

戦略的創造研究推進事業
- CREST プログラム -

研究領域「脳を知る」

研究領域評価資料

平成17年3月16日

目次

	頁
1. 戦略目標	1
2. 研究領域	1
3. 研究総括	1
4. 採択課題 研究費	1
5. 研究総括のねらい	2
6. 選考方針	3
7. 領域アドバイザー	4
8. 研究領域の運営について	4
9. 研究を実施した結果と所見	5
10. 総合所見	8

添付資料

1. 主要業績 研究代表者が CREST の成果と認める論文	1
2. シンポジウム	6
3. 受賞	6
4. 外部発表及び特許出願数	6
5. プレス発表	7
6. 総括訪問記録	
平成 11 年度 (平成 10 年度採択者)	8
平成 12 年度 (平成 10・11 年度採択者)	18
平成 13 年度 (平成 11 年度採択者)	40
平成 14 年度 (平成 10 年度採択者)	49
平成 15 年度 (平成 11 年度採択者)	62
7. 中間評価結果	
平成 13 年度 (平成 10 年度採択者)	74
平成 14 年度 (平成 11 年度採択者)	82
8. 事後評価結果	
平成 15 年度 (平成 10 年度採択者)	90
平成 16 年度 (平成 11 年度採択者)	

1. 戦略目標

脳は多くの画期的な発見が行われる可能性を秘めている研究対象であり、21世紀に残された数少ない巨大フロンティアのひとつである。また、脳科学の進歩は、人間たる所以の根元である脳を知ることにつながり、脳を知るとは即ち人間を理解することにつながる。また、脳科学研究の成果は、脳の老化の防止、アルツハイマー病等脳・神経系の困難な病気の克服、脳の原理を生かしたコンピュータやロボットの開発による新技術・新産業の創出につながる。このような意味で脳科学の推進を図り、脳機能の理解を行うことは、正に人類的課題となってきた。

したがって、第二の戦略目標を、人間の理解の基礎として脳の働きを知るとともに新技術・新産業の創出にも繋がることを念頭においた「脳機能の解明」とする。

なお、この脳機能の解明を行うためには、脳の働きの理解を目指す「脳を知る」、脳の老化、疾病のメカニズムの理解と制御を目指す「脳を守る」、脳型の情報処理システムの理解と構築を目指す「脳を創る」といった研究領域において、明確な研究目標を設定し、計画的に取り組むことが必要である。

2. 研究領域

この研究領域は、脳機能の解明のうち、人間たる所以の根元である脳の働きの理解を目標とする研究を対象とする領域である。

具体的には、「脳の発生分化機構」「神経回路網の構造、機能と形成機構」「脳の高次機能（記憶、学習、意識、情動、認識と生体リズム等）」「コミュニケーションの脳機能」の解明を目標とする。

3. 研究総括

久野 宗（京都大学、自然科学研究機構生理学研究所 名誉教授）

4. 採択課題・研究費

平成10年度、11年度に「脳を知る」領域で採択された7件の研究提案は下記の表のとおりである。平成10年度には78件の応募があり、一次選考の書類審査により13件（約17%）が、二次選考の面接審査に推薦され、最終的に4件（約5%）の研究提案が採択された。平成11年度には63件の応募があり、書類審査により12件（約19%）が面接審査に推薦され、最終的に3件（約5%）が採択された。

採択年度	研究代表者	終了時所属・役職	研究課題名	総研究費 (百万円)
平成 10 年度	小西 史朗	三菱化学生命科学研究所 室長	抑制シナプス可塑性の分子 機構の解明とその応用	558
	清水 孝雄	東京大学大学院医学系研 究科 教授	脂質メディエーターの dual receptor 系と神経機能	736
	平良 眞規	東京大学大学院理学系研 究科 助教授	脳の初期発生制御遺伝子群 の体系的収集と機能解析	588
	津本 忠治	大阪大学大学院医学系研 究科 教授	回路網形成における神経活 動の関与メカニズム	513
平成 11 年度	重本 隆一	自然科学研究機構・生理学 研究所 教授	細胞膜上機能分子の動態と 神経伝達調節メカニズム	648
	丹治 順	東北大学大学院医学系研 究科 教授	行動制御系としての前頭前 野機能の解明	577
	八尾 寛	東北大学大学院生命科学 研究科 教授	学習・記憶のシナプス前性メ カニズムの解明	568
総 額				4,188

5. 研究総括のねらい

脳は生命科学に残された大きなフロンティアである。この分野の研究を推進する気運は世界的コンセンサスとなり、欧米では 1990 年に “Decade of the Brain” (脳の 10 年) が宣言された。日本でも 1993 年に「脳の世紀推進会議」が発足し、21 世紀の脳研究の戦略目標として「脳を知る」、「脳を守る」、「脳を創る」の 3 領域が設置された。

これに呼応して、科学技術振興機構の戦略的基礎研究 (Core Research for Evolutional Science and Technology: CREST) 推進事業においても 1995 年に戦略目標の一つとして、「脳機能の解明」が設定され、1997 年以降は「脳を知る」、「脳を守る」、「脳を創る」の 3 領域が独立して研究提案を募集することになった。

「脳を知る」研究領域の目的は「脳がどのように機能するかを理解を飛躍的に促進する」ことである。この領域における研究提案は新規で独創的なアイデアに基づいた国際レベルで優れた内容であることが要請される。脳の研究は統合機能の実態を総括的に把握することを試みることも、個々の神経細胞 (ニューロン) のレベルで解析することも可能である。さらに、目的に応じて、分子、遺伝子発現のレベルで探求することが求められることもある。いずれの手法を用いるにしても、新規な情報の探索のみでなく、(i) 問題提起が明瞭で、(ii) その研究成果によって脳機能の何が明らかになるかを具体的に予測した研究提案を歓迎

迎したい。

各研究代表者は5年間の研究期間に基づいた研究を企画し、その研究チームは数名から約20名の研究者によって構成される。研究を推進するために、必要に応じて、複数の研究機関からの共同研究者の参加を推奨する。

CREST プログラムの特徴の一つは研究助成金の額が他の一般科学研究助成金と比較して高額な点である。研究提案の内容のレベルは必ずしも研究助成金の額と比例しないが、高額な助成金がない限り実施できない研究が存在することも事実である。脳機能の理解を高めるには多角的に解析することが要請される。たとえば、目標とする脳機能を実施するために必要なニューロンの回路網とその活動パターンを電気生理学的手法によって解析し、回路網の活動に参与する伝達物質、修飾ペプチド、受容体分子を生化学的に同定し、これらのニューロンの実態を免疫組織学的に電子顕微鏡レベルで観察するといった多角的アプローチは有用な情報を提供するであろう。しかし、その実施には高額な研究費を必要とする。解析を機能の一面だけに限局すれば、当然、必要な研究費は少額になるが、情報量も減少し、大きなスケールの研究は望めない。

同一研究所で多角的な研究を実施することと、異なった手法を持つ多数の研究所の共同研究は必ずしも同じ結果とはならない。それは、共同研究では個々の研究グループ代表者の興味と目標が必ずしも同一にならないからである。その結果、基本的な研究目的が各研究代表者の異なった興味と目標によって逸脱される可能性がある。

上記のような論拠に基づいて、本研究総括は、スケールの大きな研究は一人の研究代表者によって企画されるべきと考える。スケールの大きな研究には高額な研究助成金を必要とする。したがって、比較的高額の研究助成金を準備して、それを有用に使用できる研究代表者による提案に提供するというCREST プログラムは、本研究総括には理想的なプログラムと思われる。

6. 選考方針

基本的な選考方針は優れた研究提案の採択である。したがって、研究提案は国際レベルにおいて十分に優れた内容であることが要請される。選考に際しては、特に、(i) 問題点が明瞭に提起されているか、(ii) 問題は具体的に提起されているか、(iii) 提案研究は、脳機能のどのような疑問点の理解に貢献するかが明記されているかを考慮した。

戦略目標の項に記載したように脳の研究は多種の手法に依存する。研究提案の選考に際しては、同様なアプローチを使用する類似した企画の採択が重複しないように配慮した。その結果、多様性に富んだ研究課題が採択された(第4項の表参照)。その結果、多様性に富んだ研究課題が採択された(第4項の表参照)。

7. 領域アドバイザーについて

脳研究の理解には広範な知識が要請される。したがって、研究提案を領域総括だけで評価することは不可能である。広範な研究領域にまたがり、多種、多彩な研究手法に依存した研究提案をより正確に理解するために下記の表に示した研究者に領域アドバイザーとしての参加を依頼した。アドバイザーの人選には、(1) その研究者が、専門分野においてトップクラスの業績を揚げていると評価されていること、(2) 各アドバイザーの専門領域に重複がないことを考慮した。その結果、平成 10 年度に 7 名のアドバイザーが選択されたが、その後、丹治教授、彦坂教授の辞任に伴って、平成 14 年度に伊佐教授がアドバイザーに参加した。さらに、研究代表者の中間業績の評価会議に際しては、アドバイザーの他に、外部評価委員として、群馬大学大学院医学系研究科の城所良明教授が参加した。

平成 10 年度から最終年度までに参加した領域アドバイザーは下記のとおりである。

アドバイザー名	終了時所属・役職	任期
金子 章道	星城大学リハビリテーション学部 教授	平成 10 年 4 月～ 17 年 3 月
小澤 瀨司	群馬大学大学院医学系研究科 教授	平成 10 年 4 月～ 17 年 3 月
御子柴 克彦	東京大学医科学研究所 教授	平成 10 年 4 月～ 17 年 3 月
水野 昇	自然科学研究機構 生理学研究所 所長	平成 10 年 4 月～ 17 年 3 月
村上 富士夫	大阪大学大学院生命機能研究科 教授	平成 10 年 4 月～ 17 年 3 月
伊佐 正	自然科学研究機構 生理学研究所 教授	平成 14 年 4 月～ 17 年 3 月
彦坂 興秀	順天堂大学医学部 教授	平成 10 年 4 月～ 13 年 3 月
丹治 順	東北大学大学院医学系研究科 教授	平成 10 年 4 月～ 11 年 3 月

8. 研究領域の運営について

領域の活動としては下記のように、研究代表者の研究室の訪問、研究成果の公開発表会、研究成果の評価を実施した。

(A) 研究室訪問： 研究代表者グループの研究状況を十分に把握するために、研究総括と技術参事は年に 1 回研究代表者の研究室を訪問し、3～5 時間にわたって研究成果の現況と

今後の計画についての説明を受け、その内容に関しての質疑応答を実施した。この結果は、訪問記としてまとめ（添付資料、「脳を知る」研究室訪問記録 No.1～No.5 参照）科学技術振興機構、「脳を知る」領域の各研究代表者、領域アドバイザーに送付した。

(B) 研究成果の公開発表会： 採択された研究提案は、採択後 3 年目からは、毎年シンポジウムの形式で研究成果を発表した。ときには、「脳を守る」「脳を創る」領域との合同シンポジウムも実施した。

(C) 研究成果の評価： 採択後 3 年を経過した時点で、研究総括、領域アドバイザー及び必要に応じて外部評価委員を加えて、各研究代表者と面接して研究成果を評価する会議を実施した。この結果は、中間評価報告書として作成し、事業団のホームページに掲載した。5 年間の研究終了後にも事後評価を実施する予定である。

9．研究を実施した結果と所見

平成 10 年度、11 年度に「脳を知る」領域で採択された研究提案の実施において特筆すべき事項は下記のとおりである。これらの事項は、(A) 研究課題における特記すべき研究成果と、(B) 研究実施において偶発的に経験した特記すべき事項に分けて記載する。

(A) 研究課題における特記すべき研究成果： 本資料に記載される研究課題は、第 4 項の表に示した 7 課題である。以下、これら 7 件の研究課題の内容の概要を記載する。

(1) 小西史朗グループ

このグループの研究課題は小脳の抑制性シナプスの解析である。この研究において、
(i) 小脳皮質のモノアミン系ニューロンが、抑制性ニューロンからの GABA の放出を増強し、
(ii) 登上線維から放出される興奮性伝達物質が抑制性ニューロンからの GABA 放出を阻害し、
(iii) 小脳において放出された GABA は GABA_B 受容体を介して、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) で仲介されるシナプス応答を増強することが見出された。このように、小脳 GABA シナプスの伝達は複数の伝達物質によって制御されている。

(2) 清水孝雄グループ

このグループの研究課題は脂質メディエーターによる生体内のシグナル伝達とその機能的意義に関する解析である。本研究では、最初、その代表的分子、細胞質型ホスホリパーゼ (cPLA2 α)₁ の生理的、病理的意義の解析を実施した。cPLA2 α 欠損マウスでは、海馬の長期増強は正常に発現するが、長期抑圧が消失した。この研究に関連して、新規の短縮型ホスホリパーゼ A2 が見出された。この分子はカイニン酸投与による痙攣発作時に海馬歯状回に特異的に発現するので、kainate-inducible dentate specific cPLA2 (KIDS

cPLA2)と命名された。KIDS の発現は cPLA2 α 欠損マウスでも見られた。したがって、KIDS cPLA2 は cPLA2 α t とは異なったプロモーターを持ち、刺激に応じて、歯状回に特異的に発現すると推測された。

(3) 平良真規グループ

このグループの研究課題は、アフリカツメガエル予定脳領域に発現する遺伝子を収集して、脳の初期発生過程を解析することを目的とする。頭部オーガナイザー領域にはその部位特異的な転写因子 Xlim-1 が存在し、脳誘導活性に関与すると示唆されている。この情報に基づいて、Xlim-1 の標的遺伝子の同定を試み、その発現調節の機構を解析した。

(4) 津本忠治グループ

このグループの研究課題は、脳内神経回路網の形成過程の解析である。この過程は遺伝情報に依存するプロセスと、神経細胞の活動に依存するプロセスが存在する。本研究はその後者のメカニズムを、主として、大脳視覚領野を対象として解析した。これを目的として、in vivo in vitro (中枢スライス標本、培養細胞) の標本を用いて多角的な研究を実施した。その結果、神経機能の可塑的変化の研究に新しい局面を開いた。特に、BDNF と GFP の連結遺伝子をニューロンの核内に注入する手法により、BDNF の動態を観察し、ニューロン・シナプス機能の発達に対する BDNF の影響を定量的に解析することに成功した。

(5) 重本隆一グループ

このグループの研究課題は細胞膜上の酵素、受容体、イオンチャネルなどの機能分子の局在、動態、相互作用を微細形態の定量的解析によって探索することを目的とする。この目的のために、高解像度の形態観察の手法を開発し、必要に応じて電気生理学的記録を併用した。SDS-FRL と呼ばれる手法は、凍結細胞膜断面に残存するタンパク分子の分布を免疫染色法により観察する手法で、高感度の機能分子解析法としてこのグループにより開発された。さらに、AMPA グルタミン酸受容体分子を標識し、シナプスにおけるその密度を定量し、電気生理的解析結果と比較検討した。

(6) 丹治順グループ

このグループの研究課題は日本サルの大脳皮質前頭前野における認知、記憶、行動計画、運動発現の機序の解析を目的とする。このために、高次運動野から単一ニューロンの電気的活動を記録し、大脳皮質のどの領野が行動発現のどの位相に一致するかを検討した。この結果から、前頭前野のニューロンの機能は、一次運動野と異なり、運動実施に参与するだけでなく、行動課題の統合過程を表現していると推測された。さらに、前頭前野のニューロンは認知情報の順序・時間構造に関与すること、また、回数情報処理にも参与することが観察された。

(7) 八尾寛グループ

このグループの研究課題は海馬のシナプスを対象として、その伝達と可塑的变化の機構の解析を目的とする。伝達物質の放出はシナプス前神経終末端の興奮に伴う Ca^{2+} の流入に依存し、その可塑的变化はタンパク分子のリン酸化に依存する。本研究では、単一シナプス終末端における Ca^{2+} の動態を Ca^{2+} 感受性蛍光色素によって観察した。さらに、リン酸化に参与するタンパク質キナーゼの解析を計画している。神経終末端の Ca^{2+} チャンネルには L タイプ、N タイプ、P/Q タイプ、R タイプの存在が知られている。R タイプの Ca^{2+} チャンネルは N タイプと比較して、伝達物質放出連関度は低いという結果が観察された。また、4 種類の Ca^{2+} チャンネルタイプの分布は神経終末端により異なり、N タイプチャンネルの占める比率は終末端によって 10% から 40% の変異を示した。

(B) 研究実施において偶発的に経験した特記すべき事項：

(1) 重本隆一グループと九州大学グループの共同研究

重本隆一研究代表者のグループは同教授以外に 23 名の研究員が参加し、さらに、岡部繁男グループ(3 名)と久保義弘グループ(7 名)の共同研究員によって研究体制が構成されている。重本隆一教授は、また、九州大学理学部の伊藤功助教授のグループとも共同研究の成果を発表している。この共同研究は偶然のいきさつから実施されたのであるが、興味ある経験であるから、以下、その経過を記載する。

2001 年の日本生理学会は京都で開催された、その初日のポスターセッションで、本研究総括は九州大学理学部の伊藤功助教授の発表を聞く機会に恵まれた。この発表は、左右の海馬神経回路は対称的でないことを示唆する実験結果であった。結論は興味ある概念であり、それを示唆する機能的解析の結果も、納得はできたが、回路が左右対称でないという解剖学的結果は示されていないかった。本研究総括は、これを解剖学的に証明できる適任者は、重本隆一教授ではないかと考えて、伊藤功助教授に重本教授と相談することを勧めた。伊藤功助教授は率直に、その翌日、重本教授に研究結果を説明し、その数週間後には共同研究の計画の運びとなった。

この共同研究はその後、順調に進行して、その成果は 2003 年 5 月の Science に掲載された。この両グループの研究者の科学に対する真摯な態度は高く評価される。

10. 総合所見

第 6 項に記載した選考方針にしたがって採択された 7 題の研究課題はそれぞれ異なった研究アプローチを特徴としたもので、結果として、この領域に多様性に富んだ脳研究の活性をもたらした。長い研究歴史と膨大な数の研究者によって貢献されてきた脳研究

の領域に必要な情報は現象学的知識でなく、脳の動的機構である。この情報を獲得するには特定の専門領域における解析だけでは不十分である。脳機能の理解を促進するに必要な研究は多角的なアプローチである。この意味で、この領域で採択された 7 題の脳研究課題が専門領域の異なった研究代表者の提案であったことは有意義な結果であった。また、多数の応募から採択された研究課題は約 20 倍の競争率の結果であり、これは選ばれた研究課題のレベルが十分に高いことを反映している。

アメリカ合衆国の科学研究推進機構として重要な位置を占めるシステムとして NIH (National Institutes of Health: 国立衛生研究所) から支給される科学研究費がある。これは非常に大きな規模の研究助成金で、アメリカ合衆国で研究に従事するほとんどすべての研究者がこの助成金を申請し、その助成に依存して研究を実施している。これに相当する本邦のシステムは「科学研究費」と呼ばれる助成金であるが、これには、助成金額によって A、B、C のランキングに分かれる。その金額は A を除いては、NIH からの助成金額と比較してかなり少い額で、これによって大きな規模の研究を実施することは困難である。これに対して、CREST プログラムにおいて支給される額は NIH からの助成金と比較し得るレベルにあり、本邦の他の研究費支給額とは有意に異なっている。

先に記載したように(5. 研究総括のねらい、参照) 高額の研究費が支給されると、研究への多角的なアプローチが可能となり、研究に投入する人材の規模を拡張することが可能となり、高度の能率を持つ研究機器の購入が可能となる。その結果、それまで不可能であった研究を実施することが可能となり、また、研究実施のスピードを早めることも可能である。このような状況を獲得できることは極めて幸いなことである。本研究総括は 1954 年に大学を卒業して、研究生活を開始したが、当時はまだ、第 2 次世界大戦の影響が残存し、本邦の国民の生活レベルも、大学の研究レベルも現在とは比較ができないほど低く、優れた科学への挑戦は、ただ夢のような状況であった。生活のレベルと研究レベルは、それでも、1970 年頃までには期待できるほどまでには回復したが、研究助成のレベルアップはその後長く見られず、日本の科学研究は予想以上に長期間にわたって低迷を続けた。本研究総括は、アメリカ合衆国に約 20 年滞在し、1980 年に日本に帰国したが、いま、振り返って、1980 年の日本の研究助成システムですら、現在とは、比較できないほど、次元の低いものであったことが記憶に残っている。

日本の大学および、各研究室の研究財政の状況は 10 年前と比較して、明らかに質的に向上した。これは、明らかに、日本政府あるいは公共機関による積極的な研究助成への関心が高まった結果と考えられ、そのような情勢が実現したことに感謝の意を表したい。

添付資料

1. 主要業績：研究代表者が CREST の代表的成果と認める論文

小西史朗 研究代表者

「抑制性シナプス可塑性の分子機構解明とその応用」

1. Saitow F., Murakoshi T., Suzuki H. & Konishi S. Metabotropic P2Y purinoceptor-mediated pre- and post-synaptic enhancement of cerebellar GABAergic transmission. *Journal of Neuroscience* in press 2005.

小脳 GABA シナプスの制御機構を理解するため、これまで未知であったプリン受容体の役割を検討し、P2Y プリン受容体サブタイプが刺激されると GABA 伝達の短期および長期増強が起こることを示し、その誘発機構を明らかにした。

2. Hirono M., Yoshioka T. & Konishi S. GABA_B receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses.

Nature Neuroscience 4, 1207-1216, 2001.

小脳介在ニューロンから放出された GABA は GABA_B 受容体活性化に続き代謝型 mGluR1 グルタミン酸受容体機能を促進し、mGluR1 で仲介される興奮性シナプス応答を増強することを示し、受容体間クロストークの明瞭な最初の例を提唱した。

3. Satake S., Saitow F., Yamada J. & Konishi S. Synaptic activation of AMPA receptors inhibits GABA release from cerebellar interneurons.

Nature Neuroscience 3, 531-558, 2000.

これまで専ら興奮性シナプス反応を仲介すると信じられていた AMPA 型グルタミン酸受容体は、興奮だけでなく抑制を起こし、小脳介在ニューロンからの GABA 放出を阻害する前シナプス抑制を仲介することを初めて明瞭に証明した。

清水孝雄 研究代表者

「脂質メディエーターの dual receptor 系と神経機能」

1. Tokuoka, S. M., Ishii, S., Kawamura, N., Satoh, M., Shimada, A., Sasaki, S., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris, A., and Shimizu, T.

Involvement of Platelet-Activating Factor and LIS1 in Neuronal Migration.

Eur. J. Neurosci. 18, 563-570, 2003.

血小板活性化因子受容体欠損マウスを解析すると小脳原基の発育に異常が認められた。そこで、小脳の顆粒細胞を培養して血小板活性化因子の作用を見たところ、顆粒細胞の遊走を制御していることがわかった。これは PAF 分解酵素の一つである Lis-1 遺伝子の欠損が脳無回症を引き起こすことと関連すると考えられる。

2 . Nagase, T., Uozumi, N., Ishii, S., Kita, Y., Yamamoto, H., Ohga, E., Ouchi, Y. and Shimizu, T. A pivotal role of cytosolic phospholipase A2 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Nature Med.* 8, 480-484, 2002.

ブレオマイシンの様な抗ガン剤を用いると皮膚、肺、脳、肝などに著しい線維化を引き起こすことが知られている。我々のグループで作成したホスホリパーゼ A2 欠損マウスを解析したところ、この様な線維化がほとんど起こらず、阻害剤が治療や線維化の防止に使える可能性を示した。

3 . Taniguchi, M., Nagao, H., Takahashi Y.K., Yamaguchi, M., Mitsui, S., Yagi, T., Mori, K. and Shimizu, T. Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A-deficient mice. *J. Neurosci.* 23,1390-1397, 2003.

神経軸索ガイダンスに関与するセマフォリン欠損マウスを解析したところ、嗅脳の形成異常が認められ、匂い地図が著しく損なわれていた。遺伝子欠損マウスで匂い地図の異常を示した最初の報告となった。

平良真規 研究代表者

「脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析」

1. Shibata, M., Itoh, M., Ohmori, S.-y., Shinga, J. and Taira, M. Systematic screening and expression analysis of the head organizer genes in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* 239, 241-256, 2001.

脳を誘導する頭部オーガナイザーに特異的に発現する遺伝子を単離するため、部分塩基配列 (EST) と発現パターンのデータベースを構築し、体系的検索を行った結果、7個の新規遺伝子を同定した。現在これらの遺伝子の機能解析を進めているが、それにより脳の誘導とパターン形成がより明らかになることが期待される。

2. Osada, S.-I., Ohmori, S.-y. and Taira, M. XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development* 130, 1783-1794, 2003.

外胚葉外植体の神経化活性を指標にした体系的検索により、前部神経外胚葉 cDNA ライブラリーより核内膜蛋白質の遺伝子 MAN1 を単離した。MAN1 はヒト膠原病の自己抗体が認識する蛋白質として同定されていたものであるが、機能は全く未知であった。解析の結果、MAN1 は Smad1 と結合する BMP (骨形成因子) シグナルの負の修飾因子であること、および神経胚期の脳予定領域の形成に必要であることが示された、核膜蛋白質がシグナル伝達に関与することが示唆された最初の報告である。

3. Hikasa, H., Shibata, M., Hiratani, I. and Taira, M. The *Xenopus* receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* 129,5227-5239, 2002.

オーガナイザーと後方神経組織に発現する遺伝子レセプターチロシンキナーゼ Xror2 を同定した。機能解析を行った結果、Xror2 は Wnt11 と結合し、協調的に non-canonical Wnt シグナルを増強することが示された。このことより Xror2 は、原腸陥入の際の後方組織の収斂伸張運動を制御することで、神経管形成に関与することが示唆された。

津本忠治 研究代表者

「回路網形成における神経活動の関与メカニズム」

1. Hata, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Wakita, M., Fukuda, M. and Tsumoto, T.

BDNF expands ocular dominance columns in visual cortex in monocularly deprived and non-deprived kittens, but does not in adult cats. J. Neurosci., 20 RC57, 1-5. 2000.

脳由来神経栄養因子 (BDNF) が大脳皮質視覚野に存在する眼優位円柱を拡大すること及びこの作用は生後の感受性期にある仔ネコでみられるが、成ネコでは存在しないことを発見した。この結果は、BDNF が感受性期にのみ見られる大脳皮質の円柱状構造の可塑性に関与していることを示唆したものである。

2. Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M. and Tsumoto, T. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons.

Science, 291, 2419-2423, 2001.

神経回路形成に関与する神経栄養因子は標的細胞から放出され逆行性に作用すると想定されていたが、本研究では緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識した分子の動態を生きた細胞で観察するという新しい方法を適用し、BDNF は神経活動によってシナプス前細胞から後細胞へ順行性に移行して作用を発揮することを明らかにした。

3. Kohara, K., Kitamura, A., Adachi, N., Nishida, M., Itami, C., Nakamura, S. and Tsumoto, T. Inhibitory, but not excitatory cortical neurons require presynaptic BDNF for dendritic development, as revealed by chimera cell culture.

J. Neurosci., 23, 6123-6131, 2003.

抑制性ニューロンの樹状突起発達は入力してくるシナプス前部から放出される BDNF に依存しているが、興奮性ニューロンはそのような依存性を示さないことを、内因性 BDNF の細胞間移行を容易に検出できる BDNF 欠損マウスと GFP 発現マウスの神経細胞共培養標本を使って明らかにした。BDNF は神経活動によって移行するので、この結果は抑制性ニューロンの発達が神経回路発達を神経活動依存的にする主な因子であることを示したものである。

重本隆一 研究代表者

「細胞膜上機能分子の動態と神経伝達調整メカニズム」

1. Kawakami-R*, Shinohara-Y*, Kato-Y, Sugiyama-H, Shigemoto-R, Ito-I. * equal

contribution Asymmetrical allocation of NMDA receptor e2 subunits in hippocampal

circuitry. Science. 300:990-994, 2003.

分子レベルで脳の左右差が存在することを明確に示した初めての仕事。NMDA 受容体の NR2B サブユニット量が左右の海馬錐体細胞の同種のシナプスで異なることを機能的および生化学的に示した。今後この受容体局在の左右非対称性に基づく脳機能の非対称性が証明されれば、歴史に残る大きな仕事となろう。

2. Ebihara-T., Kawabata-I., Usui-S., Sobue-K., and Okabe-S. Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with GFP.

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

シナプス後肥厚部(PSD)の構成蛋白質である PSD95 および PSD-Zip45 の動態を解析し、シナプス後部構造の長期的なリモデリングの過程を明らかにした。これにより細胞全体での同期したシグナルにより起こる PSD 蛋白質クラスターの分布変化を見出し、シナプスリモデリングが細胞全体に作用する global なシグナル系によって強く制御される事を発見した。

3. Tateyama-M., Abe-H., Nakata-H., Saitoh-O and Kubo-Y. Ligand-induced rearrangement of the intracellular dimeric conformation of metabotropic glutamate receptor1a. Nature Structural & Molecular Biology 11, 637-642, 2004

代謝調節型グルタミン受容体 mGluR1 の構造変化を、FRET により光生理学的に捉えることに成功した。リガンド投与により mGluR1 サブユニット内部では明らかな構造変化は起こらないが、二量体サブユニット間の相対的配置が変化することを発見した。これにより生細胞における膜機能蛋白分子の動的構造変化のリアルタイム測定法を確立した。

4. Tanaka-J, Matsuzaki-M, Tarusawa-E, Momiyama-A, Molnar-E, Kasai-H and Shigemoto-R. Number and density of AMPA receptors in single synapses in immature cerebellum. J. Neurosci., in press 2005.

小脳プルキンエ細胞シナプスの 2 光子レーザーによるグルタミン酸刺激、そのシナプスの電子顕微鏡観察、および凍結切断レプリカ標識法を組み合わせ、AMPA 型グルタミン酸受容体の数と密度を単一シナプスにおいて初めて明らかにした。受容体の数とシナプス面積が比例関係にあり、レプリカ標識が受容体 1 分子をほぼ 1 対 1 の効率で検出できることを明らかにした。

丹治 順 研究代表者

「行動制御系としての前頭前野機能の解明」

1. Hoshi, E., Tanji, J. Integration of target and body-part information in the premotor cortex when planning action. Nature. 408:466-470, 2000.

大脳の運動前野の機能を、細胞活動特性から明確に提示した研究報告。動作企画の段階において、動作対象（ターゲット）の情報と、動作に用いられるべき身体部位の情報を統合

する過程を、時間を追って定量的に明示することに成功した。

2. Hoshi, E., Tanji, J. Area-selective neuronal activity in the dorsolateral prefrontal cortex for information retrieval and action planning.

J Neurophysiol. 91: 2707-2722, 2004.

前頭前野外側の細胞活動は、単なる記憶情報の短期的貯蔵にとどまらず、知覚情報から行動に必要な情報を抽出し、さらにその情報を変換して動作情報を生成する過程に関与することを明示した。その際、腹側から背側の領域にかけて情報処理が進行することも見出した。

3. Saito N, Mushiake H, Tanji J. Representation of immediate and final behavioral goals in the monkey prefrontal cortex during an instructed delay period.

Cereb Cortex. in press 2005.

前頭前野は将来行うべき行動に際して、その動作自体を企画しているのではなく、むしろ行動の結果を得るのに必要な情報を生成することに関与することを見出した。具体的には、行動の目標と、その目標にいたる過程という情報表現が細胞活動にすることを明示することが出来た。

八尾 寛 研究代表者

「学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明」

1. Ohnishi, H., Yamamori, S., Ono, K., Aoyagi, K., Kondo, S., and Takahashi, M.

Src family tyrosine kinase inhibits neurotransmitter release from neuronal cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 10930-10935. 2001.

リン酸化による神経伝達物質放出の抑制的機構を示した最初の論文。

2. Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A. PKC signaling for global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons is triggered by local contact with astrocytes. Neuron 41:405-415. 2004.

アストロサイトとの接触により、マイクロアイランド上に培養した海馬神経細胞において、インテグリン- Ca 非依存性フォスホリパーゼ A_2 - アラキドン酸 - 蛋白質キナーゼ C という細胞内情報伝達系を介して、オートプス形成が増強されることを示した。

3. Kamada M, Li R-Y, Hashimoto M, Kakuda M, Okada H, Koyanagi Y, Ishizuka T, Yawo H. Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. Eur J Neurosci 20, 2499-2508. 2004.

海馬のスライス培養において、生後のニューロン新生が顆粒細胞層で自発的におこなわれ、そのあるものは顆粒細胞に分化することを証明した。

２．シンポジウム

	日 時	場 所	参加者数	備 考
第 1 回	2001 年 4 月 27～28 日	京都国際会館 口演：13 題 ポスター発表：126 題	420 人	「脳を守る」領域との合同開催
第 2 回	2002 年 11 月 25～26 日	京都国際会館 口演：21 題 ポスター発表：128 題	311 人	「脳を知る」(東京) 領域との合同開催
第 3 回	2003 年 10 月 30 日	日本科学未来館 口演：10 題 ポスター発表：71 題	220 人	
第 4 回	2004 年 10 月 7～8 日	日本科学未来館 口演：16 題 ポスター発表：62 題	280 人	「脳を知る・守る・創る」領域の合同開催
	9 日	日本科学未来館	300 人	一般者を対象としたシンポジウム(講演 2 題・パネルディスカッション・特別展示 15 題)

３．受賞

受賞者	賞の名称	受賞年
清水 孝雄	Ernst Schering Award(ドイツ科学賞)	2000 年
清水 孝雄	日本医師会医学賞	2000 年
清水 孝雄	持田記念学術賞	2001 年
清水 孝雄	武田医学賞	2003 年
清水 孝雄	上原賞	2004 年
横溝 岳彦	日本生化学会奨励賞	2001 年

４．外部発表及び特許出願数

2005 年 1 月 31 日 現在

採択年度	研究代表者	論文(和文)	発表(国内)	特許(国際)
平成 10 年度	小西 史朗	18 (4)	101 (75)	1 (0)
"	清水 孝雄	67 (1)	125 (92)	2 (2)
"	平良 真規	21 (0)	72 (66)	1 (0)
"	津本 忠治	42 (9)	129 (85)	2 (0)
平成 11 年度	重本 隆一	56 (2)	131 (119)	0
"	丹治 順	34 (2)	64 (47)	0
"	八尾 寛	55 (3)	162 (138)	3 (3)

5 . プレス発表

研究代表者	見 出 し	論 文	備 考
丹治 順	大脳皮質の運動前野で“ 動作のプランニング ”情報を統合する細胞活動を発見	Nature 408:466 - 470, 2000	
津本 忠治	神経回路の形成や発達に重要な脳由来神経栄養因子(BDNF)の予想外の動きを観察	Science 291:2419 - 2423, 2001	
丹治 順	数を表現する大脳の細胞活動を発見	Nature 415:919 - 922, 2002	
平良 眞規	ノウダラケ、新規 FGF レセプター関連遺伝子は脳組織をプラナリアの頭部領域に限局するのに関与する	Nature 419:620 - 624, 2002	CREST チーム以外との共同発表
重本 隆一	障害を受けた脳神経細胞が修復される可能性が出て来た	Cell 110:429 - 441, 2002	CREST チーム以外との共同発表
津本 忠治	サイレントシナプスが目を覚ます	PNAS 100:13069 - 13074, 2003	CREST チーム以外との共同発表
重本 隆一	脳の左半球と右半球の違いを分子レベルで解明	Science 300: 990 - 994 , 2003	CREST チーム以外との共同発表
八尾 寛	グリア細胞の接着によって完成する神経細胞の成熟	Neuron 41:405 - 415, 2004	
重本 隆一	受容体サブユニットの配置変換がシグナルを仲介“ 受容体の構成成分が動く ”	Nature Structural & Molecular Biology 11:637 - 642,2004	

6．総括訪問記録

1．平成 11 年度

研究代表者：小西 史郎 三菱化学生命科学研究所

研究課題：抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明とその応用

訪問日時：1999 年 12 月 9 日（木） 14：00～17：00

「研究要旨」

研究代表者は小脳の抑制性 GABA シナプスはモノアミン作動性入力活動により長期増強を受けることを見いだした。同様な現象は、扁桃体においても観察され、内在性抗不安機構との関連の可能性が示唆された。本研究は、抑制性シナプスの可塑性の基盤となる分子機構を機能的、形態的の両面から解析し、情動、不安に関する新薬の開発まで発展させることを目的とする。

「研究進行状況」

（1）小脳 GABA シナプスの調節機構の解析：

小脳皮質のバスケット細胞(BC)からプルキンエ細胞(PC)への GABA シナプスを対象として、この両細胞に同時パッチ電極記録を実施した。この条件下で、1 個の BC の自発性興奮に一致して、PC に抑制性シナプス電流(IPSC)が観察された。BC からの神経終末端は約 5 μm で、1 個の PC に対して 10～20 個の BC が収斂していることが見いだされた。アイソプレテレンール(ノルアドレナリン、NE、 β 受容体アゴニスト)を投与すると、BC の放電頻度と PC の IPSCs 発生頻度が上昇した。BC には I_h 電流(過分極活性型陽電流)が見られ、この電流は NE あるいはフォースコリンによって増強した。したがって、NE は cAMP を活性化することにより I_h を促進し、その結果、BC を脱分極すると推定された。事実、 I_h のブロッカー(ZD7288)によりアイソプレテレンールの効果は抑制された。しかし、刺激によって誘発した IPSCs もアイソプレテレンールにより増強し、この増強は I_h の変化によるのではなく、他の機構に依存することが示唆された。

一方、BC から PC への IPSCs は climbing fiber の反復刺激を先行することにより減弱した。この現象は paired-pulse ratio の変化、IPSPs の fluctuations の大きさの変化から前シナプス機構に依存することが示唆された。この効果は AMPA レセプターの選択的ブロッカーの投与により抑制され、AMPA レセプターの desensitization を除去するとこの効果が増強した。これらの結果から予測されるように、AMPA を投与すると、濃度依存性に GABA の抑制シナプス応答が減弱した。したがって、climbing fiber から放出されたグルタミン酸は BC の神経終末端の AMPA レセプターに作用して終末端からの GABA の放出を抑制すると推定された。この効果は、climbing fiber から PC への興奮性伝達をさらに促進すると仮定される。これに対して、parallel fiber からのグルタミン酸作動性興奮性入力に GABA 抑制シナプスに影響を与えなかった。

（2）扁桃体における GABA_B 受容体によるシナプス調節機構：

扁桃体スライス標本の神経細胞はその大きさによって 3 種類に分類できる。その最も大

きい細胞群は pyramidal neuron と考えられる。このニューロン群は周辺の刺激に対してグルタミン酸性興奮応答と GABA 性抑制応答を示した。この標本にバクロフェン(GABA_B アゴニスト)を投与すると、グルタミン酸性シナプス応答も GABA 性抑制シナプス応答も前シナプス性に減弱した。また、グルタミン酸性 EPSCs を誘発して、GABA ニューロンを刺激すると、EPSCs は 1 秒以上にわたって抑制された。この抑制効果は GABA_A 拮抗剤 (バイキユクリン) に影響されず、GABA_B レセプター拮抗剤によってブロックされた。この抑制効果は paired-pulse ratio の解析から前シナプス性抑制であることが示唆され、paired-pulse ratio の変化も GABA_B レセプター拮抗剤によりブロックされた。

これらの結果は、抑制ニューロンから放出された GABA がグルタミン酸作動性ニューロン終末端の GABA_B レセプターを介して、前シナプス性抑制を誘発することを示す。この GABA_B レセプターを媒介とする前シナプス性抑制の機構は明らかでない。TTX 存在下でバクロフェンを投与すると、mIPSCs の頻度が減少するが、Ca²⁺チャネルブロッカー (Cd²⁺) では影響されなかった。また、グルタミン酸性興奮性シナプス応答はフォースコリンによって増強され、この条件下ではバクロフェンによる抑制が減弱したが、Cd²⁺ではそのような減弱が見られなかった。これらの結果から、シナプス前終末端の GABA_B レセプターの活性化は cAMP を抑制し、その結果、Ca²⁺チャネルとは独立的にグルタミン酸の放出を減弱すると推測した。

最近、タキカニン受容体と抗不安の関連が注目されているので、扁桃体におけるタキカニンレセプターの機能を検討した。扁桃体のニューロンから自発性 GABA シナプス応答を記録して、サブスタンス P あるいはその類似体誘導体を投与すると低濃度でその頻度が著明に増加した。扁桃体のタキカニンレセプターの mRNA を RT-PCR により定量すると、NK1、NK3 が検出された。これらのレセプターの関与とその機構を今後検討する予定である。

(3) 不安関連因子同定の進行状況：

恐怖条件付けによってラット扁桃体に発現する mRNA をサブトラクション法により同定することを試みた。これまで報告されているように、神経系の活性に伴って発現する遺伝子 (シトクロ - ム b、シトクロ - ム c オキシダ - ゼなど) の同定が再確認された。この手法により、現在まで、50 以上の cDNA が得られた。

遺伝子の探索と共に恐怖条件付けにより発現するタンパクを二次元電気泳動法により同定することも試みた。新たに発現するというタンパクは見られなかったが、条件付けにより著明に増加するタンパクが 50 種類ほど検出された。

(4) シナプス伝達の素量子解析手法の開発：

シナプスの可塑的变化が前シナプス性あるいは後シナプス性に発現するかの解析には量子的手法が理想的であるが、中枢シナプスでは満足すべき手法がまだ開発されていない。この問題にアプローチするために、小脳の単一 BC 細胞に対する応答を PC 細胞から記録した。このようにして記録した IPSCs の振幅を測定し、ヒストグラムを作成した。従来の解析では、伝達物質の放出のモデルを仮定して実施されてきたが、その結果はモデル依存性であり多くの不確定な要素を含んでいる。本研究では、特定のモデルを仮定せずに振幅の

分布を数学的に記載した(nonparametric method)。この方法により記載した振幅分布には複数のピークが見られ、この隣接ピーク間の平均距離(振幅)を量子サイズ(約 50pA)として算出した。

このようにして推定した量子サイズは後シナプス細胞の過分極により増大したが、ヒストグラムの分布の形あるいは failure の数は影響されなかった。外液の Ca^{2+} 濃度を低下させると、failure の数が増加し、分布は左方に移行するが、量子サイズは影響を受けなかった。これらの結果は、本法によって測定した量子サイズの妥当性を支持する。この方法により、アイソプレテレンールの作用を検討すると(上記 1 の項参照) failure の数が減少し、振幅分布のピークの位置には大きな変化が見られなかった。したがって、その変化は前シナプス性と結論される。この方法では、少なくとも量子サイズの変化を検出することはできるが、他のパラメーター(例えば m など)を測定することはできないので、現在、さらに検討中である。

(5) 抗不安薬物の探索:

本研究課題の究極の目的は情動、不安に対する新薬を開発することであり、現在、5-HT₄ レセプターリガンドの探索を計画している。このリガンドのスクリーニングを実施する目的で、ヒト型の 5-HT₄ の cDNA クローニングを実施した。このクローンを用いて、レセプターを HEK293、PC12 に発現させる準備を進めている。しかし、この実施にはスクリーニングのための大規模な compound library が必要である。三菱田辺製薬会社は 100%の特許申請権がない限り compound library の提供には協力しない意向であるから、事実上、この計画の実施は不可能と思われる。新薬の開発には、毒性検査、薬効検査など time consuming な多大の労力を必要とするので、academic な研究室での実施は容易ではない。

また、5-HT₄、5-HT₆ リガンドに関しては既に多数の製薬会社が開発し、特許も申請している。このような事情を考慮に入れて、新薬の開発の目的は何か、その実施が本当に現実的か、その価値があるかの再検討が必要と思われる。

「総合評価」

電気生理的解析は型どおりではあるが、非常に困難と思われる高度な手法をマスタ - して緻密な解析を実施している点が印象的である。小脳、扁桃体で多数の新たなシナプス調節の現象を見いだしたことが研究の発端であり、これらの現象の機構を明らかにするために詳細、緻密な解析を実施していることは高く評価できる。しかし、同様な現象が多く、これらの解析をどこまで進めるのか、その解析の結果をどのように発展させるのか明らかでない。究極の目的は何かを明確にすることが望ましい。特に、初期に計画した新薬の開発が予想と異なった状況になったので、早い段階で、長期の研究計画の再検討が望ましい。5-HT₄ に関しては、リガンドスクリーニングの計画を中止し、ロックアウトマウスの behavioral tests を重視するのにも一案かもしれない。

研究代表者：清水孝雄 東京大学大学院医学系研究科

研究課題：脂質メディエーターの dual receptor 系と神経機能

訪問日時：1999 年 11 月 17 日(水) 14:30~17:30

「研究要旨」

炎症メディエーターとして知られていた脂質メディエーターは神経・内分泌機能の調節にも参与することが示唆された。本研究は脂質メディエーターの脳機能における役割を解析することを目的とする。特に、脂質メディエーターは細胞膜のレセプター（G-タンパク共役型）と核内レセプターに結合する可能性があり、この dual receptor 系を介しての細胞内シグナル伝達過程の詳細と特異性を研究対象とする。

「研究進行状況」

（１）脂質メディエーターの産生酵素の細胞内局在部位：細胞膜が刺激されると酵素を媒介として膜リン脂質から脂質メディエーターが産生され、メディエーターは短時間の間に分解される。この酵素の一つ、細胞質型フォスホオリパーゼ A₂(cPLA₂)は細胞質に存在するが、Ca²⁺刺激によって核膜周辺に移行する。例えば、血小板活性化因子（PAF）を投与すると細胞内 Ca²⁺は数百 μM に上昇し、蛍光色素でラベルした cPLA₂は核膜周辺に移行した。この細胞内 Ca²⁺の初期の上昇は細胞内の IP₃ から由来するが、数十秒後は細胞外から由来する。したがって、刺激後短時間(< 1min)に細胞外 Ca²⁺をキレートすると、細胞内 Ca²⁺濃度は低下し、cPLA₂は細胞質内に一様に拡散した。しかし、高濃度細胞内 Ca²⁺を長期間（～5 min）維持すると、細胞内 Ca²⁺濃度が正常レベルに低下しても cPLA₂は核膜周辺に残存した。cPLA₂は膜リン脂質からアラキドン酸を遊離するので、この遊離量も Ca²⁺刺激によって増大する。しかし、アラキドン酸の遊離には cPLA₂が一定時間以上（～5 min）核膜周辺に局在することが必要であった。

同様に、CHO 細胞に 5-リポキシゲナーゼ(5-LOX)を発現させ、蛍光色素でラベルすると、酵素は細胞質内に均一に分布し、一部は核内にも見られた。この条件下で Ca²⁺イオノフォールで刺激すると、5-LOXは核膜周辺あるいは核膜に移行した。5-LOXには核移行シグナル(NLF)と核外移行シグナル(NES)が存在し、そのバランスにより、酵素の分布が規定されることが示唆された。

ロイコトリエン B₄(LTB₄)はロイコトリエン A₄から LTA₄水解酵素(LTA₄H)を介して産生される。マクロファージは LTB₄を産生するが、この細胞では LTA₄Hが細胞質に分布していることが観察された。しかし、この細胞をスライドガラスに接着させて培養すると、LTA₄Hは細胞質から、形質膜と核内に移行した。したがって、LTA₄は核内に作用して LTB₄を産生する可能性が考えられ、その結果、LTB₄のシグナルは核内レセプターを介して発現する可能性が示唆される。

cPLA₂はマイクログリアに存在すると考えられていたが、ニューロンにも広く存在するとも言われ、現在、検討中である。今後は、上記の3種の酵素(cPLA₂、5-LOX、LTA₄H)にだけ注目し、中枢神経系での分布の解析を計画している。

（２）ロイコトリエン受容体：ロイコトリエンの機能を理解する目的で、LTB₄受容体(BLT)のノックアウトマウス作成を企画し、ES細胞への組換えはすでに樹立し、現在、キメラマウスを作成中である。LTC₄、LTD₄、LTE₄がどのような条件下で脳に出現するかはまだ十分には知られていない。一般には、脳虚血、細菌感染と関連して脳脊髄液に見られ、作用としてはLHRH、CTRHの放出を促進し、シナプス活動を調節することが報告

されている。予備実験として、アストログリア細胞に Ca^{2+} 刺激を与えるとロイコトリエンの出現が観察された。

Cys-ロイコトリエンの機能を解析する目的で、その一つ(LTD4)の受容体をクローニングすることができた。この受容体は肺、肝臓にも発現するが、脳にも見られる。しかし、この受容体は哺乳動物細胞に発現させても明らかな結合活性が見られなかったため、プロモーターにルシフェラーゼを連携したレポーターを作成して PC12 を用いてアッセイを試みた。このプロモーターには種々の因子 (growth factor, cAMP, PKC, 血清) に応答するエレメントが存在し、目的とするシグナルの G タンパクの遺伝子を発現させておくと、その G タンパクの活性化によりルシフェラーゼが誘導される。この系を用いて、LTD4 受容体は $\text{G}\alpha_{16}$ あるいは $\text{G}\alpha_{q/i}$ の存在下で、哺乳動物細胞においても機能発現することが明らかとなった。RT-PCR 法により、この受容体は脳のミクログリアに発現していることが示唆された。事実、初代培養のミクログリアに LTD4 を投与すると、 Ca^{2+} 上昇が見られ、この応答は LTD4 受容体阻害剤 (オノン) によってブロックされた。今後、この受容体の機能解析をさらに進めることを計画している。特に、Cys-ロイコトリエンは視床下部においてホルモンの放出に関与することが仮定されていたので、この受容体の視床下部における発現を検討する予定である。

(3) PAF 受容体のノックアウトマウス実験の現況 : PAF は多岐にわたる薬理効果を示し、in vivo における生理機能は明らかでない。この問題にアプローチするためにその受容体ノックアウトマウスの作成を計画した。その結果、全身アナフィラキシー症状の低下が観察されたが、予測されたような、血圧の変化、海馬の LTP の変化は見られなかった。しかし、フォルマリンテストによる侵害刺激に対する応答の低下がみとめられた。この現象に関しては、痛覚に参与する小型 (CGRP、サブスタンス P 含有) 後根神経節細胞に PAF 受容体が選択的に発現しているかの検討が必要と思われる。

PAF を分解する PAF-アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) の I 型は α_1 、 α_2 、 β の三量体によって形成されるが、その β サブユニットの遺伝子の変異は脳形成の異常を示すことが知られている。この脳形成異常に PAF 受容体に関与するかどうかを検討するために、現在、PAF-AH- β 欠損マウスと PAF 受容体欠損マウスを交配して、その脳形成の検討を企画している。

(4) PLA₂ ノックアウトマウス実験の現況 : PLA₂ は分泌型 (sPLA₂) と細胞内型 (cPLA₂) に分けられる。分泌型のうち、IIA、V、IB の 3 種がアラキドン酸カスケードと関連する。cPLA₂ は N 末に Ca^{2+} -依存性リン脂質結合ドメイン (CaLB) が存在し、細胞情報伝達系に関与する。この受容体の Ser505 がキナーゼ (MAPK) に対する基質となり、ここがリン酸化を受けると Ser228 の酵素活性が上昇する。その結果 PLA₂ が活性化すると、膜脂質のリゾリン脂質から分離されてアラキドン酸が産生され、それが酸化を受けてプロスタグランジンとロイコトリエンとなる。ある種のリゾリン脂質にアセチル基が入ると PAF が産生される。したがって、PLA₂ が消失するとこれらの経路すべてに影響することが予測され、これを cPLA₂ ノックアウトマウスにより検討した。肥満細胞で刺激に対するロイコトリエンの産生を測定すると、野生型と比較してノックアウトマウスにおいては著明に抑

制された。

同様に腹腔マクロファージで Ca^{2+} イオノフォアを投与した場合にもロイコトリエンの産生はノックアウトマウスでは抑制されていた。また、肺組織のアナフィラキシー反応、炎症反応もノックアウトマウスでは低下している、あるいは、急速な回復がみとめられた。その他に、ノックアウトマウスでは分娩異常がしばしば見られ、これは排卵機能、着床機能の障害によると思われる。

中枢神経系に対する影響はまだ十分な検討は実施していない。これまで、 PLA_2 阻害剤によって小脳の LTD が抑制されると報告されていたが、 PLA_2 に特異的な阻害剤は、事実上、存在しないので、 cPLA_2 ノックアウトマウスにおいて再検討した。その結果、LTD に関しては野生型と差が見られなかった。今後、戻し交配を重ねた純系化したマウスにおいて再検討する予定である。

(5) その他の研究の進行状況：研究室訪問の予定時間が十分でなく、下記の研究の内容については概略だけの報告があり、詳細は来年度に持ち越すこととなった。

- (i) 脂質性オーファン受容体：PSP24 (脂溶性リガンド受容体) ロイコトリエン類似受容体、嗅覚フェロモン受容体など。
- (ii) セマフォリン 3A ノックアウトマウスの解析
- (iii) ステロイドホルモンの細胞膜受容体のスクリーニング

「総合評価」

脂質メデイエーターの研究は広範な物質が対象となるので、それぞれの物質の性質の検討に多大の時間と労力を費やすことが予測される。その意味で、この 1 年間の実験結果の収集は満足すべき状況にあり、研究は順調に進行している。しかし、基本的には、これらの脂質メデイエーターの脳における機能を解析するのが目的であるから、できるだけ早い段階で、物質の性質の記載実験 (例えば、細胞内分布の解析) から機能解析へ研究を方向づけることが望ましい。ノックアウトマウスの作成が機能解析の手がかりを与えることは疑いないが、 cPLA_2 のノックアウトマウスに見られるように、これらの酵素は多岐にわたる機能と関連しているからそれぞれの機能との関連を pin point するのは困難である。この点を解決するためのストラテジーに対する考慮が必要と思われる。セマフォリン 3A に関する研究は平成 8 年度「脳を知る」の藤澤肇グループの研究課題にも含まれ、既に中間報告書も提出されているので、研究成果の重複をさける配慮が望ましい。

研究代表者：平良眞規 東京大学大学院理学系研究科

研究課題：脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析

訪問日時：1999 年 11 月 17 日 (水) 10:30~13:30

「研究要旨」

脳・神経系の形成は中胚葉からの誘導により外胚葉が肥厚して生じた神経板に始まる。オーガナイザーは脳・神経系の形創りのセンターとして機能する。オーガナイザーは種々の転写因子、分泌因子遺伝子を発現し発生を制御する。本研究はアフリカツメガエルの頭部オーガナイザー、前部神経板、前脳中脳の cDNA ライブラリーを作成し、体系的発生制御遺

伝子の検索を目的とする。特に、Xlim-1 はオーガナイザーの神経誘導活性に関与しているので、その標的遺伝子の検索は主要な企画の一つである。

「研究進行状況」

昨年 12 月より開始した本プロジェクトは、従来の東大理学部 2 号館の実験室に加え、本年 3 月から理学部旧 1 号館の実験室 3 室を整備し、研究室を拡張すると共に研究員も増え、研究チームの態勢が整った。

(1) 前部神経板に発現する遺伝子の体系的収集：

神経板前部の脳になる外胚葉部分から cDNA ライブラリーを作成し、これまでに約 50 個のクローンの塩基配列を決定し、427 個のクローンを手動あるいは自動全胚 in situ ハイブリダイゼーション装置を用いて発現パターンの解析を行った。その結果、179 個のクローンが CNS に主として発現していることが明らかになった。そのうち比較的前方部に発現しているのは 97 個であった。また各クローンの発現パターンは、最初、ubiquitous, patterned, not detected の 3 種に分類し、patterned に関しては、脳、脊髄、等の各発現部位に関し 0 - 6 までの強度により数値化して表にまとめる作業を現在行っている。今後は 1 段目のスクリーニングは塩基配列決定により行い、そこで選別したものを全胚 in situ ハイブリダイゼーションにより発現パターンを解析する予定である。これまで得られたクローンの中で N9G8 (XHR1) は機能解析中であり、N2A4 は構造解析中である。

(2) 前部内中胚葉（頭部オーガナイザー領域）に発現する遺伝子の体系的収集：

前部内中胚葉（頭部オーガナイザー領域）から cDNA ライブラリーを作製した。これまで、これらの約 900 個のクローンの塩基配列（N 末から 400 ~ 500 塩基）を決定し、線虫用で使われている EST と発現パターンをリンクさせたデータベースと同様なもの作製している。これにより、新規遺伝子が既知遺伝子かの探索が容易になる。その構造から判断して、これらのクローンの多数は house-keeping, 細胞代謝、細胞骨格などに関与する遺伝子と思われる、約 350 クローンが神経発生に関与する遺伝子と推測された。これまで全胚 in situ hybridization によって解析した 196 個のうち 9 個のクローンが脊索、脊索前板に発現していることが明らかになった。

(3) 後脳中脳境界領域と目の原基に発現する hairy 類似 bHLH 型抑制性転写因子 XHR1 の機能解析：

発生制御遺伝子の機能を解析する目的で後脳中脳境界領域 (isthmus) と目の原基に発現する遺伝子、N9G8(XHR1) に注目した。これは、ショウジョウバエの hairy と類似した抑制性転写因子である。2 細胞ステージにおいて動物極の片側にその合成 mRNA を β -Gal と共に注入すると、 β -Gal は表皮に見られ、表皮が正常側より肥厚した。同様な操作によりドミナントネガティブ（抑制される遺伝子を活性化する）型を注入すると、注入側において神経組織の増殖が見られ、眼が消失し、isthmus に発現する遺伝子も見られなかった。まだ、詳細は不明であるが、これらの結果は XHR1 がパターン形成に重要な役割を持つことが示唆され、今後、さらに発生の早い段階での検討を計画している。

(4) オーガナイザー領域特異的ホメオボックス遺伝子 Xlim-1 の標的遺伝子候補の機能解析：

オーガナイザー領域特異的なホメオボックス遺伝子 Xlim-1 の標的遺伝子候補としてはレセプターキナーゼを持つ Xror2 が見出された。しかし、このレセプターに対するリガンドはまだ知られていないので、検索中であるが、具体的に報告する結果はまだ得られていない。また Xlim-1 の標的遺伝子候補として cerberus と呼ばれる因子が他の研究室から報告されているが、この遺伝子が Xlim-1 の下流にあることを見出した。Cerberus のプロモーターにルシフェラーゼを連携したレポーターを作製し、Xlim-1 の活性型に対する反応を検討すると、cerberus の転写開始部の上流に Xlim-1 反応エレメントの存在することが明らかになった。したがって、cerberus が Xlim-1 の標的遺伝子である可能性がさらに支持された。

(5) 相澤グループ及び木村グループ:

平良グループの機能解析がまだ十分に進んでいないので、相澤グループとの共同研究はまだ具体的に開始されていない。アフリカツメガエルで見出された XHR1 は発生の非常に早い時期に発現するので、これと同様な遺伝子がマウスにも存在するかを木村グループが RT-PCR により検討中である。

「総合評価」

最初は研究スペースも研究人員も十分でなかったが、CREST の助成金をフルに活用して、よく整備された研究室に拡張し、活発な研究チームを立ち上げたのは印象的である。この研究企画は、発生初期のアフリカツメガエルの脳から得られた cDNA ライブラリーから多数のクローンをランダムに選択し、その機能解析から脳の発生制御に関与する遺伝子を単離することを目的としている。したがって、5 年間の研究の最初の 2 年間はクローンのスクリーニングを集中的に実施し、機能解析は後半において実施される。このグループは研究態勢の準備に時間を要し、クローンのスクリーニングが軌道に乗り始めたのは、この数ヶ月である。この点を考慮に入れると、実験の進行スピードは順調と考えられる。しかし、機能解析が研究の主眼であり、クローンのスクリーニングだけの結果では無意味であるから、候補遺伝子がある程度見出された段階で機能解析をできるだけ早急に開始することが望ましい。現段階では、研究代表者は XHR1 と N2A4 の機能解析を主眼とし、続いて P4F1, P7E4 の機能解析を計画している。この企画は妥当と思われる。

研究代表者: 津本忠治 大阪大学大学院医学系研究科

研究課題: 回路網形成における神経活動の関与メカニズム

訪問日時: 1999 年 11 月 4 日 (木) 10:00~13:00

「研究要旨」 脳神経回路網の形成は遺伝情報と神経活動性に依存する。本研究は後者のメカニズムの解析を目的とする。この目的のために、主として大脳視覚野を対象とし、in vivo, in vitro 培養系の手段を用いて解析する。可塑的变化の現象としては視覚野眼優位コラムの変化、LTP/LTD に注目し、入力神経の活動性と神経栄養因子の関与を系統的に検討する。

「研究進行状況」

(1) 眼優位コラムに対する皮質ニューロンの活動性の影響:

仔猫の片眼を遮蔽すると遮蔽側の視覚野眼優位コラムが縮小することはよく知られてい

る。この現象に対する皮質ニューロンの活動性の影響を検討するために、皮質内に GABA を慢性的に注入すると、開眼側からの皮質内のシナプス前終末の分布が縮小することが見出された。この結果は、皮質のシナプス後ニューロンが応答しないと、入力活動の高い神経終末がむしろ縮小することを示唆する。現在、両眼遮蔽における場合の同様な実験を検討中である。

視覚野眼優位コラムの形成には BDNF が関与するという報告がある。仔猫において片眼遮蔽を実施し、BDNF を慢性的に投与すると視覚野コラムは縮小せず、拡大することが観察された。この効果は成熟猫では見られなかった。上記の皮質ニューロン活動性の影響にも BDNF が関与するかは明らかでない。

(2) 片眼遮蔽の視覚野眼優位コラムの変化と LTP の関連 :

片眼遮蔽の視覚野の機能・構造の変化に LTP が関与しているかを検討するために、感受性期 (臨界期) の仔猫の視神経に刺激電極を設置し、一側に LTP を誘発する高頻度 (θ バースト) 刺激を 2 日間、間欠的に与えた。この操作により、左右の視覚野ニューロンの光刺激に対する応答に差が生ずるかを、麻酔下の急性実験により検討した。その結果、皮質ニューロンは高頻度刺激を与えた側の眼により強い応答を示した。これは LTP の生理的意義を示唆する意味で重要な結果と考えられる。しかし、低頻度では無効か、 θ バーストはどの程度間欠的に与える必要があるのか、1 回の θ バーストで光刺激に対する応答の増強はどのくらい持続するかなどを、LTP と比較してさらに定量的に検討する必要があると思われる。

(3) 大脳視覚野における神経栄養因子の発現 :

大脳視覚野における神経栄養因子の発現が発達や神経の活動性により変化するかを検討するためにフェレットを用いて神経栄養因子の定量を実施した。発達に伴い、BDNF は変化しなかったが、NT-3 は減少した。幼弱期に両眼球に TTX を注入して、視覚入力を遮断すると、視覚野の BDNF 量が有意に減少した。一方、体性感覚野、海馬、小脳の BDNF には変化が見られなかった。また、NT-3 はどの領域においても変化が見られなかった。したがって、視覚野 BDNF の発現は神経活動性に依存していると示唆された。今後、視神経の高頻度刺激が視覚野の BDNF の発現に影響するかを検討する計画である。

(4) スライス標本の LTD に対する BDNF の影響 :

視覚野のスライス標本における LTD に対する BDNF の効果を検討すると、低濃度 (20 ng/ml) で LTD をブロックすることが見出された。このブロックは前シナプス性機構に基づくと推測された。この結果と一致して、BDNF ノックアウトマウスでは LTD が起こり易い結果が得られた。現在、このノックアウトマウスに BDNF を投与した場合の LTD の誘発状況を検討中である。

(5) 孤立神経細胞培養標本におけるシナプス抑圧に BDNF の作用 :

Micro-glial island 上に単一神経細胞を培養すると、軸索がその細胞自身にシナプス (オータプス) を形成する。この培養系の興奮性神経細胞において、活動電位と細胞体の持続脱分極を組み合わせ 1Hz で 5 分間刺激を与えるとそのシナプス応答に LTD が発生し、この LTD は伝達物質の放出の減少に起因していることが見出された。上記の実験結果と一致

して、BDNF はこの LTD を抑制した。この急性効果の他に、BDNF の慢性投与の効果を検討した。この目的のために、200 ng/ml の BDNF を 1 週間投与した孤立神経細胞培養標本のシナプス機能を自発性、誘発性シナプス電位の記録、活動シナプス神経終末端に取りこまれる FM1-43 染色により解析した。その結果、BDNF の慢性投与は活動的シナプスを増加させることが見出された。現在、BDNF ノックアウトマウスから作成した孤立神経細胞培養を用いてこの問題をさらに検討中である。

これらの結果は、LTD が伝達物質の放出低下に起因し、BDNF はこの放出低下を阻止すると解釈される。しかし、この効果と BDNF の LTP との関係、あるいは BDNF の長期投与後の伝達物質の放出促進とどのように関連するのかは明らかでない。

(6) LTD と calcineurin の関連 :

LTD に calcineurin (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase) が関与していることが示唆されている。この可能性を検討するために、calcineurin の基質に蛍光標識物質をつけたマーカーを作成し、皮質の錐体細胞に注入した。LTD を誘発する 1 Hz の連続刺激を 15 分間与えると calcineurin が活性化した。しかし、LTP を誘発する高頻度刺激ではこの活性化が見られなかった。この結果は、LTD の発生に calcineurin の活性化を必要とすることを示唆する。この研究は野心的であるが、現段階ではまだ、データ-のばらつきが大きく、今後の詳細な検討が望まれる。

(7) BDNF-GFP 融合遺伝子の作成 :

畠中研究グループとの共同研究により、培養視覚ニューロンに BDNF と GFP (green fluorescence protein) の融合遺伝子を燐酸カルシウム法で導入し、神経活動に応じた BDNF の動態の解析の準備を開始した。

(8) NMDA silent synapse の解析 :

マウスのひげ領域 (barrel cortex) とその入力源である視床を含むスライス標本において NMDA サイレントシナプスが新生期に存在することを確認した。

このサイレントシナプスは発達に伴って AMPA active synapse に変換するが、この過程に BDNF が関与するかを検討中である。この検討は国立神経精神センター神経研究所の中村グループとの共同研究である。

(9) 共同研究者の活動状況と今後の研究方針 :

愛知心身障害コロニーの仙波りつ子グループは BDNF を含む神経栄養因子の抗体の作成に成功し、BDNF のタンパクレベルでの発現の定量を実施した。阪大タンパク研の畠中寛研究グループはノックアウトマウスの genotype の決定、BDNF-GFP 融合遺伝子の作成に寄与した。NTT 基礎研の鳥光慶一研究グループ、理研の Takao Hensch 研究グループとはまだ具体的な共同研究を実施していない。

今後、遺伝子操作による研究を実施する予定である。しかし、マウスの視覚野にはコラム構造がないので transgenic mouse の使用は適当でない。したがって、BDNF-GFP 融合遺伝子ベクター (アデノウイルス系) を岡野栄之研究室との共同で作成する準備中である。このベクターをネコ、フェレットの視覚野に注入して BDNF の役割を検討する予定である。また、神経活動に伴って放出される BDNF がシナプス前かシナプス後に由来するか等を検

討するために多光子レーザー走査顕微鏡を購入することを予定している。

「総合評価」

視覚野眼優位コラムの入力活動性、神経栄養因子（特に BDNF）依存性を中心課題として in vivo in vitro 培養系において多角的に検討し、着実な研究の進展が見られている。また、予測していなかった実験結果を新たな問題提起として検討を加え、研究課題がたくみに拡張されている。この 1 年間に得られた新規の情報量、研究の進展の速度、今後の計画の見とおしはすべて十分に満足できるレベルと評価される。

1 . 平成 12 年度

研究代表者： 小西史朗 三菱化学生命科学研究所

研究課題： 抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明とその応用

訪問日時： 2000 年 11 月 27 日（月） 13:00～17:00

「研究概要」

主要研究課題は 2 項目に分けられる。第一は扁桃体、小脳の抑制性シナプスの機序と可塑性を電氣的、形態的、機能分子のレベルで解析することであり、第二は新規の抗不安薬の探索を目標とする基礎的データの収集である。研究代表者らは昨年度、小脳スライス標本において、バスケット細胞(BC)からプルキンエ細胞(PC)への GABA 性抑制性シナプス効果が登上線維の刺激によって前シナプス性に減弱する効果を見いだした。これは AMPA レセプターを媒介とした新規の制御機構である。今年度も同様な電気生理的アプローチを継続し、同時に、中枢シナプスの可塑性に参与する分子の同定の試みを開始した。

「研究進行状況」

(1) 小脳 GABA シナプスに対するノルアドレナリンの効果：

昨年度、ノルアドレナリン β アゴニスト（アイソプレテノール：ISP）を投与するとバスケット細胞(BC)の I_h 電流を促進して BC の興奮性を増強すると同時に、BC 刺激によってプルキンエ細胞(PC)に誘発する IPSCs を亢進することを観察した。今年度はこの IPSCs の増強の機構をさらに解析した。PC から記録した GABA 性 mIPSCs あるいは高浸透圧 sucrose によって誘発した GABA 性 mIPSCs は I_h チャンネルブロッカー(ZD7288)の存在下でも ISP によってその頻度の上昇が観察された。しかし、この上昇はプロテインカイネーズ阻害剤(H-89)の前処置により消失した。したがって、BC のノルアドレナリン β_2 レセプターの活性化は PKA を介して GABA の放出を促進すると結論された。しかし、PKA の標的分子は不明である。一つの可能性として、synapsin I が考えられるので、東京大学の廣川信隆教授との共同研究で synapsin I ノックアウトマウスでの検討を試みたが、現在までのところ、野生型との相違は見られなかった。次に、BC 細胞に Ca^{2+} 指示薬(oregon green BAPTA-1、calcium green 5N)を注入し、細胞興奮に伴う終末端の Ca^{2+} シグナルを共焦点レーザー顕微鏡で観察したが、ISP による変化は見られなかった。基本的に、ISP が releasable transmitter pool を増大すると仮定すると結果の説明が可能なので、この線に

沿って、小胞膜輸送の阻害剤 (bafilomycin)を併用、あるいは外液の Ca^{2+} を Sr^{2+} と置換して同期性、非同期性放出に対する ISP 効果を検討した。効果としては releasable pool の増大を示唆する結果が得られたが、他の解釈の可能な余地があった。

(2) 小脳 GABA シナプスに対するロスコピチンの効果：

Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)は細胞周期を調節する酵素であるが、小脳の PC、BC、顆粒細胞にも発現している。最近、Cdk5 inhibitor (roscovitine: Rosco)が開発されたので、Rosco の小脳抑制シナプスに対する効果を検討した。Rosco は BC 刺激によって PC に誘発した IPSCs の大きさを増大させた ($\text{EC}_{50} = 15 \mu\text{M}$)。一方、GABA 投与によって PC に誘発した電流に対しては Rosco は無効であったから、作用部位は前シナプスと示唆された。しかし、Rosco は PC の IPSCs の decay time を延長させる効果があり、この効果は PC の iontophoresis による GABA 電流においても再現されたから、後シナプス効果は皆無ではない。さらに、Rosco を投与すると PC の mIPSCs の頻度は変化しなかったが、その振幅の減少が観察された。したがって、「Rosco は神経刺激による IPSCs の振幅に対しては促進効果、mIPSCs の振幅に対しては抑制効果」という一見矛盾した結果となった。この解釈は不明である。

昨年度、BC から PC への IPSCs が AMPA レセプターを介して前シナプス性に抑制されることを見いだした。この実験を Rosco の存在下で実施すると、AMPA レセプターを介した GABA 放出の抑制は著明に減弱した。GABA 放出はグループ 2 の mGluR アゴニスト (DCG-IV)の投与によっても抑制されるが、Rosco はこの抑制に対しては無効であった。したがって、Rosco は AMPA レセプターに対する特異性を持つと考えられる。TTX 存在下で PC から記録した mIPSCs の頻度は AMPA によって亢進するが、この亢進も Rosco によってブロックされた。AMPA による IPSCs の制御は FK-506 (calcineurin inhibitor)によっても減弱するが、FK-506 は AMPA による mIPSCs の頻度の上昇には影響しなかった。このことは、前シナプス性 AMPA レセプターの活性化は少なくとも 2 種類のシナプス制御効果を持つことを示唆する。前シナプス性 AMPA レセプターと同様に、後シナプス性 AMPA レセプターも Rosco によって影響されるかを見るために PC の EPSCs に対する Roscoe の効果を検討した。登上線維刺激による EPSCs は Roscoe によって影響されず、平行線維刺激による EPSCs は Rosco によりむしろ増大した。TTX 存在下で記録した mEPSCs は Rosco によりその頻度が上昇した。したがって、Rosco は前シナプス性 AMPA レセプターと後シナプス AMPA レセプターに対して異なった効果を持つと結論された。

(3) シナプス伝達の新規素量子解析法の開発：

昨年度以来、単一 BC の刺激によって PC から記録した抑制性シナプス電流の振幅の変動の素量子解析を実施している。昨年度は、特定の分布モデルを全く仮定せずに振幅分布を nonparametric method によって記載する方法を適用した。この方法でも明らかな振幅ピークが見られる時があるが、ピークが検出できない場合があり、最小単位を構成する量子の存在が不明となった。そこで、少なくとも量子性は存在し、個々のピークは正規分布を示すという仮定の mixture model でピークの平均値と分散の算出を試みた。しかし、この方法でも、制約が少ないため、分布のピークが重複したり、分散が極端に小さくなり

unrealistic な結果となった。次に、二項分布、ポアソン分布のような統計分布に従うと仮定し、推定モデルとのずれに比例して補正強度が増加するような MPLE(maximum penalized likelihood estimation)を検討した。ここで penalty の強度(重み)は ACV(approximate cross validation)と呼ばれる方法で算出し、ピークの数も同様に推定した。この方法で IPSCs の振幅分布を記載すると、ピークが等間隔と仮定していないにも拘わらず、等間隔の分布を示し、結果は良好であった。これで、理論的な骨格は完成したので、今後、実際の実験結果の検討を実施する予定である。

(4) 扁桃体における GABA シナプスの解析：

(a) **タキカイニンレセプターの機能：** タキカイニンが抗不安と関連するといわれているが、その機能が不明なので、昨年から扁桃体におけるタキカイニンレセプターの解析に着手した。競合的 PCR 法により定量した結果、扁桃体にはタキカイニンの NK₃ 受容体のほうが NK₁ より多量に存在していた。扁桃体の錐体細胞から“自発性”シナプス電流を記録して NK₁ アゴニスト(substance P: SP)あるいは NK₃ アゴニスト(senktide: SENK)を投与すると、抑制性 GABA シナプス電流の発生頻度が増加した。これに対し、興奮性シナプス電流の発生は影響されなかった。TTX の存在下での mIPSPs の頻度は SP あるいは SENK によって影響されなかったため、これらのアゴニストは GABA 介在ニューロンの発火を促進すると推測された。また、SP と SENK によって促進される“自発性”IPSCs の立ち上がり時間経過に相違がみとめられた。この解釈として、GABA ニューロンには NK₁ レセプターの発現が強いタイプと NK₃ レセプターの発現が強いタイプが存在し、前者は後者よりも錐体細胞の細胞体のより遠方の樹状突起にシナプスを形成していると推測される。

(b) **GABA_B レセプターによる前シナプス性抑制：** 昨年度、扁桃体の錐体細胞のグルタミン酸 EPSCs は GABA ニューロンによって GABA_B レセプターを介して前シナプス性に抑制され、この抑制は cAMP とリンクしていることを見いだした。この抑制効果はフォースコリンによって低下した。EPSCs は Cd²⁺によって Ca²⁺チャネルを部分的にブロックしても低下するが、この低下はフォースコリンによって変化しなかった。この結果は、GABA_B レセプターの活性化に伴う cAMP の変化の効果は Ca²⁺チャネルを介していないことを示唆する。高浸透圧 sucrose を作用させると錐体細胞に CNQX 感受性の内向き電流が観察され、これは終末端からのグルタミン酸の放出によると考えられる。この内向き電流は baclofen により抑制されたが、Cd²⁺によって影響されなかった。また、昨年度観察したように、錐体細胞の興奮伝達にはフォースコリンによって促進され、この効果は H-89 によってブロックされたが、同時に、baclofen の効果も H-89 によって低下した。この結果は、GABA_B レセプターの活性化は cAMP 系で制御される伝達物質の放出機構に直接影響することを示唆する。

(5) GABA シナプス可塑性の分子生物学的解析の試み：

GABA レセプターの可塑性の電気生理的解析を促進する目的で GABA シナプスの形態観察を可能にするための生体標識の手法の開発を試みた。第一の方法として、シナプス小胞 GABA トランスポーター(vesicular GABA/glycine transporter: vGAT)を可視化することを計画した。そのために、生理研の小幡教授のグループとの共同で vGAT 遺伝子に EGFP を

挿入したベクターを作製を完了し、現在、トランスジェニックマウスの作製を依頼中である。もう一つのアプローチとして、GABA レセプターの β サブユニットの C-末に EGFP で標識し、 α 、 γ サブユニット遺伝子と共に HEK293 培養細胞に導入した。これらの細胞は GABA 投与に応じて応答し、機能的に GABA レセプターが発現していることが確認された。今後、GABA_A レセプターの細胞膜への組み込み、凝集(clustering)、安定化(anchoring)の過程を解析する予定である。

(6) 恐怖条件付けによって誘発する分子同定の試み：

2 日間、音の条件刺激と電氣的刺激の組み合わせをラットに与えると、条件刺激だけによって立ちすくみ(freezing)行動が見られる。4 日目に扁桃体からタンパクを抽出して、2 次元電気泳動法により分離した。その結果、正常動物と比較して恐怖条件付けにより増加した特異的な 53 のタンパクスポットを検出し、そのタンパクの同定を実施中である。

昨年度は subtractive cDNA cloning 法により、恐怖条件付けによって発現する 50 以上のクローンが見出された。これらのクローンの一部は in situ hybridization により扁桃体に発現していることが確認された。今後、mRNA の発現と増加したタンパクを比較して共通したものの存在を検討する。

(7) 新規抗不安薬物の探索に関する研究：

昨年来、セロトニン受容体、5-HT₄ と 5-HT₆ が不安に関連するとする想定からこれらのレセプター阻害物質の探索を試みている。この目的のために、ヒト、マウスからクローニングした 5-HT₄ cDNA を用いて、5-HT₄ レセプターを HEK293 に発現させた。このレセプターの活性化は cAMP を上昇させることを確認した。また、5-HT₄、5-HT₆ のノックアウトマウスの作製を計画している。

「総合評価」

ロスコピチン (Rosco) がシナプス特異的な作用を示す根拠は不明であるに拘わらず、多くの興味ある結果が示された (研究課題#2)。特にシナプス前に存在する AMPA レセプターとシナプス後の AMPA レセプターに対して異なった効果が見られたことは予想外の結果であり、今後の解析が期待される。GABA シナプスに対する ISP の作用 (研究課題#1) はほぼ最終段階にあると思われる。現在実行中の releasable pool に対する効果という仮説は、十分な具体性を欠いているので証明は困難と思われる。可塑性の機能分子の同定 (研究課題#5) は野心的であるが、subtraction 法は成功の保証に不安があるから、間口を広げずに、早急に feasibility の検討に入るべきと思われる。特に、GABA レセプターの clustering、anchoring 等の検討は具体的にその question が提起された時に開始すべきである。

研究代表者： 清水孝雄 東京大学大学院医学系研究科

研究課題： 脂質メデイエーターの dual receptor 系と神経機能

訪問時期： 2000 年 12 月 8 日 (金) 10:00 ~ 16:00

「研究要旨」

この研究の基本的課題は脳における脂質メデイエーターの機能解析である。脂質メデイエーターは刺激に応じて合成されるが、その合成酵素の多くは核膜、細胞質、核内に存在

する。合成された脂質メデイエーターは細胞外に分泌され、標的受容体と結合して機能を発現する。したがって、研究課題はこれらの酵素と脂質メデイエーターの動的挙動の解析とメデイエーターの機能解析の二つに分けられる。細胞内の酵素、分子の動的挙動は主として蛍光色素マーカーによって解析し、機能はノックアウトマウスにより解析する。

「研究進行状況」

(1) 細胞質型ホスホリパーゼ A₂ :

細胞質型ホスホリパーゼ(cPLA₂)には α 、 β 、 γ の isoforms が存在し、 α タイプが主要なアイソフォームである。この酵素は μ M 程度の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により細胞質から核周辺の膜画分へ移行し(活性化)アラキドン酸含有リン脂質を加水分解する。また、この酵素の活性は MAP kinase、p38 kinase、PKC によるリン酸化を介する種々の細胞外刺激によって亢進する。

(i) cPLA₂ ノックアウトマウス: これまで、5 種類以上の遺伝的背景の異なる純系 cPLA₂(-/-)マウスが作製され、免疫反応の検討あるいは神経機能の検討などの実験目的に応じて特定の純系を使用することが可能となった。昨年報告したように、このノックアウトマウスでは肺組織のアナフィラキシー反応が低下した。さらに、エンドトキシン(リボ多糖)あるいは塩酸吸入による肺傷害に伴う症状と死亡率が低下することが見いだされた。これは成人呼吸障害症候群(adult respiratory distress syndrome: ARDS)の治療として cPLA₂ 系活性経路の抑制が有効であることを示唆する。さらに、関節にコラ - ゲンを反復注入した後にインターロイキンを与えると、関節にリンパ球、好中球の浸潤により組織破壊が見られ、関節リュウマチのモデル症状を呈する。しかし、この症状は cPLA₂(-/-)では殆どなく、関節炎スコアの定量化においても明らかな差が見られた。また、MOG の注入によって誘発した実験的アレルギー脳炎の症状も cPLA₂(-/-)においては軽度であった。したがって、cPLA₂ の阻害は種々の疾患に伴う炎症反応を著明に改善することが示唆される。

大腸のポリープのモデル動物として知られている Apc マウスでは多数のポリープの発生が見られる。Apc 変異マウスと cPLA₂(-/-)を掛け合せると、ポリープの数には変化が見られないが、ポリープが大きくなり、死亡率も著しく低下した。これは大腸癌治療との関連で興味ある結果であるが、この効果に cPLA₂ がどのように関与するのかは明らかでない。

脳の可塑性に対する影響として、cPLA₂(-/-)における海馬 CA1 領域の LTP と LTD の発現を検討した。1 秒間 100Hz 刺激後の LTP の発現に関しては wild と cPLA₂(-/-)の間に差は見られなかった。低頻度(1 Hz)刺激(15 min)後 wild では LTD が見られたが、cPLA₂(-/-)では LTD よりむしろシナプス増強が観察された。この結果の解釈はまだ明らかでない。

(ii) 新規 cPLA₂(KIDS)の発見: 新たに見いだされた cPLA₂ はカイニン酸によって歯状回特異的に発現する cPLA₂ で KIDS(kainate-inducible dentate gyrus-specific)と名付けられた。cPLA₂ α は Kishimoto ら(1999)によって、中枢神経系に広く分布していることが示された。この時、in situ hybridization あるいは Northern blots にもちいられた DNA プロ - ブは A(237 ~ 571)、B(1080 ~ 1366)、C(1366 ~ 1927)の 3 箇所であった。同じ方法で、カイニン酸(KA)刺激に伴う発現変化を検討すると、刺激後 3 時間に cPLA₂ α より小さな位置に新たなバンドが発現し、しかも、このバンドは B と C をプロ - ブとした時は見られたが、

A をプロ - ブとした時には見られなかった。これは、cPLA₂α とは異なる cPLA₂ 様分子が存在し、この分子は KA 刺激によって発現することを示唆する。この結果をきっかけとして、KA 腹腔注入 3 時間後に一過性に海馬歯状回顆粒細胞層に部位特異的に KIDS が発現することが明らかになり、同様な結果は kids cPLA に特異的な抗体を用いた免疫組織学的にも確認された。KIDS は歯状回の nestin 陽性 progenitor cells に発現することも明らかになった。クローニングの結果、KIDS はメチオニン 308 を initiation site とする短縮型 cPLA₂ で、その上流に KA に応答するエレメントが存在すると考えられ、その promotor 領域を現在、検討中である。また、KIDS cPLA₂ の機能を知るためにその過剰発現マウス作製を試みている。

(iii) マウス cPLA₂β アイソフォームのクローニング： 酵素活性としては cPLA₂α が主要なアイソフォームであるが、β アイソフォームの機能的意義を検討する目的で、そのクローニングを試みた。構造はヒトの β タイプと相同性が高かったが、N 末の長い伸張が存在しなかった。β タイプも α と同様に活性は Ca²⁺ に依存して上昇した。α タイプの基質特異性はアラキドン酸に対して高いことが知られているが、β タイプにはそのような特異性は見られなかった。発現部位を Northern blots によって検討すると食道に強い発現が見られ、中程度の発現は中枢神経系を含めて殆どすべての臓器に見られた。

(2) PAF 受容体ノックアウトマウスの解析：

(i) 伝達物質の放出に対する影響： 昨年度の PAF 受容体欠損マウスの解析で海馬の LTP に変化が見られなかった。今回は伝達物質の放出に対する影響を海馬 CA1 領域で検討した。Paired pulse facilitation を比較するとノックアウト(KO)マウスのほうが促進の程度が低く、post-tetanic potentiation (PTP) でも増強の程度が低く、その増強からの回復が早かった。次ぎに PAF 自身が伝達物質の放出に影響するかを検討するために、自発性 mEPSCs を記録して PAF (2 μM) を添加した。この操作により、mEPSCs の振幅 (大きさ) は変化しなかったが、その発生頻度は数分以内に上昇した。しかし、この上昇は KO マウスにおいても観察されたので、結果の解釈は複雑である。

(ii) 痛覚応答に対する影響： 昨年度と同様に、ホルマリンをマウスの足の裏に注入すると、その部を舐める応答が見られ、この挙動は注入直後 (< 5 min) と 10 ~ 50 min 後に延長した。KO マウスではこの二相性応答はともに有意に短時間であった。また、熱刺激に対する下肢回避潜時も KO マウスでは延長し、侵害刺激に対する応答の低下が示唆された。これと関連して、正常後根神経節 (DRG: dorsal root ganglion) 細胞に PAF 受容体が発現していることを RT-PCR により確認した。また、DRG の dissociated cell culture の個々の細胞に PAF あるは ATP を投与して細胞内 Ca²⁺ シグナルを指標として応答を検討したが、10% の細胞で応答が見られた。応答と細胞サイズや種類の関係はまだ検討していない。

(iii) 実験的アレルギー脳炎に対する影響： 研究課題 #1-i と同様な方法で EAE (experimental allergic encephalomyelitis) を発症させたマウスと比較したところ、発症の時間経過には差が見られなかったが、症状を定量する scoring において KO マウスは有意に軽症であった。

(3) 新規 G タンパク共役型受容体の単離とリガンドの検索：

(i) **新規ロイコトリエン受容体 BLT1 と BLT2 のクローニング**: ロイコトリエン B 4(LTB4)は好中球、マクロファージの遊走を促進する。そのレセプター2種類(BLT1、BLT2)のクローニングに成功した。HL-60 白血球細胞にビタミンAを投与して LT B4 の結合能を高め、subtraction 法により 7 回貫通型 BLT1 をクローニングした。その後、ヒト、マウスにおいて BLT1 の近傍に BLT2 遺伝子も存在することを見いだした。両者のアミノ酸配列には約 45%の相同性が見られ、またヒトとマウスの間にも高い相同性(81-93%)が見られた。BLT1の発現は殆ど白血球に局限していたが、BLT2は白血球のほか脾臓、肝臓、心臓、脳を含む多数の臓器に発現が見られた。

BLT1はLTB4に高親和性に結合することは先に観察していたがBLT2に対するリガンドが不明なので、CHO 細胞にレセプターを発現させて Cytosensor によってスクリーニングを実施した。その結果、高濃度の LTB4 に対する反応が見られた。結合実験の結果、BLT2 の LTB4 に対する親和性($K_d = 22.7 \text{ nM}$)は BLT1 の約 1/10 であった。細胞の chemotaxis を用いた実験でも、その効果は BLT2 のほうが約 10 倍の高濃度を必要とした。BLT1 と BLT2 はリガンドに対する親和性だけでなく、リガンド認識においても異なり、BLT2 のほうがより多種の不飽和脂肪酸に応答し、また、市販 LTB4 阻害剤に対し異なった結合特異性を示した。

(ii) **哺乳動物神経系における PSP24 の解析**: PSP24 はリゾホスファチジン(LPA: lysophosphatidic acid)の受容体といわれ、もともとは *Xenopus* で見いだされた。このマウスホモログをクローニングし、PSP24 α と PSP24 β を得た。これらのレセプターは脳に存在し、胎生 10 日頃から発現した。部位としては、嗅球 mitral cells、海馬錐体細胞、小脳 Purkinje cells に強い発現が見られた。LPA がリガンドであるかを多種のアッセイ系で検討したが、これを支持する結果は得られなかった。このリガンドを探索するために、PC12 細胞に PSP24 を発現させ、luciferase をレポーターとしてその上流に SRE promotor を結合したプロ - プを用いた。SRM は種々のカイネーズによって活性化されるので、G - タンパクの活性化によるシグナルを無差別に検出することが可能である。さらに、 G_i の活性化を G_q 活性に変換する G - タンパクを transfect して多重スクリーニングの手法を開発した。この方法でも、LPA の応答は検出されなかった。今後、この方法で脳内の多数の lipid ligands の検索を計画している。

(4) その他の研究企画:

(i) **ロイコトリエンの細胞外輸送トランスポーター**: LTB4 は細胞内、核の周辺でアラキドン酸から産生されるが、その標的細胞のレセプターと結合して機能を発現するには細胞外へ分泌されなければならない。LTB4、LTC4 は細胞膜を通過できないから、そのためには特定のトランスポーターの存在が要請される。現在まで知られている、この種のトランスポーターは MRP(multidrug resistance protein)だけである。MRP は LTC4 を細胞外へ放出することはできるが、LT B4 の放出には参与しない。しかし、LT B4 も ATP 依存性に細胞外へ出ることを確認したので、神経細胞や炎症細胞でのトランスポーターの同定を企画している。

(ii) **ロイコトリエン D4 の産生と機能**: 脳虚血再還流後に LTC4、LTD4 が産生される。

ロイコトリエン(LT)の機能の理解のために、その標的細胞と効果を検討した。胎生 16-17 日のマウス脳からの初代培養細胞でニューロン、アストロ・マイクログリア混在、マイクログリアの 3 グループを分離した。 Ca^{2+} アイオノフォアで刺激すると、LT とプロスタグランدين(PG)の産生はグリア細胞だけに見られ、ニューロンでは見られなかった。cPLA₂の発現も同様であった。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を指標として LT に対する応答は初代培養のマイクログリアと cell-line マイクログリア (MG5 など)にのみ見られた。LTD4 に対するレセプターと考えられる CysLT1 受容体発現を Northern blots により検討すると、肺臓、脾臓、肝臓のほかにも脳にも見られた。RT-PCR により CysLT1 の発現を脳細胞で検討するとマイクログリアにのみ検出された。また、MG5 細胞の LTD4 に対する Ca^{2+} 応答は CysLT1 レセプター阻害剤、ONO-1078、MK-571 によってブロックされた。MG5 の LTD4 による chemotaxis の濃度-反応曲線は 10 nM においてピークを示した。これらの結果から、脳の障害に伴って局所に産生された LTD4 はマイクログリアに作用してその走化性を高めて傷害局所に集合させる機能を持つと推測される。集合したマイクログリアがどのような生体反応に寄与するかは、マイクログリアから分泌される物質に依存するが、その物質と効果に関する詳細は不明である。

(iii) 嗅球の神経投射と semaphorin 3A: 嗅覚系の研究はステロイドの受容体の探索、G-タンパク受容体の解析の延長として導入された。嗅覚系には「一個の嗅細胞に一個の匂い受容体」、「特定の嗅細胞は特定の嗅球内ニューロンと結合」という特異性が存在する。発現クローニング法により、いくつかの脂肪酸誘導体の受容体を単離した。セマフォリン 3A (Sema 3A) は嗅球の特異的神経投射に関与する因子と考えられる。

嗅細胞に由来する嗅神経線維は糸球体において僧帽細胞とシナプス結合をする。個々の嗅細胞はその受容体によって識別できるはずであるが、現在、識別できる唯一のタンパクは OCAM だけである。この抗体で染色すると、OCAM⁺の嗅神経線維は嗅球前部の糸球体に投射していることが示される。この OCAM⁺の糸球体は Sema 3A(-/-)のマウスでは見られなかった。したがって、この KO マウスでは嗅神経線維の投射が異常と考えられる。さらに、糸球体における僧帽細胞とのシナプス形成にも形態異常が見られた。

「総合評価」

研究課題はすべて綿密な計画に基づいて実施されているのが印象的である。主要なメデイエーターを取り上げ、たくみに、細胞・分子レベルで動的挙動を解析すると共に、機能解析のためにノックアウトが timely に作製されている。その結果、医学、生物学と密接に関連した問題に有用な具体的情報が提供されている。特に、cPLA₂ のノックアウトは実りの多い結果を与えている。さらに、思いがけない KIDS の発見は、カイニン酸による誘導と progenitor cell に対する特異性と関連して今後大きな問題に発展する可能性を持っている。新規の BLT2 の発見も予期しない副産物であり、BLT2 に対するトリガンドと PSP24 に対する今後の広範なトリガンド探索から exciting な結果を期待したい。

研究代表者： 平良真規 東京大学大学院理学系研究科

研究課題： 脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析

訪問日時 : 2000年12月7日(木) 13:00~17:30

「研究概要」

頭部オーガナイザーは前部神経板を誘導し、脳の形態形成の役割を担う。その分子機構と遺伝子カスケードの解明が本研究の究極の目的である。特に研究代表者らが見いだした Xlim-1 遺伝子は頭部形成と神経誘導に参与することが知られているのでその標的遺伝子を探索する。同時に、各脳領域の cDNA ライブラリーを作製し、部位特異的に発現する遺伝子を網羅的にスクリーニングしてその機能解析を実施する。

「研究進行状況」

(A) 頭部オーガナイザーの分子基盤

(1) Xlim-1 遺伝子の標的遺伝子の機能解析:

Xlim-1 遺伝子はオーガナイザー領域に特異的なホメオボックス遺伝子で頭部形成に必要な転写活性因子である。その標的遺伝子としては cerberus が報告されているが、昨年度、cerberus の上流に Xlim-1 反応エレメントの存在を確認した。また活性型 Xlim-1(Xlim-1/3m)により発現が上昇する他の遺伝子について構造解析、機能解析を実施した。

(i) レセプタータイロシンカイネ-ス Xror2 の機能解析:膜貫通領域を持つレセプターで細胞外に免疫グロブリン様ドメインを持ち、細胞内にタイロシンカイネースドメインを持つが、このリガンドはまだ知られていない。Xror2 は Xlim-1 と同様に背部に発現している。Xror2 がオーガナイザー活性を持つかを検討するために、4細胞の時期に Xror2 mRNA を腹側に注入したが、Xlim-1 とは異なり、胚に二次軸を形成することはなかった。しかし、尻尾が短くなり、この変化はタイロシンカイネースドメインの活性を失った変異の注入によっては観察されなかった。次ぎに、Xror2 を背部に過剰発現させると体躯の長さが短くなり、異常な頭部形成を示したが、オーガナイザー活性が亢進するような効果は見られなかった。カイネースドメインの活性を失った変異では全体として phenotype の発現は低下したが、その効果が消失することはなかった。したがって、この効果はカイネースの活性には依存しないが、レセプターの細胞外ドメインの存在は必要とすると考えられる。

体躯の長さを規定する一つの因子としては細胞の収斂伸長運動(convergent extension movement)がある。これは、細胞が中央に集合する結果、体躯の前後軸を伸展させる細胞運動である。この可能性と関連して、Xror2 を発現した細胞の分布を β -gal をトレ-サ-として検討した。その結果、Xror2 の過剰発現は細胞の中央への集合を抑制することが見いだされた。この抑制もタイロシンカイネースの失活によって低下はしたが消失はしなかった。Xror2 が細胞運動だけでなく細胞分化にも変化を与えるかを、神経のマーカーとして nrp1 を用いて検討したが、影響は見られなかった。同様に、脊索分化のマーカーとして XPA26 を用いたがこれも Xror2 によって影響される結果は得られなかった。したがって、Xror2 は神経分化には影響せず、細胞運動のみをブロックすると考えられる。

細胞の極性と軸形成には Wnt が関与することが知られているが、最近、Wnt と結合するドメイン(frizzled 様ドメイン)が Xror2 に存在することが見いだされたので、現在、Wnt レセプター Frizzled との相互作用を検討中である。

(ii) 脳誘導因子 cerberus 遺伝子のプロモーターの解析： Cerberus は Wnt、BMP、Nodal という 3 種のリガンドと結合する分泌性の阻害因子で、内胚葉にも発現するが中胚葉では Xlim-1 とオ - ヴァ - ラップして発現し、Xlim-1 の標的遺伝子と考えられている。この可能性を直接検討するために、cerberus のプロモーター領域にルシフェラーゼを結合させたレポーター遺伝子を作製し、Xlim-1(Xlim-1/3m)に対する応答を検討した。cerberus のプロモーターの-141 ~ -118 の領域には 3 箇所のホメオドメインが結合する配列 TAAT が示唆されているが、この部位を含む deletion あるいは点変異導入によって Xlim-1/3m による活性化が减弱し、この部位に Xlim-1/3m が特異的に結合することを確認した。したがって、cerberus は Xlim-1 の直接の標的遺伝子になり得ると結論される。

Xlim-1 の標的遺伝子は cerberus 以外にも、goosecoid、Otx2、chordin などが示唆されているが、これらの標的遺伝子は Xlim-1 によって単純に活性化されるのではなく、異なった標的遺伝子の活性化には異なった活性化補助因子の存在を必要とすると考えられる。例えば、Ldb1 は goosecoid を活性化するが、Xlim-1 と Ldb1 は cerberus を協調的に活性化しない。Xlim-1、Otx2、Ldb1 の 3 者が共存すると goosecoid と cerberus は活性化される。現在までのところ、cerberus 遺伝子の発現は Xlim-1、Otx2、Siamois、Mix.1 により制御されている結果が得られた。特に、Mix.1 は著明な効果を示したが、協調的活性化の法則と機構に関しては今後の詳細な解析が必要である。

(iii) Xlim-1 の機能ドメインの解析： Xlim-1 ホメオドメインの下流の 239 アミノ酸残基を進化的に保存されている 5 つの領域、CCR1 ~ CCR5 (conserved Gterminal regions) に分類し、その機能を解析した。それぞれの機能を解析するために、各領域を欠失した変異を腹側に注入した場合、2 次軸の形成がどのように影響されるかを検討した。その結果、CCR1 と CCR2 領域は 2 次軸形成能に対して抑制的に機能することが明らかになった。同時に、CCR2 は CCRR4 と共に、転写活性化ドメインとしても機能し、活性的効果も示し得ることが見いだされた。特に CCR2 の機能発現にはその部位に存在する 5 個のタイロシン残基が必要であった。

(2) 頭部オーガナイザー遺伝子の網羅的解析：

(i) 新規遺伝子の発現領域の解析： 昨年度からの継続で、前部内中胚葉(anterior endomesoderm: 頭部オーガナイザー)領域からの cDNA ライブラリーを作製し、housekeeping genes をハイブリダイゼーションにより除いた後、約 2,000 個のクローンを得て、これまで、約 1,030 の遺伝子の塩基配列を決定した。このうち 192 個の遺伝子の発現部位を検討した結果、9 個の未知遺伝子がオーガナイザー近傍に発現していた。その中で、頭部オーガナイザーに発現する 4 遺伝子、P4F1、P7E4、P8F7、P17F11 に注目した。これらの 4 遺伝子はオーガナイザーで異なった部位に発現していた。P4F1 はニワトリ crescent の Xenopus ortholog であり、N7E4 は EST クローンの一つと相同性があり、P17F11 は植物の未知遺伝子と相同性を示したが、P8F7 はどの遺伝子とも相同性が見られなかった。

Crescent に関しては他の研究室からも既に論文発表があり、この分野の研究が競合的であることは明らかであるが、同時に、現在実施しているオーガナイザー特異的遺伝子の網

羅的探索の手段としての妥当性も示されたと考えられる。

(ii) 分泌性因子 **crescent** 遺伝子の解析: アニマルキャップによる解析で **crescent** の発現は転写因子、Siamois、Xlim-1、Ldb1 によって協調的に活性化された。しかし、中胚葉化因子アクチビンで処理したアニマルキャップでは発現上昇が見られなかった。Xlim-1 はアクチビンの下流遺伝子であり、Siamois は背側化因子 Wnt の下流遺伝子であるから、**crescent** 遺伝子は Wnt とアクチビンの両方のシグナルによって活性化されることが示唆された。Crescent は frizzled ドメインを持ち、Wnt に結合する阻害因子である。Wnt は背側の決定に必要であるが、頭部の決定には阻害的效果を示す。このことから、Crescent は Wnt と結合してその頭部決定阻害効果を抑制して頭部決定を促進させる機能を持つと推測される。事実、**crescent** を背部に過剰発現させると頭部が大きくなる。

オーガナイザー因子の一つ、noggin によって BMP を阻害すると頭部がない軸が形成されることが知られている。しかし、頭部形成の過程は Wnt の阻害が必要であることが最近報告されたので、noggin mRNA と一緒に **crescent** mRNA 注入を試みたところ頭部のある軸が形成された。この結果は Crescent が Wnt を阻害するという仮定とよく一致する。しかし、Crescent がどのタイプの Wnt を阻害するかはまだ明らかでない。Crescent を背部に過剰発現させると、頭部が大きくなるが、同時に体躯の長さが短縮し、Xror2 の過剰発現の場合(研究課題#A-1-i)と類似した結果が得られた。したがって、Crescent は頭部にだけ影響を与えているのではない。一つの可能性として、Crescent は頭部形成を阻害する Wnt (例えば、Wnt-8) と収斂伸長運動に関与する Wnt (例えば、Wnt-11) にも結合することが考えられる。これらの問題は Xror2 との関連において今後検討する予定である。

(B) 神経板の初期/パターン形成の分子機構

(1) 神経外胚葉の予定領域に発現する遺伝子群:

(i) **bHLH-WRPR** 型転写抑制因子 **XHR1** の機能解析: XHR1 は、昨年度前部神経外胚葉 cDNA ライブラリーからクローニングした、中脳・後脳境界領域(MHB: midbrain-hindbrain boundary)特異的な転写抑制因子をコードする遺伝子である。この遺伝子の発現領域と発現時期をさらに詳細に検討した結果、XHR1 は MHB にステージ 10.5 に既に発現していることが明らかになった。MHB にはステージ 13~14 に発現する遺伝子、Pax-2、En-2 が知られていたが、今回の結果は MHB の領域化は原腸胚初期に既に開始していることを示唆した。発現時期の相違から XHR1 は Pax-2、En-2 遺伝子の上流にあると考えられるので、Pax-2、En-2 の発現をマーカーとして機能解析を実施した。実験には 2 細胞期の動物極に XHR1 のドミナントネガティブ、ΔWRPW、mb、VP16 を注入した。ΔWRPW と mb は XHR1 の抑制機能を阻害して標的遺伝子を抑制から解除するもので、VP16 は XHR1 の転写抑制ドメインを転写活性化ドメインと置換してより強力な阻害効果を企画したものである。その結果、これらの変異によって Pax-2、En-2 の発現が阻害され、その阻害効果としては VP16 が最も強力であった。

上記の結果は予測とほぼ一致したが、詳細においてはまだ十分に理解できない結果も観察された。例えば、MHB 領域に野生型 XHR1 の過剰発現させると En-2 の発現阻害も観察された。さらに、全神経組織のマーカーとして nrp1 を用いると、その発現は野生型 XHR1

の過剰発現によって阻害された。したがって、XHR1 自身も神経化阻害作用を示し、それが Pax-2、En-2 の発現結果に影響する可能性もあり、今後の検討が必要である。

MHB領域の形成は前脳中脳に発現する Otx2 と後脳に発現する Gbx による相互抑制作用によるという仮説が提唱されているので、XHR1 を指標として初期の MHB 領域の形成に関して Otx2 と Gbx の発現部位を解析した。しかし、XHR1 の発現に Otx2、Gbx が直接関与しているような結果は得られなかった。

(ii) 細胞極性に関与する SCR1 の構造解析： Scribble はショウジョウバエの上皮細胞の極性を決定する遺伝子と言われている。これに関連する遺伝子、N4A6 が cDNA ライブラリーから見いだされたので、その構造を解析した。N4A6 は Scribble と同様に多数のロイシンを含む繰り返し配列 LRR(leucine-rich repeat)を持つので SCR1(Scribble-related protein 1)と命名した。この C 末には PDZ ドメインと結合する配列(TSV)が存在する。この遺伝子の発現には脳の部位特異性が見られないので、神経系に一様に分布して個々の細胞の極性に関与する遺伝子と推測される。

(2) 前部神経外胚葉 cDNA 発現ライブラリーからの新規遺伝子の検索：

プラスミド発現ベクターに前部神経外胚葉の cDNA を挿入して発現ライブラリーを作成した。100 クローンを含む多数 (200 組) のプールを準備し、mRNA を合成して 2 細胞期の動物極に注入した後、胞胚期にアニマルキャップを切り出し、初期尾芽胚期に回収して神経誘導活性の有無を nrp1 の発現により検討した。この方法によって神経誘導活性を示した遺伝子として Xpitx2c が同定されたが、これは既知遺伝子で、しかも、最近、神経誘導遺伝子として学会抄録に報告された。したがって、時期は失したが、少なくとも、このアプローチは有効であると考えられる。他に 7 回膜貫通型レセプターへの共役型 G タンパク質が同定されたが、この G - タンパクがどのようにして神経誘導に関与するのかは現在不明である。これまで約 200 のプールを検討し、十数個の神経誘導活性を持つクローンが得られ、その同定を進めている。

「総合評価」

昨年度は研究室とチームの立ち上げに多大の時間を要したが、今年度は明らかに多くの具体的な結果が得られ、順調な研究の進行が見られた。この研究戦略は脳の発生に関与する遺伝子の探索とその機能解析であるから、重要な遺伝子の同定には綿密な計画が要請されると同時に、多分に僥倖にも依存することは否めない。前部神経外胚葉 cDNA のプラスミド発現ベクターライブラリーからの神経誘導遺伝子探索は独創的であり、予備実験ながら、既に有望な結果のヒントが得られている。機能解析としては、Xeror2 と crescent 両者と Wnt との関連の解明が今後大きなストーリーに結びつくように思われる。

研究代表者： 津本忠治 大阪大学大学院医学系研究科

研究課題： 回路網形成における神経活動の関与メカニズム

訪問日時： 2000 年 11 月 17 日 (金) 13:00 ~ 16:30

「研究概要」

大脳視覚野の回路網形成と可塑的变化に対する神経活動性の影響が研究の主要テーマで

ある。昨年度の研究において神経栄養因子、特に BDNF が視覚野の発達と可塑的变化に関与することが明らかになった。しかし、BDNF の関与と神経活動性は相互に依存する傾向があり、BDNF の関与のメカニズムが明らかでなく、その動態も不明である。本年度は、BDNF の動向と神経活動性との関連を *in vitro* *in vivo* の系において詳細に解析した。

「研究進行状況」

(1) 培養視覚野ニューロンにおける BDNF の動向の解析：

BDNF は大脳視覚野ニューロンの形態発達と機能に関与するが、BDNF がシナプス前ニューロンに由来するのか、シナプス後ニューロンに由来するのかは明らかでなく、またその動向がニューロンの活動性にどのような形で依存するのかも明らかでない。この問題に対するアプローチとして BDNF を培養視覚野ニューロンに発現させて、その動向を追跡することを試みた。この目的のために BDNF と GFP (green fluorescence protein) の融合遺伝子の plasmid cDNA を培養視覚野ニューロンの核内に直接注入した。その結果、BDNF と GFP が 24～48 時間以内に発現した。発現した GFP の蛍光の存在部位は免疫染色によって検出した BDNF の存在部位とほぼ一致した。また、発現した BDNF は内在性 BDNF の存在部位とも一致した。したがって、GFP の蛍光は BDNF の挙動を反映すると示唆される。BDNF は細胞体、樹状突起にも発現するが、MAP-2 negative の軸索にも存在した。軸索の BDNF は順行性に約 $0.3 \mu\text{m}/\text{sec}$ ($26 \text{ mm}/\text{day}$) の速度で移動し、また逆行性軸索輸送も観察された。単一ニューロンに plasmid cDNA を注入すると BDNF はそのニューロンに発現するとともに、そのニューロンが支配する後シナプスニューロンにも観察された。非分泌性の物質 (Ds-Red) の cDNA を注入した場合は、発現がそのニューロンに限局し、後シナプスニューロンには存在しなかった。したがって、後シナプスニューロンの BDNF は前シナプスニューロンから放出された BDNF に由来すると考えられる。TTX の存在下でニューロンの活動性をブロックした条件下では、後シナプスニューロンに BDNF が観察されなかった。また、picROTOXIN の投与下でニューロンの活動性を亢進させると、後シナプスニューロンの BDNF の存在量 (蛍光強度) が増加した。従来、BDNF は後シナプスニューロンに由来し、前シナプスニューロンに取りこまれると仮定されてきたが、この実験結果は、BDNF は前シナプスニューロンから放出され、そのニューロンに再度とり込まれるとともに、後シナプスニューロンにも移行する可能性を示唆する。この BDNF の取り込みとそのレセプター (*trkB*) が媒介する可能性があるが、これは *trkB* ノックアウトマウスを使用して検討する予定である。

(2) 孤立培養神経細胞のシナプス伝達に対する BDNF 作用の解析：

BDNF の急性効果に関しては昨年検討した。しかし、BDNF 効果は多様であるから、単純な標本においてその慢性効果を急性効果と比較することを試みた。慢性効果の研究も昨年度からの継続で新規に得られた結果は多くないが、BDNF の 1 週間の継続投与でも、急性効果と同様に、伝達物質の放出が亢進した。しかし、急性効果と異なり、m.e.p.c.s の大きさの減少が観察された。その理由は現在不明である。この標本では、もともと内在性 BDNF が存在するので、付加した BDNF の効果が明確でない可能性がある。その可能性を検討するために BDNF ノックアウトマウスから標本を作成した。従来の実験はすべてラッ

トを用いていたので、現在、コントロールマウスの結果を採集している。BDNF は興奮性シナプス電流の NMDA と AMPA 成分の両者を増大させることをこれまでラットで観察していたが、これは異なった標本で観察していたので、マウスでは同一標本で再検討した。その結果、NMDA 成分の増大がより著明である結果が得られた。

（３）BDNF の大脳皮質ニューロンの形態発達に対する影響：

BDNF と GFP の融合遺伝子をリン酸カルシウム法により大脳皮質神経細胞の低密度培養標本において発現させ、2 日後に固定して形態変化を観察した。結果としては、BDNF を発現したニューロンの樹状突起の構造が複雑になり、その数の増加が観察された。しかし、神経細胞体の大きさと neurite の全長には変化が見られなかった。これらの BDNF の効果が、発現したニューロン自身の BDNF の細胞内からの作用によるのか、*trkB* を介した効果かは明らかでない。この点は、BDNF 抗体あるいは、*trk* receptor tyrosine kinase 阻害剤(K252a)を用いて検討する予定である。また、この効果が周辺のニューロンから由来した BDNF による可能性もある。この可能性は研究課題#1 の方法（単一ニューロンの核内 cDNA 注入）により検討する。

（４）低濃度 BDNF による LTD の抑圧効果：

昨年度、低濃度の BDNF が視覚野スライス標本で LTD を抑圧し、BDNF ノックアウトマウスでは LTD が起こりやすいことを観察した。本年度はこのノックアウトマウスの標本に BDNF を投与すると LTD が抑圧されて正常マウス標本と同様な現象を示すかどうかを検討しているが、まだ結論できるだけのデータは得られていない。

（５）NMDA silent synapse の解析：

このプロジェクトは昨年度開始した国立精神神経センターの中村俊グループとの共同研究である。昨年度、生後 8-11 日までの新生マウスではひげの感覚領域である barrel cortex に AMPA 受容体を持たない NMDA 受容体だけの silent synapse が 47% の細胞に存在することを観察した。今年度はこの実験を BDNF ノックアウトマウスで実施した。その結果、これらのマウスでは、生後 8-11 日でも silent synapse が約 50% の細胞で残存することが観察された。この結果は、発達に伴う silent synapse の消失過程には BDNF が関与することを示唆する。

（６）二光子走査蛍光顕微鏡の設置状況：

二光子走査蛍光顕微鏡は培養神経細胞においてシナプス競合の形態的観察に用いることを目標としている。現段階では、顕微鏡を設置し、BDNF-GFP 融合遺伝子を核内に注入した培養細胞を用いて観察技術の習得に努めている。現在、少なくとも、樹状突起のスパイン、シナプス前線維終末などの観察は可能となった。

（７）眼優位コラムの発達と可塑性の研究：

眼優位コラムの形成に皮質ニューロンの活動性が関与するかを検討するために、コラム形成がまだ形成されていない生後 14 日の仔猫の大脳皮質にムシモールを 4 週間にわたって慢性投与した。その結果、この条件下ではコラムが形成されないことが明らかとなった。この実験では、ムシモールは GABA_A レセプターを活性化し皮質ニューロンの活動性をブロックすると仮定している。しかし、最近、ムシモールの作用は後シナプスニューロンに限

局していないという報告もあり、ムシモール投与によって皮質の前シナプス性、後シナプス性ニューロンの活動性の変化に関してはさらに詳細な検討が必要と思われる。

(8) コラム形成に対する BDNF の影響 :

昨年度、幼弱期の仔猫の片眼を遮閉しても、皮質に BDNF を慢性投与するとコラム縮小が観察されない結果を示した。今年度は、この現象に伴って、外側膝状体から皮質に投射している入力線維終末端がどのように変化しているかの検討を計画した。この目的のために、外側膝状体(LGN)にトレ - サ - (BDA)を注入し、終末端の分布を BDNF 注入視覚野皮質部で観察することを試みた。しかし、検討する皮質部に投射している LGN 部の同定が困難なため研究の進展が遅れ、現在、研究の feasibility は確認されたが、まだ十分な結果は得られていない。

(9) BDNF 効果の持続時間の検討 :

スライス標本で観察された BDNF のシナプス増強作用は長時間持続するが、実際にどの程度持続されるのかは明らかでない。この問題を検討するために、麻酔ラットを用いて、外側膝状体刺激に対する大脳視覚野の応答を 24 時間にわたって記録した。皮質に BDNF を 2 0 分間作用させると、その応答が増大し、この増強は 8-12 時間持続した。BDNF による長期増強効果は K252a の投与によりブロックされた。これらの BDNF の効果は幼弱期には観察されたが成熟ラットでは見られなかった。

(1 0) 神経活動と神経栄養因子発現の関係 :

愛知心身障害コロニーの仙波りつ子グループとの共同研究により、神経栄養因子の抗体を用いてその定量が可能となった。実験にはフェレットを用いた。両眼球に TTX を注入して視覚入力を遮断すると、大脳視覚野皮質の BDNF の減少が見られた。これは幼弱期においても成熟動物においても観察されたが、NT-3 には変化が見られなかった。BDNF の発現量の変化が大脳皮質ニューロンの活動性に依存するかどうかを検討するために、皮質にムシモールを作用させた場合の結果を現在検討中である。

「総合評価」

視覚野眼優位コラムを用いての可塑的变化の解析および、発達、可塑的变化における BDNF の関与が研究の中心課題である。昨年度と比較して、今年度の研究スピードはやや低調な印象を受けた。しかし、単一培養大脳ニューロンに BDNF を発現させて、その挙動を追跡する企画(研究課題#1)は独創的であり、新たなブレイクスルーとなり得る可能性を示している。また、仔猫の大脳皮質へのムシモールの慢性投与によって眼優位コラムの形成がブロックされるデータ(研究課題#7)も今後の大きな発展につながる可能性を持っている。しかし、ムシモールの作用点に関しては不確定な要素が存在するから、大脳の後シナプス性ニューロンの活動性を変化させる操作にはさらに検討を必要とする。

研究代表者 : 重本隆一 岡崎国立共同研究機構・生理学研究所

研究課題 : 細胞膜上機能分子の動態と神経伝達調節メカニズム

訪問日時 : 2000 年 12 月 15 日(金) 13:30 ~ 18:00

「研究要旨」

神経機能に関与する分子は酵素、イオンチャネル、レセプターなどそれぞれ独立した機能を維持するが、個々の分子は近傍の分子との相互作用により生体機能に思いがけない寄与をしている現象も見いだされている。これらの現象はこれまで厳密な形態観察あるいは詳細な定量的機能解析中に偶然の副産物として発見されてきた。本研究の課題は細胞膜上の機能分子の局在様式、共存関係、動的変化を定量的に高解像度の観察技術によって解析し、分子相互間の協調的作用によって形成している生体機構を意識的に探索することを目的とする。

「研究進行状況」

(1) 電子顕微鏡法の改良技術の開発：

(i) **SDS-FRL 法によるスクリーニング**：SDS-FRL (SDS-freeze fracture replica labelling)は藤本によって1995年に開発された手法で、fracture後のレプリカをSDSによって軽く処理して残存している膜タンパクに免疫染色を実施し、膜分子の2次元的分布を観察する手法である。この手法により、小脳のレセプター、イオンチャネル、酵素、脂質に関し50以上の分子の局在スクリーニングを実施し、これらの分子の局在を確認すると共に新たな知見を得た。また、この方法に改良を必要とする下記の問題点も判明した。

(a) **分子局在の特異性**：分子は種類によって、P面だけ、E面だけ、あるいは両面に局在する。例えば、NMDAR1は細胞質側認識抗体と細胞外抗体でラベルすることを試みても、E面にしか検出できない。したがって、複数の分子が共存していても（例えば、NMDAR1とNMDA2C）その優先局在性によって共存がマスクされる可能性がある。この問題の解決法を見いだすことが必要である。この優先局在が固定条件に依存する可能性があるので、この可能性の検討を計画している。

このような改良すべき点はあるが、この方法によって、これまで報告されていない形態特徴も見いだされた。例えば、小脳の顆粒細胞の樹状突起が接着している部位では両樹状突起のP面にNMDAレセプター分子(NMDAR1、NMDA2A、NMDA2Cなど)が非シナプス性クラスターを形成する像が観察された。この機能的意義は現在不明である。

(b) **免疫染色の検出感度の改良**：一定条件の影響を検討するには異なった標本の形態を比較するので定量的解析が必要となる。このためには抗体による検出の感度の改良が要請される。このために、第一に、2次抗体の大きなラベル（10 nm ゴールドコロイド）の代わりに1.4 nm のゴールド原子粒子を用いる。この方法で10倍の感度上昇が期待される。第二に platinum shadowing で切片に直接プラチナが接触すると抗原の保持が損なわれるという最近の報告があり、事実、この傾向が確認された。これを改良するために、最初に薄い carbon 保持膜で標本を覆い、次に、platinum shadowing を実施し、最後にもう一度 carbon で保持すること(sandwich shadowing)を計画している。また、形態を明確に見るために標本を回転しながら45°の角度で platinum shadowing (rotary shadowing)を試みる予定である。

(c) **標本のオリエンテーションの同定法**：これはアメリカの研究室で開発された手法を導入したものである。その目的はレプリカの処理に伴って組織が断片化されても、観察している標本の脳内オリエンテーションの手がかりを維持することである。この目的のために、

レプリカを縦横に記号と番号をつけた（番地付き）グリッドの上ののせて固定した後に写真を撮り、標本の脳内オリエンテーションをあらかじめの記録しておく。現在、このグリッドを発注した段階である。

(ii) 分子数の定量的電子顕微鏡法の開発：

理想的には電子顕微鏡レベルの抗体による免疫標識を定量的に実施し、目標としている分子の機能的解析から推測した結果との比較が要請される。現在、進行中の研究は生後 3 日のラットの Purkinje 細胞において実施している。この時期では、climbing fibers 由来のシナプスしか存在せず、またシナプスには AMPA レセプターのみが存在する。その自発性 miniature EPSCs の大きさ (quantal size: 平均、330 pS) と AMPA レセプターの single-channel conductance (5 pS) およびレセプターチャネルの推定 open probability (0.7) から、シナプスに局在する AMPA レセプターの数約 95 個と推定された。形態的には、生後 3 日のラット Purkinje 細胞の連続切片から単一 postsynaptic density の面積を測定し、synaptic AMPA receptor-channels の密度は約 $600/\mu\text{m}^2$ と推定された。これに対して、extrasynaptic AMPA receptor-channels の推定は約 $30/\mu\text{m}^2$ であった。

(2) 生細胞における観察と機能解析：

機能分子の局在様式、共存関係を高解像度の形態観察で探索すると同時に、その分子の機能と関連して生細胞における局在、動態の探索あるいは分子間相互作用の解析が必要である。

(i) Ca^{2+} チャネル： ラットの parallel fiber-Purkinje cell シナプスにおいて P/Q タイプ Ca^{2+} チャネル抗体によりその分布は parallel fiber の終末端に検出された。これらのチャネルは synaptic vesicle の開口放出部位 (active zone) の近傍に局在し、放出部位を取り囲むように分布していた。また、Purkinje 細胞の樹状突起に P/Q Ca^{2+} チャネルが凝集している非シナプス性 Ca^{2+} チャネルも観察された。この部位の直下に小胞体が存在することがあり、 Ca^{2+} チャネルの凝集と IP_3 受容体の関連が示唆された。

(ii) mGluR₇ レセプター： mGluR₇ レセプターはシナプス前終末端の active zone に分布していることは既に 1996 年に報告したが、この分布は後シナプスニューロン（標的細胞）に特異的で、somatostatin positive GAD positive の GABA 性ニューロン上の前終末端だけに見られた。この in vivo における現象を培養系で再現することは困難であったが、最近、岡部による海馬培養細胞系で成功した。先の報告と一致して、mGluR₇ は GAD positive 抑制性ニューロン上のシナプス前終末端に分布するが、錐体細胞上の前終末端には見られなかった。前者で mGluR₇ は somatostatin positive interneuron だけに依存するかを現在検討中である。

(iii) FRET 法の開発： K^+ チャネルを用いて久保が FRET 法の適用を試みているが、まだ良い結果は得られていない。岡部は GFP でラベルした細胞を用いて試みている。こちらのほうも、現在のところ FRET 法の適用の可能性はまだ直接には検討していない。しかし、少なくとも固定した標本ではその適用は可能であることは確認した（重本、木下）。この実験では、GFP を Golgi 細胞に特異的に発現させた標本で実施した。これに GFP 一次抗体を結合させ、二次抗体はロ - ダミンで標識した。この場合、GFP/ロ - ダミン間の距離

は～20 nm と推定されるが、GFP 励起後のエミッションはロ - ダミンのプリ - チによって増大し FRET の存在が示唆された。

(3) 共存分子の相互作用の解析：

先に、mGluR₃ と水チャネル(AQP4)がアストロサイトの膜上に共存し、mGluR₃ の活性化が AQP4 の水の透過性を調節していることを報告した。この AQP4 の水透過性の調節の時間経過を正確に測定することに成功した。方法は、CHO 細胞に AQP4 を導入し、水透過性に伴う細胞内蛍光色素の希釈度を二光子共焦点顕微鏡で計測した。この方法により 5 秒以内の変化を定量する assay 系を開発した。

この相互作用のメカニズムを知るために、mGluR₃ と類似している mGluR₂ と AQP4 の相互作用を検討した。強制的に CHO に mGluR₂ と AQP4 を発現させると、mGluR₃ と異なり、mGluR₂ は発現はするが AQP4 と同一膜上近傍に共存しなかった。今後、mGluR₂ と mGluR₃ のキメラを作製し、共存に必要な部位を同定することを企画している。さらに、dystrophin complex の一つの α_1 -syntrophin ノックアウトマウスで検討したところ、AQP4 と mGluR₃ の共存が見られなかった。この結果は、両者の共存には第 3 の分子の存在が必要であることを示唆し、 α_1 -syntrophin がその候補分子と思われる。

「総合評価」

これまでの経験から細胞膜上の異種機能分子はその相互作用により意外な機能を示し得ることは予期されていたが、新規にそのような現象がどのような形で見いだされるかは不明であった。この不確定要素にも拘わらず、mGluR₃ と AQP4 の共存に α_1 -syntrophin が関与することが示唆され、さらに mGluR₇ の標的細胞依存性が in vitro 標本において再現されたことはこの研究企画における朗報である。さらに、高解像度の形態観察技術に多数の解良点を加えられ、企画全体として順調な進行が見られる。

研究代表者： 丹治順 東北大学大学院医学系研究科

研究課題： 行動制御系としての前頭前野機能の解明

訪問日時： 2001 年 1 月 18 日（木） 13:00～16:30

「研究要旨」

大脳皮質前頭前野は高次認知機能を司る中枢と考えられている。本研究は行動発現の統合的処理としての前頭前野の機能を解析することを目的とする。基本的には前頭前野とそれに関連する高次運動野が感覚情報、記憶情報をどのように処理して、行動選択を実施するかを検討する。この目的のために、日本サルに種々のタスクを与え、行動の選択、最終行動を達成するまでの手順の選択、空間的、時間的行動制御などに関与する皮質運動野、高次運動野ニューロンの single unit 電氣的活動性、あるいは multi-unit の同時記録によって情報処理過程の基本の理解を試みる。

「研究進行状況」

(1) 行動選択における前頭前野の働き：

日常の行動選択は過去の記憶情報と現在の情報に基づいて実施される。この研究はその状況を単純化して、短時間（3 秒）前に提示された Cue（手がかり）の記憶と現在与えら

れた Cue によって行動を選択する過程をサルで検討したものである。この目的のために、図形（丸か三角）と位置（上か右か左）の記憶すべき Cue を提示し、3 秒後に正しい図形の選択、あるいは正しい位置の選択を指定する Choice cue を提示して行動を促した。2 頭のサルは共にこのタスクを 90%以上の成功率で正しく実施した。この行動に伴う前頭前野 (PF)、一次運動野(MI)のニューロン活動性を Sample cueの提示から、3秒の時間遅延(delay)、Choice cueの提示、行動実施の各段階において記録した。その結果、Sample cue期においては、図形選択的、位置選択的、図形と位置選択的ニューロンの活動性が PF から記録された。同様な種の PF ニューロン活動性は delay 期にも見られた。Choice cue期の場合も、図形と位置に選択的ニューロン活動が見られるが、その他に、Choice cue を提示して約 200 msec 後に選択行動に依存した PF ニューロン活動が観察された。したがって、PF ニューロンは選択行動に関する情報を Choice cue提示期に既に予知していると推測される。さらに、Sample cueの図形、位置に関する PF ニューロン活動は Sample cue期、Delay 期だけでなく、Choice cue 期においても持続していることが明らかとなった。このことは Sample 図形と位置の記憶情報と現在の選択図形と位置の情報から行動方向の決定が抽出されることを示唆する。事実、location-matching、shape-matching タスクにおける PF ニューロン活動性の時間経過を観察すると、Delay 期活動（記憶情報）は Choice cue期まで徐々に亢進して、Choice cue期の開始から急速に減衰するのに対し、Choice cue期活動はその期に限局して亢進する。さらに、選択行動活動は Choice cue期の開始に少し遅れてピークに達し、行動期にかけて次第に低下した。

一次運動野(MI)のニューロン活動性は選択行動の実施における腕などの運動に関連して観察されたが、Sample cue、Delay、Choice cueに対応した活動は見られなかった。また、行動実施においても、図形、位置に選択的な MI 活動性は見られなかった。この結果は、PF ニューロンが入力、記憶情報処理に関与するのに対し、MI ニューロンは運動実施にのみ参与することを示唆する。これらの入力、記憶情報処理時にニューロン活動が観察される、腹側の補足運動野、前補足運動野にムシモルを注入してニューロン活動を低下させると location-matching、shape-matching のタスクの成功率が有意に低下した。

(2) 複数の行動を企画・実施する際の前頭前野の働き：

目的に到達する動作の選択肢が多数の場合、どのようにして特定の動作を順次選択するかの手順(problem-solving planning)の解析を試みた。この機能に関与する部位は前頭前野とその周辺の運動関連領域と考えられている。この問題に対するアプローチとして、タスク運動をしているサルの中枢領域からニューロンの電気的活動性を記録することと、MRI を使用してヒトで課題を実行している時の記録を計画した。課題としては、path-planning と呼ばれるタスクを用いた。これは迷路課題の一つで、複数の経路が存在するマップの出発点からゴールまでをカーソルの水平移動、垂直移動を両手で操作してたどる。また、経路にブロックを挿入して他の経路を選択する課題も与えた。この課題に対して、最初可能な経路を思考し、続いて手でカーソルを動かすことになるが、最初は、頭頂葉、前頭前野の活動が高く、実際にカーソルを動かしている時は使用した手に応じて、その反対側の一次運動野に活動が見られた。したがって、運動実行期には運動前野、一次運動野が参与す

るが、頭頂葉と前頭前野の活性化は planning の時期に発現すると推測される。

サルの実験における困難な点は、タスクの実施に伴って記録したニューロンの活動性の解析が複雑なことである。この解析を単純化するために、分散分析を定時的に実施して活動を数量化した。この方法によって、そのニューロンがゴールの情報、経路の情報、ブロックの情報、運動実施の情報のいずれをより強く表現しているかを判定することができた。個々の細胞は単一の情報でなく、複数の情報を示す例が多かった。前頭前野における planning はこれら複数の情報解析に依存して実施されると仮定できる。しかし、個々のニューロンの持っている複数の情報が重要なのか、異なった情報を持った多数のニューロンの集合が重要なのかは明らかでないので、現在、複数のニューロンからの同時多重記録を実施している。

(3) 行動の空間的制御における前頭前野の役割：

外界の標的に動作を発揮するには、目標の決定と動作を実施する身体部位の決定を必要とする。この研究では、二者択一の標的（右か左か）の指示(1st cue)と二者択一の身体部位（右腕か左腕か）の指示(2nd cue)を与えた後、サルに運動実施を指令するタスクを行い、背側運動前野のニューロンの活動性を記録し、標的情報と身体部位情報の統合の仕組みを検討した。実験では、1st cueを腕、2nd cueを標的にした場合と 1st cueを標的、2nd cueを腕にした場合も比較した。この結果、1st cue は右腕あるいは左腕、または右標的あるいは左標的に選択的なニューロンの活動性が観察された。これに対し、2nd cue の関連したニューロンの活動性はその cue が指示する右腕あるいは左腕、右標的あるいは左標的を反映せずに特定の動作（例えば右腕で左標的への運動：action-selective）を反映した。したがって、運動前野では同一ニューロンでありながら、1st cue と 2nd cue の刺激に対して質的に異なる情報を反映し得ると結論される。

一方、前頭前野 (PF) のニューロンの活動を記録すると、1st cue でも 2nd cue でも、右、左の腕あるいは右、左の標的に関連し、統合された特定の動作(action-selective)を反映した活動を示すニューロンの数は少なかった。これらの結果は、PF のニューロンの主要な機能は入力の情報収集であり、統合機能との関連は少ないことを示唆する。一次運動野のニューロンは運動実行以外の機能を持つという報告もあるが、本研究では、一次運動野ニューロンの活動は set cue と action の時だけにしか観察されなかった。

(4) 行動の時間的制御における前頭前野の役割：

この企画は現在、ほぼ実験準備が完了して、進行中の研究である。サルに一定時間後（例えば、2 秒、3 秒、8 秒など）に行動を開始するように要求した時、サルは 10% 程度の誤差で実施することができるを見いだした。これに基づいて、前頭前野がどのようにして時間を認知するかを現在検討中である。さらに、同じタスクを反復して実施することを指令すると、実施しているタスクが何回目であるかを認知していることを示唆する結果も得られた。この結果を解析して「数の認知」の検討を実施中である。

(5) MRI による解析：

動物実験専用としての MRI 装置が平成 12 年 12 月に導入され、新設のプレハブに設置された。この機器をただちに調整し、サルの固定装置を作製して、現在、記録電極の位置の

確認を実施している。

「総合評価」

この研究はサル行動解析を目標とした長期間（＞6ヶ月間）の条件付けと、連日の学習訓練を必要とする。サル学習行動観察設備とその行動に関連したニューロン記録装置は、現在、6セットが完備され、十数名の若い研究者が意欲的に実験に従事している様子は印象的である。また、新たに設置されたMRIの設定も短時間に終了して有効に使用され、研究の進行状況は満足すべき状態と言える。すべての研究課題が熟考の末の綿密な計画に基づいている。時間情報、数の情報による新たな行動制御機構の興味深いデータも既に得られており（研究課題#4）、今後の大きな展開が期待される。

研究代表者： 八尾寛 東北大学大学院医学系研究科

研究課題： 学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明

訪問日時： 2001年1月19日（金） 9:00～12:30

「研究要旨」

研究代表者はこれまで末梢神経節の巨大シナプス前終末端を用いて伝達物質放出機構に関する詳細な研究を実施してきた。本研究は中枢シナプス、特に、海馬CA3錐体細胞上に苔状線維によって形成されるシナプスをモデルシステムとして選択し、そのシナプス伝達と可塑的变化の機構の解析を目的とする。このシナプス前線維終末端は比較的大きな形態を示すのでシナプス前終末端の Ca^{2+} 濃度の変化を測定することが可能であり、この意味で可塑的变化に伴うシナプス前性メカニズムの解析に適切と思われる。長期可塑的变化の解析のためにスライス培養標本を用い、可塑的变化に関連する形態的变化、細胞内伝達シグナル分子の動態、電気生理的応答を含む多角的検討を企画している。

「研究進行状況」

(1) GFPによるシナプス前終末端の可視化：

ラット海馬スライス培養系においてGFP発現ウイルスを歯状回顆粒細胞に導入して、その（苔状線維）終末端を可視化する標本の作製を試みた。海馬スライス標本を培養下で長期間（＞3週間）維持するのは、最初、困難であったが、種々の改良後、現在では高確率で成功するようになった。この標本において、苔状線維の走行は Zn^{2+} 選択的TSQ蛍光染色により確認された。同様に、苔状線維マーカー、calbindin $\text{D}_{28\text{K}}$ 免疫染色によっても確認する予定である。この線維走行及び他のニューロンの局在部位は基本的に急性スライス標本と一致し、細胞構築は培養条件下でも維持されることが示唆された。

EGFPはシンドビスウイルスに発現させて海馬スライス3週間培養標本の歯状回顆粒細胞層にpressure pulse法により注入した。この方法により、1～2日後に歯状回顆粒細胞、その軸索（苔状線維）と考えられる構造がEGFPによってラベルされた。この方法によるラベルの効率を高めるために、ウイルスを含んだ培養液の濃縮を試みたが、濃縮するとむしろニューロンの細胞死が促進された。今後、最適なウイルス濃度を検討する予定である。さらに、苔状線維終末端の Ca^{2+} 濃度をGFP/yellow cameleon間のFRETによる方法で測定する目的で、yellow cameleonをウイルスに組み込むことを試みている。Cameleonには

アミノ酸残基の重複配列が存在するので PCR の操作に困難があり、現在、その解決法を試みている。この手法が確立されたら、ウイルスを鼻粘膜にも注入して、嗅球の糸状体における神経終末端の Ca^{2+} 濃度を二光子レーザー走査蛍光顕微鏡で in vivo において測定することも計画している。

海馬スライス培養標本の顆粒細胞層では自然細胞死が観察される。しかし、比較的高頻度に観察される細胞死にも拘わらず、多数の顆粒細胞が長期間維持される。一つの可能性として、培養条件下でも progenitor cell の産生が考えられるので、この可能性の検討を企画している。しかし、この問題をどのように発展させるかの具体的計画は明らかでない。

(2) 単一神経終末端の Ca^{2+} 濃度測定：

マウスの海馬苔状線維シナプス前終末端を fura dextran でラベルし、シナプス前終末端領域の集団から蛍光強度を測定し、苔状線維刺激による Ca^{2+} 上昇を測定した。この Ca^{2+} 応答の大きさの約 30% は P/Q タイプ特異的ブロッカー、 ω -agatoxin IVA によって抑制された。これに対し、N タイプ特異的ブロッカー、 ω -conotoxin GVIA による抑制は最低 0 から最大 27% の範囲の大きな変動を示した。測定を実施した 7-28 日令のマウスにおいて、この N タイプブロッカーの効果の変動が発達段階に依存する傾向は見られなかった。したがって、N タイプチャネルの発現は個々の終末端によって異なる可能性が示唆される。この可能性を検討するために、 Ca^{2+} 感受性色素 Oregon Green BAPTA488-dextran を歯状回顆粒細胞層に注入し、苔状線維刺激による個々の単一終末端の Ca^{2+} 濃度上昇を測定した。単一終末端の Ca^{2+} 応答は時間経過が早く、振幅も大きく記録された。しかし、 Ca^{2+} 応答を示す終末端の数は、終末端領域の集団 Ca^{2+} 応答の結果と比較して予期以上に少なかった。これが線維の伝導ブロックによるのか、単一終末端と集団の応答の測定における手法の差によるのかは明らかでない。事実、先に記録していた終末端領域の集団の応答が実際にどの程度の数の終末端を反映していたのかも明らかでない。Oregon BAPTA のように可視光で励起される Ca^{2+} indicator では ratio 測定ができないので、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の絶対値が推定できない。この欠点を補足するために、 Ca^{2+} 感受性色素 (Fluo-3) と非感受性色素 (Cascade blue) を投与し、二光子励起によって二波長 (ピーク、540 nm と 480 nm) の同時 ratio 測定の試みを現在実施中である。

(3) シナプス前機能制御の解析：

(i) 小脳プルキンエ細胞におけるニコチン性受容体によるシナプス前制御： 生後 6 ~ 10 日ラットの小脳急性スライス標本にアセチルコリン (ACh) を投与すると、プルキンエ細胞の自発性 EPSCs および IPSCs の発生頻度が上昇した。この効果は程度は低いながら、tetrodotoxin の存在下でも観察された。この効果は α -bungarotoxin に対しては感受性を示さなかったが、dehydro- β -erythroidine によってブロックされた。したがって、この効果に関与するニコチン性レセプターサブタイプは $\alpha 7$ でなく、多分 $\alpha 4 \beta 2$ であろうと推測された。しかし、免疫染色では $\alpha 4 \beta 2$ であることを支持する結果は得られなかった。ACh による伝達物質放出促進効果は生後 15 日以降のラットでは観察されなかった。

(ii) 巨核球からの量子的放出の解析： 巨核球 (megakaryocytes) からパッチクラップ記録を実施すると miniature synaptic currents と類似した自発性内向き電流が記録された。

これは巨核球細胞内に存在する小胞から化学物質が量子的に放出され、そのオ - トクラインシグナルとしての応答である可能性が考えられるので、この可能性を検討した。マウスの骨髄から分離した巨核球からパッチクランプ法によって記録した自発性電流の振幅は最小単位の整数倍の分布を示した。これらの自発性電流の発生頻度はトロンビン、フォルボルエステル[®]の投与によって増加した。血小板と共に止血に参与する栓球は巨核球の細分によって生じるから、巨核球は止血に関与する細胞と類似した性質を持つと考えられる。血小板内小胞には ATP、ADP、5HT が存在する。もし、巨核球が 5HT を放出するのであれば、この現象は carbon fiber 電極によって観察することが可能である。その検討のために、巨核球をあらかじめ高濃度の 5HT で 30 分間前処理した後 carbon fiber による記録を実施した。その結果、巨核球の近傍から自発性応答が記録され、巨核球からのパッチクランプ記録を併用すると、その内向き電流の発生と同期した carbon fiber 電極の応答が観察された。この結果は、オ - トクラインシグナルの仮説とよく一致する。巨核球膜上には P2X1 タイプの ATP レセプターが存在すると言われ、これは免疫染色により確認された。

(iii) プルキンエ細胞におけるグリシンによるシナプス前制御： 小児に見られる高グリシン血漿によるてんかんと関連して、グリシンによる伝達物質の放出促進の可能性を生後 5 日までのラットの小脳スライス標本において検討した。プルキンエ細胞からパッチクランプを記録すると tetrodotoxin 存在下でグリシンは自発性 mEPSCs、mIPSCs の発生頻度を促進した。この効果は strychnine によってブロックされた。これらの結果は、幼弱期の小脳神経終末端にはグリシンレセプターが存在し、その活性化は脱分極によって伝達物質の放出を促進することを示唆する。

「総合評価」

このグループの研究状況はまだ初期の計画の準備段階にあり、具体的な研究結果は得られていない。この研究進行状況は満足すべき状態とは言えない。このグループが CREST に申請した優れた研究企画を実施するには研究人員が少なすぎることに、研究者の結束が十分でない印象を受けた。現在、中枢シナプス前終末端 Ca^{2+} 濃度の定量的測定のための新たな標本と手法の開発に多大な時間が取られているのが実情であり、この開発が軌道に乗れば、研究が全体として急速に進歩することは可能である。次年度にはさらに大学院生と新たな研究者の参加が予定されているので、今後の飛躍的な研究進行を期待したい。

3 . 平成 13 年度

研究代表者： 重本 隆一 生理学研究所脳形態解析研究部門
研究課題： 細胞膜上機能分子の動態と神経伝達調節メカニズム
訪問日時： 2001 年 12 月 7 日（金）10:00 ~ 16:00

「研究要旨」

本研究は神経細胞膜上に存在する酵素、イオンチャネル、レセプター分子の動態と形態を高分解能で観察し、未知の新しい生体機能に関する情報を探索することを目的とする。

これまでの研究結果によると、ある分子は特定の分子と細胞膜上に共存し、分子相互間の協調的作用によって生体機能を発揮することが知られている。このような現象は高度の検出感度を持つ微細形態の詳細な定量的解析によって見いだされた。本研究は形態観察と分子生物学的解析の解像度、検出度、定量的測定の改良、開発を進め、その新技術を応用して、機能分子間の相互作用に基づく生体機能を積極的に解析することを目指す。

「研究の進捗状況」

(1) 中枢神経系における mGluR3 レセプターの分布：

これまで解析されていなかった mGluR3 の中枢における分布を検討した。mGluR3 はシナプス前終末にもシナプス後細胞膜にも存在した。mGluR3 はグループ 2 に属する mGlu レセプターで、シナプス前終末では他のグループ 2 の mGlu レセプターと同様に、細胞膜に瀰漫的に分布していたが、後シナプス膜ではグループ 1 の mGlu レセプターのようにシナプス近傍に分布していた。この結果は *Neuroscience* (2001) に発表した。

(2) GABA_B レセプターの分布：

小脳と視床の GABA_B レセプターの分布を見ると、小脳のプルキンエ細胞 (PC) では主に樹状突起のスパインにあり、小胞 Glu トランスポーターの抗体をマーカーとして同定した興奮性 (Glu) シナプス周辺 (200-300 nm) に高密度に存在した。小脳では、GABA_B レセプターはシナプス後膜にも、シナプス前膜にも存在した。これに対し、視床の GABA_B レセプターはシナプス後膜だけに存在した。しかも、その分布は興奮性シナプスよりも、GABA 抑制性シナプス近傍に集積する傾向が見られた。これらの結果は、*Eur. J. Neurosci.* に掲載予定である。GABA_B レセプターの特異的分布の機能的意義は不明な点が多いが、最近小脳プルキンエ細胞の mGluR1 の反応を増強させることが小西らにより報告された。

(3) AMPA レセプター密度の定量的解析：

これまで、100種類以上の抗体を用いて、SDS-Freeze fracture Replica Labeling (SDS-FRL) 法により細胞膜上のレセプター、イオンチャネル分子の局在のスクリーニングを実施してきた。これらの分布密度を定量するには、高い検出感度と均一に検出し得る手法の開発が前提条件である。そのために、抗原分子の保持を改良する目的で、platinum (Pt) shadowing の前に、割断面を薄い (5-10 nm) carbon 膜で覆い、Pt shadowing 後にもう一度 carbon で保持した (sandwich shadowing)。さらに、検出感度を改良するために、2 次抗体のゴールドコロイドの大きさを 5 nm 以下にした。その結果、感度は数倍から 10 倍改善され、ラベルも均一となった。この方法により、生後 3 日のラット PC シナプスの AMPA レセプター-immunogold particle density を測定すると平均 1490/μm² であった。さらに、異なった切片における測定値の変動率も少なかった (coefficient of variation < 0.2)。また、AMPA particle density とシナプスの大きさの間に相関性は見られなかった。ちなみに、海馬シナプスにおける AMPA レセプターの数値は 0 - 140/spine で、その密度はシナプスの大きさに比例すると、最近、報告されている (*Nature Neurosci.* 4: 1086, 2001)。小脳と海馬で観察された結果の相違が何を反映しているのかは現在、不明である。

生後 3 日のラット PC シナプスの one quantum の Glu 放出によって活性化される AMPA レセプターチャネル数を電気生理学的に推定した結果は 1200/μm² で、シナプスの

AMPA immunogold particle density の値とほぼ匹敵するレベルである。機能的解析に基づいた AMPA レセプターチャンネル数の推定数と形態的推定数に関する論文は現在投稿準備中である。

AMPA レセプターチャンネル数を形態的観察によって定量できるようになったので、今後、このチャンネル数の発生過程における変化、および、LTP、LTD における変化の可能性を検討する計画である。

(4) 基本的新規手法の開発：

SDS-FRL 法による形態解析においては、固定が強いほど形態の保持はよくなるが、感度は低下する。固定しなければ、形態保持が悪く詳細が不明となる。その一つの原因は、無固定では、凍結に際して形態が破損されるからである。この障碍は加圧凍結装置 (high pressure freezing machine) を用いて、凍結の 10 - 20 msec 前に 2,000 気圧ほどに圧を高めて氷点を下降させることにより著しく改善された。この手法を今後さらに検討する予定である。

上記の装置の導入は手法の改善であるが、根本的に新たな手法の開発ではない。現在、新手法として、遺伝子操作によって分子を電子顕微鏡のレベルで標識する可能性を検討している。方法は GFP の代わりに、重金属と結合する能力を持つタンパク質、メタロチオネイン (metallothionein) を使用することを計画している。メタロチオネインをコードしている遺伝子は多数知られているが、水銀イオンと結合する変異メタロチオネインと標的機能分子と融合した蛋白を発現させる予備実験を実施している。

また、GFP を電子顕微鏡レベルで標識する手法も計画している。方法としては、GFP の抗体の遺伝子に電顕用の標識 (たとえば、金属) を結合させることを計画している。この手法により、GABA_A 受容体に 1 個しか存在しない γ_2 サブユニットを標識して、GABA_A レセプターの数を形態的に定量することが可能である。同様な手法により、GluR2 の数を定量することも考慮している。

「総合評価と今後の問題点」

昨年度は、初年度の短期間の研究成果としては、予測以上に順調な進展が見られた。昨年度と比較すると、今年度の研究の進展は、やや低調と云う印象を受けた。これは 2 つの理由に基づいていると考えられる。第一は、重要と思われた昨年のある実験結果 (培養細胞における標的細胞依存性 mGluR7 の発現の可能性、mGluR3 と AQP4 の共存と syntrophin- α の関連の可能性) の再現が困難で、期待していた方向へ研究を進展させることができなかったことである。第二は、細胞膜上に共存する 2 分子の相互作用によって機能を発現するという現象は、これまでも詳細な解析中に偶然の副産物として見いだされてきたが、その発見の確率が期待していたほど高くなかったことである。この第二の事実は、今後の研究遂行において再考を必要とする問題となる。研究代表者自身が認めているように、この問題を解決するには研究方針の変更が要請される。これまでは、多数 (100 種類以上) の細胞膜上の分子の分布、形態、動態を特徴付けて、共存する 2 分子を見いだし、その存在理由 (raison d'être) の解析から新規の生体機能を見いだすのが研究戦略であった。このアプローチでは、一つの機能発現のために共存する 2 分子が発見できるという

保証はない。研究代表者は、今後、特定の2種の分子（例えばイオンチャネルと酵素）の間に相互作用が存在すると予測できるような情報に基づいて、その2分子を標的として共存関係の詳細を解析することを企画している。この研究方針の変更は妥当な戦略と思われる。上記のような問題点は存在するが、globalな観点から見ると、この研究グループは二つの点で重要な研究成果を挙げている。第一は、この研究企画に必要な高感度で切片上均一な形態観察ができる methodology の開発が着実に進展していることである。その結果、第二に、レセプターチャネル（たとえば、AMPA レセプター）の数を推定することが可能となった。この手法で、個々の切片で推定したレセプターの数の変動率は低く、この方法の高い再現性と信頼性が保証された。神経系の可塑性の基盤として、しばしば、シナプスあるいはレセプター、チャネル分子の数と大きさの変化が示唆されている。この可能性の検討には、信頼度の高い形態学的検討が必要であり、その意味で、本研究の成果への期待は大きい。

本研究グループの人員はこの1年間で大幅に増加し、チームが充実したので今後の研究の進行の加速が予測される。この1年間、研究が期待していたほどのスピードで進展しなかったのは事実であるが、これまでの基本的 methodology の確立と新規の戦略変換を基盤とすれば、このグループの今後の研究成果に関して憂慮すべき問題はないと思われる。

研究代表者： 丹治 順 東北大学大学院医学系研究科

研究課題： 行動制御系としての前頭前野機能の解明

訪問日時： 2001年11月27日（火） 9：30～14：30

「研究要旨」

本研究は大脳皮質前頭前野における知覚認知、記憶処理、行動計画、運動発現の機序を解析することを目的とする。この目的のために、日本サルに動作選択、数の認知、時間認知、順序情報処理、目標到達が必要と考えられる種々のタスクの条件付けを行い、そのタスク実施中に皮質運動野、高次運動野からニューロンの single unit 電氣的活動を記録し、大脳皮質のどの領域が行動発現のどの位相に一致して活動するかを検討する。大脳皮質の運動野には一次運動野以外に前頭野、前頭前野を含む高次運動野が存在する。これらの異なった領域は明確に異なった機能を持つのか、あるいは、特定の機能は異なった領域に共通した特性として発現しているのかが、現在、未解決な問題として残されている。本研究はこの問題の解決にも寄与することを目的とする。

「研究の進捗状況」

（1）動作選択に関する運動領域特異性：

日本サルに与えられたタスクは、視覚 cueによって右手で右、または、左の目標（標的）を選択する、あるいは、左手によって右、または、左の目標を選択するといった4種類の動作（action）の選択・遂行である。例えば、第一の指示信号（1st cue）は右腕を使用するか左腕を使用するかを指示し、一定の遅延期間（1.5～2 sec）後に第二の指示信号によって右標的か左標的かの選択指示を与え、遅延期間後に準備指示信号を与えてから実行シグナルに切り替える。また、第一の cue によって右か左の標的を指示し、第二の cue によって

右か左の腕を指示する組み合わせも実施した。したがって、サルは第一、第二の入力信号を受けた後に、指令された実行動作を想定（準備）して運動を実施することになる。第一指示信号期に皮質運動野のニューロンから single unit recording を行うと、皮質領域によって明らかに応答が異なった。たとえば、前頭前野(PF)では固視点(central cue)に対して高い応答を示し、また、左右を指示する cue シグナルにも応答した。腹側運動前野(PMV)では左右を指示する cue シグナルと、標的の位置に対して応答した。これに対し、背側運動前野(PMD)では標的の位置と共に、使用する腕の指示に対して応答を示した。補足運動野(SMA)は第一 cue に対してはほとんど応答しないか、あるいは非特異的な応答を示した。また、一次運動野(M1)では第一 cue に対する反応が見られなかった。第一 cue の段階ではどのような動作(action)を実施するかを予測できない。しかし、第二の cue（たとえば、右腕）が与えられると、第一の cue（たとえば、左の標的）との組み合わせにより、実行すべき動作（たとえば、右腕で左の標的を選択）を予測することが可能である。したがって、第二の cue の応答は、その cue 自身（たとえば、右腕）を反映している場合と、action のタイプを反映している場合がある。第二の cue に対する PMD の応答の 50% は action を反映したものであり、25% が標的の位置に対する応答で、25% が使用する腕に対する応答であった。これに対して、第二 cue に対する PMV の応答は、第一 cue の場合と同様に、左右あるいは標的に関する入力シグナルを反映した。第二 cue に対する PF の応答は第一 cue の場合と同様であった。また、第一 cue の場合と同様に、SMA と M1 は第二 cue に対してもほとんど応答しなかった。実行動作の準備 cue に対しては、PMV は標的の位置に依存した応答が大多数で、一部は動作のタイプを反映する応答を示した。これに対し、PMD は大多数が動作のタイプを反映する応答を示し、少数が標的の位置に依存して応答した。PF は標的に依存した応答か、非特異的応答を示した。SMA も非特異的か、使用する腕に依存した応答を示した。M1 では右、あるいは左腕に選択的な応答が見られた。このように、SMA と M1 の間でも機能は異なることが明らかとなった。

この実験タスクでは、視覚 cue によって、腕と標的の指示情報を取り入れて action を選択・実行する脳の異なった領域の活動を real time で追跡することが可能であった。その結果、大脳皮質の異なった運動領域は動作の選択・実施において異なった機能を果たすと結論された。

（２）動作回数の情報処理：

行動には時間的要素があり、サルは実行した行動に基づいて次の動作を選択すると考えられる。この情報の処理を解析するために、一定の動作回数による条件付けを実施した。用いた動作はレバーを押すか、回すかの２種類で、最初に低い音のシグナルを準備期間（1.4～7.5秒）として与えた後、動作開始のシグナルを与える。動作期間は20～46秒で、その期間に一つの動作（たとえば、レバー押し）を5回反復するように条件付けた。これを実施した後、次回は異なった動作（たとえば、レバー回し）を5回反復させ、以後、同一動作を5回反復すると、もう一つの動作を5回反復するように、5回づつ2種類の動作を反復するタスクを与えた。サルは時に一動作を4回で中断したり(十数%)、6回まで反復すること(十数%)があったが、そのような誤った動作の時と、正動作（5回）の場合では動作時

間（20～46秒）には有意差はなかった。したがって、このタスクの実施は時間 cue に基づいているのではなく、回数（digital cue）に依存していると推測された。また、1回から5回までの動作時に記録された筋電図の activity にも差は見られなかったため、疲労度が cue になっている可能性も低いと考えられる。このような digital signal の情報処理には PF が関与するであろうと仮定して、PF ニューロンの single unit 記録を実施した。しかし、この回数情報処理のタスクの実施中に、PF ニューロンの応答はほとんど見られなかった。このタスクと関連して活動が見られたのは頭頂葉の5野で、しかも、5野の腕、肩の体性感覚領域に局限していた。皮質両側の5野にムシモール（GABA_A レセプターアゴニスト）を注入して神経興奮性を局所的に低下させると、動作の反応時間には差は見られなかったが、正動作（5回の反復）の比率が著明に減少した。したがって、5野が回数情報処理に参与すると結論された。しかし、5回の一つの動作から次の異なる動作への変換時には PF ニューロンの活動が観察された。したがって、PF は digital signal の処理には直接関与しないが、動作の切り替え、あるいは、状況の処理に必要と仮定される。

（３）絶対時間情報処理に関する予備実験：

レバー押しタスクで、緑のシグナルの時は、8秒間、赤シグナルの時は4秒間、黄シグナルの時は2秒間でレバーを離す条件付けを実施した。サルはこの時間学習を十数%の誤差の範囲で習得でき、色を変えても、学習は可能であった。この3種の時間タスクに関与する脳領域を検討するために、前補足運動野（Pre-SMA）と補足運動野（SMA）からの single unit を記録した。Pre-SMA では時間期間の情報を指示するシグナルに対して応答して漸減する場合と、活動が漸増して時間期間のほぼ終了時に最大活動を示す場合が観察された。SMA では特異的な応答が少なく、Pre-SMA のほうが時間情報に対してより密接であると示唆された。現在、PF からのニューロン活動の記録を実施中である。

（４）順序情報処理：

ヒトでは、認知した情報の時間構造（順序）に基づいた行動は前頭前野（PF）において企画されると云われている。この可能性をサルで検討することを計画した。タスクは固視点シグナルから一定の遅延期間（2秒）後に、例えば黄色の丸を見せ、遅延期間（0.5秒）を経て、例えば、赤の十字、さらに、緑の四角といったシグナルを順次与えて、最後に、3種類の形を同時に1秒間見せた後に go シグナルで、3種類の形の出現した順序に touch するように指示した。3種類の図形を示す順序はランダムに変更して、6通りの順序で提示した。このタスクの習得には約2年を要した。このタスクの実施中に PF の皮質ニューロンから single unit activity を記録すると、あるニューロンは、図形とは無関係に、最初、2番目、3番目のそれぞれの出現順序に特異的な順序表現活動を示した。さらに、1番と2番、あるいは2番と3番の対象に特異的な活動を示すニューロンも観察された。これらの出現順序に特異的な活動を示すニューロンは主として主溝の上部に局在していた。これに対し、主溝の下部では、順序でなく対象物体（丸、十字、四角など）に特異的な活動を示すニューロンが記録された。さらに、順序と物体の両者に特異的な活動（例えば、2番目に十字が出現した時に最大の活動を示す）が主溝の上、下両方にまたがって観察された。この研究は現在進行中で、今後さらに詳細なデータの収集を計画している。

（５）目標達成と行動選択の処理：

複数の手順で目標（ゴール）に到達することが可能な場合、その手順の企画過程と実行過程が前頭前野（PF）のニューロンの活動として表現されているかの検討を試みた。実験には迷路における経路選択課題を用いた。具体的には、最初に、格子状の経路の出発点とゴールを示し、ゴールを記憶させてから、次に経路に挿入した障害物の位置を示した後、Go シグナルで、カーソルを one step ずつ 3 回の動きでゴールに到達するタスクを与えた。カーソルの移動は右手首、左手首の回内運動、回外運動によって実施するが、手首の動きとカーソルの動きを変更して、ニューロンの活動が手首の運動を反映しているのか（motor planning）、カーソルの動きを反映しているのか（action planning）を確認した。最初に、障害物を付加せずにタスクを反復させると、複数の可能な経路から次第に特定の経路を選択するようになり、その時、手首の運動とカーソルの動きを変更させても、同じ経路を選択した。したがって、経路の選択は視覚情報に依存して計画し、手の運動に依存するのではないと結論される。次に、一度、選択した経路に障害物を挿入すると、迂回路を見出すが、そのような場合でも、特定の迂回路を選択する傾向が見られた。したがって、path planning には特定の経路に優先性はあるが、その選択は必要に応じて変更する融通性が存在すると考えられる。この action planning と関連した中枢活動を検討するために、MRI を用いて PF 領域を確認して unit recording を実施した。実験では、最初に、出発点のカーソルを示し、次にゴールと障害物の位置を指示し、Go サインとなるが、この Go サイン直前のニューロン活動を記録し、action planning の過程と活動する脳領域の関連を解析した。その結果、この時期の PF ニューロンは特定の位置のゴール、特定の方向への動きのカーソル、特定位置の障害物に対して活動性を示したが、手首の運動に対応した応答は見られなかった。したがって、PF は運動情報の処理には関与しないと考えられる。障害物の位置と比較すると、ゴールとカーソルに対応したニューロンの活動性が高かった。また、障害物の位置を示す前にも、ゴールとカーソルに対応した活動性が観察された。これらの結果は、ゴールの位置情報が与えられた時点で、ある程度の先取り予測企画の過程が存在することを示唆する。

「総合評価」

昨年度と同様に、今年度も独創的な企画に基づいて興味深い研究成果が得られた。一次運動野と高次運動野の異なった領域が明らかに異なった機能を持つことを直接、証明することができたのは、この分野の研究への大きな貢献と考えられる。また、行動の回数という digital 情報の処理に関連する皮質領域の手がかりが得られたのも画期的である。さらに、現在、進行中の絶対時間を認知する脳皮質領域の探索に関しても、近い将来に新しい知見が得られると予測される。目標達成と行動選択に参与する脳領域の解析は複雑で、昨年は今後の見通しが明らかでなかったが、今年度の研究成果には進展が見られた。この進展の一つの原因は、問題点と行動課題を単純化したためと思われる。多チャンネル同時記録、分散分析などの複雑な解析の導入よりは、問題提起を明確にして単純化するほうがより有効なアプローチと思われる。

研究代表者： 八尾 寛 東北大学大学院生命科学研究科

研究課題： 学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明

訪問日時： 2001年 11月 26日(月) 13:30 ~ 17:30

「研究要旨」

本研究は中枢シナプス伝達機能における神経終末端の機構を詳細に検討し、究極的にはシナプス可塑性のメカニズムを解析することを目的とする。シナプス伝達における神経終末端の主要な機能は伝達物質の放出であり、その放出は終末端の興奮に伴う Ca^{2+} の流入に依存する。研究代表者は中枢神経の単一シナプス前終末端の Ca^{2+} 動態を定量的に解析することを企画した。このために、マウス海馬 CA3 錐体細胞上に興奮性シナプスを形成する苔状線維 (mossy fiber) 終末端に注目し、その Ca^{2+} 濃度を測定した。また、海馬には成熟期においても神経幹細胞 (neural stem cells) が産生されることが知られている。そのような神経幹細胞が新たなシナプスを形成するか、あるいは、シナプスの可塑的变化に関与するかを検討する。

「研究の進捗状況」

(1) 神経終末端の Ca^{2+} 動態の解析：

苔状線維 - CA3 細胞のシナプスは長期増強(long-term potentiation: LTP) を含む種々の可塑性を発現し、またそのシナプス前線維終末端は比較的大きく (2-5 μm) 単一終末端の同定が可能である。実験には、生後 2-3 週のマウスから摘出した海馬スライスを用いた。

(i) 苔状線維終末端の同定： 苔状線維は歯状回顆粒細胞に由来する。この部位に Ca^{2+} 感受性色素 (dextran と結合した蛍光色素; oregon green 488 BAPTA-dextran、fura-dextran など) を充填したガラス微小管 (先端、100 ~ 200 μm) を挿入して細胞体に傷害を与えると、色素は障害神経線維の修復部位から細胞に取り込まれ軸索輸送により、1 時間以内にその終末端に到達し、神経刺激による神経終末端の Ca^{2+} の流入に応じて蛍光強度が上昇する。苔状線維には Zn^{2+} が存在し、その神経終末端では Zn^{2+} は小胞内に分布することが知られている。したがって、 Zn^{2+} に感受性を示す TSQ 染色によって、苔状神経終末端を同定できるが、その分布は dextran 蛍光色素の分布と一致した。また、苔状線維のマーカーとして calbindin $\text{D}_{28\text{K}}$ が存在するが、この分子の免疫染色の分布も dextran 蛍光色素の分布と重複した。さらに、CA3 錐体細胞の周辺には小型の GABA 作動性介在ニューロンが存在し、これらの細胞の軸索が dextran 蛍光色素を取り込む可能性がある。この可能性を検討するために、共同研究者、柳川 (生理研) らが作成した GABA 合成酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素 67 (GAD67) 遺伝子に GFP をノックインしたマウスを使用した。その結果、dextran 蛍光色素陽性神経線維の走行は GFP 陽性ニューロンとは異なることが明らかとなった。したがって、歯状回顆粒細胞部位に局所投与した Ca^{2+} 感受性 dextran 色素は選択的に苔状線維終末端の Ca^{2+} 動態をモニターすると結論された。

(ii) Sr^{2+} による Ca^{2+} 動態の観察： Ca^{2+} 感受性 Oregon green488 BAPTA-dextran と Ca^{2+} 非感受性 Texas red を一定濃度比に混在させてガラス微小管に充填して、両者の蛍光強度の比によって、終末端内の Ca^{2+} 濃度を定量した。神経終末端への Ca^{2+} の流入は Cd^{2+} によってブロックされる。予測に一致して、神経刺激による終末端の Ca^{2+} 濃度の上昇は外

液に加えた Cd^{2+} 濃度に比例して減少した。しかし、 Ca^{2+} の流入は、細胞内シグナルを発現して、安定した Ca^{2+} 動態の記録が困難になる可能性が考えられる。この点を考慮して、細胞外 Ca^{2+} を Sr^{2+} に置換して、 Sr^{2+} によって Ca^{2+} 動態を測定した。 Sr^{2+} は Ca^{2+} チャネルを介して終末端に流入するが、 Ca^{2+} と比較して、細胞内緩衝速度が遅く、その結果、強度の蛍光シグナルが得られて観察が容易となった。短時間に神経刺激を反復すると、残存した細胞内 Sr^{2+} の加算により蛍光シグナルが増大する。このシグナルの増大は刺激回数（頻度、50 Hz）に直線的に比例し、蛍光シグナルの定量性が反映されたので、この方法により、苔状線維終末端に存在する Ca^{2+} チャネルタイプを検討した。

(iii) Ca^{2+} チャネルサブタイプの同定： Ca^{2+} チャネルには、N型、L型、P/Q型、R型、T型のサブタイプが存在し、それぞれに特異的なチャネルブロッカー(ω -conotoxin, dihydropyridine, ω -agatoxin IVA, SNX 482) によって同定することが可能である。複数の苔状線維終末端の神経刺激による $\text{Sr}^{2+}(\text{Ca}^{2+})$ 蛍光応答はこれらの Ca^{2+} チャネルブロッカーの投与によって段階的に減少し、この結果から、この中枢神経終末端にはN、L、P/Q、Rの4種類のサブタイプが共存することが観察された。そのいずれのサブタイプ Ca^{2+} チャネルがより多数に存在するかは観察例によって異なり、チャネルサブタイプの分布密度は神経終末端によって変動していることが示唆された。この変動率は単一神経終末端を用いて、さらに定量的に検討する予定である。

(iv) 伝達物質の放出に参与する Ca^{2+} チャネルサブタイプ： 神経終末端からの伝達物質の放出は Ca^{2+} の流入に依存するが、 Ca^{2+} チャネルサブタイプあるいはその終末端の発現部位によって異なるかどうかは明らかでない。この関係を検討するために、苔状線維刺激によって誘発する興奮性シナプス応答を細胞外電極で記録し（field EPSPs）その立ち上がり電位の勾配(slope)の対数を細胞外 Ca^{2+} 濃度の対数の関数としてプロットし、 Ca^{2+} 流入と伝達物質放出の連関の程度を（coupling coefficient）定量化した。特異的ブロッカーの存在下で1種類の Ca^{2+} チャネルサブタイプのみを残存させて、この値を異なった Ca^{2+} チャネルに対して比較すると、NタイプとP/Qタイプに対しては差が見られなかった。この結果は、伝達物質放出部位(active zone)におけるこれら2種類の Ca^{2+} チャネルの分布密度はほぼ同一であることを示唆する。現在、Lタイプ、Rタイプに対しての検討を実施している。

（１）海馬神経幹細胞に関する研究企画とその予備実験：

哺乳動物の海馬顆粒細胞層においては成熟期においても progenitor cells が新生され、その分化によって神経細胞が産生されることが知られている。しかし、そのように新たに産生したニューロンがシナプスを形成するか、あるいは、学習・記憶の過程に参与するかなどの機能解析に関しては結論が得られていない。さらに、ニューロンの産生とその維持がどのような条件下で促進されるかも不明である。これらの問題を検討するために、ラットの海馬培養スライス標本において神経幹細胞を同定し、その細胞の動態を経時的に観察する手法を検討した。

実験には、生後1週間のラットから摘出した海馬スライスをメンブラン上に2-4週間培養したものをを用いた。最初に、DNA合成時に核をラベルする5-bromodeoxyuridine(BrdU)

を培養2週間のスライスに取り込ませ、その2週間後に BrdU 抗体によって BrdU 陽性細胞が歯状回顆粒細胞層に存在することが確認された。次に、移植した幹細胞の挙動を経時的に追跡する目的で、cell-line 化したラット海馬由来幹細胞、PZ5 cells、を DiI でラベルし、培養スライス標本に移植することを試みた。現在、移植後10日間維持している段階である。同様にレトロウイルスをベクターとして GFP を PZ5 cells に組み込んでラベルする方法も実施している。

「総合評価」

昨年度と比較して、大学院生を含めて研究人員が増え、研究体制はより充実し、その結果、研究状況も軌道に乗って、研究成果も順調な展開となった。特に重要な進展は、研究者一同の結束が感じられるようになったことである。中枢神経シナプスの Ca^{2+} チャンネルの解析は、研究代表者の豊富な知識を反映して、緻密で、系統的であり、今後の発展に必要な potentiality を包含している。 Sr^{2+} を carrier として Ca^{2+} チャンネルを解析する発想は独創的である。特に、単一神経終末端レベルにおけるデータが加われば、多くの知見が集積され、新たな概念に貢献できると思われる。海馬における神経幹細胞の動態の解析も魅力的な研究課題である。特に、幹細胞をスライス培養標本という *in vitro* 系で経時的に追跡する手法はこの分野における新展開の可能性を持っている。重要な研究分野は競合的である。本研究課題と関連した成果は、最近、他の研究室からも発表されているから（たとえば、J. Neurosci. 21: 8715-8721, 2001）論文を迅速に発表することに留意することが望ましい。

4 . 平成 14 年度

研究代表者： 小西 史朗 三菱化学生命科学研究所

研究課題： 抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明とその応用

訪問日時： 2003 年 1 月 10 日（金） 13:00 ~ 17:00

「研究要旨」

本研究は中枢抑制シナプスの可塑的変化の機構解析を目的とする。このために、電気生理的アプローチと情動記憶の分子的基盤および GABA レセプターの配送に關与する分子機構の解析を企画した。電気生理的アプローチでは、小脳、扁桃体のスライス標本を用い、これまで3種類の新規調節機序を見いだした。情動反応の分子的基盤の研究では、恐怖条件付けしたラットの扁桃体に発現する遺伝子の解析を目標とする。GABA レセプター分子の配送機構の研究に關しては、このレセプターと結合する分子の解析から開始した。

「研究進捗状況」

1. 抑制性 GABA シナプス制御機構の解析：

（1）AMPA レセプターを媒介とする GABA 放出の抑制機構：

本研究グループは、さきに、小脳登上線維 (climbing fibers: CF) 刺戟によってバスケット細胞 (B-cell) から Purkinje 細胞 (P-cell) への IPSCs が前シナプス性に抑制され (脱抑制) この脱抑制には AMPA レセプターが媒介することを報告した。今回この現象をさら

に解析し、次のような結果を得た。

(i) B-cell から P-cell への IPSCs が下オリブ核由来の CF の刺激によっても、顆粒細胞由来の平行線維刺激によっても減少するかを検討した結果、この脱抑制は CF に特異的であることが明らかとなった。

(ii) 上記脱抑制に関与する AMPA レセプターの存在部位を GluR2/3、GluR4 の抗体を用いて免疫組織化学的に探索した。その結果、免疫反応は P-cell の細胞体周囲と軸索起始部周辺の GABA ニューロン終末端が存在する部位に一致して見られ、GAD65 抗体あるいは synaptophysin 抗体との共存が観察された。また、GAD67-GFP ノックインマウスの小脳でも GABA ニューロンに由来する GFP 蛍光と GluR 抗体反応の部位の共存が示された。これらの結果は、CF 刺激によって放出される Glu と結合する AMPA レセプターは B-cell 終末端に存在することを示唆する。

(iii) AMPA による GABA 放出抑制の機構を検討するために、B-cell に Ca^{2+} -感受性蛍光色素を注入し、その終末端から B-cell 刺激に伴う Ca^{2+} -transient を記録した。この応答は AMPA の局所投与により減弱した。この結果は、AMPA による GABA 放出の抑制は神経終末端の Ca^{2+} 流入の低下によることを示唆する。

(iv) CF から放出した Glu が B-cell 終末端に作用する機構としては、spillover した Glu の拡散が考えられる。この可能性を低親和性 Glu 受容体 blocker (γ -DGG)を用いて検討した。この阻害剤は高親和性 Glu 受容体 blocker (NBQX)と比較して、高濃度 Glu 応答に対しては効果が弱く、低濃度 Glu 応答に対する効果が強い。 γ -DGG は CF 刺激による脱抑制を EPSCs より強く阻害した。この結果は、CF から拡散によって B-cell に到達した低濃度の Glu 応答が、直接 P-cell への高濃度の Glu 効果 (EPSCs)より強く阻害されたことを反映していると考えられる。次に、Glu transporter の阻害剤 (TBOA) を投与すると、濃度依存的に CF 刺激による脱抑制を増強した。この結果は、TBOA が Glu の細胞内への取り込みをブロックして、その細胞間拡散度を増強する結果と仮定できる。したがって、これらの結果は、上記の Glu spillover の仮説を支持する。

(v) AMPA レセプターを介する脱抑制は roscovitine (Rosco) の投与によって減弱することを先に報告した。Rosco は cyclin-dependent kinase (Cdk) のサブタイプ、Cdk-5 の特異的阻害剤である。Cdk-5 の標的分子として DARPP-32 (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein 32kD) が報告されている。DARPP-32 ノックアウトマウスでは AMPA レセプターを介する GABA シナプスの脱抑制が観察されなかった。この結果は、Cdk-5 から DARPP-32 へのシグナルカスケードが脱抑制に必須であることを示唆する。一つの可能性として、DARPP-32 は Cdk-5 によるリン酸化を受け、PKA を阻害する結果であると考えられる。しかし、forskolin によって PKA を活性化しても、PKA 阻害剤、H7 の投与によっても AMPA レセプターを介した脱抑制に変化は見られなかった。したがって、PKA 以外のカスケードが関与すると推測される。Rosco による脱抑制減弱の可能性としては、AMPA レセプターの修飾、 Ca^{2+} チャネルの変化、GABA 放出機構の変化によると考えられる。今後の検討が必要である。

(2) β -アドレナリン受容体を介する GABA シナプス増強機構：

これまで、ノルアドレナリン (NA) を投与すると、小脳 B-cell から P-cell への GABA シナプスが增強されることを報告してきた。この增強は β - レセプターを介し、GABA 放出の増大による。その機構の一つは、B-cell の I_h チャンネルの活性化による脱分極によるもので、この効果は I_h チャンネル blocker (ZD7288) によって消失した。しかし、ZD7288 の存在下でも、NA (β アゴニスト: アイソプレテノール; ISP) は神経刺激によって誘発される IPSCs の振幅を増大させた。この增強は PKA の活性化を必要とし、シナプス前機構に依存することが見いだされた。B-cell 線維終末端の Ca^{2+} -transient は ISP 投与によって影響されなかったが、GABA 放出の Ca^{2+} に対する感受性が ISP の投与によって上昇することが観察された。この機構は現在、不明である。

(3) GABA 受容体感受性に影響する因子:

Rebound potentiation は GABA レセプターの感受性を増強する現象として知られている。この現象は、CF 刺激によって P-cell に誘発する complex spike に伴って見られるもので、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を必要とすると考えられている。細胞内 Ca^{2+} 濃度は、特定の代謝型 Glu レセプターあるいはプリンレセプターの活性化によって上昇するから、これらのレセプターが関与する可能性が考えられる。P2Y レセプターは P-cell に存在することが知られているので、P2YR アゴニスト (ADP, 2-methylthio ATP) の効果を検討した。これらのアゴニストを投与すると P-cell の GABA 投与に対する応答が遅い時間経過で増大し、また神経刺激により誘発した IPSCs の振幅も同様な時間経過で増大した。Rebound potentiation には早い時間経過と遅い時間経過の 2 相が存在するが、その早い相は P2YR アゴニストの応答には存在しなかった。さらに、これらのアゴニストの投与によって、P-cell に自発性に発生する IPSCs の頻度と振幅の増大が半数以上の例で観察された。しかし、TTX 存在下の mIPSCs の振幅の増大は見られなかった。これらの結果から、P2YR アゴニストはシナプス前にも作用していると考えられるが、今後の詳細な検討が必要である。

(4) 代謝型 Glu レセプターによる小脳 GABA シナプス機能の調節:

ラット小脳スライス標本で、P-cell から自発性あるいは神経刺激による誘発 IPSCs を記録して mGluRI アゴニスト (DHPG) を投与すると、自発性 IPSCs の発生頻度は増加し、誘発性 IPSCs は抑制された。mGluR II, III アゴニストも誘発性 IPSCs を抑制したが、自発性 IPSCs に対しては無効かあるいは抑制的であった。これらの I 型、II 型、III 型アゴニストの効果はそれぞれの型のブロッカーによって特異的に消失した。DHPG の投与により、paired-pulse 比の変化は増加したので、その作用部位はシナプス前と推測された。自発性 IPSCs の頻度は DHPG によって増加したが、この効果は TTX 存在下では見られなかった。DHPG の効果は AMPA の作用と類似しているが、GluR のブロッカー (キヌレン酸) によって影響されなかった。また、GABA_B レセプター阻害剤、カナビノイドレセプター阻害剤も DHPG の効果に影響しなかった。したがって、DHPG は B-cell に直接作用していると考えられる。DHPG の効果はチロシンキナーゼ阻害剤 (AG 490) によってブロックされた。したがって、細胞内シグナルの詳細は不明であるが、AMPA の細胞内シグナルとは異なると仮定される。

2. GABA シナプス可塑性に関与する機能分子の探索

(1) 恐怖条件付けにより発現が増加する遺伝子の同定:

ラットに音の条件刺激(CS)と電気ショック無条件刺激(US)を組み合わせ、恐怖条件付けを2日間実施し、CSのみでfreezing行動を示した動物の扁桃体を2日後に摘出して、USを与えなかったcontrolと比較して増加している未知遺伝子を探索してきた。その結果、約1年前に、vacuolar protein sorting protein (VPS-16)のラットホモログをクローニングした。この遺伝子がコーディングしている分子はlysosome/endosome transport に関与する物質であり、細胞膜上 GABA レセプターの数の調節に参与する可能性も考えられる。この分子は恐怖条件付けによって、扁桃体を含む種々の中枢領域で発現の増加が確認された。この分子の生体内機能を検討するために、現在、この遺伝子のノックアウトマウスを作成中である。

(2) GABA_A 受容体配送・制御分子の同定:

興奮性シナプスの Glu レセプターに関しては interacting proteins が存在し、これらの分子によって細胞膜上のレセプターの数が増加することが知られている。同様な機構は GABA_A レセプターに対しても存在すると考えられ、その関連分子として GABA RAP、AP2、Gephyrin などが報告されているが、その詳細は不明である。本研究では、GABA_A レセプターの細胞内領域と結合する分子をマウスの脳遺伝子ライブラリーを用いて探索し、数種類のタンパク質を同定した。その中で、現在、snapin、dynein の2分子の解析を進めている。

Snapin は SNAP25 と結合する分子で、GABA レセプターの α 、 β サブユニットの細胞内ループと結合する結果が得られた。Dynein も α サブユニットと結合した。Dynein は motor protein で、逆行性軸索輸送に関与すると考えられている。今後、snapin、dynein の機能を解析することを計画している。

「総合評価」

この研究グループは電気生理的アプローチと分子生物学的アプローチを実施してきた。過去4年間の電気生理的解析においては、複数の新規シナプス調節機構を見だし大きな成果を挙げた。今回の報告では、そのような新規の発見は見られなかったが、これまで蓄積してきたデータの中で未解決な問題点を検討した成果が示された。この成果から、研究は明らかに進捗していると判断された。特に、AMPA レセプターを介する GABA 抑制シナプスの脱抑制が DARPP-32 ノックアウトマウスでは観察されない結果は今後の解析における大きな示唆と考えられる。一方、PY2R アゴニストおよび mGluRI アゴニストに関する研究は結果が複雑であり、目標も十分に明確でないため再検討が必要と思われる。恐怖条件付けにより扁桃体において増加する遺伝子産物が VPS16 と同定されたことは大きな進展である。VPS16 のノックアウトの結果が期待される。GABA 受容体配送分子の研究計画は論理的であり、進捗も順調で、短期間に多くのデータが得られている。しかし、残された1年間に、どこまで成果が得られるかに関して、十分な計画を必要とする。

研究代表者： 清水 孝雄 東京大学大学院医学系研究科

研究課題： 脂質メデイエーターの dual receptor 系と神経機能

訪問日時： 2003年1月17日(金) 10:00 ~ 17:00

「研究要旨」

本研究は脳における脂質メデイエーターの機能の解析を目的とする。このために、脂質メデイエーターの新規合成酵素と受容体遺伝子を単離同定し、その細胞内伝達様式を解析し、機能を細胞、組織レベル、固体レベルで検討する。細胞、組織レベルでの機能解析には組織化学、電気生理的手法を用い、固体レベルでの機能解析は遺伝子改変動物の行動変化を観察することによって実施する。

「研究進捗状況」

1. ホスホリパーゼ A2 の研究

細胞質型ホスホリパーゼ A2 (cPLA2) には α 、 β 、 γ の family が存在する。 α 、 β には Ca^{2+} と結合する C2 domain が存在するが、 γ はこの domain を欠く。さらに、 β には 4 種類の subfamily の存在することが本研究グループによって見いだされた。これまで α family の活性が強いと考えられてきたが、今回、基質によっては、 β 、 γ が α より活性が強いことが明らかになった。 β は消化管と脳に存在し、 γ は細胞内の小胞体、Golgi 装置に局在することが見いだされた。 γ には C2 domain がないので、 Ca^{2+} によって活性化されないが H_2O_2 、その他の過酸化物によって活性化されることが見いだされた。どのようにして酸化ストレスによって活性化されるかの機構は明らかではないが、チロシンのリン酸化が関与することが示唆された。現在、 γ ノックアウト(KO)マウスが準備されているので、これを用いてその機能解析を計画している。

cPLA2 α のノックアウトマウスに関してはこれまでも一部の結果が報告されてきた。今回、中脳動脈(MCA) の 75 分間の閉塞によって生じる脳の梗塞巣部位は KO マウスで有意に軽症で、死亡率も低下することが明らかになった。また、MOG 注入によって作製した多発性硬化症モデル(EAE)においても、その症状は KO マウスで軽症であった。これは炎症細胞の産生の低下に起因すると考えられる。事実、EAE 急性期の組織のミクログリア、マクロファージの浸潤は KO マウスで軽度であった。

cPLA2 の細胞レベルでの機能を解析する目的で、cPLA2 を EGFP と融合させて sindbis virus に組み込んで培養小脳ニューロンに発現することを試みた。cPLA2 は核を除く細胞質に一様に分布した。これらのニューロンに glü を投与すると、cPLA2 は核膜周辺に移行し、さらに樹状突起の spine に移動することを示唆する現象が観察され、cPLA2 がシナプス伝達機能に参与する可能性を示した。

cPLA2 α KO マウスでは分娩異常が観察される。KO マウスの排卵には異常が見られなかったが、着床機能に障害があった。子宮のプロスタグランدين (PG)を定量すると、種々の PG の分布比が正常と KO マウスにおいて異なっていた。今後、異常に低下している PG の投与によって機能低下が改善されるかを検討する予定である。

さらに、短縮型の新規 cPLA2 (KIDS; kainate-inducible dendate gyrus specific) の発見を報告した。現在、その promotor 領域、kainate-responsive element の存在部位の解析を

実施している。KIDS がどのようにして活性化されるかは、現在、不明であるが、最近、PIP2 (phosphatidylinositol biphosphate) によって活性度が上昇することを見いだした。さらに、カイニン酸刺激によって、海馬の COX II の発現上昇が見られた。

2．ホスホリパーゼ D の研究

ホスホリパーゼ D (PLD) は脂質のリン酸基の結合を加水分解してホスファチジン酸とコリンを産生する酵素である。この酵素の固体レベルでの機能は知られていないので、ショウジョウバエを用いての解析を試みた。発生時期に眼の成虫原基を用いて PLD を一過性(数時間)に強制発現させると、複眼構造は不規則になり rough eye の表現形を示した。次に、口吻の成虫原基を用いて PLD を一過性に発現させると、成虫型にならず、幼虫型の口吻が残存した。これらの結果から、PLD はショウジョウバエの発生過程において感覚器形成に関与することが示唆される。哺乳動物でも PLD は発生制御を受けていることが知られているが、この点に関して、ショウジョウバエの PLD は哺乳動物の PLD2 と類似している。発生初期の PLD 発現が低下するが、この過程は正常感覚器の発現に必須と考えられる。

3．中枢神経系における脂質伝達物質の効果

cPLA2 の KO マウスの海馬 CA1 におけるシナプス伝達の解析を実施した結果、単一刺激による伝達、あるいは、paired-pulse facilitation には著明な変化は見られなかった。また、LTP も正常と差がなかった。しかし、1 Hz 15 分間刺激による LTD は KO マウスで観察されなかった。PAF KO マウスでは、paired-pulse facilitation に僅かの低下が見られたが、LTP は正常と差が見られなかった。LTP あるいは LTD の変化がどのような機能の変化を反映しているのかは明らかでない。実際に心的障害を与えた時に、LTP、LTD が変化するかを行動制限あるいは強制水泳のストレスを 0.5 - 2 時間与え、1 週間後に観察した。その結果、LTP、LTD の発現はともに有意に阻害された。さらに、水迷路テストによる学習効果の低下も観察された。したがって、心的障害は長期増強、長期減弱の発現に影響すると推測される。

4．脳内脂質メデイエーター機能の形態学的検討

Lissencephaly では脳表面の回転部位 (convolutions) の数が少なく、大脳皮質の層構造が乱れ、ニューロンの migration に異常が見られる。この疾患では、遺伝子 *Lis1* が欠損している。この遺伝子産物は血小板活性因子 (PAF) アセチルヒドラーゼ β subunit である。したがって、PAF receptor KO マウスの解析により、PAF の細胞移動における役割のヒントが得られる可能性があると考え、その検討を試みた。この KO マウスの 1 日齢、3 週、5 週、8 週齢では異常な所見は見られなかった。しかし、KO マウスの胎生期 14.5、17.5 日では小脳の顆粒層が厚くなり、細胞移動の速度の低下を示唆していた。また、in vitro の培養系でも PAF 受容体欠損マウスは移動速度が低下していた。今後、*Lis1* と PAF receptor の double KO マウスにおける形態変化を検討する予定である。

cPLA2 の脳内局在を抗体により検討した結果、小脳皮質の P-cell に限局し、細胞体、樹状突起に分布していた。培養 P-cell にアラキドン酸を投与すると、生存率が高くなり、アスピリンを投与すると生存率は低下した。これらの効果は P-cell に特異的な傾向と思われた。また、アスピリン存在下では P-cell の形態に異常が見られた。アラキドン酸は樹状突

起の成長を促進する効果を示したのに対し、BDNF の投与ではスパインの数の増加が見られた。LTC4S は視床下部にのみ見られ、その室傍核、視索上核など下垂体後葉に投射する細胞に限局していた。特に大型ニューロンに存在し、vasopressin との共存も見られた。Oxytocin とも共存しているようであるが、さらに詳細な検討が必要である。

LTA4H は脳に広範に分布するが、その染色性に特定の細胞に対する特異性も見られた。その特異性から分裂能を持つ細胞に親和性を持つことが推測された。今後、LTA4H の分布の意義（たとえば、ストレス応答との関連）の検討を計画している。

5．ロイコトリエン受容体の研究

ロイコトリエン受容体には BLT1、BLT2、CysLT1、CysLT2 の 4 種類が存在し、BLT1 と BLT2 は本研究グループによってクローニングされた。BLT1 の KO の作製はすでに成功し、BLT2 の KO マウスの作製も現在進行中である。CysLT1 の KO マウスは他の研究室ですでに実施された。CysLT2 の KO マウスの作製は現在、新潟脳研グループと共同で進行中である。

6．G-タンパク共役型受容体（GPCR）の研究

現在使用されている薬品の約半数は GPCR が target であると云われている。したがって、そのリガンドの同定は重要な問題である。GPCR には多数の orphan receptors が残されている。GPCR のリガンドを同定するには、レセプターを細胞膜に発現させることが必要であるから、GPCR を細胞膜表面に発現した CHO 細胞をセルソーターで集めるという方法を用いた。その結果、新規の LPA (lysophosphatidic acid) に対する受容体を見いだした。LPA 受容体には 3 種類 (Edg-2, 4, 7) が知られているが、これらのすべてをノックアウトしても明白な変化は見られない。したがって、他の受容体が存在する可能性が考えられていた。種々のスクリーニングの結果、特定の GPCR と K_d 値、46-61 nM の結合能を持ち、cAMP を上昇させる LPA を見いだした。このレセプターは Edg-2、4、7 とは相同性がなく、小脳、視床下部、大脳皮質、心臓、脾臓に発現が見られた。また、K_d 値は最も低く、高親和性であった。ちなみに GPCR は 7 回膜貫通型であるが、7 回膜貫通型でも N-末が細胞内に存在し、GPCR ではないタンパクの存在が見いだされ、遺伝子情報のみで GPCR を選択することの困難性も新たに明らかとなった。

「総合評価」

本研究グループはこれまで多数の脂質メディエーター関連分子の発見、レセプターのクローニングに成功し、順調な研究の進捗を示してきた。今回も、新規 LPA リガンドと結合する GPCR レセプターを見出した。これは朗報であり、今後のこのアプローチに対する促進となる。研究代表者は先に、新規 cPLA2 (KIDS) を発見し、その機能解析のために、この遺伝子の promoter 領域の解析を実施してきたが、この試みは予想外に困難で、まだ成功していないのは残念である。現在、cPLA2、PAF 受容体、ロイコトリエン受容体を含む分子のノックアウト(KO)の解析が準備され、その結果に大きな期待が持たれる。cPLA2 の KO マウスに関しては、臨床応用の可能性を示唆する機能障害が見られ興味深い。この cPLA2 KO マウスでは LTD が欠損するという特徴を早くから見いだしていたが、その後の進展がなく、また、電気生理の解析もやや単純な印象を受けた。さらに、専

門的な探索が望ましい。同様に、PLDの研究は未完成だけでなく、何を目的として、どのような結果を期待したのかが明らかでない。形態学的手法による脳脂質メデイエーターの解析では、特定のメデイエーターが脳内で特異的な分布を示すことが明らかになり、興味ある結果が得られた。今後、新しい breakthrough となる可能性も考えられる。

研究代表者： 平良 眞規 東京大学大学院理学系研究科

研究課題： 脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析

訪問日時： 2003年1月16日(木) 13:00 ~ 17:00

「研究概要」

本研究はアフリカツメガエルの初期発生における頭部オーガナイザー、前部神経板の cDNA ライブラリーを作成し、脳形成に参与する分子と遺伝子カスケードを解析することを目的とする。基本的アプローチは多数の新規遺伝子を同定し、その機能を解析することであり、そのために脳の部位特異的発現する遺伝子を網羅的にスクリーニングする。

「研究進捗状況」

A. オーガナイザー活性の分子基盤と遺伝子カスケード

(A-1) 後方中軸中胚葉と後方神経外胚葉の Xror2 の機能

オーガナイザー領域特異的ホメオボックス遺伝子、Xlim-1 は神経誘導活性に関与している。Xror2 はその標的遺伝子候補の一つで、レセプターチロシンキナーゼ (TK) を持つ。Xror2 を過剰発現させると細胞の収斂伸張運動を阻害したが、この効果は、細胞内ドメインの TK を失活させても存在した。この現象が、細胞分化の停止に起因しているかを神経マーカーの *nnp1* を用いて検討した結果、Xror2 は細胞運動をブロックしたが、細胞分化には影響しないことが明らかになった。また、animal cap を activin で処理すると、標本の伸展が見られるが、この細胞運動も Xror2 によりブロックされた。

Xror2 は Xwnt11 およびそのレセプター Frizzled 7 (Xfz7) と相乗的に作用する。この現象は、Xror2 が Xwnt11 シグナル伝達下流の Rho family (CDC42) 系を介することを示唆する。事実、Xror2 による animal cap の収斂伸張運動の抑制は dominant-negative 型 CDC42 (CDC42^{T17N}) によって、少なくとも、部分的に軽減された。

Xror2 の効果を発現するには frizzled-domain の存在が必須である。さらに、共免疫沈降法により、Xwnt11 は Xror2 及び Xfz7 と結合することが示唆された。したがって、Wnt は Xror のリガントで、多分、その frizzled-domain に結合すると仮定される。

(A-2) Crescent の機能解析

頭部オーガナイザーに発現する Crescent は frizzled domain を持ち、Wnt と結合し、そのシグナルを阻害する因子である。Wnt は発生初期に背側を決定するに必要であるが、後期になると後方化因子として機能して頭部形成を抑制する。Crescent は Wnt 8 の後方化作用を阻害しているのか、Wnt11 による収斂伸張運動を阻害している可能性が考えられる。Crescent を前方神経外胚葉領域に異所発現させると、頭部が増大した。この結果は、Wnt の後方化作用が阻害されたことを示唆する。しかし、注入する Crescent の濃度を低下させると、頭部の増大は見られなくなるが、身体が短縮する効果は残存した。これは収斂伸

張運動を阻害した結果と考えられる。Xror2 の場合と同様な解析を実施した結果、Crescent は Wnt による後方化と収斂伸張運動を阻害することによって頭部形成に関与すると推測された。

(A3) cereberus 遺伝子のプロモーターの解析

cereberus は Xlim-1 の標的遺伝子候補と仮定されてきた。cereberus のプロモーターにルシフェラーゼを連携したレポーターを作製して Xlim-1 の活性型に対する応答を検討した結果、cereberus の転写開始部の上流に Xlim-1 反応エレメントの存在することが確認された。今回、この領域に Xotx2 とその他に 3 個の転写因子 (Xlim-1、Siamois、Mix.1) が複合体を形成して結合することが見いだされた。これらの結果は、オーガナイザーを誘導する Nodal と Wnt のシグナルが Xlim-1、Xotx2、Mix.1、Siamois の発現を介することで cereberus 遺伝子を活性化し頭部誘導をもたらすという遺伝子カスケードを示唆する。

(A4) Xlim-1 と Ldb1 による遺伝子制御

Xlim-1 がオーガナイザーでどのように制御されるかを検討している時に、Xlim-1 の LIM ドメインと結合する因子、Ldb1 (LIM ドメイン結合タンパク)が見いだされた。また、lim-3 に結合する XRnf12 も関連することが明らかになった。Rnf12 と Ldb は共にオーガナイザーの中胚葉に発現している。Rnf12 は Ldb1 をユビキチン化してプロテアソームにより分解するが、Xlim-1 が Ldb1 と結合すると分解が抑制される。この抑制には Xlim-1 の LIM ドメインと Ldb1 の LIM ドメイン結合領域の存在が必要であった。事実、Xlim-1 の代わりに、LIM ドメインを持ち、ホメオドメインを持たない LMO2 を投与しても、Ldb1 の分解は抑制された。Ldb1 あるいは XRnf12 の過剰発現及び両者の共発現の実験結果から、XRnf12 は Xlim-1 と結合していない過剰の Ldb1 を分解する可能性が考えられた。したがって、この過程によってオーガナイザーの Xlim-1 と Ldb1 の量が適切に維持されて、オーガナイザーの活性レベルが保持されると推測された。

B. 神経板に発現する遺伝子の機能解析

(B-1) 神経化における XMAN1 の役割

前部神経板 (神経外胚葉) に神経化活性を持つ遺伝子の存在する可能性を検討する目的で nrp1 の発現を指標として探索した結果得られた一つが A124C10 である。これは膠原病の自己抗原の一つで MAN1 のオーソログ (XMAN1) であった。この分子は 2 回の膜貫通領域を持ち、核内膜に存在する。この遺伝子は発生初期には外胚葉側に局在して発現し、神経胚になると neural crest から神経板にかけて存在し、中胚葉には発現しなかった。神経化活性因子は BMP (bone morphogenetic protein) を阻害することが知られている。XMAN1 は BMP の発現自身には影響しなかったが、BMP の下流標的遺伝子の発現を抑制した。XMAN1 のアンチセンスのモルフォリーノオリゴ (MO) を胚に注入して XMAN1 の翻訳をブロックすると、前方の神経組織の形成が阻害された。したがって、XMAN1 は BMP 経路を抑制して、神経形成に参与すると結論される。MO を注入すると phenotype の変化としては眼の消失が見られた。

(B2) 予定中脳・後脳境界 (MHB) における XHR1 の発現

XHR1 は midbrain-hindbrain boundary (MHB) に特異的に発現する転写抑制因子を

コ - ドする遺伝子で、原腸胚初期、ステージ 10.5 にすでに発現することが観察された。XHR1 の標的遺伝子を同定する目的で、活性型に変換したコンストラクト(XHR1-VP16)で、Glucocorticoid で活性されるコンストラクト(XHR1-VP16-GR)を作成した。このコンストラクトはデキサメサゾン(Dex)の添加によって活性化されるから、Dex によって発現した遺伝子クローンを Dex の有無による differential screening により 10 個検出した。その中の一つ ESR1 は XHR1 の発現領域で発現が抑制され、モルフォリーノオリゴで XHR1 の翻訳を抑制すると ESR1 の発現が見られた。したがって、ESR1 は XHR1 の標的遺伝子と結論される。ESR1 も転写抑制遺伝子であるが、今後、この遺伝子の機能解析を試みる。

XHR1 は脳の初期パターン形成に参与すると思われるが、その発現にはオーガナイザーからのシグナルを必要とすると考えられる。現在、この考えにしたがって、XHR1 のプロモーター領域を解析している。

C. その他

(C-1) 密着分子 (claudin) の発現パターン解析

頭部オーガナイザー領域の cDNA ライブラリーから 3 種類の claudin 遺伝子(4L1, 4L2, 7L1) がクローニングされた。Claudin は tight junction の遺伝子で、発生過程における機能の解析はこれまで実施されていない。これらの遺伝子は、初期原腸胚期では外胚葉、中胚葉に発現するが、原腸陥入が進むと、外胚葉の上皮層と内胚葉の原腸蓋に限局した。さらに分化が進むと、神経板に 4L1, 4L2 が発現した。これらの遺伝子は発生過程において発現部位が特異的に変化するのが特徴で、何か独特な機能に関連している可能性が考えられる。

(C-2) プラナリアの頭部に発現する遺伝子、nou-darake (Ndk) の機能解析

プラナリアの脳に発現する Ndk は FGF receptor-like protein 1 (FGFRL1) のオーソログであるが、その機能は不明である。理研のグループとの共同研究で、この遺伝子を *Xenopus*-胚に発現させて機能解析を検討した。この検討により、Ndk は FGF シグナルを阻害し、その結果、中胚葉の *Xbra* 遺伝子の発現が阻害されることが明らかになった。この結果は、Ndk/FGFRL1 は FGF シグナルを修飾して、プラナリアの脳形成を頭部に限局させることを示唆する。現在、FGFRL1 の *Xenopus* オーソログ (Xndk) も単離できたが、これも初期神経胚の頭部に限局して発現した。

「総合評価」

本研究は脳形成に参与する遺伝子カスケードを解明するのが目標で、多数の新規遺伝子の同定と、スクリーニングした遺伝子の機能解析を必要とする。この解析に要する時間をできる限り短縮するには、綿密な研究計画に基づいた戦略的アプローチと豊富な実験手法に関する知識が要請される。これまでのこの研究グループの成果は印象的であり、高く評価できる。特に、神経化活性を示す遺伝子、XMAN1 の単離とその機能解析及び、頭部に特異的に発現する遺伝子、Xndk の単離は今後の興味ある発展への基盤となる可能性がある。

遺伝子カスケードの過程においては、遺伝子がコ - ドする分子が相互に制御して微妙なバランスを保持していると考えられる。この可能性に関連して、Xlim-1、Ldb1、XRnf12

による相互制御の機構の解析は生体の巧みな仕組みの一例を明らかにしたと言える。

研究代表者： 津本 忠治 大阪大学大学院医学系研究科

研究課題： 回路網形成における神経活動の関与のメカニズム

訪問日時： 2003年1月24日(金) 13:00 ~ 16:30

「研究要旨」

本研究は中枢神経回路網の形成とその可塑的变化に関与する因子を解析することを目的とする。これらの過程に関与する因子として、神経活動と神経栄養因子を対象として、その効果を培養標本、in vitro スライス標本、in vivo 標本を用いて、多角的に検討する。

「研究進捗状況」

A. 培養大脳皮質神経細胞を用いた実験

(1) 内因性 BDNF の動向

先に、GFPとBDNFの融合遺伝子 plasmid cDNAを大脳皮質培養細胞の核に注入して、BDNFの細胞内移動をGFPラベルによって観察した。しかし、GFP-BDNFは人工的に作成したタンパクであるから、生理状態で、内因性BDNFと同じ動態を示すかの検証が必要である。この目的のために、BDNFノックアウト(KO)マウスとGFPを発現するGFPマウスから得られた培養大脳皮質細胞を混合して共培養を実施した。この標本では、GFPでラベルされた培養細胞は内因性BDNFを持ち、無色の(ラベルされていない)培養細胞はKOマウス由来でBDNFを欠損している。したがって、無色培養細胞にBDNFが検出されれば、それはGFP培養細胞から移行したBDNFである。BDNFの免疫組織化学的染色により、内因性BDNFはGFP-BDNFと同様に、シナプス前培養細胞からシナプス後細胞に移行することが確認された。

(2) GABAニューロンへのBDNFの移行とその形態変化に関する効果

上記の培養共細胞実験において、シナプス前細胞から移行した内因性BDNFはglutamic acid decarboxylase (GAD) 65陽性細胞(GABAニューロン)の樹状突起の形態的発達(全長及び分岐点の数)を有意に増大させた。しかし、非GABAニューロン(興奮性ニューロン)ではBDNFによる形態的变化は認められなかった。GABAニューロンにはBDNF mRNAが存在しないことが知られているので、他のニューロン由来のBDNFに依存すると推測される。これに対し、興奮性ニューロンは自己が合成するBDNFに応答しているので、他のニューロン由来のBDNFにはそれ以上の応答が見られないと仮定できる。

(3) BDNFによるGABAニューロンのシナプス機能の変化

BDNFの長期投与によるシナプス伝達機能の変化を検討するために、GABAニューロンの孤立神経細胞培養標本を用いた。BDNFを10-14日間投与すると、刺激誘発(自己シナプス性)によるIPSCsの振幅が有意に増大した。自発性IPSCsの頻度はBDNFによって上昇したが、その振幅には変化が見られなかった。これらの結果は、BDNFの作用部位がシナプス前であることを示唆する。しかし、2回刺激によるpaired-pulse ratioには変化がなく、現在、データの解釈はまだ不明である。

一つの可能性として、シナプスの数が増加していることが考えられるので、この可能性

をニューロンの形態的变化と共に検討した。GAD65陽性ニューロンを synapsin I抗体で免疫染色すると、染色はBDNFの存在下で著明になり、シナプス数の増加が示唆された。今後、さらに詳細な計測が必要である。GABAニューロンは、BDNFの存在下で、細胞体の大きさが著明に増大し、樹状突起の長さ、分岐点の数が増加した。これらの観察も、今後さらに例数を増やす予定である。ちなみに、BDNFの急性投与に際しては、GABA応答が抑制されるという報告があり、上記の慢性投与効果と逆になる。この差異が何に起因するのかは不明である。

(4) BDNFのニューロン内移動の調節

GFP-BDNFを用いて軸索あるいは樹状突起に沿っての移動が観察されるが、どのような条件下で変化するかは明らかでない。これまでの観察では、BDNFの細胞内移動はGluの投与によって抑制され、この抑制効果はTTXの存在下で消失した。したがって、ニューロンの興奮状態、活動電位の有無によってBDNFの細胞内移動が影響されると思われる。しかし、細胞外 K^+ 濃度を高めても移動は影響されなかった。現在、これらの結果の解釈は明らかでない。細胞内移動速度は変動が大きいですが、平均すると、移動速度は軸索($\sim 0.8 \mu m/sec$)のほうが、樹状突起($\sim 0.4 \mu m/sec$)より速かった。

B. スライス標本を用いた実験

(5) Silent synapse に対する BDNF の効果

大脳 barrel cortex の領域に投射する視床・皮質経路を含むスライス標本で解析すると、NMDA受容体だけのシナプス(silent synapse)は生後4日では約47%の細胞で観察されるが、生後8-11日では殆どの細胞で観察されない。BDNF KOマウスを用いると、生後8-11日でもsilent synapseは約50%の細胞で残存していた。Silent synapseでもpairing(神経刺激とシナプス後ニューロンの脱分極の併用)を行うとAMPA受容体の応答が出現する(silent synapseの活性化)ことが知られている。しかし、BDNF KOマウスではこの操作によってもsilent synapseを活性化できなかった。しかし、KOマウスでBDNFを投与して約1時間後にpairingするとAMPA受容体の応答が見られた。この現象には、*trk* レセプターのチロシinkinナーゼが関与し、その阻害剤K252bをシナプス後ニューロンの細胞内に注入すると、BDNF投与後にpairingを行ってもsilent synapseは活性化できなかった。さらに、シナプス後ニューロンの細胞内にBAPTAを注入して細胞内 Ca^{2+} を低下させるとpairingで活性化することができなかった。また、PLC γ 阻害剤(U-73122)も同様にシナプスの活性化を阻害した。したがって、silent synapseの活性化にはシナプス後のBDNFレセプターが関与していると結論された。

(6) 視床—大脳皮質シナプスの伝達物質放出能の発達の可塑性

Silent synapseが活性化される発達時期にそのシナプスにどのような変化が見られるかを電気生理的に検討した。MK801(NMDA receptorのopen channel blocker)を投与すると伝達物質放出確率が高いシナプスのほうがシナプス伝達が急速にブロックされる。この効果を利用して、放出確立の程度を生後4日(P4)と生後22日(P22)のマウスで比較した。その結果、シナプス伝達効率の減衰はP4のほうが速やかであり、P6ではすでに、P22と類似していた。伝達物質の放出確立が高いと、paired-pulse ratioが低くなるので、この関

係を指標として検討を行った。EPSCs を NMDA と AMPA 成分に分けて paired-pulse ratio を P 4 と P 2 2 で比較すると、AMPA成分は paired-pulse ratio は P4で高く、P22で低くなり、NMDA成分では P4で paired-pulse ratio が低く、P22で高くなった。これらの結果は、P4 では (silent synapse が活性化される時期)、伝達物質の放出確立が特に高い状態にあると推測される。しかし、この特徴と silent synapse の活性化の機構との関連は不明である。

C. In vivo の実験

(7) In vivo 標本における LTD の欠損

Slice 標本では、低頻度刺激 (1 Hz, 15 分) で著明な LTDが見られるが、in vivoではこの操作によって LTDが見られない。この原因は実験温度の差でもなく、in vivoにおける網膜からの自発性神経活動の入力の存在でもないことが明らかになった。Slice 標本では LTD が BDNF によってブロックされることが先に観察されていたので、BDNF の含有量の差による可能性が考えられた。この可能性を検討するために、in vivo において K252a (*trk* カイネーズ阻害剤)を投与したところ、LTDが誘発された。同様に、*trk* B 抗体の投与によっても LTDを誘発することができた。これに対し、NT 4/5 抗体の投与ではそのような効果は見られなかった。Slice 標本ではリン酸化された *trk* の量は 1~2 時間以内に著明に減少することが観察された。これらの結果から、slice 標本と in vivoにおける LTDの発現の有無の差は BDNF 受容体活性の差に起因することが示唆された。

(8) 大脳視覚領野のコラム形成に対する BDNF の関与

仔猫の視覚領野に BDNF を慢性的に投与すると、外側膝状核 (LGN) に Dextran amine を注入してラベルした入力線維の全長が短く、分岐点の数が少なくなった。その結果、その線維の全長によって支配される領域が拡張する (elongation index が増加する) 傾向を示した。幼若期の仔猫の片眼を遮蔽すると皮質のコラムが縮小し、この縮小は BDNF の慢性投与により阻止できる。この効果は、BDNF による入力線維の elongation によると推測される。

(9) 神経活動性の BDNF 発現に対する影響

幼弱期にフェレットの両眼に TTX を注入すると、視覚野の BDNF 含有量が有意に減少したが、他の中枢領域では変化が見られなかった。この変化は BDNF にだけ見られ、NGF、NT-3、NT-4/5 には変化が見られなかった。TTX を一側の眼に注入すると、同側視覚野の BDNF の変化は少なく、反対側に変化が大きく、この結果は網膜から視覚野への同側、反対側神経投射比とよく一致し、BDNF の発現は入力線維の活動性に依存することが示唆された。皮質 BDNF の発現が皮質ニューロンの活動性にも依存するかを検討するために、大脳皮質に muscimol を注入した。この操作による皮質の BDNF の減少は、TTX の両眼注入による減少より著明であった。したがって、皮質ニューロンの活動性は BDNF 発現に大きく影響することが示唆される。

D. シナプス競合機構に関する研究

培養細胞においては、単一シナプス後ニューロンにシナプスを形成する A、B 2 個のニューロンからのシナプス伝達を比較することが可能である。この標本において、Aニューロン

を GFP マウス（緑）から培養し、B ニューロンを DsRed マウス（赤）から培養すれば、この両シナプスの競合機構を慢性実験で検討し得ると予測されるので、このアプローチを試みた。しかし、DsRed には細胞毒性があり、長期の培養が困難であった。最近、新規の HcRed マウスが作成されたので、現在、このマウスを用いて検討中である。

「総合評価」

研究の進行状況は、これまでと同様に、本年度も順調である。本研究グループは、2001 年に、ラベルした GFP-BDNF の細胞内および細胞間移動を培養細胞で観察する手法を開発した。この手法は明らかに研究のブレークスルーとなった。この応用の一つとして、シナプス競合の研究が企画された（上記、研究 D）。これは特に魅力的な企画であるが DsRed の細胞毒性のため、予測したように研究が進行しなかったのは残念である。今後、HcRed マウスによる検討に期待したい。

さきの GFP-BDNF の移動観察において、BDNF はシナプス前細胞からシナプス後細胞へ移行することが観察された。今回、この BDNF のシナプス伝達およびニューロンの形態変化に関する検討が実施された。BDNF は GABA 性抑制ニューロンの形態を変化させたが、興奮性ニューロンの形態には影響しないという興味深い結果が得られた。これは、抑制性ニューロンは BDNF を合成できないからと解釈された。しかし、この仮定を支持するには、BDNF KO マウスから培養した GABA 抑制性ニューロンと興奮性ニューロンに対してはシナプス前細胞から由来する BDNF が同様な効果を示すことを証明する必要がある。

この他に、スライスあるいは *in vivo* など異なった標本を用い、silent synapse、LTD、神経活動と BDNF 発現の関係など多角的な研究を実施し、興味ある結果を得た。

5 . 平成 15 年度

研究代表者： 重本 隆一 生理学研究所脳形態解析研究部門
研究課題： 細胞膜上機能分子の動態と神経伝達調節メカニズム
訪問日時： 2004 年 2 月 16 日（月） 10:30 ~ 15:30

「研究要旨」

本研究は神経細胞膜に存在する受容体、イオンチャネルなどの機能分子の形態と動態を高解像度、かつリアルタイムで観察し、これらの分子の局在と機能のメカニズムを解析することを目的とする。さらに、可塑性、学習に伴うシナプスの変化を分子レベルで検討することを試みる。

「研究の進捗状況」

（１）カチオン(HCN)チャネルの分布：

過分極によって活性化される HCN チャネルには HCN-1~HCN-4 の４種類が存在する。これらのチャネルに特異的な抗体を作製して、中枢内の分布を検討した。タイプの異なる HCN チャネルは中枢の異なる部位に発現した。さらに、神経細胞全体に発現する場合と海馬、大脳皮質のように細胞の部位によって異なる分布が観察された。同様な発現分

布の特徴は嗅球の僧帽細胞でも見られた。HCN-1 と HCN-2 は heteromeric channel を形成することが知られているが、チャンネル分布もこれを支持する結果を示した。海馬では錐体細胞の周囲には HCN-1 チャンネルおよび HCN-2 チャンネルが観察されたが、これはバスケット細胞の終末で、バスケット細胞に HCN-1 が存在するという結果と良く一致した。また、parvalbumin 陽性細胞に HCN-1 が存在し、h 電流の活性化による脱分極は GABA の放出を促進することも示唆された。さらに、三叉神経中脳路核ニューロンでは HCN チャンネルと Na/K ポンプが共存し、両者は機能的にも共役することが観察された。

また、HCN チャンネルは有髄神経線維のランヴィエ絞輪間の髄鞘直下の神経線維膜に存在することが見いだされた。しかし、この部位にある HCN チャンネルがどのような機能に関与するかは現在、不明である。さらに、無髄神経線維にも HCN チャンネルの存在が観察された。HCN は過分極によって活性化して脱分極を生じるから、反復興奮が発生しやすくなり、高頻度応答に寄与している可能性が考えられる。

HCN チャンネルは、この他に、中枢の perineuronal oligodendrocytes と呼ばれる細胞にも発現することが見いだされたが、この機能的意義は不明である。

(2) 海馬における GABA_B レセプターの分布：

先に小脳と視床における GABA_B 受容体の局在を報告したが、同様な分布が海馬にも観察された。結果は小脳と視床の場合とほぼ同じで、GABA_B 受容体はグルタミン酸シナプス近傍の前終末とシナプス後ニューロンに分布することが観察された。これらのレセプターの機能に関しては、電気生理学的実験の報告から、前終末の GABA_B レセプターはグルタミン酸の放出を抑制し、シナプス後ニューロンのレセプターは緩徐な過分極を発生することが知られている。

(3) グルタミン酸シナプス周辺の P/Q タイプ Ca²⁺ チャンネルの集積：

免疫電顕法によって同定した P/Q タイプの Ca²⁺ チャンネルは小脳皮質表層（分子層）の平行線維終末とプルキンエ細胞間のシナプスの presynaptic active zone 内で高密度に局在していた。その部位の Ca²⁺ チャンネルの金標識数は約 200/μm² であった。またス Climbing fiber によって形成されるシナプスにも同様なパターンが弱いながらも観察された。またスパインのシナプス後部周辺でも、これらの Ca²⁺ チャンネルの分布密度は active zone から約 120 nm までの距離の部位において最も高く、そこから遠ざかるにしたがって減少した。その高密度の部位の Ca²⁺ チャンネルの数は約 60/μm² であった。P/Q Ca²⁺ チャンネルはグルタミン酸シナプスだけでなく、GABA シナプスにも存在したが、その密度はやや低い傾向にあった。

(4) 苔状線維シナプスにおける AMPA 受容体の定量：

先に、グルタミン酸シナプスの伝達物質一量子放出によって活性化される AMPA 受容体レセプター密度を推定し、約 900/μm² という値が得られた。しかし、この解析は自発性微小シナプス電流の測定値に依存し、異なったシナプスが均一の性質を持つという仮定を前提としていた。この前提は確定的でない。今回、2 光子顕微鏡で同定した単一シナプスにおいて uncaged グルタミン酸の応答を用いて再測定を実施した。実験には生後 3 日のラットのプルキンエ細胞を用いた。この時期では、興奮性入力としては climbing fiber のみが

存在する。方法は、生理研の河西教授の研究室で開発された MNI-glutamate と呼ばれる caged グルタミン酸を用い、2光子顕微鏡により限局した部位で 50 μ sec 以内に uncaging することが可能である。スライス標本を用い、single synapse を同定し、この方法により miniature e.p.s.c.s と類似した応答を記録した。この応答に、non-stationary fluctuation analysis を適用し、記録したシナプスは光学及び電子顕微鏡的に同定した。Single synapse はグルタミン酸に対する hot spot として同定したが、実験後の電子顕微鏡による検索の結果、11 の実験例のうち 4 例のみが、事実、2.5 μ m 以内には他のシナプスが存在しなかった単一シナプスで、他の 7 例では複数のシナプスを包含していた。単一シナプスの記録例の組織は、電顕の連続セクションからシナプスの大きさを測定した。これらの結果から、単一シナプスの AMPA レセプターの密度は 1150-1410 μ m² という値が得られた。これは前回の結果 (900/ μ m²) の 1.3 - 1.6 倍であった。前回の結果は自発性微小シナプス電流の大きさから得られたものであるから、一量子から放出されたグルタミン酸はその部位のすべてのレセプターを飽和していない可能性が考えられる。AMPA レセプター (GluR1-4) 抗体を用いてシナプスの (E-face) のレセプター密度を測定すると、910/シナプス という値が得られ、電気生理の結果と良く一致した。AMPA 受容体の数は観察したシナプスによって異なるが、その数はシナプスの大きさと比例していた。

(5) 成熟ラット小脳のシナプス：

成熟ラットの平行線維終末のプルキンエ細胞上のシナプスを観察すると、AMPA 受容体の分布は密度が低く、不均一な分布が観察された。その分布密度はシナプスによって異なり、その平均値の coefficient of variation (CV) は 0.8 という大きな値を示した。これに対し、GluR δ_2 の分布密度は比較的均一で、CV は 0.24 であった。プルキンエ細胞上の climbing fiber によって形成されているシナプスでは、AMPA 受容体の密度は生後 3 日でも成熟ラットでも均一な分布 (CV = 0.14) を示した。また、介在ニューロン上のシナプス AMPA 受容体の密度はさらに均一であった。したがって、受容体密度の均一性はシナプスの入力線維とシナプス後細胞のタイプの組み合わせによって異なることが明らかになった。

(6) LTD 依存性学習の解析：

これは自治医大の永尾助教授との共同研究で、マウスの水平視覚機性眼球反応 (horizontal opto-kinetic response: HOKR) の学習を解析したものである。マウスを固定して、眼前のスクリーンに示した標的を移動させ、その学習に伴う眼球の追跡運動の向上を測定した。この学習は LTD に依存すると考えられている。この訓練を 1 日に 1 回 (1 時間) を実施すると、日と共に、向上し、5-6 日で最大学習に達し、飽和した。この学習には flocculus の中央約 1/3 のプルキンエ細胞が関与することが知られている。すると、学習によって、この部位の平行線維 - プルキンエ細胞間のシナプス伝達の効率が LTD によって減弱することが期待される。この可能性を検討するために、まず、1 時間の訓練を実施することにより、どのような変化が見られるかを観察した。1 時間の訓練によっても、flocculus のシナプスの大きさも、その密度にも変化が見られなかった。しかし、1 時間の訓練によって、flocculus のシナプスの AMPA receptor 密度はコントロールの約 75% に有意に減少した。また、そのような変化はこの運動学習に無関係な paraflocculus のシナプスの AMPA

receptor では観察されなかった。

1 時間の訓練 (short-term training) では、上記シナプスの密度に変化は見られなかったが、その訓練を 5 日間実施すると (long-term training)、シナプス密度も有意に減少した。この long-term training を 2 週間中止すると、運動学習の記憶は消失し、それに伴って、一度減少していたシナプス密度もコントロールレベルに回復した。この 5 日間の運動学習によるシナプス密度の減少は約 30% であった。このシナプス密度の減少は、ブルキンエ細胞の減少、あるいは、スパインの減少による可能性が考えられる。コントロールでも、訓練を実施したマウスでも観察したスパインにはすべて 1 個のシナプスが見られ、少なくとも、スパインの形態には変化が見られなかった。現在、GFP-transgenic mouse を用いて、flocculus の個々のブルキンエ細胞樹状突起のスパインの数の定量を実施している。

(7) 海馬の LTP に伴う AMPA 受容体の変化：

小脳の AMPA 受容体を高感度で解析することが可能になったので、この手法を、in vivo における海馬空間学習の研究に適用することを企画した。海馬の LTP は空間学習に関連した現象と考えられ、基本的には、頻回刺激によるリン酸化により、AMPA 受容体の数が増え、新たなシナプスが形成されると仮定されている。海馬 CA1 領域の AMPA 受容体はシナプスに高密度に存在するが、シナプス外領域にも AMPA 受容体が比較的高い密度で見られた。Freeze fracture 法によって計測した結果、シナプス内 AMPA 受容体の密度はシナプス外 AMPA 受容体の 1-10 倍であった。AMPA 受容体の密度は細胞体近傍の樹状突起と遠位樹状突起の間では差が見られなかったが、シナプス外 AMPA 受容体の密度は遠位樹状突起のほうが高かった。また、内側貫通線維の頻回刺激による LTP 誘導 45 分後にシナプス内 AMPA 受容体密度の増加したシナプスが認められた。

シナプス内の GluR₁ の分布とシナプス外の GluR₁ の分布を比較すると、相関関係が見られ、シナプス内 GluR₁ の密度が高いシナプスでは、周辺のシナプス外 GluR₁ の密度も高かったが、GluR₂ に関してはそのような相関が見られなかった。これは、シナプス内の GluR₁ の分子は lateral diffusion によって集積するので、シナプス内 GluR₁ 密度の高い標本では、シナプス外 GluR₁ の密度も高いと考えれば説明できるが、今後、更に、検討が必要である。

(8) 中枢における左右差：

さきに、九州大学の伊藤功助教授のグループとの共同研究で、海馬神経回路に左右差の存在することを報告した。この左右差は、 ϵ -1 (NR2A) ノックアウト (KO) マウスで強調されることが見いだされた。 ϵ -1 KO マウスでは LTP が弱く、学習能力も低下すると報告されている。先の左右差の研究で、生後 2 週のマウスでは CA1 放射層において左側では LTP が見られるが、右では見られないことを報告した。これは、2 週では NR2A の発現が不十分で、その条件下では NR2B の左右差が顕著になるためと示唆される。生後 9 週のマウスでは、LTP の左右差は見られなかった。NR2A KO マウスでは成熟動物でも NR2A の発現がないので、左右差がさらに顕著に観察される。これは、LTP だけでなく、グルタミン酸電流の NMDA 成分においても左右差が見られた。したがって、NR2A の欠損下では、NR2B の左右差 phenotype が顕著になると考えられる。事実、これらの結果は、レセプタ

一部の形態的測定によっても確認された。

「総合評価」

本研究グループは、研究課題提案の初期から神経細胞膜上の機能分子の詳細な定量的形態解析に基づいた新規生体機能の発見を目標としてきた。この目標に必要な methodology の開発は、研究開始後、約 3 年頃から着実に進展し、その結果、質の高い研究成果を数多く発表し、現在、研究の productivity においても、独創性においても、理想的な状況確立したと言える。研究代表者を中心として、研究グループ全員が imaginative な研究テーマを巧みに捉えて、厳密な定量的解析を実施している態度はきわめて印象的である。

本年度の成果に加えられた、運動学習の解析は新規のテーマである。現段階では、この研究が今後、どのように進展するかを予測することは困難であるが、少なくとも、質的に異なる時間の単位で発現する短期適応（学習）現象と日の単位で発現する長期適応（学習）現象の発見は、このアプローチが将来大きく発展することを示唆していると思われる。

研究代表者： 丹治 順 東北大学大学院医学系研究科

研究課題： 行動制御系としての前頭前野機能の解明

訪問日時： 2003 年 12 月 15 日（月） 13:00 ~ 17:30

「研究要旨」

本研究はサルの前頭前野の行動計画、運動発現の機能解析を目的とする。これまで、前頭前野は目標達成と行動選択処理に関与するという仮説に基づいて種々の研究を実施してきた。今回も、同じ仮説のもとに、fMRI によるヒトの解析も含めて、下記の 7 種の項目について研究を進めた。

「研究の進捗状況」

（１）パスプランニング課題において将来実施する手順を表現するニューロン活動：

この研究はサルの前頭前野（46 野）が運動実施にどのように関与するかを検討することを目的とする。このために、左右の手のコントロールによって、カーソルをスタートからゴールへ 3 回のステップによって到達する迷路課題（path planning）を与え、その際のニューロンの活動を前頭前野から記録した。このゴールの位置は運動実施の前にすでに見ることができるので、サルは最初に、行動のプランを立て、これを実行すると推測される。この時、46 野から記録されたニューロンは 3 回のステップの実施前に活動を示し、また、3 回のステップと関連した活動も示した。しかし、実際に、手の運動に関与する活動は殆ど見いだされず（＜ 5%）、活動はカーソルの経路点と最終のゴール位置、あるいはその両者を反映していた。したがって、前頭前野の活動は運動の計画と密接に関与し、運動実行自身との関与は少ないと結論される。

（２）運動前野における手の視覚像の移動を表現する細胞活動：

運動前野は視覚情報に基づいて運動制御に関与するが、運動前野の活動によって視覚像が移動する場合（例えば、手を動かす場合）、運動制御は視覚像の移動（視覚情報）に依存するのか、移動させている運動（運動情報）に依存するのかは明らかでない。この問題を検討するために、サルにスクリーン上の手の視覚像を見ながら、指示された手をターゲッ

トへ移動させる課題を与え、この運動時の細胞活動を運動前野の背側部から記録した。このために、手の動きをカメラで記録し、その映像をスクリーンに投射した。したがって、カメラ記録を変形することにより、実際の手の運動とスクリーン上の視覚像の運動を解離することが可能となった。その結果、運動前野の活動は実際の手の運動方向でなく、スクリーン上の視覚像の運動方向を反映していることが明らかになった。運動前野の腹側部から記録すると、この場合も、運動前野の活動はスクリーン上の視覚像の動きに依存した。また、運動前野の活動はスクリーンに固有な座標に依存するのではなく、手の視覚像を表現する座標に依存することも明らかとなった。

（３）ヒト fMRI による前頭前野における行動選択の解析：

前頭前野は行動選択に関与すると言われているが、どのようなタイプの行動選択を対象としているかは明らかでない。この問題の解析のために、３種類の行動選択課題を与え、この時の活動をヒト fMRI により解析した。最初に、大きさ（大か小）、色（赤か青）、形（丸か四角）のサンプルからルールを選択させ、次に、そのルールに基づくターゲットを選択し、最後に、そのターゲットを選択するための指の運動を選択させた。例えば、最初、sample cueとして、大小の青い丸を２秒の間隔をおいて見せ、同色、同形の大小と言うルールを表示する。次に、5-14 秒後に、test cueとして、小さな赤い四角を見せ、その２秒後に、choice cueとして、大きな赤い四角と小さな青い四角を示す。最後に、assignment cueとして、5-14 秒後に、正しい target（大きな赤い四角）を選択するためのボタンを二者択一的に選ばせる（運動選択）。これらの event と関連した fMRI を 16 名の被験者から記録した。その結果、前頭前野の活動は行動セット（ルール）の選択において最も強く、target 選択に関連しても活動が見られた。ルール選択の活動は腹側に強く、target 選択は背側に著明であった。運動選択には補足運動野、運動前野の一部が関与していた。したがって、前頭前野の行動選択の関与は行動選択の種類によって部位が異なることが明らかになった。また、これらの結果は、前頭前野は運動選択への関与は強くなく、むしろ、行動プラン、運動計画と密接に関与しているという上記、（１）の研究結果とも良く一致した。

（４）前補足運動野における眼球運動の順序制御：

前頭の眼球関連運動制御部は前頭眼野 (frontal eye field; FEF)、補足眼野 (supplementary eye field; SEF)、前補足眼野 (pre-supplementary motor area; pre-SMA) に存在すると考えられる。しかし、pre-SMA は眼球運動固有ではなく、effector の部位に依存しない制御系に関与する可能性も残されている。本研究はこれらの制御系のタイプを検討する目的で、サルに上、右、左の３回の急速眼球運動 (saccade) を異なった順序で実施する課題を与えた。最初は、saccade の方向を視覚情報により指示し、５回の試行後は記憶に依存して課題を実施させ、その実施時に FEF、SEF、pre-SMA から細胞活動を記録した。その結果、FEF では、約 50% の細胞が方向にのみ選択的で、順位 (rank; 何番目に実施したか) にのみ選択的な細胞はきわめて少数であった。また、方向、順位両者に選択的な細胞も若干、見いだされた。これに対し、SEF では、方向のみ、順位のみ、その両者に選択的な細胞が多数見られ、全体として、方向よりは順位に選択的な細胞が多かった。また、pre-SMA では、方向に選択的な細胞がきわめて少数で、順位のみに選択的な細胞が多

数(24%)見られ、他に、方向と順位に選択的な細胞が存在した。次に、順位の代わりに、順序(sequence; 右、上、左など)を指標とすると、順序に選択的な細胞は SEF に最も多く(21%)、FEF、pre-SMA では、そのような細胞は 5-7% であった。したがって、前頭の眼球関連運動の制御には運動固有よりは、saccade の方向などの空間情報と、運動実施の順序、順番などの時間情報に関連し、しかも、これらの制御は前頭の異なった部位 (FEF、SEF、pre-SMA) が関与すると結論される。さらに、3 回の saccade の sequence を変更すると、最初の数回の遂行に特に強い活動を示す細胞グループが SEF、pre-SMA に観察された。

(5) 前頭前野における空間情報と身体情報の処理：

サルに右あるいは左の標的(空間情報)を、右手あるいは左手(身体情報)によって選択させる 4 種類の動作課題を実施した。視覚 cue による青十字は右か左の標的選択の指示で、緑四角は右手か左手の使用指示とした。右か左かは白い四角の位置によって示した。運動野から記録した細胞には、標的あるいは手とは関係なく、右か左の白い四角の cue の位置に対して応答を示すものがあった。前頭前野の主溝の腹側部から記録した細胞の多数(40%) は第一の cue の白い四角に応答した。この部位の細胞で、標的位置(3%) あるいは手の位置(4%) に応答する細胞はきわめて僅かであった。これに対し、主溝の背側部の細胞は標的位置(15%)、手の位置(13%) の cue に応答する細胞が多く、白い四角の cue の位置に応答する細胞(12%) は比較的少なかった。第二の cue の場合は、白い四角の位置に応答する細胞は主溝の腹側にかなり(18%) 存在するが、その背側にはほとんど見られなかった(2%)。標的位置あるいは手の位置に応答する細胞は腹側、背側、共に、約 9% であった。この他に、右手で右標的を取る、あるいは左手で左標的を取るといった、動作に応答する細胞が主溝の腹側(6%)、背側(22%) に存在した。したがって、前頭前野では情報によって処理経路(背側から腹側へ、あるいは腹側から背側へ)が異なっていると考えられる。この研究と関連して、丸、十字、四角の標識を異なった順序で見せた実験例では、その対象図形に特異的に応答するニューロンと、出現順位に特異的に応答するニューロンが前頭前野(46 野)から記録された。この場合、図形に特異的に応答する細胞(21%)は主溝の腹側(12 野の近く)に局在し、順位に特異的に応答する細胞(28%)は主溝の背側に局在していた。また、図形の特徴にも出現順位の両方に応答する細胞(27%)は主溝の腹側であるが、対象図形特異的細胞よりは上部(主溝近く)に分布していた。したがって、図形と順位の情報を表現する細胞は領域特異的に存在すると考えられる。

(6) 前頭前野の時間情報処理と動作制御への関与：

ヒトでは 46 野と 40 野、7 野で、時間経過を識別すると言われている。本研究では、サルで 3 種類の色指示シグナルを用いて 2 秒、4 秒、8 秒の時間経過(待機時間)を識別するように訓練を実施した。サルはこの識別を数% の誤差範囲で実施できた。この時間に基づく行動制御に関与する領域を見いだすために、細胞活動を FEF、SEF、pre-SMA から記録した。Pre-SMA では時間期間の情報を指示するシグナルに選択的に応答する細胞活動と 4 秒あるいは 8 秒の待機時間の終了時に最大活動を示す細胞が観察された。これに対し、SMA では時間に特異的に応答する細胞が少なく、動作開始と関連して活動する細胞が見ら

れた。したがって、時間に特異的な活動をしめす細胞は pre-SMA に分布すると考えられる。また、FEF にも待機時間の情報に選択的に反応する細胞と待機時間自体を表現する細胞が存在した。しかし、サルがどのようにして絶対時間の期間を認知するかは明らかでない。

(7) 概念的な運動計画：

複数の動作を実施する時には、動作を開始する前に動作の順序を準備する必要がある。このためには、複数の動作を時間的にカテゴリ - 化することになるので、動作の概念形成を実行したと見ることができる。そのような課題を設定して、前頭前野の細胞活動を記録した。サルを訓練して、上肢 3 種類の動作のいずれかを、音信号を cue として実施させ、1.2 秒の間隔で行う 4 回の動作を一つのセット (1 試行) とした。記憶させた 4 回の動作は、同一動作の反復 (例えば、pull-pull-pull, pull) 2 種動作の交互出現 (例えば、pull-turn-pull-turn) 2 種動作の反復交替 (例えば、pull-pull-turn-turn) のいずれかである。これらの課題において、動作準備過程 (動作開始以前) の前頭前野の細胞活動を記録解析した。この時に出現した細胞活動は一对の反復した動作、あるいは同じ動作の反復といった動作に選択的であり、動作の時間パターンを表現する特性を示した。しかも、これらの活動は動作開始の準備過程に出現したので、運動計画の概念化を反映した細胞活動と考えられる。これらの結果に基づいて、今後、どのように解析を進めて行くかはまだ、明確に計画していないが、これらの結果は、少なくともこれまでの観察とは異なり、さらに抽象化された行動計画パターンに關与する細胞活動と推測され、その意味で、新しい研究アプローチを提供するものと期待される。

「総合評価」

今回、説明を受けた成果は綿密に計画された研究に基づいたもので、内容は独創的であり、進行状況もきわめて順調と判断される。サルの前頭前野の行動計画、運動発現を多角的に解析し、豊富な結果が得られている。基本的には、種々の運動課題の実施に關与する前頭前野ニューロンの活動記録の解析であるが、複数の運動実施順位の情報、あるいは、時間情報の処理などの概念的に新規な問題を取り上げ、最初に提案した研究課題を非常に魅力的な研究プロジェクトとして発展させている。研究代表者を中心としたこのグループの研究成果は高く評価される。

研究代表者： 八尾 寛 東北大学大学院生命科学研究科

研究課題： 学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明

訪問日時： 2003 年 12 月 16 日 (火) 9:30 ~ 14:00

「研究要旨」

本研究は中枢シナプス伝達におけるシナプス前機構の解析を目標とする。シナプス前機構は伝達物質の放出動態を規定し、この動態はシナプス前終末端に分布する Ca^{2+} チャネルの性質に依存する。したがって、中枢シナプス終末端の Ca^{2+} チャネルタイプの同定、その分布の定量的解析を実施した。この解析はマウス海馬の CA3 錘体細胞上の苔状線維 (mossy fiber; MF) によって形成される興奮性シナプスを対象とした。さらに、シナプス小

胞内 pH 変化を測定することにより開口放出の検出を試みている。

「研究の進捗状況」

[A] 海馬神経終末端の Ca^{2+} チャネルの解析

(1) 神経終末端の Ca^{2+} チャネルサブタイプの同定：

海馬歯状回顆粒細胞は苔状線維 (MF) を介して CA3 錐体細胞の樹上突起上に興奮性シナプスを形成する。海馬スライス標本を用いて、顆粒細胞層に Ca^{2+} 感受性 dextran 色素を注入すると、軸索輸送により、MF 終末端に到達し、神経刺激により終末端 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴う蛍光シグナルの増大が終末端周辺から記録できた。実験には、細胞外 Ca^{2+} を Sr^{2+} に置換して、 Sr^{2+} シグナルによって測定することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加による 2 次的な Ca^{2+} チャネル活動の修飾や細胞内 Ca^{2+} 除去メカニズムの影響を最小限にした。P/Q タイプ Ca^{2+} チャネルブロッカー (ω -agatoxin IVA) を投与すると刺激による蛍光強度は著明に減弱した。この効果の用量依存性は Michaelis-Menten の式に従った。同様に、N タイプ Ca^{2+} チャネルブロッカー (ω -conotoxin) も用量依存性に蛍光強度を減弱させ、R タイプ Ca^{2+} チャネルブロッカー (SNX 482) も有効であった。蛍光強度は P/Q blocker により 30-35% がブロックされ、N blocker により 20-25% がブロックされ、R blocker も 20-25% をブロックした。しかし、3 種のブロッカーを同時に投与しても、蛍光シグナルは完全には消失せず、20-25% のシグナルが残存した。この残存部分が L タイプ Ca^{2+} チャネルに起因するかを検討するために、そのブロッカー (dihydropyridine 誘導体) を投与したが、効果は見られなかった。しかし、L タイプ Ca^{2+} チャネル agonist により僅かな促進が観察された。この結果は dihydropyridine に応答しない L タイプ Ca^{2+} チャネルの存在を示唆する。また、SNX 482 に無効な R タイプ Ca^{2+} チャネルの存在の可能性も残されている。いずれにしても、この神経終末端には、少なくとも P/Q、N、R タイプの Ca^{2+} チャネルが存在すると結論される。

(2) 神経終末端の Ca^{2+} チャネルタイプの多様性：

複数の神経終末端から Sr^{2+} 蛍光シグナルを記録すると、 ω -conotoxin の効果は記録領域によって異なり、時に、まったく無効という結果も得られた。蛍光シグナルの ω -conotoxin に対する感受性は記録領域によって大きな変動があったが、 ω -agatoxin IVA あるいは SNX-482 に対する感受性の記録領域による変動は比較的少なかった。これらの結果から、 Ca^{2+} チャネルサブタイプの分布は個々の神経終末端において異なることは明らかである。MF によって形成される CA3 錐体細胞上のシナプスは比較的大きく ($> 10 \mu\text{m}^2$)、単一シナプス終末端の Sr^{2+} シグナルを記録することが可能である。単一シナプスからの記録に 3 種の Ca^{2+} チャネルブロッカーを投与して、そこに存在する Ca^{2+} チャネルタイプの同定を試みた。その結果、個々の終末端には複数の Ca^{2+} チャネルサブタイプが存在し、異なった Ca^{2+} チャネルサブタイプの存在比率は終末端によって異なることが明らかとなった。N-タイプチャネルの存在比率は終末端により 0~40% の範囲にあった。R タイプの存在比率も同様な変動を示したが、P/Q タイプチャネルの存在比は各終末において比較的一定であった。

(3) 単一苔状線維終末端の Ca^{2+} チャネル：

複数の苔状神経終末端から記録した Ca^{2+} チャネルサブタイプに多様性があり、各チャネルタイプの存在比率が一定でない結果は、 Ca^{2+} チャネルサブタイプの発現が、個々の終末端によって異なるか、あるいは、個々の苔状神経線維によって異なる可能性が考えられる。この可能性を検討するために、同一苔状神経線維によって形成される2個の異なる終末端に発現する Ca^{2+} チャネルサブタイプを比較し、これまで12対の終末端からの記録に成功した。その結果、Nタイプを欠く場合と、共にNタイプを発現しているが、その発現比率が異なる場合に分類できる傾向が見られた。したがって、 Ca^{2+} チャネルタイプの発現は、ある程度、苔状線維に依存すると推測される。しかし、結論を得るにはさらに多くの観察例を必要とする。

(4) 免疫組織化学による Ca^{2+} チャネル分布の検討：

神経終末端の局在する Ca^{2+} チャネルを組織学的に同定するのは、分解能の点で必ずしも容易でない。この研究では、MF線維終末端の synaptosomes を用いた。このために、dextran 蛍光色素を注入して MF線維終末端をラベルした後に、タンパク質分解酵素で処理して得られた synaptophysin 陽性の synaptosomes にNあるいはRチャネル特異的抗体を用いて組織化学染色を実施した。その結果、個々の終末端には、NあるいはRタイプチャネルを持つものと持たないものの不均一な分布が観察された。したがって、定性的解析のみであるが、免疫組織化学的にも電気生理の結果を支持する結果が得られた。

(5) シナプス伝達に対する Ca^{2+} チャネルブロッカーの効果：

神経終末端の Ca^{2+} チャネルは伝達物質の放出に参与するから、シナプス応答を標識として3種の Ca^{2+} ブロッカーの影響を観察した。苔状線維刺激により発生する興奮性シナプス電位を CA3 錐体細胞層から細胞外電極を用いて記録し、N、P/Q、R Ca^{2+} チャネルに特異的なブロッカーを投与した。平均して、N-blocker はシナプス応答を約 50% 減少させ、P/Q-blocker は約 70% 減少させ、R-blocker による減少は約 20%であった。これらの効果は実験例により一定ではなかったが、その効果のばらつきは Ca^{2+} チャネルタイプの存在比のばらつきと同様に、N-blocker、R-blocker の場合に大きく、P/Q-blocker では少なかった。したがって、神経終末端に存在する Ca^{2+} チャネルタイプの分布は Sr^{2+} の蛍光強度を用いた解析でも、興奮性シナプス応答を指標とした解析でも、その結果は良く一致した。

[B] 開口放出の解析

(1) 小胞内 pH 変化による開口放出記録法：

Ca^{2+} の流入により伝達物質の放出機能は促進し、その効果はシナプス応答の記録によって解析できるが、この効果の機構を知るには開口放出の過程の解析が要請される。本研究ではシナプス小胞膜と細胞膜の融合に伴って、小胞内腔 pH が 5.5 から 7.4 に変化する現象を開口放出過程の指標として解析することを計画した。このために、pH 感受性 green fluorescent protein を小胞膜タンパク質 (VAMP: synaptobrevin) と結合した synapto-pHluorin 遺伝子を発現させた transgenic mice を作製した。これまでの予備実験の結果では、この遺伝子は CA3 の MF 線維の走行に一致して発現し、錐体細胞には見られなかった。したがって、synapto-pHluorin はシナプス前終末端に強く発現すると推測される。このタンパク質の蛍光強度は pH の上昇により著明に増加するので、開口放出は蛍光

シグナルとして測定できると予測される。事実、MF を刺激すると、CA3 の MF 終末端領域に蛍光強度の増強が観察された。単一刺激による蛍光強度の変化は約 1% 程度だったが、頻回刺激による加算平均によって明らかな応答が記録できた。したがって、今後、この方法により開口放出の機構を解析することを計画している。

しかし、最近、スライス標本ではミトコンドリア蛋白に由来する活動依存性の内因性蛍光が存在することが観察され、本研究でもこの現象が確認された。これは明らかに artifact の原因となるので、この現象の混在を定量的に解析する対策が要請される。

(2) BDNF 放出の計測法：

シナプス小胞には small, clear vesicles と large, dense-core vesicles が存在する。本研究は MF 神経終末端の dense-core vesicles の放出の計測を目的とする。この終末端における dense-core vesicles は BDNF と dynorphin を含むことが知られている。この実験では、BDNF 放出の計測を試みた。そのために、BDNF 前駆体の C 末端に GFP 誘導体の venus を結合した遺伝子を発現させた。小胞内 pH は酸性で、酸性の環境下では蛍光強度が弱くなるが、venus は pH 感受性が低く、小胞内でも蛍光強度が高く、開口放出に際しても蛍光強度はそれほど増大しない。したがって、BDNF-Venus を小胞内に発現させると、蛍光強度の減少により開口放出を計測することが可能である。培養海馬神経細胞に BDNF-Venus をトランスフェクトすると、神経細胞の細胞体、樹状突起、シナプス前終末端に発現が見られた。この標本を高 K^+ 溶液に露出すると、蛍光強度の減少が見られ、この応答は細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存し、BDNF の開口放出を反映しているという仮定とよく一致した。現在、この解析を進めると同時に、BDNF-Venus を組み込んだトランスジェニックマウスの作製を試みている。

[C] 海馬におけるニューロンの新生とその機能的意義

(1) 新生ニューロンの追跡：

ラット海馬スライスを長期間培養した標本を用いて、新生ニューロンの発生とその運命を解析した。この解析には、新生細胞のマーカーとしては BrdU(5-bromodeoxyuridine) の取り込みを用い、ニューロンのマーカーとしては Tuj 1 (幼弱ニューロン)あるいは Neu N (成熟ニューロン)を用いた。スライス培養開始後 13 日に BrdU を 3 日間加えると、1 週間後では BrdU を取り込んだ細胞はまだニューロンに分化しないが、4 週間後にはニューロンに分化し、新生ニューロンは歯状回顆粒細胞層にも見られた。また、BrdU を取り込んだ細胞は GFAP-positive のグリア細胞にも分化した。

新生細胞の分化は EGFP を組み込んだレトロウイルスを顆粒細胞層に注入して、ラベルした細胞の追跡によっても観察した。この実験系では、感染細胞の数が著しく増加する結果が得られた。注入したウイルスが長期間残存して、感染細胞数が長期間にわたって増加する可能性はほとんどないので、この結果は、感染細胞が分裂を反復して、その一部がニューロンに分化することを示唆する。レトロウイルスで感染した細胞は 4 週間後には次の 4 種類の phenotypes を示した。これらの 27% は nestin 陽性の未分化細胞で、24% は Tuj 1 陽性の幼弱ニューロン、25% は Neu N 陽性の成熟ニューロン、32% は GFAP 陽性の astrocytes であった。

（２）学習によるニューロン新生の可能性：

上記の[A]に記載した研究では MF 終末端の Ca^{2+} チャネルの分布が均一でない結果を示したが、これは新しく形成されたシナプスが異なった性質を示すことに由来する可能性が考えられる。海馬では空間学習の結果、新たなシナプスが形成されるという報告があるので、生後 21 日のマウスに水迷路学習トレーニング 1 日 3 回、5 日間を課し、空間学習を成立させた。その結果、MF の CA3 錐体細胞への投射は細胞体と basal dendrites において増加するという結果が得られた。しかし、これらの変化は海馬全体にわたって見られるのではなく、中核側 (septal side) の 0.4-1 mm に限局し、側頭側 (temporal side) には観察されなかった。今後、さらに例数を増やし、学習により変化した MF 線維終末端の機能的性質を解析することを計画している。

「総合評価」

研究課題は綿密に計画され、また、研究計画は順調に実施されている。特に、中枢神経終末端の Ca^{2+} チャネルの解析では高度の技術を導入し、詳細な定量的結果が得られ、その成果は高く評価できる。この成果の有用性に関しても期待が多い。しかし、研究のスピードが極めて緩慢である点に関しては批判の余地があり、今後の研究のスケジュールについて十分な考慮を必要とする。中枢神経終末端の Ca^{2+} チャネルの解析はこの研究提案が採択された初年度から実施された課題であり、その最初の論文が 4 年後に始めて in press になったという点に関しては改善を要する。

他の予備実験中の研究課題も十分に計画された興味深い内容であり、その成果に関する期待は大きい。しかし、これらの課題の終了時点については、現段階では予測できない不安を残している。

7. 中間評価結果

(1) 平成13年度研究領域「脳を知る」中間評価(課題評価)結果

1. 研究領域の概要

この研究領域は脳機能の解明を目標とした3領域の一つであり、脳の仕組みの理解を促進することを目的とする。具体的には、「脳の発生分化機構」「神経回路網の形成、構造、機能」「脳の高次機能(記憶、学習、意識、情動、認識、生体リズム等)」の解明を目標とする。

2. 中間評価の概要

2-1. 評価の目的

研究課題毎に研究の進捗状況と研究成果を把握し、必要な場合には、より適切な予算配分、研究計画の見直しを実施して研究運営の改善に資することを目標とする。

2-2. 評価対象研究代表者(五十音順)及び研究課題

- (1) 小西 史郎(三菱化学生命科学研究所 室長)
抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明
- (2) 清水 孝雄(東京大学大学院医学系研究科 教授)
脂質メデイエーターの dual receptor 系と神経機能
- (3) 平良 眞規(東京大学大学院理学系研究科 助教授)
脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析
- (4) 津本 忠治(大阪大学大学院医学系研究科 教授)
回路網形成における神経活動の関与メカニズム

2-3. 実施時期

平成13年10月5日

2-4. 評価方法

研究課題毎に、評価者一同が研究代表者と面談し、約90分間にわたるこれまでの研究経過の説明とその成果内容に関する質疑応答により実施。

2-5. 評価項目及び基準

- (イ) 研究の進捗状況と今後の見込み
 - ・当初の研究計画から見た進捗状況や達成度等はどうか
 - ・研究体制・遂行は適当か
 - ・研究の今後の進め方はどうか
 - ・その他
- (ロ) 研究成果の現状と今後の見込み
 - ・現状で成果が出ているかどうか
 - ・今後見込まれる成果はあるかどうか
 - ・その他

2 - 6 . 評価者

研究統括 久野 宗 京都大学・岡崎国立共同研究機構・生理学研究所 名誉教授
領域アドバイザー

小澤 滌司 群馬大学 医学部 教授
金子 章道 慶応義塾大学 医学部 教授
水野 昇 (財) 東京都神経科学総合研究所 所長
村上 富士夫 大阪大学大学院 基礎工学研究科 教授

外部評価者

伊佐 正 岡崎国立共同研究機構・生理学研究所 教授

3 . 研究課題別中間評価結果

1 . 研究代表者： 小西 史朗 (三菱化学生命科学研究所 室長)

研究課題： 抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明

研究概要： 研究代表者は先に小脳、扁桃体の抑制性 GABA シナプスはモノアミン作動性入力の活動によって長期増強を受けることを見出した。この観察に基づいて、ラットの小脳と扁桃体の抑制性シナプスの制御機構を系統的に解析することを計画した。研究の手法はシナプスの可塑的変化の電気生理学的解析と、情動記憶の成立・維持の分子機構の解析として、恐怖条件付けによって扁桃体に発現する蛋白、遺伝子の同定を試みる。

中間評価結果

研究の進捗状況と今後の見込み

緻密な高度の電気生理学的手法に基づいた解析により、中枢シナプスにおいて二種類の新規制御機構を見いだした。第一は小脳バスケット細胞(BC)からプルキンエ細胞(PC)への GABA 性抑制シナプス応答が climbing fiber の刺激によって減弱する現象である。この現象は climbing fiber の刺激によって、その終末端から漏出(spill over)したグルタミン酸(Glu)が BC 終末端の AMPA レセプターを活性化し、GABA 放出が減弱するためと推測された。第二は、小脳 PC において代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 の刺激によって引き起こされる興奮性内向き電流と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、GABA_B レセプターアゴニスト(バクロフェン)を同時に投与すると、著しく増大することが観察された。この現象は、抑制性と考えられている GABA_B レセプターの活性化が mGluR1 レセプターの興奮性応答を増強する結果と結論された。当初は、中枢の抑制シナプスを系統的に解析するという企画で、成果に関しては具体的に予測できなかったが、結果としてはユニークな現象の発見となり、これらの研究結果は高いインパクトファクタ - を持つ雑誌(Nature Neuroscience)に掲載あるいは掲載予定として受理され、目的に沿った研究成果をあげたと云える。

情動・不安の神経機構には扁桃体が関与することが示唆されている。この示唆に基づいて、恐怖条件付けによって扁桃体に発現する分子の解析を実施した。2日間、音の条件刺激と電気刺激を組み合わせることにより、条件刺激だけで立ちすくみ(freezing)行動が観察された。この条件下で、4日目に扁桃体からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動により分離

し、52 個のタンパク質スポットの増加が見られた。同様に、恐怖条件付けによって扁桃体に発現が増加する未知遺伝子を見だし、クローニングの結果、酵母の膜タンパク輸送系に關与する vacuolar protein sorting protein (VSP-16)のラットホモログであることが明らかになった。

研究成果の現状と今後の見込み

高次中枢の抑制性ニューロンの大多数は GABA 作動性ニューロンである。これらのニューロンを生体内で可視化するために、小胞 GABA/Glycine トランスポーター(VGAT)遺伝子に GFP 遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスを作成し、脳内に GFP 自家蛍光を示すニューロンを観察した。同様に、GABA 合成酵素、GAD-67 遺伝子に GFP をノックインしたマウスの解析も、生理研の柳川右千夫助教授との共同研究において実施している。この手法を適用することにより、スライス標本下において GABA 作動性抑制ニューロンを同定することが可能となった。

今後、GABA_A レセプターのシナプス部位への配送・標的(targeting)機構を解析するために、GABA_A レセプターのβ - サブユニットの C-末を GFP で標識し、GABA_A レセプターの細胞膜への組み込み、凝集(clustering)の解析を企画している。

シナプス制御機構の研究の進捗は目覚しく、当初の計画以上の成果が得られている。これらの結果、GABA_B の活性化と mGluR1 の活性化が couple し得るという思いがけない現象が見いだされた。この現象の基盤となる細胞内シグナルの機構の解析は今後、大きな問題に発展する可能性がある。この問題も含めて、電気生理学的結果を「もの」のレベルで確認して、研究をより堅固にすることが望ましい。たとえば、BC 終末端に事実、AMPA レセプターが発現しているかの形態学的証明が要請される。

恐怖条件付けによって情動記憶の基盤となる分子を同定するアプローチは多分に僥倖に依存する要素があり、この研究成果の現況から今後の見通しを予測することは困難である。同様に、GABA_A レセプターの配送に関する研究に関してもさらに具体的な研究計画と、予測される結果の目標を明らかにする必要があると思われる。少なくとも、現時点までに得られた結果から、恐怖条件付けの行動を分子レベルで理解できる手がかりを得る見込みは明白でない。

総合的評価

これまでの2年半～3年の短期間に、2種類の新規中枢抑制性シナプス伝達制御機構を見いだした成果は高く評価できる。今後、同様な抑制性シナプスの詳細な検討によってさらに新たな制御機構を見いだす可能性も期待できる。扁桃体の情動記憶の分子的基盤と GABA レセプターの配送機構に関しては、現在まで、今後の進展を示唆する具体的な成果が見られていない。問題点を絞り込んで、何を検討するのか、どのようなスクリーニングを実施するか of 明確な目標を早急に具体化することが望ましい。

2. 研究代表者 : 清水 孝雄 (東京大学大学院医学研究科 教授)
研究課題 : 脂質メデイエーターの dual receptor 系と神経機能
研究概要 : 脂質メデイエーターは炎症因子であるが、神経・内分泌機能にも

参与する。本研究は脂質メディエーターの脳機能における役割を解析することを目的とする。脂質メディエーターは刺激により合成されて細胞外に分泌され標的受容体と結合して機能を発現する。対象は脂質メディエーター産生の鍵を握る細胞質型ホスホリパーゼ A2 (cPLA2)とこの酵素により産生されるロイコトリエン、PAF 等である。脂質メディエーターの細胞レベルでの動態は蛍光分子により解析し、機能はノックアウトマウスを用いて解析する。また、脂質メディエーターは細胞膜のレセプター (G-タンパク共役型) と核内レセプターに結合する可能性があり、この dual receptor 系を介しての細胞内シグナルの特異性を解析することを目標とする。

中間評価結果

研究の進捗状況と今後の見込み

この研究課題はすべて綿密な計画に基づいて実施され、脂質メディエーターの細胞・分子レベルでの動的挙動を巧みに追跡し、その機能をノックアウトマウスによって timely に解析している。その結果、研究は着実に進行し、また、新たな展開が見られ、既に多数の優れた論文を発表している。主な研究成果として、(1) 新規ロイコトリエン受容体 (BLT1, BLT2, CysLY1, CysLT2) をクローニングし、現在、これらのレセプターノックアウトマウスの行動を解析している。(2) 血小板活性化因子(PAF)受容体あるいはホスホリパーゼ A2 (cPLA₂) のノックアウトマウスの症状、病態を観察しその機能を解析した。(3) 短縮型の新規 cPLA₂(KIDS)を発見した。

これらの結果、PAF レセプター欠損マウス及び cPLA₂欠損マウスでは共にアレルギー応答の低下が観察されたが、cPLA₂(-/-)マウスでは肺組織アナフィラキシー反応が低下し、成人呼吸障害症候に cPLA₂の抑制が有効であることが示唆された。また、関節リュウマチモデルの症状、実験的アレルギー脳炎の症状や虚血再灌流脳の障害も cPLA₂(-/-)マウスにおいて軽減が見られ、炎症疾患及び脳機能障害と cPLA₂の関連という新たな知見が得られた。また、cPLA₂欠損マウスが海馬 CA1 領域の長期抑圧 (LTD) を消失させると言うことも脂質メディエーターとシナプス可塑性に関する最初の発見となった。PAF 欠損マウスも神経伝達や脳の発生に異常を認めている。

新規 cPLA₂(KIDS)の発見は、当初予想されなかった展開であり、この分子はカイニン酸投与により海馬歯状回に特異的に発現することが明らかとなった。さらに、これを発現する顆粒細胞層の細胞の少なくとも一部は nestin 陽性の progenitor cells であることが示された。KIDS 遺伝子は cPLA₂遺伝子の C-末に tandem に存在するが、cPLA₂をノックアウトしても、カイニン酸の投与によって KIDS は海馬に発現する。したがって、cPLA₂の initiation site と KIDS の initiation site の間に KIDS の promoter 領域とカイニン酸応答領域が存在すると考えられる。KIDS の promoter 領域を同定できれば KIDS 欠損マウスを作成し、その機能を解析することが可能なので、その探索が進行中である。現在、脳の脂質メディエーターの機能は殆ど不明であるから、KIDS 欠損マウスの作成には大きな期待が寄せられる。

研究成果の現況と今後の見込み

本研究課題は脂質メデイーターの酵素動態とその生理機能の解析を主眼としている。酵素動態は細胞レベルで蛍光分子により巧妙に追跡され、機能解析もノックアウトマウスの作成により順調に成果をあげ、今後の新たな発展が十分期待される。この主眼となる課題と共に、脂質メデイーターの dual receptor hypothesis の検討が提案されているが、残念ながら、この問題の検討には大きな進展が見られなかった。問題点は、脂質メデイーターには多数の orphan ligands が存在し、特異的な ligand/receptor pair の同定が困難であった。Dual receptor hypothesis の検討には、まず、脂質メデイーターの細胞膜におけるレセプターの同定が要請される。脂質メデイーターをリガンドとすると思われる、orphan receptors のスクリーニングを進めているが、まだリガンドが同定されていない。PAF、ロイコトリエンの細胞膜レセプターはいずれも G-タンパク共役型受容体(GPCR)であり、したがって、ステロイドホルモンの第二レセプターも GPCR と示唆された。しかし、百を超える多数の培養細胞を検討した結果、細胞膜のステロイド受容体の存在を示す結果は得られなかった。また、G-タンパクの活性化によるシグナルを無差別に検出する方法により脳内の脂質メデイーターのスクリーニングを実施したが、有益な結果は得られなかった。さらに、*Xenopus* のリゾホスファチジン受容体といわれる分子(PSP24)のマウスホモログをクローニングし、この分子が脳に発現していることを見いだしたが、この分子がリゾホスファチジンのレセプターである証明は得られなかった。現在、この分子のリガンドの検索を継続中である。

総合的評価

本研究企画は研究代表者のこれまでの一貫した研究成果に基づいて綿密に計算されたものであり、それだけに課題の研究は開始した時点から極めて順調に進行し、さらに予想もしなかった新規 cPLA₂(KIDS)の発見も加わり望ましい展開となった。研究代表者のグループは脂質メデイーターの研究を国際的にリードしており、研究のアプローチも論理的であると同時に独創的で高く評価できる。上記のように、研究課題の一部は他の課題ほどの進展が見られなかったが、この問題を他の角度から再検討して解決を図るか、効率の高い研究課題にだけ焦点を絞るかのいずれかが将来の発展により大きく寄与するかは現時点では予測できない。したがって、この決断は研究代表者に一任するのが賢明と思われる。いずれにしても、総合的に見て、この研究は優れた成果と新展開を示した課題であり、今後も大きな進展が期待される。

3. 研究代表者 : 平良 真規(東京大学大学院理学系研究科 助教授)

研究課題 : 脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析

研究概要 : 脳は中胚葉の誘導を受けて外胚葉が神経化することにより形成される。この時期にオーガナイザーは種々の転写因子、分泌因子遺伝子を発現して発生を制御する。本研究はアフリカツメガエルの初期発生における頭部オーガナイザー、前部神経板、前脳中脳の cDNA ライブラリーを作成し、脳の形態形成に参与する分子機構と遺伝子カスケードの解明を目標とする。この研究における主要な手法は脳の部位特異的に発現する遺伝子の網羅的スクリーニングとその機能解析である。

中間評価の結果

研究の進捗状況と今後の見込み

この研究グループは当初、研究人員のスケールが小規模で、研究施設も不完全であったので、CRESTの助成金を活用して新たな実験室3室、動物室を含め多数の設備を充実させ、約8ヶ月間を要して活発な研究チームを立ち上げた。アフリカツメガエルでは中胚葉のオーガナイザーからの誘導因子（転写活性因子）によって外胚葉から神経板が形成され、脳の形態形成が開始する。本研究では頭部オーガナイザーと前部神経外胚葉から cDNA ライブラリーを作成し、部位特異的遺伝子を探索した。その結果、前部神経外胚葉から XHR1(転写抑制因子)が単離された。この因子は中脳・後脳境界 (midbrain-hindbrain boundary; MHB)に特異的に見られた。これまで、神経胚期に MHB 特異的に発現する遺伝子は見いだされていたが、発生初期（原腸胚期；stage 10.5）に発現する遺伝子としては XHR1 が最初の記載である。その早期発生から XHR1 はオーガナイザーによって誘導されると考えられる。形態形成に際して、オーガナイザーからは Wnt と BMP(bone morphogenetic protein)に対する抑制因子および FGF が分泌されることが知られているが、解析の結果、Wnt シグナルが XHR1 発現に対し負に関与することが示唆された。次に、オーガナイザーに特異的なホメオボックス遺伝子(Xlim-1)の標的遺伝子の一つとしてレセプターチロシンキナーゼを持つ遺伝子（Xror2）が単離された。Xror2 を背部に過剰発現させると体躯の短縮が見られた。解析の結果、Xror2 は細胞運動を抑制するが、細胞分化には影響しなかった。Xror2 のリガンドはまだ知られていないが、Xror2 は frizzled 様ドメインを介して Wnt と結合し、Wnt のシグナルを増強すると推測された。同様に、frizzled 様ドメインを持つ遺伝子として、頭部オーガナイザーの cDNA ライブラリーから crescent が単離された。Crescent も Wnt と結合し、また、背部に過剰発現させると体躯の短縮が見られ、Xror2 と同様に細胞分化には影響しなかったが、細胞運動の障害が見られた。次に、前部神経板（神経外胚葉）の内因性因子を機能によってスクリーニングし、nrp1 の発現を指標として神経化活性因子の探索を試みた。その結果、MAN-1(A124C10)遺伝子が単離された。MAN-1 は核内膜に局在する特徴を示した。これまで神経誘導活性を示す因子はすべて BMP を阻害することが知られている。MAN-1 による BMP 阻害の可能性は否定できないが、その神経化の機構をさらに検討中である。

研究成果の現況と今後の見込み

これまでは脳の形態形成過程に関与してユニークな機能を持つ遺伝子の探索が、研究の主要目標であった。その結果、数個の興味ある遺伝子を同定できたから、今後はこれらの遺伝子の特徴的機能をさらに解析することが要請される。例えば、XHR1 は MHB に特異的に限局し、しかも発生初期の原腸胚期に発現するから、この遺伝子が神経板の初期の前後形態形成を制御する可能性が考えられる。また、Xror2 は Wnt と結合し、細胞運動を制御することが明らかになったから、Xror2 が Wnt と結合して、Wnt シグナルをどのように制御するかの解析も今後の問題として残されている。同様なことは、Crescent と Wnt との相互作用についても云える。さらに、神経外胚葉の神経誘導機能を持つ神経化活性因子

遺伝子は脳の形態形成において明らかに重要な遺伝子である。この機能を示す遺伝子として MAN-1 が単離された。この遺伝子は神経外胚葉の cDNA を挿入した発現ライブラリーから得られたものであるが、研究代表者はすでにこのライブラリーから由来した多数のクローンを準備しているので、さらに新たな神経活性化因子が同定される可能性がある。MAN-1 は核内に局在する因子であるが、研究代表者は共役型 G-タンパク質構造を持つ神経化因子も単離しており、これらの特徴から神経化の機構を解析することができれば、大きな成果となると思われる。

総合的評価

脳の初期発生の制御遺伝子を網羅的に検索する試みは競合の激しい研究分野と思われるが、きわめて綿密に計画された提案であり、実験手法に精通し、洞察力に優れ、短期間に多くの重要な成果をあげているのが印象的である。遺伝子を網羅的にスクリーニングすることによって、脳の形態形成に重要な遺伝子を発見することが研究の戦略であるから、このアプローチによって、必ず重要な遺伝子に遭遇するという保証はない。しかし、これまでに研究代表者は既に数多くの興味ある遺伝子を同定しており、その成果から判断して、今後も、高い確率で優れた成果を得ることが期待される。研究期間はあと2年であるから、新たな遺伝子の探索より、これまで得た情報を機能的にまとめることを重視することが望ましい。

4. 研究代表者 : 津本 忠治 (大阪大学大学院医学系研究科 教授)

研究課題 : 回路網形成における神経活動の関与メカニズム

研究概要 : 脳神経回路網の形成は遺伝情報と神経活動性に依存する。本研究は後者のメカニズムの解析を目的とする。この目的のために、大脳視覚野を対象とし、*in vivo*, *in vitro* 培養系の手段を用いて解析する。可塑的变化の現象としては視覚野眼優位コラムの変化、LTP/LTD に注目し、入力神経の活動性と神経栄養因子の関与を系統的に検討する。

中間評価結果

研究の進捗状況と今後の見込み

中枢神経回路網の可塑的变化に対する神経活動性の影響を個体 (猫あるいはフェレット) レベル、中枢スライス標本 (ラット、マウス)、培養細胞系において多角的に解析し、研究企画を着実に進展させている。問題点の解析のアプローチが多彩で巧みであるだけでなく、問題点を明確に testable question の形で提起しているのが印象的である。仔猫の片眼を遮蔽すると遮蔽側の視覚野眼優位コラムが縮小することが知られている。この眼優位コラムの変化に LTP/LTD が関与している可能性が示唆されているが、その証明も反証も得られていない。この問題の検討中に、BDNF が視覚野ニューロン活動性と関連することが見いだされたので、BDNF の作用を検討することによって、眼優位コラムの変化とニューロンの活動性の関係を解析することを計画した。最初に、BDNF を仔猫の視覚野皮質に慢性投与すると眼優位コラムの拡張が見られた。BDNF は片眼遮蔽によって縮小したコラムも再び拡大した。しかし、これらの現象は、成熟猫では見られなかった。BDNF によるコラムの

拡大に伴って、外側膝状核からの入力終末端の拡張が見られるかを現在検討中である。幼弱ラットの大脳皮質に 20 分間 BDNF を投与すると、そのシナプス応答は 8 時間にわたって増強するがその後、減弱することが明らかになった。この効果も成熟動物では観察されなかった。さらに、この長期シナプス増強効果はチロシンキナーゼ阻害剤(K252a)によってブロックされた。BDNF のシナプス増強効果を孤立培養神経細胞で検討した結果、シナプス前終末からの伝達物質の放出の促進によることが示された。また、BDNF は LTD に対しては抑制効果を示した。BDNF 欠損マウス(-/-)において検討すると、LTD は容易に発現され、BDNF 投与によりその発現がブロックされた。したがって、正常レベルの内因性 BDNF は LTD の発生を抑制し得ると推測される。BDNF とニューロン活動性の関連を検討するために、視覚野皮質ニューロンの培養細胞の核に BDNF と GFP の融合遺伝子 plasmid cDNA を注入し、GFP 蛍光により BDNF の挙動を解析した。その結果、BDNF は約 0.3 μ m/sec の速度で順行性にも逆行性にも軸索輸送され、軸索終末からシナプス後細胞に移行することが観察された。シナプス後細胞への移行は神経活動を tetrodotoxin でブロックすると減弱し、picrotoxin で亢進させると増加した。従来、神経栄養因子はシナプス後細胞に由来してシナプス前細胞に取り込まれると仮定されてきたが、神経活動に依存して神経終末端から BDNF が放出する本結果は BDNF の挙動に関して新たな考察を要請する。

研究成果の現状と今後の見込み

GFP で標識した BDNF の挙動は必ずしも内因性 BDNF を反映しないという可能性もある。これを検討するために、研究代表者らは BDNF を持つ GFP 動物(マウス)からの皮質細胞と BDNF(-/-)マウスからの皮質細胞の共培養において、神経終末端の GFP シグナルが GFP シグナルの無い細胞体への移行する像を予備実験で観察している。これまで、BDNF がシナプス前細胞に作用してその伝達物質の放出を促進することを観察してきたが、順行性にシナプス後細胞に移行する BDNF がどのような機能を発揮するかは現在不明である。研究代表者らはシナプス後細胞へ移行した BDNF はその慢性効果に参与すると仮定して、事実、BDNF の慢性効果にはシナプス後の変化を反映する特徴が存在するかを検討した。孤立培養神経細胞に BDNF を 1 週間投与すると、シナプス応答は NMDA レセプターを介するほうが、AMPA レセプターを介するほうより大きくなる特徴が見られた。この効果はシナプス後 Glu レセプターの応答が変化した結果と示唆される。詳細は不明であるが、今後さらに検討すべき問題と思われる。神経回路網形成の可塑性には、眼優位コラムのようにシナプス競合の現象が見られる。この競合の機構は明らかでないし、その解析を *in vivo* で実施するのは困難であるから、培養細胞系で検討することを計画している。そのために、GFP(green)マウスと Ds-red マウスからの単離した外側膝状核(LGN)ニューロンと正常(無色)マウスから単離した皮質ニューロンの共培養を実施し、無色の皮質ニューロン上に形成された green のシナプス前終末と red のシナプス前終末の分布が green あるいは red LGN ニューロンの慢性刺激によって競合的变化が見られるかを電気生理学的にまた形態的に検討する。これは一例であるが、他に、これまで得られた結果から今後さらに検討すべき問題点が多数残されているのでこの研究はさらに発展することが期待される。

総合的評価

本研究は非常に論理的に企画された提案であり、個々の問題点がさらに独創的発想によって検討され、早いスピードで大きな project に発展している。蛍光で標識した BDNF の動態の解析は特に優れたアプローチで、この研究課題の新たな発展に寄与したと考えられる。また、中枢回路網形成の可塑性は age-dependent で、その臨界期の存在が何によって規定されるのかが明らかでないが、本研究は BDNF の効果にも age-dependence があることを示し、この問題に新しいヒントを提供している。この研究が今後も大きく発展することは殆ど疑いが無く、大きな成果が予期される。

(2) 平成 14 年度研究領域「脳を知る」中間評価(課題評価)結果

1 . 研究領域の概要

この研究領域は脳機能の解明を目標とする。具体的には、「脳の発生と分化」「神経回路網の形成、構造、機能」「記憶、学習、意識、認識、情動、生体リズムなどの脳の高次機能」の理解を促進することを目的とする。

2 . 中間評価の概要

2 - 1 . 評価の目的

各研究課題の研究成果と進捗状況を把握し、必要に応じて研究計画を見直し、研究運営の改善を目的とする。

2 - 2 . 評価対象研究代表者(五十音順)及び研究課題

- (1) 重本 隆一(生理学研究所、教授)
細胞膜上機能分子の動態と神経伝達調節メカニズム
- (2) 丹治 順(東北大学、教授)
行動制御系としての前頭前野機能の解明
- (3) 八尾 寛(東北大学、教授)
学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明

2 - 3 . 実施時期

平成 14 年 11 月 13 日

2 - 4 . 評価方法

研究課題毎に、評価者一同が研究代表者と面談し、約 90 分間にわたって、これまでの研究経過の説明とその成果内容に関する質疑応答の結果を評価した。

2 - 5 . 評価項目及び基準

- (イ) 研究の進捗状況と今後の見込み
 - ・ 当初の研究計画から見た進捗状況や達成度等はどうか
 - ・ 研究体制・遂行は妥当か
 - ・ 研究の今後の進め方はどうか
 - ・ その他

(口) 研究成果の現状と今後の見込み

- ・現状で成果が出ているかどうか
- ・今後見込まれる成果はあるかどうか
- ・その他

2 - 6 . 評価者

研究総括

久野 宗 京都大学、岡崎国立共同研究機構・生理学研究所 名誉教授

研究アドバイザー

伊佐 正 岡崎国立共同研究機構・生理学研究所 教授

小澤 静司 群馬大学医学部 教授

金子 章道 慶応大学医学部 教授

御子柴 克彦 東京大学医科学研究所 教授

水野 昇 (財)東京神経科学総合研究所 所長

村上 富士夫 大阪大学基礎工学部 教授

外部評価員

城所 良明 群馬大学医学部 教授

研究課題別中間評価結果

1 . 研究代表者 : 重本 隆一 (生理学研究所、教授)

研究課題 : 細胞膜上機能分子の動態と神経伝達調節メカニズム

研究概要 : 本研究は細胞膜上の酵素、受容体、イオンチャネルなどの機能分子の局在様式、動態、機能分子間の相互作用を高度の検出感度を持つ手法を用いて微細形態を定量的解析することによって新規の生体機構を探索することを目的とする。この目的のために、多数の高解像度の定量的形態観察の手法を開発し、可能な場合には、機能分子の電気生理学的性質の記録を併用し、構造・機能の定量的解析を実施した。

中間評価結果

研究の進捗状況と今後の見込み

SDS-FRL (SDS-freeze fracture replica labeling) は共同研究者、藤本によって1995年に開発されたもので、凍結細胞膜断面レプリカに残存するタンパク分子の分布を免疫染色法により観察する手法である。研究代表者のグループはこの手法を取り入れ、その抗原分子の保持の改良、検出感度の改善を加え、100種類以上の抗体を用いて、多くの膜分子の分布を高い再現性をもって定量的に解析する手法に発展させた。この手法は本研究課題の実施に必須の手段であり、研究のレベルもその手法の精度に依存する。改善されたこの手法の精度はきわめて印象的で、今後の研究成果への期待は大きい。この細胞膜機能分子の分布を定量的に解析することが可能となったので、精密な電気生理学的解析と組み合わせで比較検討し、研究課題は予測以上に順調な軌道に乗っている。

最近、九州大学の伊藤功助教授のグループがマウスの海馬神経回路の中で NMDA $\epsilon 2$ レ

セプターサブユニットが左右で異なった分布をしていることを示唆する電気生理学的結果を示した。共同研究の依頼により、研究代表者はこの現象を形態的、分子生物学的角度から解析し、その問題をさらに詳細に検討することになった。この研究は当初の提案時の研究計画には含まれていなかったが、神経科学の領域における重要な課題に発展する可能性があり、興味ある結果も得られているので（下記参照）、この新規の課題追加は有意義な企画と考えられる。

研究成果の現状と今後の見込み

研究代表者のグループは多数の細胞膜機能分子の分布を解析しているが、現在、最も定量的な結果が得られているのは生後 3 - 4 日のラットの小脳における AMPA グルタミン酸受容体分子である。新生ラットのこの時期に小脳に存在するシナプスは、事実上、下オリブ核からの線維 (climbing fibers) が Purkinje 細胞上に形成する興奮性シナプスだけである。この標本において AMPA レセプター分子を GluR1-4 レセプター抗体と二次抗体のゴールドコロイドでラベルして AMPA レセプター分子の密度を測定した。この値は 5 nm の gold particles を用いた時は、平均、 $1490/\mu\text{m}^2$ で、10 nm の gold particles の時は $728/\mu\text{m}^2$ であった。この相違は gold particle が小さいほど検出感度が高い結果と推測される。いずれの値がより正確であるかは明らかでないが、約 $1,000/\mu\text{m}^2$ が妥当な推定値と考えられる。AMPA レセプターの immunogold particle の数はシナプスの大きさ(面積)に比例し、AMPA レセプターの密度とシナプスの大きさの間には相関性が見られなかった。この形態的手法による推定値と比較するために、シナプスの AMPA レセプターの密度をさらに電気生理学的手法により検討した。生後 3 日のラットの Purkinje 細胞から自発性 miniature EPSCs を記録し、1 量子のグルタミン酸によって活性化する AMPA レセプターチャネルの数の平均とシナプスの面積の平均から推定した値は $950/\mu\text{m}^2$ で、immunogold particle 法によって測定した値とほぼ一致した。同じ、形態的手法で、小脳分子層の AMPA レセプターの密度を生後 2 - 3 週間及び成熟動物で測定すると、発達に伴って、レセプター密度が不均一になり、その平均密度が減少することが明らかになった。今後、長期抑圧 (LTD) と AMPA 密度の関連を検討する予定である。現在、中枢神経のスライス標本において、単一シナプスの受容体分子の数を機能的電気生理的手法によって測定した後、形態的手法によって同一のシナプスの面積を測定し密度を決定することが可能となった。

九州大学のグループからの要請に応じて、海馬神経回路における NMDA $\epsilon 2$ レセプターサブユニットの分布に左右差があるかを検討するために、Western blotting によって $\epsilon 2$ レセプター分子の定量を実施した。この目的のために、慢性手術によって交連線維を除去したマウス(十数匹~四十数匹)の左右の海馬スライス標本の CA3 領域の放線層 (stratum radiatum) と上昇層 (stratum oriens) を分離して別個にプールした。これらの組織の homogenate における $\epsilon 2$ サブユニットの量には左右差は見られなかった。しかし、PSD (postsynaptic density) フラクシオンで比較すると、 $\epsilon 2$ サブユニットは放線層では左側が、上昇層では右側が多いことが 3 回の実験のすべてで確認された。これらの結果は、電気生理学的実験からの予測と一致し、神経回路機能の左右差がレセプター分子のレベルで確認できた。これまで、脳の左右差の問題は単に概念的に論議されてきたが、本研究の

結果から左右差は細胞機能、分子数の差として観察することが可能となった。

総合的評価

この課題の研究の特徴は高度な技術レベルで裏打ちされた詳細、精密な形態的解析と再現性の高い定量的データの収集である。その結果、機能的解析との照合が可能となり、分子レベルでの形態、機能の相関性を追求する理想的なアプローチを確立した。研究代表者らはこれまでも、厳密な形態観察を実施中に、偶然の副産物として予測していなかった新たな現象、生体機能を発見してきた。このアプローチの難点は、どのような新規の副産物が、どのような確率で発見できるかが予測できないことである。しかし、これまでの成果から判断して、今後の発展も十分に期待される研究課題として推薦できる。

評価委員(領域アドバイザー・外部評価委員)も、「本研究の定量形態学的成果は originality が高く、世界をリードしている」という意見で全員が一致した。

2. 研究代表者 : 丹治 順(東北大学、教授)

研究課題 : 行動制御系としての前頭前野機能の解明

研究概要 : 本研究は大脳皮質前頭前野における知覚認知、記憶処理、行動計画、運動発現の機序を解明することを目的とする。この目的のために、日本サルに種々のタスクの条件付けを試み、そのタスクの実施中に皮質運動野、高次運動野から単一ニューロンの電氣的活動を記録し、大脳皮質のどの領野が行動発現のどの位相に一致するかを検討する。これらの結果から行動選択、目標到達のために感覚情報、記憶情報がどのように処理されるかの過程を解析する。

中間評価結果

研究の進捗状況と今後の見込み

この研究に用いる主要な手法は、特定の情報によって実施するサルのタスクの行動解析とそのタスク実施中の大脳皮質単一ニューロンからの電氣的活動(unit activity)の記録である。研究代表者のグループは長年の経験から、これらの手法はすでに習熟しているので、技術的な困難は予測されない。問題はどのような疑問を提起して、どのような行動発現を対象とすれば前頭前野の機能に関する新しい情報が得られるかという点である。研究代表者らは、(i) 複数のルールに基づいた行動選択における前頭前野の働き、(ii) 順序情報に基づいた行動選択における前頭前野の働き、(iii) 行動のゴール(目標)とその企画過程における前頭前野の働き、(iv) 動作回数の情報処理に関する研究を実施した。これらの実験において、いずれも興味ある成果が得られている(4-2参照)。動作回数の情報処理に関する研究は、当初の企画には含まれていなかったが、独創的企画で、その結果は、最近の *Nature* 誌に掲載された。これと関連した実験計画として、行動の時間情報処理(あるいは行動の時間構造)に関する実験が当初から提案されているが、この研究は現在、進行中である。

当初の研究課題提案に際しては、他に、前頭前野 - 大脳基底核ループ、あるいは前頭前野 - 小脳投射系の形態的、生理的解析ならびに、前頭前野機能に参与する伝達物質レセプターの検討が計画されていたが、これらのアプローチの進行は見られていない。しかし、この3年間に実施してきた研究はきわめてスムースに進行しているので、中枢ループのマ

ッピングの解析、伝達物質効果の検討は現段階では特に必要と思われない。むしろ、現在の研究の進め方に集中するほうが望ましい。

研究成果の現状と今後の見込み

(i) 複数のルールに基づく動作選択： 図形（丸か三角）と位置（上か右か左）の記憶すべき Sample cue をサルに提示し、3秒後(delay)に正しい図形の選択、あるいは正しい位置の選択を指定する Choice cue を提示して行動を促すと、このタスクは90%以上の成功率で正しく実行された。このタスクの実施中に一次運動野から記録した unit activity は運動実施時にのみ見られ、Sample cue, Delay, Choice cue に対応する活動は見られなかった。これに対し、前頭前野からの unit activity は Sample cue, Delay 期に見られ、Choice cue 期まで亢進する。この活動は Choice cueの開始から減衰するが、Choice cue に限局した活動も見られ、これは行動期にかけて低下した。これらの結果から、前頭前野は一次運動野と異なり、運動実施に参加するのではなく、行動課題の各 phase に対応して応答し、認知情報と記憶情報の統合過程を表現していることが示唆された。

(ii) 視覚認知された順序情報に基づく動作選択： 固視点から一定の遅延期間（2秒）後に、黄色の丸を見せ、遅延期間（0.5秒）後に、赤の十字、さらに緑の四角を順次与えて、最後に3種類の形を同時に1秒間見せた後に、3種の形の出現した順に touch するように指示した。このタスクの実施中に前頭前野から unit activity を記録すると、対象図形に特異的に応答するニューロンと、出現順序に特異的に応答するニューロンとその両者に応答するニューロンが見いだされた。これらのニューロンは異なった部位に存在し、前頭の前部の主溝の上部には順序に特異的な活動を示すニューロンが局在し、主溝の下部では対象図形に特異的に応答するニューロンが記録された。これらの結果から、前頭前野は認知情報の時間構造に関与し、これを保持して動作企画に参加すると推測された。

(iii) 行動の目標達成と企画過程の表現： 格子状の経路の出発点とゴールを示し、ゴールの位置を記憶させてから、経路に障害物の位置を示した後、Go シグナルにより、カーソルを one step づつ3回の動きでゴールに到達するタスクを与えた。このタスクの実施中に記録した前頭前野の unit activity は特定の位置のゴール、特定方向への動きのカーソル、特定位置の障害物に対して見られたが、手首の運動に対応した応答は見られなかった。障害物の位置よりも、ゴールとカーソルに対応した活動性が高かった。これらの結果は、前頭前野は行動のゴールと企画過程を表現し、運動情報よりは行動の目的・意味を表現することが示唆された。

(iv) 動作回数の情報処理： レバー押しを5回反復し、次いでレバー回しを反復し、5回ずつ2種類の動作を反復するタスクを与えた。この回数情報処理のタスクの実施中に活動を示すニューロンは前頭前野には見られず、頭頂野の5野で、しかも腕、肩の体性感覚領域に局限していた。皮質両側の5野にムシモールを注入してこの領域のニューロンの興奮性を局所的に低下させると、動作の応答時間には変化が見られなかったが、5回を反復する正動作の実施率が減少した。これらの結果から、5野は回数情報処理に参加すると結論された。

総合評価

本研究で実施した条件付けタスクをサルが学習するまでには数ヶ月から2年を要する。そのような忍耐と長時間が要請される研究にも拘らず、この課題は非常に順調に進捗しており、発表論文の質と数はともに印象的である。研究代表者の独創的、綿密な実験計画と研究グループ全員の研究意欲は高く評価され、今後も大きな展開が期待される

評価委員（領域アドバイザー・外部評価委員）も「研究チームを適切に統率し、独創性の高い研究発想を着実に実行し、国際的にレベルの高い成果を展開している」という意見で全員が一致した。

3. 研究代表者 : 八尾 寛(東北大学、教授)

研究課題 : 学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明

研究概要 : 本研究は海馬 CA3 錐体細胞上の苔状線維 (mossy fibers; MF) によって形成されるシナプスを対象として、そのシナプス伝達と可塑的变化の機構を詳細に解析することを目的とする。伝達物質の放出はシナプス前神経終末の興奮に伴う Ca^{2+} の流入に依存し、その可塑的变化はタンパク質のリン酸化に依存する。本研究では単一シナプス終末における Ca^{2+} の動態を Ca^{2+} 感受性蛍光色素によって観察し、リン酸化に参与するタンパク質キナーゼの解析を試みる。

中間評価結果

研究の進捗状況と今後の見込み

マウスあるいはラットの海馬 CA3 錐体細胞に投射する mossy fibers (MF) 終末の Ca^{2+} 動態を観察するために、 Ca^{2+} -感受性蛍光色素を充填したガラス微小管をその細胞体（歯状顆粒細胞）層に挿入して傷害を与えた。その結果、MF の傷害部位から取り込まれた色素は軸索輸送により1時間以内に終末に到達した。この条件下で、神経刺激を与えると、終末の Ca^{2+} 流入に応じて蛍光強度が上昇する。CA3 領域には MF 以外に、GABA 作動性 interneurons が存在し、これらの interneurons に Ca^{2+} -感受性色素が分布する可能性がある。しかし、GABA 抗体によって染色した interneurons 及びその終末の分布は Ca^{2+} -蛍光の分布と一致しなかった。さらに、GABA 合成酵素、GAD67 に EGFP をノックインしたマウスを用いても、 Ca^{2+} -蛍光の分布と GFP の分布は一致しなかった。したがって、観察された Ca^{2+} -蛍光の分布は MF 終末を反映し、interneurons による混在の可能性は少ない。 Ca^{2+} が神経終末に流入すると、 Ca^{2+} によってチャネルの特性が変化する可能性があるため、 Ca^{2+} チャネルは同程度に透過するが、細胞内の Ca^{2+} -結合タンパクとの親和性が低い Sr^{2+} と置換して実験を行った。この方法によって、MF 終末に発現している (i) Ca^{2+} チャネルサブタイプの定量、(ii) Ca^{2+} -チャネルサブタイプと伝達物質の放出連関の強度、(iii) 単一シナプス前終末の Ca^{2+} チャネルサブタイプの分布様式の定量的解析を実施した。

当初の研究課題の提案において、MF シナプス前終末をモデルシステムとして用い、シナプスの開口放出の機構、可塑性のメカニズムを解析することを企画した。本研究は、現在、このモデルシステムからの記録条件と技術が完成した段階にある。

研究成果の現状と今後の見込み

(i) MF シナプス前終末端の Ca^{2+} チャンネルサブタイプの定量： MF を 50 Hz で 5 回刺激した時の終末端 Sr^{2+} 蛍光強度を記録し、N-type 特異的ブロッカー、 ω -CgTx、P/Q-type 特異的ブロッカー、 ω -AgTx、R-type 特異的ブロッカー、SNX-482、L-type 特異的ブロッカー、nimodipine の個々の投与による蛍光強度の減少率から、P/Q、R、N、L タイプ Ca^{2+} チャンネルの存在を定量的に測定した。その結果は、P/Q : R : N : L = 40% : 25% : 20% : 10% であった。

(ii) Ca^{2+} チャンネルサブタイプと伝達物質放出連関： これらの異なったタイプの Ca^{2+} チャンネルが伝達物質の放出機能に対して同程度の連関度と持つかを検討するために、CA3 領域から細胞外電極を用いて、MF 刺激による field EPSPs を記録し、EPSPs の立ち上がり (rising phase) のスロープをシナプス伝達効率 (伝達物質の放出効率) の指標とした。この指標に対する異なった Ca^{2+} チャンネルブロッカーの効果と神経終末端の Ca^{2+} 濃度の上昇に対する効果を比較した。例えば、SNX-482 は ω -CgTx と同程度に Ca^{2+} 濃度の上昇度を減少させたが、EPSPs に対する効果は僅かであった。 ω -AgTx は他のブロッカーと同様に、 Ca^{2+} 濃度の上昇を短時間に減少させたが、伝達効率の減少効果は投与後約 20 分の間に時間と共に増強した。この現象の解釈は、現在、不明である。しかし、R-タイプの Ca^{2+} チャンネルは N タイプと比較して、明らかに伝達物質放出連関度が低く、この相違は、N-タイプ Ca^{2+} チャンネルが伝達物質放出部位の近傍に分布しているのに対し、R タイプの分布は遠距離にあると推測された。

(iii) 単一神経終末端の Ca^{2+} チャンネル： 上記の実験では、 Ca^{2+} の動態を複数の神経終末端から記録したが、その記録部位によって 4 種類の Ca^{2+} チャンネルタイプの分布は一定でなかった。たとえば、N タイプチャンネルの占める比率は部位によって 10% から 40% の変異を示した。したがって、極端に言えば、部位によっては N タイプがほとんど存在しない終末端の存在も考えられる。この可能性を検討するために、単一神経終末端の Ca^{2+} チャンネルを検討した。この実験では、2 種類の dextran 色素を用い、 Ca^{2+} 非感受性色素で終末端の形態を観察し、他の蛍光色素でその部位の Ca^{2+} 動態を観察した。これまでの実験結果では、4 種類の Ca^{2+} チャンネルタイプを示す終末端と 2 種類しか持たない終末端などが観察され、チャンネル分布は終末端により異なることが示唆されたがその詳細の記載には、さらに多数の実験例が必要である。MF のチャンネルは常に新しいチャンネルを形成し、新規の場合はたとえば N タイプで、固定化されると P/Q タイプに変換すると仮定すれば、終末端のチャンネル分布の異なることが説明される。水迷路学習後に CA3 の striatum orience に新しいシナプスが形成されるという報告があり、この結果が再確認されたので、この標本を用いて新規のシナプスと固定化されたシナプスの Ca^{2+} チャンネルタイプを検討する計画である。

総合評価

本研究は綿密な計画に基づいて注意深く実施されている。しかし、研究の進行速度が遅く、何らかの手段で speed up を図る必要がある。この 3 年間に完結した実験が少なく、個々の現象に対して独断的な憶測が多い。たとえば、R タイプ Ca^{2+} チャンネルはペプチド放出に関与する可能性を仮定しているが、これを支持するデータはない。それにも拘わ

らず、この仮定の検討を新たに計画している。P/Q タイプチャネルの伝達物質放出効果における時間的变化はこの研究課題の大きなネックであり、この現象の説明が早急に要請される。個々のストーリーの実験結果と結論をまとめて、できる限り早急に発表することが望ましい。

評価委員（領域アドバイザー・外部評価委員）も 7 名中 6 名がこの課題の進行状況が当初計画よりかなり遅れていると言う意見であった。さらに、3 名から、この成果は CREST 研究の水準に達していないとする批判もあった。他の 4 名の評価委員は、高いインパクトを持つ研究に発展する可能性がある課題であるから積極的に支援して研究効率を高めるべきと言う意見であった。その一つとして、大学院生の他にポストドク研究員の数を増やす努力が提案された。

8．事後評価結果

平成 15 年度研究領域「脳を知る」課題別事後評価結果

1．研究領域の概要

この研究領域は脳機能の理解を促進することを目的とする。このために、具体的には「脳の発生と分化」、「神経回路網の形成、構造、機能」、「記憶、学習、意識、認識、情動、生体リズム等の脳の高次機能」の解明を目標とする。

2．事後評価の概要

2 - 1．評価の目的

研究課題ごとに研究の進捗状況と研究成果を把握し、これらが初期の研究計画からの期待を反映しているかを検討する。もし、研究の進捗と成果が、予測に反して、不満足と判定された場合には、その原因を追究し、今後の研究運営の改善に資することを目標とする。

2 - 2．評価対象研究代表者

評価対象研究代表者（五十音順）及び研究課題は下記のとおりである。これらの研究代表者からの研究提案は平成 10 年に採択され、平成 15 年 11 月 30 日に、5 年間の研究助成期間を終了する。

- （1）小西 史朗（三菱化学生命科学研究所 室長）
抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明
- （2）清水 孝雄（東京大学大学院医学研究科 教授）
脂質メディエーターの dual receptor 系と神経機能
- （3）平良 眞規（東京大学大学院理学系研究科 助教授）
脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析
- （4）津本 忠治（大阪大学大学院医学研究科 教授）
回路網形成における神経活動の関与メカニズム

2 - 3．評価の実施時期

平成 15 年 10 月 31 日

2 - 4．評価方法

研究課題ごとに、評価者一同が研究代表者と面談し、約 50 分にわたるこれまでの研究経過の説明と成果内容に関する質疑応答により評価した。

2 - 5．評価項目及び基準

- （イ）研究の進捗状況
 - ・当初の研究計画から見た進捗状況や達成度等はどうか
 - ・研究体制・遂行は適当か
 - ・その他
- （ロ）研究成果の状況
 - ・期待された研究成果は得られたか
 - ・その他

2 - 6 . 評価者

研究総括 久野 宗 京都大学、岡崎国立共同研究機構生理学研究所 名誉教授
領域アドバイザー

伊佐 正 岡崎国立共同研究機構生理学研究所 教授

小澤 静司 群馬大学大学院医学系研究科 教授

御子柴 克彦 東京大学医科学研究所 教授

水野 昇 岡崎国立共同研究機構生理学研究所 所長

村上 富士夫 大阪大学大学院生命機能研究科 教授

外部評価員

狩野 方伸 金沢大学大学院医学研究科 教授

研究課題別事後評価結果

1 . 研究代表者 : 小西 史朗 (三菱化学生命科学研究所 室長)

研究課題 : 抑制性シナプス可塑性の分子機構の解明

研究概要 : 中枢の GABA 作動性抑制シナプスを、電気生理学的手法によって解析し、小脳においてシナプス制御の新たな機構の存在を見いだした。さらに、GABA 受容体分子の細胞膜への配送機構を解析する目的で、GABA_A 受容体サブユニットの細胞内ループと相互作用を示すタンパク質の同定を試みた。また、不安・恐怖の発現に關与する分子動態の変化を扁桃体で探索した。

事後評価結果:

研究進捗状況と研究成果

研究は、GABA 作動性抑制性シナプスの制御機構に関する電気生理学的解析と、GABA_A 受容体サブユニットの配送及び、恐怖条件付けによって扁桃体に発現する分子の解析に大別される。

抑制性シナプスの制御はラット小脳において検討し、3 種の新たな調節機構の存在することを見いだした。第一は、モノアミン (セロトニン、ノルアドレナリン) 作動性線維の刺激による、バスケット細胞 (BC) とプルキンエ細胞 (PC) 間の GABA シナプス伝達効率の増強である。この効果はシナプス前機構に依存し、ノルアドレナリン (NA) の場合は β_2 レセプターの活性化を媒介とする。その結果、cAMP が上昇し、I_h チャネルが活性化され BC 終末端の脱分極により GABA 放出が促進されると同時に、protein kinase A (PKA) カスケードを刺激して GABA 放出が増強されることが示された。

第二のシナプス制御として見いだされたのは、PC の AMPA 型グルタミン酸受容体に対する入力線維のシグナルによる BC/PC GABA シナプス伝達効率の減弱である。この効果は、climbing fiber (CF; 登上線維) から放出されるグルタミン酸が BC 終末端の AMPA レセプターを介して GABA 放出を抑制する機構に依存する。この AMPA レセプターは単に、ionotropic 応答を示すだけでなく、G_i, G_o タイプの G タンパクを介する metabotropic 経路をも共有していると考えられる結果が得られた。この特殊な AMPA 型レセプターの活性

化はBC終末端の Ca^{2+} チャネルを阻害することが局所の Ca^{2+} シグナル記録によって示された。さらに、BC終末端のAMPAレセプターの存在は、GAD (glutamate decarboxylase) ノックアウトマウスに GFP-linked GAD をノックインすることによってラベルしたBCとAMPAレセプターの免疫組織化学染色の併用によって確認した。

第三のシナプス制御は、parallel fiber (PF; 平行線維) によってPCに形成される興奮性シナプスに見いだされたもので、このシナプス周辺部には GABA_B レセプターと mGluR1 受容体が近接して存在する。ここでは、近傍の細胞から放出された GABA が GABA_B レセプターを活性化し、このレセプターの活性化により、PF-PC の mGluR1 の興奮性シナプス伝達を促進することを見いだした。現在、GABA による、 GABA_B レセプターと mGluR1 レセプターの cross-talk に寄与する分子機構を検討中である。

GABA_A 受容体の配送機構の解析は、未開発の分野で、これまでの興奮性シナプスにおける解析を参考として実施した。Yeast-two-hybrid 法を用い、receptor subunits の細胞内ドメインを検索系としてマウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。これによって得た陽性クローンの中から、dynein と snapin に注目して解析した。この両者は共に、 GABA_A 受容体と結合し、その結合部位を特定して、アミノ酸配列に基づき相互作用を阻害する抑制ペプチドの合成に成功した。PC の脱分極に伴い mIPSCs の発生頻度と大きさは増加したが、この効果は snapin 結合抑制ペプチドにより低下した。したがって、snapin はシナプス直下への GABA 配送を制御していることが示唆された。dynein の効果は現在、検討中である。

情動・不安の神経機構には扁桃体が関与することが示唆されている。この機構の解析のために、ラットに恐怖条件付け(fear conditioning) を与え、プロテオーム分析(二次元電気泳動法とマスペクトル法の併用)と差分 cDNA クローニングを実施した。恐怖条件付けを与えたラットの扁桃体では、35種類のタンパク質の発現量が増加していることがプロテオーム分析により見いだされた。これらの分子にはシナプスに関連するタンパク質も含まれていた。また、差分クローニングでは、細胞内タンパク輸送を仲介する VPS16 のホモログが同定され、扁桃体のこの遺伝子の発現は恐怖条件付けにより増加した。現在、VPS16 の機能を解析するために、そのノックアウト動物を作成中である。

総合的評価

小脳の GABA 作動性抑制シナプスにおいて3種類の新規の制御機構が存在するという結果はユニークな発見である。これらの機構の発見は綿密な電気生理学的解析に基づいている。モノアミン作動性線維による BC、PC 間の GABA 伝達効率の上昇は、ノルアドレナリン (NA) と同様に、セロトニン (5HT) によっても効果が見られるが、5HT の作用は解析されなかった。NA と 5HT の効果は異なった機構に依存していることを示唆する結果が得られているので、5HT の作用の検討によって新たな制御機構を発見する可能性が残されている。また、これらの制御機構の解析において、モノアミン受容体の分布部位の同定が実施されていない。さらに、PF 線維刺激による制御では GABA_B レセプターと mGluR1 レセプターの cross-talk が key issue であるにも拘わらず、その機構はまだ不明である。詳細に関しては、このように重要な解析が残されているが、これらのシナプス制御機構に関

する一連の研究は極めて順調に進んだ成果と高く評価できる。但し、中間評価以降では進展がやや遅いという批判も寄せられた。

GABA_A 受容体の配送機構と恐怖条件付けによる分子動態の可塑的变化に関する研究は、シナプス制御機構の研究と比較して明らかに遅れている。しかし、今回、dynein、snapin、VPS16 などの関連分子候補が具体的に示唆されたことは大きな進展である。ただ、現段階では、これらの候補分子が、事実、研究対象としている機構に密接に関与しているか否かの証明は得られていない。したがって、この研究に関して得られた成果が目標達成にどの程度近づいているかを判定することは困難である。今後、この研究の続行には明確な計画プログラムが必要と思われる。

2. 研究代表者 : 清水 孝雄 (東京大学大学院医学研究科 教授)

研究課題 : 脂質メデイエーターの dual receptor 系と神経機能

研究概要 : 本研究は脳の脂質メデイエーターの機能解析を目標とする。この目的のために、新分子を発見し、その分子の脳内、細胞内の局在と動態を明らかにし、その分子の欠損マウスによって機能を解析する。この解析には形態的に免疫組織化学の手法を用い、また、電気生理的手法によりニューロンの活動を記録する。新規分子としては、新たなタイプの cytoplasmic phospholipase A2 (cPLA2)、kids (kainite-inducible dendate specific cPLA2 α)、cPLA2 β (β 1- β 4)、新たな lysophosphatidic acid (LPA)受容体、2種類のロイコトリエン受容体 (BLT1、BLT2)、ロイコトリエン C4 受容体 (CysLT2) などを発見した。

事後評価結果 :

研究進捗状況と研究成果

これまで、多数の新規分子を発見してきた。しかし、脂質メデイエーターには多数の orphan receptors が存在するにも拘わらず、そのリガンドを同定するのは困難であった。今回、その一つ P2y9 のリガンドを発見した。この成功の原因は探索手法における工夫で、まず、受容体の N 末にタグ (蛍光色素) を付し、細胞膜に受容体が発現した細胞のみを回収し、さらに、リガンドとの結合により、活性化する 2nd messenger タイプと無関係にその活性を検出できる手法を用いた。その結果、LPA をリガンドとする P2y9 を見いだした。この受容体は脳や生殖器系に多く発現し、これまで知られている 3 種の LPA 受容体とはアミノ酸配列の相同性が見られなかった。

脂質メデイエーター分子の脳内分布、細胞内分布、輸送に関して、cPLA2 α の動態を解析した。cPLA2 α は静止時には細胞質に存在するが、Ca²⁺刺激により、核膜、小胞体に蓄積する。cPLA2 に GFP を融合し、神経細胞に transfection させると、静止時には細胞体、樹状突起の細胞質に一様に分布する。しかし、グルタミン酸で刺激すると、数分後には、cPLA2 は一定の間隔をもってパッチ状分布を示す。このような分布の変化は GFP 分子のみでは見られない。この cPLA2 α 分布の変化は、スパインの分布と関連するのではないかと推測しているが、その詳細は、現在、検討中である。in vivo の小脳組織標本では、cPLA2 α は皮質に分布し、特に、Purkinje 細胞 (PC) に強い発現が見られ、この発現は樹状突起

の発達と共に増強する。その細胞内発現が刺激により、どのように変化するかを今後、検討する予定である。分子の *in vivo* の局在に関しては、ロイコトリエン C4 の生成酵素が視床下部、脳下垂体後葉に特異的に存在することが観察された。この機能的意義の解析を検討中である。

個体レベルでの脂質メデイエーターの機能はノックアウト動物を用いて解析した。Lis-1 遺伝子の欠損は脳形成の異常を示すが、Lis-1 は血小板活性化因子の分解酵素（アセチルヒドラーゼ β ; PAF-AH β ）の遺伝子と同一である。そこで、PAF receptor 欠損マウスを作製すると、小脳原基の発達の遅延が見られた。この時、胎生期の小脳顆粒層での細胞移動速度の低下が示唆された。 *in vitro* においても、顆粒細胞の移動速度は PAF receptor^{-/-} において低下し、また、野生型でもその速度は PAF receptor blocker の投与により低下した。したがって、PAF 受容体からのシグナルは Lis-1 を介して、神経細胞移動に関与していることが示唆される。

cPLA2 α ^{-/-} では虚血性再還流の病態モデルでの変化が著明で、神経可塑性にも変化が見られ、睡眠異常も観察された。虚血性再還流によって見られる脳梗塞の程度は cPLA2 α ^{-/-} において軽減し、正常動物におけるこの効果は cPLA2 α inhibitor の投与によってブロックされた。また、oligodendrocytes 由来のオリゴ糖タンパク(MOG)の反復注入によって作製した多発性硬化症モデルでは発症あるいは症状は cPLA2 α ^{-/-} において明らかな軽減が見られた。この時、炎症性細胞の産生、集合の程度の低下が見られ、また、microglia の産生、凝集の程度も低下していた。microglia は脱髄の原因と考えられる。この過程において、ロイコトリエン D4 が microglia の活性化に参与し、また、PAF は microglia の細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させる結果も得られた。cPLA2 α はこれらの炎症性因子の産生に関与すると考えられる。

cPLA2 α ^{-/-} では、海馬 C1 領域の LTD が消失あるいは低下する。この機構は不明であるが、ノックアウト動物の LTD 低下はアラキドン酸の投与によって回復するから、LTD にアラキドン酸あるいはその代謝物の関与が示唆される。

総合的評価

多数の脂質メデイエーター及びそのレセプター分子の発見とその機構解析の productivity は極めて印象的である。研究は注意深い計画に基づいて着実に進められており、脂質メデイエーター分子の生理学的、病態生理学的意義を明らかにしただけでなく、神経疾患との関連を体系的に解析して顕著な成果を挙げている点も高く評価できる。評価委員全員の意見が、本研究の結果は国内外の類似研究の成果と水準と比較して、非常に高いレベルにあり、十分に満足できる展開を示した業績であるという点で一致した。

研究代表者のグループの高いレベルの研究活動と比較して、サブグループの寄与に関しては複数の委員から批判が寄せられた。その批判として、次の3点が指摘された。(1) 脳形態グループは分子の細胞内分布の詳細を明確にするために、電子顕微鏡レベルの研究を積極的に導入すべきである。(2) 成果報告で記載された電気生理学的解析は不十分な印象を免れず、行動解析と共にレベルアップの努力が必要である(ちなみに、電気生理の解析が単純すぎるという点は、2003年1月17日の総括訪問の記録にも記載されている)。(3)

ショウジョウバエのホスホリパーゼ D (PLD) の強制発現による感覚器発生過程の異常に関しては、メカニズムについての解析が全く試みられていない。これらの状況について、他の一評価委員は、「サブグループとの連携による研究の進展は見られず、むしろ、代表者グループだけで十分な成果を挙げている」と記載している。

3. 研究代表者 : 平良 眞規 (東京大学大学院理学系研究科 助教授)

研究課題 : 脳の初期発生制御遺伝子群の体系的収集と機能解析

研究概要 : 脳の形成は中胚葉 (頭部オーガナイザー) の誘導による外胚葉の神経化に依存する。本研究は脳形成に関与する遺伝子の収集と機能解析を目的とする。この目的のために、アフリカツメガエルの頭部オーガナイザー及びそれによって誘導される予定脳領域の cDNA ライブラリーを作成し、部位特異的に発現する多数の新規遺伝子を同定し、その機能解析を実施する。究極的に、脳形成に参与する遺伝子の制御パターンの解明を目標とする。

事後評価結果:

研究進捗状況と研究成果

これまで同定した多数の新規遺伝子解析の結果、脳形成過程を制御するいくつかの遺伝子の機能を解析することに成功した。その代表的な例には、下記のような遺伝子が含まれる。

(1)Crescent は頭部オーガナイザーに発現する分泌性遺伝子で、その機能解析により、背側中胚葉と外胚葉 (神経板) の収縮伸張運動を制御する因子であることが示唆された。この遺伝子は後方化作用と収縮伸張運動を阻害することにより頭部形成に関与すると考えられる。

(2) XHR1 は前部神経外胚葉に発現する遺伝子で、発生の非常に早い時期 (stage 10.5) に、中脳・後脳境界領域 (midbrain-hindbrain boundary; MHB) に発現する。XHR1 は転写抑制遺伝子で、MHB 領域化に必要な因子と考えられる。

(3) XMAN1 は神経板に発現し、神経化 (神経形成) に参与する遺伝子である。この遺伝子は、神経板に神経化活性因子が存在するかを検討するために、npr1 の発現を指標として検索中に同定された遺伝子である。XMAN1 は BMP (bone morphogenetic protein) の発現自身には影響しないが、BMP の下流標的遺伝子の発現を抑制した。したがって、XMAN1 は BMP 経路を抑制して神経形成に参与すると推測される。XMAN1 は 2 回膜貫通型タンパク質で、核内膜に存在し、膠原病の自己抗原の一つでもある。

(4) Xror2 は神経誘導に関与しオーガナイザーに特異的に発現する転写因子、Xlim-1 の標的遺伝子である。Xror2 は、crescent と同様に、細胞運動をブロックする。Xror2 と crescent は形態形成に参与する遺伝子と推測される。

(5) Cerberus も Xlim-1 の標的遺伝子で、cerberus のプロモーター領域に Xlim-1 との結合部位が見いだされた。しかし、cerberus は Xlim-1 のみによって単純に活性化されるのではなく、その活性化には Xlim-1 の他に補助因子の存在を必要とする。

(6) Rnf12 は Xlim-1 がオーガナイザーでどのような制御を受けているかの解析に見い

だされた遺伝子である。Rnf12はオーガナイザー（中胚葉）に発現し、Xlim-1の量の調節効果を持ち、この効果によりオーガナイザーの活性レベルを維持すると推測された。

(7) Ldb1はXlim-1のDNA結合ドメインのLIMと呼ばれる制御ドメインと結合する因子である。Xlim-1は頭部形成に関わる重要な転写活性化因子で、LIMは負の制御を実施する。これらの因子の相互作用の解析の結果、Rnf12はXlimb-1と結合していない過剰なLdb1を分解し、オーガナイザーにおけるXlim-1とLdb1の量を適切に維持することに貢献すると考えられた。

総合的評価

オーガナイザーに特異的に発現し、神経誘導に関与すると考えられるホメオボックス遺伝子、Xlim-1は、1992年に研究代表者らによって見いだされた。その後、マウスのノックアウトの結果から、Lim1は頭部形成に必須であることが報告された。本研究は、中胚葉オーガナイザー領域と予定外胚葉のcDNAライブラリーの網羅的スクリーニングとその機能解析から、神経誘導（脳形成）ステップを遺伝子のレベルで解析することを目的としたものである。この多大な時間と労力を必要とするプロジェクトにおいて、優れた研究成果は着実に蓄積されてきた。特に、Xlim-1の標的遺伝子の解析、XMAN1の同定はきわめて印象的である。

本研究における網羅的あるいは体系的なデータ収集という発想においての、研究成果は十分に成功しているというのが評価委員の一致した意見であった。しかし、研究の大部分が（たぶん、XMAN1の機能による解析は例外として）、同一手法の応用の反復で、新規なexcitingな発想の展開が見られないので、ユニークな研究としての魅力に欠けるという批判もあった。これに関連して、5名の評価委員から「この研究はXenopusの脳発生のデータ収集」に終始しているという批判が寄せられた。これらの委員はデータからの機能的示唆を明示すること、また、Xenopusの情報から哺乳類への展開を期待している。一評価委員は、「この研究は脳を知る領域で助成するに妥当な研究課題であったか」との疑問を寄せている。これは、研究代表者に向けられた批判でなく、研究提案の選考審査に関与した委員に向けられた疑問と理解すべきである。この他に、「サブグループとの共同研究あるいは協調を欠いている」という批判が4名の評価委員から寄せられた。

4. 研究代表者： 津本 忠治（大阪大学大学院医学研究科 教授）

研究課題： 回路網形成における神経活動の関与メカニズム

研究概要： 脳内神経回路の形成は遺伝情報に基づいたプロセスと神経活動に基づいたプロセスに依存する。本研究はその後者のメカニズムを、主に、大脳視覚分野を対象として解析する。研究はin vivo、in vitro 標本において実施した。in vitro 系としては、中枢スライス標本と培養細胞を用いた。

事後評価結果：

研究進捗状況と研究成果

この研究では、標本、手法の異なる多角的な実験を実施した。以下、8種類の異なったアプローチにおける成果を記載する。

(1) ニューロン間における BDNF の移行： 視覚領野の可塑的变化はニューロンの活動性に依存するだけでなく、BDNF にも依存する。ニューロンにおける BDNF の動態を培養系において解析した。BDNF に GFP を連結した遺伝子をラット大脳視覚野培養神経細胞の核内に注入して、約 24 時間後に発現した可視化 BDNF を観察した。BDNF は培養ニューロンの軸索内を順向性に輸送され、その終末端から放出されて、シナプス後ニューロンに移行する像が観察された。この BDNF の輸送は神経細胞の電気的活動性を必要とした。蛍光色素のみを発現させても、色素タンパク質の細胞間移行は見られなかった。

(2) BDNF による樹状突起発達の促進： ニューロン間の移行は GFP を連結した BDNF だけでなく、内因性 BDNF においても見られた。内因性 BDNF の移行により、GABA 性ニューロンの樹状突起は突起の伸展、分枝の増加、シナプス数の増加を示した。しかし、興奮性ニューロンではこれらの効果は見られなかった。これは、興奮性ニューロンは BDNF を産生するが、抑制性ニューロンは BDNF を産生しないため、後者のみが移行した BDNF の影響を表示すると示唆された。

(3) BDNF による silent synapse から成熟シナプスへの変換： 視床から大脳皮質 IV 層への経路において、野生型マウスでは大脳シナプスの silent synapse の数は生後 7-8 日から急速に減少し、AMPA 型 Glu レセプターを含む成熟型興奮性シナプスに移行するが、BDNF ノックアウトマウスでは、この減少が見られなかった。しかし、ノックアウトマウスでも外部から BDNF を投与すると silent synapse の数は減少した。この結果は、silent synapse から成熟型への変換に BDNF が関与することを示唆する。

(4) BDNF の急性効果： 視覚領野のスライス標本で錐体細胞から記録した興奮性シナプス電位は BDNF 投与後数分以内に増強されることが知られている。孤立培養神経細胞標本で解析した結果、この BDNF によるシナプス増強はシナプス前機構（伝達物質の放出亢進）を介すると推測された。BDNF による急性シナプス増強効果は in vivo でも観察され、この効果は約 4 時間で最大に達し、8~12 時間ほど持続した。しかし、この増強効果は幼弱ラットでは見られたが、成熟ラットでは観察されず、age-dependent であった。

(5) BDNF による長期抑圧阻止効果： 幼弱ラットの視覚野スライス標本で、1 Hz の頻回刺激を 15 分与えると、シナプス応答の減弱が見られ、これは長期抑圧と呼ばれる。しかし、BDNF を投与しておくとの現象は観察されない。この機構を興奮性孤立培養標本において解析した結果、長期抑圧は miniature EPSCs の頻度の低下を伴い、その amplitude は変化しなかった。したがって、この現象はシナプス前機構に依存していることが示唆された。この長期抑圧は BDNF の投与によりブロックされる。長期抑圧は in vivo 標本においては観察されなかった。しかし、in vivo 標本においても、trk receptor tyrosine kinase 阻害剤(K252a) あるいは trkB-IgG によって BDNF システムをブロックしておく、長期抑圧が観察された。したがって、in vivo では BDNF システム活性度が高いため長期抑圧が観察されにくいと推測される。事実、スライス標本では、リン酸化 trk の量、あるいは trkB の量は時間と共に低下することが観察された。

(6) 視覚コラム構造に対する神経活動性と BDNF の関与： 大脳視覚野の眼優位コラム構造の形成には眼からの入力活動性が関与する。今回、大脳皮質ニューロンの活動性自

身が関与するかを検討した。大脳皮質に GABA agonist (ムシモール) を持続投与して、ニューロンの活動性を慢性的ブロックすると、開眼側の入力線維終末端分枝分布が縮小することが観察された。この変化はシナプス前と後の同期活動が神経可塑性に必要であるという Hebb の仮説によって説明できる可能性はあるが、そのメカニズムは現在不明である。さらに、片眼を遮蔽した仔猫の視覚野に BDNF を持続的に投与すると、遮蔽眼からの入力を受けるコラムも受けないコラムも共に拡大した。しかし、この現象は成熟猫では見られなかった。したがって、臨界期のコラム構造の形成には BDNF が関与すると示唆された。

(7) BDNF 発現量の生後発達と入力依存性： フェレットの中枢神経の異なった領域のニューロトロフィンのタンパク質量を定量した。両眼球に tetrodotoxin を注入して神経活動性をブロックすると、視覚野の BDNF の発現量のみが低下した。また、ムシモールにより大脳皮質の活動性をブロックすると、皮質の BDNF 発現量が低下した。したがって、中枢神経系の BDNF の発現量は神経活動性に依存すると考えられる。

(8) 視床? 皮質投射線維の髄鞘化の機能的意義： スライス標本を用い、視床、barrel cortex の皮質間の線維伝導速度を測定し、髄鞘化の程度を形態的に定量し、発達に伴う変化を観察した。視床? 皮質間の伝導距離は中枢の部位により著しく異なるが、その情報伝導のタイミング (潜時) は、ほぼ、一定であった。大脳皮質へ到達する種々の入力のタイミングを合わせるという求心線維髄鞘化の新しい機能を示唆する結果が得られた。

総合評価

この研究は視覚野の神経活動依存性可塑的变化を解析したもので、全般的に当初計画に沿って順調に成果を挙げた。研究計画は極めて論理的で、かつ、多角的アプローチを用いて解析し、異なった標本の特徴を生かし、個体・局所神経回路・シナプス・細胞・分子レベルで統合的に結果をまとめあげ、神経可塑的变化の研究に新しい局面を開いた。独創的解析を用いたこの研究の着実な成果は高く評価できる。特に、BDNF と GFP 連結遺伝子のニューロン核内注入による、BDNF の動態観察とニューロン・シナプス機能の発達に対する BDNF の影響の観察は神経栄養因子の機能に関する研究にインパクトを与えた。

回路網形成に対する神経活動の影響に関するメカニズムの研究が殆ど BDNF を介する現象だけに集中している点、また、コラム構造の形成に対する神経活動の関与が現象的段階に留まっている点については批判もあり得るかと思われる。しかし、この 5 年間に得られた研究成果の質と量から考慮して、本プロジェクトは高い成功を示した優れた研究と判断できる。