

名古屋大学大学院理学研究科 教授

藤澤 肇

「神経結合の形成、維持、再編成を制御する分子機構の解明」

1. 研究実施の概要

成体で見られる神経回路は、発生時での神経細胞同志の選択的な識別と結合の所産である。従って、完成した脳・神経系の機能を理解する上に、個体発生の過程で神経軸索が特定の伸張路を選別し、特定の標的を識別し、これと選択的にシナプス結合する機構を明らかにすることがきわめて重要な課題である。また、完成した脳神経系が遂行する複雑な脳機能が多様でかつ特異的な神経結合に基づいていることを考えるとき、神経回路の多様性を生み出す分子制御機構の解明がきわめて重要である。さらに、これら神経回路形成を制御する機構は脳機能発現に伴う神経結合の強化や再編成など神経結合の可塑的変化の過程をも制御していると考えられる。

これまでに、神経軸索の伸張を促進ないしは抑制する因子、神経細胞の接着を促す分子、シナプス結合形成に関与すると予測される細胞接着分子、あるいは神経軸索の伸張のための足場を提供する分子などが数多く報告されているが、これら分子の機能は大部分が *in vitro* モデル実験系で得られた結果に基づいており、実際に生体内での神経回路形成の過程をどのように制御しているかほとんど不明である。

このような観点から、本研究では、以下の3点を研究の柱にすえ、生化学、分子生物学、遺伝子工学、発生工学の手段を駆使して神経軸索のガイダンスや神経細胞移動に関与する新たな分子の発見と、それら分子の機能を明らかにする研究を実施した。

1) 神経回路形成に関与することが予測される神経系膜分子ニューロピリンとプレキシンに着目し、相同組み換えによりこれらの遺伝子機能を破壊したマウスを作製し、これら膜分子の神経回路形成に果たす役割を明らかにする。

2) 神経回路形成を制御する新たな分子を見いだすための研究システムを開発する。このため、培養下で嗅覚神経回路を再現させる実験系を開発し、この系を用いて、モノクローナル抗体法により神経軸索の伸張を制御する新たな因子、分子をスクリーニングする。

3) シナプス結合とシナプス機能に深い関わりを持つ *Fyn* に注目し、*Fyn* 結合分子を検索し、神経発生ならびに脳機能発現をもたらす新たな分子メカニズムを明らかにする。

この研究を実施するにあたり、分子機能解析グループ（研究代表者：藤澤 肇、名古屋大学大学院理学研究科）、嗅覚回路形成解析グループ（研究分担者：平田たつみ、国立遺伝学研究所：分子機能解析グループの一員であった平田たつみが国立遺伝学研究所に移動したことに伴い1999年度より新たな研究グループに編成替えした）、遺伝子機能解析グループ（研究分担者：八木 健、岡崎国立共同研究機構生理学研究所）の3つの研究グループを組織し、以下の成果を得た。なお、研究開始当初は、生理機能解析グループ（研究分担者：山本亘彦、大阪大学大学院基礎工学研究科）を組織したが、1998年度に新たに開始された「脳の神経回路形成と可塑性の分子機構」（研究代表者：村上富士夫）に編成替えした。

分子機能解析グループ

1) 遺伝子機能解析グループとの共同で、ニューロピリン1ならびに神経軸索の伸張を抑制する反発因子として知られているセマフォリン3A (Sema3A) 遺伝子ノックアウトマウスを作成しその表現形を解析し、ニューロピリン1がセマフォリン3Aの機能的レセプターであること、ニューロピリン1を介したセマフォリン3Aシグナルが秩序だった末梢神経パターン形成を制御することを明らかにした。

2) ニューロピリン1を介したセマフォリン3Aシグナルは秩序だった交感神経系パターン形成を制御することを明らかにした。

3) ニューロピリン1は血管系では血管内皮増殖因子 VEGF のレセプターとして機能し、胚の血管形成を適切なレベルに制御するレギュレーターであることを明らかにした。

4) ニューロピリン1は細胞接着レセプターとしても機能する多機能分子であることを明らかにした。

5) ニューロピリンの機能解明と平行して、プレキシンの解析を実施し、マウスで4種類のプレキシソ遺伝子を分離し、それぞれのプレキシソが発生時の特定の神経回路で選択的に発現することを明らかにし、プレキシソが神経回路形成に関与する可能性を示した。

6) プレキシソがニューロピリンと複合体を構成してセマフォリンの受容体として機能することを明らかにした。

7) プレキシソ自身と直接相互作用するセマフォリンが存在することを見だし、プレキシソが多重セマフォリンレセプターであることを明らかにした。

8) 神経系の形態形成に関与する新たな遺伝子を探るために、線虫 *C. elegans* の神経系の形態に異常を示す変異体の検索を行った。この結果、腹側神経束が体壁から遊離するという表現型 *Ven* を発見し、新規な3遺伝子座と既知の *mua/mup* 遺伝子座の変異が *Ven* 異常を引き起こすことを明らかにした。

9) プレキシソ遺伝子ノックアウトマウスの作製、ならびに線虫を用いたプレキシソ分子の遺伝学的解析を行い、プレキシソの機能を明らかにする研究を実施した。

嗅覚回路形成解析グループ

1) 神経回路形成機構解析のためのモデル実験系として、嗅覚神経回路を培養下で再構築する技術を開発し、この系を用いて、モノクローナル抗体法を用いて嗅球軸索をガイドする道標細胞、*lot* 細胞を同定した。

2) *lot* 細胞の発生機構を解析し、この細胞が終脳新皮質全体から分化し、将来局在する嗅索 (LOT) 領域まで腹側接線方向へと移動することを明らかにした。

3) *lot* 細胞による短距離性軸索ガイドと軸索反発因子 *Slit* との関係性を明らかにした。

4) 僧帽細胞の軸索側枝形成と標的への侵入機構を明らかにした。

5) モノクローナル抗体法を用いて嗅球軸索伸長の制御に関与する膜蛋白質 *M6a* を見いだした。

遺伝子機能解析グループ

- 1) 遺伝子欠損マウス作製のための各種の技術開発を行った。
- 2) NMDA 受容体サブユニット、GABA 合成酵素、コンプレキシン 2 遺伝子欠損マウスの作製を行った。
- 3) 分子機能解析グループと共同で、ニューロピリン、セマフォリン、プレキシン欠損マウスを作製し、神経回路形成の分子機構の解析を行った。
- 4) Fyn 欠損マウスを用いた神経回路形成と行動制御機構の研究を行った。
- 5) Fyn 結合タンパク質の単離・同定を行い、Fyn と結合するカドヘリン様分子である CNR (cadherin-related neural receptor) を見いだした。
- 6) CNR ファミリーの発現様式の検討、Reelin との相互作用の解析を行い、CNR が脳の初期発生段階では Reelin に対する多重レセプターとして機能しており、胎児大脳皮質における神経細胞の移動の制御に重要な関わりを持っていることを明らかにした。
- 7) CNR ファミリーのゲノム構造の解析、遺伝子発現調節機構の解析を行い、CNR ファミリーが可変領域と定常領域からなり、これにより CNR ファミリーの多様性を生み出すことを明らかにした。

生理機能解析グループ（平成 8 年度、9 年度のみ）

- 1) 皮質表層に発現する軸索伸長抑制因子が層特異的な視床皮質投射を起こす機構を明らかにするため、大脳皮質切片を視床組織片と共培養する方法を考案し、大脳皮質の層特異的シナプス結合を規定する膜結合型因子の検索と機能解析を行った。

2. 研究構想

神経回路形成の分子制御機構を理解する上に、新たな神経回路形成制御分子を発見する手段の開発とともに、その分子の生理機能、特に生体内での機能を明らかにする手だてを確立することが重要である。そこで、本研究では標的組み換えによる遺伝子破壊マウスの作製、さらには、本研究の後半では線虫を用いた遺伝学的な解析手段を採用し研究を進めた。

このため、分子機能解析グループ（研究代表者：藤澤 肇、名古屋大学大学院理学研究科）、嗅覚回路形成解析グループ（研究分担者：平田たつみ、国立遺伝学研究所）、遺伝子機能解析グループ（研究分担者：八木 健、岡崎国立共同研究機構生理学研究所；現在は大阪大学細胞工学センター）の 3 つの研究グループを組織した。なお、これに加え、平成 8 年度と 9 年度は生理機能解析グループ（研究分担者：山本亘彦、大阪大学大学院基礎工学研究科）を組織した。

分子機能解析グループでは、神経軸索の伸長の制御に関与することが予測されていたがその機能が証明できていなかったニューロピリン、プレキシンに着目し、遺伝子機能解析グループとの共同でこれらの遺伝子ノックアウトマウスを作製し、その表現形を解析する

試みを実施した。これと同時に、遺伝子機能解析グループが中心となってセマフォリン 3A 遺伝子ノックアウトマウスを作製する試みを実施した。その結果、ニューロピリン 1 遺伝子ノックアウトマウスとセマフォリン 3A 遺伝子ノックアウトマウスの表現形が極めて似ていることを見だし、ニューロピリン 1 がセマフォリン 3A の機能的レセプターであるという結論に到達した。さらに、これらの遺伝子ノックアウトマウスで末梢神経系が大幅に乱れていることを発見し、ニューロピリン 1 を介したセマフォリン 3A シグナルが末梢神経系の秩序だったパターンの形成に不可欠であることを証明し、神経発生の分野で長年の懸案であった末梢神経系の投射パターンを制御する分子機構の一端を明らかにすることができた。

さらに、ニューロピリン 1 遺伝子ノックアウトマウス、セマフォリン 3A 遺伝子ノックアウトマウスの詳細な表現形の解析を通じ、ニューロピリン 1 を介したセマフォリン 3A シグナルが末梢神経系の形成のみならず、秩序だった交感神経系のパターンの成立にも不可欠であることの発見に至った。

また、ニューロピリン 1 遺伝子ノックアウトマウスの解析を通じ、血管系においては、ニューロピリン 1 は血管内皮増殖因子 VEGF のレセプターとして機能し、胚の血管形成を制御することを明らかにした。血管形成の制御機構の解明は生命科学、医学の分野で極めて重要な研究課題であるため、国内外の血管形成の専門家との共同研究を組んで研究を進めることにした。

一方、我々を含めいくつかの研究室で、プレキシシンもセマフォリンのシグナルを伝える分子であることが証明され、プレキシシンの生体内での機能を解明する研究が重要な課題となった。我々は、プレキシシンの機能を明らかにするため、新たなマウスプレキシシンの検索、プレキシシンに直接結合するセマフォリンの検索、プレキシシン A サブファミリーに属する 4 つのプレキシシン遺伝子ノックアウトマウスの作製を試みる研究を実施した。また、この研究を実施する間に、セマフォリン、プレキシシンが線虫から人に至る多くの動物で存在することが判明した。そこで、変異株を比較的容易に分離できる線虫をモデル動物として取り入れることとした。我々は、GFP (Green Fluorescent Protein) を神経系特異的に発現する *C. elegans* 系統を樹立し、この遺伝学的背景のもとで神経系形態に異常のある変異体の検索、線虫プレキシシン遺伝子変異株の分離を実施した。

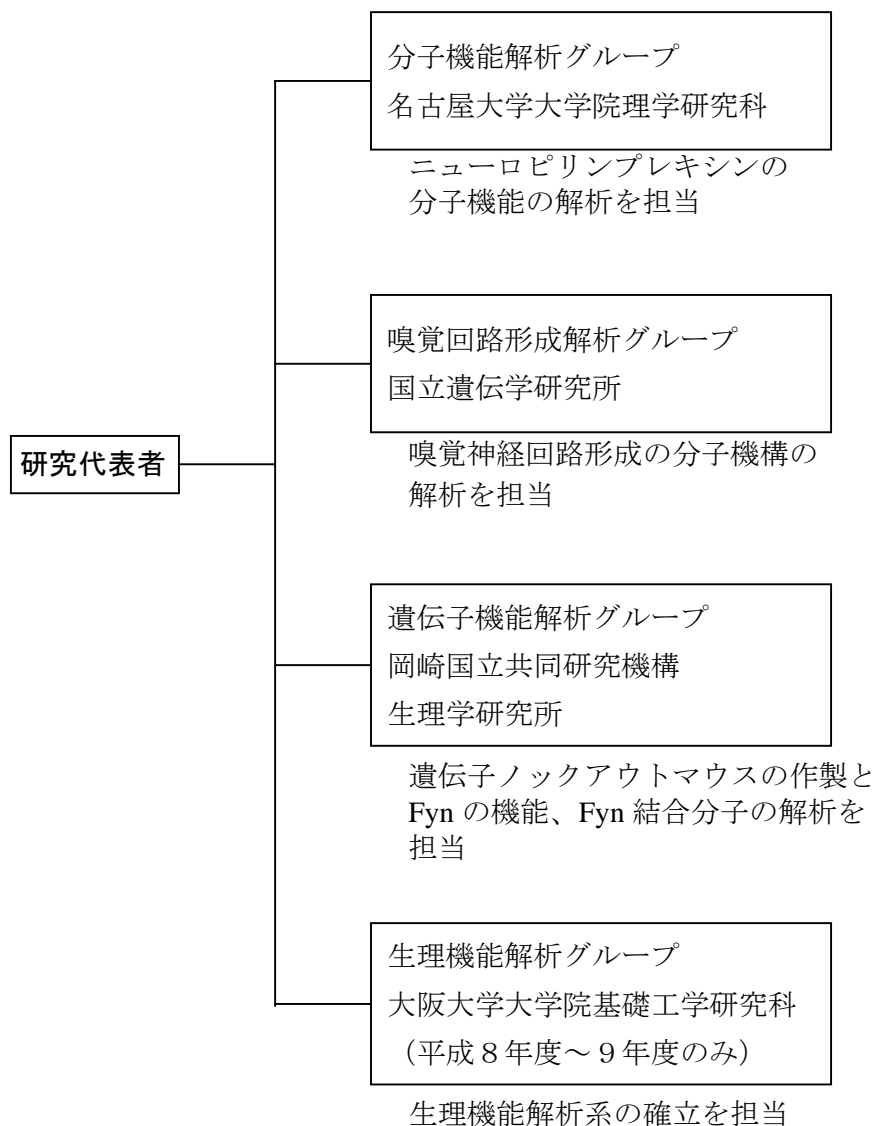
嗅覚回路形成解析グループでは、新たな神経回路形成制御因子を検索するため、嗅球から終脳への軸索投射を *in vitro* で再現させる実験系を開発し、この実験系を用いて軸索投射を阻害するモノクローナル抗体をスクリーニングし、その抗原分子、遺伝子を同定する研究計画を立てた。これにより、嗅球軸索をガイドする道標細胞 lot 細胞の同定、嗅球軸索伸長の制御に関与する膜蛋白質 M6a を見いだすことに成功した。

遺伝子機能解析グループでは、遺伝子機能欠損マウス作製のための各種の技術開発を行い、この技術を用いて、分子機能解析グループと共同で、ニューロピリン、セマフォリン、プレキシシン遺伝子機能欠損マウスを作製する研究計画を立てた。これにより、上述したニューロピリン、セマフォリン、プレキシシンの神経回路形成の制御機構を明らかにすることができた。

一方、これら遺伝子ノックアウトマウス作製と平行して、シナプス領域に濃縮し、シナプス機能や脳機能に重要な役割を果たしていることが予測されている Fyn キナーゼに着目し、Fyn 欠損マウスを用いた神経回路形成と行動制御機構の研究を実施する計画を立てた。これらの研究、とりわけ Fyn と結合する分子の単離・同定の研究を通じ、Fyn と結合するカドヘリン様分子 CNR (cadherin-related neural receptor) の発見という思いがけない成果を得るに至った。CNR が脳の初期発生段階では Reelin に対する多重レセプターでとして機能しており、大脳皮質形成時における神経細胞の移動の制御に重要な関わりを持っていること、CNR ファミリーが可変領域と定常領域からなり、これにより CNR ファミリーの多様性を生み出すことを明らかにし、神経発生の分子機構に新たな視点を加えることに成功した。

生理機能解析グループでは、大脳皮質切片と視床組織片と共培養する *in vitro* モデル実験系を開発し、この実験系を用いて皮質表層に発現する軸索伸長抑制因子が層特異的な視床皮質投射を起こす機構を明らかにする試みを行った。これにより、大脳皮質に発現する特定の糖鎖あるいは糖蛋白が視床ニューロンの軸索伸長を抑制することが示唆された。

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

<国際シンポジウム>

- 1) 20th Taniguchi International Symposium on Brain Sciences, 1997.3.16-19, Kyoto, Japan
(組織委員長)
国内外より 20 名を越える神経研究者を招待し、神経発生、神経細胞分化、神経回路形成を巡る研究の発表と討議を行った。
- 2) The NIBB International COE Symposium “Mechanisms of Neuronal Network Formation”, 2000.3.15-17, Okazaki, Japan. (オーガナイザー)
国内外より 20 名を越える神経研究者を招待しシンポジウムを行い、神経発生、神経細胞分化、神経回路形成を巡る研究の発表と討議を行った。200 名を越える国内外研究者の参加を見た。
- 3) The 4th German-Japan Joint Workshop, 2000.9.25-27, Hakone, Japan. (オーガナイザー)
日本、ドイツより 20 名を越える神経研究者を招待しシンポジウムを行い、神経発生と神経再生を巡る研究の発表と討議を行った。
- 4) 14th International Congress of Developmental Biology, Symposium “Wiring the neural network”. 2001.7.11, Kyoto, Japan. (オーガナイザー)
日本、米国より 6 名の著名な神経研究者を招待しシンポジウムを行い、神経発生を巡る最先端の研究の発表を行った。シンポジウムには 400 名を越える国内外の研究者が出席し、活発な議論がなされた。

<国内シンポジウム>

- 1) 第 70 回日本生化学会大会シンポジウム「神経回路パターンの形成機構」、1997.9.24、金沢 (オーガナイザー)
6 名の神経発生研究者を招待しシンポジウムを行い、神経回路形成を巡る最先端の研究の発表を行った。シンポジウムには 100 名を越える研究者の出席を見た。
- 2) 基礎生物学研究所形質統御実験施設ワークショップ「神経系の構築と記憶 II」1998.10.6-7、岡崎 (オーガナイザー)
シンポジウムとポスター発表を行い、神経回路形成と脳機能に関する最新の研究の発表と討議を行った。200 名を越える参加者を見た。
- 3) 第 13 回「大学と科学」公開シンポジウム「生き物の形づくり」、1999.1.22-23、神戸 (組織委員)
神経系を含む様々な発生現象の制御機構を巡る最新の研究成果を市民を対象にして報告した。600 名を越える参加者を見た。
基礎生物学研究所研究会「神経系の記憶と構築 III - 神経系の形を決める因子」2000.12.20-21、岡崎 (オーガナイザー)
シンポジウムとポスター発表を行い、脳パターンの決定、神経細胞分化、神経回路形成に関する最新の研究の発表と討議を行った。200 名を越える参加者を見た。

5. 主な研究成果

(1) 原著論文等

研究代表者 藤澤 肇

- 1) T. Hirata and H. Fujisawa: Cortex-specific distribution of membrane-bound factors that promote neurite outgrowth of mitral cells in culture. *J. Neurobiol.*, 32, 415-425 (1997)
- 2) K. Ono, H. Fujisawa, S. Hirano, M. Norita, T. Tsumori and Y. Yasui: Early development of the oligodendrocyte in the embryonic chick metencephalon. *Neurosci. Res.*, 48, 212-225 (1997)
- 3) A. Kawakami, M. Kimura-Kawakami, T. Nomura and H. Fujisawa: Distributions of Pax6 and Pax7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. *Mech. Dev.*, 66, 119-131 (1997)
- 4) M. Taniguchi, S. Yuasa, H. Fujisawa, I. Naruse, S. Saga, M. Mishina and T. Yagi: Disruption of *semaphorin III/D* gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron*, 19, 519-530 (1997)
- 5) T. Kitsukawa, M. Simizu, M. Sanbo, T. Hirata, M. Taniguchi, Y. Bekku, T. Yagi and H. Fujisawa. Neuropilin-semaphorin III/D chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron*, 19, 995-1005 (1997)
- 6) T. Nomura, A. Kawakami and H. Fujisawa: Correlation between tectum formation and expression of two PAX family genes, PAX7 and PAX 6, in avian brains. *Dev. Growth & Differ.* 40, 485-495 (1998)
- 7) Y. Sato, T. Hirata, M. Ogawa and H. Fujisawa: Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody lot1 in the formation of lateral olfactory tract. *J. Neurosci.*, 18, 7800-7810 (1998)
- 8) E. Ulupinar, A. Datwani, O. Behar, H. Fujisawa and R. Erzurumlu: Role of semaphorin III in the developing rodent trigeminal system. *Mol. Cell. Neurosci.*, 13, 281-292 (1999)
- 9) S. Nishina, S. Kohsaka, Y. Yamaguchi, H. Handa, A. Kawakami, H. Fujisawa and N. Azuma: PAX6 expression in the developing human eye. *British J. Ophthalmol.*, 89, 723-727 (1999)
- 10) M. Fukata, S. Kuroda, M. Nakagawa, A. Kawajiri, N. Itho, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, H. Fujisawa, A. Kikuchi and K. Kaibuchi: Ced42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with β -catenin. *J. Biol. Chem.*, 274, 26004-26050 (1999)
- 11) T. Takahashi, A. Fournier, F. Nakamura, L.-H. Wang, Y. Murakami, R.G. Kalb, H. Fujisawa and S.M. Strittmatter: Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell*, 99, 59-69 (1999)
- 12) T. Kawasaki, T. Kitsukawa, Y. Bekku, Y. Matsuda, M. Sanbo, T. Yagi and H. Fujisawa: A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*, 126, 4885-4893 (1999)
- 13) T. Hirata and H. Fujisawa: Environmental control of collateral branching and target invasion of mitral cell axons during development. *J. Neurobiol.*, 38, 93-104 (1999)
- 14) A. Steup, M. Lohrum, N. Hamscho, N.E. Savaskan, O. Ninnemann, R. Nitsch, H. Fujisawa, A.W. Puschel and T. Skutella: Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Mol. Cell Neurosci.*, 15, 141-55 (2000)

- 15) M. Shibata, T. Fujii, J.A. Dent, H. Fujisawa and S. Takagi: EAT-20, a novel transmembrane protein with EGF motifs, is required for efficient feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 154, 635-646 (2000)
- 16) M. Shimizu, Y. Murakami, F. Suto and H. Fujisawa: Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. *J. Cell Biol.*, 148, 1283-1294 (2000)
- 17) T. Nomura and H. Fujisawa: Alteration of the retinotectal projection map by the graft of mesencephalic floor plate or Sonic hedgehog. *Development*, 127, 1899-1910 (2000)
- 18) N. Tomioka, N. Osumi, T. Inoue, S. Nakamura, H. Fujisawa and T. Hirata: Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *J. Neurosci.*, 20, 5802-5812 (2000)
- 19) R.B. Anderson S.C. Jackson, H. Fujisawa, B. Key: Expression and putative role of neuropilin-1 in the early scaffold of axon tracts in embryonic *Xenopus* brain. *Dev. Dyn.*, 219, 102-108 (2000)
- 20) T. Ito, M. Kagoshima, Y. Sasaki, C. Li, N. Udaka, T. Kitsukawa, H. Fujisawa, M. Taniguchi, T. Yagi, H. Kitamura and Y. Goshima: Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mech. Dev.* 97, 35-45 (2000)
- 21) H. Nagao, Y. Yoshihara, S. Mitui, H. Fujisawa and K. Mori: Two mirror-image sensory maps with domain organization in the mouse main olfactory bulb. *NeuroReport*, 11, 3023-7 (2000)
- 22) Y. Murakami, F. Suto, T. Kameyama, M. Shimizu, T. Shinoda and H. Fujisawa: Differential expression of plexin-A subfamily members in the mouse nervous system. *Dev. Dyn.*, 220, 246-258 (2001)
- 23) S. Loes, P. Kettunen, I.H. Kvinnsland, M. Taniguchi, H. Fujisawa and K. Luukko: Expression of class 3 semaphorins and neuropilin receptors in the developing mouse tooth. *Mech. Dev.*, 101, 191-194 (2001)
- 24) Y. Yamada, N. Takakura, H. Yasue, H. Ogawa, H. Fujisawa and T. Suda: Exogenous clustered neuropilin-1 enhances vasculogenesis and angiogenesis. *Blood*, 97, 1671-1678 (2001)
- 25) G. Shioi, M. Shoji, M. Nakamura, T. Ishihara, I. Katsura, H. Fujisawa and S. Takagi: Mutations affecting nerve attachment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 157, 1611-1622 (2001)
- 26) A. Kuroiwa, F. Suto, H. Fujisawa and Y. Matsuda: Chromosomal assignment of four plexin A genes (Plexna1, Plexna2, Plexna3, Plexna4) in mouse, rat, Syrian hamster and Chinese hamster. *Cytogenet. Cell Genet.*, 92, 127-129 (2001)
- 27) Tatsumi Hirata, Hajime Fujisawa, Jane Y. Wu and Yi Rao. Short-range guidance of olfactory bulb axons is independent of repulsive factor Slit. *J. Neurosci.*, 21, 2373-2379 (2001)
- 28) A. Takahashi, H. Muramatsu, S. Takagi, H. Fujisawa, Y. Miyake and T. Muramatsu: A splicing factor, Prp8: Preferential localization in the testis and ovary in the adults mice. *J. Biochem.*, 129, 599-606 (2001)
- 29) G. Shioi, M. Shoji, M. Nakamura, T. Ishihara, I. Katsura, H. Fujisawa and S. Takagi: Mutations affecting nerve attachment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 157, 1611-1622 (2001)
- 30) B. Oosthuysen, L. Moons, E. Storkebaum, H. Beck, D. Nuyens, K. Brusselmans, J. Van Dorpe, P. Helling, M. Gorselink, S. Heymans, G. Theilmeier, M. Dewerchin, V. Laudénbach,

P. Vermylen, H. Raat, T. Acker, V. Vleminckx, L. Van den Bosch, N. Cashman, H. Fujisawa, M.R. Drost, R. Sciot, F. Bruyninckx, D. Hicklin, C. Ince, P. Gressens, F. Lupu, K.H. Plate, W. Robberecht, J.-M. Herbert, D. Collen and P. Carmelitte: Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nature Genetics*, 28, 131-138 (2001)

- 31) Takahiko Kawasaki, Yoko Bekku, Fumikazu Suto, Takashi Kitsukawa, Masahiko Taniguchi, Ikuko Nagatsu, Toshiharu Nagatsu, Kazuo Itoh, Takeshi Yagi and Hajime Fujisawa: Requirement of neuropilin-1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development*, in press

共同研究者 平田たつみ

- 1) T. Hirata and H. Fujisawa: Cortex-specific distribution of membrane-bound factors that promote neurite outgrowth of mitral cells in culture. *J. Neurobiol.*, 32, 415-425 (1997)
- 2) T. Kitsukawa, M. Shimizu, M. Sanbo, T. Hirata, M. Taniguchi, Y. Bekku, T. Yagi and H. Fujisawa: Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron*, 19, 995-1005 (1997)
- 3) Y. Sato, T. Hirata, M. Ogawa and H. Fujisawa: Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody lot1 in the formation of lateral olfactory tract. *J. Neurosci.*, 18, 7800-7810 (1998)
- 4) T. Hirata and H. Fujisawa: Environmental control of collateral branching and target invasion of mitral cell axons during development. *J. Neurobiol.*, 38, 93-104 (1999)
- 5) N. Tomioka, N. Osumi, Y. Sato, H. Fujisawa and T. Hirata: Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *J. Neurosci.*, 20, 5802-5812 (2000)
- 6) T. Hirata, H. Fujisawa, J.Y. Wu and Y. Rao: Short-range guidance of olfactory bulb axons is independent of repulsive factor slit. *J. Neurosci.*, 21, 2373-2379 (2001)
- 7) T. Hirata, T. Nomura, Y. Takagi, Y. Sato, N. Tomioka, H. Fujisawa and N. Osumi: Mosaic development of the olfactory cortex with Pax6-dependent and-independent components. (submitted)

共同研究者 八木 健

- 1) Y. Yanagawa, T. Kobayashi, M. Ohnishi, T. Kobayashi, S. Tamura, T. Tsuzuki, M. Sanbo, T. Yagi, F. Tashiro and J. E. Miyazaki: An efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res.*, 8, 215-221 (1999)
- 2) T. Yagi: Molecular mechanisms of Fyn-tyrosine kinase for regulating mammalian behaviors and an ethanol sensitivity. *Biochem. Pharmacol.*, 57, 845-850, 1999.
- 3) K. Senzaki, M. Ogawa and T. Yagi: Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell*, 99, 635-647 (1999)
- 4) H. Sugino, S. Hamada, R. Tasuda, A. Tuji, Y. Matsuda, M. Fujita and T. Yagi: Genomic organization of the family of CNR cadherin genes in mice and humans. *Genomics*, 63, 75-87

- (2000)
- 5) Y. Yamazaki, T. Yagi, T. Ozaki and K. Imoto: In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J. Exp. Zool.*, 286, 212-218 (2000)
 - 6) T. Yagi and M. Takeichi: Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & Development* 14, 1169-1180 (2000)
 - 7) Y. Shima, T. Yagi, Y. Isojima, N. Okumura, M. Okada and N. Nagai: Changes in circadian period and morphology of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus in fyn kinase-deficient mice. *Brain Res.*, 870, 36-43 (2000)
 - 8) H. Kitazawa, A. Katoh, T. Yagi and S. Nagao: Dynamic characteristics and adaptability of reflex eye movements of Fyn kinase-deficient mice. *Neurosci. Lett.*, 280, 179-182 (2000)
 - 9) C. Seiwa, I. Sugiyama, T. Yagi and H. Asou: Fyn tyrosine kinase participates in the compact myelin sheath central nervous system. *Neurosci. Res.*, 37, 21-31 (2000)
 - 10) G-Z. Huang, H. Ujihara, S. Takahashi, H. Kaba, T. Yagi and S. Inoue: Involvement of complexin II in synaptic plasticity in the CA1 region of the hippocampus: The use of complexin II-lacking mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 84, 179-187 (2000)
 - 11) T. Ito, M. Kagoshima, Y. Sasaki, C. Li, N. Udaka, T. Kitukawa, H. Fujisawa, M. Taniguchi, T. Yagi, H. Kitamura and Y. Goshima: Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mechanisms of Development*, 97, 35-45 (2000)
 - 12) E. Kawase, Y. Yamazaki, T. Yagi, R. Yanagimachi and R.A. Pedersen: Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis*, 28, 156-163 (2000)
 - 13) M. Zhen-tong, M. Xiao-feng, T. Yagi and S. Yamagishi: Impairment of conditioned avoidance response in Fyn-kinase deficient mice. *Chin. J. Neurosci.*, 16, 293-298 (2000)
 - 14) T. Hirayama, H. Sugino and T. Yagi: Somatic mutations of synaptic cadherin (CNR family) transcripts in the nervous system. *Genes to Cells*, 6, 151-164 (2001)
 - 15) J. Nakahara, K. Tan-Takeuchi, C. Seiwa, T. Yagi, S. Aiso, K. Kawamura and H. Asou: Related Articles Myelin basic protein is necessary for the regulation of myelin-associated glycoprotein expression in mouse oligodendroglia. *Neurosci. Lett.*, 298, 163-166 (2001)
 - 16) K. Nakamura, T. Manabe, M. Watanabe, T. Mamiya, R. Ichikawa, Y. Kiyama, M. Sanbo, T. Yagi, Y. Inoue, T. Nabeshima, H. Mori and M. Mishina: Related Articles 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)
 - 17) Y. Takei, S. Hamada, K. Senzaki, T. Mutoh, H. Sugino and T. Yagi: Two novel CNRs from the CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR1 to 8. *Genomics* 72, 321-330 (2001)
 - 18) T. Miyakawa, T. Yagi, K. Takao and H. Niki: Differential effect of Fyn tyrosine kinase deletion on offensive and defensive aggression. *Mol. Brain Res.* 122, 51-56 (2001)
 - 19) Y. Yagi, M. Yasuda and H. Niki: Ethanol sensitivity and molecular function of Fyn tyrosine kinase. "Ethanol and Intracellular signalling: From Molecules to Behavior" CSR incorporated, in Washington, DC (2001)
 - 20) P.L. Hoffmann, T. Yagi, B. Tabakoff, T.J. Phillips, H. Kono, R.O. Messing and D-S. Choi: Transgenic and gene "knockout" models in alcohol research. *Alcohol Clin Exp Res* 25,

60S-66S (2001)

- 21) Y. Sugimoto, M. Taniguchi, T. Yagi, Y. Akagi, Y. Nojyo and N. Tamamaki: Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. *Development* 128, 3321-3330 (2001)
- 22) K. Hattori, T. Yagi, M. Maekawa, T. Sato and S. Yuasa: Related Articles N-Methyl-D-aspartate-induced c-Fos expression is enhanced in the forebrain structures related to emotion in Fyn-deficient mice. *Brain Res.* 905, 188-198 (2001)
- 23) S. Hamada and T. Yagi T: The cadherin-related neuronal receptor (CNR) family: a novel diversified cadherin family at the synapse. *Neuroscience Res.* 41, 207-215 (2001)
- 24) T. Shima, N. Okumura, T. Takao, Y. Satomi, T. Yagi, M. Okada and K. Nagai: Interaction of the SH2 domain of Fyn with a cytoskeletal protein, beta-aducin. *J. Biol. Chem.* in press
- 25) Y. Yamazaki, H. Makino, K. Hamaguchi-Hamada, S. Hamada, H. Sigino, E. Kawase, T. Miyata, M. Ogawa, R. Yanagimachi and T. Yagi: Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* in press

(2) 特許出願 (海外 2件)

- ① 発明者 : 藤澤 肇、木村 徹、村上安則、菊池 薫
発明の名称 : セマフォリン受容体
特許出願番号 : 特願平 11-341337
出願日 : 平成 11 年 11 月 30 日
- ② 発明者 : 藤澤 肇、八木 健、木津川尚史、川崎能彦
発明の名称 : ニューロピリン 1 遺伝子機能破壊マウスを用いたスクリーニング方法
特許出願番号 : 特願平 11-352688
出願日 : 平成 11 年 12 月 13 日

(3) 受賞等

藤澤 肇

第 52 回中日文化賞

平成 11 年 5 月 28 日

授賞タイトル「神経ネットワーク形成の分子機構の研究」