

研究終了報告書

研究課題「脳ダイナミックスの分子機構」

研究期間：平成14年3月1日～
平成19年3月31日

三品 昌美
(東京大学大学院医学系研究科・教授)

1. 研究実施の概要

脳は、構造が機能を生み、機能が構造に影響を及ぼすハードとソフトが渾然一体となったシステムであり、脳の構造と機能とのダイナミックな関係を明らかにすることが脳を理解するために必須である。本研究の目的は、「均一な C57BL/6 マウスの遺伝的背景における部位時期特異的標的遺伝子組換え法」および「ゼブラフィッシュ神経回路特異的分子操作法」を発展展開することにより、中枢神経回路網のダイナミックな構造変換原理を実体としての脳を基盤に解明し、シナプスのダイナミックな機能的構造的変化が脳高次機能に果たす役割を解析することである。

分子生物学は生命科学発展の大きな原動力となり、脳科学においても遺伝子ノックアウト法の適用により記憶・学習をはじめとする脳高次機能を分子レベルから探求することを可能にした。標的遺伝子組換え法の有効性はいくまでもないが、従来の方法には様々な限界がある。従来法では、ノックアウトマウスを脳高次機能の能力が低い 129 系マウスに由来する胚幹細胞を用いて作成し、学習能力の高い C57BL/6 系マウスと掛け合わせた後に脳機能を解析している。多数の遺伝子が階層を通じて関与する脳高次機能を不均一な遺伝的背景下で解析することの問題点が指摘されて久しい。本研究において、学習能力の高い C57BL/6 マウスの均一な遺伝的背景、Cre 組換え酵素を用いる部位特異的遺伝子組換え、誘導可能な CrePR 組換え酵素を用いる時期特異的遺伝子組換え、Flp 組換え酵素を用いる標的遺伝子からの薬剤マーカの除去、これらの全てを満足させる完成度の高い部位時期特異的遺伝子組換え法を中枢において開発することに成功した。この過程において、新たに C57BL/6N 由来 ES 細胞株「RENKA」を樹立するとともに、この細胞株を用いて効率的に生殖系列遺伝するキメラマウスを作成する方法を確立して特許を出願した。C57BL/6 ES 細胞を用いたマウス作成システムの効率化を進め、35 系統以上の生殖系列遺伝するキメラマウスを作成するに至った。同時に、C57BL/6 マウスの遺伝的背景を有する脳部位特異的標的遺伝子組換えに必要な線条体特異的 Cre マウス、海馬 CA3 領域特異的 Cre マウス、小脳プルキニエ細胞特異的 Cre および CrePR マウス、小脳顆粒細胞特異的 CrePR マウス系統を樹立した。

NMDA 型グルタミン酸受容体 GluR1 欠損マウスと小脳プルキニエ細胞特異的グルタミン酸受容体 GluR2 欠損マウスとを用いて音による瞬目反射条件付け学習を解析し、タイミングが同じ Delay パラダイムでは GluR2/小脳が、時間差があるタイミングの Trace パラダイムでは GluR1/海馬が必要となることを示

した。すなわち、条件刺激と無条件刺激とのタイミングに応じて脳内のシステムが使い分けられていることを明らかにした。また、NMDA 型グルタミン酸受容体 GluR1 欠損マウスではモルヒネ耐性と依存が著しく減弱することを見出し、GluR1 遺伝子を脳部位特異的に導入することにより中脳水道灰白質と腹側被蓋野の GluR1 がモルヒネ耐性に、側坐核の GluR1 がモルヒネ依存の形成にそれぞれ主要な役割を担っていることを示した。

さらに、C57BL/6 系マウス由来の胚幹細胞と Cre 組換え酵素を用いる純系脳部位時期特異的標的遺伝子組換え法を展開することにより、線条体特異的に NMDA 受容体を欠損したマウス、海馬 CA3 領域特異的に NMDA 受容体 GluR1 あるいは GluR2 を欠損したマウス、海馬 CA3 領域特異的に細胞接着分子 β カテニンを欠損したマウス、海馬 CA3 領域特異的に TrkB 受容体を欠損したマウス、成熟脳で誘導的に小脳プルキニエ細胞特異的に GluR2 を欠損したマウスを得ることに成功している。興奮性シナプス伝達とその強化を担うと考えられている NMDA 受容体を海馬 CA3 領域特異的に欠損したマウスは、予想に反しカイニン酸誘発痙攣発作の閾値が低下していることを見出した。さらに、GluR2 遺伝子に loxP を導入した標的マウスを作成し、小脳プルキニエ細胞特異的に誘導型 CrePR リコンビナーゼを発現するマウスと掛け合わせ、成熟期特異的かつ小脳プルキニエ細胞特異的に GluR2 を欠損するマウスを作成した。形態学的解析により、完成した小脳シナプスから GluR2 を除去すると、シナプス前部と後部の不整合が引き起こされ、更にはシナプス結合の切断が引き起こされることを見出した。すなわち、小脳シナプス可塑性、運動学習に中心的な役割を担っている GluR2 が成熟脳においてシナプス結合も制御していることが示された。

一方、NMDA 受容体 GluR2 を海馬 CA3 領域で選択的に欠失したマウスの解析から、NMDA 受容体の機能発現には GluR2 サブユニットが必須であることを明らかにした。また、NMDA 型受容体がシナプスへの移行と GluR1 サブユニットの安定性には GluR2 サブユニットの存在が必須であることを小脳顆粒細胞において明らかにした。さらに、欠損マウスの解析から、Transmembrane AMPA receptor regulatory protein (TARP) γ -8 が海馬において AMPA 受容体の発現量と活性を調節していることを示した。AMPA 型グルタミン酸受容体を細胞膜やシナプス active zone に集積させる分子として報告されていたカルシウムチャネル γ -2 サブユニット (stargazin) が、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1 および GluR2 サブユニットのチャネル活性を著しく亢進させるばかりでなく、アロステリックな効果を持ちチャネル特性を変化させることを見いだした。脳に発現している stargazin ファミリー γ -2、 γ -3、 γ -4、 γ -5、 γ -7、 γ -8 の標的マウスを作成した。海

馬に多く発現する γ -8 を欠損したマウスでは、AMPA 型受容体が著しく減少しシナプス電流応答も減少していた。

平行して、脳神経系の発達の解析が容易な脊椎動物ゼブラフィッシュを用いて、シナプス形成機能解析系の開発に取り組んだ。ゼブラフィッシュの神経回路特異的遺伝子操作法を開発し、PKA シグナルの変化が嗅神経細胞の軸索誘導に与える影響を観察した結果、PKA シグナルのスイッチは長距離軸索誘導時に誘導分子に対する感受性を調節することを示唆した。さらに、網膜視蓋投射系において、シナプス前部の GSK-3 β 活性の抑制は、軸索分枝が広がり続けるのを抑制し、軸索終末の成熟を促進することを明らかにした。また、我々が開発した DNA 架橋剤 TMP を用いる高効率ゼブラフィッシュ変異体単離法で得た変異株から原因遺伝子をクローニングする方法として Representational difference analysis による全ゲノム間サブトラクション法を適用することに成功し、視蓋形成不全変異体 ntn から原因遺伝子としてシャペロニン CCT γ を同定した。網膜視蓋投射の形成に CCT γ が重要であることを示した。一方、メダカ由来のトランスポゾン *To12* がゼブラフィッシュにおいても活性を持ちうることに着目し、*To12* 遺伝子を改変したベクターを作製した。トランスポゾン活性を除いた *To12* nonautonomous element と外来遺伝子を組み込んだ *To12* ベクターと *To12* mRNA を同時に微量注入した受精卵では、外来遺伝子は *To12* 蛋白のトランスポゾン活性によりゼブラフィッシュゲノムに挿入され、約 50% の効率で founder を得ることができた。組換え効率が高い本法は、ゼブラフィッシュにおけるトランスジェニック系統を作成する有効な手法として世界で広く使われるようになった。さらに、嗅覚系の神経回路を嗅神経に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用いた発現ベクターを構築し、ゼブラフィッシュ個体に導入することによりこれらの神経回路網を特異的に可視化すると同時に分子操作することに成功した。恒常不活性型 A キナーゼはシナプス形成時期において VAMP2-EGFP の軸索終末への集積を阻害した。さらに A キナーゼによって調節されることが知られている転写因子 CREB の恒常不活性型を発現させても同様に VAMP2-EGFP の集積が阻害された。一方、軸索終末の形態を GAP43-EGFP 融合タンパク質を用いて可視化すると、軸索伸長期及び、嗅球内の標的近傍でシナプス形成が始まった直後の時期には多くの突起を出した複雑な形態を示すが、シナプス形成が進み、糸球体構造が明確に形成される時期には突起の少ない簡単な構造へと変化することがわかった。カルシニューリン阻害薬であるサイクロスポリン A はシナプス形成時期におこる軸索終末の形態変化を妨げた。さらにカルシニューリンの標的として知られる転写因子 NFAT のカルシニューリンによる活性化を阻害しても、この形態変化が抑え

られた。従って、軸索終末へのシナプス小胞の集積はAキナーゼ/CREBシグナルによって調節され、一方、軸索終末分化に伴う形態変化はカルシニューリン/NFATシグナルによって別々に制御されることが明らかとなった。

部位特異的グルタミン酸受容体欠損 C57BL/6 純系マウスに基づく本研究は、従来のノックアウト法の限界を打ち破り、脳高次機能のシステム制御機構に迫ることを可能にし、脳科学の多次元の分野を融合して統合的脳研究を推進する原動力になる。遺伝的背景が脳高次機能に大きく影響することから、均一遺伝背景下で可塑性分子と脳高次機能の関係を特定の脳システムにおいて解析する本研究は重要性と独創性が高く、世界標準となるべき成果を提供することになる。また、NMDA受容体と複合体を構成するPSD蛋白やシナプス間相互作用分子など中枢シナプスを構成する分子群の解明ならびに神経精神疾患の原因遺伝子あるいは危険因子の解明は著しく進展しており、多くの候補分子の実体は明らかとなっている。しかしながら、生体内における適切な機能解析系がないために、これらの分子が神経情報の入力からシナプス再編に至る過程で如何なる役割を果たすのかは、不明なままに止まっている。我々が開発したゼブラフィッシュ神経回路特異的分子操作法は、多くの候補分子の生体内における機能を系統的に解析できる系として威力を発揮すると考えられる。

2. 研究構想

脳の特徴は、ハードがあり、ソフトが外から与えられるコンピューターと異なり、構造が機能を生み、機能が構造に影響を及ぼすハードとソフトが渾然一体となったシステムであることにある。このような脳の構造と機能のダイナミクスが、臨界期に代表される遺伝子プログラミングと環境との相互作用に基づく脳の機能発達や成熟した脳が新たな情報を記憶・学習する基本的なメカニズムと考えられる。記憶障害などの脳の機能障害や脳の発達障害などの克服には創薬の標的となる機能分子の解明が必須である。同時に、ヒトをヒトたらしめている脳を理解し、脳から心へ、心からヒトへ、ヒトから社会への人間統合科学への足場を築くものである。すなわち、脳の構造と機能とのダイナミックな関係を明らかにすることが脳研究の重要課題である。このためには、中枢神経回路網のダイナミックな構造変換原理を実体としての脳を基盤に解明することが必要不可欠である。

脳神経系の分子生物学は、神経情報の伝達を担う神経伝達物質受容体やイオンチャネルの分子実態解明とこれらの分子が脳高次機能に果たす役割の解明により、脳科学の大きな進展をもたらした。これらの分野における我が国の貢献は著

しい。これらの成果により、NMDA 受容体、キナーゼ、転写因子が記憶形成に関与する鍵分子であることが明らかとなってきた。しかしながら、これらの分子群から記憶形成にいたる機構は依然として不明であり、神経回路網改変の分子機構は大きな謎のままである。一方、NMDA 受容体と複合体を構成する PSD 蛋白やシナプス間相互作用分子など中枢シナプスを構成する分子群の解明は著しく進展した。これらの分子が神経情報の入力からシナプス再編に至る過程で如何なる役割を果たすのかを解析することが、シナプスのダイナミクスを探索する有力なアプローチの一つである。しかしながら、この方面の研究は適切な機能解析系の開発が不十分なため遅々として進んでいない。

本研究の目的は、「均一な C57BL/6 マウスの遺伝的背景における部位時期特異的標的遺伝子組換え法」および「ゼブラフィッシュ神経回路特異的分子操作法」を発展展開させることにより、中枢シナプス形成の制御機構を明らかにし、シナプス再編が脳高次機能に果たす役割を解析することである。

本研究費の支援により、キメラマウス形成効率の高い C57BL/6 由来 ES 細胞株を樹立することにより、学習能力の高い C57BL/6 マウスの均一な遺伝的背景の下に、線条体、海馬あるいは小脳特異的な Cre マウスならびに誘導可能な CrePR マウスを作成することに成功した。さらに、NMDA 受容体、グルタミン酸受容体 GluR2、栄養因子受容体 TrkB など多数の標的マウスと標的遺伝子からの薬剤マーカーを除去するための Flp マウスも作成し、完成度の高い部位時期特異的遺伝子組換え法を中枢において開発した。部位特異的標的遺伝子組換え C57BL/6 純系マウスに基づく研究は、従来のノックアウト法の限界を打ち破り、脳高次機能のシステム制御機構に迫ることを可能にし、脳科学の多次元の分野を融合して統合的脳研究を推進する原動力になる。遺伝的背景が脳高次機能に大きく影響することから、均一遺伝背景下で可塑性分子と脳高次機能の関係を特定の脳システムにおいて解析する本研究は重要性和独創性が高く、世界標準となるべき成果を提供することになることが期待される。また、ゼブラフィッシュにおいてシナプス形成を生体内で可視化しながら神経回路特異的に分子操作する方法を打ち立てることに成功した。NMDA 受容体と複合体を構成する PSD 蛋白やシナプス間相互作用分子など中枢シナプスを構成する分子群の解明ならびに神経精神疾患の原因遺伝子あるいは危険因子の解明は著しく進展しており、本手法は、これらの分子が神経情報の入力からシナプス再編に至る過程で如何なる役割を果たすのかを解析できる有用な機能解析系となることが期待される。

3. 研究内容

3. 1 “シナプス可塑性分子が担う脳機能の解明（三品グループ）”

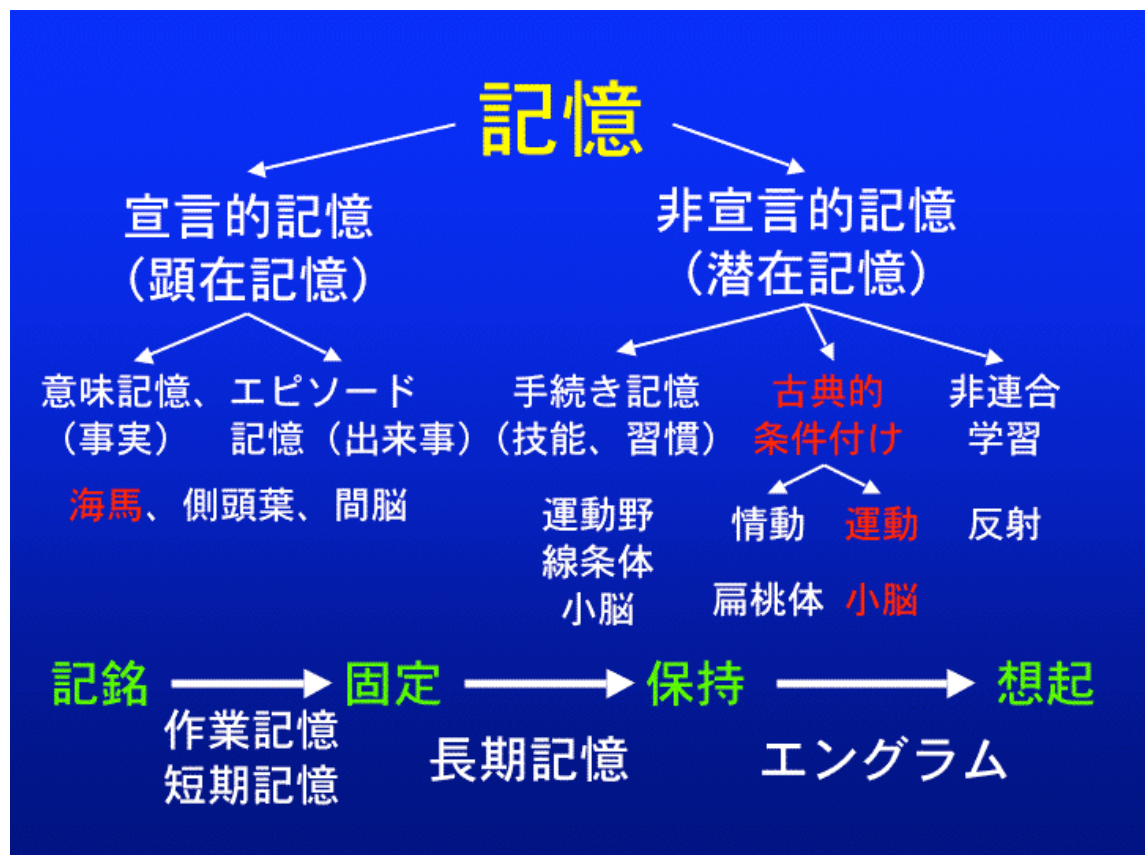
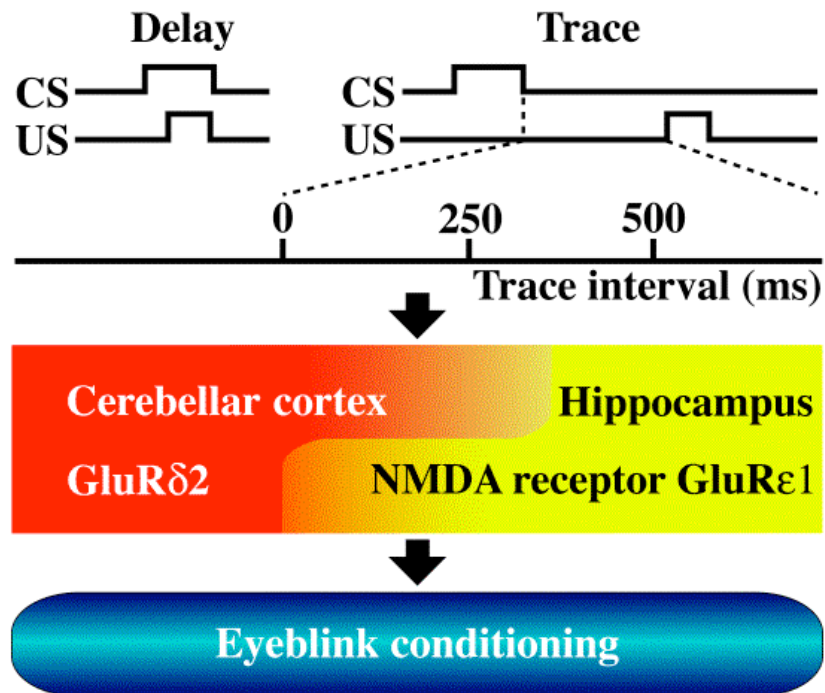
(1)実施の内容

“瞬目反射の条件付け学習は、条件刺激と無条件刺激とのタイミングに応じて脳内のシステムが使い分けられている”

グルタミン酸受容体 GluRδ2 欠損マウスでは 10Hz のリズムを有する不随意運動が認められ、それが運動失調の一因になっていると考えられる。GluRδ2 欠損マウス小脳プルキンエ細胞の活動を記録したところ、10Hz のリズムを有する野生型マウスとは異なる活動電位発火パターンが記録され、それが不随意運動の原因になっていると推定された。GluRδ2 欠損マウスにおいてはプルキンエ細胞に対する下オリーブ核ニューロンからの登上線維入力の影響が増大していた。下オリーブ核ニューロンは元来 10Hz の自発性リズムを持っており、GluRδ2 欠損マウスにおいては、登上線維のプルキンエ細胞への多重支配や平行線維入力の減少さらには学習障害により登上線維が伝える誤差信号が増加することにより、プルキンエ細胞活動に対する登上線維の影響が増加して、プルキンエ細胞活動に 10Hz のリズムが生じるようになったと推測される。

小脳プルキンエ細胞に特異的に発現しているグルタミン酸受容体 GluRδ2 は小脳可塑性に必須である。GluRδ2 欠損マウスの運動学習能力を瞬目反射と音との連合学習で解析したところ、条件刺激と無条件刺激とを同じタイミングで与える delay パラダイムにおいて著しく障害されていたが、条件刺激と無条件刺激との間に 500m秒の時間間隔を設ける trace パラダイムでは正常な学習を示すことを見出した。逆に、NMDA 型グルタミン酸受容体 GluRε1 欠損マウスは delay パラダイムをほぼ正常に学習したが、条件刺激と無条件刺激とを 500m秒の時間間隔で与える trace パラダイムで障害を示すことを示した。さらに、グルタミン酸受容体 GluRδ2 欠損マウスでは、trace の時間間隔が無い場合（0 trace 課題）でも正常であった。この 0 trace 課題の学習獲得は、野生型マウスでは海馬破壊で影響されなかったが、GluRδ2 欠損マウスでは海馬背側の破壊により学習獲得が阻害された。これらの結果から、小脳 LTD が障害された場合には、瞬目反射条件付け学習の獲得において海馬機能が優位になると考えられる。したがって、瞬目反射の条件付け学習において条件刺激と無条件刺激とのタイミングに応じて脳内のシステムが使い分けられていることを明らかにした。

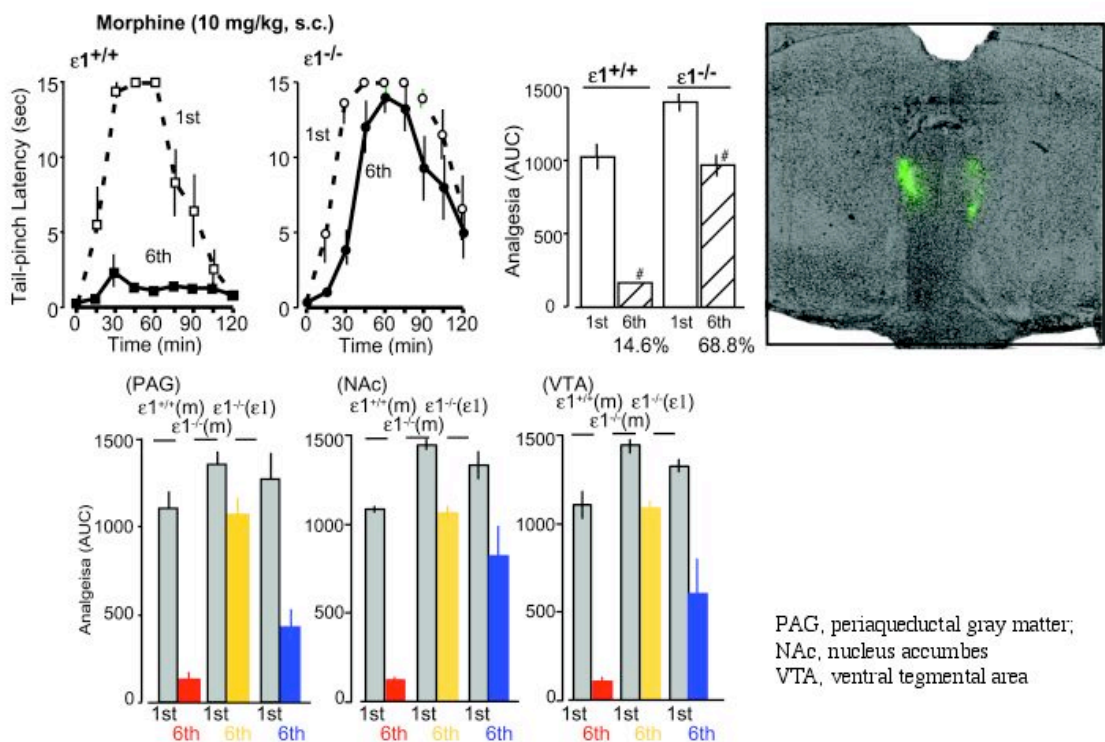
Timing Determines Neural Substrates for Eyeblink Conditioning



“NMDA 受容体はモルヒネ耐性と依存を異なる脳部位で制御する”

モルヒネに対する耐性と依存は脳の可塑的变化により引き起こされると考えられている。モルヒネの慢性投与により耐性を生じた C57BL/6 マウスでは、中脳水道灰白質、腹側被蓋野および側坐核において NMDA 受容体 GluR ϵ 1 蛋白が著しく増加することを見出した。さらに、NMDA 受容体 GluR ϵ 1 欠損マウスではモルヒネ耐性が著しく減弱することを明らかにした。ついで、GluR ϵ 1 欠損マウスの中脳水道灰白質、腹側被蓋野あるいは側坐核特異的に GluR ϵ 1 遺伝子をエレクトロポレーション法により導入し、発現させることに成功した。GluR ϵ 1 欠損マウスの中脳水道灰白質および腹側被蓋野特異的に GluR ϵ 1 遺伝子を導入することにより、モルヒネ耐性が回復した。中脳水道灰白質および腹側被蓋野の NMDA 受容体 GluR ϵ 1 がモルヒネに対する耐性の形成に重要であることを明らかにした。

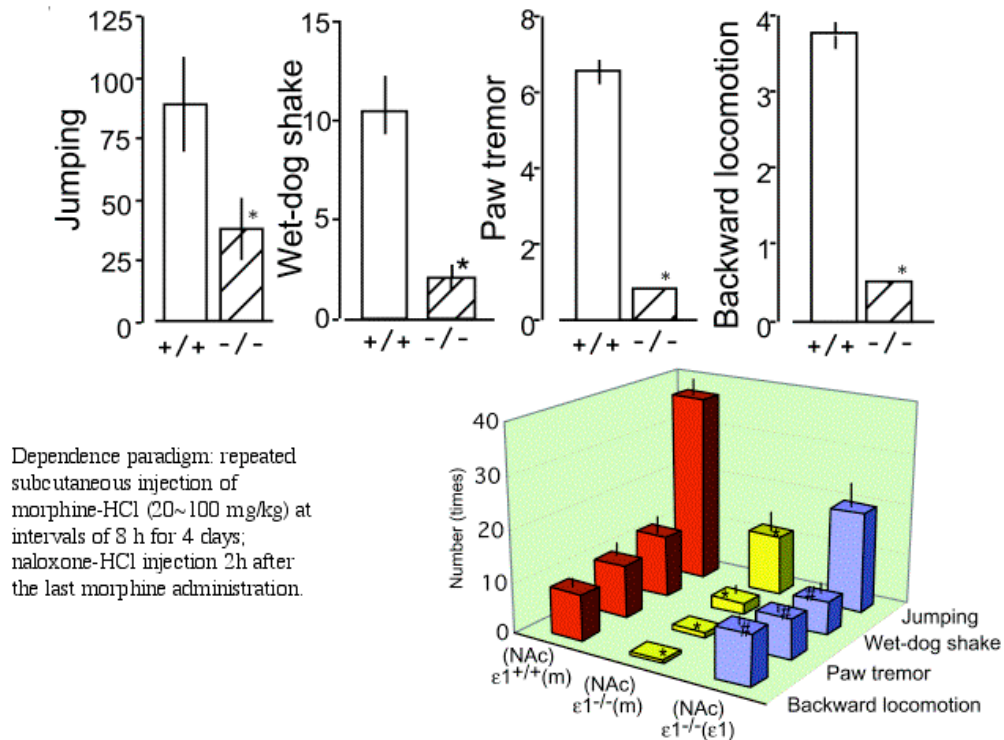
Attenuation of morphine tolerance in GluR ϵ 1 KO mice



同様に、モルヒネ依存を生じた C57BL/6 マウスでは、側坐核において NMDA 受容体 GluR ϵ 1 蛋白が著しく増加することを見出した。さらに、NMDA 受容体 GluR ϵ 1 欠損マウスではモルヒネ依存が著しく減弱することを明らかにした。ついで、GluR ϵ 1 欠損マウスの側坐核特異的に GluR ϵ 1 遺伝子をエレクトロポレーション法により導入し、モルヒネ依存の形成に側坐核の NMDA 受容体 GluR ϵ 1 が重要で

あることを示した。

Attenuated morphine dependence in GluR ϵ 1 mutant mice

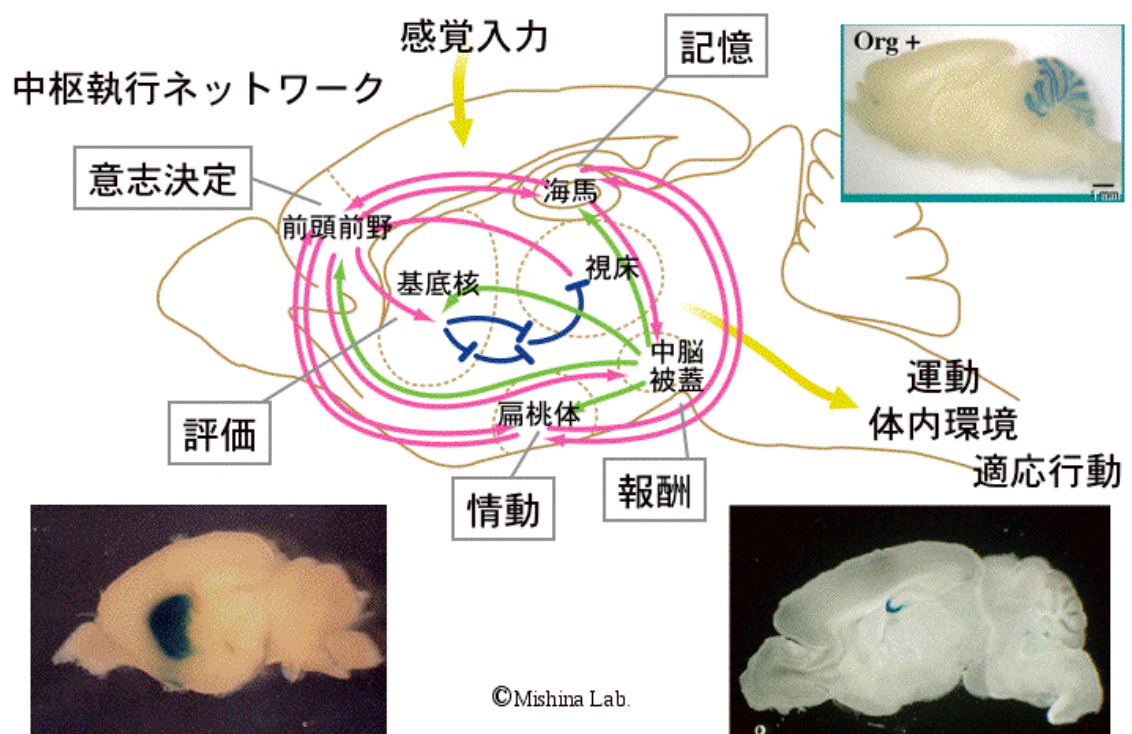


“均一な C57BL/6マウスの遺伝的背景における脳部位時期特異的標的遺伝子組換え法の開発”

C57BL/6 系統由来の ES 細胞を用いて、NMDA 型グルタミン酸受容体 GluR ϵ 1 遺伝子、グルタミン酸受容体 GluR δ 2、神経栄養因子受容体 TrkB 遺伝子に loxP を導入した標的マウスを作成した。同時に、海馬 CA3 領域あるいは線条体特異的遺伝子のプロモーター下に Cre を組み込んだマウスを作成した。これらの標的マウスと Cre マウスを掛け合わせ、線条体特異的に NMDA 受容体を欠損するマウス、海馬 CA3 領域特異的に NMDA 受容体あるいは TrkB 受容体を欠損するマウス、さらには成熟脳において小脳プルキニエ細胞特異的に GluR δ 2 欠損を誘導できるマウスを得ることに成功した。

核移行シグナルを付加した酵母由来の組換え酵素 F1p 発現ベクターを C57BL/6 系統由来の受精卵に導入し、精巣に置いて F1p mRNA の発現を示すトランスジェニックマウス系統を得た。薬剤耐性遺伝子の両端に F1p の認識配列 frt を組み込んだマウスを組換え酵素活性測定のリポーターマウスとして用い、FLP66 系統は高効率で F1p 依存的な組換えを引き起こすことを見出した。したが

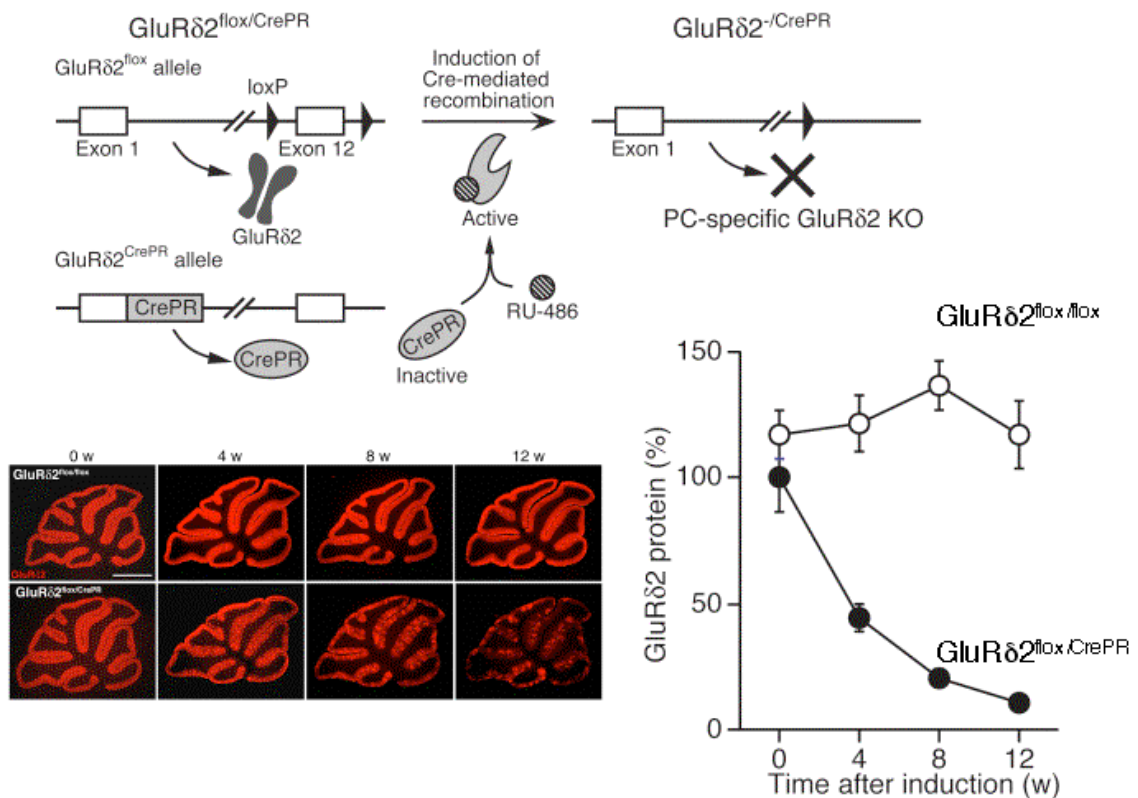
って Flp はマウス個体において効率よく機能することが示唆され、マウス個体の遺伝子操作法を拡張することが期待される。Cre/loxP システムによる部位時期特異的遺伝子ノックアウト法では標的遺伝子に loxP 配列を導入するが、相同組換え ES 細胞の選択に用いた薬剤耐性遺伝子を取り除く必要がある。FLP66 マウスを組み合わせれば、loxP 配列導入標的遺伝子マウスから薬剤耐性遺伝子を容易に取り除くことが出来る。すなわち、Cre/loxP システムによる部位時期特異的遺伝子ノックアウト法の確立に Flp66 マウスが重要な役割を果たすと期待される。

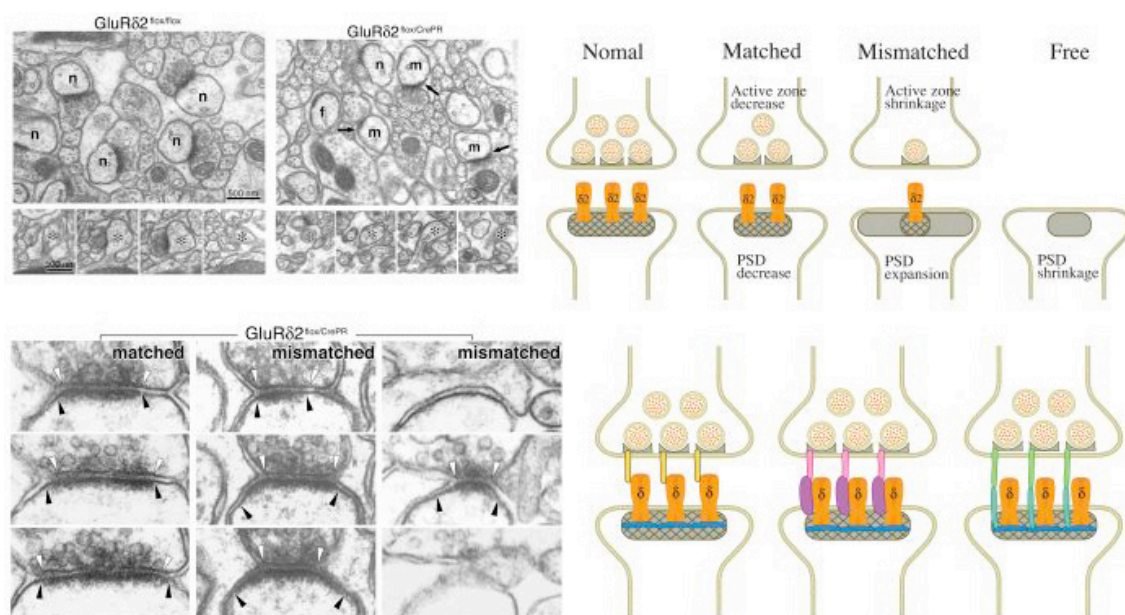


“グルタミン酸受容体 GluR82 は成体小脳のシナプス結合に必須である”

完成した脳においてシナプスの構造変化が記憶・学習などの脳高次機能や薬物依存などの脳病態の基盤になっていると考えられているが、その機構に関する直接的な知見は乏しい。我々は、グルタミン酸受容体 GluR82 遺伝子に loxP を導入した標的マウスを作成し、小脳プルキニエ細胞特異的に誘導型 CrePR リコンビナーゼを発現するマウスと掛け合わせた。プロゲステロン受容体のアンタゴニストを投与することにより、成熟期において小脳プルキニエ細胞特異的に GluR82 を欠損させることに成功した。免疫電顕による解析から、成熟小脳でシナプス後部の GluR82 の減少に伴い、平行線維-プルキニエ細胞シナプスにおいてシナプス前部のアクティブゾーンが縮退し、さらに GluR82 の消失はシナプス

結合の切断をもたらした。これらの結果は、シナプス後部に局在する GluRδ2 がシナプスを越えてシナプス前部のアクティブゾーンの大きさを制御し、シナプス結合に必須の分子であることが明確となった。また、GluRδ2 の減少に伴いシナプス後部の PSD が縮小するが、さらに GluRδ2 が低下すると膨張する構造変化が引き起こされ、シナプス前部と後部の不一致が生じることを見いだした。シナプス前部と後部の不一致が生じたシナプスにおいては、GluRδ2 と PSD93 は結合部に見出されるのに対し、AMPA 受容体は結合部と非結合部にともに分布していた。したがって、GluRδ2 はシナプス後部蛋白の構成も制御していることが示された。これらの結果は、成体小脳のシナプス結合に GluRδ2 が必須であることを示しており、完成されたシナプスの構造変化の分子メカニズムを探求する端緒を開いた。





“線条体特異的 NMDA 受容体欠損マウス”

線条体は、運動や感覚情報を担う大脳皮質からのグルタミン酸シグナルと報酬、予測誤差やストレスなどの評価情報を担うドパミンシグナルを統合して、運動の学習と制御に重要な役割を果たしていると考えられている。線条体における NMDA 受容体の役割を明らかにするために、NMDA 受容体 $\text{GluR}\zeta 1$ 遺伝子に loxP を導入した標的マウスと線条体特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスとを掛け合わせ、C57BL/6 系統の遺伝的背景のもとで線条体特異的に NMDA 受容体を欠損したマウスを作成した。変異マウスは、通常の飼育条件下では生後五週までに体重減少を伴い死亡した。餌を床に置いたところ総ての個体が生き残ったことから、運動機能の異状によってケージ上部に置いた餌を獲得することが出来ないと思われる。生育させた線条体特異的 NMDA 受容体欠損マウスは、オープンフィールドにおいて自発運動の著しい亢進を示した。一方、ホームケージにおける自発運動量は、正常マウスと同等であった。統合失調症や注意欠陥多動性障害などの疾患との関連を薬理的に検討した結果、ドパミン受容体とのサブタイプ特異的相互作用が示唆された。

“海馬 CA3 領域特異的 NMDA 受容体欠損マウス”

海馬は側頭葉てんかんの焦点の一つである。海馬の中でも CA3 領域は興奮性の反回性回路をもつため、てんかん様の神経発火の発生に関与していると想定される。海馬 CA3 領域の NMDA 型グルタミン酸受容体が発作の発症にどのように関与しているかを検討するために、NMDA 受容体 $\text{GluR}\zeta 1$ 遺伝子に loxP を導入した標的マウスと海馬 CA3 錐体細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと

を掛け合わせ、C57BL/6 系統の遺伝的背景のもとで海馬 CA3 領域特異的に NMDA 受容体を欠損したマウスを作成した。この交配により得られたマウスは生後 23 日において、海馬 CA3 領域特異的に GluR ζ 1 タンパク質が消失していた。カイニン酸を 8 mg/kg 腹腔投与すると変異マウスは強直間代発作を示したが、野生型マウスに発作は認められなかった。12 mg/kg のカイニン酸を投与すると両者のマウスで発作が認められたが、発作が生じるまでの潜時は変異マウスの方が早かった。以上の結果は、予想に反し、海馬 CA3 領域の興奮性反回路の NMDA 受容体が強直間代発作の誘発に抑制的に働くことを示唆する。海馬 CA3 領域特異的 NMDA 受容体欠損マウスは海馬の神経細胞の配置、および hilar area の介在神経細胞である mossy cell の数、および歯状回からの神経投射に異常は認められなかった。また NMDA 受容体以外のグルタミン酸受容体である GluR α 1、GluR α 2、GluR α 3、GluR γ 2 の mRNA の発現にも変化は認められなかった。カイニン酸による興奮発作の閾値低下の原因として、興奮の上昇、抑制の低下あるいはその両者が考えられるが、欠損マウスの海馬 CA3 領域における AMPA 受容体を介する興奮性応答と GABA_A 受容体を介する抑制性応答の比は正常マウスと同様であった。しかしながら、欠損マウスでは強い興奮により引き起こされる NMDA 受容体依存性の遅い K⁺チャネル応答が消失していた。したがって、NMDA 受容体-K⁺チャネル連関の欠失が海馬 CA3 領域特異的 NMDA 受容体欠損マウスのカイニン酸誘導興奮性上昇の原因になっていることが示唆された。

“海馬 CA3 領域特異的 TrkB 受容体欠損マウス”

TrkB 受容体は、ニューロンの生存維持や分化といった作用と同様に、学習やシナプス可塑性においても重要な役割を果たしている。しかしながら、TrkB 受容体は海馬シナプスのプレシナプス側、ポストシナプス側の両者に高く発現しており、シナプス部において TrkB 受容体がどのようにシナプス可塑性に機能しているのか明確ではない。そこで我々は海馬 CA3-CA1 シナプスでプレシナプス側の TrkB 受容体が担うシナプス可塑性への役割を明らかにするために、TrkB 受容体遺伝子に loxP を導入した標的マウスと海馬 CA3 錐体細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスとを掛け合わせ、C57BL/6 系統の遺伝的背景のもとで海馬 CA3 領域特異的に TrkB 受容体を欠損したマウスを作成した。電気生理学的解析の結果、変異マウスは post-tetanic potentiation (PTP) が低下しており、海馬 CA3-CA1 シナプスにおいてプレシナプス側の TrkB 受容体は短期可塑性を調節していることが明らかとなった。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

部位特異的グルタミン酸受容体欠損 C57BL/6 純系マウスに基づく本研究は、従来のノックアウト法の限界を打ち破り、脳高次機能のシステム制御機構に迫ることを可能にし、脳科学の多次元の分野を融合して統合的脳研究を推進する原動力になる。遺伝的背景が脳高次機能に大きく影響することから、均一遺伝背景下で可塑性分子と脳高次機能の関係を特定の脳システムにおいて解析する本研究は重要性と独創性が高く、世界標準となるべき成果を提供することになる。

3. 2 “シナプス形成分子の探索（三品グループ）”

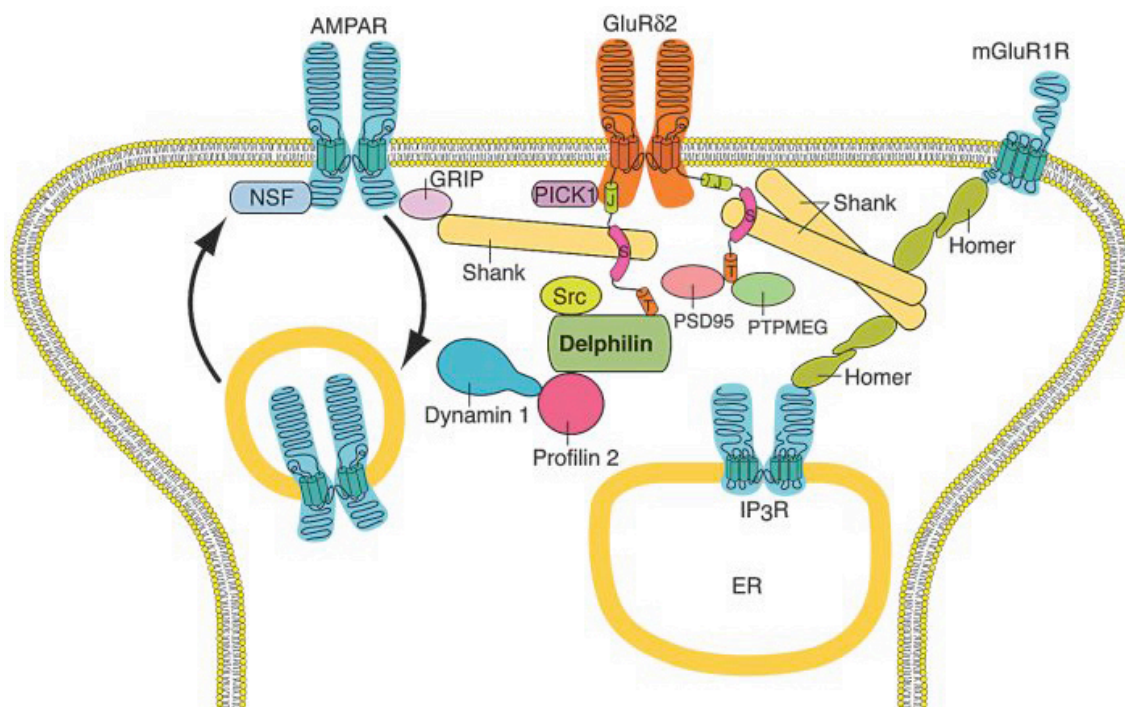
(1) 実施の内容

“グルタミン酸受容体結合蛋白の探索”

小脳プルキンエ細胞に特異的かつ高濃度に局在するグルタミン酸受容体 GluR δ 2 は小脳のシナプス可塑性、協調運動、及び神経回路形成などの鍵を握る重要な機能分子であることが明らかになりつつある。しかしタンパク質分子としての直接の機能、活性や細胞内シグナル伝達経路についてはほとんど未知のままである。我々は酵母 two-hybrid screening により、GluR δ 2 の C 末端と相互作用する新規タンパク質の cDNA クローニングに成功し、Delphinin と命名した。免疫組織化学的手法、免疫共沈実験などにより Delphinin は GluR δ 2 分子との *in vivo* での局在の一致と結合が確認された。本分子はタンパク質間相互作用の機能モジュールといわれる PDZ ドメイン及び FH (Formin Homology) ドメインを持つことから、さらに Biacore を用いて Delphinin-PDZ ドメインと GluR δ 2 C 末端の直接的相互作用、および Delphinin-FH ドメインとアクチン結合タンパク質である profilin の相互作用を確認した。また GluR δ 2 C 末端のリン酸化により Delphinin との相互作用が調節される可能性を検討した。以上により Delphinin はその PDZ ドメインにより GluR δ 2 分子と結合し、FH ドメインにより細胞骨格系や様々なシグナル伝達分子にその情報を伝達している、いわゆる scaffolding タンパク質である可能性が示された。

さらに、GluR δ 2 と結合する新たな分子として Shank を同定した。GluR δ 2 の C 末端細胞質内の中間に位置する領域が Shank の PDZ ドメインと直接結合していることを見出した。抗 GluR δ 2 抗体を用いて小脳シナプトソームから免疫沈降を行った結果、GluR δ 2/Shank/Homer/mGluR1 α 複合体が共沈され、抗 GRIP1 抗体を用いた免疫沈降では GRIP1/Shank2 複合体が共沈された。これらの結果は、LTD に重要な蛋白群が GluR δ 2 を中心として複合体を形成していること

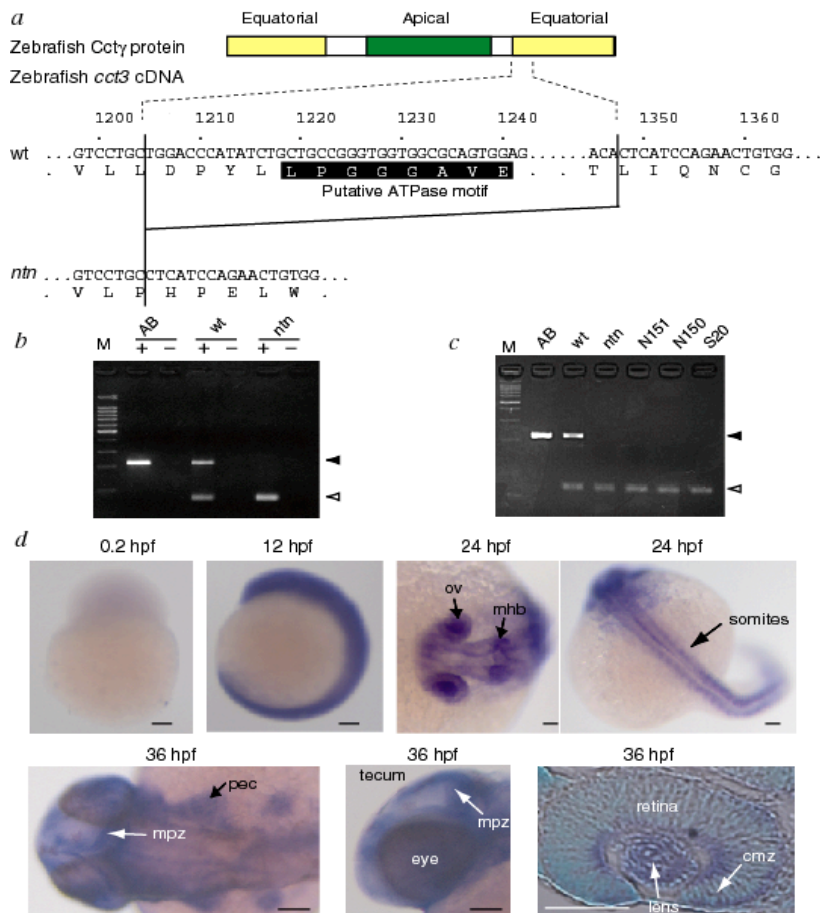
を示唆する。すなわち、GluR δ 2はShank1、Shank2を介してLTDに重要な役割を果たしている分子であるAMPA受容体、IP3受容体、mGluR1 α とを分子的に結びつける要に位置すると考えられる。



ゴルジ体は蛋白質、脂質の修飾と輸送に関わる重要な細胞内器官であり、ゴルジ体特異的蛋白群がこれらの機能を担っている。酵母 Sos recruitment systemを用いてグルタミン酸受容体結合分子を検索する過程で我々は新規タンパク質を同定した。このタンパク質は 299 アミノ酸から成り DHHC zinc finger domain と 4 つの推定膜貫通領域を有する。COS7 細胞にこのタンパクを発現させたところ trans-Golgi マーカー (NBD C6 ceramide) と局在が完全に一致した。そこで我々はこの分子を Golgi-specific DHHC zinc finger protein (GODZ) と命名した。GODZ はアミノ酸配列がマウスとヒトで非常によく保存されており、またヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエ、線虫に高い相同性を有するタンパク質群が存在することから GODZ ファミリー蛋白がゴルジ体において重要な機能を担っていることが示唆される。また GODZ とグルタミン酸受容体を COS7 細胞に共発現させるとグルタミン酸受容体のゴルジ体への集積が観察された。このことから GODZ は膜蛋白の輸送に関わることが示唆された。

“変異株のゲノム間サブトラクションによる神経回路形成遺伝子の探索”

ゼブラフィッシュは、脊椎動物において遺伝子の機能を探求する上で優れたモデル生物である。我々が開発した DNA 架橋剤 4, 5', 8-trimethylpsoralen (TMP) を用いる高効率ゼブラフィッシュ変異法で得た視蓋形成不全変異体 *ntn* から、Representational difference analysis (RDA) による野生型と変異体ゲノム間のサブトラクションを行い、*ntn* 遺伝子座と緊密に連鎖した多型マーカーを得た。これらのマーカーを用いて、*ntn* 遺伝子座を含むゲノム領域を単離した。このゲノム領域から direct cDNA selection により、シャペロニン CCT γ 遺伝子を同定し、視蓋形成不全変異体においては CCT γ 遺伝子内に欠失変異が生じていることを見出した。CCT γ mRNA を合成し、変異体に導入すると正常に視蓋形成が起こることを示した。したがって、ゼブラフィッシュ TMP 変異法と RDA 法の組み合わせは、神経系の形成分子を明らかにする有効な方法であることが明らかとなった。CCT γ 遺伝子が視蓋形成を制御する機構の解析を進めている。そのうち、CCT γ 遺伝子に 143 bp の小欠失を同定した。他の cDNA には変異は見つからなかった。変異 CCT γ mRNA は ATPase 活性モチーフを含む C 末端側 equatorial domain のほとんどを欠失していることから、変異 CCT γ 蛋白は翻訳されていても機能欠損体であると考えられる。CCT γ 遺伝子のアンチセンス morpholino 微量注入により、網膜神経節細胞が減少し、視蓋神経細胞に細胞死が認められた。アンチセンス配列を逆にしたコントロールを微量注入した胚は野生型と変わらなかった。また、CCT γ 遺伝子 mRNA を微量注入した変異体胚では、視蓋神経細胞死が抑制され、網膜神経節細胞数が野生型レベルまで回復した。以上により、CCT γ 遺伝子が *ntn* 突然変異体の原因遺伝子であることが明らかとなった。*ntn* 突然変異体の網膜神経前駆細胞数は野生型と遜色なく、転写因子 *ath5* や *brn3b* は正常に発現していることから網膜神経節細胞への commitment までは正常に起こっている。しかし、nAChR β 3 遺伝子プロモーター制御下で緑色蛍光蛋白質は発現せず、Neurolin 抗体染色、アセチル化チューブリン抗体染色も減弱していることから、分化した網膜神経節細胞が減少していることが明らかとなった。同様に、*brn3b* mRNA の発現は *ntn* 突然変異体視蓋神経細胞でも野生型と変わらなかったが、抗アセチル化チューブリン抗体染色では、中脳視蓋神経細胞の神経網が欠損し分化障害を認めた。したがって、CCT γ 蛋白は網膜神経節細胞および視蓋神経細胞で分化に必須の機能を持つことを発見した。



また、*vibrato* という自発運動と接触応答に異常を示すゼブラフィッシュ変異体を単離した。Representational difference analysis による野生型と変異体ゲノム間のサブトラクションを行い、*vibrato* 遺伝子座と緊密に連鎖した多型マーカーを得た。これらのマーカーを用いて我々は高解像度の物理的地図を作成し、*vibrato* 遺伝子座を 720 kb のゲノム領域に特定した。そのコンティグを用いた direct cDNA selection により、SEC14 とスペクトリンドメインをもつタンパク質をコードする新たな遺伝子 *solo* を同定した。*Solo* のこれらのドメインは、哺乳類 Trio と Kalirin のドメインと有意なアミノ酸配列の同一性を示した。加えて、我々は *vibrato* 領域に哺乳類 *TTN*, *COL5A2* と *CED-6* のゼブラフィッシュ相同遺伝子を見出した。これらの遺伝子のマッピングにより、ヒト染色体上で運動障害に関わると推測される領域を特定した。我々の結果は、representational difference analysis がゼブラフィッシュにおいて変異をもつゲノム領域を単離するのに有用な手段の一つであることを示唆する。

“ゼブラフィッシュの神経回路特異的遺伝子操作法の開発と神経網形成機構の解明”

ゼブラフィッシュ嗅神経細胞に GFP と優性変異型 PKA を同時に発現させることにより、PKA シグナルの変化が嗅神経細胞の軸索誘導に与える影響を観察した。PKA の機能促進は嗅球内で、機能抑制は嗅上皮内で軸索の湾曲を引き起こした。軸索が嗅球嗅上皮境界部を通過する際に PKA シグナルのスイッチが起こることが示唆された。PKA シグナルのスイッチは長距離軸索誘導時に誘導分子に対する感受性を調節すると考えられた。

網膜視蓋投射のようにトポグラフィックな投射が遺伝的にかつ活動依存的に厳密に規定され、その投射範囲がその生理機能に密接に関係している系では、軸索分枝の広がりには重要な意味を持つ。ニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta 3$ サブユニット遺伝子プロモーター制御下に GFP と glycogen synthase kinase-3 β ((GSK-3 β) ドミナントネガティブ変異体を発現させ、視神経にて軸索分枝の発達に与える影響を解析した。軸索分枝の発達—分枝の数、広がり—が対照群と比較して発生のより早い時期に停止した。また、シナプス小胞蛋白 vesicle-associated membrane protein (VAMP2/synaptobrevin) と GFP の融合蛋白をレポーターとして、視神経軸索でシナプス小胞の集積度を検討したところ、対照と比較して発生のより早い時期に既に集積していた。シナプス前部の GSK-3 β 活性の抑制は、軸索分枝が広がり続けるのを抑制し、軸索終末の成熟を促進することが明らかとなった。標的細胞からの分泌性シグナルを受容した軸索では GSK-3 β は抑制され、細胞骨格蛋白の制御を通してシナプス前部をシナプス形成準備状態にすることが示唆される。

“メダカトランスポゾンを利用した遺伝子トラップ法の開発”

遺伝子トラップ法は個体発生における重要な遺伝子の単離・機能解析に多大な効力を発揮する。われわれは、中枢神経系など組織特異的な発現を示す遺伝子の同定とその機能解析を目標に、ゼブラフィッシュにおいて遺伝子トラップ法の開発を試みた。メダカ由来のトランスポゾン *To12* がゼブラフィッシュにおいても活性を持ちうることに着目し、*To12* 遺伝子を改変したベクターを作製した。トランスポゾン活性を除いた *To12* nonautonomous element と外来遺伝子を組み込んだプラスミド DNA (*To12* ベクター) と *To12* mRNA を同時に微量注入した受精卵では、外来遺伝子は *To12* 蛋白のトランスポゾン活性によりゼブラフィッシュゲノムに挿入され、約 50% の効率で founder を得ることができた。したがって、DNA のみを微量注入する従来のトランスジェニック作製法に比べ、数十倍優

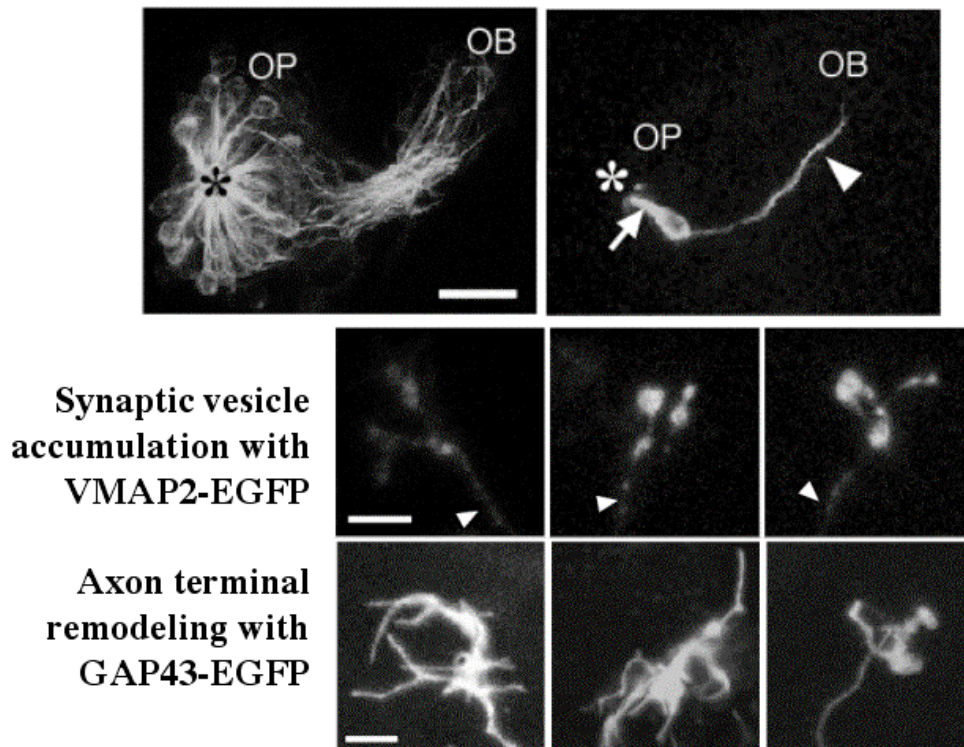
れていた。スプライスアクセプターを含むウサギ β グロビン遺伝子イントロンと GFP を連結した *To12* ベクター (*To12* トラップベクター) を作製し、受精卵に微量注入し、遺伝子トラップ法のパイロットスクリーンを行った。交配により 400—460 遺伝子座をスクリーニングしたところ、8—9%の挿入が GFP を発現した。36 パターンの組織特異的な GFP 発現を示したもののから、単一挿入を持つ 16 系統を確立した。ゲノムインバース PCR 法による挿入周辺のゲノム断片をクローニングすることにより、あるいは 5'-RACE 反応により、8 系統でトラップした遺伝子を明らかにした。トラップした遺伝子は、3-oxoacid CoA transferase (SCOT) (SAGm18G 系統), G proteinalpha-12 (SAGm18C 系統), *hoxc3* (SAGp22A 系統) といった既知の遺伝子のほかに、心臓 (SAG4A 系統)、脊索 (SAG20)、中枢神経系 (SAG56)、体節 (SAGp4)、前脳および中脳後脳境界部 (SAGp53A) などの組織特異的な発現を示す未知の遺伝子であった。ゼブラフィッシュにおいて発生過程で複雑な発現制御を受ける組織特異的遺伝子の探索方法として、*To12* トラップベクターを用いた方法は有効な方法であることを示した。

“神経特異的遺伝子操作法によるシナプス成分の探索”

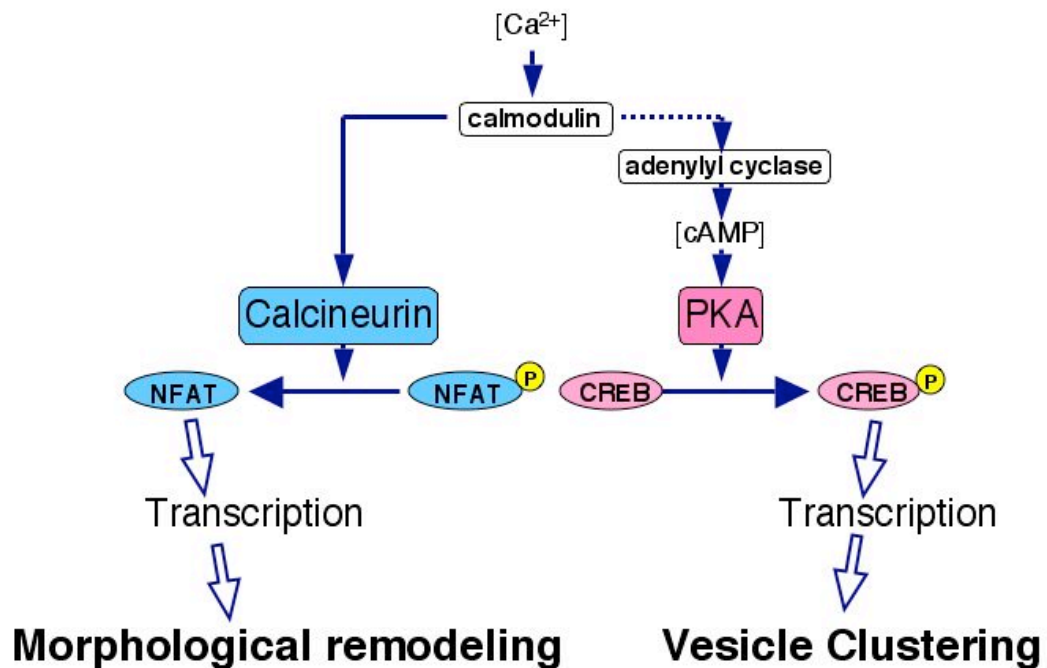
シナプス形成に伴い軸索終末が成熟する際にはシナプス小胞の軸索終末への集積や、形態変化が伴うことが知られているが、これらのイベントを調節し、軸索終末の分化引き起こすシグナル機構についてはこれまであまり調べられていない。シナプス形成に伴う軸索終末の成熟、分化の調節機構を明らかにするために、ゼブラフィッシュ嗅神経細胞軸索終末の成熟過程におけるカルシニューリンと A キナーゼシグナルの役割について解析した。Vesicle-associated membrane protein (VAMP)2-EGFP 融合タンパク質を用いてシナプス小胞をモニターすると、嗅神経細胞の軸索伸長期には軸索および成長円錐に広く分布するのに対してシナプス形成期には軸索終末に集積することが分かった。恒常不活性型 A キナーゼはシナプス形成時期において VAMP2-EGFP の軸索終末への集積を阻害した。さらに A キナーゼによって調節されることが知られている転写因子 CREB の恒常不活性型を発現させても同様に VAMP2-EGFP の集積が阻害された。一方、恒常活性型 A キナーゼ、恒常活性型 CREB は通常 VAMP2-EGFP シグナルの集積の見られない軸索伸長期において嗅神経軸索終末への VAMP2-EGFP シグナルの集積を増加させた。しかしながら恒常活性型カルシニューリンは VAMP2-EGFP シグナルの集積には影響を与えなかった。また、軸索終末の形態を GAP43-EGFP 融合タンパク質を用いて可視化すると、軸索伸長期及び、嗅球内の標的近傍でシナプス形成が始まった直後の時期には多くの突起を出した複雑な形態を示すが、シナプス形成

が進み、糸球体構造が明確に形成される時期には突起の少ない簡単な構造へと変化することがわかった。恒常活性型カルシニューリンを嗅神経細胞に発現させると、突起の少ない簡単な構造への形態変化が早まることがわかった。またカルシニューリン阻害薬であるサイクロスポリン A はシナプス形成時期におこる軸索終末の形態変化を妨げた。さらにカルシニューリンの標的として知られる転写因子 NFAT のカルシニューリンによる活性化を阻害しても、この形態変化が抑えられた。従って、軸索終末へのシナプス小胞の集積は A キナーゼ/CREB シグナルによって調節され、一方、軸索終末分化に伴う形態変化はカルシニューリン/NFAT シグナルによって別々に制御されることが分かった。軸索終末の分化はこれら別個のシグナルによって調節されることが明らかとなった。

Visualization of synapse formation *in vivo*



Dual Signaling for Axon Terminal Differentiation



これらのシグナルの引き金となる分子の探索を進めた。 β -neurexin は細胞接着分子で、ポストシナプスの neuroligin と結合してシナプス形成に関与していると考えられている。我々はゼブラフィッシュ嗅神経系を VAMP2-EGFP で可視化した系を用いて、ゼブラフィッシュ β -neurexin (zNI β) の機能を解析した。まず VAMP2-EGFP と zNI β が同一の嗅神経細胞で発現するダブルカセットベクターを構築した。野生型 zNI β 、および細胞内部位を欠失させた zNI β を発現させると、軸索終末への VAMP2-EGFP の集積が抑えられることがわかった。いっぽう、細胞外の LNS ドメインを欠失した zNI β を発現させても、VAMP2-EGFP の集積には影響が見られなかった。LNS ドメイン内の挿入配列を持つ zNI β のスプライスバリエーションおよびその細胞内部位を欠失した変異タンパクを発現させた場合にも、VAMP2-EGFP の集積が抑えられることがわかった。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

NMDA 受容体と複合体を構成する PSD 蛋白やシナプス間相互作用分子など中枢シナプスを構成する分子群の解明ならびに神経精神疾患の原因遺伝子あるいは危険因子の解明は著しく進展しており、多くの候補分子の実体は明らかとなっている。しかしながら、生体内における適切な機能解析系がないために、これら

の分子が神経情報の入力からシナプス再編に至る過程で如何なる役割を果たすのかは、不明なままに止まっている。我々が開発したゼブラフィッシュ神経回路特異的分子操作法は、多くの候補分子の生体内における機能を系統的に解析できる系として威力を発揮すると考えられる。

3.3 “コンディショナルターゲティング法の改良とこの方法を用いたシナプス伝達に関与する分子群の機能解析（崎村グループ）”

(1) 実施の内容

“遺伝子改変マウス作成法の開発”

我々は脳機能を分子レベルで解明することに適した遺伝子改変マウス作成システムを開発するに当たり2つの具体的な目標を設定した。まず、C57BL/6系統のES細胞株を樹立し、高効率で生殖系列に分化するキメラマウスを作る方法を確立して遺伝子背景の問題を克服することである。次に、発達段階での分子欠損の影響を排除できるコンディショナルなノックアウトマウスを精度良くかつ迅速に作成することである。我々は当初 Colin L. Stewart より分与された C57BL/6 由来 ES 細胞 Bruce 株の垂株から、比較的安定して生殖系列キメラを作出する方法を確立したが、その効率はあまり高くはなかった。そこで独自に C57BL/6N 系統マウスの胚盤胞から ES 細胞 RENKA 株を樹立した。この ES 細胞は、129 系統マウス由来の細胞に比べると分化し易く、フィーダー細胞と LIF の添加を要求するが、幾つかの点を改善することで分化を抑え、高い効率で生殖細胞キメラを作れることが明らかになった。検討した項目は、ES 細胞の培養に使用する血清のロットの選択、培地交換や細胞継代時期の条件、ターゲティングベクター導入時のエレクトロポレーション条件、細胞凍結の条件などである。このうち最も重要なのは血清で、至適な物を選択するには、実際に検査血清で培養した細胞からキメラマウスを作出し、生殖系列遺伝をすることを確認しなければならない。また、胚への ES 細胞注入によるキメラ作成の過程も重要なステップである。我々は CD1(ICR)8 細胞期の胚に ES 細胞を注入しているが、この時注入する細胞の増殖時期や数、操作に掛かる時間などが、成績に大きな影響を及ぼす。これらの多数に渡る項目を至適化することによりはじめて、RENKA 細胞から 129 系統 ES 細胞に匹敵する効率で生殖細胞キメラを作成することが可能になった。実際に我々がこの技術を用いて 2006-2007 年の 2 年間に企画した 29 系統の変異マウス作成計画のうち、28 系統 (96.6%) を樹立しており、この細胞を用いたシステムは完全に実用化されたと言って良い (Table 1)。RENKA 株細胞は、相同組換え効率が 1%以下とやや低い、相同組換えを起こした細胞の約 50%が生殖系列伝

達するという、C57BL/6 系統の ES 細胞では極めて優れた効率で遺伝子変異マウスができる (Table 2)。実際相同組換え体 ES 細胞のマイクロインジェクション法によるキメラマウス作成において、一匹の生殖系列遺伝するキメラマウスを作出するために必要な胚は、平均 87 個であった。なお、この ES 細胞株とキメラ作成技術は特許申請をおこなった。

Table 1. Establishment of mutant lines from RENKA ES cell line

Type of mutations	No. of mutations	No. of mutant lines established	Establishment rate (%)
Flox ^a	20	19	95.0
Knock-in	9	9	100.0
Total	29	28	96.6

^aOne vector was designed to introduce a point mutation.

Table 2. Production of germline chimeras from established homologous recombinants by microinjection.

Types of mutation	No. of clones injected	Transferring rate ^a	No. of clones transmitted (Germline transmission rate) ^b	Production efficiency ^c
Flox ^d	40	98.6 ± 14.8	21 (52.5%)	1 / 92.4 ± 16.2
Knock-in	21	91.4 ± 18.7	8 (38.1%)	1 / 74.7 ± 18.7
Total	61	96.1 ± 11.5	29 (47.5%)	1 / 87.0 ± 12.5

^aThe number of embryos transferred per clone injected.

^bThe percentage of germline chimeras born relative to recombinant clones injected.

^cThe efficiency of generating a germline chimera per embryos transferred.

^dTwo clones injected are to generate mutant mice for introducing a point mutation.

Cre/loxP 組換え系を用いたコンディショナルターゲティングをおこなうためには、loxP 配列を適切な位置に挿入した標的マウスを作成することが必要である。そのために変異導入用相同組換えベクターを構築するが、これは単純な遺伝子破壊のためのベクターと異なり、組換えを起こさない領域において標的遺伝子は正常に働く必要がある。したがって、標的の遺伝子の発現を阻害しないようにネオマイシン耐性遺伝子や loxP の配列を挿入し、十分な長さの相同組換え領域を持つベクターの作製は煩雑を極める。この点を改善するために、我々は2種類の汎用ベクター、pNeoMC/lox と pDTMC を作成した。pNeoMC/lox は、相同組換え選択に必要な neo カセットを持ち、loxP 配列に挟まれた組換え領域と片側の相同組換え領域を挿入するマルチクローニングサイトを持つ。一方 pDTMC は、ジフテリア毒素 DT ともう一方の相同組換え領域を挿入するサイトを持ち、この2つのベクターを使用することにより、標的マウスのベクターであれば4回の

DNA ラーゲーションで構築できる。さらに、BAC クローンと RED/ET 組換え系をこれらのベクターシステムと組み合わせることにより、これまで一定の技術を要した相同組換えベクター作成を平易にかつ短時間で構築することを可能にした。

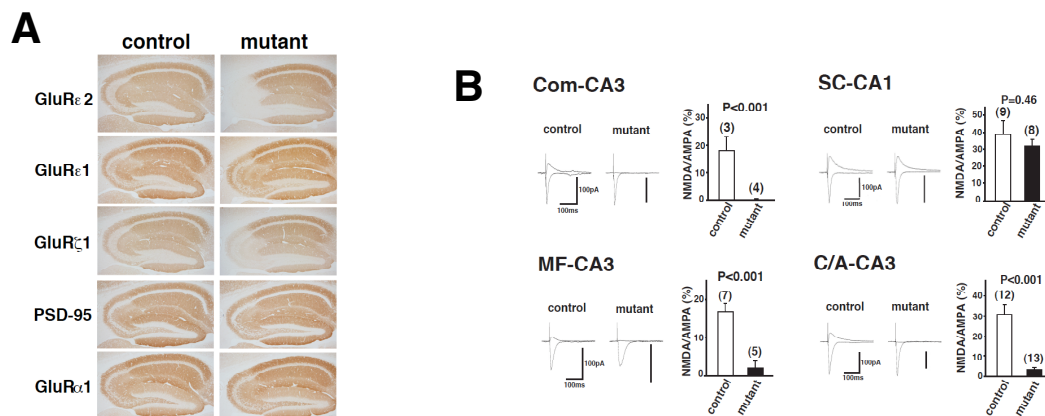
コンディショナルノックアウトマウス作成において、部位・時期選択的に Cre リコンビネースを発現するマウスの開発は、部位における機能解析という命題から重要である。しかし、神経系でこれまでに開発され、実際に使用されている Cre リコンビネース発現マウスの種類は多くない。我々はその充実を図るために、海馬 CA1 領域、CA3 領域、小脳プルキンエ細胞、幼若ニューロン、抑制性ニューロン、グリア細胞など様々な細胞で選択制高く発現する遺伝子プロモーターを用いて Cre リコンビネース発現マウスの作成をノックイン法あるいは BAC トランスジェニック法を用いておこなった。そのうち、海馬 CA3 錐体細胞の GR γ 1CRE、小脳プルキンエ細胞の D2CRE、幼若ニューロンの Tub β 3CRE など、効率良く部位と選択的組換えが惹起できるマウス系統を樹立した。

“NMDA 受容体 GluR ϵ 2 コンディショナルノックアウト”

本研究では、単純なノックアウトでは新生子致死のためにその機能が解析できなかった NMDA 型受容体サブユニット GluR ϵ 2 を成熟個体で解析するために、異なるシナプス可塑性の誘導機構が存在する海馬 CA3 に着目し、この領域選択的に GluR ϵ 2 を欠損させその機能を検索することを計画した。海馬 CA3 錐体細胞に選択的に発現する GluR γ 1/KA1 プロモーターで Cre を発現する GR γ 1Cre マウスと、GluR ϵ 2 膜貫通領域の M4 をコードするエキソンを loxP 配列で挟んだ GR ϵ 2flox マウスを作成し、交配により作出した CA3-GluR ϵ 2 KO マウスは、CA3 特異的に GluR ϵ 2 のシグナルが消失し、GluR ζ 1 のシグナルも減少していたが、GluR ϵ 1、PSD-95 に変化はなかった（図 2 A）。一方、電気生理学的に CA3 の各シナプスの NMDA 応答と LTP を調べた結果、CA3-C/A、CA3-Com、CA3-MF、全てのシナプスにおいて NMDA 応答がほぼ消失し、NMDA 受容体依存の LTP が観察される CA3-C/A、CA3-Com シナプスでの LTP が障害されていた（図 2 B）。CA3 領域に存在する GluR ϵ 1 と ϵ 2 の量比をそれぞれの抗体を用いて測定した結果、およそ ϵ 1: ϵ 2=1:2 であった。これは、CA3-GluR ϵ 2KO シナプスにおいて GluR ϵ 1 が発現しているにも関わらずチャネル応答がほぼ消失しているのは、GluR ϵ 1 の量が極端に少ない事によるものではないことが分かった。さらに、グルタミン酸の局所投与によりシナプス外領域に存在する NMDA 型受容体の応答を測定した結果、野生型に比べて 1/3 程度に減少はしているが、チャネル応答が観察された。

このことから、シナプス外領域では機能的な NMDA 型受容体が存在する事が分かった。次に、シナプスの NMDA 型受容体応答がほぼ消失している原因として、 $\epsilon 1\zeta 1$ のシナプスへの局在の変化を想定し、電顕による免疫組織化学をおこなった。その結果、GluR $\zeta 1$ のシグナルは減少していたものの、GluR $\epsilon 1$ 、PSD-95 のシグナルには変化がなく、 $\epsilon 1\zeta 1$ はシナプス部位に存在していた。ところが、PSD 画分を生化学的に調製すると、この画分では GluR $\epsilon 1$ 、PSD-95 が大きく減少していた。この減少は、PSD 画分抽出時に使用する TritonX-100 への溶解度の変化を反映していると考えられ、PSD 構造が変化し GluR $\epsilon 1$ 、PSD-95 といった分子が正しく位置していないことを推測させる。これに対し、GluR $\epsilon 1$ KO マウスの PSD 画分中の GluR $\epsilon 2$ には変化が無かった。すなわち、GluR $\epsilon 2$ 分子は、シナプスにおいて PSD の構造を正しく保ち、NMDA 型受容体の活性化に必須な分子であることが明らかになった。

図 2 CA3-GluR $\epsilon 2$ KO マウスの解析. A,海馬免疫組織化学. B,海馬 CA3 領域での電気生理学的解析.



“NMDA 受容体の分子動態”

成体小脳 NMDA 型受容体は、GluR $\epsilon 1$ 、GluR $\epsilon 3$ 、GluR $\zeta 1$ サブユニットから構成されている。NMDA 型受容体の膜移行とシナプスへの集積の分子機序を解析する目的で、GluR $\epsilon 1$ および GluR $\epsilon 3$ 遺伝子の 2 重欠損変異マウス (GluR $\epsilon 1/\epsilon 3$ -KO マウス) を作成した。野生型マウスの小脳苔状繊維-小脳顆粒細胞間シナプスでは、GluR $\zeta 1$ がシナプス後膜に局在することが示されている。しかし、GluR $\epsilon 1/\epsilon 3$ -KO マウスでは、小脳の GluR $\zeta 1$ タンパク質量が減少し、免疫組織化学的にも生化学的にも、GluR $\zeta 1$ が苔状繊維-小脳顆粒細胞間のシナプス後膜へほとんど局在していないことを見出した。これらの結果は、GluR ϵ サブユニットは

NMDA 受容体のシナプス局在化とタンパク安定性の決定因子であることを強く示唆する。我々はさらに、GluR ζ 1 タンパク質安定化の分子機構を解明するため、まず、小脳顆粒細胞の初代培養を利用して、mRNA 発現からタンパク合成までの過程を解析した。生体と同様に、培養顆粒細胞においても野生型マウスと比較して GluR ϵ 1-KO マウスでは GluR ζ 1 タンパクが減少していた。しかし培養顆粒細胞の GluR ζ 1 mRNA の発現量をノーザンブロットで比較しても変化は見出されず、パルスチェイス法で GluR ζ 1 タンパク質合成量を比較したが、GluR ϵ 1-KO マウスでは合成量は減少していなかった。以上のことから、GluR ϵ の欠損による GluR ζ 1 タンパク質の減少の原因は、mRNA の発現量やタンパク質合成量の減少によるものではないということが明らかとなった。次に、GluR ζ 1 タンパク質の分解速度を検証するため、マウス生体へタンパク質合成阻害剤を投与し、タンパク質量の変化を調べた。タンパク質合成阻害剤であるアニソマイシン (150mg/kg) を皮下に注射し、4 時間後に小脳タンパクを抽出し、GluR ζ 1 のタンパク質量を比較すると、GluR ϵ 1/ ϵ 3-KO マウスでは著しく減少していた。この結果は、GluR ϵ の非存在下では、GluR ζ 1 タンパクの分解速度が亢進することを強く示唆する。これらのことから、GluR ϵ サブユニットは NMDA 受容体のタンパク安定化に必須の因子であることが明らかになった。

“ β カテニンコンディショナルノックアウト”

細胞間接着分子カドヘリンが果たすと予想される中枢神経シナプスでの機能（シナプスの形態維持、シナプス伝達調節、可塑性発現など）や、その欠損が高次脳機能に与える影響を個体レベルで解明するため、古典的カドヘリンに共通の細胞内結合タンパクであり、接着能の発現に不可欠であると考えられている β カテニンを標的として、神経細胞特異的コンディショナル KO マウスを作成し、解析を行った。まず、 β カテニン遺伝子のイントロン 3 及びイントロン 6 に組換え酵素 Cre の認識配列である loxP を組み込んだ β カテニン-lox マウスを作成した。この標的マウスと海馬 CA3 選択的 Cre 発現マウス GRg1CRE を用い、CA3- β カテニン KO マウスを作出し、解析を行った。CA3- β カテニン KO マウスは一見正常に生育し、海馬の基本回路構造や細胞数などに大きな変化は生じないが、 β カテニン mRNA の発現量が CA3 領域で検出感度以下まで減少することが in situ ハイブリダイゼーションにより明らかとなった。また免疫組織化学的解析により β カテニンタンパク質の発現、局在は、CA3 領域放線層、上昇層において大幅に低下し、CA3 領域透明層、分子層及び CA1 領域放線層においてやや低下することが明らかとなった（図 1A）。これらの結果は、海馬神経細胞においてシナプ

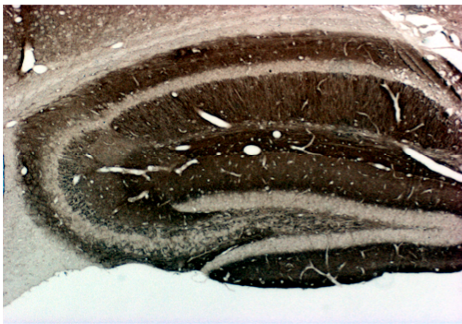
ス前部及び後部に局在する β カテニンタンパク質を CA3 神経細胞特異的に欠損させることに成功したことを示す。これらの変異マウスを用いて、海馬におけるシナプス可塑性と密接に関連した学習課題として知られる、文脈依存的恐怖条件付けを用いた行動学的解析を行った。文脈依存的条件付けから 24 時間後、同一環境に暴露された 3 分間のフリージング時間は、対照マウス群 (β カテニン-*lox* マウス、*n*=6) と比較し、CA3- β カテニン KO マウス群 (*n*=15) において有為な増加を示した (図 1B)。一方、扁桃体依存的学習課題として知られる音刺激依存的恐怖条件付けにおいては、対照群と CA3- β カテニン KO マウス群のフリージング時間に有為な差は検出されなかった。これらの結果は、海馬 CA3 における β カテニンの欠損が、海馬依存的な記憶・学習を昂進させることを示し、海馬シナプスにおいて β カテニンは可塑性の発現制御に関わる分子であることを示唆する。

図 3 A, CA3- β カテニン KO マウス海馬における β カテニンタンパクの発現分布. B, 条件付け学習テスト (左) 文脈依存的条件付け学習 (右) 音刺激依存的恐怖条件付け学習

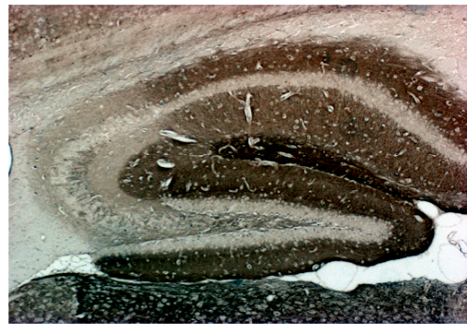
A

Immunohistochemistry

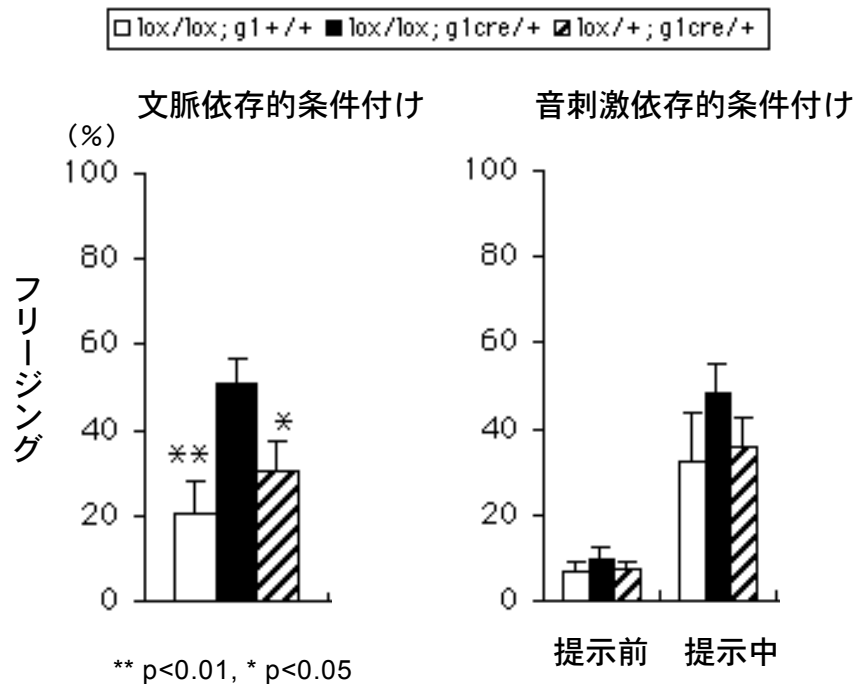
GluR γ 1 *+/+*; *lox/lox*



GluR γ 1 *Cre/+*; *lox/lox*



B

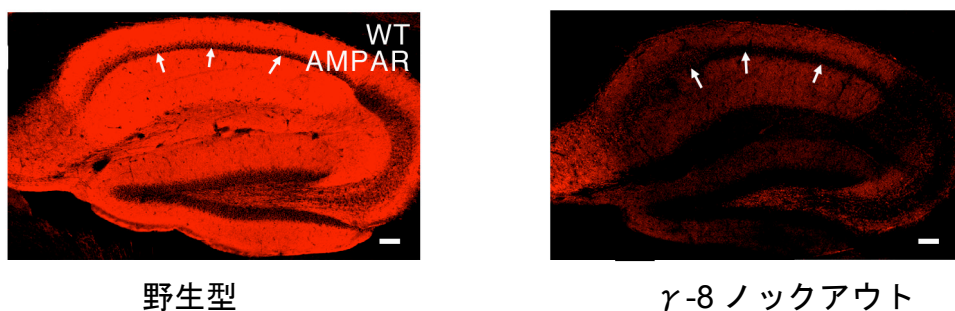


“Stargazin タンパク群による AMPA 型受容体機能調節”

本研究の過程で AMPA 型グルタミン酸受容体を細胞膜やシナプス active zone に集積させる分子として報告されていたカルシウムチャネル γ -2 サブユニット (stargazin) が、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR α 1 および GluR α 2 サブユニットのチャネル活性を著しく亢進させるばかりでなく、アロステリックな効果を持ちチャネル特性を変化させることを見いだした。Stargazin 共発現による膜表面への AMPA 型受容体サブユニットの移行量の測定から、膜表面への受容体発現増加ではチャネル活性の上昇を説明することはできず、補助的サブユニットとして直接的チャネル活性を制御することでシナプス伝達の調節を担う因子と考えた。そこで我々は、8 種類存在する γ サブユニットファミリーの発現をマウス脳で検証した結果、 γ -2、 γ -3、 γ -4、 γ -5、 γ -7、 γ -8 サブユニット mRNA が中枢神経系に多く発現しており、各サブユニットの発現は脳領域や細胞種、発達段階によって異なることを明らかにした。さらに、これらの γ サブユニットのうち、 γ -2 以外の γ -3、 γ -4、 γ -7、 γ -8 サブユニットが AMPA 型受容体チャネルの活性を亢進させることを明らかにした。次にこのファミリー分子がマウス個体でどのような作用機序で働くのかを明らかにするために、各 γ サブユニットを欠損したマウスを C57BL/6 ES 細胞から作成し、その表現型を解析した。

γ -2 を完全欠損すると *stargazer* ミュータントマウスとほぼ同様な表現型を示し、欠伸てんかんと運動失調を呈する。*Stargazer* ミュータントマウスは戻し交配により C57BL/6 純系に近づけると離乳前後に致死に至ることが報告されているが、我々が作出した C57BL/6 系統 γ -2 ノックアウトマウスも離乳前に致死であった。したがって、 γ -2 の発現を小脳顆粒細胞、プルキンエ細胞特異的にターゲティングできるマウスの作成に着手している。一方、 γ -8 サブユニットの分布を免疫組織化学により詳細に検討した結果、この分子は終脳に広く発現し、特に海馬興奮性ニューロンに多いことを見いだした。また、 γ -8 と AMPA 型受容体は細胞体樹状突起の表面で共発現することが明らかになった。そこで γ -8 の完全欠失マウスの解析をおこなった結果、 γ -8 が分布する領域で AMPA 受容体が減少しており、特に海馬で顕著であった。海馬の中でも減少には差があり、CA1 ではシナプス 35% (野生型を 100%として)、スパインシナプス外で 37%、樹状突起シナプス外で 36% と大きな低下を示した一方、苔状線維-CA3 シナプスでは 83% であった。また、電気生理学的な解析から、AMPA 型受容体のチャネル応答も減少することが明らかになった。海馬 CA1 シナプスでは 52% (野生型を 100%として)、シナプス外では 25% に減少していた。これらの解析により、 γ -8 は海馬 AMPA 型受容体の主要な補助的サブユニットであり、シナプスへの移行と活性調節に重要な役割を担うことが明らかになった。

図 4 Pan-AMPA 抗体による免疫組織化学, 左野生型, 右 γ -8 ノックアウト



(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

これまで ES 細胞を用いた遺伝子改変マウスは、技術的な理由から 129 系統由来の ES 細胞が使われてきた。しかし、この系統のマウスには脳の奇形や免疫系の異常など実験動物としては多くの問題があり、通常長い時間と多大な労力と費用をかけて戻し交配をして使用されてきた。戻し交配なしに使える近交系由来の ES 細胞は世界で熱望されてきたが、実用化レベルで使えるものはこれまでほと

んど無かった。我々が本研究により確立した C57BL/6N 系統 ES 細胞株 RENKA を用いたキメラ作成法を使うことで、129 系統由来 ES に匹敵する効率で純粋 C57BL/6 遺伝子背景の遺伝子改変マウスが作成できる。さらに、我々は独自の汎用ベクターと BAC を用いた組換え法によりターゲティングベクター作製の迅速化と平易化を達成した。今後さらに相同組換えの効率化を図れば、短時間で安価に C57BL/6 遺伝子背景のコンディショナルノックアウトマウスが系統的に作成できるシステムが提供できる。このことは、欧米ですでに進んでいる網羅的遺伝子改変マウス作製プロジェクトに抗して、我が国独自のリソースを整備する上でも重要である。また、Cre/loxP 組換え系を用いた、部位・時期選択的な遺伝子改変をおこなうために、脳部位選択的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを作成した。実用的なのは海馬 CA3 錐体細胞の GR γ 1CRE、小脳プルキンエ細胞の D2CRE、幼若神経細胞の Tub β 3CRE 等である。本研究で確立した、戻し交配が不要な純粋 C57BL/6 系統の遺伝子背景を持つ遺伝子改変マウスの系統的作出法は、神経科学分野ばかりでなく、生命科学全体の研究進展に資するものであり、欧米ですでに進んでいる網羅的遺伝子改変マウス作製プロジェクトに抗して、我が国独自のマウスリソース整備に貢献できると考えている。

シナプス形成、維持、精緻化などに関与が示唆されてきた分子群がシナプス可塑性発現と記憶・学習など脳高次機能に果たす役割を解明するために、シナプスに局在する機能分子を欠損させたマウスを作成し、その表現型の解析から、シナプス伝達に関与する分子群が、神経ネットワーク形成および脳高次機能にどのような役割を示すのかを検証することを目的に研究を進めてきた。研究の当初 2 つの分子に着目して研究を進めた。NMDA 型グルタミン酸受容体 GluR ϵ 2 サブユニットと細胞接着に関与する β カテニンである。これら分子はいずれも単純ノックアウトでは、致死であり成体での解析がおこなえない分子であることから、Cre/loxP 組換え系を用いたコンディショナルな分子欠損を試みた。我々が開発した海馬 CA3 錐体細胞に選択的に Cre リコンビナーゼを発現する D2CRE マウスを用いて、部位特異的にそれぞれの分子を欠損したマウスを作成した。GluR ϵ サブユニットを海馬 CA3 で生後欠損させたマウスは生存し解析が可能であった。この分子の欠損の結果、海馬 CA3 シナプスには形態学的解析では GluR ϵ 1 と GluR ζ 1 サブユニットが存在しているのにもかかわらず、シナプスでの NMDA 型受容体を介する電流応答が消失していた。一方、シナプス外では NMDA 型受容体を介する電流応答が認められたことから、海馬シナプスでは、機能的 NMDA 型受容体形成には GluR ϵ 2 サブユニットが必須な成分であることが明らかになった。また、NMDA 型受容体に関しては、小脳における主要な GluR ϵ サブユニットであ

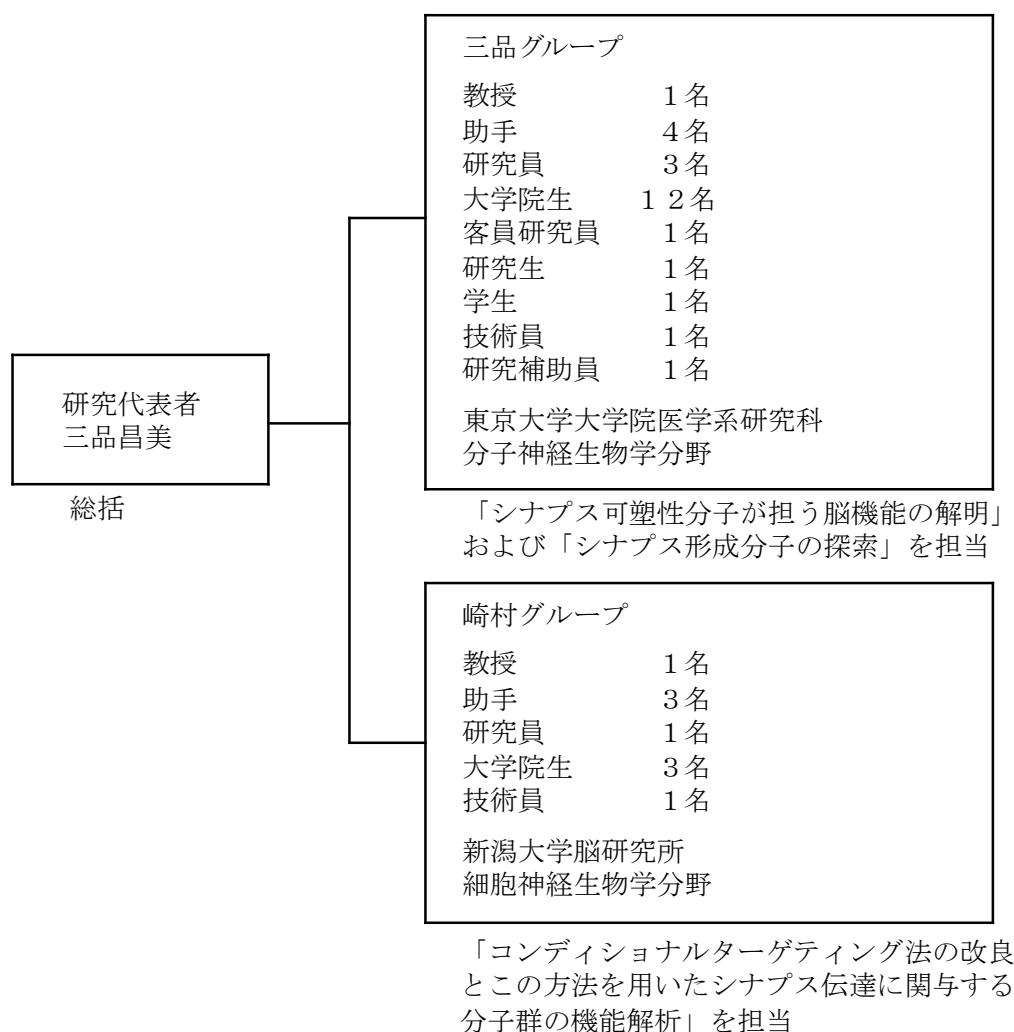
る $\epsilon 1$ 、 $\epsilon 3$ 両者を欠損する変異マウス (GluR $\epsilon 1/\epsilon 3$ -KO マウス) を作成し解析した結果、GluR ϵ サブユニットの欠損小脳の GluR $\zeta 1$ サブユニット mRNA の発現量やタンパク質合成速度は変化していないが、シナプスではこのタンパク質が著しく減少することを見いだした。これは、GluR ϵ サブユニットが NMDA 受容体のシナプス局在化とタンパク質安定性の決定因子であることを示唆する知見であった。これらの研究を通して、記憶や学習、さらに神経回路発達に密接に関連する NMDA 型グルタミン酸受容体の機能と分子動態に関する理解が深まった。

一方、細胞間接着分子カドヘリンが中枢神経シナプスで果たす役割を検証するために、古典的カドヘリンに共通の細胞内結合タンパクであり、接着能の発現に不可欠であると考えられている β カテニンを標的として、海馬 CA3 神経細胞特異的欠損マウスを作成した。この変異マウスは正常に発育したが、行動学的検索をおこなった結果、海馬依存的な記憶・学習を昂進していることが明らかになった。このことは、海馬シナプスにおいて β カテニンが可塑性の発現制御に関わる分子である可能性を示唆するものであった。

我々は、研究の本研究の過程で AMPA 型グルタミン酸受容体を細胞膜やシナプス active zone に集積させる分子として報告されていたカルシウムチャネル γ -2 サブユニット (stargazin) が、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR $\alpha 1$ および GluR $\alpha 2$ サブユニットのチャネル活性を著しく亢進させるばかりでなく、アロステリックな効果を持ちチャネル特性を変化させることを見いだした。Stargazin 共発現による膜表面への AMPA 型受容体サブユニットの移行量の測定から、膜表面への受容体発現増加ではチャネル活性の上昇を説明することはできず、補助的サブユニットとして直接的チャネル活性を制御すると考えた。そこで脳に発現している stargazin ファミリー γ -2、 γ -3、 γ -4、 γ -5、 γ -7、 γ -8 の機能を調べるために、これら分子のコンディショナルノックアウトマウスを作成した。そのうち、海馬に多く発現する γ -8 を欠損したマウスの解析から、海馬領域で全ての AMPA 型受容体サブユニット (GluR $\alpha 1$ - $\alpha 4$) が著しく減少することを見いだした。また、海馬シナプスでの AMPA 型受容体を介する電流応答も減少していた。これらのことは、生体において stargazin ファミリー γ -8 は、AMPA 型受容体の安定性とシナプスへの局在に必須である分子であり、補助的サブユニットとして働いているという考えを支持した。本研究により、興奮性シナプス伝達の主要な要素である AMPA 型グルタミン酸受容体の分子理解が深まった。本研究で作成した stargazin ファミリーのコンディショナルノックアウトマウスは、今後 AMPA 型受容体の機能解析に利用できる有用なリソースとして活用を図りたい。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

① 三品グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
三品 昌美	東京大学	教授	統括	平成14年3月～ 平成19年3月
森 寿	東京大学	講師	脳高次機能	平成14年3月～ 平成15年6月
松田 尚人	東京大学	助手	シナプス形成	平成14年3月～ 平成16年11月

竹内 倫徳	東京大学	助手	脳高次機能	平成14年3月～ 平成19年3月
吉田 知之	東京大学	助手	シナプス形成	平成14年3月～ 平成19年3月
植村 健	東京大学	助手	シナプス形成	平成14年3月～ 平成19年3月
中尾 和人	東京大学	特任助手	脳高次機能	平成17年4月～ 平成19年3月
片岡 宏隆	東京大学	SORST 研究員	脳高次機能	平成14年3月～ 平成19年3月
辻田 実加	東京大学	SORST 研究員	脳高次機能	平成14年3月～ 平成15年3月
坂本 敏郎	東京大学	SORST 研究員	脳高次機能	平成15年4月～ 平成16年7月
布施 俊充	東京大学	SORST 研究員	脳高次機能	平成14年3月～ 平成15年9月
渡辺 文寛	東京大学	大学院生 SORST 研究員	脳高次機能	平成14年3月～ 平成19年3月
加藤 永子	東京大学	大学院生 SORST 技術員	脳高次機能	平成14年3月～ 平成19年3月
川瀬 里美	東京大学	大学院生	脳高次機能	平成14年3月～ 平成16年3月
増田 賢嗣	東京大学	大学院生 SORST 研究員	シナプス形成	平成14年3月～ 平成19年3月
横山 明人	東京大学	大学院生	シナプス形成	平成14年3月～ 平成19年3月
竹田 恒	東京大学	大学院生	シナプス形成	平成14年3月～ 平成19年3月
三上 義礼	東京大学	大学院生	シナプス形成	平成14年8月～ 平成19年3月
陳 西貴	東京大学	大学院生	シナプス形成	平成16年4月～ 平成19年3月
富田 直樹	東京大学	大学院生	シナプス形成	平成16年4月～ 平成18年3月
安村 美里	東京大学	大学院生	シナプス形成	平成16年4月～ 平成19年3月
福島 章顕	東京大学	大学院生	脳高次機能	平成15年4月～ 平成19年3月
関根 千晶	東京大学	大学院生	シナプス形成	平成15年7月～ 平成19年3月
谷 紘江	東京大学	大学院生	シナプス形成	平成16年7月～ 平成18年3月
佐藤 暢彦	東京大学	大学院生	脳高次機能	平成16年4月～ 平成19年3月

野田 賀大	東京大学	大学院生	脳高次機能	平成18年4月～ 平成19年3月
伊藤 珠恵	東京大学	大学院生	脳高次機能	平成17年9月～ 平成19年3月
篠崎 綾子	東京大学	大学院生	シナプス形成	平成17年9月～ 平成19年3月
山口 哲朗	千葉大学	大学院生	脳高次機能	平成14年4月～ 平成18年6月
朱 宰烈	東京大学	客員 研究員	脳高次機能	平成18年1月～ 平成19年3月
木村 栄輝	北里大学	学生	シナプス形成	平成18年4月～ 平成19年3月
魚津 阿希子	東京大学	SORST 技術員	ゼブラフィッシュ 操作、飼育	平成16年6月～ 平成19年3月

② 崎村グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
崎村 建司	新潟大学	教授	マウス胚操作と 統括	平成14年3月～ 平成19年3月
阿部 学	新潟大学	助手	脳機能の分子機構	平成14年3月～ 平成19年3月
山崎 真弥	新潟大学	助手	脳機能の分子機構	平成14年3月～ 平成19年3月
明石 馨	新潟大学	ポスドク	脳機能の分子機構	平成14年3月～ 平成19年3月
柿崎 利和	新潟大学	ポスドク	脳機能の分子機構	平成14年3月～ 平成16年3月
萩原 輝記	新潟大学	大学院生	マウス胚操作	平成15年4月～ 平成17年3月
李 平和	新潟大学	大学院生	マウス胚操作	平成16年4月～ 平成18年3月
駒井 太陽	新潟大学	大学院生	脳機能の分子機構	平成17年4月～ 平成19年3月
深沢みず奈	新潟大学	大学院生	脳機能の分子機構	平成17年4月～ 平成19年3月
畦地 裕統	新潟大学	大学院生	脳機能の分子機構	平成17年3月～ 平成19年3月
夏目 里恵	新潟大学	SORST 技術員	マウス胚操作	平成14年4月～ 平成19年3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

なし

(2) 招聘した研究者等

なし

6. 主な研究成果

(1) 論文発表

三品グループ（国内 0 件、海外 56 件）

崎村グループ（国内 0 件、海外 15 件）

三品グループ（＊崎村グループと共同）

Takatsuki, K., Kawahara, S., Mori, H., Mishina, M. and Kirino, Y. (2002) Scopolamine impairs eyeblink conditioning in the cerebellar LTD-deficient mice. **Neuroreport** 13, 159-162.

Miyagi, Y., Yamashita, T., Fukaya, M., Sonoda, T., Okuno, T., Yamada, K., Watanabe, M., Nagashima, Y., Aoki, I., Okuda, K., Mishina, M. and Kawamoto, S. (2002) Delphilin: a novel PDZ- and formin homology-domain containing protein, which synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor $\delta 2$ subunit. **J. Neurosci.** 22, 803-814.

Haradahira, T., Okauchi, T., Maeda, J., Zhang, M-R., Kida, T., Kawabe, K., Mishina, M., Watanabe, Y., Suzuki, K. and Suhara, T. (2002) A positron-emitter labeled glycine_B site antagonist, [¹¹C]L-703,717, preferentially binds to a cerebellar NMDA receptor subtype consisting of GluR $\epsilon 3$ subunits *in vivo*, but not *in vitro*. **Synapse** 43, 131-133.

Miyamoto, Y., Yamada, K., Noda, Y., Mori, H., Mishina, M. and Nabeshima, T. (2002) Lower sensitivity to stress and altered monoaminergic neuronal function in mice lacking the NMDA receptor $\epsilon 4$ subunit. **J. Neurosci.** 22, 2335-2342.

Takeuchi, T., Nomura, T., Tsujita, M., Suzuki, M., Fuse, T., Mori, H. and Mishina, M. (2002) Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 293, 953-957.

Yoshida, T., Ito, A., Matsuda, N. and Mishina, M. (2002) Regulation by protein kinase A switching of axonal pathfinding of zebrafish olfactory sensory neurons through the olfactory placode-olfactory bulb boundary. **J. Neurosci.** 22, 4964-4972.

Sakamoto, T., Mishina, M. and Niki, H. (2002) Mutation of NMDA receptor subunit epsilon 1: Effects on audiogenic-like seizures induced by electrical stimulation of the inferior coliculus in mice. **Mol. Brain Res.** 102, 113-117.

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

Ichikawa, R., Miyazaki, T., Kano, M., Hashikawa, T., Tatsumi, H., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y., and Watanabe, M. (2002) Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor GluR δ 2. **J. Neurosci.** 22, 8487-8503. (*)

Takatsuki, K., Kawahara, S., Kotani, Mori, H., Mishina, M. and Kirino, Y. (2002) Hippocampal damage disrupts eyeblink conditioning in mice lacking glutamate receptor δ 2. **J. Biol. Phys.** 28, 539-547.

Tokuoka, H., Yoshida, T., Matsuda, N. and Mishina, M. (2002) Regulation by glycogen synthase kinase-3 β of the arborization field and maturation of retinotectal projection in zebrafish. **J. Neurosci.** 22, 10324-10332.

Takatsuki, K., Kawahara, S., Kotani, S., Fukunaga, S., Mori, H., Mishina, M. and Kirino, Y. (2003) The hippocampus plays an important role in eyeblink conditioning with a short trace interval in glutamate receptor subunit $\delta 2$ mutant mice. **J. Neurosci.** 23, 17-22.

Townsend, M., Yoshii, A., Mishina, M. and Constantine-Paton, M. (2003) Developmental loss of miniature *N*-methyl-D-aspartate receptor currents in NR2A knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100, 1340-1345.

Fagiolini, M., Katagiri, H., Miyamoto, H., Grant, S. G. N., Mishina, M. and Hensch, T. (2003) Separable features of visual cortical plasticity revealed by *N*-methyl-D-aspartate receptor 2A signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100, 2854-2859.

Brickley, S. G., Misra, C., Mok, M. H. S., Mishina, M. and Cull-Candy, S. G., (2003) NR2B and NR2D subunits co-assemble in cerebellar Golgi cells to form a distinct NMDAR subtype restricted to extrasynaptic sites. **J. Neurosci.** 23, 4958-4966.

Okada, H., Miyakawa, N., Mori, H., Mishina, M., Miyamoto, Y. and Hisatsune, T. (2003) NMDA receptors in cortical development are essential for the generation of coordinated increase in $[Ca^{2+}]_i$ in 'neuronal domains'. **Cerebral Cortex** 13, 749-757.

Sato, T. and Mishina, M. (2003) Representational difference analysis, high-resolution physical mapping and transcript identification of the zebrafish genomic region for a motor behavior. **Genomics** 82, 218-229.

Inoue, M., Mishina, M. and Ueda, H. (2003) Locus-specific rescue of GluR $\epsilon 1$ NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. **J. Neurosci.** 23,

6529-6536.

Kitayama, T., Mishina, M. and Sugiyama, H. (2003) Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. **Neurosci. Res.** 47, 55-63.

Mishina, M. (2003) Timing determines the neural substrates for eyeblink conditioning. **Int. Congress Series** 1865, 473-486.

Yoshida, T. and Mishina, M. (2003) Neuron-specific gene manipulations in transparent zebrafish embryos. **Methods Cell Sci.** 25, 15-23.

Mori, H. and Mishina, M. (2003) Roles of diverse glutamate receptors in brain functions elucidated by subunit-specific and region-specific gene targeting. **Life Sciences** 74, 329-336.

Takahashi, Y., Mori, H., Mishina, M., Watanabe, M., Fujiwara, T., Shimomura, J., Aiba, H., Miyajima, T., Saito, Y., Nezu, A., Nishida, H., Imai, K., Sakaguchi, N., and Kondo, N. (2003) Autoantibodies to NMDA receptor in patients with chronic forms of epilepsy partialis continua. **Neurology** 61, 891-896.

Kitano, T., Matsumura, S., Seki, T., Hikida, T., Sakimura, K., Nagano, T., Mishina, M., Nakanishi, S. and Ito S. (2004) Characterization of *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits involved in acute ammonia toxicity. **Neurochem. Int.** 44, 83-90. (*)

Miyamoto, Y., Yamada, K., Nagai, T., Mori, H., Mishina, M., Furukawa, H., Noda, Y. and Nabeshima, T. (2004) Behavioral adaptations to addictive drugs in mice lacking the NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. **Eur. J. Neurosci.** 19, 151-158.

Murai, N., Tsuji, J., Ito, J., Mishina, M. and Hirano, T. (2004) Vestibular compensation in glutamate receptor delta-2 subunit

knockout mice: dynamic property of vestibulo-ocular reflex. **Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol** 261, 82-86.

Yoshida, T., Katoh, A., Ohtsuki, G., Mishina, M. and Hirano, T. (2004) Oscillating Purkinje neuron activity causing involuntary movement in a mutant mouse deficient in the glutamate receptor $\delta 2$ subunit. **J. Neurosci.** 24, 2440-2448.

Matsuda, N. and Mishina, M. (2004) Identification of chaperonin CCT γ subunit as a determinant of retinotectal development by whole-genome subtraction cloning from zebrafish *no tectal neuron* mutant. **Development** 131, 1913-1925.

Uemura, T., Mori, H., and Mishina, M. (2004) Direct interaction of GluR $\delta 2$ with Shank scaffold proteins in cerebellar Purkinje cells. **Mol. Cell. Neurosci.** 26, 330-341.

Fuse, T., Kanai, Y., Kanai-Azuma, M., Suzuki, M., Nakamura, K., Mori, H., Hayashi, Y. and Mishina, M. (2004) Conditional activation of RhoA suppresses the epithelial to mesenchymal transition at the primitive streak during mouse gastrulation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 318, 665-672.

Takehara, K., Kawahara, S., Munemoto, Y., Kuriyama, H., Mori, H., Mishina, M. and Kirino, Y. (2004) The NMDA receptor GluR $\epsilon 2$ is important for delay and trace eyeblink conditioning in mice. **Neurosci. Lett.** 364, 43-47.

Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N. and Mishina, M. (2004) A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. **Dev. Cell** 7, 133-144.

Abe, M., Fukaya, M., Yagi, T., Mishina, M., Watanabe, M. and Sakimura,

K. (2004) NMDA receptor GluR ϵ /NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluR ζ 1/NR1 subunit. **J. Neurosci.** 24, 9292-9304. (*)

Mikami, Y., Yoshida, T., Matsuda, N. and Mishina, M. (2004) Expression of zebrafish glutamate receptor δ 2 in neurons with cerebellum-like wiring. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 322, 168-176.

Nishimura, W., Muratani, T., Tatsumi, S., Sakimura, K., Mishina, M., Minami, T. and Ito, S. (2004) Characterization of *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits responsible for postoperative pain. **Eur. J. Pharmacol.** 503, 71-75. (*)

Ohtsuki, G., Kawaguchi, S., Mishina, M. and Hirano, T. (2004) Enhanced inhibitory synaptic transmission in the cerebellar molecular layer of the GluR δ 2 knockout mouse. **J. Neurosci.** 24, 10900-10907.

Hirai, H., Miyazaki, T., Kakegawa, W., Matsuda, S., Mishina, M., Watanabe, M. and Yuzaki, M. Rescue of abnormal phenotypes of the δ 2 glutamate receptor-null mice by mutant δ 2 transgenes. **EMBO Report** 6, 90-95, 2005.

Takeuchi, T., Miyazaki, T., Watanabe, M., Mori, H., Sakimura, K. and Mishina, M. Control of synaptic connection by glutamate receptor δ 2 in the adult cerebellum. **J. Neurosci.** 25, 2146-2156, 2005. (*)

Yoshida, T. and Mishina, M. Distinct roles of calcineurin-nuclear factor of activated T-cells and protein kinase A-cAMP response element binding protein signaling in presynaptic differentiation. **J. Neurosci.** 25, 3067-3079, 2005.

Sakamoto, T., Takatsuki, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Niki, H. and Mishina, M. Role of hippocampal NMDA receptors in trace eyeblink conditioning. **Brain Res.** 1039, 130-136, 2005.

Katoh, A., Yoshida, T., Himeshima, Y., Mishina, M. and Hirano, T. Defective control and adaptation of reflex eye movements in mutant mice deficient in either the glutamate receptor $\delta 2$ subunit or Purkinje cells. **Eur. J. Neurosci.** 21, 1315-1326, 2005.

Sato, Y., Kobayashi, E., Murayama, T., Mishina, M. and Seo, N. Effect of *N*-methyl-D-aspartate receptor $\epsilon 1$ subunit gene disruption of the action of general anesthetic drugs in mice. **Anesthesiology** 102, 557-561, 2005.

Takahashi, Y., Mori, H., Mishina, M., Watanabe, M., Kondo, N., Shimomura, J., Kubota, Y., Matsuda, K., Fukushima, K., Shiroma, N., Akasaka, N., Nishida, H., Imamura, A., Watanabe, H., Sugiyama, N., Ikezawa, M. and Fujiwara, T. Autoantibodies and cell-mediated autoimmunity to NMDA-type GluR $\epsilon 2$ in patients with Rasmussen's encephalitis and chronic progressive epilepsy partialis continua. **Epilepsia** 46 (Suppl. 5), 152-158, 2005.

Taniguchi, M., Masuda, T., Fukaya, M., Kataoka, H., Mishina, M., Yaginuma, H., Watanabe, M. and Shimizu, T. Identification and characterization of a novel member of murine semaphorin family. **Genes Cells** 10, 785-792, 2005.

Weitlauf, C., Honse, Y., Auberson, Y. P., Mishina, M., Lovinger, D. M. and Winder, D. G. Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA-receptor dependent long-term potentiation. **J. Neurosci.** 25, 8386-8390, 2005.

Abe, T., Matsumura, S., Katano, T., Mabuchi, T., Takagi, K., Xu, L., Yamamoto, A., Hattori, K., Yagi, T., Watanabe, M., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Sasaki, Y., Suzuki, M., Mishina, M., Nakai Y. and Ito, S. Fyn-kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr 1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. **Eur.**

J. Neurosci. 22, 1445-1454, 2005.

Wu, Y., Kawakami, R., Fukaya, M., Sakimura, K., Mishina, M., Watanabe, M., Ito, I. and Shigemoto, R. Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in Schaffer collateral synapses in $\epsilon 1$ /NR2A knockout mice. **J. Neurosci.** 25, 9213-9226, 2005. (*)

Yamashita, T., Miyagi, Y., Ono, M., Ito, H., Watanabe, K., Sonoda, T., Tsuzuki, K., Ozawa, S., Aoki, I., Okuda, K., Mishina, M. and Kawamoto, S. Identification and characterization of a novel Delphilin variant with an alternative N-terminus. **Mol. Brain Res.** 141, 83-95, 2005.

Kato, Y., Takatsuki, K., Kawahara, S., Fukunaga, S., Mori, H., Mishina, M. and Kirino, Y. N-methyl-D-aspartate receptors play important roles in acquisition and expression of the eyeblink conditioned response in glutamate receptor subunit $\delta 2$ mutant mice. **Neuroscience** 135, 1017-1023, 2005.

Takatsuki, K., Kawahara, S., Mishina, M. and Kirino, Y. Characterization of hippocampal theta rhythm in wild-type mice and glutamate receptor subunit $\delta 2$ mutant mice during eyeblink conditioning with a short trace interval. **Brain Res.** 1063, 159-167, 2005.

Matsuno, H., Okabe, S., Mishina, M., Yanagida, T., Mori, K. and Yoshihara, Y. Telencephalin slows spine maturation. **J. Neurosci.** 26, 1776-1786, 2006.

Kitamura, T., Mishina, M. and Sugiyama, H. (2006) Dietary restriction increases hippocampal neurogenesis by molecular mechanisms independent of NMDA receptors. **Neurosci. Lett.** 393, 94-96.

Kakegawa, W., Miyzaki, T., Hirai, H., Motohashi, J., Mishina, M., Watanabe, M. and Yuzaki, M. (2007) Ca^{2+} permeability of the channel

pore is not essential for the $\delta 2$ glutamate receptor channel to regulate synaptic plasticity and motor coordination. **J. Physiol.**, 597, 729-735.

Xu L, Okuda-Ashitaka E, Matsumura S, Mabuchi T, Okamoto S, Sakimura K, Mishina M, Ito S. (2007) Signal pathways coupled to activation of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord by nociceptin/orphanin FQ. **Neuropharmacology**. 52, 1318-25. (*)

Mishina, M. and Sakimura, K. (2007) Conditional gene targeting on the pure C57BL/6 genetic background. **Neurosci. Res.**, in press. (*)

Aiba A, Inokuchi K, Ishida Y, Itohara S, Kobayashi K, Masu M, Mishina M, Miyakawa T, Mori H, Nakao K, Obata Y, Sakimura K, Shiroishi T, Wada K, Yagi T. Mouse liaison for integrative brain research. **Neurosci Res.**, In press. (*)

崎村グループ (* 三品グループと共同)

Ichikawa, R., Miyazaki, T., Kano, M., Hashikawa, T., Tatsumi, H., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y. and Watanabe, M.: Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor $\delta 2$. **J. Neurosci.** 22, 8487-8503. 2002. (*)

Petrenko, A.B., Yamakura, T., Baba, H., Sakimura, K.: Unaltered pain-related behavior in mice lacking NMDA receptor GluR $\epsilon 1$ subunit. **Neurosci. Res.** 46, 199-204. 2003.

Honma, D., Uenishi, H., Hiraiwa, H., Watanabe, S., Weiran T., Kiyokawa, N., Fujimoto, J., Yasue, H. and Sakimura, K.: Cloning and characterization of porcine common γ chain gene. **J. Interferon Cytokine Res.** 23, 101-111. 2003.

Abe, M., Fukaya, M., Yagi, T., Mishina, M., Watanabe, M. and Sakimura, K.: NMDA receptor GluR ϵ /NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluR ζ 1/NR1 subunit. **J. Neurosci.** 24, 7292-7304. 2003. (*)

Petrenko, A.B., Yamakura, T., Fujiwara, N., Askalany, A.R., Baba, H. and Sakimura, K.: Reduced sensitivity to ketamine and pentobarbital in mice lacking the *N*-methyl-D-aspartate receptor GluR ϵ 1 subunit. **Anesth. Analg.** 99, 1136-1140. 2004.

Yamazaki, M., Ohno-Shosaku, T., Fukaya, M., Kano, M., Watanabe, M. and Sakimura, K.: A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity. **Neurosci. Res.** 50, 369-374. 2004

Yamakura, T., Askalany, A.R., Petrenko, A.B., Kohno, T., Baba, H. and Sakimura, K. The NR3B subunit does not alter the anesthetic sensitivities of recombinant *N*-methyl-D-aspartate receptors. **Anesth. Analg.** 100, 1687-1692. 2005.

Askalany, A.R., Yamakura, T., Petrenko, A.B., Kohno, T., Sakimura, K. and Baba, H. Effect of agmatine on heteromeric *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. **Neurosci. Res.** 52, 387-392. 2005.

Fukaya, M., Yamazaki, M., Sakimura, K. and Watanabe, M. Spatial diversity in gene expression for VDCC γ subunit family in developing and adult mouse brains. **Neurosci. Res.** 53, 376-383. 2005.

Wu, Y., Kawakami, R., Shinohara, Y., Fukaya, M., Sakimura, K., Mishina, M., Watanabe, M., Ito, I. and Shigemoto, R.: Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in schaffer collateral synapses in epsilon1/NR2A knock-out mice. **J. Neurosci.** 25, 9213-26. 2005. (*)

Petrenko, A.B., Yamakura, T., Askalany, A.R., Kohno, T., Sakimura, K. and Baba, H.:

Effects of ketamine on acute somatic nociception in wild-type and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor epsilon1 subunit knockout mice. **Neuropharmacology**. 50, 741-47. 2006.

Takahashi, M., Kakita, A., Futamura, T., Watanabe, Y., Mizuno, M., Sakimura, K., Castren, E., Nabeshima, T., Someya, T. and Nawa, H.: Sustained brain-derived neurotrophic factor up-regulation and sensorimotor gating abnormality induced by postnatal exposure to phencyclidine: comparison with adult treatment. **J. Neurochem**. 99, 770-80. 2006.

Fukaya, M., Tsujita, M., Yamazaki, M., Kushiya, E., Abe, M., Akashi, K., Natsume, R., Kano, M., Kamiya, H., Watanabe, M. and Sakimura K.: Abundant distribution of TARP gamma-8 in synaptic and extrasynaptic surface of hippocampal neurons and its major role in AMPA receptor expression on spines and dendrites. **Eur. J. Neurosci**. 24, 2177-90. 2006.

Huber, V.J., Tsujita, M., Yamazaki, M., Sakimura, K. and Nakada, T.: Identification of arylsulfonamides as Aquaporin 4 inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett**. 17, 1270-3. 2007.

Mishina, M. and Sakimura, K.: Conditional gene targeting on the pure C57BL/6 genetic background. **Neurosci. Res.** in press. (＊)

(2) 口頭発表

三品グループ

①招待、口頭講演 (国内 15 件、海外 6 件)

②ポスター発表 (国内 51 件、海外 32 件)

崎村グループ

①招待、口頭講演 (国内 0 件、海外 0 件)

②ポスター発表 (国内 10 件、海外 12 件)

三品グループ国際口頭 (＊崎村グループと共同)

M. Mishina (2002) Molecular genetics of the synapse formation and

function. 2002 International Society for Neurochemistry: Molecular Basis of Neuronal Signaling (July 2002, Sapporo). **Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry** 41, 278.

M. Mishina (2002) Roles of cerebellar purkinje cell-specific GluR δ 2 in the delay and trace eyeblink conditioning. Japan-UK Workshop from Molecules to Memory 2002. (August 2002, Nara). **Abstr.** p. 32.

M. Mishina (2002) Roles of glutamate receptors in eyeblink conditioning. International Symposium on Limbic and Association Cortical Systems: Basic, Clinical and Computational Aspects. (October 2002, Toyama). **Abstr.** p. 63.

M. Mishina (2002) Differential contribution of cerebellar purkinje cell-specific GluR δ 2 to delay and trace eyeblink conditioning. Molecular and Cellular Cognition Symposium (November 2002, Orlando, USA).

M. Mishina (2005) Control of Synaptic Matching and Connection by Glutamate Receptor δ 2 in the Adult Cerebellum. Neuroscience 2005 Satellite Symposium on "Unraveling Higher Brain Functions: Recent Progress with Animal Models" July 24-25, 2005, Yokohama (Organizers: S. Itohara, M. Mishina, A. Miyawaki and K. Wada).

T. Takeuchi, G. Ohtsuki, T. Yoshida, T. Hirano, M. Fukaya, T. Wainai, H. Mori, M. Watanabe, K. Sakimura, S. Kawamoto and M. Mishina (2006) Deletion of Delphilin facilitates cerebellar LTD and OKR adaptation. Cold Spring Harbor Laboratory, The 2006 Meeting on "Channels, Receptors & Synapses", (April 18-22, Cold Spring Harbor, USA). **Abstract**, p. 117. (*)

三品グループ国内口頭 (*崎村グループと共同)

森寿、川原茂敬、桐野豊、三品昌美 (2002) 「遺伝子ノックアウトマウスを用

いた運動学習解析」第 25 回日本神経科学大会シンポジウム (2002 年 7 月、東京)
抄録集 p. 104.

H. Mori, S. Kawahara, Y. Kirino and M. Mishina (2003) Timing-dependent roles of δ - and NMDA-type glutamate receptors in eyeblink conditioning. The 76th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society (24-26 March 2003, Fukuoka). **Journal of Pharmacological Sciences** 91 (Suppl. 1), 25.

H. Mori and M. Mishina (2003) Roles of diverse glutamate receptors in brain functions studied by subunit-specific and region-specific gene targeting. The 4th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects (May 22-24, 2003, Fukui). Program & Abstracts, 74.

H. Matsuno, K. Mori, S. Okabe, M. Mishina, T. Yanagida and Y. Yoshihara (2003) Regulation of dendritic filopodia formation and synapse maturation by telencephalin. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S39.

H. Mori, H. Kataoka, M. Fukaya, M. Watanabe, Y. Kiyama, F. Fukushima, T. Takeuchi, R. Natsume, K. Sakimura and M. Mishina (2003) Generation and analysis of striatum-selective NMDA receptor knockout mice. 第 46 回日本神経化学会年会 (September 26, 2003, Niigata, Japan). (*)

T. Yoshida and M. Mishina (2004) Dual phosphorylation signaling for axon terminal differentiation of zebrafish olfactory sensory neurons. The 77th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (March 8-10, 2004, Osaka). **J. Pharmacol.** 94 (Suppl. 1), 54.

T. Takeuchi, T. Miyazaki, M. Watanabe, H. Mori, K. Sakimura and M. Mishina (2004) Conditional ablation of glutamate receptor $\delta 2$ induces synaptic rearrangements in mature cerebellum. The 77th Annual Meeting

of the Japanese Pharmacological Society (March 8-10, 2004, Osaka).
J. Pharmacol. 94 (Suppl. 1), 65. (*)

N. Matsuda and M. Mishina (2004) Cloning of chaperonin cct γ gene essential for zebrafish retinotectal development by whole-genome subtraction. The 77th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (March 8-10, 2004, Osaka). **J. Pharmacol.** 94 (Suppl. 1), 94.

M. Mishina (2004) Glutamate receptors, neural networks and higher brain functions. The 124th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan (March 29-31, 2004, Osaka). 要旨集 p. 77.

M. Mishina (2004) グルタミン酸受容体と脳機能. 第 34 回日本神経精神薬理学会/第 26 回日本生物学的精神医学会合同年会 (July 21-23, 2004, Tokyo). 講演抄録 p. 84.

M. Mishina (2004) Glutamate receptor $\delta 2$ as a key molecule of cerebellar wiring and learning. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50, (Suppl. 1), S35.

T. Takeuchi, T. Miyazaki, M. Watanabe, H. Mori, K. Sakimura and M. Mishina (2004) Synaptic mismatching and disconnection by inducible and Purkinje cell-specific ablation of glutamate receptor $\delta 2$ in mature cerebellum. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50, (Suppl. 1), S35. (*)

F. Fukushima and M. Mishina (2005) Enhanced susceptibility to seizure in hippocampal CA3 region-specific NMDA receptor knock out mice. The 78th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society (March 22-24, 2005, Yokohama). **J. Pharmacol.** 97 (Suppl. 1), 53.

H. Kataoka and M. Mishina (2006) Effects of dopamine receptor ligands on locomotor activity of mutant mice lacking NMDA receptors selectively in the neostriatum (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 79.

T. Takeuchi, T. Yoshida, G. Ohtsuki, T. Hirano, T. Wainai, M. Fukaya, M. Watanabe, H. Mori, K. Sakimura, S. Kawamoto and M. Mishina (2006) Facilitated cerebellar LTD and OKR adaptation in mice lacking Delphilin (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 109. (*)

三品グループ国際ポスター (*崎村グループと共同)

S. Kawamoto, Y. Miyagi, T. Yamashita, H. Ito, K. Watanabe, T. Sonoda, M. Watanabe, K. Okuda and M. Mishina (2002) Molecular analyses of mouse and human delphilin, glutamate receptor $\delta 2$ -interacting protein. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (November 2002, Orlando, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 28: 139.12.

T. Takeuchi, T. Wainai, K. Hashimoto, M. Fukaya, M. Watanabe, H. Mori, K. Sakimura, M. Kano, S. Kawamoto and M. Mishina (2002) Enhanced Paired-pulse facilitation at parallel fiber-Purkinje cell synapses in mutant mice lacking postsynaptic GluR $\delta 2$ -interacting protein Delphillin. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (November 2002, Orlando, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 28: 139.13. (*)

H. Kataoka, H. Mori, M. Fukaya, M. Watanabe, Y. Kiyama, F. Fukushima, T. Takeuchi, R. Natsume, K. Sakimura and M. Mishina (2002) Striatum-specific NMDA receptor knockout mice. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (November 2002, Orlando, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 28: 263.6. (*)

T. Yoshida and M. Mishina (2002) Regulation by protein phosphorylation

of the axon terminal maturation of zebrafish olfactory sensory neurons. Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting (November 2002, Orlando, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 28: 528.5.

N. Matsuda and M. Mishina (2003) Analysis of retinotectal development by TMP deletion mutagenesis and whole-genome subtraction cloning. 3rd European Conference on Zebrafish and Medaka Genetics and Development (11-14 June 2003, Paris). **Abstract**, p. 119.

T. Yoshida and M. Mishina (2003) Dual signaling for axon terminal differentiation of zebrafish olfactory sensory neurons. 3rd European Conference on Zebrafish and Medaka Genetics and Development (11-14 June 2003, Paris). **Abstract**, p. 227.

S. Kawamoto, T. Sonoda, K. Watanabe, T. Yamashita, Y. Miyagi, M. Mishina and K. Okuda (2003) Interaction profile studies, using yeast two-hybrid and surface plasmon resonance analyses, of delphinin, glutamate receptor $\delta 2$ -interacting protein. Sixth Ibro world congress of neuroscience (10-15 July 2003, prague, Czech Republic). **Abstract**, p. 293.

N. Matsuda and M. Mishina (2003) Whole - Genome Subtraction cloning of chaperonin CCT γ gene as an essential regulator of zebrafish retinotectal development. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 567.23.

T. Takauchi, T. Miyazaki, M. Watanabe, H. Mori, K. Kitayama, K. Sakimura and M. Mishina (2003) Inducible and cerebellar Purkinje cell - specific knockout of glutamate receptor $\delta 2$ in C57BL/6 mouse. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 359.2. (*)

T. Yoshida and M. Mishina (2003) Regulation by protein kinase A and

calcineurin of axon terminal differentiation of zebrafish olfactory sensory neurons. Society for Neuroscience 33nd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 34.18.

T. Uemura, H. Mori and M. Mishina (2003) Identification of Shank scaffold proteins as GluR δ 2 – interacting molecules at parallel fiber – Purkinje cell synapses in the cerebellum. Society for Neuroscience 33nd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 169.3.

M. Fagiolini, J. C. Poyer, H. Matsuno, K. Mori, M. Mishina, Y. Yoshihara and T. K. Hensch (2003) Rapid functional development of visual cortex in mice lacking dendritic adhesion molecule telencephalin. Society for Neuroscience 33nd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 37.14.

G. G. Nagy, D. J. Maxwell, M. Watanabe, M. Mishina, K. Sakimura and A. J. Todd (2003) Apparent non-specific immunogold synaptic labelling with an NMDA receptor antibody. Society for Neuroscience 33nd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 64.10. (*)

H. Matsuno, K. Mori, S. Okabe, M. Mishina, T. Yanagida and Y. Yoshihara (2003) Regulation of dendritic filopodia morphogenesis by telencephalin. Society for Neuroscience 33nd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 144.23.

T. Kitamura, M. Mishina and H. Sugiyama (2003) Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. Society for Neuroscience 33nd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 348.6.

M. Abe, M. Fukaya, T. Yagi, M. Mishina, M. Watanabe and K. Sakimura

(2003) NMDA receptor $\text{gluR}\epsilon/\text{nr}2$ subunits are essential for postsynaptic localization of $\text{gluR}\zeta 1/\text{NR}1$ subunit in neurons *in vivo*, irrespective of its C-terminal forms. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 466.16. (*)

M. Inoue, M. Mishina and H. Ueda (2003) Locus-specific rescue of $\text{gluR}\epsilon 1$ NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 644.9.

M. Suzuki, K. Inoue, M. Mishina, K. Mitani, K. Ishiwata, K. Ishii (2003) Regional correlation of pre- and post-synaptic dopaminergic function in striatum of dementia with Lewy bodies: the comparison with Parkinson's disease - a voxel based analysis - . Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (8-12 November 2003, New Orleans, USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 917.9.

M. Abe, M. Fukaya, T. Yagi, M. Mishina, M. Watanabe and K. Sakimura (2004) NMDA receptor $\text{GluR}\epsilon/\text{NR}2$ subunits are essential for postsynaptic localization and protein stabilization of $\text{GluR}\zeta 1/\text{NR}1$ subunit in neurons *in vivo*. Cold Spring Harbor Meeting on "Channels, Receptors & Synapses" (April 21-25, 2004, New York). **Abstract** p.18. (*)

H. Kataoka, M. Fukaya, M. Watanabe, F. Urano, M. Kojima, H. Ichinose, K. Sakimura, H. Mori and M. Mishina (2004) Enhanced spontaneous locomotor activity of neostriatum-dominant NMDA receptor deficient mice. Cold Spring Harbor Meeting on "Channels, Receptors & Synapses" (April 21-25, 2004, New York). **Abstract** p.57. (*)

T. Takeuchi, T. Miyazaki, M. Watanabe, H. Mori, K. Sakimura and M. Mishina (2004) Induced ablation of glutamate receptor $\text{GluR}\delta 2$ alters synaptic structures in mature cerebellum. Cold Spring Harbor Meeting

on “Channels, Receptors & Synapses” (April 21–25, 2004, New York).
Abstract p. 120. (*)

H. Takeda, T. Yoshida, N. Matsuda and M. Mishina (2005) Expression of a dominant-negative CREB by doxycycline induction system suppressed lens differentiation during eye development in zebrafish. 4th European Conference on Zebrafish and Medaka Genetics and Development (13–16 July, Dresden). **Abstract**, p. 298.

F. Watanabe, M. Fukaya, K. Yamada, T. Nomura, T. Takeuchi, H. Mori, S. Noguchi, K. Sakimura, M. Watanabe and M. Mishina (2005) Impaired cerebellar foliation in nervous system-specific FAK deficient mice. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (12–16 November 2005, Washington D. C., USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 145.8. (*)

Y. Masuda, T. Yoshida and M. Mishina (2005) Regulation by β -neurexin of presynaptic maturation in zebrafish olfactory sensory neurons. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (12–16 November 2005, Washington D. C., USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 369.14.

C. Sekine, Y. Mikami, T. Yoshida and Masayoshi Mishina (2005) Zebrafish GABA_A receptor $\alpha 6$ subunit is selectively expressed in three neural circuits with cerebellum-like wiring. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (12–16 November 2005, Washington D. C., USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 260.11.

N. Kumazawa, E. Kato, H. Matsushiro, T. Takeuchi, M. Mishina, T. Manabe (2005) Roles of presynaptic TrkB receptors in synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting (12–16 November 2005, Washington D. C., USA). **Soc. Neurosci. Abstr.** 272.1.

H. Takeda, T. Yoshida, N. Matsuda, M. Mishina (2006) A dominant-negative CREB expression by Tet-On system suppressed the lens

differentiation during zebrafish development. The 7th International Conference on Zebrafish Development and Genetics (June 14-18, 2006, Madison, Wisconsin, USA). **Abstract**, p. 617.

X. Chen, Y. Masuda, T. Yoshida and M. Mishina (2006) Molecular cloning and expression patterns of zebrafish receptor protein tyrosine phosphatase σ . The 15th World Congress of Pharmacology (July 2-7, 2006, Beijing, China). **Abstract**, p. 95.

T. Yoshida, A. Uotsu, S. Uchida and M. Mishina (2006) Synaptic vesicle accumulation and morphological remodeling require distinct calcium signaling during presynaptic differentiation of zebrafish olfactory sensory neurons. Cold Spring Harbor Laboratory, The 2006 Meeting on "Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity", (September 13-17, Cold Spring Harbor, USA). **Abstract**, p. 218.

K. Nakao, F. Fukushima, and M. Mishina (2006) Aberrant spikes associated with multiple unit activities in mutant mice lacking NMDA receptors selectively in the hippocampal CA3 region. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (14-18 October 2006, Atlanta, USA). **Soc. Neurosci. Program#** 796.1.

N. Kumazawa, E. Kato, T. Takeuchi, Ayako M. Watabe, M. Mishina, T. Manabe (2006) The presynaptic TrkB receptor modulates an N-type Ca^{2+} channel-dependent component of post-tetanic potentiation. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (14-18 October 2006, Atlanta, USA). **Soc. Neurosci. Program#** 535.16.

H. Matsuno, S. Okabe, M. Mishina, T. Yanagida, K. Mori, Y. Yoshihara (2006) Telencephalin slows spine maturation. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (14-18 October 2006, Atlanta, USA). **Soc. Neurosci. Program#** 226.2.

三品グループ国内ポスター（＊崎村グループと共同）

T. Takeuchi, T. Wainai, Y. Miyagi, T. Yamashita, S. Kawamoto, M. Fukaya, M. Watanabe, K. Sakimura, H. Mori and M. Mishina (2002) Delphilin, a novel PDZ- and Formin homology-domain containing protein, interacts with GluR δ 2 subunit at parallel fiber synapses. The 75th annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society (March 2002, Kumamoto). **Jpn. J. Pharmacol.** 88 (Suppl. 1), 151. (*)

T. Fuse. Y. Kanai, M. kanai, K. Nakamura, M. Suzuki, H. Mori and M. Mishina (2002) The effect of constitutively active RhoA on the developmental of epiblast in mouse embryos. The 75th annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society (March 2002, Kumamoto). **Jpn. J. Pharmacol.** 88 (Suppl. 1), 170.

S. Kawamoto, Y. Miyagi, T. Yamashita, M. Fukaya, T. Sonoda, T. Okuno, K. Yamada, M. Watanabe, K. Okuda and M. Mishina (2002) Delphilin: a novel PDZ protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor δ 2 (June 2002, Sapporo). **Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry** 41, 193.

片岡宏隆、森寿、深谷昌弘、渡辺雅彦、城山優治、福島章顕、竹内倫徳、夏目里恵、崎村建司、三品昌美 (2002) 「生後発達期の線虫体における NMDA 受容体の役割」第 25 回日本神経科学大会 (2002 年 7 月、東京) **抄録集** p. 23. (*)

井上誠、三品昌美、植田弘師 (2002) 「NMDA 受容体 epsilon 1/NR2A サブユニットのモルヒネ耐性・依存性形成における役割」第 25 回日本神経科学大会 (2002 年 7 月、東京) **抄録集** p. 55.

M. H. Chung, Y. Tsuchimoto, H. Mori, M. Mishina and T. Hensch (2002) Role of Parvalbumin-positive inhibitory interneurons in neuronal plasticity of mouse visual cortex. The 25th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 2002, Tokyo). **Neuroscience Research Suppl.** 26, S98.

竹内倫徳、野村隆則、辻田実加、鈴木操、布施俊光、森寿、三品昌美 (2002) 「組み換え酵素 Flp 発現マウスの作成と部位時期特異的遺伝子ノックアウト法への応用」第 25 回日本神経科学大会 (2002 年 7 月、東京) 抄録集 p. 87.

Y. Wu, R. Kawakami, K. Sakimura, M. Mishina, I. Ito and R. Shigemoto (2003) Asymmetrical distribution of NMDA receptor $\epsilon 2$ subunit in hippocampal Schaffer-CA1 pyramidal cell synapses in $\epsilon 1$ Knock-out mice. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S65. (*)

Y. Mikami, N. Matsuda, T. Yoshida and M. Mishina (2003) Predominant expression of zebrafish glutamate receptor $\delta 2$ in the cerebellum. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S65.

N. Matsuda and M. Mishina (2003) Whole genome subtraction cloning of the *no tectal* neuron gene from mutant zebrafish obtained by TMP deletion mutagenesis. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S104.

F. Fukushima, M. Fukaya, H. Kataoka, M. Watanabe, I. Itoh, K. Akashi, K. Sakimura, H. Mori, and M. Mishina (2003) Increased seizure susceptibility of hippocampal CA3 region-selective NMDA receptor GluR $\zeta 1$ knockout mice. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S113. (*)

T. Kitamura, M. Mishina and H. Sugiyama (2003) Enhancement of neurogenesis by running wheel exercise is suppressed in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S124.

F. Watanabe, T. Takeuchi, T. Nomura, S. Noguchi, K. Sakimura, H. Mori

and M. Mishina (2003) Studies on the role of focal adhesion kinase in the brain by conditional gene targeting. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S128. (*)

Y. Masuda, T. Yoshida, N. Matsuda and M. Mishina (2003) Regulation by β -neurexin of the axon terminal maturation of the zebrafish olfactory sensory neuron. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S174.

T. Yoshida and M. Mishina (2003) Dual signaling for the axon terminal differentiation of the zebrafish olfactory sensory neurons. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S175.

T. Uemura, H. Mori and M. Mishina (2003) Interaction of GluR δ 2 with Shank scaffold proteins as a link to the signaling complex for cerebellar LTD. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S176.

H. Kataoka, M. Fukaya, M. Watanabe, F. Urano, M. Kojima, H. Ishinose, K. Sakimura, H. Mori and M. Mishina (2003) Enhanced spontaneous locomotor activity of neostriatum-dominant NMDA receptor deficient mice. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S185. (*)

H. Takeda, N. Matsuda and M. Mishina (2003) Yellow-green conditioning paradigm of associative learning in zebrafish. The 26th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society (July 23-25, 2003, Nagoya, Aichi). **Neurosci. Res.** 46, S193.

M. Abe, M. Fukaya, M. Mishina, M. Watanabe and K. Sakimura (2004) NMDA receptor GluR ϵ /NR2 subunits are essential for postsynaptic

localization and protein stability of GluR ζ 1/NR1 subunit. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50, (Suppl. 1), S74. (*)

T. Uemura, H. Mori and M. Mishina (2004) Direct interaction of GluR δ 2 with Shank scaffold proteins in cerebellar Purkinje cells. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50, (Suppl. 1), S75.

Y. Mikami, T. Yoshida, N. Matsuda and M. Mishina (2004) Zebrafish glutamate receptor δ 2 is expressed in selective neurons with wiring patterns similar to cerebellar Purkinje cells. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50, (Suppl. 1), S75.

N. Kumazawa, E. Kato, T. Takeuchi, M. Mishina and T. Manabe (2004) Roles of presynaptic TrkB receptors in the hippocampal CA1 region. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50, (Suppl. 1), S76.

E. Kato, T. Takeuchi, H. Matsushiro, H. Mori, M. Fukaya, M. Watanabe, K. Akashi, K. Sakimura and M. Mishina (2004) C57BL/6 mice lacking TrkB neurotrophin receptor in hippocampal CA3 region. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50,

(Suppl. 1), S76. (*)

Y. Masuda, T. Yoshida, N. Matsuda and M. Mishina (2004) β -Neurexin suppressed VAMP2-EGFP accumulation in axon terminals of zebrafish olfactory sensory neurons. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50, (Suppl. 1), S123.

T. Sakamoto, K. Takatsuki, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Niki and M. Mishina (2004) Role of hippocampal NMDA receptors in trace eyeblink conditioning. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50, (Suppl. 1), S194.

Y. Kato, K. Takatsuki, S. Kawahara, H. Mori, M. Mishina and Y. Kirino (2004) Different contribution of NMDA receptors to the eyeblink conditioning between GluR δ 2 mutant mice and wild-type mice. The 27th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society and The 3rd Joint Meeting of the Japan Neuroscience Society and The Japanese Society for Neurochemistry (September 21-23, 2004, Osaka). **Neurosci. Res.** 50, (Suppl. 1), S197.

F. Watanabe, M. Fukaya, K. Yamada, S. Noguchi, T. Nomura, T. Takeuchi, H. Mori, M. Watanabe, K. Sakimura and M. Mishina (2005) Impaired cerebellar foiation of mice lacking kinase domain of FAK in nervous system. The 78th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society (March 22-24, 2005, Yokohama). **J. Pharmacol.** 97 (Suppl. 1), 219.
(*)

E. Kato, N. Kumazawa, T. Takeuchi, T. Manabe, H. Matsushiro, H. Mori, M. Fukaya, M. Watanabe, K. Akashi, K. Sakimura and M. Mishina (2005) Presynaptic TrkB receptors regulate short-term plasticity at the

hippocampal CA3-CA1 synapses. The 78th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society (March 22-24, 2005, Yokohama). **J. Pharmacol.** 97 (Suppl. 1), 267. (*)

N. Kumazawa, E. Kato, H. Matsushiro, T. Takeuchi, M. Mishina and T. Manabe (2005) Roles of presynaptic TrkB receptors in synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region. The 28th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 26-28, 2005, Yokohama). **Neurosci. Res.** 52 (Suppl.), S78.

T. Kitamura, M. Mishina and H. Sugiyama (2005) Running exercises accelerate neuronal turnover in the dentate gyrus through activation of NMDA receptors. The 28th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 26-28, 2005, Yokohama). **Neurosci. Res.** 52 (Suppl.), S98.

C. Sekine, Y. Mikami, T. Yoshida and M. Mishina (2005) Zebrafish GABA_A receptor $\alpha 6$ subunit is selectively expressed in three neural circuits with cerebellum-like wiring. The 28th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 26-28, 2005, Yokohama). **Neurosci. Res.** 52 (Suppl.), S126.

F. Watanabe, M. Fukaya, K. Yamada, T. Nomura, T. Takeuchi, H. Mori, S. Noguchi, K. Sakimura, M. Watanabe and M. Mishina (2005) Impaired cerebellar foliation in nervous system specific FAK deficient mice. The 28th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 26-28, 2005, Yokohama). **Neurosci. Res.** 52 (Suppl.), S136. (*)

H. Matsuno, S. Okabe, M. Mishina, T. Yanagida, K. Mori and Y. Yoshihara (2005) Telencephalin slows spine maturation. The 28th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 26-28, 2005, Yokohama). **Neurosci. Res.** 52 (Suppl.), S183.

T. Uemura, T. Ikeda, S. Itohara and M. Mishina (2006) Inducible

ablation of cerebellar granule cells by a CrePR-loxP recombination system (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 207.

F. Fukushima, T. Shinoe, M. Fukaya, H. Kataoka, M. Watanabe, T. Manabe and M. Mishina (2006) Mechanisms of enhanced excitation in mutant mice lacking NMDA receptors selectively in the hippocampal CA3 region (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 208.

Y. Masuda, T. Yoshida and M. Mishina (2006) β -Neurexin selectively regulates synaptic vesicle accumulation in developing axon terminals of zebrafish olfactory sensory neurons *in vivo* (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 239.

Y. Mikami, C. Sekine, H. Sagara, T. Yoshida and M. Mishina (2006) Developmental expression of zebrafish glutamate receptor $\delta 2$ (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 245.

X. Chen, Y. Masuda, T. Yoshida and M. Mishina (2006) Molecular cloning and expression patterns of zebrafish receptor protein tyrosine phosphatases (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 245.

H. Tani, T. Yoshida and M. Mishina (2006). Molecular cloning and expression patterns of zebrafish SynCAM1 genes (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 246.

N. Tomita, T. Yoshida and M. Mishina (2006). Molecular cloning and expression pattern of zebrafish TM4SF2 gene (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 246.

F. Watanabe, T. Miyazaki, M. Fukaya, T. Takeuchi, M. Watanabe and M. Mishina (2006) Impaired cerebellar climbing fiber innervation in the nervous system-specific FAK deficient mice (March 8-10, 2006,

Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 246.

C. Sekine, Y. Mikami, T. Yoshida and M. Mishina (2006) Zebrafish GABA_A receptor $\alpha 6$ subunit is expressed in three neural circuits showing characteristic cerebellum-like wiring (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 247.

M. Yasumura, T. Uemura and M. Mishina (2006). Proteomic analysis of glutamate receptor $\delta 2$ mutant mice (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 247.

E. Kato, H. Mori, N. Saito, K. Sakimura and M. Mishina (2006) Establishment of GluR $\delta 2$ -tTA mouse line expressing tetracycline-controlled transactivator (tTA) selectively in cerebellar Purkinje cells (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 248. (*)

H. Takeda, T. Yoshida, N. Matsuda and M. Mishina (2006) Inducible expression of dominant-negative CREB by Tet-On system suppressed lens differentiation during zebrafish development (March 8-10, 2006, Yokohama). **J. Pharmacol.** 100 (Suppl. 1), 292.

K. Saito, K. Nakamura, T. Kakizaki, S. Ebihara, M. Uematsu, S. Takamori, M. Yokoyama, S. Konishi, M. Mishina, J. Miyazaki, K. Obata and Y. Yanagawa (2006) Generation and analysis of vesicular GABA transporter knockout mouse. The 29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 19-21, 2006, Kyoto). **Neurosci. Res.** 55 (Suppl. 1), S80.

T. Takeuchi, G. Ohtsuki, T. Yoshida, M. Fukaya, T. Wainai, H. Mori, K. Sakimura, S. Kawamoto, M. Watanabe, T. Hirano and M. Mishina (2006) Threshold regulation of cerebellar LTD is critical for motor learning efficiency. The 29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 19-21, 2006, Kyoto). **Neurosci. Res.** 55 (Suppl. 1), S98. (*)

N. Kumazawa, E. Kato, T. Takeuchi, A. M. Watabe, M. Mishina and T. Manabe (2006) The presynaptic TrkB receptor modulates an N-type Ca^{2+} channel-dependent component of post-tetanic potentiation [PTP]. The 29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 19-21, 2006, Kyoto). **Neurosci. Res.** 55 (Suppl. 1), S110.

W. Kakegawa, T. Miyazaki, H. Hirai, M. Mishina, M. Watanebe and M. Yuzaki (2006) Ca^{2+} influx through $\delta 2$ glutamate receptor is not required for cerebellar functions. The 29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 19-21, 2006, Kyoto). **Neurosci. Res.** 55 (Suppl. 1), S172.

M. Taniguchi, Y. Mikami, T. Masuda, T. Yoshida, N. Matsuda, M. Mishina and T. Shimizu (2006) Identification of a zebrafish semaphorin. The 29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 19-21, 2006, Kyoto). **Neurosci. Res.** 55 (Suppl. 1), S185.

S. Hasagawa, M. Yamaguchi, H. Nagao, M. Mishina and K. Mori (2006) Increased contacts between activated microglia and dendrites of hippocampal neurons following excitotoxic neuronal damage. The 29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (July 19-21, 2006, Kyoto). **Neurosci. Res.** 55 (Suppl. 1), S186.

崎村グループ国際ポスター (*三品グループと共同)

Sakimura, K., Hashimoto, K., Shimada, K. and Petrenko, A. B. : The role of NMDA receptors in excitotoxicity and ischemia. Society for Neuroscience 32th Annual Meeting, Orlando, USA, 11. 2002.

Abe, M., Fukaya, M., Yagi, T., Mishina, M., Watamabe, M., Sakimura, K. : NMDA receptor GluR ϵ /NR2 subunits are essential for postsynaptic localization of GluR ζ 1/NR1 subunit in neurons *in vivo*, irrespective of its C-terminal forms. Society for Neuroscience 33th Annual Meeting,

New Orleans, USA, 11. 8-12, 2003. (*)

Abe, M., Fukaya, M., Yagi, T., Mishina, M., Watamabe, M., Sakimura, K.: NMDA receptor GluR ϵ /NR2 subunits are essential for postsynaptic localization of GluR ζ 1/NR1 subunit in neurons *in vivo*. Channels, Receptors & Synapses Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 4. 22, 2004. (*)

Yamazaki, M., Shosaku, T., Fukaya, M., Kano, M., Watanabe, M., Sakimura, K.: Functional association of AMPA receptor with calcium channel γ subunits. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, USA, 10. 23~27, 2004.

Kakizaki, T., Akashi, K., Kamiya, H., Fukaya, M., Abe, M., Natsume, R., Watanabe, M. and Sakimura, K.: NMDA receptor GluR ϵ 2 subunit is crucial for hippocampal synaptic function. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, USA, 10. 23~27, 2004.

Akashi, K., Kakizaki, T., Kamiya, H., Fukaya, M., Watanabe, M. and Sakimura, K.: NMDA receptor GluR ϵ 2/NR2B subunit is crucial for hippocampal synaptic functions. The 20th Biennial Meeting of the ISN and the ESN, Innsbruck, Austria, 8. 21-26, 2005.

Usui, H., Ichikawa, T., Kobayashi, K., Sakimura, K. and Kumanishi, T.: Human lethal(3)malignant brain tumor (H-L(3)MBT) gene regulates cell proliferation and Hox expression. The 20th Biennial Meeting of the ISN and the ESN, Innsbruck, Austria, 8. 21-26, 2005.

Yamazaki, M., Ohno - Shosaku, T., Fukaya, M., Kano, M., Watanabe, M., Sakimura, K.: Calcium channel γ subunit is an AMPA receptor cofactor. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington, D.C., USA, 11.16, 2005.

Akashi, K., Kamiya, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Natsume, R., Abe,

M., Kakizaki, T., Sakimura, K.: Kainate receptor including GluR γ 1 subunit is involved in the hippocampus related learning and memory. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington, D.C., USA, 11. 16, 2005.

Yamazaki, M., Ohno - Shosaku, T., Fukaya, M., Kano, M., Watanabe, M. and Sakimura, K.: Stargazin family g-4 is involved in the dynamics of AMPA receptor expression. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, Atlanta, USA, 10.15, 2006.

Akashi K., Abe M., Kakizaki T., Natsume R., Sakimura K.: Effects of GluR β 2/GluR6 disruption on dynamics of the other kainate receptor subunits. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, Atlanta, USA, 10.15, 2006.

Abe, M., Natsume, R., Tsujita, M., Usui, H and Sakimura, K.: Generation of Cre-expressing mouse using C57BL/6 ES cell RENKA for the analysis of brain function. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, Atlanta, USA, 10.15, 2006.

崎村グループ国内ポスター（＊三品グループと共同）

明石馨，柿崎利和，阿部学，夏目里恵，崎村建司： γ 1 サブユニット欠損マウスを用いたカイニン酸型グルタミン酸受容体の機能解析．第 75 回日本生化学会大会，京都市，10. 2004.

Sakimura, K.:Development of a temporal and cell-specific gene knockout mouse and its application to brain research. 第 46 回日本神経化学会，新潟，9. 24-26, 2003.

崎村建司、山崎真弥、少作隆子、深谷昌弘、狩野方伸、渡辺雅彦：AMPA 型受容体チャネルの活性調節機序とその機能．第 77 回日本薬理学会年会，大阪，3. 8-10, 2004.

阿部学，深谷昌弘，三品昌美，渡辺雅彦，崎村建司：NMDA 受容体 GluRε/NR2 サブユニットは GluRζ 1/NR1 サブユニットのポストシナプスへの局在化とタンパク安定化に必須である． Neuro2004（第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会），大阪， 9. 21～23， 2004. （＊）

山崎真弥，少作隆子，深谷昌弘，狩野方伸，渡辺雅彦，崎村建司：Stargazin ファミリーは AMPA 型受容体のサブユニットか？ Neuro2004（第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会），大阪， 9. 21～23， 2004.

山崎真弥，小作隆子，深谷昌弘，狩野方伸，渡辺雅彦，崎村建司：カルシウムチャネルγサブユニットは AMPA 型受容体機能に必要な補助因子である．第 28 回日本神経科学大会，横浜， 7. 28， 2005.

辻田実加，深谷昌弘，神谷温之，阿部 学，山崎真弥，櫛谷悦子，夏目里恵，渡辺雅彦，崎村建司：海馬 AMPA 型グルタミン酸受容体の分布と機能における TARPγ-8 の役割．第 79 回日本薬理学会年会，横浜， 3. 8， 2006.

李 平和，阿部 学，山崎真弥，辻田実加，夏目里恵，崎村建司：TARPγ-2 コンディショナルノックアウトマウスの作成．第 79 回日本薬理学会年会， 横浜， 3. 10， 2006.

畦地裕統，阿部学，夏目里恵，崎村建司：GluRα2 ノックアウトマウスの作製と生化学的解析．第 29 回神経科学大会，京都， 7. 19， 2006.

駒井太陽，山崎真弥，辻田実加，阿部学，夏目里恵，崎村建司：Stargazin ファミリーγ4 ノックアウトマウスにおける AMPA 型受容体発現量の解析．第 29 回神経科学大会，京都， 7. 19， 2006.

明石馨，阿部学，柿崎利和，夏目里恵，崎村建司：GluRβ2/GluR6 サブユニット欠損によるカイニン酸受容体サブユニットの動態への影響．第 29 回神経科学大会，京都， 7. 19， 2006.

(3)特許出願（国内 1 件、海外 0 件）

発明者 崎村建司

発明の名称 「近交系 C 5 7 B L / 6 由来 E S 細胞株 R E N K A 及びこの細胞を用いたキメラマウス作製法」

出願人 科学技術振興事業団

出願日 平成 14 年 10 月 24 日

(4) 新聞報道等

① 新聞報道

著作権保護のため、非表示にしています。（科学技術振興機構）

② 受賞

2003 年 6 月 17 日 第 44 回藤原賞 藤原科学財団

「神経情報伝達と脳可塑性の分子機構に関する先駆的研究」

7. 結び

我々は、「均一な C57BL/6 マウスの遺伝的背景における部位時期特異的標的遺伝子組換え法」および「ゼブラフィッシュ神経回路特異的分子操作法」を開発することに成功した。標的遺伝子組換え法は、ポストゲノム時代の中心的課題である遺伝子と生体機能との関係を解明する重要な方法論として広く用いられ、臓器特異的、時期特異的および可逆的など様々な開発が進められている。しかしな

がら、世界的に広く使用されているE S細胞は問題の多い1 2 9系統マウス由来であり、このため掛け合わせによりB 6系統マウスなどのゲノムに近づけた遺伝背景で生体機能の解析が進められているのが現状である。雑多な遺伝的背景の集合体をもとにして得られた遺伝子機能解析データは、科学的価値がきわめて乏しいものであるのは明らかであるのも拘わらず、1 2 9系統マウス由来のE S細胞を用いた標的遺伝子組換え法以外に有効な手段がなく、多くの実験が進められているのが世界的な現状である。我々は、この状況を打破し、均一なB 6マウスの遺伝的背景における遺伝子機能の解析を可能にし、世界標準となる価値ある遺伝子機能解析系を打ち立てることに成功している。本研究の支援により、この独自の метод論による成果を広く成果に発信していくことにより、生命科学の発展に大きく貢献すると考えられる。また、ゼブラフィッシュは人類と共通の脊椎動物のモデル生物として世界的な脚光を浴び、欧米で遺伝学が大規模に進められている。我が国でも同様なプロジェクトに研究費が投資されている。我々は、ゼブラフィッシュの逆遺伝学の開発の成功しており、全ゲノムの解析が終わった後の個体レベルの遺伝子機能解析に大きな威力を示すと考えられる。我が国から独自性のある研究成果を世界に発信していくことが重要であることは自明である。ゼブラフィッシュ分子遺伝学やマウスの標的遺伝子組み換え法は、ポストゲノム時代の脳研究のみならず生命科学研究全体の発展に大きく貢献するものである。我々の方法論は、いずれも独自に開発したものであり、旧来の方法論を打破して新たな地平を開くことが出来、脳研究という重要分野において世界に発信して行くことが出来ると考えている。これらの方法論を発展させていくためには、ポストドクや実験補助員の人的資源が必須である。脊椎動物のモデル生物であるゼブラフィッシュおよびマウスを多数飼育、維持していくことが地道ではあるが必要不可欠である。科学技術振興事業団による研究支援はポストドクや実験補助員の雇用に極めて有用であり、大きな力となったことを強調し、貴事業団のご支援に対し心より感謝申し上げます。

