

東北大学大学院生命科学研究科・教授

八尾 寛

「学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明」

研究期間：平成11年11月1日～平成17年3月31日

1. 研究実施の概要

Hebb (1949) は学習・記憶のメカニズムとして、「シナプス前終末の活動と受容側のニューロンの活動が同期することがシナプス伝達を増強する」という仮説を提唱した。長期増強 (LTP) は、シナプスに与えた頻回活動が、シナプス伝達を数時間以上にわたり増強する現象である。LTP は、Hebb の仮説にあてはまる可塑性であり、学習・記憶の細胞メカニズムと考えられている。近年、シナプス前性の可塑性が学習・記憶のメカニズムや回路形成のメカニズムとして普遍的に重要であることが明らかになってきた。たとえば、海馬CA3錐体細胞に形成される苔状線維 (mossy fiber, MF) シナプスでは、NMDA 型グルタミン酸受容体に依存しないLTPがシナプス前終末で引き起こされる。MFシナプスは、エピソード記憶の形成・想起に関与していると考えられている。MFのシナプス前性の可塑性は、学習・記憶の要素の一つと考えられるが、その誘導・発現・維持のメカニズムの詳細は不明である。

本研究においては、海馬MFシナプス前終末を主要なモデルシステムとして、シナプス前性の可塑性の誘導・発現・維持のメカニズムを素過程・分子レベルで解明することを目的とする。この目的のために、海馬スライス、海馬スライス培養系、海馬ニューロン培養系、海馬シナプトソーム、培養分泌細胞の研究システムを用いる。それぞれのシステムの利点を生かし、インタラクティブに相互比較することにより、はじめて、シナプス前性の可塑性のメカニズムが明らかになる。これらのシステムに、分子生物学的、生化学的、電気生理学的にアプローチする。さらに、シナプス前終末の機能、分子間インタラクションを可視化する新しい細胞生物学的手法を開発・導入する。機能分子に注目して、ノックアウト、ノックインなどの遺伝子改変動物を作製し、シナプス前性の可塑性における機能を検証する。本研究は以下の5つのセクションをインタラクティブに遂行した。

(1) 海馬におけるシナプス前性可塑性の研究

① シナプス前終末Ca²⁺動態計測法の開発：

軸索の断端から dextran 結合型Ca²⁺感受性蛍光色素を取り込ませることによりシナプス前終末のCa²⁺濃度を測定するCa²⁺感受性デキストラン法の開発・改良を進め、共焦点レーザー顕微鏡下に単一の海馬MF終末の形態を同定し、Ca²⁺濃度を高い精度で測定した。

② 遺伝子工学を応用した開口放出計測法の開発：

(i) Cre/loxPリコンビナントシステムによるシナプトフルオリンの部位特異的な発現系の作製：

pH感受性GFP誘導体 (super ecliptic pHluorin) をVAMPのC末につなげたコンストラクト (シナプトフルオリン) を神経細胞に発現するトランスジェニックマウスの作製をおこなった。シナプトフルオリン遺伝子を組み込んだloxPサイレントトランスジェニックマウスを作製し、部位特異的なプロモーターの下流にCreリコンビナーゼ遺伝子を持つマウスと交配することにより、部位特異的にシナプトフルオリンを発現するマウスを得た。これらのシナプトフルオリンの大部分は、小胞に分布し、小胞の開口放出にตอบสนองして蛍光強度の変化が計測可能であることを確認した。CAG-Creマウスとのリコンビナントにおいては、脳を含む全身の臓器においてシナプトフルオリンの発現が認められ、VAMP-2が関与している開口放出の制御機構の研究に有用であることが示された。

(ii) Thy1-シナプトフルオリントランスジェニックシステム：

thy1.2遺伝子のC末をシナプトフルオリンcDNAで置き換えたコンストラクトを導入したトランスジェニックマウス6系統を作製した。シナプトフルオリンmRNA発現部位は系統ごとに異なるパターンを示した。とくに、海馬および小脳のシナプス機能の研究に有用な系統が得られた。

(iii) 有芯小胞開口放出の計測：

pre-pro BDNF cDNAに本プロジェクトにおいて作製した改変GFPの一つvenus

を結合したコンストラクトを作製し、シンドビスウィルスベクターを用いて海馬ニューロンに発現させた。この結果、MFシナプス前終末にBDNF-venusが発現すること、活動依存的にBDNF-venusが開口放出されることを観察した。

③ MFシナプス前終末の分子・機能レベルのヘテロ性：

単一MF巨大シナプス前終末において、N、L、P/Q、Rの4種類のCa²⁺チャネルサブタイプが共存することを明らかにした。P/Qタイプの分布に大きなばらつきが認められなかったのに対し、NタイプおよびRタイプに大きなばらつきが認められた。また、Lタイプにも大きなばらつきがあることが示唆された。本研究の成果は、形態的に同様なシナプス前終末が機能的にヘテロであるという新しい概念を世界に先駆けて提出するものである。

④ マウス空間学習成立にともなうMFネットワークの再構築：

Water maze空間学習の成立したマウス群において、MFの投射領域が拡大し、異所性に新たにシナプスが形成されることが認められた。空間学習が形成される過程でMFネットワークの再構築が生じていることが示唆される。

⑤ スライス培養系における歯状回顆粒細胞の新生：

EGFPのコンストラクトを組み込んだレトロウィルスベクターを作製し、海馬スライス培養に感染させることにより、新生細胞を特異的にラベルした。この方法により、新生細胞が分裂増殖し、その一部が自然にニューロンに分化することを報告した。これらのニューロンが歯状回顆粒細胞のシナプスネットワークに組み込まれていることが示唆された。

⑥ ADPリボシル化因子(ARF6)とその活性化因子(EFA6)のシグナルによる樹状突起形成の制御機能の解明：

in situハイブリダイゼーション法を用いて、EFA6mRNAは、海馬錐体神経や歯状回顆粒細胞の細胞体及び樹状突起に非常に豊富に発現していることを示した。不

活性型EFA6Aの過剰発現により、海馬神経細胞の樹状突起の形成が促進されることを見出した。すなわち、EFA6A-ARF6シグナル経路が、樹状突起形成の新たな制御シグナル経路として機能していることが示唆された。また、EFA6Cについては、小脳プルキンエ細胞の細胞体、樹状突起とその棘突起、とくにシナプス後肥厚分画に豊富に局在することを見出した。EFA6Cは、小脳プルキンエ細胞樹状突起の後シナプス側における細胞膜のダイナミズムをせいぎょしていることが示唆される。

(2) 新世代機能プローブおよびその導入法の開発

- ① 蛍光タンパク遺伝子への変異導入あるいはサンゴなどの生物からの遺伝子クローニングなどにより、数々の新しい蛍光タンパクの創出ならびにそれらをベースとした蛍光プローブを開発した。高いフォールディング効率を有した明るい改変GFPのVenus、フォトコンバージョンを起こし緑から赤に色が変わるKaede、pHに感受性を示しシグナルの変化量が大きいGFP変異体などが特筆に価する。
- ② 細胞外のpHは約7.4であるのに対し、シナプス小胞内は約5.5であることが知られている。改変GFPにはpH依存性の蛍光特性を有するものがあるので、これとシナプス小胞特異的なタンパクとのリコンビナントプローブを作製し、シナプス小胞内のpHを定量化する手法を開発し、シナプス小胞の開口放出過程がリアルタイムで計測できることを示した。
- ③ 改変GFPを用い、Ca²⁺などの細胞内セカンドメッセンジャーを定量化する新しい機能プローブを開発した。
- ④ 光受容体チャネルを遺伝子工学的に神経細胞に導入し、光感受性を獲得させることにより、光刺激により脱分極させ、活動電位を引き起こした。
- ⑤ ニューロングリア相関として、海馬由来の培養神経細胞ではアストロサイトとの接触によってシナプス前終末部ならびにシナプス後膜の成熟が生じシナプス形成が顕著に誘発されることを見出した。また、この相互作用が、インテグリンーPKCカスケードを介していることを明らかにした。

(3) シナプス前性可塑性にともなうタンパク質リン酸化、タンパク質発現の解析

シナプス伝達は、シナプス小胞に貯蔵され開口放出される神経伝達物質によって担われている。神経伝達物質放出は様々なリン酸化酵素（キナーゼ）によって制御され、シナプス可塑性の重要な機構の一つとなっている。これらの機構を明らかにするため次のような問題についての解析を行った。

- ・ 開口放出はどのような素過程を経て引き起こされるのか？
 - ・ 開口放出の素過程が、さまざまなキナーゼによってどのように制御されているのか？
 - ・ キナーゼによるシナプス前性制御が、どのような脳の機能の制御に関っているのか？
- ① ラット副腎髄質細胞腫由来PC12細胞の変異株PC12-dB3を単離し、Ca²⁺依存的な開口放出能が殆ど消失していること、これが、SNARE複合体へのVAMP-2の結合が著しく低下をともなっていることを明らかにした。PC12細胞を用い細胞膜上のPIP2の局在を調べた。その結果、ドックした分泌小胞上にPIP2クラスターが形成されることが分泌能の獲得（プライミング）であることが示唆された。神経伝達物質放出において、カルモジュリンは開口放出に必須ではないが、ある種の神経細胞や分泌細胞ではその制御に関与し、ミオシンVがその標的タンパク質であることが示唆された。また、細胞内Ca²⁺の増加により、SNAP-25が切断されることを見出した。この反応は、細胞内システインプロテアーゼであるカルパインの作用であることが示唆された。
- ② 神経伝達物質放出の制御における、cAMP依存性キナーゼ（PKA）、プロテインキナーゼC（PKC）、Srcファミリーチロシンキナーゼ、脂質キナーゼなどの作用機序を、PC12細胞システムを用いて解明した。また、エリスロポエチン（EPO）レセプターに結合しているJAK2が、虚血状態で引き起こされる開口放出によるグルタミン酸放出を抑制し神経細胞死を抑制することを明らかにした。
- ③ SNAP-25のPKC依存的リン酸化部位に変異を加えたノックインマウスを作成し、解析を行った。ホモマウスは、個体ごとに全く異なる行動様式を示し、あるものは、非常に怖がりやすく、少しの環境変化でフリージング行動を引き起こす特徴

を示したのにたいし、一部は、常に壁際に沿って動き回るという多動性を示した。これらの結果からSNAP-25のリン酸化が情動制御に何らかの重要な働きを果たしていることが示唆された。

- ④ 開口放出の制御タンパク質と考えられているComplexinを培養海馬神経細胞に発現させ、その局在分布を共焦点顕微鏡で解析した結果、Complexinの発現量は dendrite では細胞体から遠ざかるに従い減少するのに対し、軸索では減少しないことを見出した。すなわち、Complexinを、軸索からシナプス前部に選択的に輸送する機構があることが示唆された。また、軸索への選択輸送に必須なコア候補配列を特定した。

(4) シナプスにおけるエクソ-エンドサイトーシス制御の素過程解析

海馬歯状回顆粒細胞のオートプス系を用いて海馬ニューロンシナプスの可塑的制御の分子機構を解明した。

- ① FM1-43や励起・蛍光波長の異なるFM4-64により、個々のシナプスにおける開口放出をモニターした。cAMP系活性化によるシナプス前終末LTPがmuteシナプスの賦活化をともなうことを明らかにした。
- ② 低分子量G蛋白質Rab3Aのアクティベーターの一種、Rab3GEPの遺伝子をノックアウトした動物由来の海馬神経細胞オートプスを用いて、この分子のシナプス前エクソサイトーシスにおける役割解析した。開口放出の素過程解析の結果、Rab3GEPはRab3A以外の蛋白質にも作用し、ポストドッキング過程において膜融合・放出を増強する方向に作用していることが示唆された。
- ⑥ ニューロン-グリア相関として、海馬由来の培養神経細胞ではアストロサイトとの接触によってシナプス前終末部ならびにシナプス後膜の成熟が生じシナプス形成が顕著に誘発されることを見出した。また、この相互作用が、インテグリン- PKCカスケードを介していることを明らかにした。
- ③ 平行線維PF-プルキンエ細胞間シナプスにおけるAMPA-Rシナプス膜発現は構成

性エクソサイトーシスと構成性エンドサイトーシスの平衡によって保たれていることが示唆された。

(5) 機能分子を組み込んだ遺伝子改変動物の作製

ニューロンの機能分子に注目して、ノックアウト、ノックインなどの遺伝子改変動物を作製し、シナプス前性の可塑性における機能研究に資することを目的とする。

- ① GABA合成酵素GAD67にEGFP遺伝子をノックインした動物を作製し、解析した。扁桃体において3種類のGABA性インターニューロンを同定し、ノルアドレナリンに対する応答が異なることを見出すとともに、そのメカニズムを解明した。
- ② Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼIIサブユニット (CaMKIIを不活性型に置換したノックイン型遺伝子改変マウスを作成し、解析した。
- ③ シナプトフルオリン遺伝子を組み込んだloxPサイレントトランスジェニックマウスおよびThy1-トランスジェニックマウスを作製し、解析した。

考察

以上の研究を総括し、シナプス前性の可塑性の本質を形態、機能のレベルで解析するとともに、可塑性のメカニズムを分子レベルで考察した。また、リン酸化の標的となる分子の開口放出における機能を考察した。

2. 研究構想

研究開始時に目指した目標

本研究は、学習・記憶のメカニズムをシナプス前終末の構造的・機能的な可塑性から解明することを提案するものである。シナプス前終末からの伝達物質の開口放出は、シナプス前終末に分布するニューロモジュレーター受容体やタンパク質リン酸化による調節を受けており、ドッキング、 Ca^{2+} 流入、小胞と形質膜の融合など、開口放出反応を律速する素過程の各々が調節の標的になっている。他方、syntaxin, synaptotagmin,

SNAP-25など多くの開口放出関連分子が同定されている。しかし、シナプス前終末の可塑性を分子レベルで解明するには、微小性、ヘテロ性、生化学的複雑性などに由来する困難がある。本研究は、この困難を、green fluorescent protein (GFP) を利用した新世代プローブ、新しいプローブ導入法、ニューロンの新しい培養系、リン酸化タンパク質の検出法、遺伝子改変動物の作製などをインタラクティブに駆使することによってブレイクスルーし、シナプス前終末の構造・機能がどのような分子により調節されているのか、学習・記憶の過程で、それらの分子がどのような修飾を受けるのかを解明することを目標とした。

立案した5年間の研究計画・進め方の概要

立案した5年間の研究計画を次ページに提示する。これらの進め方は、以下の6項目に要約される。

① 新世代機能プローブおよびその導入法の開発

GFPを用いたFRETに基づき、細胞内Ca²⁺濃度、シナプス小胞の形質膜へのドッキングなどをレポートする新世代機能プローブを開発する。また、新世代機能プローブを組み込んだウィルスベクターを作製する。pH感受性のGFP誘導体と小胞膜タンパクとのリコンビナントプローブを作製し、シナプス小胞内のpHを定量化する手法を確立する。

② 機能プローブを組み込んだ遺伝子改変動物の作製

GFPを用いた新世代プローブを部位特異的にノックインした動物、リン酸化標的タンパクをノックアウトした動物などを作製する。遺伝子改変動物の行動を解析し、分子と行動との連関を研究する。

③ プレシナプス可塑性の誘導・発現・維持にかかわる分子メカニズムの解析

海馬スライス培養系にウィルスベクターを用いて、MFシナプス前終末特異的に、Ca²⁺感受性色素、新世代機能プローブなどを導入し、可塑性のメカニズムを素過程レベルで解析する。シナプス前終末可塑性にともなうシナプス前終末形態

と機能の連関を解析する。また、開口放出関連蛋白およびそのリン酸化されたものに特異的な抗体を用いて、可塑性に伴うタンパク質リン酸化を解析する。機能プローブを組み込んだ遺伝子改変動物の急性スライスを用いた結果と比較する。

④ プレシナプスの機能的ヘテロ性の検証

micro-island culture法を用いて、シナプス前終末可塑性を解析する。素過程の詳細な解析、muteシナプス賦活化の分子メカニズムの解明、細胞内情報伝達メカニズムクロストークを解析する。

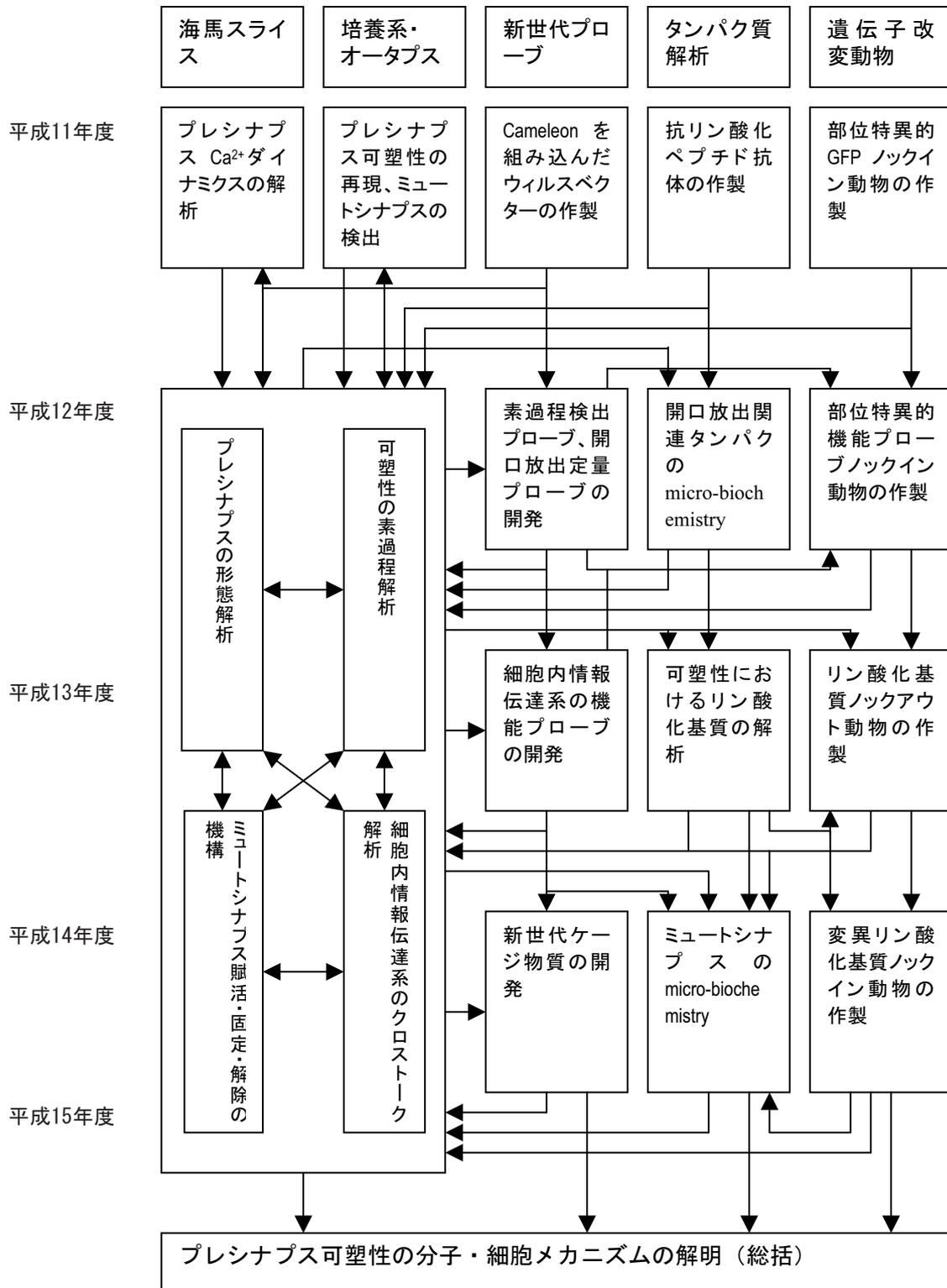
⑤ プレシナプスの可塑性にともなう蛋白質リン酸化、蛋白質発現の解析

シナプス前終末可塑性にともなうタンパク質リン酸化およびタンパク質発現の解析を行う。また、これらの解析に必要な抗体を作製する。新世代プローブで得られた結果をタンパク質レベルで確認する。mute synapseの賦活化にともない、開口放出制御タンパクの分布や機能が変化する可能性を検証する。

⑥ まとめ

以上の研究を総括し、プレシナプス可塑性のメカニズムを分子・細胞のレベルで考察する。また、リン酸化の標的となる分子の開口放出における機能を考察する。

研究年次計画



その後の新展開から生まれた目標

- プレシナプス可塑性の重要な素過程の一つである Ca^{2+} 流入を海馬苔状線維終末で計測したところ、複数の Ca^{2+} チャネルサブタイプによりなわれていることがわかり、これを明確にすることがメカニズムの解明の前提になった。そこで、海馬苔状線維終末にどのような Ca^{2+} チャネルサブタイプが分布しているのか、それらは、同一のシナプス前終末に共存しているのかを解明することを目標にした。
- 上記の研究の過程で、 Ca^{2+} チャネルサブタイプの分布が測定領域ごとに変動していることを新たに見出した。これは、形態的に相同なシナプス前終末が、分子・機能のレベルでヘテロであるという新しい概念を提出するものであると考え、単一のプレシナプスに分布する Ca^{2+} チャネルサブタイプの発現比率のばらつきを検証することを目標にした。
- プレシナプス可塑性のアッセイ系として海馬のスライス培養を用いる計画であったが、培養スライスにおいて、歯状回顆粒細胞の細胞死が培養期間を通して持続して存在することを見出した。しかし、歯状回顆粒細胞の目立った減少は認められなかった。したがって、スライス培養において自発的なニューロン新生が持続的に存在していることが示唆された。プレシナプスのヘテロ性を研究するにあたり、新生したニューロンがネットワークに組み込まれ、新しいシナプスを形成するかは、重要な問題である。そこで、スライス培養において、自発的なニューロン新生があり、新生したニューロンがネットワークに組み込まれるかを検証することを目標にした。
- ポストシナプスの可塑的制御機構についても研究を展開し、樹状突起形成機構や受容体調節機構を解明することを目標にした。
- ニューロングリア相関もまた、シナプス制御の重要な因子であるので、これを解明することを目標にした。

研究構想実現のために各サブグループが担った役割分担

中核チーム（東北大学大学院生命科学研究科）

- 機能プローブをシナプス前終末に導入および開口放出素過程の解析
- 遺伝子改変動物作成チームと協同による機能プローブを組み込んだトランスジェニック動物の作製と解析
- プレシナプスニューロンの新生、シナプス再構築、樹状突起形成の研究
- 神経細胞を光刺激する方法の開発
- 研究の総括

新世代プローブ開発チーム（理化学研究所脳科学研究センター）

- 新しい蛍光タンパク質プローブの開発
- FRETを利用したリコンビナント機能プローブの開発
- 機能解析チームとの協同によるニューロングリア相関の解析

分子解析チーム（北里大学医学部）

- 開口放出関連タンパクの機能とリン酸化の役割の解析
- 開口放出制御分子の選択的軸索輸送の解析

機能解析チーム（理化学研究所脳科学研究センター）

- シナプス可塑性の素過程レベルの解析
- 新世代プローブ開発チームとの協同によるニューロングリア相関の解析
- シナプス後部可塑性の制御機構の解明

遺伝子改変動物チーム（群馬大学大学院医学系研究科）

- 機能プローブを部位特異的に組み込んだ遺伝子改変動物の創出
- 中核チームと協同による機能プローブを組み込んだトランスジェニック動物の作製と解析

3. 研究成果

3. 1 “海馬におけるシナプス前性可塑性の研究”（中核チーム）

(1) 研究内容及び成果

(1) タンパク質リン酸化による開口放出増強は、どの素過程で生じているのか？

C-キナーゼアゴニストのフォルボルエステルは、MFシナプス伝達を数倍に増強する。この増強作用はシナプス前性に引き起こされると考えられているが、シナプス前終末のCa²⁺流入、開口放出確率、易放出性小胞プール（RRP）のいずれの素過程を促進しているかを明らかにした。この結果、開口放出関連分子のリン酸化との因果関係が示唆された。

(i) MF終末端Ca²⁺流入の測定（図1-1）：

海馬スライスのMF終末にデキストラン結合Ca²⁺感受性色素をとりこませ、神経終末端のCa²⁺流入を測定する手法を開発・改良した。MF近傍のGABA作動性

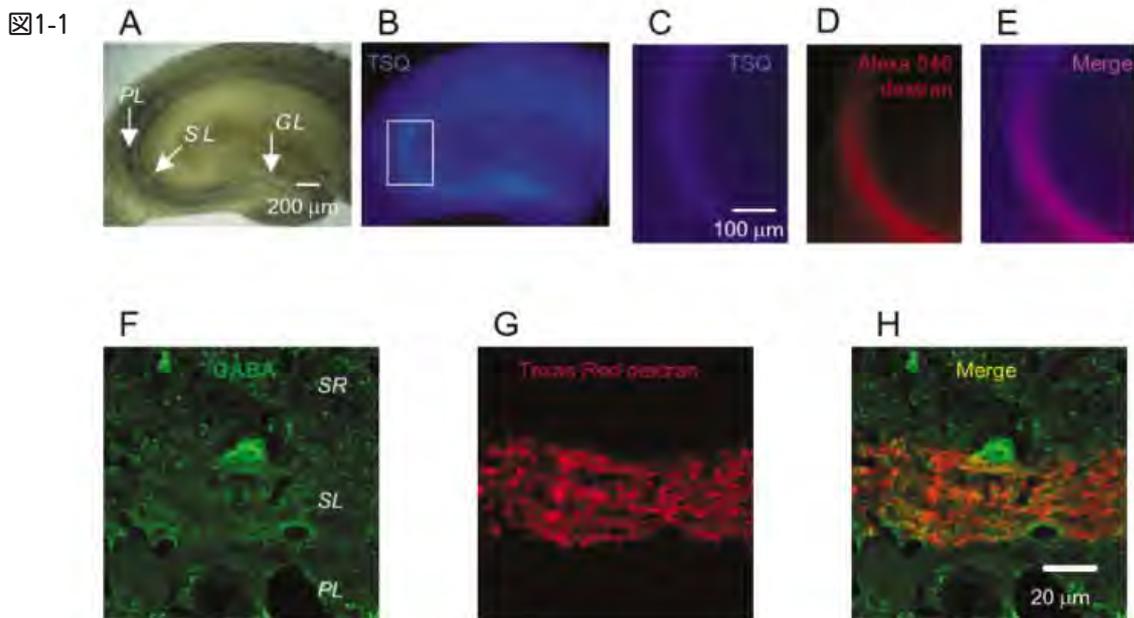


FIGURE 1. Identification of mossy fibers (MFs) and MF terminals. A: Plain photograph of a transverse slice of mouse hippocampus: granule cell layer of dentate gyrus (GL), stratum lucidum (SL), and pyramidal cell layer of the CA3 region (PL). B: View of the same slice of A under UV light: Zn²⁺ was visualized by TSQ. C: Enlarged view of TSQ fluorescence corresponding to the rectangular field around CA3 region in B. The exciting light was the wavelength of 330–385 nm, and the emitted light was absorbed below the wavelength of 420 nm. D: Same view of C; the anterograde-loading method was used to label axons and boutons with Alexa Fluor 546-conjugated dextran (Alexa 546 dextran). The exciting light was the wavelength of 520–550 nm and the emitted light was absorbed below the wavelength of 580 nm. E: Merged view with C,D. Note that Alexa Fluor 546 fluorescence

appears to be included in TSQ fluorescence. F: Immunohistochemical view of anti-γ-aminobutyric acid (GABA): stratum radiatum (SR), stratum lucidum (SL), and pyramidal cell layer (PL). This view is one of the serial sections of confocal microscopy by the Ar laser at the wavelength of 488 nm. G: View of the same section of F by the He-Ne laser at the wavelength of 543 nm; the axons and boutons labeled by Texas Red-conjugated dextran (Texas Red dextran) are visualized. The anterograde-loading method was used to label these fibers and boutons. H: Merged view with F,G. Note that GABAergic interneurons do not appear to uptake Texas Red-conjugated dextran, although anti-GABA-derived fluorescence and Texas Red fluorescence is closely associated at some point.

介在ニューロンがdextran 蛍光色素を取り込む可能性を検討するために、GAD67-GFPノックインマウス（柳川ら）を使用した。その結果、dextran蛍光色素はGFP陽性ニューロンには取り込まれなかった。したがって、歯状回顆粒細胞部位に局所投与したCa²⁺感受性dextran色素は選択的にMF終末端のCa²⁺動態をモニターすると結論された。本手法は、MF終末に対する特異性および単一終末の蛍光測定が可能な点において、他の手法よりも優れていることが確認された。

(ii) リン酸化により修飾される素過程：

PKCはMFシナプス前終末においてCa²⁺流入とCa²⁺流入以後の開口放出素過程を促進した。後者は、小胞と形質膜の融合確率の増大を伴っていると考えられる。フォルボルエステルは、また、PKC非依存的に開口放出を促進した。これは、Munk13-1などのC1ドメインを有する分子を介し、RRPを増大していると考えられる。

(2) 個々のMFシナプス前終末は機能的に異質なのか？

(i) 単一シナプス前終末に発現するCa²⁺チャンネルサブタイプの多様性（図1-2）：

MFシナプス前終末のSr²⁺流入は、サブタイプ特異的なチャンネルブロッカーの投与によって段階的に減少し、N、L、P/Q、Rの4種類のサブタイプが共存することが観察された。蛍光デキストラン法をさらに改良し、カルシウム感受性蛍光デキストランと非感受性蛍光デキストランを同一

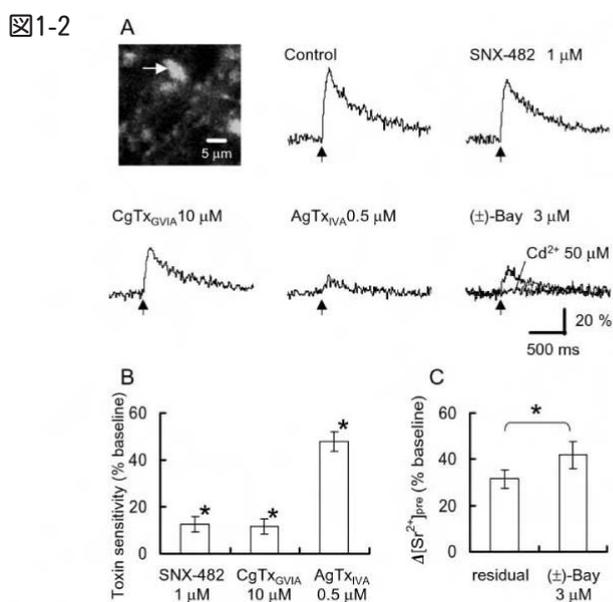


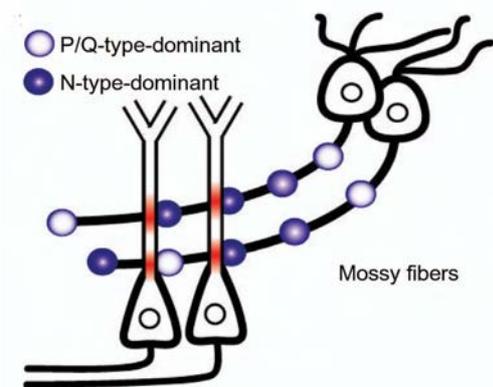
FIGURE 9. Non-PQNR-type component of $\Delta F/F$ that is sensitive to DHPs. A: Top left photograph is a view of a large mossy fiber (MF) bouton labeled by Texas Red-conjugated dextran applied at granule cell layer of dentate gyrus; the anterograde-loading method was used. White arrow indicates the bouton employed in measurement of $\Delta F/F$; the cross-sectional area was 37.35 μm^2 . This view is one of the serial sections of confocal microscopy by the He-Ne laser at the wavelength of 543 nm. Traces from top middle to bottom right: sample records of $\Delta F/F$ measured from the particular MF bouton shown in A; fluorescent probe is Oregon Green BAPTA-1 dextran. MF was stimulated at the time indicated by the black arrow with a train of 5 electrical pulses at 50 Hz. Voltage-dependent calcium channel (VDCC) antagonists and agonists were added to the extracellular perfusate every 10 min in series: control, 1 μM SNX-482, 10 μM CgTx_{GVIA}, 0.5 μM AgTx_{IVA}, 3 μM (\pm)-Bay K8644 ((\pm)-Bay, 3 μM) and 50 μM Cd²⁺ (overlaid trace). Note that R-, N-, P/Q-, and L-type components were identified in this bouton. B: Summary of $\Delta F/F$ sensitivities to VDCC subtype-selective blockers investigated in large individual MF boutons ($n = 10$). Each column (from left to right) is blockade by 1 μM SNX-482, 10 μM CgTx_{GVIA} and 0.5 μM AgTx_{IVA}. Asterisks indicate that the effects of the blocker are statistically significant. C: Summary of effects of an L-type agonist, (\pm)-Bay K8644 ((\pm)-Bay) on $\Delta F/F$ measured from large individual MF boutons ($n = 8$). Left column is the $\Delta[Sr^{2+}]_{\text{free}}$ component resistant to the co-application of 1 μM SNX-482, 10 μM CgTx_{GVIA} and 0.5 μM AgTx_{IVA}. Right column is the same component after application of 3 μM (\pm)-Bay K8644 ((\pm)-Bay 3 μM). Asterisk indicates that the difference is statistically significant.

のMFシナプス前終末に取り込ませることにより、共焦点レーザー走査顕微鏡下に単一のMF巨大シナプス前終末を形態的に同定し、 Sr^{2+} 流入にともなう蛍光強度の変化を計測した。 Sr^{2+} 流入のサブタイプ特異的なチャンネルブロッカーに対する感受性から、単一MF巨大シナプス前終末に分布する Ca^{2+} チャンネルサブタイプを同定した。 Ca^{2+} チャンネルサブタイプの分布密度は神経終末端によって変動していることが示唆された。

(ii) Ca^{2+} チャンネルサブタイプの分布の変動 (図1-3) :

単一MF巨大シナプス前終末における Ca^{2+} チャンネルサブタイプの分布を比較したところ、P/Qタイプの分布に大きなばらつきが認められなかったのに対し、NタイプおよびRタイプに大きなばらつきが認められた。また、L

図1-3



タイプにも大きなばらつきがあることが示唆された。同一のMF軸索上に隣接する2つの巨大シナプスを比較したところ、隣接しないもの同士と同程度のばらつきが認められた。すなわち、神経細胞ごとに異なるサブタイプの発現をしているのではなく、終末ごとにヘテロであることが示唆された。MF巨大シナプス前終末は、CA3錐体細胞の尖頭樹状突起基部に形成されるグルタミン酸性シナプスであるという共通の形態的特徴を有している。本研究の成果は、形態的に同様なシナプス前終末が機能的にヘテロであるという新しい概念を世界に先駆けて提出するものである。

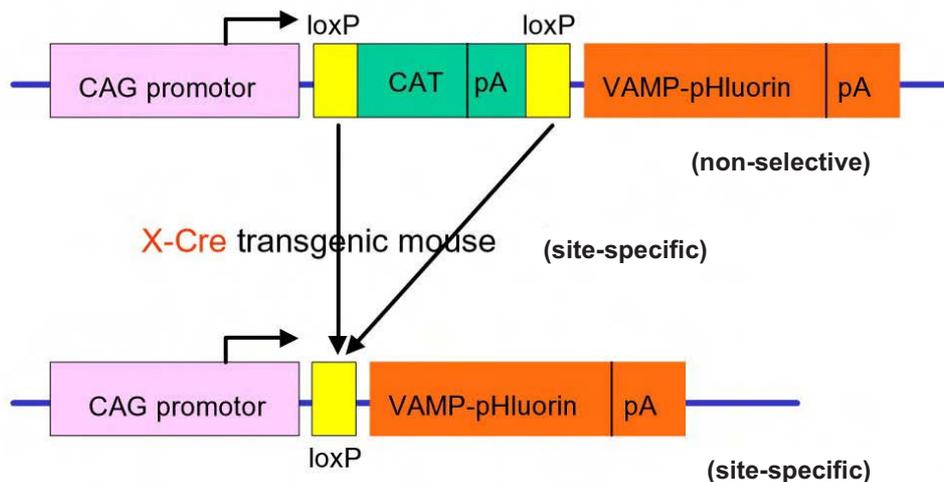
(3) 遺伝子工学を応用した開口放出計測法の開発

(i) Cre/loxPリコンビナントシステムによるシナプトフルオリンの部位特異的な発現系の作製 (図1-4) :

「MFシナプスの伝達物質放出能は、シナプス前終末により大きなばらつきがあ

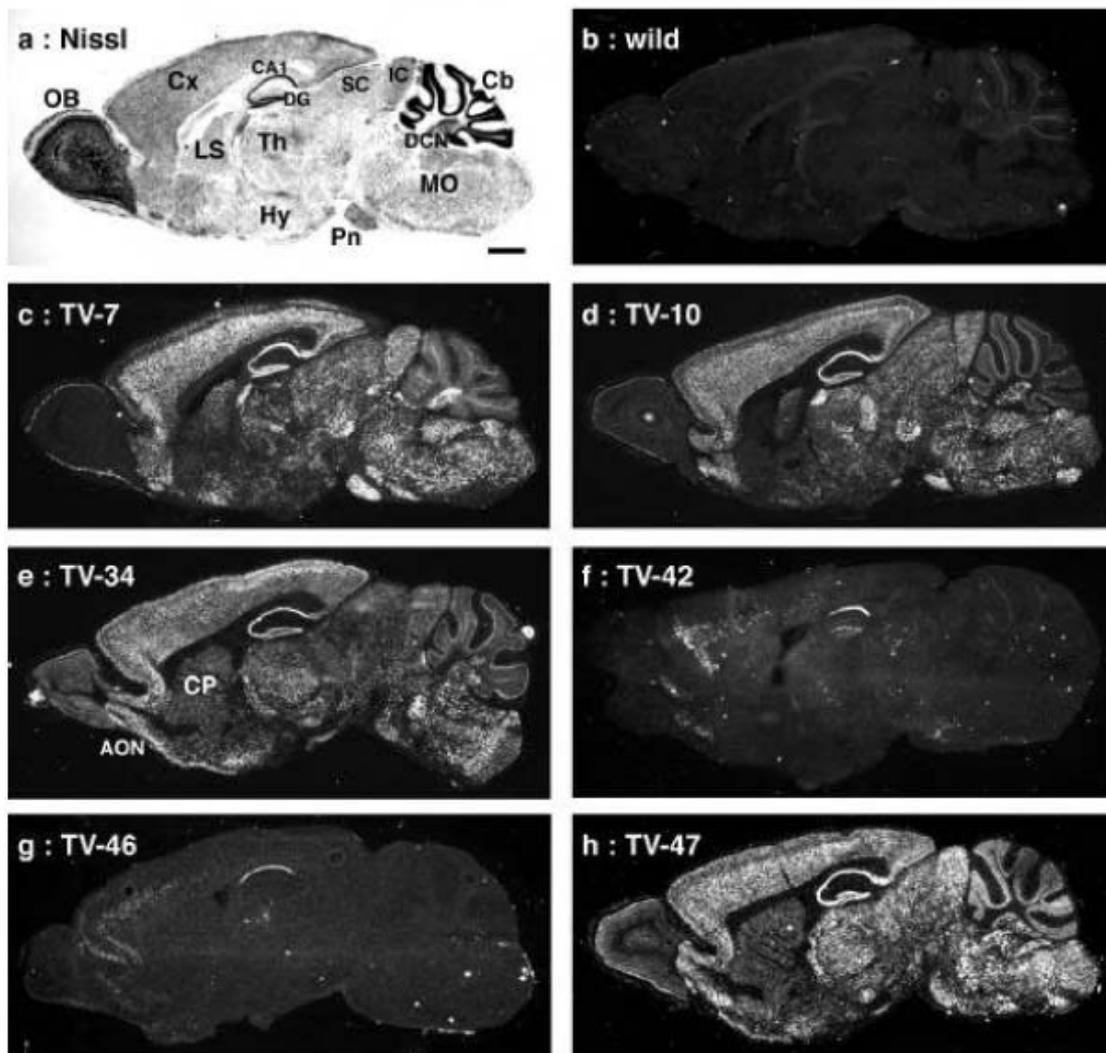
る。あるものはきわめて低いレベルの伝達物質放出能しか有しない。MF-LTPの誘導により、低いレベルの伝達物質放出能を示したシナプス前終末の放出能のみが増大する。しかし、高いレベルの伝達物質放出能を示したシナプス前終末の放出能は増大しない。」この仮説を検証するためには、個々のMFシナプスを同定して、伝達物質放出能を複数のシナプス前終末から同時に測定する必要がある。pH感受性GFP誘導体 (super ecliptic pHluorin) をVAMPのC末につなげたコンストラクト (シナプトフルオリン) を作製し、シンドビスウィルスベクターを用いた歯状回顆粒細胞に発現させた。その結果、単一シナプスレベルにおいて、高い精度でexo-endocytosisを定量化できることがわかった。シナプトフルオリンを用いた開口放出計測を脳、脳スライスなどで効率よくおこなうことを期待して、柳川チームとの共同でシナプトフルオリンを神経細胞に発現するトランスジェニックマウスの作製をおこなった。第1の方法は、Cre/loxPリコンビナントシステムを応用したものである。シナプトフルオリン遺伝子を組み込んだloxPサイレントトランスジェニックマウスを作製し、部位特異的なプロモーターの下流にCreリコンビナーゼ遺伝子を持つマウスと交配することにより、部位特異的にシナプトフルオリンを発現するマウスを得た。崎村研 (新潟大) から譲り受けた1-CreNノックインマウスとのリコンビナントにおいては、海馬CA3錐体細胞特異的にCreリ

図1-4 Cre-loxP recombination system



コンビナーゼが発現し、その終末の分布する海馬stratum radiatumとstratum oriens 特異的にシナプトフルオリンが発現した。また、平林博士(生理研)から譲り受けたCAMKIIa-Creトランスジェニックマウスとのリコンビナントにおいては、MF終末特異的にシナプトフルオリンが発現した。これらのシナプトフルオリンの大部分は、小胞に分布し、小胞の開口放出に応答して蛍光強度の変化が計測可能であることを確認した。宮崎博士(大阪大)から譲り受けたCAG-Creマウスとのリコンビナントにおいては、脳を含む全身の臓器においてシナプトフルオリンの発現が認められた。シナプトフルオリンの分布は、VAMP-2の分布とほぼ同様であり、VAMP-2が関与している開口放出の制御機構の研究に有用であることが示された(表1-1)。

図1-5



(ii) Thy1-シナプトフルオリントランスジェニックシステム (図1-5) :

柳川チームとの共同でthy1.2遺伝子のC末をシナプトフルオリンcDNAで置き換えたコンストラクトを導入したトランスジェニックマウスを作製し、6系統を得た。in situ hybridizationによりシナプトフルオリンmRNA発現部位を検索したと

表1-1 Tissue expression of VAMP-2 and the functional significances of exocytoses.

Tissue	Function	References
adipocyte	translocation of the glucose transporters (GLUT-4) from an intracellular site to the cell surface in response to insulin	1, 2
adrenal chromaffin cell	exocytosis of secretory granules	3
adrenal gland	a component of secretory vesicles	4
brain	neuroexocytosis	5, 6, 7
gastric parietal cell	trafficking of the H, K-ATPase-containing tubelovesicles to and from the apical membrane (secretion of HCl)	8
granulocyte (eosinophil)	IgE receptor-mediated exocytosis of eosinophil cationic protein (ECP)	9, 10
granulocyte (mast cell)	release of secretory granules which contain a variety of proinflammatory mediators, chemotactic factors and immunoregulatory cytokines	11
granulocyte (neutrophil)	secretion of secondary and tertiary granules which contain a wide array of proteins involved in the adhesion and extravasation as well as enzymes implicated in the generation of soluble mediators of inflammation.	10, 12
heart	a component of exocytotic machinery	4
kidney collecting duct cell	trafficking of water channel protein, aquaporin-2, containing vesicles in response to antidiuretic hormone	13
kidney glomerular cell	a component of exocytotic machinery	4
liver hepatocyte	a component of exocytotic machinery	4
lung endothelial cell	trafficking of endothelial caveolae which mediates endocytosis and transcytosis of macromolecules	14
pancreatic acinar cell	regulated secretion of zymogens into the pancreatic duct in response to cholecystokinin or acetylcholine	15, 16
pancreatic islet cell	insulin secretion	4, 15, 17
parotid acinar cell	cAMP-dependent amylase release	18
skeletal muscle	translocation of the glucose transporter (GLUT-4) from an intracellular site to the cell surface in response to insulin	19
smooth muscle	a component of exocytotic machinery	4, 10
sperm	secretion of acrosomes which mediate egg-sperm interactions by aiding the sperm's penetration through the egg's zona pellucida (acrosome reaction)	20
thyroid gland	a component of exocytotic machinery	4

ころ、いずれも神経細胞特異的ではあったが、発現の部位は系統ごとに異なるパターンを示した。ある系統においては、海馬の歯状回顆粒細胞とCA1錐体細胞特異的にシナプトフルオリンmRNAが発現した。この系統の海馬では、シナプトフルオリン分子は、MFシナプス前終末特異的に発現した。この系統の小脳においては、小脳皮質顆粒層に分布する苔状線維終末特異的にシナプトフルオリン分子の発現が認められた。したがって、海馬および小脳のシナプス機能の研究に有用な系統が得られた。

(iii) 有芯小胞開口放出の計測：

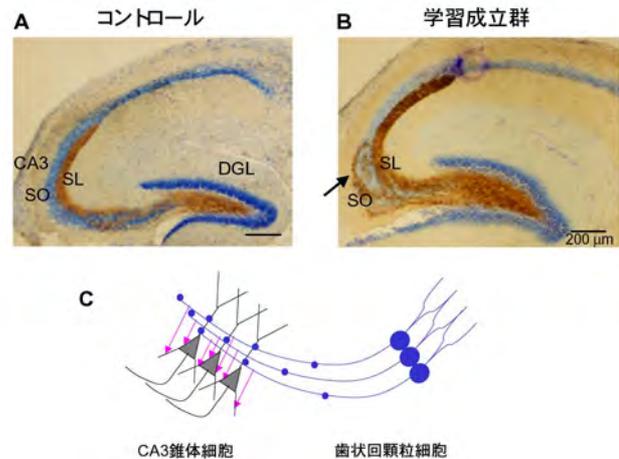
シナプス前終末には、グルタミン酸などの伝達物質を含む透明小胞とペプチドを含む有芯小胞が共存している。後者の開口放出の制御機構についての知見は少ない。海馬MFシナプス前終末には、BDNFが有芯小胞に含まれ、活動依存的なBDNF放出がこのシナプスの可塑性において重要な機能を担っていることが示唆されている。しかし、MFシナプス前終末からのBDNF放出を直接計測した報告はない。本研究においては、pre-pro BDNF cDNAに改変GFPのvenusを結合したコンストラクトを作製し、シンドビスウィルスベクターを用いて海馬ニューロンに発現させた。Venusは、本プロジェクトにおいて宮脇チームが作製したもので、EGFPの約10倍の明るさがあり、pH 5-8における明るさの変動が少ない特徴がある。培養海馬ニューロンの細胞体-樹状突起において、活動依存的にBDNF-venusが開口放出されることによる蛍光強度減少を観察した。また、このシンドビスウィルスベクターをstereotaxicにマウス海馬歯状回に注入し、MFシナプス前終末にBDNF-venusが発現すること、活動依存的にBDNF-venusが開口放出されることを観察した。本手法がMFシナプス前終末におけるBDNF開口放出の制御機構の解明に有用であることが示された。

(4) マウス空間学習成立にともなうMFネットワークの再構築(図1-6)

マウスMFシナプス前終末をTimm染色法により可視化することにより、その分布をMorris water maze課題を課したマウスと課さないコントロールマウスで比較した。

Water maze 空間学習の成立した群において、MF の投射領域が拡大していることが認められた。投射領域の拡大は、海馬中隔側においてもっとも顕著に認められた。また、CA3 領域 stratum oriens において、通常シナプス形成の認められない遠位部に新たにシナプスが形成されることを認めた。空間学習が形成される過程で MF ネットワークの再構築が生じていることが示唆される。

図1-6



(5) 歯状回顆粒細胞の新生が海馬のネットワークを変化させるのか？ (図1-7)

哺乳動物の海馬顆粒細胞層においては成熟期においても progenitor cells が新生され、その分化によって神経細胞が産生されることが知られている。しかし、そのように新たに産生したニューロンがシナプスを形成するか、あるいは、学習・記憶の過程に参加するかなどの機能解析に関しては結論が得られていない。さらに、ニューロンの産

図1-7

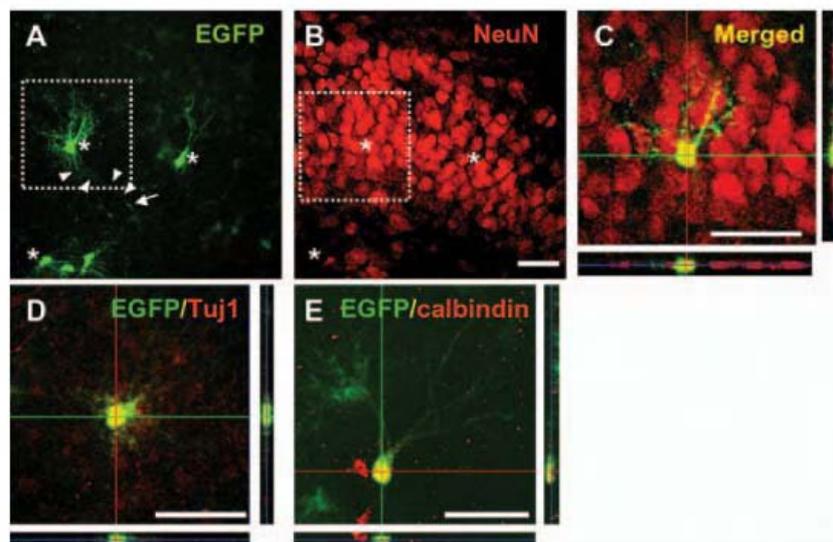


FIG. 6. Emergence of neuronal phenotypes in EGFP-expressing cells four weeks after retrovirus vector inoculation. (A and B) The double immunofluorescent confocal images of GCL: anti-EGFP (A, green), anti-NeuN (B, red). Typical EGFP-expressing NeuN-positive cells bear dendrite-like processes and an axon-like process (arrowheads) with a terminal bouton-like structure (arrow). EGFP-expressing cells that are immunoreactive with anti-NeuN are indicated by asterisks. (C) Three-dimensional analysis of a NeuN-positive EGFP-expressing cell. A rectangular region in A and B were merged and enlarged with x-z and y-z images. (D) Three-dimensional analysis of a double immunofluorescent confocal image of GCL: anti-EGFP (green) and anti-Tuj1 (red). The x-z and y-z images were accompanied. (E) Three-dimensional analysis of a double immunofluorescent confocal image of GCL: anti-EGFP (green); anti-calbindin D28K (red). The x-z and y-z images were accompanied. Scale bars, 50 μ m.

生とその維持がどのような条件下で促進されるかも不明である。これらの問題を検討するために、ラットの海馬培養スライス標本において神経幹細胞を同定し、その細胞の動態を経時的に観察する手法を検討した。海馬スライス培養標本でも歯状回顆粒細胞層でニューロンが新生されているかを検討する目的で、スライス培養にbromodeoxyuridine (BrdU) をとりこませ、BrdU陽性細胞を解析した。神経細胞マーカーに対する抗体を用いた免疫染色法を用いて、歯状回顆粒細胞層にBrdU陽性神経細胞が存在することを確認した。すなわち、海馬スライス培養標本の歯状回顆粒細胞層でニューロンが新生されていることを実証した。さらに、小柳研（京都大）との共同で、EGFPのコンストラクトを組み込んだレトロウィルスベクターを作製し、海馬スライス培養に感染させることにより、新生細胞を特異的にラベルした。この方法により、新生細胞が分裂増殖し、その一部が自然にニューロンに分化することを報告した。これらのニューロンは、歯状回顆粒細胞層に分布し、顆粒細胞の分子マーカーのcalbindin D28Kを発現することを観察した。すなわち、歯状回顆粒細胞のシナプスネットワークに組み込まれていることが示唆された。

(6) 低分子量GTP結合タンパク質ADPリボシル化因子6 (ARF6)の神経形態形成における機能解析

神経細胞は、細胞体より伸びる2種類の突起、すなわち軸索と樹状突起をもつ高度に極性を持った細胞であり、その極性の形成に関与する分子機序を解明することは、神経回路形成のみならず神経可塑性の形成の機序の理解に大きく貢献するものと考えられる。ADPリボシル化因子 (ARF) は、Rasスーパーファミリーに属する低分子量GTP蛋白質で、従来、細胞内輸送小胞の形成の観点から多くの研究が行われてきた。近年、ARFの6分子種のうちARF6は、他のARF分子と異なり、上皮系培養細胞において、細胞膜のリサイクリングや細胞骨格の制御に関わることが明らかになってきた。また、神経細胞の突起形成におけるARF6の機能関与が2003年になり報告され、ARF6情報伝達系が、神経細胞の極性形成過程における細胞膜のダイナミズムに深く関与することが明らかになりつつある。本研究では、ARF6の活性化因子であるGDP/GTP交換

因子であるEFA6 (exchange factor for ARF6) に着目して、EFA6-ARF6シグナル経路の神経形態形成、とくに樹状突起の形成の機能関与を明確にすることを目的とした。その結果、本分子が、海馬神経細胞に極めて豊富に発現し、細胞体のみならず樹状突起へそのmRNAを能動的に輸送していることを明らかにし、神経活動依存性に樹状突起の局所において翻訳されていることが示唆する所見を得た。また、海馬の発達過程における発現解析により、海馬神経細胞の樹状突起の形成期に一致して著明に発現が誘導されることが明らかになった。さらに、機能阻害型の変異遺伝子を海馬初代培養細胞への導入により、海馬神経細胞の樹状突起の形成が著しく誘導されることより、海馬神経細胞の樹状突起の形成に対して抑制的に関与していることを見いだした。これらの結果は、EFA6A-ARF6シグナル経路が、樹状突起形成の新たな制御シグナル経路として機能することを初めて明らかにしたもので、今後詳細な分子機序の解明が望まれる。神経細胞は、発達過程及び成熟期において、たえず神経回路を再構築し、可塑性を形成している。その神経回路形成の分子基盤を明確にすることは、神経高次機能や神経再生などを解明する上で必須である。ADPリボシル化因子 (Arf) は、Rasスーパーファミリーに属する低分子量GTP蛋白質で、従来、細胞内輸送小胞の形成の観点から多くの研究が行われてきた。近年、Arfの6分子種のうちArf6は、細胞膜やエンドゾームに局在し、細胞膜のリサイクリングや細胞骨格の制御に関わることが明らかになってきた。また、神経細胞の突起形成におけるArf6の機能関与が本年になり報告され、Arf6情報伝達系が、神経細胞の極性形成過程における細胞膜のダイナミズムに深く関与することが明らかになりつつある。本研究では、ARF6の活性化因子であるGDP/GTP交換因子であるEFA6 (exchange factor for ARF6) に着目して、分子ファミリーの構造決定、発現解析、および神経形態形成、とくに樹状突起の形成の機能関与を明確にすることを目的とする。

- (i) in situ ハイブリダイゼーション法によるEFA6Aの成熟期および発達過程における海馬での発現局在 (図1-8) :

EFA6Aのラット海馬における遺伝子発現局在をEFA6Aに対するオリドヌクレオチドプローブを作成し、放射性in situハイブリダイゼーション法を用いて検討

した結果、EFA6A mRNAは、海馬錐体神経細胞層及び歯状回顆粒細胞層に非常に豊富に発現していることが明らかになった。さらに特筆すべきことに、海馬神経細胞の樹状突起の存在する層においても発現シグナルが観察され、樹状突起におけるEFA6A mRNAの局在が示唆された(A)。さらに、非放射性in situハイブリダイゼーション法を用いて、発現解析を行った結果、EFA6A mRNAは、神経細胞

胞体のみならず樹状突起においても局在することが明確となった(B)。また、EFA6Aのラット海馬の発達過程における遺伝子発現を放射性in situハイブリダイゼーション法を用いて検討した結果、EFA6A mRNAは、生後1~2週齢の海馬において著明に発現の増加が観察され、樹状突起へのmRNAの局在は、1週齢の海馬ですでに観察された。

(ii) ノーザンブロット解析によるEFA6Aの発達過程における海馬での発現解析：

EFA6Aのラット海馬の発達過程における遺伝子発現を、ノーザンブロット解析法により検討した結果、EFA6A mRNAは、上述の発現様式に一致して、生後1~2週齢の海馬において著明に発現の増加が観察された。

(iii) 初代海馬神経培養細胞へのEFA6A変異遺伝子導入による樹状突起形成への影響：

EFA6AのSec7領域に存在するGTP/GDP交換能を不活性型に変異導入した遺伝子EFA6A (E246K) を、胎生期ラット海馬より作成した初代神経細胞に対して、リン酸カルシウム法により遺伝子導入を行い、樹状突起への影響を検討した。その結果、海馬神経細胞の樹状突起の形成が、不活性型EFA6A (E246K) の過剰発

図1-8

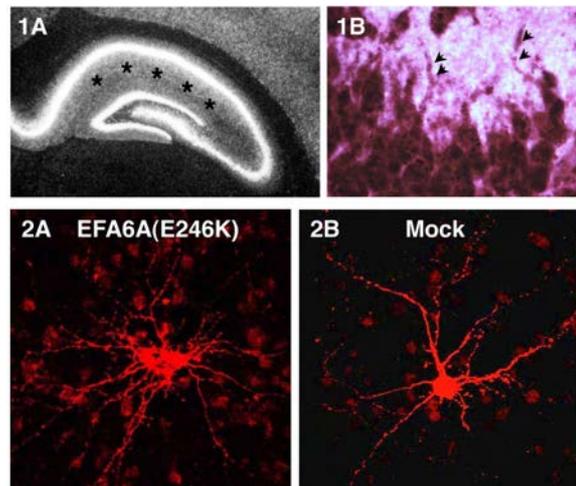


図1 海馬におけるEFA6Aの遺伝子発現局在 (A) 放射性in situハイブリダイゼーション法による成熟期海馬における EFA6Aの遺伝子発現。*は、樹状突起の存在する領域における遺伝子発現シグナルを示す。(B) 非放射性in situハイブリダイゼーション法によるEFA6Aの海馬錐体神経細胞の樹状突起における局在遺伝子発現 (矢印)。

図2 初代海馬神経培養細胞への不活性型EFA6A変異遺伝子導入による樹状突起形成への影響。不活性型変異遺伝子の導入(A)により、コントロール(B)に比べて著明な樹状突起の形成が誘導される。

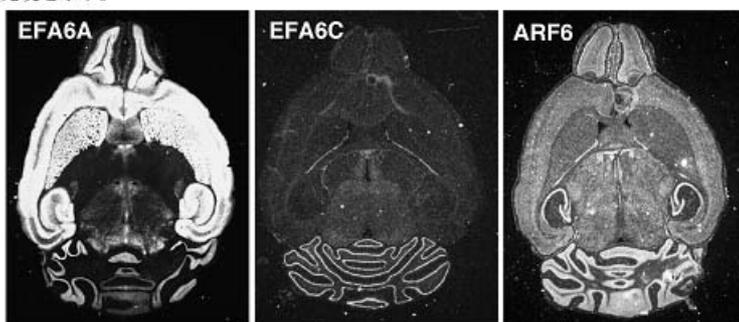
現により、コントロールとして用いた β -galactosidase遺伝子が導入された神経細胞のそれと比べて顕著に(約2倍)多く誘導された。

(iv) 成熟期神経系におけるEFA6Cの遺伝子発現様式(図1-9)：

EFA6Cの遺伝子発現解析により、ARF6は、神経細胞に普遍的に発現しており、EFA6Aは嗅球、大脳皮質、海馬などの前脳領域に豊富に発現しているのに対し

図1-9

図3 EFA6A, EFA6C, ARF6の成熟期マウス脳内遺伝子発現様式
成熟期マウス脳水平断面のin situ ハイブリダイゼーション法によるEFA6A, EFA6C, ARF6の遺伝子発現様式を示す。神経系に普遍的に発現するARF6に対して、EFA6Aは前脳領域に豊富に発現し、また、EFA6Cは小脳プルキンエ細胞と脈絡叢に局限した発現を示す。



て、EFA6Cは、小脳プルキンエ細胞と脈絡上皮細胞に局限して発現していることが明らかになり、ARF6の活性化は、EFA6AとEFA6Cにより、神経領域特異的に異なる調節を受けている可能性が示唆された。

(v) 小脳におけるEFA6Cの細胞内局在(図1-10)：

EFA6Cの細胞内局在を明らかにするために、特異抗体の作成し免疫組織化学的解析を行った。その結果、小脳プルキンエ細胞の細胞体、樹状突起とその棘突起に豊富に局在することが明らかにした。さらに、生化学的解析により、シナプス後肥厚分画に豊富に局在することを明確にした。これらの所見より、ARF6の活性化因子であるEFA6Cは、小脳プルキンエ細胞の樹状突起の後シナプス側の細胞膜のダイナミズムに深く関与する可能性が示唆された。現在、小脳プルキンエ細胞へ、不活性型EFA6C変異遺伝子を、シンドビスウイルスを用いて導入し、樹状突起の形成への機能関与に関して検討を加えている。以上の内容の研究成果は、J. Neurochemに受理され、現在印刷中である。

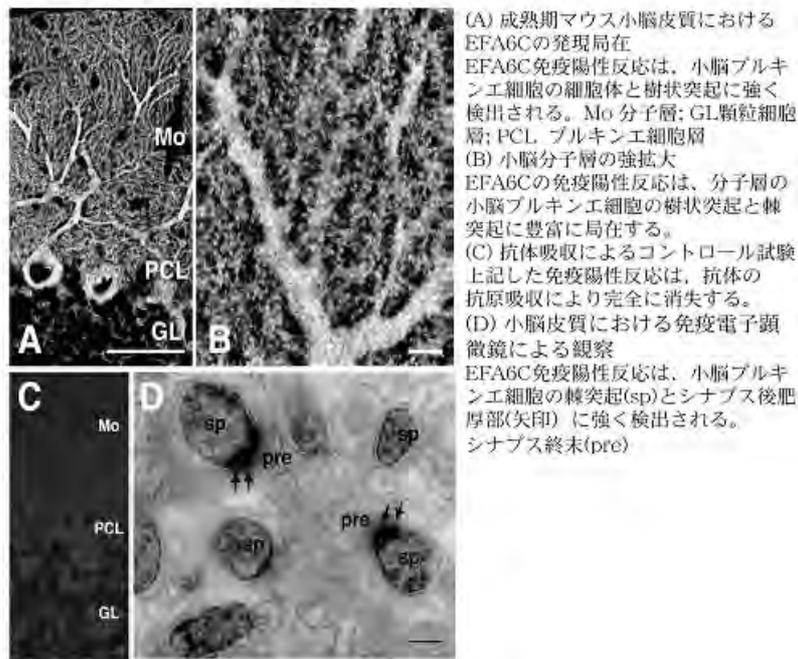
(2) 研究成果の今後期待される効果

海馬MF-CA3シナプス伝達がRタイプCa²⁺チャンネルブロッカーにより抑制されるという報告がある (Gasparini et al., 2001) が、ほとんど抑制されないという報告 (Breustedt et al., 2003) もあり、本課題研究はこの矛盾を一部説明するものである。これに対し、RタイプCa²⁺チャンネルを介するCa²⁺流入がMF-LTPなどシナプス前終末の可塑性を促進するという報告がある (Dietrich et al., 2003; Breustedt et al., 2003)。しかし、この考えを裏付けるには、本課題研究のシナプス前終末におけるRタイプの分布や機能の詳細な研究が必要である。MFは、CA3錐体細胞に大型のシナプスを形成するとともに、GABA性の介在ニューロンに小型のシナプスを形成する。われわれは、予備実験で、R-タイプに依存した伝達を小型のシナプスにおいて認めている。これを発展させることにより、サブタイプの分布と機能の連関およびその調節機序が解明されることが期待される。

中枢神経の個々のシナプス前終末において、Ca²⁺チャンネルサブタイプの発現がヘテロであることが神経ネットワークの可塑性にとり重要な意味を持つことが示唆されて

図1-10

図4 小脳皮質におけるEFA6Cの免疫組織学的発現局在



いる (Reid et al. 2003) が、本課題研究は、これを初めて実証するものである。

VAMP-pHluorine (SpH) 法がシナプス前終末における exo-endocytosis の定量化において、有用であることを示すいくつかの報告がなされている。Gandhi and Stevens (2003) は、単一シナプス前終末における単一小胞の開口放出が計測可能であること、小胞の endocytosis には、‘kiss-and-run’, ‘compensatory’, ‘stranded’ の3つ様式が存在することを示した。Fernandez-Alfonso and Ryan (2004) は、SpH法で endocytosis の速さを計測し、従来の方法で計測されたものよりも速いことを示した。また、SpH法により exocytosis と endocytosis を分離して定量できることを利用して、synaptotagmin I が endocytosis の制御にも関与していることが示されている (Nicholson-Tomishima and Ryan, 2004)。しかし、脳スライスのシナプス前終末の開口放出の研究への応用は、本研究課題が世界に先駆けた取り組みをおこなっており、SpHをシナプス前終末に発現するトランスジェニック動物の作成は、今後の研究を発展させるものと期待される。

てんかんモデルのキンドリングにより、basal dendrite の分布する SO に異所性のシナプスが形成されるという報告がある (Ben-Ari and Represa, 1990)。本研究課題は、ラットにモリス水迷路学習を課すと、学習成立動物に異所性シナプスの形成されるという報告 (Ramirez-Amaya et al. 2001) を、マウスを用いて追試するとともに、定量的解析によりネットワークが再構築されていることを証明するものである。

本研究課題は、また、海馬スライス培養系においてニューロンが自発的に新生されていることを世界に先駆けて報告した。また、レトロウィルスベクターを用いた EGFP 標識により、ニューロンが新生し、分化し、ネットワークに組み込まれる過程を追跡することのできる *in vitro* の系を確立したことにより、新生ニューロンの機能研究の進展が期待される。

神経系は、神経細胞の精巧な回路網を有し、その枠組みが発達過程及び成熟期を通して常に再構築する。この神経回路の形成の分子メカニズムを解明することは、学習、記憶などの神経高次機能の理解に直結するものと考えられる。また、脆弱X症候群などの精神遅滞を伴う先天性神経疾患において、神経細胞の樹所突起の樹状突起の形成不全が認められ、本研究のねらいである神経形態形成、特に樹状突起形成における低

分子量GTP結合タンパク質ADPリボシル化因子6 (ARF6) の機能解析は、神経科学における基礎的研究であるのみならず、近い将来、新たな治療法などの開発への展開を含み貢献できるものと考えられる。

3. 2 “新世代機能プローブおよびその導入法の開発” (新世代プローブ開発チーム)

(1) 研究内容及び成果

(1) 蛍光蛋白機能プローブの開発および改良

これまでに得られた成果として、蛍光タンパク遺伝子への変異導入あるいはサンゴなどの生物からの遺伝子クローニングなどにより、数々の新しい蛍光タンパクの創出ならびにそれらをベースとした蛍光プローブの開発を行ってきた。

特に、高いフォールディング効率を有した明るい改変GFPのVenusを組み込んだCa²⁺指示薬カメレオンは、調製したばかりの脳のスライスで、遺伝子導入後数時間以内のカルシウムイメージングを可能にし、また、分泌顆粒をVenusで蛍光ラベルすることでPC12細胞で脱分極や細胞刺激によって起こる顆粒分泌の素過程を、実時間で観察することも可能にした。図2-1は上述のVenus遺伝子を発現させたラット海馬由来の培養神経細胞である。きわめて明るいいため樹状突起などの細部の構造を観察しやすい。

さらに、サンゴの一種から紫外領域の光でフォトコンバージョンを起こし緑から赤に変化するKaedeの遺伝子クローニングに成功した(図2-2, 左は照射前、右は照射後)。その性質を用い、Kaedeタンパクを発現しつ

図2-1

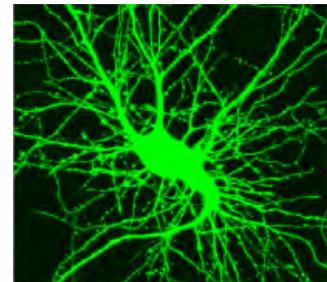
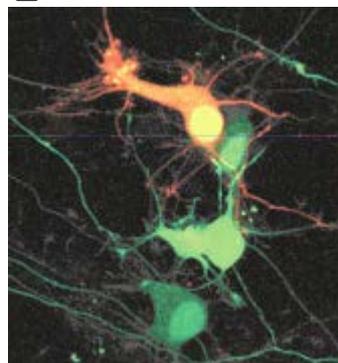


図2-2



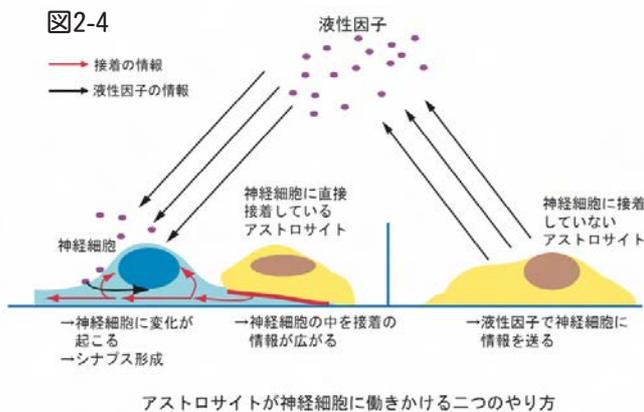
図2-3



つ重なり合い絡み合った培養神経細胞の一つに局所的に光を当て、単一の細胞体やその突起を赤色に変化させることで特異的にラベルし、周囲の緑色の神経細胞と明瞭に区別することを可能にした(図2-3, 図中の最上部の細胞に対して集中的に紫外領域の光を照射することで赤い細胞に変化させた)。

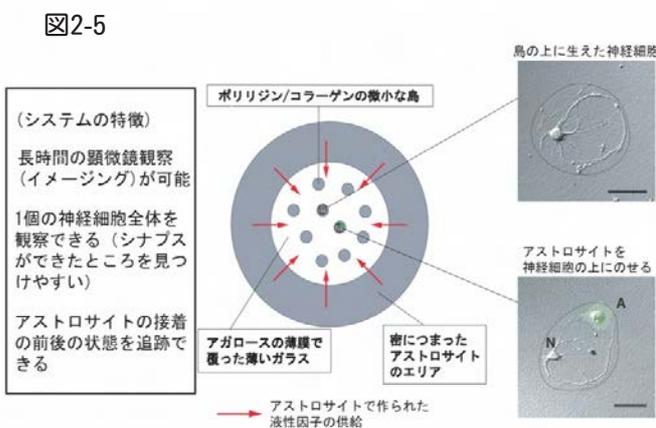
この他にも、サンゴ類からcyanの蛍光を発するMiCy、オレンジの蛍光を発するKusabira-Orangeなどの遺伝子をクローニングにも成功し、これまでの蛍光タンパクとは異なる蛍光波長域での蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)ベースのアプリケーションの可能性を見出した。

また、pHに感受性を示しシグナルの変化量が大きいGFP変異体の開発に成功した。この蛍光タンパクを神経終末部の分泌小胞に存在するVAMP2に融合させて、開口放出に伴う蛍光シグナルの変化を培養海馬神経細胞で捉えることが可能であることを確認済みである。



(2) ニューロン-グリア相関の解析

近年、神経細胞とグリア細胞の一つであるアストロサイトとの相互作用が注目を集めている。特に、神経細胞でのシナプス形成がアストロサイトからの液性因子によるものか、あるいはアストロサイトが神経細胞に接着することで生じるものかについては未解決のまま残された課題であった(図2-4)。



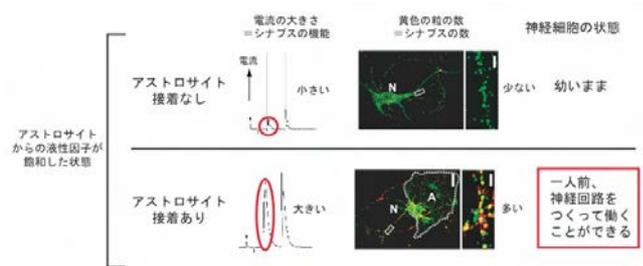
神経培養の培養システム：真上から見た模式図

われわれはこの点を明確にするための検討を行ってきた。実験にはmicroisland culture という精巧な培養法を用いて、一旦、アストロサイトと神経細胞を分離して超低密度で培養し、その後両者を再会させるという方法をとった (図2-5)。

その結果、海馬由来の培養神経細胞ではアストロサイトとの接触によってシナプス前終末部ならびにシナプス後膜の成熟が生じシナプス形成が顕著に誘発されることが判明した。そして、その効果は液性因子による効果を大きく上回ることが確認された (図2-6)。

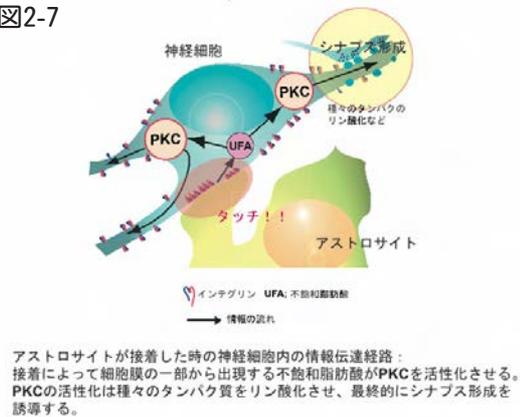
われわれは、同時に、この過程に生じる細胞内情報伝達経路についても検討を行った。アストロサイトとの接触は神経細胞表面のインテグリンを介して局所で行われ、その情報は神経細胞内でアラキドン酸をメディエーターとして神経細胞内を伝播し、これによってProtein Kinase C (PKC) が活性化される。さらに、この活性化したPKCが細胞内全体に広がった結果、最終的にシナプス形成が促進されることを明らかにした (図2-7)。

図2-6



(結果) アストロサイトの接着によって神経細胞に変化が起こった
→シナプス形成が促進された

図2-7



(2) 研究成果の今後期待される効果

まず、本チームが行った蛍光蛋白機能プローブの開発および改良に関する研究によって得られた知見ならびに新しいツールから、近い将来、神経細胞のみに限らず、細胞、組織そして個体レベルで細胞の営みを可視化することに応用できると考えられる。すなわち、これまで実時間での解析が困難であった複雑な細胞内情報伝達経路の解明に

応用し、種々の病気に関する情報伝達系の時空間的解明に有用なツールという形で科学技術ならびに社会に貢献することが可能であると思われる。

また、ニューロン-グリア相関の解析によって得られた知見は、シナプス形成を促進するメカニズムの詳細な解明へと発展すると予想され、科学技術に関して貢献できると考えられる。また、将来的に、脳の健康を維持するための基礎、さらに外傷性の+ダメージを受け損傷した中枢神経系の機能回復、あるいは発達期の神経回路形成の遅延を改善する治療法の開発の基礎という形で、科学技術のみならず社会に還元し得ると考えている。

3.3 “シナプス前性可塑性にともなうタンパク質リン酸化、タンパク質発現の解析”

(分子解析チーム)

(1) 研究内容及び成果

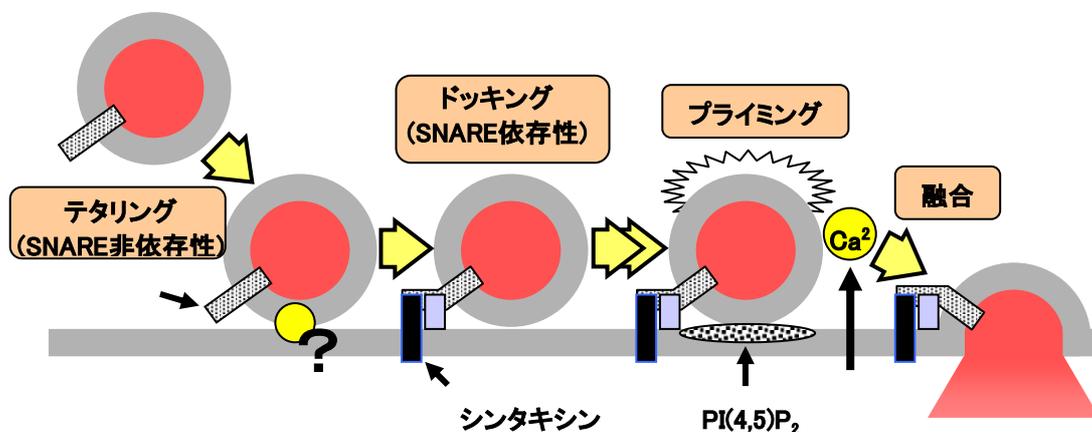
(1) 神経伝達物質放出の素過程の解明

ラット副腎髄質細胞腫由来の株化細胞であるPC12細胞は、ドーパミンやアセチルコリンなどの神経伝達物質をCa²⁺依存的に開口放出する。開口放出の素過程を明らかにするため、放出能が低下したPC12細胞の変異株を単離し解析を行った。Single cell cloningによって単離したPC12-dB3細胞は、脱分極依存的なCa²⁺動態変化、SNAREタンパク質の発現、分泌小胞の形状などには異常は認められないが、Ca²⁺依存的な開口放出能を殆ど消失していた。全反射蛍光顕微鏡観察では細胞膜にドックする小胞数は正常細胞とほぼ等しかったが、透過型電子顕微鏡観察では細胞膜にドックした小胞数が有意に減少しており、細胞膜への結合状態（ドッキング？）に異常が存在することが示唆された。抗SNAREタンパク質抗体を用いた免疫沈降実験や、リコンビナントタンパク質への結合実験から、PC12-dB3細胞ではSNARE複合体へのVAMP-2の結合が著しく低下していることが明らかとなった。現在PC12-dB3に発現するVAMP-2の遺伝子解析を行うと共に、正常なVAMP-2の発現によって放出能がどのように変化するかを解析している。

神経伝達物質の放出にホスファチジルイノシトール (PI) 代謝が重要な役割を果た

していることが示唆されている。開口放出におけるPIP2の役割を明らかにするため、PC12細胞を用い細胞膜上のPIP2の局在を調べた。超音波破碎法により細胞質面を露出させたPC12細胞の細胞膜シートを、抗PIP2抗体、抗クロモグラニンB抗体、抗VAMP-2抗体、抗シンタキシン抗体などで抗体染色したところ、それらはクラスター状の局在を示すことが明らかとなった。PIP2スクラスターの数と神経伝達物質放出能との相関を調べたところ、脱分極刺激を加えてしばらくすると神経伝達物質放出能は低下していったが、それに伴い分泌小胞と共存するPIP2クラスターの数も減少したが、シンタキシンクラスター数には変化が見られなかった。PC12細胞にPIP5キナーゼを発現させると細胞膜上のPIP2クラスター数が増加し、神経伝達物質放出能も増加した。神経伝達物質放出能の増加の割合は、脱分極刺激の強さを変化させてもほぼ同じであった。以上の結果からドックした分泌小胞上にPIP2クラスターが形成されることが分泌能の獲得（プライミング）であると考え次のようなモデルを提出した（図3-1）。

図3-1 開口放出の素過程のモデル



(2) 神経伝達物質放出におけるCa²⁺イオンの役割

シナプス小胞の開口放出はCa²⁺イオンによって誘発される。膜融合過程のCa²⁺センサータンパク質としてはシナプトタグミンが有力視されているが、開口放出が起こるまでの他の素過程にもCa²⁺依存性な過程が存在することが示唆されている。

神経伝達物質放出におけるカルモジュリンの関与を明らかにするため、PC12細胞

や培養小脳顆粒細胞、培養大脳皮質神経細胞などを用い、カルモジュリン阻害剤であるオフィオボリンA (OBA) の作用を解析した。PC12細胞にOBAや他のカルモジュリン阻害剤を作用させると、ドーパミンやアセチルコリン放出が用量依存的に抑制された。同様の抑制は培養大脳皮質神経細胞からのグルタミン酸 (Glu) 放出でも認められたが、培養小脳顆粒細胞からのGlu放出はまったく抑制を受けなかった。坑シナプトフィジン抗体を架橋させた磁気ビーズを用い、これらの細胞から分泌小胞やシナプス小胞を単離したところ、OBAによる抑制が見られるPC12細胞や大脳皮質細胞の小胞ではカルモジュリン結合タンパク質であるミオシンVが結合しているのに対し、抑制が見られない小脳顆粒細胞ではミオシンVの結合は認められなかった。これらの結果からカルモジュリンは開口放出に必須ではないが、ある種の神経細胞や分泌細胞ではその制御に関与し、ミオシンVがその標的タンパク質である可能性が明らかとなった。

培養小脳顆粒細胞にイオノマイシンを作用させ細胞内にCa²⁺導入すると、開口放出に必須なSNAREタンパク質の中でSNAP-25の分子量のみが30kDaから20kDaへ減少した。SNAP-25の分子量変化はNMDA処理でも引き起こされたが、脱分極刺激では引き起こされなかった。SNAP-25の様々な領域を認識する抗体を用いた解析から、SNAP-25のN末端のコイルドコイルドメインを含む領域が切断されていることが明らかとなった。細胞内システインプロテアーゼであるカルパインの阻害剤を作用させると、Ca²⁺依存的なSNAP-25の分子量変化が阻害され、Ca²⁺依存的なGlu放出が上昇した。これらの結果から、NMDAレセプターの異常活性化が起こるような条件下では、細胞内でカルパインがSNAP-25を切断し、Glu放出を持続的に抑制する機構が存在すると考えられた。

開口放出の素過程やリン酸化による制御をさらに詳細に解析していくためには、シナプス小胞を短時間で高度に精製することが必要である。小胞性のグルタミン酸トランスポーターや小胞性のGABAトランスポーター、VAMPなどに対する特異抗体を架橋させた磁気ビーズを作成し、興奮性および抑制性のシナプス小胞を精製する方法を確立し、それぞれの構成タンパク質の解析を質量分析機を用いて進めている。

(3) リン酸化による伝達物質放出制御機構の解明

(i) cAMP依存性キナーゼ (PKA) による制御機構：

PC12細胞にPKAの阻害剤であるH-89を作用させると、用量依存的にCa²⁺依存性ドーパミン放出が抑制された。ドーパミン放出の量子解析を行うため、培養したラット副腎髄質細胞からのカテコールアミン放出を、微小炭素電極を用いたアンペロメトリー法で解析した。細胞膜透過性のPKAの特異的な阻害ペプチド (myr-PKI) を作用させると副腎髄質細胞からのカテコールアミン放出も抑制されたが、放出頻度には変化が見られず大きな量子量を示す放出が選択的に抑制された。これらの結果から、PKAは部分的に恒常的な活性化を受けており、神経伝達物質放出能の維持に関与していると考えられた。

(ii) プロテインキナーゼC (PKC) による制御機構：

PC12細胞にフォルボールエステル (PMA) を作用させるとSNAP-25のSer187がリン酸化され、ドーパミンやアセチルコリン放出が促進された。PKCの阻害剤を用いた解析などからPMAによる神経伝達物質放出促進はPKC依存的な機構と非依存的な機構との複数の機構で起こっていることが明らかとなった。PKC依存的な放出促進の機構を明らかにするため、PC12細胞の分泌小胞をEGFPを用いて蛍光標識し、PMAを作用させた際の局在変化を共焦点顕微鏡で定量解析した。カテコールアミンを含む大型の有芯小胞の標識にはモノアミントランスポーター、アセチルコリンを含む小型のシナプス様小胞の標識にはアセチルコリントランスポーターのそれぞれN末端にEGFPを融合させたタンパク質を発現させて行った。PMA未処理の状態ではどちらの分泌小胞も細胞質全体にほぼ一様に分布していたが、PMAを作用させると細胞膜付近に集積した。このような変化は不活性な4 α フォルボールでは引き起こされず、またPMAによる変化はPKCの阻害剤であるBISで完全に阻害された。以上の結果から、PKCによるリン酸化によって分泌小胞が開口放出を行う場である細胞膜にリクルートされ、放出機能が亢進すると結論された。

(iii) チロシンキナーゼによる抑制性制御機構：

PKAやPKCを初めとする様々なタンパク質リン酸化酵素が、神経伝達物質放出を促進的に制御しているが、抑制的に作用する制御系は明らかにされていなかった。PC12細胞にSrcファミリーキナーゼを阻害剤する genisteinやPP2を作用させるとCa²⁺依存的なドーパミン放出が促進されたが、阻害活性を持たないgenistinやPP3では促進は見られなかった。PC12細胞に恒常的活性化型v-Srcを一過的に発現させると伝達物質放出は抑制されたが、キナーゼ活性を失った変異型では抑制は起こらなかった。PC12細胞にPP2を作用させると、パキシリンやPyk2のチロシンリン酸化が抑制され、F-アクチンの動態や細胞形態に大きな変化が観察された。ラトランキュリンやサイトカラシンDでPC12細胞のF-アクチンを脱重合させても神経伝達物質放出の促進が見られた。一方、小脳顆粒細胞からのグルタミン酸放出もPP2によって促進された。以上の結果からSrcキナーゼはおそらくは細胞骨格系のダイナミクスを変化させることにより、PC12細胞や中枢神経細胞からの神経伝達物質放出を抑制的に制御していると結論した。

PC12細胞や培養小脳顆粒細胞にエリスロポエチン (EPO) レセプターのアゴニストであるEPOやEMP1を短時間作用させると、JAK2が活性化され、Ca²⁺依存的な神経伝達物質放出が抑制された。EPOやEMP1によるJAK2のリン酸化や神経伝達物質放出の抑制は genisteinを作用させると見られなくなったが、阻害活性を持たない genistinでは影響されなかった。培養小脳顆粒細胞や海馬神経細胞を化学虚血状態にすると、初期には開口放出機構によって、後期には非開口放出機構によってグルタミン酸放出が引き起こされた。EPOレセプターを活性化すると開口放出によるGlu放出が抑制され、海馬CA1領域の神経細胞死が抑制できることを明らかとなった。以上のことからEPOレセプターに結合しているJAK2は、虚血状態で引き起こされる開口放出によるグルタミン酸放出を抑制し神経細胞死を抑制することが明らかとなった。

(iv) 脂質キナーゼによる制御機構：

PC12細胞にNGFやEGF, IGF-1を短時間作用させるとPI3キナーゼが活性化され、

神経伝達物質放出が促進された。これらの促進作用はCaチャンネルを活性化することなしにイオノマイシンで放出を誘発した場合でも見られることから、Ca²⁺流入以降の何らかのステップの変化に基づいていると考えられた。NGF、EGFおよびIGF-1による放出促進はどちらもPI3キナーゼの阻害剤でほぼ完全に阻害されることから、これらの促進にはPI3キナーゼが関与していると考えられた。NGFやEGFによる促進はMAPキナーゼの阻害剤でも顕著に抑制されたが、IGF-1による促進はほとんど影響を受けなかった。GFPとPKBのPHドメインの融合タンパク質を発現したPC12細胞を用い、PI3キナーゼが活性化される細胞内局在部位を調べたところ、NGFやEGFでは細胞膜で活性化が起こるのに対しIGF-1では細胞質で活性化されることが明らかとなった。以上のことから NGFやEGFとIGF-1による神経伝達物質放出促進は異なる機構で行われており、NGFやEGFによってレセプターが活性化されると、細胞膜でPI3キナーゼが活性化され、MAPキナーゼ依存的に神経伝達物質の放出が促進されるのに対し、IGF-1レセプターの活性化では細胞内膜系で活性化されたPI3キナーゼによってMAPキナーゼ非依存的に神経伝達物質の放出促進が起こされると結論された。

(4) 脳機能へのリン酸化の役割

リン酸化を介したシナプス前性制御がどのように脳機能の制御に関っているかを明らかにするためリン酸化部位に変異を加えたノックインマウスを作成し解析を行った。PKCによって細胞内でリン酸化されるSNAP-25のSer187をAlaに変異させたノックインマウスの脳をニッスル染色で調べた結果、変異ホモマウスでは全体的な脳構築には顕著な異常は認められなかったが、ヘテロマウスを掛け合わせてホモマウスの作成を行うと、出生したホモ個体の数はメンデル則で予想される数の約7割でしかないことや、出生したホモ個体も、生後2週目から3週目の1週間にホモマウスの約30%が死亡することから、SNAP-25のリン酸化が脳の発達過程に何らかの重要な役割を果たしている可能性が考えられた。生後3週以降まで生存したホモマウスのその後の生存率は野生型と変化が見られなくなり、最長で2年以上生存した。リン酸化部位に変異を持

つホモマウスの行動には顕著な異常が認められた。ホモマウスは非常に怖がりやすく、少しの環境変化でフリージング行動を引き起こす特徴を示した。オープンフィールドでの自由行動試験を行うと、野生型やヘテロマウスは顕著な探索行動を行いフィールド全体をくまなく歩き回るのに対し、ホモマウスは2種類の特異な行動様式を示した。半数以上のホモマウスは、殆どの時間を壁際に過ごすばかりではなく、実験開始後しばらくすると行動を停止した。しかし、一部のホモマウスは全く異なる行動様式を示し、実験期間中、常に壁際に沿って動き回るという多動性を示した。このような行動様式の違いは、同腹のホモ個体間でも見られることがあった。不安感の行動試験である明暗選択テストを行うと、野生型やヘテロマウスは暗室のみならず明室でも盛んな探索行動を示したが、ホモマウスは殆どの時間を暗室で過ごしていた。これらの結果からSNAP-25のリン酸化が情動制御に何らかの重要な働きを果たしていることが示唆された。(図3-2)

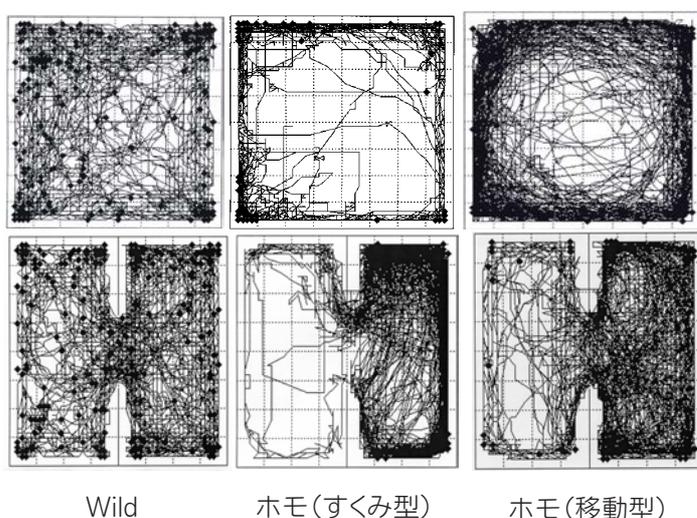


図3-2 SNAP-25ノックインマウスの行動軌跡。

オープンフィールド（上段）および明暗選択テスト（下段、左が明室、左が暗室）。2匹のホモマウスは同腹の姉妹であるが、行動様式が大きく異なり、右側のホモはオープンフィールドで多動を示す

(5) 選択的輸送

以上の結果から、シナプス前性制御には多様なキナーゼが多様な機構で関与し、脳機能の制御に関わっていることが明らかとなった。一つの可能性として、個々のシナプス前部には、これらのキナーゼや制御タンパク質が全てそろって存在するのではなく、さまざまな組み合わせで存在し、シナプスに個性を作り出している可能性が考えられ

る。シナプス前部への制御タンパク質の選択的な配送機構を明らかにするため、開口放出の制御タンパク質と考えられているComplexinを培養海馬神経細胞に発現させ、その局在分布を共焦点顕微鏡で解析した。その結果Complexinの発現量はデンドライトでは細胞体から遠ざかるに従い減少するのに対し、軸索では減少しないことから、軸索を通過してシナプス前部に選択的に輸送する機構があることが示唆された。さまざまなComplexinのデリーションミュータントを発現させ、その分布を比較することによって、軸索への選択輸送に必須なコア候補配列を特定した。このコア候補配列が実際の脳でも軸索への選択的配送シグナルとして働くかを明らかにするため、EGFPを融合させたコア候補配列を発現させたトランスジェニックマウスの作成を進めている。

(2) 研究成果の今後期待される効果

シナプス前性制御に関するリン酸化基質の同定は多くのグループで進められているが、リン酸化アミノ酸が特定されたものはまだ多くはなく、そのリン酸化部位の変異がどのような脳機能の異常に繋がるかを示した例はない。我々はSNAP-25のSer187の変異がマウスの情動異常を引き起こすことを明らかにしたが、その成果は次のような波及効果を持つと考えられる。

- ①「不安感」という情動の脳内メカニズムが明らかになれば、今日の脳科学が次に目指す重要な課題である、情動の分子基盤の解明に大きな進展をもたらすものと期待できる。
- ②不安感は記憶・学習機能や判断力などにも大きな負の影響を及ぼし、社会にとっても大きな損失となる。過度の不安感の蓄積は、うつ病や統合失調症などの、さらに大きな情動障害を伴う精神疾患を誘発することも考えられ、神経内科、精神科などの臨床現場では優れた抗不安薬の必要性がますます高まっている。本研究で得られたリン酸化部位変異マウスは、新たな創薬の標的候補やスクリーニング系を提示するばかりではなく、従来とはまったく異なる作用機序を持つ向精神薬を開発することが期待できる。

③遺伝子改変マウスの作成は、脳科学のみならず様々な分野できわめて有効な解析手段となっているが、その作成や維持には、多大な人的、経済的投資を必要とすることから、効率的なストラテジーの確立が模索されている。生理的に重要なリン酸化部位の、僅か1アミノ酸変異で大きな表現形の変化をもたらされたことは、リン酸化部位変異マウスの作成と解析が高次機能の解析に有効であることを示しており、今後の研究に重要な示唆を与えられると思われる。

軸索や樹状突起への遺伝子産物の選択的輸送機構に関してはレセプターやイオンチャンネルなどの膜タンパク質に関しては研究が進みつつあるが、可溶性のタンパク質に関してはほとんど手がつけられていない。我々は培養神経細胞を用いて軸索への選択的輸送に関ると考えられるComplexinのコア候補配列を特定したが、この配列の妥当性がトランスジェニックマウスで証明できれば、この問題を解明する上で重要な突破口になるものと考えられる。

3. 4 “シナプスにおけるエクソ-エンドサイトーシス制御の素過程解析”

(機能解析チーム)

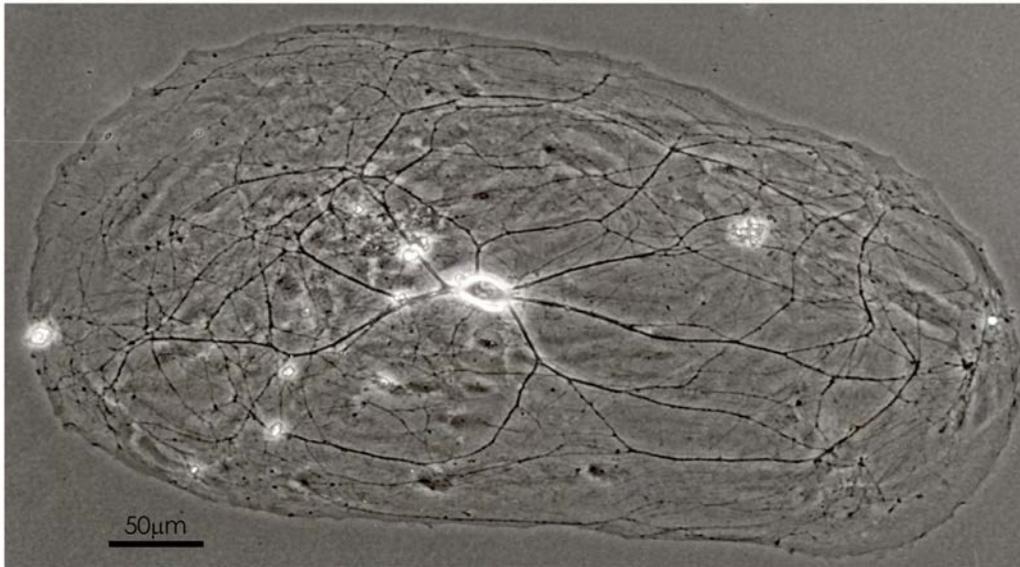
(1) 研究内容及び成果

(1) オータプスを用いたシナプス前可塑性の画像解析

海馬CA3領域は空間学習に重要な役割を果たしている。CA3領域における苔状線維末端部は、テタヌス刺激により、神経伝達物質の放出が増強するタイプのシナプス可塑性を示す。この可塑性の誘導はcAMP依存性であるが、神経伝達物質の放出増強のメカニズムとして、放出サイト数の増加が関与しているかは不明であった。我々はラット培養神経細胞を用いて、蛍光画像解析法によりシナプス前放出サイト数がcAMP-PKA系の活性化により増加するか否かを検討した。

苔状線維の起始核である歯状回の神経細胞をグリア細胞のマイクロアイランド上で培養し(図4-1)、オータプス(自己回帰性シナプス)を形成させた。活性のあるシナプス前放出サイト数をカウントするために、活性のあるシナプス前放出サイトに取り込まれる蛍光色素FM色素を用いた。マイクロアイランド上のすべてのオ-タプスのシナ

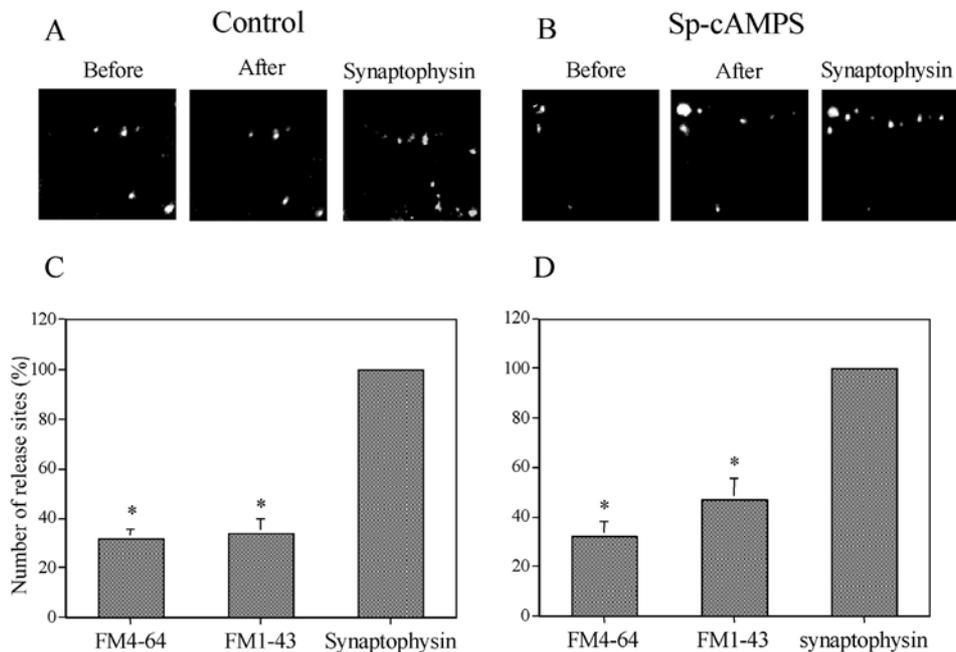
図4-1 ラット海馬神経細胞のマイクロアイランド培養



プス前サイトは同じ1個の起始細胞を持つ。よって1細胞あたりの放出サイト数を定量化することが可能となる。取り込み刺激には電場刺激 (1Hz, 20sec) を用い、cAMP合成を増強させる forskolin等の投与前と投与後の放出サイト数をカウントし、cAMP系の増強が放出サイト数に与える効果を定量解析した。まず蛍光色素FM4-64 (赤色) を含む細胞外液中で電気刺激 (1Hz, 20sec) を行い、活性シナプス前サイトにこれを取り込ませ蛍光イメージを記録した。次いでcAMP産生を増強させるフォルスコリン (FSK, 50 M) を30分間投与した後、蛍光色素FM1-43 (緑色) を電気刺激によって取り込ませイメージを記録し、最後に高濃度KCl (60mM) 細胞外液の灌流により色素を放出させイメージを記録し、消えた蛍光スポットのみを活性シナプスサイトとしてカウントした。cAMP系をFSKで賦活化すると活性シナプス前サイトの数が増加することが示された。輝度の変化ではなく、不活性シナプス前サイトが活性化された可能性が高い。膜透過型-非加水分解型のsp-cAMPSの投与でも同様のシナプス前サイト数の増加が生じ、これらの増加は蛋白質キナーゼA (PKA) の阻害剤、KT5720の投与により、阻害された。Sp-cAMPSによるシナプス前サイトの増加は、0.1mM Ca^{2+} 外液中では見られず、2mM Sr^{2+} も Ca^{2+} の役割を代替できなかったことから、シナプス前サイト活性化メカニズムにおいて、PKAの下流にも Ca^{2+} 依存性の過程があることが示唆された。

固定後、シナプス小胞膜蛋白質、シナプトフィシンに対する抗体を用いてシナプス小胞集積サイトのイメージを記録し、活性シナプス前サイトのFM蛍光イメージと比較検討した。その結果、シナプス小胞の集積サイトの内、約70%は不活性（ミュート）サイトであり、cAMP系活性化により約15%が活性型に転換されることが示された(図4-2)。

図4-2 活性および不活性シナプス前サイトとSp-cAMPSによるサイトの活性化



(2) シナプス前エクソサイトーシスにおけるRab3 GEPの機能解析

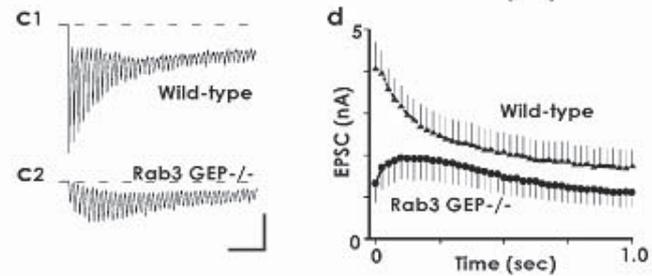
シナプス前末端部からの神経伝達物質の開口放出（エクソサイトーシス）は多数の蛋白質の関与する、多くの素過程から成ると考えられる。それぞれの蛋白質の機能解析には遺伝子ノックアウト動物の活用が有益である。我々は高井義美教授（阪大院）のグループより神経特異的低分子量G蛋白質Rab3Aのアクティベーターの一種、Rab3 GEPの遺伝子をノックアウトした動物の提供を受け、この分子のシナプス前エクソサイトーシスにおける役割をマイクロアイランド上で培養した海馬神経細胞オートプスを用いて解析した。帝王切開後、各個体別に海馬を取り出し細胞を単離、培養し、培養後2-3週の細胞のうち、オートプスを形成している細胞を選んでホールセル・パッチクランプ法によりシナプス電流を解析した。その結果、KO動物において、興奮性シ

ナプス後電流 (EPSC) の振幅は有意に小さく、ペアドパルス修飾比 (PPMR) は有意に大きかった。シナプス前末端部からの神経伝達物質の放出が減少していると推定された。非同期EPSCに関する量子解析の結果、量子

サイズに差はなく非同期EPSC頻度はKO群で有意に小さかった。これらのことからKO群のシナプス前エクソサイトーシスが抑制されていると考えられた。細胞外Caイオン濃度を2mMから8mMに上昇させた時のEPSC振幅上昇率は両群で同程度であり、Ca感受性に大きな差は見られなかった。

反復刺激 (40Hz) に対し、オータプスの興奮性シナプス電流 (EPSC) は野生型では単純減少し(図4-3.C1)、KO群では一時増大しその後漸減し、両群とも定常値に達する(図4-3.C2)。この間の総放出量(各EPSC振幅ピーク値の総和)を同期的放出可能プール量(RRP_{syn})の目安としたところ、 RRP_{syn} の値に差は認められなかった(WT群, 970粒; KO群, 890粒)。初めのEPSC振幅ピーク値を RRP_{syn} で割った値を放出確率として解析したところ、KO群の放出確率 $_{syn}$ (0.05)はWT群の放出確率 $_{syn}$ (0.19)より有意に低下していた。高浸透圧蔗糖液 (0.5M) を用いて計測した総放出可能プール量 (RRP_{total})も両群間で差はなかった(WT群, 4700粒; KO群, 5700粒)がKO群の放出確率 $_{total}$ (0.013)はWT群の放出確率 $_{total}$ (0.04)より有意に低かった。オータプスを電子顕微鏡で観察したところ、KO群においても多くのシナプス小胞が膜にドッキングしており、末梢シナプスでの様相とは大きく異なっていた。末梢シナプスではRab3 GEPはドッキング以前のプロセスでも重要な役割をはたす、と考えられるが、中枢シナプスではドッキング以後の過程に働いて放出確率を上昇させていることが示唆された。しかしCa感受性に両群間で大きな差がないことを考慮すると、Rab3 GEP KO動物ではシナプス小胞のプライミング過程に異常があることが強く示唆された。Rab3A自身は放出

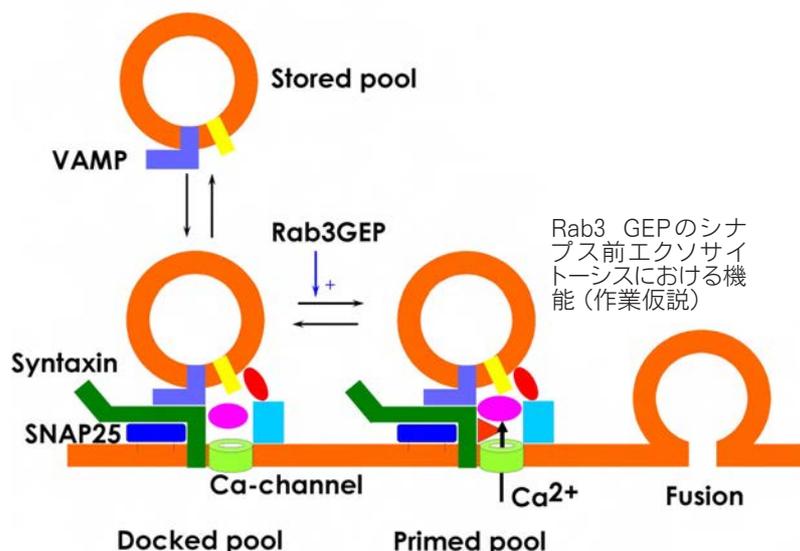
図4-3
40Hz



培養海馬神経細胞オータプスにおける反復刺激に対する興奮性シナプス後電流応答

を抑制すると考えられているので、Rab3 GEPはRab3A以外の蛋白質にも作用し、ポストドッキング過程において膜融合・放出を増強する方向に作用していることが示唆された（図4-4）。

図4-4



(3) オータプスを用いたグリア細胞によるシナプス形成促進の分子機構の解明

新世代プローブ開発チームとの共同研究により、コラーゲンのマイクロアイランド上に培養した海馬神経細胞を用いて、グリア細胞によるシナプス形成増強作用の分子機構を解析した。

(4) エクソ／エンドサイトーシスによる受容体機能調節の解明

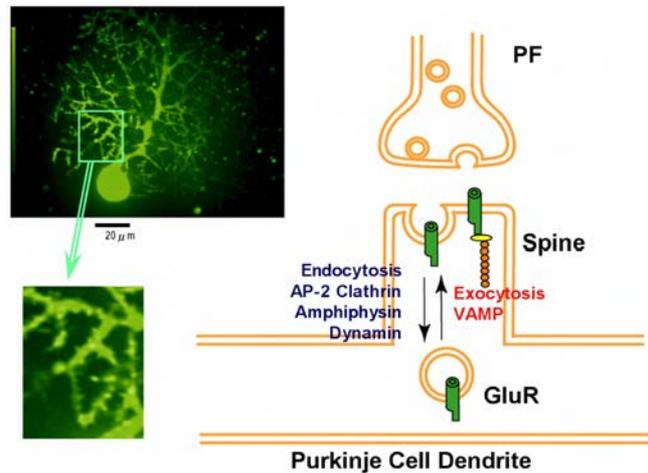
エクソ／エンドサイトーシスによるシナプス受容体機能の調節も、シナプス可塑性メカニズムの一つと考えられる。小脳皮質における運動学習の基礎過程は、平行線維PF-プルキニエ細胞間シナプス伝達の長期抑圧LTDであり、エンドサイトーシスによるAMPA型グルタミン酸受容体のシナプス膜からの除去がLTDの分子機構と考えられている。一方、AMPA-Rのシナプス膜への挿入調節は全く不明であった。テタヌス毒素のプルキニエ細胞内投与により、VAMP（小胞膜SNARE蛋白質）を阻害すると、PF-

EPSC振幅は減少したことから、SNARE蛋白質を介した構成性エクソサイトーシスがAMPA-Rのシナプス膜発現に

関与していることが示された。一方、エンドサイトーシスを阻害するペプチド（ダイナミン阻害ペプチド）を細胞内投与すると、PF-EPSC振幅は徐々に増加した。これは構成性エンドサイトーシスがシナプス

膜におけるAMPA-R発現に常

図4-5 小脳プルキンエ細胞におけるエクソ/エンドサイトーシスによるGlu受容体のシナプス表面発現調節



時関与していることを示唆している。PF-EPSCの振幅は常時、一定であることから、AMPA-Rシナプス膜発現は構成性エクソサイトーシスと構成性エンドサイトーシスの平衡によって保たれていることが示唆された（図4-5）。

(2) 研究成果の今後期待される効果

エクソ/エンドサイトーシスは真核細胞の持つ最も基本的な性質でありながら、多くの分子が関わる複雑な過程であるため、近年になってはじめて、本格的な蛋白質分子と機能の関係が研究され始めた。エクソ/エンドサイトーシス制御の基礎機構が解明されると、多くの疾患の診断、治療に貢献すると思われるが、一例として、インスリン非依存性糖尿病等の治療に著しい進展が期待できる。

また、シナプスにおけるエクソ/エンドサイトーシス制御機構が明らかになることにより、シナプス可塑性、シナプス修飾の仕組みが解明される。シナプス可塑性の解明により、より効果的な記憶学習法、あるいは記憶学習障害を改善する薬剤の開発が可能となる。また、小脳運動学習機能が解明されりことで、小脳疾患における運動障

害の改善薬、リハビリテーション効果を高める薬剤の開発等も期待できる。生体アミン、ペプチド等によるシナプス修飾作用にもエクソ/エンドサイトーシス制御は関与している。シナプス修飾作用は情動、睡眠などの基礎にあり、この修飾機構の解明により、情動障害や睡眠障害に対する新たな治療薬等の開発が期待できる。これらの諸疾患の治療の促進により、国庫からの医療費負担を軽減させ、国民の生産性をより向上させることが期待できる。

3.5 “遺伝子改変動物の作製”（遺伝子改変動物作製チーム）

(1) 研究内容及び成果

遺伝子改変マウスを作成・解析することにより、特定のニューロンおよびそのシナプス終末における機能とその分子基盤を明らかにすることを目的とした。

(1) GABAニューロンの機能解析を目的とした遺伝子改変マウスの開発

中枢神経系においては、神経が同期して活動する現象、あるいは学習や記憶の素過程と考えられているシナプス可塑性の形成には、GABAニューロンが抑制性インターニューロンとして行う神経情報処理が重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、GABAニューロンは、中枢神経系に散在し、比較的少数であることから、*in vivo*や*in vitro*において正確に同定することは困難であった。一方、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD; GAD65とGAD67の2型存在）は、GABA合成酵素であり、中枢神経系ではGABAニューロン特異的に発現する。従って、GAD遺伝子を利用して特定の分子をGABAニューロンに発現させた遺伝子改変マウスを開発することにより、GABAニューロンの機能解析に用いることにした。

(i) トランスジェニックマウスを用いたGABAニューロン特異的遺伝子発現調節機序の解明：

最初に、GABAニューロン特異的遺伝子発現に必要な転写調節機序を明らかにする目的で、GAD65およびGAD67の両遺伝子をマウスゲノムライブラリーから単離し、プロモーター領域の解析を行った。GAD65あるいはGAD67の遺伝子プ

ロモーター領域に β -ガラクトシダーゼ (**lacZ**) 遺伝子を結合させた融合遺伝子作成し、マウス受精卵に導入することにより、トランスジェニックマウス (**GAD67-lacZ**マウスおよび**GAD65-lacZ**マウス) を作成した。いずれのトランスジェニックマウスにおいても**GABA**ニューロンが豊富な領域に**lacZ**の発現が観察されることから、プロモーター領域が**GABA**ニューロン特異的発現に寄与していることが示唆された。しかし、視床などの**GABA**ニューロンには、全く**lacZ**の発現が観察されないことから、**GABA**ニューロン特異的発現にはイントロンなどのプロモーター以外の領域がさらに必要であることが示唆された。(Makinae et al., *J. Neurochem.* 2000; Kobayashi et al., *Biochim. Biophys. Acta* 2003)

(ii) **GABA**ニューロンを**GFP**で標識した遺伝子改変マウスの開発：

GABAニューロンを蛍光分子で標識することを目的として、**GAD67**遺伝子に相同組み換えを利用した遺伝子標的法を用いて発光オワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白、**Green fluorescent protein (GFP)** 遺伝子をノックインしたマウス (**GAD67-GFP**マウス) を作成した。トランスジェニックマウスを用いたプロモーター解析の結果に基づいて、遺伝子標的法を利用することにした。具体的には、**GAD67**遺伝子に**GFP**遺伝子をノックインしたコンストラクトを作成し、**ES**細胞に導入することにより、相同組み換えによる**GAD67**遺伝子**GFP**ノックインした**ES**クローンを得た。これらのクローンをを用いてキメラマウスを作成し、野生型マウスとの交配により**GAD67-GFP**マウスを樹立した(図5-1)。**GAD67-GFP**マウスの小脳皮質組織標本を作成し、**GFP**の自家蛍光の観察(図5-2) 抗**GFP**抗体を用いた免疫組織化学で検討した結果、**GABA**ニューロンの発現パターンに一致した**GFP**の発現が観察された。また、**GAD67-GFP**マウス扁桃体の**GFP**陽性細胞についてホールセル記録した結果、**GABA**ニューロンに特徴的な高頻度の活動電位を観察した。以上の結果は、**GAD67-GFP**マウスが**GABA**ニューロンの形態学解析や機能解析に有用であることを示唆した。(Yanagawa et al., *FAONS Congress*, 2002)

(iii) **GAD67-GFP**マウスの改良：

GAD67-GFPマウスには、**ES**細胞をスクリーニングするための**lox-P**配列で挟ま

図5-1

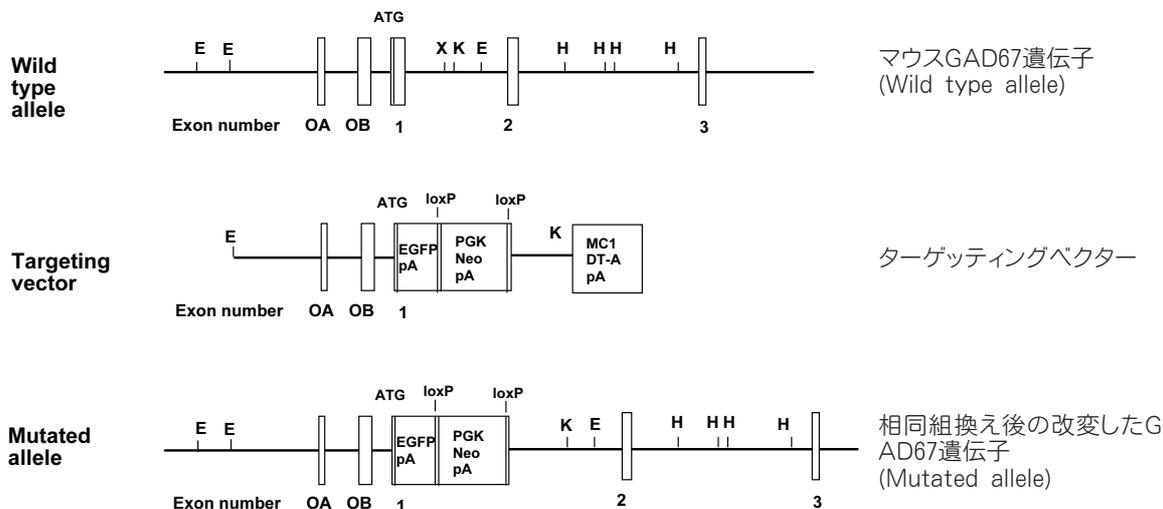
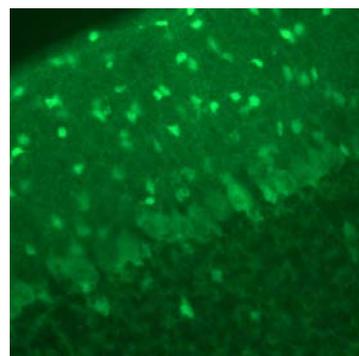


図5-2 GAD67-GFPマウス小脳皮質の蛍光観察像



れたPGK-neo遺伝子が含まれている。GAD67-GFPマウスからPGK-neo遺伝子を削除したマウス (GAD67-GFP (Δ neo) マウス) を作成・解析した結果、GAD67-GFP (Δ neo) マウスはGAD67-GFPマウスよりGFPの発現が高いことを観察した。従って、GAD67-GFP (Δ neo) マウスが、GABAニューロンの機能や発生を解析するのにさらに有効な資材となることを明らかにした。GABAニューロンのシナプス終末は同定が困難なため、GABAシナプスの機能解析は容易ではない。そこで、シナプス機能を解析するための蛋白分子 (synapto pHluorin など) をコードする遺伝子をGAD67遺伝子にノックインした遺伝子改変マウスを作成すれば、GABAニューロンのシナプス終末の同定とシナプス機能解析が大変容易になることが期待できる。(Tamamaki et al., J Comp. Neurol. 2003)

(2) GABAニューロンの機能解析とその分子基盤

(i) 扁桃体GABAニューロンの電気生理学的特性：

扁桃体のGABAニューロンを薬理的に修飾すると、齧歯類の情動学習の程度に変化が生じることが知られており、これらの神経核内のGABAニューロンが情動学習の調節に重要な役割を果たしている。また、脳幹からのモノアミン投射系は扁桃体の神経活動を修飾することによって情動行動を調節する。しかしながら、扁桃体は解剖学的に海馬、新皮質、小脳のような整然とした層構造を取らず、GABAニューロンをスライス内で形態あるいは位置に基づいて同定することは容易でない。そこで、GABAニューロンを蛍光下に同定可能なGAD67-GFPマウスを用いて解析を行った。扁桃体基底外側核のGFP陽性細胞は、細胞内通電に対する発火パターンから3種類のサブタイプに分類できた。(1) Fast-spiking (FS) 細胞 (平均150Hz程度のスパイク頻度)、(2) Low-threshold-spiking (LTS) 細胞 (平均100 Hz程度のスパイク発射)、(3) Regular-spiking (RS) 細胞 (平均40Hz程度のスパイク頻度)。これらの細胞の形態学的特徴は、FS細胞とLTS細胞の細胞体長径が15-18 μm 程度の中型の細胞で、RS細胞の細胞体長径が25 μm 以上と比較的大型であった。

次に、モノアミンのアドレナリン (NA) によるGABAニューロンの神経活動への効果について検討した。GABAニューロンの中で、Regular-spikingパターンを呈するRS細胞では、NAを投与すると全例で、脱分極とその後の持続性スパイク発射が生じた。また、RS細胞からの電位固定記録でNAによる内向き電流が観察され、この電流はprazosinで抑制された。さらに、voltage-rampなどで解析した結果、NAのRS細胞に対する興奮性作用は $\alpha 1$ アドレナリン受容体を介して1) Na^+ 依存性非選択性カチオンチャネルの活性化、2) 静止電位で活性化されている K^+ コンダクタンスの抑制という二つの異なるメカニズムが関与することが示唆された。(Yanagawa et al., IBRO meeting 2003)

(ii) 中脳GABAニューロンの解析：

中脳上丘浅層GABAニューロンの特徴について、GAD67-GFPマウスを用いて

検討した。その結果、GFP陽性細胞は接線方向に樹状突起が伸びている形態学的特徴が観察された。一方、GFP陽性細胞に脱分極性のパルス刺激を与えて解析した結果、複数の発火パターンの存在が観察された。(Endo et al., *Neurosci Lett.* 2003) また、中脳下丘GABAニューロンの特徴についても、GAD67-GFPマウスのGFP陽性細胞に脱分極性のパルス刺激を与えて解析した結果、複数の発火パターンの存在が観察された。(Ono et al., *Neurosci Res.* 2005) 以上の結果は、GABAニューロンは機能の異なる複数の種類があることを示唆しており、GABAニューロンの機能を理解する上で有用な基礎情報となる。

(iii) 視床外側膝状体核GABAニューロンの解析：

視床外側膝状体核は視覚径路にあり、網膜から神経線維を受け、大脳皮質視覚野に神経を投射する。外側膝状体核には、多数のドーパミン神経終末があり、視覚刺激による興奮活動をドーパミンが抑制する。その作用機序を明らかにするために、野生型マウスおよびGAD67-GFPマウスの脳スライス標本を用いてホールセル記録を行った。野生型マウスから記録した抑制性後シナプス電流の頻度は、ドーパミンD2受容体アゴニストのquipirole (QUIN) で増加した。さらに、GAD67-GFPマウスのGFP陽性細胞から記録した結果、QUINが細胞膜の脱分極を引き起こし、この脱分極はドーパミンD2受容体アンタゴニストのsulpirideで消去された。従って、ドーパミンによる興奮活動の抑制は、GABAニューロンのD2受容体を介する活性化によって引き起こされることが示唆された。(Munsch et al., *Eur J. Neurosci.*, 2005)

(iv) GABAニューロンにおける遺伝子発現解析：

GABAニューロンには複数のサブタイプがあり、カルシウム結合蛋白質などがそのサブタイプ特異的に発現する。GAD67-GFPマウスを用いて、GFP陽性細胞とサブタイプのマーカー蛋白の発現を2重染色法によって解析を行った。まず、大脳皮質運動野におけるニューロンを示すNeuN陽性細胞の中で、GFP陽性細胞が19.5%を占めた。さらに、GFP陽性細胞のうち、カルレチニン陽性細胞、パルブアルブミン陽性細胞、ソマトスタチン陽性細胞は、それぞれ13.9%, 40.1%,

23.4%であり、GABAニューロンのサブタイプの割合を明らかにした。

(Tamamaki et al., J Comp. Neurol. 2003)

ラット前脳基底部のニューロキニンB受容体を発現しているニューロンの性質について、免疫組織化学、in situ hybridization法、レトログレード標識法を用いて解析した。ニューロキニンB受容体免疫陽性細胞は無名質を含む前脳基底部で観察された。また、無名質ではニューロキニンBの前駆体ペプチドのプレプロタキニンB免疫陽性の軸索終末も観察された。ニューロキニンB受容体陽性細胞の90%以上がGABAニューロンであった。小麦胚芽凝集素を用いたレトログレード標識法を行った結果、前脳基底部のニューロキニンB受容体陽性細胞は、線維を大脳皮質に投射していることを明らかにした。(Furuta et al., J Comp. Neurol. 2004)

(3) 不活性型カルモジュリンキナーゼ II ノックインマウスの作成と解析

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は細胞内Ca²⁺の上昇と関連したシナプス可塑性に重要な働きをしていると考えられている。CaMKIIのキナーゼ活性の低下とそれによる基質蛋白のリン酸化の低下に直接起因した脳機能の変化を観察する目的で、CaMKIIの前脳での主要なサブユニットである (CaMKII) を不活性型に置換したノックイン型遺伝子改変マウスを作成した。ノックインマウス前脳において、CaMKII蛋白が発現しているにもかかわらず、CaMKIIキナーゼ活性が顕著に低下していることを確認した。今後、これらマウス脳の生化学的解析とシナプス可塑性に関する電気生理学的、行動学的解析を行うことによって、CaMKIIのプロテインキナーゼ活性に直接関連した脳機能の解明が進捗する。

(2) 研究成果の今後期待される効果

Oliva et al. (2003) は、GAD67プロモーターを含む上流域2.8kbとEGFP遺伝子の融合遺伝子を用いてトランスジェニックマウスを作成した。また、Chattopadhyaya et al. (2004) は、GAD67遺伝子を含む大腸菌人工染色体にEGFP遺伝子を挿入したDNAを

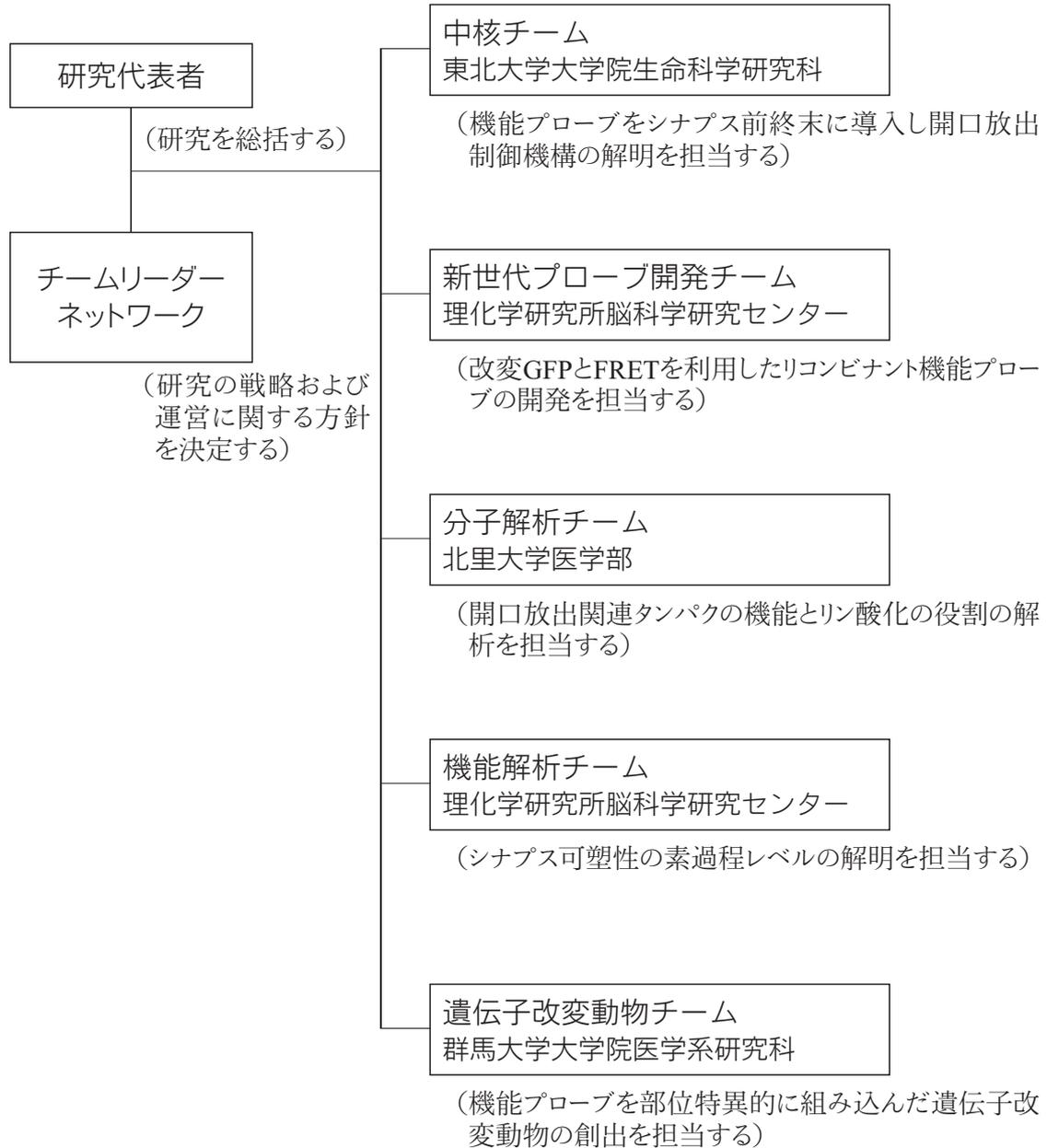
導入したトランスジェニックマウスを作成した。その結果、Olivaの作成したマウスとChattopadhyayaの作成したマウスでは、それぞれ海馬のGABAニューロンの一部と大脳皮質のGABAニューロンの一部でEGFP遺伝子の発現が認められ、解析することができた。一方、我々の作製したGAD67-GFPマウスは、大脳皮質GABAニューロンのほぼすべてにEGFPの発現を観察した (Tamamaki et al., 2003)。また、GAD67-GFPマウスは、大脳皮質や海馬に限らず中枢神経系のGABAニューロン全体にEGFPの発現を観察する。GABAニューロンは、様々な領域で種々の生理機能に関与していることから、GAD67-GFPマウスはGABAニューロンの諸機能を探る上で、有力な資材となり得る。また、GAD67遺伝子は、神経系以外では膵臓、歯牙、毛などの組織で発現が観察される。実際に、GAD67-GFPマウスを利用して、精巣上体や胸腺にもGAD67陽性細胞があることを観察し、解析を行うことができた。(Watanabe et al., 投稿中)

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α (CaMKII α) は、すでに単純ノックアウトマウスが作成され、記憶・学習に関連する行動異常、電気生理学的異常、易けいれん性などが観察された (Silva et al., 1992)。しかし、単純ノックアウトマウスでは、(1) 他の蛋白質をリン酸化するプロテインキナーゼとしての機能、(2) Ca²⁺/カルモジュリン結合能、(3) 他の蛋白質と結合して構造蛋白として働く機能、のすべてが失われており、ノックアウトマウスで観察された異常が、(1)~(3)のどの機能が失われたか不明であった。そこで、本研究では、CaMKII α のプロテインキナーゼのみを特異的に失ったノックインマウスを作成したので、CaMKII α のプロテインキナーゼ活性に直接関連した脳機能の解明が進捗すると期待できる。

抑制性伝達物質のGABAは、てんかん病やアルコール精神病をはじめとする精神神経疾患、不安や抑うつなどの精神症状との関連が報告されている。GABA性神経伝達の解明が進捗すれば、上記精神神経疾患の発症機構の解明に役立ち、治療や予防が可能になることで、社会福祉に貢献する。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表 (各研究グループごとに記載)

中核チーム (八尾 寛)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
八尾 寛	東北大学 (生命)	教授	総括	H11.11~H17. 3	
阪上 洋行	東北大学 (医学)	助教授	シナプス機能解析	H13. 4~H17. 3	
石塚 徹	東北大学 (生命)	講師	遺伝子導入	H11.11~H17. 3	
鎌田 真希	JST	研究員	シナプス形態解析	H11.11~H17. 3	CREST研究員
荒木 力太	東北大学 (生命)	大学院生	遺伝子導入	H13. 4~H17. 3	CREST時給制
宮崎 憲一	東北大学 (生命)	大学院生	遺伝子導入	H13. 4~H17. 3	CREST時給制
須山 成朝	東北大学 (生命)	大学院生	遺伝子改変動物の作製	H14. 4~H17. 3	CREST時給制
角田 雅昭	東北大学 (生命)	大学院生	シナプス回路解析	H15. 4~H17. 3	
小橋 雄一	東北大学 (生命)	大学院生	シナプス機能解析	H15. 4~H17. 3	
奈良 諭	東北大学 (生命)	大学院生	遺伝子導入	H15. 4~H17. 3	
真鍋 友則	東北大学 (生命)	大学院生	遺伝子解析	H15. 4~H17. 3	
鈴木 崇太	東北大学 (生命)	大学院生	行動解析	H16. 4~H17. 3	
引間 卓弥	東北大学 (生命)	大学院生	機能解析	H16. 4~H17. 3	
吉本 光里	東北大学 (生命)	大学院生	機能解析	H16. 4~H17. 3	
鹿野 美紀	東北大学 (生命)	事務員	チーム事務全般	H16.11~H17. 3	CREST時給制
社本 麻里	JST	事務員	チーム事務全般	H11.11~H16. 9	CREST事務員
李 仁勇	JST	研究員	シナプス回路解析	H15. 5~H16. 4	CREST研究員
徳永 太	東北大学 (医学)	大学院生	シナプス機能解析	H12. 4~H16. 3	CREST時給制
和地 恵	東北大学 (生命)	大学院生	動物行動解析	H12. 4~H16. 3	
斎 哲	東北大学 (医学)	技 官	実験補助	H11.11~H15. 3	
原田 嘉夫	日本医科大学	講 師	シナプス機能解析	H11.11~H15. 3	
古関 誠	東北大学 (生命)	大学院生	遺伝子解析	H13. 4~H15. 3	
橋本 美香	東北大学 (生命)	大学院生	遺伝子解析	H13. 4~H15. 3	

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
南 宏美	JST	研究員	遺伝子解析	H13. 4～H14. 6	CREST研究員
梅宮 正志	東北大学 (生命)	助教授	シナプス機能解析	H11.11～H13. 8	
河 和善	東北大学 (医学)	助教授	シナプス機能解析	H11.11～H13. 3	
阿部 高明	東北大学 (医学)	助手	遺伝子導入	H11.11～H13. 3	
安達 尚宣	東北大学 (医学)	大学院生	遺伝子解析	H11.11～H13. 3	
藤原 耕	東北大学 (医学)	大学院生	遺伝子解析	H11.11～H13. 3	
岡部 光則	東北大学 (医学)	大学院生	遺伝子導入	H11.11～H13. 3	
鈴木 建弘	東北大学 (医学)	大学院生	遺伝子導入	H11.11～H13. 3	
浅野 直喜	東北大学 (医学)	大学院生	遺伝子導入	H12. 7～H13. 3	

新世代プローブ開発チーム (宮脇 敦史)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
宮脇 敦史	理研 BSI (細胞)	グループディレクター チームリーダー	新世代プローブの開発	H11.11～H17. 3
濱 裕	理研 BSI (細胞)	研究員	シナプスにおける情報伝達の可視化	H11.11～H17. 3
水野 秀昭	理研 BSI (細胞)	研究員	新世代プローブの開発	H12. 4～H17. 3
永井 健治	理研 BSI (細胞)	研究員	新世代プローブの開発	H12. 4～H17. 3
阪上 朝子	理研 BSI (細胞)	テクニカルスタッフ	新世代プローブの開発	H12. 4～H17. 3
原 央子	慶應義塾大学	大学院生	シナプスにおける情報伝達の可視化	H14.10～H17. 3
小暮 貴子	理研 BSI (細胞)	テクニカルスタッフ	シナプスにおける情報伝達の可視化	H15. 8～H17. 3
片山 博幸	理研 BSI (細胞)	研究員	新世代プローブの開発	H16. 5～H17. 3
日野 美紀	理研 BSI (細胞)	研究員	新世代プローブの開発	H13. 4～H15. 3

分子解析チーム（高橋 正身）

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
高橋 正身	北里大学	教授	リン酸化解析	H11.11～H17. 3	
片岡 正和	信州大学	助教授	遺伝子解析マウスの作製	H13. 4～H17. 3	
東 貞宏	北里大学	助手	遺伝子解析マウスの維持	H15. 4～H17. 3	CREST時給制
菅谷津貴子	北里大学	技術員	リン酸化解析	H15. 4～H17. 3	CREST時給制
安藤 公祐	東京薬科大学	大学院生	放出機構解析	H14. 4～H17. 3	CREST時給制
稲村実穂子	北里大学	大学院生	リン酸化解析	H15. 4～H17. 3	CREST時給制
西宮聖一郎	北里大学	大学院生	放出機構解析	H15. 4～H17. 3	CREST時給制
片山 憲和	北里大学	大学院生	リン酸化部位変異マウスの解析	H16. 4～H17. 3	CREST時給制
高野 幸太	北里大学	大学院生	トランスジェニックマウスの解析	H16. 4～H17. 3	CREST時給制
南 和志	三菱生命研	特別研究員	電気生理	H11.11～H13. 3	
川上 政勝	東京大学	大学院生	リン酸化解析	H11.11～H13. 3	
二本松 伊都子	三菱生命研	技術員	免疫組織化学	H11.11～H14. 3	
関口真理子	三菱生命研	技術員	スライス培養	H11.11～H14. 3	
山森 早織	三菱生命研	技術員	分子生物学的解析	H11.11～H14. 3	
笠井 陽子	三菱生命研	研究員	画像解析	H12. 4～H14. 3	
桑原 玲子	三菱生命研	技術員	株細胞培養	H12. 4～H14. 3	
板倉 誠	三菱生命研	特別研究員	リン酸化解析	H13. 4～H14. 3	
網野 真也	東京大学	大学院生	リン酸化解析	H11.11～H14. 3	
大西 浩史	群馬大学	講師	チロシンリン酸化解析	H11.11～H14. 3	
古賀 毅	東京大学	大学院生	リン酸化解析	H11.11～H15. 3	CREST時給制
辻村 淳	東京薬科大学	大学院生	放出機構解析	H14. 4～H15. 3	CREST時給制
青柳 共太	東京大学	大学院生	放出機構解析	H15. 4～H16. 3	CREST時給制

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
陳 乃 宏	北里大学	訪問教授	リン酸化解析	H15. 4～H16. 3	学振 特別研究員
寺澤まどか	大阪大学	大学院生	リン酸化部位変異マウスの解析	H15. 8～H16.10	CREST時給制

機能解析チーム（山口 和彦）

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
山口 和彦	理研 BSI (記憶)	副チーム リーダー	シナプス機能解析	H11.11～H17. 3	
小野寺 加代子	理研 BSI (記憶)	技術 アドバイザー	シナプス機能解析	H12.10～H17. 3	CREST謝金
松本あづみ	理研 BSI (記憶)	テクニカル スタッフ	機能分子解析	H16. 4～H17. 3	
彦坂 幸子	理研 BSI (記憶)	研究 補助員	研究補助	H14. 4～H17. 3	
立川 哲也	東京薬科大学	大学院生	シナプス機能解析	H15. 4～H17. 3	
平田 快洋	東京薬科大学	大学院生	シナプス機能解析	H11.11～H12. 3	
金子 貢巳	理研 BSI (記憶)	テクニカル スタッフ	機能分子解析	H11.11～H13. 3	
柿澤 昌	理研 BSI (記憶)	研究員	シナプス機能解析	H12. 4～H12. 8	CREST研究員
小山内 実	理研 BSI (記憶)	研究 補助員	研究補助	H13. 6～H13. 8	CREST時給制
白井めぐみ	理研 BSI (記憶)	テクニカル スタッフ	機能分子解析	H13. 5～H16. 3	

遺伝子改変動物チーム（柳川 右千夫）

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
柳川右千夫	群馬大学 (医学)	教授	遺伝子改変動物の作製	H15. 4～H17. 3	
山肩 葉子	生理学研究所	助手	遺伝子改変動物の解析	H15. 8～H17. 3	
兼子 幸一	鳥取大学 医学部	助手	遺伝子改変マウスの電気 生理学的解析	H11.11～H16.10	

氏名	神原 叙子	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
蒔苗 公利	生理学研究所	非常勤 研究員	遺伝子改変動物の解析	H11.11~H13. 3	
季 鳳雲	生理学研究所	外国人 特別研究員	遺伝子改変動物の作製	H11.11~H14. 3	
神原 叙子	生理学研究所	技官	遺伝子改変動物の作製	H12. 4~H13. 6	
戸塚 昌子	JST	技術員	遺伝子改変動物の作製	H12. 4~H15. 3	CREST技術員
山本 友美	生理学研究所	技官	遺伝子改変動物の作製	H14. 4~H16. 3	
原 早苗	JST	研究 補助員	遺伝子改変動物の解析	H15. 4~H16. 3	CREST 研究補助員
海老原利枝	JST	研究員	遺伝子改変動物の作製	H15. 4~H16. 5	CREST研究員

(3) JST が雇用し派遣する研究員等

氏名	現職	派遣先	担当する研究項目	参加時期	備考
鎌田 真希	JST研究員	東北大学 (生命)	シナプス形態解析	H11.11~ H17. 3	研究員
鹿野 美紀	東北大学 (院) 生命科学	東北大学 (生命)	チーム事務全般	H16.11~ H17. 3	時給制チーム 事務員
荒木 力太	東北大学 (院) 大学院生	東北大学 (生命)	遺伝子導入	H13. 4~ H17. 3	時給制補助員
宮崎 憲一	東北大学 (院) 大学院生	東北大学 (生命)	遺伝子導入	H13. 4~ H17. 3	時給制補助員
須山 成朝	東北大学 (院) 大学院生	東北大学 (生命)	遺伝子改変動物の作製	H14. 4~ H17. 3	時給制補助員
安藤 公祐	東京薬科大 (院) 大学院生	北里大学 (医)	放出機構解析	H14. 4~ H17. 3	時給制補助員
稲村美穂子	北里大学 (院) 大学院生	北里大学 (医)	リン酸化解析	H15. 4~ H17. 3	時給制補助員
西宮聖一郎	北里大学 (院) 大学院生	北里大学 (医)	放出機構解析	H15. 4~ H17. 3	時給制補助員
片山 憲和	北里大学 (院) 大学院生	北里大学 (医)	リン酸化部位変異マウ スの解析	H16. 4~ H17. 3	時給制補助員
高野 幸太	北里大学 (院) 大学院生	北里大学 (医)	トランスジェニックマ ウスの解析	H16. 4~ H17. 3	時給制補助員

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

- 研究チーム内打ち合わせ

日 時：平成11年12月4日16:00

場 所：岡崎国立共同研究機構生理学研究所

趣 旨：遺伝子改変動物の作製について

内 容：機能プローブを組み込んだ遺伝子改変動物の作成計画について打ち合わせをした。

参加人数：2名

- 研究チーム内打ち合わせ

日 時：平成11年12月22日16:00

場 所：理化学研究所脳科学総合研究センター

趣 旨：GFP誘導機能プローブの開発について

内 容：シナプス前終末の機能のどの部分に注目してGFP誘導機能プローブを開発するか、どのようにしてそれをシナプス前終末に導入するか、それを用いて何を明らかにするのか打ち合わせをした。

参加人数：4名

- 研究チームミーティング

日 時：平成12年1月20日13:00

場 所：東北大学

趣 旨：平成11-12年度研究プロジェクトの立案

内 容：各研究グループが従来すすめてきた研究に基づいて、研究プロジェクトを具体的に検討し、平成11-12年度の各研究グループの分担を決定した。

参加人数：23名

- チーム内打ち合わせ

日 時：平成12年10月27日

場 所：生理学研究所

内 容：GAD67遺伝子GFPノックインマウスの作成の進捗状況をもとに今後の研究方針について打ち合わせをした。

参加人数：3名

- チーム打ち合わせ

日 時：平成13年2月5日

場 所：生理学研究所

内 容：GAD67遺伝子GFPノックインマウスの作成の進捗状況をもとに今後の研究方針について打ち合わせをした。

参加人数：2名

- H13年度 CREST八尾チーム チームミーティング

日 時：2001年10月5 - 6日

場 所：岡崎国立共同研究機構 生理学研究所

趣 旨：研究チーム会議及び進捗状況報告

参加人数：27名

- 平成14年度 チームミーティング

日 時：平成14年9月10-20日

場 所：東北大学

内 容：学会形式スタイルにて、チームリーダーによる口頭発表での研究経過報告、及び班員によるポスター発表 15件

参加人数：22名

(2) 招聘した研究者等

な し

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (国内2件、海外61件)

1. 本田 泉, 神谷 温之, 八尾 寛. Re-evaluation of Phorbol ester-induced potentiation of transmitter release from mossy fibre terminals of the mouse hippocampus. *Journal of Physiology*; **529** (3); 763-776 (2000)
2. Sawano Asako, Miyawaki Atsushi. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Research*; **28** (26): E78 (2000)
3. Hideaki Mizuno, Asako Sawano, Pharhad Eli, Hiroshi Hama, Atsushi Miyawaki. Red Fluorescent Protein from *Discosoma* as a Fusion Tag and a Partner for Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biochemistry*; **40** (8): 2502-2510 (2000)
4. Takeharu Nagai, Asako Sawano, Eun Sun Park, and Atsushi Miyawaki. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*; **98** (6): 3197-202 (2001)
5. Kevin Truong, Asako Sawano, Hideaki Mizuno, Hiroshi Hama, Kit I Tong, Tapas Kumar Mal, Atsushi Miyawaki and Mitsuhiro Ikura. FRET-based in vivo Ca^{2+} imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nature Structural Biology*; **8**: 1069-1073 (2001)
6. Asako Sawano, Hiroshi Hama, Naoaki Saito and Atsushi Miyawaki. Multi-color imaging of Ca^{2+} and protein kinase C signals using novel epi-fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*; **82**: 1076-1085 (2002)

7. Takeharu Nagai, Keiji Ibata, Eun Sun Park, Mie Kubota, Katsuhiko Mikoshiba and Atsushi Miyawaki. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient Maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*; **20**: 87-90 (2002)
8. Sawano, S. Takayama, M. Matsuda, and A. Miyawaki. Lateral Propagation of EGF Signaling after Local Stimulation Is Dependent on Receptor Density. *Developmental Cell*; **3**: 245-257 (2002)
9. R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno and A. Miyawaki. An optical marker based on the UV-induced green-to red photoconversion of a fluorescent Protein. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA (PNAS)*: **99** (20); 12651-56 (2002)
10. 川上 政勝, 岩崎 聡, 佐藤 一紀, 高橋 正身. Erythropoietin inhibits calcium-induced neurotransmitter release from clonal neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* : **279**; 293-297 (2000)
11. 岩崎 聡, 片岡 正和, 関口 真理子, 島崎 洋次, 佐藤 一紀, 高橋 正身. Two distinct mechanisms underlie the stimulation of neurotransmitter release by phorbol esters in clonal rat pheochromocytoma PC12 cells. *The Japanese Biochemical Society*:**128**; 407-414 (2000)
12. 川上 政勝, 関口 真理子, 佐藤 一紀, 小崎 俊司, 高橋 正身. Erythropoietin Receptor-mediated Inhibition of Exocytotic Glutamate Release Confers Neuroprotection during Chemical Ischemia. *Journal of Biological Chemistry*: **276**; 39469-39475 (2001)
13. 大西 浩史, 山森 早織, 斧 加奈子, 青柳 恭太, 近藤 俊三, 高橋 正身. Src family tyrosine kinase inhibits neurotransmitter release from neuronal cells. *Proceedings of National*

- Academy of Sciences, USA (PNAS)*: **98** (19); 10930-35 (2001)
14. 青柳 恭太, 高橋 正身. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Enhances Ca^{2+} -Dependent Neurotransmitter Release from PC12 Cells and Cultured Cerebellar Granule Cells without Affecting Intracellular Ca^{2+} Mobilization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*: **286** (3); 646-651 (2001)
 15. Nishiki T., Nihonmatsu I., Tsuchida Y., Kawasaki M., Sekiguchi M., Sato K., Mizoguchi A, Takahashi M. Distribution of soluble N-ethylmaleimide fusion protein attachment proteins (SNAPs) in the rat nervous system. *Neuroscience* : **107** (3); 363-371 (2001)
 16. Shoji-Kasai Y., Itakura M., Kataoka M., Yamamori S., Takahashi M. Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells. *European Journal of Neuroscience*: **15**; 1390-1394 (2002)
 17. Amino S., Itakura M., Onishi H., Tsujimura J., Koizumi S., Takei N., Takahashi M. Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC12 cells by increasing Ca^{2+} -responsible secretory vesicles through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biochemistry*: **131**; 887-894 (2002)
 18. 高橋 正身, 大西 浩史. Negative regulation of exocytosis at the nerve terminal. *Molecular Psychiatry*: **7**; 536-537 (2002)
 19. Keigo Kohara, Akihiko Ogura, Kimio Akagawa, Kazuhiko Yamaguchi. Increase in number of functional release sites by cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured neurons isolated from hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience Research* **41**: 78-88 (2001)

20. K. Yamaguchi, M. Tanaka, A. Mizoguchi, Y. Hirata¹, H. Ishizaki, K. Kaneko, J. Miyoshi and Y. Takai. A GDP/GTP exchange protein for the Rab3 small G protein family up-regulates a post-docking step of synaptic exocytosis in central synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; in press
21. Kimitoshi Makinae, Takashi Kobayashi, Takayasu Kobayashi, Hodeichi Sinkawa, Hiroyuki Sakagami, Hisatake Kondo, Fumi Tashiro, Jun-ichi Miyazaki, Kunihiro Obata, Shinri Tamura and Yuchio Yanagawa. Structure of the Mouse Glutamate Decarboxylase 65 Gene and Its Promoter: Preferential Expression of Its Promoter in the GABAergic Neurons of Transgenic Mice. *Journal of Neurochemistry*: **75**, 1429-1437 (2000)
22. Yamanaka H, Maehira F, Oshiro M, Asato T, Yanagawa Y, Takei H, Nakashima Y. A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system. *Biochemical and Biophysical Research Communication* : **271**; 796-800 (2000)
23. Hideki Nishimura, Hiroyuki Sakagami, Akiyoshi Uezu, Kohji Fukunaga, Makoto Watanabe and Hisatake Kondo. Cloning, characterization and expression of two alternatively splicing isoforms Of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I γ in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 2003, **85**, 1216-1227
24. Hiroyuki Sakagami, Shigetsune Matsuya, Hideki Nishimura, Ryoji Suzuki¹ and Hisatake Kondo. Somatodendritic localization of the mRNA for EFA6A, a guanine nucleotide exchange protein for ARF6, in rat hippocampus and its involvement in dendritic formation. *European Journal of Neuroscience*, Vol, 19, pp. 863-870, 2004
25. Shigetsune Matsuya, Hiroyuki Sakagami, Akira Tohgo, Yuji Owada, Hye-Won Shin,

- Hiroshi Takeshima, Kazuhisa Nakayama, Shoichi Kokubun and Hisatake Kondo. Cellular and subcellular localization of EFA6C, a third member of the EFA6family, in adult mouse Purkinje cells. *J. Neurochem.* (2004) in press.
- 26 Takashi Tokunaga, Kenichi Miyazaki, Makoto Koseki, Jalal Izadi Mobarakeh, Toru Ishizuka, and Hiromu Yawo. Pharmacological Dissection of Calcium Channel Subtype-Related Components of Strontium Inflow in Large Mossy Fiber Boutons of Mouse Hippocampus. *HIPPOCAMPUS* **14**: 570-585 (2004)
27. Maki Kamada, Ren-Yong Li, Mika Hashimoto, Masaaki Kakuda, Hiroshi Okada, Yoshio Koyanagi, Toru Ishizuka, and Hiromu Yawo. Intrinsic and Spontaneous Neurogenesis in the Postnatal Slice Culture of Rat Hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 20, pp. 2499-2508, 2004
28. Rikita Araki, Hiroyuki Sakagami, Yuchio Yanagawa, Takuya Hikima, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo. Transgenic Mouse Lines Expressing Synapto pHluorin in Hippocampus and Cerebellar Cortex. (投稿中)
29. Kenichi Miyazaki, Tomonori Manabe, Tokunaga Kenichi, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo. Variable Compositions of Presynaptic Calcium Channel Subtypes In Large Mossy Fibre Synapses of Mouse Hippocampus. (投稿中)
30. Koga T, Kozaki S, Takahashi M. (2002). Exocytotic release of alanine from cultured cerebellar neurons. *Brain Res*, **952**, 282-289.
31. H. Mizuno, T. K. Mal, K. I. Tong, R. Ando, T. Furuta, M. Ikura, and A. Miyawaki. Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein.

Molecular Cell; **12**: 1051-1058 (2003)

32. S. Shimozono, T. Fukano, K. D. Kimura, I. Mori, Y. Kirino, and A. Miyawaki. Slow Ca^{2+} dynamics in pharyngeal muscles in *Caenorhabditis elegans* during fast pumping. *EMBO reports*; **5** (5): 521-526 (2004)
33. T. Fukano, H. Hama, and A. Miyawaki. Similar diffusibility of membrane proteins across the axon-soma and dendrite-soma boundaries revealed by novel FRAP technique. *Journal of Structural Biology*; **147**: 12-18 (2004)
34. T. Fukano, S. Shimozono, and A. Miyawaki. Simultaneous dual-excitation ratiometry using orthogonal linear polarized lights. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; **317**: 77-83 (2004)
35. H. Hama, C. Hara, K. Yamaguchi, and A. Miyawaki. PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*; **41**: 405-415 (2004)
36. S. Karasawa, T. Araki, T. Nagai, and H. Mizuno, and A. Miyawaki. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemical Journal*; **381**: 307-312 (2004)
37. T. Nagai, and A. Miyawaki. A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; **319**: 72-77 (2004)
38. T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa, and A. Miyawaki. Expanded dynamic

- range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*; 101 (29): 10554-10559 (2004)
39. Koga T. and Takahashi M. Quantal size of catecholamine release from rat chromaffin cells is regulated by tonic activity of protein kinase A. *Neurosci Lett.* 360: 145-148 (2004)
40. Ando K., Kudo Y., and Takahashi M. Negative regulation of neurotransmitter release through specific cleavage of SNAP-25 by calpain. *J. Neurochem., in revision* (投稿中)
41. Aoyagi K., Sugaya T., Umeda M., Yamamoto S., Terakawa S., and Takahashi M. The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J. Biol. Chem., in revision* (投稿中)
42. Kataoka M., Yamamori S., Ikegami S., Kuwahara R., Suzuki-Migishima R., Nakahara Y., Nihonmatsu I, Inokuchi K., Katoh-Fukui Y., Yokoyama M., and Takahashi M. A single amino acid mutation in SNAP-25 induces anxiety-related behavior in mouse. *In submission.* (投稿中)
43. Itakura M., Yamamori S., Kuwahara R., Sekiguchi M., and Takahashi M. Two distinct regulatory mechanisms of neurotransmitter release by phosphatidylinositol 3-kinase. *In submission.* (投稿中)
44. Atsushi Miyawaki, Takeharu Nagai and Hideaki Mizuno. Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering. *Current Opinion in Chemical Biology* 2003, 7: 557-562

45. Atsushi Miyawaki. Fluorescence imaging of physiological activity in complex systems using GFP-based probes. *Current Opinion in Neurobiology* 2003 **13**:591-596
46. Takahashi M, Itakura M, and Kataoka M. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: Regulation of neurotransmitter release by phosphorylation. *J Pharmacol Sci* **93**, 41-45 (2003)
47. Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A. PKC signaling for global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons is triggered by local contact with astrocytes. *Neuron* 41: 405-415 (2004)
48. Ebihara S, Obata K & Yanagawa Y. Mouse vesicular GABA transporter gene: genomic organization, transcriptional regulation and chromosomal localization. *Mol. Brain Res.* **110**, 126-139. (2003)
49. Endo, T., Yanagawa, Y., Obata, K. and Isa, T. Characteristics of GABAergic neurons in the superficial superior colliculus in mice. *Neuroscience Letters* **346**:81-84 (2003)
50. Kobayashi, T., Ebihara S., Ishii, I., Kobayashi, T., Nishijima, M., Endo, S., Takaku, A., Sakagami, H., Kondo, H., Tashiro, F., Miyazaki, J., Obata, K., Tamura, S., and Yanagawa, Y. Structural and functional characterization of mouse glutamate decarboxylase 67 gene promoter. *Biochimica et Biophysica Acta* **1628**: 156-168 (2003)
51. Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K. and Kaneko, T. Green Fluorescent Protein Expression and Colocalization with Calretinin, Parvalbumin, and Somatostatin in the GAD67-GFP Knock-In Mouse. *The Journal of Comparative Neurology* **467**:60-79 (2003)

52. Shimura, S., Watanabe, U., Yanagawa, Y. and Yamamoto, T. Altered taste function in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamate decarboxylase. *Neuroscience Letters*, **356**, 171-174 (2004)
53. Furuta, T., Koyano, K., Tomioka, R., Yanagawa, Y. and Kaneko, T. GABAergic basal forebrain neurons that express receptor for neurokinin B and send axons to the cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology* **473**, 43-58 (2004)
54. Ebihara, S., Yamamoto, T., Obata, K. and Yanagawa, Y. Gene structure and alternative splicing of the mouse glycine transporter type-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 857-864 (2004)
55. Jiang, B., Kitamura, A., Yasuda, H., Sohya, K., Maruyama, A., Yanagawa, Y., Obata, K. and Tsumoto, T. Brain-derived neurotrophic factor acutely depresses excitatory synaptic transmission to GABAergic neurons in visual cortical slices. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 709-718 (2004)
56. Yamanaka, H., Yanagawa, Y. and Obata, K. Development of stellate and basket cells and their apoptosis in mouse cerebellar cortex. *Neurosci. Res.* **50**, 13-22 (2004)
57. Yamagata Y, Obata K. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is reversibly autophosphorylated, inactivated and made sedimentable by acute neuronal excitation in rats in vivo. *J Neurochem.* **91**, 745-54 (2004)
58. Munsch, T., Yanagawa, Y., Obata, K., and Pape, H.C. (2004). . Dopaminergic control of local interneuron activity in the thalamus. *Eur. J. Neurosci.* in press (投稿中)

59. Naoki Takada, Yuchio Yanagawa, Yukio Komatsu. Activity-dependent maturation of excitatory synaptic connections in solitary neuron cultures of mouse neocortex. *European Journal of Neuroscience*. (投稿中)
60. Munenori Ono, Yuchio Yanagawa, Konomi Koyano. GABAergic neurons in Inferior colliculus of the GAD67-GFP knock-in mouse: Electrophysiological and morphological properties. *Neuroscience Research*. (投稿中)
61. Ryohei Tomioka, Keiko Okamoto, Takahiro Furuta, Fumino Fujiyama, Takuji Iwasato, Yuchio Yanagawa, Kunihiko Obata, Takeshi Kaneko, Nobuaki Tamamaki. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *European Journal of Neuroscience*. (投稿中)
62. 石塚 徹 (東北大学), 八尾 寛 (東北大学). pH感受性蛍光タンパク質フルオリンを用いたエキソサイトーシスの光学計測. 「化学と生物」掲載予定日 未定
63. 柳川 右千夫, 小幡 邦彦 (2002) GABAトランスポーター (御子柴 克彦・清水 隆夫 編). 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 pp.116-120.

(2) 口頭発表

① 招待, 口頭講演 (国内33件, 海外3件)

1. Yawo, T. Tokunaga, K. Miyazaki, H. Minami, T. Ishizuka, Y. Yanagawa and K. Obata. (東北大学, 科学技術振興事業団, 生理学研究所). Functional variety of Ca²⁺ channel subtypes expressed in hippocampal mossy fiber terminals. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (Orlando, USA, Nov., 2002)

2. Atsushi Miyawaki “Fluorescence imaging of signaling process”: A special lecture in signaling Pathways and Networks series (Stanford University, CA, USA), January 29, 2004
3. Atsushi Miyawaki “Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling”-A special lecture in the symposium of “Axon Guidance & Neural Plasticity” (Cold Spring Harbor, NY, USA), September 23, 2004
4. 八尾 寛（東北大学大学院生命科学研究科，医学系研究科，CREST）. 伝達物質放出可塑性の素過程解析. 平成12年度生理学会研究所研究会「シナプス伝達の機能と分子の接点を探る」2000年10月27日（岡崎）
5. 八尾 寛，徳永 太（東北大学大学院生命科学研究科，医学系研究科，CREST）. 海馬苔状線維終末カルシウムチャネルサブタイプの機能連関. 第78回日本生理学会大会 2001年3月29日（京都）
6. 河 和善，鎌田 真希（東北大学大学院医学系研究科，CREST）. ニコチン性Ach受容体によるシナプス機能のモジュレーション：小脳プルキンエ細胞をモデルにした解析. 第33回東北生理談話会 2000年10月28日（福島）
7. 八尾 寛（東北大学大学院生命科学研究科）. カルシウムチャネルによるシナプス伝達制御. CREST「脳を知る」シンポジウム 脳神経科学の最先端2001. 2001年11月（東京）
8. 大西 浩史（三菱化学生命科学研究所）. 神経栄養因子による神経伝達物質放出の制御. 生理学研究所研究会「シナプス共同研究機構塑性の分子機構 2000年6月15日（岡崎）

9. 柳川 右千夫, 海老原 利枝, 蒔苗 公利, 小幡 邦彦. 「マウスヴェシクル型GABAトランスporter遺伝子の構造と発現調節機構」. 第23回日本神経科学大会, 横浜, 9月5日 (2000)
10. 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. 海馬帯状背に終末に発現するCa²⁺チャンネルの多様性. 第79回日本生理学会大会 2002年3月 (広島)
11. 八尾 寛 (東北大学). Diversity of Ca²⁺ channel subtypes in presynaptic terminals. 第45回日本神経化学会大会 (2002年7月, 札幌)
12. 鎌田 真希 (東北大学). 神経細胞死により促進される海馬歯状回の代償的神経新生. 生理学研究所研究会「シナプス伝達制御の分子機構」(2002年9月, 岡崎)
13. 宮崎 憲一 (東北大学). 単一海馬苔状線維終末における4種類のCa²⁺チャンネルサブタイプの発現. 生理学研究所研究会「シナプス伝達制御の分子機構」(2002年9月, 岡崎)
14. 八尾 寛 (東北大学). 学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月, 京都)
15. 宮脇 敦史 (理化学研究所・BSI). Confocal imaging of subcellular calcium concentrations using a dual-excitation ratiometric indicator based on green fluorescent protein. 第25回神経科学大会 (2002年7月, 東京)
16. 宮脇 敦史 (理化学研究所・BSI). 「細胞内情報伝達の時空間的制御」. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (国立京都国際会館・京都) 平成14年11月25日

17. 板倉 誠¹, 山森 早織¹, 大西 浩史², 高橋 正身^{1, 3} (1北里大・医, 2群馬大・生体調節研, 3CREST). チロシンフォスファターゼによる神経伝達物質放出の制御. 第45回日本神経化学会大会 (2002年7月, 札幌)
18. 高橋 正身^{1, 2} (1北里大・医, 2CREST). 神経伝達物質放出の短期的および長期的制御機構. CREST「脳を知る」の合同シンポジウム (2002年11月, 京都)
19. 八尾 寛 (東北大学大学院生命科学研究科 脳機能解析分野). 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)
20. 宮崎 憲一 (東北大学大学院生命科学研究科 脳機能解析分野). 単一海馬苔状線維終末におけるCa²⁺チャンネルサブタイプ発現の多様性. ー同一軸索上終末のCa²⁺チャンネルサブタイプ発現ー. 生理学研究所研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」 (2003. 9.20. 岡崎)
21. 和地 恵 (東北大学大学院生命科学研究科 脳機能解析分野). 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. 生理学研究所研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」 (2003. 9.20. 岡崎)
22. 和地 恵 (東北大学大学院生命科学研究科 脳機能解析分野). 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)
23. 稲村 実稲子 (北里大学大学院 医療系研究科). Stargazin ファミリーの NMDA 受容体依存的なプロテアーゼによる切断. 第46回 日本神経化学会 (2003. 9.24. 新潟)
24. 青柳 共太 (東京大学大学院 総合文化研究科). PtIns (4,5) P2 Microdomains and the Sites of Neurotransmitter Release. 第76回 日本生化学会 (2003.10.16. 横浜)

25. 青柳 共太 (東京大学大学院 総合文化研究科). PI (4,5) P2 マイクロドメインと神経伝達物質放出部位. 第28回 クロマフィン研究会 (2004. 1.24. 軽井沢)
26. 八尾 寛 (東北大学). 空間学習マウスにおける海馬苔状線維異所性投射の形態計測解析. 第37回東北生理談話会 (仙台) 平成16年10月16-17日
27. 荒木 力太 (東北大学). フローリントランスジェニックマウスを用いた開口放出の測定. 第37回東北生理談話会 (仙台) 平成16年10月16-17日
28. 八尾 寛 (東北大学) その他. 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 (大阪国際会議場) 平成16年9月23日
29. 八尾 寛 (東北大学). 海馬ネットワークのダイナミクス. CREST 脳3領域合同終了シンポジウム (東京 未来科学館) 平成16年10月7-8日
30. 八尾 寛 (東北大学) その他. トランスジェニックマウスを用いたシナプトフルオリン開口放出計測システム. 生理研研究会 (愛知県) 平成16年11月27日
31. 須山 成朝 (東北大学) その他. 海馬苔状線維終末からのBDNF開口放出の測定. 生理研研究会 (愛知県) 平成16年11月27日
32. 八尾 寛, 宮崎 憲一, 石塚 徹; 中枢神経ネットワークにおけるプレシナプス機能のヘテロ性. 第82回日本生理学会大会 2005年5月18-20日 (仙台)
33. 濱 裕. 「アストロサイトの接触によって誘発された神経細胞内のシグナリング: 局所から細胞全体へ」. 於第81回日本生理学会大会 (札幌) シンポジウム「細胞機能の時

空間イメージングと制御の新戦略」. 平成16年6月2日

34. 濱 裕, 宮脇 敦史. 「幼若な神経細胞とPKCシグナリング」. 於「脳」三領域合同終了シンポジウム (CREST) (御台場 日本科学未来館・東京) 平成16年10月7日
35. 山口 和彦 (理研 脳センター 記憶学習). 構成性エンドサイトーシスの阻害によるラット小脳プルキニエ細胞平行繊維シナプスにおけるAMPA受容体表面発現の増強. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会 平成16年9月23日 大阪国際会議場 (大阪)
36. 山口 和彦 (理研 脳センター 記憶学習). 小脳プルキニエ細胞におけるグルタミン酸受容体のトラフィックキング. 「脳」三領域合同終了シンポジウム (CREST) 日本科学未来館 (東京)

② ポスター発表 (国内102件, 海外22件)

1. Amino, S., Itakura, M., Ohnishi, H., Takei, N., and Takahashi, M. PI3 kinase is essential for NGF-dependent enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells. 第30回北米神経科学学会大会 (2000年11月 ニューオーリンズ)
2. Kawakami, M., Sekiguchi, M., Kozaki, S., and Takahashi, M. Erythropoietin inhibits vesicular glutamate release from rat cerebellar and hippocampal neurons during ischemia. 第30回北米神経科学学会大会 (2000年11月 ニューオーリンズ)
3. Yamaguchi, K., Kohara, K. Increase in number of active release sites by PKA cascade in cultured rat dentate neuron. 30th Annual Meeting, Society for Neuroscience, 6 Nov. 2000 (New Orleans, LA, USA)

4. Makinae, K., Obata, K. and Yanagawa, Y. Developmental expression of vesicular GABA transporter in mouse brain. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience, New Orleans, La., U.S.A., Nov. 6th (2000)
5. Itakura, M., Ohnishi, H., Amino, S., Sekiguchi, M., Kuwahara, R., Yamamori, S., Kataoka, M., and Takahashi, M. Phosphatidylinositol 3-kinase enhances neurotransmitter release by two different mechanisms. ISN/ASN Meeting in Buenos Aires Argentina, Aug. 2001
6. Ohnishi, H., Yamamori, S., Hirata, K., Aoyagi, K., Kondo, S., Takahashi, M. Inhibition of neurotransmitter release by protein tyrosine kinase. ISN/ASN Meeting in Buenos Aires Argentina, Aug. 2001
7. Ebihara, S., Obata, K. and Yanagawa, Y. Structure, chromosomal localization, and promoter analysis of the mouse vesicular GABA transporter gene. 31th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, CA, U.S.A., Nov. 11th (2001)
8. 徳永 太 (東北大学). Are R-type Ca^{2+} channels involved in neurotransmitter release from hippocampal mossy fiber terminals?
9. Yanagawa, Y., Kaneko, K. & Obata K. Genetic targeting of green fluorescent protein to GABAergic neurons. The 3rd FAONS Congress (Seoul, Korea) (2002年9月)
10. 徳永 太 (東北大学大学院医学系研究科 神経細胞制御学分野). A Fundamental Model That Explains How Neurogenesis in Dentate Gyrus Is Needed by The Mossy Fiber-CA3 Pyramidal Cell Network in Hippocampus. 第6回 IBRO神経科学世界大会 サテライトシンポジウム (2003. 7. 9. プラハ)

11. 鎌田 真希 (東北大学大学院医学系研究科 神経細胞制御学分野). Neurogenesis after NMDA-induced neuronal death in the hippocampal slice culture. 第6回 IBRO神経科学世界大会 サテライトシンポジウム (2003. 7. 8. プラハ)
12. 徳永 太 (東北大学大学院医学系研究科 神経細胞制御学分野). A Fundamental Model of The Mossy Fiber-CA3 Pyramidal Cell Network in Hippocampus Based on The Synaptic Properties Determined by Voltage-Dependent Calcium Channel Distribution. 第6回 IBRO神経科学世界大会 (2003. 7.14. プラハ)
13. 鎌田 真希 (東北大学大学院医学系研究科 神経細胞制御学分野). Evidences of neurogenesis in the hippocampal slice culture. 第6回 IBRO神経科学世界大会 (2003. 7.14. プラハ)
14. 荒木 力太 (東北大学大学院生命科学系研究科 脳機能解析分野). Direct measurement of exocytosis in the hippocampal mossy fiber terminals of synaptopHluorin-transfected mice. 第6回 IBRO神経科学世界大会 (2003. 7.13. プラハ)
15. 宮崎 憲一 (東北大学大学院生命科学系研究科 脳機能解析分野). Varigation of N-Type Ca^{2+} channel distribution among individual mossy fiber terminal. 第6回 IBRO神経科学世界大会 (2003. 7.14. プラハ)
16. 青柳 共太 (東京大学大学院 総合文化研究科). PHOSPHATIDYLINOSITOL-4,5-BISPHOSPHATE MICRODOMAINS AND SITES OF NEUROTRANSMITTER RELEASE. 第33回 北米神経科学会 (2003.11. 8. 米国 ニュー・オリンズ)
17. 安藤 公祐 (東京薬科大学大学院 生命科学系研究科). NEGATIVE REGULATION OF NEUROTRANSMITTER RELEASE THROUGH THE SPECIFIC CLEAVAGE OF

- SNAP-25 CALPAIN. 第33回 北米神経科学会 (2003.11.11. 米国 ニュー・オリンズ)
18. 柳川 右千夫 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 神経化学部門); Characterization of GABAergic neurons in the basolateral amygdala using GAD67-GFP knock-in mouse. 第6回IBRO神経科学世界大会 (2003. 7.12. チェコ・プラハ)
 19. 山肩 葉子 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 神経化学部門). Hyperphosphorylated, inactivated and sedimentable Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II induced by prolonged seizure activity in rats in vivo. 第6回IBRO神経科学世界大会 (2003. 7.12. チェコ・プラハ)
 20. 山肩 葉子 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 神経化学部門). Structure, Chromosomal Localization, and Promoter Analysis of the Mouse Vesicular GABA Transporter Gene. 33rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (New Orleans, LA) 2003, 11, 9
 21. 宮崎 憲一 (東北大学). Variable compositions of presynaptic calcium channel subtypes in large mossy fiber synapses of mouse hippocampus. Society For Neuroscience, Annual Meeting 2004 San Diego, CA, USA) 2004, 10, 25
 22. 安藤 公祐 (東薬大院・生命科学). The effect ophiobolin A, a novel calmodulin antagonist, on neurotransmitter release From PC12 and rat cerebellar granule cells. Society for neuroscience 34th annual meeting (San Diego, USA 2004, 10, 25)
 23. 河 和善, 鎌田 真希 (東北大学大学院 医学系研究科 生体情報学分野). 「ニコチン性受容体による中枢シナプス伝達の修飾作用ー小脳プルキンエ細胞での解析」. 第77回日本生理学会大会, 横浜, 平成12年3月27日

24. 河 和善, 鎌田 真希 (東北大学大学院医学系研究科, CREST). 小脳プルキンエ細胞におけるニコチン性ACh受容体によるシナプス入力促進作用. 第23回日本神経科学大会 2000年9月4日 (横浜)
25. 河 和善, 鎌田 真希 (東北大学大学院医学系研究科, CREST). 出生直後のシナプス機能の解析: ラット小脳ニューロンをモデルとしたパッチ電極によるwhole-cell電流記録. 第78回日本生理学会大会 2001年3月30日 (京都)
26. 大西 浩史, 山森 早織, 平田 加奈子, 青柳 恭太, 近藤 俊三, 笠井 陽子, 高橋 正身. 「チロシンキナーゼによる神経伝達物質放出の抑制的制御」. 第23回日本分子生物学会年会 (12月 神戸)
27. 蒔苗 公利, 小幡 邦彦, 柳川 右千夫. 「マウス脳発生過程におけるヴェシクル型GABAトランスポーターの発現」. 第23回日本神経科学大会, 横浜, 9月4日 (2000)
28. 柳川 右千夫, 海老原 利枝, 蒔苗 公利, 小幡 邦彦. 「マウスヴェシクル型GABAトランスポーター遺伝子の構造と発現調節機構」. 第23回日本神経科学大会, 横浜, 9月5日 (2000)
29. 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Ca²⁺チャン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
30. 徳永 太, 八尾 寛 (東北大学大学院生命科学研究科, 医学系研究科, CREST). Caチャンネルの各型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

31. 鎌田 真希, 南 宏美, 八尾 寛 (東北大学大学院生命科学研究科). 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
32. 徳永 太, 八尾 寛. Ca^{2+} チャンネルの各サブタイプは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
33. 柳川 右千夫, 兼子 幸一, 神原 叙子, 戸塚 昌子, 八木 健, 小幡 邦彦. 「GABAニューロンをGFPで標識した遺伝子改変マウスの開発」. 第24回日本神経科学大会・第44回日本神経化学合同大会, 京都, 9月26日 (2001)
34. 兼子 幸一, 小幡 邦彦, 柳川 右千夫; 「GFPノックインマウスを用いた扁桃体外側核および基底外側核GABA作動性ニューロンの電気生理学的特性とモノアミンによる修飾作用の解析」
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26日 (2001)
35. 山本 友美, 小幡 邦彦, 柳川 右千夫
「マウスグリシントランスポーター2の遺伝子構造と発現調節機構」
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26日 (2001)
36. 海老原 利枝, 柳川 右千夫, 小幡 邦彦
「マウスヴェシクル型GABAトランスポーターの遺伝子構造と発現調節機構」
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26日 (2001)
37. 徳永 太, 八尾 寛 (東北大学). 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)

38. 八尾 寛, 徳永 太, 宮崎 憲一, 南 宏美, 石塚 徹 (東北大学, 科学技術振興事業団). RタイプCa²⁺チャンネルサブタイプを介するCa²⁺流入は早い伝達物質放出と関連しているか. 第25回日本神経科学大会 (2002年7月 東京)
39. 鎌田 真希, 南 宏美, 八尾 寛 (東北大学, 科学技術振興事業団). 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)
40. 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 (東北大学, 科学技術振興事業団, 生理学研究所). 単一海馬苔状線維終末に置ける4種類のCa²⁺チャン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)
41. 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 (東北大学, 科学技術振興事業団, 生理学研究所). 単一海馬苔状線維終末における4種類のCa²⁺チャンネルサブタイプ発現の多様性. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月 京都)
42. 古関 誠, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大学). 苔状線維シナプス前終末におけるN-type Ca²⁺チャンネルは不均一に分布しているか?. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月, 京都)
43. 鎌田真希, 南宏美, 八尾寛 (東北大学, 科学技術振興事業団). 神経細胞死は神経新生を相補的に促進する. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月 京都)
44. 橋本 美香, 南 宏美, 石塚 徹, 小柳 義夫, 八尾 寛 (東北大学, 科学技術振興事業団). 海馬スライス培養系において神経前駆細胞が神経回路へ統合されるメカニズムに

ついて. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月 京都)

45. 荒木 力太 (東北大学). pH感受性蛍光タンパク質を用いたミュートシナプス仮説の検証. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (東北大学)
46. 徳永 太, 八尾 寛 (東北大学). P/Q型Ca²⁺チャネルは神経伝達物質放出と強く機能的に結びついているか?. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月 京都)
47. 和地 恵, 八尾 寛 (東北大学). 新しく形成されたシナプスは固定化されてシナプスと機能的に異なるか?. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月 京都)
48. 阪上 洋行 (東北大学). Cloning, expression and characterization of two alternative splicing forms of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I? in rat brain. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月 京都)
49. 鎌田 真希, 南 宏美, 八尾 寛 (東北大学, 科学技術振興事業団). 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)
50. 徳永 太, 宮崎 憲一, 八尾 寛 (東北大学). カルシウムチャ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)
51. 荒木 力太, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大学). 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)
52. 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 (東北大学, 科学技術振興事業団, 生理学研究所). 単一海馬苔状線維終末のデキストラン結合Ca²⁺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)

53. 原 央子 (理化学研究所・BSI). アストロサイトの接触により誘発される神経細胞でのPKCの活性化. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月 京都)
54. 濱 裕 (理化学研究所・BSI). ニューロン-アストロサイト間の接触によるシナプス形成の誘発について. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月 京都)
55. 濱 裕 (理化学研究所・BSI). アストロサイトとの接触によって誘発される海馬神経細胞でのシナプス形成について. 第25回日本分子生物学会年会 (2002年12月 横浜)
56. 原 央子 (理化学研究所・BSI). アストロサイトの接触に起因する神経細胞でのProtein Kinase C の活性化. 第25回日本分子生物学会年会 (2002年12月 横浜)
57. 古賀 毅¹, 高橋 正身^{2, 3} (1東大院・総合文化, 2北里大・医, 3CREST). cAMP依存性プロテインキナーゼによる放出素量の制御. 第25回日本神経科学大会 (2002年7月 東京)
58. 片岡 正和¹, 関口 真理子², 高橋 正身^{3, 4} (1信州大・工, 2三菱化学生命研, 3北里大・医, 4CREST). 前シナプス蛋白質, complexinの神経軸索への優先的局在化. 第25回日本神経科学大会 (2002年7月 東京)
59. 片岡 正和¹, 桑原 玲子², 中原 陽子², 鈴木 理可², 茂手木 淑子², 福井 由宇子², 横山 峯介², 高橋 正身^{3, 4} (1信州大・工, 2三菱化学生命研, 3北里大・医, 4CREST). SNAP-25 (S187A) 変異マウスの作製. 第45回日本神経化学学会大会 (2002年7月 札幌)

60. 辻村 淳¹, 板倉 誠², 関口 真理子³, 工藤 佳久¹, 高橋 正身^{2, 4} (1東薬大院・生命科学, 2北里大・医, 3三菱化学生命研, 4CREST). NMDA receptor-dependent recruitment of AMPA receptor and calnexin to plasma membrane in cultured rat hippocampal neurons. 第45回日本神経化学会大会 (2002年7月 札幌)
61. 安藤 公祐¹, 工藤 佳久¹, 高橋 正身^{2, 3} (1東薬大院・生命科学, 2北里大・医, 3CREST). 神経伝達物質放出へのカルモジュリン阻害剤の影響. 第45回日本神経化学会大会 (2002年7月 札幌)
62. 青柳 共太¹, 高橋 正身^{2, 3} (1東大院・総合文化, 2北里大・医, 3CREST). PtdIns (4,5) P2マイクロドメインと分泌小胞の開口放出部. 第75回日本生化学会大会 (2002年10月 京都)
63. 安藤 公祐¹, 工藤 佳久¹, 高橋 正身^{2, 3} (1東薬大院・生命科学, 2北里大・医, 3CREST). 神経伝達物質放出へのカルモジュリン阻害剤の影響. CREST「脳を知る」の合同シンポジウム (2002年11月 京都)
64. 辻村 淳¹, 工藤 佳久¹, 板倉 誠², 高橋 正身^{2, 3} (1東薬大院・生命科学, 2北里大・医, 3CREST). 輸送小胞の開口放出によるシナプス伝達の制御. CREST「脳を知る」の合同シンポジウム (2002年11月 京都)
65. 片岡 正和¹, 桑原 玲子², 山森 早織³, 中原 陽子², 鈴木 理可², 茂手木 淑子², 福井 由宇子², 横山 峯介², 高橋 正身^{3, 4} (1信州大・工, 2三菱化学生命研, 3北里大・医, 4CREST). SNAP-25(S187A)変異マウスの作製とその性質. CREST「脳を知る」の合同シンポジウム (2002年11月 京都)
66. 青柳 共太¹, 高橋 正身^{2, 3} (1東大院・総合文化, 2北里大・医, 3CREST). PtdIns

- (4,5) P2マイクロドメインと分泌小胞の開口放出部. CREST「脳を知る」の合同シンポジウム (2002年11月 京都)
67. 山口 和彦, 小野寺 加代子 (理研・脳センター・記憶学習, CREST/JST). 小脳プルキニエ細胞平行線維シナプスにおけるグルタミン酸受容体活性のexo/endocytosisによる調節. 第25回日本神経科学大会 (2002年7月 東京)
68. 山口 和彦, 田中 三紀, 溝口 明, 平田 快洋, 石崎 宏好, 金子 貢巳, 三好 淳, 高井 義美 (理化学研究所・BSI). Rab3 GEPによる中枢神経シナプス開口放出のポストドッキング過程の促進. CREST「脳を知る」領域シンポジウム (2002年11月 京都)
69. 山口 和彦, 小野寺 加代子 (理研・脳センター・記憶学習, CREST/JST). 小脳プルキニエ細胞平行線維シナプスにおける構成性エクソ／エンドサイトーシスによるグルタミン酸受容体の移送. 第80回日本生理学会大会 (2003年3月 福岡)
70. 遠藤 利朗, 小幡 邦彦, 柳川 右千夫, 伊佐 正 (生理学研究所). 上丘浅層におけるニコチン型アセチルコリン受容体を介したGABA性シナプス伝達の修飾—GAD67-EGFPノックインマウスを用いた解析. 第25回日本神経科学大会 (東京) (2002年7月)
71. 柳川 右千夫, 兼子 幸一, 小幡 邦彦 (生理学研究所). GFPノックインマウスを用いた扁桃体基底外側核GABA作動性ニューロンに対するノルアドレナリンの修飾作用の解析. 第25回日本神経科学大会 (東京) (2002年7月)
72. 海老原 利枝, 小幡 邦彦, 柳川 右千夫. マウスグルタミン酸脱炭酸酵素67遺伝子プロモーターの解析. 第25回日本神経科学大会 (東京) (2002年7月)
73. 兼子幸一, 小幡邦彦, 柳川右千夫. Ca^{2+} 感受性非選択性カチオンチャンネル活性化に

- よる扁桃体基底外側核GABAニューロンに対するノルアドレナリンの興奮性作用. GFPノックインマウスを用いた解析. CREST「脳を知る」合同シンポジウム（京都）（2002年11月）
74. 徳永 太（東北大学大学院医学系研究科 神経細胞制御学分野). 海馬苔状線維終末におけるL型カルシウムチャネルの役割. 第26回 日本神経科学大会（2003. 7.25. 名古屋）
75. 鎌田 真希（東北大学大学院医学系研究科 神経細胞制御学分野). 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）
76. 濱 裕（理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム). 神経細胞の成熟においてPKCが果たす役割についてmaturation. 第46回 日本神経化学会（2003. 9.25. 新潟）
77. 安藤 公祐（東京薬科大学大学院 生命科学系研究科). Negative Regulation of Neurotransmitter Release through the Specific Cleavage of SNAP-25 by Calpain. 第46回 日本神経化学会（2003. 9.25. 新潟）
78. 青柳 共太（東京大学大学院 総合文化研究科). PtIns (4,5) P2 Microdomains and the Sites of Neurotransmitter Release. 群馬大学第1回COE国際シンポジウム「神経伝達物質放出とホルモン分泌の分子機序」（2003.11.21. 前橋）
79. 山口 和彦（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). Regulation of exo/endocytosis in the function of central synapse. 第26回 日本神経科学会（2003. 7.23. 名古屋）

80. 柳川 右千夫, 海老原 利枝, 常川 直子, 小幡 邦彦. GABAニューロンの発生・分化と遺伝子発現. 第26回日本神経科学大会 (2003.7.25 名古屋)
81. 柳川 右千夫 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 神経化学部門). 抑制性ニューロンの発生と機能分化. 第26回 日本神経科学会 (2003. 7.25. 名古屋)
82. 海老原 利枝 (科学技術振興機構). マウス・ヴェシクル型GABAトランスポーターとグルタミン酸脱炭酸酵素の発現現象機構についての研究. 第26回 日本神経科学会 (2003. 7.24. 名古屋)
83. 兼子 幸一 (鳥取大学 医学部 精神行動医学教室) 小幡 邦彦, 柳川 右千夫. カルシウム依存性非選択性カチオンチャネルの活性化による扁桃体基底外側核Regular-spiking細胞に対するノルアドレナリンの興奮性作用：GAD67-GFPノックインマウスを用いた研究. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月23日
84. 繁富 英治, 山崎 弘二, 柳川 右千夫, 加藤 総夫. GAD67-GFPマウス孤束核におけるシナプス前P2X受容体活性化グルタミン酸放出促進のシナプス後ニューロン依存性. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月23日
85. 太城 康良, 柳川 右千夫, 小幡 邦彦, 村上 富士夫. 髄脳GABA作動性ニューロンの発生起源. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月24日
86. 勝丸 博信, 出来本 秀行, 柳川 右千夫, 小幡 邦彦, 村上 富士夫. 胎生期大脳皮質GABA作動性ニューロンの微細形態－細胞移動との関連. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月24日
87. 海老原 利枝, 小幡 邦彦, 北村 邦夫, 柳川 右千夫. マウス・ヴェシクル型GABAトラ

- ンスポーターとグルタミン酸脱炭酸酵素の発現調節機構についての研究. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月24日
88. 常川 直子, 柳川 右千夫, 小幡 邦彦. マウス上丘におけるGABAニューロンの発生. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月24日
89. 桑名 俊一, 柳川 右千夫, 岡田 泰昌, 菅原 美子, 小幡 邦彦. Firing patterns of GABAergic neurons in the pre-Boetzing complex of GAD67-GFP knock-in mice. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月25日
90. 常川 直子, 柳川 右千夫, 小幡 邦彦. Development of GABAergic neurons in mouse superior colliculus. 国際シンポジウム “Dynamics of Natural Development” (2003. 8.10. 豊中)
91. 八尾 寛 (東北大学) その他. 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ン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 (札幌) 平成16年6月3日
92. 鎌田 真希 (東北大学). 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 (札幌) 平成16年6月3日
93. 真鍋 友則 (東北大学). Heterogenous expression of N-and R-type Ca^{2+} channels among large mossy fiber terminals in mouse hippocampus -2. Morphological evidences. 第81回日本生理学会大会 (札幌) 平成16年6月3日
94. 八尾 寛 (東北大学) その他. 中枢神経ネットワークのプレシナプス機能を可視化する. 第1回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台国際センター) 平成16年5月14日

95. 石塚 徹（東北大学）その他. 遺伝子改変動物を用いた生体機能計測. 第1回東北大学バイオサイエンスシンポジウム（仙台国際センター）平成16年5月14日
96. 鎌田 真希（東北大学）. スライス培養法によるニューロン新生の解析. 第1回東北大学バイオサイエンスシンポジウム（仙台国際センター）平成16年5月14日
97. 鎌田 真希（東北大学）. 生後由来海馬培養スライス標本内における新生細胞の表現型. 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（大阪国際会議場）平成16年9月22日
98. 荒木 力太（東北大学）その他. 遺伝子ターゲ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（大阪国際会議場）平成16年9月23日
99. 八尾 寛（東北大学）その他. 中枢シナプス前終末に発現するカルシウムチャネルの多様性. CREST脳3領域合同終了シンポジウム（東京 未来科学館）平成16年10月7-8日
100. 八尾 寛（東北大学）その他. 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形態計測解析. CREST脳3領域合同終了シンポジウム（東京 未来科学館）平成16年10月7-8日
101. 阪上 洋行（東北大学）. Possible involvement of Efa6A, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6, in dendritic formation of hippocampal neurons through interaction with actinin- α . CREST脳3領域合同終了シンポジウム（東京 未来科学館）平成16年10月7-8日
102. 鎌田 真希（東北大学）. 生後由来海馬培養スライスにおけるニューロン新生. CREST

脳3領域合同終了シンポジウム（東京 未来科学館）平成16年10月7-8日

103. 荒木 力太（東北大学）その他. フローリントランスジェニックマウスを用いた開口放出の測定. CREST脳3領域合同終了シンポジウム（東京 未来科学館）平成16年10月7-8日
104. 宮崎 憲一（東北大学）. 単一シナプス前終末におけるカルシウムチャンネルサブタイプのヘテロな発現. CREST脳3領域合同終了シンポジウム（東京 未来科学館）平成16年10月7-8日
105. 稲村 実穂子. Different phosphatases regulate stargazing family in cortical neurons. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会 平成16年9月22日（大阪）
106. 安藤 公祐, 工藤 佳久（東薬大院）, 高橋 正身（北里大）. 神経伝達物質放出におけるカルモジュリン阻害剤の影響. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会. 平成16年9月21日～9月23日 大阪国際会議場 大阪
107. 青柳 共太, 菅谷津 貴子（北里大）, 梅田 真郷（京大）, 山本 清二, 寺川 進（浜松医大）, 高橋 正身（北里大）. PI (4,5) P2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. 平成16年9月21日～9月23日 大阪国際会議場 大阪
108. 西宮 聖一郎, 板倉 誠, 小寺 義男, 前田 忠計, 高橋 正身（北里大）. VAMPファミリー含有小胞の解析. 第27回日本神経科学大会・第14回日本神経化学会大会. 平成16年9月21日～9月23日 大阪国際会議場（大阪）
109. 西宮 聖一郎, 板倉 誠, 小寺 義男, 前田 忠計, 高橋 正身（北里大）. Molecular

characterization of VAMP-2,2 and 4-containing intracellular vesicles. NEURO2000
(大阪) 2004, 9, 22

110. 安藤 公祐(東薬大院), 青柳 共太, 菅谷津 貴子(北里大), 工藤 佳久(東薬大院), 高橋 正身(北里大). グリア細胞からのグルタミン酸放出機構. 「脳」三領域合同終了シンポジウム「脳！大いなるフロンティアに挑む」. 平成16年10月7日～8日 日本科学未来館 (東京)
111. 西宮 聖一郎, 板倉 誠, 高橋 正身 (北里大). さまざまなVAMPファミリータンパク質含有小胞の単離と解析. 「脳」三領域合同終了シンポジウム「脳！大いなるフロンティアに挑む」. 平成16年10月7日～8日 日本科学未来館 (東京)
112. 稲村 実穂子, 板倉 誠, 高橋 正身 (北里大). リン酸化, 脱リン酸化によるStargazin familyタンパク質制御の多様性. 「脳」三領域合同終了シンポジウム「脳！大いなるフロンティアに挑む」. 平成16年10月7日～8日 日本科学未来館 (東京)
113. 立川 哲也, 工藤 佳久, 山口 和彦. 小脳プルキンエ細胞AMPA受容体の構成性トラッキングにおけるPKCの関与. 第81回日本生理学会 (札幌) 平成16年6月3日
114. 山口 和彦, 小野寺 加代子 (理研・脳センター・記憶学習, CREST/JST). ラット小脳プルキンエ細胞におけるグルタミン酸受容体 (GluR2) C末端ペプチドによる平行線EPSCの増強. 第81回日本生理学会 (札幌) 平成16年6月3日
115. 立川 哲也, 工藤 佳久, 山口 和彦. 小脳プルキンエ細胞AMPA受容体の構成性トラッキングにおけるPKCおよびp38MAPKの関与. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会 平成16年9月22日 (大阪)

116. 立川 哲也, 山口 和彦. 小脳プルキンエ細胞AMPA受容体の構成性トラフィックキングにおける蛋白質燐酸化の関与. 「脳」三領域合同終了シンポジウム (東京) 平成16年10月7日
117. 山口 和彦, 小野寺 加代子, 立川 哲也, 松本 あづみ. 小脳プルキンエ細胞平行繊維シナプスにおけるAMPA受容体付加とLTD誘導の関係. 「脳」三領域合同終了シンポジウム (東京) 平成16年10月7日
118. 上松 正和, 柳川 右千夫, 小幡 邦彦, 吉田 祥子. 培養小脳組織からのGABA放出パターンの観察. 第27回日本神経学会大会, 大阪, 平成16年9月21日
119. 山肩 葉子, 井本 敬二, 戸塚 昌子, 八木 健, 小幡 邦彦, 柳川 右千夫. 不活性型カルモジュリンキナーゼ II α サブユニット遺伝子改変マウスの作成と解析. 第27回日本神経学会大会, 大阪, 平成16年9月21日
120. 伊佐 かおる, Thongchai Sooksawate, Mary Behan, 小幡 邦彦, 柳川 右千夫, 伊佐 正. GAD67-GFPノックインマウスを用いた上丘中間層GABA作動性ニューロンの電気生理学的及び形態学的特性. 第27回日本神経学会大会, 大阪, 平成16年9月21日
121. 田中 正彦, 柳川 右千夫, 小幡 邦彦, 丸野内 棣. *In vitro*における小脳プルキンエ細胞樹状突起形成過程の経時観察. 第27回日本神経学会大会, 大阪, 平成16年9月22日
122. 宮崎 憲一, 小橋 雄一, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大学). 海馬スライス苔状線維における早いシナプス形成のPKAによる促進. 第82回日本生理学会大会 2005年5月18-20日 (仙台)

123. 荒 力太, 阪上 洋行, 柳川 右千夫, 引間 卓弥, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大学, 群馬大学). シナプトフローリントランスジェニックマウスによる開口放出の測定. 第82回日本生理学会大会 2005年5月18-20日 (仙台)
124. 須山 成朝, 石塚 徹, 八尾 寛 (東北大学). マウス海馬苔状線維終末からのBDNFの活動依存的放出. 第82回日本生理学会大会 2005年5月18-20日 (仙台)

② プレス発表

1. 宮脇 敦史, 濱 裕. 「グリア細胞の接着によって完成する神経細胞の成熟－神経シナプス形成における, グリア細胞接着の効果実証とその分子メカニズムを解明－」. (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). 於 文部科学省 (東京) 平成16年2月4日

(3) 特許出願

① 国内 (3件)

1. (発明者) 柳川 右千夫
(発明名称) グリーン蛍光蛋白質により形質転換されたトランスジェニック動物
(出願番号) 特願2002-162552
(出願日) 2002年6月4日
2. (発明者) 山肩 葉子, 柳川 右千夫
(発明名称) 不活性型Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII α ノックイン動
的および同ノックイン細胞
(出願番号) 特願2004-96995
3. (発明者) 八尾 寛, 柳川 右千夫, 宮崎 純一, 石塚 徹, 荒木 力太
(発明名称) 遺伝子改変動物を用いた生体開口放出計測システムの発明

(出願番号) 特願2004-106661

(出願日) 平成16年3月29日

② 海外 (1件)

1. (発明者) 柳川 右千夫

(発明名称) グリーン蛍光蛋白質により形質転換されたトランスジェニック動物

(国際出願番号) PCT/JP02/05949

2. (発明者) 山肩 葉子, 柳川 右千夫

(発明名称) 不活性型型Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII α ノックインマ
ウス

(出願申請中)

3. (発明者) 八尾 寛, 柳川 右千夫, 宮崎 純一, 石塚 徹, 荒木 力太

(発明名称) 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

(出願申請中)

(4) 新聞報道等

① 新聞報道

1. “グリア細胞の一種「アストロサイト」シナプス形成を促進 神経細胞と接着効果理研・JSTが解明”. 日刊工業新聞 平成16年2月5日 (木)

2. “「グリア細胞」が接触 神経結合促す仕組み発見 理研”. 日経産業新聞 平成16年2月5日 (木)

3. “脳神経細胞の成熟メカニズムを解明 理研-JST グリア細胞接着不可欠 再生医療への応用期待”. 化学工業日報 平成16年2月5日 (木)

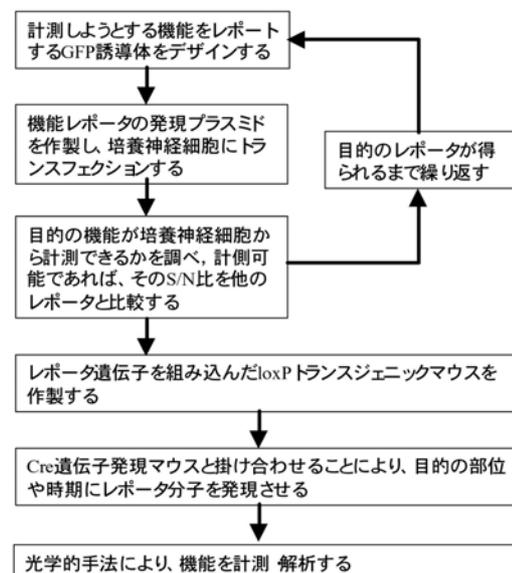
4. “脳回路網の形成促進 神経細胞への脂肪酸流入が重要 理研. 日本工業新聞 平成16年2月5日（木）
5. “周辺細胞から脂肪酸が流入＝脳神経網の形成促進-理研”. JIJI NewsWide 平成16年2月5日（木）
6. “脳神経細胞の成熟にグリア細胞の接触必須 理研などの研究グループ 新しい実験系で解明”. 科学新聞 平成16年2月13日（金）

7. 結び

“研究の目標等から見た達成度、得られた成果の意義等の自己評価、今後の研究の展開、研究代表者としてのプロジェクト運営について（チーム全体の研究遂行、研究費の使い方、若手研究者の育成等）、その他戦略的基礎研究推進事業に対するご意見、ご要望をご自由にお書き下さい。また、研究室の雰囲気が伝わるようなメンバーの集合写真、実験室や作製した主な研究設備のスナップ写真等あれば挿入して下さい。”

本研究課題においては、それぞれバックグラウンドの異なるグループがチームを形成することにより、共同研究の成果をあげることができた。これは、右図のように新しい機能研究の戦略である。この戦略は、以下のようにまとめることができる。(1) 未知のメカニズムの解明にあたり、神経細胞あるいはその機能要素のどのような機能を定量化する必要があるかを設定する。(2) その機能を光学的に定量化できる

図1 機能研究法の新戦略



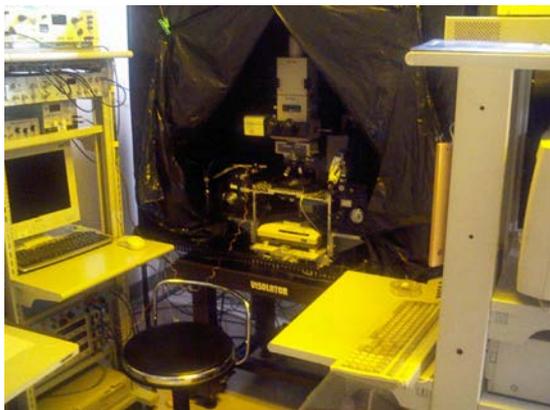
タンパク質レポーター（新世代機能プローブ）をデザインする。(3) 培養神経細胞などにレポーターを発現させ、目的の精度が得られているかを検証する。(4) この結果をフィードバックすることにより、レポーターの改良をおこなう。(5) このようなレポーターを組み込んだ遺伝子改変動物を作製する。(6) 遺伝子改変動物の脳組織、あるいは、培養を用いて、機能を光学的に計測し、未知のメカニズムを解明する。本研究課題においては、遺伝子改変動物の作製にCre/loxPリコンビネーションシステムを応用したが、この方法は、脳の部位あるいは細胞特異的に新世代機能プローブを発現できるメリットがあった。この戦略の成果として、GAD-EGFPノックインマウスやシナプトフルオリンloxPマウスのような有用な遺伝子改変動物が生み出され、本課題研究にとどまらず、国内外において、さまざまな研究に用いられている。このような波及効果は、今後ますます大きくなると考えられるので、CREST研究課題としての重要な成果の一つである。また、本研究課題は、このような新しい戦略のモデルケースとして、世界に先駆けるものになった。本戦略こそが、神経細胞ネットワークの機能の研究を進めるにあたり、今後先導的な役割を果たすものと考えられる。また、本研究課題の遂行の過程で、神経ネットワークを研究するにあたり、蛍光プローブにより形態的に同定されたシナプスの機能をリアルタイムに計測するという「時空生理学」とも名づけるべき新しい学問領域が生まれたことも注目に値する。しかし、本研究課題のように革新性の高いプロジェクトの場合、5年の研究期間が終了する頃になり、ようやく成果が得られてきた。とくに、プロジェクトとしての成果を研究期間内に論文としての形で出すには時間が足りないと思われる。とくに中核チームは、研究法の開発に全力で取り組んだがゆえに、論文数が少なく、その意味での達成度が低かった。しかし、特許申請がいくつか成果として生まれているので、開発研究としての達成度は評価できる。

本研究課題の成果として特筆に価することとして、中枢神経ネットワークの機能を解析するのに有用なさまざまなツールを発明したことが挙げられる。新世代プローブ開発チームは、さまざまな蛍光タンパクプローブを世の中へ送り出した。Venus、およびこれを組み込んだ機能プローブ、Kaede, pH感受性EYFP誘導体などは、その代表

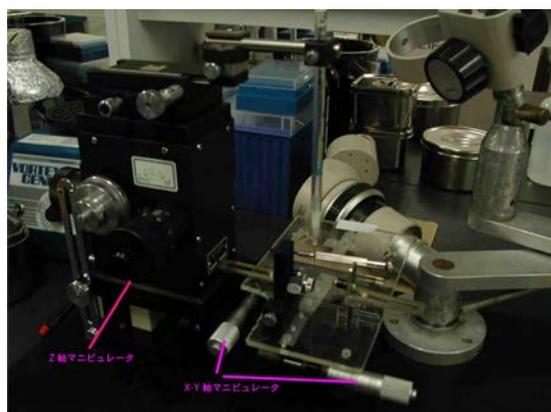
的なものであり、今後の応用が期待される。分子解析チームは、開口放出制御タンパクSNAP-25のリン酸化部位を変異させたノックインマウスを作成した。このマウスが環境に依存した情動障害を示すことから、情動異常を伴う統合失調症や、双極性障害の動物モデルになることが期待される。機能解析チームは、新世代プローブ開発チームと共同でマイクロアイランド培養下におけるニューロン-グリア共培養系を開発した。このシステムは、今後においてもニューロン-グリア相関を研究の進展を促進することが期待される。遺伝子改変動物作製チームは、さまざまな遺伝子改変動物を世の中へ送り出した。たとえば、GAD67-GFPノックインマウスは、国内外の75以上の研究機関で用いられている。また、中核チームと共同で作製したシナプトフルオリントランスジェニックマウスについては、国内外の8箇所の研究機関との共同プロジェクトが、すでにスタートしている。また、脳以外の全身諸器官の主要な機能研究に用いられる可能性が高く、今後、さまざまな領域の研究を促進することが期待される。中核チームは、蛍光デキストラン法を開発し、シナプス前終末の形態を同定しながら機能を計測することを可能にした。また、スライス培養系においてニューロン新生が自発的に生じていることを明らかにした。このシステムは、ニューロン新生・分化の研究や、脳の修復の研究を促進することが期待される。

研究代表者としてのプロジェクト運営について（チーム全体の研究遂行、研究費の使い方、若手研究者の育成等）本プロジェクトにおいては、年度ごとにチームミーティングを開催し、それぞれのサブチームについて研究の進捗状況を把握するとともに、研究の交流を図った。このような交流を通じて、サブチーム間の連携が促進され、新しい研究の流れが自然に形成されたことの意義は、大きい。また、このミーティングやCRESTシンポジウムが若手研究者の研究交流の場となり、彼らの育成を促進したと考えられる。また、本研究において、光学的レポーターの開発、生体への導入、光学解析などが主要な研究方法であるが、これらの研究を遂行できる若手研究者は多くない。とくに遺伝子工学的手法から生理学的手法までを一通りカバーできる研究者は少ない。本研究プロジェクトの期間を通じて、これらの人材を養成できたことの意義は大きい。

トランスジェニックマウスのSPF化などで最終年度に予想外の経費を必要としたが、柔軟に対処していただいたおかげで、国内外の研究期間との共同研究が順調に始まっている。16年度の研究期間を17年3月まで延長していただいたことも、本研究課題にとり、大きなサポートになった。ゆえに、もう二三年研究期間を延長していただければ、これまでの投資を回収してあまりある成果が出たものと予想される。



パッチクランプ光学計測併設システム



マウス用脳定位固定ウィルス注入装置



モリス水迷路システム



CRESTシンポジウム（日本科学館，2004）