

遺伝子制御による選択的シナプス強化・除去機構の解明

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

「長期記憶の形成・消去」および「機能的神経回路形成」の基礎である活動依存的、永続的かつ入力特異的なシナプス強化および除去の機構を明らかにする。

この目的のために「成熟海馬での長期増強、抑圧現象」および「発達期小脳における登上線維シナプスの除去現象」を取り上げ、これらのシナプスの永続的变化に関与する遺伝子群を同定し、それらが、どの様なシグナル系や接着タンパク質・足場タンパク質・細胞骨格タンパク質などを介して、シナプスの構造や機能を変化させているのかをシナプスレベルで明らかにする。また遺伝子改変動物を作製し、脳スライスによる機能的解析と個体レベルでの行動解析を行なうことにより、その機能的意義を検証する。

これにより、活動依存的、永続的かつ入力特異的なシナプス強化および除去の機構と意義について統合的に理解することをめざす。

2. 研究内容及び目標

1. シナプス形成、強化に伴う遺伝子発現と遺伝子産物の選択的配置に関する研究

(1) 海馬での後期 LTP に伴い発現する遺伝子の網羅的解析と機能に関する研究 (㈱三菱化学生命科学研究所)

海馬の後期 LTP に伴い発現誘導される遺伝子を網羅的に探索し、それらの中の未知の遺伝子の構造を明らかにする。また、LTP 誘導後の遺伝子発現の空間的、時間的変化、および遺伝子産物の局在分布や、シナプス強化に伴う局在変化を解析するとともに、遺伝子産物の機能を明らかにする。選択的シナプス強化に関連が深い遺伝子についてノックアウトマウスを作成し、後期 LTP や記憶、学習行動への影響を調べる。

(2) 小脳の発達期に発現制御される遺伝子に関する研究 (㈱三菱化学生命科学研究所)

ラット小脳の発達に伴いプルキンエ細胞で発現が制御される遺伝子を探索する。これらの遺伝子が海馬の後期 LTP に伴い発現が制御されるか否かを調べ、発達期のシナプス形成と成熟期のシナプス強化の分子機構の共通性を探る。また、小脳の P15 に特異的に発現するものは、計画 2.

(1) の候補遺伝子として解析する。

(3) 遺伝子産物の選択的配置に関する研究 (㈱三菱化学生命科学研究所)

海馬 LTP 系を用いて、Ves1-1S タンパク質が「synaptic

tag 仮説」から予想される細胞内局在を示すかどうかを検討する。また、Ves1-1S のノックアウトマウスを作製し、初期 LTP および後期 LTP が変化するかどうかを検討する。これらと平行して、単一ニューロン内における Ves1-1S タンパク質のシナプス選択的な分配機構を解析する系を確立する。この系を用いて薬理学的手法により Ves1-1S タンパク質のシナプス特異的の局在に関与するシグナル伝達系を解析するとともに、synaptic tag の分子実体を明らかにする。

2. シナプスの選択的除去機構に関する研究

(1) 登上線維シナプスの選択的除去に関わる遺伝子に関する研究 (金沢大学医学部)

登上線維シナプス除去がおこる時期 (臨界期, P15-18) に選択的に発現する遺伝子を網羅的に探索する。次に選択的除去が起こらない種々のノックアウトマウスでは発現が見られないものを選び出し、候補遺伝子の絞り込みを計る。同定された候補遺伝子が、登上線維シナプス除去に関与するかを調べるため、これらのアンチセンス DNA を合成し、発達期マウス小脳に持続的に与えて分子の機能を阻害したままマウスを成長させ、登上線維シナプス機能を電気生理学的に解析する。cDNA クローニングを行い全分子構造を明らかにし、その遺伝子や遺伝子産物の発現の時間的、空間的变化を調べる。また免疫電顕組織化学法で、シナプスでの局在を明らかにする。候補遺伝子について、遺伝子操作マウスを作製し、それらの表現型を解析する。

(2) 細胞骨格、足場タンパク質、シナプスタグ分子、開口放出関連タンパク等の登上線維シナプス除去への関与に関する研究 (金沢大学医学部)

登上線維シナプスにおける細胞骨格、足場タンパク質、シナプスタグ分子、開口放出関連タンパクの局在と発現時期を調べ、登上線維シナプス除去の分子基盤を解明する。また遺伝子操作マウスが作成された分子に関して、電気生理学的解析を行い、生理機能への役割を明らかにする。

3. シナプス選択的強化に伴う代謝型グルタミン酸受容体シグナル系の役割に関する研究

(1) CA1 LTP における代謝型グルタミン酸受容体の役割に関する研究 (神戸大学医学部)

海馬におけるシナプス選択的な強化機構に代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) がどのように寄与するかを主に電気生理学的手法により明らかにする。具体的には、強化されるべきシナプスがマークされる際に mGluR の活性化が必要かどうかを確かめるため、薬理学的に NMDA 受容体を遮断しておいて mGluR を単独で活性化させた場合の LTP 発現の選択性を検討する。これまでに、mGluR 5 選

拮抗的アンタゴニストのLTP誘導に対する効果とグループ I mGluR 選択的アゴニストのシナプス伝達に対する効果を検討した。

(2) 代謝型グルタミン酸受容体の標的分子に関する研究
(神戸大学医学部)

他サブグループが解析を進める機能タンパクは mGluR により制御される可能性が強い。これらのタンパクの機能を阻害する薬物によりシナプス強化がどのように影響されるかを検討し、それぞれの機能タンパクの役割を明らかにする。また、これらの機能分子のノックアウトマウスあるいは mGluR シグナル系のノックアウトマウスを用いて電気生理学的解析を行い、シナプス強化にかかわるシグナル系の全容を明らかにする。さらに mGluR の標的分子として NMDA 受容体 NR2 サブユニットが考えられるので、そのチロシリン酸が mGluR 活性化により変化するかどうかを検討中である。

(3) 細胞接着分子の CA1 LTP における役割に関する研究
(神戸大学医学部)

これまでの研究から、細胞接着分子が海馬でのシナプス伝達の可塑性に関与することが明らかとなっているが、これをさらに発展させシナプス強化がどのような分子機構で発現し安定するかを単一シナプスレベルで明らかにする。

4. 細胞接着分子と結合する足場タンパク質を介するシナプス強化、除去の分子機構に関する研究

(1) シナプスの強化、除去における細胞接着因子と足場タンパク質に関する研究 (東京医科歯科大学)

シナプスの足場タンパク質 PSD-95 および S-SCAM に相互作用するニューロリギンが、シナプスの選択的強化、除去に果たす役割を明らかにする。

(2) シナプスの強化、除去における細胞膜表面タンパク質のエンドサイトーシスと足場タンパク質に関する研究 (東京医科歯科大学)

足場タンパク質自身のエンドサイトーシスの動態、並びに受容体や細胞接着分子のエンドサイトーシスの制御への関与を明らかにする。海馬スライスに足場タンパク質の変異体を過剰発現させることによって、細胞膜表面上に分布する受容体や接着因子の数に変化が生じ LTP の誘導が阻害されるかを検討する。

(3) シナプスの強化、除去における細胞骨格の制御と足場タンパク質に関する研究 (東京医科歯科大学)

足場タンパク質と細胞骨格のシナプスにおける相互作用を検討し、シナプスの強化・除去との相関を明らかにする。足場タンパク質の変異体を導入することによって、その細胞骨格の変化に修飾が起こるかを検討する。

(4) シナプスと細胞核に局在する分子が、シナプスの強化、除去において果たす役割に関する研究 (東京医科歯科大学)

シナプスの足場タンパク質 S-SCAM に、 β カテニンが結合することを見出している。 β カテニンは細胞接着機構

の構成因子であると同時に、核内で遺伝子転写制御に関与していることが知られている。また、PSD-95 に結合する分子 BEGAIN も、シナプスのみならず細胞核にも局在している。そこで、シナプスと細胞核の両方に局在する分子が、シナプスの選択的強化、除去に果たす役割を明らかにする。

5. 細胞骨格と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去機構に関する研究

(1) シナプス強化、除去におけるアクチン結合 PDZ タンパク質に関する研究 (三重大学医学部)

海馬 CA3 領域での LTP や LTD に伴うシナプス微細形態変化と足場タンパク質 (Afadin, Neurabin, Catenin 等) の局在変化をレーザー顕微鏡による多重免疫染色と免疫電顕で分析する。また培養海馬神経細胞や海馬スライス培養に GFP と足場タンパク質の融合タンパク質やアクチン結合ドメインを欠失させた改変遺伝子を発現させ、シナプス活動に伴う局在変化を調べる。また登上線維の除去が見られない mGluR, PLC β 4, Gq, PKC γ などのノックアウトマウスで足場タンパク質の発現、局在がどの様に変化しているかを免疫組織化学的に明らかにする。

(2) Rho シグナル系を介したシナプス構造および機能制御に関する研究 (三重大学医学部)

Rho の標的タンパク質である Rho-キナーゼや MBS 等の細胞内局在を発生段階のラットの神経組織や培養神経細胞、海馬、小脳などで電子顕微鏡レベルで明らかにする。また LTP や LTD の成立に伴い、それらのタンパク質の局在がどの様に变化するかを調べる。さらに Rho-キナーゼや MBS の過剰発現や特異的機能阻害によって突起伸長やシナプス強化、除去への影響を調べる。神経突起、成長円錐画分からアフィニティーカラム法や免疫沈降法を用いて Rho-キナーゼや MBS と結合するタンパク質を探索し、その分子構造を明らかにすると共に突起伸長やシナプス機能への役割を明らかにする。

(3) 神経突起伸展におけるシナプス小胞開口分泌関連タンパク質の機能解析 (三重大学医学部)

シナプス小胞開口分泌関連タンパク質である VAMP2, SNAP25, Syntaxin, Synaptotagmin 遺伝子やその変異体を初代培養神経細胞や株化された培養神経細胞に導入し、神経突起の伸展や成長円錐の形成への影響を調べることでこれらのタンパク質の機能および機能領域を明らかにする。さらに green fluorescent protein (GFP) と融合させたシナプス小胞開口分泌関連タンパク質を作成し、培養神経細胞に導入することで、細胞が生きたまの状態で GFP 融合 VAMP2, SNAP25, Syntaxin や Synaptotagmin の経時的な挙動を調べる。

(4) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究 (三重大学医学部)

成体ラットと幼若ラットとの脊髄随節置換を行い、運動

系知覚系伝導路の神経機能回復例，失敗例，および正常コントロールの間でディファレンシャルディスプレイやサブトラクションクロニングを行い，神経再生依存的に発現する遺伝子を同定する。得られた遺伝子と海馬での長期増強との関連をノザンプロット，*in situ* hybridization で調べる。

6. シナプス膜機能タンパク質の組み込み機構に関する研究

(1) チャンネルやレセプターの細胞膜への組み込みに関わる輸送小胞の単離に関する研究 (㈱三菱化学生命科学研究所)

ラット脳やPC12細胞のホモジネートをショ糖密度勾配法で分離した後，各分画から immunoaffinity 精製法で Ca チャンネルや AMPA レセプターを含む細胞内小胞を単離する。特異的に含まれるタンパク質の部分アミノ酸配列を明らかにし，抗体を作成する。免疫組織化学や免疫電顕によって輸送小胞の細胞内局在を明らかにするほか，シナプスの選択的強化，除去に伴ってその局在が変化するかなどを明らかにする。

(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究 (㈱三菱化学生命科学研究所)

輸送小胞に特有なタンパク質と GFP との融合タンパク

を培養神経細胞やスライス培養に発現させ，神経活動に伴ってその局在がどの様に変化するかを調べる。様々な阻害剤や，膜透過性のキレーターを作用させ，膜への組み込みやその制御に関わるシグナル系を明らかにする。また輸送小胞が細胞骨格タンパク質や足場タンパク質と結合するか否かも調べる。

3. 年次計画

本プロジェクトでは，「長期記憶の形成・消去」および「機能的神経回路形成」の基礎である活動依存的，永続的かつ入力特異的なシナプス強化および除去の機構を明らかにすることを目標とする。

第Ⅰ期ではシナプスレベルでの解明を目指し，シナプス強化・除去に関わる遺伝子群の全容，遺伝子産物の特定のシナプスへの選択的輸送機構，シナプス強化・除去に伴うシナプス機能分子やシナプス構造の変化，これらを統御する細胞内シグナル伝達系などを明らかにする。

第Ⅱ期ではこれらの成果を個体レベルにまで展開し，記憶形成や消去の分子基盤を明らかにすることをめざす。

研究項目	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度
1. シナプスの形成，強化に伴う遺伝子発現と遺伝子産物の選択的配置に関する研究					
(1) 海馬での後期 LTP に伴い発現する遺伝子の網羅的解析と機能に関する研究	← 遺伝子の探索	← 遺伝子産物の機能解析		← 学習・記憶における役割の評価	
(2) 小脳の発達期に発現制御される遺伝子に関する研究		← 遺伝子の探索		← 遺伝子機能の解明	
(3) 遺伝子産物の選択的配置に関する研究		← シナプスタグ仮説の検証，シナプスタグに関わるシグナル伝達系の解明		← シナプスタグの分子実体の解明	
2. シナプスの選択的除去機構に関する研究					
(1) 登上線維シナプスの選択的除去に関わる遺伝子に関する研究		← 新たな候補遺伝子の網羅的探索			
		← 候補遺伝子の機能解析			
		← 候補遺伝子の構造解析と局在候補遺伝子操作マウスの作製と解析			
(2) 細胞骨格，足場タンパク質，シナプスタグ分子，開口放出関連タンパク質等の登上線維シナプス除去への関与に関する研究			← 細胞骨格，足場タンパク質，シナプスタグ分子，開口放出関連タンパク質等の局在		
		← 候補遺伝子操作マウスの作製と解析			

研究項目	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度
3. シナプス選択的強化に伴う代謝型グルタミン酸受容体シグナル系の役割に関する研究					
(1) CA1 LTPにおける代謝型グルタミン酸受容体の役割に関する研究	LTPの電気生理学的解析				
(2) 代謝型グルタミン酸受容体の標的分子に関する研究	ノックアウトマウスの作製		ノックアウトマウスの電気生理学、行動学的解析		
(3) 細胞接着分子のCA1 LTPにおける役割に関する研究	細胞接着分子ノックアウトマウスの電気生理学的解析		単一シナプスレベルでの解析		
4. 細胞接着分子と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去の分子機構に関する研究					
(1) シナプスの強化、除去における細胞接着因子と足場タンパク質に関する研究	PDS-95/SAP90やS-SCAM neuroliginやカドヘリンとの関係の解明			足場タンパク質に結合する新規細胞接着因子の同定と解析	
(2) シナプスの強化、除去における細胞膜表面タンパク質のエンドサイトーシスと足場タンパク質に関する研究	足場タンパク質のエンドサイトーシスの解析			受容体・細胞接着因子のエンドサイトーシスの解析	
(3) シナプスの強化、除去における細胞骨格の制御と足場タンパク質に関する研究	足場タンパク質と細胞骨格の相互作用の解析			足場タンパク質による細胞骨格の制御機能解析	
(4) シナプスと細胞核に局在する分子が、シナプスの強化、除去において果たす役割に関する研究	細胞核に局在する分子			シナプスの機能解析	
5. 細胞骨格と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去機構に関する研究					
(1) シナプスの強化、除去におけるアクチン結合PDZタンパク質に関わる研究	足場タンパク質の脳内局在の解析			ノックアウトマウスを用いた解析	
(2) Rhoシグナル系を介したシナプス構造および機能制御に関する研究	Rho標的タンパク質の探索と脳内局在の解析			Rho標的タンパク質の機能解析	
(3) 神経突起伸展におけるシナプス小胞開口分泌関連タンパク質の機能解析	突起伸長での小胞の挙動解析法の開発			突起伸長と小胞の関連解明	
(4) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究	遺伝子の探索			選択的シナプス除去機構の解明	
6. シナプス膜機能タンパク質の組み込み機構に関する研究					
(1) チャンネル、レセプターの細胞膜への組み込みに関わる輸送小胞の単離に関する研究	輸送小胞の単離と組成タンパク質の解析				

研究項目	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度
(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究			← 輸送小胞の機能制御機構の解明 →		
所要経費(合計)	179百万円	194百万円			

4. 平成13年度における実施内容と達成目標

1. シナプス形成、強化に伴う遺伝子発現と遺伝子産物の選択的配置に関する研究

(1) 海馬での後期LTPに伴い発現する遺伝子の網羅的解析と機能に関する研究

平成12年度は、海馬の後期LTPに伴い発現誘導される遺伝子の網羅的探索を完了すると共に、得られた遺伝子群の部分構造を明らかにした。本年度は海馬の後期LTPに伴い発現する遺伝子のうちVesl-1S, acticinの機能改変がLTPに与える影響を明らかにする。また、これらの機能改変動物の学習行動を解析する。

(2) 小脳の発達期に発現制御される遺伝子に関する研究

平成12年度は、ラット小脳の発達に伴いプルキンエ細胞で発現が制御される遺伝子の探索方法を確立し、この方法を用いて発達期小脳の選択的シナプス除去に関わる遺伝子の候補を得た。本年度は、これらの遺伝子の構造を明らかにするとともに、発現制御のパターンを *in situ* hybridization 法などを用いて調べる。

(3) 遺伝子産物の選択的配置に関する研究

平成12年度は、海馬LTP系を用いて、Vesl-1Sタンパク質がシナプスタグ仮説により一部説明可能であることを明らかにするとともに、ウィルスベクターによる海馬初代培養ニューロンへの遺伝子導入系を確立した。本年度は、*in vitro*の細胞培養系を用いてGFPを融合したVesl-1Sタンパク質の細胞内局在を簡便に解析できる系を作成する。また、GFP融合したVesl-1Sトランスジェニックラットを作成し、LTPに伴うGFP-Vesl-1Sの細胞内局在を解析する。

2. シナプスの選択的除去機構に関する研究

(1) 登上線維シナプスの選択的除去に関する研究

平成12年度の研究により、登上線維シナプス除去がおこる時期(臨界期, P15-18)の前後でプルキンエ細胞において発現が制御され、PKC γ の制御下にある遺伝子を differential display 法で探索した結果、23の候補遺伝子を同定した。また、遺伝子スクリーニングのためのアクセシ系として、登上線維の起始核である下オリブ核と小脳皮質の共培養を試みた。本年度は、共培養系を改良して、登上線維-プルキンエ細胞シナプスを人工的に作る系を確

立し、候補遺伝子のアンチセンスDNAを合成して共培養系に与え、登上線維-プルキンエ細胞シナプス形成に影響を与えるものをスクリーニングすることにより、候補遺伝子の絞り込みを進める。また、有望な候補遺伝子について、遺伝子操作マウスを作製する。

(2) 細胞骨格、足場タンパク質、シナプスタグ分子、開口放出関連タンパク等の登上線維シナプス除去への関与に関する研究

自然発生ミュータントマウス(stargazer)の欠損遺伝子の産物であるstargazinは、興奮性シナプス後部へAMPA受容体を発現させるのに重要な足場タンパク質であることが最近明らかになった。平成12年度に引き続き、現在我々はstargazer mouseの登上線維シナプス発達を調べ、その役割を明らかにする。また、Vesl-1Sの登上線維シナプス形成に関する役割を調べるため、Vesl-1Sをプルキンエ細胞にのみ過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成する。

3. シナプス選択的強化に伴う代謝型グルタミン酸受容体シグナル系の役割に関する研究

(1) CA1 LTPにおける代謝型グルタミン酸受容体の役割に関する研究

マウス海馬スライスを用いて、mGluRを活性化させた際にシナプス選択的にマーク(いわゆるシナプスタグ)がつくかどうかを電気生理学的に検討する。具体的には、高頻度刺激を与えたシナプスに選択的に新たなタンパクが輸送されるかどうかを調べる。その予備実験として、mGluR選択的アゴニスト投与およびシナプス活性化によるmGluR活性化のシナプス伝達と可塑性に対する効果を検討する。

(2) 代謝型グルタミン酸受容体の標的分子に関する研究

各種機能タンパクの遺伝子ノックアウトマウスを定法により作製する。現在、mGluRと相互作用すると考えられるいくつかの分子についてノックアウトマウスの作製を継続中である。これと並行して、それぞれのタンパクの機能を阻害する薬物のLTPに対する効果を電気生理学的に解析する。

(3) 細胞接着分子のCA1 LTPにおける役割に関する研究

細胞接着分子であるカドヘリンあるいはテレンセファリンの遺伝子ノックアウトマウスから海馬スライスを作製し、

ホールセル記録法により興奮性シナプス電流を記録する。電気刺激により誘発される興奮性シナプス電流および微小シナプス電流を正常動物と比較し、キネティックなどに差があるかどうかを検討し、正常シナプス伝達における細胞接着分子の役割を明らかにする。また、低親和性のAMPA受容体あるいはNMDA受容体アンタゴニストを用いて、シナプス間隙での伝達物質の濃度を評価することにより、細胞接着分子がシナプス間隙の容積を調節している可能性を検討する。さらに、溝口グループが解析する細胞接着分子ネクチンのシナプス伝達における役割を電気生理学的に検討する。

4. 細胞接着分子と結合する足場タンパク質を介するシナプス強化、除去の分子機構に関する研究

平成12年度には、足場タンパク質S-SCAMと、足場タンパク質PSD-95に結合するBEGAINを中心として解析を進めた。その結果、S-SCAMに β カテニンが結合すること、 β カテニンはS-SCAMを介してニューロリギンの裏打ち分子として機能していることを見出している。また、S-SCAMがシナプスに局在決定される分子機構についても解析を行っている。BEGAINに関しては、シナプスのみならず細胞核にも局在すること、ロイシンジッパーをもつN末端を介して細胞核から樹状突起に局在決定されること、シナプスへの局在決定にはN末端領域以外が必要で、かつシナプスの活動に依存することを見出している。以上の結果を踏まえて、平成13年度には以下のことを進行する。

- (1) ニューロリギンによる細胞接着が β カテニンの転写制御に与える影響を解析する。
- (2) S-SCAMを介して形成されるニューロリギンとNMDA受容体、およびそれらを裏打ちする β カテニンの複合体形成が、シナプスの選択的強化、除去の過程に並行して変動するかを明らかにする。
- (3) S-SCAMのシナプスへの局在決定機構をさらに解析して、とくに成熟後のシナプスでもS-SCAMの局在がシナプスの活動を反映して動的な変化を示すかを明らかにする。
- (4) BEGAINのシナプスへの局在決定機構をさらに解析して、とくに一度シナプスに局在決定されたBEGAINが、核に移行するか否かを明らかにする。
- (5) 上記(3)(4)において、S-SCAMやBEGAINが動的な変動を示す場合には、どのようなシグナル伝達系を介して制御されるのか、細胞骨格は関与しているのかを明らかにする。

5. 細胞骨格と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去機構に関する研究

平成12年度には、足場タンパク質Afadinに結合するNectinのシナプス形成における役割と、足場タンパク質Neurabinの神経活動依存性の局在変化、並びに中枢神経

損傷後の新しい再生様式を中心として解析を進めた。その結果、Nectinの機能阻害によりシナプスの形成異常が惹起されること、Neurabinは活動依存性にPSDから細胞質へ局在を変化させることを見出している。また、幼若ラットの脊髄随節置換において、錐体路軸索が脱束化した後、再束化した場合には、神経機能の著明な回復が認められることを見出している。以上の結果を踏まえて、平成13年度には以下の課題について研究を進展させる計画である。

(1) シナプス強化、除去におけるアクチン結合性PDZタンパク質に関する研究

海馬培養神経細胞に足場タンパク質(Afadin, Neurabin)とGFPの融合タンパク質を発現させ、シナプス活動に伴う局在変化の時間的変化を調べる。また、登上線維の起始核である下オリブ核神経細胞における足場タンパク質の探索とそのシナプス除去に伴う変化を免疫組織化学的に明らかにする。

(2) Rhoシグナル系を介したシナプス構造および機能制御に関する研究

Rhoの標的タンパク質であるRho-キナーゼやMBSとGFPの融合タンパク質を培養神経細胞に発現させ、シナプス強化、除去、神経突起伸長における役割を明らかにし、作用機構を解析する。Rho-キナーゼやMBSの作用点をプロテオミクアナリシスで解析する。

(3) 神経突起伸展におけるシナプス小胞開口分泌関連タンパク質の機能解析

green fluorescent protein (GFP) と融合させたシナプス小胞開口分泌関連タンパク質を作成し、培養神経細胞に導入し、神経活動依存的なプレシナプスの分子構築を同定する。

(4) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究

幼若ラットとの脊髄随節置換を行い、神経の脱束化と再束化の間でディファレンシャルディスプレイやサブトラクションクローニングを行い、点投点投射の回復に依存的な発現をする遺伝子を同定する。

6. シナプス膜機能タンパク質の組み込み機構に関する研究

(1) チャンネルやレセプターの細胞膜への組み込みに関する研究

ラット脳より調整する粗膜画分を密度勾配超遠心法で分離した後、immunoaffinity精製を行い、AMPA受容体を含む細胞内小胞を大量に調整する。単離した小胞に含まれるタンパク質の組成をイムノブロット法や、マイクロシーケンシング法によって明らかにする。未知のタンパク質である場合にはcDNAクローニングを行い、全分子構造を明らかにする。

(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究

AMPAレセプターを含む小胞に特異的に存在するタンパク質の特異抗体や、GFPとの融合タンパク質の発現ベ

クターを作成する。免疫細胞染色や免疫電顕法を用い、AMPA レセプターを含む小胞のシナプス後部での局在分布を明らかにする。培養した神経由来細胞を用い、細胞膜

上への AMPA レセプターやL型Caチャンネルの組み込み機構をボツリヌス神経毒素などを用いて明らかにする。

II 平成13年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. シナプス形成、強化に伴う遺伝子発現と遺伝子産物の選択的配置に関する研究		
(1) 海馬での後期LTPに伴い発現する遺伝子の網羅的解析と機能に関する研究	(株)三菱化学生命科学研究所	井ノ口 馨
(2) 小脳の発達期に発現制御される遺伝子に関する研究	(株)三菱化学生命科学研究所	井ノ口 馨
(3) 遺伝子産物の選択的配置に関する研究	(株)三菱化学生命科学研究所	井ノ口 馨
2. シナプスの選択的除去機構に関する研究		
(1) 登上線維シナプスの選択的除去に関わる遺伝子に関する研究	金沢大学医学部	橋本 浩一
(2) 細胞骨格、足場タンパク質、シナプスタグ分子、開口放出関連タンパク等の登上線維シナプス除去への関与に関する研究	金沢大学医学部	橋本 浩一
3. シナプス選択的強化に伴う代謝型グルタミン酸受容体シグナル系の役割に関する研究		
(1) CA1 LTPにおける代謝型グルタミン酸受容体の役割に関する研究	神戸大学医学部	真鍋 俊也
(2) 代謝型グルタミン酸受容体の標的分子に関する研究	神戸大学医学部	真鍋 俊也
(3) 細胞接着分子のCA1 LTPにおける役割に関する研究	神戸大学医学部	真鍋 俊也
4. 細胞接着分子と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去の分子機構に関する研究		
(1) シナプスの強化、除去における細胞接着因子と足場タンパク質に関する研究	東京医科歯科大学	畑 裕
(2) シナプスの強化、除去における細胞膜表面タンパク質のエンドサイトーシスと足場タンパク質に関する研究	東京医科歯科大学	畑 裕
(3) シナプスの強化、除去における細胞骨格の制御と足場タンパク質に関する研究	東京医科歯科大学	畑 裕
(4) シナプスと細胞核に局在する分子が、シナプスの強化、除去において果たす役割に関する研究	東京医科歯科大学	畑 裕

研究項目	担当機関	研究担当者
5. 細胞骨格と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化, 除去機構に関する研究		
(1) シナプス強化, 除去におけるアクチン結合PDZタンパク質に関わる研究	三重大学医学部	溝口 明
(2) Rhoシグナル系を介したシナプス構造および機能制御に関する研究	三重大学医学部	溝口 明
(3) 神経突起伸展におけるシナプス小胞開口分泌関連タンパク質の機能解析	三重大学医学部	溝口 明
(4) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究	三重大学医学部	溝口 明
6. シナプス膜機能タンパク質の組み込み機構に関する研究		
(1) チャンネル, レセプターの細胞膜への組み込みに関わる輸送小胞の単離に関する研究	(株)三菱化学生命科学研究所	高橋 正身
(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究	(株)三菱化学生命科学研究所	高橋 正身
7. 研究管理	金沢大学医学部	狩野 方伸

III リエゾン会議

委員	所 属
○狩野 方伸	金沢大学 医学部生理学第二講座教授
井ノ口 馨	(株)三菱化学生命科学研究所 研究主幹
高橋 正身	(株)三菱化学生命科学研究所 部長
橋本 浩一	金沢大学 医学部助手
真鍋 俊也	神戸大学 医学部教授
溝口 明	三重大学 医学部教授

(注：○は研究管理統括者)