

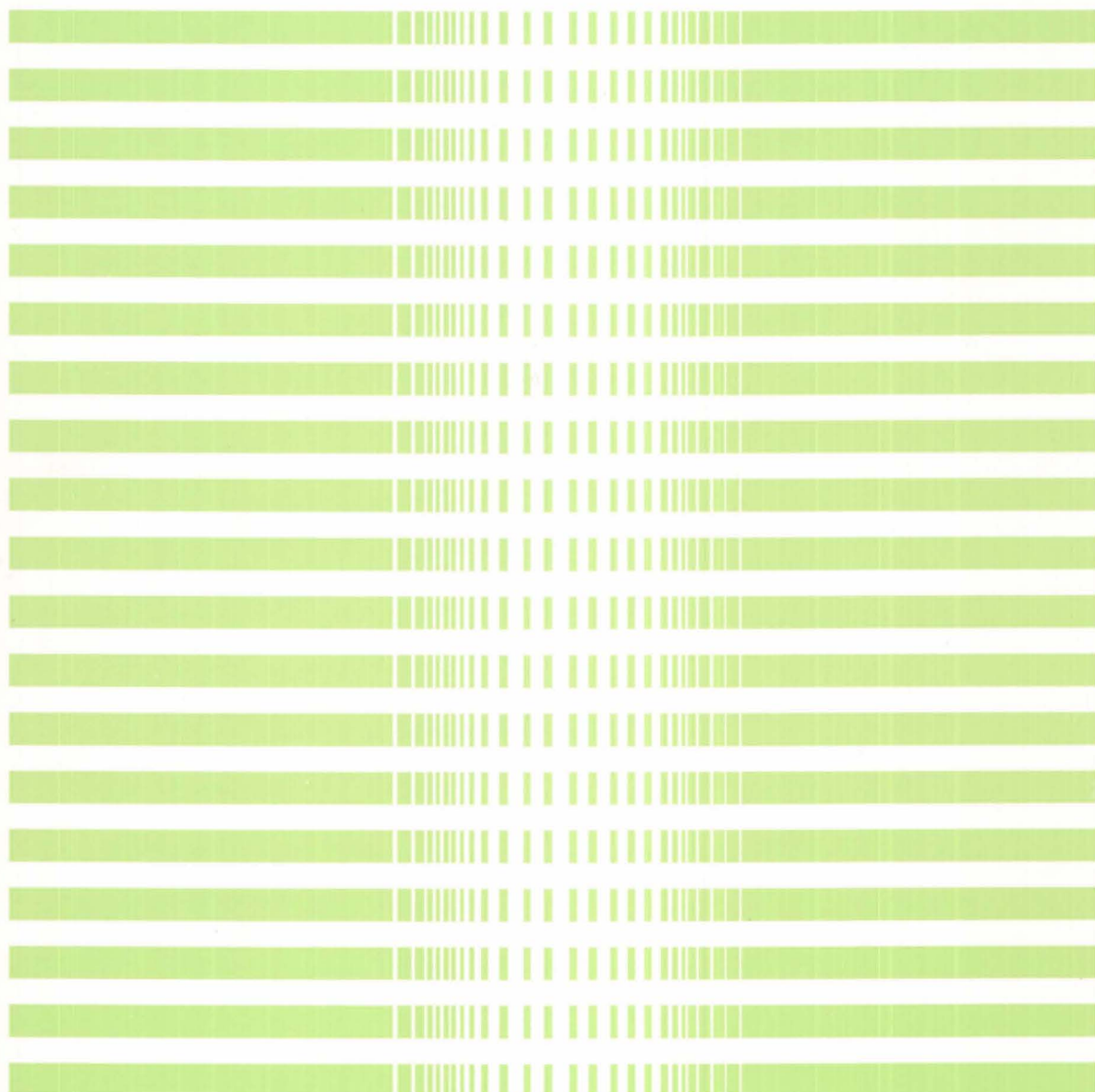
ISSN: 0037-3796



神経化学

Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry

Vol.46 (No.1), 2007



平成 19 年 3 月

目 次

理事会からのお知らせ	1
国際神経化学会入会について	
輝け次代の担い手たち	3
個体脳機能の解明に向けて—分子から行動へ—	
駒井 章治 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)	
大脳皮質形成に関わる Cdk5 と Reelin/Dab1 情報伝達系の相互作用	
佐藤 裕 (東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻神経分子機能研究室)	
胎仔大脳皮質構築過程におけるニューロトロフィンの果たす役割	
福光 秀文 (岐阜薬科大学・薬学部・分子生物学教室)	
統合失調症と脳内 D-セリン代謝：新たな治療薬開発をめざして	
山本 直樹 (東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野)	
研究室紹介	39
東京大学・大学院医学系研究科・神経生化学分野	
尾藤 晴彦	
兵庫医科大学 解剖学第二講座	
野口 光一	
第 50 回日本神経化学会 (横浜) 大会のご案内と演題募集	43
日本神経化学会奨励賞候補者募集のお知らせ	44
学会揭示版	46
編集後記	52

理事会からのお知らせ

国際神経化学会入会について

国際対応委員長 池 中 一 裕

国際神経化学会 (International Society for Neurochemistry: ISN) は全世界の神経化学研究者の情報交換を目的として作られた学会です。ISNでは隔年で大会を開催しており、今回は2007年8月19日から24日までCancun (Mexico) で開かれます。プログラムは毎回充実したものであり、世界のトップクラスの脳神経系の研究者が集まり、多くの情報を収集することができます。Ph.D.またはM.D.を取得して8年以内の若い研究者には大会参加への旅費が補助される制度があります。今、ISNに入会されますと、いろいろな特典がありますので、是非この機会にご入会下さい。

ISNに入会すると、

- 1) その年の12月までの会費が免除になります。
- 2) ISN大会の参加費が会員レートになります
- 3) Journal of Neurochemistryの購読料が割引になり、online版には無料でアクセスできます。
- 4) Neurochemical Societies newsletter, Neurochemistry Newsが年に2回送付されます。

入会資格：Ph.D., M.D.もしくは同等の学位を有するもので、広く神経化学に関連した活動をする事が期待できる人。

年会費：US\$40

ただし、新しく入会した人にはその年の12月までの会費が免除されます。また、最近神経化学分野での研究を始め博士課程を修了したばかりの人、または今後も神経化学分野での活動することが期待される博士課程にある人は入会后4年間会費を減額 (US\$20) される資格があります。

入会方法：入会フォーム (<http://www.neurochem.org/>) (入会フォームには現会員の署名が必要です。)、履歴書 (英文)、論文リスト (3つ：著者名、タイトル、ジャーナル名、巻号、ページ、掲載年の順) を下記まで送付のこと (現在オンラインでの入会申し込みはしていません)

Dr. Roger F. Butterworth
Director, Neuroscience Research Unit
Professor of Medicine, University of Montreal
Hopital Saint-Luc du CHUM
1058 St-Denis Street
Montreal, Quebec
H2X 3J4 Canada
Email: isn.butterworth@sympatico.ca

(注) それぞれの名前、住所等はタイプするか、わかりやすくはっきりと記入すること、また入会が認められたのちに会費を納入すること。

輝け次代の担い手たち

「個体脳機能の解明に向けて - 分子から行動へ -」

駒井 章治

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

はじめに

分子生物学が隆盛を極める中、同方法を用いて多くの生物学的現象が明らかにされてきました。しかしヒトゲノムの解読が終了し、ポストゲノムとして何ができるかという問題に直面して早数年が経とうとしております。神経科学領域においても大きなブレークスルーが必要なのではないかという停滞感が我々研究者を悩ませているのではないのでしょうか。Sakmann、Neher 両氏により開発されたパッチクランプ法¹⁾による細胞内記録によって本来の目的であった単一チャネルからの記録のみならず、全細胞記録や樹状突起などの細胞各部位からの記録が比較的容易に行えるようになりました。中でも *in vivo* への適応は近年めざましい発展を遂げ、以前は深部組織への適応が難しいと

された低抵抗の電極を利用した方法が開発され²⁾ 様々な脳部位において適用されてきています。

一方生体組織に対して比較的低侵襲な状況でイメージングする技術として開発された2光子レーザー顕微鏡はその特性から様々な生体組織の観察に適応されてきました³⁾。中でもその低侵襲特性と深部への透過性の良さから脳神経系への応用では多くの素晴らしい結果を残しています^{4,5)}。

これら2つの技術を融合させ、個体脳において遺伝子改変細胞から選択的に記録を行う技術 (*in vivo* two-photon targeted patch (TPTP) 法) がマックスプランク研究所のグループにより開発され、筆者は同技術開発の一端を担うことができました(図1)^{6,8)}。

本方法を用いることによって様々な現象に対し

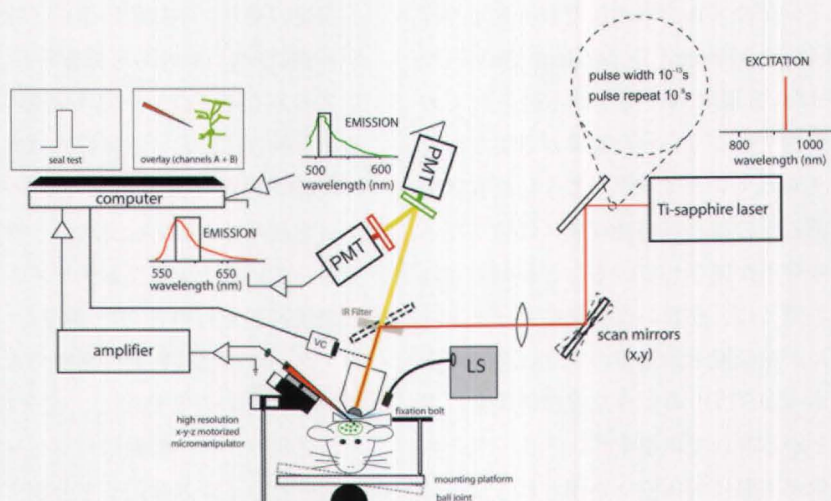


図1 2光子レーザー走査顕微鏡によるTPTP法(文献7より引用)

TPTP法の概略図。超短パルスレーザーにより励起した励起光を2つの光電増倍管(PMT)により検知し、PCのソフトウェア上で重ね合わせることで遺伝子改変細胞(緑色)へAlexa-594を充填した(赤色)パッチピペットを近づけ、パッチする。動物個体に対して様々な刺激を与えることで感覚刺激応答などの記録を行うことが可能である。

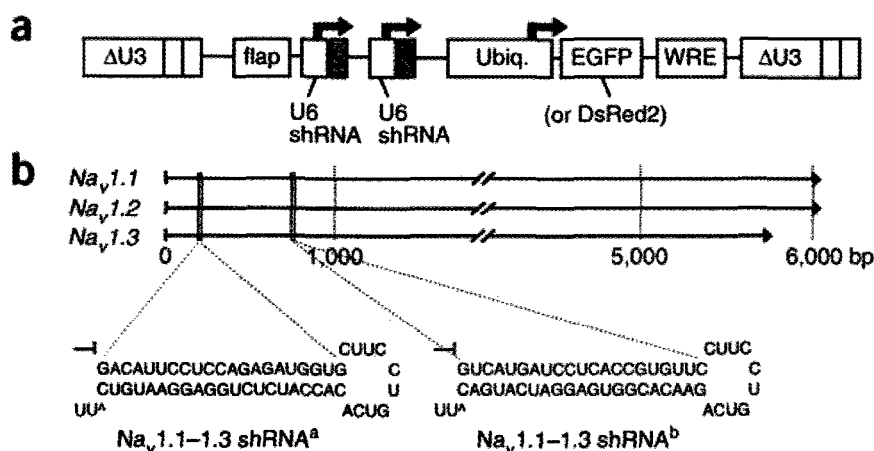


図2 レンチウイルスベクターと shRNA の概要 (文献 6 より引用)

a. 自己抑制的ウイルスベクター内に b で示すナトリウムチャンネルに対する shRNA とラベリングマーカーとして EGFP もしくは DsRed2 を配置した。それぞれの遺伝子は U6 および Ubiquitin プロモーターにより駆動するように設計した。b. 樹状突起に主に発現するとされるナトリウムチャンネル群 (Nav1.1-1.3) に相同な配列に対する shRNA を作成し、a で示したウイルスベクターに組み込んだ。

てアプローチすることが可能であると思われますが、今回本研究では樹状突起の機能について注目しました。ご存じの通り樹状突起は多種多様な形態を見せると共にその生理的重要性は多数のスライス実験等で明らかになってきています⁹⁾。樹状突起は一般に能動的特性を有しており、順行性伝導される誘起電位の増幅及び、逆行性活動電位の増幅といった機能があると考えられています。特に逆行性活動電位は活動電位の発火とシナプス後電位のタイミングのズレで増幅強度が決まる神経可塑性現象 (Spike-Timing Dependent Plasticity; STDP) と呼ばれる現象への関与が示唆されており、実際の脳内でもこういった現象が重要な機能を持つと考えられています¹⁰⁻¹²⁾。こうした樹状突起におけるある種の神経可塑性現象には様々なイオンチャンネル分子が関与していることが報告されております。例えば、皮質の錐体細胞ではナトリウムチャンネルが逆伝搬活動電位の成立に必須であり、同チャンネルがSTDPのような可塑性現象に重要であることが示されています¹⁰⁾。そこで私たちは同様の現象が実際に個体脳で処理される情報に対していかなる影響を持ちうるのかという点に問題に対し、ナトリウムチャンネルという分子ツールを利用することによって切り込みを入れようと考

えたわけです。こういった問題点を解決する一つの手段としてTPTP法は非常に有用であり、その第一段階として我々の研究が位置していると考えています。

本稿では同技術を用いた一連の実験と、今後の可能性について述べたいと思います。

レンチウイルスベクターを用いたRNAi法による遺伝子発現抑制

前述の通り、本技術は遺伝子操作した神経細胞から選択的にin vivo記録を行う方法ですが、マウスのみならずラットにも適応可能であるため、遺伝子操作法における嗜好性はありません。今回の実験ではヒトHIV由来のレンチウイルスベクターを利用したRNAi法により樹状突起に豊富に発現しているナトリウムチャンネル、Nav1.1, 1.2, 1.3の発現抑制を行いました(図2)。レンチウイルスベクターは自己抑制的に増殖できないようにデザインされたものを使用し、安全に心がけました。また発現ベクターの他にパッケージング、アクセサリとウイルス遺伝子を分割することによってもその安全性を保ちました。ナトリウムチャンネルそれぞれの遺伝子を発現抑制するためにNav1.1, 1.2, 1.3に相同な配列に対するshRNAを作成しま

した。目的のshRNAはU6プロモーターにより、またラベリングマーカーとして発現させるEGFPはユビキチンプロモーターによって駆動されるようにデザインしました^{6,8)}。

シミュレーションによる樹状突起機能に対するナトリウムチャネルのインパクトの算定

まず、実際に実験を行う前に皮質2/3層の細胞において樹状突起のナトリウムチャネルが細胞体における内在性発火および逆伝搬活動電位、カルシウム流入にどれほどの影響を持ちうるのかを算定する目的でモデル細胞によるシミュレーションを行いました。Mainenらにより考案された皮質

2/3層の細胞¹³⁾を実際の細胞体における発火が模倣できる形にチャネルコンダクタンスを調整することで定常状態を決定し、その後shRNAによって発現抑制が期待できる程度のコンダクタンス抑制(50%)を行いました。ここではshRNAによる抑制と同様に樹状突起と細胞体のナトリウムチャネルコンダクタンスのみの抑制を行い、軸索や軸索起始部においては変化がないように設定しました。すると細胞体における活動電位の振幅に一定の減少が見られました(図3a)。特に遠位樹状突起への逆伝搬活動電位の振幅の減少は顕著で、この際のカルシウム流入も劇的に減少することがこの算定によって予測されました(図3b)。

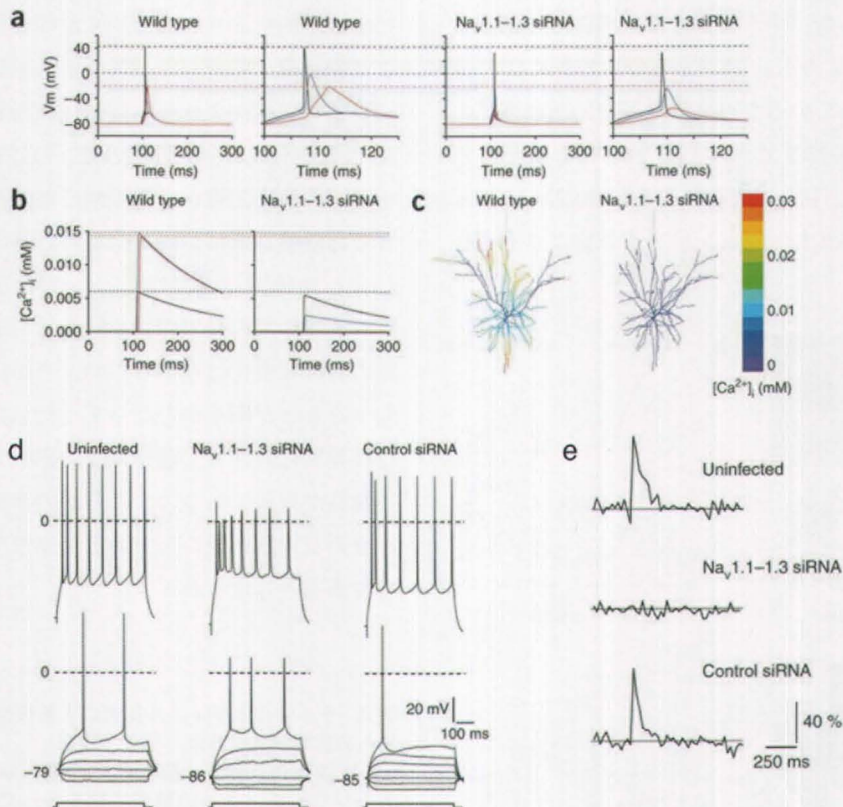


図3 ナトリウムチャネル抑制による影響のシミュレーションによる算定と、実際の細胞が示した発火様式の例 (文献6より引用・改変)

a-c. 皮質2/3層のモデル細胞において樹状突起、細胞体のナトリウムコンダクタンスを半減させることによって見られる興奮性の減少。aでは細胞体(黒)、近位樹状突起(青)、遠位樹状突起(赤)における活動電位に伴う電位変化を示した。bナトリウムチャネル減少によってみられるカルシウム流入の減少を、cはカルシウム流入を空間的に示した。d-e. 実際に前述のshRNAを含むウイルスベクターを投与して、ナトリウムチャネル発現を減少させた細胞から記録を行った。d. 細胞体での活動電位の振幅が60%まで減少していることが分かる。e. 近位樹状突起における逆伝搬活動電位に伴うカルシウム流入。ナトリウムチャネルの発現抑制によってほぼ完全に抑制されていることが分かる。

ナトリウムチャンネルによる内在性興奮性への影響

そこで、実際に上記のように作成したウイルスベクターを脳定位固定装置により一次体性感覚野（パレル皮質）2/3層に投与しました。パレル皮質の臨界期である生後12-14日齢にshRNAの発現が最大になるように生後8日齢の動物にウイルスベクターの投与を行いました。その後12-14日の発現、回復期間の後、EGFPを発現するウイルス感染細胞から選択的に電気記録を行いました。内在興奮性に対する影響を検討する目的でウイルス投与された脳からスライスを作成し、パッチクランプ法による細胞体からの全細胞記録を行いました。矩形電流を印加し、この時の発火応答を近接するウイルス感染していない細胞と比較することで検討しました。するとウイルス感染した細胞ではshRNAによりNav1.1, 1.2, 1.3サブタイプの発現が抑制されているため、細胞外での活動電位の振幅が約60%にまで減少していることが明らかとなりました（図3d）。このことはshRNAによる作用が、シミュレーションによる算定よりも大き

かったことを示し、樹状突起において逆伝搬活動電位が重篤に障害されていることを示唆していました。そこで実際に樹状突起での逆伝搬活動電位がどれくらい影響を受けているかをカルシウム流入を指標に計測してみました。すると近位の樹状突起においても逆伝搬活動電位がほぼ完全に抑制されていることが明らかとなりました（図3e）。

体性感覚応答受容野に対するナトリウムチャンネル発現抑制の影響

以上のように我々の作成したウイルスベクターを用いたRNAiにより特定のナトリウムチャンネルの発現抑制を行うことができ、生理学的にも作用があることが確認できたため、実際に「個体脳」における同ナトリウムチャンネルの作用を検討することを試みました。上記スライス実験の時と同様にウイルスベクターを生後8日齢の動物に投与し、12-14日の発現、回復期間の後、EGFPを発現するウイルス感染細胞から選択的に電気記録を行うことで体性感覚野における受容野応答の成熟を検討しました（図4）。臨界期において樹状突起ナトリウムチャンネルの発現抑制を起こした細胞では受容野の特性に変化はないものの、その応答強度が減弱することが明らかとなりました（図4a-d）。これは臨界期における受容野発達に樹状突起の積極的興奮性が重要であり、なんらかの神経可塑性現象が重要な役割を果たしている可能性を示唆するものであると考えられます。

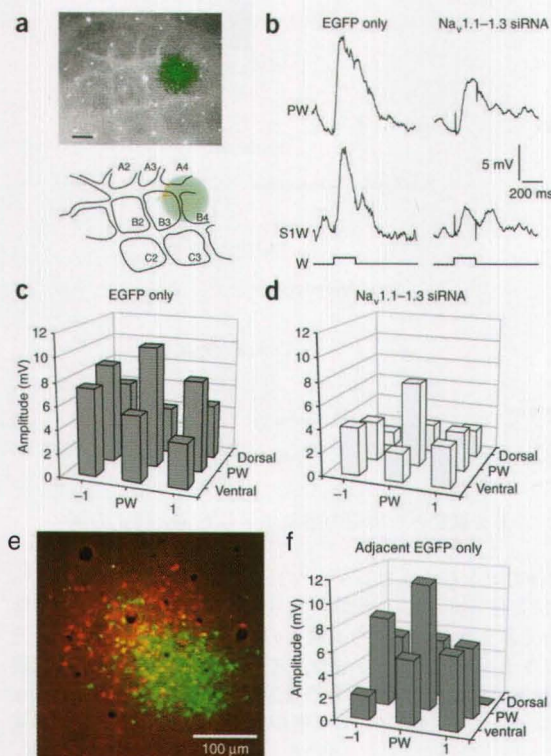


図4 ナトリウムチャンネル抑制による体性感覚受容野応答への影響（文献6より引用・改変）

a-d. 1次体性感覚野大脳皮質2/3層に対し臨界期の間ナトリウムチャンネルの発現抑制を行った結果。ナトリウムチャンネル発現抑制により受容野応答が減弱しているようが見られる。aは実際のウイルス感染細胞（緑色）と1次体性感覚野（パレル構造）の様子を示す。e-f. 前細胞からの影響を除外するために近接する細胞から記録を行った。この場合dで見られたような減弱は見られない(f)。eは2種類のウイルスが感染している様子を示す。赤色のナトリウムチャンネル抑制細胞と緑色の隣接する正常細胞が見える。赤色ネットワーク内にある緑色細胞から記録を行った。

ネットワーク(シナプス前細胞)からの影響の検討

ウイルス感染細胞において受容野応答の減弱が見られたものの、本研究において行った感染実験では残念ながらウイルスは単一神経細胞のみに感染しているのではなく平均約200の神経細胞に感染しています。こういった状況では体性感覚応答の減少がシナプス前細胞の興奮性の減少を反映しているだけという可能性が否定できません。そこで2種類のウイルス(shRNAの有る無し)を感染させ(図4e)、shRNAを含むウイルスが感染した近傍の細胞から記録を行いました。こうすることによってナトリウムチャネルの発現が抑制されている細胞と同じネットワーク内にあると想定され、なおかつナトリウムチャネルが正常に保持されている細胞から記録をとることによって、シナプス前細胞の興奮性による影響を除外することが可能になると考えたからです。その結果、前細胞の興奮性の減少によって今回得られた受容野応答の減弱がもたらされたのではないことが明らかになりました(図4f)。

成熟シナプスの減少による受容野応答の減弱

では、何が起こったことによって今回見られた受容野応答の減弱が見られたのでしょうか。受容野応答を見た同様のサンプルから脳スライスを作成し、微小興奮性シナプス後電流(mEPSC)を計測することによって機能的シナプスにどういった変化が見られるのかについて検討を行いました。その結果mEPSCの振幅及び頻度が減少していることが明らかになりました(図5c, d)。このことは機能的シナプスの数が減少していることを示唆しているものと考えられます。そこで、実際にシナプス数がどのように変化しているかを共焦点顕微鏡を用いてシナプス数を計測したところ、予想に反して増加していることが明らかとなりました(図5a, b)。ここで、増加しているシナプスの形態を、詳細に検討を行ったところ、細長い、未成熟なタイプのシナプスの数が増加していることが明らかとなりました(図5a)。つまり、臨界期

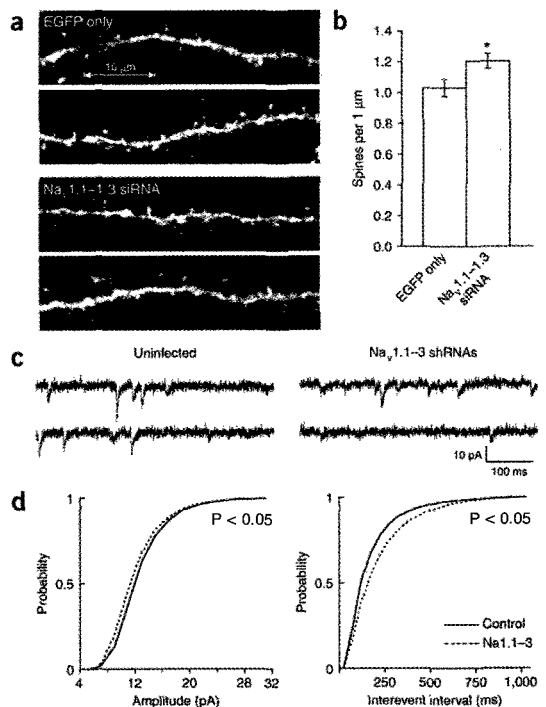


図5 微小シナプス電流とスパイン数に対する影響
(文献6より引用)

a-b. 生理計測と同様の条件で得られた脳を固定した後スライスし、共焦点顕微鏡により観察、スパイン数と形態を計測した。c-d. ウイルス感染細胞から微小シナプス電流を記録計測し、同電流の振幅と発現頻度を示す。振幅、発現頻度共に若干ではあるが統計的に有意に減少していることが分かる。

においてある特定の可塑性現象に関わるとされる樹状突起のナトリウムチャネルの発現抑制を施すと、シナプスの成熟が障害されることによって受容野応答が減弱することが明らかとなったわけです。本研究は臨界期における樹状突起の興奮性の重要性を個体脳で初めて明らかにしたもので、脳の機能を細胞単位で解析した画期的な試みであったと考えています。

恒常的可塑性に対する影響

ネットワーク全体の活動状況に応じて全体の活動を一定に(恒常的に)するように作用する可塑的な変化が報告されています¹⁴⁾。今回の実験ではナトリウムチャネルの発現抑制を行ったため、神経細胞に対し抑制作用をもたらしたと考えられま

す。前述のような恒常的可塑性が見られるとすれば、今回の場合シナプス入力が増強されるべきですが、そういった変化は全く見られなかった(図5c,d)ことから、本研究で施した条件で皮質2/3層の細胞に対し臨界期に抑制的な操作を行っても恒常的可塑性は誘導されないと考えられます。

終わりに

今回本研究で利用した2PLSMを用いたイメージングやin vivo patch clamp法は神経機能を多角的に追求する上で非常に重要な技術となりうると考えられます。また、これらを組み合わせて開発されたTPTP法も様々な遺伝子改変の手法を利用することができ、更に様々な動物種、脳領域に対して適応可能であるということから特定の行動を規定する分子や細胞、神経回路を生理行動学的に解析する良い手段となるでしょう。しかし、これだけでは解決しきれない問題も多く残されていることも事実です。これを乗り越えるためにより良い顕微鏡やプローブの開発、記録法やイメージング法の開発が必要不可欠であることはいうまでもありません。今後は様々な科学技術領域の融合が大きなブレークスルーを見いだす鍵になるのかもしれない。

文献

- 1) Neher, E. and Sakmann, B., *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature, 1976. 260 (5554) : p. 799-802.
- 2) Margrie, T.W., Brecht, M., and Sakmann, B., *In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain*. Pflugers Arch, 2002. 444 (4) : p. 491-8.
- 3) Denk, W., Strickler, J.H., and Webb, W.W., *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, 1990. 248 (4951) : p. 73-6.
- 4) Helmchen, F. and Denk, W., *Deep tissue two-photon microscopy*. Nat Methods, 2005. 2 (12) : p. 932-40.
- 5) Helmchen, F. and Denk, W., *New developments in multiphoton microscopy*. Curr Opin Neurobiol, 2002. 12 (5) : p. 593-601.
- 6) Komai, S., et al., *Postsynaptic excitability is necessary for strengthening of cortical sensory responses during experience-dependent development*. Nat Neurosci, 2006. 9 (9) : p. 1125-33.
- 7) Komai, S., et al., *Two-photon targeted patching (TPTP) in vivo*. Nat Protocols, 2006. 1 (2) : p. 648-653.
- 8) Dittgen, T., et al., *Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101 (52) : p. 18206-11.
- 9) London, M. and Hausser, M., *Dendritic computation*. Annu Rev Neurosci, 2005. 28: p. 503-32.
- 10) Stuart, G.J. and Hausser, M., *Dendritic coincidence detection of EPSPs and action potentials*. Nat Neurosci, 2001. 4 (1) : p. 63-71.
- 11) Bi, G.Q. and Poo, M.M., *Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type*. J Neurosci, 1998. 18 (24) : p. 10464-72.
- 12) Markram, H., et al., *Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs*. Science, 1997. 275 (5297) : p. 213-5.
- 13) Mainen, Z.F. and Sejnowski, T.J., *Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons*. Nature, 1996. 382

(6589) : p. 363-6.

- 14) Turrigiano, G.G. and Nelson, S.B.,
*Homeostatic plasticity in the developing
nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2004. 5
(2) : p. 97-107.

輝け次代の担い手たち

大脳皮質形成に関わる Cdk5 と Reelin/Dab1 情報伝達系の相互作用

佐藤 裕

(東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻神経分子機能研究室)

はじめに

近年、脳形成期における神経細胞の配置、投射の異常に伴う神経回路網形成異常が癲癇、精神遅滞、統合失調症などの重篤な発達障害、精神疾患の原因になることが分かってきた。これらの分子基盤の理解、臨床治療への応用のために多くの研究が精力的に行われ、その一端が明らかになってきている。例えば、哺乳類の大脳新皮質は脳の外表面に平行な6層構造を有する。同一層内の神経細胞は類似の細胞形態と特徴的な投射様式を持っており、それらが整然と配置され、各層の神経細胞が互いに連絡しあうことで、複雑かつ正確な回路網が形成され、脳は高度な情報処理能力を発揮できる。このような層構造は次のように形成されると考えられている。大脳皮質の興奮性神経細胞は、脳室帯から脳表面の軟膜へと突起を伸ばした、いわゆる‘放射状グリア’（実際は分化したグリア細胞ではなく、神経細胞を産生する幹細胞）から生れ、軟膜方向へと放射状に移動（radial migration）し、同じ時期、場所で産生された神経細胞はおよそ同じ場所に配置される。その移動様式は、(1)細胞体トランスロケーション（somal translocation）、(2)多極性移動（multipolar migration）、(3)ロコモーション（locomotion）に大別され、最終的に‘inside-out’と呼ばれる、早生まれの細胞を遅生まれの細胞が追い越すかたちで細胞が適切な位置に配置される¹⁾（図1、左図、次ページ参照）。一方、大脳皮質の抑制性神経細胞は大脳基底核原基からの接線方向への移動（tangential migration）により主に供給される。

このような神経細胞の分裂・分化、移動、配置といった、脳の層構造形成に関わる因子の同定は驚くほど急速に進んでいる。Reelin、Dab1、Lis1、DCX、Nudel、filamin、DISC1、Cdk5などを始めとして、ここでは列挙しきれないほど多くのタンパク質が報告されている²⁾。一方、それら因子間の相互作用に関しては未だ理解されているとはいえない。その中でもCdk5とReelin/Dab1情報伝達系との関連については、欠損マウスで観察される大脳皮質での層構造の異常が‘一見’類似していたこと、両シグナルを構成する因子が‘比較的’共通していたことから、両者の間に直接的なクロストークが存在する可能性が議論されながら、はっきりとした知見は得られていなかった。2002年にCdk5がDab1をリン酸化するという直接的な相互作用の報告がなされたが、その上流、下流、そしてリン酸化自身の役割についてもほとんどわかっていなかった³⁾。本稿では、これまでに明らかにされたCdk5とReelin/Dab1系に関するそれぞれの知見と、Cdk5とReelin/Dab1系のクロストークに関する最近の報告に、私自身のデータを交えて解説するつもりである。

Cdk5とその役割

サイクリン依存性キナーゼ群（Cdks：Cyclin-dependent kinases）は、細胞周期進行を制御する重要なセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞周期依存的にタンパク質量の変動する活性化サブユニット、サイクリンによって活性が調節されている。Cdksのほとんどは分裂の活発な増殖細

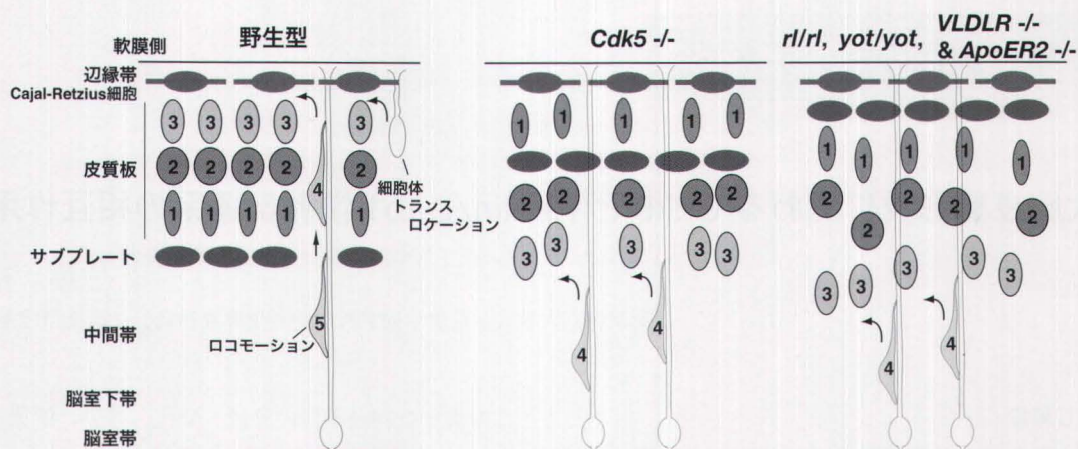


図1 大脳皮質における層構造形成と神経細胞の移動

脳室帯または脳室下帯で生まれた神経細胞は多極性移動、ロコモーション、細胞体トランスロケーションなどの移動様式により表層（軟膜）側へ移動する。この時、遅生まれの細胞は早生まれの細胞を追い越して軟膜側の辺縁帯（Reelin 分泌細胞である Cajal-Retzius 細胞を含む）直下へ辿り着く。このため、遅生まれの細胞は早生まれの細胞より表層側へと配置される 'inside-out' と呼ばれる層構造を形成する（左図）。しかし、Cdk5 欠損マウス（Cdk5^{-/-}）（中央図）、または Reelin 欠損マウス（rl/rl）、Dab1 欠損マウス（yot/yot）、ApoER2 と VLDLR の二重欠損マウス（ApoER2^{-/-}&VLDLR^{-/-}）（右図）では遅生まれの神経細胞が早生まれの細胞を乗り越えられず、層構造が逆転する（outside-in）。

胞において、細胞周期のアクセル役として機能している。その中でCdk5は分化、分裂を終えた神経細胞で主に活性が検出される特異的なCdkであり、神経系の発生に伴って次第に活性を増加する（近年では脾臓、筋肉、精巣などでの活性も報告されているが、それらにおける活性は神経細胞に比べると相当低いと考えられる）。これはCdk5の活性化サブユニットであるp35またはp39が神経細胞において豊富に発現していることに起因する。Cdk5はヒストンH1、神経細胞に特異的な中間径繊維であるニューロフィラメントH、微小管結合タンパク質であるタウのリン酸化酵素の一つ（TPKII：tau protein kinase II）として同定されてきた。当初同定された基質はいずれも細胞骨格系のタンパク質であり、Cdk5はこれらの基質のリン酸化を介して神経細胞で細胞骨格の制御を行っていると考えられていた。現在知られているCdk5の生理的機能として神経細胞の移動や神経突起の伸長、シナプス活動、また神経変性病理における神経細胞死などがある。特にアルツハイマー病では、主要な病理的特徴の一つである神経原繊維変化の主な構成成分が高リン酸化された

タウであることから、Cdk5とタウのリン酸化との関連が注目を集めている。他のタウオパチーであるピック病（Pick disease）、進行性核上性麻痺（progressive supranuclear palsy）、大脳皮質基底核変性症（corticobasal degeneration）、前頭側頭葉型認知症（FTDP-17：frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17）においても、異常リン酸化タウが細胞内凝集体として観察されており、Cdk5が多くの神経変性疾患に関与している事が強く示唆されている^{4)・5)}。

一方、Cdk5の生理的機能はCdk5遺伝子欠損マウスによって解析されている。興味深いことに、Cdk5は脳の発生期、特に層構造形成において必須であることが示されている⁶⁾。Cdk5を欠損したマウスは周産期致死であり、脳の広い範囲（大脳皮質、海馬、小脳、脳幹、脊髄）で神経細胞の配置や形態が異常となる。大脳皮質では、層構造形成の初期段階であるプレプレートの形成は正常に行われ、また将来の第6層になるべき神経細胞群はプレプレートを分割し、皮質板に進入する（p35欠損マウスにおいて、プレプレート間に入る早生まれの細胞でさえも野生型の細胞とは異なる細胞

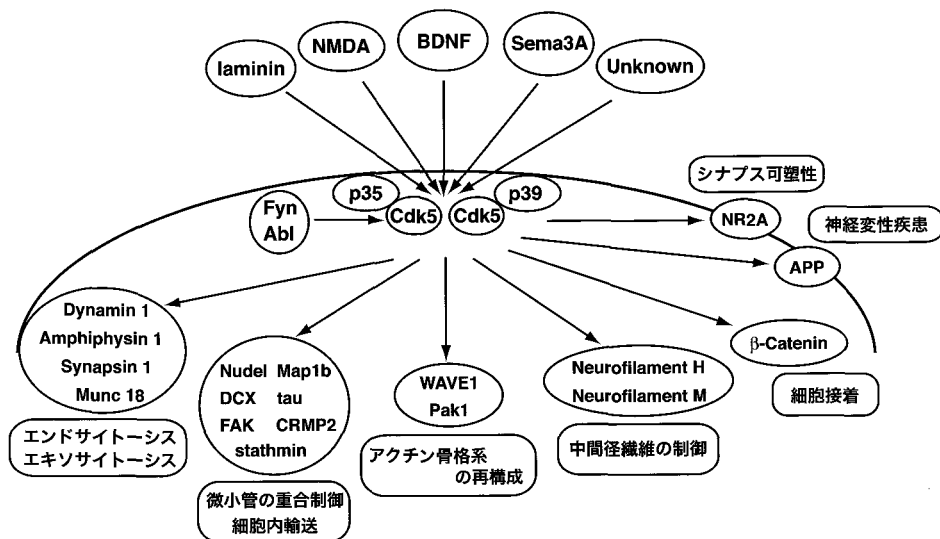


図2 Cdk5 の関わる情報伝達系

Cdk5 は p35 又は p39 と結合することにより活性化される。Cdk5 活性は様々な細胞外刺激により、転写レベル (laminin、BDNF)、タンパク質量 (NMDA)、酵素活性レベル (Sema3A) で制御されている。Cdk5 は様々な基質のリン酸化を介し、エンドサイトーシス・エキソサイトーシスや、微小管、アクチンフィラメント、中間径繊維といった細胞骨格系、または細胞接着などの生理機能の制御に関わる。また異常活性化されることでアルツハイマー病などの神経変性疾患にも関与する可能性が示唆されている。

形態をしていることから、早生まれの細胞でも完全に正常という訳ではないようだが⁷⁾。しかし、その後に生まれた神経細胞はサブプレートを通り抜けることができず、サブプレート直下に次々と蓄積してしまい、いわゆる 'outside-in' のパターンを呈する (図1、中央図)。小脳では、分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層の3層からなるはずの小葉において著しい形成不全を生じる。Cdk5 の活性化サブユニットである p35 のみを欠損したマウスも Cdk5 欠損マウスほど顕著ではないが、類似した層構造の異常を示す。また、生後3週間以降、痙攣発作による突然死が観察されるとも報告されている。一方、p39 欠損マウスは明らかな表現型異常を呈さないが、p35 と p39 の双方を欠損したマウスでは Cdk5 活性がほぼ完全に消失し、Cdk5 欠損マウスとはほぼ同一の表現型を示す。このことは p35 と p39 が Cdk5 の主要な活性化サブユニットであり、脳形成において互いに役割を補完し合っていることを意味する。p39 欠損マウスで神経細胞の配置に著しい異常は認められないのに対し、p35 欠損マウスで明確な異常が認められる

のは、p39 が p35 に比べ発現時期が遅いという報告と、Cdk5-p35 は Cdk5-p39 より安定で高い活性を示すという結果によって説明できる^{4)・5)}。

Cdk5 欠損マウスで観察される層構造不全は神経細胞の移動の異常に起因する。細胞の移動を簡略すると、先端端でのフィロポディア・ラメリポディアの伸展と接着と、それに続く細胞核を含む細胞体の前方への移動と後端側の収縮・退縮からなる。Cdk5 は運動性に関わる細胞骨格や細胞接着の制御等を介して神経突起の伸長、神経細胞の移動を調節していると考えられている (図2)。Cdk5 はアクチン重合に関わるタンパク質をリン酸化することで、神経細胞の形態変化や運動に大きく関わっている。低分子量 G タンパク質 Rac は成長円錐のアクチンダイナミクスに関わるが、Cdk5 と Rac の結合は、Rac 下流の Pak1 の Cdk5 によるリン酸化を促し、アクチンダイナミクスに影響を与える⁵⁾。最近、Cdk5 が WAVE1 (Rho ファミリーの下流で葉状仮足の形成を担う WASP ファミリーの一つ) をリン酸化し、Arp2/3 によるアクチン重合を阻害することも報告された⁸⁾。

Cdk5は微小管の重合制御や微小管を足場とした細胞内物質輸送の制御にも関わる。Cdk5は微小管結合タンパク質であるタウ、MAP1bをリン酸化し、その微小管結合能、及び微小管重合能を減少させ、微小管を不安定化する⁵⁾。また軸索のガイダンス因子であるSema3Aは、Fynとそれに続くCdk5の活性化を介してCRMP2やタウのリン酸化を引き起こす。リン酸化されたCRMP2はさらにGSK3 β によってリン酸化され、タウとともに微小管重合を調節し、突起の伸長に関与する⁹⁾。Cdk5はX連鎖性滑脳症の原因タンパク質DCXや、I型滑脳症の原因タンパク質Lis1の結合タンパク質であるNudelも基質とし、細胞移動の重要な過程である細胞核の移動や微小管に沿ったタンパク質の輸送を制御している^{5), 10)}。他にCdk5は非受容体型チロシンキナーゼであるFAKをリン酸化し、微小管形成中心から伸びて核を取り囲む'かご'状微小管構造を制御し、核の移動に関与するとも報告されている¹¹⁾。

細胞接着に関して、Cdk5は β -cateninをリン酸化し、 β -cateninのカドヘリンからの解離を促し、カドヘリンを不安定化する。その結果、細胞間接着は弱まる。また、神経細胞がlamininと接着すると、p35の発現量が増加し、Cdk5活性が上昇し、神経突起の伸長が導かれる、との報告もある^{4), 5)}。

Reelin-Dab1情報伝達系

変異マウス*reeler*では、大脳皮質、海馬、小脳、脳幹、脊髄といった中枢神経系の様々な領域で神経細胞の配置に異常が認められる。大脳皮質においては、最終分裂を終えた神経細胞がプレプレートに割って入れず、その下に逆転傾向'outside-in'をもって配置している(図1、右図)。また各層の細胞は全体に広がって分布する傾向を示し、層構造を識別しにくくなっている。この*reeler*の原因遺伝子産物として同定されたのがReelinである¹²⁾。Reelinは大脳皮質では辺縁層のCajal-Retzius細胞から分泌される3461アミノ酸からなる細胞外分泌タンパク質で、多量体

化することでシグナル伝達の効率を高める¹³⁾。ApoE receptor 2(ApoER2)とvery low density lipoprotein receptor (VLDLR)、 $\alpha 3 \beta 1$ integrin、CNRが移動中の神経細胞上のReelin受容体と考えられている(図3-A)。特にリポタンパク質受容体でもあるApoER2とVLDLRは生化学的、遺伝学的にもReelin受容体としての解析が進んでいる。ApoER2、VLDLRは膜一回貫通型受容体であり、N末側の細胞外ドメインでReelinとC末側の細胞質領域でDab1などの細胞内エフェクターと結合する。ApoER2とVLDLRをとともに欠損させた変異マウスは*reeler*マウスとほぼ同一の表現型を示す¹²⁾。

Dab1は555アミノ酸(約80kDa)からなる細胞内アダプタータンパク質である(図3-A)。N末側にReelin受容体や細胞膜の脂質成分(ホスファチジルイノシトール4,5リン酸)との結合に必要なPhospho-tyrosine bindingドメイン(PTBドメイン)を有する。またこの領域におけるN-WASPとの結合は、Arp2/3を介したアクチン重合を制御する¹⁴⁾。中央部には*in vitro*でSrcファミリーキナーゼ(Src、Fyn)によってリン酸化されるチロシン残基のクラスター(Tyr185、Tyr198、Tyr200、Tyr220、Tyr232)が存在し、その内のTyr198、Tyr220、Tyr232のリン酸化は*in vivo*においてReelinによって引き起こされる。リン酸化されたDab1はさらにSrcファミリーを活性化することでシグナルを増強する。上記5つのチロシン残基を全て非リン酸化アミノ酸であるフェニルアラニンに置換したDab1を発現する変異マウスが*reeler*マウスとほぼ同一の表現型を示すことから、Reelin情報伝達系においてDab1のチロシンリン酸化は必須であると考えられている。チロシンリン酸化されたDab1はSH2ドメインをもつ多くのタンパク質との結合能を獲得する。チロシンリン酸化されたDab1はPI3Kのサブユニットであるp85 α と結合し、PI3Kカスケードを活性化する¹²⁾。ReelinによってTyr220、232をリン酸化されたDab1はNck β のSH2領域に結合し、Nck β の局

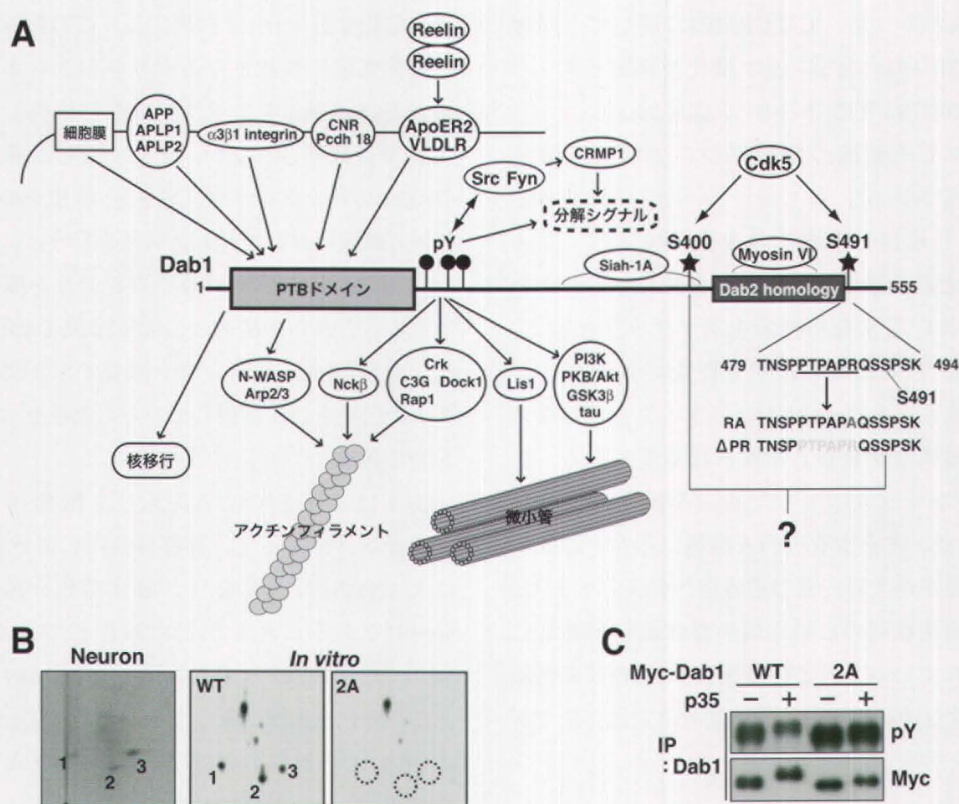


図3 Dab1 を介した情報伝達系と Cdk5 による C 末側 Ser リン酸化

A. Dab1 分子の模式図とシグナル伝達。Dab1-p80 は N 末側の PTB ドメイン、中央部のリン酸化チロシン領域 (pY) と C 末部からなる。Reelin 受容体である ApoER2、VLDLR は Dab1 の PTB 領域に結合し、Tyr リン酸化を介して下流 (Nck β 、Crk、Lis、PI3K) へとシグナルを伝達する。また他に Dab1 に結合する様々なタンパク質も報告されている。Dab1 は図に示したようなタンパク質との相互作用を介して、主に細胞骨格系の制御に関与すると考えられている。既知の結合タンパク質の多くはチロシン領域よりも N 末側に集中し、C 末側の機能はよく分かっていない。Cdk5 は神経細胞内で 400、491 番目の Ser 残基 (Ser400、Ser491) をリン酸化する (図 3-B 参照)。

B. 二次元リン酸化ペプチドマッピングによる Dab1 リン酸化部位の同定。 32 P で代謝ラベルした初代培養神経細胞の Dab1 (Neuron) と *in vitro* でリン酸化した Dab1 (*In vitro*) を比較すると、3 つのシグナル (1-3) が一致する。Ser400 と Ser491 を Ala に置換した Dab1-2A では 3 つのシグナルが消失することから、それらが主なリン酸化部位であることが判る。

C. Cdk5 による Dab1 Tyr リン酸化の抑制。HEK293 細胞に Dab1 と Cdk5 の活性化サブユニットである p35 を共に強制発現し、Dab1 の Tyr リン酸化の変化を調べた。p35 との共発現によって Dab1 の Tyr リン酸化 (pY) は抑制された。Cdk5 によるリン酸化部位、Ser400 と Ser491 を変異させた Dab1-2A では、Tyr リン酸化抑制効果が観察されない。

在を細胞体から神経突起、成長円錐へと変え、アクチン骨格の構造を変化させる¹⁵⁾。また Dab1 は Crk ファミリーの SH2 にも結合し、Dab1-CrkL-C3G-Rap1、または Dab1-CrkII-Dock1-Rac からなる情報伝達系を制御し、細胞接着やアクチン骨格系を制御しているようである^{16)・17)}。Tyr198、220 をリン酸化された Dab1 は Lis1 と結合できる。しかし、滑脳症で見られる変異 Lis1 と Dab1 は結

合できない¹⁸⁾。この結果は、Lis1 と Dab1 の結合が脳形成において重要であることを示唆する。また、*reeler* マウスや ApoER2 と VLDLR が欠損したマウスにおいては、Dab1 のチロシンリン酸化レベルが大幅に減少するのに反して Dab1 のタンパク質量は増大している。これは Dab1 のチロシンリン酸化がユビキチン・プロテアソーム系による分解シグナルとしても使われているからである¹²⁾。

reeler マウスにおいてはCRMP1に関しても同様に、CRMP1のチロシンリン酸化の抑制とタンパク質量の増加が観察される¹⁹⁾ (図3-A)。

Dab1のC末領域の機能については殆ど解析が進んでおらず、ユビキチンリガーゼであるSiah-1Aと結合しその活性を調節する²⁰⁾、ミオシンVIと結合する²¹⁾、など限られた報告しかない (図3-A)。C末側の機能を示すデータとして、Dab1-p45 (C末領域を殆どもたないスプライシングバリエーションの一つ) をノックインしたマウス脳での層構造を観察した報告は重要である。このp45をシングルコピーでのみ発現するマウス (p45/-) は、本来皮質板の表層側に存在するはずの神経細胞が大脑皮質の辺縁層へ侵入しており、また海馬歯状回のCA1領域の錐体細胞が異常に配置されている²²⁾。この結果はDab1のC末側領域も正常な神経細胞の移動、位置決定に必須であることを示唆している。

Cdk5とReelin/Dab1情報伝達系の相互作用

図2、図3-Aに示したように、Reelin/Dab1とCdk5の下流では多くの因子が共有されており、Reelin/Dab1とCdk5がかなり密接に関わっていることを示唆する。しかしCdk5欠損マウスにおいてReelinのmRNAの発現、またDab1のmRNA量、タンパク質量に変化はない。逆に*reeler* マウスにおいてCdk5のタンパク量も変化しない。一方、ReelinがCdk5活性に与える影響に関しては、異なる複数の報告がなされており未だははっきりしない¹²⁾、²³⁾、²⁴⁾。

p35欠損マウスにReelinまたはDab1の欠損を付加すると、より重篤な表現型を表すこと²⁵⁾、またCdk5によるDab1-Ser491のリン酸化はReelin非依存的であること³⁾ などから、Reelin/Dab1とCdk5は独立した別々の情報伝達系で機能していると考えられた。しかし、最近のOhshimaらの報告²⁶⁾ によると、Dab1は*in vitro*、培養細胞内でSer491を含む複数のSP、TP部位をCdk5によってリン酸化され、これらのリン酸化はDab1のチロシン

リン酸化を*in vitro*で抑制する。この抑制は、リン酸化部位の候補となるセリン、スレオニン残基全て (8ヶ所) をアラニン残基に置換した変異Dab1では観察されない。また、Cdk5欠損マウス (*reeler* のバックグラウンドをもつ) 由来の初代培養神経細胞に対してReelin刺激を行うと、対照群 (*reeler*) と比べてDab1のチロシンリン酸化が促進する。これらの結果はCdk5によるDab1のリン酸化がDab1のチロシンリン酸化から下流へのシグナル伝達を負に制御している可能性を示唆するものである。

我々はこれまでに二次元リン酸化ペプチドマッピングによって、神経細胞内におけるCdk5によるDab1の主要なリン酸化部位がSer400とSer491であることを学会で報告してきた。(図3-B)。これら2ヶ所のリン酸化がDab1のチロシンリン酸化を抑制できるかどうかを培養細胞であるHEK293細胞にDab1もしくはSer400とSer491をアラニンに置換した変異Dab1 (Dab1-2A) をCdk5-p35と共発現することで調べた (図3-C)。野生型のDab1では、Cdk5-p35との共発現によってDab1のチロシンリン酸化が抑制されていたが、Dab1-2AではCdk5-p35との共発現によってもその抑制は観察されなかった。この結果は細胞内で観察されるDab1のチロシンリン酸化の抑制効果も、Cdk5によるSer400、Ser491の2ヶ所のリン酸化によるものであることを示唆している。

ではCdk5によるDab1のリン酸化の役割はDab1のチロシンリン酸化の抑制だけなのだろうか？この疑問を解決するために、我々はアフィニティークロマトグラフィーによるDab1結合タンパク質の単離と質量分析計によるその同定を試みた。簡単なスキームは図4-Aに示した。まずGSTタグを付加したDab1のC末断片を大腸菌で発現し、グルタチオンビーズに結合させ、これを精製Cdk5-p35によってリン酸化した。このDab1 C末断片カラムを用い、ラット脳抽出液からDab1のリン酸化状態に依存して結合するタンパク質を単離した。その結果、3種類のタンパク質がセリン

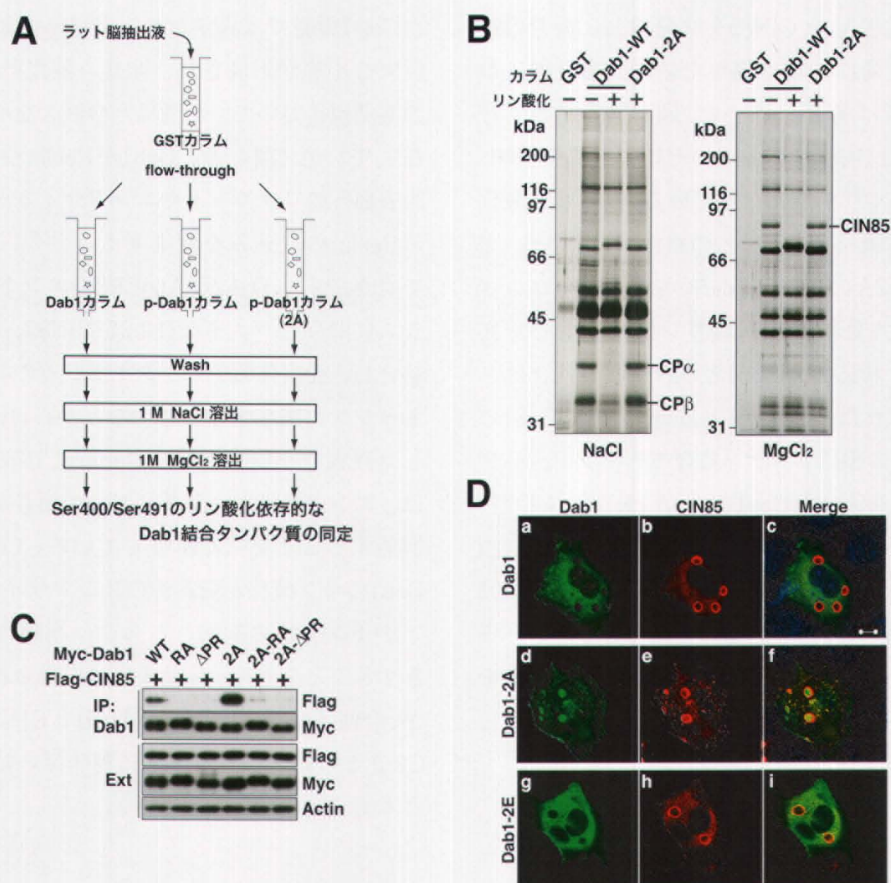


図4 Dab1 の Ser リン酸化に依存して結合するタンパク質の同定

A. 結合タンパク質の同定方法。

B. Dab1 カラムから 1 M NaCl 及び 1 M MgCl₂ で溶出した画分の銀染色像。NaCl、MgCl₂ 溶出画分において非リン酸化 Dab1 に特異的に結合するバンドが観察された。これらを質量分析法によって解析した結果、それぞれ CP α、CP β、CIN85 と同定された。

C. 細胞内における Dab1 と CIN85 の結合。HEK293 細胞に Dab1 と CIN85 を共発現させ、免疫沈降によって細胞内における結合を観察した。リン酸化されない Dab1-2A は CIN85 とよく結合していた。CIN85 との結合モチーフである 'PxxxPR' 配列 (図 3-A 参照) を変異させた Dab1 (RA: Arg を Ala に置換した変異体、ΔPR: PxxxPR が欠失した変異体) は CIN85 との結合能を失った。

D. Dab1 と CIN85 の細胞内局在。Cos-7 細胞に Dab1 と CIN85 を共発現し、その局在を観察した。CIN85 を発現した Cos-7 細胞は巨大な vesicle を形成した。Dab1-2A を CIN85 と共発現すると、この vesicle に Dab1 が局在していた。

'非リン酸化'型の Dab1 に結合していた (図 4B)。この結合は Cdk5 によるリン酸化に依存的であり、Ser400 と Ser491 をリン酸化しておく観察されなかった。質量分析計による同定の結果、これらのタンパク質は CP α、CP β、CIN85 であることがわかった。CP α、CP β は α、β のヘテロ二量体を形成して、アクチンフィラメントの + 端に結合し、アクチン重合を阻害するとともにフィラメントを安定化するタンパク質である。CIN85 は

多数の結合ドメインをもつアダプタータンパク質であり、クラスリン依存性のエンドサイトーシスを介して受容体型チロシンキナーゼの代謝に関わると考えられている²⁷⁾。アクチンの脱重合はエンドサイトーシスの過程においても重要であり、CP と CIN85 が結合するという報告²⁸⁾と合わせて、CP と CIN85 は協調してエンドサイトーシスに機能している可能性が高い。

HEK293 細胞に Dab1 の野生型 (WT) または非

リン酸化型 (2A) と CIN85 を共発現し、両者の結合を免疫沈降によって調べた結果、細胞内においても両者は結合していた (図 4C)。また、野生型の Dab1 (内在性のキナーゼによって Ser400、Ser491 が弱くリン酸化されている) は非リン酸化型の Dab1 に比べ、CIN85 との結合が抑制され (図 4C、WT と 2A の比較)、Cdk5 の活性化サブユニット p35 との共発現は Dab1 のリン酸化を著しく亢進させ、それに伴い Dab1 と CIN85 との結合はさらに抑制された (data not shown)。また Dab1 の Ser491 近傍の SH3 ドメイン結合モチーフ 'PxxxPR' 配列に変異を入れた Dab1 (RA、Δ PR、図 3-A 参照) では CIN85 との結合が顕著に抑制されていた (図 4C)。これらの結果は、CIN85 が Dab1 の Ser491 近傍の PxxxPR 配列を認識して結合しており、細胞内においても Dab1 のリン酸化が両者の結合を制御していることを示す。さらに CIN85 を導入し

た Cos-7 細胞では異常なエンドソームと思われる巨大な小胞が形成され、非リン酸化型の Dab1 との共発現において、両者はその巨大な小胞で共局在していた (図 4D)。Dab1 が Reelin 受容体の細胞表面へのリクルートやエンドサイトーシスによる Reelin の取込みを促進すること²⁹⁾、Dab1 のホモログである Dab2 が ApoER2 のエンドサイトーシスに関与し³⁰⁾、また Dab2 が CIN85、CD2AP と結合し、受容体型チロシンキナーゼのエンドサイトーシスに関与すること³¹⁾ などから、図 4-D に示した巨大な小胞における Dab1 と CIN85 の共局在は、エンドサイトーシスにおいて両者が協調して機能することを強く示唆している。Cdk5 による Dab1 のリン酸化が受容体のエンドサイトーシス、アクチン骨格の制御、さらには細胞の移動に関与することを直接示す結果はまだ得られていないが、今回示した Cdk5 による Dab1 と CIN85、CP α 、CP β との結合制御は非常に興味深い結果であると考えている (図 5)。

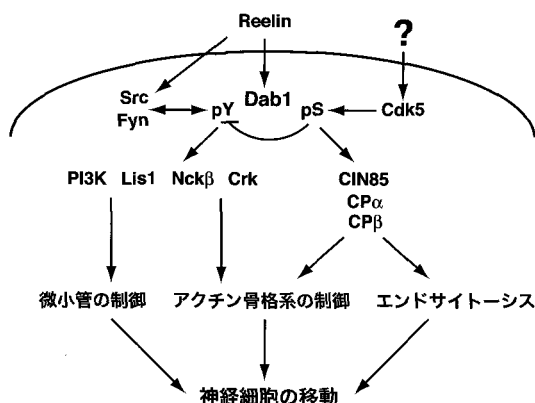


図 5 Dab1 のリン酸化とそれに関与すると考えられる情報伝達系

Src または Fyn によって Tyr リン酸化された Dab1 は PI3K、Lis1、Nck β 、Crk などによりシグナルを伝える。また Dab1 は C 末部において、CIN85 との結合を介してアクチン骨格系の制御や受容体のエンドサイトーシスに関与している可能性が考えられる。Cdk5 は Dab1 の C 末の Ser リン酸化を介して、Tyr リン酸化を抑制し、また CIN85、CP α 、CP β との結合を阻害し、Dab1 から下流へのシグナル伝達を妨げる可能性が考えられる。Src ファミリーによる Dab1 の Tyr リン酸化だけでなく、Cdk5 による Dab1 の Ser リン酸化も神経細胞の正常な移動と配置に関わっていると考えられる。

おわりに

今回、Cdk5 と Reelin/Dab1 の相互作用に関するこれまでの知見と我々の見つけた新たな役割の可能性について紹介した。変異マウスの類似性とシグナルを構成する因子の共通性から推測された Cdk5 と Reelin/Dab1 情報伝達系の関係は、ここにきて新たな局面を迎え始めている。Dab1 は、Reelin 及びその受容体によって誘導されるチロシンリン酸化を中心にその機能を語られることが多い。確かに Reelin シグナルにおいてチロシンリン酸化は必須であり、その下流の因子も数多く報告されてきている。一方、Cdk5 による Dab1 のセリンリン酸化は構造的な変化を引き起こし、チロシンリン酸化に抑制的に働く。この結果は Cdk5 と Reelin/Dab1 が完全に独立したパラレルな関係ではなく、Dab1 のセリンリン酸化が Reelin シグナルの '修飾' に関わることを示す。また、今回紹介したように、Cdk5 による Dab1 のセリンリン酸化は Dab1 と他のタンパク質との相互作用に阻害

的にも働いている。この結果はCdk5によるDab1のリン酸化がReelin/Dab1情報伝達系に対して新たな系路を付け加えることを意味する。Cdk5とDab1は脳形成期においてだけではなく病理においても共通のパートナーを有する。Reelinはアルツハイマー病の原因となるA β の前駆タンパク質APP(β -amyloid precursor protein)とDab1との結合やA β の産生を制御している³²⁾。セリンリン酸化型のDab1はAPPと*in vitro*でより強く結合し(data not shown)、またCdk5はAPPのリン酸化を介してその代謝に関与している⁵⁾。これらの結果はReelin/Dab1、Cdk5、APPの相互作用がアルツハイマー病に関与する可能性も示唆する。他にReelin/Dab1とCdk5はそれぞれNMDA受容体を介したシナプス活動にも関与している⁵⁾・³³⁾。またDab1は膜近傍で機能する他に、チロシンリン酸化非依存的に核移行すること³⁴⁾も最近示され、これまでとは違う、予想外のDab1の機能が現れ始めている。今後、これらの興味深い情報伝達系の解明に少しでも貢献したいと願っている。

謝辞

今回紹介した研究は、東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻神経分子機能研究室において行われたものであり、研究の遂行にあたり研究室の久永眞市教授、浅田明子助手、斎藤太郎助手、淵上孝裕卒研究生には多くの御指導、または実験のサポートを賜りました。この場を借りて御礼申し上げます。また共同研究、並びに多くの助言を頂いた、東京都立大学大学院理学研究科化学専攻生物化学研究室的磯辺俊明教授、田岡万悟助手、杉山奈美氏、慶応義塾大学医学部解剖学教室の仲嶋一範教授、久保健一郎博士に心より御礼申し上げます。またこのような執筆の機会を与えて下さいました仲嶋先生に改めて感謝申し上げます。

文献

- 1) Kanatani S, Tabata H, Nakajima K (2005) Neuronal migration in cortical development.

- J Child Neurol 20:274-279.
- 2) Marin O, Valdeolmillos M, Moya F (2006) Neurons in motion: same principles for different shapes? Trends Neurosci 29:655-661.
- 3) Keshvara L, Magdaleno S, Benhayon D, Curran T (2002) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates disabled 1 independently of Reelin signaling. J Neurosci 22:4869-4877.
- 4) Hisanaga S, Saito T (2003) The regulation of cyclin-dependent kinase 5 activity through the metabolism of p35 or p39 Cdk5 activator. Neurosignals 12:221-229.
- 5) Smith D (2003) Cdk5 in neuroskeletal dynamics. Neurosignals 12:239-251.
- 6) Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. Proc Natl Acad Sci U S A 93:11173-11178.
- 7) Gupta A, Sanada K, Miyamoto DT, Rovelstad S, Nadarajah B, Pearlman AL, Brunstrom J, Tsai LH (2003) Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glial interaction in radial migration. Nat Neurosci 6:1284-1291.
- 8) Kim Y, Sung JY, Ceglia I, Lee KW, Ahn JH, Halford JM, Kim AM, Kwak SP, Park JB, Ho Ryu S, Schenck A, Bardoni B, Scott JD, Nairn AC, Greengard P (2006) Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. Nature 442:814-817.
- 9) Uchida Y, Ohshima T, Sasaki Y, Suzuki H, Yanai S, Yamashita N, Nakamura F, Takei K, Ihara Y, Mikoshiba K, Kolattukudy P, Honnorat J, 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.
- 10) Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG (2004) Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* 41:215-227.
 - 11) Xie Z, Tsai LH (2004) Cdk5 phosphorylation of FAK regulates centrosome-associated microtubules and neuronal migration. *Cell Cycle* 3:108-110.
 - 12) Stolt PC, Bock HH (2006) Modulation of lipoprotein receptor functions by intracellular adaptor proteins. *Cell Signal* 18:1560-1571.
 - 13) Kubo K, Mikoshiba K, Nakajima K (2002) Secreted Reelin molecules form homodimers. *Neurosci Res* 43:381-388.
 - 14) Suetsugu S, Tezuka T, Morimura T, Hattori M, Mikoshiba K, Yamamoto T, Takenawa T (2004) Regulation of actin cytoskeleton by mDab1 through N-WASP and ubiquitination of mDab1. *Biochem J* 384:1-8.
 - 15) Pramatarova A, Ochalski PG, Chen K, Gropman A, Myers S, Min KT, Howell BW (2003) Nck β interacts with tyrosine-phosphorylated disabled 1 and redistributes in Reelin-stimulated neurons. *Mol Cell Biol* 23:7210-7221.
 - 16) Ballif BA, Arnaud L, Arthur WT, Guris D, Imamoto A, Cooper JA (2004) Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons. *Curr Biol* 14:606-610.
 - 17) Chen K, Ochalski PG, Tran TS, Sahir N, Schubert M, Pramatarova A, Howell BW (2004) Interaction between Dab1 and CrkII is promoted by Reelin signaling. *J Cell Sci* 117:4527-4536.
 - 18) Assadi AH, Zhang G, Beffert U, McNeil RS, Renfro AL, Niu S, Quattrocchi CC, Antalffy BA, Sheldon M, Armstrong DD, Wynshaw-Boris A, Herz J, D'Arcangelo G, Clark GD (2003) Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet* 35:270-276.
 - 19) Yamashita N, Uchida Y, Ohshima T, Hirai S, Nakamura F, Taniguchi M, Mikoshiba K, Honnorat J, Kolattukudy P, Thomasset N, Takei K, Takahashi T, Goshima Y (2006) Collapsin response mediator protein 1 mediates reelin signaling in cortical neuronal migration. *J Neurosci* 26:13357-13362.
 - 20) Park TJ, Hamanaka H, Ohshima T, Watanabe N, Mikoshiba K, Nukina N (2003) Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. *Biochem Biophys Res Commun* 302:671-678.
 - 21) Morris SM, Arden SD, Roberts RC, Kendrick-Jones J, Cooper JA, Luzio JP, Buss F (2002) Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton. *Traffic* 3:331-341.
 - 22) Herrick TM, Cooper JA (2002) A hypomorphic allele of dab1 reveals regional differences in reelin-Dab1 signaling during brain development. *Development* 129:787-796.
 - 23) Ohkubo N, Lee YD, Morishima A, Terashima T, Kikkawa S, Tohyama M, Sakanaka M, Tanaka J, Maeda N, Vitek MP, Mitsuda N (2003) Apolipoprotein E and Reelin ligands modulate tau phosphorylation

- through an apolipoprotein E receptor/disabled-1/glycogen synthase kinase-3 β cascade. *Faseb J* 17:295-297.
- 24) Gonzalez-Billault C, Del Rio JA, Urena JM, Jimenez-Mateos EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simo S, Torre AL, Gavin R, Wandosell F, Soriano E, Avila J (2005) A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. *Cereb Cortex* 15:1134-1145.
 - 25) Ohshima T, Ogawa M, Veeranna, Hirasawa M, Longenecker G, Ishiguro K, Pant HC, Brady RO, Kulkarni AB, Mikoshiba K (2001) Synergistic contributions of cyclin-dependant kinase 5/p35 and Reelin/Dab1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2764-2769.
 - 26) Ohshima T, Suzuki H, Morimura T, Ogawa M, Mikoshiba K (2006) Modulation of Reelin signaling by Cyclin-dependent kinase 5. *Brain Res.*
 - 27) Dikic I (2002) CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS Lett* 529:110-115.
 - 28) Hutchings NJ, Clarkson N, Chalkley R, Barclay AN, Brown MH (2003) Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *J Biol Chem* 278:22396-22403.
 - 29) Morimura T, Hattori M, Ogawa M, Mikoshiba K (2005) Disabled1 regulates the intracellular trafficking of reelin receptors. *J Biol Chem* 280:16901-16908.
 - 30) Cuitino L, Matute R, Retamal C, Bu G, Inestrosa NC, Marzolo MP (2005) ApoER2 is endocytosed by a clathrin-mediated process involving the adaptor protein Dab2 independent of its Rafts' association. *Traffic* 6:820-838.
 - 31) Kowanetz K, Terzic J, Dikic I (2003) Dab2 links CIN85 with clathrin-mediated receptor internalization. *FEBS Lett* 554:81-87.
 - 32) Hoe HS, Tran TS, Matsuoka Y, Howell BW, Rebeck GW (2006) DAB1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor 2 trafficking and processing. *J Biol Chem* 281:35176-35185.
 - 33) Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang TS, Kavalali ET, Bezprozvanny I, Herz J (2005) Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci* 25:8209-8216.
 - 34) Honda T, Nakajima K (2006) Mouse Disabled1 (DAB1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein. *J Biol Chem* 281:38951-38965.

輝け次代の担い手たち

胎仔大脳皮質構築過程におけるニューロトロフィンの果たす役割

The functions of neurotrophins on the developing cerebral cortex.

福光 秀文

(岐阜薬科大学・薬学部・分子生物学教室)

1. はじめに

大脳皮質神経系は下位中枢から集められた情報を処理統合し、それを基に下位中枢の機能を制御することにより、運動系の制御、認知、記憶、意識や感情の創出など、身体と精神の活動を統御する最高位の中枢器官である。また、その機能的な失調は様々な精神疾患の原因になると考えられており、多くの研究者を魅了してきた。

大脳皮質は均一な神経上皮層より発生する2つのグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）と神経細胞により構築される。近年の組織培養法や蛍光トレーサーを用いて、1つの細胞を可視化する技術の発達から、神経系前駆細胞は極めて多彩な動きをしながら、大脳皮質を構築をしていることが明らかにされつつある¹⁾。しかし、それぞれのプロセスの生物学的意義とそれらをコントロールする分子機構は多くの部分が未解明のままである。筆者らの研究室では、神経細胞の生存、分化成熟、機能維持を促進する神経栄養因子の中でもニューロトロフィン類に着目し、大脳皮質発達過程での役割について研究を進めてきた。その成果を国内外の知見と合わせて紹介したい。

2. 大脳皮質の細胞構築

大脳皮質では類似した形態、遺伝子発現、線維連絡を持つ神経細胞群が層状に整然と配置されている。マウスではこの皮質神経細胞層の構築は胎生11日齢ごろから始まり、以下のように進行する。まず、大脳皮質の原基である神経上皮（あ

るいは脳室帯）では細胞核が上下運動を繰り返しながら、神経細胞を発生し始める。この時発生した神経細胞髄膜直下まで移動し preplate と呼ばれる一過性の神経層を形成する（E11²⁾）。次に preplate は 髄膜側の Cajal-Retzius 神経細胞（CR 神経細胞）と 脳室側の subplate 神経細胞に分離し、ここに将来の皮質 II-VI 層を構成する皮質神経細胞が侵入し始める（E12 から 17 まで³⁾、図1を参照）。この時、新しく発生した神経細胞はその都度、最外層付近まで移動して定着するため、より早期に発生した神経細胞ほど下層に、より後期に発生した神経細胞ほど上層に位置するよ

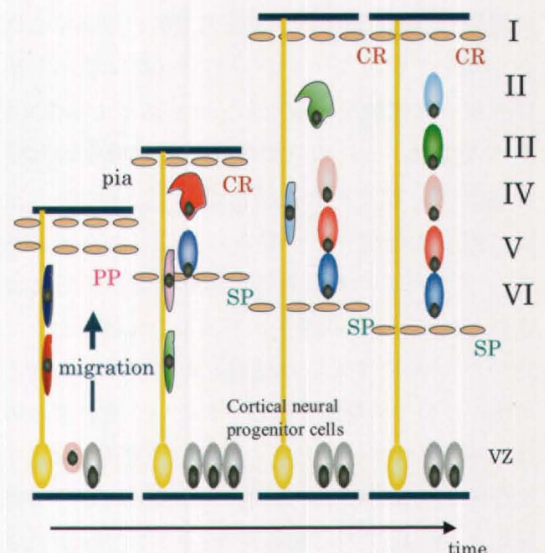


図1 大脳皮質の発達. 脳室帯 (ventricular zone; VZ) で増殖した神経系前駆細胞 (cortical neural progenitor cells) から発生した神経細胞は髄膜 (pia) 側へ向かって移動し、将来の皮質灰白質を形成する。

うになる (inside-out の法則)。CR 神経細胞は、Reelin を分泌することで、II-VI 層の神経細胞の最終定着位置を制御しており、Reelin の遺伝子欠損マウスでは preplate の分離が起こらず、さらに II-VI 層の神経細胞の位置が逆転することが知られている。CR 神経細胞は生後その多くは消失するが、この細胞が消失した第 I 層は下層神経細胞からの樹状突起の神経叢と細胞外マトリックスに占められるようになる。subplate 神経細胞は皮質下領域からの神経投射を皮質内に誘導する機能を持ち、生後すぐに第 6 層の神経細胞層に紛れ込むかあるいは細胞死によって除去され、消失する⁴⁾。

3. 大脳皮質発達過程におけるニューロトロフィンとその高親和性受容体の発現

筆者らは、まずこの大脳皮質形成過程におけるニューロトロフィンの発現を免疫組織学的に明らかにすることから着手した。研究を始めた当初 (1997 年頃)、ニューロトロフィンファミリータンパク質の哺乳類間の相同性が高いことから、その発現を免疫組織学的に明らかにできる抗体が市販されていなかった。そこで、我々は独自に開発した BDNF、NT-3 を特異的に認識する抗体を用いて免疫染色を行った (当初はラット胎仔を用いて実験を行ったが、マウスでも mRNA レベルではニューロトロフィンとその受容体が発現していることを確認しており、そのステージに準じた発現分布が見られることが予想される)。それぞれの高親和性受容体に対する抗体は市販されているものをその特異性を確認した上で用いた。NGF/TrkA は検討したステージを通して大脳皮質での発現が観察されない。それぞれのニューロトロフィンとその抗親和性受容体は以下のように発現が認められる。preplate (CR 神経細胞と subplate 神経細胞を含む) ; BDNF/TrkB, E13-18、NT-3, E15-20、TrkC, E13-18 (E18 は subplate 神経細胞のみ)。皮質板細胞 ; BDNF/TrkB, E15-20、NT-3/TrkC, E18 (下層皮質神経

細胞のみ)。脳室帯神経前駆細胞 ; BDNF/TrkB, E15-20、NT-3/TrkC, E13-18。したがって、ニューロトロフィンのうち BDNF と NT-3 が大脳皮質の形成過程で発現しており、何らかの機能を持つことが推測された⁵⁾。

4. 大脳皮質形成に対するニューロトロフィンの作用

筆者らが胎生期の大脳皮質構築過程におけるニューロトロフィンの局在を明らかにした頃から、この過程に及ぼす NTs の作用が徐々に明らかになってきた。まず、特異的なプロモーターを用いて神経系前駆細胞に BDNF を強制発現させたマウス大脳皮質では、CR 神経細胞での Reelin の発現が低下するだけでなく、CR 細胞自身の集積が起こり、大脳皮質 II-VI 層の構造に乱れが生じる⁶⁾。同様の CR 神経細胞の集積はスライス培養中の大脳皮質に NT-4 を添加処理した場合にも起こる。この時、CR 神経細胞の細胞死や細胞増殖には影響を与えていないことから、CR 神経細胞の移動が変化する可能性が示唆されている⁷⁾。同様にスライス培養系を用いて、抑制性神経細胞の移動が BDNF や NT-4 によって促進されることが示された⁸⁾。このようにニューロトロフィン、特に BDNF、NT-4 は大脳皮質のさまざまな神経細胞の移動を制御していることが明らかになった。

5. 大脳皮質興奮性神経細胞の層特異的性質獲得に及ぼす BDNF の影響

このような中、筆者らの研究室でも BDNF を直接胎仔の脳室内に投与方法を用いて、大脳皮質神経細胞の挙動に対する影響をみることにした。具体的には、E13 の胎仔側脳室に BDNF を投与し、その 3 時間後に親マウスの腹腔内に BrdU を投与した。そして、その 2 日後に胎仔脳を摘出し、大脳皮質における BrdU の分布を明らかにした。ここで、この時点における BrdU 陽性細胞は投与時点で、分裂期にあり BrdU を

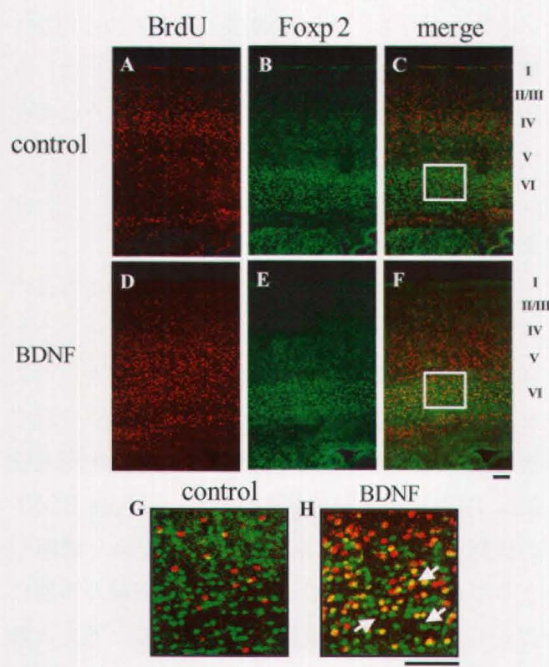


図2 BDNF 投与による大脳皮質神経細胞の層特異的性質獲得の変化

E13.5 に BDNF を脳室内に投与し、その3 時間後に BrdU を母体腹腔より投与した。その後、分娩、飼育を通常どおり行わせた。図は生後 6 日齢大脳皮質における BrdU 陽性細胞の分布と Foxp2 (layer VI) と BrdU を特異的に認識する抗体を用いた二重染色像。 Scale bars, 200 μ m

取り込んだ後、静止期に入った細胞であることを示している（つまり、そのほとんどが E13 日に発生した神経細胞となる）。対象群、BDNF 投与群ともに皮質板内に多数の陽性細胞が認められ、脳室帯から分裂領域から神経細胞となった細胞が皮質板内へ移動したことを示している。この時、対象群と比べて BDNF 投与群ではその数が 2 倍以上に上昇していた。同様の措置を行ったマウスを自然分娩させた後、生後6日（postnatal 6 day; P6）で BrdU を観察した。対象群では多くの陽性細胞（70%）が第 II-IV 層に位置していたのに対し、BDNF 投与群では陽性細胞の多く（70%）は第 V-VI 層に存在していた^{9)・10)}。

ここで、BDNF 投与によって BrdU 陽性細胞は、II-IV 層の神経細胞の性質を保ったまま、移動と定着のみが変化している、あるいは、より深層の神経細胞（V-VI 層）に変化した結果、細胞移動

と定着が変化している、という2つの可能性がある。

そこで、この点を明らかにするために、まず各層の興奮性神経細胞に特異的に発現する分子（II-IV 層: Brn1¹¹⁾, VI 層: Foxp2¹²⁾）を特異的に認識する抗体と抗 BrdU 抗体を用いて2重免疫染色を行った（図2 参照）。皮質全体で見ると、Brn1、Foxp2 陽性細胞の分布と数は対象群と BDNF 投与群で変化が認められなかった。つまり、大脳皮質の層構造は全体としては変化していなかった（このことは他の分子マーカーの in situ hybridization の結果からも裏付けられた）。一方、BrdU 陽性細胞に限ってみると、対象群では約 30、8 % の BrdU 陽性細胞がそれぞれ Brn1、Foxp2 を発現していたのに対し、BDNF 投与群では Brn1 の陽性細胞率が減少（13 %）し、Foxp2 の陽性細胞率が増加していた（17%）。さらに、より下層に定着した BrdU 陽性細胞はその層に固有の下位中枢に投射していることも確認した（data は示さず）。このことから、より下層に定着するように変化した BrdU 陽性細胞はその位置だけでなく、遺伝子発現、軸索投射などの層に固有の性質を変化させていることが明らかになった¹⁰⁾。

6. 大脳皮質神経系前駆細胞の細胞周期に及ぼす BDNF の影響

BDNF によって大脳皮質神経前駆細胞に誘導される初期変化をみるために、E13 の胎仔側脳室に BDNF を投与し、その3時間後に親マウスの腹腔内に BrdU を投与した後、経時的に脳を摘出し、BrdU 陽性細胞の分布を観察した。その結果、脳室帯内で起こる細胞周期依存的な神経系前駆細胞の挙動が対象群よりも、BDNF 投与群で早く進行することにより、脳室帯からの離脱が早められていることが明らかとなった。また、さまざまな解析の結果、細胞周期 S 期の長さが対象群では 3.3 時間であるのに対し、BDNF 投与群では 2.3 時間になっていることが分かった。した

がって、BDNF 処理によって最終分裂前の親細胞の細胞周期が変化することで、細胞内で機能する転写因子などの内因分子の発現や作用時間などが変化した結果、その娘細胞の神経細胞の性質が変化すると推定される¹⁰⁾。

7. BDNF の作用の臨界期

大脳皮質深層の神経細胞の層に固有の性質はその親細胞が最終分裂時の S 期に大脳皮質環境からのシグナルによって影響を受け、late S から G2 期に決定されることが知られている¹³⁾。このことから、BDNF も細胞周期 S 期に BrdU 陽性細胞の性質を変えている可能性がある。そこで、BrdU を投与する時間を E13 の 14:00 に固定し、その 6 時間前、3 時間前、あるいは 6 時間後に BDNF を投与して、生後 6 日後に脳を摘出し、大脳皮質内における BrdU 陽性細胞の分布を観察した。BDNF および BrdU の有効濃度の持続時間がそれぞれ $\sim 3^{10)}$ 、 ~ 5 時間¹⁴⁾であることを考慮すると、BrdU 陽性細胞はそれぞれ 6 時間前で 1 細胞周期前の G2/M から S 期、3 時間前で G1 から G2+M 期、1 時間後では G1 後期から 1 細胞周期後の G1 前期、6 時間後では S 期から 1 細胞周期後の G1 期に BDNF の作用を受けて

いることになる。解析の結果、BDNF の作用を S 期周辺で受けた時 (3 時間前と 1 時間後) にのみ BrdU 陽性細胞はより深層に定着するように変化することが明らかとなった (図 3)¹⁰⁾。

まとめ

これまで、ニューロトロフィンやその受容体のノックアウトマウスでは、脳構築過程で生じたと考えられる顕著な異常が発見されていなかったことから、この過程における重要性は見過ごされてきた。ところが、今回、紹介した筆者らの研究成果は BDNF の中和抗体を用いて、内因性 BDNF の機能を阻害すると全く正反対の現象を誘導できることから、内因性の BDNF が同様の機能によって、大脳皮質形成に寄与していると考えられる¹⁰⁾。さらに最近になって、BDNF のシグナルを細胞内に伝達する TrkB の Shc/PLC- γ の結合部位を変異させ、恒常的不活性化状態にしたマウスでは BDNF 抗体を投与したときと同様に同じ時期に発生した神経細胞がより上層に定着することが報告されたことから、BDNF/TrkB 経路が大脳皮質層形成に重要な働きを持つことが裏付けられた¹⁵⁾。その生物学的意義は明確ではないが、TrkB が脳室帯神経系前駆細胞で発現していること、皮質板神経細胞での発現細胞が脳室帯神経系前駆細胞よりも多いこと⁵⁾、¹⁶⁾を考え合わせると、皮質板神経細胞で発現分泌される BDNF の量とそのときの皮質板から脳室帯までの距離によって神経系前駆細胞に対する BDNF の作用濃度が決定され、その時発生する神経細胞の性質がコントロールされているのかもしれない。

謝辞

このような執筆の機会を与えていただきました諸先生方に心より御礼申し上げます。ここで紹介した研究は、現所属の岐阜薬科大学分子生物学教室で行われたものであり、ご指導いただきました古川昭栄教授に厚く御礼申し上げます。逆行性トレーサーを用いた軸策投射の同定は岐阜大学医学

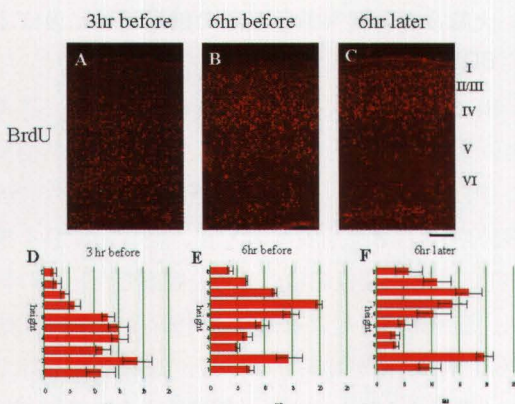


図 3 神経細胞が獲得する層特性を変化させる BDNF の作用時期 BrdU を投与する時刻を固定 (E13.5 の 14:00) し、BDNF を脳室内に投与する時刻をその 3 時間前、6 時間前、6 時間後とした場合の P6 大脳皮質における BrdU 陽性細胞の分布。定着位置の変化は BDNF を 3 時間前 (S 期) に作用させたときに限られる。

部中村浩幸准教授、伊藤和夫教授との共同研究にて行われました。また、両研究室所属の大学院生、学部生の協力のもと新たな成果を求めて継続して研究を遂行しております。この場を借りて感謝申し上げますとともに、今後ともよろしくお願い申し上げます。遺伝子材料の御供与いただきました国内外の研究者の方々にも感謝申し上げます。

文献

- 1) Kriegstein AR and Noctor SC. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* **27**, 392-399 (2004).
- 2) Marin-Padilla, M. Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*) . A Golgi study: I. The primordial neocortical organization. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* **134** (2) , 117-145 (1971).
- 3) Angevine, J., Sidman, R. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192**, 766-768 (1961).
- 4) Allendoerfer, K., Shatz, C., The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 185-218 (1994).
- 5) Fukumitsu H, Furukawa Y, Tsusaka M, Kinukawa H, Nitta A, Nomoto H, Mima T, Furukawa S Simultaneous expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in Cajal-Retzius, subplate and ventricular progenitor cells during early development stages of the rat cerebral cortex. *Neuroscience* **84**, 115-127 (1998).
- 6) Ringstedt T, Linnarsson S, Wagner J, Lendahl U, Kokaia Z, Arenas E, Ernfors P, Ibanez CF BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron* **21**, 305-315 (1998).
- 7) Brunstrom JE, Gray-Swain MR, Osborne PA, Pearlman AL Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron* **18**, 505-517 (1997).
- 8) Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* **129**, 3147-3160 (2002).
- 9) Ohmiya M, Shudai T, Nitta A, Nomoto H, Furukawa Y, Furukawa S Brain-derived neurotrophic factor alters cell migration of particular progenitors in the developing mouse cerebral cortex. *Neurosci Lett* **317**, 21-24 (2002).
- 10) Fukumitsu H, Ohtsuka M, Murai R, Nakamura H, Itoh K, Furukawa S Brain-derived neurotrophic factor participates in determination of neuronal laminar fate in the developing mouse cerebral cortex. *J Neurosci* **26**, 13218-13230 (2006).
- 11) McEvelly RJ, de Diaz MO, Schonemann MD, Hooshmand F, Rosenfeld MG. Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science* **295**, 1528-1532 (2002).
- 12) Ferland RJ, Cherry TJ, Preware PO, Morrissey EE, Walsh CA Characterization of

Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J Comp Neurol* **460**, 266-279 (2003).

- 13) McConnell SK, Kaznowski CE Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* **254**, 282-285 (1991).
- 14) Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS Jr The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* **15**, 6046-6057 (1995).
- 15) Medina DL, Sciarretta C, Calella AM, Von Bohlen Und Halbach O, Unsicker K, Minichiello L TrkB regulates neocortex formation through the Shc/PLC γ -mediated control of neuronal migration. *EMBO J* **23**, 3803-3814 (2004).
- 16) Behar TN, Dugich-Djordjevic MM, Li YX, Ma W, Somogyi R, Wen X, Brown E, Scott C, McKay RD, Barker JL Neurotrophins stimulates chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci* **9** 2561-2570 (1997).

輝け次代の担い手たち

統合失調症と脳内 D- セリン代謝：新たな治療薬開発をめざして

山本 直樹

(東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野)

はじめに 一統合失調症と神経伝達障害仮説

統合失調症は、生涯発症率が0.8%と高い頻度で生じる精神疾患である。その多くは発症時期が思春期前後に相当し、その後長期間にわたって治療継続を余儀なくされる場合が少なくない。統合失調症の精神症状は多岐にわたるが、大きく陽性症状と陰性症状に分けることができる。陽性症状は、妄想、幻覚、精神運動興奮といった症状を含み、日常の精神活動としては本来認められないものが病的に出現したものとしてとらえられる。一方、陰性症状は、意欲減退、感情鈍麻、自閉、会話内容の貧困化といった症状を含み、本来すでに獲得しているはずの日常生活あるいは社会生活に必要な精神活動の減退ないし消失としてとらえられる。

統合失調症の分子病態を理解する上で、また

動物モデルを想定する上で、薬理学的所見が有用である(図1)。まず、第一に、methamphetamine (MAP) などの覚せい剤やcocaineは、ヒトにおいて幻覚・妄想、精神運動興奮といった統合失調症の陽性症状に類似した精神症状を引き起こすことはよく知られている。このような薬物をラットなどの実験動物に投与した場合にも、移所運動量の亢進や常同行動といった行動異常が認められる^{1,2)}。これらの薬物は、ドーパミン受容体の間接的アゴニストとして作用する。第二に、現在統合失調症の治療にもちいられる抗精神病薬はいずれもドーパミンD2受容体アンタゴニストとしての活性を有する。陽性症状については多くの場合これらD2アンタゴニストに比較的反応性が得られることもあって、これらのことから、統合失調症の陽

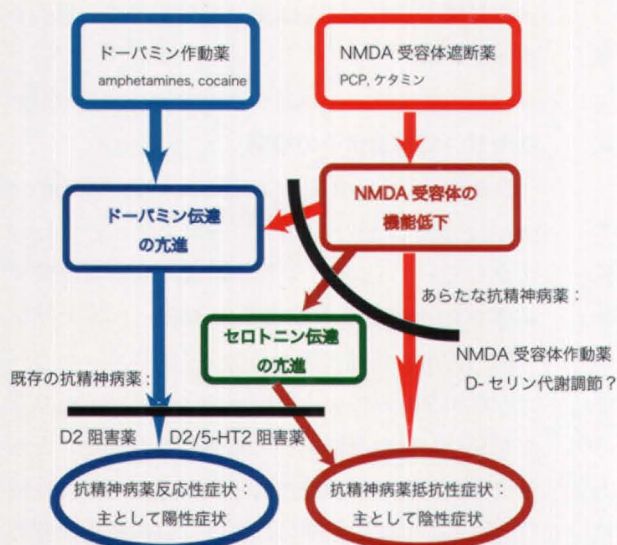


図1 薬理学的作用からみた統合失調症の発症機序。統合失調症様症状発現薬のうち、間接的ドーパミン作動薬 (amphetamine 類や cocaine) はドーパミン伝達の亢進を引き起こす。その結果、統合失調症の陽性症状に類似した症状が出現する。一方、NMDA 受容体遮断薬 (PCP やケタミン) は NMDA 受容体機能低下を起こすとともに二次的にドーパミン伝達やセロトニン伝達の亢進を引き起こす。その結果、陽性症状と陰性症状に類似した症状がともに出現するといわれる。このため統合失調症においても NMDA 受容体の機能低下が推測され、ドーパミン D2 阻害作用やセロトニン 5-HT2 阻害作用をもつ既存抗精神病薬に対して抵抗性の症状の改善をはかるためには NMDA 受容体のコ・アゴニストである D-セリンなどの代謝調整機能をもつ治療薬の開発が期待される。(文献 3, 4 より改変)

性症状発現において中脳辺縁系ドーパミン神経伝達の過剰がその病態にかかわっていると推測されている（ドーパミン仮説）³⁴⁾。

一方、陰性症状の分子病態については現在も不明な点が多い。また、現在の抗精神病薬に対して治療抵抗性である場合が多く、今後陰性症状に対する効果的な治療薬の開発が望まれている。陰性症状に関する薬理的なつながりとして、NMDA型グルタミン酸受容体（NMDA受容体）阻害薬がある。Phencyclidine（PCP, phenylcyclohexyl piperidine）は、NMDA受容体のチャンネル遮断薬であるが、濫用によってヒトでは、統合失調症の陽性症状とともに陰性症状にも類似した症状が出現することが知られている。同様の薬理作用をもつケタミンketamineは受容体遮断作用のより強い立体異性体（S>R）においてより精神症状を引き起こしやすいことから、これらの薬物誘発性精神症状はNMDA受容体機能の選択的な抑制によって生じていると考えられる。さらに、統合失調症症例では、健常例に比較してNMDA受容体チャンネル遮断薬に感受性が高く、精神症状が誘発されやすい。これらから、NMDA受容体機能障害が、陽性・陰性症状の両者を含めた統合失調症の総合的な病態にかかわるのではないかと考えられている（NMDA受容体仮説）³⁴⁾。

NMDA受容体コ・アゴニストとしてのD-セリン

上述した統合失調症のNMDA受容体仮説に基づいて、私たちはNMDA受容体のコ・アゴニストであるD-セリンに着目して難治性統合失調症の治療薬開発を目指した研究に取り組んでいる。D-セリンは、哺乳類の生体内分子としてはL-体アミノ酸のみが存在するという従来の生化学的知見を覆す新たな脳内在性分子として1992年に当時、国立精神・神経センターの西川らによって見いだされた³⁵⁾。前述のように統合失調症においてNMDA受容体シグナルの機能低下が推定されているが、D-セリンはこのNMDA受容体に対し内在性コ・アゴニストとして作用する。精神異常発

現薬PCPによって引き起こされるラットの異常行動に対して脳室内D-セリン投与により改善効果が得られること、さらに実際にHarvard大学のCoyleらが統合失調症患者に対してD-セリン経口投与の二重盲検臨床試験をおこない、陽性症状だけではなく陰性症状や認知機能を改善する効果を報告したことから、D-セリンによるNMDA受容体作用の増強によって統合失調症の既存抗精神病薬に抵抗性の症状を改善することが期待される。しかしD-セリン全身投与後の脳内移行の低効率性や腎障害等の副作用の可能性などを考慮すると、脳内在性D-セリンの調節をもたらし薬剤の開発が長期的な治療戦略としてはるかに合理的かつ安全と考えられる。したがってシナプス間隙におけるD-セリン濃度の制御およびD-セリンの生合成・代謝にかかわる分子機構を明らかにすることにより、従来とは全く作用機序の異なる統合失調症治療薬を見いだす有力な手がかりを得ることが期待できる。これは、ドーパミン受容体阻害作用をもった定型および非定型抗精神病薬によっても十分な治療効果が得られない、いわゆる難治症例に対する新たな治療戦略を提供することを意味する。そこで、私たちは、シナプス間隙における内在性D-セリン濃度の制御にかかわる分子機構を明らかにすることによって、統合失調症の新規治療薬を開発するための標的分子候補を提供することを目標として、脳内D-セリン代謝機構の解析を行っている。

D-セリン応答遺伝子の検索

RAP-PCR（RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction）法およびmicroarray法をもちいてD-セリン投与により大脳新皮質で誘導される遺伝子の検索をおこない、D-セリンの脳内作用や代謝に関わる分子・神経ネットワークの解明を試みている。前述のように、D-セリンやグリシンは血液脳関門の通過効率が低いことから成熟ラットでは腹腔内投与による脳内移行は限定されるが、新生児期には良好な脳内移行が認め

られる。このような条件において D-セリン投与後に大脳新皮質において誘導される遺伝子 *dsr-1* (D-serine responsive transcript-1) を RAP-PCR 法により単離した (図 2) ⁶⁾。 *dsr-1* は、V-ATPase (vacuolar-type proton-ATPase) の V0 portion (膜貫通部位) 複合体に含まれる subunit M9.2 に類似性をもつ。 *dsr-1* mRNA は M9.2 mRNA の variant form として、M9.2 と異なるエンハンサー / プロモーターによる発現制御 (alternative promoter usage) ならびに alternative splicing によって生じ、D-セリンによって *dsr-1* に選択的な発現調節を受けている可能性が推測される。 *dsr-1* 遺伝子産物の機能についてはこのような M9.2 蛋白質との構造類似性および組織分布の特徴からいくつかの可能性が推測される。V-ATPase は分泌顆粒内の pH 調節に関わる。たとえば、中枢神

経系における V-ATPase の役割は、シナプス終末において ATP の加水分解によりエネルギー依存性に水素イオンをシナプス小胞内に保持することにより pH を酸性にしてモノアミンなどの神経伝達物質を活性化する。さらに水素イオンは、神経伝達物質が vesicular transporter を介して顆粒内に取り込まれる際のカウンターイオンとして作用する。従って、 *dsr-1* 遺伝子産物の推測される機能としては第一に、V-ATPase の活性調節因子として作用し、Dsr-1 蛋白質は中枢神経系において、一方で M9.2 は末梢組織においてそれぞれの調節機能を担っている可能性が考えられる ^{6,7)}。D-セリンの作用によって *dsr-1* 発現誘導を介して中枢神経系の V-ATPase 活性が選択的に促進されるのかもしれない。さらに、V-ATPase のいくつかのサブユニットは本来の機能とは異なる

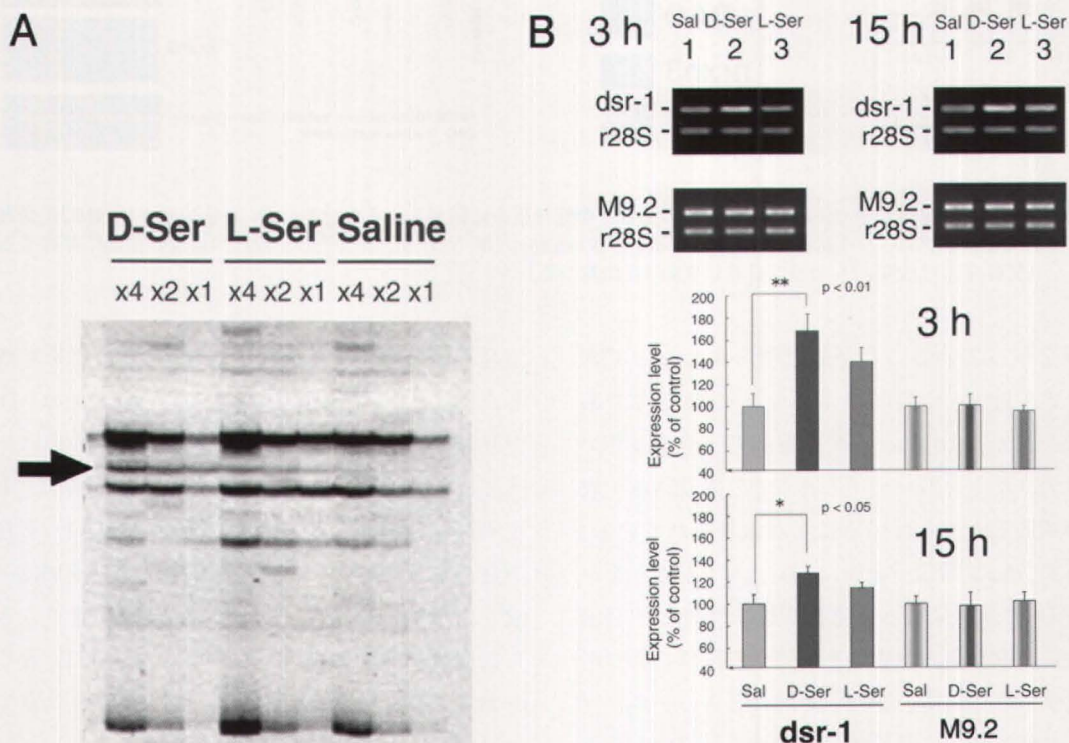


図 2 D-セリン応答遺伝子 *dsr-1*. RAP-PCR 法をもちいて D-セリン投与後に大脳新皮質において発現が上昇する遺伝子を探索した。(A) L-セリンおよび生理食塩水投与と比較して D-セリン投与によってシグナルの増強したバンド (矢印) を単離した。左から順に cDNA template は等倍に希釈されている。(B) *dsr-1* 転写産物を 28S ribosomal RNA とともに増幅して半定量化した結果を示している。D-セリン投与 3 h 後、15 h 後ともに *dsr-1* の発現が有意に上昇している。一方 M9.2 遺伝子産物に変化は認められなかった。(文献 6 より改変)

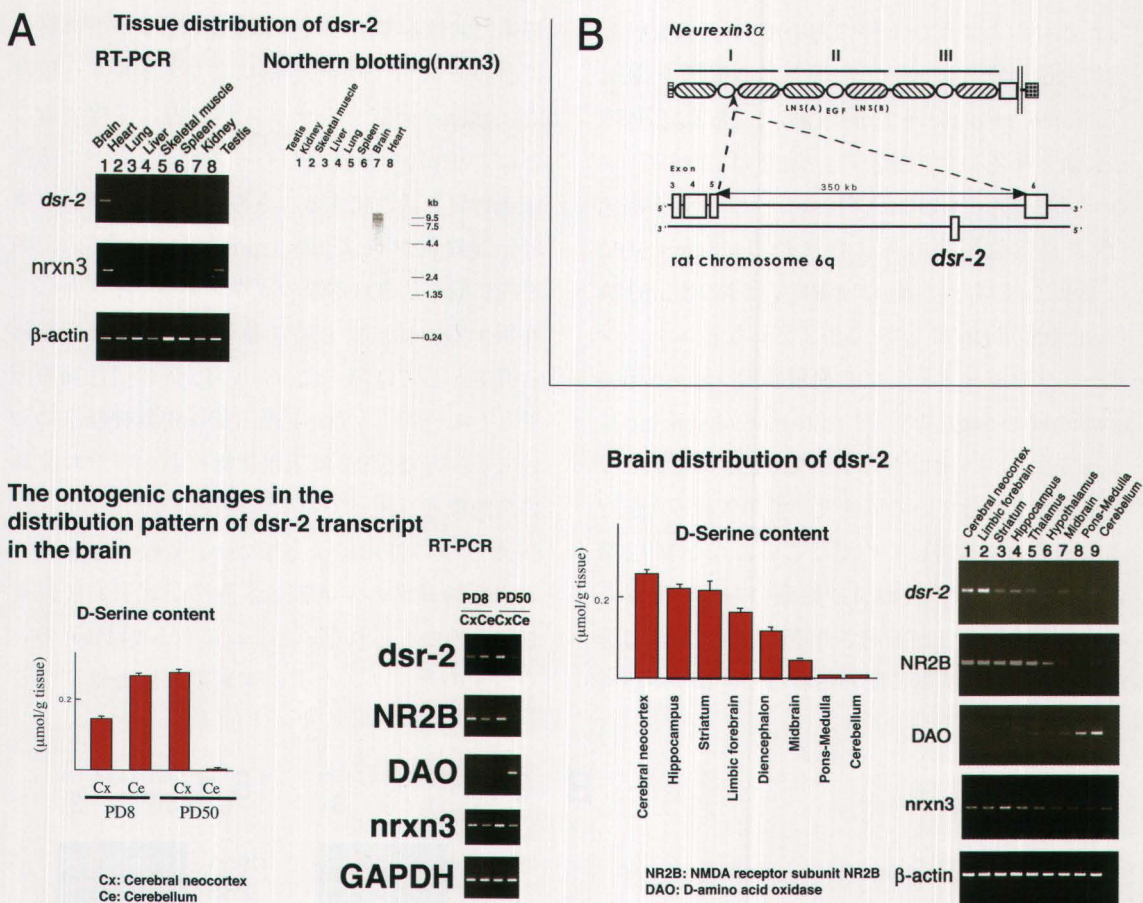


図3 D-セリン応答遺伝子 *dsr-2*. (A) *dsr-2* の発現は中枢神経系に局限し、その分布は D-セリンおよび NMDA 受容体 NR2B サブユニットに類似する. (B) *dsr-2* は *neurexin III* (*nrxn3*) 遺伝子の intron 内に反対鎖側に存在する. (文献 9 より改変, D-セリン分布は文献 10 に基づく)

役割を担っていることが最近明らかとなってきた。V-ATPase の膜サブユニットのひとつである mediatoaphore ductin 蛋白質がアセチルコリンやカテコラミンのシナプス終末での取り込み・放出の調節をも担っていることが報告されている。従って、*dsr-1* 遺伝子産物は、D-セリン自身、ないしは D-セリンによって直接影響を受ける神経伝達物質の取り込みや放出を調節する役割を持つ可能性が示唆される。また、Shimada らのグループは、中枢神経系に特異的に発現する isoform を見出し、NM9.2 と名付けている⁸⁾。*dsr-1* 遺伝子産物との相互作用や複合体形成の可能性も含めて、神経伝達系における役割の解明が待たれる。

さらに、ラット大脳新皮質から D-セリンによっ

て発現調節を受ける遺伝子転写産物 *dsr-2* を単離した⁹⁾。大脳新皮質において *dsr-2* mRNA は、D-セリン投与後 3 時間においてコントロール群に比べて有意に発現が上昇した。*dsr-2* 転写産物は、中枢神経系にのみ発現し、脳内分布は遊離 D-セリン量および NMDA 受容体 NR2B サブタイプに一致した前脳部優位のパターンを示す (図 3)。さらに発達過程での発現パターンの変化も D-セリンおよび NR2B に一致する。私たちの研究室では以前、この時期に小脳において D-セリンが一過性の上昇を示すことを確認している¹⁰⁾。また、Schell らによる免疫組織学的解析として、この時期に小脳パーグマン細胞に D-セリン免疫性が認められることが報告されている¹¹⁾。D-セリンの

新生児期の小脳における役割については十分に解明されていないが、小脳神経回路形成においてげっ歯類では生後1から3週において、NMDA受容体を介した2つの構造変化が知られている。ひとつは、顆粒細胞の放射移動である。分裂後細胞は外顆粒層で接線移動した後に、パーグマン細胞に沿って脳室に向かってつまり内向きに放射移動して顆粒層に到達する。もうひとつは、登上線維および平行線維のプルキンエ細胞との適切なシナプス形成の獲得である。すなわち、これらの線維は、プルキンエ細胞の樹状突起とシナプスを形成する一方で過剰なシナプスは除去(elimination)される。この時期に、NMDA受容体の機能を阻害薬で抑制するとこのような適切な細胞移動やシナプス形成が損なわれる。一方で、統合失調症における小脳神経回路の構造的変化あるいは神経発達障害を示唆する新たな画像解析法による知見が近年複数報告されている。Andreasenらは認知機能タスク時の小脳血流低下、MRS所見などを総合して、小脳機能障害に伴う大脳皮質-小脳-視床-大脳皮質の回路異常の存在を推測している¹²⁾。このような変化の少なくとも一部は、統合失調症における小脳神経発達の障害を反映しているかもしれない。

NMDA受容体のチャンネル阻害剤であるPCPやMK801を動物に投与することによって引き起こされる行動変化は発達依存的であり、たとえばげっ歯類では生後3週より後で成熟期と同じ異常行動がみられるようになることから統合失調症の薬理的動物モデルと考えられている¹⁾。この現象は、ヒトにおいても小児期にはNMDA受容体のチャンネル阻害剤ケタミンの精神症状発現作用が成人期に比してきわめて弱く、麻酔薬としてもちいることが可能であることから理解できる。このような統合失調症モデル成立の臨界期は、上述のような、D-セリンの脳内組織分布のパターンの変化、およびNMDA受容体NR2Bサブタイプおよび今回報告した*dsr-2*遺伝子の発現パターンとその発達過程における変化に呼応したかたち

で生じているように考えられる。このような発達過程におけるシナプス機能変化は、ヒトにおける統合失調症の発達依存性(思春期以降)の症状顕在化とも共通する機序に関与しているかもしれない。

ゲノム解析により*dsr-2*遺伝子はきわめてユニークな構造をもつことが明らかとなった(図3)。すなわち*dsr-2*遺伝子は、neurexin III(*nrnx3*)遺伝子の第5 intron中にその反対鎖側に位置されることが明らかとなった。この*nrnx3*遺伝子の特徴の第一は、複数の長大な intron 構造をもち、このため、上述したように染色体の広範な領域にひろがって存在している。この構造は哺乳動物でいずれも保存されていると推測され、たとえばヒトでは第14染色体の14q24.3-q31.1すなわち染色体の数%を占めるに至る極めて巨大な遺伝子であるといえる⁹⁾。Neurexin I β 蛋白質は、前シナプス膜に局在しており、後シナプス膜に存在する neuroligin と直接相互作用してカルシウム依存性シナプス小胞の開口放出を制御することが推定されている。また、neurexin II α はノックアウトマウスの解析からNMDA受容体機能発現にとって必須であることが報告されている。Neurexin III蛋白質については、直接的な分子機能は明らかではないが、やはりシナプス機能の維持や変化に重要な役割をもつことが推測される。*nrnx3* mRNAとともに反対鎖から*dsr-2* mRNAが発現することにより、*dsr-2*と、*nrnx3*の新生RNAやsplicing後の intron とのあいだで二本鎖RNAが形成された場合には、RNA interference機構等を介した*nrnx3*の転写あるいは転写後の発現制御が起こることが推測される。

このように*dsr-1*および*dsr-2*遺伝子産物は、その構造、組織分布ならびにD-セリンに対する応答性から、中枢神経系において神経シナプス小胞機能の調節やD-セリンの代謝や作用シグナルに関わる可能性が推測され、D-セリンの作用および代謝における分子機構の解明に重要な手がかりになるものと考えられる。

細胞外D-セリン濃度の調節機構：

D-セリンの取り込みと放出

ラット大脳新皮質より粗シナプトソーム (P2 fraction) を分画し、D-セリンの取り込み活性および放出活性を解析した。D-セリンの取り込みは、飽和性、温度依存性の活性が認められ、主に Na^+ および Cl^- イオンに依存していた¹³⁾。Km

値 $283 \pm 71 \mu\text{M}$, V_{max} 値 $207 \pm 21 \text{ pmol/mg protein/min}$ であった。その取り込み活性は pH6.5-7.0 で最適値を示す。生理的条件下で標識 D-セリンの取り込みは、大過剰の非標識 D-セリン、L-セリン、グリシン、L-アラニン、L-システインおよび L-スレオニンによって阻害されることから、D-セリンの取り込みは、主として中性アミノ酸ト

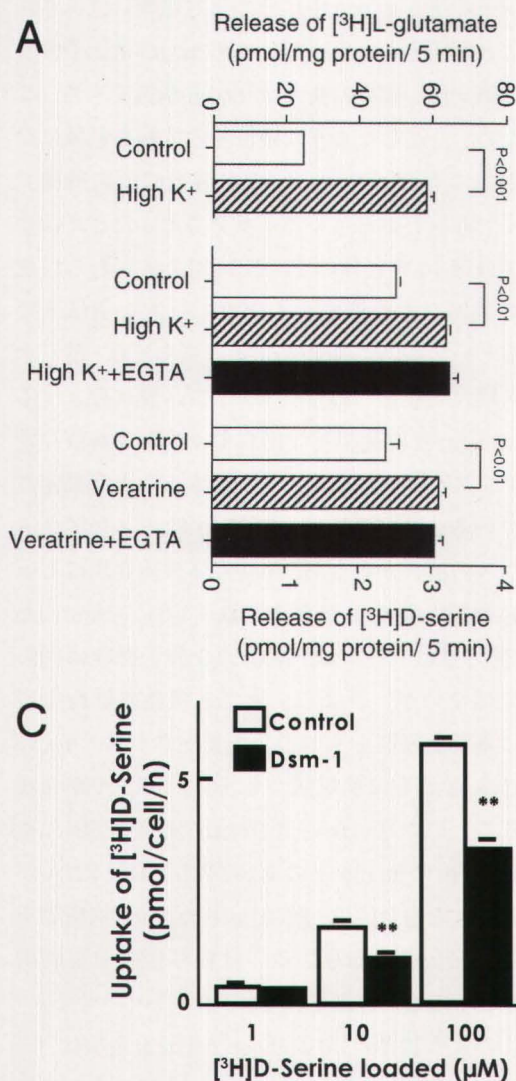


図4 D-セリンの細胞内取り込みと放出。(A) ラット大脳新皮質シナプトソーム P2 分画において、D-セリンの放出はグルタミン酸とは異なり、脱分極刺激に依存せず、また開口放出のようなカルシウム要求性を認めない。(B) 細胞外 D-セリン濃度調節因子 dsm-1 の構造。Dsm-1 蛋白質は 431 アミノ酸からなり、10 回膜貫通性構造をもつ。(C) Dsm-1 の発現。Xenopus oocyte において Dsm-1 は D-セリンを生理的濃度において細胞内取り込みを抑制する。(D) Dsm-1 の細胞内局在。細胞核周囲にあるゴルジ装置を中心に細胞全体に顆粒状の分布を示す。COS-7 細胞に Lumio および V5 tag 化した Dsm-1 蛋白質を発現させて 2 種類の蛍光検出 (Lumio の場合は無固定条件下) により同様の局在を示すことを確認した。青色は DAPI による細胞核染色。(文献 15 より改変)

ランスポーター (ASCT等)を介している可能性が推測された。一方で、グリシンの取り込み活性の大部分はD-セリンにより阻害されないが、これは中枢神経系におけるグリシンの取り込みを担うグリシントランスポーターの基質選択性を反映していると考えられる。

ひとたび取り込まれたD-セリンはP2分画から温度依存性に放出される。しかしながら、高カリウムのような脱分極刺激に反応してグルタミン酸の放出が亢進するのに対して、D-セリンの放出は高カリウム刺激やveratrine刺激によってわずかに亢進するにとどまり、いずれもカルシウムキレートによる影響をうけない。したがってD-セリンのおもな放出は脱分極に依存せず、グルタミン酸の開口放出などとは異なった制御を受けていることが推測された(図4)。これは、私たちの研究室で、*in vivo* microdialysisによって観察された結果¹⁴⁾に一致している。

これらの結果を踏まえて、取り込みや放出により細胞外D-セリンの制御にかかわるD-serine modulator遺伝子の発現クローニングを試みた。アフリカツメガエル卵母細胞を用いてD-セリンの細胞内への取り込み活性を指標とした発現クローニングを行った。D-セリンの細胞への蓄積を減少させる分子を単離し、*dsm-1* (D-serine modulator-1)と名付けた¹⁵⁾。ラット*dsm-1* cDNAは全長2.0 kbで、431アミノ酸からなるDsm-1蛋白質をコードしている(図4)。この遺伝子産物はKyte-Doolittle hydrophobicity profileから10回膜貫通構造をもつ膜蛋白質であると予測された。Dsm-1は、ヒト3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) transporter蛋白質PAPST1とアミノ酸配列で91.8%の一致を示す^{15,16)}。PAPST1は硫酸基の供与体となるPAPSを細胞質からゴルジ装置のcisterna内へ輸送する活性をもつ膜蛋白質として2003年に単離されたが、PAPST1遺伝子はラット*dsr-1*遺伝子のヒトorthologであると推測される。

*dsm-1*遺伝子産物は卵母細胞のもつナトリウム

イオン依存性および非依存性のD-セリンの取り込み活性(内在性トランスポーター活性)をいずれも低下させた。*dsm-1*を発現させると、D-セリンに対する親和性(K_m 値)は、見かけ上 65 ± 1 から $40 \pm 7 \mu M$ に低下し、 V_{max} は 1.50 ± 0.04 から 1.03 ± 0.04 pmol/oocyte/hに約30%低下した。これまでの研究によれば*in vivo* microdialysis等の結果から推測される細胞外D-セリン濃度はおよそ $10 \mu M$ 程度と考えられている。これに対して、*dsm-1*はこれに相当する濃度においてもD-セリンの細胞内取り込みを抑制することがわかった(図4)。発現系として使用したアフリカツメガエルの卵母細胞は、D-セリンを微量ながら含有し(0.225 ± 0.017 pmol/cell)、medium中に加えたD-セリンに対し温度依存性の取り込み活性を示した。このことは、卵母細胞にD-セリンを取り込む能力をもつシステム(内在性transporter)が存在することを示している。これに対してDsm-1蛋白質は見かけ上の取り込み活性を抑制してD-セリンの細胞内蓄積量を減少させた。Dsm-1はその構造上トランスポーター様の再取り込み(reuptake)や逆向きの放出(reverse uptake)機能を有する可能性が推測される。そのメカニズムとしては、1) plasma membrane上でD-セリンを放出ないし再取り込みを制御する、あるいは、2) vesicleに局在してD-セリンを貯蔵し開口放出に関わる可能性、等が考えられるが、COS-7細胞に発現させたDsm-1蛋白質の局在からは後者の可能性が示唆される。

dsm-1 mRNAは脳と肝臓に多く発現している。さらに、脳内局在は、D-セリン及びNMDA受容体NR2B subunitの分布に類似しており、大脳新皮質、海馬、線条体を含む前脳部に優位に発現していた。さらに、*dsm-1* mRNAは、D-セリン合成・分解酵素の存在が報告されているastrocyteに発現していることがわかった^{15,17)}。*dsm-1*は、ラット前脳部の細胞外液中の生理的なD-セリンの濃度($10 \mu M$)においても、その作用が認められた。各種アミノ酸については、D-セリンの他、L-セリン、

L-スレオニン、グリシンに対してもその蓄積及び卵母細胞に内在する基礎レベルを減少させる作用を示したが、そのうちD-セリンに対する作用が最も強かった。

以上のように、*dsm-1*が、D-セリン及びNMDA受容体が豊富な脳部位に優位に分布すること、ラット脳の生理的な細胞外D-セリン濃度においてもその作用を示すこと、この作用はD-セリンに対して比較的選択的であることなどから、*dsm-1*が哺乳類の脳において生理的な役割を担っている可能性が考える。Dsm-1蛋白質は、NMDA受容体のコ・アゴニストであるD-セリンの細胞内および細胞外液中の濃度の調節に関わることにより、最終的にNMDA受容体の神経伝達を調節していることが推測される。

おわりに 一統合失調症の神経化学的アプローチ

統合失調症の新たな治療薬開発をめざして、NMDA受容体コ・アゴニストであるD-セリンの脳内代謝機構に着目しておこなった私たちの最近の研究をご紹介します。NMDA受容体機能の障害は、統合失調症をはじめとした精神神経疾患の病態に関わる可能性が示唆されている。ここに紹介したD-セリン代謝関連遺伝子産物が脳内D-セリンの分子機構を解く鍵となるだけでなく、グルタミン酸-D-セリン系シグナルおよび神経ネットワークを調節する分子として、それらの疾患に対する新たな治療薬開発に寄与することが期待される。

我が国における統合失調症の神経化学的研究のひとつの源流は、今から80年以上前の1926年(大正15年)、九州大学において急性錯乱状態(当時の致死性カタトニー)の患者脳のacidosisとNissl小体の変化に関心を抱いた下田光造の指導のもとで中脩三によってはじめられた脳内グリコーゲン定量の研究にさかのぼる。その後の糖エネルギー代謝を主体とした生化学研究の発展期を経て、いまからおよそ50年前に本学会の前身である神経化学懇話会の創始にかかわった大阪市立

大学の中脩三と川北幸男は、当時の著書のなかで「一連の基礎的研究と神経精神医学が対象とする疾患との間に存在する深い溝を考えるとこれらを繋ぐ新しい研究方法の必要性が痛感される」と述べられている¹⁸⁾。そして半世紀を経て、神経伝達物質とその受容体を中心として神経化学的研究が著しく進歩し、精神疾患の病態の解明と新規治療薬開発の戦略が大きな転機を迎えている。「新しい研究方法」にあふれる現在においてもなお残る「溝」を埋めるにはどうしたら良いか、あらためて自問しながら今後の研究をすすめていきたいと思う。

謝辞

本研究は、国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部および東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野において西川徹教授のもとで多くの共同研究者とともに行われたものであり、日頃のご指導に深甚なる感謝の意を表します。また大学院生および博士研究員としてご指導いただいた大阪市立大学医学部第一生化学・故森澤成司名誉教授、井上晃助教授、Columbia大学P&S精神医学、神経生物学行動科学センター、HHMI・故James H. Schwartz教授、Eric R. Kandel教授に深謝いたします。最後に、研修医以来、常にご高配およびご激励をいただいた大阪市立大学医学部神経精神医学・川北幸男名誉教授、山上榮名誉教授、切池信夫教授、New York大学医学部生理学・故中研一教授、東京医科歯科大学医学部神経精神医学・融道男名誉教授、車地暁生助教授に厚く御礼申し上げます。とくに川北先生には本執筆にあたって50年前の日本神経化学会へのタイムスリップを疑似体験させていただき有り難うございました。

文献

- 1) 西川徹. 統合失調症の分子薬理学的解析-ドーパミン受容体およびNMDA受容体作用薬を用いたアプローチ-. 脳 21. 8, 9-15 (2005).

- 2) Sakurai S, Ishii S, Umino A, Shimazu D, Yamamoto N, Nishikawa T: Effects of psychotomimetic and antipsychotic agents on neocortical and striatal concentrations of various amino acids in the rat. *J Neurochem* 90, 1378-1388 (2004) .
- 3) 西川徹. 統合失調症の分子機構研究の最前線. *実験医学* 24, 2663-2671 (2006)
- 4) 山本直樹, 黒田安計, 西川徹. ドパミン・興奮性アミノ酸仮説. 佐藤光源, 丹羽真一, 井上新平編. 統合失調症の治療. 朝倉書店, 東京 (2007, 印刷中) .
- 5) Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K. The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett.* 296, 33-36 (1992) .
- 6) Tsuchida H, Yamamoto N, Kajii Y, Umino A, Nishikawa T. Cloning of D-serine-regulated transcript *dsr-1* from the rat cerebral cortex. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1189-1196 (2001) .
- 7) Ludwig J, Kerscher S, Brandt U, Pfeiffer K, Getlawi F, Apps DK, Schagger H. Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *J Biol Chem* 273, 10939-10947 (1998) .
- 8) Ueda T, Ugawa S, Shimada S. A novel putative M9.2 isoform of V-ATPase expressed in the nervous system. *Neuroreport* 14, 25-30 (2003) .
- 9) Taniguchi G, Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Shimazu D, Sakurai S, Takebayashi H, Nishikawa T. Cloning of a D-serine-regulated transcript *dsr-2* from rat cerebral neocortex. *J Neurochem* 95, 1541-1549 (2005) .
- 10) Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T. Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *Eur J Neurosci.* 7, 1657-1663. (1995) .
- 11) Schell MJ, Brady RO Jr, Molliver ME, Snyder SH. D-Serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* 17, 1604-1615 (1997) .
- 12) Ho BC, Mola C, Andreasen NC. Cerebellar dysfunction in neuroleptic naive schizophrenia patients: clinical, cognitive, and neuroanatomic correlates of cerebellar neurologic signs. *Biol Psychiatry* 55, 1146-1153 (2004) .
- 13) Yamamoto N, Tomita U, Umino A, Nishikawa T: Uptake of D-serine by synaptosomal P2 fraction isolated from rat brain. *Synapse* 42, 84-86 (2001)
- 14) Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T. Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis. *Neuroscience* 66, 635-643 (1995) .
- 15) Shimazu D, Yamamoto N, Umino A, Ishii S, Sakurai S, Nishikawa T. Inhibition of D-serine accumulation in the *Xenopus* oocyte by expression of the rat ortholog of human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter gene isolated from the neocortex as D-serine modulator-1. *J Neurochem* 96, 30-42 (2006) .
- 16) Kamiyama S, Suda T, Ueda R, Suzuki M, Okubo R, Kikuchi N, Chiba Y, Goto S, Toyoda H, Saigo K, Watanabe M, Narimatsu H, Jigami Y, Nishihara S. Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter. *J Biol Chem* 278, 25958-25963 (2003) .

- 17) Kanematsu S, Ishii S, Umino A, Fujihira T, Kashiwa A, Yamamoto N, Kurumaji A, Nishikawa T: Evidence for involvement of glial cell activity in the control of extracellular D-serine contents in the rat brain. J Neural Transm 113, 1717-1721 (2006)
- 18) 中脩三, 川北幸男. 神経化学の進歩と臨床. 内村祐之, 笠松章, 島崎敏樹編. 精神医学最近の進歩. (最近の進歩シリーズ 14) 医歯薬出版 (1957)

研究室紹介

東京大学・大学院医学系研究科・神経生化学分野

尾藤 晴彦

教室の由来

当研究室は、1961年7月に東京大学医学部附属脳研究施設生化学部門(脳研生化)として発足しました。ちょうど10年前に、1997年の大学院講座制への移行に伴い、東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻基礎神経医学講座神経生化学分野(神経生化)となり、現在に至っています。これまでに、歴代の教室主任(黒川正則教授、芳賀達也教授)の下、一貫としてニューロン機能を担う素過程の分子理解を目的とした神経シグナル伝達機構の解明を精力的に行ってきたのが特徴です。

私は、2003年に縁あって助教授・教室主任として、当教室に着任致しました。現在、助手2名(奥野浩行、竹本・木村さやか)、技術専門職員1名、ポスドク1名、大学院生4名、医学部生4名とともに、神経回路の形成と再編成を制御する細胞情報伝達に関わるプロジェクトを推進しております。

現在の研究活動(詳細は<http://www.neurochem.m.u-tokyo.ac.jp>を参照下さい)

神経回路は、神経細胞の結合と機能的なシステム形成のための厳格な「設計図」と、個体ごとに内部・外部の環境変化に刻一刻と対応しその経験を蓄積できる「適応性・学習能力」という、「剛」と「柔」の性質を併せ持っています。

1個のニューロンには数万個のシナプスがあり、各々独立した入力を受けます。独立した数万個の入力が一つの神経核の遺伝子発現をどのように調節制御するのか(many-to-one problem)。ま

た一つの神経核で転写されたtranscriptの情報が、どのように再分配されて最終的に各シナプスへ伝達されるのか(one-to-many problem)。このような根本的な問題を解き明かすために、奥野助手を中心に、シナプスから核へと核からシナプスへのシグナリングに関する研究を行っています。

またこのような可塑的な情報変換を過不足なく実行可能な神経回路形成・シナプス形成を支配するルールは何か。シナプス局所の分子解剖は近年相当進歩しましたが、シナプスを構成するプレ側(神経終末)とポスト側(シナプス後肥厚部)の構造の位置、数、形態がどのように決まり、細胞内の分子動態とシグナル伝達がどのようにこれを制御しているのかは未解明です。そこで、竹本助手を中心に、シナプス形成に至るまでの突起形成・伸展過程・アクチンダイナミクスなどの生化学・酵素学を探索しています。

これらに併行して、ここ数年来、グルタミン酸光融解法を用いた局所刺激法、遺伝子発現イメージング、単一シナプス蛋白相互作用解析、神経細胞におけるRNA干渉法などの方法論を確立し、さらにウィルスを用いた遺伝子導入などの新規手法の導入や最適化も進めています。このような方法論を駆使し、単一ニューロン生化学から単一シナプス生化学への脱皮を図っています。

目指すところ

神経情報は、膜電位の上昇下降と神経伝達物質放出によって起こります。特に、シナプス電位の変化は、神経細胞内で電気的シグナルと化学的シグナルの両者を生成します。神経可塑性はこの両

者の絡み合いから成り立っていると考えられますが、化学的シグナルの全貌は、変化するシグナル毎に別個の定量技術を開発する必要があるため、解明が遅れています。我々の中期的目標は、神経活動依存的な化学的シグナル伝達の素過程を一つでも多く同定し、そのダイナミクスを明らかにすることにあります。

幸い、上記のプロジェクトを通じ、1) 転写因子CREBとその複合体による遺伝子調節が、神経活動によりどのように制御され長期記憶を形成するのか、2) 長期可塑性の発生に伴いシナプス近傍のシグナル伝達はどのように統合されるのか、3) そもそも神経回路形成に必須な神経突起がど

のようなプロセスを経て生まれるのか、などについて、少しずつ新たな知見が得られてきています。今後、これらの成果をさらに一層深めていきたいと考えています。このように情報が一時的にあるいは不可逆的に神経回路に書き込まれるメカニズムを理解することを通じ、脳の作動原理の一端が明らかになるのではないかと期待しています。

先の長いopen-end questionに興味のある方、また地道な生化学と一緒に取り組んでみたい方は是非ご連絡下さい(尾藤晴彦: hbito@m.u-tokyo.ac.jp)。今後とも神経化学会の会員の皆様の御指導・御叱咤を宜しくお願い致します。

兵庫医科大学 解剖学第二講座

野口 光一

兵庫医科大学は神戸と大阪の中央、西宮市の東端、武庫川の畔にあり、阪神甲子園球場からは車で1-2分のところですが、35年の歴史を刻んできました。野口は平成6年に第2代目の教授として赴任し、前任者が形質人類学を専門としていたため、全くゼロからのスタートでした。教室を立ち上げた直後の平成7年1月の阪神淡路大震災で、大学・病院・研究室共に甚大な被害を受けましたが、内外の援助を得て復興し、現在に至っております。現在教室員は、教員計5名、研究補助2名、ポスドク1名、大学院生3名で、日々研究活動に取り組んでいます。

ペインリサーチ「疼痛伝達の分子メカニズムの解明」を教室の一貫したテーマとして、分子形態学的手法を中心に、行動薬理学、分子生物学、神経生理学手法を取り入れています。各種疼痛関連病態における神経系での各種活性物質の発現動態と、神経情報伝達の変化、感覚受容・行動の変化との関連を追求し、基本的疼痛伝達機構と各種疼痛病態の解明を進め、基礎的疼痛研究から臨床的应用へのシーズとなる結果を得ることを目的としています。国際的な発表を重視しており、北米神経科学学会には毎年数題以上ポスター発表を行い、また国際疼痛学会には野口が現在理事を務めている関係で、積極的に参加しています。現在進めている研究テーマについて簡単に紹介致します。

1. Neuropathic Pain：神経障害に伴う難治性疼痛であるNeuropathic painのモデル動物における神経活性物質の動態と疼痛行動との関係を検討し、その分子メカニズムの解明を目指す

しています。教室では数種類のモデルを使用し、一次知覚ニューロン及び脊髄ニューロン、さらに上位中枢における動態解析と、その病態における意義を検討しています。

2. 神経疼痛関連チャネル分子の意義：この数年間で発見されたTRPファミリーなど、侵害刺激関連チャネルの意義について、上記の疼痛モデルを用いて in vivo にて解析を進めています。温熱刺激、冷刺激に反応するチャネルが、侵害刺激に対してもそれぞれ病態特異的な役割を持つことが明らかとなってきました。
3. 神経栄養因子：感覚系神経回路の可塑性に影響を与える種々の神経栄養因子についての行動学的、分子組織科学的、及び薬理学的研究を進めています。種々の神経可塑的な変化が、慢性痛の重要な因子であることは間違いないが、その可塑的变化において極めて重要な役割を果たしているのが、各種神経栄養因子であります。
4. 一次知覚ニューロンにおける分子情報伝達機構：この数年来、ペインリサーチにおけるトピックスとなっている細胞内シグナル伝達系に関して、その侵害伝達における意義を追究しています。疼痛伝達系においても多彩な細胞内情報伝達系の活性化が生じており、それが最終的な疼痛情報認知までつながることが明らかとなりました。
5. 疼痛メカニズムにおける炎症関連物質、サイトカインの意義：末梢神経障害、組織の炎症、虚血等により、様々なサイトカインが生じますが、それがいかにして神経系、特に侵害刺激伝達系に伝わっていくかを、この数年積極的に検索を進めています。単なる免疫反応の

一部としてではなく、神経系特異の応答メカニズムが存在すると考えられます。

6. 疼痛メカニズムにおける可塑性関連因子の意義：非常に新規性の高いテーマとして、神経障害後の細胞接着因子、細胞外に遊離されるプロテアーゼなどの脊髄ニューロンにお

ける役割について検討しています。海馬等で示唆されているこうした物質の動態が、慢性疼痛のメカニズムとして意義があるか否か、を種々の実験系において確認を進めています。

第50回日本神経化学会（横浜）大会のご案内と演題募集

一般演題応募、事前参加登録、宿泊のご案内

第50回日本神経化学会大会が、第30回日本神経科学大会、第17回日本神経回路学会大会と合同で2007年（平成19年）9月10日から12日の3日間、パシフィコ横浜にて「Neuro2007」と称して開催されます。私ども日本神経化学会にとっては50周年という節目の大会でもあり、50周年記念式典も予定されておりますので、会員皆様のご参加をお待ちしております。

現在、一般演題の受付を行っており、締め切りは3月末日です。また事前の参加登録、宿泊の受付も開始いたしました。詳しくはホームページでご案内しておりますので、アクセスしてください。

なお、海外から3名の招待講演者は既にお知らせしたとおりですが、企画および公募シンポジウムの概要も決まりつつあります。いずれもホームページで公開してまいりますので是非ご覧ください。アドレスは

<http://www2.convention.co.jp/neuro2007>です。

皆様方からの演題応募を心からお待ちしております。

第50回日本神経化学会大会

大会長 高坂 新一

国立精神・神経センター 神経研究所所長

日本神経化学会奨励賞候補者募集のお知らせ

日本神経化学会では2000年度より神経化学分野の優秀な若手研究者を対象に、日本神経化学会奨励賞を贈呈しています。本年度も候補者を募集致しますので、下記の事項を注意深くお読みいただき、奮ってご応募下さい。

なお、奨励賞受賞者の発表と授賞式は本年度の第50回日本神経化学会の会期中に行います。最優秀奨励賞受賞者には副賞としてメダルと金十萬円が贈られます。さらに「神経化学」誌にご自身が書かれた総説を掲載し、また、次年度の大会でシンポジウムを企画することができます。

(1) 候補者の対象

本会の会員歴3年以上、研究歴3年以上で、本会で積極的に発表した実績を持ち、平成19年4月1日現在で満40歳未満の方。

(2) 応募方法

原則的に自薦とします。申請希望者は以下の書類を、下記事務局へ、必ず簡易書留(宅配便も可)にて送付して下さい。なお、応募書類は返却致しません。(本年度締切期限につきましては、後日ご案内いたします。)

- 1) 研究の概要：申請研究の概要を〈研究題目(和英両方のタイトルをつけて下さい)〉〈背景・目的〉〈結果〉〈学術的意義・特色・独創的な点〉に分けてA4用紙2枚以内に記入すること。この研究の概要は奨励賞受賞シンポジウムの際に、抄録として会員に配布されます。
- 2) 申請者の略歴：大学卒業からの略歴を記載すること。学位の種類、取得年月日、取得機関も明示すること。また、過去5年程度の日本神経化学会大会における発表歴を必ず記載すること。
- 3) 業績目録：英文原著、英文総説、和文原著、和文総説に分けて、全著者名、発表年、タイトル、雑誌名、巻、開始および最終ページを記入すること。申請者名は太字にするか、下線を引くこと。学会の抄録や要旨、Proceedingsなどは含めず、業績目録の書式は“Journal of Neurochemistry”の投稿規定に準じること。
- 4) 選考に関連する主要論文の別刷り：3編を8部ずつ添付すること。

(3) 選考方法

本年度の選考委員会による書類審査で数名の奨励賞受賞者を選出します。受賞者には第50回日本神経化学会(横浜大会)の会期中に開催される「日本神経化学会奨励賞受賞シンポジウム(最優秀奨励賞選考会)」において研究成果を発表していただきます。発表と質疑は英語で行います。なお、この発表と質疑も選考評価の対象になります。その後の選考委員会で最優秀奨励賞受賞者を決定し、大会期間中に奨励賞と最優秀奨励賞の授賞式を行いますので、応募は奨励賞受賞シンポジウムで発表の出来る方に限らせていただきます。このシンポジウムは一般の参加者にも公開されます。

本年度選考委員は以下の通りです。

津田 正明(委員長／富山大)

木山 博資(大阪市大)

田代 朋子(青山学院大)

豊島 至 (秋田大)

仲嶋 一範(慶應義塾大)

山脇 成人(広島大)

米田 幸雄(金沢大)

*「選考委員の所属する研究室から自薦者が出た場合は、選考に加わらない(奨励賞内規5.)」と定められております。

(4) 締切

2007年5月14日(月) 必着

(5) 応募書類の送付先

〒160-0016 新宿区信濃町35信濃町煉瓦館 財団法人国際医学情報センター内

日本神経化学会奨励賞選考委員会

TEL : 03-5361-7107 FAX : 03-5361-7091

学 会 掲 示 板

(財)井上科学振興財団 第24回井上研究奨励賞の受賞候補者を募集

(財)井上科学振興財団(井口洋夫理事長)は、第24回(平成19年度)井上研究奨励賞の受賞候補者を次のとおり募集している。

1. 概要：平成16～18年度の過去3年間に、理学・工学・医学・薬学・農学等の分野で博士の学位を取得した35才未満(医学・歯学・獣医学の分野については37才未満)の研究者で、自然科学の基礎的研究において新しい領域を開拓する可能性のある優れた博士論文を提出した研究者に、賞状、メダル及び研究奨励金50万円を贈呈する。
2. 授賞件数：30件
3. 募集方法：博士論文を指導した研究者の推薦に基づき、学位を授与した大学の学長からの推薦
4. 推薦締切日：平成19年9月20日(木)
5. 照会先：財団法人 井上科学振興財団
〒150-0036 東京都渋谷区南平台町15-15 南平台今井ビル601

電話：03-3477-2738

F A X：03-3477-2747

E-M A I L：inoue01@inoue-zaidan.or.jp

U R L：http://www.inoue-zaidan.or.jp

(財)井上科学振興財団 第24回井上学術賞の候補者を募集

(財)井上科学振興財団(井口洋夫理事長)は、第24回(平成19年度)井上学術賞の受賞候補者を次のとおり募集している。

1. 概要：自然科学の基礎的研究で特に顕著な業績をあげた50才未満の研究者に対し、学術賞(賞状及び金メダル、副賞200万円)を贈呈する。
2. 授賞件数：5件以内
3. 募集方法：指定の関係28学会、及び財団の役員・評議員等からの推薦
4. 推薦締切日：平成19年9月20日(木)
※日本神経化学会よりご推薦される場合は、平成19年8月20日(月)必着で学会事務局までお送りください。

<学会推薦応募書類送付先>

日本神経化学会 研究助成金等候補者選考委員会
〒160-0016 東京都新宿区信濃町35 信濃町煉瓦館
(財)国際医学情報センター内
電話：03-5361-7107
FAX：03-5361-7091

5. 照会先：財団法人 井上科学振興財団
〒150-0036 東京都渋谷区南平台町15-15 南平台今井ビル601

電話：03 - 3477 - 2738
FAX：03 - 3477 - 2747
E - M A I L : inoue01@inoue-zaidan.or.jp
U R L : <http://www.inoue-zaidan.or.jp>

(財)井上科学振興財団 久保亮五記念賞の候補者を募集

(財)井上科学振興財団(井口洋夫理事長)は、第11回久保亮五記念賞(平成19年度)の候補者を次のとおり募集している。

1. 概要：日本の統計物理学・物性科学における波及効果の大きい基礎的研究で優れた業績をあげた45才未満の若手研究者に対し、賞状、メダル及び賞金100万円を贈呈する。
2. 授賞件数：1件(毎年)
3. 募集方法：関係専門分野の研究者からの推薦とします。
推薦は公募です。自由にご推薦ください。
4. 推薦締切日：平成19年6月30日(土)
5. 照会先：財団法人 井上科学振興財団
〒150-0036 東京都渋谷区南平台町15-15 南平台今井ビル601

電話：03 - 3477 - 2738

F A X：03 - 3477 - 2747

E - M A I L：inoue01@inoue-zaidan.or.jp

U R L：http://www.inoue-zaidan.or.jp

千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ第20回 「小胞体ストレスと脳神経疾患」

日 時：平成19年9月28日（金）10：00～17：00

場 所：千里ライフサイエンスセンタービル（5階）ライフホール

着眼点：小胞体ストレスは異常タンパク質を細胞内に蓄積させ、細胞に致命的傷害を与える。近年、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患や精神疾患の発症に、小胞体ストレスが密接に関わることが示唆されている。本セミナーでは、小胞体ストレスおよびその応答機構の仕組みと小胞体機能が破綻して生じる脳神経疾患発症の分子機序について取り上げる。

コーディネーター：大阪大学大学院医学系研究科 研究科長・神経機能形態学 遠山正彌
宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野 今泉和則

プログラム：

1. 小胞体ストレス応答の多様性

宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野 今泉和則

2. 遺伝性神経変性疾患における小胞体ストレスの役割

マサチューセッツ大学医学部分子医学部門 浦野文彦

3. 虚血と小胞体ストレス

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学神経分子標的学講座 小川智

4. ニトロソ化ストレスによる小胞体ストレス惹起機構と神経変性疾患との関係

北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室 上原孝

5. パーキンソン病と小胞体ストレス

京都大学大学院医学研究科臨床神経学（神経内科） 高橋良輔

6. 精神疾患における小胞体ストレス反応障害の意義

理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム 加藤忠史

定員：300名

参加費：大学・官公庁職員、当財団の賛助会員 3,000円

一般 5,000円、学生 1,000円

申し込み要領：①氏名、勤務先、〒所在地、所属、電話およびFAX 番号を明記の上、郵便、FAX またはE-mail で下記宛お申し込み下さい。

②事務局より受付の通知を返送いたしますので、通知書に記載した振り込み先口座に参加費をお振り込み下さい。

③入金を確認後、通常2週間以内に領収書兼参加証をお届けいたします。

申込先：（財）千里ライフサイエンス振興財団ブレインサイエンス係

〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2

千里ライフサイエンスセンタービル8階

TEL 06-6873-2001 FAX 06-6873-2002

E-mail tkd-lsf@senri-lc.co.jp

出版物の複写権等委託済表示例

有限責任中間法人 学術著作権協会

1. 下記の表示例またはその内容を要約した表示を、貴誌の表2、扉裏、目次ページ、奥付または表4のいずれかに毎号掲載して下さい。これにより利用者は、この出版物の複写について、どこに許諾を求めたらよいか分かり、円滑な複写利用に役立ちます。
2. 貴誌に掲載された著作物の転載・翻訳など、複写以外の利用については、本会には権利の委託が行われておりませんので貴会において対応して下さい。

※下記の権利者名には貴団体名称をお入れください。

(2) 和文による表示例

複写される方へ

権利者名は有限責任中間法人 学術著作権協会（学著協）に複写に関する権利委託をしていますので、本誌に掲載された著作物を複写したい方は、学著協より許諾を受けて複写して下さい。但し、社団法人日本複写権センター（学著協より複写に関する権利を再委託）と包括複写許諾契約を締結されている企業の社員による社内利用目的の複写はその必要はありません。（※社外頒布用の複写は許諾が必要です。）

権利委託先：有限責任中間法人 学術著作権協会

〒107-0052 東京都港区赤坂 9-6-41 乃木坂ビル 3 階

電話：03-3475-5618 FAX：03-3475-5619 E-mail：info@jaacc.jp

注意：複写以外の許諾（著作物の転載・翻訳等）は、学著協では扱っていませんので、直接権利者名へご連絡ください。（TEL：権利者電話番号）

また、アメリカ合衆国において本書を複写したい場合は、次の団体に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

Phone 1-978-750-8400 FAX 1-978-646-8600

(3) 欧文による表示例

Notice for Photocopying

If you wish to photocopy any work of this publication, you have to get permission from the following organization to which licensing of copyright clearance is delegated by the copyright owner.

<All users except those in USA>

Japan Academic Association for Copyright Clearance, Inc. (JAACC)

6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan

Phone 81-3-3475-5618 FAX 81-3-3475-5619 E-mail: info@jaacc.jp

<Users in USA>

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

Phone 1-978-750-8400 FAX 1-978-646-8600

編集後記

4年間担当させて頂いた「神経化学」の仕事も本号の編集をもって最後となりました。機関誌が年令や専門を異にする会員交流の場になればと願い、編集にはそれなりの工夫をして参りました。特に、若手会員の研究紹介を積極的に進めたいと考え、奨励賞受賞研究の紹介の他に、「輝け次代の担い手たち」をシリーズで続けて参りました。目を見張る力作を幾つも掲載できたのは大変嬉しいことでした。突然の原稿依頼や執拗な原稿催促に快く応じて下さった数多くの会員の皆様、原稿の取りまとめにお手伝い下さった学会事務局の皆様、そして六甲印刷の皆様には心より感謝申し上げます。「神経化学」が学会の発展のために貢献することを祈り、次ぎの編集委員長に引継ぎます。

(柳澤勝彦)

神経化学 46巻 第1号

平成19年3月31日発行

編集兼発行者 日本神経化学会

代表者 遠山 正彌

発行者 日本神経化学会

〒160-0016 東京都新宿区信濃町35 信濃町煉瓦館

(財)国際医学情報センター内

印刷所 (株)六甲出版販売
