

認識と形成 研究領域 領域活動 評価報告書

- 平成 15 年度終了研究課題 -

研究総括 江口 吾朗

1. 研究領域の概要

生物は、内的あるいは外的要因を認識して、フレキシブルに形づくりを営み、また部分的欠損を自ら修復しようとします。このように生物に固有の能力に注目し、遺伝子、分子、細胞等生物の構成要素の機能に基礎を求め、生物の形づくりと形の修復を制御している細胞内や細胞間の認識、情報伝達、各種調節因子の機能的カスケードなどについて研究するものです。

単に個体発生や再生のみならず、細胞そのものの構造形成をはじめ、生体防御系・内分泌系、神経系などによる生体の恒常性維持機構、さらには個体集団の形成等に関する研究を含みます。

2. 研究課題 研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

基本方針

- (1) 自ら単独で研究を実施する研究者を対象とする。
- (2) 研究課題が「認識と形成」研究領域の感覚に富む課題を優先する。
- (3) 時代を先駆ける独創性豊かな基礎研究を優先する。
- (4) 研究計画を具体的に実施していくための、必要不可欠な研究技術が伴っている研究者を優先する。

4. 選考の経緯

選考	書類選考*	面接選考	採択者数**
対象者	329 名	30 名	15 名

* 1 応募課題につき領域アドバイザー2 名が書類審査を行った。

** 採択 1 年後、研究者 1 名が辞退した。

5. 研究実施期間

平成 12 年 10 月 1 日～平成 15 年 9 月 30 日

6. 領域の活動状況

領域会議を 6 回開催し研究進捗状況の報告、討論、研究交流を図り、研究報告会(東京ガーデンパレス)を 1 回開催し、3 年間の研究成果を広く公表し評価をいただいた。

また、研究総括は研究者を訪問し、研究環境の調査と研究進捗状況の把握を行い、各研究者には、研究生活における心構えに関して種々のアドバイスをを行った。

7. 評価の手続き

研究総括が、研究者の領域会議での報告、自己評価報告書、研究最終報告書を基に、必要に応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。また、一般公開の研究報告会における、外部参加者からの研究成果に対する評価をも参考にした。

(評価の流れ)

平成 15 年 9 月	研究終了
平成 15 年 12 月	研究報告会開催
平成 15 年 12 月	研究報告書および自己評価提出
平成 16 年 1 月	研究総括による評価

8. 評価項目

- (1) 外部発表 (論文、口頭発表等) 特許、研究を通じての新しい知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

9. 研究結果

本「認識と形成」領域は、さきがけ研究 21 の一領域として平成 12 年度に発足した。科学技術振興事業団 (現 独立行政法人 科学技術振興機構) の依頼により 領域の総括をお引き受けするに際して、自身の研究領域の研究の現状と国際的動向を踏まえ、生物の体制構築と体制の安定な維持の機構を原理的に解明することは、再生医療に代表される将来の医療技術や創薬技術の開発研究に不可欠であり急務であると思慮し、「形成と修復」を領域名として提案させていただいた。しかし、事業団側からこの領域名は限定がきつく、領域としては狭隘に過ぎると修正を求められ、協議の結果、事業団側から提案された「認識と形成」を一抔の危惧を覚えながら領域名として採用することとした。

「認識と形成」では逆に領域範囲が広漠過ぎて、応募者が多数にのぼると懸念しつつ公募に踏み切ったが、結果は危惧通りとなり 本領域の初年度、すなわち第一期生の応募者は実に 329 名に達した。多忙な領域アドバイザー諸先生に格別の御協力を要請し、事業団の特段の御理解と御助力を得て、15 名を一期生として採用することができた。それでも採択率はわずか 4.56%、約 22 倍の難関となった。

本領域の研究はきわめて順調に開始されたが、一年ほどを経過した時点で、1 名が理化学研究所の独立主幹研究ユニットのユニットリーダーに採用されたため、3 年間の研究期間を全うしたのは 14 名となった。予期し得なかった研究環境の変化等により、研究者自身が当初に掲げ、また領域の総括とアドバイザー各位が期待した目標に到達することができなかった 3 名を除き、11 名が所期の目的を達成したと評価された。これら 11 名の内 6 名は予期以上の成果を収めており、殊に 4 名の成果は研究の新しい飛躍的展開を強く期待させるものである。

一期生 14 名の夫々の研究成果と研究目標に対する達成度等は、以下の個々の研究者による研究成果報告、自己評価および領域アドバイザー各位の評価を加味した研究総括の見解の通りである。一期生 14 名の 3 年間の研究は、総体として当初の目的をほぼ達成し、その成果は国内

外の関連領域研究の発 3 に十分貢献しうると共に、わが国の生命科学研究に大きなインパクトを与えることを期待させるものである。

10. 評価者

研究総括 江口 吾朗 学校法人尚絅学園 理事長、同大学長

領域アドバイザー氏名 (五十音順)

井出 宏之	東北大学 大学院生命科学研究科 研究科長
大箸 信一	金沢工業大学 東京赤坂研究所 教授
岡田 清孝	京都大学 大学院理学研究科 教授
坂野 仁	東京大学 大学院理学系研究科 教授
谷口 功	熊本大学 工学部 学部長
藤澤 幸夫	大阪大学 先端科学技術共同研究センター 知財特任教授
安田 國雄	奈良先端科学技術大学院大学 副学長
山森 哲雄	岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所 教授

(参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	3	27	30
口頭	53	28	81
その他	12	1	13
計	67	56	124

(2)特許出願件数

国内	国際	計
2	0	2

(3)受賞等

・東京テクノフォーラムゴールドメダル賞 (2002年4月)

・木原記念財団学術賞 (2003年4月)

・Amersham Bioscience & Science Prize for Young Scientists (2001年12月)

(4)招待講演

国内 20件

国際 3件

別紙

認識と形成」領域 研究課題名及び研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
安達(山田) 卓 (兼任)	モルフォゲンシグナル分子の濃度調節による病的組織の修復 (神戸大学 大学院自然科学研究科)	神戸大学 発達科学部 助教授 (名古屋大学 大学院理学研究科 助手)	48
栗崎 健 (兼任)	昆虫の変態時に見られる神経回路網の再編成機構 (東京大学 分子細胞生物学研究所)	東京大学 分子細胞生物学研究所 助手 (科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業 研究員)	46
稲垣 直之 (兼任)	神経細胞が極性を獲得する機構 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)	奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 助教授 (同上)	39
上田 昌宏 (専任)	分子計測による細胞性粘菌の走化性応答の解析 (大阪大学 大学院生命機能研究科)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (大阪大学大学院医学系研究科 研究機関研究員)	42
柿本 辰男 (兼任)	サイトカニン合成酵素による植物形態形成の制御 (大阪大学 大学院理学研究科)	大阪大学 大学院理学研究科 助教授 (同上 助手)	30
川崎 一郎 (専任)	線虫における生殖顆粒の機能解析 (国立遺伝学研究所)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (国立遺伝学研究所 生物遺伝資源情報研究室 研究員)	43
金 宗潤 (専任)	ハキリパチによる昆虫の空間認識と巣の形成機構の解析 (農業技術研究機構 中央農業総合研究センター)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (農業環境技術研究所 特別研究員)	31
高松 敦子 (専任)	粘菌を用いた認識と形成の数理解析によるアプローチ (東京大学 生産技術研究所)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (理化学研究所 基礎科学特別研究員)	34
坪井 昭夫 (兼任)	嗅覚神経回路の形成と再生の分子基盤 (東京大学 大学院理学系研究科)	東京大学 大学院理学系研究科 助手 (同上)	43

浜崎 浩子 (兼任)	鳥類中枢神経系の可塑的な形態形成 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所)	東京医科歯科大学難治疾患研究所 助教授 (同上)	32
平野 伸二 (専任)	多様な中枢神経系のプロトカドヘリン による形態形成の制御 (理化学研究所 発生・再生科学総合 研究センター)	科学技術振興機構 さきがけ研究 者 (愛知県心身障害者コロニー発達障 害研究所研究員)	46
平本 正輝 (専任)	形態形成時の受容体による位置情報 の提示機構 (国立遺伝学研究所)	科学技術振興機構 さきがけ研究 者 (国立遺伝学研究所 研究員)	47
藤森 俊彦 (兼任)	細胞系譜マッピングによる哺乳類の胚 軸形成機構の解析 (京都大学 大学院医学研究科)	京都大学 大学院医学研究科 助 手 (同上)	43
湯浅 純一 (専任)	神経細胞の軸索成長の基本的メカニ ズム (神戸大学 大学院医学系研究科)	科学技術振興機構 さきがけ研究 者 (岡崎国立共同研究機構 基礎生 物学研究所 助手)	45

研究課題別評価

1. 研究課題名 :モルフォゲンシグナル分子の濃度調節による病的組織の修復

2. 研究者氏名 :安達 (山田) 卓

3. 研究の狙い :

<目標> がんの自然治癒という立場からみた生体のもつ一つの戦略として、アポトーシスの誘導を挙げることができる。アポトーシスとは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子に傷害をもった細胞は、がん化する前にアポトーシスを起こして取り除かれる、という仕組みである。この現象に代表されるように、生体は異常組織を未然に取り除く積極的な性質をもっていることが知られるが、いかなる種類の異常細胞も、同様な方法で取り除くことができるのかどうか？という問題に答えるための知識は、数年前までほとんど得られていなかったと言って良い。しかしこの問題の重要性は、発生生物学上の1テーマとしての意義に限定されず、体細胞突然変異に起因する様々な疾患の予防・治療への発展や、自然免疫メカニズムの延長線上という観点からも注目されるべきである。本研究では、このような観点における研究の端緒として、位置情報を与えるモルフォゲンのシグナル強度が異常となった細胞が、如何にして取り除かれるか？についての解明を目指した。

<目的> 未分化な組織が特殊化した形態や機能をもつ組織へと発展するための初期段階には、モルフォゲンと呼ばれる細胞外物質からの刺激を受けることが必要である。モルフォゲンは未分化な組織のごく限られた部域で産生されて、それが組織全体へと拡散することによって作られる濃度勾配が、各細胞の分化方向を運命付ける位置情報をもたらすと考えられている。もしもモルフォゲンの濃度勾配が崩れると、あるいはモルフォゲンが惹き起こすシグナル伝達強度が強まったり弱まったりして正常値から外れると、組織は異常形態を形成してしまうが、一方で組織には異常発生を認識し、アポトーシスによってそれを破壊しながら正常形態へと修復していく機構が備わっている。本研究課題では、このような状況のモデルとしてショウジョウバエの翅におけるモルフォゲン Dpp (Decapentaplegic)を扱い、異常形態の修復過程が包含する細胞応答と分子機構の探求を試みた。

<解決すべき問題> ショウジョウバエ翅原基上にモルフォゲンシグナルである Dpp シグナルの異常が起きた細胞を作り出す際に、組織全体が異常になった時と、正常組織の中に異常細胞が現れた時の両方をそれぞれ作り出してアポトーシス誘発状況を比較し、それらが別現象として捉えられるかどうかの検証が必要であった (Hh シグナルに対する依存性の違いから最終的に別現象という結論に到達している)。またアポトーシスシグナルとして、ストレス応答性のシグナル伝達因子 JNK の活性を検出することを考えた。JNK のシグナルが一部のアポトーシス誘導に必要であるという事実は、現在では常識化したと考えられるが、本研究が開始された当初、それに対する認識は高いものではなかった。そこで、従来からアポトーシス誘導分子として知られる Caspase-3 の活性と JNK 活性を同時に検出して、両者を比較検討した。

<問題解決へのアプローチ> 結果から見ると、異常細胞を取り除くための非自律的細胞死

「Morphogenetic Apoptosis」の発見には、Caspase-3 活性よりも JNK 活性を観察する事が決定的に重要であった。JNK 活性を見るためには、JNK 活性化によって転写誘導される事が知られる遺伝子 puckerd の発現を検出し、またそれが JNK 活性化因子 Hemipterous (=MKK7) の突然変異体バックグラウンドでは消失することを、実験毎に一つ一つ確認した。一方、Caspase-3 の活性化を見るために、現在では市販されているが当時は入手困難であった抗 Human Cleaved Caspase-3 抗体の譲渡を、IDUN Pharmaceutical 社 (アメリカ) と交渉の上で受けることができた。

4. 研究結果：

Dpp シグナルは、本来は翅原基の中央部でシグナル強度が高い。これを低くする操作を行うと、翅原基の中央部は異常な発生運命 (翅原基の周辺部としての運命) をたどるが、それだけでなく、この時細胞死誘導性のタンパク質リン酸化酵素 JNK の活性化が起きて細胞が除去される。周辺細胞のうち、なぜ翅原基の中央部にあるものだけが除去されるのかを説明するために、中央部にだけ存在するもう一つのモルフォゲン Hh (Hedgehog、短距離拡散性) に着目した。通常中央部では常に Dpp シグナルも Hh シグナルもどちらも高く、周辺部ではどちらも低い。そこで、中央部で Dpp シグナルが低くなった状況に加え、さらに Hh シグナルも低くなった状況をもたらしたところ、細胞死は完全に抑圧された。つまり複数のモルフォゲンシグナルのバランスが乱れるとアポトーシスが起きるようにプログラムされており、それが異常細胞の除去につながっていることが示された。

一方、野生型の組織の中に Dpp シグナル伝達因子突然変異体のクローンを作成すると、突然変異体クローンと周辺の野生型細胞との境界線を中心として、その両側 (クローン内外) で細胞死誘導性のタンパク質リン酸化酵素 JNK の活性化が見られる。つまり本来緩やかなスロープを作るべきモルフォゲン活性勾配の中に大きな段差が生じると、段差の両側の細胞が段差の存在を認識して、その細胞から順次遠方の細胞へと JNK を活性化して細胞死を導き始め、最終的に突然変異体クローンを完全に除去して、緩やかなモルフォゲン活性勾配を再び出現させる。この現象は、体細胞突然変異などによって生じた異常細胞を除去し、正常形態形成を保証するために獲得されたメカニズムと考えられ、Morphogenetic Apoptosis と名付けられた。

この現象、Morphogenetic Apoptosis は、異常レベルのモルフォゲン刺激を受容したために、誤った発生運命を進行させていく悪性のクローンを組織内で検出し、除去するためのメカニズムであり、体細胞突然変異に起因する異常形態の自然治癒には必須の細胞応答で、正常発生を保証していると考えられる。しかし Morphogenetic Apoptosis の存在意義は、単にモルフォゲン活性勾配のスロープの修復にとどまらず、生体内に発生する様々な異常細胞集団 (例えば、環境汚染物質に曝露された細胞や発癌初期における変異細胞クローンなど) の検出と排除にも使われている可能性がある。今後はそれら、Morphogenetic Apoptosis が活用される生体内現象や疾患を広く探索するほか、如何なる分子が正常細胞とのコミュニケーションに用いられ、細胞死シグナルの発生と伝播に関与するのかなどの問題について取り組み、研究を進展させていく計画である。

5. 自己評価：

モルフォゲンシグナルのレベルが異常となった細胞がいつのまにか除去される現象自体はかつてから知られていたが、組織内部にはもともとモルフォゲンシグナルのレベルが高い細胞と低

い細胞が存在しているのに、なぜ異常レベルの細胞の除去が可能になるのかは問題視されたことがなかった。一言で言うと、その方法について調べたのが本研究である。研究を開始して直ちに判明した事は、モルフォゲンシグナルレベルが異常になった細胞のみが徐々に細胞死していく(取り除かれていく)のではなく、レベルの非常に異なる細胞が隣接すると、両者が異常事態を認識して細胞死を起こし、それが繰り返された結果、異常な細胞を取り除くことが可能となる、という全く予想されたこともないメカニズムであった。しかし、それはモルフォゲンシグナルレベルが高い細胞と低い細胞の両方が存在している状況下で異常細胞を発見するには、この方法以外には有り得ないのではないかと、とらけの極めて合理的なメカニズムであり、さらに、生体内に起こり得る様々な種類の異常細胞の除去においても適用されている可能性がある、言わば多くの普遍性が期待される非常に意義の大きいしくみの発見であったと考えている。

しかし、研究成果公表に至るまでの流れとその後の発展の困難さには、正直な所感として満足できない面が多々あった。まず、この研究成果の斬新さ、意義、面白さ、発展性、そういった実質面がレビューワーからまった評価されず、多くの研究者が目にするメジャー・ジャーナルへの掲載ができなかったのは残念な体験であった。レビューワーからは、あるいは逆に評価されたのかも知れないが、膨大な時間と労力を要する要求を突き付けられ、それに正面から応えるべくこちらが1年以上苦闘している間に、結論が似かよったシンプルな実験結果が大御所からハイレベルジャーナルに出された。実はこれは長引くリバイスの過程から大いに危惧していたことで、論文が受け入れないのならジャーナルではなく、インターネット上で私的に論文を公開してプライオリティーを確保できないか、とまで半ばノイローゼ的に考えたりもしたが、最終的にはそのような非常識な行いをする度胸ももつことはできなかった。今冷静に振り返ってみて、提出する論文にはなるべくスキを見せない細心の注意が必要であることを戒めとして学ぶことができたし、尋常でないリバイスを求められた時に打つべき次の手段を予め考えておく入念さなど、研究とは別次元の技術が、現実問題として重要であることも学んだ。上記の競合論文の内容が、我々のものとは随分異質であることを、せめて幸いに思いたいと考えている。

次にこの研究は、1997年ごろに私が日本で行っていた研究が端緒となり、さらにアメリカへ留学中に自由な発想のもとに始めさせてもらった実験に直接由来している。留学中、日本からサラリーをもらっていたためにそのような自由を与えて下さった留学先の教授 Michael B. O'Connor 氏に謝意を表すべく、彼に Corresponding Author となっていた。しかし、自分でジャーナルと交渉しない分、最終的に論文の内容やエディタへの対応に必ずしも満足できない面が残ってしまったことは事実である。謝意と責任所在はもちろん別件であり、自らの責任で行った研究はやはり自らが Corresponding Author になるべきもの、と今は考えている。

最後に研究そのものの内容についてであるが、Morphogenetic Apoptosis を誘発・伝播する細胞間シグナルが何であるか、この最も単純で大きな興味を解決することが、未だに全くできていないことが極めて残念である。これをスクリーンする方法にいくつか手出ししてみたが、簡単に言うと「異常細胞が残ってしまう突然変異体(サプレッサー)」というのがそもそも致命的に弱く、突然変異誘発が成功しても系統化できないというジレンマが生じて研究が持続できない。そこで、従来型のサプレッサー突然変異体スクリーンとはまったく異なるアイデアを考え出して取り組むべき問題

である、と現在その方法を模索中である。

以上のように本研究の成果には、極めて満足できる面と全くそうでない面との両方があるため、そうでない面の今後の成果を切望して、私自らの自己評価点を5段階評価の「3」としたいと考えている。

6. 研究総括の見解：

動物の個体がその多細胞体制を構築し維持する上で、不必要あるいは異常となった細胞を排除する現象は古くから知られ研究されてきた。本研究はこの課題に独創的に取り組み、異常細胞を排除するための非自律的細胞死を発見し、morphogenetic apoptosis と定義付け、その仕組みの概要を明らかにした。この成果は研究の更なる発展を担保すると共に、傷害やがんの克服にも応用しうる新技術の開発にも結びつくものとして高く評価できる。ただ、個人研究であることを深く自覚し、論文発表の際の correspondence にはより責任を持つことが望まれる。

7. 主な論文等：

主な論文

1. Adachi-Yamada, T.; puckered-GAL4 driving in JNK-active cells. *Genesis*, 34, 19-22 (2002).
2. Adachi-Yamada, T. and O'Connor, M.B.; Morphogenetic apoptosis; A mechanism correcting discontinuities in morphogen gradients. *Dev. Biol.*, 251, 74-90 (2002).

口頭発表

1. 安達 卓, Michael B. O'Connor Morphogenetic Apoptosis: モルフォゲンシグナル勾配の不連続を修復する細胞死 .第 25 回日本分子生物学会年会 (2002) 横浜 .
2. Adachi-Yamada, T. and Michael B. O'Connor.: Morphogenetic Apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients. *Keystone Symposia* (2003) Keystone, USA.
3. 安達 卓, Mark Stapleton, Michael B. O'Connor :ショウジョウバエの Dpp シグナル抑制因子 / アポトーシス誘導因子としての *Taip6* .日本発生生物学会第 36 回大会 (2003) 札幌 .
4. 春本 敏之, 上田 龍, 西郷 薫, 安達 卓 :ダイオキシンレセプターのショウジョウバエホモログ *Spineless* の活性化が導くアポトーシスの 性質について .日本発生生物学会第 36 回大会 (2003) 札幌 .
5. Adachi-Yamada, T.: Roles of morphogenetic apoptosis during imaginal disc development .第 2 回日韓ショウジョウバエ シンポジウム (2003) 東京 .
6. 春本 敏之, 安達 卓 Molecular basis of distance-dependent variation of nonautonomous apoptosis mediated by by Ras .日本ショウジョウバエ研究会第 6 回研究集会 (2003) 東京 .
7. 大庭圭介, 春本敏之, 安達 卓 :モルフォゲン Dpp のシグナルレベルの異常が誘導する細胞死のメカニズム .第 26 回日本分子生物学会年会 (2003) 神戸 .
8. Harumoto, T. and Adachi-Yamada, T.: Distance-dependent variation of apoptotic responses caused by activated Ras in *Drosophila* wing. *Keystone Symposia* (2004) Snowbird, USA.

研究課題別評価

1. 研究課題名 : 昆虫の変態時に見られる神経回路網の再編成機構

2. 研究者氏名 : 粟崎 健

3. 研究の狙い :

神経回路網の一部は発生過程ならびに発生が完了した後も再編成されることが知られているが、その制御機構についてはほとんどわかっていない。神経回路網の再編成をおおまかに見ると、古い神経回路の消失と新しい神経回路の形成という2つの現象に分けることができる。そこで本研究では、変態期においてエクダイソンを受容することにより細胞自立的に神経回路が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に注目した。軸索分岐の消失(プルーニング)過程とそれを制御する機構を明らかにすることで、神経回路網の再編成機構の一端を明らかにすることを目指した。

4. 研究結果 :

幼虫キノコ体神経回路を構成する約 800 個の神経細胞のうち 1細胞のみをラベルして、蛹期における時間経過に伴う軸索分岐の形態の変化を解析した。その結果、蛹期に入ると、まず、軸索分岐上に形成されたバリコシティーと呼ばれるこぶ状の構造体の除去がはじまり、次いで軸索の局所的な変性が起こり、最終的に軸索分岐が断片化して消失していくことがわかった。この結果から、軸索分岐のプルーニングは軸索が退縮することにより引き起こされるのではなく、軸索変性により生じていることが明らかになった。また、軸索分岐プルーニングを軸索分岐全体に注目して、様々な細胞構造を可視化できるマーカーを用いて解析した結果、軸索分岐上に形成されたバリコシティーの除去はクラスター状に集団で同時に起こっていることがわかった。

キノコ体軸索分岐の周辺に存在するグリア細胞に注目して、その形態変化を調べた結果、3 齢幼虫後期ではキノコ体軸索分岐の外周を覆っていたグリア細胞の一部が、変態期に入ると軸索分岐内に浸潤し、貪食作用により軸索分岐の一部をクラスター状に分解・除去していることがわかった。グリア細胞において特異的にその細胞機能の一部を阻害すると、グリア細胞の軸索分岐内への浸潤ならびに、軸索分岐上バリコシティーの除去が抑制された。残された軸索の一部は成虫まで生き残った。

キノコ体神経細胞で特異的に優性抑制型エクダイソン受容体を発現させると、グリア細胞の浸潤が細胞非自立的に抑制された。以上の結果より、キノコ体軸索分岐のプルーニングは、(1)キノコ体細胞がエクダイソンを受容することにより、神経-グリア相互作用を介してグリアの浸潤を誘因し、(2)浸潤したグリア細胞が軸索分岐を貪食・分解することで完了することが示唆された。「グリア細胞の貪食作用を用いて軸索分岐を除去する」というシステムを取り入れることにより、変態期のキノコ体神経細胞は不要となった軸索分岐を迅速に除去し、速やかに新しい神経回路を形成することで神経回路の再編成を行っていると考えた。

5. 自己評価 :

不要な軸索分岐は、グリア細胞により貪食されることで積極的に取り除かれる」というシステム

を発見できたことが、3年間の研究の最大の成果である。こうした機構は今まで知られていなかったものであり、本研究により一つの新しい概念を提出することができたと考えている。ただし、当初の目的の一つに掲げていた、神経回路再編成を制御する遺伝的機構の解明については、これを果たすことができなかった。このことについては、今後の取り組むべき研究課題として残された。

6. 研究総括の見解：

研究目標のひとつである神経回路再編成の制御遺伝子を解明するまでには至らなかったが、研究期間を通じ終始意欲的に研究に取り組んだ。研究遂行に必要な情報の収集に努め助言等も積極的に生かし、ショウジョウバエの幼虫 - 成虫変態期を系として、幼虫キノコ体神経回路について、不要な軸索分岐がグリア細胞の貪食作用で除去されること発見すると共に、前述の今一つの目的を達成するための基礎を築いた。今後の研究の進展が十分期待できる。

7. 主な論文等：

1. Verkhusha, V. V., Otsuna, H., Awasaki, T., Oda, H., Tsukita, S., Ito, K. An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation J. Biological Chem. 276, 29621-29624 (2001)
2. Kurusu, M., Awasaki, T., Masuda-Nakagawa, L. M., Kawachi, H., Ito, K., Furukubo-Tokunaga, K. Embryonic and larval development of the Drosophila mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclinIII in Development 129, 409-419 (2002)
3. Ito, K., Okada, R., Tanaka, N. K. & Awasaki, T. Cautionary observations on preparing and interpreting brain images using molecular biology-based staining techniques. Microsc Res. Tech. 62, 170-86 (2003).
4. Tanaka, N.K., Awasaki, T., Shimada, T. and Ito, K. Integration of chemosensory information in the second-order olfactory centers of Drosophila (投稿中)
5. Awasaki, T. & Ito, K. Phagocytotic action of glial cells is required for stereotyped axon pruning in Drosophila metamorphosis (投稿中)
6. 栗崎 健、浜 千尋 Rho ファミリーGTPase を介した軸索誘導 脳の科学 24, 739-745 (2002)

研究課題別評価

1. 研究課題名 神経細胞が極性を獲得する機構

2. 研究者氏名 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)

3. 研究の狙い:

神経細胞は、1本の軸索と複数の樹状突起を有し神経極性を形成する。神経極性は、神経細胞の基本的な機能であるシグナルの入出力や統合に重要な役割を果たすにも関わらず、その形成および維持の分子機構は未だよくわかっていない。本研究の目的は、神経細胞の極性形成に関わる分子群を同定し機能解析を行うことにより 神経極性形成・維持の分子ネットワークを明らかにすることである。

4. 研究結果:

I) CRMP-2 の軸索形成作用の解析

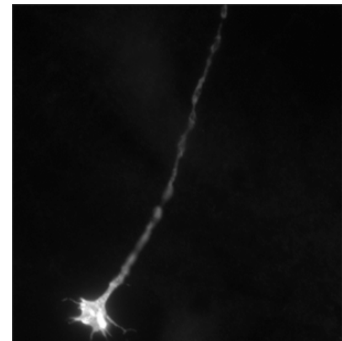
- 1) 培養海馬神経細胞の軸索形成を担う分子のひとつとして Collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2)を見いだし、これが細胞内で微小管の重合促進を介して作用することが明らかとなった。
- 2) 大阪市立大学、木山博教授との共同研究により、ラット舌下神経が再生の過程で CRMP-2 を高レベル発現すること、またアデノウイルスを用いて CRMP-2 を切断後のラット舌下神経に遺伝子導入すると神経再生の速度が上昇することがわかった。

II) プロテオミクスを用いた神経細胞の極性形成に関わる分子群の網羅的同定

- 1) 神経極性形成分子群の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 93 cm x 103 cm の巨大ゲルを用いたシステムで、通常の約5倍の1万個以上のタンパク質スポットを検出することが可能となった。また、質量分析法による高感度タンパク質同定のためのタンパク質前処理法および消化法を確立した。以上により、本研究での高感度のプロテオミクスを用いた神経極性形成分子群の解析が可能となった。
- 2) 確立した高解像度二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・細胞体に濃縮するタンパク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、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。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。
- 3) 同様の二次元電気泳動解析により、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することが明らかとなった。またこれらのうち92個のタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。

III) プロテオミクスで同定された分子の機能解析

1) 以上の研究から特に興味深い分子として、1個の新規タンパク質が同定された。この分子は CRMP-2 と同様に軸索に濃縮するのみならず神経細胞の極性形成にもなって発現が上昇することがわかった。また、Myc タグを付加した遺伝子を発現させて細胞内局在を調べたところ神経軸索の先端部の成長円錐に強く濃縮していた (図)。



2) 神経軸索に濃縮するものとして同定された分子の中には RNA 結合タンパク質、翻訳終結因子等のタンパク質の翻訳に関与する分子が含まれていた。また、実際に軸索で局所的に翻訳合成を受ける 12 個のタンパク質を検出した。

5. 自己評価 :

本研究ではまず細胞内タンパク質 CRMP-2 に軸索形成活性を見だし、その分子作用機構の解析を行った。続いてプロテオームの手法を用いた新規極性形成分子の同定に挑戦した。実際にプロテオーム解析を行ってみると、一般に行われていた手法には、2次元電位泳動法で検出できるタンパク質数が少なすぎる、あるいは質量分析法でのナノグラムレベルの微量タンパク質の同定が実際には困難である等の問題点が存在することがわかった。そこでプロテオーム解析法を自ら改良せざるを得ず、予想以上に時間がかかった。しかし最終的には研究期間内にいくつかの興味深い分子を同定することができ、神経細胞のかたち作りの分野に今後新たな知見を見出す基盤づくりができたものと安堵している。今後は、軸索成長円錐に濃縮する新規タンパク質と軸索で局所的に翻訳合成を受けるタンパク質に焦点を絞って解析を進めていく予定である。今後は、本研究をしっかりと発展させていく責任を強く感じる。

6. 研究総括の見解 :

本研究に着手して間もなく、上司 (教授) の転出に伴い研究計画の大幅な、また不測の変更を強いられた。したがって、CRMP-2 の濃縮機構に関する当初の研究計画を推進することが不可能となった。しかし、アドバイザーや他の研究者の示唆や助言を十分に生かし、二次元電気泳動による目標タンパク質の探索に独自の方法的工夫をこらして、当初の危惧を見事に克服し、最終的には幾つかの興味深い標的タンパク質の検出分離に成功した。この成果は今後の研究の飛躍的發展を基礎付けるものとして高く評価する。

7. 主な論文等 :

主な論文 :

1. Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2001) CRMP-2 Induces Axons in Cultured Hippocampal Neurons. *Nature Neurosci.* 4, 781-782.
2. Taya, S., Inagaki, N., Sengiku, H., Makino, H., Iwamatsu, A., Urakawa, I., Nagano, K., Kataoka, S., and Kaibuchi, K. (2001) Direct Interaction of Insulin-like growth factor-1 receptor with leukemia-associated RhoGEF. *J. Cell Biol.* 155, 809-819.

3. Canossa, M., Gartner, A., Campana, G., Inagaki, N., and Thoenen, H. (2001) 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.
4. Oguri, T., Takahata, I., Katsuta, K., Nomura, E., Hidaka, M., and Inagaki, N. (2002) Proteome analysis of rat hippocampal neurons by multiple large gel two-dimensional electrophoresis, *Proteomics* 2, 666-672.
5. Inagaki, N., Katsuta, K., Nomura, E., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T. (2002) High resolution large gel two-dimensional electrophoresis for proteomics, *BIOforum Int.* 6, 324-325.
6. Fukata Y., Itoh T.J., Kimura T., Menager C., Nishimura T., Shiromizu T., Watanabe H., Inagaki, N., lwamatsu A., Hotani H., Kaibuchi K. (2002) CRMP -2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly, *Nature Cell Biol.* 4, 583-591.
7. Suzuki, Y., Nakagomi, S., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Aizawa, H., Kikuchi, K., and Kiyama, H. (2003) Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured moter neurons of rat, *J. Neurochem.* 86, 1042-1050.
8. Inagaki, N. and Katsuta, K. (2004) Large gel two-dimensional electrophoresis: improving recovery of cellular proteome, *Curr. Proteomics*, in press.
9. Nomura, E., Katsuta, K., Ueda, T., Toriyama, M., and Mori, T. and Inagaki, N., (2004) 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*, in press.

その他 :出版物

1. 稲垣直之、貝淵弘三 (2001) CRMP-2 は海馬神経細胞の軸索形成を誘導する、*細胞工学* 20 (10) 1408-1409.
2. 有村奈利子、稲垣直之、貝淵弘三 (2001) CRMP-2 による神経極性形成の制御機構、*実験医学*.19 (17) 2309-2311.
3. 稲垣直之、貝淵弘三 (2001) 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 (3) 230-234.
4. 深田優子、稲垣直之、貝淵弘三 (2001) 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.
5. 稲垣直之 (2002) 細胞内の空間シグナル、*細胞工学* 21 (4) 345.
6. 稲垣直之 (2002) 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.
7. 稲垣直之 (2003) 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.
8. 稲垣直之、稲垣昌樹、単一スパインにおけるCaMKIIシグナリングの可視化 (2003) *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
9. 勝田和大、野村英子、稲垣直之 (2003) Multiple Large gel two-dimensional electrophoresis for proteomics, *J. Electrophoresis* 47, 27-31.

招待講演

1. 稲垣直之、貝淵弘三、CRMP-2 による神経細胞の軸索形成およびガイダンス機構、
2. 第 74 回 日本生化学会大会シンポジウム、(2001) 京都
3. 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
4. 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

Plenary Session

1. 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 (September 14-17, 2003).

研究課題別評価

1. 研究課題名 : 1分子計測による細胞性粘菌の走化性応答の解析

2. 研究者氏名 : 上田昌宏

3. 研究の狙い :

細胞が化学物質の空間的濃度勾配を検出して、一定の方向へと移動する現象は、走化性 (chemotaxis) と呼ばれている。走化性は免疫応答、神経回路形成、形態形成など様々な生物学的過程を支える基本的な細胞機能である。走化性情報伝達システムの機能の一つは、化学物質の濃度勾配を的確に認識することであるが、その仕組みについてはよくわかっていない。本研究では、生きた細胞内において情報伝達分子 1つ1つの反応をイメージングする細胞内 1分子イメージング法を開発し、情報伝達分子が細胞内のどこで、いつ、どのように機能しているのかを調べた。具体的には、走化性研究のモデル生物として知られる細胞性粘菌 *Dictyostelium* の走化性受容体を研究対象とし、その 1分子反応を生きた細胞内で捉えることを目指した。

4. 研究結果 :

細胞性粘菌 *Dictyostelium* は、化学物質サイクリック AMP (cAMP) に対して走化性を示す。cAMP センサーは三量体 G 蛋白質共役型の受容体である。cAMP 受容体 1つ1つの振る舞いを調べるために、受容体への信号入力過程 (cAMP 結合) と受容体からの信号出力過程 (三量体 G 蛋白質の活性化) を 1分子レベルでイメージングできる実験系を開発した。

[1] 入力信号 (cAMP 結合) の 1分子イメージング

蛍光性 cAMP アナログ (Cy3-cAMP) を有機合成し、Cy3-cAMP が細胞上の cAMP 受容体に結合する様子を 1分子イメージングすることに成功した。これにより cAMP が、細胞のどこに、いつ、何個、何秒間結合しているのか、つまり細胞が受け取る入力信号のありのままの姿を捉えることができるようになった。

Cy3-cAMP 1つ1つの結合時間から、cAMP 受容体のリガント解離速度を求めることができる。リガント解離速度は受容体の反応状態を表わすパラメーターである。こうした解析から、受容体の反応状態が細胞上の場所によって異なっていることが分かった。細胞の前側にある受容体は、環境からの情報を細胞内に効率良く伝達するが、後ろ側では情報伝達の効率が低く、細胞全体としては細胞の前方部から優先的に情報が伝達されていることが示唆された (Ueda et al. 2001)。

[2] 出力信号 (三量体 G 蛋白質の活性化) の 1分子イメージング

三量体 G 蛋白質が活性化されるとき、そのサブユニットに結合した GDP が GTP と交換される。当初の研究計画では、この GDP/GTP 交換反応を 1分子イメージングすることを目指した。しかしながら、この方法では十分な成果が得られなかった。ところが、この実験方法の開発過程で、三量体 G 蛋白質の振る舞いとして興味深い現象を発見した。

サブユニット (或いは サブユニット) と GFP (緑色蛍光蛋白質) の融合遺伝子を用いて粘菌細胞

を形質転換し、GFP の 1 分子イメージングにより、サブユニット (或いは サブユニット) の挙動を観察することに成功した。結果、両サブユニットは細胞膜と細胞質の間を活発に行き来すること、さらに、その速度が cAMP 刺激 (受容体の活性化) に伴って変化することが分かった。また、走化性を行なっている細胞では、その速度が細胞上の場所によって異なっていることが分かった。細胞の前側にある G 蛋白質と後ろ側にある G 蛋白質とではその振るまいが異なり、細胞の前側では受容体による活性化が効率よく行なわれていることが示唆された。この結果は、Cy3-cAMP による信号入力過程の解析とよく一致する。

5. 自己評価 :

当初の目標は、[1] 入力信号の可視化、[2] 出力信号の可視化、さらに [3] 入力信号と出力信号の同時計測であった。[1] についてはほぼ当初の計画通り、[2] については計画通りには進まなかったが、新たな現象の発見につながった。これらの研究は、走化性情報伝達研究だけでなく細胞内情報伝達研究一般に対しても貢献できたと考えている。[3] についてはようやく研究を開始することができ、今後の進展を見守っていただければありがたい。

細胞の中で生体分子を 1 分子イメージングする研究は 1998 年に始まり (最初の報告は 2000 年) 私自身もその初期のころから参加してきた。本研究も、大きくはこうした研究の流れの中に位置付けられ、細胞内 1 分子研究の先導的役割を果たしてきていると思う。本研究を通して、黎明期にある細胞内 1 分子研究に携わったことは私にとって非常に幸運であったし、また、今後の発展に対する責任も感じている。さきがけ研究はここで終えるものの、本研究で得られた成果を基にして、さらに研究を続けたい。

6. 研究総括の見解 :

個人研究としてきわめて精力的に研究を遂行した。黎明期にある生細胞内での分子の 1 分子の可視化と計測の技術開発研究で先導的な役割を果たしてきた。出力信号として GDP/GTP 交換反応の 1 分子イメージングには成功しなかったが、GFP-G タンパク質サブユニットの挙動を捉えることにより、新たな現象を発見しており、今後の大きな目標でもある入力信号と出力信号の同時計測の完成を大いに期待したい。いずれにせよ、本研究はさきがけ研究の好例として高く評価できる。

7. 主な論文等

1. Ueda, M., Sako, Y., Tanaka, T., Devreotes, P. N. & Yanagida, T. (2001). Single molecule analysis of chemotactic signaling in Dictyostelium cells. *Science* 294 :864-867.
2. 上田昌宏・石井由晴・柳田敏雄 (2002) 生体ナノ分子機械の分子メカニズム 応用物理 第 71 巻、pp1457-1466

研究課題別評価

1. 研究課題名 : サイトカイニン合成酵素による植物形態形成の制御

2. 研究者氏名 柿本辰男

3. 研究の狙い :

サイトカイニンは、アデニンにイソペンテニル基が結合した植物ホルモンであり、細胞分裂を誘導するとともに、未分化細胞塊を芽に分化させる作用も持つ。また、腋芽形成、栄養応答、栄養の分配、老化などにも影響する。このように植物の成長の重要な過程を制御する因子であるが、植物内在のサイトカイニンが実際にこれらの過程を調節しているのかどうかに関しては、確たる証拠はない。また、サイトカイニンが、どのようにして植物の形態形成を制御しているのかは、植物科学の重要な未解決問題である。これを知るためには、サイトカイニンがどこで、どのような経路で、どのような酵素によって合成されるのか、その合成過程はどのような調節を受けているのかを明らかにすることが必須であり、これらを目標とした。

4. 研究結果 :

植物のサイトカイニンの合成経路と合成の律速酵素もわかっていなかった。ただ、アデニン骨格のイソペンテニル化は重要であると考えられたので、私は、イソペンテニル基の転移を触媒する酵素をコードする可能性のある配列を検索し、サイトカイニン合成経路で働くイソペンテニル基転移酵素群を発見した。また、これらの産物の酵素活性を詳細に調べ、その活性は、これまでに知られていなかった ATP と ADP をイソペンテニル化する酵素(ATP/ADP イソペンテニル基転移酵素)であることを示した。これにより、植物のサイトカイニンは主に ATP と ADP のイソペンテニル化により合成されることを明らかにした。

シロイヌナズナには、ATP/ADP イソペンテニル基転移酵素をコードすると考えられる遺伝子が 7 つ(*AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT4*, *AtIPT5*, *AtIPT6*, *AtIPT7*, *AtIPT8*) 存在する。これらの発現パターンを、RT-PCR と、各遺伝子のプロモーターによるレポーター遺伝子の発現により調べた。その結果、各遺伝子は、それぞれに特徴的な発現パターンを持っていることがわかった。これらの遺伝子の発現はサイトカイニン自身により抑制され、フィードバック制御が働いていることがわかった。窒素栄養はサイトカイニンの量を増加させ、これが栄養応答に関わっていると考えられている。窒素栄養によるサイトカイニンの増加にサイトカイニン合成酵素遺伝子の発現誘導が関与している可能性を調べたところ、*AtIPT3* が硝酸イオンにより誘導されることがわかった。

次に、各サイトカイニン合成酵素の役割を知るために、T-DNA 挿入システムをスクリーニングして各サイトカイニン合成酵素遺伝子破壊株を得た。現在、*AtIPT8* は相同組換えにより破壊しているところである。それぞれ一遺伝子の破壊、多くの組あわせの二重突然変異体では見かけ上の異常はみられなかった。唯一表現型が現れたのは、*AtIPT3* の破壊株である。*AtIPT3* 遺伝子は硝酸イオンにより誘導されるが、この破壊株では硝酸イオンによるサイトカイニン誘導遺伝子の発現上昇は抑制されていた。このことは、硝酸イオンによるサイトカイニン量の増加には *AtIPT3* 遺伝子の誘導が関わっていることを示している。また、サイトカイニン受容体遺伝子の三重変異体を作成したところ、極めて小さな不完全な植物となったため、内在のサイトカイニンが実際に重要な役割

を果たしていることは明らかである。今後は、さらに多くのサイトカイニン合成酵素を同時に破壊した多重突然変異体の解析が必要である。

5.自己評価：

サイトカイニンは重要な植物ホルモンであり、その合成系を明らかにするとともに各サイトカイニン合成酵素遺伝子の発現解析と各遺伝子の破壊株の解析を行うという計画は、当を射た物である。

まず、サイトカイニンの合成経路と、サイトカイニン合成酵素遺伝子に関しては、「認識と形成」領域での研究に参加する時点である程度まで研究を進めていたので、これを詳細につめ、確かなものとして確定できたことは当たり前のことである。

サイトカイニン合成酵素遺伝子群の発現解析に関しては、発現レベルが低いため様々な苦労があったが、最終的には、多くの実験を納得するまで行った結果を論文発表したことは良かったと考えている。ここで見いだした、遺伝子発現のホルモンや環境応答などは、今後さらに追求していく。

サイトカイニン合成酵素遺伝子の、単一および二重遺伝子破壊株は、予測に反してどれもシビアな表現型は現わしていない。サイトカイニン合成酵素遺伝子の遺伝子破壊株の取得と二重変異体の作成には当初考えていたよりも長く時間がかかってしまい、3つ以上の遺伝子の多重変異体を作る時間はなかった。「認識と形成」領域における研究終了後も、多重突然変異体の作成を着実に進めており、この間の研究は将来の発展に結びつくものである。

6.研究総括の見解：

サイトカイニンによる植物体の形態形成の制御のしくみをサイトカイニン合成酵素に着目して、研究計画を着々と推進し、国際的にも非常に高水準の成果を挙げた。サイトカイニン合成酵素遺伝子の破壊株も分離解析し、単一または二重遺伝子破壊株では表現型が得られないことからさらに重変異体で検討を進める必要が生じた。しかし、植物の形態形成の分野では極めて注目度の高いサイトカイニンについて、今後、飛躍的な研究の展開が十分期待でき、研究継続の価値はきわめて高い。

7.主な論文等：

原著論文

1. Miyawaki K, Matsumoto-Kitano, M. and Kakimoto, T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37, 128-138 (2004).
2. Kakimoto T, Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyldiphosphate: ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.*, 42, 677-685 (2001)
3. Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K. and Kakimoto T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* 409, 1060 - 1063 (2001)

総説、著書

1. Kakimoto T, Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol* 54, 605-627 (2003)
2. Kakimoto T, Biosynthesis of cytokinins. *J. Plant Res.*, 116, 233-239 (2003)
3. 柿本辰男: サイトカイニンの受容と情報伝達、植物の生長調節 38(1)48-57 (2003)
4. 柿本辰男: サイトカイニンの合成と代謝、植物の環境応答と形態形成のクロストーク 岡穆宏ら(編)、シュプリンガーフェアラーク東京、(印刷中)
5. 岡穆宏、柿本辰男: サイトカイニン応答、同上、(印刷中)
6. サイトカイニンの合成と代謝、別冊植物細胞工学 (福田ら編) 秀潤社 (印刷中)
7. 柿本辰男: サイトカイニン、別冊蛋白質核酸酵素、植物の形づくり(中村ら編) (2002)
8. 柿本辰男: サイトカイニン、新しい植物ホルモンの科学 (小柴、神谷編) 講談社 (2002)

招待講演

1. Kakimoto, T. Biosynthetic enzymes of cytokinins. Plant Science Center Symposium II, Wako, Saitama, Japan. November 18-19, 2002
2. Kakimoto, T. Biosynthesis and perception of cytokinins. Botanikertagung 2002, Freiburg, Germany, September 22-27, 2002.
3. Kakimoto, T. Biosynthesis and perception of cytokinins. San Diego Center for Molecular Agriculture fall symposium. Ja Jolla, California, USA, October 2001.
4. 柿本辰男 木原財団学術賞受賞講演 2003. 5月
5. 柿本辰男 東京テクノフォーラム 21ゴールドメダル受賞講演 大阪 2002.9月
6. 柿本辰男 東京テクノフォーラム 21ゴールドメダル受賞講演 日本プレスセンター2002.7月
7. 柿本辰男 サイトカイニンを介した植物機能の調節機構、公開シンポジウム、和光理研,2002年4月
8. 柿本辰男ら、サイトカイニンを介した植物形態形成調節機構の解明に向けて、植物生理学会シンポジウム、岡山、2002年3月
9. 柿本辰男、サイトカイニンの合成酵素と受容体の解析 公開シンポジウム、京都、2002.2月
10. 柿本辰男、サイトカイニンの合成酵素と受容体の解析 公開シンポジウム、大阪、2002.2月
11. 柿本辰男、他、植物ホルモン、サイトカイニンの受容、情報伝達系と植物機能調節、日本分子生物学会シンポジウム、横浜、2001.12月

受賞

1. 2002年4月 東京テクノフォーラムゴールドメダル賞
2. 2003年4月 木原記念財団学術賞

研究課題別評価

1. 研究課題名 線虫における生殖顆粒の機能解析

2. 研究者氏名 川崎 一郎

3. 研究の狙い：

多細胞動物において、世代間の遺伝情報の伝達は全能性と不死性という特別な性質を持った生殖系列によって営まれている。様々な動物の生殖細胞には生殖顆粒と呼ばれる特異的な構造が見られるが、生殖系列が体細胞系列に見られない特別な性格を持つために、この生殖顆粒が重要な働きをしていると考えられている。本研究では線虫 *C. elegans* の生殖顆粒の分子実体をより明らかにし、その構成成分が、どのような分子機構で機能し、また相互作用しているかを解析する。そして、それらの積み重ねにより、生殖顆粒が全体として生殖系列の発生にどのような生物学的役割を果たしているのかを分子機構的に明らかにしていくことを目指す。

4. 研究結果：

線虫 *C. elegans* の生殖顆粒「P 顆粒」の構成成分である PGL-1 と相互作用する蛋白質を酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングし、同じ蛋白質ファミリーに属する PGL-2 と PGL-3、さらに mRNA の 5' cap 結合蛋白質で翻訳開始制御因子である eIF4E のひとつ、IFE-1 を検出した (線虫には他の真核生物と異なり5つの eIF4E、IFE-1 が存在する)。さらに抗体を用いた解析により、PGL-2 と PGL-3 も PGL-1 と同様に P 顆粒の構成成分であること、また IFE-1 も PGL-1 の存在に依存して P 顆粒に局在できることを明らかにした。IFE-1 は生殖系列に特異的に発現する eIF4E のひとつで、その機能を阻害すると精子機能が異常になる。PGL-1 と IFE-1 の相互作用の発見は、PGL-1 が精子形成に必要な mRNA の翻訳制御に関与している可能性を示すものである。加えて、PGL-1 と別の翻訳開始制御因子 IFF-1 (生殖系列に特異的に発現する eIF5A のひとつ) の相互作用も発見され、PGL ファミリー蛋白質の翻訳制御への関与の可能性がますます強くなると示唆された。さらに PGL ファミリー蛋白質のうち、少なくとも PGL-3 は孵化後の生殖系列の発生において PGL-1 と重複して機能していることも逆遺伝学的解析から明らかになった。

次に、RNA 結合蛋白質である PGL ファミリー蛋白質に結合する生殖顆粒の RNA 成分 (または生殖系列に特異的な mRNA) を同定するために、酵母 tri-hybrid 法を用いて線虫 cDNA ライブラリーから PGL-1, PGL-3 と相互作用する mRNA (cDNA) クローンをスクリーニングし、これまでに PGL-1 または PGL-3 と結合し、生殖系列で発現、機能する mRNA クローンを複数同定した。現在、野生型および *pgl-1; pgl-3* 二重変異体の粗抽出液から抗 PGL-1 抗体を用いて免疫共沈法により PGL 蛋白質/RNA 複合体を回収し、それぞれの共沈複合体から定量的 RT-PCR により上記の mRNA クローンが検出できるかどうかを確認中である。そして、それらが PGL ファミリー蛋白質や、IFE-1、IFF-1 によって実際にどのような (翻訳) 制御を受けているかを、今後、分子レベルで明らかにしていきたいと考えている。

5. 自己評価：

当初の研究計画のうち、PGL-1 と相互作用する蛋白質に関しては、新たに幾つかのものが同

定でき、またそれらの機能とPGL-1との相互作用についても新たな知見を得ることができた。PGLファミリー蛋白質に結合するRNAの単離同定に関しては、Yeast tri-hybrid法という新たな手法を用いることにより複数のクローンを得ることができたが、その正当性や機能、さらにそれらのRNAのPGLファミリー蛋白質による制御のメカニズムに関しては、ほとんど解析することができなかった。本研究期間終了後も、それらの研究を継続していくつもりである。

6. 研究総括の見解：

発生生物学の古典的な重要課題のひとつである生殖顆粒の分子の実態を、その構成成分として知られていたPGL-1に着目し解析を試みた。PGL-1と相互作用するタンパク質やPGLファミリーに結合するRNAを複数発見し一通りの成果を得た。その意味では、目的を概ね達成したと評価する。今後方法論の改善に意を用い、得られた成果を生かして当初の目標に肉迫して欲しい。

7. 主な論文等：

原著論文

1. Kawasaki, I., A. Amiri, Y. Fan, N. Meyer, S. Dunkelbarger, T. Motohashi, T. Karashima, O. Bossinger, Y. Kohara, and S. Strome
2. The PGL family proteins associate with germ granules and function redundantly in *C. elegans* germline development.
3. Submitted to *Genetics* in October 2003.
4. Hanazawa, M., I. Kawasaki, H. Kunitomo, K. Gengyo-Ando, K. L. Bennett, S. Mitani, and Y. Iino
5. The *C. elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1.
6. Submitted to *Mech. Dev.* in August 2003 (Revised on December 22, 2003).
7. Iwahashi, J., I. Kawasaki, Y. Kohara, K. Gengyo-Ando, S. Mitani, Y. Ohshima, N. Hamada, K. Hara, T. Kashiwagi, and T. Toyoda
8. *Caenorhabditis elegans* reticulon interacts with RME-1 during embryogenesis.
9. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 293: 698-704 (2002).
10. Amiri, A., B. D. Keiper, I. Kawasaki, Y. Fan, Y. Kohara, R. E. Rhoads, and S. Strome
11. An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*.
12. *Development* 128: 3899-3912 (2001).

総説・著書

1. 川崎一郎 「特殊化された生殖細胞の形成」 飯野雄一 / 石井直明 編 「線虫 究極のモデル生物」 (シュプリンガー・フェアラーク東京) pp.65-77 (2003)
2. 川崎一郎 「線虫初期胚で生殖質の局在化を制御する分子機構」 松居靖久監修 特集「生殖細胞形成の根本原理を求めて」 *細胞工* Vol.22 No.10 (秀潤社) pp.1061-1064 (2003)

研究課題別評価

1. 研究課題名 :ハキリバチによる昆虫の空間認識と巣の形成機構の解析

2. 研究者氏名 金 宗 潤

3. 研究の狙い :

動物の巣造り行動は、その空間認識と形態形成において、目を見張るものがある。ヒトのような言語認識を持たない彼らは、いったいどのように空間情報を認識し、材料を加工して巣を形造るのか？昆虫類、特にハキリバチは、巣造り行動において絶妙なテクニックで植物の葉を大顎で切り取り、巣の材料として用いるが、この時巣の空間サイズを正確に認識し、材料をこれにふさわしい大きさに加工する。また、環境条件に応じてフレキシブルに巣の空間サイズを調節し、巣の部分的欠損を修復しようとする。

これら空間情報の認識や、巣の形成における内部機構とは一体どのようなものか？私は、「蜂は材料や巣をどのように認識しているのか？」という根本的な問いに答えることを目標として、巣造り行動の仕組みを明らかにし、生物による認識についての私達の理解に新しいコンセプトを与えることを目指したいと考えた。

本研究の目的は、蜂が行う巣の空間サイズの認識、材料加工における空間情報の置換という一行動連鎖に着目して、巣造り行動を主に行動学的な手法で解析することである。また、巣造り行動における動作を、超伝導磁気センサーを用いて定量し、目に見えない行動の動機に迫る。

本研究で解決すべき問題は、ハキリバチの行動におけるファブール (Fabre) の問いに答えることでもある。

ハキリバチの巣造り行動は、過去約百年余りの間に、4名の行動学者によって詳細に研究されてきた。中でもファブールは、蜂にガラス管の中で巣を造らせ、巣形成の一部始終を記述した。彼の方法は自然状態の行動を観察することでは良い方法だったが、「ハチが空間をどのように認識しているのか？」というメカニズムに関して、未解明の問題を残した。それは、(1)巣造りの行動の各工程において、どの程度細部に至るまでプログラムされた生得的行動であって、それ以外が認識 (cognition) や学習などの高度な行動であるのか？(2)ハチは巣の空間サイズを認識しているように見えるが、その認識方法の実態とは何か？といった問いである。

本研究では、まず上述 (1) の問いに答える為、巣造りの途中で、巣に様々な人為的操作を加え、蜂がどのようにこれを修復しようとするかを、蜂が切る葉のサイズに着目して解析した。次に (2) の問いに答える為、ガラス管内に蜂に巣造りをさせ、その行動をビデオテープで録画し、細かな挙動も残さず解析するという動作解析法というアプローチを用いた。また、巣造り行動の中心である葉切り行動においては、蜂は脚の触覚感覚器や大顎によって葉のサイズを認識するというハーゼンカンプ (Hasenkamp) の提唱した仮説に対し、蜂はむしろ脚の開き (スタンス) によってこれを認識するという仮説を提案した。この両仮説を検証するため、3D 動画解析法を用いて、葉切り行動を細かく解析した。さらに、従来困難とされてきた行動中の電氣的計測の代わりに、超伝導磁気センサー (SQUID) を用いて、巣や葉の空間認識に関わる脚の動作定量を試みた。

4. 研究結果：

(1) 巣に対する操作実験の結果：蜂が形成中の巣に対して、葉を抜き取る、それを元に戻す、巣内空間を縮めるなど、様々な操作を加えた結果、蜂は巣の変化をその都度適切に認識すると同時に、最終的な巣内空間を常に一定のサイズに整えようとするのが解った。即ち、蜂は部品である葉を切る際、予め計測した巣内空間を葉のサイズに合うように形成すること、つまり後者に置換することが明らかになった。このことは同時に、巣造り行動は空間サイズを認識する内部機構をもち、その細部にいたるまで単にプログラム化された生得的行動だけで構成されてはいないことを示す。

(2) 巣内行動の画像解析：蜂が巣内で示す行動をビデオに収録し、その行動パラメータを解析した結果、蜂が巣を出る直前に後退しながら巣の長さを計測することが判明した。また、この時の前脚の歩幅と歩数を積算し、後退距離を求めると、これが切る葉の長さに近似した。これは、蜂が後退距離で巣の長さを計測し、この距離を何らかの方法で葉の長さに置き換えていることに他ならない。

(3) 葉切り行動の画像解析：蜂に一箇所葉を切るように訓練し、その3D画像を撮り、動作解析ソフトを用いて、体軸、関節角、脚の位相などを経時的に解析した結果、主に後脚の肘角度の開き方が、最終的な葉のサイズの決め手になっていること、つまり肘角度が広いと葉のサイズが大きいことが解った。

(4) 葉切り行動に対する操作実験：蜂が葉を切り始めてから、約2秒後(大顎の咀嚼数で約5回目)に、蜂に上から黒い布を貼ったビーカーを被せて遮光したが、葉切り行動は最後まで影響を受けないばかりか、切られた葉のサイズにも影響がなかった。このことから、やはり蜂は視覚によらない方法で葉のサイズを認識していることが確認された。次に、葉に予め小さな窓をくり抜いて、この部分が脚の感覚器や大顎に接触しないようにしたが、同様に行動や葉のサイズに影響はなかった。従って、これらの実験からハーゼンカンプの仮説は否定された。さらに、葉を切っている最中に後脚をピンセットで引っ張る、あるいは葉に切り込みをいれておき、途中で葉の一部を抜き取るなどの方法で、脚の開きを強制的に操作した結果、蜂は確かに後脚の開きによって葉のサイズを認識していることが明らかになった。

(5) 超伝導磁気センサーによる動作解析：動作進行中の蜂に対して、超伝導磁気センサー(SQUID)を用い、主に脚の動きに伴うナノテスラレベルの磁気変化を測定したが、検体自身の動きに起因するノイズを軽減することが殆ど不可能であったため、このアプローチは断念した。代りに、次に示すような神経行動学的手法によって、行動の内部メカニズムを明らかにしていく方法を採用した。

(6) 神経行動学的解析：昆虫の中枢神経による行動解発機構に関する最近の仮説では、3対の脚を制御する胸部神経球が、大まかな運動パターンを発生し、これを脳及び食道下中枢節が行動目標に沿うように調節すると考えられている。胸部神経球が葉切り運動パターンの発生を担い、脳がこれに対して葉切り動作の開始・停止を命じると想定すると、脳に細胞体を持つ下降ニューロン群中に後者の動作を担う命令ニューロンが存在すると考えられる。コバルトリジン染色法によって下降ニューロン群の脳内局在を確認し、これに対して吸引電極刺激を行った結果、触角葉基部に隣接する前脳(proto-cerebrum)の前野部(frontal surface below frons)に細胞体を持つ、下降ニューロンが、この動作に関与している可能性のあることが判明した。しかし、中脚及び後脚と大顎の動きは連動していたが、前脚は静止していたので、動作発現を担うニューロンとしては完

全ではない。今後、細胞内誘導法によって、この点を精査していく必要があると考えられた。

5. 自己評価：

本研究は、ハキリバチが巣の空間を認識し、これを巣の形成に活かしている、という仮説が正しいことを明らかにした。すなわち、蜂はサイズパラメータを認識し、この情報を一時的に保存し、葉切りという別の工程でこれを再生したのである。これは、物体や空間のサイズを客観的に比較認識する、ヒトなどが持つ高度な脳機能に劣らない機構であり、大変有意義な発見であったと考える。研究の手法においては、画像解析法を用いて蜂の動作を正確に解析したことが、後退歩行による巣内空間の計測や、葉切り行動における脚の伸展の重要性などを確認するために適切であった。しかし、超伝導磁気センサーを用いた蜂の動作解析が不可能であると判明したことや、これに代わる電気生理学的解析が未完成であることなど、認識・形成行動の内部メカニズムを明らかにするための方法をさらにレベルアップしていく必要があると感じた。また、蜂はトンネル内の位置をどのように認識するのか？という問いについても、もうすこし時間をかけて研究すべきであったと思う。最後に、外部発表をより意欲的に行うことが必要であったと思う。操作実験をまとめた論文は未だ投稿中である。現在、3D 画像解析の実験結果を論文にまとめている。

6. 研究総括の見解：

本研究は、本領域の目的である“生物の形成と修復”といった問題からいづらか距離のある課題を扱うものだが、研究内容のユニークな点が高く評価され採択された。アドバイザー等の助言や示唆を積極的に生かし意欲的に研究を展開したが、研究環境に加え生活上の制約もあって、研究計画を予定通りに実施することが困難なこともあった。したがって、当初に期待した成果を達成するには至らなかった。今後は、新たな解析法を開発し、ハキリバチの営巣行動の内部メカニズムにアプローチすることを強く望む。

7. 主な論文等：

論文

1. Kim, J.-Y. Regulation of nest material size and number in the leaf-cutter bee, *Megachile tsurugensis*. Behaviour. (投稿中)

ポスター発表

1. Kim, J.-Y. 6th International Congress of Neuroethology. Title: Video analysis of limb coordination in leaf-cutting behavior of *Megachile* spp. Bonn, Germany, 29 August, 2001 (Poster)

招待講演

1. 金宗潤 JISTEC主催ウィンター・インスティテュート韓国大学院生の為の公演
表題：「Entomology: Whence for the Future Technology?」茨城県つくば市JISTEC交流会館、平成15年1月10日
2. 金宗潤 名古屋大学農学部公開セミナー 表題：「ハキリバチの生態と空間認識について」
名古屋大学農学部、平成13年11月29日

研究課題別評価

1. 研究課題名 粘菌を用いた認識と形成の数理解析によるアプローチ

2. 研究者氏名 高松敦子

3. 研究の狙い：

生物系では、細胞内の Ca^{2+} 振動に始まり、神経細胞の周期的発火、心筋細胞の拍動、蛍の周期的発光など、細胞レベルから個体レベルに至るまで、系や階層を超え至る所で振動現象が観察される。これらの現象は、数理的には、非線形型の振動現象として理解されているが、バネや振り子の振動現象（調和振動）との違いは、外から刺激を加えられても振動が停止したり振幅が変化するという点ではなく、速やかに自分の持っていたリズムに回復するという点、つまり、外乱に対する強さを持っている点にある。さらに、振動を発生する同じようなユニット（振動子）が互いに影響を及ぼし合う（相互作用する）と、協調し合いながら同調して振動する（同期現象）。振動子が多数集合し相互作用した系を結合振動子系というが、神経細胞集団、心臓（心筋細胞集団）、蛍集団などに見られる同期現象のメカニズムを説明する数理モデルとして注目されている。結合振動子系の簡単な数理モデルを用いた系による同期現象の理論的解析は非常に進んでいるが、汎用的なモデルであるが故に、実験結果との直接比較ができず、理論による結果に対する実証は困難であった。また、現実の系では、同期現象以外にも系の形や相互作用の様式に依存して、より複雑な振動パターンが観察されるはずである。

本研究では、マイクロ加工という細胞サイズの加工を可能にする技術を用いて、真正粘菌変形体の形を制御し、生きたままの細胞を用いた結合振動子系を構築することが目標であった。真正粘菌変形体は、細胞の厚みなどに非線形型の振動現象が見られ、細胞全体を結合振動子系として考えることができる。また、ニューロンや心筋細胞などと比較して実験系としての取り扱いが容易であるという利点がある。マイクロ加工技術により、粘菌振動子間の相互作用の強さなどを人工的に制御できるので、結合振動子系の汎用型の数理モデルによる結果と直接比較が可能である。この系を用いて、粘菌結合振動子系に見られる振動の時空間パターンを観察し、それらのパターンの真正粘菌における機能について考察する。汎用型の結合振動子系のモデルに着目しているので、得た結果を系や階層を超えた粘菌以外の系にも適用できる可能性があり、従来のドライな数理モデルに比べて、より現実的で、且つ系統的な実験結果を得られることが期待されていた。

4. 研究結果：

生きたままの粘菌細胞を用いた結合振動子系を構築するために、マイクロ加工技術を用いて粘菌細胞の形を自在にパターンニングする技術を確立した。これらの系は、振動子部（丸い部分）と結合部（振動子部をつなぐチャンネル部分）から構成され、振動子部で振動現象を観察し、チャンネル部分の幅で振動子間の相互作用を制御する。

リング状に配置した粘菌結合振動子系では、1つの形状（振動子の配置と相互作用強度を固定した状態）で複数の振動の時空間パターンが観察され、さらに、それらパターン間を自発的に遷移する現象が見いだされた。非線形科学の分野で「カオス的遍歴」として知られた現象に、これは近

い。「カオスの遍歴」であるかどうかを見極めるため、現在、実験データの精緻化を行い、解析中である。「カオスの遍歴」について生物系で系統的に示された例はこれまでになく、この現象の生物学的意義について考察する良いモデル系になると考えられる。

それぞれの振動パターンを、対称系の分岐理論を用いて数学的解析を行った。この理論では、系に幾何学的対称性さえあれば、系を構成する要素の詳細な数理モデルなしに、系全体が示しうる振動パターンのカタログを与えてくれるので、生物系のように数理モデル構築が困難な系に有用である。その結果、予想されたパターンのほぼ全てが観測されていたことがわかった。これは、系統的に制御された生物実験系で初めて実証された結果であり、対称性の分岐理論の有用性を示した。

さらに鎖状に配置した粘菌結合振動子系について、隠れた対称性を持つ振動の時空間パターンについて発見した。対称系の分岐理論による解析では、鎖状振動子系の中心についての軸対称的振動パターンのみが観察されるはずだが、片端から他端への進行する Traveling wave 型のパターンを始め、軸対称だけでは説明が困難なパターンがいくつか観察された。鎖状振動子系の両端を繋ぐ隠れ振動子を1つ配置したモデルを用いれば、これらの全てのパターンをシンプルに説明できることがわかった。これは、振動子系が鎖状に配置されているため、両端の振動子、つまり、境界条件により生成されるものと考えられる。これまでに、結合振動子系における境界条件について、理論的に考察した例は少なく、また、実験結果との対比も行われてきていない。Traveling wave は、ヤツメウナギやヒレを始めとした細長い生き物の神経活動パターンにも見られるが、境界条件を取り入れることにより、これらの系についても理論的考察が可能となるかも知れない。

次に、多重に示す振動パターンの生物としての意義を考察するために、粘菌結合振動子系に入力、つまり、外部刺激を与える方法として、多点温度刺激デバイスを開発した。温度刺激を与えるヒータ/センサーとしては透明抗体であるITO (Indium Tin Oxide) をマイクロパターンニングすることで作成した。ヒータによる加熱領域は粘菌振動子1個分の大きさ(=2mm)であり、また、多点温度をそれぞれに制御できるように設計してあるので、粘菌結合振動子系に複合的な刺激パターンを与えることができる。現在、このシステムを用いて、多重振動パターン間の制御を試みている。粘菌結合振動系への入出力関係を調べることによって、振動パターンの表す生物としての意義を考察できると考えている。

5. 自己評価：

真正粘菌変形体を結合振動子系と捉え、生きた細胞系の構成、相互作用などのパラメータを人工的に制御することにより、これまでコンピュータシミュレーションなど机上の解析だけでは得られなかったより複雑ではあるが系統的な結果を得ることができた。一つの成果は、シンプルな汎用的数理モデルを用いて理論的に予想されてきた結果が、複雑であると思われていた生物系にも適用可能であることを示したことであり(対称系の分岐理論による解析など)、理論家や非線形科学の専門家間で国際的に評価され、専門の教科書(M. Golubitsky and I. Stewart, 2002, The symmetry perspective, Birkhauser)やレビュー論文(I. Kiss and J. L. Hudson, 2003, AIChE Journal, 2234-2241)などに引用された。しかし、一方では、シンプルな数理モデルだけでは、今のところ記述できない現象があることを見いだしている(遷移現象、Traveling wave など)。これらについては、今後より精緻な実験データを取得することにより、新しい数理モデル構築へ向けてのフィードバック

クができるだろう。むしろ、こちらが本研究の本命であり、3年間の研究期間ではその足掛かりを得た段階であり、ここで時間切れとなってしまったことは残念である。問題点は、これまでの研究は真正粘菌変形体のみを対象としてきたが、そこで得られた結果に一般性があるのか、つまり他の系にも適用できるのかという点である。今後の課題として、生物/非生物系を含めて、結果の一般性、汎用性を視野に入れた研究を継続し、生物実験系と数理/理論生物学分野の橋渡しの役割を果たして行きたい。

6. 研究総括の見解：

本研究は「認識と形成」領域のひとつのチャレンジとして採択された。生物体の形成や修復のしくみを解明する手法としての数理解析の有効性が成果として示されることを期待したからである。しかし、アドバイザーや他の研究者の示唆や助言が十分に生かされず、真正粘菌を用いた非線形振動現象の数理解析にとどまり、その意味で現象解析の域を出なかった。非線形科学の領域では評価され得る成果が挙げられたとは言え、本研究課題を敢えて採択したチャレンジの適否は問われて然るべきだと考える。

7. 主な論文等：

原著論文

1. Takamatsu, A., Tanaka, R. and Fujii, T. (2003) "Hidden Symmetry in Chains of Biological Coupled Oscillators", submitted.
2. Takamatsu, A., Yamamoto, T. and Fujii, T. (2003) "Spontaneous Switching of Frequency-locking by Periodic Stimulus in Oscillators of Plasmodium of the True Slime Mold", to appear from BioSystems.
3. Takamatsu, A., Tanaka, R., Yamada, H., Nakagaki, T., Fujii, T. and Endo. (2001) "Spatio-temporal symmetry in rings of coupled biological oscillators of Physarum plasmodium"; Phys. Rev. Lett. 87 078102.

解説等

1. Takamatsu, A., Fujii, T. (2002) "Construction of a living coupled oscillator system of plasmodial slime mold by a microfabricated structure" Chap. 1.2 in Sensors Update Vol. 10, No. 1, 33-46, Wiley-VCH, Weinheim
2. 藤井輝夫, 高松敦子 (2001) マイクロ構造を用いたウェットシステムの構築, 生産研究 (東京大学 生産技術研究所 発行) 53, pp. 24-25.

ほかプロシーディングズ 4 件

口頭発表

1. Takamatsu, A., Yamamoto, T. and Fujii, T. (2003) "Spontaneous switching of frequency-locking by periodic stimulus in oscillators of plasmodium of the true slime mold", 5th international workshop on information processing in cells and tissues. Lausanne, Switzerland.

2. Takamatsu, A. , Tanaka, R. and Fujii, T. (2003) ‘Experimental evidence of hidden symmetry in a chain of coupled biological oscillators with plasmodial slime mold ’; Dynamics Days Arizona, Twenty-Second Annual International Conference, Scottsdale, Arizona, USA
3. Takamatsu, A. and Fujii, T. (2002) ‘Observation of response to stimuli in oscillating cells patterned by microfabricated structure ’, The Sixth International Symposium on Micro Total Analysis System (μ TAS), Nara, Japan.
4. Takamatsu, A., Tanaka, R., Yamamoto, T. and Fujii, T. (2002) ‘Control of Oscillation Patterns in a Symmetric Coupled Biological Oscillator System ’; 7th Experimental Chaos Conference, San Diego, USA.
5. Takamatsu, A. and Fujii, T. (2002) ‘Resonant pattern in a coupled oscillator system of plasmodial slime mold by periodic force of temperature ’, Gordon Research Conference on Oscillations & Instabilities in Chemical Systems, Oxford, UK.
6. Takamatsu, A., Yamamoto, T. and Fujii, T (2001) ‘An integrated cell observation system for plasmodial slime mold ’, International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2001), Kawasaki, Japan.
7. Takamatsu, A. and Fujii, T. (2001) ‘Biological coupled oscillator system in the plasmodial slime mold ’; 21st IUPAP International Conference on Statistical Physics, Cancun, Mexico.

ほか国内口頭発表 7 件(内招待講演 1 件)

研究課題別評価

1. 研究課題名 嗅覚神経回路の形成と再生の分子基盤

2. 研究者氏名 坪井昭夫

3. 研究の狙い：

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。一般に、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微妙な相違として識別されると考えられている。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、個々の嗅細胞が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、同じ種類の受容体を発現する嗅細胞が嗅球上の特定の糸球に対して位置特異的に軸索投射すると云う二つの基本ルールによって支えられている。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、嗅球における糸球マップ(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、匂い地図の構築原理の解明を、延いては、嗅覚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。

4. 研究結果：

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。本研究では先ず、マウス嗅覚受容体遺伝子MOR28クラスター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に局在し、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、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、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。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。この観察は、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。

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系球に投射しているが、本研究では更に、MOR28系球近傍にどのよう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対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系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、どの様なパラメータが、MOR28系球近傍への投射に関与しているのかを知る為、近傍の系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(ゾーン4)が、嗅覚受容体の発現に依存してサブゾーンに細分化されること、及び、嗅上皮での嗅覚受容体の発現サブゾーンが、嗅球での投射サブゾーンに対応して、大まかな投射位置を規定していることが示唆された。

5. 自己評価 :

本研究により、これ迄、嗅上皮において大まかに四つに区画化されていたゾーン構造がサブゾーンに細分化され、更に、これらサブゾーンの背腹軸に沿った連続した重なり合いにより嗅上皮が形成されていると推定された。また特定の嗅覚受容体を発現する嗅細胞は、嗅上皮のサブゾーン内で軸索を伸展し、嗅球上で対応するサブゾーン内の系球に軸索を収斂していることが示された。このような現象は、ニワトリの視覚系における網膜?視蓋のトポグラフィックな投射に類似しており大変興味深い。しかしながら本研究では、嗅細胞がどの様にして嗅上皮から嗅球へsubzone-to-subzone対応によって投射するのか、並びに、嗅球上にsubzone-to-subzone対応によって軸索を伸展する嗅細胞が、どの様にしてサブゾーン内の特定の系球に投射するのかと云うメカニズムの解明には至らなかった。そこで今後、嗅球において近接した系球に対応する嗅覚受容体群に関して、その嗅上皮での発現時期、一次構造、共発現する軸索ガイダンス分子などを解析することにより、これらの分子機構を明らかにしたいと考えている。これ迄他のグループにより、嗅覚受容体分子が嗅細胞の嗅球への軸索投射に instructive な役割を果たしていることは示されているが、その実体は未だ明らかにされていない。本研究を発展させることにより、嗅球における匂い地図の構築に関する新たなlogicが明らかになれば、神経系における多様性の識別に一つのブレークスルーを生むと期待される。

6. 研究総括の見解 :

先駆的で国際的注目度の極めて高い課題に意欲的に挑戦した。中枢神経系の嗅覚神経回路形成と再生の機構を“匂い地図の構築原理”といった視点から探究し、嗅上皮で区画化されていたゾーン構造は嗅覚受容体の発現に依存してサブゾーンに細分化され、当該サブゾーンが大略脳内の嗅球への投射位置を規定していることを明らかにした。この成果そのものは非常に重要であり高く評価できる。しかし、本研究者の独自性を十分担保しうる発表論文がないので、個人研究としての主体性がやや稀薄である点に意を注ぎつつ、研究を一層発展させることを強く望む。

7. 主な論文等 :

原著論文

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. Tsuboi, A., Nishizumi, H., Miyazaki, T., Kato, H., Oroku, K., Nagawa, F. and Sakano, H.: The murine olfactory sensory map: implication for a sub-areal correlation between the olfactory epithelium and bulb upon the axonal projection of olfactory sensory neurons. (submitted)

総説

1. 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)

口頭発表

1. 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)
2. 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, July 1-6 (2001)
3. 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)
4. Tsuboi, A., Yoshihara, S., Nagawa, F. and Sakano, H.: 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)
5. Tsuboi, A., Miyazaki, T., Nishizumi, H. and Sakano, H.: Expression and projection for murine Class I odorant receptors., 第 26 回日本神経科学大会 (名古屋)7 月 22? 25 日 (2003)

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, 文科省科学研究費 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)

特許

1. 小早川高、坂野仁、林令子、坪井昭夫 嗅覚情報の受容伝達に関わるタンパク質 SRO 特願 2002-130392 号 5月22日 (2002) (出願中)

研究課題別評価

1. 研究課題名 鳥類中枢神経系の可塑的な形態形成

2. 研究者氏名 浜崎浩子

3. 研究の狙い：

われわれ高等動物にとって、記憶し学習することは生きていくために大変重要なことである。記憶や学習は、脳の神経回路の働きが可塑的に変化していくことで可能となる。このような神経回路の変化はいつ、どのようにしておこるのだろうか。この変化をとらえるために、鳥類を使って研究をおこなった。ガン、カモなどの鳥類においては、「刷り込み」といって孵化したばかりの雛が親鳥の姿や声を覚えて親の後をついていくようになる一つの記憶・学習行動が有名である。ニワトリのヒヨコに親鳥の代わりに図形を覚えさせることで刷り込み行動を実験室で再現し、この行動をささえる神経系の成り立ちについて解剖学的・生理学的に調べてその一端を明らかにすることが本研究のめざすところである。

4. 研究結果：

ヒヨコは液晶画面に映した図形に刷り込まれる

コンピュータ制御によって液晶画面に映した図形を回転式のかごにいったヒヨコに呈示することにより、ヒヨコはその図形や色を覚えて、その後、同じ図形やその図形と同じ色に対して走り寄り、記憶学習行動のひとつである刷り込み行動を見せた。この行動を回転かごの回転方向と回転数によって評価することができた。これによって、液晶画面に映す図形を自由に変化させることで、刷り込み行動の刺激となる対象物の特徴を調べることも可能になった。

視覚情報を処理する脳の領域（ヴルストと外線条体）

刷り込み行動における対象の認識では、視覚系が重要である。鳥類には2種類の視覚系があり、それぞれの中核はヴルストと外線条体と呼ばれる終脳の部位である。それぞれが刷り込み行動においてどのような役割を担っているかについて、各部位の破壊を行うことによって調べた。その結果外線条体は、刷り込み学習後の刷り込みに用いた図形とそれとは異なる図形の識別に重要であり、この部分を破壊すると刷り込み行動の発現がなくなることが明らかとなった。また、ヴルストの破壊では、学習後の刷り込み行動の発現には影響を与えないが、刷り込みの学習課程に障害がおこり学習不能となることが示唆された。

ヴルストでは色や図形に対して違った反応が見られる

ヴルストに注目し、ヒヨコに色の付いた図形を見せたときにどのような神経活動が見られるかについて、光学的神経活動イメージング法を用いて調べた。ヴルストから、視神経刺激にตอบสนองした神経活動が記録できたのに続き、動く図形や、色に対する反応が得られた。また、輝度が同じだが異なる色に対して反応する部位が違うことが明らかになった。電位感受性色素を用いたイメージングでも同様な反応が得られた。免疫組織化学により、ヴルストにはグルタミン酸受容体が存在し、また、グルタミン酸受容体の阻害剤によってヴルストからの神経応答は見られなくなることから、この反応はグルタミン酸受容体を介した反応であることが確認された。

ヴルストは胚時期の脳の一部から発生する

ニワトリ胚とウズラ胚の間で前脳背側部を細分化して移植し、移植部分の発生運命をたどる実験によって、刷り込み行動に重要な領域であるヴルスHは前脳背側部の一部から分化してくることが明らかとなった。これは、脳の発生において胚時期の前脳の領域は将来どこに分化するかが決まっているということを意味している。

神経回路の発達を調べるツールとしてのトランスジェニックウズラの誕生

神経細胞の軸索やその作り出す回路を可視化することができるWGA (コムギ胚芽凝集素) とEGFP (緑色蛍光色素) を組み込んだベクターを用いて、名古屋大学上平先生との共同研究によってトランスジェニックウズラの作製を試みた。現在までに、第2世代の2羽において、血球でのトランスジーンが存在が確認された。

5. 自己評価 :

記憶・学習に伴う行動の変化について、その基盤となる可塑的な神経系の発達について個体と分子・細胞レベルで研究を行うことはかねてからの希望であった。さきがけ研究に参加する機会を得て、各方面からの支持のもとにこの希望がかなえられたことは大変ありがたいことであり、貴重な3年間であった。しかし、論文という形で成果まで持っていけなかったことは実力不足であることを示している。刷り込み行動における視覚中枢であるヴルストの役割 (上記研究結果)

)については、論文を準備しているところである。

しかし、新しいことをいろいろと試していく中で様々な新しい発見があり、私自身にとってはいくつかの宝物を手に入れた感がある。ヴルスHにおいて、異なる色に対して違った神経活動の反応パターンをもつことは初の発見であり、これは哺乳類における皮質視覚野とある程度の類似性を示すものである。特に齧歯類は色覚の研究に不向きであるのに対して、ニワトリ・ウズラ胚では色覚が発達しているうえに遺伝子導入や移植が可能なので、色覚の発達・記憶の機序の研究に関する良いモデルとなることを示している。また、発生初期終脳の発生運命についての知見が得られたことは、初期終脳の形態形成といった組織レベルでの可塑的発達を調べることを可能とし、これは脳発生の研究を発展させる上で重要であると考えられる。

神経系にマーカーを入れたトランスジェニックウズラの系統の樹立までできなかったことは大変残念であった。さらなる努力を積み重ね、ぜひこのウズラの実用化にこぎつけたいと考えている。

6. 研究総括の見解 :

本研究はさきがけ研究にふさわしく、将来性がありかつ非常に重要である。ユニークな実験系を構築し、研究計画を推進する過程で適切な解析システムを確立した。それによりニワトリの刷り込み行動の成立について、予備的とはいえ、新しい知見を得たことは評価に値する。しかし、研究を展開する上での焦点の絞込みが足りなかったために、3年間の成果として高く評価しうるまでには至らなかった。今後、成果の発表は然るべき専門学術誌を通じて行うことに努めると共に、より一層の努力を期待したい。

7. 主な論文等 :

総説

1. 浜崎浩子、前川文彦 (2002), 行動神経科学の研究と鳥類モデル, Sophia Life Science Bulletin, 21:47-52.

学会発表

1. 前川文彦、佐藤勝重、田中光一、浜崎浩子 (2003), In vivo optical imaging of the activity of visual wulst: a new tool for surveying visual information processing in aves., 第26回日本神経科学大会、名古屋, Neurosci. Res. Supple., 46: S72 (P1-A-077).
2. 浜崎浩子、前川文彦(2002), An attempt to analyze neural basis for the imprinting behavior in birds., 鳥類における刷り込み行動の神経基盤解析の試み, 第25回日本神経科学大会、東京, Neurosci. Res. Supple., 26: S46 (I-F-247).

研究課題別評価

1. 研究課題名 : 多様な中枢神経系のプロトカドヘリンによる形態形成の制御

2. 研究者氏名 : 平野 伸二

3. 研究の狙い :

高等動物の中枢神経系は、多様に機能分化した神経細胞が複雑な神経回路を形成している。このような神経系の形成には細胞間相互作用が非常に重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子メカニズムについては未だ十分解明されていない。プロトカドヘリンはカドヘリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、1)非常に多くの種類があること、2)その多くが神経系に特異的に発現していること、3)サブファミリーの違いにより細胞内領域のアミノ酸配列が全く異なることなどの特徴がある。従って、プロトカドヘリンは神経系で様々なシグナル伝達経路をともなった複雑な細胞間相互作用に関与している可能性が高く、私はこの一連のプロトカドヘリン分子群が神経回路形成など神経系形成の鍵を握る分子であると考えている。

本研究では、プロトカドヘリンの神経回路形成における役割の解明を目的とし、私が発見したOLプロトカドヘリンを中心に1)ゲノム構造の、2)プロトカドヘリンの発現分布、3)細胞内局在、4)シグナル伝達系、5)生体内での機能などについて3年間にわたり解析を行った。

4. 研究結果 :

(1)OLプロトカドヘリンのゲノム構造

既知のプロトカドヘリンの中には遺伝子群をつくっているものが知られており、OLプロトカドヘリン遺伝子が一つか、あるいは遺伝子クラスターをつくっているかはその機能を考えるうえで大きな問題である。そこで、BACクローンを単離し、近傍には他のプロトカドヘリンの遺伝子はないことを確認した。既に行っていた染色体 *in situ* ハイブリダイゼーションの結果とあわせて考えるとOLプロトカドヘリン遺伝子は一つであることが分かった。また、エクソン-イントロンの構造を決定したところ、他のプロトカドヘリンと同じく、第1エクソンが分子のほとんどをカバーしており、4つの小さなエクソンが付加されて分子ができあがることが分かった。これらの情報をもとに第1エクソンのほとんどを欠失するノックアウトマウスの作製を(4)で行った。

(2)プロトカドヘリンの発現分布

プロトカドヘリンの機能を推測するため、その分布を知る必要がある。まずマウスの生後の脳におけるOLプロトカドヘリンタンパクの分布を詳細に解析した。その結果、このタンパク質が様々な神経核に区画をつくって分布すること、さらに嗅覚系、オリブ核、小脳皮質投射系、視覚系など特定の神経回路の一部に沿って分布することが明らかになった。また、ドイツのレディス博士らと共同研究でニワトリOLプロトカドヘリンについて分布を調べたところ、発生後期の脳では、視覚系の神経回路に沿って分布が見られた。また、ニワトリ、マウスとも発生初期の神経系ではOLプロトカドヘリン陽性の線維が顕著に見られた。これらのことは、この分子が神経回路形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆していた。

一方、別のファミリーであるプロトカドヘリン2Aの発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより調

べた。その結果、プルキンエ細胞や視覚系の一部の神経核、さらに上衣細胞の一部に特異的な発現が見られることが明らかになった。

(3) 細胞内局在

OL プロトカドヘリンの機能を知るために細胞内局在を検討した。マウス17日胚の海馬台の初代培養1週間目では樹状突起にもあるが、軸索などでは点状に分布していた。特に成長円錐に濃縮していることも観察された。従って、OL プロトカドヘリンは、軸索の走行や標的の認識に関与することにより、神経回路形成に関与する可能性が考えられた。さらに2週間ほど培養すると一部はシナプスにあるらしいことがわかった。

一方、副嗅球のグロメルラスでは、生後3週間を経ても発現が強く続くという特殊な発現パターンを示す。免疫電顕により局在を調べると、ミエリン化が起こる時に一過性に軸索のまわりに局在が見られた。この観察は、この分子がミエリン化の初期の細胞間相互作用に機能している可能性を示唆している。

(4) シグナル伝達機構について

OL プロトカドヘリンのシグナル伝達機構を明らかにするために結合分子の同定を試みた。既存の抗体による免疫沈降法やイースト2ハイブリッドシステムなど試みたが、候補となるものは得られなかった。GST プルダウン法では、細胞内領域に結合する分子の候補として ROCK が得られたが、培養細胞内での結合は確認できなかった。つぎに細胞外領域に FLAG タグをつけた分子を培養細胞に導入してタグ抗体により免疫沈降したところ、4つのバンドが検出された。今後これらの4つの成分の解析をすすめる必要があるが、一方で再度免疫沈降できる抗体を作製するなどの見直しが必要である。

(5) OL プロトカドヘリンの生体内での役割

OL プロトカドヘリンの生体内での役割を明らかにするために OL プロトカドヘリン遺伝子を欠損するノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスはレキシコンジェネミック社から得た。このマウスは見かけ上大きな異常は無く生まれてくるが、やがて成長不良となり数週間で死んだ。発生期の脳組織を調べると、末梢神経系のパターンには影響がなかったが、中枢神経系の皮質脊髄路、視床皮質路、皮質視床路、黒質線状体経路など大脳基底核付近の神経回路に走行異常などが見られることが明らかになった。このことから OL プロトカドヘリンはこれらの神経回路形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

本研究の成果は、OL プロトカドヘリンがいくつかの神経回路の形成に必須であることを示した点である。このプロトカドヘリンが形成に関与する皮質脊髄路は手足の随意運動を支配しておりまたそのほかの神経回路も乳児の発達に重要な働きをしている。今のところ遺伝病などとの関連は見つかっていないが、今回の発見は胎児から乳児期の神経発達やその障害を理解するうえで医学的にも重要な知見になると考えられる。

5. 自己評価：

本研究では、プロトカドヘリンという分子の生体内での役割について明らかにすることを目標とし、そのためにいくつかの事柄を行った。結合分子の同定ができなかったなど不十分な点も多かったが、分布の解析、ノックアウトマウスでの解析は興味深い結果を得た。これまで知られている細胞接着分子の中でこれほど顕著に神経回路形成に異常がでるものは少なく、本研究の価値は高い。個別の解析では以下の通りである。

(1)ゲノムの構造については、予定通り済んだが、遺伝子が1つであったためそれ以上の解析は必要がなかった。構造上の新規な発見はなかったが、ノックアウトマウスの作製などの基礎的なデータとして結果を利用した。達成度60%。

(2)分布については、マウス、ニワトリについて詳細に検討することができた。神経回路の一部に沿って分布していることを記載したのは地味ではあるが重要である。発生期の分布について発表には至っていないが、ニワトリについては今後小さな論文にまとめたいと考えている。その他のプロトカドヘリンの発現分布については、プロトカドヘリン2Aについての発現パターンを記載した。達成度85%。

(3)細胞内局在については、蛍光顕微鏡レベルではその概要がわかったが、シナプスとの関係など最終的なつめはまだ不十分である。また、既存の抗体の性質により免疫電顕が十分にできなかった。達成度60%。

(4)シグナル伝達機構の解析については、結合分子の同定ができず不十分な結果に終わった。再度抗体を作りなおすなど抜本的なやり直しが必要であると考えられる。達成度10%。

(5)ノックアウトマウスの解析については、予定より時間がかかっていることがマイナス点だが、非常に興味深い表現型が観察された。本研究の目的を遂行するにはまだOLプロトカドヘリンが神経回路形成にどのように関わっているかを分子レベルで明らかにする必要があり、今後の解析が期待される。達成度70%。

以上のことを総合的に自己評価をすると50%程度の達成度である。本研究課題については期間終了後も引き続き行っていく予定である。ノックアウトマウスの解析についてはなるべく早く完了させるとともに、シグナル伝達経路の解明など達成できなかった点についても追求をしていきたいと考えている。

6. 研究総括の見解：

神経系形成におけるプロトカドヘリンの役割にアプローチするのが本研究の目的であった。プロトカドヘリンは本研究者のオリジナルな研究対象であり、研究課題そのものの意義と重要性は大きい。

KOマウスの解析に時間を要したこともあって解析はOLプロトカドヘリンに終始したが、OLプロトカドヘリンについては十分な成果を挙げた。課題は個人研究の域を超えるものであり、3年間の

研究としては目的を達成し期待通りの成果を得たと評価でき、今後の発展が十分期待できる。

7. 主な論文等：

主な論文

1. Hirano, S., Wang, X., and Suzuki, S.T. Restricted expression of protocadherin 2A in the developing mouse brain. *Molecular Brain Res.* 98, 119-123, 2002 .
2. Redies C, Kovjanic D, Heyers D, Medina L, Hirano S, Suzuki ST, Puelles L. Patch/matrix patterns of gray matter differentiation in the telencephalon of chicken and mouse. *Brain Res Bull.* 57(3-4):489-493, 2002.
3. Aoki, E., Kimura, R., Suzuki, S.T., Hirano, S. Distribution of OL-protocadherin protein in correlation with specific neural compartments and local circuits in the postnatal mouse brain. *Neuroscience.* 117(3):593-614, 2003.
4. Hirano, S., Suzuki, S.T., Redies, C. The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci.* 8:d306-355, 2003
5. Muller, K., Hirano, S., Puelles, L., Redies, C. OL-Protocadherin Expression in the Visual System of the Chicken Embryo. *J. Comp. Neurol.* In press.

講演

1. 2001年 10月 三菱化学生命化学研究所セミナー

その他

1. 青木英子、平野伸二、鈴木信太郎、*Neuro 2001* 第24日本神経科、第44回日本神経科学合同大会 要旨集40巻275ページ、2001年
2. 青木英子、平野伸二、鈴木信太郎、2002年 第25日本神経科学大会 要旨集40巻200ページ、2002年

研究課題別評価

1. 研究課題名 形態形成時の受容体による位置情報の提示機構

2. 研究者氏名 平本 正輝

3. 研究の狙い：

生物の形を作るには、発生過程において個々の細胞の位置や形態を決めるための道しるべが必要である。精密な神経回路も、道しるべ分子により形成される。しかしどの様な方法で、どの様に道しるべ分子を配置する事で精巧な神経回路を作るのかについてはまだ確立した概念すらない。

分泌型の分子は、「化学走性仮説」で提唱された様式で軸索誘導を行なうと考えられていた。しかし私は新たな軸索ガイダンスメカニズム (Capture/relocation system) を発見し、化学走性仮説は間違っており、このメカニズムが本質ではないかと考えた。そこで次の2点を調べる必要があると考えた。

1. Capture/relocation system は、私がたまたま注目していた軸索誘導でのみ使われているものであり、一般的でないものかもしれない。しかしこの解析はこれまでの分泌性道しるべ分子に注目した組織学的研究の中で最も精度が高いものであり、Capture/Relocation system は分泌性道しるべ分子の本当の作用メカニズムであり、化学走性仮説は間違っているとも考えられる。そこでこれまで知られている有名な現象との関係を明らかにし、その一般性を検討する。

2. もし、「化学走性仮説」が間違っており、分泌性道しるべ分子の濃度勾配が位置や場所を知らせるのでないならば、何がこれらを決めるのだろうか明らかにする。

4. 研究結果：

成果1：roundaboutの表現型の本当の原因を解明

ショウジョウバエや脊椎動物の正中線からは SLIT という反発性の分泌分子が分泌されている。神経線維は ROBO という受容体でこの分子を認識する。ショウジョウバエでは ROBO をコードする遺伝子の変異体は本来真っ直ぐのびる縦走神経が正中線へ引き寄せられたかの様に曲がる。この表現型は、SLIT が反発性の濃度勾配を形成して、縦走神経を正中線に近づかせない様にしていると解釈されてきた。しかし我々は、Capture/Relocation system に基づくネトリンと Frazzled の寄与を考慮に入れこの現象を解析したところ、このモデルは間違っており新しいメカニズムがある事が明らかになった。この発見はこれまで化学走性 (反発) 現象と考えられていた証拠を覆すだけでなく、ネトリンによる長距離作用が Capture/Relocation system を介する事の一般性を拡大するものである。

成果2：軸索内局在機構が細かな位置情報を提供する事を発見

中枢神経の縦走神経束は medio-lateral 方向にいくつかの領域に分かれている。Slit には ROBO 以外に、同じファミリーに属する ROBO-2, ROBO-3 という受容体があるが、縦走神経はこれらのうちのどの ROBO-n を発現するかで走行する領域が決まる。この現象も化学走性仮説で説明されており (図 3 左)、Slit は正中線をピークとする濃度勾配を作り、ROBO-2,

ROBO-3 は Slit の反発性濃度勾配に対する感度が異なると考えられている。しかし次の事実が明らかになった。

1. 横行神経束の一部のセグメントにROBO-3が局在し、それと直行して走る縦走神経に作用し medio-lateralの位置を決めている。
2. さらに、ROBO-2を発現する軸索同士は誘引しあうが、ROBO-2とROBO-3を発現する軸索は反発しあう
3. 軸索は細胞自律的にコンパートメントを形成し、ROBO 分子を軸索の一部に配置する能力がある。

成果3： 反発性信号を伝える受容体 'Unc-5' がネトリンを脱局在させる事の発見

ネトリンの局在に異常を示す変異体の同定

ネトリンの受容体には Frazzled の他にも UNC-5 と呼ばれるものがあり、これはネトリンを反発性分子として認識する。今回 UNC-5 は細胞外ドメインの作用により、Frazzled によるネトリンの relocation 能力をキャンセルする性質を発見した。Capture/Relocation system の存在とこの事実は、分泌性分子は電波塔から出る電波の様に位置を知らせるのではなく、ダイナミックに位置を変えてめまぐるしく変化する軸索パターン形成に対応していると考えられる。この様にダイナミックな制御をするには、他にも様々な遺伝子が働いていると考えられたので、ネトリンの分布の制御に異常が起こる変異体を探す事により、その様な分子の探索を行なっている。これまで3つのカテゴリーに分類される6系統の候補を得た。(1.ネトリンが発現細胞以外の場所では検出されない:4系統 2. "1"に加え、ネトリン発現細胞内での分布に異常がある:1系統 3.ネトリンが本来局在しない場所に分布する:1系統)。今後原因遺伝子を同定する事により、そのメカニズムに迫る。

5.自己評価：

PRESTO をビッグプロジェクトと誤解し、頭の中にあった事全てを実行しようとしたが、さきかけ終了段階で中途半端になってしまった。今後は本質を見据えて、テーマを取捨選択し効率の良い研究を行なえる様にしたい。しかし、色々手を出したおかげで変異体を同定したり新たな現象を発見するなど、将来の研究の足がかりを多数得ることができた。

3年目からはテーマ1(成果1)に集中し、2004年1月に論文を投稿できる段階になった。この発見は軸索ガイダンスの研究者には驚かれる事が多かった為、データを追加してより完成度の高い論文に仕上げの事に変更した。結果として当初の予定よりかなり遅くなってしまったが、その分完成度の高い論文になったと思う。さきかけ期間内に論文を発表する事ができなかったのは残念であるが、これを挽回する論文としたい。テーマ1の研究は、他の研究者に対する情報の発信という意味合いが強い。私が発見した Capture/relocation system は例外的なメカニズムと認識されているが、今回の論文で多くの研究者との繋がりを示す事になる。

6.研究総括の見解：

神経軸索誘導について、ガイダンスの仕組みが働いていることを見出し、分泌性の道しるべ分子によって精密な神経回路が形成されるという新規仮説を提唱している。非常に頭脳的に研究を展開し、豊富なデータを蓄積したので今後の発展に大きな期待がもてる。しかし、論文発表が稀少なので、得られたデータを着実に公表しつつ、目標に積極的に肉迫して欲しい。

7. 主な論文等：

出版物

1. パターニングにおける受容体の第二の機能, Capture/Relocation system と化学走性仮説, 細胞工学 2002 年 6 月 22 日 第 20 巻・第 7 号 P1030-P1039

口頭発表 招待講演

1. 2000.12.07 受容体による位置情報の提示機構 第 23 回 日本分子生物学会年会
2. 2001.01.09 位置情報の新たなしくみ (招待講演) 工業技術院神経学セミナー
3. 2001.07.02A new model on positional information : receptors as presenter of instructive ligands. 14th International Congress of Developmental Biology
4. 2001.12.4-10 :Amersham Bioscience & Science Prize for Young Scientists 2001 (受賞講演)

研究課題別評価

1. 研究課題名 細胞系譜マッピングによる哺乳類の胚軸形成機構の解析

2. 研究者氏名 藤森俊彦

3. 研究の狙い：

脊椎動物の体には少なくとも前後、背腹、左右の3つの軸を設定することができる。これらの体軸は、発生の非常に初期に決定される。特にほ乳類において軸形成がどのようにして始まるかを明らかにしたいと考えた。他の脊椎動物では発生中の胚を直接観察する事が容易であることから受精直後からどのように胚軸が決まるかが明らかにされてきた。ほ乳類では胚発生は卵管および子宮の中で進み、胚を生きたままに観察する事は容易ではないが、最近のマウスを用いた研究から、軸形成機構については多くの事が明らかになりつつある。3つの軸のうち、最初に能動的に決められるのは前後軸であると考えられ、形態的に胚軸の前後が明瞭になるステージから発生時期をさかのぼる方法での研究がいくつかのグループにより行われてきている。その結果、形態的にはまだ胚軸が明確でない受精後5.5日目に着床部分からもっとも遠位にある内胚葉(visceral endoderm)で Cer-1 などのマーカーとなる遺伝子の発現が見られ、この細胞が移動して将来の前側になることが示されている。さらに発生時期をさかのぼった着床の直後は、技術的にもアプローチが難しい時期であり、形態的指標や有用な分子マーカーも存在せず、多くの問題が未解決である。

本研究においては、胚の細胞を標識し、2細胞期から前後軸の明瞭な7日目胚までの連続する細胞系譜の詳細なマッピングを行い、いつどこで胚の中に非対称性が現れ、それが胚軸にどう反映されるかを探ることを目標とした。これにより、現在理解されている所までのギャップを埋め、軸が最初に方向づけされる段階で機能している分子を同定する為の基礎的情報を獲得し、軸形成のメカニズム解明へ一歩進むことを本研究の目的とした。

ほ乳類胚の持つ調節性は明らかである。キメラマウスを作製する実験などで見られる様に、着床前の内部細胞塊の細胞は様々な状況に応じて運命を変更する事が可能で、前後軸が決定されているとは言えない。しかし、これはあくまでも緊急時に発動される調節メカニズムを含んでおり、本来の発生はどのようなプログラムで進められているか、胚がどの程度までモザイク的な発生を見せるか、胚の細胞間での違いがどう現れてくるのかを別の問題として問う点にも意義がある。そこで、できるだけ正常な発生に近い状態のもとで、胚の軸がどのように決められて行くかを検討することを旨とした。

4. 研究結果：

a) Cre-loxP システムを用いた4細胞期までの細胞の標識とその細胞系譜の解析

従来までの色素などを用いた細胞の標識法に比べ、Cre レコンビナーゼを用いたゲノム上の組み換えによる細胞の標識法は、不可逆的であることや標識のシグナルが薄まってしまわないなどのメリットがある。CAG-CAT-Z マウスをレポーターとして用い、特定の割球の核に Cre 発現ベクターを注入して細胞を標識した。4細胞期までの胚の中で一つの割球をランダムに選び標識し、その割球に由来する細胞が8.5日目胚の中でどんな存在様式を示すか調べた。その結果、2細胞

期の割球間には、将来の発生運命に関して明瞭な差はみられないこと、4細胞期になると胚体外外胚葉と、それ以外の組織への分化運命の方向付けが始まるが、依然将来の体軸に関しては性質の差はみられないことが明らかになった。また、胚の中のどの細胞層においても、標識された細胞と、されていない細胞がランダムに混ざり合っていることから発生中に胚の中で大幅な細胞の配置換えがおきることが分かった。2細胞期、あるいは4細胞期に標識した胚を胚盤胞の時期に解析すると、標識細胞がまとまって存在していることから細胞の配置換えは着床後におこると考えられた。これらの結果から、細胞の配置換えが着床後に胚の中でおき、胚軸の方向付けもされることが予想された。

b)胚を in vitro で培養して、細胞の挙動を連続的に解析する手法の開発

胚の中の特定の細胞を標識し、その子孫の挙動を解析する方法にはいくつかの難点がある為、胚の中の全ての細胞を可視化して連続して観察する手法を開発することにした。まず、胚を in vitro で培養する技術の開発を行った。受精後着床以前までの約4日間については、顕微鏡上のCO₂ インキュベーターで胚を培養することが可能となった。着床後については、過去に成功した報告に基づいて実験を行っているが、容易に入手できる材料を使って高効率に発生が進められるよう更に技術を改良中である。胚の中の個々の細胞を可視化する為に、核に移行させるシグナルと融合した蛍光タンパク質 GFP を全ての細胞で発現するトランスジェニックマウスを作製した。まず、SV40の核移行シグナルを付加したGFPをCAGプロモーターの下流で発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを使って条件設定を行い、胚を安定に培養して3次元画像を連続的に取得するタイムラプスシステムを完成した。更に核分裂の際にGFPのシグナルが失われないヒストンに融合したGFPを発現するマウスを作製した。

c)胚盤胞での胚軸と卵割期の割球との関連の解析

卵割期から軸の見られる時期までの連続的な理解が必要であると考え、まずは培養法を確立した

胚盤胞までの時期を解析した。胚盤胞においては、過渡的な軸ではあるが将来胚に寄与するICM(内部細胞塊)が存在する側(Embryonic側)としない側(Abembryonic側)という軸を設定できる。胚が動かないようにアルギン酸ゲルの中に包埋して発生させ、第一卵割面とE-Ab軸との間の角度を調べた。その結果、この角度にばらつきはあるものの、多くの胚で垂直に近い関連がみられた。マウスでは、第2卵割以降細胞の分裂は同調してはおきない。次に、タイムラプス観察によって、細胞の分裂パターンを解析した。その結果細胞の分裂パターンはいくつかに分類され、必ずしも決まったパターンをとらないことが明らかになった。更に、2細胞期からの卵割の順と、胚盤胞でのE-Ab軸との関連を調べた所、ほぼランダムであることが判明した。これらの結果をまとめると、第一卵割面と胚盤胞での軸との間には関連が見られるが、2細胞期の2つの割球の間の性質の差は明瞭ではないことが示唆された。

今後はこれまでに開発したシステムを用いて、さらに詳細に第一卵割から、軸形成の時期までの連続的な細胞系譜の解析を行い、軸形成機構を明らかにすることができると考えている。

5.自己評価：

この三年間を通して、研究計画に基づいて必ずしも速いペースではないが、確実に研究は進められたと考えている。細胞系譜から一通り軸形成機構解析を終了する事を研究開始時には目標として設定したが、残念ながら最終的な目標は達成出来なかった。しかし、この期間を通して、着

床以降に胚の中でダイナミックな細胞の配置換えがおきる事を明確に実験的に示すことができた事は意義がある。また、哺乳類胚は非常に高い調節能を有していることは周知の事実であるが、正常発生においてもこの調節能を利用していることが明らかにできた事も意味が大きい。これまでに準備してきた細胞系譜の追跡のシステムはほぼ実用段階にきており、今後実際に胚の中での細胞の挙動を詳細に解析することができると考えられ、今後本研究を発展した研究を続ける必要がある。以上のように今後の発展性も考慮に入れると、これまでの3年間の研究は有意義であったとすることができる。

6. 研究総括の見解：

哺乳動物では未踏であり極めて困難な課題に挑もうとする非常に意欲的な研究である。マウスを材料として独創的な実験系を確立し、個体発生の本質的問題に真正面から取り組み粘り強く研究を展開した。その結果、哺乳類では、受精直後はもとより卵割初期過程では非常に融通性が高く体軸は決定されていないこと、また着床以降に胚体内でダイナミックな細胞の配置換えが起ることを実証した。一部の目的は未達成ではあるが、成果は今後の飛躍的発展を期待させるものとして高く評価できる。

7. 主な論文等：

主な論文

1. Toshihiko Fujimori, Yoko Kurotaki, Jun-ichi Miyazaki and Yo-ichi Nabeshima. , Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos., Development 130, 5113-5122 (2003).
2. 動物発生工学 発生のプログラム、岩倉洋一郎他編、p50-69、朝倉書店 2002

特許

1. 電気注入法を用いた動物細胞への細胞内導入物質の導入方法およびその装置、
発明者 藤森俊彦、特許出願人 科学技術振興事業団 沖村憲樹、
出願年月日 :平成14年7月9日、出願番号 :特願2002-200223

研究課題別評価

1. 研究課題名 神経細胞の軸索成長の基本メカニズム

2. 研究者氏名 湯浅(河田) 純一

3. 研究の狙い：

多様な様式をとりながらも高度に秩序立てられた神経回路網がどのようにして形成されるのか、その基本原理を解明することは神経発生学の主要命題と考えられる。神経回路のおおまかな枠組みを作り上げる過程で重要な役割を果たしているのが軸索先端部の成長円錐であるが、種々の細胞外シグナルに応答しながらその将来の進行方向がどのようにして決定されるのかに関しては、いまだ不明な点が多い。本研究は、semaphorin シグナル伝達分子として同定された細胞内タンパク質 CRMP を成長円錐舵取り機構の主要コンポーネントと想定し、その機能解析を通して、軸索成長、ひいては神経回路形成の基本原理に迫ることを目標とした。

4. 研究結果：

まず、現在知られている5つのメンバーのうち CRMP 1 - 4について、既知のものとは N 末端領域が異なるバリエーションが存在することを明らかにした。ゲノム構造解析を行い、サブタイプ特異的なエクソンの順序に従って、新規バリエーション群を A タイプ (CRMP-As) 既知のものを B タイプ (CRMP-Bs) と命名した。興味深いことに、CRMP-As が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。

発生期において最も普遍的に発現している CRMP2A と CRMP2B を線維芽細胞において過剰発現させた場合、アクチン系に顕著な影響を及ぼすことなく微小管パターンをそれぞれ配向化とランダム化し、細胞の形態を劇的に変化させた。また、これら2つの CRMP は共存下でもその対照的な活性を発揮することが判明した。さらに、網膜培養ニューロンにおいて過剰発現させて、軸索形成における CRMP2A と CRMP2B の機能的差異について検討した。その結果、CRMP2A は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。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、両サブタイプの対照的な微小管パターン調節活性を発揮することで、軸索成長、さらにさまざまな種類の細胞の極性制御に関与すると考えられる。本研究により、まだおぼろげながらも CRMP の正体が見え始めてきた。

CRMP が普遍的な細胞極性制御因子だとするならば、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よう。今後さらに CRMP の機能を解明していくことで、神経回路形成の基本原理がよりはっきりと見えてくること、そしてその知見がさまざまな神経疾患の根本的な治療法の開発に繋がることを期待したい。

5. 自己評価：

CRMP の正体を暴くためには、非常に激しい国際的競争が現在もなお続いている。さきがけの期間を含めてそのような世界にどっぷりと浸り、競争の厳しさを身を持って知ったというのが正直

な感想である。仕事を最低限、まがりなりにも論文にまとめることはできたが、反省すべき点はあまりにも多い。来年よりアメリカに留学する予定であるが、新しい環境で心機一転し、また研究に取り組みたい。そして、さきがけに応募した際、心の中に描いていたテーマに新しい視点からアプローチしてみたいと考えている。

6. 研究総括の見解：

極めて競争の激しい状況下に置かれながら、適切な研究計画を着実に実施し、CRMP 分子を神経細胞の成長円錐の舵取りの主役と想定して、軸索成長の基本的しくみを解明しようとした。CRMP 全体としては発見していた新規バリエーションを既知分子との比較のもとに解析し、当初の目的をほぼ達成した。CRMP - 分子モーター複合体の *in vivo* 単分子イメージングの完成と共に、微小管との関係についてさらに解析が進展することを十分期待させる。

7. 主な論文等：

原著論文

1. Fukada, M., Watanabe, I., Yuasa-Kawada, J., Kawaguchi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., and Noda, M. (2000). Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J. Biol. Chem.* 275, 37957-37965.
2. Yuasa-kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., Ohkawara, T., Murata, M., and Noda, M. (2003). Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2329-2343.

学会発表

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 回日本神経科学学会大会 7.7, 2002.
2. 湯浅純一、野田昌晴 新規 CRMP バリエーションの同定と機能解析, 第 25 回日本分子生物学会ワークショップ 横浜 12.12, 2002.

招待講演

1. 湯浅純一 神経細胞の軸索成長の基本的メカニズム, 国立遺伝学研究所セミナー (Biological Symposium) 7.9, 2002.

特許出願

1. 神経成長円錐の新規シグナル制御分子 CRMP, 出願日 : 平成 14 年 5 月 31 日 出願番号 特願 2002-160853