

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題
「脳における神経回路形成と細胞移動」

研究期間：平成14年11月 1日～
平成19年 3月31日

村上 富士夫
(大阪大学、教授)

1. 研究実施の概要

脳の機能の解明は人類に残された最後の課題であり、それに向けて様々なアプローチが試みられている。その構築過程である発生、特に神経回路形成の機構の解明は極めて有効なアプローチの一つである。また、神経細胞は軸索伸長に先立ち、移動を行い、脳内の正しい位置に到達するが、これは回路形成が正しく行われるために必須のプロセスである。この両者には密接な関係があり、統一的な理解が必要である。しかし、細胞移動や軸索伸長の機構の解明に関しては、現象の正確な記述とそれを忠実に再現することの出来る *in vitro* の標本が必要である。軸索伸長に関しては固定標本に DiI 等のトレーサーを注入や、分子マーカーによる染色をおこなうことで、*in vivo* の知見が得られるが、細胞移動の解析にはそのような方法が使えない。そのため、移動に関しては、その機構はおろか現象レベルの解析でさえ十分ではない。

近年、分子生物学を利用した分子標識による細胞可視化技術や顕微鏡技術の発展に支えられ、細胞移動の機構の解析が世界中で急速に進められつつある。然るに我が国における当該分野の研究への関心は決して高いとは言えず、世界に遅れをとる可能性が高い。その前に強力な推進体制の構築が必要である。これまでに我々が推進してきた神経回路形成とその可塑性の分子機構で培った培養技術をはじめとする様々な実験技術や知見は、そのまま利用することが可能である。また細胞移動の分子機構を調べることによって得られる知見は、神経回路形成の分子機構の解明の発展にフィードバックさせることが出来る。

本研究では、神経回路形成の機構と細胞移動の機構との関係を明らかにし、2つの現象を統合的に理解することを目指した。細胞移動の機構を解明するためには、固定標本の観察だけでは不十分であり、移動のダイナミクスを明らかにする必要がある。そこで本研究では前脳、後脳の神経細胞を用い、まず移動のダイナミクスの解析を進める。その知見をもとに *in utero* 電気穿孔による遺伝子導入、遺伝子改変動物の利用、スライスあるいは展開脳標本への操作を駆使し、細胞移動のメカニズムと回路形成との関係の解明を目指した。脳の機能の解明は人類に残された最後の課題であり、脳の機能の解明に向けて様々なアプローチが試みられているが、その構築過程である発生、特に神経回路形成の機構の解明は極めて有効なアプローチの一つであると考ええる。

以上の目的のために、研究代表者グループでは主に2つの実験系を用いて研究を推進した。その一つは大腦皮質の神経細胞であり、2番目は後脳の小脳前核を形成する神経細胞である。前者においては以下の発見があった。

D) *In utero* 並びに、*in vitro* エレクトロポレーション法を用いることにより、GFP 遺伝子を大腦皮質の脳室層の細胞に導入することに成功し、以下の結果を得た。

- 1) 大腦皮質の脳室層で生まれた細胞は法線方向に移動し、錐体細胞へと分化する。またこれらの細胞を生み出す細胞はこれまで放射状グリアと呼ばれていた細胞である (Hatanaka and Murakami, 2002)。
- 2) この移動の過程において、遅生まれの細胞の放射状グリアに沿った移動には *cdk5* が関与している (Hatanaka et al., 2004)。

II) いっぽう研究分担者である、柳川らが開発した GAD67-GFP マウス、電気穿孔による蛍光蛋白遺伝子の大腦基底核原基への導入により、GABA 作動性局所回路ニューロン（以下 GABA ニューロンと記す）を可視化し、大腦皮質内での GABA ニューロンの移動様式を明らかにした。

- 1) 大脳基底核原基から皮質に進入した GABA ニューロンは主に中間帯通って皮質内に進入する。
- 2) その一部は表面に向かって動き、辺縁帯に移動する。
- 3) 驚いたことに辺縁帯に到着した後は、GABA ニューロンは特定の方向ではなく多方向に、そして長距離に互って移動をする(Tanaka et al., 2003)。
- 4) これらの細胞は長時間（数日）に互って辺縁帯に滞留している。
- 5) その後 GABA ニューロンは皮質板に向かって降る。

これらの事実は神経細胞の移動の概念を変えるものである。即ち、移動細胞には特定の方向性があると考えられてきたが、我々の発見は移動の途中で細胞が「ぶらつく」過程があることを示しており、全く予期せぬ結果が得られた。

後脳における神経細胞移動と神経核形成のメカニズム

以上の研究と平行して、我々は後脳の菱脳唇由来の神経細胞を用いて移動と神経核形成のメカニズムの研究を推進し、神経核形成の過程の可視化に成功するとともに、その分子機構の一端を明らかにした。具体的には、第四脳室に **egfp** の遺伝子を導入し、電気穿孔法を適用することで細胞を標識して移動を追跡した。その結果、後方のルートを移動する外側網様核と外楔状束核は、これまでの報告の通り、反対側に神経核を形成した。一方、前方のルートを移動する橋核と橋被蓋網様核を形成するニューロンは一部が正中線を交差し、反対側にも神経核を形成した。また何れの移動細胞も移動方向を接線方向から法線方向に変化させ、脳幹の深部に向かって移動して神経核を形成した。また興味深いことに法線方向に向かう際には放射状グリアの突起に沿って細胞が移動している様子が観察された。このように神経核形成は単に移動細胞がその移動を停止させるのみではなく、複雑に移動の様式を変化させることによって実現されることが明らかになった。

神経回路形成との比較

細胞の「ぶらつき」：GABA ニューロンが辺縁帯で一定時間を過ごすという事実は軸索の挙動とも類似していて興味深い。すなわち視床-大脳皮質投射をはじめとする幾つかの投射系では軸索が最終標的に到達する前にその手前で一定期間伸長を停止する「待ち」のモードがあることが知られている。移動細胞の「ぶらつき」がどのような意味を持っているかを考える上でこの共通性は興味深い。一方、軸索の場合、本研究で観察されたような多方向に彷徨うような動きをする例は存在せず、両者のガイド機構には明らかに違いがあることを意味する。

一方、後脳の小脳前核細胞の移動に関しては興味深い共通性が見られた。スペースの都合により、詳述できなかったが、小脳前核細胞が正中線を交差する前には **Slit** の受容体である **Robo1** も **Robo2** も発現しておらず、交差後に初めてその発現が認められる。また **Robo3** に関しては交差前から発現している。このような発現パターンとその変化は脊髄の交連性線維の示すものと同様であり、軸索の成長円錐と移動細胞とで正中線の交差の機構に共通性があることを示唆するものである。また細胞移動への関与が知られている **Ephrin/Eph** システムが後脳における軸索伸張の方向を決めるのにも関与していることを明らかにした。

2. 研究構想

神経細胞は軸索伸長に先立ち、移動を行い、脳内の正しい位置に到達する。これは神経回路形成にとって重要であるとともに神経核や層状構造の構築、さらには特定の部位での神経細胞の多様性の確立に必須である。細胞移動は、その軌跡が残らないため、神経回路形成の場合とは異なり、固定標本の観察だけでは限られた情報しか得られず、細胞の動きを何らかの方法で捉える必要がある。

本研究では神経細胞の移動の分子機構を明らかにするため、我々が神経回路形成の研究で開発した *in vivo* 標本に極めて近い標本である後脳、前脳の展開標本等を用い、GFPで可視化した細胞移動のダイナミクスの解析を進める。またその知見をもとに遺伝子導入、遺伝子改変動物の利用、スライス、展開脳標本への操作を駆使し、神経細胞移動のメカニズムの解明を目指す。

3. 研究内容

3. 1 “脳における神経回路形成と細胞移動（村上グループ）”

（1）実施の内容

【平成 14 年度】

1) GABA 作動性介在ニューロンの皮質内移動とその動態

中枢神経系の発生において、ニューロンは各領域に特異的な様式に従って移動・配列し、皮質構造や神経核を形成する。脳の構造基盤の形成原理を解明するには、それを構成する主要なニューロンがどこで生まれ、どのように移動するのかを明らかにする必要がある。大脳皮質を構成するニューロンの約 20%は GABA 作動性の介在ニューロンとされており、近年それらのニューロンは胎仔発生期において大脳基底核原基から大脳皮質へ移動してくるとされている。この移動は大脳皮質の特定の経路で起こるが、その移動経路を制御するメカニズムは未だ不明である。大脳皮質 GABA 作動性ニューロンの移動制御のメカニズムを解明する上で、これらニューロンの移動様式や動態を詳細に観察することは極めて重要な示唆を与えてくれると期待される。

我々はほぼ全ての GABA 作動性ニューロンで特異的に GFP が発現する GAD67-GFP ノックインマウスを用いて大脳皮質の冠状断スライス標本と展開標本を作製し、大脳皮質における GABA 作動性ニューロンの動態をタイムラプス観察し、その移動速度と運動方向を定量した。その結果、中間層と脳室下層では接線方向の顕著な移動が観察された一方、辺縁層や皮質板、サブプレートに分布する GABA 作動性ニューロンの多くはわずかな運動性しか示さなかった。さらにその移動の運動性や方向性は細胞によって実に多様であり、脳表面に対し垂直方向に移動する細胞や、接線方向ではあるが大部分の細胞とは逆に大脳基底核原基の方向へ戻るように移動する細胞もわずかに観察された。また多くの細胞は、跳躍的な動態を示していた。これらの結果より、発生中の大脳皮質において GABA 作動性ニューロンはそれぞれの層で特異的な動態を示すことが明らかになった。これら特徴的な動態の大部分はこれまでに提唱されている移動制御メカニズムだけでは十分に説明できず、このことはそれぞれの層での特異的な運動を可能にする、新たな移動制御メカニズムが存在することを示唆している。

2) 培養系における大脳皮質錐体細胞の起源と移動動態、およびその形態分化の解析

神経細胞は、発生過程において様々なメカニズムのもとにそれぞれの決められた場所へと移動する。大脳皮質脳室帯の細胞については、これが法線方向に移動して錐体細胞にな

るという証拠が集まりつつあるが、法線方向に移動する細胞の起源と、これがどのような細胞に分化するかについての解析は十分でない。さらに移動細胞の形態とその成熟細胞の形態との関係も不明瞭なままである。そこでこれらの問題の解決を目指した。

まず、大脳皮質脳室帯由来の細胞動態を可視化し、解析できる培養系を作成し、次に胎生18-19日のラット胎仔脳の脳室帯細胞をエレクトロポレーション法により GFP で標識した。その後大脳皮質をスライス状に切ってこれを器官培養した。

培養1日後の GFP 陽性細胞は神経前駆細胞とラジアルグリア細胞の両方の性質を示した。その後数日の間にかかなりの数の GFP 陽性細胞が脳の表層方向に向かって移動した。これらの細胞は先端突起を脳表層に向け、細胞の後端に脳室帯にも届くような細長い突起を残していた。先端突起は MAP2 陽性であり、培養5-6日目になると、あるものは樹状突起状に形態変化が認められた。一方、後端から伸びている突起は軸索の様な形態的特徴を有していた。移動細胞の後端突起の経時的変化を追ったところ、その先端が軸索のように伸長することが確認された。種々の分子マーカーや形態的な解析の結果はこれら GFP 陽性細胞の殆どが錐体細胞様の興奮性神経細胞になったことを示した。以上の結果は脳室帯の細胞が放射状方向に移動する神経細胞を生み出すこと、これら移動細胞の持つ先端突起、細胞後端の突起がそれぞれその後の樹状突起、軸索になること、そしてこれら細胞が錐体細胞へと分化していくことを示していると考えられる(Hatanaka and Murakami., 2002)。

3) 腹側正中線の通過による小脳前核神経細胞の底板由来誘引分子、翼板由来誘引分子に対する反応性の解析

発生期における神経細胞の移動は、層構造や神経核といった中枢神経系における機能、構造単位を形成するために不可欠な現象である。しかしながら、神経細胞の移動方向を制御するメカニズムに関する知見は非常に少なく、本研究ではその知見を得ることを目的とした。

ラット後脳の二次元展開培養を用い、小脳前核神経細胞が正中線を越えて移動するメカニズムを解析した。

これらの細胞は最初腹側正中線の底板によって誘引されるが、一度正中線を越えると、底板の誘引分子に対する反応性を失い、翼板に誘引されるようになることが明らかになった。また、正中線におけるこれらの細胞の底板由来誘引分子に対する反応性消失は底板との遭遇に依存するが、翼板由来誘引分子に対する反応性獲得は底板との遭遇を必要としないことがわかった。これらの結果は正中線付近で小脳前核神経細胞が底板由来誘引分子、翼板由来誘引分子に対する反応性を変化させることがそれらの正中線を越える移動に重要な役割を果たしていることを示唆している(Taniguchi et al., 2002)。

【平成15年度】

上に述べたように本年度は前脳と後脳の2つの系を用いて、細胞移動のメカニズムの検討をおこなった。以下ではこれらの中でも特に研究の進展の著しかった大脳皮質における神経細胞の放射状方向への移動に関して詳しく述べる。

1) 大脳皮質興奮性細胞の移動と分化

哺乳動物大脳皮質の発生過程において、ニューロンは脳室帯 (VZ, ventricular zone) で生まれる。VZで生まれたニューロンはVZを離れ、SVZ (subventricular zone)、IZ (intermediate zone) を通ってCP (cortical plate) に到達する。大脳皮質のニューロンの移動に関して、radial、tangential 両方向の移動が報告されている。radial 方向の移動は

大脳皮質の層構造を構築するために必須の役割を持つ。Rakic(1972)はサル胎児脳において大脳皮質ニューロンが radial glia の細い突起に接していることを観察することによって、大脳皮質ニューロンが radial glia の細い突起上を移動することを提言した。このことは *in vitro* においても分散培養系で radial glia と移動中のニューロンとのダイナミックスを解析することによって支持された。さらに、ラット胎生 18-19 日の VZ 由来のニューロンがスライス培養系で radial glia の細い突起と接しながら移動することを観察した。これらのことによりグリア細胞にガイドされたニューロンの移動は大脳皮質ニューロン移動の主要な原理であることが受け入れられてきた。

しかし、radial glia によらない radial 方向の移動に関してもいくつかの報告がある。例えば nuclear translocation は、細胞分裂中の細胞内で分裂した一方の核が細胞質中を細胞分裂が終わる前に移動していくというもので、グリア細胞にガイドされる様式とは異なる移動である (Berry と Rodgers(1965))。タイムラプスによる観察によると radial 方向に少なくとも 2 つの移動様式がある。somal translocation と locomotion である。これらの 2 つの移動様式が存在するが、これらの 2 つの異なる様式を担うメカニズムは何であろうかという疑問が生じる。somal translocation はマウス胎生 13-14 日という比較的早い時期に観察されるが locomotion はそれ以後の遅い時期に観察される。従ってこれらの移動様式と発生段階との間に相関があることが考えられる。しかしこれまでこのことについて系統的に調べた研究は無く、これらが異なるメカニズムによっているのかについても不明のままであった。

そこで本研究では胎生 12.5 日と胎生 15.5 日齢で GFP 遺伝子導入されたマウスで VZ 細胞の移動を観察し、早い時期、遅い時期での細胞移動の解析を行った。また Cdk5 遺伝子ドミナントネガティブを導入することにより遅い時期に生まれたニューロンの移動に Cdk5 が関与していることを明らかにした

胎生 12.5-16.5 日齢での VZ 細胞の動態

実験には ICR 系統のマウスを用い、GFP (green fluorescent protein) を組み込んだプラスミドを使って子宮内電気穿孔を行った。GFP 陽性細胞が大脳皮質のどの層に位置するかは電気穿孔をする時期による。E12.5 に電気穿孔をしたものでは GFP 陽性細胞は 4-6 層に見られた。E13.5 に電気穿孔をしたものでは 2-5 層に見られた。E14.5 に電気穿孔をしたものでは 2/3 層と 4 層の上部に見られた。E15.5 と E16.5 でラベルしたサンプルでは 2/3 層の上部にのみ見られた (図 1)。これらの結果は下層部が先にできて、上層部があとからできるというこれまで言われている神経細胞発生の原理と一致する。大部分の VZ 細胞は興奮性ニューロンへと分化することが報告されている。2/3 層、5 層、6 層の GFP 陽性細胞は錐体細胞形をしていた。4 層の GFP 陽性細胞は spiny stellate cell の形状に似ていた。

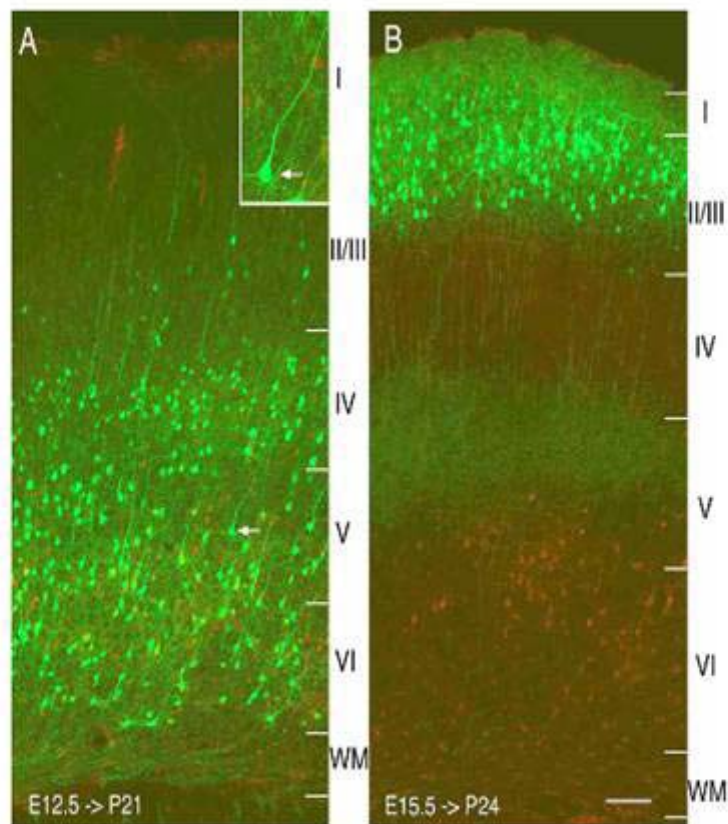


図1：in utero 電気穿孔法によって標識された大脳皮質の細胞。胎生12.5日目めの標識で皮質の深部(A)に、15.5日目に標識では表層部に(B)細胞が標識されている。

次に、**somal translocation** は胎生13-14日齢マウスで起こることが報告されているので、胎生12.5日に電気穿孔をしたサンプルで解析した。胎生13.5日で観察したところVZでは紡錘形をしたニューロンが**radial** 方向に配列しているのが観察された(図2)。しかし背側大脳皮質においてVZより上の層では**stellate cell** 様の細胞が観察された。このことは、VZ細胞は最初**radial** 方向に配列しているがVZを離れるとその形態も配向も変わることを示している。さらに、**stellate cell** が**radial glia** と接しながら移動しているかを確認するために**nestin** の免疫染色を用いて観察したところ、はっきりした接触の様子は観察されなかったので、**stellate cell** のIZおよびpro-CP(未発達のCP)での移動には**radial glial fiber** が関与していないことが考えられる。

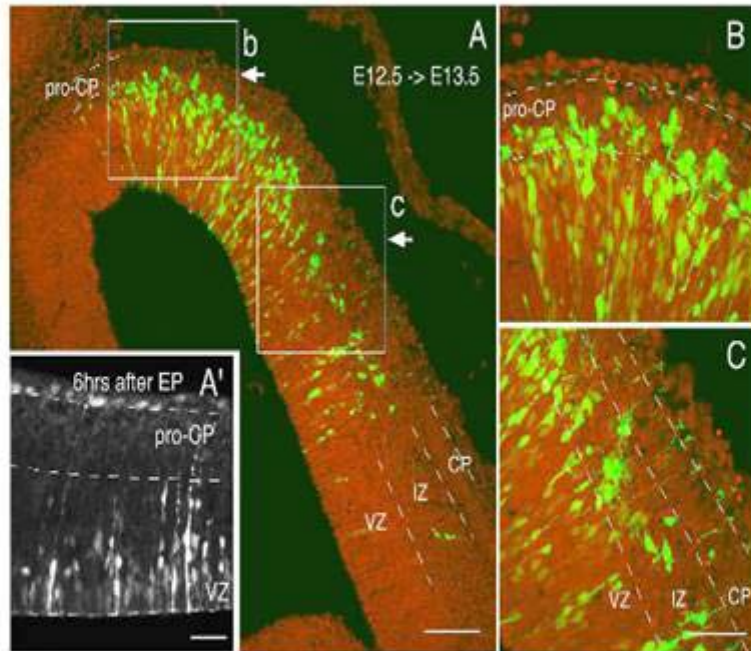


図 2：遺伝子導入直後の標識細胞の形態。正中線に近い部位では細胞体の多くは表層付近に到達しているのに対して (A, B)、外側部 (A, C) ではその手前に留まっている。

遅い時期（胎生 15.5 日）に生まれたニューロンは急速にその大脳皮質内での位置を変えて移動する（図 3）。胎生 15.5 日に電気穿孔を施した後 1 日目の胎生 16.5 日にはほとんどの GFP 陽性細胞は VZ と SVZ に存在する。胎生 17.5 日では一部は IZ にも見られ、胎生 18.5 日では CP にも見られるようになる。P（生後）0 日では CP の最上層部にも見られる（図 3 D）。細胞移動は P 3 日でほぼ完了する。

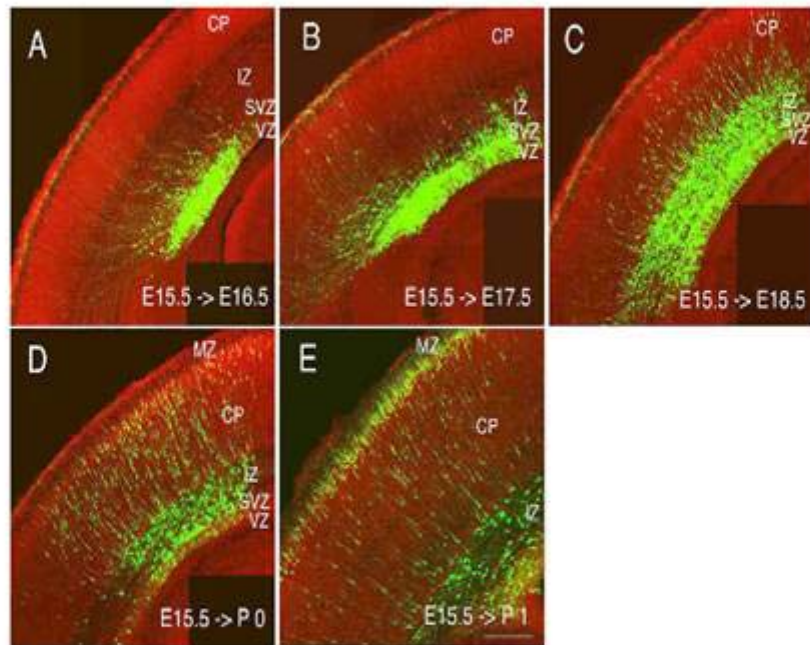


図3：遅生まれの細胞の皮質内での移動。遺伝子導入1日後では大部分の細胞は脳室帯や脳室下帯に分布しているが、時間が経過するにしたがって表層に向かい、5日後には皮質板に大部分が分布するようになる。

遅い時期に生まれたニューロンは移動とともにその形状を変える（図4）。胎生16.5日のVZでのGFP陽性細胞は放射状グリアの形状をしていて（図4A、B）SVZではstellate cellの形状をしている。このことはradial glia様の細胞がstellate cellへと形状を変えたことを示している。胎生17.5日ではstellate cellはIZの下層に見られた。

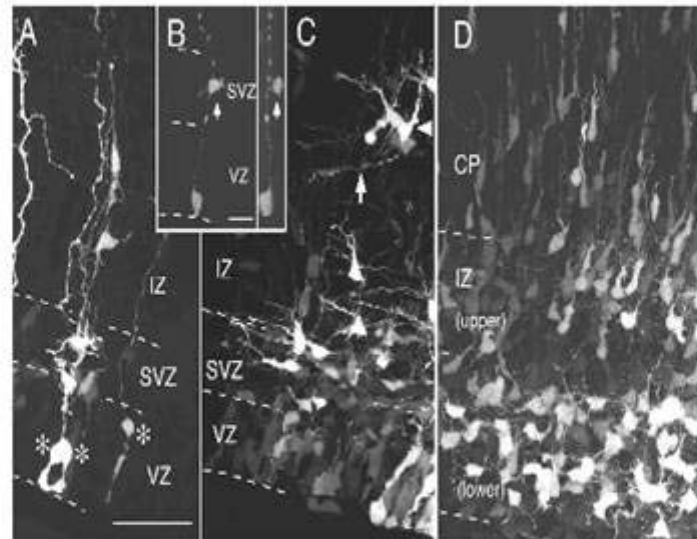


図 4：遅生まれの細胞の位置と形態の変化。遺伝子導入後 1 日後（A）、3 日後（B）、4 日後（D）の変化を示す。

Cdk5 は遅い時期に生まれたニューロンの移動に関与する

Cdk5 は cyclin-dependent kinase の homolog であり、Cdk5 ノックアウトマウスでは胎生 12.5 日齢では差が無く胎生 15.5 日齢では CP 直下に異常な移動をしたニューロンが存在することが報告されている。そこで次に我々は Cdk5 があとから生まれたニューロンの移動に関与している可能性を探るために、GFP と cdk5dn（ドミナントネガティブ）遺伝子を導入し解析した。初期に生まれたニューロンはこれによる影響は受けなかったが（図 6 A-E）、後期に生まれた（胎生 15.5 日）ニューロンはその移動が制限され、下層にとどまるなどの影響を受けた。このことは Cdk5 が後期に生まれたニューロンの移動に関与していることを示している（Hatanaka et al., 2004）。

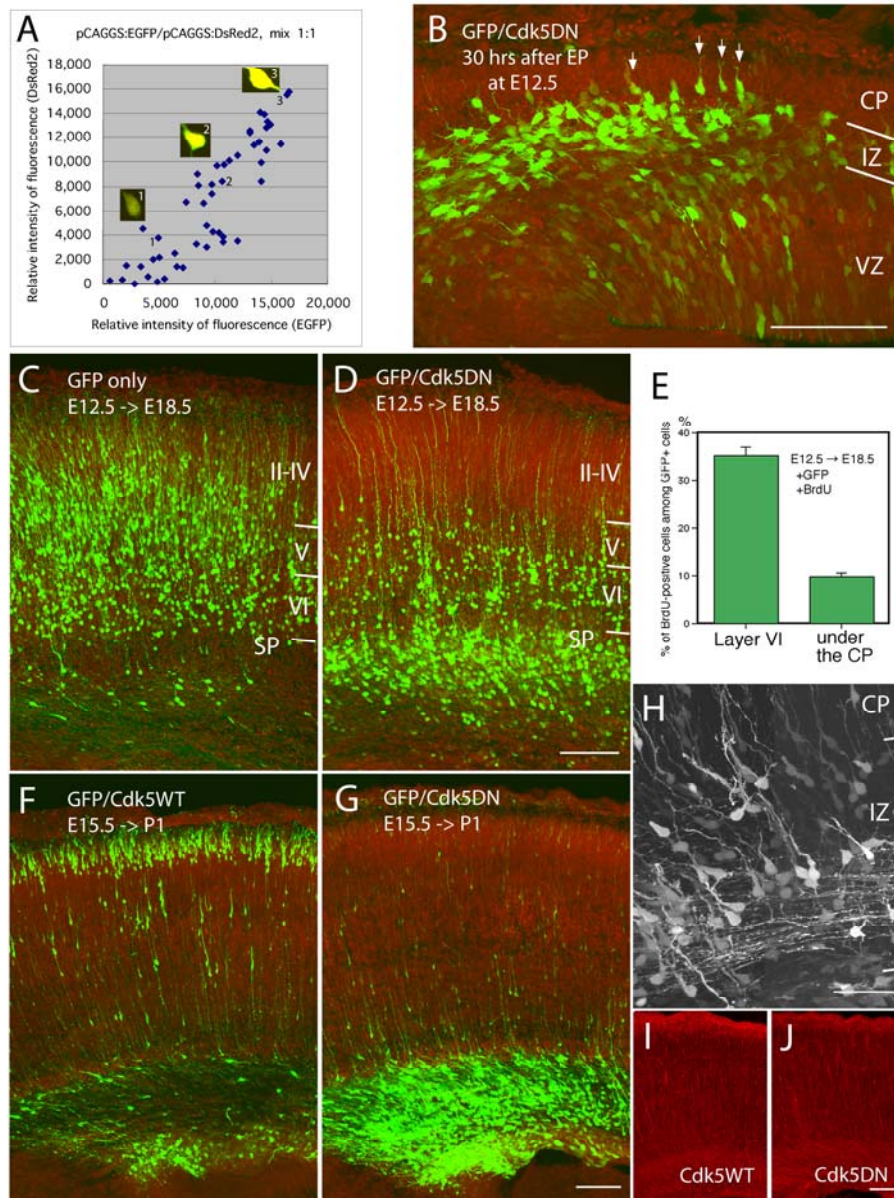


図5：cdk5 阻害による法線方向への移動の阻害。B-D は早生まれ（E12.5 に電気穿孔により GFP または GFP+cdk5 のドミナントネガティブ体を導入）の細胞への cdk5 阻害の効果。導入後 5 日目にはコントロール(B)では大部分が 2-5 層に分布しているのに対して、cdk5 のドミナントネガティブ体を導入したマウスでは多くの細胞がサブプレートに溜まっている (D)。D-F では同様の実験を示すが、電気穿孔は E15.5 でおこなった。生後 1 日目で観察をしたところ、cdk5 のドミナントネガティブ体を導入したマウスでは大部分が皮質に進入出来ない様子がわかる (G)。

まとめ

マウス大脳皮質 V Z 細胞の早い時期、遅い時期に生まれた細胞群の移動を子宮内電気穿孔を用いて解析した。V Z 細胞は移動とともにその形態を変化させる。胎生 12.5 日にラベルした早い時期に生まれた細胞は放射状方向に配向した双極性の細胞形をとるが胎生 15.5 日にラベルした遅い時期に生まれた細胞は radial glia の突起に沿って移動する。さらに Cdk5 ドミナントネガティブの遺伝子導入による解析により、遅い時期に生まれた V Z 細胞の移動には Cdk5 が関与していることが明らかになった。

2) 4層特異的分子の探索

以上の研究の他、第4層、第5層より抽出した RNA よりサブトラクション cDNA ライブラリー を作製し、各クローンに対して塩基配列の決定を行うとともに、ラット大脳切片に対して *in situ hybridization* を行い、4層特異的分子の同定と発現パターンの解析を行った。

【平成16年度】

1) 大脳皮質 GABA 作動性ニューロンの移動メカニズムの研究

大脳皮質の神経回路網を構成している神経細胞には主に興奮性の投射ニューロンと抑制性の介在ニューロン（その多くはGABA作動性ニューロンと考えられる）が存在している。この2種類のニューロンは発生部位から神経回路を形成する最終目的地までそれぞれ特徴的な様式で移動することが知られている。投射ニューロンは直近の脳室壁で生まれ、放射状方向の移動によって移動するのに対し、GABA作動性ニューロンは遠く離れた大脳基底核原基脳室壁近くで生まれ、接線方向の移動をして大脳皮質に進入する。この長距離を移動するGABA作動性ニューロンがどのようなメカニズムで最終目的地まで移動するかについては不明な点が多い。この大脳皮質へと長距離移動するGABA作動性ニューロンには数多くのニューロンが含まれ、一様な *population* ではないと考えられる。本研究では投与時に最終分裂中のニューロン特異的に取り込まれる BrdU (Bromodeoxyuridine) を用いて発生時期特異的マーキングを行い、ある特定の時期に生まれたGABA作動性ニューロン群の挙動を解析し、そのようなサブグループがどういう特徴的な移動様式をするかについて解析した。その結果、胎生 10.5 日に生まれたニューロンは胎生 15.5 日でサブプレート(subplate)付近を中心に存在し、胎生 18.5 日ではほとんど観察されなかった。胎生 11.5 日に生まれたニューロンでは、胎生 13.5 日で脳室下帯と辺縁帯に分布していたが、胎生 15.5 日では大脳皮質全体に、そして胎生 18.5 日では皮質板を中心に分布していた。胎生 12.5 日に生まれたものは胎生 13.5 日では脳室下帯にほとんどが分布していたが、胎生 15.5 日では大脳皮質全体に、そして胎生 18.5 日では皮質板と辺縁帯を中心に分布していた。このことにより、大脳皮質発生初期に生まれたGABAニューロンは主に脳室下帯→大脳皮質全体→皮質板という劇的な移動の様式をとること、そして発生時期の異なるニューロン群はそれぞれ違った特徴的な移動様式をとることが分かった。

これと平行して GAD67-GFP トランスジェニックマウスを用いてGABAニューロンの皮質内での移動を解析した。その結果、胎生 13.5 日には辺縁帯と中間帯を中心として多数のGABAニューロンが分布しているのが確認された。またその2日後には皮質板全体に亘ってGABAニューロンの分布が認められた。また、*real time analysis* の結果、皮質内での背内側方向へのGABAニューロンの移動は主に中間帯/脳室下帯を中心として起きていることが確認された(図6)(Tanaka et al., 2004)。さらにこの移動には GPI アンカーされた分子は必要では無いことも明らかになった。

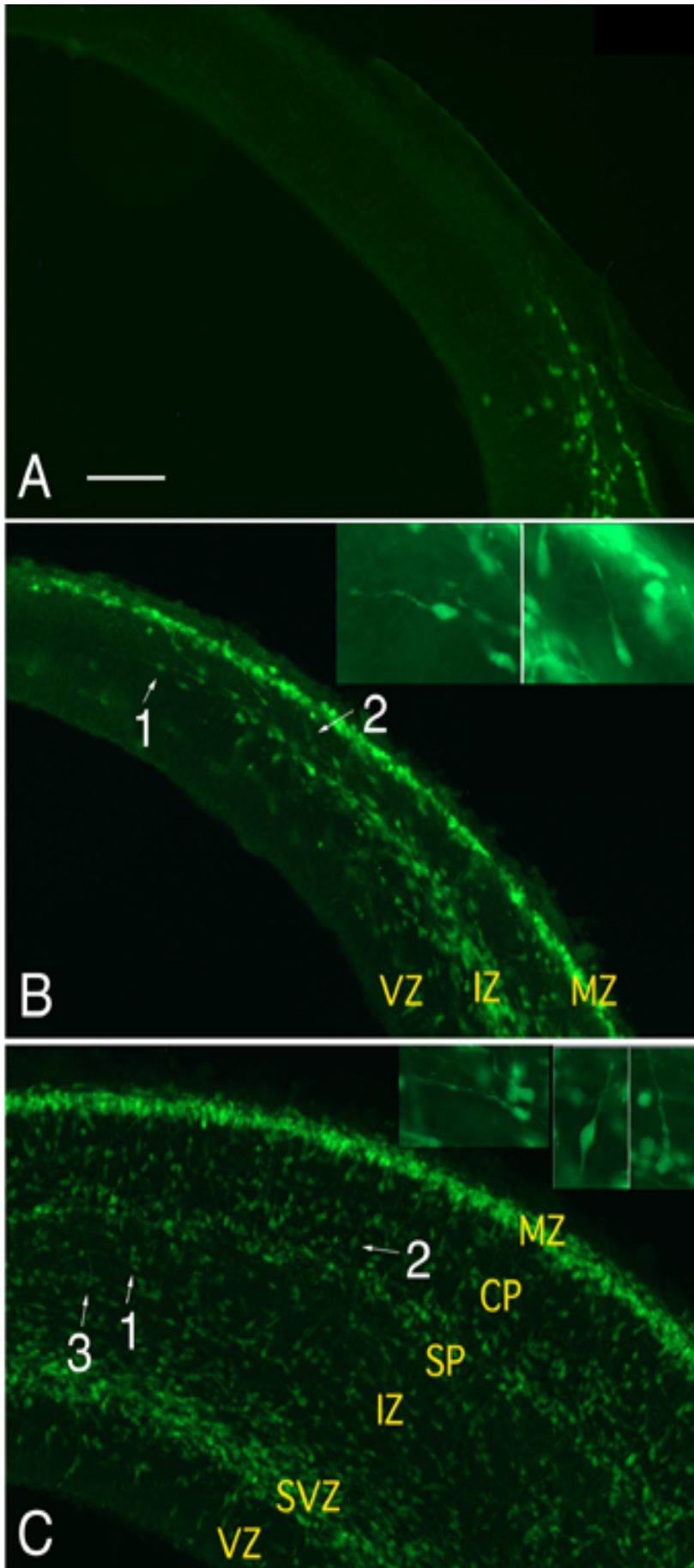


図6 : GAD67-GFP マウスの大脳皮質における GABA 作動性神経細胞の分布。
A は胎生 12 日目、B は 13.5 日目、C は 15.5 日目の冠状断切片。13.5 日目には中間帯と辺縁帯に細胞が分布しており、15.5 日目にはサブプレートや脳室下帯にも分布が広がる様子がわかる。

2) 小脳前核ニューロン群の移動メカニズムの解析

下菱脳唇(lower Rhombic Lip)に由来する小脳前核ニューロン群は ECN (external cuneate nucleus)、LRN (lateral reticular nucleus) などの神経核を形成するが、接線方向と放射状方向の二通りの移動様式をとる。本研究ではこの接線方向から途中で放射状方向へとスイッチする移動様式のメカニズムについて研究を行った。マウス子宮外において胎仔の後脳下菱脳唇に電気穿孔法を用いて EYFP(enhanced yellow fluorescent protein)遺伝子を導入して強制発現させ、下菱脳唇由来の小脳前核ニューロンの移動の解析を行った。下菱脳唇由来の小脳前核ニューロンは対側に向かって接線方向に移動した後、途中で放射状方向に移動方向を変える。法線方向への移動方向を変化させたのち、ECN、LRN などの核を形成すると考えられる (図 7) (Kawauchi et al., 2006)。

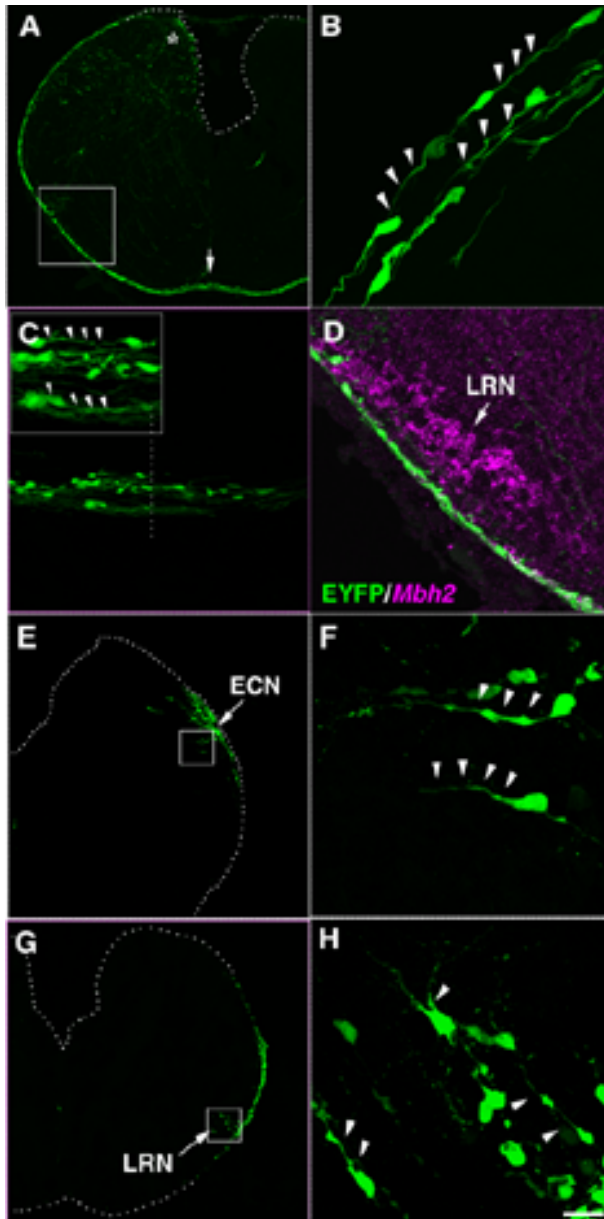


図 7 : 小脳前核細胞の移動 A-D GFP で標識された細胞が神経管の周囲に沿って移動する様子。
E-F その一部は移動方向を法線方向に変えて ECN(E-F)や LRN(G-H)を形成する。

3) ニューロン移動停止に関わる分子の探索

脳の発生過程において神経細胞は誕生後神経回路網内の正しい位置に移動するが、正しい神経核や層構造が形成されるためには細胞移動の後に適切な時期に適切な位置で移動を

停止することが重要である。現在細胞移動の分子メカニズムに関する研究は盛んにおこなわれ、少しずつ明らかになりつつあるが、移動停止のメカニズムは明らかになっておらず細胞移動全体のメカニズムを明らかにするためには移動停止の分子メカニズムが解明されることが重要だと考えられる。本研究では細胞移動・停止に関わる分子メカニズムを解明するために、後脳の小脳前核神経細胞の ECN、LRN 神経細胞群を一つのモデルとして用いた。ECN は反対側の腹側で停止し、LRN は背側で停止することから、本研究では ECN で発現していて LRN では発現していない遺伝子をスクリーニングし、ECN 特異的に発現しているストップシグナルに關与する遺伝子を単離することを目的とした。スクリーニングの結果、37 個の独立クローンが得られた。

4) 中脳ドーパミン作動性ニューロンの吻尾軸方向への軸索投射メカニズム

発生初期において神経細胞はその軸索を背腹軸方向と吻尾軸方向の二方向に投射させる。背腹軸方向の軸索投射には近年の研究によって蓋板・底板由来の拡散性分子が重要な役割を果たしていることが明らかになってきたが、一方吻尾軸方向への正確な軸索投射を制御する分子機構はその重要性にもかかわらず、まだほとんど解明されていない。正確な吻尾軸方向の軸索投射には軸索伸長の方向性と背腹軸における走行位置の二つの局面が正確に制御される必要がある。本研究ではこれら二つの局面を制御する分子機構の解明のための実験系として、中脳腹側部から吻側の大脳皮質、線状体に軸索を投射させる中脳ドーパミン作動性ニューロン (mDANs) を用いた。これまでの当研究室の研究により Semaphorin3F (Sema3F) とその受容体である Neuropilin-2 (NP2) の関与を示唆する知見が得られていた。そこで本研究によって次のことが明らかになった。1) Sema3F に対する RNA プローブを用いた *in situ* hybridization の結果、mDANs の軸索は Sema3F の発現領域を沿うようにして走行していることが分かった。2) 抗 NP2 抗体を用いた免疫染色法により mDANs の軸索に NP2 が発現していることが分かった。3) 培養下において Sema3F は mDANs 軸索伸長を抑制した。4) NP2 ノックアウトマウスでは mDANs の軸索束が脱束化し、一部の軸索は本来走行しない中脳背側部を走行していた。以上の結果 Sema3F/NP2 系が背側への軸索伸長を抑制することで mDANs の軸索ガイダンスの二局面のうちの背腹軸における背腹軸における走行位置の決定に寄与していることを示すものである。

【平成17年度】

1) 大脳皮質 GABA 作動性ニューロンの移動メカニズムの研究

大脳皮質の神経回路網を構成している神経細胞には主に興奮性の投射ニューロンと抑制性の介在ニューロン（その多くは GABA 作動性ニューロンと考えられる）が存在している。この2種類のニューロンは発生部位から神経回路を形成する最終目的地までそれぞれ特徴的な形式で移動することが知られている。投射ニューロンは直近の脳室壁で生まれ放射状方向の移動によって移動するのに対し、GABA 作動性ニューロンは遠く離れた大脳基底核原基脳室壁近くで生まれ、接線方向の移動をして大脳皮質に進入する。この長距離を移動する GABA 作動性ニューロンがどのようなメカニズムで最終目的地まで移動するかについては不明な点が多い。これまでの我々の研究で辺縁層に到達して GABA 作動性ニューロンは多方向に移動することが明らかになっている。しかしながら、その定量的解析は行われていなかった。本年度は *real time analysis* によって辺縁層を移動する GABA 作動性ニューロンの方向性の定量的解析をおこなった。その結果、これらのニューロンは全ての方向に向かう移動を示すものの、その多くは吻側または、尾側に向かって移動することが明らかになった。さらに興味深いことに、多方向向かう移動は脳室層でも観察する

ことが出来た。また固定標本の解析から、サブプレートや皮質板でもそのような動きがあることが示唆された。これらの結果は新皮質の広い範囲で、多方向性の移動が起こっていることを示している。さらに興味深いことに、辺縁層を接線方向に移動したGABA作動性ニューロンは皮質版に向かって移動していくことが、明らかになった。元来細胞移動は特定の部位から別の特定の部位へと細胞がその位置を変えることを意味しており、我々の研究結果はこれまでの細胞移動の概念を変える必要のある新奇な発見である。その意義については明らかではないが、一つの可能性として考えられることは、皮質内の分散である (Tanaka et al., 2006)。

2) 小脳前核ニューロン群の移動メカニズムの解析

下菱脳唇(lower Rhombic Lip)に由来する小脳前核ニューロン群は ECN (external cuneate nucleus)、LRN (lateral reticular nucleus) などの小脳前核群を形成するが、その移動様式や核形成の機構は明らかではない。そこで本年度は後脳小脳前核細胞群の核形成の研究を行った。そのため、マウスの胎仔標本を用いて、後脳背側部の菱脳唇に片側性に *exo utero* 電気穿孔で EYFP(enhanced yellow fluorescent protein)遺伝子を導入することによって菱脳唇由来の小脳前核細胞の前駆細胞を *in vivo* で標識し、その運命を追うことにより、橋と延髄において小脳前核を形成する4つの神経核の移動と核形成の過程を可視化することに成功した。その結果、これまでの報告に反して橋核と橋被蓋網様核の神経細胞の一部は正中線を交叉して移動することが明らかになった。また外側網様核と外楔状核の神経細胞が正中線を越えて移動することが明らかになった。興味深いことに小脳前核細胞の前駆細胞は何れも移動の最終段階において接線方向から方向転換をし、脳室方向に向かって移動する様子が観察された。ラディアル線維を選択的に染める抗ネスチン抗体を投与したところ、脳室方向に向かって移動する細胞はネスチン陽性繊維に沿うように分布している観察像を得た。また電子顕微鏡を用いて観察をおこなったところ、ラディアル繊維に移動細胞が接触している様子が観察された(図8)。以上の結果は小脳前核細胞による核形成には脳室方向に向かう移動が欠かせない重要なステップであること、またそれには radial glial cell の突起が重要な役割を果たしていることを示している (Kawauchi et al., 2006)。

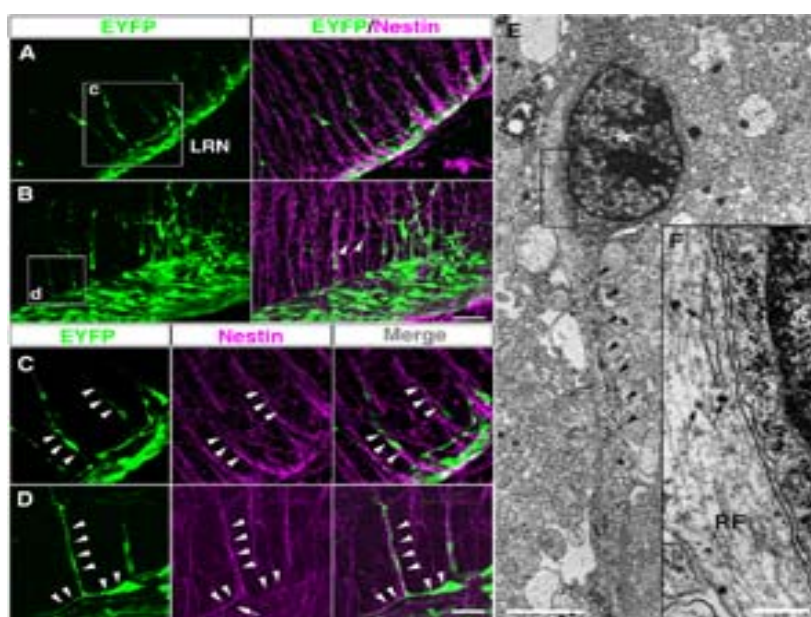


図8：ネスチン陽性繊維に沿って移動する小脳前核細胞の光顕像 (A・D) と電顕像 (E)。

3) 小脳前核細胞の移動に於ける Ncadherin の役割

小脳前核細胞の移動の分子機構に迫るため、様々な分子の小脳前核細胞における発現を検討する過程で、Ncadherin を含むいくつかのカドヘリン遺伝子の移動経路における発現を確認することができた。そこで延髄展開培養標本を作成し、それに電気穿孔法を用いて GFP 遺伝子と共にドミナントネガティブ体の強制発現や、遺伝子の全長の過剰発現をさせることにより、その移動に対する効果を検討した。その結果 Ncadherin のドミナントネガティブ体を導入した細胞はその移動が遅れることが確認された。しかしながら、これらの細胞の底板の誘引活性に対する反応性や接着因子 TAG-1 の発現に変化は認められず、神経細胞の性質そのものが変化したとは考えられないため、Ncadherin の機能が抑制された直接の効果として、移動速度が低下したものと考えられる。興味深いことに *exo utero* 電気穿孔法により母体内胎仔に Ncadherin のドミナントネガティブ体を導入したところ、反対側に形成される筈の ECN、LRN が同側に形成された。この結果は移動が遅れた結果、ECN、LRN の前駆細胞が反対側に到達する前に、核形成シグナルへの応答性を獲得したことによると考えられる。以上のように小脳前核細胞の移動や核形成には Ncadherin が極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった (Taniguchi et al., 2006)。

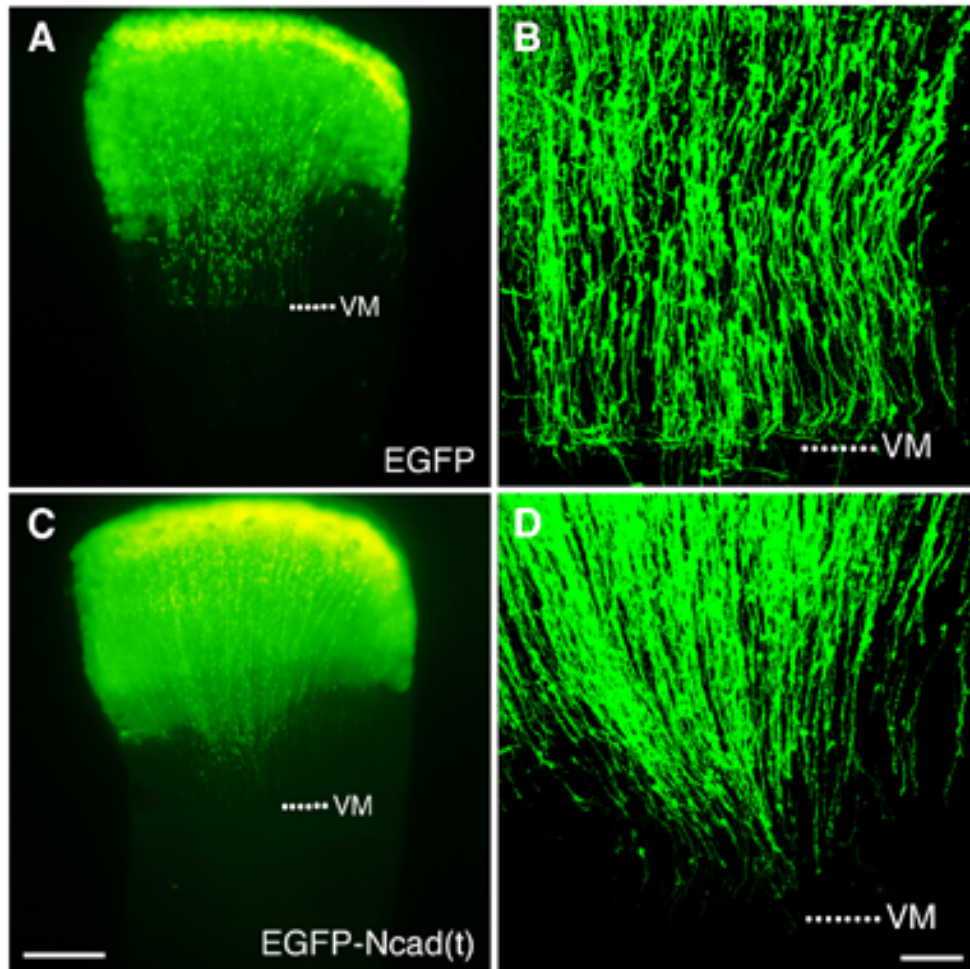


図 9：後脳の展開培養標本における小脳前核細胞の移動と Ncadherin の阻害による移動の遅れ。A-B 対照。C-D Ncadherin のドミネガ体の導入による移動の遅れ。VM は腹側正中線を示す。

4) 中脳ドーパミン作動性ニューロンの吻尾軸方向への軸索投射メカニズム

発生初期において神経細胞はその軸索を背腹軸方向と吻尾軸方向の二方向に投射させる。背腹軸方向の軸索投射には近年の研究によって蓋板・底板由来の拡散性分子が重要な役割を果たしていることが明らかになってきたが、一方吻尾軸方向への正確な軸索投射を制御する分子機構はその重要性にもかかわらず、まだほとんど解明されていない。正確な吻尾軸方向の軸索投射には軸索伸長の方向性と背腹軸における走行位置の二つの局面が正確に制御される必要がある。本研究ではこれら二つの局面を制御する分子機構の解明のための実験系として、中脳腹側部から吻側の大脳皮質、線状体に軸索を投射させる中脳ドーパミン作動性ニューロン(mDANs)を用いた。昨年度までの研究で Sema3F の受容体である Neuropilin-2(NP2)の関与が明らかになった。本年度はそれを更に発展させた結果下記の知見が得られた。1) Sema3F 発現細胞と mDANs を含む中脳腹側部の共培養下において、NP2 陽性 mDANs 軸索の Sema3F 発現細胞に向かう伸張は抑制されたものの、軸索伸張そのものは亢進した。2) NP2 ノックアウトマウスでは mDANs の軸索束の一部が、吻側に向かわずに尾側に向かっていた。以上の結果は Sema3F/NP2 系が吻尾軸方向の軸索伸張を制御する可能性を示唆するものである (Yamauchi et al., in preparation)。

【平成 18 年度】

1) 大脳皮質における GABA 作動性の局所回路ニューロンの移動

大脳皮質を構成する GABA 作動性の局所回路ニューロンの大部分は大脳基底核原基で生まれた後、大脳皮質に移動することが明らかにされてきた。しかし皮質内の最終的な位置に到達するまでには複雑な経路をたどるものと予想される。我々が最近得た知見によると、これらの細胞は接線方向への移動により大脳新皮質の中間層に到達した後に、放射状方向に移動方向を変え、辺縁層にいたる。これらの細胞はその後、再び接線方向に移動することにより皮質内で広がったのち、脳質層に向かって再び放射状の移動を示し、皮質板や辺縁層に至ることを見出した(Tanaka et al., 2004)。そこで考えられる可能性として、異なる領野に配置されるニューロンはもともと異なった性質を有し、異なるルートを辿って移動していくのではないかというものと、領野による GABA ニューロンの性質に違いはなく、辺縁層に到達したニューロンはランダムに皮質全体に広がった後、皮質板に向かって降りてゆくという可能性がある。後者の場合、後天的にその性質(領野によって異なるものへと)が変化する可能性がある。

これらの可能性を検討するため、まず皮質内における GABA ニューロンの動きを追跡するための方法の開発・確立をすすめた。興味深いことに、我々の以前の研究により皮質辺縁層の GABA ニューロンは多方向に向かって移動することが明らかになっていた(Tanaka et al., 2004)。しかしその動きが局所的なものなのか、それとも長距離位互るものなのかは明らかでなかった。そこで、母胎内のマウス胎仔の大脳皮質に脂溶性のトレーサー DiD をガラス電極で注入し、必要な生存期間の後に標識された細胞の分布の解析を試みた。その際 GABA ニューロンの同定のために GAD67-GFP マウス(グルタミン酸脱炭酸酵素の遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインしたもの)を用い、皮質において GFP と DiD によって 2 重標識された細胞のみを解析の対象とした。DiD の注入は胎生 15.5 日目に行い、1.5 または 3 日後に胎仔を固定して観察した。また注入部位は前頭葉、頭頂葉、後頭葉についてそれぞれ行ったが、その何れの場合も、注入後 3 日目には注入部位から 2 ミリ以上離れた脳表面の部位に標識ニューロンが観察された(図 10)(Tanaka et al., 2006)。このことは辺縁層に到達した GABA ニューロンは接線に長距離に互って移動することを意味している。また、

GABA ニューロンが辺縁層において数日間という極めて長期にわたって滞留する可能性が示唆される。

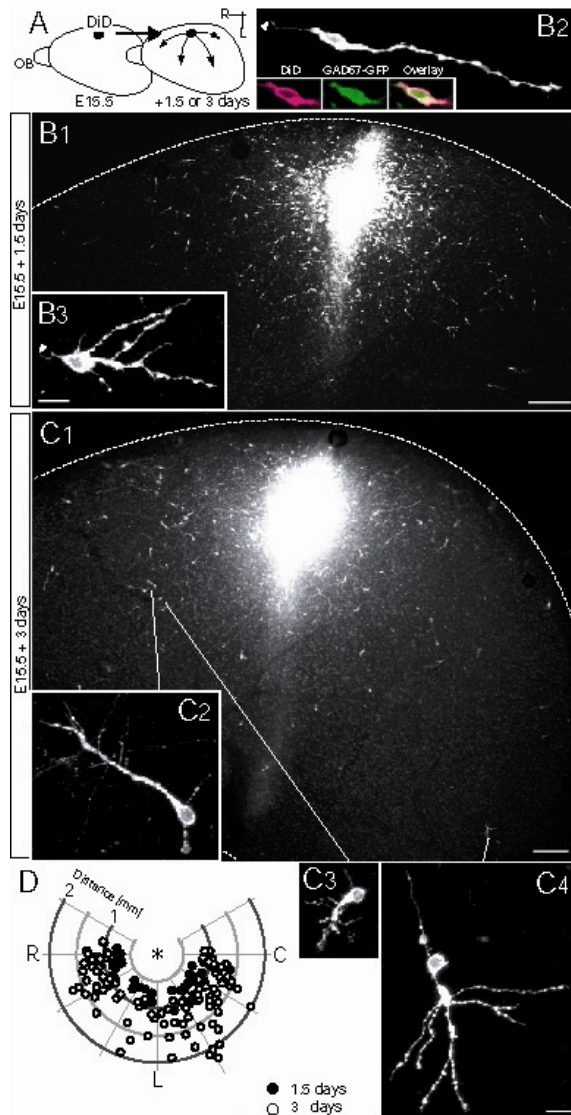


図10：辺縁層における GABA ニューロンの長距離に互る移動。脂溶性色素 DiD を皮質に注入し、1.5 または 3 日後に脳を固定し、標識細胞の分布を観察した。B, C はそれぞれ 1.5 および 3 日後の細胞の分布を示す。挿入図は標識細胞の拡大図。D は標識細胞の注入部位からの距離の測定結果を示す。

次にそのような移動方向の多様性がどのような要素によって規定されているかを明らかにするため、特定の部位に由来する GABA ニューロンの辺縁層での動きの観察を試みた。皮質 GABA ニューロンの起源は一ヶ所ではなく、複数箇所であることが知られており、異なる起源のニューロンが異なる方向へ向かって移動する可能性が考えられた。そこで GABA ニューロンの起源の一つである medial ganglionic eminence(MGE)由来の GABA ニューロンを特異的に標識し、その移動の様子を辺縁層で観察した。そのため、DsRed 遺伝子を電気穿孔法で胎仔の MGE に導入し、標識された細胞が皮質辺縁層到達するまで数日間待った後、皮質を展開して real-time imaging を行った。その結果、GAD67-GFP マウスを用いた時と同様に全方向に向かう GABA ニューロンの（脳表面に平行な面での）移動が観察された（図 11）。このことは起源とは関係なく GABA ニューロンは多方向への移動をすることを意味している (Tanaka et al., 2006)。

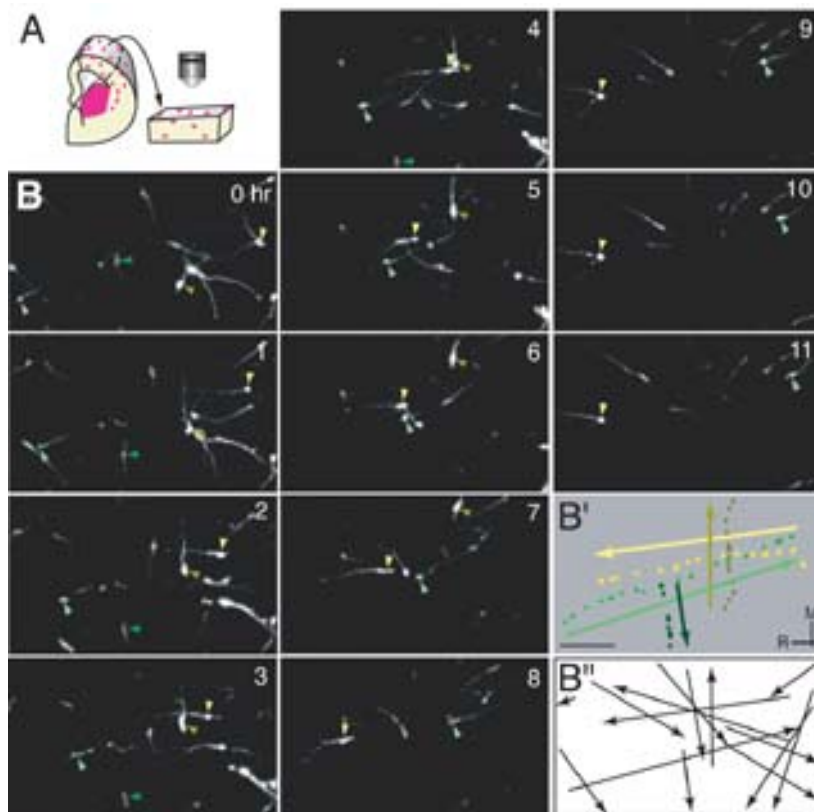


図 1 1 : MGE 由来の GABA ニューロ边缘層での移動。DsRed 遺伝子を電気穿孔法で胎仔の MGE に導入し (A)、標識された細胞が皮質边缘層到達するまで数日間待った後、皮質を展開して real-time imaging を行った。B の各パネルの右上の数字は観察を計測開始後の時間を示す。あらゆる方向に細胞が動いていることがわかる。

边缘層での全方向への GABA ニューロンの移動は切片標本では観察することが出来ず、皮質全体を展開して表面から観察を行うことにより、明らかにすることが出来た。したがって全方向への GABA ニューロンの移動は边缘層以外の層においても起こっている可能性が考えられる。技術的制約のため、表面から離れた部位の GABA ニューロンの（脳表面に平行な面での）移動の可視化は困難である。しかしながら、脳室層のニューロンに関しては観察可能である。我々は GAD67-GFP マウスを用い、上と同様に皮質を展開して、しかし上下反転させて pial surface が表になるように置いた標本作製することによって脳室層のニューロンの動態を可視化した。その結果興味深いことに脳室層のニューロンも脳室に平行な面において全方向へ向かって移動していることが明らかになった (Tanaka et al., 2006)。

2) 延髄における GABA ニューロンの移動

前脳では GABA ニューロンは興奮性ニューロンとは異なる腹側の部位で発生したのち、接線方向に移動して、大脳皮質に至る。大脳皮質では興奮性ニューロンと入り交じって神経回路を形成する。本研究ではこのような発生のストラテジーが前脳特有のことなのか、それとも他の部位にも当てはまることなのかを確認するため、延髄をモデルにし、GABA ニューロンの発生と移動の研究をおこなった。実験には wild type と GAD67-GFP マウスの胎仔を用い、gad67 の in situ hybridization と GFP 蛍光を手がかりに GABA シグナルの発生にともなう変化を追うとともに、組織片の移植によって移動を調べた。その結果、細かい点において違いはあるものの、延髄においても GABA ニューロンは腹側で発生し、背側に向かって神経管の周囲に沿う様に移動することが明らかになった (Tashiro et al., in press)。延髄では主要なニューロン群である小脳前核細胞が背側端の菱脳唇で生まれて腹側に向かって移動することが知られており、延髄に於いても興奮性神経細胞と抑制性神経

細胞が別々の部位で生まれ、移動により混じりあう可能性を示している（図 12）。

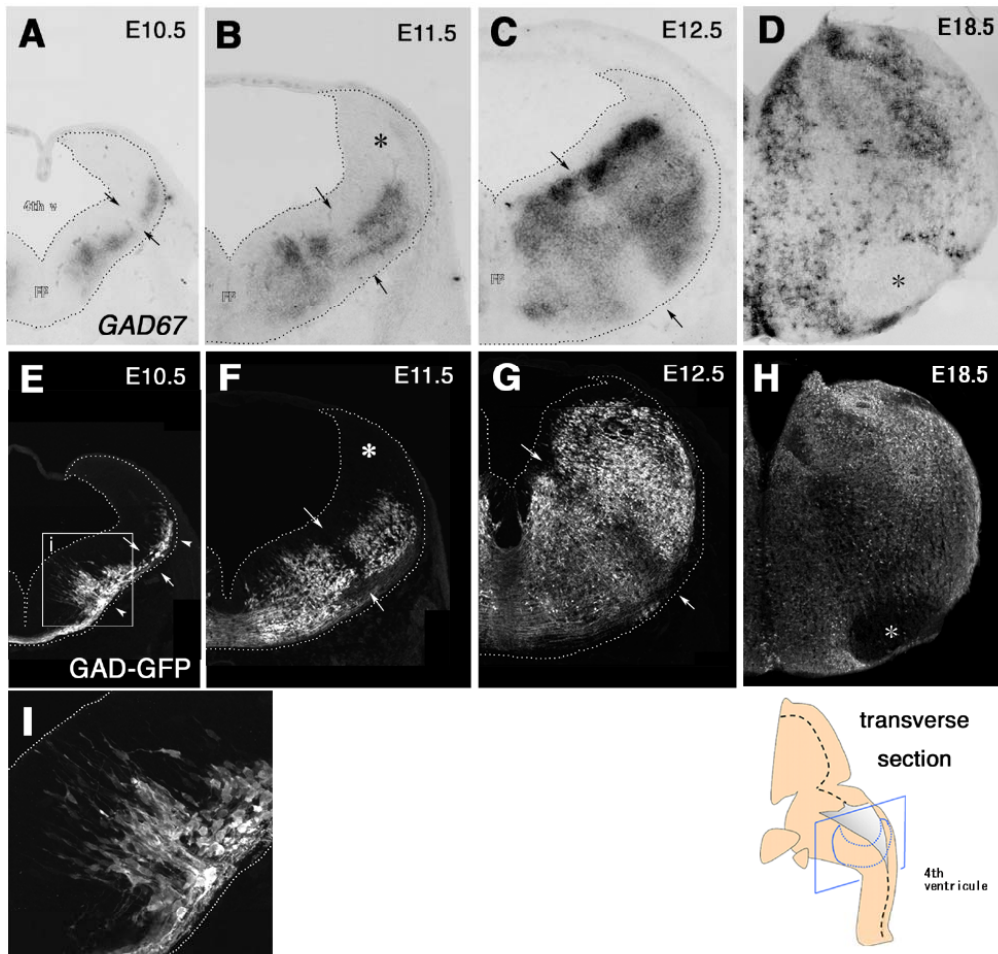


図 12：延髄における GAD67 の発達に伴う変化。A-D は mRNA の発現。E-H は GAD67-GFP マウスにおける蛍光を示す。I は E の拡大図。GAD67 のシグナルが腹側から背側に広がる様子が確認できる。

3) 吻側に投射する神経回路形成の分子機構

発達初期の神経管では軸索は主に 2 つの軸、吻尾軸と背腹軸に沿って延びる。これらのうち後者については比較的その機構がよく研究されているが、前者については知見が乏しい。本研究では後脳に起源を持ち、腹側正中線を交差して反対側に至り、神経管の背側部で吻側に向かってほぼ 90°ターンした後小脳に吻側に投射する神経細胞（以後 cC-VC と呼ぶことにする）をモデルとして用い、その分子機構の解明を行った。この神経細胞体は第八神経の神経管への進入部の尾側に存在することから、起始部に DiI を注入してこの投射を可視化した。実験材料としてはニワトリ胚神経管の展開培養標本を用いた。そして cC-VC の吻側へ向かうターンが cC-VC 軸索に発現する EphA 受容体とその部位の神経管に濃度勾配をもって発現する eph-A による反発作用によって実現されることを明らかにした（図 13）（Zhu et al., 2006）。

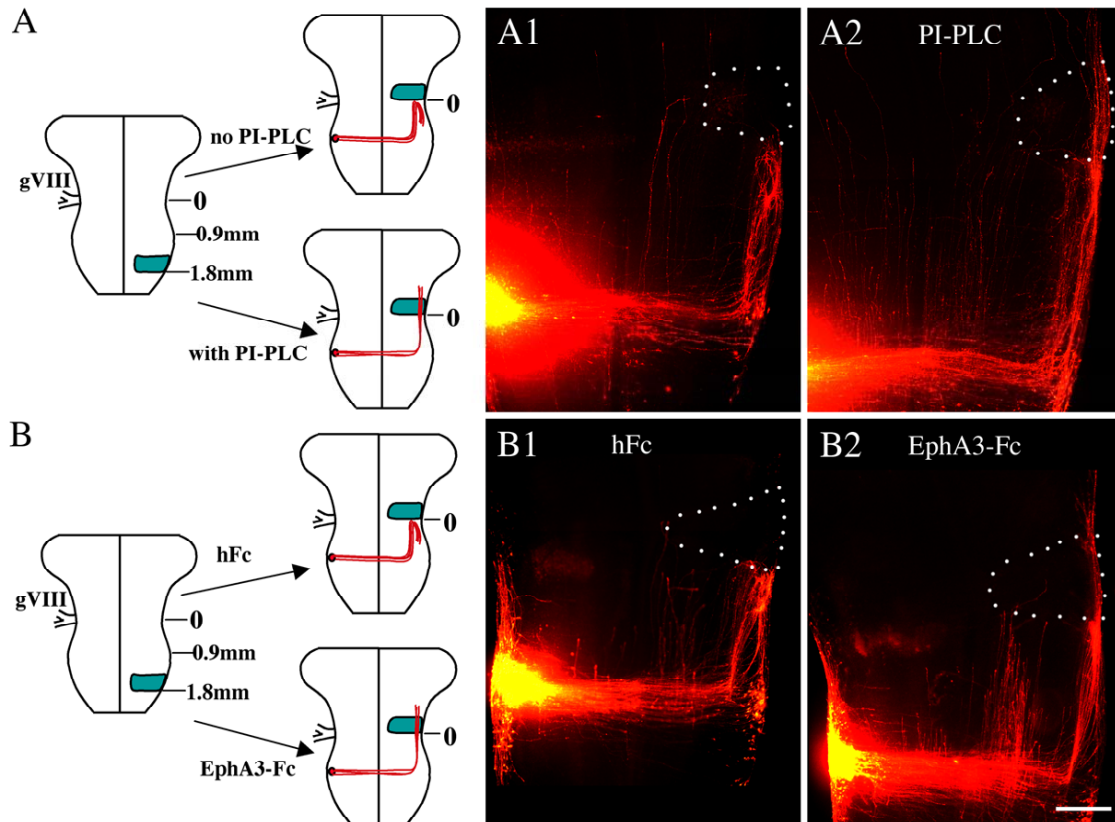


図1 3：展開標本における cC-VC 軸索の走行（赤色）と移植片（青色）の効果。cC-VC のターニングが起こる部位の尾側部から移植片を取り、吻側部に移植したのち、DiI で標識した cC-VC 軸索への影響を検討した。移植片は cC-VC 軸索の走行を阻害した(A1)が、その効果は PI-PLC (A2) や (EphA3-Fc) の投与(B2)で消失した。

（2）得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

本研究は大脳皮質と後脳の移動細胞の移動の様子をin vivoまたはそれに極めて近いin vitroの標本を用いて可視化したものである。特に大脳皮質においてはその動態をも解明したものであり、これに匹敵する研究は国内外とも見あたらない。これらの成果を得るのに開発した技術をさらに改良することにより、より長期に亙るイメージングが可能になるものと思われ、その結果、移動の過程ばかりではなく、移動の停止やその後起こるであろう成熟の過程の可視化が可能となると考えられ、これらの過程のメカニズムの理解も進むであろう。また本研究では遺伝子の電気穿孔法の利点を生かして、神経細胞の移動と神経核形成の分子機構に迫ることも出来た。

神経細胞の移動はin vitroの系を用いないと直接観察することが困難であるが、in vitroで観察している限り、in vitroのアーティファクトの混入の可能性を否定することはできない。本研究で開発した展開標本を用いたイメージング技術の延長上にはin vivoイメージングがあり、これが実現出来れば、in vitroのアーティファクトの評価が可能になる。本研究の成果は脳の成り立ちの理解を大きく前進させた。また脳の移植医療を進める際に必要な移植片から宿主への神経細胞の移動の理解にも大きな貢献をするであろう。

3. 2 “抑制性ニューロンの発生 (柳川グループ)”

(1) 実施の内容

1 : 抑制性ニューロンの発生を明らかにするための遺伝子改変マウスの開発

1—1 : 抑制性ニューロンを蛍光蛋白質で標識したトランスジェニックマウスの作成

抑制性ニューロンは、GABA ニューロンとグリシンニューロンに大別される。GABA ニューロンは中枢神経系全般に分布するが、グリシンニューロンは脳幹、脊髄に分布する特徴がある。また、脳幹、脊髄のニューロンでは一部、グリシンニューロンと GABA ニューロンとが一致する。抑制性ニューロン全体の発生と移動を明らかにする目的で、抑制性ニューロンを蛍光蛋白質で標識したトランスジェニックマウス(VGAT-Venus マウス) の作成を試みた。具体的には、抑制性ニューロンのマーカーである小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) 遺伝子を含む細菌人工染色体クローンに蛍光蛋白質 Venus をコードする遺伝子をノックインしたコンストラクトをマウス受精卵に導入することにより作成した。PCR を用いた遺伝子解析を行い、4 系統のトランスジェニックマウスを樹立した。トランスジェニックマウスにおける Venus の発現を in situ hybridization 法で検討したところ、4 系統の中で系統 39 が Venus の発現が最も多く、出生日の蛍光強度観察の結果と一致した。系統 39 成体では、Venus mRNA と VGAT mRNA の脳内および脊髄での発現分布が類似していた。また、系統 39 の胎生 14.5 日大脳皮質における Venus の発現分布について組織学的解析を行った (図 1)。Venus 陽性細胞は、他領域に比較して marginal zone と subventricular zone で多数観察された。また、intermediate zone に位置する Venus 陽性細胞の神経突起の向きが接戦方向であった。これら所見は大脳皮質抑制性ニューロンの特徴に類似しており、VGAT-Venus マウスが抑制性ニューロンの神経回路形成や移動を明らかにする資材として有用であることを示唆している。

1—2 : グリシンニューロンを標的とした遺伝子改変マウス作成のためのグリシン・トランスポーター 2 (GLYT2) 遺伝子解析

グリシンニューロンは、GABA ニューロンと共に代表的な抑制性ニューロンである。グリシンニューロンにおける遺伝子発現の特徴を理解する目的で、グリシンニューロンのマーカーであるマウスグリシン・トランスポーター 2 (GLYT2) について検討した。最初に、転写産物について cDNA を単離し、解析した結果、798 個のアミノ酸から構成されていた。次に、マウスゲノムライブラリーから GLYT2 遺伝子を単離し、構造解析した結果、全長約 55 kb、18 個のエクソンから構成されていた。5'-RACE 法を用いて転写産物の 5'末端について検討した結果、選択的スプライシングにより 3 種類のアイソフォーム (GLYT2a、GLYT2b、GLYT2c) が存在することを明らかにした。これらの結果は、グリシンニューロン特異的遺伝子発現を検討する上で、重要な情報となる (Ebihara et al., 2004)。次に、グリシンニューロン特異的に遺伝子発現を制御できるマウスを開発する目的で、グリシンニューロンに Cre recombinase が発現する遺伝子改変マウス (GLYT2-Cre ノックインマウス) の作成を試みた。我々が明らかにした遺伝子情報に基づき、GLYT2 の 3 種類のアイソフォームに対応できる位置に Cre recombinase を挿入したコンストラクトを作成し、ES 細胞に導入した。G418 添加培地で選択した ES クローンをサザン法でスクリーニングした結果、多数の相同組み換え体を得た。今後は、定法に従い、キメラマウスを作成し、最終的に GLYT2-Cre ノックインマウスを作成する。

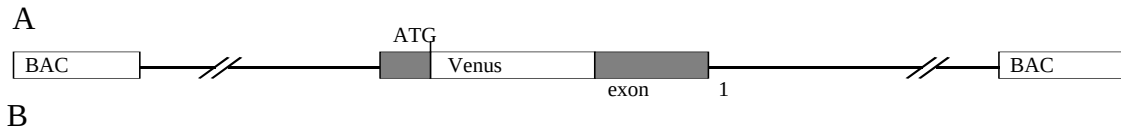


図1：VGAT-Venus トランスジェニックマウスの作成。(A) トランスジェニックマウス作成のために使用したコンストラクトの説明図。小胞型 GABA トランスポーター遺伝子のエクソン 1 の翻訳開始コドン (ATG) に一致して Venus 遺伝子を挿入した。(B) 胎生期 14.5 日の VGAT-Venus トランスジェニックマウス系統 39 の組織学解析。大脳皮質での Venus の発現 (左)。DAPI を用いた核染色 (中)。左図の拡大 (右)。

2：大脳皮質 GABA ニューロンの発生と移動に関する研究

2—1：大脳皮質 GABA ニューロンの移動およびサブタイプへの分化における Lhx6 の役割

大脳皮質に存在する神経細胞は、興奮性の錐体ニューロンと抑制性介在ニューロン (GABA ニューロン) の 2 種類に大別される。興奮性錐体ニューロンが *homogeneous* に対して、GABA ニューロンは *heterogeneous* であり、形態、発現する分子、機能で多様性がある。大脳皮質 GABA ニューロンは、カルシウム結合タンパク質のパルブアルブミン、カルレチニン、ペプチドのソマトスタチンで代表される化学マーカーの発現の有無でサブタイプに分類される。3 種類のサブタイプは、互いに殆どオーバーラップしない特徴がある。大脳皮質 GABA ニューロンは、大脳基底核原基で発生し、接戦方向への移動により皮質へ到達するが明らかにされているが、大脳皮質 GABA ニューロンのサブタイプの発生と分化のメカニズムは多くが未解決である。大脳基底核原基でそれらのサブタイプを決定している可能性を考えて、最初は大脳基底核原基に発現している転写因子、Lhx6 に焦点を当てて、GABA ニューロンサブタイプに分化への関与の有無について検討した。そこで、Lhx6 の発現について検討した結果、大脳皮質と海馬のパルブアルブミンニューロンとソマトスタチンニューロンのサブタイプでは殆どの細胞で Lhx6 が発現していた。一方、カルレチニンニューロンサブタイプでは、一部のニューロンでしか Lhx6 の発現がみられなかった。次に、Lhx6 のノックアウトマウスを作成・解析した結果、大脳皮質と海馬のパルブアルブミンニューロンとソマトスタチンニューロンの数が著しく減少していた。また、Lhx6 ノックアウトマウスと GABA ニューロンを EGFP で標識した GAD67-GFP マウスと交配・解析した結果、胎生期 12.5 日および 13.5 日のノックアウトマウスでは、皮質内の GFP 陽性細胞 (GABA ニューロン) の数がコントロールに比較して減少していた。これらの結果は、大脳皮質内における GABA ニューロンのサブタイプへの分化および正常な移動に Lhx6 活性が必要であることを示している。(Liodis, P. et al., 2007)

2—2：発生時期の大脳皮質の特定領域の環境と GABA ニューロンの移動様式

胎生期の GABA ニューロンの移動経路にあたる環境がその移動にどのような影響を与えるかを明らかにする目的で、GAD67-GFP マウス由来のスライス培養を行い、GFP 標識した GABA ニューロンのタイムラプス観察を行った。その際に、大脳皮質を重層した培養を用いて検討を行った。胎生期 12.5 日に GABA ニューロンが大脳基底核原基から皮質に入り、皮質内を外側から内側に向かって接線方向に移動するには大脳皮質外側領域が誘引する基質となり、内側領域が反発する基質になることを明らかにした。(Britto, J.M., et al., 2006)

3：小脳プルキンエ細胞樹状突起形成の分子機構

GAD67-GFP マウスではプルキンエ細胞が GFP で標識されているので、プルキンエ細胞を生きたままで繰返し観察することができる。そこで、小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達過程とそのメカニズムを明らかにする目的として、出生日あるいはその翌日の GAD67-GFP マウス小脳から分散細胞培養を長期間行うことで、検討した。殆どのプルキンエ細胞は、25 日間の培養期間中に数本の樹上突起をもつに至る。培養過程で多くの樹状突起が伸長していく一方で、一部の一次樹状突起が退縮するが、一次樹状突起の伸長と退縮の時期は、培養開始後 10～15 日で活発であることを明らかにした。また、退縮する一次樹状突起について観察した結果、最も短く、分枝していない形態学的特徴をもつことが判明した。樹状突起の伸長と退縮に関わる分子機構について、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMKII) に注目し、阻害剤 KN93 の投与実験を行ない一次樹状突起に対する効果を検討した。培養開始後 5～15 日に KN93 を添加した場合に一次樹状突起が減少し、培養開始後 15～25 日ではそのような効果は観察されなかった。以上の結果は、プルキンエ細胞の最終形態には樹上突起の伸長と退縮の両方が必要であり、CaMKII 活性が関与することを示している。(Tanaka, M. et al., 2006)

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

1：類似研究の国内外の動向、成果の今後の展開見込

GABA ニューロンを蛍光分子、EGFP で標識しようとしたトランスジェニックマウスは複数、報告されている (Oliva et al., 2000; Chattopadhyaya et al., 2004; Lopez-Bendito et al., 2004; Ma et al., 2006)。しかし、いずれのトランスジェニックマウスも GABA ニューロンの一部にしか EGFP が発現しない。GAD67-GFP ノックインマウスは、殆どすべての GABA ニューロンに EGFP が発現していることから、GABA ニューロンの移動の解析にはとても有用である (Tanaka et al., 2003; Tanaka et al., 2006)。しかし、GAD67 遺伝子を破壊しているため、野生型マウスに比較して脳内 GABA 含量が減少している問題がある (Tamamaki et al., 2003)。一方、VGAT-Venus トランスジェニックマウスは、脳内 GABA 含量が野生型マウスと同等であることが予想され、そのような問題が解決できる。また、VGAT-Venus マウスの脳幹、脊髄では、GABA ニューロンとグリシンニューロンの両者が Venus で標識されており、電気生理学解析と単一細胞 RT-PCR 法とを組み合わせることにより、それぞれのニューロンの性質を容易に明らかにできる利点がある。

GABA ニューロンの多様性を理解する上で、サブタイプ決定の分子機構を明らかにすることは重要であり、転写因子 Lhx6 が大脳皮質 GABA ニューロンのパルブアルブミンとソマトスタチンのサブタイプの決定に関与することを示唆した。転写因子 Nkx2.1 のノックアウトマウスでは Lhx6 ノックアウトマウスと同様にパルブアルブミンとソマトスタチンのサブタイプニューロンが減少し (Anderson et al., 2001)、転写因子 Dlx1 ノックアウトマウスでは、ソマトスタチンとカルレチニンのサブタイプニューロンが減少する (Cobos et al., 2005)。これらの転写因子間の関係の有無について検討する必要がある。ラット大脳皮質 GABA ニューロンは、化学マーカーにより、6 種類のサブタイプに大別される (Uematsu et al., 2007)。Lhx6 の他のサブタイプへの効果についての検討も今後の課題である。

小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成に Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMKII) が関与することを明らかにした。我々は、CaMKII の主要サブユニットである α (CaMKII α) を不活性型に置換したノックインマウスを作成している。この遺伝子改変マウスを利用することで、プルキンエ細胞の樹状突起形成における CaMKII α 活性の効果を検証することができる。

2：科学技術や社会への考えられる波及効果

抑制性神経伝達物質の GABA は、てんかん病やアルコール精神病、不安症などの精神疾患との関連が報告されている。伴性劣性遺伝形式の滑脳症では、精神遅滞やてんかん発作を呈するが、原因遺伝子である *Arx* のノックアウトマウス解析で GABA ニューロンの移動の障害が報告された (Kitamura et al., 2002)。一方、グリシン神経伝達を障害すると、運動障害や感覚障害が出現する。従って、抑制性ニューロンが発生期に適切な移動を行い、適切な神経回路を形成することが重要である。抑制性ニューロンの発生の解明が進捗すれば、上記の疾患や障害の発症機構の解明に役立ち、治療や予防が可能になることで社会福祉に貢献する。

3. 3 “細胞移動と大脳皮質形成（佐藤グループ）”

（1）実施の内容

大脳皮質の興奮性神経細胞は、大脳皮質内脳室帯にて生まれ、法線方向（脳表方向）に移動し、大脳皮質を構成する（図 1）。この移動開始を含む細胞移動のコントロールは層構造をはじめとする大脳皮質の正しい形成に不可欠であり、この移動開始過程を含む神経細胞移動の乱れはさまざまな神経・精神疾患の原因となりうるということが明らかとなりつつあり、近年大きな注目を浴びている（Science 誌の 2005 breakthrough of the year の 1 つにこの分野が取り上げられた）。

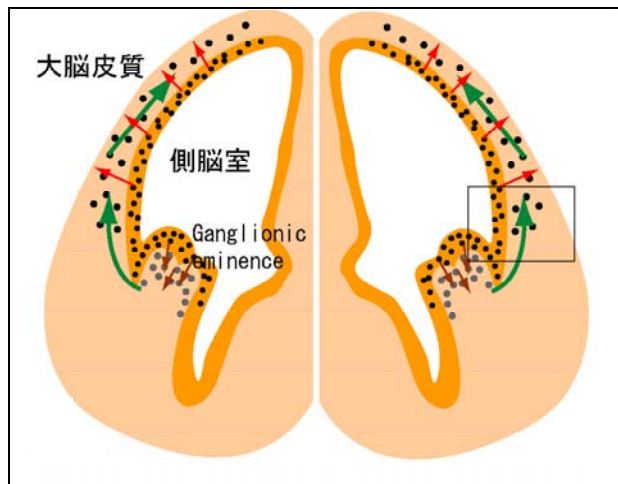


図 1：大脳皮質は移動細胞により形成される（形成期の大脳皮質断面図）。赤線で興奮性神経細胞の移動の様子を、緑線で抑制性神経細胞の移動の様子を示す。四角で囲った部位で細胞移動の様子を、下図に示す。

我々は、形成期の大脳皮質脳室帯に発現する新規分子 **FILIP** を同定し、**FILIP** が細胞移動に必須とされるアクチン結合分子フィラミン A の分解を促進することで、従来不明であった脳室帯からの細胞移動開始機構について、その開始を負に制御する新しいコントロールの仕組みを見いだした（Nature Cell Biol, 2002）

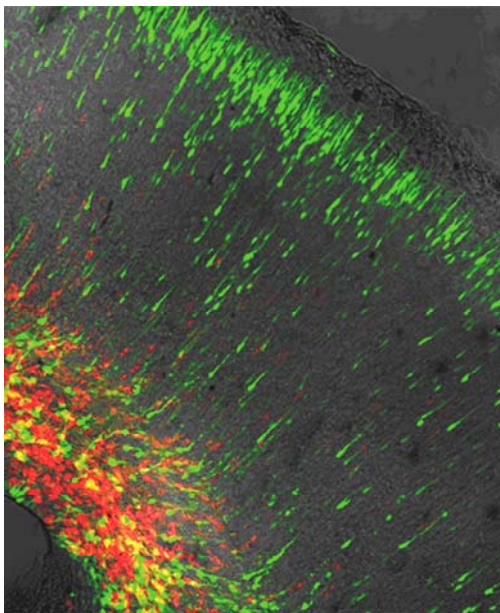


図 2：大脳皮質の形成時にフィラミン A は興奮性神経細胞の細胞移動に関わる。胎生 19 日目のマウス大脳皮質。胎生 15 日に子宮内遺伝子導入法により脳室帯の細胞に遺伝子を導入した。緑は通常の細胞。細胞は法線方向に脳表へと移動する。一方、フィラミン A の働きが不十分な細胞（変異フィラミン A を発現する細胞：赤）は、この時期では、正しく移動せず、脳室帯・脳室下帯からあまり移動しない。

この **FILIP** によるフィラミンの分解促進に伴う脳室帯からの移動開始制御の概念は、我々が初めて提示した概念であり、その内容は、*Nature* の *Review* 誌である *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 3:472, 2002 の *Highlights* 欄にて紹介された。この成果をさらに発展させ、細胞移動と大脳皮質形成の関連を分子レベルでさらに明らかにするべく、以下の(i)～(iii)の研究を実施した。

(i) *in vivo*における FILIP の機能を遺伝子ノックダウン法および FILIP ノックアウトマウスを作成し解析する。

(ii) FILIP による移動制御に続いて起こる現象である脳表へ向けての細胞移動が、なぜ脳室帯から脳表への一方向のみに方向性をもって生ずるのか、またその際の細胞極性・形態制御はどのようにコントロールされているかについて研究を進める。

(iii) FILIP、フィラミン A の機能調節に係る分子機構を明らかにする。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

(i)、(ii) FILIP とフィラミン A の発現量が移動中の神経細胞の形態制御に重要な役割を担うことを明らかにし論文として発表した。すなわち、FILIP のノックダウンによりフィラミンの存在量が増加した移動神経細胞では、その形態が双極性となり、一方、アクチン結合部位を欠損させ、その機能を阻害した変異フィラミンを発現させた場合、神経細胞の形態は多極性となった (Nagano et al., 2004、図 2 参照)。

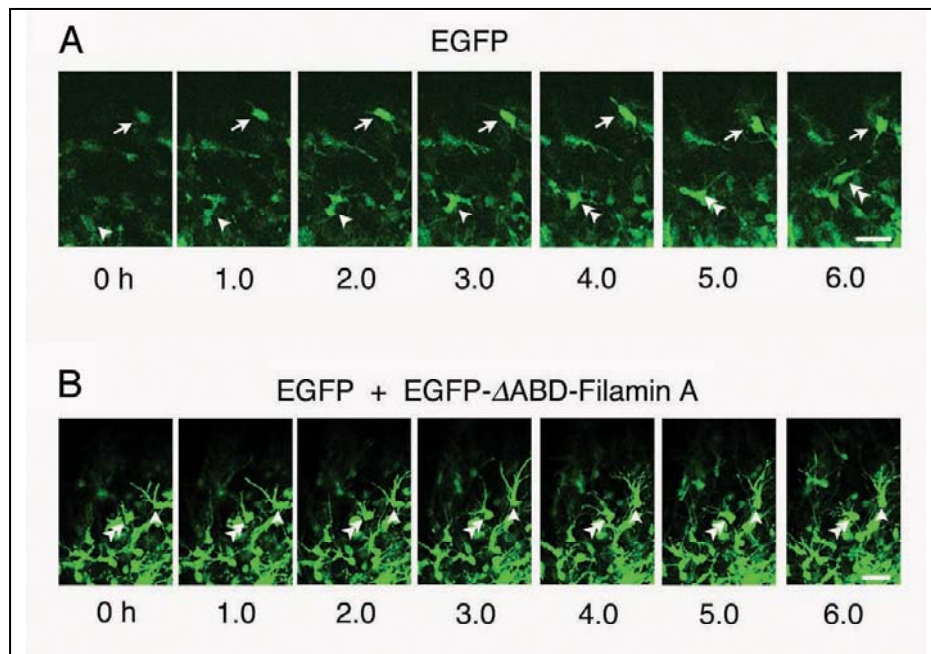


図 3 : アクチン結合部位を欠損したフィラミン A 分子発現神経細胞は多極性になる (パネル B、パネル A はコントロール)

この論文は、アクチン繊維の調節に関わる系 (フィラミン分子) が細胞の双極性 $\longleftrightarrow$ 多極性の形態制御に関わることを初めて示したものであり、*J. Neurosci.* の *This Week in the Journal* 欄にてハイライトペーパーとして紹介された。

細胞極性のメカニズムについては、極性をもたらす分子として細胞膜上の分子であるフォスファチジルイノシトールの関与が想定された。そこで、フォスファチジルイノシトールに結合する分子を蛍光標識し、移動途中の神経細胞をラベルし、観察したところ、確かに移動先端にフォスファチジルイノシトール 3 リン酸が集積している像が観察された (発表準備中)。

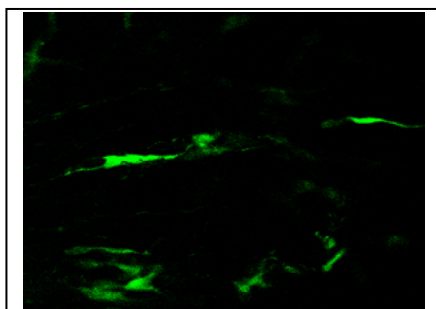
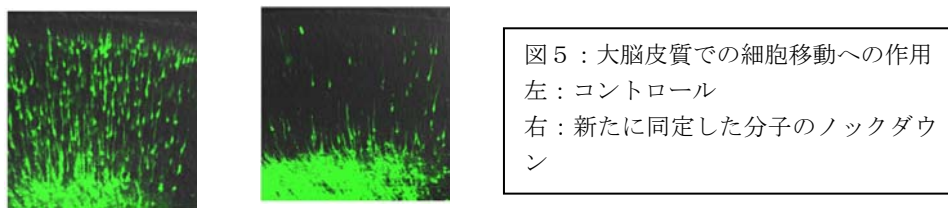


図 4 : フォスファチジルイノシトール 3 リン酸に結合する ARNO-GFP にて標識した移動中の神経細胞。移動方向は右。細胞体より移動先端に伸びた突起が標識されている。

さらに FILIP ノックアウトマウスを作成し、解析を進めた。この研究は現在も進行中である。

(iii) フィラミン A の細胞内局在の変化 (pleckstrin-homology domain をもつフィラミン A 結合蛋白 LL5 による細胞質から細胞膜へのリクルートとそれに伴う FILIP 活性の不活化) により、フィラミン A の分解、ひいては大脳皮質神経細胞の移動を制御する新しい分子機構を見いだした。さらに、LL5 が神経細胞移動のコントロール分子として働くのみならず、一般的に膜の脂質 (特にフォスファチジルイノシトール 3 リン酸) に応じ、フィラミンを移動先端に運ぶことで、ラメリポディアの形成促進作用があることを見いだした (投稿中)。

この成果に加え、FILIP 類似で新たな移動活性調節に関わる分子を同定した (下図)。現在この分子の解析を進めている。



大脳皮質の形成を細胞移動の観点から研究することは、大脳皮質の形成機構を明らかにできるという、いわば科学的な成果に留まらず、ここ 2〜3 年、いままで不明であった神経疾患や神経症状 (例えば失読症) が、細胞移動の障害によることが明らかとなったことより、新たな切り口での病態の理解を提供するのみならず、病因に直接迫りうる良いアプローチ法となっている。さらに、細胞移動障害と精神疾患との関連が取り沙汰されており、細胞移動障害とそれによる脳の構築変異は少なくともある種の精神疾患の発症の素地となりうるとの報告もなされている。今後、さらに細胞移動の観点から、大脳皮質形成機構を分子レベルも含め解明を進めることで、新たな観点による精神疾患の理解、ひいては新たな治療法開発へと研究が展開することが大いに期待される。

3. 4 “運動ニューロンの生存、細胞移動、軸索パターン形成における small GTPase シグナル伝達系の役割 (小林グループ)”

(1) 実施の内容

低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho は、細胞の骨格や運動、神経軸索の伸展、アポトーシスなど様々な細胞応答を制御する。その標的タンパク質の一つである Rho 依存性セリン/スレオニンキナーゼ(Rho-kinase/ROK/ROCK)は、Rho の制御下で種々の細胞機能を調節する。運動神経細胞は、細胞の運命決定、神経回路形成や細胞の生死などを制御する分子メカニズムを解析する上で極めて優れたモデルとなっていることから、本研究では、運動神経細胞の発生における Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の機能の解明に取り組んだ。

まず最初に、Cre-*loxP* システムを利用した神経細胞特異的な組み換え反応系を用いて、RhoA のドミナントネガティブ変異体あるいは Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体を運動神経細胞に強制発現させたトランスジェニックマウス(RhoA DN マウス、Rho-K DN マウス)を作製し、運動神経細胞における Rho と Rho-kinase の活性を抑制した(図 1)。これらのトランスジェニックマウスでは、胎生初期において脊髄運動神経細胞に顕著なアポトーシスが誘導された。このことから、発生初期の脊髄運動神経細胞の生存に Rho/Rho-kinase シグナル伝

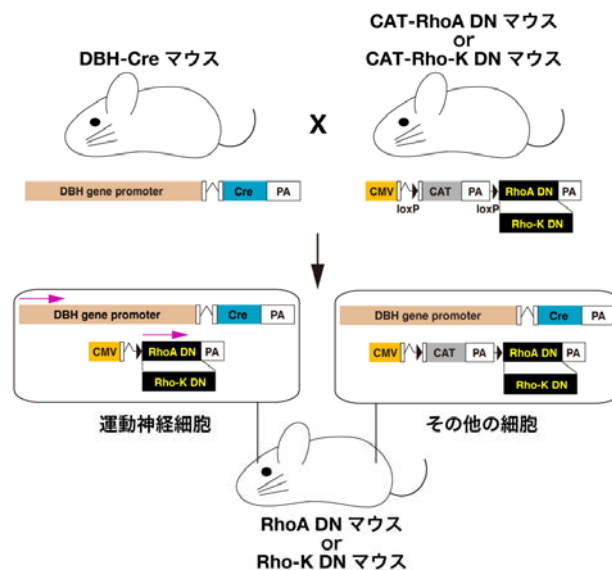


図 1.Cre-*loxP* 組み換え反応。DBH-Cre マウスと CAT-RhoA DN マウスあるいは CAT-Rho-K DN マウスを交配することによって、双方の遺伝子を有する RhoA DN マウスあるいは Rho-K DN マウスを作製することが出来る。これらのマウスでは、それぞれ運動神経細胞特異的に Rho あるいは Rho-kinase の活性が阻害される。DBH, ドーバミンβ-ヒドロキシラーゼ; CMV, サイトメガロウィルス遺伝子プロモーター; CAT, クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ; PA, ポリアデニレーションシグナル配列; RhoA DN, RhoA ドミナントネガティブ変異体; Rho-K DN, Rho-kinase ドミナントネガティブ変異体。

達系が重要な役割を果たしていることが明らかになった (Kobayashi et al., 2004; Matsushita et al., 2004)。菱脳運動神経細胞には、体性運動神経細胞と内蔵性運動神経細胞が存在する。胎生初期の Rho-K DN マウスの菱脳運動神経細胞にも顕著なアポトーシスの誘導が観察されたが、軸索回路形成の異常は体性運動神経にのみ見出された(図 2)。このことから、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系は、胎生初期において菱脳運動神経細胞の生

存と軸索回路形成に重要な役割を持つことが明らかになった。また、体性運動神経細胞が存在する菱脳領域を単独で組織培養したところ、Rho-K DN マウス由来の組織培養では、野生型のものと比較して、運動神経軸索の分岐や走行に異常が観察された(図 3)。このことは、運動神経細胞の正常な回路形成に

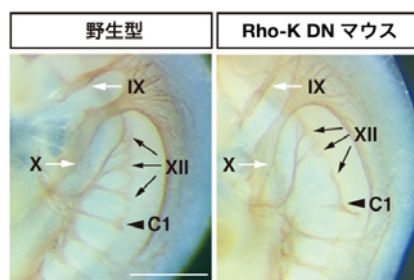


図 2. 抗ニューロフィラメント抗体を用いたホールマウント免疫染色。胎生 10.5 日の胎仔に対して、抗ニューロフィラメント抗体を用いて免疫染色を行った。菱脳においては、体性運動神経（黒矢印）に特異的に軸索回路形成異常が観察された。IX, 舌咽神経; X, 迷走神経; XII, 舌下神経; C1, 第1頸神経。Scale bar; 500 μ m。

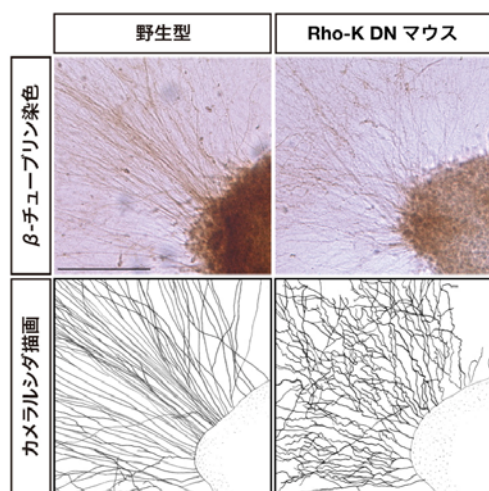


図3. 菱脳の組織培養。体性運動神経細胞が存在する菱脳領域を単独で組織培養し、抗β-チューブリン抗体を用いて免疫染色を行った。Rho-K DN マウス由来の組織培養では、野生型のものと比較して、運動神経軸索の分岐や走行に異常が認められる。Scale bar; 150 μm。

は、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系による軸索細胞骨格の制御が必須であることを示唆している。現在、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系に依存して菱脳運動神経の軸索回路形成を制御する分子機構の解明に取り組んでいる。共培養法の利用により、肝細胞増殖因子（HGF）の下流で Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が機能し、運動神経軸索の回路形成に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある（投稿準備中）。

（2）研究成果の状況及び今後期待される

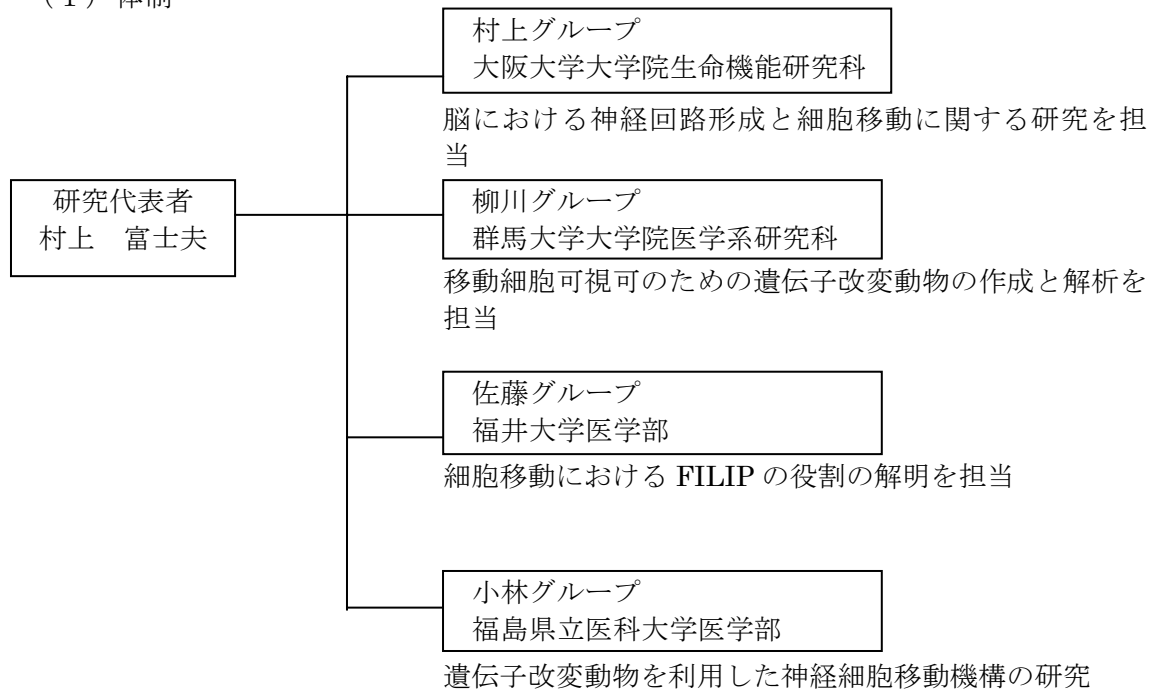
効果

Rho シグナル伝達系の *in vitro* における機能は詳細に解析されているが、*in vivo* における機能は不明な点が多い。最近、個体の発生、生理や病態における Rho シグナル伝達系の機能解析が国内外で精力的に進められている。Rho/Rho-kinase シグナル伝達系は多彩な細胞機能を有することから、このシグナル伝達系の個体における役割を解明することは極めて興味深い課題である。本研究では、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が、胎生初期の運動神経細胞の生存と軸索回路形成に必須の役割を果たしていることを初めて明らかにした。今後、Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の上流あるいは下流で機能する分子を同定し、運動神経細胞の生存や軸索回路形成を制御する詳細な分子機構を解明する必要がある。一方、以下に挙げる課題も、医療への応用を考慮すると極めて重要であると考えられる。1) 成熟期のこれらのトランスジェニックマウスを利用して、運動神経細胞の生存維持に Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が機能しているか否かを検討する、2) 胎生期に菱脳で観察された軸索回路形成の異常が、成熟期にどのような影響を及ぼすのかを解析する。これらのトランスジェニックマウスが、難治性の運動神経変性疾患や、軸索回路形成の異常に起因する神経麻痺などのモデルマウスとなり得るならば、これらの疾病を治癒するための薬剤や治療法の開発に大きく貢献出来る可能性がある。

また、種々の Cre トランスジェニックマウスを利用する事により、運動神経細胞のみならず、他の神経細胞における Rho/Rho-kinase シグナル伝達系の機能を解析する事が可能となる。今後、本実験系を駆使して、様々な神経細胞におけるこのシグナル伝達系の機能解析を網羅的かつ多角的に行う予定である。現在、ドーパミン神経細胞において Rho の活性を抑制したトランスジェニックマウスの作製が完了しており、このマウスを利用した組織学的・行動生理学的な解析が進行中である。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

①村上グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
村上富士夫	大阪大学大学院 生命機能研究科	教授	研究全般の立案・遂行、全体の統轄、ポストドクの指導	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
勝丸博信	大阪大学大学院 生命機能研究科	助教授	展開培養標本を用いた移動機構の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
小林裕明	大阪大学大学院 生命機能研究科	助手	子宮内遺伝子導入による移動細胞の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
Yan Zhu	大阪大学大学院 生命機能研究科	CREST 研究員	細胞移動における Ca ⁺⁺ イオンの役割	平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 10 月
西田和彦	大阪大学大学院 生命機能研究科	CREST 研究員	子宮内遺伝子導入による細胞移動の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 10 月
川内大輔	大阪大学大学院 生命機能研究科 千葉大学大学院 医学研究院	CREST 研究員 助手	サブストラクチュアライゼーション、PCR を用いた細胞移動能獲得の分子機構の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 5 月 平成 17 年 5 月～ 平成 19 年 3 月
田中大介	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	サブストラクチュアライゼーション、PCR を用いた細胞移動能獲得の分子機構の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
山内健太	大阪大学大学院	CREST 研	ドーパミン作動性遺伝子	平成 16 年 4 月～

	生命機能研究科	究員 大学院生	の細胞投射形成機構 の解析	平成 17 年 3 月 平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
木村俊哉	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	移動を制御する遺伝 子の cDNA サブトラクション	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
稲村直子	大阪大学大学院 生命機能研究科	研究員	細胞移動のタイムプラス解 析	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
松本智子	大阪大学大学院 生命機能研究科	CREST 技術員	細胞の移動能獲得野 分子機構の解析に関 する実験における技 術的支援	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
風間志保子	大阪大学大学院 生命機能研究科	研 究 補 助 員	研究チームの事務処 理	平成 16 年 10 月～ 平成 18 年 1 月 平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
渡辺治康	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	子宮内遺伝子導入に よる移動細胞の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
喜多善亮	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	展開培養標本を用い た移動機構の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
柳田光俊	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	展開培養標本を用い た移動機構の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
山寄絵海	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	移動を制御する遺伝 子の cDNA サブトラクション	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
小林剛	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	子宮内遺伝子導入に よる移動細胞の解析	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
皿谷俊祐	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	細胞移動のタイムプラス解 析	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
宅島祐介	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	細胞移動のタイムプラス解 析	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
川北真由香	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	移動を制御する遺伝 子の cDNA サブトラクション	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
宋文杰	大阪大学大学院 工学研究科	助教授	細胞移動のカリウムイメ ージング	平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 3 月
玉田篤史	基礎生物学研究 所 理科学研究所脳 科学総合研究セ ンター	研究員	菱脳唇由来細胞の最 終移動先の決定	平成 14 年 11 月～ 平成 16 年 3 月 平成 16 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
山本亘彦	大阪大学大学院 生命機能研究科	教授	トランスウェル培養法を用い た実験全般	平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 3 月
吉村小緒利	大阪大学大学院 生命機能研究科	CREST 技術員	細胞の移動能獲得野 分子機構の解析に関 する実験における技	平成 16 年 4 月～ 平成 17 年 3 月

			術的支援	
野口由美子	大阪大学大学院 生命機能研究科 筑波大学基礎医学系	CREST 研究員 講師	GABA 作動性ニューロンの起源の探索	平成 14 年 11 月～ 平成 15 年 5 月 平成 15 年 6 月～ 平成 16 年 3 月
太城 康良	日本学術振興会	特 別 研 究 員	移動細胞のタイムラプス解析	平成 14 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
森 俊之	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	子宮内遺伝子導入による移動細胞の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 15 年 3 月
岩下 美里	大阪大学大学院 生命機能研究科	大学院生	移動を制御する遺伝子の cDNA サブトラクション	平成 14 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
玉田 恵子	大阪大学大学院 生命機能研究科	研究員	子宮内遺伝子導入による移動細胞の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 15 年 3 月
花村 健次	基礎生物学研究 所	研究員	展開培養標本を用いた移動機構の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 15 年 3 月
熊田 竜郎	基礎生物学研究 所	研究員	展開培養標本を用いた移動機構の解析	平成 14 年 11 月～ 平成 16 年 3 月
中村 京子	大阪大学大学院 生命機能研究科	研 究 補 助 員	研究チームのサーバ、ソフトウェア等の管理	平成 17 年 9 月～ 平成 18 年 4 月

②柳川グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
柳川 右千夫	群馬大学	教授	遺伝子改変動物の作成と解析	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
柿崎 利和	群馬大学	助手	遺伝子改変動物の作成と解析	平成 16 年 5 月～ 平成 19 年 3 月
斉藤 憲史	総合研究大学院 大学	大学院生	遺伝子改変動物の作成と解析	平成 16 年 5 月～ 平成 19 年 3 月
山肩 葉子	生理学研究所	助手	遺伝子改変動物の作成と解析	平成 15 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
山本 友美	生理学研究所	技官	遺伝子改変マウスの作成と解析	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
上松 正和	生理学研究所	特 別 共 同 利 用 研 究 員	遺伝子改変マウスの作成と解析	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月

③佐藤グループ（脳における神経回路形成と細胞移動）

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
-----	-----	-----	------	------

佐藤 真	福井大学医学部	教授	研究の総括、細胞移動の開始に関わる分子機構に関する実験全般	平成 15 年 1 月～平成19年3月
永野 隆	福井大学医学部	助教授	神経細胞移動開始の分子機構に関する実験	平成 15 年 1 月～平成16年3月
竹内 聖二	福井大学医学部	講師	神経細胞移動開始の分子機構に関する実験	平成 17 年 4 月～平成19年3月
八木 秀司	福井大学医学部	助手	神経細胞移動開始の分子機構 及び方向性をもった細胞移動開始の分子機構に関する実験	平成 15 年 1 月～平成19年3月
安藤 康一	福井大学医学部	助手	細胞増殖から細胞移動開始へ至る機構に関する実験	平成 15 年 1 月～平成17年3月

④小林グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
小林 和人	福島県立医科大学	教授	運動ニューロンの生存、細胞移動、軸索パターン形成における small GTPase シグナル伝達系の役割	平成 14 年 11 月～平成 17 年 9 月
小林 憲太	福島県立医科大学	助手	運動ニューロンの生存、細胞移動、軸索パターン形成における small GTPase シグナル伝達系の役割	平成 14 年 11 月～平成 17 年 9 月
小林 とも子	福島県立医科大学	CREST 研究員	運動ニューロンの生存、細胞移動、軸索パターン形成における small GTPase シグナル伝達系の役割	平成 15 年 8 月～平成 17 年 9 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15年8月10日～8月11日	シンポジウム “Dynamics of Neural Development”	千里ライフサイエンスセンター	100人	4つのセッションに分けて2日間にわたり17名の研究者が講演を行った。
平成16年9月21日～24日	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）	大阪国際会議場	3000人	プレナリーレクチャー、特別講演、シンポジウム、一般演題の発表他、市民公開講座も開催した。
平成17年3月14日	福井大学21世紀COEプログラムワークショップ 「神経科学における多様なイメージング技術の応用と統合」	福井大学	50名	神経科学における分子イメージングの最先端と応用について国内より著名な業績を挙げているシンポジストを数名招き、ワークショップを開催した。

(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
Andrew Rumusden （イギリス Kings College London、教授）	シンポジウム“Dynamics of Neural Development”において”Boundaries and compartments in the developing brain”についての講演を行うため	千里ライフサイエンスセンター	平成15年8月8日～8月13日
Edward S. Ruthazer （アメリカ Cold Spring Harbor Laboratory、研究員）	シンポジウム“Dynamics of Neural Development”において”Control of axon branch dynamics by correlated neural activity.”についての講演を行うため	千里ライフサイエンスセンター	平成15年8月6日～8月12日
Alain Chedotal （フランス国立科学研究センター、グループリーダー）	発達期の小脳形成機構における Slit と semapholin の役割について講演及び神経回路の形成機構に関して知見交換・討論のため	大阪大学大学院生命機能研究科	平成16年8月20日～8月22日
Alain Chedotal （フランス国立科学研究センター、グループリーダー）	“Role of slits and semaphorins in the developing cerebellar system”と題した講演を行うとともに、実験等に関する技術指導を行うため	大阪大学大学院生命機能研究科	平成18年6月18日～6月20日

6. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内2件、海外76件)

村上グループ

1. Hatanaka Y., and Murakami, F. (2002) In vitro analysis of the origin, migratory behavior and maturation of cortical pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.*, 45, 1-14.
2. Nagano, T., Yoneda, T., Hatanaka, Y., Kubota, C., Murakami, F, and Sato, M. (2002) Filamin A-interacting protein FILIP regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nature Cell Biology* 4, 495-501.
3. Taniguchi, H., Tamada, A., Kennedy, T.E. and Murakami, F. (2002) Crossing the ventral midline causes neurons to change their response to floor plate and alar plate attractive cues during transmedian migration. *Dev. Biol.* 249, 321-332.
4. Takemoto, M., Fukuda, T., Sonoda, R., Murakami, F., Tanaka, H., Yamamoto, N. (2002) Ephrin-B3-EphA4 interactions regulate the growth of specific thalamocortical axon populations in vitro *Eur. J. Neurosci.* 16, 1168-1172.
5. Yamamoto N (2002) Cellular and molecular basis of axonal targeting in the formation of lamina-specific thalamocortical projections. *Neurosci. Res.*, 42, 167-173.
6. Takemoto M, Fukuda T, Murakami F, Tanaka H, Yamamoto N (2002) Role of ephrin-B3 in the formation of region- and lamina-specific thalamocortical projections. *Eur. J. Neurosci.*, 16, 1168-1172.
7. Mizuseki, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Muguruma, K., Ikeya, M., Nishiyama, A., Arakawa, A., Suemori, H., Nakatsuji, N., Kawasaki, H., Murakami, F. and Sasai, Y. (2003) Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *PNAS* 100, 5828-5833.
8. Miyahara, M, Shirasaki, R, Tashiro, Y, Muguruma, K, Heizmann, CW and Murakami, F. (2003) Pathfinding and Growth Termination of Primary Trigeminal Sensory Afferents in the Embryonic Rat Hindbrain. *J. Comp Neurol.* 460, 503-513.
9. Hattori, S., Murakami, F. and Song, W.-J. (2003) Rundown of a transient potassium current is attributable to changes in channel voltage dependence. *Synapse* 48, 57-65.
10. Kawauchi, D., Kobayashi, H., Sekine-Aizawa, Y., Fujita, S.C. and Murakami, F. (2003) MuSC is involved in regulating axonal fasciculation of mouse primary vestibular afferents. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2244-2252.
11. Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K. and Murakami, F. (2003) Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* 130, 5803-5813.

12. Hattori, S., Murakami, F. and Song, W.-J. (2003) Quantitative relationship between Kv4.2 mRNA and A-Type K⁺ current in rat striatal cholinergic interneurons during development. *J. Neurophysiol.* 90, 175-183.
13. Hanamura K, Harada A, Katoh-Semba R, Murakami F, Yamamoto N (2004) BDNF and NT-3 promote thalamocortical axon growth with distinct substrate and temporal dependency. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 1485-1493.
14. Christelle Sabatier, Andrew S. Plump, Le Ma, Katja Brose, Atsushi Tamada, Fujio Murakami, Eva Y.-H.P. Lee, and Marc Tessier-Lavigne (2004) The Divergent Robo Family Protein Rig-1/Robo3 Is a Negative Regulator of Slit Responsiveness Required for Midline Crossing by Commissural Axons. *Cell* 117, 157-169.
15. Hua Long, Christelle Sabatier, Le Ma, Andrew Plump, Wenlin Yuan, David Ornitz, Atsushi Tamada, Fujio Murakami, Corey S. Goodman, and Marc Tessier-Lavigne (2004) Conserved Roles for Slit and Robo Proteins in Midline Commissural Axon Guidance. *Neuron*, 42, 213-223.
16. Kenji Hanamura Akiko Harada, Ritsuko Katoh-Semba, Fujio Murakami and Nobuhiko Yamamoto (2004) BDNF and NT-3 promote thalamocortical axon growth with distinct substrate and temporal dependency. *Eur J. Neurosci*, 19, 1485-1493.
17. Yun Zhong, Makoto Takemoto, Tsuyoshi Fukuda, Yuki Hattori, Fujio Murakami, Daisuke Nakajima, Manabu Nakayama, and Nobuhiko Yamamoto (2004) Identification of the Genes that are Expressed in the Upper Layers of the Neocortex. *Cerebral Cortex*, 14, 1144-1152.
18. Okabe, N., Shimizu, K., Ozaki-Kuroda, K., Nakanishi, H., Morimoto, K., Takeuchi, M., Katsumaru, H., Murakami, F. and Takai, Y. (2004) Contacts between the commissural axons and the floor plate cells are mediated by nectins. *Dev. Biol.* 273, 244-256.
19. Hatanaka, Y., Hisanaga, S., Heizmann C.W. & Murakami, F. (2004) Distinct Migratory Behavior of Early- and Late-born Neurons Derived from Cortical Ventricular Zone. *J. Comp Neurol.*, 479, 1-14.
20. Zhong Y, Takemoto M, Fukuda T, Hattori Y, Murakami F, Nakajima D, Nakayama M, Yamamoto N (2004) Identification of the genes that are expressed in the upper layers of the neocortex. *Cereb. Cortex*, 14, 1144-1152.
21. Sugo N, Niimi N, Aratani Y, Takiguchi-Hayashi K, Koyama H (2004) p53 Deficiency rescues neuronal apoptosis but not differentiation in DNA polymerase beta-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 9470-9477.
22. Kobayashi, H., Yamamoto, S., Maruo T., & Murakami, F. (2005) Identification of a cis-Acting Element Required for Dendritic Targeting of activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA. *E. J. Neurosci.*, 22, 2977-2984.

23. Sakumura Y, Tsukada Y, Yamamoto N, Ishii S (2005) A model of molecular machinery for axon guidance based on crosstalk between Rho GTPases. *Biophysic. J.*, 89, 812-822.
24. Uesaka N, Hirai S, Maruyama T, Ruthazer ES, Yamamoto N (2005) Activity-Dependence of Cortical Axon Branch Formation: A Morphological and Electrophysiological Study Using Organotypic Slice Cultures. *J. Neurosci.*, 25: 1-9.
25. Kawauchi, D., Taniguchi, H., Watanabe, H., Saito, T. & Murakami, F (2006) Direct Visualization of Nucleogenesis by Precerebellar Neurons : Involvement of Ventricle-directed, Radial Fibre-Associated Migration. *Development*, 133, 1113-1123.
26. Taniguchi, H., Kawauchi, D., Nishida K. & Murakami, F. (2006) Classic Cadherins Regulate Tangential Migration of Precerebellar Neurons in the Caudal Hindbrain. *Development* 133, 1923-1931.
27. Tanaka, D.H., Maekawa, K., Yanagawa, Y., Obata, K. & Murakami, F. (2006) Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development*, 133, 2167-2176.
28. Andrews, W., Liapi, A., Plachez, C., Camurri, L., Zhang, J., Mori, S., Murakami, F., Parnavelas, J.G., Sundaresan, V. & Richards, L.J. (2006) Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. *Development*, 133, 2243-2252.
29. Stephanie R Kadison, Fujio Murakami, Michael P Matise, Zaven Kaprielian (2006) The Role of Floor Plate Contact in the Elaboration of Contralateral Commissural Projections Within the Embryonic Mouse Spinal Cord, *Dev. Biol.* 296, 499-513.
30. Yan Zhu, Sarah Guthrie, Fujio Murakami (2006), Ephrin-A/EphA controls the rostral turning polarity of a lateral commissural tract in chick hindbrain, *Development*, 133, 3837-3846.
31. Tashiro, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., Murakami, F. (2007) Development and Migration of GABAergic Neurons in the Mouse Myelencephalon. *J. Comp. Neurol.*, in press
32. Yamamoto, N., Tamada, A. and Murakami, F. (2003) Wiring of the brain by a range of guidance cues. *Prog. Neurobiol.* 68, 393-407.(review)

柳川グループ

1. Endo, T., Yanagawa, Y., Obata, K., and Isa, T. (2003) Characteristics of GABAergic Neurons in the Superficial Superior Colliculus. *Neurosci. Lett.*, 346, 81-84.
2. Kobayashi, T., Ebihara, S., Ishii, K., Kobayashi, T., Nishijima, M., Endo, S., Takaku,

- A., Sakagami, H., Kondo, H., Tashiro, F., Miyazaki, J., Obata, K., Tamura, S. and Yanagawa, Y. (2003) Structural and Functional Characterization of Mouse Glutamate Decarboxylase 67 Gene Promoter. *Biochim. Biophys. Acta*, 1628, 156-168.
3. Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K., and Kaneko, T. (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* 467, 60-79.
 4. Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F. (2003) Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development*, 130, 5803-5813.
 5. Shimura, T., Watanabe, U., Yanagawa, Y. and Yamamoto, T. (2003) Altered taste function in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamate decarboxylase. *Neurosci. Lett.*, 356, 171-174.
 6. Furuta, T., Koyano, K., Tomioka, R., Yanagawa, Y., and Kaneko, T. (2004) GABAergic basal forebrain neurons that express receptor for neurokinin B and send axons to the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 473, 43-58.
 7. Ebihara, S., Yamamoto, T., Obata, K., and Yanagawa, Y. (2004) Gene structure and alternative splicing of the mouse glycine transporter type-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 857-864
 8. Munsch, T., Yanagawa, Y., Obata, K., and Pape, H.C. (2005) Dopaminergic control of local interneuron activity in the thalamus. *Eur. J. Neurosci.* 21, 290-294
 9. Takada, N., Yanagawa, Y., and Komatsu, Y. (2005) Activity-dependent maturation of excitatory synaptic connections in solitary neuron cultures of mouse neocortex. *Eur. J. Neurosci.* 21, 422-430
 10. Ono, M., Yanagawa, Y., and Koyano, K. (2005) GABAergic neurons in inferior colliculus of the GAD67-GFP "knock-in" mouse: Electrophysiological and morphological properties. *Neurosci. Res.* 51, 475-492.
 11. Nishimaru, H., Restrepo, C. E., Ryge, J., Yanagawa, Y. and Kiehn, O. (2005) Mammalian motor neurons co-release glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 102, 5245-5249.
 12. Abe, H., Yanagawa, Y., Kanbara, K., Maemura, K., Hayasaki, H., Azuma, H., Obata, K., Katsuoka, Y., & Watanabe, M. (2005) Epithelial localization of green fluorescent protein-positive cells in epididymis of the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Andrology* 26, 566-578.
 13. Acuna-Goycolea, C., Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Obata, K., & van den Pol, A.N. (2005) Mechanisms of NPY, PYY3-36, and PP inhibition of identified GFP-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate

nucleus. *J. Neurosci.* 25, 7406-7419.

14. Endo, T., Yanagawa, Y., Obata, K., & Isa, T. (2005) Nicotinic acetylcholine receptor subtypes involved in facilitation of GABAergic inhibition in mouse superficial superior colliculus. *J. Neurophysiol.* 94, 3893-3902.
15. Marowsky, A., Yanagawa, Y., Obata, K. & Vogt, K.E. (2005) A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron* 48, 1025-37.
16. Watanabe, E., Hiyama, T., Shimizu, H., Kodama, R., Hayashi, N., Miyata, S., Yanagawa, Y., Obata, K. & Noda, M. (2006) Sodium-level-sensitive sodium channel Na^x is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290, R568-76.
17. Kuwana, S., Tsunekawa, N., Yanagawa, Y., Okada, Y., Kuribayashi, J., & Obata, K. (2006) Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Boetzinger complex. *Eur. J. Neurosci.* 23, 667-674.
18. Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Dohi, T., Egashira, Y., Shibayama, Y., & Watanabe, M. (2006) Antigen presenting cells expressing glutamate decarboxylase 67 were identified as epithelial cells in glutamate decarboxylase 67- GFP knock-in mouse thymus. *Tissue Antigen* 67, 198-206.
19. Tanaka, M., Yanagawa, Y., Obata, K., & Marunouchi, T. (2006) Dendritic morphogenesis of cerebellar Purkinje cells through extension and retraction revealed by long-term tracking of living cells in vitro. *Neuroscience* 141, 663-674.
20. Britto, J.M., Obata, K., Yanagawa, Y., & Tan, S.-S. (2006) Migratory Response of interneurons to different regions of the developing neocortex. *Cerebral Cortex*, 16, i57-i63.
21. Jiao, Y., Zhang, C., Yanagawa, Y. & Sun, Q.-Q. (2006) Major effects of sensory experiences on the neocortical inhibitory circuits. *J. Neurosci.* 26, 8691-8701.
22. May, C.A., Nakamura, K., Fujiyama, F., Komatsu, Y., & Yanagawa, Y. (2007) Homozygous GAD65 and heterozygous GAD67 knock-out mice reveal normal retinal development and maintenance despite reduced amounts of GABA. *Acta Neuropathologica*, 113 101-103
23. Hoskison, M.M., Yanagawa, Y., Obata, K & Shuttleworth, W.C. (2006) Calcium-dependent NMDA-induced dendritic injury and MAP2 loss in acute hippocampal slices. *Neuroscience*, 145, 66-79.
24. Sohya, K., Kameyama, K., Yanagawa, Y., Obata, K., & Tsumoto, T. (2007) GABAergic neurons are less selective to stimulus orientation than excitatory neurons in layer II/III of visual cortex, as revealed by in vivo functional Ca²⁺

imaging in transgenic mice. *J. Neurosci.* 27, 2145-2149.

25. Liodis, P., Denaxa, M., Grigoriou, M., Akufo-Addo, C., Yanagawa, Y., & Pachnis, V. (2007) *Lhx6* activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J. Neurosci.*, 27, 3078-3089.
26. Panzanelli, P., Fritch, J.M., Yanagawa, Y., Obata, K., & Sassoe-Pognetto, M. GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* in press
27. Uematsu, M., Hirai, Y., Karube, F., Ebihara, S., Kato, M., Abe, K., Obata, K., Yoshida, S., Hirabayashi, M., Yanagawa, Y. & Kawaguchi, Y. Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic Venus-expressing rats. *Cerebral Cortex*, in press
28. Fujii, M., Arata, A., Kanbara-Kume, N., Saito, K., Yanagawa, Y., & Obata, K. Respiratory activity in brainstem of fetal mice lacking glutamate decarboxylase 65/67 and vesicular GABA transporter. *Neuroscience*, in press

佐藤グループ

1. Kubota, C., Nagano, T., Baba, H., and Sato, M. (2004) Netrin-1 is crucial for the establishment of the dorsal column-medial lemniscal system : *J. Neurochem.*, 89, 1547-1554.
2. Nagano, T., Morikubo, S. and Sato, M. (2004) Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. *J. Neurosci.*, 24, 9648-9657
3. Yagi, H., Takamura, Y., Yoneda, T., Konno, D., Akagi, Y., Yoshida, K., and Sato, M. (2005) *Vlgr1* knockout-mice show audiogenic seizure susceptibility. *J. Neurochem.*, 92, 191-202.
4. Sato, M. and Nagano, T. (2005) Involvement of Filamin A and Filamin A-interacting protein (FILIP) in controlling the start and cell shape of radially migrating cortical neurons. *Anat. Sci. Int.*, 80, 19-29. (review article)
5. Ando, K., Nagano, T., Nakamura, A., Konno, D., Yagi, H. and Sato, M. (2005) Expression and characterization of disulfide bond use of oligomerized extracellular matrix constituents in the developing brain. *Neuroscience* 133, 947-957.
6. Enomoto R., Kinebuchi T., Sato M., Yagi H., Kurumizaka H., Yokoyama S. (2006) Stimulation of DNA strand exchange by the human TBPIP/Hop2-Mnd1 complex. *J Biol Chem.* 281, 5575-81.
7. Yagi, H., Tokano, H., Maeda, M., Takabayashi, T, Nagano, T., Kiyama, H., Fujieda, S., Kitamura, K., Sato, M. (2007) Deletion of *Vlgr1* results in hearing defect because of the disturbed maturation of stereocilia of cochlear hair cells. *Genes Cells*

12, 235-250.

小林グループ

1. Matsushita, N., Okada, H., Yasoshima, Y., Takahashi, K., Kiuchi, K., and Kobayashi, K. (2002) Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J. Neurochem.*, 82, 295-304.
2. Okada, H., Matsushita, N., Kobayashi, K., and Kobayashi, K. (2003) Identification of GABA_A receptor subunit variants in midbrain dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* 89, 7-14.
3. Kobayashi, K., Takahashi, M., Matsushita, N., Miyazaki, J., Koike, M., Yaginuma, H., Osumi, N., Kaibuchi, K., and Kobayashi, K. (2004) Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase. *J. Neurosci.* 24, 3480-3488.
4. Matsushita, N., Kobayashi, K., Miyazaki, J., and Kobayashi, K. (2004) Fate of transient catecholaminergic cell types revealed by site-specific recombination in transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 78, 7-15.
5. Saino-Saito, S., Sasaki, H., Volpe, B. T., Kobayashi, K., Berlin, R., and Baker, H. (2004) Differentiation of the dopaminergic phenotype in the olfactory system of neonatal and adult mice. *J. Comp. Neurol.*, 479, 389-398.
6. Yoshizaki, T., Inaji, M., Kouike, H., Shimazaki, T., Sawamoto, K., Ando, K., Date, I., Kobayashi, K., Suhara, T., Uchiyama, Y., and Okano, H. (2004) Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosci. Lett.* 363, 33-37.
7. Jomphe, C., Bourque, M.-J., Fortin, G., St-Gelais, F., Okano, H., Kobayashi, K., and Trudeau, L.-E. (2005) Use of TH-GFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture. *J. Neurosci. Methods* 146, 1-12.
8. Kobayashi, K. and Nagatsu, T. (2005) Molecular genetics of tyrosine 3-mono-oxygenase and inherited diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 267-270.
9. Pignatelli, A., Kobayashi, K., Okano, H., and Belluzzi, O. (2005) Functional properties of dopaminergic neurones in the mouse olfactory bulb. *J. Physiol.*, 564, 501-514.
10. 小林 憲太、貝淵 弘三、小林 和人 (2002) Rho GTPase シグナル伝達系による神経細胞の軸索パターン形成と生存の制御 自律神経 (39) 45-51.
11. 小林 憲太、小林和人 (2004) Cre-loxP システム：コンディショナルな遺伝子改変技術 脳 21 (7) 90-93.

(2)口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 4 1 件、海外 5 件)

村上グループ

1. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Multiple Roles of the Floor Plate in the Guidance of Axonal Growth Cones and Migrating Neurons、3rd Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration、Perth (AUS) 、2002.12.5
2. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、脳の発生と細胞移動。第 38 回脳のシンポジウム、東京、2002.3.8
3. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、脳における神経回路形成と成長円錐の反応性の変化、第 26 回日本医学会総会、福岡、2003.4.4.
4. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Tangential migration of rhombic lip-derived neurons 後脳菱脳唇由来ニューロンの接線方向への移動、第 26 回神経科学大会、名古屋、2003.7.23
5. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Dynamic and zone-specific migratory behavior of neocortical GABAergic neurons、International Symposium "Dynamics of Neural development"、大阪、2003.8.10-11
6. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、脳における軸索ガイドのメカニズム、組織再生と機能回復、東京、2003.12.6
7. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Analysis and Mechanism of Migratory Behavior of Cortical Excitatory Neurons、2nd International Symposium on Emergent Mechanisms of Communication in the Brain "IEMC 2004"、淡路島、2004.3.3
8. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、脳を形作る原理を求めて：脳における細胞の移動、第 36 回 脳の医学・生物学会、名古屋、2004.3.6
9. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Role of choroid plexus-derived chemorepellents in neuronal circuit formation、16th International Congress of the IFAA Anatomical Science 2004、京都、2004.8.27
10. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)：脳における神経回路形成と細胞移動、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 (CREST/SORST)「脳神経科学の最先端 2004」、東京、2004.10.6
11. 川内大介 (千葉大学大学院医学研究院、SORST・JST)、脳における細胞移動と神経核形成-in vivo 遺伝子導入法によるアプローチ、大阪大学大学院生命機能研究科「フロンティアバイオサイエンスコロキウム」、大阪、2005.5.11
12. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Visualizing nucleogenesis in the

hindbrain, Development and regeneration of neural connections, Treilles(France)、2005.6.28-7.3

13. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、川内大輔 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、田中大介 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、核形成の最終段階としての放射状方向細胞移動、第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005.7.26
14. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Intracortical Migration of Cortical Interneurons、Neuronal Differentiation in Cortical Development、大阪、2005.9.16
15. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Tangential and Radial Migration of Neurons as Key Steps for Neurogenesis, Dynamics of Biological Systems、大阪、2006.1.13
16. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Multidirectional Tangential Migration of Cortical GABAergic Interneurons、Dynamics of Cortical Development and Neuronal Migration、東京、2006.1.30
17. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Intracortical Multidirectional Tangential Migration of Cortical GABAergic Interneurons、基礎生物科学研究所研究会「大脳皮質の発生と機能構築」、岡崎市、2006.3.17
18. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Involvement of Radial Fiber-Associated Ventricle-directed Migration of Neurons in Hindbrain Neurogenesis、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、京都、2006.6.21
19. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、小脳前核ニューロンの移動と核形成、Neuroscience2006、京都、2006.7.21
20. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、“Intracortical multidirectional migration of cortical interneurons”、“CORTICAL DEVELOPMENT: GENES AND GENETIC ABNORMALITIES”、London、2007.2.7
21. 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、脳の基本機能ユニットの構築と神経細胞移動、第 84 回日本生理学会大会・塚原仲晃 記念レクチャー3、大阪、2007.3.22

柳川グループ

1. 柳川右千夫^{1,2,3}、海老原利枝^{1,2}、常川直子^{1,2}、小幡邦彦^{1,2} (1生理研・神経化学、2総合研究大学院大学、3CREST & SORST) GABA ニューロンの発生・分化と遺伝子発現、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、平成 15 年 7 月 25 日
2. 柳川右千夫^{1,2} (1群馬大院・医・遺伝発達行動学、2SORST) 脳研究のための遺伝子改変動物、第 83 回日本生理学会大会 (教育講演)、前橋、平成 18 年 3 月 28 日

佐藤グループ

1. 佐藤 真：大脳皮質形成；脳室からの細胞移動開始を司る新たな分子基盤、第 108 回日本解剖学会全国学術集会、シンポジウム「ポストゲノムの形態学的再認識」、福岡、2003.4.
2. 佐藤 真：Molecular mechanism of directed migration start out of the cortical ventricular zone, 第 26 回日本神経科学大会、シンポジウム「大脳皮質の発生・進化和機能構築」、名古屋、2003.7.
3. 佐藤 真：脳形成・発達とけいれん、第 46 回日本神経化学会、オープンシンポジウム (学会主催)、新潟、2003.9.
4. 永野 隆、森久保聡一、八木 秀司、佐藤 真：Filamin A 結合蛋白質 FILIP による大脳皮質脳室帯細胞の形態制御、第 46 回日本神経化学会、ミニシンポジウム、新潟、2003.9.
5. 佐藤 真：脳形成の基本原則；脳室帯からの細胞移動開始の新しい制御の仕組み、第 19 回形態科学シンポジウム「神経系の発生・形成・再生 その分子メカニズム」、和歌山、2003.10.
6. Sato, M. : Potential roles of FILIP and Filamin on the migration start out of the ventricular zone、シンポジウム 1.Developmental Biology 「Molecular and cellular principals of cerebral cortical development」第 16 回国際解剖学会議、京都、2004.8.
7. 佐藤 真、永野 隆：「アクチン結合タンパクフィラミンによる移動細胞の形態制御」シンポジウム「大脳皮質の細胞構築制御」、Neuro2004、大阪、2004.9.
8. Nagano, T., Morikubo, S. and Sato, M. : Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 (CREST/SORST)「脳神経科学の最先端 2004」、東京、2004.10.
9. Sato, M. : Involvement of Filamin A and FILIP in controlling the start and cell shape of radially migrating cortical neurons、CORTICAL DEVELOPMENT - neural stem cells to neural circuits、ギリシャ、2005.5.
10. Sato, M. : Involvement of FILAMIN A and FILIP in controlling the start and cell shape of radially migrating cortical neurons、Neuronal Differentiation in Cortical Development、大阪、2005.9.
11. 八木秀司、高村佳宏、赤城好男、吉田和典、佐藤 真：Vlgr1 mutant mice showed high susceptibility to audiogenic seizure、第 48 回日本神経化学学会(福岡)大会 ミニシンポジウム、福岡、2005.9.

12. 八木秀司、小泊絵里、勝山亮一、佐藤 真 : *Vlgr1* 遺伝子欠損マウスを用いた聴覚性痙攣の解析、日本解剖学会第 65 回中部支部学術集会、金沢、2005.10.
13. 佐藤 真 : 神経上皮に発現する *Vlgr1* 分子の機能解析、第 10 回グリア研究会、大阪 2005.10.
14. Sato, M. : A novel mechanism that controls radial migration by sensing membrane phosphoinositides、Keio University School of Medicine, International Symposium 東京、2006.1.
15. 佐藤 真 : 大脳皮質形成に係る新たな神経細胞移動調節の仕組み、第 24 回 Brain Science Conference、大分、2006.2.
16. Sato, M. : A novel mechanism that controls radial migration by sensing membrane phosphoinositides、基礎生物学研究所研究会「大脳皮質の発生と機能構築」、岡崎、2006.3.
17. 佐藤 真、高林哲司、タケラマン、八木秀司、岡本昌之、マリク ファウジア、久保田 力、藤枝重治、永野 隆 : フォスファチジルイノシトールによる新たな神経細胞移動調節機構の同定、第 111 回日本解剖学会・全国学術集会、相模原市、2006.3.
18. 八木秀司、戸叶尚史、前田光代、高林哲司、木山博資、藤枝重治、喜多村 健、佐藤 真 : *Vlgr1* 欠損による蝸牛有毛細胞の発達不全、第 111 回日本解剖学会・全国学術集会、相模原市、2006.3.
19. Yagi, H. Tokano, H. Maeda, M. Takabayashi, T. Kiyama, H. Fujieda, S. Kitamura, K. and Sato, M. : Abnormal cochlear hair cells were observed in the *Vlgr1* mutant mice. 第 49 回日本神経化学学会大会、名古屋、2006.9.
20. Sato, M. Takabayashi, T. Okamoto, M. Rahman, M T. Yagi, H. Malik, F. Fujieda, S. and Nagano, T. : A novel mechanism that controls radial migration by sensing membrane phosphoinositides、第 49 回日本神経化学学会大会、名古屋、2006.9.
21. 久保田 力、永野 隆、馬場久敏、佐藤 真 : 脊髄発生における細胞移動の調節機構－F I L I P の関与について－、第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会、長崎、2006.10.
22. Sato, M. : LL5beta regulation of lamellipodium formation. Gordon Research Conference, GRADIENT SENSING & DIRECTED CELL MIGRATION, カリフォルニア、2007.1.
23. 佐藤 真 : ラメリポディアの形成促進に係る新たな分子機構、2007 年 生体運動研究合同班会議、金沢、2007.1.

②ポスター発表 (国内 53 件、海外 13 件)

村上グループ

1. 森 俊行 (大阪大院・生命機能)、大竹口浩蔵 (大阪大院・基礎工学)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)：滑車神経の背側投射パターン形成・底板に依存しないガイド機構の役割。第 25 回日本分子生物学会年会、横浜市、2002.12.13
2. 田中大介 (大阪大院・生命機能)、中舎洋平 (大阪大院・基礎工学)、柳川右千夫、小幡邦彦 (生理学研究所)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、基礎生物学研究所、SORST(JST))、大脳皮質 GABA 作動性ニューロンの層特異的な移動様式と動態、第 25 回日本分子生物学会年会、横浜市、2002.12.13
3. 畠中 (野口) 由美子 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、久永真市 (都立大学生物)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、発生期マウス大脳皮質深層、浅層細胞の移動の差違。第 26 回日本神経科学大会、名古屋市、2003.7.25
4. Yan Zhu (大阪大院・生命機能、SORST・JST) , Sara Guthrie(MRC Centre for Developmental Neurobiology, King's College, London), Fujio Murakami (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Repellent cues in the caudal and ventral hindbrain define the pathway of the rostrally turning lateral commissural axons in chicken.第 26 回日本神経科学大会、名古屋市、2003.7.24
5. 川内大輔 (大阪大院・生命機能)、小林裕明 (大阪大院・生命機能)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、小脳前核細胞群の移動に関与する遺伝子の探索。第 26 回日本神経科学大会、名古屋市、2003.7.23
6. 玉田篤史 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)、熊田竜郎 (岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、Robo 蛋白質のラット小脳遠心路における発現パターンの解析。第 26 回日本神経科学大会、名古屋市、2003.7.24
7. 太城康良 (大阪大院・生命機能、JSPS)、柳川右千夫 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)、小幡邦彦 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST)、髄脳における GABA ニューロンの発生起源。第 26 回日本神経科学大会、名古屋市、2003.7.24
8. 勝丸博信¹、出来本秀行¹、柳川右千夫^{2,3}、小幡邦彦²、村上富士夫^{1,3} (¹大阪大・院・生命機能、²生理研・神経化学、³CREST & SORST) 胎生期大脳皮質 GABA 作動性ニューロンの微細形態—細胞移動との関連、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、2003.7.24
9. Nakaya Y., Yanagawa Y., Obata K., Murakami F (大阪大院・生命機能、SORST(JST))、Multimodal tangential migration of cortical interneurons、Cell Biology of the neuron、New Orleans(USA)、2003.11.7
10. 玉田篤史 (理研・脳科学総合研究センター)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・

JST) : Role of choroid plexus-derived chemorepellents, 16th International Congress of the IFAA Anatomical Science、京都、2004.8

11. 小林裕明 (大阪大院・生命機能)、山本祥也 (大阪大院・基礎工学・生物学)、丸尾知彦 (大阪大院・基礎工学・生物学)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST、JST) : Identification of a Dendritic Targeting Element in the 3'UTR of Arc mRNAs. 第 27 回日本神経科学大会(Neuro2004)、大阪、2004.9.21
12. 川内大輔 (大阪大院・生命機能、SORST、JST)、斎藤哲一郎 (京都大・再生医科学・発生分化)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST、JST) : Unilateral and bilateral origins of precerebellar neurons as revealed by exo utero gene transfer. 第 27 回日本神経科学大会(Neuro2004)、大阪、2004.9.21
13. 山内健太 (大阪大院・生命機能)、水島茂樹 (大阪大院・生命機能)、六車恵子 (大阪大院・生命機能)、玉田篤史 (理研・脳科学総合研究センター)、高島成二 (大阪大院・医・第一内科)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST) : Fgf8-induced Sema3F is involved in axon guidance of the midbrain dopaminergic neurons. 第 27 回日本神経科学大会(Neuro2004)、大阪、2004.9.21
14. 田中大介 (大阪大院・生命機能)、柳川右千代 (群馬大院・医、SORST・JST)、小幡邦彦 (理研・BSI)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST) : 大脳皮質 GABA 作動性ニューロンの吻尾軸方向への移動、第 27 回日本神経科学大会 (Neuro2004)、大阪、2004.9.21
15. Yan Zhu (大阪大院・生命機能、SORST・JST) , Sarah Guthrie(MRC Centre for Dev Neurobiol, King's College London, UK), Fujio Murakami (大阪大院・生命機能、SORST・JST) : Eph-A/ephrin-A plays a role in controlling the rostral turning of the developing secondary vestibular cerebellar axons in chick hindbrain, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (Axon Guidance & Neural Plasticity), Cold Spring Harbor, NY, USA, 2004.9
16. 田中大介、村上富士夫 (大阪大院・生命機能) : Long-distance multidirectional tangential migration of cortical interneurons in the marginal zone, CORTICAL DEVELOPMENT - neural stem cells to neural circuits、ギリシャ、2005.5.12
17. 西田和彦、村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST) : 小脳前核神経細胞群の一群に特異的に発現する分子の同定、第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005.7.26
18. 加藤明文、小林裕明、篠田直樹 (大阪大院・生命機能、) 村上富士夫 (大阪大院・生命機能、SORST・JST) : Dendrin mRNA 樹状突起輸送シグナルの同定、第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005.7.26
19. 畠中由美子 (筑波大院・人間総合・分子生物学)、山口正洋 (東京大院・医・細胞分子生理)、村上富士夫 (大阪大院・生命機能)、榊正幸 (筑波大院・人間総合・分子生物学) : 発生過程における海馬特異的遺伝子 R-spondin2 の機能解析、第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005.7.26

20. 稲村直子、村上富士夫（大阪大院・生命機能）、抑制性ニューロンの移動を制御する要因の解析、第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005.7.28
21. 川内大輔（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、斉藤哲一郎（京都大・再生医科学・発生分化）、村上富士夫（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、小脳前核神経細胞群は核形成時に脳室層に向かって移動する、第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005.7.28
22. Yan Zhu（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、Sarah Guthrie（MRC Centre for Dev Neurobiol, King's College London, UK）and Fujio Murakami（大阪大院・生命機能、SORST・JST）：Eph-A/ephrin-A is involved in the rostrocaudal turning direction of lateral hindbrain commissural axons, 第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005.7.28
23. 木村俊哉（大阪大院・生命機能）、小林剛（大阪大院・生命機能）、柳川右千夫（群馬大学医学系研究科、SORST・JST）、小幡邦彦（理化学研究所）、村上富士夫（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、GABA 作動性ニューロンをモデルとした、発生期大脳皮質における神経細胞の移動活性に関わる新機能分子の探索、Neuroscience 2006、京都、2006.7.21
24. Yan Zhu（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、松本智子（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、三上栄（京都大学再生医科学研究所）、長澤 丘司（京都大学再生医科学研究所）、村上富士夫（京都大学再生医科学研究所）、Critical role of chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in precerebellar neuronal migration、Neuroscience2006、京都、2006.7.21
25. 西田和彦（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、中山和英（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、吉村小緒利（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、村上富士夫（大阪大院・生命機能、SORST・JST）、小脳核細胞群の移動における免疫グロブリンスーパーファミリー分子 NEPH2/mKirre の関与、Neuroscience2006、京都、2006.7.21
26. 山内健太¹、水嶋茂樹¹、玉田 篤史²、山本亘彦¹、高島成二³、村上富士夫^{1,4}（¹大阪大院・生命機能、²理研・BSI、³大阪大院・医学系研究科、⁴SORST、JST） FGF8-induced Semaphorin 3F Regulates Growth Polarity of Midbrain Dopaminergic Axons. UK-APDBN Joint Meeting on Development and the Emergence of Function in the Nervous System、神戸、2007.2.8-10.

柳川グループ

1. 兼子幸一^{1,2}、小幡邦彦¹、柳川右千夫^{1,2}（¹生理研・神経化学、²CREST & SORST）カルシウム依存性非選択性カチオンチャネルの活性化による扁桃体基底外側核 Regular-spiking 細胞に対するノルアドレナリンの興奮性作用：GAD67-GFP ノックインマウスを用いた研究、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、平成 15 年 7 月 23 日
2. 繁富英治¹、山崎弘二^{1,2}、柳川右千夫^{3,4,5}、加藤総夫¹（¹慈恵医大・神経生理、²慈恵医大・薬理第一、³生理研・神経化学、⁴総合研究大学院大学、⁵CREST & SORST）GAD67-GFP マウス孤束核におけるシナプス前 P2X 受容体活性化グルタミン酸放出促進のシナプス後ニューロン依存性、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、平成 15 年 7 月 23 日

3. 太城康良¹、柳川右千夫^{2,3}、小幡邦彦²、村上富士夫^{1,3}（¹大阪大・院・生命機能、²生理研・神経化学、³CREST & SORST）髄脳 GABA 作動性ニューロンの発生起源、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、平成 15 年 7 月 24 日
4. 勝丸博信¹、出来本秀行¹、柳川右千夫^{2,3}、小幡邦彦²、村上富士夫^{1,3}（¹大阪大・院・生命機能、²生理研・神経化学、³CREST & SORST）胎生期大脳皮質 GABA 作動性ニューロンの微細形態－細胞移動との関連、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、平成 15 年 7 月 24 日
5. 海老原利枝^{1,2}、小幡邦彦^{1,2}、北村邦夫³、柳川右千夫^{1,2,4}（¹生理研・神経化学、²総合研究大学院大学、³三菱化学生命科学研究所、⁴CREST & SORST）マウス・ヴェシクル型 GABA トランスポーターとグルタミン酸脱炭酸酵素の発現調節機構についての研究、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、平成 15 年 7 月 24 日
6. 常川直子^{1,2}、柳川右千夫^{1,2,3}、小幡邦彦^{1,2}（¹生理研・神経化学、²総合研究大学院大学、³CREST & SORST）マウス上丘における GABA ニューロンの発生、第 26 回日本神経科学大会、名古屋、平成 15 年 7 月 24 日
7. 桑名俊一¹、柳川右千夫^{2,4,5}、岡田泰昌³、菅原美子¹、小幡邦彦^{2,4}（¹帝京大・医・生理、²生理研・神経化学、³慶応大・月が瀬リハビリセンター、⁴総合研究大学院大学、⁵CREST & SORST）Firing patterns of GABAergic neurons in the pre-Boetzing complex of GAD67-GFP knock-in mice. 第 26 回日本神経科学大会、名古屋、平成 15 年 7 月 25 日
8. 上松正和^{1,5}、柳川右千夫^{2,4}、小幡邦彦³、吉田祥子¹（¹豊橋技術科学大学・物質工学系、²群馬大院・医・遺伝発達行動学、³理研・脳センター、⁴科学技術振興事業・CREST & SORST、⁵豊橋技術科学大学・未来技術流動センター）培養小脳組織からの GABA 放出パターン、第 27 回日本神経科学大会、大阪、平成 16 年 9 月 21 日
9. 田中正彦¹、柳川右千夫^{2,3}、小幡邦彦⁴、丸野内隼¹（¹藤田保健衛生大・総医研・応用細胞学、²群馬大院・医・遺伝発達行動学、³科学技術振興事業・CREST & SORST、⁴理研・脳センター）In vitro における小脳プルキンエ細胞樹状突起形成過程の経時観察、第 27 回日本神経科学大会、大阪、平成 16 年 9 月 22 日
10. Sooksawat Thongchai^{1,2}、小幡邦彦³、柳川右千夫^{4,5,6}、伊佐正^{1,5}（¹自然科学研究機構・生理学研究所・認知行動発達機構研究部門、²チュラロンコン大学薬学部生理学、³理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経回路メカニズム研究グループ、⁴群馬大学・大学院医学系研究科、⁵CREST、科学技術振興機構、⁶SORST、科学技術振興機構）GAD67-GFP ノックインマウスにおける上丘中間層 GABA ニューロンのコリン作動性入力に対する応答、第 82 回日本生理学会大会、仙台、平成 17 年 5 月 19 日
11. 平井康治^{1,2}、上松正和^{2,3}、海老原利枝²、阿部訓也⁴、吉田祥子³、加藤めぐみ²、平林真澄²、柳川右千夫^{5,6}、川口泰雄^{1,2}（¹総研大・生命科学・生理科学、²生理学研究所、³豊橋技術科学大学・物質工学系、⁴理化学研究所、⁵群馬大学、⁶SORST）VGAT-Venus

トランスジェニックラットの脳皮質非錐体細胞での Venus 発現パターン、第 28 回日本神経科学大会、横浜、平成 17 年 7 月 27 日

12. 桑名俊一¹、岡田泰昌²、栗林淳也³、柳川右千夫^{4,5}、小幡邦彦⁶ (1 帝京大・医・生理、² 慶應大・月が瀬ハセンター、³ 慶應大・医・麻酔学、⁴ 群馬大院・医・遺伝発達行動学、⁵ SORST、⁶ 理研・脳センター・小幡ユニット) 延髄外部の GABA 性呼吸ニューロンの特性：GAD67-GFP ノックイン新生マウスによる検討、第 83 回日本生理学会大会、前橋、平成 18 年 3 月 28 日
13. Kunihiro Obata¹, Akiko Arata², Kenzi Saito³, Moritoshi Hirono⁴ & Yuchio Yanagawa⁵ Maintained GABA content and reduced neuronal activity in the fetal mouse brain lacking vesicular GABA transporter (VGAT). 5th Annual Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, 2006.7.8
14. 斉藤憲史^{1,2,3}、中村健司⁴、柿崎利和^{1,3}、海老原利枝⁵、上松正和⁶、高森茂雄⁷、横山峯介⁴、小西史朗⁴、三品昌美^{3,8}、宮崎純一⁹、小幡邦彦¹⁰、柳川右千夫^{1,3} (1 群馬大院・医・遺伝発達行動学、² 総研大、³ SORST、⁴ 三菱化学生命研、⁵ 熊本大、⁶ 豊橋技科大、⁷ 東京医歯大、⁸ 東京大、⁹ 大阪大、¹⁰ 理研) 小脳型 GABA トランスポーター遺伝子欠損マウスの作成と解析、第 29 回日本神経科学学会大会、京都、平成 18 年 7 月 19 日
15. 桑名俊一¹、栗林淳也²、岡田泰昌³、柳川右千夫^{4,5}、小幡邦彦⁶ (1 帝京大・医・生理、² 慶應大・医・麻酔学、³ 慶應大・月が瀬ハセンター、⁴ 群馬大院・医・遺伝発達行動学、⁵ SORST、⁶ 理研・脳センター・小幡ユニット)：呼吸調節における延髄腹外側部 GABA 性ニューロン：GAD67-GFP ノックイン新生マウスによる検討、第 29 回日本神経科学学会大会、京都、平成 18 年 7 月 19 日
16. 島田明佳¹、Nyberg Tobias¹、河西奈保子¹、古川由里子²、鳥光慶一^{1,2}、小幡邦彦³、柳川右千夫^{2,4}、津本忠治^{2,3} (1 NTT 物性研、² SORST、³ 理研・脳科学総合研究センター・神経回路メカニズム研究グループ、⁴ 群馬大院・医・遺伝発達行動学) マウス大脳培養細胞における GABAA レセプタ由来の自発活動、第 29 回日本神経科学学会大会、京都、平成 18 年 7 月 20 日
17. 柿崎利和^{1,2}、斉藤憲史^{1,3}、柳川右千夫^{1,2} (1 群馬大院・医・遺伝発達行動学、² SORST、³ 総合研究大学院大学)：体壁形成における GABA 作動性シグナル伝達系の役割、第 29 回日本神経科学学会大会、京都、平成 18 年 7 月 21 日
18. 古川由里子^{1,2}、河西奈保子¹、島田明佳¹、鳥光慶一^{1,2}、小幡邦彦³、柳川右千夫^{2,4}、津本忠治^{2,3} (1 NTT 物性科学基礎研究所、² SORST、³ 理研・脳科学総合研究センター・神経回路メカニズム研究グループ、⁴ 群馬大院・医・遺伝発達行動学)：ラットおよびマウス培養神経細胞活動に及ぼすマグネシウムの影響、第 29 回日本神経科学学会大会、京都、平成 18 年 7 月 21 日

佐藤グループ

1. Nagano, T. Morikubo, S. Yagi, H. Sato, M. : Filamin A-Interacting Protein FILIP regulates cell shape prior to radial migration In the cortical ventricular zone. 33rd

Society for Neuroscience. 2003,11, New Orleans, LA

2. Yagi, H. Yoshida, K. Yoshikawa, H. Sato, M. : Disruption of neurepin resulted in high susceptibility to audiogenic seizures. 33rd Society for Neuroscience. 2003,11, New Orleans, LA
3. Ando, K. Sato, M. : Otx1 plays an important role for the specification of the caudal neocortex. 33rd Society for Neuroscience. 2003,11, New Orleans, LA
4. Nagano, T. Morikubo, S. Yagi, H. Sato, M. : Filamin A-Interacting Protein FILIP regulates cell shape prior to radial migration in the cortical ventricular zone. International Symposium "Dynamics of Neural Development", 2003、8、大阪
5. Hideshi, Y. Yoshihiro, T. Yoshio, A. Kazunori, Y. and Makoto, S. : Vlgr1 is responsible for audiogenic seizure susceptibility、 ISN.ESN 20th Biennial Meeting、 2005、8、オーストリア
6. 八木秀司、佐藤 真：精巣に強い発現を認める TBPIP(TBP-1 interacting protein)の核内動向、第 108 回日本解剖学会全国学術集会、2003、4、福岡
7. 安藤康一、八木秀司、永野 隆、相沢慎一、寺島俊雄、佐藤 真：大脳皮質視覚野の領野形成・分化における Otx1 の機能、第 108 回日本解剖学会全国学術集会、2003、4、福岡
8. 八木秀司、高村佳弘、宇治誠人、安藤康一、佐藤 真：Neurepin knockout mice are highly susceptible to audiogenic seizure、第 26 回日本神経科学大会、2003、7、名古屋
9. 久保田 力、永野 隆、安藤康一、柿田明美、高橋 均、馬場久敏、佐藤 真：Cell migration out the spinal ventricular zone is potentially regulated by FILIP、第 26 回日本神経科学大会、2003、7、名古屋
10. 安藤康一、中村 晃、永野 隆、佐藤 真：Pancortin の細胞外分泌に多量体形成は必須である、第 46 回日本神経化学会、2003、9、新潟
11. 榎本りま、胡桃坂仁志、佐藤 真、横山茂之：TBPIP の機能ドメインの解析、第 26 回日本分子生物学会、2003、12、神戸
12. 八木秀司：遺伝子欠損マウスを用いた聴覚原性痙攣の解析、第 110 回日本解剖学会・全国学術集会」、2005、3、富山
13. 八木秀司、高村佳宏、戸叶尚史、高林哲司、藤枝重治、喜多村 健、佐藤 真：遺伝子変異マウスの解析により判明した Vlrg1 遺伝子欠損による聴覚異常、大 8 回日本神経科学大会、2005、7、横浜
14. Rahman,M T. Morikubo, S. Yagi, H. Nagano, T. Okabe, M. and Sato, M. : Filamin A-Interacting Protein (FILIP) deficiency results in increased Filamin A expression

and decreased proliferation in the ventricular zone during neocortex development、
第 48 回日本神経化学学会(福岡)大会、2005、9、福岡

15. 八木秀司、佐藤 真 : c-Fos 発現検出による聴覚原性けいれん発症機序の検討、日本分子イメージング学会 設立総会、2006、5、京都
16. Yagi, H. Sato, M. : Severity of audiogenic seizures influenced by multiple factors in *Vlgr1*-mutated mice、第 29 回日本神経科学大会、2006、7、京都
17. 佐藤 真 : フィラミン/FILIP の神経系形成に及ぼす働きについて、平成 18 年度 特定領域研究「統合脳」5 領域 冬の公開シンポジウム、合同班会議、2006、12、東京

小林グループ

1. Kenta Kobayashi¹, Masanori Takahashi², Tomoyuki Masuda³, Jun-ichi Miyazaki⁴, Hiroyuki Yaginuma³, Noriko Osumi², Kozo Kaibuchi⁵, Kazuto Kobayashi¹ (¹Dept Mol Genet, Inst Biomed Sci, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ²Dept Dev Neurobiol, Tohoku Univ Grad Sch of Med, Sendai, Japan; ³Dept Anat, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ⁴Div Stem Cell Reg Res, Osaka Univ Grad Sch of Med, Suita, Japan; ⁵Dept Cell Pharmacol, Nagoya Univ Grad Sch of Med, Nagoya, Japan) : Essential role of Rho/Rho-kinase signaling in development of hindbrain motor neuron. 36th SFN meeting, 2006 October, Atlanta.
2. Kenta Kobayashi¹, Masanori Takahashi², Tomoyuki Masuda³, Jun-ichi Miyazaki⁴, Hiroyuki Yaginuma³, Noriko Osumi², Kozo Kaibuchi⁵, Kazuto Kobayashi¹ (¹Dept Mol Genet, Inst Biomed Sci, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ²Dept Dev Neurobiol, Tohoku Univ Grad Sch of Med, Sendai, Japan; ³Dept Anat, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ⁴Div Stem Cell Reg Res, Osaka Univ Grad Sch of Med, Suita, Japan; ⁵Dept Cell Pharmacol, Nagoya Univ Grad Sch of Med, Nagoya, Japan): Requirement of Rho/Rho-kinase signaling pathway in development of hindbrain motor neurons. 35th SFN meeting, 2005 October, Washington D.C.
3. Kenta Kobayashi¹, Masanori Takahashi², Natsuki Matsushita³, Jun-ichi Miyazaki⁴, Masato Koike⁵, Hiroyuki Yaginuma⁶, Noriko Osumi², Kozo Kaibuchi⁷, Kazuto Kobayashi¹ (¹Dept Mol Genet, Inst Biomed Sci, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ²Dept Dev Neurobiol, Tohoku Univ Grad Sch of Med, Sendai, Japan; ³Dept Embryol, Inst Dev Res, Aichi Hum Ser Cen, Kasugai, Japan; ⁴Div Stem Cell Reg Res, Osaka Univ Grad Sch of Med, Suita, Japan; ⁵Dept Cell Biol & Neurosci, Osaka Univ Grad Sch of Med (A1), Suita, Japan; ⁶Dept Anat, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ⁷Dept Cell Pharmacol, Nagoya Univ Grad Sch of Med, Nagoya, Japan): Survival of developing motor neurons mediated by Rho/Rho-kinase signaling pathway. 34th SFN meeting, 2004 October, San Diego.
4. Kenta Kobayashi¹, Masanori Takahashi², Natsuki Matsushita¹, Kazuaki Takahashi¹, Jun-ichi Miyazaki³, Masato Koike⁴, Hiroyuki Yaginuma⁴, Noriko Osumi², Kozo Kaibuchi⁵, Kazuto Kobayashi¹ (¹Dept Mol Genet, Inst Biomed Sci, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ²Dept Dev Neurobiol, Tohoku Univ Grad Sch of Med, Sendai, Japan; ³Dept Nutri Physiol Chem, Osaka Univ Med Sch, Suita, Japan; ⁴Dept Anat, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ⁵Dept Cell Pharmacol, Nagoya Univ Grad Sch of Med, Nagoya, Japan): Target-independent survival of spinal cord motor neurons by Rho/Rho-kinase signaling pathway. 6th IBRO world congress, 2003 July, Prague.

5. Kenta Kobayashi¹, Masanori Takahashi², Natsuki Matsushita¹, Kazuaki Takahashi¹, Hiroyuki Yaginuma³, Noriko Osumi², Kozo Kaibuchi⁴, Kazuto Kobayashi¹ (¹Dept Mol Genet, Inst Biomed Sci, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ²Dept Dev Neurobiol, Tohoku Univ Grad Sch of Med, Sendai, Japan; ³Dept Anat, Fukushima Medical Univ Sch of Med, Fukushima, Japan; ⁴Dept Cell Pharmacol, Nagoya Univ Grad Sch of Med, Nagoya, Japan): Blockade of motor neuron death during development by Rho GTPase signaling pathway. 32th SFN meeting, 2002 November, Orlando.

(3) 特許出願 (1 件)

② 海外 (佐藤グループ)

発明者：佐藤 真、永野 隆

出願番号：特願 2003-52653 (米国出願番号、10/788, 793)

国際出願日：2002 年 7 月 29 日

名称：細胞移動調節及び細胞死調節機能を有するタンパク質

(4) 新聞報道等

① 新聞報道 (小林グループ)

福島民放新聞 (2004 年 4 月 8 日)

Rho/Rho-kinase シグナル伝達系が、胎生期の脊髄運動神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることを明らかにした研究成果が報道された。運動神経変性疾患の治療法開発の可能性なども含めて、大きく紹介された。

(5) その他特記事項

なし

7. 結び

▼達成度、得られた成果の意義等

本研究が CREST 研究を引き継いで発展させたものであることは、短期間で大きな成果を挙げることに繋がった。その一部は上記のようにすでに論文発表した、そのほかに、現在代表者チームだけからでも学会発表を予定しているものだけで7件の成果があり、これらはいずれ SORST の成果として論文発表する予定である（本報告書は既に論文発表をしたものを中心に作成した）。

プロジェクトの提案時に計画していた目標は全て達成した。すなわち、前脳と後脳の2つの系を用いて、遺伝子導入により、神経細胞の移動や核形成の可視化に成功した。後者に関しては、*in vitro* の展開標本を開発することで、移動細胞が正中線を越える機構を解明した。また、*in vivo* 標本への遺伝子導入により、*in vivo* での移動と核形成の可視化、そして分子機構の解明を進めた。本報告書には間に合わなかったが、ライブイメージングにも成功している。また、前者に関しては遺伝子導入と、遺伝子改変マウスを用いて、興奮性細胞、抑制性細胞の移動や最終分化の過程の可視化に成功した。また *in utero*, *exo utero* 電気穿孔法を駆使し、*in vivo* における移動の態様を明らかにする一方、ライブイメージングにより動態をも明らかにした。また、電気穿孔法の利点を生かし、移動の分子機構の一部を明らかにすることが出来た。

また本研究代表者は神経細胞移動という新しい分野へと研究を発展させたが、新しい分野でも既にその研究は高く評価され、多数の一流国際誌に発表することができた。またそれに加えて、多くの国際シンポジウムに招待された。特にライブイメージングを駆使した細胞動態の可視化は他の研究者の研究者の追従を許さないもので、注目を浴びている。新技術の導入の当然の帰結ではあるが、これまで全く未知であった動態が次々と明らかになり、脳の発生の仕組みの理解が大きく前進した。神経核という脳の基本ユニットの形成の過程の可視化に成功したことは、現在ほぼ未知と言っても過言ではない神経核形成の分子機構の研究を大きく加速し、脳の構築原理の理解の飛躍的進展に結びつく可能性がある。また大脳皮質の抑制性介在ニューロンの新奇な移動モードの発見は大脳皮質の構築の機構を考える上で新風を吹き込んだ。

神経細胞の移動と神経回路形成の関係という意味でも注目すべき結果が得られた。すなわち、神経細胞が正中線を越えて反対側に至るのに用いられる分子機構には軸索成長円錐が正中線を越えて伸長するのと同様な機構（Robo1,2,3 と Slit の相互作用）があることを示す知見が得られた。第2番目は成長円錐の *Waiting period* に類似した *Wandering period* の発見である。このことは単に用いられる分子において両者に共通性があるだけでなく、成長円錐や細胞が目的地に到達し、適切な相手と調和の取れた構造を形成するために使われる戦略にも共通性もあることを示している。

本プロジェクトは4月で終了したが、今後の新たな展開につながる成果も得られつつある。その一つは *in vivo* でのイメージングであり、2番目は移動細胞の成熟過程の可視化である。何れも研究は初期段階であるが、何れも実現の可能性が高い。神経移動の分子機構の解明も進展しており、今後 SORST の研究成果が、それらの研究を発展させるのための基礎を与えてくれるであろう。

▼今後の研究の展開

プロジェクト運営について

（チーム全体の研究遂行、研究費の使い方、若手研究者の育成等）

プロジェクトではチーム間の連携・共同研究による研究の発展はもとより、各研究分担者も高い成果を挙げた。その証拠の一つとして分担者の一人の柳川は研究期間の途中で群馬大学の教授に昇進した。また小林は昨年度、自らが代表者となる **CREST** のプロジェクトを発足させた。柳川の開発した **GAD67-GFP** マウスは本研究はもとより、世界中の研究者によって使われているが、新たに抑制性ニューロンの移動の解析に極めて有用な **VGAT-Venus** マウスの作成に成功した。佐藤は脳皮質脳室帯に発現する新規分子 **FILIP** を同定し、**FILIP** が細胞移動に必須とされるアクチン結合分子フィラミン A の分解を促進することで、従来不明であった脳室帯からの細胞移動開始機構について、その開始を負に制御する新しいコントロールの仕組みを見いだした。小林は **Rho/Rho-kinase** シグナル伝達系に焦点を当て、これが胎生初期の運動神経細胞の生存と軸索回路形成に必須の役割を果たしていることを初めて明らかにした。

本研究が **CREST** に引き続いて行われたものであるため、**CREST** によって購入した備品を引き続き使用することができた。またそのため予算を既存の装置のアップグレードや、増設、更新に振り向けることが出来、極めて効率的であった。使途に関しては次第に制限が増えてきたとは言え、科研費に比べて自由度が高く、効率的に執行することが出来た。特に費目間の予算の移動の自由度が大きかったのは有難かった。

若手研究者の育成における効果も大きい。本経費によって雇用した研究員や技術員は与えられた職務を遂行する中で、後輩である大学院生や学部生の模範となって刺激を与え、また指導をしてくれた。また大学院生の技術習得や外国での会議を含む学会発表も自由に行わせることが出来た。外国から招待をした新進気鋭の研究者との接触や議論の機会を与えることが出来たのも、彼らの成長にとって重要であった。数字や論文リストで表現することはできないが、本プロジェクトを実施することが出来たおかげで、多くの大学院生を育てることが出来た。これは将来の我が国の基礎科学の発展にとっても大変有意義なことである。



本研究代表者の研究室集合写真（2007 年 4 月）。本研究はこのような若人たちの力によって支えられた。