

遺伝子制御による選択的シナプス強化・除去機構の解明

研究管理統括者：狩野 方伸（金沢大学医学部）

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、どのよう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。

(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、そのチロシンリン酸が mGluR 活性化により変化するかどうかを検討する。

(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) 人為的遺伝子発現操作によるシナプスの強化、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)

海馬スライスやマウ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、LTP の誘導やシナプスの強化、除去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、局在がどのよう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ように変化するかを調べる。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) 神経突起伸長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、神経突起の伸長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、細胞が生きたままの状態での 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ナルクロニングを行い、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 (北里大学医学部)

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 (北里大学医学部)

輸送小胞に特異なタンパク質と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

てその局在がどのよう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			
(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		← 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		← 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		
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			

研究項目	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度
(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	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		
(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	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		
(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		
(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	細胞核に局在する分子		シナプスの機能解析		
(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	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		
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	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		
(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	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		
(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	遺伝子の探索		選択的シナプス除去機構の解明		
(3) 神経突起伸長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	輸送小胞の単離と組成タンパク質の解析		輸送小胞の機能制御機構の解明		
(4) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究	輸送小胞の単離に関する研究		輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究		
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	輸送小胞の単離に関する研究		輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究		
(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	輸送小胞の単離に関する研究		輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究		
(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究	輸送小胞の単離に関する研究		輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究		
所要経費(合計)	179百万円	194百万円	240百万円		

4. 平成14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13年度は、海馬の後期LTPに伴い発現誘導される遺伝子の一つとして我々が単離したactivinがLTPの持続に重要な働きをしていることを明らかにした。本年度はactivinの機能が阻害された遺伝子操作動物、およびactivin機能が促進する遺伝子操作動物を作成し、これらの機能改変が海馬LTPに与える影響を明らかにする。また、LTPにともない発現誘導されるもう一つの遺伝子vesl-1Sの欠損変異マウスを作成し解析する。

(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13年度は、ラット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絞り込み、遺伝子の部分構造を明らかにした。本年度は、これらの遺伝子の全体構造を明らかにするとともに、これらの遺伝子の機能を改変した遺伝子操作動物を作成する。また、橋本と共同でこれらの遺伝子改変が登上線維の発達過程に与える影響を解析する。

(3) 遺伝子産物の選択的配置に関する研究

平成13年度は、初代培養ニューロンを用いてGFPを融合したVesl-1Sタンパク質の細胞内局在を高い空間解像度で観察できる系の作成に成功した。本年度は、この系を用いて単一ニューロン内におけるGFP-Vesl-1Sタンパク質がシナプス選択的に輸送されるか否かを解析する。

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わる遺伝子に関する研究

平成13年度までの解析により、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として23の候補遺伝子が明らかになった。平成14年度は、これらの候補遺伝子をさらに絞り込み、重要なものに関しては井ノ口らと共同で遺伝子操作マウスを作成し、登上線維の発達過程に与える影響を解析する。また、数ある候補遺伝子を効率的に検索するため、Gene Gunを用いて特定分子のアンチセンスDNA等を生体内のプルキンエ細胞で発現させることにより、特定の分子の機能を生体細胞内で阻害する実験系の開発を試みる。

(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

平成13年度に作成したVesl-1Sを小脳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および、現在井ノ口らが作成中のVesl-1Sノックアウトマウスを解析し、Vesl-1Sが登上線維シナプス形成に与える役割を調べる。また、平成13年度に引き続き、AMPA受容体の膜表面への機能発現に必要な足場タンパクであるstargazin

の登上線維シナプス発達過程に与える影響を調べる。

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解析し、mGluRのシナプス選択的強化機構における役割を引き続き検討する。また、Vesl-1Sのホモマウスが得られた場合には、電気生理学的な解析を開始する。さらに、代謝型受容体に共通の特性を明らかにするために、代謝型受容体であるムスカリン性アセチルコリン受容体のシナプス伝達と可塑性における役割の検討を行う。また、最近、mGluRと同様に、シナプス前終末で伝達物質の放出を調節することが明らかになりつつあるカイニン酸受容体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。

(2) 代謝型グルタミン酸受容体の標的分子に関する研究

各種機能蛋白の遺伝子ノックアウトマウスの作製を継続する。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進行中である。これと並行して、それぞれの蛋白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。また、mGluRの標的分子と考えられるNMDA受容体のチロシンリン酸化に関する研究も進める。

(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ェリンの遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析を継続する。また、コアメンバーの溝口グループおよび畑グループとの共同研究であるネクチンおよびS-SCAMの機能解析を継続する。さらに、細胞接着に重要と考えられる糖鎖であるHNK-1抗原のシナプス伝達における役割についても検討する。

4. 細胞接着分子と結合する足場蛋白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蛋白質に関する研究

シナプスの足場蛋白質PSD-95及び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) 人為的遺伝子発現操作による、シナプスの強化、除去における足場タンパク質の役割解明に関する研究

S-SCAMの遺伝子改変マウスにおける神経シナプスの分子構成の異常を解析することにより、足場蛋白質がシナプスの強化、除去において果たす役割を解明する。

(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

足場蛋白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。足場蛋白質による細胞骨格の制御と、細胞骨格による足場蛋白質の制御の両方を検討する。

(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

シナプスの足場蛋白質 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 タンパク質に関わる研究

発生期の下オリブ核へのトレーサー注入による登上線維終末の選択的標識により、本終末のシナプス除去過程における分子構築の変化を特に PDZ タンパク質を中心として解析する。また、発生段階の下オリブ核の cDNA ライブラリーを作製し、発生時期特異的遺伝子を同定する。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

Rho の標的タンパク質である Rho-キナーゼや MBS 等のスパインにおける局在、および電位依存性形態変化における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

海馬培養細胞を用いて、シナプス形成に伴うプレシナプ

スおよびポストシナプスの分子構築の発達過程を、組織化学的および電気生理学的に解析し、これらの分子構築と神経突起の伸展速度および神経信号との関連を明らかにする。

(4) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究

成体および幼若ラット脊髄髄節置換モデルを用いて、錐体路および赤核脊髄路の再生依存的に発現する遺伝子を探索し、クローニングする。

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わる輸送小胞の単離に関する研究

平成 13 年度に確立した方法に従い、AMPA-R を含む細胞内小胞をラット脳ホモジネートから 5 つの異なる分画に分けて大量に精製する。精製した小胞のタンパク質組成を、イムノプロット法、マイクロシーケンス法を用いて明らかにする。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。特に v-SNARE である VAMP の種類、Calnexin の有無、既知の細胞内オルガネラ指標タンパク質の有無を明らかにし、各小胞の特質を明確にする。さらに AMPA レセプターを含む小胞に特異的に存在する蛋白質の特異抗体、GFP-融合タンパク質の発現ベクターを作成する。

(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究

培養海馬神経細胞を用い、各小胞に特徴的な抗体による免疫細胞染色を行い、各小胞の細胞内局在を明らかにする。培養海馬神経細胞を用い、細胞膜への AMPA-R, Calnexin の組み込みが様々なタイプのボツリヌス毒素で阻害されるかを調べ、どの様な SNARE タンパク質が関与しているかを明らかにする。さらに細胞膜への AMPA-R, Calnexin の組み込みに関わるシグナル系を明らかにする。また改変 SNAP-25 のノックインマウスを用い、AMPA-R, NMDA-R, Calnexin, 小胞輸送関連タンパク質の発現、分布に異常が見られるかを検索する。

II 平成14年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
<p>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</p> <p>(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</p> <p>(2) 小脳の発達期に発現制御される遺伝子に関する研究</p> <p>(3) 遺伝子産物の選択的配置に関する研究</p>	<p>(株)三菱化学生命科学研究所</p> <p>(株)三菱化学生命科学研究所</p> <p>(株)三菱化学生命科学研究所</p>	<p>井ノ口 馨</p> <p>井ノ口 馨</p> <p>井ノ口 馨</p>
<p>2. シナプスの選択的除去機構に関する研究</p> <p>(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</p> <p>(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</p>	<p>金沢大学医学部</p> <p>金沢大学医学部</p>	<p>橋本浩一</p> <p>橋本浩一</p>
<p>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</p> <p>(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</p> <p>(2) 代謝型グルタミン酸受容体の標的分子に関する研究</p> <p>(3) 細胞接着分子の CA1 LTP における役割に関する研究</p>	<p>神戸大学医学部</p> <p>神戸大学医学部</p> <p>神戸大学医学部</p>	<p>真鍋俊也</p> <p>真鍋俊也</p> <p>真鍋俊也</p>
<p>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</p> <p>(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</p> <p>(2) 人為的遺伝子発現操作によるシナプスの強化，除去における足場タンパク質の役割解明に関する研究</p> <p>(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</p> <p>(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</p>	<p>東京医科歯科大学</p> <p>東京医科歯科大学</p> <p>東京医科歯科大学</p> <p>東京医科歯科大学</p>	<p>畑 裕</p> <p>畑 裕</p> <p>畑 裕</p> <p>畑 裕</p>
<p>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</p> <p>(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</p> <p>(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</p>	<p>三重大学医学部</p> <p>三重大学医学部</p>	<p>溝口 明</p> <p>溝口 明</p>

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
(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	北里大学医学部	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	北里大学医学部	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	㈱三菱化学生命科学研究所 研究主幹
高 橋 正 身	北里大学 医学部 教授
橋 本 浩 一	金沢大学 医学部 助手
畑 裕	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授
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)