鍋俊也　スライスパッチによるシナプス可塑性解析法「新パッチクランプ実験技術法」岡田泰伸（編）（吉岡書店）pp. 110-117, 2001.
9. 神谷温之、真鍋俊也　海馬シナプス伝達可塑性の分子機構　遺伝子医学　５巻 p. 499-501, 2001.
10. Manabe, T.　Does BDNF have pre- or postsynaptic targets? Science 295:1651-1652, 2002.
11. 真鍋俊也　海馬におけるシナプス可塑性「脳の発生・分化・可塑性」御子柴克彦、清水孝雄（編）（共立出版）pp. 166-177, 2002.
12. 神谷温之、真鍋俊也　高次脳機能　－学習・記憶と海馬シナプス伝達の可塑性－　総合リハビリテーション３０巻１０号　pp. 915-919, 2002.
13. 神谷温之、真鍋俊也　神経の可塑性と記憶･学習「分子生物学イラストレイテッド（改訂第２版）」田村隆明、山本雅（編）（羊土社）pp. 319-323, 2002.
14. 真鍋俊也　陳述記憶の分子機構「脳・神経研究２００４」御子柴克彦、真鍋俊也、三浦正幸（編）（羊土社）pp. 146-152, 2003.
15. 真鍋俊也　シナプス可塑性とNMDA型グルタミン酸受容体「神経回路の機能発現のメカニズム」大森治紀、渋木克栄、野田亮、山森哲雄（編）（共立出版）蛋白質・核酸・酵素４９巻３号　pp. 398-404, 2004.
16. 真鍋俊也　分子機構面からみた学習とは？－シナプス可塑性の誘導メカニズム－「（特集）学習・教育と脳科学」（裳華房）生物の科学　遺伝５８巻３号　pp. 33-38, 2004.
17. 渡部文子、真鍋俊也　神経可塑性「キーワードで理解するシグナル伝達イラストマップ」山本雅、仙波憲太郎（編）（羊土社）pp. 201-209, 2004.
18. 真鍋俊也　海馬におけるシナプス伝達と可塑性･記憶の分子機構「（特集）記憶･学習の分子基盤に迫る」（中山書店）Molecular Medicine４１巻９号　pp. 1095-1101, 2004.
19. 真鍋俊也　長期増強「原著を探る」Clinical Neuroscience ２２巻１０号　pp. 1218-1219, 2004.

A04-04　尾藤晴彦

1. 古屋敷智之、成宮周、尾藤晴彦. 神経細胞におけるアクチン細胞骨格系の制御 in 動くシナプスと神経ネットワーク（塩坂貞夫編、金芳堂）pp. 25-34, 2003.
2. 古屋敷智之、荒川芳輝、竹本-木村さやか、尾藤晴彦、成宮周.　神経活動によるアクチン細胞骨格制御とその多様性. 実験医学別冊「バイオイメージングでここまで理解る」(楠見明弘・小林剛・吉村昭彦・徳永万喜洋編）羊土社刊、pp. 32-36, 2002.
3. 古屋敷智之、尾藤晴彦、成宮周.　Rho と細胞骨格制御. in シグナル伝達：細胞運命と細胞機能を制御する仕組み.（西田栄介、大野茂男編、共立出版）pp. 49-67, 2001.
4. Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. Activity-dependent regulation of communication from synapse to nucleus. in "*The 22nd Taniguchi International Symposium on Brain Sciences*" (O. Hayaishi ed., Japan Scientific Societies Press, Tokyo), pp. 107-120, 2000.

A04-05 森　郁恵

1. Mori, I. (2001). Olfaction, in Encyclopedia of Genetics, eds. Brenner et al., AcademicPress, London, United Kingdom, pp1368-1370.
2. 木村幸太郎、森　郁恵 (2000)．線虫C. elegans, GFP とバイオイメージング－
実験医学別冊　ポストゲノム時代の実験講座、pp86-97.
3. 木村幸太郎、森　郁恵 (2000). 線虫　C. elegansを用いて神経系のメカニズムを探る、
バイオイメージング　Vol. 9.　No. 1,　1-5.
4. 森　郁恵 (2001).　ポストゲノムの神経科学：線虫の研究から、脳の科学　23,　53-57.
5. 木村幸太郎、森　郁恵 (2001).　生命の不思議全部見せます：線虫C. elegans、
特集「モデル生物」、大矢・貝淵監修、細胞工学21、No. 1,　pp37-43.
6. 稲田　仁、森　郁恵 (2002).　研究者は電気線虫の夢を見るか？：線虫C. elegans の
神経発生研究、シリーズバイオサイエンスの新世紀「第11 巻　脳の発生・分化・可塑性」、
御子柴・清水編、日本生化学会編集、pp42-52.
7. 森　郁恵 (2002).　線虫の感覚の分子生物学,　特集「分子を感じる」、森　憲作監修、細胞工学21、No12、pp1448-1452.
8. 毛利亮子、森　郁恵 (2003).　線虫における快と不快：感覚シグナルの受容、統合、学習・記憶の研究から見えること、特集「快と不快の科学」、脳の科学　25,　209-215.
9. 久原　篤、森　郁恵 (2003)．　感覚刺激の受容とそれに対する応答、線虫究極のモデル動物、

飯野・石井編、シュプリンガー・フェアラーク東京、pp101-109.
10. 森　郁恵（2003）．　レーザーによる細胞破壊、線虫ラボマニュアル、三谷昌平編、シュプリンガー・フェアラーク東京、pp49-64.
11. 奥村将年、大河内善史、森　郁恵（2004）．　線虫学習行動の分子遺伝学：温度走性機構、神経回路の機能発現のメカニズム、蛋白質核酸酵素 ▪ 49, ▪ pp444-449.

A04-06 山口 瞬

1. Okamura H., Yamaguchi S., Yagita K., Ishida Y., Matsuo T., Yan L.: Circadian oscillation of mammalian period genes. Zeitgebers, entrainment and masking of the circadian system (edited by Honma K., Hokkaido university press, Sapporo) 89-100, 2001
2. Okamura H., Yamaguchi S., Yagita K., Isejima H., Matsuo T., Masubuchi S., Kobayashi M.: Molecular mechanism of circadian clock in the suprachiasmatic nucleus and cultured fibroblasts. Circadian clock as multi-oscillating system. (edited by Honma K. and Honma S. Hokkaido University Press, Sapporo) pp75-81, 2003

A04-10 塩坂 貞夫

塩坂貞夫編、動くシナプスと神経ネットワーク、金芳堂、2003 年 9 月

A04-13 浜 千尋

1. 粟崎健　浜千尋
ショウジョウバエ Trio は神経突起の伸長を制御する GEF である
実験医学　１８巻７月号　(2000)
2. 粟崎健　浜千尋
神経回路はどのようにして形成されるか---Rho ファミリーGTPase を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)による神経突起の伸長制御
化学と生物　３９巻第２号　２月号　(2001)
3. 曽根雅紀　浜 千尋
ペリアクティブゾーン仮説 -シナプスにおける発生制御領域の存在
細胞工学　２０巻第２号　２月号　(2001)
4. 粟崎健　浜千尋
Rho ファミリーGTPase を介した軸索誘導機構
脳の科学　２４巻　739-745　(2002)

A04-17 飯野雄一

飯野雄一、花澤桃世、「線虫 *C. elegans* とゲノム研究」細胞工学 20(1)、秀潤社 (2001)
飯野雄一、「神経系における MAP キナーゼの機能」蛋白質 核酸 酵素 47(11)、共立出版 (2002)
飯野雄一、「線虫の神経可塑性のメカニズム」CLINICAL NEUROSCIENCE 別冊 21(1)、中外医学社 (2003)

A04-18　窪田 芳之

窪田　芳之　　シナプス結合の 3 次元構造　-GABA 作働性シナプス-, 生体の科学、第５４巻　医学書院 2003 p97-103.

A04-21 曽良 一郎

1. Sora I, Ikeda K, Mishina Y. Receptor knockout and gene targeting - Generation of knockout mice, *in Opioid Research: Methods and Protocols, edited by Zhizhong Z. Pan,* pp205-216. Totowa, NJ (USA): Humana Press. (2003)
2. Ikeda K, Yoshii M, Sora I, Kobayashi T. Opioid receptor coupling to GIRK channel: in vitro studies using a Xenopus oocyte expression system and in vivo studies on weaver mutant mice, *in Opioid Research: Methods and Protocols, edited by Zhizhong Z. Pan*, pp53-64. Totowa, NJ (USA): Humana Press. (2003)

A04-22 上野 照子

1. 小野武年, 上野照子.　第 6 章　認知機能の神経機構 7. 情動　脳神経科学 (Neuroscience) (伊藤正男監修, 金澤一郎, 篠田義一, 廣川信隆, 御子柴克彦, 宮下保司 編集), 753-770, 三輪書店, 東京, 2003.
2. 池本桂子, 上野照子, 石橋一寿, 永津郁子, 西村明儒, 西克治, 小野武年, 西条寿夫, 澁谷治男.　胎

生期ストレスがカテコールアミン(CA)ニューロンの発達に与える影響: 形態学的アプローチ. **脳と精神の医学** 14: 323-330, 2003.

3. Komura, Y., Tamura, R., Uwano, T., Nishijo, H. and Ono, T. Transmodal coding for reward prediction in the audiovisual thalamus. In Cognition and Emotion in the Brain, by T. Ono, G. Matsumoto, R. R. Llinas, A. Berthoz, R. Norgren, H. Nishijo and R. Tamura (Eds.), 383-396, Elsevier, Amsterdam, 2003.

4. Tran, A. H., Tamura, R., Uwano, T., Kobayashi, T., Katsuki, M., Matsumoto, G. and Ono, T. Dopamine D2 receptor-knockout changed accumbens neural response to prediction of reward associated with place in mice. In Cognition and Emotion in the Brain, by T. Ono, G. Matsumoto, R. R. Llinas, A. Berthoz, R. Norgren, H. Nishijo and R. Tamura (Eds.), 493-508, Elsevier, Amsterdam, 2003.

A04-23 少作 隆子

1. Hensch and Fagiolini (Eds.), "Excitatory-Inhibitory Balance", Kluwer Academic/Plenum Publishers, M. Kano, T. Ohno-Shosaku, T. Maejima, T. Yoshida, Endocannabinoid-mediated modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission, p99-109, 2003年

A04-24 加藤 啓子

1) 加藤啓子 てんかんモデルマウスにおける糖鎖変化 (2004) 増刊号 神経糖鎖生物学 蛋白質 核酸 酵素 49:2491-2498 2004年11月 49(15): 2491-2498

2) 加藤啓子 神経可塑性の獲得帰庫における分子生物学的基盤の解明 (2004)三共生命科学研究振興財団 研究報告集 vol.29 2004年11月 20:54-65

3) 加藤啓子、平林義雄 小脳グリア細胞の分化 (2004) 「グリア細胞-その新しい展開」CLINICAL NEUROSCIENCE 中外医学社 ２３巻 in press

A04-26 西 真弓

1. 西真弓、河田光博：FRET- GFP を用いた FRET によるタンパク質-タンパク質相互作用の可視化. 高田邦昭編. 共焦点顕微鏡でデータを出そう一標本製作と観察から発表まで
羊土社、東京: pp 52-59, 2003

2. 西真弓、河田光博：LSM510META を用いた Emission Fingerprinting 法- マルチスペクトル共焦点レーザー顕微鏡がひらく多重蛍光観察. 高田邦昭編. 共焦点顕微鏡でデータを出そう一標本製作と観察から発表まで
羊土社、東京: pp 52-59, 2003

3. 西真弓、河田光博：GFP を用いて分子の動態をみる. 日本組織細胞化学編. 組織細胞化学、学際企画、東京: p 183-189, 2004

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

工業所有権など取得の件数　３７件

A01-10 稲垣　直之

１．神経成長円錐局在分子Shootin1 もしくはそのスプライシングバリアントを利用した神経軸索の形成・伸長と神経再生への応用、稲垣直之、島田忠之、鳥山道則、小原收、長瀬隆弘、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所、特許出願番号：特願2004-235708、特許出願日：平成１６年８月１３日

２．Axon formation and elongation employing nerve growth cone localized molecule shootin1 or its splicing variants, and applications for nerve regeneration.　N. Inagaki T. Shimada M. Toriyama O. Ohara　T. Nagase, Nara Institute of Science and Technology Kazusa DNA Research Institute. 国際出願番号：PCT/JP2005/未定平成１７年２月１０日

A02-01 澁木　克栄

１．澁木克栄、工藤雅治、（権利者名）新潟ＴＬＯ、（工業所有権の種類）特許、２００４年９月６日出願（工業所有権の名称）学習機能障害評価方法、及びその学習機能障害評価用装置

A02-05 伊藤　誠二

１．伊藤誠二(他２名) 蛋白質のプロセッシングを測定するためのモニター蛋白質(特許出願 2002-360744)

２．近江谷克裕、芦高恵美子、伊藤誠二　分泌型キメラタンパク質（特許出願 2002-261229)

３．伊藤誠二（他６名）膜結合型グルタチオン非特異的 PGE 合成酵素（特許出願 2001-383226)

４．芦高恵美子、伊藤誠二、石山幸一、大崎博功　知覚過敏抑制ペプチド類（特許出願 2000-171386)

A02-07 田中　光一

１．発明の名称：グルタミン酸トランスポーターGLAST 機能欠損マウス
出願番号　：特願 2003-114793

A02-08 玉巻　伸章

１．玉巻伸章（特願）平成　16 年　3 月 31 日
発明の名称：大脳皮質グルタメイト作動性神経細胞およびそれ自身（大脳皮質グルタメイト作動性神経前駆細胞）のみを生体内において生み出す大脳皮質グルタメイト作動性神経前駆細胞
２．玉巻伸章（特願 2003-042253）平成　15 年　2 月　20 日
発明の名称：GABA 作動性神経細胞のみを生み出す前駆細胞の分離方法
３．玉巻伸章（特願 2003-019440）平成　15 年　1 月　28 日
発明の名称：大脳皮質または大脳基底核原基由来の神経幹細胞及び前駆細胞の分離
４．玉巻伸章（特願 2001-1904）平成　13 年　1 月　9 日
発明の名称：神経細胞再髄鞘化のための移植用細胞キット

A02-15 八尾　寛

１．遺伝子改変動物を用いた生体開口放出の計測方法，そのためのヘテロ動物特許，八尾　寛，柳川右千夫，宮崎純一，石塚　徹，荒木力太，特願 2004-106661（2004 年 3 月 31 日出願）

A02-19 井上　貴文

1．特願 2004-309686
工業所有権の名称：IP_3指示薬
発明者：御子柴克彦、松浦徹、道川貴章、井上貴文
出願人：独立行政法人理化学研究所、独立行政法人科学技術振興機構
出願日：平成 16 年 10 月 25 日

A02-25 高田　昌彦

１．名称：超音波ドップラー法を応用した脳機能解析方法及びその脳機能解析
発明者名：畑中伸彦、徳野博信、高田昌彦、南部　篤
権利者名：財団法人東京都医学研究機構、独立行政法人科学技術振興機構
出願年月日：平成 13 年 9 月 10 日

内容：経脳硬膜超音波ドプラー法を用いて脳の血行動態を直接モニターし、賦活化された領域を解剖学的に同定する、新しい脳機能イメージング法の開発

A03-02 白尾 智明

1. 白尾智明、児島伸彦、山崎博幸、関野祐子、花村健次 「シナプス成熟障害モデル動物」 科学技術振興事業団:特願2004－257060 平成16年9月3日
2. 山崎博幸、関野祐子、白尾智明「樹状突起スパイン移行配列」科学技術振興事業団:特願2004－145707 平成16年5月14日
3. 白尾智明、金明鎬「s－ドレブリンA」科学技術振興事業団: 特願2001－380662 平成13年12月13日
4. 白尾智明、佐治真理、関野祐子、小林利佳「ドレブリンA発現抑制動物神経細胞及び非ヒトモデル動物」 科学技術振興事業団:特願2001－339652 平成13年11月5日
5. 発明者:白尾智明、関野祐子、田中聡一「ドレブリンA発現抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド」科学技術振興事業団:特願2001－107694 平成13年4月5日

03-06 山形 要人

1．現在、一件申請準備中。

A03-11 金保安則

1．工業所有権の名称：アレルギーマウス
発明者：金保安則、佐々木雄彦、佐々木純子、米川博通、松岡邦枝
権利者名：財団法人 東京都医学研究機構
工業所有権の種類：特許
番号：特願２００４－２９２１２３
出願年月日：平成１６年１０月６日（特許出願中）

A03-12 崎村 建司

1．特許出願：「近交系マウスC57BL/6由来生殖系列細胞分化能を有するES細胞株及び該細胞株を用いたキメラマウス」 発明人：崎村建司 特願2002-310328 出願年月日： 平成14年10月24日

A03-17 加藤 伸郎

1．特開 2003-335666 過興奮している神経細胞を特異的に抑制する薬剤

A03-28 中井 淳一

1．「緑色蛍光蛋白質の蛍光強度を効率的に制御する方法と緑色蛍光蛋白を用いたバイオセンサーの遺伝子の開発」中井淳一，2000 年． 2004 年 6 月米国における特許が認められた。

A03-51 佐藤 真

1．細胞移動調節及び細胞死調節機能を有するタンパク質、出願中

A04-05 森 郁恵

1．線虫C. elegans における精神疾患脳機能障害関連現象の解析方法（国内、外国特許出願中）

A04-06 山口 瞬

1．特許出願番号：特願 2000-213334
発明の名称：ピリオド１遺伝子のプロモーターを含む DNA、及び該 DNA が導入された非ヒト哺乳動物、並びに遺伝子発現量の観測システム、及び遺伝子発現法の観察方法
発明完成の日時：平成 12 年 7 月 13 日

A04-09 程 肇

1．出願番号：PCT/JP00/08127
発明者：程 肇、榊 佳之、山崎 晋、阿部 倫一、高橋 利一、Michael Menaker
発明の名称：TRANSGENIC MAMMALS INTRODUCED A PERIOD 1 PROMOTER THAT CONFERS RHYTHMICAL EXPRESSION
出願人：Univ Virginia Patent Found
出願日：2003. 3. 5

A04-10 塩坂 貞夫

1. 特許願 2004-073 625 ポリマー膜を用いたSemi-dry法によるプロテアーゼ活性測定法
2. 特開平 11-318461 ヒトニューロプシン、そのＤＮＡ配列、その遺伝子、及びそのプライマー
3. 特開平 08-311099 ニューロプシン、ＤＮＡ、組換え発現ベクター、形質転換体及びニューロプシンの製造法
4. 特開平 08-245700 ニューロプシンに対する抗体（商品化済）

A04-12 渡邉 和忠

１．脳高次機能障害を有する非ヒト動物及びその製造方法
発明者：渡邉 和忠、深間内 文彦、浅野 雅秀、岩倉 洋一郎
権利者、科学技術振興事業団
番号：特開 2003-088271
出願年月日：平成１３年５月２日
取得年月日：平成１５年３月２５日

A04-17 飯野 雄一

１．「mRNA回収方法」、発明者：飯野雄一・國友博文、特願2001-157359、出願日：平成13年5月25日

A04-21 曽良 一郎

１．曽良一郎，池田和隆、井手聡一郎（2004）ミューオピオイド受容体遺伝子解析による薬物感受性の評価方法[出願]特許庁，特願 2004-106136

A04-24 加藤 啓子

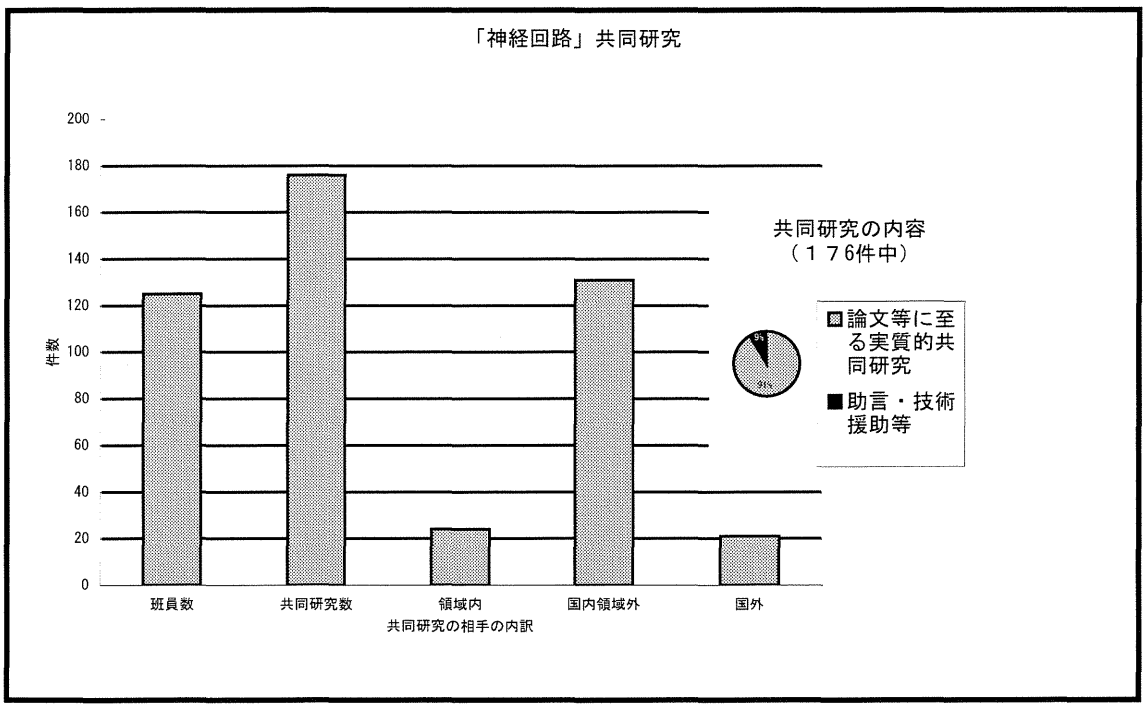
１．工業所有権の名称：脳内物質の回収装置
発明者名：　加藤啓子
権利者名：奈良先端科学技術大学院大学
工業所有権の種類、番号：特願 2003-380832
出願年月日：2003 11 11

共同研究

共同研究総数；　１７６件

総班員数を、報告書を提出した１２９名（計画２１＋公募総数１０８）とした場合、１班員当たりの共同研究は１．４件。
内訳は、領域外研究者との共同研究；１５２件(86.3%)、領域内；２４件(13.6%)。

個々の共同研究の詳細は、それぞれの班員の報告書に記載の通りである。
多くの共同研究(91%)が、論文等に至る実質的な共同研究であった。



研究成果の報告

研究成果の概要

班員の研究成果報告

研究成果の概要

研究項目 A01「神経回路による特徴抽出のメカニズム」(班長:大森治紀)

研究項目 A01 では５名の計画班員、および総数では１９名の公募班員により、神経回路の特徴抽出および情報統合の様々なはたらきを明らかにした。

(1)聴覚系:硬骨魚後脳の分節に繰り返される形態学的に相同な一群の網様体脊髄路ニューロンが，聴覚神経から共通に投射を受けながら，カリウムチャネルの発現と局所回路の違いによって異なる興奮性を持つことを明らかにし，逃避運動の発現にそれぞれ特徴的な役割を果たすことを明らかにした（小田)。視床ニューロンへのシナプス伝達および神経回路特性を調べ、これらの回路機構へのペプチドによる神経修飾作用を解析した。ペプチドがニューロンのCa^{2+}チャネルや自発放電特性などを修飾する機構を、魚類脳スライスを用いて明らかにした（岡)。トリの聴神経核を用いて音圧情報および時間情報の抽出、および時間差の検出回路を解析し、個体の発達過程で特徴抽出が尖鋭化する事、シナプス終末の形態、シナプス電流、神経細胞の膜興奮性が協調して時間揺らぎを最小にする事、およびシナプス電位を加速する事で左右音情報のﾏｲｸﾛ秒に至る時間差識別が可能になる事を明らかにした（大森)。聴覚中継路である外側上オリーブ核細胞において、神経細胞内Cl^-くみ出し分子であるK^+-Cl^- 共役担体（KCC2）の発達発現増加にともない、GABAの作用が脱分極性（しばしば興奮性）から抑制性に変化する。この変化は発達期における聴覚依存性の神経入力活動に依存する事を明らかにした（鍋倉)。大脳皮質一次聴覚野において、純音刺激に対して等周波数帯と呼ばれる帯状の領域が活動するが、局所的に引き起こされた大脳の活動が皮質の内在性神経回路によって等周波数帯全体を自律的に伝播することを明らかにした（宋)。鳥類では有毛細胞の損傷再生の後に神経細胞との接続が再生する可能性が形態的研究から示されている。しかし機能的接続は未確認である。本研究では有毛細胞と神経細胞の成長円錐部が機能的伝達を行えることを明らかにした（辰巳)。

(2)嗅覚系:嗅覚受容体遺伝子の発現制御に関与する DNA 領域を同定すると共に、相同性の高い嗅覚受容体遺伝子を発現する嗅細胞は嗅球上の局所的な糸球ドメインに軸索投射する事、及び、嗅上皮における嗅覚受容体遺伝子の発現領域が嗅球上での背腹軸に沿った大まかな投射位置を規定している事を明らかにした（坪井)。1) 嗅覚二次神経細胞の軸索が、発生ステージにしたがって嗅索内で秩序だって配置されていることを明らかにした。2) 活動依存的神経回路モデルを用いて嗅神経投射のシミュレーションを行い、様々な実験結果の説明が可能であることを示した。3) 膜タンパク質 M6a が軸索伸長に関与する事を明らかにした（平田)。

(3)視覚系:網膜神経節細胞群の周期的同期スパイク発火は、逃避行動の誘発に必須な情報を脳に送っていること、更に、網膜双極細胞の$GABA_C$受容体や錐体視細胞の代謝型グルタミン酸受容体は、グルタミン酸放出のフィードバック制御に関わっていることを明らかにした（立花)。大脳皮質視覚野の興奮性シナプスにおけるNMDA受容体依存性と非依存性の 2 種類の長期増強は、共に視覚反応の可塑性と同様な年齢と視覚体験に対する依存性を示すことを明らかにした。この結果は、これらのシナプス可塑性が視覚野の経験依存的機能発達に寄与することを示唆した（小松)。大脳皮質における情報処理の統合メカニズムを解明する目的で、視覚野ニューロンの応答が受容野外の広範囲に呈示した刺激によりどのように修飾されるのかを調

べる事により、視床-皮質間の双方向性結合が、皮質ニューロンの出力を合目的的にコントロールしている.ことが示唆された（佐藤宏道）。初期視覚野の細胞は、テクスチャー刺激と明るさで定義される刺激に対する両眼視差選択性が同一であるという「手がかり不変性」を持つことを示し、２種の信号の両眼統合の仕組みを特定した。また、周波数領域での逆相関法を利用した新計測法の精度と計測時間の実験的評価を行った（大澤）。霊長類の下側頭葉皮質TE野の抑制性細胞を同定し、その視覚反応性を調べた。抑制性細胞も視覚刺激により活動し、近傍の標的細胞に対して、刺激に依存した抑制を与えることで、TE野細胞の選択的反応性の形成に貢献することを明らかにした（藤田）。視覚情報から運動情報への変換過程において、前頭連合野のニューロン集団における情報表現の変化を調べたところ、視覚刺激が呈示される視野内の位置の違い、行われる眼球運動の方向の違い、あるいは課題の進行に伴って活動の分布パターンが変化することを明らかにした（船橋）。

(4)運動系:サッケード眼球運動など指向運動の制御中枢である中脳上丘の局所神経回路をスライス標本と個体レベルで研究した。運動出力層でのバースト発火生成機構とその修飾メカニズム及び層間の信号伝播機構とその機能的意義、浅層での動きの検出に重要な樹状突起での信号処理機構を解明した（伊佐）。静止および移動刺激に対して、上丘・脳幹網様体ニューロンの反応様式を調べ、移動刺激に対して上丘浅層から中間層のニューロンの間で刺激の速度情報が指向運動の振幅情報に変換されること、および脳幹網様体で更にこれが指向運動の振幅の予測に変換される機構を明らかにした（佐々木成人）。

(5)大脳皮質:直接路・間接路という２大線条体出力系以外に、Neuorkinin B 産生ニューロンから成る第３の線条体出力系を明らかにした。この出力系は特異的に無名質に投射し、Neurokinin B 受容体を発現しているGABA 作動性無名質大脳皮質投射ニューロンを脱分極することにより、大脳皮質に影響を与えると考えた（金子武嗣）。定量的な形態的パラメーターから特定した大脳皮質の介在ニューロンは周期活動中においても固有の発火様式をとることを明らかにした。また皮質回路のシナプス構成として、軸索分枝・シナプスブトン形成の確率分布パターンを介在ニューロンごとに決める事ができた（川口）。

(6)回路の発達と形成:大脳皮質視覚野では、片眼視覚遮断により脳由来神経栄養因子が減少し、またその下流で働くとされるERK1/2の活性化が減弱した。さらに、発達期にのみ活性化ERK1/2の核への移行が観察された。従って、発達期の可塑性発現にはERK1/2の核移行によるシグナルが関与する可能性が考えられた（畠）。滑車神経軸索が中脳後脳境界に誘導される分子機構を調べ、滑車神経軸索と背側峡部に発現するneuropilin-2と、Sema3Fを含む中脳に存在するneuropilin-2リガンドの相互作用が、境界に沿った軸索誘導に重要であることを明らかにした（渡邉　裕二）。高感度プロテオーム解析法を独自に開発して神経細胞の軸索および樹状突起に濃縮する分子群を網羅的に検出し、軸索に濃縮する82個のタンパク質スポットの同定に成功した。また、軸索局在分子の中に新規神経極性形成分子shootin1を見出し、その機能解析を行った（稲垣直之）。

研究項目 A02[シナプス可塑性による回路調節](班長:澁木克栄)

研究項目A02 では以下の研究がなされた。大脳では、感覚野可塑性の機能を研究するため、フラビン蛋白蛍光を用いた脳機能イメージング法を開発した。この方法を用いてテタヌス刺激による体性感覚野応答の増強や、弁別学習に伴う体性感覚野応答の抑圧を見いだした。またマウス脳活動の経頭蓋的イメージングに成功した(新潟大・澁木)。運動学習である到達運動のプリズム適応に、サル脳内のどの神経回路が関わっているかを解析した。その結果、到達運動に必要な座標変換が大脳運動前野腹側部で行われること、この領域の変換系を担う神経回路が小脳の入力をもとに動的に変化することを明らかにした(弘前大・蔵田)。視床刺激に対して、ニコチン投与は皮質内の広範な促通効果と4層にバレル構造状の抑制領域を惹起した。この抑制はGABA細胞への視床終末に作用したものと思われる。視床終末の放出確率は高、低2種あり臨界期のサイレントシナプスへは高いものがシナプスしている可能性がある(阪大・木村)。大脳皮質において、$GABA_B$シナプス前抑制系は、機能円柱内で垂直方向に広がることが明らとなった。この$GABA_B$シナプス前抑制系は、同一機能円柱内では共通興奮性入力の同期化に寄与するが、隣接する機能円柱間では、むしろ、共通興奮性入力の脱同期化に寄与することが明らかとなった(阪大・姜)。経脳硬膜超音波ドプラー法を用いて脳の血行動態を直接モニターし、運動課題を遂行中のサルから賦活化された大脳皮質や大脳基底核、視床の領域を解剖学的に同定、その活動変化を経時的に観察する、新しい脳機能イメージング法の開発に成功した(東京都神経研・高田)。

海馬では以下の研究がなされた。記憶・学習障害改善薬開発研究の一環として、肝細胞増殖因子に優れた作用があることを見出した。また、海馬CA3 野におけるヘテロシナプス可塑性、基底外側扁桃体の活動レベルによる歯状回シナプスのメタ可塑性の機構についても解析した(東大・松木)。海馬ニューロン群の定量解析を進め、各領野・層の長軸方向でのニューロン構成の差異を明らかにした。また、mossy cellの電気的性質が長軸方向で異なることを明確にした。嗅球ではギャップ結合・シナプス等のニューロン相互関係の形態学的解析を進め、糸球体特異的な同期活動に対応するギャップ結合を明確に示した(九大・小坂)。海馬苔状線維シナプスでみられるシナプス前性長期増強の発現機構について解析し、シナプス前終末へのカルシウム流入量は変化しないことを明らかにした。また、海馬苔状線維終末にはリアノジン受容体が存在し、シナプス前終末内カルシウム動態を制御することを見出した(北大・神谷)。Ca^{2+}感受性蛍光デキストラン法を開発し,海馬スライスにおける苔状線維シナプス前終末において、Nタイプ、P/Qタイプ、Rタイプ、Lタイプの 4 種類のCa^{2+}チャネルサブタイプを同定し、シナプス前終末における機能を比較した。サブタイプの分布は終末ごとに大きなばらつきを示した(東北大・八尾)。海馬CA1 領域における長期増強誘導、維持の機構を明らかにした。長期増強誘導には、CaMKII活性化反応が強く関与していた。長期記憶のモデルである長期増強維持機構には、遺伝子発現の増強が必要であり、CaMKIV、MAPキナーゼ(MAPK)活性化反応が明らかになった。さらに遺伝子発現の増強がみられた(熊本大・宮本)。胎生期ラットのエストラジオール投与は生後海馬長期増強の形成能を促進した(山形大・伊藤)。2光子励起法によるケイジドグルタミン酸の活性化によって、海馬錐体細胞の単一スパインにおいて機能的および形態的可塑性を誘発した。その結果、機能増強と形態増大が非常によく連関するとともに、大きいスパインは安定で、小さいスパインは変化し易いことを見出した(生理研・松崎)。

小脳では以下の研究がなされた。マウス小脳の登上線維—プルキンエ細胞シナプスをモデルとして、生後発達に伴う過剰なシナプスの除去と機能成熟との関連を明らかにした。この過程に、I 型インシュリン様増殖因子、グルタミン酸受容体δ2 サブユニット、P/Q 型カルシウムチャネルが関与することを明らかにした(金沢大・狩野)。NO-cGMP-PKG-G-substrate 系がプルキンエ細胞において AMPA 受容体の分布変化を介して小脳長期抑圧(LTD)に関与することを明らかにし、さらに、G-substrate 遺伝子欠損マウスにおいて、長期記憶が特異的に障害されることを明らかにした(理研・遠藤)。覚醒サルを用い、サッケード運動学習中に小脳室頂核ニューロン活動が変化すること、及び学習履歴によりサッケード運動学習が加速されることを明らかにした(筑波大・岩本)。小脳プルキンエ細胞樹状突起においてカルシウム流入機構は平行

線維入力により局所的に非常に大きなカルシウム上昇をもたらすことを見いだした。カルシウム放出機構は小脳皮質の発達時期に亢進しておりシナプス可塑性を制御していることを見いだした（東大・井上)。小脳失調症等の神経症状を示すカルシウムチャネル変異マウスを材料とし、主に電気生理学的手法を用いてシナプス伝達を中心に神経症状発症や代償のメカニズムに関する検討を行った。神経症状の多様性は、異なる神経細胞が異なる分子サブタイプ依存性・代償作用等を示すことによると考えられる(生理研・井本)。小脳プルキンエ細胞と平行線維間シナプスで、代謝性グルタミン酸レセプターを介する細胞内カルシウム放出と細胞膜からのカルシウム流入が起きた（京大・武地)。

脊髄・視床では以下の研究がなされた。ノックアウトマウスを解析した結果、タンパクのリン酸化と遺伝子発現誘導がアロディニアに伴う神経可塑性に関与するが、グルタミン酸遊離増大、NMDA 受容体の活性化、NOS 活性化の一連のメカニズムが共通機構であることを見いだした。また NOS 活性の機能的可視化に成功した（関西医大・伊藤)。骨粗鬆症モデルである卵巣摘出ラット脊髄膠様質細胞から in vivo パッチクランプ記録を行い、エストロゲンの減少により C 線維終末の 5-HT 受容体の脱落が起こり痛覚過敏が惹起されること、また、カルシトニンは 5-HT 受容体の数を回復し鎮痛作用を示すことを明らかにした（九大・吉村)。体性感覚を中継するマウス視床 VB 核において第 1 次体性感覚野からの feedback 投射（皮質視床路）の生理的意義とシナプス特性、またそこに関わる分子について調べた。皮質視床路シナプスを介した代謝型グルタミン酸受容体 1 型(mGluR1)シグナルが炎症性疼痛の coding に重要であることを明らかにした(生理研・宮田)。脊髄視床路ニューロンには HCN チャネルが発現し、抑制性シナプス入力による膜電位過分極がこれを活性化した（生理研・籾山)。In vivo と脊髄スライス標本からシナプス応答を記録し、炎症に伴い脊髄痛覚回路に如何なる可塑的変化が惹起されるか解析した。炎症初期に興奮性入力が著明に増大した後、非侵害情報を伝える A デルタ線維の単シナプス性入力が痛覚回路で観察された。この可塑性発現に脳由来神経栄養因子が関与した（九大・古江)。侵害刺激受容体であるカプサイシン受容体 TRPV1 の制御機構（感覚神経終末レベルでの可塑性）の分子メカニズムを明らかにした。TRPV4 が新たな温度受容体であることを明らかにした。新規温度受容体を発見した（岡崎統合バイオサイエンスセンター・富永)。

その他以下の研究がなされた。アストロサイトのグルタミン酸トランスポーターは、細胞外グルタミン酸濃度を制御することにより脳の発生に関与するだけでなく、神経活動のセンサーとして働き、神経細胞の活動上昇に伴うエネルギー補給に重要な役割を果たすことを明らかにした（医歯大・田中)。樹状突起の主要細胞骨格を成す微小管の配置は、様々な分子の調節を受ける。形態調節の役割を担う分子の候補として MAP2 の低分子 splicing variants (SV)を想定し、新規 SV の探索とその働きを調べた（熊本大・玉巻)。代謝型グルタミン酸受容体のリガンド感受性が scaffold 蛋白質 Homer1c の結合により変化することを見いだした。また、リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の動的構造変化を FRET 法により解析し、2 量体間の配置が変化することを明らかにした（生理研・久保)。エンドサイトーシスの分子機構解析のための in vitro 実験系を確立した。また神経内分泌細胞を用いて AMPA 型受容体のエンドサイトーシスを解析した（岡山大・竹居)。線虫を用いて、JKK-1 MAPKK と JNK-1 MAPK からなるキナーゼカスケードが、足場タンパク質 UNC-16, UNC-14 およびキネシンとともにシナプス小胞の軸索特異的局在を制御することを見いだした（名古屋大・久本)。グループ 1 mGluR に結合する蛋白タマリンを同定することにより、受容体の輸送、局在及び情報伝達機構についての新規メカニズムを発見した（京大・中嶋)。神経回路網形成には神経活動に依存した細胞体から神経突起の先端部への物質の供給が不可欠である。神経活動依存的な小胞輸送過程に関与する分子の候補としてシナプトタグミン 4 を同定し、その機能解析を行った（理研・福田)。線条体コリン作働性インターニューロンを特異的に破壊すると、急性期には線条体黒質路と線条体淡蒼球路がそれぞれ興奮・抑制する。慢性期には線条体のドーパミン受容体が減少してこの変化が代償され、基底核神経回路では異なる神経伝達物質間でも代償機構が働くことを示した（京大・金子）

研究項目 A03「神経回路網形成の分子基盤」(班長:野田　亮)

研究項目 A03 では、枢神経系の形態形成に至る各段階に関与する分子の発見と機能解析を、様々な実験系を用いて進めた。以下に成果の概要を述べる。

1)　神経幹細胞と機能分化

ショウジョウバエを用いた研究によって、神経細胞の多様性生成における Seven-up の役割（広海)、神経幹細胞における時間と転写因子発現を結び付ける機構（一色)、視覚認知に関わる dve の機能（中越）などを明らかにした。また、ゼブラフィッシュにおける Hedgehog の作用機構を解析した（川上)。

2)　突起伸長

細胞膜や細胞骨格の制御に関わるリゾフォスファチジン酸（福嶋)、LIM-kinase-1/Slingshot-1（水野)、Sema4D/PSD-95 およびSema4C/SFAP75 系（稲垣)、RhoG/Elmo/Dock180 およびSema4D/Plexin-B1/R-Ras/Rnd1 系（根岸)、DNER（見学)、Rac1, 3（饗場)、mDia/DIP/Pax6 系（富永）などの培養細胞や個体レベルでの機能解析を進めた。また、ショウジョウバエとラット脳スライスにおいて７回膜貫通型カドヘリンが、樹状突起および軸索の伸長や、いったん伸長した突起の維持に重要な役割を果たすこと（上村)、また哺乳類においてFEZ1/UNC-76 が、PKCζ, DISC1, actin, kinesin, tubulin等と相互作用してミトコンドリア等のオルガネラを軸策先端へ輸送すること（黒田）などを見出した。さらに、成長円錐からシナプスへの転換にはCaMKII／syntaxinを介したCa^{2+}濃度検知が重要であることを示した（五十嵐)。

3)　軸索ガイダンス

新たなガイダンス分子として、D unit コンドロイチン硫酸を見出した（一條)。また、線虫におけるセマフォリン／プレキシン系の役割（高木)、マウス嗅覚系感覚地図形成（谷口）やゼブラフィッシュ運動神経成長円錐の停止（東海林）における Sema3A の役割、セマフォリン・シグナルの伝達に関わると考えられる CRMP の構造的・機能的多様性（野田昌晴）や翻訳系への作用（柳)、マウス交連神経の誘導における Math1／MBH1 転写因子カスケードの役割(齋藤)、ゼブラフィッシュにおける軸索屈曲機構(八田)、ショウジョウバエ bZIP 型転写制御因子 Apontic/Trachea defective およびコアクチベーターMBF1 の中枢神経系および気管回路網形成における役割（広瀬）などを明らかにした。

4) スパイン／シナプスの形態形成と成熟

フィロポディアからスパインの変化に際して神経特異的アクチン結合タンパク質ドレブリンが先導的役割を果たすこと（白尾)、持続性 LTP におけるシナプス/スパイン形態変化の重要性（井ノ口)、また神経突起リモデリングにおいてリン脂質代謝酵素 PIP5K および PLD2 がそれぞれ反発応答および誘引応答に関与すること（金保）などを明らかにした。後シナプス肥厚構成分子 S-SCAM、MAGUIN、BEGAIN、SAPAP（畑）や PSD-Zip-45、PSD-Zip-90（祖父江）などの分子間相互作用も解明した。さらに、ショウジョウバエ capricious タンパク質の神経筋認識過程および視神経投射における役割を明らかにした（能瀬）。

5) シナプス機能

NMDA 型受容体のシナプスへの移行には GluR・（NR2）サブユニットが必須であること、また Stargazin タンパクが AMPA 型受容体活性を直接調節することを見出した（崎村)。海馬における神経活動依存的に発現する遺伝子の探索から arcadlin を同定し、N-cadherin のエンドサイトーシスに関わることを明らかにした（山

形)。さらに大脳皮質錐体細胞における新たな細胞内カルシウム放出機構の存在を明らかにした（加藤)。

6） 脳の層構造・領野形成

神経細胞配置制御因子リーリンは、二量体を形成し、細胞内アダプター分子 Dab1 を細胞膜上のマイクロドメインに移行させてそのシグナルを伝達すること（仲嶋)、またラット大脳皮質 4 層の unc5h4、辺縁系の ephrin-B3、視床軸索の T-cadherin などが視床皮質投射の制御に関与すること（山本）を明らかにした。ラット小脳皮質においては、aldolase C の縦縞状発現パターンと下オリーブから小脳への登上線維の投射パターンとの密接な関係を二重染色法により同定し、５グループからなる小脳の機能区画を明らかにすることができた（杉原)。大脳皮質興奮性神経細胞特異的ノックアウト・マウスを用いた実験から、NMDA 受容体 とアデニル酸シクラーゼ１の、マウス体性感覚野のバレル形成における役割を明らかにした（岩里)。また、Otx1 欠損マウスにおいては、脳領野発達の異常、視覚野 GABA 性神経細胞数の減少などを見出した（佐藤)。

7） 新たな技術

C57BL/6 由来 ES 細胞を用いた部位時期特異的遺伝子組換え法の実用化（崎村)、ショウジョウバエにおけるジーンチップの応用（能瀬）や味覚神経の標識（中村）、スライス培養系におけるシンドビス・ウイルス・ベクターによる遺伝子導入（野田亮）、単一細胞由来 cDNA を用いたサブトラクション・スクリーニング（中川)、*in vivo* electroporation（塩見健輔、斉藤）、GFP を用いた Rho/結合タンパク質相互作用検出系およびグルタミン酸受容体センサー（中井)、１分子観察（佐甲）などの新技術も積極的に開発あるいは導入された。

8） 新たな現象

膜結合型マトリックス・メタロプロテアーゼ制御因子 RECK が、神経管の形成に必須であること（野田亮)、変態期のショウジョウバエにおける神経回路崩壊がグリア細胞による軸索分岐の貪食により生じ、この過程には *drpr*、*ced-6* 遺伝子が必須であること（栗崎)、転写抑制因子 Id2 欠損マウスが多動、注意障害、記憶障害、嗅球の狭小化などを示すこと（横田)、受容体様分子 DNER 欠損マウスが運動協調性の低下を示すこと、また DNER はグリア細胞におけるグルタミン酸輸送体の発現を誘導すること（竹島)、脆弱Ｘ症候群で機能欠損が見られる FMR1 が、ミトコンドリア局在型糖代謝関連因子の修飾制御に関わり、神経系や生殖腺で特異的に発現する交尾制御因子 lingerer と small RNA を介して複合体を形成すること（塩見美喜子）などを明らかにした。

研究項目 A04「学習と行動の分子メカニズム」(班長:山森哲雄)

研究項目 A04 では、学習行動の分子機構解明の為、以下の 4 つの柱を中心として研究を行い、げっ歯類での学習や行動を制御する分子の同定や機能解析を中心としながら、線虫の連合学習制御因子の解明から霊長類の大脳皮質領野特異的に発現する遺伝子の解明に至るまで、幅広い研究成果をあげた。

1) 学習行動に関与する遺伝子とその機能。

げっ歯類行動システム (Wheel running system と視聴覚弁別課題) の開発・改良と遺伝子発現を指標とした脳内情報処理過程の解明を行った (山森哲雄:平12ー16)。Fyn 欠損雌マウスにおけるほ乳行動異常の解析し、ヘキサナールの効果を明らかにした。また、Fyn 結合分子群として得られた CNR/プロトカドヘリンの神経回路形成過程での発現制御を明らかにした (八木健:平成12ー16)。海馬以外での CaMKIV/CREB 依存的転写の意義を初めて解明した。更に、CREB 機能を修飾し得る新規キナーゼを単離し、CREB 下流の Arc 蛋白のシナプス機能に関する知見を得た。また Rho/ROCK/LIMK 経路の突起形成への寄与を証明し、神経活動に伴うスパイン内アクチン再編成を可視化した (尾藤晴彦:平12ー16)。キンカチョウの歌中枢における CREB 活性化は、言語認識の指標となる可能性があることを示唆した。またキンカチョウ脳からグルタミン酸受容体21種類をクローニングし発現パターンを調べたところ、音声学習を制御する神経回路において特異な発現を示し、vocalization の複雑性との相関が認められた (萩原正敏:平12ー14)。「におい」の嫌悪学習成立の神経機構の一つである嗅球内シナプス可塑性への MAPK-CREB カスケードの関与、長期増強現象が NMDA 受容体に依存せずノルアドレナリンによって促進されることを明らかにした (奥谷文乃:平15ー16)。キンドリング形成過程でおこる異常なシナプス強化や長期増強でおこるシナプス強化に関連しているニューロプシンの機能解析を行い、ニューロプシン欠損マウスに於ける非対称性シナプス数の有意な減少、海馬においてこれまでの研究においては見出されていなかった L1 の前シナプス膜への局在を見出した。さらに、ニューロプシンを欠くマウスではシナプス接着が形成されにくく、未熟型 L1 シナプスが蓄積されることを示唆した (塩坂貞夫:平12ー13)。ショウジョウバエの Rho ファミリーGTPase 活性化因子 Trio と SIF がそれぞれ軸索伸長とシナプス成長を制御していることを明らかにした (浜千尋:平12ー14)。

時計遺伝子を用いたトランスジェニックマウス作成により、単一細胞レベルでリズムを観察できる系の開発し、遺伝子発現のリアルタイム・モニタリングに成功した。その系を用いて、視交叉上核の個々の神経細胞が、約24時間周期のリズムを作り出し、それらが視交叉上核内で統合されるメカニズムを明らかにした。(山口瞬:平12ー16)。時計遺伝子 Perl のプロモータと luciferase の融合遺伝子を導入した動物を用いて、時計中枢及び末梢が光同調過程で脱同調すること、並びに同調に機能する Perl プロモータの配列を見いだした。(程肇:平12ー16)。

胎生期ストレス負荷ラットにおける感情・学習障害機構の解明を行った (上野照子:平成15ー16)。神経活動により発現変化するシアル酸転位酵素の解析を行った (加藤啓子:平成15ー16)。イムノトキシン細胞標的法を用いたストレスの脳に対する影響の解析を目指して、ネスチンのプロモーター/エンハンサーの構築を用いて IL-2R/GFP を発現するトランスジェニックマウスおよびコルチコステロイドレセプターのプロモーターの下流に GFP を発現するトランスジェニックマウスを作成し、その解析を開始した(西真弓:平15ー16)。

2) 伝達物質受容体の機能

海馬での長期増強の起こりやすさの生後変化に符合して、NMDA 受容体のチロシンリン酸化が増加すること、及び、NR2B (GluR・2) サブユニットの 1472 番目のチロシンが最も強くリン酸化され、そのリン酸化

がシナプス可塑性と学習において重要な役割を果たすことを明らかにした(真鍋俊也:平１２ー１６)。NMDA型およびδ型グルタミン酸受容体(GluR)サブユニットの遺伝子欠損マウスを作成し解析することにより、分子的に多様なGluRサブユニットが記憶・学習、反射制御、行動制御において異なる機能を担うことを見出した（森寿：平成１２ー１４)。NMDA 型およびδ型グルタミン酸受容体(GluR)サブユニットの遺伝子欠損マウスを作成し解析することにより、分子的に多様なGluRサブユニットが記憶・学習、反射制御、行動制御において異なる機能を担うことを見出した（渡邊和忠：平１２ー１４)。カルシウム結合蛋白カルビンジンは、カルシウム透過型AMPA受容体の機能発現を促進し、そのAMPA受容体を介したカルシウム流入によって核に移行しCREBのリン酸化を促進することを示唆した（岡戸晴生：平１２ー１６)。培養海馬ニューロンを用い、(1) Gq共役型受容体の活性化と脱分極が同期することにより多量の内因性カンナビノイドが放出されること、(2) この現象に内因性カンナビノイドの生成の律速酵素であるPLCβ1が同期性検出器として働いていることを明らかにした。(小作隆子：平１５ー１６)。報酬回路は従来、ドーパミン神経系が中心的な役割を担うとされてきたが、他のモノアミンやオピオイド神経伝達が複雑に関与する機構であることを示唆した（曽良一郎：平１５ー１６)。

３）線虫行動の分子機構

線虫の温度走性を行動パラダイムとして、温度受容や行動の可塑性に重要なシグナル分子を明らかにし、温度走性の神経回路および構成要員である神経細胞の活性が行動をどのように制御しているかについて、新しい知見を得た（森郁恵：平１５ー１６)。線虫の化学走性における学習のアッセイ系を確立し、この学習に分泌蛋白質HEN-1とインスリン経路が必要であることを明らかにした。線虫のインスリン様分子INS-1は介在神経AIAから分泌され、右側の感覚神経ASERに働きかけ、PI3キナーゼの活性を通して線虫の化学走性行動を正から負へと変化させることを示した(飯野雄一:平１３ー１６)。神経回路における感覚情報の統合の測定系を開発し、線虫C. elegansの感覚情報の統合と連合学習に異常を持つ変異体hen-1を同定した。その原因遺伝子産物HEN-1は、シナプス領域に局在し、成熟した神経系で働く分泌タンパク質であり、神経機能修飾分子であることを示した。(石原健：平１２ー１６)。

４）大脳皮質機能

霊長類の視覚野(occl)と連合野特異的発現遺伝子(Rbp)の同定を行った（山森哲雄：平成１２ー１６)。大脳皮質微細局所神経回路の構造と細胞の同定を行い、ダブルブーケ細胞の神経終末のシナプス接着ターゲットを検討し、一部の非錐体細胞の樹状突起と、錐体細胞の棘突起を主なターゲットにしている事を明らかにした（窪田芳之)。前頭連合野の機能コラム間相互作用とモノアミン修飾作用の解明を目的とし、光学測定法を用いた実験系において、機能コラムは、他の皮質領域と動的に相互作用し合い、さらにドーパミンD1受容体により、隣接するコラムに影響を与えることなくその活動を増強することを明らかにした。（澤口俊之：平１５ー１６)。

班員の研究成果報告

聴神経核における特徴抽出回路の形成と機能

大森治紀
京都大学医学研究科

平成１２年度―平成１６年度

研究成果の要旨

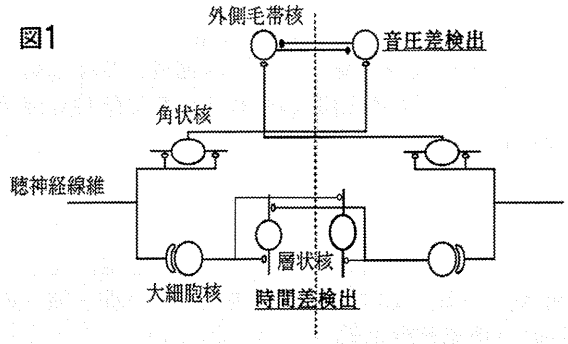
トリの聴神経核を用いて音圧情報および時間情報の抽出、および時間差の検出回路を解析した。個体の発達過程で特徴抽出が尖鋭化する事、シナプス終末の形態、シナプス電流、神経細胞の膜興奮性が協調して時間揺らぎを最小にする事、およびシナプス電位を加速する事で左右音情報のマイクロ秒に至る時間差識別が可能になる事を明らかにした。

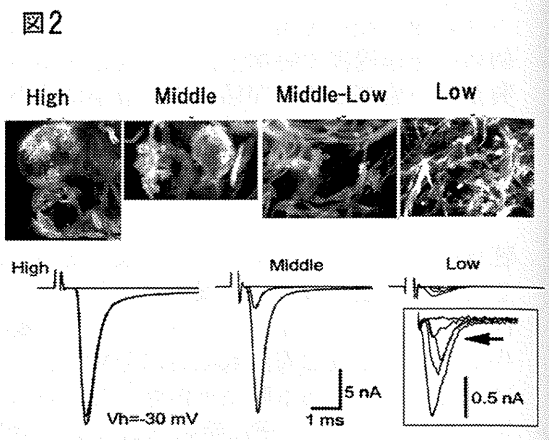
研究成果

聴覚はコミュニケーションの手段であるばかりではなく、動物にとっては、音を正確に聞き分ける能力は外敵や獲物の位置を知るためにも不可欠である。音は基本的に周波数、時間、強さの属性を持つが、これらを手がかりとした正確な分析が聴覚神経回路では行われている。たとえば蝸牛器官では音波は周波数成分に分解され、さらに時間情報および強度情報は個々の周波数成分毎に活動電位列である時系列信号として符号化され聴神経によって伝達される。蝸牛神経核では聴神経の投射をうけ、逆に時系列信号から時間情報および音圧情報が個別に抽出され、ここからは並列した情報としてより上位の神経核に伝達される。上位の神経核、たとえば下丘では、音の強さおよび時間情報が周波数情報と共に統合され、動物個体を取り巻く座標空間を現す神経情報として活用される、すなわち空間地図として認識される。
一連の聴覚神経回路の働きの中で、音源の位置を特定する手がかりとなる時間情報と強さの情報を抽出して処理する機構は、動物個体を用いた in vivo の実験系及び脳切片標本を用いた in vitro の実験系の両方で解析が進められており、多くの知見が得られてきた。本報告では、①脳幹切片標本を用いて明らかにしたニワトリ下位脳幹神経核における特徴抽出、②両耳間時間差検出に関わる層状核での同時検出機構、および③同時検出精度の極限推定値について報告する。
トリの蝸牛神経核は蝸牛器官から聴神経が投射する２つの神経核で構成されている(図１)。１つは角状核であり、音圧を抽出し符号化する役割が知られている。もう一つは大細胞核であり、音の時間情報を抽出し左右の層状核に伝達する事が知られている。メンフクロウを用いた in vivo の詳細な研究が、特に大細胞核－層状核－下丘の時間情報の検出処理系に対してなされている(Konishi, 2003)。しかしながら、音圧、時間のどちらの処理系に於いても、時系列信号としての聴神経活動から聴覚情報を抽出し、それぞれ意味のある情報として処理するシナプスあるいは神経細胞の具体的なメカニズムはこれまで不明であった。

①音圧を抽出する角状核神経細胞の発達。聴覚系の全ての神経核には特徴周波数(CF)軸が存在する（周波数局在)。角状核は聴神経(ANF)の直接投射を受けるが、ANFは角状核には腹内側から投射し、背側に高いCF線維、腹側に低いCF線維が順に配列する。ANFは小さなブトン様終末構造を作り多数のシナプスを角状核細胞に形成する。大多数（約 80%）の角状核細胞は樹状突起を聴神経線維の投射方向に伸ばす。従って、ある程度限られた周波数帯域の入力を受け角状核細胞は聴神経から音圧情報を抽出する。我々は脳幹切片標本で全細胞記録を行い、角状核細胞より活動電位発射パターンを解析した(業績 7)。持続した注入電流に応じて、角状核細胞の 20%は電流注入の最初に１発の活動電位を発射する(onset型)。しかし 80%の細胞（tonic型）は、通電量に正確に比例して活動電位発射頻度を上げ 700Hzに至る高頻度の活動電位を持続的に発射した。Onset型の発射パターンはデンドロトキシン(DTX)感受性の低閾値型K(LTK)チャネルで決定された。一方、tonic型の発射はTEA感受性のKチャネルで通電量と活動電位発射頻度間の感度（スロープ）が決まり、閾値はonset型と同じくLTKチャネルで決定された。胎生後期でも 20%の細胞はonset型であり、存在確率は生後と変わらない。一方、tonic型の細胞は胎生期には活動電位発射パターンに多くの亜系をもつが、これはイオン電流が総量として未発達の為であり、電流量が増大する生後は単純なtonic型となる。以上のように、角状核の神経細胞には２型あるが、特にtonic型の細

胞は入力としてのシナプス電流に比例した頻度で活動電位を発射することにより音圧情報を抽出して符号化するメカニズムを持つ事が期待される。そして2種類のKチャネルの制御下に入出力特性が実現されている。音圧の情報は上位の外側毛帯核において左右の強度差が比較され左右の音圧差が計算される（図１）。音圧差を計算する具体的な神経回路機構の解析は今後の課題である。





②時間情報を抽出する大細胞核における時間揺らぎとシナプス伝達。大細胞核では投射するANFのCFに応じてシナプス前終末の形態が変わる（図２）。DiIを蝸牛器官に充填して染色する事によりANF終末構造を可視化すると、高いCFから中程度のCF領域では数個の巨大な杯様終末が大細胞核神経細胞体上に形成されていた。それに対して低いCF領域では杯様終末ではなくブトン様終末が形成される。シナプス電流も対応した変化を示し高域から中域のCFでは静止膜電位レベル(-65mV)では 20nAを超える非常に大きなEPSCが記録され、しかもシナプス電流はall-or-noneに発生した（図２は-30mVでの記録)。一方低いCF領域では刺激強度の増大に応じてシナプス電流が逐次増大した。In-situ Hybridizationおよび免疫染色により、DTX感受性のあるLTKチャネル(Kv1.1)がCFに対応した分布を示し、発現するチャネルは高CF領域で高密度、低CF 領域で低密度であった。しかし、高域－中域の細胞ではDTXによってLTKチャネルを阻害しても、非常に大きなシナプス電流で補償される結果、活動電位発生に大きな時間的揺らぎを生ずる事はなかった。低域の細胞ではDTX後、多くが自発発火した。ANFに電気刺激を与えて発生する大細胞核の活動電位の時間的な揺らぎは、高域CF細胞では 10 マイクロ秒、低域CF細胞でも 30 マイクロ秒であり、広いCF帯域において非常に正確なタイミングで活動電位が発生している。従って、大細胞核ではシナプスの形態、伝達物質放出量および細胞膜興奮性が協調して、時間的に非常に正確な伝達特性を実現している[(9)]。大細胞核は図１にも示すように、ANFからのシナプス入力を受け、軸索は直ちに分枝して左右の層状核に投射する。大細胞核からの入力信号を元に層状核では左右両耳で捉えた音の時間差が精密に計算され、音源定位に至る神経情報の処理が始まる（図３）。

③同時検出精度の極限値としての両耳間時間差計算精度の推定。正面から左右に音源がずれた場合には音波が伝播する距離が両耳で異なる（図３）。従って、両耳で捉える音には音源のズレに相当するわずかな位相の違いが生ずる。位相のズレは頭の大きさに比例し１度の音源のズレに対して人では10 マイクロ秒、メンフクロウでは４マイクロ秒、ニワトリでは２マイクロ秒程度である。層状核では神経細胞が一列に並び、同側および対側の大細胞核から軸索投射を受ける。特に、対側からの軸索は層状核の内側から外側に走向し遅延線回路(delay line)を形成する（図４）。層状核神経細胞は腹側および背側の両極に樹状突起をのばし、大細胞核からの軸索投射を受ける(図５)。左右の入力が限られた時間窓内に到達した場合に活動電位を発射する事で、層状核細胞は同時検出器として働いている（図６）。同時検出器としての精度は個体の発達過程で改善し、胎生後期には４ミリ秒程度もある時間窓が、生後は１ミリ秒程度となる（共に室温での実験)。さらにトリの体温である 40 度Cでは 300 マイクロ秒程度に短縮する（図７)。これは音源定位に優れたフクロウ

図3

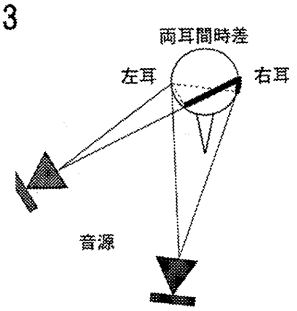


図4

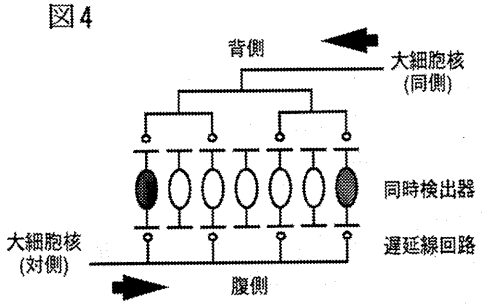


図5

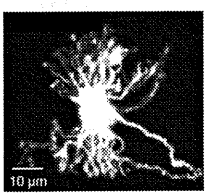


図6

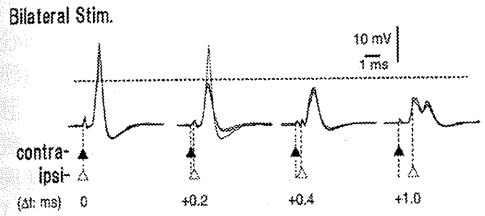


図7

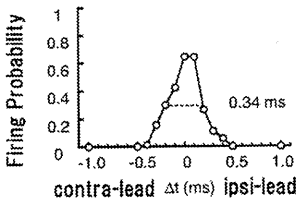
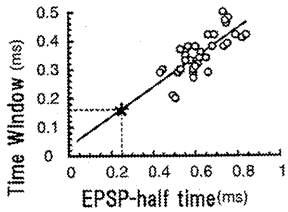


図8



のin vivo実験で得られている100マイクロ秒に匹敵する精度である。個体の発達過程および室温から40℃の間で温度を変えた実験でEPSP時間経過は変化し、同時検出の時間窓と高い正の相関を示した（図８）。さらに、層状核のEPSPは脱分極後に過分極が続く（図６ Δt=0.4ms参照）。この膜過分極はDTXに感受性をもつLTKチャネルがEPSPによるわずかな脱分極で活性化される事により生ずる。従って、LTKチャネルの働きによりEPSPの下降相が能動的に加速され短縮する。結果として静止膜電位レベルではEPSPの時間経過は実質的にEPSCに等しいか、あるいは多少の膜脱分極が加わる事でEPSCよりも加速され得る[8]。聴覚系のシナプス（たとえばMNTB）では個体の成熟に伴い伝達物質放出の同期化が著しく亢進し、成熟したシナプスではEPSCはmEPSCに非常に近い時間経過をとる（Chuhma & Ohmori, 1998）。層状核細胞ではEPSCとmEPSCの時間経過は近接しており、生後数日令でも1.7倍程度の違いしかない[5]。一方、EPSPの時間経過がEPSCに等しい、あるいはEPSCより速いという上記の結果は、究極においてEPSPの時間経過はmEPSCの時間経過に限りなく近づき得る事を示している。mEPSCの時間経過（半値幅）は平均250マイクロ秒である。対応する同時検出の時間窓は160マイクロ秒である（図8,*）。この値はニワトリの取りうる同時検出時間窓の極限推定値であり、メンフクロウが実現している時間窓に限りなく近い。ニワトリに比べてメンフクロウは頭の大きさ（両耳間距離）が2倍程度大きく、音源定位では決定的にメンフクロウが有利である。さらに層状核の同時検出精度にも、上記のin vitro実験ではおよそ2倍の差があるが、こちらはいくつかのメカニズムが最適化される事で、ニワトリでも克服可能な違いである。それらはシナプス前の要素として伝達物質放出の同期化が高まる事、シナプス後の要素としてLTK電流が最適化する事、および本稿では述べないが、静止膜電位付近で働くHCN電流の活性化レベルが最適化されることなどによって、EPSPの時間経過が一層短縮する事である。

音源定位は層状核における左右両耳間時間差の計算だけで実現出来る聴覚の機能ではなく、角状核に始まる左右両耳間音圧差の計算に関わる上位の神経核の働きも重要である。さらに本稿では触れていない、動物の可聴周波数帯域全体における同時検出精度や、より上位の神経核（下丘）における音圧差情報と時間差情報の統合も非常に重要な要素である。しかし、動物の持つ超能力の１つの代表とされるメンフクロウの高い音源定位能力-すなわち暗闇での狩猟能力-も、聴覚神経回路を構成する大細胞核や層状核の神経細胞による、特徴抽出および同時検出という特定の神経情報処理の問題として取り扱える事が、in vitro 実験精度の向上により、ようやく可能になってきた。詳細な神経回路機能の解析ができる in vitro 実験と動物本来の機能を直接解析出来る in vivo 実験の双方を平行して進める研究によって、音源定位に関わる神経回路機構の全貌を明らかにできる事はそれほど遠い将来ではないかも知れない。

共同研究

金子武嗣　無名質神経細胞に対するニューロキニンB作用。
J. Comp. Neurol　473(1)43-58, 2004.
玉巻伸章　GFP-virusの供与を受け神経細胞軸索投射とシナプス電流へのGFP発現の影響を検討した。
野田　亮　GFPラベルした海馬培養神経細胞でのsmall-G蛋白によるシナプス伝達修飾の研究。
Neuroreport 14(9) 1203-1207, 2003.
Neuroscience 127(4) 973-981, 2004.
小坂俊夫　マウス歯状回細胞の活動に関与するイオン電流の解析
Eur. J. Neurosci 17, 1338-1354, 2003.
中井淳一　CFP-Caプローブの供与を受け、神経細胞への発現を試した。

A01-02

研究課題　大脳皮質視覚野のシナプス可塑性と反応選択性の発達
研究代表者名　小松由紀夫
所属　名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学
特定領域「神経回路」参加年度　平成12－16年度

研究成果の要旨
大脳皮質視覚野の興奮性シナプスにおけるNMDA受容体依存性と非依存性の2種類の長期増強は、共に視覚反応の可塑性と同様な年齢と視覚体験に対する依存性を示すことを明らかにした。この結果は、これらのシナプス可塑性が視覚野の経験依存的機能発達に寄与することを示唆する。

研究成果
大脳皮質一次視覚野細胞はそれぞれ特定の視覚刺激に対して選択的に反応し、視覚対象の部分的特徴を抽出する。この反応選択性は生後発達の一時期（感受性期）の視覚体験に依存して形成される。感受性期において視覚入力は、神経活動に依存するシナプスの可塑的変化を引き起こし、反応選択性の発達に影響を及ぼすと考えられている。視覚野には複数の種類の長期増強と長期抑圧が見出されている。本研究では、抑制性シナプスにおける長期増強の維持機構、興奮性シナプスの長期増強の年齢と経験に対する依存性ならびに、その誘発の分子機構を解析し、以下に記す成果を得た。

1）抑制性シナプスの長期増強維持機構
視覚野では興奮性シナプスだけでなく抑制性シナプスも可塑的で、後者にも長期増強と長期抑圧が起こる（Komatsu and Iwakiri, 1993）。抑制性シナプスの長期増強は感受性期に限局して起こるので（Komatsu, 1994）、視覚反応可塑性の基礎過程と思われる。NMDA受容体依存性の興奮性シナプスの長期増強は、入力特異性と連合性を有し、その誘発には高頻度刺激によるシナプス後細胞内Ca^{2+}濃度の一過性上昇が必要である。この点に関しては、視覚野抑制性シナプスの長期増強も同じである(Komatsu, 1996)。いったん増強が発生した後は、増強を維持するために神経活動により細胞内Ca^{2+}濃度を上昇させる必要はないと、NMDA受容体依存性長期増強を含めて一般的に考えられてきた。しかし、視覚野の抑制性シナプスの長期増強では、高頻度刺激により誘発した後も、シナプス前細胞の低頻度活動とそれに伴うCa^{2+}流入が維持に必要であることを見出し、その機構を解析して以下の結果を得た(Komatsu and Yoshimura, 2000)。
感受性期のラット視覚野スライス標本において、興奮性シナプス伝達を薬理学的にブロックして、4層の電気刺激により5層細胞に誘発される抑制性シナプス後電位（IPSP）を細胞内記録した。灌流液には長期増強を高頻度で誘発できるように4 mMのCa^{2+}を加えた。
長期増強はテスト刺激を低頻度で続けると、少なくとも2時間以上持続する。長期増強の維持に神経活動が必要か調べるために、長期増強誘発後にテスト刺激を30分間止めた。テスト刺激再開後、約2/3の細胞でテスト反応の大きさが高頻度刺激前のレベルに戻り、増強は消失した。テスト刺激を止めても長期増強が維持された細胞に、Na^{+}チャネル・ブロッカーを与えて、活動電位発生を一時的に止めると、長期増強は消失した。したがって、長期増強を維持するためには、テスト刺激により誘発されるか、あるいは自発的に発生するシナプス前細胞の活動電位が必要である。また、細胞外Ca^{2+}濃度を4から2.4mMに一過性に下げると長期増強は消失するので、細胞内への一定以上のCa^{2+}流入が維持に必要と考えられる。GABA受容体とCa^{2+}チャネルのブロッカーを用いた実験より、シナプス後細胞のGABA受容体の活性化や膜電位変化は維持に必要ないが、シナプス前細胞の活動電位に伴なうシナプス前終末へのCa^{2+}流入が必要であることが分かった。この抑制性シナプスでの伝達物質の放出はQ型Ca^{2+}チャネルによるが、長期増強の維持に関与するのはP、L、Nの高閾値型Ca^{2+}チャネルであった。また、維持に関与するCa^{2+}の流入量はコンダクタンスの大きいCa^{2+}-activated-K^{+}（BK）チャネルにより制御されていることも判明した。この長期増強はノルアドレナリンが存在すると正常Ca^{2+}濃度(2.4mM)でも維持されるので、ノルアドレナリンは維持に関与するチャネルを調節して、Ca^{2+}流入量を増加させ、維持を促進するものと思われる。

以上より、抑制性シナプスの長期増強の継続と終了は抑制性シナプス前細胞とノルアドレナリン作動性細胞の活動により制御されていることが明らかとなった（図１）。視覚入力により抑制性シナプスに長期増強が起こり、その結果、視覚反応性に可塑的変化が生じるとするならば、その変化を維持するためには、抑制性細胞が低頻度で発火し続ける必要があると思われる。

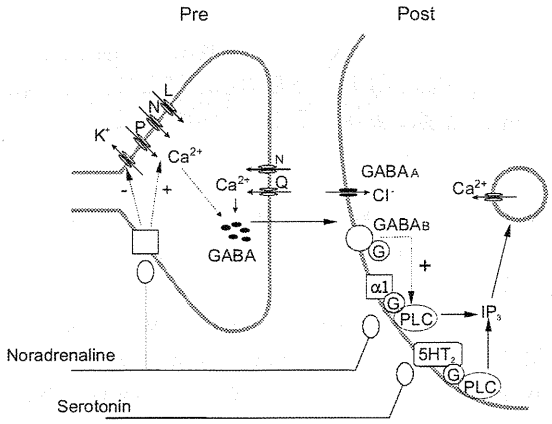


図１　抑制性シナプスの長期増強の維持機構

II）NMDA 受容体依存性シナプス可塑性

興奮性シナプスにおける NMDA 受容体依存性長期増強は視覚反応選択性形成の基礎過程と考えられ、２・３層細胞において詳しく研究されてきた。長期増強を誘発するための条件刺激として、シナプス前線維の高頻度刺激と、シナプス後細胞の脱分極とシナプス前線維の低頻度刺激のペアリング刺激の２種類が用いられてきた。海馬 CA1 錐体細胞では両者とも興奮性シナプスに長期増強を誘発することが確立されており、視覚野においても同様と考えられ、高頻度刺激を用いて長期増強の解析が多数行われてきた。しかし、ラット視覚野切片標本において４層の刺激により２・３層錐体細胞に誘発される興奮性シナプス後電位（EPSP）と IPSP を分離して解析した結果、ペアリング刺激は興奮性シナプスに長期増強を誘発するが、高頻度刺激は興奮性シナプスに長期増強を誘発せずに、抑制性シナプスに長期抑圧を誘発することが分かり、それらの特性と分子機構を解析し、以下に記す結果を得た（Komatsu and Yoshimura, 2003）。

a）興奮性シナプスの長期増強

ペアリング刺激による長期増強の誘発は年齢と視覚体験に強く依存している（図２A）。最も高頻度で発生するのは、開眼前のシナプス結合ができて間もない時期で（生後７－13 日）、調べた全ての細胞で起き、感受性期（生後 20－30 日）では発生率が少し低下するが半数以上の細胞で起きた。成熟動物（生後 60－90 日）では全く発現しないが、生後直後より視覚遮断して育てると、成熟してもかなり高頻度で発生した。

NMDA 受容体はチャネル形成に必須な NR1 サブユニットとチャネル特性を規定する NR2 サブユニットからなる。NR2 サブユニットは NR2A-D の４種類からなり、それぞれのサブユニットは異なる C 末端を持ち、それぞれ特定の分子と結合し、別個の信号伝達系を活性化できると考えられている。その発現は部位と年齢に依存し、大脳皮質では NR2A と NR2B が見られる。NR2B の発現は生まれた時点で既に始まっており、2 週以内にプラトーに達するのに対して、NR2A の発現は生後２週より始まり、その後数週間増加する。したがって、発達とともに両者の割合は変化し、NR2A/NR2B の比は増大する。さらに、視覚遮断はこの変化を妨げるので、NR2 サブユニットの変化は感受性期の規定に関与するかもしれない。

NR2B を含む NMDA（NR2B-NMDA）受容体が長期増強の誘発に必須であることが、そのサブユニットを含む受容体を選択的に阻害する薬物（ifenprodil）により明らかとなった。この薬物は３μM で NR2B-NMDA 受容体を完全にブロックすることが知られているが、その濃度で長期増強の誘発を完全にブロックする。生後 20－30 日では、この濃度の ifenprodil は NMDA 受容体を介する興奮性シナプス後電流（EPSC）の振幅を約半分にする。NR2 サブユニットに非選択的な NMDA 受容体

阻害薬 2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV)は１μM で同程度に NMDA-EPSC を減弱させる。しかし、その濃度では長期増強は少し小さくなるが発現する。したがって、興奮性シナプスの長期増強誘発には NR2B-NMDA 受容体の活性化が必要と考えられる。また、ifenprodil を用いて NMDA 受容体の NR2B 成分を評価すると、開眼前が最大で、その後減少し、暗室飼育するとこの減少は阻止された。したがって、NR2B の変化は長期増強の発生を規定する重要な因子と考えられる（図２B、図３）。

この長期増強が最も起こりやすい開眼前の時期には、視覚刺激ではなく自発活動に由来する興奮が網膜から視覚野に送られる。自発的興奮はゆっくりと網膜上を伝播するので、視覚野の網膜地図や受容野の大きさなどの視覚野の大まかな機能構築の発達に関与する可能性が考えられる。

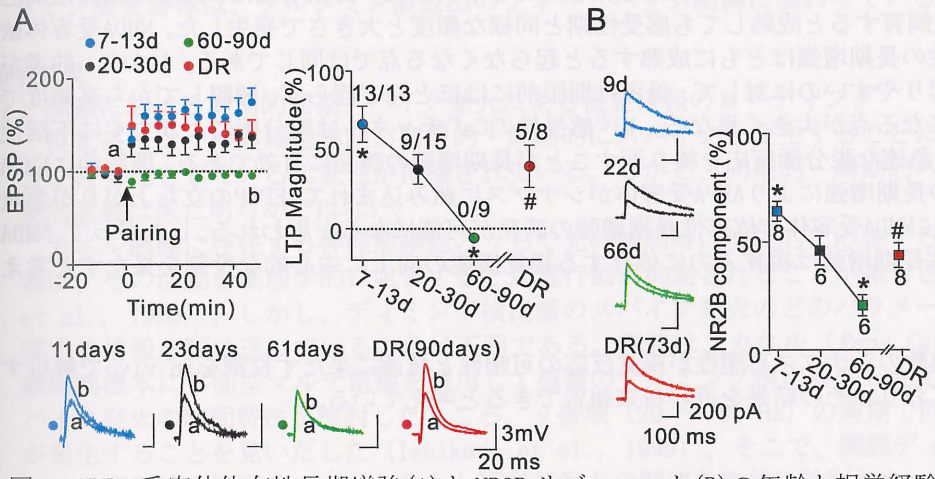


図２　NMDA 受容体依存性長期増強(A)と NR2B サブユニット(B)の年齢と視覚経験に対する依存性

b）抑制性シナプスの長期抑圧

興奮性シナプス前線維の高頻度刺激が抑制性シナプスに及ぼす効果を調べるために、単一シナプス前細胞の刺激により２・３層錐体細胞に誘発される抑制性シナプス後電流（IPSC）を膜電位固定記録した。一時的に電位記録モードにして、４層に高頻度刺激を与えると IPSC に長期抑圧が生じた。この長期抑圧は APV 存在下では発生しないので、NMDA 受容体の活性化により抑制性シナプスに異シナプス性に生じると考えられる（図 3）。興奮性シナプスの長期増強と異なり、NR2A－NMDA 受容体の活性化を誘発に必要とし、発達期でも成熟期でも同様に生じた（図３）。

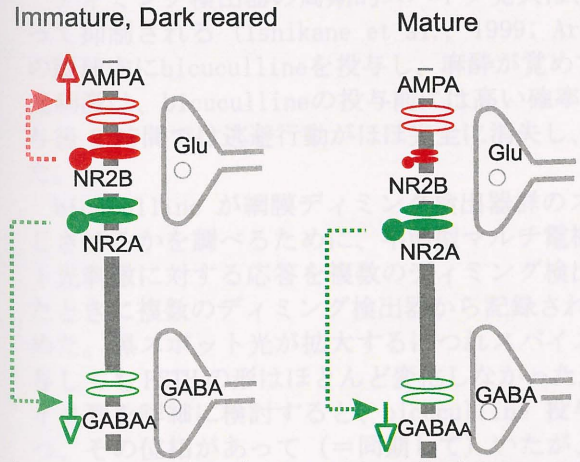


図 3 NMDA 受容体依存性シナプス可塑性と NR2 サブユニットの年齢と経験に依存する変化

III) 興奮性シナプスのNMDA受容体非依存性長期増強

NMDA受容体の活性化を必要としない、興奮性シナプス伝達の長期増強が感受性期に限局してネコ視覚野で起きることが見出されている(Komatsu and Iwakiri, 1992)。シナプス前線維に2Hz刺激を15分間与えると2-4層細胞から記録されるEPSPに長期増強が起る。この長期増強は、静止膜電位付近で不活性化され、低濃度のNi^{2+}によりブロックされる特性を持つCa^{2+}チャネル（TまたはR型）が活性化されてシナプス後細胞内のCa^{2+}濃度が上昇することが、その誘発に必要である。感受性期には、Ni^{2+}感受性のCa^{2+}チャネル電流が一過性に上昇するので、長期増強が誘発可能になると考えられる。

ラット視覚野においても同様の長期増強が誘発されることを見出した(Ohmura et al., 2003)。４層刺激により２・３層錐体細胞に誘発されるEPSPを解析した。長期増強は、感受性期に限局して起るが、暗室飼育すると成熟しても感受性期と同様な頻度と大きさで発生した。NMDA受容体依存性と非依存性の長期増強はともに成熟すると起らなくなる点では同じである。しかし、前者が開眼前に最も起りやすいのに対して、後者は開眼前にはほとんど起らず、開眼してから高頻度で発生するようになる点が大きく異なる。Ni^{2+}感受性のCa^{2+}チャネルは脱分極によりすぐに不活性化されるので、急速な脱分極反応を繰り返すことが長期増強の誘発に有効である。開眼前にNMDA受容体依存性の長期増強によりAMPA受容体がシナプスに組み込まれて、EPSPの立ち上がりが急峻になり、開眼後にNMDA受容体非依存性長期増強の誘発が可能になると思われる。したがって、NMDA受容体非依存性長期増強は視覚入力に依存する視覚機能の向上に中心的な役割を果たすと考えられる。

以上述べた複数のシナプス可塑性が視覚反応の可塑性と発達に果たす役割をin vivoで解析することを始めており、その結果を近い将来報告できると考えている。

共同研究

共同研究の相手　柳川右千夫

共同研究内容：皮質細胞の単独培養による興奮性シナプス結合形成・成熟の活動依存性解析。成果：神経活動は量子振幅に影響を与えないが、伝達物質の放出確率を低下させ、シナプス数を増加させる。

A01-03

表題（研究課題）　視覚情報の特徴抽出と統合の神経機構
研究代表者名　　立花政夫
所属　　東京大学・大学院人文社会系研究科・心理学研究室

特定領域「神経回路」参加年度
平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨
網膜神経節細胞群の周期的同期スパイク発火は、逃避行動の誘発に必須な情報を脳に送っていることが明らかになった。また、網膜双極細胞の$GABA_C$受容体や錐体視細胞の代謝型グルタミン酸受容体は、グルタミン酸放出のフィードバック制御に関わっていることがわかった。

研究成果
1）網膜における周期的同期スパイク発火による視覚情報のコーディング
視覚系では，神経細胞集団が同期的・周期的にスパイクを発生することによって情報の統合や符号化をしている可能性が指摘されている。しかし、同期的・周期的スパイク発火の機能的意義は未だ明らかではない。
カエル網膜に存在する神経節細胞のうちで光の減弱時に持続的に応答するディミング検出器は、その活動を薬理学的に阻害すると逃避行動が抑制されることが報告されている（King et al., 1999）。しかし、ディミング検出器のスパイク発火のどのパラメータが逃避行動に関する情報を脳に送っているのかは不明である。私達は、カエル（*Rana Catesbeiana*）の剥離網膜標本に平面型マルチ電極を適用して複数のディミング検出器から光応答を記録し、スパイク発火の時間特性を検討したところ、γ帯域（20 ～ 80 Hz）の周期で同期的なスパイクが発生することを見いだした（Ishikane et al., 1999）。そこで、網膜ディミング検出器における同期的・周期的スパイク発火と逃避行動との関連を詳細に検討した。
カエルは視角 0 度から定速で拡大する黒スポット光刺激を提示すると逃避行動をおこす。黒スポット光の拡大速度（5 ～ 50 度/秒）が速くなるほど、また、黒スポット光の最終直径（0 ～ 55 度）が大きくなるほど逃避行動が生起する確率（逃避率）が高くなった。
網膜に同様な拡大する黒スポット光刺激を提示し、ディミング検出器のスパイク発火を記録した。スパイク発火列から自己相関やパワースペクトルを求めると、γ帯域で周期的にスパイクを発生していることが明らかになった。黒スポット光の拡大速度を速めたり最終直径を大きくしたりすると、パワースペクトルにおけるγ帯域でのピークの周波数は変わらずにそのパワーが増加した。
ディミング検出器の周期的スパイク発火は、$GABA_A$受容体の阻害剤であるbicucullineによって抑制される（Ishikane et al., 1999; Arai et al., 2004）。そこで、麻酔したカエルの眼球内にbicucullineを投与し、麻酔が覚めてから行動実験を行った。拡大する黒スポット光刺激は、bicucullineの投与前には高い確率（～ 0.85）で逃避行動を引き起こしたが、投与後 2 時間では逃避行動がほぼ完全に消失し、投与後 1 日では逃避率は元のレベルに回復した。
bicuculline が網膜ディミング検出器群のスパイク発火パラメータにどのような影響を生じさせるかを調べるために、平面型マルチ電極を剥離網膜標本に適用して拡大する黒スポット光刺激に対する応答を複数のディミング検出器から記録した。1 回だけ拡大刺激を提示したときに複数のディミング検出器から記録されたスパイク列から PSTH（ビン幅 50 ms）を求めた。黒スポット光が拡大するにつれスパイス数の増加が認められたが、bicuculline を投与しても PSTH の形はほとんど変化しなかった。しかし、複数のディミング検出器からのスパイク列を詳細に検討すると、bicuculline 投与前にはスパイクはほぼ一定の間隔で生じ、且つ、その位相があって（＝同期して）いたが、bicuculline の投与によってスパイクの間隔が乱れることがわかった。そこで、2 ms のビン幅内で複数のディミング検出器がスパイクを発生している事象を同期イベントと定義し、同期イベント列を求めた。この同期イベント列の自己相関とパワースペクトルを計算すると、bicuculline の投与前には同期イベントがγ周期で起きていたが、bicuculline の投与によって同期イベントは周期性を失いランダムに

生起することがわかった。bicuculline は同期イベント数を増加させたが、これは、網膜の抑制性シナプス伝達が遮断されたためにスパイクの発火頻度が増加したためであると考えられる。したがって、bicuculline の眼球内投与によって逃避行動が消失したのは、ディミング検出器群における周期的同期スパイク発火の抑制によるものと推測された。

周期的スパイク発火は遠く離れた細胞間の同期を促進すると考えられる。そこで、拡大する黒スポット光刺激に対するディミング検出器群のスパイク発火について相互相関を計算した。その結果、bicuculline を投与すると細胞間距離が 0.5 mm以下の場合、周期性は消失したが同期性は減少しないこと、また、細胞間距離が 0.5 mm以上の場合、周期性も同期性もほとんど消失することがわかった。したがって、bicuculline で抑制性$GABA_A$作動性シナプスが遮断されると、細胞間距離が近い場合は興奮性の共通入力やギャップ結合によって同期的なスパイクが発生するが、細胞間距離が遠い場合はスパイクが同期しなくなると考えられる。bicuculline によって同期イベント数は増加したが、局所的な同期イベントがランダムに生じたために、逃避行動を引き起こすことができなかったのだろう。

$GABA_A$受容体の阻害剤とは対照的に、$GABA_C$受容体の阻害剤TPMPAはディミング検出器の周期的スパイク発火を促進することを見いだした（Arai et al., 2004）。そこで、TPMPAをカエルの眼球内に投与し、拡大する黒スポット光刺激に対する逃避行動を調べた。その結果、TPMPA投与前には逃避行動を引き起こさなかったような小さな黒スポット光に対してもTPMPA投与後 2 時間では逃避行動を引き起こすことがわかった。このような逃避行動の促進は、投与後１日で投与前の状態に回復した。

剥離網膜標本にマルチ電極を適用して複数のディミング検出器から拡大する黒スポット光刺激に対するスパイク応答を記録した。複数のディミング検出器のスパイク列から同期イベントを抽出し、同期イベントの自己相関とパワースペクトルを計算した。その結果、TPMPA はγ帯域の周波数を変化させずにパワーを顕著に増強することがわかった。また、同期イベント数やスパイクの発火数は、bicuculline と同様、TPMPA によっても増加した。

bicuculline と TPMPA の眼球内投与による逃避率の変化は、ディミング検出器群の周期的同期スパイク発火と密接に対応していることが明らかになった。いずれの阻害剤もスパイクの発火数や同期イベント数を増加させたので、逃避率の変化を説明することはできない。なお、ディミング検出器以外の神経節細胞は、拡大する黒スポット光刺激に対して一過性の応答を示し、bicuculline や TPMPA を投与するとスパイク発火数は増えたが光応答パターンは変化しなかった。

カエルに水平方向に往復運動する縦縞を提示すると、頭部を回転させて追跡する。bicuculline の眼球内投与によって逃避行動が消失したカエルに水平に往復運動する縦縞を提示すると、投与前と同様な頭部回転運動を示した。TPMPA の眼球内投与も視覚誘発性頭部回転運動に有意な変化を引き起こさなかった。したがって、これら２種類の GABA 阻害剤は、視覚誘発性頭部回転運動に関与する網膜内神経回路の機能に重大な影響を与えなかったと結論することができる。

以上の実験結果から、カエル網膜のディミング検出器群における周期的同期スパイク発火は、逃避行動に必須な情報を脳に送っていることが明らかになった。

２）網膜ディミング検出器における周期的スパイク発火の生成機構

カエルの剥離網膜標本にホールセルクランプ法を適用し、ディミング検出器の膜電位応答を記録した。光強度の増大によって過分極し、光強度の減弱によって持続的な脱分極が生じ周期的なスパイクが発生した。パッチ電極からNaチャネル阻害剤QX-314 を細胞内投与して記録しているディミング検出器のスパイク発火を阻害すると、光強度の減弱によって生じる脱分極に律動的膜電位変動が重畳していることがわかった。この律動的膜電位変動は、TTXを細胞外投与して網膜全体のスパイク発火を阻害すると、消失した。ディミング検出器自体を電流注入によって脱分極させても周期的なスパイク発火は生じなかった。したがって、ディミング検出器は律動的なシナプス入力を受けて周期的なスパイクを発生していることがわかった。また、律動的なシナプス入力は$GABA_A$受容体の阻害剤bicuculline で消失し、$GABA_C$受容体の阻害剤TPMPAで増強されることがわかった。以上の結果は、Naスパイクを発生しGABA作動性

シナプスを構成するアマクリン細胞が律動的な膜電位変動を生成するのに重要な役割を担っていること、また、化学シナプスを介してディミング検出器に伝えられた律動的な入力が周期的なスパイクを発生させることを示している。

3）網膜双極細胞軸索終末部における$GABA_C$受容体の機能

マウス網膜のスライス標本にホールセルクランプ法を適用し、双極細胞とアマクリン細胞間のシナプス伝達を光応答に基づいて解析した。双極細胞からのグルタミン酸の放出はアマクリン細胞からの$GABA_C$受容体を介するフィードバックによって抑制されること、また、放出されたグルタミン酸の漏出（spill over）量に依存してアマクリン細胞のAMPA型受容体とNMDA型受容体が活性化される割合が変化することが明らかになった。

4）網膜視細胞における代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）の機能

イモリ網膜のスライス標本にホールセルクランプ法を適用し、視細胞にあるグループⅢmGluRの機能を検討した。この受容体のアゴニストであるL-AP4を投与すると2次ニューロンである双極細胞や水平細胞の光応答が減弱した。これは、L-AP4が2次ニューロンに直接作用したためではなく、錐体視細胞のmGluRを活性化してL型Ca電流の活性化曲線を過分極側に移動させてグルタミン酸の放出を抑制したためであることがわかった。また、錐体視細胞のCa電流は、グルタミン酸と共に開口放出されたプロトンによっても抑制されることがわかった。一方、桿体視細胞のCa電流は錐体視細胞と同様にL型であるにもかかわらず、L-AP4やプロトンの影響を受けなかった。錐体視細胞からのグルタミン酸放出量は、開口放出されたグルタミン酸とプロトンによってフィードバック制御を受け、光順応状態に応じて最適なダイナミックレンジを確保できるように調節されていると考えられる。

5）網膜双極細胞軸索終末部におけるCaドメインと開口放出部位

全反射型顕微鏡を用いて、キンギョ網膜から単離したMb1型双極細胞を膜電位固定し、軸索終末部の膜直下におけるCaイメージングを行うと共に、FM色素でラベルしたシナプス小胞の動態を観察した。脱分極によって複数のCaマイクロドメインが観察された。伝達物質放出の早い成分に対応する開口放出はCaマイクロドメイン近傍で生じ、遅い成分に対応する開口放出はCaマイクロドメイン近傍のみならず、そこから離れた場所でも生じることがわかった。

共同研究

共同研究の相手

田中光一（東京医科歯科大学）

共同研究内容と成果

マウス網膜のグルタミン酸トランスポーターの役割：野性型及びグルタミン酸トランスポーター欠失マウスの網膜スライス標本にホールセルクランプ法を適用して神経節細胞のスパイク発火を記録した。グルタミン酸トランスポーターの阻害や欠失は、スパイク発火の時間特性を劣化させることがわかった。また、視細胞と双極細胞間のシナプスでは、グルタミン酸トランスポーターの阻害は光刺激の強度情報と持続時間情報の独立性を損なうことがわかった。

共同研究の相手

中西忠重、吉田和道（京都大学）

共同研究の内容と成果

マウス網膜のスターバースト・アマクリン細胞の機能：スターバースト・アマクリン細胞をイムノトキシン細胞標的法によって選択的に破壊すると、網膜神経節細胞の方向選択性が消失し、行動レベルでは視機性眼振が消失した。したがって、網膜神経節細胞の方向選択性の形成にスターバースト・アマクリンセルが深く関与していることがわかった。

逃避運動の生成と可塑性の神経機構

小田　洋一

名古屋大学大学院生命理学研究科・大阪大学大学院生命機能研究科

特定領域「神経回路」参加年度　平成 12～16 年度

研究成果の要旨

硬骨魚後脳の分節に繰り返される形態学的に相同な一群の網様体脊髄路ニューロンが，聴覚神経から共通に投射を受けながら，カリウムチャネルの発現と局所回路の違いによって異なる興奮性を持つことが明らかになり，逃避運動の発現にそれぞれ特徴的な役割を果たすことが示唆された．

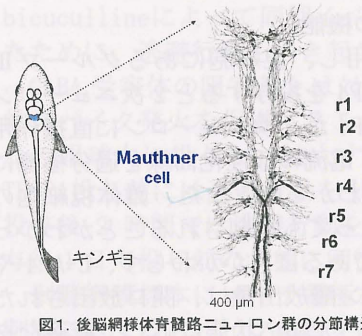


図1．後脳網様体脊髄路ニューロン群の分節構造

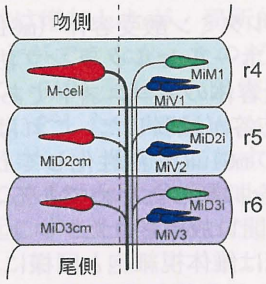


図２．後脳分節に繰り返される形態学的に相同なRSニューロン群

研究成果

１．形態的相同ニューロンの機能分化と機能結合

硬骨魚の後脳に存在する網様体脊髄路(RS)ニューロン群が分節をなし（図１），同じ形態学的特徴をもつ相同ニューロンが隣接する分節に繰り返されている点（図２）に着目し，それら相同ニューロンの機能的分化と相互の結合を調べた．対象は後脳の第 4 分節に存在し硬骨魚の逃避運動をトリガーするマウスナー(M)細胞と，その形態学的相同ニューロンである第５分節の MiD2cm と第６分節の MiD3cm である．この３つの RS ニューロンを特にマウスナー・シリーズと呼ぶ．

（１）マウスナー・シリーズへの聴神経投射

キンギョの後脳第 4～6 分節に存在する相同 RS ニューロンへの聴覚神経の投射を蛍光色素を用いて形態学的に調べ，分節に対応した投射を見出した（図３）．さらに，RS ニューロンの細胞内記録から，聴覚神経から RS ニューロンへのシナプス結合を明らかにした（*J. Neurosci.* 2004）．

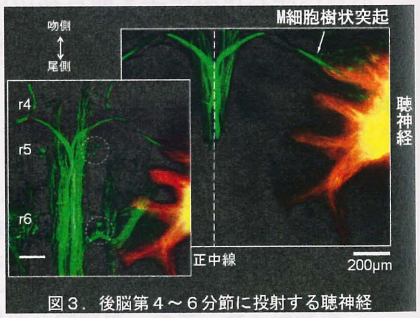


図３．後脳第４～６分節に投射する聴神経

（２）相同 RS ニューロンの異なる発火特性

第 4～6 分節の相同 RS ニューロンは，聴神経から同じような投射を受けながら，著しく異なる発火特性を示すことを細胞内記録から見出した（図４）．すなわち，MiD2cm と MiD3cm は脱分極に対応した周波数で連続発火するのに対して，M 細胞は，脱分極の開始時に単発の活動電位しか発生しない．チャネル阻害剤の効果から，M 細胞の特異的な発火パターンは，M 細胞のデンドロトキシン(DTX)感受性カリウムチャネルと反回性抑制回路によって生じることを明らかにした．また，DTX 感受性カリウムチャネルのサブユニット(Kv1.2)に対する抗体を用いて免疫組織学的に調べると（図５），後脳背側部の RS ニューロン群の中では M 細

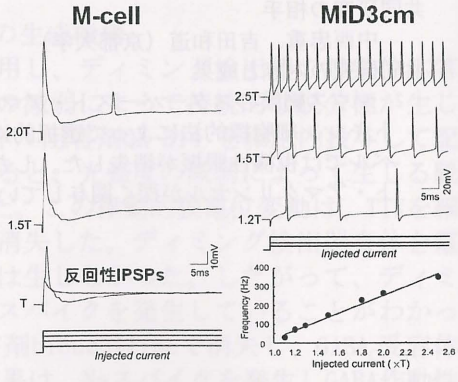


図４．M細胞とMiD3cmの異なる発火パターン

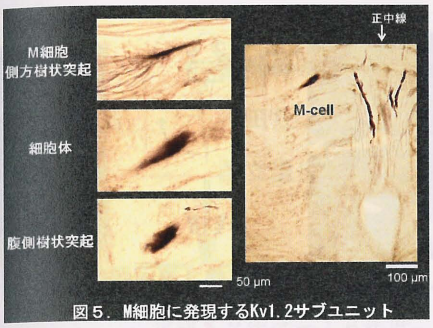


図５．M細胞に発現するKv1.2サブユニット

胞のみが Kv1.2 を発現していることが示された（*J. Neurosci.* 2004）．これらの相同 RS ニューロンに見られた発火特性の分化は，魚の逃避運動の多様な制御に寄与すると考えられる．

（３）相同 RS ニューロン間の階層的結合

２つの相同ニューロンの同時細胞内記録から，M 細胞から MiD2cm および MiD3cm へ介在ニューロンを介した抑制性シナプス結合を見出した（図６）．結合は一方向で逆の結合は観察されなかった．M 細胞が単発発火すると，MiD2cm や MiD3cm のバースト発火が一時的に止まるほどこの抑制シナプス入力は強力であった．一方，後脳の背側に左右一対存在するマウスナー・シリーズとは異なり，腹側にクラスターをなして分布する MiV2 と MiV3 は M 細胞から強い興奮性結合を受ける．このように形態学的な相同性と分節構造を反映した結合様式は興味深い．相同 RS ニューロンとの間でつくる階層的な結合回路が，M 細胞によって誘導される逃避運動の制御に重要な役割を果たすと考えられる．

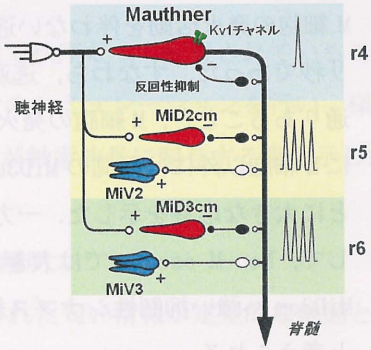


図６．分節間相同ニューロンからなる機能回路

２．形態学的相同ニューロンから構成される機能回路のはたらき

ニューロン活動のイメージングは，生体内のニューロン活動を非侵襲で記録し，しかも複数ニューロンのパラレルプロセッシングを解析する上で重要な手法である．本研究では生体内カルシウム・イメージングによって，後脳網様体ニューロン群が魚の逃避運動中にどのように働くかを調べた．

（１）　抑制性シナプス応答の生体内イメージング

カルシウム・イメージングでは，これまで主にニューロンの活動電位と興奮性シナプス応答が計測されてきたが，本研究では M 細胞群の活動を大きく左右する抑制性シナプス応答を初めて生体内で光学計測した（図７）．M 細胞の活動電位は抑制性シナプスコンダクタンスにより振幅が減少することに着目し，抑制性シナプス入力による M 細胞の活動電位の減衰をカルシウム・イメージングした（*J. Neurosci.* 2002）．実験には体が透明なゼブラフィッシュ稚魚を用い，カルシウム蛍光指示薬（Oregon Green BAPTA-1）を RS ニューロン群に取り込ませて共焦点レーザー顕微鏡で計測した．光学計測の結果は，M 細胞のホールセル記録で電気生理学的に検証した．さらにこの方法を用いて，抑制性シナプス応答の長期増強（*J. Neurophysiol.* 1995; *Nature* 1998）をも光学計測することに成功した．

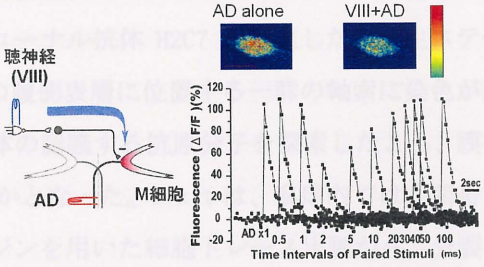


図7．聴神経からM細胞へのフィードフォワード抑制

（２）　逃避運動中の後脳ニューロン群の活動

逃避運動中のゼブラフィッシュからニューロン活動と運動を同時に記録するために，共焦点レーザー顕微鏡と光学顕微鏡を上下に組み合わせた光学計測システムを新たに開発した（図８）．２つの顕微鏡間で光の干渉が起こらないように工夫し，頭部を固定したゼブラフィッシュ稚魚の尾部の運動を高感度高速デジタルカメラ（1ms/frame）で記録しつつ，後脳 RS ニューロン群の活動

をカルシウム・イメージングした．水流刺激を頭部に与えると，M 細胞の発火活動に対応する蛍光応答が記録され，反対側に尾が屈曲する．多くの場合（80%）は逃避運動は刺激側の M 細胞の活動電位を伴うが，M 細胞の発火活動を伴わない逃避運動も一部見出された．M 細胞の発火活動を伴う逃避運動(M escape)は，刺激からの潜時が平均 4 ミリ秒で起こるのに対して，M 細胞の発火活動を伴わない逃避運動(Non-M escape)は M escape より遅く起こり平均潜時 9 ミリ秒であった．すなわち，逃避運動を駆動する回路が M 細胞を介するものと介さないものの 2 通りあることと，M 細胞の発火によって逃避運動が実現されたと考えられる．また，逃避運動中に M 細胞以外には両側の MiD3cm に蛍光応答が観察された．刺激と反対側の MiD3cm は逃避運動ごとに大きな応答を示した．一方，同側の MiD3cm は M escape では小さな応答を示すのみなのに対して，Non-M escape では大きな蛍光応答を示した．これは電気生理学的に示された M 細胞から MiD3cm へ強い抑制性シナプス結合を反映し，Non-M escape を駆動する神経回路に含まれていると考えられる．

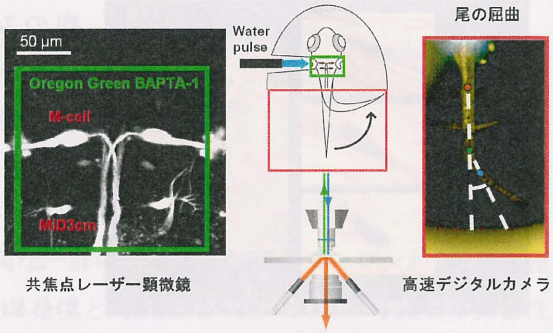


図８．ゼブラフィッシュの逃避運動とRS細胞活動の同時計測

A01-05

表題　嗅覚の神経回路形成の分子機構

研究代表者名　平田たつみ

所属　国立遺伝学研究所

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度ー１６年度

研究成果の要旨

1) 嗅覚二次神経細胞の軸索が、発生ステージにしたがって嗅索内で秩序だって配置されていることを明らかにした。2) 活動依存的神経回路モデルを用いて嗅神経投射のシミュレーションを行い、様々な実験結果の説明が可能であることを示した。3) 膜タンパク質 M6a が軸索伸長に関与する事を示した。

研究成果

(1)嗅覚二次神経回路における軸索の発生ステージ依存的な配置の解明

近年の研究で、嗅覚一次中枢である嗅球の表面には、高度に選別された匂い情報が定型的な地図として表現されていることがわかってきた。この地図が、その後どのような形で中枢へと受け渡されていくのかが次の興味深い問題であるが、これ以降の軸索投射の規則性については全くわかっていない。嗅球の投射神経細胞は複数の嗅皮質領域へと投射するが、軸索標識等の実験からは、これらの間の結合に秩序を見いだすことはできない。それどころか、嗅球の軸索の伸長経路である嗅索内において、すでに軸索は不規則に入り混じり、細胞体とのトポグラフィックな位置関係は失われると考えられている。

我々は、嗅索を走行する軸索の一部を染色するモノクローナル抗体 H2C7 を単離した。発生ステージにより染色パターンに若干の違いはあるが、常に嗅索中の腹側表層に位置する一群の軸索に染色が認められる。この染色パターンの意味を知るために、H2C7 抗体の認識する抗原分子を探索したころ、膜型チロシンキナーゼレセプターc-kit が抗原であることが明らかとなった。c-kit は、嗅球内では中間帯に分布する細胞で強く発現されていた。ブロモデオキシウリジンを用いた細胞トレース実験から、分裂を終えた投射神経細胞が、中間帯を放射状に移動する際に一過的に c-kit を発現し、その後その発現を停止することが示された。すなわち、同時期に誕生した嗅球の二次投射神経細胞は、その細胞体の空間的配置にかかわらず、軸索を嗅索の中で近傍へと収束させて伸長すると考えられた。そして嗅索の中では、深層背側部から表層腹側部に向かって、発生ステージのより新しい軸索が付け加えられてゆくと考えられた。

これまでの研究で、嗅球における投射神経細胞体の位置と嗅索内の軸索配置との間にはトポグラフィックな対応関係はないとされてきた。本研究は、その結果を追証すると共に、嗅索内の軸索には発生ステージの違いに応じた組織化が存在することを示した。今後はこの軸索配置の果たす意義についての解析が必要であろう。

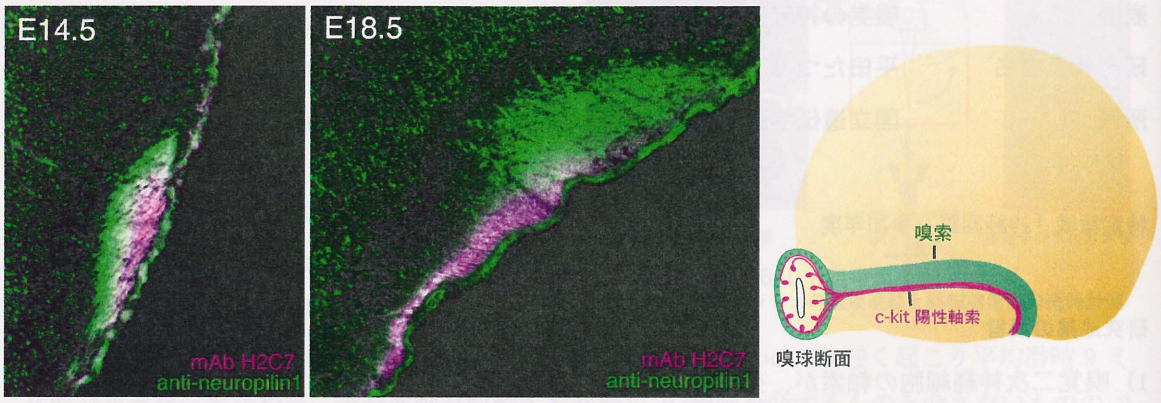


図1　胎生14.5日目（左）と18.5日目（右）嗅索のモノクローナル抗体H2C7（マゼンタ）と抗neuropilin1抗体（緑）による二重免疫染色像。抗neuropilin1抗体はほとんど全ての嗅索中の軸索を染色する。それに対してH2C7抗体は、嗅索の中で腹側表層に分離した軸索集団を認識している。H2C7 抗体の認識する抗原分子(c-kit)は、中間帯を移動中の誕生まもない嗅覚二次神経細胞において一過的に発現され、その後その発現は停止する（右）。つまりH2C7抗体の染色パターンは、同時期に誕生した神経細胞の軸索が嗅索の中で近傍に位置することを示している。

(2)活動依存的神経回路モデルを用いた嗅神経投射のシミュレーション

大気中の匂い分子は嗅細胞の発現する匂い受容体により認識される。マウスでは約 1000 種の匂い受容体の遺伝子が存在するが、個々の嗅細胞はこのなかから1種類をのみを選んで発現する事が知られている。同じ匂い受容体を発現する嗅細胞は嗅上皮上では散在しているが、その軸索は収束して同一の糸球体へと投射する。結果として、嗅球表面には匂い受容体の種類によって特徴づけられる糸球体の地図ができあがる。嗅神経の投射において、匂い受容体自身が非常に重要な働きをすることがわかっている。たとえば、ある匂い受容体遺伝子を欠損したマウスでは、その遺伝子を発現する嗅細胞の軸索は糸球体に収束することができない。また、ある匂い受容体遺伝子座に別の受容体を組み替えてやると、その遺伝子を発現した軸索は、元々の受容体とも新しく獲得した受容体とも異なる第3の糸球体に収束すると報告されている。

嗅神経投射において、嗅細胞の神経活動が関与するか否かについては大きな論争がある。そこで、Hebb型学習則に基づく活動依存的神経回路モデルを用いて嗅神経投射のシミュレーションを行い、現在までに示されている実験データをどこまで説明できるか検討した。一般的に軸索投射は大まかには活動非依存的にガイドされ、活動依存的に最終的な調整が行われると考えられている。本研究ではその考えを基に、活動依存的な嗅神経相互作用が働く範囲を 48 x 48　の格子内に限定し、その中で16種類の匂い受容体を発現する嗅細胞の軸索が相互作用する様子を、Tanakaの自己組織化モデルを用いてシミュレートした。その結果、仮想匂い分子の刺激により、同じ受容体を発現する嗅細胞が糸球体様構造に収束することが示された。さらに、匂い受容体欠損マウスにおける嗅神経投射のパターンや、トランスジェニックマウス等で遺伝子改変した匂い受容体遺伝子アレルを発現する軸索の分離など、多くの実験結果をこ

のモデルによりうまく再現することができた。

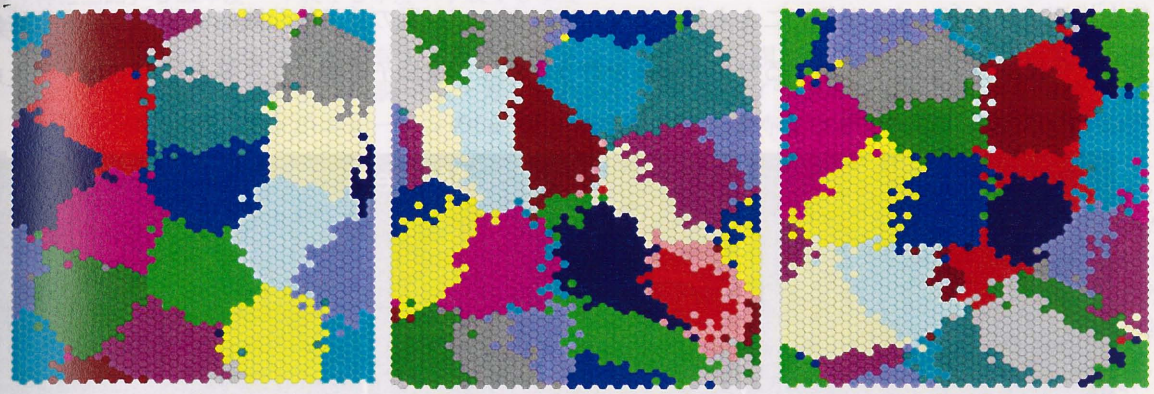


図２ 活動依存的神経回路モデルによる嗅神経投射のシミュレーション。（左）仮想的な匂い分子刺激により 16 種類の異なる匂い受容体を発現する嗅神経は分離した糸球体を形成する。（中）同じ構造を持つ匂い受容体でも、遺伝子操作を行ったアレルから発現された嗅神経（薄赤）は、元々のアレルを発現する嗅神経（赤）とは分離した糸球体を形成することができる。細胞表面に提示された匂い受容体の密度の違いを想定して実験結果を再現した。（右）外界の匂い分子の存在頻度を変えた仮想実験。ある匂い分子の頻度を下げると、その分子に強く反応する匂い受容体（赤）を発現する嗅神経の糸球体が分裂する。生体で観察される２重糸球体との関連が期待される。

(3) 成長円錐局在タンパク質 M6a の軸索伸長における機能

発生時、神経細胞の軸索の多くは、非常に長い距離を伸長して標的にたどり着く。この時重要なのが軸索の先端にある成長円錐で、これが周囲の環境を探るセンサーとして働きながら、軸索を伸長方向へと導いていくと考えられている。外界の情報を細胞内に伝えるという重要性から考えても、成長円錐の細胞膜には軸索伸長に必須な分子が存在すると考え、成長円錐の膜表面に結合するモノクローナル抗体を多種類作成した。これらの抗体を一つ一つ初代神経細胞の培養に加えて、突起伸長に与える影響を検索したところ、膨大な数のモノクローナル抗体の中から唯１つマウス中枢神経の軸索伸長を非常に強く阻害する抗体 1B4 を単離する事ができた。

伸長中の軸索にこのモノクローナル抗体 1B4 を作用させると、成長円錐の形態は保たれたままで、糸状仮足も盛んに運動性を示すにもかかわらず、成長円錐の前進が停止するという奇妙な反応が観察される。これは、軸索反発因子等の作用による成長円錐の崩壊とは全く異なり、これまで知られていない珍しい軸索反応である。免疫染色を行うと、この抗体の認識する抗原分子は成長円錐の先端に局在することが分かった。さらに、この抗体の認識する抗原分子を探索した結果、抗原は４回膜貫通タンパク質の M6a であることが明らかになった。M6a たんぱく質を培養株細胞に強制発現すると、細長い突起が多数形成され、この突起上に M6a たんぱく質が濃縮するのが観察された。1B4 抗体を添加すると、この突起は瞬時に退縮し、M6a たんぱく質の何らかの機能を反映した現象であると考えられた。

M6a は成長円錐の表面に多く分布することから、1993 年に同定されたタンパク質である。当時軸索

伸長への関与が示唆されたものの、それ以降なぜかほとんど解析が進んでいない。特に、その構造上機能を推測できるドメインが無いことも災いして、M6a タンパク質の分子的な機能に関する知見は皆無である。今後は M6a と相互作用する分子の解析を行うと共に、遺伝子破壊マウス等を用いて M6a の生理的機能を明らかにしたいと考えている。

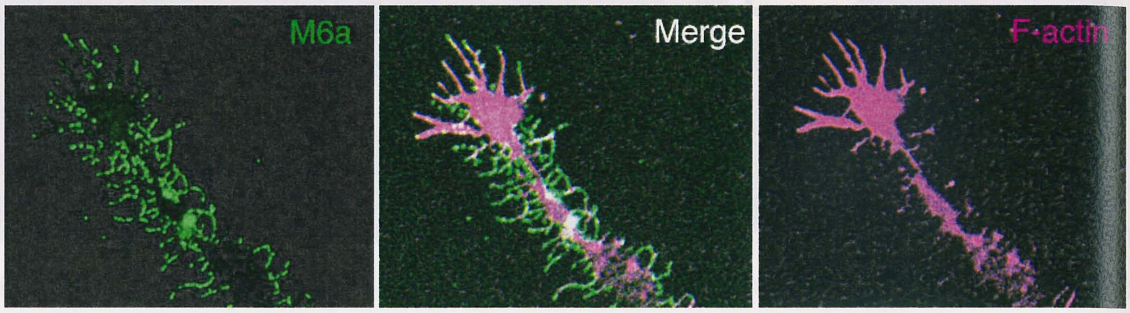


図３　培養嗅球軸索のモノクローナル抗体 1B4（緑）と rhodamine-phalloidin（赤）による二重染色像

A01-06

表題（研究課題）　糸球体神経核脳スライスを用いた神経回路特性の修飾機構の解析

研究代表者名　岡　良隆
所属　東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

特定領域「神経回路」参加年度　平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨

実験上有利な特徴を有する魚類脳スライスを用いて、視床ニューロンへのシナプス伝達や神経回路特性を生理学的に調べる一方、それらに対するペプチドの神経修飾作用を解析する基礎として、ペプチドがニューロンのCa^{2+}チャネルや自発放電特性などを修飾する機構を明らかにした。

研究成果

哺乳類を中心とする多くの脊椎動物中枢神経系において、神経核は多くの場合比較的小型の多種の細胞により構成され、構築も複雑である。一方、ある種の硬骨魚類（本研究で用いたのは主にカワハギ）に存在する「第３型糸球体核」は視覚性の入力を受け視床下部下葉に投射する機能的に興味深い神経核で、構成細胞種が少なく(2 種)、明瞭な層状細胞構築を持ち、また巨大な（>60μm）シナプス後樹状突起を含むという形態学的特徴をもち、神経核機能の解析の為の優れたモデル系になる可能性がある(図 1)。そこで最初に糸球体核脳スライス標本を用いて，電気生理学的手法により 2 種の構成細胞及びシナプス伝達の生理学的解析を行った(図 2，3)。次に、このデータをもとにして、糸球体核大型細胞の細胞体におけるlow-passフィルター特性が細胞のどのような性質によるのかを膜電位固定法で調べた。活動電位発火後に大型細胞の静止膜電位に変化は見られず、また定電流刺激による単発発火の特性はCa^{2+} freeの細胞外液でも同様であることからK^+やCa^{2+}チャネルの関与の可能性は低いと考えられた。そこで活動電位の生成に直接関与するNa+チャネルの解析を膜電位固定下で行った。その結果、大型細胞のNa^+チャネルは特に-80mV前後で極めて大きな不活性化からの回復の時定数（τ_h）を持つこと明らかとなった。シュミレーションプログラムNEURON上でこのNa^+チャネルの再構成をsingle compartmentのもとで行った結果、このNa^+チャネルと、古典的なHodgkin-Huxley型のK^+チャネルの組み合わせのみで、大型細胞の基本的な単発発火特性及びlow-pass filter特性が再現できた(図 4)。

一方、当研究室では終神経GnRH系と呼ばれるペプチド系に関して研究を進めており、それらが脳全体に広く投射して神経作用を及ぼす重要な神経系であるということがわかっている(図 5)。これらの従来の研究を元に、次に、上記のように生理学的解析を行った２種の構成細胞について，神経細胞の興奮性や神経伝達に対する修飾作用を持つと考えられるGnRHペプチドの影響を解析することを計画した。まず，免疫組織化学によりカワハギのGnRH神経線維の糸球体核付近における分布を調べたところ，それらは糸球体核の中にはあまり侵入しないが，神経核の周囲に比較的豊富に存在する，という結果を得た。また、in situ hybridizationを用いて他種の硬骨魚類の脳で調べたところでは、GnRH受容体mRNAが糸球体の２種のニューロンに発現していることが分かった(図 6)。一方、GnRHペプチドのCa^{2+}チャネルに対する神経修飾作用を調べると、NおよびRタイプチャネルで顕著に効果があることが分かった(図 7)。これらのチャネルは糸球体ニューロンに入力するシナプス終末の伝達物質放出に係わることが予想されることから、今後はGnRHペプチドの糸球体シナプスに対する神経修飾作用を解析して行くと同時に、大型細胞の特性を決めるNa^+チャネルに対するGnRHペプチドの神経修飾作用などについても解析を進める予定である。

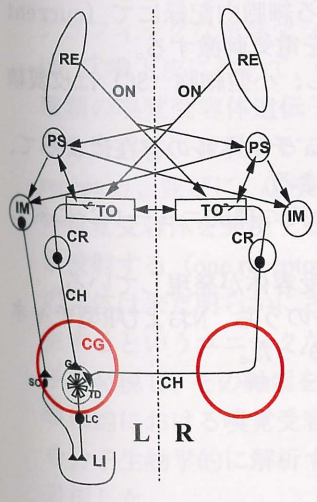


図 1

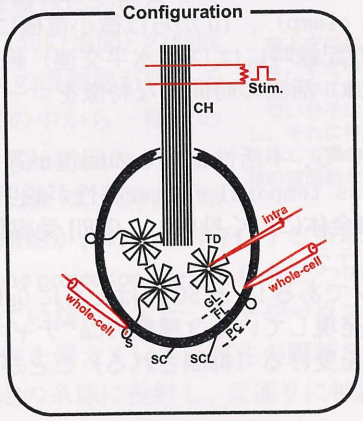


図 2

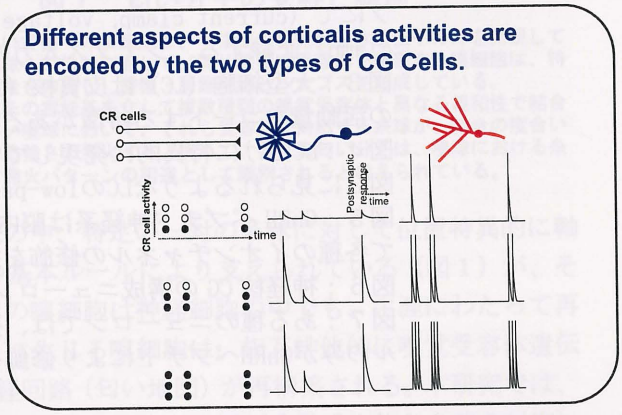


図 3

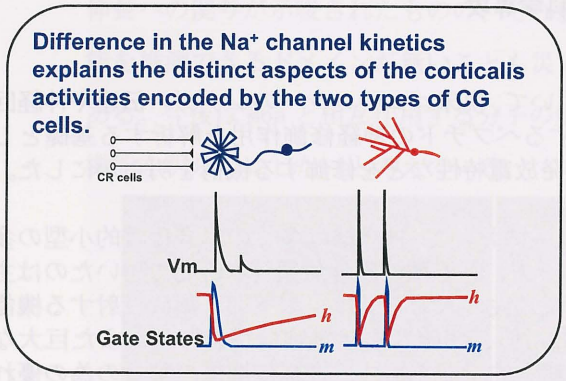


図４

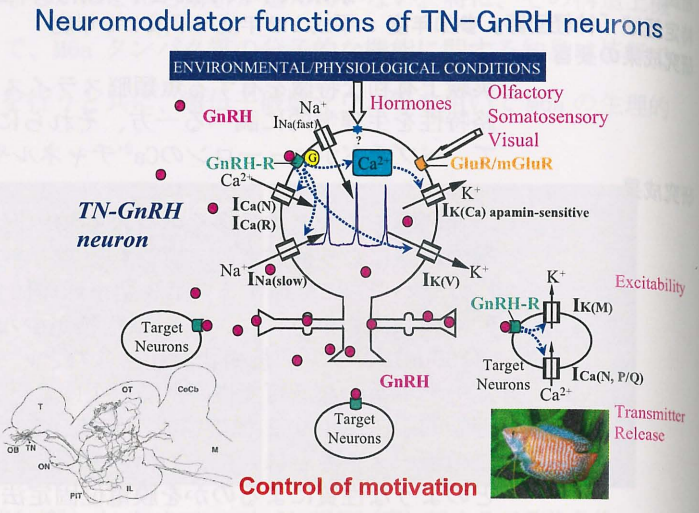
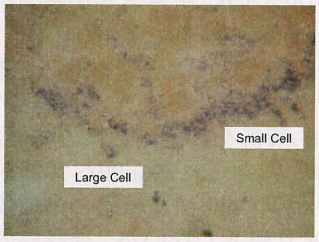


図５

CG and TN-GnRH system

- CG receives visual inputs and are involved in the feeding and/or aggressive behaviors
- TN-GnRH neurons project widely in the brain and acts as a neuromodulatory system that regulates the motivational state of the fish



In situ hybridization of GnRH receptors in the dwarf gourami CG
(Oka et al, unpublished data)

図６

Each HVA I_{Ca} subtype has different sensitivity for the GnRH-induced inhibition

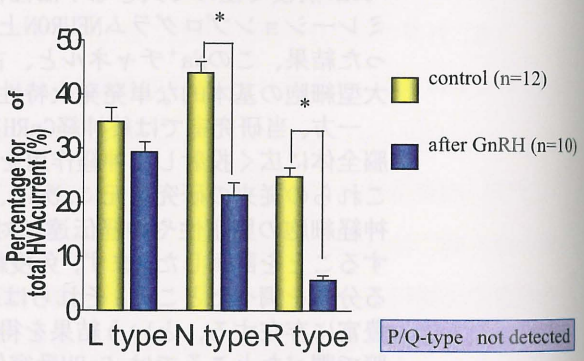


図７

図の説明

図１：従来の解剖学的知見により明らかになっている、糸球体神経核をめぐる神経回路。CG:糸球体、LC: Large cell、SC: Small cell、TD: Tip dendrite of LC

図２：糸球体神経核（CG）の２種の細胞、LC、SC からの記録方法。細胞体からはパッチクランプにて（current clamp, voltage clamp）、TD からは微小電極による細胞内記録にて（current clamp）記録する。シナプス入力の記録時には CH（水平交連）線維を電気刺激する。

図３：大型細胞（LC）は皮質核（CR）活動の時間的な特徴をコードし、小型細胞（SC）は皮質核の活動量をコードする特徴がある

図４：LCだけに特異的に発現している、不活性化からの回復が遅いNa^+チャネルの存在によって、図３に見られるようなLCのlow-pass temporal filter特性が説明できる。

図５：GnRH ペプチド神経系は脳内全体に広く投射し、GnRH 受容体を持つ標的ニューロンに対して各種のイオンチャネルの修飾を行う。

図６：神経核 CG の構成ニューロンである LC と SC にはともに GnRH 受容体が発現している。

図７：ある種のニューロンでは、発現している３種類のCa^{2+}チャネルのうち、NおよびR型チャネルのみがGnRHペプチドにより修飾を受ける（抑制される）ことが分かった。

A01-07

嗅覚系における神経回路の形成と再生の分子機構

坪井昭夫
東京大学大学院理学系研究科

特定領域「神経回路」参加年度　平成１２年度ー平成１６年度

研究成果の要旨

嗅覚受容体遺伝子の発現制御に関与する DNA 領域を同定すると共に、相同性の高い嗅覚受容体遺伝子を発現する嗅細胞は嗅球上の局所的な糸球ドメインに軸索投射する事、及び、嗅上皮における嗅覚受容体遺伝子の発現領域が嗅球上での背腹軸に沿った大まかな投射位置を規定している事を明らかにした。

研究成果

【目的】

私は、神経回路がどの様にして形成され維持されるのか、また神経回路が何らかの原因で破壊された時、どの様にして再構築されるのかを明らかにすることを目的とし、嗅覚系をモデルに研究を行っている。高等動物の嗅覚系では、全遺伝子の約３％を占める一千種類に及ぶ嗅覚受容体遺伝子により、数十万種類の匂い分子が識別されている。匂い分子と嗅覚受容体の対応は、複数の類似した分子群と複数の種類の受容体群の関係という、結合の度合いを勘案したグループ対グループの対応であると考えられている。従って、匂い分子は嗅上皮において、その官能基を介して複数種類の嗅覚受容体と異なる親和性で結合すると、嗅球においてはそれら受容体に対応する糸球が、結合の度合いに応じて異なる強さで発火し、その発火の空間的なパターンの相違を脳が識別すると考えられている（図１）。即ち、嗅覚系では、嗅上皮においてレセプターにより受容された匂い分子と云う化学情報が、嗅球においては、糸球の発火パターンと云う空間的な位置情報に変換されていると言える。この様な嗅球におけるトポグラフィックな糸球マップ（匂い地図）の形成は、①嗅上皮において、個々の嗅細胞が約一千種類の嗅覚受容体遺伝子群の中から一種類のみを選択的に発現すること（one neuron - one receptor）、並びに、②嗅球において、同じ種類の嗅覚受容体を発現する嗅細胞が、約一千対存在する糸球の中、特定の一対の糸球に対して位置特異的に軸索投射する（one receptor - one projection site）という二つの基本ルールにより支えられている（図１）が、その実体は未だ明らかにされていない。また、ヒトやマウスの嗅細胞は神経細胞の中でも、生涯にわたって再生するというユニークな特性を備えている。再生の際新たに生じる嗅細胞は、相互排他的に嗅覚受容体遺伝子を発現し、その軸索を特定の糸球に投射し、元通りに神経回路（匂い地図）が再構築される。本研究では、嗅細胞における嗅覚受容体遺伝子の発現により規定される、嗅球上の匂い地図（嗅覚受容体と糸球の対応）を分子生物学的に解析することにより、嗅覚系における神経回路の形成と再生に関するメカニズムの解明を目指した。

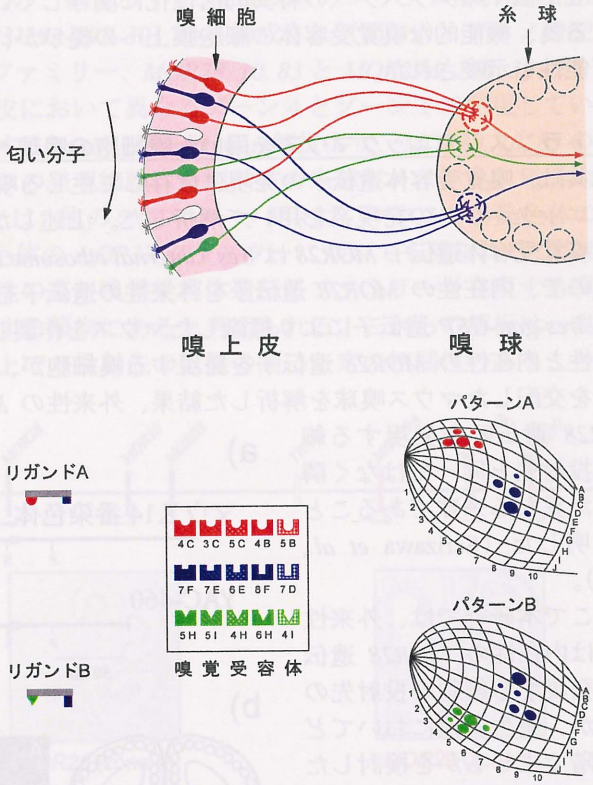


図１　匂い分子の受容と識別

嗅上皮において個々の嗅細胞は、一種類の嗅覚受容体遺伝子のみを発現している。また嗅球への投射に際して、同じ種類の受容体を発現する嗅細胞は、特定の糸球に軸索を伸展し、僧帽・房飾細胞とシナプスを形成している。

匂い分子はその官能基を介して複数種類の嗅覚受容体と異なる親和性で結合し、それに伴い嗅球において、それら受容体に対応する糸球が、結合の度合いに応じて異なる強さで発火する。従って、個々の匂い分子は、嗅球における糸球の空間的な発火パターンの相違として識別されると考えられている。

【成果と考察】

1．トランスジェニックマウスを用いた嗅覚受容体遺伝子*MOR28* クラスターの発現制御の解析

私共のグループでは、嗅覚受容体遺伝子の発現制御のメカニズムを解明する為、長年の懸案であったトランスジェニックマウスにおける嗅覚受容体遺伝子の発現系の確立を試み、YAC（yeast artificial chromosome）ベクターを用いることにより世界に先駆けて成功した（Serizawa *et al.*, 2000）。更に、マウス嗅覚受容体遺伝子 *MOR28* クラスター（*MOR28-10-83-29A*）を導入したトランスジェニックマウスの解析から、これら遺伝子群の発現には、*MOR28* の転写開始点上流約 100 kb の領域が必要であることを示した。そこで本研究において、マウス *MOR28* クラスターとそのヒト ortholog クラスター領域に関して比較ゲノム解析したところ、*MOR28* 遺伝子の転写開始点上流約 75 kb に、唯一、双方で相同性の高い 2 kb の領域が同定された（Nagawa *et al.*, 2002）。興味深いことに、*MOR28* 遺伝子の上流に存在するこの相同性領域を欠失させたトランスジェニックマウスでは、*MOR28, 10, 83, 29A* 遺伝子の発現が同時に消失した。この観察は、嗅覚受容体遺伝子の発現がクラスターのレベルで制御されており、一つの嗅覚受容体遺伝子が選択される前に、一つのクラスターが choice されることを示唆している。現在、この相同領域に含まれる制御配列を特定すると共に、これに結合する制御因子を単離することを目指している。ここに述べるクラスターの選択には、複数の制御因子の組み合わせが個々のクラスターの特異的活性化に関与している可能性が有り、クラスター選択の相互排他性を確保する為、機能的な嗅覚受容体の細胞膜上への提示が、活性化複合体の形成にフィードバック阻害として働く可能性も示唆された。

2．トランスジェニックマウスを用いた嗅細胞の嗅球への軸索投射の解析

私共は、嗅覚受容体遺伝子の発現に依存して生じる嗅細胞の軸索投射の分子機構を解明する為、トランスジェニックマウスの発現系を用いて解析した。上述したトランスジェニックマウスにおいては、YAC DNA 上の嗅覚受容体遺伝子 *MOR28* は *ires*（*internal ribosome entry site*）を介して *tau-lacZ* 遺伝子により標識されているので、内在性の *MOR28* 遺伝子を外来性の遺伝子を発現する細胞と区別する為、ノックインの手法を用いて *ires-gap-GFP* 遺伝子により標識したマウスを作製した（図２a）。*lacZ* または *GFP* 遺伝子で標識された外来性と内在性の *MOR28* 遺伝子を発現する嗅細胞が、嗅球上のどの糸球に軸索投射するのかを知る為、これらを交配したマウス嗅球を解析した結果、外来性の *MOR28* 遺伝子を発現する嗅細胞の投射先は、内在性 *MOR28* 遺伝子を発現する細胞の投射先と同一ではなく隣接した異なる糸球であることが判明した（Serizawa *et al.*, 2000）。

そこで本研究では、外来性または内在性の *MOR28* 遺伝子を発現する細胞の投射先の分離が、発生過程においてどの段階で生じるかを検討した（Sengoku *et al.*, 2001）。胎生 15 日に外来性 *MOR28* に対する軸索が見え始め、胎生 17 日には内在性 *MOR28* に対する軸索が現れ、まだ糸球様の構造は見られず、胎生 19 日には両 *MOR28* 発現細胞の軸索は混在していた（図２b）。生後直後では糸球様の構造は見られたが、外来性 *MOR28* を発現する細胞の軸索末端は内在性のものに混在していた。生後 2 日目以降で二種類の *MOR28* 発現細胞の投射先が分離し始め、生後 5 日以降にははっきりとした分離が認められた

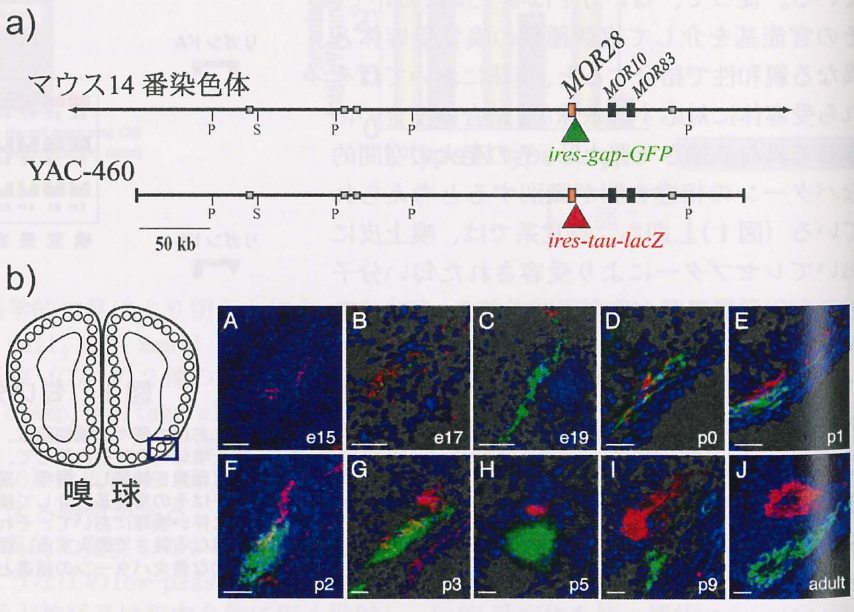


図２ トランスジェニックマウスを用いた嗅細胞の嗅球への軸索投射の解析

a）嗅覚受容体遺伝子*MOR28*クラスターのゲノム構造とそれを有するYACベクターを示す。三つの嗅覚受容体遺伝子、*MOR28*、*MOR10*及び*MOR83*は、マウス14番染色体上に隣接して存在し、互いに高い相同性を示す。

b）外来性と内在性の*MOR28*遺伝子を、それぞれ*lacZ*と*GFP*遺伝子で標識したマウスに関して、発生過程における嗅球の連続切片を免疫染色によって解析した。外来性（抗β-ガラクトシダーゼ抗体）或いは内在性（GFP蛍光）の*MOR28*遺伝子を発現する細胞の投射先は、それぞれ赤色、緑色で観察される。

（図２b）。同様なことは、界面活性剤 Triton X-100 で処理した嗅上皮の再生過程についても見られ、これらの結果は、外来性または内在性の *MOR28* を発現する嗅細胞は、同じ受容体蛋白質を産生するにも拘わらず、投射に際しては、隣接してはいるが異なる糸球に軸索を伸展することを示している（Sengoku *et al.*, 2001）。また、それぞれを発現する嗅細胞の軸索の選別・収束は pathfinding の過程ではなく、糸球構造の形成に伴って生じることも示唆された。更に、嗅細胞の嗅球への軸索投射に関して、上述したノックイン及びトランスジェニックマウスを用いて解析した結果、嗅覚受容体遺伝子の染色体上での位置、遺伝的多型、遺伝子標識の種類及び有無などが、軸索投射を規定するパラメータになり得ることが示された（Ishii *et al.*, 2001）。

3．嗅覚受容体遺伝子のゲノム上での連鎖と嗅球上での投射先の相関

一方、嗅覚受容体遺伝子は、マウスにおいて約 1500 種類の多重遺伝子系を形成し、殆どの染色体上に約 40 個のクラスターをなして存在する。本研究では次に、マウス嗅覚受容体遺伝子 *MOR28* クラスター（Tsuboi *et al.*, ***J. Neurosci.*** 20, 8409, 1999）を含めた複数のクラスターに関して、受容体遺伝子を発現する嗅細胞の投射先を解析した。その結果、「同一クラスター上に隣接して存在し、相同性の高い嗅覚受容体遺伝子ファミリーを発現する嗅細胞は、嗅上皮において同一ゾーンで類似した匂い分子を受容し、嗅球において局所的な糸球ドメインに軸索投射する」ことが示唆された。その一例を示すと、私共のマウスゲノム解析から *MOR28* 遺伝子クラスターは、６つのメンバー（*MOR28-10-83-29A-29B-30*）から構成され（図３a）、アミノ酸配列の相同性から、これら受容体遺伝子群は二つの異なるファミリー、*MOR28, 10, 83* と *MOR29A, 29B, 30* に分類され（Nagawa *et al.*, 2002）、各々のファミリーは嗅上皮において異なるゾーン４とゾーン１で発現していることが明らかになった（図３b）。更に、嗅球切片に関する *in situ* hybridization 解析より、*MOR28, 10, 83* の発現細胞は腹側後方の糸球ドメインへ、*MOR29A, 29B, 30* の発現細胞は背側前方の糸球ドメインへ、局所的に軸索投射していることが判明した（図３c）。同様なことは、他のクラスター、例えば、マウス２番染色体の *A16* クラスター、７番染色体の *P2* クラスターや４番染色体の *mOR37* クラスターについても見られることから、一般に、同一クラスター上に隣接して存在し、相同性の高い嗅覚受容体遺伝子ファミリーを発現する嗅細胞は、嗅球において局所的な糸球ドメインに軸索投射する傾向にあると考えられる。これらの解析は、嗅覚受容体遺伝子の染色体上での連鎖（linkage）と、嗅球上での投射先の位置の間に一定の相関性のあることを示唆するものであり、匂い地図形成の遺伝学的基礎を理解する上で極めて有用であると考えられる。またこれらの観察は、嗅球の光学的イメージング解析より得られた「特定の官能基を有する匂い分子は、嗅球表面において局所的なドメイン内の糸球を興奮させる」という知見を勘案すると、「類似した匂い分子はその官能基を介して、相同性の高い嗅覚受容体群により受容され、嗅球上の特定のドメインに属する糸球を興奮させる」と考えられる。

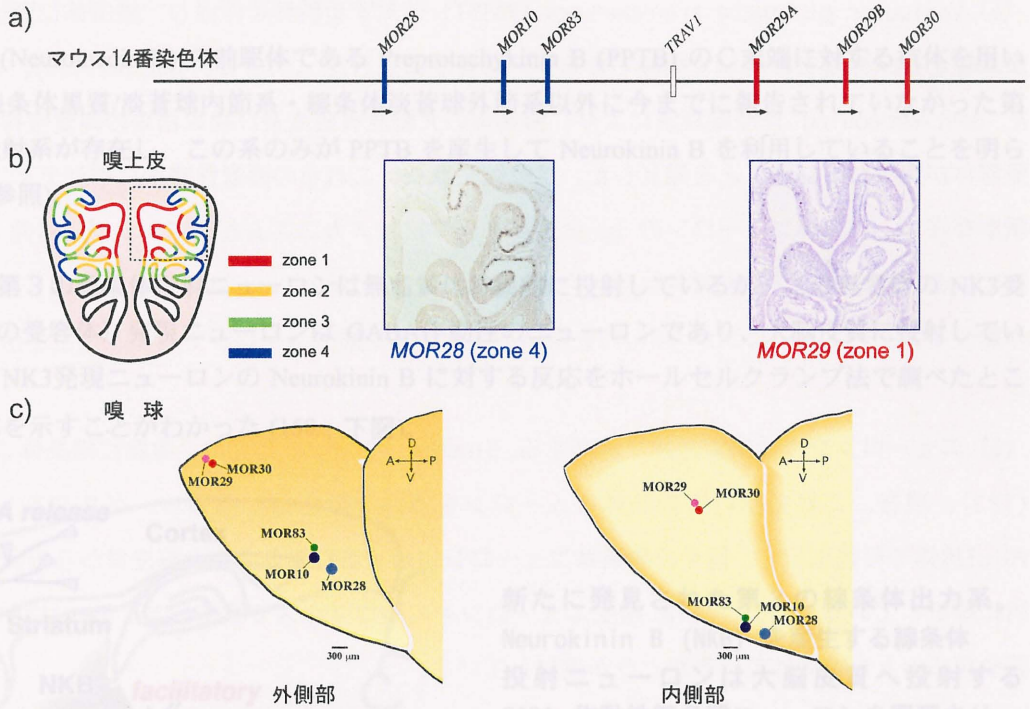


図３ *MOR28*クラスターの受容体遺伝子に関する発現と投射の解析

a）*MOR28*遺伝子クラスターは、１４番染色体上に存在し、６つのメンバーから構成され、アミノ酸配列の相同性から、これら受容体遺伝子群は二つの異なるファミリー、*MOR28, 10, 83*と*MOR29A, 29B, 30*に分類される。
b）嗅上皮切片に関する*in situ* hybridization解析より、*MOR28, 10, 83*と*MOR29A, 29B, 30*のファミリーは、異なるzone 4とzone 1で発現していることが明らかになった。
c）嗅球切片に関する*in situ* hybridization解析より、*MOR28, 10, 83*の発現細胞は腹側後方の糸球ドメインへ、*MOR29A, 29B, 30*の発現細胞は背側前方の糸球ドメインへ、局所的に軸索投射していることが判明した。

4．嗅上皮における嗅覚受容体の発

A01-07

現領域と嗅球における投射領域との対応

上述した様に、MOR28, 10, 83（ゾーン４レセプター）は同一ファミリーに属し、これら発現細胞は嗅球上の腹側後方の近接した糸球に投射しているが、本研究では更に、MOR28 糸球近傍にどの様な種類の嗅覚受容体を発現する嗅細胞が軸索投射しているのかを検討した。先ず、ノックインの手法を用いて *MOR28* 遺伝子を *ires-gap-GFP* 標識したマウスの嗅上皮から、GFP を指標にして、ゾーン４領域を摘出し、total RNA を抽出し、逆転写後、嗅覚受容体遺伝子に対する縮重プライマーセットを用いて PCR を行い、約 200 種類の cDNA を単離した。次に、嗅上皮切片に関する *in situ* hybridization 解析より、それら cDNA の中からゾーン４で発現する嗅覚受容体遺伝子を選別して、これら発現細胞の嗅球における投射先を laser micro-dissection 法と *in situ* hybridization 法を用いて検討した。これ迄の解析から、*MOR28, 10, 83* 遺伝子ファミリーと相同性の高い嗅覚受容体遺伝子ファミリーを発現する嗅細胞が、必ずしも MOR28 糸球近傍に軸索投射しているのではないことが判明した。そこで次に、どの様のパラメータが、MOR28 糸球近傍への投射に関与しているのかを知る為、近傍の糸球に対応する嗅覚受容体群に関して、嗅上皮における発現様式を解析した。その結果、興味深いことに、これ迄提唱されていた嗅上皮のゾーン構造が、嗅覚受容体の発現に依存して細分化されること、及び、嗅上皮における嗅覚受容体遺伝子の発現領域が、嗅球上での背腹軸に沿った大まかな投射位置を規定していることが示唆された(投稿中)。今後は、嗅球における投射位置の前後軸が何によって規定されているのかを知る為、鳥類の視覚系において網膜・視蓋上に濃度勾配を作って投射マップの形成を支えている Eph-ephrin 系に着目し、これらが嗅覚受容体分子と協調して投射位置の決定に関与している可能性を検討する。具体的には、Eph-ephrin のシグナル伝達系で機能する因子の dominant-negative 変異体を、*Cre-loxP* システムを用いて特定の嗅覚受容体遺伝子と共に発現させ、その軸索投射を解析している。

A01-08

表題（研究課題）：　新たに発見された線条体の投射ニューロン系

研究代表者名：　金子武嗣　（分担者：　古田貴寛、藤山文乃）

所属：　京都大学大学院・医学研究科・高次脳形態学

特定領域「神経回路」参加年度：　平成１２年度～１６年度

研究成果の要旨：

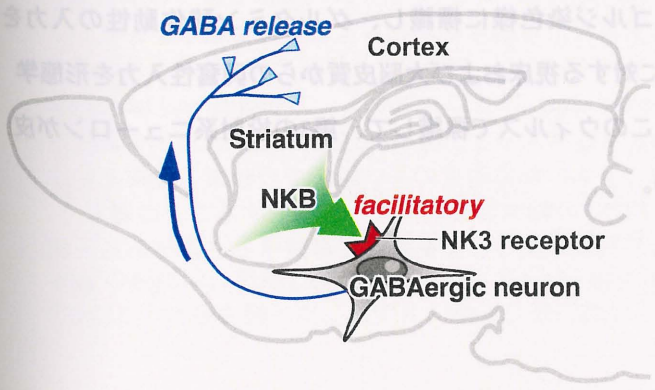
直接路・間接路という２大線条体出力系以外に、Neuorkinin B 産生ニューロンから成る第３の線条体出力系が存在していた。この出力系は特異的に無名質に投射し、Neurokinin B 受容体を発現しているGABA作動性無名質大脳皮質投射ニューロンを脱分極して、大脳皮質に影響を与えると考えられた。

研究成果：

従来、運動系の高次中枢の一つである線条体には、投射ニューロンとして、線条体 - 淡蒼球内節/黒質網様部投射系（直接路）と線条体 - 淡蒼球外節 - 視床下核 - 淡蒼球内節/黒質網様部投射系（間接路）の２大出力系のみが存在すると考えられていた。我々は線条体投射ニューロンあるいは線条体への入力を免疫学的に識別する手段を開発して、多重免疫蛍光標識・免疫電顕・逆行性標識法・ホールセルクランプ・遺伝子工学等を用いて、この５年間で以下のような成果を得た。

（１）Neurokinin B (Neuromedin K) の前駆体である Preprotachykinin B (PPTB) のＣ末端に対する抗体を用いて、新線条体には線条体黒質/淡蒼球内節系・線条体淡蒼球外節系以外に今までに報告されていなかった第３の線条体無名質投射系が存在し、この系のみが PPTB を産生して Neurokinin B を利用していることを明らかにした (業績 106 参照)。

（２）PPTB 陽性の第３の線条体投射ニューロンは無名質に特異的に投射しているが、この無名質の NK3受容体 (Neurokinin B の受容体）発現ニューロンは GABA作動性のニューロンであり、大脳皮質に投射していることを発見した。NK3発現ニューロンの Neurokinin B に対する反応をホールセルクランプ法で調べたところ、脱分極性の反応を示すことがわかった (150；下図)。



新たに発見された第３の線条体出力系。Neurokinin B (NKB) を産生する線条体投射ニューロンは大脳皮質へ投射するGABA 作動性無名質ニューロンを興奮させることにより、大脳皮質の活動を制御する。

（3）腹側線条体（側坐核，嗅結節）に分布する投射ニューロンを化学的に分類した。Preprodynorphin (PPD)、Preprotachykinin A (PPTA)、Preproenkephalin (PPE) 、PPTBに対する抗体を用いて分類すると側座核・嗅結節ともに PPD 陽性ニューロンとPPE 陽性ニューロンはほとんど別のグループであることがわかった。PPTA 陽性ニューロンは PPD 陽性ニューロングループをを包含しており、一部 PPE 免疫活性も示した(131)。次に、腹側線条体の投射ニューロンの投射先と化学的性質を検討した。腹側淡蒼球へは PPD, PPE 陽性ニューロンの両者が投射していたが、中脳へはPPD陽性ニューロンのグループのみが投射していた (140)。

（4）PPTB 陽性ニューロンは側座核には背側線条体（尾状核・被殻）と同様に存在しているが、嗅結節には全く存在していなかった。また、側座核，PPTB 陽性ニューロンは島状に密集する傾向があり（cell cluster, lateral stripe of the striatum）、この部位には μオピオイド受容体が一致して強く発現していた。これらの PPTB 陽性ニューロンが他の投射ニューロンの分泌する enkephalin によって制御されていることを示唆する (131)。これらの縞状に密集した腹側線条体 PPTB 産生ニューロンも無名質を中心とした前脳基底部に投射しており、背側線条体ばかりでなく腹側線条体にも第3の投射系が存在していることが示唆された (156)。

（5）Vesicular glutamate transporters (VGluT) に対する抗体を作成し、線条体に興奮性に入力する大脳皮質線維と視床線維を区別して標識できるツールを手に入れた (115,127,136,142,153)。これらの抗体を用いた post-embedding 免疫電顕法により、線条体の大脳皮質由来及び視床由来の興奮性神経終末には AMPA 受容体が発現していることを発見した。この結果から、これらの興奮性終末にポジティブフィードバック機構が存在し、線条体ニューロンの up state を作り出すメカニズムとしてシナプス前性 AMPA 受容体が使われているのではないかと推測された (Fujiyama et al., 2004 inpress)。さらに同じ論文で、線条体のコリン作動性インターニューロンが VGluT3を用いるグルタミン酸ニューロンでもあることを示した。

（6）ニューロンをゴルジ染色様に標識する Sindbis virus を開発し、実際に線条体ニューロンを標識した (123)。現在、これを用いて線条体ニューロンをゴルジ染色様に標識し、グルタミン酸作動性の入力をVGluT抗体で可視化して、個々の線条体ニューロンに対する視床および大脳皮質からの興奮性入力を形態学的に解析している。特に、PPTB 産生ニューロンをこのウィルスで標識して、第3の投射系ニューロンが皮質や視床の入力を受けているかどうか検討している。

共同研究

太文字で示した人が共同研究の相手である。

108. **Beuckmann C.T., Lazarus M., Gerashchenko D., Mizoguchi A.**, Nomura S., **Mohri I.**, Uesugi A., Kaneko T., Mizuno N., **Hayaishi O., Urade Y.**, Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (b-trace) in the central nervous system of the adult rat. The Journal of Comparative Neurology, vol. 428 (no. 1), pp. 62-78, December 25, 2000.

124. **Sallo C., Fischer J., Franzoni F-M., Mackle K.**, Kaneko T., **Conrath M.**, CB1-cannabinnoid and m-opioid receptor colocalization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. Neuro Report, vol.12 (no. 17), pp. 3689-3692, December 4, 2001.

132. **Aoyagi T., Kang Y., Terada N**, Kaneko T., **Fukai T.**, The role of Ca 2+ -dependent cationic current in generating gamma frequency rhythmic bursts: modeling study. Neuroscience, vol.115(no.4) pp.1127-1138, Dicember 16, 2002.

134. **Ichinohe N.**, Fujiyama F., Kaneko T., **Rockland S. K.**, Honeycomb-Like mosaic at the border of layers 1 and 2 in the cerebral cortex. The Journal of Neuroscience, vol 23(no.4), February 15, 2003.

137. **Pompolo S, Pereira A**, Kaneko T, **Clarke IJ,** Seosonal changes in the inputs to gonadotropin releasing hormone in the ewe brain; an assessment byconventional fluorescence and confocal microscopy. The Journal of Neuroendocrinology, vol. 15(no. 5), pp. 538-545, May, 2003.

138. **Lin L.-H., Agassandian K.**, Fujiyama F., Kaneko T., **Talman W .T.**, Evidence for a glutamatergic input to pontine preganglionic neurons of the superior salivatory nucleus in rat. Journal of Chemical Neuroanatomy, vol. 25 (no.4), July, 2003.

141. **Sano H., Yasoshima Y., Matsushita N.**, Kaneko T., **Kohno K., Pastan I., Kobayashi K.**, Conditional ablation of striatal neuronal types containing dopamine D2 receptor disturbs coordination of basal ganglia function. The journal of Neuroscience, vol. 23(no.27), pp.9078-9088, October 8, 2003.

143. **Van der Gucht E, Jacobs S**, Kaneko T, **Vandesande F, Arckens L**. Distribution and morphological characterization of phosphate-activated glutaminase-immunoreactive neurons in cat visual cortex. Brain Research, vol. 988 (no. 1-2), pp. 29-42, October 24, 2003.

144. **Oliveira L.R. A., Hydling F., Olsson E., Shi T., Edwards H. R.**, Fujiyama F., Kaneko T., **Hofelt T., Cullheim S., Meister B.**, Cellular localization of three vesicular gulutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. Synapse, vol. 50 (no.2), pp. 117-129, November, 2003 (online; July 23).

145. **Arimatsu Y., Ishida M.**, Kaneko T., **Ichinose S., Omori A.**, Organization and development of corticocortical associative neurons expressing the orphan nuclear receptor Nurr1. The Journal of Comparative Neurology, vol. 466 (no.2), pp. 180-196, November 10, 2003.

147. **Lin L.-H., Edwards R-H., Fremeau R.-T.-J.**, Fujiyama F., Kaneko T., **Talman W.-T.**, Localization of vesicular glutamate transporters and neuronal nitric oxide synthase in rat nucleus tractus solitarii. Neuroscience, vol.123(no.1), pp.247-255, 2004 (online; December 3, 2003).

148. **Tsubo Y.**, Kaneko T., **Shinomoto S.**, Predicting spike timings of current-injected neurons. Neural Networks, vol. 17 (no.2), pp. 165-173, March, 2004 (online; December 29, 2003).

特許など：特になし。

A01-09

「発達期視覚野の可塑性における内因性脳由来神経栄養因子の役割」

畠　義郎
鳥取大学大学院医学系研究科　機能再生医科学専攻　生体高次機能学分野

特定領域「神経回路」参加年度：平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨：
大脳皮質視覚野では、片眼視覚遮断により脳由来神経栄養因子が減少し、またその下流で働くとされるERK1/2の活性化が減弱した。さらに、発達期にのみ活性化ERK1/2の核への移行が観察された。従って、発達期の可塑性発現にはERK1/2の核移行によるシグナルが関与する可能性が考えられる。

研究成果：
発達期の哺乳類視覚野は視覚入力の変化に対してとりわけ高い経験依存的可塑性を示すことが知られている。例えば、生後初期に一方の眼の視覚入力を短期間遮断するだけで、視覚野ニューロンは視覚遮断された眼に対する反応性を失い、さらにその入力が投射する皮質領域（眼優位コラム）は退縮する。この視覚入力変化に対して高い可塑性を示す時期を臨界期と呼ぶ。近年、神経栄養因子とりわけ脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor: BDNF)が、この可塑性において重要な役割を果たす機能分子として注目されている。例えば、この時期の動物に片眼視覚遮断を行うと同時に、BDNFを視覚野に投与しておくと、視覚遮断の効果が減弱あるいは反転することが報告されている。さらに、我々はTransneuronal labeling法により、仔ネコ視覚野にBDNFを慢性的に投与すると眼優位コラムが拡大するが、成熟ネコではそのような作用は見られないという結果を報告した（Hata *et al.*, 2000）。このことはBDNFが発達期の視覚野において、視床からの入力線維の軸索を伸長し、その結果コラム構造が拡大したものと解釈することができる。

しかし、コラム拡大がどのようなメカニズムによるものかを探るには、単一入力線維の軸索形態がどのような変化を示したかについてより直接的に調べる必要がある。そのため、BDNFを投与した視覚野において、視床からの入力線維の皮質内での形態を定量的に解析した。仔ネコ視覚野に浸透圧ポンプを用いてBDNFを投与すると共に、外側膝状体にBiotinylated dextranamine（BDA）を電気泳動的に投与し、視覚野への投射軸索を順行性に標識した。そして、視覚野の連続切片標本を作成して、標識された軸索をABC法により可視化した。入力線維の皮質内での分枝パターンをコンピュータ上で３次元的に再構成し、得られた軸索形態のデータを、免疫組織学的に同定したBDNFが投与されていた皮質領域とそれ以外の領域で比較した。その結果、BDNF投与領域における入力線維軸索は、対照皮質のものに比較して軸索分岐数が少なく、軸索総延長も短い傾向にあった。しかし、皮質内での水平方向の広がり、すなわち軸索が投射する皮質領域の広さについては、BDNF投与領域において縮小する傾向は見られなかった。また正常な視覚野では軸索が高密度に集まった領域が存在し、この部位が眼優位コラムに対応するものと考えられているが、BDNF投与領域では、軸索密度の最大値が低い傾向にあった（Ohshima *et al.*, *Soc. Neurosci. Abst.* 28: 332.6, 2002）。Transneuronal labeling法により観察される眼優位コラムの拡大効果とあわせて考えると、BDNFの効果は１）反対側の眼に対するコラムでの軸索の伸長、および２）同側眼コラムの軸索密度の高い領域での軸索の退縮という２種類の作用を含むと考えられる。この結果は、BDNFの軸索伸長効果のみで説明することは難しく、より複雑な作用あるいは皮質ニューロンを介した間接効果などをあわせて考慮する必要がある。例えば、最近、BDNFが抑制性ニューロンの機能を亢進するということが報告されている。また、我々

は以前に、皮質ニューロンを抑制すると入力軸索に強力な退縮効果が見られることを報告した。これらのことから、BDNF投与が皮質内抑制系をupregulateし、皮質ニューロンの活動を低下させることで、活動依存的なメカニズムにより軸索の退縮を引き起こした可能性が考えられる。実際にBDNF投与領域の皮質ニューロンから光反応を記録してみると、対照皮質に比べて減弱しており、BDNF領域の皮質ニューロンは視覚入力に対して強い反応を示さないことがわかった。さらに、抑制性伝達物質であるGABAの合成酵素GAD65を免疫組織学的に検索したところ、BDNF投与皮質では強い陽性反応を示すニューロンが多数観察された。このことは、BDNF投与により皮質内抑制機構が亢進していることを示唆している。

以上のように、BDNFは発達期の視覚野神経回路に大きな影響を及ぼすが、眼優位可塑性発現の過程に内因性のBDNFが関与しているかどうかは不明な点が多い。片眼遮蔽のような神経活動変化により引き起こされる可塑性に関与するのであれば、その発現量もまた活動依存的に変化する可能性がある。実際、一部の神経栄養因子の発現量がmRNAレベルで活動依存的に変化することが報告されている。しかし、mRNA量の変化は必ずしもタンパク質量の変化と一致しないため、実際に機能するタンパク質そのものの変化を調べることが重要である。そこで我々は、フェレットの両眼に電位感受性ナトリウムチャンネルの阻害剤であるテトロドトキシン（TTX）を注入することにより眼球からの入力を完全に阻害し、大脳皮質一次視覚野における各種神経栄養因子のタンパク質量がどのように変化するのかを２部位酵素免疫測定法を用いて調べた（Ichisaka *et al.*, 2003）。その結果、測定をおこなったNGF、BDNF、NT-3、NT-4/5のうちBDNFのみが視覚入力の阻害により有意に減少した。この結果より、視覚野においてBDNFのみが視覚入力に依存してそのタンパク質量を大きく変化させるものと考えられる。眼優位可塑性は発達期にのみ観察されることから、それに関わる分子も発達期にのみ存在したり活動依存的な振る舞いを示したりすることが期待される。ところが、視覚入力阻害によるBDNFタンパク質量の減少は、発達期のみでなく、その後の成熟期でも同程度にみられた。さらに、BDNFタンパク質量自体も発達期に特別多いわけではなく、成熟期と比較して有意な変化はなかった。従って、BDNFが眼優位可塑性発現に関わる可能性は十分にあるが、臨界期の高い可塑性の根拠となっているわけではないと考えられる。

一方、眼優位コラムに対するBDNFの作用は発達期と成熟期で異なる。発達期の視覚野にBDNFを投与すると眼優位コラムの拡大が見られるが、同様の操作を成熟動物の視覚野で行っても眼優位コラムに変化は見られない。このことから、発達期には神経活動変化に伴うBDNF量の変化が可塑性発現の引き金となるが、成熟期においてはBDNFが可塑性のメカニズムとリンクしていない可能性が考えられる。例えば、TrkB受容体以降に位置する可塑性に重要なシグナル分子が成熟期では活性化されない可能性などである。BDNFがTrkB受容体に結合すると受容体細胞内ドメインのチロシンキナーゼが活性化され、MAPK(mitogen-activated protein kinase)-CREB(cAMP-response element binding protein)、PLC-γ (phospholipase Cγ)、PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)等のシグナル分子が動くことが知られている。実際、最近になって、MAPK(ERK)やCREBが眼優位可塑性に必須であるとの報告がなされた。これらの知見は可塑性発現メカニズムを考える上で大変重要であるが、視覚遮断により実際にこれらの分子の動態に変化があるかどうかは不明な点が多い。また、それが臨界期と関わるかどうかもわかっていない。そこで、ERKについて、片眼遮蔽によりその量や活性が調節されるかどうか、その効果は年齢依存的かどうかを明らかにするため、ラットの一次視覚野で、ERKの活性化状態であるリン酸化ERKの片眼遮蔽による変化を、免疫組織化学染色法により調べた。

ラットにおいては、片眼遮蔽後48時間で眼優位性の変化が観察され始める。可塑性発現に必要な分子の変化は、機能的変化に先立って生じているはずである。そこで片眼遮蔽後24時間の時点でのERK1/2の状態を調べた。まずリン酸化状態に関わらずERK1/2を認識する抗体を用いて、全ERK1/2

分子の分布を調べたところ、正常動物では視覚野を含めて皮質の全層に陽性細胞が観察されたが、特にⅡ/Ⅲ層に多く分布していた。片眼遮蔽動物でも分布や密度に違いは認められなかった。したがって、24時間の短期片眼遮蔽はERK1/2の発現量や分布に影響しないと考えられる。次に、リン酸化ERK1/2を特異的に認識する抗体を用いて、活性化型ERK1/2の分布を調べた。正常動物では、リン酸化ERK1/2陽性細胞は主にⅡ/Ⅲ層に存在し、Ⅵ層にもいくぶん観察された。短期片眼遮蔽動物では、遮蔽眼から入力を受けている領域のⅡ/Ⅲ層でリン酸化ERK1/2陽性細胞の有意な減少が見られた（図１）。次に両眼を遮蔽した動物について調べたところ、一次視覚野全域において片眼遮蔽よりも顕著な陽性細胞の減少が観察された。両眼遮蔽では入力は片眼遮蔽よりも弱くなるが、入力の強さは均衡がとれており、急速な可塑性は発現しないことが知られている。従って、ERK1/2の活性は可塑性発現に依存して変化するのではなく、単純に視覚入力の強さに依存して変化すると考えられる。一方、Ⅱ/Ⅲ層ほどではないが陽性細胞が観察されたⅥ層では、より長期の視覚遮断を行っても、陽性細胞数の変化は見られなかった。このことから、ERK1/2は層ごとに異なるメカニズムによって活性調節がなされている可能性が考えられる。同様の実験を成熟動物を用いて行ったところ、臨界期動物と同じく、視覚遮断によるリン酸化ERK1/2陽性細胞の減少が認められた（図１）。このことから、ERK1/2のリン酸化は生後齢にかかわらず視覚入力により調節されていることがわかった。すなわち、臨界期の高い可塑性はERK1/2の活性調節の違いによって作り出されているのではないと考えられる。

次のステップとして、活性化によって引き起こされるERK1/2の核移行に注目した。その結果、臨界期の短期片眼遮蔽によって、健常眼からの入力を強く受けている領域で、核がリン酸化ERK1/2陽性である細胞が劇的に増大していることがわかった（図２）。一方、遮蔽眼からの入力を強く受けている領域では、核陽性細胞の数は正常動物と変わりなかった。しかし、この領域ではリン酸化ERK1/2陽性細胞の総数が大きく減少しており、リン酸化ERK1/2陽性の核を持つ細胞の割合は、正常動物に比べて増大していた。

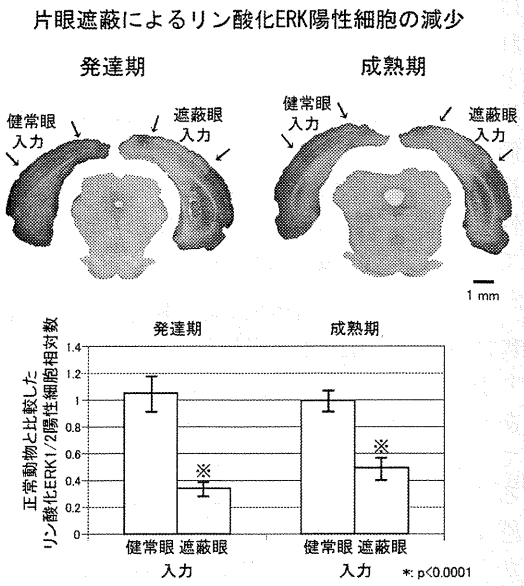


図１　（上）ラット前額断標本の抗リン酸化ERK抗体による免疫染色像。大脳皮質のうち矢印で挟まれた領域が視覚野。（下）視覚野Ⅱ/Ⅲ層での陽性細胞数を両側視覚野で比較した。正常動物に対する割合で示してある。

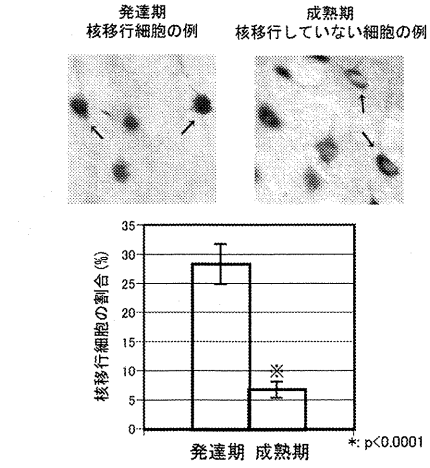


図２　（上）抗リン酸化ERK抗体による免疫染色の例。（下）陽性細胞の中で核が濃染したものの割合を発達期と成熟期で比較した。

さらに、このような変化は両眼遮蔽や成熟期動物では見られなかった。すなわち、眼優位可塑性の発現する条件でのみ、リン酸化ERK1/2の核移行の亢進が観察されたということである。これらの結果は、臨界期のみに見られる高い可塑性発現にERK1/2の核移行が重要な役割を果たす可能性を示すものである。

研究課題：神経細胞の軸索および樹状突起形成を担う分子群の解析

研究代表者名：稲垣直之

所属：奈良先端科学技術大学院大学、バイオサイエンス研究科

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度-平成１６年度

研究成果の要旨

本研究では、高感度プロテオーム解析法を独自に開発して神経細胞の軸索および樹状突起に濃縮する分子群を網羅的に検出し、軸索に濃縮する82個のタンパク質スポットの同定に成功した。また、軸索局在分子の中に新規神経極性形成分子shootin1を見出し、その機能解析を行った。

研究成果

1) Collapsin response mediator protein 2 （CRMP-2）は発生時期のラットの脳に高レベルに発現する蛋白質である。本研究では、CRMP-2 を一次培養海馬神経細胞に高レベル発現させると培養海馬神経細胞に過剰な軸索や軸索分枝の形成を引き起こすことを見出した。さらに、実際に成長しつつある軸索には内在性 CRMP-2 が濃縮して存在することも明らかとなった。以上の結果は CRMP-2 が軸索の形成に必要であり、CRMP-2 の細胞内分布が神経細胞の極性形成に重要な役割をはたす可能性が示唆された。

2) 次に CRMP-2 による軸索形成作用の分子機構を解析するために CRMP-2 に結合する蛋白質をアフィニティーカラム法と yeast two-hybrid 法を併用して網羅的にスクリーニングした。その結果チューブリンが同定された。そこで、CRMP-2 の欠失変異体を用いて微小管との cosediment assay をおこない、少なくとも CRMP-2 の 323 番目から 381 番目のアミノ酸の部分が微小管との結合に寄与することが明らかとなった。次に CRMP-2 がチューブリンあるいは微小管に結合することによって、微小管の動態にどのような作用を及ぼすかについて、暗視野顕微鏡を用いて調べた。その結果、微小管に結合するフラグメントおよび全長の CRMP-2 が微小管の重合を促進することがわかった。一方、微小管に結合しないフラグメントは微小管の重合を促進しなかった。また野生型の CRMP-2 は神経細胞の突起形成を促進したが、チューブリン結合部位を欠く CRMP-2 は神経突起形成を促進しなかった。以上、CRMP-2 結合蛋白質としてチューブリンが同定され、CRMP-2 のチューブリン結合ドメイン（323 番目から 381 番目のアミノ酸の部分）が神経突起形成に必要であることから、CRMP-2 のチューブリンとの相互作用が軸索形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

3) また、大阪市立大学、木山博教授との共同研究により、ラット舌下神経が再生の過程で CRMP-2 を高レベル発現すること、またアデノウイルスを用いて CRMP-2 を切断後のラット舌下神経に遺伝子導入すると神経再生の速度が上昇することがわかった。この結果から CRMP-2 が神経軸索再生の治療に利用できる可能性が示唆された。

4) 次に、神経極性形成分子群のプロテオーム解析を用いた網羅的検出のために、高解像度二次元電気泳動法を確立した。確立した二次元電気泳動法は タンパク質分離の解像度を上げるために 93 cm x 103 cm の巨大ゲルを用い、タンパク質の検出感度と定量性を上げるために[^{35}S]によるオートラジオグラフィーを使用した。このシステムは知る限り世界最高の検出感度とダイナミックレンジを持っており、通常の約５倍の１万個以上の蛋白質スポットを検出することが可能となった。

5) また、質量分析装置による高感度のタンパク質同定のために、界面活性剤 ALS を用いたゲル内タンパク質消化効率の改善に成功した。さらに、二次元電気泳動法の前にゲル濾過カラムによるプレフラクションを行うことにより、微量タンパク質の同定が大幅に向上した。

6) 高感度二次元電気泳動法を用いて、培養海馬神経細胞の極性形成時に発現が上昇する蛋白質群のスクリーニングを終えた。その結果、海馬神経細胞に発現するタンパク質 6,197 個のうち 4.5%にあたる 277 個のタンパク質が神経極性形成に伴って発現量が上昇し、4.3%にあたる 265 個のタンパク質の発現が減少することが明らかとなった。次に、これらの培養海馬神経細胞の極性形成に伴って発現量が上昇するタンパク質 277 個のうち 92 個を MALDI-TOF 分析装置およびエレクトロスプレー Q-TOF 解析装置を用いて同定した、その内訳は、タンパク質・膜輸送関連分子、タンパク質合成・分解関連分子、シグナル関連分子、細胞骨格・細胞接着関連タンパク質 22 個、代謝関連タンパク質、その他、機能未知であった。

7) これに加えて、高感度２次元電気泳動システムを用いてラット培養海馬神経細胞の軸索あるいは樹状突起・細胞体に濃縮する蛋白質のディファレンシャル解析を行った。その結果、培養海馬神経細胞に発現するタンパク質 5,164 個のうち 4%にあたる 200 個のタンパク質が軸索に、27%にあたる 1,414 個のタンパク質が樹状突起・細胞体に濃縮することがわかった(図１)。次に、これら 200 個の軸索に濃縮するタンパク質スポットのうち 82 個のタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。その内訳はタンパク質合成・分解関連分子 20.8%、細胞骨格・細胞接着関連分子 15.6%、シグナル関連分子 14.2%、代謝関連分子 12.9%、タンパク質・膜輸送関連分子 9.1%、脂質結合タンパク質 7.8%、機能未知およびその他 18.2%であった（図２)。

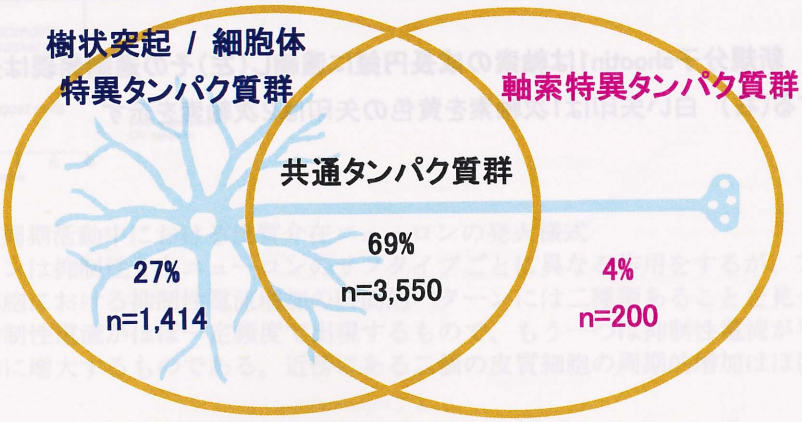


図1　神経細胞のプロテオームの極性分布

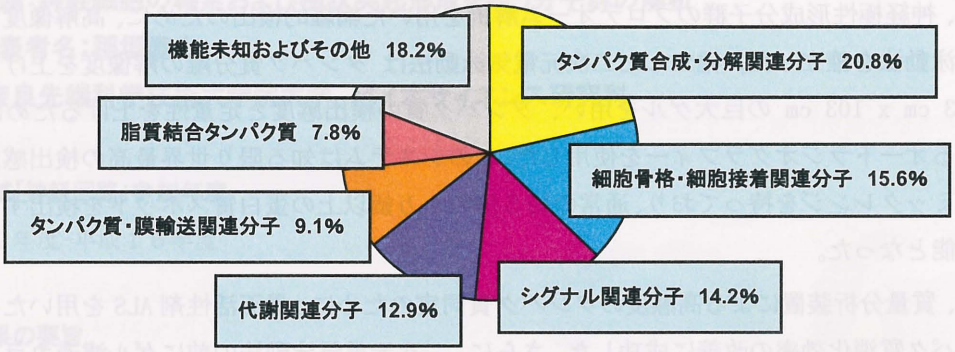


図２　同定された軸索に濃縮するタンパク質群

8) 本研究で開発された高感度プロテオーム解析法で同定された軸索に濃縮する 82 個のタンパク質群と神経細胞の極性形成時に発現が上昇する 92 個の蛋白質群との両方に共通するものとして、新規のタンパク質 shootin1 を見出した。組織分布を調べたところ、shootin1 は脳に特異的に発現しその発現量は軸索が形成される生後４日目にピークを迎えた。また、ラット海馬培養神経細胞では、shootin1 が極性形成に伴って軸索の成長円錐に強く濃縮することが明らかとなった。さらに、shootin1 の異所性の過剰発現は神経極性に乱れを惹き起こし過剰軸索を形成させた。以上の結果から今回見出した shootin1 は神経極性形成に関与する重要な分子であると結論された（図 3)。

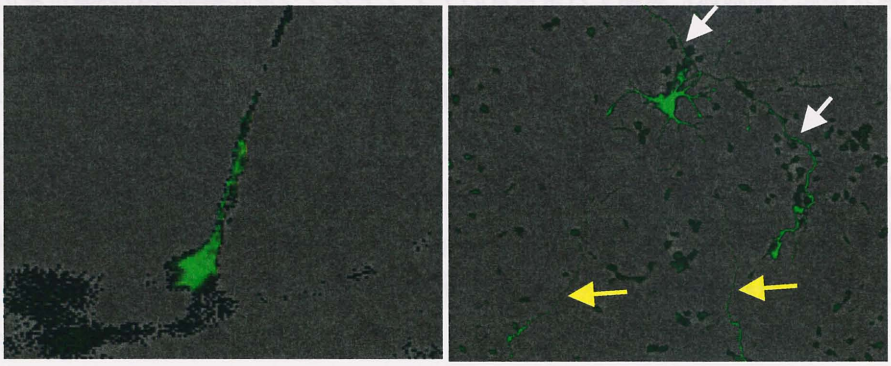


図3　新規分子shootin1は軸索の成長円錐に濃縮し(左)その過剰発現は過剰軸索を形成する(右)　白い矢印は1次軸索を黄色の矢印は2次軸索を示す

A01-11

研究課題
GABA 作働性介在ニューロンの大脳皮質局所回路における役割

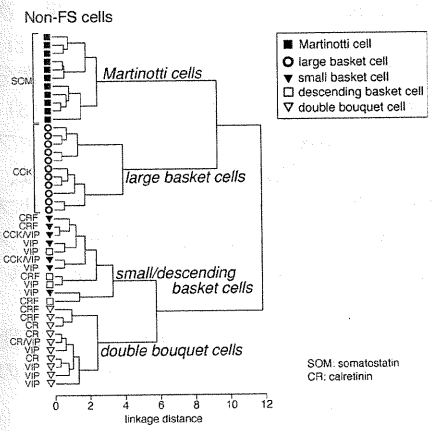
研究代表者名
川口 泰雄

所属
自然科学研究機構・生理学研究所・大脳神経回路論研究部門

特定領域「神経回路」参加年度
平成１２−１６年度

研究成果の要旨
大脳皮質の介在ニューロン構成を形態的パラメーターから定量的に確認し、皮質周期活動中においてもタイプごとに固有の発火様式をとることを明らかにした。次に皮質回路のシナプス構成を理解するために、先ず軸索分枝・シナプスブトン形成の確率分布パターンをタイプごとに決めた。

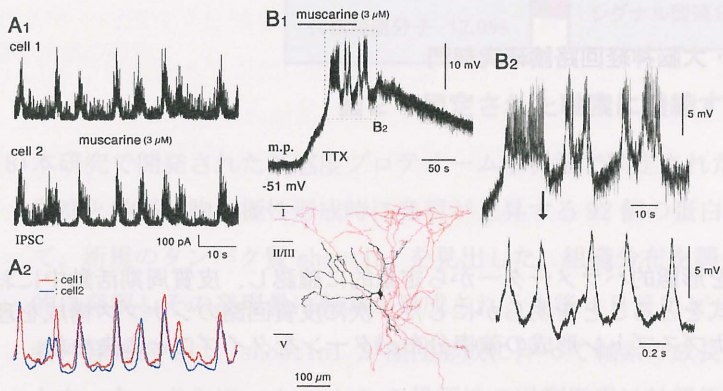
研究成果
（１）皮質介在ニューロンのサブタイプの定量的同定
皮質介在ニューロンは形態や通電による発火パターンからそれぞれいくつかのグループに定性的にわけられているが、両者を組み合わせたサブタイプの定量的同定はほとんど行われていなかった。先ず軸索のブトンがシナプス結合を作っているのを系統的に確認した後、生理的性質を調べた細胞の形態を三次元再構築した。細胞体・樹状突起・軸索・ブトン空間分布の形態的パラメーターを測定し、発火様式と組み合わせて定量的にサブタイプを決めた。９つのサブタイプが得られたが、この定量的分類はペプチド・カルシウム結蛋白質の発現パターンとよく相関しており、皮質介在ニューロンの基本的クラスと考えられる。



介在ニューロン（non-FS type）の形態的パラメーターによるクラスター解析
左端に発現物質がかいてある。

（２）大脳皮質周期活動中における皮質介在ニューロンの発火様式
アセチルコリンは抑制性介在ニューロンのサブタイプごとに異なる作用をするが、アセチルコリンによる皮質細胞における抑制性電流増加の時間的パターンには二種類あることを見つけた。一つは、増加した抑制性電流がほぼ一定頻度で出現するもので、もう一つは抑制性電流が平均して 0.2 ヘルツで周期的に増大するものである。近傍にある二個の皮質細胞の周期的増加はほぼ同期してい

た。一方、二個の細胞のバースト中の個々のシナプス電流の開始点の相互相関を調べると低かった。皮質の抑制性ニューロン群には、興奮性ニューロンとは独立に 0.1 から 0.3 ヘルツのリズムをつくる機構が皮質内に内在的にあると考えられる。マルティノッティ細胞とよばれる細胞の中には、アセチルコリンによって内在的にこのリズムを作るものがあった。



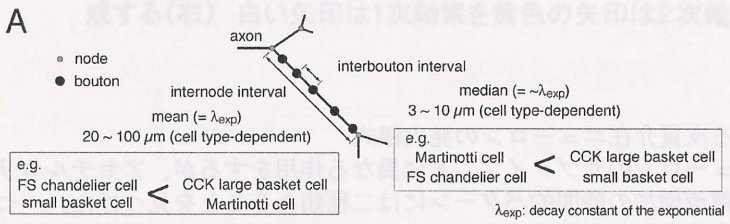
A: ムスカリンによる抑制性電流の周期的上昇と二細胞間での同期

B: マルティノッティ細胞のムスカリンによる周期的興奮

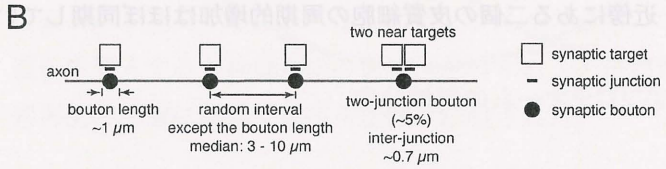
興奮性回路による皮質周期的活動時における介在ニューロンの反応をみるために、外液のマグネシウム濃度を下げ皮質スライス標本に自発活動を引き起こした。自発活動中の発火様式をサブタイプごとに定量化したところ、FS 細胞が、各時期で最も高頻度発火し、400Hz 位まで発火頻度を上昇させた。ソマトスタチン細胞、VIP 細胞、大型 CCK 細胞の発火パターンは、FS 細胞のとは異なるものであった。皮質ニューロンの発火様式は、興奮性入力の強度・時間パターンだけでなく、形態的・化学的性質の異なるサブタイプに依存して動的に変わることが明らかになった。

（3）皮質介在ニューロンの軸索・シナプスブトンの表現型

皮質回路で軸索が分枝・伸長しシナプス後要素を選択する規則はほとんどわかっていない。介在ニューロンの多様なサブタイプは固有のルールでシナプス形成している可能性がある。各サブタイプについて、軸索分枝・シナプスブトン形成の局所的な性質を定量化して比較した。その結果、次のようなことがわかった。(1) 各サブタイプは、(i) 軸索ブトンの細胞体にシナプスする割合、(ii) 軸索の分枝する頻度、(iii) 細胞体より白質側にあるブトンの割合などで同定できる。(2) 軸索分岐点（ノード）での分枝間角度や軸索の曲がりくねりには、サブタイプ間で差がみられない。(3) ノードの間の距離は指数分布し、その平均（標準偏差に等しい）は細胞ごとに異なる。(4) シナプスブトン間距離も指数分布し、その平均は細胞ごとに異なる。(5) ノード間距離とブトン間距離は、独立に決まってていて、各サブタイプはそれらの値の固有の組み合わせをとる。非錐体細胞のサブタイプは、軸索に沿っての分枝・ブトン形成は同じ分布型をとるが、その間隔の組み合わせは、タイプごとに異なり、それぞれ、局所的なシナプス結合の強さ、後シナプス構造の選択に関連していると考えられる。



A: ノード間距離とブトン間距離の分布とそのサブタイプでの違い



B: 介在ニューロンのシナプスブトン配列

（4）FS 細胞のシナプス結合選択性

皮質ニューロンの軸索がその結合標的を選択していく規則はよくわかっていない。介在ニューロンがシナプス結合する相手に関する選択性の程度はサブタイプごとに大きな違いがある。FS 細胞の軸索は、細胞体からスパインまで多様な構造にシナプス作る。この後シナプス構造多様性を理解するために、同じ投射先をもつ比較的一様な錐体細胞への FS 細胞の入力パターンをペアー記録とそれらの形態再構築で調べた。連続した発火に対して抑圧される抑制性シナプス電流を生じ、シナプス結合部位の近傍に限局した抑制を錐体細胞にかけていた。FS 細胞の軸索は同じタイプの錐体細胞の多様なドメインにコンタクトしていたが、FS・錐体細胞ペアーごとに固有のドメイン結合パターンをとった。コンタクトする部位は、FS 細胞軸索と後シナプスの錐体細胞樹状突起の密度分布の相関が高い部位や、近接点が多い領域に一定の頻度で作られる傾向があったが、細胞体への神経支配は近接点の多さとは相関していなかった。

A01-13

1．研究課題　「上丘局所神経回路における層間及び層内信号伝達の動的調節と運動指令の生成機構」（平成１２年度）
「哺乳類上丘における視覚・運動変換の鍵となる樹状突起信号伝播とその修飾機構」（平成１３－１４年度）

2．研究代表者名　伊佐　正

3．所属　大学共同利用機関法人・自然科学研究機構・生理学研究所・認知行動発達機構研究部門

4．特定領域「神経回路」参加年度　平成１２-１４年度

5．研究成果の要旨

サッケード運動など指向運動の制御中枢である中脳上丘の局所神経回路をスライス標本と個体レベルで研究し、運動出力層でのバースト発火生成機構とその修飾メカニズム及び層間の信号伝播機構とその機能的意義、浅層での動きの検出に重要な樹状突起での信号処理機構を解明した。

6．研究成果

(1) 上丘中間層におけるバースト発火の生成機構

中脳の上丘はサッケードを制御する中心的な領域である。上丘中間層にはサッケードのベクトルマップが存在し、各サッケードに先行して対応する領域の神経細胞群がバースト発火を示す。ラット上丘スライス標本において中間層ニューロンは bicuculline 存在下で顕著な非線形的入出力関係を示すが、この機構は前記の運動指令の生成過程の基礎をなすものと考えられる。今回、この非線形的信号変換機構を解明するために中間層において隣接する 2 個のニューロンから同時に whole cell 記録を行った。するとこれらのニューロンは脱分極通電に対する発火応答の入出力関係は線形的で、直接の結合はなくとも、細胞外液に bicuculline を加え Mg 濃度を低下させると数百ミリ秒以上持続する脱分極と活動電位の連続発火を自発的に繰り返すようになり、その間 2 個のニューロン間でこの脱分極は極めてよく同期していた。そして APV の投与はこれらの同期的脱分極を消失させた。従って中間層のニューロン群における興奮性結合と NMDA 受容体の活性化が非線形的興奮性の基礎であることが明らかになった。(Saito & Isa, 2003, J. Neurosci)

(2) 上丘浅層、中間層における水平性興奮・抑制性結合

上丘中間層には近接する領域間は興奮性、離れた領域間は抑制性の内在性回路が存在するとされているがその実験的裏付けは希薄である。

上記(１)のように中間層の近接する２個のニューロンから同時記録を行い、bicuculline, low Mg を含む外液条件下で２個のニューロンが示す自発的脱分極の同期性を定量化し、様々な距離のニューロンペア同士で比較し、浅層ニューロンとも比較したところ、中間層では距離と共に同期性が減衰するが１ミリ離れるまで同期性が見られるなど広範な水平性興奮性結合が存在するのに対し、浅層では１００ミリ以内に同期性は消失することが明らかになった。(Saito & Isa 2004, J. Neurophysiol.)

一方、水平性抑制性結合の強さについてはこの内在性回路の機能的意義について検討するため、

上丘局所領域にアセチルコリンのアゴニストであるニコチンを微量注入して神経細胞活動を増強し、サッケードへの影響を調べることで検討した。注入後、自発サッケードは注入部位の神経細胞群が表現する領域（注入部位表現領域）に頻繁に向かったが、標的が注入部位表現領域近傍に呈示された場合に短縮した。しかし、標的が注入部位表現領域から離れていた場合、反応潜時の遅延は生じなかった。サッケードの終点、軌道は注入部位表現領域方向にバイアスした。kろえらの結果より、上丘内の抑制性内在性回路は運動準備期間中の活動を制御するほど十分に強くはないと考えられた。(Watanabe et al. J. Neurophysiol., in press)

(3) 上丘における層間の信号伝播機構

（1）の実験のように同時記録された細胞に bicuculline、low Mg 条件下で生じる同期性脱分極の起きるタイミングを異なる層に属するニューロンペアで調べたところ、中間層の wide field vertical cell が最も脱分極の開始が早く、次に中間層ニューロンそして浅層ニューロンの順になったころからこれまでに知られている浅層ー中間層への信号伝達のほかにより深い層から浅い層への信号伝達経路が存在することが明らかになった。(Saito & Isa, J. Neurophysiol. in press)

(4) 上丘浅層出力ニューロンにおける樹状突起での活動電位生成とその H 電流による制御機構

Wide field vertical (WFV) cell は上丘から視床に投射する主要な出力ニューロンの一つであり、視覚対象の動きの検出に関係すると考えられている。我々は入力線維刺激への反応の解析から、このニューロンでは入力に対して活動電位が樹状突起で開始されることを示す結果を得た。また、WFV cell は hyperpolarization-activated cation current（I_h）を顕著に示し、I_h チャネルのうち HCN1 を主に樹状突起に発現することを明らかにした。I_h の抑制薬の効果から、HCN1 は樹状突起における活動電位の開始または細胞体への伝導を促進していると考えられる結果を得た。このような特性は WFV cell が樹状突起への入力を統合して動く視覚刺激を鋭敏に検出するのに重要であると考えられる。

(5) ニコチン型アセチルコリン受容体による浅層 GABA 性信号伝達の修飾

二丘傍核から上丘浅層へのコリン作動性投射は GABA 作動性抑制を調節すると考えられていたが、機構の詳細は分かっていない。一方、上丘浅層ニューロンは nAChR を発現することが組織学的研究から知られていたが、機能はまったく不明であった。我々は GAD67-GFP マウスで上丘浅層ニューロンの ACh に対する電流応答を調べ、GABA 作動性介在ニューロンは nAChR サブタイプのうち、α７型とα３β２型を発現することを明らかにした。また nAChR は投射ニューロンへの $GABA_A$ 受容体を介した抑制をシナプス前性に強力に促進することを見出した。(Endo & Isa, in submission)

(6) ラット上丘中間層における GABA 作動性シナプス伝達に対するムスカリン受容体の活性化によるシナプス前抑制

上丘中間層に対する中脳の脚橋被蓋核、背外側被蓋核からのコリン作動性線維の機能を明らかにするため、生後１７-２２日のマウスの上丘中間層ニューロンから whole cell 記録を行い、グルタミン酸受容体の拮抗薬である CNQX, APV 存在下で近傍を電気刺激して誘発される IPSC に対するムスカリン 10 μM の持続投与の効果を解析した。その結果、IPSC は 70%にまで減弱した。paired pulse ratio 及び coefficient of variation の解析、miniature IPSC の解析結果から

muscarine による IPSC の抑制作用はシナプス前性であると結論された。そしてこの muscarine による抑制作用は pirenzepine, 4-DAMP によって阻害されたが、methoctramine は作用が見られなかった。これらの結果は muscarine によるシナプス前抑制作用が M1,M3 型ムスカリン受容体によるものであることを示す。このようなムスカリン受容体による GABA 作動性シナプスに対する抑制作用はニコチン型受容体、M3 型受容体によるシナプス後性興奮作用とともに上丘からの出力を促進する方向に作用すると考えられる。(Li et al. 2004)

(7) ラット上丘中間層に対するコリン作動性入力のシナプス後作用

上丘中間層には中脳の脚橋被蓋核、背外側被蓋核からコリン作動性線維が投射することが知られているが、その作用は十分に解析されていない。このコリン作動性入力の作用機序を明らかにするため、生後１７-２２日のラットの上丘中間層ニューロンから whole cell 記録を行い、アセチルコリンのアゴニストであるカルバコール 30 μM を持続投与して応答を解析した。その結果、大多数のニューロンでα4β2型ニコチン受容体の活性化を介する速い内向き電流ないしは M3 型ムスカリン受容体を介する遅い内向き電流が記録された。また一部のニューロンでは M2 型ムスカリン受容体を介する外向き電流が記録された。大多数のニューロンで内向き電流が主体であったことから上丘中間層に対するコリン作動性入力の主たる効果は興奮性であると結論された。

(8) マウスの上丘電気刺激により誘発されるサッケード運動とその制御の分子機構

サッケードの制御における各種神経伝達物質の役割について、これまでのところほとんど不明である。我々が新たに開発したマウスのサッケード測定システム、ならびに上丘電流刺激によるサッケード誘発系を、抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素である GAD65 のノックアウトマウスに適用し、サッケード制御システムにおける GABA の役割について解析した。その結果 GAD65KO マウスでは（１）刺激中に眼球の不安定な振動が頻繁にみられ（２）サッケードの最大速度が上昇し（３）振幅の大きなサッケードがみとめられなかった。 以上の結果とサッケード制御の理論モデルに基づいた計算機シミュレーションの結果を比較することにより、サッケード制御系において GAD65 由来の GABA が主としてサッケードの振幅を計算するフィードバックの効率調節に関与していることが示唆された。

８．共同研究

（１） 共同研究の相手 重本隆一 （生理学研究所・脳形態解析研究部門）

（２） 共同研究内容 「上丘浅層出力ニューロンにおける樹状突起での活動電位生成とその Ⅱ 電流による制御機構」重本博士が作成した HCN1 に対する抗体を用いて上丘視神経層の wide field vertical cell の樹状突起における HCN1 チャンネルの発現を解析した。

A01-14

表題（研究課題）
一次視覚野の特性抽出性と刺激文脈依存的反応調節

研究代表者名
佐藤　宏道

所属
大阪大学健康体育部運動生理学部門

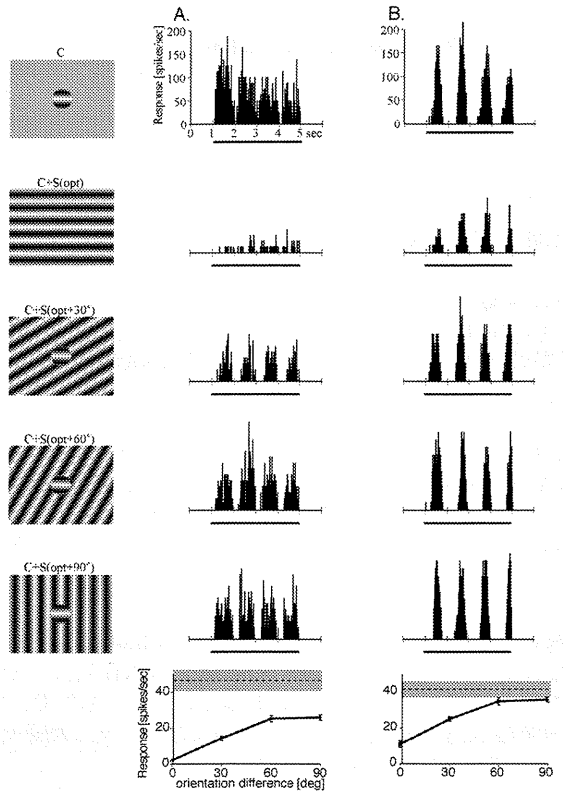
特定領域「神経回路」参加年度
平成１３年度「一次視覚野の特徴抽出性と刺激文脈依存的反応調節」
平成１４年度「一次視覚野の特徴抽出性と刺激文脈依存的反応調節」

研究成果の要旨
大脳皮質の情報処理の統合メカニズムを解明する目的で、視覚野ニューロンの応答が受容野外の広範囲に呈示した刺激によりどのように修飾されるのかを調べた。その視床−皮質間の双方向性結合が、皮質ニューロンの出力を合目的的にコントロールしていることが示唆された。

研究成果
目的:
本研究は認知現象の根拠となる大脳皮質の統合的・合目的的な情報処理の実態とそのメカニズムを解明する目的で行われた。研究対象としたのは一次視覚野における刺激文脈依存的反応修飾であるが、この現象は広視野が一様な図形で刺激された場合にはニューロン活動が抑制されるというもので、「視野情報の分節化」あるいは知覚的な「図−地分化」の生理学的根拠と考えられている。他方でこの現象は大脳皮質の情報処理がどのように最適化されているのかを理解する上で極めて重要である。

方法:
研究 I.　大脳皮質一次視覚野の刺激文脈依存的な反応修飾の性質
麻酔・非動化したネコ16匹の大脳皮質一次視覚野において101個の単一ニューロンの活動を電気生理学的に記録した。視覚刺激としてサイン波状に輝度変化するグレーティングパタンを用い、刺激サイズ、グレーティングの方位、空間周波数、運動方向、位相を可変とした。刺激は、円形のグレーティングパッチによる受容野刺激およびモニター画面（40x30度）上の受容野周囲部分のグレーティング（受容野周囲刺激）からなり、いずれもパラメータ可変とした。記録実験終了後に形態学的解析を行った。検討した点は以下の通りである。
1）受容野刺激に対する応答が受容野周囲刺激により修飾を受ける細胞の割合、修飾の強度、層分布。
2）受容野刺激と受容野周囲刺激の方位コントラストに対する修飾効果の依存性
3）受容野刺激と受容野周囲刺激の運動方向コントラストに対する修飾効果の依存性
4）受容野刺激と受容野周囲刺激の相対的空間位相に対する修飾効果の依存性
研究 II.　刺激文脈依存的反応修飾のメカニズム
麻酔・非動化したネコ17匹の大脳皮質一次視覚野においてガラス多連管微小電極を用い46個の単一ニューロンの活動を電気生理学的に記録し、皮質内抑制性神経伝達物質 GABA の A 型受容体拮抗薬であるビククリンをイオン泳動投与することにより皮質内抑制を遮断したときの受容野外刺激による反応修飾作用の変化を調べた。さらに視床外側膝状体においても単一ニューロン活動を記録し、反応修飾効果を視覚野におけるそれと比較検討した。

結果:
研究 I.　大脳皮質一次視覚野の刺激文脈依存的な反応修飾の性質（文献1）
受容野外に、受容野刺激と同じパラメータのグレーティングを呈示することにより、ニューロン応答は平均44％の抑制を示した。観察した101個のニューロンのうち、1S.D.以上の反応減少を示したものが66個（65％）、1S.D.以上の反応増大を示したものが6個（6％）であり、受容野周囲刺激による反応修飾効果は殆どの場合、抑制性であった。反応例を図1に示す。図1においてＡは複雑型細胞、Ｂは単純型細胞の例である。最上段のヒストグラムは受容野のみをドリフトするグレーティング（4周期）で刺激したときのニューロン応答である。受容野刺激と受容野外刺激のグレーティング方位が同一のとき（上から2段目）に最も強い抑制効果が観察された。抑制効果は受容野内外の刺激の方位コントラストが増大するにつれて弱まった（上から3，4、5段目）。この結果は受容野に呈示した刺激と、受容野外の刺激パタンが図地分離しない場合には反応抑制が生じ、分離する場合には抑制されないと表現することが



でき

図1　受容野外刺激による反応修飾と方位コントラスト依存性

る。抑制性反応修飾は入力層である4層よりも、他領野への出力層である2／3層において、また単純型細胞よりも複雑型細胞においてより顕著であった。この結果は皮質内神経回路において修飾効果が強められていることを示唆する。

受容野外刺激により、受容野刺激に対する反応が50％以下に抑制されたニューロンについて、刺激が図地分離する場合としない場合の修飾効果を、方位コントラスト、ドリフト方向、相対位相に関して検討した。方位コントラストおよびドリフト方向については、視野が一様なグレーティングパタンで刺激される場合、すなわち図地分離しない場合の方が、図地分離する場合に比べて統計的に有意に強い抑制効果を生じた。しかし、方位コントラストをつけずにグレーティングの相対位相を変えることにより図地分離の有無を作った場合には、位相差によらず同程度の反応抑制を受けたニューロンが過半数（56％）を占めた。また、同位相（図地分離なし）の受容野外刺激によって抑制性修飾を受けないニューロンでも、逆位相（図地分離）の受容野外刺激により抑制性修飾を受けるという場合が少なからず見出された。これらの結果は、刺激文脈依存的反応抑制が一義的に図地分離の有無と対応しているのではないことを示唆する。

研究 II.　刺激文脈依存的反応修飾のメカニズム

研究 I において観察された受容野外刺激による抑制性の反応修飾のメカニズムを検討した。この修飾効果は多くの場合抑制性であるために、皮質内 GABA 抑制の関与が示唆されてきた。従来、一次視覚野ニューロンの受容野を形成するための興奮と抑制の空間統合モデルとして採用されてきたものに Difference of Gaussians model (DOG model)がある。このモデルでは興奮性入力と抑制性入力の分布について受容野の中心をピークとする2つのガウス分布を想定し、抑制の空間統合範囲の方が興奮のそれに比べて広いと仮定する（図4A）。この2つのガウス分布の差が受容野内外の各場所における反応誘発力となる。刺激サイズを受容野の中心から拡大した場合には、興奮と抑制のガウス関数の積分値の差がニューロン応答の刺激サイズチューニング関数となるが、興奮の方が小さい刺激（受容野サイズ）で最大値となるため、それより大きな刺激に対しては抑制が増大するために反応は抑制される。これが正しいとすると、皮質内抑制をブロックしたときにはニューロン応答が興奮の積分ガウス関数の特徴を示すことが期待される。

そこで GABA の A 型受容体拮抗薬のビククリンをイオン泳動投与し、記録ニューロン近傍の抑制を遮断したときに修飾効果がどのように変化するかを観察した。一例を図2に示す。このニューロンは受容野サイズ（8.9 度）のグレーティングで刺激したときには、受容野外を含む 28.4 度のグレーティングで刺激したときに比べてはるかに強い反応を示した（図2A、上段（コントロール）のヒストグラム）。すなわち受容野外刺激による抑制性修飾を受けていた。ビク

クリン投与中(中段)にどちらの大きさの刺激に対しても反応の増大が認められたが、大きな刺激対する反応抑制は依然として明瞭に残った。

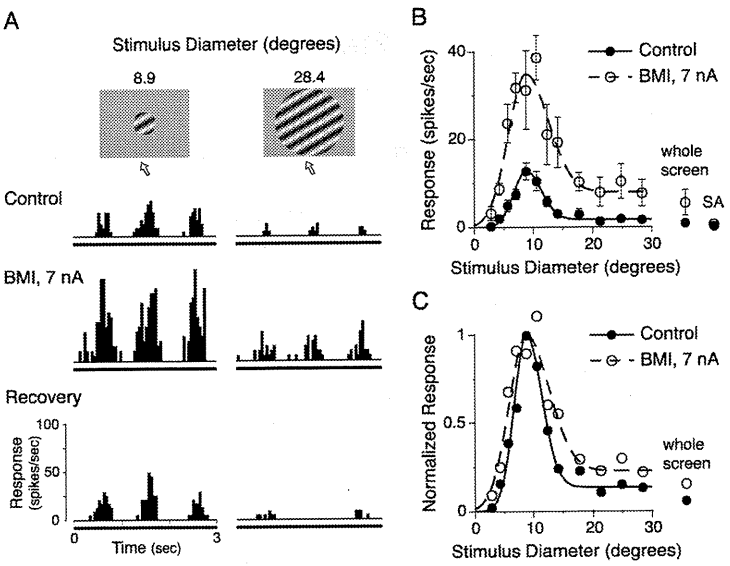


図2　皮質内抑制遮断と反応修飾

図2B に刺激サイズに対するコントロール(●、実線)とビククリン投与中(○、破線)のスパイク応答のチューニング関数をしめす。ビククリン投与中の反応はどの刺激サイズにおいてもコントロールに比べて増大したが、受容野サイズより大きな刺激による抑制はほとんど影響を受けず、最大応答について正規化したカーブ(図2C)は極めてよく似た形状だった。このニューロンの例では、ビククリンにより拮抗された反応抑制は、抑制成分のうち15．2%のみだった。

皮質ニューロンにおいて興奮性入力と抑制性入力が線形加算されると仮定すると、ビククリン投与中のチューニングカーブは興奮のチューニング、ビククリン投与中のチューニングカーブとコントロールのそれとの差は皮質内抑制の寄与分と見なせるので、すなわち抑制のチューニングの推定値となる。37個のニューロンのコントロール時、およびビククリン投与中の刺激サイズチューニング関数を正規化・平均し、差を求めることにより興奮と抑制のチューニングを推定したところ、どちらも受容野サイズにピークをもち、それ以上の刺激サイズで抑制を示すよく似た関数となった(図3)。

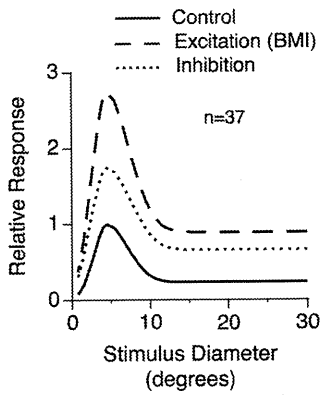


図3．興奮と抑制の刺激サイズチューニング

この結果は、一次視覚野の神経回路をドライブする興奮性入力自体が、刺激サイズチューニングにおいて受容野サイズ以上の刺激に対して抑制を示すという特性をもつことを示唆する。そこで一次視覚野への入力源となっている視床外側膝状体のニューロン20個について刺激サイズチューニングを調べた。その結果、外側膝状体ニューロンは一次視覚野ニューロンに比べて受容野サイズが小さい(平均受容野サイズ;一次視覚野4．8度、外側膝状体1．99度)という差があったが、受容野外刺激により平均反応強度が47%減弱し、一次視覚野の44%とほぼ同等だった。

考察:

研究 I. 大脳皮質一次視覚野の刺激文脈依存的な反応修飾の性質

一次視覚野における刺激文脈依存的反応修飾は、受容野刺激に対するニューロン活動の抑制として観察された。この修飾効果には受容野内外のグレーティング刺激の方位コントラスト、運動方向コントラストについての依存性が見られた。これらの結果は視野が一様な刺激特徴の図形で刺激された場合には多くのニューロンで反応抑制が生じて出力を減少させ、周囲と異なる刺激が存する場合には反応を抑制せずに出力するというメカニズムが一次視覚野に備わっていることを意味する。この現象が刺激の図地分離に all or none で依存するのではなく、たとえば図1に見られるように方位コントラストの増大につれて連続的に変化する関数特性を示したことは、一次視覚野の刺激特徴抽出性を形成するメカニズムと密接に関わっていることを示唆する。刺激文脈依存的反応修飾は、知覚的には「視野の分節化」あるいは「図地分離」の基礎となりうるが、また、脳の情報処理のストラテジーとして、一様な刺激特徴をもつ視野部分についての情報処理を抑え、周囲と異なる部分についての処理を行うことで、情報処理の単純化・高速化、メモリーおよびエネルギーの節約を実現する極めて合目的的な脳機能を反映していると考えられる。

研究 II. 刺激文脈依存的反応修飾のメカニズム

一次視覚野における刺激文脈依存的反応修飾の元になっているのは、皮質内抑制による直接的なニューロン活動の抑制ではなく、むしろ皮質下で生じる受容野外刺激による反応抑制であり、外側膝状体から一次視覚野への入力それ自体が受容野外刺激による抑制を示すことが分かった。この皮質への興奮性入力は皮質神経回路において興奮性ニューロンおよび抑制性ニューロンを、刺激サイズについても方位や運動方向などの刺激パラメータについてもよく似たチューニング特性でドライブしていると見られる。皮質内神経回路および高次視覚領野からのトップダウン入力は、文脈依存的反応修飾作用や特徴抽出性を合目的的に増強あるいは調節しているものと考えられる。

国際共同研究

・2002 年 5-9 月　エール大学医学部 N. W. Daw 教授「大脳皮質視覚野の可塑性メカニズムに関する研究」

A01-15

階層的処理によるテクスチャー情報抽出機構

大澤五住

大阪大学 大学院生命機能研究科 脳神経工学講座

特定領域「神経回路」参加年度

平成１３年度ー平成１６年度

研究成果の要旨

初期視覚野の細胞は、テクスチャー刺激と明るさで定義される刺激に対する両眼視差選択性が同一であるという「手がかり不変性」を持つことを示し、２種の信号の両眼統合の仕組みを特定した。また、周波数領域での逆相関法を利用した新計測法の精度と計測時間の実験的評価を行った。

研究成果

１．ネコの二次視覚野（18 野）及び比較のために一次視覚野（17 野）において、テクスチャー刺激を用い視覚刺激を行いながら反応を記録した。また同時に、従来使われてきた明るさの変化で定義される刺激パターンも使用した。テクスチャー刺激は高い空間周波数の正弦波のコントラストを振幅変調した画像パターンである。さらに、両眼同時刺激に対する反応をテクスチャー刺激、明るさパターンの刺激の両方について記録した。この実験により、以下の点が明らかになった。

（１）テクスチャー刺激に反応する細胞で、明るさで定義される刺激に対し両眼視差選択性を持つものは、そのほとんどがテクスチャー刺激の両眼視差にも選択性を持ち、この２種類の刺激についての最適両眼視差は同じである。このことは、神経細胞が異種の視覚手がかりについて反応特性が不変なこと、つまり「手がかり不変性」を持つことを意味する。

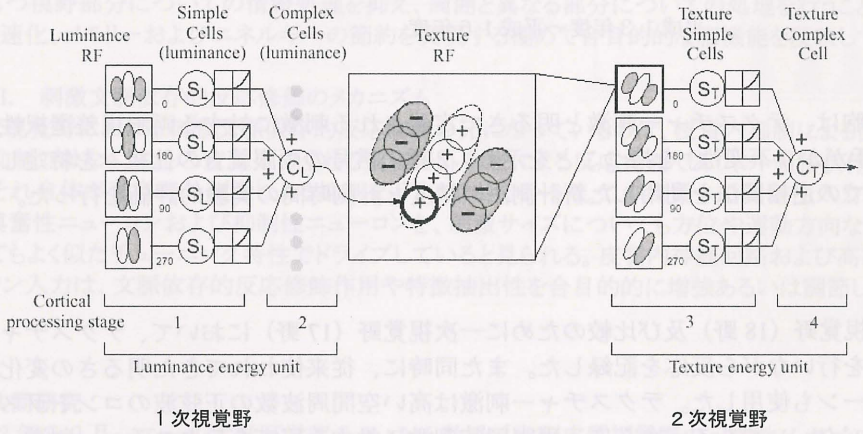
（２）明るさで定義される両眼からの入力信号とテクスチャーで定義される両眼入力信号は同一の段階で一度に統合される。この結果は、２つの目に異なる種類の刺激（１つの目には明るさで定義された正弦波、もう片方の目にはテクスチャーで定義された正弦波を提示する特殊な刺激）をコントロールとして使用することで示すことができた。

２．逆相関法を周波数領域（空間周波数と方位の領域）で行うことにより、短時間の間に一次及び２次視覚野における神経細胞の空間周波数と方位の結合特性を測定することが可能になった。従来の運動する正弦波刺激による測定よりも、格段に神経細胞の特性に関して得られる情報量が増えた。また、比較により従来法による結果との整合性を確認し、新手法が従来法を代替できるより良い方法であることを示した。

本研究ではテクスチャー（模様）の境界に反応する細胞、すなわち「テクスチャー細胞」とも言うべき細胞の両眼統合の機構を解明することを主目的としてきた。これらの細胞は一次視覚野の単純型・複雑型細胞の出力を統合して作られ、それらに続く、視覚皮質の 3 段及び 4 段目の細胞であるとの仮説に基づいている。このような神経回路構造を、図－１に示すようにエネルギーモデルとよばれる神経回路を 2 段直列につないだ、「カスケード・エネルギーモデル」として提唱してきた。このモデル細胞にさまざまなテクスチャー視覚刺激を提示して、モデルの各部位の細胞での反応を計算することができる。　この結果、ちょうど従来の一次視覚野の単純型・複雑型細胞が、明るさの違いで定義される物体の境界を抽出するのに適した特性をもっているのと同様に、カスケード・

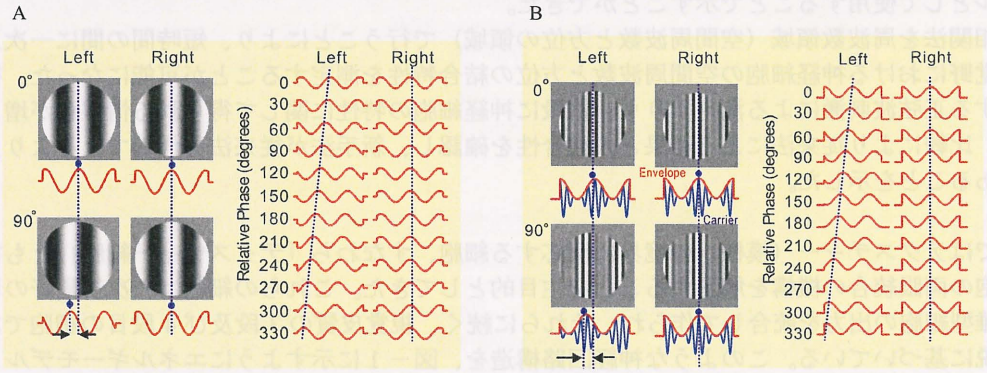
エネルギーモデル、すなわちテクスチャー細胞の出力は、テクスチャーの違い（あるいは有無）によって定義される物体の境界をよく抽出することを定量的に示すことができた。この計算実験に使われた視覚刺激には、いわゆる「主観的輪郭」と呼ばれる一群のパターンがあり、このようなパターンの境界線を、我々が見た時に得る境界の知覚と同様にモデル予測により示すことができた（幾山、大澤, 2002)。

このモデルによる研究成果に基づき、本研究ではさらに生理学的実験により、実際の脳内での高



図−１：カスケード・エネルギーモデル（Cascaded Energy Model）

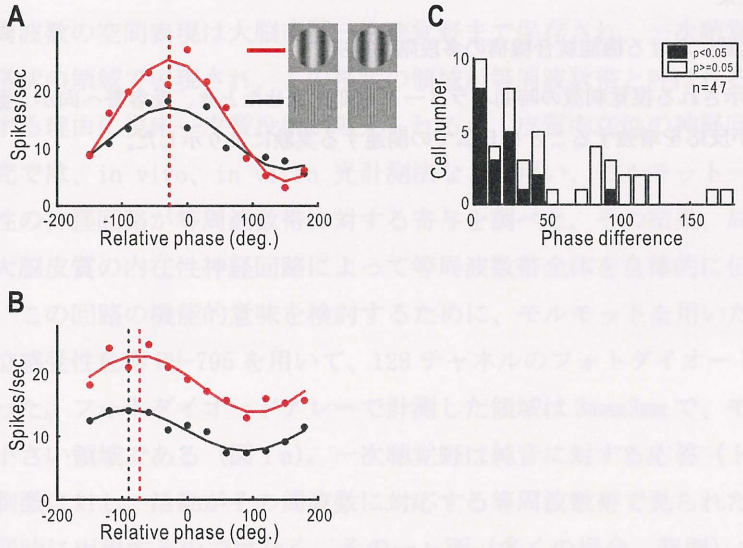
次特徴抽出機構の解明を目指すため、図－２に示すエンベロープ刺激と輝度刺激の組み合わせのそれぞれについて両眼視差を変化させ、正弦波を最適方向に運動させることにより両眼視差チューニング特性を調べた(Ohzawa and Freeman, 1986)。単純な正弦波輝度刺激の場合には何も問題はないが、エンベロープ刺激については何を運動させるかが問題となる。今回はテクスチャーの有無でできた波の周期が輝度刺激の周期とだいたい同じであることが Baker らの研究によりわかっているので、エンベロープを運動させ高周波の carrier 成分は静止状態に保った。



図－２：両眼間の相対位相差を変化させることにより、両眼視差チューニング特性を輝度刺激（A）とエンベロープ刺激（B）について測定する

エンベロープ刺激と輝度刺激に対する両眼視差選択性には「手掛かり不変性」があるだろうか。こ

の疑問に答えるために、両者の刺激について両眼視差チューニング特性を測定した。この測定は2種類の刺激について順番に行うのではなく、全ての刺激セットをまとめ、ランダムに混ぜて測定を行った。こうすることで、時間を隔てた測定の場合に問題となる非動化した状況での残留眼球運動などの本質的で無い原因によるチューニング特性のピークの変化の影響を排除することができる。図－３にこの結果を示す。図－３ＡとＢはそれぞれ別の細胞のエンベロープ刺激にたいする両眼視差選択性（赤）と輝度刺激に対するそれ（黒）をプロットした結果である。図－３Ａ、Ｂともに赤と黒で示されるグラフは同じ両眼間相対位相でピークをとることが見て取れ、「手掛かり普遍性」があることが分かる。手掛かり不変性はこの２種の刺激によるチューニング特性のピーク位相の差として定量化することができる。すなわち、ピーク位相の差がゼロであれば手掛かり不変性があることになる。



図－３：エンベロープ刺激と輝度刺激に対する両眼視差選択性の「手掛かり不変性」

エンベロープ刺激と輝度刺激に対する両眼視差チューニングのピーク位相の差を４７個の１８野細胞についてヒストグラム化した結果を図－３Ｃに示す。この結果より、有意な両眼視差チューニングを持つ細胞ではほとんどの場合チューニングのピーク位相が５０度以内の差に収まっていることが解った。このことから、ポピュレーションとしてみても、１８野細胞の両眼視差チューニングに関しては「手掛かり不変性」が存在すると結論することができる。

また、本研究では視覚刺激発生装置、実験制御とリアルタイムデータ解析のためのソフトウエアと詳細なデータ解析プログラム環境の開発を行い、安定した視覚実験環境を得ることができた。本研究では初期視覚野の研究では欠くことのできない空間周波数と方位選択性の計測をこれまでの数倍の早さで行うことのできる新手法を実装し、従来の手法とのデータの互換性あるいは比較可能性の検証をおこなった。この新手法はサブスペースマッピング法(Ringach et al. 1997)とよばれ逆相関法を周波数領域で適用したもので、刺激系列として毎秒２０－３０枚のいろいろな方位や空間周波数を持つグレーティングをランダムな順番で提示する。この刺激によって生起させられたスパイクと刺激との相関を求めることにより、どの刺激が最もよくスパイクを生起させたのかが２次元のマップとして得られる。このマップはそのまま、２次元の空間周波数特性になっており、１５－２０分ほどで１８０（１０ｘ１８）点のグレーティングに対する反応強度を測定することができる。これ

までではほぼ同じ時間で高々３０点ほどのデータしか得ることができなかった。このような高速な細胞の反応特性計測法は、近年様々な領野での反応特性と機能の研究に利用されるようになっており、今回開発したシステムは今後の研究に非常に有効なベースとなる。

共同研究

共同研究の相手

Dr. Yves Fregnac, CNRS, Gif-sur-Yevette, France

共同研究内容と成果

「感覚系皮質における機能統合機構の多段階的研究」

古典的受容野の外と内に提示される視覚刺激の時間パラメータを変化させたとき、受容野へ向かう動きを持つ colinear に提示される刺激が反応を増強することを日仏での関連する実験により示した。

研究課題：　新たに発見された一次聴覚皮質機能構造の回路基盤と機能意義

研究代表者名：　宋文杰

所属：　大阪大学大学院工学研究科電子工学専攻

特定領域「神経回路」参加年度：　平成１２年度、平成１５－１６年度

研究成果の要旨：

大脳皮質一次聴覚野において、純音刺激に対して等周波数帯と呼ばれる帯状の領域が活動する。本研究によって、局所的に引き起こされた大脳の活動が皮質の内在性神経回路によって等周波数帯全体を自律的に伝播できることが示された。

研究成果：

言語などの複雑音は蝸牛において周波数分解され、空間的に表現されることが知られている。音声周波数の空間表現は大脳皮質一次聴覚野まで保存され、一次聴覚野では、一つの純音は一つの帯状の領域で表現され、この帯状の領域が等周波数帯と呼ばれる。純音が等周波数帯を活性化する理由に視床―皮質投射が考えられるが、皮質内在性の神経回路の関与も考えられる。本研究では、in vivo、in vitro 光計測法などを用い、モルモット一次聴覚野において、皮質内在性の神経回路が等周波数帯に対する寄与を調べた。その結果、局所的に引き起こされた活動が大脳皮質の内在性神経回路によって等周波数帯全体を自律的に伝播できることが分かった。また、この回路の機能的意味を検討するために、モルモットを用いた学習標本を確立した。

電位感受性色素 RH-795 を用いて、128 チャネルのフォトダイオードアレーで in vivo 光計測を行った。フォトダイオードアレーで計測した領域は 3mmx3mm で、モルモット一次聴覚野よりやや小さい領域である（図１a)。一次聴覚野は純音に対する応答（トノトピー）で同定した。純音刺激に対し、活動がその周波数に対応する等周波数帯で見られたが、活動は等周波数帯全体に同時に出現するのではなく、その一ヶ所（多くの場合、背側）から始まって、約 10msec 弱で等周波数帯全体に広がった（図 1b)。皮質内在性の神経回路の関与を調べるため、等周波

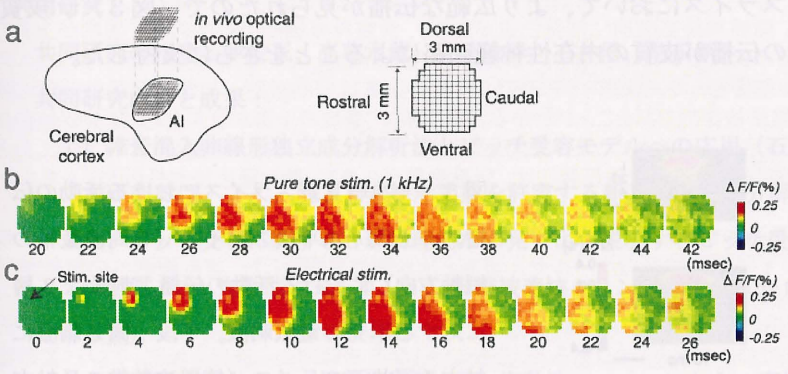


図１．a. 一次聴覚野の活動を光計測法で計測する概念図。b. 計測された 1kHz 純音に対する応答。c. 局所的な電気刺激に対する応答。純音に対する応答と似た応答が引き起こされた。

数帯の一ケ所を電気的に興奮させた。電気刺激の直接的な効果が空間的に限局されていたが（< 250μm)、電気刺激による興奮が自律的に等周波数帯全体に伝播した(図１c)。また、電気刺激による興奮と純音刺激による興奮は空間的に強い相関を示した。電気刺激による興奮の伝播を支える神経回路を特定するために、まず活動の伝播速度を調べた。電気刺激による興奮の伝播

速度と純音刺激による伝播速度のいずれも刺激の強さ（純音：25-70dB；電気：0.1-0.5 mA）に依存しなかった。電気刺激による興奮の伝播速度が純音刺激によるものと比べて有意に遅かったので、電気刺激による興奮の伝播が皮質内在性神経回路による可能性が示唆された。この考えを支持するデータとして、皮質における自発活動も電気刺激による興奮と似た速度で伝播することを確認した。電気刺激による興奮の伝播が皮質内在性神経回路による可能性を更にテストするために、イボテン酸注入により、内側膝状体を破壊した動物を用いて同様な電気刺激実験を行った。その結果、皮質における純音に対する応答が消失したのに対し、電気刺激による興奮の伝播が影響されなかった（図２）。これらの結果は、モルモット一次聴覚野において皮質内在性神経回路が等周波数帯の形状を規定していることを示唆する。

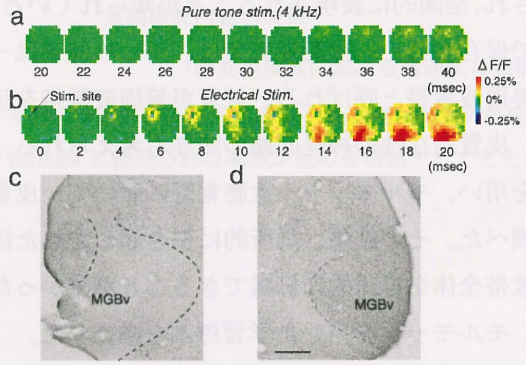


図２．電気刺激によって皮質で誘発される自律的な活動の伝播は視床の破壊によって影響されなかった。a. 破壊後純音に対する応答。通常の潜時での応答が消失した。b. 破壊後電気刺激に対する応答。応答の空間パタンも伝導速度も健常動物と差がなかった。c. 破壊部位。d. コントロール。

上記の考えを更にテストするために、皮質以外の神経回路の影響が除外できる一次聴覚野のスライスにおける活動の伝播を等周波数帯の短軸方向（水平面スライス）と長軸方向（冠状面スライス）で比較した。一次聴覚野はin vivoの光計測で得られたマーカーで同定した。これらの実験は100x100チャネルのCMOSカメラで計測した。電位感受性色素としてdi-2-ANEPEQを用いた。実験の結果、いずれの断面のスライスにおいても、皮質の2/3層において、広範な活動の伝播が見られたが、冠状面スライスにおいて、より広範な伝播が見られたので（図３）、皮質の等周波数帯における活動の伝播が皮質の内在性神経回路によることをさらに支持した。

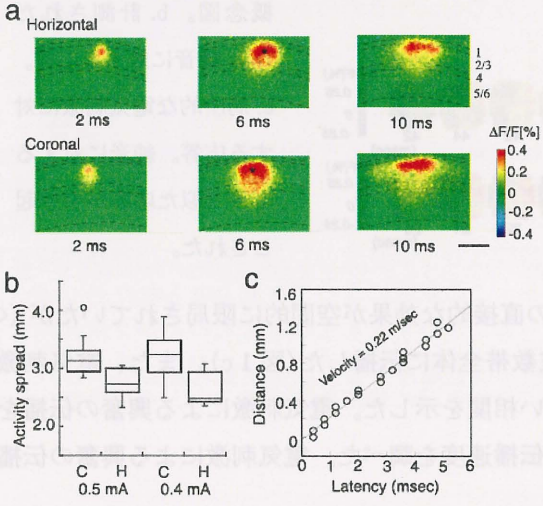


図３．一次聴覚野スライスにおける活動の伝播。a. 上段：水平面スライス（等周波数帯の短軸方向）における活動の伝播。刺激は２層に対する単発の電気刺激。下段：同じ刺激に対する冠状面スライス（等周波数帯の長軸方向）での伝播。活動が 2/3 層においてより広範囲に伝播した。b. 伝播範囲のまとめ。c. スライスにおける伝播速度。In vivo における電気刺激による活動の伝播速度に近い。

上記の結果より、モルモット一次聴覚野において、皮質内在性神経回路によって等周波数帯全体を活動が自律的に伝播できることを示している。また、等周波数帯における活動の自律的伝播は局所的な電気刺激によって引き起こすことが出来ることも示された。このような皮質回路の機能意義を検討するために、行動レベルで評価する必要がある。そのための準備として、モルモットを用いて、純音刺激と瞼への電気刺激を組み合わせる古典的条件付け学習を成立させた。純音を条件刺激として、瞼への電気刺激を無条件刺激として訓練させると、数日で学習が成立することが分かった（図４）。また、成立した学習は条件刺激のみを与えることによって消去させることも出来ることが分かった（図４）。今後、このような標本を用いて、等周波数帯を作り出す皮質内在性神経回路の機能意義を検討していく計画である。

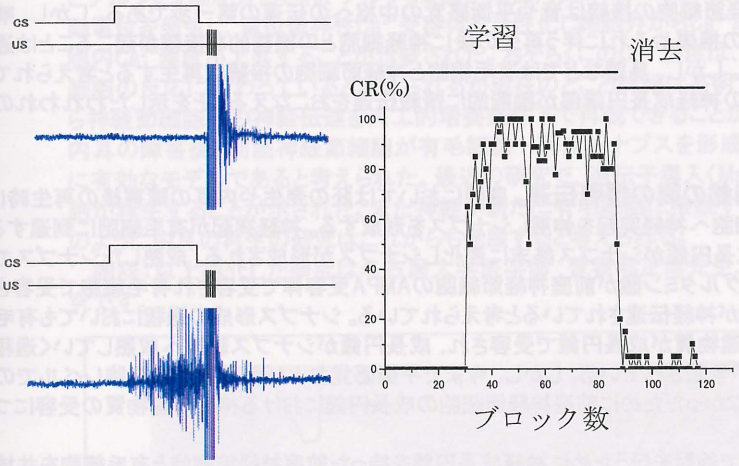


図４. モルモットを用いた古典的条件付け学習。CS:純音刺激、US:瞼への電気刺激。記録：瞼の筋電位。左上段：学習が成立する前。左下段：学習が成立後。CS によって瞼の反応が誘発された。右：学習と消去曲線。

上記の研究成果は平成１５年度と平成１６年度におけるもので、平成１２年度は大脳基底核におけるリズム生成に関する課題で研究を行ったが、その成果は Otsuka et al., 2001, 2004 等にまとめた。

共同研究：

共同研究の相手：伊佐正、高草木薫、青崎敏彦、石井信、前田新一

共同研究内容と成果：

１）雑音混入非線形独立成分解析法とピッチ受容モデルへの応用（石井信、前田新一）

本研究では、ノイズ混入と非線形変換を許容する新しい独立成分解析のアルゴリズムを提案した。また、ピッチ受容に関する心理物理的な知見をよく説明するピッチ受容の新しいモデルを提案した。

２）黒質 GABA 作動性ニューロンから脚橋被蓋核コリン作動性ニューロンに対する抑制（伊佐正、高草木薫）

本共同研究によって、黒質網様部 GABA 作動性ニューロンから、直接脚橋被蓋核コリン作動性ニューロンに抑制的に作用することが明らかになった。

３）ドーパミン D4 受容体を介する淡蒼球 GABA 受容体電流の修飾作用（青崎敏彦）

本研究によって、ドーパミン D4 受容体が活性化されると、細胞内シグナル伝達系で後シナプス性的に、淡蒼球 GABA 受容体電流が減少することが明らかにされた。

A01-18

表題(研究課題) 聴覚神経細胞の神経成長円錐と有毛細胞の間の情報伝達の研究

研究代表者名　辰巳仁史
所属　名古屋大学大学院 医学系研究科 イメージング生理学

特定領域「神経回路」参加年度　平成12年度

研究成果の要旨
形態的研究から鳥類では有毛細胞の損傷再生の後に神経細胞との間の接続が再生すると考えられている。しかしその機能については不明である。本研究では有毛細胞と神経細胞の神経成長円錐部が機能的に情報伝達をおこなえることを示した。

研究成果

はじめに。有毛細胞と神経節細胞の接続は音や平衡感覚の中枢への伝達の第一歩である。しかし、哺乳類においては、有毛細胞の損傷やそれに伴う再生の後に神経細胞との機能的な接続が起こることは通常おこらないと考えられいる。しかし、鳥類などでは有毛細胞と神経節細胞の接続は再生すると考えられている。有毛細胞と神経細胞の神経成長円錐部が機能的に情報伝達をおこなえることを示したわれわれの研究を紹介する。

有毛細胞と神経成長円錐の間の情報伝達。鳥類においては胚の発生や内耳の障害後の再生時に、前庭神経節細胞は有毛細胞へ神経突起を伸展しシナプスを形成する。神経突起が有毛細胞に到達すると神経突起の先端にある成長円錐がシナプス終末に変化しシナプスが形成される。成熟したシナプスでは有毛細胞から分泌されたグルタミン酸が前庭神経節細胞のAMPA受容体で受容され有毛細胞で受容された平衡感覚に関わる情報が神経伝達されていると考えられている。シナプス形成の過程においても有毛細胞から分泌された神経伝達物質が成長円錐で受容され、成長円錐がシナプス終末へ成熟していく過程に影響を及ぼしていることが予想されている。しかし、今まで平衡感覚および聴覚系では細胞レベルでの研究がほとんど行われていなかったために前庭神経節細胞の成長円錐における神経伝達物質の受容についてはほとんど解っていない。

われわれは細胞レベルで検討を行うために神経成長円錐を持った前庭神経節細胞と有毛細胞を共培養しシナプス形成の初期段階をモデル化した実験系を作成した(図1A)。この実験系を用いて有毛細胞から分泌された神経伝達物質が成長円錐で受容される過程を電気生理学的および、イメージング技術を用いて観察研究した。実験には前庭神経節細胞と有毛細胞の間でシナプスが形成されている時期(E15－20)の鶏胚を使用した。鶏胚から分離した前庭神経節細胞を1－8時間培養した。前庭神経節細胞は培養後、約3時間で成長円錐を形成した。有毛細胞は分離後直ちに実験に以下のように使用した。

培養した前庭神経節細胞の標本へ別に分離した有毛細胞を移し、さらに有毛細胞をマイクロマニュピレーションして成長円錐へ図1Aに示すように移動した。ガラス電極から有毛細胞を電気刺激し、有毛細胞を電気的に興奮させると、前庭神経節細胞に情報伝達がおこり、前庭神経細胞の細胞内Ca^{2+}濃度が上昇した。この細胞内Ca^{2+}濃度の上昇について薬理学的な検討を行ったところ、non-NMDA受容体のアンタゴニストである10 μM CNQXで阻害された。細胞内カルシウム濃度の上昇は有毛細胞への電気刺激の回数に依存し、情報伝達が刺激強度依存的であることがわかる。細胞内Ca^{2+}濃度の上昇がグルタミン酸受容体を介した反応であることが推測されたためグルタミン酸を成長円錐に投与しCa^{2+}の流入経路について検討したところ有毛細胞と前庭神経細胞の間の情報伝達には、伝達物質グルタミン酸と電位依存性Ca^{2+}チャネルが関与していることがわかった。

さらに機能的な有毛細胞から神経成長円錐への情報伝達があるかどうか検討するために、ホールセルパッチクランプ法を用いて神経節細胞のホールセル電流と活動電位を測定した。有毛細胞への電気刺激後5秒ほど持続する内向き電流が観察され、情報の伝達が可能であることが分かった。また電流固定モードで有毛細胞へ電気刺激したところ、神経節細胞で活動電位が観察された(図1B)。膜電位を変化させ内向き電流の電位依存性について検討したところ、グルタミン酸が有毛細胞から放出されて、アンパ型の受容体結合して神経伝達が行われていることが推測された。グルタミン酸の受容機構の性質を調べるために、グルタミン酸を前庭神経節細胞へY-tube法、ケージド化合物光分解法(以下で述べる)を用いて投与し、グルタミン酸に対する応答の薬理学的、電気生理学的な検討を行った。各濃度のグルタミン酸をY-tube法によって投与したところ内向き電流が惹起された。(Y-tube法はY字型のtubeから薬物を細胞に与える方法で、早い時間経過で決まった濃度の薬品を細胞に与えることができる)

レーザー光を当てると伝達物質など生理活性を持つ物質を生み出す方法が知られている。この方法のよいところはレーザーを当てたところに生理活性物質が生まれるので、細胞や組織の好きなところに光を当てるだけで、物質を投与できることである。このような物質をケージド化合物という。ここではケージドグルタミン酸の光分解法を用いて成長円錐および細胞体にグルタミン酸を投与し、惹起されるホールセル電流を比較した。成長円錐において13.6 pA、細胞体において85.1 pAの内向き電流が観察された。神経細胞の各部分にグルタミン酸の受容体があること、そして成長円錐のグルタミン酸受容体は比較的少ないことがわかった。有毛細胞へ電気刺激を行った後に成長円錐で観察される細胞内Ca^{2+}濃度の上昇は10 μM CNQXで阻害されたことから、有毛細胞から分泌されグルタミン酸は、成長円錐のnon-NMDA受容体に作用したと考えられる。以上の結果は成長円錐に機能的なnon-NMDA受容体が存在していることを示唆している。ホールセルパッチクランプ法により膜電流を固定し、有毛細胞へ電気刺激を行うと前庭神経節細胞において膜電位の上昇と活動電位が観察された。以上の結果からこの実験系で、有毛細胞を電気的に興奮させるとグルタミン酸が分泌され、グルタミン酸が成長円錐のnon-NMDA受容体に作用し、膜電位を脱分極させ活動電位を発生し、電位依存性Ca^{2+}受容体を活性化し細胞外からCa^{2+}が流入し、前庭神経節細胞における細胞内Ca^{2+}濃度が上昇することが示唆された。おそらくこのCa^{2+}濃度は、シナプス形成などこれからひきつづく細胞の反応に関わっていると考えられるが現在のところ詳細は不明である。以上の実験から、有毛細胞から神経節細胞への神経伝達を人工的培養条件下で再現できることがわかった。このことからこの実験系は内耳の障害後、前庭神経節細胞が有毛細胞へ再度シナプスを形成する過程を細胞レベルで検討するのに有効なモデルであると考えられた。最近の研究で、遺伝子導入(Math1)によって哺乳類の内耳に有毛細胞が再生することが示された。また神経が新たに有毛細胞に接続する様子も形態的に観察されている。このように内耳の再生の研究はこれからも発展すると考えられる。

謝辞:以上紹介した研究は名古屋大学医学部　曽我部正博先生、耳鼻科　星野道隆先生　との共同研究です。

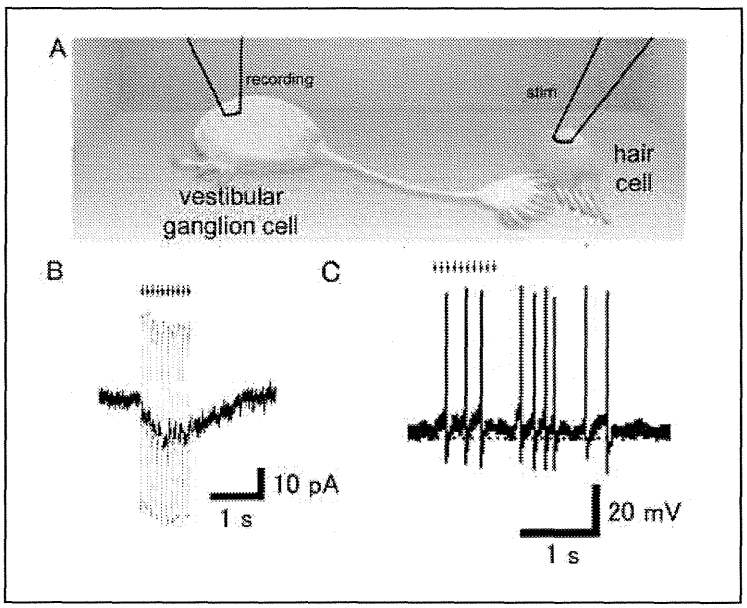


図1　有毛細胞を電気的に興奮させ、パッチクランプ法により前庭神経節細胞のホールセル電流を測定した。(A)実験系の概略図を示す。(B) 膜電圧固定モードで、神経伝達を示す内向きの電流が記録された。(C)膜電流固定モードで、前庭神経節細胞の電位を測定した。有毛細胞への刺激後、活動電位が観察された。破線は刺激前の静止膜電位を示す。

A01-19

研究　課題：　柔軟な情報表現とその動的な変化に関わる前頭連合野神経回路の研究

研究代表者：　船橋新太郎

所　　属：　京都大学大学院人間・環境学研究科共生人間学専攻認知・行動科学講座

参加年度：　平成１２年度

研究成果の要旨：

視覚情報から運動情報への変換過程において、前頭連合野のニューロン集団における情報表現の変化を調べたところ、視覚刺激が呈示されるい視野内の位置の違い、行われる眼球運動の方向の違い、あるいは課題の進行に伴って活動の分布パターンが変化することが観察された。

研究成果：

ODR 課題と R-ODR 課題を学習した１頭のサルの片側外側前頭連合野から記録した２５０個のニューロン活動を用いて、視覚刺激の位置と眼球運動方向に関する情報表現方法、および視覚情報から運動情報への変換過程における情報表現の変化を明らかにする目的で、試行のある時間帯（２００ミリ秒間）でのニューロンの活動の強さを、その活動が記録された皮質部位に表示するという方法で、記録した全てのニューロンの活動を２次元平面上に表示した活動分布パターン図を作成した。この図を課題の注視期から報酬出現までの全ての期間にわたって求め、時間経過に従って配置した。その結果、呈示される視覚刺激の視野内での位置の違い、行われる眼球運動の方向の違い、あるいは課題の進行に伴って、活動分布パターンが変化することが明らかになった。この結果は、ある情報は前頭連合野におけるニューロンの空間的な発火分布パターンとして表現され、また、情報の変化は空間的な発火分布パターンの変化として捉えられることが明らかになった。

その後、２頭のサルの前頭連合野背外側部から記録された課題関連活動をもとに、それらの集団としての活動パターンと表現する情報やその変化を集団ベクトル（population vector）解析法を用いて解析した。その結果、視覚情報から運動情報への変換に前頭連合野ニューロンが関わっていること、このような情報変換の過程は集団ベクトルの方向の時間変化として可視化して検討できることが明らかになった。

研究課題：　上丘でのターゲットの速度・位置検出機構

研究代表者：佐々木成人

所属：　　東京都神経科学総合研究所

参加年度　　平成 12 年度

研究成果の要旨：

静止・移動刺激に対して、上丘・脳幹網様体ニューロンの反応様式を調べ、移動刺激に対して上丘浅層から中間層のニューロンの間で刺激の速度から指向運動の振幅情報に変換されること、脳幹網様体で更にこれが指向運動の振幅の予測に変換される機構を明らかにした。

研究成果

はじめに：視野内に対象物が現れたとき、動物がそれらに頭、体幹と眼球を向ける運動を指向運動とよぶ。我々はこの指向運動のうち特に頸の指向運動について、その経路とその機能を調べ、すでに、図１の様に**1)**上丘（SC）が（頸の）指向運動の脳幹の中枢であること、**2)**頸の指向運動は基本的には、水平・垂直方向の運動に別れて制御されていること、**3)**水平運動は上丘-橋・延髄網様体（NRPC, NRG）-頚筋（SPL, BCC）の経路で、垂直運動は上丘-フォレル野（FFH）- 頚筋の経路により制御されることを明らかにしている。

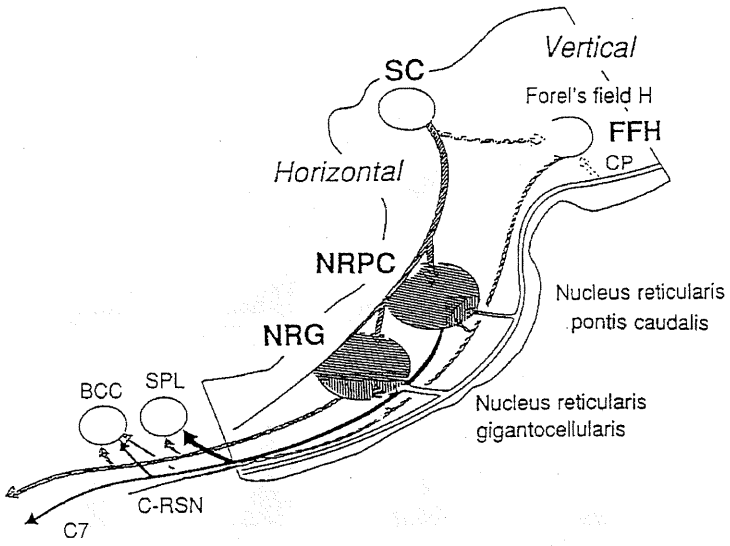


図１　頸の指向運動に関与する経路

ネコをパネルに向かって静かに立たせ、このパネル中央に投射した光点を注視させた状態から、新たな光点を視野周辺に突然提示(静止光刺激)して、または光点を ramp-hold 状に注視点から移動(移動光刺激)させて、誘発される指向運動は異なることを見いだした。前者は光点の空間位置情報を手がかりにするで位置誘導型指向運動、後者は光点の移動(速度)情報を手がかりにするので速度誘導型指向運動)と呼ぶことにした。位置誘導型指向運動は従来から良く研究されている指向運動と同じであるが、速度誘導型指向運動はこれまでほとんど報告がない。その特徴は、位置誘導型指向運動に比べ速度が 2 倍、潜時は 1/2 以下である。このため光点が動くと(duration 100ms, 400-800° /s)、頭は光点がターゲットの到着する前から動きだし、光点にがターゲット

に到着後すぐに、ネコもターゲットに指向している。これはあたかも到達位置を予測してそこに指向しているように見える。この速度誘導型指向運動の更なる特徴は頭と眼球の運動に加え、身体を対象物に向け前進させ、これを捕獲しようとする、一連の運動からなることである。この運動はネコが眼前を動くネズミを取る運動と同じであると推測している。速度誘導型指向運動は動物が無拘束の状態でないと誘発されないため、これまでに殆ど研究がない。本研究では、速度誘導型指向運動の神経機構を、上丘・脳幹より神経活動を記録して、位置誘導型指向運動と比較しつつ、明らかにすることを目的とした。

方法： ネコををパネルに向かって立たせ、このパネル中央に投射した光点を注視させた状態から、 1）光点を視野周辺に向かって step に移動させ誘発される位置誘導型指向運動、step-ramp 状に移動させ誘発される速度誘導型指向運動、光点を移動の途中で一時消す刺激（gap 刺激）による速度移動型指向運動の変化、 2）これと同時に上丘及び脳幹の神経活動を記録することにより、指向運動と神経活動の対応関係を詳しく調べた。

静止・移動刺激に対する上丘ニューロンの活動様式

上丘は浅層、中間層、深層に分れる。静止刺激(step 刺激)に対しては浅層のニューロンは図 2 に示すように視野の特定の部位（5 U と 4U）に光が点灯した時に潜時約 30ms 発火し、それ以外では殆ど発火しない受容野を持つ(図 2 左下)。一方移動刺激に対しては、上丘浅層ニュ-ロンの受容野が、位置誘導型指向運動の場合より拡大した。このため光点が移動し始めると潜時約 30ms、光点がそのニューロンの受容野に到達するまで、持続的に活動した(図 2 右下)。

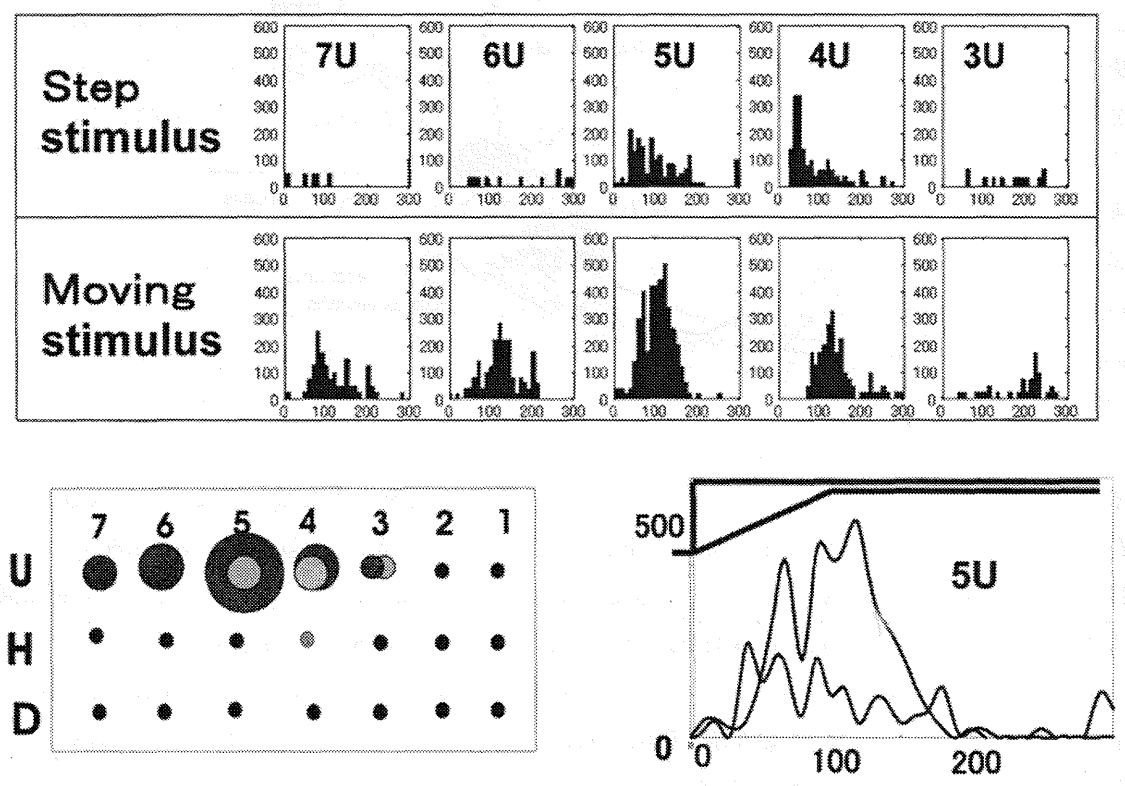


図 2　上丘浅層ニューロンの静止・移動刺激に対する反応

光点の移動中に光点を刺激開始ごいろいろなタイミングで（潜時で）一時（20-50ms）消す(gap刺激)とニューロン活動は gap にほぼ 1 対 1 に対応して活動の著明な減少・消失を伴ったことより、この受容野の拡大は、主に視野中心部からから入力の収束を受ける様になったためと考えられた。上丘中間層ニューロンは静止刺激に対しては、浅層の受容野に対応し、受容野の直下のニューロンが活動したが受容野以外の部位のニューロンは浅層同様活動しなかった(図 3 下段上)。一方移動刺激(移動時間 30-100ms)では、中間- 深層ニューロンは、浅層のニューロンの反応とは全く異なり、視野中心からの距離に比例して活動が増大した。即ち運動の大きさ（振幅）に比例して活動した(図 3 下段下)。その潜時（約 30ms）は浅層とほぼ同じであった。この結果は中間層のニュ- ロンは、光点の移動開始、即ち浅層の foveal region に受容野を持つニュ-ロンからも連続して入力の収束を受けることが強く示唆された(図 3 左下)。これを確かめるために gap を刺激開始から始めると gap の持続時間に比例して潜時が延長した。一方刺激の途中に gap を入ると、潜時は一定(30ms)でその後 gap の持続時間に対応してスパイク発射の消失が見られたことから確かめられた。

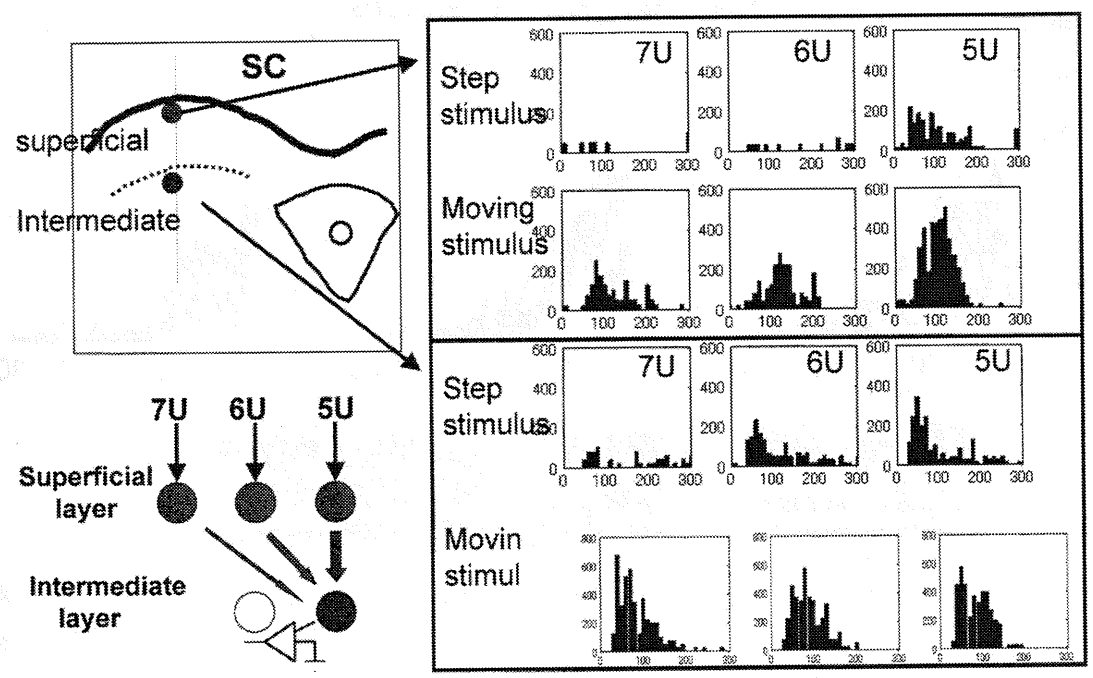


図３　上丘浅層中間層ニューロンの静止・移動刺激に対する反応

上丘深層ニューロンについても中間層とほぼ同じ結果をえた。

脳幹ニューロンの活動　脳幹網様体ニューロンは上丘中間層・深層のニューロンから入力を受ける。活動パターンから 2 種類(phasic neuron, phasic sustained neuron)の網様体ニューロンが同定されている。Phasic neruron（PN）は静止・移動刺激の両者に対して頭の運動に約 10ms 先行バースト状に一過性に発火することから速度誘導型・位置誘導型指向運動の両者に関与する。一方 phasic sustained neuron(PSN)は移動刺激のみに反応する。 図４は移動刺激に対して上丘中間層ニューロンと PSN を同時記録したときのヒストグラムを示す。 PSN は上丘中間

層のニューロンとほぼ同じ潜時（約 30ms）で活動し、その活動のパターンは中間層のニューロンに非常に類似している。Gap 刺激でも gap の持続時間に対応して、活動を停止し、その発火総数も減少した。　その反応パターンも上丘中間層ニューロンにほぼ一致した。

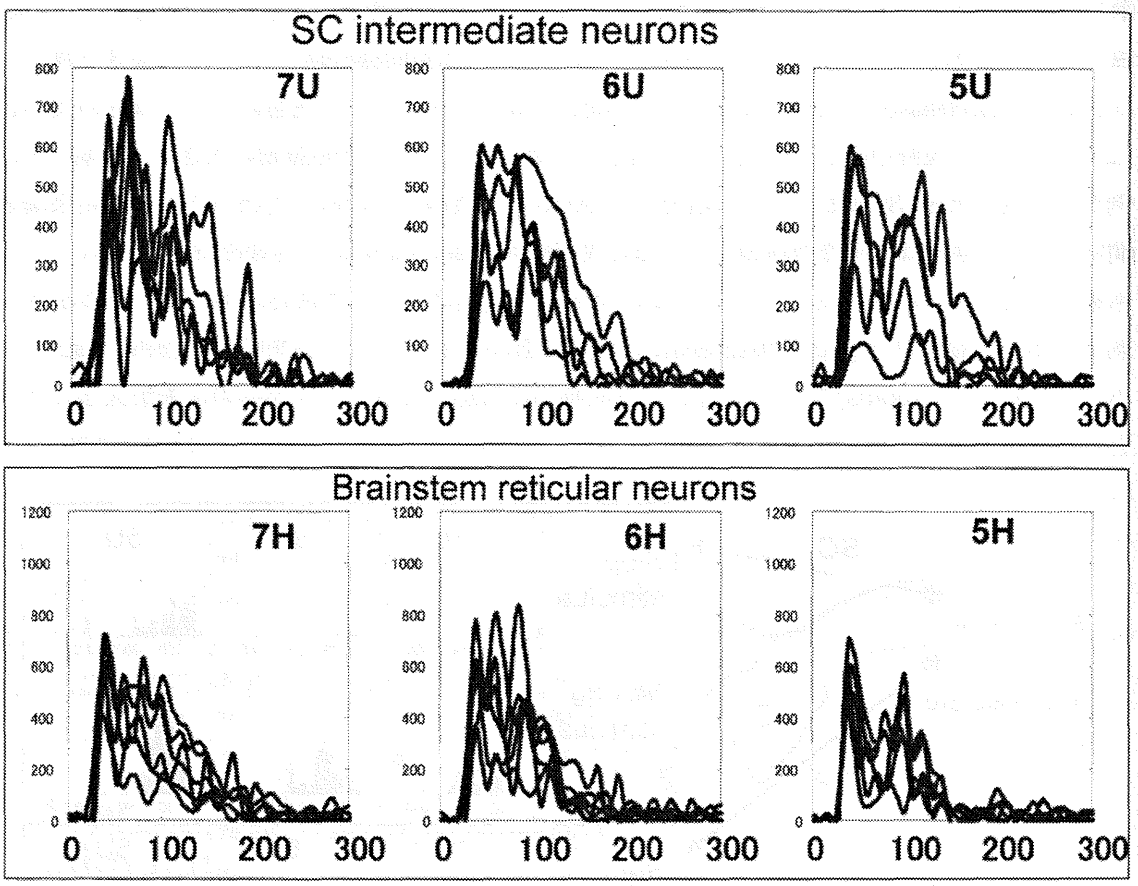


図４　上丘中間層ニューロンと網様体ニューロン（PSN）の移動刺激に対する活動

これらの結果から PSN は上丘中間層のニューロンから直接投射を受け、更に PSN の発火のピークは 50ms 以内であることは PSN が中間層のニューロンから指向する位置情報を 50ms 以内に抽出し頸の運動ニューロンに出力していることを意味する。これが速度誘導型指向運動で、あたかも到達位置を予測している神経機構であると考えられる。

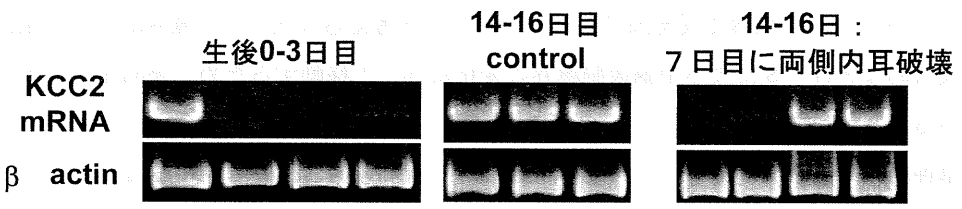
A01-22

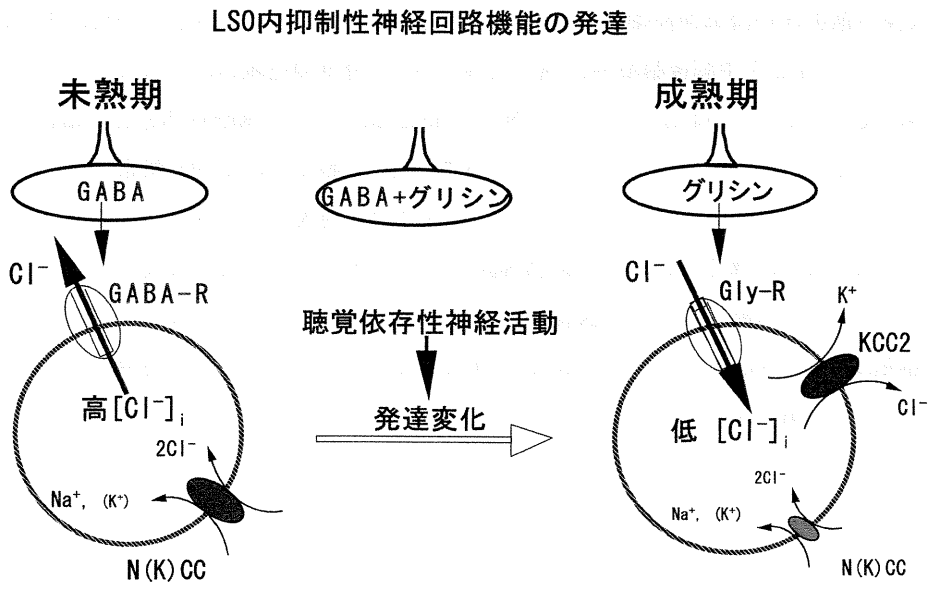
研究課題:聴覚系をモデルとした抑制性神経回路機能発達に対する神経活動入力による制御

研究代表者:鍋倉淳一
所属:自然科学研究機構生理学研究所
参加年度:平成12 年度

研究成果の要旨:聴覚中経路である外側上オリーブ核細胞において、神経細胞内Cl^-くみ出し分子であるK^+-Cl^- 共役担体(KCC2)の発達発現増加にともない、GABAの作用が脱分極(しばしば興奮性)から抑制性へ変化する。この変化は発達期における聴覚依存性の神経入力活動に依存していた。

研究成果:
ほとんどの抑制性回路が介在神経細胞によって構成されているため生体において抑制性回路のみを選択的に活性化することは困難であるという技術的制約のため、抑制性神経回路の発達変化の制御の研究は殆ど報告をみない。この中で、聴覚系外側上オリーブ核には対側音入力がグリシン作動性抑制性として入力する。この抑制性回路の特徴を利用して、神経活動による抑制性神経回路機能の発達制御を外側上オリーブ核から急性単離した神経細胞にグラミシジン穿孔パッチ法を適用して検討した。この核に対する主要伝達物質であるグリシンは、生後１週目までは活動電位を伴う興奮性応答を引き起こし、生後２週目には細胞の過分極を伴う抑制性に発達変化した。この興奮から抑制性への変化は発達に伴う細胞内Cl^-濃度の減少によることが明らかとなった。この細胞内Cl^-濃度の発達減少のメカニズムとして、幼若期には細胞内外のNa+濃度差に依存したCl^-の取り込みがあるために細胞内Cl^-濃度は高く保たれている。発達に伴い、細胞内外のK+濃度差に依存したCl^-の汲みだし機構が機能的に発現するために細胞内Cl^-濃度は低くなる。この結果とCl^-汲みだしおよび取り込み機構はフロセマイドによってブロックされることから、２種類のCl^-トランスポーター(K+-Cl^- cotransporter(KCC) とNa+, K+-Cl^- cotransporter)機能 の発達変化による細胞内Cl^-濃度の低下が、グリシンの興奮性から抑制性への変化の原因であることが判明した。この細胞内Cl^-濃度調節機構の発達変化は聴覚発生直前に内耳を破壊し、聴覚依存性入力を遮断すると抑制され、神経細胞に特異的に発現しているKCC2mRNAの発現が内耳破壊動物では成熟後も障害された。特に、同側内耳破壊によって聴覚依存性グルタミン酸作動性入力を遮断した動物では細胞内Cl^-濃度調節機構の発達障害は著明であった。以上のから、抑制性伝達物質応答は神経回路入力活動、特に発達期の興奮性入力によって制御されていることが判明した。
さらに、近年内側台形体核から外側上オリーブ核への伝達物質が幼若期の GABA からグリシンへ単一終末内でスイッチすることが電気生理学および免疫組織学的手法によって判明した。





A01-23

表題（研究課題） 「発生脳の神経回路形成：中脳-後脳の領域化と軸索誘導」

研究代表者名 渡邉 裕二

所属 東北大学生命科学研究科脳構築分野

/東北大学加齢医学研究所分子神経研究分野

特定領域「神経回路」参加年度 平成１２年度

研究成果の要旨

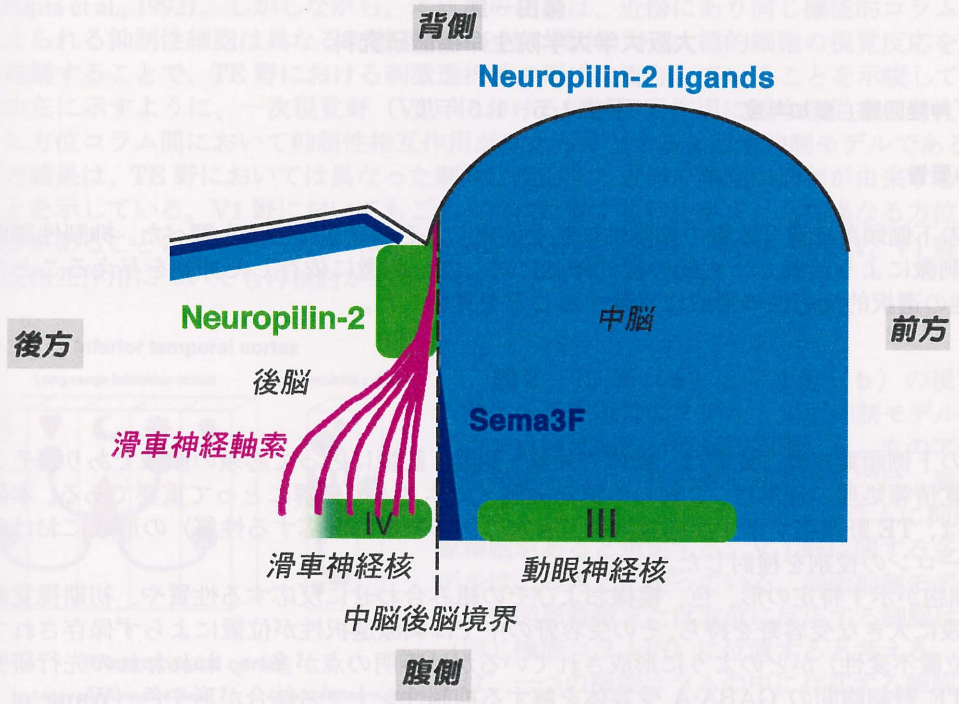
滑車神経軸索が中脳後脳境界に誘導される分子機構について調べ、滑車神経軸索と背側峡部に発現するneuropilin-2と、Sema3Fを含む中脳に存在するneuropilin-2リガンドの相互作用が、境界に沿った軸索誘導に重要であることが明らかにした。

研究成果

峡部発生においてはＦＧＦ８が局所的なオーガナイザーとして作用し、中脳と後脳の領域化に働くことが知られている。領域化は各領域内の細胞発生運命を左右するが、脳内を伸長する神経軸索の走行パターンにも影響を与えると考えられる。そこで我々は領域形成と軸索誘導の関連に着目し、峡部を中脳後脳境界に沿って走行する滑車神経軸索に注目してその軸索誘導の分子機構について調べた。その結果、中脳と後脳の発生運命を分けるOtx2/Gbx2遺伝子発現境界に沿って、軸索誘導因子Sema3F遺伝子が中脳後端に発現していることを見いだした。Sema3F分子は実際に生体内で滑車神経軸索を反発することから、反発因子として中脳後脳境界に沿った軸索誘導にはたらくことがわかった。一方Sema3F分子の受容体であるneuropilin-2遺伝子は滑車神経核に発現しており、neuropilin-2分子が軸索で反発因子を感知していると考えられた。この境界に沿った軸索誘導機構は、異所的なＦＧＦ８による中脳後脳境界の変化に伴って移動するため、峡部オーガナイザーの下流にあることが示唆された。

滑車神経軸索は腹側にある左右一対の神経核から背側方向に伸長し、中脳後脳境界にある背側交叉点で左右の軸索が交叉する。意外にもneuropilin-2遺伝子は峡部背側の神経上皮にも発現しており、成長円錐を含む滑車神経軸索の遠位部は交叉前に同じ場所に収束していた。その役割を調べるためneuropilin-2を中脳後脳境界に強制発現すると、滑車神経軸索は正常の走行パターンから外れて中脳に侵入することがわかった。生体内でのneuropilin-2の細胞外部分との結合実験により、神経上皮のneuropilin-2がリガンドと結合することで、中脳での滑車神経軸索に対する反発活性が中和されることが示された。したがってneuropilin-2は反発因子をブロックすることにより滑車神経軸索を背側交叉点に導くという、軸索誘導因子の受容体としての新たな役割をもつことが示唆された。以上のことから峡部では、中脳後脳境界を挟んで後脳に存在するneuropilin-2（滑車神経軸索と背側峡部）と、中脳に存在するSema3Fを含むリガンドの相互作用が、境界に沿った軸索誘導に重要であることが明らかとなった。

A01-23


背側
Neuropilin-2 ligands
Neuropilin-2
後方
中脳
前方
後脳
Sema3F
滑車神経軸索
IV
III
滑車神経核
動眼神経核
中脳後脳境界
腹側

A01-24

下側頭葉皮質局所神経回路による物体特徴の抽出過程

藤田一郎
大阪大学大学院生命機能研究科

特定領域「神経回路」参加年度　　平成１５−１６年度

研究成果の要旨

霊長類の下側頭葉皮質 TE 野の抑制性細胞を同定し、その視覚反応性を調べた。抑制性細胞もまた視覚刺激により活動し、近傍の標的細胞に対して、刺激に依存した抑制を与えることで、TE 野細胞の選択的反応性の形成に貢献することを見出した。

研究成果

霊長類の下側頭葉皮質 TE 野は、物体の知覚・認識・記憶にとって必須の領域であり、そこにおける視覚情報処理の理解は、これらの認知機能メカニズムの理解にとって重要である。本研究においては、TE 野細胞が示す反応選択性（特定の図形特徴に反応する性質）の形成における抑制性ニューロンの役割を検討した。

TE 野細胞が示す特定の形、色、模様およびその組み合わせに反応する性質や、初期視覚野に比べて格段に大きな受容野を持ち、その受容野の中では刺激選択性が位置によらず保存されている性質（位置不変性）がどのように形成されているかは不明の点が多い。われわれの先行研究において、TE 野細胞間の GABA-A 受容体を解する抑制性シナプス結合が形や色（Wang et al., Nature Neurosci., 3:807-813, 2000）、テクスチャーやパターン（Wang et al., NeuroRep., 14: 453-457, 2003）に対する反応選択性の形成に寄与していること、さらに、受容野を決めることにも貢献していること（Wang et al., Cerebral Cortex, 12: 62-74, 2002）を示した。これらの研究では、GABA-A 受容体の特異的拮抗剤であるﾋﾞｷｭｷｭﾘﾝﾒﾁｵﾀﾞｲﾄﾞ（BMI）をイオン泳動微小投与することにより、反応選択性や受容野構造がどのように変化するかを調べた。

BMI は、TE 野細胞の特定の視覚刺激に対する反応に対してのみ脱抑制による反応増強を起こすものの、別の刺激に対する反応には影響をおよぼさない。このことは、BMI の効果が、GABA 抑制の「氷山効果」や「ゲインコントロール効果」では説明できないことを示しているものの、抑制性細胞が刺激選択性を持つことを必ずしも意味しない（シナプス後細胞の樹状突起別に刺激選択的な興奮入力が到着しており、それとは別に、刺激選択性を持たない抑制シナプス入力が細胞体近位側でシャント抑制を施している可能性もある）。本研究では、複数の TE 野細胞から活動電位列を同時記録し、相互相関解析法を適用することによって、全動物標本実験において抑制性細胞を同定し、その視覚反応性を調べた。抑制性 TE 細胞もまた視覚刺激反応選択性を有しており、その好む刺激は標的細胞と異なることを示した（Tamura et al., 2003, 2004）。

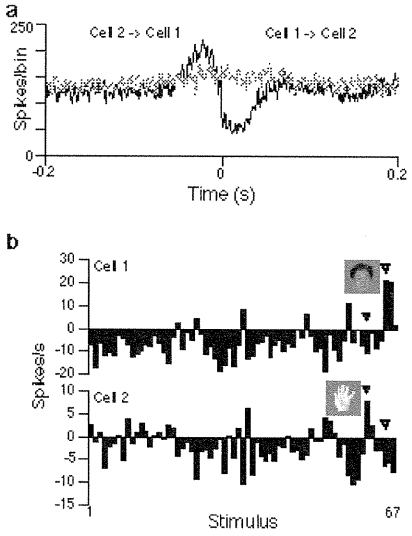


図１　a　抑制性結合を示唆する０タイムビンからずれた'トラフ'を示す相互相関ヒストグラム。TE 野から記録したごく近接した２つの細胞間の相互相関ヒストグラムに現れたこのトラフは Cell1 から Cell2 にむけて抑制性作用があることを示す。**b**　図 a に示す細胞の６７個の視覚刺激に対する反応ヒストグラム。白矢印で示す刺激（人の顔）は cell 1 に最大応答を引き起こす一方で cell 2 に対しては抑制反応を引き起こした。逆に、黒矢印で示す刺激（手のひら）は cell 2 に最大応答を、cell 1 に抑制反応を引き起こした。

TE 野において近傍同士の神経細胞の反応特性は似る傾向があり、機能的コラム構造を示す（Fujita et al., 1992）。しかしながら、本研究の結果は、近傍にあり同じ機能的コラムに属すると考えられる抑制性細胞は異なる刺激選択性を持つ傾向があり、標的細胞の視覚反応を刺激選択的に抑制することで、TE 野における刺激選択性の形成に寄与していることを示唆している。図２ｂの左に示すように、一次視覚野（V1）における抑制相互作用に関する従来の考え方は、異なった方位コラム間において抑制性相互作用がはたらくとする長距離抑制モデルである。一方、今回の結果は、TE 野においては異なった刺激に反応する近傍の細胞に抑制が由来する場合があることを示している。V1 野においてもごくそばに位置する細胞がまったく異なる方位に反応する場合があるという報告もあり（Maldonado & Gray, 1996）、今回の結果は、V1 野における抑制性相互作用についても再検討が必要であることを示している。

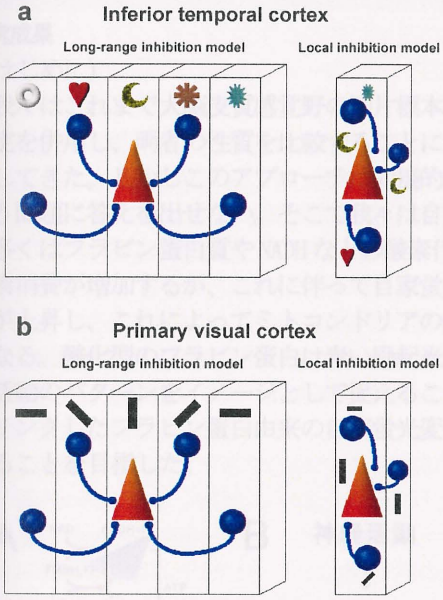


図２　TE 野（**a**）とＶ１野（**b**）の視覚情報処理に関する長距離抑制モデルと局所抑制モデル。三角のアイコンは錘体細胞（興奮性細胞）を、丸のアイコンは抑制性細胞を示す。長距離抑制モデルでは、異なった図形特徴または方位に反応する別のコラムに抑制入力の起源細胞があると想定する。Ｖ１野に関する多くの理論モデルはこの考えに従っている。局所抑制モデルでは、異なった図形特徴または方位に反応する細胞は、ごく近傍（同じ機能コラム内）に位置すると考える。このモデルでは、一つの機能コラムの中に存在する細胞の刺激選択性は完全には同一ではない。

共同研究

１．　合原一幸、渡辺正峰、細田謙二、川崎真弘（東京大学）
「下側頭葉皮質 TE 野が表現する情報構造の数量化解析」
TE 野細胞が様々な形や物体像に示す反応が、どのような刺激特徴により引き起こされているかの解析を、様々な数量化解析手法を用いて行っている。

２．　篠本滋（京都大学）
「下側頭葉皮質 TE 野ニューロンのスパイキングパターンの統計学的性質」
TE 野細胞の発火パターンの統計学的性質は２群に分類でき、それぞれが 2-3 層、5-6 層に偏って分布していた。この性質を利用することで、インビボ細胞外記録の実験中に、記録細胞の層位置を推定できる。また、TE 野の性質は、前頭葉皮質や内側運動野と異なっていた。

３．　Guy Elston (Melbourne University), Javier DeFelipe (Instituto Cajal)
「成体サルにおける皮質視覚野ニューロンの形態学的可塑性」
V1 野と TE 野の錘体細胞は顕著な形態学的差異を持つ。予備的実験から、視覚入力操作時における細胞形態の可塑的変化にも V1 野と TE 野では違いがある可能性を見出した。

A02-01

研究課題　**大脳聴覚野シナプス可塑性による回路調節**

研究代表者名　**澁木克栄**

所属　**新潟大学脳研究所システム脳生理学分野**

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨

シナプス可塑性による大脳皮質感覚野の回路調節機構を研究するため、ミトコンドリアのフラビン蛋白蛍光を用いた脳機能イメージング法を開発した。この方法を用いてテタヌス刺激による体性感覚野応答の増強や、弁別学習に伴う体性感覚野応答の抑圧を見いだした。またマウス脳活動の経頭蓋的イメージングに成功した。

研究成果

（はじめに）

我々はこれまで大脳皮質感覚野の切片標本を用いたＬＴＰ、ＬＴＤなどの解析と、二音弁別機能の行動学的な測定を併用し、両者の性質を比較することによって大脳皮質聴覚野におけるシナプス可塑性の機能を解明しようとしてきた。しかしこのアプローチは間接的であり、シナプス可塑性がどのように高次機能を成立させるのかという問題に答えを出せない。そこで我々は自家蛍光を用いた脳機能イメージングの開発に取り組んだ。自家蛍光の多くはフラビン蛋白質やNADHなどの酸素代謝に密接に関連した物質に由来する。神経細胞が刺激されたときに酸素消費が増加するが、これに伴って自家蛍光の変化が起きる。特に神経細胞が興奮すると細胞内カルシウム濃度が上昇し、これによってミトコンドリアの酸素代謝が亢進し、電子伝達系の一員であるフラビン蛋白が酸化型になる。酸化型のフラビン蛋白は青い励起光の下に緑色の自家蛍光を発するため、緑色自家蛍光を測定すれば神経活動のパターンをイメージとして捉えることが出来るはずである（図１）。本研究ではこの脳の酸素代謝と密接にリンクしたフラビン蛋白由来の自家蛍光変化を利用し、大脳皮質感覚野におけるシナプス可塑性の役割を解明することを目指した。

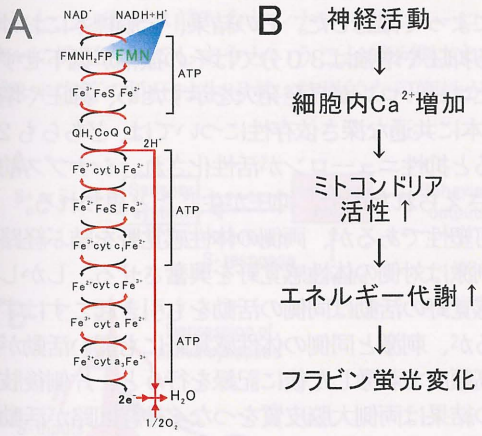


図１　フラビン蛋白蛍光イメージングの原理

A：フラビン蛋白は電子伝達系の一員であり、酸化型が緑色自家蛍光を発する。Ｂ：神経細胞の興奮は細胞内Ｃａの上昇を介してミトコンドリアの代謝活性を高め、フラビン蛋白蛍光強度を上昇させると期待される。

（フラビン蛋白蛍光の脳組織における特性）

本研究の目標を達成するため、まずラットを用いた動物実験で、フラビン蛋白蛍光の脳組織における光学的特性を解析した。ラットの大脳切片を作成し、これを局所的に電気刺激すると青色励起光下の緑色自家蛍光が大きく変化した。この励起光や蛍光の波長特性はフラビン蛋白由来の蛍光特性に相当する。また反応はテトロドトキシンや無カルシウム液、無グルコース液、フラビン蛋白質の特異的な阻害剤のＤＰＩなどでブロックされた。以上から図１のようなメカニズムでフラビン蛋白蛍光が生ずることが確認された。また無刺激時の緑色自家蛍光の性質を解析したところ、約５０％が脳切片灌流液中の酸素濃度やグルコース濃度に応じて変化し、この部分がミトコンドリア電子伝達系のフラビン蛋白由来であると推定された。さらにカルシウム指示薬を用いた脳機能イメージングと自家蛍光イメージングを比較すると、まずカルシウム濃度が上昇し、その同じ場所で遅れて自家蛍光変化が生ずることが判った。以上の結果から、少なくとも脳切片標本のレベルではフラビン蛋白蛍光を用いた神

経活動の光学的な記録が可能であることが判った。

次にウレタン麻酔下のラットの大脳皮質表面を露出し、脳切片標本と同様のフラビン蛋白蛍光変化が観察できるかどうかを検討した。タングステン電極を脳に直接刺入し、電気刺激を加えると刺激局所の蛍光強度が上昇した。また前肢や後肢に機械的刺激を与えると、それぞれに対応する体性感覚野の蛍光が上昇した。また音刺激に対する聴覚野の反応も同様に記録することが出来た。これらは０．２秒程度の時間分解能をもち、また振幅が電気刺激に対して２０％、自然刺激に対して２－３％と非常に大きいという特徴を示した。これは酸素消費に伴うヘモグロビンの脱酸素化を吸光度などで測定する従来の方法で得られる光学的な反応振幅と比べ１０－１００倍にも相当する。またこの方法で得た蛍光反応と電気的に記録した電場電位の分布を、それぞれ局所電気刺激と後肢の機械刺激によって反応を起こした場合に比較したが、どちらの場合も非常に良い相関を示した。蛍光反応に引き続き、動脈血流の増加が吸光像として観察された。蛍光変化はＤＰＩで阻害され、動脈血流の増加を反映する吸光像の変化は一酸化窒素合成酵素阻害剤で阻害された。またこのとき蛍光反応は殆ど変化しなかった。また動脈像の変化と蛍光反応を比較すると、後者がより速く、また局在して生ずるので、脳機能をイメージとして捉えるためにはより優れた信号であると思われる。以上から、少なくともラット大脳皮質においては、脳切片標本においても、または麻酔下の全脳標本においてもフラビン蛋白蛍光を用いた脳機能イメージングが可能であることが判った。

（フラビン蛋白蛍光イメージングのシナプス可塑性解析への応用）

通常ＬＴＰやＬＴＤなどのシナプス可塑性は、脳切片標本を用いて研究される。しかしながら脳切片標本では基本的な神経回路網が脳切片作成時に切断され、必ずしも生理的な現象が再現できるとは限らない。また通常の脳切片標本では自然刺激を使用することが不可能であるため、仮に何らかの結果が得られたとしても、それを直ちに生理学的に解釈することが容易でない。以上の問題を克服するためには麻酔下で全脳標本を用いてシナプス可塑性の解析を行うことが望ましい。そこで我々はフラビン蛋白蛍光イメージングを応用することを試みた。

まず後肢に対応する体性感覚野に直接刺激電極を刺入し、これを用いて高頻度刺激（１００ヘルツ、１秒）を加えた前後で、後肢振動刺激に対する体性感覚野応答がどのように変化するかを解析した。この結果は刺激を加える脳表面からの深さによって大きく結果が左右され、２・３層に対応する深さ０．５ミリを刺激した場合は抑圧が生じた。抑圧は３０分程持続した。一方５・６層や白質に対応する深さ１．５―２ミリを刺激した場合は増強が生じた。増強の持続時間も抑圧と同様に３０分程であった。両者の中間に対応する１．０ミリの深さを刺激した場合は弱い増強が生ずるか、殆ど変化が生じなかった。このような深さ依存性が果たして従来のスライス標本でも確認されるかどうかを脳切片標本における電場電位記録によって確認した。その結果、全脳標本におけるのと同様の深さ依存性が確認された。しかし、脳切片標本における抑圧や増強は３０分ではその振幅が低下せず、より安定であった。恐らく全脳標本では代謝が活発であり、またニューロンが自発発火を示すため、抑圧や増強が長続きしなかったものと思われる。一方、全脳標本と脳切片標本に共通な深さ依存性については、どちらも２・３層の反応を記録しているので、この層に直接電気刺激が加わると抑性ニューロンが活性化され、シナプス前要素が活動するにもかかわらずシナプス後ニューロンの発火が押さえられたので、抑圧が生じたと思われる。

以上の応答は体性感覚野内の局所神経回路におけるシナプス可塑性であるが、両側の体性感覚野を結ぶ経路においてもシナプス増強が見られた。即ち通常は片側後肢の機械刺激は対側の体性感覚野を興奮させる。しかしながら両側半球は交連線維によって結ばれているので片側の体性感覚野の活動は同側の活動をも引き起こすはずである。実際、通常は自然刺激と対側の体性感覚野が強く活動するが、刺激と同側の体性感覚野にも弱い活動が認められる。さらに同側の体性感覚野（深さ２ミリ）を電気的に高頻度で刺激した後に記録を行うと、片側後肢の刺激に対して両側の体性感覚野が反応を示すようになった。この結果は両側大脳皮質をつなぐ神経回路が活動依存性の可塑性を示すことを示唆する。即ち局所神経回路だけでなく、両側半球を結ぶ神経回路を含む可塑性をも解析対象とすることが出来たのである。以上の結果からフラビン蛋白蛍光イメージングは全脳レベルの可塑性の解析に実際に応用可能であることが判った。

（フラビン蛋白蛍光イメージングの高次脳機能解析への応用）

我々は大脳皮質体性感覚野におけるシナプス可塑性が、体性感覚情報の弁別学習にどのような役割を果たすか研究を進めた。まず体性感覚情報を用いた学習を定量的に研究するため、スキナー箱の床の振動数（20 又は 40 ヘルツ）を弁別する体性感覚弁別テストを開発した。まず飲水制限したラットを床振動が起きたときに給水器をなめると報酬（サッカリン水）が出るということを学習させた。次にスキナー箱で３－５日間訓練すると、最初は報酬(水)がもらえる振動数(20 又は 40 ヘルツ、動物ごとに異なる)の床振動（Ｓ＋）に対しても、報酬がもらえない対照振動数(40 又は 20 ヘルツ)の床振動（Ｓ－）に対しても等しく飲水行動を示したが、訓練期間中にＳ

－に対する飲水行動の頻度が徐々に減少し、最終的にＳ＋に対しては飲水行動で応ずるがＳ－は無視するようになった。即ちこの弁別学習の本質は、報酬がもらえない刺激（Ｓ－）に対する飲水行動を抑圧することであった。この弁別学習は３－５日かけてゆっくりと進行するプロセスである。また学習のパフォーマンスはＳ＋やＳ－にどのようなパラメータの刺激を用いるかということには直接影響されることはなかった。

このような弁別学習を習得済みの動物をウレタンで麻酔し、記録側と対側の後肢の振動刺激（40 又は 20 ヘルツ）に対する体性感覚野の応答をフラビン蛋白蛍光による脳機能イメージングで解析した。まず２０ヘルツの振動刺激をＳ＋として用いた４匹のラットではすべてＳ＋（２０ヘルツ）に対する反応が、Ｓ－（４０ヘルツ）に対する反応より広い範囲でかつ大きな変化幅で出現した。一方４０ヘルツの振動刺激をＳ＋として用いた４匹のラットではすべてＳ＋（４０ヘルツ）に対する反応が、Ｓ－（２０ヘルツ）に対する反応より大きかった（。即ち実験に用いた８匹のラット全部において報酬と連合させた刺激（Ｓ＋）に対する体性感覚野の反応が対照刺激（Ｓ－）に対する反応より大きいことが判った。この実験パラダイムの特長は、同一の動物においてＳ＋とＳ－を比較するので、ラットの応答に個体ごとのばらつきがかなり見られるという状況にもかかわらず、学習の結果をきれいに反映するデータを取得することが出来た。またナイーブなラットの体性感覚野の応答と、弁別学習を習得済みの動物の応答をフラビン蛋白蛍光法で比較したところ、Ｓ＋に対する応答はナイーブな動物のそれと殆ど変わらないが、Ｓ－に対する応答は反応の振幅においても広がりにおいても特異的に抑圧されていることが判った。以上の結果は、Ｓ＋とＳ－に対して応答の差が生ずる原因はＳ＋の増強によって生ずるのではなく、むしろＳ－の抑圧によって生ずると言うことを示している。またこの結果は、行動実験においてＳ－を省略すると、体性感覚野の応答に有意な差が生じないという対照実験の結果とも合致する。

以上のような実験結果はどのように解釈すべきであろうか。先ず図２Ａに示すように、脳内には扁桃体などの感覚情報と報酬とを連合させる学習中枢が存在し、感覚情報と報酬との連合を行っていると想定される。このような中枢は、体性感覚情報（即ちＳ＋とＳ－）を体性感覚野を介して受け取るわけだが、学習が進行するにつれ、何らかのフィードバックが体性感覚野に対してなされ、その結果Ｓ－に対する体性感覚野応答の特異的な抑圧が生ずる。このときＳ－によって生ずるはずの飲水行動も必然的に抑圧されてしまうはずである。即ちＳ－に対する体性感覚野の応答を抑圧するという可塑性は、Ｓ－に対する飲水行動を抑圧するという弁別学習において中心的なシナプス機構の一部であると思われる。

それではこのような抑圧がどのようなメカニズムで生ずるのであろうか。一つの可能性は上位の学習中枢からの入力が体性感覚野の抑制ニューロンを介して反応性の低下をもたらし、この時の入力（Ｓ－）が入ってもシナプス後ニューロンが活動しないようにしてしまうということである（図２Ｂ）。このような状況が何度も繰り返されると、シナプス前入力とシナプス後ニューロンの発火が分離してしまうので、Ｓ－入力に対応するシナプスが徐々に抑圧されてしまうということが予測される。一方Ｓ＋入力が入った特に上位学習中枢からの抑制が無ければＳ＋応答の抑圧は生ぜず、特異的な可塑性が可能となる。

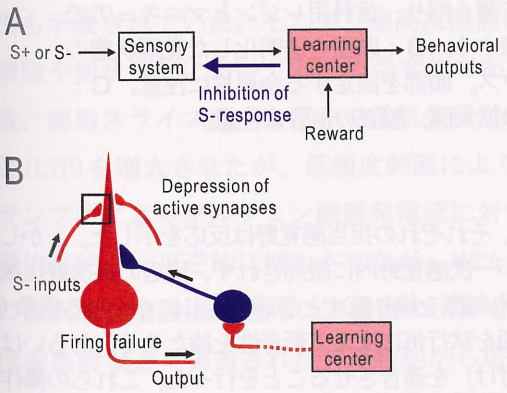


図２　体性感覚野可塑性の機能とメカニズム
Ａ：学習中枢は体性感覚野を介してＳ＋やＳ－の入力を受け取るが、弁別学習の結果、体性感覚野Ｓ－反応が特異的に抑圧される。その結果、Ｓ－に対する飲水行動が抑圧され、弁別学習が成立する。**Ｂ**：体性感覚野の抑制ニューロンは学習中枢からの入力を受け、これとＳ－入力が同期したときにＳ－反応の抑圧が生ずる。

上の実験モデル（図２Ｂ）について検証するため、我々は麻酔ラットにおいて実験を行った。現時点では学習中枢の部位が同定されていないため、これを直接刺激することが出来ない。そこで皮質浅層電気刺激（１００ヘルツ、１００発）を加えるという方法を取った。即ちこのような電気刺激の直後にはニューロンが不応期になり、抑制性のニューロンも活性化されるので、シナプス後ニューロンが活動しにくい状況になる。このときシナプス前線維を刺激してもシナプス後ニューロンが発火しないのでシナプス抑圧が生ずるはずである。この考えに基づいて、皮質浅層電気刺激（１００ヘルツ、１００発）の直後に４０ヘルツ又は２０ヘルツの後肢振動刺激を０．５秒間与えるという実験を行った。先ずナイーブな動物に４０ヘルツと２０ヘルツの刺激を与えるとほぼ同様な体性

感覚野応答が引き起こされることを確認した。これを確認した後に反応の中心部の皮質浅層にタングステン電極を刺入し、電気刺激を行った。この時電気刺激に引き続いて４０ヘルツの振動刺激を与え、８回このような組み合わせ刺激を繰り返した。このような繰り返しの後に、４０ヘルツに対する反応を記録すると、２０ヘルツに対する反応と比較して特異的な抑圧が生じていた。一方別のラットを用い、電気刺激と２０ヘルツの自然刺激を組み合わせると２０ヘルツの刺激に対する反応が振動数に特異的な形で抑圧された。この結果は、電気刺激によって誘発された抑制性シナプス活動や相対不応期の期間に入力を受けたシナプスでは、シナプス前入力によってシナプス後ニューロンが駆動されないのでシナプス伝達が抑圧されるという予想と合致する。

以上をまとめると、我々は大脳体性感覚野の振動刺激に対する応答をフラビン蛋白蛍光で可視化することに成功した。報酬と特定の振動数の振動刺激を連合させ、振動数の弁別学習をすませたラットの体性感覚野応答をこの方法を用いて分析したところ、報酬と連合していない振動数刺激に対する応答が選択的に抑制されることが判った。Ｓ－応答の特異的抑圧は、Ｓ－に対する飲水行動をも特異的に抑圧するので、弁別学習の中心的なシナプス機構であると思われる。さらに麻酔下のラットで体性感覚野の電気刺激と振動刺激を組み合わせると振動数選択的な抑制が生じたことから、振動数選択的なシナプスは体性感覚野の神経回路内に存在すると思われる。

（マウス大脳活動のフラビン蛋白蛍光によるイメージング）

これまでの解析は主にラットを用いて行ってきたが、様々な遺伝子工学的な処置が可能なマウスが脳科学の実験対象として重要になりつつある。そこで我々はフラビン蛋白蛍光法を遺伝子改変動物の解析に応用するため、マウス大脳活動の光学的な記録を行った。マウスの頭蓋骨は透明度が高く、麻酔したマウスで頭蓋骨の乾燥を防止すればフラビン蛋白蛍光イメージングが経頭蓋的に容易に行える。しかしこのままでは大脳皮質の長期的な観察や無麻酔状態での光学的記録が出来ない。そこで我々は頭蓋骨を内側の緻密な部分を残して薄く削り、削った部分を透明な歯科用レジンで置換し、さらにその上に透明なマニキュアを塗って補強・保護する術式を考案した（図３）。この方法は、そもそも開頭しないので脳に与える外科的侵襲や感染の危険が殆どないという点にある。また手術自体も簡単で、麻酔開始後約５０分で終了し、手術を受けたマウスは術後２－３時間でエサや水を摂取するなど活発に動き始める。光学的な記録法は脳の動きを嫌うという特性を持つ。しかし金属片を歯科用レジンで頭蓋骨に接着し、この金属片をネジで固定すれば、無麻酔でも脳の動きを簡単に阻止出来る。これらの特徴を生かし、覚醒マウス大脳活動を透明化した頭蓋を介して光学的に記録することに成功した。

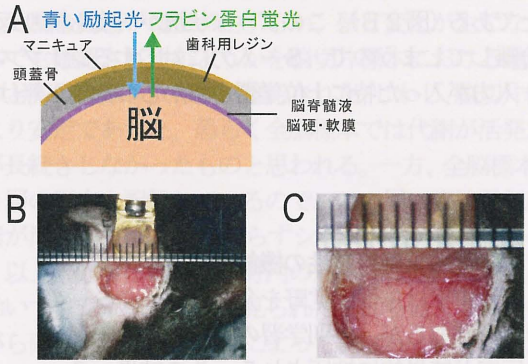


図３　覚醒マウス大脳皮質活動のフラビン蛋白蛍光イメージングによる解析
Ａ：マウス頭蓋骨透明化の模式図。マウスの頭蓋骨は薄いが、その内側の緻密な部分を残して薄く削り、歯科用レジンとマニキュアで補強する。Ｂ：頭蓋を透明化した覚醒状態のマウス。頭部を固定する金属片に注意。Ｃ：Ｂの拡大図。脳表の血管に注意。

覚醒マウスに対し、皮膚刺激・光刺激・音刺激などを行うと、それぞれの担当感覚野は反応を示した。しかし、麻酔下の応答と無麻酔での応答を比較すると、後者では刺激が一次感覚野内に限局されず、周辺の高次野に広がりやすいという特徴があった。また反応の振幅も小さく、何度も刺激を繰り返すと急速に応じにくくなる現象（慣れ）が著明であった。我々はこの慣れを防ぐため、刺激の種類を試行毎に変えて新奇性を持たせる、あるいは本来はニュートラルな感覚刺激と嫌な刺激（顔面への空気吹き付け）を連合させることを行った。これらの操作により連合野を含む大脳皮質の刺激に対する反応が著明に増強された。このうち連合による大脳活動変化は単純な学習の脳内過程を直接可視化したものと解釈できる。

フラビン蛋白蛍光法による大脳活動の解析はまだ始まったばかりだが、非常に強力かつ応用性に富む手法と思われる。特に覚醒状態で脳機能が測定できる点出来る点は、ラットより優れている。また通常の麻酔マウスでも経頭蓋的な脳機能イメージングは可能であり、予備的な実験において活動依存的な大脳皮質感覚野（体性感覚野・視覚野・聴覚野）の発達期可塑性の研究において大きな威力を示し始めている。これらの実験系を用いれば、これまで表現型が必ずしもはっきりしなかった遺伝子改変マウスでも大脳皮質感覚野をその場とする高次脳機能における異常が見つかることが期待される。

A02-02

生体内物質によるシナプス可塑性および記憶・学習行動の調節機構

松木　則夫
東京大学大学院薬学系研究科・薬品作用学教室

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨

記憶・学習障害改善薬開発研究の一環として生体内生理活性物質に着目し、肝細胞増殖因子(HGF)に優れた作用があることを見出した。また、海馬 CA3 野におけるヘテロシナプス可塑性、基底外側扁桃体の活動レベルによる歯状回シナプスのメタ可塑性の機構についても解析した。

研究成果

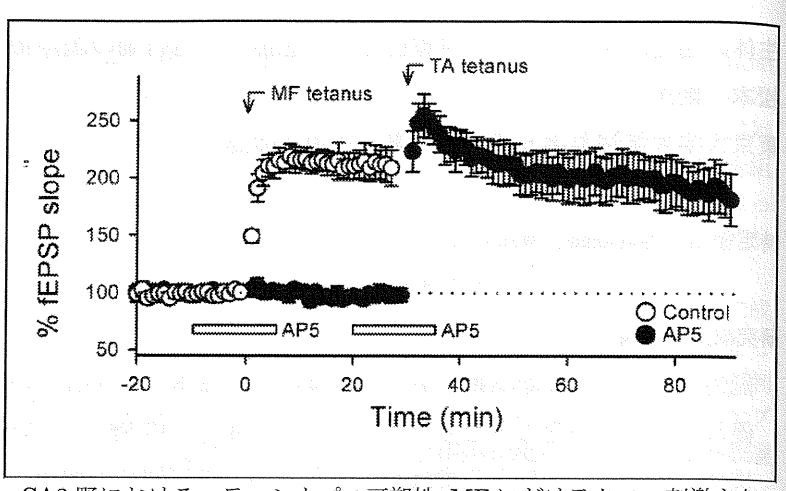
本研究は記憶・学習障害改善薬開発研究の一環として、生体内に存在する生理活性物質によるシナプス可塑性および記憶・学習の調節機構解明を目的とした。本医薬品は薬物代謝や排泄機構が低下している老齢者に対して長期に使用することになるため、通常はあまり問題にならない副作用も重大となる。実際に、老齢者に対する副作用のために多くの新規医薬品開発がストップしている。従って、副作用をできるだけ軽減するために生体内物質をスタートに考えた。その結果、肝細胞増殖因子(HGF)が理想的な作用をもつことを明らかにした。さらに、研究を進めていく過程で、個体全身動物を用いた試験と脳切片を用いた試験とのあまりにも大きなギャップを痛感し、医薬品開発の方策を探るためにも、両者をつなぐ研究の必要性を痛感した。そこで、細胞レベル・シナプスレベルよりも一段階巨視的なシナプス間、海馬と他の脳部位間の調節機構についても研究を行い、シナプス可塑性調節機構についていくつかの新知見を得ることができた。

肝細胞増殖因子(HGF)は肝臓再生に重要な役割を果たす成長因子であるが、末梢作用だけでなく中枢作用も示唆されていた。そこで、脳高次機能に HGF が関与している可能性を検討した。まず、海馬神経細胞や樹状突起において HGF の受容体である c-Met が発現していることを免疫組織化学的に確認した後、海馬スライス標本を用いて電気生理学的な検討を行った。テタヌス時に HGF を適用すると長期増強(LTP)を増大させたが、低頻度刺激により誘発される長期抑圧(LTD)には影響しなかった。パッチクランプ法によりグルタミン酸誘発電流に対する作用を検討した。その結果、HGF は NMDA 誘発電流を用量依存的かつ可逆的に増大させたが、AMPA 誘発電流には影響しなかった。NMDA 型受容体を介する反応の選択的な増強は細胞内 Ca2+濃度の上昇を指標にしても確認できた。NMDA 型受容体を介する反応増強は虚血時などで傷害された神経細胞から遊離されるグルタミン酸による神経毒性を増悪させる可能性がある。しかし、細胞への傷害作用を指標にした場合には、HGF は NMDA 誘発毒性に全く影響しなかった。

学習課題遂行能力に対する作用を検討した。HGF を試行前に脳室内投与することにより、水迷路学習における潜時が著明に短縮した。HGF を投与した動物は Y 字型岐路交替学習においても優れた能力を示した。このような空間学習能力の向上は正常動物でも観察され、今まで同種の作用が報告されている他のさまざまな神経栄養因子と比べて、非常に強い作用であった。

このように HGF は現時点では理想的な脳高次機能に対する作用をもつことが明らかになり、今後は

同様の作用を持つ低分子化合物を探索することにより、記憶・学習障害改善薬開発の方向性が示せたと考える。



CA3 野におけるヘテロシナプス可塑性。MF にだけテタヌス刺激を与えると TA 入力の長期増強が起こり、それは NMDA 型受容体の MF 局所適用で抑制された。その状態でも TA シナプスに直接テタヌス刺激を与えると TA 入力の長期増強が観察された。

海馬におけるシナプス可塑性は記憶・学習の素過程として多くの研究者の注目を集め、シナプスレベルや分子レベルでの知見が飛躍的に増えてきている。しかし、海馬体全体としての機能については不明な点が多い。また、嗅内野皮質→歯状回→CA3 野→CA1 野→嗅内野皮質と巡る古典点な３シナプス経路が知られているが、これらの３つのシナプスが単に直列に繋がっているのであれば、３つある必然性は小さい。海馬シナプスにおける可塑性解析は大部分がシャッファー側枝－CA1 野シナプスを用いて行われているが、個体動物の記憶・学習とは必ずしも相関しない。また、海馬は記憶の獲得だけではなく、記憶の固定にも重要な役割を果たしている。つまり、情報を処理し、２～３週間に渡り(ラットの場合)その情報が新皮質に固定されるまで海馬は何らかの形で働き続けなければならない。こうした観点から、CA3 野の役割に注目した。CA3 野では、三種類の投射(TA:嗅内野皮質からの直接、MF:歯状回顆粒細胞を介するもの、AC:反回性のもの)を受け持続的な興奮が維持されているが、これらのシナプス間の相互作用に関しても不明な点が多い。

MF 内には大量の亜鉛イオンが含まれるがその生理的な役割はよく分かっていなかった。我々は、東京大学大学院薬学系研究科の長野哲雄教授らが開発した、感度と選択性の高い亜鉛蛍光プローブ(ZnAF2)を用いて、神経活動に伴い MF 終末から亜鉛イオンが遊離して拡散していく経過を観察することができた。さらに、遊離した亜鉛イオンは AC シナプスで NMDA 型受容体を抑制し、反回性入力の可塑性を低下させることを明らかにした。

次に、CA3 野錐体細胞が受ける、三種類の入力間の時間経過の速い相互作用について検討した。MF 入力が TA 入力に僅かに先行すると TA 入力を抑制したが、MF 入力にだけテタヌス刺激を与えると TA 入力をヘテロシナプス的に長期増強させることを見出した。このヘテロシナプス可塑性には MF シナプスにある NMDA 型受容体活性化が必要であることも明らかにした。従来、MF シナプス自身の LTP には NMDA 型受容体活性化は不要とされてきたが、本研究により MF シナプスにおける NMDA 型受容体の必要性が初めて示された。さらに、このヘテロシナプス可塑性時には CA3 野錐体細胞の活動電位発生閾値が低下して興奮性が高まること、および AC 反回入力の持続的な興奮が必須であり、その過程で NMDA 型受容体が重要な役割を果たしていることを明らかにした。以上のことをまとめると、嗅内野皮質の活動が低頻度の場合には TA と MF 間の相互作用は低いが、興奮性が高くなると(10Hz～)TA 入力はむしろ抑制されるがその後 MF の活動が低下すると TA 入力が持続的に増大し、さらに興奮性が上がると遊離した亜鉛イオンの拡散により、TA 入力の持続的増大が遮断されると考えられる。TA や AC シナプスの数が MF シナプスに比べて圧倒的に多い事実を考えると、MF シナプスは主要回路というよりも TA 入力の弁別に働いている可能性がある。

海馬体外からの入力による海馬シナプス伝達の調節機構についても解析した。情動に深く関わる扁桃体と海馬の相互作用については当教室において初めて報告されている。扁桃体の基底外側部と歯状回シナプスの関係を厳密に検討したところ、扁桃体に低頻度刺激を与えると貫通線維－歯状回の BCM 曲線が下方にシフトし興奮性が抑制(LTD の増大と LTP の低下)され、逆に高頻度刺激により BCM 曲線が上方にシフトし興奮性が増大(LTP の増大と LTD の低下)されることを見出した。扁桃体による両方向性の調節が示されたことにより、扁桃体の興奮性が海馬シナプス伝達調節に深く関わっている可能性が示された。さらに、現時点での活動レベルだけではなく、それまでの活動歴も関わってくることからメタ可塑性の性質もあることが明らかになった。

その他の研究成果としては、シナプス可塑性におけるドコサヘキサエン酸および過酸化水素の役割を明らかにしたこと、および容量性カルシウム流入の重要性を示唆したことが挙げられる。

共同研究

共同研究の相手

長野哲雄、菊地和也　(東京大学大学院薬学系研究科・薬品代謝化学教室)

共同研究内容と成果

苔状繊維のシナプス伝達における亜鉛イオンの役割について解析し、神経活動に伴い実際に亜鉛イオンがシナプス終末から遊離されること、遊離された亜鉛イオンがゆっくりと拡散し、隣接する反回性入力の NMDA 型受容体を抑制することを見出した。

A02-03

大脳皮質の構成要素・機能分子の局在についての免疫細胞化学的・形態学的定量解析

小坂俊夫

九州大学大学院医学研究院　神経形態学分野

特定領域「神経回路」参加年度　平成 12 年度～平成 16 年度

研究成果の要旨

海馬では構成ニューロン群の定量解析を進め、各領野・層の長軸方向でのニューロン構成の差異を明らかにした。また、mossy cell の電気的性質が長軸方向で異なることを明確にした。嗅球ではギャップ結合・シナプス等のニューロン相互関係の形態学的解析を進め、特に、糸球体特異的な同期活動に対応するギャップ結合をより明確に示した。

研究成果

1）マウス海馬GABAニューロン群サブポピュレーションの定量解析

GABA ニューロン群サブポピュレーションであるカルシウム結合蛋白 parvalbumin (PV)、calbindin D28k (CB)、calretinin (CR)　含有ニューロン群の定量解析 (Fig. 1)、更に、ペプチド含有 GABA ニューロン群、NO 合成酵素含有ニューロンの領域、層別の分布密度についてステレオロジーによる定量解析を完了した。これらの解析により、マウス海馬において GABA ニューロン群の構成がほぼ明らかになり、海馬長軸方向でのニューロン構成の差異がより明確になった。

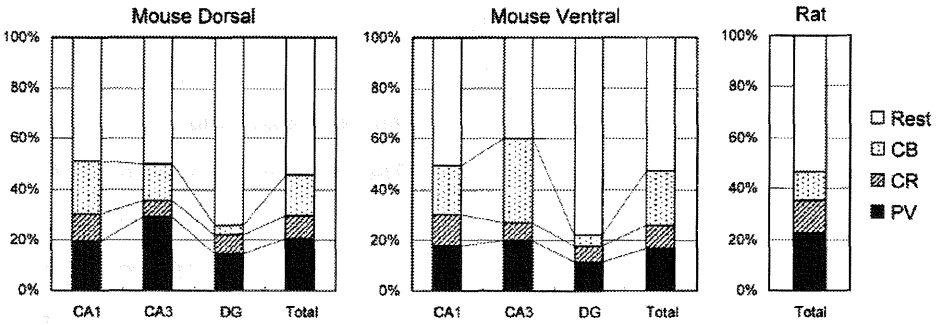


Fig. 1. The proportions of calcium binding protein-containing GABAergic neurons in the total GABAergic neurons in the mouse and rat hippocampi. DG, dentate gyrus; CB, calbindin D28K; CR, calretinin; PV, parvalbumin; Rest, the rest of the g-aminobutyric acid GABAergic neurons.

2）マウス海馬歯状回mossy cellの電気生理的解析

スライスパッチクランプ法で、マウス海馬歯状回 mossy cell の電気生理的性質を検討した。マウス mossy cell は我々がこれまでカルシウム結合蛋白 calretinin の含有、thorny excresences の構造の面で背腹側の長軸方向で差異があることを示してきたが、興味深いことに電気生理的性質においても大きな差異があることが明らかとなった (Fig. 2)。

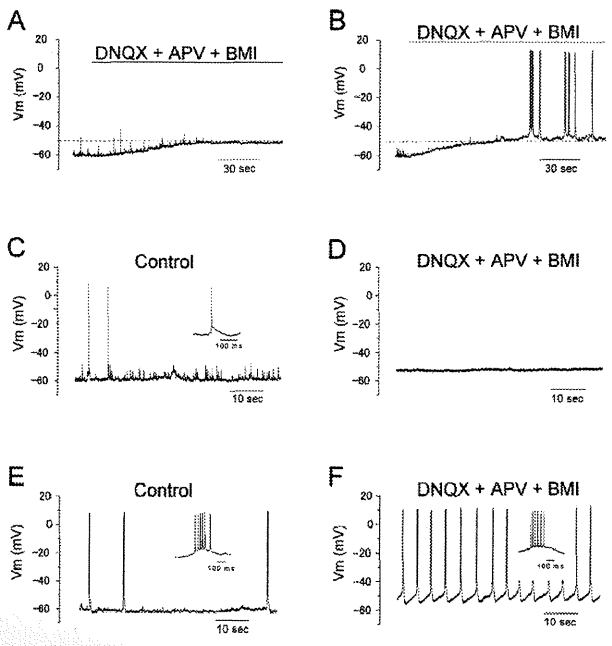
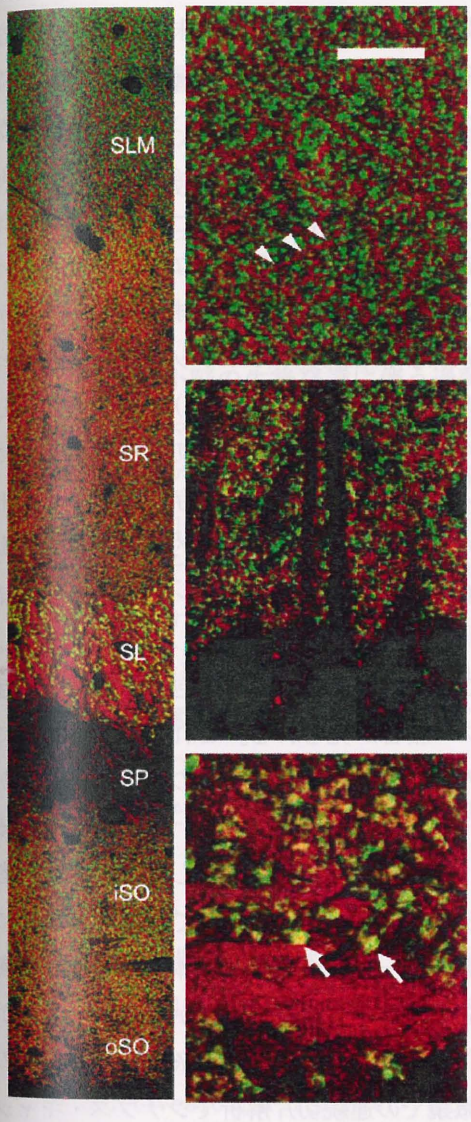


Fig. 2. (A and B) Gradual depolarization induced by the concomitant application of glutamatergic and GABAergic antagonists (10 mM DNQX, 100 mM D-APV and 10 mM BMI). (A) The concomitant application of synaptic antagonists to a dorsal mossy cell induced no intrinsic firing activity. (B) The concomitant application of antagonists to a ventral mossy cell induced intrinsic burst firings. (C–F) Dorsoventral differences in the intrinsic firing activity of mossy cells. (C) In the absence of synaptic antagonists, the dorsal cell showed single spikes. The inset shows a voltage trace with a faster time base. (D) After the concomitant application of DNQX, DAPV and BMI, the spike activity of the dorsal cell was abolished; C and D are from the same cell. (E) In the absence of synaptic antagonists, a ventral mossy cell showed burst firings at a low frequency. The inset shows a voltage trace with a faster time base. (F) After the concomitant application of DNQX, D-APV and BMI, the ventral cell showed rhythmic bursting. The inset shows a voltage trace with a faster time base. E and F are from the same cell.

背側海馬のmossy cellは自発的なEPSPの頻度、最大値が腹側海馬のmossy cellより大きかった。更に、シナプス結合を遮断すると背側海馬のmossy cellはスパイク発火がなくなったが、腹側海馬のmossy cellはリズム的バースト発火を示した。この腹側海馬のmossy cellのリズム的発火にI_{NaP}が大きな役割を果たしていることを明らかにした。

3）カルシウム結合蛋白Neuronal calcium sensor-1（NCS-1）の海馬・小脳における分布



NCS-1はEF handカルシウム結合蛋白に属し、カルシウムの結合により大きなコンフォメーションの変化を示すことから、カルシウムセンサーとしての機能、特に、シナプス伝達、可塑性との関連が推定されている。これまでNCS-1はシナプス後部での分布と機能が推定されていた。しかし、我々が免疫細胞化学的にその分布の詳細を海馬と小脳において検討したところ、海馬では確かにシナプス後部に相当する樹状突起はNCS-1陽性であったが、更に、mossy fibers及びそのterminalsがNCS-1陽性であり、シナプス後部のみでなく前部でもNCS-1が存在している場合があることが明らかとなった(Fig.3)。また、小脳でも介在ニューロンの細胞体、basket cellの軸策終末pinceau、顆粒細胞の細胞体・樹状突起が一様にNCS-1陽性であり、やはりシナプス前部・後部の両者にNCS-1が分布していた。Purkinje細胞においては細胞体、樹状突起が陽性であったが、その近傍に陰性のPurkinje細胞も存在していた。しかも、陽性のものと陰性との分布は小脳皮質全体で縦じまのバンド状になっていた。このNCS-1陽性Purkinje細胞の縦じまは、従来zebrinIIで示されていたコンパートメントにほぼ一致することを明らかにした。

Fig. 3. Montage images of pseudo-color CLSM images showing NCS-1 (red) and synaptophysin (green) immunoreactivities in the CA3 regions of the hippocampus. In the SLM (top), NCS-1-IR elements are cylindrical, and make a meshwork, which are considered as dendrites. NCS-1-IR presumed dendrites and synaptophysin-IR boutons show characteristic complementary distribution patterns (arrowheads). In the SR (middle), colocalization of NCS-1 and synaptophysin immunoreactivities is occasionally encountered. In the SL (bottom), large-sized synaptophysin-IR apparent mossy fiber terminals are intensely NCS-1-IR (arrows).

4）海馬、大脳皮質におけるGABAニューロン間ギャップ結合の解析

ニューロン間の重要な相互作用の場であり、最近生理学的解析が進んでいる電気的カップリングに対応する構造、ギャップ結合について研究を進めた。我々は以前、ラット海馬PV含有GABAニューロン間にギャップ結合が存在する事を発見したが、それを発展させ、ギャップ結合によってPV含有GABAニューロン樹状突起が相互にコンタクト・結合したネットワークを形成していることを提唱した。　更に、成体ラットの大脳新皮質で上述した海馬と同様のPV含有GABAニューロン間のギャップ結合による樹状突起ネットワークを見出した。この所見は最近の生理学的解析で示されている主に同一タイプのニューロン間での電気的カップリングに対応する構造である。また、PV陽性と陰性の樹状突起間のギャップ結合も発見し、異なった性質を示す介在ニューロン間でのカップリングの可能性も示唆した。

5）嗅球におけるシナプス・ギャップ結合によるニューロン相互関係の形態学的解析

海馬、大脳皮質ではギャップ結合は主に同一タイプのニューロン間に見られる。しかし、ギャップ結合

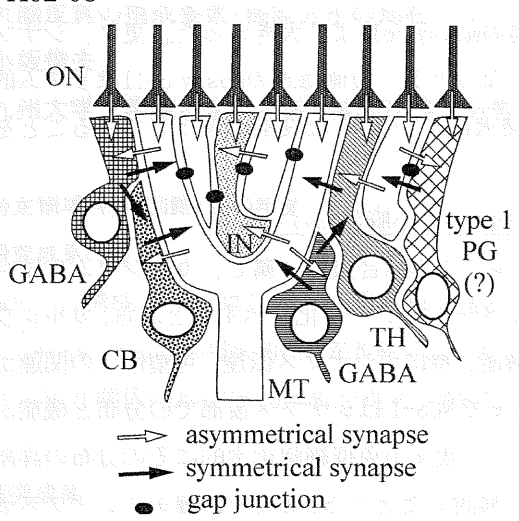


Fig. 4. Summary of neuronal connections via chemical synapses and gap junctions in the glomerulus. Gap junctions are seen between MT cell dendrites, between MT cell dendrites and type 1 PG cell dendrites with as yet uncharacterized properties, and between MT cell dendrites and dendrites of some interneurons (IN) different from PG cells .

は決して同種のニューロン間だけに限られるわけではない。嗅球におけるギャップ結合の解析を、電子顕微鏡レベルで行った。その結果、従来考えられていたこととは異なり，ギャップ結合は多様なニューロン間で形成されていることを示した(Fig. 4)。特に，糸球体では、我々が発見し、提唱したtype1，2の傍糸球体細胞のうち、嗅上皮感覚ニューロン軸策終末からシナプスを受けているtype1傍糸球体細胞が僧帽細胞・房飾細胞の一次樹状突起 tuft との間でギャップ結合を作っていることを明らかにした。しかし、type1傍糸球体細胞の中心グループであるGABA陽性およびtyrosine hydroxylase(TH)陽性ドーパミン性傍糸球体細胞も、ギャップ結合を形成している主要なニューロンではなく、まだ同定されていない別のtype1傍糸球体細胞の存在が示唆された。更に、傍糸球体細胞以外にギャップ結合を投射ニューロンと形成する新たな介在ニューロン(IN)の存在も示唆した。一方、詳細な電子顕微鏡レベルでの連続切片－再構築法により、投射ニューロン間にもギャップ結合が存在することを形態学的に始めて証明した。これらの所見に基づき，最近注目され始めた糸球体特異的な同期的ニューロン活動の機構として、投射ニューロン間のギャップ結合による直接の相互作用及び、介在ニューロンとのギャップ結合または混合シナプス(ギャップ結合＋化学シナプス)による間接的相互作用の双方を可能性として提唱した。

嗅球糸球体では嗅上皮感覚ニューロン軸策終末、主ニューロンである僧帽細胞・房飾細胞の一次樹状突起tuft 及び介在ニューロン傍糸球体細胞の樹状突起間に複雑なシナプス結合が見られる。これまでごく単純に主ニューロンのtuftの遠位部に興奮性の嗅ニューロン軸策終末が入力し、近位部に抑制性の傍糸球体細胞からの入力があるというdistal-proximal synaptic segregationが一般的に考えられていた。しかし、僧帽細胞を標識し、レーザー顕微鏡と電子顕微鏡とで標識された僧帽細胞の樹状突起tuftを解析したところ、両者の入力は決して遠位部と近位部に分かれているわけではなく、ある程度クラスターを作って、モザイク状にtuft 上に分布していることを明らかにした。主ニューロンでは細胞体、一次樹状突起糸球体侵入部、二次樹状突起、軸策初節部等いくつかのスパイク発生部位があり、どの部位でスパイクが発生するかを様々な入力が修飾しているとされている。従って、糸球体内でのシナプスの分布は、特に、一次樹状突起糸球体侵入部でのスパイク発生に大きな影響を与えうると考えられる。更に、電子顕微鏡での連続切片解析でシナプス・ギャップ結合による糸球体内ニューロン局所回路が明らかになりつつある(Fig. 4)。

共同研究

Dr. Andreas Jeromin: Samuel Lunenfeld Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada.
カルシウム結合蛋白Neuronal calcium sensor-1 NCS-1 の海馬、小脳における分布

石塚　智　助教授：九州工業大学　生命体工学研究科
マウス海馬歯状回mossy cellの生理学的解析

A02-04

表題（研究課題）　発達脳におけるシナプス除去と機能成熟に関与するシグナル伝達系

研究代表者名　狩野 方伸

所属　金沢大学　大学院医学系研究科　シナプス発達・機能学研究分野

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨

マウス小脳の登上線維―プルキンエ細胞シナプスをモデルとして、生後発達に伴う過剰なシナプスの除去と機能成熟との関連を明らかにした。この過程に、I 型インシュリン様増殖因子、グルタミン酸受容体δ2 サブユニット、P/Q 型カルシウムチャネルが関与することを明らかにした。

研究成果

１．マウス小脳の生後発達に伴う過剰なシナプスの除去と機能成熟

私たちはマウスの小脳をモデルとして、生後発達の過程で一般的にみられる過剰なシナプス結合の除去とシナプスの機能成熟の分子機構を研究してきた。マウスをはじめ成熟動物では小脳プルキンエ細胞はただ 1 本の登上線維に支配されるが、幼若動物では複数の登上線維による多重支配を受けることが知られている。マウスでは生後 3 週の間に過剰な登上線維が除去され、生後 20 日で 1 対 1 の関係がほぼ完成する。私たちは、生後２日目以降、様々な日齢のマウスから小脳スライスを作製し、プルキンエ細胞から whole-cell recording を行った。登上線維刺激の強度をゼロから徐々に上昇させ、誘発される興奮性シナプス後電流(EPSC)のステップの数により、記録しているプルキンエ細胞を支配する登上線維の本数を同定した。また、登上線維シナプスの機能的変化を電気生理学的及び薬理学的に解析した。その結果、以下の５点が明らかになった。

(1) 生後２－３日のプルキンエ細胞は、ほぼ同じ振幅の EPSC を発生する登上線維によって多重支配されているが、生後７日になると、プルキンエ細胞は、大きな振幅の EPSC を発生する１本の強力な登上線維（CF-multi-S）と、相対的に小さな振幅の EPSC を発生する数本の弱い登上線維（CF-multi-W）により多重支配されるようになる。

(2) CF-multi-S 刺激では、単一のシナプス間隙に複数のシナプス小胞から伝達物質が放出される(multivesicular release)のに対し、CF-multi-W 刺激では、multivesicular release の確率がきわめて低く、単一のシナプス間隙に単一のシナプス小胞しか放出されない（one-site one-vesicle release）確率が高い。

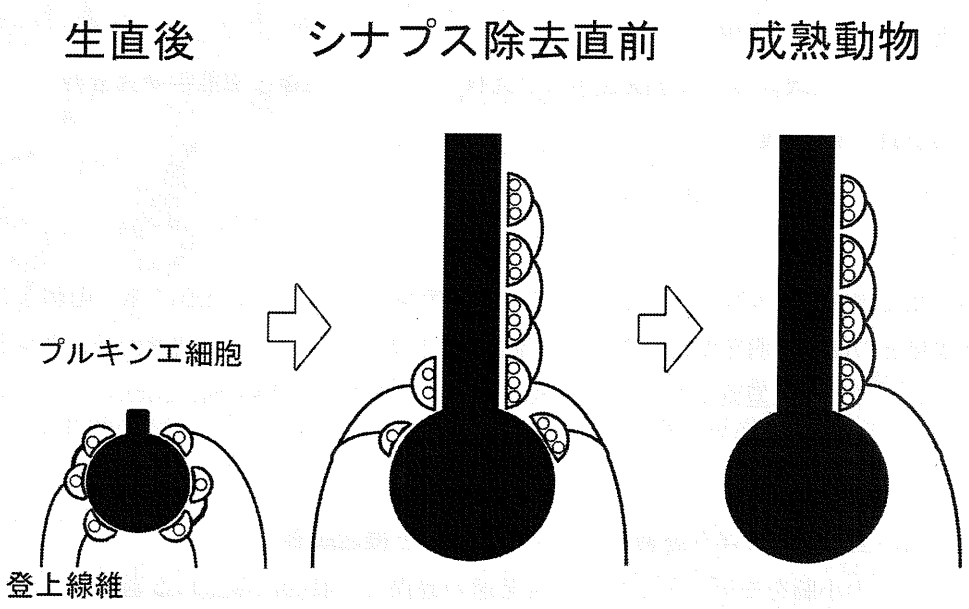
(3) 生後２－３日の登上線維では、CF-multi-W と同様、one-site one-vesicle release の確率が高い。

(4) 成熟動物の登上線維では、CF-multi-S と同様に multivesicular release がみられる。

以上の結果から、シナプス形成直後の登上線維は機能的に未熟で、伝達物質の放出様式は one-site one-vesicle release であるが、発達に伴い将来残存する登上線維では multivesicular release に移行し、そうでないシナプスは未熟なまま残されていることが示唆された。さらに、私たちは、以下の点を明らかにした。

(5) 多重支配を受けるプルキンエ細胞において、CF-multi-S と CF-multi-W の強さの相対的な差があるレベルを超えると(具体的には、CF-multi-W 刺激による EPSC の振幅が CF-multi-S の 20%以下)と、2 日以内に CF-multi-W は除去される、ことを間接的に示した。

以上の結果を、以下の模式図に示す。



<u>生直後：</u>プルキンエ細胞は複数の機能的に未成熟な登上線維により多重支配されている。
<u>シナプス除去直前：</u>プルキンエ細胞は１本の機能的に成熟した強い登上線維（multivesicular releaseをおこす）とそれ以外の機能的に未成熟な弱い登上線維（one-site one-vesicle releaseに近い）により多重支配されている。強い登上線維と弱い登上線維の相対的な差が５倍以上になると２日以内に弱い登上線維が除去される。
<u>成熟動物：</u>プルキンエ細胞は１本の機能的に成熟した登上線維により単一支配される。

２．Ｉ型インシュリン様増殖因子の登上線維シナプス除去への関与

ethylene-vinylacetate copolymer（Elvax）法を用いて、発達期マウス小脳にＩ型インシュリン様増殖因子(IGF-1)および機能阻害抗体を限局的に持続投与した。薬物と Elvax を溶媒によって混合し、200-400μm 程度のフィルム状に引き伸し、500×500μm 程度の微小ブロックを作製した。これを、生後 10 日前後のマウスの小脳表面に植え込んだ後に、マウスを生後３０日程度まで成長させ、小脳スライスを作製した。プルキンエ細胞から whole-cell patch-clamp を行ない、登上線維を電気刺激して、プルキンエ細胞が何本の登上線維によって支配されているか、またそのシナプス伝達の性質を調べた。

IGF-1 を生後 12 日以降のマウス小脳に局所投与しても効果がなかったが、生後８日から投与すると複数の登上線維により多重支配されるプルキンエ細胞が有意に増加した。反対に IGF-1 とその受容体の機能阻害抗体を生後８日から投与すると、多重支配を受けるプルキンエ細胞の比率が有意に減少し、登上線維シナプス応答が減弱した。これから、生後８日から 12 日の小脳内に存在する内因性の IGF-1 が登上線維シナプスの栄養因子として機能し、その欠乏がシナプス除去につながることを明らかにした。また、小脳プルキンエ細胞の単離培養系において、IGF-1 がプルキンエ細胞の生存と細胞体および樹状突起の伸展を著明に促進することを明らかにした。樹状突起の伸展効果は、顆粒細胞の数には相関しなかったが、アストログリアの数およびアストログリアの突起とプルキンエ細胞樹状突起の接触点の数に正の相関が認められた。これらから、IGF-I の効果はプルキンエ細胞に対する直接作用だけでなく、アストログリアを介する間接効果も含むことが示唆された。

３．グルタミン酸受容体δ２サブユニットの登上線維シナプス除去への関与

グルタミン酸受容体δ2 サブユニット（GluRδ2）は、成熟動物において小脳プルキンエ細胞に特異的

に発現し、平行線維がシナプスを形成するプルキンエ細胞のスパインに局在している。GluRδ2 ノックアウトマウス(*GluRδ2-/-*)では、平行線維シナプスの形成不全と、過剰登上線維除去に異常が見られる。私たちは登上線維シナプス除去における GluRδ2 の役割を明らかにするために、*GluRδ2-/-*の登上線維の投射を詳しく解析した。成熟動物において大多数のプルキンエ細胞が登上線維の多重支配を受けており、また、野生型では観察されないような立ち上がり時間が遅く時間経過の長い EPSC が多数観察された。膜電流固定下で膜電位を記録し、登上線維刺激によってプルキンエ細胞に興奮性シナプス後電位 (EPSP) を発生させ、電位依存性カルシウムチャンネル開口による細胞内カルシウム上昇を指標に、登上線維シナプスの部位を推定した。その結果、早い立ち上がり時間を示す EPSP を誘発すると細胞体のごく近傍からカルシウム上昇が見られたのに対し、立ち上がり時間の遅い EPSP を誘発すると、プルキンエ細胞の遠位樹状突起に限局してカルシウム上昇が見られた。この結果は、*GluRδ2-/-*には、野生型と同様にプルキンエ細胞近位樹状突起にシナプスを形成する登上線維に加えて、本来ならば平行線維が投射するはずの遠位樹状突起にシナプスを形成する過剰な登上線維が存在する示す。これらの結果から、GluRδ2 の欠損により、平行線維シナプス形成が阻害され、本来ならば平行線維がシナプスを形成する部分に登上線維が侵入してくることが明らかになった。GluRδ2 の主要な機能は平行線維シナプスの形成・安定化であり、登上線維の異常は平行線維シナプス密度の減少による 2 次的なものと考えられる。

4．P/Q 型カルシウムチャネルの登上線維シナプス除去への関与

高閾値型の P/Q 型カルシウムチャネルを形成する *α 1A* サブユニットの欠損マウス（*α 1A-/-*）では、プルキンエ細胞樹状突起における登上線維支配領域の退縮と平行線維支配領域の拡大がみられた。正常では、登上線維は近位樹状突起を、平行線維遠位樹状突起を支配する。*α 1A-/-*の電気生理学的及び形態学的解析の結果、登上線維はより近位の樹状突起や細胞体にシナプスを形成しており、平行線維は遠位樹状突起のみならず近位樹状突起や細胞体にもシナプスを形成していた。また、多くのプルキンエ細胞が複数の登上線維に多重支配されていた。対照的に、個々の登上線維の発生するシナプス電流はほぼ正常であった。これらの結果は、発達期のプルキンエ細胞において、P/Q 型カルシウムチャネルは登上線維シナプスの強化因子であり、また過剰な登上線維シナプス除去に必要であることを示す。

共同研究

(1)　共同研究の相手

渡辺雅彦、深谷昌弘、宮崎太輔（北海道大学）

(2)　共同研究の内容と成果

小脳シナプスの生後発達に関して形態学的解析を分担していただいた。私たちの生理学的所見と形態学的所見が互いに補強しあい、シナプス除去と機能成熟に関与するシグナル伝達系の理解が格段に進展した。

特許など

特に該当せず。

A02-05

脊髄における神経可塑性モデル、アロディニアの発症機構

伊藤　誠二

関西医科大学医化学教室

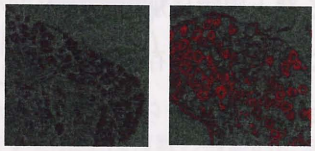
特定領域「神経回路」参加年度　平成 12 年度～平成 16 年度

研究成果の要旨

様々なノックアウトマウスで疼痛反応を解析した結果、タンパクのリン酸化と遺伝子発現誘導がアロディニアに伴う神経可塑性に関与するが、グルタミン酸遊離↑⇒NMDA 受容体の活性化⇒NOS の活性化が共通機構であり、脊髄後角神経回路網の NOS 活性の機能的可視化に成功した。

研究成果　＜本研究で明らかになったアロディニアの発症機構とこれからの展望＞

図２　DRG での PACAP の発現上昇



無処置　　神経損傷

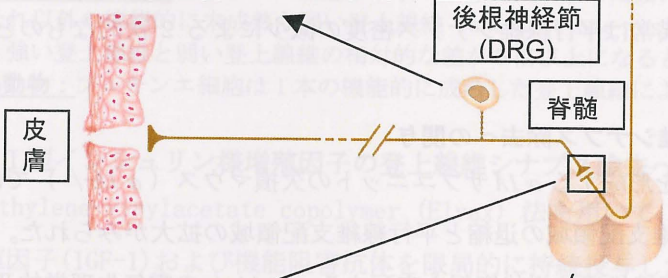
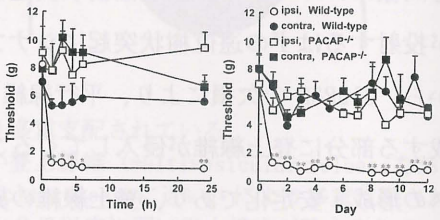
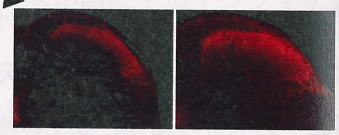


図１　PACAP$^{-/-}$マウスの疼痛反応の消失



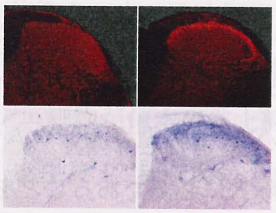
炎症性疼痛　　神経因性疼痛

図６　Rho-K による MARKS のリン酸化



無処置　　神経損傷

図３　脊髄後角の組織染色

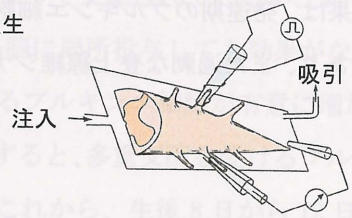


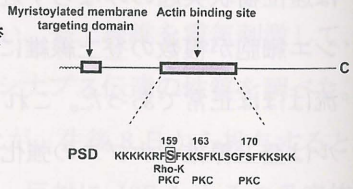
PACAP

NO 産生

無処置　　神経損傷

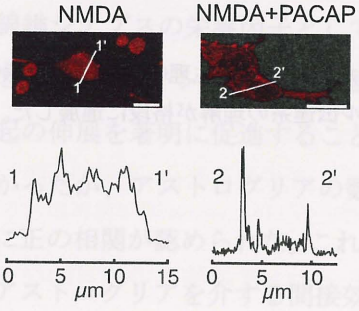
図５
摘出脊髄標本と脊髄スライスでのPGE_2によるNO産生の上昇

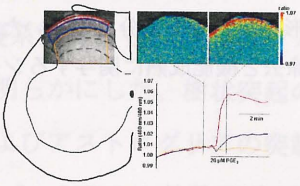




MARKS の構造とリン酸化部位

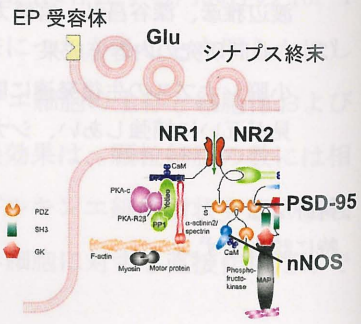
図４　神経型 NOS (nNOS) のトランスロケーション





蛍光 NO 指示薬 DAF-FM を使用

図７　PSD の NMDA 受容体複合体



痛みは生体にとって警告反応となるだけでなく、炎症や手術後の痛み、癌末期の疼痛、神経損傷による神経因性疼痛と種々の原因で起こり、自発痛、熱などの侵害性刺激に対する感受性が亢進する痛覚過敏反応、本来痛みを誘発しない触覚刺激による痛み（アロディニア）とさまざまな病態をとる。痛覚を引き起こす侵害性刺激は無髄の一次求心性 C 線維を介して脊髄後角に伝えられるのに対し、触覚は有髄の Aβ線維を介して伝達される。このように触覚と痛覚は明確に区別されているにもかかわらず、神経損傷による神経因性疼痛では時にアロディニアによる耐え難い激痛を伴う。本研究ではなぜ触覚刺激が痛覚として誤認されるのかという重要かつ基本的な問題を解明するために、痛覚伝達の最初の中継地である脊髄後角での神経回路網の機能的あるいは器質的変化に焦点をあてて *in vivo* の疼痛行動から、脊髄組織、培養細胞、タンパクのリン酸化や遺伝子発現変化まで、すなわち個体レベルから分子レベルまで網羅的かつ体系的に検討した。本研究で解明されたアロディニアの発症機構に関する代表的な実験結果を前頁の図に要約した。

1）ノックアウトマウスを用いた疼痛反応の *in vivo* での行動解析（図１）

これまで疼痛行動は主にラットを用いて解析されてきたが、ノックアウトマウスで解析するために、髄腔内投与とL5 脊髄神経選択的切断による神経因性疼痛（SNL）モデルをマウスで確立した。グルタミン酸NMDA受容体NR2A (ε2)、2D (ε4)、GABA合成酵素、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、プロスタグランジン合成酵素、プロスタグランジン受容体、ノシセプチン前駆体、ノシセプチン受容体、サイトカイン、神経ペプチドPACAPなど様々なノックアウトマウスにアロディニア発症させその機序を検討した。SNLモデルを作製した７日後に、熱刺激と機械的刺激に対する疼痛閾値の変化を測定した。PACAPのノックアウト ($PACAP^{-/-}$) マウスでは痛覚過敏反応やアロディニアが生じなった。数多くの他のノックアウトマウスでも同様の実験を行い、どの因子が神経因性疼痛に関与するかカスケードが想定できている。

2）後根神経節(DRG)と脊髄での遺伝子誘導と神経回路網の機能的活性化(図２、図３)

最近のDNAマイクロアレイの実験では、神経損傷に伴い 100 以上の遺伝子発現が変化することが報告されているが、どのように疼痛反応に関与するかは不明である。再現良く上昇する遺伝子の１つにPACAPがある。DRGには無髄のC線維を出し、痛覚伝達に関与する小型細胞と有髄のA線維を出し、触角の伝達に関与する中型・大型細胞が存在する。神経損傷に伴いPACAPの発現がDRGの中型・大型細胞、脊髄後角の浅層で増加するが、$PACAP^{-/-}$マウスでは見られない。痛覚伝達にはグルタミン酸NMDA受容体が重要であり、その活性化に伴い一酸化窒素(NO)の産生が増加する。神経型NOS (nNOS)活性は組織を固定後、NADPHジアホラーゼ活性で組織染色して測定できる。神経損傷後、NADPHジアホラーゼ活性がPACAPの発現誘導部位に一致して増加しているが、$PACAP^{-/-}$マウスでみられない。非可逆的な神経損傷により作製された神経因性疼痛モデル動物でみられるNADPHジアホラーゼ染色の上昇は、プロスタグランジン(PG)合成阻害薬やノシセプチン受容体拮抗薬などの鎮痛薬投与により可逆的に抑制される。誘導型NOS(iNOS)$^{-/-}$マウスでは神経因性疼痛が生じることからiNOSは神経因性疼痛に関与しないこと、またnNOSタンパクの発現は変化しないことから、神経損傷に伴いnNOSが活性化されることが想定された。

3）脊髄スライス及び培養細胞での nNOS の活性化機構（図４）

NADPHジアホラーゼがnNOSの活性化を反映しているかどうか確認するために、蛍光NO指示薬DAF-FMを用いてNO産生を検討した。脊髄スライスにNMDAあるいはPACAPを単独投与した場合にはNO産生がみられなかったが、NMDA存在下にPACAPは濃度依存的にNO産生を増加させた。$PACAP^{-/-}$マウスでNMDAとPACAPが相乗的に作用してアロディニアを誘発することから、疼痛行動とNO産生と

の関連が確認された。さらに、培養細胞を用いてNMDAとPACAPでnNOSの細胞質から細胞膜へのトランスロケーションが引き起こされ、NO産生が上昇することが示された。

4）脊髄後角での神経回路網の活性化機構解明のための生化学的アプローチの系の確立（図5）

膜型PGE合成酵素のノックアウトマウスは図1の実験結果と同様に神経因性疼痛が生じない。DAF-FMを負荷した脊髄スライスにPGE_2を投与すると脊髄後角浅層にNO産生の上昇が認められる。シナプス終末から遊離されたグルタミン酸はシナプス後細胞のNMDA受容体の活性化に伴う細胞内Ca^{2+}の上昇が活性化を引き起こす。PGE受容体はEP1～EP4 の4つのサブタイプがあり、脊髄後角では様々なシグナルを介して神経因性疼痛を誘発することが示唆されている。トランスロケーションをはじめとするnNOSの活性化機構を生化学的に解明するために、摘出脊髄標本（大塚モデル）を用いてnNOS活性をNADPHジアホラーゼ活性として組織化学的あるいは生化学的に測定する系を確立した。脊髄後角のNADPHジアホラーゼ活性がNOS活性と同一であることを生化学的に確認し、現在、nNOSの活性化に関するシグナル伝達の解析を進めている。

5）脊髄後角でのタンパクのリン酸化、nNOS の活性化と神経因性疼痛（図6）

これまで、カラゲニンや CFA などの非常に強力な起炎物質を足蹠に注入して慢性炎症を誘発し、炎症性サイトカインや COX-2 を誘導する系で生化学的変化が解析されてきた。我々は神経因性疼痛は炎症が消退した後の脊髄後角での中枢性感作を如何にとらえるか腐心してきた。nNOS の活性化に見られるように、誘導型酵素(iNOS や COX-2)は関係しておらず、生化学的変化も弱く、局所的に解析して初めて捕らえられる。MARCK は細胞骨格タンパクでアクチンとの結合がプロテインキナーゼ C(PKC)で調節され、dendrites でのスパイン形成やシナプス終末からの神経伝達物質の遊離に関与することが知られている。MARCKS の 159 番目の Ser は Rho キナーゼにより特異的にリン酸化される。この部位特異的リン酸化抗体を用いて脊髄後角浅層のリン酸化が神経因性疼痛の維持に関与すること、Rho キナーゼの特異的阻害薬で nNOS の活性化とアロディニアが部分的に抑制されることを示した。MARCKS 以外のタンパクもリン酸化部位特異的抗体とノックアウトマウスを用いて、リン酸化が nNOS の活性化と神経因性疼痛に重要であることを見出している。

6）研究成果のまとめと展望（図7）

神経損傷に伴い脊髄後角での中枢性感作により引き起こされる神経因性疼痛は、海馬の記憶・学習にみられる長期増強などの可塑性変化と驚くほど共通性があると考えられるようになり、最近その発症機構が注目を集めている。神経因性疼痛の研究は個体から、組織、細胞、分子レベルまで体系的に解析できる特長がある。特定研究「神経回路」班に加えていただき、多くの研究者と共同研究を行いアロディニアを伴う神経因性疼痛の発症機構の解明を精力的に行うことができた。本報告書では、紙面の制約上、神経因性疼痛に伴う nNOS の活性化に焦点を当て記載した。本研究で明らかになった点は、器質的な神経損傷に伴う神経因性疼痛がグルタミン酸遊離の促進⇒NMDA 受容体の活性化⇒NOS の活性化という共通の機能的変化により維持されており、さまざまな生体因子はこの共通機構の構成因子か修飾因子と考えられる。これまでの神経因性疼痛の研究は新しい分子が関与するかどうかという探索的研究であったが、今後それらの因子を集約し、体系づける研究を行うことが必要である。postsynaptic density (PSD)の NMDA 受容体複合体（図7）1つ取り上げても 100 以上のタンパクから構成され、神経活動に応じてその構成が dynamic に変化し、synapse 強度を調節している。本研究班で明らかになった神経回路網の機能的変化を基盤として、シナプス可塑性における pre と post 因子の寄与、spine 形成・再構築にも取り組み、神経因性疼痛の発症機構の解明をさらに進め難治性疼痛の治療につなげたいと考えている。

共同研究

1. 三品昌美教授（東大・医）、崎村建司教授（新潟・脳研）グルタミン酸 NMDA 受容体ノックアウトマウスによる疼痛反応の解析
2. 成宮周教授（京大・医）、市川厚教授・杉本幸彦助教授（京大・薬）プロスタグランジン受容体ノックアウトマウスによる疼痛反応の解析
3. 審良静男教授（阪大・微研）膜型 PGE 合成酵素ノックアウトマウスによる疼痛反応の解析
4. 馬場明道教授（阪大・薬）PACAP ノックアウトマウスによる疼痛反応の解析
5. Liew, FY 教授（Glasgow 大学）誘導型 NOS ノックアウトマウスによる疼痛反応の解析

   上記以外にも岩倉洋一郎教授（東大・医科研）、山口正洋講師（東大・医）武藤誠教授（京大・医）、八木健教授（阪大・医）、柳川左右夫教授（群馬・医）、竹島浩教授（東北大・医）、裏出良博博士（大阪バイオ研）、横山知永子博士（国立循環器病センター）、岩里琢治博士（理研）、Reinscheid 博士（California 大学 Irvine 校）などと遺伝子改変マウスによる疼痛反応の共同研究を進めている。
6. 長野哲雄教授（東大・薬）蛍光 NO 指示薬 DAF-FM を用いた脊髄や小脳スライスの NO 産生の可視化と痛覚反応との関連
7. 佐々木泰治教授（北里大・薬）、鈴木正昭教授（岐阜大・医）Rho キナーゼ選択的阻害薬とリン酸化部位選択的 MARCKS 抗体を用いる痛覚反応における Rho キナーゼの役割の解明
8. 稲垣直之助教授（奈良先端大）ラージゲルを用いた 2 次元電気泳動による痛覚反応に関与するタンパクのプロテオミクス解析

A02-06

研究課題　到達運動のプリズム適応における大脳小脳神経回路機能連関の動的変化

研究代表者名　　蔵田　潔

所属　　弘前大学医学部生理学第二講座

特定領域「神経回路」参加年度　平成12年度～平成16年度

研究成果の要旨

運動学習である到達運動のプリズム適応に、サル脳内のどの神経回路が関わっているかを解析した。その結果、到達運動に必要な座標変換が大脳運動前野腹側部で行われること、この領域の変換系を担う神経回路が小脳の入力をもとに動的に変化することを明らかにした。

研究成果

ヒトやサルが行う上肢による到達運動は、シフトプリズムを装着することにより視覚空間座標と運動座標との間に解離が生じても、10-20 回の試行で正確に目標に到達することができる。しかもこの運動学習にはプリズムの着脱毎に、極めて高い再現性のあることが確認されている。このような運動学習に大脳皮質運動前野腹側部が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。本研究期間において、この目標点への手到達運動のプリズム適応が運動前野腹側部内およびその周辺の神経ネットワークにおける信号伝達の変化によって達成されるという仮説を立て、運動前野腹側部への出力先である一次運動野から単一ニューロン活動の多点同時記録を行い、データの詳細な解析を行った。

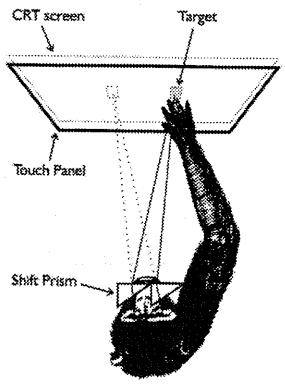


図１．本研究で用いた到達運動課題。サルの眼前にシフトプリズムを装着し、運動座標上の到達目標（Target）が視覚座標上のもの（点線の四角）と乖離している。

本研究で用いた到達運動課題では、プリズムによって視覚座標と運動座標を乖離することができ、ニューロン活動がどちらの座標系を反映しているかを解析できる（図 1）。また、目標点を視覚空間上に呈示してからその目標に向かっての運動を開始するまでの反応時間中に、視覚空間から運動座標変換が行われていると考えられる。そこで、この反応時間中に発火頻度の変化する運動関連活動に特に注目し、運動前野腹側部と一次運動野におけるニューロン活動を解析・比較した。その結果、運動前野腹側部の運動関連活動には、目標点が視覚空間のどこにあるか、すなわち視覚空間座標を反映するもの（V neuron、図 2）と、どこに運動するかに依存して活動する

運動空間座標を反映するもの（M neuron、図3）、さらにそれらの中間的座標を反映するニューロンがあった。一方、一次運動野ではV neuronはほとんど存在していなかった。このことは、運動前野腹側部において主たる視覚座標から運動座標への変換が行われており、一次運動野はその変換をもとに最終運動指令を生成しているものと考えられる。

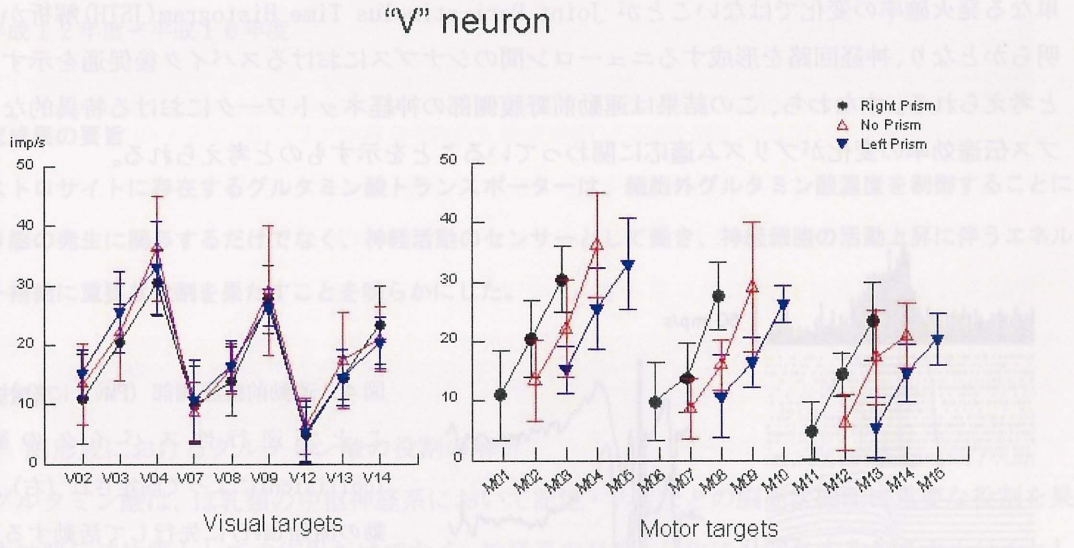


図2．運動前野腹側部から記録された1個のニューロン活動を、視覚座標系（左）と運動座標系（右）上の到達目標（横軸）に対する運動関連活動の発火頻度を縦軸にプロットした。このニューロンはプリズムの有無によらず視覚座標系の同一点に対し同様の発火が見られ、視覚座標系を反映する活動である（V neuron）（Kurata and Hoshi, 2002）。

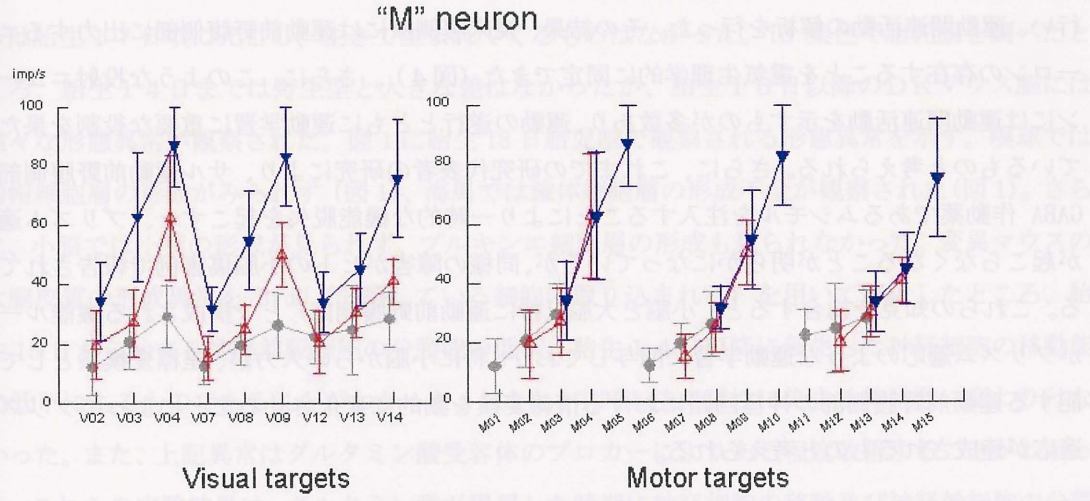


図3．運動前野腹側部から記録された運動関連活動の別の代表例。このニューロンはプリズムの有無によらず運動座標系の同一点に対し同様の発火が見られ（右）、運動座標系を反映する活動である（M neuron）。

同一の電極から同時に記録した複数のニューロン活動を解析したところ、座標変換過程を示すニューロンを含めてもプリズム適応中に特異的な発火を示すものはほとんどなかった。しかし、ニューロン間の相互相関を解析すると、プリズム適応中に特異的に一方のニューロンの発火後に発火確率の増加するニューロンが存在し、そのようなニューロン対は運動関連活動を示すニューロン間である場合が多数であった。さらに、運動学習に伴うこのような現象は、ニューロン間の単なる発火確率の変化ではないことが Joint Peri-stimulus Time Histogram(JSTH)解析からも明らかとなり、神経回路を形成するニューロン間のシナプスにおけるスパイク後促通を示すものと考えられる。すなわち、この結果は運動前野腹側部の神経ネットワークにおける特異的なシナプス伝達効率の変化がプリズム適応に関わっていることを示すものと考えられる。

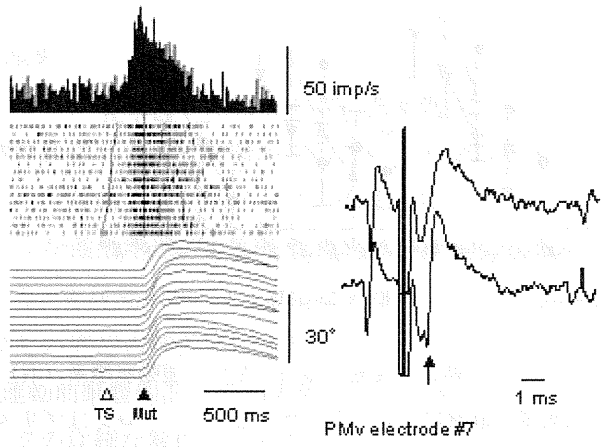


図４．運動前野腹側部（PMv）に投射することが逆行性スパイクの衝突(collision)によって同定され（右）、運動の開始(Mvt)に先行して活動する運動関連活動を示した視床ニューロン。

さらに、同一の運動課題を用いて、小脳から入力を受け、運動前野腹側部に出力することが解剖学的に知られている視床腹側核と、運動前野腹側部との両方からニューロン活動の多点記録を行い、運動関連活動の解析を行った。その結果、視床腹側核には運動前野腹側部に出力するニューロンの存在することを電気生理学的に同定できた（図４）。さらに、このような投射ニューロンには運動関連活動を示すものが多数あり、運動の遂行とともに運動学習に重要な役割を果たしているものと考えられる。さらに、これまでの研究代表者の研究により、サル運動前野腹側部をGABA 作動薬であるムシモルを注入することにより一時的な機能脱失を起こすと、プリズム適応が起こらなくなることが明らかになっているが、同様の障害がヒトの小脳傷害例で報告されている。これらの知見を総合すると、小脳と大脳（特に運動前野腹側部）とで構成される機能ループがプリズム適応のような運動学習に関与しており、特に小脳からの入力が、座標変換系として機能する運動前野腹側部の神経回路における情報変換を動的に変化させることによってプリズム適応が達成されるものと考えられる。

A02-07

グリア細胞に存在するグルタミン酸シナプス伝達関連分子の機能的役割

田中光一

東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究部

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度ー平成１６年度

研究成果の要旨

アストロサイトに存在するグルタミン酸トランスポーターは、細胞外グルタミン酸濃度を制御することにより脳の発生に関与するだけでなく、神経活動のセンサーとして働き、神経細胞の活動上昇に伴うエネルギー補給に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果

１．　脳形成におけるグルタミン酸の役割の解析

グルタミン酸は、ほ乳類の中枢神経系において記憶・学習などの脳高次機能に重要な役割を果たす神経伝達物質としての作用だけでなく、神経系の発生・分化にも関与するシグナル分子としての作用を持っていると考えられている。しかし、記憶・学習における役割に比べ、中枢神経系形成シグナル分子としてのグルタミン酸の役割は不明な点が多い。我々は、細胞外グルタミン酸濃度調節にとって重要な役割を果たす２種類のグリア型グルタミン酸トランスポーター欠損マウス(GLT1,　GLAST)を作成した。これら２つの欠損マウスを掛け合わせグリア型グルタミン酸トランスポーターを全く持たない double knockout mouse(DK マウス)を作成したところ、DK マウスは胎生１７日頃に死亡し、生きて生まれてくるものはなかった。TB 染色で胎児脳を調べたところ、胎生１４日までは野生型と大きな差はなかったが、胎生１６日以降のＤＫマウス脳には様々な形態異常が観察された。図１に胎生 18 日胎児脳で観察される形態異常を示す。嗅球では僧帽細胞層の形成がみられず（図 1)、海馬では錐体細胞層の形成不全が観察された(図 1)。さらに、小脳では小葉の形成が見られず、プルキンエ細胞層の形成も見られなかった。変異マウスの大脳皮質の形成異常を BrdU（分裂している細胞に取り込まれる）を用いて解析したところ、胎生 15 日から始まる神経前駆細胞の分裂能の低下、胎生１４日以降に新生した神経細胞の移動能の低下によるものであることがわかった。しかし、TUNEL 法で陽性に染まる細胞数に変わりはなかった。また、上記異常はグルタミン酸受容体のブロカーによりある程度改善することがわかった。これらの実験結果は、グルタミン酸が限局した時期に神経細胞の移動及び神経幹細胞の分裂に関与し、脳の形成に重要な役割を果たすことを in vivo で初めて証明したものである。

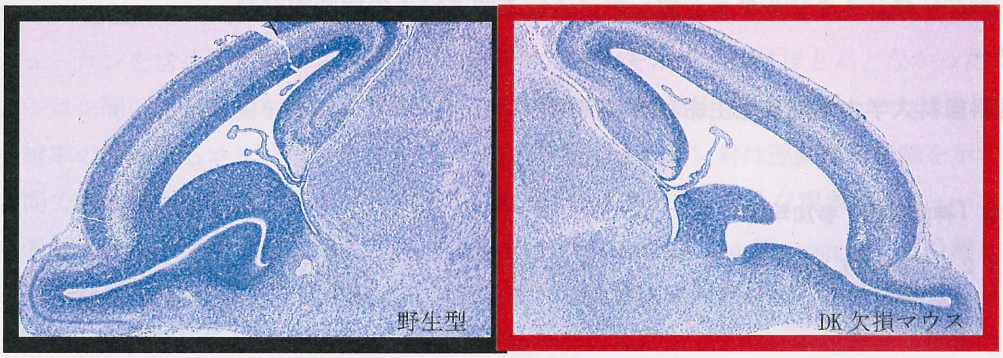


図１ DK 欠損マウスの脳形成異常

２． 神経回路網の活動を維持するためのエネルギー補給のメカニズム

神経系は他の臓器に比べエネルギー要求性が高く、神経回路網が正常に形成し機能を維持するためには、神経活動の亢進した脳部位に選択的に代謝エネルギーを補充する必要がある。しかし、その分子メカニズムは不明な点が多かった。数年前、この神経—代謝カップリングにおいてグリア型グルタミン酸トランスポーターが重要な役割を果たすという仮説が提唱されたが、その仮説に対する実験的証明はなかった。本研究は上記仮説が正しいことを、グリア型グルタミン酸トランスポーター(GLAST)欠損マウスを用いて明らかにした。

神経—代謝カップリングを評価する系として、マウスのヒゲ刺激による体性感覚野神経細胞の活動亢進に伴うグルコースの取り込み増加を用いた。体性感覚野には、ヒゲ１本１本に対応するシナプスの集合体が存在し、バレルと呼ばれている。GLASTは、バレルのアストロサイトに限局して存在し、欠損マウスでは、その発現は完全に消失していた。しかし、バレル構造や視床からの入力繊維の分布に変化はなかった。野生型マウスでは、C1C2 のひげを刺激すると、対応する体性感覚野の 2-[1-^{14}C]deoxy-D-glucose(2-DG)の取り込みが 17%増加する。しかし、GLAST欠損マウスのひげを刺激しても、2-DGの取り込みは 5%しか増加しなかった。この結果は、GLAST欠損マウスの体性感覚野において、神経活動亢進に伴うエネルギー補給（2-DGの取り込みの増加）が障害されていることを示している。また、神経—代謝カップリングをin vitroで解析する方法として、培養したアストロサイトにグルタミン酸を添加した時（神経活動の亢進に相当する）に誘導されるグルコースの取り込み促進（血管からのエネルギー源であるグルコースの取り込みに相当）・乳酸の放出促進（神経細胞のエネルギー基質である乳酸の補給に相当）を解析する実験系がある。この実験系を用いて、GLASTの神経—代謝カップリングにおける役割を解析した。野生型マウスから調整したアストロサイトにグルタミン酸（200μM）を添加すると、アストロサイトにおける 2-DGの取り込み・乳酸の培地への放出量が増加した。しかし、GLAST欠損マウスから調整したアストロサイトを用いて同様の実験を行うと、グルタミン酸により誘導されるアストロサイトの代謝反応が観察されなかった。これらの結果は、神経活動の亢進→シナプス間隙のグルタ

ミン酸濃度上昇→グリア型グルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸の再吸収の活性化（同時にNa^+がグリア内へ流入）→グリアのNa-K ATPaseの活性化（グリア内でのエネルギー消費増大)→グリアによる毛細血管からのブドウ糖の取り込み増加→グリアの解糖系によるブドウ糖から乳酸の生成（グリア内の消費したエネルギーの補充）→生成した乳酸を神経細胞が取り込みエネルギーを補充、という経路が重要であることを、in vivo, in vitroで証明した（図２)。これは、アストロサイトにあるグルタミン酸トランスポーターが神経活動亢進のセンサー分子として働き、その後のエネルギー補給の一連の反応をトリガーすることを示しており、神経系が正常に形成し、作動するためにはアストロサイトのグルタミン酸トランスポーターが不可欠であることを初めて証明した研究であり、脳機能の再建には、神経回路網だけでなくこのようなグリア網の再構築が必要であることを示している。

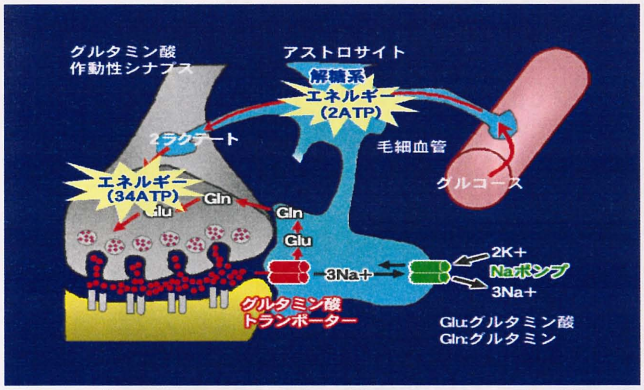


図２　グリアを介した神経細胞へのエネルギー補給

A02-08

可塑性の高い状態にある樹状突起の可視化の試み

玉巻伸章
熊本大学・大学院医学薬学研究部・脳回路構造
平成12-16年度参加

樹状突起の主要細胞骨格を成す微小管の配置は、様々な分子の調節を受ける。形態調節の役割を担う分子の候補としてLow molecular weight MAP2 splicing variants (SV)を想定し、新規SVの探索とその働きを調べた。

神経細胞での情報の入力は、樹状突起により受け取られる。樹状突起の形態は、神経細胞が生まれ機能する場まで移動し、その後形成される。その極性は、周りの神経誘導物質などにより、調節されるが、樹状突起の主要な形態は、すでに遺伝子によって決められていると考えられる。大脳皮質においては、特徴的な１本の長い先端樹状突起と数本の基底樹状突起をもつ錐体細胞がある。樹状突起の表面構造であるスパインや、伸長の際に現れる成長円錐の形態は、アクチン線維と微小管の両方が関与すると考えられるが、主要な樹状突起の形態は微小管によって決定されていると考えられる。しかしその形態を調節するメカニズムについてはまだ良く知られていない。我々は、どの様にして幹となる部分が形成され、可塑性の高い状態にある樹状突起側枝が形成されるのかを探る目的で、樹状突起の主要分子であり、微小管結合蛋白であるMicrotuble-Associated Protein 2 (MAP2) に着目して研究を進めた。MAP2には、同一遺伝子からの選択的スプライシングによって生じた多くのスプライシング・バリアント (SV) があり、

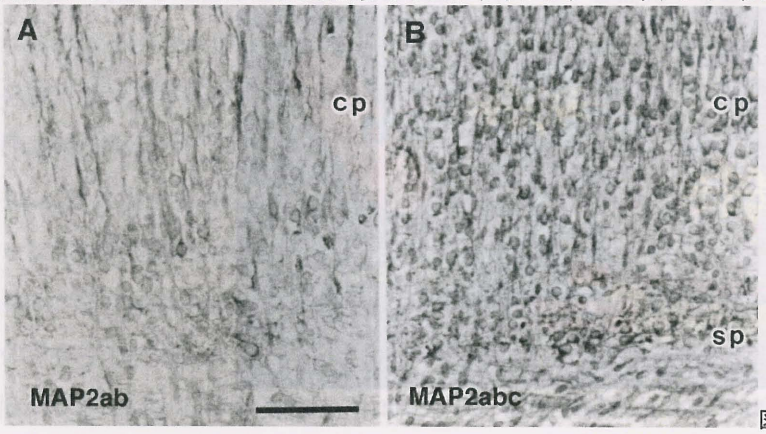
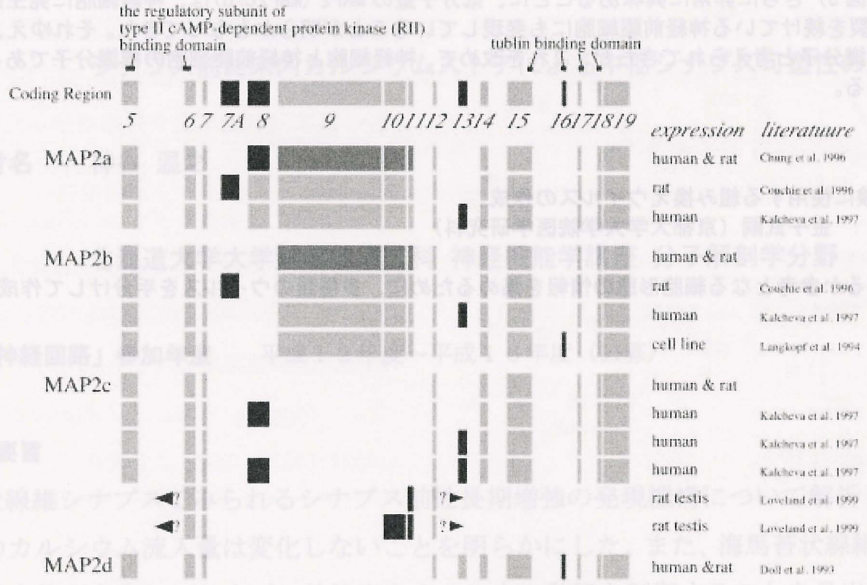


図１

高分子量 (HMW MAP2 ; MAP2a/b) と低分子量 (LMW MAP2; MAP2c/d) のSVが知られている。近年さらに10種以上のMAP2-SVが見つかり、これらの発現は時間的、空間的な調節を受けていることが知られる。図１にあるように、MAP2abに対する免疫組織化学では先端樹状突起の軸のみを染めるのに対し、MAP2abcに対する免疫組織化学では先端樹状突起の側枝も多く染色される傾向があった。それゆえ我々は、MAPcと呼ばれるSVが、可塑性の高い樹状突起と考えられている側枝の形態維持に働いていると考えた。

加えて、上記の二種類の抗体が認識するSVは、MAP2abc以外にもあると考えられたので、ヒト胎児脳 (21～30週齢) cDNA試料からのPCRと 5'-RACE、およびラット E16、E17胚の脳から得られたmRNAの RT-PCRによって新規MAP2-SVを探索し、新しいスプライシングバリアントを更に複数クローニングした。この中には新規エクソン 5A を持つMAP2-SVが見つかり、転写開始領域が複数あるこが示された。またいくつかのエクソンを欠き、二つのtype II cAMP dependent protein kinase binding site の内一方を欠く MAP2-SV も発見した(MAP2e)。新規 MAP2-SV の western blotting 像と免疫組織化学像から、MAP2abc, MAP2ab それぞれに対する抗体のエピトープも明らかになり、MAP2abに対する免疫組織化学で検出できるSV、MAP2abcに対する免疫組織化学で検出できるSV、それ以外にいずれの免疫組織化学によっても検出することのできないMAP2の発現があることが示唆されてきた。これまでに見つかっているSVとわれわれの見つけたSVに加え、よく使われている抗MAP2抗体の認識エピトープを図２に整理した。

さらに、このような働きの未知のMAP2-SVの、樹状突起形態形成への寄与を調べる目的で、MAP2c, MAP2eをGFPと伴に強制発現するプラスミドを作成した。同プラスミドを、コルヒチン処理した株細胞に強制発現させたところ、MAP2eの場合には、MAP2cの場合に見られたフィロポードよりも有意に短いフィロポードが観察された。



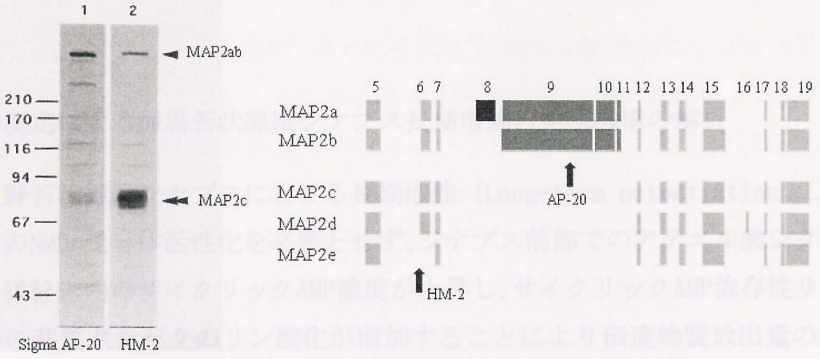


図 2

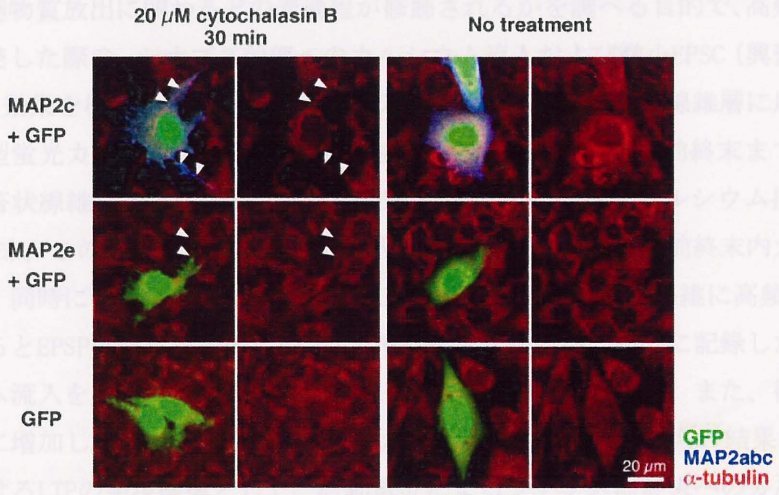


図 3

このことからも新規の MAP2-SV、MAP2e は、細胞の中で微小管と結合し、何らかの細胞形態への影響を与えている

と考えられた（図3）さらに非常に興味あることに、低分子量のMAP2（MAP2c/d）は、神経細胞に発生運命が定まっているが、まだ分裂を続けている神経前駆細胞にも発現していることが明らかとなってきた。それゆえ、これまでMAP2は神経細胞の標識分子と考えられてきたが、これを改めて、神経細胞と神経前駆細胞の標識分子であると理解を訂正する必要性がある。

共同研究： 実験に使用する組み換えウイルスの作成。
共同研究の相手： 金子武嗣（京都大学大学院医学研究科）
共同研究内容：
実験に使用するか参考となる細胞形態の情報を集めるために、多種類のウイルスを手分けして作成した

A02-09

特定領域研究「神経回路」研究報告書

研究課題　　シナプス前終末内カルシウムストアによる中枢シナプス可塑性の調節機構

研究代表者名　　神谷 温之

所属　　北海道大学大学院医学研究科 神経機能学講座 分子解剖学分野

特定領域「神経回路」参加年度　　平成１２年度～平成１６年度（公募）

研究成果の要旨

海馬苔状線維シナプスでみられるシナプス前性長期増強の発現機構について解析し、シナプス前終末へのカルシウム流入量は変化しないことを明らかにした。また、海馬苔状線維終末にはリアノジン受容体が存在し、シナプス前終末内カルシウム動態を制御することを見出した。

研究成果

１．光学的測定による海馬苔状線維シナプス長期増強の発現機構の解析

海馬CA3 野苔状線維シナプスにおける長期増強（Long-term potentiation; LTP）は、シナプス後細胞でのNMDA受容体活性化を必要とせず、シナプス前部でのアデニル酸シクラーゼ活性化により苔状線維終末内のサイクリックAMP濃度が上昇し、サイクリックAMP依存性リン酸化酵素を介して何らかの基質タンパクのリン酸化が増加することにより伝達物質放出量の持続的増加を引き起こすという、シナプス前性のメカニズムが想定されている。本研究では、シナプス前性LTPにおいて伝達物質放出に関わるどの素過程が修飾されるかを調べる目的で、高頻度刺激により長期増強を誘発した際の、シナプス前部へのカルシウム流入および微小EPSC（興奮性シナプス後電流）に対する効果を検討した。マウス海馬スライス標本において入力線維層に局所的に注入した細胞膜透過型蛍光カルシウム指示薬が軸索内に取り込まれシナプス前終末まで輸送されることを利用して苔状線維シナプスのシナプス前部だけに選択的に蛍光カルシウム指示薬を負荷する（軸索標識法）。このような標本において蛍光強度を指標にシナプス前終末内カルシウム濃度変化を測定し、同時に興奮性シナプス後電位(EPSP)も記録した。苔状線維に高頻度刺激（100Hz 1秒）を与えるとEPSP振幅は持続的に増大しLTPが誘発されたが、同時に記録したシナプス前部へのカルシウム流入を反映する蛍光シグナルは変化しなかった（図１）。また、微小EPSCの平均頻度は約２倍に増加したが、平均振幅には変化がみられなかった。これらの結果から、苔状線維シナプスにおけるLTPの発現機構として、活動電位によるシナプス前終末へのカルシウム流入量は変化せず、カルシウム流入以降の開口放出機構の促進が伝達物質放出量の持続的な増大を引き起こすと考えられた。

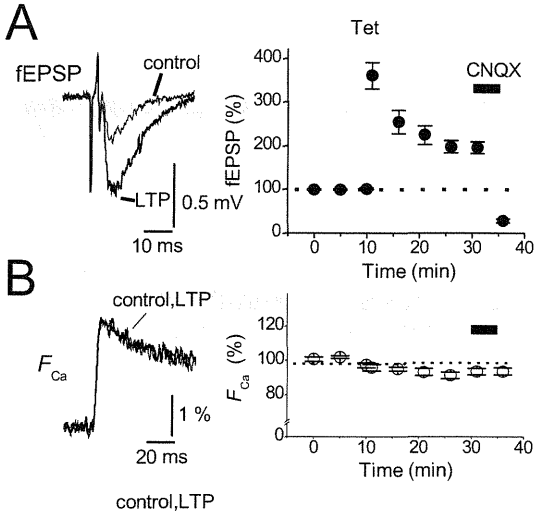


図1　苔状線維シナプスの長期増強ではシナプス前部へのカルシウム流入は変化しない。

A: フィールドEPSP記録（fEPSP）。100Hz1秒の高頻度刺激により長期増強が生じた。B: 同時記録したシナプス前部へのカルシウム流入を反映する蛍光シグナル（F_{Ca}）。長期増強発現に伴いシナプス前カルシウム流入は不変であった。カルシウム流入以降の開口放出機構の機能亢進が長期増強を引き起こすと考えられた。（Kamiya et al., *J Neurosci*, 22(24): 10524-10528, 2002 より改変）

2．シナプス前終末内カルシウムストアによる海馬苔状線維シナプス可塑性の調節機構

シナプス前部でのカルシウム動態を制御する因子のうち、細胞内カルシウムストアの役割に関しては不明な点が多い。本研究では、細胞内ストアからのカルシウム放出に関与するリアノジン受容体が海馬CA3 野苔状線維シナプス前部でのカルシウム動態を制御する可能性について検討を行った。リアノジン受容体を介するカルシウム放出を促すカフェインを投与すると、苔状線維シナプス伝達は著明に増大した。このとき、二発刺激促通は減少し、また、苔状線維終末に由来する微小EPSCの頻度が増加したことから、カフェインの作用はシナプス前終末からの伝達物質放出の促進によると考えられた。また、前述した光学的測定法を用いて、カフェイン投与による終末内カルシウムレベルの増加を確認した。さらに、苔状線維の反復刺激に伴う細胞内カルシウム上昇が、リアノジン受容体の阻害薬であるTMB-8 により部分的に抑制されることを見出した（図2）。以上の結果から、苔状線維終末には機能的なリアノジン受容体し、おそらくカルシウム誘発性カルシウム放出（calcium-induced calcium release; CICR）の機構を介して、繰り返し刺激によるシナプス前部でのカルシウム動態を増幅すると考えられた。

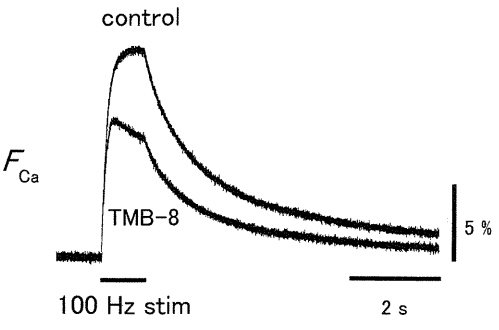


図2　リアノジン受容体は反復刺激による苔状線維シナプス前部でのカルシウム上昇を増幅する。

100Hz1 秒の高頻度刺激によるシナプス前部でのカルシウム上昇（蛍光シグナル：F_{Ca}）。リアノジン受容体阻害剤TMB-8 はシナプス前カルシウム上昇を部分的に抑制した。特に高頻度刺激の後期において抑制が顕著であった。

共同研究

高井義美（大阪大学大学院医学研究科）「Rab GDIα遺伝子欠損マウスのシナプス機能解析」
Rab GDIα遺伝子欠損マウスでの短期シナプス可塑性の異常を明らかにした。

渡辺すみ子（東京大学医科学研究所）「培養網膜上でのRx遺伝子導入ES細胞の機能解析」
培養網膜上でRx遺伝子導入ES細胞が神経細胞に分化することを明らかにした。

大野博司（理化学研究所横浜研究所）「AP-3B遺伝子欠損マウスのシナプス機能解析」
AP-3B遺伝子欠損マウスでは抑制シナプス伝達の異常を認めた。

研究課題　「代謝型グルタミン酸受容体の機能修飾機構と活性化に伴う動的構造変化の解析」
研究代表者名　久保義弘
所属　自然科学研究機構・生理学研究所・神経機能素子研究部門

特定領域「神経回路」参加年度　平成 12 年度 － 平成 16 年度

研究成果の要旨

代謝型グルタミン酸受容体のリガンド感受性が scaffold 蛋白質 Homer1c の結合により変化することを見いだした。また、リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の動的構造変化を FRET 法により解析し、2 量体間の配置が変化することを明らかにした。

研究成果

代謝型グルタミン酸受容体 1 型（mGluR1）は、脳の様々な部域に発現している受容体である。この遺伝子を改変したマウスは、海馬や小脳のシナプス伝達の可塑的変化の異常と、記憶や学習といった行動学的異常を示す。このことから、mGluR1 は、いわば、記憶の鍵を握る重要な分子として注目されてきた。

近年、mGluR1 の細胞外領域の結晶を用いた X 線構造解析により、2 つのサブユニットが会合しホモ二量体として構成されていること、それぞれのサブユニットはグローブ状の構造をしており、グルタミン酸結合によりグローブが閉じるように細胞外領域の構造が変化することが明らかにされた。ところで、代謝型受容体のシグナル伝達は、細胞内において G 蛋白質を活性化することによりひきおこされる。mGluR1 のシグナル伝達機構を理解するためには、細胞外領域の構造変化に伴って起こる細胞内領域の構造変化を知ることが必要であるが、この点は未解決であった。そこで、我々は、光ラベルを用いた分子の動的構造変化解析という最先端の手法を用いてこの問題にアプローチすることを目指して研究を開始した。

異色の蛍光物質間で、距離が近いほど、エネルギーの受け渡し（FRET（Fluorescent Resonance Energy Transfer）効率）が大きくなることが物理化学的に知られている。我々は、mGluR1 のリガンド投与による構造変化を、FRET 効率の変化として捉えることを計画した（図1）。

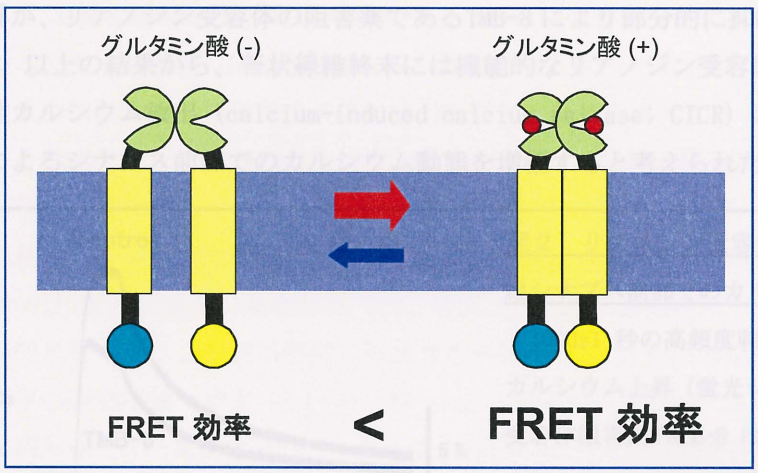


図 1　FRET 効率の解析による構造変化の検出の概略
シアン色の蛍光物質 CFP と黄色の蛍光物質 YFP 間の距離が変化した時に FRET 効率の変化が起こるので、CFP と YFP を mGluR1 分子にラベルして、FRET 効率の変化を測定することにより、mGluR1 の構造変化をリアルタイムで捕らえることができる。

まず、遺伝子工学的に、mGluR1 の細胞内領域の様々な箇所に、シアン色の蛍光蛋白、もしくは黄色の蛍光蛋白、もしくはその両方を付加し、この分子をHEK293細胞に発現させた。一般的に、膜蛋白ではあっても、細胞に強制発現させた場合、膜上に存在するばかりでなく細胞内に貯留す

る。我々の目的は、リガンド投与に伴うFRET の変化を測定することなので、細胞内に貯留する分子の放つ蛍光は、変化分を薄めてしまうバックグラウンドとなる。そこで、通常の光学システムではなく、いわゆる全反射照明を用いて、細胞膜上に存在する分子の蛍光のみを測光することにした。リガンド投与に伴う FRET 効率の変化を解析したところ、以下の知見が得られた(図 2)。

(1) 2 量体サブユニットの、細胞内ループ 1 が相互に遠ざかる。
(2) 2 量体サブユニットの、細胞内ループ 2 が相互に近づく。
(3) ひとつのサブユニットの内部では明らかな構造変化は起こらない。

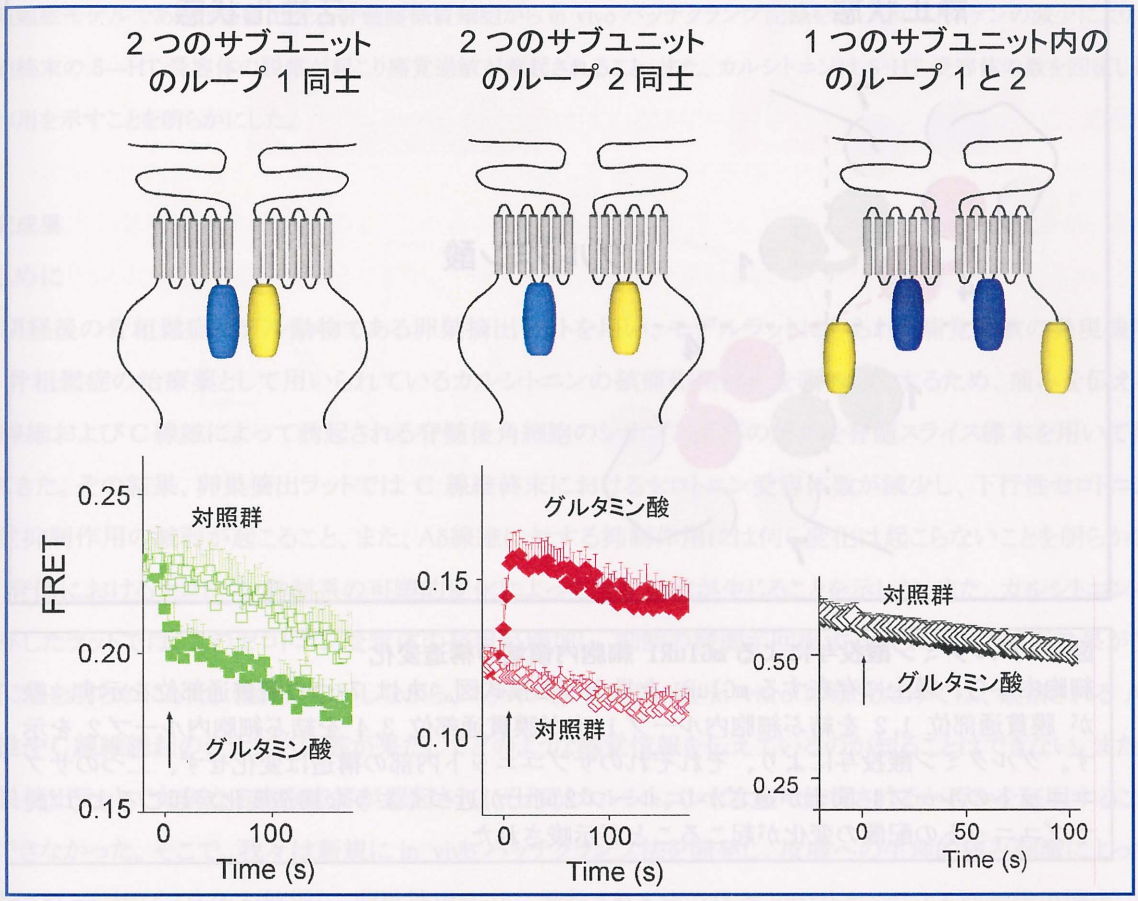


図 2. グルタミン酸投与による蛍光ラベルした mGluR1 の FRET 効率の変化
上段は、作成した分子のデザインを示している。左、中央は、それぞれ、ふたつのサブユニットの細胞内ループ 1 間、2 間の距離の変化を検出するもの、右は、ひとつのサブユニット内のループ 2 と C 末端間の距離を検出するためのものである。下段はそのデータで、矢印のタイミングでグルタミン酸を投与したものと、投与しなかった対照群のデータが示してある。左では、FRET 効率が低下、中央では増加、右では変化しなかったことがわかる。

これらの知見から、リガンド投与により mGluR1 の細胞内領域においては、個々のサブユニットの構造が変化するというよりは、2 つのサブユニット間の配置が変化することが示唆され (図 3) 、この動きがG蛋白質の活性化を引き起こすと考えられた。

ところで、我々は以前、下流の反応を指標として、グルタミン酸のみならずCa^{2+}、Gd^{3+} などの細胞外多価陽イオンによってもmGluR1 が活性化されることを発表した。その後、Gd^{3+} の結合部位が、結晶構造解析によって、グルタミン酸結合部位と異なる、2 つのサブユニット間の負電荷

を持つアミノ酸に富む領域に同定された。我々は、この部位が機能的に重要であることを、点変異体の解析により明らかにした。今回、ループ 2 のコンストラクトにより、Ca^{2+} や Gd^{3+} が mGluR1 の構造変化を確かに引き起こすことが確認された。Gd^{3+} は、脳内に存在しないが、これらの結果を考えあわせると、Gd^{3+} の作用を模倣する生理的物質が脳に存在していることを示唆しているようにも思われる。

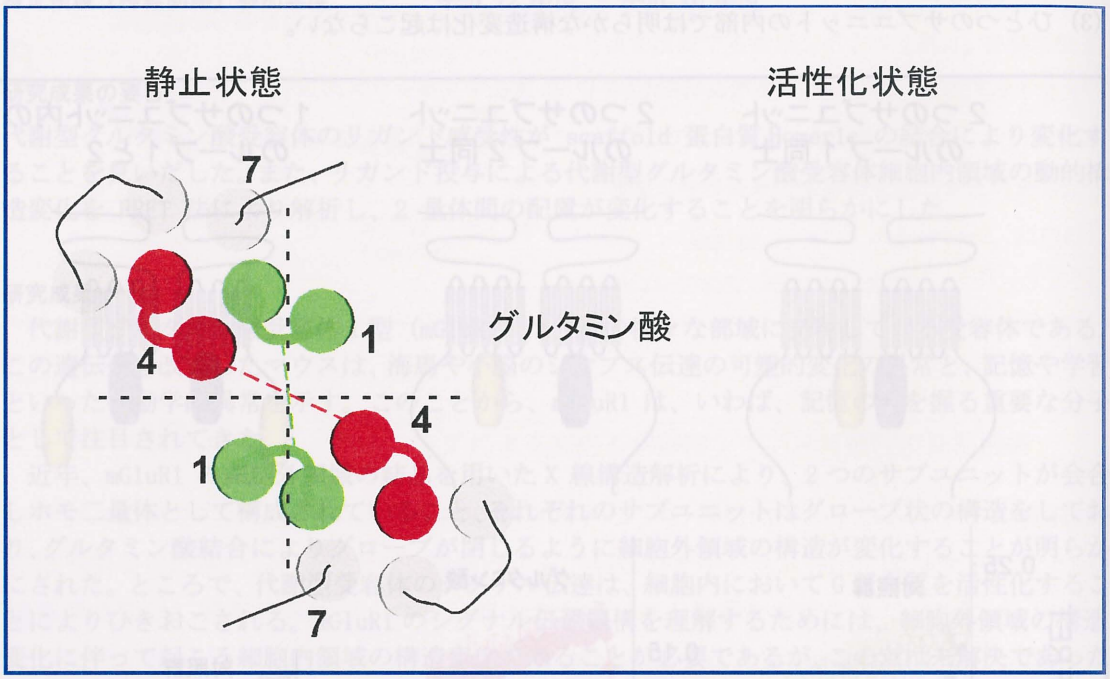


図 3　グルタミン酸投与による mGluR1 細胞内領域の構造変化
細胞内から、膜上に存在する mGluR1 を見上げた模式図。丸は 7 つの膜貫通部位を示す。緑が 膜貫通部位 1,2 を結ぶ細胞内ループ 1、赤が膜貫通部位 3,4 を結ぶ細胞内ループ 2 を示す。グルタミン酸投与により、それぞれのサブユニット内部の構造は変化せず、二つのサブユニットのループ 1 同士が遠ざかり、ループ 2 同士が近づくような構造変化が起こるような、サブユニットの配置の変化が起こることが示唆された。

ゲノムプロジェクトが完了し、今後は、ゲノムのコードする個々の蛋白の構造と機能を解析していくことが求められている。そのため、蛋白の結晶を用いて行う、いわゆる構造解析が精力的に進められているが、膜機能蛋白の場合は結晶化が容易でないため一般に極めて困難である。また、結晶化した構造を知るだけでは、動態に関する情報が欠如しているため、リアルタイムで、生きた細胞における膜機能蛋白の動的構造変化を解析する研究手法が切望されてきた。FRET 法による水溶液中の蛋白構造変化の解析は、既に確立されているが、生細胞で受容体蛋白に適用し成功した例は、極めて少ない。我々の研究は 「生細胞における膜機能蛋白分子の動的構造変化のリアルタイム測定」 を確立した点において意義があると考えている。ポストゲノムの時代に、蛋白の構造と作動原理を探っていくために、構造生物学的アプローチを相補うものとして、大きな期待が持てるからである。

共同研究

相手：　中田裕康、斉藤修　（東京都神経科学総合研究所、生体機能分子）
内容：　CFP/YFP ラベルした mGluR1 分子のリガンド結合能を binding assay により定量していただいた。

In vivo パッチクランプ法による卵巣摘出ラット脊髄セロトニン受容体の可塑性

吉村　恵、九州大学医学研究院、統合生理学

平成１３年度～１４年度

研究成果の要旨

骨粗鬆症モデルである卵巣摘出ラット脊髄膠様質細胞から in vivo パッチクランプ記録を行い、エストロゲンの減少によりC線維終末の 5—HT 受容体の脱落が起こり痛覚過敏が惹起されること、また、カルシトニンは 5-HT 受容体の数を回復し鎮痛作用を示すことを明らかにした。

研究成果

はじめに

閉経後の骨粗鬆症モデル動物である卵巣摘出ラットを用い、モデルラットにみられる痛覚過敏の発現機序と、骨粗鬆症の治療薬として用いられているカルシトニンの鎮痛作用機序を明らかにするため、痛みを伝えるAδ線維およびC線維によって誘起される脊髄後角細胞のシナプス応答の解析を脊髄スライス標本を用いて行ってきた。その結果、卵巣摘出ラットでは C 線維終末におけるセロトニン受容体数が減少し、下行性セロトニン痛覚抑制作用の減弱が起こること、また、Aδ線維に対する抑制作用には何ら変化は起こらないことを明らかにし、脊髄におけるセロトニン抑制系の可塑的変化によって痛覚過敏が生じることを示した。また、カルシトニンを投与したラットでは、このセロトニン受容体の発現が増加し、抑制の減弱が回復することによって鎮痛効果が生じることを明らかにした。(図1)。しかしながら、スライス標本を用いた in vitro の研究だけでは、観察されるAδ線維やC線維誘起のシナプス応答が果たしてどのような感覚情報を伝えているのか知ることはできない。また、卵巣摘出ラットで如何なる痛み応答が惹起され、それがカルシトニンによって修復されるか否かを証明することはできなかった。そこで、我々は新規に in vivo パッチクランプ法を開発し、皮膚への生理的痛み刺激によって誘起されるシナプス応答を解析し、卵巣摘出ラットに惹起される痛み応答とセロトニンによる抑制作用機序、カルシトニンによる鎮痛作用機序を明らかにすることを目的に研究を行った。

実験方法

In vivo 標本の作製とパッチクランプ記録

Sham、卵巣摘出(OVX)ラット、OVXにカルシトニン投与(OVX+KCT)ラット、それぞれのラットをウレタン麻酔し、人工呼吸下に両側を気胸とし、低容量、高頻度の換気を行い呼吸に伴う胸郭の振動を最小限にした。腰部椎弓を切除し L4~L6 レベルの脊髄を露出した後、ラットを脳脊髄固定装置にセットした。実体顕微鏡下に硬膜を切開し、クモ膜と軟膜に微細鋏みを用いて約1mmのパッチ電極刺入用の窓を開けた。露出した脊髄表面は38度Cの酸素負荷した Krebs 液で灌流し、薬液も直接脊髄表面に投与した。パッチ電極を脊髄表面より

脊髄後角へ刺入し、スライス標本と同様に

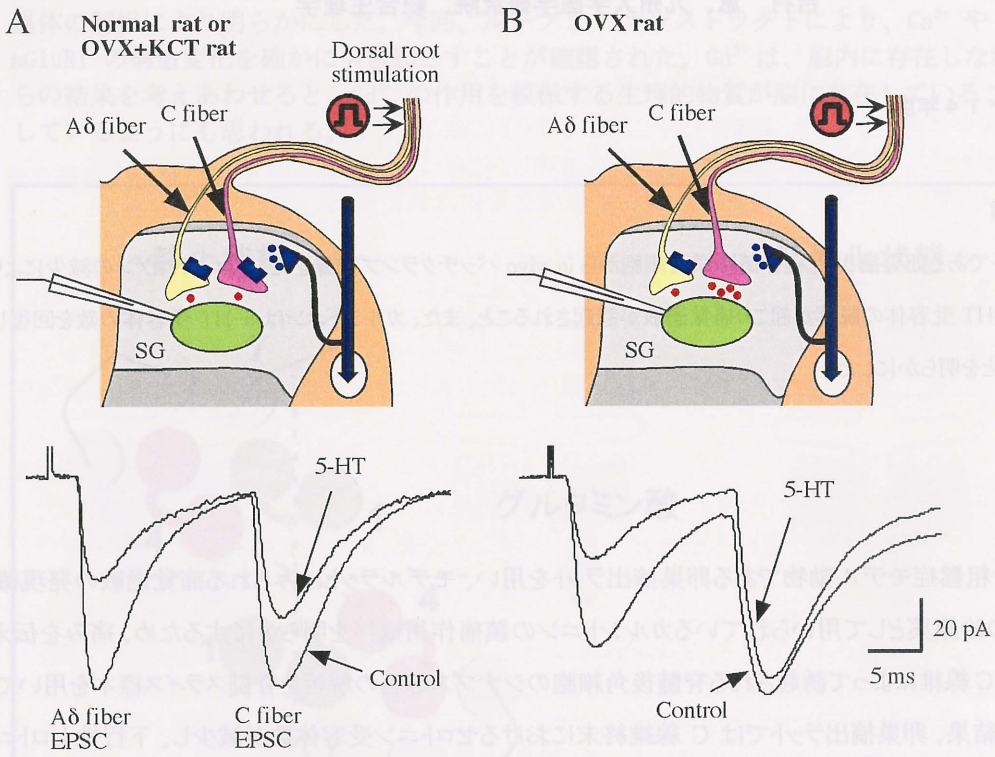


図1　脊髄スライス標本を用いた卵巣摘出によるセロトニン抑制作用の減弱と
カルシトニン(KCT)投与による抑制作用回復の解析

正常ラットから後根を付した脊髄スライス標本を作製し、膠様質細胞から記録を行った。後根を電気刺激すると、Aδ 線維誘起の EPSC と C 線維誘起の EPSC が観察された。正常ラットでは、セロトニン(40 μM) は Aδ 線維誘起の EPSC と C 線維誘起の EPSC をともに抑制した(A)。一方、卵巣摘出ラットでは、セロトニンは Aδ 線維誘起の EPSC を抑制したが、C 線維誘起の EPSC は抑制しなかった(B)。カルシトニン(KCT)を投与すると C 線維誘起の EPSC に対するセロトニンの抑制作用が回復した(A)。

ブラインド法によりギガオームシール(5 ー 20 GΩ)を形成した後ホールセルクランプ記録を行った。電極内液もスライスで用いたものと同様 K-gluconate や Cs を含むものを用いた。安定した記録を得るためにはラットを長時間良い状態に保つことが必要で、また、呼吸などの振動を抑制し、術中の出血を最少にし、呼吸、体温および体液の適正な管理を行った。スライス標本を用いて行った実験と同様に、痛みを伝える Aδ線維や C 線維およびセロトニンなどの痛みの伝達を調節する神経線維が密に終末する脊髄後角第Ⅱ層、いわゆる膠様質から記録を行い、皮膚への生理的感覚刺激によって誘起されるシナプス応答を解析した。機械的痛み刺激は有鉤鑷子で皮膚を挟んで、触刺激は皮膚を筆でブラッシュして、あるいは皮膚へ空気を吹き付けて行った。

実験結果および考察

1)　膠様質細胞に誘起された痛み応答と触応答

膠様質細胞を−70 mV の電位固定下に置くと自発性の EPSC が観察された。次に皮膚への痛み刺激を加えた。痛み刺激には鈎付き鑷子を用いた刺激、いわゆるpinch 刺激を用いた。しかし、上記のように痛み刺激と触刺激の両方に応答を示す細胞に pinch 刺激を用いる場合には注意が必要であった。手で有鈎鑷子を持ち皮膚を摘んでpinch 刺激を加えると、痛み刺激と同時に、手の微小な揺れなどによる触刺激も加わり、誘起された応答が痛みと触のどちらの刺激によるものか判断できなかった。そこで有鈎鑷子を動かぬように固定し、その上におもりを載せて刺激を行った。加重が小さく鑷子が触れただけでは、膠様質細胞は刺激のはじめにのみ EPSC の発生頻度を増したが、すぐに順応し刺激を加えているにもかかわらず応答は消失した。次に、加重をある一定以上に大きくすると、刺激を加えている間持続して EPSC の振幅と発生頻度が増し、さらに大きくすると発生頻度が著明に増大した。このように加重の大きさに比例して EPSC の発生頻度が増大したことは、膠様質細胞が痛みに応答することを示している。一定した触刺激では順応がはやく解析が困難であったため、ラットの体毛に air を吹き付けて触刺激を加えた。この刺激では EPSC の振幅と発生頻度が著明に増大し、その応答は刺激を加えている間持続した。触刺激や痛み刺激によって誘起された EPSC は CNQX によって抑制され、緩徐なシナプス応答は観察されなかった。記録したすべての細胞は痛み刺激と触刺激の双方に応答し、意外にもこれらの刺激による EPSC の振幅と発生頻度に有意な差は見られなかった。このことは、膠様質細胞はAδ 線維やC 線維の入力を受けるが、これらの線維すべてが痛みを伝えているわけではないことを示している。事実、ラット体毛の触覚情報はAδ 線維によって伝えられること、またC 線維の一部は非侵害性の情報を伝えることが知られている。

2)　セロトニンによる痛みおよび触応答の抑制

セロトニン(50 μM)を脊髄表面より投与すると、痛み刺激および触刺激によって誘起されたEPSC は抑制された。誘起されたEPSC の振幅と発生頻度をコントロールとしセロトニン存在下で比較すると、セロトニンは痛みおよび触刺激によって誘起されたEPSC の振幅のみを同程度に抑制し、頻度には何ら影響を与えなかった。

3)　膠様質における痛みの伝達とセロトニン抑制作用機序

以上の結果およびスライス標本を用いて得られた結果から、膠様質細胞はAδ 線維とC 線維からグルタミン酸を介した入力を受けること、痛みと触刺激に応答しセロトニンはこれら痛み、触応答をともに抑制することが明らかになった。従って図2に示すように、痛みはAδ 線維やC 線維によって、触刺激は一部のAδ 線維によって伝えられ、これらの伝達はサブスタンス P などのペプチドによるものではなく、グルタミン酸によって行われると考えられた。皮膚へ痛みや触刺激が加えられるとAδ 線維やC 線維に活動電位が発生し脊髄へ伝えられるが、セロトニンはAδ 線維やC 線維の終末部に作用し、グルタミン酸の放出を減らして膠様質細胞に誘起される興奮性のシナプス応答を抑制することが示唆された。

4)　卵巣摘出ラットおよびカルシトニン製剤投与ラットにおける痛み応答

正常ラット、卵巣摘出ラット、卵巣摘出ラットにカルシトニン製剤を投与したラットから痛み応答と触応答を記

録・比較した。Sham ラットでは、痛み刺激によって誘起された EPSC の振幅と発生頻度は、触刺激によって誘起されたものと同程度であった。ところが、卵巣摘出ラットでは、触応答に比して大きな痛み応答が誘起された。一方、カルシトニン製剤を投与した OVX+KCT ラットでは、Sham ラットと同様に痛み応答と触応答の大きさは同程度であった。誘起された EPSC の振幅と発生頻度を解析し、それぞれのラットにおいて痛み応答と触応答の大きさを比較した。Sham ラットでは、痛み応答と触応答の発生頻度および振幅に有意差はみられなかった。一方、OVX ラットでは、発生頻度に有意差はみられなかったが、触応答に比して有意に大きな振幅を持つ痛み応答が誘起された。OVX+KCT ラットでは、Sham ラットと同様に痛みと触応答間に有意差はみられなかった。これは、正常ラットでは同程度の痛みと触覚が膠様質細胞に入力されるが、卵巣を摘出すると痛みの入力が増強されることを示している。この痛み入力の増強は、カルシトニン製剤の投与によって抑制され、正常の入力に修復されたと考えられた。

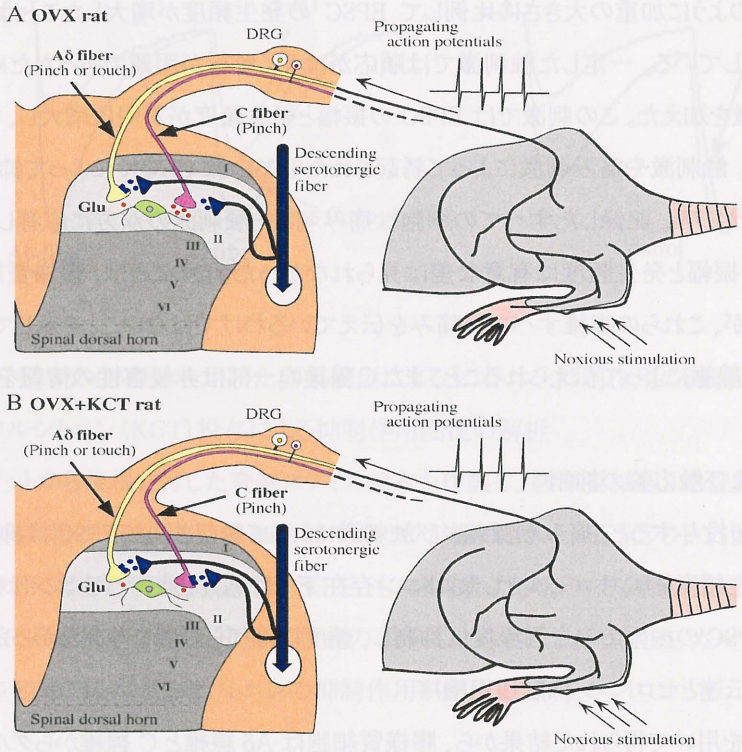


図2 卵巣摘出による痛覚過敏発現とエルカトニン製剤による鎮痛作用機序

卵巣を摘出すると、C 線維終末に発現しているセロトニン受容体数が減少してセロトニンによる抑制作用が減少し、痛みの伝達が増強される(A)。エルカトニン製剤を投与すると C 線維終末のセロトニン受容体が発現し、セロトニン抑制作用が回復する。痛みの伝達が正常のものに戻って鎮痛効果が現れる(B)

A02-12

表題　小脳の神経可塑性に関与するNOカスケードの研究

研究代表者　遠藤昌吾

所属　理化学研究所脳科学総合研究センター
神経回路メカニズム研究グループ　遠藤ユニット

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２−１４年度

研究成果の要旨

NO-cGMP-PKG-G-substrate系がプルキンエ細胞においてAMPA受容体の分布変化を介して小脳長期抑圧（LTD）に関与することを明らかにし、さらに、G-substrate 遺伝子欠損マウスにおいて、長期記憶が特異的に障害されることを明らかにした。

研究成果

１）小脳LTDにおけるNOカスケードの役割り

a.NOカスケード下流因子の同定と解析(Endo et al, 2003)

小脳長期抑圧にNO（一酸化窒素）が必要であり、NO-cGMP-PKG系が重要な役割を果たすことは各種の薬理学的実験から明らかになっていたが、その下流因子については明らかではなかった。我々は小脳の神経可塑性を担うプルキンエ細胞に特異的に存在するPKG基質G-substrateに焦点をあて、その生理的役割について解析した。我々はG-substrate cDNAをマウス、ラット、ヒトの脳cDNAライブラリーから単離することに成功した。Gbstrate の cDNA は１５５−１６０残基のアミノ酸からなる耐熱性のタンパク質をコードしていた。G-substrateのPKGによる２つのリン酸化部位（Thr）前後のアミノ酸配列は種間で非常によく保存されていた。G-substrate のリン酸化部位周辺のアミノ酸配列は内在性のホスファターゼ阻害タンパク質 I-1 及びDARPP-32と良く類似していた。非リン酸化型のG-substrateはホスファターゼを阻害しないが、PKGによりリン酸化されたG-substrateはホスファターゼ-1/-2Aを強力に阻害することが明らかとなった（図１）。また、G-substrateは細胞質-核間を移行することから、細胞質のみならず、核内で何らかの生理的役割を果たすと考えられる。

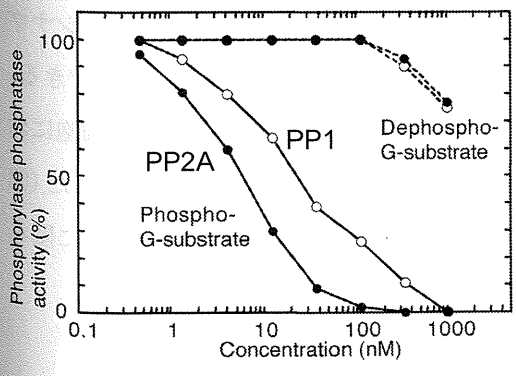


図１　G-substrateによるSer/Thrプロテインホスファターゼ（PP）の阻害作用。PKGによりリン酸化されたG-substrateはPP-1およびPP-2Aを阻害したが、脱リン酸化型 G-substrate はほとんど阻害作用を示さなかった。

b. G-substrate 遺伝子欠損マウスの作出とその解析

プルキンエ細胞特異的に存在する G-substrate はこの細胞で独特な生理機能を果たすことが考えられる。そこで、G-substrate 遺伝子欠損マウスを作出して、その生理機能を解析した。マウス G-substrate 遺伝子は５つの Exon に分かれて存在していた。ES 細胞における遺伝子組み換えを利用した、遺伝子ターゲッテイングにより翻訳開始 Met を含む Exon を欠失した遺伝子を持つマウスを作出した。このマウスを交配して、G-substrate 遺伝子を homo に欠損したマウスを作出した。G-substrate 遺伝子を homo に欠損したマウスでは G-substrate mRNA、G-substrate タンパク質の発現は観察されなかった。G-substrate 遺伝子欠損マウスと wild type マウスの様々な行動解析を行い、特に小脳依存性の学習に着目して、G-substrate 欠損の影響を検討した。その結果、G-substrate 欠損マウスにおいては、optokinetic reflex の短期順応は全く正常であったが長期順応が大きく障害されていた（図２）。長期順応には転写依存性-翻訳依存性の長期神経可塑性、が関与すると考えられている。G-substrate が核と細胞質をリン酸化依存的に shuttling することは、G-substrate が転写および翻訳と何らかの関わりを持つ可能性を示唆しており、非常に興味深い。今後、G-substrate 欠損マウスにおいてどのような分子の転写翻訳が影響を受けているのかを明らかにすることは、小脳依存性の長期記憶の分子機構を解明する大きな手がかりとなる。

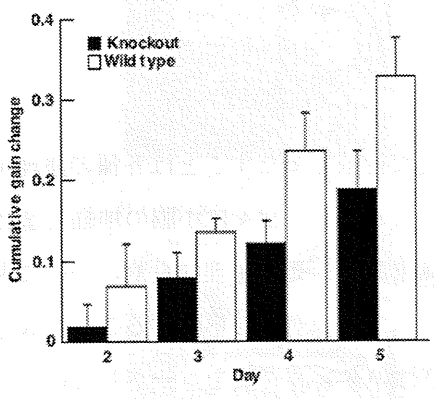


図２　G-substrate は長期の Optokinetic reflex 順応に関与する。一日１時間５日間のトレーニングを行い、ゲイン（順応）の変化を観察した。G-subsrate 欠損マウス（Knockout）は野生型（Wild type）に比較してゲインの上昇が遅かった。各日１時間のトレーニング前後でのゲインの変化は両遺伝子型において等しいが、翌日のトレーニング開始時のゲインに大きな違いがあることから、G-substrate は短期順応を長期順応に変換する機構に関与すると考えられる。

２）NO カスケードと他の細胞内情報伝達機構とのクロストーク

a. ERK カスケードとのクロストーク（Endo and Launey, 2003a;2003b;Launey et al, 2004）

小脳 LTD には MEK1/2-ERK1/2 カスケードが重要な役割を果たすことが明らかにされていることから、ERK 系と NO 系とのクロストークを検討した。NO 供与試薬である NOR3 や SNAP は、プルキンエ細胞において単独で ERK1/2 を活性化した。さらに、この ERK1/2 活性化は MEK1/2 の阻害剤で完全に阻害されることから、MEK-ERK 系が関与している。また、LTD においてシナプス伝達を減少させる主要な機構であると考えられる、シナプスにおける AMPA 受容体数の減少は、薬理学的には PKC の活性化剤である TPA により引き起こすことができる。TPA により引き起こされる受容体数減少は SNAP により強化された。この結果から、小脳プルキンエ細胞においては NO 系と MEK-ERK 系そして PKC 系の相互作用が LTD 惹起に重要な働きをすることが明らかとなった（図３）。また、これら３つの系がプルキンエ細胞において、グルタミン酸受容体（AMPA 受容体）の減少に関与することも明らかにした。初期の小脳 LTD に関与する分子機構に関与する３つの系が明らかになった。

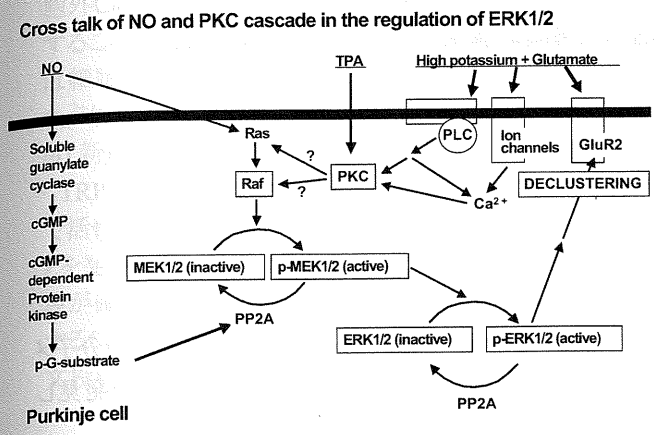


図３　プルキンエ細胞内における、NO系、ERK系、PKC系の相互作用。これらの諸系の相互作用により、短期的にはプルキンエ細胞上のグルタミン酸受容体の減少が引き起こされ、平行線維—プルキンエ細胞間の神経伝達効率の減少、すなわち、LTDが惹起されると考えられる。

共同研究

共同研究相手

理化学研究所脳科学総合研究センター

永雄　総一（「神経回路」班友）

共同研究内容

G-substrate 遺伝子欠損マウスの眼球運動の詳細な解析

本研究において作出したG-substrate遺伝子欠損マウスの眼球運動の詳細な解析を共同で行い、G-substrate欠損により短期のoptokinetic reflex （OKR）順応は全く影響を受けないが、長期のOKR順応が特異的に障害されることを発見した。

A02-13

研究課題　カプサイシン受容体と痛み受容神経の可塑性に関する研究（平成１２年）
痛み刺激受容体と受容体発現神経の可塑性に関する研究（平成１３，１４年度）
温度受容・体温調節に関する神経回路形成機構の解明（平成１５，１６年度）

研究代表者名　富永真琴
所属　岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理

特定領域「神経回路」参加年度　平成12年度~16年度（平成12~14年度班員、15，16年度班友）

研究成果の要旨
侵害刺激受容体であるカプサイシン受容体TRPV1の制御機構（感覚神経終末レベルでの可塑性）の分子メカニズムを明らかにした。TRPV4 が新たな温度受容体であることを明らかにした。新規温度受容体を発見した。

研究成果
(1) TRPV1の構造機能協関の解析
TRPV1 の細胞外プロトンによる活性化部位及び機能制御部位を変異体作成によって同定した(PNAS 2000)。
(2) TRPV1の機能制御機構の解析
炎症部位では炎症関連メディエイターが放出され、痛み刺激受容を制御していると考えられている。そこで、炎症関連メディエイターのカプサイシン受容体TRPV1 機能に対する効果を検討した。細胞外ATPは、濃度依存的にPKC活性化を介してTRPV1 活性を増大させることが明らかとなった。その機能増強効果には代謝型ATP受容体が関与することが判明した(PNAS 2001)。このATPとTRPV1 の機能連関はTRPV1 欠損マウスを用いて個体レベルで証明され、$P2Y_2$受容体が関与することが判明した(J Neurosci 2003)。PKCによるTRPV1 の直接のリン酸化を証明し、PKCεによるリン酸化の基質となる2つのセリン残基を同定した(JBC 2002)。疼痛発生に関与するブラジキニンもB2 受容体活性化を介してTRPV1 機能を制御していることが分かった(J Neurophysiol 2002)。炎症に関与するとされるProteinase Activated Receptor 2 (PAR2)もその活性化の下流でPKCによってTRPV1 をリン酸化してTRPV1 活性の増強を引き起こすことが明らかとなり、個体レベルでもTRPV1 とPAR2 の機能連関が証明された(J Neurosci 2003)。TRPV1 はリン酸化によってその活性化温度閾値が本来の侵害性熱刺激温度閾値の 43 度から体温以下に下がることが明らかになっており、体温でTRPV1 が活性化して疼痛発生につながることになる。このGqタイプ代謝型受容体とイオンチャネル型受容体TRPV1 の機能連関は全く新しい炎症性疼痛の発生機序として注目されている。（図1）

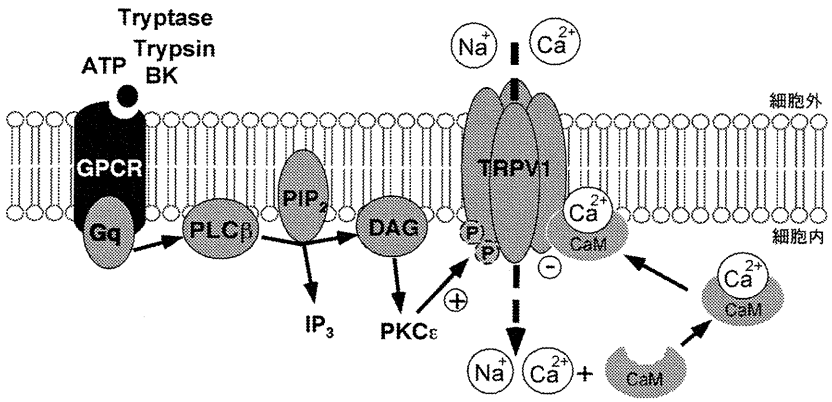


図1. カプサイシン受容体 TRPV1 の機能制御機構
Gqタンパク質共役型受容体(GPCR: G protein-coupled receptor)にリガンドが結合するとphospholipase Cβ (PLCβ) が活性化される。PLCβ は phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) を diacylglycerol (DAG) と inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)に分解する。DAGはPKCを活性化する。PKCはTRPV1 をリン酸化することによって活性増強を引き起こす。一方、流入したCa^{2+}は、calmodulin (CaM)と複合体を形成し、TRPV1 に結合することによって不活性化を引き起こす。+; 活性化、—; 抑制

(3) TRPV1 脱感作機構の解析

発痛物質カプサイシンが逆説的に鎮痛薬として使われている。その細胞レベルでのメカニズムの1つは、細胞外Ca^{2+}依存性の電流減少(脱感作)である。TRPV1 がCa^{2+}依存性にCa^{2+}結合タンパク質calmodulinが結合することを明らかにし、結合部位をTRPV1 C末の 35 残基まで絞り込んだ。この 35 残基を欠失させた変異体では細胞外Ca^{2+}依存性の電流減少がほとんど起こらず、Ca^{2+}/calmodulin複合体のこの部位への結合が細胞外Ca^{2+}依存性の脱感作に強く関与することが示唆された(PNAS 2003)。(図1)

(4) 新規温度受容体の探索

TRPV1 は、痛み刺激受容体であるとともに初めて分子実体が明らかになった温度受容体である。低浸透圧で活性化することが知られている TRPV4 が温かな温度(35 度以上)で活性化する新たな温度受容体であることを発見した。TRPV4 は感覚神経には発現が少なく、表皮ケラチノサイトや体温中枢である視床下部にその発現が確認され、体温調節にも関与することが推定された(J Neurosci 2002)。従って、TRP スパーファミリーに属する6つの温度受容体が存在することになる。(図2)最近、7つ目の温度感受性 TRP チャネルを発見した(論文投稿中)。

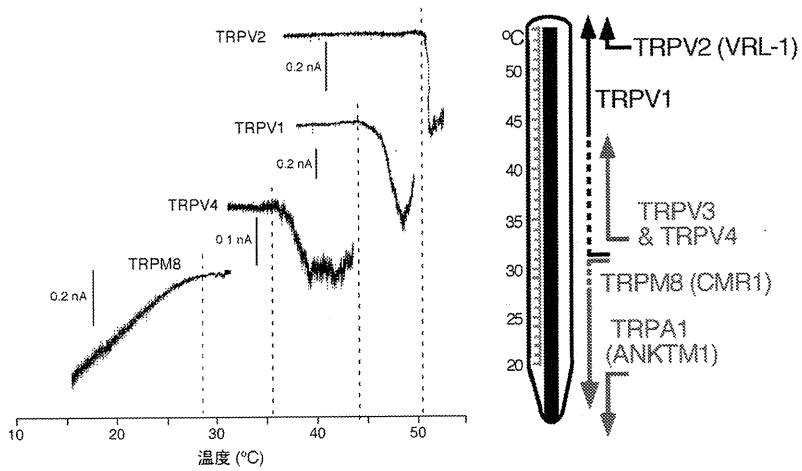


図2. 4つの温度受容体チャネル電流の温度依存曲線(左)と知られている温度受容体のカバーする温度(右)
左:保持電位−60 mV での全細胞電流。下向きが活性化して細胞内に流入する内向き電流を示す。点線は活性化温度閾値を示す。カプサイシン受容体 TRPV1 は約 43 度以上、TRPV2 は約 51 度以上、TRPV4 は約 36 度以上、TRPM8 は約 28 度以下で活性化する。
右:冷から熱の温度刺激を感知する6つの TRP ファミリーメンバー温度受容体を示す。TRPV1 の低温側、TRPM8 の高温側の点線は、受容体の機能制御によって活性化温度閾値が変化しうることを示す。

共同研究

1. Dr. Caterina(ジョンズホプキンス大学)「TRPV4 の温度感受性の解析」
   TRPV4 が約 35 度を温度閾値とする新たな温度受容体であることを明らかにした(J Neurosci 2002)。
2. Dr. Roufogalis(シドニー大学)「カプサイシン受容体 TRPV1 の脱感作後の再感作の分子機構の解析」
   再感作に PKC によるリン酸化が関与することを明らかにした(Cell Calcium 2004)。
3. 成宮周教授、杉本幸彦助教授(京都大学)「プロスタグランジンと TRPV1 の機能連関の解析」
   プロスタグランジンE_2がEP_1およびIP受容体活性化を介してTRPV1 活性を制御することを明らかにした(論文投稿中)。
4. 中村靖夫助手(秋田大学)「TRPV1 の膀胱における機能の検討」
   TRPV1 欠損マウスを用いて膀胱機能を解析し、野生型と比較し、TRPV1 の膀胱における役割を検討している。
5. 久保伸夫助教授(関西医科大学)「気道における TRPV1 の機能の検討」
   TRPV1 欠損マウスに種々の気道刺激を行い、TRPV1 の気道における機能を検討している。
6. 米田俊之教授(大阪大学)「骨転移性疼痛発生の分子メカニズム」
   マウス大腿骨に腫瘍を移植して骨腫瘍による疼痛を TRPV1 欠損マウスと野生型マウスで比較検討している。

A02-14

AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスの分子機構

研究代表者:竹居孝二、岡山大学・大学院医歯学総合研究科

特定領域「神経回路」参加年度:平成13年度

研究成果の要旨

1. エンドサイトーシスの分子機構解析のための in vitro 実験系を確立した。
2. 神経内分泌細胞を用いて AMPA 型受容体のエンドサイトーシスを解析した

研究成果

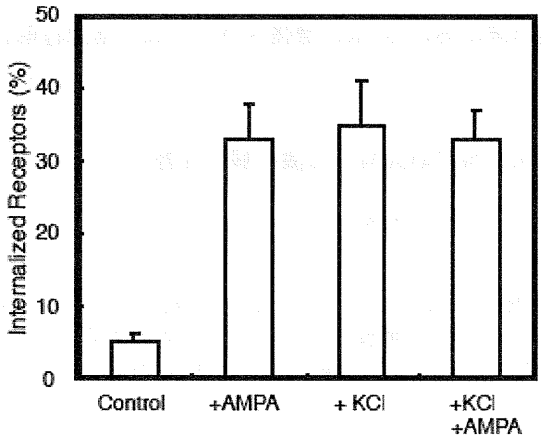
エンドサイトーシスによる小胞形成を *in vitro* で再現する実験系を確立した。人工脂質膜(リポソーム)を膜成分として、ATP および GTP 存在下に細胞質と反応させることにより、大型(直径＞1μm)のリポソームから小胞(直径＜200nm＞が多数形成され、形成された小胞の大きさ、数、相対的質量を動的光拡散法により定量化した。

AMPA 受容体のエンドサイトーシスの機構、動態を調べるため、神経内分泌細胞である膵島β細胞(MIN6)を用いた。MIN6 における AMPA 受容体とエンドサイトーシス機能タンパク dynamin、amphiphysin の発現を確認した。次にβ細胞表面タンパクをビオチン化した後 AMPA 刺激し、細胞表面のビオチンを不活性化後、細胞を融解、免疫沈降した。これにより AMPA 受容体の細胞内取込みを明らかにした。

GluR2/3 を機能的に発現する膵β細胞株 MIN6-m9 細胞を用いて AMPA 型受容体のエンドサイトーシスを解析した。細胞表面の膜タンパクを NHS-SS-biotin でラベルした後、グルタミン酸もしくは AMPA で刺激した。細胞表面の活性化 biotin をグルタチオンにより不活性化した後、細胞を融解、細胞内に取込まれた biotin 化タンパクをアビジンビーズで沈降し、ウエスタンブロッティングした。これにより AMPA 型受容体のエンドサイトーシスが検出され、このエンドサイトーシスは競合的アンタゴニストによって、阻害された。

AMPA 受容体は、グルタミン酸刺激により細胞外ナトリウムを細胞内に流入させ、膜脱分極を誘発する。脱分極刺激のみでも AMPA 受容体のエンドサイトーシスが起こるのかどうかを上記の方法により調べた結果、30mM KCl による脱分極刺激によって AMPA 受容体はエンドサイトーシスされた。さらに、脱分極刺激後に細胞膜に残る AMPA 受容体の量を biotin ラベルにより調べると、刺激前に比べ明らかに減少していた。

以上より、AMPA 受容体のエンドサイトーシスには脱分極刺激が重要であることが判明した。



GluR2のエンドサイトーシスへの脱分極の関与

NHS-SS-biotinで標識したMIN6 m9細胞をKCl (50 mM)或いは、KCl+AMPAで刺激し、GluR2のエンドサイトーシスを図3と同様に定量した。GluR2のエンドサイトーシスは、脱分極刺激のみでも起こり、それは、AMPA刺激を同時に与えた場合でも増強されなかった。

共同研究

Pietro De Camilli, Department of Cell Biology, Howard Hughes Medical Institute, Yale University

研究内容と成果:エンドサイトーシスの分子機構の解明。De Camilli研究室で確立されたエンドサイトーシスタンパクのノックアウトマウスを、われわれの in vitro 解析系に用いて、タンパクの機能解析を行った。

A02-15

表題（研究課題） 海馬シナプス前終末におけるPKC増強メカニズムの素過程解析

研究代表者名 八尾　寛

所属 東北大学・院・生命科学研究科・脳機能解析分野

特定領域「神経回路」参加年度 平成１３年度～平成１４年度

研究成果の要旨

Ca^{2+}感受性蛍光デキストラン法を開発し，海馬スライスにおける苔状線維シナプス前終末において，Nタイプ，P/Qタイプ，Rタイプ，Lタイプの４種類のCa^{2+}チャネルサブタイプを同定し，シナプス前終末における機能を比較した．サブタイプの分布は終末ごとに大きなばらつきを示した．

研究成果

海馬歯状回顆粒細胞の軸索（苔状線維, mossy fiber, MF）がCA3 領域透明層に投射し，CA3 錐体細胞の尖頭樹状突起基部に形成する大型のアンパサンシナプスは，海馬における主要な情報の流れを担っている．MFシナプスにおいては，C-キナーゼ(PKC)依存的に伝達物質放出が促進されるシナプス前性の可塑性がある．Honda et al. (2000)は，MFシナプス前終末におけるPKC活性化が，(1) 活動電位にともなう終末内Ca^{2+}濃度上昇；(2) Ca^{2+}流入以後の開口放出機序の２つのメカニズムを強化することを示した．しかし，PKCのCa^{2+}チャネルに対する作用については，未解決の問題が残されている．また，シナプス前終末には，一般に複数のCa^{2+}チャネルサブタイプが発現しており，それぞれが異なる機能を担っていることが示唆されている．したがって，PKCの作用機序を素過程レベルで解析するにあたり，MFシナプス前終末に発現しているCa^{2+}チャネルサブタイプを同定し，それぞれの担っている機能を明らかにすることが前提になる．海馬CA3 領域において，MFは，大型のアンパサンシナプスを形成するだけでなく，GABA性インターニューロンに小型のアンパサンシナプスとフィロポディア様シナプスを形成しており，これら３種類のシナプス前終末は，形態的に識別される（Acsady et al., 1998）．本研究は，シナプス前終末のCa^{2+}濃度測定法，開口放出の定量化などの方法を駆使して，形態的に同定された大型のアンパサンMFシナプス前終末に発現するCa^{2+}チャネルサブタイプを同定し，それぞれの担っている機能を明らかにすることを目的とした．

Ca^{2+}チャネルサブタイプ特異的なアンタゴニストを用いて，形態的に同定された大型のアンパサンMFシナプス前終末に発現するサブタイプの分類を試みた．その結果，Nタイプ（$Ca_v2.2$），P/Qタイプ（$Ca_v2.1$），Lタイプ($Ca_v1.2/1.3$)，Rタイプ($Ca_v2.3$)の少なくとも 4 種類のカルシウムチャネルサブタイプが発現していた．伝達物質放出量とシナプス前終末におけるCa^{2+}流入量(ΔCa)の間には，経験的に $Release \propto (\Delta Ca)^m$ の関係が成立する（図 1A）．サブタイプ特異的なトキシンの抑制効果から求めたm値は，それぞれ，4.5（Nタイプ），3.6（P/Qタイプ），1.3（Rタイプ）であった（図 1B）．すなわち，NタイプとP/Qタイプが速い伝達物質放出と強く連関しているのに対し，Rタイプは，連関していないことが示唆された．個々の大型のアンパサンMFシナプス前終末におけるサブタイプのチャネル発現比率がシナプス前終末ごとに大きく異なっていることを新たに見出した．発現比率の変動は，NタイプおよびRタイプでとくに顕著に認められた．

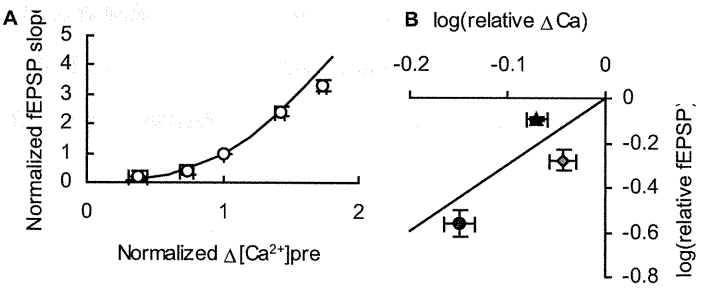


図 1　MFシナプス前終末Ca^{2+}チャネルサブタイプの伝達物質放出連関．
A, $[Ca^{2+}]_o$の変化に対するfEPSPとCa^{2+}流入の相対的な関係(m = 2.5).
B, トキシン抑制後の相対値（◆: CgTx-GVIA, ●: AgTx-IVA, ▲: SNX-482）. 実線は, m = 2.5 の傾き.

共同研究

3.8.1 共同研究の相手

小柳義夫　（京都大学ウィルス研究所）
岡田広司　（東北大学・院・医学系研究科）
柳川右千夫　（群馬大学・院・医学研究科）
小幡邦彦　（理化学研究所）
Mobarakeh, JI　（東北大学・院・医学系研究科）
阪上洋行　（東北大学・院・医学系研究科）
明石 馨　（新潟大学脳研究所）
崎村建司　（新潟大学脳研究所）
平林敬浩　（生理学研究所）
宮崎純一　（大阪大学・院・医学系研究科）
仲井邦彦　（東北大学・院・医学系研究科）
佐藤 洋　（東北大学・院・医学系研究科）

3.8.2 共同研究内容（表題程度）と成果（簡潔に）

海馬スライス培養系における新生ニューロンの回路形成
　レトロウィルスベクターEGFP 発現系により新生ニューロンを同定した.
GAD67-EGFP ノックインマウスにおけるインターニューロンの同定
　EGFP が GABA 性インターニューロン特異的に発現されることを確認した.
コンディショナルエクスプレッション法によるシナプトフルオリンの部位特異的発現系の構築
　部位特異的な発現に成功した.
空間学習にともなう海馬ネットワークの可塑性
　モリス水迷路学習により苔状線維シナプス構築が変化した.

A02-16

表題:線虫 *C.elegans* をモデル動物としたシナプス局在制御機構の解析

研究代表者名:久本直毅

所属:名古屋大学大学院理学研究科

特定領域「神経回路」参加年度:平成13年度—平成14年度

研究成果の要旨

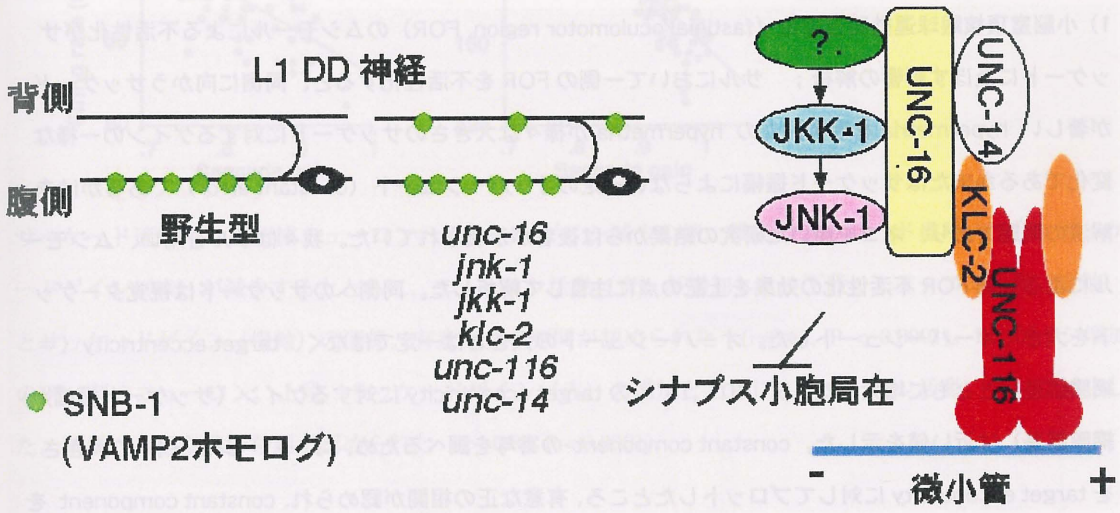
線虫 *C.elegans* を用いて、JKK-1 MAPKK と JNK-1 MAPK からなるキナーゼカスケードが、足場タンパク質 UNC-16, UNC-14 およびキネシンとともにシナプス小胞の軸索特異的局在を制御することを見いだした。

研究成果

シナプスの可塑性の研究は、培養細胞系や脳を用いた研究から、さまざまな因子が関与することが明らかになっているが、機能的なシナプスの維持やその位置的変化の制御に関与する因子については今だ知見が少なく、不明の点が多い。線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下 *C.elegans*)では、運動神経のひとつである DD ニューロンにおいて、そのシナプスの局在が成長段階に応じて変化することが知られており、L1 幼虫期には、DD ニューロンの機能的なシナプスは腹部に存在するが、L2 幼虫期以降は背部にその局在を変える。この変化は、シナプス小胞の局在をシナプトブレビン(SNB-1)-GFP で可視化することにより *in vivo* で容易に観察できる。したがって、*C.elegans* をモデル動物として、SNB-1-GFP を指標に機能的なシナプスの局在制御機構の研究を行うことは非常に有効であると考えられる。

我々は Y.Jin 博士との共同研究により、シナプス小胞の局在が L1 幼虫期の DD ニューロンにおいて本来存在する腹側だけでなく背側にも局在化するようになる変異体として同定した unc-16 の原因遺伝子が、ほ乳動物の JSAP/JIP3 のホモログをコードしていることを見いだした。JSAP/JIP3 は、ほ乳動物細胞において JNK 型の MAP キナーゼカスケードの構成因子である MLK MAP キナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)、MKK4/7 MAP キナーゼキナーゼ(MAPKK)および JNK MAP キナーゼとそれぞれ結合することにより、MAP キナーゼカスケードのシグナル伝達を助ける足場として機能する。線虫では、JNK のホモログとして JNK-1 が、その活性化因子として働く MAPKK として JKK-1 と SEK-1 が単離されている。これらの遺伝子産物と UNC-16 との関係について培養細胞を用いて調べたところ、これらの因子はいずれも UNC-16 と結合した。また、*jnk-1* 変異体および *jkk-1 sek-1* 二重変異体では、共に L1 幼虫期の DD ニューロンでシナプスの局在制御機構が異常であった。さらに、酵母 two-hybrid 法を用いて UNC-16 と結合する因子をスクリーニングしたところ、キネシン軽鎖をコードする KLC-2 と、UNC-51 プロテインキナーゼに結合して軸索ガイダンスを制御する因子 UNC-14 がそれぞれ単離された。これらの因子は、培養細胞を用いた生化学的解析でも結合が確認された。*klc-2* 変異体を作成したところ、

unc-16 変異体と同様にシナプスの局在制御の異常を示した。また同様の異常は、キネシン重鎖をコードする *unc-116* 変異体においても観察された。さらに、UNC-14 については、UNC-14 の UNC-16 結合部位を欠失した *unc-14(ju56)* 変異体において、軸索ガイダンスは正常であるが、シナプスの局在制御の異常を示すことが判明した。D 神経において UNC-14 の局在を観察したところ、野生型では dot 状に局在したが、キネシンおよび *unc-16* 変異体ではその局在が消失した。これらのことから、*C.elegans* ではキネシン/UNC-16/UNC-14/JNK カスケード複合体が、DD ニューロンにおける機能的なシナプスの局在制御に関わることが示唆された。(なお、UNC-14 関連の成果については、「神経回路」班員終了後の成果も一部含んでいる)。



共同研究

共同研究の相手:上記 UNC-16 の研究は米 UCSC の Y.Jin 博士らとの共同研究である。

共同研究の内容:上記研究成果のとおり

A02-17

研究課題：眼球運動制御に関わる脳幹-小脳神経回路の可塑的調節

研究代表者名：岩本義輝

所属：筑波大学・人間総合科学研究科・感性認知脳科学専攻

特定領域「神経回路」参加年度：平成１３－１４年度

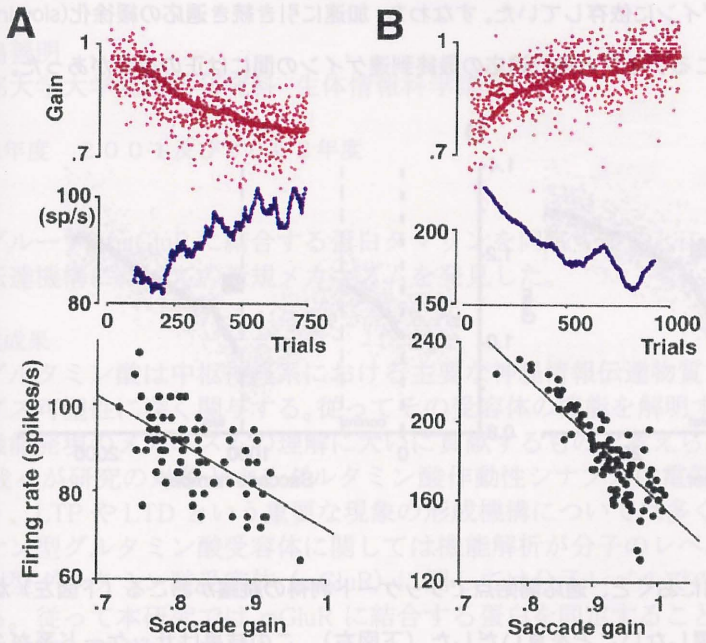
研究成果の要旨：

覚醒サルを用い、サッケード運動学習中に小脳室頂核ニューロン活動が変化すること、先行学習の記憶（学習履歴）によりサッケード運動学習が加速されることを明らかにした。

研究成果：

1）小脳室頂核眼球運動関連部位（fastigial oculomotor region, FOR）のムシモールによる不活性化がサッケードに及ぼす影響の解析；　サルにおいて一側の FOR を不活性化すると、同側に向かうサッケードが著しい hypermetria を示す。この hypermetria が様々な大きさのサッケードに対するゲインの一様な変化であるかまたはサッケード振幅によらない一定のオーバーシュート（constant error）であるかは未解決の問題であり、ネコを用いた研究の結果からは後者が示唆されていた。我々はサルを用い、ムシモールによる一側 FOR 不活性化の効果を上記の点に注目して解析した。同側へのサッケードは視覚ターゲットを大きくオーバーシュートした。オーバーシュートの大きさは一定ではなく、target eccentricity（＝網膜誤差）とともに増大した。5°,10°,15°　の target eccentricity に対するゲイン（サッケード振幅/網膜誤差）は近い値を示した。constant component の寄与を調べるため、オーバーシュート の大きさを target eccentricity に対してプロットしたところ、有意な正の相関が認められ、constant component を表す回帰直線の y 切片は非常に小さかった。以上の結果から、サル一側 FOR の不活性化による同側サッケードの hypermetria は 振幅によらない一様なゲイン変化であることが明らかになった。

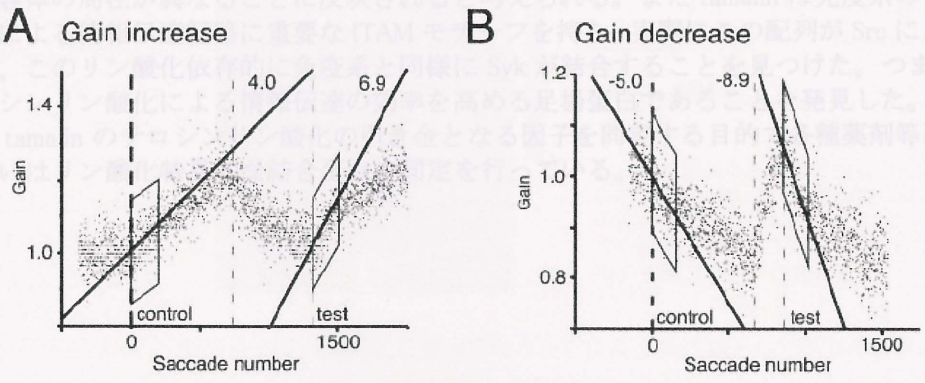
2）サッケード適応に伴う FOR バーストニューロン活動変化：　FOR の不活性化実験の結果から、室頂核ニューロンのサッケードに関連したバースト活動は同側へ向かうサッケードの振幅を小さくすると考えられた。従って、適応に室頂核が関与するならば、同側の室頂核バースト活動はゲイン減少の際に増加し、ゲイン増加で減少することが予想された。この予想を実験的に検証した。室頂核バーストニューロンについて、適応前後の活動を比較したところ、ゲイン減少に対応してバースト活動の増加が、ゲイン増加に対応してバースト活動の減少が認められた。適応と関連した活動変化は、サッケード開始時点の約 30 ミリ秒前から約 10 ミリ秒後の期間で認められた。適応中のゲインとニューロン活動は同様の経過を示し、両者には有意な負の相関があった（下図参照）。以上の結果は、小脳室頂核の活動変化とサッケードゲインの変化の因果関係を示唆する。



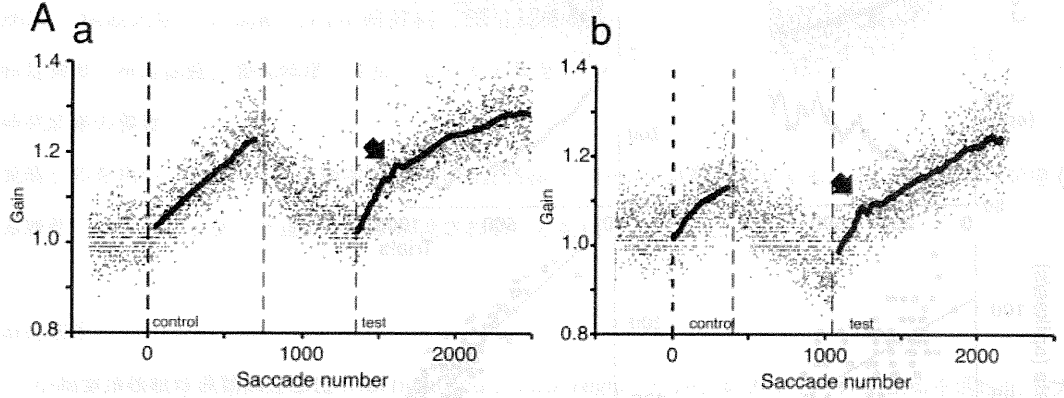
サッケード適応中の室頂核ニューロンの活動。A ゲイン減少の例。横軸はサッケード番号。上段：サッケードゲイン（赤）が減少するとともに、ニューロン活動（青）が増加した。下段：ニューロン活動（縦軸）とサッケードゲイン（横軸）の関係。有意な負の相関が認められた　(r=0.62, P < 0.0001)。B　ゲイン増加の例。別のニューロン。上段：サッケードゲイン（赤）の増加とともに、ニューロン活動（青）が減少した。下段：有意な負の相関が認められた　(r =0.83, P < 0.0001)。

3）学習履歴によるサッケード適応の加速

学習履歴が次の運動学習に及ぼす効果は、瞬目反射条件付けにおいて詳しく調べられ、条件付け獲得後それを消去し再び条件付けを獲得させると、再獲得は最初の獲得より速くおこることが知られている。これは先行学習の履歴が消去後も保存されることを示す。サッケード運動学習においては学習履歴の効果を調べた研究はこれまでなかった。本研究では新たな適応課題を用い、サッケード適応を繰り返すと２度目の適応が速くおこることを明らかにした（下図）。



適応の加速は先行適応の最終到達ゲインに依存していた。すなわち、加速に引き続き適応の緩徐化(slowing、下図矢印)が認められ、緩徐化がおこるゲインと先行適応の最終到達ゲインの間には正の相関があった。



さらに２度目の適応前に動物を暗闇におくと、適応開始点でサッケード利得の跳躍がおこる（下図左）が、視覚誤差がない条件では利得は跳躍しないことを見いだした（下図右）。この結果はサッケード系が２つの利得状態を持ち、状況依存的に利得を切り替え得ることを示唆する。

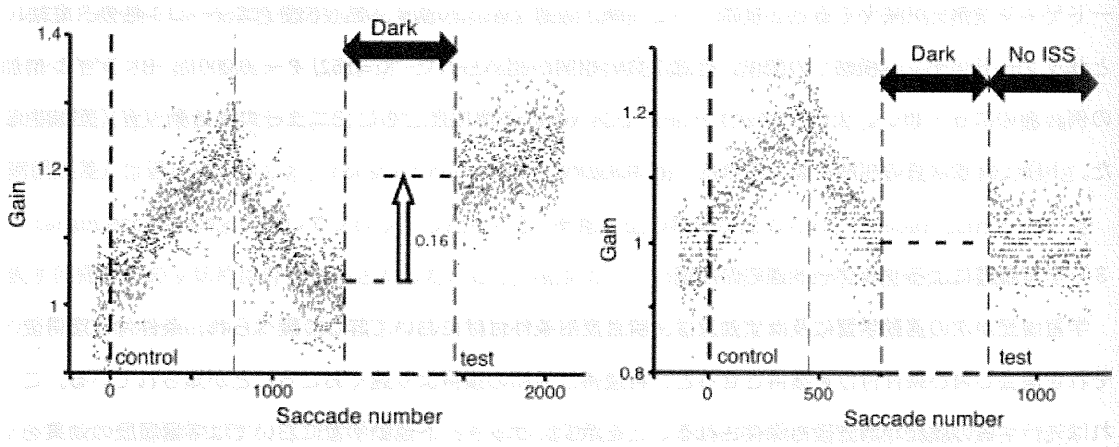


図. 左：適応再開時に利得跳躍、　　右：誤差がないと利得は跳躍しない.

A02-18

シナプス前代謝型グルタミン酸受容体の機能解析

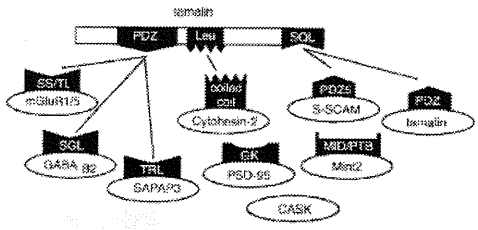
中嶋善明
京都大学大学院医学研究科　生体情報科学講座

参加年度　２００１及び２００２年度

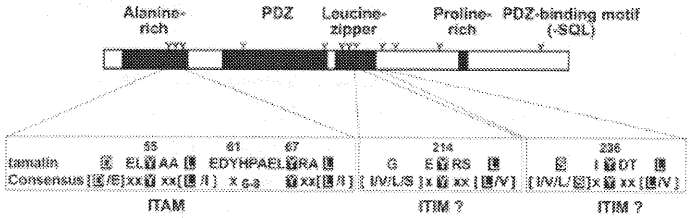
要旨
グループ１mGluRに結合する蛋白タマリンを同定することにより、受容体の輸送、局在及び情報伝達機構についての新規メカニズムを発見した。

研究成果
グルタミン酸は中枢神経系における主要な神経情報伝達物質であり、学習や記憶の形成等のシナプス可塑性に深く関与する。従ってその受容体の機能を解明することは神経回路の成熟と特異的機能発現のメカニズムの理解に大いに貢献するものと考えられる。
我々が研究の対象とするグルタミン酸作動性シナプスは電気生理学的に広く解析が行われており、LTPやLTDという重要な現象の形成機構については多くの報告がなされている。近年、イオン型グルタミン酸受容体に関しては機能解析が分子のレベルで詳細に行われつつある。一方、代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）に関しては分子レベルでの機能解析は緒についたところである。従って本研究ではmGluRに結合する蛋白を同定することによる受容体の分子レベルでの機能解析を行うことにした。
結果
１　酵母ハイブリッド法を用いてmGluR結合蛋白を同定しtamalinと名付けた。
２　tamalinは394アミノ酸からなりそのPDZ domainを介してmGluR1及び5のC末端部分と結合する。
３　tamalinは低分子量G蛋白Arfに対するGEFであるcytohesinとも結合する。
４　mGluR1及び５、tamalinとcytohesinは３量体を形成する。
５　Arfが細胞内輸送に深く関わることに一致してtamalinはmGluR1の膜表面への、mGluR５の神経突起への発現量を増加させた。
その後の展開
我々はmGluR1及び5に結合する蛋白tamalinを同定し、tamalinがmGluR1及び5の輸送に関わることを見つけた。イオン型グルタミン酸受容体の機能にPDZ domainをもつ蛋白が深く関わることが報告されているが、mGluRの機能に関してもPDZ domainをもつtamalinが重要な関与をするものと考える。tamalinはPDZ domain以外にも蛋白相互作用に関わると考えられる領域をいくつか持つ。従ってイオン型グルタミン酸受容体と同様にmGluRも多数の蛋白から成る複合体を形成することにより受容体の輸送局在及び情報伝達機構が制御されると予想した。そこで複合体形成の中心的な分子がtamalinであると考え、tamalin結合蛋白の同定を進めtamalinがシナプス後膜の足場蛋白及び輸送に関わる蛋白と結合することを見つけた。しかしながらmGluRを含む複合体形成様式はNMDA受容体とは異なるものであり、このことがmGluR1及び5とNMDA受容体の局在が異なることに反映されると考えられる。またtamalinは免疫系のチロシンリン酸化による情報伝達経路に重要なITAMモチーフを持ち、実際にこの配列がSrcによりリン酸化され、このリン酸化依存的に免疫系と同様にSykが結合することを見つけた。つまりtamalinはチロシンリン酸化による情報伝達の効率を高める足場蛋白であることを発見した。現在、脳におけるtamalinのチロシンリン酸化の引き金となる因子を同定する目的で各種薬剤等による刺激、あるいはリン酸化特異的な結合蛋白の同定を行っている。

タマリンを中心とする複合体



タマリンによるチロシンリン酸化情報伝達系



研究課題　　小脳プルキンエ細胞樹状突起におけるカルシウムシグナリングの解析
研究代表者名　　井上 貴文
所属　　東京大学医科学研究所脳神経発生・分化分野

特定領域「神経回路」参加年度　　平成13年度ー平成16年度

研究成果の要旨

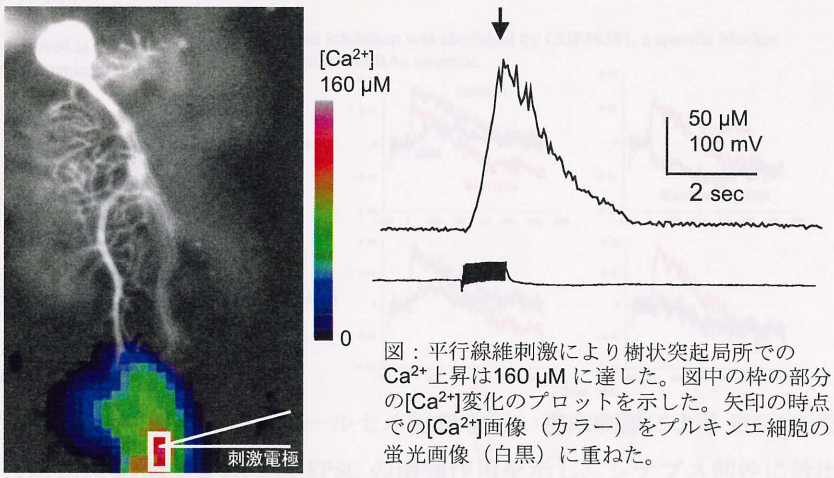
小脳プルキンエ細胞樹状突起においてカルシウム流入機構は平行線維入力により局所的に非常に大きなカルシウム上昇をもたらすことを見いだした。カルシウム放出機構は小脳皮質の発達時期に亢進しておりシナプス可塑性を制御していることを見いだした。

研究成果

細胞内カルシウム放出チャンネルである1型イノシトール3リン酸受容体(IP3R1)は小脳プルキンエ細胞に非常に豊富に発現しており、ERからのカルシウム放出の主要な機能を担っている。細胞内カルシウム濃度の増加は、プルキンエ細胞におけるシナプス可塑性のモデルである長期抑圧現象(LTD)に必須であることが知られていたが、豊富に発現しているIP3Rの機能がLTDに関与しているか否かは不明であった。IP3R1の機能を探るため、IP3R1の機能を特異的に阻害するモノクローナル抗体と、IP3R1遺伝子のノックアウトマウスを用いて、LTD実験を行ったところ、IP3R1はLTDに必須であることがわかった。この知見は、シナプス刺激によりプルキンエ細胞樹状突起に存在するIP3R が機能すること、すなわちカルシウムを放出することのはじめての証拠であった。

1型小脳脊髄変性症(SCA1)のモデルマウスではプルキンエ細胞は生後2ヶ月以降変性、脱落していく。SCA1モデルマウス・プルキンエ細胞においてIP3R1の発現量は著しく減少していたが、シナプス刺激によるカルシウム放出はむしろ活性化していることを見いだした。すなわち、平行線維刺激によるカルシウム放出が野生型プルキンエ細胞よりもより起こりやすくなっているのみならず、野生型では見られない、登上線維刺激によるカルシウム放出も観察された(Inoue et al., 2001)。

これらの知見は、プルキンエ細胞樹状突起でのカルシウム動態はきわめて複雑な時間・空間的特性をもっており、細胞内メカニズムを厳密かつ精妙に制御していることを示唆している。本研究は、このシナプス入力により駆動されるカルシウム動員機構を詳細にとらえたうえで、機能タンパク質の修飾・局在変化を様々なカルシウム変動のパターンにより誘導し解析することを目的とした。この第一段階として、プルキンエ細胞樹状突起のカルシウム動態を平行線維を刺激し、細胞外からの流入・細胞内放出機構それぞれの関与の度合いを詳細に検討した。50Hz、3ー8発の刺激で、既に報告されている様にカルシウムの流入と細胞内からの放出が二相性に見られた。刺激回数を増加するとカルシウム上昇は一相性となり、持続時間は刺激回数に比例し、50発刺激ではカルシウム上昇は6ー8秒程度持続し、カルシウム濃度は200μMにまで上昇していることがFuraptraをカルシウム指示薬として用いることによりわかった(図)。IP3受容体欠損マウスおよびIP3受容体阻害剤2-APBを用いた結果、この大きなカルシウム上昇はほとんどがカルシウム流入によるもの



図：平行線維刺激により樹状突起局所でのCa^{2+}上昇は160 μMに達した。図中の枠の部分の[Ca^{2+}]変化のプロットを示した。矢印の時点での[Ca^{2+}]画像（カラー）をプルキンエ細胞の蛍光画像（白黒）に重ねた。

であり、更にAMPA型グルタミン酸受容体阻害剤やカルシウムチャンネル阻害剤を用いナトリウム濃度とカルシウム濃度変化を比較した結果、P型カルシウムチャンネルを通ったカルシウムがその本態であることが明らかとなった。プルキンエ細胞樹状突起に発現しているAMPA受容体はカルシウムを通さないタイプであることが分子生物学的研究から示唆されているが、ここでは機能的に示すことができた(Kuruma et al, 2003)。カルシウムとナトリウム濃度を同時に測定することにより両者の樹状突起での挙動の明瞭な相違が測定できた。これは両イオンの細胞質の緩衝能、細胞質からの汲み出し、拡散速度の違いによるものであり、データの解析からこれらのパラメータを推し量ることが可能となる。シナプス入力によって、細胞内カルシウム濃度が通常考えられている細胞内カルシウム濃度の範囲から大きく逸脱した200μMにまで達するということは、カルシウムの細胞毒性を考える上で、興味ある知見である。

更に小脳皮質の生後発達に伴うカルシウム放出活性の変化を検討した。50Hz・数回の平行線維刺激によってシナプス後部の刺激部位周辺に限局した二相性のカルシウム濃度上昇が見られ、その2番目のピークはカルシウム放出による。このカルシウム放出活性の生後発達に伴う変化を調べるため、異なる日齢のマウスを用いて二相性カルシウム上昇を観察した。細胞外からのカルシウム流入による1番目のカルシウム上昇とカルシウム放出による2番目のカルシウム上昇の大きさを比較すると、2ー3週齢のマウスのプルキンエ細胞では カルシウム放出が相対的に大きく、4週齢以降では逆にカルシウム流入の方が大きかった。すなわち平行線維刺激で誘起されるプルキンエ細胞樹状突起のカルシウム動態は2週前後の幼弱なマウスにおいてはカルシウム放出がカルシウム流入よりも支配的であり、成長に伴ってそれが逆転することが示された(後藤ら, 2002)。この生後発達に伴うカルシウム放出能の変化の役割を探ることを目的として、2週齢と4週齢のマウスを用いて平行線維・プルキンエ細胞シナプスのLTDの起こりやすさに差異がないか否かを検討した。2週齢では平行線維刺激のみでLTDを起こす場合が見られ、同時に測定したカルシウム放出活性の大きさとLTDの度合いに相関が見られた。同じ刺激方法では4週齢ではLTDは見られなかった(投稿準備中)。以上の結果から、小脳皮質が発達・成熟をする2週齢前後では、シナプス結合の可塑的変化や成熟化にシナプス後部のカルシウム放出能が重要な役割を果たしているという結論に至った。

期間中に平行して行った研究成果として、海馬初代培養神経細胞の樹状突起において、①ERが網状のものだけでなく粒状に存在し、樹状突起中を高速に移動していること(Bannai et al, 2004)、②網状ERの膜上のIP3R1の側方拡散はアクチン骨格により特異的に制御されていること(Fukatsu et al., 2004)、③IP3R1のmRNAがRNA顆粒の一部として運搬されていること(Bannai et al, in press) を見いだした。これらの成果と、本研究による成果を踏まえて、プルキンエ細胞樹状突起中におけるIP3R1のmRNAとタンパクおよびERそのものの動態と、種々のシナプス入力パターンに応じて変化するカルシウムパターンとの関連を今後の研究課題としたい。

コリン性入力による視床－皮質投射制御：バレル特異的な興奮－抑制パターンの形成

木村文隆

大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻神経統合機能分野

特定領域「神経回路」参加年度　平成１３年度～平成１６年度

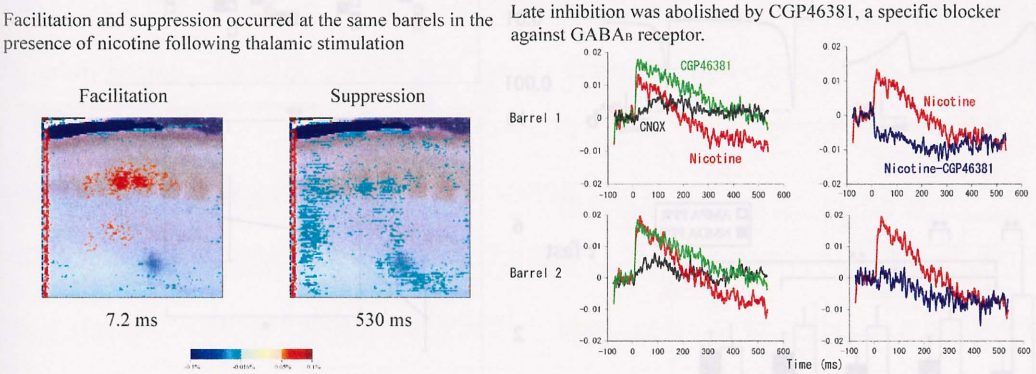
研究成果の要旨

視床刺激に対して、ニコチン投与は皮質内の広範な促通効果と4層にバレル構造状の抑制領域を惹起した。この抑制はGABA細胞への視床終末に作用したものと思われる。視床終末の放出確率は高、低2種あり臨界期のサイレントシナプスへは高いものがシナプスしている可能性があった。

研究成果

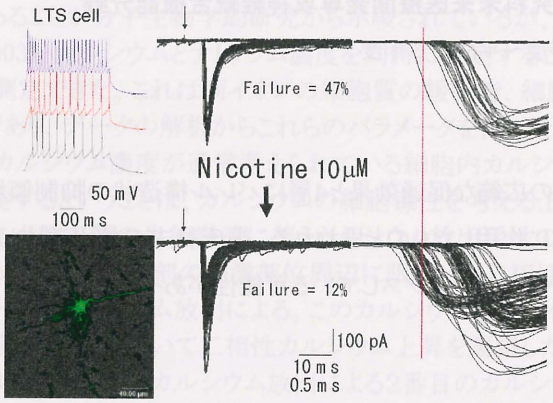
大脳皮質には前脳基底部大細胞核群よりアセチルコリン(ACh)含有線維の密な投射があるが、皮質内神経回路が ACh によりどのような制御を受けるか、その詳細は未だ不明確な点が多い。我々は、これまで皮質細胞間シナプス反応がムスカリニック受容体（mACh-R）を介して抑制されることを示してきた。本実験では、視床－皮質シナプス反応に対するニコチニック受容体（nACh-R）の作用に注目した。

視床－皮質スライス標本を作製し、視床刺激による皮質内興奮伝播を膜電位感受性色素を用いた光学的計測法により観察し、ニコチン投与の効果を検討した。その結果ニコチン存在下では、１）４層内での興奮が増強されること、２）４層の興奮は、２／３層、５層にも増強されて伝播していくこと、３）４層内では、興奮に引き続き逆に抑制される領域が出現すること、が明らかとなった。４層内での興奮、及び抑制を受ける領域とバレル構造との関連を調べる目的で、実験終了後にcytochrome oxydaseによりバレル構造を染色すると、興奮、抑制ともにもっとも強い領域はどちらもバレル構造と一致していることがわかった（下図左）。またこの抑制は、$GABA_B$受容体アンタゴニストであるCGP46381 により消失することから（下図右）、GABA細胞を介するものであることが明らかとなった。



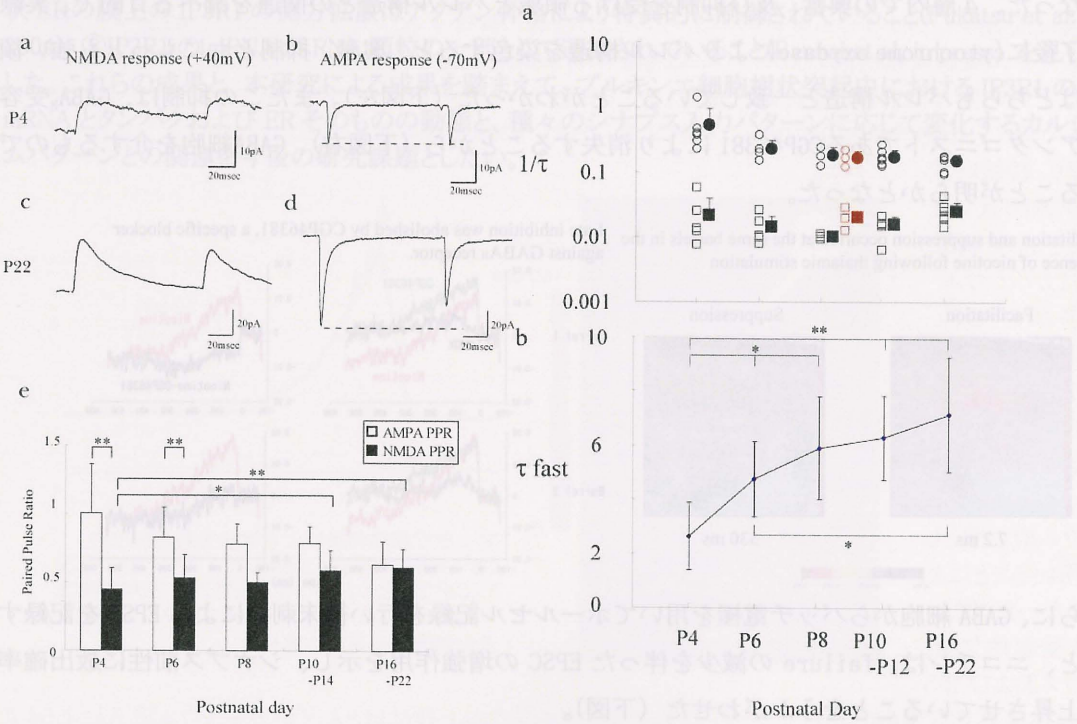
さらに、GABA 細胞からパッチ電極を用いてホールセル記録を行い視床刺激による EPSC を記録すると、ニコチンは、failure の減少を伴った EPSC の増強作用を示し、シナプス前性に放出確率を上昇させていることをうかがわせた（下図）。

Nicotine facilitated thalamic input to GABAergic neurons in layer IV presynaptically.

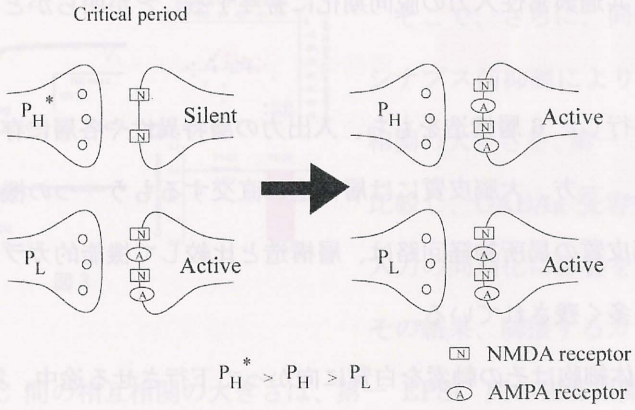


ニコチンの放出確率に対する上昇効果をさらに詳細に検討するためには、視床－皮質シナプスの放出確率を理解することが必要と思われたので、次にこの点の検討を試みた。

放出確率を検討する目的で、２発刺激による反応（Paired Pulse Ratio, PPR）を AMP-AEPSC について調べると、発達に伴い PPR が減少し、放出確率は発達に伴い変化することが示唆された。ところが、興味深いことに、NMDA-EPSC の PPR は発達に伴って逆に上昇し（すなわち放出確率の減少）、AMPA-EPSC と反対の発達変化を示した（下図左）。NMDA-EPSC による放出確率の変化を MK-801 による刺激依存性減衰率から推定すると、放出確率は発達に伴い減少し、PPR による結果を支持した。また、MK-801 法では高、低２種の放出確率の神経終末が存在することが示唆されたが、高い方のみが出生初期にさらに高い値を示すことが同時に明らかとなった（下図右）。



AMPA-PPRとNMDA-PPRの乖離（PPR乖離）がなぜおきたかについては、この乖離を示したのが臨界期とほぼ一致すること、さらに視床－皮質シナプスの臨界期にはシナプス後性のサイレントシナプスが存在することなどから、サイレントシナプスが関与していることが考えられる。この場合、AMPA-EPSCとNMDA-EPSCは異なるシナプスでの反応を反映している可能性が考えられる。そこで、PPR乖離とサイレントシナプス含有率との関連を調べると、両者に有意な相関が認められた。このことから、臨界期に特異的に存在すると考えられる、より高い放出確率を持つ終末（P_H*）は、完全ではなくともより選択的にサイレントシナプスと結合している可能性が示唆された（下図）。



共同研究

共同研究の相手：国立精神神経センター、中村俊　部長

共同研究の内容：マウスバレル領域の視床－皮質投射において、臨界期のサイレントシナプスの活性化にはBDNFが必要であることを示し、PNAS誌に発表した（２００３年）。

表題（研究課題）　大脳皮質機能円柱内及び機能円柱間局所回路の動作機構

研究代表者名　姜　英男

所属　大阪大学大学院歯学研究科 高次脳口腔機能学講座 口腔生理学教室

特定領域「神経回路」参加年度　平成１３年度～平成１６年度

研究成果の要旨

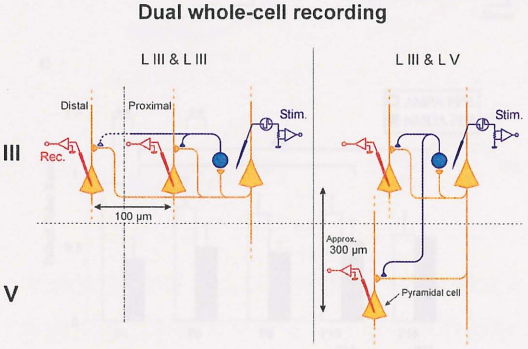
大脳皮質において、$GABA_B$シナプス前抑制系は、機能円柱内で垂直方向に広がることが明らとなった。この$GABA_B$シナプス前抑制系は、同一機能円柱内では共通興奮性入力の同期化に寄与するが、隣接する機能円柱間では、むしろ、共通興奮性入力の脱同期化に寄与することが明らかとなった。

研究成果

大脳皮質は、脳表面に平行した 6 層構造をもち、入出力の層特異性や各層に存在するニューロンの膜特性が明らかにされてきた。一方、大脳皮質には層構造に直交するもう一つの機能単位、機能的カラムが存在する。しかし、大脳皮質の局所神経回路は、層構造と比較して機能的カラム構造の詳細な神経回路機構は未だに不明な点が多く残されている。

大脳皮質第 II/III 層の錐体細胞はその軸索を白質に向かって下行させる途中、第 II/III 層及び V 層の両方において軸索終末領域を形成し、それぞれの層の錐体細胞とシナプス結合することが知られており、皮質内局所神経回路の基本構造を形成する。こうした興奮性シナプス結合を抑制性入力が調節することにより、カラム内或いはカラム間の神経細胞活動の同期化や非同期化が実現されていると考えられるが、その機構の詳細については不明である。

そこで、こうした抑制性入力による調節機構を明らかにするため、ラット大脳皮質バレル野スライス標本を用いて、隣接するカラムの二つの第III層錐体細胞から（図 2)、或いは、同一カラム内の第III層及びV層錐体細胞から（図 3) dual whole-cell patch clamp 記録を行い、第III層に paired pulse (200 ms 間隔）の微小刺激を与えて、第一及び第二の paired EPSCs を誘発した（図 1)。第二EPSCは$GABA_B$受容体活性化によるシナプス前抑制の結果、その振幅が小さくなる（paired pulse depression)。



Paired pulse depression of layer III-evoked EPSCs

図 1

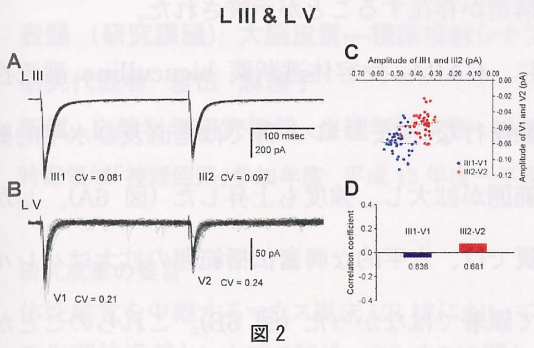


図 2

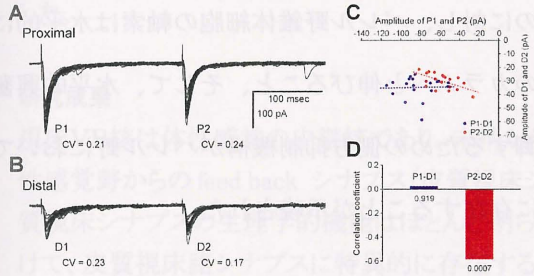


図 3

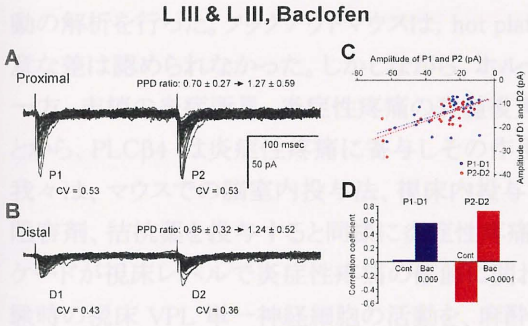


図 4

同一カラム内の第III層及びV層錐体細胞の同時記録では、両方の細胞において同程度の paired pulse depression が同様に認められたが（図 2)、隣接するカラムの第III層錐体細胞からの同時記録では遠位の細胞における paired pulse depression は顕著ではなく（図 3)、$GABA_B$ 受容体を活性化する抑制系がカラムに沿って垂直方向に広がっている可能性が示唆された。

そこで、さらに、同時記録された二つの細胞間で、シナプス前抑制により抑制された第二EPSC間の相互相関の大きさを、第一 EPSC 間の相互相関の大きさと比較し、$GABA_B$ 受容体を活性化する抑制系が興奮性入力の同期化に影響を与えるか否かについて調べた。その結果、隣接するカラムの二つの第III層錐体細胞間では、第二 EPSC 間の相互相関の大きさは、第一 EPSC 間の相互相関の大きさに比較して、より小さいか、或いは、負の値となった（図 3D)。一方、同一カラム内の第III層錐体細胞及び第V層錐体細胞では、第一 及び第二 EPSC の相互相関の大きさの間には有意な差は認められなかった（図 2D)。以上のことから、カラムに沿って垂直方向にひろがる $GABA_B$ 抑制系が興奮性入力のカラム間の脱同期化に関与する可能性が示唆された（図 3)。実際、baclofen を投与して、$GABA_B$ 作用を無差別に引き起こすと、隣接するカラムの二つの第III層錐体細胞において誘発される第一 及び第二 EPSC 同士の相関は共に正となり、脱同期化作用が消失した（図 4)。

こうした GABA 作用による水平抑制及び垂直抑制の空間的広がりをさらに明らかにするため、カラム構造が明確なバレル野と不明確な味覚野とで、膜電位感受性色素（RH414）を用いた実験を行なった。

第 IV 層を金属電極で電気刺激すると、バレル野においては、先ず興奮が第 II/III 層に垂直伝播し、そこから隣接するカラムへと水平的に広く伝播したのに対し（図 5A)、島皮質では垂直伝播は認められたものの、水平的な伝播は顕著ではなかった（図 5B)。先ず、このことから、島皮質においても機能的カ

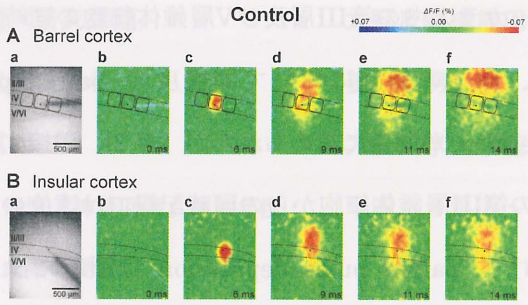


図 5

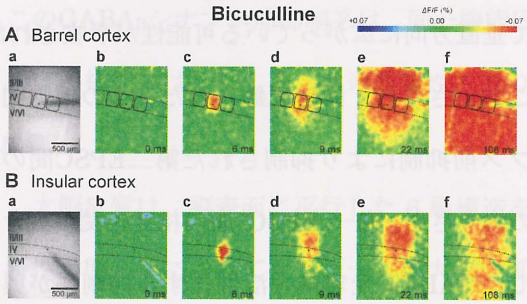


図 6

ラム構造が存在することが示唆された。

次に、$GABA_A$ 受容体遮断薬 bicuculline 灌流投与下で実験を行なうと、バレル野では垂直及び水平的興奮伝播の範囲が拡大し、強度も上昇した（図 6A)。しかし、島皮質では、水平的な興奮伝播範囲の拡大はバレル野に比して顕著ではなかった（図 6B)。これらのことから、島皮質錐体細胞の軸索の水平的広がりは限定したものであるのに対し、バレル野錐体細胞の軸索は水平的に広く周囲のカラムへと伸びること、そして、水平的興奮伝播を制御するための側方抑制機構がバレル野においてより顕著に存在することが示唆された。

A02-22

表題 （研究課題）: 大脳皮質—視床投射シナプスの可塑性と分子機構の研究

研究代表者: 宮田 麻理子

所属: 自然科学研究機構 生理学研究所 神経シグナル部門

特定領域「神経回路」参加年度 平成 13 年度－平成 16 年度

研究成果の要旨

体性感覚を中継するマウス視床 VB 核において第 1 次体性感覚野からの feedback 投射（皮質視床路）の生理的意義とシナプス特性、またそこに関わる分子について調べた。皮質視床路シナプスを介した代謝型グルタミン酸受容体 1 型（mGluR1）シグナルが炎症性疼痛の coding に重要であることを明らかにした。

研究成果

視床VB核は体性感覚の中継核であり、末梢からの上行性入力（内側毛帯シナプス）と同時に第 1 次体性感覚野からの feed back シナプス（皮質視床シナプス）が多数入力する（図 1 参照）。しかしながら、皮質視床シナプスの生理学的機能はほとんど明らかになっていない。研究代表者は、平成 13-14 年にかけて、皮質視床路シナプスに特異的に存在する mGluR1-PLCβ4 カスケードに着目し、これらが、視床において炎症性疼痛の知覚に重要であることを見出し、皮質視床シナプスの生理学的意義を明らかにした。平成 15 年度からは詳細な皮質視床シナプス特性の解析に着手し、その特性を規定する分子として、カイニン酸受容体の存在を見出した。以下にその概説をする。

1） 炎症性疼痛における視床VB核の mGluR1 カスケードの役割

マウス視床VB核において、唯一のアイソホームである phospholipase Cβ4（PLCβ4）は、代謝型グルタミン酸受容体1型（mGluR1）などの三量体 G 蛋白の Gq/11 結合型受容体に共役し、IP3, PKC を駆動し，シナプス機能に重要な働きをする酵素である。研究代表者らは、この分子が体性感覚情報とりわけ体性痛覚の情報処理に寄与するか否かを調べるため、PLCβ4 の遺伝子欠損マウスを用いて、疼痛関連行動の解析を行った。ノックアウトマウスは，hot plate test, tail flick test などの急性痛は野生体と比べて有意な差は認められなかった。しかしながら、ホルマリンテストによる炎症疼痛行動は有意に減弱していた。一方、末梢の炎症所見、炎症性疼痛の脊髄後角で神経活動性を反映する c-FOS 発現には差がないことから、PLCβ4 は炎症性疼痛に寄与しその作用部位は、脊髄より上位であることが示唆された。さらに我々は、マウスでの脳室内投与法、視床内投与法を確立し、野生体に PLC またその上流に mGluR1 の阻害剤、拮抗薬を投与すると同様に炎症性疼痛が減弱した。これらの結果から、mGluR1-PLCβ4 のカスケードが視床レベルで炎症性疼痛の修飾に関わっていることが明らかになった。さらに、炎症性疼痛試験時の視床 VPL 単一神経細胞の活動を、麻酔下の PLCβ4 ノックアウトマウス、野生マウスで細胞外記録法を用いて調べた。野生マウスでは疼痛関連行動の時間経過と良く一致して神経活動が見られるのに対し、ノックアウトでは炎症性疼痛に伴う神経活動が有意に減弱していた。これらの結果から、mGluR1-PLCβ4 カスケードが視床 VB の神経活動性を調節することによって、炎症性疼痛をコードしていることが明らかになった。VB 核の mGluR1 は大脳皮質から視床への feedback シナプスの後膜側のみに存在するため、炎症性疼痛の coding に皮質視床シナプスが寄与していることが示唆された。この成果は平成 15 年の J. Neurosci.に発表した。

2） 皮質視床シナプスと内側毛帯シナプスのシナプス特性の解析

平成 13 年から 14 年までの研究で痛覚情報処理に皮質視床シナプスが関わっていることを明らかにし

た。感覚情報は末梢から情報は内側毛帯シナプスを介して VB 核投射細胞に入力する。一方、皮質からは大量のフィードバックシナプス(皮質視床シナプス)が入力している。感覚情報は内側毛帯シナプスの入力が皮質視床シナプス入力と連合して情報処理をしていると考えられる。しかしながら、これらシナプスの特性を詳細に解析した報告はなく、不明な点が多い。研究代表者は平成 14 年度後半から視床VB核投射神経細胞のシナプス解析に着手し、視床水平断標本において、内側毛帯シナプスと皮質視床シナプスの EPSCs を同一のVB投射細胞から記録する方法を確立した。マウス VPL 核投射細胞において、皮質視床シナプスの EPSCs に、NMDA 受容体、AMPA 受容体に加えてカイニン酸受容体成分が存在することを見出した。一方、末梢からの感覚情報を受ける内側毛帯シナプス EPSC には、カイニン酸受容体成分は存在しなかった。カイニン酸受容体は、AMPA 受容体に比べて decay time constant が遅いため、高頻度のシナプス入力で内向き電流は加算され、非常に大きな興奮性を標的細胞に与えると考えられる。さらに、マウス体性感覚野の5－6層の神経細胞では、カイニン酸受容体の GluR5－7遺伝子が有意に高く発現しており、皮質視床シナプスの前終末にも、カイニン酸受容体が存在すると推定する。従って、皮質視床シナプスの前後シナプスに存在するカイニン酸受容体が、入力頻度を感知して、精巧に感覚情報のゲインをコントロールしている可能性がある。一部の成果は、北米神経科学会等に発表し、現在論文にまとめているところである。今後は、皮質視床シナプスのカイニン酸受容体によるシナプス入力のゲインコントロールの研究を進める予定であり、また、炎症性疼痛時にこのようなシナプス入力がどのように変化するのか、mGluR1 の寄与を含めて研究する予定である。

最後に、本研究助成によって皮質視床シナプスの感覚情報処理における役割を、分子レベルからシステムレベルにわたって実験系を確立することができた。本研究助成に感謝すると共に、今後の研究の発展に一層努力したい。

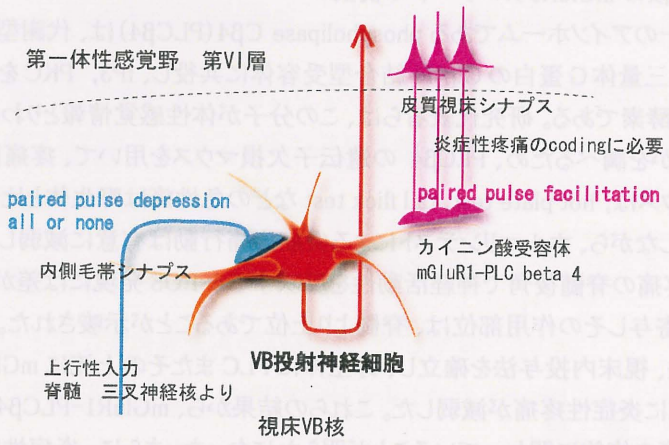


図1. 視床VB投射神経細胞への主な興奮性入力

共同研究

渡辺雅彦教授(北海道大学・医学部・機能形態)体性感覚経路におけるPLCβアイソフォームの分布

視床VB核ではPLCβ4が唯一のアイソフォームであることが明らかになった。

A02-23

チャネル変異による神経回路機能の長期的変化

井本 敬二

自然科学研究機構 生理学研究所

特定領域「神経回路」参加年度 平成13年度～平成16年度

研究成果の要旨

小脳失調症等の神経症状を示すカルシウムチャネル変異マウスを材料とし、主に電気生理学的手法を用いてシナプス伝達を中心に神経症状発症や代償のメカニズムに関する検討を行った。神経症状の多様性は、異なる神経細胞が異なる分子サブタイプ依存性・代償作用等を示すことによると考えられる。

研究成果

電位依存性カルシウムチャネルは、広く神経系に発現しているばかりではなく、Ca^{2+}流入による脱分極に加えて様々な細胞内反応を引き起こすことから、チャネル変異は脳神経系に複雑な変化を引き起こす。特に$Ca_V2.1$（P/Q型）チャネルは神経系の主要なカルシウムチャネルであり、主要なサブユニットである$\alpha_1 2.1$サブユニットの遺伝子変異は、ヒトのみならずマウスでも神経症状を引き起こす。疾患マウスとして、tottering （*tg*）、leaner （tg^{la}）、 rolling （tg^{rol}）[9]、rocker （tg^{rkr}）などが知られており、これらマウスの共通の神経症状は小脳失調症であるが、その程度には差があり、tottering、rockerでは 3～4 週令になって発症するのに対して、leanerでは生後早期より発症する。rollingはその中間的な症状を示す。またtottering、leanerではヒトの欠神発作に類似のてんかん症状を示すことが知られている。これらの報告より、カルシウムチャネル$\alpha_1 2.1$サブユニット遺伝子という単一遺伝子の異常によりある程度幅のある疾患が引き起こされることがわかる。主要な問題点として次の項目があげられる。（1）$Ca_V2.1$チャネルは脳の主要なカルシウムチャネルであるのにかかわらず、多くの場合に小脳失調症のように、症状が比較的局所に限られている。（2） ヒトの疾患は優性遺伝を示すのに対して、マウスの疾患は劣性遺伝を示す。（3） 慢性進行性の症状を示す場合もあれば、てんかんのように突発性発作性の症状を示す場合もある。

チャネル機能の変化

tottering、leaner、rolling、rockerの変異を導入したcDNAを発現させたところ、いずれもチャネル活性の低下が見られた。tottering ではチャネル開閉のキネティックスには大きな変化を見ることは出来なかったが、leanerでは活性化および不活性化の電位感受性に異常が見られた。また急性単離小脳プルキンエ細胞で測定したチャネル活性は正常に比較して tottering、rollingでは 40%の低下、leanerの場合 60%の低下、rockerでは 20%の低下が見られ、症状の重篤度と相関を示した。Ca^{2+}流入の増加が変異マウスの神経細胞障害を引き起こす、と一部ではいまだに主張されているが、このような一致したデータから考えて、流入の減少が原因と考えるのが妥当である。

小脳の形態学的変化

ヒトのSCA6 では小脳の著明な萎縮が起きる事が知られているが、失調症マウスでの形態学的変化に関する報告は様々である。rockerマウスでは、プルキンエ細胞の樹状突起が”しだれやなぎ状”になることが報告されている。$Ca_V2_{\circ}1$チャネルノックアウトマウスでは登上線維の伸展の仕方が異なると

いう報告があるため、現在われわれは各変異マウスにおける登上線維の伸展の程度を形態学的に検討しているが、これまでに結果を得たrockerでは登上線維の伸展が制限されているという結果を得ている。

小脳のシナプス伝達の変化

いずれの変異マウスにおいても、失調症の発症に伴い小脳平行線維－プルキンエ細胞シナプス電流量の減少が観察される。このシナプス伝達の減少は、他の部位におけるシナプス伝達の減少などとあわせて考えて、シナプス終末のカルシウムチャネルの機能障害によるものであると考えられる。(平行線維の数が減少している可能性も残されており、現在検討中である。)

登上線維－プルキンエ細胞シナプスでは電流量の減少は軽度であるか、rollingの様に増加している場合もあった。この増加には、$Ca_V2.2$ チャネル成分の代償的な増加のみならず、シナプス後側であるプルキンエ細胞のAMPA受容体感受性の亢進を伴っていたが、rollingでは登上線維が比較的近位の樹状突起にシナプスがあることも大きく影響していると考えられる。

小脳の出力系であるプルキンエ細胞より小脳核への投射の機能的解析を行ったところ、変異マウスでは電気刺激で誘発される抑制性シナプス伝達は著明に減少していた。しかし自発的な微小抑制性シナプス後電流の解析からはプルキンエ細胞－小脳核神経細胞シナプスは、数、シナプス後側の機能に関してほぼ正常と考えられた。また形態学的な解析から、シナプス終末数は保たれていると考えられることから、このシナプスにおけるシナプス伝達の障害は、主に機能的なものであると考えられる(論文準備中)。

このように小脳失調症マウスでは、いろいろな部位におけるシナプスが、いろいろな程度で障害を受けている。それらの障害のうちでどれが最も神経症状の発症に関係しているかは、脳スライス標本での実験結果からだけでは理解し得ない。そのためわれわれは *in vivo* 計測のシステムを準備し、現在データを収集しつつある。今後、外部刺激に対する小脳神経細胞活動の応答を記録し、正常マウスと変異マウスで比較していく予定である。プルキンエ細胞だけでなく、特に小脳核神経細胞の活動に注目して観察を進めている。

海馬での変化

カルシウムチャネル変異マウスは、ホモの遺伝子型で神経症状を生じるが、ヘテロでは無症状であるとされてきた。しかしヘテロの tottering マウスでも軽度ながら水迷路学習障害が見られることから、海馬でのシナプス可塑性を検討した。ヘテロ tottering マウスでは、CA1→CA3 シナプスでは異常は認められなかったが、苔状線維→CA3 シナプスでは、シナプス伝達自体が低下しており、それに伴い短期・長期シナプス可塑性に異常があることが明らかとなった (論文準備中)。

現時点での理解と推測

本研究の成果および他の研究結果から、カルシウムチャネル変異マウスの神経症状の発現過程 (図1) とそれに対する正常維持機能 (図 2) に関して、いくつかの推察をすることが可能である。カルシウムチャネルに異常がある場合、それらが引き起こす異常は、いくつかのカテゴリーに分類される。(1) シナプス伝達の障害、(2)　細胞死、(3) 発達の障害 (？)、である。

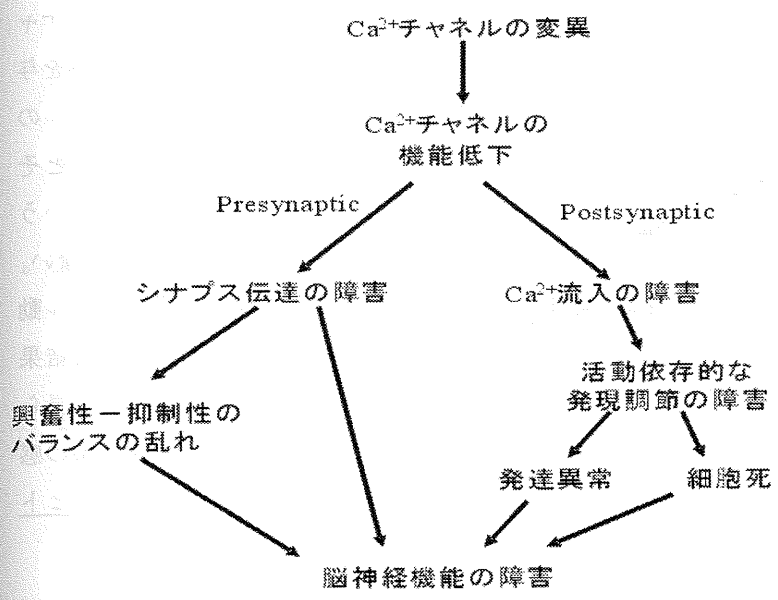


図1

脳には複数の種類のカルシウムチャネルが発現しているが、何れかがノックアウトされても、一応神経回路は形成され、生存可能である。$Ca_V2.1$～2.3のノックアウトマウスのうち、$Ca_V2.1$ のノックアウトがもっとも重篤である。カルシウムチャネルに障害が生きた場合シナプス伝達で予測されることは、シナプス伝達の外液Ca^{2+}依存性から推測することが出来る。小脳登上線維のシナプスのように、放出確率が高いシナプスではおそらくカルシウム濃度－放出曲線は飽和した状態になっていると予想される。従って多少ともカルシウムの流入が減少しても、大きな変化は及ぼさないであろう。一方、小脳平行線維のように放出確率が低く放出がカルシウム濃度の3～4乗に比例するなら、わずかのカルシウム流入の現象でも大きな影響を及ぼすであろう。言いかえるなら、Safety marginの高いシナプスは影響を受けにくいということになる。(元々のシナプス結合の強さ)

神経細胞には通常複数のタイプのカルシウムチャネルが発現している。確かに$Ca_V2.1$ と$Ca_V2.2$ は多くの面で異なった性質を示すが、多くの神経細胞にとっては、その差は比較的小さいのかもしれない。何れかのタイプのカルシウムチャネルに障害が起こっても、機能は保ち得るようになっているのではないであろうか。他のタイプのカルシウムチャネル発現が代償的に増加する場合もあり得るのであろう。しかしある種の神経細胞では、一定のタイプのカルシウムチャネルに対する依存性が高く、そのタイプのチャネルに異常が起きると障害が起きてくると考えられる。小脳プルキンエ細胞は$Ca_V2.1$ に対する依存性が高く、また上頚神経節では$Ca_V2.2$ に対する依存性が高いと考えられる。(代償作用の強弱)

これらのサブタイプ依存性は、おそらく発達過程に見られるサブタイプの変化に関係していると考えられる。実際多くの神経細胞では生後すぐは$Ca_V2.2$ が主要なカルシウムチャネルであり、成長に伴って$Ca_V2.1$ にスイッチしていくことが知られており、tottering での失調症発症が生後 2－3 週間である原因ではないかと考えられる。タイプのスイッチは遺伝的なプログラムによるのであろうが、そこで活動依存性がどの程度関与するのかは興味のあるところである。(発達との関係)

興奮性細胞と抑制性細胞のどちらでカルシウムチャネルのタイプ依存性が高いかは興味のあるところであるが、海馬の抑制性細胞で明確なサブタイプ依存性が報告されていることなどを考えると、抑制性神経細胞は比較的サブタイプ依存性が高いのではないかと推測される。抑制性神経細胞のネットワークは、局所神経回路の同期性興奮や周期性興奮の制御に大きな役割を果たすので、興奮性と抑制性のネットワークのバランスが崩れることにより、発作性の神経症状が出現するのではないかと推測される。(発作性症状の発現機序)

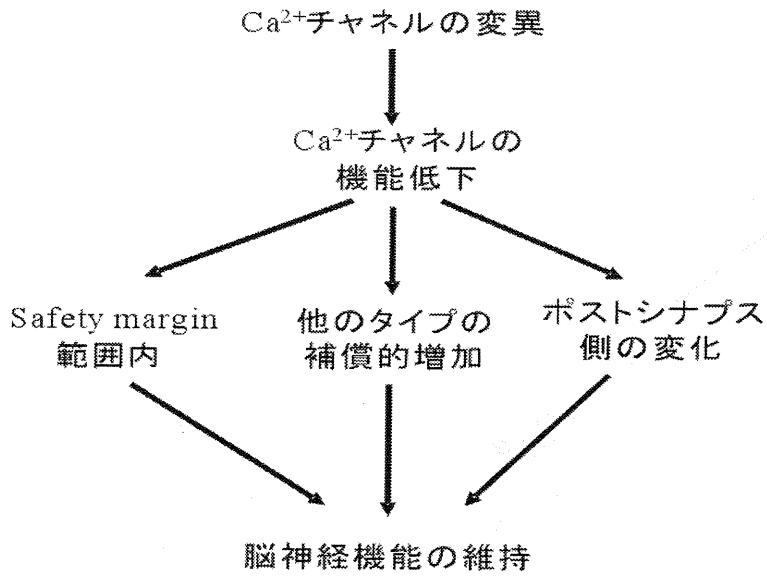


図2

また今回の系統的な研究で明らかとなった点の一つは、カルシウムチャネルの発現量は、神経機能に影響を与えるということである。ヘテロのtottering マウスでも、神経症状とそれに伴うシナプス変化があるということは、従来あまり知られていない。本結果は、ヒトの神経疾患とモデル動物の疾患を比較する上で重要な結果である。マウスでホモしか症状が見られないという場合、それは測定系の感度の低さによる可能性がある。(ヒトとマウスの違い)

A02-25

表題(研究課題)

学習の成立過程における大脳皮質ー大脳基底核連関の可塑的神経機構

研究代表者名

高田昌彦

所属

財団法人東京都医学研究機構　東京都神経科学総合研究所　統合生理研究部門

特定領域「神経回路」参加年度

平成 13 年度ー平成 16 年度

研究成果の要旨

経脳硬膜超音波ドプラー法を用いて脳の血行動態を直接モニターし、運動課題を遂行中のサルから賦活化された大脳皮質や大脳基底核、視床の領域を解剖学的に同定、その活動変化を経時的に観察する、新しい脳機能イメージング法の開発に成功した。

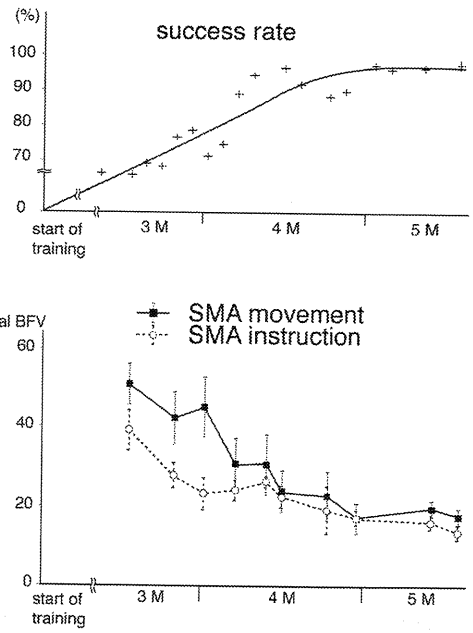
研究成果

前頭葉に分布する運動領野や前頭前野は、大脳基底核との間で大脳皮質ー大脳基底核ループを形成しており、このようなループ回路は運動制御だけでなく運動学習や認知行動のさまざまな局面に深く関与している。しかし、運動課題や認知課題の学習過程における大脳皮質や大脳基底核の活動変化を実際に調べた研究はこれまでほとんどない。また、従来の電気生理学的手法では、学習過程における神経活動の経時的変化を定量的に追跡することはきわめて困難である。本研究では、研究代表者らが最近開発した経脳硬膜超音波ドプラー法を用いて、超音波画像をとおしてモニターした脳血流、特に血流速度の変化を神経活動の変化として捉え、脳の機能的イメージングを行うことにより、学習の成立過程における大脳皮質ー大脳基底核連関の可塑的神経機構を明らかにすることを目的とした。その結果、研究代表者らは、経脳硬膜超音波ドプラー法を用いた脳機能イメージングの方法論を確立し、両手のボタン押し課題を実行中のサルで、前頭葉に分布するさまざまな運動領野の血行動態を描出するとともに、このような運動課題の学習過程における運動領野の活動変化を経時的に観察することに成功した。

実験では、ニホンザルに手がかり刺激に応じて片手もしくは両手の運動を弁別し、遅延期間後に実際に片手あるいは両手でボタン押しを行うような運動課題を訓練した。脳血流の計測には超音波画像診断装置(LOGIQ 700 MR EXPERT、GE 横河メディカルシステム)を使用し、ドプラー音として得られたデータを JTFA(joint-time frequency analysis)法により解析した。測定部位は、一次運動野、補足運動野、運動前野背側部および腹側部で、部位ごとに 50 回試行の加算を平均し、手がかり刺激提示前の

血流速度に対する増加率を算出した。その結果、(1)一次運動野では、片手課題で運動開始に関連した顕著な血流増加が反対側性にみとめられ、両手課題でも同様の血流増加が両半球でみとめられた。(2)補足運動野では、片手課題と両手課題のいずれでも、特に手がかり刺激と運動開始に関連した血流増加が反対側性、同側性、および両側性にみとめられた。(3)運動前野背側部では、片手課題で遅延期間と運動開始に対応した血流増加が反対側性にみとめられ、両手課題でも同様の血流増加が両半球でみとめられた。(4)運動前野腹側部では、片手課題で手がかり刺激と運動開始に対応した血流増加が反対側性にみとめられ、両手課題でも同様の血流増加が両半球でみとめられた。以上の結果は、これまでに報告された電気生理学的所見とよく一致しており、経脳硬膜超音波ドプラー法による脳機能イメージングが有効であることを示している。さらに、ボタン押し課題の学習過程における血流変化を解析した結果、補足運動野では、手がかり刺激と運動開始に関連した血流増加率が学習初期に比べて学習成立時にかなり減少していることが明らかになった(図参照)。すなわち、学習の初期段階では、運動に対応して血流増加を示す領域が一次運動野や補足運動野など運動領野の広い範囲に及ぶのに対し、学習の進行とともに、そのような領域が一次運動野に限局した。また、課題実行中にボタン押し課題を弁別課題から単純な繰り返し課題に変更すると、補足運動野における手がかり刺激や運動開始に関連した血流増加が減少もしくは消失した。これらの結果は、補足運動野が運動学習の成立過程に深く関与することを示唆している。

研究代表者らは、経脳硬膜超音波ドプラー法により描出された前頭断面の連続画像を三次元的に再構築し、課題に関連して活動する運動領野の分布を立体的に示すとともに、大脳皮質に比べて深部に位置するため、従来の方法では血行動態の描出が困難であった大脳基底核(特に、線条体)の機能的イメージングを実現することにも成功した。



A02-25

共同研究

相手:姜　英男(大阪大学)

内容:黒質ドーパミン細胞における電位依存性カルシウムチャネルの分布様式

成果:黒質ドーパミン細胞における電位依存性カルシウムチャネルの分布を免疫組織化学的に解析した結果、

Lタイプに相当するアルファ1Dチャネルが優位に存在することが明らかになった。

A02-26

脳海馬長期増強，維持の分子機構に関する研究

宮本英七
熊本大学医学部薬理学第一講座（教授），早稲田大学大学院理工学研究科（客員教授）

特定領域「神経回路」参加年度
平成 12 年度ー13 年度：班員
平成 14 年度ー16 年度：班友

研究成果の要旨
動物の学習，記憶のモデルと考えられている海馬 CA1 領域における長期増強誘導，維持の機構を明らかにすることに努めた．長期増強誘導には，CaMKII 活性化反応が強く関与していた．長期記憶のモデルである長期増強維持機構には，遺伝子発現の増強が必要であり，CaMKIV，MAP キナーゼ(MAPK)活性化反応が明らかになった．さらに遺伝子発現の増強がみられた。

研究成果

１． 研究の背景

ヒトを含めた動物の脳の構造・機能・発育が遺伝的制御を受けていることはいうまでもない．動物種によって脳の構造は大きな差を示している．脳の発達が直接遺伝子制御下にあるとともに，一方で外部からの感覚入力やシナプス活動に基づいて，脳が構造的・機能的に変化しうる可変性をもっていることも事実である．このような脳の可変性は，損傷を受けた後の脳の回復過程や発育時における大脳皮質ニューロンの物体の認識能，とりわけ，動物が学習・記憶能をもっていることなどでも確認することができる．このような脳の可変性は可塑性とよばれている．

脳の可塑性はいくつかのレベルで研究されている．動物を個体のまま(全動物)で研究するのが最もオーソドックスな方法である．しかし，全動物の研究では，適当な部位を剔出して分子機構を解析するのが困難であり，処理しやすいサンプルを得るには，単純な系や組織を用いることが必要である．そのための方法として，いくつかのモデルを作製し，作られたモデルを分析することで，機能を分子の面から明らかにする試みがなされている．個々のモデルは深く研究され，その機構が明らかにされつつある．

1973 年，Bliss と Lømo は家兎海馬歯状回を用いて巧妙に脳の可塑性を証明する実験をした．入力線維である貫通線維に刺激電極をおき，テタヌス性電気刺激を与えると，歯状回顆粒細胞での興奮性後シナプス電位(excitatory postsynaptic potential；EPSP)が高まり，この現象は長く持続することから，LTP と名づけられた．LTP が注目されたのは，学習・記憶の機構の基本モデルと考えられたことによる．記憶の成立が RNA やペプチドに蓄えられるのではなく，シナプス伝達効率の上昇によるとされた．概念の大きな転換が行われたことになる．

その後の研究では，海馬 CA1 領域を対象として多くの研究が進められてきた．また，実験的には *in vivo* の組織を用いるのではなく，海馬切片が使われ，EPSP の変化を切片で記録することが可能になった．方法の発展によって，微量のサンプルを用いた分子の同定，変化，酵素活性化反応を解析することが可能になった．

２． LTP 誘導

成熟ラット脳から海馬を剔出し，切片を作製した．CA1 領域にLTPを誘導し，電気生理学的に確認して微量組織を採取した．得られたサンプルを解析に用いた．CaMKII活性化反応が観察され，長期に持続していた．CaMKII活性化反応は自己リン酸化反応に基づいており，確かに，α，βサブユニット自己リン酸化反応が確認された．酵素活性化反応は，NMDAグルタミン酸受容体阻害薬(AP5)によって抑制

された．活性化CaMKIIの標的分子はAMPAグルタミン酸受容体であった．受容体のリン酸化反応による活性化反応によって，Ca^{2+}流入が増加し，LTPの持続することが明らかにされた．細胞内ではプロテインホスファターゼ2Aの活性抑制を介して，CaMKII活性化反応や基質反応の増強を持続させた．

3． LTP維持

短期記憶の形成には，酵素活性化反応(CaMKII活性化反応)，受容体(AMPA受容体)リン酸化反応による活性化反応によって持続的にCa^{2+}が流入し，LTP誘導が惹起される．長期記憶が形成されるには，誘導機構が作動するだけでは十分ではない．新しいシナプス回路が形成される必要があろう．実際，最近の報告によると，LTPが長時間持続する時にスパイン(棘)の結合面が大きくなり，さらにスパインの数の増加が観察されている．このことは，LTP維持に，遺伝子発現刺激，蛋白質合成の増強が前提となることを示すものである．

A．酵素活性化反応

LTP誘導時に，MAPK，CaMKIIが活性化された．MAPKはMAPKK(MEK)によってそれぞれ特定の部位であるスレオニン，チロシン残基がリン酸化され，CaMK IVはCaMKKによって特定のスレオニン残基がリン酸化され，活性化される．両酵素はプロテインホスファターゼによる脱リン酸化反応によって不活性化される．LTP誘導時に両酵素はかなり早い時間的経過で活性化され，不活性化された．その経過は類似しており，LTP誘導後3分で活性化反応は最大になり，10分程度で不活性化され，元のレベルに戻った．MEK阻害薬であるPD098059，U0126はMAPK活性化反応を抑制した．また，CaMKIV阻害薬であるカルミダゾリウム(CMZ)，KN62,KN93はCaMKIV活性化反応を抑制した．予想に反して，遺伝子発現に関与する酵素活性化反応は，LTP誘導時期にすでに始まっていた．このことは，誘導の初期にすでに始まり，維持機構の準備が早期に始まっていると考えるべきであろう．

B．CREB活性化反応

MAPK，CaMKIVの標的転写因子であるCREB(cAMP-response element binding protein)活性化反応をLTP時に調べた．両酵素活性化反応が長期増強後3分を最大として減少したのに対し，CREBリン酸化反応は，3分で有意に認められ，時間的経過とともに上昇した．CMZ，KN93は，CaMKIV，CREBリン酸化反応を阻害し，一方，U0126はMAPK，CREBリン酸化反応を阻害した．阻害薬の効果から，CREBリン酸化反応はCaMKIV，MAPKによって惹起されていることを示している．CREBはCaMKIVの直接の基質となり，MAPKはRSK2(ribosomal S6 kinase 2)活性化反応を介してCREBをリン酸化する．

LTP発現時にひき起こされるCREBリン酸化反応が，確かに遺伝子発現を刺激しているのか，c-Fos発現をマーカーとして調べた(図1)．LTP誘導後，30分，60分でc-Fos発現が有意に増加した．c-Fos発現はCaMKIV,MAPKK(MEK)それぞれの阻害薬であるCMZ,U0126によって抑制された．これらの結果は，CaMKIV，MAPK活性化反応がCREB活性化反応を刺激し，ついでc-Fos発現を増強するカスケードが作動したことを示している．

4． 考察と展望

海馬CA1領域におけるLTPは，前シナプスニューロンからのグルタミン酸放出によって，後シナプスニューロン膜に存在するNMDAグルタミン酸受容体が刺激されることで始まる(図2)．LTP誘導には，NMDA受容体を通して細胞外から流入したCa^{2+}がCaMKIIを活性化し，ついでCaMKIIはAMPAグルタミン酸受容体をリン酸化して活性化することで惹起される．一方，LTP維持は，数時間から数日にわたる長い時間的経過で成立しており，酵素，受容体の活性化反応による可逆的反応では十分でない．シナプス構成成分の生合成，シナプス回路の新生などの構造的な変化を伴うことが必要だと考えられる(図2)．本文で述べたとおり，遺伝子発現を刺激する反応のカスケードであるCaMKIV，MAPK活性化反応，CREB活性化反応，c-Fos発現刺激が作動している．

脳の可塑性はヒトや動物が外界に適応し，機能をより高めていく上での有効な生命活動である．遺伝的に決定された脳の構造に柔軟な対応策を生み出して行くものと考えることができる．学習・記憶のモデルと考えられる海馬の LTP に関する研究もさらに発展が期待される。

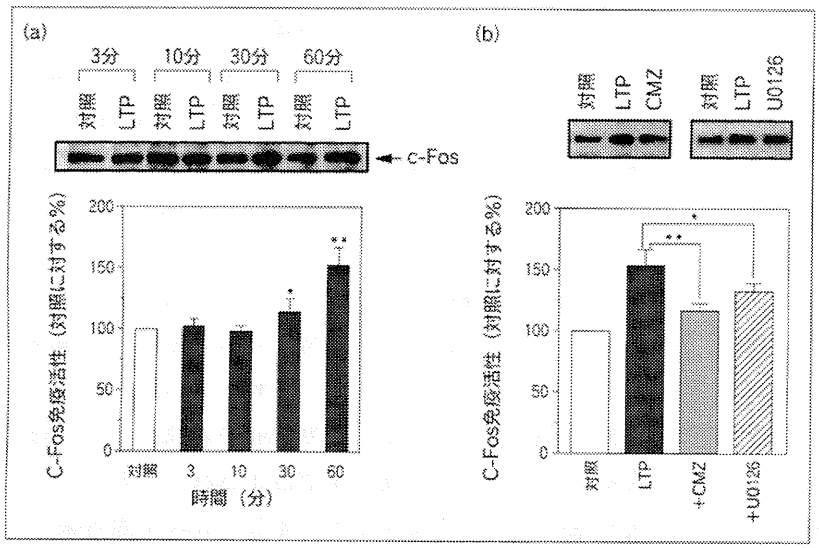


図1　LTP時のc-Fos発現増強
(a) c-Fos発現増強の経時的変化，(b) c-Fos発現に対するカルミダゾリウム（CMZ）とU0126の効果．（文献11より許可を得て転載）

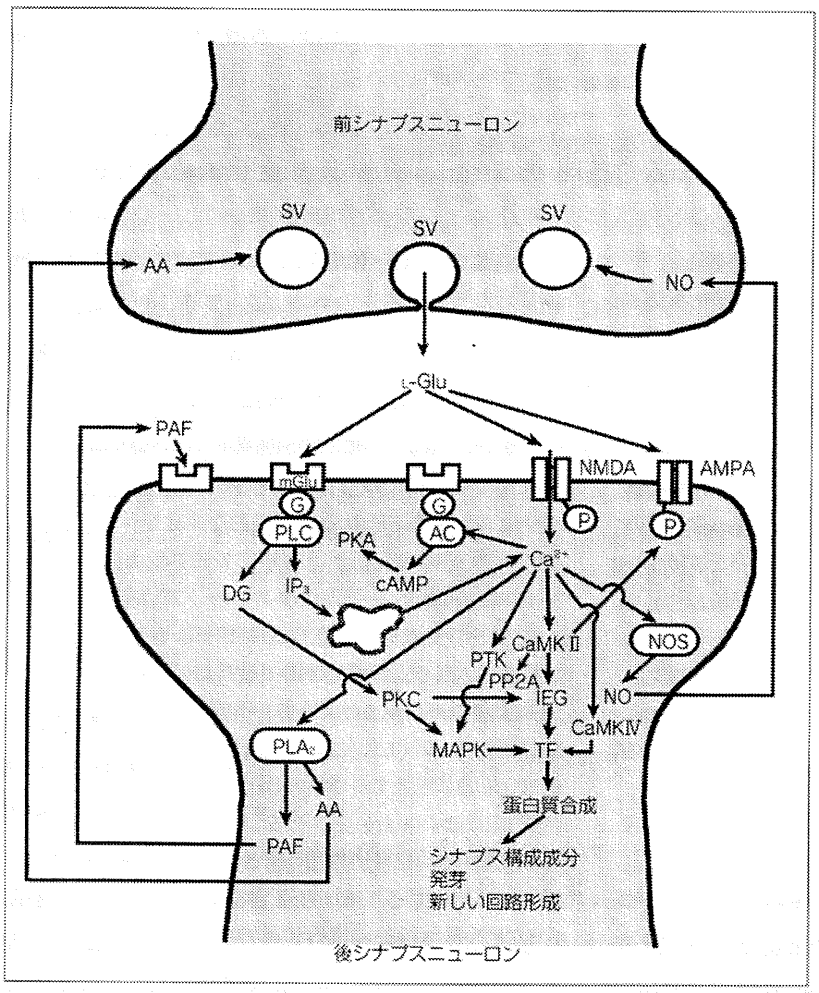


図2　LTP誘導と維持の分子機構
SV：シナプス小胞；AA：アラキドン酸，mGlu：代謝型グルタミン酸受容体，PLC：ホスホリパーゼC，AC：アデニル酸シクラーゼ，PTK：ホスホチロシンキナーゼ，NOS：NO合成酵素，IEG：前初期遺伝子，PP2A：プロテインホスファターゼ2A，DG：ジアシルグリセロール，IP_3：イノシトール1,4,5-三リン酸．

A02-27

表題（研究課題）：神経活動依存的小胞輸送に関わるシナプトタグミン４分子の機能解明

研究代表者名：福田 光則

所属：独立行政法人理化学研究所・福田独立主幹研究ユニット

特定領域「神経回路」参加年度：平成１２年度

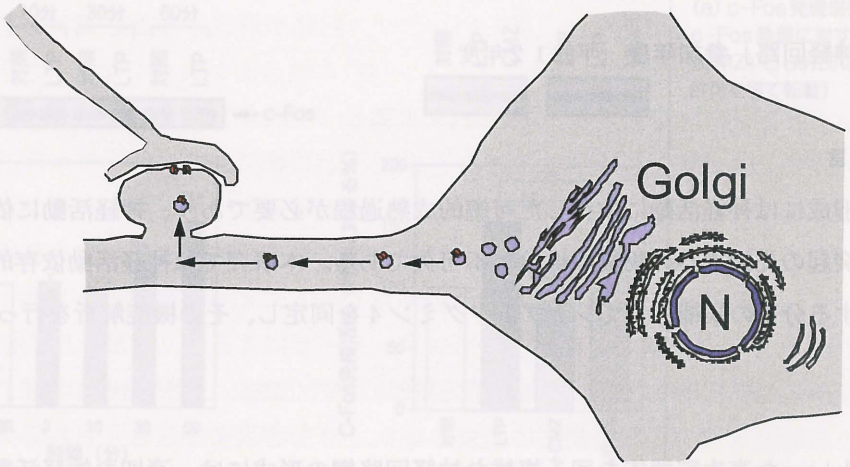
研究成果の要旨

神経回路網形成には神経活動に依存した可塑的成熟過程が必要であり、神経活動に依存した細胞体から神経突起の先端部への物質の供給が不可欠である。本研究では神経活動依存的な小胞輸送過程に関与する分子の候補としてシナプトタグミン４を同定し、その機能解析を行った。

研究成果

記憶・学習といった高次脳機能を司る複雑な神経回路網の形成には、適切な神経活動に依存した可塑的成熟過程が必要と考えられている。すなわち特定の入力のあった神経突起のみで何らかの質的・量的な変化が起こるはずである。本研究では神経活動に依存した神経突起の質的・量的変化を膜（小胞）輸送という観点から捕らえ、神経活動に依存した細胞体（ゴルジ体）から神経突起の先端部への新規小胞輸送過程（以下、"神経活動依存的小胞輸送(activity-dependent vesicle transport)"とする）が存在することを明らかにするとともに、この過程を制御する分子の候補として小胞輸送の制御に関わるシナプトタグミン 4 分子を同定することに成功した。これまでの解析から以下の知見を得ている。（１）マウス海馬においてシナプトタグミン４分子の発現は一過性で（生後 3 日から 13 日頃まで）シナプスが形成される時期とほぼ一致している。（２）シナプトタグミン 4 分子は海馬神経初代培養細胞でゴルジ体及び神経突起の先端に存在し、金コロイドを用いた免疫電顕によりシナプトタグミン４分子は神経突起内（axon 及び dendrite）の小胞あるいは小さなオルガネラ様の構造物に存在し、シナプス小胞には局在しないことが明らかとなった。（３）シナプトタグミン 4 分子のタンパク質量は膜脱分極刺激あるいはフォルスコリン刺激（外界のカルシウム濃度 にも依存）によりプロテインキナーゼ A 依存的に数倍にまで増加するとともに、ゴルジ体から神経突起先端方向への輸送が促進された（図参照）。（４）PC12 細胞をモデル系とした解析から、シナプトタグミン 4 分子を含む小胞がカルシウム依存的に開口放出を起こすためには神経成長因子（NGF）の刺激が不可欠であり、膜脱分極刺激（フォルスコリンなど）だけでは不十分であった。（５）シナプトタグミン４分子は神経細胞だけではなくアストロサイト（グリア細胞）にも豊富に存在し、アストロサイトからのグルタミン酸放出を制御することによりシナプス修飾作用を持つことが示唆された。以上の結果から神経細胞には特異的な”神経活動依存的小胞輸送”システムが存在し、おそらくシナプトタグミン 4 分子がこの小胞輸送過程を制御して

いるのではないかと推察された。今後、シナプトタグミン 4 含有小胞にどのようなカーゴ分子が乗っているのかを、生化学的に小胞を単離することにより明らかにしていく予定である。



共同研究

Thomas F. J. Martin (University of Wisconsin)

「有芯顆粒開口放出におけるシナプトタグミン-SNAP-25 のカルシウム依存的相互作用の重要性」

PC12 細胞の有芯顆粒からカルシウム依存的にホルモンが分泌されるためには、有芯顆粒上に存在するシナプトタグミン 1 及び 9 が細胞膜上の SNAP-25 とカルシウム依存的に直接結合することが重要なプロセスであることを明らかにした。

Philip G. Haydon (University of Pennsylvania School of Medicine)

「シナプトタグミン 4 分子によるアストロサイトからのグルタミン酸放出メカニズムの解明」

グリア細胞の一種であるアストロサイトからもカルシウム依存的にグルタミン酸が放出されることが最近着目されているが、このプロセスにはシナプトタグミン 1 ではなくシナプトタグミン 4 分子が関与することを初めて明らかにした。

線条体コリン作働性インターニューロンによる基底核神経回路の可塑性の解析

金子　鋭
京都大学医学研究科

特定領域「神経回路」参加年度　平成12年度

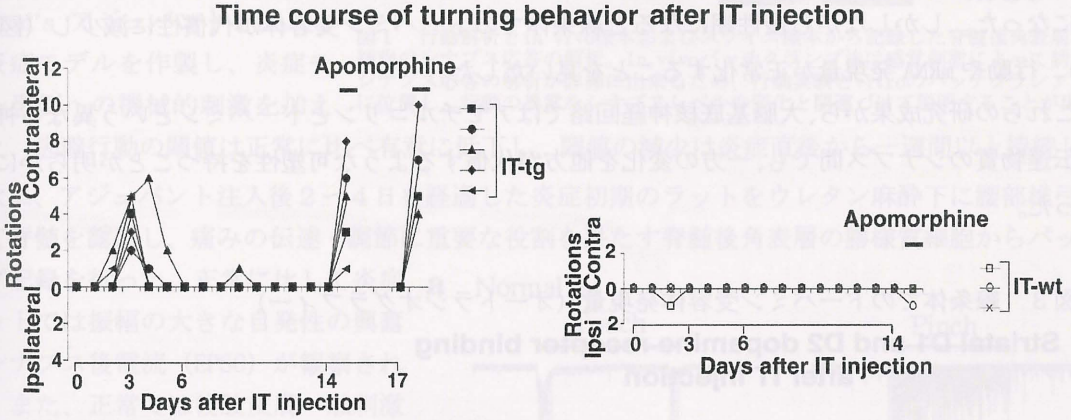
研究成果の要旨

線条体コリン作働性インターニューロンを特異的に破壊すると、急性期には線条体黒質路と線条体淡蒼球路がそれぞれ興奮・抑制する。慢性期には線条体のドーパミン受容体が減少してこの変化が代償され、基底核神経回路では異なる神経伝達物質間でも代償機構が働くことを示した。

研究成果

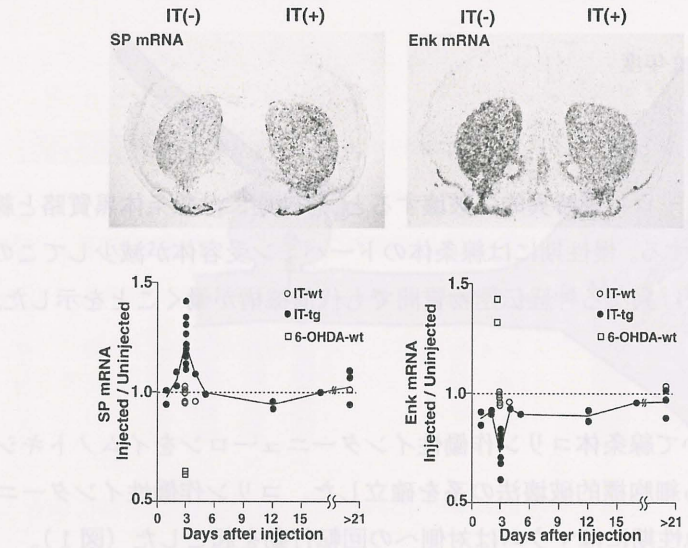
トランスジェニックマウスを用いて線条体コリン作働性インターニューロンをイムノトキシン（ＩＴ）により特異的に破壊する細胞標的破壊法の系を確立した。コリン作働性インターニューロンを一側性に破壊すると、急性期にはマウスは対側への回転行動を起こした（図１）。

図１　ＩＴ投与後のトランスジェニックマウス（ｔｇ）と野生型（ｗｔ）の回転行動



線条体黒質路のニューロンにはサブスタンスＰ、線条体淡蒼球路のニューロンにはエンケファリンが発現しており、その発現量はニューロンの活動性を反映すると考えられている。そこで定量的 in situ hybridization により線条体でのサブスタンスＰとエンケファリンの mRNA 発現量を測定したところ、行動変化と同様の時間経過で急性期にはＩＴ投与側でそれぞれ増加・減少していた（図２）。

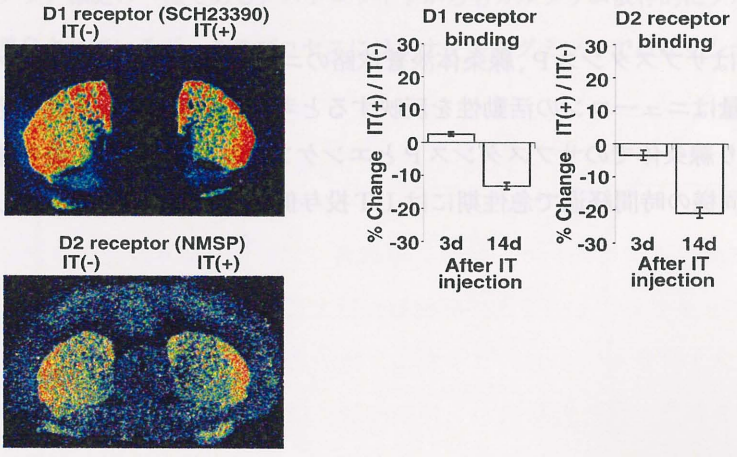
図２　サブスタンスＰ（ＳＰ）とエンケファリン（Ｅｎｋ）のmRNA発現量



これにより急性期には線条体黒質路が活性化し線条体淡蒼球路が抑制されていることが明らかになった。しかしながら慢性期になると線条体でのドーパミン受容体が代償性に減少し（図３）、行動やmRNA発現量が正常化することを見いだした。

これらの研究成果から、大脳基底核神経回路ではアセチルコリンとドーパミンという異なる神経伝達物質のシナプス間でも、一方の変化を他方が代償するような可塑性を持つことが明らかになった。

図３　線条体でのドーパミン受容体発現量（オートラジオグラフィー）



A02-31

表題（研究課題名）　痛覚回路可塑性のin vivoパッチクランプ解析

研究代表者名　古江　秀昌

所属　九州大学大学院医学研究院 統合生理学

特定領域「神経回路」参加年度

平成１５年度ー１６年度

研究成果の要旨

In vivoと脊髄スライス標本からシナプス応答を記録し、炎症に伴い脊髄痛覚回路に如何なる可塑的変化が惹起されるか解析した。炎症初期に興奮性入力が著明に増大した後、非侵害情報を伝えるAβ線維の単シナプス性入力が痛覚回路で観察された。この可塑性発現に脳由来神経栄養因子が関与した。

研究成果

炎症に伴う行動の異常を観察し、脊髄痛覚回路におけるシナプス入力の可塑的変化を脊髄スライスおよび in vivo パッチクランプ法を用いて解析した（図１）。

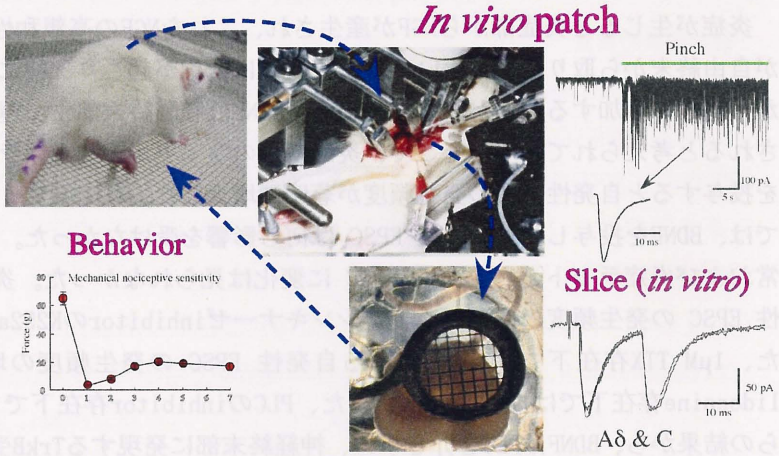


図１　行動解析とin vivo標本およびスライス標本から記録した脊髄後角表層、膠様質細胞のシナプス応答の解析。In vivoパッチクランプ法は感覚刺激によって誘起されるシナプス応答の解析が詳細に出来るため、行動実験とvitroのパッチクランプ法の中間に位置し、行動の異常をシナプスレベルの変化と関連づけて説明することが出来る。

(1) 炎症に伴う行動の変化と脊髄痛覚回路への興奮性入力の増大

一側のラット後肢足底皮下にFreund's アジュバントを注入して炎症モデルを作製し、炎症モデル患側への機械的刺激を加えると、逃避行動の閾値は正常に比べ有意に低下し、閾値の減少は炎症直後から一週間以上持続した。

次に、アジュバント注入後２ー４日を経過した炎症初期のラットをウレタン麻酔下に腰部椎弓を切除して脊髄を露出し、痛みの伝達・調節に重要な役割を果たす脊髄後角表層の膠様質細胞からパッチクランプ記録を行った。正常に比して炎症ラットでは振幅の大きな自発性の興奮性シナプス後電流（EPSC）が観察された。また、正常では後肢皮膚へ触刺激を加えると、刺激の最初にEPSCの振幅と発生頻度が一過性に増大した後、瞬時に応答が消失し刺激前の状態に戻るaccommodation が観察されたが、炎症ラットでは、触刺激によって持続してEPSC の振幅と発生頻度が増大し、accommodation は観察されなかった。機械的痛み刺激を加えると、正常ラットでは刺激の間中持続して EPSC の振幅と発生頻度が増大した。一方、炎症ラットでは機械的痛み刺激に対する応答が著明に大きくなった（図２）。

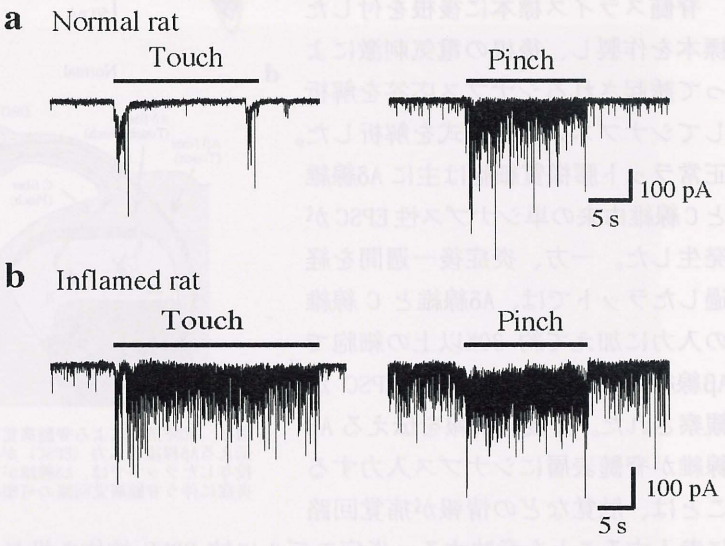


図２　感覚刺激によって誘起された興奮性シナプス応答、正常および炎症モデルでの比較。後肢皮膚に触,機械的痛み刺激を加えると、EPSCの発生頻度と振幅が著明に増大した。正常では触刺激によるaccommodationが観察されたが（a）、炎症モデルではそのaccommodationが消失し、機械的痛み刺激に対する応答も増大した（b）。

一次求心性線維の後根および脊髄表

面に 1μM TTX を投与すると、炎症ラットに観察された振幅の大きな自発性 EPSC や触刺激および機械的痛み刺激によって誘起された EPSC は可逆的に抑制された。一方、炎症モデルから脊髄スライス標本を作製し EPSC を記録すると、正常ラットおよび炎症ラットで自発性 EPSC の発生頻度および振幅に差は得られなかった。また、炎症ラット in vivo 標本で見られた振幅の大きな自発性 EPSC は観察されず、1μM TTX を投与しても、自発性 EPSC の発生頻度および振幅に変化は見られなかった。以上より、炎症モデルでは末梢に感作が生じて自発性の活動電位が発生し脊髄膠様質細胞に振幅の大きな EPSC が観察されたと考えられた。これに加えて、触刺激に対する accommodation の消失、痛み応答が大きくなるなど、脊髄痛覚回路への興奮性入力が著明に増大した。

(2) 脳神経栄養因子による興奮性シナプス伝達の増強

炎症が生じると炎症部からNGFが産生され、これをNGFの高親和性受容体、TrkAを発現したC線維などが自由終末から取り込む。次いで遺伝子発現に変化が起こり、特に脳由来神経栄養因子（BDNF）の発現が一過性に増加することが知られている。BDNFは脊髄終末部まで運ばれ、活動依存性に後角表層に放出されると考えられている。そこで、炎症初期のラットから脊髄スライス標本を作製しBDNF（200 ng/ml）を投与すると自発性EPSCの発生頻度が著明に増大した。炎症後７日を経過したラットおよび正常ラットでは、BDNFを投与しても自発性 EPSC は何ら影響を受けなかった。また、NGFや NT-3を投与しても、正常および炎症ラットとも自発性 EPSC に変化は見られなかった。炎症初期に見られた BDNFによる自発性 EPSC の発生頻度の増大は、チロシンキナーゼinhibitorのK252a（200 nM）によって抑制された。また、1μM TTX存在下では BDNFによる自発性 EPSC の発生頻度の増大が同様に観察されたが、10 mM lidocaine存在下では抑制された。また、PLCのinhibitor存在下でも発生頻度の増大が見られた。これらの結果から、BDNFはPLCを介さずに、神経終末部に発現するTrkB受容体を介して TTX非感受性Na チャネルを活性化し、グルタミン酸の放出を促進したと考えられた。

(3) 炎症に伴う痛覚回路への Aβ線維入力の増大と BDNF 抗体を用いた可塑的変化の阻止

脊髄スライス標本に後根を付した標本を作製し、後根の電気刺激によって誘起されるシナプス応答を解析してシナプス入力の様式を解析した。正常ラット膠様質細胞は主に Aδ線維と C 線維由来の単シナプス性 EPSC が発生した。一方、炎症後一週間を経過したラットでは、Aδ線維と C 線維の入力に加えて約 30%以上の細胞で Aβ線維由来の単シナプス性 EPSC が観察された。非侵害情報を伝える Aβ線維が脊髄表層にシナプス入力することは、触覚などの情報が痛覚回路に参入することを意味する。炎症モデルに抗 BDNF 抗体を投与したラットで解析を行うと、Aβ線維由来の単シナプス性 EPSC の入力は減弱し、正常と同様に Aδ線維と C 線維由来の単シナプス性 EPSC が観察された（図３）。行動実験においても抗 BDNF 抗体を投与したラットでは、機械的痛みに対する閾値が有意に減弱した。

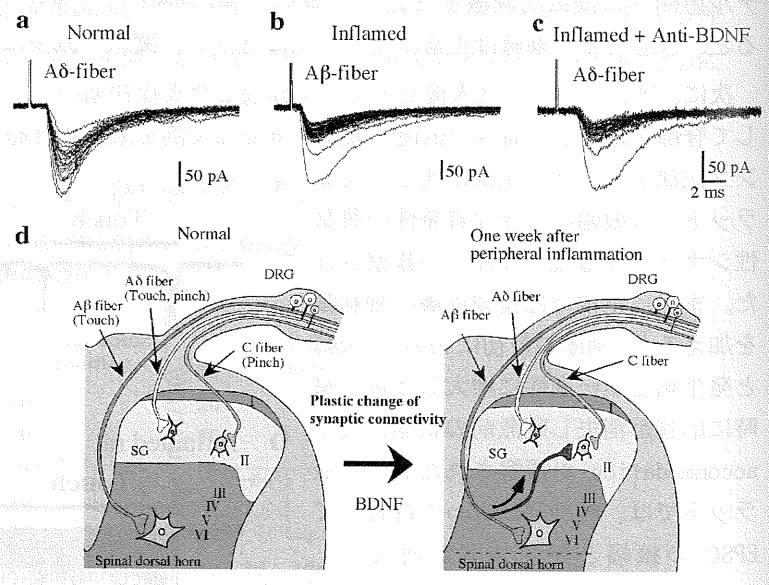


図３　BDNF抗体による脊髄痛覚回路可塑的変化の阻止。炎症モデルでは非侵害性情報を伝えるAβ線維の入力（EPSC）が観察された（b）。正常および炎症モデルに抗BDNF抗体を投与したラットでは、Aδ線維が入力しAβ線維の入力はほとんど見られなかった（a, c）。炎症に伴う脊髄痛覚回路の可塑的変化にBDNF が関与することが示唆された（d）。

以上より、炎症初期にはAδ線維やC線維が感作して、末梢から脊髄への情報が過剰に投射されるとともに、活動依存性に放出されたBDNFがこれを助長して、膠様質の活動が亢進されることが示唆された。一方、炎症後一週間を経過すると、Aβ線維の単シナプス性入力が増加して、脊髄膠様質における痛覚回路のシナプス結合に可塑的変化が生じた。Aβ線維の入力増大による触情報の痛覚回路への割り込みは、触刺激に対する逃避行動の閾値低下を説明するものと考えられ、抗BDNF抗体は炎症に伴う痛覚回路へのAβ線維の入力を阻止したことから、可塑性発現にBDNFが関与することが明らかになった。

共同研究

A. J. Todd, J. S. Riddell, University of Glasgow、脊髄膠様質細胞の生理的応答と形態的特徴の相関解析を行った。

表題（研究課題）　２光子励起ケイジドグルタミン酸を用いたシナプス結合形態・機能の動態と可塑性の研究

研究代表者名　松崎　政紀

所属　自然科学研究機構生理学研究所生体膜部門

特定領域「神経回路」参加年度

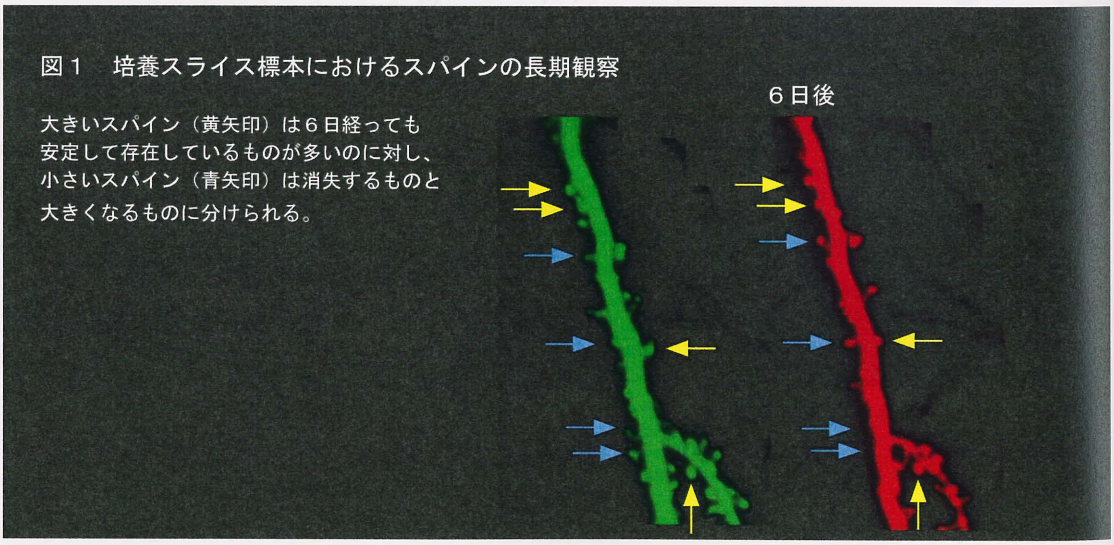
平成１５年度～平成１６年度

研究成果の要旨

２光子励起法によるケイジドグルタミン酸の活性化によって、海馬錐体細胞の単一スパインにおいて機能的および形態的可塑性を誘発した。その結果、機能増強と形態増大が非常によく連関するとともに、大きいスパインは安定で、小さいスパインは変化し易いことを見出した。

研究成果

我々は、ケイジドグルタミン酸を２光子励起法で活性化する手法により、海馬錐体細胞において、機能的 AMPA 受容体発現とスパイン形態に強い相関があることを見出してきた。本研究では、神経回路の調節という観点から、単一のシナプス形態を詳細に実時間観察し、２光子励起ケイジドグルタミン酸を用いて単一シナプスで可塑性を誘発し，シナプス形態がどのように長期的に安定するのか、その形態依存性を見出すことを目的とした。シナプス後部のスパイン形態について詳細に検討するため、培養海馬スライス標本にＧＦＰ遺伝子を導入して長期間にわたって形態観察を行うことを可能にした。その結果、通常の培養状態において、大きなスパインの多くは５日間以上、安定して存在し続けるものが多く、一方で小さなスパインは消滅するか、または小さいまま残っているか、もしくは大きくなる傾向がみられた（図１）。



ＧＦＰ発現した錐体細胞のスパインに２光子励起法によるケイジドグルタミン酸の頻回刺激を行い、同時に形態変化を追跡した。その結果、反復刺激直後に、刺激したスパインに限局した頭部の肥大化が見られた。半数の例では、形態変化は可逆的で３０分ほどで元に戻るが、残りの場合には刺激したスパインにほぼ限局した頭部の肥大が２時間以上持続することが見出された。この形態可塑性は、スパインの初期形態に依存し、スパイン頭部の小さいものに強い。スパイン頭部の肥大化はＮＭＤＡ受容体阻害剤、カルモジュリン阻害剤、およびアクチン重合阻害剤によってほぼ完全に阻害された。シナプス前線維のテタヌス電気刺激によっても、一部のスパイン頭部に同様な形態変化が起こることから、この現象はシナプス可塑性に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに穿孔パッチした錐体細胞において脱分極と２光子励起ケイジドグルタミン酸法を組み合わせることで、刺激スパインのみでAMPA受容体反応の増強が誘発された。小さなスパインでＡＭＰＡ受容体反応の増強と形態の増大が見られ、大きいスパインでは電流反応も形態も大きく変化しなかった。長期観察の実験と合わせるとこれらの結果は、大きなスパインは変化しにくく安定しており、小さいスパインは可塑性に富み、学習するのに適した状態にあることを示している。また長期観察により、グルタミン酸の頻回投与によるスパイン頭部の肥大は、数日に及んで持続することがあることもわかった。これらのことから、神経回路網の形成・維持においてスパイン形態頭部の柔軟な変化と固定化が重要な役割を担っていることが示唆された。

共同研究

共同研究の相手

酒井規雄博士（広島大学）、坪川宏博士（生理学研究所）、斉藤尚亮博士（神戸大学）

共同研究内容と成果

γPKC-GFP トランスジェニックマウスの小脳プルキンエ細胞樹状突起に沿ったγPKC 移行の伝播

γPKC-GFP トランスジェニックマウスを作製し、小脳プルキンエ細胞樹状突起におけるγPKC-GFP の動態を実時間イメージングによって調べた。代謝型グルタミン酸受容体のアゴニスト投与により、樹状突起内で一過的にγPKC が細胞膜へ移行するのが観察された。さらに平行線維の電気刺激によって、遠位の樹状突起で起こったγPKC の移行が細胞体近傍まで伝播することがわかった。

A03-01

表題　神経突起伸長に関与する分子の探索と機能解析
研究代表者名 野田　亮
所属 京都大学大学院医学研究科分子腫瘍学領域
特定領域「神経回路」参加年度 平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨
神経突起伸長、神経細胞の特性、Rasの機能等に関連する分子をcDNAの expression cloning、gene-trap、subtraction、signal sequence trap等を用いて探索し、発見された分子（Rap1, RECK, septin, TMX, c-IAP2, endomucinなど）の分子、細胞、個体レベルでの機能解析を進めた。

研究成果
活性化ras遺伝子は、褐色細胞腫由来ラット細胞株PC12において分裂停止、突起伸長、電気興奮性獲得などを伴う神経分化を誘導する（Nature 318, 73-75, 1985)。この発見を端緒に、我々は、神経系の発生・分化の分子機構に興味を持ち、１）神経突起伸長のメカニズム、２）神経細胞を特徴付ける分子、３）ras遺伝子の機能、という３つの方向で研究を進めてきた。アプローチとしては、活性および発現パターンに基づくcDNAの単離とその生物学的機能の解析という手法を基本としている。以下に、本研究課題の期間内に得られた成果の概略を述べる。

１）神経突起伸長のメカニズム
PC12細胞にnerve growth factor（NGF）を作用させると、immediate early geneとしてNGFI-A（別名egr-1,zif268など）が発現してくる。この遺伝子の作用を理解する目的でPC12細胞にこの遺伝子を強制発現させたところ、突起伸長が抑制されることを見出した（文献1)。また、PC12細胞をNGF処理後に発現量の変化する遺伝子を、より系統的に探索することを目的として、発色、薬剤耐性、薬剤感受性という３つの活性を併せ持つ３分子融合マーカー GBT（β-Gal/BSD/HSV-tk）を考案し、これをsplice acceptorの下流に繋げたものを組み込んだsuicide型レトロウイルス遺伝子トラップ・ベクター（3'-LTRにエンハンサーを欠くため、プロウイルスDNA合成の過程でエンハンサーを失う）を構築した。先ず、このベクターの評価を目的として、上皮系細胞におけるTGF-β応答遺伝子の探索を試みたところ（文献2)、新規膜結合型チオレドキシンTMX（文献8）を含む一連の遺伝子が検出された。また、X-線応答遺伝子としてアポトーシス制御因子として知られるc-IAP2が検出され、その発現制御がNF-κBを介して起こることが見出された（文献7)。

２）神経細胞を特徴付ける分子の探索とその機能
神経を特徴付ける分子を探索する目的で、以前に我々は、マウス１０日胚由来の神経前駆細胞で発現し、マウス成体脳では発現低下している10個の遺伝子（Nedd1ー10）を単離した。その一つであるNedd5（現在はSept2）は、酵母の発芽関連因子Cdc3,10,11,12と構造類似性を持つGTP結合タンパク質をコードし、哺乳類の細胞質分裂に必須であることが見出されている（**Genes & Dev. 11, 1535-1547, 1997**)。そこで、septinファミリーと名付けられたこれらの分子の脳神経系における機能解明を目指して実験を進めた。まず、５種のseptin（Sept4ー7）に特異的な抗体を作成し、マウス胎児および成体の脳における発現パターンを比較したところ、互いに異なる分布を示すことが見出され、これらが酵母やショウジョウバエで提唱されているように、常に決まった比率を持つヘテロ多量外を作って機能するとは限らないことが示唆された（文献4)。また、パーキンソン病を含むシヌクレイン症で見られる細胞内封入体（Lewy小体）にSept4が特異的に濃縮されていることが見出された（文献16)。さらに、脳で高発現しているSept4の生理機能を明らかにする目的で遺伝子欠損マウスを作成したところ、意外なことに、脳では大きな発達異常が見られず、精子形成に障害が起こることが分かった（文献25)。Septinは一定の曲率を持った環状あるいは螺旋状の分子集合体を自発構築する能力を持ち、ある種のアダプター・タンパク質を介してアクチン線維と会合し、その形態に影響を与えることが示されているが（木下らDev. Cell 3, 1-20, 2002)、細胞レベルで

の機能については不明の点が多い。共同研究によって、Septin が Borg という分子の下流で作用し、Cdc42 による負の制御を受けていることを見出した（文献 11)。

3） ras 遺伝子の生物学的機能

Ras ファミリー低分子量 G タンパク質は神経系細胞では neurotrophin 受容体シグナルの伝達に関わることが PC12 細胞等を用いた実験から明らかにされているが、活性化 ras 遺伝子変異体は線維芽細胞においては悪性増殖をもたらす。この現象を利用して、ras 遺伝子の機能を抑制する分子（transformation suppressor）を探索している。Ras に近縁の低分子量 G タンパク質 Rap1 (**Cell 56, 77-84, 1989**) と膜結合型マトリックス・メタロプロテアーゼ制御因子 RECK (**Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13221-13226, 1998**)は、この方法によって単離された分子であり、本研究では、その機能解析を進めた。

先ず、Ras および Rap1 のシナプス伝達における役割を明らかにする目的で、H-Ras-12V, H-Ras-17N, Rap1A-12V のいずれかを GFP と共に発現するシンドビス・ウイルス・ベクター（神経に親和性を持つ RNA 型ウイルスを基盤とたベクター）を作成し、これらを培養下の海馬スライスおよび神経グリア融合細胞株（NG108-15）に感染させ、パッチクランプによる電気生理学的解析を行った（京大・大森教授のご指導を賜った）。その結果、イオン性グルタミン酸受容体（文献 18）および Na 電流（文献 21）に対して Ras は促進的に、Rap1A は抑制的に作用することを見出した。また、Rap1A の活性化因子の一つとして知られる C3G に強く結合する Rap1A 変異体を作成し、これが正常 Rap1A 遺伝子の機能を dominant negative に抑制することを示した（文献 24）。この変異体は、今後 Rap1A の機能を解明する上で有用と考えられる。この他、N-Ras と Rb の機能的関連性（文献 17）、骨滑膜線維芽細胞における Ras の活性（文献 13）などの解析も進めた。

一方、RECK の生理機能解明を目指して遺伝子欠損マウスを作成したところ、血管や神経管を含む様々な器官の発生異常を伴う胎生致死形質（胎生 1.5 日前後で死亡）を示し、この表現型は、MMP-2 欠損変異によって部分抑制されることから、RECK は MMP-2 を含む複数の MMP ファミリー・プロテアーゼの制御を介して発生に必須の役割を果たすことが示唆された（図１）（文献 12)。RECK の発現は、多種類のがんで低下しているが、がん細胞における RECK の強制発現が浸潤、転移、血管新生を抑制すること（文献 12)、また肝、膵、肺（非小細胞)、大腸などの固形がんで、RECK の残存発現量と予後との間に正の相関性があることが示された（文献 6,15,20,22)。共同研究によって、Rap1 と RECK の機能を関連付ける成果も生まれた。すなわち、MMP 制御因子として発見された分子の一つである TIMP-2 は、血管内皮細胞の細胞移動を抑制するが、そのメカニズムとして Rap1 を介した RECK の発現亢進が効いている可能性が示唆された（文献 26)。新たな transformation suppressor を単離する試みも続けているが、得られた分子の一つである tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) が、(i) 活性化 Ras によって発現抑制される、(ii) pro-MMP-2 の活性化を阻害する、という２つの点で RECK と共通性を持つことが見出された（文献 3)。また、MMP-2 が長期脳虚血によって発現亢進すること（文献 10)、MMP-2 と MT1-MMP の２重変異マウスが血管、筋肉の発達異常を伴って出生直後に死ぬことなども見出された（文献 19)。

4） その他の研究成果

電位感受性色素を用いた電気生理学的研究によって、小脳における GABA 作動性神経と NMDA サブユニットの役割を解析した（文献 5)。Signal sequence trap 法を用いて、細胞間排斥作用を持つ膜貫通型糖タンパク質 endomucin-1,2 を単離し（文献 9)、その血球運動に対する効果を解析した（文献 23)。suppression subtractive hybridization 法を用いて、脳脈絡叢で特異的に発現している遺伝子を探索した（文献 14)。

A03-01

共同研究
共同研究の相手
大森治紀
共同研究内容と成果
Ras および Rap1 のシナプス伝達における役割を解明するために、各種変異タンパク質を GFP と共に発現するシンドビス・ウイルスを感染させた培養海馬スライスおよび神経細胞のパッチクランプ実験を行った。その結果、イオン性グルタミン酸受容体（文献 18）および Na 電流（文献 21）に対して Ras は促進的に、Rap1A は抑制的に作用することを見出した。

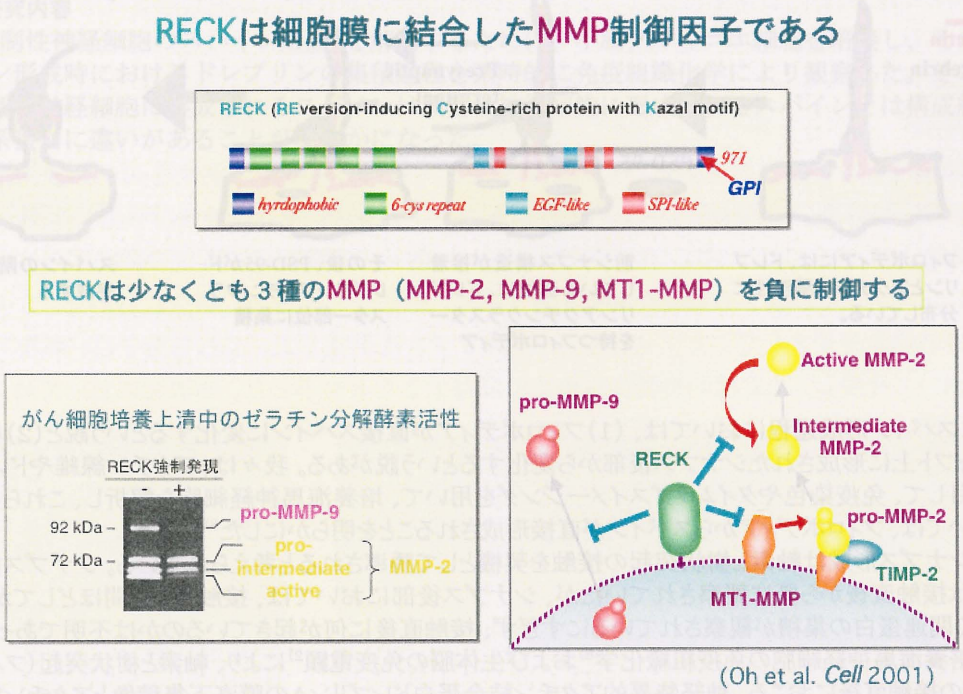


図 1

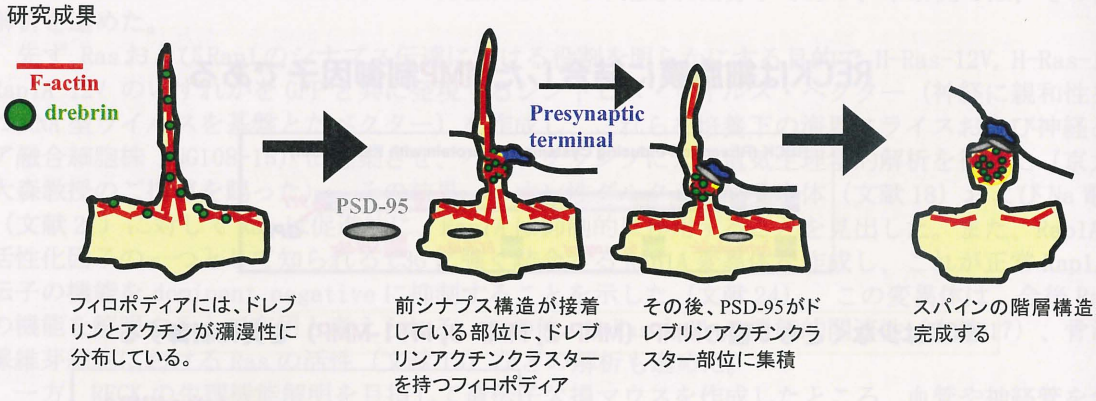
表題(研究課題)　「樹状突起スパイン内細胞骨格再編成の分子基盤とその制御機構」
研究代表者名　白尾智明
所属　群馬大学大学院医学系研究科高次細胞機能学

特定領域「神経回路」参加年度　平成11年度～16年度

研究成果の要旨

シナプス形成時におけるフィロポディアからスパインへの変化は、まず神経特異的アクチン結合蛋白ドレブリンAが軸索とフィロポディアの接触部に集積し、その後シナプス後部におけるアクチン細胞骨格系の再編成が起こり、その結果PSD蛋白群の集積が促進され、スパインが完成することがわかった。

研究成果



スパイン形成過程においては、(1)フィロポディアが直接スパインに変化するという説と(2)樹状突起シャフト上に形成されたシナプス後部から変化するという説がある。我々は、アクチン線維やドレブリンに着目して、免疫染色やタイムラプスイメージングを用いて、培養海馬神経細胞を解析し、これらの細胞においては、フィロポディアからスパインが直接形成されることを明らかにした[8]。

シナプス形成は軸索と樹状突起の接触を契機として誘導されると考えられている。シナプス前部の変化は接触直後から既に観察されていたが、シナプス後部においては、接触後1時間ほどしてから起こるPSD関連蛋白の集積が観察されているにすぎず、接触直後に何が起きているのかは不明であった。我々は培養海馬神経細胞の免疫組織化学[8]および生体脳の免疫電顕[2]により、軸索と樹状突起(フィロポディア)の接触直後におこる、神経特異的アクチン結合蛋白ドレブリンAの膜直下集積像とアクチン細胞骨格系の再編成像を観察することに成功した。

次に、このスパイン形成過程におけるアクチン細胞骨格系とシナプス後部肥厚(PSD)の関連を解析した。培養神経細胞でのドレブリンAの発現を阻害すると、接触部におけるアクチン細胞骨格の再編成が起こらなくなり、PSD－95の集積も抑制されることがわかった。また、このPSD－95の集積はドレブリンAの局所的集積により促進されることもわかった[8]。従来の研究によれば、成熟後のスパインにおいては、PSD－95の集積には、アクチン細胞骨格系に非依存的であることが示されている。今回の研究結果を考え合わせると、発達過程の海馬神経細胞においては、PSD－95の集積は先行するアクチン細胞骨格の再編成に依存的であるが、一度シナプス後部への集積が完遂するとアクチン非依存性になることが示された。

今回の研究結果から、シナプス形成時に見られるシナプス後部のアクチン細胞骨格系の再編成の制御機構として、「ドレブリンのアイソフォームが、非神経細胞にも発現する幼弱型ドレブリンEから神経細胞特異的ドレブリンAに変化する」ことの重要性が示唆された。しかし、未熟神経細胞にドレブリンAを強制的に発現させてもスパインの形成は促進されなかった[1]。そこで、ドレブリンのシナプス後部への局在が神経活動依存性に制御されている可能性を解析したところ、「グルタメート受容体活性がドレブリンのシナプ

ス後部への集積制御に重要役割を果たしている」ことがわかった（投稿準備中）。

軸索とフィロポディアの接触直後に起こるドレブリンの膜直下への集積が、シナプス形成時のシグナル伝達に、どのような役割を果たしているのかは今のところ不明である。しかし、非神経細胞を用いた解析により、細胞間接着部位に形成されるギャップ結合は、ドレブリンが膜蛋白コネキシンに結合することにより始めて機能的になることが我々の研究により明らかになった[4]。従って、シナプス形成最初期においては、シナプス前部と後部のシグナル伝達にドレブリンの膜集積が何らかの役割を果たしていることが推測できる。

共同研究

共同研究の相手　遠藤 昌吾（理研脳科学総合研究センター）

共同研究内容

「抑制性神経細胞のスパイン形成」を解明するために、小脳プルキニエ細胞を培養し、そのスパイン形成時におけるドレブリンの集積過程を系時的に免疫組織化学により観察した。その結果抑制性神経細胞に形成されるスパインは興奮性神経細胞に形成されるスパインとは構成細胞骨格系蛋白に違いがあることが明らかになった。

A03-03

研究課題：神経軸索誘導に関与する分子の探索と機能解析

研究代表者名：能瀬聡直

所属：東京大学大学院理学系研究科・物理学専攻

参加年度

平成１２年度～平成１６年度、計画班員

研究成果の要旨

ショウジョウバエの神経系をモデルとして神経軸索誘導過程に関与する分子の探索および機能解析を行った。具体的には、1. ジーンチップを用いた神経筋標的認識分子の網羅的探索、2. カプリシャスの神経筋認識過程における動態観察および視神経投射における機能解析を行った。

研究成果

１．序

神経細胞は多数の細胞の中からいかにしてシナプス結合の相手を識別するのか？我々はシナプス結合の「特異性」に興味をもち、ショウジョウバエの神経筋結合系をモデルとした研究を展開してきた。図１に示すように、この系においては、個々の運動神経が特定の標的筋肉に軸索を投射し、シナプスを形成する過程を解析することが可能である。以前の研究において、この系における標的認識分子として、カプリシャス、コネクチンを同定した。これら分子は、特定の筋肉細胞において発現し、その標的特異性の決定に関与することを示した。本研究においては、より網羅的に標的認識分子を同定する新たな試みとしてGene Chip法を用いた解析を行った。また、生体において標的認識過程を経時的に観察することを可能にするライブイメージングの系を立ち上げ、特にカプリシャスの動態と機能に関する研究を発展させた。また、ショウジョウバエ視神経投射の系におけるカプリシャスの機能を解析し、この分子が神経細胞間の層特異的な標的認識にも関与することを示した。

２．ジーンチップを用いた標的認識分子の網羅的探索

異なる運動神経細胞により支配されている二つのとなりあった筋肉（筋肉12と筋肉13、図１参照）間で発現様式の異なる遺伝子を、ジーンチップを用いて網羅的に同定することを試みた。まず胚を解剖し、顕微鏡下でマイクロピペットを用いて筋肉12及び筋肉13を200個ずつ（約20個体分）単離し、RNAを抽出し、逆転写及び転写反応によるRNAの増幅でGeneChip解析に用いるのに十分量のcRNAを得た。ショウジョウバエ・ゲノムの全遺伝子がスポットされているAffymetrix社のGeneChipとハイブリダイゼーションを行い、発現量の違いを調べた結果、２つの筋肉間で２倍以上の差をもって発現する遺伝子を多数同定することに成功した（候補遺伝子とよぶ）。候補遺伝子の多くのものについて、胚のin situハイブリダイゼーションや定量的PCRにより、筋肉間での発現差異を確認した。候補遺伝子のうち、特に膜タンパク質や分

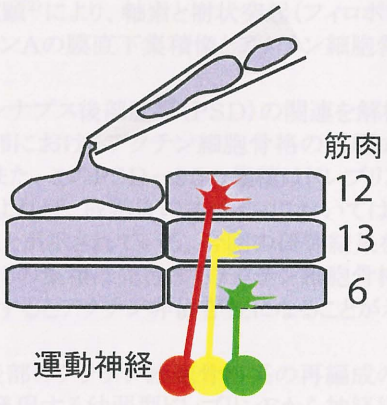


図１ショウジョウバエ神経特異結合系において単一筋肉を単離する。

泌蛋白質に着目し、異所発現による機能解析を行った結果、いくつかが実際に標的認識分子として働くことを示した。本手法により、シナプス特異性決定に関わる分子群のより総括的な解析が可能になると考えられ、現在候補遺伝子の機能解析をさらに推進している。

３．神経筋標的認識過程のイメージング

ショウジョウバエ胚の神経筋結合系において、標的認識の際、標的である筋肉細胞がアクチン性の突起（myopodia）を出していることが報告されている。myopodia は成長円錐との相互作用によりシナプス部に動的に凝集することから、標的認識において重要な構造である可能性が報告されている。しかしながら、その標的認識過程における役割は必ずしも明確ではなかった。そこで本研究においては、標的認識分子カプリシャスの局在と myopodia との関連を解析した。蛍光蛋白質 GFP との融合蛋白質(Caps-GFP)を GAL4-UAS システムを用い特定の筋肉において強制発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いてその挙動を追った。すると興味深いことに、Caps-GFP は、myopodia の先端部に集積していた（図２）。この結果は標的細胞が突起の先端部に標的認識分子を提示しながら、積極的にシナプス前細胞の成長円錐を探索していることを示唆するものである。 さらに、実際に標的認識が、myopodia 先端部においておこるかを調べるため、運動神経軸索と筋肉とが最初に接触を開始する瞬間をライブイメージングによって捉えることを試みた。このため、運動神経細胞と筋肉の両方に膜結合型 GFP を発現し、その微細構造を可視化した。その結果、確かに、神経筋間の最初の接触が myopodia の先端部においておこることを見いだした（図３）。以上の結果はシナプス後細胞の方も結合相手の認識過程に能動的に関与するという考え方を支持している。

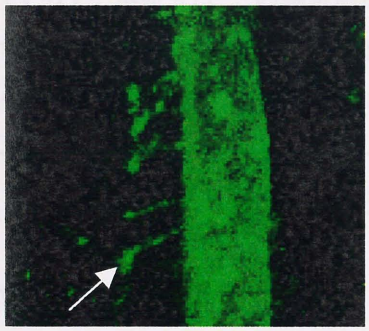


図２ マイオポディア先端（矢印）へのカプリシャス GFP の局在

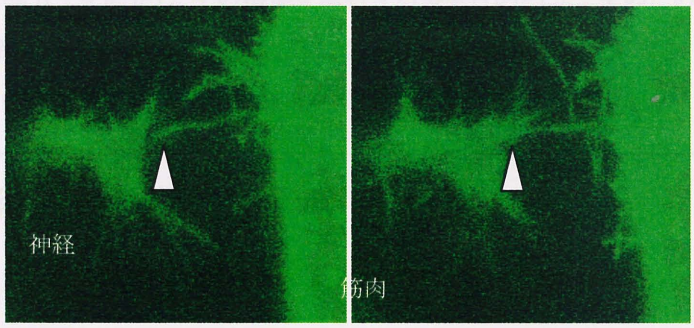


図３ 神経筋間の最初の接触の可視化：１分間隔のタイムラプス。マイオポディアの先端部において、最初の接触が起こるのが分かる（矢印）。

４．視神経の層特異的投射におけるカプリシャスの役割

ショウジョウバエの個眼を構成する８個の視神経細胞 R1-R8 は脳内の異なる部位に投射する。特に R7、R8 は medulla 領域の異なった層 M3、M6 に層特異的な神経結合を形成する（図４）。カプリシャスの分布を調べたところ R8 と、その投射先である M3 層において特異的に発現していた。カプリシャス機能欠失変異体では、Ｒ８の神経終末の配置パターンに乱れが生じていた。また、R７においてカプリシャスを異所発現させると、その投射先が、R8 の標的領域である M3 層(カプリシャスを発現する)へと変化した（図５）。以上の結果は、Capricious を発現する視神経は同じく Capricious を発現する層領域へ投射する、というメカニズムの存在を示唆している。これ

らのことから、Capricious は１種の視神経とその投射先において発現し、標的特異性決定にはたらいていると考えられる。神経筋結合系、視神経投射系双方において、特定の神経細胞の標的特異性を決定することから、Capricious は脳神経系の様々な部位において同様の役割を果たしている可能性が考えられる。

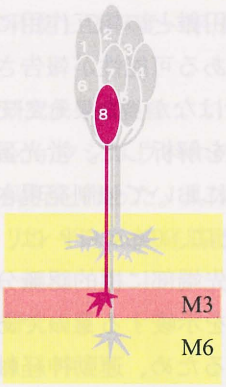


図４ ショウジョウバエ視神経投射のパターン

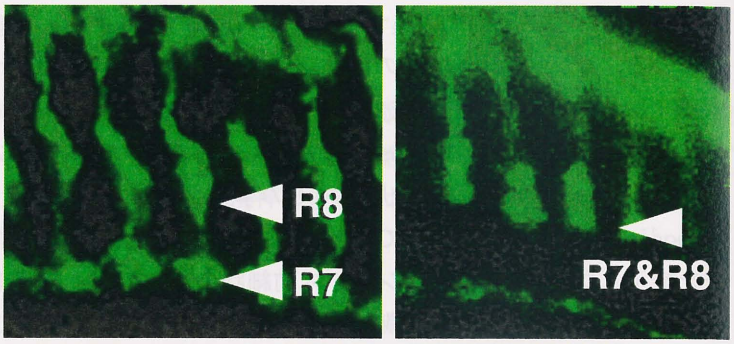


図５カプリシャスの異所発現の影響：正常体(左)では、R7, R8 はそれぞれ M3, M6 層に投射する。これに対し、すべての R7 でカプリシャスを異所発現すると、R7 も M3 層に投射するようになる。

A03-04

表題(研究課題)　神経軸索側枝誘導に関与する分子の探索と機能解析

研究代表者名　塩見健輔

所属　筑波大学大学院人間総合科学研究科

特定領域「神経回路」参加年度

平成12年度ー16年度

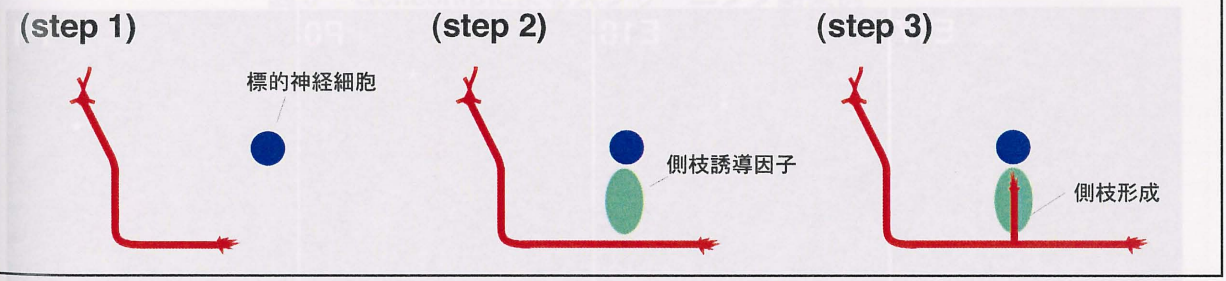
研究成果の要旨

本研究の目的は、神経軸索側枝形成を誘導する因子を同定する事である。そこで皮質脊髄路において、その因子を発現していることが知られている橋核と、発現していないと考えられる橋背側部との間で遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法を用いて比較し、これまでに数種類の候補遺伝子を得る事に成功した。

研究成果

神経回路形成過程では、成長円錐が周囲の微小環境を感知することにより、神経軸索を適切な標的へと導く。ある種の神経細胞では、軸索主幹から分岐した側枝が標的領域へと伸長し、神経回路が形成される(図1)。軸索の正しい伸長には、様々な軸索ガイダンス因子による軸索の誘引と反発が必要であり、これまで多くの研究により軸索ガイダンス分子やその受容体が単離されているが、その一方で側枝形成の分子機構についてはこれまでのところほとんど分かっていない。本研究は、この軸索側枝誘導分子を同定し、その機能を解析する事を目的とした。そのために我々は、これまでに良く研究されている皮質脊髄路をモデル系として選択し、軸索側枝誘導活性を持つと報告されている橋核に特異的に発現していると予想される目的遺伝子を、マイクロアレイ法を用いて単離する事を試みた。

図1　側枝形成による神経回路形成



先ず、胎生20日ー生後2日のラット、もしくは胎生17日ー生後2日のマウス大脳皮質に脂溶性色素 DiI を注入して皮質脊髄路の軸索を標識し、どの時期にどの場所で軸索に側枝が形成されるかを決定した。その結果、ラット胎生 20 日目(マウス17日目)に上丘 (SC branch)、ラット胎生 21 日目(マウス18日目)に赤核 (RN branch)、生後 0 日目に橋核 (BP branch)、生後 0 日目から 1 日目にかけて上オリーブ核、顔面神経核(運動核)、下オリーブ核、後索核へそれぞれ側枝を伸ばすことが確認できた(図2)。また橋核へは生後0日ー2日にかけて盛んに側枝が形成される事が明ら

かとなった。また橋においては、橋背側に比べ橋核(basilar pons)に向かって優位に側枝が伸長され、橋背側へ向けては、ほとんど軸索側枝が形成されない事が明らかになった(図3)。

図2　マウス皮質脊髄路における側枝形成

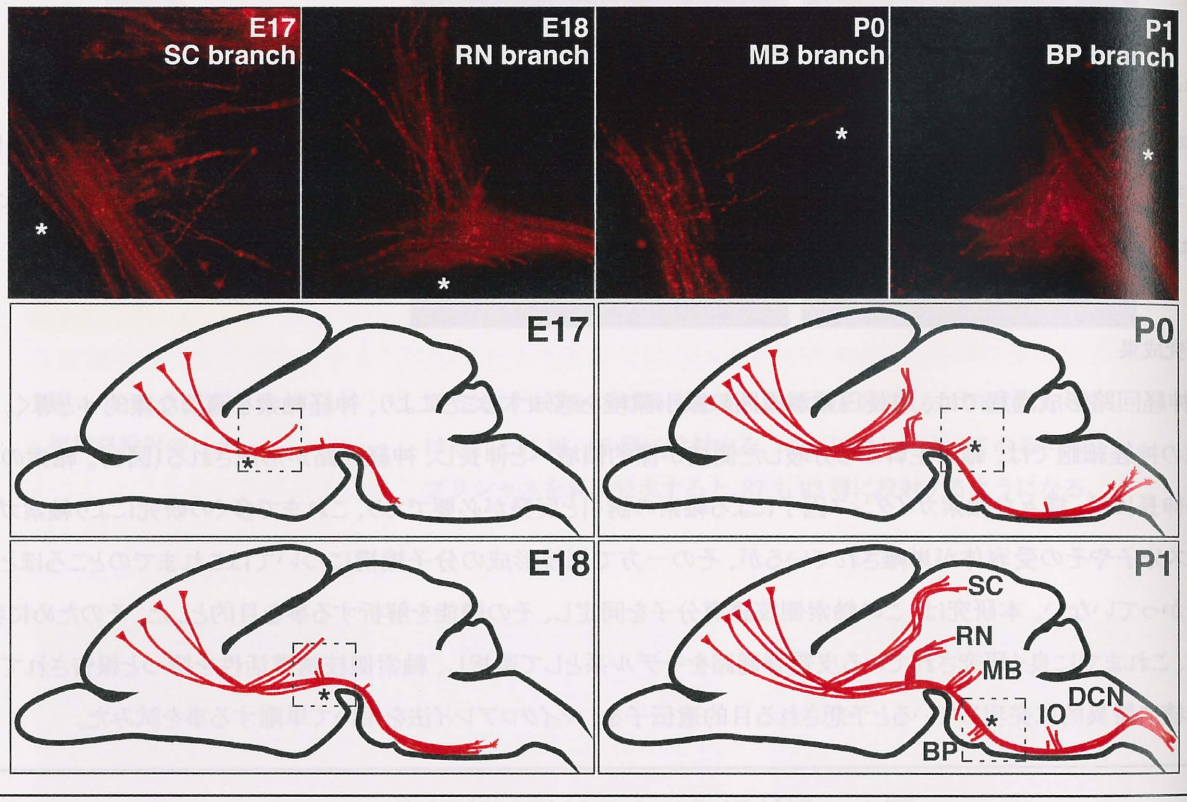
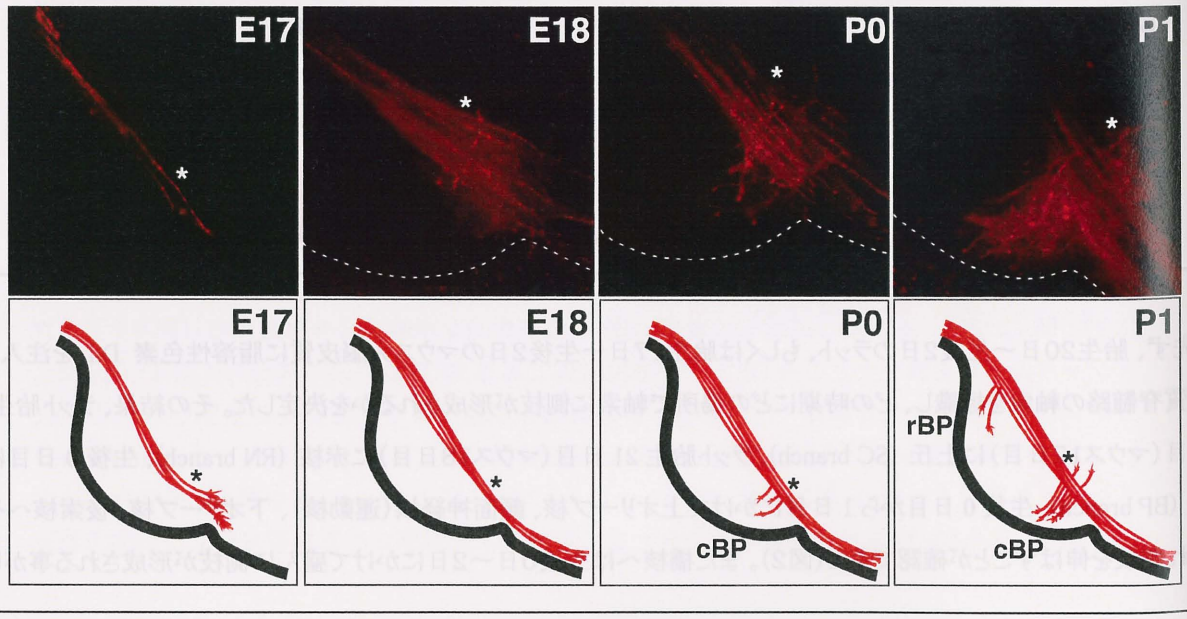


図3　マウス橋核における側枝形成



以上の結果に基づき、新生仔ラットの橋核と橋背側部から mRNA を抽出し、定法に従って、両者の間で発現量に差のある遺伝子をマイクロアレイ法(Affymetrix 社 Gene Chip)を用いてスクリーニングした。約 7,000 種類の既知遺伝子と約 17,000 種類の EST に関して、発現量の指標となる数値(A.D.)が橋核において30以上で、かつ橋核での発現が橋背側部での発現より5倍以上であった遺伝子の内、分泌タンパクをコードする既知の遺伝子と未知の EST 配列を合わせた20種類を候補遺伝子とした(図4)。

図4 神経軸索側枝形成因子の単離方法

Gene Chip (Affymetrix) (ラット)を用いたスクリーニング

既知遺伝子:約7,000種類
EST配列:約17,000種類

Total RNA (ラット P1 橋核・橋背側部)

↓

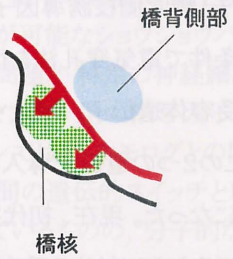
Gene Chip : Average Difference (A.D., 発現量) ≧ 30
A.D. (橋核) ≧ 5 X A.D. (橋背側部)

既知遺伝子(分泌タンパク質)、EST配列 20 種類

↓

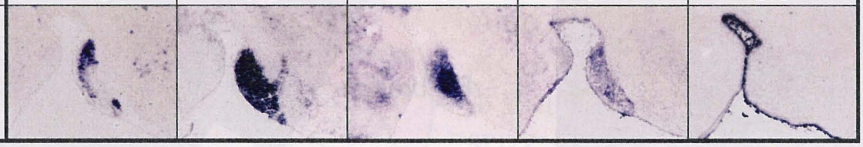
In situ hybridization による候補遺伝子の絞り込み
橋核での発現
他の側枝形成部位での発現

既知遺伝子(分泌タンパク質):3 種類
EST配列:2 種類

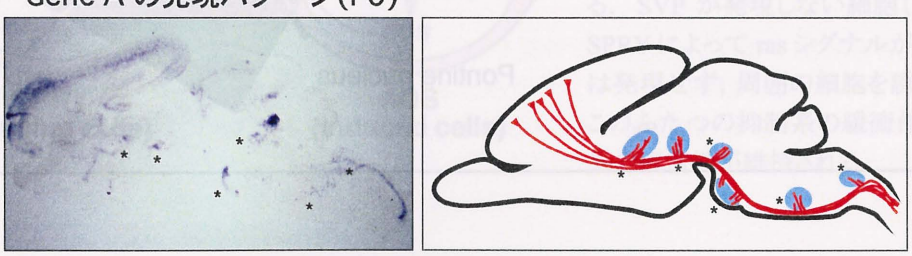


ついで、この20種の遺伝子に関して in situ ハイブリダイゼーション法を用いて新生仔ラット脳内での発現パターンと発現時期について詳細な解析を行った。その結果、軸索側枝誘導因子として機能する為に適切な時期に橋核を含む皮質下の側枝形成部位に発現が認められたものは、既知遺伝子3種類と未知の EST 配列2種類の計5つであった(図5)。図5には代表例4つを示す。図5の GeneE は、髄膜のみで発現しているため、候補から除外した。また A.D.の値の大きさと実際の遺伝子の発現の強さには相関が認められた。

図5 Genechipによるスクリーニング結果例

	Gene A	Gene B	Gene C	Gene D	Gene E
A.D. at BP	298.5	785.8	67.4	35.1	149.2
A.D. at DP	44.4	124.7	13.0	6.9	18.0
Fold Change	7.3	6.3	4.3	5.1	8.3
Expression at BP					

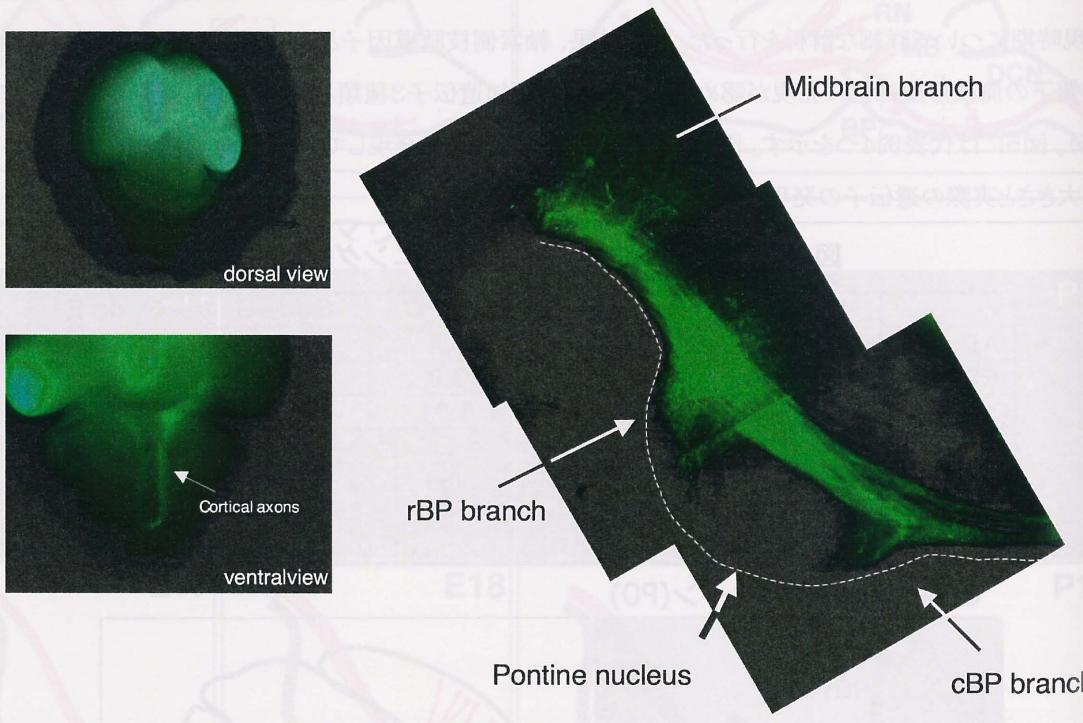
Gene A の発現パターン(P0)



さらに既知遺伝子がコードする蛋白質に対応する受容体が知られているものについて、その新生仔ラット大脳における発現を in situ ハイブリダイゼーション法を用いて調べ、皮質脊髄路の出力である大脳皮質第5層ニューロンに発現が認めたものは有力な候補とした。またデータベースに EST 配列が登録されているのみで、コードする蛋白質が不明なものに関しては、ゲノムデータベース検索ならびに 5'-RACE により、コードする蛋白質を同定しようとしている。更に有力候補として残った遺伝子に関しては、完全長 cDNA を単離し、その機能解析に用いるべく準備を進めている。

次に、これら候補遺伝子の *in vivo* における機能を解析するため、マウス子宮内胎仔脳に対する電気穿孔法による遺伝子導入系の確立を試みた。条件検討の結果、胎生 12.5 日目のマウス胎仔にこの方法を用いる事によって、目的の遺伝子(軸索側枝誘導因子の候補遺伝子)を皮質脊髄路の周囲に異所的に強制発現させる事が可能となった。また別の条件で電気穿孔法を行う事によって、大脳皮質第 5 層の皮質脊髄路起始細胞に目的の遺伝子(候補因子に対する受容体遺伝子、あるいはその受容体のドミナントネガティブフォーム)を強制発現させる事も可能となった(図6)。従ってこの2つの遺伝子導入実験系を用いることにより、候補遺伝子の側枝形成に対する影響を *in vivo* で調べる事が可能になった。現在、初代神経培養およびマウス子宮内胎仔脳に対する電気穿孔法を用いて、これらの候補遺伝子およびそれらに対する受容体遺伝子の機能解析を行っている。

図6 エレクトロポレーション法による Cortical neuron へのGFP遺伝子導入



A03-05

研究課題名：神経細胞特異化の分子機構

研究代表者名：広海健

所属：国立遺伝学研究所・発生遺伝研究部門，総合研究大学院大学・遺伝学専攻

特定領域「神経回路」参加年度：1999 年度～2004 年度

研究成果の要旨

転写因子 Seven-up は神経誘導抑制因子のネットワークを制御することにより，神経細胞の「数の恒常性」に寄与する．また，Seven-up は，神経幹細胞における転写因子のスイッチングをおこなうことにより，自己複製型の幹細胞プログラムを変化させ，「神経細胞の多様性生成」を可能にしている．

研究成果

神経回路の形成に必要な軸索経路の選択，標的認識，シナプス形成などの素過程は，個々の細胞の個性獲得，つまり「神経細胞特異化」に依存している．我々は，個々の細胞が同定でき，遺伝的解析が可能なショウジョウバエ胚中枢神経系および複眼の系を用い，「神経細胞の多様性はいかにして造られるか」という問題と「特定の神経細胞の数はどのようにして一定に保たれるのか」という問題を取り上げた．着目したのは，核内リセプター型の転写因子 Seven-up である．Seven-up は進化的に極めてよく保存された転写因子で，主要ドメインではヒトホモログとの間に 90%以上の同一性を保っている．Seven-up がショウジョウバエ複眼で2種のニューロン間の遺伝的スイッチとして働くことや，様々な生物で Seven-up ホモログが神経発生過程で機能していることが知られているものの，分子的な作用機構は不明であった．我々は複眼のニューロン分化および胚中枢神経系における神経幹細胞の細胞系譜生成過程において Seven-up の遺伝的標的を同定し，神経細胞の「数の恒常性」および「神経細胞の多様性生成」における機能を明らかにした．

(1)ショウジョウバエ複眼は8種類，20個の細胞が一細胞の例外もなく完全に同一セットでひとつの個眼を構成するため，神経細胞の「数の恒常性」を解析する極めて優れた系である．複眼の光受容ニューロンは SPITZ と呼ばれる EGF 様分子によって活性化される ras シグナルによって誘導される．ニューロンになりうる性質を持っている細胞は多数存在するにもかかわらず，各個眼には必ず8個のニューロンが誘導され，偏差は0である．我々はこの正確な誘導は，2種類の ras シグナル抑制因子の発現を転写因子 Seven-up が細胞種特異的に制御することによって達成されていることを見いだした．Seven-up は R1/R3/R4/R6 の4個のニューロンでのみ発現し，ras シグナルの抑制因子をコードする *sprouty* 遺伝子の転写を抑制する．そのため，これらの細胞では ras シグナル活性が上昇し，ras シグナル依存的に転写される *argos* 遺伝子の発現が上昇する，Argos 蛋白質は，分泌されて周囲の細胞の EGF 受容をおさえることによってニューロン分化を抑制する．このような細胞自立的な抑制と非自立的な抑制の拮抗作用により個眼の数の恒常性が維持される(図1)．(投稿準備中)

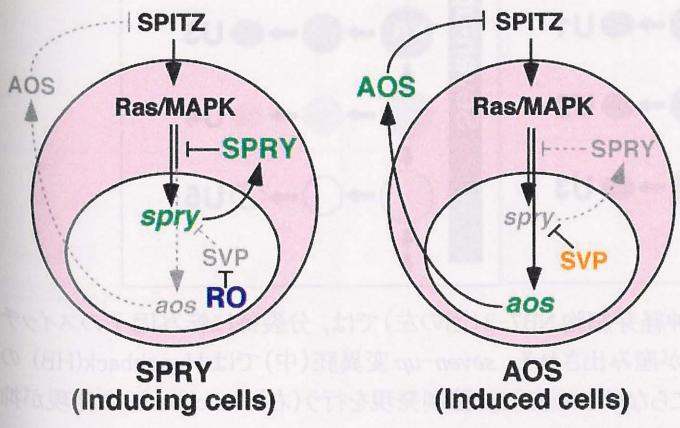


図1 ショウジョウバエ複眼におけるニューロン誘導の制御．Seven-up (SVP) 発現細胞(図の右側の細胞)は，細胞自立的な抑制因子 Sprouty (SPRY) の発現が抑えられているため，ras シグナル活性が高く，そのために ras シグナル依存的に発現する分泌蛋白質 Argos (AOS) が発現し，誘導因子 SPITZ と結合して誘導が無限に続くのをを抑制する．SVP が発現しない細胞(図の左側の細胞)で SPRY によって ras シグナルが低下する結果，AOS は発現せず，周囲の細胞を誘導する能力を持つ．このふたつの抑制系の緩衝作用により，誘導の結果の恒常性が維持される．

A03-05

(2) 多くの器官では組織を構成する細胞は幹細胞の分裂によって産み出される. 幹細胞の特徴は自己複製能により同種の細胞を産み続けることだが, 神経系の神経幹細胞は「分裂毎に異なる種類のニューロンやグリア細胞を産み出す」という特徴を持っている(図2). ショウジョウバエ中枢神経系では, 神経芽細胞と呼ばれる神経幹細胞が, 分裂に伴って Hunchback, Krüppel 等の転写因子の発現スイッチングを行って時間とともに自らの性質を変え, 子孫細胞に誕生の順序の情報にリンクした細胞運命を付与する.

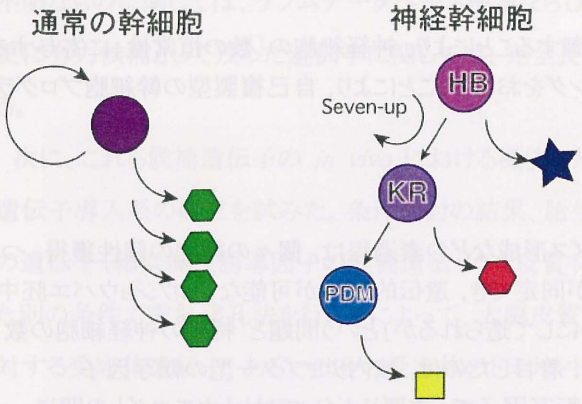


図2 2種類の幹細胞プログラム. 通常の幹細胞(左)は自己複製することにより同種の細胞を作り続ける. 神経幹細胞(右)は Seven-up の作用により分裂毎に自らの性質を変え, 多様な細胞種を生成する.

我々は, Seven-up が神経芽細胞の細胞系譜の特定の時間区画のみで発現することにより, 転写因子スイッチングの時間情報を与えていることを見いだした. *seven-up* 変異胚では神経芽細胞は Hunchback を発現し続け, ニューロン多様性の生成機構は破綻する(図3). Seven-up 強制発現により Hunchback 蛋白質および *hunchback-lacZ* 融合遺伝子の発現はともに抑制される. 従って, Hunchback から Krüppel への転写因子スイッチングは, Seven-up が神経芽細胞における *hunchback* 遺伝子の転写を抑制することによっておこる可能性が高い. 神経芽細胞の初期に生まれる細胞の運命決定には Hunchback や Krüppel が必須であるのに対し, 細胞系譜後期の細胞生成は *hunchback*, *Krüppel*, *seven-up*3重変異体でもおこる. 従って, 神経芽細胞の後期系譜がおそらく幹細胞プログラムのデフォルト(基底状態)であり, そこに Seven-up が導入されることによって自己複製型の幹細胞プログラムを変化させ, 神経細胞の多様性生成を可能にしたのだろう. (投稿中)

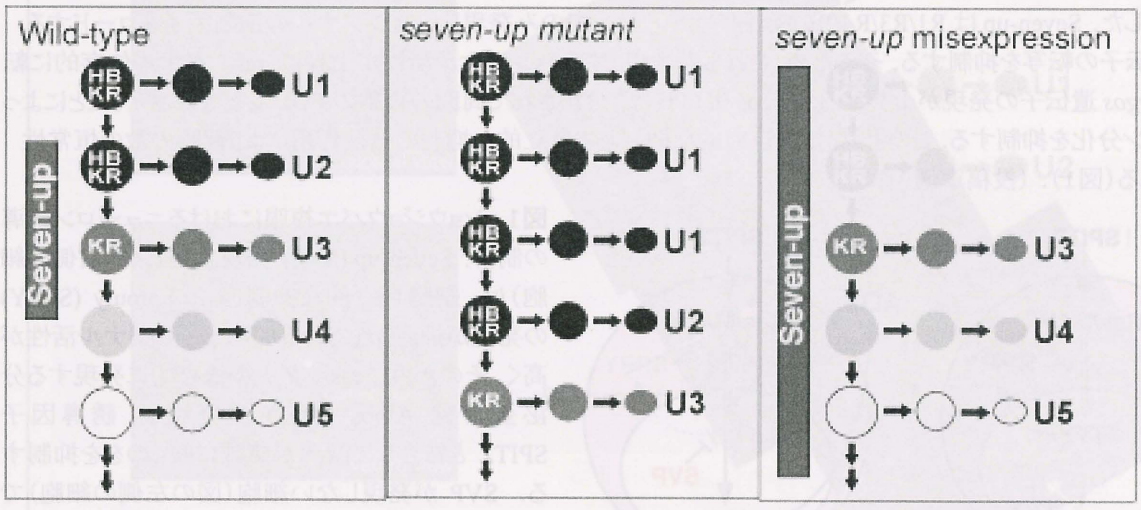


図3 Seven-up による神経細胞多様性生成. 正常な神経芽細胞 NB7-3(図の左)では, 分裂毎に転写因子のスイッチングがおこり, U1ーU5 と呼ばれる5種類のニューロンが産み出される. *seven-up* 変異胚(中)では Hunchback(HB) の発現が長く続き, そのため本来の多様性の生成がおこらない. *seven-up* 強制発現を行う(右)Hunchback の発現が抑制され, 細胞系譜初期に産み出されるニューロンが生成されない.

共同研究

共同研究の相手:広瀬進

共同研究内容:コアクチベーターMBF1の遺伝解析

MBF1は進化的に保存されたコアクチベータであり,bZIP型転写因子とTBPを結びつける働きを担っている.MBF1の生体内での機能を解明するため,その変異系統を作成し,発生遺伝学的解析を行った.その結果,MBF1変異ではbZIP転写因子TDFによる神経回路形成・気管伸長に異常があり,JUNによる酸化ストレス応答が低下していることが判明した.更に,MBF1は合成直後のJUNと細胞質内で結合し,酸化による不活性化からJUNを保護することが明らかになった.(発表論文5, 9)

A03-06

神経活動依存的に発現する分子の探索と機能解析

山形　要人

（財）東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・神経薬理研究部門

特定領域「神経回路」の参加年度　平成１２ 年度ー平成１６ 年度

研究成果の要旨

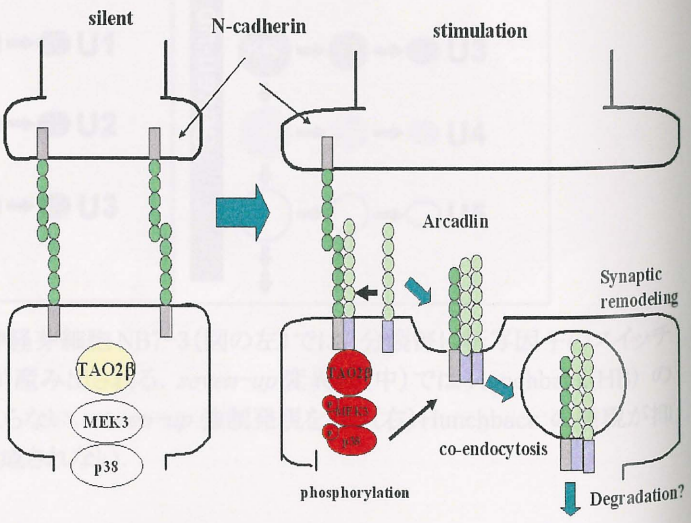
神経活動依存的に発現する遺伝子を探索し、その遺伝子産物の機能解析を行った。その結果、これらの遺伝子産物はそれぞれ違った機能的役割を担いながらも、「神経活動によるシナプスの形態学的・機能的変化、すなわち神経可塑性を制御している」ことを明らかにした。

研究成果

（1）Arcadlin は、神経活動によって脳内で誘導される新しい接着分子である。この分子は、細胞外領域に六個のカドヘリンリピートを持ち、神経活動依存的に一過性に発現し、LTP の形成機構にも深く関与している。この五年間に Arcadlin に関する機能解析を行い、以下の結果を得た。

1）Arcadlin の細胞内結合タンパク質を明らかにするため、two-hybrid system を用いて Arcadlin 細胞内領域と相互作用するタンパク質の cDNA をスクリーニングし、複数の遺伝子を単離した。HEK293T 細胞に Arcadlin、単離された cDNA と GFP の融合遺伝子を共発現させ、Arcadlin の細胞外領域に対する抗体で免疫沈降を行ない、抗 GFP 抗体でウエスタン解析を行った。さらに、共焦点レーザー顕微鏡で Arcadlin の染色と GFP 蛍光の局在が同じ遺伝子産物を探索したところ、セリンースレオニンキナーゼの TAO2 が Arcadlin の細胞内領域に結合していることが予想された。TAO2 は MEK3 をリン酸化し、リン酸化された MEK3 が p38 MAP kinase をリン酸化することが知られている。そこで、HEK293T 細胞に arcadlin、TAO2、MKK3、p38MAPK を発現させ、Arcadlin の細胞外領域を細胞外から添加したところ、MEK３、p38 MAPK のリン酸化が生じ、Arcadlin がエンドサイトーシスすることが明らかになった。ることがわかった。このエンドサイトーシスは、p38 MAPK inhibitor の SB203580 によって抑制され、dominant negative dynamin によっても抑制されることから、p38 MAPK によって調節される clathrin-mediated endocytosis であると考えられた。以上の結果から、TAO2 は物理的に Arcadlin 細胞内領域に結合しているだけでなく、Arcadlin 細胞外領域の同種結合によって機能的に活性化され、その信号を p38 MAPK へ伝達していることが明らかになった。

2）Arcadlin が、別のシナプス接着分子 N-cadherin と神経細胞内で結合していることを免疫沈降法によって明らかにした。さらに、１）の実験系を用いて N-cadherin が Arcadlin と一緒にエンドサイトーシスされることも明らかにした。そこで、その生理的意義を調べるため、*arcadlin* と *N-cadherin* をラット海馬初代培養ニューロンに導入し、樹状突起を観察した。その結果、*arcadlin* と *N-cadherin* 両方を発現したニューロンの filopodia が、N-cadherin のみを発現したニューロンに比べて著しく減少していることが分かった。また、filopodia 膜に存在する



はずのN-cadherinとArcadlinが、樹状突起内の小胞に存在する像も観察された。さらに、*N-cadherin*と*arcadlin*を共発現している成熟ニューロンにおいてもspineが減少していることが明らかになった。逆に、*arcadlin*遺伝子欠損マウス由来のニューロンでは、野生型に比べてspineが増加していた。以上の結果から、「神経活動によって一過性に誘導されたArcadlinは、興奮性シナプスにおいてN-cadherinとシスに結合する。そして、Arcadlinが同種結合することによって両分子がエンドサイトーシスを起こし、シナプス膜表面のN-cadherin分子が減少する」と考えられる。N-cadherinがシナプス形成や維持に必須な分子であるため、その細胞内移行はシナプスの減少を引き起こすと考えられる。また、Arcadlinが海馬の顆粒細胞で最も誘導されるが、これは発作後に生じる顆粒細胞の過剰なシナプス形成を抑制しているためとも考えられる。

(2) 神経活動によって誘導されるプロスタグランジン合成酵素の脳における役割の解析を行った。

1) COX-2（アラキドン酸からプロスタグランジンG2/H2を合成する酵素）のてんかん原性獲得過程における役割を明らかにするため、COX-2ノックアウトマウスを用いて扁桃核キンドリングを行った。野生型マウスでは、キンドリングによる痙攣発作によってCOX-2 mRNAが海馬CA3領域を中心に誘導された。また、キンドリング発達過程においてCOX-2欠損マウスの後発射持続時間は野生型に比して有意に短く、痙攣行動の発達過程も野生型より有意に遅れていた。以上の結果から、COX-2によって産生されたプロスタグランジンは、てんかん原性獲得過程を促進すると考えられた。

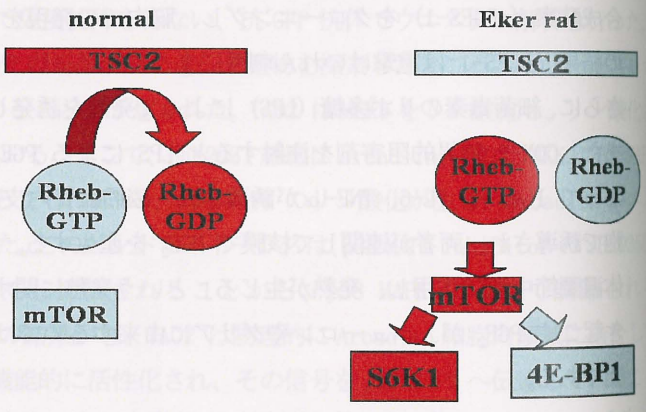
2) 次に、COX-2の下流に位置するPGE2合成酵素の解析も行った。PGE_2は、発熱や炎症のメディエーターとして知られているが、脳内でも神経活動によって合成が調節されている。そこで、PGE_2の脳での産生部位を明らかにするため、ラットのPGE合成酵素（mPGES-1）をクローニングし、脳内での発現をin situ hybridization、Northern blotを用いて解析した。その結果、mPGES-1は電撃けいれん刺激によって神経細胞ではなく、脳の血管内皮細胞で誘導されることが明らかになった。さらに、細菌毒素のリポ多糖（LPS）によって発熱を誘発した時にもCOX-2とmPGES-1が同じ血管内皮細胞で誘導された。また、COX-2特異的阻害剤を注射するとLPSによるPGE_2の産生と発熱が完全に抑えられた。以上の結果から、「LPSによってIL-1やIL-6、TNF-αが誘導され、脳の血管内皮細胞の受容体に作用する。その結果、COX-2とmPGESが内皮細胞で誘導され、両者が連関して核膜でPGE_2を産生する。そして、産生されたPGE_2が脳の実質の方へ運ばれ、視床下部の体温調節中枢に作用し、発熱が生じる」という発熱に関する新しいモデルを提唱した。これは、細菌感染による発熱を引き起こすPGE_2が、ニューロンやグリアに由来するのではなく、血管内皮細胞由来であることを世界で初めて証明した研究である。

3) さらに、カイニン酸による海馬神経細胞脱落における両酵素の役割を解析した。カイニン酸を海馬実質内に注入すると、COX-2は海馬の神経細胞で、mPGES-1は血管内皮細胞で誘導され、48時間後にはCA3を中心に錐体細胞が脱落することが分かった。この細胞脱落は、COX-2ノックアウトマウスでは軽減しており、COX-2の特異的阻害薬NS-398投与によっても抑えられた。現在、mPGES-1ノックアウトマウスを用いて、PGE_2が直接細胞脱落に関わっているかどうかを調べている。

3) Arcも神経活動依存的に誘導される分子である。しかしながら、他の蛋白質とのアミノ酸配列の相同性が低いことから、その機能を類推できない。そこで、Arc結合蛋白質の機能解析を行うことによってArcの機能を見つけようと試み、新しいSH3蛋白質Endophilin-3(Endo3)を見出した。Endophilinは、シナプス小胞や受容体のエンドサイトーシスに関与するdynamin蛋白質に結合し、その機能阻害によってエンドサイトーシスが停止することが知られている。そこで、dynamin-dependentなドーパミンD2受容体のエンドサイトーシスにおけるEndo3の役割を解析したところ、完全長のEndo3を共発現させるとD2受容体のエンドサイトーシスがむしろ抑制されることが分かった。Endo3の発現がこの現象がD2Rに特異的かどうかを確かめるため、トランスフェリン(Tf)のエンドサイトーシスに及ぼす効果を調べたところ、Tfのエンドサイトーシスも抑制されることが分か

った。さらに、その抑制のメカニズムを明らかにするため、Endo1 と 3 の variable region を互いに入れ替えたところ、ほとんど抑制が見られなくなった。以上の結果から、Endo1 と 3 は同じファミリーに属するが、エンドサイトーシスに対しては全く逆の作用を示し、その相違は variable region の相違によると考えられた。次に、実際に脳内で Endo3 が D2R のエンドサイトーシスを調節するかどうかを検証するため、両者が共存する神経細胞を探索し、嗅上皮細胞の神経終末を見出した。しかしながら、in vivo で D2R のエンドサイトーシスを観察することは現状では非常に困難なことから、嗅上皮由来の 13S24 細胞を用いて、以下の実験を行った。この細胞はドーパミンあるいはドーパミン作動薬に反応し、分化することが知られている。そこで、EGFP あるいは EGFP-endo3 をこの細胞に過剰発現させ、ドーパミン作動薬で分化させた。その結果、EGFP だけを発現させた細胞群に比べて、EGFP-endo3 を強制発現させた細胞群では分化細胞の割合が約二倍に増加していることが分かった。これは、endo3 が過剰発現することによって細胞膜の D2R のエンドサイトーシスが抑制され、細胞の分化が早まったと考えられる。以上の結果から、神経活動によって誘導された Arc 蛋白質は Endo3 に結合することによって、受容体やチャネル、接着分子のエンドサイトーシスを制御し、シナプス可塑性を調節していると考えられた。

（4） Rheb は神経活動依存的に発現する低分子量 G 蛋白質である。長らく機能が分からなかったが、昨年 Rheb 分子が異常に活性化されると結節性硬化症(TS)を発症することが示された。TS の原因遺伝子 TSC2 は Rheb に対する GTPase-activating protein (GAP) であり、その分子に変異があるため、Rheb の GTP が加水分解されない。その結果、GTP 結合型 Rheb が mTOR（ラパマイシンの標的分子）を活性化し、蛋白合成が亢進するため脳内に結節が生じる（右下図）。mTOR は樹状突起内の蛋白合成にも関与することも示唆されている。そこで、rheb が樹状突起内の蛋白合成を介して、どのようにシナプスの機能的成熟を制御するかを調べるため、独自に開発した遺伝子導入法を用いて、ラットの海馬スライスに遺伝子を導入し、レーザー顕微鏡を用いてスパイン形態を調べた。その結果、ラットの海馬スライスに *EGFP-rheb* を遺伝子導入すると Rheb 発現スパインが filopodia 様になることが分かった。さらに、TS のモデルラット（Eker）の脳スライスに EGFP 遺伝子を導入したところ、活性型 rheb を導入した時と同じスパイン変化が観察された。このことから、結節性硬化症ではスパインの成熟過程が障害されるため、発達障害を引き起こすと考えられた。



共同研究

3.8.1 共同研究の相手

氏名

班外（各プロジェクト毎の共同研究者）

1) 田中秀和博士（大阪大院・医・薬理）、Edward De Robertis 教授(HHMI, UCLA)

2) 芳賀達也教授（学習院大・生命研）、岡村均教授（神戸大院・医・解剖）、松岡勝人博士（新潟大院・医・解剖）

3) 松村潔助教授（京都大院・情報）、北川一夫博士（大阪大院・医・内科）

4) 樋野興夫部長（癌研・実験病理）

班内　共同研究はいくつか行っているが、まだ発表できる成果は得られていない。また、生理研の松崎班員に gene gun を用いた脳スライスへの遺伝子導入法を見学させていただき、大変参考になった。

3.2 共同研究内容（表題程度）と成果（簡潔に）

Arcadlin の機能解析；田中博士とは Arcadlin と N-cadherin の相互作用について、De Robertis 教授とは arcadlin knockout mouse について共同研究を行い、その成果を現在投稿中である。

Arc および Arc 結合蛋白質 Endophilin の機能解析：岡村教授とは Arc の日内変動に関する共同研究（業績 6）、芳賀教授とは Arc 結合蛋白質 Endophilin-3 に関する共同研究（業績 1）、松岡博士とは副嗅球における Arc の役割に関して共同研究（業績 5, 7, 8, 10）を行った。

プロスタグランジン合成酵素 COX-2 と mPGES-1 の機能解析：松村助教授と mPGES-1 に関する共同研究（業績 7, 9, 11）、北川博士とは脳虚血における COX-2 の役割（業績 3）に関して共同研究を行った。

Rheb の機能解析：樋野部長から結節性硬化症のモデルである Eker ラットを頂き、現在共同研究を進行中である。

3.1 表題(研究課題)　プロテオミクスによる成長円錐からシナプス終末への分子過程の解明

3.2　研究代表者名　五十嵐　道弘

3.3 新潟大学大学院医歯学総合研究科　(医歯学系)　分子細胞機能学

3.4 特定領域「神経回路」参加年度　平成 12－16 年度

3.5 研究成果の要旨

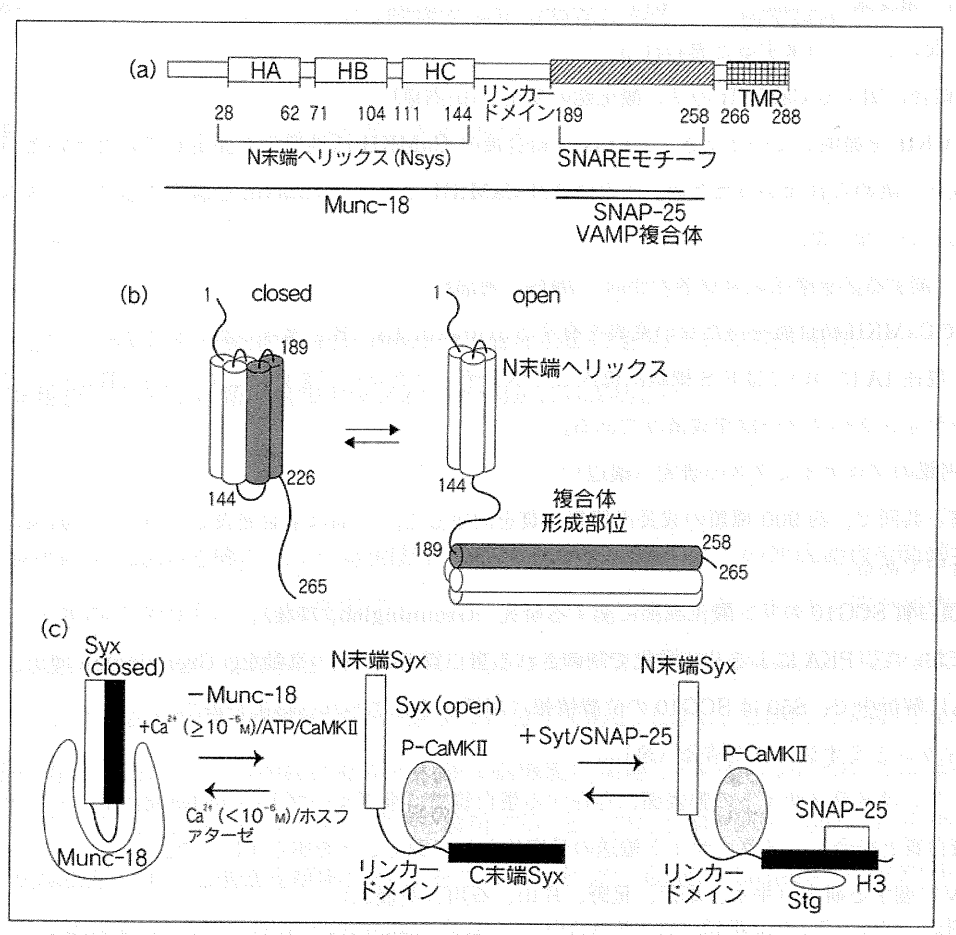
成長円錐からシナプス終末への変換要素の１つが、Ca^{2+}濃度検知機構にあることを証明した。自己リン酸化型CaMKIIが 10^{-6}M以上のCa^{2+}濃度を検知してsyntaxinにCa^{2+}依存性に結合し、syntaxinの立体構造変化を調節して、シナプス伝達を制御することを証明した。

3.6 研究成果

1)　成長円錐はシナプス終末にどのような機構で変化するかを生化学的に明らかにするため、その特性を調べた。その結果、成長円錐はα-latrotoxin (α-LTX) のCa^{2+}非依存性開口放出が起こることがわかった。また成長円錐はシナプス終末の伝達に比較して、rab3A-GTP系の関与が乏しいことがわかった。以上の点から、シナプス伝達は成長円錐にもとから備わっているSNARE系にCa^{2+}依存性の要素が付随し、GTP系の関与が加わって成立することが示唆された(業績 9))。

2) CaMKIIはシナプス前部においてもシナプス小胞の総蛋白質の 2%を占め、シナプス前終末においても重要な機能が示唆される。われわれは、開口放出において中核的な役割を果たすSNARE蛋白質のシンタキシン(syntaxin-1A)に着目し、submicromolar orderのCa^{2+}によって制御される結合蛋白質を探索して、2 種類の分子を見出した。そのうちの１つがCaMKIIであった。われわれの結果から、CaMKIIは活性化（自己リン酸化）した際にのみ、10^{-6}MのCa^{2+}を要求してシンタキシンのlinker domainに結合することがわかった。この部位は、シンタキシンの立体構造変化調節に関係し、シンタキシンはopen formの際にのみ開口放出を促進するSNARE複合体の形成が可能である。われわれはCaMKIIがopen formのみに結合し、SNAP-25 やsynaptotagminなどの蛋白質をリクルートする中間的な複合体形成を促進することがわかった。この結合は、副腎髄質や上頸神経節ニューロンでの開口放出を調節していることを証明した。このCaMKII結合はシンタキシンの立体構造をopen formに固定すると考えられる。シンタキシンは 1 ミリ秒程度で立体構造の変化が起こるため、このような結合が立体構造の固定に寄与すると考えられる(図；業績 2)，5))。

3) 同様に Ca2+依存性シンタキシン結合蛋白質としてミオシンＶを見出した。ミオシンＶは、シナプス小胞と結合して局所的にアクチン依存性に小胞を輸送すると考えられる。われわれはこの分子が、シナプス小胞蛋白質の VAMP と結合することを見出した。VAMP はミオシンＶの globular tail 部分に結合することを明らかにした。さらにミオシンＶが、メラノサイトでの受容体となる melanophilin に結合することがわかった。これらの結果は、ミオシンＶの小胞やオルガネラの受容体として働く分子を見出したことを意味する。ミオシンＶとシンタキシンの結合はこれらの結合とは違って、globular tail の部分に結合しないことがわかった。現在、その詳細な解析を進めている(業績 7)、投稿中)。



3.8 共同研究

3.8.1 共同研究者

熊倉　鴻之助・笹川　展幸　(上智大学生命科学研究所)、持田　澄子(東京医科大学)、高橋　智幸(東京大学大学院医学系研究科)、山内　卓　(徳島大学)、崎村　建司・阿部　学(新潟大学脳研究所) 、Gabriele Grenningloh (ローザンヌ大学細胞生物学研究所；スイス)、牛木　辰男　(新潟大学　医歯学系)、石川　良樹　(群馬大学大学院医学系研究科)、高橋　正身(北里大学医学部)、車田　正男・星野　嘉恵子　(新潟大学医歯学系)、片山　栄作 (東京大学医科学研究所)、池辺　光男 (マサチューセッツ大学医学部；アメリカ)、礒辺　俊明 (東京都立大学大学院理学研究科)、加藤　薫(産業技術総合研究所)、泉　哲郎 (群馬大学生体調節研究所)

3.8.2 共同研究の成果

1) CaMKII と syntaxin の相互作用による開口放出の制御 (熊倉、笹川、高橋智、持田)

クロマフィン細胞による amperometry (熊倉、笹川)、上頸神経節ニューロンのシナプス活動 (持田)、calyx of Held のシナプス活動 (高橋智) を当研究室で作成したプローブを用いて測定していただき、前 2

者で開口放出の頻度減少を確認した。Calyx of Held の系で有意差がなかった原因は、この系での CaMKII の発現量が少ないことに由来すると思われる。

2) Syntaxin 結合に関する CaMKII のリン酸化能の変化 (山内卓)

脳由来 CaMKII を提供していただき、syntaxin 結合後の CaMKII 活性変化を測定していただいたが、活性自体の変化は認められなかったため、この結合は CaMKII でなく、syntaxin を調節するメカニズムであることが明らかとなった。

3) Syntaxin に関するノックインマウスの作成 (崎村、阿部)

Syntaxin で CaMKII 結合能を持たない変異を有する syntaxin-1A, 1B を導入したノックインマウスを作成中であり、現在 1A についてはＥＳ細胞に導入してポジティブクローンを見出している。1B についても既にターゲッティングベクターは作成済みである。

4) 単離成長円錐のプロテオミクスの研究（礒辺）

礒辺研究室と共同で、約 900 種類の成長円錐蛋白質を同定した。一部は学会発表したが、この結果の詳細は現在解析中である。

5) 成長円錐蛋白質 SCG10 のリン酸化調節に関する研究（Grenningloh, 加藤）

成長円錐において、PKA によるリン酸化で制御される蛋白質 SCG10 の挙動を、Grenningloh 博士、加藤博士とともに解析中で、S50 は SCG10 の位置情報に関係すると思われる結果を得た。

6) メラノフィリンとミオシンＶの結合（泉）

メラノフィリンはメラノサイトの膜表面に存在する蛋白質で、泉グループとの共同研究によってミオシンＶがこの蛋白質と結合し、メラノサイト輸送の受容体として働くことを明らかにした。

7) ミオシンＶに関する研究（牛木、車田、星野、片山、石川、高橋正）

Ca^{2+}依存性にsyntaxin-1aに結合するミオシンＶの立体構造の観察(牛木、片山)、運動性への影響(石川)、局在の検討（星野、車田)、小胞膜との関連(高橋正)について検討していただいた。この結果、ミオシンＶ複合体の形状、シナプス小胞へのミオシンＶの集積、運動速度への本質的影響のないこと、などの成果を得ている。

A03-08

中枢神経系の神経回路形成におけるセマフォリンの機能解析

谷口雅彦

東京大学大学院医学系研究科生化学分子生物学講座

特定領域「神経回路」参加年度　平成12年度ー平成16年度

研究成果の要旨

セマフォリンの機能解析のためにセマフォリン3A(Sema3A)ノックアウトマウスの解析を主に行った。この解析により、Sema3A は嗅覚系感覚地図（匂い地図）の正確な形成に必須であることを解明した。また、脳において興味深い発現をしている2種類の新規セマフォリンの同定にも成功した。

研究成果

複雑な脳神経系における機能的な神経回路を形成する過程において、この形成過程を制御する分子として誘引因子と反発因子が存在する。反発因子としては、スリット，エフリン，セマフォリン等が報告されている。セマフォリンは現在までに 20 種類以上報告されているが、セマフォリン3A（Sema3A）は現在までに軸索の反発性軸索ガイド分子であることが示唆されている数少ない分子である。しかし、生体内で実際にSema3Aがどの神経回路形成過程に関わり、その神経回路がどの様な脳機能に関連しているのかについてはほとんど分かっていなかった。そこで、Sema3A ノックアウトマウスを解析することにより、生体内での Sema3A の神経回路形成過程及び高次脳機能における機能を解明することを主な目的とした。以前に Sema3A ノックアウトマウスにおいて、初期発生中の末梢神経系の神経回路形成に異常が認められることを解明した。Sema3A の機能的なレセプターがニューロピリン-1（NP-1）であることを名古屋大学の藤澤博士らと共同研究により明らかにした。これらの成果は Neuron 誌に2報報告した。

嗅覚系において、嗅上皮に存在する嗅細胞は約 1000 種類存在すると言われている嗅覚受容体の内1種類だけを発現しており、同種の嗅覚受容体を発現する嗅細胞の嗅神経は嗅球に存在する約 1800 個の糸球体の内わずか2ー数個の糸球体に正確に投射・収束する。このように糸球体の空間配置は嗅球における嗅覚系感覚地図、いわゆる「匂い地図」を形成する。しかし、正確な匂い地図形成の分子メカニズムは現在ほとんど分かっていない。Sema3A は末梢神経系だけでなく嗅覚系を含む中枢神経系にも特異的な発現が認められる。現在は、嗅球に Sema3A の発現が認められる、嗅神経に Sema3A レセプターである NP-1 が発現している、嗅神経は Sema3A により反発される、という理由等から嗅覚系、特に匂い地図形成における Sema3A の機能に注目をして研究を進めている。Sema3A ノックアウトマウスの嗅球の構造には大きな変化は認められなかった。そこで次に、抗 OCAM（嗅上皮及び嗅球の Zone II-IV に発現）抗体と抗 NP-1 抗体を匂い地図（糸球体地図）作製における分子マーカーとして使用し、成体 Sema3A ノックアウトマウスの匂い地図形成を解析した。ワイルドマウスでは、NP-1を発現している嗅神経は嗅球の内側と外側の2つのバンドとして認められた。しかし、Sema3A ノックアウトマウスにおいてはワイルドマウスで見られたパターンが全く見られず、NP-1 陽性の糸球体は嗅球全体に広がっていた。（図）また抗 OCAM 抗体による匂い地図においても興味深い結果が得られた。さらにノックアウト

マウスの機能解析において、匂いに対する嗅球の反応を見るために optical imaging 法を用いて神経活動を解析した結果、匂いに対するパターン形成の変化を明らかにした。これらの変化はノックアウトマウスの個体ごとに異なり、さらに同一個体の左右の嗅球間でさえ変化していた。以上のことより、Sema3A は嗅球において正確な匂い地図を形成するために必須であることを解明した。Sema3A は嗅球における匂い地図の軸形成に特に関与していると考えられた。

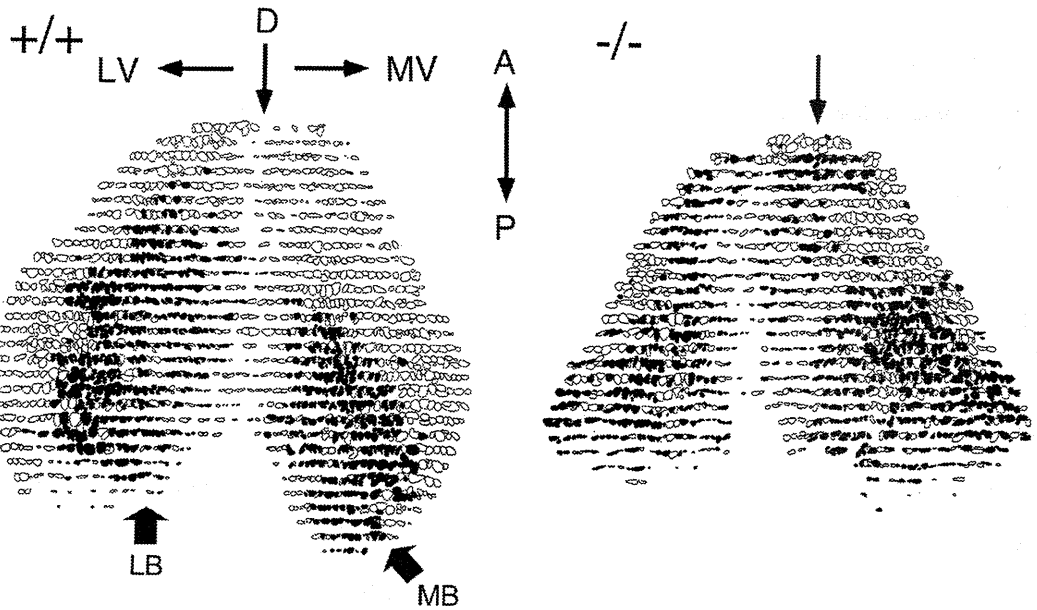


図　ニューロピリン-1(NP-1)抗体による嗅球の糸球体（匂い）地図
ワイルドマウス(+/+)とSema3Aノックアウトマウス(-/-)の糸球体地図を示している。D(dorsal)が嗅球の背側で、LV(lateroventral)とMV(medioventral)の方向が腹側である。A(anterior)が嗅球の前側で、P(posterior)が後側である。●がNP-1抗体陽性の糸球体で、○が陰性の糸球体である。ワイルドマウスではLB(lateral band)とMB(medial band)の２つのバンドが認められる。ノックアウトマウスではこのようなパターンは認められない。

また、セマフォリン分子の中枢神経系における機能を解析するために、中枢神経系に発現が認められる新規のセマフォリン分子のクローニングを試みた結果、2種類の新規セマフォリン分子(Sema3G と Sema6D)のクローニングに成功した。Sema6D は成体では脳に特異的に高発現しており、胎仔から成体の脳に至るまで高発現している。Sema3G は中枢神経系においては生後の小脳特異的に発現している。Sema3G、Sema6D とも神経軸索に対する反発活性を持っている。これら新規セマフォリンの機能解析も現在進めている。

共同研究

共同研究の相手

森　憲作（東京大学大学院医学系研究科生理学講座）

共同研究内容と成果

匂い地図形成における Sema3A の役割。嗅球における嗅覚系感覚地図（匂い地図）の正確な形成に Sema3A が必須であることを解明した。

A03-09

表題：神経回路ネットワーク形成における低分子量G蛋白質Rhoファミリーの役割

研究代表者名：根岸　学

所属：京都大学大学院生命科学研究科

特定領域「神経回路」参加年度：平成１２年度―平成１６年度

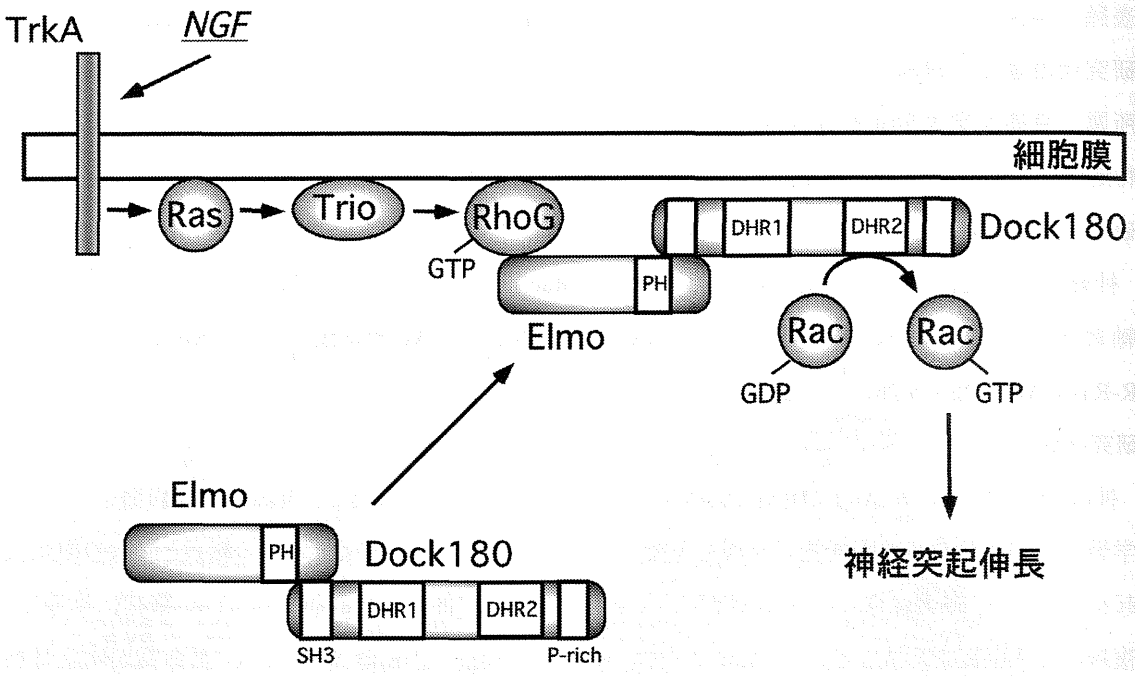
研究成果の要旨

神経突起伸長にRhoG-Elmo-Dock180の新しいRac活性化経路か関わることを明らかにした。また、軸索ガイダンス分子、Sema4Dの受容体、Plexin-B1はR-Ras GAPを直接コードし、Rnd1の結合によりR-Ras GAP活性を発揮し、反発作用を示すことを見いだした。

研究成果

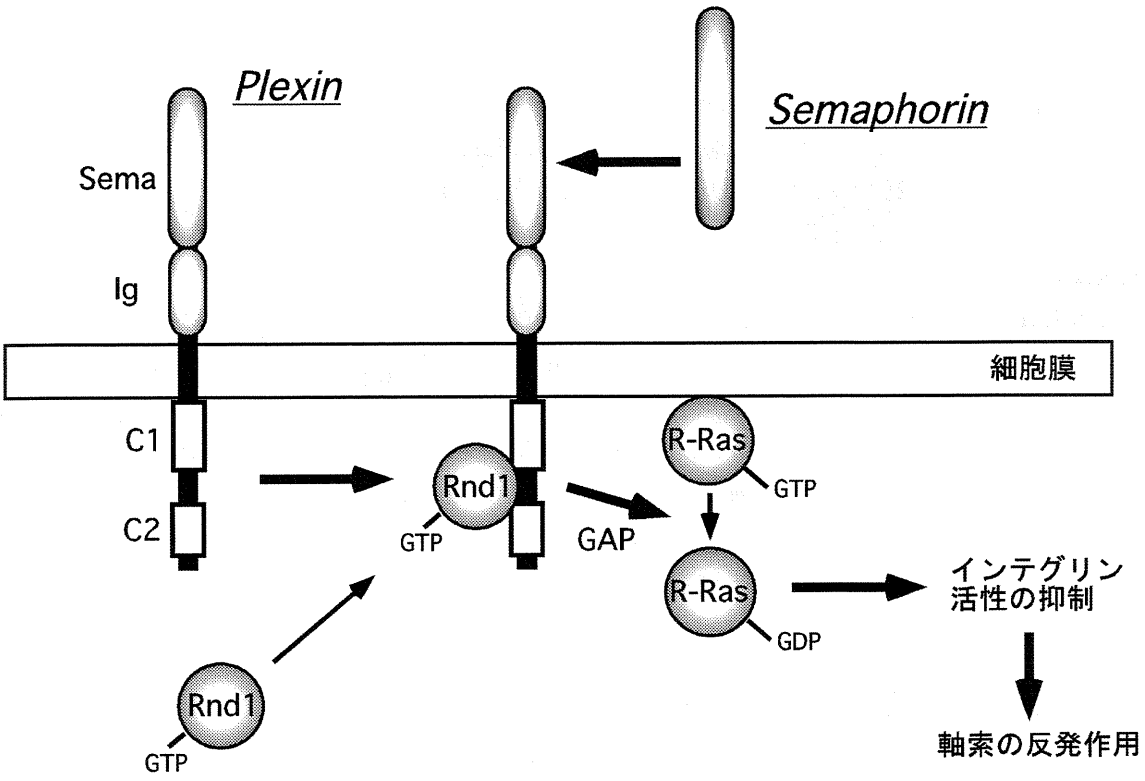
神経細胞は、その特徴的な構造である神経突起を介して互いに接着し、複雑な神経回路を形成し、学習や記憶などの高次脳機能の発現を可能にしている。通常、神経細胞は1本の軸索と複数の樹状突起を伸長する。軸索は様々な軸索ガイダンス分子に導かれて伸長し、目的のターゲット細胞に到達し、複雑な神経回路を形成する。この軸索ガイダンス作用に細胞内でRhoファミリーG蛋白質が細胞骨格の制御を介して重要な役割を果たしている。Rhoファミリーの中で、Rho、Rac、Cdc42は最もよく研究されており、Rhoは神経突起の退縮を、RacとCdc42は神経突起の伸長に関わっていることが明らかにされている。Rhoファミリーにはそれ以外に多くの種類が存在するが、それらの神経機能における役割はあまりよく分かっていない。

PC12細胞で、NGFがRasを活性化して神経突起伸長を引き起こすことはよく知られている。我々は、RhoファミリーG蛋白質の1つ、RhoGがRasの下流で作用し、RacとCdc42を活性化し、神経突起の伸長を引き起こすことを見いだし、RhoGがRacとCdc42の上流の制御分子であることを見いだした。さらに、RhoGによるRacやCdc42の活性化機構を明らかにするため、Rac、Cdc42を活性化するRhoGのエフェクター分子を酵母のtwo-hybrid法でスクリーニングし、ElmoがRhoGのエフェクターであることを同定した。ElmoはDHドメインを持たない新しいタイプのRac活性化因子、Dock180に結合する分子として同定された分子である。活性化されたRhoGはElmoに結合し、Elmo-Dock180を細胞膜に移行させ、三者複合体を形成し、Racを活性した。そして、NGFまたはRhoGによる神経突起伸長はElmoやDock180のドミナントネガティブ体で抑制されたことから、NGFによる神経突起伸長に、RhoG-Elmo-Dock180の経路が働き、Racを活性化して突起伸長促進を引き起こしていることがわかった。この新しいRac活性化経路、RhoG-Elmo-Dock180は、種を超えてその存在が知られており、ショウジョウバエではMtl-DCED12-Mbc、線虫ではMIG2-CED12-CED5が対応すると考えられる。MtlやMIG2はaxon pathfindingに必要であることが知られているので、この新しい経路が神経突起伸長、さらに神経回路形成に重要な役割を果たしていることが考えられる。



我々は、Rho ファミリーの中で、中枢神経系に主要に発現している常時活性型の Rnd1 の神経機能を明らかにするため、まず Rnd1 の脳における発現を解析した。その結果、Rnd1 は胎生20日頃から発現し始め、生後14日から20日頃高い発現がみられ、その後減少した。発現は脳の幅広い範囲でみられ、特に、大脳皮質や海馬の錐体細胞や小脳のプルキンエ細胞に極めて強く発現していた。このことから、Rnd1 が神経回路形成期にこれらの神経細胞で何らかの役割を果たしていることが推察された。そこで、Rnd1 の神経機能の分子機構を明らかにするため、Rnd1 に結合する分子を two-hybrid 法でスクリーニングし、神経軸索ガイダンス分子、Sema4D の受容体、Plexin-B1 の細胞内領域に Rnd1 が結合することを見いだした。Plexin-B は C 末端に PDZ 結合モチーフがあり、PDZ-RhoGEF が結合して RhoA を活性化し、退縮反応が起きることが知られている。しかし、この PDZ 結合モチーフは B クラスのみで他の Plexin クラスには見あたらず、また、ショウジョウバエや線虫の Plexin-B にはないことから、Plexin ファミリーの共通の情報伝達機構とは考えられなかった。Plexin ファミリーの細胞内領域には、全てにおいて種を超えてよく保存されている領域 C1 と C2 が存在する。そして、Rnd1 は C1 と C2 の間に結合する。我々はこの領域の機能を解析し、Plexin-B1 の細胞内領域が R-Ras に対する GAP であることを見いだした。この R-Ras GAP 活性の発現には Rnd1 が Plexin-B1 に結合することが必要であり、リガンドの Sema4D の刺激により、in vivo および in vitro で R-Ras GAP 活性を発揮した。次に、Sema4D による反発作用における R-Ras GAP 活性の役割を、PC12 細胞やラット初代培養海馬神経細胞を用いて解析した。その結果、Plexin-B1 の R-Ras GAP 活性を欠失した変異体や Rnd1 が結合出来ない変異体は Sema4D による反発作用を示さないこと、また、siRNA により Rnd1 をノックダウンしても反発作用が消失すること、また、R-Ras GAP の GAP ドメインのみを発現させたり、siRNA で R-Ras をノックダウンするとそれだけで退縮作用が引き起こされることから、Plexin-B1 はその細胞内領域にある R-Ras GAP により反発作用を発揮

することがわかった。さらに、Sema3A-Plexin-A による反発作用も R-Ras 活性の低下が必要であり、R-Ras GAP が Plexin ファミリーの共通の情報伝達系であることが推察される。R-Ras は細胞の遊走や細胞膜の伸展を促進することが知られており、神経軸索は R-Ras の活性で伸展し、Plexin はこの R-Ras 活性を抑制することにより反発作用を発揮するものと考えられる。



regulator for neurite outgrowth in PC12 cells. **Mol Cell Biol** 20: 7378-7387, 2000

層特異的な視床皮質投射形成を担う細胞表面・細胞外マトリックス分子の解析

大阪大学大学院生命機能研究科
山本亘彦

特定領域「神経回路」参加年度　平成１２−１６年度

研究成果の要旨

発生期の大脳皮質に発現する細胞外分子の探索を行い，netrin受容体の新規分子unc5h4が皮質4層に，ephrin-B3が辺縁系に，T-cadherinが視床軸索に発現することが分かり，培養系などの解析からそれらが視床皮質投射の形成や皮質細胞分化に関与する可能性が示唆された。

研究成果

視床皮質投射は層，領域，機能コラムの特徴を有し，これまでの生理学や解剖学の研究からその投射様式やシナプス結合について詳細に記載されていることから，神経回路の形成機構を知るために適した系と言えよう。近年の発生学的な研究やin vitro標本での研究から，視床視床軸索が内包を経て大脳に侵入する過程や最終標的である皮質４層細胞の認識機構が明らかになってきた。さらに，その分子機構として内包付近での誘引機構や，標的層においては枝分かれ促進因子や軸索伸長抑制因子の存在が示唆されている（Yamamoto et al., 1997, 2000a, 2000b)。しかしながら，これらを担う分子の正体や作用機序については依然不明なままである。本研究では，視床皮質投射形成の分子メカニズムを解明するために，軸索の伸長経路から標的層までの誘導を担う分子機構について次の研究を行った。

① 大脳皮質４層に発現する遺伝子探索
② 視床軸索伸長に対するEph-ephrinシステムの役割
③ 皮質内での視床軸索成長に対する神経栄養因子の役割
④ 視床軸索に発現するT-cadherinとその神経回路形成における役割の解析

以下，これらの研究について示す。

①大脳皮質４層に発現する遺伝子探索

視床軸索の標的である皮質４層に発現する遺伝子を同定するために，4層cDNAから５層cDNAを差し引いたサブトラクションライブラリーを作製し，そのライブラリーから個々のクローンの生後７日目ラット大脳における発現パターンをin situ hybridizationによって調べた。その結果，皮質４層を中心に強く発現する２つのクローン（#571, #585）とまた2/3層から４層にかけて強く発現する２つのクローン（#746, #846）が得られた。４層に強い発現が見られた#571は，netrin受容体ファミリーに属する新規分子(unc5h4)であり，#585はdeltex様遺伝子(deltex-like gene)であることが判明した。一方，2/3層から４層にかけて強く発現していたクローン#746と#846はそれぞれ分泌因子stem cell factor（SCF）と転写調節因子myocyte specific enhancer factor 2C（MEF-2C）であることが分かった。

これら４個のクローンは大脳皮質の広い領域にまたがって発現が見られたが，unc5h4とSCFは体性感覚野や視覚野に比較的強く発現していた。それに対して，deltex-like遺伝子とMEF-2Cは大脳皮質全体に強く発現していた。以上４個の分子と視床皮質投射の形成との関連性を調べるために，発生を追って発現パターンを解析すると，unc5h4とSCFが特に興味深い発現を示した。

unc5h4 の発現部位はどの時期においても４層細胞の位置とよく合致していた。一方，SCF は視床ニューロン軸索が大脳皮質内で伸長する時期に，深層での発現が次第に弱くなり，代わりに表層での発現が徐々に強く現れ，成長する視床ニューロン軸索の先端の位置との間に相関が見られた。さらに unc5h4 については，その細胞外ドメインのタンパク質を塗布した培養皿上で視床ニューロンを培養したところ，細胞体や軸索が集合する傾向にあることが見出された。

以上の結果より，2/3 層から 4 層にかけて層特異的に発現する遺伝子を得ることに成功し，またその内の unc5h4 は視床皮質投射の形成に関連していることが示唆された。

図１．生後７日目ラット脳切片における unc5h4 の発現パターン．右では，隣合う切片でのニッスル染色と比べられている。

②視床軸索伸長に対する Eph-ephrin システムの役割

大脳皮質における神経結合は層構造と領野構造の二つの原則に基づいて構築される。中でも視床から大脳への結合については詳細な記述がなされ，視床ニューロンの軸索はそのモダリティーに応じて特定の領野に投射し，さらに皮質内では主として４層で終止し枝分かれを形成することが知られている。我々は，この特異的な神経回路の形成機構を明らかにすることを目的として発生期の脳に発現する分子の探索を行っている（上記参照）。その探索の過程でレセプター型チロシンキナーゼ EphA4 が視床外側部に発現していることを見出した。近年 Eph とそのリガンドファミリー ephrin は軸索ガイダンス機構に関与する分子メカニズムとして報告されており，本研究では視床皮質投射形成に EphA4 とそのリガンド分子の相互作用がどのように関与しているかを解明しようとした。

まず発生期におけるラットの脳での EphA4 の詳細な発現パターンの解析を行った。*in situ* ハイブリダイゼーション法により EphA4 は発生期を通して外側膝状体や一次体性感覚野へ投射する後外側腹側核・後内側腹側核などの視床外側部に強く発現していることが示された。一方大脳辺縁系へ投射する視床内側部にはほとんど発現していなかった。さらに，抗体染色により視床軸索の走行している内包や中間層（白質）に EphA4 が強く発現することが示された。次に EphA4 のリガンド分子として作用し得る ephrin-A1・A2・A3・A4・A5 と ephrin-B2・B3 の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて調べたところ，すでに報告されている ephrin-A５に加えて，ephrin-B3 が発生期の脳に強く発現していることが判明した。ephrin-B3 は，胎生期には扁桃体や海馬などの大脳辺縁系に強い発現していたのに対して，大脳新皮質においては全く発現が見られなかった。ただし，生後３日目になると新皮質の 2/3 層と 5 層上部に発現が観察された。これらの発現分布は EphA4 と ehprin-B3 の相互作用が視床皮質投射の形成に抑制的に働いていることを連想させるものである。そこで ephrin-B3 を強制発現させた細胞

株由来の膜分画上で機能解析を行ったところ，視床外側部の組織片からの突起伸長が著しく抑制された。一方，視床内側部の組織片からの突起伸張にはそのような効果は無かった。

以上の結果より，視床外側部の軸索が大脳辺縁系を避けて大脳新皮質を選択するメカニズムならびに最終標的である新皮質 4 層で局所的な枝分かれを形成するメカニズムに， EphA4 と ephrin-B3 の抑制的・反発的なシグナル伝達が関与していることが示唆された。

③皮質内での視床軸索成長に対する神経栄養因子の役割

視床皮質投射におけるニューロトロフィン及び細胞表面分子並びに細胞外マトリックス分子の影響を明らかにするために，視床皮質投射系の形成に対するニューロトロフィンの役割を明らかにすることを試みた。そのために培養下における視床ニューロンの軸索伸長を解析した。ラットの胎生 15 日目の視床組織片を，コラーゲン基質上あるいは一旦ホルマリンで固定した大脳皮質切片上(生後 7 日目)で，BDNF，NT3 のニューロトロフィン存在下(各 200nM)で 2-7 日間培養した。コラーゲンゲル内あるいはコラーゲン塗布膜上では BDNF を添加することで視床ニューロンの軸索伸長が著しく促進され，促進距離が約倍近くに増加した。それに対して，NT3 存在下では顕著な変化は見られなかった。一方，固定皮質切片上では NT3 の添加によって軸索伸長が約 1.5 倍増大し，BDNF 存在下でも軸索伸長は増大したが，約 1.2 倍程度に過ぎなかった。さらに，NT3 存在下では層での軸索伸長の違いもあり，表層での軸索がより強く促進される傾向が見られた（表層では NT3 添加により 1.7-1.9 倍に増加するが，深層では 1.2-1.4 倍程度)。以上，発達期の視床ニューロンの軸索伸長はコラーゲンにおいては BDNF，固定切片上ではより NT3 によって促進されたことから，BDNF と NT3 による基質に依存した軸索伸長の制御機構が存在することが示唆された。

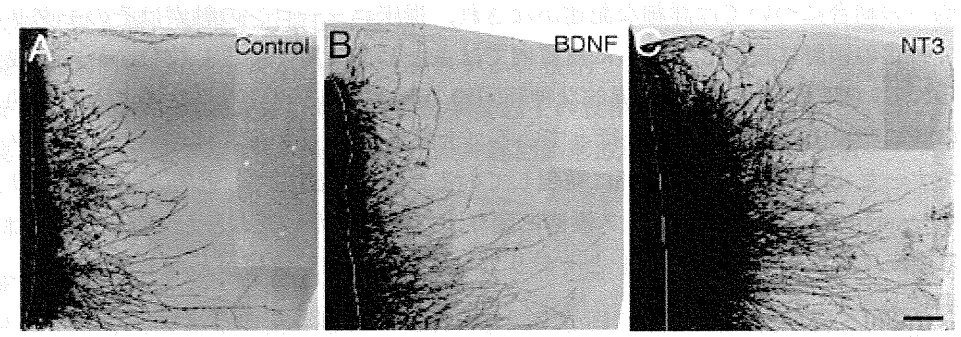


図２．視床軸索は NT3 存在下で皮質切片上での軸索伸長が増大する.

④視床軸索に発現する T-cadherin とその神経回路形成における役割の解析

層特異的に発現する細胞表面分子や細胞外マトリックス分子を同定し，その形態的あるいは機能的意義を解析することを目指して，遺伝子探索に加えてモノクローナル抗体法を用いる解析を行った。その内で６C９抗体は発生期の視床−皮質間の投射経路に強い発現を示すものであった。その抗原を同定するために，６C９抗体のアフィニティーカラムを作製し，発生期脳をホモジェナイズした膜分画（可溶化）を加えて溶出させた。その結果，SDS-PAGE において分子量約８万のシングルバンドが得られ，さらにアミノ酸分析装置により配列を解析したところ，6C9 抗原は T-cadherin(CD13)と呼ばれるカドヘリンファミリーに属する膜タンパクであることが判明した。次に，T-cadherin の ISH を行ったところ，そのシグナルは視床に加えて，大脳皮質 5,6 層の一

部の細胞に強く発現することが明らかになった。

このように，T-cadherin は皮質下位神経核投射に関わる 5 層細胞や視床に特異的に発現することが明らかになり，軸索の束化などに関与し，皮質視床あるいは視床皮質投射の形成に一役かっていることが示唆された。

共同研究

共同研究者：藤田一郎，米島宏幸，Zoltan Molnar，Etinne Audina ら

研究内容：大脳皮質 5 層に発現する分子探索の結果，げっ歯類から霊長類の大脳において 5 層細胞が転写調節因子 ER81 特異的に発現し，脊髄・上丘への投射と皮質皮質投射の一部を形成に関与することが示唆された。

研究成果：2004 年第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学大会合同大会（大阪）にて発表．及び論文（ER81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate cerebral cortices）投稿中.

A03-11

リン脂質代謝酵素による神経突起形成と伸長の制御

研究代表者：金保安則
（財）東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所
特定領域「神経回路」参加年度：平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨

様々なシグナル伝達系に関与しているリン脂質代謝酵素 PIP5K と PLD の神経突起リモデリングにおける役割を解析した。その結果、PIP5K は軸索の反発応答とスパイン形態を制御し、PLD アイソザイムの一つである PLD2 は軸索の誘引応答を制御していることが明らかとなった。

研究成果

細胞内に存在するリン脂質代謝酵素は、アゴニスト刺激に応答して細胞膜構成成分のリン脂質を代謝し、種々のシグナル伝達において重要な役割を果たす脂質性シグナル分子を産生する。リン脂質代謝酵素のホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ（PIP5K）とホスホリパーゼ D（PLD）は細胞膜形態を制御する可能性が考えられる脂質性シグナル分子のホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸（PIP2）とホスファチジン酸（PA）をそれぞれ産生する。そこで我々は、これら二種のリン脂質代謝酵素について、神経突起の形成や伸長など、神経細胞の形態変化における役割について解析を行い、以下の結果を得た。

（１）PIP5Kに関する研究成果　―軸索リモデリングとスパイン形態における役割―

１．軸索リモデリングにおける役割

マウス神経芽細胞腫 N1E-115 細胞は、血清存在下では球状を呈しているが、血清飢餓により神経突起を伸長する。また、一旦形成された神経突起は、リゾホスファチジン酸（LPA）や血清刺激により退縮する。この細胞を神経細胞モデルとして用いて、PIP5K が神経突起リモデリングへ関与するか否かについての解析を行った。現在までに PIP5K はα、β、γの三種類のアイソザイムが同定されているが、野生型 PIP5Kα を N1E-115 細胞に過剰発現させると、血清飢餓による神経突起の伸長が阻害されて球状を呈していた。一方、PIP5Kαの活性欠失型変異体（PIP5Kα-KD）を過剰発現させると、血清存在下で培養しているにもかかわらず非常に長い神経突起が形成された。さらに、PIP5Kα-KD の過剰発現は、LPA 刺激による神経突起の退宿を阻害した。LPA 刺激による神経突起の退縮においては、低分子量 G 蛋白質の RhoA とそのターゲット分子である ROCK（Rho kinase）が重要な役割を果たしていることが知られているが、PIP5Kα-KD を ROCK と共発現すると、ROCK による神経突起の退縮が阻害された。これらの結果から、PIP5Kαは N1E-115 細胞の神経突起退縮シグナル系において RhoA/ROCK の下流因子として機能していることが明らかとなった。

上記の結果は神経様培養細胞を用いて得られたものであり、PIP5Kαが実際に神経細胞でもこのような生理機能を有するかを検証する必要がある。そこで、初代培養マウス後根神経節（DRG）神経細胞を用いて詳細な解析を行った。PIP5K の各アイソザイムをマウス DRG 神経細胞に過剰発現させてそれらの細胞内局在を観察すると、αとγアイソザイムは細胞体にのみ局在しており、PIP5Kβは細胞体に加えて軸索と成長円錐にも局在していた。また、内在性 PIP5Kβの細胞内局在も過剰発現させた PIP5Kβと同様であった。これらのことより、DRG 神経細胞における軸索リモデリングに PIP5Kβが関与している可能性が高い。従

って、PIP5Kβに焦点をあて、その可能性について検討した。野生型PIP5Kβをマウス DRG 神経細胞に発現させると、その軸索伸長が抑制され、成長円錐が縮小した。一方、活性欠失型 PIP5Kβ（PIP5Kβ-KD）を発現させると、軸索伸長は有意に促進され、成長円錐も拡大した。これらの結果から、PIP5Kβは DRG 神経細胞における軸索伸長を負に制御していることが示唆された。さらに、反発因子セマフォリン 3A による成長円錐の崩壊を指標にして、反発応答シグナル系における PIP5Kβの関与の有無を検討した結果、PIP5Kβ-KD はセマフォリン 3A による成長円錐の崩壊を顕著に阻害した。このことより、PIP5Kβは DRG 神経細胞のセマフォリン 3A 依存的反発応答シグナル系において重要な役割を果たしていることが示唆される（図１）。

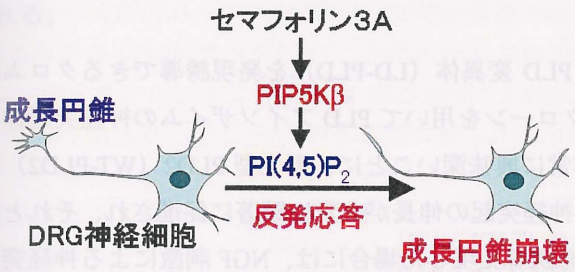


図1　PIP5KβはDRG神経細胞におけるセマフォリン3A依存的な反発応答シグナル系を制御している

以上の結果から、PIP5K が神経細胞の軸索リモデリングにおける反発応答シグナル系を制御していることは確かであるが、N1E-115 細胞と DRG 神経細胞ではそれぞれ PIP5Kαとβが関与するという、異なる結果が得られた。この相違は、用いた細胞種の違いに起因しているのかも知れない。今後は、この点を明らかにする必要がある。

２．スパイン形態形成における役割

神経細胞の興奮性シナプス後部の樹状突起には、スパインと呼ばれるアクチン細胞骨格に富んだキノコ型の微小突起構造体が存在する。その形態は神経活動や記憶の細胞レベルでの現象と考えられる長期増強に伴って変化するため、シナプス可塑性において重要であると推察されている。PIP5K は、その産物 PIP2 がアクチン細胞骨格を再構築することによって細胞膜形態を制御する可能性が想定されているので、PIP5K のスパイン形態制御における関与について解析を行った。三種の PIP5K アイソザイムのうち、野生型 PIP5Kβを初代培養海馬神経細胞に過剰発現させるとスパイン数が顕著に減少し、一方、PIP5Kβ-KD を過剰発現するとスパイン数は増大した。これらの結果から、PIP5Kβはスパイン形態を制御していることが示唆される。スパイン形態制御シグナル系における PIP5Kβの上流因子を同定するため、我々が PIP5K 活性化因子として同定した低分子量Ｇ蛋白質 ARF6 に焦点を絞って解析を進めた。活性型 ARF6（ARF6-CA）を初代培養海馬神経細胞に過剰発現させるとスパイン数は顕著に減少し、一方、ドミナントネガティブ ARF6 変異体（ARF6-DN）を過剰発現させるとスパイン数の増大が認められた。このように、ARF6 と PIP5Kβはスパイン形態に対して同様の効果を有していることが明らかとなった。さらに、ARF6-CA は PIP5Kβと細胞内で相互作用し、in vitro で ARF6-CA は PIP5Kβを活性化することが明らかとなった。これらの結果から、スパイン形態制御において、ARF6→PIP5Kβシグナル系がスパイン形態を負に制御していることが示唆される。

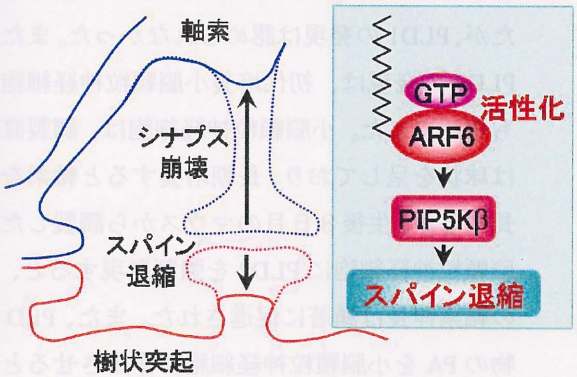


図2　PIP5KβはARF6の下流因子として機能し、スパイン形態を制御する

（２）PLDに関する研究成果　―軸索伸長における役割―

動物細胞 PLD については、これまでに PLD1 と PLD2 の二種類のアイソザイムが同定されている。PLD1 の活性調節機構と生理機能についてはこれまでに精力的な解析が行われており、低分子量G蛋白質の ARF や Rho ファミリーメンバー、プロテインキナーゼCにより活性化されることや、神経伝達物質の放出などの調節性エキソサイトーシスに密接に関与していることが明らかになっている。一方、PLD2 の活性調節機構や生理機能については不明な点が多い。PLD2 は主には細胞膜に局在しており、細胞膜形態を制御することが想定されている PA を産生することから、我々は PLD2 が神経細胞の形態を制御する可能性を想定して、その解析を行った。

二種類の PLD アイソザイムとそれらの活性欠失型 PLD 変異体（LD-PLD）を発現誘導できるクロム親和性細胞腫 PC12 細胞を作製し、これらの PC12 細胞クローンを用いて PLD アイソザイムの神経突起伸長における関与についての解析を行った。その結果、非常に興味深いことに、野生型 PLD2（WT-PLD2）を誘導発現した PC12 細胞においては、NGF 刺激による神経突起の伸長が非常に顕著に促進され、それと同時に PLD 活性も促進された。これに対し、LD-PLD2 を誘導発現した場合には、NGF 刺激による神経突起の伸長と PLD 活性化はともに抑制された。一方、WT-および LD-PLD1 を誘導発現した PC12 細胞においてはこのような影響は認められなかった。これらのことから、PLD2 は PC12 細胞において NGF 依存的な神経突起の伸長に関与することが示唆される。

PC12 細胞の NGF 依存的な神経突起の伸長においては、MAP kinase の一つである extracellular signal-regulated kinase（ERK）が重要な役割を果たすことが知られている。そこで、神経突起伸長シグナル系における ERK と PLD2 の関係を解析した結果、（１）PLD2 を誘導発現した PC12 細胞において NGF 依存的な PLD の活性化と神経突起伸長の促進が ERK の上流因子である MEK の特異的阻害剤により抑制されること、（２）活性型 MEK と WT-PLD2 を共発現すると、PLD2 活性が上昇すると同時に活性型 MEK による神経突起の伸長が促進されること、および（３）活性型 MEK の過剰発現による神経突起の伸長は LD-PLD2 の共発現により阻害されること、が明らかとなった。これらの結果から、PLD2 は NGF 依存的に活性化される ERK の下流で活性化されて、神経突起の誘引応答シグナル系で重要な役割を果たすことが結論づけられる。

PC12 細胞は神経様培養細胞であり、PLD2 が実際に神経細胞でもこのような生理機能を有するかを検証する必要がある。そこで、初代培養小脳顆粒細胞を用いて詳細な解析を行った。生後８日目のマウスから調製した小脳においては、PLD2 が発現していたが、PLD1 の発現は認められなかった。また、PLD2 の発現は、初代培養小脳顆粒神経細胞でも確認できた。小脳顆粒神経細胞は、調製直後は球状を呈しており、長期培養すると軸索を伸長するが、生後８日目のマウスから調製した小脳顆粒神経細胞に PLD2 を強制発現すると、この軸索伸長は顕著に促進された。また、PLD 産物の PA を小脳顆粒神経細胞に作用させると、軸索伸長が促進された。これらの結果から、PLD2 はその産物 PA を介して軸索伸長に重要

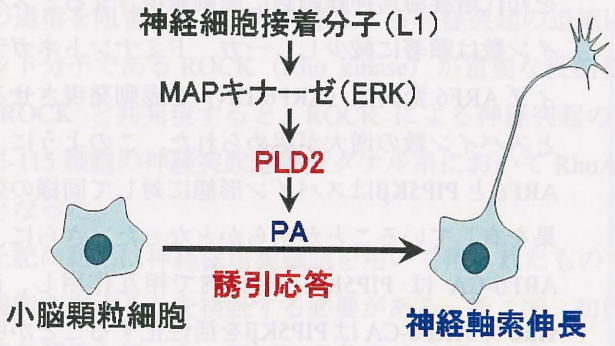


図３　PLD2は小脳顆粒細胞においてERK MAPキナーゼの下流で機能してL1依存的な誘引応答を制御する

な役割を果たしているものと結論づけられる。さらに、小脳顆粒神経細胞に発現している神経細胞接着因子L1を刺激すると軸索伸長が促進することが知られているが、L1刺激による軸索伸長の促進は、PLD活性によるPA産生を抑制する一級アルコールにより阻害された。また、L1刺激による軸索伸長促進シグナルにおいてもPC12細胞のNGF依存的な神経突起伸長シグナルと同様にMEK/ERKが重要な役割を果たしていることが知られているが、L1刺激により小脳顆粒神経細胞のPLD活性が上昇すること、およびMEK特異的阻害剤によりL1依存的なPLD活性化が阻害されることが明らかとなった。以上の結果から、PLD2は小脳顆粒細胞のL1依存的な誘引応答シグナル系において、ERKの下流で機能しているものと結論づけられる。

A03-12

遺伝子組換え法を用いた神経回路形成・調節機序の分子解析

崎村建司
新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野
特定領域「神経回路」参加年度　平成12度ー平成16年度

研究成果の要旨
神経機能解析に適したC57BL/6由来ES細胞を用いた部位時期特異的遺伝子組換え法を実用化した。また、NMDA型受容体のシナプスへの移行にはGluRε(NR2)サブユニットが必須であることを見出した。さらにStargazinタンパクがAMPA型受容体活性を直接調節することなどを見出した。

研究成果

シナプスの形成、維持、変化は、神経系における脳の情報処理の基本的要件であり、これらの分子機序の解明は、脳高次機能を分子レベルで理解するために必須である。本研究の目的は、遺伝子組換え法を用いて神経回路形成・調節機序の分子解析を個体レベルでおこなうことである。この目的のために我々は、２つの目標を立て研究を進めてきた。第１に、脳の領域と時期を限定して遺伝子組換えを起こせるシステムを確立し、発達時期のシナプス形成と保持に関与する分子が成体におけるシナプス可塑性や高次脳機能へ果たす役割の検証をおこなう事である。第２に、興奮性シナプス伝達を担うグルタミン酸受容体に着目し、この分子群の機能解析をおこなうことである。

第１の目標を達成するために、脳機能解析に適したC57BL/6系統マウス由来ES細胞から時期・部位特異的に遺伝子欠損が誘導できる手法の開発を進めた。現在ノックアウトマウス作成に利用されているES細胞株のほとんどは、株化が容易で生殖系列遺伝するキメラが得やすい129系統由来のものであるが、この系統は脳梁の形成不全などの奇形があり神経系の機能解析には不向きである。この問題を解決するために129系統以外のES細胞からマウスを作成する技術が世界的に求められているが、高効率で生殖系列遺伝するES細胞株がほとんどないのが現状であった。そこで我々はC57BL/6N系統マウス胚盤胞から新たにES細胞株RENKAを樹立した。この細胞株を用いて、効率よく生殖系列遺伝するキメラマウスが作成できる方法の検討をおこなった。その結果、次のような点がES細胞の分化を抑制し、キメラマウス作成効率上昇に関与することが明らかになった。１）ES細胞を樹立するときに使用した培地と同等な組成のES mediumでES細胞の培養とES細胞を注入したキメラ胚の培養をおこなう。２）8細胞期の胚にES細胞を注入すると胚盤胞に注入するより均一なキメラが出来やすい。３）注入するES細胞は、凍結ストックからES mediumの中でおこし、対数増殖初期のものを用いる。４）胚にES細胞を注入するときの培地のpH変化はキメラ作成に影響するので、できるだけ短時間で操作する。５）注入するES細胞の数を変化させ、キメラ率の高い個体が取れる細胞数を決める。遺伝子組換えを起こしたそれぞれのクローンは同一細胞株由来であるが、その至適な注入数はクローンごとに異なっている。６）注入後の胚は速やかにES mediumの中に入れ、炭酸ガス培養器に戻し、翌日胚盤胞まで発生が進んだ胚を選択し、偽妊娠させた仮親の子宮に移植する。これらの点を考慮することにより129系統ES細胞を用いると同等の効率で遺伝子組み換えマウスが作出できるようになった。なお、これらの成果の一部は、「近交系Ｃ５７ＢＬ／６由来ＥＳ細胞株ＲＥＮＫＡ及びこの細胞を用いたキメラマウス」として特許申請した。

脳の部位と時期特異的に遺伝子組換えをおこなうために、我々は、P1ファージの組換え酵素であるCreリコンビネースとその認識配列loxPのシステムを採用した。これは、プロゲステロンリガンド結合領域とCreリコンビネースの融合タンパクが、プロゲステロンアンタゴニストにより高S/N比で組換え活性を誘導できるためである。薬剤による組換え誘導が可能なCrePR/loxP系は、我々が目的とする誘導型組換えに合致するものである。我々は、シナプス可塑性と脳機能の関係を検討するモデル系として最もよく研究されている、小脳プルキンエ細胞と顆粒細胞のシナプス及び海馬を標的とした組換え系を開発することにした。

小脳プルキンエ細胞特異的に遺伝子組換えを惹起するために、プルキンエ細胞特異的に発現するグルタミン酸受容体δ2サブユニット(GluRδ2)遺伝子プロモーター制御下で、活性誘導が可能なCrePRタンパクを発現するマウスの作成をおこなった。CrePRの発現をこの細胞に限局させるために、トラ

ンスジェニックの手法でなくGluRδ2遺伝子にCrePRを標的遺伝子組換えで導入する方法を用いた。まず、GluRδ2遺伝子の翻訳開始点にフレームを合わせてCrePR遺伝子を挿入したベクターを作製し、C57BL/6 ES細胞へ導入した。つぎに、相同組換え体ES細胞株よりキメラマウスを作出した。相同組み換え体5クローンのうち1クローンから、生殖細胞系列に変異遺伝子が伝達されるキメラマウスが得られた。このキメラマウスをC57BL/6系マウスと交配し、得られた仔から変異マウス系統（D2CPR）を確立した。樹立したD2CPRマウスが、プルキンエ細胞特異的で誘導可能な遺伝子組換え能力を持つかどうかを調べるために、まずin situハイブリダイゼーションによってCrePR遺伝子がプルキンエ細胞特異的に発現していることを確認した。次に、アンチプロゲステロン（RU486）に依存したCrePR組換え活性誘導の確認をおこなった。このために、Cre組換え酵素活性によって、lacZ遺伝子が発現するトランスジェニックマウスとD2CPRマウスを交配し、得られた仔のうち、両遺伝子をヘテロにもつ個体をレポーターマウスとして使用した。5-7週齢のレポーターマウスにRU486を投与し、経時的にβ-ガラクトシダーゼ（β-gal）活性染色をおこなった。その結果、プルキンエ細胞特異的な染色が認められた。また、プルキンエ細胞でのβ-gal活性染色は小脳全体にわたって観察され、領域による大きな差は認められなかった。一方、RU486非投与群では、β-gal活性染色が認められなかった。さらに、RU486投与後の遺伝子組換え率の変化を経時的に調べるために、プルキンエ細胞をメチルグリーンピロニン色素によって共染色し、β-gal活性染色のあった細胞を計測することで、定量的に組換え率を求めた。その結果、組換え率は時間と共に上昇し、RU486投与後6週において約80%のプルキンエ細胞が遺伝子組換えをおこしていることを確認した。以上の結果より、D2CPRマウスは、プルキンエ細胞および時期特異的に遺伝子組換えをおこなえることが明らかになった。したがって、このD2CPRマウスは、成体における小脳可塑性に関与する分子の同定と、それらの作用機構解明のために有用な系を提供すると考えられる。

海馬領域の中でCA3は複数の入力を受けるだけでなく、海馬内での情報伝達を担うと考えられている。海馬CA3の持つ機能を分子レベルで解析する目的で、CA3錐体細胞特異的遺伝子組み換え系の確立を試みた。この目的のために、CA3に特異的な発現をするカイニン酸型グルタミン酸受容体γ1サブユニット（GluRγ1）に着目し、この遺伝子のプロモーター制御下でCreが発現するマウスの作製を計画した。まず、GluRγ1遺伝子とCre遺伝子の開始メチオニンが一致するようにCre遺伝子を挿入したターゲッティングベクターを構築した。C57BL/6 ES細胞へベクターを導入し、相同組み換えをおこしたクローンを選択した。選択した細胞をマウス初期胚にマイクロインジェクションすることによりキメラマウスを作出した。4クローンのうち1クローンから生殖細胞系列に変異遺伝子を伝達するキメラマウスが得られた。このキメラマウスをC57BL/6系統マウスと交配し、γ1CreNマウスを樹立した。γ1CreNマウスの組換え特性は、Cre活性レポーターマウスCAG-CAT-Zと交配させ、両遺伝子をヘテロに持つマウスを選択し、脳スライスをβガラクトシダーゼ活性染色することにより評価した。マウスの週齢を追って解析した結果、海馬CA3領域に出生後よりβガラクトシダーゼ活性が認められるようになり、その後成体に至るまで海馬CA3領域に特異的にβガラクトシダーゼ活性が認められた。これ以外の領域での活性はほとんど認められなかった。CA3錐体細胞の組換え効率は生後8日で約85%に達し、その後さらに上昇した。γ1CreNマウスを標的遺伝子にloxP配列を持つマウスと交配することにより、生後の海馬CA3錐体細胞特異的な標的分子の欠損を高効率で誘導できると考えられる。

このマウスを用いて、GluRε2サブユニットおよび細胞接着分子βカテニンを海馬CA3領域で特異的に欠損したマウスの作出に成功した。GRγ1CreとGluRε2サブユニット遺伝子にloxP配列を挿入した標的マウスGluRε2floxとを交配させ、loxPをホモに持ちCreをヘテロに持つマウスを得た。このマウスは正常に発育し、交配も可能であるが、海馬CA3領域のGluRε2タンパクが欠損していることを免疫組織化学で明らかにした（図1）。成体での表現型を現在解析中であり、非常に興味ある結果を得ており現在論文投稿準備中である。一方、細胞接着分子βカテニン遺伝子にloxP配列を挿入した標的マウスβCATfloxとGRγ1Creを交配させ、海馬CA3領域で特異的にβカテニンの染色性が消失したマウスを作成した。このマウスでは、大きな形態異常は認められず正常に発達し成体での解析が可能であり、現在行動学的な解析とシナプスの微細な形態や電気生理学的な解析を進めているところである。

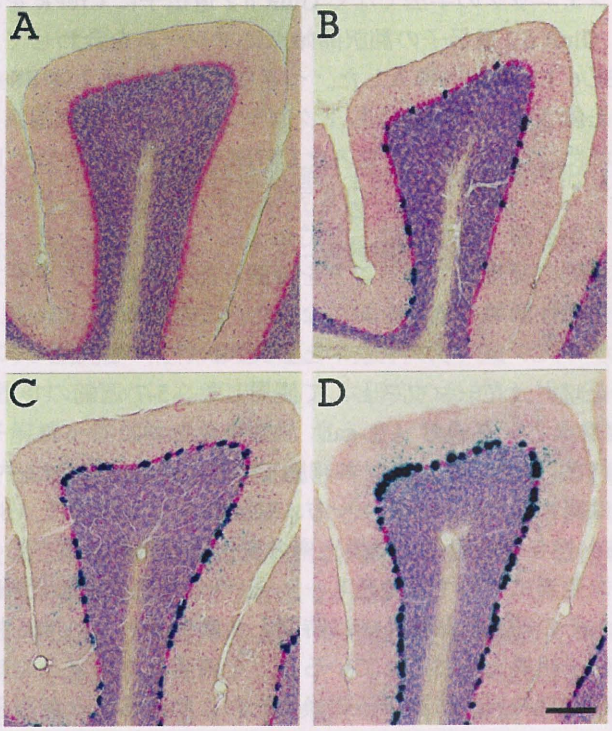


図1
誘導型 Cre 発現マウス D2CPR による
小脳プルキンエ細胞特異的遺伝子組換え
A:誘導前、B:RU486 投与 1 週後、
C: 投与 2 週後、D: 投与 4 週後

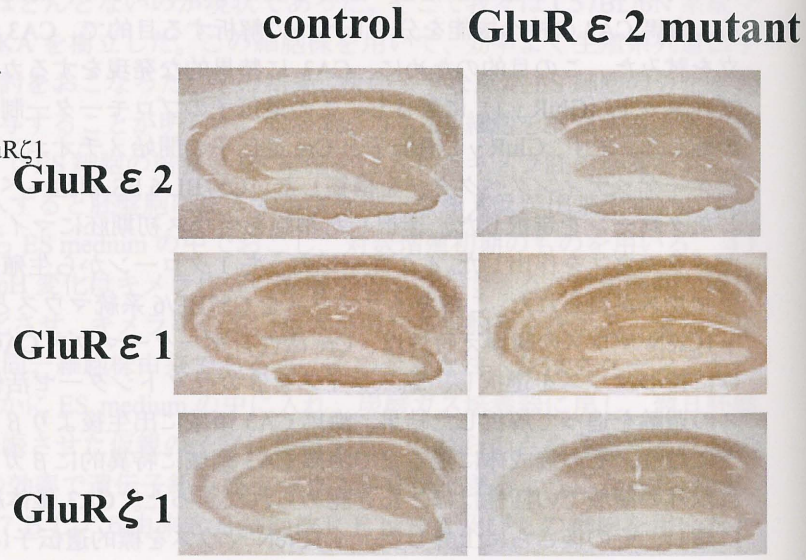


図2
NMDA 型受容体 GluRε2 サブユニット
海馬 CA3 特異的ノックアウト
左: 野生型、抗 GluRε2、GluRε1、GluRζ1
抗体による免疫染色
右: GluRε2 lox/lox, GRγ1Cre マウス
海馬 CA3 領域で GluRε2 の染色性が
消失している

第 2 の研究目標は興奮性シナプス伝達を担うグルタミン酸受容体に着目し、この分子群の機能解析をおこなうことであるが、本研究期間中に次のようなことを明らかにした。

NMDA 型受容体はシナプス可塑性の鍵を握る分子であり、多様な機能を持つことが知られている。我々は今までにこの機能的多様性が、この受容体を構成する GluRεサブユニットの分子的多様性に依存することを明らかにしてきた。一方、初代神経培養細胞を用いた解析から GluRζ1 の C 末端のスプライシング型により細胞膜への移送効率が異なるという説が唱えられてきた。生体内での NMDA 型受容体サブユニット構成とシナプスへの移行はその生理機能を理解する上で極めて重要である。我々は

GluRε1、GluRε3 サブユニットダブル欠失マウスを作成し、NMDA 型受容体がシナプスへ移行するには GluRεサブユニットの存在が必須であり、GluRζ1 単独でのシナプスへの移送はほとんど起こらないことを小脳顆粒細胞において明らかにした。さらに、培養細胞での解析から重要性が強調されていた GluRζ1 の C 末端のスプライシング型は、生体脳におけるこの分子のシナプス表面への移行に影響しないことを示した。また、GluRζ1 は GluRεが存在しないと小胞体ですみやかに分解されることが明らかになった。

一方、AMPA 型受容体は GluRα1-α4 のサブユニットから構成され、速い興奮性伝達を担う分子と考えられている。この受容体の活性調節機序として、サブユニットの膜表面から細胞内への引き込みと再出現、シナプス上でのサブユニットの再構成など様々な仮説が提唱されているが、これらの仮説のほとんどは培養細胞での研究に基づいており、生体脳で証明されたものはない。最近申請者らは、小脳失調症状を呈する突然変異マウス Stargazer の原因遺伝子である stargazin(voltage dependent calcium channel γ2;VDCCγ2)が AMPA 型受容体のチャネル活性を直接調節することを見出した。VDCC γ2 分子を AMPA 型受容体サブユニットと共発現するとその活性が著しく上昇するが、この上昇はこれまで報告されてきた膜表面への AMPA 型受容体の発現の亢進では説明できない。また、GluRα2 ホモメリックチャネルはほとんど活性をもたないと考えられてきたが、VDCC γ2 分子と共発現すると大きなチャネル活性を持つことや、γ2 と GluRαが正の共同性を持って結合することなどから、この分子は AMPA 型受容体に結合しその活性調節に直接関与すると考えた。さらに VDCC γ2 以外にも VDCC γ3、γ4、γ7、γ8 に同様の活性があることを見出した。これらのことは、AMPA 型受容体の活性調節には、VDCC γ分子群の寄与があることを強く示唆する。

共同研究
共同研究の相手
金沢大学大学院医学系研究科　狩野方伸教授
共同研究内容と成果
AMPA 型受容体活性調節における stargazin タンパクの役割を解析し新たな知見を得た。
共同研究の相手
東京大学大学院医学系研究科　三品昌美教授
共同研究内容と成果
C57BL/6 系統由来 ES 細胞を用いたコンディショナルターゲティング法の開発を進め、その実用化を達成した。
共同研究の相手
北海道大学大学院医学研究科　渡辺雅彦教授
共同研究内容と成果
NMDA 型受容体のシナプス移行の分子メカニズムを解析し、この過程に GluRεサブユニットが必須であることを見出した。

脊髄神経回路網の特異的構築と機能を制御する分子機構

斎藤哲一郎

京都大学・再生医科学研究所

特定領域「神経回路」参加年度　平成１２年度ー平成１６年度

研究成果の要旨

脊髄の交連神経細胞の運命は、Math1 から MBH1 への転写因子のカスケードで決定され、MBH1 は転写抑制因子として機能する。

研究成果

交連神経細胞は、左右対称の形態を持つ動物に共通に存在し、左右の情報交換を行う基本的な神経細胞である。交連神経の軸索伸長では多くのことが明らかとなってきているが、交連神経細胞の分化には不明な点が多い。そこで、differential PCR 法で発見した *MBH1* (*mammalian Bar-class homeobox 1*) 遺伝子を中心に、脊髄交連神経細胞の分化機構を解析した。in situ hybridization 法により、*MBH1* は脊髄の発生過程で特定の神経細胞群で一過的に発現し、*MBH1* 発現細胞は蓋板の近傍から翼板の腹部に移動することが示された。さらに、*MBH1* の発現機構を詳細に解析するため、*MBH1* ゲノムの種々の DNA 断片とレポーター遺伝子の *lacZ* を持つトランスジェニックマウスを多種類作製した。その結果、*MBH1* の発現は交連神経細胞に分化し始めた細胞で特異的に始まり、神経細胞の分化過程で維持されることが明らかとなった。同時に、*MBH1* の発現には *MBH1* ゲノムの３’側に存在する E-box を含む領域が関与し、E-box に変異を導入すると発現が消失することが示され、この E-box が MBH1 の発現に必須であることが明らかとなった。また、他の転写因子等の発現と詳細に比較することにより、ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子の Math1 (mammalian atonal homolog 1) を発現した細胞が、次に *MBH1* を発現することが明らかとなった。

一方、遺伝子機能を脊髄で解析するため、以前に開発したマウス脳への in vivo electroporation法を改良し、マウス脊髄に高効率で遺伝子導入出来る実験系を確立した。この手法を用い、*Math1* を強制発現させると、*MBH1* の発現が異所的に誘導された。これに対し、*Math1* のノックアウトマウスでは、*MBH1* の発現が消失することが示され、*MBH1* はMath1 の下流遺伝子であることが明らかとなった。さらに、クロマチン免疫沈降法を用い、マウス胎仔の脊髄内で Math1 タンパク質が結合しているDNA断片を解析することにより、Math1 タンパク質は*MBH1* 遺伝子の３’側に存在するE-box領域に生体内で結合していることが示された。つまり、Math1 タンパク質が直接的に*MBH1* 遺伝子を制御していることが明らかになった。これにより、長い間謎とされてきたMath1 等のプロニューラル因子*の標的遺伝子が初めて明らかになった。

また、*MBH1* を electroporation 法で異所的に発現させると、TAG-1 や DCC 等の交連神経細胞の分化マーカーが誘導されると同時に *MBH1* 発現細胞が交連神経細胞へ運命転換することが示され（図１）、*MBH1* は交連神経細胞への運命決定を担うことが明らかとなった。次に、MBH1 タンパク質の分子機能を調べるため、MBH1 タンパク質の DNA 結合ドメインを転写抑制化ドメインや転写活性化ドメインと結合させたキメラタンパク質を作製した。転写抑制化ドメインを持つキメラタンパク質は、MBH1 と同一の機能を有したが、転写活性化ドメインを持つキメラタンパク質は、MBH1 の機能を抑制した。さらに、Math1 下流のカスケードが、転写活性化ドメインを持つキメラタンパク質で阻害された。この結果、MBH1 タンパク質は転写抑制因子として働くことが示され、Math1 の下流で交連神経細胞が分化する時には MBH1 が必須であり、MBH1 は何らかの転写抑制因子の発現を抑えることにより、交連神経細胞への運命を決定すると考えられる。以上の結果、脊髄交連神経細胞の運命決定には MBH1 が必要十分であり、プロニューラル因子の Math1 から MBH1 を経て最終分化に至るまでの神経細胞分化のカスケードが初めて示された（図２）。

プロニューラル因子：神経系細胞の前駆細胞で発現し、神経細胞への分化のスイッチを入れる転写因子。ショウジョウバエで最初に明らかにされ、哺乳動物には Math1 や Mash1、Neurogenin 等がある。これらの転写因子は CANNTG の塩基配列からなる E-box に結合する。

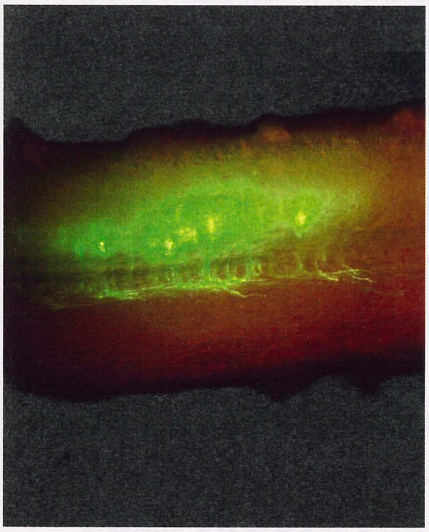


図１　*MBH1* による運命転換。*MBH1* を異所的に発現させると、神経細胞の運命転換が起き、ほぼ全ての *MBH1* 発現細胞は交連神経細胞となる。その軸索は床板を通過後、90 度方向転換し脳へ向かう（脊髄の腹側から撮影）。ダブルプロモーターベクターを用い、*MBH1* と *EYFP* を同一細胞で発現させ、細胞と軸索を可視化している。

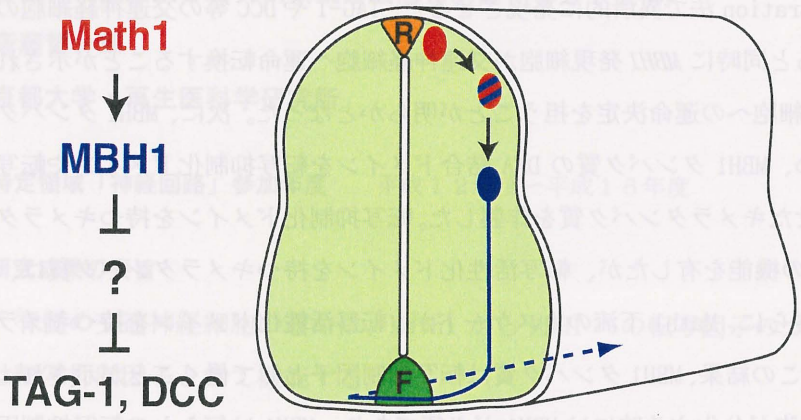


図２　交連神経細胞の運命決定カスケード。*Math1* は、蓋板（R）に隣接した細胞で発現し、続いて *MBH1* の発現が誘導される。*MBH1* 発現細胞は翼板の腹側に移動し、その軸索は床板（F）を越えた後、脳に向かって投射する。

共同研究

Fu-chin Liu 博士（National Yang-Ming University, Taiwan）と「*No1z-1* 遺伝子の脳内での発現解析」を行い、*No1z-1* 遺伝子が線状体で特異的に発現することを示した。

奥田晶彦博士（埼玉医科大学）と「Sox-2 エンハンサーの解析」を行い、Sox-2 エンハンサーの SRR2 が神経幹細胞で働くことを示した。

A03-14

表題　　小脳顆粒細胞のマイグレーションを制御する分子機構の解析

研究代表者　見学美根子

所属　　理化学研究所脳科学総合研究センター　神経細胞極性研究チーム

特定領域「神経回路」参加年度　　平成12年度～14年度（平成15年度～16年度、班友）

研究成果の要旨

小脳顆粒細胞の二相性移動が、運命の異なる先導突起により駆動される核移動ダイナミクスの違いで実現される事を明らかにした。また後期相の先導突起に局在する新規膜貫通分子 DNER を同定し、DNER の細胞内輸送機構と細胞間シグナルとしての機能を明らかにした。

研究成果

1）•小脳顆粒細胞の極性を制御する Pax6 の機能解析

小脳顆粒細胞は発生中細胞移動しながら軸索と樹状突起を伸長し、特徴的な形態を獲得する。顆粒細胞の細胞極性形成に重要な分子として転写因子 Pax6 の機能を同定した。

Pax6 変異ラットの顆粒細胞は軸索の形成が乱れ、正しい細胞移動が起こらない。変異ラットの顆粒細胞を培養すると、神経突起形成が異常に昂進しており、軸索の極性化と伸長が阻害されていた。この異常は (1)Pax6 の強制発現によってレスキューされるが、野生型顆粒細胞との共培養ではレスキューされない。(2)野生型小脳にレトロウイルスベクターを用いてドミナントネガティブ型 Pax6 分子を強制発現すると、ウイルスの感染を受けた細胞の形態分化と移動が選択的に阻害される。また Pax6 変異顆粒細胞では突起の運動性が昂進しており、細胞骨格編成系に異常があることが示唆された。これらの結果から、Pax6 が顆粒細胞の形態と移動の極性を司る内因性調節因子である事が示された（文献５）。

2）•小脳顆粒細胞二相性移動の細胞機構

顆粒細胞は最終分裂を終えるとまず小脳表面に平行に移動（接線移動）し、90 度方向転換して小脳内層に移動（放射移動）する。この方向転換に伴う細胞極性の再編成を司る細胞機構を解析した。

生後発達期の小脳から外顆粒層(EGL)を解離し組織片培養を行うと、顆粒細胞が培養皿上で方向転換をはさむ二相性の細胞移動を再構成できることがわかっている。そこでこの系を利用し、形態変化と移動ダイナミクスをタイムラプスレーザー共焦点顕微鏡で詳細に追跡した。その結果、接線移動と放射移動に用いられる先導突起は性質が異なり、それぞれ将来軸索と樹状突起に分化する突起であることが明らかになった（図－1、文献 2）。さらに顆粒細胞の二相性

移動の核と先導突起の移動ダイナミクスを比較解析した結果、各位相は異なるダイナミクス（somal translocation と locomotion）を介して起ることが明らかになった。すなわち顆粒細胞は機能の異なる先導突起を形成し、移動ダイナミクスを変える事で方向転換を実現していることが明らかになった（図－2、文献 2）。

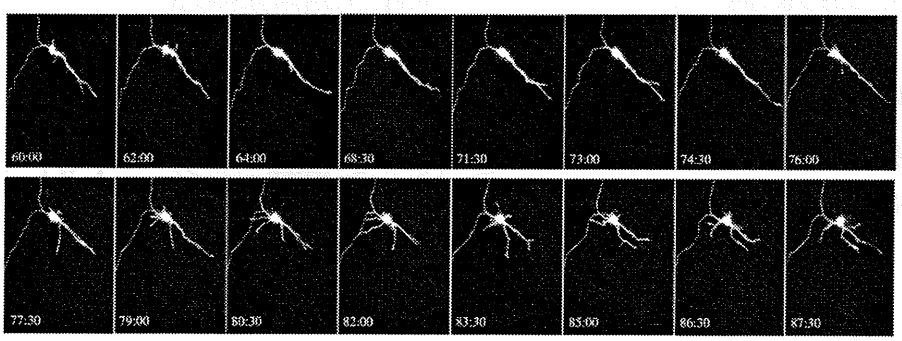
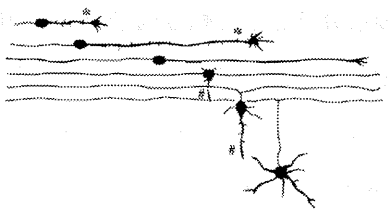


図-1　タイムラプス顕微鏡でとらえた先導突起から樹状突起への分化過程



	leading process	kinetics
* tangential migration	future axon	somal translocation
# radial migration	future dendrite	locomotion

図-2　小脳顆粒細胞の二相性移動のメカニズム

3）神経系細胞の形態分化を制御する細胞間シグナル DNER の同定

顆粒細胞は移動方向の転換の際に細胞極性の再編成を行うと考えられるので、方向転換の起る時期の顆粒細胞で特異的に発現する分子を探索した。上記の小脳 EGL 組織片培養を用い、顆粒細胞の方向転換期に特異的に発現する分子を PCR サブトラクティブハイブリダイゼーション法で単離した。その結果、新規 EGF 関連膜貫通分子 DNER(Delta/Notch-like EGF-related Receptor)を同定した。DNER は分裂後の中枢神経系ニューロンに特異的に発現し、タンパク質は放射移動する顆粒細胞の樹状突起性先導突起のほか中枢神経系ニューロンの樹状突起に局在する。DNER の局在は、細胞内領域のチロシン基モチーフとクラスリン被覆小胞蛋白質 AP-1 の結合を介した選択的小胞輸送経路に一部依存し、チロシン基に点突然変異を持つ分子は軸索にも分布する事が明らかになった（図－3,4、文献 4）。

さらに DNER の生体における機能解析を行った。分子構造から推定し、Notch シグナルとの相互作用を調べたところ、DNER が Notch のリガンドとして機能することが明らかになった。小脳ではプルキンエ細胞に強く発現し、バーグマングリアの Notch シグナルを活性化してバーグマングリアの形態分化を制御する事を証明した。

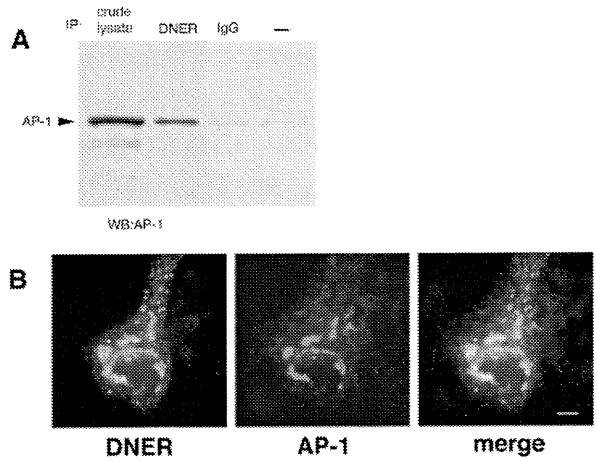


図-3　小脳ニューロンにおける DNER と AP-1 の結合

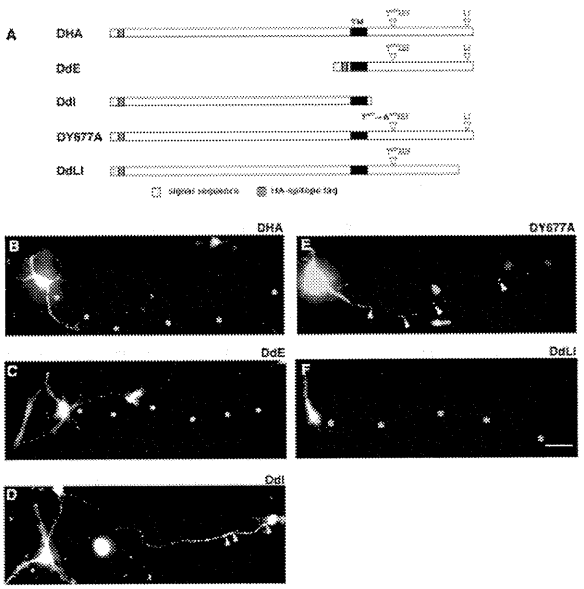


図-4　DNER の樹状突起局在は細胞内チロシン基に依存する。

共同研究

京都大学生命科学研究科　上村匡　教授

プルキンエ細胞の樹状突起パターンを制御する細胞間シグナル flamingo の機能解析

小脳スライス培養に遺伝子導入する手法を共同で開発した（文献１）。

東北大学医学系研究科　竹島浩　教授

DNER ノックアウト動物の表現型を解析

竹島研究室で作製された DNER ノックアウト動物の小脳における症状を解析した（投稿準備中）。

A03-15

基底核-視床-大脳皮質神経回路網の機能発現における分化抑制因子 Id2 の役割

横田義史

福井大学医学部生命情報医科学講座分子遺伝学領域

特定領域「神経回路」参加年度　平成 12 年度ー平成 14 年度

研究成果の要旨

Id2 は、neurogenin をはじめとする basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子の機能抑制因子の一つであり、細胞分化の抑制作用と細胞増殖促進作用を合わせ持つ。Id2 欠損マウスは、中枢神経系に著明な構造異常を認めないものの、ドーパミントランスポーター欠損マウスが示す行動異常に類似した、自発運動量の亢進（対照の３ー４倍）と左右いずれか一側への旋回行動を認める。Id2 欠損マウスが示す多動の原因を明らかにすることを通して、基底核-視床-大脳皮質神経回路網の形成あるいは機能発現の制御機構を明らかにすることを目標とした。その結果、多動の根本原因は確定できなかったが、Id2 欠損マウスの多動の原因は黒質ドーパミン作動性神経細胞の発生分化過程にあるのではなく、ドーパミン作動性神経細胞の機能亢進によることなどが示された。また、Id2 欠損マウスが多動の他に注意障害と記憶障害を呈すること、また、adult における嗅球の狭小化を示すことなどが明らかになった。

研究成果

Id2 は、neurogenin をはじめとする basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子の機能を蛋白レベルで抑制的に制御する因子の一つであり、細胞分化の抑制作用と細胞増殖促進作用を合わせ持つ。Id2 欠損マウスは、中枢神経系の著明な構造異常はないものの、多動を示す。多動は、生後３ー４週目から出現するもので、open field における自発運動量の亢進（対照の３ー４倍）を主体とし、左右いずれか一側への旋回行動も認めるもので、ドーパミントランスポーター欠損マウスが示す行動異常と類似したものである。実際、線条体においてドーパミンの代謝産物である DOPAC の増加（対照の約３倍）を認める。黒質から豊富なドーパミン作動性神経の投射を受ける線条体は、基底核-視床-大脳皮質神経回路網の中に位置づけられることから、Id2 欠損マウスが示す多動の原因を明らかにすることを通して、基底核-視床-大脳皮質神経回路網の形成あるいは機能発現の制御機構を明らかにすることを目指した。未だ多動の原因は確定できていないが、以下に挙げる成果を得た。また、本研究を進める過程で、Id2 欠損マウスにみられる多動以外の病態に関する下記の成果も得られた。

1）in situ hybridization 法を用いて Id2 の詳細な発現解析を行い、これまでに報告されている発現部位（大脳皮質第２/３層，５層、小脳プルキンエ細胞）以外の領域、すなわち、線条体の介在ニューロン、扁桃体、淡蒼球、黒質網様体部、内側膝状体、外側膝状体、上丘、下丘、中隔核、視交叉上核、蝸牛神経核、上オリーブ核などにも Id2 の発現を認めることを確認した。しかし、黒質緻密部のドーパミン作動性神経細胞自体には Id2 の発現は確認できなかった。

2）in situ hybridization 法を用いて神経発生に係わる bHLH 因子の発現解析を行い、対照と Id2 欠損マウスで比較した。11.5 日齢胎仔では Mash1、neurogenin2 に差は認めなかったが、Math2 は大脳皮質の発現範囲が広くかつ強く認められた。一方、11.5 日齢胎仔の脳室帯での細胞増殖の程度を Ki67 抗体で検討したところ、対照に比し Id2 欠損マウスでは染色性が減弱していた。したがって、Id2 欠損マウスでは神経発生に関わる bHLH 型転写因子の機能

亢進が起こり、bHLH 型転写因子によって形成されるカスケードの一部の活性化が起こることが明らかになった。しかし、出生後では、Mash1、neurogenin2、NeuroD、Math2 いずれでも差を認めず、著明な解剖学的な異常も認めないことから、この早期の活性化が中枢神経系の発生過程に及ぼす影響は少ないと考えられた。

3）mid-rostrocaudal portion of the mammillary nucleus を基準に 300μm ごとの計 6 セクションを準備し、抗ドーパミントランスポーター抗体および抗チロシン水酸化酵素抗体を用いて黒質のドーパミン作動性神経の数と分布を検討した。しかし、いずれの部位でも Id2 欠損マウスと対照マウスの間で著明な差は認められなかった。一方、Western blot による脳全体での発現検討では著変はみられないものの、免疫組織化学による検討では、黒質のドーパミン作動性神経細胞におけるドーパミントランスポーターおよびチロシン水酸化酵素の発現亢進が認められた。以上より、Id2 欠損マウスの行動異常の原因は、ドーパミン作動性神経細胞の数の増加や分布の変化ではなく、ドーパミン作動性神経細胞の機能亢進にあることが示唆された。

4）線条体における in situ hybridization 法を用いて、線条体における D1 系（D1 受容体、サブスタンスP、ダイノルフィン）と D2 系（D2 受容体、エンケファリン）の神経細胞の分布を検討したが、Id2 欠損マウスと対照マウスの間で著明な差は認められなかった。また、抗 μ-opioid 抗体を用いた免疫組織化学により patch/matrix 構造を検討したが、差は認めなかった。

5）行動解析では、Id2 欠損マウスが電気刺激を用いた驚愕反射において prepulse inhibition がかかりにくいこと、passive avoidance に障害があること、水迷路テストにおいて障害がみられることが明らかになった。以上のことから、Id2 欠損マウスには注意障害と記銘障害が認められることが明らかになった。

6）Id2 欠損マウスは adult において嗅球の狭小化を示す。これは、生後 6 週頃に明らかになって来るもので、胎性期、新生児期には対照マウスと差を認めない。嗅球自体の構造的異常はみられない。adult マウスの傍脳室帯の神経幹細胞をニューロスフェア法を用いて培養すると、Id2 欠損マウスでは対照に比し、約半分程度しかニューロスフェアが形成されないこと、Id2 欠損マウスの傍脳室帯では対照に比べ BrdU の取り込み率が低下していること、また海馬には著明な異常を認めないことなどから、Id2 欠損マウスでは adult の傍脳室帯の神経幹細胞に特異的な増殖障害があることが示唆された。

A03-16

3.1 シナプス後肥厚部(PSD)特異蛋白質の検索と機能解析

3.2 祖父江憲治

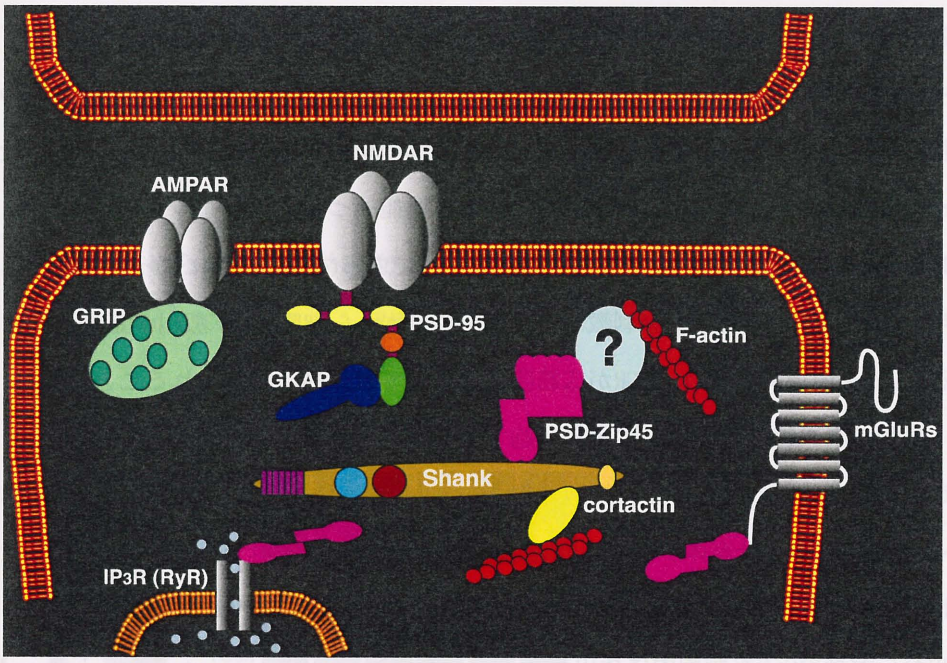
3.3 大阪大学大学院医学系研究科

3.4 平成 13、14 年度

3.5

PSD 足場蛋白質のシナプス後部におけるダイナミクスを解析した。PSD-Zip45 はシナプス活性に依存したダイナミクスを示すこと、シナプス後部には PSD-Zip45/shank 系と PSD-95/GKAP 系のコンパートメントが存在し、PSD-Zip45/Shank 系はアクチン系細胞骨格と連携したダイナミクスを示すことを見い出した。新たな PSD 足場蛋白質として PSD-Zip70 をクローニングし、機能解析を行った。

3.6



シナプス後部における PSD-Zip45/Shank 系と PSD-95/GKAP 系のコンパートメント

3.8 共同研究

岡部繁男　東京医科歯科大学　医学部

PSD-Zip45 のシナプス後部における刺激依存性ダイナミクスを明らかにした。

藤吉好則　京都大学大学院　理学部

PSD-Zip45 の結晶構造解析を行った。

亢進が起こり、bHLH 型転写因子によって形成されるカスケードの一部の活性化が起こることが明らかになった。しかし、出生後では、Mash1、neurogenin2、NeuroD、Math2 いずれでも差を認めず、著明な解剖学的な異常も認めないことから、この早期の活性化が中枢神経系の発生過程に及ぼす影響は少ないと考えられた。

3）mid-rostrocaudal portion of the mammillary nucleus を基準に 300μm ごとの計 6 セクションを準備し、抗ドーパミントランスポーター抗体および抗チロシン水酸化酵素抗体を用いて黒質のドーパミン作動性神経の数と分布を検討した。しかし、いずれの部位でも Id2 欠損マウスと対照マウスの間で著明な差は認められなかった。一方、Western blot による脳全体での発現検討では著変はみられないものの、免疫組織化学による検討では、黒質のドーパミン作動性神経細胞におけるドーパミントランスポーターおよびチロシン水酸化酵素の発現亢進が認められた。以上より、Id2 欠損マウスの行動異常の原因は、ドーパミン作動性神経細胞の数の増加や分布の変化ではなく、ドーパミン作動性神経細胞の機能亢進にあることが示唆された。

4）線条体における in situ hybridization 法を用いて、線条体における D1 系（D1 受容体、サブスタンスＰ、ダイノルフィン）と D2 系（D2 受容体、エンケファリン）の神経細胞の分布を検討したが、Id2 欠損マウスと対照マウスの間で著明な差は認められなかった。また、抗 μ-opioid 抗体を用いた免疫組織化学により patch/matrix 構造を検討したが、差は認めなかった。

5）行動解析では、Id2 欠損マウスが電気刺激を用いた驚愕反射において prepulse inhibition がかかりにくいこと、passive avoidance に障害があること、水迷路テストにおいて障害がみられることが明らかになった。以上のことから、Id2 欠損マウスには注意障害と記銘障害が認められることが明らかになった。

6）Id2 欠損マウスは adult において嗅球の狭小化を示す。これは、生後６週頃に明らかになって来るもので、胎性期、新生児期には対照マウスと差を認めない。嗅球自体の構造的異常はみられない。adult マウスの傍脳室帯の神経幹細胞をニューロスフェア法を用いて培養すると、Id2 欠損マウスでは対照に比し、約半分程度しかニューロスフェアが形成されないこと、Id2 欠損マウスの傍脳室帯では対照に比べ BrdU の取り込み率が低下していること、また海馬には著明な異常を認めないことなどから、Id2 欠損マウスでは adult の傍脳室帯の神経幹細胞に特異的な増殖障害があることが示唆された。

A03-16

3.1 シナプス後肥厚部(PSD)特異蛋白質の検索と機能解析

3.2 祖父江憲治

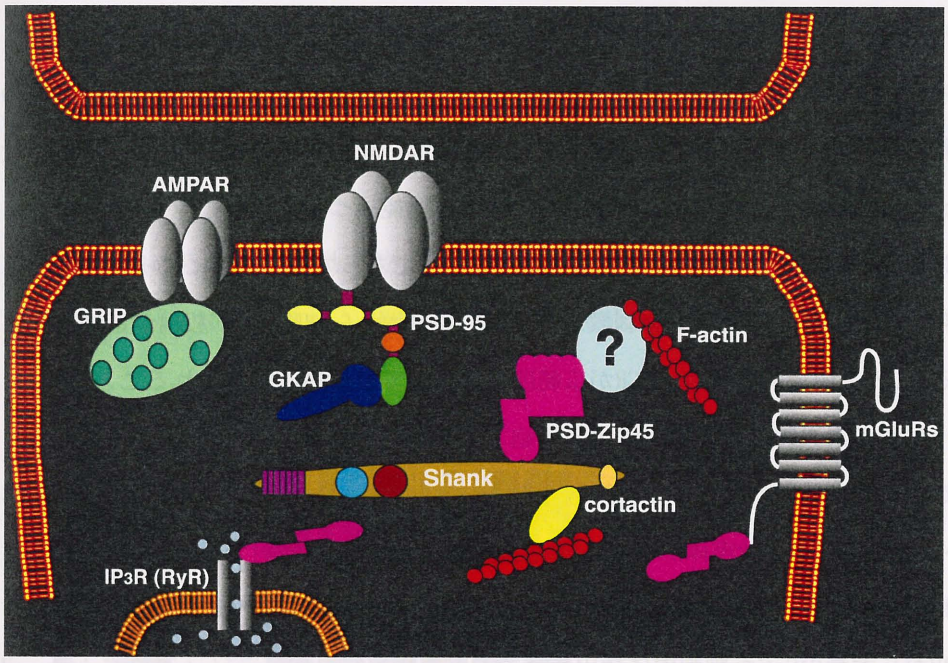
3.3 大阪大学大学院医学系研究科

3.4 平成13、14年度

3.5

PSD足場蛋白質のシナプス後部におけるダイナミクスを解析した。PSD-Zip45はシナプス活性に依存したダイナミクスを示すこと、シナプス後部にはPSD-Zip45/shank系とPSD-95/GKAP系のコンパートメントが存在し、PSD-Zip45/Shank系はアクチン系細胞骨格と連携したダイナミクスを示すことを見い出した。新たなPSD足場蛋白質としてPSD-Zip70をクローニングし、機能解析を行った。

3.6



シナプス後部における PSD-Zip45/Shank 系と PSD-95/GKAP 系のコンパートメント

3.8 共同研究

岡部繁男　東京医科歯科大学　医学部

PSD-Zip45のシナプス後部における刺激依存性ダイナミクスを明らかにした。

藤吉好則　京都大学大学院　理学部

PSD-Zip45の結晶構造解析を行った。

A03-17

IP3-assisted CICR の発生機構と生理作用に関する研究

加藤伸郎

京都大学医学研究科

参加年度：平成 13-14 年度参加

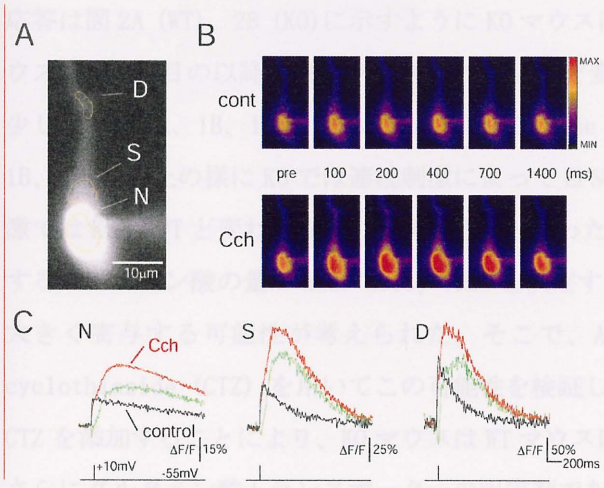
研究成果の要旨：大脳皮質錐体細胞において、新規の細胞内カルシウム放出機構を見出した。それは活動電位の発生によって引き起こされ、カルシウムイオンによる IP3 受容体の活性化をともなっており、IP3-assisted CICR と名付けた。その生理機能のひとつは、膜興奮性のフィードバック抑制であった。

研究成果：1,4,5-イノシトール三リン酸受容体（IP3R）は、1,4,5-イノシトール三リン酸（IP3）とカルシウムイオン（Ca^{2+}）をともにリガンドとする。一定の低濃度Ca^{2+}の存在下で、細胞外の事象によって細胞内IP3 が増大する場合には、IP3 受容体から細胞内Ca^{2+}放出が起こる。この放出はIP3-induced Ca^{2+} release (IICR)とよばれ、その機構と機能については詳しく知られている。また、このIICRがいったん起こると、たとえIP3 濃度が一定であっても、IICRによって増加したCa^{2+}がIP3 受容体のCa^{2+}リガンドサイトを刺激して、IP3 受容体から細胞内Ca^{2+}放出が正帰還的に引き起こされる。この正帰還的放出は、IICRが広範囲に遷延して自律的に維持されることを許し、カルシウム波・振動の素過程として卵や平滑筋細胞でよく調べられてきた。

一方、一定の低濃度IP3 の存在下で、細胞外のイベントを反映して増加したCa^{2+}がIP3 受容体のCa^{2+}サイトを刺激してIP3 受容体からのCa^{2+}放出を促すかどうかは不明であった。我々は、大脳皮質錐体細胞においてカルシウムイメージング法を適用し、IP3 存在下では 細胞外からのCa^{2+}流入によりIP3Rから大量のCa^{2+}が細胞内に放出されることを観察し、IP3-assisted Ca^{2+} induced Ca^{2+} release (IP3-assisted CICR)と呼んだ (Yamamoto et al., 2000)。**IP3-assisted CICR**の大脳皮質錐体細胞における生理作用を追及するうち、活動電位によってトリガーされたカルシウム流入がIP3-assisted CICRを引き起こすと、発端となった活動電位の発火が抑えられることを見出した。すなわち、IP3-assisted CICRの生理作用のひとつは細胞膜興奮性のフィードバック抑制であることを報告した(Yamamoto et al. 2002a,b)。この際、IP3-assisted CICRがカリウムチャンネルを直接または間接のターゲットとしていることが考えられた。

この未知のターゲットはSKチャンネルであることを、本年になって明らかにした(Yamada et al., 2004)。ラット視覚野２/３層錐体細胞にて短時間の脱分極パルスを与えると、脱分極パルスに引き続いて外向きの電流が観測される。これば電位依存性カルシウムチャネル（VDCC）を介して流入したCa^{2+}によって開くSKチャネルを通る電流である。ムスカリンアゴニストのカルバコールなどで細胞内IP3を上昇させると、この外向き電流に加えて、さらに遅い外向き電流が流れるのが観察された。SKチャネルのアンタゴニストのアパミンは、この２つの外向き電流を共に阻害した。さらに高速のカルシウムイメージングによって、細胞内Ca^{2+}濃度を同時記録した。脱分極パルスによって細胞内Ca^{2+}濃度は上昇する。これはVDCCを介して流入したCa^{2+}である。カルバコール投与下では脱分極パルス後の細胞内Ca^{2+}濃度上昇に引き続いて、大きく遅いCa^{2+}濃度上昇が観察された。ヘパリン投与により遅いCa^{2+}濃度上昇は阻害された。アパミンを投与しても、この二相性のCa^{2+}濃度上昇は観測された。

これらの結果より、早い外向き電流はVDCCから流入したCa^{2+}によって開いたSK チャンネルによる電流であり、遅い外向き電流はIP3Rから流出したCa^{2+}によって開いたSKチャネルを介する電流であることが分かった。さらに電流固定下の実験ではスパイク後過分極（mAHP）がカルバコールにより大きくなった。また500msの通電記録では、spike frequency adaptationがカルバコールにより強められた。活動電位によってCa^{2+}チャンネルから流入したCa^{2+}がIP3 存在下ではIP3-assisted CICRを起こし、SKチャネルを開いて膜興奮性を抑制的することが判明した。



A03-18

研究者名、　東北大学加齢医学研究所神経機能情報研究分野　小椋　利彦
研究課題名、　網膜をモデルとした神経分化メカニズムの解明

網膜は背腹軸に沿った形態形成を行い、また網膜神経節細胞軸索の中枢神経系（ニワトリでは視蓋）への投射も、同様に背腹軸に沿った位置情報をもとに規則正しく行われる。このよう topopraphic な神経投射が、網膜に結ばれた外界の映像を正確に脳へ伝達する基盤となる。したがって、網膜の背腹軸に沿った位置情報がどのようなメカニズムで構築されているのかを解明することは、きわめて重要な意味を持っている。これまでの研究から、網膜背側には Tbx5 遺伝子が、腹側には Vax 遺伝子が発現しており、背腹軸に沿った形態形成と網膜視蓋投射を調節していることがわかっていた。しかし、その後の詳細な検討の結果、Tbx5、Vax の発現領域にはギャップが存在し、網膜上に連続した位置情報を持たせるには、他の遺伝子の関与があることがわかってきた。本研究による詳細な解析の結果、Tbx3、Tbx2 遺伝子が網膜背側に異なった発現を示すことを見いだし、網膜背側から Tbx5、Tbx3、Tbx2、Vax の 4 つの領域に分かれることがわかり、肢芽で見いだしたように、網膜にも Tbx code が成立しており、種々の Tbx 遺伝子の発現の組み合わせによって網膜上の連続した位置情報が作られていることが示唆された。

網膜視蓋投射の解析は、従来 DiI を網膜上に移植して、蛍光ラベルされた視蓋表面の軸索を観察することが行われてきた。しかし、この方法は技術的に煩雑で難しい。これを克服する目的で、レトロウイルスベクターを改良し、Alkaline phosphatase 遺伝子を組み込んだ物を網膜に電気穿孔法で導入した。その結果、効率よく視蓋表面の網膜神経節軸索をラベルし、可視化することに成功した。

この方法を用いて、Tbx code が実際に網膜背腹軸上の連続した位置情報を規定できるか検討した。その結果、Tbx5、Tbx3、Tbx2 遺伝子を個別に強制発現した場合、導入した遺伝子に特異的な視蓋上の位置に正確に投射していることが確認された。このことから、網膜上にも Tbx code が存在し、3 つの遺伝子の発現の組み合わせが topographic な位置情報の決定に直接関与していると結論された。これは、Tbx 遺伝子群の機能を類推する上できわめて重要で、他の組織、器官の形成にも通底する知見となった。

A03-19

表題：中枢特異的新規受容体ファミリー分子群

研究代表者名：竹島浩

所属：東北大学大学院医学系研究科

特定領域「神経回路」参加年度：平成13、14年度

研究成果の要旨：DNER は神経細胞特異的受容体様分子であり、運動協調性の低下を示す DNER 欠損マウスを用いた解析を行った。DNER は細胞間相互作用によりグリア細胞に対しグルタミン酸輸送体の発現を誘導するなど、小脳機能形成に不可欠なシグナル伝達に寄与することが示された。

研究成果：DNER は一回膜貫通型の蛋白質で小脳 Purkinje 細胞(PC)において強く発現している。この分子には細胞外領域に１０個の EGF モチーフが存在し、細胞内にチロシンキナーゼによるリン酸化部位が存在する。この構造上の特徴から、DNER が小脳の分化・発生おいて神経細胞間または神経細胞−グリア細胞間の機能的相互作用に関与している可能性が考えられた。そこで DNER ノックアウト(KO)マウスを作成し、解析して以下の結果を得た。

KO マウスはロータロッド検定で野生型(WT)マウスにくらべ有意に運動協調性の低下を示した。そこで小脳の電気生理学的異常を検討するために、スライス切片の PC に対して whole cell 膜電位固定を行い、平行繊維(PF)を刺激し、AMPA 受容体(AMPAR)による興奮性後シナプス電流(EPSC)を記録した。図 1E (WT, control)、F (KO, control)、G に示すように、単発刺激による EPSP において KO マウスは WT マウスに比べて大きな差はなかった。しかし、連続刺激による EPSC の応答は図 2A (WT)、2B (KO)に示すように KO マウスは WT マウスに比べて大きかった。また WT マウスでは２回目の以降の EPSC の大きさはほとんど変化しないのに対して KO マウスでは徐々に減少した (図 1A、1B、1C)。さらに half decay time も KO マウスでは顕著に延長していた(図 1A、1B、1D)。以上の様に KO では連続刺激によって EPSC の half decay time が延長するが、単発刺激では KO は WT と変わらないことが明らかとなった。従って、単発刺激ではシナプス間隙に存在するグルタミン酸の量が half decay time を決定するのではなく、AMPAR の desensitization が大きく寄与する可能性が考えられた。そこで、AMPAR の desensitization の阻害剤である cyclothiazide (CTZ) を用いてこの可能性を検証した。図 1E(WT)、1F(KO)、2H に示すように、CTZ を添加することにより、KO マウスは WT マウスに比べ有意に half decay time が延長した。さらにグルタミン酸トランスポーターの阻害剤である TBOA を添加すると KO マウスと WT マウスの half decay time はほぼ同じになった。これらの結果から KO マウスのシナプス間隙ではグルタミン酸の取り込みが減少し、持続的なグルタミン酸が存在することが明らかとなった。

グルタミン酸トランスポーターである GLAST を高発現する Bergmann glia (BG)は、PF-PC 間の

シナプスの radial fiber を構成する。anti-GLAST による免疫組織染色法と免疫ブロット法で、KO マウス小脳において GLAST の発現の低下が認められた（図 2)。一方、グルタミン酸トランスポーターは GLAST のほかに GLT-1、EAAC-1、EAAT-4 が存在するが、これらのトランスポーター群の発現低下は認められない。

我々は DNER が Notch のリガンドとして機能し、BG の分化を制御することを明らかにしている。以上の結果から、DNER は PC 細胞に発現し、神経細胞−グリア細胞間の機能的相互作用を通じて BG の機能を調節し、転じて PC 細胞の機能を制御する reciprocal control に関わる因子であることが示唆された。以上は見学博士（理化学研究所）のグループとの共同研究の成果であり、論文投稿準備中である。

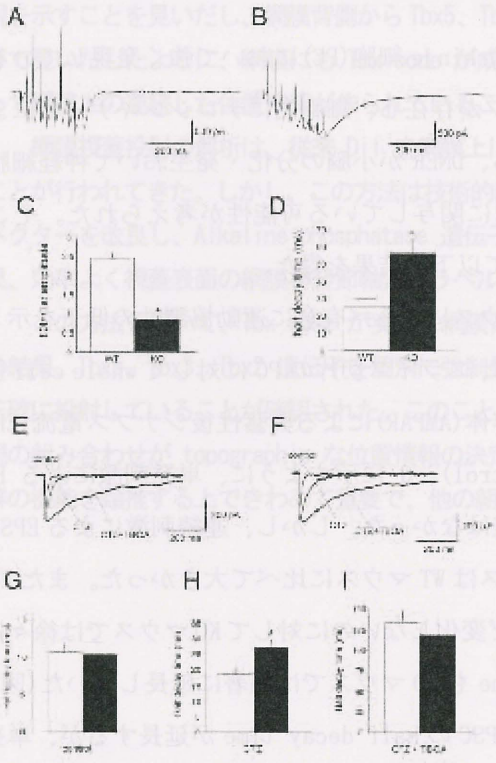


図1　小脳スライス標本の電気生理学的解析

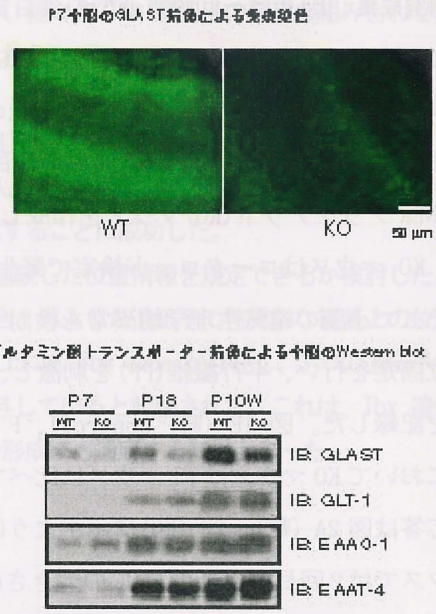


図2　抗体を用いた小脳の生化学的解析

共同研究：

共同研究の相手：見学先生（京都大学理学部/理化学研究所）

共同研究内容：DNER 分子の機能解析を共同で行い、上記の研究成果を得た。

A03-20

神経回路網形成における Apontic/Trachea defective の役割

広瀬　進
国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門

特定領域「神経回路」参加年度　平成13年度、平成14年度

研究成果の要旨

ショウジョウバエの MBF1 が、bZIP 型転写制御因子 Apontic/Trachea defective のコアクチベーターとして働き、中枢神経系と気管の回路網形成に関わることを明らかにした。

研究成果

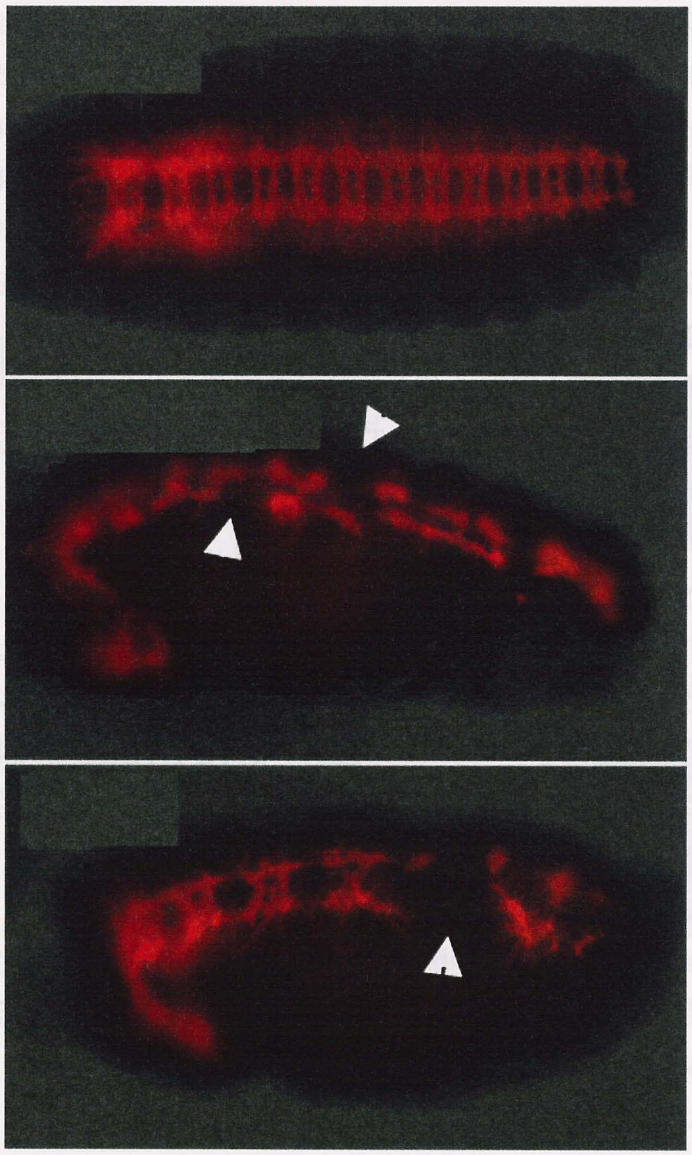
我々は転写制御因子と TATA ボックス結合タンパク質（TBP）の間を仲介して転写活性化するコアクチベーターMBF1 を発見し、ショウジョウバエを用いてその個体レベルでの機能を解析してきた。その結果、MBF1 と相互作用する因子のひとつとして Apontic (APT)/Treachea defective (TDF)を同定した。APT/TDF は中枢神経系（CNS）、末梢神経（PNS）や呼吸器官である気管（Trachea）で発現している。

本研究から以下の成果が得られた。

1. *apt/tdf* 変異株では CNS と気管のネットワーク形成に異常が生じる
2. 抗 APT/TDF 抗体と全てのニューロンの核を染色する抗 ELAV 抗体、もしくは全てのグリア細胞の核を検出する抗 REPO 抗体で野生株の胚を二重染色したところ、CNS と PNS いずれについてもほとんどのニューロンとグリアが APT/TDF を発現していることが判明した。このことは、APT/TDF が神経回路網形成において基本的な役割を果すことを示唆している。
3. APT/TDF の認識する塩基配列を同定した。
4. APT/TDF 結合配列-lacZ 融合遺伝子を導入した transgenic fly を作製し、APT/TDF とその結合配列に依存して lacZ が発現することを示し、APT/TDF が転写活性化因子であることを明らかにした。
5. *mbf1* 欠損変異株では、APT/TDF による転写活性化が著しく低下した。
6. APT/TDF を唾腺で強制発現すると、唾腺染色体上で APT/TDF と MBF1 が共局在することを示した。
7. CNS と気管のネットワーク形成において、*apt/tdf* と *mbf1* 遺伝子間に遺伝学的相互作用を見出した。

これらの結果は、CNS と気管のネットワーク形成において、MBF1 が APT/TDF のコアクチベーターとして働くことを示している。

tdf と *mbf1* 変異株における中枢神経系の異常



yw

mbf1

tdf ^{P2}

A03-21

研究課題　「神経回路形成における CRMP の機能」

研究代表者　野田昌晴

所属　自然科学研究機構　基礎生物学研究所　統合神経生物学研究部門

特定領域「神経回路」参加年度　平成 11, 12 年度：　班友

平成 13, 14 年度：　公募班員

平成 15, 16 年度：　班友

研究成果の要旨

CRMP は semaphorin による軸索ガイダンスシグナルを担う細胞内タンパクとして単離され、これまでに CRMP1-5 の５つの遺伝子が同定されている。我々は CRMP1-4 についてプロモーターの使い分けによって生じる別のアイソフォームが存在することを見出し、これを A タイプ、従来のものを B タイプと命名した。A タイプは B タイプの機能に干渉する活性を有することが判明した。

研究成果

神経系のさまざまな場所で領域特異的な神経結合パターン、いわゆる投射地図を見い出すことができる。我々はニワトリ網膜-視蓋投射系をモデル系として用い、その形成過程の分子メカニズムの全容解明を目指してきた。ニワトリ胚網膜における領域特異性の決定に関与する分子群の大規模スクリーニングを行った結果、多数の候補分子を同定することができた。それらのうちに、機能はまだ不明ながらも軸索ガイダンス機構の主要コンポーネントと想定されてきた CRMP ファミリーの新規バリアントを見い出した。この分子は厳密には一過性の領域特異性を示すに過ぎなかったが、これを手がかりに、CRMP1ー4 について、N 末端領域が既知のタイプとは異なるバリアントが存在することを明らかにした（図１）。ゲノム構造解析から、これらの新規バリアント群を A タイプ（CRMP-As）、既知の CRMPs を B タイプ（CRMP-Bs）と命名した。

興味深いことに、網膜神経節細胞において CRMP-As は軸索特異的に局在するのに対し、CRMP-Bs は軸索、樹状突起の両方に分布していた。従来の研究では、両タイプに共通のコア部分に対する抗体を用いて、CRMP は神経突起の軸索に主に分布されてきたが、これは A、B 両タイプを同時に検出していたためと思われる。

発生期に最も普遍的に発現している CRMP2A、-2B を網膜組織片培養系において過剰発現させたところ、CRMP2A は視神経軸索側枝形成に対し抑制的な作用を、一方 CRMP2B は促進的な作用を示した（図２）。一般に神経細胞では樹状突起の分岐が激しいが、樹状突起部には CRMP-Bs のみが発現していることと一致する結果である。

また、胚性線維芽細胞において過剰発現させた場合、CRMP2A、-2B は微小管パターンをそれぞれ配向化、ランダム化し、細胞の形態を劇的に変化させた。当初、CRMP ファミリーは神経系に特異的に発現する分

子群として同定されたが、実際には低レベルながらも多くの非神経性組織においても発現しているため、両タイプの CRMP による対照的な微小管パターン調節により、神経細胞の軸索成長を始めとして、細胞の極性が制御されていると考えられる。また今回の研究で、CRMP の N 末、C 末に GFP 等の他の分子を連結した隔合分子は本来の機能を失うことが明らかとなり、これまで隔合タンパクを用いて報告された CRMP-B タイプの機能については見直しが必要との結論に達した。軸索ガイダンスからシナプス成熟までに亘る神経回路形成過程も、高度に厳密に制御された細胞極性化の一過程とみなすことができ、CRMPs の機能解析を通して神経回路形成の普遍原理に迫ることが可能ではないかと考えている。

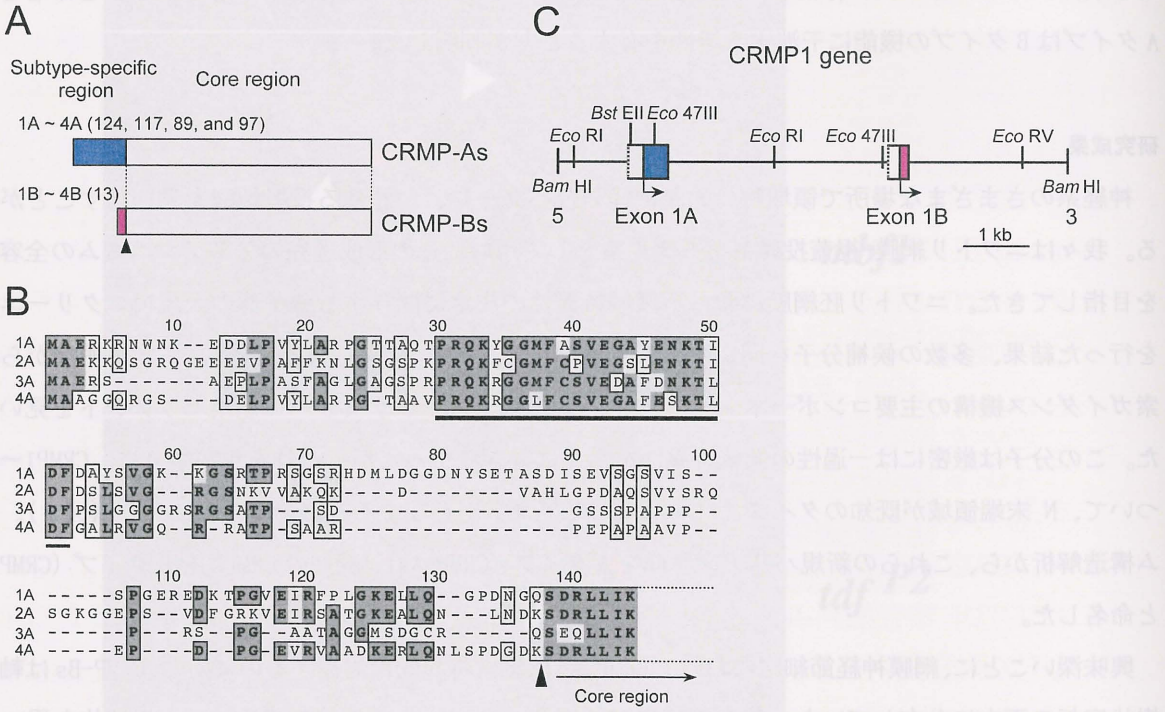


図 1　新しい CRMP アイソフォームの同定
従来の CRMP1-4 に対して、N 末領域の長さと配列の異なるアイソフォームが存在する。遺伝子では新タイプの N 末領域をコードする第一エクソンが従来タイプの第一エクソンより上流にあることから、新タイプを CRMP-A、従来のものを CRMP-B と呼ぶことにした。

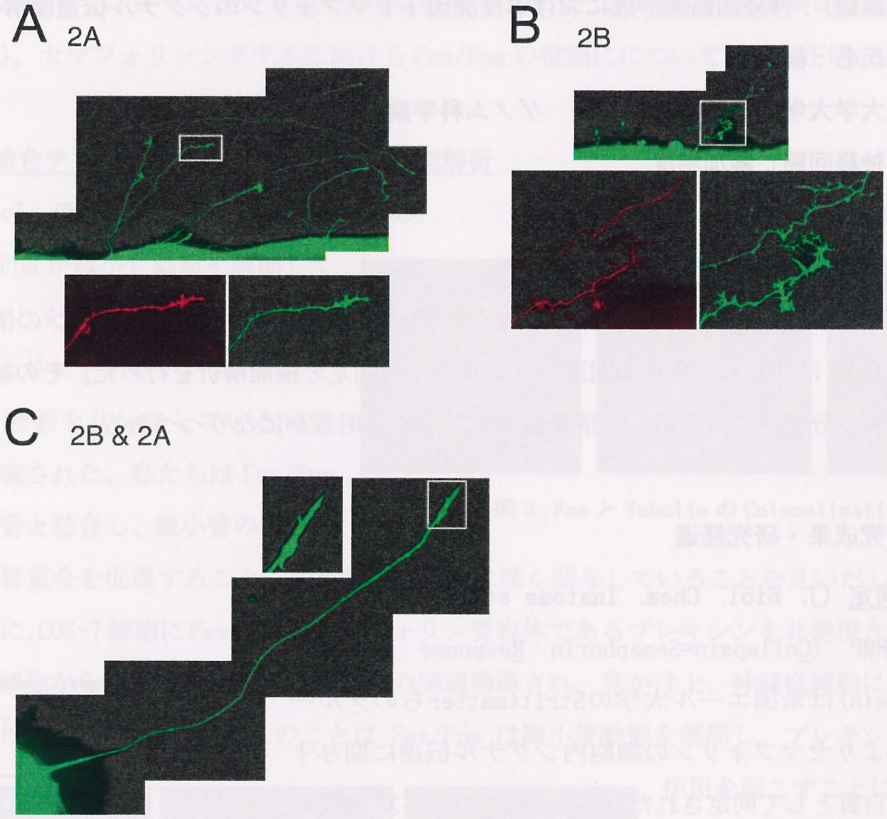


図 2　CRMP-2A、CRMP-2B の過剰発現の神経軸索に与える影響
CRMP-2B は分枝を誘導し、CRMP-2A は伸長を促進する結果を得た。同時発現では CRMP2A の活性の方が優性である。従来、CRMP-2B を用いて軸索分化を誘導する機能があるとされていたが、これは融合タンパクを用いた結果であった。融合タンパクは本来の機能を失っている可能性が高く、ドミナントネガティブ効果の結果、CRMP-As の活性が優位になった可能性が高い。

表題（研究課題）：神経回路網形成における反発因子セマフォリンのシグナル伝達機構の解析

研究代表者氏名：柳　茂

所属：神戸大学大学院　医学系研究科　ゲノム科学講座　機能ゲノム学分野

特定領域「神経回路」参加年度：

平成１３年度ー１６年度

研究成果の要旨：

反発因子セマフォリンは神経回路形成に重要な役割を果たす。私達はセマフォリンの情報伝達に関与する蛋白質CRMPに注目し、多くの関連シグナル分子の同定と機能解析を行った。その結果、神経回路形成に関連する分子群による新しい情報伝達システムが明らかになりつつある。

研究成果：

従来の研究成果・研究経過

CRAMの同定（J. Biol. Chem. Inatome et al. 2000）

CRMP（Collapsin=Semaphorin Response Mediator Protein）は米国エール大学のStrittmatterらのグループによりセマフォリンの細胞内シグナル伝達に関与する蛋白質として同定された。CRMPは線虫のunc-33の哺乳類相同遺伝子である。unc-33の突然変異は線虫において運動神経の走行異常をおこし、異常行動を起こす。この事実はunc-33遺伝子ファミリーは神経ガイダンスの重要な分子であることを意味する。CRMPはセマフォリンの細胞内シグナル伝達に関与する分子として想定されているが、その分子メカニズムは不明である。一方、私たちはCRMPと結合する新規蛋白質CRAM（CRMP Associated Molecule）を発見した。CRAMはCRMP同様、神経発生過程に特異的に発現するunc-33ファミリーに属する蛋白質である。図１に示すようにCRAMは４つのCRMPとは遺伝系統樹的に離れており、CRMPとは異なる機能が推測されたが、この時点ではその機能は不明であった。

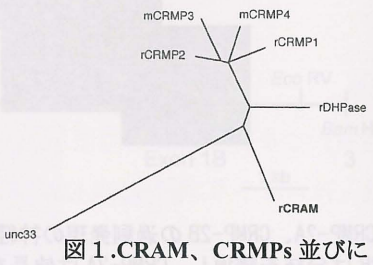


図１.CRAM、CRMPs並びにUnc-33の遺伝系統樹

本課題における研究成果

（ア）CRAM結合チロシンキナーゼFes/Fpsの同定と機能解析

（EMBO J., Mitsui et al. 2002）

CRAMに会合するチロシンキナーゼとしてFes/Fpsを同定した。Fes/Fpsはセマフォリン刺激により活性化し、受容体プレキシンやCRMP/CRAMをリン酸化することを見出した。

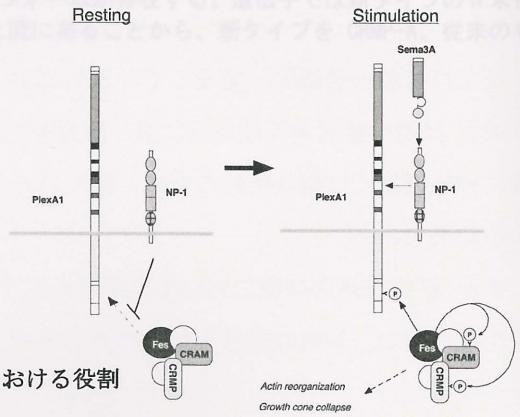


図２.Fesのセマフォリンシグナルにおける役割

Fes/Fps のセマフォリンシグナルにおける活性化機構について新しいモデルを提唱した（図２参照）。セマフォリンシグナルにおける Fes/Fps の役割にについては未だ不明である。

（イ）CRAM 結合チロシンキナーゼ Fes/Fps の機能解析

(J. Biol. Chem. Takahashi et al. 2003)

Fes/Fps が微小管動態を調節していることを発見し、報告した。Fes/Fps がセマフォリンシグナルと微小管動態をリンクしている可能性が示唆された。私たちは Fes/Fps が微小管と結合し、微小管の核形成と微小管重合を促進すること、微小管の安定性に深く関与していることを見いだした。

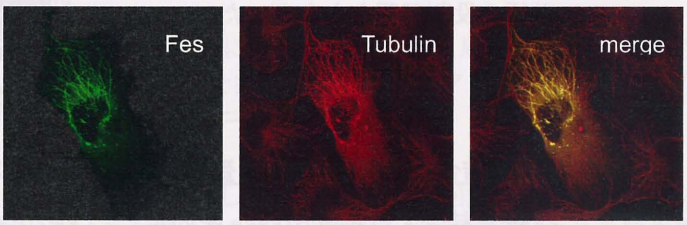


図３. Fes と Tubulin の Colocalization

さらに、COS-7 細胞に Fes/Fps とセマフォリン受容体であるプレキシンを共発現させると、COS-7 細胞から微小管重合を伴う神経様の突起誘導され、見かけ上、神経様細胞に変換する活性が検出された（図４）。このことは Fes/Fps は微小管動態を調節し、プレキシンと相互作用を起こすことにより、神経突起の進展を促進したと考えられる。セマフォリンは反発因子なので、一見この現象は相反する結果のようにも思えるが、軸索はセマフォリンから反対方向に進展するので、このような軸索の形態変化における微小管動態の調節機構に関与しているのではないかと考えている。

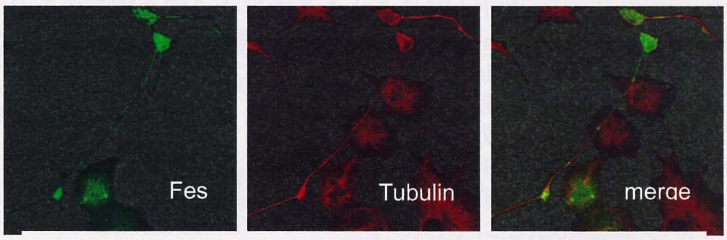


図４.Fes とプレキシンの共発現による神経様突起進展

（ウ）CRMP/CRAM に会合する新規 GTPase、ミトコンドリア Septin の同定

(Genes Cells Takahashi et al. 2003)

CRAM 結合蛋白質の同定を試みたところ、新規の Septin ファミリー蛋白質が同定された。この Septin はミトコンドリアに特異的に移行することより M-septin と命名した（図３）。私達はこのミトコンドリア Septin が障害ミトコンドリアの消去機構に関与している結果が得られており、現在解析中である。

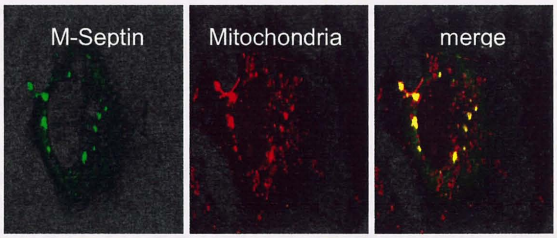


図 3. M-Septin はミトコンドリアに局在する

（エ）CRAM はセマフォリンシグナルを負に制御する役割を発見

(Mol. Biol. Cell Hotta et al. in press)

CRAM は４つの CRMP と異なり、セマフォリンシグナルを抑制する役割が見出された。さらに興味深いことに CRAM が成長円錐の形成に必須の役割が明らかとなった。

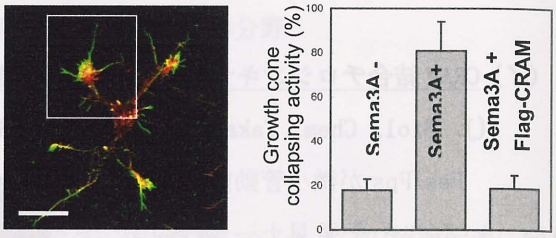


図３. CRAM による Semaphorin 応答の抑制

（オ）CRAM に結合する新規 GTPase 蛋白質の発見 （論文投稿中）

CRAM に結合する新規 GTPase を同定し、CRAG と命名した。CRAG はセマフォリンシグナルに重要な役割が明らかになると共に、神経変性疾患との関連性が見出され、現在文投稿中である。

特定領域神経回路　報告書

3.1 表題：神経回路形成とシナプス形成における成長円錐反発分子セマフォリンの作用機序（H13・14 年度）、神経回路形成における膜型セマフォリン分子の作用機序（平成 15・16 年度）

3.2 研究代表者名：稲垣　忍

3.3 所属：大阪大学医学系研究科・保健学専攻・生体情報科学講座・神経生物学グループ

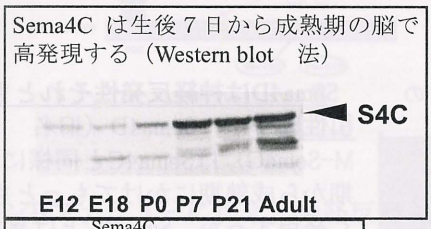
3.4 特定領域「神経回路」参加年度：平成 13 ー16 年度

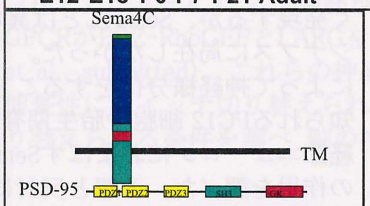
3.5 研究成果の要旨　1) 膜型セマフォリン Sema4C は PSD-95 に結合しシナプスに局在する。2) 興奮性ニューロンに高発現する Sema4C 結合蛋白 SFAP75 は細胞死を抑制する。3) セマフォリンが正か負に作用するかを決めているのはプレキシン受容体を発現する標的ニューロンである。

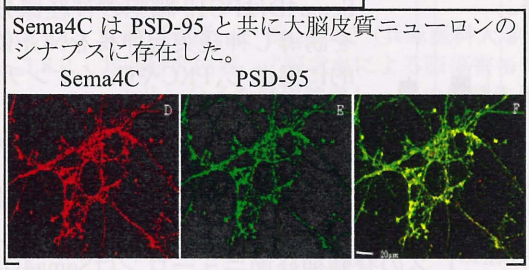
3.6 研究成果

セマフォリンは神経成長円錐を退縮させる反発性の因子として同定され，神経回路の形成に重要な分子である（Taniguchi et al., 1997）。しかしながら，セマフォリン分子は神経回路形成が行われる胎生期のみならず成熟動物にも発現するが、幼若期から成熟脳におけるセマフォリンの機能はほとんどわかっていない(Miyazaki et al., 1999)。私達は膜型セマフォリン分子である Sema4C（旧名；M-SemaF）や Sema4D（旧名；M-SemaG）が生後幼若期のシナプス形成期から成熟期に最も発現量が多いことから、シナプス形成やシナプス再構成に伴う神経突起の伸長・接着に関与していると考えた。また、膜型分子であるのでリガンドとして作用するだけで無く両方向性シグナル分子として成熟脳で機能していると考え，成熟脳で豊富に発現する分子からセマフォリン分子の細胞内領域に結合する蛋白質をアフィニティー法やイーストツーハイブリッド法を用いて検討した。本研究では、これらの膜型セマフォリン結合蛋白質の脳内および細胞内局在や作用機序を明らかにすることにより、幼若期や成熟脳における膜型セマフォリン分子の役割を明らかにすることを目的とした。

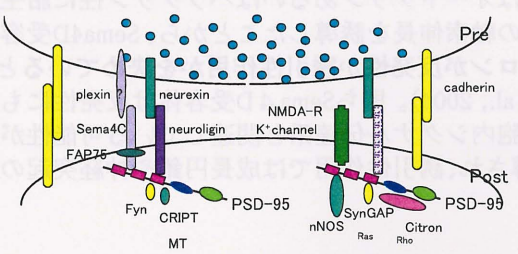
シナプスに局在する膜型セマフォリンSema4C　私達は膜型セマフォリンであるSema4C（旧名：M-SemaF）が主な神経回路が形成される胎生期から成熟期にかけて急速に発現が増加し、成熟脳に最も豊富に発現していることから、成熟脳の機能に重要な役割を果たしていると考えた。私達はSema4Cが成熟脳に豊富に発現する分子の１つである後シナプス肥厚蛋白質PSD-95 と結合することをアフィニティ法を用いて明らかにした(Inagaki et al., 2001)。Sema4CとPSD-95 蛋白質が成熟マウスの大脳皮質では神経線維成分に豊富に発現することを免疫組織化学的に明らかにすると共に、大脳皮質において両者が結合していることを免疫沈降法を用いて示した。さらに、Sema4Cの細胞内局在についてシナプトソーム／PSD分画法（Huttner et al., 1983, Phillips et al., 2001）を用いて調べたところ、Sema4CはPSD-95 と類似の局在を示し、シナプトソームや後シナプス肥厚画分に豊富に存在した。また、培養神経細胞の後シナプス部位でPSD-95 と共存することを明らかにした。以上の結果から、M-SemaFが興奮性シナプス後膜側ではNMDA受容体、接着分子ニューロリギン、FynやCitronなどの様々なシグナル分子と共にPSD-95 を介してクラスターを形成し神経可塑性に関与していることを予想させた（reviewd by Kim and Sheng）。また，M-SemaFはRGS-GAIP（Gαi GTPase activating protein，Gαi-GAP）結合分子であるGIPCに結合する（Wang et al., 1999）。これらの結果から神経系では主にPSD-95 を介してM-SemaFを発現する細胞内へ情報伝達がなされるが、他の細胞ではGIPCを介してM-semaFが受容体分子などの膜分子のダウンレギュレーションや細胞内局在、再分配に関与するG 蛋白質シグナル伝達系に関与している可能性が示唆された。即ち，後シナプス肥厚膜に局在するM-SemaFは後シナプス肥厚膜にクラスターされている様々な受容体分子とリンクして細胞内局在や再分配に関与している可能性ならびに，リガンドとして前シナプス側にその形態や接着に関与するアクチン骨格系シグナ





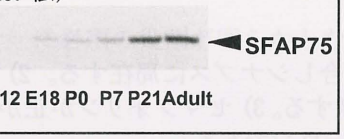


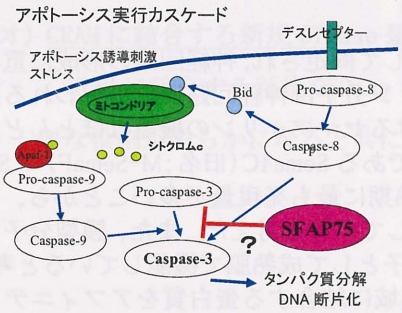
興奮性シナプスにおける Sema4C と他の分子ノシェーマ



ル伝達に関与していることが示唆された。しかしなお、その本当の役割は不明であるので、現在Sema4Cの受容体を同定し、同分子のドミナントネガチブ変異体を導入することによるシナプスやスパインの形態変化を調べている。

SFAP75は生後21日と成熟動物脳でもっとも発現が高い（Western blot 法）





Sema4C結合蛋白質SFAP75は細胞死を抑制する　私達はアフィニティー法を用いて成熟マウス大脳皮質からM-SemaF に結合する分子、SFAP75 を同定した（Ohoka et al., 2001）。SFAP75 は身体のなかでは主に脳に特異的に発現し、脳の細胞の中ではニューロンに発現する。また、テトラエチルアンモニウムによるシナプス可塑性の増強によって発現が誘導され、神経突起伸長作用を有する（Shinozaki et al., 1999）。脳内に広く分布するが、特に海馬の錐体細胞や歯状回の顆粒細胞や扁桃体中心核に最も強く発現する。大脳皮質では全層に発現するが第2と第6層に強く発現する。その他、運動ニューロンや知覚ニューロンにも強く発現し、ニューロン特異的な発現パターンを示し、成熟に従って増加する分子であるが、その役割は不明である。最近、ノックアウト動物の報告がなされたが、胎生早期に致死になることから、胎生早期でも発達に大変重要な役割を果たしていることが示唆される（Mochizuki et al., 2003）。私達は最近、SFAP75が細胞ストレスによるアポトーシスを抑制することを発見した（Sakai et al., 未発表データ）。脳におけるSFAP75 の機能はよく分からなかったが、前述したように、SFAP75 が興奮性ニューロンに高発現され、ニューロンの興奮性の亢進により誘導されること、成熟脳で発現が増加することから、脳の発達過程における神経細胞死ではなく、脳の傷害やシナプスの興奮性の亢進によって誘導される神経細胞死をSFAP75 が抑制していることを示唆する、新たな知見を得た。さらに、内在性分子による神経細胞死抑制機序を明らかにすることにより、神経変性疾患等における神経細胞死に対する新たな治療法の開発に貢献できる。

Sema4D(S4D)は PC12 細胞(左図)や脊髄神経節ニューロン（右図）の神経突起伸長を促進する。

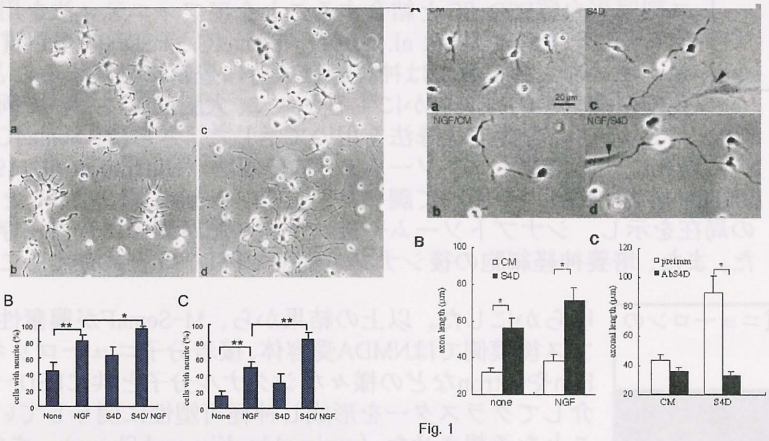


Fig. 1

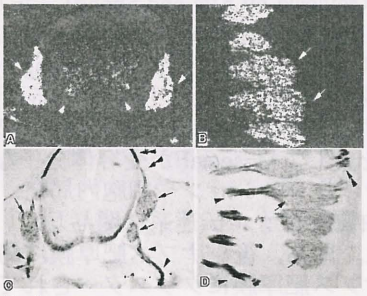
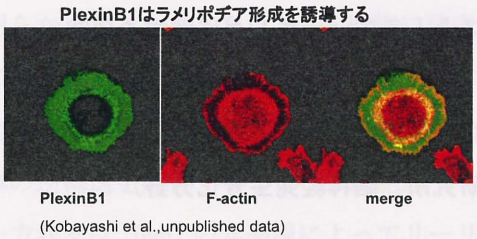


Fig. 3

Sema4DmRNA は胎生期脊髄神経節に高発現するが（A,B）、Sema4D は神経線維に局在する。

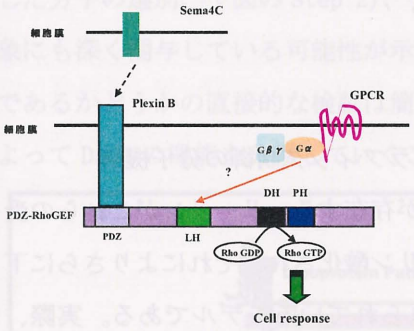
Sema4Dは神経反発性それとも誘引性因子？　Sema4D（旧名M-SemaG）はSema4Cと同様に幼若期から成熟期にかけてもっとも強く発現するが、Sema4Cとは異なりシナプスに局在しなかった。 NGFによって神経様分化をすることで知られるPC12 細胞や胎生期脊髄神経節ニューロンにおよぼすSema4Dの作用を調べた。予想と反対に、Sema4DはPC12 細胞の神経様分化を誘導し神経突起伸長をNGF依存的に促進し、PKCやCaイオンチャネルやPI3Kinase系とも関連する（Fujioka et al., 2003）。Sema4Dは海馬では成長円錐を退縮し反発性作用を示す（Swiercz et al., 2002）。一方、胎生マウスの脊髄神経節ニューロンはSema4Dならびに Sema4D受容体であるプレキシンB1を発現する。Sema4Dはオートクリンあるいはパラクリン性に胎生期脊髄神経節ニューロンの軸索伸長を誘導したことから、Sema4D受容体を発現する**標的ニューロンが反発性か誘引性作用かを決めている**と考えられる（Masuda et al., 2004）。即ちSema４D受容体は反発性にも誘引性にも反応できる細胞内シグナル伝達系と関連している可能性が高い。神経反発性作用では成長円錐や神経突起の退縮が誘導され、誘引性作用では成長円錐や神経突起の伸長



(Kobayashi et al.,unpublished data)

が誘導される。これらのシグナルのスイッチにはアクチン細胞骨格を制御する低分子G蛋白質の１つであるRhoファミリー分子が関与することが予想された。そこで私達は野生型ならびに変異型のSema4D受容体を非神経細胞に発現し、受容体の反発性と誘引性作用の両方に関連すると思われるシグナル伝達系について調べた。その結果、１）Sema4D受容体の過剰発現がRhoファミリー分子Rac1 の表現系として知られているラメリポディア形成を促進すると共に、Rhoの表現系として知られる細胞を縮小化を誘導した（Kobayashi et al., 未発表データ）。２）Sema4Dリガンドは Sema4D受容体を発現する細胞に対してのみ細胞縮小化を亢進した。Sema4D受容体発現によるラメリポディア形成の分子機序はなお不明だが、少なくともSema4Dリガンドによるものと異なる表現系がみられたことからSema4D受容体は未知のリガンドや分子と相互作用している可能性が示唆された。また、ラメリポディア形成作用と細胞縮小の一見相反する作用を有することから、神経に対し正と負の作用を有することとよく一致する。これは今後、標的ニューロンが作用を決定するメカニズムを解明するモデル系として大いに有用であろう。

Sema4D受容体であるプレキシンB1 はPDZ-RhoGEFを介してRhoAを活性化する



私達はSema4D受容体であるプレキシンB1 の細胞情報伝達に関与する細胞内シグナル分子を探索した。その結果、プレキシンB1 のC末端はアクチン細胞骨格を制御するRhoファミリー分子に属するRhoAの活性化分子、PDZ-RhoGEFとLARGが結合することを見いだした(Hirotani et al., 2002)。前述の非神経細胞をモデル系を用いてSema4Dが引き起こす細胞縮小化作用にはプレキシンB1 とRhoAの活性化が必要であることを明らかにした。いろいろな脳の細胞外シグナルを伝達するGPCR受容体、例えばβ_2アドレナリン受容体、5-HT_2受容体、ドパミン受容体にはPDZドメイン認識配列があり、様々なPDZドメイン含有蛋白と結合することが生理的機能を発揮するのに重要である（Gavarini et al., 2004, Jeanneteau et al., 2004, Xiang, et al., 2004）。私達はプレキシンBファミリーに加え、神経反発性因子であり神経の形態形成に重要な細胞外シグナルを伝達するGPCRがPDZ-RhoGEFとLARGを介してRhoA活性化のシグナル伝達に関わることを見い出した（Yamada et al., submitted）。これらの神経反発性因子の作用も標的ニューロンによって誘引性あるいは神経突起伸長性にスイッチ切り替えられると考えているので、その作用機序を明らかにして負の作用を正に、切り替えられる条件を調べ、脳の神経損傷後の神経回路の再生のための新たな治療法の開発に貢献したい。

3.8 共同研究など

3.8.1　共同研究者　　松山知宏（兵庫医科大学）

3.8.2　共同研究内容　“脳虚血による脳傷害モデル動物を用いたセマフォリン分子の役割”　脳虚血傷害セマフォリン分子を発現誘導し、脳の保護作用を示すことを明らかにした。

脳のレイヤー形成を制御する蛋白質のプロテオリシスとトラフィッキングに関する研究

研究代表者　服部光治

所属　名古屋市立大学　大学院薬学研究科　病態生化学分野

（平成１５年度までの所属　東京大学　医科学研究所　脳神経発生分化分野）

特定領域「神経回路」参加年度

平成１３年度ー平成１６年度

研究成果の要旨

脳のレイヤー形成に必須の分泌蛋白質リーリンと、その受容体の細胞内トラフィックが、従来リーリンの下流分子とされてきた細胞内蛋白質 Dab1 によって調節されていることを見いだした。また、リーリンの分泌後分解について生化学的に解析した。

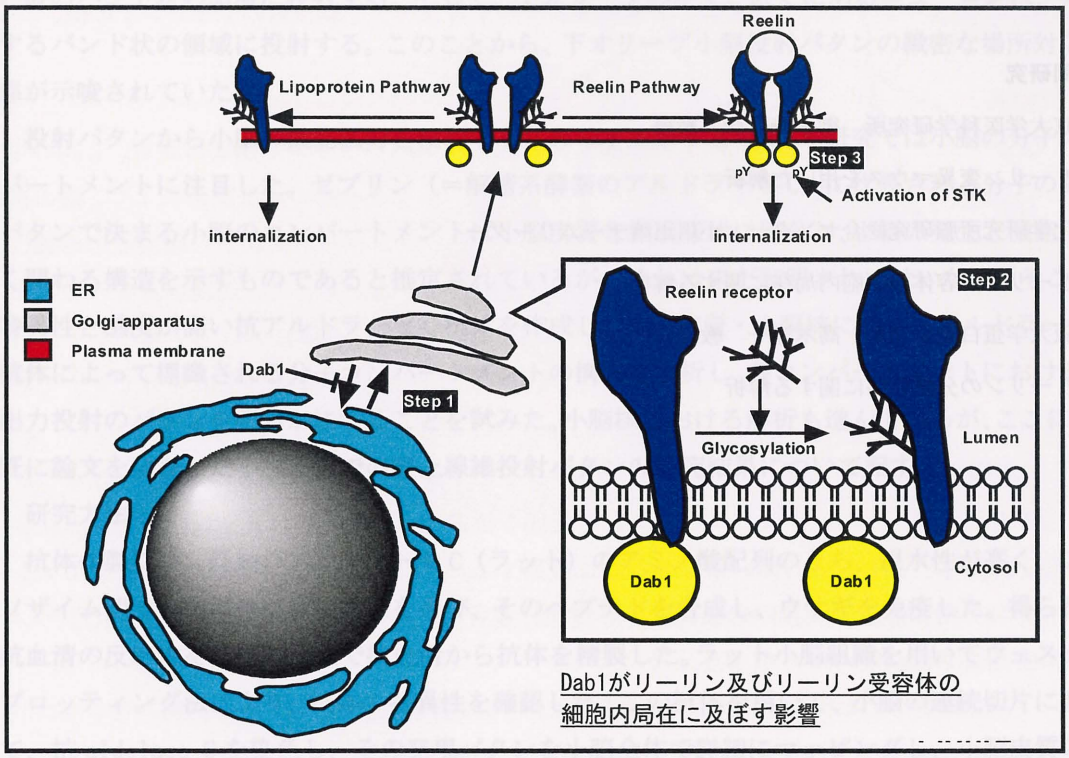
研究成果

(1) Dab1 による、リーリン受容体及びリーリンの細胞内トラフィック制御の分子機構

リーリンには VLDLR 及び ApoER2 と呼ばれる二つの受容体が存在する。リーリンがこれらの受容体に結合すると、細胞内蛋白質 Dab1 のチロシン残基がリン酸化され、それによりさらに下流へシグナルが伝えられるというのが従来一般に受け入れられているモデルである。実際、VLDLR/ApoER2 のダブルノックアウトマウスや Dab1 変異マウス（yotari マウス）はリーリン欠損マウスとほぼ同様のフェノタイプを示すことから、これらの分子が同じ情報伝達経路にあることは間違いないと思われる。しかし、リーリンがいかなる変化を神経細胞内で引き起こすかについてはここ数年間あまり理解が進んでおらず、既成概念にとらわれない新たな視点から解析することが必要であると考えられる。

我々は、yotari マウス由来の神経細胞では、野生型マウス由来神経細胞に比べて、その細胞表面へのリーリンの結合量が少ないことを見いだした。このことは、Dab1 変異によって、リーリン受容体の細胞内トラフィッキングに異常が生じていることを示唆している。この点をさらに追求するために、COS 細胞（内在性には Dab1 を持たない）を用いて解析した結果、VLDLR または ApoER2 それぞれ単独に発現させた場合よりも、Dab1 を共発現させたときのほうがリーリンの細胞表面への結合（すなわち細胞膜表面への受容体の機能的発現）が増大することがわかった。実際、細胞表面蛋白質をラベルする実験からもこの結果は支持された。以上のことから、Dab1 は VLDLR 及び ApoER2 の細胞膜表面への発現を正に制御することが強く示唆された。また、VLDLR 及び ApoER2 の成熟蛋白質はともに O-結合型糖鎖をもつことが知られているが、Dab1 はこの糖鎖を持たない（すなわち未成熟型蛋白質）に選択的に結合することが免疫沈降法により

明らかとなった。さらに、COS 細胞に発現させた VLDLR は主に小胞体に多く存在するが、Dab1 の共発現により小胞体への局在は減弱し、細胞表面への局在が増大した。既に発表されている他のグループの結果なども考え合わせると、Dab1 は、ゴルジ装置から小胞体へのリーリン受容体の逆輸送を阻害することで、細胞膜への輸送を促進する効果をもつ可能性が高いと思われる。一方我々は、Dab1 の共発現によってリーリンのエンドサイトーシスも強力に阻害されることを見いだした。また、Dab1 をリン酸化するとされる Src ファミリーチロシンキナーゼを阻害することでも、リーリンのエンドサイトーシスは阻害された。これらのことから、Dab1 のリン酸化は、リーリンのエンドサイトーシスを制御する重要な因子であることが示唆された。以上をまとめると、Dab1 は従来、リーリンを受容した細胞内でリン酸化を受けて下流へのシグナルを媒介するとする機能のみが注目されてきたが、それ以外にもリーリン受容体の小胞体・ゴルジ間の輸送（下図の Step 1）、おそらくはゴルジ体におけるリーリン受容体の成熟（もしくは成熟した分子の選別。下図の Step 2）、リーリンのエンドサイトーシス（下図の Step 3）などの現象にも深く関与している可能性が示唆された。これらの経路が実際の脳の発生においても重要であるかどうかの直接的な検証は簡単ではないと思われるが、さらに詳細な解析を行うことによって Dab1 の機能を分離していくことが重要であると推察される。



(2) リーリンの分泌後分解の分子機構と生理的意義に関する解析

リーリン蛋白質には二カ所の特異的分解部位が存在し、全長（約 430kDa）以外に 5 種の分解産物が存在すること、及び、この分解は分泌後にされるものであることは既に知られている。こ

れら分解産物の中で、中央部のリピート部分だけからなる断片だけで、リーリンの生理活性の発揮には十分であるとする最近の報告があるが、それ以外にはリーリンの分解に関する解析は進んでおらず、触媒する酵素の実体も未知である。また、リーリンのN末端領域には機能阻害抗体CR-50の結合部位が、C末端領域には極めて良く保存された塩基性アミノ酸残基に富む構造が存在するが、これらの領域の機能を考える上でも、リーリンの分解について解析することは重要である。我々は、リーリンの特異的抗体を用いたカラムを作製してリーリンの部分精製を行ったところ、部分精製したリーリンは極めて不安定であり、水溶液中で数日以内にはほとんど検出できなくなることを見いだした。二価イオンキレーターやプロテアーゼ阻害剤の添加によってもその安定性はほとんど回復しなかったが、驚くべき事に、血清脂質や脳脂質抽出物を加えるとリーリンの安定性が飛躍的に増大することを発見した。このことは、リーリンには何らかの脂質性物質を結合する性質があり、それによって安定性が増大することを示唆している。今後は、分解部位の特定を行い、その周囲に変異を導入することで非分解型リーリンを作製してその機能を調べるとともに、リーリンに結合する脂質性物質の同定及びその生理的意義などの検討を行いたい。

共同研究

東京大学医科学研究所　御子柴克彦　教授

　リーリン変異マウスを用いた解析

理化学研究所脳研究総合センター　小川正晴チームリーダー

　リーリン受容体の細胞内局在に関する解析

大阪大学蛋白質研究所　高木淳一　教授

　リーリンの分泌経路に関する解析

A03-25

小脳皮質・小脳核の分子コンパートメントと小脳入出力神経回路

杉原泉

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・システム神経生理学分野

平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨

ラットの小脳皮質全体において、小脳皮質の分子マーカー（アルドラーゼC）の縦縞状発現パタンと下オリーブから小脳への登上線維の投射パタンとの密接な関係を二重染色法により同定し、この関係を利用して５グループからなる具体的な小脳の機能区画の構築を示した。

研究成果

研究目的：

小脳の局所神経回路は均一なので、小脳の機能区分は、入出力神経回路の結合のパタンによって決定される。われわれは、小脳の入出力線維の投射パタンを明らかにして小脳の機能区分を検討することをめざしてきた。これまでに、ラットにおいて延髄の下オリーブ核に由来する登上線維の投射を、単一軸索のレベルで、連続切片から明らかにした。個々の下オリーブ核ニューロンの軸索は枝分かれして、平均７本の登上線維となる。単一軸索に由来する登上線維は、非常に細い縦のバンド状の領域に投射する。そして、下オリーブの中で、近くにあるニューロンは、共通するバンド状の領域に投射する。このことから、下オリーブ小脳投射パタンの緻密な場所対応関係が示唆されていた。

投射パタンから小脳の機能区分を検討するための手がかりとして、本研究では小脳の分子コンパートメントに注目した。ゼブリン（＝解糖系酵素のアルドラーゼC）に代表される分子の発現パタンで決まる小脳のコンパートメントは小脳皮質を縞模様状に区分し、小脳の発生と機能に深く関わる構造を示すものであると推定されているが、それは未だ証明されてはいない。そこで、特異性と感度が高い抗アルドラーゼC抗体を作成し、小脳皮質・小脳核においてアルドラーゼC抗体によって標識される分子コンパートメントの構築を解析し、各コンパートメントにおける入出力投射のパタンを明らかにすることを試みた。小脳核における解析も進んでいるが、ここには、既に論文を発表した小脳皮質での登上線維投射パタンの研究結果について記す。

研究方法：

抗体作製には、既知のアルドラーゼC（ラット）のアミノ酸配列のうち、親水性が高く、アイソザイム間での相同性が低い部分を選び、そのペプチドを合成し、ウサギを免疫した。得られた抗血清の反応性を確認した上で抗血清から抗体を精製した。ラット小脳組織を用いてウェスタンブロッティング法により、抗体の特異性を確認した。この抗体を用いて、小脳の連続切片において、抗aldolase Cを染色し、その発現パタンを小脳全体で詳細にマッピングし、小脳皮質の分子コンパートメント構築パタンの全体像を把握した。

一方、小脳皮質に投射する登上線維をビオチン化デキストランのラット下オリーブ核への微量注入によって標識し、分子コンパートメントも二重染色によって標識した。トレーサーによって

標識されたニューロンの属するコンパートメントを同定した上で、軸索終末の分布を１例ごとに正確にマッピングした。一部では、単一軸索の再構築も併せて行った。

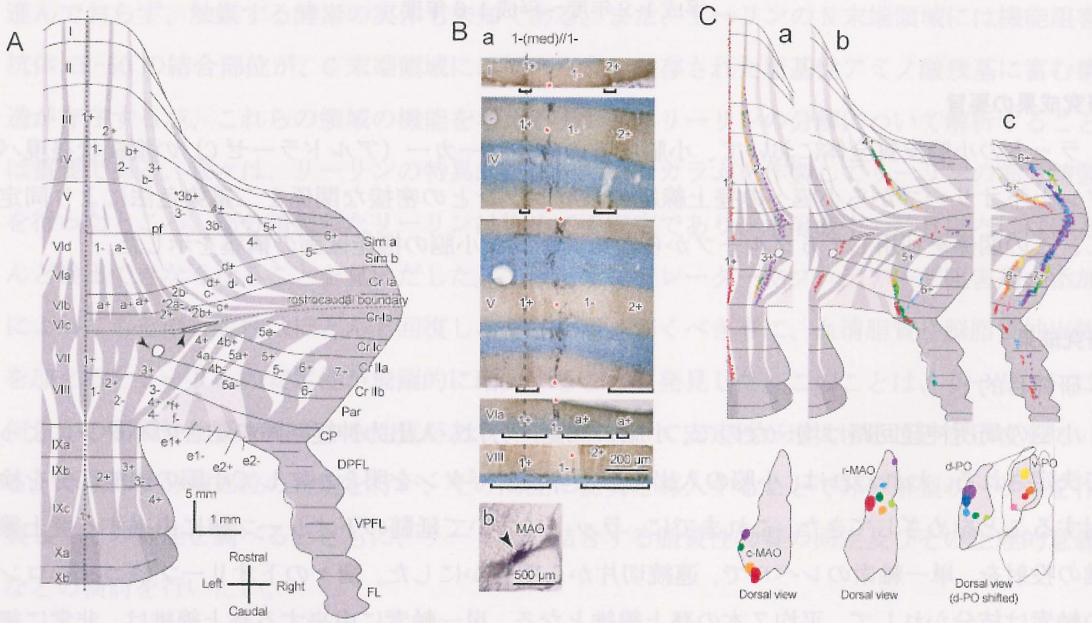


図１　A, 小脳皮質全体におけるアルドラーゼＣコンパートメントのパタン。　B, アルドラーゼC（茶）と下オリーブ小脳投射（黒）の二重染色。　C, 下オリーブ小脳投射のマッピングの例。（略語と詳細な説明は文献の１）

研究結果：

１）抗アルドラーゼＣ抗体染色による小脳皮質の分子コンパートメント構築の解析。２匹のウサギから高特異性・高感度の精製ポリクローナルを得た。ラット小脳の免疫染色により、縦の縞模様状の分子コンパートメントを標識した。アルドラーゼＣコンパートメントの縞模様の形態は、小脳内の場所（吻側・中央部・尾側）によって全く異なっていた。そこで、連続切片を一枚ごとに追跡して、コンパートメントの連続性を詳しく調べ、小脳皮質全体におけるアルドラーゼ Cコンパートメントのパタンを解析し、平面状に展開した小脳皮質の模式の上にマッピングした（図１Ａ）。

２）　小脳皮質のアルドラーゼＣコンパートメントと下オリーブ小脳投射の相関。下オリーブ核にBDAを微小注入して、少数のニューロンの集団を標識すると、そのニューロンの軸索に由来する登上線維は、１本の縦の細い帯状の範囲に投射する。その帯は、１つのアルドラーゼＣコンパートメント内に存在し、互いの縦の境界が完全に並行になっていた（図１Ｂ）。これにより、両者の密接な関係が明らかになった。

３）　小脳皮質のアルドラーゼＣコンパートメントの吻側尾側の対応。アルドラーゼＣコンパートメントの縦縞模様のパタンは複雑であった。primary fissure より尾側で、おおよそ lobule VIc　から　crus Ib のレベルに、パタンの横方向に吻側尾側の境界が認められた（rostrocaudal boundary）（図１Ａ、点線）。この境界を境にして吻側のコンパートメントと尾側のコンパートメントが断絶しているために吻側－尾側間でのコンパートの同一性・連続性が不明である。しかし、

下オリーブニューロンの軸索はしばしば枝分かれして吻側と尾側に投射することを利用してそれを明らかにすることを試みた。その結果、例えば吻側の’2+’と尾側の’3+’というように、すべてのコンパートメントにおける吻側－尾側の対応関係を明らかにした（図１Ｃ）。

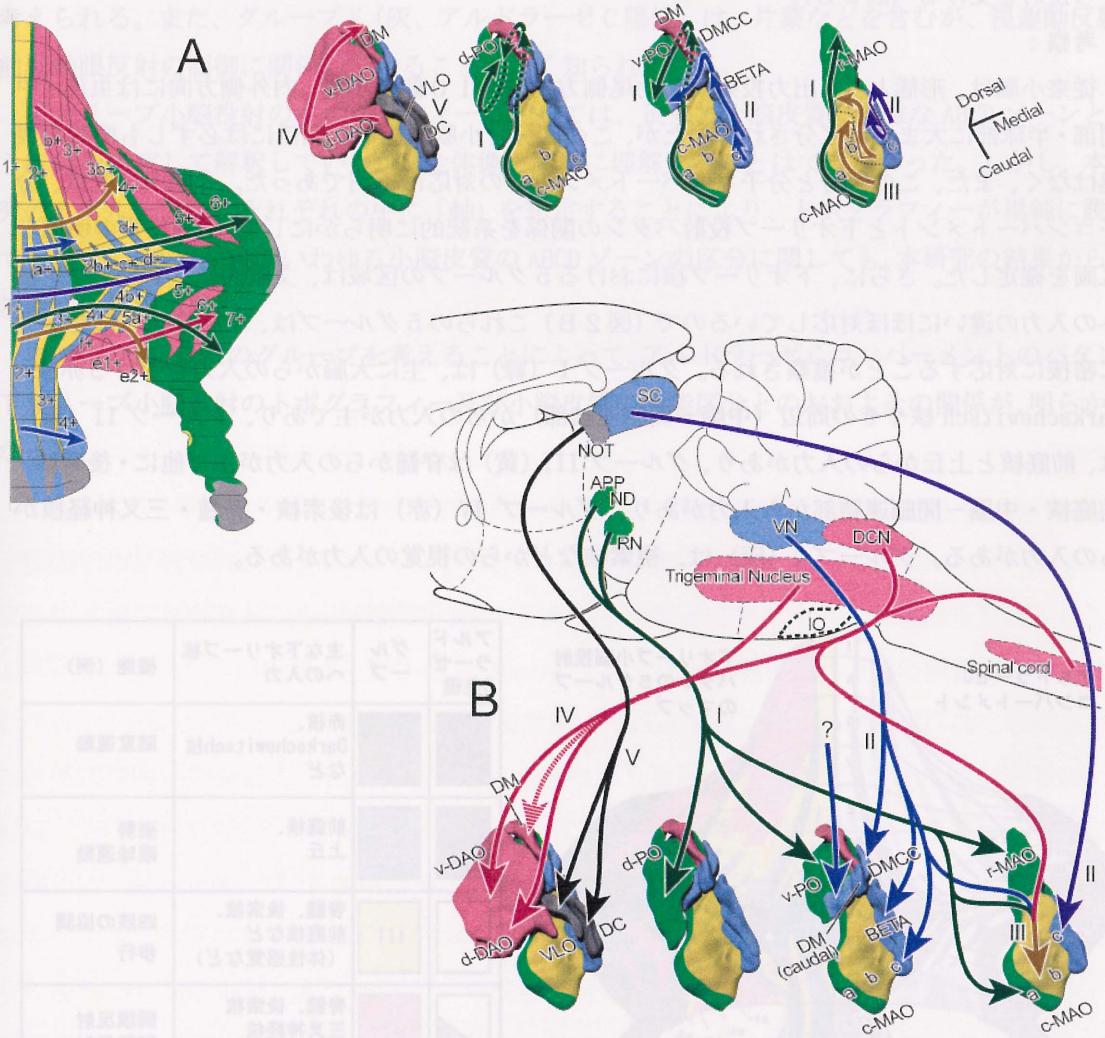


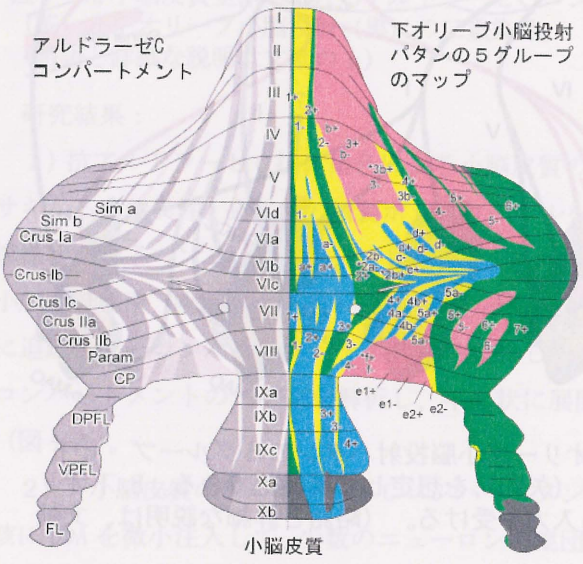
図２　アルドラーゼCコンパートメント・下オリーブ小脳投射パタンの５グループ　A, 下オリーブ小脳投射のトポグラフィー。「軸」（矢印）を想定して単純化できる。B, 下オリーブの、各グループに属する部分は、異なる入力を受ける。（略語と詳細な説明は、文献１を参照）

４）　アルドラーゼＣコンパートメントと、下オリーブ小脳投射の系統的対応関係とグループ区分。次に小脳全体で、アルドラーゼＣのコンパートメントと下オリーブ小脳投射の関係をシステマティックに調べるため、下オリーブ核のすべての副核の各所に９５例の微小注入を行い、その投射をアルドラーゼＣとの二重染色からマッピングして解析した。陽性・陰性のコンパートメントは小脳では縞模様を構成するが、下オリーブ内で、それらに投射する部分はまとまって存在することが分かった。その区分は必ずしも副核の区分とは一致しなかった。更に細かく見ると、陽性のコンパートメントに対する投射は、更に３つのグループに区分され、陰性のコンパートメ

ントに対する投射は更に２つのグループに区分されたため、全体として５つのグループに分けられた。その１例として、グループＩは、小脳では、前葉の吻側縁までずっと続く陽性のコンパートメントのグループで、下オリーブ核の比較的外側部（内側副核と外側・吻側と主核の大部分）から投射を受ける（図２Ｂ）。

考察：

従来小脳は、形態と、入出力投射から吻尾側方向には１０個の小葉、内外側方向には虫部・中間部・半球部に大まかに区分されていたが、この区分と小脳機能との関係には必ずしも明確な根拠はなく、また、この区分と分子コンパートメントとの対応は不明であった。今回の研究は、分子コンパートメントと下オリーブ投射パタンの関係を系統的に明らかにして、小脳皮質の明確な区画を確定した。さらに、下オリーブ核における５グループの区域は、文献的に、下オリーブ核への入力の違いにほぼ対応しているので（図２Ｂ）これらの５グループは、小脳皮質の機能区分に密接に対応することが推察される。グループＩ（緑）は、主に大脳からの入力を受ける赤核・Darkschewitsch 核やその周辺（中脳－間脳連結部）からの入力が主であり、グループ II（青）は、前庭核と上丘からの入力があり、グループ III（黄）は脊髄からの入力が主で他に・後索核・前庭核・中脳－間脳連結部から入力があり、グループ IV（赤）は後索核・脊髄・三叉神経核からの入力がある。グループＶ（灰）は、視索核などからの視覚の入力がある。



アルドラーゼC発現	グループ	主な下オリーブ核への入力	機能（例）
	I	赤核、Darkschewitsch核など	随意運動
	II	前庭核、上丘	姿勢 眼球運動
	III	脊髄、後索核、前庭核など（体性感覚など）	四肢の協調 歩行
	IV	脊髄、後索核 三叉神経核（体性感覚）	瞬膜反射 脊髄反射
	V	視索核（視覚）	視運動性眼振 前庭動眼反射

図３　アルドラーゼCコンパートメント・下オリーブ小脳投射パタンの５グループと小脳の機能区分との関係

この入力の違いから、今までに小脳の色々な部位で記録されている動物の運動などに関連した小脳活動が、どのグループの区画から記録されていたのかを推定することができる。すなわち、各グループの機能を大まかに推定することができる（図３）。まず、グループＩ（緑、アルドラーゼＣ陽性）は、上位中枢からの入力があり、随意運動の制御などに関係すると推定される。グループ II（青、アルドラーゼＣ陽性）は前庭核と上丘からの入力があり、姿勢・頭の向きの保

持や、急速眼球運動などの制御に関係すると思わる。グループIII（黄、アルドラーゼC陰性）は、体性感覚の入力とその他前庭系の入力を受け、四肢の動きの協調や歩行に関係した活動の記録される部分が含まれると思われる。グループIV（赤、アルドラーゼC陰性）は、体性感覚の入力が主で、瞬目反射 や四肢の引っ込め反射 の条件付けに関係している部分はここに属すると考えられる。また、グループV（灰、アルドラーゼC陽性）は、片葉などを含むが、視運動反射，前庭動眼反射の制御に関係していることはよく知られている。

下オリーブ小脳投射のトポグラフィーに関しては、従来、小脳皮質に複雑なABCDゾーンという区分を想定して解釈していたが、全体像を簡単に理解することはできなかった。しかし、本研究の５グループで、それぞれの中に「軸」を想定することにより、トポグラフィーが単純に説明できる（図２Ａ）。従来のいわゆる小脳皮質のABCDゾーンの区分に関しても、本研究の結果から、包括的に説明できる。

このように、５個のグループを考えることによって、アルドラーゼCコンパーメントのパタン、下オリーブ小脳投射のトポグラフィー及び小脳皮質の機能区分とのおおよその関係が、明らかになった。

A03-26

視覚認識に関わる神経回路網形成機構の解析

中越英樹

岡山大学大学院・自然科学研究科

特定領域「神経回路」参加年度:平成 13 年度ー平成 16 年度

研究成果の要旨

dve 遺伝子は光受容ニューロン（R1-R7）において発現し，内側光受容ニューロン（R7, R8）のロドプシン発現パターン（機能分化）を制御する．また，R1-R6 の投射先であるラミナにおける Dve 発現細胞は，神経幹細胞様の性質を示し，ラミナ神経系再構築への関与が示唆された．

研究成果

対象物認知に関わる神経回路（DE 細胞）

defective proventriculus（*dve*）遺伝子は，ショウジョウバエ視覚認識行動異常の原因遺伝子として同定されたホメオドメイン転写因子である．Dve 発現細胞は，視覚神経系発生の初期（３齢幼虫ー蛹期初期）の視葉薄層（ラミナ；lamina）と，後期（蛹期中期ー成虫）の複眼および中心脳の一部の細胞群において認められた．視覚認識行動異常を示した突然変異体（dve^{SH255}）は，転写開始点のすぐ上流にトランスポゾンが挿入されていたため，上流発現制御領域からの遺伝子発現が変化している可能性が考えられた．そこで *dve* 遺伝子上流領域の制御下に GAL4 を発現できる系統を樹立した．この系統によって標識される細胞を **D**ve **E**nhancer 応答細胞（DE 細胞）と呼ぶ．興味深いことに，成虫DE 細胞では Dve タンパク質を検出することができなかったが，蛹期初期までDve タンパク質を検出できるラミナ領域では，成虫期に DE 細胞が存在していた．そこで，発生段階をさかのぼって調べてみたところ，ラミナ領域の Dve 発現細胞はタンパク質の発現が消失する直前に DE 細胞として標識されていることが明らかとなった．つまり，この時期には Dve 発現細胞と DE 細胞は一致しているが，その後の DE 細胞においては，何らかの転写後調節によって Dve タンパク質の発現がきわめて低レベルに維持されているものと考えられる．また，中心脳の DE 細胞軸索は視覚中枢に投射しており，視覚認識能への関与が予想される（図 1A）．DE 細胞は GAL4 発現細胞として標識されているので，この細胞に特異的にテタヌス毒素を発現させて神経活動の阻害を引き起こすことが可能である．DE 細胞の神経活動を阻害すると，走光性や明暗認識は正常であるにも関わらず，対象物認知の行動（ストライプパターンに対する指向性）のみが異常を示した．つまり，対象物認知に関わる神経回路を遺伝的に標識できているものと考えられる．この DE 細胞に *dve* 遺伝子の過剰発現を誘導した場合にも，視覚認識行動の異常が観察され，*dve* 遺伝子の転写後調節が視覚認識の神経回

路機能に重要であるという可能性を示唆している.

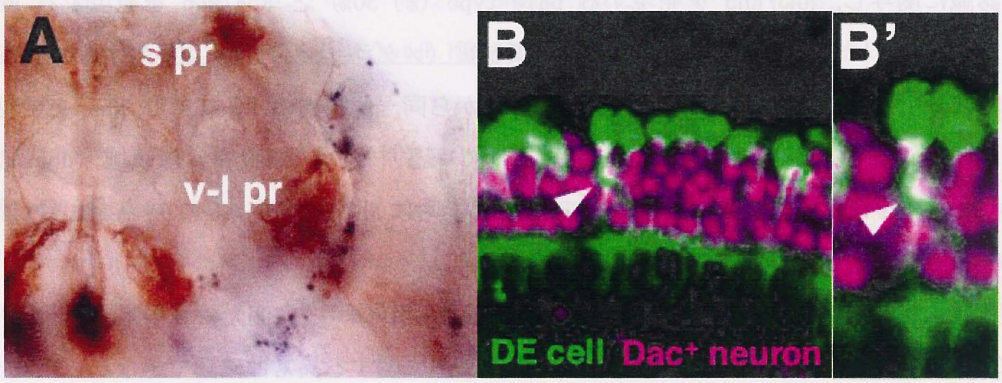


図1. Dve Enhancer 応答細胞（DE 細胞）
(A) 成虫中心脳における DE 細胞の軸索投射パターン（茶色）. 視覚中枢（s-pr, v-l pr）への投射が観察される. (B) 蛹化後 32 時間のラミナ DE 細胞（緑）とニューロンマーカー（Dac; マゼンタ）の比較. DE 細胞の軸索様突起に沿って, Dac+ のニューロンを生み出しているように観察される（矢頭）. (B') 拡大図.

神経幹細胞様の性質を示すラミナ DE 細胞

3齢幼虫期から蛹期初期にかけてラミナに存在する Dve 発現細胞（Dve-positive cells in lamina; **DPL**）は, 光受容ニューロンの軸索末端から分泌される因子に応答して細胞分裂を行うラミナ前駆細胞に由来することが明らかとなった. しかし, 蛹期中期においても, DPL はニューロンマーカー（Elav, Dac), グリアマーカー（Repo, Omb）のいずれも発現していない. DPL は蛹期中期以降は検出されなくなるため, 蛹期中期に DPL と一致した発現を示すラミナ DE 細胞を用いて, 以後の発生段階を解析した. ラミナ DE 細胞は軸索様の長い突起を持ち, その突起に沿うように新しい神経細胞が移動しているかのような画像を得ることができた（図 1B, B'). これらの結果から, ラミナ DE 細胞は脊椎動物のラディアルグリアに相当する神経幹細胞であるという可能性が考えられる. 予備的な結果として, 蛹期中期のラミナ DE 細胞に細胞死を誘導した成虫個体では, ラミナニューロン数の減少が観察された. つまり, ラミナ DE 細胞は神経幹細胞様の性質を保持し, 蛹期にラミナ神経系を再構築する細胞群であるという可能性が示唆された.

色覚認識に関わる内側光受容ニューロンの機能分化

ショウジョウバエの複眼は約800個の個眼から構成され, その中には8種類の光受容ニューロ

ン（R1-R8）が存在する．（1）外側光受容細胞（R1-R6）は Rhodopsin1（Rh1）を発現することで物体認識に関与し，神経軸索をラミナ（lamina)に投射する．(2) 内側光受容細胞（R7/R8）は色覚認識に関与し，Rh3/Rh5 を発現する pale type（約 30%）と Rh4/Rh6 を発現する yellow type（約 70%）によって構成され，軸索を視葉髄質（メダラ；medulla）に投射する．各個眼が機能的に分化するためには，Rh3 を発現する R7 から同一個眼内の R8 に対し Rh5 を発現するように誘導シグナルが発信されることが知られている．また，複眼の背縁領域（dorsal rim area; DRA）に存在する十数個の個眼では R7/R8 がともに Rh3 を発現しており，これらは偏光の認識を司る．

複眼における *dve* 遺伝子発現は，外側光受容細胞（R1-R6）と内側光受容細胞（yellow-type R7）で検出されたが，*dve* 変異複眼では外側光受容細胞に関する異常は確認できなかった．一方，内側光受容細胞（R7/R8）では Rh4 発現が消失し，Rh3/Rh6 という異常なロドプシン発現パターンを示した（図２）．内側光受容細胞において Dve を発現していない pale type のロドプシン発現パターンも異常になっていることから，外側光受容細胞（R1-R6）で発現している Dve が内側光受容細胞に働きかけ，その機能分化を制御していることが明らかとなった．

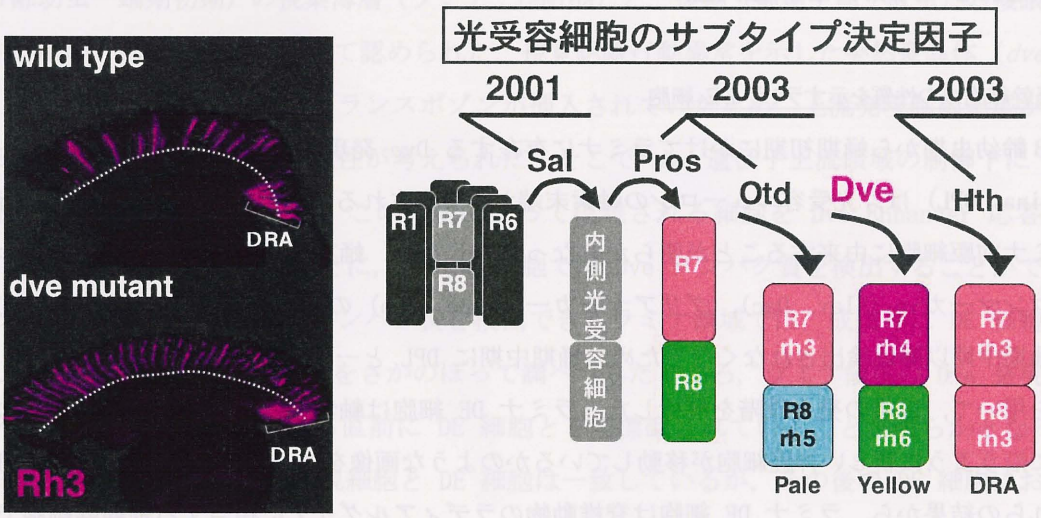


図2 Dve による光受容細胞の機能分化

野生型および *dve* 変異複眼切片（frontal section，右側が背側）における Rh3 発現．*dve* 変異複眼では、Rh3 発現が顕著に増加しているが，DRA（dorsal rim area）での発現は変化せず，R8 でも Rh3 を発現している．内側光受容細胞の初期状態は Rh3/Rh6（in R7/R8）であり，yellow type 個眼への機能分化には Dve の機能が必須である．

共同研究

共同研究の相手：NP コンソーシアム（国内のショウジョウバエ研究者９名）

共同研究内容と成果：「GAL4 エンハンサートラップ系統の作成とデータベース公開」

http://flymap.lab.nig.ac.jp/~dclust/getdb.html において作成した系統のデータを一般公開している.

共同研究の相手：高松芳樹（東京都神経科学総合研究所）

共同研究内容と成果：「ショウジョウバエ CaMKII 遺伝子の発現制御機構解析」

Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II 遺伝子の発現制御領域の解析を行い，嗅覚学習における記憶中枢としての mushroom body での発現細胞等を解析した.

A03-27

研究課題　神経回路形成における mDia を介する低分子量G蛋白質間の協調作用の解明

研究代表者名　富永知子

所属　岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理

特定領域「神経回路」参加年度　平成 13 年度 ~ 平成 16 年度

研究成果の要旨

mDia の結合蛋白質 DIP を介した新たな情報伝達経路 (Rho の不活化、Rac の活性化)を見いだし、これにより mDia による神経の軸索伸展効果が起こる可能性を示した。mDia,DIP ともに Adult の小脳顆粒細胞、Embryo の網膜に発現し、Pax6 との関連も示した。

研究成果

Rho の標的蛋白質である mDia および mDia を介する新たな情報伝達経路の解析によって、細胞運動の時・空間的制御機構を解明することを目指し、神経の成長円錐の形態維持・軸索伸長過程の検討を行った。また、新たに見いだした mDia 関連蛋白質 Pax6, DIP と mDia の中枢神経系での発現パターンを検討した。

1) mDia 結合蛋白質としての Pax6　Yeast two-hybrid 法により 得られた mDia 結合蛋白質の一つは、中枢神経系の発生時に重要な核内転写調節蛋白質 Pax6 であった。非神経細胞においてmDiaが核内へ入りPax6 と結合しその転写活性を抑制すること、小脳顆粒細胞の初代培養系においてmDiaの一過性強制発現によって内因性の Pax6 の発現が変化することを見いだした (JBC, 2002)。

2) 軸索伸長に対するmDia の促進的作用　小脳顆粒細胞の初代培養系においてmDia の一過性強制発現によって軸索伸展が促進されること、branching数が増加することが明らかとなった。これらの効果は、RhoおよびRhoキナーゼによる成長円錐退縮作用とは相反し、その退縮作用は mDiaとの共強制発現により打ち消され、軸索伸展効果が認められることが判明した (JBC, 2002)。

3) mDia 結合蛋白質DIPの発見とDIPを介した低分子量G蛋白質間の協調作用　Yeast two-hybrid 法により新規 mDia 結合蛋白質 DIPを見いだした。この蛋白質はmDiaのみならずN-WASP, Grb2 とも結合し、membrane raffling 部位に多く存在すること、mDiaの下流でストレスファイバー形成に重要な働きをすることを明らかにした (JBC, 2001)。

さらに線維芽細胞、上皮細胞を用いた DIP の情報伝達経路の解析から、DIP が Growth Factor 刺激により Src 依存的にチロシンリン酸化されること、DIP の免疫沈降により p190RhoGAP と rac の GEF である Vav2 が共沈し、さらには DIP のリン酸化にともなって p190RhoGAP、Vav2 もチロシンリン酸化されることを見いだした。すなわち、DIP の Src による活性化に伴い、 Rho の不活化、 Rac の活性化

が起こることを生化学的に確認した。また、このシグナル伝達にともない DIP が p190RhoGAP、Vav2 を細胞膜直下に動員し、細胞形態や細胞運動を調節することを細胞生物学的に確認した。これらのシグナルおよび細胞生物学的な変化は、DIP の dominant negative 体および siRNA によってうち消されることも確認している（EMBO J, 2004）（図 1）。

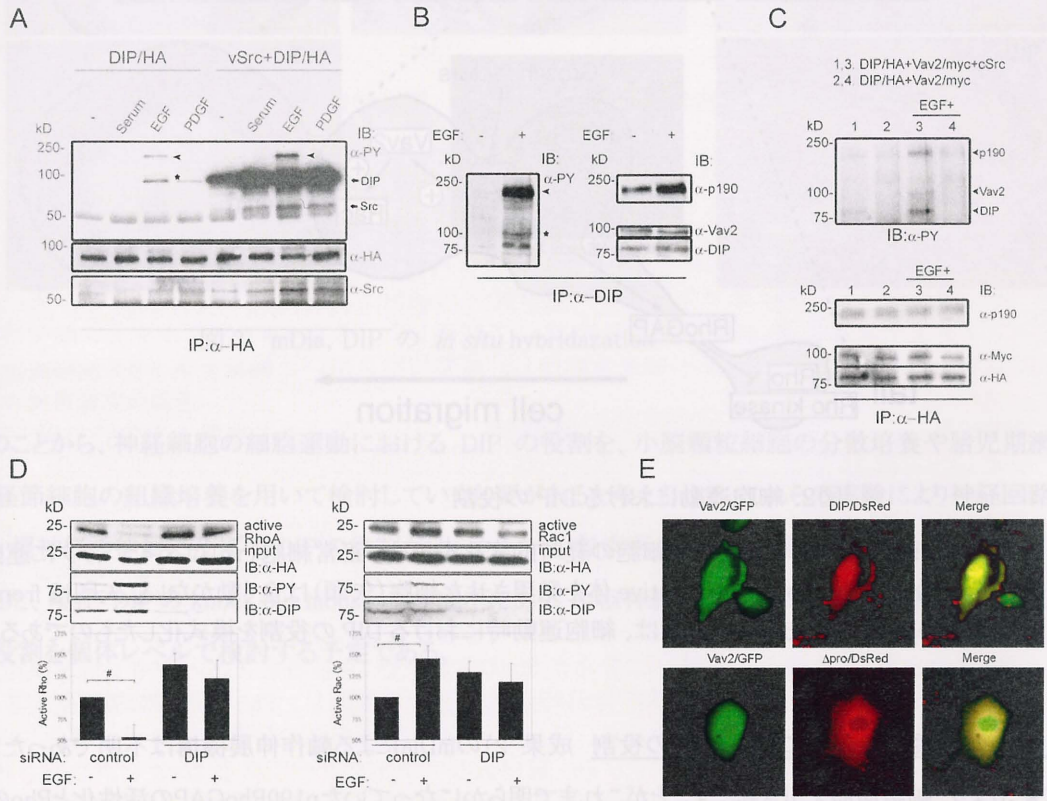


図 1. DIP の新たな情報伝達経路

A. DIP の Growth Factor および vSrc によるチロシンリン酸化と 2 種類（◂★）の共沈するリン酸化蛋白質の存在を示す。**B.** EGF 刺激によりチロシンリン酸化され DIP と共沈する蛋白質は p190RhoGAP（◂）と Vav2（★）であった。**C.** DIP, p190RhoGAP, Vav2 のリン酸化は Src-/- 細胞では認められず、Src 依存的であることを示す。**D.** Rho（左）、Rac（右）の activation assay。DIP のリン酸化により、Rho が不活化し Rac が活性化されるが、DIPsiRNA によりそれらの効果が打ち消される。**E.** HeLa 細胞における EGF 刺激時の DIP および Vav2 の raffling 膜での共局在。Dominant negative 型 DIP(ΔPro)共発現により Vav2 の局在も影響される。

以前報告している Rho-mDia-Src 系（Mol. Cell, 2000)と併せ、Rho-mDia-Src-DIP を介した Rho への negative feedback と Rac の活性化という、低分子量 G 蛋白質間の協調作用の存在を示唆し、この機構が細胞運動のダイナミクスに関与していると考えている（図 2）。

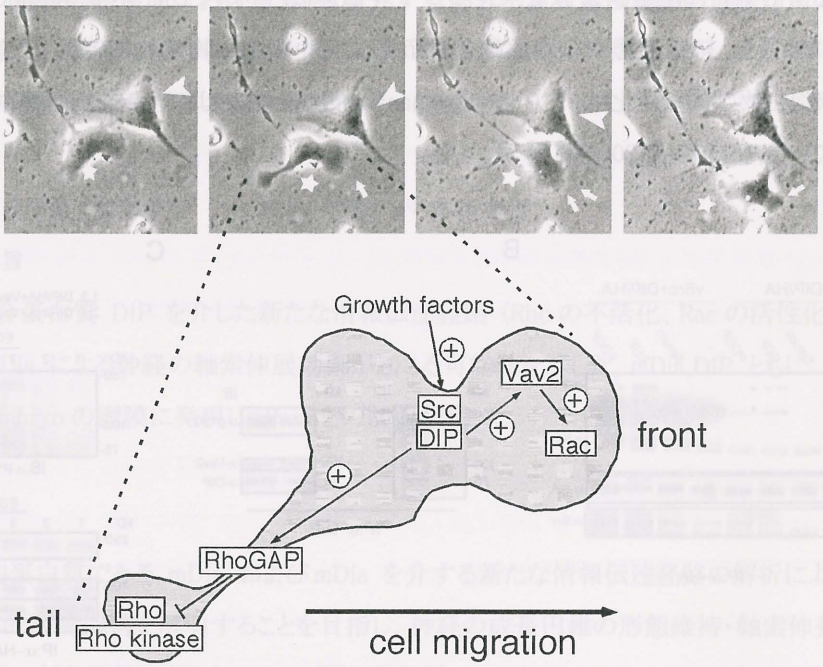


図2. 細胞運動における DIP の役割

上段は、EGF 刺激による線維芽細胞の経時的変化を示す。正常細胞(☆)はダイナミックに運動しているが、DIP の dominant negative 体を発現させた細胞(矢頭)は全く動かない。矢印は front の membrane raffling を示す。下段は、細胞運動時における DIP の役割を模式化したものである。

4) mDiaの軸索伸展作用におけるDIPの役割　成果 2) のmDiaによる軸作伸展機構は不明であったが、成果 3) より、軸索伸展を引き起こすことがこれまで明らかになっていたp190RhoGAPの活性化とRhoの不活化、Racの活性化がDIPを介して起こっていることが想定された。そこで、PC12 細胞の NGF刺激に伴い DIP がチロシンリン酸化されると共に、p190RhoGAP、Vav2 も膜分画でチロシンリン酸化されることを確認した。同時に、PC12 細胞、NIE-115 細胞においてRas 依存的あるいはSrc依存的な軸索伸展効果がDIPの一過性強制発現によって促進されることが判った。

5) mDia, DIP の中枢神経系における発現　mDia, DIP は脳を含め組織普遍的に発現することが Northan Blottingで示されている。そこで中枢神経系における両者の部位特異的な発現を、RT-PCR, Immunoblotting, *in situ* hybridazation を用いて検討した。Adultにおいては、mDia, DIP 共に大脳、小脳、脳幹、網膜において発現することが RT-PCR, IB で確認された。また、*in situ* hybridazation によって Adult の小脳顆粒細胞、大脳皮質、視床下部等、E14 の網膜の神経節細胞で両者の共局在が確認された。成果 1) で報告したmDiaの結合によって転写活性が変化する Pax6 が、E14 網膜においては未分化細胞層に発現していることがmDia, DIPとは対照的である。(図 3)。

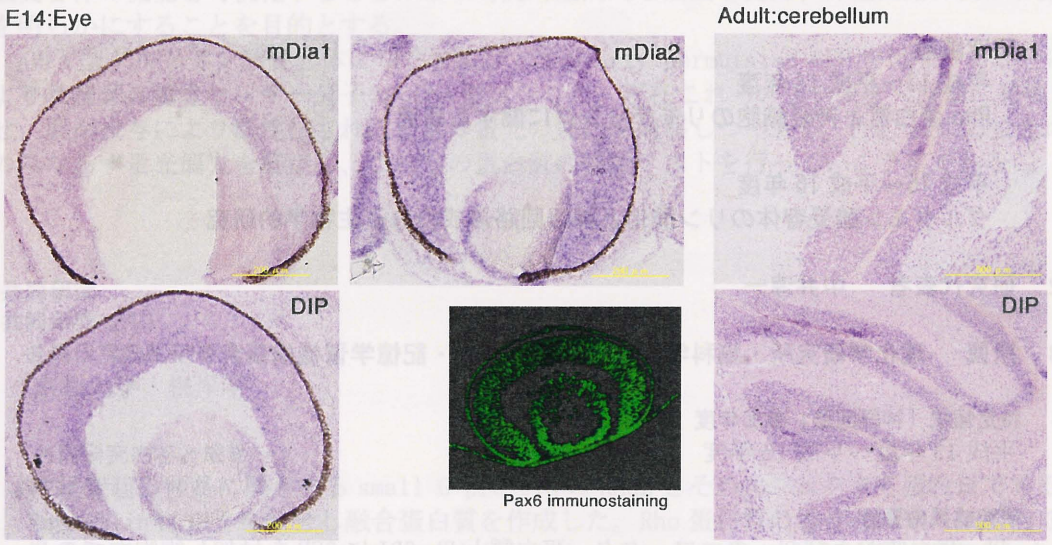


図 3. mDia, DIP の *in situ* hybridazation

このことから、神経細胞の細胞運動における DIP の役割を、小脳顆粒細胞の分散培養や胎児期網膜神経節細胞の組織培養を用いて検討していく必要があると考えられる。これらの実験により神経回路形成、視神経の伸展に及ぼす DIP の役割が明らかとなり、軸索再生研究にも道を開くと考えられる。

また、現在 DIP の knock out mouse を作成中であり、中枢神経系を中心に組織形成等における DIP の役割を個体レベルで検討する予定である。

１．研究課題

平成 13～平成 14 年度
Rho 蛋白質と神経細胞のリモデリングに関する研究

平成 15～平成 16 年度
グルタミン酸受容体のリン酸化と神経回路形成の分子生物学的研究

２．研究代表者　中井淳一

３．所属　理化学研究所・脳科学総合研究センター・記憶学習機構研究チーム

４．特定領域「神経回路」参加年度
平成 13 年度～平成 16 年度

５．研究成果の要旨

Rho 蛋白質および Rho のエフェクター蛋白質と RhoGDI に GFP を付加し細胞内での Rho とエフェクターまたは RhoGDI の結合を FRET にて観察した。また AMPA 型グルタミン酸受容体に GFP を付加した蛍光センサー分子を試作し、培養細胞を用いた機能テストを行った。

６．研究成果

平成 13～平成 14 年度
Rho 蛋白質と神経細胞のリモデリングに関する研究

Small G protein に属する Rho 蛋白質は神経突起の伸長に関与することが知られており神経細胞のリモデリングに関与すると考えられる。この研究では Rho 蛋白質が神経細胞内で時間的、空間的にどのように活性化され、また不活性化され機能しているかを検討し、Rho と神経細胞のリモデリングとの関係を明らかにすることを試みた。

RhoA 蛋白質の 14 番目をバリンに変えた Rho14V および 19 番目をアスパラギンに変えた Rho19N の cDNA を作成した。Rho14V は常時活性型として機能し、Rho19N は常時不活性型として機能する。次に正常 Rho, Rho14V, Rho19N それぞれに GFP の誘導体である YFP を付加し融合蛋白質の cDNA を作成した。一方 Rho 蛋白質のエフェクターである Rock をクローン化し、Rock の Rho 結合部位にも GFP の誘導体である CFP を付加した融合蛋白質の cDNA を作成した。これらの cDNA を培養細胞に導入し、Rho14V, Rho19N において FRET の蛍光比に違いが見られるか観察したが、有意な差は認められなかった。そこで YFP-RhoA14V, YFP-RhoA19N と Rock－CFP をさらに融合した cDNA(YRho14VRKC および YRho19NRKC)を作成し、Rho14V と RhoN19 で FRET に差が出るかを検討した。その結果、Rho14VRKC と Rho19NRKC の間で FRET の蛍光比にわずかな差が見られたものの有意な差は見られなかった。さらに Rho の活性を抑える RhoGDI-1 に GFP を結合した融合蛋白質をコードする cDNA を作成し、同様な実験を行ったがやはり有意さは見られなかった。

これらの結果から今回の実験では RhoA とエフェクター蛋白質の一つである Rock との結合を細胞内で明確に捕らえることはできなかった。しかし、この結果は RhoA とこれまで報告のあった Rock の RhoA 結合部位の細胞内での結合を否定するものではない。Rho や Rock に GFP を結合したことによる影響も考えられ、今後 GFP を結合する部位を検討することにより RhoA とエフェクター分子の結合を細胞内で観察できる可能性がある。

平成 15～平成 16 年度
グルタミン酸受容体のリン酸化と神経回路形成の分子生物学的研究

グルタミン酸受容体は興奮性神経伝達に関与し、グルタミン酸受容体の活性化は神経活動依存的な神経回路のリモデリングをきたすと予想される。この研究では AMPA 型グルタミン

酸受容体の機能を可視化することにより時間的空間的な活動を捉え、神経回路に及ぼす作用を明らかにすることを目的とする。

AMPA 型グルタミン酸受容体に GFP および circularly permutated GFP を付加することにより数種類の蛍光センサー分子の cDNA を試作した。現在これらの蛋白質を大腸菌に発現させ、薬剤投与により活性化されたときの蛍光の変化を観察しつつある。FRET による蛍光比のみならず蛍光偏光を測定し、これらの蛋白質の機能テストを行っていく予定である。

8. 共同研究

共同研究（1）

共同研究の相手

京都大学・根岸学

共同研究内容と成果

神経突起の伸長に関与する small G protein の Rnd2 とそのエフェクター蛋白質である Rapostlin に GFP を結合し融合蛋白質を作成した。Rho 蛋白質の場合と同様に細胞内での結合を観察した。Rapostlin に GFP を付加したことにより Rnd2 との結合が阻害された。

共同研究（2）

共同研究の相手

独立行政法人農業生物資源研究所・田村俊樹

共同研究内容と成果

Genetically-encoded probe を用いて昆虫における神経系の情報処理機構を明らかにするため、カイコにおいて GAL4－GAL4UAS の発現システムを用いた遺伝子の発現系を構築した。この成果により各種の外来性遺伝子を効率的に発現させることが可能になった。

共同研究（3）

共同研究の相手

メリーランド大学・ Mordecai Blaustein

共同研究内容と成果

GFP を用いたカルシウムセンサーである G-CaMP を、細胞膜が小胞体と近接するマイクロドメインに部位選択的に発現させた。その結果マイクロドメインにおけるカルシウム濃度が他の細胞質のそれと異なることを示した。

A03-29

表題（研究課題）：　大脳皮質特異的遺伝子欠損システムを用いたバレル形成分子機構の研究

研究代表者：　岩里　琢治

所属：　独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター 行動遺伝学技術開発チーム

特定領域「神経回路」：　参加年度　平成１３年度-平成１６年度

研究成果の要旨：

神経活動依存的回路発達のモデルとして、マウス体性感覚野バレル形成に注目し、研究を進めてきた。私達が開発した大脳皮質興奮性神経細胞特異的に標的遺伝子をノックアウトする手法を用い、NMDA受容体 とアデニル酸シクラーゼ１の、バレル形成における役割の一端を明らかにした。

研究成果

１．研究の背景

発達期の高等動物において脳は、まず、内的要因、すなわち遺伝子にコードされたプログラムにしたがって、そのおおまかな回路を形作る。そして、その回路は、生後のある一定期間（臨界期）に、外界や体の各部からの刺激という外的要因によって微調整され完成される、と考えられている。この後者の過程を「神経活動依存的回路発達」とよぶが、その分子レベルの機構はよくわかっていない。

夜行性動物であるマウスやラットでは、ヒゲからの体性感覚はもっとも重要な感覚の一つである。マウスやラットの大脳皮質体性感覚野の第４層には、「バレル」とよばれる特殊な組織学的構造が存在する。ヒゲからの入力を伝える視床-皮質軸索は、第４層で枝分かれし、同じヒゲからの入力を伝える一群の軸索終末が集まって、ひとつのクラスターをつくる。一方、その入力をうける第４層神経細胞の細胞体が、その周りを取り囲み樽のような形を構成することから、この構造は「バレル」とよばれる。バレルの数と配置は、顔におけるヒゲの数と配置を反映する。バレルとバレルの間は細胞体のほとんど無い「中隔」とよばれる構造によって組織学的に分離している。ヒゲからの入力は、大脳皮質に伝わるまでに、脳幹の三叉神経(PrV)核と視床 VPM 核のシナプスを介するが、生後１週間に、ヒゲからの入力に依存して、脳幹、視床、皮質第４層に順次、顔におけるヒゲの配置と同様のパターンが形成される。脳幹、視床におけるバレル様の構造をそれぞれ「バレレット」「バレロイド」とよぶ。生後すぐにヒゲの毛根を焼き切るなどの処置をして、ヒゲからの入力を遮断すると、対応するバレルが縮小し、隣接するバレルが拡大する。これらの特徴から、バレル形成は神経活動依存的回路発達のモデルとして注目されてきた。しかし、方法論の不備のため、その分子レベルの機構の理解は顕著に遅れていた。

２．バレル形成における大脳皮質 NMDA 受容体の役割

発達期にみられる可塑性と、成体でのシナプス可塑性や学習記憶とは、多くの共通の機構を持つことが示唆されている。成体海馬でのシナプス可塑性で中心的な役割を果たす分子の一つに、シナプス後膜に分布する NMDA 型グルタミン酸受容体(NMDAR)がある。私達は、大脳皮質の興奮性神経細胞でのみ標的遺伝子を欠失することを可能にする Emx1-Cre マウスを開発した（図１）。そして、それを利用し、大脳皮質興奮性神経細胞特異的に NMDAR の必須サブユニット NR1 を欠失した CxNR1KO マウスを作製した。その解析から大脳皮質の NMDAR が、バレル形成に重要な役割を果たすことを明らかにした（Iwasato et al., 2000）。本特定研究では、大脳皮質 NMDAR の役割の詳細を知る目的で、CxNR1KO マウスの視床-皮質シナプスのポスト側（すなわち第４層神経細胞の樹状突起とスパイン）とプレ側（すなわち視床-皮質軸索終末）で、どのような異常が起きているかを、組織学的に詳細に解析した。

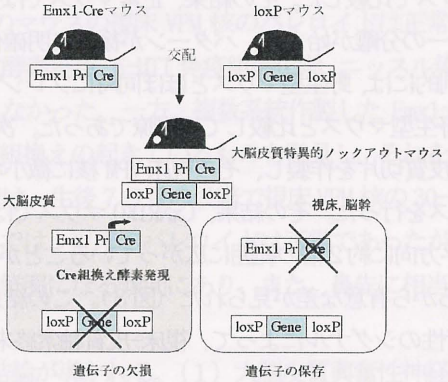


図１　Emx1-Cre マウスを用いた大脳皮質興奮性神経細胞特異的ノックアウトの仕組み

野生型マウス体性感覚野では、第４層神経細胞の細胞体は、樽様に集合することによりバレルを形成する。そして、その樹状突起はバレル中心に向かって非対称的な伸展をし、ひとつのバレルにのみ限局する傾向にある。一方、CxNR1KO マウスでは、体性感覚野の細胞体はバレルを形成せず、均一に分布する。その樹状突起の形態を解析するために、生後１６日目のマウスの脳切片を用いて、ゴルジ-ニッスル染色をおこなった。その結果、第４層興奮性神経細胞（正確には、spiny stellate cells）の樹状突起は、野生型マウスのように非対称的な伸展ではなく、放射状にすべての方向に伸びる傾向があること、また、より広い領域にまたがることが明らかとなった（図２）。このことは、NMDAR が、樹状突起の方向性の選択に関わっていることを示す。また、樹状突起上のスパインの密度も高かった。NMDAR によって余分な樹状突起やスパインの伸長抑制あるいは刈り取りが行われることが、バレル形成には必要なのだと考えられる。

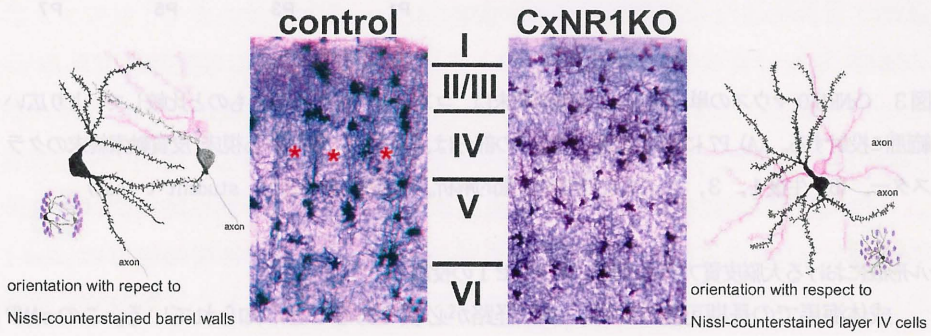


図２　コントロールマウスでは、体性感覚野第４層興奮性神経細胞の樹状突起は、バレル中心に向かって非対称的な伸展をする。一方、CxNR1KO マウスでは、全方向に放射状に伸展する傾向がある。ゴルジ-ニッスル染色と樹状突起の例。

野生型マウスでは、１本のヒゲからの入力を伝える一群の視床-皮質軸索終末は、隣接するものから明確に分離したクラスターを形成する。発達期視床-皮質軸索終末に発現するセロトニントランスポーター（5-HTT）に対する抗体を用いて、このクラスターを組織化学染色したところ、CxNR1KO マウスでも、クラスターが形成されることが示されている。ただし、そのクラスターは正常ではなく、野生型のものと比較して、小さく、境界も不鮮明であった（Iwasato et al., 2000）。本特定研究では、生後１週間の発達段階でプレシナプスのクラスターのパターンがどのように発達するかを、5-HTT に対する免疫組織化学によって、

野生型マウスとCxNR1KOマウスで比較した。その結果、正常マウスでは生後３日目ぐらいでプレシナプスの視床-皮質軸索終末クラスターの分離が始まり、パターンが徐々に明確化してくることが観察された。一方のCxNR1KOマウスでも時系列的には、野生型マウスとほぼ同時にプレシナプスのパターンが形成されるものの、出現の最初の段階から野生型マウスと比較して不明瞭であった。次に、個々の視床-皮質軸索の形態を明らかにするために、視床-皮質切片を作製し、その視床VPM核に微小なDiI結晶を挿入することにより、単一視床-皮質軸索のトレースを行った。その結果、CxNR1KOマウスでは、単一視床-皮質軸索は、野生型マウスのものと比較して、水平方向に約２倍の範囲に広がっていることがわかった。また、生後発達をおって解析すると、生後３日目ごろから有意な差が見られた（図３）。この結果は、発達期に大脳皮質細胞からのNMDARを介した何らかの逆行性のシグナルによって、視床-皮質軸索終末の微調整が起きていることを示す。

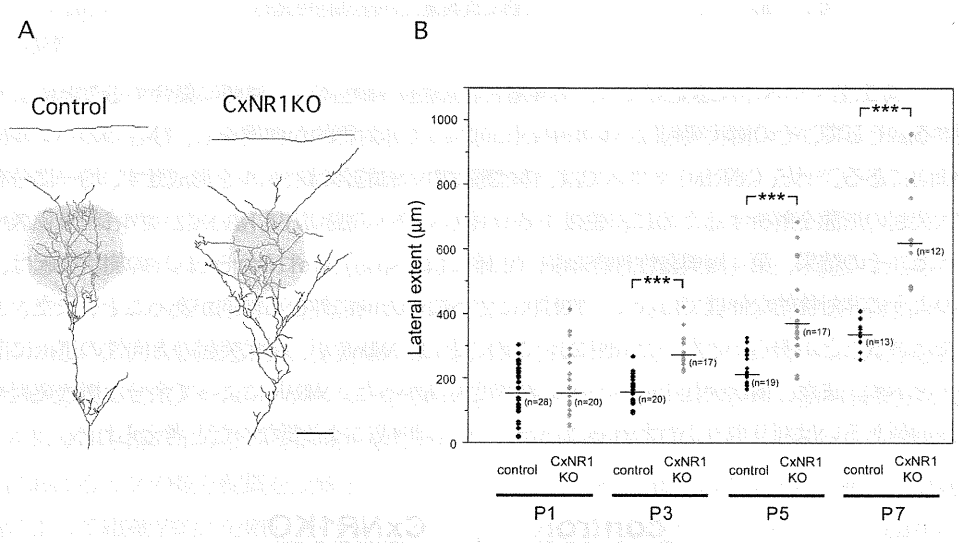


図３　CxNR1KOマウスの単一視床-皮質軸索終末は、コントロールマウスのものと比較して、より広い範囲に投射する。(A) P7における例。グレーの部分は、CO染色でみられる視床-皮質軸索終末のクラスター。(B) 生後１，３，５，７日目での定量的解析。有意差（$p<0.001$　student t test）

３．バレル形成における大脳皮質アデニル酸シクラーゼ１の役割

成体海馬での長期可塑性には、cAMP経路が必須であることが知られている。このcAMP経路のバレル形成への関与を解析する目的で、発達期脳で広範囲かつ高レベルに発現するカルシウム誘導性アデニル酸シクラーゼであるAC1の、大脳皮質興奮性神経細胞特異的ノックアウトマウスを作製した。常法により、胚性幹（ES）細胞での相同組換えを利用して、AC1エクソン１を２個のloxP配列で挟み、floxed AC1マウスを作製した。薬剤耐性マーカーであるpgk-neoは、２個のFRT配列で挟んでおき、マウス作製後、受精卵でのflp組換え酵素発現により除去した。まず、体の全細胞でloxP間の配列を欠失したAC1 nullのホモ接合体マウスを作製した。このマウスでは、AC1の転写産物が完全になくなっていることをRT-PCRにより確認した。AC1 nullマウスには、一般的な発達、行動に顕著な異常はみられなかった。しかし、バレル形成は完全に障害されていることが観察された。また、視床VPM核にあるバレロイドに関しても、不明瞭になるなどの軽度の異常がみられた。このことは、報告されているAC1ノックアウトマウスにみられる表現型と同様であり、バレル形成におけるAC1の重要性を示す。

AC1が体性感覚経路のどこでどのような役割を果たしているのかを明らかにする目的で、floxed

AC1 マウスと Emx1-Cre マウスを交配することにより、大脳皮質興奮性神経細胞特異的 AC1 ノックアウト（CxAC1KO）マウスを作製した。このマウスの視床 VPM 核のバレロイドは正常であった。また、大脳皮質第４層でのバレルもチトクローム酸化酵素染色、5-HTT 免疫組織化学、ニッスル染色で調べたところ、プレ側、ポスト側どちらにも異常は検出されなかった。一方、複数系統作製した Emx1-Cre マウスの中に、大脳皮質だけでなく、視床の一部の細胞でも組換えの起きているものを発見し、それを用いて CxAC1KO(KI 系統) マウスを作製した。この系統のマウスでは、生後７日目の段階で視床 VPM 核の 30-50%の細胞で AC1 欠失が起きていることを確認した。このマウスでは、視床のバレロイドは正常であったが、大脳皮質のバレルには部分的な異常がみられた。境界がやや不鮮明になる傾向にあり、また、鼻先に相当するバレルが完全になくなっているマウスも多く見られた。

以上の結果から以下の結論が導かれる。（1）大脳皮質興奮性神経細胞の AC1 はバレル形成に必須ではない。（2）視床-皮質軸索終末に存在する AC1 は、バレル形成にともなう視床-皮質軸索終末の微調整に重要な働きをすると考えられる。（3）大脳皮質興奮性神経細胞において、NMDAR の下流の分子として AC1 は必須ではない。

今後、視床細胞 AC1 のバレル形成における役割の解明、大脳皮質細胞 AC1 の体性感覚野発達にともなう第４層および第２／３層の可塑性における役割を、現有マウスの解析、および新規遺伝子改変マウスの開発と解析を並行されるすることによって明らかにしていきたい。

謝辞：CxNR1KO マウスの組織学的解析は、米国ルイジアナ州立大学の Reha S. Erzulumlu 教授の協力のもとに行った。

表題　　線虫 *C. elegans* プレキシン下流因子の検索

研究代表者名　　高木　新

所属　　名古屋大学大学院理学研究科　生命理学

特定領域「神経回路」参加年度　平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨

脊椎動物神経軸索伸長反撥因子であるセマフォリンとその受容体であるプレキシンが、線虫 *C. elegans* において表皮形態形成および神経機能に関わることを明らかにした。プレキシンの下流因子の遺伝学的検索を行い、セマフォリンシグナルが蛋白質翻訳を活性化する可能性を示した。

研究成果

プレキシンは脊椎動物神経系形成に重要な役割を果たす軸索伸長の反撥因子であるセマフォリンの受容体である。　線虫 *C. elegans* には、３種のセマフォリン遺伝子（*smp-1, smp-2, mab-20*）と２種のプレキシン遺伝子（*plx-1*、 *plx-2*）しか存在せず、セマフォリン・プレキシン系の生体内機能を解明するよい材料となると考えられる。　本研究前半では、遺伝学的に *C. elegans* セマフォリン分子とプレキシン分子の機能を探るとともに、これらの分子間の対応関係を解明した。

・プレキシン変異の単離：線虫 *C. elegans* プレキシンの生体内での機能を解析するため、トランスポゾンによる変異作成系を用いて、翻訳開始点および上流領域を欠失した２つの *plx-1* 変異（*nc36, nc37*）、１つの *plx-2* 変異（*nc7*）を単離した。

・*plx-1* の解析：*plx-1* 変異体 *nc36, nc37* はともに、雄成虫尾部の感覚神経である ray1 の位置が野生型に比べて前方にずれるという異常を示した。　また、体側のクチクラ中の構造である alae にも異常が見られた。　実体顕微鏡レベルでは、産卵数の減少、陰門の形態異常の表現型を示した。 GFP を用いた発現解析から、幼虫雄の尾部表皮組織、幼虫雌雄同体の陰門原基の表皮細胞、ならびに alae 直下の表皮細胞である seam cell。および神経細胞での *plx-1* の発現が示唆された。　ray1 は第３齢幼虫期に尾部の表皮組織から産生され、この時期、尾部の表皮細胞は分裂・融合を行いながら再配置される事が知られている。　第３齢幼虫の *plx-1* 変異体では多くの個体で表皮中の ray1 の前駆細胞が野性型に比べ前背側方向に位置していた。　また、*plx-1* 変異体幼虫では seam cell、陰門原基の表皮細胞の形態・配置にも異常が認められた。　以上の結果から、*plx-1* は表皮組織の形態形成に関わることが明らかになった。　一方、神経系では、陰門付近の ventral cord 運動神経細胞体に位置異常が認められ、また、行動レベルでは運動パターンの軽微な異常が観察された。　さらに、*plx-1* 変異と *C. elegans* Rac の変異体である *ced-10(n1993 lf)* と *nc37* との２重変異体では、ほとんど動かないという強い Unc 表現型を示すことを見いだした。　これら結果は *C. elegans* においてもプレキシンが神経機能に関与することを示唆する。

・*C. elegans* 膜貫通型セマフォリン遺伝子の解析：　*smp-1*cDNA 全長クローンを合成した。　ま

た、*smp-2* 全長 cDNA を RT-PCR によって単離した。 次に、これらを鋳型として dsRNA を合成し、injection 法、あるいは soaking 法による RNA interference を用いてその機能を妨げると、*plx-1* 変異体と同様 ray1 前方化の表現型を示した。 また、同じころ、我々とは独立に、カナダ トロント大学の Joe Culotti 博士らは *smp-1*, *smp-2* 変異体を単離して、これらの変異体の ray1 が前方化とすることを報告した。 彼らと共同研究を行い、*smp-1* 変異体が陰門形成において *plx-1* 変異体と同様の異常を示すことを明らかにした。

・膜貫通型セマフォリンの発現解析： *smp-1*, *smp-2* の発現パタンをプロモーター部位にレポーター遺伝子を結合したコンストラクトを作製して発現を調べたが、表皮で発現がみられなかった。 表皮での表現型から、この発現は本来の発現を反映していないと予想された。 そこで *smp-1* 遺伝子のプロモーターおよびコーディング領域約半分にレポーター遺伝子を結合したコンストラクトを作製して発現を調べ、神経細胞および陰門原基を含む表皮細胞での GFP 発現を検出した。また、*smp-2* 遺伝子について同様のコンストラクトを作成して発現を調べたところ、神経細胞および表皮細胞での GFP 発現を検出したが、陰門原基では一部の細胞でしか発現がみられなかった。

・*plx-2* の解析： *plx-2* 変異（*nc7*）は遺伝子内に約２ｋｂの欠失をふくみ、その結果、セマドメイン以降の細胞外領域を膜貫通領域まで欠く蛋白質を発現すると予想される。 *nc7* は単独では表現型を示さなかった。 また、東京女子医科大学の三谷 昌平博士のグループによって単離された欠失変異 *plx-2*(*tm729*) はセマドメイン中に終止コドンが生じる null allele と予想されるが、これもまったく表現型を示さなかった。

分泌型セマフォリンをコードする *mab-20* の変異体でも雄尾部の形態が異常であることが知られているが、その表現型は *plx-1* 変異体と異なっている。 すなわち、*plx-1* 変異体では *mab-20* 変異体に見られる ray の融合が全く見られず、*mab-20* 変異体では ray1 の前方方向への位置異常が見られないというように、両者の表現型はオーバーラップしない。 さらに、*plx-1* と *mab-20* の二重変異体は両者の異常を併せ持つことから、*plx-1* と *mab-20* は独立に機能することが示唆された。 *mab-20* が *plx-1* 以外のプレキシンに関連することが予想されたので、*mab-20* と *plx-2* の関係を遺伝学的に調べた。 ２重変異体では、*plx-2*（*nc7*）は *mab-20* の弱い allele である *bx24*, *bx61* の ray 融合表現型を強めるが、*mab-20*(null) の表現型は強めない。 この結果から、*plx-2* が *mab-20* と同じ遺伝学的経路で機能することが示唆された。

・各種セマフォリンとプレキシン間の結合解析：培養細胞に *C. elegans* セマフォリンとプレキシンを発現させるために pCAGGS あるいは pCEP4 ベクターをベースとして myc あるいは AP タグをつけたコンストラクトを作成した。 SMP-2 以外は HEK293 細胞を用いて発現させることができた。 この系を用いて SMP-1 と PLX-1, MAB-20 と PLX-2 が結合することを明らかにした。 SMP-1 と PLX-1 間の解離定数は約 5 nM であった。

プレキシンから成長円錐の崩壊に至る分子機構の解明がプレキシンセマフォリン研究における焦点のひとつとなっている。 プレキシンは A-D サブファミリーに分類されるが、プレキシンB

のシグナル伝達には、細胞骨格の調節作用がよく知られる低分子量Gタンパク質 Rac, Rho および PDG-RhoGEF などが必要であることが示されている。 一方、セマフォリン３ファミリーによる成長円錐崩壊に関与すると考えられているプレキシン A では、ハエと脊椎動物での研究から膜タンパク質 offtrack、MICAL oxydoreductase がシグナルの伝達に必要といわれている。 しかし、Offtrack や MICAL が成長円錐崩壊にどのように関係しているのかは全く不明である。 また、最近、アフリカツメガエルの神経性網膜培養細胞を用いて、Sema3A による成長円錐崩壊には蛋白質翻訳が必要であること、さらに Sema3A が蛋白質翻訳を活性化させるという報告があったが、この現象の重要性は確定していない。本研究の後半ではプレキシン A をコードする *plx-1* 変異体に見られた表現型を手がかりとして *plx-1* のシグナル伝達に関係する遺伝子の同定を試みた。

・*plx-1* サプレッサーの単離： *plx-1* 変異体の雄尾部感覚器 ray1 の位置が９割以上の個体で前方へ移動するという高い浸透度を示すことを利用して、この表現型を抑圧する変異体の検索を行い、これまでに複数個のサプレッサーを単離した。 このうち *nc40, nc41*、２種のサプレッサーは７割から８割の個体で ray1 表現型を抑圧するとともに、*ced-10 plx-1* に見られる synthetic Unc の表現型もほぼ完全に抑圧した。 Ray1 の位置と運動性という異なる２つの表現型を抑圧することから nc41 は *plx-1* のシグナル伝達に密接に関係した因子に生じた変異である可能性が高い。 古典的なマッピング及び SNP(single nucleotide polymorphism)を利用したマッピングによって *nc41* は LGII [+11.99 +15.89]に位置することが明らかになった。

・*nc40* 原因遺伝子の同定： *nc40* の SNP mapping を行い、これが遺伝子内 *Y48G9A.1* にあることをつきとめ、変異体遺伝子の配列決定により *nc40* が exon1 を含む約７ｋｂの欠失であることを明らかにした。 *Y48G9A.1* は出芽酵母の *GCN1* と相同であり、eIF2α kinase である GCN2 の活性化因子をコードすると予想される。 酵母では飢餓状態などのストレス存在下で GCN2 が翻訳開始因子 eIF2α をリン酸化して翻訳を抑制することが知られている。リン酸化型 eIF2α 特異抗体を用いて *nc40* では eIF2α のリン酸化レベルが低下していることを明らかにした。 さらに、GCN2 とは異なる eIF2α kinase をコードする *pek-1* 遺伝子の変異もプレキシン変異体の ray1 表現型を抑圧した。 逆に、表皮形態形成時特異的な eIF2α の機能阻害、あるいは GCN-2 の過剰発現によって蛋白質翻訳を抑制すると、プレキシン変異体と同様に ray1 の前方化が認められた。このように、ray1 の位置が蛋白質翻訳活性の指標になることが明らかとなった。 また、以上の結果はプレキシンの下流で翻訳が活性化されるという仮説を支持している。

A03-31

神経回路形成における GTP 結合蛋白質 Rac1 の in vivo での機能解析

饗場　篤
神戸大学大学院医学系研究科

特定領域「神経回路」参加年度
平成12年度ー平成16年度

研究成果の要旨

低分子量 G タンパク質 rac 遺伝子の内、幼弱期から成熟脳まで脳の全領域で発現する rac1 および幼弱期・発達期の脳の特定領域で発現が強い rac3 遺伝子座に loxP を導入したマウスを作製した。プルキンエ細胞特異的に Rac1 を欠損したマウスを作製した。神経軸索ガイダンス因子セマフォリン 3F を欠損したマウスの作製と解析を行なった。

研究成果

(1)　Rac1 および Rac3 コンディョナルノックアウトマウスの作製と解析

低分子量 G タンパク質 Rac は神経細胞の神経突起伸長や樹上突起の制御を介してシナプスや神経回路の形成に関与していることが示唆されてきた。特に Rac の標的分子である Pak3、負の制御因子である oligophrenin、正の制御因子である ARHGEF6 がいずれもヒトの家族性の精神遅滞の原因遺伝子であることが近年明らかになり、ヒトを含めた神経回路の形成に Rac 分子が深く関与することが示された。我々はこれまでに、Rac1 ノックアウトマウスを作製解析し、ノックアウト胚が三胚葉形成時に、致死にいたること、ノックアウト胚から単離した初代培養細胞では接着能や運動能が低下することを明らかにしてきた。本研究では、Rac の神経回路形成およびシナプス可塑性おける機能を in vivo で明らかにするため、脳を含めた全身で発現している Rac1 および脳で発現が多い Rac3 を神経細胞特異的にノックアウトするマウスの作成、解析を開始した。まず、rac1, rac3 mRNA の中枢神経系での発現を in situ ハイブリダイゼーション法により検討し、rac1 mRNA は幼弱期から成熟脳にいたるまで、神経系のほとんどの細胞（ニューロンおよびグリア）で強い発現が見られるのに対し、rac3 mRNA は幼弱期から神経系での発現が強く、特に発達期に強いシグナルが脳全体で見られるが、成熟脳での発現は相対的に低いことが明らかとなった（図1A）。Cre-loxP 系を用いた Rac1 および Rac3 コンディョナルノックアウトマウスを作製するため、1）rac1 遺伝子の開始コドンを含むエキソンを組換え酵素 Cre の認識配列 loxP で挟んだアリルを導入したホモ型 rac1(flox /flox)マウス（図1B）、2）rac3 遺伝子の開始コドンを含むエキソンの 5'非翻訳領域に loxP を導入し、rac3 遺伝子の最終エキソンの polyA 付加シグナルの 3'領域に loxP-HcRed を導入したヘテロ型 rac3(+/flox-HcRed)マウス（図1C）を、ES 細胞を用いたジーンターゲッティング法により作製した。

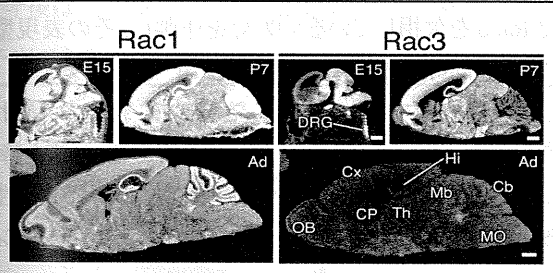


図 1A rac1, rac3 mRNA のマウス脳での発現

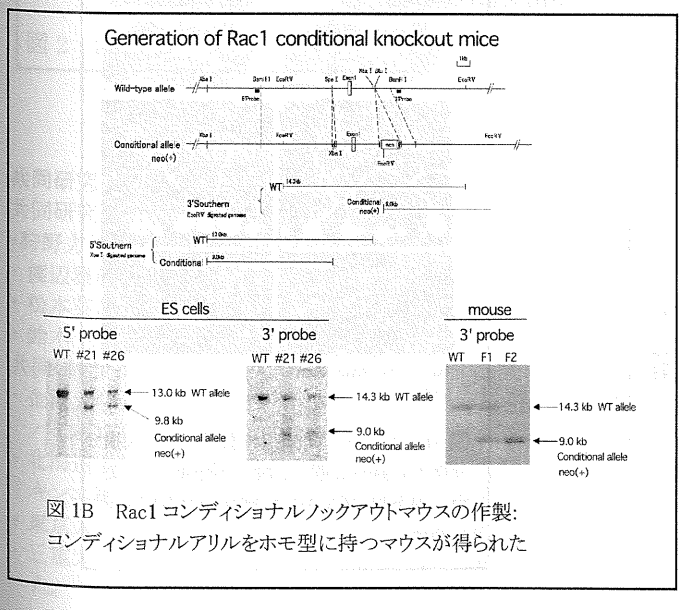


図 1B　Rac1 コンディショナルノックアウトマウスの作製:
コンディショナルアリルをホモ型に持つマウスが得られた

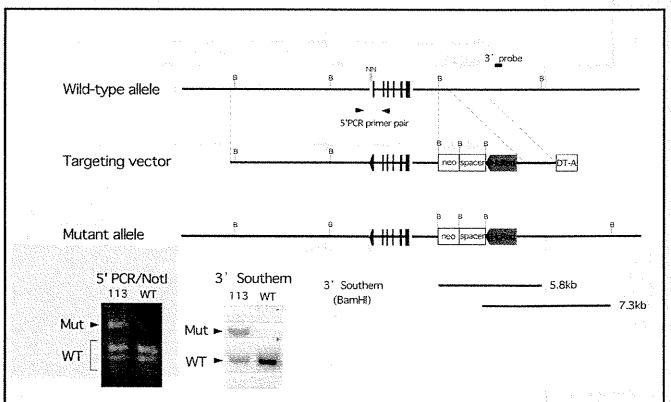


図 1C　Rac3 コンディショナルノックアウトマウスの作製:
コンディショナルアリルをヘテロ型に持つマウスが得られた

rac3(flox-HcRed /flox-HcRed)マウスではCreの発現しない細胞ではRac3蛋白質が発現し、蛍光蛋白質HcRedは発現しない。一方、Creが発現した細胞では、rac3のコーディングエキソンが全て欠失すると同時に、rac3遺伝子プロモーター下でHcRed蛋白質が発現する。その結果、rac3遺伝子欠損細胞が蛍光蛋白質でラベルできる。

rac1(+/flox)キメラマウスは、L7遺伝子座にcre遺伝子をノックインし小脳プルキンエ細胞でCre蛋白質を発現することが確認されている L7(+/cre)マウスと交配し、rac1(flox/flox)L7(+/cre)マウスを作製した(図1D)。rac1(flox/flox)L7(+/cre)マウスで小脳および眼球で、rac3のコーディングエキソンが欠失していることを、これらの組織から抽出したゲノミックDNAを用いたPCR法により確認した(図1D)。作製した rac1(flox/flox)L7(+/cre)マウス (Rac1-PC-KO)の小脳の形態をヘマトキシリン染色により検討したが、大きな形態的な異常は観察されなかった(図1E 上段)。またカルビンジン染色によりプルキンエ細胞の樹上突起の形状を観察した(図1E 中段および下段)。現在、この Rac1-PC-KO で樹上突起の形態に異常があるかどうかを検討するため、解析の例数を増やすこと、および電子顕微鏡を用いた解析を行っている。

Rac1-PC-KO は小脳失調を示さず、明らかな行動異常は見られない。我々は、小脳プルキンエ細胞でのシナプス可塑性を必要とすると考えられている瞬目反射の条件付け学習等の運動学習に異常が無いかどうか検討する予定である。また、平行線維-プルキンエ細胞シナプスのシナプス伝達やシナプス可塑性(長期抑圧)、登上線維-プルキンエ細胞シナプスのシナプス除去が正常に起こるかどうかも検討したいと考えている。

rac3 mRNA の発現が rac1mRNA の発現と重なりながらも発生、発達依存的にしかも部位特異的な発現をしていることから、Rac3タンパク質がvivoではRac1タンパク質と異なる働きをしていることも考えられる。Rac3ノックアウトマウスに関してはまず生殖系列細胞で、Creを作用させて通常のノックアウトマウス(全身でRac3を欠損しているマウス)を作製し、その表現型を解析したいと考えている。もし、Rac3ノックアウトマウスが致死の場合は、Rac1と同様、神経細胞特異的Creマウスと交配し、神経細胞特異的ノックアウトを解析する予定である。また、Rac3 が発現している細胞では、Rac1 が発現していると考えられるので、Rac1Rac3 二重ノックアウトマウスを作製してその表現型も解析したいと考えている。その際、各々の Rac 蛋白質を特異的に認識する抗体が必要であると考えられるので、抗原として各々のRac蛋白質とGSTを結合した蛋白質を大腸菌内で産生、精製を行った。もし2種のRacタンパク質を特異的に認識する抗体が得られれば、Rac1およびRac3に特異的に結合するタンパク質をアフィニティー精製により網羅的に解析したいと考えている。

また、プルキンエ細胞以外の神経細胞でRacコンディショナルノックアウトを作製のための領域特異的Cre発現マウスとして、大脳皮質、海馬等で Cre を発現する Emx1-cre ノックインマウスを作製した。また、小脳顆粒細胞で Cre を発現するNR2C(GluRε3)-cre Tg(2系統のファウンダーを交配中)を作製中である。

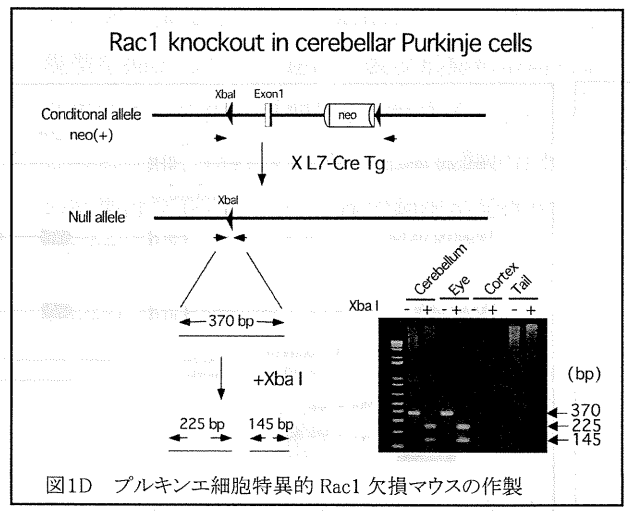


図1D　プルキンエ細胞特異的 Rac1 欠損マウスの作製

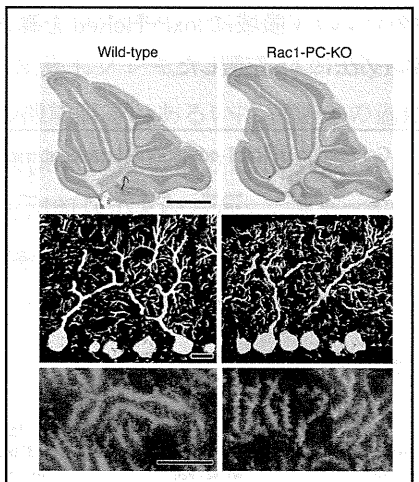


図 1E　プルキンエ細胞特異的 Rac1 欠損マウス小脳の形態　上段:ヘマトキシリン染色，中下段:プルキンエ細胞のカルビンジン染色

(2)　セマフォリン 3F ノックアウトマウスの作製と解析

セマフォリン 3F(Sema3F)は神経軸索ガイダンス因子セマフォリンのひとつで、*in vitro* で神経軸索突起の誘導あるいは反発活性を示す。Sema3F の中枢神経系での発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで調べたところ、神経回路形成時には広汎に発現し、生後の神経回路の成熟とともに発現部位は限局化した(図 2A)。生後脳では聴覚系中枢の一つである下丘に極めて限局して高発現していた。

Sema3F の神経回路形成及び神経機能への関与を個体レベルで調べるため、マウス Sema3F の開始メチオニンと in frame になるよう lacZ 遺伝子をノックインしたマウスを作成した(下図 2B はターゲティング方法，C は 5'プローブを用いたマウス尾 DNA のサザンブロット解析)。neo 遺伝子は EIIa-cre トランスジェニックマウスとの交配で除去した(図 2C)。ノザンブロット解析により、Sema3F(loxP/loxP)マウスにおける Sema3F mRNA の消失を確認した(図 2D)。

作成した Sema3F ノックアウトマウス(KO)の現在までの解析結果は以下の通りである。1)Sema3F KO は野生型より体長も脳の大きさも小さい傾向がある。2)Optical imaging により嗅球の匂い地図の形成を比較したが、野生型と比べて顕著な差は認められなかった。3)小脳の大きさ及び VGLUT2 染色による登上線維終末の分布は、野生型と比べて顕著な差は認められなかった。4)海馬のカルビンジン染色で、苔状線維の infrapyramidal bundle の縮退異常が認められた(図 2E)。

今後は生後脳で Sema3F が限局的に高発現している下丘を中心とした聴覚系情報処理における Sema3F の役割を解析する予定である。

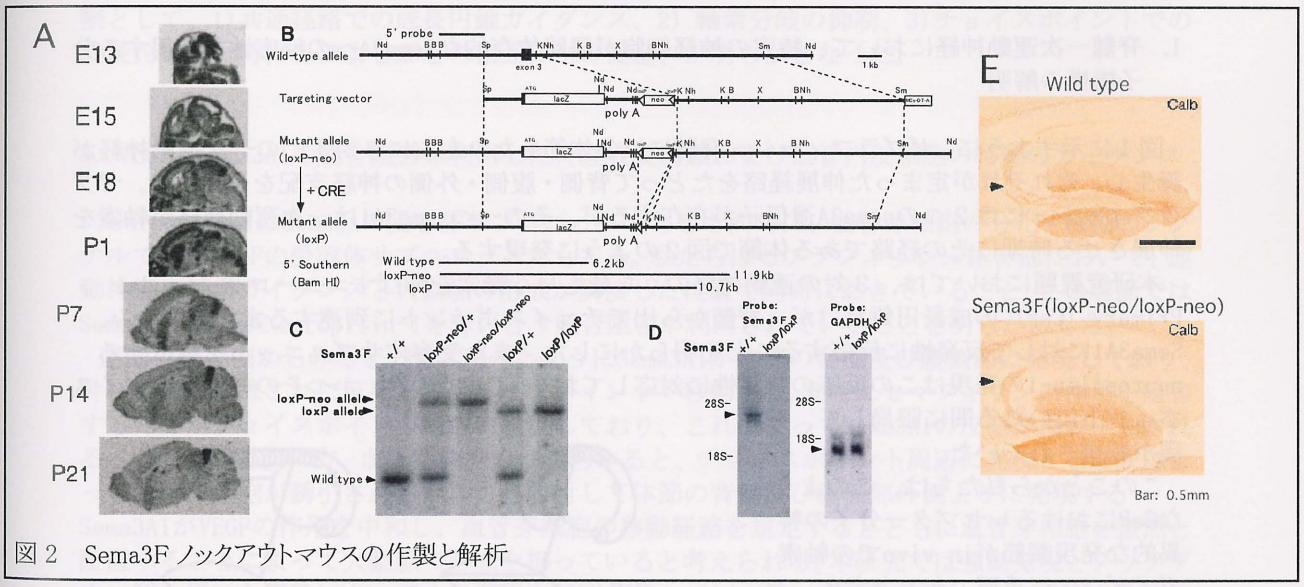


図 2　Sema3F ノックアウトマウスの作製と解析

共同研究

共同研究の相手

・狩野方伸、小作隆子、橋本浩一(金沢大学大学院医学系研究科)
・渡辺雅彦、深谷昌弘(北海道大学大学院医学研究科)
・松本英之、森　憲作(東京大学大学院医学系研究科)
・鈴木　昇(三重大学生命科学研究支援センター)

共同研究内容と成果

・金沢大学の狩野らと、ドーパミン受容体欠損海馬初代培養細胞の解析を行ない、他のグループにより報告されていた$GABA_A$受容体とドーパミンD5 受容体の機能的な相互作用がin vivoでは再現されないことを確認した。
・北海道大学の渡辺らとマウス脳における rac1 および rac3 mRNA の発現を in situ ハイブリダイゼーション法により明らかにした。また、プルキンエ細胞特異的に Rac1 を欠損させたマウス脳および Sema3F ノックアウトマウス脳の予備的な形態学的解析を行なった。
・東京大学の森らと optical imaging により Sema3F ノックアウトマウスにおける嗅球の匂い地図の形成を検討した。
・三重大学の鈴木らが作製した L7 遺伝子座 Cre ノックインマウス L7(+/cre)を用い、プルキンエ細胞特異的 Rac1 ノックアウトマウスを作製した。

A03-33

神経回路形成の複数のステップで作用するゼブラフィッシュ・セマフォリンの機能解析

研究代表者名：　東海林　亙

所属：　東北大学加齢医学研究所分子発生研究分野

特定領域「神経回路」参加年度：　平成１２年度

研究成果の要旨

本研究ではSema3Aの生体内での作用をゼブラフィッシュを用いて解析し、脊髄一次運動神経成長円錐のガイダンス・軸索分岐の抑制・チョイスポイントにおける成長円錐の一時停止にこの因子が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果

1. 脊髄一次運動神経において、特定の神経細胞が経路依存的なSema3Aへの反応性を獲得する分子機構の解明

図１に示すように、ゼブラフィッシュ脊髄には各体節あたり左右に３対ずつの一次運動神経が誕生し、それぞれが定まった伸展経路をたどって背側・腹側・外側の神経支配を分担する。ゼブラフィッシュには２つのsema3A遺伝子が存在するが、その一つsema3A1は一次運動神経が軸索を伸展させる時期にその経路である体節で図２のように発現する。

本研究課題においては、３対の運動神経のうち最も早く軸索を伸ばすニューロン、Caudal Primary（CaP）の成長円錐だけが、脊髄から出てチョイスポイントに到達するまでの間のみ、Sema3A1に対して反発性に反応することを明らかにした。また受容体サブユニットを構成するneuropilin-1の発現はこの反応の特異性に対応しており、CaPでのみ、かつその軸索がチョイスポイントにいたる間に限局して、発現が制御されていた。

このことから私たちは、このようなCaPにおけるレセプター分子の特異的な発現調節がin vivoでの軸索ガイダンスに重要であると考え、その制御機構を理解することを目的としてneuropilin-1遺伝子のシスエレメントを解析した。その結果、neuropilin-1遺伝子上流約-5kbに発現に重要な領域を発見し、３つの転写因子の結合配列が必須であることを見いだした。

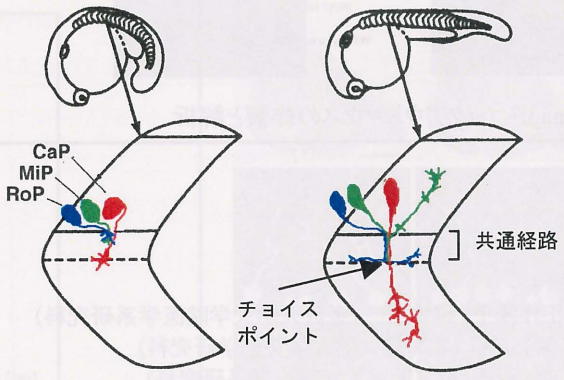


図１：脊髄一次運動神経の軸索伸展経路

2. 脊髄一次運動神経ガイダンスにおけるSema3Aの役割

Sema3A1の発現パターンと運動神経の特異的な反発反応は、共通経路(図１)においてCaPの成長円錐をチョイスポイントに導く作用を予測させた。Sema3A1およびNeuripilin-1のノックダウン実験の結果はこの予測を支持し、一部のCaP軸索にチョイスポイントに到達しないガイダンスのエラーが観察された。またノックダウン胚では共通経路の軸索に過剰な分岐がみられ、この場面ではSema3A1は軸索分岐を抑制する作用を示した。

さらに私たちはタイムラプス解析から、ノックダウン胚ではチョイスポイントにおけるCaPの成長円錐の一時停止がなくなってしまうことを見いだした。正常胚では成長円錐はチョイスポイントで一時停止し、Muscle Pioneer (MP)と呼ばれる単核の特殊な筋細胞と相互作用すると考えられている。MPとCaPの相互作用は約半数のセグメントに現れるCaPの双子ニューロン Variable Primary (VaP)を除去する役割があり、MPの除去によりVaPの細胞死が起こらずに一つのセグメントに2つのCaPができてしまうことが報告されている。これに対応して、Sema3A1のノックダウンによって一時停止が起きない場合には、MPを除去したときと同様にVaPの細胞死がなく、2つのCaPがみられる例がみられた。以上の結果から、脊髄運動神経に対するSema3A1の役割として、1)共通経路での成長円錐ガイダンス、2) 軸索分岐の抑制、3)チョイスポイントでの成長円錐の一時停止によるMPとの相互作用の促進、が明らかとなった。

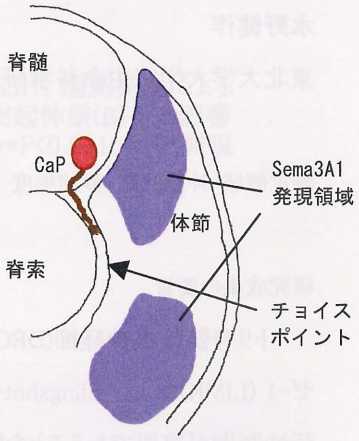


図2：脊髄一次運動神経CaPの軸索伸展経路とSema3A1発現領域との位置関係(体幹部を横断面でみたところ)

3. VEGFとSema3A1の競合阻害を利用した神経成長円錐および血管内皮細胞の移動のガイダンス

Neuropilin-1はSema3Aの受容体サブユニットであると同時に、血管芽細胞の分化・移動のシグナルであるVEGFの受容体サブユニットでもある。私たちはゼブラフィッシュ体幹部において、運動神経の軸索ガイダンスと大動脈の形成が隣接した位置で同時におきていること、この場面ではSema3AとVEGFがNeuropilin-1を奪い合う競合阻害が利用されていることを明らかにした。

運動神経の側からみると、既に述べたようにSema3A1が体節の背側及び腹側部に発現しており、神経成長円錐はこれに反発してチョイスポイントへ移動する。同時にセマフォリンの作用を阻害するVEGFがチョイスポイント周辺に発現しており、これによってSema3A1の反発作用が中和されると考えられる。一方、血管芽細胞の側からみると、チョイスポイント周辺に発現するVEGFによって血管芽細胞が誘引されるが、これに対して体節の背側及び腹側部外側よりに発現するSema3A1がVEGFの作用を中和し、血管芽細胞の移動経路を規定するとともに血管芽細胞を整然と配置することによって大動脈の形成を担っていると考えられる。本研究では強制発現とノックダウン胚を用いた実験によってこの仮説を証明し、Sema3AとVEGFが発現領域を一部で重複させることによって、成長円錐と血管芽細胞の移動を協調して制御していることを明らかにした。

A03-34

神経回路形成過程におけるアクチン細胞骨格のリモデリング機構の解明

水野健作

東北大学大学院生命科学研究科

特定領域「神経回路」参加年度　　平成12年度

研究成果の要旨

トリ脊髄後根神経節(DRG)ニューロンの成長円錐の運動性および突起伸展において、LIM キナーゼ-1 (LIMK)および Slingshot-1 (SSH)によるアクチン脱重合因子コフィリンのリン酸化、脱リン酸化による活性制御が重要であることを明らかにした。

研究成果

発生過程の脳神経系では、種々のガイダンス因子による制御によって、正確で秩序だった神経回路網が形成される。伸長中の軸索先端に位置する神経成長円錐は、誘因因子や反発因子などの外部環境を感受するセンサーとして、内外のシグナルを形態や運動性の変化に変換することで方向性をもった軸索伸長を司っていると考えられる。神経成長円錐の運動性と形態制御においてアクチン細胞骨格のリモデリングが中心的な役割を担っているが、その制御機構の詳細は不明である。私達は、発生過程の脳神経系に高発現するプロテインキナーゼである LIM キナーゼ(LIMK)を同定し、これがアクチン脱重合、切断因子であるコフィリンの Ser-3 をリン酸化、不活性化するキナーゼであることを解明した。また、LIMK は Rho や Rac の下流因子としてアクチン細胞骨格の再構築制御に関わることも明らかにした。LIMK1 はウイリアムス症候群の原因遺伝子の一つとして空間認知障害への関与も示唆されている。さらに、最近、コフィリンの脱リン酸化、活性化酵素として、Slingshot(SSH)が同定された。本研究では、コフィリン、LIMK、SSH が神経成長円錐の運動性および形態変化、突起伸展の制御においてどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的として解析を行った。

トリ胚脊髄後根神経節 (DRG)ニューロンに Yellow fluorescent protein (YFP)もしくは Cyan fluorescent protein (CFP)を結合させたコフィリン、LIMK1、SSH1 及びこれらの変異体をヘルペスウイルスベクターにより単独あるいは2種類同時に発現させ、成長円錐の運動性、形態、突起伸展に及ぼす影響を蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス観察により解析した。運動性に関しては、2 分毎の成長円錐の面積変化率を比較することで定量的に解析し、突起伸展に関しては、10 分間で神経突起が伸長した距離を比較することで定量的に解析した。

解析の結果、野生型 LIMK1 を過剰発現した DRG ニューロンの成長円錐は運動性と突起伸展速度が著しく減少した(図 1)。また、通常の成長円錐にみられる扇形の伸展形態でなく、退縮した形態を示した(図 2)。一方、常時活性型コフィリン(S3A)や野生型 SSH1 を過剰発現したニューロンの成長円錐は運

動性と突起伸展速度の上昇が認められ(図1)、先細で分枝の多い形態を示した(図 2)。

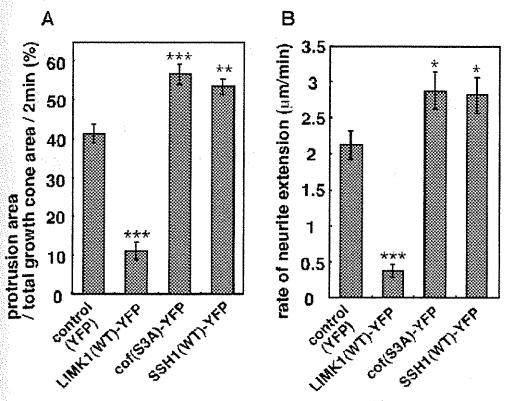


図 1 LIMK1, コフィリン, SSH1 過剰発現による成長円錐の運動性(A)と突起伸展(B)への影響
*P<0.05、**P<0.005、***P<0.001、YFP 発現細胞との比較

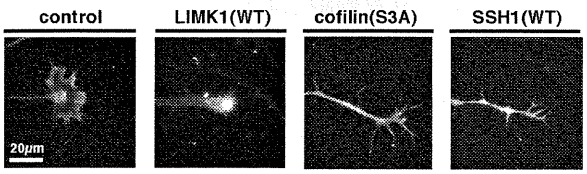


図 2 LIMK1, cofilin, SSH1 過剰発現による成長円錐の形態変化

さらに、LIMK1 の発現による成長円錐の運動性と突起伸展速度の低下は、常時活性型コフィリン(S3A)もしくは野生型 SSH1 を共発現させることで回復した(図 3)。以上の結果から、コフィリンの活性は成長円錐の運動性と突起伸展に促進的に働き、正常な成長円錐の運動と突起伸展にはコフィリンの活性が必要であることが示された。また、コフィリンの活性を調節するどのタンパク質の過剰発現でも正常な成長円錐の形態が保たれなくなったことから、コフィリンのバランスのとれた活性制御は成長円錐の形態維持においても重要であることが示唆された。

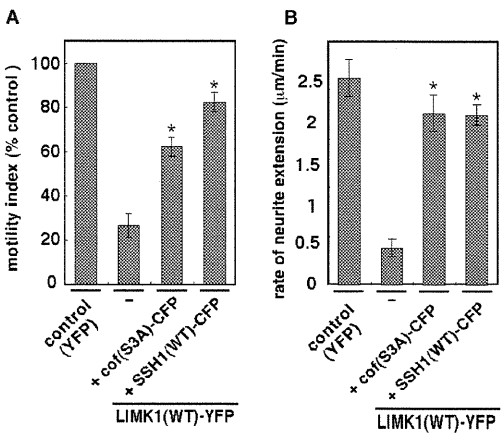


図 3 LIMK1 による成長円錐の運動性と突起伸展速度の低下は常時活性型コフィリンもしくは野生型 SSH1 共発現により回復する
*P <0.001、LIMK1 を単独で発現した細胞との比較

コフィリンの活性と成長円錐の運動性が関連していることを確かめるために、成長円錐内のリン酸化

型コフィリン量を細胞染色により検出したところ、LIMK1 を発現した DRG ニューロンの成長円錐では、リン酸化型コフィリン量が増加していた(図 4)。一方、LIMK1 とともに SSH1 を発現した DRG ニューロンの成長円錐では、リン酸化型コフィリン量は通常のレベルであった(図 4)。これらの結果から LIMK1 発現による成長円錐の運動性と突起伸展速度の低下はコフィリンのリン酸化、不活性化のためであり、SSH1 を共発現させることでコフィリンが再び活性化され、成長円錐の運動性と突起伸展速度も回復したと考えられる。

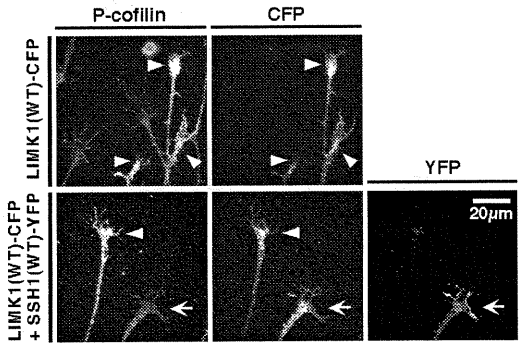


図 4 LIMK1, SSH1 発現による成長円錐内のコフィリンリン酸化量の変化
矢頭は LIMK1 発現細胞、矢印は LIMK1+SSH1 発現細胞を示す

共同研究

1. 尾藤晴彦、成宮周(京大、医)小脳顆粒細胞の神経突起形成、軸索伸長における ROCK と LIM キナーゼの役割を解明した。
2. 藍沢広行、矢原一郎(都臨床研)五嶋良郎(横浜市大)セマフォリン 3A による成長円錐退縮において LIM キナーゼによるコフィリンのリン酸化の役割を解明した。
3. 丹羽隆介、上村匡(京大ウイルス研)コフィリンホスファターゼとして Slingshot を同定し、神経成長円錐の運動性や突起伸展における役割を解明した。
4. 深澤有吾、井ノ口馨(三菱生命研)海馬 LTP の維持においてスパインの F アクチン含量、コフィリンリン酸化レベルの増加の重要性を解明した。

A03-35

研究課題　神経回路の成熟過程における神経シナプス構成分子の集積の解析
研究代表者名　畑　裕
所属　東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科

特定領域「神経回路」参加年度　平成12年度

研究成果の要旨

興奮性シナプスの後シナプス肥厚PSDの構成分子のうち、S-SCAM、MAGUIN、BEGAIN、SAPAPについて、PSDへの局在決定がどのような分子間相互作用を介して起こるかを解析し、PSD形成における分子集積の序列を決定した。

研究成果

興奮性シナプスのPSDは、数十種類の蛋白分子が数千個集合してできあがっている。それらの分子は、複雑な、しかし、調節された分子間相互作用によって、互いに結合してPSDを作り上げ、シナプスの機能を支えている。本研究では、私たちが見出したPSDの分子のうち、S-SCAM、MAGUIN、BEGAIN、SAPAPを対象として、それらがどのような分子間相互作用によってPSDに集積しているかを明らかにした。まず、解析対象とする分子Xのどの領域がPSDへの局在決定に関わるかを明らかにし、次にその領域に結合する分子Yを同定した。さらに、分子Yの分子Xに対する結合領域を過剰発現させることにより、分子XのPSDへの集積が阻害されるかを解析した。同様の検討を分子Xと分子Yを入れ替えて行った。分子Yの変異体により分子XのPSDへの集積が阻害されるときは、分子Yは分子Xより分子集積の序列において先に位置すると想定した。この結果、以下のことが明らかになった。

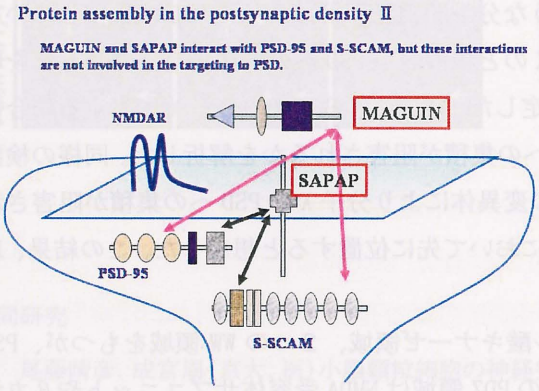
1）S-SCAMは6つのPDZ領域、1つのグアニル酸キナーゼ領域、2つのWW領域をもつが、PSDへの集積はC末端のPDZ領域を必要とする。このPDZ領域はNMDA受容体サブユニットやβカテニンのC末端のPDZ結合モチーフに結合する。βカテニンのS-SCAM結合領域を過剰発現させるとS-SCAMのPSDへの集積が阻害される。S-SCAMのβカテニン結合領域を含むC末端部分を過剰発現させると、不完全なPSDへの集積を示すが、βカテニンを同時に過剰発現させるとPSDに顕著に集積する。βカテニンのシナプスへの集積はS-SCAMとの結合に必要なC末端部分に依存せず、カテニンとの相互作用に必要なアルマジロリピートに依存する。NMDA受容体のサブユニットのC末端はS-SCAMのPSDへの集積を阻害せず、むしろS-SCAMによってPSDに集積される。

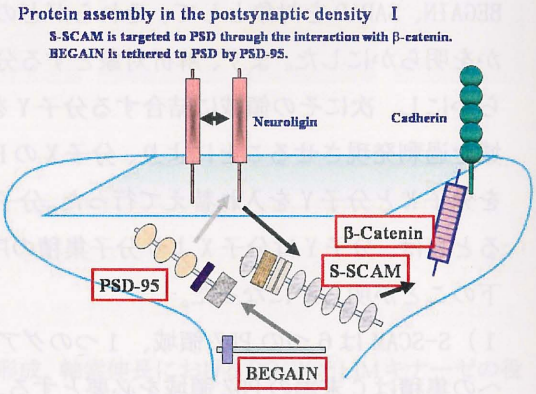
2）MAGUINにはSAM領域、PDZ領域、PH領域があるが、PSDへの集積はPH領域に依存して起こる。MAGUINがPH領域を介してどのような分子と相互作用するかは未解決である。MAGUINにはC末端にPDZ結合モチーフをもつMAGUIN-1と、PDZ結合モチーフをもたないMAGUIN-2があるが、どちらも等しくPSDに集積する。

3）BEGAINはPSD-95のグアニル酸キナーゼ領域に結合するPSDの分子として同定されたが、PSDのみならず神経細胞核にも局在する。BEGAINを非神経細胞に発現させると細胞核にのみ局在し、細胞核の外には分布しない。核への局在は神経細胞においても非神経細胞においてもN末端部分によって決定される。このN末端部分を神経細胞に発現させると細胞核の外にも局在し樹状突起

に集積を形成する。したがって、BEGAIN の N 末端に結合する神経細胞特異的分子の存在が予測されるが未同定である。BEGAIN は N 末端だけでは PSD に局在せず、PSD に局在するためには C 末端部分を必要とする。C 末端部分は PSD-95 との結合に必要な領域であるが、PSD-95 のグアニル酸キナーゼ領域を過剰発現させると BEGAIN の PSD への集積が阻害されるので、PSD-95 との相互作用によって PSD に局在決定されると推定される。また、BEGAIN の PSD への集積は NMDA 受容体のブロッカーによって阻害されるので、BEGAIN の PSD への集積は NMDA 受容体が活動するようになってから起こると考えられる。

４）SAPAP は N 末端部分で細胞骨格に、中央部分で PSD-95 と S-SCAM のグアニル酸キナーゼ領域に、C 末端で Shank/synamon に結合するが、SAPAP の PSD への集積は、N 末端部分に依存し、中央部分･C 末端部分を必要としない。PSD-95 のグアニル酸キナーゼ領域を過剰発現させても SAPAP の PSD への集積は阻害されない。逆に SAPAP の中央部分を過剰発現させても PSD-95 の PSD への集積は阻害されない。しかし、SAPAP の C 末端を過剰発現させると Shank/synamon の PSD への集積は阻害される。





以上から、MAGUIN や SAPAP は S-SCAM や PSD-95 と独立に PSD に集積すること、S-SCAM はβカテニンによって PSD に集積され、おそらくカドヘリン依存性接着部位にまず局在すること、BEGAIN は PSD-95 に結合することで PSD に集積し、その過程は NMDA 受容体によって制御される可能性があることが明らかになった。

「脳神経系の初期パターンをつくるシグナル伝達機構の遺伝学的解析」

研究代表者　川上　厚志
所属　東京大学大学院理学系研究科生物科学
特定領域「神経回路」参加年度　平成１２年度（2000年度）

研究成果の要旨

ヘッジホッグ(Hh)シグナルによる細胞多様性の調節機構の解析を行った。3つのゼブラフィッシュ変異体の解析から、1)DispatchedによるHh分子分泌の調節、2)Dzip1によるGli転写因子活性の調節、3)神経管背側マトリックス分子Scube2による背側Bmpの抑制機構について明らかにした。

研究成果

生物の発生において，脳神経系の初期パターン形成は様々のシグナル分子，成長因子の作用によってコントロールされている。その中でも脊椎動物の脊索とフロアープレート(ミッドラインと総称する)は，初期神経管の基本的パターンと細胞の分化を支配し，後には神経回路形成をガイドするするシグナリングセンターとして重要な働きをしている。ここで働くシグナルのひとつはHh ファミリー分子であることが明らかにされているが，この分子シグナルは濃度依存的に作用してミッドライン周辺の神経組織(および非神経組織に)多種多様の細胞形成を誘導することができる(図 1)。このような現象についての詳細やまたシグナルカスケードについての知見が進むいっぽうで、Hh シグナルがいかにして多種の異なった細胞をそれぞれの場所に形成させることができるのかの具体的な作用調節についてはまだ充分に明らかにされていない。

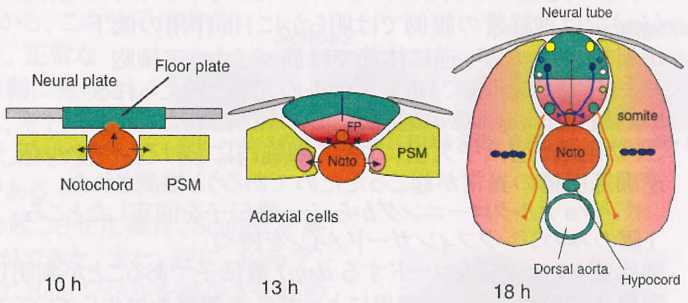


図1：ゼブラフィッシュにおける神経系の形成と Hh シグナルの底部神経管および体節中胚葉への誘導作用

当研究では，脳神経系の初期パターン形成における細胞多様性の形成機構に分子レベルでアプローチするために，ゼブラフィッシュを用いて遺伝学的なアプローチを行った。ゼブラフィッシュでは多数のミッドラインシグナル伝達に欠損を持つと考えられる変異体群があり、これらを用いたHhシグナル制御機構の解明によって，脳神経系のパターン形成における細胞多様性の誘導機構の理解を進めることを目的とした。

以前の研究では，弱い欠損を示す *detour* 変異体の解析からヘッジホッグシグナルの下流で働く転写因子 *gli1* の欠損を明らかにし、Gli1 および Gli2 の Hh シグナル活性化における働きを解析した(論文 4)。これを進め、平成 12 年度の特定研究では Hh シグナルを経由した神経系のパターン形成の調節機構にさらに迫るため、1)強い Hh シグナルの欠損を示す *chameleon* (*con*) の原因遺伝子・作用機構の解明と、2)Hh シグナルの収斂するアウトプットである Gli 転写因子の活性調節機構の解析。3)ミッドラインでの分子シグナルの相互作用と調節メカニズムを明らかにすることを主な目標として掲げた。以下、それぞれについて研究期間後の展開も含めて報告する。

1) *chameleon* (*con*) の原因遺伝子・作用機構の解明

ゼブラフィッシュ変異体 *con* では非常に強い Hh シグナルの欠損を示したが、この欠損は Shh の強制発現によってレスキューされた。従って、Con は Shh よりも遺伝的に上流で作用していることが予想されていた。このような表現型を示す遺伝子はこれまでに行われたマウスでのターゲッティングでも知られていなかったので、この分子はミッドラインシグナリングで何らかの調節的な役割を果たしている重要な新規分子であると考えポジショナルクローニングを進めていた。しかしながら、この遺伝子はゲノム上の解析の困難な場所にあったために同定に時間がかかり、残念ながらショウジョウバエでの *dispatched* (*disp*) 遺伝子の同定やさらにマウスでのホモローグの解析に先んじることができなかった。ゼブラフィッ

シュでの *disp* ホモローグが Phillip Ingham のグループによって同定され、*disp1* 遺伝子が染色体上で *con* 変異の近傍にあることがわかったことなどから *con* 原因遺伝子であることが判明し共同研究での論文出版となった(論文 5)。

Disp 分子は Hh レセプターである Patched と類似の構造を持った 12 回膜貫通型タンパクであり、コレステロールセンシングドメインを持つ。Shh は *in vivo* でのプロセッシングによってコレステロール修飾されるが、Disp 分子はコレステロール修飾された Shh 分子を細胞外へと輸送する機能を持つことがマウスでの解析などから示唆されていた。ゼブラフィッシュでの解析によって、実際にコレステロール修飾された Shh が細胞外へ出るには Disp 分子を必要とするが、コレステロール修飾されない Shh 分子は構成的に細胞外へと分泌されることが示された。リガンドのコレステロール修飾と細胞外への分泌は厳密に制御された過程であると考えられる。

2) Gli 転写因子の活性調節機構

Hh シグナルは最終的には Gli 転写因子の活性に収斂することがショウジョウバエの遺伝学的な解析などから示唆されているが、Hh リガンドによる細胞内経路の活性化がどのようにして転写因子の活性とリンクするか完全には明らかになっていない。われわれが新たに解析したゼブラフィッシュ変異体 *iguana* (*igu*) では神経管の腹側では明らかに Hh 作用の低下が起こっていたが、逆に体節では筋パイオニア細胞および周囲の速筋で Hh シグナルの亢進と考えられる標的遺伝子 *engrailed* の発現上昇が観察された(図 2)。これから *igu* 遺伝子欠損によって細胞内におけるシグナル伝達調節機構の異常が起こったためであろうと推測された。

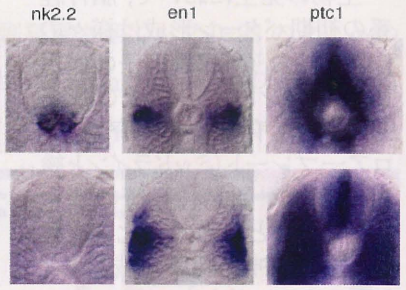


図2 : *igu* 変異体の表現型
神経管底部では *nk2.2* 発現の欠損が起こるが、体節領域では Hh シグナルの亢進が起こっているように見える。

ポジショナルクローニングから *igu* 遺伝子を同定したところ、1個のみのジンクフィンガードメインを持つ細胞質タンパク質をコードする *dzip1* 遺伝子であることが判明し、変異体ではナンセンス変異によって C 末領域を欠失していることが明らかになった(論文 6)(図 3)。エピスタシスの解析から、Igu 分子は Gli1, 2 の上流で作用するが、Gli2 のプロセッシングに関わる PKA よりも下流で作用することが示唆され、Dzip1 は Gli 転写因子のレベルで作用する調節因子であることが示唆された。

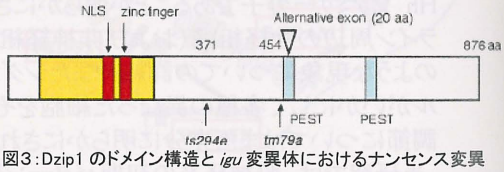


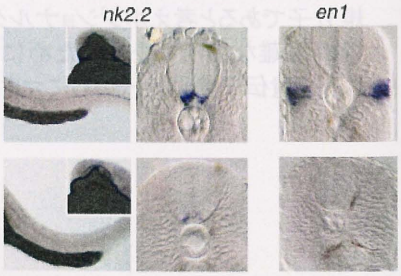
図3 : Dzip1 のドメイン構造と *igu* 変異体におけるナンセンス変異

実際に、正常な Dzip1 は細胞質に存在するが、Dzip1 は本来核移行シグナルを持ちC末ドメインを欠く変異体フォーム(機能喪失型と考えられる)では核に移行することも明らかになった。しかし一方で、Dzip1 自身は DNA 結合タンパクではなく、また Gli タンパクとの直接の結合もいままでのところ確認できていない。また、正常な Dzip1 も変異した Dzip1 も、過剰に発現させても何ら異常を起こさないことから、この分子は Hh シグナルにおいて必須であるが、それ自身は積極的な作用を示さないコファクター分子と考えられる。

Dzip1 の機能を欠損する *igu* 変異体では、Hh シグナルの標的遺伝子は神経管で低下、体節で亢進するように見えるが、いずれも Hh リガンドの存在と無関係に発現していることが阻害剤を用いた薬理学的解析からわかった。つまり、*igu* 変異体では Gli 転写因子はシグナル伝達とのリンクを失って、完全な標的遺伝子のオンが起こらないと同時に、完全なそれらのオフもできなくなっていることが解析の結果明らかになった。標的組織によって表現型が異なって見えるのは、Hh シグナルの低下は一様に起こっているが、標的遺伝子によって閾値が異なっているためであると考えられた。従ってこれらの結果から、Dzip1 は Hh シグナルにおける細胞膜上のエフェクターである Smoothened の活性化を Gli 転写因子へと伝えるリンクの重要な構成因子と考えられ、その作用はおそらく Su(Fu)などの因子とともに Gli 転写因子の核移行を Hh シグナルに依存して制御していると考えられる。

3) 背側 BMP と Hh シグナルの相互作用機構

発生初期、表皮となる領域には高濃度の BMP 分子が存在し、これらは背側オーガナイザー領域に発現が誘導される Chordin をはじめとした BMP アンタゴニストによって抑制されて、神経組織と中軸中胚葉を生じることができる。しかし、胚の腹側(表皮側)には高濃度の Bmp が存在し続け、神経管の形成とともに神経系のルーフプレートや隣接する表皮で発現するようになる。近年、*in vivo*、*in vitro* のいくつかの解析から、これらの背側と表皮に存在する BMP は神経管の腹側での Hh シグナルの活



性化に影響することが示唆されている。

われわれが最近解析を行ったゼブラフィッシュ *you* 変異体では、Hh シグナルの標的遺伝子の活性化から見て明らかな Hh シグナルの欠損が起こっているが、これまでに知られている他のミッドライン変異体のいずれとも異なって、神経管底部での欠損はマイルドであった。このような表現型は濃度依存的な Hh 作用と一見矛盾することから、You 分子は長距離のシグナル制御過程に関わっていると予想された(図4)。

*you*変異体で傷害を受けている遺伝子を同定したところ、分泌型の細胞表面分子であることが示唆されている Scube2 (Signal peptide-CUB domain-EGF repeat containing gene 2)というマトリックスタンパクをコードする遺伝子であることがわかった(図 5)。*scube2* の発現は、神経管の形成期に神経板と表皮の境界部で活性化され、管の形成とともに背側の領域で発現していた(図 6)。

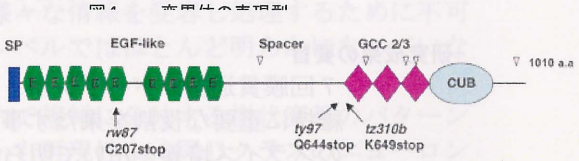


図5：Scube2 の構造と you 変異体における変異

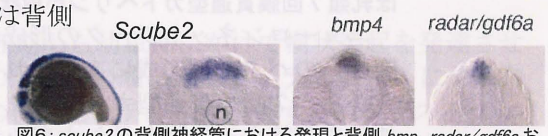


図6：*scube2* の背側神経管における発現と背側 *bmp, radar/gdf6a* および *bmp4* の発現

このような発現と Hh シグナルへの影響から、この分子は背側 Bmp の制御に関わっていると推測された。正常な Scube2 も変異体型の Scube2 も、胚で過剰に発現させても何ら異常は起こさなかったことから、それ単独で作用する分子ではないと考えられた。しかしながら、ゼブラフィッシュ胚に背側 Bmp の一つである Radar/Gdf6a を発現させて胚の腹側化を起こさせた場合、Scube2 を共発現させると Bmp の作用を抑制することができた。また、逆に、Bmp アンタゴニストである Noggin, Chordin によって Bmp レベルを減少させ胚の背側化を起こさせた場合には、Scube2 の共発現によってそれらの作用は促進された。従って、弱いながらも Bmp との相互作用が存在することが確かめられた。さらに背側 Bmp との関わりを証明するために、*radar/gdf6a* または *bmp4* のノックダウンを行ったところ、これらの背側 Bmp のいずれも発現を減少させると *you* 変異体での Hh シグナル欠損がレスキューされた(図 7)。これらの結果から、Scube2 の正常な機能は神経管の背側において Gdf6a, Bmp4 などの背側 Bmp シグナルの過剰な拡散を制限して、腹側神経管や体節領域への阻害的な影響を抑制することであることがわかった。

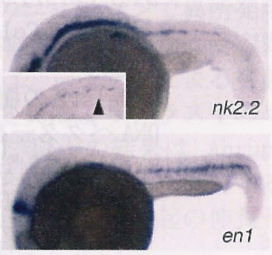


図7：背側 Bmp のノックダウンによる you 変異体のレスキュー
you 変異体における *radar/gdf6a* のノックダウンの結果を示す。モザイク状に *nk2.2* の発現が見られる。

Scube2 機能には C 末領域が不可欠であり、この領域で他の分子と相互作用して完全な機能を発揮すると考えられる。今後、Scube2 のパートナー分子の同定が重要な課題と考えられる。また、ファミリー分子の Scube1, 3 はそれぞれ血管内皮や骨芽細胞などに発現していることから、これらの組織での Bmp シグナルの制御のどのような側面に関わっているかも興味深い。さらに、Bmp シグナルはどのようなレベルで Hh シグナルを阻害するのであろうか？Bmp シグナルの下流転写因子 Smad は Gli3 との結合が示唆されていることから、転写因子の制御のレベルでこれらは相互作用しているのかもしれない。

業績リスト

共同研究

共同研究の相手：　岡本　仁　　(理化学研究所脳科学総合センター)
共同研究内容：　「*you*変異体の解析」
成果：

*you*変異体は、染色体上の位置や表現型・相補性テストから理研におけるスクリーニングから同定された変異体*rw87*と同一の遺伝子の変異であることが判明し、当初それぞれが進めていた解析を共同で進めることとなった。変異遺伝子の同定および解析の結果、背側に発現する分泌性の細胞表面分子Scueb2が欠損していることを明らかにした（論文８）。

表題　　７回膜貫通型カドヘリンによる樹状突起と軸索のパターン形成の調節

研究代表者名　　上村　匡
所属　　京都大学・大学院生命科学研究科

特定領域「神経回路」参加年度
平成１２年度（班員）、平成１３年度ー平成１６年度（班友）

研究成果の要旨
７回膜貫通型カドヘリンが、樹状突起および軸索の伸長や、いったん伸長した突起の維持に重要な役割を果たす事を、ショウジョウバエを用いた遺伝学的手法とラット脳のスライス培養を用いて明らかにした。

研究成果

ほ乳類７回膜貫通型カドヘリンが樹状突起形成に果たす役割

ニューロンネットワークの形成は、ニューロンが伸ばす２種類の突起（軸索と樹状突起）のパターン形成に支えられている。我々はショウジョウバエをモデルとした研究から、７回膜貫通型カドヘリンFlamingo（Fmi、図１）が、軸索と樹状突起の両方の伸長を調節する役割を果たす事を示した（Reuter et al., 2003; Senti et al., 2003）。７回膜貫通型カドヘリンは進化的に高度に保存されており、ヒトを含めたほ乳類のゲノムには *Celsr1-Celsr3* の３つの遺伝子が存在する。我々は *fmi* のマウスホモログである *Celsr1-Celsr3* のそれぞれが、神経発生において特徴的な発現パターンを示すこと、そしてCelsr2タンパク質が神経突起に分布することを明らかにした(Shima et al., 2003)。

Celsr2の樹状突起のパターン形成における役割を解析するために、*Celsr2* の発現をDNAベクターを用いたRNA干渉によりノックダウンさせることを試みた。効果的な干渉RNA（small interfering RNA, siRNA)を発現するプラスミドを、樹状突起を可視化させるためのEGFP発現ベクターとともに、遺伝子銃を用いてラット脳のスライスに導入した。siRNAの発現により、プルキンエ細胞や錐体細胞では樹状突起の形態が顕著に単純化した。これは突起の縮退が原因であることが強く示唆された。このような表現型は対照プラスミドでは見られなかった。また、siRNA発現プラスミドとともに、siRNAに非感受的なCelsr2の発現ベクターを共導入することによって、表現型を復帰させることができた。これら全ての結果はsiENA発現プラスミドによる効果はCelsr2の機能喪失によるものであることを示唆しており、Celsr2は樹状突起の維持に必須であると考えられる(Shima et al., 2004)。

さらに、構造- 機能解析を行ったところ、7回膜貫通型カドヘリンがふた通りの機構で働いていることを支持するデータを得た。一つは分子間のホモフィリックな結合であり、これはいったん伸長した突起の維持に働いている。もう一つは未知のリガンドに対するレセプターとして働き、突起の伸長制御を担う機構である。この仮想上のリガンドの同定を試みるとともに、7回膜貫通型カドヘリンの下流で働くシグナル伝達経路の解明も試みている。

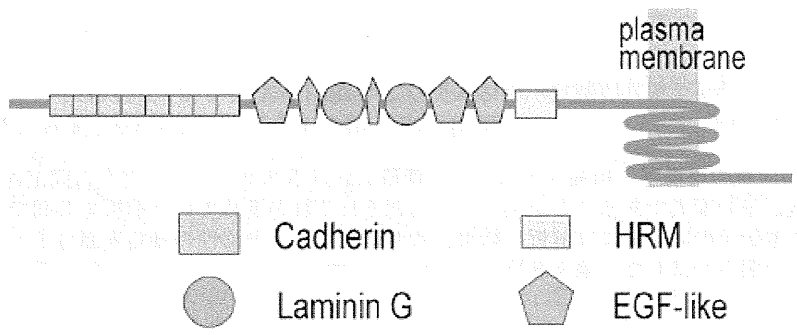


図１　７回膜貫通型カドヘリンの構造図。
Cadherin:カドヘリンリピート；Laminin G:ラミニン球状ドメイン；HRM：セクレチンレセプターなどのGタンパク質共役型レセプターに保存されたドメイン；EGF-like：EGF リピート。Usui et al. Cell 98, 585-595 (1999) を改変。

樹状突起パターンの多様性を調節する遺伝プログラム

軸索ガイダンスの研究の進展に比べて、樹状突起のパターン形成に関しては多くの問題が明らかにされていない。その代表的な問題として、ニューロンのクラス毎に特徴的な樹状突起のパターンを形作る分子基盤がある。樹状突起がカバーする領域（受容野）の大きさは入力の数を、また、突起の長さや分岐の複雑度は信号伝達などの生理的特性を左右する。従って樹状突起パターンの多様性は、ニューロンのクラスごとに特有の機能を支える基盤であり、神経系が様々な情報を受容し処理するために不可欠である。しかしながら、その多様性は分子レベルではほとんど明らかになっていない。

クラス毎に形状が大きく異なり、狭い空間内で複雑に分岐する樹状突起のパターン形成を研究するには、一細胞の解像度で、しかも再現性よく同じクラスのニューロンを可視化する必要がある。そこで我々は、ショウジョウバエの dendritic arborization (da) neuron をモデルとして、個体を生かしたまま樹状突起を一細胞レベルで観察できる系を作り上げた(Sugimura et al., 2003)。

ショウジョウバエの胚後期で誕生し、胚期から幼虫期にかけて樹状突起を発達させる da neuron は、分岐の複雑度と受容野のサイズの順に応じてクラス I- IV に分類されており、樹状突起形態の多様性解析への優れたモデル系を提供する。クラス I のニューロンとは対照的に、クラス IV のニューロンは、幼虫期を通してより高次な分岐を展開し続け、レーザーによる突起切断に対して高い反応性を示す。

クラス特異的に発現する遺伝子を探索したところ、転写調節因子 Abrupt がクラス I 特異的に発現していることを見出した。Abrupt を他のクラスのニューロンで異所発現させると、それらはクラス I のニューロンのように分岐の複雑度が低く、かつ受容野の狭い樹状突起を発達させた。クラス IV に発現させた場合には、レーザーによる突起切断に対する反応性も失われた。対照的に、*abrupt* 機能喪失変異によりクラス I のニューロンは、正常よりも複雑に分岐する突起を形成した（図２）。以上の結果は、Abrupt がクラス I に特徴的な樹状突起のパターンを調節する役割を果たすことを支持する (Sugimura et al., 2004)。今後は Abrupt の標的遺伝子を明らかにし、突起の伸長や分岐が細胞骨格のレベルでどのように制御されているのかを追究したい。

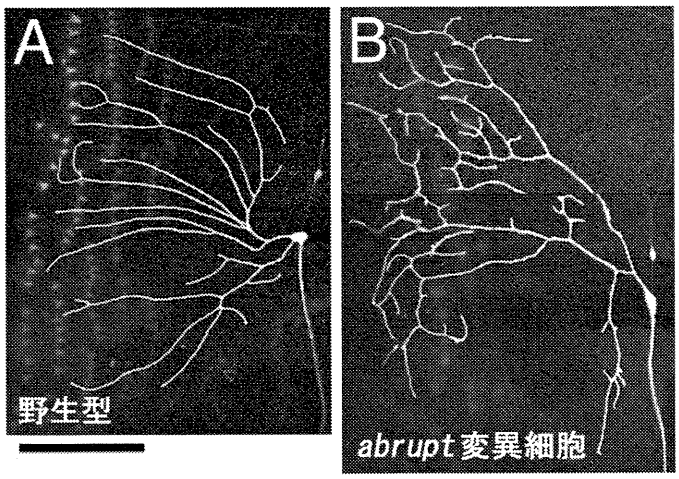


図２　*abrupt* 遺伝子による樹状突起の分岐の調節。(A と B) いずれも同じクラスのニューロンを標識して、突起のパターンを可視化した。(A) 野生型のニューロン。(B) *abrupt* 変異をホモに持つニューロンは、分岐の数が増えてしまい、かつクシ状のパターンが乱れてしまう。Sugimura et al. Neuron, 43, 809-822 (2004).

共同研究

共同研究相手

見学美根子（理化学研究所脳科学研究センター）
平野丈夫（京都大学・大学院理学研究科）
竹市雅俊（理化学研究所発生・再生科学総合研究センター）
Stephen Crews (University of North Carolina)

林茂生（理化学研究所発生・再生科学総合研究センター）

共同研究内容と成果

(1) ほ乳類７回膜貫通型カドヘリンの機能解析
ほ乳類７回膜貫通型カドヘリンが、樹状突起のパターン形成に重要な役割を果たすことを、脳スライス培養と RNAi を用いて明らかにした。
(2) 樹状突起の多様性の分子基盤
樹状突起形態の多様性を調節する転写調節因子を発見した。

A03-39

遺伝情報が特定のシナプスに選択的に機能発現する機構の解明

研究代表者：　井ノ口馨

所属：　三菱化学生命科学研究所（MITILS）

特定領域「神経回路」参加年度：　２０００年度

研究成果の要旨

LTPに伴いシナプスの形態がダイナミックに変化すること、シナプス形態の可塑性がLTPの持続（L-LTP）に重要な役割を果たしていること、さらにスパイン形態の可塑性にはスパインアクチンの動態が重要であることを明らかにした。

研究成果

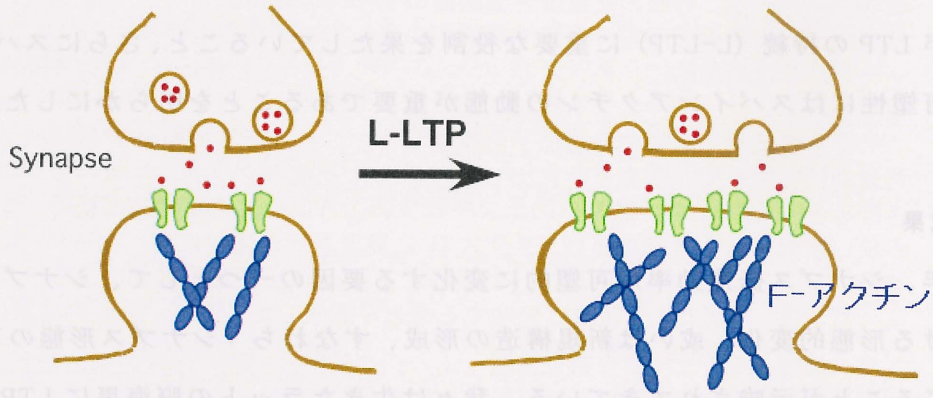
近年、シナプス伝達効率が可塑的に変化する要因の一つとして、シナプス後部における形態的変化、或いは新規構造の形成、すなわち「シナプス形態の可塑性」が生じることが示唆されてきている。我々は生きたラットの脳海馬にLTPを誘導し、シナプス領域におけるアクチン分子の長期間にわたる動態の変化、変化の分子カスケード、変化とLTPの持続性の関係等を検討した。

海馬の歯状回分子層は内側・中間・外側の３層より構成され、外層には外側嗅内野からの、中層には内側嗅内野からの貫通線維が投射しシナプス層を形成している。貫通線維に強いテタヌス刺激、或いは弱いテタヌス刺激を与えることにより、それぞれのシナプス層に長期持続型のL-LTP、あるいは短期減衰型のE-LTPを起こすことができる。我々は、無麻酔下で自由に行動しているラットに強いテタヌス刺激を与えて長期持続型のL-LTPを引き起こし、その海馬切片をphalloidin染色することにより、LTPが誘導されたシナプス部位に特異的にF-アクチンが増加することを見出した。LTPが生じたシナプス層をレーザーマイクロダイセクション法で採取し、不溶性画分のアクチンを定量しF-アクチン量が確かに増加していることを生化学的に確認した。

シナプス層を電顕観察し、phalloidinに強く染まる部位はスパインであること、

コントロール側と比較してLTP側ではphalloidinで強く染色されるスパインの比率が倍加していることが分かった。さらに、前シナプスと後シナプスの接触面（synaptic apposition）の長さがLTP側で約２倍になっていたことから、LTP誘導に伴いスパイン内のF-アクチン量が増え、その結果としてスパインが大きくなることが明らかとなった。

Spine の F-アクチン動態と LTP の持続



- Spine F-アクチンの増加
- Synaptic apposition の増大
- アクチン動態がLTP の持続 に重要

→ LTP の持続には スパインの形態変化が 重要である

無麻酔自由行動下の動物では、強いテタヌス刺激を与えることにより数週間にわたってシナプス伝達の増強が持続するL-LTPが生じる。これらの動物の海馬では、LTPが引き起こされたシナプスのF-アクチン増加が少なくとも５週間は持続していた。一方、弱いテタヌス刺激を与え７日以内に減衰する短期減衰型のLTPを引き起こしたときには、LTPの持続と同様にシナプス部位でのF-アクチン増大も７日後には元のレベルに戻っていた。これらの結果は、スパイン内のF-アクチン増加がLTPの持続に重要な役割を果たしていることを示唆している。

次に、LTP持続に対するアクチン重合阻害剤の効果を麻酔下のラット歯状回LTP

実験系を用いて検討した。麻酔下動物のLTP系では強いテタヌス刺激により１２時間以上持続するL-LTPが引き起こされる。アクチン重合阻害剤のラトランキュリンＡ存在下ではテタヌス直後の増強レベルがコントロール群と差がなかったにも関わらず、LTPが早く減衰し８時間でテタヌス前のレベルに戻った。タンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミド存在下で強いテタヌス刺激により誘導されたLTPの減衰がこれとほぼ同様の推移を示した。ラトランキュリンＡは通常のシナプス伝達には影響を与えなかった。これらの結果は、スパインアクチンの動態が海馬LTPの持続に重要な役割を果たしていることを示している。

A03-40

表題　神経軸索誘導に必須な脳特異的PKCζ結合タンパク質FEZ１の解析

研究代表者名　黒　田　俊　一

所属　大阪大学・産業科学研究所・生体触媒科学研究分野

特定領域「神経回路」参加年度　平成１３年度

研究成果の要旨

線虫由来UNC-76の哺乳類オルソログFEZ1は、protein kinase Cζ(PKCζ), disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1), actin, kinesin, tubulinと相互作用してミトコンドリア等のオルガネラを軸策先端へ輸送するのに必須なタンパク質である事が判明した。

研究成果

神経系組織は、多種多様な神経細胞から構成されている。神経細胞は最も発達した極性を有する細胞であり、１つの神経細胞は通常１つの細胞体と１本の軸索、複数の樹状突起から構成されている。成熟中の神経系組織では、神経軸索が他の軸索に沿って伸長し、互いに結合し、細胞外環境に応答して標的細胞へと伸びていく。神経系組織発達時に行われるこれらの極性を持った軸索伸長と神経束形成は、規則的な神経回路の構成に必須である。様々な神経細胞が神経回路を形成し、その結果神経系組織が形成される。哺乳類では神経軸索形成機構解明のための *in vitro* モデルとして一般に中枢神経系の海馬が用いられている。神経軸索形成過程は、次の５つの段階に分けられている。まず、ラメリポリアが神経細胞の辺縁に形成される（stage 1)。次に、いくつかの短い未分化の神経突起が伸長する（stage 2)。未分化の神経突起のうち１本が伸長して軸索としての性質を有するようになる（stage 3)。残りの神経突起が樹状突起としての性質を獲得していく（stage 4)。軸索と樹状突起がさらに成熟し、シナプス形成が起こる（stage 5)。一方、神経軸索伸長機構に関わる分子やシグナルカスケードについては現在のところ充分に解明されていない。それらの研究の為に、線虫やショウジョウバエがモデルとしてよく用いられている。変異導入解析によって、netrin, slit, semapholin, ephlin などの細胞表面タンパク質や分泌タンパク質が、神経軸索伸長・神経束形成に必須であることが明らかになった。しかし、細胞内分子やシグナルカスケードがどのようにしてこれらの細胞外分子に応答して神経軸索を伸長させるかは不明な点が多い。本報告書では、神経軸索伸長に必須な事が線虫で証明されているUNC-76及び、その哺乳類オルソログで我々が発見したFEZ1及びFEZ２に関する最近の知見を記載する。

【UNC-76は線虫の軸索伸長および神経束形成に必須のタンパク質である】

線虫では、神経系発生時に働く多くの遺伝子が変異体群の遺伝学的解析により見つかっており、特に行動異常を示した変異体の中からは *unc* (*uncoordinated*) 遺伝子群が同定されている。そして、神経軸索伸長、神経束形成に必要な*unc*遺伝子群には少なくとも２つのグループに大別されている。第一のグループ（*unc-14, unc-33, unc-44, unc-51, unc-73*) は神経細胞と非神経細胞に沿った軸索の伸長に必要である。また、第二のグループ（*unc-34, unc71, unc-76*) は神経束形成と神経細胞に沿った軸索伸長に必要で、非神経細胞に沿った軸索伸長には関与していない。したがって、後者のグループに属する遺伝子群は、神経細胞が軸索を他の神経細胞へ向けて伸長させて細胞間情報伝達を行うために機能していると考えられる。行動異常を示した変異体として、線虫*unc-76*変異体が同定され解析が行われた。UNC-76は、約 43kDaのタンパク質でコイルドコイルドメインを有す

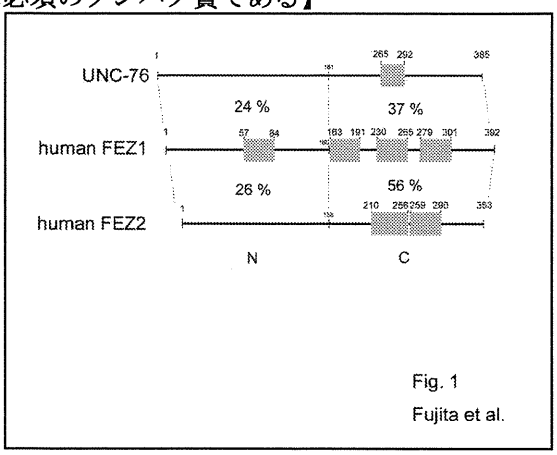


Fig. 1
Fujita et al.

るが、その他のタンパク質モチーフは持たず (Fig. 1)、線虫の神経系細胞にのみ発現している。線虫*unc-76*変異株は軸索伸長が不完全で神経束形成が不全という２つの形態的異常が見られており、その結果、行動異常が起こると考えられている。しかし、UNC-76 が分子としてどの様な機能を有するかは全く分かっていない。

【UNC-76 のオルソログである FEZ1 はプロテインキナーゼＣζの結合タンパク質である】

1997 年HorvitzらはヒトEST データベースからUNC-76 のヒトホモログを見出し、fasciculation and elongation protein zeta 1 (FEZ1) と名づけた。ヒトFEZ1 は４つのコイルドコイル領域を持つ45kDaのタンパク質で、UNC-76 と 35%の同一性 (46%の類似性) を示す(Fig. 1)。ヒト*FEZ1*遺伝子は、線虫の*unc-76*変異 (行動異常、神経束形成不全) を一部相補することから、FEZ1 は UNC-76 の哺乳類オルソログであることが示された。一方、1999 年に我々は酵母Two-Hybrid法により、PKCζの結合タンパク質としてFEZ1 を同定した。PKCζはセリン・スレオニンキナーゼの一種であり、神経細胞の生存・アポトーシス・分化などに関与している。*PKCζ*mRNAは様々な組織で発現しているが、特に神経組織で高発現しており、*FEZ1* mRNAも神経系組織で発現していた。また、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12 細胞にFEZ1 と常活性型変異体PKCζを共発現させると、神経成長因子 (NGF ; nerve growth factor) 非存在下で神経様突起を伸長した。試験管内でFEZ1 はPKCζによってリン酸化されることから、FEZ1 はPKCζによってリン酸化されて神経分化を誘導することが示唆された。しかし、PC12 細胞内でPKCζ/FEZ1 複合体によりリン酸化される基質はまだ見つかっていない。軸索伸長に関わる分子群及びシグナル伝達経路は哺乳類と線虫でよく保存されているため、哺乳類におけるPKCζ/FEZ1 複合体並びに線虫におけるPKC/UNC-76 複合体は、軸索伸長と神経束形成機構に重要な役割を果たすと考えている。

【FEZ1 は DISC1 と結合して統合失調症に関与している】

2003 年、我々は海馬の成長円錐で FEZ1 が DISC1 および actin と結合することを見出した。*DISC1*遺伝子は統合失調症の原因遺伝子であり、陽性症状 (幻覚、妄想) と陰性症状 (社会的ひきこもり、認知的機能不全) の両方に関与している。NGF 存在下で PC12 細胞の中で DISC1 の FEZ1 結合領域と FEZ1 を強制発現させると神経様突起伸長は著しく促進された。*FEZ1* mRNA はラット脳の嗅球、海馬、小脳に発現しており、*DISC1* mRNA の発現部位と同じであった。さらに、海馬由来神経培養細胞において、両 mRNA は胎児の軸索形成や神経発達段階で強く発現していた。また、これまでの他の研究者から、軸索形成時の成長円錐で actin 繊維の活発な再構築、actin 繊維の脱重合による軸索の異常形状を誘起が報告されており、FEZ1/DISC1/actin 複合体は成長円錐で actin 繊維の再構築に関与している可能性が高い。さらに、PKCζは actin 繊維構造を維持するために actin 繊維に結合することが示されている。以上から、神経細胞の成長円錐においてFEZ1/PKCζ/DISC1/actin 複合体が、哺乳類の神経回路形成機構の重要部分を担っている可能性が高いと考えている。しかしながら、依然としてFEZ1 が分子としてどの様に機能するかは未解明のままであった。

【FEZ1 は神経細胞のオルガネラ輸送に必須なタンパク質である】

2003 年、Gindhart らはショウジョウバエ由来UNC-76 がキネシン結合タンパク質であることを見出した。キネシンは、オルガネラ輸送のためのモータータンパク質で、キネシン重鎖 (KHC)、キネシン軽鎖 (KLC) から成る。ショウジョウバエでは*unc-76*遺伝子が欠損すると体節の軸索でのシナプス小胞の輸送に異常が生じ、その結果細胞死が起こる。これは*khc*もしくは*klc*をノックアウトしたショウジョウバエの表現形に類似している。以上から、哺乳類神経細胞における FEZ1 とキネシンの相互作用が示唆された。一方、最近、我々はPC12 細胞において FEZ1 がキネシンおよびPKCζと相互作用し、PC12 細胞の細胞体から神経様突起先端へミトコンドリアを輸送するのに必須である事を見出した (藤田ら、J. Cell Biol. 投稿中)。線虫および哺乳類の成熟した神経細胞においてUNC-76 およびFEZ1 は、細胞体と成長円錐に局在していることが知られている。また、海馬由来神経細胞ではシナプス小胞やオルガネラの軸索に沿った成長円錐への輸送は軸索形成時に活発に行われることも知られている。さらに、神経細胞内のオルガネラ輸送やポストゴルジ輸送を抑制すると、軸索の退縮が引き起こされる事も報告されている。以上から、FEZ1 は

哺乳類神経細胞においてキネシン及びPKCζと結合してオルガネラの軸索輸送（少なくともミトコンドリアの順行性輸送）に関与しており、その機能は線虫、ショウジョウバエ、哺乳類で保存されていると考えられる（Fig. 2）。

【FEZ1 の哺乳類ホモログ FEZ2 の機能】

ヒトESTデータベースから、*in silico* 解析によりFEZ1 の哺乳類ホモログとして、fasciculation and elongation protein zeta-2 (FEZ2) が同定された。FEZ2 タンパク質は2つのコイルドコイル領域を持つ、約 42kDaのタンパク質である（Fig.1）。ヒトFEZ2 タンパク質は、ヒトFEZ1 と約 48%、UNC-76 と約 32%の同一性を示す。UNC-76 のC末端側半分（181-385 アミノ酸残基）、ヒトFEZ1 のC末端側半分（160-392 アミノ酸残基）、ヒトFEZ2 のC末端側半分（158-353 アミノ酸残基）は、N末端側半分よりも高度に保存されている（Fig.1）。FEZ2 の機能を明らかにするため、我々はラット主要臓器における *FEZ2* mRNA と *FEZ1* mRNAの発現パターンを比較した。*FEZ1* mRNAと異なり、*FEZ2* mRNAは成体ラットの様々な組織で弱く発現していたが、脳における発現量は *FEZ1* mRNAの 5%未満であった。しかし、FEZ2 はPKCζと相互作用し、FEZ2 と常活性型変異体PKCζを共発現させたPC12 細胞は神経様突起を伸長した。したがって、FEZ2 は非神経細胞でF-actinの構築、オルガネラ輸送に働き、細胞の形態変化や生存維持に関与していると予想された。

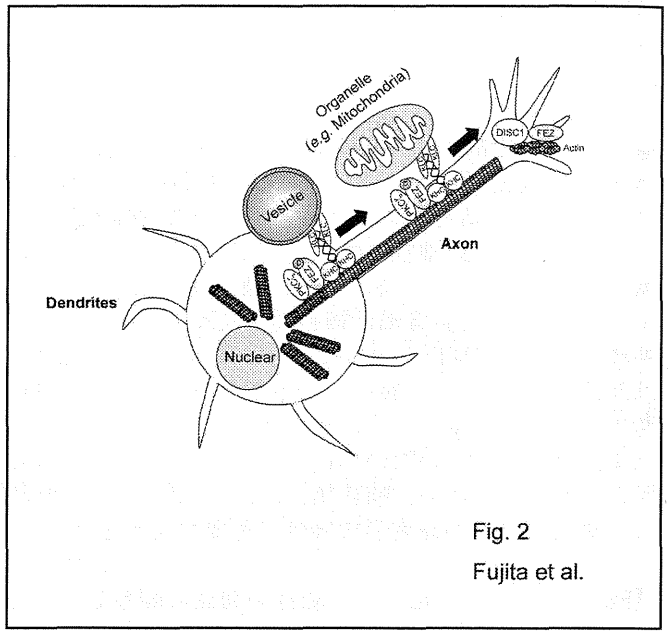


Fig. 2
Fujita et al.

【結論】

UNC-76/FEZ1/FEZ2 タンパク質の構造類似性や機能から、我々は哺乳類神経細胞で FEZ1 を含むタンパク質が軸索伸長機構に関与する仮説を立てた(Fig.2)。

神経細胞は、軸策伸長を誘引する各種刺激によって、細胞体で FEZ1 タンパク質の合成が促進されると考えられる。続いて FEZ1/PKCζ/キネシン複合体がマイクロチューブ上に形成され、オルガネラや小胞の順行性軸索輸送を行う。その後、成長円錐では FEZ1/DISC1/F-actin 複合体が形成され、actin 繊維の再構築が促進されると予想される。しかしながら、このモデルでは PKCζから FEZ1 へのリン酸化シグナルがどのように関与するかは不明なままである。極めて最近であるが、九州大学の中村らは FEZ1 が PKCζによりリン酸化を受け、リン酸化 FEZ1 はユビキチン化酵素 E4 と強く相互作用することを見出した。また、FEZ1 はポリユビキチン化を受けるが、その細胞内安定性は大きく変化せず、ポリユビキチン鎖がリン酸化シグナルのような「情報」として、神経軸策誘導を促進する作用があることを示した。この発見は今後の FEZ1 研究にとり意義深いが、どの様な分子がポリユビキチン鎖を「情報」として受容するのかは不明である。

神経細胞の軸索伸長は神経回路の構築に必須であり、この機構に異常が生じると、様々な神経疾患を引き起こすと考えられる。興味深いことに、FEZ1 は統合失調症原因遺伝子 DISC1 と結合する。KHC 変異も神経疾患に関係している。例えば、HSP（脊髄小脳変性症）は、モーターニューロンやセンサーニューロンの軸索変性によって同定された神経変性疾患の一つであり、ふらつき、痙攣、体力低下などの症状が進行する。更に最近では、共同研究者の北大の鈴木らは神経疾患発症に関与するウイルス JCV の agnoprotein が FEZ1 と神経細胞内で結合し、キネシンと FEZ1 の相互作用を阻害することも見出している。したがって、UNC-76/FEZ1 を含んだ軸索伸長機構の解明は、神経疾患の治療薬の開発に貢献できると期待している。

【謝辞】
本研究成果の大半は、藤田敏次博士、生田潤子氏、アンドレスマツラナ博士、濱田樹理博士によるものであり、ここに感謝いたします。また、本研究班に平成１４年度公募研究で採択されながら、文部科学省在外研究員（長期）に採用により辞退したにも関わらず、このような研究発表の機会を与えてくださり感謝いたします。

A03-41

神経回路形成時の微小管ダイナミクスに対する脂質メディエーターの効果

福嶋伸之

近畿大学理工学部生命科学科

参加年度

平成 15 年度ー16 年度

研究成果の要旨

リゾフォスファチジン酸は神経突起退縮反応をもたらす。この反応には微小管の細胞体への輸送が関与していることが示唆された。またアクチン重合が必要であること、少なくとも部分的に微小管アクチン架橋因子が関わっていることが示された。さらにポリグルタミン酸化チューブリンとアクチンの共存が示され新たな細胞骨格の機能が示唆された。

研究成果

緒言

リゾフォスファチジン酸（LPA）は多様な生理活性を引き起こす細胞外脂質メディエーターである。これまで LPA がアクチン骨格の再編成を促進することにより幼若神経細胞の神経突起形成を制御していることが示されている。しかしながら神経突起の形態変化時にはアクチンのみならず微小管も再編成されていると考えられるが、その詳細は明らかではない。また微小管を構成するチューブリンは様々な様式の翻訳後修飾（チロシン化、アセチル化、ポリグルタミン酸化など）を受けることが知られているが、神経突起形成や形態変化とどのように関わっているか未だ不明である。本研究では LPA が神経突起の形態変化を引き起こすとき種々の翻訳後修飾を受けた微小管がどのように再編成されるかについて検討した。さらに神経突起形態変化における微小管アクチン架橋因子（Microtubule actin-crosslinking factor/MACF）の役割を調べた。

方法

細胞培養；胎生１２日のマウス大脳皮質より調製した培養神経細胞を用いた。また神経上皮株細胞である TR 細胞を用いた。

免疫細胞染色（IC）；細胞を細胞骨格バッファー（10 mM Pipes、150 mM NaCl、5 mM MgCl2、1 mM EDTA、pH6.8）で洗浄し、4%フォルムアルデヒドおよび 1%Triton x-100 を含む細胞骨格バッファーで固定した。細胞にブロッキング溶液を加え、さらに１次抗体、ビオチン化２次抗体と連続して反応させた。Alexa488 標識ストレプトアビジンおよびローダミン標識ファロイジンを加えて抗原およびアクチンを可視化した。

遺伝子導入；pflag-CMV-1 を用いて作製した MACF の種々のコンストラクトを lipofectoamine2000 を用いて TR 細胞に発現させた。方法はプロトコールに従った。

細胞からのタンパク質抽出とウエスタンブロッティング（WB）；細胞を細胞骨格バッファーで１度洗浄し、さらに細胞骨格安定化バッファー（20%グリセロール、５%DMSO、0.5% Triton x-100 およびプロテアーゼ阻害剤ミックスを含む細胞骨格バッファー）で可溶化した。20,000 xg にて遠心し、上清（可溶性画分）お

よび沈殿（細胞骨格画分）に分離した。それぞれにSDS-Laemmliバッファーを加え、WBに用いた。

抗体；用いた抗体と使用濃度は次の通りである。抗αチューブリン抗体 DM1A、1μg/ml（IC）、100ng/ml（WB）;抗βチューブリン抗体TUB2.1、1:400（IC）、1:2,000（WB）;抗βチューブリンタイプIII抗体SDL.3D10、1:400（IC）；抗アセチル化チューブリン抗体 6-11B-1、1:1,000（IC）、1:10,000（WB）；抗チロシン化チューブリン抗体TUB-1A2、1:1,000（IC）、1:10,000（WB）；抗ポリグルタミン酸化チューブリン抗体B3、1:1,000（IC）、1:10,000（WB）；抗MAP2(2a+2b)抗体AP20、1μg/ml（IC）；抗FLAG抗体M2、1μg/ml（IC）、100ng/ml（WB）；ビオチン化標識抗体、5μg/ml（IC）、パーオキシダーゼ標識抗体、100ng/ml（WB）。

結果と考察

幼若神経細胞内における各種チューブリンの分布とLPAによる再編成

LPAによる神経突起退縮反応は培養日数の短い（幼若の）神経細胞において認められる反応である。この反応はアクチンの再編成に依存しており、アクチンを含む退縮微小突起の形成をともなうことが知られている（MCN,2002,20,p271）。この幼若神経細胞内における微小管の分布を免疫細胞化学的に調べた。最初に全微小管を検出するために抗αチューブリン抗体を用いた。約 29%の神経細胞が細胞体直径よりも長い神経突起を有していたが、微小管はこれらの突起から細胞体までほぼ全体に分布していた（図1A）。突起を持たない、あるいは短い突起を持った細胞においてもほぼ全細胞領域に分布していた。しかしながら神経突起先端部ではアクチンの分布に対して微小管の存在はほとんど認められず、軸索の成長円錐で報告されているアクチンおよび微小管の存在様式と類似していた（図1B）。LPAを15分添加したとき、神経突起の退縮、細胞の円形化と退縮微小突起の形成が見られ（図1C）、予想した通り、微小管を含む神経突起を有する神経細胞数の減少（10.5%）が観察された。また退縮微小突起内には微小管の存在はほとんど検出されなかった（図1D）。同様の細胞内分布およびLPAに対する反応は、抗チロシン化チューブリン抗体を用いたときにも得られた（結果示さず）。続いて安定化した微小管に存在することが知られているアセチル化チューブリンについて同様の検討を行った。アセチル化チューブリンの分布はチロシン化チューブリンのそれとは異なり、神経突起内でもより細胞体に近い箇所に認められた（結果示さず）。しかしながらLPAに対する反応性は全微小管、チロシン化チューブリンの場合と同じであった（結果示さず）。また退縮微小突起内にこの種のチューブリンは存在しなかった。最後にポリグルタミン酸化チューブリンの分布を調べた。このチューブリンの機能や神経細胞内における詳細な分布は未だ明らかではないが、他の細胞では運動性の制御に関わっていることが報告されている。幼若神経細胞におけるポリグルタミン酸化チューブリンは神経突起から細胞体まで全体に分布していたが、αチューブリンのそれとは異なり神経突起の先端部ではアクチン共存しているようであった（図2A、B）。特に突起成長方向に太い繊維状構造を呈していた。これらを含む神経突起もLPAに対して退縮反応を示したが、興味あることに退縮微小突起内においてポリグルタミン酸化チューブリンはほぼアクチンと重なって分布していたのみならず、アクチンより外側にまで存在していた（図2C、D）。興味あることにサイトカラシンD（CD）で細胞を処理したとき、CDに抵抗性を示すアクチンとポリグルタミ

ン酸化チューブリンは常に共存していた（結果示さず）。このようなアクチンと共存するチューブリンの存在はこれまで知られておらず、その役割は全く不明である。またアクチンと物理的に連関しているかどうかも明らかではない。ポリグルタミン酸修飾はグルタミン酸の数に多様性があり、現在これらの違いがチューブリンの機能や分布に影響している可能性について検討している。

LPAによる微小管再編成

LPA による微小管の再編成が脱重合を伴うのかどうかについて検討した。LPA 処理前後の細胞から細胞骨格画分および可溶性画分を調製し、それぞれに含まれるαチューブリンの量をウエスタンブロッティングにより調べた。LPA 処理前後で両画分のチューブリンの量に顕著な変化は認められなかった（図３）。チロシン化およびポリグルタミン酸化チューブリンに関しても同様であった（結果示さず）。さらに微小管を重合、安定化させるタクソールで前処理をした神経細胞に対する LPA の作用を調べた。タクソール処理は染色時の蛍光強度を上昇させるとともに細胞骨格画分のαチューブリン量の増加をもたらした（図３）。これらの細胞に対して LPA は非処理時と同様に神経突起の退縮を引き起こすとともに（結果示さず）、細胞体における染色強度の上昇（約２８％）をもたらした。一方、タクソール非処理細胞と同様に、細胞骨格画分におけるαチューブリン量に変動は見られなかった（図３）。これらのことは LPA が微小管の脱重合を促進しないこと、むしろ重合した微小管の細胞体への輸送を促進していることを示唆している。

微小管とアクチン

LPA による微小管再編成がアクチン再編成（重合）に依存しているかどうかを検討するため、あらかじめ CD で細胞を前処理し LPA の作用を調べた。CD の前処理は LPA による微小管再編成を完全に抑制したことから（結果示さず）、アクチンと微小管の連関が考えられた。このことを詳細に調べるために、細胞骨格架橋因子である MACF の微小管結合ドメインを神経上皮株細胞に発現させ LPA の微小管再編成に対する効果を観察した。細胞内においてこのドメインは微小管との共存を示したのみならず微小管の安定化をもたらした。さらにこの細胞は LPA による微小管崩壊に対して抵抗性を示した（図４A）。興味あることにこのドメインを発現した細胞では LPA によるアクチンの再編成は正常細胞と同様に認められた（図４B-D）。これらの結果は LPA によって活性化されたシグナルがアクチンから MACF を介して微小管へ伝達されることにより再編成が起こり、神経突起の退縮が生じることを示唆している。

まとめと展望

LPA による神経突起内の微小管の再編成は微小管の脱重合によるものではなく細胞体への輸送によることが示唆された。このとき微小管アクチン架橋因子が関与している可能性が示された。一方、種々の翻訳後修飾を受けるチューブリンのうち、ポリグルタミン酸化チューブリンはアクチンと共存していることが初めて明らかにされた。この種のチューブリンは細胞の運動性などに関与していると考えられるため、アクチンとの相互作用を介して細胞形態や運動を制御しているかもしれない。この点を検討し、細胞外メディエーターによる細胞骨格制御がどのように神経回路形成に影響しているかについて明らかにする。

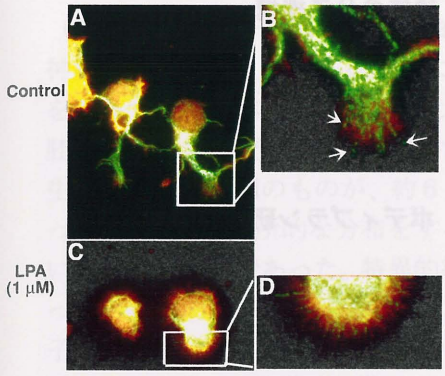


図１　大脳皮質由来の幼若神経細胞におけるαチューブリンの分布。対照（A、B）およびLPAを添加した（C、D）神経細胞を固定しαチューブリン（緑）およびアクチン（赤）を染色した。図は両者を重ね合わせたものである。BおよびDはそれぞれAおよびCの拡大図である。矢印；神経突起先端部に存在する微小管。

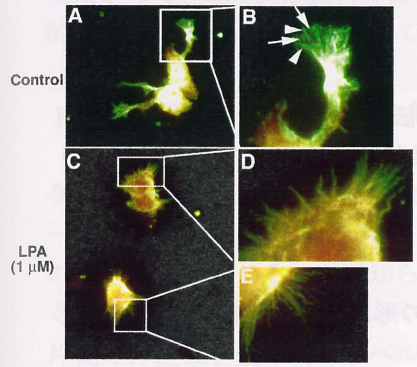


図２　大脳皮質由来の幼若神経細胞におけるポリグルタミン酸化チューブリンの分布。対照(A、B)およびLPAを添加した(C-E)神経細胞を固定しポリグルタミン酸化チューブリン（緑）およびアクチン（赤）を染色した。図は両者を重ね合わせたものである。B、DおよびEはそれぞれAおよびCの拡大図である。矢印；神経突起先端部に存在するポリグルタミン酸化チューブリン。

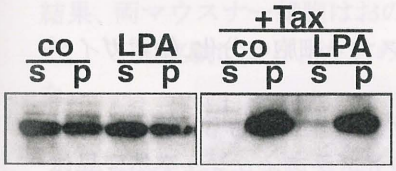


図３　大脳皮質神経細胞の可溶性画分（s）および細胞骨格画分（p）におけるαチューブリンに関するウエスタンブロッティング。LPAを添加しても細胞骨格画分のチューブリン量に変化は見られない。

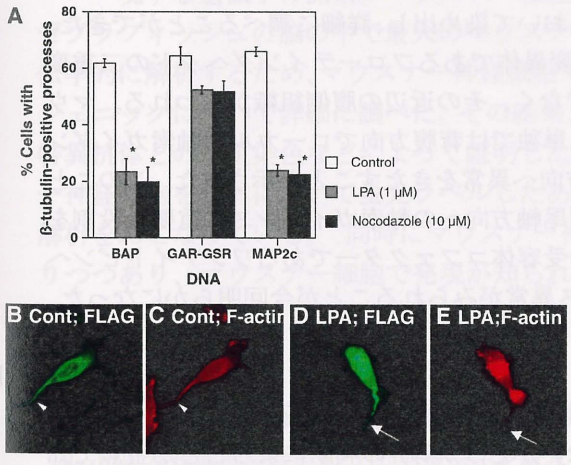


図４　MACFの微小管結合部位（GAR-GSR）を発現させたTR細胞におけるLPAの突起退縮作用。A；LPAあるいはノコダゾールを15分間添加したときの突起を有する細胞の割合。対照としてBAPおよびMAP2cを用いている。発現させた分子にはFLAGタグを結合させている。B-D；代表的なGAR-GSR発現細胞のLPAに対する応答。

表題（研究課題）　Identified Neuron の個性獲得・発現・維持の分子機構

研究代表者名　　八田公平

所属　　理化学研究所　発生・再生科学総合研究センター　ボディプラン研究グループ

特定領域「神経回路」参加年度

平成１５年度-平成１６年度

研究成果の要旨

ゼブラフィッシュのマウスナー細胞のイメージング、変異体、遺伝子発現解析により、軸索の頭尾方向へのターニングに中枢神経系の腹側組織が重要な役割を果たすこと、また行動解析により逃避方向選択の視覚情報による modulation を初めて明らかにした。

研究成果

マウスナー神経細胞が中心的役割を果たす逃避行動の神経回路の形成機構と機能について以下のような成果を得た。

（１）マウスナー細胞特異的モノクローナル抗体をもちいたマウスナー細胞の分化、軸索ガイダンスに異常をきたす突然変異体の探索。

神経細胞が特定の位置に特定の数だけ分化した後、そのアイデンティティを維持し、特異的な軸索伸張や樹状突起形成をおこす仕組みを解析するため、いくつかのゼブラフィッシュ突然変異体とそれらの二重変異体について同定可能な神経細胞への影響を調べた。特異的抗体をもちいることによって、マウスナー細胞をホールマウント胚において染め出し、詳細に調べることができた。フロアプレートのないサイクロプスと脊索を欠く変異体であるフローテイングヘッドの二重変異体では、正中軸（脊索、フロアプレート）だけでなく、その近辺の腹側組織が失われる。マウスナー細胞の軸索ガイダンスは、どちらの変異体も単独では背腹方向でローカルな軸索ガイダンス異常を示すが、二重変異体では、むしろ頭尾軸方向へ異常をきたすことが示された。このことは、フロアプレートより背側に存在する細胞群が頭尾軸方向への軸索ガイダンスに重要な役割を果たしていることを示唆している。また、ノーダル受容体コファクターであるワンアイドピンヘッドの突然変異体においても、特徴的なガイダンス異常がみられることが今回明らかになった。

（２）逃避行動における視覚の役割。

マウスナー細胞が中心的な働きをする逃避行動は単なる反射運動ではなく例えば、右・左のどちらに逃げるかは、まわりの状況（壁などが近くにないかどうか等）の判断によることが金魚で知られている。しかしながら、その状況判断が側線によるのか、視覚によるのかは全くわかっていなかった。私達は、まず、ゼブラフィッシュにおいても同様な行動変化がおこることをしめした。赤外線カメラをもちいて、暗闇の中で、視覚が使えない状態にしたときの行動変化について詳しい観察を行い、魚は視覚をもちいて壁の位置を認知し、逃避の方向にあらかじめバイアスをかけていることを初めて明らかにした。

（３）マウスナー細胞の分化、軸索ガイダンスに異常をきたす突然変異体の探索。
神経細胞誕生のとき側方抑制によって神経細胞の数を制御する役割をもつノッチーデルタ経路を阻害する変異体や、我々が新たにデザインしたNotch１aに対するモルフォリーノを注入した胚を調べた。そのうちのひとつでは、同定可能な神経細胞であるマウスナー細胞が最大３０倍(野生型では左右２個のものが、約６０個）まで増えることを示した。これは、予想以上に多数であった。細胞体が異所的な分布をするものもあったが、後脳の第４節に左右側方に誕生してくるという性質は不変であった。特異的抗体をもちいて調べた軸索ガイダンスも一見異常であるが、もっとも基本的なパタン（まずフロアプレートを越えてから、尾方へ曲がる）および、マーカー分子の発現には変化がなく、個々の神経細胞のアイデンティティは保たれていることが示された。したがって、この突然変異体は、特異的神経細胞分化や基本的回路形成を制御する遺伝子を系統的に解析するための材料として、非常に優れていることが示された。

（４）光転換法をもちいた、一般的神経発生と神経回路形成の研究とマウスナー細胞発生起源の研究。
ケージド蛍光色素とGFP発現トランスジェニック魚を用いたイメージングによって、マウスナー細胞の起源について調べた。ゼブラフィッシュにおいては神経管形成の時期に左右の神経板の細胞が入り交じることが知られている。しかしながら、マウスナー細胞が左右両方からやってくるのか、あるいは、片方からやってきて両方へ分配されるのかは知られていなかった。私達は、片側の神経板を全体的にラベルすることにより、このことを直接的に調べることを試みた。その結果、両マウスナー細胞はおのおの左右の神経板に由来し、正中線を超える例は見つからなかった。この実験により、左右のマウスナーが別の細胞系譜から生じてくることが初めて証明された。

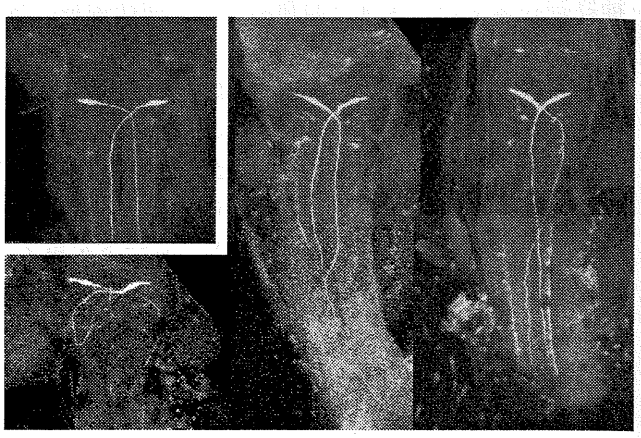
（５）マウスナー細胞でGFPを発現する魚の系統の研究、および、マウスナー細胞で特異的に発現する遺伝子の探索。マウスナー細胞で特異的に遺伝子を発現させる方法の開発。
ゼブラフィッシュの脳の中で最大のマウスナー神経細胞の発生と機能を分子生物学的、ないし遺伝学的に解析するため、マウスナー神経細胞でGFPを発現する可能性のあるいくつかのトランスジェニックについて詳細に調べた。その結果、いくつかのラインで特徴的な発現していることを特異抗体との二重染色などによって証明した。また、バックフィル等の技術によって、マウスナー神経細胞を生体において蛍光ラベルしたあと細胞体を集め、cDNAライブラリーの作成とその解析をおこなっている。同時にマウスナー神経細胞で遺伝子を強制発現させるシステムをつくりつつあり、マウスナー細胞で発現が知られている遺伝子の機能解析を開始している。

共同研究

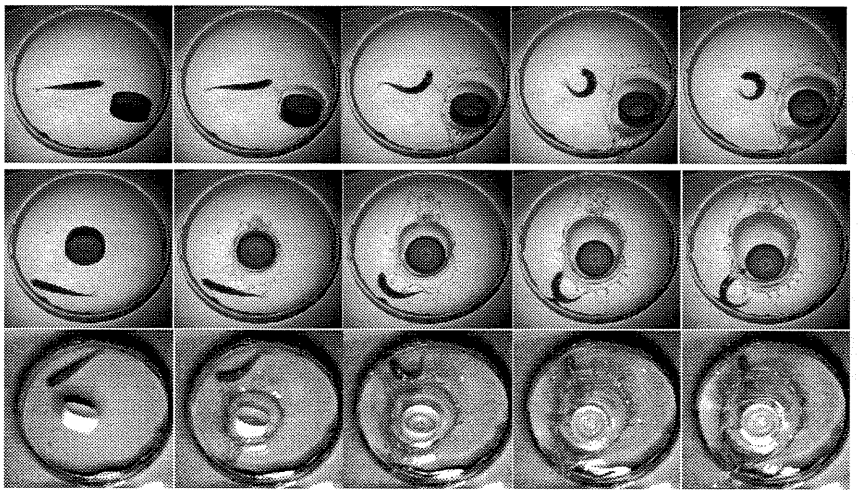
弥益　恭　埼玉大学理学部生体制御学科

「Hoxb1b 発現制御領域をもつEGFP遺伝子を組み込んだトランスジェニックゼブラフィッシュの解析」
Hoxb1bはもっとも初期に発現するHox遺伝子のひとつで、とくに、後脳４節のidentity決定および、マウスナー細胞の分化に重要な役割を果たしている。今回、二重免疫染色や、イメージング技術をもちいて、上記系統において、Hoxb1bプロモーターが２つの波にそって発現すること、２番目の波においては、マウスナー細胞をふくむいくつかの神経細胞で特異的に発現することを初めて明らかにした。

図版１　（左）マウスナー細胞における *Hoxb1b:EGFP* の特異的発現。　図版２（右）*oep* 突然変異体における軸索ガイダンス異常（左上に野性型を示す。モノクロナール抗体染色）。



図版３　逃避行動における運動方向決定に対する視覚による modification。上図：通常の条件下における刺激から離れる向きの逃避行動。中図：壁が近いと、latency を犠牲にせずに刺激に向かって逃げる決断をすることができる。下図：暗闇での同様の実験を赤外線カメラで追ったもの。視覚を使えない条件下では、壁の存在を認知できず、壁に頭をぶつけてしまう。



A03-43

中枢神経系の層形成過程においてニューロンが特定の層を認識する分子メカニズムの研究

中川真一

独立行政法人理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・高次構造形成研究グループ

特定領域「神経回路」参加年度

平成15年度ー平成16年度

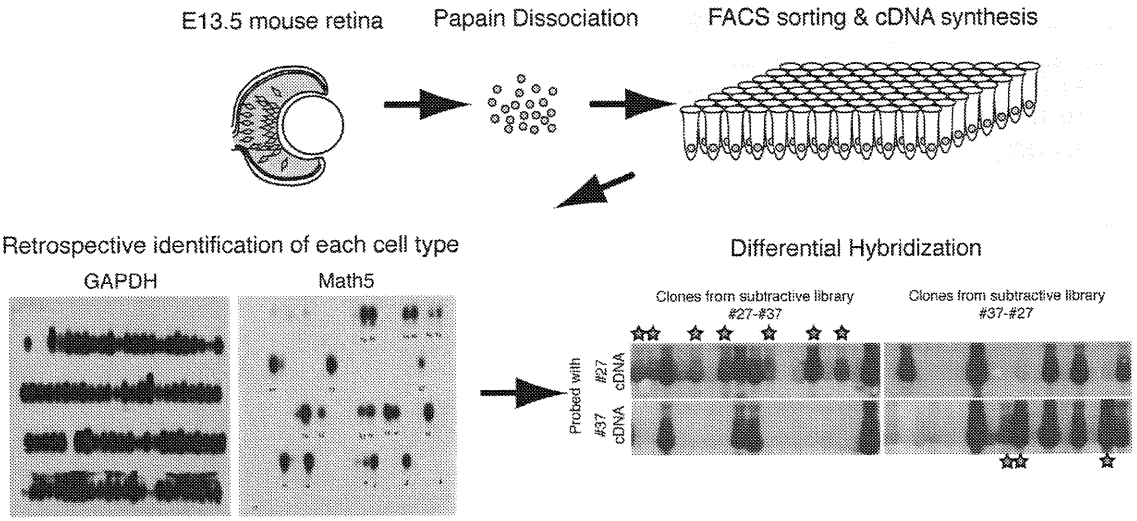
研究成果の要旨

網膜の層形成時にニューロンが特定の層を認識するメカニズムを調べるため、単一細胞由来のcDNAを合成し、それらを用いて作製したサブトラクションライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、複数の細胞タイプ特異的な発現を示す候補遺伝子を得ることが出来た。

研究成果

網膜の発生過程において、視細胞と神経節細胞は同じ神経上皮のアピカル側で最終分裂を行うにもかかわらず、その後正反対の方向へ移動しそれぞれの細胞タイプに特異的な層を形成する。この細胞タイプ特異的な振る舞いを制御する分子メカニズムを明らかにするために、層形成時においてそれぞれの細胞で特異的に発現する遺伝子を同定することを試みた。まず、発生初期の網膜を単一細胞に解離し、それぞれの細胞からcDNAを合成した。次にそれぞれのcDNAにおけるマーカー遺伝子の発現をサザンブロットで調べ、細胞タイプを遡及して同定した。さらに、予定視細胞と予定神経節細胞由来のcDNAを用いてサブトラクションライブラリーを作製し、ディファレンシャルスクリーニングによって各細胞タイプに特異的に発現する遺伝子を複数同定することに成功した(図1、表1)。

図1　実験の流れの模式図



次に、得られた候補遺伝子の網膜における発現を調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、複数の候補遺伝子が予定視細胞、および予定神経節細胞で発現していることが確かめられた(図2)。それらのうちの大半は機能が未知の遺伝子であり、今後、これらの遺伝子の機能解析を行うことによって、網膜の細胞タイプ特異的な振る舞いがどのようにしてコントロールされているかを明らかにしてゆく予定である。

図2 得られた遺伝子のマウス14日目胚網膜における発現パターン(抜粋)

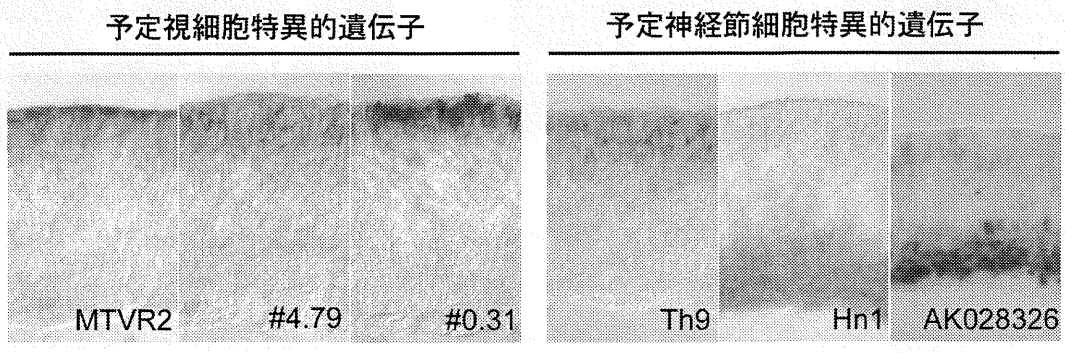


表1 細胞タイプ特異的に発現していた遺伝子のリスト

(1) 予定神経節細特異的に発現する遺伝子群

Clone/gene name	Description
#7.60	No database-matches.
AK028326	10kb Non-coding RNA. Nuclear localization
Th9	Contains ubiquitin-ligase associated domain. Unknown function.
HN1	Contains proline-rich domain. Unknown function.
Septin5	Neuron specific form of a cytoskeletal protein septin.
Evl	Ena-Vasp like protein. Regulates actin cytoskeleton.
SOX10	Transcription factor.

(2) 予定視細胞特異的に発現する遺伝子群

Clone/gene name	Description
#4.79	No database-matches.
#0.31	No database-matches.
MTVR2	Mammary tumovirus receptor 2. Unknown physiological function.

A03-44

表題（研究課題）　神経幹細胞に内在する時間的な発生プログラムの解明

研究代表者名　一色　孝子

所属　情報システム研究機構・国立遺伝学研究所・系統生物研究センター

特定領域「神経回路」参加年度

平成１５年度　平成１６年度

研究成果の要旨

種を超えて細胞の時間特異性の決定に関与すると考えられる因子を新規に同定し、その結果、ほとんど未解明であったショウジョウバエ胚発生期後期の神経幹細胞の時間変化を、一連の転写因子群の発現パターンの分裂ごとの切り替えという分子表示に変換して捉えることができた。

研究成果

(1)　研究目的

発生過程において、神経幹細胞の個性は常に一定ではなく時間とともに変化していく。このため、一つの幹細胞は多様な子孫神経細胞を一定の順番で作り出すことができる。例えば、哺乳類大脳では、一個の神経幹細胞はより表層へと移動すべき細胞ほど遅く作り出していく。その結果として整然とした皮質層構造が形作られる。このように、神経幹細胞が刻々と変化する機構は神経回路網の基盤を作る遺伝的発生プログラムであるが、その分子メカニズムはいまだ多くが未知である。特に、高等動物においては、個体中で特定の幹細胞系譜を再現的に追跡することすら困難であることがメカニズム解明の大きな障害となっている。本研究では、神経幹細胞が全て同定可能で、その細胞系譜が遺伝的に規定されているショウジョウバエ胚中枢神経系をモデル系に用いることにより、この神経幹細胞系譜が刻々と形成されるための分子メカニズムを明らかにすることを目指してきた。

ショウジョウバエ胚性神経幹細胞は、時間的に変化することによって、分裂ごとに異なる姉妹神経前駆細胞を順次生み出す（図１）。神経前駆細胞は通常一回のみ分裂して、２つの神経細胞あるいはグリアとなる。以前、我々は、神経幹細胞系譜形成の前半において、ほぼ全ての幹細胞が、Hunchback、Krüppel、Pdm、Castor という４種の転写因子を順次発現し、これらの転写因子の発現を分裂とカップルして自律的に切り替えること、一方、姉妹前駆細胞は、生まれたときに幹細胞から受け継いだ転写因子の発現を維持して神経細胞に引き継ぐことを報告した（図１）。この仕組みによって前半の各転写因子は細胞に時間特異性を与えていることがわかっていた。

しかしながら、神経幹細胞は Castor 発現開始以降も胚発生期だけでも平均して１０回程度分裂することから、後期特異的に発現して時間的個性を与える未知因子が存在することが予想されていた。また、各転写因子の発現制御や、各転写因子が神経系細胞に与える個性の実体もあまり明らかになっていない。そこで、本研究では、新規の時間特異性決定因子とその下流因子を同定することを目的として、転写産物の発現パターンを指標にして神経系で広範囲に時期特異的に発現される遺伝子をゲノムワイドに探索した。その結果、時期特異的に発現される因子を新たに数種見いだした。さらに、この発見をもとに、ほとんど不明であった Castor 発現以降の系譜形成後期過程を一分裂ごとの精度で詳細に明らかにし、系譜形成後期過程においても、

前半と同様に、転写因子の発現の組み合わせが分裂ごとに切り替わる仕組みが働いていることを示す結果を得た（図１）。

(2)　研究結果と考察

1. 胚中枢神経系で広範囲に発現し、その発現が時間的に変化する遺伝子のゲノムワイドな検索

ショウジョウバエの胚発生期に発現していると予測されている遺伝子全体の約５０％について、転写産物の胚発生期におけるおおまかな時空間的発現パターンの公開データベース化が完了している。このデータベースにもとづいて、神経系で広範囲に時期特異的に発現している遺伝子候補を選択し、*in situ* hybridization を前述の４種の転写因子や細胞種マーカーを用いた染色と組み合わせて行い、各遺伝子を発現している神経系細胞の種類や時期を特定した。その結果、これまでのところ、ホメオドメイン型転写因子遺伝子 *cut* と線虫 *heterochronic* 遺伝子のショウジョウバエホモログ３種 *lin-28*、*lin-29*、*lin-41* を目的の新規遺伝子として同定している（各遺伝子の詳細については後述）。Lin-28、Lin-29、Lin-41 についてはそれぞれのタンパクに対する抗体を新たに作製し、これら３つと *cut* 遺伝子翻訳産物も時期特異的に発現されていることを確認した。

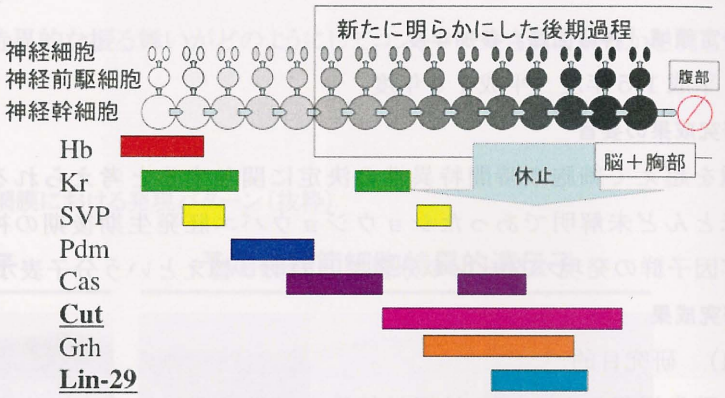


図１　神経幹細胞系譜形成と転写因子の発現

神経幹細胞での各転写因子の発現は子孫分化細胞に受け継がれる。Hb:Hunchback, Kr: Krüppel, SVP:Sevenup, Cas: Castor, Grh: Grainyhead

2. 神経幹細胞系譜形成後期過程の解析

新たに見いだした遺伝子産物のうち、Lin-29 と Cut は後期特異的に神経幹細胞から発現され、前半の転写因子群と同様に、神経幹細胞における発現が子孫神経細胞に受け継がれていた。同様な発現を示すものとして転写因子 Grainyhead が報告されていた。また、我々は、前半で発現されていた転写因子 Krüppel と Seven-up が後期に再び発現されることも見いだしていた。そこで、系譜形成後期過程を分子レベルで明らかにすべく、これら一群の転写因子の発現順序を特定の幹細胞系譜において詳細に解析した。その結果、胚発生のほぼ終了に至るまでの神経幹細胞の時間変化を、一連の転写因子の発現パターンの連続的な変化という分子的なかたちでとらえることができた（図１）。さらに、転写因子の発現の組み合わせが、幹細胞では分裂ごとに変化する一方で、分化細胞では幹細胞から受け継いだ発現が維持される仕組みが、系譜形成過程全般を通して働いていることがわかった。従って、神経幹細胞による細胞多様性創出のメカニズムを考える上で、転写因子群に対する幹細胞／分化細胞における非対称的な発現制御機構の解明がますます重要な課題として浮上している。以上のことに加え、上記の解析結果によって、

後期過程における各転写因子の機能や発現制御を一分裂単位の精度で調べることがようやく可能になった。現在、我々は、後期特異的転写因子群の遺伝子変異体を入手または作製し終えており、各転写因子の機能と相互制御関係について分子遺伝学的に調べを進めている。

胚発生の終了とともに腹部の幹細胞が細胞死を起こす一方で、多くの脳と胸部の幹細胞は、一旦休止した後、幼虫期後期に再び活性化して成虫に必要とされる神経細胞群を産生する。後期特異的転写因子群 Castor、Cut、Grainyhead、Lin-29 は、胚発生期のみならず、幼虫期以降に産生される細胞群でも発現していた。このことから、神経幹細胞は、ある特定の時点で休止期に入り、自身がどこまで時間変化していたかという記憶を保持したまま休眠を続け、数十時間後に再活性化されるとその記憶に従って続きの時間変化をはじめることが強く予想される。今後は、前述した後期特異的転写因子の発現を指標にして、幹細胞の休止と再活性化、胚性幹細胞から幼虫型幹細胞への変容、幼虫—蛹期における逐次的系譜形成、の３つの分子メカニズムについても探求する。

3. 時間的な発生プログラムの種を超えた保存性

新規に時期特異的に発現することを見いだした *cut* のマウスホモログおよび線虫 *heterochronic* 遺伝子 *lin-28*、*lin-29*、*lin-41* は、時間的な発生プログラムにおいて機能していることが示されている。従って、本研究が対象とする時間的発生プログラムは、種を超えて広く保存されている基本的メカニズムである可能性が強く示唆された。

a. ホメオドメイン型転写因子 Cut

cut は、ショウジョウバエ幼虫末梢神経系において細胞運命決定に関わる遺伝子として古くから報告されていた。また、２００３年には末梢神経系神経細胞の樹状突起のクラスの決定において重要な役割を担っていることが明らかにされ、この役割は種を超えて保存されていることが強く示唆されている。非常に興味深いことに、ごく最近、Cut のマウスホモログである Cux1、Cux2 が、大脳皮質において、第 II 層から第 IV 層に属する誕生時期の遅い神経細胞で特異的に発現されていることが報告された。すなわち、Cut/Cux は非常に類似した時間的発現を示すことが明らかになった（図２）。この類似の意義はまだ不明であるものの、ショウジョウバエと哺乳類の神経系の時間的発生においてこういった高い類似性が認められた分子は、Cut/Cux が初めてといってよい。しかしながら、Cut/Cux の中枢神経系における機能は全く解明されていない。ショウジョウバエでは、Cut を発現している神経細胞のほとんどは、分節境界をこえない短

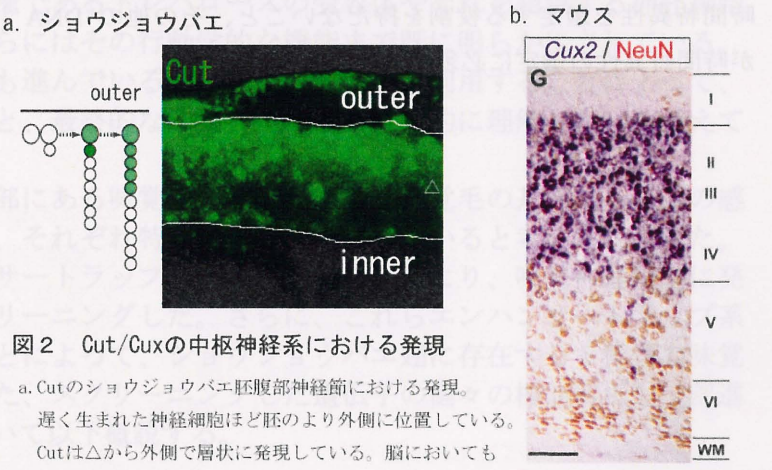


図２　Cut/Cuxの中枢神経系における発現

a. Cutのショウジョウバエ胚腹部神経節における発現。遅く生まれた神経細胞ほど胚のより外側に位置している。Cutは△から外側で層状に発現している。脳においても同様の層状の発現が認められる（data not shown）。

b. Cux2の大脳皮質における発現

Zimmer C. et al. Cerebral Cortex Epub (2004)

い軸索を持つ介在神経であると思われる。以上のことから、今後、今回明らかにした系譜形成過程において Cut の機能を探求していくことにより、高等動物を含めた逐次的細胞系譜形成およびその神経回路網構築への寄与に関する重要な知見を提供できると期待している。

b. 線虫 *heterochronic* 遺伝子ショウジョウバエホモログ *lin-28*、*lin-29*、*lin-41*

線虫 *heterochronic* 遺伝子群は、線虫の幼虫発生において細胞に時間的個性を与える役割を持つ遺伝子群である。現在、我々は *lin-28*、*lin-29* について重点的に解析を進めている。

Lin-28 は RNA 結合タンパク質であり、ほぼ全ての Hunchback 陽性の神経分化細胞特異的に発現され（図３）、その発現は Hunchback によって正に制御されている。

Lin-29 は、Krüppel に比較的類似した C_2H_2Zn フィンガーモチーフを持つ転写因子であり、Lin-29/Krüppel ではこの C_2H_2Zn モチーフが DNA に直接結合する部位であると考えられている。しかし、Lin-29 と Krüppel の発現時期は全く違うため（図３）、Lin-29/Krüppel はそれぞれ異なる時間特異性の決定に関与しているはずであり、実際、そのことを支持する結果を得ている。そこで、これらのタンパクのどの部位に固有の時間特異性の選定に関わる部位が存在しているかを特定する目的で、Lin-29/Krüppel のキメラタンパクをコードするトランスジーンを持つ株を作製し、各キメラタンパクの機能を分子遺伝学的に解析した。その結果、C_2H_2Zn フィンガーモチーフは交換可能であって時間特異性を選定する役割を持たないこと、その他の DNA に直接結合しないと予想される部分が時間特異性の選定に必須であることがわかった。

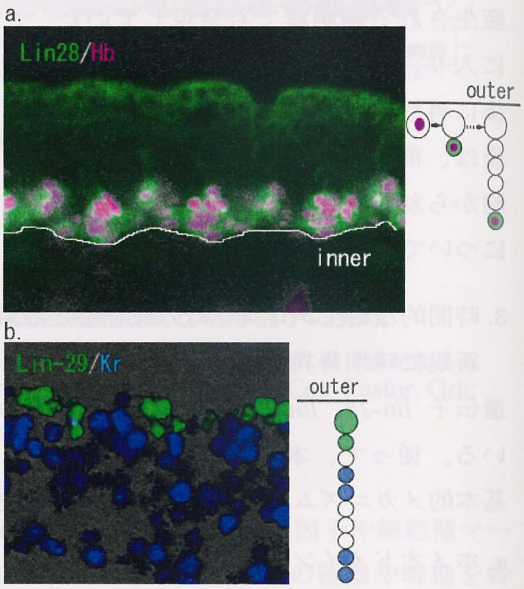


図３　heterochronic遺伝子ホモログの発現

a. ステージ１２胚におけるLin-28の発現。Lin-28（緑）はHunchback（Hb、紫）を発現している神経細胞の細胞質に局在する。

b. ステージ１７胚におけるLin-29の発現。Lin-29（緑）はKruppel(Kr、青）を発現している細胞よりも表皮側に位置する、より遅い時期に産生される神経細胞の核に局在している。

A03-45

ショウショウバエ感覚神経細胞の誕生からネットワーク形成まで

中村　真

自然科学研究機構・基礎生物学研究所・発生生物学研究系

特定領域「神経回路」参加年度　平成 15 年度 ~ 平成 16 年度

研究成果の要旨

ショウジョウバエ味覚神経細胞に特異的にレポーターを発現する系統を167系統単離した。成虫翅前縁部に存在する５種類の神経細胞をレポーター遺伝子の発現を指標に識別することができた。これらの系統は、今後、味覚研究の重要なツールとして利用されることが期待される。

研究成果

ショウジョウバエの末梢感覚器官は一層の上皮細胞組織から誕生し、その場に応じた誘導を受け、機械感覚器や化学感覚器へと分化する。この神経細胞の誕生から、運命決定までの過程は、神経発生学のなかでも非常に研究が進んでおり、いくつもの重要な機構が明らかにされている。神経幹細胞からの非対称分裂による神経細胞の分化、および細胞系譜の研究などはそのよい例であろう。ショウジョウバエの成虫の体表を覆う組織は、成虫原基と呼ばれる未分化な細胞塊から変態過程を経て形成される。我々は、翅成虫原基と、脚成虫原基における末梢感覚神経器官、神経細胞形成に特に興味を持って研究してきた。これら組織から形成される末梢感覚器は、単一神経に支配される機械感覚器と複数の神経支配を受ける化学感覚器に大別される。これまで、多くの研究は機械感覚器形成における細胞分化と誘導機構に焦点が当てられてきた。それに比べて、化学感覚器の分化機構に関する研究は比較的遅れている。これらの化学感覚器は主に水溶性の化学物質を検知するための器官で、味覚器と一般に呼ばれている。一方、ショウジョウバエ味覚器の研究はこれまで、主に口吻に存在する味覚器の、主に生理学的な解析を中心に研究されており、糖の一種であるトレハロースの受容体やそれを発現する神経細胞（＝糖受容細胞）の存在、さらにはその行動学的な機能まで既に明らかにされている。我々は、発生学的な解析が最も進んでいる翅、脚、成虫原基を利用することによって、末梢感覚神経細胞の発生機構と、最終的な機能分化機構を統合的に理解したいと考えている。

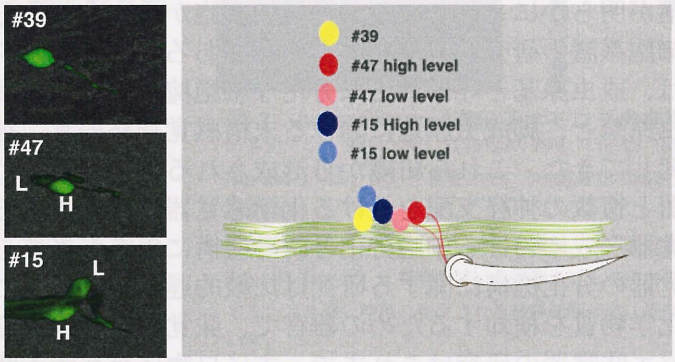
ショウジョウバエの翅前縁部にある味覚受容器は、一本の感覚毛の基部に５種類の感覚神経細胞の細胞体が存在し、それぞれ特異的な機能を担っていると考えられてきた。本研究では、まず、エンハンサートラップ法を利用することにより、味覚神経細胞に発現する遺伝子を網羅的にスクリーニングした。さらに、これらエンハンサートラップ系統をマーカーとして用いることによって、ショウジョウバエ翅に存在する５種類の味覚神経細胞の識別を行った。また、スクリーニングした遺伝子の個々の機能解析も一部進めている。それらの結果について以下概説する。

（エンハンサートラップスクリーニング）

これまでのスクリーニングの結果、ショウジョウバエ翅、脚に存在する味覚器に特異的に発現するエンハンサートラップ個体に注目して、約 5,000 系統の新規 P 因子挿入個体の解析を終了した。5,000 系統中、約 1 割の個体が、翅もしくは脚の感覚神経組織にレポーターの発現を示した。最終的に、コンフォーカル顕微鏡を用いて個々の神経細胞レベルでのスクリーニングを行い、味覚神経細胞中何個の神経細胞（または補助細胞）での発現がみられるかを検討した。その結果、味覚神経クラスター中で、1 個の神経細胞でのみ発現が見られるもの（10 系統）、2 個の神経細胞（13 系統）、3 個の神経細胞（3 系統）、4 -5 個の神経細胞（57 系統）、付属細胞で発現（27 系統）、付属細胞と神経細胞で発現（12 系統）がそれぞれ得られた。P 因子の挿入箇所は上記の系統を含む 167 系統に関して Inverse-PCR によって検討した。その結果、129 系統(77%)に関して挿入部位が判明した。これらがトラップしている遺伝子の機能別プロファイルをみると、細胞接着に関与すると思われるものが 19%、転写因子など遺伝子発現調節に関与するものが 14%と比較的高い割合で含まれていた。これに対して、神経機能（12%）やシグナル伝達（9%）に関与するものの割合は予想に反してそれほど多くは含まれていなかった。

（味覚神経細胞の識別）

翅前縁部に存在する味覚神経クラスターに関して、エンハンサートラップを用いた細胞識別を行った。実際には、スクリーニングした中から、5 個の神経細胞クラスター中の 1 個で発現する系統 10 系統、2 個で発現する系統 13 系統に注目して、発現解析を行った。これらのエンハンサートラップ系統に於けるレポーター遺伝子の発現は、遺伝子量に依存して変化し、GAL4 もしくは、UAS-GFP の量を増やすことにより、当初考えていたよりも多数の神経細胞で発現していることが確認された。しかしながら、#15, #39, #47 という少数の系統では、複数の神経細胞での発現は認められるものの、その発現レベルの差を利用して 5 種類の神経細胞を完全に識別することができた（前ページの図参照）。



（感覚神経特異的細胞接着因子 Dpr ファミリー分子の解析）

今回のスクリーニングでも明らかとなったが、感覚神経細胞には多様な膜タンパク質、受容体、接着因子が特異的に発現しており、その発現プロファイルと機能分化の関係は非常に興味深い。我々が味覚関連遺伝子として以前単離した*defective proboscis extension response* (*dpr*)は、Ig-domainを 2 個もつ膜タンパク質をコードしている。我々は、Dprに構造上類似のタンパク質がゲノム上に20種類あることを見いだしている。また、最近C. Vogel (MRC)らはIg-domainタンパクをショウジョウバエと線虫のゲノムデータから網羅的に抽出し比較解析を行っている（Development 2003）。その結果、Dprファミリーは我々が見つけたものを含めて23種類あることが明らかにされている。我々は、Dpr ファミリ

ータンパク質が神経細胞の接着因子として機能するかどうか調べる目的で、培養細胞を用いた機能解析を行った。その結果、Dpr-1, Dpr-2, Dpr-3は何れもホモフィリックな接着活性を持つ膜タンパク質であることが明らかとなった。これらは、何れも味覚神経細胞の一部での発現が認められることから、Dprファミリー分子は味覚神経の機能に特に重要な機能を持つことが推測された。

（今後の課題）

当初の予想に反して、スクリーニングしたエンハンサートラップからのレポーター遺伝子の発現は、遺伝子量に依存して変化した。また、これらのエンハンサートラップ系統の全ては、中枢神経系での別個の発現が観察された。これらの結果は、当初目的の一つに挙げた、GAL4 を用いた細胞特異的除去実験は、現時点では難しいことを示している。我々は、エンハンサートラップベクターに改良を加えることで、個々の神経細胞での特異的発現を達成できないか現在、検討を加えている。神経細胞での遺伝子発現制御の一つの機構として、転写後調節が重要な役割を担っていることが最近明らかとなっている。これらの機構には特異的な RNA 結合タンパク質と mRNA の 3'非翻訳領域が重要であることが分かっている。我々は、エンハンサートラップベクターの 3'領域に各種神経特異的遺伝子の 3'-UTR を結合したベクターを開発中である。今後、それらのトランスジェニック系統を用いた遺伝子発現ならびに神経機能の解析を進める予定である。

A03-46

表題（研究課題）　脆弱Ｘ遺伝子 FMR1 と小分子 RNA が携わる翻訳制御

研究代表者名　塩見美喜子

所属　徳島大学ゲノム機能研究センター

特定領域「神経回路」参加年度　平成１５年度

研究成果の要旨

精神遅滞を伴う脆弱Ｘ症候群は FMR1 の機能欠損を起因とする遺伝性疾患である。患者は神経シナプス形成の場である樹状突起スパインの形態異常を伴う。FMR1 は標的遺伝子の発現制御を行うとされているが、その作用機序は未だ不明である。申請者らは現在ショウジョウバエを用いて FMR1 の機能を遺伝学、生化学手法を駆使することによって解明しつつある。これまで①FMR1 欠損型ショウジョウバエは記憶障害や睡眠障害を伴う②FMR1 機能はリン酸化によって制御される③FMR1 は RNAi 必須因子や microRNA と特異的に結合する事などを発表した。最近の研究からは、FMR1 が、(Ⅰ) ミトコンドリア局在型糖代謝関連因子の修飾制御に関わる事、(Ⅱ) 神経系や生殖腺で特異的に発現する交尾制御因子 lingerer と small RNA を介して複合体を形成する事などを見出した。現在、この二つの事象に関して詳細な解析を進めつつある。FMR1 が small RNA と共にどの様な標的遺伝子の発現制御を、どの様な作用機序で行う事が正常な脳機能発現に不可欠であるかを解明する。

研究成果

脆弱Ｘ症候群は最も高頻度に精神遅滞を伴うヒト遺伝病であり、その発症率は新生児の約四千人に一人である。精神遅滞以外には、自閉症的症状や睡眠障害、その他特異な身体的特徴を示す。病理学的には、神経シナプス形成の場であり、脳高次機能（特に可塑性）に直接関わることが確実視されている樹状突起状スパインの形態異常を示す。1991 年、脆弱 X 症候群の原因遺伝子 *FMR1* が同定された。現在では、*FMR1* の 5'非翻訳部位に位置する CGG リピートの異常伸長とそれに付随して起こる過剰な DNA メチル化による *FMR1* 遺伝子の転写阻害が発症原因であることがわかっている。私は、*FMR1* というたった一つの遺伝子の発現（機能）欠失が精神遅滞発症へと至る分子機序に興味を持っている。現在は、*FMR1* 側系遺伝子をもたないショウジョウバエをモデル生物として選択し、ショウジョウバエ FMR1（dFMR1）の機能解析をすすめている。

野生型ショウジョウバエと dFMR1 欠損型変異体（B55）の頭部においてどのような遺伝子発現が変化しているかを観察した。野生型と B55 の頭部抽出物を蛋白質２次元電気泳動ゲル上で展開・染色することによって、発現パターンの異なる蛋白質を一つ見出した。これは、糖新生因子 pepck に高い相同性（70%）を示す。この遺伝子産物（Dmpep:暫定的名称）のモノクローナル

抗体を作成した。この抗体を用いることによって、1) 野生型と B55 において Dmpep 発現量は変わらないが、2 次元電気泳動ゲル上で Dmpep の pI が異なる、2)モノクローナル抗体の一つ (2D1) は、野生型 Dmpep に反応するが、B55 の Dmpep には反応しない、3)Dmpep はミトコンドリアに局在する、などを明らかにした。dFMR1 の有無が Dmpep 修飾、ひいてはその機能に影響を及ぼし、その結果糖代謝やミトコンドリア機能を変動させている可能性が非常に大きく、これらに焦点を絞って解析を進めている。ショウジョウバエ脳を抗体染色したところ、Dmpep は特定の神経系において発現が高いことが示された（図１）。この神経細胞機能と Dmpep 機能、糖代謝、ミトコンドリア機能との相互関係をも明らかにしつつある。

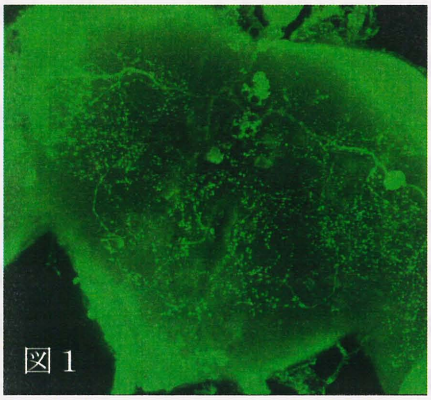


図 1

最近、神経系や生殖腺で特異的に発現する交尾制御因子 lingerer が in vivo で dFMR1 と特異的に結合する事を突き止めた（図２）。lingerer 欠損変異体ショウジョウバエ交接器には形態変化が観察されないため、神経筋系の異常が交尾接合異常の原因であると考えられる。dFMR1 欠損変異体では神経筋結合のシナプス末端に異常が観察される事をふまえ、これら２遺伝子の相互関係を遺伝学、生化学両面から解析しつつある。lingerer 欠損変異体ショウジョウバエは、すでに入手済みである。lingerer は UBA ドメインを有することから、ユビキチン経路において何らか役割を担う因子であると推測される。この事は dFMR1 機能とユビキチン経路の関係を示唆するため、今後、実験的に検証する。さらに最近、lingerer は RNA 結合性タンパク質であり、dFMR1/lingerer 複合体は small RNA 分子を含む事を見出した（図３）。現在、この RNA 分子の配列決定を進めている。興味深いことに哺乳細胞は lingerer 相同体を二つ有する。申請者らはすでにヒト lingerer 相同体も FMR1 と結合する事を見出した。今後、ショウジョウバエに限らず、哺乳細胞も扱うことによって FMR1 と lingerer の相互関係を解析する。

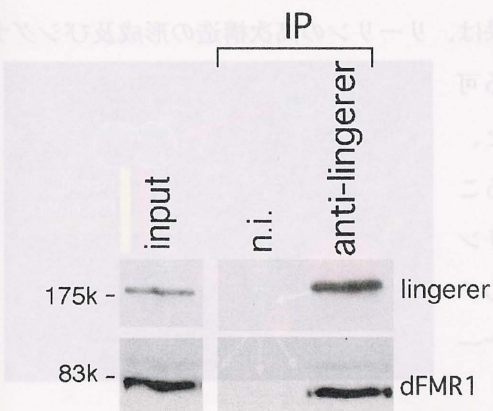


図 2

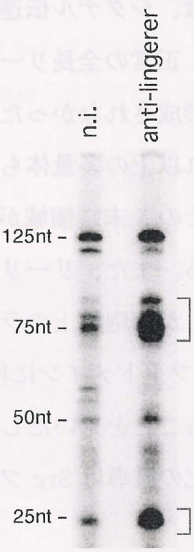


図 3

A03-47

表題（研究課題）： 大脳皮質神経細胞の移動・配置を制御するメカニズム

研究代表者： 仲嶋一範

所属： 慶應義塾大学医学部

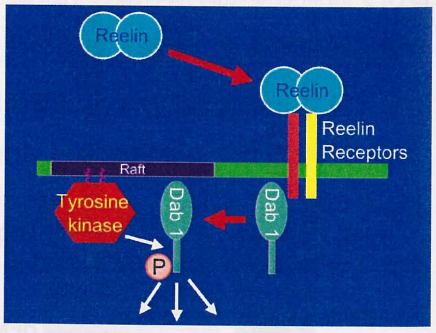
参加年度：平成 15 年度ー平成 16 年度

研究成果の要旨：

神経細胞配置制御因子リーリンは、二量体を形成し、細胞内アダプター分子 Dab1 を細胞膜上のマイクロドメインに移行させてそのシグナルを伝達することを見いだした。また、髄膜が、リーリン分泌細胞の辺縁帯への局在の維持、及び神経細胞の生存に重要な機能を有することを見いだした。

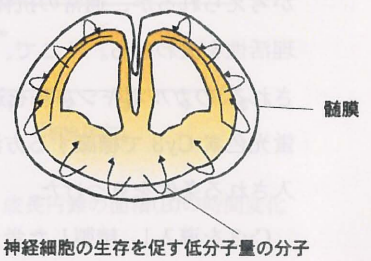
研究成果：

神経細胞の移動・配列の機構を解明する上で、移動が終了する過程を理解することは非常に重要である。神経細胞の移動終了・配置決定を制御する分子として、リーリンが知られている。リーリンは、細胞移動の終点（脳表面近く）に存在する細胞（大脳皮質ではカハール・レチウス細胞）から細胞外に分泌され、脳室面から移動してくる神経細胞の配置を制御していることが知られている。リーリンが欠損すると、例えば大脳皮質においては層構造が逆転し、脳の機能も異常になることからも、リーリンによる神経細胞の正しい配置制御が重要な意義を有していることが明らかである。そこで本研究では、まずはリーリンについての解析を行い、リーリンは互いに二分子が会合してホモ二量体を形成して機能することを見いだした。この会合には、N 末端近くの領域が重要な役割を担っていることがわかった。そこで、N 末端を欠失させた変異体を作成したところ、安定な二量体を形成できなくなり、かつ、受容体に結合後のシグナルを有効に惹起できなくなることを見いだした。リーリンは、シグナル伝達が起きる時に、細胞外で複数の受容体を架橋している可能性が考えられた。また、正常の全長リーリンを架橋剤によって架橋すると、二量体しか形成されず、それ以上の多量体は形成されなかったが、N 末端を欠失させた変異体を同様に架橋したところ、二量体ばかりでなくそれ以上の多量体も検出された。以上の結果は、リーリンの高次構造の形成及びシグナル伝達には、その N 末端領域が重要な意義を有している可能性を示唆する。また、リーリンが受容体に結合すると、細胞内の Dab1 が細胞膜上のラフトドメインに移行すること、そして、ラフトドメインに移行した Dab1 は高度にリン酸化されていることを見いだした。また、細胞内 Dab1 のチロシンリン酸化の誘導は Src ファミリーのチロシンキナー



ゼによりなされること、ラフトドメインの破壊により、リーリンによるDab1のリン酸化が阻害されること、リーリン非存在下であっても、Dab1を強制的にラフトドメインに局在化させることにより、Dab1のチロシンリン酸化が引き起こされること等を明らかにした。

また、神経細胞の移動・配置を制御する仕組みを解析するための実験系として、しばしばスライス培養が用いられているが、我々は、スライス培養においては、正しく *in vivo* のように辺縁帯直下で細胞移動を終了できないことを見いだした。その理由として、(1)スライスを作成する際に、正しい移動終了過程に必須な線維構造等が切断されている可能性、(2)スライス作成時に技術的にやむをえず除かれてしまう髄膜が正しい移動終了に必須な役割を担っている可能性、(3)血液循環が正しい移動終了に必須である可能性等を想定した。そこで、新たな培養系として、全大脳皮質を丸ごと培養する系を確立し、この系において髄膜つきで培養して、移動細胞の挙動を解析した。その結果、この系においては、細胞は正しく辺縁帯直下で移動を終了し、inside-out様式での皮質形成が達成されることがわかった。そこで、髄膜が皮質形成にいかなる役割を果たすのかをさらに解析した結果、髄膜は、リーリンを分泌するカハール・レチウス細胞の辺縁帯への配置を維持するために重要な機能を有していること、また、発生期大脳皮質は自らの神経細胞の生存に重要な分子を分泌しており、その局所濃度を髄膜が維持することによって、細胞の生存が保証されていること等が示唆された。



研究課題　　**神経伸長情報処理分子の細胞内１分子反応計測**
研究代表者　　**佐甲靖志**
所属　　**大阪大学大学院生命機能研究科**

特定領域「神経回路」参加年度　　平成 15，16 年度

研究成果の要旨

神経成長因子(nerve growth factor; NGF)の蛍光標識法を確立し、ニワトリ後根神経節細胞の単一成長円錐における NGF-受容体複合体の分子運動、NGF の結合解離反応、成長円錐の伸展を引き起こす分子数を決定した。また、PC12 細胞で NGF-受容体複合体、低分子量 GTPase の動態計測を行った。

研究成果

蛍光標識 NGF の合成と細胞表面での１分子観察

NGF, NGF 受容体の細胞内動態や反応を追跡するために、蛍光標識した NGF 分子を利用することが考えられるが、通常の抗体標識などで行う蛋白質のアミノ基(N-末端、Lys)への標識は、NGF の生理活性を失わせる。そこで、NGF β-subunit (NGF の生理活性はβ-subunit だけですべて正常に発現される)のカルボキシル基を適当なクロスリンカーの反応でチオール基に変換し、マレイミド化された蛍光色素 Cy3 で標識する方法を開発した。反応条件を検討し、β-subunit あたり１個の蛍光色素が導入される条件を見つけた。

Cy3 を導入し、精製した蛍光 NGF(Cy3-NGF)が、非標識 NGF とほぼ同様の生理活性を持つことを、ニワトリ後根神経節(dorsal root ganglion, 以下 DRG)細胞の応答性から確認した（図１）。

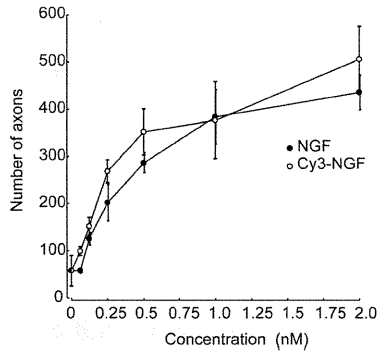
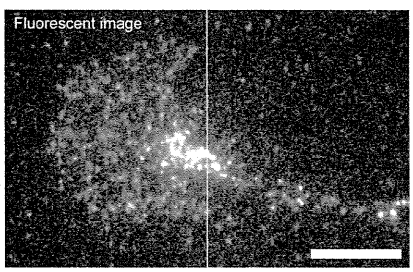


図１. Cy3-NGF の生理活性
NGF および Cy3-NGF を与えた神経節から 18 時間後に伸長した軸策の数をプロットした。Cy3-NGF が非標識 NGF とほぼ同様の生理活性を持っていることがわかる。

さらに我々が従来開発してきた、細胞内蛍光１分子観察法によって、DRG 細胞あるいは PC12 細胞の成長円錐や細胞体表面で、Cy3-NGF が１分子観察できることを確認した（図２）。



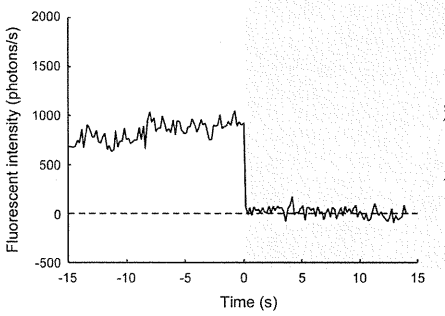


図２成長円錐上での１分子可視化。
輝点の１段階褪色（右）から、１分子が検出されていることがわかる。

ニワトリ後根神経細胞の成長円錐における NGF/NGF 受容体複合体の 1 分子動態計測

成長円錐伸展運動と NGF 信号

Cy3-NGF の添加によって、成長円錐のフィロポディアは退縮しラメリポディアの伸展が起こる。成長円錐上の Cy3-NGF 分子結合数の時間変化と成長円錐の伸展運動を同時計測し、伸展に必要な NGF 分子数を求めた（図３）。0.4nM Cy3-NGF を培養液に添加し、成長円錐の面積変化を計測して、添加約１分後から伸展が起こることを観察した（図３Ｂ）。おなじ成長円錐で計測した Cy3-NGF の結合分子数は、添加１分後には 40 分子であった（図３Ａ）。従って、平均 40 分子の結合が成長円錐の伸展運動が引き起すに十分であることが明らかになった。

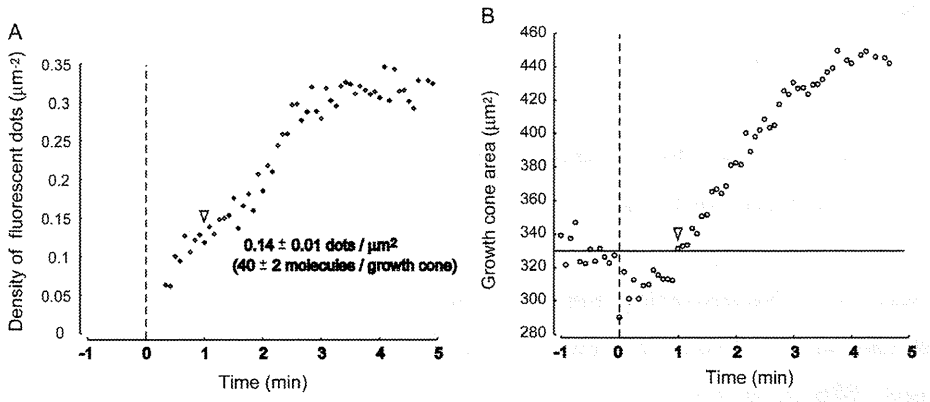
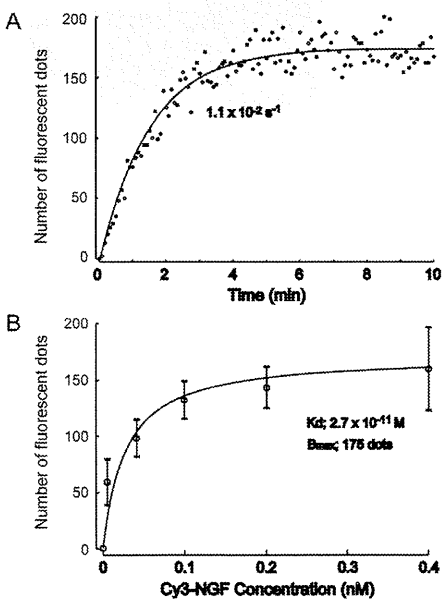


図３．Cy3-NGF の結合と成長円錐の伸展
細胞外液に 0.4nM の Cy3-NGF を加え、成長円錐への結合分子数(A)と、成長円錐の面積(B)の時間変化を計測した。６つの成長円錐の平均を示す。

成長円錐における NGF/NGF 受容体の結合・解離反応



成長円錐上のNGF受容体に対するCy3-NGFの結合反応を観察し、結合速度を求めた（図４）。0.4nM Cy3-NGFでは成長円錐あたりの結合数は、添加後の時間と共に増加し、数分で平衡状態に到達した(図４Ａ)。１次の反応速度は $1x10^{-2}\ s^{-1}$、平衡状態での結合数は 160 分子であった。

同様の計測をCy3-NGF濃度を変えて行い、結合曲線を作製した（図４Ｂ）。単純な結合・解離反応を仮定したモデルに実験データを近似し、解離定数 $2.7x10^{-11}$ M, 成長円錐上の結合部位数 180 と求められた。

図４.成長円錐における Cy3-NGF と受容体の結合反応
A 0.4nM Cy3-NGF での結合速度
B Cy3-NGF と受容体の結合曲線

次に、結合が平衡状態に達してから細胞外液を洗浄して、その後の成長円錐上の蛍光強度減少を計測して、解離速度定数を求めたところ、$8.2x10^{-4}\ s^{-1}$という値が得られた（図５）。この解離速度定数の

値と、先に求めた 0.4nMCy3-NGFにおける結合速度から計算される解離定数 $3x10^{-11}$ Mは平衡状態の結合曲線（図４Ｂ）から求めた解離定数 $2.7x10^{-11}$ Mとよく一致している。

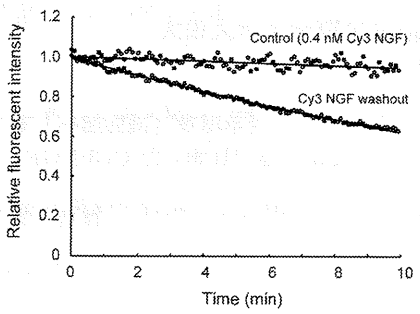
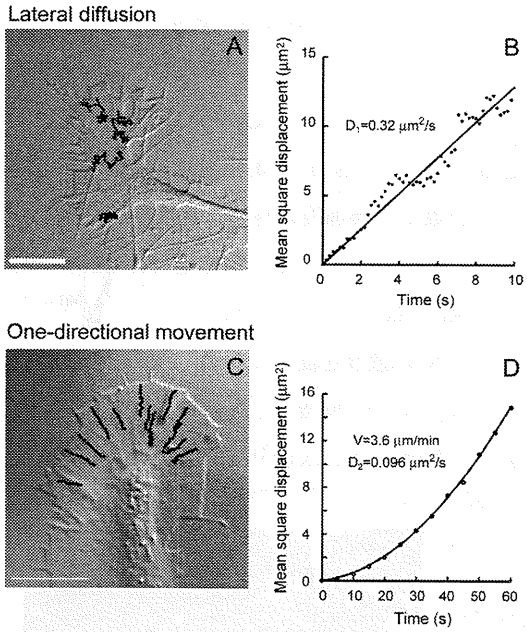


図５．Cy3-NGF と NGF 受容体の解離反応
0.4nM Cy3-NGF 存在下で結合が平衡状態に達してから時間 0 に外液を洗浄し Cy3-NGF を取り除いた。その後の成長円錐に結合した蛍光強度の時間変化を示す。Control は洗浄しなかった場合で、わずかな強度の減少は光褪色による。速度定数を求める際には褪色の影響を補正している。

従来、多細胞・多分子を扱う生化学的な方法により、細胞には親和性の異なる２種の NGF 結合部位が存在することが知られている。上で求められた解離定数は高親和性結合部位の解離定数と一致している。すなわち、成長円錐には高親和性の NGF 結合部位が 180 存在し、その内の 40 箇所に NGF が結合すると成長円錐の伸展が起きると考えられる。

成長円錐における NGF/NGF 受容体複合体の運動

成長円錐に結合したCy3-NGFの運動には、拡散運動（図６Ａ）と、成長円錐先端から中心部への方向性輸送（図６Ｃ）が存在する。結合直後にはほとんどの分子は拡散運動しており、１分子運動解析から拡散定数 0.3 $\mu m^2 s^{-1}$程度の単純拡散運動であることが分かった（図６Ｂ）。この拡散係数は、細胞膜蛋白質としては非常に大きく、自由拡散に近いものである。静止した分子は存在しない。



その後、結合した分子の約 20%が徐々に方向性輸送へ運動モードを変更する。輸送速度は 4 μms^{-1}で、拡散係数は $0.1\mu m^2 s^{-1}$に低下しており、細胞骨格系を介した輸送運動、おそらくは成長円錐で見られるアクチンバンドルの逆行性運動によるものと考えられる。方向性の運動はアクチン線維の破壊によって消失する。NGF受容体とアクチンの相互作用は従来知られていないが、直接あるいは間接の結合があるものと予想される。

図６　Cy3-NGF/NGF 受容体複合体の運動
成長円錐に結合した Cy3-NGF は、速い単純拡散運動を行う。その後、約 20%の分子が方向性輸送の経路に載る。

PC12 細胞における NGF/NGF 受容体複合体の１分子動態計測

成長円錐上での運動計測から、NGF の結合した受容体は、分子の活性化に伴う運動制御を受けていることが予想される。NGF/NGF 受容体複合体の運動を詳細に解析するために、PC12 細胞において

Cy3-NGF の 1 分子運動追跡を行った。Cy3-NGF は DRG 成長円錐上と同様に、速い単純拡散運動をおこなうが、数秒に 1 回程度、数秒間の拡散運動の停留が見られた（図 7）。停留中に他の Cy3-NGF 分子が近傍に結合することがしばしばあり、NGF 情報伝達の場が一時的に形成されていることを予想させる。運動の停留と分子の反応、細胞骨格との相互作用については現在解析中である。

その後、Cy3-NGF は数分子の集合体を形成するが、GFP で標識したクラスリン L 鎖との共局在から、集合部位はコーテッドピットであると考えられる。この集合体形成はアクチン線維の破壊やコレステロール除去の影響を受けない。

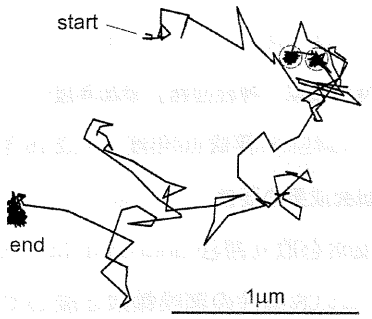
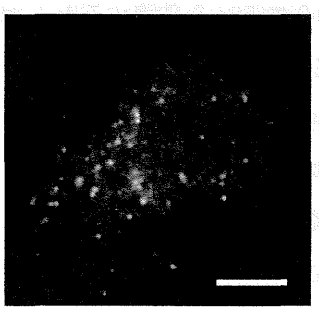


図 7 . PC12 細胞に結合した Cy3-NGF の運動軌跡の例
赤丸で囲った部分などに運動の一時的な停留が見られる。最終的な停留点はおそらくコーテッドピット。

PC12 細胞における Ras, Rac の 1 分子動態観察

NGF は DRG 細胞や PC12 の伸展反応、軸作伸長を誘導するが、その情報伝達経路には Ras や Rho family の低分子量 GTPase が関与している。Ras, Rho family の情報伝達反応は主として細胞膜で起こると考えられている。GFP(YFP)を融合した Ras, Rho, Rac および Ras のエフェクターである Raf1 を PC12 細胞に発現し、細胞膜における 1 分子蛍光観察によって、分子の動態を観察した（図 8）。



Raf, Rho, Rac はいずれも細胞膜と細胞質を循環しており、Ras を含めて細胞膜上では速い側方拡散運動を行っていることが明らかになった。今後、1 分子計測から、個々の分子の細胞膜滞在時間を計測し、分子の反応を検出する。

図 8　PC12D 細胞における GFP-Raf1 の 1 分子観察
NGF 添加後、Ras の活性化によって Raf1 の細胞膜への局在変化が起こる。
スケールは 10μm

共同研究

共同研究の相手：大阪大学医学系研究科生体機能調節医学

共同研究内容と成果：PC12 細胞における NGF 受容体の動態を解析し、間歇的停留状態、結合の hot spot の存在を明らかにした。

共同研究の相手：大阪大学医学系研究科細胞分子認識

共同研究内容と成果：低分子量 GTPase の細胞内活性化の可視化法を応用し、腫瘍細胞運動機構の解析を行った。CD44 の下流で Rac が活性化されることを明らかにした。

共同研究の相手：東京都臨床研、産業技術総合研究所関西

共同研究内容と成果：ニワトリ後根神経節細胞における NGF 受容体の動態計測を共同で行った。

表題（研究課題）

網膜軸索路形成のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンによる制御

研究代表者名　　一條裕之

所属　　筑波大学　大学院人間総合科学研究科　感性認知脳科学専攻

特定領域「神経回路」参加年度

平成15年度ー平成16年度

研究成果の要旨

視索を取り囲む neuropil は D unit コンドロイチン硫酸(CS)を提示し、視索深層を走行する D unit CS 陽性の網膜軸索と接している。大多数の網膜軸索は D unit 陰性で浅層を走行する。D unit を含む CSs が網膜軸索の choronological sorting と軸索路形成に関わることが示唆される。

研究成果

網膜視蓋投射は神経回路網形成の有用なモデルシステムである。従来から網膜神経節細胞の軸索が前方の終脳への侵入を阻止する機構の存在が示唆されていた。私たちの一連の実験は 終脳由来分泌型 chondroitin sulfate proteoglycans の糖鎖、chondrotin sulfate glycosaminoglycans (CSs)、が網膜軸索伸長を選択的に抑制することを示した。胚の内在性 CSs を破壊すると、網膜軸索路が前方に拡大した。これは CSs が網膜軸索路の前方境界を規定する因子のひとつであることを示唆する。CSs には A一E などのユニットが区別され、これらのユニット構造の組み合わせに由来する構造多様性が存在する。CSs の多様な構造を広く認識する CS56 モノクローナル抗体を用いて観察すると軸索路形成期のニワトリ胚の中枢神経系に広く CSs が分布することが示されている。Chondroitinase ABC による内在性 CSs の広範な破壊の効果は終脳間脳境界に限局していた。この結果は多様な CSs のうち、終脳間脳境界辺りに分布する特定の CSs が網膜軸索路形成に寄与することを示唆するのかもしれない。

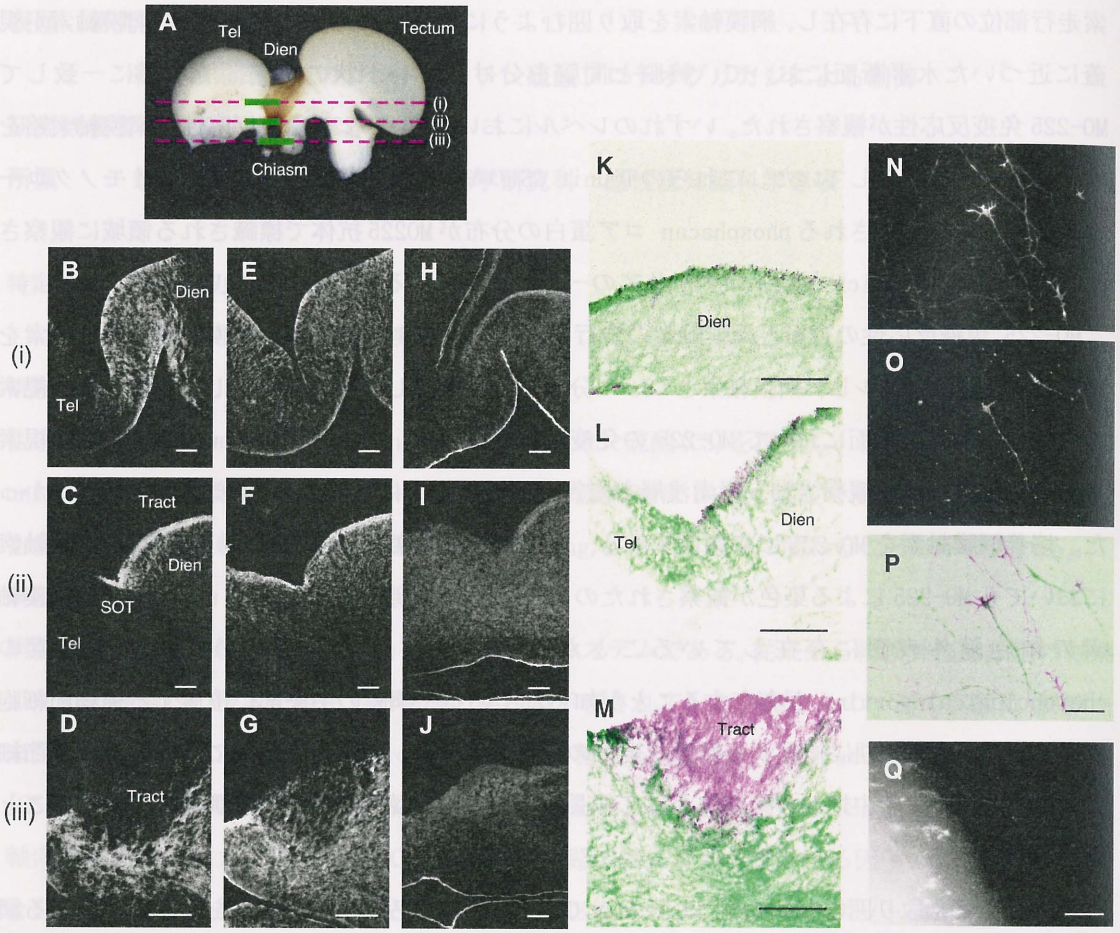
CSs の各ユニットの分布を網膜軸索路形成期のニワトリ孵卵 7 日胚において検討した。2H6, MC21C, MO-225 はそれぞれ A, C, D unit を豊富に含む CS を選択的に認識することが知られているモノクローナル抗体である。MO-225 による免疫反応性は網膜軸索路の周辺に限局して観察された。対照的に 2H6 の免疫反応性は終脳、間脳、中脳において広く観察され、その分布に空間的特異性は認められなかった。MC21C の免疫反応性は孵卵 7 日胚においてはとても小さく、空間的特異性は明らかではなかった。

MO-225 の免疫反応陽性の局在は D unit CS の分布を反映すると考えられる。視交叉に近位の視索の水平断面においては、網膜軸索が太い神経線維束を形成するが、MO-225 免疫反応性はこの網膜軸索線維束を取り囲むように観察された。視索と supraoptic tract が直交する水平断面において、網膜軸索は間脳の軟膜側の表面に広がって走行するが、MO-225 免疫反応性は網膜軸

索走行部位の直下に存在し、網膜軸索を取り囲むように観察された。間脳の背側で網膜軸索が視蓋に近づいた水平断面において、終脳と間脳を分けるバンド状の終脳間脳境界に一致してMO-225免疫反応性が観察された。いずれのレベルにおいてもMO-225免疫反応性は網膜軸索路を取り囲むように存在していた。これらのD unit CSのキャリアは不明であるが、6B4モノクローナル抗体で明らかにされるphosphacan コア蛋白の分布がMO225抗体で標識される領域に観察されるので、D unit-richなCSsのキャリアの一つとなっているのかもしれない。

MO-225 免疫反応性の分布と網膜軸索の走行を詳細に検討するために、網膜神経節細胞軸索をHRPで順行性にラベルし、網膜軸索とCSsの分布を二重標識し、共焦点観察し、比較した。視索を含む間脳の水平断面においてMO-225の免疫反応性は（1）視索直下のneuropil、（2）視索深層の網膜軸索、に観察され、視索浅層を走行する網膜軸索はMO-225によって染色されなかった。培養網膜軸索をMO-225にて染色すると、一部の網膜軸索が染色された。未固定の培養軸索においてもMO-225による染色が観察されたので、MO-225抗原、すなわちD unit CS、は網膜軸索の細胞膜外表面に存在していることが示唆された。視索においては網膜軸索のchoronological sortingが存在することが知られている。網膜の中央部に位置する神経節細胞に由来し、発生の初期に伸長する軸索は視索の深層を走行し、網膜の周辺部に位置する神経節細胞に由来し、発生の中期から後期にかけて伸長する軸索は視索の浅層（軟膜側）を走行することが知られている。

網膜軸索路を取り囲むneuropilはD unit CS を豊富に含み、D unit CSを表面に提示する網膜軸索と接している。D unit CSを提示しない大多数の網膜軸索は間脳の軟膜側を軸索束を形成して走行する。D unitを豊富に含むCSsが網膜軸索のchoronological sortingと軸索路形成に関わることが示唆される。これらの記載的データをふまえて、D unit CSを中心とするCSsの構造多様性と網膜軸索路形成のおける機能特異性の関係の解析を行っている。



A;孵卵7日ニワトリ胚。(i)背側の水平断面、(ii)supraoptic tract と視索が直交する水平断面、(iii)視交叉に近い腹側の水平断面。Tel,終脳、Dien,間脳、Tectum,視蓋、chiasm,視交叉。

B,C,D;MO-225 による染色（D unit CS の分布)。

E,F,G;2H6 による染色（A unit CS の分布)。

H,I,J;6B4 による染色（phosphcan コア蛋白の分布)。

K,L,M; HRP によって順行性標識された網膜神経節細胞の軸索の分布（紫）と MO-225 の免疫反応性の分布（緑）

N;培養網膜軸索のファロイジン染色

O;培養網膜軸索の MO-225 染色（N と同一視野）

P;N と O の重ね合わせ（紫；ファロイジン染色、緑；MO-225 染色）

Q;培養網膜軸索の未固定 MO-225 染色

A03-50

研究課題　変態期のショウジョウバエにおける神経回路崩壊を制御する遺伝的プログラム

研究代表者　粟崎　健

所属　東京大学・分子細胞生物学研究所

特定領域「神経回路」参加年度

平成15年度ー平成16年度

研究成果の要旨

変態期のショウジョウバエにおける神経回路崩壊は、軸索分岐が神経-グリア相互作用によって活性化されたグリア細胞により貪食されることにより生じること、*drpr*、*ced-6* 遺伝子がこうしたグリア細胞の機能に必須であることを明らかにした。

研究成果

発生過程において形成された神経回路網を個体制御のために適した機能的な状態に完成させるためには、回路の一部の局所的な作り替えが不可欠である。この過程では、すでに伸長した軸索分岐や樹状突起を特異的に除去したり再伸長させるプロセスが必要である。神経線維の一部が特異的に崩壊・除去される現象は、神経回路を再編成する時だけでなく障害や発病などによっても生じることが知られている。しかしながらこうした神経回路崩壊の制御機構についてはほとんど分かっていない。本研究では変態期において再編成することが知られているショウジョウバエの幼虫キノコ体神経回路（図1A-D）を実験系に用いて、神経回路再編成時にいかにして不要になった神経回路が崩壊するのか？この制御機構ならびにこれを支配する遺伝的プログラムを明らかにすることを目的として研究を行った。

幼虫キノコ体の軸索分岐に注目してその崩壊過程を単一神経細胞レベルで可視化してその形態変化を時系列的に調べた結果、軸索分岐の崩壊が軸索断裂・変性によりおこっていることがわかった（図1E-H）。またこの時、軸索分岐の断裂・変性にはエクダイソン受容体と

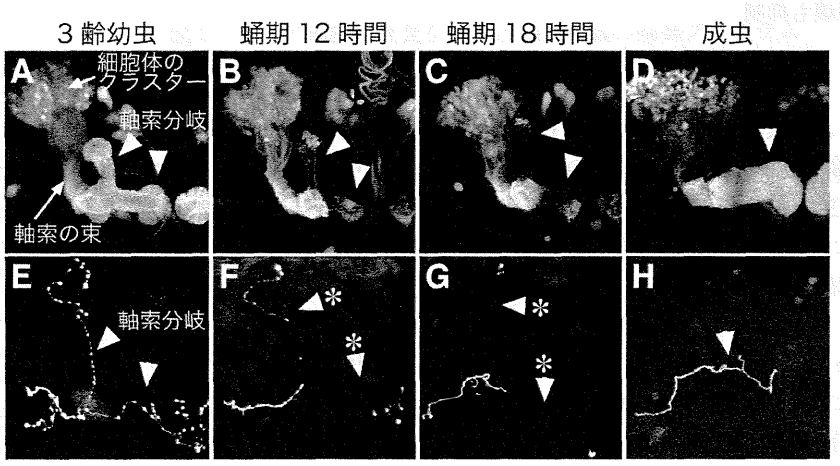


図1 キノコ体軸索分岐の再編成過程
軸索分岐（矢尻）は蛹期 12-18 時間(F, G)で変性・崩壊（＊）する

ヘテロ2量体を形成するレチノイドX受容体をコードする遺伝子，*ultraspiracles*（*usp*)が必要であること,即ちエクダイソンの受容が必要であることを明らかにした。

キノコ体軸索分岐は束状の構造を作っておりその外周はグリア細胞により覆われている。

そこで、軸索崩壊時におけるグリア細胞の形態変化について調べた。その結果、変態期になるとグリア細胞が軸索分岐束内部に突起を伸長させ、軸索分岐の一部をクラスター状に取り囲むことがわかった(図 2B 矢尻)。さらに、軸索分岐を取り囲んだグリア細胞にはライソソームが集積していることが分かった。そこで、「軸索分岐はグリア細胞により貪食・分解されることで崩壊する」と推論し、以下この仮説について実験的検証を行った。

エンドサイトーシスに機能的に働くことが知られている分子、Dynamine、のショウジョウバエ相同分子 Shibire(Shi)の温度感受性突然変異分子、Shi[ts]は制限温度において優性抑制的に働くことが知られている。そこで Shi[ts]をグリア細胞で特異的に発現させ、変態期に許容温度から制限温度に温度シフトさせ、グリア細胞で Shi 依存的な細胞機能を阻害させた。その結果、こうした個体ではグリア細胞の浸潤・貪食作用が阻害されることがわかった。また、この時キノコ体軸索分岐の崩壊が顕著に抑制されることがわかった (図 2D,E)。また、変態期のはじめ 24 時間にグリア細胞の細胞機能を阻害した個体においては、成虫においても本来崩壊されるべき軸索分岐の一部の残骸が残っていた。このことは軸索分岐崩壊が著しく遅延されたことを示す。以上の結果は、「軸索分岐はグリア細胞により貪食・分解されることで崩壊する」という仮説を支持した。

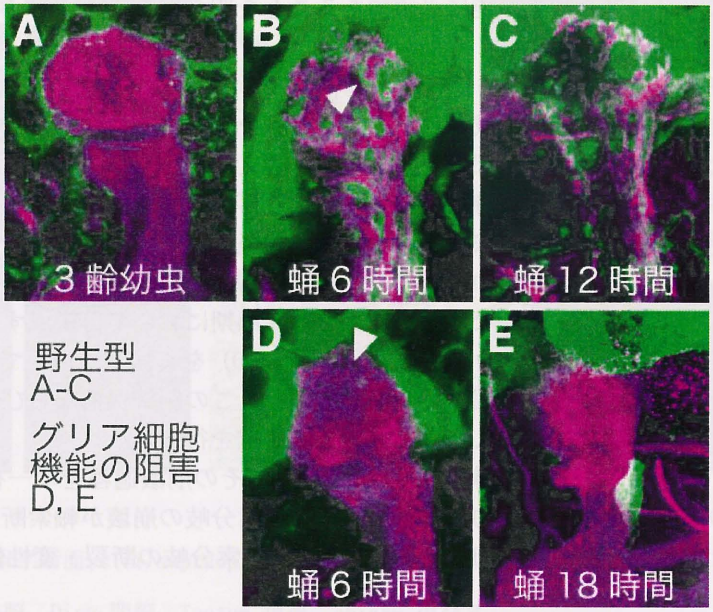


図 2 グリア細胞 (緑) と幼虫キノコ体軸索分岐 (紫)。
野生型(A-C)の蛹期 6 時間以降で見られるグリアの浸潤・貪食が阻害されると、軸索分岐崩壊も抑制される (D,E)

軸索分岐崩壊において除去される軸索分岐とこれを貪食するグリア細胞の関係はアポトーシス細胞とこれを除去するファゴサイトの関係と類似している。そこで、既に線虫を用いた研究から明らかにされているアポトーシス細胞の除去に関与する 2 つの遺伝子群, *ced-1/ced-6/ced-7* ならびに *ced-2/ced-5/ced-10/ced-12* に注目して、それらのショウジョウバエ相同遺伝子の発現を変態期のグリア細胞で調べた。その結果、スカベンジャー受容体様分子をコードする *drpr* (ced-1 のショウジョウバエ相同遺伝子)、ならびに活性化された Drpr の C 末端と相互作用するアダプター分子をコードする *ced-6* が変態期のはじめに注目したグリア細胞において特異的に発現することが分かった。そこで、これらの遺伝子の機能を RNA 干渉を用いてグリア細胞で特異的に阻害させ、キノコ体軸索崩壊に対する影響を調べた。その結果、*drpr, ced-6* の発現を阻害した個体では、グリア細胞の浸潤・貪食作用ならびに軸索分岐崩壊が抑制された。興味深いことに、これらの個体では成虫においても本来崩壊するべき軸索分岐の一部が崩壊せずに維持されていた。この結果は、グリア細胞による軸索分岐の貪食・除去は Drpr/Ced-6 を介した貪食標的の検出・認識が必要であること、そして、グリア細胞の貪食作用

がなければ軸索崩壊が起こらないことを示した。

エクダイソン受容体タイプB突然変異では、キノコ体の軸索分岐の崩壊・除去が抑制されることが示されている。そこで、幼虫キノコ体で特異的にエクダイソンの受容を阻害させ、グリア細胞の浸潤・貪食に対する影響を調べた。その結果、グリア細胞における *drpr, ced-6* は正常に発現が誘導されるにも関わらず、軸索分岐束への浸潤ならびに貪食が顕著に抑制されることが分かった。このことは、エクダイソンを受容した幼虫キノコ体の軸索分岐がDrprのリガンドとなるような貪食標的シグナルを提示することが必要であることを示唆した。また、グリア細胞においてエクダイソンの受容を特異的に阻害するとグリア細胞における *drpr, ced-6* の発現が抑制された。これは、グリア細胞における貪食標的検出・認識分子の発現と軸索分岐における貪食標的シグナルの提示がエクダイソンにより協調的に調節されていることを示唆した。以上の結果から、エクダイソンを受容した神経細胞ならびにグリア細胞はDrprとそのリガンドを介した神経–グリア相互作用により軸索分岐崩壊を制御しているというモデルを提唱した(図3)。

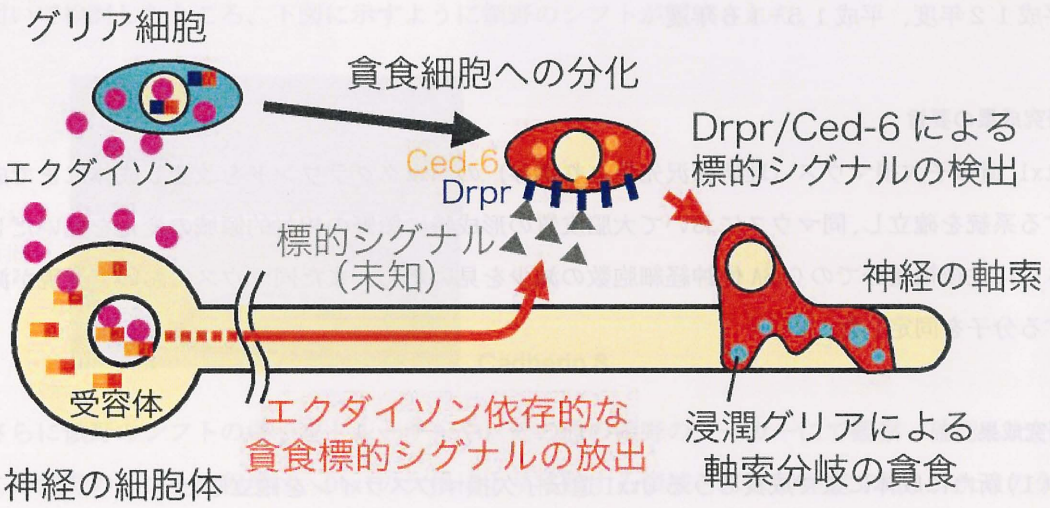


図3　グリア細胞の貪食を介した軸索崩壊の制御プログラム

謝辞

研究遂行に協力して頂いた伊藤啓氏(東京大学分子細胞生物学研究所)ならびに高橋邦明氏、上田龍氏(国立遺伝学研究所)に感謝いたします。

A03-51

表題（研究課題）

Otx1 の大脳皮質形成に及ぼす役割と分子カスケードについて

研究代表者名

佐藤　真

所属

福井大学医学部形態機能医科学講座組織細胞形態学・神経科学領域

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度、平成１５−１６年度

研究成果の要旨

Otx1 遺伝子欠損マウス（理研相沢先生より供与）のバックグラウンドを改変し成体にまで成長する系統を確立し、同マウスにおいて大脳皮質の形成特に領野の相対的領域の変化を見いだした。さらに生後視覚野での GABA 性神経細胞数の減少を見いだし、また同マウスにおいて発現が減弱する分子を同定した。

研究成果

（1）新たに成体にまで成長しうる Otx1 遺伝子欠損マウスラインを確立した。

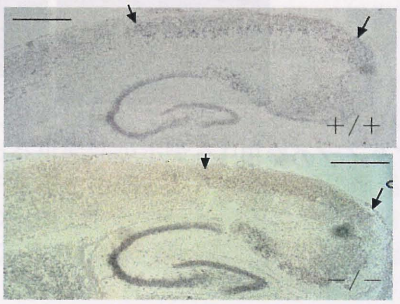
Otx1 遺伝子欠損マウスはイタリアの Simeone のグループによるものと、熊本大の相沢教授のグループによるものがある。Simeone のマウスは生後も長く生存する。一方、相沢教授のマウスは生後まもなく、homozygote は死亡する。この違いは前者が部分ノックアウトであるためとも考えられたが、他方バックグラウンドの違いによる可能性も考えられた。そこで我々は、相沢教授よりマウスの供給を受け、Otx1 遺伝子欠損マウス（体色 black） x　BDF1 マウスの交配を試みた。その結果成体にまで成長する homozygote の系を樹立した。

（2）Otx1遺伝子欠損マウスでは、大脳皮質の領野の境界が移動していることを観察した。

Weimann、Susan McConnell らは、錐体路の形成・成熟様式を、ホメオボックス遺伝子の一つである Otx1 の遺伝子欠損マウス（Simeone らのマウス）にて検討し、同マウスでは視覚野から延髄に伸びる錐体路の一部において軸索の刈り込み現象が観察されず、視覚野の一部（なかでも特に運動野に隣接した部位）から伸びる軸索は、成体においても、運動野からの軸索と同様に延髄への投射を保持したままであることを報告し、生後において、Otx1 が錐体路の発達・成熟に伴う大脳皮質領野特異的な軸索の刈り込みに関係するとの考えを提唱した（J.M. Weimann, et

al., *Neuron*, 24: 819-831, 1999)。Otx1は生後には視覚野の第５層の皮質下投射ニューロン全般に発現する。しかしながら、Weimann らは、Otx1欠損マウスにおいては、その一部の細胞（運動野と接する視覚野の領域と彼らが考えている部位）のみが延髄まで投射を伸ばし、いわゆる運動野パターンを示したに過ぎないのに、Otx1 が第５層ニューロンが視覚野型となるのに大切な役割を担うと報告した。Otx1は視覚野全体に発現するのに、その遺伝子欠損マウスにおいては、視覚野全部でなく、一部のみがこのようなパターンの変化を示すことは、我々にとり大きな疑問であった。そこで我々は、Otx1 欠損マウスでは、むしろ領野の移動が起きているのではないかと仮定した。例えば、運動野がやや尾方向に拡大し、視覚野が（相対的に）小さくなっているのであれば、Otx1遺伝子欠損マウスでの観察は矛盾なく説明できる。

そこで、実際、Otx1遺伝子欠損マウス大脳皮質において、領野のマーカー（cadherin8）を用いて検討したところ、下図に示すように領野のシフトが観察された。



Cadherin 8

さらに領野のシフトの様子をトレーサーや、その他の領野のマーカーにて観察・確認した。この領野のシフトの程度は、Otx1の欠損により移動する領域とほぼ同程度であり、Otx1の欠損により視覚野の一部からの軸索投射様式が異なる事実を良く説明した（投稿準備中）。

この変化は胎生中期に発現する脳形成に関わる分子の発現変化によると考えられたため、幾つかの分子について検討した。Fgf8では顕著な変化が認められなかったが、 in situ hybridizationにて変化を認めた分子もあったため、蛋白レベルでの変化を検討している。

又、Otx1 の有無により、発現が変化する分子の検索も併せて行い、その結果シグナル伝達分子の一つに発現の差を見いだした。但し、この分子と領野シフトの関係の解明は、今後の課題である。

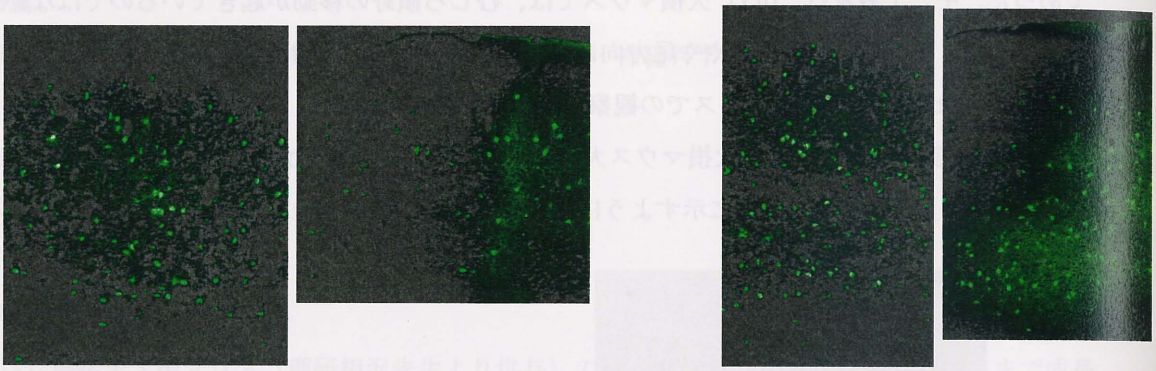
（３）生後の視覚野におけるGABA細胞数の減少を観察した。

Otx1は胎生期前脳に発現し、生後になりその発現が視覚野第５層ニューロンに限局してくる。Zhangらの報告によると、ラットにおいて、発達の時期によりOtx1は核内に存在して転写因子として働く時期と、細胞質に留め置かれる時期があり、胎生期後期から生後するでは、遺伝子発現はあっても、その機能を発揮できない時期があるという（Zhang, Y.A. et al., Mol.

Cell. Neurosci. 19:430-446, 2002)。

我々のデータでは、Otx1 の欠損による領野の変化には、従来は生後の Otx1 の発現がかかわるとされていたが、そうではなく胎生中期の発現が影響していると考えられた。そこで、生後（特に Otx1 分子が核内に以降し局在する生後 6 日目以降）の Otx1 の役割を検討した。その結果、Otx1 遺伝子の欠損マウスにおいて生後の視覚野で GABAergic neuron 数の減少を観察した（下図）。

3W 視覚野（左+/+, 右 -/- ）　　3W 体性感覚野（左+/+, 右-/- ）



GABA 細胞のサブタイプの発現

共同研究

共同研究の相手（国内）

理化学研究所　相澤慎一グループディレクター（本研究）

東京大学・理化学研究所　横山茂之教授　TBPIP の機能（2004J Biol Chem）、TBPIP, FILIP の結晶解析

大阪大学　村上富士夫教授 FILIP の機能（遺伝子導入法）(2002 Nat Cell Biol)

１、研究課題：学習行動下での遺伝子発現

２、研究代表者：山森哲雄

３、所属：自然科学研究機構・基礎生物学研究所

４、特定領域「神経回路」参加年度　平成１２ー１６年度

５、研究成果の要旨：遺伝子発現を指標した学習行動下での脳内情報処理過程の解明と大脳皮質領野の形成機構解明の分子マーカーの同定を行った。

６、研究成果

１）学習行動下での遺伝子発現の解析

a)小脳 LTD と遺伝子発現

小脳 LTD は、伊藤正男等により 1982 年に報告された運動学習の基本的素過程と考えられるシナプス可塑性である。研究代表者は、伊藤のもとで、LTD 刺激を代替した条件下で、c-Fos や JunB 等の最初期遺伝子の発現が有為に増加ずることを明らかにした。更に、この現象を解明する為、蛋白合成阻害剤（アニソマイシン、シクロヘキサミド）や転写阻害剤（アクチノマイシン D, DRB）の存在下での LTD がどのように影響を受けるかを調べたところ、驚いたことに、蛋白合成阻害剤の存在下では、LTD の形成が初期過程から阻害されることが判った(Karachot et al., 2001)。これは、従来アプリシアや海馬 LTP で報告されているシナプス可塑性では、初期過程には蛋白合成は必要ではなく、後期過程にのみ必要であるという知見とは異なる。我々の報告と平行して、Mark Bear 等のグループも mGluR１型依存性の海馬 LTD では初期過程からの蛋白合成依存性が見られることを報告している。従って、LTD 初期過程からの蛋白合成依存性は、mGluR1 型の共通の性質である可能性が示唆された。

b)遺伝子発現を指標とした脳内情報処理過程の解明

上記の小脳 LTD と遺伝子発現の関係を明らかにする研究を出発点として、最初期遺伝子 c-Fos を用いて、その発現を調べることにより学習行動下での脳内情報処理過程を明らかにする研究を始めた。この為に、櫻井芳雄博士（京都大学）と共同研究で、同博士が開発した AVD (Audio Visual Discrimination)-task システム下での遺伝子発現を調べた。このシステムでは、音（高音と低温の区別）と光（右と左の区別）をキュー（手懸り）にラットが４通りの組み合わせの内正しいキューに反応してレバーを押すと餌が貰える。図１の場合、AVD-A(auditory)では高音が正解、AVD-V(visual)は、向かって右側の光が正解である。このシステムの利点は、c-Fos が多様な感覚刺激に反応する為、従来のシステムでは難しかった学習依存的な c-Fos 発現の誘導を、可能な 4 通りの刺激の各々の組み合わせがセッション当たり同数になるように設定することによって、学習課題依存的な c-Fos 発現を観察することができることである。更に、興奮性や抑制性細胞特異的なマーカーと二重染色することによって、それがどのような四種類の神経細胞で発現しているのかを調べることができる。その結果、図２に示したように、課題依存的な有為な c-Fos の発現誘導を、対応する大脳皮質一次感覚野（音刺激の場合聴覚野、光刺激の場合視覚野）の興奮性細胞特異的に観察することができた（Sakata et al., Eur J Neurosci, 15, 735-743, 2002 より引用)。

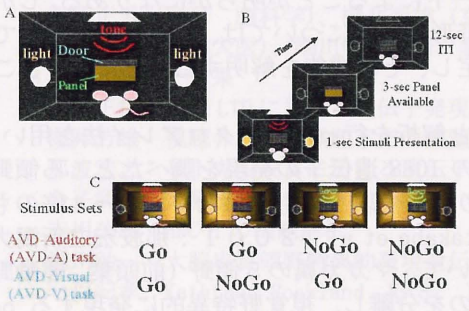


図１　AVD-task

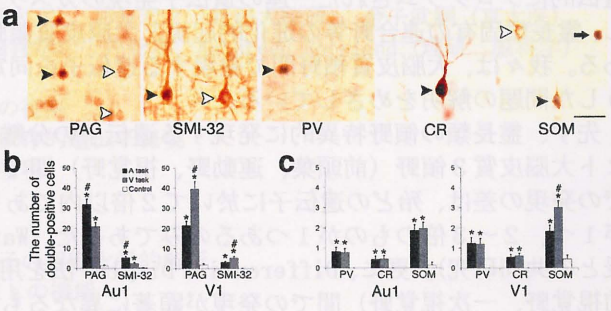


図２　大脳皮質に於ける c-Fos の課題依存性的発現

このように、c-Fos 発現と細胞種特異的マーカーを組み合わせることによって、学習課題遂行下で特異的に活動する領域と神経細胞種を特定できることが判ったので、これを運動学習にも適用することを考え、研究室の木津川等は、Wheel Running System を立ち上げた（図３）。

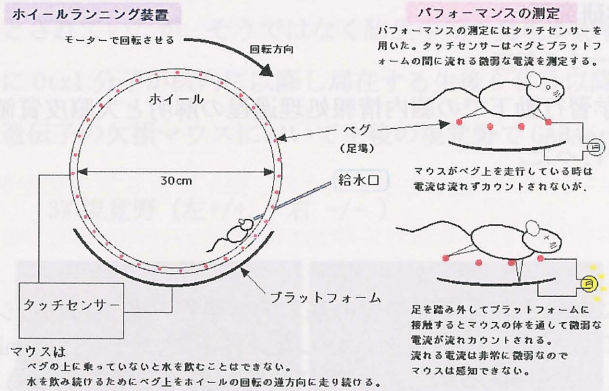


図３　Wheel Running System

このシステムでは、２４時間絶飲させたマウスを図３に示したような装置に入れる。図に示した方向にホイールが回転する為、給水口から出る水を効率良く飲む為には、マウスはホイール内で足場となるペグ上をそのパターンに合わせて走行しなければならない。脚を踏み外した場合は、タッチセンサーから微弱な電流が流れる為、踏み外した（誤り）回数を数えることができる。パターンを変えた直後では、踏み外しの回数が増えるが、次第に学習し、１週間でほぼ誤りなく走ることができるようになる。c-Fos を指標として、走行パターン変化に伴う脳内に於ける神経活動の変化を調べた。その結果、大脳皮質運動野、線条体、小脳で有為な c-Fos 発現の増加が見られた。特に、線条体で最も顕著であった。そこで、線条体の神経細胞種特異的なマーカーとの２重染色法によって、走行パターンの変化と c-Fos 発現の関係を調べた。その結果、走行パターンを変えた直後に、nNos（nitric oxide synthetase）陽性細胞での c-Fos の発現が一過的に増加することが判った。他方、直接経路(direct pathway)や間接経路(indirect pathway)のマーカーである、サブスタンス P(SP)やエンケファリン(Enk)陽性細胞、また介在神経の PV(Parvalbumin)陽性細胞では、走行中は、顕著に c-Fos 発現が増加するものの、走行パターンを学習したあともその発現は増加したままである事が判った。これらの結果は、wheel running 中に活動が促進する線条体の神経細胞の中は、パターン変化に特異的なものと、走行そのものに特異的なものの２種類がある可能性を示唆する(Kitsukawa 2002, 2004 北米神経科学大会)。

２）霊長類大脳皮質領野特異的に発現する遺伝子

霊長類の大脳皮質は，認知機能等の高次脳機能に決定的ともいうべき役割を果すと考えられる。大脳皮質は、前世紀初頭、ブロードマンにより５２領野に分けられたが、大脳皮質領野の機能的重要性が前世紀後半以降の研究から次第に明らかになってきた。大脳皮質がどの程度遺伝的プログラムにより決定され、どの程度環境入力により決定されるかについて、長らく論争があったが、マウスに於ける発生工学的手法を用いた最近の研究から、大脳皮質の基本的領域決定は、遺伝的にプログラムされた一連の遺伝子発現のカスケードによることが明らかになりある。しかし、霊長類固有の連合野等の進化的起源と大脳皮質領野形成機構については、依然として不明である。我々は、大脳皮質領野間で発現する遺伝子を同定し、その機能を解明することにより、こうした問題の解明をめざしている。

先ず、霊長類の領野特異的に発現する遺伝子の分離と解析を行った。マクロアレイ法を用いて、ヒト大脳皮質３領野（前頭葉、運動野、視覚野）間での 1088 遺伝子の発現を調べたところ領野間での発現の差は、殆どの遺伝子に於いて２倍以内であり、４倍以上のものはなく、３ー４倍のものが１つ、２ー３倍のものが１つあるのみであった（Watakabe et al、２００１：那波宏之新潟大教授との共同研究)。更に、Differential Display 法を用いて、マカカ属の５領野（前頭葉、運動野、前視覚野、一次視覚野）間での発現が顕著に異なるものを分離し、視覚野特異的に発現する occ1 遺伝子を分離した（図４)。occ1 は、成熟サル視覚野に於いて顕著な活動依存的発現を示す（図４挿入図は、TTX を片眼に注入した個体の視覚野に於ける occ1 の発現パターンを示す。Tochitani et al.,

Eur J Neurosci, 13, 297-307, 2001 より引用)。また、生後発達依存的でもある(Tochitani et al., 2003)。更に、哺乳類のなかでも、霊長類とそれ以外の種では、大脳皮質での発現パターンが著しく異なる。一方、小松等は、連合野特異的に発現する遺伝子 *Rbp* (Retinol-binding protein)を分離し、その解析を行い、occ1 遺伝子と非常に良い対照的発現を示すことを示した。In situ hybridization による詳細な解析の結果、Rbp 遺伝子の発現が以下の特徴を示すことが明らかになった。1) 一次感覚野で少なく、高次感覚野と高次連合野で多い。2) 一次感覚野で発現量が多いことが知られている Parvalbumin や occ1 発現と、一次感覚野に於ける発現の対比性を示す。3) 大脳皮質視覚野に於いては、一次視覚野では、2層表層に発現するのみであるが、腹側高次視覚野へ移行するに従って、2層から3層深部へとその発現が増加し、TE 野では、4層を除く全層で発現が見られる。4) 高次連合野では、2、3、5層で発現が強い。5) 大脳皮質の Rbp 陽性細胞は、主に興奮性細胞である。6) 大脳皮質以外では、海馬、線状体、扁桃体に Rbp の強い発現がみられた。7) RBP の発現は、生後直後では、2次視覚野から連合野に亘る大脳皮質の広い領域に於いて2、3層のみに見られ、成熟個体でみられる連合野の特異的発現は、主に、生後形成されると考えられる。こうした Rbp 遺伝子の発現の特徴は、これが霊長類の連合野特異的に発現する遺伝子の最初の報告であるのみならず、Rbp がレチノールを細胞内に運搬することにより、細胞内のレチノイド代謝を制御し、その結果、連合野の機能に何らかの積極的役割を演じる可能性を示唆しており、今後、連合野の分子レベルでの理解に重要な貢献するものと考えられる(図5は、Komatsu et al, Cereb Cortex, 2004 より引用)。

我々は、更に、Restriction Landmark cDNA Scanning(RLCS)法を用いて、凡そ 25,000 程の RNA 種を調べ、領野間で最大5倍以上の差のある遺伝子を5遺伝子、2ー5倍のものを 10 遺伝子前後に絞り込み、サブグループに分類しつつある。これら少数の特異的遺伝子の機能と発現制御を解明することによって大脳皮質の形成と進化機構を明らかにすることができると考えている。

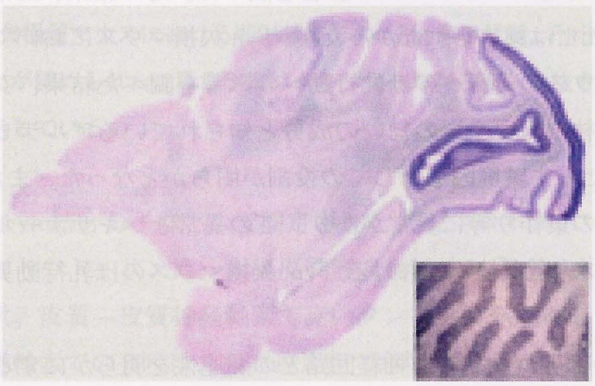


図4、occ1 の霊長類脳での発現

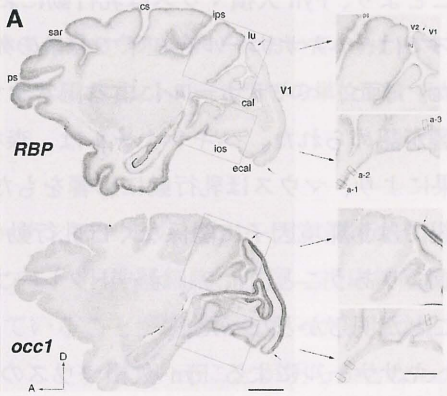


図5、occ1 と Rbp の発現パターンの比較

8. 共同研究

8. 1 共同研究の相手

伊藤正男 (理研 脳科学)、櫻井芳雄 (京大文)、那波宏之 (新潟大脳研)、金子武嗣 (京大医)
赤川公朗 (杏林大医)、端川勉 (理研 脳科学) 一戸紀孝、Kathreen Rockland (理研 脳科学)

8. 2 内容と成果

伊藤正雄 小脳 LTD に於ける遺伝子発現の役割
櫻井芳雄 視聴弁別学習課題下での課題依存的遺伝子発現
那波宏之 ヒト大脳皮質に於ける遺伝子発現
金子武嗣 大脳皮質興奮性細胞の同定
赤川公朗 HPC-1 の機能解析
端川勉 大脳皮質領野特異的発現遺伝子の組織化学的解析
一戸紀孝、Kathreen Rockland Kv3. 1b の機能

A04-02

Fyn遺伝子と動物行動

八木　健

大阪大学大学院生命機能研究科

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨

本研究では、動物行動を制御するFyn遺伝子に注目して研究を行った。その結果、Fyn欠損雌マウスにおけるほ乳行動異常の解析、環境因子としてのヘキサナールの効果を明らかにした。また、Fyn結合分子群として得られたCNR/プロトカドヘリンの発現解析を行い、神経回路形成過程での発現制御を明らかにした。

研究成果

本研究では、動物行動を制御する遺伝子としてFynに注目し、マウス脳神経系におけるFynおよびFyn結合分子群の解析を行ってきた。Fyn欠損マウスは、ほ乳行動異常が認められており、Fyn欠損マウスの母親はFyn欠損マウスの子にミルクを与えることができず、Fyn欠損マウスの子が死亡することが知られている。この死亡の原因には、環境因子が想定されていた。オートクレーブ床敷チップの環境では、子の死亡が観察され、オートクレーブしていない床敷チップの環境では、子の死亡は回避されていた。我々はまず、この床敷チップの原因となるオートクレーブによる環境因子の同定を試みた。その結果、床敷チップのオートクレーブにより、ヘキサナール、ペンタナールなどのアルデヒドが環境に放出されることが明らかとなった。特にヘキサナールの濃度が、１０倍以上高くなることより、Fyn欠損マウスほ乳行動におけるヘキサナールの影響を調べた。その結果、正常やFynヘテロ欠損マウスでは、ヘキサナール存在下での子の死亡は認められなかったが、Fyn欠損マウスにおいては子の死亡が観察された。また、ヘキサナールによる正常マウスの母親へのほ乳行動への影響を調べた結果、クラウチング行動への影響が認められた。ヘキサナールは、森林の匂いや尿の匂いの成分と知られているアルデヒドであるが、本研究結果により、マウスほ乳行動に影響をもたらす環境因子としての役割が明らかとなった。また、Fyn欠損マウスの母親では、環境因子に関係なくほ乳行動の巣作り等に異常があり、この異常とヘキサナールの環境因子との異常が重なりあうことにより、オートクレーブ床敷環境下における Fyn 欠損マウスのほ乳行動異常、子の死亡が起こることが明らかとなった。

また、このヘキサナールによる Fyn 欠損マウスのほ乳行動異常と神経回路との関連性を明らかにする目的で、ヘキサナールにより活性化される脳領域の解析をc-fos発現活性を利用して行ったところ、Fyn欠損マウスの雌マウス脳では、ヘキサナールにより視床下部の Medial preoptic area (MPOA)が活性化されていた。この活性化は、正常雌マウスでは全くおこらず、Fyn欠損マウスでの特異的な活性化であった。興味深いことに、このMPOAは正常雌マウスにおいて子マウス存在下での活性化が認められる領域であった。これらの結果より、ヘキサナールが生育環境に存在すると正常雌マウスでは活性化されないMPOA領域が、Fyn欠損マウスでは活性化されることが明らかとなった。ヘキサナールは、におい分子として作用することより、におい認識に関わる神経回路の異常がFyn欠損マウスにあることが予想された。そこで、ヘキサナール存在下での Fyn 欠損マウスにおける活性化領域の違いを更に検討した結果、嗅球や副嗅球での活性化の程度には全く差が認められないものの、扁桃体の領域で、ヘキサナールによるFyn欠損マウスでの活性化の違いが認められた。このことより、Fyn欠損マウスではにおいの情報処理における扁桃体神経回路での異常が想定された。Fyn欠損マウスでは、今までに、恐がりとなる情動性の異常が認められており、この扁桃体での神経活動の異常は興味深い。これらの結果により、Fynがほ乳動物における認識機構や情動性制御に関わっていることが明らかとなった。ヒトにおいては、不安や恐怖などの情動性、環境の認識に関わる精神神経疾患が知られており、Fynのヒト精神神経疾患との関わりについても今後興味がもたれる。

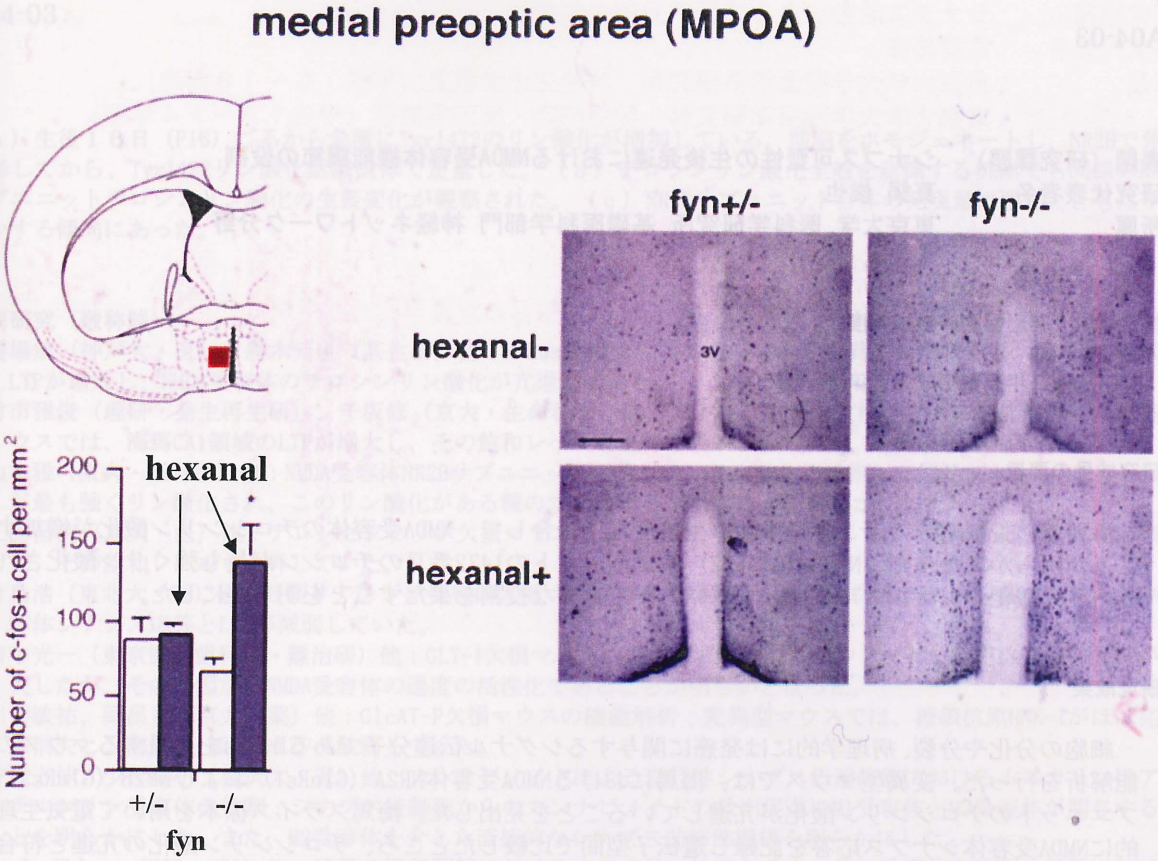


図1　Fyn欠損雌マウスにおけるMPOA領域でのc-Fos発現解析。Fynホモ欠損マウス（-/-）においてのみ、ヘキサナール存在下による活性化が認められた。黒カラムはヘキサナール存在下、白抜きカラムはコントロール下での単位面積（mm²）あたりのc-Fos発現量を示している。

また、Fyn 結合分子群として同定された CNR/プロトカドヘリンファミリーについての解析を行った。その結果、CNR/プロトカドヘリンは、大脳皮質形成過程におけるサブプレート神経細胞、皮質—視床神経軸索、視床—皮質神経軸索、皮質—皮質神経軸索で高いタンパク質発現をしていることが明らかとなった。また、興味深いことにこの神経軸索での発現は、脳発達過程で急激に減少して行くことをしていることが明らかとなった。この CNR/プロトカドヘリンタンパク質量の急激な減少は、ミエリン形成不全となる shiverer 変異体では緩やかな減少となることより、神経回路形成過程におけるミエリン形成が CNR/プロトカドヘリンタンパクの発現制御に関与することが示唆された。これらの結果より、Fyn 及び CNR/プロトカドヘリンによる神経回路形成、行動制御の関与が示唆された。今後は、これらの結果をもとに機能的な神経回路形成過程における Fyn 及び CNR/プロトカドヘリンの役割を、ヒトの精神神経疾患との関連性も含め、詳しく解析する予定である。

A04-03

表題（研究課題）　シナプス可塑性の生後発達におけるNMDA受容体機能調節の役割
研究代表者名　真鍋 俊也
所属　東京大学 医科学研究所 基礎医科学部門 神経ネットワーク分野

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度～平成１６年度

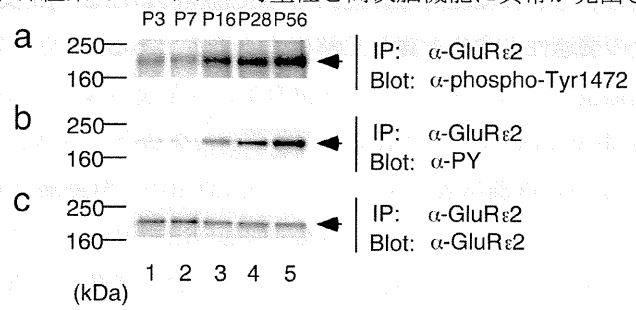
研究成果の要旨

海馬での長期増強の起こりやすさの生後変化に符合して、NMDA受容体のチロシンリン酸化が増加することが明らかになった。NR2B（GluRε2）サブユニットの1472番目のチロシンが最も強くリン酸化され、そのリン酸化がシナプス可塑性と学習において重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果

細胞の分化や分裂、病理学的には発癌に関与するシグナル伝達分子であるH-Rasを欠損するマウスの機能解析を行った。変異型マウスでは、海馬におけるNMDA受容体NR2A（GluRε1）およびNR2B（GluRε2）サブユニットのチロシンリン酸化が亢進していることを見出した。海馬スライス標本を用いて電気生理学的にNMDA受容体シナプス応答を記録し遺伝子型間で比較したところ、チロシンリン酸化の亢進と符合して変異型マウスでのNMDA受容体シナプス応答が選択的に増大していることが明らかとなった。さらに、LTPが変異型マウスで約２倍に増大していることも明らかとなり、H-RasがNMDA受容体を修飾することにより、シナプス伝達とその可塑性を制御していることがわかった（Manabe et al., J. Neurosci., 2000）。

NMDA受容体のチロシンリン酸化がNMDA受容体シナプス応答とLTPを修飾することが明らかになったため、次に、NR2Bサブユニットで Srcファミリーチロシンリン酸化酵素のひとつであるFynによりリン酸化される部位を決定した。ペプチドマッピングによりC末端の７ヶ所のチロシンがリン酸化されることがわかったが、人工発現系のHEK細胞での検討から、そのうちの最もC末端に近い３つのチロシンがおもにリン酸化されることが明らかとなった。さらに、その３つの中で、最も末端に近い1472番目のチロシン（Tyr1472）が最も強くリン酸化されることが明らかとなった。Tyr1472がリン酸化されたNR2Bサブユニットを特異的に認識する抗体を作製し、脳内におけるNR2Bサブユニットのチロシンリン酸化を定量したところ、未処理の脳組織でもある程度のリン酸化が入っているが、その程度は生後発達に伴って変化し、生後２週くらいから大きく増加することがわかった（図参照）。これは、LTPを観察でき始める時期に一致しており、このリン酸化の増大との関連性が示唆された。また、海馬スライスでLTPを誘導すると、数十分の経過でTyr1472のリン酸化が増加することも明らかとなり、シナプス可塑性にこのリン酸化が重要な役割を果たす可能性が示唆された（Nakazawa et al., J. Biol. Chem., 2001）。さらに、現在、Tyr1472をフェニルアラニンに置換してリン酸化が入らなくなったサブユニットを発現するノックインマウスの解析を進めており、中枢神経系でのシナプス可塑性と高次脳機能に異常が見出されている（論文投稿中）。



NMDA受容体NR2B（GluRε2）サブユニットのTyr1472のリン酸化の生後変化

（ａ）生後１６日（P16）ごろから急激にTyr1472のリン酸化が増加している。前脳をホモジェネートし、NR2Bで免疫沈降してから、Tyr1472リン酸化認識抗体で定量した。（ｂ）チロシンリン酸化全般を認識する抗体でも同様のNR2Bサブユニットチロシンリン酸化の生後変化が観察された。（ｃ）NR2Bサブユニット自体の発現量は週齢とともにやや減少する傾向にあった。

共同研究（敬称略）

饗場篤（神戸大・医）、勝木元也（基生研）他：H-Ras欠損マウスの機能解析；変異型マウスでは、海馬CA1領域のLTPが増大し、NMDA受容体のチロシンリン酸化が亢進していた。

竹市雅俊（理研・発生再生研）、千坂修（京大・生命科学）他：カドヘリン１１欠損マウスの機能解析；変異型マウスでは、海馬CA1領域のLTPが増大し、その飽和レベルも上昇していた。

山本雅（東大・医科研）他：NMDA受容体NR2Bサブユニットのチロシンリン酸化の役割；NR2BサブユニットのTyr1472が最も強くリン酸化され、このリン酸化がある種の学習に重要であることを明らかにした。

三品昌美（東大・医）他：テレンセファリン欠損マウスの機能解析；変異型マウスでは、海馬CA1領域のLTPが増大し、その飽和レベルも上昇していた。

竹島浩（東北大・医）他：３型リアノジン受容体欠損マウスの機能解析；変異型マウスでは、海馬CA1領域のAMPA受容体シナプス応答とLTPが減弱していた。

田中光一（東京医科歯科大・難治研）他：GLT-1欠損マウスの機能解析；変異型マウスでは、海馬CA1領域のLTPが消失したが、その原因が、NMDA受容体の過度の活性化であることが明らかとなった。

川嵜敏祐、岡昌吾（京大・薬）他：GlcAT-P欠損マウスの機能解析；変異型マウスでは、糖鎖抗原HNK-1がほぼ完全に消失し、海馬CA1領域のLTPが減弱していた。

狩野方伸、少作隆子（金沢大・医）他：カンナビノイドによる逆行性シナプス伝達修飾におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の役割；シナプス後細胞からのカンナビノイドの放出促進にM1受容体とM3受容体が関与することを明らかにした。また、M2受容体を介した直接的なシナプス前修飾機構を明らかにした。

F. J. Ehlert（UCI, USA）他：腸管の機能調節におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の役割；腸管におけるムスカリン性アゴニストによる脱感作にM2受容体およびM3受容体が関与することを明らかにした。

渡辺すみ子（東大・医科研）、新井賢一（東京都臨床研）他：網膜における幹細胞分化に関する研究；網膜におけるES細胞のニューロンへの分化にホメオボックス遺伝子Rx/raxが影響を与えることを明らかにした。

御子柴克彦（東大・医科研）他：唾液分泌におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の役割；唾液分泌に必須である唾液腺細胞内Ca^{2+}濃度上昇に、M3受容体がおもに関与することを明らかにした。

大野博司（理研・免疫アレルギー研）他：AP-3欠損マウスの機能解析；変異型マウスでは、抑制性シナプス伝達が減弱し、LTPの誘導閾値が低下することを明らかにした。

野田昌晴（基生研）他：チロシン脱リン酸化酵素Ptprz欠損マウスの機能解析；変異型マウスでは、年齢依存的にLTPが増大し、それにRhoGAP-ROCK経路が関与することを明らかにした。

A04-04

研究課題　シナプス活動による遺伝子発現の制御
研究代表者　尾藤晴彦
所属　東京大学大学院医学系研究科　神経生化学教室（平成１５～１６年度）
京都大学大学院医学研究科　神経細胞・薬理学教室（平成１２～１４年度）

特定領域「神経回路」参加年度
平成１２～１６年度

研究成果の要旨
本研究により、海馬以外でのCaMKIV/CREB依存的転写の意義を初めて解明した。さらにCREB機能を修飾し得る新規キナーゼを単離し、CREB下流のArc蛋白のシナプス機能に関する知見を得た。またRho/ROCK/LIMK経路の突起形成への寄与を証明し、神経活動に伴うスパイン内アクチン再編成を可視化した。

研究成果
長期記憶が成立するためには、シナプス伝達の場である樹状突起スパインにおけるシグナル伝達効率の上昇が持続的に維持されることが必須と考えられている。その分子機構として着目されているものの一つは、転写因子CREBを介したシナプス活動依存的遺伝子発現上昇に伴う入力特異的シナプス修飾である。CREBの関与はアメフラシからマウス・ラットに至る多くの動物種において確認されているが、そのシナプス活動依存的活性制御機構については、詳細はまだ明らかになっていない。

研究代表者は、これまで、CaMKK-CaMKIVカスケードが興奮性海馬CA1錐体細胞における主要な活動依存的CREBリン酸化経路であることを世界に先駆けて示し、同時にCREBのリン酸化そのものよりもCREBリン酸化の持続性が神経活動パターンによって制御されることが下流の遺伝子発現に必須であることを証明した（Bito et al., **Cell** 1996; Bito et al., **Curr. Opin. Neurobiol.**, 1997; Bito, **Cell Calcium** 1998）。しかし、CREB活性化制御の分子的実体やその生理的意義については多くのことが不明であったので、本研究においては、以下の４点を解明することを目標にした。

１）海馬以外の部位におけるCREB活性化のメカニズムや意義を解明する。
２）CREB転写複合体制御に関わる新規CaMKファミリーリン酸化酵素を検索し、その機能を解明する。
３）CREB下流の転写産物のシナプス入力特異的制御を解析する。
４）CREB依存的に長期修飾を受けるシナプス機能を可視化・解析する一つの試みとして、樹状突起スパイン等の神経突起内アクチンダイナミクスの可視化を行い、その制御機構を解明する。

成果１）小脳顆粒細胞生存におけるCaMKIVのCREBキナーゼとしての役割の解明

従来から、我々を含め多くのグループが、CaMKIVは小脳顆粒細胞において非常に強く発現していることを見出していたが、その機能は不明であった。そこでフランスStrasbourg大Loeffler研からの短期派遣留学生Violaine Seeとの協同研究により、まずL型カルシウムチャンネル活性化→CaMKIV活性化→CREBリン酸化という経路（Mermelstein, Bito et al., **J. Neurosci.**, 2000）が小脳顆粒細胞にも生理的に存在することを解明し、引き続きその生理学的意義の解明を試みた。

その結果、初代培養小脳顆粒細胞の培養液中のカリウム濃度を25mMから5mMへ低下させることにより、caspase-3依存性apoptosisが活性化されるが、この過程でCaMKIVが限定分解され、これに並行してphospho-CREB量が減少することを見いだした。CaMKIV分解とpCREB減少は、L型カルシウムチャンネルの活性化またはcaspase阻害剤により防止された。逆にapoptosis非誘導条件下でも同チャンネル阻害によりcaspase-依存性CaMKIV分解が誘導された。この際、活性型CaMKIVの強制発現により、CREBリン酸化の回復のみならず、apoptosis防止効果も顕著であることから、CaMKIV活性の維持による核内リン酸化CREB量の保持が小脳顆粒細胞の生存にとって必須であることが明らかになった（See et al., **FASEB J.**, 2001）。

このようなデータにより、CaMKIVによるCREBリン酸化制御が、海馬錐体細胞における長期可塑性の発現以外にも、数多くの生理的意義を有していることを初めて明らかにしたものである。ほぼ同時期に、一部の遺伝性変性疾患の病因におけるCREB転写阻害の重要性が示されたこともあり、本発見は、CaMKIVによるCREBリン酸化機構が、生存制御により脳高次機能を司る神経回路網の長期的維持にも関与している可能性を示唆するものである（図１）（Bito and Takemoto-Kimura, **Cell Calcium**, 2003）。

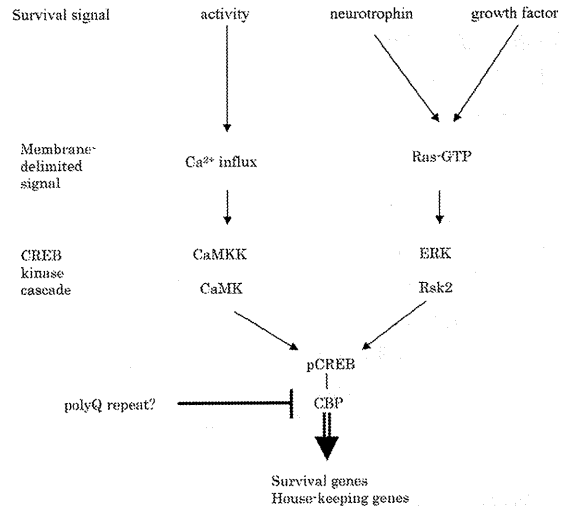


図１：CaMKシグナルの神経生存における役割

成果２）CaMK類似CREB制御キナーゼ(CLICK)の同定と機能解析

転写因子CREBは、記憶学習などの長期的現象の際に遺伝子発現を介して神経細胞における長期的な変化を誘導する。活動依存的CREBキナーゼとして、CaMKIV, PKA, Rskなどが知られているが、PKA, Rskはいずれも活性中心周囲領域の塩基配列を非常に保存した複数のメンバーから成るキナーゼ群を形成している。そこでCaMKIVにも、触媒部位を中心にホモロジーを有する類似キナーゼがトランスクリプトームに存在するかを調べるため、PCR法ならびに、CREBリン酸化を媒介する領域に対するホモロジーによりCaM kinase IV類似の新規CREB制御kinaseの候補を探索した。その結果、in vitroにてCREB活性を修飾可能なキナーゼを３つ同定して、CLICK-I,-II,-IIIと名づけた。これらはいずれも機能未同定のキナーゼで、脳特異的発現分布を有し、in vitroのCREB転写活性を修飾することから、長期記憶・長期可塑性に対する何らかの貢献があることが期待された。これまでにCLICK-I,-II,-IIIの全長cDNA塩基配列ならびに全遺伝子構造をヒトならびマウスで決定し、現在各々について遺伝子破壊マウスを作成中である。

特にCLICK-IIIはin vitroにおいてCa^{2+}/CaM依存性に活性化され、少なくともin vitroにおいてはCREBSer133をリン酸化するCaMキナーゼ活性を有することを明らかにした。興味深いことにCLICK-III mRNAは中枢神経系でdiffuseに少～中程度に発現しており、しかしながら大脳辺縁系、間脳の限られた神経核、とくに扁桃体中心核、視床下部内副側核、松果体にて極めて強く発現しているCaMKIアイソフォームであることを見出した。このような発現パターンは他のCaM kinaseと異なっており、高次脳機能における新たな働きを担っている可能性が示唆される。

さらにCLICK-IIIC末端は、膜局在シグナルであるC末端CAAX配列によりprenyl化修飾を受ける結果、Golgi膜および形質膜へ局在化されることを明らかにした（図２）。このように脂質修飾を受け、膜移行を行う神経特異的キナーゼの存在を中枢神経系で発見したのは全く最初の例であり、報告直後より多くの注目を浴びることとなった。本知見は、神経細胞において、膜でのカルシウム流入部位の近傍にカルシウム・カルモデュリン標的キナーゼを局在化させ、興奮・リン酸化共役の効率を高めるための新たな分子機構を示唆するものである(Takemoto-Kimura et al., **J. Biol. Chem.**, 2003)。

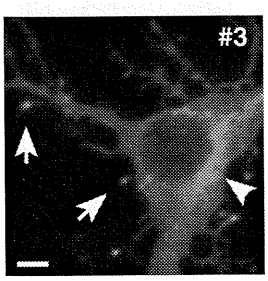


図２：神経細胞におけるCLICK-IIIの膜局在

成果３）CREB下流の転写産物Arcのシナプス活動依存的制御とその意義の解明

c-fosやzif/268等前初期遺伝子群を形成する遺伝子の多くはプロモーター領域に典型的なCRE配列を有し、CREB活性化の下流で転写制御を受けることが明らかになっているが、そのほとんどについては、いまだ明確なシナプス機能との相関が明示されていない。

初代培養海馬錐体細胞において、可塑性刺激様なカルシウム上昇を伴う刺激を付与した後、新規蛋白合成依存的に樹状突起スパイン内発現が６０～１２０分以内に上昇する蛋白をスクリーニングしたところ、Arcが浮上した。ジョンズホプキンズ大学Worley研究室との協同で、Yeast 2-hybridスクリーニングおよびin vitro binding assayによりArcにはCaMKIIαならびβなどとの結合能があることが明らかになった。引き続き、ランダムCFP/YFP挿入法を用い、ArcとCaMKIIの結合能を損なわないFRET対を作成・最適化し、神経細胞に遺伝子導入したところ、生きた神経細胞においてもスパイン内で、Arc-CaMKIIの間のFRETが確認された。すなわち、CREB活性化後、Arc転写誘導、Arc蛋白翻訳活性化の後、Arcはシナプス近傍に濃縮され、そこで一定量がCaMKIIと結合した状態で存在することが初めて明らかとなった。現在の結合の生理的意義を探索中である。(Okuno et al., 投稿準備中)

成果４）樹状突起スパイン等神経突起へのアクチン集積機構の解明、および突起形成におけるRhoシグナル経路の同定

海馬錐体細胞の樹状突起スパインは、活動依存的な形態可塑性を引き起こすことが知られている。我々は、GFPとアクチン分子の融合蛋白を作製し、adenovirusを用いて神経細胞に導入し、この過程で生じるアクチン細胞骨格の活動依存的再編成の可視化に初めて成功した。GFP-actin imagingを生きた初代培養海馬錐体細胞で行った結果、a)アクチン細胞骨格に動的な成分と静的な成分が共存すること、b)一定の条件下でスパインや細胞体辺縁膜へのアクチンの集積が神経活動依存的に引き起こされること、c)スパインへのアクチン移行はNMDA受容体依存的カルシウム流入により、また細胞体辺縁膜へのアクチン集積は、電位依存性カルシウムチャンネルにより特異的に引き起こされることを発見した(図３) (Furuyashiki et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2002)。

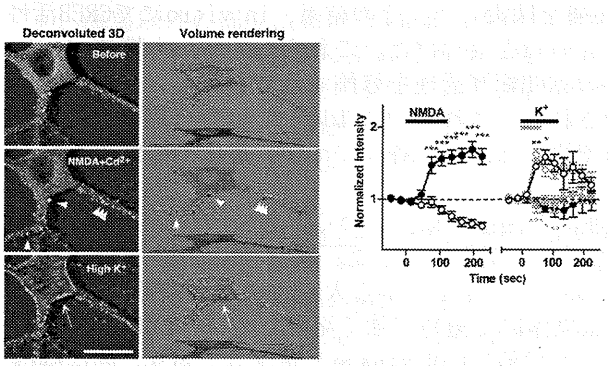


図３：NMDA刺激依存的アクチン集積のスパインへの誘導の可視化

上記の結果は、神経細胞骨格シグナリングが、神経回路の発生途上あるいは発達後を問わず、重要な役割を果しており、神経細胞の形態制御の時空間的ダイナミックスが高次脳機能に大きく寄与している可能性を強く裏付けるものである。

そこでわれわれは、形態的に最も単純な神経細胞である小脳顆粒細胞に着目して、まず極性が生じ、２本の軸索がまず伸展し始め、その後に細胞体周辺に数多くの樹状突起が発生する過程（図４）を支配するシグナル経路の役割を探索した。

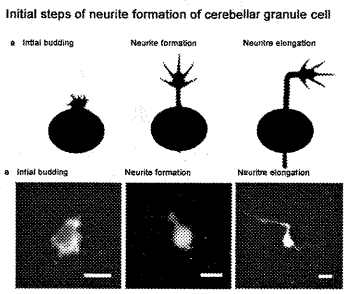


図４：小脳顆粒細胞の突起進展機構

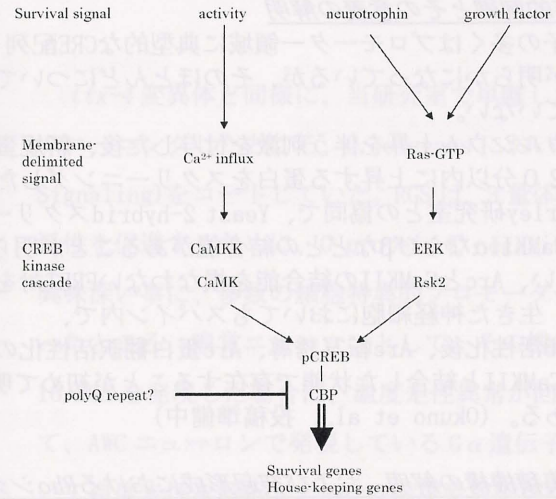


図１：CaMKシグナルの神経生存における役割

成果２）CaMK類似CREB制御キナーゼ(CLICK)の同定と機能解析

転写因子CREBは、記憶学習などの長期的現象の際に遺伝子発現を介して神経細胞における長期的な変化を誘導する。活動依存的CREBキナーゼとして、CaMKIV, PKA, Rskなどが知られているが、PKA, Rskはいずれも活性中心周囲領域の塩基配列を非常に保存した複数のメンバーから成るキナーゼ群を形成している。そこでCaMKIVにも、触媒部位を中心にホモロジーを有する類似キナーゼがトランスクリプトームに存在するかを調べるため、PCR法ならびに、CREBリン酸化を媒介する領域に対するホモロジーによりCaM kinase IV類似の新規CREB制御kinaseの候補を探索した。その結果、in vitroにてCREB活性を修飾可能なキナーゼを３つ同定して、CLICK-I,-II,-IIIと名づけた。これらはいずれも機能未同定のキナーゼで、脳特異的発現分布を有し、in vitroのCREB転写活性を修飾することから、長期記憶・長期可塑性に対する何らかの貢献があることが期待された。これまでにCLICK-I,-II,-IIIの全長cDNA塩基配列ならびに全遺伝子構造をヒトならびにマウスで決定し、現在各々について遺伝子破壊マウスを作成中である。

特にCLICK-IIIはin vitroにおいてCa^{2+}/CaM依存性に活性化され、少なくともin vitroにおいてはCREBSer133をリン酸化するCaMキナーゼ活性を有することを明らかにした。興味深いことにCLICK-III mRNAは中枢神経系でdiffuseに少～中程度に発現しており、しかしながら大脳辺縁系、間脳の限られた神経核、とくに扁桃体中心核、視床下部内側核、松果体にて極めて強く発現しているCaMKIアイソフォームであることを見出した。このような発現パターンは他のCaM kinaseと異なっており、高次脳機能における新たな働きを担っている可能性が示唆される。

さらにCLICK-IIIC末端は、膜局在シグナルであるC末端CAAX配列によりprenyl化修飾を受ける結果、Golgi膜および形質膜へ局在化されることを明らかにした（図２）。このように脂質修飾を受け、膜移行を行う神経特異的キナーゼの存在を中枢神経系で発見したのは全く最初の例であり、報告直後より多くの注目を浴びることとなった。本知見は、神経細胞において、膜でのカルシウム流入部位の近傍にカルシウム・カルモデュリン標的キナーゼを局在化させ、興奮・リン酸化共役の効率を高めるための新たな分子機構を示唆するものである(Takemoto-Kimura et al., **J. Biol. Chem.**, 2003)。

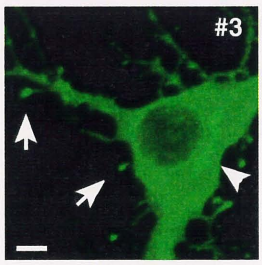


図２：神経細胞におけるCLICK-IIIの膜局在

成果３）CREB下流の転写産物Arcのシナプス活動依存的制御とその意義の解明

c-fosやzif/268等前初期遺伝子群を形成する遺伝子の多くはプロモーター領域に典型的なCRE配列を有し、CREB活性化の下流で転写制御を受けることが明らかになっているが、そのほとんどについては、いまだ明確なシナプス機能との相関が明示されていない。

初代培養海馬錐体細胞において、可塑性刺激様なカルシウム上昇を伴う刺激を付与した後、新規蛋白合成依存的に樹状突起スパイン内発現が６０～１２０分以内に上昇する蛋白をスクリーニングしたところ、Arcが浮上した。ジョンズホプキンズ大学Worley研究室との協同で、Yeast 2-hybridスクリーニングおよびin vitro binding assayによりArcにはCaMKIIαならびβなどとの結合能があることが明らかになった。引き続き、ランダムCFP/YFP挿入法を用い、ArcとCaMKIIの結合能を損なわないFRET対を作成・最適化し、神経細胞に遺伝子導入したところ、生きた神経細胞においてもスパイン内で、Arc-CaMKIIの間のFRETが確認された。すなわち、CREB活性化後、Arc転写誘導、Arc蛋白翻訳活性化の後、Arcはシナプス近傍に濃縮され、そこで一定量がCaMKIIと結合した状態で存在することが初めて明らかとなった。現在の結合の生理的意義を探索中である。(Okuno et al., 投稿準備中)

成果４）樹状突起スパイン等神経突起へのアクチン集積機構の解明、および突起形成におけるRhoシグナル経路の同定

海馬錐体細胞の樹状突起スパインは、活動依存的な形態可塑性を引き起こすことが知られている。我々は、GFPとアクチン分子の融合蛋白を作製し、adenovirusを用いて神経細胞に導入し、この過程で生じるアクチン細胞骨格の活動依存的再編成の可視化に初めて成功した。GFP-actin imagingを生きた初代培養海馬錐体細胞で行った結果、a)アクチン細胞骨格に動的な成分と静的な成分が共存すること、b)一定の条件下でスパインや細胞体辺縁膜へのアクチンの集積が神経活動依存的に引き起こされること、c)スパインへのアクチン移行はNMDA受容体依存的カルシウム流入により、また細胞体辺縁膜へのアクチン集積は、電位依存性カルシウムチャンネルにより特異的に引き起こされることを発見した(図３) (Furuyashiki et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2002)。

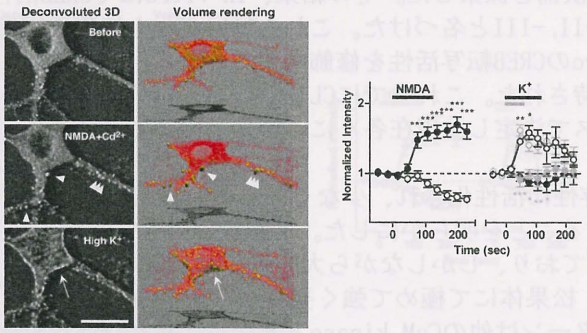


図３：NMDA刺激依存的アクチン集積のスパインへの誘導の可視化

上記の結果は、神経細胞骨格シグナリングが、神経回路の発生途上あるいは発達後を問わず、重要な役割を果しており、神経細胞の形態制御の時空間的ダイナミックスが高次脳機能に大きく寄与している可能性を強く裏付けるものである。

そこでわれわれは、形態的に最も単純な神経細胞である小脳顆粒細胞に着目して、まず極性が生じ、２本の軸索がまず伸展し始め、その後に細胞体周辺に数多くの樹状突起が発生する過程（図４）を支配するシグナル経路の役割を探索した。

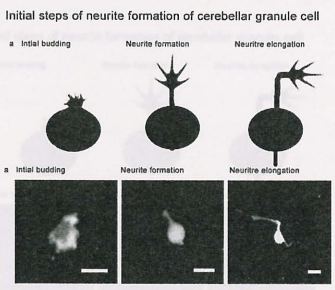


図４：小脳顆粒細胞の突起進展機構

ttx-4 変異体と同様に、当研究室で単離した好冷性温度走性異常を示す変異の原因遺伝子をクローニングしたところ、C. elegans において EAT-16 とよばれる RGS(Regulator of G protein Signaling)をコードしていた。RGS は、3 量体 G protein のシグナル経路において、Gα の GTPase 活性を促進するために、G protein の negative regulator として機能する事が知られている。興味深い事に、多数の細胞特異的プロモーターを用いて温度走性異常のレスキュー実験を行なったところ、嗅覚ニューロンとして、その機能が詳細に解析されている AWC ニューロンで EAT-16/RGS を発現した場合に、温度走性異常が回復する事を示唆する結果を得た。この結果を受けて、AWC ニューロンで発現している Gα 遺伝子のノックアウト系統、あるいは過剰発現系統について温度走性を解析し、AWC の温度受容シグナル伝達系において EAT-16/RGS のターゲットとなり得る Gα の候補や、その下流に存在すると考えられる guanylyl cyclase も同定した。

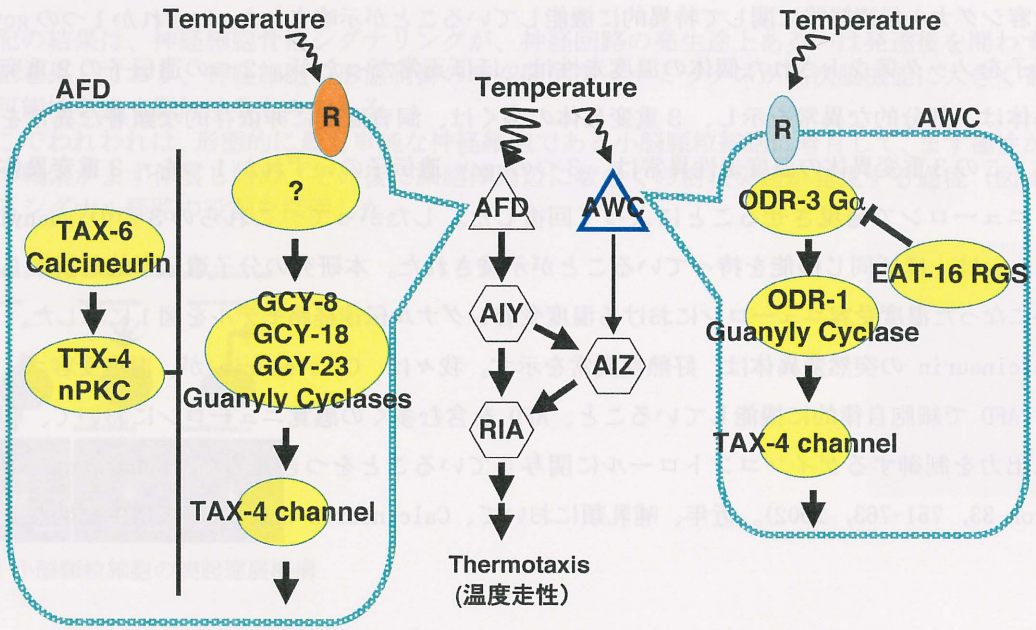
これまでの解析から、温度受容ニューロン AFD において、刺激である温度に依存して膜電位変化を起こすためには、ほ乳類の視覚や嗅覚の系に必須な環状ヌクレオチド依存性チャンネル（CNG channel）が、重要な役割を担っている事が明らかになっている。さらに、ヒト培養細胞（HEK293）を用いた電気生理学的実験より、*C. elegans* の CNG channel は、cGMP 依存的であることが示唆されている。そこで、*C. elegans* の温度受容シグナル伝達機構が、哺乳類の視覚系と類似性があるという仮説に基づき、CNG channel の上流で機能すると予想される分子をコードする遺伝子に関するノックアウト系統を作成し、温度走性行動に異常が生じるがどうかを検討した。その結果、cGMP の産生に必要な guanylyl cyclase をコードする３種類の gcy 遺伝子が、温度走性に関与しているという結果が得られた。アミノ酸配列の比較から、これら３つの gcy 遺伝子は、細胞外ドメインを持つリセプタータイプで、お互いのアミノ酸レベルの同一性が、全長に渡って 50%近くあり、C. elegans のゲノムに存在する receptor type guanylyl cyclase の中で１つのサブファミリーを構成していることがわかった。これらの gcy 遺伝子は、それぞれ、温度受容ニューロンである AFD の感覚繊毛付近でのみ発現していたため、温度入力後の温度受容シグナル伝達経路に関して特異的に機能していることが示唆された。いずれか１つの gcy 遺伝子をノックアウトされた個体の温度走性は、ほぼ正常だったが、２つの遺伝子の２重突然変異体は、部分的な異常を示し、３重変異体の多くは、飼育温度に非依存的な顕著な異常を示した。この３重変異体の温度走性異常は、３つの gcy 遺伝子のいずれか１つを、３重変異体の AFD ニューロンで発現させることによって回復した。したがって、これらの３つの guanylyl cyclase は、ほぼ同じ機能を持っていることが示唆された。本研究の分子遺伝学的解析から明らかになった温度受容ニューロンにおける温度受容シグナル伝達経路モデルを図１に示した。

Calcineurin の突然変異体は、好熱性異常を示す。我々は、Calcineurin が、温度受容ニューロン AFD で細胞自律的に機能していること、AFD を含む多くの感覚ニューロンにおいて、刺激の入出力を制御するゲインコントロールに関与していることをつきとめた（Kuhara et. al., Neuron 33, 751-763, 2002)。近年、哺乳類において、Calcineurin は、LTP や LTD に関与して

いることが報告されている。*C. elegans* の Calcineurin は、感覚ニューロンにみならず介在ニューロンにおいても発現が観察されるため、Calcineurin が、*C. elegans* の学習・記憶に関与しているかどうかを、我々の開発した飼育温度（CS）と餌（US）の連合学習の行動パラダイムを用いて検証した。Calcineurin の変異体の感覚ニューロンのみで Calcineurin を発現しているトランスジェニック系統の温度走性は、正常であるが、興味深いことに、飼育温度と餌に関する連合学習テストにおいて異常を示すことがわかった（Aho 表現型）。多種類の神経細胞特異的プロモーターを用いて、このトランスジェニック系統のいろいろな介在ニューロンにおいて Calcineurin を発現させたところ、温度走性神経回路上の介在ニューロン AIZ と RIA の両方で、Calcineurin を発現させると、飼育温度と餌の連合学習が、正常に回復することが明らかになった。

飢餓を体験させても、温度走性が逆転しない *aho* 変異体において異常になっている *aho* 遺伝子を２つクローニングした。aho-2 遺伝子は、ヒトのインスリンのホモログである ins-1 遺伝子と同一であることがわかった。脳内のインシュリン濃度は血中濃度よりも高いことが知られているが、その作用機序については、ほとんど不明である。最近、インスリンシグナル伝達経路が温度と飢餓の温度走性の可塑性に関与していることが明らかになってきたが、インスリン様ペプチドが、どのように温度走性の神経回路を制御するのかについは、今後の課題である。aho-3 遺伝子は、酵母からヒトまで、アミノ酸配列のレベルで非常に高く保存されているタンパクであった。しかし、この遺伝子の機能については、まったく知見が得られていない。したがって、温度走性をモデル系として、この遺伝子の機能解析を行なうことも、今後の課題であると考えている。

分子遺伝学的解析に基づく温度受容のメカニズム



A04-06

表題（研究課題）　ルシフェラーゼを利用した脳機能の解析
研究代表者名　山口　瞬
所属　神戸大学大学院医学系研究科脳科学講座分子脳科学分野

特定領域「神経回路」参加年度
平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨
時計遺伝子のプロモーターにルシフェラーゼをつないだトランスジェニックマウスを作成し、遺伝子発現のリアルタイム・モニタリングに成功した。その系を用いて、視交叉上核の個々の神経細胞が、約２４時間周期のリズムを作り出し、それらが視交叉上核内で統合されるメカニズムを明らかにした。

研究成果
哺乳類の代謝、ホルモン、生理現象、行動などに見られる約２４時間周期のリズム（概日リズム）は、脳の視交叉上核に存在する体内時計によって作り出されている。視交叉上核の神経細胞は、時計遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子を約２４時間周期で発現しており、ショウジョウバエからのアナロジーで、この時計遺伝子の周期的発現のメカニズムこそ、概日リズム形成の中核であると考えられた。哺乳類の時計遺伝子として、mPer1, mPer2, mPer3, mCry1, mCry2 などがクローニングされたが、これらが周期的に発現するメカニズムは全く不明であった。そこで、以下の事柄を明らかにした。

１）時計遺伝子mPer1 のmRNAが周期的に発現をするのに十分なプロモーター領域の同定(Curr Biol. 2000)

時計遺伝子 mPer1 の mRNA は、視交叉上核で毎日１０倍近い増減を繰り返す。このようなダイナミックな変化をもたらすメカニズムを解明するため、マウスの時計遺伝子 mPer1 の５’-上流領域のゲノムを単離した。mPer1 の cDNA の５’末端をクローニングし、ゲノム構造と比較した結果、mPer1 の mRNA は二つの異なる第一エクソン（エクソン 1A とエクソン 1B）から産生され、共通のエクソン２につながることを明らかにした。ゲノムの塩基配列の解析から、エクソン 1A と 1B 両方の５’側近傍に、周期的な転写調節のカギとなる、E-box(CACGTG)が各々２つおよび３つ、密集して存在することを明らかにした。また、夜間、マウスに光を照射すると、視交叉上核で mPer1 の mRNA が誘導されるが、その誘導機構に関わると推測される、多数の cyclic AMP-responsive element (CRE)や AP-1 , AP-3, Egr-1 の結合モチーフが存在することも明らかにした。

さらに、エクソン 1A およびエクソン 1B を含む、mPer1 の５’-上流領域 7.2kb のゲノム DNA を、ホタルの発光酵素ルシフェラーゼにつなぎ、同コンストラクトを用いて、トランスジェニックマウスを作成した。このトランスジェニックマウスの視交叉上核では、ルシフェラーゼの mRNA が、本来の mPer1 と同様、著明な発現リズムを示した。また、本来の mPer1 よりは弱いものの、夜間の光照射による誘導も見られた。

以上のことから、上記 7.2kb のゲノム領域は、時計遺伝子 mPer1 の mRNA が周期的に発現をするのに十分なプロモーター領域であることを証明した（Curr Biol. 2000)。

２）時計遺伝子mPer1 プロモーターに結合し、mPer1 の発現の振幅を大きくする転写因子群の解明(Mol Cell Biol. 2000, Genes Dev. 2001)

mPer1 のプロモーター領域の塩基配列の解析から、PAR proteins (proline and acidic amino acid rich proteins; DBP, HLF, TEF の３つの転写因子が属する）が結合するモチーフが存在することを見出した。実際、視交叉上核では、DBP の mRNA と蛋白は、mPer1 の転写が盛んな昼間に多く存在すること、さらに in vitro のプロモーターアッセイから、DBP が mPer1 の転写に促進的に働くことを明らかにした(Mol Cell Biol. 2000)。

さらにその後、DBP と同じ活性型の転写因子、HLF と TEF も、視交叉上核で DBP と同位相の発現リズムを示すことを見出した。一方、PAR protein と構造が似ており、同じ結合モチーフに結合するが、抑制に働く転写因子 E4BP4 は、視交叉上核で全く逆位相で発現していることを明らかにした（Genes Dev. 2001)。

以上のことから、視交叉上核で、昼間は活性型の転写因子群 PAR proteins が、夜間は抑制型転写因子 E4BP4 が発現して、同一のモチーフに結合し、mPer1 等の発現リズムの振幅を増大させるという、巧妙なシステムが存在することを明らかにした。

生きた状態の哺乳動物の脳で、遺伝子の発現変化を観察することができれば、神経科学の分野で、多大の成果をもたらす新技術と成り得る。時計遺伝子 mPer1 の mRNA は、視交叉上核で毎日１０倍近い増減を繰り返す。このダイナミックな発現変化に着目し、マウスの脳で遺伝子発現のリアルタイム・モニ

タリングを行う系の開発を目指した。

3）mPer1 プロモーター／ルシフェラーゼ・トランスジェニックマウスを用いた個体レベルの遺伝子発現リアルタイム・モニタリング(Nature 2001)

mPer1 プロモーター／ルシフェラーゼ・トランスジェニックマウスの脳室から、微量ポンプを用いて基質のルシフェリンを持続投与し、視交叉上核を発光させた。さらに、視交叉上核に光ファイバーを挿入してフォトンを導出し、光電子増倍管で発光量をモニターすることで、世界で初めて、生きたままのマウスの脳で、時計遺伝子が周期的に発現する様子を観察することに成功した(Nature 2001, 図１参照)。この系の解析から、発光量の変化は、本来の mPer1 の mRNA の発現変化を忠実に再現し、位相のずれはほとんど無い（０～２hr）ことも示した。

mPer1 プロモーター／ルシフェラーゼ・トランスジェニックマウスの視交叉上核の組織培養と CCD カメラあるいは二次元フォトンカウンティングシステムを組み合わせることで、組織レベルおよび細胞レベルで遺伝子発現をモニタリングできる系を開発した。この系を用いて時計遺伝子の発現変化を観察することで、以下の事柄を明らかにした。

4）体内時計の位相変位に関わるシグナル経路の解明(Curr Biol. 2001)

マウスに夜間、光を短時間（１５分程度）照射すると、マウスの体内時計の位相は最大数時間シフトする。夜の始めに光照射すると、体内時計の位相は後退（時計の針が遅れる）し、夜の終わり頃に照射すると、位相は前進（時計の針が進む）する。このような現象は、体内時計が周囲環境の明暗周期に同調するのに役立っている。この体内時計の位相変位に関わる神経経路は、網膜から視交叉上核への直接の神経投射であり、神経伝達物質は、グルタミン酸と PACAP である。一方、受けて側の視交叉上核の神経細胞では、NMDA 受容体の関与が示唆されていたが、その関与の度合いおよび NMDA 受容体以降のシグナル伝達メカニズムは明らかでなかった。

このようなメカニズムを解明するため、まず、薬剤投与の実験が容易な系を作り上げた。mPer1 プロモーター／ルシフェラーゼ・トランスジェニックマウスの視交叉上核を組織培養し、メディウムにルシフェリンを入れて発光させ、発光量を CCD カメラ、あるいは二次元フォトンカウンティングシステムでモニターした。その結果、視交叉上核全体の発光量は、著明な概日リズムを示し、長期間（２ヶ月以上）体外で、体内時計のリズムを観察できる系を確立した。この系に、様々なタイミングで NMDA を投与し、体内時計の位相変位は前進も後退も含めて、NMDA 受容体の刺激のみで再現できることを明らかにした(Curr Biol. 2001)。

5）視交叉上核の個々の神経細胞の作り出すリズムが視交叉上核レベルで統合されるメカニズムの解明 (Science 2003b)

発光のモニター・システム（CCD カメラ付き顕微鏡）の感度を高め、単一神系細胞レベルでリズムを観測できる系を完成させた（図２参照)。mPer1 プロモーター／ルシフェラーゼ・トランスジェニックマウスの視交叉上核の組織培養で、個々のニューロンの発光リズムを同時に観測することで、ニューロン間のリズムの相互関係を解析した。発光のリズムは、視交叉上核の背内側から開始し、腹外側に拡がるようにして終焉した。この発光リズムの空間的、時間的パターンは、生体内での時計遺伝子 mPer1 の mRNA の発現パターンを忠実に踏襲したものであった。このような、視交叉上核内での空間的、時間的、統制のメカニズムを調べるため、蛋白合成阻害薬、シクロヘキシミドの投与実験を行った。シクロヘキシミドを短時間（６時間以内）投与しても、大きな影響は見られなかったが、長時間（１２時間以上）投与した場合、個々の視交叉上核の神経細胞のリズムは全て、シクロヘキシミドの washout 後に、同一位相から再開した。すなわち、シクロヘキシミド投与中に全ての神経細胞の時計が停止して、リセットされたと考えられる。この停止から再開に至る手順を経た後、個々の神経細胞のリズムの位相を調べた。その結果、再開後約３日で、元の背内側から腹外側に拡がる発光リズムのパターンを回復することがわかった。したがって、視交叉上核内で見られた、空間的、時間的に組織化されたリズム位相は、視交叉上核内に内在するメカニズムによって形成されていることを明らかにした(Science 2003b)。

さらに、テトロドトキシンの投与実験を行い、活動電位の関与を調べた。テトロドトキシンを投与して、約３日で少し、５日から７日すると完全に、個々の神経細胞のリズム位相が、バラバラになった。したがって、活動電位依存的なメカニズムによって、空間的、時間的に組織化されたリズムが作り出されていた。また、テトロドトキシン投与中には、個々の細胞の発光リズムの振幅が急速に減弱することも見出した。実際、このとき発光だけでなく、時計遺伝子の mRNA 量や蛋白量も極端に減少していることから、時計遺伝子の振幅を大きく保つためにも、活動電位が利用されていることを明らかにした。

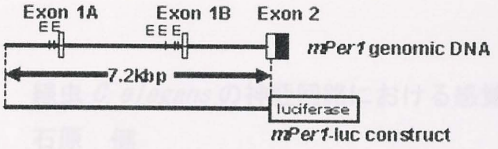


図1a mPer1プロモーター/ルシフェラーゼ・トランスジェニックマウスの作成に使用したコンストラクト

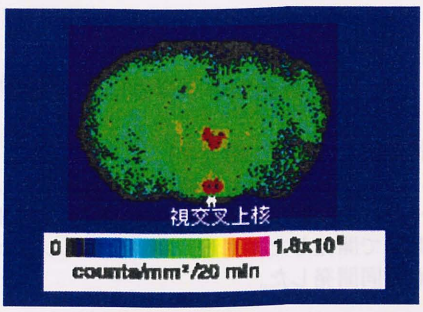


図1b 脳切片における発光パターン

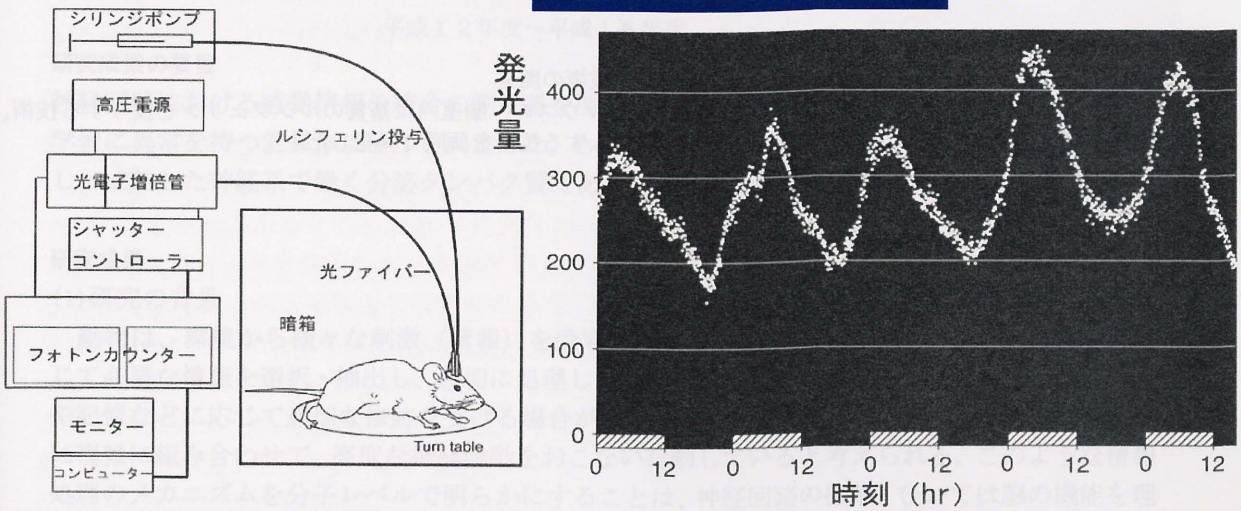


図１ｃ　生きたマウスの脳での時計遺伝子リアルタイム・モニタリング

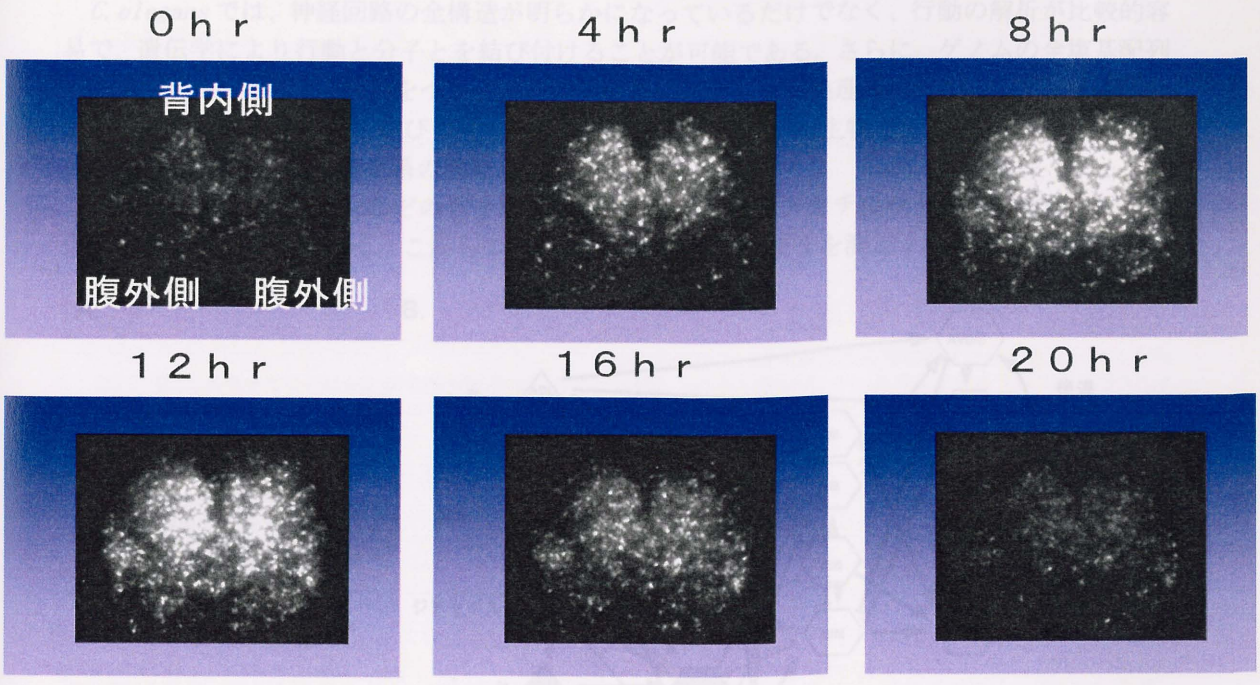


図2　mPer1ﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ/ルシフェラーゼ・トランスジェニックマウスの視交叉上核の組織培養で見られる発光のリズム。多数の輝点は、個々の神経細胞からの発光に対応する。

共同研究

共同研究の相手　小林正樹　（東北工業大学）

共同研究内容と成果　ルシフェラーゼの微弱発光を検出するシステムの開発

時計遺伝子のプロモーターの制御下でルシフェラーゼを発現するトランスジェニックマウスの、脳内での発光を検出するシステムを、共同で開発した。また、同トランスジェニックマウスを用いて、単一神経細胞レベルで、発光をモニターできる系も共同開発した。

共同研究の相手　柴田重信　（早稲田大学）

共同研究内容と成果　マウスの脳から発光を検出する技術の開発

ルシフェラーゼ遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの、脳室内に基質のルシフェリンを投与する技術、および脳内での発光を導出するための光ファイバーを挿入する技術を共同で開発した。

線虫 *C. elegans* の神経回路における感覚情報処理の基礎過程の解析

石原　健

九州大学大学院理学研究院生物科学部門

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度～平成１６年度

研究成果の要旨

神経回路における感覚情報の統合の測定系を開発し、線虫 *C. elegans* の感覚情報の統合と連合学習に異常を持つ変異体 *hen-1* を同定した。その原因遺伝子産物 HEN-1 は、シナプス領域に局在し、成熟した神経系で働く分泌タンパク質であり、神経機能修飾分子であると考えられた。

研究成果

(1)研究の背景

動物は、環境から様々な刺激（情報）を受容している。脳・神経系は、その中から状況に応じて必要な情報を選択・抽出し、適切に処理して行動を決定している。その過程で、過去の経験や記憶などに応じて適切な修飾を受ける場合がある。高等生物では、このような処理過程を非常に複雑に組み合わせて、高度な神経活動をおこない行動していると考えられる。このような情報処理のメカニズムを分子レベルで明らかにすることは、神経回路の機能、ひいては脳の機能を理解する上で重要なことである。我々は、このような複雑な神経機能を明らかにすることを目指して、単純な神経系を持つ線虫 *Caenorhabditis elegans* をモデルとして研究を行っている。

C. elegans では、神経回路の全構造が明らかになっているだけでなく、行動の解析が比較的容易で、遺伝学により行動と分子とを結び付けることが可能である。さらに、ゲノムの全塩基配列も決定されているなど、行動をつかさどる神経回路における情報処理機構について、分子・細胞・回路のそれぞれのレベルを結びつけて解析するのに適したモデル生物である。

(2)感覚情報統合の行動測定系の開発

C. elegans は、銅イオンなどの重金属イオンから忌避し、ジアセチルなどの匂い物質に対して化学走性を示し寄っていく。これらの刺激を用いて、情報の統合を測定する測定系を開発した。

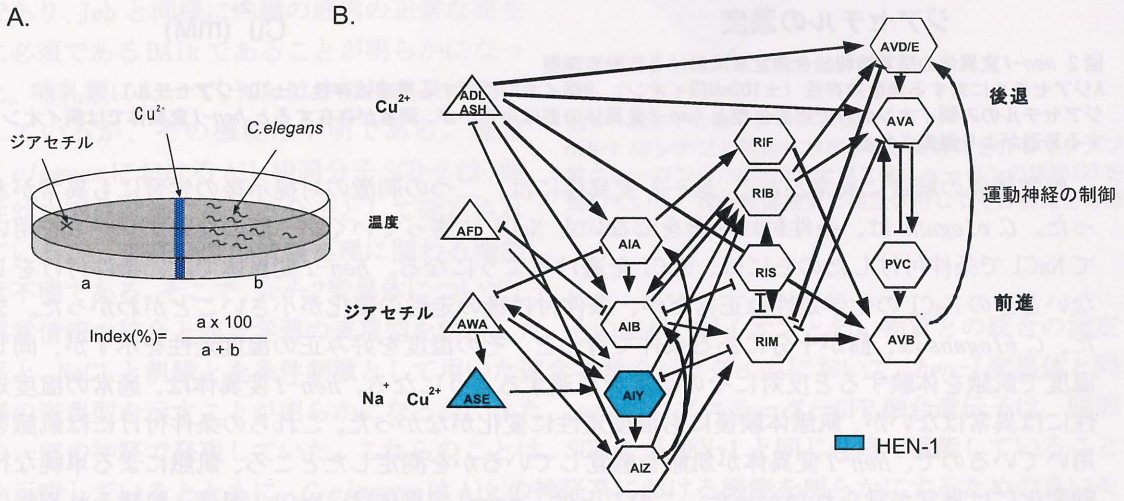


図１　感覚情報統合の測定系

A 寒天プレートの中央に銅イオンをぬり、片側に線虫、反対側にジアセチルをおき、90 分後の虫を数える。

B HEN-1 の関わる行動を制御する神経回路。感覚神経は三角形、介在神経は六角形、→は化学シナプス、H 型はギャップジャンクションを表している。HEN-1 は ASE と AIY の二つの神経で発現している。

このパラダイムにおいては、ジアセチルに寄っていくためには、銅イオンのバリアーをこえる必要がある(図1A)。実際、野生型 *C. elegans* は、ジアセチルと銅イオンのそれぞれの濃度に応じて、銅イオンのバリアーを越えて、ジアセチルへ寄っていく虫の割合が変わってくる。一方、神経細胞のレーザー破壊した線虫の行動解析実験から、ジアセチルは AWA 神経、銅イオンは ASH、ADL、ASE 神経と異なった感覚神経細胞で受容されることがわかっている。これらのことは、ジアセチルの感覚情報と銅イオンの感覚情報とは、神経回路上でお互いに抑制しあうという情報処理を受けていることを示している。また、神経回路図から、この情報処理には 10 数対からなる神経細胞が関わっていると考えられた(図1B)。

(3)情報の統合と学習に異常を示す変異体 *hen-1* の同定

我々は、感覚情報の統合の行動測定系において、銅イオンを越えて匂い物質のほうへ行きにくい変異体 *hen-1* を同定した。*hen-1* 変異体は銅イオンからの忌避反応、匂い物質ジアセチルへの化学走性のそれぞれには、異常が見られなかった。しかし、銅イオンと匂い物質の両者の存在下で行動を測定した場合にのみ、野生型に比べ銅イオンからの忌避反応が優先され、大きな差がみられた(図2)。これらの結果は、*hen-1* 変異体が、ジアセチルと銅イオンに対する感覚受容には異常がみられないが、これらの二つの情報の統合には異常があることを示している。

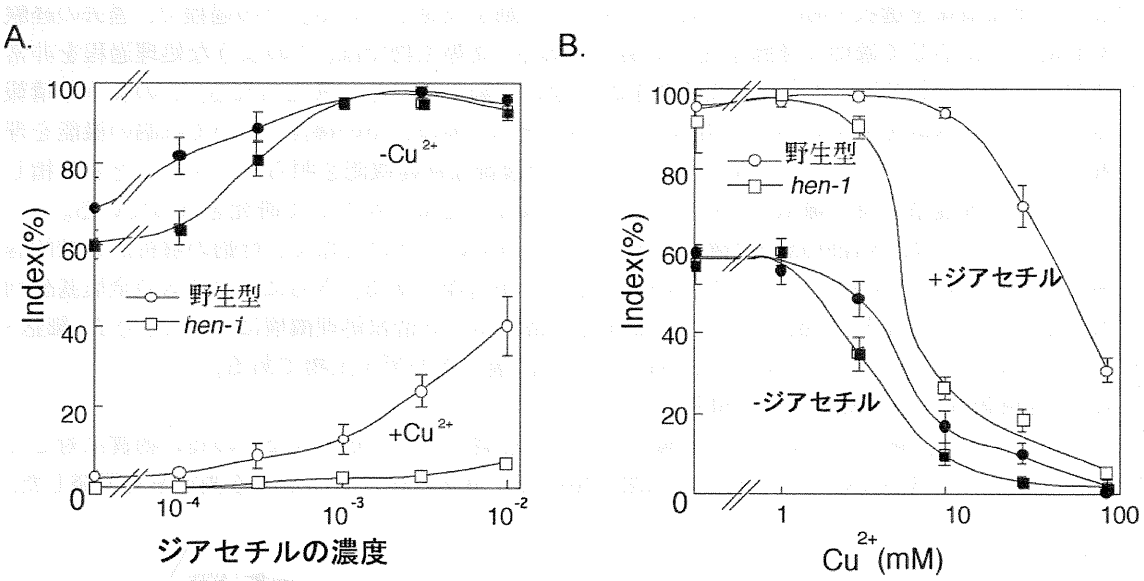


図2 *hen-1* 変異体の感覚情報統合測定系における行動表現型
Aジアセチルに対する濃度依存性（±100mM銅イオン）, B銅イオンに対する濃度依存性（±10^{-2}ジアセチル）
ジアセチルのみ銅イオンのみでは野生型と *hen-1* 変異体の差は小さいが、両者が存在すると *hen-1* 変異体では銅イオンに対する忌避がより優先される。

感覚情報の統合に異常がある *hen-1* 変異体には、二つの刺激の対提示後の学習にも異常があった。*C. elegans* は、条件付けなどをしないと NaCl に寄っていくが、餌のないプレートを用いて NaCl で条件付けしたのちには、NaCl を避けるようになる。*hen-1* 変異体では、条件付けをしないときの NaCl の化学走性は正常だが、条件付け後の走性の変化が小さいことがわかった。また、*C. elegans* は、餌が十分にある条件で育つと、その温度を好み正の温度走性を示すが、同じ温度で飢餓を体験すると反対にその温度を忌避するようになる。*hen-1* 変異体は、通常の温度走性には異常はないが、飢餓体験後にも温度走性に変化がなかった。これらの条件付けには飢餓を用いているので、*hen-1* 変異体が飢餓を感覚しているかを測定したところ、飢餓による単純な行動変化には異常が見られなかった。このことは、*hen-1* 変異体は、NaCl、温度、飢餓それぞれに対する感覚受容は正常であるが、NaCl と飢餓、温度と飢餓による条件付け後の学習に異常があることを示している。これらの学習には二つの感覚情報が必要なことを考えると、それらの情報

から記憶を形成する過程に異常がある可能性もある。

(4)感覚情報の統合と連合学習の制御に関わる分子メカニズムの解明

hen-1 変異体の原因遺伝子のポジショナルクローニングの結果、*hen-1* 遺伝子は、分子量約1万の分泌タンパク質をコードしていることがわかった。HEN-1は、LDL受容体の細胞外にあるLDLaモチーフを一つ持つが、それ以外の既知のモチーフはなかった。HEN-1タンパク質の発現を免疫染色により解析したところ、感覚神経ASEと介在神経AIYでのみ発現していた。また、細胞内での局在を共焦点顕微鏡で観察したところ、神経軸索の神経結合が形成されている領域で、点状の局在が観察された(図3)。

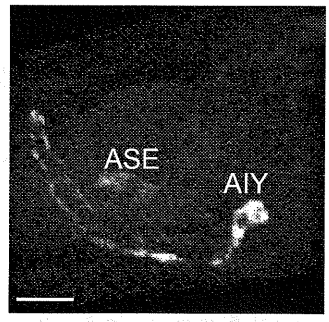


図3　HEN-1の発現
HEN-1はAIYとASE神経の軸索に点状に局在している。スケールバーは10μm

これらの神経細胞での発現が機能の発現にどのように関与しているかを明らかにするために、*hen-1* 変異体において、様々な細胞において特異的に野生型HEN-1を発現させると、本来発現しているASEやAIY神経を含め、神経細胞で発現させた場合には表現型は回復したが、筋肉細胞で発現させた場合には表現型の回復はみられなかった。また、*hen-1* 変異体において、時期特異的にHEN-1を発現させて成虫の行動で表現型を調べると、神経回路が形成される胚発生後期や幼虫期にHEN-1を発現させても表現型の回復はみられないが、行動する直前の成虫期に発現を誘導すると表現型が回復した。これらのことから、HEN-1タンパク質が神経回路の形成に働いているのではなく、成熟した神経系において、分泌され細胞非自律的に神経機能を制御する分子であると考えられた(図4)。

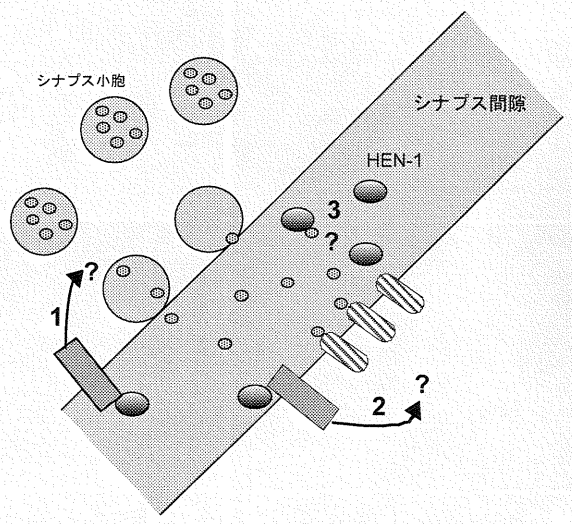


図4　HEN-1の働くメカニズム
HEN-1はシナプス間隙に放出され、受容体を介してシナプス前ニューロン(1)またはシナプス後ニューロンの活動(2)を修飾している、神経伝達物質と相互作用してその機能を修飾している(3)可能性がある。

(5)HEN-1受容体候補遺伝子の同定

ショウジョウバエにおけるHEN-1類似分子Jeb(*Jelly belly*)は、内臓の筋肉前駆細胞の分化と細胞移動に必須の分子である。この分子の受容体は、受容体チロシンキナーゼAlk(Anaplastic lymphoma kinase)の相同分子であり、Jebと同様に内臓の筋肉の正常な発生に必須であるDAlkであることが明らかになった。哺乳類において、Alkは中枢神経系で発現しているが、その機能は不明である。線虫 *C. elegans* におけるAlk相同分子SCD-2は、耐性幼虫形成制御に関わる分子として同定されているが、神経系での情報処理に関わる機能は不明である。そこで、*scd-2* 変異体について、感覚情報の統合と連合学習の表現型を解析した。その結果、銅イオンと匂い物質との統合の測定系と、NaClと飢餓とを条件刺激として用いた連合学習のパラダイムにおいて、*hen-1* 変異体と同様の表現型を示すことが明らかになった。また、*scd-2* のプロモーターGFP融合遺伝子は、頭部の一部の神経で発現していた。これらのことは、SCD-2がHEN-1と同じ経路で機能していることを示唆しているとともに、*C. elegans* はAlkの神経系における機能を明らかにするための良いモデル系であることを示していると考えられる。

共同研究

飯野雄一　東京大学遺伝子実験施設

NaCl と飢餓を用いた学習パラダイムにおける行動の解析

hen-1 変異体と *scd-2* 変異体が、NaCl と飢餓を用いた学習パラダイムにおいて、異常を示すことが明らかになった。

森郁恵　名古屋大学理学部

温度と飢餓を用いた学習パラダイムにおける行動の解析

hen-1 変異体が、温度と飢餓を用いた学習パラダイムににおいて、異常を示すことが明らかになった。

安藤恵子、三谷昌平　東京女子医大

hen-1 の欠失変異体の単離・解析

hen-1 の欠失変異体を TMP/UV 法を用いて作成した変異体バンクより同定した。

カルシウム透過型A MPA　受容体- カルビンジン情報伝達系の分子機構と生理的意義

岡戸晴生
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・分子神経生理研究部門

特定領域「神経回路」参加年度　　平成１２年度ー１６年度

研究成果の要旨

カルシウム結合蛋白カルビンジンは、カルシウム透過型 AMPA 受容体の機能発現を促進し、その AMPA 受容体を介したカルシウム流入によって核に移行し CREB のリン酸化を促進することが示唆された。このカルシウム透過型 AMPA 受容体- カルビンジン情報伝達系を新たな“神経活動—遺伝子発現系”として提唱する。

研究成果

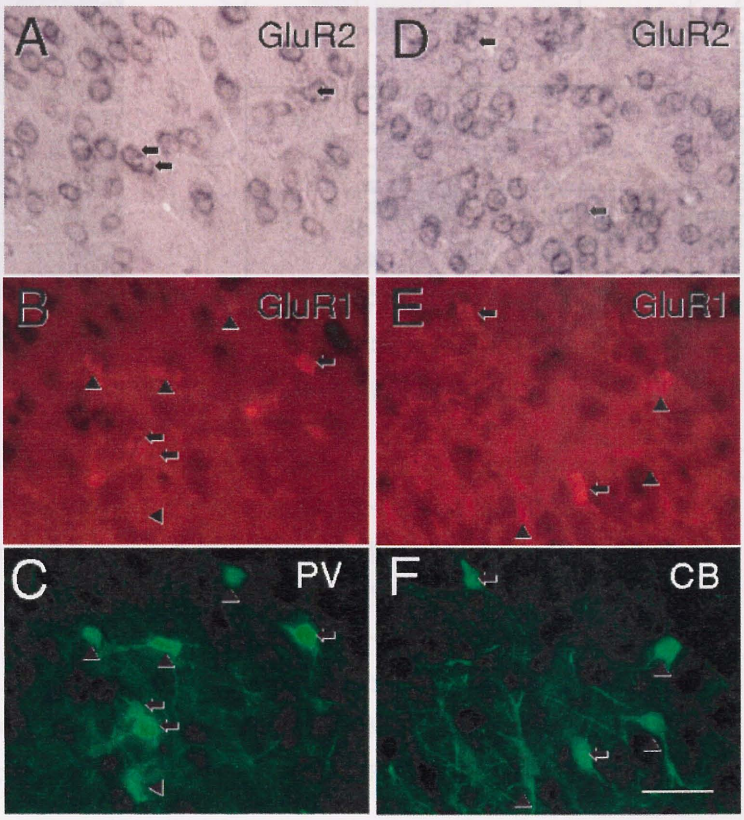
われわれはカルシウム結合蛋白（CalbindinD28k, Parvalbumin）発現細胞がカルシウム透過型 AMPA 受容体を有することを見出し、両者の機能相関を研究した。

本研究では、とくに AMPA 受容体が活性化することに伴って細胞内にカルシウムが流入し、転写因子 CREB がリン酸化される機構に、カルシウム結合蛋白がどのように関与するのかを明らかにすることが目的である。

以下のような結果を得た：

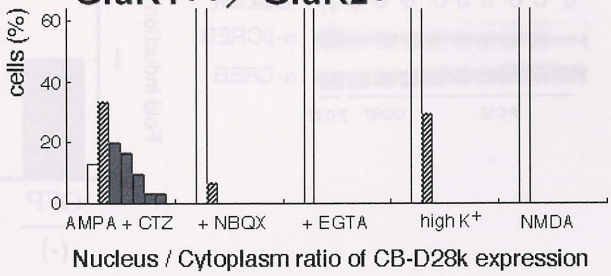
1） ラット大脳皮質ではカルシウム結合蛋白（カルビンジン、パルブアルブミン）陽性ニューロンはカルシウム透過型 AMPA 受容体を有する傾向を見出した。その際「GluR1 陽性、GluR2 陰性ニューロン」と「GluR1 強　陽性、GluR2 陽性ニューロン」を推定上のカルシウム透過型 AMPA 受容体含有ニューロンとした。（右図）

2） ラット大脳皮質の培養ニューロンにおいて上記推定上のカルシウム透過型 AMPA 受容体含有ニューロンであるカルビンジン陽性ニューロンは AMPA 刺激により細胞内カルシウム濃度が上昇し、機能的なカルシウム透過型 AMPA 受容体を有することが示された。



▲ GluR1+／GluR2-　　ラット扁桃体
GluR1++／GluR2-

GluR1++／GluR2+

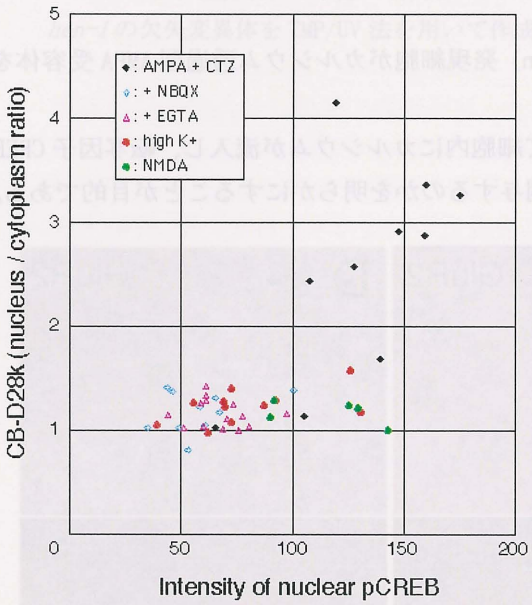


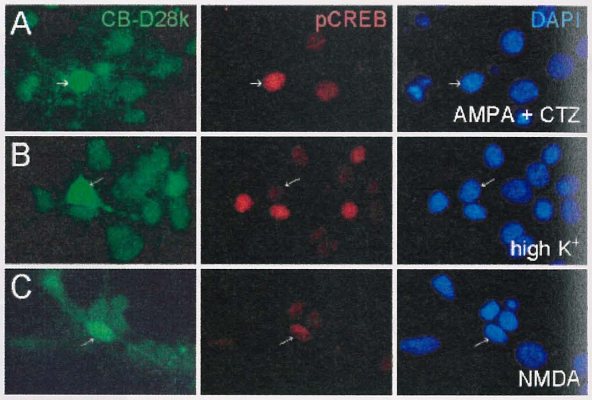
Nucleus / Cytoplasm ratio of CB-D28k expression

3） ラット大脳皮質の培養ニューロンにおいては、AMPA 刺激時にカ

ルビンジンが核に移行することを見出した（右図、右下図）。この核移行はAMPA受容体アンタゴニストNBQX処理、あるいはEGTAの外液添加よって阻害される。またNMDA刺激、高カリウム刺激ではカルビンジンの核移行はみられないことから、カルシウム透過型AMPA受容体を介したカルシウム流入に特異的にカルビンジンが核移行することが示唆された。

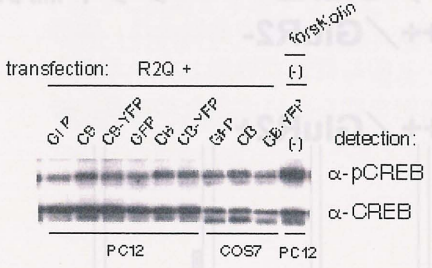
4） カルビンジン陽性ニューロンはCREBのリン酸化の程度が大きく、カルビンジンの核移行とCREBのリン酸化が正の相関を示した（下図）。

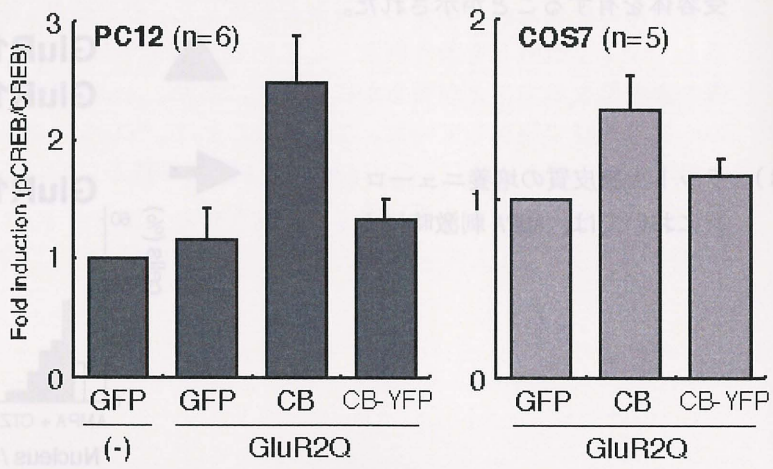




5） カルシウム結合蛋白カルビンジンとカルシウム透過型AMPA受容体の機能連関を株細胞を用いて解析したところ、①カルシウム透過性AMPA受容体の細胞膜発現はカルビンジンの共存により促進されること（右図）、②カルシウム透過型AMPA受容体を介したカルシウム流入により、CREBのリン酸化が促進されるが、この過程でカルビンジンの核移行が重要であることが示唆された（下図）。核移行が必要であることは、核移行不能カルビンジン変異体(CB-YFP)を利用した。

6） カルシウム透過型AMPA受容体の細胞膜発現は細胞内カルシウムキレータBAPTA-AMによっても促進した。従ってAMPA受容体の膜発現を促進するカルビンジンの作用はカルシウム緩衝作用であることが推測さ



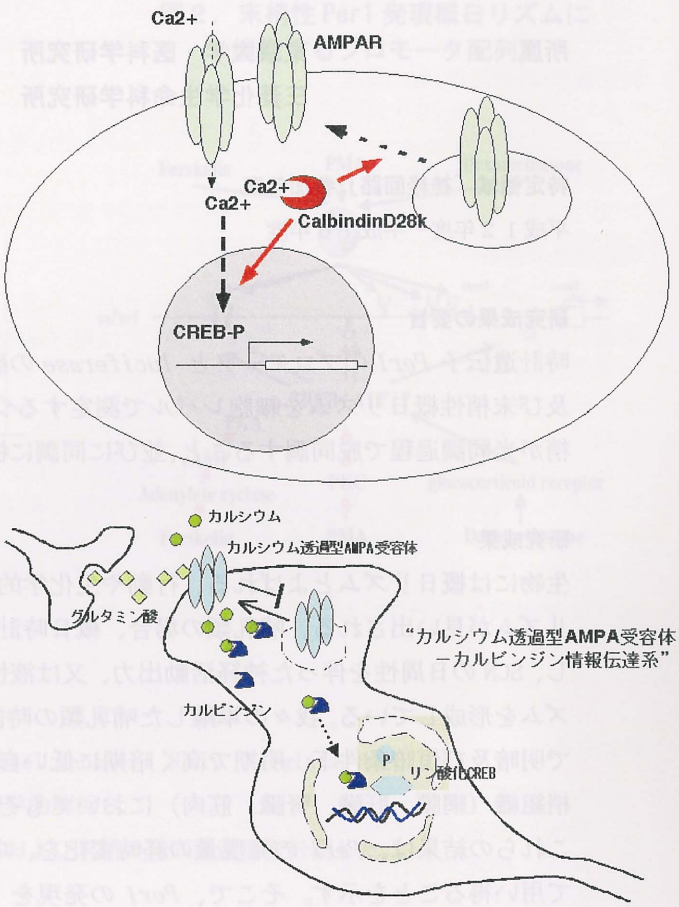


れる。

7） In vivo におけるカルビンジンと CREB のリン酸化を解析した。生後暗所で飼育したマウスに光り刺激を加えた時、カルビンジンの核移行と CREB のリン酸化が相関した。このことはカルビンジンの核移行が生理的に機能的意義を有している可能性を示している。

カルシウム透過型 AMPA 受容体は、カルシウム結合蛋白カルビンジンによってその細胞膜発現が促進される（右図）。これは細胞内カルシウムキレーターBAPTA-AM によっても模倣されることから、このカルビンジンの働きは、カルシウムバッファーとしてのはたらきであることが示唆される。一方、CREB のリン酸化にはカルビンジンの核移行が必要であるが、そのカルビンジンの機能は不明である（右図）。Berggard 他（2002）は、カルビンジンはカルシウム結合により３次元構造が変化することを見出し、カルビンジンにはカルシウム緩衝能に加えて、カルシウムセンサーの役割がある可能性を提唱している。本研究におけるカルシウム透過型 AMPA 受容体の活性化に伴うカルビンジンの核移行、それに付随する CREB のリン酸化は、カルビンジンがカルシウムセンサーとして機能している可能性を示している。

以上のことから、神経活動に伴う遺伝子発現の活性化に「カルシウム透過型AMPA受容体− カルビンジン情報伝達系」（右図）という新たな情報伝達系が機能していることを提唱する。



A04-09

表題（研究課題）　概日時計中枢である視交叉上核と末梢組織の概日リズム同調機構の解析

研究代表者氏名　程　肇

所属　東京大学・医科学研究所　（平成１２年度～平成１５年度）
三菱化学生命科学研究所　（平成１６年度）

特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度ー平成１６年度

研究成果の要旨

時計遺伝子 *Per1* のプロモータと *luciferase* の融合遺伝子を導入した動物を用いて、時計中枢及び末梢性概日リズムを細胞レベルで測定するシステムを構築した。そして、時計中枢及び末梢が光同調過程で脱同調すること、並びに同調に機能する *Per1* プロモータの配列を見いだした。

研究成果

生物には概日リズムとよばれる、行動や生化学的活動を支配する 24 時間に近い周期を持つ活動リズムが見い出される。哺乳類の場合、概日時計中枢は脳視床下部の視交叉上核（SCN）に存在し、SCN の日周性を伴った神経活動出力、又は液性因子の分泌により末梢組織を支配して概日リズムを形成している。我々の単離した哺乳類の時計遺伝子 *Per1* の転写翻訳産物量は、マウス SCN で明暗及び恒暗条件下、明期で高く暗期に低い自律的な日周変動を示した。 また、幾つかの末梢組織（網膜、肝臓、腎臓、筋肉）においてもその発現は約 6-12 時間遅れた位相で振動した。これらの結果は、*Per1* の発現量の経時変化を、中枢と末梢組織それぞれの計時情報の指標として用い得ることを示す。そこで、*Per1* の発現を *in vivo* でモニターするために *Per1::luc* 融合遺伝子のトランスジェニック動物を作製した。得られた *Per1::luc* トランスジェニック動物の SCN スライス培養系では、luciferase 活性が約１ヶ月間行動リズムと同じ約 24 時間の周期で発現振動した。また、いくつかの末梢組織（肝臓や筋肉）の培養系でも luciferase 発現日周リズムは 2-6 周期保たれた。そこで、SCN と末梢組織の相互作用を調べるために、まず明暗条件飼育下 *Per1::luc* トランスジェニックマウスの光サイクル位相を６時間前進または後退させた。すると、SCN の luciferase 発現リズムは早くも１日後に新しい光サイクル条件に同調することができた。しかし、末梢組織での luciferase 発現リズム及び行動リズムは、位相同調の完了に約 3-6 日間を要した。即ち、 SCN と末梢組織の概日時計振動は、光同調過程において通常とは異なり脱同調し、いわゆる時差ぼけとは SCN と末梢組織での概日リズムの脱同調であることが判明した。次に、末梢組織の概日時計振動機構を調べるために、転写制御に必要な *Per1* プロモータ配列内のいくつかの領域を変異させた *Per1::luc* 遺伝子を、安定に導入した NIH３T３細胞を樹立した。このプロモータ変異体導入細胞を用いて概日リズム同調機構を分子レベルで解析した。フォルスコリン、デキサメタゾン、及びフォルボールエステルで誘導できる *Per1* の発現

概日振動には、プロモータ上に存在する５つの E box 配列が必須であった。一方、フォルスコリンとフォルボールエステルでの *Per1* の一過的発現誘導には、プロモータ上に存在する４つの Cre 配列のうち、第３の Cre だけが必要であったが、デキサメタゾンによる誘導には他の Cre 配列も機能していた。

図１．概日時計中枢及び末梢組織での Per1::luc 発現リズム

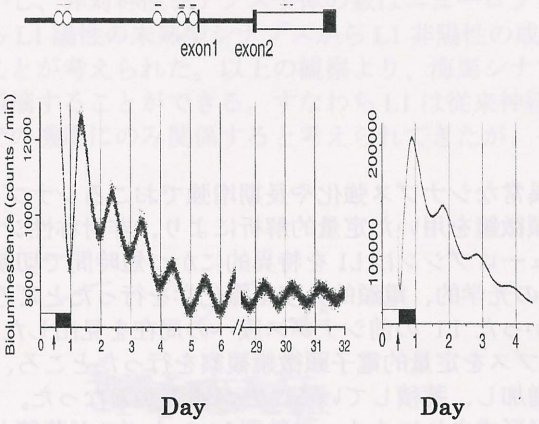
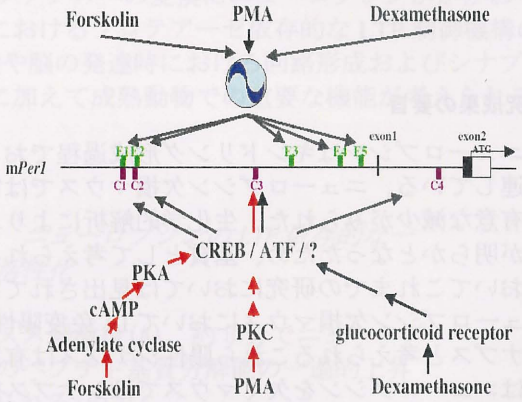


図２．末梢性 Per1 発現概日リズムに機能するプロモータ配列



共同研究

共同研究の相手：　山崎　晋、Gene Block、Michael Menaker　(Univ. Virginia, USA)

共同研究内容：　Per1::luc 導入動物を用いた生理学的解析

共同研究成果：　Per1::luc 動物を用いて時計中枢および末梢の光同調速度を計測した。

A04-10

研究課題名：　ニューロプシン遺伝子欠損マウスの海馬神経回路の検討

研究代表者名：　塩坂　貞夫

所属：　奈良先端科学技術大学院大学、教授

特定領域「神経回路」参加年度

平成 12 年度～平成 13 年度

研究成果の要旨

ニューロプシンはキンドリング形成過程でおこる異常なシナプス強化や長期増強でおこるシナプス強化に関連している。ニューロプシン欠損マウスでは電子顕微鏡を用いた定量的解析により，非対称性シナプス数の有意な減少がみられた。生化学的解析により、ニューロプシンは L1 を特異的にかつ短時間で切断することが明らかとなったため、基質として考えられる L1 の光学的、電顕的免疫組織化学を行ったところ、海馬においてこれまでの研究においては見出されていなかった L1 の前シナプス膜への局在を見出した。さらに、ニューロプシン欠損マウスにおいて L1 免疫陽性シナプスを定量的電子顕微鏡観察を行ったところ、未熟型シナプスと考えられるこれら陽性シナプスは有意に増加し、蓄積していることが明らかとなった。これらことはニューロプシンを欠くマウスではシナプス接着が形成されにくく、未熟型 L1 シナプスが蓄積されることを示唆した。したがって海馬においてはシナプス間隙におけるニューロプシンと L1 の相互作用により細胞外接着機構の制御が行われることを強く示唆した。

研究成果

我々は海馬神経可塑性の分子メカニズムを知る目的で、海馬に強発現する局所プロテアーゼのクローニングを試み、神経可塑性関連プロテアーゼを同定した。この新規プロテアーゼをニューロプシンと命名し、合成基質を用いてこれがトリプシンタイプの新規プロテアーゼであることを明らかとした（図１）。海馬、扁桃体の局所プロテアーゼ、ニューロプシンは神経接着の強さの調節や接着していたシナプス構造の離脱・再接着などをダイナミックな構造変化を通じて神経情報伝達およびその可塑性など神経機能の基本的機構を構成すると考えられる。また、神経栄養因子など様々な機能タンパク質のプロセッシングを通じ、それらの活性制御に関わる可能性がある。

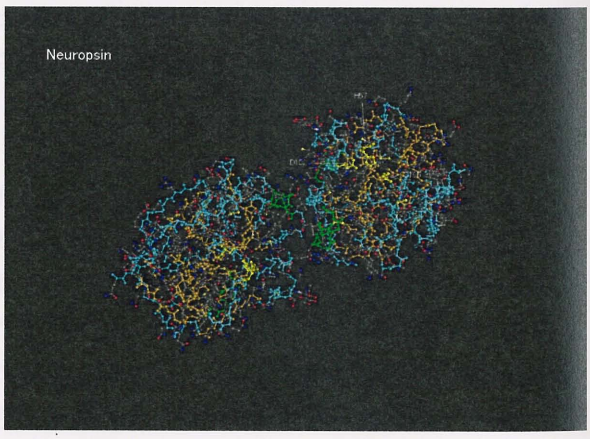


図 1　ニューロプシンの立体構造

ニューロプシンはキンドリング形成過程でおこる発芽や、異常な回路形成に関連しているとおもわれる。ニューロプシンは細胞外で作用し、シナプスおよびその近傍に作用し、LTP の初期過程を調節するものと思われるが、この時プロテアーゼ活性が重要であり、活性を熱変性や中和抗体によりブロックすると調節機能は無くなる。細胞外で、プロテアーゼが作用し得る物質は細胞外マトリックスタンパク質である。接着因子である L1 を効率よく、N-カドヘリンおよびフィブロネクチンをかなりよく切断することを観察した。しかし E-カドヘリンおよび NCAM については全く切断しない。一方、神経可塑性プロテアーゼとして解析が進んでいる組織プラスミノーゲンアクチベータ（tPA）の神経系での基質としてかなり明確となっているラミニン

X 線結晶解析の結果、ニューロプシンはトリプシンなどと同様、球状たんぱく質であり図のように２量体を形成していた。

にたいしてはニューロプシンは作用しない。従って、ニューロプシンと tPA は基質特異性が大きく異なる。

モノクローナル抗体を作成し、ニューロプシンの定量化、活性測定法を開発した。この方法により LTP や NMDA 刺激後のニューロプシン活性を測定することによって、ニューロプシンは NMDA 受容体の活性化とともに MAP キナーゼ系を介して起こることを明らかとした。この反応が LTP のレベルを調節することはリコンビナントニューロプシンたんぱく質をスライス海馬にバスアプライし、テタヌス刺激によって増強される LTP を検討することによって明らかとなった。すなわち NMDA によるパルス的活性の増大が LTP のレベルを調節しているものと考えられた。このニューロプシンの活性化は LTP 刺激後わずか 5 分で起こり、L1cam 切断に要する時間は 15 分でありこれは LTP の初期相に当たると考えられた（図２）。

ニューロプシン KO 動物を定量的電子顕微鏡観察を行った。ニューロプシン KO 動物ではプレシナプス側に L1 免疫反応を有する一部非対称型シナプスが有意に増加し、また免疫反応産物の蓄積が見られる。この L1 陽性非対称性シナプスはシナプス小胞が少なく、小さなスパインと接着するなど未熟なシナプスの形態を示す。しかし、非対称性シナプス全体の数はニューロプシン KO 動物において野生型より減少しており、このことから L1 陽性の未熟型シナプスから L1 非陽性の成熟型シナプスへの変換にニューロプシンがかかわっていることが考えられた。以上の観察より、海馬シナプスにおけるプロテアーゼ依存的な LTP 制御機構の存在を指摘することができる。すなわち L1 は従来神経発達や脳の発達時における回路形成およびシナプス形成時での機能にのみ関係すると考えられてきたが、それに加えて成熟動物での重要な機能が考えられる。

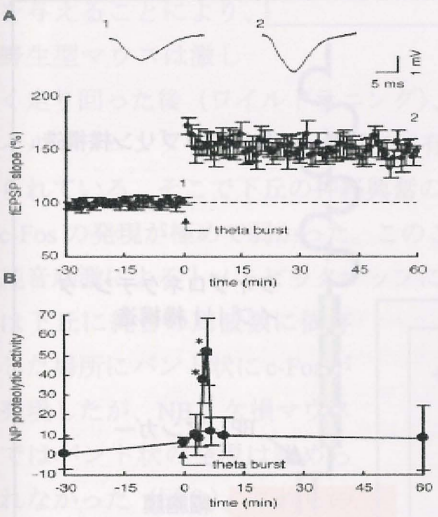


図 2　ニューロプシンの LTP 依存的な一過的活性化

テタヌス刺激後(A)、約 5 分でニューロプシンのペプチド基質分解能の一過的上昇が見られる(B)。

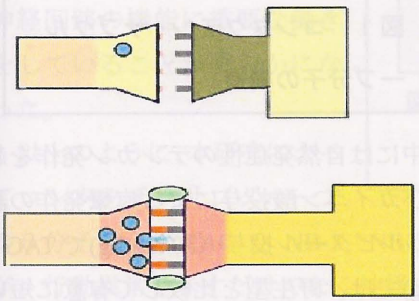


図 3　L1 の分子解裂による LTP の調節

神経活動依存的にニューロプシンの活性化が起こり、その結果 L1 の分子解裂がおこる。この反応はシナプスの新生や繋ぎ変えを誘導する可能性がある。まずシナプスは L1 陽性の未熟型シナプスとして新生され、これが刺激を繰り返し受けることによって下段のような成熟型シナプスになる。

考察

L1 シナプスは未熟型シナプスとして産生され、これが刺激を受ける際に、ニューロプシンが活動依存的に活性化される。活性化されたニューロプシンはきわめて短時間にプレシナプスでの L1 の Shedding(分子解裂）を引き起こす。その結果、シナプスは形態的変化を起こすとともに、分子的にも L1 シナプスから他への変換がおこり、より強固な接着構造を持つ成熟型シナプスへと生まれ変わる（図３）。松崎ら（Nature、2004）によれば小型スパインは神経可塑性に富むシナプス形態であると考えられ、我々の知見とよく一致している。このようなことから本研究はプロテアーゼを経由する新たな神経可塑性の調節機構が存在することを強く示唆するものである。

A04-12

表題：神経認識分子群コンタクチンサブグループの神経機能における役割の解析

研究代表者：渡邉　和忠

所属：長岡技術科学大学・生物系

参加年度：平成１２年度ー平成１４年度

要旨：

私たちは神経認識分子群コンタクチンサブグループの神経機能における役割を明らかにするために、このサブグループに属する６分子のうち NB-2、NB-3、TAG-1 の遺伝子欠損マウスを作製・解析した。その結果、形態学的には大きな異常は認められないが行動学的に異常を示し、神経機能に関連した分子の発現も顕著に変化していることを見出した。

研究成果：

コンタクチンサブグループは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経認識分子群で、コンタクチン、TAG-1、BIG-1、BIG-2 と、私たちが同定した NB-2、NB-3 の６分子から構成されている。これらの分子はＮ末端側の６つの免疫グロブリン様構造の繰り返しに続いて４つのフィブロネクチン・タイプ III 様繰返し構造をもち、C 末端はグリコシルフォスファチジル・イノシトールの修飾を受け細胞膜表面に結合している（図１）。これらは脳・神経系に特異的に発現しており、特に出生後に急激に増加する。ラットやマウスでは主として神経回路網完成の最終段階にある生後１週から４週にかけて非常に強い発現が認められる。私たちはコンタクチンサブグループ分子群の脳・神経系での機能を明らかにする目的で TAG-1、NB-2、NB-3 のそれぞれの遺伝子欠損マウスを作製し、形態学的、行動学的解析を行うことにした。

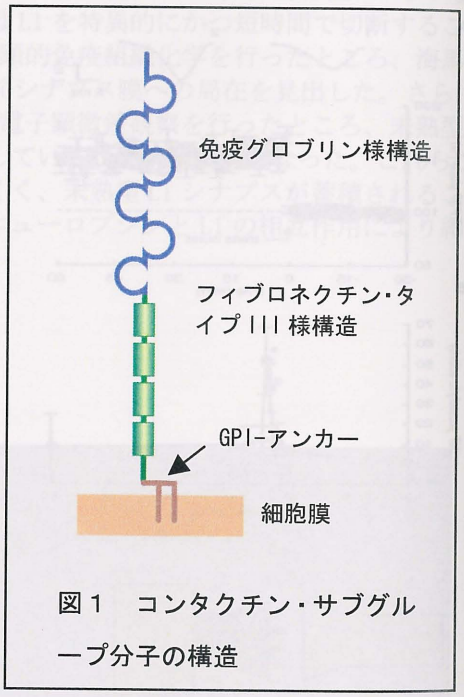


図１　コンタクチン・サブグループ分子の構造

本研究で作製した TAG-1、NB-2、NB-3 の各遺伝子を欠損したマウスは何れも形態学的に大きな異常は示さなかった。またヘテロ同士の掛け合わせでは、野生型、ヘテロ、ホモの遺伝型のマウスがメンデルの法則に従って出生した。更に遺伝子欠損マウス同士の掛け合わせによっても繁殖可能であった。

TAG-1 は他のコンタクチンサブグループ分子と比較して発現時期が早く、胎児期の脳でも強い発現が見られる。TAG-1 欠損マウスの中には自然発症性のテンカン発作を起こすものがいることに気がついた。そこでペントバルビタール、およびカイニン酸投与による痙攣発作の誘発実験を行ったところ、野生型では痙攣発作を誘発しない量のペントバルビタール投与（30 mg/kg)で TAG-1 欠損マウスは５２％が痙攣を誘発した。またカイニン酸投与（20 mg/kg)では、野生型と比較して有意に短い時間で痙攣発作を起こし、野生型の致死率１０％以下に対して７５％が２４時間以内に死亡した。この痙攣発作の原因を探るため、アデノシン A1 受容体、ドーパミン D1、D2 受容体の発現レベルをオートラジオグラフィーによって調べたところ、TAG-1 欠損マウスでは海馬においてアデノシン A1 受容体が野生型よりも約４０％程度多く発現していることが明らかになった。

一方、NB-3 欠損マウスは作製する際に NB-3 の遺伝子を LacZ の遺伝子で置換した。このヘテロマウスを用いて NB-3 の発現場所を調べたところ、成体の小脳顆粒細胞に強い発現が認められた。このことから NB-3 欠損マウスでは小脳の機能に異常がある可能性が考えられたため、運動協調性についての実験を行った。その結果、NB-3 欠損マウスは野生型と比較して筋力には異常は認められないが、棒渡りやロータ・ロッド（図

2）などの実験から運動協調性が劣っていることが明らかになった。

NB-2 欠損マウスについても同様に NB-2 遺伝子を Tau-LacZ 遺伝子と置換したマウスを作製した。X-gal 染色の結果からは、NB-2 は蝸牛核、上オリーブ核、下丘など聴覚系に限定された領域でのみ強く発現していた。

そこで、聴覚刺激性痙攣誘発実験と純音刺激実験によって聴覚系の機能について調べることにした。聴覚刺激性痙攣誘発実験では出生後３週程度で強い音刺激（110 dB)を与え１週間後に同様の音刺激を与えることにより、野生型マウスは激しく走り回った後（ワイルドラニング)、痙攣発作を起こす。しかし NB-2 欠損マウスでは野生型に比較してワイルドラニングを引き起こす頻度が有意に低かった。この聴覚刺激性痙攣には下丘の関与が大きいことが知られている。そこで下丘の神経興奮の程度を c-Fos の免疫染色によって調べたところ、NB-2 欠損マウスでは c-Fos の発現が極めて弱かった。このことは下丘の神経機能に異常があることを強く示唆しているため、更に純音刺激によるトノトピックマップに従った神経の興奮を c-Fos で野生型と比較した。その結果、野生型では下丘に純音の周波数に依存した場所にバンド状に c-Fos が発現したが、NB-2 欠損マウスではバンド状の発現は認められなかった（図３)。これらのことから NB-2 は主に聴覚系の神経回路の機能に重要な働きをしていることが明らかになった。

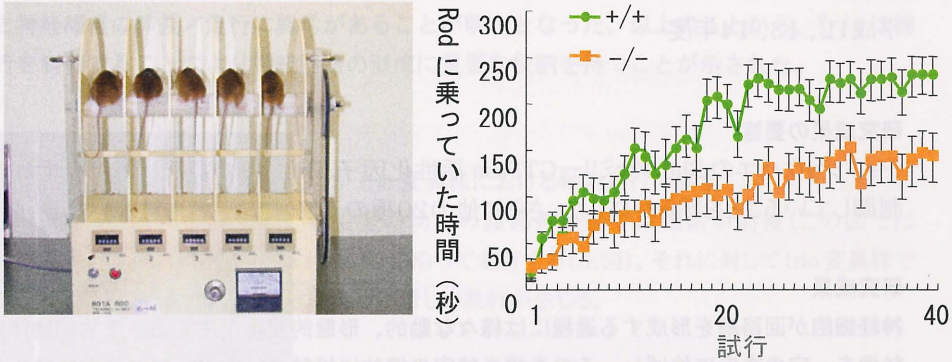


図２　NB-3 欠損マウスのローター・ロッド実験

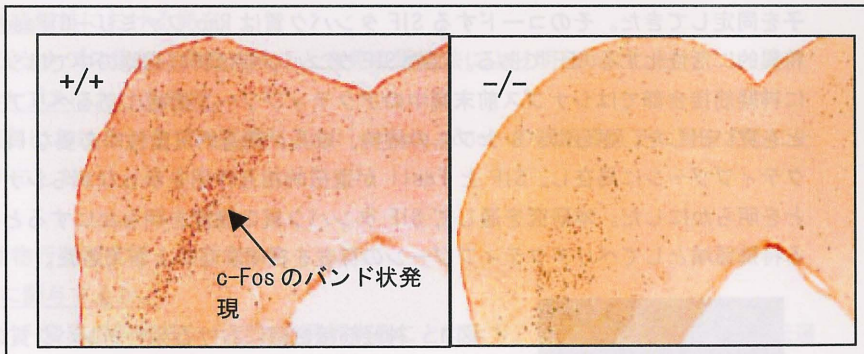


図３　純音刺激による野生型と NB-2 欠損マウスの下丘での c-Fos 発現比較

以上のように、本研究によってコンタクチンサブグループの６分子のうち TAG-1、NB-2、NB-3 の何れも遺伝子欠損によって形態学的には大きな異常は見出されないが、行動異常を示すだけでなく神経機能に密接に関与している分子の発現レベル、発現パターンの変化を示すなど重大な異常が見出された。このことはこれらの分子が神経機能に重要な役割を果たしていることを示しており、今後の神経回路網の発達や機能についての研究に重要な指針を与えるものと考えられる。

共同研究

1. 狩野方伸
   神経認識分子 NB-3 欠損マウスでは運動協調性に異常が認められるが、小脳神経細胞の電気生理学的性質での異常は検出されないことを明らかにした。
2. 二木宏明
   神経認識分子 NB-2 欠損マウスでは聴覚系神経回路の機能に異常があることを明らかにした。

A04-13

神経回路網の形成を制御するRhoファミリーGTPase活性化因子群

浜　千尋

独立行政法人理化学研究所・発生再生科学総合研究センター

平成12、13、14年度

研究成果の要旨

ショウジョウバエのRhoファミリーGTPase活性化因子TrioとSIFがそれぞれ軸索伸長とシナプス成長を制御していることを明らかにした。さらに他の20種のGEFについても機能解析を試みた。

研究成果

神経細胞が回路網を形成する過程には様々な動的、形態的変化が生じる。まず細胞体が移動するとともに軸索を一定の方向に伸ばし、その先端を特定の標的に接触させた後、構造的に特殊化したシナプスへと分化させる。これらの一連の現象は神経細胞にみられる普遍的な現象で神経発生の根幹を成すが、その過程に存在する制御機構は未だ不明な点が多い。

われわれはこれらの動的な形態変化を伴う一連の現象をRhoファミリーGTPaseシグナル経路に注目して統一的に理解することを目標とした。RhoファミリーGTPaseは一般に細胞の移動や形態の制御をする重要な分子であることが明かとなっており、神経細胞の形態変化にも同様な役割を持つことが予想される。このGTPaseが細胞外からのシグナルに応答して活性化されるためにはグアニンヌクレオチド交換因子（GEF)が必要である。本研究では２種のGEF、SIFとTrioの解析を行ってきたのでその結果を報告する。

（１）ショウジョウバエの活動性が低下した変異株の解析からその原因遺伝子として *still life* (*sif*) 遺伝子を同定してきた。そのコードするSIFタンパク質はRhoファミリーGTPaseの一員であるマウスRac1を特異的に活性化するGEFである。このSIFタンパク質は神経細胞の中ではシナプスに特異的に存在し、特に神経筋接合部ではシナプス前末端中のアクティブゾーン周縁にあるペリアクティブゾーンに局在することを見い出した。さらに、シナプスの維持、成長、構造的可塑性に必要なFasciclin II (FasII)もペリアクティブゾーンに局在し、SIFとFasIIが遺伝的相互作用を示しながらシナプスの成長を制御していることを明らかにした。本研究を通してSIFタンパク質の機能を明らかにすると共にシナプスの発生を制御する特殊領域としてペリアクティブゾーンの存在を提唱することができた。

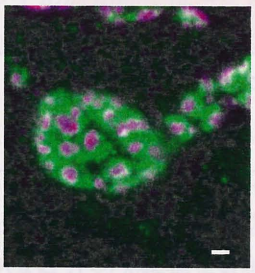


図１　神経筋接合部におけるSIFタンパク質の局在。SIFタンパク質（緑）はシナプス前部のアクティブゾーン（紫、抗PAK抗体）の周縁部にあるperiactive zoneに局在し、シナプスの成長を制御している。

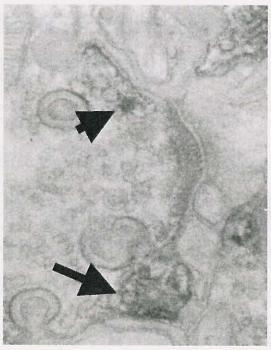


図２　脳内の神経細胞間シナプスにおけるSIFタンパク質の局在。シナプス前部のアクティブゾーンの側部にSIFタンパク質は局在している（矢印）。

（２）神経発生において機能する他の新規 GEF の同定を試みた。まず、ショウジョウバエのデータベースから GEF 候補分子を選択し、その中から神経系での発現を基準にしてショウジョウバエ Trio を同定することができた。このタンパク質は胚においては表皮系と神経系で発現しており、特に神経系では神経繊維における局在が顕著であった。Trio タンパク質の機能を明らかにするため、突然変異株を分離してその表現型を解析してみると神経繊維の伸長／走行に異常があることが明かとなった。以上のことから、Trio は神経繊維の伸長／走行を制御することにより神経回路の形成に重要な役割を持つことが示された。

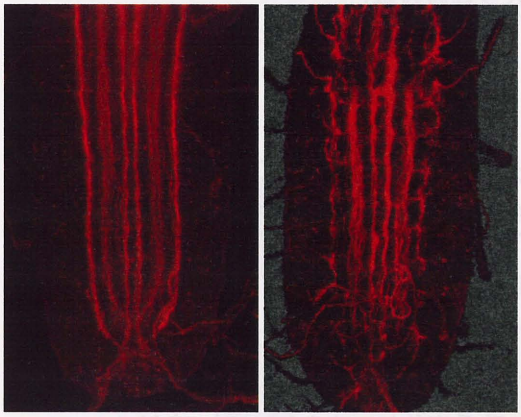


図3 trio 変異株における軸索走行の異常
野生型の幼虫の腹部神経節では軸索が前後（この図では上下）に沿って走行する（左図）。それに対して trio 変異株では走行に著しい乱れが生じる。

共同研究
鈴木えみ子　（国立遺伝学研究所、助教授）
（１）　Trioタンパク質の神経繊維における局在。
Trio タンパク質が軸索およびシナプス後部に存在することを免疫電顕法により明らかにした。
（２）　SIFタンパク質のシナプスにおける局在。
SIF タンパク質がシナプス前部におけるシナプス周縁部（periactive zone）の細胞膜直下に局在することを免疫電顕法を用いて明らかにした。

黒見坦（群馬大学医学部、動物行動研究所、助教授）
SIFタンパク質は神経伝達に関与するか。
電気生理学的手法を用いて sif 変異の神経筋シナプスを解析することにより、SIF タンパク質は神経伝達には関わっていないことが明らかとなった。

貝淵弘三（名古屋大学医学部教授）
SIFタンパク質のGEF活性の測定
マウスの RhoA, Rac1, Cdc42 を基質にして SIF の GEF 活性を測定したところ、Rac1 に特異的作用する GEF であることが明らかとなった。

特定領域研究「神経回路」報告書

研究課題:「グルタミン酸受容体チャネルによる学習行動制御機構」(平成12年度)、「コンディショナル・ノックアウトマウスを用いた運動学習の分子機構解析」(平成13, 14 年度)

研究代表者:森 寿

所属:東京大学 大学院医学系研究科 分子神経生物学

(現、富山医科薬科大学 大学院医学系研究科 分子神経科学)

参加年度:平成12-14年

研究成果の要旨:

NMDA 型およびδ型グルタミン酸受容体(GluR)サブユニットの遺伝子欠損マウスを作成し解析することにより、分子的に多様な GluR サブユニットが記憶・学習、反射制御、行動制御において異なる機能を担うことを見出した。

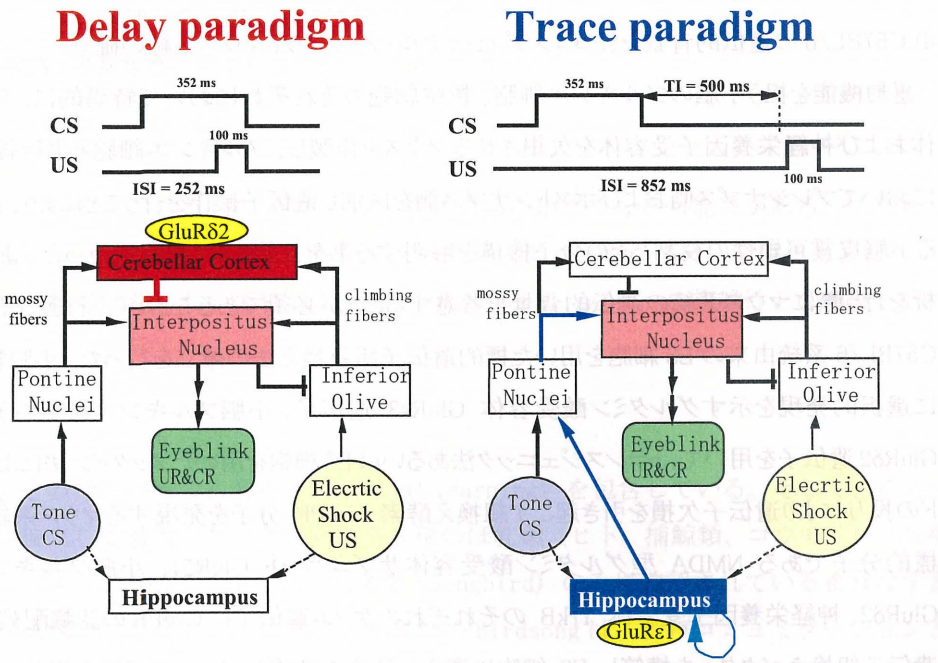
研究成果:

a) 運動学習制御における GluR サブユニットの機能

中枢神経系の主要な興奮性神経伝達を担うグルタミン酸受容体(GluR)チャネルは、遺伝子クローニングの結果、分子的に多様であり、それぞれのサブユニットが発達段階と脳内部位を異にして特徴的な発現分布を示す事が明らかにされた。GluR チャネルのそれぞれのサブユニット分子が個体レベルでどのような機能を担うのか明らかにするために、特に我々が世界に先駆けて遺伝子クローニングした NMDA 型およびδ型 GluR サブユニットの遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作成し解析を行った。小脳プルキンエ細胞に特異的に発現する GluRδ2 サブユニットの KO マウスを用いて、瞼への電気刺激 (非条件刺、US) と音(条件刺激、CS)を連合させ、CS のみにより引き起こされる瞼を閉じる反応(条件付け反応、CR)を測定する瞬目反射条件付けを行った。この瞬目反射条件付けは運動学習課題の一つである。その結果、GluRδ2 KO マウスでは、瞬目反射条件付けにおいて CS と US が時間的に重なって与えられる delay 課題では学習障害を示す一方、CS と US が重ならない trace 課題においては学習障害を示さなかった。GluRδ2 KO マウスは小脳プルキンエ細胞特異的遺伝子ノックアウトであり、かつ平行線維-プルキンエ細胞間の長期抑圧(LTD)に障害を示すマウスであることから、小脳皮質 LTD が特定の運動学習課題に関わることを見出した(業績 3, 6)。さらに薬理学的方法により GluRδ2KO マウスにムスカリン性アセチルコリン受容体の阻害薬であるスコポラミンを投与すると瞬目反射条件付けの trace 課題の学習が障害された。スコポラミンは海馬の機能障害を引き起こすことが知られており、この結果は trace 課題が海馬に担われている可能性を示唆するものと考えられた (業績 7)。

一方、NMDA 型 GluRε1 KO マウスは海馬 CA1 の長期増強 (LTP)の誘導閾値と文脈学習閾値の両方が上昇しているマウスであることをすでに報告していたが、瞬目反射条件付け学習においては、CS と US が重ならない trace 課題に障害を示す一方、CS と US が重なる delay 課題ではほとんど障害がなかった。従って、海馬においてシナプス可塑性を担う NMDA 受容体が trace 課題の学習に関わることが

示唆された（業績 4）。GluRδ2 KO マウスと GluRε1 KO マウスの瞬目反射条件付けの解析結果より、運動学習を担う脳システムと分子機構が CS と US のタイミングにより異なることが明らかになった（下図）。



瞬目反射条件付けによる運動学習には、課題により異なる脳システムと分子が関与する。

b) GluRε2 サブユニットによる反射制御

GluRε2 は発生初期から脳内に広く発現分布し、出生後にその発現が前脳に限局するサブユニットである。このサブユニットの KO マウスは哺乳反射が欠如しており出生後 1 日以内に死亡した。このサブユニットのヘテロ欠損マウスは、発育し繁殖も可能であったが音に対する驚愕反応が亢進していることが示唆されていた。従って GluRεサブユニットのホモ欠損マウスならびにヘテロ欠損マウスと GluRδ2 ホモ欠損マウスを用いて音驚愕反射（ASR）を定量的に解析した。ASR は脳幹部以下が関わる反射回路に担われており、前脳が反射の修飾を行っている。解析の結果、GluRε2 ヘテロ欠損マウスの ASR が非常に亢進していることを見出した（業績 5）。従って GluRε2 サブユニットは前脳に発現し ASR の修飾に特異的に関わるサブユニットであることを明らかにした。また、刺激となる音を提示する前に驚愕反射を引き起こさないような弱い音刺激を与えると ASR が抑制されるプレパルス阻害（PPI）が知られており、この PPI は、複数の刺激に対応するための感覚運動関門の役割を果たしていると考えられている。統合失調症の患者では PPI が障害されており、今までは PPI は前脳が関わると考えられてきた。この PPI を KO マウスで測定したところ GluRδ2 ノックアウトマウスが障害を示したことから、小脳が PPI 制御に関わる可能性が示唆された。

c) 行動制御における GluRεサブユニットの機能

GluRε1 KO マウスは、統合失調症の陽性症状に似た、新規環境下での行動量の増加を示した。この行動量の増加は、ドパミン作動系とセロトニン作動系の機能亢進が関わる可能性が示唆された(業績 1)。一方、GluRε4 KO マウスは、行動量の低下を示すとともに恐怖やストレスに対する感受性が低いことを明らかにした(業績 8)。

d) C57BL/6 の遺伝的背景をもつコンディショナル・ノックアウトマウス系統の確立

運動機能を担う小脳のプルキンエ細胞、顆粒細胞のそれぞれにおいて特異的に、グルタミン酸受容体および神経栄養因子受容体を欠損させるマウスを作製し、プルキンエ細胞と平行線維とのシナプスにおいてプレシナプス側およびポストシナプス側を区別し遺伝子操作を行うことにより、運動学習における小脳皮質可塑性の役割とその分子機構を解明する事を目的として研究を行った。また、行動学的解析を行う際にマウス系統の遺伝的背景を考慮することが必須であることから、行動学的解析に優れた C57BL/6 系統由来の ES 細胞を用いた標的遺伝子組み換え法の確立を行った。小脳顆粒細胞特異的に選択的発現を示すグルタミン酸受容体 GluRε3 遺伝子、小脳プルキンエ細胞特異的発現を示す GluRδ2 遺伝子を用いて、トランスジェニック法あるいは ES 細胞を用いたノックイン法により、合成ステロイドの投与により遺伝子欠損を引き起こす組換え酵素 CrePR 分子を発現するマウス系統を得た。一方、標的分子である NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluRζ1, 小脳プルキンエ細胞特異的 GluRδ2、神経栄養因子受容体 TrkB のそれぞれのゲノム遺伝子に CrePR の認識配列を導入した標的遺伝子組換えベクターを構築し ES 細胞に導入し目的の標的分子マウス系統を得た。また、ES 細胞の選択に用いる Neo 耐性遺伝子を FLP-FRT の遺伝子組み換えシステムにより除去することを個体レベルで可能とした(業績 9)。これら CrePR マウスと標的マウスの掛け合わせにより小脳細胞特異的誘導型遺伝子欠損マウス系統を作成することができた。これらのマウス系統の表現型解析は進行中であるが、遺伝子欠損による運動障害が観察されており、脳機能解析における細胞特異的かつ誘導型の遺伝子操作が非常に有効である事を明らかにした。

共同研究(共同研究の相手、共同研究内容と成果)

1. 新潟大学脳研究所 崎村建司 教授:GluR KO マウスの遺伝的背景を C57BL/6 にするための戻し交配マウスの作成、ならびに C57BL/6 系統由来 ES 細胞を用いた遺伝子ノックアウトマウス作成の共同研究を行い、マウス系統を確立した(業績 5)。
2. 東京大学医科学研究所 真鍋俊也 教授: GluR KO マウスの電気生理学的解析の共同研究を行いシナプス可塑性に変化があることを明らかにした(業績 2)。
3. 北海道大学医学部 渡辺雅彦 教授:GluR KO マウスの形態学的解析の共同研究を行い、詳細な形態学的特徴を明らかにした(業績 2)。
4. 東京大学大学院薬学研究科 桐野豊 教授:ノックアウトマウスを用いた瞬目反射条件付けによる行動解析の共同研究を行い、運動学習における GluR の機能を明らかにした(業績 3、4、6、7)。
5. 名古屋大学大学院医学系研究科 鍋島俊隆 教授;ノックアウトマウスを用いた行動解析の共同研究を行い、GluRεサブユニットの行動制御における機能を明らかにした(業績 1、2、8)。

平成１２年度研究課題　キンカチョウの歌学習機構における転写因子 CREB の役割

平成１３・１４年度研究課題　歌学習臨界期におけるキンカチョウ脳内 CREB の活性化と遺伝子発現変動

研究代表者名　萩原正敏

所属　東京医科歯科大学難治疾患研究所形質発現分野

特定領域「神経回路」参加年度　平成１２年度―平成１４年度

研究成果の要旨

キンカチョウの歌中枢における CREB 活性化は、言語認識の指標となる可能性がある。またキンカチョウ脳からグルタミン酸受容体２１種類をクローニングし発現パターンを調べたところ、音声学習を制御する神経回路において特異な発現を示し、vocalization の複雑性との相関が認められた。

研究成果

ヒトの言語は、その特性の一つに音声学習（Vocal learning）を包含している。そして、音声学習は、進化的に独立して獲得したと考えられる３種のほ乳類（ヒト、捕鯨類、コウモリ）と３種の鳥類（オウム／インコ類、ハチドリ類、鳴禽類：Songbird）のみに確認されている希有な学習形態である。興味深いことに、ヒトの言語と鳴禽類の Birdsong は、音声コミュミケーションとしての生成目的は異なるが、多くの共通点がこれまでに確認されてきている。大脳辺縁系を含む神経回路の関与、性差、脳内左右差、学習臨界期の存在、Sensory と Motor の協調学習、環境および社会要因によりその学習効率が変化する等といったものである。けれども、ヒトの言語をはじめ、音声学習を生成する分子基盤に関しては、その神経回路の存在が知られるようになって以降もこれまでほとんど研究されてこなかった。音声学習によって獲得される鳥のさえずりは、種により Song を構成する音素の数、順序、繰り返しが異なり、一つのシラブルの長さそのものも種によって大きく異なる。しかし、これらの多様性に富む Learned Song Vocalization は鳥類 Vocal Learner に共通して存在する脳内神経回路 Song system から生成される。我々は鳥類 Vocal Learner に共通して存在する神経回路とその回路から生成される学習によって獲得される種特異的な多様な音声が、その神経回路内の神経興奮パターンが異なることにより制御されているのではないかと考えた。そこで神経細胞の興奮に中心的な役割をもつグルタミン酸受容体に着目し、鳴禽類脳からグルタミン酸受容体遺伝子群をクローニングすることを試みた。その結果、対象とした２１のサブユニット遺伝子すべてを zebra finch brain から得ることができた。zebra finch グルタミン酸受容体遺伝子群は、ヒトを含むグルタミン酸受容体に塩基配列で７２ー９０％、アミノ酸配列で７８ー１００％という高い相同性を示した。これはグルタミン酸受容体の脳内における機能の面においてもほ乳類と鳥類の間で共通に働く分子機構が保存されていることを示唆している。次に、グルタミン酸受容体遺伝子群の Songbird brain での発現パターンを調べてみると、２１のサブユニット遺伝子すべてが異なる発現パターンを示し、かつ、鳥類とほ乳類の脳

内発現パターンは大脳皮質、基底核辺縁系、視床、中脳、延髄、小脳で高い類似性を示し、鳥類とほ乳類が共通のハ虫類様の祖先から進化してきたとする仮説を裏付ける結果を得た(図１)。さらに音声学習、発声に重要な song system を構成する神経核群 (Vocal Pathway) のグルタミン酸受容体遺伝子の発現レベルは、２１のサブユニット中１９の遺伝子で、それぞれの神経核:Song Nucleus が位置する同じ周辺脳組織と比べて有意な特異的発現レベルの増減を認めた(図２)。この Vocal Pathway に対して、聴覚受容、認識に関係する脳組織群 (Auditory Pathway) は、周辺の脳組織と比べて顕著なグルタミン酸受容体遺伝子の発現レベルの増減を認めなかった。これは、音声学習、発声を生成する神経回路が、脳内の周辺の組織と比べて、グルタミン酸受容体遺伝子の発現レベルで特化していることを意味している。また、この特化が Song system で音声発声(motor)を制御する神経核間では正の相関、終脳皮質-基底核-視床ループでは負の相関をすることを認めた。

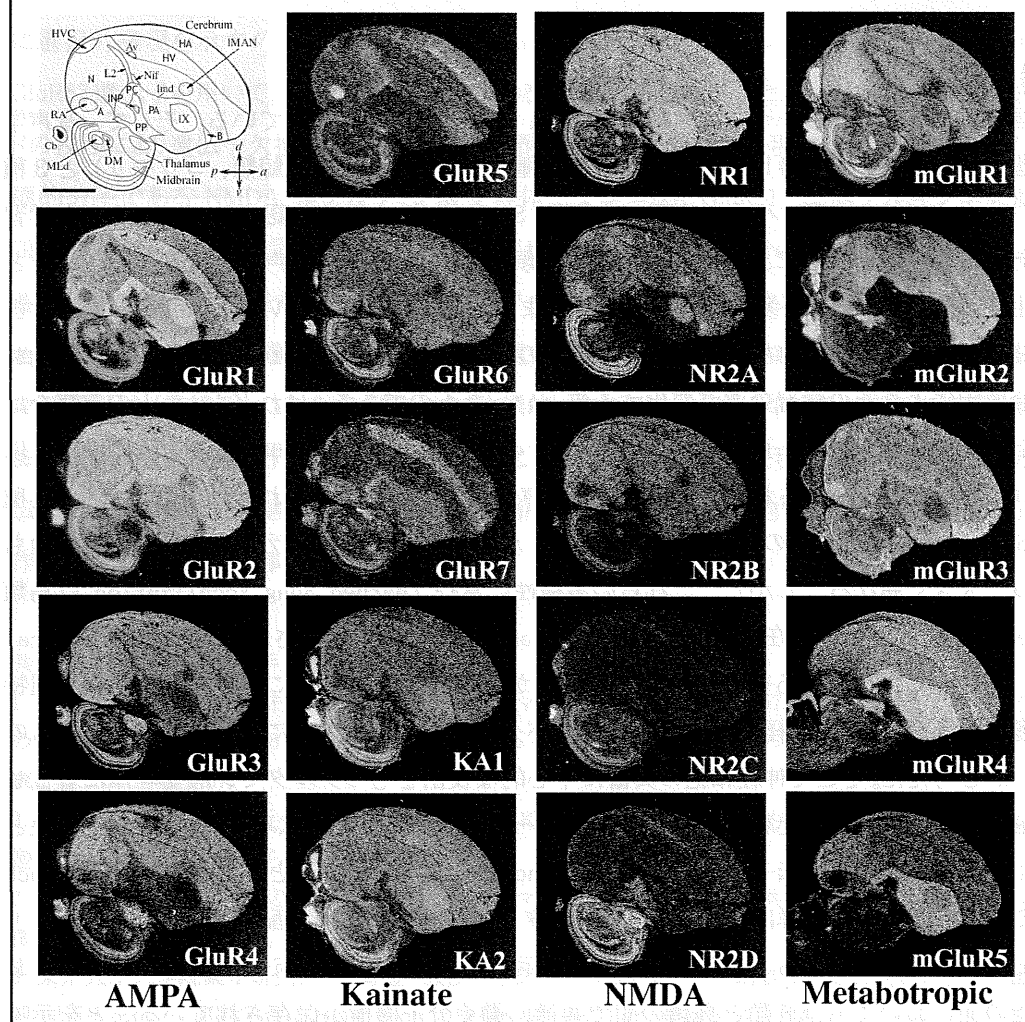


Fig. 1. Glutamate receptor subunit expression in the adult zebra finch male brain. Shown are negative image autoradiographs of in-situ hybridizations, parasaggital brain sections, ~1.5mm from the midline, hybridized to ^{35}S-labeled riboprobes of 19 different zebra finch glutamate receptor subunits. White label is mRNA signal. At the bottom of each column is the receptor family name of that column. At the upper left is a camera lucida drawing of brain areas. See SOM and http://jarvis.neuro.duke.edu/nomen/index.html for an explanation of terminology and abbreviations. Scale bar =2mm.

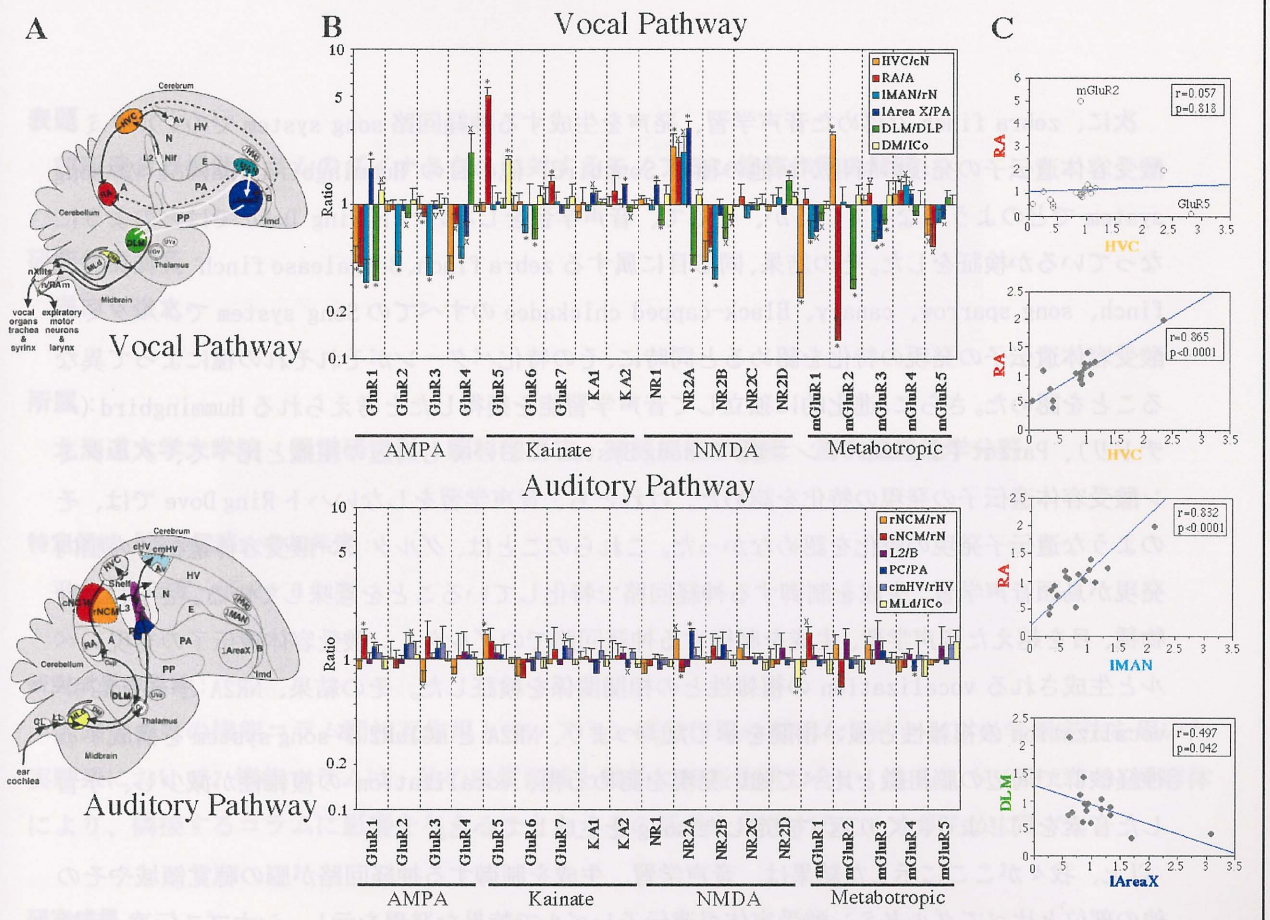


Fig. 2. Magnitude relationships of vocal and auditory nuclei glutamate receptor specializations. (**A**) Sagittal diagrams of the songbird vocal and auditory pathways color-coded to match with (B) and (C). The posterior vocal pathway synapses on brainstem motor neurons that innervate vocal and respiratory musculature (upper diagram, black lines). The anterior vocal pathway forms a loop (upper diagram, white lines). The posterior sends input to anterior and the anterior sends output to the posterior (upper diagram, dashed lines). Thick gray line in the cerebrum designates the lmd border that separates pallium from subpallium. The connectivity view presented will be reported in detail separately (Jarvis, in preparation). (**B**) Gene expression ratios of 20 glutamate receptor subunits for zebra finch vocal and auditory nuclei relative to respective surrounding brain subdivisions (NR3A not shown). Legend insert: amount of mRNA expression per cell in vocal or auditory region/amount of mRNA expression per cell in an adjacent region representing respective surrounding subdivisions, counted as radioactively exposed silver grains. For the vocal:non-vocal ratios, cN is caudal N ventral to HVC; A is non-auditory A anterior to RA; rN is N rostral to lMAN; PA is striatum caudal to lArea X; DLP is dorsal and medial to DLM; the quantified region of ICo is between DM and MLd. For auditory:non-auditory ratios the quantified non-auditory areas are the same as that used to make vocal ratios; rHV is rostral to CMHV. Expression ratios are log scaled to graphically view comparable values above and below 1. When expression is similar to the surround (not specialized) the ratio is ~1; when higher or lower than the surround (specialized) the ratio is above or below ~1 respectively. *=student t-test highly significant above or below 1 at $p<0.01$; x=student t-test significant above or below 1 at $p = 0.05$-0.01; v=clear specialized expression variation in one or more individuals. Error bars are SEM (n=3). (**C**) Gene expression ratios of glutamate receptor subunits (individual dots) in vocal nuclei relative to the surround correlated to each other (y- and x-axes). Axes are in linear format. Regression statistics are shown in each graph. Open circles (○) in the top graph indicate that the data contain GluR5 and mGluR2 values. Solid circles (●) in the bottom three graphs indicate that these two outliers were removed.

次に、zebra finch で認めた音声学習、発声を生成する神経回路 song system でのグルタミン酸受容体遺伝子の発現の特化が、他の種の Songbird、他の目の Hummingbird、Parrot の song system でどのようになっているか、そして、音声学習をしないハト Ring Dove ではどのようになっているか検証をした。その結果、同じ目に属する zebra finch、Bengalease finch、strawberry finch、song sparrow、canary、Black-capped chickadee のすべての Song system でグルタミン酸受容体遺伝子の発現の特化を認めると同時に、その特化パターンがそれぞれの種によって異なることを認めた。さらに、進化的に独立して音声学習能を獲得したと考えられる Hummingbird (ハチドリ)、Parrot (オウム／インコ類)の song System においても周辺の組織と比べて、グルタミン酸受容体遺伝子の発現の特化を認めた。けれども、音声学習をしないハト Ring Dove では、そのような遺伝子発現の特化を認めなかった。これらのことは、グルタミン酸受容体遺伝子の脳内発現が鳥類音声学習、生成を制御する神経回路で特化していることを意味している。さらに、動物種、目を越えた音声学習、生成を制御する神経回路でのグルタミン酸受容体遺伝子の発現レベルと生成される vocalization の複雑性との相関関係を検証した。その結果、NR2A と mGluR2 が vocalization の複雑性と強い相関を示した。つまり、NR2A と mGluR2 が song system を構成する神経核群で周辺の脳組織と比べて強い発現を認める程、vocalization の複雑性が減少し、学習した音素を同じようにくり返す安定した song を生成していた。

以上、我々がここに示した結果は、音声学習、生成を制御する神経回路が脳の聴覚領域やその他の部位と比べてグルタミン酸受容体が遺伝子レベルで特異な発現を示し、シナプス伝達、可塑性という役割をとおして、vocalization の複雑性に関与していることを強く示唆している。さらに、これらのことは、グルタミン酸を含めた神経伝達物質が音声学習、生成を含めた様々な種特異的な動物行動に影響を与えていることを示唆している。

共同研究　上記の研究は Duke 大学の E. Jarvis 博士及び独協医大の坂口博信博士と共同で行った。

A04-16

表題：

前頭連合野機能コラムのダイナミクスに対するモノアミン修飾作用の解明

研究代表者名：

澤口　俊之

所属：

北海道大学大学院　医学研究科　脳科学専攻　神経機能学講座　高次脳機能学分野

特定領域「神経回路」参加年度：

平成１３年度～平成１６年度

研究成果の要旨：

前頭連合野の機能コラム間相互作用とモノアミン修飾作用の解明を目的とし、光学測定法を用いた実験系において、機能コラムは、他の皮質領域と動的に相互作用し合い、さらにドーパミンD1受容体により、隣接するコラムに影響を与えることなくその活動を増強することを明らかにした。

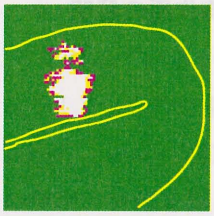
研究成果：

本研究では、前頭連合野のダイナミックなコラム活動（コラム内及びコラム間相互の情報処理過程）とその活動に及ぼすモノアミン修飾作用を *in vitro* の実験系から明らかにすることを目的とした。

はじめに、サル前頭前皮質脳スライスを用いた *in vitro* 実験系により、スライスを電気刺激することで誘発されるコラム活動のダイナミクスに焦点を当てた。まず、前頭連合野背外側部に実際に機能コラムが存在するかどうかを，サルの脳スライス標本における膜電位感受性色素による光学測定法によって調べた。前頭連合野背外側部の４６野，主にその主溝周辺領域から組織ブロックを採取し、厚さ４００μmのスライスを作成した。その後、膜電位感受性色素（RH482またはRH155）により染色して、皮質に電気刺激（シングルパルス、４００μA以下）を加え、光学測定システム（SD1001）を用いて吸光変化として膜電位由来のシグナルを検出した。その結果、特に皮質のⅢ層下部やⅣ層を電気刺激したときに，はっきりとしたコラム状の光学シグナル（コラム活動、皮質に垂直で１mm弱の一定幅を持ったシグナル）が現れることを見出した。

つぎに、コラム活動が他の皮質領域と動的に相互作用しうるかどうかを明らかにするために、解剖学的染色（逆行性トレーサーである fast blue を９野に注入）を行った後、上記同様、前頭連合野背外側部脳スライス標本を作成し膜電位感受性色素を用いた光学測定を行った。その結果、光学測定法によって記録されたコラム活動の内部に、解剖学的染色法により標識された細胞構築学的コラム構造を形成した出力ニューロン群（皮質第 II/II 層と第 V/VI 層に分布）が多く含まれていた（図１）。これらの結果は、コラム活動がコラム構造内の出力ニューロン群を駆動できることを示唆する。また、機能単位として考えられるこのようなコラム活動は、他の皮質領域と相互作用しているかもしれない。

A. Columnar activity at different stimulation sites in the same slice



← : Shade of an electrode

B. Superimposed image of columnar labeled neurons and contours of columnar activity

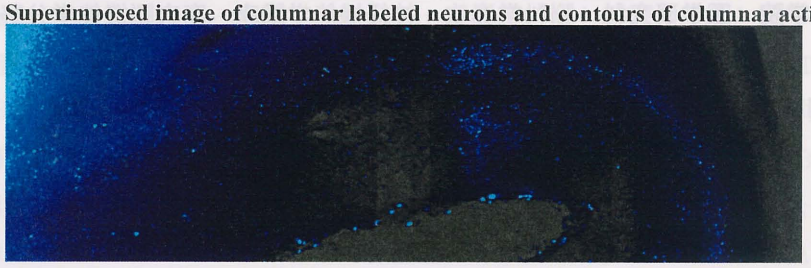


図１．コラム活動と細胞構築学的コラム構造の関係。　A.同じスライスにおいて異なった刺激部位で誘発された異なったコラム活動。矢印は刺激の電極の影。B.逆行性に標識された出力ニューロン群とコラム活動の輪郭。細胞構築学的コラム構造が、コラム活動内部に含まれていた（水色のトレース）。Asterisk:刺激部位
PS: Principal sulcus WM: White matter

さらに、このコラム活動に対するドーパミン修飾作用に焦点を当てた。コラム活動に対するドーパミン修飾作用を明らかにするために、ドーパミン D1,D2 受容体を薬理学的に活性化あるいは不活性化した後に膜電位感受性色素を用いた光学測定を行った。ドーパミン D1 受容体の選択的アゴニスト（SKF38393）をバス投与したその結果、D1 アゴニストは、コラム幅を変えることなく、興奮性シナプス伝達を増強した（図２）。一方で、ドーパミン D2 受容体の選択的アゴニスト（Quinpirole）の投与は、コラム活動になんら影響を与えなかった。これらの結果から、ドーパミン D1 受容体は、隣接するコラムに影響を与えることなくコラム活動を増強することを示唆する。

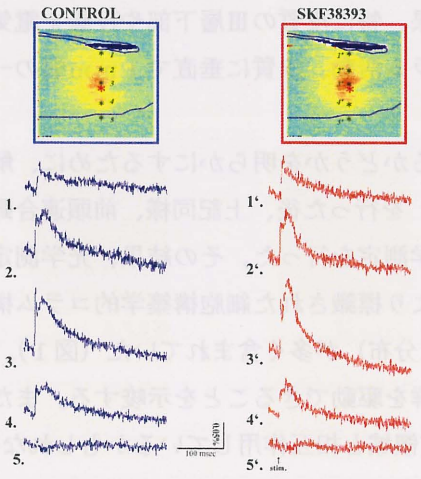


図２．ドーパミン D1 受容体選択的アゴニスト（SKF38393）による前頭連合野コラム活動の増強。下のトレース（１～５）は、皮質の各点における光学シグナルの時間経過。

以上の結果を踏まえ、前頭連合野機能コラムとドーパミンD1受容体による修飾作用を模式化したものが図３になる。前頭連合野脳スライス標本において、他の皮質領域および視床から優位な入力のある皮質第IV層への電気刺激は、コラム活動を誘発した。そして、皮質第II/III層と第V/VI層に分布する出力ニューロン群を駆動することができた。このことは、１）前頭連合野に実際に機能コラムが存在し、２）前頭前皮質第 IV 層への情報入力が機能コラム内で処理され、その処理結果が、皮質第II/III層と第V/VI層の出力ニューロンから他の皮質領域へ出力として送られることを示唆する。また、ドーパミンD1受容体活性化は、機能コラムの幅を変えることなく興奮性シナプス伝達を増強した。このことから、ドーパミンD1受容体活性化によって増強された機能コラムは、コラム内で情報処理を行ったのち強い出力を他の皮質領域へ送っているかもしれない。

このような前頭連合野機能コラムのダイナミクス（コラム内及びコラム間相互の情報処理過程）とドーパミンD1受容体による機能コラムの修飾作用は、前頭連合野の担う高次認知機能の基礎的、かつ、重要な神経メカニズムであると考えられる。

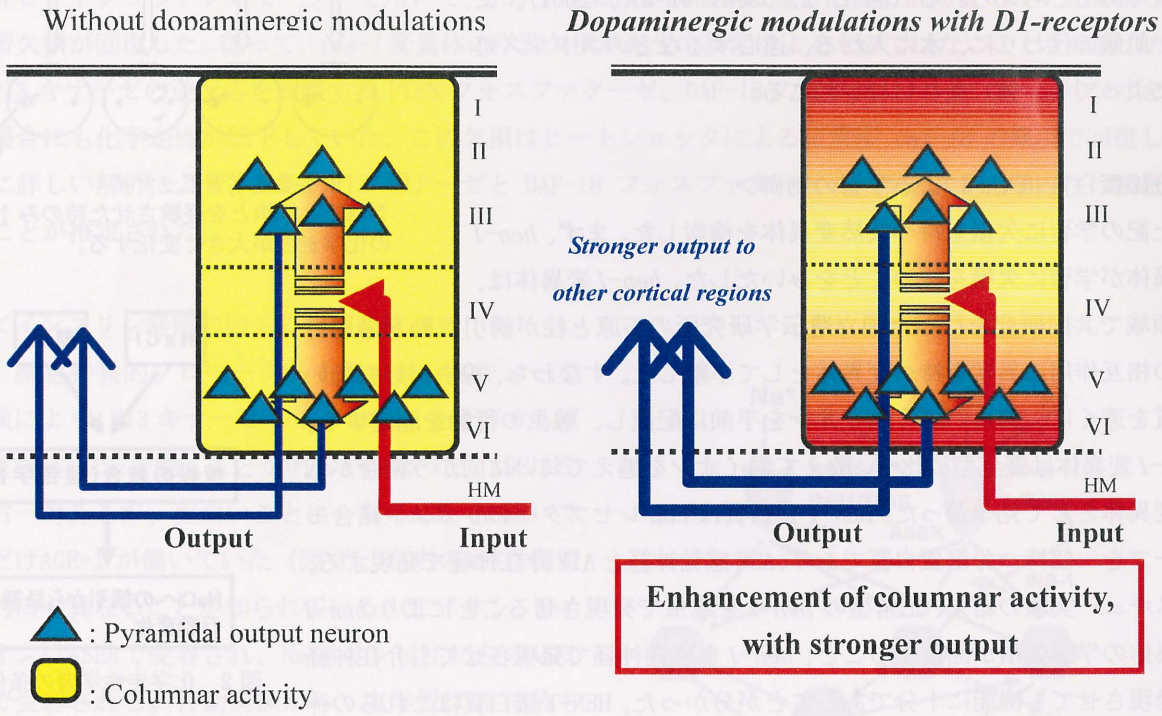


図３．前頭連合野機能コラムとドーパミンD1受容体修飾作用の模式図。

A04-17

研究課題　線虫の化学走性とその可塑性に関わる神経回路と機能分子の同定

研究代表者名　飯野雄一

所属　東京大学遺伝子実験施設

特定領域「神経回路」参加年度

平成 13 年度～平成 16 年度

研究成果の要旨

線虫の化学走性における学習のアッセイ系を確立し、この学習に分泌蛋白質 HEN-1 とインスリン経路が必要であることを明らかにした。線虫のインスリン様分子 INS-1 は介在神経 AIA から分泌され、右側の感覚神経 ASER に働きかけ、PI3 キナーゼの活性を通して線虫の化学走性行動を正から負へと変化させることがわかった。

研究成果

＜連合学習アッセイ系の構築＞

線虫の化学走性行動における連合学習のアッセイ系を開発した。通常の線虫は NaCl に対して正の化学走性を示す。ところが、NaCl 存在下で飢餓を経験させると NaCl への走性が顕著に低下し、逆に NaCl を忌避するようになる。この変化は NaCl 非存在下で飢餓を経験させても、NaCl と餌を共に与えても起こらない。したがって、NaCl と飢餓の組み合わせを学習する連合学習であると考えられる（図 1, 2, Saeki *et al.*, 2001）。また、飢餓の代わりに、水に入れる、遠心するなどのストレス処理によっても、強い条件付けが起こる。

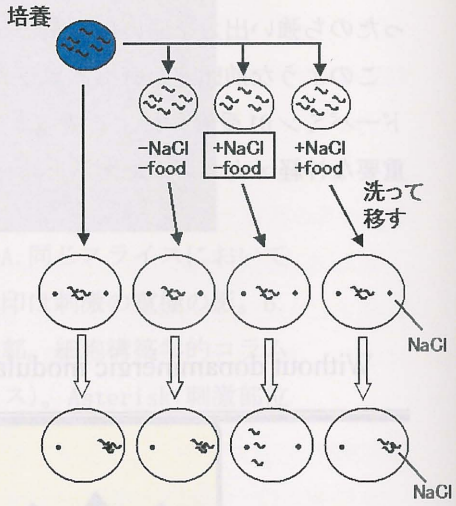


図 1　化学走性学習アッセイ
NaCl と飢餓とを経験させた時のみ NaCl への化学走性が大きく変化する。

＜分泌蛋白質 HEN-1 による学習の制御＞

上記の学習に欠損を持つ突然変異体を検索した。まず、*hen-1* 変異体が学習に欠損を持つことをみいだした。*hen-1* 変異体は、本領域で共同研究を行った国立遺伝学研究所の石原と桂が誘引行動と忌避行動の相互作用に異常を持つ変異体として単離した。すなわち、線虫が好む匂い物質を遠くに、線虫が嫌う銅イオンを手前に配置し、線虫の行動を測定する。*hen-1* 変異体は野生型に比べ、敢えて銅イオンを越えて匂いに向かう割合が低い変異体として見つかった。HEN-1 蛋白質は LDL レセプターのリガンド結合モチーフを一個持つ分泌蛋白質であり、ASE 感覚神経と AIY 介在神経で発現する。レスキュー実験の結果、正常型の *hen-1* を成虫で発現させることにより *hen-1* 変異体の学習欠損が回復すること、*hen-1* を感覚神経で発現させても介在神経で発現させても機能に十分であることが分かった。HEN-1 蛋白質はこれらの神経のシナプス部から分泌され、他の神経の機能を修飾することにより、2 つの情報（NaCl と飢餓あるいは銅イオンと匂い物質）の統合を制御すると考えている（石原・桂との共同研究; Ishihara *et al.*, 2002）。

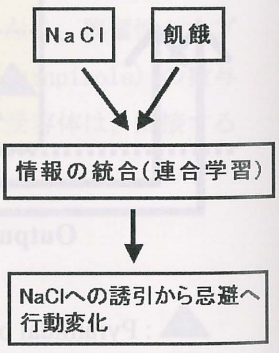


図 2　化学走性学習の条件関係

一方、NaCl への化学走性の学習に欠損のある突然変異体を変異原処理により新たに分離した。そのうちのひとつが、*scd-2* 遺伝子の欠失変異であることが分かった。*scd-2* はヒトの癌遺伝子であるチロシンキナーゼ型レセプター、ALK のホモログをコードする。既存の *scd-2* 変異体を調べたところ、やはり学習欠損が見られた。最近ショウジョウバエの ALK ホモログである dALK が、HEN-1 のホモログである Jelly Belly の受容体であることが示されており、SCD-2 は HEN-1 の受容体と推定される（桂、石原との共同研究）。

＜インスリン経路の連合学習への関与＞

NaCl への化学走性の学習に欠損を持つ変異体を検索した中で、インスリン受容体ホモログをコードする *daf-2* の変異体が連合学習に欠損を示すことを見出した。すなわち、*daf-2* 変異体は、NaCl と飢餓を経験させた後でも相変わらず NaCl へ正の化学走性を示す。*daf-2* 変異体は神経系による耐性幼虫形成の制御に異常がある（構成的耐性幼虫形成）変異体として、また長寿の変異体としてよく知られている。耐性幼虫や寿命の系では、*daf-2* の上流、下流で働く因子がすでに同定されている。そこで、*daf-2* の上流、下流で働くと予想される遺伝子の変異体を調べたところ、インスリン様ペプチドをコードする *ins-1*、PI3 キナーゼをコードする *age-1*、PDK（ホスホイノシチド依存性キナーゼ）ホモログをコードする *pdk-1*、Akt/PKB キナーゼをコードする *akt-1* の、いずれの変異体でも学習欠損が見られた。このうち INS-1 は耐性幼虫形成や寿命には関与せず、耐性幼虫形成では別のインスリン様分子 DAF-28 が働くとされている。したがって、インスリンシグナル伝達経路が学習による化学走性の変化に必須であるが、使われているインスリンは別の経路とは異なることがわかった。INS-1 は、線虫のゲノム上で予想されるインスリン様ペプチドのうちで、最もヒトインスリンに近い分子である。ヒトやげっ歯類では、インスリン受容体が脳で多く発現していることが知られており、食欲の制御における機能や、学習・記憶やアルツハイマー型痴呆との関連も指摘されているが、詳細は不明である。

＜インスリン経路の因子の働き方＞

ヒートショックプロモーターを用いて、*ins-1* 変異体が成虫期に達した後に正常型 *ins-1* を発現させると学習欠損が回復した。従って、*ins-1* 変異体の学習欠損が発生の異常によるものではないことを確認した。一方、PI3 キナーゼの逆反応を触媒する PTEN フォスファターゼ、DAF-18 の変異体においては、条件づけを行わない場合にも化学走性が低下していた。この欠損はヒートショックによる正常型 *daf-18* の発現で回復した。さらに詳しい解析により、AGE-1 PI3 キナーゼと DAF-18 フォスファターゼのバランスが化学走性行動を規定することが推定された。

＜インスリン経路の因子の作用部位＞

細胞特異的プロモーターを用いたレスキュー実験により、PI3 キナーゼ AGE-1 はNaClを受容する感覚神経、ASEで働くことが明らかになった。ASEは左右一対あるが、面白いことに、右のASE（ASER）でだけAGE-1 が働いていた（図 3）。左右のASEは機能的にも異なることが知られている。Cl^-イオン、K^+イオンはASERで受容され、Na^+イオンは主に左のASELで受容される。行動実験から、塩学習はCl^-で最も強く起こることが確認された。これらのことから、このアッセイ系で見るかぎり、右のASE感覚神経だけが可塑性を示すと考えられる。一方、INS-1 インスリンの働く場所を決定したところ、ASEなど複数の感覚神経から入力を受けるAIA介在神経で働くことが学習に必要であるとわかった。以上の結果から、NaClと飢餓の刺激を受けると、NaClを受

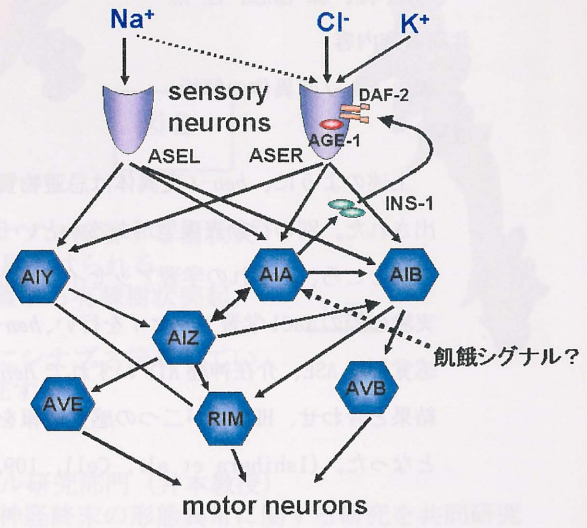


図３　インスリン経路の作用部位
インスリンINS-1 は介在神経AIAから分泌され右のASEに作用する。これにより、Cl^-などへの走性が変化する。

容するASEが興奮し、その入力を受けたAIAからインスリンが放出され、これがASERに働きかけることによってNaClへの化学走性行動が切り替わるというモデルが考えられる。ASERの中ではAGE-1 PI3 キナーゼが活性化され、PIP_3などのホスホイノシチド二次メッセンジャーが増加することが化学走性の低下を引き起こすと考えられる（図 4）。注目すべき点は、単一の神経、ASERでAGE-1 が働くことにより化学走性が正から負へと変化することである。神経細胞内シグナル伝達により行動がスイッチする現象として興味深い。

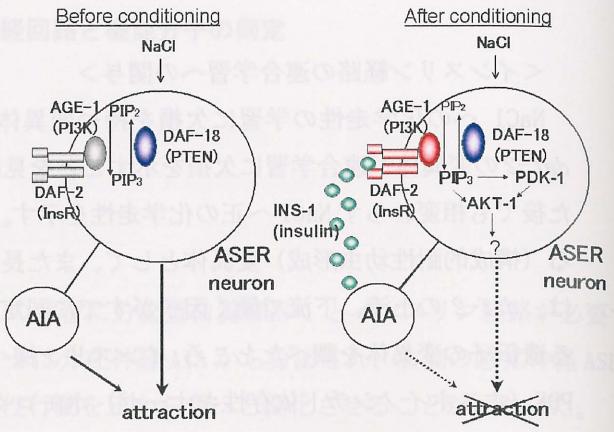


図 4　インスリン経路の作用のモデル
インスリンレセプターDAF-2、PI3 キナーゼ AGE-1 により PIP3 のレベルが上昇すると、PDK-1、AKT-1 の働きにより ASER のレスポンスが変化する。

＜嗅覚順応におけるRas-MAPK経路の機能＞

線虫の匂い物質への化学走性の可塑性、嗅覚順応の新たなアッセイ系を開発した。この順応（早期順応）は、通常の感覚順応と異なり、介在神経AIYの働きを必要とすることを見出した。さらに、線虫のRasをコードする唯一の遺伝子である*let-60* の機能が異常になると順応の欠損を来たすことを見出した。さらに、活性化型MAPキナーゼに対する抗体を用いた染色実験により、MAPキナーゼが匂い刺激によってAIY介在神経内で活性化されること、AIYにおけるRas-MAPK経路の機能が順応に必須であることを明らかにした。嗅覚順応は多くの動物で観察され、単離した嗅覚神経を用いたメカニズムの研究が進んでいる。しかし、より高次の神経回路を介した順応があると言われているものの、そのような機構についての研究はほとんど進んでいない。上記の結果はこのような機構の一つとして、線虫のRas-MAPK経路が介在神経で働き、そこでの機能が嗅覚順応に重要であることを示している。

共同研究

共同研究の相手

石原 健、森 郁恵、桂 勲

共同研究内容

線虫 *hen-1* 変異体の解析

成果

上述のように、*hen-1* 変異体は忌避物質と誘引物質の相互作用に異常を持つ変異体として石原、桂により見出された。別の行動表現型があるかという疑問に対し、飯野が NaCl の化学走性学習を、森らが温度学習を調べたところ、いずれの学習アッセイでも *hen-1* 変異体が異常を示すことがわかった。飯野はさらにレスキュー実験の際のNaCl学習アッセイを行い、*hen-1*変異体の学習欠損が成虫期での *hen-1*の発現により回復すること、感覚神経 ASE、介在神経 AIY いずれで *hen-1* を発現させても欠損が回復することを確かめた。石原ら、森らの結果と合わせ、HEN-1 が二つの感覚情報を統合し行動制御に結びつける重要な分泌蛋白質であることが明らかとなった。(Ishihara et al., Cell, 109, 639-649 (2002))

表題（研究課題）　大脳皮質微細局所神経回路のダブルブーケ細胞の構造と機能
研究代表者名　窪田　芳之
所属　自然科学研究機構　生理学研究所　大脳神経回路論研究部門
特定領域「神経回路」参加年度　平成１２年度ー平成１６年度

研究成果の要旨
ダブルブーケ細胞の神経終末のシナプス接着ターゲットを検討した。その結果、一部の非錐体細胞の樹状突起と、錐体細胞の棘突起を主なターゲットにしている事が明らかとなった。

研究成果
大脳皮質の非錐体細胞の一つのサブタイプであるダブルブーケ（DB）細胞がどのようなターゲット特性を持つかを形態的に解析した。ラットを実験動物に用い、前頭皮質のスライスを作成し、ホールセル記録法で電気的な特徴を記録解析した後、バイオサイチンを注入した。固定後、ABC液で反応し DAB 染色を施しエポンに包埋した。これらの非錐体細胞を光学顕微鏡で観察描画した後、軸索部分を電子顕微鏡で観察し、３次元再構築画像解析ソフトで前、後シナプス要素の３次元像を再構築し、その出力構造を形態的に解析した。カルレチニン(CR)を含有することを免疫組織化学法で同定した下降軸索を持つ DB 細胞３個と、CRF を発現する２個の DB 細胞で検討し比較した。その結果、CR 陽性 DB 細胞のターゲットは、約 1/3 のものが興奮性終末が多く入力する非錐体細胞の樹状突起の幹であった。また、約 1/3 はそれ以外の樹状突起の幹であった。残りの終末は、棘突起の頭部や柄部に入力していた。その棘突起には興奮性と考えられる入力が認められたことから、ある特定の興奮性入力信号に影響を与えていることが示唆された。細胞体に対する入力は少数では有るが存在した。また、CRF 陽性 DB 細胞のターゲットは、上述の種類に加えて、DB 細胞の持つ尖端樹状突起の方向に伸びる樹状突起が２−３割占めていた。以上の点から、DB 細胞はさらに２種類のサブタイプに分かれる事が示唆された。

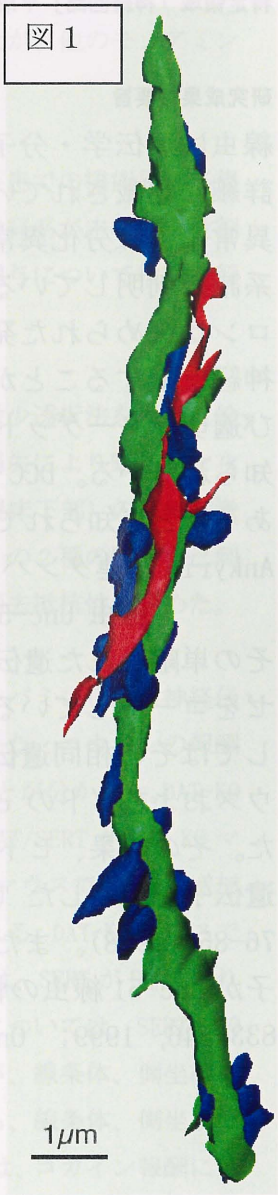


図１

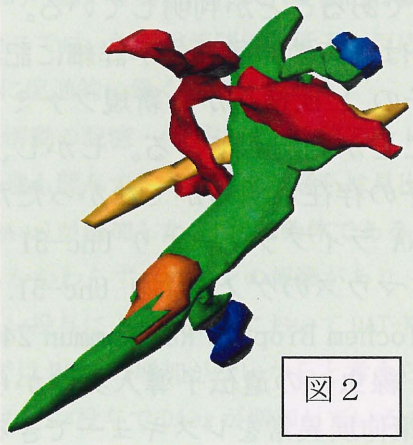


図２

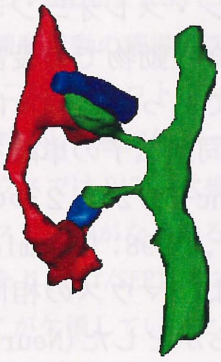


図３

図１　ダブルブーケ細胞の神経終末（赤色）がシナプス接着する樹状突起（緑色）。多数の興奮性シナプス入力（青色）が見受けられる。
図２　ダブルブーケ細胞の神経終末がシナプス接着する有棘樹状突起。棘突起頭部に興奮性シナプス入力がある。
図３　ダブルブーケ細胞の神経終末が棘突起頭部にシナプス接着している。その棘突起頭部に興奮性のシナプス入力が存在する。

共同研究
1）自然科学研究機構　生理学研究所　神経シグナル研究部門（井本教授）
tottering mouse の小脳核でのプルキニエ細胞神経終末の形態異常に関する研究を共同研究として行った。
2）自然科学研究機構　基礎生物学研究所　脳生物学研究部門（山森教授）
大脳皮質および視床における VGLUT1, VGLUT2 の in situ hybridization によるシグナルの有無の検討を共同研究として行った。

A04-20

神経回路形成におけるマウス UNC-51 セリン/スレオニンキナーゼの役割

白澤卓二

東京都老人総合研究所　分子老化研究グループ

特定領域「神経回路」平成 12 年度

研究成果の要旨

線虫は遺伝学・分子生物学が応用でき、神経系をはじめ全ての細胞の発生・分化が詳細に記載されている有用な生物学的実験系である。従って、細胞レベルでの発生異常または分化異常のミュータントが簡単にスクリーニングできる。線虫には分化系譜が判明しているニューロンより構成される神経系が存在し、それぞれのニューロンは決められた発生時期に軸索を特定のパスに伸展させ特定のターゲット組織を神経支配することが知られている。遺伝学的な検索の結果、適切な軸索の伸展および適切なターゲットへのガイダンスには 10 以上の遺伝子の働きが必要であることが知られている。DCC (Deleted Colorectal cancer) は線虫の Unc-40 の相同遺伝子であることが知られている。CRAP-62 は Unc-44 の相同遺伝子で、Unc-44 遺伝子産物は Ankyrin 関連タンパクであることが判明している。

線虫 Unc-51 は軸策の伸展異常が詳細に記載されたミュータントであるが、その単離された遺伝子の 1 次構造から新規ファミリーのセリン・スレオニンキナーゼをコードしていることが判明している。しかし、これまで脊椎動物での役割に関してはその相同遺伝子の存在が明らかでなかったために不明であった。我々は、マウスおよびヒトの cDNA ライブラリーより Unc-51 キナーゼ相同遺伝子の単離を試みた。その結果、ヒト、マウスのゲノムより Unc-51.1 および Unc-51.2 と２つの相同遺伝子を同定した (Biochem Biophys Res Commun 246, 222-227., 1998; Genomics 51, 76-85, 1998)。また、線虫への遺伝子導入実験から、ヒトおよびマウスの相同遺伝子が Unc-51 線虫の軸策伸展異常をレスキューできることを明らかとした(Neuron 24, 833-846, 1999; Oncogene, 18, 5850-5859, 1999)。

1．研究課題名：報酬回路におけるモノアミン・オピオイド神経伝達の分子機構

2．研究者名：曽良　一郎

3．所属：東北大学医学系研究科精神・神経生物学分野

4．特定領域「神経回路」参加年度：平成15年度～平成16年度

5．研究結果の要旨

報酬回路は従来、ドーパミン神経系が中心的な役割を担うとされてきたが、他のモノアミンやオピオイド神経伝達が複雑に関与する機構であることが示唆された。

6．研究結果

報酬回路は情動と密接に関連する高次神経回路であり、多くの精神疾患での機能異常が想定されている。報酬回路では中脳辺縁ドーパミン、中脳皮質ドーパミン神経系が中心的な役割を担うとされてきたが、我々は他のモノアミンやオピオイド神経伝達の関与について検討を行った。

1．モノアミンの報酬に関する研究

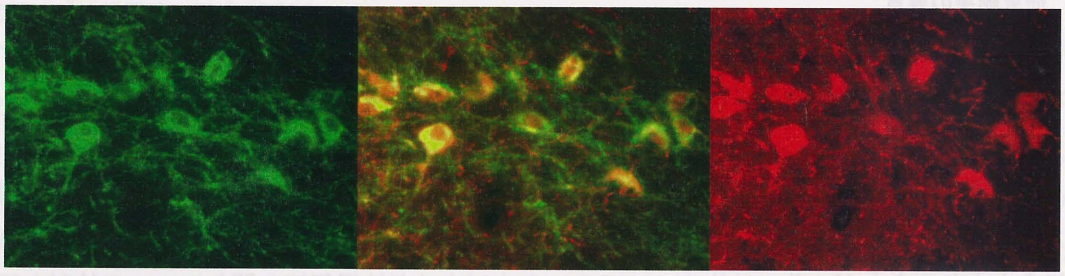
報酬に関する脳内モノアミン神経伝達を解析することを目的に、脳内微少透析法を用いて検討した。DAT-KOマウスの細胞外ドーパミン濃度(DA*ex*)は、再取り込みの消失により野生型マウスの約10倍に増加していた。DATKOマウスを用いて、内側前脳束（外側視床下部）の電気刺激によるヘッドディッピング式（能動的行動）と場所滞在式（受動的行動）の2種の脳内自己刺激試験（ICSS）を行った。DATKOマウスでは、刺激電流閾値の低下と反応消去抵抗性を認めた。DA*ex*の増加はICSSによる報酬効果に促進的に働くと考えられた。

報酬行動の獲得に深く関与する快情動の記憶・学習には、中脳辺縁ドーパミン(DA)系神経伝達に加えてセロトニン(5-HT)神経伝達も関与することを申請者らは見出した。コカインの報酬に対応して細胞外ドーパミン濃度(DA*ex*)が増加したのは、線条体であることが分かった。DAT-KOマウスではDATが欠損しているにもかかわらずコカインの報酬があり、DAT/SERTダブルKOマウスで報酬がなくなるのは、コカイン投与により線条体においてDAT-KOマウスでDA*ex*の増加があり、DAT/SERTダブルKOマウスではDA*ex*の増加がないからと考えられる。DAT-KOマウスでDATが欠損しているにも関わらずコカイン投与でDA*ex*が増加しているのは、SERTがDA再取り込みを補完したことを示唆している。コカイン投与による5-HTの変化については、SERT -KOマウスで前頭前野皮質でのセロトニン濃度(5-HT*ex*)の増加が見られないが、線条体、側坐核では増加が見られ、DAT/SERTダブルKOマウスで見られなくなったことから、線条体、側坐核ではDATが5-HTの再取り込みを補完していると考えられた。これらの結果は、コカイン報酬にはDATとSERTが共に関与し、同族トランスポーターの補完作用が存在することを示唆している。

さらに、線条体とは異なり前頭前野皮質では、選択的5-HT取り込み阻害薬(SSRI)であるfluoxetine投与によりDAT欠損、SERT欠損マウスのみならず野生型においてもDAex、細胞外ノルエピネフリン濃度(NEex)が上昇することが脳内微少透析法を用いて明らかとなった。前頭前野皮質のモノアミン神経伝達は線条体とは異なったメカニズムにより情動機能を制御していると考えられる。

同族トランスポーターの補完作用を明らかにするために、SERT欠損マウスにおいて腹側被蓋野、黒質においてDA神経のマーカーとしてのDATと5-HTの局在を二重染色により検討した。その結果、腹側被蓋野、黒質のDA細胞体に5-HTが認められた(図１)。SERT欠損により細胞外5-HT濃度(5-HTex)が上昇した条件下ではDATが5-HTの再取り込みを補完する可能性が示唆された。

図 1. SERT 欠損マウスの黒質 DA 細胞における 5-HT



Dopamine transporter(DAT)　　DAT & 5-HT　　Serotoni(5-HT)

2. オピオイド報酬に関する研究

オピオイドの報酬効果はミューオピオイド受容体(μOR)を標的分子とすることがミューオピオイド受容体欠損マウス(μOR-KO)の行動解析から、我々は明らかにした。本研究では報酬に関する脳内オピオイド神経伝達の役割を解析することを目的に検討した。

μOR-KO マウスを用いて、内側前脳束（外側視床下部）の電気刺激によるヘッドディッピング式（能動的行動）と場所滞在式（受動的行動）の２種の脳内自己刺激試験（ICSS）を行った。μOR-KO マウスでは ICSS の反応が増強しており、野生型ではモルヒネ投与により ICSS の反応は低下した。よって、μOR は外側視床下部刺激による報酬効果に抑制的に作用すると考えられた。

テールサスペンジョン法と水車法による逃避意欲試験を行ったところ、野生型と比較してμOR-KO マウスの逃避行動が亢進しており、μOR-KO マウスはストレス負荷による意欲低下への耐性が増していた。ストレス負荷の指標として副腎皮質ホルモンを測定したところ、野生型ではこれらのストレス負荷により副腎皮質ホルモンが上昇したが、μOR-KO マウスでは副腎皮質ホルモンは変化しなかった。

さらに、ノルアドレナリン合成酵素であるドーパミンβ水酸化酵素(DBH)のプロモーターを用いて、ノルアドレナリン神経にμORを過剰発現するマウスをまず作製し、μOR-KOと掛け合わせることにより、ノルアドレナリン神経にのみ特異的にμORが発現する遺伝子改変マウスモデルを作製した。全身のμORの欠損により増強したストレス耐性は、ノルアドレナリン神経にのみμOR発現を回復させた場合に消失した。オピオイド系はノルアドレナリン神経系、副腎皮質系を介して生体が受けるストレスを制御している可能性が考えられた。

８．共同研究

Uhl GR (NIDA/NIH)　オピオイド受容体欠損マウスモデルによる報酬回路の解析：
モルヒネ報酬は C57B6/129SV 混合と C57/BL6 という異なる遺伝的背景による影響を受けなかった。

A04-22

研究課題名: 胎生期ストレス負荷による感情・学習障害機構の解明

研究代表者: 上野　照子

所属: 富山医科薬科大学医学部生理学

特定領域「神経回路」参加年度: 平成 15-16 年度

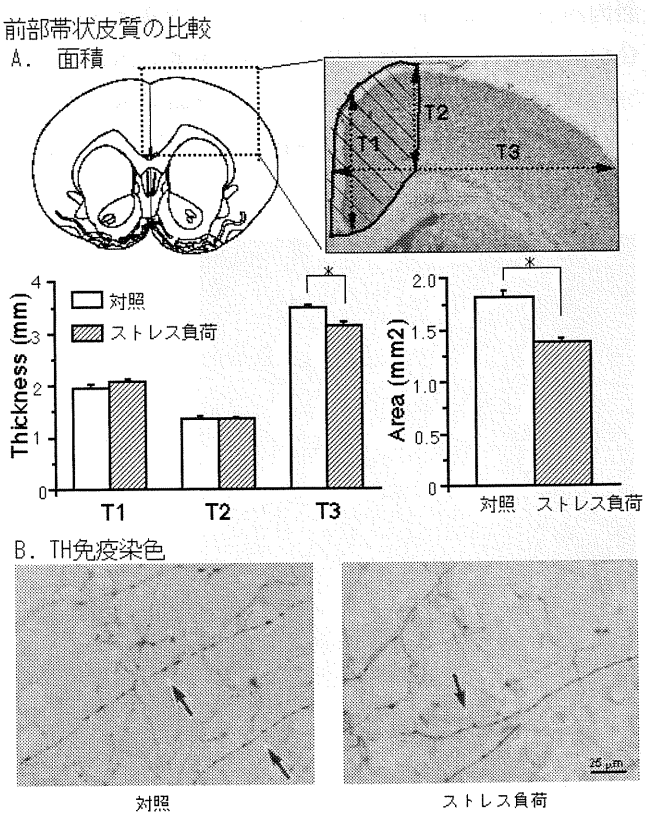
研究成果の要旨:

胎生期ストレス負荷により，生後 8 日目では 1)体重，脳，胸腺，脾臓，および腎臓の絶対湿重量の減少，2)前部帯状皮質の面積，チロシン水酸化酵素陽性線維およびバリコースの減少，3)四肢協調運動機能の発達の遅延が認められた。成長後では 4)空間学習の障害や学習行動中に突然行動を休止する行動異常が認められた。

研究成果:

1) **胎生期ストレス負荷ラットの作製**: 受精後 10 日目(E10)の妊娠ラットを入れた飼育用ケージを，反復寒冷ストレス装置(現有)内に設置し，出生予定日(E21)の 2 日前(E19)まで同装置内で飼育することにより，胎生期ストレス負荷ラットを作製した。対照ラットとして，ストレス非負荷妊娠ラットから出生したラットを用いた。

2) **胎生期ストレス負荷ラットにおける大脳辺縁系発達の解剖学的検索**: 生後 8 日目(P8)のラットの脳および末梢臓器(胸腺，脾臓，副腎，肝臓，腎臓，心臓)の湿重量，体重を胎生期ストレス負荷群と対照群で比較した。その結果，ストレス負荷群では対照群に比べ，脳，胸腺，脾臓，および腎臓の絶対湿重量と体重が有意に小さかった。また，体重当たりの相対値で比較すると、胎生期ストレス負荷群では，胸腺の相対値が有意に低く，逆に肝臓の相対値が高かった。さらに P8 ラットの脳組織ニッスル染色標本を作製し，大脳辺縁系の各領域の発達程度を比較する目的で，前部帯状皮質の面積を比較解析した。脳梁の最も吻側部レベルの前額断における前部帯状皮質の面積は，胎生期ストレス負荷群で有意に小さかった。また，チロシン水酸化酵素(TH)免疫組織化学により，胎生期ストレス負荷群では前部帯状皮質の TH 陽性線維およびバリコースが減少することが明らかになった。青斑核の TH 陽性ニューロンの免疫反応性が低く，線条体と中脳では差が認められなかったことから，前部帯状皮質におけるノルアドレナリン神経の発達障害が示唆された。



3) **生後初期における運動機能の発達に対する胎生期ストレスの影響**: 生後 1-14 日までのラットを用いた。四肢の協調運動の発達を観察するために，傾斜版テスト(25 度の斜面にラット頭部を下向きにして置き，ラット頭部が上向きになるまでの時間を測定)，および遊泳テスト(37℃の温水中にラットを放し遊泳行動を観察)を行い，各群の動物における運動発達特性を比較した。その結果，胎生期ストレス負荷群は対照群と比較して，傾斜板テストでの体軸回旋の潜時が有意に長かった。また，遊泳テストでは，前後肢の協調運動性や前後肢の体幹への引き寄せが発現する時期の遅延が見られた。

4)**成ラットの情動・記憶機能に対する胎生期ストレスの影響**: 情動・記憶機能を明らかにするために，当教室で独自に開発した場所学習課題をテストした。まず，報酬性の脳内刺激(ICSS)用電極を埋め込み手術回復後，スキナー箱を用いてレバー押しによる ICSS の訓練を行った。各 4 群のラットにおける電流強度には差がないことから，報酬獲得行動あるいは動機付け行動そのものには影響がないことが明らかになった。レバー押し訓練後，ラットを直径 150cm の円形オープンフィールド内に置き，場所移動課題（円形オープンフィールド内に報酬場所を 2 ヶ所設定し，ラットがこの 2 ヶ所の報酬場所間を交互に移動すれば，それぞれの報酬場所で ICSS を獲得できる。このためラットは，報酬場所を学習し，記憶することが要求される)を行った。ストレス負荷群では，課題試行中に移動を休止するという行動の途絶が認められ，場所学習課題の学習が有意に障害された。このような現象は，不安の亢進や帯状回の破壊でしばしば認められる現象であり，大脳辺縁系に何らかの機能異常が生じていることが示唆された。さらにストレス負荷群では，情動性の指標となる高輝度条件下驚愕反応の強度が増加することが明らかになった。

A04-23

シナプス可塑性の誘導における内因性カンナビノイドの役割

少作隆子
金沢大学大学院　医学系研究科　シナプス発達・機能学

特定領域「神経回路」参加年度

平成15年度ー平成16年度

研究成果の要旨

培養海馬ニューロンを用い、(1) Gq 共役型受容体の活性化と脱分極が同期することにより多量の内因性カンナビノイドが放出されること、(2) この現象に内因性カンナビノイドの生成の律速酵素である PLCβ1 が同期性検出器として働いていること、を明らかにした。

研究成果

目的：　最近の研究により、脳の様々な領域において、内因性カンナビノイドが逆行性シグナルとして機能することが明らかとなった。内因性カンナビノイドはシナプス後ニューロンから放出され、それがシナプス前終末に存在するカンナビノイド受容体タイプ 1（CB1）を活性化し、神経伝達物質の放出を抑制する。また、内因性カンナビノイドは、線条体の興奮性シナプス伝達や扁桃体および海馬の抑制性シナプス伝達の長期抑圧（long-term depression, LTD）の誘導にも重要な役割を担っていることが報告されている。我々は、培養海馬ニューロンを用いて、内因性カンナビノイドの合成・放出が、（1）脱分極による細胞内Ca^{2+}濃度上昇、（2）グループI代謝型グルタミン酸受容体（I-mGluR）の活性化、により引き起こされることを報告してきた。また、脱分極とI-mGluR活性化が同時におこると、内因性カンナビノイドの合成・放出が著しく促進されることを見いだした。この現象は、海馬における高頻度刺激により誘導される抑制性シナプス伝達の長期抑圧（I-LTD）に、I-mGluR依存性内因性カンナビノイド放出が関与していることを考えると生理的に重要であると思われるが、その詳しい分子メカニズムは解明されていない。そこで本研究では、培養海馬ニューロンを用い、内因性カンナビノイド放出に対する脱分極と受容体活性化の相乗効果のメカニズムの解明を目指した。

方法：　ラットおよびマウスの海馬ニューロンを単離培養し、ニューロン・ペアより IPSC を記録し、受容体活性化による内因性カンナビノイドの放出を IPSC の振幅を指標にして調べた。IPSC にはカンナビノイド感受性のものと非感受性のものがあるが、本実験ではカンナビノイド感受性 IPSC のみを使用した。また、phospholipase C(PLC)産物であるジアシルグリセロール（DAG）により活性化される TRPC6 チャネルを強制発現させ、生きた細胞一個の PLC 活性をリアルタイムでモニターする方法を用いた。TRPC6 と EGFP の cDNA をガラス微小管にて培養海馬ニューロンの細胞核に注入し、9-24 時間後に光っているニューロン（図 1）より TRPC6 電流を測定した。

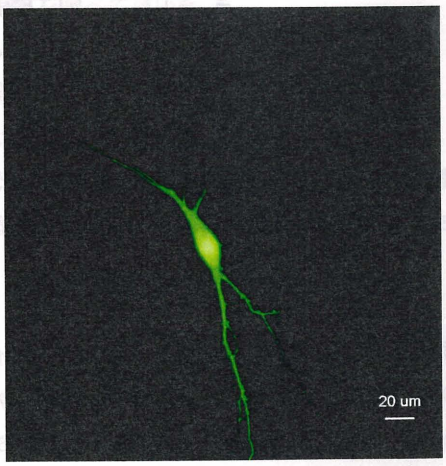


図 1　TRPC6 と GFP の強制発現細胞

結果：

(1) I-mGluRと同様に、M_1/M_3ムスカリニック受容体にはその活性化により内因性カンナビノイドの放出を引き起こす作用があることが判明した。また、I-mGluRの場合と同様に、脱分極とM_1/M_3受容体活性化の同期により内因性カンナビノイドの放出が著しく促進されることが明らかとなった。

(2) I-mGluR およびムスカリニック受容体の活性化による内因性カンナビノイドの放出は PLCβ1 欠損マウスでは消失しており、内因性カンナビノイドの合成・放出に PLCβ1 が必須であることが判明した。

(3) I-mGluRおよびムスカリニック受容体の活性化により引き起こされる内因性カンナビノイドの放出は、細胞内Ca^{2+}濃度に強く依存し、脱分極による一過性のCa^{2+}濃度上昇により著しく増強された。

(4) I-mGluRおよびムスカリニック受容体の活性化により誘導されるTRPC6 電流はPLCβ1 欠損マウスで消失していることから、TRPC6 電流はこれらの受容体を介するPLCβ1 の活性化を反映すると考えられた。

(5) TRPC6 チャネル電流を指標としてPLCβ1 活性を調べたところ、I-mGluRおよびムスカリニック受容体を介するPLCβ1 の活性化が細胞内Ca^{2+}濃度に強く依存し（図 2)、また、脱分極によるCa^{2+}濃度上昇により著しく増強されることが示された。

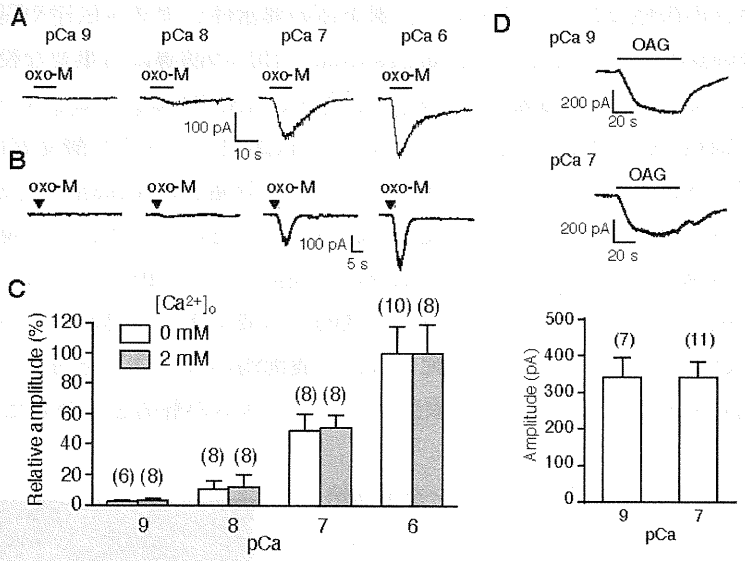


図 2　TRPC6 電流の細胞内Ca^{2+}濃度依存性

Aは細胞外Ca^{2+}濃度が 2mM、Bは 0 mMの時のムスカリン受容体アゴニスト（3 μM oxo-M）投与により誘発されるTRPC6 電流が細胞内Ca^{2+}濃度依存性であることを示す例。Cはその振幅の平均値。DではTRPC6 channel自身にはCa^{2+}濃度依存性がないことを示している。）

考察：　以上より、内因性カンナビノイド放出に対する脱分極と受容体活性化の相乗効果が、PLCβ1 のCa^{2+}依存性で説明できることが判明した。すなわち、内因性カンナビノイドの合成・放出の律速酵素と考えられるPLCβ1 が、生理的範囲において強いCa^{2+}依存性を示すため、細胞内Ca^{2+}濃度上昇と受容体活性化が同時に起こると強く活性化され多量のカンナビノイドが放出されると考えられる（図3参照）。高頻度刺激時には、シナプス後ニューロンの脱分極とI-mGluRの活性化が同時に起こり、それにより

PLCβ1 を介して多量の内因性カンナビノイドが放出されると考えられる。

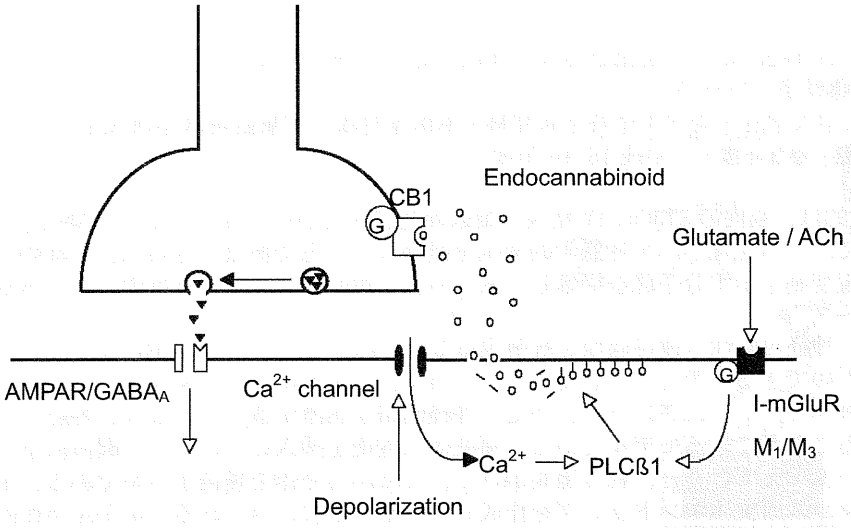


図 3　内因性カンナビノイドの合成・放出メカニズム

共同研究

（1）相手：松井稔（東京大）、武藤誠（京都大）、真鍋俊也（東京大）、大森優子（北大）、深谷昌弘（北大）、渡辺雅彦（北大）

内容：ムスカリン性アセチルコリン受容体活性化によるシナプス伝達調節機構

成果：ムスカリン性アセチルコリン受容体（M1-M5）の活性化により海馬抑制性シナプス伝達がどのような影響を受けるのかを調べた結果、以下のことが判明した。シナプス前終末の M2 受容体の活性化により、伝達物質 GABA の放出が抑制される。一方、シナプス後ニューロンの M1/M3 受容体の活性化により内因性カンナビノイドが放出され、それがシナプス前終末の CB1 受容体を介して GABA の放出を抑制する。本研究において、上記前 3 名の共同研究者（松井、武藤、真鍋）よりムスカリン性アセチルコリン受容体の各サブタイプのノックアウトマウスを提供して頂いた。また、他の共同研究者（大森、深谷、渡辺）には M2 受容体および CB1 受容体の分布を調べて頂いた。

（2）相手：坪川宏（生理研）

内容：海馬スライス標本における内因性カンナビノイドを介するシナプス伝達調節

成果：内因性カンナビノイドを介するシナプス伝達調節機構に関して、培養海馬ニューロンを用いて得られた結果（ムスカリン性アセチルコリン受容体の役割など）はスライス標本においても当てはまることが確かめられた。

（3）相手：Hee-Sup Shin（Korea）

内容：内因性カンナビノイド放出における PLCβ1 の同期性検出器としての役割

成果：脱分極と Gq 共役型受容体活性化が同時に起こることにより、内因性カンナビノイドの放出が引き起こされる。この過程に、PLCβ1 が同期性検出器として働いていることが明らかとなった。本研究において、上記共同研究者より、PLCβ1 ノックアウトマウスを提供して頂いた。

A04-24

表題：視床を介する神経回路の可視化と神経可塑性の分子生物学的解
研究代表者名：加藤啓子
所属：大阪府立大学大学院・農学生命科学研究科・獣医学専攻・実験動物医学研究室
特定領域「神経回路」参加年度：　平成 15-16 年度
研究成果の要旨：

本研究の目的は、脳内の ST3Gal IV 発現・視床神経細胞及びその神経連絡を可視化し、神経可塑性の獲得過程における生理学的・形態学的変化を観察することである。さらに、神経の可塑的変化に連動した発現変動を示す分子群を探索し、個々の分子群の動態解析を目指すことにある。

研究成果：

申請者らは、神経可塑性の獲得過程を解明するためには、まず *in vivo* 脳において、刺激の伝播を観察することのできるモデル系が必要であると考え、てんかんモデルマウスに着目した。てんかんモデル（扁桃体キンドリング）とは、特定の神経回路を刺激することにより、神経可塑性の獲得過程を観察することができるモデルである。扁桃体に電極を挿入し、けいれん閾値以下の軽微な電気刺激を一日一度加えて行くと、約４週間かけて、てんかん発作を獲得する系である。申請者らは現在までに、マウス扁桃体キンドリングを作成し、行動や脳波にみられるてんかん発作の獲得過程のクライテリアを作成し、伝搬経路内における神経樹状突起の形態学的変化を誘導することを明らかにしてきた。扁桃体刺激は、扁桃体→海馬→視床前核→大脳皮質帯状回へと伝搬され、この伝搬経路内では少なくとも４つのシナプスが作られ分子情報を伝達する。伝達経路内の各神経核では、遺伝子・蛋白質レベル及び、翻訳後修飾レベルにおける様々な変化が情報の源となり、上述の行動学的・生理学的・形態学的な神経可塑性が獲得されると考えられる。申請者らは実際にキンドリング刺激の伝搬する扁桃体→海馬で、神経・樹状突起の発達を確認している。一方で本研究の遂行は、てんかん獲得過程の解明にもつながるものであり、本研究におけるキンドリング刺激は、異常神経可塑性を誘導しているともいえる。てんかんは全人口の 1%以上のヒトに発症する頻度の高い慢性神経疾患であり、初診時年齢１５歳以上の成人てんかん患者の４分の１は難治化に進行するといわれている。しかしながらその原因は非常に多様であるが、てんかん発作が起こること自体がその後の発作の原因になるものである。本研究課題を遂行することは、てんかん発作の獲得する過程を分子レベルで明らかにし、統一的な反応系を見つけることにもなる。

てんかん獲得過程に生じる神経可塑性に関与する分子を探索する第一歩として、多様性を持つシアル酸化糖鎖の関与を予想した。シアル酸は糖鎖構造の末端に付加される負の電荷を持つ糖であり、脳内のシアル酸含量が末梢組織に比べて約５倍多いこと、*N*-glycan の４０％がシアル酸化されており、その４分の１がポリシアル酸化されていること、さらには脳ガングリオシド組成が哺乳動物間で保存されていることが知られている。これら脳におけるシアル酸修飾の特徴は脳の大きな特徴のひとつであるということができる。申請者らは、神経可塑性の獲得過程におけるシアル酸化の影響を観察することにし、キンドリング刺激伝搬経路に沿って、糖脂質と糖タンパク質へのシアル酸修飾の変化を調べてきた。まずはキンドリング刺激を直接受ける海馬において、てんかん発作獲得前後の糖脂質へのシアル酸修飾を調べた。その結果、てんかん獲得後に GQ1b の発現上昇が明らかになった（図１）。ガングリオシドは、ガングリオシド１分子あたりのシアル酸数により M, D, T, Q と分類されるものであり、シアル酸数の多いガングリオシドが誘導されたと考えられる。

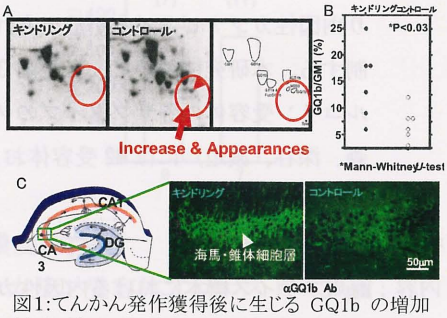


図1:てんかん発作獲得後に生じる GQ1b の増加（未発表）**A:** 原点付近に GQ1b を含むスポットの増加（海馬→Folch 法による脂質抽出→DEAE-Sepharose→脱塩→2D 薄層クロマトグラフィー）**B:** A に明記したスポットの中で GQ1b のみ有為に増加 **C:** 海馬 CA3 の錐体細胞層に GQ1b 発現上昇。

一方申請者らは、以前より糖たんぱく質へのシアル酸修飾の変化を調べていた。糖たんぱく質に付加される糖鎖構造は非常に複雑であることから、まずはてんかん誘導に連動して発現変化を示

すシアル酸転移酵素を決定し、その酵素が修飾するシアル酸化を検討した。その結果、キンドリング刺激の伝搬する海馬→視床の神経細胞においてα2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)の発現上昇を検出した。さらに海馬では、ポリシアル酸付加の亢進が観察された。このことは、ST3Gal IV によりシアル酸付加を受けたと思われる Siaα2-3Galβ1-4GlcNAc-構造へのポリシアル酸化の亢進が海馬で生じたと考えられ、これは、ポリシアル酸化のキーエンザイムが ST3Gal IV である可能性を示している。また、大脳皮質でも ST3Gal IV によりシアル酸付加を受けたと思われる Siaα2-3Galβ1-4GlcNAc-構造を持つ糖たんぱく質の増加が観察された（図２）。このことは、扁桃体→海馬→視床前核→大脳皮質（帯状回）への刺激の伝搬に伴う糖タンパク質へのシアル酸化が、ST3Gal IV の発現上昇により誘導された可能性を示唆している。

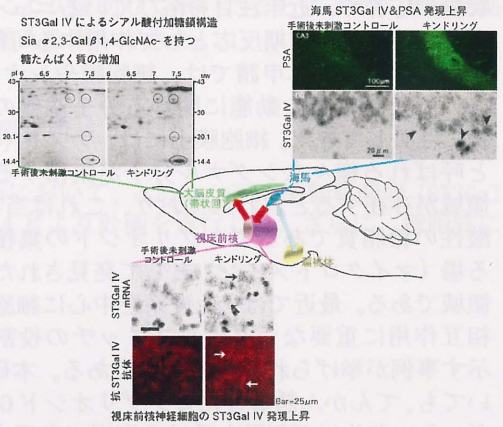


図２：刺激伝搬経路における ST3Gal IV 発現上昇と ST3Gal IV 基質受容体の発現の亢進。(海馬）歯状回顆粒細胞における ST3Gal IV 発現上昇に伴い、その投射先である CA3 領域において ST3Gal IV 基質受容体であるポリシアル酸化(PSA)の亢進。(視床前核）海馬から直接投射される視床前核において、ST3Gal IV 発現上昇。(大脳皮質帯状回）視床前核の投射先である帯状回において、ST3Gal IV 基質受容体である Siaα2,3-Galβ1,4-GlcNAc-構造を持つ糖タンパク質増加を示すスポットの検出。

さらに本研究において、各シアル酸転移酵素の脳内発現分布を詳細に観察したところ、以前より解析されていた試験管内での酵素活性と、実際の発現分布とが非常に適合していることを明らかにすることができた。その中の一例を以下に記す。以前の報告による試験管内での酵素活性測定により ST3Gal I と II は Galβ1,3-GalNAc-に基質特異性を示し、特に ST3Gal I は *O*-glycan に、ST3Gal II はガングリオシドに作用する傾向が高いと示唆されていた。このことから ST3Gal II は、asialoGM1→GM1b, GM1a→GD1a, GD1b→GT1b の生合成に関与すると予想されてきた。一方で、ST3Gal II は ST3Gal V と共に小脳の顆粒細胞層に発現するが、ST3Gal I は小脳での発現を示さなかった。ST3Gal V は LacCer を基質に GM3 の生合成をおこなうことから、GM1a や GD1b の生合成の上流で作用する酵素である。すなわち、ST3Gal II とⅤの共存が GD1a や GT1b の生合成を可能にしており、mRNA の発現分布は ST3Gal II のガングリオシドへの作用に確証を与えた。このことから、糖鎖関連酵素の詳細な分布は、どのような糖鎖構造が最終的に *in vivo* で合成されるのかを明らかにする上で、非常に有効であることを示すことができた。

図３：ST3Gal IV-ターゲティッドマウス F1 ゲノムのサザンブロット。5'-プローブ(SspI) 11.5kb から 9.5kb (targeted); inner プローブ(HindIII) 6.88kb から 3.71kb; 3'プローブ(EcoRI) 11.1kb から 9.8kb. へのバンドの移動を確認した。

本申請の目的のひとつは、ST3Gal IV のノックアウトマウスを作成し、次に野生型マウス及びノックアウトマウスそれぞれの視床を介する神経回路を可視化する事であった。現在までに（独）理化学研究所脳科学総合研究センター・平林義雄博士の協力を得て、C57Bl/6J マウス由来のゲノムと ES 細胞(E14)を用い、コンディショナルノックアウトマウスを作成してきた。このマウスの特筆すべき点は、一般によく利用されている 129 マウス由来の ES 細胞を利用する場合とは異なり、系統による脳形成不全の可能性を除外できる点である。現在までに、図３に示したようにターゲットマウスが、３ラインできており 2004 年１１月１６日に CAG promoter-CrepolyA プラスミドを受精卵に導入した。発生初期に作用する Cre 遺伝子を導入することにより ST3GalIV 遺伝子の完全欠失マウスを作成し、2004 年１２月中には F1 のサザンブロッティングの結果が出る予定である。今後は Cre の作用が効いた事を確かめた後、完全欠失マウスの null を得ると共に、組織特異的（エノラーゼプロモーター、GFAP プロモーター）Cre マウスとの交配を行う予定である。

本申請のもう一つの目的は、神経の可塑的変化に連動した発現変動を示す分子群を探索し、個々の分子群の動態解析を目指すことである。神経可塑性の獲得時に、シナプスを中心とした化学伝達物質の応答や、近年注目を浴びているニューロンーグリア間の細胞膜上での応答が、細胞内へのシグナル情報系の初期反応として作用する可能性が考えられる。そこで本申請では、細胞膜やシナプスといった生体膜の動態に関わる分子基盤の解析に注目してきた。細胞膜上には、ラフト（筏）と呼ばれる様々なシグナル分子が集積する膜領域が存在すると言われており、これは当初、酸性の糖脂質であるガングリオシドの集積する場（マイクロドメイン）として発見された膜領域である。最近では、免疫系を中心に細胞間相互作用に重要なシグナルスイッチの役割を示す事例が挙げられているものである。本研究においても、てんかん誘導後にガングリオシドGQ1bが、キンドリング刺激を受ける海馬で発現上昇を示している。そこで本申請者らは、神経可塑性の獲得過程に関わるラフトーシナプス間における分子基盤を詳しく解析することにした。

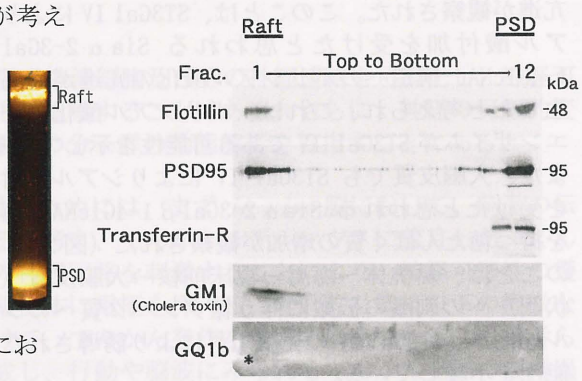


図４：マウス海馬・非イオン性界面活性剤(0.5% Triton X-100)南洋性膜画分の分離。左図、密度勾配超遠心による低比重膜画分と高比重膜画分の分離。右図、左図の膜画分の上層から下層にかけて１２分画に分け、各画分におけるラフトマーカーとシナプス画分のマーカー分子によるウエスタンブロッティング。特にトランスフェリンリセプターはラフトに存在しないマーカーであり、ガングリオシドGM1はラフトマーカー分子である。

具体的にまず、マウス海馬・大脳皮質より膜画分を調整し、ラフト画分とシナプス画分の分離を試みた（図４）。未手術マウス脳から海馬・大脳皮質を非イオン性界面活性剤（0.5% Triton X-100）で処理後、難溶性膜画分を比重分離した。GQ1bはラフトを含む低比重膜画分に存在し、シナプスを含む高比重膜画分（PSD画分）では検出限界以下であった。近年、ラフトと呼ばれる膜画分には複数の機能分離を示す分画に分けられるといった知見が報告されてきているが、本研究では、ラフトとシナプスを完全に分離する事を目的としており、図４に示したように、ラフトを含む画分とシナプスを含む画分の距離を長くとった密度勾配を利用している。

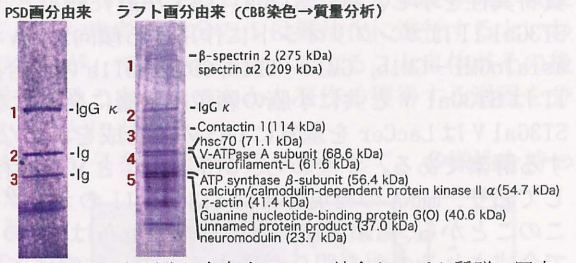


図５：ラフト画分に存在するGQ1b結合タンパク質群の同定。低比重及び高比重膜画分をガングリオシドGQ1bで免疫沈降後、SDS-PAGEを行い図に記した番号のバンドを切り取り抽出後、質量分析により同定した。

次にガングリオシドGQ1bを介した分子シグナルを検索するため、ラフトあるいはシナプスを含む画分内のガングリオシドGQ1b結合分子の存在を免疫沈降法により検討した(図５)。その結果初期実験ではあるが、ラフトを含む低比重膜画分にいくつかの分子の共存を示唆する結果を得た。一方で、シナプスを含む高比重膜画分には、低比重膜画分で検出された分子は共沈されなかった。以上の結果は、GQ1b膜ドメイン・シグナルの存在を示唆するものである。そこで今後は、GQ1b膜ドメイン・シグナルに焦点を置き、GQ1bのてんかん形成への作用を調べる予定である。

申請者らは、神経可塑性の獲得過程において糖タンパク質と糖脂質共にシアル酸化の誘導が生じることを明らかにしてきた。糖タンパク質に対するシアル酸化に関しては、ST3GalIVというキーエンザイムのコンディショナルノックアウトマウスの作成がほぼ完成したことから、神経可塑性の獲得過程における生理学的・形態学的変化の観察が可能となった。今後、ST3GalIV遺伝子の上流を含む100kb以上の長さを持つBACベクターを用いたトランスジェニックマウスを作成することにより、野生型マウス及びノックアウトマウスそれぞれの視床を介する神経回路を可視化することが可

能となる。また糖脂質では、GQ1b の発現誘導を軸にしたラフトーシナプス間の動態の観察系を確立したことから、今後はキンドリングモデルに加え、ST3Gal IV ノックアウトマウスにおけるラフトーシナプス間の動態も観察することができる。本申請により援助して頂いたことにより、神経回路内での神経可塑性の獲得過程の解明につながる準備を整える事ができた。

共同研究

共同研究の相手：　平林義雄　理化学研究所脳総合科学研究所

共同研究と成果：糖鎖修飾による神経機能の発現と制御

共同研究は、2002 年 12 月より開始。理化学研究所において、α2,3-シアル酸転移酵素（ST3Gal IV）のノックアウトマウスを作製計画を立て、2003 年 4 月より計画を遂行した。さらに、糖脂質に関する教授を受けた。

A04-25

においの学習におけるシナプス・分子機構に関する行動学的研究

奥谷　文乃

高知大学医学部　神経統御学講座　統合生理学教室

特定領域「神経回路」参加年度

平成１５年度～平成１６年度

研究成果の要旨

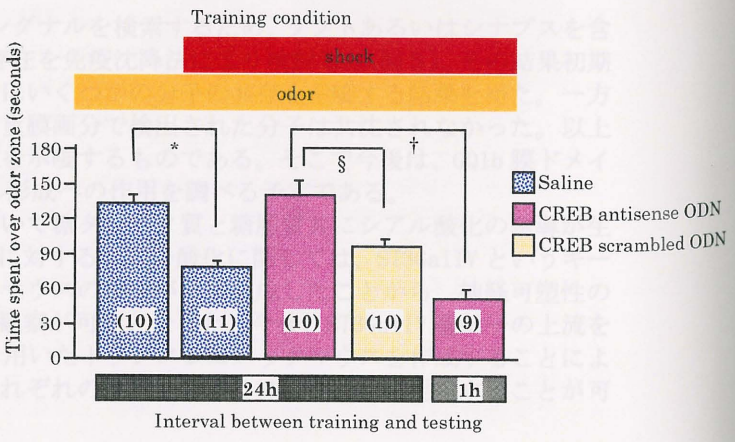
においの嫌悪学習成立の神経機構の一つである嗅球内可塑性のシナプス・分子機構について、行動学的・生化学的に MAPK-CREB カスケードの関与を、および電気生理学的に嗅球フィールド電位上に誘導できる長期増強現象が NMDA 受容体に依存せずノルアドレナリンによって促進されることを明らかにした。

研究成果

未開瞼の幼若ラットは、条件刺激として母のにおいを、無条件刺激として母性行動による体性感覚刺激を対提示されることにより古典的条件づけが成立し、母親のにおいを学習する。われわれのにおいの嫌悪学習のモデルである幼若ラットでは、においを人工的な citral とし体性感覚刺激として嫌悪性の電撃を用いてトレーニングすることにより citral を避ける行動を示すようになる。嗅球内では嗅覚二次伝達ニューロンである僧帽細胞はインターニューロンである糸球体周辺細胞や顆粒細胞と樹状突起間シナプスを形成し、相反性に抑制を受けている。これらのシナプスが嗅覚の順応、側方抑制など効率的な嗅覚情報伝達に貢献している。嗅覚刺激と体性感覚刺激の対提示によって学習が成立するメカニズムとして、青斑核から嗅球へ豊富に投射している遠心性ノルアドレナリン線維が体性感覚刺激によって活性化され、僧帽細胞の顆粒細胞からの脱抑制を引き起こし可塑性成立を導くと考えられている。これまでにトレーニング時の嗅球内への薬物注入により、抑制性シナプス伝達抑制により学習の促進、あるいは伝達増強により学習が抑制されることから、嗅球内シナプスの可塑性がこの学習に関与する可能性が示唆された。そこでこの嗅球内可塑性のメカニズムを解明するために以下の研究を行った。

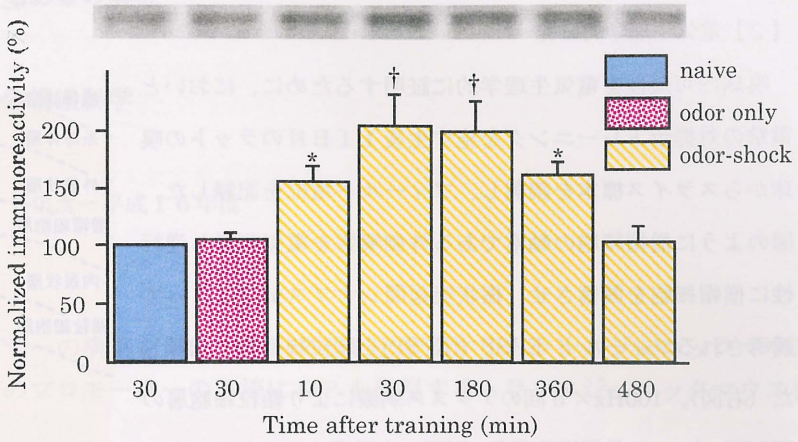
【１】行動学的・生化学的研究

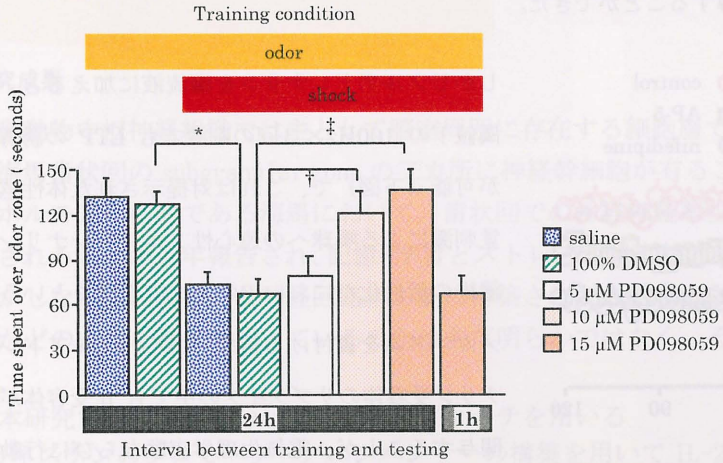
記憶学習の基盤と考えられているシナプス可塑性には細胞内における転写調節因子 CREB (cyclic AMP response-element binding protein) の関与が知られている。そこでまず CREB 合成を阻害する目的で、CREB antisense ODN (oligodeoxynucleotide) をにおい一電撃対提示トレーニングの６時間前に嗅球内に注入し学習への影響を観察した。コントロールとして同じ構成成分を持ち配列の異なる CREB scrambled ODN を注入した。上図のように CREB antisense ODN を注入された動物ではにおい嗜好性テストにおいてにおい分画上の滞留時間に有意な減少が見られず、学習成立は阻害された。



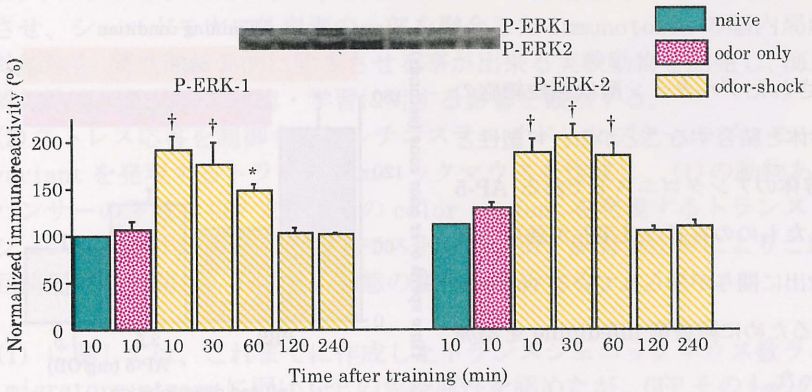
トレーニング後１時間でテストをした場合には学習成立には影響がなく、CREB が長期記憶にのみ必要とされることが明らかとなった。

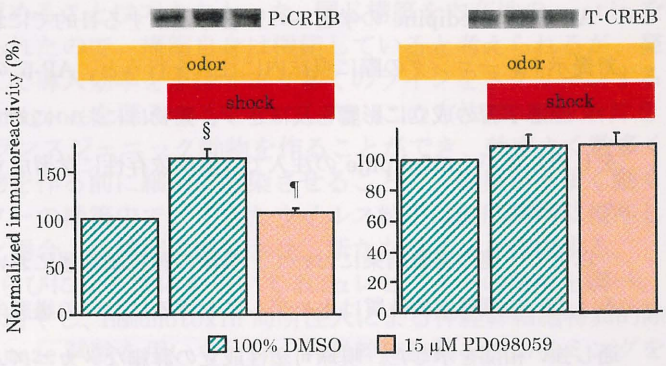
また Western blotting を行い、嗅球における活性型の P-CREB の定量を試みた（右図）。すると学習が成立する条件ではトレーニング後１０分で P-CREB は増加し始め３０分から３時間でピークとなり、６時間後まで持続した。





CREB のリン酸化に関わる代表的な酵素 ERK/MAPK (extracellular-signal regulated kinase/mitogen-activated protein kinase)の活性化阻害剤を嗅球に注入し、学習への影響を観察した。コントロールには溶媒の 100% DMSO を注入し学習に影響がないことを確認した。PD98059 の嗅球内注入は濃度依存性においの嫌悪学習成立を阻害した（左図）。この場合も１時間後にテストをする短期記憶に影響はなかった。さらに Western blotting により CREB のリン酸化能を持つ活性型 P-ERK1/2 の発現量はにおいと電撃の対提示トレーニングから１０分後に増加しはじめ、６０分まで持続した（左図）。すなわち P-ERK1/2 は P-CREB の増加に先行する。また PD98059 を注入し学習が阻害された条件の嗅球をトレーニング後１０分で摘出し P-CREB の定量を行った。すると T-CREB の発現量には影響がなく P-CREB の増加のみ抑制されたことから P-ERK1/2 の CREB リン酸化作用が学習成立に不可欠であることが明らかとなった（右図）。



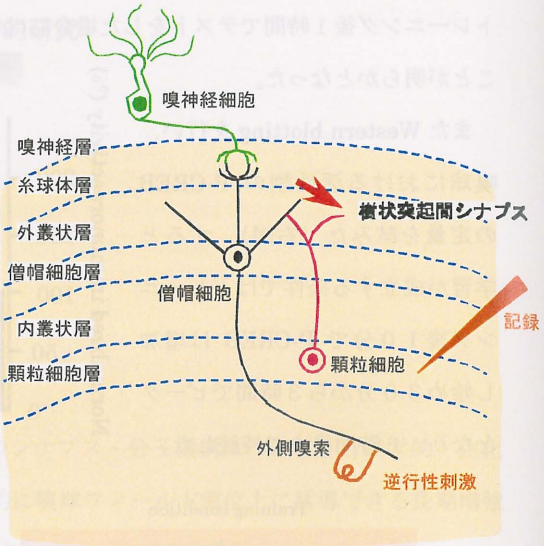


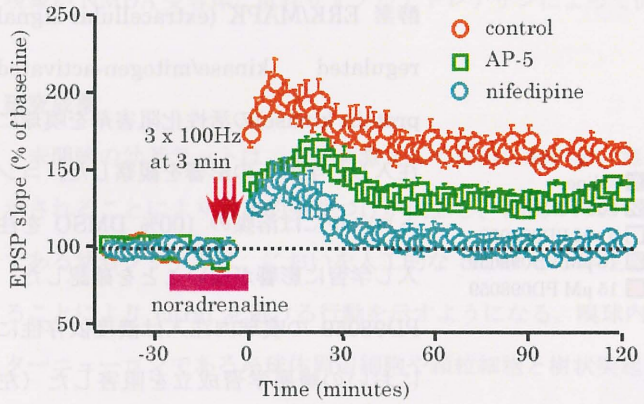
以上の結果から嗅球内において MAPK のリン酸化、続いて CREB のリン酸化が起こり、学習成立へと導くこ

とが明らかとなった。

【２】電気生理学的研究

嗅球内可塑性を電気生理学的に証明するために、においと電撃の対提示トレーニングを施す生後１１日目のラットの嗅球からスライス標本を調製し、フィールド電位を記録した。図のように僧帽細胞の軸索である外側嗅索を電気刺激し逆行性に僧帽細胞を興奮させ、樹状突起間シナプス伝達によって誘導されるフィールド EPSP (fEPSP)を顆粒細胞層で記録した（右図）。100Hz× 5 回のテタヌス刺激により顆粒細胞層の fEPSP slope に長期増強現象 (LTP) を誘導することができた。



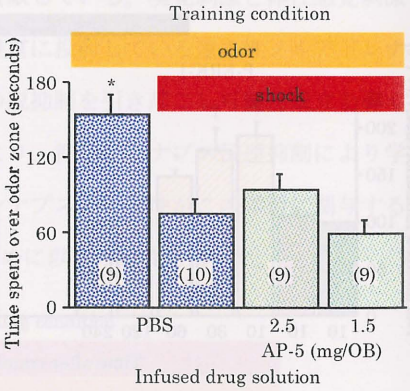


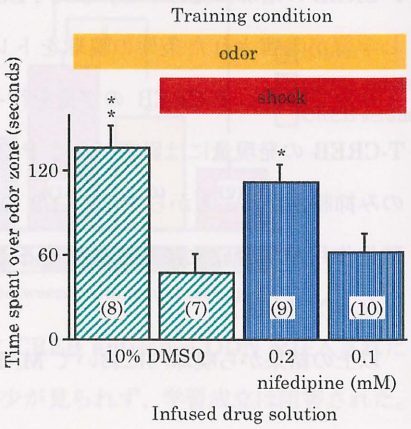
しかしノルアドレナリンを灌流液に加えると、閾値下の 100Hz× 3 回の刺激でも LTP の誘導が可能（下図）で、これは対提示された体性感覚刺激による嗅球への遠心性ノルアドレナリン線維の活性化がにおいの学習成立を導くというメカニズムを裏付ける結果である。ノルアドレナリン受容体のサブタイプの中でも β 受容体が関与することが、電気生理学実験ならびに行動学的実験で確認された。

また顆粒細胞が僧帽細胞から放出されたグルタミン酸は顆粒細胞の AMPA 受容体ならびに NMDA 受容体と結合することから、可塑性との関与が報告されている NMDA 受容体のアンタゴニストである AP-5 を加えると、増強の程度はやや減少したものの有意な LTP が誘発された。またシナプス前からの伝達物質放出に関与が知られている voltage-gated Ca^{2+} channel の関与を検索するために阻害剤 nifedipine を添加すると LTP はまったく誘導されなかった。

AP-5 と nifedipine の学習への影響を観察する目的でにおいと電撃の対提示トレーニングの際に嗅球内に注入を行うと、AP-5 の注入はにおいの嫌悪学習の成立に影響を及ぼさず、動物はにおいに対する嫌悪反応をしめしたが、nifedipine の注入では濃度依存性に学習成立が阻害された（右図）。

以上の一連の実験結果において、嗅球の顆粒細胞層において誘導される LTP の薬理学的性質は本モデルにおけるにおいの嫌悪学習成立と共通し強い相関を示した。嗅球可塑性成立の詳細なメカニズム解明をめざし、さらに実験を追加していきたいと考えている。





A04-26

表題：成熟脳における神経幹細胞の役割：イムノトキシン細胞標的法を用いたモデル脳による記憶・学習とストレスに対する影響の解析

研究代表者名：西　真弓

所属：京都府立医科大学大学院・生体構造科学

特定領域「神経回路」参加年度：平成１５年度ー平成１６年度

研究成果の要旨：

ネスチンのプロモーター／エンハンサーの構築を用いて IL-2R/GFP を発現するトランスジェニックマウスおよびコルチコステロイドレセプターのプロモーターの下流に GFP を発現するトランスジェニックマウスを作成し、その解析に取りかかった。

研究成果：

哺乳動物中枢神経組織では主として脳室周囲に存在する細胞層である脳室下帯 subventricular zone (SVZ) と海馬歯状回の subgranular zone の二カ所に神経幹細胞が有ることが知られている。また、脳内でのストレスホルモンの標的である海馬において、歯状回での神経細胞新生が副腎摘出で促進、ストレス負荷により阻害されることが近年報告され、記憶・学習とストレスの関連などからも非常に興味がもたれるところである。しかしながら、基本的な神経回路網が既に構築された成熟脳において、これらの新たに産生されたニューロンがどのような役目を担っているのかは未だ明らかではなく、それを明かにするのが本研究課題の目的である。

本研究では、大きく分けて二つのアプローチを用いる

(1)ネスチンのプロモーター／エンハンサーの構築を用いて IL-2R/GFP をトランスジェニックマウスに発現させ、シュードモナス外毒素の一部を融合した immunotoxin の脳内局所投与と組み合わせることにより神経幹細胞を 時空間特異的に除去させる事が出来る実験動物を開発し、海馬による空間学習のモデルにより神経幹細胞選択的除去の記憶・学習に対する影響を観察する。

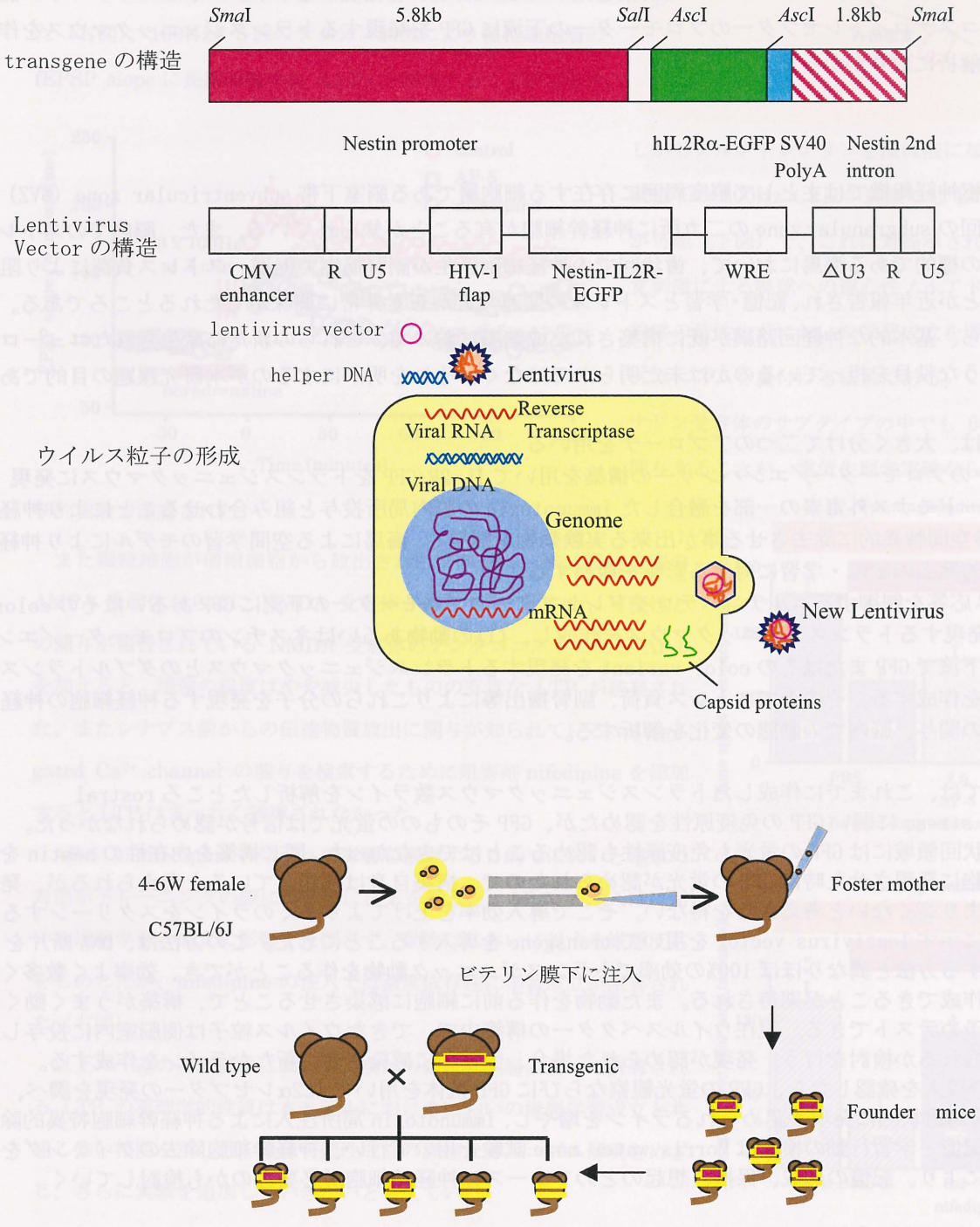
(2)ストレス応答を制御するコルチコステロイドレセプターのプロモーターの下流に GFP あるいはその color variant を発現するトランスジェニックマウスを作成し、(1)の動物あるいはネスチンのプロモーター／エンハンサーの下流で GFP またはその color variant を発現するトランスジェニックマウスとのダブルトランスジェニックを作成する。その上でストレス負荷、副腎摘出等によりこれらの分子を発現する神経細胞の神経回路形成への関与、脳内での動態の変化を解析する。

(1) に関しては、これまでに作成したトランスジェニックマウス数ラインを解析したところ rostral migratory stream に弱い GFP の免疫原性を認めたが、GFP そのものの蛍光では信号が認められなかった。また海馬歯状回領域には GFP の蛍光も免疫原性も認めることはできなかった。同じ構築を内在性の nestin をもつ BHK 細胞に発現させた時は GFP の蛍光が認められたので、構築自身は機能していると考えられるが、発現効率はあまり高くないと考えざるを得ない。そこで導入効率を上げてより多くのラインをスクリーンするために図１に示す lentivirus vector を用いて transgene を導入することにした。この方法は、DNA 断片を前核に注入する方法と異なりほぼ 100%の効率でトランスジェニック動物を作ることができ、効率よく数多くのラインを作成できることが期待される。また動物を作る前に細胞に感染させることで、構築がうまく動くかどうかを予めテストできる。現在ウイルスベクターの構築中で、できたウイルス粒子は側脳室内に投与して発現がみられるか検討を行う。発現が認められた場合、受精卵に感染させ、新たなラインを作成する。Transgene の導入を確認したら、GFP の蛍光観察ならびに GFP 抗体を用いて IL2α レセプターの発現を調べ、SVZ および海馬歯状回に発現の認められるラインを増やし、immunotoxin 局所注入による神経幹細胞特異的除去を行う。記憶・学習行動の検討は Morris water maze 試験を用いて行い、神経幹細胞除去のタイミングを変えることにより、記憶の形成、保持、想起のどのフェーズに神経幹細胞が必要なのかも検討していく。

(2)に関しては、研究代表者の西のところで、glucocorticoid receptor (GR)のプロモーターの下流にGFPを繋いだトランスジェニックマウスを作成した。そしてこのマウスの固定した成熟脳でのGFPの発現を解析したところ海馬領域において、GFP陽性細胞とGR免疫陽性細胞とがほぼ100%一致しており、海馬における解析に使用できることが確認された。また、生後5日の海馬の初代培養神経細胞においてもGFP陽性細胞を認めた。このマウスにおいては、GFPが細胞体のみならず神経突起にも拡散して分布するため、核内レセプターであるGR陽性細胞の形態をGFPの蛍光を指標に観察することができた(図2)。現在、GFPの変わりにmonomeric red fluorescent protein (mRFP)1を用いたトランスジェニックマウスを作成中であり、(1)のマウスとのダブルトランスジェニックマウスを作成して、(2)の課題を進めていく予定である。

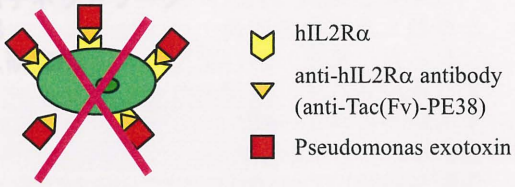
図1

(A)トランスジェニックマウスの作成



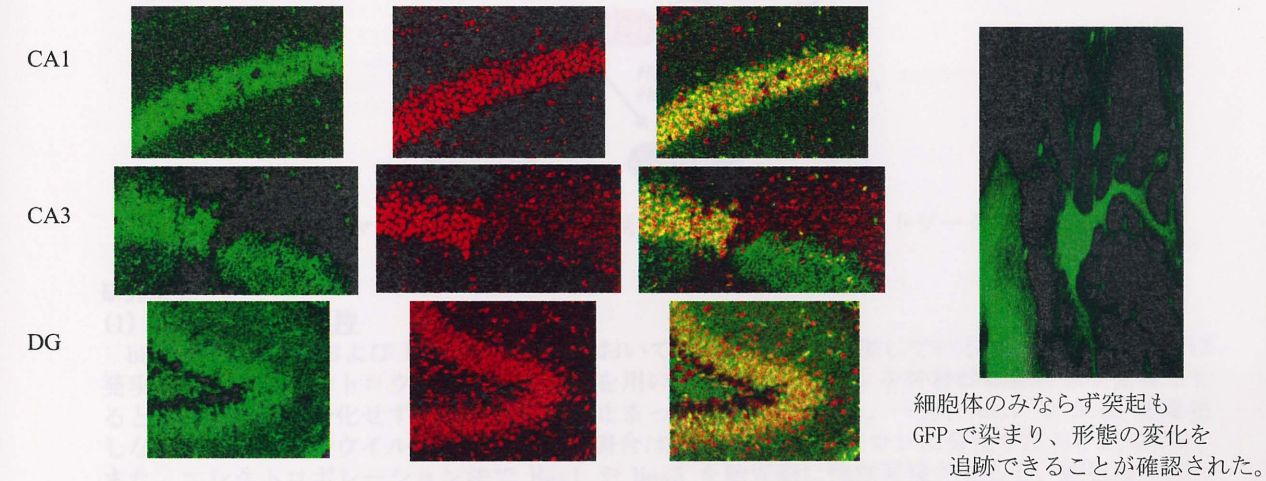
A04-26

(B)イムノトキシンによる神経幹細胞特異的除去



イムノトキシンはレセプターと結合後
endocytosis によって取り込まれ、細胞が死滅する。

図 2 GR promoter-GFP transgenic mouse



細胞体のみならず突起も
GFP で染まり、形態の変化を
追跡できることが確認された。

海馬領域において、GR プロモーターの制御下で発現する GFP の蛍光陽性細胞と GR 抗体陽性細胞とが一致することが確認された。

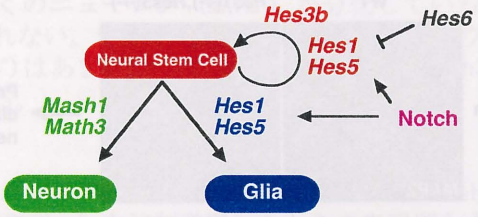
神経分化を制御する転写因子ネットワーク

影山龍一郎
京都大学ウイルス研究所

特定領域「神経回路」参加年度
平成１２年度～平成１６年度（班友）

研究成果の要旨

神経発生過程は、(1)神経幹細胞の維持、(2)神経幹細胞からニューロンへの分化、(3)神経幹細胞からグリア細胞への分化という３つのステップに分けることができる。本研究では、これら３つのステップを制御する転写因子ネットワークを明らかにした（サマリー図参照）。その結果、いずれのステップも以下のようなbHLH因子が中心的な役割を担うことが示された。また、ニューロンのサブタイプの決定には bHLH 因子のみでは不十分で、ホメオドメイン因子との組み合わせが重要であった。



サマリー図：神経分化を制御する bHLH 因子ネットワーク

研究成果

(1) 神経幹細胞の維持

bHLH 因子 Hes1 および Hes5 は胎児脳において神経幹細胞に発現しているが、ニューロンには発現していない。レトロウイルスベクターを用いて Hes1 や Hes5 を神経幹細胞に強制発現させるとニューロンに分化せず、未分化状態に止まった（図１、Hes1）。一方、Hes1 や Hes5 を発現しないコントロールウイルスを感染させた場合は、効率良くニューロンに分化した（図１、CLIG）。また、エレクトロポレーション法で Hes1 や Hes5 を胎児脳に強制発現させると、細胞はニューロンに分化せず、すべて神経幹細胞の状態に止まった。したがって、Hes1 および Hes5 は神経幹細胞を維持する活性があることがわかった。同様に、Hes3b にも神経幹細胞を維持する活性があった。

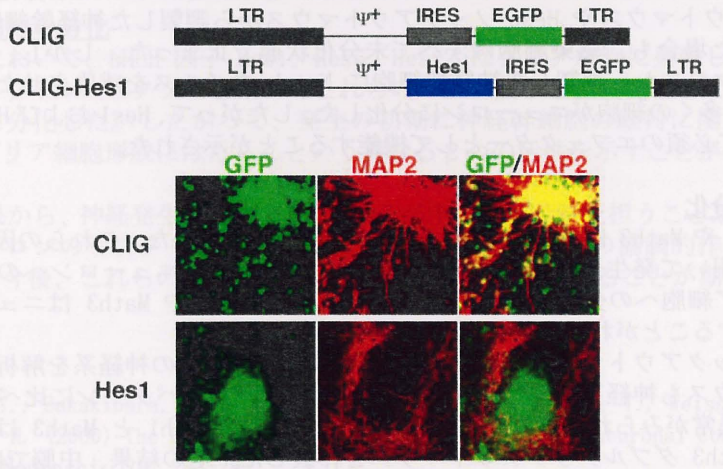


図１：レトロウイルスベクターによる Hes1 の強制発現。コントロールレトロウイルス CLIG が感染した細胞(GFP⁺)は効率良くニューロン(MAP2⁺)に分化したが、Hes1 を発現させるレトロウイルスが感染した細胞(GFP⁺)は未分化状態で止まっていた。

さらに、Hes1 および Hes5 の機能をしらべるために、Hes1-Hes5 ダブルノックアウトマウスを作製した。この変異マウスは、多くの場合、小さい脳をもつか、神経管閉鎖不全から無脳症になった。また、眼の発生も大きく障害されていた。この変異マウス脳では、神経幹細胞があまり維持されず、正常よりも早くニューロン(MAP2$^+$)に分化した（図２）。特に、神経管が閉鎖する前からニューロンへの分化が亢進して細胞増殖が低下しており、このために神経管閉鎖不全になることが示唆された。また、ニューロンへの分化を決定する bHLH 因子 Mash1（後述）の発現が増加していた。これらの結果から、Hes1 や Hes5 はニューロン分化決定因子 Mash1 の発現を抑制することによって神経幹細胞を維持し、神経系形成を制御することが示された。

神経幹細胞の増殖能をしらべるためにニューロスフィア・アッセイを行った。その結果、野生型マウスの大脳由来の細胞は bFGF や EGF 存在下で効率良くニューロスフィアを形成し、しかも大きく成長した。一方、Hes1-Hes5 ダブルノックアウトマウス由来の細胞はニューロスフィア形成能が著しく低下し、しかも小さなものしかできなかった。したがって、Hes1 および Hes5 は神経幹細胞の増殖・維持に必須の役割をもつことが示された。

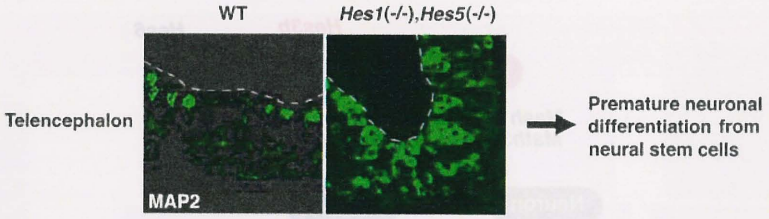


図２： *Hes1-Hes5* ダブルノックアウトマウスの大脳領域。野生型 10.5 日胚では、大脳表層に１層のニューロン(MAP2$^+$)が分化しているが、それ以外の多くの細胞はまだ、未分化である。一方、*Hes1-Hes5* ダブルノックアウトマウスの大脳では正常よりも多くのニューロンが分化し、神経幹細胞の維持が阻害されている。

次に、Hes1 および Hes5 の発現制御機構を探った。Hes1 および Hes5 のプロモーター下にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターを用いてプロモーター・アッセイを行った。活性型 Notch を共発現すると Hes1 および Hes5 プロモーター活性が著しく亢進した。したがって、Hes1 や Hes5 の発現は Notch シグナルによって制御されることがわかった。Notch シグナル系も神経幹細胞の維持を制御することから、次に Notch の下流で Hes1 や Hes5 が重要な役割を担うかどうかを検討した。野生型マウス胎児脳から調製した神経幹細胞に活性型 Notch を発現させるレトロウイルス（Notch ウイルス）を感染させたところ、感染細胞はすべて未分化状態で止まった。Hes1 ノックアウトマウスや Hes5 ノックアウトマウスから調製した神経幹細胞に Notch ウイルスを感染させた場合も、感染細胞はすべて未分化状態で止まった。しかし、Hes1-Hes5 ダブルノックアウトマウスから調製した神経幹細胞に Notch ウイルスを感染させた場合は、未分化状態で止まらず、多くの細胞がニューロンに分化した。したがって、Hes1 および Hes5 は Notch シグナル系において必須のエフェクターとして機能することが示された。

(2) ニューロンの分化

bHLH 因子 Mash1 や Math3 は分化途中のニューロンに発現していた。これらの因子をレトロウイルスベクターを用いて発生途中の神経系に発現させたところ、ニューロンへの分化を促進するとともに、グリア細胞への分化を抑制した。すなわち、Mash1 や Math3 はニューロン分化決定因子として機能することがわかった。

次に、Mash1 ノックアウトマウスや Math3 ノックアウトマウスの神経系を解析した。いずれのノックアウトマウスも神経系に異常がみられたが、幅広い発現パターンに比べて、発生の遅い時期に局所的な異常がみられるのみであった。多くの領域で Mash1 と Math3 は共発現するので、次に Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスを作製した。その結果、中脳では Mash1 ノックアウトマウスや Math3 ノックアウトマウスでニューロンが形成されたが、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスではニューロンは欠損していた（図３）。さらに、野生型ではまだグリア細胞（アストロサイト）の分化がみられない時期に、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスでは多くの細胞がグリア細胞に分化していた（図３）。すなわち、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスでは本来ニューロンに分化するべき細胞がグリア細胞に運命転換していた。以上から、Mash1 や Math3 はニューロンへの分化を促進するとともに、グリア細胞への分化を抑制することが明らかになった。

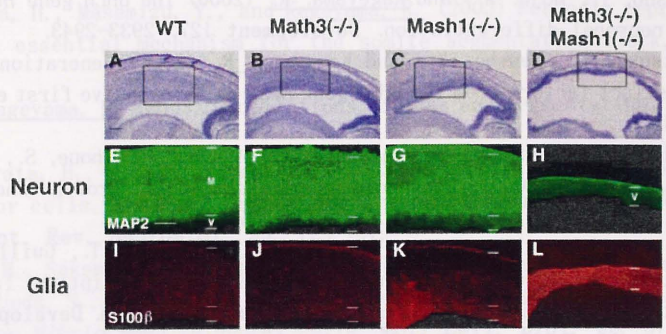


図３：Mash1 および Math3 変異マウスの中脳領域。野生型、Mash1 ノックアウト、Math3 ノックアウトの 15.5 日胚では多くのニューロン（$MAP2^+$）が分化しているが、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスではみられない。一方、野生型、Mash1 ノックアウト、Math3 ノックアウトマウスではグリア細胞（$S100\beta^+$）はあまりできていないが、Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスでは数多く形成されている。

ニューロン分化が抑制されグリア細胞分化が亢進するという Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスの表現型は、Hes1 や Hes5 を強制発現したときの表現型とよく似ている。Hes1 や Hes5 は抑制因子で Mash1 や Math3 の活性を抑制することから、Hes1 や Hes5 を強制発現すると Mash1-Math3 ダブルノックアウトマウスと同じ状態をつくることが考えられた。おそらく、Hes1、Hes5 と Mash1、Math3 はお互いに拮抗的に作用して神経分化を制御することが示唆された。

新たに bHLH 因子 Hes6 を同定したが、他の Hes 因子群と異なり、分化しつつあるニューロンに強く発現していた。Mash1 は他の bHLH 因子 E47 とヘテロダイマーを形成しプロモーターに作用するが、Hes1 はこのヘテロダイマー形成を抑制する。一方、Hes6 は Mash1-E47 ヘテロダイマーを抑制せず、むしろ Hes1 による抑制を阻害した。すなわち、Hes6 は Hes1 の機能を阻害し、Mash1 のはたらきを促進した。実際、レトロウイルスベクターを用いて Hes6 を強制発現させたところ、ニューロンへの分化が促進された。

ニューロンには多くのサブタイプが存在するが、bHLH 因子だけではこれらの多様なサブタイプの決定はできなかった。しかし、ホメオドメイン因子とともに共発現させると多様なサブタイプの決定が可能になった。おそらく、ホメオドメイン因子は領域特異性を決め、bHLH 因子によってその領域に特異的なニューロンへの運命決定が引き起こされると考えられた。

(3) グリア細胞の分化

発生後期において、bHLH 因子 Hes1、Hes5、Hesr2 はグリア細胞に発現していた。生後の網膜細胞にレトロウイルスベクターを用いてこれらの bHLH 因子を強制発現させたところ、効率良くグリア細胞に分化した。したがって、発生の初期に神経幹細胞の維持に関わる因子が発生の後期においてグリア細胞形成にはたらくという異なる２つの活性を示すことがわかった。

以上の結果から、神経発生において bHLH 因子が中心的な役割を担うことが明らかになった。また、ニューロンのサブタイプの決定はホメオドメイン因子との協調的作用が重要であることが示された。今後、これらの研究成果は神経再生医療へ応用されることが期待される。

業績リスト

(1) 学会誌等

1. Nakamura, Y., Sakakibara, S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R., and Okano, H. (2000) The bHLH gene *Hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. **J. Neurosci.** 20, 283-293.
2. Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F. Serup, P. and Madsen, O.D. (2000) Control of endodermal endocrine development by HES-1. **Nature Genet.** 24, 36-44.
3. Cau, E., Gradwohl, G., Casarosa, S., Kageyama, R., and Guillemot, F. (2000) *Hes* genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. **Development** 127, 2323-2332.
4. Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Kageyama, R. (2000) Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene *Hes5* in mouse retina. **Development** 127,

2515-2522.
5. Bae, S.-K., Bessho, Y., Hojo, M., and Kageyama, R. (2000) The bHLH gene *Hes6*, an inhibitor of *Hes1*, promotes neuronal differentiation. **Development** 127, 2933-2943.
6. Hirata, H., Ohtsuka, T., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2000) Generation of structurally and functionally distinct factors from the bHLH gene *Hes3* by alternative first exons. **J. Biol. Chem.** 275, 19083-19089.
7. Sawada, K., Konishi, Y., Tominaga, M., Watanabe, Y., Hirano, J., Inoue, S., Kageyama, R., Blum, M., and Tominaga, A. (2000) Goosecoid suppresses cell growth and enhances neuronal differentiation of PC12 cells. **J. Cell Sci.** 113, 2705-2713.
8. Ito, T., Udaka, N., Yazawa, T., Okudela, K., Hayashi, H., Sudo, T., Guillemot, F., Kageyama, R., and Kitamura, H. (2000) Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. **Development** 127, 3913-3921.
9. Zheng, J.L., Shou, J., Guillemot, F., Kageyama, R., and Gao, W.-Q. (2000) *Hes1* is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. **Development** 127, 4551-4560.
10. Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2000) Mammalian *achaete-scute* and *atonal* homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. **EMBO J.** 19, 5460-5472.
11. Ohno, N., Izawa, A., Hattori, M., Kageyama, R., and Sudo, T. (2001) dlk inhibits stem cell factor-induced colony formation of murine hematopoietic progenitors: Hes-1-independent effect. **Stem Cell** 19, 71-79.
12. Satow, T., Bae, S.-K., Inoue, T., Inoue, C., Bessho, Y., Hashimoto, N., and Kageyama, R. (2001) The bHLH gene *hesr2* promotes gliogenesis in mouse retina. **J. Neurosci.** 21, 1265-1273.
13. Bessho, Y., Miyoshi, G., Sakata, R., and Kageyama, R. (2001) *Hes7*: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. **Genes to Cells** 6, 175-185.
14. Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T., and Kageyama, R. (2001) Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. **Development** 128, 1313-1322.
15. Nakashima, K., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Hisatsune, T., Nakafuku, M., Miyazono, K., Kishimoto, T., Kageyama, R., and Taga, T. (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98, 5868-5873.
16. Zine, A., Qui, J., Aubert, A., Therianos, S., Guillemot, F., Kageyama, R., and de Ribaupierre, F. (2001) Hes1 and Hes5 activities are required for the normal development of the hair cells in the mammalian cochlea. **J. Neurosci.** 21, 4712-4720.
17. Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2001) Roles of Notch signaling in expansion of neural stem cells of the developing brain. **J. Biol. Chem.** 276, 30467-30474.
18. Hirata, H., Tomita, K., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2001) *Hes1* and *Hes3* regulate maintenance of the isthmic organizer and development of the mid/hindbrain. **EMBO J.** 20, 4454-4466.
19. Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., and Kageyama, R. (2001) Dynamic expression and essential functions of *Hes7* in somite segmentation. **Genes & Dev.** 15, 2642-2647.
20. Inoue, C., Bae, S.-K., Takatsuka, K., Inoue, T., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2001) *Math6*, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, promotes neuronal differentiation. **Genes to Cells** 6, 977-986.
21. Haruta, M., Kosaka, M., Kanegae, Y., Saito, I., Inoue, T., Kageyama, R., Nishida, A., Honda, Y., and Takahashi, M. (2001) Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. **Nature Neurosci.** 4, 1163-1164.
22. Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J.E., and Kageyama, R. (2002) *Math3* and *NeuroD* regulate amacrine cell fate specification in the retina. **Development** 129, 831-842.
23. Hirata, H., Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Bessho, Y., Harada, T., Yoshikawa, K., and Kageyama, R. (2002) Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. **Science** 298, 840-843.
24. Hatakeyama, J. and Kageyama, R. (2002) Retrovirus-mediated gene transfer to retinal explants. **Methods** 28, 387-395.
25. Kunisato, A., Chiba, S., Nakagami-Yamaguchi, E., Kumano, K., Saito, T., Masuda, S., Yamaguchi, T., Osawa, M., Kageyama, R., Nakauchi, H., Nishikawa, M., and Hirai, H. (2003) HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. **Blood** 101, 1777-1783.
26. Kayahara, T., Sawada, M., Takaishi, M., Fukui, H., Sano, H., Fukuzawa, H., Suzuki, K., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., and Chiba, S. (2003) Candidate markers for stem and early progenitor

cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. **FEBS Letter** 535, 131-135.

27. Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y., and Kageyama, R. (2003) Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. **Genes & Dev.** 17, 1451-1456.
28. Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003) Oscillations, clocks and segmentation. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 13, 379-384.
29. Kageyama, R., Hirata, H., and Hatakeyama, J. (2003) Retroviral vectors for gene delivery to dividing progenitor cells. In *Viral Vectors for Treating Diseases of the Nervous System* (Ed. D.S. Latchman). **Int. Rev. Neurobiol.** 55, 123-147.
30. Tomita, S., Ueno, M., Sakamoto, M., Kitahama, Y., Ueki, M., Maekawa, N., Sakamoto, H., Gassmann, M., Kageyama, R., Ueda, N., Gonzalez, F.J., and Takahama, Y. (2003) Defective brain development in mice lacking the *HIF-1α* gene in neural cells. **Mol. Cell. Biol.** 23, 6739-6749.
31. Tateya, I., Nakagawa, T., Iguchi, F., Kim, T.S., Endo, T., Yamada, S., Kageyama, R., and Ito, J. (2003) Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. **Neuroreport** 14, 1677-1681.
32. Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003) The bHLH genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. **J. Biol. Chem.** 278, 44808-44815.
33. Sumazaki, R., Shiojiri, N., Isoyama, S., Masu, M., Masu, K., Osawa, M., Nakauchi, H., Kageyama, R., and Matsui, A. (2004) Conversion of biliary system to pancreatic tissue in *Hes1*-deficient mice. **Nature Genet.** 36, 83-87.
34. Hatakeyama, J. and Kageyama, R. (2004) Retinal cell fate determination and bHLH factors. **Seminars Cell Dev. Biol.** 15, 83-89.
35. Tsunematsu, R., Nakayama, K., Oike, Y., Nishiyama, M., Ishida, N., Hatakeyama, S., Bessho, Y., Kageyama, R., Suda, T., and Nakayama, K.I. (2004) Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for notch degradation during vascular development. **J. Biol. Chem.** 279, 9417-9423.
36. Takatsuka, K., Hatakeyama, J., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2004) Roles of the bHLH gene *Hes1* in retinal morphogenesis. **Brain Res.** 1004, 148-155.
37. Miyoshi, G., Bessho, Y., Yamada, S., and Kageyama, R. (2004) Identification of a novel bHLH gene, *Heslike*, and its role in GABAergic neurogenesis. **J. Neurosci.** 24, 3672-3682.
38. Kano, H., Arakawa, Y., Takahashi, J.A., Nozaki, K., Kawabata, Y., Takatsuka, K., Kageyama, R., Ueba, T., and Hashimoto, N. (2004) Overexpression of RFT induces G1～S arrest and apoptosis via p53/p21Waf1 pathway in glioma cell. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 317, 902-908.
39. Akagi, T., Inoue, T., Miyoshi, G., Bessho, Y., Takahashi, M., Lee, J.E., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2004) Requirement of multiple bHLH genes for retinal neuronal subtype specification. **J. Biol. Chem.** 279, 28492-28498.
40. Hirata, H., Bessho, Y., Masamizu, Y., Yamada, S., Lewis, J., and Kageyama, R. (2004) Instability of Hes7 protein is critical for the somite segmentation clock. **Nature Genet.** 36, 750-754.
41. Akagi, T., Mandai, M., Ooto, S., Hirami, Y., Osakada, F., Kageyama, R., Yoshimura, N., and Takahashi, M. (2004) *Otx2* homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue. **Invest. Ophthal. Vis. Sci.**. in press.
42. Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y., and Takahashi, M. (2004) Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101, 13654-13659.
43. Kodama, Y., Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K., and Chiba, T. (2004) The role of Notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. **Gastroenterology,** in press.
44. Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2004) *Hes* genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. **Development,** in press.

(2) 口頭発表

1. Kageyama, R.: Roles of bHLH and homeobox genes in retinal cell type specification. Gordon Research Conference. Newport, USA, 2002.
2. Kageyama, R.: Regulation of cell differentiation by the bHLH oscillator Hes1. British Society for Developmental Biology Spring Meeting. Warwick, UK, 2003.
3. Kageyama, R.: Regulation of neural stem cell differentiation by bHLH factors Hes1 and Hes5. XVth International Congress of Neuropathology. Torino, Italy, 2003.

H-02

フェロモン記憶とシナプス可塑性

楚　秀人
高知大学医学部神経統御学講座統合生理学教室

特定領域「神経回路」参加年度

平成12ー平成16年度

研究成果の要旨

スライス標本を用いて、妊娠の成立と維持に不可欠なフェロモン記憶のシナプス相関、すなわち副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプスに可塑性が誘導されることを捉え、そのメカニズムを明らかにした。

研究成果

マウス副嗅球のスライス標本を作製し、僧帽細胞樹状突起から顆粒細胞樹状突起へのグルタミン酸作動性シナプス伝達とその可塑性について解析した。僧帽細胞の軸索（外側嗅索、LOT）を電気刺激すると副嗅球の外叢状層において２峰性の誘発陰性フィールド電位が記録された。第２番目の電位の発生はCNQXによって抑制され、第１番目の電位の発生は、CNQXにもAP5にも影響されず、TTXによって抑制されたことから、第１番目の電位は僧帽細胞の逆行性興奮を、第２番目の電位は顆粒細胞樹状突起に発生した興奮性シナプス後電位（フィールドEPSP、fEPSP）を表わしている。LOTを比較的低頻度で長時間（10 Hz、20 発、3 分間隔で 4 回）刺激すると、fEPSPの長期増強（LTP）が誘導された。一方、短時間高頻度刺激（100 Hz、100 発、3 分間隔で 4 回）はLTPの誘導に有効ではなかった。これらの結果は、フェロモン記憶の形成に数時間のフェロモン曝露が必要であることと符合する。このLTPはNMDA受容体に依存して誘導された。フェロモン記憶に不可欠なノルアドレナリン（NA）はα_2受容体を介してLTPの発現を促進した（図１）。さらに、NAは僧帽細胞（シナプス前細胞）に作用して伝達物質の放出を抑制することによって、逆に 10 Hz入力に対する顆粒細胞（シナプス後細胞）の応答性を高め、LTP誘導を促進することが示唆された（図２）。

われわれは以前、代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）の group II（mGluR2/mGluR3）に特異的なアゴニストである（2S, 1'R, 2'R, 3'R)-2-(2, 3-dicarboxycyclopropyl)glycine（DCG-IV)を副嗅球へ注入すると、そのとき嗅がせたフェロモンに特異的な記憶が形成されることを報じている。mGluR2 が副嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞に強く発現していることから、DCG-IV による mGluR2 の活性化が僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達に可塑性を誘導する可能性が高い。そこで、これを検証するために、mGluR2 欠損マウスを用いて電気生理学的解析を行った。僧帽細胞の軸索を電気刺激（10 Hz、20 発、3 分間隔で 10 回、この刺激のみでは LTP は成立しない）するとともに DCG-IV を投与すると、野生型では NMDA 非依存性の LTP が誘導されたが、mGluR2 欠損マウスではこれが阻害されていた（図３）。

以上の結果より、副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達における LTP 誘導のメカニズムに NA によって制御される NMDA 依存性の経路と mGluR2 を介した NMDA 非依存性の経路の存在が明らかとなった（図４）。

また、シナプス後膜肥厚の時間的変化の超微形態学的解析により、フェロモンの記憶が副嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞との間に形成されている相反性相互シナプスの形態学的変化によって維持されており、かつ、それは静的ではなく、動的な変化によって支えられていることを明らかにした(図5)。

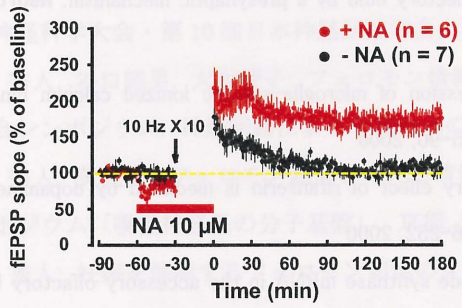


図1　ノルアドレナリン(NA)は NMDA 受容体依存性 LTP の誘導をゲートする

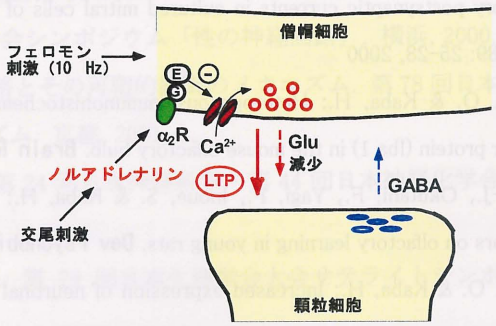


図2　ノルアドレナリンはグルタミン酸放出を抑制して LTP へと導く

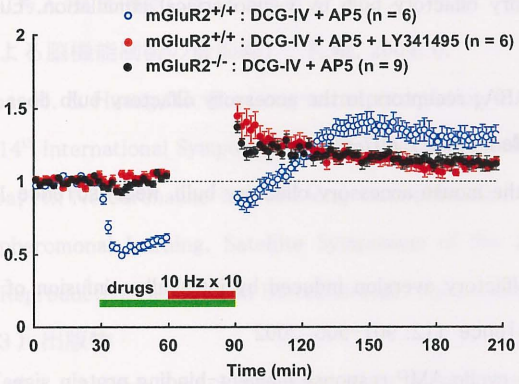


図3　mGluR2 の活性化による LTP 誘導

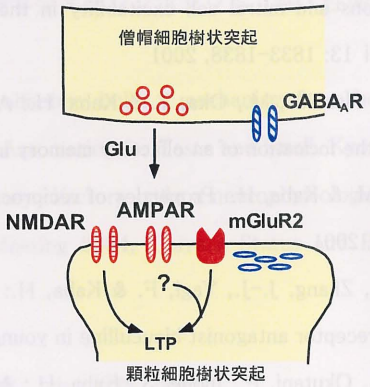


図4　LTP へと導く2つの経路

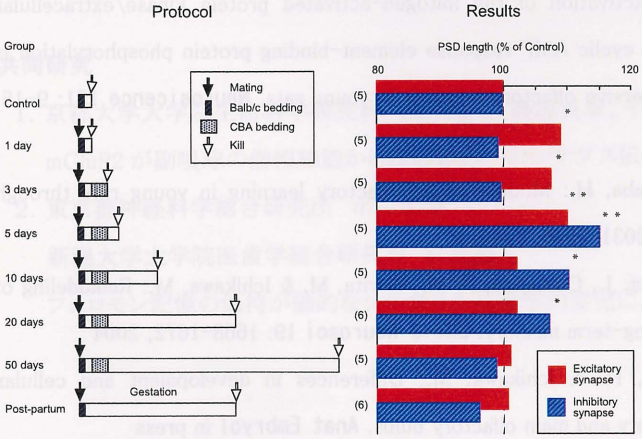


図5　相反性相互シナプスの後膜肥厚のダイナミックな変化。記憶は、交尾後 1-5 日は興奮性シナプスに、その後は抑制性シナプスに保持されている。

(1)学会誌等

Okere, C. O. & Kaba, H.: Region-specific localization of glutamine synthetase immunoreactivity in the mouse olfactory bulb: implication for neuron-glia interaction in bulbar synaptic plasticity. **Brain Res** 857: 308-312, 2000

Osako, Y., Otsuka, T., Taniguchi, M., Oka, T. & Kaba, H.: Oxytocin depresses spontaneous γ-aminobutyric acid-ergic inhibitory postsynaptic currents in cultured mitral cells of the rat olfactory bulb by a presynaptic mechanism. **Neurosci Lett** 289: 25-28, 2000

Okere, C. O. & Kaba, H.: Heterogenous immunohistochemical expression of microglia-specific ionized calcium binding adaptor protein (Iba 1) in the mouse olfactory bulb. **Brain Res** 877: 85-90, 2000

Zhang, J.-J., Okutani, F., Yagi, F., Inoue, S. & Kaba, H.: Facilitatory effect of ritanserin is mediated by dopamine D_1 receptors on olfactory learning in young rats. **Dev Psychobiol** 37: 246-252, 2000

Okere, C. O. & Kaba, H.: Increased expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory recognition memory in mice. **Eur J Neurosci** 12: 4552-4556, 2000

Osako, Y., Otsuka, T., Taniguchi, M., Oka, T. & Kaba, H.: Oxytocin enhances presynaptic and postsynaptic glutamatergic transmission between rat olfactory bulb neurones in culture. **Neurosci Lett** 299: 65-68, 2001

Otsuka, T., Ishii, K., Osako, Y., Okutani, F., Taniguchi, M., Oka, T. & Kaba, H.: Modulation of dendrodendritic interactions and mitral cell excitability in the mouse accessory olfactory bulb by vaginocervical stimulation. **Eur J Neurosci** 13: 1833-1838, 2001

Otsuka, T., Hashida, M., Oka, T. & Kaba, H.: Activation of $GABA_A$ receptors in the accessory olfactory bulb does not prevent the formation of an olfactory memory in mice. **J Vet Med Sci** 63: 807-809, 2001

Taniguchi, M. & Kaba, H.: Properties of reciprocal synapses in the mouse accessory olfactory bulb. **Neuroscience** 108: 365-370, 2001

Okutani, F., Zhang, J.-J., Yagi, F. & Kaba, H.: Non-specific olfactory aversion induced by intrabulbar infusion of the $GABA_A$ receptor antagonist bicuculline in young rats. **Neuroscience** 112: 901-906, 2002

Zhang, J.-J., Okutani, F., Inoue, S., Kaba, H.: Activation of the cyclic AMP response element-binding protein signaling pathway in the olfactory bulb is required for the acquisition of olfactory aversive learning in young rats. **Neuroscience** 117: 707-713, 2003

Zhang, J.-J., Okutani, F., Inoue, S. & Kaba, H.: Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway leading to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation is required for the long-term facilitation process of aversive olfactory learning in young rats. **Neurosicence** 121: 9-16, 2003

Okutani, F., Zhang, J.-J., Otsuka, T., Yagi, F. & Kaba, H.: Modulation of olfactory learning in young rats through intrabulbar $GABA_B$ receptors. **Eur J Neurosci** 18: 2031-2036, 2003

Matsuoka, M., Kaba, H., Moriya, K., Yoshida-Matsuoka, J., Costanzo, R. M., Norita, M. & Ichikawa, M.: Remodeling of reciprocal synapses associated with persistence of long-term memory. **Eur J Neurosci** 19: 1668-1672, 2004

Muramoto, K., Kato-Negishi, M., Kuroda, Y., Kaba, H. & Ichikawa, M.: Differences in development and cellular composition between neuronal cultures of rat accessory and main olfactory bulbs. **Anat Embryol** in press

（2）口頭発表

桃　秀人: フェロモンと生殖. 第73回日本内分泌学会学術総会シンポジウム「神経系・内分泌系における情報伝達

Update」. 京都, 2000. 6.

Kaba, H. & Okere, C. O.: The importance of neuron-glia interaction in the formation of an olfactory memory in mice. 13th International Symposium on Olfaction and Taste and 14th European Chemoreception Research Organisation Congress. Brighton, UK, 2000. 7.

椛　秀人, オケレ チューマ, 大塚智子, 大迫洋治, 谷口睦男, 奥谷文乃: フェロモン記憶の神経機構. 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会シンポジウム「性の神経回路」. 横浜, 2000. 9.

椛　秀人, 谷口睦男, 大塚智子: フェロモン情報処理回路とその可塑的制御のメカニズム. 第 78 回日本生理学会大会シンポジウム: 神経回路による特徴抽出のメカニズム. 京都, 2001. 3.

椛　秀人, 黄光哲: フェロモン記憶を支える情報分子. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会シンポジウム「嗅覚神経系の分子基盤」. 京都, 2001. 9.

椛　秀人: 妊娠を保障するフェロモン記憶のメカニズム. 第 79 回日本生理学会大会サテライトシンポジウム第 2 回環境生理シンポジウム. 広島, 2002. 3.

Kaba, H.: Synaptic changes associated with pheromonal learning in the mouse accessory olfactory bulb. Sixth Annual Meeting of the Society for Behavioral Neuroendocrinology, Presidential Symposium "The Neurobiology of Accessory Olfactory Function", Amherst, Massachusetts, U.S.A., 2002.6.

椛　秀人:嗅覚機能におけるオキシトシンの役割. 第 81 回日本生理学会大会シンポジウム「性・性関連ホルモンによる脳機能制御の最前線」. 札幌, 2004. 6.

Kaba, H. & Huang, G.-Z.: Long-term potentiation in the accessory olfactory bulb: a mechanism for olfactory learning. 14th International Symposium on Olfaction and Taste/38th Japanese Association for Taste and Smell, Kyoto, 2004.7.

Kaba, H.: Noradrenaline-induced long-term potentiation in the accessory olfactory bulb: a neurophysiological correlate of pheromonal learning. Satellite Symposium of the JSAR Annual Meeting 2004, Current Status and Perspectives in Reproductive Biology and Biotechnology, Kyoto, 2004.9.

（3）出版物

椛　秀人:バイオサイエンスの新世紀、第 12 巻「感覚器官と脳内情報処理」、共立出版、2002

椛　秀人:アロマサイエンスシリーズ 21「においと脳・行動」、フレグランスジャーナル社、2003

椛　秀人:アロマサイエンス・シリーズ 21「香りの研究エッセイ」、フレグランスジャーナル社、2004 印刷中

共同研究

1. 京都大学大学院生命科学研究科　横井峰人、篠原良章、中西重忠

   mGluR2 が副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達の可塑性に関わることを明らかにした。

2. 東京都神経科学総合研究所　市川眞澄

   新潟大学大学院医歯学総合研究科　松岡勝人

   フェロモン記憶の保持が動的なシナプスの形態学的変化によって支えられていることを明らかにした。

記憶情報処理に関わる機能的神経回路の動作を検出する

櫻井芳雄

京都大学大学院文学研究科心理学研究室

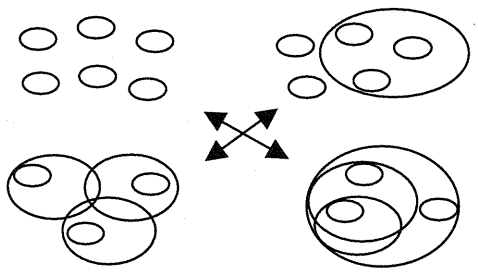
特定領域「神経回路」参加年度

平成１２年度～平成１６年度

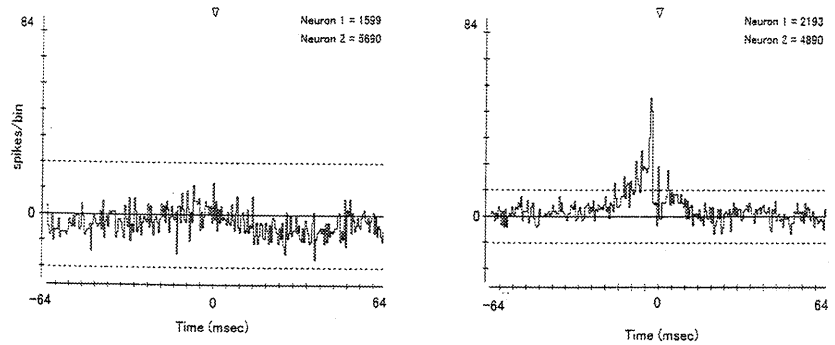
研究成果の要旨

脳が記憶情報を処理する際，表現する情報とその処理方式に応じダイナミックに変化する機能的神経回路を，複数ニューロン間の機能的結合（functional connectivity）の変化から検出した。また，課題遂行中のラットとサルから長時間にわたりマルチニューロン活動を同時記録し続ける方法と，それを個々のニューロン活動に正確かつ自動的に分離する方法を開発した。

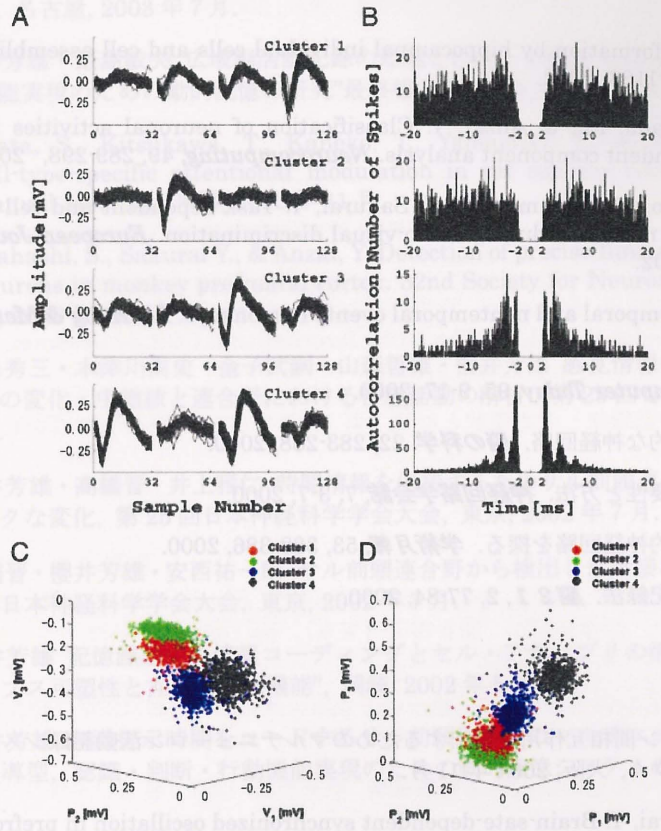
研究成果



表現する情報とその処理に応じて変化する機能的神経回路（セル・アセンブリ）の概念図（詳しくは櫻井(2004)を参照のこと）



２つの課題遂行中に同時記録した２個の海馬 CA1 ニューロン間の機能的結合を示す相互相関ヒストグラム（コリログラム）の例。左は音刺激の長さを区別する duration 弁別課題を行っている時の相関活動，右は音刺激の高さを区別する pitch 弁別課題を行っている時の相関活動である。課題中の全試行を加算してある。各コリログラム内の点線は，統計的有意性を示す信頼限界値であり，それを越えたピークが，相関した活動，すなわち機能的シナプス結合が働いていることを意味する。この２個のニューロンは pitch 弁別課題中にのみ相関した活動を示している。（詳しくは Sakurai(2002)を参照のこと）



テトロード（tetrode）電極で記録したマルチニューロン活動を個々のニューロンに自動的に分離する方法。従来の方法では解決できなかったスパイク・オーバーラップ（Spike Overlap）問題とスパイク波形の非定常（Spike Waveform Nonstationary）問題を解決できた。(詳しくは Takahashi et al. (2003)

業績リスト

(1) 学会誌等

Sakata, S., Yamamori, T, and Sakurai, Y. Cross-modal transfer and multisensory enhancement in the rat. ***Experimental Brain Research,*** 159, 409-417, 2004.

Sakurai, Y., Takahashi, S., and Inoue, M. Stimulus duration in working memory is represented by neuronal activity in the monkey prefrontal cortex. ***European Journal of Neuroscience,*** 20, 1069-1080, 2004.

櫻井芳雄 マルチニューロン活動の記録－なぜ・どのようにして. ***電子情報通信学会誌***, 87, 279-284, 2004.

櫻井芳雄 セル・アセンブリによる神経情報の表現 － 実験的検証に向けて. ***蛋白質・核酸・酵素***, 49, 463-470, 2004.

櫻井芳雄 マルチニューロン活動を記録するために. ***脳の科学***, 25, 19-26, 2003.

Takahashi, S., Anzai, Y., and Sakurai, Y. A new approach to spike sorting for multi-neuronal activities recorded with a tetrode - how ICA can be practical. ***Neuroscience Research***, 46, 265-272, 2003.

Takahashi, S., Anzai, Y., and Sakurai, Y. Automatic sorting for multi-neuronal activity recorded with tetrodes in the presence of overlapping spikes. ***Journal of Neurophysiology***, 89, 2245-2258, 2003.

高橋晋・安西祐一郎・櫻井芳雄 独立成分分析を応用したマルチニューロン活動の解析. ***脳の科学***, 25,

53-60, 2003.

Sakurai, Y. Coding of temporal information by hippocampal individual cells and cell assemblies in the rat. ***Neuroscience***, 115, 1153-1163, 2002.

Takahashi, S., Sakurai, Y., Tsukada, M., & Anzai, Y. Classification of neuronal activities from tetrode recordings using independent component analysis. ***Neurocomputing,*** 49, 289-298, 2002.

Sakata, S., Kitsukawa, T., Kaneko, T., Yamamori, T., & Sakurai, Y. Task-dependent and cell-type specific Fos enhancement in rat neocortex during audio-visual discrimination. ***European Journal of Neuroscience***, 15, 735-743, 2002.

Sakurai, Y. Working memory for temporal and nontemporal events in monkeys. ***Learning & Memory***, 8, 309-316, 2001.

櫻井芳雄 ニューロンから心へ. ***Computer Today***, 95, 9-17, 2000.

櫻井芳雄 記憶情報をコードする動的な神経回路. ***脳の科学***, 22, 283-288, 2000.

櫻井芳雄 多細胞同時記録実験の必要性と方法. ***神経回路学会誌***, 7, 3-7, 2000.

櫻井芳雄 記憶情報をコードする動的神経回路を探る. ***学術月報***, 53, 382-386, 2000.

櫻井芳雄 マルチニューロン活動の記録法. ***脳２１***, 2, 77-84, 2000.

(2) 口頭発表

高橋晋・櫻井芳雄　詳細なニューロン間相互作用を検出するためのマルチニューロン活動記録システム. 第 19 回生体・生理工学シンポジウム, 大阪, 2004 年 11 月.

Sakata, S., Yamamori, T., & Sakurai, Y. Brain-sate-dependent synchronized oscillation in prefrontal cortex. 34th Society for Neuroscience Annual Meeting, 米国, 2004 年 10 月.

Takahashi, S., & Sakurai, Y. Real-time spike sorting system for sub-millisecond neuronal interactions in vivo. 34th Society for Neuroscience Annual Meeting, 米国, 2004 年 10 月.

高橋晋・櫻井芳雄　サブミリ秒のニューロン間相互作用を検出するリアルタイム式スパイク・ソーティング. 第 27 回日本神経科学学会・第 47 回日本神経化学学会合同大会, 大阪, 2004 年 7 月.

坂田秀三・山森哲雄・櫻井芳雄　前頭前野における脳の状態に依存した周期的同期的活動. 第 27 回日本神経科学学会・第 47 回日本神経化学学会合同大会, 大阪, 2004 年 7 月.

櫻井芳雄・高橋晋　刺激提示時間のワーキングメモリーにおけるサル前頭連合野ニューロンの相関活動. 第 27 回日本神経科学学会・第 47 回日本神経化学学会合同大会, 大阪, 2004 年 7 月.

櫻井芳雄　Brain-machine interface のためのマルチニューロン活動の計測. 第 43 回日本エムイー学会大会, 金沢, 2004 年 3 月.

小池康晴・広瀬秀顕・櫻井芳雄・飯島敏夫　運動野の神経活動から腕の筋電信号と運動の予測 第 43 回日本エムイー学会大会, 金沢, 2004 年 3 月.

小池康晴・広瀬秀顕・櫻井芳雄・飯島敏夫 運動野の神経活動からの腕の運動予測. ニューロコンピューティング研究会, 札幌, 2004 年 1 月.

Sakata, S., Yamamori, T., & Sakurai, Y. Behavioral studies of multisensory processing in the rat. 33rd Society for Neuroscience Annual Meeting. 米国, 2003 年 11 月.

Takahashi, S., & Sakurai Y. Real-time spike sorting with independent component analysis. 33rd Society for Neuroscience Annual Meeting. 米国, 2003 年 11 月.

櫻井芳雄・高橋晋・井上雅仁 刺激提示時間をコードするサル前頭連合野のマルチニューロン活動. 第 26 回日本神経科学学会大会, 名古屋, 2003 年 7 月.

高橋晋・櫻井芳雄 マルチニューロン活動の実時間スパイクソーティング. 第 26 回日本神経科学学会大会, 名古屋, 2003 年 7 月.

櫻井芳雄・飯島敏夫 広域脳活動記録の処理と活用. 公開シンポジウム"文脈主導型、認識・判断・行動機能実現のための動的記憶の研究"最終報告会, 仙台, 2002 年 12 月.

Sakata, S., Kitsukawa, T., Kaneko, T., Yamamori, T., & Sakurai, Y. Neural mechanisms of cell-type-specific attentional modulation in rat senosry cortex. 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting, 米国, 2002 年 11 月.

Takahashi, S., Sakurai Y., & Anzai, Y. Detection of precise functional connections among neighboring neurons in monkey prefrontal cortex. 32nd Society for Neuroscience Meeting Annual Meeting, 米国, 2002 年 11 月.

坂田秀三・木津川尚史・金子武嗣・山森哲雄・櫻井芳雄 感覚情報の選択に関わる細胞種特異的な神経活動の変化：中継核と連合野における神経活動の解析. 第 25 回日本神経科学学会大会, 東京, 2002 年 7 月.

櫻井芳雄・高橋晋・井上雅仁 時間情報を保持するためサル前頭連合野の機能的神経回路が示すダイナミックな変化. 第 25 回日本神経科学学会大会, 東京, 2002 年 7 月.

高橋晋・櫻井芳雄・安西祐一郎 サル前頭連合野から検出した近接ニューロン間の詳細な相互作用. 第 25 回日本神経科学学会大会, 東京, 2002 年 7 月.

櫻井芳雄 記憶課題中の情報コーディングとセル・アセンブリの活動. 生理学研究所共同利用研究会"シナプス可塑性と丸ごとの脳機能", 岡崎, 2002 年 5 月.

櫻井芳雄 刺激提示時間をコードするサル前頭連合野のマルチニューロン活動. 公開シンポジウム"文脈主導型, 認識・判断・行動機能実現のための動的記憶システムの研究"プロジェクト, 仙台, 2001 年 12 月.

櫻井芳雄 記憶情報処理を担う動的神経回路. シンポジウム"高次脳研究の最前線－未来開拓学術研究推進事業の成果報告", 京都, 2001 年 11 月.

Sakata, S., Kitsukawa, T., Yamamori, T., & Sakurai, Y. Local circuitry components uderlying audio-visual selection and processing in rat neocortex. 31st Society for Neuroscience Annual Meeting, 米国, 2001 年 11 月.

Takahashi, S., Sakurai, Y., & Anzai, Y. Automatic sorting of multiunit recordings in the presence of overlapping spikes. 31st Society for Neuroscience Annual Meeting, 米国, 2001 年 11 月.

櫻井芳雄 サルによる時間情報の保持と前頭連合野のマルチニューロン活動. 生理学研究所共同利用研究会"マルチニューロン活動と脳内情報処理(3)", 岡崎, 2001 年 10 月.

坂田秀三・木津川尚史・金子武嗣・山森哲雄・櫻井芳雄 刺激の行動的意味に依存したラット感覚野における Fos の発現は興奮性細胞に選択的である. 第 24 回日本神経科学学会・第 44 回日本神経化学学会合同大会, 京都, 2001 年 9 月.

高橋晋・櫻井芳雄・安西祐一郎 独立成分分析によるマルチニューロン活動の自動的 Spike Sorting. 第 24 回日本神経科学学会・第 44 回日本神経化学学会合同大会, 京都, 2001 年 9 月.

櫻井芳雄・高橋晋・井上雅仁 刺激の提示時間をコードするサル前頭連合野のマルチニューロン活動. 第 24 回日本神経科学学会・第 44 回日本神経化学学会合同大会, 京都, 2001 年 9 月.

櫻井芳雄 記憶情報処理を担う海馬体内のセル・アセンブリ. 第 78 回日本生理学会大会, 京都, 2001 年 3 月.

Sakata, S., Kitsukawa, T., Sakurai, Y., & Yamamori, T. Attention modulates fos expression in rat auditory cortex. 30th Society for Neuroscience Annual Meeting, 米国, 2000 年 11 月 .

Sakurai, Y. Cell-assembly coding of temporal information in the working brain. The Fifth International Dynamic Brain Forum, 中国, 2000 年 9 月.

野瀬出・井上健太郎・筒井健一郎・櫻井芳雄・仁木宏明・泰羅雅登 脳の時間表現－fMRIによる解析－. 第23回日本神経科学学会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 2000年9月.

坂田秀三・木津川尚史・櫻井芳雄・山森哲雄　ラットの視聴覚弁別課題の遂行に伴う行動的な個体差の解析. 第23回日本神経科学学会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 2000年9月.

櫻井芳雄 ラット・マウス・サル用の慢性可動電極を使用したマルチユニットレコーディングの実際. 第23回日本神経科学学会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 2000年9月.

Sakurai, Y. How are real dynamics of the brain uncovered with the hippocampal-cortical functions ? . CREST Symposium "Creating the Brain", 東京, 2000年7月.

Sakata, S., Kitsukawa, T., Sakurai, Y., & Yamamori, T. Task- and modality-dependent expression of Fos in rat cortex related to intermodal attention. The NIBB International COE Symposium, 岡崎, 2000年3月.

櫻井芳雄 多数ニューロン活動の同時記録法：その現状と展望. 第22回生理学技術研究会. 岡崎, 2000年2月.

(3) 出版物

櫻井芳雄 多細胞同時記録実験の必要性とその実際. 銅谷賢治・伊藤浩之・藤井宏・塚田稔（編）*脳の情報表現－ニューロン・ネットワーク・数理モデル*. 朝倉書店（東京）, pp.159-172, 2002.

櫻井芳雄 *考える細胞ニューロン－脳と心をつくる柔らかい回路網*. 講談社（東京）, 2002.

櫻井芳雄 海馬と記憶. 久保田競（編）*記憶と脳*. サイエンス社（東京）, pp.,133-176, 2002

櫻井芳雄 ラットのワーキングメモリーとその脳内情報処理機構. 苧阪直行（編） 脳とワーキングメモリー, 京都大学出版会（京都）, pp.73-92, 2000.

櫻井芳雄 記憶情報処理と海馬内のセル・アセンブリ. 板倉徹・前田敏博（編） 大脳辺縁系, ブレーン出版（東京）, pp.37-52, 2000.

共同研究

相手： 山森哲雄・坂田秀三・木津川尚（基礎生物学研究所）

内容と成果：

遺伝子発現を利用し神経情報の表現を解析した。その結果，同時提示される視覚刺激と聴覚刺激を用いた視聴覚弁別課題を行っているラットの視覚野と聴覚野において，最初期遺伝子 c-Fos が，視覚と聴覚のどちらの刺激を手掛かりするかにより異なって発現することがわかった。さらに，そのような課題依存的な c-Fos 発現は，興奮性のニューロンにだけ見られた。また，視覚と聴覚間の統合機能を調べるラット用の行動課題を開発し，そこでの行動を分析した。現在，ラットのマルチニューロン活動に現れる周期的同期的活動の機能的意味を調べている。

H-04

眼球反射の運動学習記憶の生成と維持の神経機構

永雄　総一

（独立行政法人）理化学研究所・脳科学総合研究センター・ 運動学習制御研究チーム

平成 12 年度―平成 16 年度

（班友）

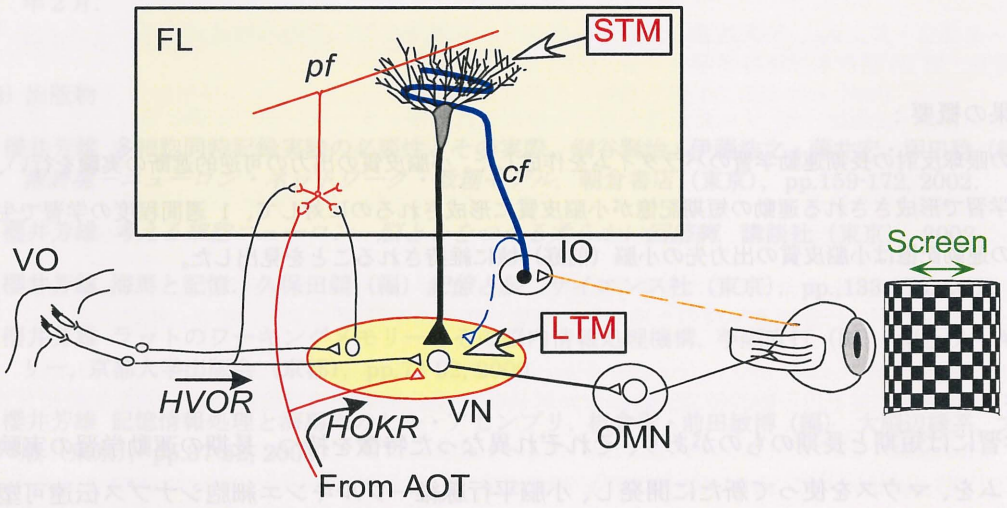
研究成果の概要：

マウスの眼球反射の長期運動学習のパラダイムを作成した。小脳皮質の出力の可逆的遮断の実験を行い、数時間の学習で形成さされる運動の短期記憶が小脳皮質に形成されるのに対して、1 週間程度の学習で生じる長期の運動記憶は小脳皮質の出力先の小脳（前庭）核に維持されることを見出した。

研究成果：

運動学習には短期と長期のものがあり、それぞれ異なった特徴を持つ。長期の運動学習の実験パラダイムを、マウスを使って新たに開発し、小脳平行線維―プルキンエ細胞シナプス伝達可塑性長期抑圧（LTD）と役割を検討した。マウスに 1 日 1 時間正弦波状に動くチェックパターンのスクリーンを 1 時間持続して見せる練習を行うと、視機性眼球反応の利得に短期の適応が生じる。この短期の適応は 24 時間以内に消失するが、1 日 1 時間の練習を 4-5 日にわたり毎日行うと、練習を行う前の利得が徐々に増加し長期の適応が生じた。このパラダイムにより、数時間単位でおこる短期の学習と、数日から 1 週の単位でおこる長期の学習を分離して定量評価できるようになった。　次に、長期学習の記憶の貯蔵の場が片葉であるかを、局所麻酔剤の微小投与による小脳片葉の遮断実験により検討したが、1 時間の練習で生じた短期適応は完全に消去されたが、5 日間の練習で生じた長期適応による利得の変化には変化が見られなかった。　このことは、時間単位の練習によって生じた短期学習の記憶は小脳皮質にあるが、数日-週単位の練習によって生じる長期学習記憶は別の脳部位にあることを意味する。長期適応においては、前庭動眼反射にも適応が生じて利得が増加する。視機性眼球反応と前庭動眼反射の神経回路は同定されており、オーバーラップするのは小脳片葉とその出力先である前庭神経核である。従って、視機性眼球反応の長期適応の記憶は小脳核に相当する前庭神経核に貯えられている可能性が高いと結論した。このことを実験的に検証するために、急性の電気生理実験を行った。長期適応が生じたマウスと対照のマウスを抱水クロラール麻酔し前庭を開放し、水平半規管を電気刺激した。　内側前庭核に

ガラス管微小電極を刺入し、誘発される電場電位を測定し、短シナプス性の短潜時反応（N1）の大きさと最大勾配を比較したが、いずれも長期適応後のマウスは対照に比し有意に増加していた。次に、短期適応が生じそれから長期適応が形成されるのか、それとも両者はもともと独立に生成されその時間経過が違うだけなのかを調べた。片葉やLTDに必要な信号を供給する下オリーブ核を破壊したマウスでは短期適応も長期適応もともに消失した。LTDの阻害剤は短期と長期の適応をともに阻害する作用があることを確認した。さらにLTDの欠損マウスでは、長期適応に異常があることを見出した。これらの所見から、練習によりLTDによって小脳皮質に短期運動学習の記憶がまず形成され、練習が長期間に及ぶと二次的に小脳皮質の出力先の小脳（前庭）核に長期記憶が形成されると結論した。



AOT, 副視索路. FL, 小脳片葉. IO, 下オリーブ核. OMN, 外眼筋運動神経核. HOKR, 水平性視機性眼球反応. HVOR, 水平性前庭動眼反射. LTM, 長期記憶. STM, 短期記憶. VO, 前庭器. VN, 前庭核. *cf*, 登上線維. *pf*, 平行線維.

業績

（1） 学会誌発表

Nagao S, Kitazawa H. Subdural applications of NO-scavenger or NO-blocker to the cerebellum depress the adaptation of monkey post-saccadic smooth pursuit eye movements. **NeuroReport** 2000; 17:131-133.

Kitazawa H, Katoh A, Yagi T, Nagao S. Dynamic characteristics and adaptability of reflex eye movements of Fyn-deficient mice. **Neurosci Lett** 2000; 280: 179-182.

Katoh A, Kitazawa H, Itohara S, Nagao S. Inhibition of nirtic oxide synthesis and gene-knockout of neural nitric oxide synthetase impaired adaptation of mouse of mouse optokinetic eye movements. **Learning and Memory** 7:220-226, 2000.

Kitamura T, Nagao S, Kunimoto K, Shirama K, Yamada J. Cytoarchitectonic subdivisions of the parabrachial nucleus in the Japanese monkey (Macaca fuscata) with special reference to spinoparabarachial fiber terminals. **Neurosci. Res** 39:95-108,2001.

Shutoh F, Katoh A, Kitazawa H, Aiba A, Itohara S, Nagao S. Loss of adaptability of horizontal optokinetic response eye movements in *mGluR1* mutant mice. **Neurosci. Res**. 42: 141-145, 2002.

Xiong G, Hiramatsu T, Nagao S. Corticopontocerebellar pathway from the prearcuate region to hemispheric lobule VII of the cerebellum: An anterograde and retrograde tracing study in the monkey. **Neurosci. Lett.** 322:173-176, 2002

Xiong G, Nagao S. The Lobulus Petrosus of Monkey Paraflocculus Relays Visual Inputs to the Cerebellar Nuclear Complex, an Anterograde and Retrograde Tracing Study. **Exp. Brain Res.** 147:252-263, 2002.

Nagao S, Kitazawa H. Effects of reversible shutdown of the monkey flocculus on the retention of adaptation of the horizontal vestibulo-ocular reflex. **Neuroscience** 118: 563-570, 2003.

Nagao S. The pontine nuclei mediated cerbello-cerebral interactions and its functional role. **The Cerebellum** 3:11-15, 2004.

Shutoh F, Katoh A, Ohki M, Itohara S, Tonegawa S, Nagao S. Role of protein kinase C family in the cerebellum-dependent adaptive learning of horizontal optokinetic response eye movements in mice. **Eur. J. Neurosci.** 18: 134-142, 2003.

Aruga J, Ogura H, Shutoh F, Ogawa M, Franke B, Nagao S, Mikoshiba K. Locomotor and oculomotor impairments are involved with cerebellar dysgenesis in Zic3-deficient (Bent tail) mutant mice. **Eur. J. Neurosci.** In press

（2） 口頭発表

Nagao S, Shutoh F, Katoh A, Kitazawa H, Itohara S. Eye movement characteristics and adaptability of γ-subunit of protein kinase C deficient mice. **Neurosci Res Suppl** 24: P-284, 2000.

Kitazawa H, Nagao S. Characteristics of predictive components of primate pursuit eye movements. **Neurosci Res Suppl** 24: P-626. 2000.

Naya Y, Yoshida M, Ito A, Shibata S, Ihara T, Nagao S, Miyashiya Y. Temporal dynamics of Neural activity during pair-association task: comparison between area 36 and TE in monkeys. **Jpn J Physiol** 50 Suppl. 533, 2000.

Kitazawa H, Nagao S. Characteristics of two types of open-loop smooth pursuit eye movements to step-ramp moving target. predictive components of primate pursuit eye movements. **Jpn J Physiol** 50 Suppl. 548, 2000.

Li Y-X, HashimotoT, TokuyamaW, Miyashita Y, Nagao S. BDNF induction in vestibulo-olivary network following unliateral labyrintectomy in rats revealed by quantitative RT-PCR analysis. **Soc Neurosci Abstr** 26: 317.11, 2000.

Naya Y, Yoshida M, Ihara S, Nagao S, Miyashita Y. Spatail distribution of memory-related area 36 and area TE during pair-association task. **Soc Neurosci Abstr** 26: 106.1, 2000.

Kitazawa H, Katoh A, Shutoh F, Takeda T, Itohara S, Tonegawa S, Nagao S. Dynamic characteristics and adaptability of reflex eye movements in PKC-γ deficient mice. **Soc Neurosci Abstr.** 2000; 26: 564.1.

Shutoh F, Katoh, Kitazawa H, Aiba A, Itohara S, Nagao S. Dynamic characteristics and adaptability of eye movements in mice devoid of metabotrophic glutamate receptor. **Jpn J Physiol Suppl** 51:472,2001.

Nagao S, Katoh A, Shutoh F, ,Kitazawa H, Itohara S. Role of NO in the adaptation of ocular reflexes. **Jpn J Physiol Suppl** 51:S242, 2001.

Shtoh F, Katoh, A, Kitazawa, H, Ohki M, Itohara S. Neural mechanisms underlying the abnormal characteristics of eye movements seen in mice devoid of protein C-□subunit. **Neurosci Res Suppl** 25, S120, 2001.

Xiong G, Shutoh F, Kitazawa H, Nagao S. Monkey lobulus petrosus of the paraflocculus relays visual inputs to the cerebellar nuclei. **Neurosci Res Supp**. 25, S113, 2001.

Kitazawa H, Hiramatsu T, Nagao S. Effects of reversible inactivation of frontal eye field on the adaptation of monkey smooth pursuit. **Neurosci Res Suppl** 25, S200, 2001.

Kitazawa H, Nagao S. Effects of reversible inactivation of periarcuate pursuit area on the adaptation of primate post-saccadic pursuit. pursuit. **Soc Neurosci Abstr** 28, 364.13, 2002.

Hiramatsu T, Ohki M, Xiong G, Takeda T, Nagao S. Effects of chemical lesions of the lobulus petrosus of paraflocculus on the dynamic characteristics and adaptability of primate smooth pursuit eye movement. **Soc Neurosci Abstr** 28, 766.6, 2002.

Nagao S, Kitazawa H. Effects of acute shutdown of the monkey flocculus on the memory trace for horizontal vestibule-ocular reflex. **Soc Neurosci Abstr** 28, 766.13, 2002.

Shutoh F, Katoh A, Ohki M, Tonegawa S, Itohara S, Nagao S. Functional diversity of protein kinase C family revealed by alteration of retinal slip dependency in the adaptation of mouse horizontal optokinetic (HOKR) eye movement. **Soc Neurosci Abstr** 28, 766.8, 2002.

Yamada J, Morishita K, Kitamura T, Nagao S. Brainstem neurons projecting to lobule VII and flocculus-paraflocculus in rats, detected using the double-labeling method. **Soc Neurosci Abstr** 28, 564.8, 2002.

Ohki M, Kitazawa H, Hiramatsu T, Nagao S. Participation of hemisheric lobule VII in monkey smooth pursuit eye

movement control. **Neurosci Res Suppl** 46: S164, 2003.
Hiramatsu T, Ohki M, Xiong G, Nagao S. Involvement of paraflocculer petrosal lobulus in the control of smooth pursuit in primate. **Neurosci Res Suppl** 46: S165, 2003.
Shutoh F, Nagao S. Effects of acute flocculus shutdown on the long-term adaptation of mouse optokinetic response eye movements. **Neurosci Res Suppl** 46: S165, 2003.
Nagao S, Hiramatsu T, Ohki M, Kitazawa H, Kitamura T, Yamada J. Anatomical characteristics of primate oculomotor vermal lobule VII revealed by double-staining methods. **Neurosci Res Suppl** 46: S84, 2003.
Nagao S, Hiramatsu T, Ohki M, Kitazawa H, Kitamura T and Yamada J. Anatomical characteristics of eye movement related primate cerebellar paravermis revealed by double-labeling method. **Soc Neurosci Abstr** 74.10, 2003.
Ohki M, Kitazawa H, Hiramatsu T, Kitamura T, Yamada J and Nagao S. Role of primate cerebellar hemispheric lobule VII in eye movement control revealed by lesions. **Soc Neurosci Abstr** 274.5, 2003.
Shutoh F, Nagao S. Long-term optokinetic training and adaptation of mouse ocular reflex eye movements. **Soc Neurosci Abstr** 274.6, 2003.
Hiramatsu T., Ohki M., Xiong G.X., Kitazawa H. and Nagao S.: Primate lobulus petrosus of cerebellar paraflocculus has an important role in the control of voluntary eye movements. **Soc Neurosci Abstr** 274.8, 2003.
大木雅文，永雄総一．小脳半球第７小葉と随意眼球運動制御. P-027.**第 62 回日本めまい平衡医学会総会**，横浜，2003.
Shutoh F, Ohki M, Kitazawa H, Itohara S, Nagao S. Long-term adaptation of mouse ocular reflex. **Jpn J Phyiol Suppl** 53:501, 2003.
Shutoh F, Ohki M, Itohara, S, Nagao S. Neural mechanism of long-term motor learning revealed by different effects of floccular lesion and shutdown on the long-term adaptation of mouse ocular reflex. **Neuro** 2004, P3-273.
Ohki M, Shutoh F, Nagao S. Changes of electrical responsiveness of vestibular nuclei correlated with the long-term adaptation of horizontal optokinetic responses in mice. **Neuro** 2004, P3-258
Nakadate, T, Shutoh, F, Nagaos, S, Shigemoto R. Reduction of synapse density after long-term adaptation of horizontal optkinetic response in the mouse flocculus. **Neuro** 2004, P2-092
Kitazawa H, Ohki M, Hiramatsu T, Kitamura T, Yamada J. Effects of microstimulation of monkey cerebellar hemispheric lobule VI/VII on eye movements. **Neuro** 2004 PI-233
Masugi-Tokita M, Nakadate K, Shutih F, Wan W, Molnar E, Nagao S, Shigemoto R. Reduction of AMPA receptor content in parallel fiber synapses by cerebellar motor learning. **Neuro** 2004 OG3-06.
Kitazawa H., Ohki M., Hiramatsu T. Kitamura T, Yamada J, Nagao S. Eye movement related areas in primate cerebellar hemispheric lobule VI/VII revealed by microstimulation technique. **Soc Neurosci Abstr** 536.8, 2004
Ohki M, Shutoh F, Nagao S. Alteration of electrical resposiveness of vestibular nuclei correlated with long-term adaptation of optokinetic eye movement response in mice. **Soc Neurosci Abstr** 989.7, 2004
Nagao S, Shutoh F, Ohki M, Kitazawa H, Itohara S. Critical role of cerebellar LTD in the murine long-term adaptation of horizontal optokinetic response revealed by lesion, pharmacological and gene-knockout experiments. **Soc Neurosci Abstr** 989.8, 2004
Shigemoto R, Nakadate K, Shutoh F, Wang W, Fukazawa Y, Molnar E, Nagao S. Reduction of AMPA receptor content in parallel fiber-purkinje cell synapses by cerebellar motor learning. **Soc Neurosci Abstr** 989.14, 2004
Shutoh F, Ohki M, Kitazawa H, Itohara S, Nagao S. Effects of acute flocculus lesion on the long-term adaptation of horizontal optokinetic response eye movements in mice. **Soc Neurosci Abstr** 1005.11, 2004

（３） 出版物

永雄総一．平衡感覚における小脳の役割． 野村恭也他編. **CLIENT 21.** 第３巻 **感覚器.** Pp214－213. 中山書店, 2000.
永雄総一． 小脳、前庭動眼反射と視機性眼球反応．甘利俊一他編. **脳科学ハンドブック**. Pp320－329. 朝倉書店, 2000.
永雄総一． 眼球運動 **新運動生理学**「上巻」Pp 51-60. 宮村実晴編. 真興交易, 2001.

H-08

研究課題　新規バイオイメージングプローブの開発とその神経系への応用

研究代表者名　長野 哲雄

所属　東京大学大学院薬学系研究科

特定領域「神経回路」参加年度　平成 12 年度～平成 16 年度（班友）

研究成果の要旨

生体可視化に有用な各種バイオイメージングプローブ類を新たに開発した。具体的には一酸化窒素（NO）、亜鉛イオンおよび活性酸素種のプローブ類である。これらを用いて神経伝達について有用な知見が得られた。

研究成果

【研究の目的と概略】

“生きている状態”では、生理活性分子の濃度あるいは活性は常にダイナミックに変動しており、種々の生理活性分子が相互にネットワークを構築して生体機能を維持している。我々はこれからの生命科学研究において「時間」と「空間」の情報を組み入れた生理機能解析が極めて重要であると考えており、そのためにはバイオイメージング技術が不可欠となると思われる。酵素や受容体が活性を保持した“生きている状態”でのダイナミック解析はバイオイメージングにより可能であり、これにより生体内のネットワーク研究が進展すると思われる。

バイオイメージング技術には、ハード面の蛍光顕微鏡やレーザーなどの光学系の測定システムの進展とともに、ソフト面の生理活性分子を特異的かつ高感度で捉えるバイオイメージングプローブの開発が必須となる。両者は車の両輪として機能する。近年長足の進歩を遂げている光学系測定システムはこの分野に大きなインパクトを与えているが、他方のバイオイメージングプローブの開発に関しては、蛍光タンパク質の GFP はあるものの、生理活性分子に適合したバイオイメージングプローブは日本のみならず世界的に見てもほとんどなく、この分野の研究は手つかずの状態にあった。

我々の研究グループは偶然あるいはランダムスクリーニングによるものではなく、有機化学および光化学を基盤として論理的にバイオイメージングプローブを開発している。論理的に開発することにより、その原理に基づいて多くの生理活性分子に対するプローブを精密に分子設計できることになる。

本特定領域「神経回路」研究において、我々は Photoinduced electron Transfer（PeT：光誘起電子移動）機構に基づいて、新たに高感度かつ高選択的な以下の三種の蛍光バイオイメージングプローブの開発に成功した。すなわち 1)一酸化窒素(NO)、2)亜鉛イオン、3)活性酸素のイメージングプローブである。

【一酸化窒素蛍光バイオイメージングプローブ】

一酸化窒素（NO）は循環器系および免疫系のみならず、神経系においてもNO合成酵素が存在することから重要な生理機能を担っていると考えられているが、生理機能に関して未だ確定的な結論には達していない。我々は現在までにNOを選択的に生細胞中から捉え、イメージングできるDAF-2 およびDAF-2DAを開発してきた。本「神経回路」研究においては、nMレベルのNOを検出するための更に高感度なバイオイメージングプローブの開発に取り組み、DAMBO-P^{II}を創製した。本プローブは従来のプローブに比べ、pHが変化した場合でも蛍光強度が変化せず、感度も３倍上昇した。

【亜鉛イオンバイオイメージングプローブ】

生理活性種として注目を集めつつある亜鉛イオン（Zn^{2+}）のバイオイメージングプローブ：ZnAFsおよびZnABの開発に成功し、それらを大脳切片の虚血に適用することにより実用性を示した。このZn^{2+}蛍光プローブの創製によりZn^{2+}の生体におけるダイナミックな解析が可能となった。

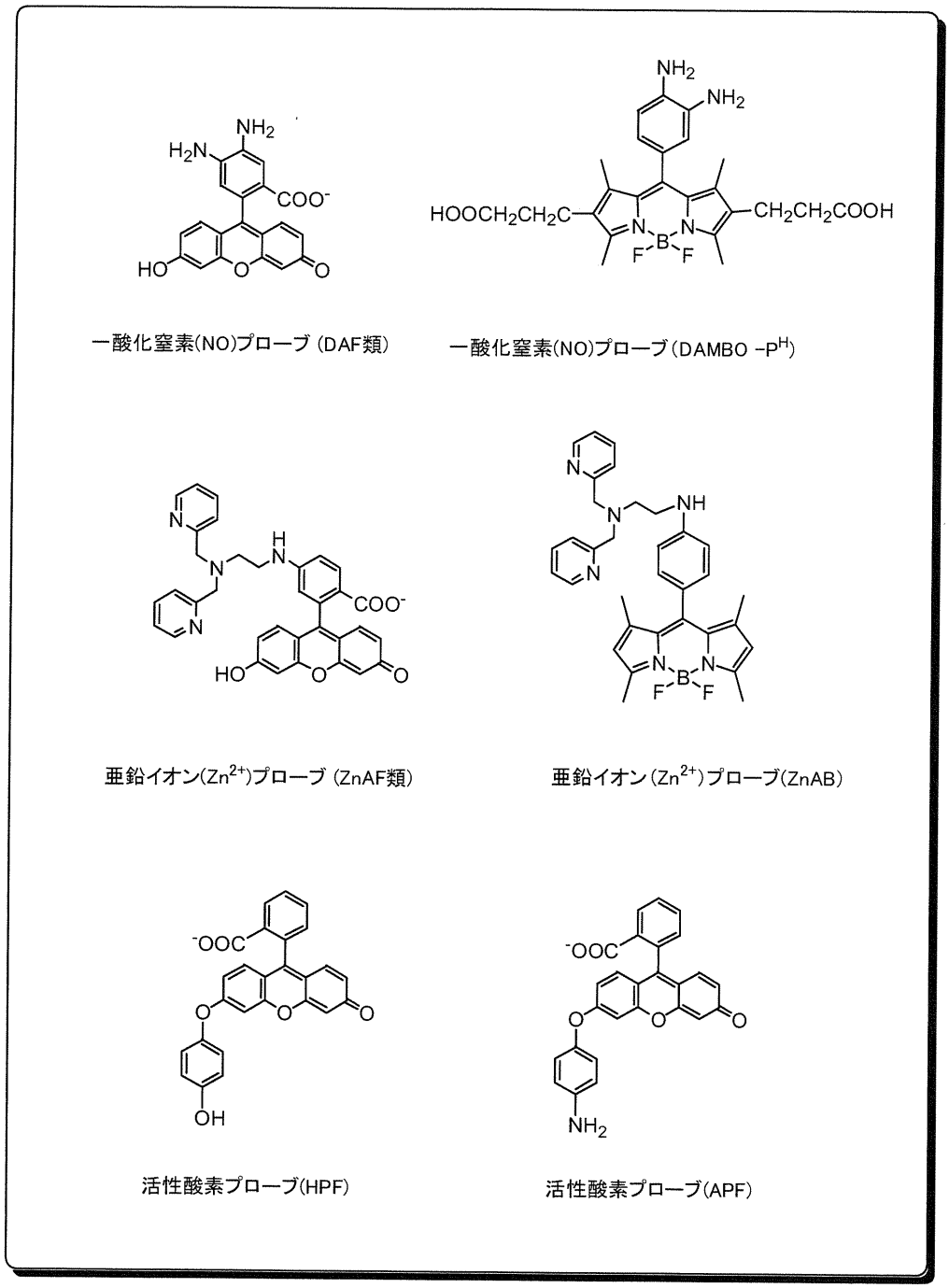


図. 新たに開発された各種イメージングプローブ類

Zn^{2+}は多くの酵素や転写制御因子の構造保持または活性中心として機能している必須微量金属の一つであるが、最近では、タンパクに弱く結合しているかあるいはフリーの状態のZn^{2+}に注目が集まるようになってきた。細胞内のZn^{2+}濃度の上昇はタンパク結合性のZn^{2+}の放出あるいはベシクルからの放出によることが示され、神経伝達への関与が報告されている。また虚血再灌流後の選択的な細胞死が起こる時Zn^{2+}が蓄積することから、細胞死への関与も報告されている。さらに、ベータアミロイドの形成に関与していることやてんかん発作に関与していることなど、疾病との関係が指摘されている。我々はNOバイオイメージングプローブの開発原理として確立したphotoinduced electron transfer機構に基づいてZn^{2+}バイオイメージングプローブの分子設計と合成を行い、ZnAF、ZnABの開発に成功した。このプローブはCa^{2+}, Mg^{2+}, Fe2+, Cu^{2+}等の他の金属イオンではまったく蛍光強度は増加せず、Zn^{2+}特異的である。またその蛍光強度は非常に大きく、

検出感度は5nMであり、高感度、高選択的Zn^{2+}蛍光プローブと言える。また、細胞内のZn^{2+}を測定するため、膜透過性でかつ細胞内に留まるタイプのプローブも創製した。このような実用可能なZn^{2+}プローブは現在まで知られてなく、世界で始めてである。

このプローブを用いた大脳海馬での苔状線維、CA3 領域での電気刺激に対応し放出されるZn^{2+}をイメージングとして捉えることに成功し、このZn^{2+}の生理機能について興味ある知見を得た。また、虚血時でのZn^{2+}の濃度変化をバイオイメージングとして捉えるなど、このプローブの有用性が示された。

【活性酸素バイオイメージングプローブ】

従来、活性酸素は酸化ストレスなどにおいて酸化反応種として非特異的に生体成分に障害を与えるという観点からの研究が主であった。しかしながら最近は活性酸素が酸化ストレスにおいて情報伝達分子として特異的に情報のカスケードに関係している報告がなされるようになってきた。このため、活性酸素種を特定して解析すること、すなわち数種類知られている活性酸素種をある程度特異的に検出するプローブが求められるようになってきた。しかしながら従来活性酸素プローブとして汎用されてきたDCFHは活性酸素種間で特異性がないだけではなく、それ自身が酸素存在下で容易に自動酸化を起こすなど、特異性には大きな問題点があった。この研究では新たに、酸化力の強いハイドロキシルラジカルとパーオキシナイトライトにより、蛍光を生じるプローブHPFとさらにClO^-とも反応するAPFを開発した。これらを用いて好中球から中性条件下でClO^-の生成をイメージングとして捉えることに成功した。また情報伝達の研究においてはASK-1 に関連するカスケードにおいて活性酸素の関与を画像として捉えることに成功した。これらの結果は、HPFおよびAPFの各プローブが活性酸素の生理的な役割を解析する上で有用であることを示している。

業績リスト

1. ″Rational Principles for Modulating Fluorescence Properties of Fluorescein″ Tasuku Ueno, Yasuteru Urano, Ken-ichi Setsukinai, Hideo Takakusa, Hirotatsu Kojima, Kazuya Kikuchi, Kei Ohkubo, Shunichi Fukuzumi and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, in press.
2. ″Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications″ Kenjiro Hanaoka, Kazuya Kikuchi, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, 126, 12470-12476 (2004).
3. ″Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyrromethene Chromophore -Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe-″ Yu Gabe, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, 126, 3357- 3367 (2004).
4. ″Active Oxygen Species Generated from Photoexcited fullerene (C_{60}) as Potential Medicines - $O_2^{-\cdot}$ versus $^1O_2$ -″ Yoko Yamakoshi, Naoki Umezawa, Akemi Ryu, Kumi Arakane, Naoki Miyata, Yukihiro Goda, Toshiki Masumizu and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, 125, 12803-12809 (2003).
5. ″Rational Design Principle for Modulating Fluorescence Properties of Fluorescein-based Probes by Photoinduced Electron Transfer″ Tetsuo Miura, Yasuteru Urano, Kumi Tanaka, Tetsuo Nagano, Kei Ohkubo and Shunichi Fukuzumi, **J. Am. Chem. Soc.**, 125, 8666-8671 (2003).
6. ″Selective Detecting of Zinc Ions with Novel Luminescent Lanthanide Probes″ Kenjiro Hanaoka, Kazuya Kikuchi, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, **Angewandte Chemie, Int. Ed.**, 42, 2996-2999 (2003).
7. ″A Novel Design Method of Ratiometric Fluorescent Probes Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Switching by Spectral Overlap Integral″ Hideo Takakusa, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Hirotatsu Kojima, and Tetsuo Nagano, **Chemistry-A European Journal**, 9, 1479-1485 (2003).
8. ″Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species″ Ken-ichi Setsukinai, Yasuteru Urano, Katsuko Kakinuma, Hideyuki J. Majima and Tetsuo Nagano, **J. Biol. Chem.**, 278, 3170-3175 (2003).
9. ″Design and synthesis of a novel magnetic resonance imaging contrast agent for selective sensing of zinc ion″ Kenjiro Hanaoka, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Michiko Narazaki, Takashi Yokawa, Shigeru Sakamoto, Kentaro Yamaguchi and Tetsuo Nagano, **Chemistry and Biology**, 9, 1027-1032(2002).
10. ″A Novel, Cell-Permeable, Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Zinc Ion″ S. Maruyama, K. Kikuchi, T. Hirano, Y. Urano and T. Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, 124, 10650-10651(2002).

11. "Multiple Active Intermediates in Oxidation Reaction Catalyzed by Synthetic Heme-thiolate Complex Relevant to Cytochrome P450" Noriyuki Suzuki, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, J. Am. Chem. Soc., 124, 9622-9628 (2002).
12. "Mossy Fiber Zn2+ Spillover Modulates Heterosynaptic N-methyl-D-aspartate Receptor Activity in Hippocampel CA3 Circuits" Sayaka Ueno, Masako Tsukamoto, Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Maki K. Yamada, Nobuyoshi Nishiyama, Tetsuo Nagano, Norio Matsuki and Yuji Ikegaya, J. Cell Biology, 158, 215-220 (2002).
13. "Improved Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs, Suitable for Biological Applications." Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, J. Am. Chem. Soc., 124, 6555-6562 (2002).
14. "A Fluorescent Anion Sensor That Works in Neutral Aqueous Solution for Bioanalytical Application" Shin Mizukami, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano, Akira Odani and Kazuya Kikuchi, J. Am. Chem. Soc., 124, 3920-3925 (2002).
15. "Orthogonality of Calcium Concentration and Ability of 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2) to Detect NO" Noriyuki Suzuki, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, J. Biol. Chem., 277, 47-49 (2002).
16. "Design and Synthesis of an Enzyme-Cleavable Sensor Molecule for Phosphodiesterase Activity Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer" Hideo Takakusa, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Shigeru Sakamoto, Kentaro Yamaguchi and Tetsuo Nagano, J. Am. Chem. Soc., 124, 1653-1657 (2002).
17. "Bioimaging of Nitric Oxide" Tetsuo Nagano and Tetsuhiko Yoshimura, Chemical Reviews, 102, 1235-1269 (2002).
18. "Gi and Go as a redox sensor" Motohiro Nishida, Kevin L. Schey, Shuichi Takagahara, Kenji Kontani, Toshiaki Katada, Yasuteru Urano, Tetsuo Nagano, Taku Nagao and Hitoshi Kurose, J. Biol. Chem., 277, 9036-9042(2002).
19. "Selective Sensing of Zinc Ion with A Novel Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent" Kenjiro Hanaoka, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano and Tetsto Nagano, J. Chem. Soc., Perkin Transaction 2, 1840-1843 (2001).
20. "Rational Design of Fluorescein-based Fluorescence Probes. -Mechanism-based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen-" Kumi Tanaka, Tetsuo Miura, Naoki Umezawa, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, J. Am. Chem. Soc., 123, 2530-2536 (2001).
21. "Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer System with Coumarin Donor Included in ・-Cyclodextrin" Hideo Takakusa, Kazuya Kikuchi, Yasuturu Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, Analytical Chemistry, 73, 939-942 (2001).
22. "Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on Rhodamine Chromophore" Hirotatsu Kojima, Miki Hirotani, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, Analytical Chemistry, 73, 1967-1973 (2001).
23. "Highly Zinc-Selective Fluorescent sensor Molecules Suitable for Biological Applications" Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, J. Am. Chem. Soc., 122, 12399-12400 (2000).
24. "First Synthetic NO-heme-thiolate Complex Relevant to Nitric Oxide Synthase and Cytochrome P450nor" Noriyuki Suzuki, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Takeshi Uchida, Masahiro Mukai, Teizo Kitagawa and Tetsuo Nagano, J. Am. Chem. Soc., 122, 12059-12062 (2000).
25. "Development of Time-resolved Fluorometric Detection System Using Diffusion-enhanced Energy Transfer" Mitsunori Koresawa, Kazuya Kikuchi, Shin Mizukami, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, Analytical Chemistry, 72, 4904-4907 (2000).
26. "Design and Synthesis of Intramolecular Resonance Energy Transfer Probes for Use in Aqueous Solution" Yasutomo Kawanishi, Kazuya Kikuchi, Hideo Takakusa, Shin Mizukami, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchiand Tetsuo Nagano, Angewandte Chemie, Int. Ed., 39, 3438-3440 (2000).
27. "Novel Zinc Fluorescent Probes Excitable with Visible Light for Biological Applications" Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, Angewandte Chemie, Int. Ed., 39, 1052-1054 (2000).

共同研究　松木則夫研究グループとの共同研究

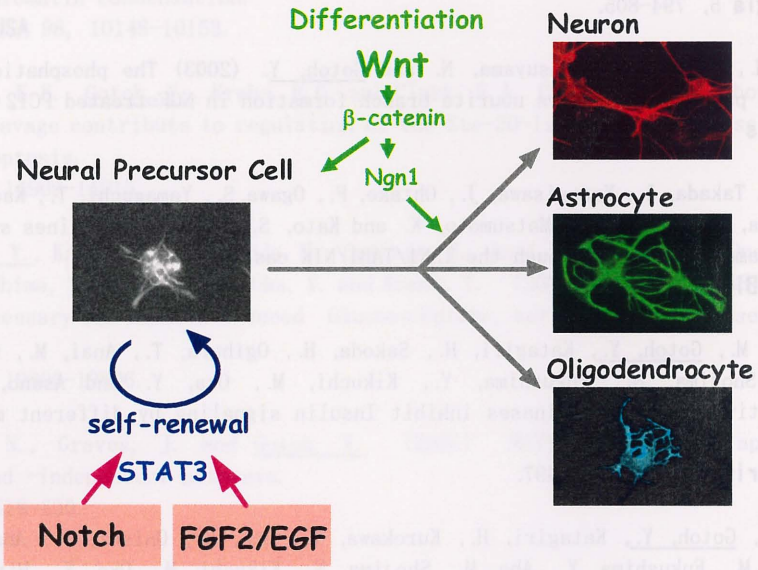
特許など　なし

〔班友〕
研究代表者名　　後藤　由季子
所属　　東京大学分子細胞生物学研究所
特定領域「神経回路」参加年度　　平成１２年度

研究成果の要旨

大脳皮質由来神経系前駆細胞のニューロン分化誘導因子として Wnt7a を同定した。また神経系前駆細胞の自己複製において重要な Notch の下流シグナル伝達を解析し、Notch-Hes 経路による転写因子 STAT3 の活性化が主要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果



業績リスト

Oishi, K., Kamakura, S., Isazawa, Y., Yoshimatsu, T., Kuida, K., Nakafuku, M., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004) Notch promotes survival of neural precursor cells via mechanisms distinct from those regulating neurogenesis.
Dev. Biol. In press

Kamakura, S., Oishi, K., Yoshimatsu, T., Nakafuku, M., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004) Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signaling.
Nat. Cell Biol. 6, 547-554

Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins.
EMBO J. 23, 1889-1899.

Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004)

The Wnt-beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells.
Development 131, 2791-2801.

Miyagi, S., Saito, T., Mizutani, K., Masuyama, N., Gotoh, Y., Iwama, A., Nakauchi, H., Masui, S., Niwa, H., Nishimoto, M., Muramatsu, M. and Okuda, A. (2004) The sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct multipotent stem cells.
Mol. Cell. Biol. 24, 4207-4220.

Sunayama, J., Ando, Y., Itoh, N., Tomiyama, A., Sakurada, K., Sugiyama, A., Kang, D., Tashiro, F., Gotoh, Y., Kuchino, Y. and Kitanaka, C. (2004) Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32.
Cell Death Differ. In press.

Ogihara T, Asano T, Katagiri H, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Fujishiro M, Kushiyama A, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Gotoh Y, Komuro I, Fujita T. (2004) Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase.
Diabetologia 5, 794-805.

Higuchi, M., Onishi, K., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2003) The phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses neurite branch formation in NGF-treated PC12 cells.
Genes Cells 8, 657.

Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamaguchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K. and Kato, S. (2003) Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade.
Nat. Cell Biol. 5, 224-230.

Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Abe, M., Shojima, N., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. and Asano, T. (2003) Three Mitogen-Activated Protein kinases inhibit Insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes.
Mol. Endocrinology 17, 487-497.

Sakoda, H., Gotoh, Y., Katagiri, H., Kurokawa, M., Ono, H., Onishi, Y., Anai, M., Ogihara, T., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Abe, M., Shojima, N., Kikuchi, M., Oka, Y., Hirai, H. and Asano, T. (2003) Differing roles of Akt and SGK in glucose metabolism, DNA synthesis and oncogenic activity.
J. Biol. Chem. 278, 25802-25807.

Katome, T., Obata, T., Matsushima, R., Masuyama, N., Cantley, L.C., Gotoh, Y., Kishi, K., Shiota, H. and Ebina, Y. (2003) Use of RNA-interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/PKB-isoforms in insulin actions.
J. Biol. Chem. 278, 28312-28323.

Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2002) Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53.
J. Biol. Chem. 277, 21843-2850.

Tsuruta, F., Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2002) The PI3K-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria.
J. Biol. Chem. 277, 14040-14047.

Shinohara, M., Terada, Y., Iwamatsu, A., Shinohara, A., Mochizuki, N., Higuchi, M., Gotoh, Y., Ihara, S., Nagata, S., Itoh, H., Fukui, Y. and Jessberger, R. (2002) SWAP-70 is a guanine nucleotide

exchange factor that mediates signaling of membrane ruffling.
Nature 416, 759-763.

Higuchi, M., Masuyama, N., Suzuki, A. and Gotoh, Y. (2001) Akt mediates Rac/Cdc42-Regulated Cell Motility in Growth Factor-Stimulated Cells and in Invasive PTEN-Knockout Cells.
Curr. Biol. 11, 1958-1962.

Morishima, Y., Gotoh, Y., Barrett, T., Takano, H., Davis, R.J., Shirasaki, Y. and Greenberg, M.E. (2001) β-Amyloid Induces Neuronal Apoptosis Via JNK Pathway Activation and the Subsequent Induction of Fas Ligand.
J. Neurosci. 21, 7551-7560.

Masuyama, N., Oishi, K., Mori, Y., Ueno, T., Takahama, Y. and Gotoh, Y. (2001) Akt Inhibits the Orphan Nuclear Receptor Nur77 and T cell Apoptosis.
J. Biol. Chem. 276, 32799-32805.

Ura, S., Masuyama, N., Graves, J. and Gotoh, Y. (2001) Caspase Cleavage of MST1 Promotes Nuclear Translocation and Chromatin Condensation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10148-10153.

Graves, J.D., Draves, K.E., Gotoh, Y., Krebs, E.G. and Clark, E.A. (2001) Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste-20-like Protein Kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis.
J. Biol. Chem. 276, 14909-14915.

Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Funaki, M., Inukai, K., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. and Asano, T. (2001) MKK6/3 and p38 MAPK Pathway Activation is not Necessary for Insulin-Induced Glucose Uptake, but Regulates Glucose Transporter Expression.
J. Biol. Chem. 276, 19800-19806.

Ura, S., Masuyama, N., Graves, J. and Gotoh, Y. (2001) MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and -independent pathways.
Genes to Cells. 6, 519-530.