

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生物の発生・分化・再生」
研究課題
「細胞内パターンニングによる組織構築」

研究終了報告書

研究期間 2002年10月～2008年3月

研究代表者：広海 健

(情報システム研究機構
国立遺伝学研究所 教授)

1 研究実施の概要

組織構築に寄与するためには、細胞は集団の中で「位置」を知り、それに見合った運命決定や形態分化を行わなければならない。従来の発生生物学では、細胞の形態分化は細胞集団の中の位置情報の「下流」の現象としてとらえられてきた。しかし、神経細胞のように長い細胞突起を持つ細胞では、軸索や樹状突起などの細胞突起の一領域に分子を局在させることによって、組織全体のパターン形成のための位置情報を提供できるはずである。すなわち、突起内の分子局在は、組織構築を指令する「上流」の現象となりうる。われわれはこのような細胞特性に着目し、「細胞内パターンニング」という名の下に組織構築に新しい視点を持ち込んだ。

これまでも、細胞内の分子局在が細胞極性、細胞接着といった細胞生物学的現象を介して組織構築に貢献することはよく知られている。われわれが目指したのは、新しい細胞内パターンニング現象や新規細胞内区画の発見である。新しい現象に立脚してその機構を探求することにより、細胞生物学に新展開が期待できると共に、その現象がどのように利用されているかを探ることにより、組織構築の新しい作動原理が見いだせると期待される。

「軸索内パターンニング」現象の発見

新しい細胞内パターンニング現象の候補として、われわれはタンパク質の軸索内局在に着目した。生体内において、軸索ガイド因子受容体をはじめとする多くの膜タンパク質が軸索の特定の領域にのみ局在していることは古くから知られていた(図1A-C)。このような局在パターンは軸索の束が特定の経路を形成している場所で見られることが多いため、この現象は軸索の接着の「結果」と考えられてきた。軸索内の膜タンパク質局在が細胞自律的に制御されている可能性を追求するために、われわれは初代培養したショウジョウバエの神経細胞の系を開発し、培養下で他の細胞との接触なしに伸長した軸索内に特定の膜タンパク質が局在できるか否かを検討した。その結果、組織から単離された神経細胞においても複数の膜タンパク質が細胞自律的に軸索の近位部あるいは遠位部の領域に局在することを見いだした。近位部、遠位部領域にはそれぞれ複数種のタンパク質が局在しており、近位部と遠位部のパターンは相補的だった。このことは軸索が近位部、遠位部の二つの区画に分けられており、これらの区画は膜タンパク質の軸索内局在の「ユニット」として働くことを示している(図1D, E)。軸索を二つの区画に分け、それぞれの区画に特定のタンパク質を配置するという現象を、われわれは「軸索内パターンニング」と名付けた。

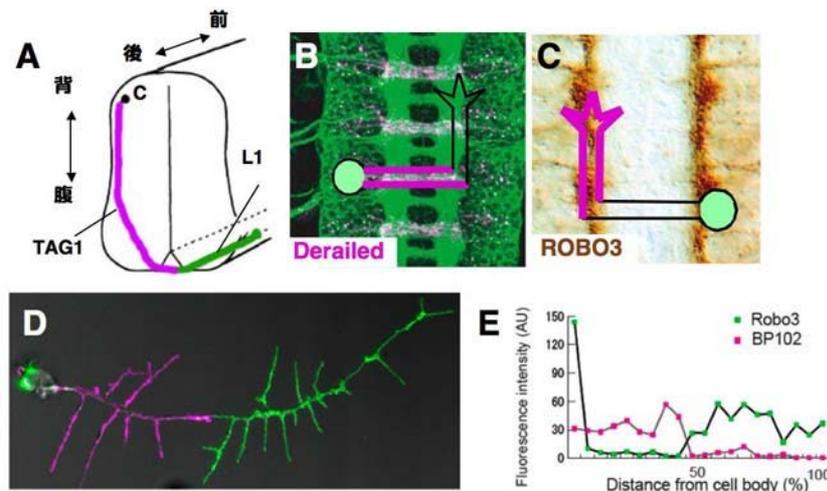


図1 軸索内パターンニング

(A-C): 生体内における膜タンパク質の軸索内局在. (A): 脊髄の交連神経では軸索が腹側正中線に達するまでとその先の部分で異なる膜タンパク質が局在している. (B, C): ショウジョウバエ胚の中樞神経系では Derailed は横行神経束に ROBO3 は縦走神経束にのみ発現している. このような発現パターンは, 個々の神経軸索ではそれぞれ軸索近位部, 遠位部への局在を意味する. (D): 低密度初代培養下でのショウジョウバエの神経細胞. 緑は ROBO3-GFP 融合タンパク質の分布, マゼンタはモノクローン抗体 BP102 による染色. ROBO3-GFP と BP102 抗原はそれぞれ軸索の遠位部, 近位部に細胞自律的に局在する. 左端が細胞体. (E) ROBO3-GFP と BP102 染色の強度を定量したもの. 二つの分子は境界を共有しており, 「軸索を二つの『区画』に分ける」というパターンニング現象があることが推測できる.

「軸索内パターンニング」の機構

[膜タンパク質の区画特異的配置機構]

膜タンパク質を軸索の近位部あるいは遠位部に配置する機構としては, 二つの仮説が考えられる. 第1は, 「軸索伸長に伴って細胞膜が軸索先端に付け加わる」という現象を利用して遺伝子発現を時間的に制御することによって近位部, 遠位部というパターンを作り出す, というストラテジーである. これは「軸索伸長」が「時間情報を空間情報に変換している」といえる. 第2は mRNA やタンパク質などの「遺伝子産物」に特異的区画への配置のための情報が含まれているという考えである. 遺伝子発現のタイミングを人工的に変える実験を行ってこれら仮説を検証した結果, 軸索内パターンは遺伝子発現の時間的制御によって作られるのではなく, 遺伝子産物そのものが区画特異的配置のための情報を有していることが判明した. 軸索内には GFP 融合タンパク質を含む小胞が移動しているのが観察され, 小胞輸送を阻害すると GFP 融合タンパク質の膜への配置は阻害された. 区画特異的配置には小胞輸送と選別が関与している可能性が高い (図2).

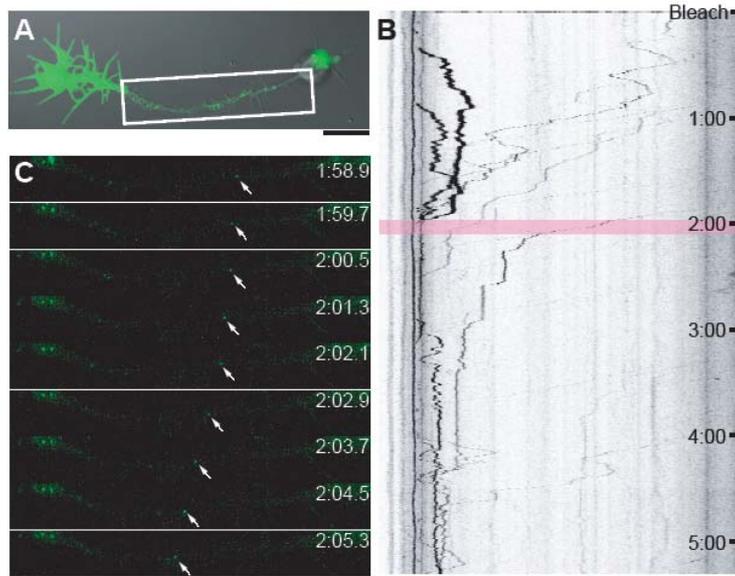


図2 ショウジョウバエの軸索内で観察される小胞輸送

(A) Robo3-GFPを発現する神経細胞. 軸索の近位部を拡大し, 経時変化をキモグラフとして表示したのが(B). 左向きの移行は順行性の輸送を, 右向きの移行は逆行性の輸送を示す. ピンク色の帯で示された部分の元データを(C)に示した. 最大速度は毎秒約 $2\mu\text{m}$ であることから, モータータンパク質による軸索内輸送であることが示唆される.

[軸索内パターンの維持機構]

「軸索内パターンニング」は膜タンパク質を軸索内の特定の区画に配置するだけでは達成できない. 一般に膜タンパク質は膜内で移動できるから, 局在パターンを維持するためには, 軸索内領域に配置された膜タンパク質がその区画から流出してパターンが崩れてしまうのを防ぐ機構があるはずである. パターン維持の機構として, われわれは, 「軸索内局在タンパク質は細胞骨格に係留されていて動かない」という可能性と, 「軸索内区画の境界には膜タンパク質の拡散を防ぐ障壁がある」という二つのモデルを検討した. FRAP (fluorescent redistribution after photo-bleaching) 実験で膜内の流動性を解析したところ, 軸索内区画に局在している膜タンパク質も区画内では膜内を移動できることが分かった. 一方, 軸索内に一様に分布している膜タンパク質も区画の境界では動きが制限されており, 一つの区画から隣の区画へ自由には移動できないことが判明した. これは軸索膜が近位部, 遠位部の二つの膜区画(membrane compartment)に分けられていることを示している. 軸索内パターンは区画境界の拡散障壁によって維持されていると考えられる(図3).

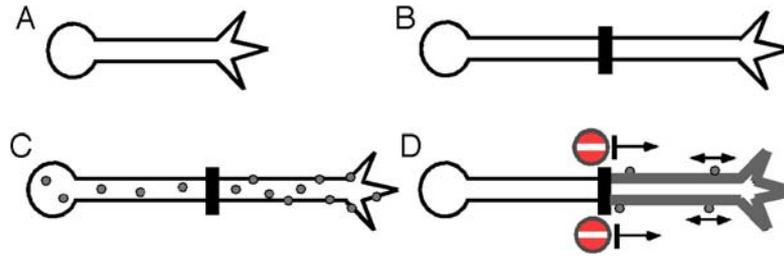


図3 膜タンパク質の軸索遠位部への局在機構の想像図

A, B: 軸索伸長と区画境界形成. C: 遠位部への選択的配置. D: 区画境界によるパターン維持.
左が細胞体, 右が成長円錐.

神経突起内の分子局在の意義

軸索内パターンングのような神経突起内の分子局在現象は、様々な形で神経系の形成や機能に寄与している可能性が高い。たとえば、軸索ガイド分子 Netrin の受容体 Frazzled は軸索内局在をすることによってそのリガンド Netrin を神経系内部の「要所」に配置し、軸索ガイダンス情報を提供する。われわれは神経回路形成に着目し、そこでの神経突起内の分子局在現象がどのような役割を果たしているかを解析した。

[軸索内局在する受容体の正と負のリガンド調節活性]

Netrin 提示機能を持つ Frazzled は「誘引性」のガイダンス受容体であるが、Netrin の受容体には「反撥性」の受容体である UNC5 もあり、UNC5 を発現する軸索は Netrin が存在する領域を避けて走行する。神経回路形成過程では同じ道筋を多くの軸索が順に通過するという現象があるので、もし最初に通過した Netrin 反撥性の軸索が Frazzled のように Netrin を提示すれば、その後続く軸索の走行にとって障害が出るはずである。われわれは、UNC5 には Netrin 提示活性がなく、逆に Frazzled による提示を抑制することを見いだした。この活性を使い、Netrin 反撥性の軸索は後続の軸索のために Netrin のない綺麗な道筋を作り上げているのだと考えられる。この結果は、Netrin に対する「誘引」と「反撥」という相反する反応性に対応して、受容体は「提示」と「提示抑制」という二つのリガンド調節活性を持つことを示している。受容体による二つの活性がうまく調和がとれていることが、神経回路形成の基本原理になっていると考えられる。

	Netrinに対する反応性	リガンド調節活性
Frazzled	誘因 (attractive)	提示 (presentation)
UNC5	反撥 (repulsive)	提示抑制 (inhibition of presentation)

[軸索に提示されたガイド情報に対する応答性の調節機構]

軸索内局在によるガイド情報配置は、「既存の軸索束」という位置情報を他の軸索の誘導に有効に使う方法ではあるが、一つの問題が生じる。それは、高等動物の神経系が体節というモジュールの繰り返し構造を基盤にしていることから生じる「境界問題」である。たとえば、縦走神経軸索は Frazzled が横行神経の軸索内局在によって作り上げる Netrin 分布によってモジュール「内」の道筋をたどった後、体節境界を越えて次のモジュールへの接続を行わねばならない。そのためにはモジュールの境界において横行神経軸索によって提示された Netrin による軸索ガイド情報を無視する必要がある。モジュール境界において、軸索ガイド情報に対する行動をどのようにしてスイッチングするのかは知られていなかった。われわれは、縦走神経は軸索がモジュール境界に到達したときに軸索ガイド受容体である ROBO を発現することによって提示された Netrin に対する反応性を抑制(無効化)していることを見いだした。ROBO の変異体においては Netrin に対する反応性が持続するため、体節境界において縦走軸索が横行神経に添って正中線に向かって投射してしまう。ROBO のリガンドである Slit は、これまで考えられていたように正中線からの反撥場を作っているのではなく、軸索上に存在して ROBO シグナルの量的調節を行っていることも判明した。この結果により、軸索に提示されたガイド情報に対する応答性の調節機構が明らかになるとともに、回路モジュールの「集積化」という複雑性を可能にする戦略にも重要な示唆を与えた。

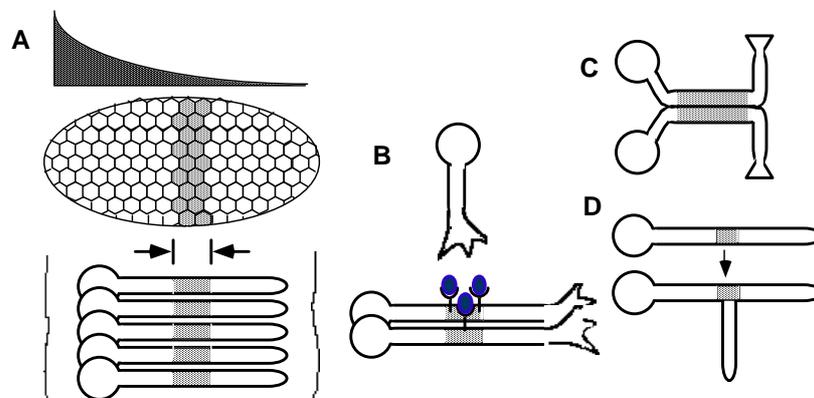
[樹状突起内の局所的酵素活性によるプルーニング制御]

軸索内の分子局在だけでなく、樹状突起内の分子局在も神経細胞内の局所的行動に重要な情報を与える。樹状突起内の局所的現象の一例として、われわれは樹状突起のプルーニング(刈り込み)を取り上げた。ショウジョウバエの感覚神経細胞の多くは蛹期の神経細胞リモデリング期に一部の樹状突起が除去される。われわれは、プルーニングでの樹状突起断片の除去には細胞死の遂行を司るタンパク質分解酵素 caspase が必要であることを示した。さらに、caspase 活性を可視化するプローブを開発し、プルーニング期に除去される樹状突起に限局して caspase が活性化されていることを見いだした。上流からのシグナルによって caspase が細胞内で局所的に活性化され、それが貪食細胞に認識されるためのシグナルを作り出していると考えられる。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

ゲノムの情報はその産物が正常な細胞内分画に局在して始めてその機能を発揮できる。タンパク質の細胞内での局在が細胞極性や細胞運動に重要であることはよく知られており、細胞内局在や細胞内輸送の分子機構もめざましい進展を見せている。一方、組織構築においては、細胞外に分泌されるタンパク質の分布が組織全体のパターンニングを支配し、細胞内のシグナル分子の下流の情報伝達機構や細胞応答の解析が発生研究の主流となっている。これら二つのプロセスは一見作用距離が全く異なるため、それぞれ独立に局所的あるいは大局的な現象を支配すると考えられがちである。しかし、神経のように長い突起を持つ細胞においては、細胞「内」の物質の分布が広範囲に影響を及ぼすことも可能である(図)。また、分泌タンパク質の分布を拡散だけに依存しても正確で頑強な位置情報は形成し得ないので、周囲の細胞の能動的機能が細胞外に分泌されたタンパク質の配置に関与する可能性も高い。事実、分泌されたモルフォゲンがエンドサイトーシスを介して細胞間を移動する例も知られている。組織構築の原理を包括的に理解するためには、細胞内の様々の領域への分子の局在、すなわち「細胞内パターンニング」を含めた新しい視点が必要である。



細胞内パターンニングによる組織構築

(A)場の中の特定の領域の特異化(矢印)は細胞外因子の濃度勾配に対する閾値応答(上)としても細胞内の区画化(下)としても可能である。(B-D)軸索内パターンニングで可能な巨視的現象の例。(B)局在した受容体によるリガンド提示。束化(C)や分岐形成(D)の位置情報提供。

上に載せたのは、2002年に本プロジェクトを提案した時の研究構想のイントロダクションである。この提案はわれわれが行ったいくつかの鍵となる発見に基づいていた。ひとつは、ショウジョウバエにおいて、受容体の「細胞内局在」がリガンドの再配置を通じて神経系内のガイダンス情報(位置情報)を決定している(図B, Hiramoto et. al., 2000)という知見である。これまで軸索ガイド

ンス情報は細胞外の分泌タンパク質の拡散によって生じると考えられてきたが、この発見は「神経回路形成のための情報の根源が、『細胞内』の分子分布に起因する」という全く新しい視点を開いたといえる。同時にこの結果は、細胞内あるいは軸索内の分子分布の様相や機構について、もっと広く調べる必要性をも示していた。そこでわれわれは、個々の神経細胞が持つ軸索内の分子局在能力の解析を始めていた。2002年の時点では、ショウジョウバエの初代培養下の神経細胞において、あるモノクローン抗体の抗原が軸索の一部の領域を染める、ということを見いだしていた。これは、神経細胞が細胞自律的な軸索内局在パターンを作りうることを示唆した点で画期的な発見ではあったが、その普遍性や局在機構は未知であった。

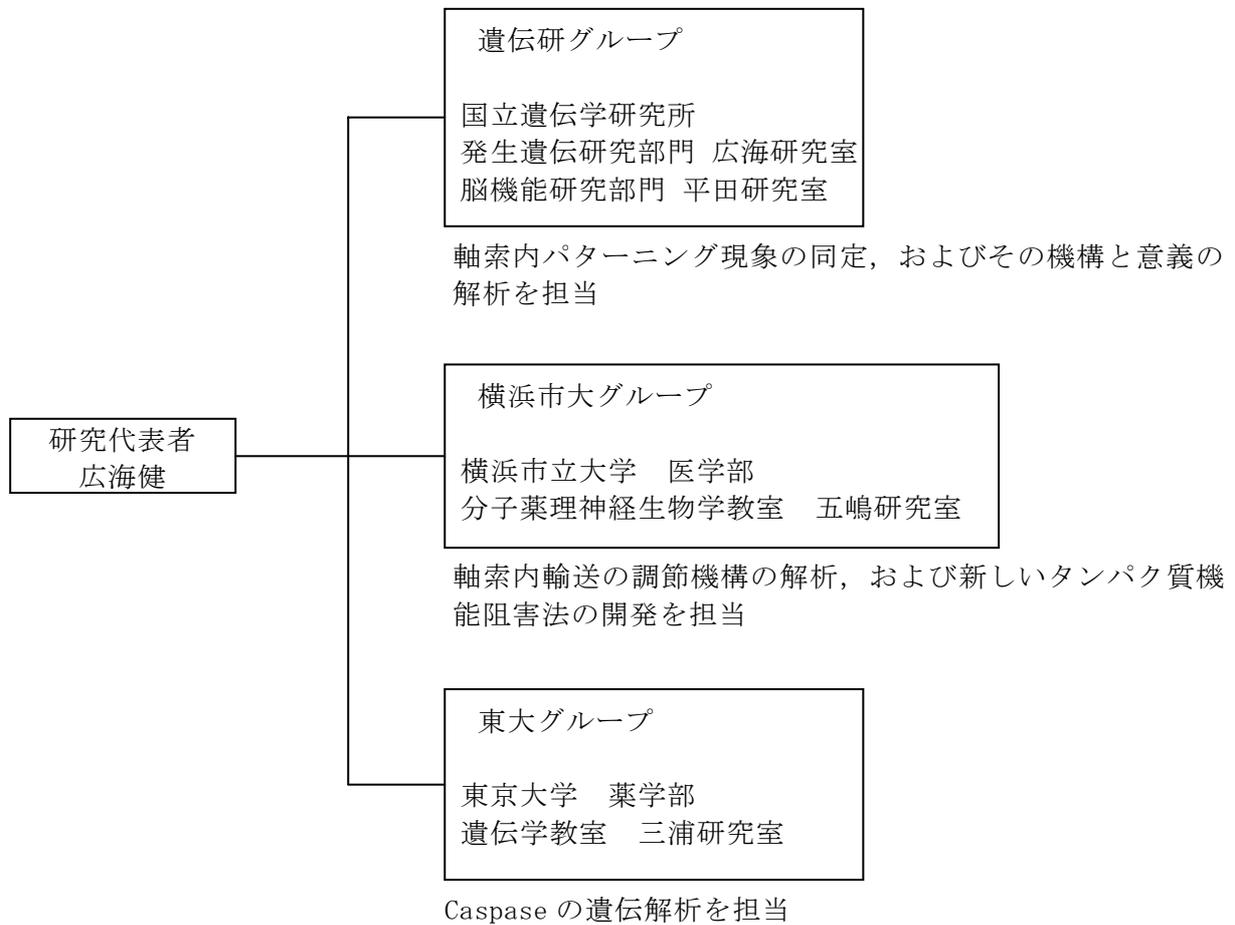
このような背景の下で、われわれは二つの方向性を持って本プロジェクトを開始した。ひとつは、神経突起内の分子局在、特に突起の領域化(パターンニング)の全体像の見極めである。そのために、多数の問題 --- たとえば、「細胞自律的な軸索内局在は多くの分子について起こる普遍的現象か」、「その機構は何か」、「軸索だけでなく樹状突起内にも『パターン』はあるのか」、「ショウジョウバエ以外のモデル生物(線虫、マウス)ではどのような突起内パターンがあるか」等 --- を設定した。もう一つは「細胞内パターンニング」の意義の発見である。つまり、軸索の領域化のような細胞生物学的に興味深い現象が、組織構築においてどのように用いられているのかを探ることを目指した。

遺伝研グループは上記二つの方向性を包括的に取り上げた。特に、ショウジョウバエにおける軸索内パターンニングの機構と意義の解析に力を注いだ。横浜市大グループは、以下の3つ点からプロジェクトを支援した。

- (1) 軸索内パターンニングに関与する可能性の高い「軸索輸送」と「局所的タンパク質合成」という二つの細胞内現象を取り上げ、その神経系構築および機能に関する役割を解析する。
- (2) 線虫 *C. elegans* を用いた Netrin 系の遺伝解析を行うことにより、ショウジョウバエで発見された Netrin 受容体による Netrin の分布制御の普遍性を探る。
- (3) 生物物理学的な原理を用いたタンパク質の機能破壊法を開発し、細胞内パターンニング現象の新たな解析ツールを提供する。

東大グループは caspase の遺伝解析に協力した。

(2) 実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 神経突起のパターニングと分子の局在化機構

(1) 研究実施内容及び成果

3.1.1 神経軸索の細胞自律的区画化(遺伝研グループ)

分子が神経軸索内の一部の領域に局在する機構を解析するために、ショウジョウバエの軸索ガイダンス受容体である ROBO ファミリー (ROBO, ROBO2, ROBO3) と Derailed を取り上げた。軸索の投射に必須の役割を果たしているこれらの受容体はすべて1回膜貫通型タンパク質であり、ショウジョウバエ胚神経系において ROBO ファミリーは軸索の遠位端側に局在し、Derailed は近位部に局在する(図 4A-D)。われわれは、(1) 神経細胞は自律的に受容体の軸索内パターンを形成する能力を持っているか、(2) これらの受容体を軸索の特定の領域に配置し、とどめておくメカニズムは何なのか、の二つの点を解析した。

細胞自律的な軸索内局在をテストするための実験系として、ショウジョウバエの神経細胞の低密度初代培養系を開発した。ショウジョウバエの初期胚を解離して軸索伸長開始前の神経細胞を低密度で培養し、他の細胞との接触なしに軸索伸長させることに成功した。単離された神経細胞において、ROBO は軸索内に一様に分布した(図 4E)。このことは、ROBO の局在には細胞外からのシグナルが必要であることを示唆する。一方、ROBO2, ROBO3 と Derailed は培養条件下でもそれぞれ軸索の遠位部、近位部に局在した(図 4F-I)。この結果は、神経細胞が細胞自律的に軸索内に分子のパターンを形成しうることを示している。軸索の近位部と遠位部のパターンは相補的であり、境界を共有していた。また、近位部、遠位部の領域にはそれぞれ2種以上の膜タンパク質が局在することも見出した。したがって、軸索の近位部、遠位部という領域は膜タンパク質局在の単位となる「区画」であることが示唆される。

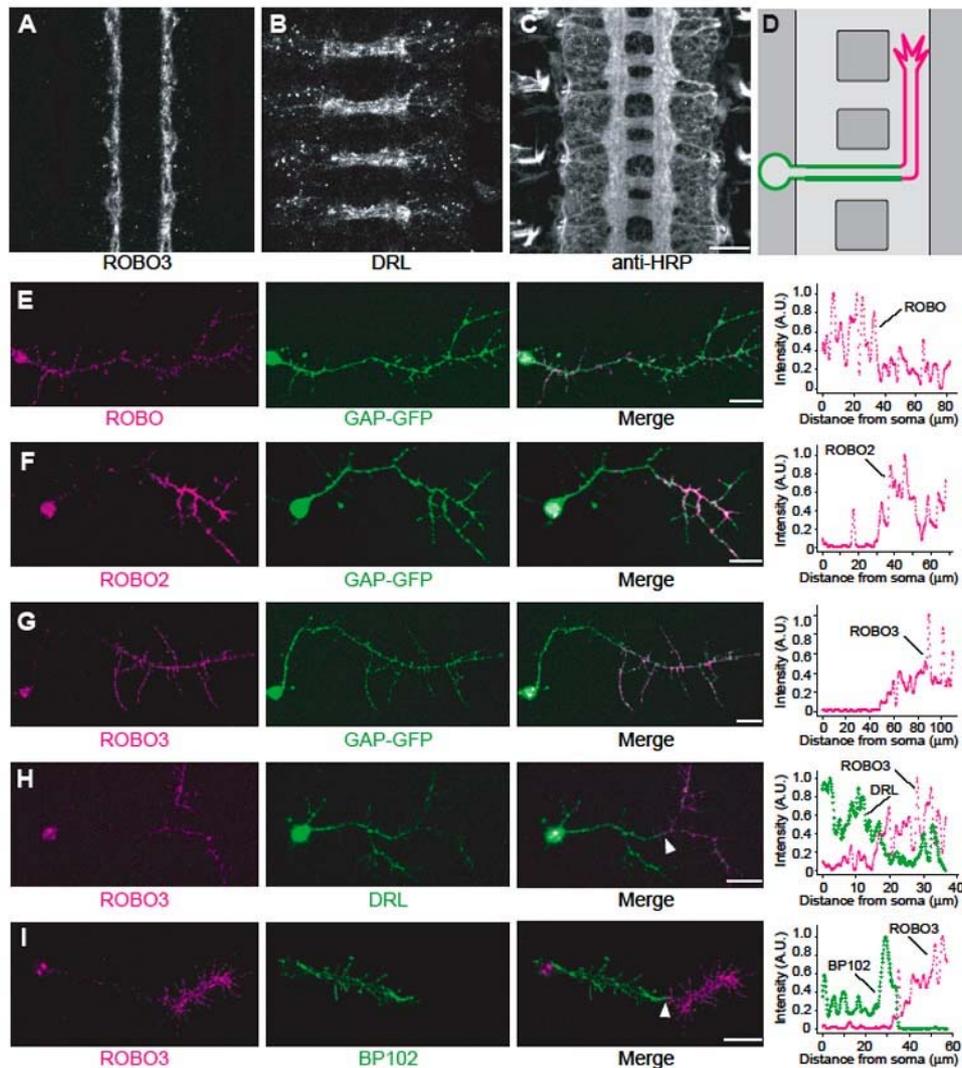


図4 ショウジョウバエ神経細胞における軸索ガイド受容体の細胞自律的な軸索内局在 (A-D) ショウジョウバエ胚の腹部神経節 (中枢神経系) における ROBO3 (A) と Derailed (B) 軸索ガイド受容体の発現. 抗 HRP 抗体 (C) はすべての神経細胞膜を染める. (D) 神経細胞軸索における ROBO3 (マゼンタ) と Derailed (緑) タンパク質局在の模式図. (E-G) 低密度初代培養した神経細胞における ROBO (E), ROBO2 (F), ROBO3 (G) タンパク質の発現 (マゼンタ). GAP-GFP (緑) は細胞膜を一様に標識する. (H, I) ROBO3 (マゼンタ) と Derailed (緑) または BP102 抗原 (緑) の相補的発現. 矢頭は共有されている境界. 右側のパネルは軸索に添った染色強度. スケールバー: 10 μ m.

特定の膜タンパク質が軸索の近位部あるいは遠位部に配置される現象の最も単純なモデルは、「これらの分布が遺伝子の時間的発現パターンを反映している」という解釈である. 新たに合成された膜タンパク質は軸索内輸送で軸索先端に運ばれ, そこで膜に取り込まれる, という考えに基づけば, 軸索伸長過程で遺伝子発現を「ON から OFF へ」, あるいは「OFF から ON へ」と切り換えることにより「近位部」あるいは「遠位部」というパターンを作りうる. ROBO3 や Derailed の局在パターンがこのような「時・空間変換」によって作られているのかどうかをテストするために, われわれ

はこれらのタンパク質と GFP との融合タンパク質を合成する遺伝子を作成し、その転写を軸索伸長の途中で OFF から ON へと切り換える実験を行った(図5A). 軸索伸長後期にのみ Derailed-GFP 遺伝子を発現させても Derailed-GFP タンパク質は軸索近位部に局在した(図5 B-D). また、同様の実験で得られた ROBO-GFP3 の分布の近位部端は転写誘導時の軸索先端とは一致しなかった(図5E-G). これらの結果は、遺伝子転写の時間的プロフィールは、産物の局在を決める必須の要素ではないことを示している. 従って、区画特異的に「タンパク質を配置する」機構があるはずである.

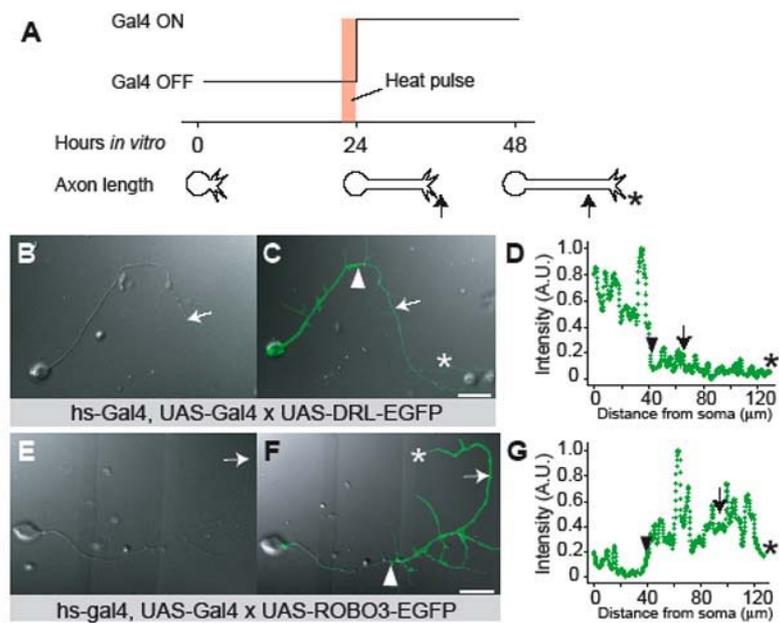


図5 軸索近位部, 遠位部への膜タンパク質局在は遺伝子発現の時間的制御を必要としない
 (A): 実験デザイン: 培養開始後 24 時間で GFP 融合遺伝子の転写を OFF から ON にスイッチし, その 24 時間後に GFP 融合タンパク質の分布 (B-G) を観察する. (B, E): 転写誘導直前, (C, F): 誘導後 24 時間. (B-D): Derailed-GFP, (E-G): ROBO3-GFP. 矢印は GFP 融合遺伝子転写開始時における軸索先端の位置, 矢頭は GFP 融合タンパク質局在の境界. (D, G): 軸索の長さによって蛍光強度を定量したもの.

タンパク質の細胞内の特定の領域に配置させる機構としては, mRNA の局在, 局所的タンパク質合成, 小胞輸送等, さまざまな可能性がある. GFP 融合タンパク質の局在には mRNA の 5' や 3' 側の非翻訳配列は必要ではなかったため, タンパク質レベルの調節が示唆された. 実際, 軸索内には GFP でラベルされた小胞が移動しているのが観察される. 軸索近位部にある ROBO3-GFP 小胞の輸送を阻害すると軸索遠位膜への出現が著しく阻害された. これらの結果から, 標的領域への配置には小胞輸送が関与していることが明らかになった(図6). 別々の区画に配置される膜タンパク質の局在には, それぞれ異なる輸送経路がある可能性が高い.

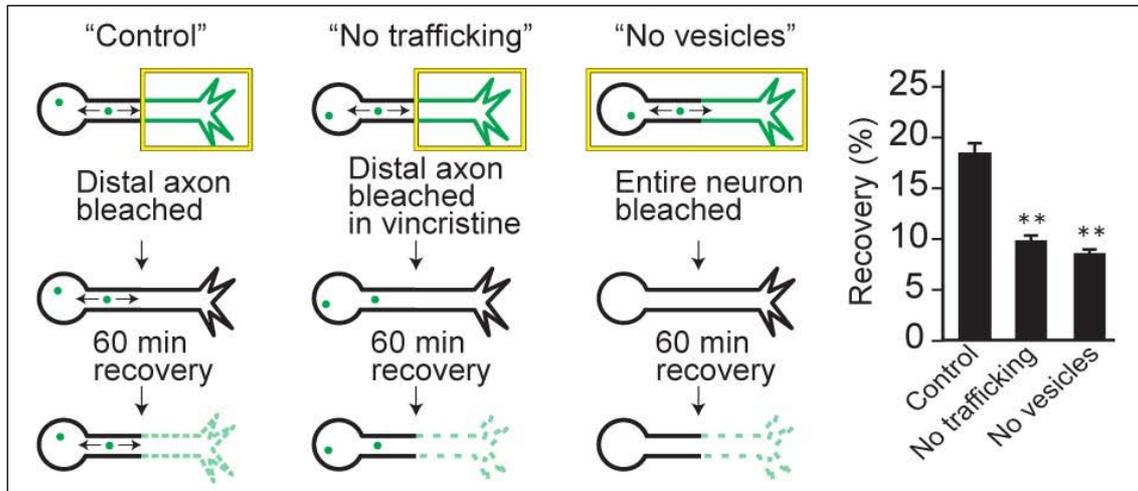


図6 軸索内区画への膜タンパク質配置には小胞輸送が関与している

軸索遠位部に局在している ROBO3-GFP を退色させると、近位部の小胞が移動して 60 分後には最初の蛍光強度の約 18% が回復する (左, Control). 軸索内の小胞輸送を阻害 (中: No trafficking) したり、近位部の小胞を退色 (右: No vesicles) させたりするとこの回復は著しく減少する。

区画への「配置」のメカニズムが何であろうと、それだけでは軸索内パターンニングは説明できない。細胞膜は流動的であると考えられているから、膜タンパク質の局在パターンを維持するには区画に配置されたタンパク質が隣の区画へ移動するのを防ぐ機構が必要である。FRAP 法を用いて膜タンパク質の動態を解析したところ、ROBO3 や Derailed のような区画に局在している膜タンパク質も区画「内部」では細胞膜内で移動できることがわかった。従って、細胞骨格へのアンカリングによってパターンが維持されている可能性は低い。一方、軸索膜に一樣に分布する人工的な1回膜貫通タンパク質 (CD8-GFP) を用いた FRAP 実験の結果、区画の境界では膜内の動きが制限されていることが明らかになった (図7)。区画の境界では膜タンパク質の移動を制限する何らかの「障壁」があり、これが区画特異的な局在パターンを維持していると考えられる。

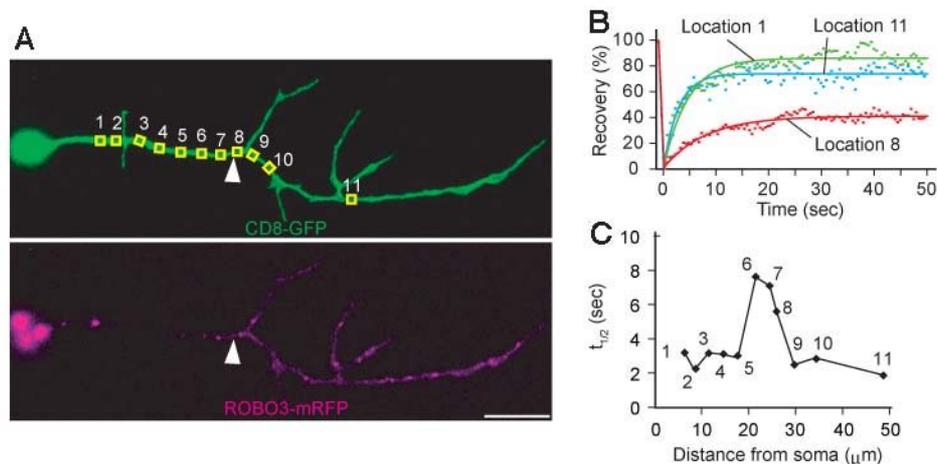


図7 軸索膜内の拡散障壁

A: 軸索に沿って $1\ \mu\text{m}$ 角の領域で FRAP 実験を行った。矢頭は ROBO3-RFP の局在によって判定された区画境界。B: 3 つの場所における蛍光強度回復の時間経過。区画境界付近では蛍光強度の戻りが遅く、膜内の分子の動きが制限されていることが分かる。C: 膜内の分子の動きにくさを軸索に沿ってプロットしたもの。区画境界付近中約 $10\ \mu\text{m}$ の範囲に膜内の分子の動きが遅い領域がある。

われわれの解析の結果、軸索内パターンニングは二つのプロセスに分割できることが分かった。一つは特異的タンパク質の軸索近位部あるいは遠位部の区画への配置であり、これには小胞輸送が関与している。もう一つは軸索中部に膜タンパク質の拡散障壁を作り、軸索を近位部、遠位部の2つの膜区画(membrane compartment)に分けることである。前者はタンパク質の個性(特異性)によって配置場所が決まる現象だが、後者の障壁はタンパク質の種類によらず、一般的な膜タンパク質の挙動に影響を与える一般的な構造である。おそらく、軸索伸長過程ではこれら2つのプロセスが連続して起こり、特定の分子の区画特異的配置が達成されるのであろう。

このようにして生じた区画は神経発生だけでなく、神経回路の機能にも寄与しているかもしれない。ショウジョウバエの胚中枢神経系の神経細胞の多くは1本の突起のみを有しており、その近位部が樹状突起型区画(dendritic compartment)として入力を受け、遠位部が軸索区画(axonal compartment)として出力を受け持つ。培養下で単離された状態でも、多くの神経細胞ではシナプスマーカーの発現は軸索の区画と良い相関を示した(図8)。われわれが見いだした細胞自律的な区画形成がこのような機能的な区画の基盤を作っている可能性も高い。

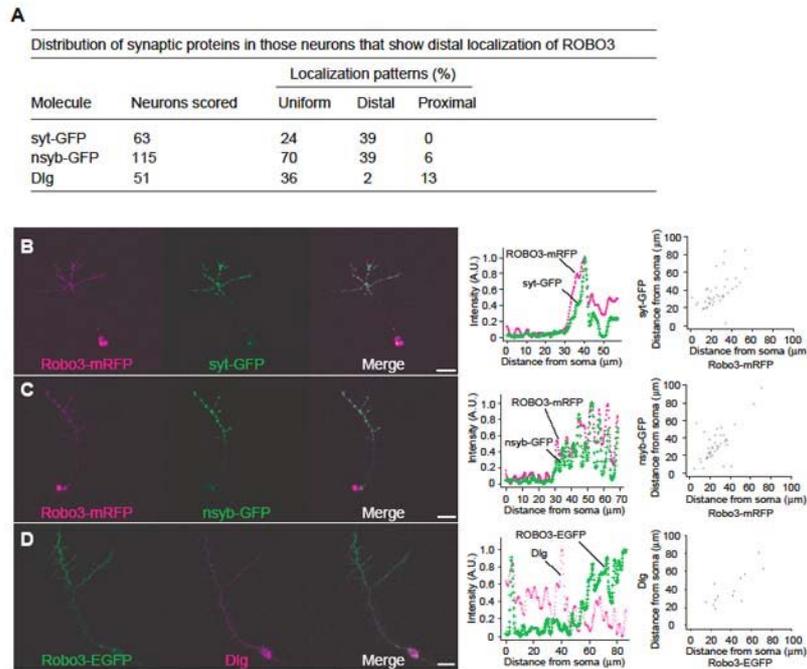


図8 初代培養下のショウジョウバエ神経細胞におけるシナプスタンパク質の局在
 ROB03 融合タンパク質が軸索遠位部に局在している細胞におけるシナプスタンパク質の分布。
 (B-D) 初代培養した神経細胞におけるシナプスタンパク質局在の例。左側のグラフは分子の局在
 強度。右側のグラフでは ROB03 融合タンパク質の局在境界とシナプスタンパク質の局在境界の比
 較。

3.1.2 膜タンパク質の軸索内局在における糖鎖の関与(遺伝研グループ)

細胞表面のタンパク質の多くは糖修飾を受けており、それによって細胞間相互作用やタンパク質のソーティングが調節されている。「膜タンパク質がどのようにして軸索内の区画に配置されるか」という問題を解析する一つの方法として、我々は膜タンパク質の軸索内区画への局在と糖修飾との関連を解析した。様々な糖鎖を認識する20種類のレクチンを用いてショウジョウバエの初代培養系の神経細胞を染色したところ、あるレクチンが軸索の近位部、あるいは中間部を強く染めることが判明した(図9)。このパターンは糖鎖エピトープを持つと考えられているモノクローン抗体 BP102 と同一の染色パターンであった。このレクチンと BP102 はどちらもショウジョウバエの神経系では梯子状軸索束を染め、Western ブロット解析では 75kD と 100kD の糖タンパク質を認識する。これらの結果は、特定の糖修飾が軸索内区画特異的な配置に関与している可能性を示唆している。

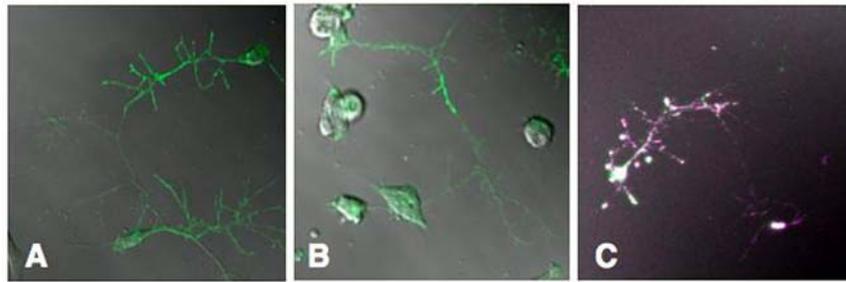


図9 レクチンによるショウジョウバエ初代培養神経細胞の染色

このレクチンは軸索の近位部 (A) や中間部 (B) の区画を強く染める. この染色パターンはモノクローン抗体 BP102 による染色パターンと一致する (C, 緑: レクチン, マジェンタ: BP102 染色)

3.1.3 脊椎動物における軸索内パターンニング(遺伝研グループ)

生体内において軸索内の特定の領域に膜タンパク質が局在する現象はショウジョウバエに限らず, 脊椎動物においても広く見られる. 多くの場合, 軸索内局在は軸索走行経路と相関がある. たとえば, 脊髄の背側に細胞体を持つ交連神経の軸索は, 腹側正中線(底板)に到達するまでの領域では膜タンパク質 TAG1 が局在しており, その後頭部方向に伸びる経路では膜タンパク質 L1 が局在している(図1A). このような事例は軸索内局在と軸索走行経路との間に何らかの因果関係がある可能性を示唆している. ショウジョウバエの神経細胞においては, ROBO ファミリーや Derailed のような特定の膜タンパク質が細胞自律的にそれぞれ軸索の遠位部, 近位部に局在する(3.1.1 参照). しかし, 高度の多様性を持つ脊椎動物の神経系はどのような軸索内局在パターンを持ちうるのかという問題は全く解析されていない. われわれは「軸索内パターンニング」という観点から様々な膜タンパク質の生体内での軸索内局在様式を解析した.

実験系として脊髄の交連神経と脊髄後根神経節を取り上げた. 交連神経で軸索遠位部に発現する膜タンパク質として新たに Semaphorin 受容体 Plexin-A1, Plexin-A4, Neuropilin-2 を同定した. これらの膜タンパク質はいずれも脊髄後根神経節神経でも発現していたが, その局在様式は交連神経とは必ずしも同一ではなかった. たとえば, Neuropilin-2 は交連神経では軸索遠位部に局在するが, 脊髄後根神経節の神経細胞では軸索近位部に局在していた(図10). この結果は軸索内パターンの特異性はタンパク質の一次構造のみによって決まるものではなく, 細胞の個性と関連した予想外の複雑性を秘めていることを示唆している.

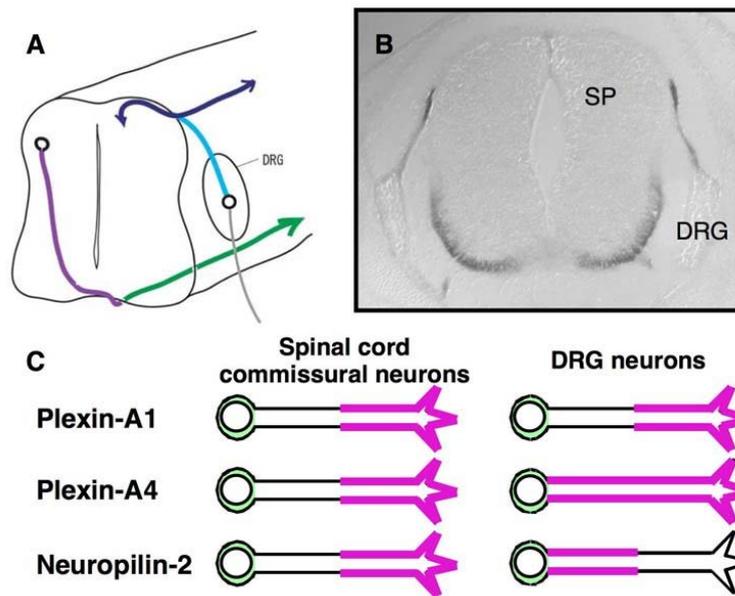


図 10 脊椎動物における軸索内パターンニング

(A): 脊髄の交連神経(左)と脊髄後根神経節神経(右)の軸索走行パターン. (B): Neuropilin-2 タンパク質の発現パターン. (C): 脊髄交連神経と脊髄後根神経節神経における膜タンパク質の局在パターン.

3.1.4 樹状突起内パターンニング(遺伝研グループ)

軸索内の分子局在が神経系内の位置情報を与えるのと同様に、樹状突起も神経回路形成情報の重要な担い手となりうる。たとえば、神経系の多くの部位では軸索は標的細胞が作る受容野の特定の領域、あるいは「層」にのみ投射する。このような現象は、樹状突起やその一部への分子局在、すなわち「樹状突起内パターンニング」によって制御されている可能性がある(図11 A)。われわれは樹状突起内パターンニングが神経回路形成に関与している可能性のあるプロセスとして、海馬への層特異的投射を取り上げた。

海馬 CA3 野は錐体細胞によって作られるが、ここには歯状回顆粒細胞、嗅内野細胞など様々な領域からの軸索がそれぞれ特異的な層に投射する。たとえば、歯状由来の苔状線維は錐体細胞の頂上樹状突起と基底樹状突起の細胞体近位部に特異的に投射する(図11B)。苔状線維の層特異的な投射に必要な遺伝子の内、標的細胞側で働く遺伝子に Semaphorin 受容体をコードする plexin-A2 がある。plexin-A2 ノックアウトマウスでは苔状線維が頂上樹状突起に投射できず、基底樹状突起に投射する(図11C)。われわれは plexin-A2 タンパク質が CA3 野中で苔状線維が投射する層に最も強く発現していることを見いだした(図11D)。分散培養で単離された錐体細胞では、plexin-A2 タンパク質は頂上樹状突起と基底樹状突起に強く発現しており、軸索には見られなかった(図11E)。一方、苔状線維に反発因子として機能する plexin-A2 のリガンド Semaphorin6A は、CA3 野の樹状突起領域に分布していた。これらの結果は、標的細

胞における plexin-A2 の樹状突起局在が Semaphorin6A の軸索反発活性を中和することによって苔状線維の投射を制御していることを示唆している (Suto *et al.*, *Neuron* 53, 535-547, 2007: 名古屋大などとの共同研究).

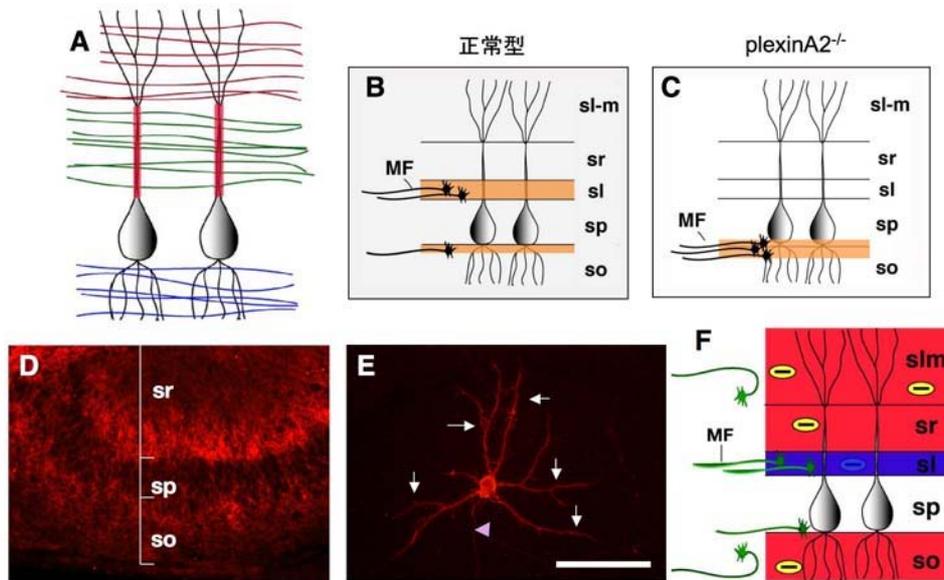


図 11 樹状突起内パターンニングによる神経回路形成モデル

(A): 樹状突起の特定の区画に分子局在があれば、海馬に観られるような軸索の層特異的投射の位置情報となりうる。(B): 海馬 CA3 野では錐体細胞の樹状突起が作る受容野に様々な神経軸索が層状に投射する。たとえば、歯状回由来の苔状線維は錐体細胞の頂上樹状突起と基底樹状突起の細胞体近位部に特異的に投射する。(C): plexinA2 変異系統では苔状線維が頂上樹状突起に投射できない。(D): PlexinA2 タンパク質は CA3 野の中で苔状線維が投射する層に最も強く発現している。(E): 錐体細胞において PlexinA2 タンパク質は細胞自律的に樹状突起(矢印)に局在し、軸索(矢頭)には分布しない。(F): 苔状線維の層特異的投射のモデル。PlexinA2 の錐体細胞の樹状突起内分布が苔状線維に対する反撥活性を中和し、層特異的投射の位置情報を作る。

3.1.5 線虫を使った Netrin 受容体の細胞内輸送の遺伝解析(横浜市大グループ)

軸索ガイダンス受容体の細胞内局在は、その細胞の軸索ガイド機能や神経系内の位置情報提供などに重要な役割を果たす。しかし、細胞内局在の分子機構、特に局在分子に trans に働く因子はほとんど知られていない。我々は線虫 *C. elegans* を用い、進化的に保存された軸索ガイダンス受容体である UNC-5 の細胞内局在に必要な遺伝子を検索した。その結果、*unc-51* 変異体と *unc-14* 変異体において UNC-5 タンパク質が神経細胞の細胞体に蓄積することを見いだした。*unc-51*, *unc-14* 変異体は、DD/VD 神経の軸索ガイダンスに関して、受容体をコードする *unc-5* やそのリガンド Netrin をコードする *unc-6* の変異体と遺伝的に相互作用した。また、UNC-5, UNC51, UNC-14 タンパク質は神経細胞の細胞質に共局在していた。*unc-51*, *unc-14* 変異体では UNC-5 以外の軸索ガイダンス受容体の細胞内分布には異常はなかった。これらの

結果は、UNC-51 と UNC-14 が UNC-5 の細胞内局在を特異的に制御していることを示す (図12).

UNC-51 は酵母のオートファジーに必要な APG1 に相同なセリン/スレオニンキナーゼであり、その結合分子である UNC-14 は Rab, Rap 等の GTPase のシグナリングに重要と考えられる RUN ドメインを有する分子である. しかしながら、軸索ガイダンスにおけるそれらの分子機能はほとんど知られていない. われわれは、protein phosphatase 2A (PP2A) の触媒サブユニットである LET-92/PP2A-C が UNC-51 と物理的に相互作用すること、および、*let-92/PP2A-C* 変異体のヘテロ接合体が、*unc-51* 変異体の軸索ガイダンス異常の表現型を部分的に抑制すること、また、ヘテロ接合体の PAA-1 (PP2A の調節サブユニット A, PP2A-A) あるいは、SUR-6 (PP2A の調節サブユニット B, PP2A-B) が *unc-51* 変異体の表現型を増強することを見出した. UNC-51 によるリン酸化活性と PP2A による脱リン酸化活性のバランスが、軸索ガイダンスにおいて重要な役割を演じていると考えられる.

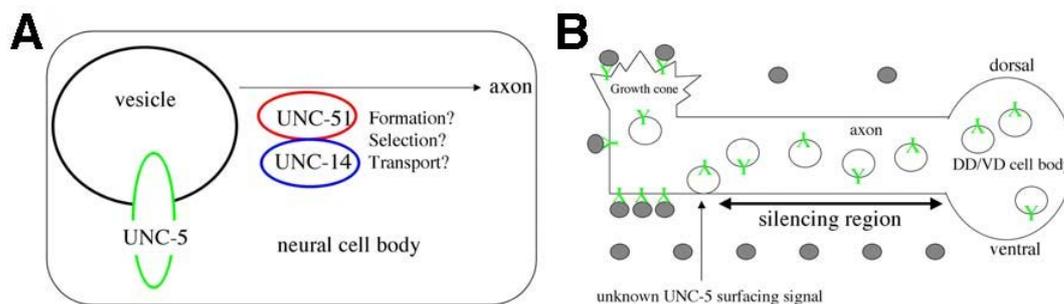


図 12 UNC-5 タンパク質局在における UNC-51 と UNC-14 の機能

(A): UNC-51 と UNC-14 は UNC-5 タンパク質を含む小胞の形成、選別、あるいは輸送に関与している. (B): UNC-5 サイレンシングモデル. UNC-5 を発現する DD/VD ニューロンでは腹側を前方に伸びる軸索の近位部はリガンドである Netrin に反応性を示さないため UNC-5 受容体はサイレンシングされていると考えられている. UNC-5 小胞は成長円錐や軸索遠位部で何らかのシグナルを受け取り、UNC-5 を膜表面に配置させると考えられる. (図は Ogura et al., *Development* 133, 3441-3450, 2007 より転載)

(2) 研究成果の今後期待される効果

われわれが本プロジェクトで達成した最大の成果は「軸索内パターンニング」という新しい細胞生物学的現象の発見である. 軸索内の特定の領域に分子が局在していることはマウス、ニワトリ、バツタ、ショウジョウバエ等様々な系で知られており、器官構築に寄与する普遍的現象であると考えられている. しかし、これまでこれらの分子局在は細胞間相互作用の「結果」であると考えられており、個々の細胞が持つ基本的特性だという認識はなかった. われわれが見いだした細胞自律的な膜の区画化は、その機構の解析を通じて「軸索内パターンニング」という新しい分野を拓く

だろう。今後は「特定の膜タンパク質はいかにして特定の区画に配置されるか」と「膜上の拡散障壁の実体は何か」という二つの問題が大きな課題となるだろう。アルツハイマーなどの神経変性疾患においても細胞内の分子分布が異常になることが知られているので、突起内の分子局在の機構解明が病態理解に直接つながる可能性も高い。

3.2 細胞内パターンニングによる神経回路形成

(1) 研究実施内容及び成果

3.2.1 軸索内パターンニングに基づく軸索ガイダンス(遺伝研グループ)

神経細胞が標的に向かって突起を伸ばす現象(軸索ガイダンス)は、「誘因あるいは反撥分子の『濃度勾配』に従って軸索を伸ばす」という化学走性仮説で説明されてきた。軸索走行に影響を及ぼす分泌タンパク質もいくつか同定されている。しかし、これらのタンパク質の濃度勾配が観察された例はない。われわれは、誘因性の軸索ガイド分子として考えられている分泌タンパク質 Netrin が「受容体の軸索内局在」という軸索内パターンニングに基づくメカニズムによって、濃度勾配とは異なるパターンに再配置されることを発見した(Hiramoto *et. al*, 2000)。そこで、反撥シグナルと考えられている Slit に関してその作用機構を再検討した。Slit の受容体 ROBO の変異体では、本来前後方向に伸びる縦走軸索が正中線に向かって間違っただ筋をたどる。ショウジョウバエ胚で Slit の異所的発現実験を行った結果、この ROBO の作用には Slit が濃度勾配を形成することは不必要であることが明らかになった(図13B)。これは、長距離作用を呈す反撥因子 Slit についても、化学走性仮説に基づく考え(図13A)が間違っていることを示している。ROBO は、縦走軸索が体節モジュールの境界に近づいたときに軸索先端の成長円錐で発現し、軸索を正中線へと誘導する Netrin 信号を無効化していることも明らかになった(図13C)(Hiramoto and Hiromi, *Nature Neuroscience* 9, 58-66, 2006)。

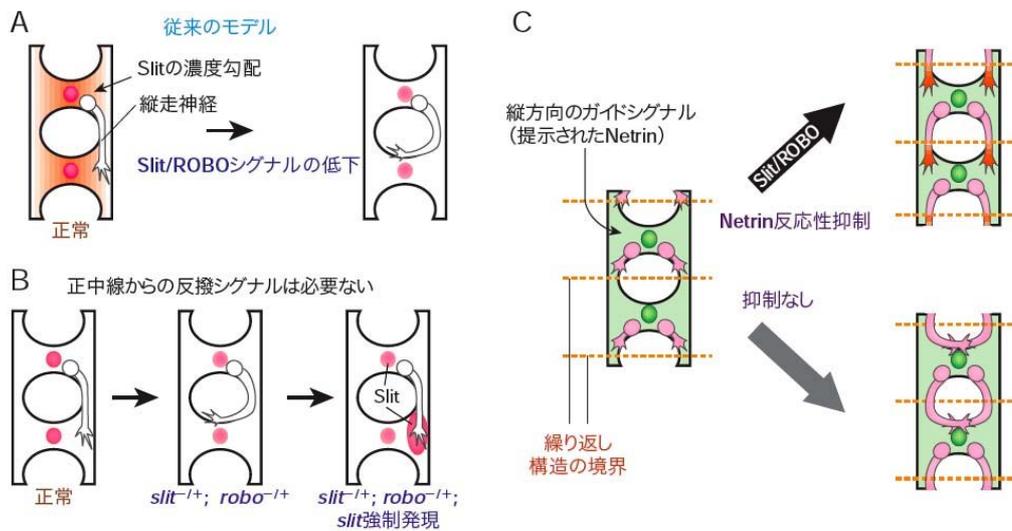


図 13 反撥性軸索ガイド因子 Slit の新しい作用機構モデル

A: 従来の考え方. Slit は正中線を頂点とする濃度勾配を作り, 縦走軸索はそれに対する反撥場を受容して正中線から離れたところを走行する. B: 正中線からの反撥シグナルを否定する実験結果. Slit シグナル低下による異所的正中線交差を回復させるには Slit を正中線から遠いところで発現させてもよい. C: Slit シグナルの新しい作用機構モデル. 縦走軸索は軸索状に提示された Netrin に対する接触屈性で縦走経路を開始する. Slit の働きはその受容体 ROBO の活性化を通じ, Netrin に対する反応性を失わせることである. ROBO の変異体では Netrin に対する反応性抑制が起こらないため, 次の体節において縦走軸索は提示された Netrin に添って正中線方向に道を間違ってしまう. (図は平本正輝ら: 細胞工学 26, 1147-1152, 2007 より転載)

3.2.2 Unc5 による Netrin の脱局在作用と反撥性軸索ガイダンス(遺伝研グループ)

軸索内の分子の局在の意義として最も理解が進んでいるのは, 軸索ガイド分子 Netrin の受容体による再配置と提示である. Frazzled は「誘引性」の Netrin 受容体であり, Netrin と結合して横行神経を正中線方向に誘導した後に, Netrin の分布を変えて引き続いて起こる縦走神経形成のために新しいガイド情報を作る (Hiramoto *et al.*, 2000). Netrin の受容体には「反撥性」の受容体として働く UNC5 もあり, 末梢に伸びる運動ニューロンにおいて軸索内局在をしている(図14B). われわれは, この「反撥性」の受容体がリガンドに対してどのような作用を持つかを解析した. Frazzled とは異なり, Unc5 には Netrin を提示する活性は持たなかった. 逆に, Unc5 は Frazzled によって Netrin が軸索東上に提示される事を抑制すること, この「提示」対「提示抑制」という活性の違いは細胞外領域で決まることを見いだした(図14C). Unc5 変異系統では運動ニューロンの道筋に Netrin が異所的に提示されており, そのためにこの道筋を通る他の神経軸索の走行に異常が生じた. これらの結果から, 軸索ガイド受容体はそのリガンドに対する応答性(誘引 vs. 反撥)に対応したリガンドの分布調節能力(提示 vs. 提示抑制)を持つことが明らかになった. 受容体のリガンドの分布調節能力がリガンドに対する応答性と調和がとれていることが, 多くの軸索が束になって同じ経路をたどる, という現象に寄与していると考えられる.

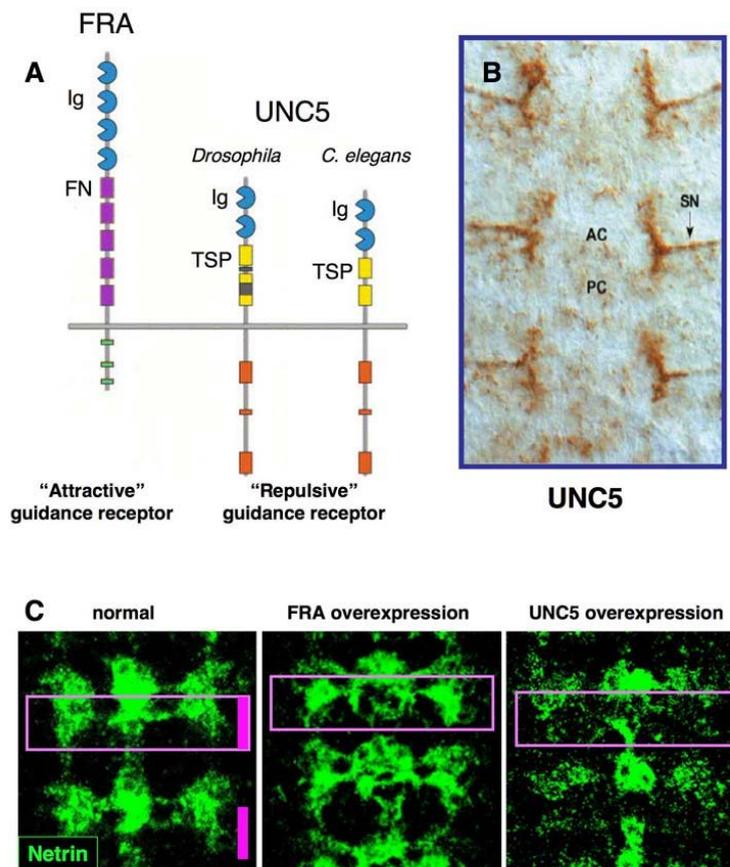


図 14 反撥性 Netrin 受容体 UNC5 による Netrin 提示抑制

(A): Netrin 受容体には「誘因性」の受容体 FRA (Frazzled, マウスホモログは DCC 線虫ホモログは UNC40)と「反撥性」受容体の UNC5 がある. (B): ショウジョウバエ肺中枢神経系では UNC5 は中枢神経系から外側に伸びる軸索束に局在している. (C): FRA は Netrin 提示能力があるが, UNC5 は FRA による Netrin 提示を抑制する.

3. 2. 3 局所的 caspase 活性による樹状突起のプルーニング(遺伝研グループ, 東大グループ)

細胞内パターンニングによって作られた細胞内の領域特異性は, 局所的な生理変化, つまり細胞内の限られた場所で様々なタンパク質修飾反応や切断反応を引き起こすことにより, 細胞の運命決定, 形態変化, 分裂といった組織構築の細胞現象を制御する. したがって, 細胞内パターンニングによる組織構築の理解には, このような分子反応を可視化する技術が不可欠である. そこで, 細胞死をはじめ器官形成過程における様々な細胞現象に関与しているタンパク質切断酵素 caspase を取り上げ, その活性の生体内でのモニタリングや細胞内局在が検出できるプローブを開発した.

caspase 活性による切断反応を検出するプローブとしては既に FRET (蛍光共鳴エネルギー転移)を利用したものが存在する. しかし, FRET の検出は特殊な装置を必要とするため, われわれは通常の共焦点顕微鏡で caspase 活性が観察できる新しい蛍光プローブを作成した. このプロ

ープは YFP と RFP を caspase 切断配列 (DEVD) を含むリンカーで接続し、両末端に別々の細胞内局在シグナルを付加した融合タンパク質である (図 15A)。切断前は YFP と RFP は共局在するが、caspase によって融合タンパクが切断されると、YFP と RFP が個別の細胞内局在を示すようになる。このプローブを導入したショウジョウバエの培養細胞およびトランスジェニック系統を用い、アポトーシスの際に活性化される内在性 caspase 活性の経時観察に成功した (図 15B,C)。また、caspase による切断面に対する抗体反応を利用し、空間的分解能を更に上げて細胞内の caspase 活性の局在が観察できるプローブも開発した (図 16A)。

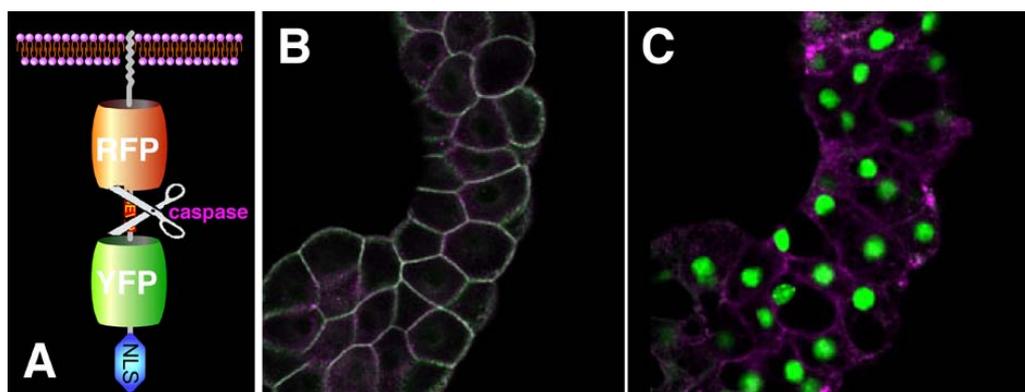


図 15 caspase 活性の生体内観察

A: caspase 活性検出プローブの模式図。膜局在シグナルを持つ RFP と核移行シグナルを持つ YFP が caspase 切断配列 DEVD でつながれている。B, C: ショウジョウバエ 3 令幼虫唾腺における caspase 活性のモニタリング。RFP シグナルをマゼンタ、YFP シグナルを緑で表示。切断前はこの融合分子は膜に局在するので、細胞膜が白く (マゼンタ+緑) みえる。エクダイソンを投与して細胞死を誘導すると、caspase がプローブを切断し、RFP と YFP のシグナルが細胞膜と核に分離する。

細胞内の局在した caspase 活性によって制御される可能性がある細胞現象の一つとして樹状突起のプルーニング (刈り込み) を取り上げた。プルーニングは神経突起の内の一部のみを選択的に除去する、という現象である。ショウジョウバエの *ddaC* 感覚神経細胞は蛹期に神経細胞が幼虫型から成虫型へとリモデリングされる際に大規模な樹状突起のプルーニングを行う。このプルーニング過程では、細胞質の断片化、呑食作用による除去など、細胞死の過程で起こる現象と共通の現象が多く見られる。我々は細胞死の遂行を司る caspase が感覚神経細胞の樹状突起プルーニングにも必要であることを見いだした。caspase 活性のない細胞では樹状突起の細胞体からの分離は起こったが、その後の除去が起こらなかった。Caspase 活性のプローブを用いた観察により、caspase はプルーニングを受ける樹状突起で選択的に活性化され、軸索や細胞体では活性化されることが分かった (図 16B)。これらの結果は、局所的な caspase 活性化が樹状突起の選択的なプルーニングを支配していることを示している。(Williams *et al.*, *Nature*

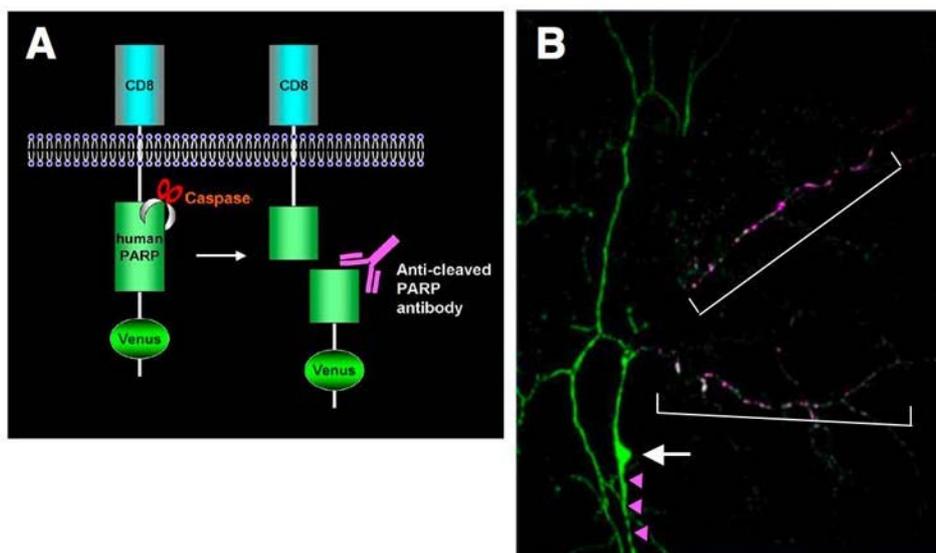


図 16 樹状突起内の局所的 caspase 活性による樹状突起のプルーニング

(A): 高い空間分解能で細胞内の caspase 活性を可視化するプローブ. Caspase によって切断された PARP (ヒト polyADPribose polymerase) の切断面を認識する抗体で検出する. (B): リモデリング期の ddaC 神経における樹状突起内の特異的 caspase 活性 (マジェンタ). Caspase 活性は軸索(矢頭)や細胞体(矢印)には見られない.

3. 2. 4 膜蛋白質 M6a によって規定される新しい軸索内膜区画と軸索伸長停止反応(遺伝研グループ・平田研究室)

神経細胞には分子局在の単位となるようないくつかの「区画」が存在する. たとえば, 細胞体, 軸索, 樹状突起といった構造はそれぞれ機能的に分化した区画であり, 軸索の中にも initial segment や成長円錐といった特異的分子を集積して特定の機能を発揮する領域がある. 成長円錐自体も糸状仮足や葉状仮足といった膜突起を伸ばして周囲の環境に含まれる軸索ガイド分子の情報を探索する. 新しい性質を持つ区画の同定は, 細胞の新たな機能の発見や, その区画を規定する「細胞内パターンニング」の機構解析にもつながりうる. われわれは, 神経軸索膜を抗原とするモノクローン抗体のスクリーニングを通じて神経細胞の新しい膜区画を見いだした.

モノクローナル抗体 1B4 を用いて培養下の神経細胞を抗体染色すると, 成長円錐から伸びる糸状仮足の先端や軸索の柄から伸びる微小な突起が染まる(図17A-C). この突起は蛍光スフィンゴミエリンでも良く染まり, 特殊な膜区画を構成すると考えられる. 成長円錐や軸索柄の骨格となっているアクチン繊維や微小管は, この膜管構造には含まれていなかった. 1B4 はリポフィリンファミリーに属する M6a タンパク質を特異的に認識していた. リポフィリンは親脂質性の4回膜貫通タンパク質であり, 脂質のマイクロドメイン形成や細胞膜内でのタンパク質間相互作用を介

してシグナル伝達に関与していることが提唱されているが、正確な細胞生物学的機能や発生過程での役割はわかっていない。

われわれは、培養下で軸索伸長している神経細胞に1B4抗体を投与すると成長円錐が形態を保ったままで盛んに運動するにもかかわらず軸索伸長が停止することを見いだした(図17D, E)。M6a 遺伝子を欠損させたマウスでは、軸索は1B4抗体に対する応答性を失ったが軸索伸長は活発だったので、1B4抗体はM6aを不活化したのではなく、M6a依存的シグナルの活性化を通じて軸索行動を変化させたと考えられる。1B4抗体投与下の細胞行動は、軸索が伸長経路選択の重要地点(decision regions)を通過する際の挙動と類似している。軸索はこのような「交差点」ともよぶべき状況判断が特に重要な場所では、速度をゆるめてゆっくりと伸長しながら成長円錐を複雑に広げ、これが正確な経路選択を保証すると考えられている。従って、decision regionsには細胞の行動を変化させるための何らかの「信号」があるはずだし、神経細胞は交差点にさしかかったことを知る「手段」を持っているはずである。M6aやそれが局在する膜管構造は「軸索伸長の一旦停止信号」を認識するセンサーである可能性が考えられる。

従来の軸索ガイダンスの研究では周囲の環境に含まれる軸索ガイド分子の情報を感知するのは成長円錐であると考えられおり、実際多くの軸索ガイド受容体は成長円錐の膜上に分布し、細胞骨格の制御を行っている。たとえば、反撥性ガイド分子は、成長円錐に含まれるアクチン線維を破壊し、成長円錐の運動はおろか、その構造もろとも消滅させることで、不適切な領域への軸索伸長を強力に阻害する。1B4抗体によって誘発される軸索反応は、細胞骨格のレベルでも反撥性ガイドシグナルとは異なる可能性が高い。今回われわれが発見した膜区画は、軸索伸長停止反応を引き起こすための新たな情報受容システムを構成するのかもしれない。

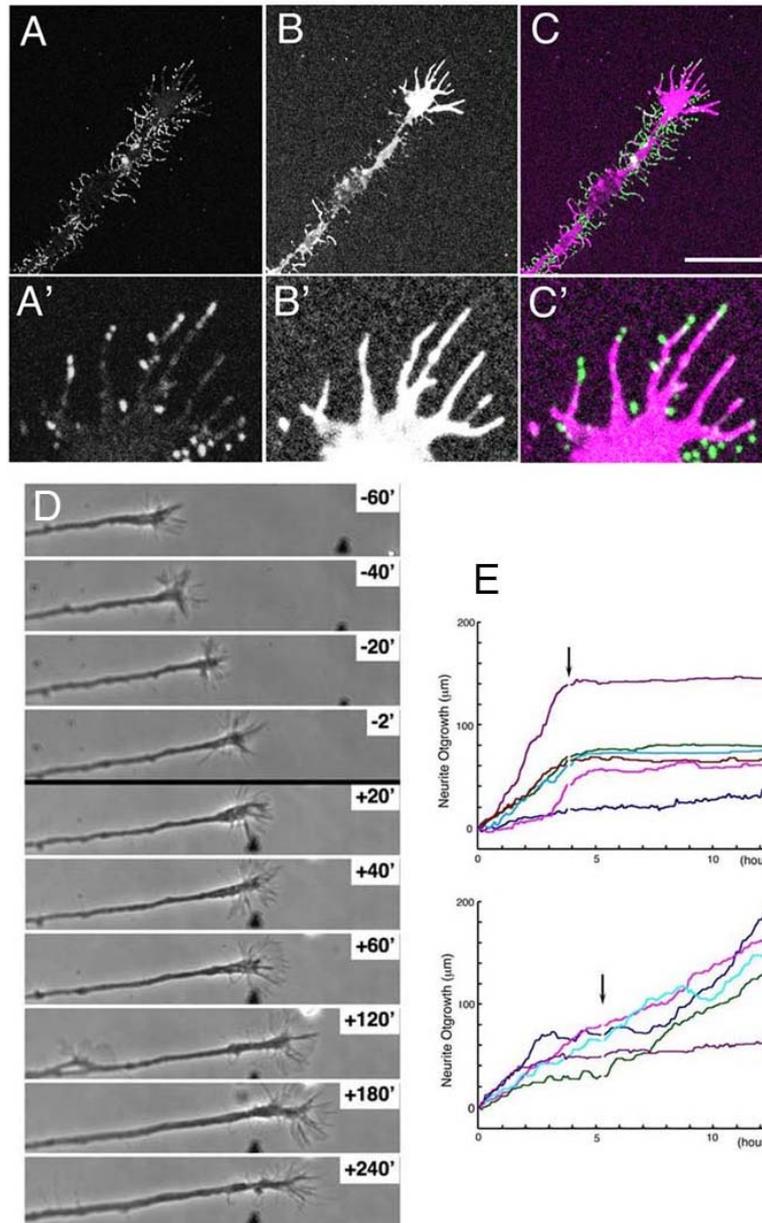


図 17 M6a によって規定される膜区画と軸索伸長停止反応

(A-C) リポフィリンファミリーのメンバーである M6a タンパク質の軸索内局在. (A, A') : M6a の軸索内局在. (B, B') : ファロイディンによるアクチン繊維染色. (C, C') : 重ね合わせ画像. (D) : 1B4 抗体によって引き起こされる軸索伸長停止行動. 抗体投与前 (-60'→2') に較べて投与後 (+20'→+240') では軸索伸長速度が著しく低下しているが, 成長円錐は広がったままである. (E) : 1B4 抗体 (上) とコントロールメディア (下) を投与したときの軸索伸長の時間経過. 矢印は投与時を示す.

3. 2. 5 細胞移動と軸索伸長のスイッチング(遺伝研グループ・平田研究室)

神経組織構築において神経細胞が行う重要な素過程に「細胞移動」と「突起伸長」がある. これらの細胞行動は, 「細胞体」と「神経突起」という二つの細胞内区画が行う行動が, 「共役して起こる」か「独立している」かで区別されるが, そのスイッチング機構については不明である

(図18). われわれは、細胞移動における細胞体とそこから伸びる突起との連携を調べることで、複数の細胞内区画の間の「協調」の機構を解析している。

誕生後に長距離の細胞移動を行う神経細胞の代表例として終脳の lot 細胞が挙げられる。lot 細胞は終脳新皮質で生まれた後、腹側に向かって接線方向に移動する。この行動は器官培養で再現でき、lot 細胞が移動方向に先導突起を伸ばしつつ動くことが観察できる。われわれは、この器官培養系に protein kinase 阻害剤である K252a を投与すると細胞体の動きが抑えられる一方で、先導突起の伸長は抑えられないという事を発見した(図18B)。伸長を続ける突起の一部は、目的地である予定嗅索領域に到達すると正常に 90 度回転できるので、細胞体の移動が阻害されても神経突起のガイダンスは正常に機能しうることがわかった。小脳顆粒細胞でも、K252a は先導突起の伸長を維持したまま細胞体の動きを抑えることが分かり、K252a のターゲットが多くの神経細胞において細胞体と軸索の行動の共役に重要な役割を果たしていることが示唆された。今回発見した現象は、細胞が移動から突起伸長への切り替えをする際の細胞内機構を探る重要な手がかりとなるだろう。

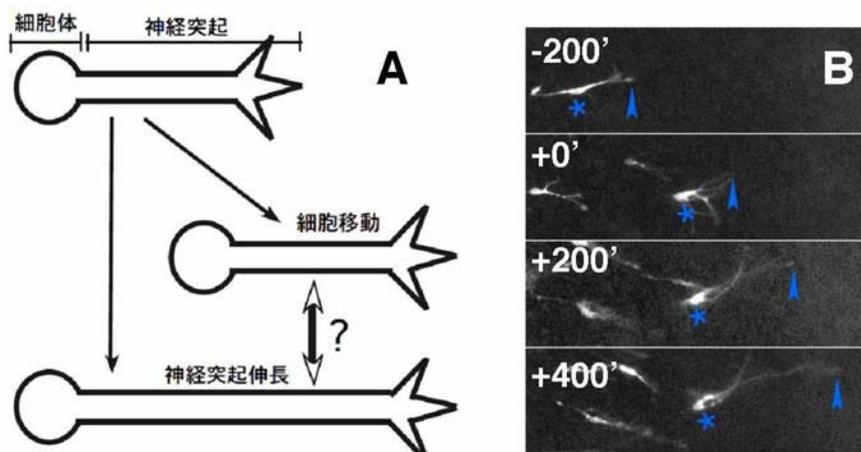


図 18 細胞移動と突起伸長のスイッチング

(A): 細胞移動と突起伸長の本質的な違いは、細胞体と神経突起の運動行動の共役の有無にある。多くの神経細胞では細胞移動に引き続いて突起伸長が起こるが、その切り替え機構は知られていない。(B): K252a による細胞体と神経突起の運動行動の共役阻害。K252a 投与後、突起 (arrowhead) は伸長するが細胞体 (asterisk) の運動は停止してしまう。

3. 2. 6 細胞内区画間のシグナル伝達(横浜市大グループ)

神経分化過程では、成長円錐、軸索、樹状突起といった神経細胞内の機能的「区画」が互いに情報伝達を行わねばならない。たとえば、軸索終末で検出された情報は逆行性シグナルによって細胞体方向に伝えられ、細胞死やシナプス成熟などの変化を引き起こす。これらの細胞内区画間の情報伝達がいかにして達成されているのかはよく分かっていない。われわれは海馬培

養神経細胞を用いて軸索ガイド因子 Semaphorin3A によって誘発される情報伝達の機構と意義を解析した。

海馬培養神経細胞の成長円錐に Semaphorin3A を局所的に投与すると、軸索および樹状突起内の輸送が亢進した。軸索、樹状突起における輸送のピークはそれぞれ Semaphorin3A 刺激後5分、15分であり、成長円錐に与えられた刺激が何らかの情報伝達機構により細胞体・樹状突起に伝搬し、樹状突起内の輸送亢進という効果が誘起されたと考えられた。一方、成長円錐への Semaphorin3A 投与後様々な時間で軸索を切断したところ、投与後1分で切断しても樹状突起の輸送亢進反応は正常に起こった。このことは、細胞内区画間のシグナル伝達には Ca^{++} 波や電気信号などの早い伝達機構によって担われている可能性を示唆する。実際、この反応はテトロドトキシン(TTX)によって完全に阻害されたので、 Na^{+} チャネル依存性の膜の脱分極が関与することが明らかになった。

Semaphorin3A によって亢進する樹状突起内の輸送によって何が運ばれるのかを同定するため、グルタミン酸受容体に着目した。Semaphorin3A 適用後の樹状突起では、GluR1 の量には差は見られなかったが、GluR2/3 の量(抗 GluR2/3 抗体反応性)が増加していた。また、Semaphorin3A 欠損マウス海馬では、GluR2/3 の量が低下していた。これらの結果から、成長円錐に与えられた Semaphorin3A は膜の脱分極を伴う早いシグナル伝達によって樹状突起に伝えられ、グルタミン酸受容体の量をサブタイプ特異的に制御する、という細胞内区画の間の逆行性シグナル伝達の全体像が明らかになった(図19)。

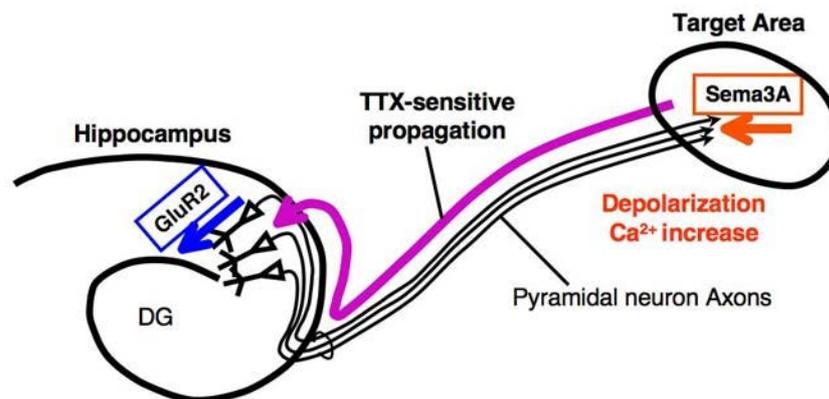


図 19 細胞内区画間のシグナル伝達

海馬 CA3 野の錐体細胞の軸索先端の成長円錐に Semaphorin3A (Sema3A) を投与すると、樹状突起において突起内輸送が亢進し、樹状突起におけるグルタミン酸受容体 GluR2 の量が増加する。この成長円錐→樹状突起という二つの細胞区画間のシグナル伝達は Na^{+} チャネルに依存し、刺激後1分以内に終了するきわめて早い応答である。

3. 2. 7 成長円錐における局所的タンパク質合成による軸索伸長の制御(横浜市大グループ)

軸索伸長や退縮といった神経細胞の巨視的行動には、細胞核、軸索、あるいはその先端の成長円錐といった様々な細胞内区画における遺伝情報の発現や制御が関わっている。軸索伸長の制御への関与が示唆されている機構の一つに局所的タンパク質合成がある。実際、細胞体や軸索柄だけでなく、成長円錐にも多くの種類の mRNA が存在する。しかし、成長円錐部での局所的タンパク質合成の生理的意義については不明な点が多く、タンパク質合成の「調節」が細胞内のどの部分で指令されているのかもわかっていない。われわれは、培養ニワトリ後根神経節細胞の NGF 刺激による突起伸長の系を利用して、成長円錐における局所的タンパク質合成の機構と意義を解析した。

細胞外環境に応じてタンパク質合成の調節を担う因子の候補はタンパク質翻訳伸長因子 eEF2 (eukaryotic elongation factor 2) である。eEF2 は Ca^{++} 依存性の特異的リン酸化酵素 EF2K によってリン酸化されることによって不活化され、PP2A によって脱リン酸化されることによって活性型となる。NGF 刺激によって突起伸長が促進されている条件下では、非リン酸化型 eEF2 が成長円錐部に豊富に分布していた。PP2A を薬理的に阻害すると脱リン酸化型 eEF2 が減少し、神経突起伸長は抑制された。この結果は突起伸長に脱リン酸化型 eEF2 依存的なタンパク質合成が必要であることを示している。一方、高濃度 KCl 刺激によって細胞内カルシウム濃度を上昇させるとリン酸化型 eEF2 が成長円錐内で増加すると共に、EF2K の抑制因子 S6K と eEF2 自体が減少し、同様に神経突起伸長が抑制された(図20)。同様の現象は、細胞外 ATP 刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇によっても観察されたので、細胞死などによって細胞内 ATP が細胞外に多量に放出された場所に、細胞内 Ca^{++} 上昇を介してタンパク質合成を抑制することによって軸索投射が起こらないようにするメカニズムが存在すると考えられる。(Iizuka *et al.*, 2007)

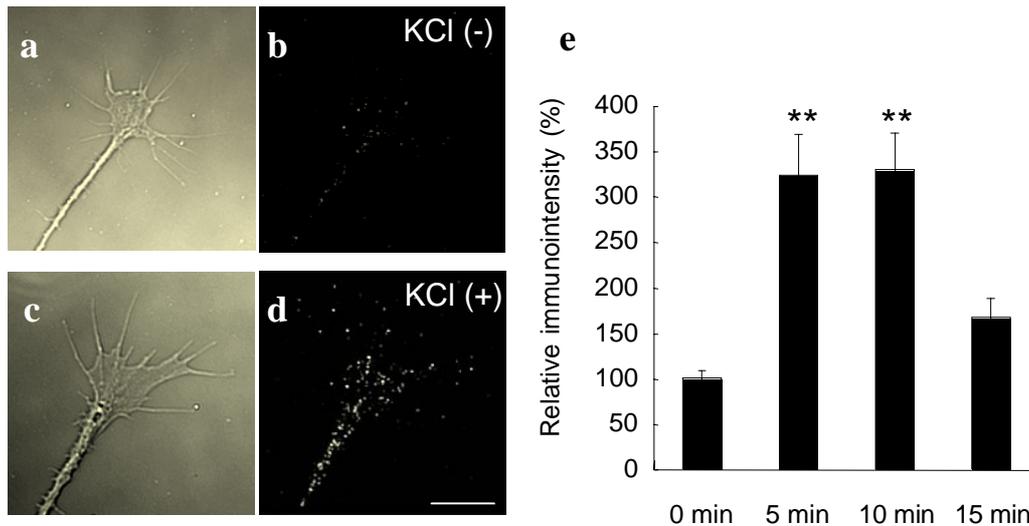


図20 鶏卵胚培養 DRG 細胞の成長円錐における高濃度 KCl 刺激による eEF2 のリン酸化亢進 (a, b) NGF 刺激によって伸長する成長円錐部のリン酸化 eEF2 の分布. 伸長中の成長円錐部にはリン酸化 eEF2 の分布は非常に低い. (c, d) 高濃度 KCl (30 mM) 刺激によって成長円錐部のリン酸化 eEF2 の分布は増加する. (e) 高濃度 KCl 刺激による成長円錐部のリン酸化 eEF2 分布量の経時的変化. 刺激前 (0 分) の抗リン酸化 eEF2 抗体による成長円錐全体の蛍光強度を 100% とした相対値で示す. 刺激後 5 分および 10 分でリン酸化 eEF2 が増加する. (Iizuka *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 353:244, 2007 より)

タンパク質合成の eEF2 による制御が必要とされている神経細胞内の区画を同定するために、レーザー分子不活性化法 (CALI 法) を用いて局所的機能破壊実験を行った. eEF2 を成長円錐でのみ急性的に機能阻害したところ、NGF 刺激によって誘導された神経突起伸長は一過性に阻害された. また EF2K を成長円錐で局所的に不活性化すると、ATP 刺激による神経突起伸張阻害は起こらなくなった (図21). この結果は、eEF2 活性調節を介して突起伸長を制御している場所は、成長円錐という特異的細胞内区画であることを示している. 成長円錐で eEF2 機能を破壊しても成長円錐の糸状仮足や葉状仮足の形態や運動性には影響が認められなかったため、成長円錐部における局所タンパク質合成系は突起伸長に直接的に寄与する微小管重合に関連するタンパク質を新生すると考えられる.

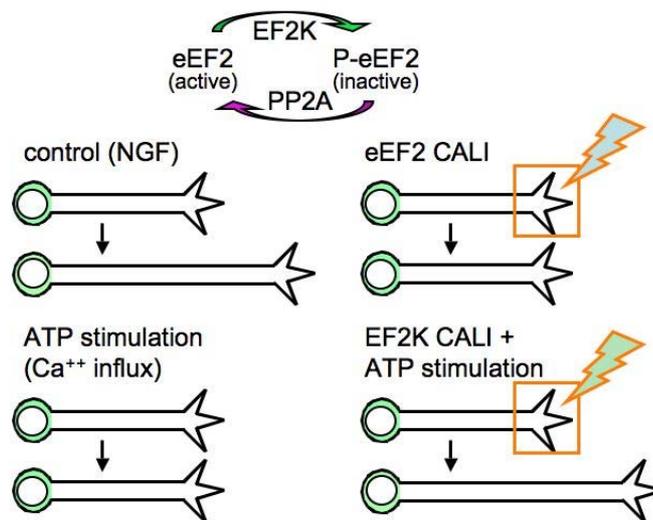


図 21 成長円錐におけるタンパク質翻訳伸長因子の役割

タンパク質翻訳伸長因子 eEF2 は Ca^{++} 依存性リン酸化酵素 EF2K によって不活化され、脱リン酸化酵素 PP2A によって活性化される。成長円錐特異的に eEF2 を破壊すると突起伸張は阻害される。ATP 刺激などで細胞内 Ca^{++} を上昇させると EF2K によるリン酸化で eEF2 が不活化されて突起伸張は抑制される。この阻害は成長円錐にある EF2K を局所的に破壊しておくことと起こらない。

3.2.8 軸索側枝形成のプロテオーム解析(遺伝研グループ, 平田研究室)

軸索内の位置情報を用いて行われることが予想される細胞現象の一つは、軸索の側枝の形成である。そこで、発生過程の特定の時期にのみ側枝を伸ばす性質のあるマウス嗅球投射ニューロンを用い、側枝形成期に軸索内でおこる劇的な構造の再構成に関与する分子を網羅的同定を行った。二次元電気泳動を用いて側枝形成前後の嗅索軸索におけるタンパク質発現の比較を行ったところ、側枝形成が起こる前と開始後のステージで発現量に差があるタンパク質のスポットが得られた。この中には微小管と Ca 関連タンパク質が多く含まれていた(図22)。これらのタンパク質が軸索側枝形成に関わっている可能性が考えられる。

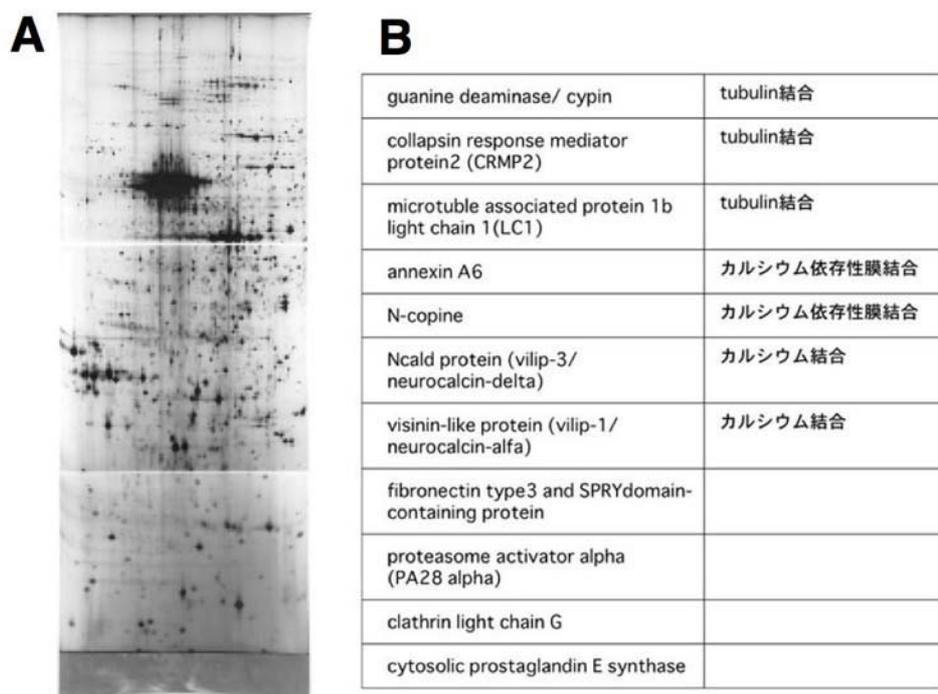


図 22

(A): 側枝形成後の嗅索軸索におけるタンパク質の2次元電気泳動図(部分). (B): 側枝形成後に増加することが同定されたタンパク質.

(2) 研究成果の今後期待される効果

われわれは神経突起内の分子分布が関与している発生プロセスをいくつか取り上げ、その意義を解析した。むしろ個別研究としての重要性もあるが、本プロジェクトの価値は、組織構築に「細胞内パターンニング」という新しい視点を導入したことだろう。新しい膜区画の発見(3.2.4)、細胞内区画間の共役制御(3.2.5)やシグナル伝達(3.2.6)など、既存の「言語」とは異なる説明の仕方をするすることで、新たな意義が生まれると共に、将来の発展の方向性にも新規な角度が期待できる。神経細胞以外の細胞にも長い細胞突起を持つものは多いので、われわれのアプローチの成功は他の発生研究の将来のアプローチにも影響を与えると期待できる。

3.3 時空間分解能を有する簡便な選択的分子不活化法の開発と適用

(1) 研究実施内容及び成果

3.3.1 簡便な光照射分子不活性化技術(SELT-FALI法)の開発と適用(横浜市大グループ)

興味ある分子の機能を任意の時間から連続的に不活化する事ができれば、発生現象などにおける強力な分子機能解析法になる。われわれは FITC 色素を標識した抗体を光励起することによって培養中の細胞や組織に発現する分子を任意の時間で不活化する方法(Fluorophore-assisted light inactivation: FALI)の確立と発生現象における分子機能解析法としての適用を試

みた. FALI 技術とは, FITC 色素を標識した標的分子に対する特異抗体が抗原分子と結合した状態で青色光照射を受けると, 光励起された FITC 色素から一重項酸素が産生され, そのラジカルの影響で抗原分子の構造変化によって機能的に不活性化するというものである(図23).

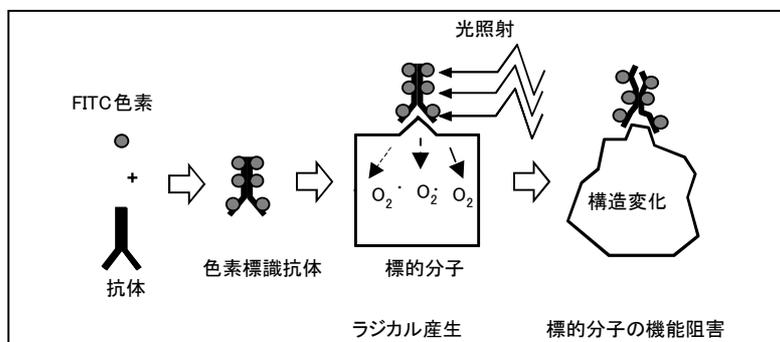


図 23 FALI 法の原理

FITC 色素標識した抗体が標的分子と結合した状態で光照射を受けると FITC 色素から一重項酸素が産生し, 標的分子の構造変化を誘起して機能的に不活性化する.

反発性の軸索ガイダンス分子 Semaphorin3F(Sema3F)の受容体である Neuropilin2(Nrp2)に対する抗体を用い, COS 細胞に発現させた Nrp2 と Sema3F との結合能を指標に, Nrp2 に対する FALI(Nrp2-FALI)を行って検討した. 最初に, 今迄用いられてきたレーザー光を用いず, 通常の白熱光や微弱な青色光を用いて分子不活性化を誘起する簡便法の確立を検討したところ, 白熱光や白色冷光による青色光を照射することで FITC 標識抗 Nrp2 抗体を介して Nrp2 の機能阻害を誘起し, Nrp2 と Sema3F の結合を阻害することに成功した. この FALI 効果は光照射量依存的で, 2000Lux の青色光を最短 15 分間照射することでほぼ 100%の阻害効果をもたらした. そこで, 神経細胞の初代培養系で FALI 効果を検討したところ, Nrp2-FALI は Sema3F が引き起こす交感神経節細胞の成長円錐崩壊反応と神経突起忌避反応の双方を有意に阻害した. 更に, 終脳の器官培養系においても微弱青色光の 24 時間連続照射による Nrp2-FALI は Nrp2 と Sema3F の結合を有意に阻害した. 以上から, 微弱青色光照射によって長時間に渡って標的分子を阻害できる簡便型光照射分子不活性化技術 SELT-FALI 法 (Simple, Easy and Long-Term FALI) が確立できた(図24).

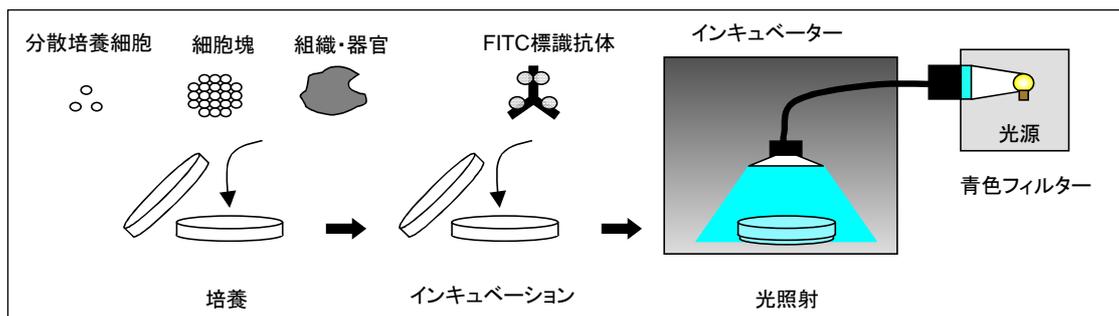


図 24 SELT-FALI 法の概略

培養皿内で通常の方法で細胞，細胞塊，組織を培養し，FITC 標識した特異抗体を添加してインキュベーションする．その後，不活性化したい時間にインキュベーター内に外部から光ファイバー経由で設置した照明装置で微弱な青色光を照射する．対照実験として，FITC 標識していない特異抗体または FITC 標識した非特異的 IgG を用いて同様に光照射する．

嗅索神経束 (lateral olfactory tract: LOT) の形成に係る新たな機能分子を探索する目的で，LOT を免疫源としてモノクローナル抗体を作製し，LOT の細胞表面分子を認識する種々の抗体を用いて機能的スクリーニングを行った．マウス胎仔の終脳器官培養系において 24 時間光照射 SELT-FALI 実験を行ったところ，H24G11 抗体による FALI は LOT の形成異常を引き起こし，この抗体が認識する抗原分子が LOT 形成に重要な分子であることが示された．H24G11 抗原分子を同定したところ，今迄報告されたことのない新規の軸索ガイダンス関連分子であった．われわれはこの分子を仮に LOT usher substance (Lotus) と命名し，現在，Lotus の細胞機能や LOT 形成に係る分子機構を詳しく検討している (竹居ら，特許出願，2007)．このように，SELT-FALI 法は各培養系における分子機能解析法として有効であり，特に器官培養系においては比較的長時間に渡る発現現象の分子機構を探る新たな研究手段として有用であると期待される．

(2) 研究成果の今後期待される効果

今回開発した SELT-FALI 法は特別な光照射装置を必要とせず，誰でもどこでも簡単に適用可能である．細胞や組織表面に発現する分子に対する機能阻害法として有用であろう．現法では特定時期に光照射することで時間分解能を持って解析に供することが可能である．今後はピンホールによって光照射領域を限定するなどのハードウェア的改良を行うことで空間分解能も有する方法に発展するさせることも可能で，当初の目的であった時空間的制御が可能な機能阻害実験系が近未来的に確立できるものと期待される．ポストシーケンス時代の分子の生物学的機能解析法として有用であると共に，細胞内パターンや細胞極性といった細胞局所の分子機能の解析にも有用である．

4 研究参加者

①遺伝研グループ

氏名	所属	役職(身分)	研究項目	研究参加期間
広海 健	国立遺伝学研究所	教授	研究の統括	2002. 11. -
平田たつみ	国立遺伝学研究所	准教授	軸索内局在蛋白質の同定	2002. 11. -
川崎能彦	国立遺伝学研究所	助教	軸索内局在蛋白質の同定	2002. 11. -
浅岡美穂	国立遺伝学研究所	助教	細胞内パターンニングの意義	2003. 4. -
湯浅喜博	国立遺伝学研究所	受託研究員	細胞内パターンニングの意義	2002. 11. -
岩波将輝	国立遺伝学研究所	大学院生	細胞内パターンニングの意義	2002. 11. -2004. 3
金井誠	国立遺伝学研究所	研究員	細胞内パターンニングの意義	2002. 11. -2007. 3
近藤周	国立遺伝学研究所	大学院生	caspase 活性の細胞内可視化	2002. 11. -2004. 3
勝木健雄	国立遺伝学研究所	CREST 研究員	軸索内局在蛋白質の同定	2002. 11. -
長坂 強	国立遺伝学研究所	大学院生	軸索内局在蛋白質の同定	2003. 4. -2004. 3
本藤隆亮	国立遺伝学研究所	大学院生	細胞内パターンニングの意義	2003. 4. -2006. 3
山谷仁志	国立遺伝学研究所	CREST 研究員	軸索内局在蛋白質の同定	2002. 11. -2007. 3
伊藤圭祐	国立遺伝学研究所	研究員	軸索内局在蛋白質の同定	2003. 4. -
野住素広	国立遺伝学研究所	研究員	軸索内局在蛋白質の同定	2003. 4. -2006. 3
福島菜奈恵	国立遺伝学研究所	研究員	軸索内局在蛋白質の同定	2003. 4. -2004. 3
平本正輝	国立遺伝学研究所	CREST 研究員	細胞内パターンニングの意義	2003. 10. -2004. 3
	国立遺伝学研究所	研究補助	細胞内パターンニングの意義	2004. 4. -2006. 09
梅村 徹	国立遺伝学研究所	CREST 研究員	軸索内局在蛋白質の同定	2004. 4. -
須藤文和	国立遺伝学研究所	CREST 研究員	細胞内パターンニングの意義	2004. 4. -
森田諒介	国立遺伝学研究所	大学院生	細胞内パターンニングの意義	2004. 4. -2007. 3
三田さくら	国立遺伝学研究所	大学院生	細胞内パターンニングの意義	2007. 4. -
鈴木郁夫	国立遺伝学研究所	大学院生	細胞内パターンニングの意義	2007. 4. -

②横浜市大グループ

氏名	所属	役職(身分)	研究項目	研究参加期間
五嶋良郎	横浜市立大学	教授	軸索内局在蛋白質の機能解析	2002. 11. -
竹居光太郎	横浜市立大学	准教授	新規軸索ガイダンス分子の機能解析	2002. 11. -
中村史雄	横浜市立大学	准教授	軸索内局在蛋白質の機能解析	2002. 11. -
小倉颯一	横浜市立大学	助教	線虫の Netrin 経路の遺伝解析	2002. 11. -
佐藤泰史	横浜市立大学	研究員	FALI 法の開発	2002. 11. -
臼井洋	横浜市立大学	特任助教	細胞輸送(グルタミン酸受容体)	2006. 4. -
富田祐介	横浜市立大学	大学院生	セマフォリン受容体局在の解析	2006. 4. -
肥田友伸	横浜市立大学	大学院生	CRMP 変異体解析	2006. 4. -
山下直也	横浜市立大学	大学院生	CRMPKO マウス解析	2006. 4. -
朝倉太郎	横浜市立大学	大学院生	線虫 Netrin 輸送機構	2006. 4. -
飯塚朗	横浜市立大学	大学院生	局所タンパク質合成	2006. 4. -
池谷真澄	横浜市立大学	大学院生	新規軸索ガイダンス分子の機能解析	2006. 4. -

③東大グループ

氏名	所属	役職(身分)	研究項目	研究参加期間
三浦正幸	東京大学	教授	caspase 活性の細胞内可視化	2004. 4. - 2005. 3.
近藤 周	東京大学	CREST 研究員	caspase 活性の細胞内可視化	2004. 11. - 2005. 3

5 招聘した研究者等

該当なし

6 成果発表等

(1) 原著論文発表(国内誌0件, 国際誌41件)

1. Liu, Q-X, Jindra, M. Ueda, H., Hiromi, Y. and Hirose, S. (2003). *Drosophila* MBF1 is a coactivator for Tracheae Defective and contributes to the formation of tracheal and nervous systems. **Development** *130*, 719-728.
2. Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong, W.-C., Hiromi, Y. and Okano, H. (2003). *Drosophila* homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. **Development** *130*, 2419-2428.
3. Yamada, T., Okabe, M. and Hiromi, Y. (2003). EDL/MAE regulates EGF-mediated induction by antagonizing Ets transcription factor Pointed. **Development** *130*, 4085-4096.
4. Goshima, Y. (2003). CRMP-2: an intracellular mediator protein for Semaphorin3A signaling. **Neurosci. Res.** *46*, Suppl.1, S24.
5. Suto, F., Murakami, Y., Nakamura, F., Goshima, Y., and Fujisawa, H. (2003). Identification and characterization of a novel mouse plexin, plexin-A4. **Mech. Dev.** *120*, 385-396.
6. Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T. and Mizuno, K. (2003). Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. **J. Neuroscience** *23*, 2527-2537.
7. Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J. R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. M. and Hong, K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. **Nature** *424*, 990-995.

8. Yau, D. M., Yokoyama, N., Goshima, Y., Siddiqui, Z. K., Siddiqui, S. S., and Kozasa, T. (2003). Identification and molecular characterization of the G α 12-Rho guanine nucleotide exchange factor pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** *100*, 14748–14753.
9. Cheng, Q., Sasaki, Y., Shoji, M., Sugiyama, Y., Tanaka, H., Nakayama, T., Mizuki, N., Nakamura F., Takei, K., and Goshima, Y. (2003). Cdk5/p35 and Rho-kinase mediate ephrin-A5-induced signaling in retinal ganglion cells. **Mol. Cell. Neurosci.** *3*, 632–645.
10. Niwa, N., Hiromi, Y. and Okabe, M. (2004). A conserved developmental program for sensory organ formation in *Drosophila melanogaster*. **Nature Genetics** *36*, 293–297.
11. Jindra, M., Gaziova, I., Uhlirova, M., Okabe, M., Hiromi, Y. and Hirose, S. (2004). Coactivator MBF1 preserves the redox-dependent AP-1 activity during oxidative stress in *Drosophila*. **EMBO J.** *23*, 3538–3547.
12. Aizawa, H., Sato, Y., Maekawa, M., Fujisawa, H., Hirata, T. and Yuasa, S. (2004). Development of the amygdalohypothalamic projection in the mouse embryonic forebrain. **Anat. Embryol.** *208*, 249–264
13. Kawasaki, T. Takagi, Y., Yamatani, H. and Hirata, T. (2004). Systematic screening and identification of the antigens recognized by monoclonal antibodies raised against the developing lateral olfactory tract. **J. Neurobiology** *62*, 330–340
14. Tozaki, H., Tanaka, S. and Hirata, T. (2004). Theoretical consideration of olfactory axon projection with an activity-dependent neural network model. **Mol. Cell. Neurosci.** *26*, 503–517.
15. Yamatani, H., Sato, Y., Fujisawa, H. and Hirata, T. (2004). Chronotopic organization of olfactory bulb axons in the lateral olfactory tract. **J. Comp. Neurol.** *475*, 247–260.
16. Li, C., Sasaki, Y., Takei, K., Yamamoto, H., Shouji, M., Sugiyama, Y., Kawakami, T., Nakamura, F., Yagi, T., Ohshima, T. and Goshima, Y. (2004). Correlation between semaphorin3A-induced facilitation of axonal transport and local activation of a translation initiation factor eukaryotic translation initiation factor 4E. **J. Neuroscience** *24*, 6161–6170.
17. Kakinuma, Y., Saitoh, F., Ohsawa, S., Furuichi, T. and Miura, M. (2004). A sulfatase regulating the migratory potency of oligodendrocyte progenitor cells through tyrosine phosphorylation of β -catenin. **J. Neurosci. Res.** *77*, 653–661.

18. Kakinuma, Y., Saitoh, F., Osawa, S. and Miura, M. (2004). A mechanism of impaired mobility of oligodendrocyte progenitor cells by tenascin C through modification of Wnt signaling. **FEBS Lett.** *568*, 60–64.
19. Arai, H., Furuya, T., Yasuda, T., Miura, M., Mizuno, Y. and Mochizuki, H. (2004). Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1 β and expression of caspase-11 in mice. **J. Biol. Chem.** *279*, 51647–51653.
20. Kanai, M. I., Okabe, M. and Hiromi, Y. (2005). Seven-up controls switching of transcription factors that specify temporal identities of *Drosophila* neuroblasts. **Dev. Cell** *8*, 203–213.
21. Iwanami, M., Hiromi, Y. and Okabe, M. (2005). Cell-type specific utilization of multiple negative feedback loops generates developmental constancy. **Genes Cells** *10*, 743–752.
22. Koma, Y., Ito, A., Watabe, K., Hirata, T., Mizuki, M., Kitamura, T., Kanakura, Y. and Kitamura, Y. (2005). Distinct role for c-kit receptor tyrosine kinase and SgIGSF adhesion molecule in attachment of mast cells to fibroblasts. **Lab. Invest.** *85*, 426–435.
23. Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., Kolattukudy, P., Honnorat, J. and Goshima, Y. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3 β phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. **Genes Cells** *10*, 165–179.
24. Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., Morone, N., Usukura, J., and Kaibuchi K. (2005). Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. **Mol. Cell. Biol.** *22*, 9973–84.
25. Ohsawa, S., Hamada, S., Kakinuma, Y., Yagi, T. and Miura, M. (2005). A novel function of neuronal PAS domain protein 1 (NPAS1) in erythropoietin expression in neuronal cells. **J. Neurosci. Res.** *79*, 451–458.
26. Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (2006). ROBO directs axon crossing of segmental boundaries by suppressing responsiveness to relocalized Netrin. **Nature Neuroscience** *9*, 58–66.
27. Williams, D. W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y. and Truman, J. W. (2006). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. **Nature Neuroscience** *9*, 1234 –

1236.

28. Kondo, S., Senoo-Matsuda, N., Hiromi, Y. and Miura, M. (2006). DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation. **Mol. Cell. Biol.** *26*, 7258–7268.
29. Kawasaki, T., Ito, K. and Hirata, T. (2006). Netrin 1 regulates ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. **Development** *133*, 845–853.
30. Gil, V., Nicolas, O., Mingorance, A., Urena, J. M., Tang, B. L., Hirata, T., Saez-Valero, J., Ferrer, I., Soriano, E., and del Rio, J. A. (2006). Nogo-A and Nogo receptor expression in the human hippocampus in neuronal aging and Alzheimer's disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** *65*, 433–444.
31. Morita, A., Yamashita, N., Sasaki, Y., Uchida, Y., Nakajima, O., Nakamura, F., Yagi, T., Taniguchi, M., Usui, H., Katoh-Semba, R., Takei, K. and Goshima, Y. (2006). Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. **J. Neuroscience** *26*, 2971–2980.
32. Nakajima, O., Nakamura, F., Yamashita, N., Tomita, Y., Suto, F., Okada, T., Iwamatsu, A., Kondo, E., Fujisawa, H., Takei, K., and Goshima, Y. (2006). FKBP133: A novel mouse FK-506 binding protein homolog alters growth cone morphology. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** *346*, 140–149.
33. Ogura, K. and Goshima, Y. (2006). The autophagy-related kinase UNC-51 and its binding partner UNC-14 regulate the subcellular localization of the Netrin receptor UNC-5 in *Caenorhabditis elegans*. **Development** *133*, 3441–3450.
34. Kaneko, S., Iwanami, A., Nakamura, M., Kishino, A., Kikuchi, K., Shibata, S., Okano, H. J., Ikegami, T., Moriya, A., Konishi, O., Nakayama, C., Kumagai, K., Kimura, T., Sato, Y., Goshima, Y., Taniguchi, M., Ito, M., He, Z., Toyama, Y. and Okano, H. (2006). A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. **Nature Medicine** *12*, 1380–1389.
35. Charrier, E., Mosinger, B., Meissirel, C., Aguera, M., Rogemond, V., Reibel, S., Salin, P., Chounlamountri, N., Perrot, V., Belin, M. F., Goshima, Y., Honnorat, J., Thomasset, N. and Kolattukudy, P. (2006). Transient alterations in granule cell proliferation, apoptosis and migration in post-natal developing cerebellum of CRMP1^{-/-} mice. **Genes Cells** *11*, 1337–1352.
36. Yamashita, N., Uchida, Y., Morita, A., Ohshima, T., Hirai, S., Nakamura, F., Usui, H., Taniguchi, M., Mikoshiba, K., Honnorat, J., Kolattukudy, P., Thomasset, N., Takei, K., Takahashi, T. and

- Goshima, Y. (2006). CRMP1 mediates Reelin signaling in cortical neuronal migration. **J. Neuroscience** *26*, 13357–13362.
37. Suto, F., Tsuboi, M., Kamiya, H., Mizuno, H., Kiyama, Y., Komai, S., Shimizu, M., Sanbo, M., Yagi, T., Hiromi, Y., Chedotal, A., Mitchell, K.J., Manabe, T. and Fujisawa, H. (2007). Interactions between Plexin-A2, Plexin-A4, and Semaphorin 6A control lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. **Neuron** *53*, 535–547.
38. Matsuno, M., Kose, H., Okabe, M. and Hiromi, Y. (2007). TFIIH controls developmentally-regulated cell cycle progression as a holocomplex. **Genes Cells** *12*, 1289–1300.
39. Fouquet, C., Di Meglio, T., Ma, L., Kawasaki, T., Long, H., Hirata, T., Tessier-Lavigne, M., Chedotal, A., and Nguyen-Ba-Charvet, K.T. (2007). Robo1 and robo2 control the development of the lateral olfactory tract. **J. Neuroscience** *27*, 3037–3045.
40. Iizuka, A., Sengoku, K., Iketani, M., Nakamura, F., Sato, Y., Matsushita, M., Nairn, A.C., Takamatsu, K., Goshima, Y. and Takei, K. (2007). Calcium-induced synergistic inhibition of a translational factor eEF2 in nerve growth cones. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** *353*, 244–250.
41. Asakura, T., Ogura, K. and Goshima, Y. (2007). UNC-6 expression by the vulval precursor cells of *Caenorhabditis elegans* is required for the complex axon guidance of the HSN neurons. **Dev. Biol.** *304*, 800–810.

(2) その他の著作物（総説，書籍など）

1. 広海健 (2004). 1枚の写真館「縞と縞の間」 **細胞工学** *23*, 1361.
2. 五嶋良郎 (2004). 序: 神経軸索伸長の運命決定因子とは? **細胞工学** *23*, 1016–1018.
3. 五嶋良郎 (2004). 原著を探る—伝達物質としてのドーパミン. **Clinical Neuroscience** *22*, 733.
4. 中島央美, 中村史雄, 五嶋良郎 (2004). 軸索ガイド分子の情報伝達と形態形成. **Clinical Neuroscience** *22*, 1033.
5. Kuranaga, E., and Miura, M. (2004). Genetic analysis for JNK-mediated apoptosis. **Acta. Histochem. Cytochem.** *37*, 223–22.
6. Kanda, H. and Miura, M. (2004). Regulatory roles of JNK in programmed cell death. **J. Biochem.** *136*, 1–6.

7. Igaki, T., and Miura, M. (2004). Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *BBA* 1644, 73-81.
8. 三浦正幸 (2004). カスパーゼの生化学と生理機能. *生化学* 76, 1519-1533.
9. 竹本研, 三浦正幸 (2004). 細胞死シグナルの可視化: in vivo ライブイメージングをめざして. *実験医学* 22, 2136-2140.
10. 三浦正幸 (2004). アポトーシス研究から見たモデル生物系の疾患研究への応用: 分子から個体レベルの疾患研究へ. *ファルマシア* 40, 307-311.
11. 金井誠, 広海健 (2006). 神経幹細胞における遺伝子発現プログラムのスイッチング. *細胞工学* 25, 33 - 37.
12. 中村史雄, 竹居光太郎, 五嶋良郎 (2006). 軸索ガイダンス分子による神経成長円錐の細胞骨格制御. *蛋白質核酸酵素* 51, 733-741, 共立出版.
13. 中島央美, 中村史雄, 須藤文和, 岡田貴子, 岩松明彦, 藤澤肇, 竹居光太郎, 五嶋良郎 (2006). 新規分子 KIAA0674 の同定と発現解析. *横浜医学* 57, 85-93.
14. 近藤周, 岡部正隆, 三浦正幸, 広海健 (2007). カスパーゼが誘導する増殖因子転写のメカニズム. *実験医学* 25, 1575-1579.
15. 平本正輝, 広海健 (2007). ポスト化学走性仮説: 拡散性濃度勾配を使わない軸索パターンニング. *細胞工学* 26, 1147-1152.

(3) 学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演 (国内会議 29 件, 国際会議 15 件)

1. Hiromi, Y. (遺伝研) : Building the neural network through intra-cellular patterning. 第 26 回日本神経科学学会大会, 名古屋, 2003 年 7 月.
2. Hiromi, Y. (遺伝研) : Constructing the nervous system through intra-axonal patterning. The 7th Membrane Research Forum, Nagoya, 2003 年 8 月.
3. Hiromi, Y. (遺伝研) : Constructing an organ through intracellular patterning. Swiss-Japan Meeting "Progress in Developmental Biology: Genes, Cells and Body Plan", Ohito, 2003 年 11 月.

4. Asaoka, M. (遺伝研) : Establishment of the stem cell fate in the *Drosophila* germline. Swiss-Japan Meeting “Progress in Developmental Biology: Genes, Cells and Body Plan” , Ohito, 2003年11月.
5. 五嶋良郎 (横浜市大) : CRMP-2 セマフォリン 3A 応答の細胞内情報媒介分子, 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 2003年7月.
6. 竹居光太郎 (横浜市大) : 大時空間的分子不活性化実験技術とシミュレーションモデルの精緻: 神経突起伸長モデルにおける CALI 法の適, 2003年度情報計算化学生物学会, 東京, 2003年9月.
7. 五嶋良郎 (横浜市大) : Intracellular dynamics of proteins mediating an axon guidance molecule Sema3A. 第76回日本生化学会, 横浜, 2003年10月.
8. 竹居光太郎 (横浜市大) : Dynamics of calcium signal regulating neurite outgrowth. 第76回日本生化学会, 2003年10月.
9. 竹居光太郎 (横浜市大) : レーザー分子不活性化法 (CALI 法) のシステムバイオロジーへの適用. 第11回日本バイオイメージング学会, 横浜, 2003年10月.
10. 竹居光太郎, 李蟬夏, 仙石くみこ, 佐々木幸生, 中村史雄, 五嶋良郎 (横浜市大) : 神経成長円錐における局所的蛋白合成の生理的意義. 平成15年度生理学会関東支部会, 東京, 2003年10月
11. 五嶋良郎, 佐々木幸生, 中村史雄, 小倉顕一, 竹居光太郎 (横浜市大) : 神経成長円錐の情報伝達機構と神経再生. 第77回日本薬理学会年会, 大阪, 2004年3月.
12. Hiromi, Y. (遺伝研) : Intra-axonal patterning: its mechanism and implications. Neuro 2004, Osaka, 2004年9月.
13. Hiromi, Y. (遺伝研) : Intra-axonal patterning: its mechanism and implications. The 8th Membrane Research Forum, Nagoya, 2004年11月.
14. Asaoka, M. (遺伝研) : The establishment of the stem cell fate in the *Drosophila* germline. The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Sperm- Coats, Shima, 2004年11月.
15. 五嶋良郎 (横浜市大) : 神経ガイダンス分子による樹状突起・スパイン形成機構. 27

回分子生物学会，神戸，2004年12月。

16. 三浦正幸（東大）： Genetic pathway of TNF/TNFR signaling in *Drosophila*. Symposium in 10th International TNF superfamily conference. Lausanne, Switzerland, 2004年8月.
17. 三浦正幸（東大）： Genetic dissection of neural cell death and degeneration pathway. Symposium in 16th International Congress of International Federation of Association of Anatomists, Kyoto, Japan, 2004年8月.
18. 三浦正幸（東大）： Genetic pathway of extrinsic and intrinsic cell death signaling in *Drosophila*. In The 8th GIST International Symposium on Life Science. Gwangju, Korea, 2004年11月.
19. 三浦正幸（東大）： Regulatory mechanisms of IAP degradation in *Drosophila*. Symposium in Cell Death, Cell Cycling and Cell Senescence. Kazusa, Chiba, Japan, 2004年11月.
20. 広海健（遺伝研）： 細胞内パターンニングによる組織構築—細胞「内」の分化 シンポジウム「新しい水晶体研究のために」第44回日本白内障学会総会 第20回日本眼内レンズ屈折手術学会総会，京都，2005年6月.
21. Hiromi, Y. (遺伝研)： Intra-axonal patterning: its mechanism and implications. SFB590 2nd International Symposium "From Protein to Tissue", Dusseldorf, 2005年9月.
22. Hiromi, Y. (遺伝研)： Sub-axonal compartments in neuronal development. Symposium: "Signal Transduction in Morphogenesis" 28th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, 2005年12月.
23. Hiromi, Y. (遺伝研)： Sub-axonal membrane compartments in neuronal development. The 9th International Membrane Research Forum, Kyoto 2006年3月.
24. 竹居光太郎（横浜市大）： 光照射による蛋白質機能阻害法. 第2回原子・分子・光化学 (AMO) 討論会, 和光, 2005年6月.
25. Takei, K. and Goshima, Y. (横浜市大)： Calcium-regulated local protein synthesis within nerve growth cone. 第48回日本神経化学会, 福岡, 2005年9月.

26. 五嶋良郎（横浜市大）： 反発性ガイダンス分子による軸索伸長制御機構. 第 111 回日本解剖学会シンポジウム, 神奈川, 2006 年 3 月.
27. Hiromi, Y. (遺伝研) : Intra-axonal patterning: its mechanism and implications. Gordon Research Conference on Visual System Development. II Cioco, Italy, 2006 年 5 月.
28. Kanai, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Switching gene-expression program in neural stem cells. 日本発生生物学会第 39 回大会, 広島, 2006 年 5 月.
29. 広海健 (遺伝研) : 軸索内パターンニングによる神経回路形成 第 25 回神経組織培養研究会, 東京, 2006 年 9 月.
30. Hiromi, Y. (遺伝研) : Intra-axonal patterning: its mechanisms and implications. The Second Taiwan-Japan Bi-Lateral Symposium on Cellular and Developmental Biology Taipei, Taiwan, 2007 年 1 月.
31. 須藤文和, 八木健, Chedotal, A., Mitchell, K. J., 広海健, 藤澤肇 (遺伝研) : プレキシン/セマフォリンシグナルによる海馬神経回路形成の制御. 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 大阪, 2007 年 3 月.
32. 竹居光太郎 (横浜市大) : 成長円錐における蛋白新生の生理的意義. 神経組織の成長・再生・移植研究会第 21 回学術集会, 企画シンポジウム「シナプス前部および後部の発達」, 東京, 2006 年 5 月.
33. Takei, K. and Goshima, Y. (横浜市大) : Calcium-regulated local protein synthesis within nerve growth cone. 第 48 回日本神経化学会. 企画シンポジウム「神経突起形成の分子機構」, 福岡, 2006 年 9 月.
34. 五嶋良郎 (横浜市大) : 軸索ガイダンス分子による軸索輸送制御. 第 29 回神経科学会シンポジウム「神経軸索の伸長とガイダンスメカニズム」, 京都, 2006 年 7 月.
35. 五嶋良郎 (横浜市大) : 軸索ガイダンス分子応答と神経回路形成. 第 25 回神経組織培養研究会シンポジウム, 東京, 2006 年 9 月.
36. 五嶋良郎 (横浜市大) : Semaphorin 3A の神経軸索伸長・シナプス形成制御機構. 第 34 回慶應ニューロサイエンス研究会, 東京, 2006 年 12 月.

37. Goshima, Y. (横浜市大) : Cdk5 regulates axon guidance, Synapse maturation and cell migration through phosphorylation of the CRMP family proteins Cdk5 symposium, 香港, 2007年1月.
38. 竹居光太郎 (横浜市大) : 培養細胞における時空間的・選択的分子機能阻害法の適用とその応用. 第26回神経組織培養研究会 企画シンポジウム「達人に聞く培養細胞を用いたアッセイ法の極意」, 東京, 2007年3月.
39. 竹居光太郎 (横浜市大) : 局所タンパク合成による成長円錐の運動制御. 第112回日本解剖学会総会全国学術学会 企画シンポジウム「軸索ガイダンス研究の最前線」, 大阪, 2007年3月.
40. Hiromi, Y. (遺伝研) : Intra-axonal patterning. Visual Processing in Insects: From Anatomy to Behavior, Janelia Farm, 2007年4月.
41. 広海健 (遺伝研) : 生命科学若手夏の学校シンポジウム「所変わればラボ変わる～比べてわかる日本と世界～. 埼玉県嵐山町, 2007年8月.
42. Hiromi, Y. (遺伝研) : Intra-axonal patterning: pattern formation within a nerve cell. International Symposium “Gene Expression Control and Genome Evolution”, Okayama, 2007年9月.
43. 五嶋良郎 (横浜市大) : セマフォリンと神経再生. シンポジウム「再生医学」第18回末梢神経学会, 弘前, 2007年8月.
44. Goshima, Y. (横浜市大) : CRMP family proteins that regulate axon guidance, synapse maturation and cell migration. 第30回神経科学学会, 横浜, 2007年9月.

②口頭発表 (国内会議 20件, 国際会議 12件)

1. Hiromi, Y. (遺伝研) : Intra-axonal patterning. The 14th International Workshop on the Molecular and Developmental Biology of Drosophila. Crete, 2004年1月.
2. Hiromi, Y. (遺伝研) : Constructing an organ through intracellular patterning. Princeton University, Dept. Molecular Biology, Princeton, 2004年3月.
3. Goshima, Y. (横浜市大) : Phosphorylation of CRMPs by Cdk5 plays a crucial role in Semaphorin-3A signaling. EMBO Workshop on A decade of research on Semaphorins: Semaphorin function and mechanism of action, Corsica, France, 2003年6月.

4. 竹居光太郎, 李蟬夏, 仙石くみこ, 佐々木幸生, 中村史雄, 五嶋良郎 (横浜市大) : 神経成長円錐における蛋白質新生. 第 20 回神経組織培養研究会, 箱根, 2004 年 2 月.
5. Hiromi, Y. (遺伝研) : Constructing an organ through intracellular patterning. RIKEN CDB, Kobe, 2004 年 4 月.
6. Suto, F., Tsuboi, M., Mizuno, H., Sanbo, M., Yagi, T., Mitchell, K., Chedotal, A., Hiromi, Y., and Fujisawa, H. (遺伝研) : Plexin/Semaphorin signals regulate laminated mossy fiber projections in the hippocampus. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Axon Guidance & Neural Plasticity", Cold Spring Harbor, 2004 年 9 月.
7. Takei, K., Li, C., Sengoku, K., Sasaki, Y., Nakamura, F., Goshima, Y. (横浜市大) : Role of local protein synthesis within nerve growth cone in Sema3A-induced neurite retraction and NGF-induced neurite outgrowth. 第 57 回日本細胞生物学会, 大阪, 2004 年 5 月.
8. Findley, W. M., Nishiyama, M., Goshima, Y. and Hong, K. (横浜市大) : Sema 3A induces both attraction and repulsion in spinal nerve growth cones via differential Ca²⁺ effects. Cold Spring Harbor Meeting on Axon guidance and neural plasticity. Cold Spring Harbor, New York, 2004 年 9 月.
9. Goshima, Y., Yagami, T., Aoki, R., Utsumi, Y., Ogura, K. and Nakamura, F. (横浜市大) : DOPA, as a neurotransmitter candidate in the nucleus tractus solitarii, 第 27 回日本神経科学大会, 大阪, 2004 年 9 月.
10. 三浦正幸 (東大) : ポリグルタミン誘発性神経変性におけるトランスロコンの役割、日本生化学会, 横浜, 2004 年 10 月.
11. 倉永英里奈, 三浦正幸 (東大) : タンパク質分解系による生と死の制御. ショウジョウバエからの展開, 日本分子生物学会, 神戸, 2004 年 12 月.
12. 松田七美, 井垣達吏, 三浦正幸 (東大) : ショウジョウバエ Bax-like ファミリータンパク質 Drob-1 の神経保護作用. 日本分子生物学会, 神戸, 2004 年 12 月.
13. 勝木健雄, 平本正輝, 広海健 (遺伝研) : Drosophila neurons possess an intrinsic ability to generate sub-axonal membrane compartments by a diffusion barrier mechanism. ショウジョウバエ研究会第 7 回研究集会, 淡路, 2005 年 7 月.

14. Hiromi, Y. (遺伝研) : Intra-axonal patterning: its mechanism and implications. IGBMC, Strasbourg, 2005年8月.
15. 勝木健雄, 平本正輝, 広海健 (遺伝研) : ショウジョウバエの神経軸索は拡散障壁によって細胞自律的に区画化される. 日本遺伝学会第77回大会, 東京, 2005年9月.
16. 岡村真由美, 山路聡, 三島渉, 吉見竜介, 小林信明, 三浦健次, 佐藤隆, 篠原岳, 岡秀昭, 掛水信将, 築地淳, 小松茂, 金子猛, 中村史雄, 五嶋良郎, 石ヶ坪良明 (横浜市大) : 肺癌細胞の転移機構におけるセマフォリン-インテグリンシグナルの解析. 第45回日本呼吸器学会学術講演会, 千葉, 2005年4月.
17. Takei, K., Sengoku, K., Matsushita, M., Nairn, A., and Gosima, Y. (横浜市大) : Regulation of neurite outgrowth by local protein synthesis within nerve growth cones. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005年7月.
18. Aoki, R., Yagami, T., Katayama, R., Miyamae, T., Nakamura, F., Kajiwara, Y., Yamamoto, N., Fujita, R. and Goshima, Y. (横浜市大) : 線虫Gタンパク質共役型受容体, C06H5.7, に対する非アミンアゴニスト. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005年7月.
19. 五嶋良郎, 井澤純一, 三須良實, 月見里薫 (横浜市大) : ニコチン, メタンフェタミン, コカインのラット側坐核からのドーパ・ドパミン遊離と行動変化との相関. 第113回日本薬理学会関東部会, 2005年10月.
20. 中山雄一, 倉又恵美子, 内田穰, 小倉顕一, 中村史雄, 竹居光太郎, 五嶋良郎 (横浜市大) : Semaphorin 3A シグナルに於ける CRMP - Filamin 相互作用の役割. 第113回日本薬理学会関東部会, 2005年10月.
21. 今泉千尋, 五嶋良郎, 竹居光太郎 (横浜市大) : Neuronal Calcium Sensor-1による神経突起伸長制御. 第113回日本薬理学会関東部会, 2005年10月.
22. 朝倉太郎, 小倉顕一, 五嶋良郎 (横浜市大) : *C. elegans* の陰門前駆細胞に発現する Netrin/UNC-6 は HSN 神経軸索誘導に関与する. 第79回日本薬理学会年会, 横浜, 2006年3月.
23. 中島央美, 須藤文和, 近藤英作, 岩松明彦, 藤澤肇, 五嶋良郎, 中村史雄 (横浜市大) : Plexin-A4 と相互作用する新規 FK506 結合タンパク質の同定とその Semaphorin 情報伝達における役割. 第79回日本薬理学会年会, 横浜, 2006年3月.

24. 山下直也, 後藤泰一郎, 臼井洋, 山本藍子, 佐々木幸生, 中村史雄, 竹居光太郎, 五嶋良郎 (横浜市大): Semaphorin3A はシグナル伝達に関与する分子の軸索内輸送を選択的に亢進する. 第79回日本薬理学会年会, 横浜, 2006年3月.
25. Hiromi, Y. (遺伝研): Intra-axonal patterning: its mechanism and implications. MRC Centre for Developmental Neurobiology, King's College London, 2006年5月.
26. 川崎能彦, 平田たつみ (遺伝研): 嗅覚2次神経回路形成機構. 日本発生生物学会第39回大会, 広島, 2006年6月.
27. Katsuki, T., Hiramoto, M., Umemura, T., Suto, F., De Falco, T., Morita, R. and Hiromi, Y. (遺伝研): Intra-axonal patterning and its role in axon guidance, Cold Spring Harbor Meeting: Axon Guidance Synaptogenesis & Neural Plasticity, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2006年9月.
28. Hiromi, Y. (遺伝研): Intra-axonal patterning: its mechanisms and implications. NCBS, Bangalore, India, 2007年1月.
29. Hiromi, Y. (遺伝研): Patterning within a nerve cell: a new strategy to make a circuit. Dept. Biotechnology, Anna University, Chennai, India, 2007年1月.
30. Hiromi, Y. (遺伝研): Patterning within a nerve cell: a new strategy to make a circuit. Dept. Biotechnology, IIT-Madras, Chennai, India, 2007年1月.
31. Hiromi, Y. (遺伝研): Intra-axonal patterning: its mechanism and implications. Duke University, Durham, NC, 2007年5月.
32. Nakamura, F., Goshima, Y., Uetani, N., Iwakura, Iwakura and Stephen M. Strittmatter (横浜市大): Analysis of entorhino-hippocampal projection in PTP δ mutant mice. 第30回神経科学学会, 横浜, 2007年9月

③ポスター発表 (国内会議 63 件, 国際会議 38 件)

1. Yuasa, Y., Hiromi, Y. and Okano, H. (遺伝研): Differentiation of lateral glial cells in the Drosophila embryo. 日本分子生物学会第3回春季シンポジウム, 米子, 2003年5月.
2. 湯浅喜博, 広海健 (遺伝研): ショウジョウバエのグリア細胞における dead ringer/retained の役割. 日本発生生物学会第36回大会, 札幌, 2003年6月.

3. 勝木健雄, 平本正輝, 広海健 (遺伝研) : ショウジョウバエの神経細胞は細胞自律的に軸索内コンパートメントを形成する. 発生生物学会第36回大会, 札幌, 2003年6月.
4. Katsuki, T., Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Intrinsic sub-axonal patterning in *Drosophila* neurons. ショウジョウバエ研究会第6回研究集会, 東京, 2003年7月
5. Katsuki, T., Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Cell autonomous axonal patterning. The 7th Membrane Research Forum, Nagoya, 2003年8月.
6. Kondo, S. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Characterization of *Drosophila* Spred a negative regulator of ras signaling. 18th European *Drosophila* Research Conference, Gottingen, 2003年10月.
7. Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : ROBO silences the responsiveness to the presented Netrin to go through the segmental boundary. Cold Spring Harbor Meeting "Neurobiology of *Drosophila*", Cold Spring Harbor, 2003年10月.
8. 湯浅喜博, 広海健 (遺伝研) : ショウジョウバエ Longitudinal Glia における PROSPERO の発現調節機構. 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003年12月.
9. 勝木健雄, 平本正輝, 広海健 (遺伝研) : 細胞自律的な軸索内パターンニング. 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003年12月
10. Asaoka, M., Hiromi, Y. and Lin, H. (遺伝研) : The establishment of the stem cell fate in the *Drosophila* female germline. Keystone Symposia "Germ Cells", Keystone, 2004年1月.
11. Yuasa, Y. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Combinational expression of three transcriptional factors is essential for the PROS expression in the longitudinal glia. 45th Annual *Drosophila* Research Conference, Washington, DC, 2004年3月.
12. 平田たつみ (遺伝研) : 中枢神経系における軸索伸長機構. 第26回日本医学会総会シンポジウム, 福岡, 2003年4月
13. Hirata, T. (遺伝研) : Axonal elongation in the central nervous system. International Symposium "Dynamics of Neural Development", Osaka, 2003年8月.

14. Hirata, T. (遺伝研) : Involvement of membrane protein M6a in axonal projection. The Second International Symposium on Future Medical Engineering based on Bionanotechnology, Sendai, 2003年9月
15. Goshima, Y., Li, C., Sasaki, Y., Nakamura, F. and Takei, K. (横浜市大) : A correlation between Sema3A-induced axoplasmic transport and local protein synthesis in nerve growth cone. EMBO Workshop on The Assembly of Neural Circuits, Varenna, Italy, 2003年9月.
16. Li, C., Sasaki, Y., Shoji, M., Sugiyama, Y., Kawakami, T., Nakamura, F., Takei, K., Goshima, Y. (横浜市大) : Local protein synthesis in nerve growth cone is involved in Sema3A-induced axoplasmic transport. 日本細胞生物学会, 大津, 2003年5月.
17. Ogura, K. and Goshima, Y. (横浜市大) : LET-92, a catalytic subunit of protein phosphatase 2A is required for axon guidance of *C. elegans*. Fourteenth International *C. elegans* Meeting, University of California Los Angeles, 2003年7月.
18. 内田穰, 佐々木幸生, 瀧側太郎, 中村史雄, 五嶋良郎 (横浜市大) : セマフォリン 3A 情報伝達における CRMPs, Cdk 5 の役割. 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 2003 年 7 月.
19. 刀川夏詩子, 高橋俊文, 五嶋良郎, 中村史雄 (横浜市大) : チロシンフォスファターゼ δ (PTP δ) 細胞外領域がマウス胚大脳初代培養神経細胞におよぼす作用. 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 2003 年 7 月.
20. 山本藍子, 佐々木幸生, 後藤泰一郎, 中村史雄, 竹居光太郎, 五嶋良郎 (横浜市大) : 神経軸索ガイド分子 Sema3A はニューロピリン 1 とプレキシシン A の軸索輸送を促進する. 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 2003 年 7 月.
21. 小倉頭一, 五嶋良郎 (横浜市大) : 線虫 *C. elegans* の Netrin 受容体 UNC-5 の細胞内局在には UNC-51, UNC-14 が必要である. 第 26 回日本分子生物学会, 神戸, 2003 年 12 月.
22. 朝倉太郎, 小倉頭一, 五嶋良郎 (横浜市大) : Venus を用いた *C. elegans* Netrin のライブイメージ解析. 第 26 回日本分子生物学会, 神戸, 2003 年 12 月.
23. 森田麻, 佐々木幸生, 内田穰, 中島央美, 中村史雄, 竹居光太郎, 五嶋良郎 (横浜市

- 大) : 大脳皮質ニューロンの spine 及び branch 形成における軸索ガイド分子 Sema3A の役割. 第 26 回日本分子生物学会, 神戸, 2003 年 12 月.
24. 竹居光太郎, 李蟬夏, 仙石くみこ, 佐々木幸生, 中村史雄, 五嶋良郎 (横浜市大) : 神経成長円錐における蛋白質新生. 第 20 回神経組織培養研究会, 箱根, 2004 年 2 月.
 25. Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Netrin distribution control by attractive and repulsive receptors. 4th Axon guidance & Neural plasticity meeting, Cold Spring Harbor, 2004 年 9 月.
 26. Katsuki, T., Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Cell-autonomous axonal patterning in *Drosophila* neurons: compartment boundaries regulate the localization of Robo receptors. Axon Guidance & Neural Plasticity, 2004 年 9 月.
 27. Yuasa, Y. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Specification of longitudinal glia. The 10th European Symposium on *Drosophila* Neurobiology, Neuchatel, Switzerland, 2004 年 9 月.
 28. Asaoka, M., Hiromi, Y. and Lin, H. (遺伝研) : Lineage analysis of stem cell fate in *Drosophila* germline. Cold Spring Harbor Laboratory meeting "Germ Cells", Cold Spring Harbor, 2004 年 10 月.
 29. Yamatani, H. and Hirata, T. (遺伝研) : Comparison of protein expression in the lateral olfactory tract before and after collateral branching. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, 2004 年 10 月.
 30. Katsuki, T., Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : An intrinsic ability of neurons to compartmentalize their axons. The 8th membrane research forum, Nagoya, 2004 年 11 月.
 31. Asaoka, M., Hiromi, Y. and Lin, H. (遺伝研) : Lineage analysis of stem cell fate in *Drosophila* germline. The 17th Naito Conference "Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [I]". Miura-gun, 2004 年 11 月.
 32. Kanai, M., Okabe, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Function of seven-up in *Drosophila* CNS development. 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004 年 12 月.
 33. 浅岡美穂, 北館祐, 重信秀治, 小林悟, 広海健 (遺伝研) : ショウジョウバエにおけ

- る生殖幹細胞ニッチの形成機構. 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004年12月.
34. 梅村徹, 勝木健雄, 広海健 (遺伝研): Identification of a sub-axonally localized antigen. 第9回国際膜研究フォーラム, 京都, 2005年3月.
 35. Ogura, K. and Goshima, Y. (横浜市大): UNC-51 and UNC-14 regulate vesicle transport including a Netrin receptor UNC-5. East Asia *C. elegans* Meeting, 2004年
 36. Goshima, Y., Yamamoto, H., Takei, K., Iizuka, A., Usui, H. and Nakamura, F. (横浜市大): Ryanodine receptors and tetrodotoxin-sensitive sodium channels mediate Semaphorin3A-induced axonal transport. Cold Spring Harbor Meeting on Axon guidance and neural plasticity, Cold Spring Harbor, New York, 2004年9月.
 37. Sato, Y. and Goshima, Y. and Takei, K. (横浜市大): Development of the simple analysis system for neuronal molecular function with spatial and temporal resolutions. 第27回日本神経科学大会, 大阪, 2004年9月.
 38. Morita, A., Takei, K., Sasaki, Y., Uchida, Y., Nakajima, O., Nakamura, F., and Goshima, Y. (横浜市大): Role of *Sema3A* in dendritic branching and spine formation of mouse cortical neurons. 第27回日本神経科学大会, 大阪, 2004年9月.
 39. Sengoku, K., Matsushita, M., Nairn, A., Goshima, Y. and Takei, K. (横浜市大): Calcium-regulated local protein synthesis within nerve growth cones. 第27回日本神経科学大会, 大阪, 2004年9月.
 40. 矢上達郎, 青木令奈, 片山梨絵, 宮前文明, 中村史雄, 梶原康宏, 山本直毅, 五嶋良郎 (横浜市大): Gタンパク質共役型受容体 *CO6H5.7* のアゴニストの同定. 第27回日本神経科学大会, 大阪, 2004年9月.
 41. 青木令奈, 矢上達郎, 片山梨絵, 宮前文明, 中村史雄, 梶原康宏, 山本直毅, 五嶋良郎 (横浜市大): 3,4-Dihydroxybenzaldehyde, 線虫 *CO6H5.7* に対する新規アゴニスト. 第27回日本神経科学大会, 大阪, 2004年9月.
 42. Nakamura, F., Nakajima, O., Okada, T., Takei, K., Goshima, Y. and Strittmatter, S. M. (横浜市大): Protein tyrosine phosphatase δ -neuropilin-1 complex is an alternate functional receptor for semaphorin-3A. EMBO Workshop on Axon Guidance and Neural Plasticity, Cold Spring Harbor, USA, 2004年10月.

43. Nakamura, F., Nakajima, O., Okada, T., Takei, K., Goshima, Y., and Strittmater, S. M. (横浜市大) : Extracellular domains of protein tyrosine phosphatase δ and σ bind to neuropilin -1 and modulate Sema3A-induced growth cone collapse. 第77回日本生化学会, 横浜, 2004年10月.
44. Andoh, T., Ohtsuka, T., Ishiwa, D., Kamiya, Y., Takei, K. and Yamada, Y. (横浜市大) : Inhibitory effects of barbiturates on ATP-sensitive K channels in rat substantia nigra. 北米神経科学会, San Diego, 2004年10月.
45. Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Yanai, S., Suzuki, H., Nakamura, F., Takei, K., Mikoshiba, K., and Goshima, Y. (横浜市大) : Phosphorylation of CRMPs by Cdk5 and GSK3beta plays a critical role in Semaphorin-3A signaling. Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2004年11月.
46. Takei, K. (横浜市大) : Role of local protein synthesis within growth cone in nerve growth regulation. The 7th Annual Symposium on Japanese-American Frontiers of Science, Irvine, CA, USA, 2004年12月.
47. 朝倉太郎, 小倉頭一, 五嶋良郎 (横浜市大) : 軸索ガイド分子 Netrin/UNC-6 の局在化制御と HSN 神経軸索誘因機構. 第27回分子生物学会, 神戸, 2004年12月.
48. 新澤直明, 栗山泰, 青沼宏佳, 三浦正幸, 嘉糠洋陸 (東大) : ショウジョウバエ細菌感染モデル: 病態解明のための遺伝学的ツール. 日本分子生物学会, 神戸, 2004年12月.
49. 青沼宏佳, Schneider, D., 八木健, 三浦正幸, 嘉糠洋陸 (東大) : ショウジョウバエ細菌感染モデル: 病態解明のための遺伝学的ツール. 日本分子生物学会, 神戸, 2004年12月.
50. 高橋潤, 倉永英里奈, 菅田浩司, 西川彰男, 三浦正幸 (東大) : ショウジョウバエ TNF superfamily 分子 Eiger により誘導される神経細胞死はミトコンドリアを介した経路によって実行される. 日本分子生物学会, 神戸, 2004年12月.
51. 富岡武泰, 倉永英里奈, 岡野栄之, 三浦正幸 (東大) : TRAF タンパク質のキノコ体形態形成への関与. 日本分子生物学会, 神戸, 2004年12月.
52. 殿城亜矢子, 倉永英里奈, 三浦正幸 (東大) : Reaper による細胞死経路を介在する新規制御因子の同定と機能解析. 日本分子生物学会, 神戸, 2004年12月.

53. 菅田浩司, 井垣達吏, 松田七美, 三浦正幸 (東大): ショウジョウバエ TNF superfamily 分子 Eiger により誘導される神経細胞死はミトコンドリアを介した経路によって実行される. 日本分子生物学会, 神戸, 2004 年 12 月.
54. 近藤周, 三浦正幸, 広海健 (東大): 新規蛍光プローブを用いた生体内におけるカスペーゼ活性のモニタリング. 日本分子生物学会, 神戸, 2004 年 12 月.
55. 大澤志津江, 濱田俊, 八木健, 三浦正幸 (東大): 組織学的手法による神経細胞死の検出. 日本分子生物学会, 神戸, 2004 年 12 月.
56. 住岡暁夫, 三浦正幸, 鈴木利治 (東大): AICD と Fe65 複合体の転写活性化能における TPEER 配列の機能の同定. 日本分子生物学会, 神戸, 2004 年 12 月.
57. 富岡武泰, 倉永英里奈, 岡野栄之, 三浦正幸 (東大): Role of Drosophila TRAF1-mediated JNK activation in the mushroom bodies. 46 th Annual Drosophila Research Conference. San Diego, California, USA, 2005 年 3 月.
58. 殿城亜矢子, 倉永英里奈, 富岡武泰, 三浦正幸 (東大): Identification of defender against cell death signal using genetic screen. 46th Annual Drosophila Research Conference. San Diego, California, USA, 2005 年 3 月.
59. 近藤周, 広海健, 三浦正幸 (東大): Dual role of Drosophila caspases in execution of apoptosis and resumption of mitosis after DNA damage-induced cell cycle arrest. 46th Annual Drosophila Research Conference, San Diego, California, USA, 2005 年 3 月.
60. 本藤隆亨, 広海健 (遺伝研): A search for Seven-up-interacting molecules. ショウジョウバエ研究会第 7 回研究集会, 淡路, 2005 年 7 月.
61. 勝木健雄, 平本正輝, 広海健 (遺伝研): Drosophila neurons possess an intrinsic ability to generate sub-axonal membrane compartments by a diffusion barrier mechanism. ショウジョウバエ研究会第 7 回研究集会, 淡路, 2005 年 7 月.
62. 平本正輝, 広海健 (遺伝研): UNC-5 Suppresses the Frazzled mediated Netrin relocation in long-range navigation mode. ショウジョウバエ研究会第 7 回研究集会, 淡路, 2005 年 7 月.
63. Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (遺伝研): Unc5 suppresses Frazzled-mediated Netrin

- presentation to receive the long-range instructive signal of Netrin. Neurobiology of Drosophila, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, 2005年10月.
64. Katsuki, T., Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Drosophila neurons possess an intrinsic ability to generate sub-axonal membrane compartments by a diffusion barrier mechanism. Neurobiology of Drosophila, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, 2005年10月.
 65. 勝木健雄, 平本正輝, 広海健 (遺伝研) : ショウジョウバエの神経軸索は拡散障壁によって細胞自律的に区画化される. 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月.
 66. Sato, Y., Goshima, Y. and Takei K. (横浜市大) : Simple protein inactivation method (FALI) in organotypic culture of the nervous system. 第28回日本神経科学会, 横浜, 2005年7月.
 67. Imaizumi, C., Jeromin, A., Mikosiba, K., Goshima, Y, and Takei, K. (横浜市大): Role of neuronal Calcium sensor-1 in neurite outgrowth of cultured sensory neurons. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005年7月.
 68. 中島央美, 須藤文和, 岩松明彦, 藤澤肇, 五嶋良郎, 中村史雄 (横浜市大) : Plexin-A4 結合分子の同定. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005年7月.
 69. Yamashita, N., Uchida, Y., Honnorat, J., Kolattukudy, P., Nakamura, F. and Goshima, Y. (横浜市大): The role of CRMP in Sema3A mediated dendritic formation in neocortex. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005年7月.
 70. Willis, D.E., Zheng, J.Q., Li, K.W., Sasaki, Y and Goshima, Y. (横浜市大) : Bassell G, Minnen J. van, Twiss J.L: Differential mRNA transport in regenerating DRG neurons. Neuroscience Meeting, Washington D.C., 2005年11月.
 71. 佐藤泰史, 五嶋良郎, 竹居光太郎 (横浜市大) : 光照射による簡便な分子不活性化技術の培養実験系への適用. 分子生物学会, 2005年12月.
 72. 中島央美, 須藤文和, 近藤英作, 岩松明彦, 藤澤肇, 五嶋良郎, 中村史雄 (横浜市大) : Plexin-A4 と相互作用する新規 FKBP の同定とその Semaphorin 情報伝達に於ける役割. 第28回日本分子生物学会年会, 2005年12月.

73. 小倉顕一, 五嶋良郎 (横浜市大) : C. elegans の LET-92/PP2a-C (protein phosphatase 2A catalytic subunit) は UNC-51 (オートファジー関連キナーゼ)、UNC-14 (UNC-51 結合分子) と協調して軸索ガイダンスを制御する. 分子生物学会, 2005 年 12 月.
74. Imaizumi, C., Jeromin, A., Mikosiba, K. and Goshima, Y. (横浜市大) : Regulation of neurite extension mediated by neuronal Calcium sensor-1 in nerve growth cone. 第 79 回日本薬理学会年会, 横浜, 2006 年 3 月.
75. Ogura, K. and Goshima, Y. (横浜市大) : UNC-51 and UNC-14 is essential for proper localization of Netrin receptor UNC-5 in C elegans. 国際線虫学会, Los Angeles, 2006 年 6 月.
76. 近藤周, 岡部正隆, 広海 健, 三浦正幸 (遺伝研) : アポトーシスが誘導する代償性細胞増殖はカスパーゼと JNK シグナルによって制御される. 日本発生生物学会第 39 回大会, 広島, 2006 年 6 月.
77. Yamatani, H. and Hirata, T. (遺伝研) : Identification of temporally different proteins expressed during the collateral branching of the lateral olfactory tract. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 2006 年 7 月
78. 伊藤圭祐, 川崎能彦, 平田たつみ (遺伝研) : Protein kinase 阻害剤・K252a の移動性ニューロンに対する効果. 第 29 回日本神経科学学会大会, 京都, 2006 年 7 月.
79. Kawasaki, T. and Hirata, T. (遺伝研) : Distinctive guidance of main and accessory olfactory bulb axons in the lateral olfactory tract. CSHL meeting "Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity" CSHL New York, 2006 年 9 月.
80. Asaoka, M., Kitadate, Y., Shigenobu, S., Kobayashi, S. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Stem cell formation in Drosophila germline requires gonadal somatic cells. The 19th Naito Conference "Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [II]", 三浦郡, 2006 年 11 月.
81. 勝木健雄, 平本正輝, 広海健 (遺伝研) : 神経突起の細胞自律的なコンパートメント化. メンブレントラフィック~分子機構から高次機能への展開~, 小豆島, 2006 年 11 月.
82. De Falco, T., 梅村徹, 勝木健雄, 広海健 (遺伝研) : 軸索内コンパートメント特異的

な膜タンパク質局在機構. メンブレントラフィック～分子機構から高次機能への展開～, 小豆島, 2006年11月.

83. Yuasa, Y. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Transcriptional network regulating terminal differentiation of the longitudinal glia in the *Drosophila* embryo, 神経発生討論会, 岡崎, 2006年12月.
84. 勝木健雄, 平本正輝, 広海健 (遺伝研) : 神経突起内の細胞自律的なパターンニング機構. 神経発生討論会, 岡崎, 2006年12月.
85. Morita, R., Katsuki, T. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Relationship between sub-axonal compartment and axonal turning in vitro. UK-APDBN Meeting "Development and the Emergence of Function in the Nervous System", 神戸, 2007年2月.
86. Yuasa, Y. and Hiromi, Y. (遺伝研) : PROSPERO Regulates the terminal differentiation of *Drosophila* CNS Gglia. UK-APDBN Meeting "Development and the Emergence of Function in the Nervous System", 神戸, 2007年2月.
87. Katsuki, T., Hiramoto, M. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Sub-axonal membrane compartmentalization in *Drosophila* neurons. 第10回国際細胞膜研究フォーラム, 京都, 2007年2月.
88. Yuasa, Y. and Hiromi, Y. (遺伝研) : Subtype specific expression and function of PROS in the longitudinal glia. Annual *Drosophila* Research Conference, Philadelphia, 2007年3月.
89. Usui, H., Yamamoto, H., Iizuka, A., Shouji, M., Yamashita, N., Taniguchi, M., Nakamura, F., Takei, K., and Goshima, Y. (横浜市大) : *Sema3A* drives AMPA receptor subunit *GluR2* to dendrite. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 第79回日本生化学会・第29回日本分子生物学会合同国際大会, 京都, 2006年6月.
90. Asakura, T., Ogura, K. and Goshima, Y. (横浜市大) : The vulval precursor cells of *C. elegans* supply *Netrin/UNC-6* for the proper axon guidance of the HSN neurons. 第29回神経科学会, 京都, 2006年7月.
91. Iketani, M., Yanai, S., Nakamura, F., Goshima, Y. and Takei, K. (横浜市大) : Regulation of growth cone motility by collapsing response mediator protein-2. 第

29 回日本神経科学会, 京都, 2006 年 7 月.

92. Ogura, K. and Goshima, Y. (横浜市大) : The autophagy-related kinase UNC-51 and its binding partner UNC-14 regulate the subcellular localization of the netrin receptor UNC-5 in *C. elegans*. Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2006 年 9 月.
93. 飯塚朗, 竹居光太郎, 仙石くみこ, 五嶋良郎 (横浜市大) : 細胞外 ATP によるタンパク翻訳因子 eEF2 を介した神経突起伸長制御. 第 113 回日本薬理学会関東部会, 高崎, 2006 年 9 月.
94. 山下直也, 内田穰, 森田麻, 臼井洋, 中村史雄, 竹居光太郎, 五嶋良郎 (横浜市大) : 大脳皮質形成における Collapsin response mediating protein 1 (CRMP1) の役割. 2006 年度生理学研究所シナプス研究会, 岡崎, 2006 年 12 月.
95. 飯塚朗, 竹居光太郎, 仙石くみこ, 五嶋良郎 (横浜市大) : 細胞外 ATP による eEF2 リン酸化を介した神経突起伸長制御. 第 80 回日本薬理学会総会, 名古屋, 2007 年 3 月.
96. Ogura, K., Mitani, S., Gengyo-Ando, K., Baillie, D. L., Kohara, Y. and Goshima, Y. (横浜市大) : LET-92, a catalytic subunit of protein phosphatase 2A negatively regulates the autophagy related kinase UNC-51 on axon guidance of DD/VD motor neurons, 16th International *C. elegans* Meeting. UCLA, USA, 2007 年 6 月.
97. Miyazaki, M., Ugajin, K., Yamashita, N., Nakamura, F., Kolattukudy, P. and Goshima, Y. (横浜市大) : Phenotype analysis of *crmp5*-deficient mice. 第 30 回神経科学学会, 横浜, 2007 年 9 月.
98. Uchida, Y., Ohshima, T., Yamashita, N., Nakamura, F., Kolattukudy, P., Honnorat, J. and Goshima, Y. (横浜市大) : Phosphorylation of CRMP2 at S522 is required for proper dendritic patterning of layer V cortical neurons in vivo. 第 30 回神経科学学会, 横浜, 2007 年 9 月.
99. Iizuka, A., Iketani, M., Sengoku, K., Nakamura, F., Matsushita, M., Nairn, A., Goshima, Y. and Takei, K. (横浜市大) : Calcium dependent-regulation of neurite outgrowth mediated by a protein translation factor eEF2 within nerve growth cones. 第 30 回神経科学学会, 横浜, 2007 年 9 月.
100. Iketani, M., Imaizumi, C., Jeromin, A., Nakamura, F., Mikoshiba, K., Goshima, Y.

and Takei, K. (横浜市大) : Neuronal calcium sensor-1 in nerve growth cones independently regulates both the neurite outgrowth and growth cone morphology. 第30回神経科学学会, 横浜, 2007年9月.

101. Yamashita, N., Morita, A., Uchida, Y., Ohshio, T., Nakamura, F. Jerome, H., Pappachan K. and Goshima, Y. (横浜市大) : CRMP1 regulates spine maturation through mediating Semaphorin3A signaling in vivo. 第30回神経科学学会, 横浜, 2007年9月.

(4) 特許出願

①国内出願 (1件)

1. 発明の名称:神経突起伸長制御タンパク質

発明者:竹居光太郎, 佐藤泰史, 中村史雄, 五嶋良郎

出願人:公立大学法人横浜市立大学

出願日:2007年2月7日

出願番号:2007-27615

その他 0件

②海外出願 (0件)

その他 0件

(5) 受賞等

①受賞

②新聞報道

③その他

(6) その他特記事項

7 研究期間中の主な活動

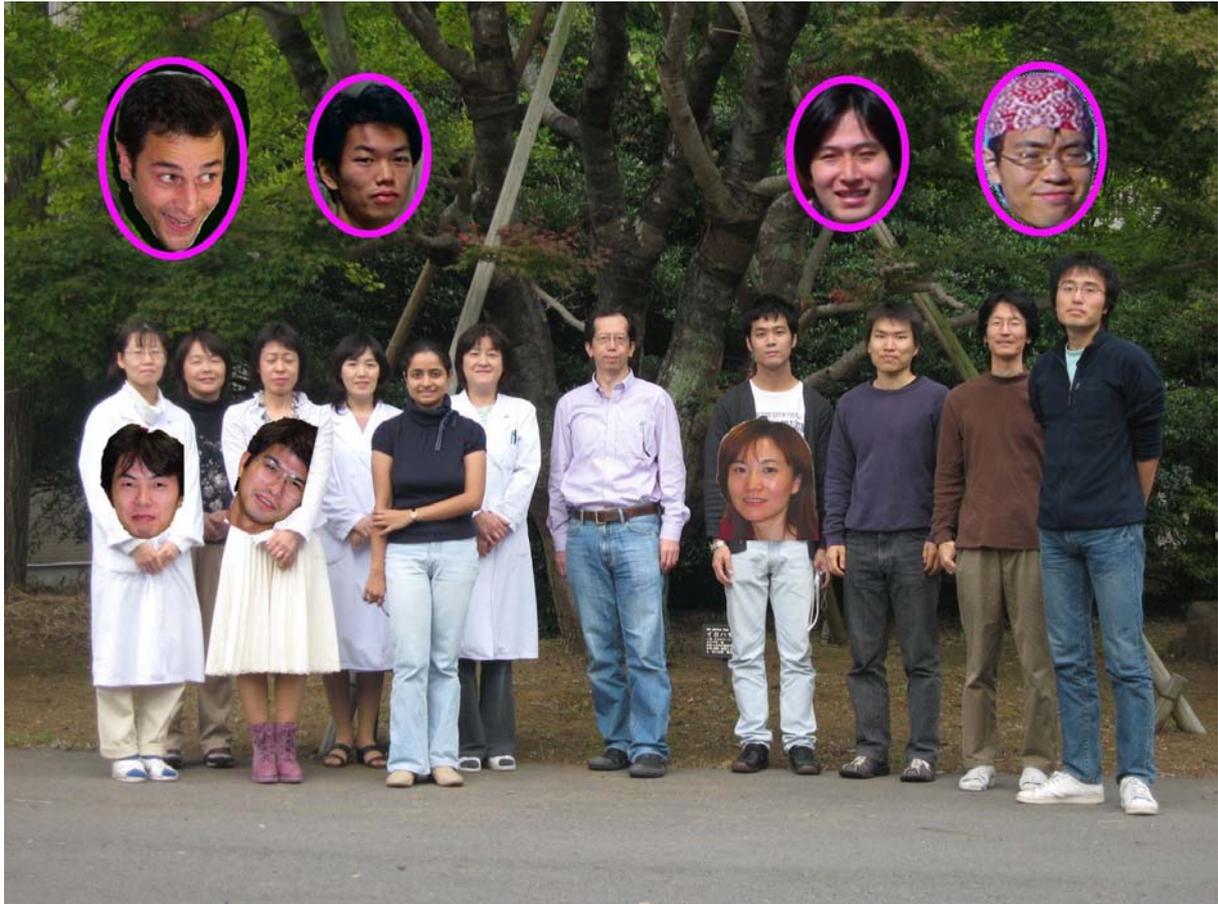
ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2003年 7月3日	細胞内パターンニングの brainstorming ミーティング	国立遺伝学研究所	21名	
2004年 7月7日-8日	細胞内パターンニングの brainstorming ミーティング	国立遺伝学研究所	25名	
2005年 7月21日-22日	細胞内パターンニングの brainstorming ミーティング	国立遺伝学研究所	24名	
2006年 7月31日-8月1日	細胞内パターンニングの brainstorming ミーティング	国立遺伝学研究所	25名	

8 結び

本研究は、「細胞内パターンニング」という視点で組織構築を見直し、新しい発生原理を導き出そうとするものである。われわれのアプローチは「long standing question を解く」という典型的な研究パターンとは性格を異にする。むしろ、神経突起内の分子局在という現象に着目したときに、「そこからどのような問題が生じるか？」を考えようと努めた。それゆえ、特定の方向に深く掘り下げるのではなく、様々な実験系を用い、多様な可能性を探るという方針をとった。こういうアプローチをとることにより、「軸索内パターンニング」という現象を定義し、その発展方向を明確にすることが可能になったとともに、「神経細胞の新しい膜区画の発見」といった当初は予想していなかった成果を上げることもできた。このプロジェクトは遺伝子や系統生物のリソースの作成を目指したものではないが、「細胞内パターンニングという視点で捉えうる現象や問題」というリソースができた、と言えるだろう。

「軸索内パターンニング」や「Intra-axonal patterning」という言葉はまだ一般的には用いられていない。しかし、このタイトルで行ってきている講演に対する反応から判断すると、聴衆がこの概念に共感し、刺激を受けているのがよくわかる。本プロジェクトで得られた成果を契機に、生物の発生・分化の様々な研究分野で新たな方向性が生み出されていくだろう。むしろ、本チームも適切なサポートが受けられればわれわれが作り出した分野の更なる発展に貢献したい。



国立遺伝学研究所 発生遺伝研究部門