

自然科学研究機構・生理学研究所・教授

重本 隆一

「細胞膜上機能分子の動態と神経伝達調節メカニズム」

研究期間：平成11年11月1日～平成16年10月31日

1. 研究実施の概要

本研究課題の目的は、神経細胞膜上の受容体やチャネルなどの機能分子の微細局在や動態を高解像度かつリアルタイムで明らかにし、シナプス局在の分子機構や機能分子のダイナミズムに基づいた神経伝達調節のメカニズムを解明することである。脳における情報伝達は、ニューロンやグリアの細胞膜上に存在する神経伝達物質受容体やイオンチャネルなどによって細胞内に仲介され、調節されている。細胞膜にはこれらの機能を発現するための特殊化された領域、コンパートメントが存在し、機能的に関連のある分子が集積していると考えられる。シナプスはこの代表的な例であり、受容体やイオンチャネルなどの機能分子は発達過程や可塑的变化、また虚血などの病態に応じてダイナミックに細胞膜上の局在を変化させる。しかしながら、このような細胞膜上における機能分子の局在や動態をシナプスなどのコンパートメントとの位置関係を明らかにしながら、実際に目に見える形で高解像度で経時的に示すためには、従来の方法だけでは不十分であり、新たな定量的方法を開発する必要があった。そこで本研究では、電子顕微鏡レベルの高解像度で脳内の機能分子の局在を定量的に明らかにし、さらに生細胞においてリアルタイムで細胞膜上機能分子の動態や機能分子活性化を可視化できる方法を確立し、そのダイナミズムに基づいた神経伝達調節のメカニズム解明を目指した。新たに開発された方法としては、定量的凍結切断レプリカ免疫標識法 (SDS-FRL 法)、未固定急速凍結標本を用いた *postembedding* 法、GFP およびその誘導体で標識されたシナプス関連蛋白質のリアルタイム解析法、受容体サブユニット間相互作用の FRET 法による活性化の検出等がある。従来法とこれらの新しい方法を組み合わせる事により定量的なグルタミン酸受容体数と密度の測定、学習による受容体動態の解明、シナプス前終末における伝達物質放出関連分子の定量的な分布、電位依存性カルシウムチャネルの局在解析、シナプス形成過程および可塑的变化の過程におけるシナプス関連分子の集合と離散の可視化、2光子励起顕微鏡によるシナプス微細構造の動態解析とカルシウム濃度変化の同時測定、内向き整流性 K^+ チャネルの構造機能関連と RGS 蛋白による機能修飾、代謝型グルタミン酸受容体の活性化のリア

ルタイム可視化と機能制御機構の解明などの成果が得られた。

まず、電子顕微鏡レベルの高解像度で脳内の機能分子の局在を定量的に明らかにするために、藤本和が開発した凍結切断レプリカ免疫標識法（SDS-FRL法）を脳組織に適用し、その利点を伸ばし欠点を克服するための多くの改良を加えた。これにより、例えばAMPA型グルタミン酸受容体では機能的受容体チャンネル1分子に対してほぼ1個の金コロイド標識の割合で検出できるほどの高感度を達成した。NMDA型グルタミン酸受容体やGABAA受容体などについても、AMPA型受容体と同レベルの金標識数を得ていることから、これに近い感度を達成しているものと考えている。これにより個々のシナプスにおけるグルタミン酸受容体やGABA受容体の局在や数の分布状況が精密に捉えられるようになり、得られる情報が格段に信頼性を増すことになった。例えば小脳でプルキンエ細胞が作る2種類の興奮性シナプス、平行線維シナプスと登上線維シナプスのAMPA型受容体密度は、平均でそれぞれ平方ミクロンあたり約400と約1500個と推定され、平行線維シナプスは個々のシナプスでの受容体密度がほとんどゼロから平方ミクロンあたり1000個近くまでと大きくばらついているのに比し、登上線維シナプスでは受容体密度が極めて一定である事が明らかとなった。このことは同じ細胞の作るシナプスでも入力線維の種類によって大きく異なる調節がされている事を示している。また平行線維の作るシナプスでも相手がプルキンエ細胞か介在神経細胞かでAMPA型受容体の局在様式が大きく異なることも明らかとなった。すなわち介在神経細胞上のシナプスでは登上線維シナプスにも増してAMPA型受容体密度は極めて一定であった。このような定量的SDS-FRL法は高感度であると同時に非常に高効率でもあり、従来事実上不可能であった電子顕微鏡的な分子動態の解析が可能となった。例えば、水平性視機性眼球運動の適応学習を起こしたマウスの小脳片葉においては、AMPA型受容体のシナプスにおける密度が1時間後に23%減少することを見出した。これは生理的学習行動によるシナプスのグルタミン酸受容体の動態を初めて検出したものである。

一方、蛍光標識による定量的リアルタイム解析によって海馬神経細胞におけるシナプス構成蛋白質の動態およびシナプスへの局在の分子機構の解明が進んだ。この手法

により PSD-95-GFP で標識されるシナプス後肥厚部は24時間でその20%が置き換わる極めて動的な構造である事が明らかになった。さらにシナプス前部および後部に存在する複数の蛋白質の動態を同時に観察するために、GFPの波長変異体を利用した可視化手法を開発した。また刺激依存的なシナプス後部蛋白質の動態を解析するため、海馬神経細胞の様々な刺激条件下におけるシナプス後部蛋白質の局在変化を検討し、異なったカルシウム流入経路がシナプス後部蛋白質の一種である Homer 分子の動態を二方向性に制御する事を見出した。さらに GFP 融合シナプス蛋白質の観察を安定した発現レベルで行うためにトランスジェニックマウス系統を作成し、これらのマウス由来の海馬神経細胞を利用して長期間に亘るシナプス構造のリモデリングの過程を直接可視化した。非刺激条件ではむしろ樹状突起に多く存在する分子である RNA 結合蛋白質 TLS に関して、蛋白質合成誘導刺激である代謝型グルタミン酸受容体の活性化によって TLS がシナプス後部に集積する事、またこの分子が樹状突起スパイン構造の発達に必須である事を示した。以上の研究成果は、これまできわめて静的に捉えられていたシナプス後部の分子構築が、数分の時間単位で刻々とその分子構築を変化させる動的な構造で有る事、さらにシナプス後部において様々な情報伝達経路により特異的な分子の集積・分散が引き起こされる事を示している。

分子レベルでのリアルタイム解析としては、受容体サブユニット間相互作用の FRET 法による活性化の検出に成功した。代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) の細胞外領域は結晶構造解析により、ホモ二量体として構成されグルタミン酸結合により細胞外領域の構造が変化することが報告され、二量体サブユニット間の配置が活性化に伴い変化することが推測されていた。そこで、細胞外領域の構造変化に伴って起こる細胞内領域の動的構造変化のリアルタイム解析を行うため、二量体構造変化を異色の蛍光物質間 FRET 効率の変化として光生理学的に捉える方法を開発し、培養細胞の細胞膜上 mGluR1 分子の蛍光を全反射照明下で測光した。その結果、グルタミン酸投与によりサブユニットの内部では明らかな構造変化は起こらないが、二量体サブユニットの相対的配置が変化することが明らかとなった。この研究により生細胞における膜機能蛋白質の動的構造変化のリアルタイム測定法 が確立された。

以上のように新たに開発された方法により、これまで不可能であった細胞膜上機能分子の動態が解析できるようになり、新たな知見が次々と生まれつつある。この5年間の研究の成果はいまだ出始めたところであり、今後さらに大きな発展が期待される。今後は脳の情報伝達を担う神経細胞の細胞膜上機能分子が神経活動や病態に応じてどのような動きをするのか、特に *in vivo* の脳で個体の発達や行動、病態と結びつけた解析を進めていきたいと考えている。

2. 研究構想

研究チームとして、研究開始時に目指した目標は以下の4項目にまとめられた。

- 1) 脳における神経伝達物質受容体やその効果器分子と予想されるチャネル、酵素などの膜上機能分子の局在様式や共存関係を高解像度で、定量的に、神経要素を同定しながら、明らかにする（重本、藤本、Nusser）。
- 2) 1)によって発見した機能分子の膜上コンパートメントにおける集積や共存関係を、培養細胞で再現させ、生細胞においてその動態を観察し、アゴニスト刺激やリン酸化などの修飾による変化を明らかにするとともに、脳内で同じことが起きていることを確認する（岡部、重本）。また、機能分子が、膜上コンパートメントに集積しているのみならず直接カップルしている場合には、FRET法（後述）により、受容体刺激等によってひきおこされる分子間相互作用の動的変化を可視化することを試みる（久保、岡部、重本）。
- 3) 共存する機能分子間でおこる相互作用に必要な分子内の領域を *mutagenesis* によって同定し、それを培養細胞で確認する（久保、重本）。
- 4) 3)で得られたデータに基づいて作成した、機能分子間相互作用を失わせた分子を、*transgenic* や *knock-in* の手法を用いて、個体に戻し、機能分子の動態や相互作用の生理的な役割を明らかにする（海老原、岡部、久保、重本）。

これらの目標を実現するための研究計画・進め方としては、下記の8項目にまとめられる。

- 1) まず神経細胞膜上の受容体やイオンチャネルなどの機能分子の微細局在や動態を高解像度で明らかにする新しい方法論を確立する。
- 2) それによりシナプス関連機能分子の局在や共存のスクリーニングを行う。具体的には各種のグルタミン酸受容体、GABA受容体、各種のK channel, Ca channel, PSD95やHomer 1c分子(PSD-Zip45)などの各種のシナプス関連分子とシナプスとの位置関係、共存関係をスクリーニングする。
- 3) SDS-FRL法によるスクリーニングで発見した細胞膜上機能分子の局在や共存関係を、preembedding法あるいはpostembedding法で、神経細胞要素を同定しながら確認する。神経細胞要素の同定は、従来から行ってきた神経トレーサーや化学マーカーによるほか、特異的プロモーターによって特定の神経細胞が標識されたトランスジェニック動物を積極的に利用する。
- 4) 興味深い共存関係が観察されれば、受容体と効果器をつなぐG蛋白質の各サブタイプ、および、G蛋白質応答の速さを調節するRGS蛋白質についても、同じコンパートメント上に含まれるものを同定する。
- 5) 脳で見いだされた細胞膜上機能分子の共存関係やその動態を調節する分子メカニズムを明らかにするために、培養細胞を用いて機能分子を直接可視化し動態をリアルタイムで解析するモデル系を開発する。
- 6) 2分子が直接相互作用することが想定される場合は、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 法により、「その分子間相互作用を、生細胞において実時間で可視化する」という先導的な試みを行なう(久保)。すなわち、目的とする2種の分子を、帯域のずれた、そして片方の発光スペクトルともう片方の励起スペクトルの重なる、2種の蛍光物質によりそれぞれラベルし、分子が近接相互作用をする時に蛍光物質間でエネルギーの受渡しが起こるということを指標にして、近接相互作用を光学的に観察する。蛍光物質のラベルは、遺伝子工学的に分子内にGFPの誘導体を導入することにより行なう。

- 7) 2分子間の相互作用や機能的な **coupling** に重要な構造、あるいは、その間で機能する関連蛋白 (**regulator**) との相互作用を司る分子領域を同定することを目指す。
- 8) 細胞膜上機能分子の動態が個体において、どのような生理的意義を持っているのかを明らかにするために個体レベルでの形態学的変化と機能的変化の両面を解析する。この際 **transgenic** や **knock-in** などの遺伝子操作を用いたマウスを作製して利用する。

これらの研究構想に基づき、まず 1) に関しては、重本、藤本の協力により **SDS-FRL** 法を脳組織へ適用するための様々な改良が行われた。それにより、脳領域や細胞種を同定して解析する事、レプリカの両側の標識をし多重標識する事、1分子につき1金粒子に近い感度を達成する事、レプリカに接する組織を切片で解析する事、など先進的な形態学的方法が確立された。2) に関しても100種類を超える機能分子について **SDS-FRL** 法による分布の電子顕微鏡観察が行われ、多くの新しい所見を得た。また5) については岡部グループによって、**PSD95**, **synaptophysin**, **Homer** などのシナプス関連分子のリアルタイム動態解析が可能となり、複数の分子の同時リアルタイム解析は、これらの分子共存の動態解析を可能とした。3) に関しては神経細胞やグリア、さらに各種シナプスの同定に2) でスクリーニングした多くの分子がマーカーとして有用である事が重本グループにより明らかとなった。例えばこれらを利用してグルタミン酸作動性シナプス、**GABA** 作動性シナプス、それらにする神経終末、伝達物質放出部位、各種介在神経細胞やグリア細胞などを同定する事ができる。一方、神経トレーサーを用いた同定は **SDS-FRL** 法への適用は困難であり、細胞膜上発現マーカーを特定の神経細胞に導入した動物を使った技術開発が現在進行中である。4) については久保グループで内向き整流性 K^+ チャネルの構造機能連関と **RGS** 蛋白による機能修飾について成果があがった。また異なる2分子間ではないが、**ATP** 受容体チャネル **P2X₂** についてはそれ自身の間の密度依存的相互作用によってチャネルの性質が調節されるという画期的な発見があった。6) についても久保グループで代謝調節型グルタミン酸受容体 **mGluR1** のホモ2量体の相互位置関係を **FRET** で解析する事に成功し

た。7) に関しては、Homerの共発現がmGluR1の受容体機能に及ぼす作用が解明され、mOPA1とRGS14間の相互作用に関係する分子領域、mOPA1とGABA_A受容体alpha4サブユニット間の相互作用に関係する分子領域が明らかとなった。8) については、以上の研究成果に基づいた遺伝子変異動物を重本グループと久保グループで作製中の段階である。以上のように当初の研究構想はおおむね達成されたと考えているが、異なる2つの分子の相互作用とそれに関係する分子領域の同定、その領域のmutantを用いた解析については、やや遅れている感がある。つまり、当初の4項目の目標の最後の項目については、現在まだ進行中であり、成果を見るに至っていない。一方、これらの研究の過程で当初の目標設定後の新展開から生まれた目標としては、定量性をさらに追求しシナプスに存在する受容体や関連分子の絶対数を明らかにする事、NMDA受容体の左右非対称性局在という驚くべき発見を受けて左右非対称性の生理学的意義とその生成メカニズムを明らかにする事、in vivoで記憶学習の長期定着メカニズムを解明する事、シナプス後部という複雑なシグナル伝達複合体の形成機構および動作原理の解明、P2X₂受容体が細胞膜上に存在する開状態のチャンネルの密度に依存して性質を動的に変化させる構造変化の実体解明などがある。

3. 研究成果

3. 1 “神経伝達物質受容体とイオンチャンネルの局在と機能（重本グループ）”

(1) 研究内容及び成果

この5年間で論文発表に至った主な研究成果としては、以下のようなものがある。

- 1) mGluR1阻害抗体による小脳失調 (Smitt, Kinoshita et al., New Eng. J. Med., 2000)
- 2) mGluR3の脳内局在 (Tamaru et al., Neuroscience, 2001)
- 3) GABA_B受容体の局在
小脳、視床 (Kulik et al., Eur. J. Neurosci., 2002)
海馬 (Kulik et al., J. Neurosci., 2003)

大脳皮質における発達変化 (Lopez-Bendito et al., Eur. J. Neurosci., 2002)

4) Ih チャネルサブユニット HCN1-4 の局在と機能

錐体細胞樹状突起における濃度勾配 (Lorincz et al., Nature Neurosci., 2002)

脳内分布 (Notomi et al., J. Comp. Neurol., 2004)

中脳路核神経細胞における Na-K pump との共役と共存 (Kang et al., J. Neurosci., 2004)

バスケット細胞における局在 (Lujan et al., Eur. J. Neurosci., 2005)

5) AMPA 受容体のシナプスにおける数と密度

小脳シナプス mEPSC による解析 (Momiya, A. et al., J. Physiol., 2003)

2光子刺激と SDS-FRL 法による単一シナプスでの定量 (Tanaka et al. J. Neurosci., 2005)

6) NMDA 受容体 $\epsilon 2$ の左右非対称性配置 (Kawakami et al., Science, 2003)

7) P/Q-type カルシウムチャネルの小脳における局在 (Kulik et al., Eur. J. Neurosci., 2004)

8) Presynapse の機能分子の SDS-FRL 法による定量的解析 (Hagiwara et al., J. Comp. Neurol., 2005)

1) mGluR1 阻害抗体による小脳失調

従来よりヒトのホジキン病患者で小脳失調症を併発する例のあることが知られていた。また代謝調節型グルタミン酸受容体 mGluR1 のブロックにより長期抑圧現象や運動学習が阻害され、mGluR1 ノックアウトマウスでは小脳失調をきたす事が知られていた。我々はこのような症例の一部に代謝調節型グルタミン酸受容体 mGluR1 の活性化を阻害する自己抗体が存在する事を突き止めた。この自己抗体をマウスの小脳付近のくも膜下に注入することにより、小脳失調症状を再現することに成功し (図1)、受容体阻害抗体が機能的にヒトの脳神経症状を引き起こすことを初めて証明した。



図1

2) mGluR3の脳内局在

代謝調節型グルタミン酸受容体 mGluR3 のマウス脳内局在を免疫組織化学法と免疫電子顕微鏡法を用いて調べた。神経細胞やグリアに広範な分布を示し、軸策や軸策終末においては、同じサブファミリーに属する mGluR2 と同様、伝達物質放出部位とは離れた preterminal に多く存在した。一方、樹状突起やスパインにおいては予想に反して mGluR2 よりもむしろ異なるサブファミリーに属する mGluR1/5 とよく似た局在、すなわち興奮性シナプス後部の周囲に密度が高いという特徴を持っていた (図2)。

3) GABA_B 受容体の局在

脳内における主要な抑制性伝達物質である GABA には、イオンチャネル型の GABA_A 受容体と G 蛋白共役型の GABA_B 受容体が存在する。GABA_A 受容体は、

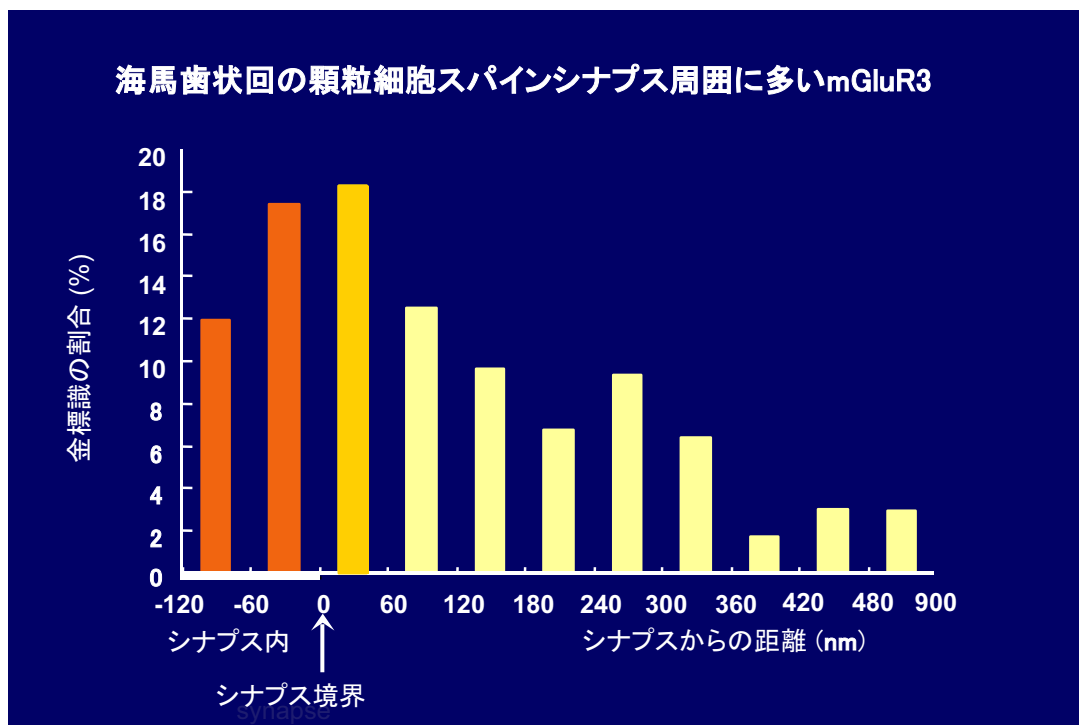


図2

GABA 作動性シナプスに主に存在することが知られていた。我々は、免疫電子顕微鏡法により GABA_B 受容体が小脳や海馬では GABA 作動性シナプスよりもむしろ興奮性のグルタミン酸作動性シナプスの周囲に集積していることを見いだした (図3)。

GABA_B 受容体はシナプス前終末の伝達物質放出部位とシナプス後部の両方に存在していた。また、視床においてはいずれのタイプのシナプスとも特に位置的な関連なく広範に分布している。これらの結果は、GABA_B 受容体が小脳や海馬の興奮性シナプスにおいては、間接的な抑制性 GABA 終末の活動による調節を受けている事を示し (図4)、またこれらの受容体によって活性化される機能分子の共存や機能調節、GABA_B 受容体の役割が脳領域によって異なる可能性を示唆している。

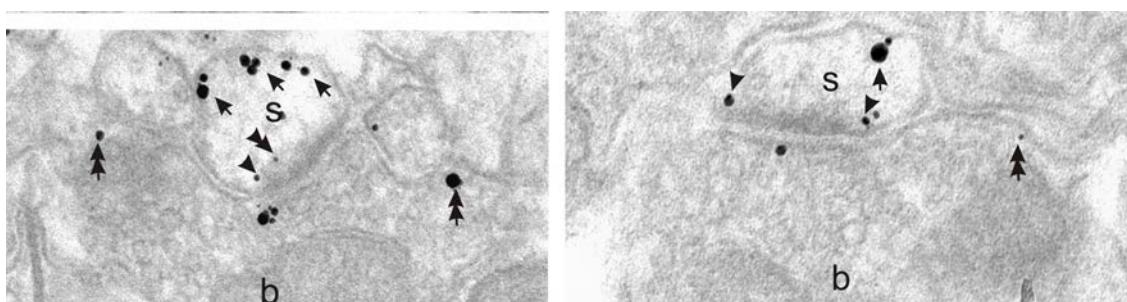


図3

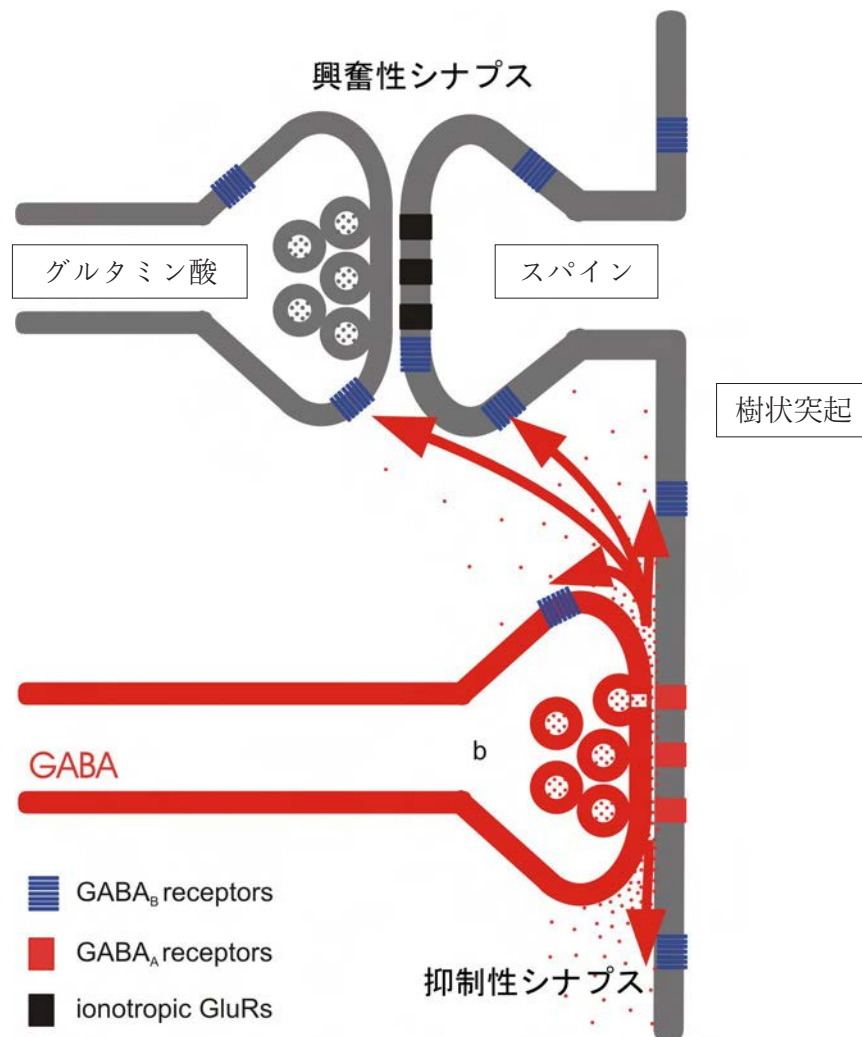


図4

4) Ih チャネルサブユニットHCN1-4の局在と機能

Hyperpolarization Cyclic Nucleotide-gated (HCN) チャネルは神経細胞の静止膜電位の設定や周期的発火に深く関与していると考えられている過分極によって活性化されるカチオンチャネルである。現在、HCN1から4までのチャネル遺伝子がクローニングされている。本研究ではHCNチャネルに特異的な抗体を作製し、光学顕微鏡・電子顕微鏡レベルでの局在分布を検討した。各HCNチャネルは、それぞれ特異的な脳内分布を示し、軸索終末、細胞体、樹状突起などに多様な免疫陽性像が認められた。HCN1とHCN2については、大脳皮質および海馬において錐体細胞の特

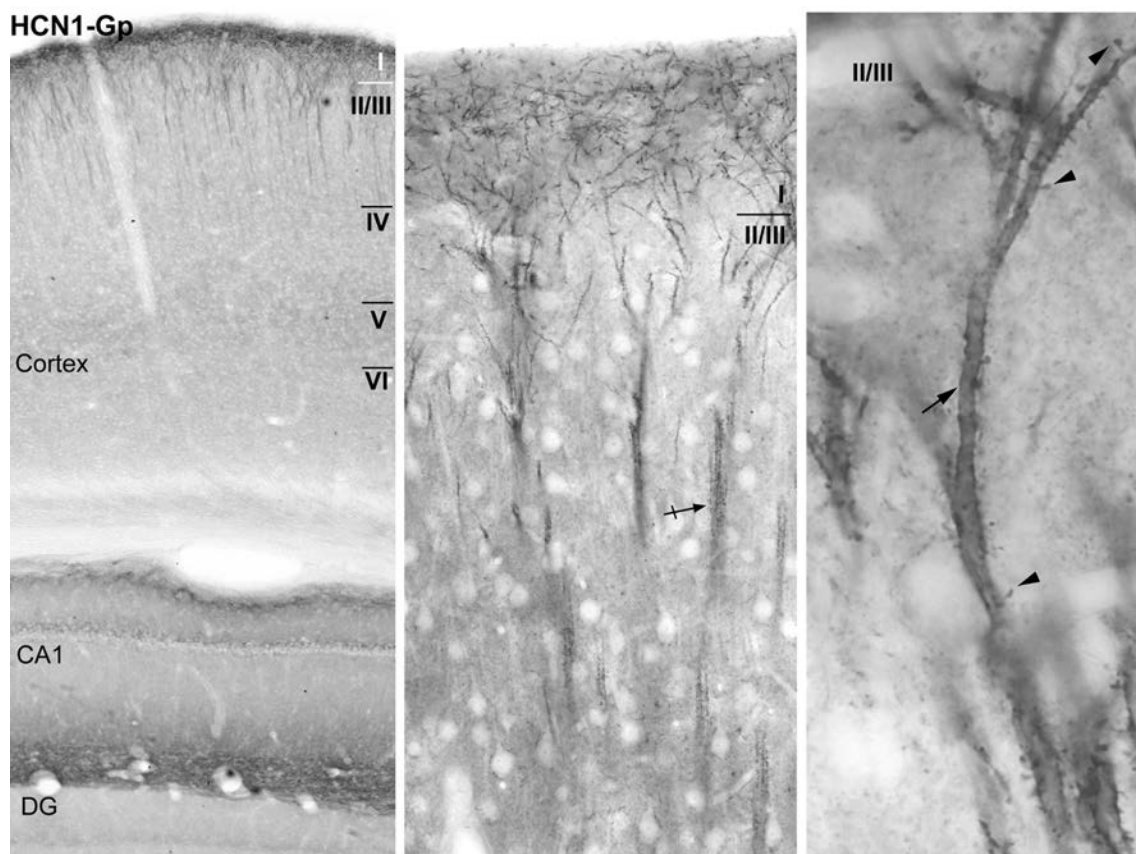


図5

に遠位の樹状突起に強い陽性像が認められ(図5)、電子顕微鏡的にも金標識の密度勾配が明瞭に認められた。この勾配は遠位の入力に対するシナプス反応の標準化に重要な役割を持っていることが知られている。一方、興奮性シナプスの存在するスライムには少なく、細胞体からの距離だけでなく異なる膜コンパートメントにおいても、チャンネル密度の調節が行われている事を示唆している。またHCN1は海馬のバスケット細胞や小脳のバスケット細胞の神経終末に豊富に存在している他、すべてのHCNチャンネルサブユニットが特定の軸索の細胞膜上にも発現していた。現在、生理学的にはシナプス前のHCNチャンネルには放出抑制作用があることが報告されているが、軸索についての機能は全く分かっていない。異なるHCNチャンネルサブユニットが、異なるタイプの軸索の静止電位や活動電位の伝達にどのように関わっているのか、今後ノックアウト動物や電気生理学的方法を用いて検討していく必要がある。

さらにHCN2については、神経細胞だけでなく **perineuronal oligodendrocyte** と呼ばれるグリア細胞にも強い発現がみとめられた (図6)。この種のグリア細胞については、神経細胞体に接するように位置しており、神経細胞障害時に保護的に働くあるいはミエリンの再生に関係しているとの報告があるが、過分極性の応答については全く知られていない。これらの未知の Ih チャンネル機能の解明が今後の課題となっている。

さらに三叉神経中脳路核神経細胞においては、全く予想されていなかった Ih チャンネル機能が見出された。静止膜電位を形成する原動力となっている Na-K ポンプと Ih チャンネルの共存および双方向性の機能的共役が存在することを発見したもので、Ih チャンネルを通して流入する Na によって Na-K ポンプの活性化が起こり、逆に活性化された Na-K ポンプはゆっくりとした Ih チャンネル活性の促進を引き起こす。これらの相互作用は細胞膜上の極めて限定されたマイクロドメインで起こっている事が分かり、電子顕微鏡的にも極めて類似した局在パターンを示した。

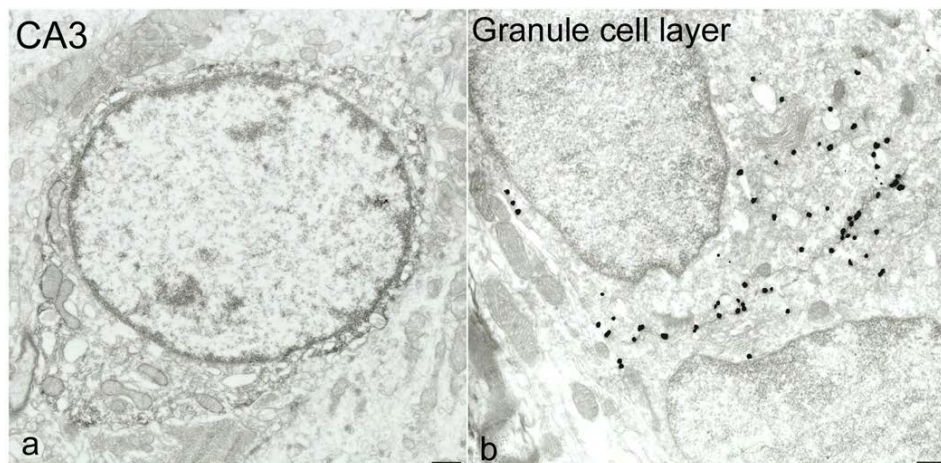


図6 グリア細胞におけるHCN2の細胞膜局在

5) AMPA受容体のシナプスにおける数と密度

生後3-4日のラットプルキンエ細胞をモデルとして用いた場合、single quantaによって活性化される AMPA チャンネルの密度は電気生理学的方法により 900

channels/ μm^2 と計算され、さらに2光子レーザーによって単一シナプスを刺激し、その後電子顕微鏡的に記録されたシナプスの面積を超薄切片の再構築から計測した結果（図7）、約1000 channels/ μm^2 という値が得られた。一方、カーボン蒸着を工夫することにより3–10倍の感度の上昇とラベリングの均一性を確保することができた改良SDS-FRL法ではこれにほぼ匹敵する immunogold particle 密度（約1000 particles/ μm^2 ）を達成した（図8）。この結果はSDS-FRL法がチャンネル1分子をほぼ1個の金粒子で検出できる感度を持っていることを示している。また生後3–4日の登上線維–プルキンエ細胞シナプスでは、個々のシナプスのAMPAチャンネル数がシナプス面積に比例している事が明らかとなった。この方法で発達に伴うAMPAチャンネル密度の動態を計測したところ、小脳分子層においては、生後2–3週でシナプス内およびシナプス間におけるAMPAチャンネルの密度に不均一性が増大してくること、平均密度は減少することがわかった。一方、GluR2受容体はAdultでも

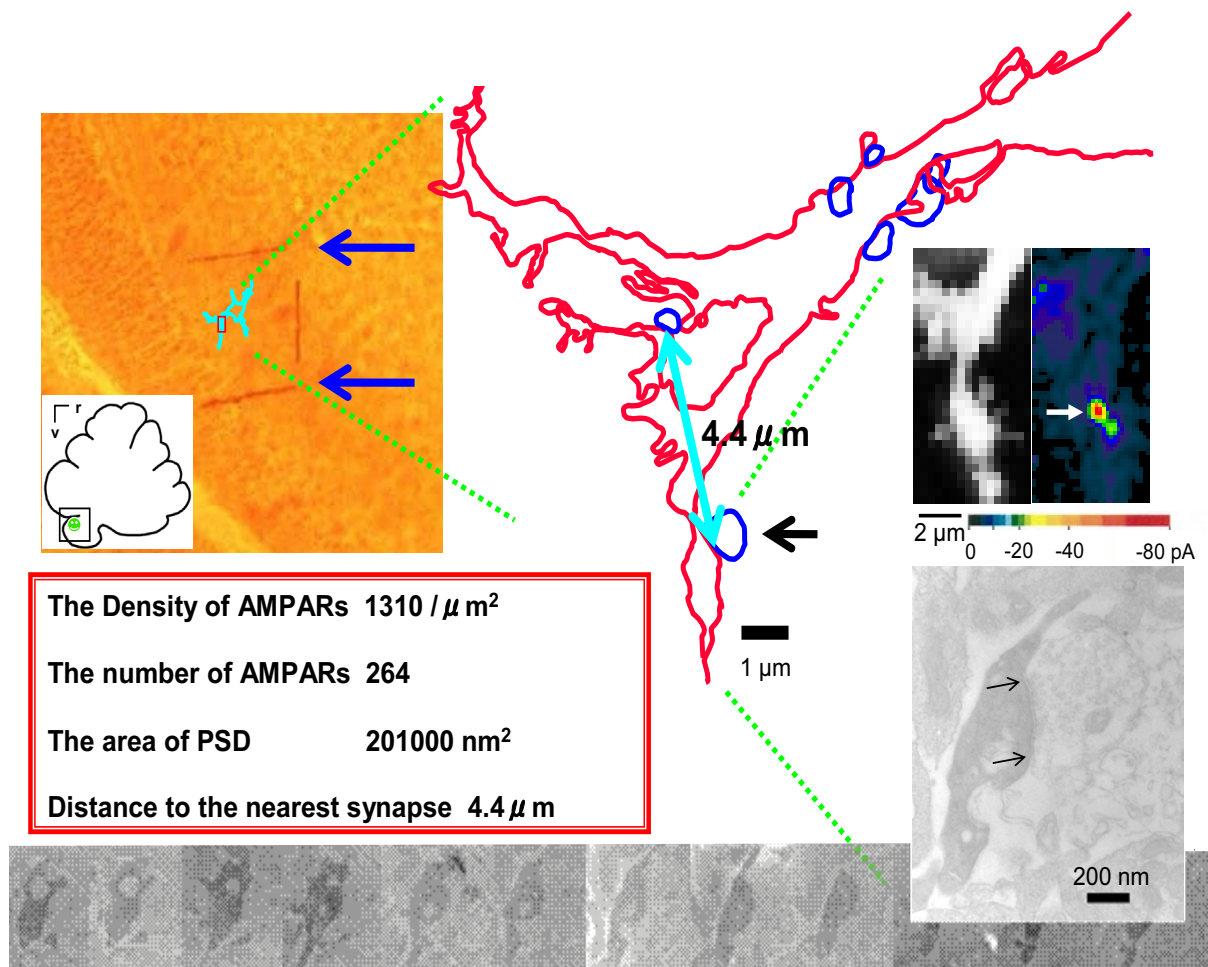


図7 2光子レーザーによる単一シナプス刺激

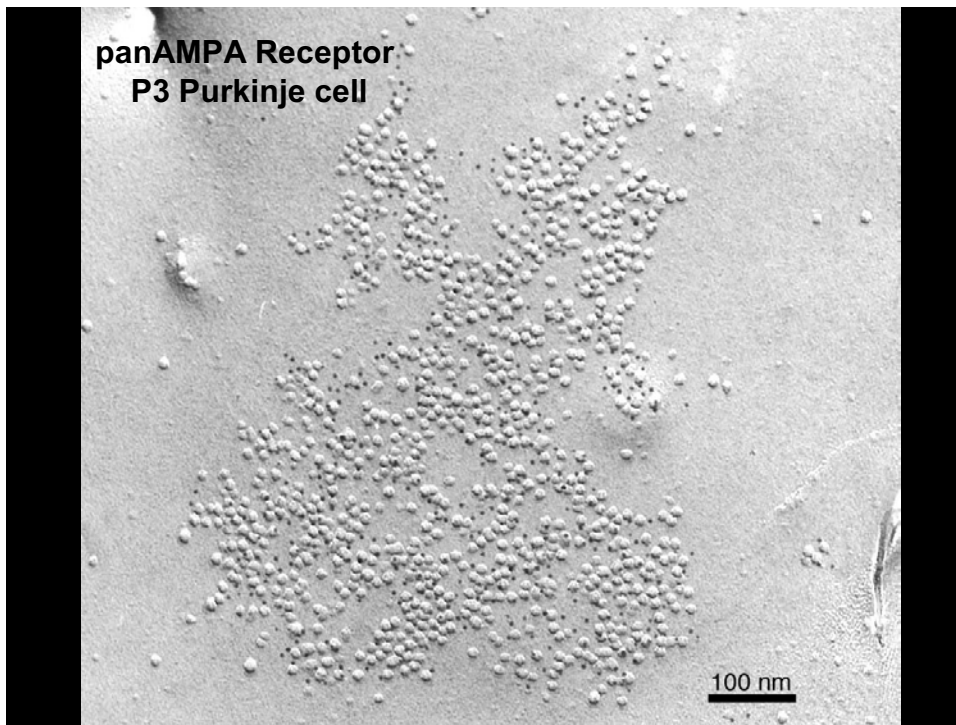


図8

均一な受容体分布を示した。この AMPA チャネル密度の変化は、生後発達過程で増大してくる平行線維シナプスの AMPA チャネル密度の不均一性によるものである事が明らかとなった。

脳の興奮性シナプスにおいて速い神経伝達を担う AMPA 受容体の数はシナプス反応性を決める最も重要な要素である。今回の結果は、SDS-FRL法が個々の興奮性シナプスにおける反応性を推定するために非常に有用であり、*in vivo*で記憶や学習に伴うシナプス可塑性によっておこるシナプス反応の変化に AMPA 受容体の動態がどのように関わっているのかを直接調べる手段を手にした事になる。従ってこの方法のポテンシャルは今後ますます大きくなる事が予想される。

6) NMDA受容体e2の左右非対称性配置

イオンチャネル型のグルタミン酸受容体でも特に記憶形成に重要であると考えられている NMDA 受容体の局在については、九州大学の伊藤功助教授との共同研究で驚くべき発見がもたらされた。伊藤助教授は NMDA 受容体 NR2B サブユニット

の特異的な阻害薬の感受性が右の海馬スライスと左の海馬スライスで異なることに気づき、我々の研究室でも NR2B のシナプスにおけるタンパク量や postembedding 法による標識密度を CA1 で調べたところ、錐体細胞頂上樹状突起の分布する stratum radiatum では同側から入力するシナプスについて左のほうが右よりも NR2B 含量が多く、逆に基底樹状突起の分布する stratum oriens では右のほうが左よりも多いことが明らかとなった。しかも電気生理学的解析から反対側入力についてはこれと全く反対の関係になっていることが示唆された(図9)。非対称性分布は錐体細胞のシナプスに特異的で同種の入力線維でも介在細胞に対するシナプスでは左右に有意差はない。この結果は分子レベルで脳の左右差がはっきり示された最初の例である。

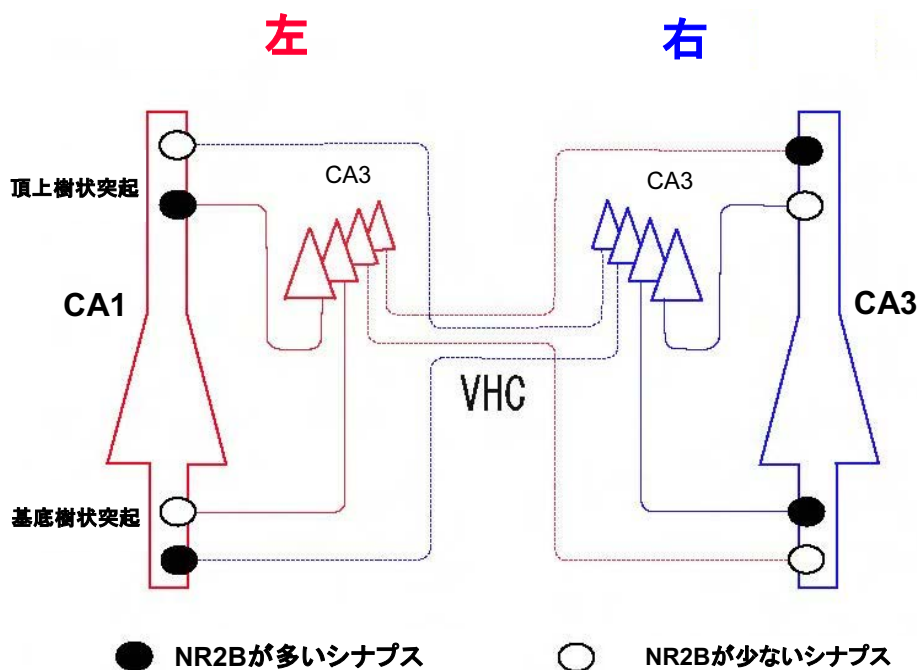


図9

7) P/Q-type カルシウムチャネルの小脳における局在

Preembedding法による免疫電子顕微鏡法でP/Q-type calcium channelの $\alpha 1A$ サブユニットがグルタミン酸作動性シナプス周囲へ集積している事を明らかにした(図10)。このチャンネルは神経終末からの伝達物質放出を抑制する事がよく知られていたが、

放出部位での電子顕微鏡的局在は示されていなかった。我々は、放出部位における $\alpha 1A$ の金標識がそれ以外の軸索終末の細胞膜に比べ圧倒的に高い密度で存在していることを定量的に示した。また予想外の事に、平行線維とシナプスを形成するプルキンエ細胞のグルタミン酸作動性後シナプス部位の周辺にも集積している事が明らかとなった。後シナプス周辺には代謝調節型グルタミン酸受容体 $mGluR1$ や $GABA_B$ 受容体が存在する事も報告しており、 $mGluR1$ と $GABA_B$ 受容体、 $mGluR1$ と $\alpha 1A$ については機能的な共役が存在する事も知られている。従ってこれらの機能分子がグルタミン酸シナプスの周辺で共存して働いている事が示唆された。(図10)

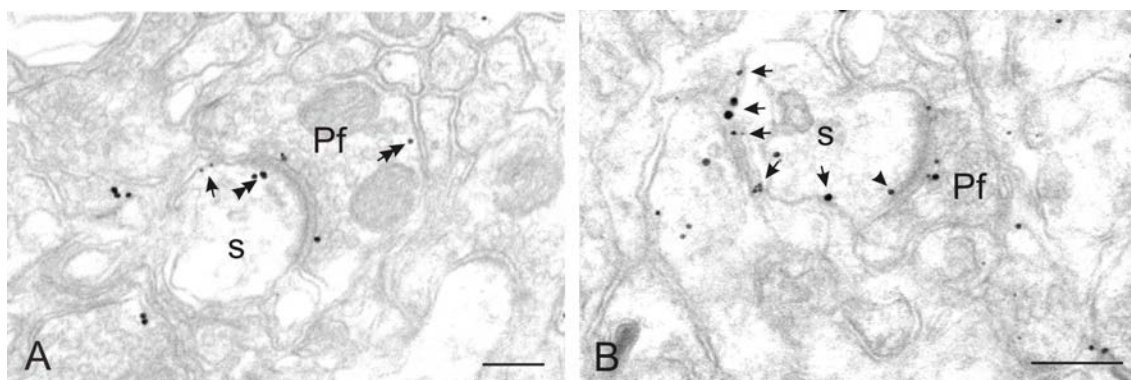


図10

8) Presynapse の機能分子の SDS-FRL 法による定量的解析

SDS-FRL 法の欠点として構造の同定が困難であることが挙げられる。これは、一つには膜面を2次元的に観察できる代わりに断面が見ることができないためであり、二つ目には藤本が開発した原法ではレプリカが断片状になるため、組織学的なオリエンテーションが失われるためであった。そこでレプリカ下の組織を保ったままグリッド上や樹脂内に固定し、ラベリングや ultrathin section による断面の観察を行う方法を開発した。これにより、標識された構造物についてさらに多くの形態学的情報が得られるようになるとともに、より複雑で小さい組織に適応できるようになった。これらの方法をもちいて CAZ 蛋白質といわれる足場蛋白質がレプリカ上

で伝達物質放出部位に存在する事を証明した(図11)。さらにこの標識を手がかりとして、tSNARE 蛋白である SNAP25 や syntaxin が、伝達物質放出部位を含むシナプス前要素に広範に分布している事を明らかにした。定量的な計測の結果、伝達物質放出部位に特に濃縮しているとは認められなかった。また小胞性グルタミン酸トランスポーターや小胞性 GABA トランスポーターがシナプス前終末の細胞膜に存在する事を示し、これらの機能分子がレプリカ上で興奮性終末と抑制性終末を同定する事に役立つ事が明らかとなった。

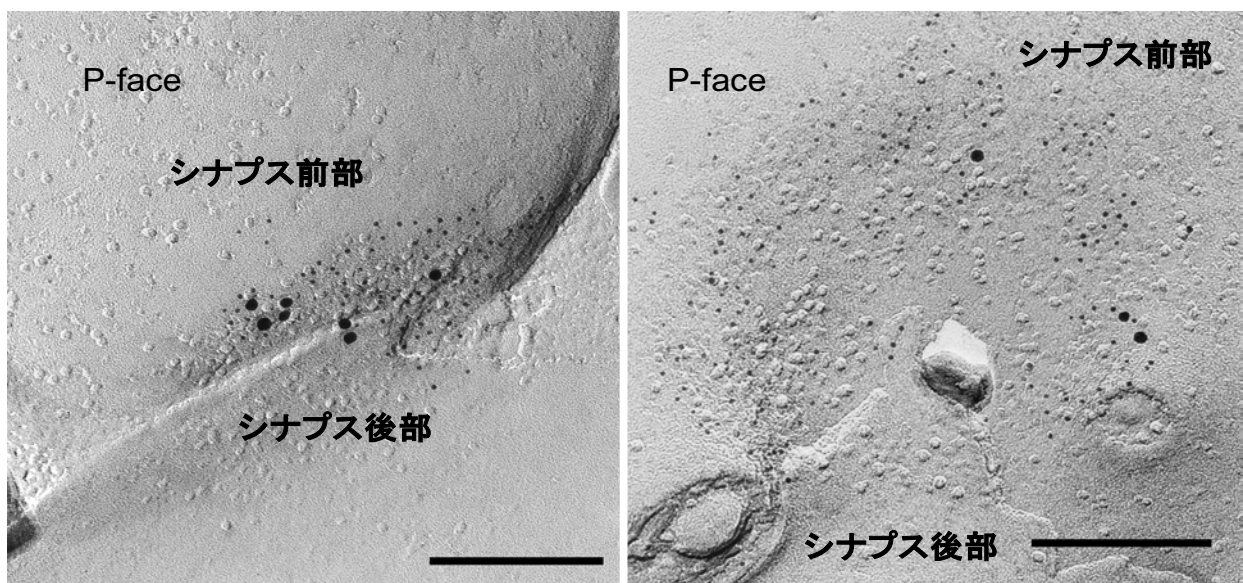


図11 CAST(5nm金標識)と Bassoon (15nm金標識) の伝達物質放出部位における共存

(2) 研究成果の今後期待される効果

SDS-FRL法については世界でも類似研究は極めて少ない。特に神経細胞を対象としたものとしては、John Rash の connexin の研究が挙げられるのみにである。本研究の SDS-FRL 法で得られた所見は、ほとんどの部分がまだ未発表の段階であるが、今後積極的に発表を行い神経科学分野におけるこの方法の重要性を世界に認知させることが肝要である。またこの方法は特殊な設備を必要とする事から、大学共同利用機関としての生理学研究所の特徴を生かして、国内の研究者との共同研究を今後積極的に推進していきたいと考えている。それによって国内で独創的な研究がさらに発展する

事が期待できる。また今後は GFP 発現動物やノックアウト、ノックインなどの遺伝子改変動物を使うことによって、SDS-FRL 法やリアルタイム解析による *in vivo* での機能分子の動態解析、分子数の計測、生理的機能の解析がさらに進展する事が予想される。特に生理的な記憶形成や学習による機能分子の動態を理解する事は、現在までに蓄積されてきた *in vitro* での研究成果の妥当性を明らかにすると共に、長期的な記憶定着のメカニズムを明らかにする事に繋がる。このような研究はシステムレベルでの機能分子の統合的理解を進めるモデルとなる事が期待される。またグルタミン酸受容体や GABA 受容体、カルシウムチャネルなどの機能分子は各種神経疾患において非常に重要な役割を持っていることが多く知られている。これらの機能分子の病態モデル動物での動態と機能の解析は、ヒトの神経疾患の理解や治療法の開発に必須の情報をもたらすものと考えている。

3.2 GFP融合分子を利用した機能分子の動態およびシナプス局在の分子機構

(岡部グループ)

(1) 研究内容及び成果

海馬神経細胞を対象として、シナプス構成蛋白質の動態およびシナプスへの局在の分子機構を解析する事を目的として研究を展開した。蛋白質の動態を直接可視化する手法としては GFP 融合蛋白質を利用し、生細胞のタイムラプス観察を定量的に行った。この手法により PSD-95-GFP で標識されるシナプス後肥厚部は 24 時間でその 20% が置き換わる極めて動的な構造である事が明らかになった。シナプス前部および後部に存在する複数の蛋白質の動態を同時に観察するために、GFP の波長変異体を利用した可視化手法を開発した。更に刺激依存的なシナプス後部蛋白質の動態を解析するため、海馬神経細胞の様々な刺激条件下におけるシナプス後部蛋白質の局在変化を検討し、異なったカルシウム流入経路がシナプス後部蛋白質の一種である Homer 分子の動態を二方向性に制御する事を見出した。更に GFP 融合シナプス蛋白質の観察を安定した発現レベルで行うためにトランスジェニックマウスシステムを作成し、これらの

マウス由来の海馬神経細胞を利用して長期間に亘るシナプス構造のリモデリングの過程を直接可視化した。非刺激条件ではむしろ樹状突起に多く存在する分子であるRNA結合蛋白質 TLS に関して、蛋白質合成誘導刺激である代謝型グルタミン酸受容体の活性化によって TLS がシナプス後部に集積する事、またこの分子が樹状突起スパイン構造の発達に必須である事を示した。以上の研究成果は、これまできわめて静的に捉えられていたシナプス後部の分子構築が、数分の時間単位で刻々とその分子構築を変化させる動的な構造で有る事、さらにシナプス後部において様々な情報伝達経路により特異的な分子の集積・分散が引き起こされる事を示している。

(1-1) PSD-95-GFPを利用したシナプス後部構造の持続的なターンオーバーの解析 (文献1)

主要なシナプス後肥厚部蛋白質である PSD-95 に GFP 分子を融合したプローブを複製し、組換えアデノウィルスを利用して培養海馬神経細胞に発現させた。PSD-95-GFP 分子は選択的に興奮性シナプスのシナプス後部に局在し、樹状突起スパインに一致して集積した (図1)。タイムラプス画像を取得して24時間での PSD-95-GFP クラスターの局在変化を検討した所、20%以上のクラスターが生成あるいは消失していた (図2)。クラスターの形成率は消失率よりも高く、両者のバランスによって神経回路

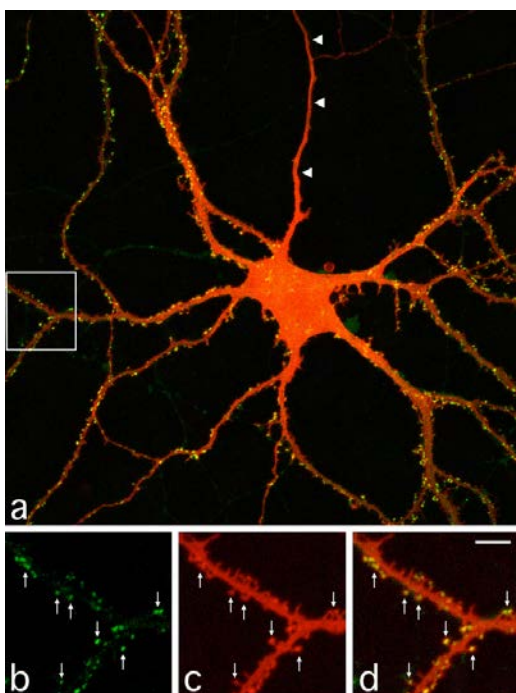


図1 PSD-95-GFPの樹状突起スパインへの局在

1個の PSD-95-GFP (緑) を発現する海馬興奮性神経細胞を膜親和性色素の Dil (赤) で染色した像。

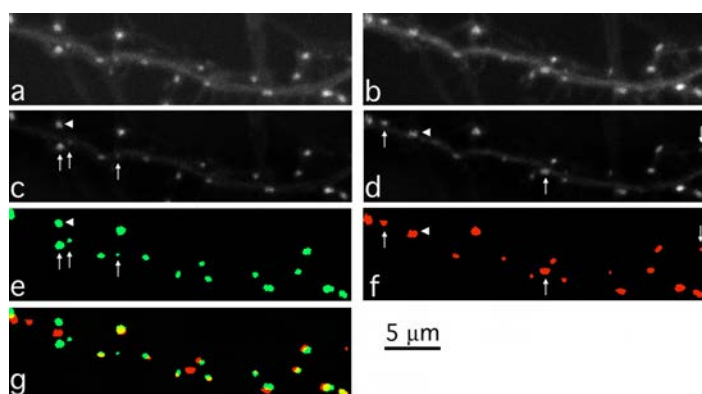
(a) 弱拡大像。複数の分岐する樹状突起には PSD-95-GFP のクラスターが存在するが、一本の分岐しない軸索 (矢頭) には PSD-95-GFP のクラスターは存在しない。

(b-d) (a) の白枠部分の拡大像。PSD-95-GFP の蛍光クラスター (b) は樹状突起スパイン構造 (c) に一致して存在する事が両者の重ねあわせ像 (d) でわかる。

スケールバー 10ミクロン (a)、4ミクロン (b-d)。

網の成熟過程におけるシナプス後部密度の増加が説明される事がわかった。PSD-95-GFPのクラスターの動態は興奮性シナプス伝達を薬理的に抑制する事で抑えられた。持続的なシナプス後肥厚部のターンオーバーとそのシナプス活動による制御は神経回路網の活動依存的なリモデリングにおいて重要な現象であると考えられる。

図2 PSD-95-GFPの蛍光クラスターの24時間における生成・消失



(a,b) 同一の樹状突起部位を24時間間隔で観察した画像。

(c,d) 蛍光バックグラウンドを除去した画像。

(e,f) 画像を二値化し、蛍光クラスターを抽出した画像

(g) 二値化した画像を重ね合わせ、24時間で形成されたクラスターを赤、消失したクラスターを緑、持続的に存在したクラスターを黄で表した画像。

クラスターの形成・消失は高頻度で観察された。

(1-2) 複数のGFPバリエーションを利用した、シナプス前部・後部構造の同期した形成過程のタイムラプス観察 (文献2)

培養海馬神経細胞では興奮性シナプスの分布が樹状突起のシャフトからスパインへと培養日数に従い変化するため、この間に新規のスパインシナプスの形成が活発に見られ事が期待される。二波長タイムラプス観察により、三つのシナプス構造—即ち樹状突起スパイン、シナプス後肥厚部、シナプス小胞—の形成過程を解析する事に成功した。主要なシナプス後肥厚部蛋白質である PSD-95 の局所的な集積は、スパイン形成と同期して観察された (図3)。シナプス後部の PSD-95 の集積と、シナプス小胞に豊富に存在する蛋白質である synaptophysin の集積も同期して観察された (図4)。これに対して、既存の樹状突起のシャフトに存在する PSD-95 のクラスターは、スパイン形成を促進する事なく消失するが多かった。軸索と樹状突起の接着部位で見られ

る、局所的かつ段階的なシナプス構成要素の集積は、興奮性シナプスの発生過程でのリモデリングの現象を良く説明する。

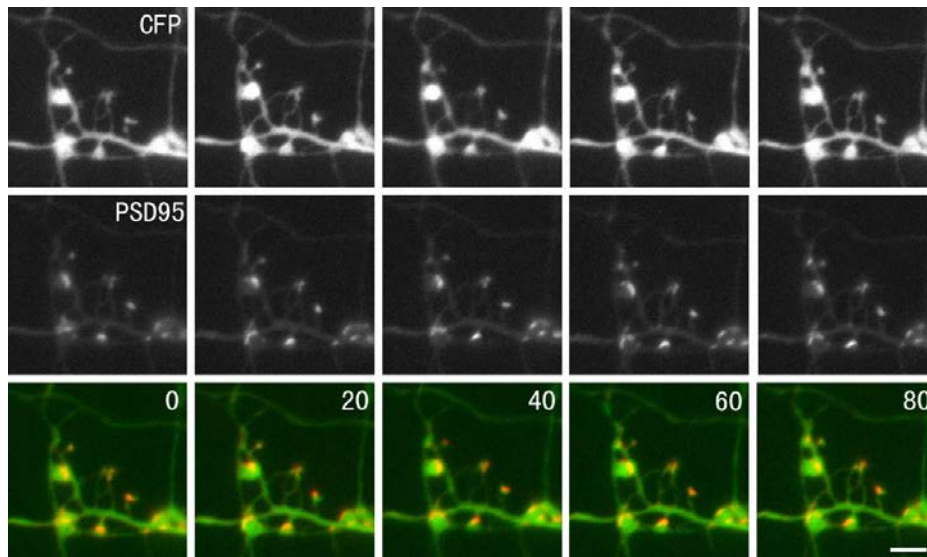


図3 二種類のGFP波長変異体を利用した樹状突起スパイン形成とPSD-95の集積の同期性の解析

一個の神経細胞にCFP分子とPSD-95-YFP分子を同時発現させ、CFPの蛍光で樹状突起の形態形成を、YFPの蛍光でシナプス後肥厚部の発達を観察した。数字は観察の時間を分で表す。観察後40分でPSD-95の新たなクラスターが形成され、ほぼ同期して新規スパインの伸長が見られた(矢印)。

スケールバー 3ミクロン。

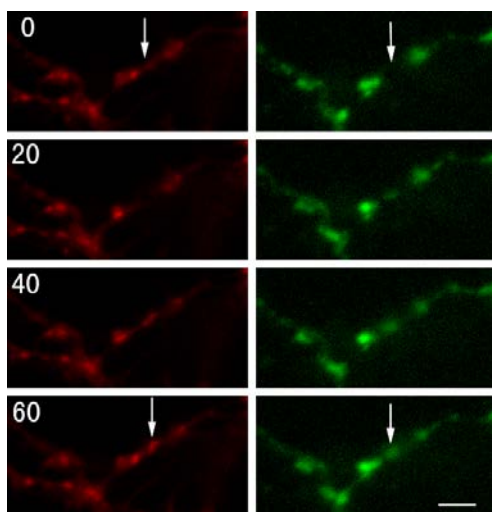


図4 二種類のGFP波長変異体を利用した観察で見られたPSD-95の集積とシナプス小胞の集積の同期性。

PSD-95-YFP分子(赤)を発現する細胞の樹状突起において、synaptophysin-CFP(緑)を発現する神経細胞由来の軸索と近接するものを選択し、両者の構造の間で新規に形成されるシナプスを同定した。数字は観察後の時間を分で表す。20分から40分の段階で、シナプス後部および前部の構造がほぼ同時に形成されたことがわかる。

スケールバー、3ミクロン。

(1-3) NMDA 受容体およびカルシウムチャネルの活性化による Homer 1c 分子(PSD-Zip45) の二方向性の局在制御機構 (文献3)

Homer 1c 分子と PSD-95 分子はそれぞれ全く異なった蛋白質相互作用のモチーフを持つシナプス後肥厚部に局在する蛋白質である。GFP 融合 Homer 1c 分子および PSD-95 分子を利用して、両者の動態およびその局在制御機構を解析した。タイムラプス観察により、PSD-95 はより安定にシナプスに局在するのに対し、Homer 1c 分子はそのシナプスへの集積量が時間的に大きく変動することが明らかになった。更に電位依存性カルシウムチャネルの活性化により Homer 1c 分子はクラスター化し、NMDA 受容体依存的なカルシウム流入は Homer 1c 分子の既存のクラスターを分散させた (図5)。これに対して PSD-95 分子はどちらのカルシウム流入経路に対してもその局在を変化させなかった。以上の実験は神経細胞の活動が特異的なシナプス後肥厚部蛋白質の分布を変化させる事を示している。Homer 1c 分子は代謝型グルタミン酸受容体の活性

図5 高濃度カリウムイオン刺激 (90K) による電位依存性カルシウムチャネルの活性化とグルタミン酸刺激 (10Glu) による NMDA 受容体活性化の Homer 1c 分子の局在に与える影響。

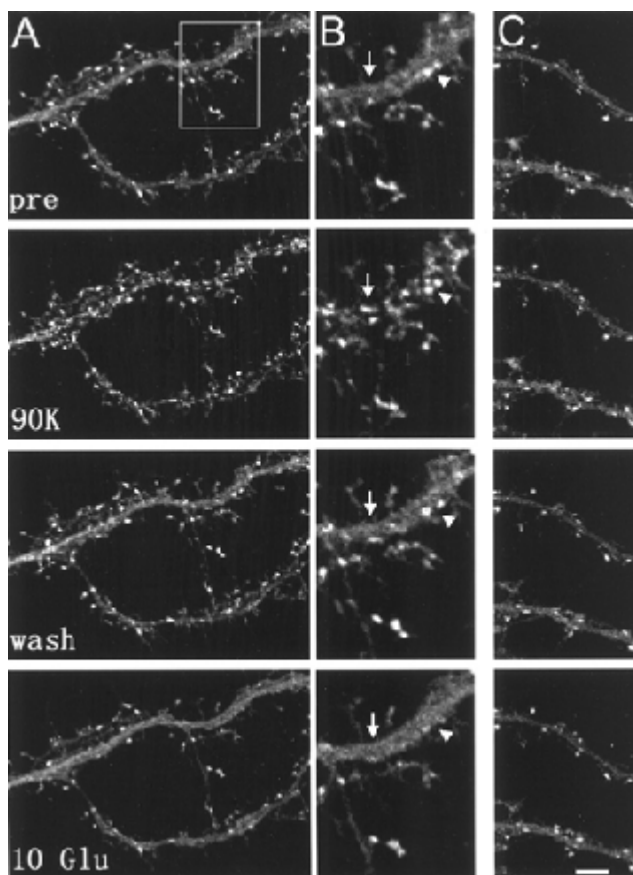
A は GFP-Homer 1c の分布の弱拡大像。

B は A の白枠内の強拡大像。

C は PSD-95-GFP を発現する樹状突起における刺激に対する反応。

Homer 1c 分子はカリウム刺激で新規クラスターを形成し (B 矢印)、グルタミン酸刺激でクラスターを分散させる (B 矢頭) が、PSD-95 分子はその局在を全く変化させない。

スケールバー5ミクロン(A,C)、2.5ミクロン(B)。

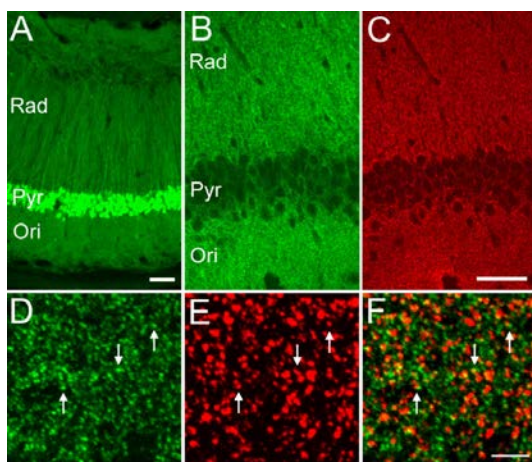


を制御する働きを持つ事が報告されており、このようなシナプス後部の足場蛋白質の局在変化は間接的にシナプス機能を制御している可能性が高い。

(1-4) トランスジェニックマウス由来海馬神経細胞を利用した単一樹状突起領域の長期観察—シナプス後部構造の同期したリモデリングの発見 (文献4)

シナプス構造の長期観察を可能にするために、GFP融合シナプス後肥厚部分分子(PSD-95-GFPおよびGFP-Homer 1c)を発現するトランスジェニックマウス系統を樹立し、これらのマウスから海馬神経細胞の分散培養を行った。GFP融合シナプス後肥厚部分分子の発現は安定しており、シナプス後肥厚部のリモデリングの過程を1週間以上追跡する事が可能であった。同じ細胞群を培養11日から17日まで追跡して観察したところ、Homer 1cのクラスターの密度は樹状突起1ミクロンあたり0.32個から0.73個に上昇した。新規に形成された樹状突起はHomer 1c分子のクラスターをその直後から形成し、発芽した基部の樹状突起のクラスター密度に数日で追いついた。Homer 1cのクラスター密度は単調に増加する場合もあるが、一方で複雑な増加パターンを示すものも多かった。PSD-95分子についても同様の結果(単調な増加パターンと一時

図6 GFP-Homer 1c発現トランスジェニックマウスの海馬切片の蛍光像。



(A) Actin promoter-GFP マウスの海馬 CA1 領域の GFP 蛍光像。錐体細胞の細胞体に強い GFP の蛍光が認められる。Rad; Stratum radiatum, Pyr; Pyramidal cell layer, Ori; Stratum oriens.

(B,C) GFP-Homer 1c 発現トランスジェニックマウスの海馬切片の弱拡散蛍光像。GFP 蛍光(緑)はシナプスが集積する領域に強く、シナプシンI抗体で染色される領域(赤)と良く一致する。

(D-F) Stratum radiatum の強拡散像。GFP-Homer 1c のクラスター(緑)の位置はシナプシンI陽性のクラスター(赤)と隣接して存在し(矢印)、シナプス後部と前部の構造をそれぞれ反映していると考えられる。

スケールバー、50ミクロン(A-C)、5ミクロン(D-F)。

的なクラスター密度の低下を含む複雑なパターンの混在) が得られた。神経細胞間でのクラスター密度の増加パターンの比較から、シナプス後肥厚部分のクラスター密度の変化は、1個の細胞内の複数の樹状突起領域では同期して起こり、一方で細胞間での同期性は見られない事が明らかになった。このような細胞内でのクラスター形成の同期現象はcAMPを介した情報伝達系を活性化する事で失われた。以上の結果は1個の神経細胞において、全ての樹状突起領域に存在するシナプス後部構造を同時に制御するシステムが存在し、その制御にはcAMPを介した情報伝達が関与している事を示している。(図6)(図7)

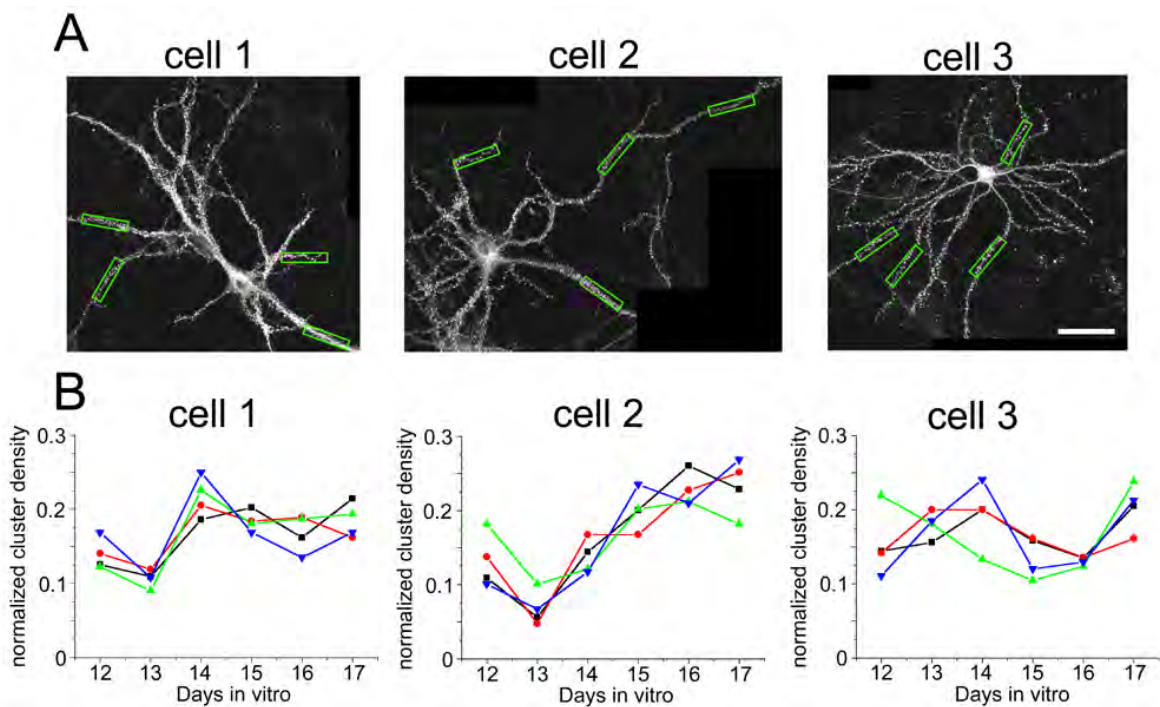


図7 単一ニューロンにおけるGFP-Homer 1cクラスターの形成・消失パターンの同期性。

(A) 同一培養皿内に存在する近接する3個の興奮性海馬神経細胞の樹状突起の形態をGFP-Homer 1cの蛍光により観察したもの。緑の長方形枠がGFP-Homer 1cの蛍光クラスターの密度を測定した領域に相当する。

スケールバー、50ミクロン

(B) 上の画像を基に6日間のGFP-Homer 1cクラスターの密度変化を3個の細胞内の4箇所樹状突起領域についてプロットしたもの。細胞内での相関が細胞同士の相関よりも高い傾向に有ることがわかる。

(1-5) RNA結合蛋白質TLSの代謝型グルタミン酸受容体の活性化に伴う樹状突起スパインへの移行とスパイン形成における役割 (文献5)

TLS (Translocated in LipoSarcomas) はヒトの脂肪肉腫に関連する染色体転座部位に存在する遺伝子の翻訳産物として当初同定されたが、N末端側にDNA結合ドメインと転写活性ドメイン、C末端側に複数のRNA結合ドメインを持つ脳に豊富に存在するRNA結合蛋白質である。TLSの機能を調べるために、GFP融合蛋白質を作製しその神経細胞内局在と動態を解析した。TLSはRNAとの複合体として樹状突起に輸送されるが、その局在には微小管とアクチン線維の両方が必要である。TLSは幼弱な海馬神経細胞では樹状突起のシャフトに存在し、タイムラプス観察により樹状突起内を活発に輸送されている事が明らかになった。このような輸送過程にあるTLSの密度は神経細胞の成熟に伴い減少し、逆にTLS分子がスパインへ集積する像が高い頻度で観察された。発達依存的なTLSの局在変化の基礎にシナプスの発達に伴う神経細胞のグルタミン酸受容体依存的な活性化が存在する可能性を検討した。TLSはAMPA受容体およびNMDA受容体の活性化には反応しないが、代謝型グルタミン酸受容体の活性化により特異的にスパインへ移行した。一方TSLノックアウトマウスでは神経細胞の生存には大きな影響がなかったが、スパインの形態異常およびスパイン密度

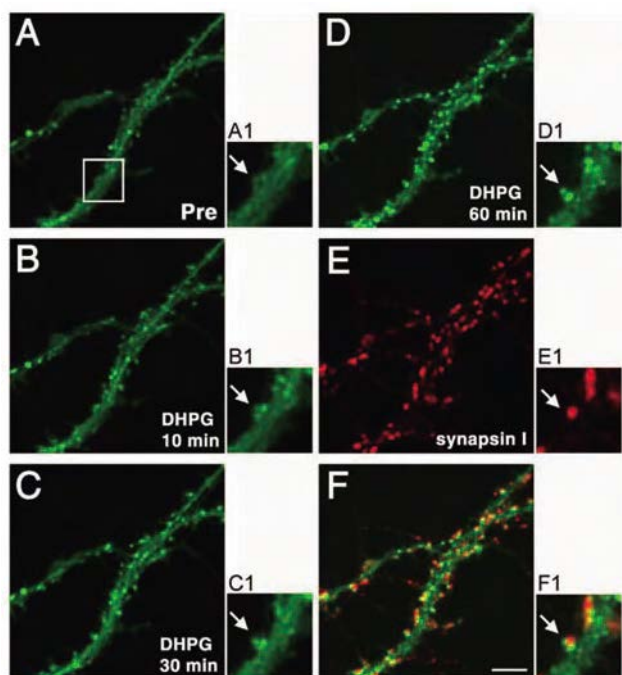


図8 代謝型グルタミン酸受容体刺激によるTLS-GFPの樹状突起スパインへの移行。

- (A) 代謝型グルタミン酸受容体特異的アゴニストDHPGによる刺激前はGFP-TLSは樹状突起細胞質に比較的一様に分布する。
 (B-D) 刺激後60分でTLSはスパインに集積する。
 (E) 同一樹状突起領域のシナプシンI免疫染色像を示す。
 (F) GFPとシナプシンI抗体染色の重ね合わせ像。TLSの集積部位がシナプシンI陽性のシナプス前部の位置に一致する事がわかる。スケールバー、5ミクロン

の低下が観察された。以上の結果はRNA結合蛋白質TLSがグルタミン酸受容体の活性化によりシナプス後部に集積しスパイン形成に重要な役割を果たす事を示している。(図8) (図9)

研究内容・成果のまとめ

本研究により、これまで静的な構造であると考えられてきたシナプス後肥厚部に存在する足場蛋白質群が動的にその局在を変化させ、かつその変化が分子種特異的に多様な情報伝達系によって制御されている事が明らかになった。これらシナプス後肥厚部の足場蛋白質は近年の研究により直接・間接にシナプス機能自体に影響を与える事が明らかになっており、シナプス活動により活性化される情報伝達系は足場蛋白の局在制御を介して自らの、あるいは近傍のシナプスの性質をフィードバック制御していると考えられる。

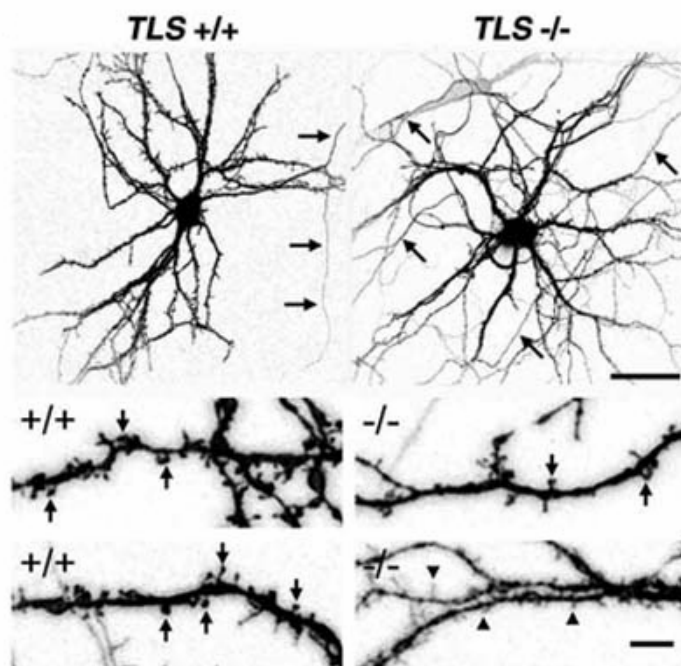


図9 TLSノックアウトマウス由来の培養海馬神経細胞の樹状突起の形態。

膜親和性色素であるDilを用いて細胞の形態を蛍光シグナルとして記録した。弱拡大でノックアウトマウス由来の細胞は軸索様の細く分岐しない突起(矢印)を多く持つ事がわかる。

強拡大の像ではノックアウトマウス由来の細胞でもスパインは存在するが(矢印)、かつその密度が低い。フィロポディアはノックアウト由来の細胞でより頻繁に観察された(矢頭)。

スケールバー、50ミクロン(弱拡)、5ミクロン(強拡)

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究の成果は神経科学領域にとどまらず、細胞生物学、発生学、生化学などの分野に対して影響を与える事が期待される。細胞生物学的にはシナプス後肥厚部の分子集合体は様々なシグナル伝達機能を持つ構造体と考えられ、このような構造の動的変化についてのモデルが得られれば、細胞一般における様々なシグナル伝達複合体の設計原理の理解に対しても適用が可能である。発生学の観点からは、シナプス形成は二種類の細胞による相互認識機構を理解する上での良いモデルであり、シナプス前部構造と後部構造の間での情報のやりとりにより、両者での分子集積が急速に開始されるという本研究で得られた結果は、他の細胞間接着構造の理解においても有用な知見である。生化学的にはシナプス後肥厚部は膜直下に存在する複雑な分子集合体の典型的なモデルと考えられ、個々の分子間結合ドメインと全体の分子構築の関連を解明する上での重要な解析対象である。本研究で用いられた、動態を視野に入れた分子間相互作用の解析は、従来の生化学的手法では決して得る事の出来なかった分子集合体の動的側面を明らかにした点で極めて重要であると考えられる。本研究で開発された細胞内での動態測定手法と試験管内での再構成実験とが更に相補的に実験データを提供することで、シナプス後部という複雑な分子機械の形成機構および動作原理の解明も近い将来には可能になる事が期待される。

文献1 **Okabe, S., Kim, H., Miwa, A., Kuriu, T., and H. Okado.**

Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity.
Nature Neuroscience, 2, 804-811, 1999.

文献2 **Okabe, S., Miwa, A., and H. Okado.**

Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules.
Journal of Neuroscience, 21, 6105-6114, 2001.

文献3 **Okabe, S., Urushido, T., Konno, D., Okado, H., and K. Sobue.**

Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its

differential regulation by NMDA receptors and calcium channels.

Journal of Neuroscience, 21,9561-9571,2001.

文献4 Ebihara, T., Kawabata, I., Usui, S., Sobue, K., and **S. Okabe**.

Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with GFP.

Journal of Neuroscience, 23, 2170-2181, 2003.

文献5 Fujii, R.*, **Okabe, S.***, Urushido, T., Inoue, K., Tachibana, T., Nishikawa, T., Hick, G. G., and T. Takumi * equal contribution

The RNA-binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology.

Current Biology in press.

3.3 “膜機能分子の動的構造機能連関と膜上直接相互作用による機能修飾”

(久保グループ)

(1) 研究内容及び成果

久保グループでは、イオンチャネル・受容体等の膜機能分子の構造機能連関と、G蛋白質等の他分子との機能協関、およびその動的構造変化を知ることを目的として研究を行った。内向き整流性K⁺チャネルKir2.1、イオンチャネル型ATP受容体P2X、ムスカリニックチャネルKCNQ、代謝型グルタミン酸受容体mGluR1、高分子量G蛋白質OPA1、G蛋白質応答調節因子RGS蛋白等を主たる研究対象とし、クローン化させた遺伝子と種々の変異体を発現させ、電気生理学的手法によりその機能調節機構と構造機能連関機能を、免疫組織化学的手法によりその局在の動態を、光学的手法FRETにより動的構造変化を解析した。具体的な研究項目を列挙すると、

(a) 代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構の解明

(b) 代謝型グルタミン酸受容体の動的構造変化のFRET法による検出

- (c) 新規高分子量GTP結合蛋白質 mOPA1 の機能解析
- (d) 自身の発現密度に依存する ATP 受容体チャネル P2X₂ の性質の変化
- (e) ムスカリニックチャネル KCNQ の活性調節の分子機構
- (f) 内向き整流性K⁺ チャネルの構造機能連関と RGS 蛋白による機能修飾

である。ここでは、特にめざましい進展が見られた (a,b,c,d) について、その成果を以下に記す。

(a) 代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構の解明

我々は、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) が示す細胞外Ca²⁺やGd³⁺などの多価陽イオン感知能を解析する過程において、発現系により mGluR1 のGd³⁺応答能に差が見られることを見いだした。その分子基盤の一つとして、mGluR1 をクラスター化／離散化させる分子である Homer の有無を想定し、Homer の共発現が mGluR1 の受容体機能に及ぼす作用について、HEK293細胞一過性発現系を用いて細胞内Ca²⁺濃度の測定により解析した。その結果、Homer1cの共発現により (1) グルタミン酸に対する応答のピーク値立ち上がり速度が増大すること、(2) グルタミン酸に対する用量応答関係が右側に（感受性が下がる向きに）シフトすること、(3) クラスター化能力の無い Homer1a の共発現によっては、グルタミン酸応答のピーク値、応答の立ち上がり速度ともむしろ減少することを観察し、さらに (4) Homer 結合能を欠く mGluR1a の変異体 P1147E では上記に示した Homer1c 共発現の影響が観察されないという結果から、mGluR1a と Homer1c との結合がグルタミン酸応答に影響を与えていることを実証した。また、(5) 免疫組織学的解析により、Homer1a の共発現は mGluR1a の細胞膜上での発現を増大させ、Homer1c は著明に減少させることを観察した。次に mGluR1a の多価陽イオン応答に対する Homer 分子共発現の影響の解析を行い、(7) Homer1c 分子は、グルタミン酸応答に対する影響と同様の効果を、細胞外Ca²⁺に対する応答に関しても示すことを見いだした。さらに、驚いたことに (8) mGluR1a の Gd³⁺に対する応答が、sub mM order では用量依存的に増大し、mM order では応答が逆に抑制されるという、ベル状の用量応答関係を示すこと、そして (9) Homer 1c の共発現は mGluR1a の Gd³⁺応

答を示す範囲を高低濃度両方向に拡大させることが明らかになった。Homerが mGluR1a のグルタミン酸に対する用量応答関係に与えた作用の一部は 上述の Homer による細胞表面における mGluR1a 発現量の制御と、(Worley らによって提唱された) Ca^{2+} ストアとの直接リンクにより説明できると思われる。しかし、このメカニズムでは Gd^{3+} に対する用量応答関係の変化は説明できず、Homer 分子との結合が mGluR1a のリガンド受容という機能に何らかの質的变化を起こしていることが示唆された。

(b) 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の動的構造変化のFRET法による検出

代謝型グルタミン酸受容体1型 (mGluR1) は、脳の様々な領域に発現している受容体である。この遺伝子を改変したマウスは、海馬や小脳のシナプス伝達の可塑的变化の異常と、記憶や学習といった行動学的異常を示す。このことから、mGluR1 は、いわば、記憶の鍵を握る重要な分子として注目されてきた。

近年、mGluR1 の細胞外領域の結晶を用いたX線構造解析により、2つのサブユニットが会合しホモ二量体として構成されていること、それぞれのサブユニットはグローブ状の構造をしており、グルタミン酸結合によりグローブが閉じるように細胞外領域の構造が変化することが明らかにされた。ところで、代謝型受容体のシグナル伝達は、細胞内においてG蛋白質を活性化することにより引き起こされる。mGluR1 のシグナル伝達機構を理解するためには、細胞外領域の構造変化に伴って起こる細胞内領域の構造変化を知ることが必要であるが、この点は未解決であった。そこで、我々は、光ラベルを用いた分子の動的構造変化解析という最先端の手法を用いてこの問題にアプ

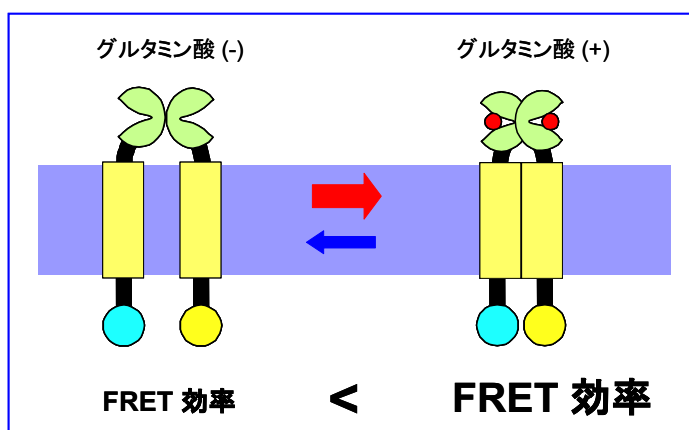


図1 FRET 効率の解析による構造変化の検出の概略

シアン色の蛍光物質CFPと黄色の蛍光物質YFP間の距離が変化した時にFRET 効率の変化が起こるので、CFPとYFPを mGluR1 分子にラベルして、FRET 効率の変化を測定することにより、mGluR1 の構造変化をリアルタイムで捕らえることができる。

ローチすることを目指して研究を開始した。

異色の蛍光物質間で、距離が近いほど、エネルギーの受け渡し (FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) 効率) が大きくなるのが物理化学的に知られている。我々は、mGluR1 のリガンド投与による構造変化を、FRET 効率の変化として捉えることを計画した (図1)。

まず、遺伝子工学的に、mGluR1 の細胞内領域の様々な箇所に、シアン色の蛍光蛋白、もしくは黄色の蛍光蛋白、もしくはその両方を付加し、この分子を HEK293 細胞に発現させた。一般的に、膜蛋白ではあっても、細胞に強制発現させた場合、膜上に存在するばかりでなく細胞内に貯留する。我々の目的は、リガンド投与に伴う FRET の変化を測定することなので、細胞内に貯留する分子の放つ蛍光は、変化分を薄めてしまうバックグラウンドとなる。そこで、通常の光学システムではなく、いわゆる全

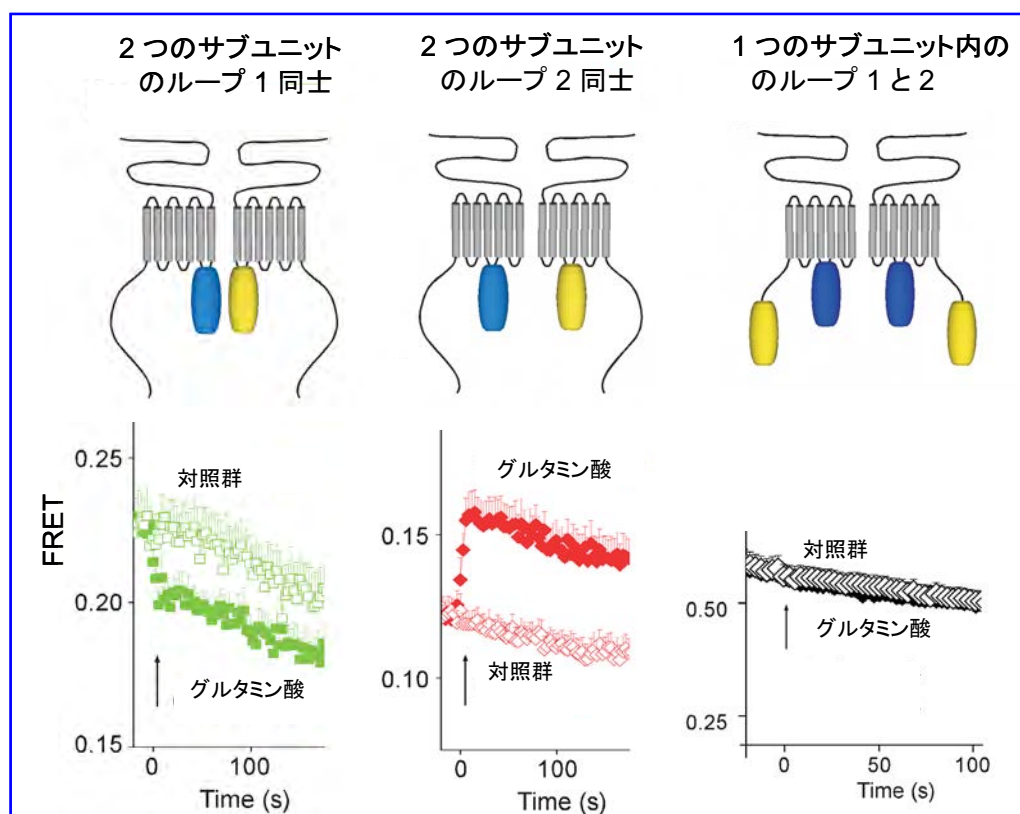


図2 グルタミン酸投与による蛍光ラベルしたmGluR1 のFRET 効率の変化

上段は、作成した分子のデザインを示している。左、中央は、それぞれ、ふたつのサブユニットの細胞内ループ1間、2間の距離の変化を検出するもの、右は、ひとつのサブユニット内のループ2とC末端間の距離を検出するためのものである。下段はそのデータで、矢印のタイミングでグルタミン酸を投与したものと、投与しなかった対照群のデータが示している。左では、FRET 効率が低下、中央では増加、右では変化しなかったことがわかる。

反射照明を用いて、細胞膜上に存在する分子の蛍光のみを測光することにした。リガンド投与に伴う FRET 効率の変化を解析したところ、以下の知見が得られた (図2)。

- (1) 2 量体サブユニットの、細胞内ループ 1 が相互に遠ざかる。
- (2) 2 量体サブユニットの、細胞内ループ 2 が相互に近づく。
- (3) ひとつのサブユニットの内部では明らかな構造変化は起こらない。

これらの知見から、リガンド投与により mGluR1 の細胞内領域においては、個々のサブユニットの構造が変化するというよりは、2つのサブユニット間の配置が変化することが示唆され (図3)、この動きがG蛋白質の活性化を引き起こすと考えられた。

ところで、我々は以前、下流の反応を指標として、グルタミン酸のみならず Ca^{2+} 、 Gd^{3+} などの細胞外多価陽イオンによっても mGluR1 が活性化されることを発表した。その後、 Gd^{3+} の結合部位が、結晶構造解析によって、グルタミン酸結合部位と異なる、2つのサブユニット間の負電荷を持つアミノ酸に富む領域に同定された。我々は、こ

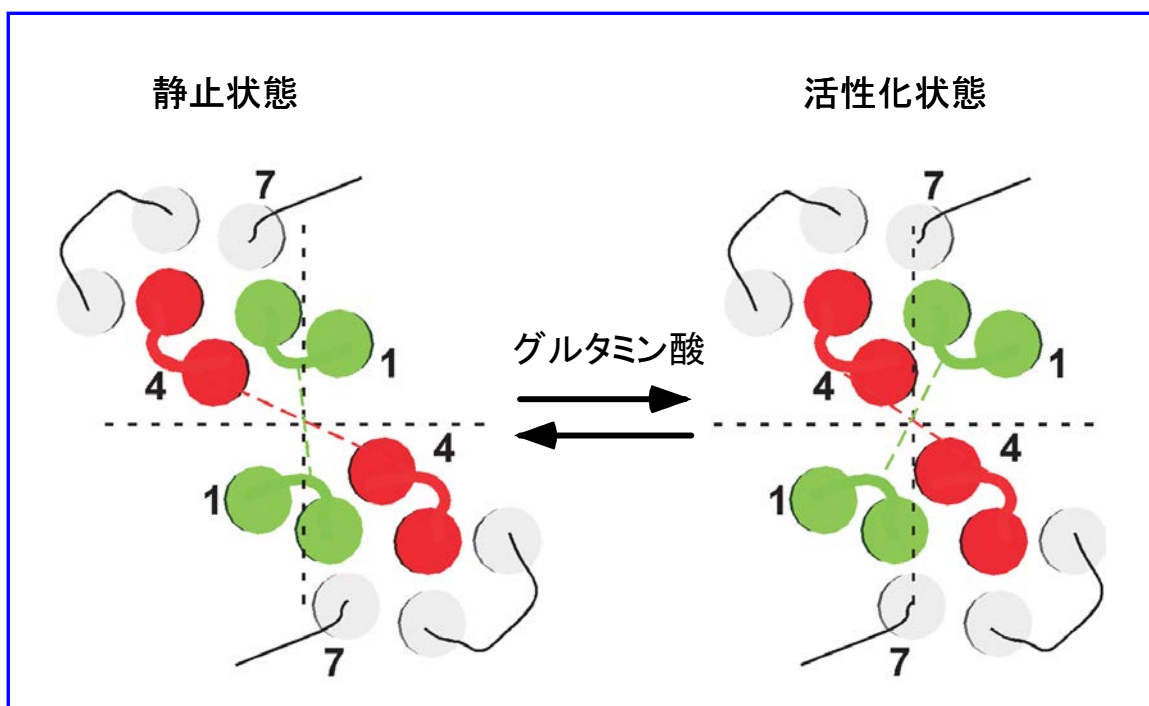


図3 グルタミン酸投与によるmGluR1 細胞内領域の構造変化

細胞内から、膜上に存在する mGluR1 を見上げた模式図。丸は7つの膜貫通部位を示す。緑が膜貫通部位1,2を結ぶ細胞内ループ1、赤が膜貫通部位3,4を結ぶ細胞内ループ2を示す。グルタミン酸投与により、それぞれのサブユニット内部の構造は変化せず、二つのサブユニットのループ1同士が遠ざかり、ループ2同士が近づくような構造変化が起こるような、サブユニットの配置の変化が起こることが示唆された。

の部位が機能的に重要であることを、点変異体の解析により明らかにした。今回、ループ2のコンストラクトにより、 Ca^{2+} や Gd^{3+} がmGluR1の構造変化を確かに引き起こすことが確認された。 Gd^{3+} は、脳内に存在しないが、これらの結果を考えあわせると、 Gd^{3+} の作用を模倣する生理的物質が脳に存在していることを示唆しているようにも思われる。

(c) 新規高分子量GTP結合蛋白質mOPA1の機能解析

GTP結合タンパク質 (Gタンパク質) の主要なファミリーとして、7回膜貫通型受容体と共役して機能する 3量体Gタンパク質、細胞運動・細胞形態決定に多彩な役割を果たす低分子量Gタンパク質、Dynamaminなどの高分子量Gタンパク質 (約100 kDa) の3つが挙げられる。高分子量Gタンパク質に属するファミリーのメンバーのいくつかは、細胞内においてエンドサイトーシスが起きる際に、脂質二重膜を直接断ち切る役割を担っていることが示されてきた。

本研究の準備段階において、「新規の高分子量GTP結合タンパク質 (novel large G (nLG))」をコードするcDNAをサケ科魚類脳、およびマウス脳よりクローン化し、この分子を強制発現させたCOS細胞においてはnLGがミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの形状をtube状からvesicle状へと劇的に変化させるという知見を得た。

その後、我々が同定したマウスクローンのヒトにおける ortholog が、常染色体性優性の遺伝病であり網膜神経節細胞の萎縮ならびに視神経細胞の脱落、失明の症状が発症する1型視神経萎縮症 (Optic atrophy type 1) の原因遺伝子 (OPA1) としてポジショナルクローニングにより同定された。この事実は、OPA1タンパク質がミトコンドリアの形態や局在・機能を何らかの形で制御・修飾することにより、細胞の生存や維持に密接に関することを示唆するものである。

本研究においては、我々が同定したマウスクローン (mouse OPA1 (mOPA1)) について、結合蛋白を同定し、mOPA1タンパク質の細胞内におけるミトコンドリアへの輸送、ならびにmOPA1が局在するミトコンドリアが分裂する機構について解析することにより、このタンパク質が細胞生理学的に果たしている機能を解明することを目的

として進めた。その結果、後述するように、mOPA1がミトコンドリアの膜間領域とマトリックス領域の乖離をひきおこすという興味深い、次の研究段階につながる重要な知見が得られた。

• mOPA1と相互作用する蛋白質の酵母 two-hybrid 法によるスクリーニング

マウス脳新規高分子量GTP結合タンパク質の機能解析を開始するにあたり、まず、相互作用する蛋白質を同定することを目的に酵母two-hybrid法によるスクリーニングを行った。なお、本研究にて解析を行うマウス高分子量GTP結合タンパク質のヒトにおける相同分子が、遺伝性視神経萎縮の原因遺伝子であることが他のグループにより報告されOPA1と命名されたことより、以下マウスタンパク質をmOPA1と表記する。960アミノ酸よりなるmOPA1のほぼ全長に相当する部分(90-960の領域)をbaitとして用いて、マウス脳cDNAライブラリーを酵母two-hybrid法によってスクリーニングを行った。その結果、3量体Gタンパク質シグナル伝達系の調節因子であるRGSファミリーのサブタイプの一つであるRGS14、GABA_A受容体alphaサブユニットのサブタイプの一つであるalpha4サブユニット、mOPA1自身のC末端断片、および数種の新規遺伝子をmOPA1と相互作用する分子として同定することができた。欠失変異体を用いたtwo-hybrid法による検討により、mOPA1とRGS14間の相互作用はmOPA1のC末端付近に位置する645-885の領域と、RGS14の266-434の領域により行われていることが判明した。RGS14における相互作用する領域は3量体Gタンパク質のGTPaseを活性化するRGSドメインとは異なった領域であった。またmOPA1とGABA_A受容体alpha4サブユニット間においてはmOPA1の210-355の領域と、GABA_A受容体alpha4サブユニットのC末端付近において相互作用していることが判明した。

• 野生型mOPA1の遺伝子導入によるCOS-7細胞のミトコンドリア形態変化

mOPA1の遺伝子導入がミトコンドリア形態に与える影響を詳細に観察するため、2種類のミトコンドリアマーカーを使用した。膜間部分(外膜と内膜の間)は、内在性に発現するチトクロームCタンパク質の抗体染色によって標識し、マトリックス(内膜の内側部分)は、マトリックスへ移行することが知られている緑色蛍光タンパク質(EYFP-mito)を遺伝子導入することによって標識した。

まず mOPA1 の遺伝子導入を行っていない COS-7 細胞のミトコンドリア形態を、ミトコンドリアマーカーを用いて観察した。COS-7 細胞のミトコンドリアは主として細長いチューブ状の形態を示し、全体としては複雑なネットワーク状の構造をとる様子が認められた。2 種類のミトコンドリアマーカーを用いて得られたミトコンドリアの像は、予想通りほぼ完全に一致した。

我々が以前より見出しているように、野生型 mOPA1 を遺伝子導入した COS-7 細胞においては、mOPA1 は細胞質全体にわたって小さな粒状の局在を示す。このとき膜間部分マーカーであるチトクローム C によって観察されるミトコンドリア形態も、同様に小さな粒状を示す。mOPA1 とチトクローム C の局在がほぼ完全に一致することより、mOPA1 はミトコンドリアに局在し、その形状をチューブ状から粒状へ断片化する機能を持つと考えられた。

一方、野生型 mOPA1 とマトリックスマーカーである EYFP-mito を同時に遺伝子導入した

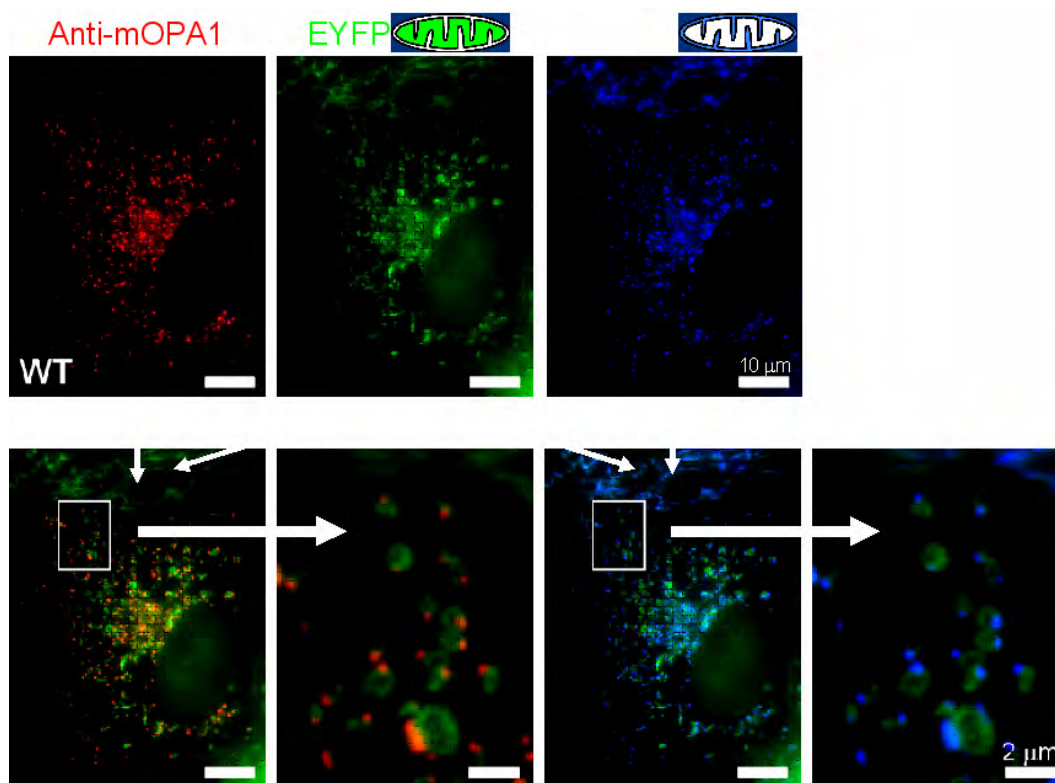


図1 野生型mOPA1を遺伝子導入したCOS-7細胞の抗体染色

(上段) COS-7細胞に野生型mOPA1とEYFP-mitoを遺伝子導入し、内在に発現するチトクロームCとともに抗体染色を行った。mOPA1、EYFP-mito、チトクロームCの局在を三色でそれぞれ示し、すべての像を重ねたものを右に示した。

(下段) mOPA1とEYFP-mitoの像の重ねあわせを左に、チトクロームCとEYFP-mitoの像の重ねあわせを右に示した。四角で囲んだ領域の拡大したものをそれぞれ示した。

COS-7細胞における両タンパク質の局在を観察したところ、マトリックスマーカーによって観察されるミトコンドリア形態は、先の観察とは異なり、主にリング状もしくは馬蹄形様の形状を示した。さらにmOPA1はリング状に観察されたミトコンドリアの一部分に、小さい粒状の形状で限局している様子が認められた。

本来同じ形態をとるべき2種類のミトコンドリアマーカーが異なった形態を示すという矛盾が生じたので、両マーカーを同時に観察することを試みた(図1)。野生型 mOPA1 と EYFP-mito を遺伝子導入した COS-7 細胞を抗体染色に供し、mOPA1 の局在を赤で、チトクロームCの局在を青で標識し、EYFP-mito の緑の蛍光と共に3者の局在を同時に観察した。その結果、EYFP-mito により表されるマトリックスは主にリング状もしくは馬蹄形様の形状をしており、そのリング状構造の一部分にチトクロームCにより表される膜間部分と mOPA1 とが共局在している様子が認められた。

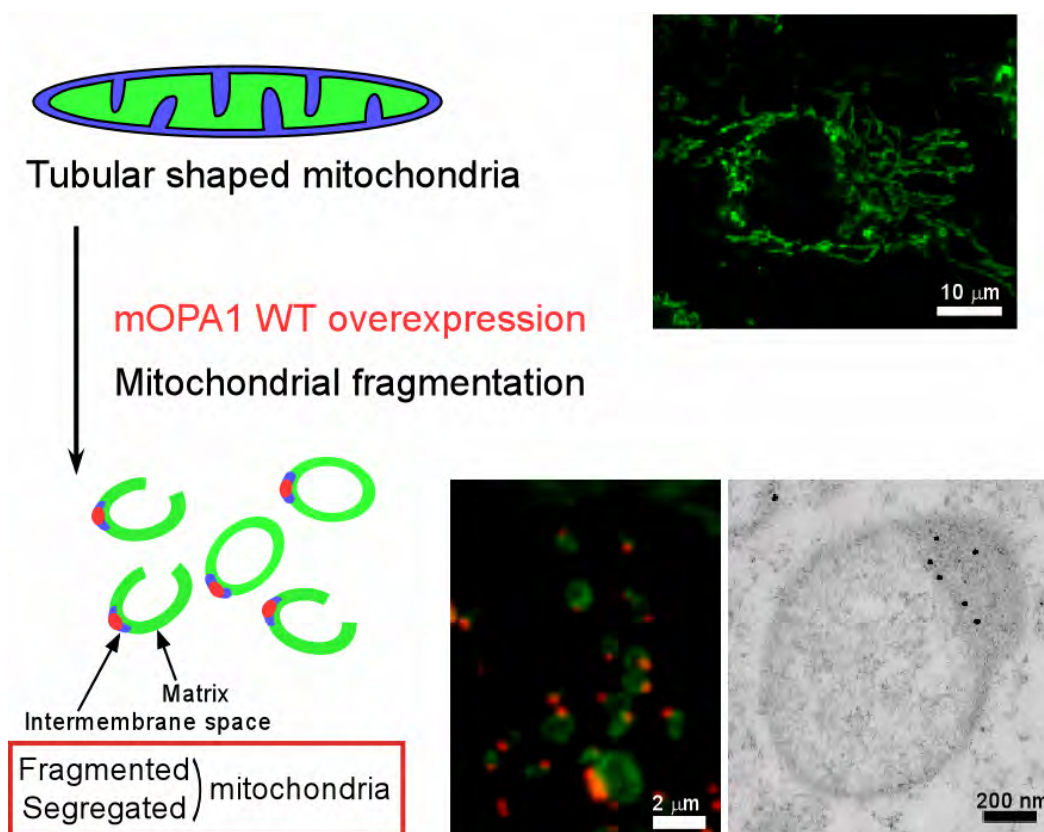


図2 野生型mOPA1の遺伝子導入によるミトコンドリア断片化のモデル

野生型 mOPA1 の過剰発現により、通常チューブ状を示すミトコンドリアは断片化される。断片化されたミトコンドリア内部において、膜間部分はマトリックスの一部に限局している様子が認められた。

さらに免疫電顕による解析により、mOPA1を発現する細胞においてはミトコンドリア内膜にあるべき特徴的なひだ構造が消失し、凝集して片寄った分布をしている膜間部分にmOPA1が局在していることが判明した。以上得られた結果より、mOPA1は遺伝子導入した細胞内においてミトコンドリア膜間部分に局在し、ミトコンドリア内膜に何らかの作用を与えることによりミトコンドリア全体の形態に影響を与え、ミトコンドリア断片化を導いていることが示唆された（図2）。

• mOPA1のGTP結合モチーフに導入したアミノ酸点変異の効果

mOPA1の遺伝子導入により観察されるミトコンドリアの形態変化に、mOPA1のGタンパク質としての機能が関与するかどうかを検討するため、GTP結合モチーフにアミノ酸点変異を導入した変異体を用いて解析を行った。一般的にGタンパク質ファミリーのタンパク質においてGTP結合がなくなるような変異として用いられる点変異をmOPA1の相当する部位に導入

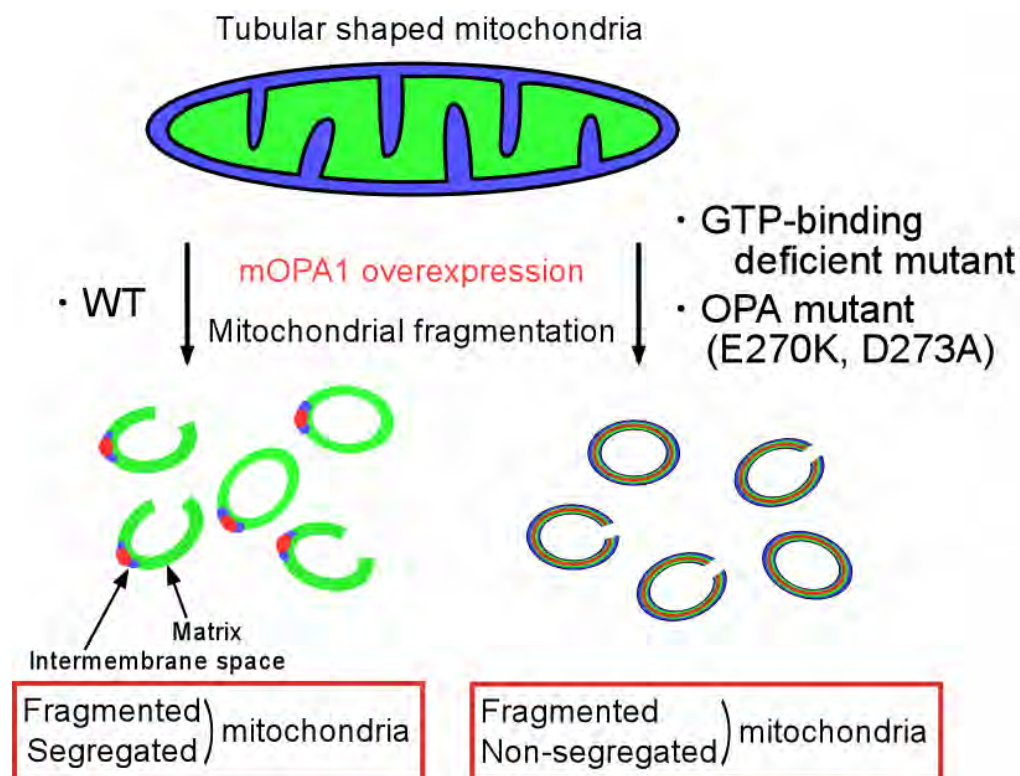


図3 GTP結合欠失変異体の遺伝子導入によるミトコンドリア断片化のモデル

GTP結合欠失変異体の過剰発現によっても野生型の場合と同じように、ミトコンドリアの断片化は観察された。しかし、野生型の場合と異なり、膜間部分とマトリックス部分の乖離は見られなかった。

した変異体 (K301A) を、野生型と同様に COS-7 細胞に遺伝子導入し、ミトコンドリア形態を上記の2つのマーカーを用いて観察した。

mOPA1 の K301A 変異体を遺伝子導入した COS-7 細胞においては、野生型 mOPA1 を導入した場合と同様に、細長いチューブ状のミトコンドリアが断片化されることが判明した。しかし野生型 mOPA1 を導入した場合とは異なり、K301A 変異体と膜間部分マーカー、マトリックスマーカーの3者の局在はいずれも主にリング状を示し、かつそれらの局在がほぼ完全に一致する様子が観察された (図3)。

・考察

高分子量Gタンパク質 mOPA1 が細胞生理学的に果たしている機能を解明することを目的とし、培養細胞を発現系として用いて解析を行った。今回の研究において、ミトコンドリア形態の観察に膜間部分とマトリックスとを標識する別々のマーカーを使用することによって、mOPA1 の遺伝子導入がもたらすミトコンドリア断片化機構が非常に複雑であることが示唆された。

我々が以前より見出しているように、mOPA1 を遺伝子導入した COS-7 細胞においては、通常チューブ状を示すミトコンドリアが断片化されるという現象が認められた。本研究で新たに得られた野生型 mOPA1 についての免疫染色の結果を総括すると、断片化されたミトコンドリアの内部において、mOPA1 が局在する膜間部分がマトリックスから乖離し、非常に片寄った分布を示すという予想外のモデルが想定された (図2)。研究の当初で指摘した、mOPA1 を遺伝子導入した細胞において2種類のミトコンドリアマーカーが異なった形態を示すという矛盾は、膜間部分マーカーとマトリックスマーカーの像が当然重っているという仮定から生じたものといえる。ミトコンドリアは外膜と内膜という二重膜により構成されているが、この構造において、膜間部分がマトリックスから乖離する様子は非常に想像しづらい。可能性としては、(1) 通常ではミトコンドリア内部に一様に分布する内膜のひだ構造 (クリステ) が、断片化したミトコンドリア内部では一ヶ所に凝集しているモデル、(2) 通常ならひだ構造を作るために外膜よりも大きい面積を持つ内膜が、何らかの理由によりその面積が極端に減少することによりひだ構造自体が消失し、膜間部分が一ヶ所に押し込められているというモデ

ル、等が考える。いずれのモデルにおいても、野生型 mOPA1 の遺伝子導入によりミトコンドリア全体の形態が変わるとともに、内膜の構造が大きく変化することが強く推察される。免疫電顕による mOPA1 の遺伝子導入を行った COS-7 細胞の観察結果もこの考えを指示した。

Gタンパク質に関する研究において、GTP 結合モチーフにアミノ酸点変異を導入して、GTP 結合能や GTP 水解活性能をなくすような変異体を用いた解析は一般的に行われている。3量体Gタンパク質や低分子量Gタンパク質のファミリーにおいては、GTP 結合能をなくした変異体が恒常的に不活性化した状態、GTP 水解活性能をなくした変異体が（自身的水解能を失うことにより常に GTP 結合型であるため）恒常的に活性化した状態の機能を反映するものとして扱われている。高分子量Gタンパク質ファミリーにおいては、GTP の水解エネルギーを用いて脂質二重膜を直接断ち切るタンパク質もあるため、GTP 水解活性をなくした変異体については、その結果の解釈が困難になることが予想された。そこで本研究では GTP 結合能をなくした変異体のみについての解析を行い、その効果について検討した。今回用いた mOPA1 の K301A 変異体を遺伝子導入した COS-7 細胞においても、野生型 mOPA を導入した場合と同様に、細長いチューブ状のミトコンドリアがリング状に断片化されることより、本研究で観察されているミトコンドリア断片化能については GTP 水解活性もしくは水解エネルギーは関与しないことが示唆される。しかしこの変異体においては、膜間部分がマトリックスから乖離するような様子は、少なくとも抗体染色の解像度では観察出来なかった。野生型 mOPA1 で得られた結果とともに考えると、mOPA1 が GTP 依存的な反応を行うことにより、ミトコンドリア内膜の構造変化が引き起こされることが推測された。

(d) 自身の発現密度に依存する ATP 受容体チャネル P2X₂ の性質の変化

イオンチャネル型の ATP 受容体 P2X は、時間依存的にイオン選択性が変化することや、記録ごとにうち向き整流性の強度がばらつくなどの特徴あるポアの性質を持つことが知られている。我々は P2X₂ 受容体の整流性の分子機構を明らかにする目的で、アフリカツメガエル卵母細胞に P2X₂ を発現させ2本刺し膜電位固定下で ATP 投与後の電流を記録した結果、内向き整流性のばらつきが発現密度に相関することを見いだ

した。これを手がかりとして今回、受容体の種々の性質を**発現レベルとの関連において**解析し以下の知見が得られた。

(1) P_{K^+}/P_{Na^+} の発現密度に依存した変化は観察されなかったが、 P_{NMDG^+}/P_{Na^+} は発現密度と負の相関を示した。(2) 内向き整流性の強弱は発現密度と負の相関を示した。脱分極パルス直後に観察される外向き電流 ($I_{initial}$) は、経時的に減衰し定常レベルに (I_{steady}) に達した。 $I_{initial}$ および I_{steady} の、内向き電流の大きさに対する割合はどちらもチャンネルを高発現にすることによって増加した。(3) 高濃度のATP (100M) により弱い内向き整流性電流を呈する発現密度の高い細胞に、低濃度ATP (3M) を投与するとその内向き整流性は増強した。(4) [ATP]-応答関係のKdの値は発現密度と負の相関を示した。Hill係数は発現密度に相関なく一定値2であった。(5) ポア上部の点変異I328Cにより上記の発現密度に依存したポアの性質の変化がほぼ消失した。

以上の結果をまとめると、「P2X₂受容体の内向き整流性等の性質は、膜上に存在する「開状態」のチャンネルの密度に依存して動的に変化する。」と表現できる。我々は

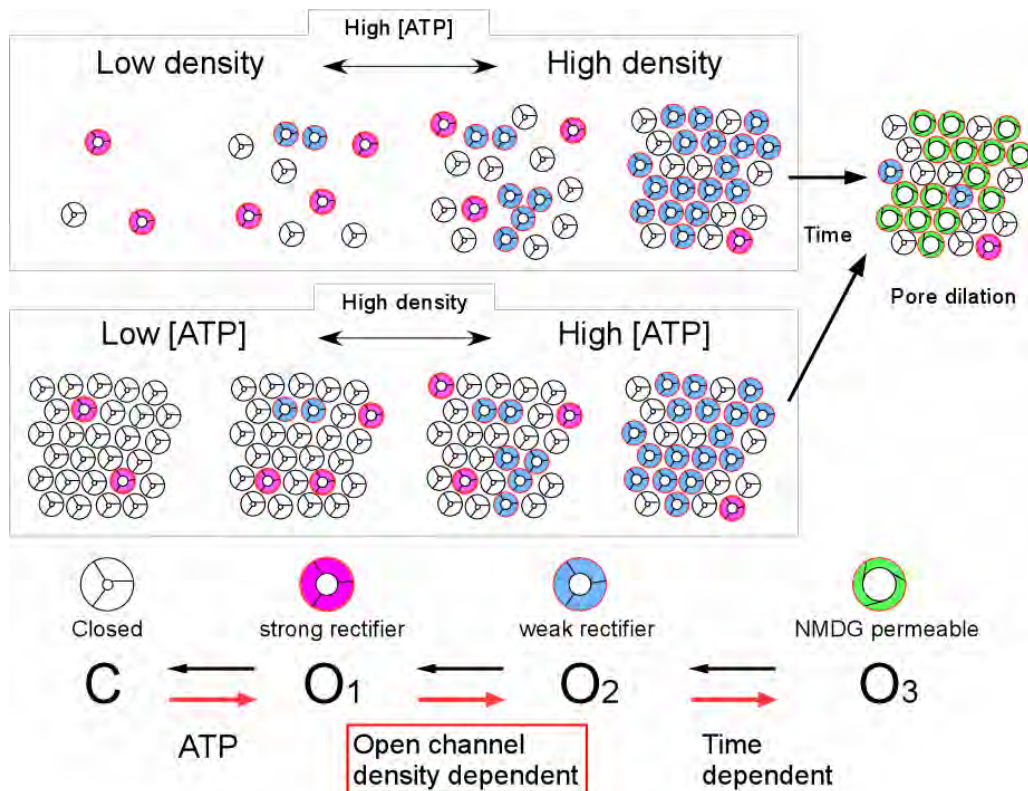


図4

「ATP投与により開状態に入った、ごく近傍にあるP2X₂受容体チャネル間の相互作用によりポア上部においてなんらかの構造変化が起こり、ポアの性質やリガンド感受性が変わる。」というイメージが、最も自然にかつ矛盾なくデータを説明できる。(図4)

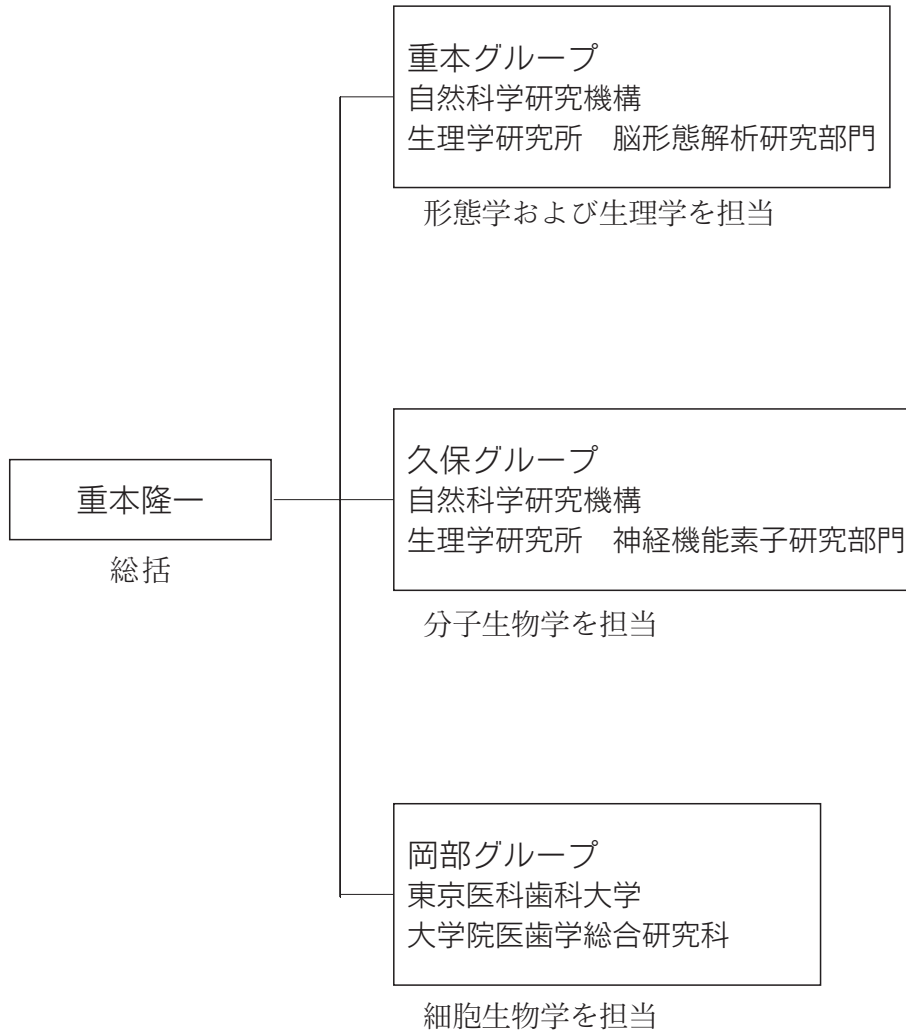
(2) 研究成果の今後期待される効果

ここでは、研究(b)で行った、膜機能蛋白の構造変化の光学的手法によるリアルタイム解析の波及効果について特に強調したい。

ゲノムプロジェクトが完了し、今後は、ゲノムのコードする個々の蛋白の構造と機能を解析していくことが求められている。そのため、蛋白の結晶を用いて行う、いわゆる構造解析が精力的に進められているが、膜機能蛋白の場合は結晶化が容易でないため一般に極めて困難である。また、結晶化した構造を知るだけでは、動態に関する情報が欠如しているため、リアルタイムで、生きた細胞における膜機能蛋白の動的構造変化を解析する研究手法が切望されてきた。FRET法による水溶液中の蛋白構造変化の解析は、既に確立されているが、生細胞で受容体蛋白に適用し成功した例は、極めて少ない。我々の研究は「生細胞における膜機能蛋白分子の動的構造変化のリアルタイム測定」を確立した点において意義があると考えている。ポストゲノムの時代に、蛋白の構造と作動原理を探っていくために、構造生物学的アプローチを相補うものとして、大きな期待が持てるからである。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

①重本グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
重本 隆一	生理学研究所 脳形態解析研究部門	教授	研究全体の総括 膜上機能分子の免疫 電子 顕微鏡解析 動態メカニズムの分 子生物学的解析	平成11年11月～ 平成16年10月
初山 俊彦	同上	助教授	神経伝達調節の電気 生理学的解析	平成11年11月～ 平成16年10月
木下 彩栄	同上	助手		平成11年11月～ 平成14年9月
初山 明子	同上	助手	神経伝達調節の電気 生理学的解析	平成13年4月～ 平成15年11月
深澤 有吾	同上	助手	機能分子の可塑性発 現に伴う動態	平成13年10月～ 平成16年10月
馬杉美和子	同上	学振 特別研究員	AMPA受容体の小脳 における局在	平成11年11月～ 平成16年10月
篠原 良章	同上	同上	NMDA受容体局在 の左右非対称性	平成13年4月～ 平成16年10月
中舘 和彦	独協医科大学	助手	小脳運動学習に伴う AMPA受容体の動態	平成13年4月～ 平成16年10月
澤 栄恵	生理学研究所 脳形態解析研究部門	研究補助員	研究補助	平成11年11月～ 平成16年10月
川島 進	同上	技術補佐員	同上	平成15年4月～ 平成16年3月
山田 幸子	同上	研究補助員	同上	平成13年11月～ 平成16年10月
原 早苗	同上	同上	同上	平成16年4月～ 平成16年10月
納富 拓也	同上	大学院生	膜上機能分子の動態 メカニズムの解析	平成12年4月～ 平成15年10月
Andrea Lorincz	同上	外国人 研究職員	AMPA受容体の機能 と局在	平成16年5月～ 平成16年10月
Mate Sumegi	同上	学振外国人 特別研究員	電子顕微鏡用タグの 開発のノックイン動物 の作製	平成16年5月～ 平成16年10月

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
田中 淳一	同上	COE研究員	AMPA受容体の動態	平成14年 4月～ 平成16年10月
春日井 雄	同上	大学院生	GABA受容体の局在	平成14年4月～ 平成16年10月
萩原 明	同上	研究員	機能分子の共存とその意義	平成14年4月～ 平成16年10月
Yue Wu	同上	研究員	NMDA 受容体の動態	平成14年4月～ 平成16年10月
足澤 悦子	同上	大学院生	HCNチャンネルの局在と共存	平成11年11月～ 平成16年10月
王 文	同上	大学院生	小脳運動学習に伴うシナプスの動態	平成15年10月～ 平成16年10月
土井 幸枝	同上	研究補助員	事務	平成12年1月～ 平成16年10月
藤本 和	福井県立大学	教授	膜上機能分子のSDS-FRL法による形態学的解析	平成11年11月～ 平成15年11月
村手 源英	理研	研究員	定量的電顕法の開発	平成13年4月～ 平成16年10月
小川 智史	理研	研究員	膜上機能分子のSDS-FRL法による形態学的解析	平成11年11月～ 平成16年3月
Zoltan Nusser	Institute for Experimental Medicine Hungarian Academy of Science	Group Leader	HCNチャンネルやGABA受容体の局在の解析	平成11年11月～ 平成16年10月

②久保グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
久保 義弘	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学 生理学研究所 神経機能素子研究部門	教授 教授	研究全般	平成11年10月～ 平成15年12月～ 平成16年10月
村田 喜理	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学	博士課程 大学院生	前向き整流性K ⁺ チャンネルの構造機能解析	平成11年10月～ 平成14年3月
阿部 秀樹	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学	CREST研究員	光学生理	平成12年4月～ 平成14年9月

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
三坂 巧	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学 生理学研究所 神経機能素子研究部門	CREST研究 補助員 学振 特別研究員 助手	分子細胞生物	平成12年 4月～ 平成13年 4月～ 平成15年11月～ 平成16年10月
渡部 禮子	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学	CREST研究 補助員	研究補助全般	平成12年 4月～ 平成15年12月
藤原祐一郎	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学 生理学研究所 神経機能素子研究部門	博士課程 大学院生 学振 特別研究員	イオンチャネル間の膜 上相互作用	平成13年 4月～ 平成16年 4月～ 平成16年10月
中條 浩一	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学 生理学研究所 神経機能素子研究部門	井上財団 ポスドク研究員 非常勤研究員	同上	平成14年 4月～ 平成16年 4月～ 平成16年10月
立山 充博	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学 生理学研究所 神経機能素子研究部門	CREST研究員 助教授	光学生理	平成14年10月～ 平成16年6月～ 平成16年10月
池田 光伸	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学	博士課程 大学院生	膜上機能分子の解析	平成15年 4月～ 平成15年12月
長友 克広	東京医科歯科大学大学院 機能協関システム医学	修士課程 大学院生	GTP結合蛋白質とRGS の分子間相互作用	平成15年 4月～ 平成16年10月
山本 友美	生理学研究所 神経機能素子研究部門	技官	研究補助	平成15年12月～ 平成16年10月
岩井 博正	生理学研究所 神経機能素子研究部門	博士課程 大学院生	ATP受容体チャネル P2X ₂ の動的構造変 化解析	平成16年 4月～ 平成16年10月

②岡部グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
岡部 繁男	東京医科歯科大学	教授	膜上機能分子の生細胞 における動態とその メカニズムの解析 遺伝子改変動物の作 製	平成11年11月～ 平成16年10月
海老原竜彦	工業技術院 生命工学技術研究所	研究員	遺伝子改変動物の作 製	平成11年11月～ 平成16年10月

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
栗生 俊彦	東京医科歯科大学	CREST研究員	機能分子の動態と機能発現	平成14年4月～平成16年3月
山本 和弘	産業技術総合研究所	技術員	研究補助	平成16年4月～平成16年10月

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

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成12年 2月 9日	チーム初会合 (顔合わせ)	生理学研究所	4人	今後の研究の進め方についてお互いの考えを確認しあった。
平成12年 9月 28-29日	チーム内打ち合わせ	生理学研究所	5人	研究セットアップの状況報告会
平成13年 9月 14-15日	研究チームミーティング	東京 医科歯科大学	10人	各グループの研究進行状況について報告・討議する
平成14年11月 1-2日	チームミーティング	生理学研究所	15人	各グループの研究進行状況について報告・討議する
平成15年 5月 9-10日	チーム内打ち合わせ	生理学研究所	21人	チームミーティング
平成15年12月 26-27日	チーム内打ち合わせ	生理学研究所	12人	チームミーティング
平成16年 8月 20-21日	重本チームミーティング	生理学研究所	16人	各グループの研究・進行状況について報告・討議する

(2) 招聘した研究者等

氏名（所属・役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Akos Kulik	GABA _B 受容体局在の解析	生理学研究所・ 脳形態解析研究部門	平成12年 7月24日 -8月25日
Akos Kulik	GABA _B 受容体局在の解析	生理学研究所・ 脳形態解析研究部門	平成12年10月23日 -11月28日
Akos Kulik	GABA _B 受容体局在の解析	生理学研究所・ 脳形態解析研究部門	平成13年 8月 7日 -8月22日

氏名（所属・役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Wu Yue (大連医科大学、講師)	NMDA受容体局在の解析	生理学研究所・ 脳形態解析研究部門	平成13年 7月29日 -9月15日
Rafael Lujan (Associate professor)	GABA _B 受容体局在の発達 変化の解析	生理学研究所・ 脳形態解析研究部門	平成14年 7月28日 -8月11日
Guillermina Lopez-Bendito (Postdoctoral fellow)	GABA _B 受容体局在の発達 変化の解析	生理学研究所・ 脳形態解析研究部門	平成14年 7月28日 - 8月11日
Akos Kulik (University of Freiburg Albertstr. 教授)	GABA _B 受容体とイオンチャネ ルの共存の電子顕微鏡的解 析	生理学研究所・ 脳形態解析研究部門	平成16年7月9日 -8月21日

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表（国内13件、海外81件）

1. Saitoh O, Yoshihiro K, Odagiri M, Ichikawa M, Yamagata K and Sekine T. RGS7 and 8 differentially accelerate G protein-mediated modulation of K⁺ currents. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 9899-9904, 1999.
2. Okabe S, Kim H, Miwa A, Kuriu T and Okado H. Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nature Neuroscience*, 2, 804-811, 1999.
3. Okabe, S., Miwa, A., and H. Okado. Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *Journal of Neuroscience*, 19, 7781-7792, 1999.
4. Sillevius Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, Moll W, Coesmans M, Jaarsma D, Henzen-Logmans S, Vecht C, De Zeeuw C, Sekiyama N, Nakanishi S, Shigemoto R. Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N Engl J Med* Jan 6, 342, 21-7, 2000.

5. Ichise T, Kano M, Hashimoto K, Yanagihara D, Nakao K, Shigemoto R, Katsuki M & Aiba A. mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science*, 288, 1832-1835, 2000.
6. Perroy J, Prezeau L, De Waard M, Shigemoto R, Bockaert J & Fagni L. Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J Neurosci*, 20, 7896-7904, 2000.
7. Boudin H, Doan A, Xia J, Shigemoto R, Huganir RL, Worley P & Crag AM. Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron*, 28, 485-497, 2000.
8. Asai K, Fujimoto K, Harazaki M, Kusunoki T, Korematsu S, Ide C, Ra C and Hosoi S. Distinct aggregation of b and g chains of the high-affinity IgE receptor upon cross-linking. *J Histochem cytochem*, 48, 1705-1715, 2000.
9. Miyashita T and Kubo Y. Extracellular Ca^{2+} sensitivity of mGluR1 α associated with persistent glutamate response in transfected CHO cells. *Receptors and Channels*, 7, 25-40, 2000.
10. Miyashita T and Kubo Y. Extracellular Ca^{2+} sensitivity of mGluR1 α induces an increase in the basal cAMP level by direct coupling with Gs protein in transfected CHO cells. *Receptors and Channels*, 7, 77-91, 2000.
11. Kondo M, Okabe S, Sumino R and Okado H. High GluR1 /GluR2 expression ratio correlates with expression of Ca^{2+} -binding proteins in the rat forebrain neurons. *European Journal of Neuroscience*, 12, 2812-2822, 2000.

12. Shigemoto R, Mizuno N. Metabotropic glutamate receptors-immunocytochemical and in situ hybridization analyses. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy, Volume 18: Glutamate (Ottersen OP and Storm-Mathisen J, ed), pp63-98. New York: Elsevier, 2000.
13. 宮下知之, 久保義弘. 代謝型グルタミン酸受容体の持つ細胞外Ca²⁺感知機能. ブレインメディカル, 12, 154-160, 2000.
14. 久保義弘. K⁺チャンネル. KEY WORD 精神 第2版, 164-165, 2000.
15. 久保義弘. カリウムチャンネル 特集 チャネロパチー. Clinical Neuroscience, 18, 278-281, 2000.
16. 久保義弘. 機能発現法による cDNA クローニング. in "脳, 神経研究のための分子生物学技術講座 (小幡邦彦他編, 文光堂), 8-30, 2000.
17. 久保義弘. K⁺チャンネル, Na⁺チャンネル. Vascular Biology ナビゲーター (丸山征郎他編, メジカルレビュー社), 252-253, 2001
18. 久保義弘, 村田喜理. イオンチャンネルと精神疾患 特集「精神疾患の分子医学」. 現代医療 33, 2671-2677, 2001.
19. 宮下知之, 阿部秀樹, 久保義弘. 細胞外カルシウムが神経細胞の機能におよぼす作用 特集「神経疾患とカルシウム」. Clinical Calcium 11, 1425-1431, 2001.
20. Saitoh O, Masuho I, Terakawa I, Nomoto S, Asano T and Kubo Y. RGS8 requires its N-terminus for subcellular localization and acute desensitization of G protein gated K⁺ channels. Journal of Biological Chemistry, 276, 5052-5058, 2001.

21. Soom M, Schönherr R, Kubo Y, Kirsch C, Klinger R and Heinemann SH. Multiple PIP₂ binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. FEBS letters, 490, 49-53, 2001.
22. Noda T, Fujimoto K and Ide C. Annulate lamellae are interconnected by three distinct cisternal structures. Acta histochem cytochem, 34, 103-110, 2001.
23. Kubo Y and Murata Y. Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1 K⁺ channel. Journal of Physiology, 531, 645-660, 2001.
24. Mion S, Corti C, Neki A, Shigemoto R, Corsi M, Fumagalli G, Ferraguti F. Bidirectional regulation of neurite elaboration by alternatively spliced metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) isoforms. Mol Cell Neuroscience, 17, 957-72, 2001.
25. Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N, Shigemoto R. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse central nervous system: Differential location relative to pre- and postsynaptic sites. Neuroscience, 106, 481-503, 2001.
26. Lopez BG, Shigemoto R, Lujan R, Juiz JM. Developmental changes in the localisation of the mGluR1alpha subtype of metabotropic glutamate receptors in Purkinje cells. Neuroscience, 105, 413-29, 2001.
27. Murata Y, Okado H and Kubo Y. Characterization of heteromultimeric G-protein coupled inwardly rectifying potassium channels of the tunicate tadpole with a unique property. Journal of Biological Chemistry, 276, 18529-18539, 2001.

28. Murata Y, Okado H, Katsuyama Y, Okamura Y and Kubo Y. Primary structure, developmental expression and functional properties of an inward rectifier K^+ channel of the tunicate. *Receptors and Channels*, 7, 387-399, 2001.
29. Umeda, T. and S. Okabe. Visualizing synapse formation and remodeling: recent advances in real-time imaging of CNS synapses. *Neuroscience Research*, 40,291-300, 2001.
30. Misaka T, Miyashita T and Kubo Y. Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization and effect on mitochondrial morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 15834-15842, 2002.
31. 久保義弘. 内向き整流性 K^+ チャンネルの整流性を決定する新たな構造基盤 特集「イオンチャンネルの最前線」. *医学のあゆみ* 201, 1017-1021, 2002.
32. 久保義弘. 代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構 特集「神経伝達機構の分子的記述」. *医学のあゆみ* 202, 1023-1026, 2002.
33. Saitoh O, Murata Y, Odagiri M, Itoh M, Itoh H, Misaka T and Kubo Y. Alternative splicing of RGS8 gene determines inhibitory function of receptor- type-specific Gq signaling. *Proc Natl Acad Sci, USA* 99, 10138-10143, 2002.
34. Kulik A, Nakadate K, Nyíri G, Notomi T, Malitschek B, Bettler B, Shigemoto R. Distinct localization of GABA_B receptors relative to synaptic sites in the rat cerebellum and ventrobasal thalamus. *Eur J Neuroscience*, 15, 291-307, 2002.
35. Lopez BG, Shigemoto R, Fairen A, Lujan R. Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex*, 12, 625-

- 38, 2002.
36. Lopez BG, Shigemoto R, Kulik A, Paulsen O, Fairen A, Lujan R. Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABA_BR1 and GABA_BR2 during rat neocortical development. *Eur J Neurosci*, 15, 1766-78, 2002.
 37. Dalezios Y, Lujan R, Shigemoto R, Roberts JD, Somogyi P. Enrichment of mGluR7a in the Presynaptic Active Zones of GABAergic and Non-GABAergic Terminals on Interneurons in the Rat Somatosensory Cortex. *Cereb Cortex*, 12, 961-974, 2002.
 38. Losonczy A, Zhang L, Shigemoto R, Somogyi P, Nusser Z. Cell type dependence and variability in the short-term plasticity of EPSCs in identified mouse hippocampal interneurons. *J Physiol*, 542, 193-210, 2002.
 39. Nunzi MG, Shigemoto R, Mugnaini E. Differential expression of calretinin and metabotropic glutamate receptor mGluR1alpha defines subsets of unipolar brush cells in mouse cerebellum. *J Comp Neurol*, 451, 189-99, 2002.
 40. Okabe S, Urushido T, Konno D, Okado H and Sobue K. Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. *Journal of Neuroscience*, 21, 9561-9571, 2001.
 41. Okabe S, Miwa A and Okado H. Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *Journal of Neuroscience*, 21, 6105-6114, 2001.
 42. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T and Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons by recruitment of

- endogenous neural progenitors: an animal model for a neuronal replacement therapy for ischemic brain injury. *Cell*, 110, 429-441, 2002.
43. Millan C, Lujan R, Shigemoto R, Sanchez PJ. The Inhibition of glutamate release by metabotropic glutamate receptor 7 affects both $[Ca^{2+}]_C$ and camp. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 14092-14101, 2002.
44. Kitano J, Kimura K, Yamazaki Y, Soda T, Shigemoto R, Nakajima Y, Nakanishi S, Tamalin A. PDZ domain-containing protein, links a protein complex formation of group 1 metabotropic glutamate receptors and the guanine nucleotide exchange factor cytohesins. *Journal of Neuroscience* , 22, 1280-1289, 2002.
45. Millan C, Lujan R, Shigemoto R, Sanchez PJ. Subtype-specific expression of groupIII metabotropic glutamate receptors and Ca^{2+} -channels in single nerve terminals. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 47796-47803, 2002.
46. Lorincz A, Notomi T, Tamas G, Shigemoto R, Nusser Z. Polarized and compartment-dependent distribution on HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nature Neuroscience*, 5, 1185-1193, 2002.
47. Momiyama T. Parallel decrease in ω -conotoxin-sensitive transmission and dopamine-induced inhibition at the striatal synapse of developing rats. *Journal of Physiology*, 546, 483-490, 2002.
48. Ai T, Fujiwara Y, Tsuji K, Otani H, Nakano S, Kubo Y, Horie M. Novel KCNJ2 mutation in familial periodic paralysis with ventricular dysrhythmia. *Circulation*, 105, 2592-2594, 2002.

49. Murata Y, Fujiwara Y, Kubo Y. Identification of a site involved in the block by extracellular Mg^{2+} and Ba^{2+} as well as permeation of K^+ in Kir2.1 K^+ channel. J Physiol, 544, 665-677, 2002.
50. Fujiwara Y, Kubo Y. Ser 165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to blockade by intracellular Mg^{2+} . J Gen Physiol, 120, 677-692, 2002.
51. Murata, Y., Fujiwara, Y. and Kubo, Y. Identification of a site involved in the block by extracellular Mg^{2+} and Ba^{2+} as well as permeation of K^+ in Kir2.1 K^+ channel. J. Physiol. 544, 665-677, 2002.
52. Ebihara T, Komiya Y, Nakaseko I, Adachi AH, Okabe S, Okamura Y. Coexpression of a $Ca_v1.2$ protein lacking N-terminus and the first domain specifically suppresses L-type calcium channel activity. FEBS Letters, 529, 203-207, 2002.
53. Okabe-S. Birth, growth, and elimination of a single synapse. Anatomical Science International, 77, 203-210, 2002.
54. Enomoto M, Shinomiya K, Okabe S. Migration and differentiation of neural progenitor cells from two different regions of embryonic central nervous system after transplantation into the intact spinal cord. European Journal of Neuroscience, 17, 1223-1232, 2003.
55. Ebihara T, Kawabata I, Usui S, Sobue K, Okabe S. Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with GFP. Journal of Neuroscience, 23, 2170-2181, 2003.

56. Usui S, Konno D, Hori K, Maruoka H, Okabe S, Fujikado T, Tano Y, Sobue K. Synaptic targeting of PSD-Zip45 (Homer 1c) and its involvement in the synaptic accumulation of F-actin. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 10619-10628, 2003.
57. Momiyama A, Silver RA, Häusser M, Notomi T, Wu Y, Shigemoto R, Cull CGS. The density of AMPA receptors activated by a transmitter quantum at the climbing fibre-Purkinje cell synapse in immature rats. *J Physiol*, 549, 75-92, 2003.
58. Somogyi P, Dalezios Y, Luján R, J David BR, Watanabe M, Shigemoto R. High level of mGluR7 in the presynaptic active zones of select populations of GABAergic terminals innervating interneurons in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 17, 2503-2520, 2003.
59. Kawakami R, Shinohara Y, Kato Y, Sugiyama H, Shigemoto R, Ito I. Asymmetrical allocation of NMDA receptor $\epsilon 2$ subunits in hippocampal circuitry. *Science*, 300, 990-994, 2003.
60. Kaneda K, Imanishi M, Nambu A, Shigemoto R, Takada M. Differential expression patterns of mGluR1 α in monkey nigral dopamine neurons. *Neuro Report*, 14, 947-950, 2003.
61. Lopez BG, Lujan R, Shigemoto R, Ganter P, Paulsen O, Molnar Z. Blockade of GABA_B receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cerebral Cortex*, 13, 932-942, 2003.
62. Minami I, Kengaku M, Sillevius SP, Shigemoto R, Hirano T. Long-term potentiation of mGluR1 activity by depolarization-induced Homer1a in cerebellar Purkinje neurons. *Eur J Neurosci*, 17, 1023-1032, 2003.

63. Kulik A, Vida I, Lujan R, Hass CA, Lopez BG, Shigemoto R, Frotscher M. Subcellular localization of metabotropic GABA_B receptor subunits GABA_{B1a/b} and GABA_{B2} in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 23, 11026-11035, 2003.
64. Nakazawa T, Watabe AM, Tezuka T, Yoshida Y, Yokoyama K, Umemori H, Inoue A, Okabe S, Manabe T and Yamamoto T. p250GAP, a novel brain-enriched GTPase-activating protein for Rho family GTPase, is involved in the NMDA receptor signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 2921-2934, 2003.
65. Inoue A and Okabe S. The dynamic organization of postsynaptic proteins: translocating molecules regulate synaptic function. *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 332-340, 2003.
66. Abe H, Misaka T, Tateyama M and Kubo Y. Effects of co-expression with Homer isoforms on the function of metabotropic glutamate receptor1a. *Molecular and Cellular Neuroscience* 23, 157-168, 2003.
67. Abe H, Tateyama M and Kubo Y. Functional identification of Gd³⁺ binding site of metabotropic glutamate receptor1a. *FEBS letters*, 545, 233-238, 2003.
68. Saitoh O and Kubo Y. Biochemical and Physiological Properties of Regulator of G protein Signaling 8. *Recent Res Devel Biophys Biochem* 3, 269-289, 2003.
69. 久保義弘, 藤原祐一郎. K⁺チャンネル構造機能連関研究のフロンティア特集「チャネロパター」. *神経研究の進歩*, 47, 69-180, 2003.
70. 久保義弘, 藤原祐一郎, 立山充博. イオンチャンネルの構造, 機能と不整脈. *診断と治療*,

91, 699-706, 2003.

71. 立山充博, 久保義弘. リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の二量体構造の動的変化. 細胞工学, 23, 1062-1063, 2004.
72. Fujiwara, Y. and Kubo, Y. Density Dependent Changes of the Pore Properties of P2X₂ Receptor Channel. *Journal of Physiology* 558, 31-43, 2004.
73. Tateyama, M., Abe, H., Nakata, H., Saitoh, O and Kubo, Y. Ligand-induced rearrangement of the intracellular dimeric conformation of metabotropic glutamate receptor1a. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 637-642, 2004.
74. Kawabata I, Umeda T, Yamamoto K and Okabe S. Electroporation-mediated gene transfer system applied to cultured CNS neurons. *Neuroreport*, 15, 971-975, 2004.
75. Kang Y, Notomi T, Saito M, Zhang Wei, Shigemoto R. Bidirectional Interactions between H-Channels and Na⁺-K⁺ Pumps in Mesencephalic Trigeminal Neurons. *J Neurosci*, 24, 694-3702, 2004.
76. Kulik A, Nakadate K, Hagiwara A, Fukazawa Y, Lujan R, Saito H, Suzuki N, Futatsugi A, Mikoshiba K, Frotscher M, Shigemoto R. Immunocytochemical localization of the α_{1A} subunit of the P/Q-type calcium channel in the rat cerebellum. *Eur J Neurosci*, 19, 2169-2178, 2004.
77. Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4 in the rat brain. *J Comp Neurol*, 471, 241-276, 2004.

78. Somogyi J, Baude A, Omori Y, Shimizu H, Mestikawy SE, Fukaya M, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P. GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3(VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur J Neurosci*, 19, 552-569, 2004.
79. 笏山明子, 重本隆一. グルタミン酸受容体の分布とシナプスでの機能. *蛋白質核酸酵素*, 49, 287-294, 2004.
80. Kogo N, Dalezios Y, Capogna M, Ferraguti F, Shigemoto R, Somogyi P. Depression of GABAergic input to identified hippocampal neurons by group III metabotropic glutamate receptors in the rat. *European J Neurosci*, 19, 2727-2740, 2004.
81. Ferraguti F, Cobden P, Pollard M, Cope D, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P. Immunolocalization of metabotropic glutamate receptor 1alpha (mGluR1alpha) in distinct classes of interneuron in the CA1 region of the rat hippocampus. *Hippocampus*, 14, 193-215, 2004.
82. Lopez BG, Shigemoto R, Kulik A, Vida I, Fairen A and Lujan R. Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABA_{B1a/b} and GABA_{B2} in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus*, 14, 836-848, 2004.
83. Savio CC, Shigemoto R, Mercer JN and Surmeier DJ. HCN2 and HCN1 channels govern the regularity of autonomous pacemaking and synaptic resetting in globus pallidus neurons. *J Neurosci*, 24, 9921-9932, 2004.
84. Lujan R, Shigemoto R, Kulik A and Juiz JM. Localization of the GABA_B receptor 1a/b subunit relative to glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *J*

Comp Neurol, 475, 36-46, 2004.

85. Saitoh, O and Kubo, Y. Biochemical and Physiological Analyses of the RGS8 function. *Methods in Enzymology* 390, 129-148, 2004.
86. Kawabata, I., Umeda, T., Yamamoto, K., and S. Okabe. Electroporation-mediated gene transfer system applied to cultured CNS neurons. *Neuroreport*, 15 971-976, 2004.
87. Tanaka J, Matsuzaki M, Tarusawa E, Momiyama A, Molnar E, Kasai H and Shigemoto R. Number and density of AMPA receptors in single synapses in immature cerebellum. *J Neurosci*, 25, 799-807, 2005.
88. Lujan R, Shigemoto R, Lopez BG. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Nuerosci*, 130, 567-580, 2005.
89. Umeda, T., Ebihara, T., and S. Okabe. Simultaneous Observation of Stably Associated Presynaptic Varicosities and Postsynaptic Spines: Morphological Alterations of CA3-CA1 Synapses in Hippocampal Slice Cultures. *Molecular and Cellular Neuroscience*, in press.
90. Yamamoto, K., Yamaguchi, M., and S. Okabe. Direct visualization of cell movement in the embryonic olfactory bulb using green fluorescent protein transgenic mice: evidence for rapid tangential migration of neural cell precursors. *Neuroscience Research*, in press.
91. Fujii, R.*, Okabe, S.*, Urushido, T., Inoue, K., Tachibana, T., Nishikawa, T., Hick, G. G., and T. Takumi * equal contribution. The RNA-binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology. *Current*

Biology in press.

92. Itoh, M., Nagatomo, K., Kubo, Y., Sugimoto, M. and Saitoh, O. Molecular cloning and characterization of a new RGS protein of Medaka. *Gene*, in press.
93. Ju, W. K., Misaka, T., Nakagomi, S., Agarwal, N., Kubo, Y., Lipton, S. A. and Bossy-Wetzel, E. OPA1 expression in the normal rat retinal and optic nerve. *J. Comparative Neurology*, in press.
94. Hagiwara, A., Fukazawa, Y., Deguchi-Tawarada, M., Ohtsuka, T., and Shigemoto, R. Differential distribution of release-related proteins in the hippocampal CA3 area as revealed by freeze-fracture replica labeling. *J. Comparative Neurology*, in press.

(2)口頭発表（内容が重複しているものは除く。国際学会発表を優先。）

①招待, 口頭講演（国内71件, 海外27件）

1. 岡部繁男. シナプス後肥厚部の解析. 第13回箱根 GIBCO-BRL 生物学フォーラム, 神奈川県, 平成11年7月22-24日.
2. 岡部繁男. 光学顕微鏡によるシナプス蛋白質の動態解析. 総合脳 技術ワークショップ「脳研究への新しいアプローチ」, 岡崎, 平成12年2月10日.
3. 久保義弘 (東京都神経科学総合研究所). 代謝型グルタミン酸受容体の細胞外Ca²⁺感知機能の構造基盤と生理的意義. 東京大学理学部臨海実験所セミナー, 三崎, 平成12年3月4日.
4. 久保義弘 (東京都神経科学総合研究所). 代謝型グルタミン酸/Ca²⁺受容体mGluR1を導入したCHO細胞の形態変化に関わる細胞内情報伝達系. 第77回日本生理学会大会,

神奈川, 平成12年3月27日.

5. 久保義弘 (東京都神経科学総合研究所・神経生理学研究部門). 代謝型グルタミン酸受容体の持つ細胞外Ca²⁺感知機能の生理的意義. 第77回日本生理学会大会シンポジウム「Ca²⁺と細胞機能」, 神奈川, 平成12年3月28日.
6. 久保義弘. K⁺チャネルの構造と機能. 第77回日本生理学会大会シンポジウム「イオンチャネルの分子構造と機能」, 神奈川, 平成12年3月29日.
7. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 神経細胞における機能分子の可視化技術. 第12回共焦点顕微鏡国際ワークショップ, 大阪, 平成12年4月6-7日.
8. 久保義弘. 代謝型グルタミン酸受容体は細胞外Ca²⁺によっても活性化される!. 関西医科大学 生理学セミナー, 大阪, 平成12年9月29日.
9. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). シナプス形成・維持過程における機能分子の動態. 第23回日本神経科学会・第10回日本神経回路学会合同大会シンポジウム「シナプス形成の制御機構△標的認識から機能発現へ」, 横浜, 平成12年9月4-6日.
10. 山本和弘 (産業技術総合研究所), 岡部繁男 (東京医科歯科大学), マウス胎児脳嗅球部における神経細胞の移動, 第23回日本神経科学会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 平成12年9月4-6日.
11. Shigemoto R (National Institute for Physiological Sciences), Ultrastructural localization of metabotropic glutamate receptors in the rat CNS as revealed by conventional and replica immunogold labeling, XV International Symposium on Morphological Sciences, Kyoto, Sep. 18-21, 2000

12. Fujimoto K (福井県立大学). Assembly-disassembly of glutamate receptor and water channel aquaporin in astrocyte cell membrane. XV International Symposium on Morphological Sciences, Kyoto, Sep. 18-21, 2000.
13. 久保義弘. 内向き整流性 K^+ チャンネル IRK1 の内向き整流性を決定する新たな構造基盤. 名古屋大学環境医学研究所 生理学セミナー, 名古屋, 平成12年10月25日.
14. 藤本和 (福井県立大学), 小川智史 (理研). 細胞膜機能分子の分布と動態の免疫電子顕微鏡的解析. 第53回細胞生物学会, 福岡, 平成12年10月30日-11月2日.
15. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 神経シナプス形成とリモデリングの可視化. 第53回日本細胞生物学会シンポジウム「神経シナプス構成分子の集積と機能の連関」, 福岡, 平成12年11月2日.
16. Ebihara T (工業技術院生命工学技術研究所), Okabe S (東京医科歯科大学). Construction and analysis of the low activity mutant L-type calcium channel, Annual Meeting: Society for Neuroscience, New Orleans USA, Nov 4-9, 2000.
17. Okabe S (東京医科歯科大学). Time-lapse fluorescence analysis of postsynaptic density formation in dendritic filopodia/spines, Annual Meeting: Society for Neuroscience, New Orleans USA, Nov 4-9, 2000.
18. Okabe S (東京医科歯科大学). Visualization of postsynaptic density, Neuroscience Lecture Series, University of Bonn, Germany, Nov 16, 2000.
19. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). シナプスの形態変化と機能分子の動態. 第7回シナプス研究会「シナプスの形成・維持・可塑性」, 岡崎, 平成12年12月7-8日.

20. 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. Glu125はIRK1チャンネルの細胞外Mg²⁺ブロックに対する感受性を決定する. 第78回日本生理学会大会, 京都, 平成13年3月29日.
21. 三坂巧（東京医科歯科大学大学院）, 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. マウス脳新規高分子量G蛋白質に結合する分子群のtwo-hybrid法による検索. 第78回日本生理学会大会, 京都, 平成13年3月29日.
22. 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. RGS8のN端配列による細胞内局在とG蛋白質応答の制御. 第78回日本生理学会大会, 京都, 平成13年3月29日.
23. 重本隆一（生理学研究所）. グルタミン酸受容体の局在：シナプスとの位置関係についての定量的解析, 第78回日本生理学会大会, 京都, 平成13年3月30日.
24. 岡部繁男. シナプス形成とリモデリングの可視化：GFP融合蛋白質のアデノウィルスを用いた海馬神経細胞での発現系による解析, 第106回日本解剖学会 シンポジウム, 高知, 平成13年4月2-4日.
25. 久保義弘. 代謝型グルタミン酸受容体は細胞外mGluR1aによっても活性化される！. 東北大学医学部 特別講義, 仙台, 平成13年8月30日.
26. 久保義弘. 内向き整流性K⁺チャンネルKir 2.1の内向き整流性を決定する新たな構造基盤. 第5回 Molecular Cardiovascular Conference, 小樽, 平成13年8月31日.
27. 三坂巧（東京都神経科学総合研究所）, 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. マウス脳の新規高分子量GTP結合蛋白質のプロセッシングと細胞内局在. 第23回日本神経科学大会, 横浜, 平成13年9月4日

28. 久保義弘. 代謝型グルタミン酸受容体の細胞外 mGluR1a 感知機能の構造基盤と生理的意義. 名古屋大学環境医学研究所 生理学セミナー, 名古屋, 平成13年10月17日.
29. 久保義弘. イオンチャネル・受容体の構造と機能. 東京大学理学部生物学科 動物学特別講義, 東京, 平成13年10月24日.
30. 久保義弘. 代謝型グルタミン酸受容体の分子構築と機能制御機構. 第24回東京都神経科学総合研究所シンポジウム「神経伝達機構の分子的記述とそれからの展開」, 東京, 平成13年11月30日.
31. 久保義弘. 内向き整流性K⁺チャネルの整流性を決定する新たな構造基盤. 東北医学会第347回例会シンポジウム, 仙台, 平成13年12月5日.
32. Yoshihiro Kubo, Structural determinants for the rectification property of the inwardly rectifying K⁺ channel Kir2.1., COE International Symposium “Receptors and Ion Transporters in Cardiovascular system” Osaka Univ. Graduate School of Medicine, Ichou-Kaikan Osaka, 2002.2.4.
33. 久保義弘. イオンチャネルの構造と機能. 東京医大先端医学特別講義, 東京, 平成14年5月8日.
34. 村手源英 (理研), 藤本和 (福井県立大学). 神経細胞の膜機能分子の動態解析. 日本電子顕微鏡学会第58回学術講演会, 大阪国際交流センター, 平成14年5月14日.
35. 岡部繁男. GFP. 第28回レーザー顕微鏡研究会 ナイトセッション「生物における分子の可視化」, 東京, 平成14年7月4-5日.

36. 重本隆一（生理学研究所）. 小脳可塑性関連分子の局在と動態. 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月7日.
37. 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. 内向き整流性 K^+ チャンネル Kir2.1の細胞外 Mg^{2+} と Ba^{2+} によるブロック, および K^+ 透過に寄与するアミノ酸残基の同定. 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月7日.
38. 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. Andersen症候群の病因となる内向き整流性 K^+ チャンネル (Kir2.1) 変異による機能異常の解析. 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月7日.
39. 三坂巧（東京都神経科学総合研究所）, 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. ミトコンドリア分裂に関わるマウス高分子量Gタンパク質 mOPA1 のC末端部分を介した相互作用の解析. 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月7日.
40. 山本和弘（産業技術総合研究所）, 岡部繁男（東京医科歯科大学）. 器官培養したマウス胎児脳嗅球部で観察された tangential 方向の神経細胞運動. 第25回日本神経科学会, 東京, 平成14年7月7-9日.
41. 岡部繁男（東京医科歯科大学）, 海馬スライスにおける錐体細胞特異的遺伝子発現法を用いたシナプス動態解析, 第25回日本神経科学会, 東京, 平成14年7-9日.
42. 岡部繁男（東京医科歯科大学）. 正常脊髄に移植した胎児海馬および脊髄由来神経幹細胞の移動様式. 第25回日本神経科学会, 東京, 平成14年7月9日.
43. 海老原達彦（工業技術院生命工学技術研究所）, 岡部繁男（東京医科歯科大学）. PSD-Zip45 (Homer 1c) トランスジェニックマウスを用いた海馬神経細胞におけるシナプスリ

モデリングの長期観察. 第25回日本神経科学会, 東京, 平成14年7月9日.

44. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). Differential dynamic behavior of postsynaptic density proteins and its regulation by neuronal activity. 第45回日本神経化学会大会シンポジウム協調的分子配置によるシナプスの機能発現, 札幌, 平成14年7月16-18日.
45. Yoshihiro Kubo (東京医科歯科大学大学院). Ser165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to blockade by intracellular Mg^{2+} , Gordon Research Conference “Ion Channels”, New Hampshire, USA, 2002.7.17.
46. 重本隆一 (生理学研究所). Changes of AMPA receptor number and density during development in the cerebellum. Japan-UK workshop from molecules to memory 2002, 奈良, 2002.8.30.
47. Fujimoto K (福井県立大学). Membrane lipid distribution revealed by freeze-fracture replica and freeze-substitution labeling. The 15th International Congress on Electron Microscopy, Durban, Sep. 1-6, 2002.
48. 重本隆一 (生理学研究所). Subcellular localization of LTD-related membrane molecules in the rat cerebellum. 第4回国際代謝調節型グルタミン酸受容体学会、イタリア、2002.9.11.
49. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 神経回路形成過程の可視化技術の開発と脳機能解明への応用. 文部科学省シンポジウム2002「明日をめざす科学技術」, 東京, 平成14年10月22-24日。
50. 岡部繁男. シナプス機能分子のリアルタイム解析と神経伝達調節. CREST「脳を知る」シ

ンポジウム 脳神経科学の最先端2002, 京都, 平成14年年 11月25日.

51. 藤本和 (福井県立大学), 村手源英 (理研), 小川智史 (理研). Dynamics of cell membrane proteins and lipids as revealed by freeze-fracture replica labeling electron microscopy. 第30回生理研国際シンポジウム, 岡崎, 平成15年3月14日.
52. Kubo, Y., Structural determinants for the rectification property of the inward rectifier K^+ channel Kir2.1., Japan-US Brain Research Cooperative Program Symposium “Neural Signalplexes and Ion Channel Regulation”, Okazaki Conference Center, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, 2003.3.16.
53. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). シナプス後肥厚部蛋白質の動的挙動とその神経活動による制御. 第76回日本薬理学会・第80回日本生理学会 学術・研究委員会シンポジウム「興奮性シナプス可塑性研究の最近の話題」, 福岡, 平成15年3月24-26日.
54. 三坂巧 (東京都神経科学総合研究所), 久保義弘 (東京医科歯科大学大学院), 高分子量G蛋白質 mOPA1 の遺伝性視神経萎縮においてみられる疾患変異体の機能解析, 第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月24日.
55. 重本隆一 (生理学研究所). Clustering of glutamate receptors in synaptic sites. 第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月26日.
56. Yoshihiro Kubo (東京医科歯科大学大学院) and Hideki Abe (東京医科歯科大学). Effects of co-expression with Homer isoforms on the function of metabotropic glutamate receptor1. Symposium “Trafficking and clustering of channels and receptors”, 第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月26日.

57. 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. P2X 受容体とNic 受容体の膜上直接相互作用の構造基盤の探索. 第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月26日.
58. 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. 電位依存性カリウムチャンネル KCNQ2 のスプライスバリエントの機能差異. 第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月26日.
59. 馬杉（時田）美和子（生理学研究所）. “Quantitative analysis of glutamate receptors at parallel fiber-Purkinje cell synapses using SDS-FRL”. 第108回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「シナプス構造と機能の可視化」, 福岡, 平成15年4月1日-3日.
60. 岡部繁男（東京医科歯科大学）. 「シナプス後部構造-形成とリモデリングの可視化」. 第108回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「シナプス構造と機能の可視化」, 福岡, 平成15年4月1日-3日.
61. 重本隆一（生理学研究所）, 靱山明子（生理学研究所）. “Number and density of AMPA-type glutamate receptors in synaptic sites”. 第108回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「シナプス構造と機能の可視化」, 福岡, 平成15年4月1日-3日.
62. 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. 「開状態におけるイオンチャンネルポアの柔軟性の分子基盤 P2X₂ 型 ATP 受容体チャンネルは自身の発現密度をセンスする」. 平成15年度生理学研究所研究会「バイオ分子センサー」, 岡崎, 平成15年5月21日.
63. 久保義弘（東京医科歯科大学大学院）. “Functional significance of charged amino acids on the wall of the inner vestibule of Kir2.1.”. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月23日.

64. 岡部繁男 (東京医科歯科大学), 「スパインにおけるシナプス後部分子の動的分布変化」第26回神経科学大会 シンポジウム「樹状突起スパイン形成を制御する分子機構」, 名古屋, 平成15年7月23日-25日.
65. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 「樹状突起形態形成調節分子テレンセファリン：フィロポディア形成およびシナプス成熟過程への関与」. 第26回日本神経科学会, 名古屋, 平成15年7月23日-25日.
66. 栗生俊彦 (東京医科歯科大学), 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 「海馬興奮性シナプスにおける活動依存的なPSD-Zip45の動態」. 第26回日本神経科学会, 名古屋, 平成15年7月23日-25日.
67. 立山充博 (東京医科歯科大学大学院), 阿部秀樹 (東京医科歯科大学), 久保義弘 (東京医科歯科大学大学院). 「代謝型グルタミン酸受容体のガドリニウム結合部位の機能解析」. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月24日.
68. 三坂巧 (東京都神経科学総合研究所), 久保義弘 (東京医科歯科大学大学院). 「高分子量GTP結合蛋白質mOPA1によるミトコンドリア形態の変化」. シンポジウム「ミトコンドリアの機能・動態と神経細胞死」第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月25日.
69. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). “Dynamics of postsynaptic molecules during development of neuronal network”. 国際シンポジウム “Dynamics of Neural Development”, 大阪, 平成15年8月10日-11日.
70. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 「PSDの分子構築とその動態の定量的解析」. 生理学研究所研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」, 岡崎, 平成15年9月19-20日.

71. 久保義弘. イオンチャネルの構造機能連関研究のこれまで、現在、そして、これから. 東京大学分子細胞生物学研究所セミナー, 東京, 平成15年9月24日.
72. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). “Dynamics of Postsynaptic Density”. シンポジウム「シナプス伝達の分子機構」. 第46回日本神経化学学会大会, 新潟, 平成15年9月24日-26日.
73. Kubo Y (東京医科歯科大学大学院). “Alternative splicing of RGS8 gene determines inhibitory function of receptor-type-specific Gq signaling”. シンポジウム「RGS蛋白質ファミリーによる細胞情報制御」. 第76回日本生化学会大会, 横浜, 平成15年10月18日.
74. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 「海馬興奮性シナプスの構造と機能」特別講演. 第12回海馬と高次機能学会, 東京府中, 平成15年11月23-24日.
75. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 「2光子レーザー顕微鏡観察」. 第2回細胞生物学ワークショップ 北海道大学21世紀COEプログラム「バイオとナノを融合する新生命科学拠点」. 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻・タンパク質研究所21世紀COEプログラム共同開催, 大阪, 平成15年11月24-29日.
76. 久保義弘 (東京医科歯科大学大学院). 「自身の発現密度に依存するATP受容体P2X₂の性質の変化」. 平成15年度生理研研究会「神経回路網形成と可塑性機構研究における領域横断的アプローチ」, 岡崎, 平成15年12月4日.
77. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 「海馬興奮性シナプスにおけるシナプス後部分子の活動依存的な動態」. シンポジウム「分子可視化技術による神経細胞の機能解析」日本顕微鏡学会第48回シンポジウム, 東京, 平成15年12月6-7日.
78. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 「シナプス後部分子の動態と分子種特異的な集積メカ

- ニズム」. 横浜市立大学21世紀COEシンポジウム, 横浜, 平成15年12月19日.
79. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). 「中枢神経系興奮性シナプスの動的変化」. 東京医科歯科大学21世紀COEシンポジウム, 東京, 平成16年2月14日.
 80. 舩山俊彦 (生理学研究所). 「中脳ドーパミン性ニューロンにおけるD2受容体を介する脱分極誘発性シナプス伝達抑制」. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 平成16年3月10日.
 81. 久保義弘. 代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造機能連関. 慶応大学医学部生理学大学院セミナー, 東京都, 平成16年5月14日.
 82. 舩山明子 (生理学研究所). “Estimating errors associated with the peak-scaled non-stationary fluctuation analysis (PS-NSFA) of climbing fibre-Purkinje cell by Monte Carlo simulation”. 平成15年生理学研究所研究会「神経可塑性の分子基盤」, 岡崎, 平成16年5月29日.
 83. 重本隆一 (生理学研究所). 細胞膜上機能分子の高解像度定量的局在解析に向けた新しいアプローチ: グルタミン酸受容体を例に. 第81回日本生理学会大会, 札幌, 平成16年6月2日.
 84. 久保義弘. Regulation mechanisms and structural rearrangements of metabotropic glutamate receptor. 神戸大学大学院医学系研究科 特別講義, 神戸, 平成16年6月25日.
 85. 岡部繁男. 海馬興奮性シナプスの分子構築と動態. 第31回岡山脳研究セミナー「シナプスのメカニズムと神経研究の新しい展開」, 岡山, 平成16年7月26-27日.
 86. 岡部繁男. Turnover of PSD molecules in hippocampal neurons. Workshop on Molecular

Basis of Synaptic Plasticity, New York, June 27-30, 2004.

87. 岡部繁男. Dynamics of postsynaptic density in hippocampal neurons, in symposium “Visualizing dynamics of neuronal structure and function”. 16th International Congress of the IFAA “Anatomical Science 2004 From Gene to Body”, Kyoto, August 22-27, 2004.
88. 重本隆一 (生理学研究所). レプリカ免疫標識法によるシナプスと機能分子の活動依存性動態の解析. 16th International Congress of the IFAA Anatomical Science 2004 From Gene to Body, 京都, 平成16年8月26日.
89. 立山充博 (生理学研究所). リガンド結合による代謝型グルタミン酸受容体の二量体構造変化. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会, 大阪, 平成16年9月21日.
90. 初山俊彦 (生理学研究所). 線条体に移植された神経上皮細胞の分化とシナプス再構築. 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, 平成16年9月21-23日.
91. 藤原祐一郎, 久保義弘. 自身の発現密度に依存するATP受容体チャンネルP2X₂の性質の変化. 名古屋大学環境医学研究所 大学院セミナー, 名古屋, 平成16年9月27日.
92. 立山充博, 久保義弘. リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の2量体構造の動的変化. 金沢大学大学院医学系研究科 特別講義, 金沢, 平成16年10月4日.
93. 岡部繁男. シナプス分子動態の定量的解析. 科学技術振興機構「脳」三領域合同終了シンポジウム, 東京, 平成16年10月7-8日.

94. 岡部繁男 (東京医科歯科大学). シナプス分子動態の定量的解析, 「脳を知る」「脳を守る」「脳を創る」合同シンポジウム, 東京都, 平成16年10月7日.
95. 三坂巧 (生理学研究所). ミトコンドリア断片化に関わる高分子量Gタンパク質mOPA1のホモ多量体形成の解析. 「脳を知る」「脳を守る」「脳を創る」合同シンポジウム, 東京都. 平成16年10月7-8日.
96. 立山充博 (生理学研究所). 代謝型グルタミン酸受容体サブユニットの配置変換がシグナル伝達を仲介する. 「脳を知る」「脳を守る」「脳を創る」合同シンポジウム, 東京都, 平成16年10月7-8日.
97. Fujiwara, Y. and Kubo, Y.. Density dependent changes of the pore properties of P2X₂ receptor channel. シンポジウム「Structure and function of ion channels」第77回日本生化学会大会, 横浜, 平成16年10月15日.
98. 深澤有吾 (生理学研究所). 海馬歯状回における *in vivo* 長期増強現象誘導後の AMPA 受容体の定量的解析. Neuroscience 2004, サンディエゴ, 平成16年10月23日.

②ポスター発表 (国内52件、海外10件)

1. Okabe, S., Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit, *Acta Anat Nip* 1999;74:99, 第104回日本解剖学会総会全国学術集会, 東京三鷹, 平成11年3月29-31日.
2. Okabe S., Kim H., Miwa A., Kuriu T., Okado H., Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity in cultured hippocampal neurons, 第22回日本神経科学大会, 大阪, 平成11年7月6-8日.

3. 宮下知之, 久保義弘, 代謝型グルタミン酸/ Ca^{2+} 受容体mGluR1aを導入したCHO細胞の形態変化に関わる細胞内情報伝達系. 第77回日本生理学会, 日吉, 平成12年3月27日.
4. 村田喜理, 久保義弘. 内向き整流性 K^+ チャンネルの細胞外陽イオンによるブロックの構造基盤. 第77回日本生理学会, 日吉, 平成12年3月27日.
5. 馬杉美和子 (生理学研究所), 納富拓也 (生理学研究所), 重本隆一 (生理学研究所). SDS-FRL法による細胞膜上機能分子の共存の解析. 第23回日本神経科学会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 平成12年9月4日.
6. 宮下知之, 三坂巧, 久保義弘. マウス脳の新規高分子量GTP結合蛋白質のプロセッシングと細胞局在. 第23回日本神経科学会第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 平成12年9月4日.
7. 山本和弘, 岡部繁男. マウス胎児脳嗅球部における神経細胞の移動. 第23回日本神経科学会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 平成12年9月4-6日.
8. Ebihara, T, Kuroyanagi, H, Okamura, Y, Okabe, S, Construction and analysis of the low activity mutant L-type calcium channel, Annual Meeting: Society for Neuroscience, New Orleans USA, Nov 4-9, 2000.
9. 村田喜理, 久保義弘. Glu125はIRKIチャンネルの細胞外 Mg^{2+} ブロックに対する感受性を決定する. 第78回日本生理学会, 京都, 平成13年3月29日.
10. 久保義弘, 増保生郎, 寺川偉温, 野本総, 浅野富子, 斉藤修. RBS8のN端配列による細胞内局在とG蛋白質応答の制御. 第78回日本生理学会, 京都, 平成13年3月29日.

11. 三坂巧, 久保義弘. マウス脳新規高分子量G蛋白質に結合する分子群のtwo-hybrid法による検索. 第78回日本生理学会, 京都, 平成13年3月29日.
12. K. Yamamoto, S. Okabe, Rapid movement of neural precursor cells in the olfactory bulb, 第106回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高知, 平成13年4月2-4日.
13. 阿部秀樹, 久保義弘. Homer分子が代謝型グルタミン酸受容体の応答特性に及ぼす作用. 第24回日本神経科学大会, 京都, 平成13年9月26日.
14. 岡部繁男, 漆戸智恵, 今野大治郎, 岡戸晴生, 祖父江憲治. 海馬神経細胞におけるPSD-Zip45の動態. 第24回日本神経科学会, 京都, 平成13年9月26-28日.
15. 藤原祐一郎, 久保義弘. 内向き整流 K^+ チャンネルの内向き整流性決定に関与する第4の部位の検索. 第24回日本神経科学大会, 京都, 平成13年9月27日.
16. 三坂巧, 久保義弘. マウス脳高分子量G蛋白質 (mLG) の遺伝子導入 COS7 細胞における細胞内局在とミトコンドリアの形態変化. 第24回日本神経科学大会, 京都, 平成13年9月28日.
17. 三坂巧、久保義弘、ミトコンドリア分裂に関わる高分子量G蛋白質 mOPA1 の細胞内プロセッシングの解析、第79回日本生理学会大会、広島、平成14年3月28日。
18. 阿部秀樹、久保義弘、Homerの共発現が mGluR1a の多価陽イオンに対する応答に及ぼす作用、第79回日本生理学会大会、広島、平成14年3月28日。
19. 藤原祐一郎、久保義弘、内向き整流性 K^+ チャンネルKir 2.1膜貫通領域M2のSer165残基の細胞内ブロッカー感受性に対する寄与、第79回日本生理学会大会、広島、平成14年

3月28日。

20. 村田喜理, 小田桐恵, 伊藤まさゆき, 久保義弘, 斉藤修. RGS8のスプライス異型RGS8Sの新規同定と両者のG蛋白質応答制御能の比較. 第79回日本生理学会大会, 広島, 平成14年3月28日.
21. 漆戸智恵, 岡戸晴生, 川端いつみ, 岡部繁男. 海馬神経細胞におけるNMDA受容体の動態. 第107回日本解剖学会総会・全国学術集会, 浜松, 平成14年3月29-31日.
22. 栗生俊彦, 川端いつみ, 漆戸智恵, 岡部繁男. 海馬興奮性シナプスにおけるPSD-Zip45 (Homer 1c)の動態. 第107回日本解剖学会総会・全国学術集会, 浜松, 平成14年3月29-31日.
23. 榎本光裕, 岡部繁男. 脊髄移植胎児海馬由来神経幹細胞の組織内移動様式. 第107回日本解剖学会総会・全国学術集会, 浜松, 平成14年3月29-31日.
24. 村田喜理, 久保義弘. 内向き整流性K⁺チャンネルKir2.1の細胞外Mg²⁺とBa²⁺によるブロック、およびK⁺透過に寄与するアミノ酸残基の同定. 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月7日.
25. 三坂巧, 久保義弘. ミトコンドリア分裂に関わるマウス高分子量Gタンパク質mOPA1のC末端部分を介した相互作用の解析. 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月7日.
26. 榎本光裕, 岡部繁男. 正常脊髄に移植した胎児海馬および脊髄由来神経幹細胞の移動様式. 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月7-9日.
27. 海老原達彦, 川端いつみ, 岡部繁男. PSD-Zip45 (Homer 1c)トランスジェニックマウスを

- 用いた海馬神経細胞におけるシナプスリモデリングの長期観察. 第25回日本神経科学会, 東京, 平成14年7月7-9日.
28. 山本和弘, 山口正洋, 岡部繁男. 器官培養したマウス胎児脳嗅球部で観察された tangential 方向の神経細胞運動. 第25回日本神経科学会, 東京, 平成14年7月7-9日.
 29. 梅田達也, 三齊誠, 八木健, 岡部繁男. 海馬スライスにおける錐体細胞特異的遺伝子発現法を用いたシナプス動態解析, 第25回日本神経科学会, 東京, 平成14年7月7-9日.
 30. Fujiwara, Y. and Kubo, Y., Ser165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to blockade by intracellular Mg^{2+} , Gordon Research Conference “Ion Channels”, New Hampshire, USA, 2002.7.17.
 31. Masugi Tokita M (生理学研究所), Tarusawa E (生理学研究所), Fujimoto K (福井県立大学), Shigemoto R (生理学研究所). Quantitative analysis of glutamate receptors at parallel fiber-Purkinje cell synapses using SDS-FRL. 第30回生理研国際シンポジウム, 岡崎, 平成15年3月13日.
 32. 三坂巧, 久保義弘. 高分子量Gタンパク質mOPA1の遺伝性視神経萎縮症においてみられる疾患変異体の機能解析. 第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月24日.
 33. 初山明子 (生理学研究所), 納富拓也 (生理学研究所), 重本隆一 (生理学研究所). Rebound firing triggered by inhibitory synaptic inputs and HCNchannel activation in rat spinothalamic tract neurons. 第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月25日.
 34. 藤原祐一郎, 久保義弘. $P2X_2$ 受容体のポアの性質は発現密度に依存して変化する. 第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月26日.

35. 中條浩, 久保義弘. ムスカリン受容体刺激によるKCNQチャンネル調節の構造基盤. 第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月26日.
36. 藤原祐一郎, 久保義弘. Ki2.1 チャンネルのポア内側壁の電荷を持つアミノ酸の機能的意義. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月23日.
37. 立山充, 阿部秀樹, 久保義弘. 代謝型グルタミン酸受容体のガドリニウム結合部位の機能解析. 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月24日.
38. 馬杉(時田)美和子(生理学研究所), 足澤悦子(生理学研究所), 藤本和(福井県立大学), 重本隆一(生理学研究所). “Quantitative analysis of AMPA receptors in the cerebellum using SDS-FRL”. 第26回日本神経科学会, 名古屋, 平成15年7月23日-25日.
39. Yue Wu(生理学研究所), Ryuichi Shigemoto(生理学研究所). “Asymmetrical distribution of NMDA receptor ϵ 2 subunit in hippocampal Schaffer-CA1 pyramidal cell synapses in ϵ 1 knock-out mouse”. 第26回日本神経科学会, 名古屋, 平成15年7月23日-25日.
40. 萩原明(生理学研究所), 深沢有吾(生理学研究所), 重本隆一(生理学研究所). “Differential distribution of CAZ and SNARE proteins visualized by immunogold labeling”. 第26回日本神経科学会, 名古屋, 平成15年7月23日-25日.
41. 栗生俊彦, 川端いづみ, 漆戸智恵, 岡部繁男. 海馬興奮性シナプスにおける活動依存的なPSD-Zip45の動態. 第26回日本神経科学会, 平成15年7月23日-25日.
42. 三坂巧, 久保義弘. 高分子量GTP結合蛋白質mOPA1によるミトコンドリア形態の変化. 第

26回日本神経科学大会, 名古屋, 平成15年7月25日.

43. 立山充博, 阿部秀樹, 久保義弘. FRET法による代謝型グルタミン酸受容体の動的構造変化の解析. 第81回日本生理学会大会, 札幌, 平成16年6月2日.
44. 三坂巧, 久保義弘. ミトコンドリア断片化に関わる高分子量Gタンパク質mOPA1のホモ多量体形成の解析. 第81回日本生理学会大会, 札幌, 平成16年6月2日.
45. 中條浩一, 久保義弘. KCNQ2では起こるがKCNQ1では起こらないPKCを介したコンダクタンス-電圧関係のシフト. 第81回日本生理学会大会, 札幌, 平成16年6月2日.
46. 藤原祐一郎, 久保義弘. 内向き整流性K⁺チャンネル (Kir2.1) のポア内面の電荷を帯びたアミノ酸残基の機能的意義. 第81回日本生理学会大会, 札幌, 平成16年6月2日.
47. 長友克広, 伊藤政之, 久保義弘, 齋藤修. メダカ由来RGSタンパクの機能解析. 第81回日本生理学会大会, 北海道, 平成16年6月2日.
48. 昀山俊彦 (生理学研究所). 神経上皮細胞移植による線条体シナプス再構築. 第81回日本生理学会大会, 札幌, 平成16年6月3日.
49. Yuichiro Fujiwara and Yoshihiro Kubo, Density Dependent Changes of the Pore Properties of P2X₂ Receptor Channel, 2004 Gordon Research Conferences “Ion Channels”, Tilton School Tilton, NH, July 11-16, 2004.
50. 王文 (生理学研究所). 水平性視機性眼球反応の過程に伴う小脳片葉の平行線維-ブルキンエ細胞シナプスにおけるAMPA受容体の減少. 16th International Congress of the IFAA Anatomical Science 2004 From Gene to Body, 京都, 平成16年8月22-27日.

51. 萩原明 (生理学研究所). レプリカ標識法を用いた海馬CA3領域におけるシナプス前終末上での active zone の同定. 16th International Congress of the IFAA Anatomical Science 2004 From Gene to Body, 京都, 平成16年8月22-27日.
52. 梅田達也, 海老原達彦, 岡部繁男. Morphological changes of tightly associated presynaptic varicosities and postsynaptic spines: visualization of CA3-CA1 synapses in hippocampal slice cultures, 16th International Congress of the IFAA “Anatomical Science 2004 From Gene to Body, Kyoto, August 22-27, 2004.
53. 立山充博, 阿部秀樹, 中田康裕, 斉藤修, 久保義弘. リガンド結合による代謝型グルタミン酸受容体の二量体構造変化. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会 合同大会, 平成16年9月21日.
54. 久保義弘, 山本友美, 三尾和弘, 佐藤主税. バキューロウイルス発現系を用いたATP 受容体 P2X₂ 蛋白の精製. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会 合同大会, 大阪, 平成16年9月22日.
55. 深澤有吾 (生理学研究所). 凍結切断レプリカ標識法による海馬歯状回 LTP 誘導後の AMPA 型グルタミン酸受容体の定量的解析. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会合同大会, 大阪, 平成16年9月21-23日.
56. 田中淳一 (生理学研究所). 幼若ラット小脳プルキンエ細胞単一シナプスにおけるAMPA 受容体数および密度の推定. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学学会大会 合同大会, 大阪, 平成16年9月21-23日.
57. 梅田達也, 海老原達彦, 岡部繁男. 機械的に強く接着したシナプス前部構造と後部構造の速い形態変化. 第27回日本神経科学大会, 第47回日本神経化学学会大会・合同大会,

大阪, 平成16年9月21-23日.

58. 萩原明 (生理学研究所). 凍結切断レプリカ免疫標識法による神経伝達物質放出関連蛋白質の異なる分布様式に関する解析. 「脳を知る」「脳を守る」「脳を創る」合同シンポジウム, 東京都, 平成16年10月7日.
59. 深澤有吾 (生理学研究所). 凍結切断レプリカ免疫標識法による海馬歯状回LTP誘導後のAMPA型グルタミン酸受容体の定量的解析. 「脳を知る」「脳を守る」「脳を創る」合同シンポジウム, 東京都, 平成16年10月7日.
60. 篠原良章 (生理学研究所). マウス海馬におけるNMDA受容体のサブユニット依存的左右非対称性局在. *Neuroscience 2004*, サンディエゴ, 平成16年10月24日.
61. 萩原明 (生理学研究所). レプリカ標識法を用いた海馬CA3領域におけるt-SNAREタンパク質の分布解析. *Neuroscience 2004*, サンディエゴ, 平成16年10月24日.
62. 重本隆一 (生理学研究所). 小脳運動学習に伴う平行線維プルキンエ細胞シナプスのAMPA受容体の減少. *Neuroscience 2004*, サンディエゴ, 平成16年10月24日.

③プレス発表

- 1) 小脳失調の原因抗体発見 岡崎共同研究機構
2000年3月11日、朝日新聞 (朝刊13面)
運動障害の原因解明 小脳に抗体たまる
2000年3月11日、日本経済新聞 (朝刊11面)
運動妨げる抗体発見 小脳の働きなくす
2000年3月11日、中日新聞 (朝刊11面)
歩行障害の原因抗体 重本教授らが発見

2000年3月12日、東海愛知新聞（朝刊3面）

2) 左脳 神経細胞に差 右脳 たんぱくの分布を分析

2003年5月9日、朝日新聞（朝刊1面トップ）

3) 細胞内で配置転換「記憶」握る代謝型グルタミン酸受容体シグナル伝達時に。

2004年6月7日、日刊工業新聞（21面）

代謝型グルタミン酸受容体1型シグナル伝達機構解明

2004年6月18日掲載、科学新聞（7面）

(3) 特許出願（国内0件、海外0件）

①国内

②海外

(4) 新聞報道等

①新聞報道 プレス発表以外に特になし

②受賞 なし

③その他

(5) その他特記事項

特になし

7. 結び

本事業は、機能分子の動態と神経伝達調節メカニズムという、極めて広い戦略目標を掲げて5年間の研究を行った。研究の目標から見た達成度としては100%満足できるものではなかったが、戦略的な研究の進め方が独自の方法論と研究成果を生み出す結

果となり、予想外の発見にも恵まれ今後の展開も楽しみな点が多い事から、何とか合格点はつけられるものと自己評価している。願わくばあと1年程度、全体的な研究の進展が早ければもっとよかっただろうというのが率直な感想である。3つのグループはそれぞれの未発表データを最低半年に1回、詳しく議論する機会をもち、相互に刺激を与えると同時に、技術的な面で多くの協力を行ってきた。例えば蛍光標識を用いた *in vitro* での動態観察と電子顕微鏡を用いた *in vivo* の動態観察はお互いを補い合うものとして、比較検討する価値が大きい。分子数や密度の計測も蛍光標識、金標識の両方を用いて同じ標本を解析することでその信頼性は飛躍的に増大する。論文として共同研究が発表されている例はまだ少ないが、現在までに構築された信頼関係と各グループの若い研究者同士の交流はこれから長い将来に渡って極めて大きな意味を持ってくるであろうことを確信している。今後さらに新たな目標の達成に向けて協力を継続することで3つのグループは完全に合意している。研究の途上で藤本和氏が急死したことは何にも換えがたい損失であったが、研究の発展に伴い新たな共同研究者が我々の共同研究グループに加わってきており、旧CRESTチームを核とする研究者ネットワークはサポートして頂いた研究資源に勝るとも劣らない貴重なリソースとして今後とも大きな意義を有すると考えている。

得られた成果の科学技術や社会への貢献・波及効果については、我々のチームでは代謝調節型グルタミン酸受容体の活性化が小脳機能に必須でありこれを阻害する自己抗体を持つ患者さんから、この抗体を取り除くことで小脳失調が回復することを発表している。しかしながらこのような例は大変例外的であり、その他の研究成果が近い将来に我々の研究成果が社会還元されることは考えにくい。しかし、脳内の受容体やイオンチャネルの機能異常が多く神経疾患の原因になっており、それらの動態やその異常もいくつかの神経疾患に関係している可能性は大いにあると考えている。少なくとも将来、遺伝性神経疾患の理解や神経再生を用いた治療戦略の構築のために、我々のデータが有用な基礎情報となることは十分あり得ることである。また記憶や学習の脳内機構といった点については、一般の国民にも広く関心を呼ぶ話題であり、「脳を知る」というこの事業の本来の目的を満たす形で社会還元につながっていけば、大変光栄なことではない

かと考えている。

CRESTの研究資金制度のあり方で特筆されることは、研究の進展に伴って緊急に生じる必要性に非常に柔軟な対応が可能となっていることである。これは多額の資金を必要とする大型設備の導入のみならず、特に優れた若い研究者や高い技術を持ったテクニカルスタッフを臨機応変に雇用できる点に最も有用性を感じた。この柔軟性は研究事務所の存在によるところが大きいと考えられ、研究統括をはじめ研究事務所のスタッフの皆様には本当に感謝している。非常にありがたいことにSORSTとなってこの研究チームは引き続き科学技術振興機構のサポートを受けることができたことになったが、研究事務所の役割が低下していることに一定の危惧を覚えている。これも時代の要請かもしれないが、今後は法人化された大学や研究所の自助努力がより重要となってくるようである。またもう一つの観点として、審査や評価を行っていただいている多くの先輩研究者から、定期的にかなり率直なご批判や評価をいただけたことも科研費など他の研究資金制度に比べての利点であると考えられる。一流の研究者からの批判は非常に貴重な助言となりうる。単に論文のリストのみによって業績を判断するのではなく、研究内容について突っ込んだ議論を行って頂けたことは、その後の研究の進め方を考える上で極めて有用であった。チーム型研究のあり方については、単なる研究費のバラマキといったことではなく、学問的に大変優れた研究者であり且つ率直に批判し合える共同研究者と深いつながりを持てたことは本当に有意義なことであった。このような関係から真に意味のある対等な共同研究の長期的な発展が望めると確信している。

最後にこのような恵まれた条件を与えて頂いた研究事務所および科学技術振興機構の皆様には深く感謝いたします。また今後とも本プロジェクトの成果がさらに花開くよう一層の努力を続ける所存です。