

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. 遺伝子制御からみた選択的シナプス強化・除去の分子機構に関する研究

(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）

第I期では海馬の後期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した。また、LTP誘導後の遺伝子発現の空間的、時間的变化、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明らかにした。第II期ではこれらの遺伝子産物の機能を明らかにするとともに、選択的シナプス強化に関連が深い遺伝子について機能改変したマウスを作成し、真鍋グループ・橋本グループと協力し後期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）

第I期で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を探索しそれらの遺伝子構造を明らかにした。これらの遺伝子の一つであるチュブリン細胞骨格の制御因子をコードする stathmin 遺伝子をプルキンエ細胞のみに過剰発現する遺伝子操作マウスを作製した。第II期では橋本グループと協力しこのマウスの登上線維除

去過程を調べ、選択的シナプス除去におけるポストシナプス側のチュブリン細胞骨格系の制御の役割を明らかにする。また、発達期の下オリブ核で特異的に発現制御される遺伝子を溝口グループと協力して探索し、選択的シナプス除去に関わるプレシナプス側の分子機構を明らかにする。(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タンパク質や synaptopodin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、単一ニューロン内における Ves1-1Sタンパク質や synaptopodin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タンパク質や synaptopodin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. 細胞内シグナル伝達系からみた選択的シナプス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（金沢大学大学院医学系研究科）

発達脳におけるシナプス選択的改変機構のモデルとして、小脳登上線維シナプスの選択的除去機構を取り上げ、これに関与する新たな遺伝子を同定し、その作用機構を明らかにする。第I期の井ノ口グループとの共同研究から、登上線維シナプス除去の臨界期（P15-18）に選択的に発現が変化する5種類の候補遺伝子が同定された。これらのうち2つは、チュブリン細胞骨格の重合制御因子 stathmin および N-acetyl transferase ホモログをコードしており、他の3 clonesは未知のcDNAであった。第II期では井ノ口グループ、真鍋グループの協力のもとに遺伝子改変マウスを作成し、これら遺伝子の登上線維除去過程における機能的意義を明らかにする。

(2) 内因性カンナビノイドを介するシグナル伝達系の登上線維シナプス除去への関与に関する研究（金沢大学大学院医学系研究科）

第I期の研究から、シナプス後部に存在する mGluR1の活性化により内因性カンナビノイドが産生され、これが逆行性にシナプス前終末の活動を調節することを明らかになった。第II期にはこの新しいシグナル伝達系の登上線維除去過程における機能的意義について明らかにする。

(3) 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（金沢大学大学院医学系研究科）

第I期に引き続き、登上線維除去過程に関与する可能性のある細胞骨格、足場タンパク、シナプスタグ分子、開口放出関連タンパク等について調べ、その意義を明らかにする。井ノ口グループ、真鍋グループ、畑グループの協力のもとに作成された遺伝子改変マウスを解析する。

3. 細胞内シグナル系からみた選択的シナプス強化機構に関する研究

(1) 海馬シナプス伝達の選択的強化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（東京大学医科学研究所）

海馬シナプス伝達の選択的強化における代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の役割の全貌を明らかにする。また、メタ可塑性におけるmGluRの役割を分子・細胞レベルで明らかにする。さらに、mGluRと相互作用する vesl-1Sのノックアウトマウスの作製も、井ノ口グループ、橋本グループと共同で進める。

(2) 海馬シナプス伝達可塑性におけるムスカリン性アセチルコリン受容体およびカイニン酸受容体に関する研究（東京大学医科学研究所）

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 (mAChR) の選択的シナプス強化とシナプス可塑性調節における役割を明らかにする。それを通じて、代謝型神経伝達物質受容体に共通する特性の解明を目指す。さらに、代謝型受容体に類似のシナプス前修飾を行うカイニン酸受容体のシナプス伝達制御の分子機構を明らかにする。また、抑制性シナプス伝達の修飾におけるmAChRの役割に関して、橋本グループとの共同研究をさらに進める。

(3) 代謝型受容体により制御される機能分子に関する研究（東京大学医科学研究所）

細胞接着分子やNMDA受容体などmGluRにより調節を受ける分子の機能解析を畑グループと溝口グループの協力を得て進め、シナプス可塑性の制御におけるこれら分子の役割を明らかにする。また、NMDA受容体と細胞内シグナル伝達系との相互作用の分子機構を解明する。

4. シナプスにおける細胞接着からみた選択的シナプス強化・除去機構に関する研究

(1) S-SCAMによるカドヘリン接着とニューロリギン接着の制御の解析（東京医科歯科大学大学院）

シナプスの裏打ち蛋白質S-SCAMが、ニューロリギンのシナプス局在に果たす役割を解明する。また、S-SCAMが、カドヘリンやニューロリギンを介する接着の強度を変化させるかを明らかにする。

(2) S-SCAM遺伝子欠損マウスにおいて発現が変動する遺伝子の解析（東京医科歯科大学大学院）

S-SCAM α 遺伝子欠損マウスの解析を、前年度に引き続き、真鍋グループ・溝口グループと共同で行う。その他、S-SCAM α 遺伝子欠損マウスにおいて、発現が低下ないし亢進している可能性がある遺伝子の候補を、サブトラクションにより複数個得ているので、これらについて実

際に発現が変動しているかを確認する。実際に発現が変動している遺伝子については、井ノ口グループと共同してその機能を解析する。

(3) S-SCAM α に特異的に結合する分子の探索（東京医科歯科大学大学院）

S-SCAMには大きさが異なる α ・ β ・ γ 3つのアイソフォームがある。S-SCAM α 欠損マウスはS-SCAM β ・ γ が発現しているにもかかわらず、生後1日で死亡する。したがって、S-SCAM α には、S-SCAM β ・ γ と異なる機能があると想定される。そこで、S-SCAM α に特異的に結合する分子の探索を高橋グループと共同で行う。

(4) 発達期小脳における細胞接着の変化の解析（東京医科歯科大学大学院）

生後10日までのプルキンエ細胞の細胞体にあるシナプスは脱落し、生後10日以降にプルキンエ細胞の近位樹状突起に形成されるシナプスは生き残ると想定される。この両者における接着構造の違いを、橋本グループ・溝口グループと共同して明らかにする。

(5) NMDA型グルタミン酸受容体が活性化しているシナプスにおいてBEGAINと結合する分子の探索（東京医科歯科大学大学院）

シナプス裏打ち蛋白質BEGAINは、NMDA型グルタミン酸受容体の阻害剤のもとでは、シナプスに局在しなくなる。そこで、NMDA型グルタミン酸受容体が活動しうる条件で、シナプスにおいてBEGAINが相互作用する分子を高橋グループと共同して探索する。

5. 細胞骨格と足場タンパク質からみた選択的シナプス強化・除去機構に関する研究

(1) シナプス形成期・除去期に特異的に発現が変化する新規接着分子、足場タンパク質の遺伝子の探索（三重大学医学部）

下オリーブ核、小脳、海馬でシナプス形成期・除去期に特異的に発現変化する新規接着分子、足場タンパク質の遺伝子を探索する。具体的には、種々の発生段階 (P1, P5, P10, P12) の各脳領域よりサブトラクションライブラリーを作製し、L細胞にトランスフェクションし、細胞接着活性を持つクローンを単離する。井ノ口グループと協力し、プルキンエ細胞側の接着分子との相補性や、LTPに伴う遺伝子発現変化との関連から、シナプス強化・除去の分子実体を解析する。

(2) シナプス形成期・除去期に特異的に発現が変化する接着分子、足場タンパク質のシナプスにおける機能解析（三重大学医学部）

接着分子ネクチン、足場タンパク質のNeurabinの遺伝子産物の局在・挙動とシナプス形成・除去の関連を海馬と小脳で解析する。接着分子ネクチン、足場タンパク質のNeurabinとRhoの標的タンパク質MBSに関してはノックアウトマウスが作製できたので、シナプスの構造と機能の

変化を解析する。橋本グループ、真鍋グループと協力して電気生理学的解析を、畑グループと協力して遺伝子産物の局在・挙動解析を行う。

(3) シナプスにおけるRhoの標的タンパク質の探索と機能解析(三重大学医学部)

シナプスにおけるRhoの作用機構を解明するために、シナプスに局在するその標的タンパク質を、アフィニティカラムや免疫沈降法を用いて探索し、高橋グループとの共同で免疫沈降産物の質量分析による同定を行う。また、得られた標的タンパク質とRhoとのシナプスにおける共存と刺激時における挙動を比較解析する。

(4) シナプス再生に関与する遺伝子の探索(三重大学医学部)

中枢神経損傷後のシナプス再生期において、シナプス再生成功神経細胞と再生失敗神経細胞における遺伝子発現パターンの比較から、シナプス再生に関与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からみた選択的シナプス強化・除去機構に関する研究

(1) シナプス膜へのグルタミン酸レセプターの組み込みに関わる輸送小胞の分子実態に関する研究。(北里大学医学部)

シナプス膜へのグルタミン酸レセプターの組み込みに関わる輸送小胞を単離精製し、構成タンパク質を明らかにすると共に、脳や神経細胞内での局在や、組み込みが起こる部位を溝口グループと協力し特定する。

(2) シナプス膜へのグルタミン酸レセプターの組み込み制御機構に関する研究。(北里大学医学部)

シナプス膜へのグルタミン酸レセプターの組み込みを誘発するシグナル機構を明らかにすると共に、リン酸化やシナプスタグによる制御機構を井ノ口、橋本、真鍋、畑らのグループと協力し明らかにする。

(3) 選択的シナプス強化・除去におけるグルタミン酸レセプターの組み込み制御の役割に関する研究。(北里大学医学部)

選択的シナプス強化・除去が起こる際に、グルタミン酸レセプターの組み込み制御がどのような役割を果たしているかを橋本グループや真鍋グループと協力して明らかにする。またその異常が脳の機能にどのような障害を引き起こすかを井ノ口グループと協力し明らかにする。

3. 年次計画

遺伝子発現を伴う選択的なシナプス強化・除去が起こる際には、シナプスタグとシナプス変化に関わる様々な遺伝子産物との相互作用や、シナプスでの協調的分子配置機構、シナプス構造改変機構などが重要である。本研究グループは第I期の成果として、それらに関しても様々な重要な手がかりを得ている。さらに各グループの成果には数多くの接点が生まれており、選択的シナプス強化・除去機構を明らかにしていく上で不可欠な統合的な研究が可能な段階に達している。このような状況を踏まえ、第II期の1年目では、グループ間の協力体制を一層強化し、統合的な解析を強力に進めていく。最終年度においてはそれらの成果をふまえ、遺伝子改変マウスの解析に一層の重きを置きつつ全グループの成果を結集し、目標の達成を目指す。

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				
(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) 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			← 足場タンパク質のノックアウトマウスの解析	
(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	

研究項目	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度
(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	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	
(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					
(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	輸送小胞の単離と組成タンパク質の解析				
(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					
(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	240百万円	276百万円	

4. 平成15年度における実施内容と達成目標

1. 遺伝子制御からみた選択的シナプス強化・除去の分子機構に関する研究

(1) 海馬での後期LTPに伴い発現する遺伝子の機能に関する研究

平成14年度は、activin signaling分子のsmad3が学習・記憶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の機能を空間特異的・時間特異的に阻害あるいは強化できる遺伝子操作動物を作出する。真鍋グループと協力して作出動物の海馬LTPや学習・記憶を解析し、変異の影響を明らかにする。また、真鍋グループ・橋本グループと協力してvesl-1S欠損変異マウスのシナプス可塑性・学習行動および小脳登上線維シナプスの選択的除去の解析を開始する。

(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14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構造を明らかにするとともに、そのう

ちの一つstathmin遺伝子の機能を小脳プルキンエ細胞特異的に改変した遺伝子操作動物を作成した。本年度は、この動物の行動を調べると共に、橋本グループと共同でこ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。また、溝口グループと協力して発達期の下オリブ核で特異的に発現制御される新規接着分子・足場タンパク質を探索する。

(3) 遺伝子産物の選択的配置に関する研究

平成14年度は、初代培養ニューロンを用いてVesl-1S-GFPタンパク質が種々の外来刺激に伴い細胞体で発現誘導された後にスパイン部位に輸送されることを明らかにした。本年度は、Vesl-1Sタンパク質およびSynaptopodinタンパク質が入力特異的にスパイン部位に輸送されるか否かを検討し、synaptic tag仮説の妥当性を明らかにする。Vesl-1S-GFPタンパク質が入力特異的にスパイン部位に輸送されるか否かを検討する。

2. 細胞内シグナル伝達系からみた選択的シナプス除去機

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

井ノ口グループにより作成された、5つの候補遺伝子の一つであるstathmin遺伝子の機能改変マウスを解析し、その登上線維除去過程における機能的意義を調べる。

(2) 内因性カンナビノイドを介するシグナル伝達系の登上線維シナプス除去への関与に関する研究

第I期の研究により、シナプス後部に存在するmGluR1から、内因性カンナビノイドを介した登上線維シナプス前部への、新たなシグナル伝達系の存在が明らかになった。この経路が登上線維の選択的シナプス除去過程に与える影響を解析する。

(3) 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

神経活動依存的に発現が促進されるvesl-1Sの、選択的シナプス除去過程における機能的意義を調べるために、第I期までにvesl-1sを小脳ブルキンエ細胞特異的に過剰発現するマウスが井ノ口グループにより作成された。このマウスの解析を昨年引き続き行う。vesl-1Sの機能的意義についてさらに深く解析するために、井ノ口グループ、真鍋グループと協力して作成中のvesl-1sノックアウトマウスの解析を開始する。

3. 細胞内シグナル系からみた選択的シナプス強化機構に関する研究

(1) 海馬シナプス伝達の選択的強化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標本を用いて、グループI mGluRのアゴニストであるDHPGのシナプス伝達とメタ可塑性に対する作用について電気生理学的な解析を行う。また、その作用がグループI mGluRであるmGluR1およびmGluR5を欠損するマウスにおいてどのように変化するかを検討する。さらに、井ノ口グループと共同で作製を進めているvesl-1Sのノックアウトマウスの機能解析を進める。

(2) 海馬シナプス伝達可塑性におけるムスカリン性アセチルコリン受容体およびカイニン酸受容体に関する研究

mAChRのシナプス可塑性における役割を明らかにするために、海馬スライス標本を用いてmAChRのアゴニストの作用を検討する。また、すでに作製済みのmAChR欠損マウスにおけるシナプス可塑性を詳細に検討する。さらに、現在進行中の橋本グループとのノックアウトマウスの培養細胞を用いた研究をさらに推進する。

カイニン酸受容体のシナプス前調節機能の詳細を明らかにするため、海馬スライスのCA3苔状線維シナプスにおいて電気生理学的な解析を行う。また、カイニン酸受容体サブユニットのノックアウトマウスを用いた機能解析を行う。

(3) 代謝型受容体により制御される機能分子に関する研究

細胞接着分子であるカドヘリンのシナプス可塑性における役割の詳細を電気生理学的に検討する。また、カドヘリンの各種サブタイプのノックアウトマウスを用いて機能解析を行う。さらに現在、畑グループ、溝口グループと進めている各種接着分子およびそれに関連する分子の役割に関する研究をさらに推進する。

NMDA受容体機能調節に関与する細胞内シグナル伝達系の詳細を明らかにするため、点変異導入マウスやサブユニット置換マウスを用いて電気生理学的な解析を進める。

4. シナプスにおける細胞接着からみた選択的シナプス強化、除去の分子機構の研究

(1) S-SCAMによるカドヘリン接着とニューロリギン接着の制御の解析

神経細胞の培養系を用いて、ニューロリギンのシナプス局在にS-SCAMが関与するかを明らかにする。また、線維芽細胞にカドヘリンないしニューロリギンを発現させ、さらにS-SCAMを発現することにより、カドヘリンを介するホモフィリックな接着や、ニューロリギンとニューレキシンによるヘテロフィリックな接着の強度に変化が生じるかを明らかにする。

(2) S-SCAM α 遺伝子欠損マウスにおいて発現が変動する遺伝子の解析

前年度に引き続き真鍋グループ、溝口グループと共同して、S-SCAM α 遺伝子欠損マウスの解析を推進する。S-SCAM α 遺伝子欠損マウスにおいて発現が変動している可能性がある候補遺伝子に関しては、それぞれのプローブを作製し、S-SCAM α 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの脳を対象にノザンプロットを行う。発現が変動していることが確認された遺伝子に関しては、井ノ口グループと共同して*in situ* hybridizationを行い、まず、脳内での発現パターンを空間的・時間的に解析する。

(3) S-SCAM α に特異的に結合する分子の探索

S-SCAM α 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの脳からS-SCAMの免疫沈降を行い、沈降してくる蛋白質を比較することにより、S-SCAM α に特異的に結合する分子の候補を絞り、質量分析により同定する。免疫沈降物の質量分析については、高橋グループとの共同で推進する。

(4) 発達期小脳における細胞接着の変化の解析

発達期小脳におけるカドヘリン系接着とニューロリギン系接着の変化を解析する。そのためには、感度が高いニューロリギンの抗体が必須である。現時点で十分な感度の抗体は、世界的にも存在していない。平成15年度は、まずニューロリギンの抗体の作製を行う。

なお、発達期小脳の解析に関しては、すでに多くの知見を集積している橋本グループと溝口グループと共同して推進する。

(5) NMDA型グルタミン酸受容体が活性化しているシナプスにおいてBEGAINと結合する分子の探索

海馬スライス培養系にMycタグ付きのBEGAINを発現し、Myc抗体で免疫沈降を行いBEGAINと共沈する分子を質量分析により同定する。NMDA型グルタミン酸受容体に対する阻害剤を用いることにより、NMDA型グルタミン酸受容体の活動に依存してBEGAINと相互作用する分子を同定することを試みる。項目(3)と同様に、免疫沈降物の質量分析については、高橋グループとの共同で推進する。

5. 細胞骨格と足場タンパク質からみた選択的シナプス強化・除去機構に関する研究

(1) シナプス形成期・除去期に特異的に発現が変化する新規接着分子、足場タンパク質の遺伝子の探索

第一期の研究で、私どもは、接着分子ネクチンやカドヘリンがシナプスの形態形成や可塑性の制御に関与していることを見いだしたが、これら以外にも新規接着分子が多数存在していると予想し、井ノ口グループと協力し既に100種以上の遺伝子を候補として見いだしている。本年度はさらに、脳領域として、下オリブ核・小脳・海馬と大脳・脊髄を大きく比較し、それぞれの領域でシナプス形成期・除去期に特異的に発現変化する新規接着分子、足場タンパク質の遺伝子を探索する。種々の発生段階の各脳領域よりサブトラクションライブラリーのうち、海馬でP10からP5を、およびP5からP1をサブトラクションしたライブラリーをすでに作製しており、L細胞にトランスフェクションし、Homophylicな細胞接着活性を持つクローンを単離する計画である。

(2) シナプス形成期・除去期に特異的に発現が変化する接着分子、足場タンパク質のシナプスにおける機能解析

接着分子ネクチン、足場タンパク質のNeurabinについては、神経刺激に伴ってPSDと細胞質を行き来する可能性をとらえているので、GFP標識したそれらの遺伝子産物の局在・挙動とシナプス形成・除去の関連を海馬培養細胞で解析する。接着分子ネクチンと足場タンパク質NeurabinおよびRhoの標的タンパク質MBSに関してはノックアウトマウスが作製できたので、海馬と小脳でシナプスの構造と機能の変化を解析する。

(3) シナプスにおけるRhoの標的タンパク質の探索と機能解析

昨年度、標的タンパク質MBSがシナプスに局在することを見いだしているが、シナプスに局在するその標的タンパク質を、アフィニティカラムや免疫沈降法を用いて精製し、TOF-MASにより同定する。本年度は、まずRhoおよびMBSに対する抗体を作製し、免疫沈降法で解析し、質量分析については、高橋グループとの共同で遂行する。

(4) シナプス再生に関する遺伝子の探索

実験モデルとして、マウスの中脳神経損傷後のシナプス再生成功手術が確立できたので、今年度は、再生神経細胞と再生失敗神経細胞を区別して標識し、それぞれからライブラリーを作製し、遺伝子発現パターンの比較から、シナプス再生に関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からみた選択的シナプス強化・除去機構に関する研究

(1) シナプス膜へのグルタミン酸レセプターの組み込みに関わる輸送小胞の分子実態に関する研究。

第I期で確立した方法を用い、ラット脳の様々な膜画分から、GluR1やGluR2を含む小胞を単離精製し、各小胞に含まれるタンパク質をTOF-MSなどを用いて同定する。各分画のGluR小胞を特徴づけるタンパク質の特異抗体や、GFPとの融合タンパク質発現ベクターの構築を行う。溝口グループとの協力の下に作成したGluR小胞の特異抗体を用いた免疫組織化学、免疫電顕を行い、GluR輸送小胞の、細胞内局在と細胞膜への組み込み部位を明らかにする。

(2) シナプス膜へのグルタミン酸レセプターの組み込み制御機構に関する研究。

GluR小胞特異的タンパク質とGFPとの融合タンパク質を培養海馬神経細胞に発現させ、共焦点蛍光顕微鏡や全反射蛍光顕微鏡でGluR小胞の局在や動態をリアルタイムで解析し、組み込みに関わるシグナル系や制御系を明らかにする。また畑グループ、溝口グループと協力し細胞骨格タンパク質や足場タンパク質との相互作用も解析する。

(3) 選択的シナプス強化・除去におけるグルタミン酸レセプターの組み込み制御の役割に関する研究。

シナプスタグ形成に関わる分子変化が、GluR小胞の機能や性質にどのような変化をもたらすかを井ノ口グループ、橋本グループ、真鍋グループと協力し、単離小胞や培養細胞系を用いて明らかにする。

II 平成15年度における研究実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
<p>1. 遺伝子制御からみた選択的シナプス強化・除去の分子機構に関する研究</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>井ノ口馨</p>
<p>2. 細胞内シグナル伝達系からみた選択的シナプス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) 内因性カンナビノイドを介するシグナル伝達系の登上線維シナプス除去への関与に関する研究</p> <p>(3) 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>金沢大学大学院医学研究科</p>	<p>橋本浩一</p>
<p>3. 細胞内シグナル系からみた選択的シナプス強化機構に関する研究</p> <p>(1) 海馬シナプス伝達の選択的強化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) 海馬シナプス伝達可塑性におけるムスカリン性アセチルコリン受容体およびカイニン酸受容体に関する研究</p> <p>(3) 代謝型受容体により制御される機能分子に関する研究</p>	<p>東京大学医科学研究所</p>	<p>真鍋俊也</p>
<p>4. シナプスにおける細胞接着からみた選択的シナプス強化, 除去の分子機構の研究</p> <p>(1) S-SCAMによるカドヘリン接着とニューロリギン接着の制御の解析</p> <p>(2) S-SCAM α 遺伝子欠損マウスにおいて発現が変動する遺伝子の解析</p> <p>(3) S-SCAM α に特異的に結合する分子の探索</p> <p>(4) 発達期小脳における細胞接着の変化の解析</p> <p>(5) NMDA型グルタミン酸受容体が活性化しているシナプスにおいてBEGAINと結合する分子の探索</p>	<p>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科</p>	<p>畑 裕</p>

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
5. 細胞骨格と足場タンパク質からみた選択的シナプス強化・除去機構に関する研究 (1) シナプス形成期・除去期に特異的に発現が変化する新規接着分子, 足場タンパクの遺伝子の探索 (2) シナプス形成期・除去期に特異的に発現が変化する接着分子, 足場タンパク質のシナプスにおける機能解析 (3) シナプスにおける Rho の標的タンパク質の探索と機能解析 (4) シナプス再生に関与する遺伝子の探索	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からみた選択的シナプス強化・除去機構に関する研究 (1) シナプス膜へのグルタミン酸レセプターの組み込みに関わる輸送小胞の分子実態に関する研究 (2) シナプス膜へのグルタミン酸レセプターの組み込み制御機構に関する研究。 (3) 選択的シナプス強化・除去におけるグルタミン酸レセプターの組み込み制御の役割に関する研究	北里大学医学部	高 橋 正 身

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
橋 本 浩 一	金沢大学 医学部生理学第二講座 助手
真 鍋 俊 也	東京大学 医科学研究所 教授
畑 裕	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授
溝 口 明	三重大学 医学部 教授
高 橋 正 身	北里大学 医学部 教授

(注：○は研究管理統括者)