

東京大学大学院医学系研究科 教授

三品 昌美

「脳形成遺伝子と脳高次機能」

1. 研究実施の概要

脳の最大の特徴は、構造が機能を生み、機能が構造に影響を及ぼすハードとソフトが渾然一体となったシステムであることにある。記憶学習や神経回路網の発達に代表される脳の構造と機能のダイナミックな関係、すなわち神経回路網のダイナミックな形成と再編の機構の解明が脳科学の重要課題である。シナプス可塑性とシナプス形成に共通の分子が関与するとの知見から、脳の形成や神経回路網の整備に関与する分子を系統的に単離し、これらの分子を時期および脳の部位特異的にノックアウトすることにより、記憶・学習の分子機構の全体像に迫るという新たな戦略が生まれた。この戦略を実行するためには、二つの方法論の開発が必要不可欠である。すなわち、系統的に脳神経回路網の形成ならびに整備 (refinement) 遺伝子を単離する方法とこれらの分子がシナプス可塑性さらには記憶・学習に果たす役割を、脳神経系の発生分化と切り離して、解析する方法である。我々は、前者の方法論として脊椎動物で分子遺伝学の適用が可能なゼブラフィッシュを用いた遺伝子の系統的単離法の開発を、後者として発生工学の適用が容易なマウスの部位及び時期特異的分子および遺伝子操作法の開発を選んだ。すなわち、脊椎動物で分子遺伝学の適用が可能なゼブラフィッシュを用いて遺伝子クローニングと直結した高頻度変異誘発法を開発し、次いで、特定の時期に脳の特定の部位で遺伝子を欠損させる第二世代標的遺伝子組換え法を開発することを目的とした。前者は三品グループが担当し、後者は三品グループと崎村グループが緊密に連携して実施した。

脊椎動物のモデル生物として有望視されているゼブラフィッシュにおいて、神経回路網形成の分子機構解明を目的に新たな順および逆分子遺伝学の方法論を開発することに成功した。脳の形成遺伝子探索系として、欠失変異を引き起こす DNA 架橋剤 TMP を用いたゼブラフィッシュの高頻度変異法を開発した。ついで、TMP 変異法により単離した変異株の中から、視蓋神経叢の形成不全や接触刺激に対する応答異常を示す神経系の変異株を選び、RDA (representational difference analysis) 法を適用して正常ゲノムと変異ゲノム間でサブトラクションを行い、原因遺伝子を含む数百 kb の遺伝子領域を同定することに成功し、TMP 変異-RDA クローニング法が可能であることを示した。続いて、ゼブラフィッシュ嗅覚系ならびに網膜視蓋投射系の神経回路を嗅神経あるいは視神経に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用いた GFP 発現ベクターを構築し、ゼブラフィッシュ個体に導入することによりこれらの神経回路網を特異的に可視化した。さらに、ダブルカセットベクターを用いて、特定の遺伝子を嗅神経あるいは視神経に特異的に発現させ、嗅神経軸索が嗅上皮嗅球境界を通過し標的に到達するためには誘導分子に対する感受性を調節すると考えられる PKA シグナルのスイッチが起こることが必要であることを示し、網膜視蓋投射系のシナプス形成に Wnt から GSK-3 β に至るシグナルが重要であることを明らかにした。すなわち、神経回路形成の分子機構を解析する系として、神経回路網特異的遺伝子操作法を開発した。TMP 変異-RDA クローニング法は未知の脳形成遺伝子を系統的に単離するために有効であり、神経回路網特異的可視化遺伝子操作法はシナプス分子の機能検定系として大きな威力

を發揮するものと考えられる。これらの方法論は、シナプス形成と再編の制御機構の解明を目的にいずれも独自に開発したものであり、世界へ発信することが期待できる。脊椎動物のモデル生物であるゼブラフィッシュによる分子機能の検定系や変異系は網羅的に分子の生体機能を解析することを可能にし、多くの研究室で利用可能である。ゼブラフィッシュ分子遺伝学は、ポストゲノム時代の生命科学研究全体の発展に大きく貢献するものと考えられる。

NMDA 型グルタミン酸受容体サブタイプ特異的のノックアウトにより、NMDA 受容体 $\epsilon 1$ サブユニットが海馬シナプス可塑性の閾値と文脈依存学習の閾値を決定していることを示し、NMDA 受容体 $\epsilon 2$ サブユニットが驚愕反射の情動を制御していることを明らかにした。これらの結果は、クローニングにより見出した NMDA 受容体の分子的多様性が機能的多様性を生み出していることを示している。さらに、小脳プルキニエ細胞特異的のノックアウトにより、グルタミン酸受容体 $\delta 2$ が小脳可塑性と瞬目反射連合学習運動学習に必須であることを示すとともに、瞬目反射連合学習の条件刺激と無条件刺激とのタイミングに応じて脳内のシステムが使い分けられていることを明らかにした。

マウスの学習行動は遺伝的背景により大きく影響を受ける。標的遺伝子組換えに広く用いられている ES 細胞は学習能力が低い 129 系統に由来しているため、標的遺伝子組換えを脳研究に適用するには重大な欠陥を孕んでいる。我々は、学習能力に優れた C57BL/6 系統マウスに由来する ES 細胞を用いて標的遺伝子組換えを行う系を確立することによりこの問題点を克服することに成功した。シナプス可塑性あるいはシナプス形成の鍵分子と考えられる NMDA 型グルタミン酸受容体、神経栄養因子受容体、細胞接着分子、転写因子の遺伝子に組換え酵素 Cre の標的配列を導入した組換え B6ES 細胞を単離し、キメラマウスから組換えマウスを作成し、学習能力に優れた B6 マウスに遺伝的背景を統一した標的マウスを得た。また、Cre リコンビナーゼの認識配列 loxP を組み込んだ組換えマウスから薬剤耐性マーカー遺伝子を取り除くために、C57BL/6 系統 FLP リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスを作成した。さらに、脳の部位時期特異的標的遺伝子組換え系として、変異プロゲステロン受容体のホルモン結合領域と遺伝子組換え酵素 Cre リコンビナーゼの融合蛋白遺伝子を脳部位特異的遺伝子の下流に導入することにより特定の神経細胞特異的にかつ時期特異的に遺伝子をノックアウトすることを可能にした。すなわち、線条体特異的、海馬 CA3 顆粒細胞、小脳プルキニエ細胞あるいは小脳顆粒細胞特異的に Cre リコンビナーゼあるいは CrePR 融合リコンビナーゼ遺伝子を発現する C57BL/6 系統マウスを作成した。したがって、学習能力の高い C57BL/6 マウスの遺伝的背景において、記憶学習制御分子の部位時期特異的標的遺伝子組換えを可能にした。均一な C57BL/6 マウスの遺伝的背景における部位時期特異的標的遺伝子組換え法は、脳科学の大きな焦点となっている記憶・学習の基本メカニズムの解明や、多様な記憶の獲得、保存、想起に関与する脳部位の同定に大きな力を發揮することが期待できる。分子・神経回路・システムを結んで脳を解明しようとする研究は、脳神経科学の中心的な柱としてその重要性は広く認知され、米国の

Howard Hughes Institute やドイツの Max-Planck-Institute など強力に推進されている。均一な C57BL/6 マウスの遺伝的背景における部位時期特異的標的遺伝子組換え法は、独自に開発したものであり、世界へ発信することが期待できる。さらに、C57BL/6 マウスの均一な遺伝的背景を持つノックアウトマウスは、多因子が関与する疾患や体質などの解析に有用である。新たなマウスの標的遺伝子組み換え法は、ポストゲノム時代の生命科学研究全体の発展に大きく貢献するものと考えられる。

脳の最大の特徴は、構造が機能を生み、機能が構造に影響を及ぼすハードとソフトが渾然一体となったシステムであることにある。記憶学習や神経回路網の発達に代表される脳の構造と機能のダイナミックな関係、すなわち神経回路網のダイナミックな形成と再編の機構が解明されれば、再生医学や疾患の治療、創薬標的タンパク質の探索の基礎を提供するものと思われ、様々な脳機能障害を改善し、治療する道に貢献することが期待できる。

2. 研究構想

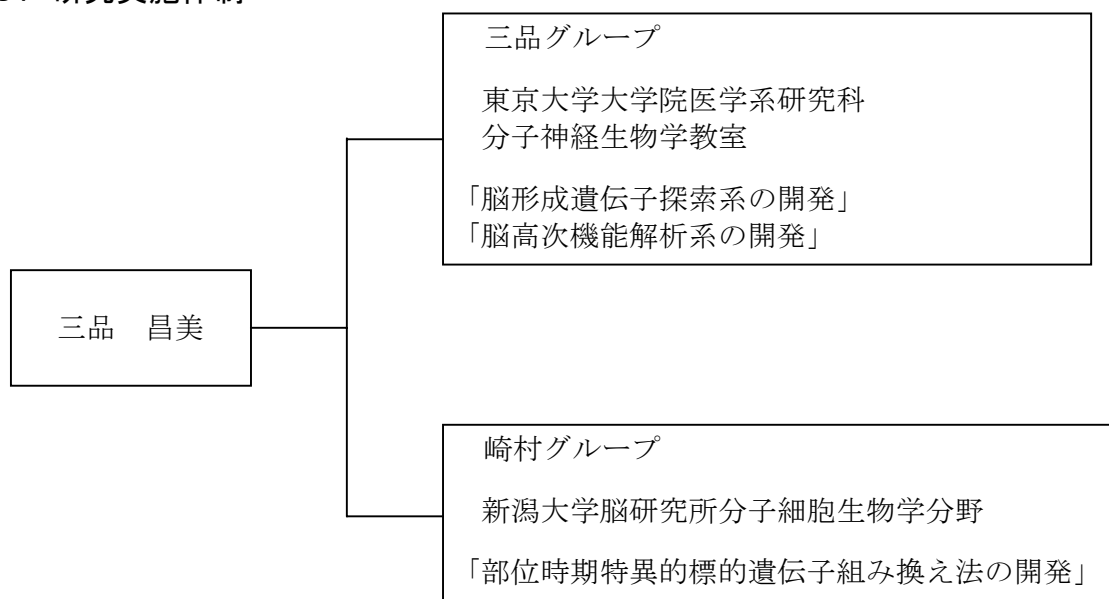
脳研究は、脳はどのように理解できるのかとの問いかけでもある。グルタミン酸受容体チャネルが完成された脳の入力依存性可塑性と脳・神経系の形成期の経験依存性可塑性にともに関与するという知見は記憶・学習の機構を考えるうえで示唆的である。生命は高等動物の記憶・学習を可能にする装置・機構を全く新たに生み出したのであろうか、それとも生命は既存の装置をうまく使うことにより記憶・学習を可能にしているのであろうか。もし後者だとすると、記憶・学習の基本機構は発生・分化ではなかろうか。発生・分化の本質は内蔵する遺伝プログラムと細胞外部からの刺激・情報に基づく自身の変化である。細胞は発生・分化の過程を終えて体の組織の一部として最終的な安定状態に落ち着く。脳・神経系は発生・分化の完了する直前で留まり、発生・分化の変化する能力を保持し続けることにより記憶・学習を可能にしているとしたらどうであろうか。

記憶・学習の基本機構として発生・分化の機構が利用されているとすれば、シナプス形成に関与する分子を系統的に単離し、これらの分子を時期および部位特異的にノックアウトすることにより、記憶・学習の分子機構の全体像に迫るという新たな戦略が生まれる。この戦略を実行するためには、二つの方法論の開発が必要不可欠である。すなわち、系統的に脳神経回路網の形成ならびに整備 (refinement) 遺伝子を単離する方法とこれらの分子がシナプス可塑性さらには記憶・学習に果たす役割を、脳神経系の発生分化と切り離して、解析する方法である。

本研究は、シナプス可塑性とシナプス形成に共通の分子が関与するとの知見から、脳の形成や神経回路網の整備に関与する分子を系統的に単離し、これらの分子を時期および脳の部位特異的にノックアウトすることにより、記憶・学習の分子機構の全体像に迫るという新たな戦略を中心に置いている。この戦略の実行に、二つの方法論が柱となる。我々は、前者の方法論として脊椎動物で分子遺伝学の適用が可能なゼブラフィッシュを用いた遺伝子の系統的単離法の開発を、後者として発生工学の適用が容易なマウスの部位及び時期特

異的分子および遺伝子操作法の開発を選んだ。すなわち、脊椎動物で分子遺伝学の適用が可能なゼブラフィッシュを用いて遺伝子クローニングと直結した高頻度変異誘発法を開発する。次いで、特定の時期に脳の特定の部位で遺伝子を欠損させる第二世代標的遺伝子組換え法を開発する。前者は三品グループが担当し、後者は三品グループと崎村グループが緊密に連携して実施する。

3. 研究実施体制



4. ワークショップ・シンポジウム等の開催

(1) 1997年12月、京都

第20回日本分子生物学会ワークショップ

「脳高次機能と神経回路網形成の接点」

(2) 1999年8月31日～9月1日

三品グループと崎村グループの研究打ち合わせ

東京大学医学部、20名

発表・討論ならびに打ち合わせ

(3) 1999年10月22日～23日

三品グループと崎村グループの研究打ち合わせ

新潟大学脳研究所、15名

発表・討論ならびに研究打ち合わせ

- (4) 2000年2月25日～26日
三品グループと崎村グループの研究打ち合わせ
東京大学医学部、20名
発表・討論ならびに打ち合わせ

5. 主な研究成果

(1) 原著論文等

- 1) Uchino, S., Kudo, Y., Watanabe, W., Nakajima-Iijima, S. and Mishina, M.: Inducible expression of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels from cloned cDNAs in CHO cells. *Mol. Brain Res.* 44, 1-11 (1997)
- 2) Uchino, S., Nakajima-Iijima, S., Okuda, K., Mishina, M., and Kawamoto, S.: Analysis of the glycine binding domain of the NMDA receptor channel ζ 1 subunit. *NeuroReport*, 8, 445-449 (1997)
- 3) Ito, I., Futai, K., Katagiri, H., Watanabe, M., Sakimura, K., Mishina, M. and Sugiyama, H.: Synapse-selective impairment of NMDA receptor functions in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 or ϵ 2 subunit. *J. Physiol.* 500, 401-408 (1997)
- 4) Kai, N., Mishina, M. and Yagi, T.: Molecular cloning of Fyn-associated molecules in the mouse central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 48, 407-424 (1997)
- 5) Minami, T., Sugatani, J., Sakimura, K., Abe, M., Mishina, M. and Ito, S.: Absence of prostaglandin E₂-induced hyperalgesia in NMDA receptor ϵ subunit knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 120, 1522-1526 (1997)
- 6) Hayashi, Y., Ishida, A., Katagiri, H., Mishina, M., Fujisawa, H., Manabe, T. and Takahashi, T.: Calcium and calmodulin-dependent phosphorylation of AMPA type glutamate receptor subunits by endogenous protein kinases in the postsynaptic density. *Mol. Brain Res.*, 46, 338-342 (1997)
- 7) Kawamoto, S., Uchino, S., Xin, K-Q., Hattori, S., Fukushima, J., Mishina, M. and Okuda, K.: Arginine-481 mutation abolishes ligand-binding of the AMPA-selective glutamate receptor channel α 1 subunit. *Mol. Brain Res.* 47, 339-344 (1997)
- 8) Taniguchi, M., Yuasa, S., Fujisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M. and Yagi, T.: Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron*, 19, 519-530 (1997)
- 9) Kurihara, H., Hashimoto, K., Kano, M., Takayama, C., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y. and Watanabe, M.: Impaired parallel fiber-Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor δ 2 subunit. *J. Neurosci.* 17, 9613-9623 (1997)
- 10) Tabuchi, S., Kume, K., Aihara, M., Ishii, S., Mishina, M. and Shimizu, T.: Lipid mediators modulate NMDA receptor currents in a *Xenopus* oocyte expression system. *Neurosci. Lett.*, 236, 13-16 (1997)
- 11) Ito, S., Minami, T., Sugatani, J., Sakimura, K. and Mishina, M.: Disappearance of allodynia induced by intrathecal prostaglandin F₂ α in mice lacking NMDA receptor ϵ 1/ ϵ 4 subunits. *Progress in Pain Research and Management*, 8, 323-332 (1997)

- 12) Taniguchi, M., Sanbo, M., Watanabe, M., Naruse, I., Mishina, M. and Yagi, T.: Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res.* 26, 679-680 (1998)
- 13) Watanabe, M., Fukaya, M., Sakimura, K., Manabe, T., Mishina, M. and Inoue, Y.: Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fiber-recipient layer) of the hippocampal CA₃ subfield. *Eur. J. Neurosci.* 10, 478-487 (1998)
- 14) Ando, H. and Mishina, M.: Efficient mutagenesis of zebrafish by a DNA cross-linking agent. *Neurosci. Lett.* 244, 81-84 (1998)
- 15) Ito, I., Akashi, K., Sakimura, K., Mishina, M. and Sugiyama, H.: Distribution and development of NMDA receptor activities at hippocampal synapses examined using mice lacking the ϵ 1 subunit gene. *Neurosci. Res.* 30, 119-123 (1998)
- 16) Kohmura, N., Senzaki, K., Hamada, S., Kai, N., Yasuda, R., Watanabe, M., Ishii, H., Yasuda, M., Mishina, M. and Yagi, K.: Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at synaptic complex. *Neuron*, 20, 1137-1151(1998)
- 17) Yamakura, T., Sakimura, K., Mishina, M. and Shimoji, K.: Sensitivity of the *N*-methyl-D-aspartate receptor channel to butyrophenones is dependent on the ϵ 2 subunit. *Neuropharmacology*, 37, 709-717 (1998)
- 18) Kiyama, Y., Manabe, T., Sakimura, K., Kawakami, F., Mori, H. and Mishina, M.: Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor ϵ 1 subunit. *J. Neurosci.* 18, 6704-6712 (1998)
- 19) Mizuta, I., Katayama, M., Watanabe, M., Mishina, M. and Ishii, K.: Developmental expression of NMDA receptor subunits and the emergence of glutamate neurotoxicity in primary cultures of murine cerebral neurons. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 721-725 (1998)
- 20) Mori, H., Manabe, T., Watanabe, M., Satoh, Y., Suzuki, N., Toki, S., Nakamura, K., Yagi, T., Kushiya, E., Takahashi, T., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M.: Role of the carboxyl-terminal region of the GluR ϵ 2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. *Neuron*, 21, 571-580 (1998)
- 21) Munemoto, Y., Kuriyama, H., Doi, T., Sato, K., Matsumoto, A., Sugatani, J., Cho, H., Komeda, M., Altschuler, R.A., Kitajiri, M., Mishina, M. and Yamashita, T.: Auditory pathway and auditory brainstem response in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 and ϵ 4 subunits. *Neurosci. Lett.* 251, 101-104 (1998)
- 22) Kitahara, T., Takeda, N., Uno, A., Kubo, T., Mishina, M. and Kiyama, H.: Unilateral labyrinthectomy downregulates glutamate receptor δ -2 expression in the rat vestibulocerebellum. *Mol. Brain Res.* 61, 170-178 (1998)
- 23) Morikawa, E., Mori, H., Kiyama, Y., Mishina, M., Asano, T. and Kirino, T.: Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the ϵ 1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J. Neurosci.* 18, 9727-9732 (1998)
- 24) Hayashi, T., Umemori, H., Mishina, M. and Yamamoto, T.: The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature*, 397, 72-76 (1999)
- 25) Furuyashiki, T., Fujisawa, K., Fujita, A., Madaule, P., Uchino, S., Mishina, M., Bito, H. and Narumiya, S.: Citron, a Rho-target, interacts with PSD-95/SAP-90 at glutamatergic synapses in the thalamus. *J. Neurosci.*, 19, 109-118 (1999)

- 26) Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Hori, Y., Sakuma, S., Sugimoto, T., Sakimura, K., Mishina, M. and Ito, S.: Involvement of primary afferent C-fibers in touch-evoked pain (allodynia) induced by prostaglandin E2. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1849-1856 (1999)
- 27) Kawamoto, S., Hattori, S., Uchino, S., Mishina, M. and Okuda, K.: Expression of NMDA receptor channel subunit proteins using Baculovirus and Herpesvirus vectors, in "Methods in Molecular Biology, 128: NMDA Receptor Protocols" (Li, M., ed.), pp. 19-32, Humana Press, Totowa (1999)
- 28) Sakata, K., Fukushima, T., Minje, L., Ogurusu, T., Taira, H., Mishina, M. and Shingai, R.: Modulation by L- and D-isomers of amino acids of the L-glutamate response of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Biochemistry*, 38, 10099-10106 (1999)
- 29) Tsujita, M., Mori, H., Watanabe, M., Suzuki, M., Miyazaki, J. and Mishina, M.: Cerebellar granule cell-specific and inducible expression of Cre recombinase in the mouse. *J. Neurosci.* 19, 10318-10323 (1999)
- 30) Hisatsune, C., Umemori, H., Mishina, M. and Yamamoto, T.: Phosphorylation-dependent interaction of the *N*-methyl-D-aspartate receptor ϵ 2 subunit with phosphatidylinositol 3-kinase. *Genes Cells*, 4, 657-666 (1999)
- 31) Hashimoto, K., Fukaya, M., Qiao, X., Sakimura, K., Watanabe, M. and Kano, M.: Impairment of AMPA receptor function in cerebellar granule cells of ataxic mutant mouse stargazer. *J. Neurosci.* 19, 6027-6036 (1999)
- 32) Yamakura, T., Sakimura, K. and Shimoji, K.: Direct inhibition of the *N*-methyl-D-aspartate receptor channel by high concentrations of opioids. *Anesthesiology*, 91, 1053-1063 (1999)
- 33) Inoue, M., Mishina, M. and Ueda, H.: Enhanced nociception by exogenous and endogenous substance P given into the spinal cord in mice lacking NR2A/ ϵ 1, an NMDA receptor subunit. *Br. J. Pharmacol.* 129, 239-241 (2000)
- 34) Mishina, M.: Molecular diversity, structure, and function of glutamate receptor channels, in "Handbook of Experimental Pharmacology 147: Pharmacology of Ionic Channel Function" (Endo, M., Kurachi, Y and Mishina, M., eds.), pp. 393-414, Springer-Verlag, Berlin (2000)
- 35) Ito, I., Kawakami, R., Sakimura, K., Mishina, M. and Sugiyama, H.: Input-specific targeting of NMDA receptor subtypes at mouse hippocampal CA3 pyramidal neuron synapses. *Neuropharmacology*, 39, 943-951 (2000)
- 36) Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Mori, H., Sakimura, K., Watanabe, M., Mishina, M. and Ito, S.: Characterization of nociceptin/orphanin FG-induced pain responses in conscious mice: Neonatal capsaicin treatment and *N*-methyl-D-aspartate receptor GluR ϵ subunit knockout mice. *Neuroscience*, 97, 133-142 (2000)
- 37) Hironaka, K., Umemori, H., Tezuka, T., Mishina, M. and Yamamoto, T.: The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor δ 2 and ϵ subunits. *J. Biol. Chem.*, 275, 16167-16173 (2000)
- 38) Matsuda, I. and Mishina, M.: Identification of a juxtamembrane segment of the glutamate receptor δ 2 subunit required for the plasma membrane localization. *BBRC.* 275, 565-571 (2000)
- 39) Tanaka, J., Nakagawa, S., Kushiya, E., Yamasaki, M., Fukaya, M., Iwanaga, T., Simon, M.I., Sakimura, K., Kano, M. and Watanabe, M.: G α q protein subunits G α q and G α 11 are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and

- hippocampal pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 12, 781-792 (2000)
- 40) Yamakura, T., Sakimura, K. and Shimoji, K.: *N*-methyl-D-aspartate receptor channel block by meperidine is dependent on extracellular pH. *Anesth. Analg.* 90, 928-932 (2000)
 - 41) Yamakura, T., Sakimura, K. and Shimoji, K.: The stereoselective effects of ketamine isomers on heteromeric *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. *Anesth. Analg.* 91, 225-229 (2000)
 - 42) Nakamura, K., Manabe, T., Watanabe, M., Mamiya, T., Ichikawa, R., Kiyama, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Inoue, Y., Nabeshima, T., Mori, H. and Mishina M.: Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule. *Eur. J. Neurosci.* 13, 179-189 (2001)
 - 43) Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune, C., Umemori, H., Semba, K., Mishina, M., Manabe, T. and Yamamoto, T.: Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR ϵ 2 (NR2B) subunit of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 693-699 (2001)
 - 44) Miyamoto, Y., Yamada, K., Noda, Y., Mori, H., Mishina, M. and Nabeshima, T.: Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neural systems in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. *J. Neurosci.* 21, 750-757 (2001)
 - 45) Uchino, S., Nakamura, T., Nakamura, K., Nakajima-Iijima, S., Mishina, M., Kohsaka, S. and Kudo, Y.: Real-time two-dimensional visualization of ischemia-induced glutamate release from hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* 13, 670-678 (2001)
 - 46) Kishimoto, Y., Kawahara, S., Mori, H., Mishina, M. and Kirino, Y.: Long-trace interval eyeblink conditioning is impaired in mutant mice lacking the NMDA receptor subunit ϵ 1. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1221-1227 (2001)
 - 47) Kishimoto, Y., Kawahara, S., Suzuki, M., Mori, H., Mishina, M. and Kirino, Y.: Classical eyeblink conditioning in glutamate receptor subunit δ 2 mutant mice is impaired in the delay paradigm but not in the trace paradigm. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1249-1253 (2001)
 - 48) Kitayama, K., Abe, M., Kakizaki, T., Honma, D., Natsume, R., Fukaya, M., Watanabe, M., Miyazaki, J., Mishina, M. and Sakimura, K.: Purkinje cell-specific and inducible gene recombination system generated from C57BL/6 mouse ES cells. *BBRC.* 281, 1134-1140 (2001)
 - 49) Minami, T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Shimamoto, K., Sakimura, K., Mishina, M., Mori, H. and Ito, S.: Characterization of the glutamatergic system for induction and maintenance of allodynia. *Brain Res.* 895, 178-185 (2001)
 - 50) Takeuchi, T., Kiyama, Y., Nakamura, K., Tsujita, M., Matsuda, I., Mori, H., Munemoto, Y., Kuriyama, H., Natsume, R., Sakimura, K. and Mishina, M.: Roles of the glutamate receptor ϵ 2 and δ 2 subunits in the potentiation and prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. *Eur. J. Neurosci.* 14, 153-160 (2001)
 - 51) Wainai, T., Takeuchi, T., Seo, N. and Mishina, M.: Regulation of acute nociceptive responses by the NMDA receptor GluR ϵ 2 subunit. *Neuroreport*, 12, 3165-3172 (2001)
 - 52) Uchino, S., Watanabe, W., Nakamura, T., Shuto, S., Kazuta, Y., Matsuda, A., Nakajima-Iijima, S., Kohsaka, S., Kudo Y., and Mishina M.: Establishment of CHO cell lines expressing four *N*-methyl-D-aspartate receptor subtypes and characterization of subtype selectivity of a novel antagonist PPDC. *FEBS Letters*, 506, 117-122 (2001)

- 53) Kishimoto, Y., Kawahara, S., Fujimichi, R., Mori, H., Mishina M., and Kirino Y.: Impairment of eyeblink conditioning in GluR δ 2 mutant mice depends on the temporal overlap between conditioned and unconditioned stimuli. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1515-1521 (2001)
- 54) Ikeno, K., Yamakura, T., Yamazaki, M. and Sakimura, K.: The Lurcher mutation reveals Ca^{2+} permeability and PKC modification of the GluR δ channels. *Neurosci. Res.*41, 193-200 (2001)
- 55) Yamada, K., Fukawa, M., Shimizu, H., Sakimura, K. and Watanabe, M.: NMDA receptor subunits GluR ϵ 1, GluR ϵ 3 and GluR ζ 1 are enriched at the mossy fibre-granule cell synapse in the adult mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci*, 13, 2025-2036 (2001)
- 56) Yamazaki, M., Fukaya, M., Abe, M., Ikeno, K., Kakizaki, T., Watanabe, M. and Sakimura, K.: Differential palmitoylation of two mouse glutamate receptor interacting protein 1 (GRIP1) forms with different N-terminal sequences. *Neurosci. Lett.* 304, 81-84 (2001)
- 57) Hashimoto, K., Ichikawa, R., Takechi, H., Inoue, Y., Aiba, A., Sakimura, K., Mishina, M., Hashikawa, T., Konnerth, A., Watanabe, M., and Kano, M.: Roles of GluR δ 2 and mGluR1 in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J. Neurosci.* 21, in press.
- 58) Takatsuki, K., Kawahara, S., Kotani, S., Mori, H., Mishina, M., and Kirino, Y.: Hippocampal damage disrupts eyeblink conditioning in mice lacking glutamate receptor subunit δ 2. *J. Biol. Phys.* in press.
- 59) Miyagi, Y., Yamashita, T., Fukaya, M., Sonoda, T., Okuno, T., Yamada, K., Watanabe, M., Nagashima, Y., Aoki, I., Okuda, K., Mishina, M. and Kawamoto, S. Delphilin: a novel PDZ-and formin homology-domain containing protein, which synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor δ 2 subunit. *J. Neurosci.* in press.

(2) 特許出願 (海外 1 件)

発明者 : 三品昌美、安藤秀樹

発明の名称 : ソラレン誘導体による高効率変異法

出願番号 : 特願平 10-249392

出願日 : 1998.9.3

(3) 受賞等

なし