

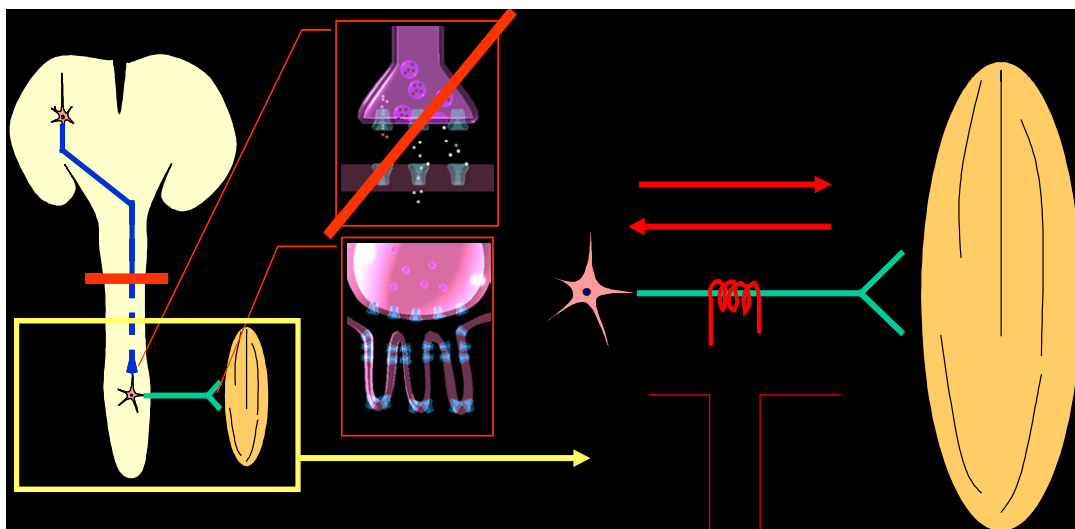
## 研究テーマ 電気刺激に伴う神経・筋機能の解明

研究者	近藤尚武	東北大学大学院医学系研究科	共同(委託)研究員
	鈴木良地	財団法人みやぎ産業振興機構	派遣(委託)研究員
	阪上洋行	東北大学大学院医学系研究科	共同研究員
	大和田祐二	東北大学大学院医学系研究科	共同研究員
	斎藤幸子	東北大学大学院医学系研究科	共同研究員
	吉田美加	東北大学大学院医学系研究科	共同研究員

### 1 フェーズI

#### (1) 研究の概要

脳から脊髄前角運動ニューロンへの指令が病的に遮断された個体において、末梢運動神経線維に強制的・持続的に機能的電気刺激を与えることが、脊髄前角運動ニューロンと支配骨格筋細胞でおきている正常生理的条件下での現象と如何なる変動を惹起するかについて、遺伝子工学・分子生物学的手法を駆使して追求する。これらの所見から、障害脊髄例での運動神経機能的電気刺激による機能回復の分子基盤を確立する基礎データを構築する。



#### (2) 研究の目標

脊髄レベルでの外的損傷（横断全切断）により、損傷部位より下位と上位の脊髄前角神経細胞に如何なる形態の変化および機能分子の遺伝子発現の変動が招来されるかを組織学、遺伝子工学的に解析する。

一方、脊髄・脳におけるシグナル伝達関連のリピドキナーゼとプロテインキナーゼおよび同ホスファターゼについての発現局在解析という当教室の10年来の研究を続行するなかで、神経軸索損傷修復に最も重要な要素のひとつである細胞膜の補充と細胞死回避に注

目して、それらの現象に深く関与することが判明しつつあるイノシトールリン脂質 (PI) の代謝酵素分子に解析焦点を合わせる。また、核内での転写翻訳調節に重要な Ca/calmodulin 依存性プロテインキナーゼ (CaMK) の分子多様性についても同様の視点で追求する。

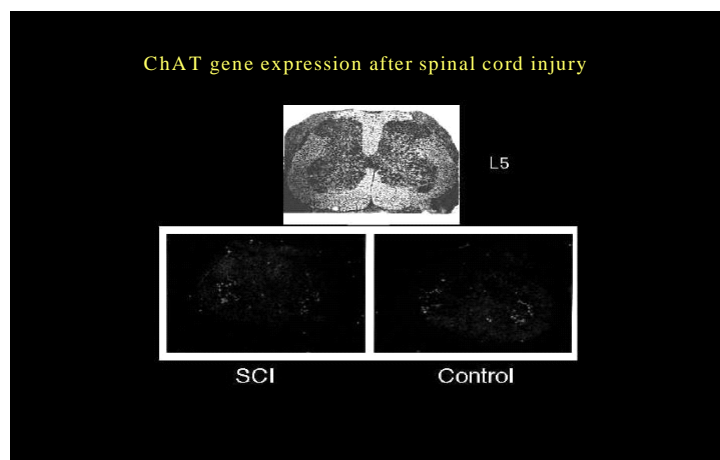
### (3) 実施内容及び結果

ノーザンブロット解析と遺伝子組織化科学的解析：

成熟ラット (8 週齢・雄) を全身麻酔下でその脊髄を露出させ、上部胸部レベルで外科的に全横断切をおこない、以後経時的 (1 日、2 日、1 週、2 週、4 週) に下部腰髄を採取した。一方、脊髄露出のみの手術後直ちに縫合・回復させたラットを同様の時間経過後にコントロールとして実験に供した。組織学的には、前角神経細胞の数、サイズ、シナプスの形状などの変化を顕微鏡・電顕的に解析した。次いで、アセチルコリン合成酵素 (ChAT、神経筋シナプスでの興奮性神経伝達物質)、CGRP (calcitonin gene related peptide)、agrin、ARIA (いずれも、前角運動ニューロンが産生して軸索末端で放出して支配する骨格筋のアセチルコリン受容体発現と局在を制御する分子)、GABA とグルタミン酸 (脊髄でのそれぞれ抑制性と興奮性の代表的神経伝達物質) の受容体 {AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionate)-receptor Glu-R A,B,C,D の4種のサブユニット、および GABA receptor  $\alpha 2$  と  $\gamma 2$ } を解析標的として、ノーザンブロット解析と遺伝子組織化科学的解析によりこれらの分子の mRNA の発現局在の変動の有無を精査した。さらに、外科的な脊髄全横断切 2 週後の下部腰髄を採取し、脊髄露出のみの手術後直ちに縫合・回復させたラットをにコントロールとして、それぞれの脊髄試料よりメッセンジャー RNA を抽出し、遺伝子サブトラクション法による既知、未知分子の発現変動解析も実施した。一方、脊髄・脳におけるシグナル伝達関連分子の発現局在解析に関しては、リピドホスファターゼの代表のひとつのイノシトール環 5 位を脱リン酸化する SHIP2 (SH2 domain 含有 5・ホスファターゼ) の mRNA の脳内遺伝子発現局在を精査した。

イ ChAT：

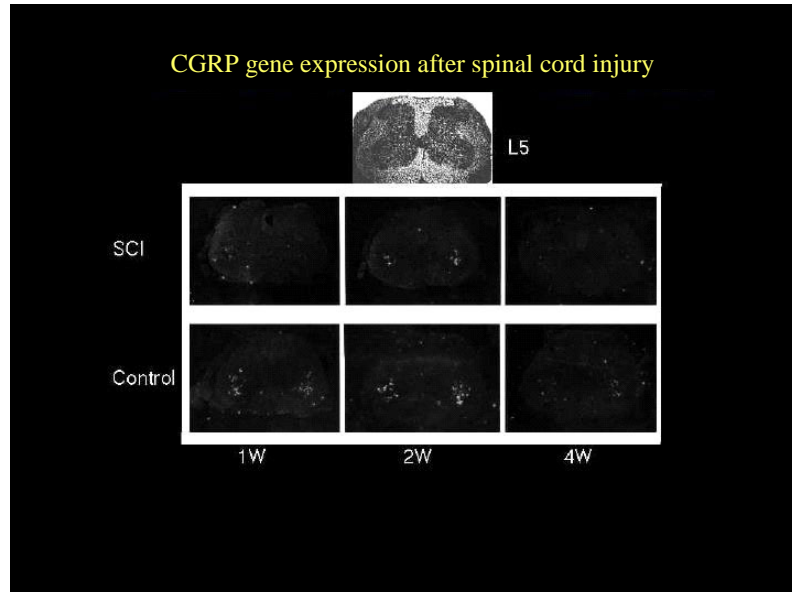
脊髄損傷後 1 週、2 週、4 週における実験群とコントロール群の当該脊髄試料をノーザンブロット解析すると、mRNA の発現量の変化に有為差は認められなかった。遺伝子組織化科学的解析では mRNA



の発現は実験群とコントロール共に主として前角運動ニューロンに局在するが、損傷後に発現ニューロンの数、サイズ、発現シグナル強度にコントロールと較べて著変を認めなかった。

□ CGRP:

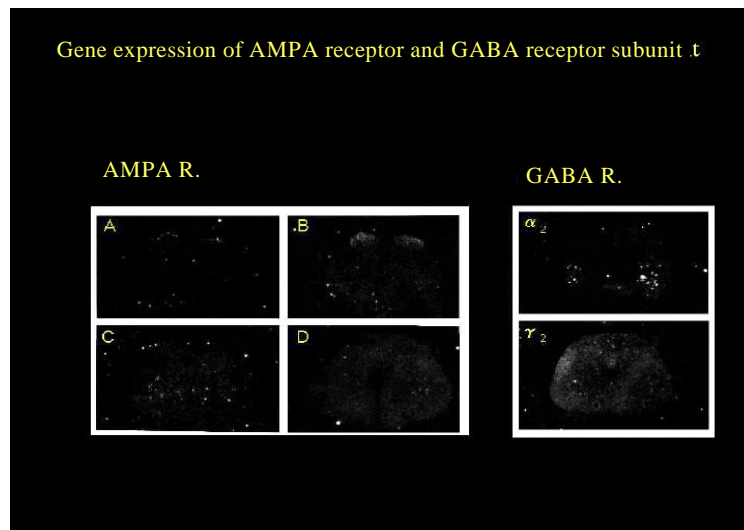
と同様の時間経過において、ノーザンブロット解析では mRNA の発現量が経時的に減少し術後 4 週でコントロールの約半量となった。遺伝子組織化学的解析では mRNA の発現は実験群



とコントロール共に前角運動ニューロンに局在するが、発現シグナルの中ないし弱陽性ニューロンの出現頻度は術後経時的に減少した（個々のニューロンの発現シグナルの減少でニューロンそのものの消失ではない）。次に、電気刺激下での脊髄 motoneuron での CGRP 発現変化を精査した。脊髄横断損傷後 4 週後から 1 週間にわたって、電気刺激を下腿の長指伸筋 EDL(Extensor Digitorium Longus)に 20Hz（実際ヒト臨床で使われている刺激周波数に準拠）持続時間 200msecond, 強度 80v の陰性矩形波を 20min/day の頻度で加えた。脊髄横断損傷例において、CGRP 陽性シグナルの減少は再確認できたが、上述の電気刺激条件のもとではその発現減少が正常値へ回復することを含めた発現変化は認められなかった。

ハ グルタミン酸受容体 と GABA 受容体:

遺伝子組織化学により、Glu-R A, B の mRNA 発現は後角優位で、Glu-R C, D の mRNA の発現は前角優位であったが、実験群とコントロールで強度の有意差は認められなかった。GABA-R  $\alpha_2$ ,

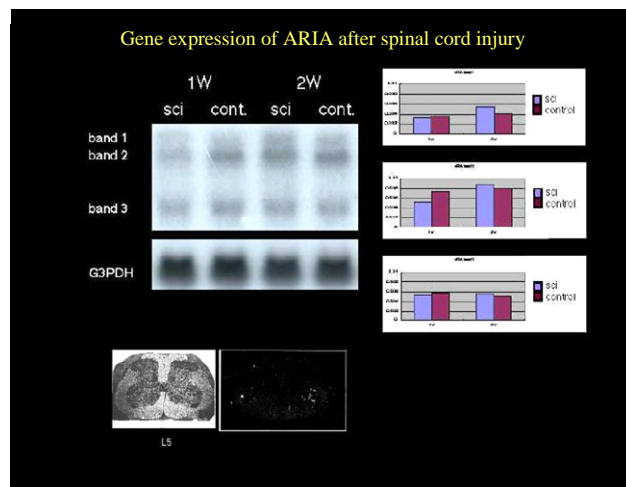
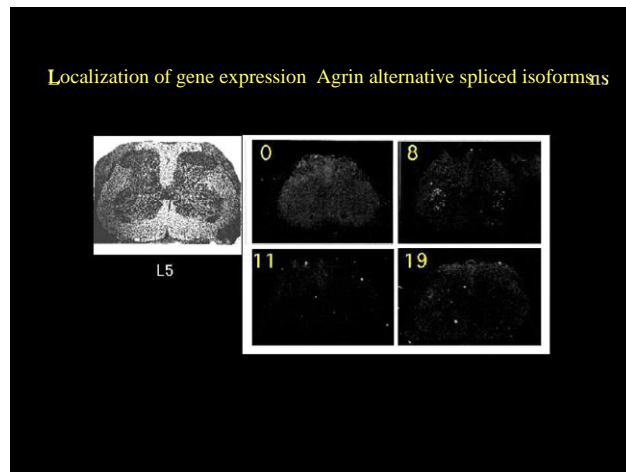
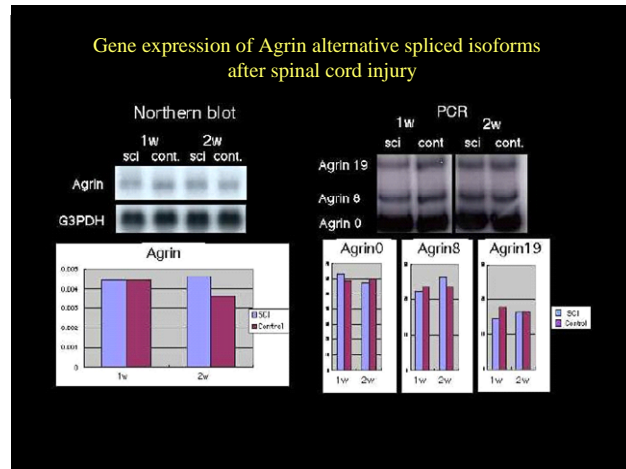


g2 の mRNA の発現は前角運動ニューロンに局在していたが、実験群とコントロールの間にその強度に有意差はなかった。

## 二 agrin と ARIA:

術直後、1日、2日、7日と比較的短期における変化の有無を精査した。ノーザンブロット解析では、各検体について内コントロールとしての GAPDH (glyceral dehyde-3-phosphate dehydrogenase) による補正をして発現強度を比較した。いずれの術後時期においても、agrin と ARIA 双方が脊髄損傷部位の頭側と尾側の両方で実験群においてコントロール群より若干低い値を示したが、統計学的には明らかな有意差は認められなかった。遺伝子組織化学的解析では、実験群とコントロール共に前角運動ニューロンに同程度の強度を示す発現シグナルが局在した。

さらにサブタイプごとに精査した。agrin-0, agrin-8, agrin-11, agrin-19 はアセチルコリン受容体凝集能に差がある agrin のアイソフォームである。そのうち、明らかなアセチルコリン受容体凝集能を有するのは agrin-8 と agrin-19 である。ヒヨコの毛様体神経節の節前および節後の軸索切断により、この agrin-8 と agrin-19 の mRNA 発現が神経節含有 agrin mRNA 総量内での比率が統計学的に有意に変化することが知られている。そこで、脊髄損傷後1週と2週の試料を用いて、同様の解析手段にて、各アイソフォームの mRNA 発現比率を精査した。しかし、術後1週で損傷部の尾側における agrin-19 の比率が実験群で若干減少したのみであった。



ホ その他：

神経再生に深く関与することが最近明らかにされた新規分子の Nogo が本実験系の脊髄損傷後に発現変動を示すかを、ノーザンブロットと遺伝子組織化学により解析した。脊髄損傷後 1, 2, 7, 14, 28 日の試料で実施したが、いずれの試料においても明確な変化は認められなかった。

subtraction 法による解析：

胸髄切断後の腰髄で一次スクリーニングを実施して、遺伝子発現増強をしめす 160 クローンと発現減少する 96 クローンを分離同定出来た。次いで二次スクリーニングを実施して、前者で 12 クローン 9 種と後方で 21 クローン 18 種に絞り込みが出来た。これらの各々をクローニングベクターに組み込んで塩基配列を確認出来た。それらの名称あるいはジーンバンク上での EST 符号を以下に記す( 文献的に、ニューロン特異的なものに(n)、オリゴデンドロサイト特異的なものに(o)、アストロサイト特異的なものに(a)を付す )と、増強するクローン： transferrin (o), cytochrome oxidase subunit 1, Ser-tRNA (n), Rattus norvegicus glial fibrillary acidic proteins alpha and delta (GFAP) (a), cysteine proteinase inhibitor cystatin C, AW532544, AW251325, AW140536 similar to ribosomal protein L41, AI 412970, AI 111802 ;

減少するクローン： cytosolic 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A synthase (o), rat myelin basic protein (MBP) (o), UDP- galactose:ceramide alactosyltransferase (o), L-MAG (o), myelin basic protein (MBP) (o), Rat brain myelin proteolipid protein (PLP) (o), 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (o), n-chimaerin (n), alpha-adducin (n), clathrin heavy chain (n), Mus musculus membrane protein TMS-1 (n), AA944304, AI 072950, AA801059, AA849109, AA210215, AW143075, AA849109.

これらのサブトラクション法で得られたもののうちで先ず、発現増強を示したものについて腰髄切片上での発現局在を in situ hybridization 法により調べた。その結果、ニューロンにおける明瞭な発現増強が確認出来たものは cysteine proteinase inhibitor cystatin C の 1 クローンのみであった。しかし、さらなる厳密なコントロールのもとでのノーザンブロット解析ではその発現増強は再確認できなかった。発現減少するものについても同様の解析を実施したが、n-chimaerin についてはノーザンブロットでその発現減少を確認できたが、切断部位の頭側と尾側の双方において減少していた。

増強するとして同定された AW532544 について、DIG 標識 cRNA probe を用いた in situ hybridization 法により発現局在を調べると、陽性シグナルは前角、後角いずれにおいてもニューロン細胞体に一致して検出された。既知の分子でこのクローンと相同性の高い分子はデータベース上では見出せなかった。このクローンに相同な 986bp をプローブにして、ラット cDNA ライブラリーをスクリーニングして得たクローンを解析した結果、500bp だけ 5' 方向に伸長することができたが、翻訳領域に達するには至らなかった。さらに、5' レース法で翻訳領域を PCR で増幅することを反復試行したが、特異的バンドが得られなかった。トータル RNA のアプライ量をスクリーニング時の 4 倍に増量してノーザンブロットを反復実施したが、胸髄損傷 2 週後のラット脊髄における発現増強は再現されなかった。ノーザンブロット解析結果から予想されるこの分子の cDNA の全長が 10kb 程度と予想さ

れ、反復施行で翻訳領域解析まで至らなかったことを併せ考え、このクローンの解析は相当長時間を要することが推測されるので、この線での追求は止む無く中断することにした。

シグナル伝達関連タンパク（主にリポド性シグナリングに深く関与するもの）の脳脊髄での発現局在解析：

SHIP2(SH2 domain 含有 5・ホスファターゼ)の mRNA の脳内遺伝子発現局在精査に関して、先ずラットの cDNA 塩基配列を初めて明らかにしてジーンバンクに登録した。それを基にこの遺伝子発現は遺伝子組織化学的に解析したところ、胎生期脳の脳室胚芽層に最初に明瞭に検出された。生後発達が進むにつれてこの発現は白質に明瞭となり、灰白質には有意の発現を示さなかった。白質での発現パターンからオリゴデンドロサイトがその責任細胞であると示唆された。一方、脂質性セカンドメッセンジャーのホスファチジン酸産生に与かる phospholipase D (PLD) の既知 2 アイソフォームの脳内遺伝子発現局在も精査した。その結果、PLD1 と PLD2 いずれも胎生期脳室胚芽層に有意の発現を示すが、脳灰白質には生後早期に一過性に PLD2 だけが弱く発現するだけで、生後成獣まで主要発現部位は白質であった。その発現パターンから、PLD1 についてはオリゴデンドロサイトが、PLD2 ではアストロサイトが発現責任細胞であると示唆された。白質即ちグリア細胞にこれだけ有意な発現を示すシグナル分子が 3 種も見出されたのは、これまでに無く異例である。グリアでのシグナル機構の解析に有用な一歩を示した。

#### ( 4 ) 業績

- 1 Kondo,H. (1999) Molecular biological and histochemical analysis on the functional significance of phosphoinositide metabolism in the nervous system. In "Handbook of Genetic Influences on the Nervous System" ed. Joh,TH et al., CRC Press, 261-276
- 2 Sakagami,H., Kobayashi,T. & Kondo,H. (1999) Immunological evidence that the isoform of Ca/calmodulin-dependent protein kinase IV is expressed in the cerebellar granule cells as a distinct translational product. *Eur.J.Neurosc.*11:2531-2536
- 3 Iwasa, H. & Kondo, H. (1999) Difference in the width of the intercellular spaces in the epithelial basal infolding and the renal glomerular filtration site between the freeze-substitution with OsO<sub>4</sub> in acetone and the conventional fixation. *J. Anat.* 194:215-221
- 4 Kudo, M., Saito, S.,Sakagami,H. & Kondo, H. (1999) Localization of synaptotagmin mRNAs in the rat brain. *Mol.Brain Res.* 64:179-185
- 5 Suzuki, R., Sakagami, H. & Kondo, H (1999) Localization of mRNA for Dri 42, subtype 2b of phosphatidic acid phosphatase in developing and mature brain of rats. *Mol.Brain Res.*66:195-199
- 6 Yoshida, S., Kokubunn, S., Sakagami, H. Owada,Y. & Kondo, H. (1999) Localization of PDK1 mRNA localization in the brain. *Tohoku J. Exp. Med.*187:249-255
- 7 Kudo,M., Saito,S., Owada,Y., Suzaki,H. & Kondo,H.(2000) Localization of mRNAs for SHIP2, SH2 domain-containing inositol phosphate 5-phosphatase, in the brain of developing and mature rats. *Mol.Brain Res.*75:172-177

- 8 Sakagami,H. & Kondo,H.(2000) Distinct immunohistochemical localization of two isoforms of Ca/calmodulin-dependent protein kinase kinases in the adult brain. *Eur.J.Neurosc.* 12:89-99
- 9 Saito,S., Kondo,H.(2000) Localization of mRNAs for phospholipase D (PLD) type 1 and type 2 in the brain of developing and mature rats. *Dev.Brain Res.*120:41-47

## 2 フェーズ

### (1) 研究の概要

脳から脊髄前角運動ニューロンへの指令が病的に遮断された個体において、末梢運動神経線維に強制的・持続的に機能的電気刺激を与えることが、脊髄前角運動ニューロンと支配骨格筋細胞でおきている正常生理的条件下での現象と如何なる変動を惹起するかについて、遺伝子工学・分子生物学的手法を駆使して追求する。これらの所見から、障害脊髄例での運動神経機能的電気刺激による機能回復の分子基盤を確立する基礎データを構築する。

### (2) 研究の目標

脊髄レベルでの外的損傷（横断全切断）により、損傷部位より下位と上位の脊髄前角神経細胞に如何なる形態の変化および機能分子の遺伝子発現の変動が招来されるかを組織学、遺伝子工学的に解析する。

一方、脊髄・脳におけるシグナル伝達関連のリポドキナーゼとプロテインキナーゼおよび同ホスファターゼについての発現局在解析という当教室の10年来の研究を続けるなかで、神経軸索損傷修復に最も重要な要素のひとつである細胞膜の補充と細胞死回避に注目して、それらの現象に深く関与することが判明しつつあるイノシトールリン脂質 (PI) の代謝酵素分子に解析焦点を合わせる。また、核内での転写翻訳調節に重要な Ca/calmodulin 依存性プロテインキナーゼ (CaMK) の分子多様性についても同様の視点で追求する。

### (3) 実施内容

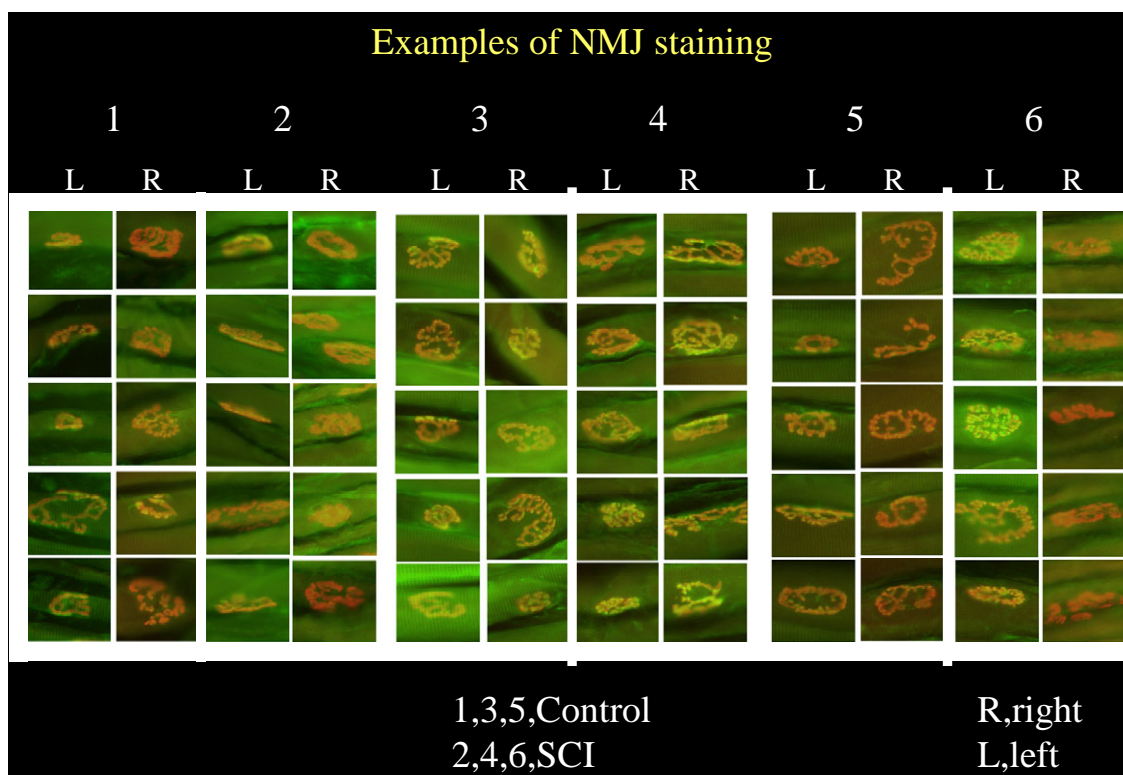
成熟ラット（8週齢・雄）を全身麻酔下でその脊髄を露出させ、上部胸部レベルで外科的に全横断切をおこない、脊髄遮断手術後2Wの雄の後肢の長指伸筋 EDL (extensor digitorum longus) を試料として、texas red-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (筋細胞膜 Ach 受容体の標識) および抗 synaptophysin 抗体 (神経終末の標識) を用いた免疫組織化学による解析を行った。そして、光学顕微鏡下での Ach 受容体・神経終末陽性領域の測定により、先ず神経筋接合部の大きさと形状を正常例 (control / sham) と脊髄横断損傷例 (SCI) で観察し、次いで、それぞれの片側 (Lt) 運動神経束電気刺激負荷例と無刺戟側 (Rt) 例とで比較検討した。一方、脊髄・脳におけるシグナル伝達関連分子の発現局在解析に関しては、遺伝子組織化学とノーザンプロット法を駆使してシグナル分子の mRNA の脳内遺伝子発現局在を精査し、必要に応じて cDNA クローニングも適宜遂行した。

### (4) 結果



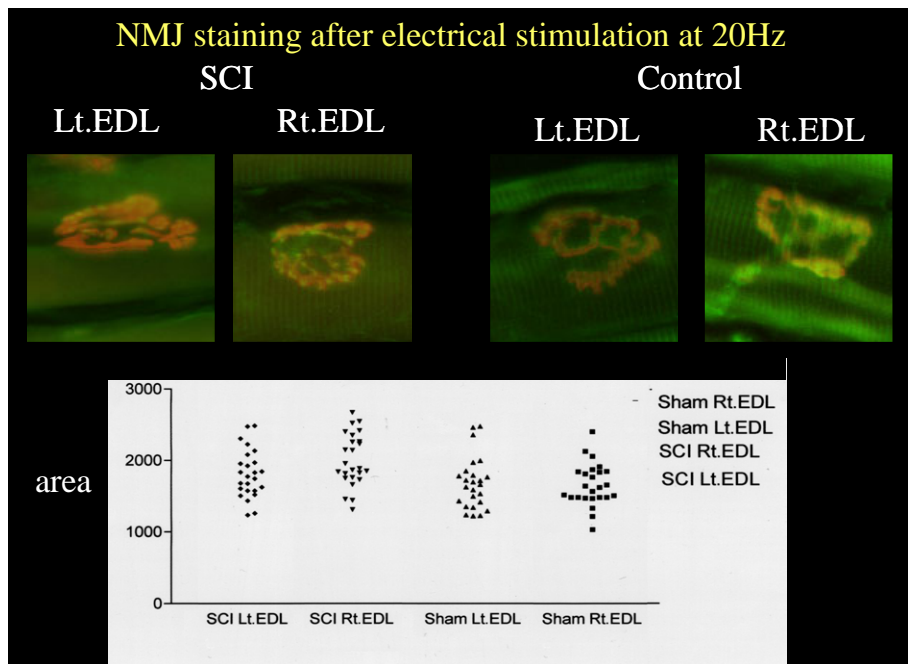
NMJ の形態変化の解析：

正常例に比較して、脊髄損傷例では神経筋接合部の面積が若干拡大し、その運動神経束刺激側では面積が減少して正常例の値に近づく傾向が観察されたが、その変化の統計学的な有意差の有無は認められなかった。さらに、坐骨神経を經由して逆行性に Dil でラベルした脊髄前角 motoneuron の樹状突起の分枝様式を光学顕微鏡下で精細に観察したが、電気刺激側で樹状突起の分枝数が減少する傾向を一例で得たが、その統計学的有意を得ることは出来なかった。



シグナル伝達関連タンパク（主にリポド性シグナリングに深く関与するもの）の脳脊髄での発現局在解析：

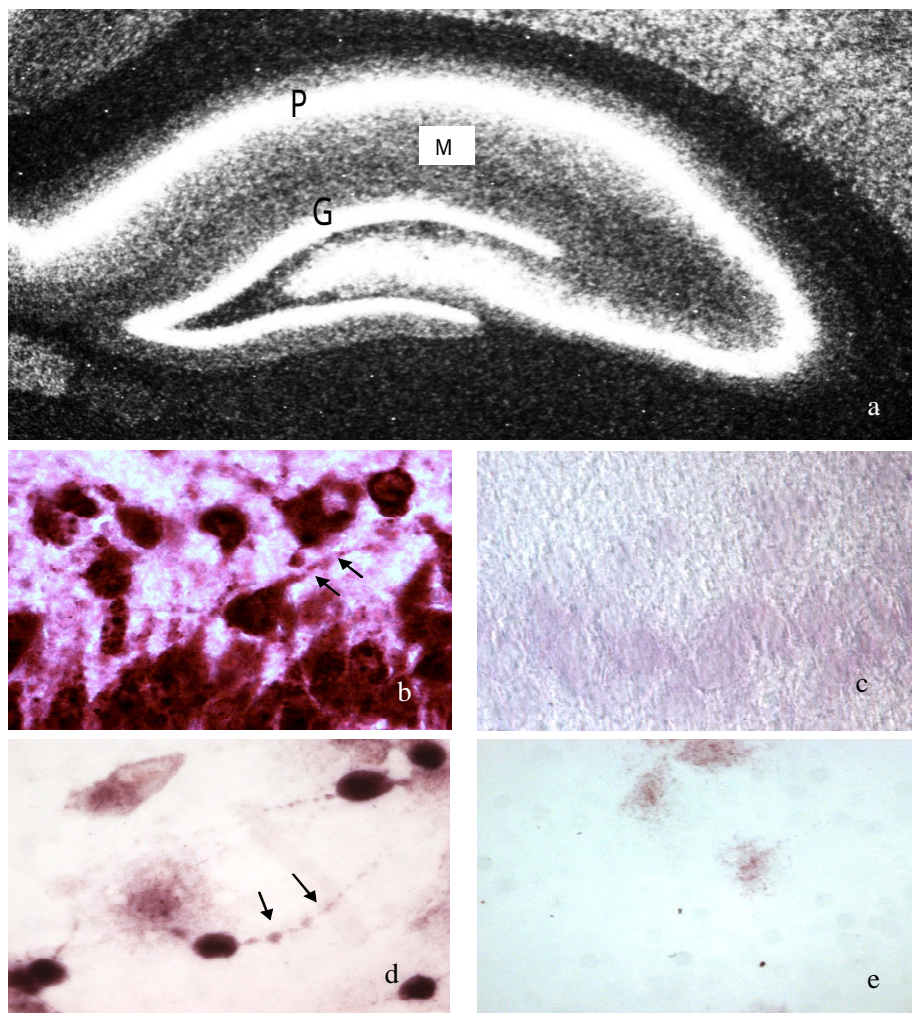
脂質シグナル関連キナーゼの代表である protein kinase C (PKC) の既知アイソフォーム全 10 種の発達期と成熟期での脳内遺伝子発現局在を詳細に解明した。その結果、胎生期脳では PKC $\epsilon, \mu, \lambda, \zeta$  の 4 種だけが有意発現をしめし、そのうちで脳室胚芽層には  $\mu, \lambda$  だけが発現された。もう一つの胚芽層である小脳外顆粒層で  $\mu, \lambda$  に加えて  $\beta$  の発現も認められた。生後発達過程では、 $\delta, \mu, \theta$  が脳の各々限られた領域にだけ発現されるがその他のアイソフォームは灰白質に広く多様に発現されていた。また、マウスの右舌下神経切断を施し、Endophilin I mRNA の発現の術後時間変化を 21 日間観察した。小型の neuron と思われる細胞群に発現シグナルが観察された。さらに、シグナルカスケードで重要な細胞内 Ca に機能が強く依存する Ca/calmodulin-dependent protein kinase kinase の 2 つのアイソフォームが脳内で組織と細胞レベルで如何なる発現局在を示すかを免疫組織化学的に精査した。このリン酸化酵素の基質である CaMKIV が細胞核に局在するのにこの酵素分子のいずれのアイソフォームも細胞質に局在するので、リン酸化の場の特定が新たな問題となった。



樹状突起分枝制御と ARF GEP である EFA6 との関係：

イ *in situ* ハイブリダイゼーション法により、EFA6 mRNA の発現を解析容易で記憶等に重要な海馬で実施した。この遺伝子発現は、胎生期18日齢の海馬錐体細胞層において既に認められ、生後1~2週齢にその発現のピークを示した。EFA6 mRNA の発現シグナルは、海馬錐体細胞層(P)及び歯状回顆粒細胞層(G)すなわちニューロンの細胞体のみならず、海馬の分子層(M)すなわち樹状突起においても認められた(a)。樹状突起での mRNA の局在に関しては、非アイソトープ *in situ* ハイブリダイゼーション法によりさらに明確にした(図 b の矢印、コントロール c)。そして培養ニューロンの突起では数珠状(図 d の矢印、コントロール e)この所見により、発達過程における海馬神経細胞の樹状突起の形成に参与する可能性が強く示唆されたため以下の実験を行った。

**EFA6A mRNA is localized somatodendritically in the rat hippocampus**

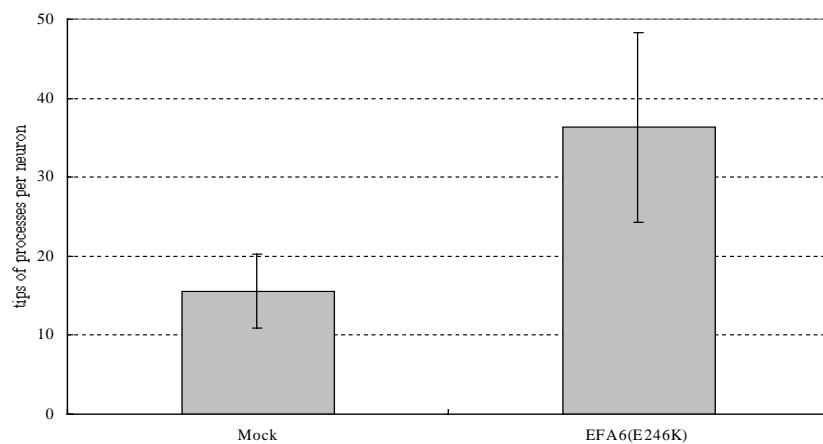
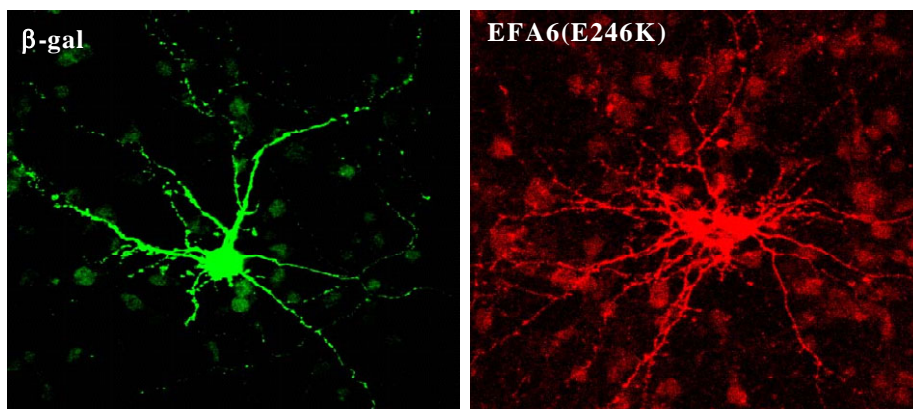


□ 野性型と恒常的非活性型の EFA6 を COS-7 細胞に過剰発現させ、その細胞の形態を細胞骨格の一つである actin の細胞内局在の変化を検討した結果、野性型 EFA6 を過剰発現させると細胞の形態が球形に変化するのに対して、恒常的非活性型の EFA6 を過剰発現させると微細突起群 ( filopodia ) が著しく伸展した。さらに、海馬初代培養細胞に GDP/GTP 交換能を不活性型にした変異 EFA6 遺伝子 (恒常的非活性型 E246K) を過剰発現した結果、control ( $\beta$ -gal) に比べて、樹状突起の数が著しく増加した。

八 EFA6 の c DNA の 3' -非翻訳領域の塩基配列解析を 400 塩基長まで進めた。しかし、CaMKII について既知の向樹状突起転送責任ドメインである CPE cis-acting element の存在は確認できなかった。

別の責任ドメインの存在が示唆される。

**Over-expression of an inactive mutant of EFA6A induces prominent dendritic formation in the primary hippocampal neurons**



( 5 ) 業績

- 1 Minami, H., Suzuki,R., Owada, Y.,Handa, K. & Kondo, H.(2001) Localization of mRNAs for novel and atypical as well as conventional protein kinase C (PKC) isoforms in the brain of developing and mature rats.J. Mol Neurosc.14:125-136
- 2 Suzuki,I., Owada,Y., Suzuki,R., Yoshimoto,T.& Kondo,H. (2001) Localization of mRNAs for six ARFs (ADP-ribosylation factors) in the brain of developing and adult rats and changes in the expression in the hypoglossal nucleus after its axotomy. Mol. Brain Res.88:124-134
- 3 Owada Y., Abdelkawi Abdelwahab S, Suzuki R., Iwasa H., Sakagami H., Spener F. & Kondo H. (2001) Localization of epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP) in the alveolar macrophages and some alveolar type II epithelial cells in mouse lung. Histochem. J. 33:453-457
- 4 Suzuki,I., Owada,Y., Suzuki,R., Yoshimoto,T. & Kondo,H. (2002) Localization of mRNAs for subfamily of guanine nucleotide-exchange proteins (GEPs) for ARFs (ADP-ribosylation factors) in the brain of developing and mature rats under normal and postaxotomy conditions. Mol. Brain Res. 98: 41-50
- 5 Owada,Y., Suzuki,R., Iwasa,H., Spener,F. & Kondo,H. (2002) Localization of epidermal-type fatty acid binding protein in the thymic epithelial cells of mice. Histochem Cell Biol. 117:55-60.
- 6 Owada,Y., Takano,T., Yamanaka,H., Kobayashi,H., Sugitani,Y.,Tomioka,Y., Suzuki, I., Suzuki,R., Terui,T., Mizugaki,M., Tagami,H., Noda,T.,& Kondo,H.(2002) Altered Water Barrier Function in Epidermal Fatty Acid Binding Protein (E-FABP) Deficient Mice. J. Invest. Dermatol 118:430-435
- 7 Akiba,Y., Saito,S., Kudo,M., Suzuki,R., Watanabe,M., Owada,Y. & Kondo,H.(2002) Localization of mRNAs for phosphoinositide kinases in the brain of developing and mature rats. Brain Res. Gene Expression Pattern. 1: 123-133
- 8 Kondo,H. (2002) Are there gap junctions between chief (glomus, type I) cells in the carotid body chemoreceptor? A review. Microsc. Res. Tech. 59: 227-233
- 9 Owada,Y. & Kondo,H. (2002) Analysis of the phenotypes of E-FABP-gene knockout mice. Mol. Cell. Biochem. 239: 83-86
- 10 Sakagami,H., Nishimura,H. & Kondo,H. (2002) Transient up-regulation of elongation factor-2 kinase (Ca/calmodulin-dependent protein kinase III) mRNA in developing mouse brain. Neurosci Lett. 330: 41-44
- 11 Owada, Y. & Kondo, H. (2003) Localization of fatty acid binding proteins (FABPs) in rodent brain. In Dutta-Roy, Spener (Eds): Mammalian Fatty Acid Binding Proteins:

Structure and Roles in Cell Homeostasis. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, pp. 253-265

12 Takano, N., Owada, Y., Suzuki, R., Sakagami, H., Shimosegawa, T., Owada, Y. & Kondo, H. (2003) Cloning and characterization of a novel variant of mouse M-rdgB $\beta$ 1, a mammalian homologue of *Drosophila retinal degeneration B gene* protein and its mRNA localization in mouse brain in comparison with other M-rdgBs. *J. Neurochem.* 84:829-839

13 Kondo H. (2003) Cytoplasmic Matrix in Embedment-free Electron Microscopy— Non-molecular biological histology (Review) *Anat Science Intl.* 78:17-24

14 Nishimura H., Sakagami H., Uezu A., Fukunaga K., Watanabe M. & Kondo H. (2003) Cloning, characterization and expression of two alternatively splicing isoforms of *ca/calmodulin-dependent protein kinase I $\gamma$*  in the rat brain. *J Neurochem* 85:1216-1227

### 3 フェーズ の取組み予定

EFA6 の樹状突起の形成に関与する分子機構をさらに解明するために、先ずその向樹状突起転送責任ドメイン探索を遂行する。次いで、酵母2ハイブリット法を用いて、結合蛋白質の同定を試みる。尚、予備的結果として、樹状突起に存在するある種のアクチン結合分子の単離に成功している。すなわち EFA6 は、樹状突起においてアクチン結合分子を介してアクチン細胞骨格の近傍に局在し機能する可能性が示唆された。これらの仮説に従い、さらに本分子の神経形態形成における機能解明を機能的電気刺激と合い携えて今後引き続き追及していく。