

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

「遺伝子改変細胞キメラ培養による
神経回路網形成機構の解明」

研究期間：平成15年12月 1日～
平成19年 3月31日

津本 忠治

(独立行政法人理化学研究所、
ユニットリーダー)

1. 研究実施の概要

近年の脳科学研究の発展によって、1個の受精卵から複雑な神経回路網をもつ脳が形成される過程は、遺伝情報によりおおまかな回路網が形成される初期・中期の過程と神経活動による精緻化や修正がなされる後期の過程に分けられることが明らかとなった。さらに、この後期過程の回路網形成では、神経細胞間の接点であるシナプスの入力依存性の変化が重要であることが示唆され、その変化に関与する分子に関してもかなりの知見が集積してきた。しかしながら、シナプス入力という電気的活動が如何に神経回路の形態変化をもたらすのかは、未だほとんど明らかではない。

本研究では、先行した CREST 研究において、電気的活動と回路網の形態変化を繋ぐ有力な物質であることが示唆された脳由来神経栄養因子(Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF と略) に焦点を当てた。また、CREST 研究において開発した遺伝子改変細胞キメラ培養標本 (BDNF ノックアウトマウス由来の神経細胞と緑色蛍光蛋白質を発現する遺伝子改変マウス由来の神経細胞の共培養標本) を応用し、BDNF の輸送や分泌によって神経回路網の形成がいかなる影響を受けるのかの解明をも目指した。このキメラ培養標本では、抑制性神経細胞、興奮性神経細胞、或いは特定の蛋白質を欠損する細胞を蛍光の有無によって容易に同定でき、電気活動による回路網変化におけるそれぞれの役割を明らかにすることができることが期待され、後述するように一定の成果が得られた。

しかしながら、神経細胞培養標本では、生理的な大脳皮質の神経回路網が失われてしまい、人工的な回路網の機能を観測しているという問題点も存在する。この問題点を克服するため、本研究では大脳皮質視覚野の回路網の大部分をそのまま維持しているスライス培養標本をも用いた。また、BDNF ノックアウトマウス由来神経細胞の共培養標本の代わりにスライス培養標本内のごく少数の細胞だけに BDNF を欠損させる単一細胞ノックアウト標本の開発をも試みた。このため、BDNF 遺伝子を loxP 遺伝子で挟む遺伝子改変マウス (floxed BDNF transgenic mouse) からスライス培養標本作製し、Cre-recombinase と緑色蛍光蛋白質 (Green Fluorescence Protein, GFP と略) 発現ベクターを遺伝子銃により神経細胞内に同時に打ち込んだ。その結果、緑色蛍光を発している神経細胞には Cre-recombinase が働き BDNF mRNA 及び BDNF 蛋白質が欠損していることを確認した。

この研究によって、標的細胞に BDNF が欠損しているとその細胞に接触する GABA シナプス数が大きく減少すること、ただし同一 GABA ニューロンから出て他の BDNF 保有細胞に接触する GABA シナプス数は減少しないことが明らかとなった。この結果は、シナプス後細胞から放出される BDNF の作用はその局所のシナプスにのみ作用す

ることを示している。すなわち、GABA シナプスの形成、維持には活動的な標的細胞から放出される BDNF が局所的に重要な役割を演じていることを示している。

この結果は、活動的な GABA シナプスの強化に BDNF が重要な役割を果たしているが、直接入力を受けず活動的でない GABA シナプスでは BDNF のサポートを受けられないことをも示唆している。BDNF だけがシナプスの発達や維持に関与するとは必ずしもいえないが、本研究によって、入力を受けないシナプスが退行するメカニズム、特にその分子機構を明らかにする手がかりが示された。また、本研究によって、比較的正常な神経回路網を保持しているスライス標本において、1 個或いは少数の神経細胞に特定の蛋白質を欠損させることができた。この方法の応用によって BDNF のみならず他の蛋白質の神経回路網形成における役割を解明する道が開けた。

上述した floxed transgenic mouse は、生理的な状態の神経回路網で目的の蛋白質を欠損させる方法として有効である。ただ、この方法はそのような遺伝子改変マウスの作製に長い日時を要するという欠点を有している。一方、数年前に線虫で発見された RNA 干渉は、その後哺乳類でも生じ、比較的短時間で蛋白質発現を阻止することが明らかとなった。ただ、哺乳類の脳に RNA 干渉を適用しようとする場合、最大の問題点は small interfering RNA (siRNA) を如何に標的の神経細胞に注入するかであった。本研究では、電気穿孔法を改良した方法を使って特定の脳部位の神経細胞に siRNA を効率的に注入する方法を開発することに成功した。また、この方法を利用して、大脳皮質視覚野に豊富に存在することが知られているプロスタグランディン及びその受容体のシナプス長期増強における役割を明らかにした。

研究代表者らは、先行した CREST 研究において、GFP によって標識された BDNF の cDNA を神経細胞の核内に直接注入する方法を開発した。本研究の一部では、この方法を使い、GFP で標識した BDNF を培養神経細胞に発現させ、軸索のみならず樹状突起内の動きをも解析した。さらに、神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF と略) と移動様式が異なるかどうかを明らかにするため BDNF を cyan fluorescence protein (CFP) で NGF を yellow fluorescence protein (YFP) で標識し BDNF と NGF の動態の相違をも解析した。すなわち、波長の異なる 2 種の蛍光蛋白質で BDNF と NGF を標識し、軸索や樹状突起内でのそれぞれの動態を同時に観測した。その結果、BDNF と NGF の移動は異なる分泌制御系に依拠していることが明らかとなった。この成果は異なる分子の動態を同時に可視化する方法を示すとともに同じ neurotrophin でも BDNF と NGF では異なる機能的役割を担っていることを示唆したものである。

GABA ニューロンを含む回路は大脳皮質内で抑制性神経回路を形成し、大脳皮質神経回路網の活動依存的形成や変化に重要な役割を果たすと考えられている。ただ、生

きた標本で GABA ニューロンを同定することは容易ではないためその役割に関する本格的な研究が遅れていた。そこで、本研究では GABA ニューロンが GFP を発現する GAD67-GFP ノックインマウスを使用した。この GABA ニューロンが緑色蛍光を発する脳からは、まず、大脳視覚野のスライス標本を作製し、GABA ニューロンへの興奮性シナプスでシナプス長期増強が起きるかどうかが、起きるとすればどのようなメカニズムによるのかを調べた。その結果、このシナプスでは、従来報告されてきたような NMDA 受容体の関与はなく、代謝型グルタミン酸受容体のタイプ 5 (type 5 metabotropic glutamate receptors, mGluR5 と略) が関与していることと mGluR5 は IP₃ による Ca²⁺ ストアからの Ca²⁺ 放出を介して長期増強に関与していることが明らかとなった。

生理的状态での神経回路網の形成や機能発現機構を解明するためには生体丸ごとの *in vivo* 標本での解析も必要である。GABA ニューロンは生後発達の臨界期において、大脳皮質視覚野神経回路の入力依存的変化に重要な役割を果たしていると思定されているが、その活動性等は、*in vivo* 標本ではほとんど調べられていなかった。これは *in vivo* 標本では GABA ニューロンと興奮性ニューロンを実験中に区別することが困難であることによっていた。ところが、上述したように、GAD67-GFP ノックインマウスでは *in vivo* の状態でも蛍光顕微鏡下で GABA ニューロンを比較的容易に同定できる。そこで、GAD67-GFP ノックインマウスを使用し、視覚野興奮性ニューロンと GABA ニューロンの光反応性、特に方位選択性、の違いを 2 光子走査蛍光顕微鏡による *in vivo* カルシウムイメージング法を使って調べた。その結果、大脳皮質視覚野の興奮性ニューロンは非常に強い方位選択性を持つのに対して、GABA ニューロンは方位選択性を持たないことを発見した。この発見は、GABA ニューロンが、興奮性ニューロンの反応性を全体的に抑えることによって、興奮性ニューロンの方位選択性を発現させていることを示唆している。

遺伝子改変動物脳に二光子励起機能的カルシウムイメージング法を適用できることを示した本研究によって、*in vivo* 標本でもタイプの異なる神経細胞の活動を区別して可視化できることが明らかとなり、今後、異なるタイプの神経細胞からなる大脳皮質神経回路網の情報処理原理を解明する研究への応用が期待される。

以上、本研究の最初に計画した遺伝子改変細胞の培養標本に限定せず、スライス培養標本から動物丸ごとの *in vivo* 標本まで、種々の遺伝子改変細胞を組み込んだ神経回路を作成し、その機能を解析することによって、遺伝情報によっていったん出来上がった神経回路網が入力によって変わるメカニズムの一端を解明し、さらに、今後その全体像を理解するための新しい方法を提示することができた。

2. 研究構想

前述したように、1個の受精卵から複雑な神経回路網をもつ脳が形成される過程は、遺伝情報によりおおまかな回路網が形成される初期・中期の過程と神経活動による精緻化や修正がなされる後期の過程に分けられる。この後期過程のメカニズム解明は神経科学における最重要課題の一つであり、その研究成果は、学術的に重要であるのみならず、乳幼児教育のあり方への示唆や新しい情報処理システムの開発等、現代の情報化社会にも重要なインパクトを与えると思われる。

近年の神経科学研究は、回路網形成の後期過程では、神経細胞間の接点であるシナプスの入力依存性の変化が重要であることを示したが、その変化に関与する分子に関しては、研究代表者らは、先行したCREST研究において、BDNFが電氣的活動と回路網の形態変化を繋ぐ有力な物質であることを見出した。したがって、本研究ではBDNFに焦点を当てて主な研究を計画した。また、研究方法としては、CREST研究で開発した神経細胞キメラ培養標本を応用し、BDNFの存在や移行によって複数のシナプス結合がいかに変化するかの解析を目指した。この標本では、研究目的にそってデザインした神経回路において、BDNFを欠損する神経細胞、GABAニューロン或いは一定の刺激を受けたシナプス前終末を蛍光の有無によって容易に同定でき、シナプスの機能や形態変化における電気活動とBDNFや関連分子の役割を明らかにすることができることを期待した。

しかしながら、神経細胞キメラ培養標本は、正常な神経回路網を反映せず、そこで観測される現象は生理的なものでない可能性がある。この観点から、本研究の一部では、大脳皮質の回路網の大部分をそのまま維持している大脳皮質スライス培養標本を用い、回路網の特定の神経細胞でBDNFが欠損している単一細胞ノックアウト法の開発をも試みた。さらにはGABAニューロンが緑色蛍光を発する遺伝子改変マウスの急性スライス標本や*in vivo*標本を使ってGABAニューロンの役割解明をも目指した。

これら細胞培養標本からスライス標本、さらには*in vivo*標本を使った研究によって、発達期におけるシナプスの形成、維持、強化や退行等におけるBDNFと神経活動の役割を総合的に明らかにし、ひいては神経回路網の形成や改変機序の解明を目指した。

3. 研究内容

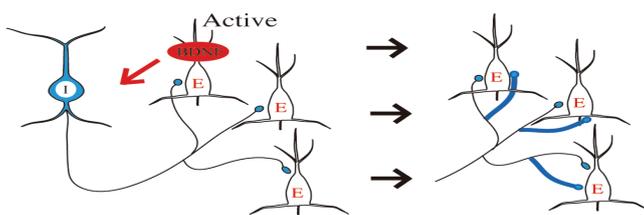
3. 1 単一細胞遺伝子改変標本による神経回路網形成機構の解明（津本グループ）

（1）実施の内容

本研究では大脳皮質の基本的神経回路が保存されている視覚野皮質のスライス培養標本を使用し、BDNFが神経回路網形成、特に抑制性回路の形成、にどのような作用を

及ぼすかを調べた。そのため、皮質回路網の中で一個の細胞だけに BDNF を欠損させ、その細胞を標的としている GABA シナプスの発達がどのような影響を受けるかを解析した。さらに、同一の GABA ニューロンの軸索側枝で他の BDNF 含有細胞に終止している GABA シナプスが同様の影響を受けるかどうかをも調べた。これは、標的細胞から活動依存的に放出される BDNF がその部位のシナプスにのみ局所的に作用するのか、或いは GABA ニューロンの投射シナプス全体に及ぶのかを明らかにするためである (Fig. 1 参照)。

A General action



B Local action

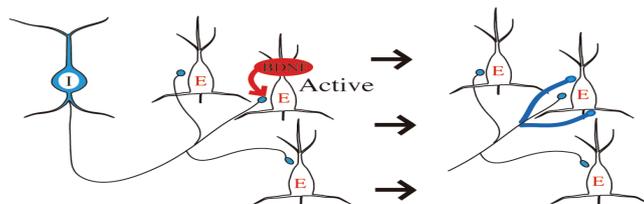
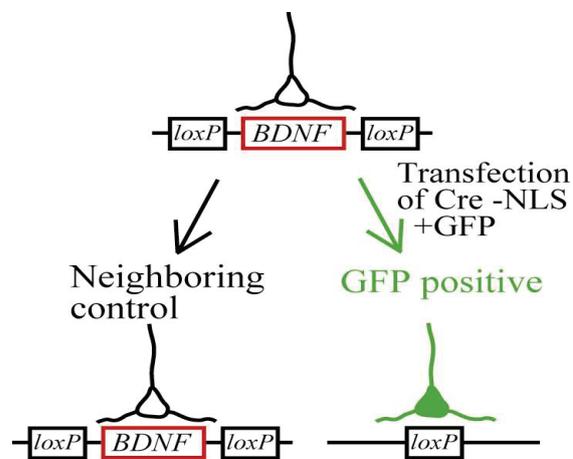
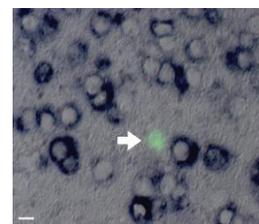


Fig. 1. BDNF が GABA シナプスに作用する 2 つのモード。A, 全般的作用。活動的シナプス後細胞より放出された BDNF は GABA 細胞が作る全シナプスに増殖性作用を及ぼす。B, 局所的な作用。活動的シナプス後細胞に接触している GABA シナプスにだけ増殖性作用を及ぼす。

大脳皮質神経回路の中で一個のニューロンだけ BDNF を欠損している標本を作製するため BDNF 遺伝子が loxP で挟まれている floxed BDNF transgenic mouse から皮質視覚野スライス標本を作製し、Cre-recombinase を遺伝子銃により神経細胞内に打ち込んだ。同時に GFP 発現ベクターも打ち込み Cre-recombinase が働き BDNF が欠損している細胞を GFP で標識した (Fig. 2)。



上、*In situ* hybridization: 緑色の GFP 陽性細胞には BDNF mRNA がみられない。Scale bar, 10 μ m.



下、抗 BDNF 免疫染色。緑色の GFP 陽性細胞には抗 BDNF 免疫活性 (赤) がみられない。拡大率、上と同じ。

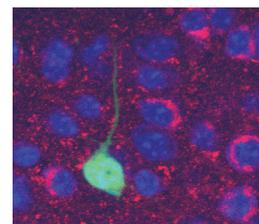


Fig 2. 左、 Cre-recombinase が導入された細胞は BDNF 遺伝子がノックアウトされると同時に GFP が発現する。右、 GFP 標識細胞は BDNF mRNA 及び BDNF 蛋白質を欠損する。

以上の実験の結果、BDNF を欠損している興奮性細胞には GABA 性終末が少ないが、同じ GABA ニューロンの軸索側枝によって支配されている近傍の興奮性細胞は多くの GABA 性終末を持っていることが明らかとなった (Fig. 3)。この結果は、GABA 性シナプスに対する BDNF の作用は局所的であることを示している。

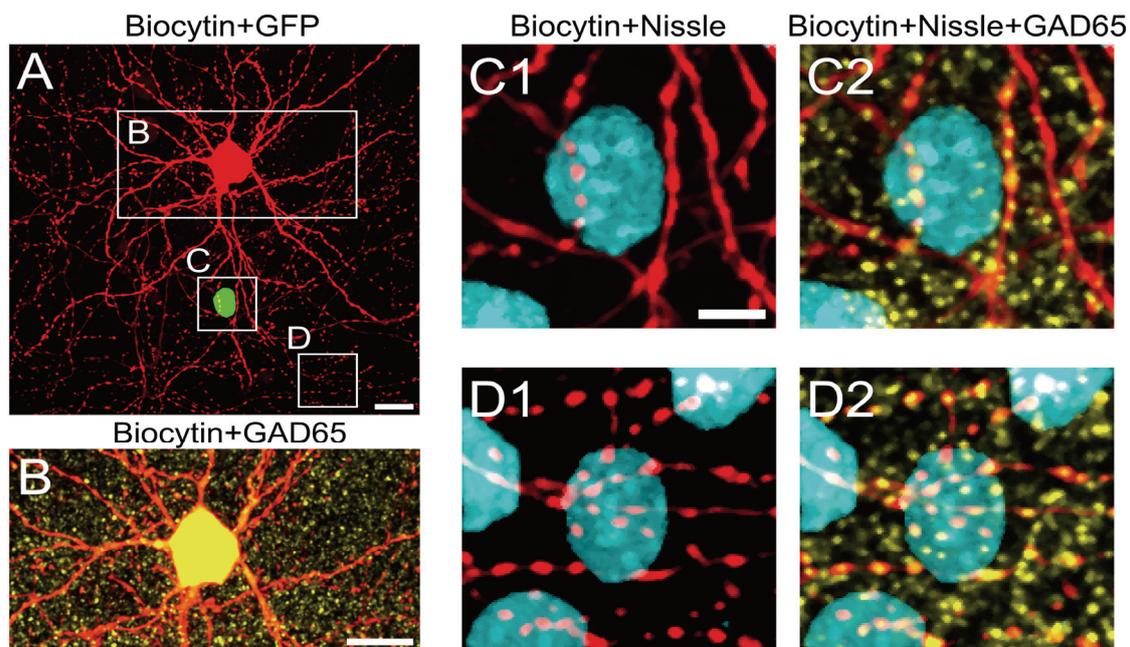


Fig. 3. GABA 性シナプス前終末数へのシナプス後細胞における BDNF 欠損の影響。 **A**, BDNF を欠損させた興奮性細胞 (枠C内の緑色細胞) とそれに軸索を送る GABA 性バスケット細胞 (枠B内の細胞 で Biocytin が注入され赤色を呈する)。枠 D には同じ GABA 性細胞の軸索側枝を受け、内因性 BDNF をもつ興奮性細胞が存在するが、このパネルでは染色されていない。 **B**, Biocytin と 抗 GAD65 抗体による二重染色。 Biocytin 注入を受けた細胞は GABA 性細胞であることが明らかとなった。 **C1, C2, D1** と **D2**, パネル A の枠CとDの拡大図。 **C2** では BDNF を欠損する細胞体上に GABA 性終末が 5 個のみ見られるが、 **D2** では BDNF を内在する細胞体上に 13 個存在する。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

本成果は *Journal of Neuroscience* に投稿し、現在改訂中である。本研究によって BDNF は GABA 性シナプスの形成に重要であるが、その作用は局所的で同じ GABA ニューロンが作る他のシナプスには及ばないことも明らかとなった。また、神経回路網の中の一個或いは少数の細胞だけ BDNF が欠損し、しかもその細胞は GFP によって標識されているという標本を作ることに成功した。loxP で挟んだ遺伝子をもつ遺伝子改変マウスは他の蛋白質でも作製可能であるので、本研究は種々の蛋白質を欠損したマウス

標本を比較的容易に作るができるということを示した点でも大きな意義がある。

3.2 RNA干渉による特定の細胞の遺伝子発現ノックアウト法の開発（津本グループ）

(1) 実施の内容

生理的な状態の神経回路網で特定の蛋白質の発現を阻止する方法として遺伝子ノックアウト法が存在するが、周知のようにこの方法は発生初期から全身で目的の蛋白質が欠損しているという欠点を有している。部位或いは時期限定的ノックアウト法も最近開発されつつあるが、大脳視覚野の特定の細胞に限定する方法は未だ開発されていないと思われる。

一方、数年前にMello とFire ら (Fire et al., Nature 391, 806, 1998) が線虫で発見したRNA干渉は、その後哺乳類でも生じることが明らかとなった。ただ、哺乳類の脳にRNA干渉を適用しようとする場合、最大の問題点は small interfering RNA (siRNA) を如何に標的の細胞に注入するかであった。我々は電気穿孔法を改良した方法を使って特定の脳部位の細胞にsiRNAを効率的に注入する方法を開発した (Fig. 4)。また、ごく最近、この方法が実際にシナプス長期増強のメカニズム解明に有効であることも報告した (Akaneya & Tsumoto, J. Neurosci., 26, 10209, 2006)。

本方法では siRNA を圧により大脳皮質に注入後、siRNA が充分拡散するよう約1時間待つ。次に、膜を穿孔させるため、電圧をかけ siRNA を細胞内へ導入する。この時、細胞膜に穴を開けるための強く短いパルスと、siRNA をその穴より細胞内へ移行させるための弱く長いパルスからなる複合刺激を与える (Fig. 4C)。siRNA などの核酸はマイナスの電荷を帯びているためマイナス刺激によって駆動される。

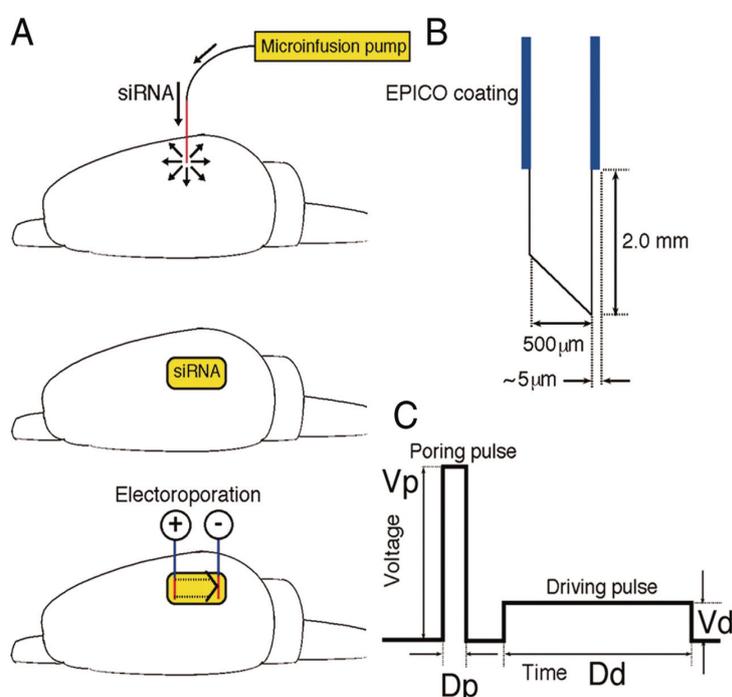


Fig. 4 *in vivo* 大脳皮質へ siRNA を導入する方法。A 上、siRNA を圧により大脳皮質に注入する。A 中、siRNA が充分拡散するよう約1時間待つ。A 下、電圧をかけ siRNA を細胞内へ導入する。B, 刺激電極の形状を示す。C, 細胞膜に穴を開けるための強く短いパルスと、siRNA をその穴より細胞内へ移行させるための弱く長いパルスからなる複合刺激を示す。siRNA などの核酸はマイナスの電荷を帯びているためマイナス刺激によって駆動される。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

本研究成果は *Journal of Neurophysiology* に発表した (Akaneya, Y., Jiang, B. and Tsumoto, T., RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. *J. Neurophysiol.*, 93, 594-602, 2005)。

RNA 干渉を応用する方法は哺乳類脳で特定の蛋白質をノックダウンできる方法として注目されてきた。しかしながら、脳内の目標の細胞に如何に siRNA を注入するかは、この方法を脳研究に適用する場合の最大の問題点であった。本研究では、代表者らが開発した方法 (前頁の Fig. 4 参照) を応用してこの問題を克服することができた。

ノックアウトマウスの作製に比して時間や労力をそれほど要しないこの RNA 干渉を利用した方法を用いれば、ラット等他の動物種でも特定の蛋白質の機能を *in vivo* で比較的容易に検証できる。このような有用な方法を提起した点からも、本研究は脳研究に重要なインパクトを与えたと思われる。

3.3 RNA 干渉を応用してプロスタグランディンの長期増強における役割を解明した研究 (津本グループ)

研究代表者らが開発した脳内の目的の神経細胞に siRNA を電気穿孔法により導入する方法 "RNAi-inducing gene silencing method" を利用して、大脳皮質視覚野に豊富に存在することが知られているプロスタグランジン及びその受容体のシナプス長期増強 (Long-Term Potentiation, LTP と略) における役割解明を試みた。

Prostaglandin E₂ (PGE₂) は細胞膜で作られシナプス可塑性に関与していると想定されてきたが大脳皮質視覚野では実証的データは報告されていなかった。我々はその4種の受容体のうち、EP2 と EP3 の siRNA をラット視覚野神経細胞に導入し Fig. 5 に模式的に示すような役割を担っていることを明らかにした。その結果を模式的に述べると以下ようになる (Fig. 5)。シナプス長期増強を起こすような高頻度刺激によって NMDA 受容体等を介してシナプス後部のカルシウムが増加する。このカルシウムは一方では Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) を活性化するが、もう一方では cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) を活性化する。活性化した cPLA₂ は細胞膜よりアラキドン酸を産生する。アラキドン酸は cyclooxygenase-2 (COX-2) により PGH₂ となり、PGH₂ は直ちに PGE₂ に変わる。この PGE₂ はシナプス後膜より放出されシナプス後の EP2 と EP3 に結合する。また、高頻度刺激によって活性化された CaMKII は EP2 と EP3 の移動をも起こし、シナプス後部における EP2 の増加と EP3 の減少を生じる。EP2 は cAMP を増加、EP3 は減少させる作用があるのでこの移動は相乗的に cAMP を増加させ、早期 LTP を起こす。cAMP はまたシナプス後部の

cAMP response element-binding protein (CREB) を賦活し、後期 LTP が誘発される。

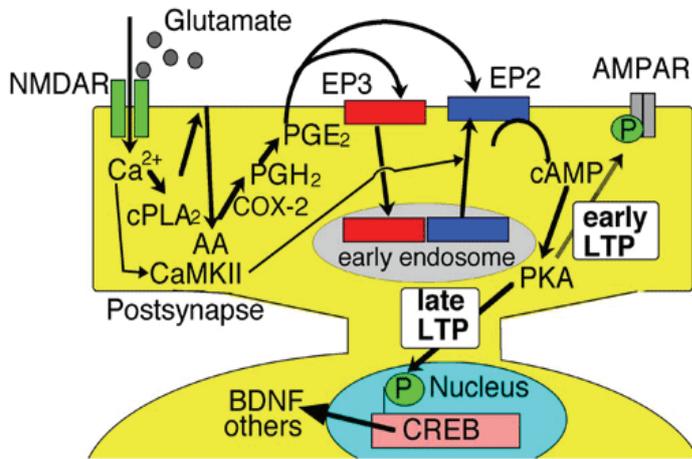


Fig. 5. 視覚野のシナプス長期増強への Prostaglandin E₂ (PGE₂) の関与メカニズム。AA, arachidonic acid. cPLA₂, cytosolic phospholipase A₂. COX-2, cyclooxygenase-2. PGH₂ prostaglandin H₂. PGE₂, prostaglandin E₂. CaMKII, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. EP2 and EP3, PGE₂ receptor subtypes.

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

この成果は Journal of Neuroscience に発表した(Akaneya, Y. and Tsumoto, T., J. Neurosci. 26, 10209-10221, 2006)。本研究はシナプス長期増強を起こすメカニズムとして、プロスタグランジン E₂ がシナプス後部から放出されシナプス後部の受容体に作用していることを見出したが、このようなシナプス後→シナプス後メッセンジャーの存在とその機能の報告は初めてであり、シナプス可塑性研究に新しい局面をもたらした。また、cAMP の増大と減少という反対の作用をもつ受容体の双方向性の移動による相乗効果も長期増強のメカニズムとしては最初の知見であり、関連研究者の強い関心を引き起こした。当研究は前述した siRNA の電気穿孔法を使うと特定の分子の関与メカニズムが解明できることを示した点からも、今後は siRNA が脳研究に広く使われる契機になると思われる。

3.4 神経細胞樹状突起及び軸索における BDNF 動態の解析 (津本グループ)

研究代表者らは、以前に BDNF は大脳皮質の興奮性細胞では軸索内を主に順向性に移動し、神経活動に応じてシナプス後細胞に移行することを報告した (Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M. and Tsumoto, T., Science 291, 2419-2423, 2001)。一方、BDNF は樹状突起内を移動することも以前に報告され、逆向性にシナプス前細胞に移行することも想定されている。ただ、軸索と樹状突起で移動方向が本当に逆であるのか、また、これらの移動は神経活動によって制御された輸送であるのか、拡散に基づく移動であるのか、等は不明であった。本研究では GFP で標識した BDNF を培養神経細胞に発現させ、その軸索や樹状突起内の動きを観測した。さらに、NGF と移動様式が異なるかどうかを明らかにするため BDNF を cyan fluorescence protein (CFP) で NGF を yellow fluorescence protein (YFP) で標識し BDNF と NGF の移動様態の相違をも解析

した (Fig. 6)。

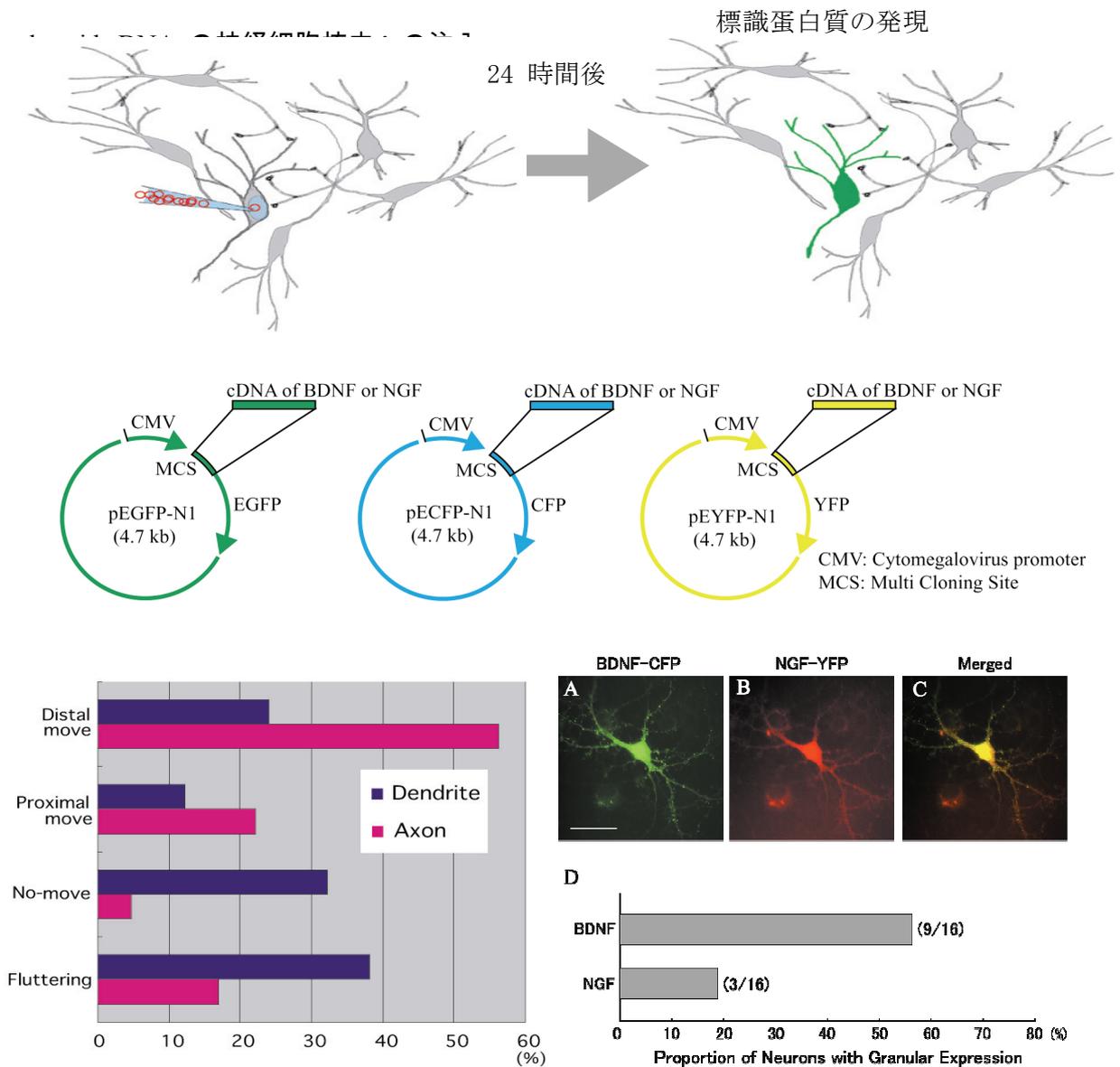


Fig. 6 蛍光蛋白質標識 neurotrophin plasmid cDNA の核内直接注入法とその細胞内発現。上、注入方法と各蛍光蛋白質標識 neurotrophin plasmid cDNA。左下、軸索及び樹状突起において4種の移動様式を示すBDNF-GFP粒子の割合。右下A-C、顆粒状のBDNF-CFP (A)とスミア状のNGF-YFP (B) の発現。D, 顆粒状発現の割合。

本研究ではBDNF は約2/3のケースで顆粒状に発現するがNGFは約70%のケースでスミア状に発現することを見出した (Fig. 6D)。この結果から、BDNFは活動依存的顆粒放出系によって制御されているがNGFは非依存的放出系に依拠していることが示唆された。また、軸索内のBDNF 粒子の多くはスムーズに軸索末端方向に順行性に移動す

るのに対して樹状突起内のBDNF粒子の多くは静止しているか短い距離を往復運動しているものが多かった。この結果は、BDNFは分泌制御系に発現するが、NGFは活動非依存系と、両者は全く異なった分泌系に発現すること、及びBDNFの軸索内での動きは順行性が主であることを示している。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

以上の実験で得られた結果はBDNFの動きを示す動画データが主であったため動画の搭載が可能なオンラインのみのジャーナルBMC Neuroscienceに発表した(Adachi, N., Kohara, K and Tsumoto, T., BMC Neurosci. 6, 42, 2005)。本研究では波長の異なる2種の蛍光蛋白質でBDNFとNGFを標識し、軸索や樹状突起内でのそれぞれの動態を同時に可視化することに成功した。その結果、BDNFとNGFの移動は異なる分泌制御系に依拠していることが明らかとなった。この成果は異なる分子の動態を同時に可視化する方法を示すとともに同じneurotrophinでもBDNFとNGFでは異なる機能的役割を担っていることを示唆したものであり、神経栄養因子研究に強いインパクトを与えた。また、異なる蛍光蛋白質を使い複数の分子の動態や相互作用を解明する方法として本研究で示した方法は多くの研究に応用されると思われる。

3.5 抑制性神経細胞への興奮性シナプスの可塑性メカニズムの解明 (津本グループ)

抑制性神経細胞であるGABAニューロンを含む回路は大脳皮質内で抑制性神経回路を形成し、大脳皮質神経回路網の活動依存的形成に重要な役割を果たすと考えられている。この抑制性神経回路の可塑性はGABAニューロンが標的の細胞と作るGABA性シナプスでは良く調べられているが、GABAニューロンが受け手となる興奮性シナプスではほとんど研究されていない(Fig. 7の赤枠内シナプス)。そこで、GABAニューロンをGFPで標識したGAD67-GFPノックインマウスの大脳皮質視覚野の急性スライス標本を作製し、GABAニューロンへの興奮性シナプスでシナプス長期増強が起きるかどうかを観測し、起きるとすればどのようなメカニズムによるのかを解析した。

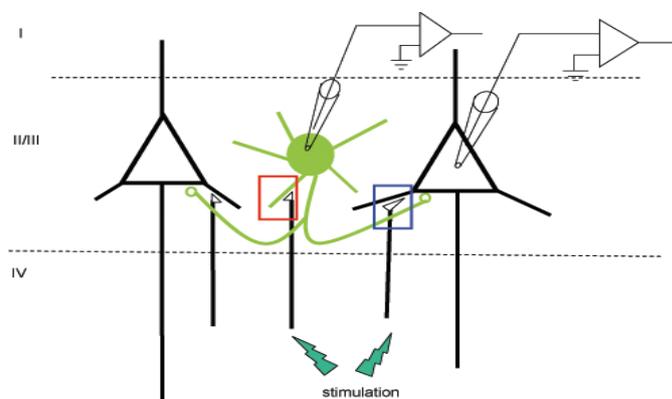


Fig. 7. 大脳皮質における2種類の興奮性シナプス。GABAニューロンに終止する興奮性シナプス(赤枠内)と錐体細胞に終止する興奮性シナプス(青枠内)。

本実験において、まず同じ GABA ニューロンでもバスケット細胞と非バスケット細胞では長期増強の有無、程度が大きく異なることを見出した。Fig. 8 の左列に示すように GABA 性バスケット細胞では顕著な長期増強が誘発されたが、非バスケット細胞では顕著な長期増強は誘発されなかった。従って、長期増強のメカニズムを調べる実験は全て Fast-spiking cell と同定された GABA ニューロンで行った。

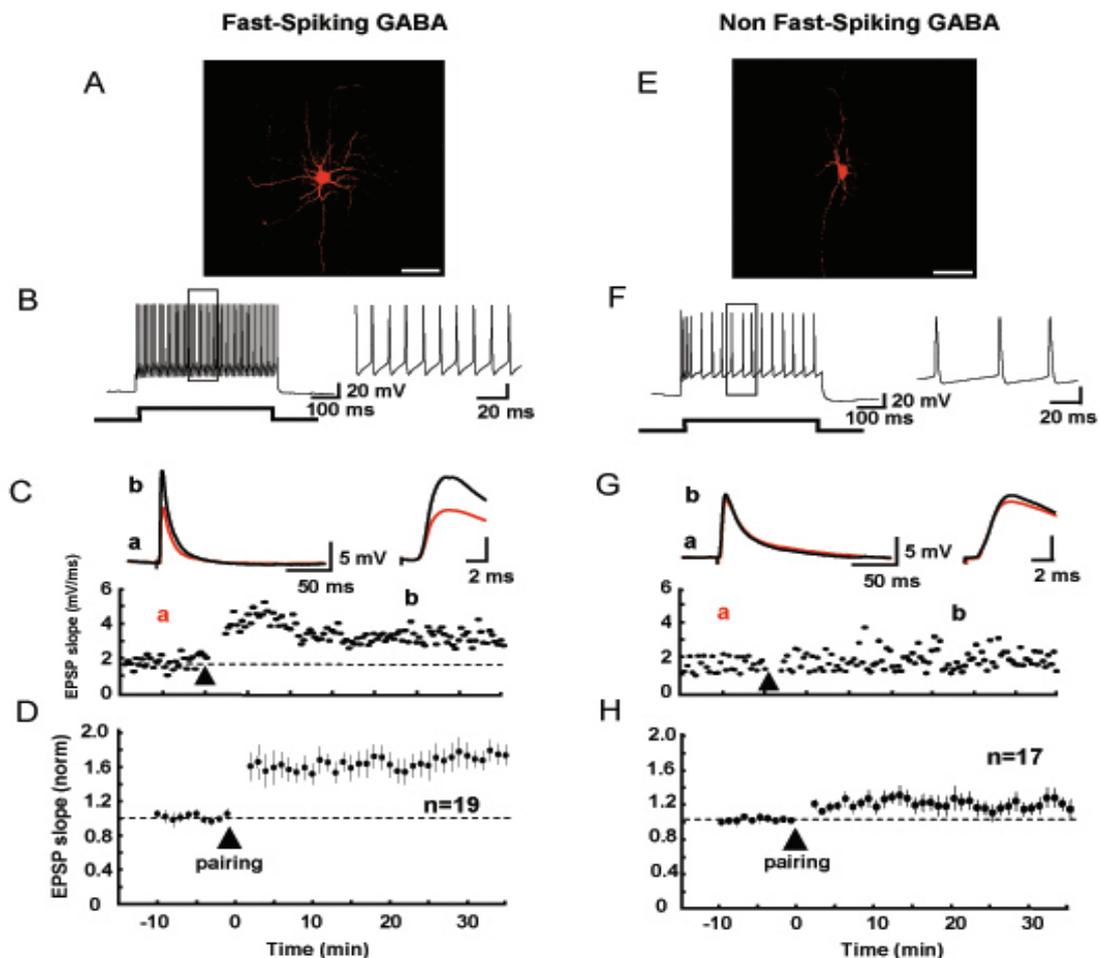


Fig. 8 GABA 性バスケット細胞と非バスケット細胞における長期増強の有無。
A と **E**、biocytin 注入像。**B** と **F**、脱分極電流を流した時の活動電位発射活動。**C** と **G**、IV 層の電気刺激に対して生じた興奮性シナプス後電位 (EPSP) の立ち上がり傾斜値の時間経過。▲で示した時点でシナプス後の脱分極と高頻度刺激というペア刺激を与えた。上の波形の赤はペア刺激前のコントロール反応で黒がペア刺激後 25 分の反応。
D と **H**、EPSP の立ち上がり傾斜値の平均値と標準誤差。n は細胞数。

本研究では種々の阻害薬や作動薬を使って長期増強の誘発メカニズムを調べた。その結果、Fig. 9 に示すように以下のプロセスが関与していることが明らかとなった。1) 錐体細胞への興奮性シナプスのような NMDA 受容体の関与はなく、代謝型グルタミン

酸受容体のタイプ5 (type 5 metabotropic glutamate receptors, mGluR5) が関与している。
 2) mGluR5 は phospholipase C (PLC) の活性化、IP₃ の放出、IP₃ による Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出を介して長期増強に関与する。

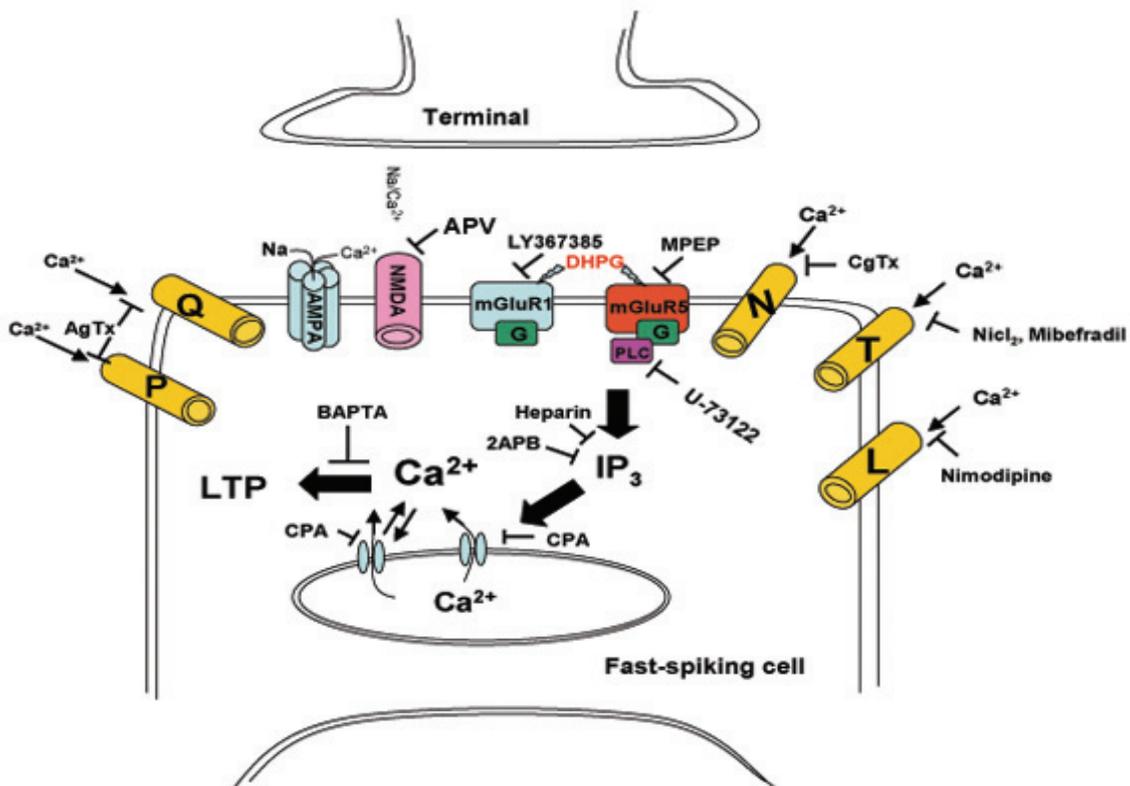


Fig. 9 Fast-spiking, GABA ニューロンにおける長期増強誘発メカニズムの単純モデル。L, N, P, Q, T は各タイプの電位依存性 Ca²⁺チャネル。AgTx, ω-Agatoxin IVA の略で P, Q タイプ電位依存性 Ca²⁺チャネルのブロッカー。CgTx, ω-Conotoxin MVIIA の略で N タイプ電位依存性 Ca²⁺チャネルのブロッカー。APV, 2-amino-5-phosphonvaleric acid の略で NMDA 受容体に選択的な拮抗薬。MPEP, 2-methyl-6-(phenylethynyl) pyridine hydrochloride の略で mGluR5 に選択的な拮抗薬。DHPG, (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine の略で mGluR5 に選択的な作動薬。LY367385, (s)-(+)-α-amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid の通称で mGluR1 に選択的な拮抗薬。2APB, 2-aminoethyl diphenyl borate の略。CPA, cyclopiazonic acid の略で Ca²⁺ ストアの Ca²⁺ 枯渇を起こす。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

GABA ニューロンへの興奮性シナプスの可塑性が錐体ニューロンへの興奮性シナプス

の可塑性とは全く異なるメカニズムによっていることの発見は、大脳皮質の回路網全体の可塑性をモデル化し、その動作原理を考える場合貴重なデータを提供すると思われる。

3.6 遺伝子改変マウス視覚野における GABA ニューロン光反応性の *in vivo* 解析 (津本グループ)

生理的状态での神経回路網の形成や機能発現機構を解明するためには生体丸ごとの *in vivo* 標本での解析も必要である。大脳皮質視覚野で回路網を形成する2大要素である GABAニューロンと興奮性ニューロンのうち前者は生後発達の臨界期において、視覚野神経回路の入力依存的変化に特に重要な役割を果たしていると思定されている。しかし、GABAニューロンの活動性が興奮性ニューロンと異なるのかどうかは、*in vivo* 標本ではほとんど調べてこられなかった。これは *in vivo* 標本では GABAニューロンと興奮性ニューロンを実験中に区別することが困難なためであった。ところが、最近開発された GAD67-GFPノックインマウスでは *in vivo* の状態でも蛍光顕微鏡下で GABAニューロンを比較的容易に同定できる。そこで、GAD67-GFPノックインマウスを使用し、可塑性研究の準備実験として視覚野興奮性ニューロンと GABAニューロンの光反応性、特に方位選択性、の違いを2光子走査蛍光顕微鏡を使った *in vivo* 機能的カルシウムイメージング法で調べた。

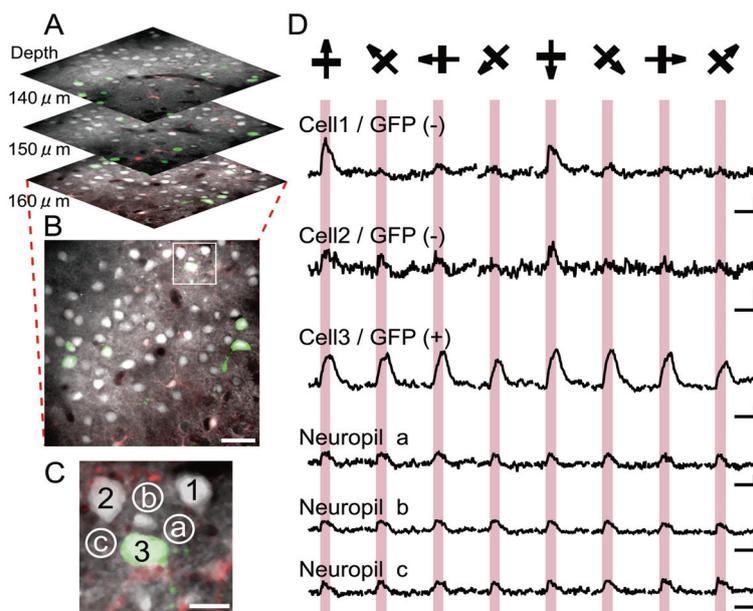


Fig. 10. GAD67-GFPノックインマウスにおける多数の皮質細胞活動のイメージング。A, 皮質視覚野で表面から所定の深さ面における画像。緑色、白色、赤色は、それぞれGABA、興奮性ニューロン、グリアの活動を示す。各画像は190 x 190 μmに相当。B, スケールバーは30 μm。C, B上の枠の拡大像。1-3 と a-c は各細胞体と細胞外領域に相当し、それぞれから記録した蛍光強度変化はDに示されている。D, 上に示した光刺激を提示したときの蛍光強度変化。細胞1と2はGFP陰性で興奮性ニューロン、細胞3はGFP陽性でGABAニューロン。右端の較正スケールは5% (-ΔF/F) と10秒。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

本研究では、抑制性神経細胞が緑色蛍光を発するように遺伝子を改変したマウスに、機能的二光子励起イメージング法を適用したところ、大脳皮質視覚野の興奮性ニューロンは非常に強い方位選択性を持つのに対して、抑制性ニューロンは方位選択性を持たないことを発見した。この発見は、抑制性ニューロンが、興奮性ニューロンの反応性を全体的に抑えることによって、興奮性ニューロンの方位選択性を発現させていることを示唆している。遺伝子改変動物脳に機能的二光子励起イメージング法を適用できることを示した本研究成果によって、タイプの異なる神経細胞の活動を区別して可視化できることが明らかとなり、今後、異なるタイプの神経細胞からなる大脳皮質の神経回路における情報処理の原理を解明する研究に広く応用されることが期待される。

3.7 BDNF の Lipid rafts を介するシグナル伝達メカニズムの研究 (小島グループ)

BDNF が遺伝子発現や蛋白質合成を調節することはすでに報告されているが、脳の脂質代謝を調節する可能性やコレステロールに富んだ Lipid rafts を介するシグナル伝達を行う可能性については十分な理解が進んでいない。小島らは、神経細胞のコレステロールを定量する方法、Lipid rafts を生化学的に調製する方法、そして神経細胞のコレステロールを可視化する方法などを確立しこれらの研究を推進した。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

BDNF の新たな機能として、神経細胞のコレステロール含量を増やすことを見出した。その生理的役割を知るため電気生理学的解析を進めたところ、BDNF 依存的に増加したコレステロールはシナプス小胞の readily releasable pool の形成に重要であることを見出した。Lipid rafts はコレステロールを多く含むマイクロドメインであるが、BDNF の新たなシグナル伝達様式として Rafts を介するものを発見し、その情報伝達がシナプス伝達効率の亢進および樹状突起や軸索の伸張に必要であるが、神経細胞の生存維持には関与しないことを見出した。これらの成果は、BDNF を始めとした神経栄養因子類と脳の脂質機能の関係を示唆し、遺伝子や蛋白質レベルとは異なる新たな脳機能調節機構の研究に発展する可能性を示した。

3.8 BDNF の一塩基多型に関する研究 (小島グループ)

BDNF をコードする遺伝子領域に一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs と略) が複数存在し、BDNF 蛋白質のアミノ酸配列が置換されていることが、ヒトゲノムプロジェクトにより明らかにされた。Val66Met と呼ばれる BDNF の一塩基多型が

活動依存的な BDNF 分泌とエピソード記憶に影響することをアメリカ NIH のグループとの共同研究により明らかにして以来 (Egan et al., *Cell*, **127**, 257, 2003)、小島らは、BDNF をモデルとした脳分子の SNPs 研究を進めてきた。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

神経系遺伝子の SNPs を分子生物学的に研究する手法はまだ十分には体系化されていないため、コホート解析を中心とした相関研究がほとんどである。小島らは、BDNF の SNPs に焦点を当てその研究手法の整備を進め、次のような成果を得てきた。ハンチントン舞蹈病の細胞モデルについて、Val66Met の polymorphism と BDNF の分泌の関連を GFP 蛋白質により解析した。その結果、Val66Met 変異はその細胞モデルの BDNF 分泌には影響しないが、その疾患の原因分子 (PolyQ-Huntingtin) 自身が BDNF の分泌を抑制することを見出した。また、バイオインフォマテクスから分子機能に影響する SNPs を予測する研究では、前駆体 BDNF から成熟型 BDNF へのプロセッシング反応を阻害する BDNF の SNP を見出し、そのモデルマウスの作製に成功した。このモデルマウスを用いた研究結果は、BDNF のプロセッシング反応と脳疾患発症の関連を示唆し、BDNF をターゲットとした創薬研究に貢献することが期待される。

3.9 多点電極基板上での培養系における解析 (鳥光グループ)

GAD67-GFP ノックインマウスを用いることにより、GABA ニューロンを GFP の発現によって、それ以外の細胞と区別することが可能な状態、すなわち、GFP を発現する抑制性ニューロン (GFP 陽性細胞) と発現しない興奮性ニューロン (GFP 陰性細胞) を蛍光によって識別できる状態で、神経回路網形成に伴う各細胞の寄与についての解析に取り組んだ。

まず、GFP 陽性細胞と陰性細胞が混在する状態の初代培養系を 64 チャンネルの微小電極アレイ基板上で構成し、発達に伴う電気的变化を計測した。使用した電極は、微細加工で作製した Indium Tin Oxide ベースの電極に、電気化学的に高分子ゲル poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) を修飾することにより、電極インピーダンスの低減と細胞に対する適合性を高めることを可能にした。これにより、数ヶ月の長期間に渡る継続的電気計測が可能となった。同電極により自発電気活動の計測だけでなく、電気刺激印加実験も可能であるが、本研究では、活動計測を中心に実験を進めた。

実験では、セルソーターを用いることにより、細胞の蛍光に基づき GFP 陽性細胞と陰性細胞を分離し、各々の細胞を分離育成したホモな状態と、各細胞が混在するヘテ

ロな状態を作成した。これらの細胞構成の異なる系における電氣的応答性の違いを、高分子ゲル多点電極を用いて計測、解析を行った。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

測定では、GFP 陽性細胞と陰性細胞が混在するヘテロな状態と、各々の細胞を分離、培養したホモな状態での電氣的応答性の違いを比較検討した。その結果、生後初期の GAD67-GFP ノックインマウス脳からの分離細胞では、GFP 陽性細胞のみのホモな状態の発達過程と、ヘテロな状態での発達過程との間で、ホモの方が神経活動発現が若干早い傾向が観察されたものの、顕著な相違は観察されなかった。しかしながら、GFP 陽性細胞の電気特性の発達において特徴的な反応がヘテロの状態にも混在していること、そしてそれが発達において中心的役割を果たしている、あるいは何らかの役割を担っていることが示唆される結果が得られた。同時に、高分子ゲル電極による電気測定が長期に渡る神経活動測定に有効であること、セルソーターによるソーティングの精度を上げる必要性のあることが明らかになった。

今後、GFP 陽性細胞のみのホモの系において、神経活動の発現が若干早くなる傾向性を明らかにするとともに、GFP 陽性細胞に特徴的な信号解析を進めることにより、神経回路網形成における GABA ニューロンの役割を解明できるものと考えられる。

3.10 抗体作製、その効力検定及び BDNF の生体リズムへの関与機構の研究（仙波グループ）

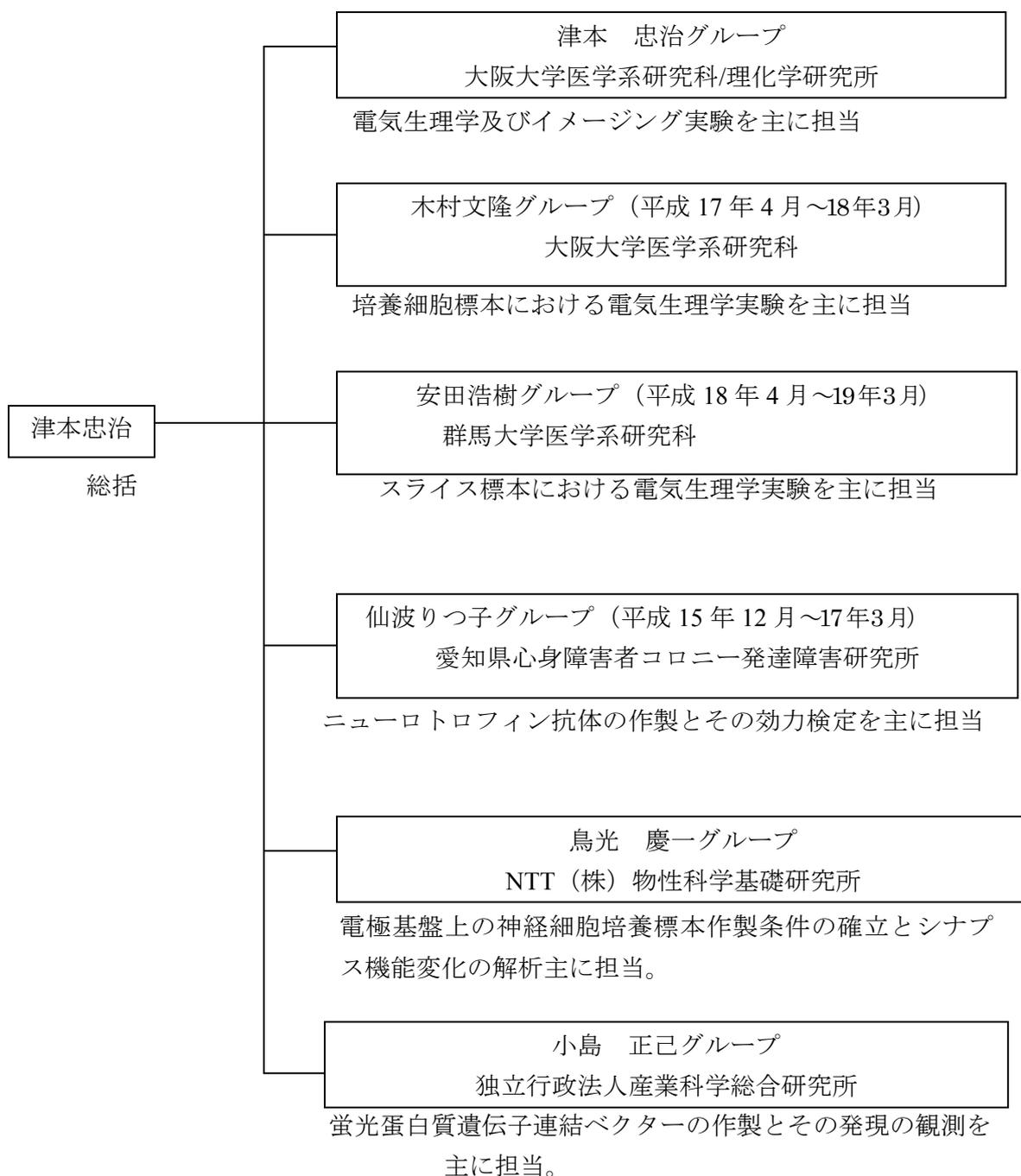
TrkB およびリン酸化 TrkB の抗体を作製、精製し、その特異性を電気泳動で確認したところ、市販のものよりは特異性の高い抗体が得られた。また、その後の研究において、幼若ラット大脳皮質の BDNF および NT-3 発現には日内変動があり、BDNF は暗期に高く、NT-3 は明期に高いことを見いだした。睡眠のリズムを乱すとこれらのレベルに影響があり、明期を8時間早めた環境で1週間飼育したラットや BDNF ノックアウトマウスでは、大脳皮質 IV 層のシナプス形成不全が生じることを示唆する結果を得た。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

以上の結果は、BDNF および NT-3 の日内変動（BDNF および NT-3 の量的バランス）が大脳皮質の生後発達に極めて重要であること示唆している。本研究によって生体リズムへの関与という Neurotrophin の新しい機能が今後、明らかになることが期待される。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

① 津本忠治グループ

大阪大学医学系研究科/理化学研究所脳科学総合研究センター

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
津本忠治	大阪大学/理化学研究所	教授/ユニットリーダー	総括	H. 15. 12～19. 3
木村文隆	大阪大学	助教授	培養細胞実験	H. 15. 12～17. 3
茜谷行雄	大阪大学	助手	スライス実験	H. 15. 12～17. 3
安田浩樹	大阪大学	助手	スライス実験	H. 15. 12～17. 3
小原圭吾	大阪大学/理化学研究所	CREST 研究員	培養細胞実験	H. 16. 04～17. 5
亀山克朗	大阪大学/理化学研究所	CREST 研究員	<i>in vivo</i> 実験	H. 15. 12～19. 3
惣谷和広	大阪大学/理化学研究所	研究員	<i>in vivo</i> 実験	H. 15. 12～19. 3
安達直樹	大阪大学/理化学研究所	CREST 研究員	培養細胞実験	H. 15. 12～18. 3
北村明彦	大阪大学	研究員	スライス実験	H. 15. 12～16. 3
A. Sarihi	理化学研究所	研究員	スライス実験	H. 17. 4～19. 3
Bin Jiang	理化学研究所	CREST 研究員	培養細胞実験	H. 18. 4～19. 3
丸山篤史	大阪大学/理化学研究所	テクニカルスタッフ	培養細胞実験	H. 15. 12～19. 3
黄 艶	大阪大学	派遣大学院生	スライス実験	H. 15. 12～17. 3
西田めぐみ	大阪大学	実験補佐員	実験補助	H. 15. 12～17. 3
足羽美恵	大阪大学	研究補助員	研究チーム事務	H. 15. 12～17. 3
蒔苗千賀子	理化学研究所	事務補佐員	研究チーム事務	H. 17. 4～18. 3
宮崎弥生	理化学研究所	事務補佐員	研究チーム事務	H. 18. 4～19. 3

② 木村文隆グループ

大阪大学医学系研究科

平成 17 年 4 月～18 年 3 月

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
木村文隆	大阪大学大学院医学系研究科	助教授	培養細胞実験	H. 17. 4～18. 3
安田浩樹	大阪大学大学院医学系研究科	助手	スライス実験	H. 17. 4～18. 3
茜谷行雄	大阪大学大学院医学系研究科	助手	スライス実験	H. 17. 4～18. 3
黄 艶	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	スライス実験	H. 17. 4～18. 3
仲村めぐみ	大阪大学大学院医学系研究科	研究補助員	実験補助	H. 17. 4～17. 5
緒方裕美子	大阪大学大学院医学系研究科	事務補佐員	経理事務	H. 17. 4～18. 3

③ 安田浩樹グループ

群馬大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月～19 年 3 月

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
安田浩樹	群馬大学大学院医学系研究科	講師	スライス実験	H. 18. 4～19. 3

③ 仙波りつ子グループ

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

平成 15 年 12 月～17 年 3 月

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
仙波りつ子	愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所	研究室長	抗ニューロトロフィン抗体の作製	H. 15. 12～17. 3
宮崎 則子	愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所	研究補助員	実験補助	H. 15. 12～17. 3

⑤ 小島正巳グループ

独立行政法人産業技術総合研究所

平成 15 年 12 月～19 年 3 月

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
小島正巳	(独法) 産業技術総合研究所	研究員	ベクター作製	H. 15. 12～19. 3
鈴木辰吾	(独法) 産業技術総合研究所	CREST 研究員	ベクター作製	H. 15. 12～19. 3
原とも子	(独法) 産業技術総合研究所	研究補助員	実験補助	H. 15. 12～19. 3

⑥ 鳥光慶一グループ

NTT (株) 物性科学基礎研究所

平成 15 年 12 月～19 年 3 月

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
鳥光慶一	(株) NTT物性科学基礎研究所	研究員	基盤回路作製	H. 15. 12～19. 3
古川由里子	(株) NTT物性科学基礎研究所	研究補助員	実験補助	H. 15. 12～19. 3

5. 研究期間中の主な活動

該当なし。

6. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内 4 件、海外 37 件)

津本グループ

Sohya K., Kameyama K., Yanagawa Y., Obata K. and 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 Ca^{2+} imaging in transgenic mice. *J. Neurosci.* 27, 2145-2149.

Akaneya Y. and Tsumoto, T. (2006) Bidirectional trafficking of prostaglandin E_2 receptors involved in long-term potentiation in rat visual cortex. *J. Neurosci.*, 26, 10209-10221.

Akaneya, Y., Jiang, B. and Tsumoto, T. (2005) RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. *J. Neurophysiol.*, 93, 594-602.

Adachi, N., Kohara, K. and Tsumoto, T. (2005) Difference in trafficking of brain-derived neurotrophic factor between axons and dendrites of cortical neurons, revealed by live-cell imaging. *BMC Neurosci.*, 6, 42 (a full-length paper on the on-line journal)

Kameyama, K., Hata, Y. and Tsumoto, T. (2005) Recovery of binocular responses after brief monocular deprivation in kittens. *Neuroreport* 16, 1447-1450.

Jiang, B., Kitamura, A., Yasuda, H., Sohya, K., Maruyama, A., Yanagawa, Y., Obata, K. and Tsumoto, T. (2004) Brain-derived neurotrophic factor acutely depresses excitatory synaptic transmission to GABAergic neurons in visual cortical slices. *Europ. J. Neurosci.*, 20, 709-718.

Palizvan, M.R., Sohya, K., Kohara, K., Maruyama, A., Yasuda, H., Kimura, F. and Tsumoto, T. (2004) Brain-derived neurotrophic factor increases inhibitory synapses, revealed in solitary neurons cultured from rat visual cortex. *Neuroscience*, 126, 955-966.

Yanagisawa, T., Tsumoto, T and Kimura, F. (2004) Transiently higher release probability during the critical period at thalamocortical transmission in the barrel cortex. *Europ. J. Neurosci.*, 20, 3006-3018.

Kohara, K., Kitamura, A., Adachi, N., Nishida, M., Itami, C., Nakamura, S. and Tsumoto, T. (2003) Inhibitory but not excitatory cortical neurons require presynaptic brain-derived neurotrophic factor for dendritic development, as revealed by chimera cell culture. *J. Neurosci.*, 23, 6123-6131.

- Jiang, B., Akaneya, Y., Hata, Y. and Tsumoto, T. (2003) Long-term depression is not induced by low frequency stimulation in rat visual cortex in vivo: A possible preventing role of endogenous BDNF. *J. Neurosci.*, 23, 3761-3770.
- Salami, M., Itami, C., Tsumoto, T and Kimura, F. (2003) Change of conduction velocity by regional myelination yields constant latency irrespective of distance between thalamus and cortex. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100, 6174-6179.
- Itami, C., Kimura, F., Kohno, T., Matsuoka, M., Ichikawa, M., Tsumoto, T and Nakamura, S. (2003) BDNF-dependent unmasking of “silent” synapses in developing mouse barrel cortex. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100, 13069-13074.
- Akaneya, Y., Altinbaev, R. S., Bayazitov, L.T., Kinoshita, S., Voronin, L.L. and Tsumoto, T. (2003) Low-frequency depression of synaptic responses recorded from rat visual cortex. *Neuroscience*, 117, 305-320.
- Ichisaka, S., Katoh-Semba, R., Hata, Y., Ohsima, M., Kameyama, K. and Tsumoto, T. (2003) Activity-dependent changes in the protein level of brain-derived neurotrophic factor but no change in other neurotrophins in the visual cortex of young and adult ferrets. *Neuroscience*, 117, 361-371.
- Yasuda, H., Higashi, H., Kudo, Y., Inoue, T., Hata, Y., Mikoshiba, K. and Tsumoto, T. (2003) Imaging of calcineurin activated by long-term depression-inducing synaptic inputs in living neurons of rat visual cortex. *Eur. J. Neurosci.*, 17, 287-297.
- Katoh-Semba, R., Ichisaka, S., Hata, Y., Tsumoto, T., Eguchi, K., Miyazaki, N., Matsuda, M., Takeuchi, I. K. and Kato, K. (2003) NT-4 protein is localized in neuronal cells in the brain stem as well as the dorsal root ganglion of embryonic and adult rats. *J. Neurochem.*, 86, 660-668.

木村グループ

- Itami, C., Kimura, F. and Nakamura, S. (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates the maturation of layer 4 fast-spiking cells after the second postnatal week in the developing barrel cortex. *J. Neurosci.*, 27, 2241 – 2252.

小島グループ

- Suzuki, S., Kiyosue, H.K., Hazama, S., Ogura, A., Kashihara, M., Hara, T., Koshimizu, H. and Kojima, M. (2007) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) stimulates cholesterol biosynthesis and accumulates presynaptic proteins in lipid rafts: A novel role for BDNF in synapse development. *J. Neurosci.*, *in press*
- Daniel, T., Canals, J., Kojima, M., Egea, G. and Alberch, J. (2006) Mutant huntintin impairs the post-Golgi trafficking of brain-derived neurotrophic factor but not its Val66Met polymorphism. *J. Neurosci.*, *26*, 12748–12757.
- Nishiyama K, Konishi A, Nishio C, Araki-Yoshida K, Hatanaka H, Kojima M, Ohmiya Y, Yamada M, Koshimizu H. (2005) Expression of cystatin C prevents oxidative stress-induced death in PC12 cells. *Brain Res.* *67*, 94-99.
- Suzuki, S., Numakawa, T., Shimazu, K., Koshimizu, H., Mei, L., Lu, B. and M. Kojima, M. (2004) BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: Roles in synaptic modulation. *J. Cell Biol.*, *167*, 1205-1215.
- Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B. and Zheng, J.Q. (2004) Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron*, *42*, 51-62.
- Matsuo, Y., Nishinaka, Y., Suzuki, S., Kojima, M., Kizaka-Kondoh, S., Kondo, N., Son, A., Sakakura-Nishiyama, J., Yamaguchi, Y., Masutani, H., Ishii, Y. and Yodoi, J. (2004) TMX, a human transmembrane oxidoreductase of the thioredoxin family: the possible role in disulfide-linked protein folding in the endoplasmic reticulum. *Archiv. Biochem. Biophys.* *423*, 81-87.
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B. and Weinberger, D.R. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, *112*, 257-269.

仙波グループ

- Morita, A., Yamashita, N., Sasaki Y., Uchida Y., Nakajima, O. Nakamura, F., Yagi, T., Taniguchi, M., Usui, H., Katoh-Semba, R., Takei, K., Goshima, Y. (2006) Regulation of dendritic branching and spine maturation by Semaphorin 3A-Fyn signaling. *J. Neurosci.*, *26*, 2971-2980.
- Koyama, R., Yamada, M., Fujisawa, S., Katoh-Semba, R., Matsuki, N. and Ikegaya, Y. (2004) Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *J. Neurosci.*, *24*, 7215-7224.

Hanamura, K., Harada, A., Katoh-Semba, R., Murakami, F. and Yamamoto, N. (2004) BDNF and NT-3 promote thalamocortical axon growth with distinct substrate and temporal dependency. *Eur J. Neurosci.*, 19, 1485-1493.

Sadakata, T., Sato, Y., Katoh-Semba, R., Mizoguchi, A., Fukuda, M., Mikoshiba, K. and Furuichi, T. (2004) The secretory granule associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. *J. Neurosci.*, 24, 43-52.

鳥光グループ

Nyberg, T., Shimada, A. and Torimitsu, K. (2007) Ion conducting polymer microelectrodes for interfacing with neural networks, *J. Neurosci. Methods*, 160, 16-25.

Torimitsu, K. (2006) Nano-bio interface -neural and molecular functions. *Advances in Science and Technology*, 53, 91-96.

Kasai, N., Shimada, A., Nyberg, T. and Torimitsu, K. (2006) Fabrication of an electrochemical sensor array for 2D H₂O₂ imaging, *Electrochemistry*, 74, 628-631.

Kasai, N., Han C, and Torimitsu K. (2005) Hydrogen peroxide distribution and neuronal cell death in a rat hippocampal slice, *Sensors and Actuators B*, 108, 746-750.

Han, C., Kasai, N. and Torimitsu, K. (2005) CA2 : the most vulnerable sector to bicuculline exposure in rat hippocampal slice cultures. *NeuroReport*, 16, 333-336.

Han, C., Kasai, N. and Torimitsu, K. (2005) Apoptosis induced by bicuculline is involved the P/Q-type voltage dependent calcium channel in the rat hippocampal slice cultures, *Epilepsia*, 46, 11.

Torimitsu, K., Kasai, N., and Furukawa, Y. (2004) Magnesium effect on neural activities *in vitro*. *Clinical Calcium*, 14, 1204-1211.

Ajito, K., Han, C. and Torimitsu, K. (2004) Detection of glutamate in optically trapped single nerve terminals by Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 76, 2506-2510.

Kurita, R., Hayashi, K., Torimitsu, K. and Niwa O. (2004) Continuous measurement of glutamate and hydrogen peroxide using a microfabricated biosensor for studying the neurotoxicity of tributyltin, *Anal. Sci*, 19, 1581-1585.

河西奈保子, 島田明佳, トビアスナイベルヒ, 鳥光慶一 (2007) 多点電気化学センサとラット脳のリアルタイムイメージングへの応用、*Electrochemical Sensor Array and Its Application to Real Time Imaging of a Brain Slice*、*電気学会論文誌C (電子・情報・システム部門誌)*、127、217-221.

Torimitsu, K. (2005) 神経細胞をベースにしたナノバイオデバイス作製の取り組み.

バイオテクノロジージャーナル, 5, 165-169.

Kasai, N., Han, C. and Torimitsu, K. (2004) 生体試料からの過酸化水素放出空間分布のリアルタイム測定に成功, 日経ナノビジネス, 4, 9-10.

Torimitsu, K. (2004) Neural Functions and Molecular Device, 化学工業, 55, 297-303.

(1) 口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 11 件、海外 10 件)

津本グループ

Tsumoto, T. Brain-derived neurotrophic factor: Its trafficking and actions on cortical neurons. Plenary Lecture in the 4th FAONS Congress, Hong Kong, China, Nov. 30, 2006

Tsumoto, T. A local promoting action of BDNF on cortical GABAergic synapses, as revealed by single-cell gene knockout method. First Korean-Japanese Neuroscience Symposium, Seoul, Korea, Nov. 2, 2006.

Tsumoto, T.: A local, promoting action of BDNF on cortical GABAergic synapses, as revealed by single-cell gene knockout method. Japan-US Neuroscience Corporative Program Symposium. Hawaii, USA, March 13-16, 2006

Sarihi, A., Komaki, A.-R., Jiang, B., Obata, K., Yanagawa, Y. and Tsumoto, T. Metabotropic glutamate receptor-dependent LTP of excitatory synapses to fast-spiking GABAergic neurons in visual cortex. The 4th Congress of Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies (FAONS) Hong Kong (2006.11-12)

Tsumoto, T.: Activity-regulated trafficking of BDNF in axons and dendrites of cortical neurons. Workshop "Frontiers in Cellular Neuroimaging", Wako city, Japan, June 17-21, 2005

小島グループ

Kojima, M., Cell biology and model mice of BDNF polymorphisms, NGF conference: Hot Topics, 2006.5, France

Kojima, K., Cell biology and genetically engineered animal of single nucleotide polymorphisms in BDNF gene, Looking into novel molecular mechanisms using genetic variation, Neuroscience Center University of Helsinki, 2006.5, Helsinki, Finland

Kojima, M., Biological roles of proBDNF in CNS, McMaster University, 2004.10, Hamilton, Canada.

Kojima, M., Biological roles of proBDNF in CNS, 2004.10, Weill Medical College of Cornell

University, New York.

小島正巳、脳由来神経栄養因子 BDNF の機能的 SNPs と精神疾患発症の関係”、千里ライフサイエンスセミナー：『社会行動を司る脳の分子とエピジェネティクス』—新しい人間科学をめざして、2006.10、大阪

小島正巳、Cell biology and model mouse of single nucleotide polymorphisms in neural genes”、東京大学・国際シンポジウム：From genes to cognition、2006.7、東京

小島正巳、Molecular and cellular biology of BDNF polymorphisms、日本・フィンランド共同神経科学シンポジウム：シナプス形成と制御機構、2006.6、札幌

小島正巳、神経細胞成長抑制因子の調製技術及び諸因子の高感度検出法、バイオテクノロジー産業化のための技術シーズ公開会、2006.1、大阪

小島正巳、脳遺伝子配列のわずかな違い（一塩基多型）による脳機能の調節、関西大学先端機構シンポジウム、2006.1、大阪

小島正巳、Looking into brain function using genetic variants -‘Jekyll and Hyde’ model of growth factor function in brain、脳と心のメカニズム：第6回冬のワークショップ、2006.1、北海道・ルスツ

小島正巳、Multiple modulations of neuronal functions by brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、システム神経生物学スプリングスクール、2005.3、奈良

小島正巳、Processing of BDNF and brain disorders”、第29回日本神経科学大会、2006.7、京都

小島正巳、Many faces of single nucleotide polymorphisms in BDNF gene: Looking into Brain Functions using Genetic Variations”、Shingo Suzuki, Hisatsugu Koshimizu、第28回日本神経科学大会、2005.7、横浜

小島正巳、Brain-derived neurotrophic factor and genetic risk in brain function”、第82回生理学会大会、2005.3、仙台

鳥光グループ

Keiichi Torimitsu, Neurology Overview, Proceeding of IMG2006, New Perspectives in Magnesium Research, Nutrition and Health, 333-337, October 22 (2006).

Kasai, N., Han, C. and Torimitsu, K., Multichannel detection of hydrogen peroxide released from a rat hippocampal slice, 10-IMCS Technical Digest, 20, Suppl.B, 764-765 (2004).

② ポスター発表（国内19件、海外13件）

- Shimada, A., Tobias, N., Kasai, N., Furukawa, U., Torimitsu, K., Obata, K., Yanagawa, U. and Tsumoto, T. Spontaneous activity of cultured mouse cortical neurons emerged through activation of GABAA receptors. *Neuroscience Research* 55, Supplement 1, S176 (2006)
- Furukawa, U., Kasai, N., Shimada, A., Torimitsu, K., Obata, K., Yanagawa, U. and Tsumoto, T. Effects of Mg²⁺ on neural activity of cultured cortical neurons of the rat and mouse. *Neuroscience Research* 55, Supplement 1, S213 (2006)
- Adachi, K., Kohara, K., Sohya, K. and Tsumoto, T. Differential trafficking of BDNF between axons and dendrites of cortical neurons. *Neuroscience Research* 52, Supplement, S132 (2005)
- Akaneya, Y., Sohya, K., Kitamura, A., Tsumoto, T. and Ziff, E. Involvement of ephrin/eph signaling and cell contact in hippocampal neuron maturation during early development. Program No. 601.7. 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience (2005)
- Kameyama, K., Hata, Y. and Tsumoto, T. Recovery from brief monocular deprivation-induced changes in the visual cortex of anesthetized and paralyzed kittens. *Neuroscience Research* 52, Supplement, S101 (2005)
- Kimura, F., Itami, C. and Tsumoto, T. Thalamocortical inputs to GABAergic cells are more susceptible to nicotinic enhancement than excitatory cells in mouse barrel cortex. *Neuroscience Research* 52, Supplement, S70 (2005)
- Maruyama, A., Yanagawa, U., Obata, K. and Tsumoto, T. Influences of neural activity on motility and dendritic development of cortical GABAergic neurons. The 83rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Gunma (2006.3)
- Sarihi A., Komaki A.-Reza., Jiang, B., Obata, K., Yanagawa, Y. and Tsumoto, T. Plasticity of excitatory synapses to GABAergic neurons in visual cortex. *Neuroscience 2006*, The 29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, *Neuroscience 2006 abstract CD*, Kyoto (2006.7)
- Huang, Y., Yasuda, H. and Tsumoto, T. Mechanism of heterosynaptic LTD in visual cortex of young mice. *Neuroscience Society Annual Meeting 2006*, Atlanta, Georgia, U.S.A (2006.10)
- Kameyama, K., Hata, Y. and Tsumoto, T. The shift of ocular dominance induced by a short monocular deprivation recovers in the anesthetized and paralyzed condition. *Society for Neuroscience 35th Annual Meeting*, Washington DC (2005.11)

仙波グループ

- Tokime K, Katoh-Semba R, Yamanishi K, Mizutani H Neurotrophins profiles in atopic dermatitis model mouse. Society for investigative dermatology meeting (St. Louis) 2005.
- Katoh-Semba R, Tsuzuki M, Matsuda M: Developmental changes of GDNF protein in selected brain regions and peripheral tissues of rats. International Society for Neurochemistry (Innsbruck) 2005.
- Sadakata T, Kakegawa W, Katoh-Semba R, Mizoguchi A, Shutoh F, Okamoto T, Tanaka M, Sekine Y, Yuzaki T, Nagao S, Itohara S, Furuichi T., CAPS2 is required for normal cerebellar development and function by regulating the release of BDNF and NT-3. Japan Neuroscience Meeting Satellite Symposium (Yokohama) 2005.

鳥光グループ

- Torimitsu, K., Furukawa, Y., Nakashima, H., Furukawa, K., Kashimura, Y., Hu, W. Nanobioscience –Neural functions and molecules-, *ICCE-II*, August 8-14, 2004, Hilton Head Island, U.S.A
- Suhara, W., Goto, T., Kobayashi, M., Torimitsu, K., Mikoshiba, K. and Fujimoto, I. Observation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor(IP3R) native tetramer structure by atomic force microscopy (AFM), *Annual Meeting Society for Neuroscience*, October 23-27, 2004, San Diego, U.S.A
- Torimitsu, K., Kasai, N. and Furukawa, Y. Effect of magnesium on neural activities in cultured rat cortical and hippocampal neurons, *8th European Magnesium Congress*, RSMR, May 25-28, 2004, Cluj-Napoca, Romania
- Han, C. and Torimitsu, K. Neural cell death and sprouting of mossy fibers are induced by kainic acid exposure in rat hippocampal slice cultures, *The 3rd International Symposium on Neuroscience*, Institute of Basic Medical Science of China, June 11-16, 2004 Guangzhou, China
- Torimitsu, K., Furukawa, K., Nakashima, H., Fujimoto, I. and Hu, W. Nano-Bio Science : From molecule to nano-bio device, 中国化学会第 24 回大会, April 24-27, 2004, 湖南長砂、中国
- Torimitsu, K. Nano-bio interface -neural and molecular functions-, *CIMTEC 2006, 4th Forum on New Materials*, 2006.6.4-6.9, Acireale, Italy
- Torimitsu, K. Neurons and receptor proteins for nano-bio interface, *CALIT 3rd Nano-Bio-Cogno Conv. Vision. Symp.*, 2006.9.13-9.16, Leuven, Belgium
- Torimitsu, K. Frontier Technologies for brain repair –Neurons and chips-, The Computational

Neuroscience research Cluster presents a special workshop on Neural Stem Cells & Frontier Technologies for Brain repair, December 1-3, 2006, Adelaide, Australia

鳥光慶一、古川由里子、河西奈保子、島田明佳、津本忠治「神経活動に及ぼす新経路因子の影響」SORST発表会、日本未来科学館、2004.10.6.

韓春錫、河西奈保子、鳥光慶一、Bicucullineによって誘発された海馬の神経細胞のアドトーチスとP/Q, L型カルシウムチャネルの関連について、第38回日本てんかん学会、静岡、2004.9.30.

鳥光慶一、古川由里子、河西奈保子、韓春錫、藤本一朗、培養神経細胞における細胞活動と神経栄養因子、Neuro2004, 第47回日本神経科学会・日本神経化学会、大阪国際会議場、2004. 9. 21.

河西奈保子、韓春錫、島田明佳、鳥光慶一、GABAA受容体阻害による神経細胞死における電位依存性カルシウムチャネルの関与、Neuro2004, 第47回日本神経科学会・日本神経化学会、大阪国際会議場、2004. 9. 22.

Nyberg, T., Kasai, N., Shimada, A., Han, C., Fujimoto, I. and Torimitsu, K. Polymer hydrogel electrodes for the study of neural network formation, Neuro2004, 第47回日本神経科学会・日本神経化学会、大阪国際会議場、2004. 9. 23.

韓春錫、河西奈保子、鳥光慶一、ラットの海馬スライス培養においてCA2-CA3aはbicucullineの刺激によって最も損傷を受けやすい領域の一つである、Neuro2004, 第47回日本神経化学会、日本神経化学会、大阪国際会議場、2004. 9. 23.

ハンチュンシ、河西奈保子、鳥光慶一、ラット海馬の苔状線維の発達におけるBicucullineの薬理作用、第80回日本生理学会2004. 3/24-26.

鳥光慶一、第24回日本マグネシウム学会総会 教育講演 「細胞内マグネシウムと神経」2004.11.27

古川由里子、鳥光慶一、小幡邦彦、柳川右千夫、津本忠治、GFP 遺伝子改変マウスを用いた GABA 作動性神経回路の形成、日本組織培養学会第79回大会、2006. 5. 24~26

古川由里子、河西奈保子、島田明佳、鳥光慶一、小幡邦彦、柳川右千夫、津本忠治、ラット及びマウス培養大脳皮質細胞活動に及ぼすマグネシウムの影響、第29回日本神経科学大会、2006. 7. 19~7. 21

島田明佳、Tobias Nyberg、河西奈保子、古川由里子、鳥光慶一、津本忠治、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回日本神経科学大会、2006. 7. 19~7. 21

(3) 特許出願 (国内3件、海外1件)

① 国内

津本グループ

出願番号 2006-312236

【発明の名称】 神経伸長促進剤と抑制剤および神経性疾患の改善剤・予防剤・治療薬

【発明者】 白木公康、浜結香、吉田与志博、津田正明、津本忠治、遠藤俊郎、高橋理明

【特許出願人】 財団法人阪大微研会、独立行政法人理化学研究所

【出願日】 平成18年11月17日

小島グループ

国内

【発明の名称】 変異 BDNF 遺伝子導入ノックインマウス

【出願番号】 2006-000397

【出願日】 平成18年1月5日

【発明者】 小島正己、他3名

【発明の名称】 神経細胞死促進因子および該因子を高感度に検出する方法

【出願番号】 2005-177093

【出願日】 平成17年6月17日

【公開日】 平成18年12月28日 (公開番号: 2006-345787)

【発明者】 小島正己、他4名

海外

【発明の名称】 変異 BDNF 遺伝子導入ノックインマウス (MUTANT BDNF GENE INTRODUCING KNOCKIN MOUSE)」

【出願番号】 11/649360

【出願国】 U.S.A.

【出願日】 平成19年1月4日

【発明者】 小島正己、他4名

6. 新聞報道等

津本グループ

“異なる働きの3種類の脳細胞 色分けして観察”、日刊工業新聞 平成19年2月22日 (記事)

“脳細胞 種類別色分け観察 情報処理解明に道”、科学新聞 平成19年3月2日 (記事)

小島グループ

“神経栄養因子の変異による神経変性”、読売新聞、平成17年7月（記事）

7. 結び

平成15年に終了したCREST研究では、発達脳視覚野の神経回路網が神経活動に応じて変わるメカニズム、特にBDNFの役割、に関してかなりの成果を得ることができた。例えば、蛍光蛋白質とBDNFの連結遺伝子を組み込んだプラスミドを培養神経細胞の核内に直接注入し、蛍光標識されたBDNFを生きた神経細胞内に発現させ、それが実際に動く様子をtime-laps image recordingで動画として解析することに成功した。本研究は、このCREST研究中に得られた蛍光蛋白質を発現する遺伝子改変マウスと特定の蛋白質を欠落しているノックアウトマウスの神経細胞からなるキメラ培養標本を応用してBDNF及びその関連分子の神経回路網形成における役割の解明を目指したものである。ただ、研究を進めるうちに、神経細胞培養標本の問題点も明らかとなり、大脳皮質の正常な神経回路網が保存されているスライス標本や*in vivo*の丸ごと脳に遺伝子改変細胞を組み込んだ標本をも開発した。その結果、正常或いは正常に近い神経回路網の中で一個或いは少数の細胞にだけBDNFを欠損させたり、抑制性ニューロンを興奮性ニューロンと分けてその活動を計測することに成功した。このように、細胞培養、スライス、*in vivo*と各レベルの標本において、目的の蛋白質を欠損或いは発現する細胞を組み込んだ神経回路の作成に成功したことによって、回路網形成メカニズムの解明に向けて有力な方法を提示することができた。

最後に、前述してきたように、CRESTの延長によって約3年半の間、寛大な財政的、事務的なサポートをいただいて新しい研究方法を開発し、またいくつかの新知見を得ることが出来たことは研究者として大変幸せであったと思う。このように機会を与えていただいたことに厚く感謝する次第である。