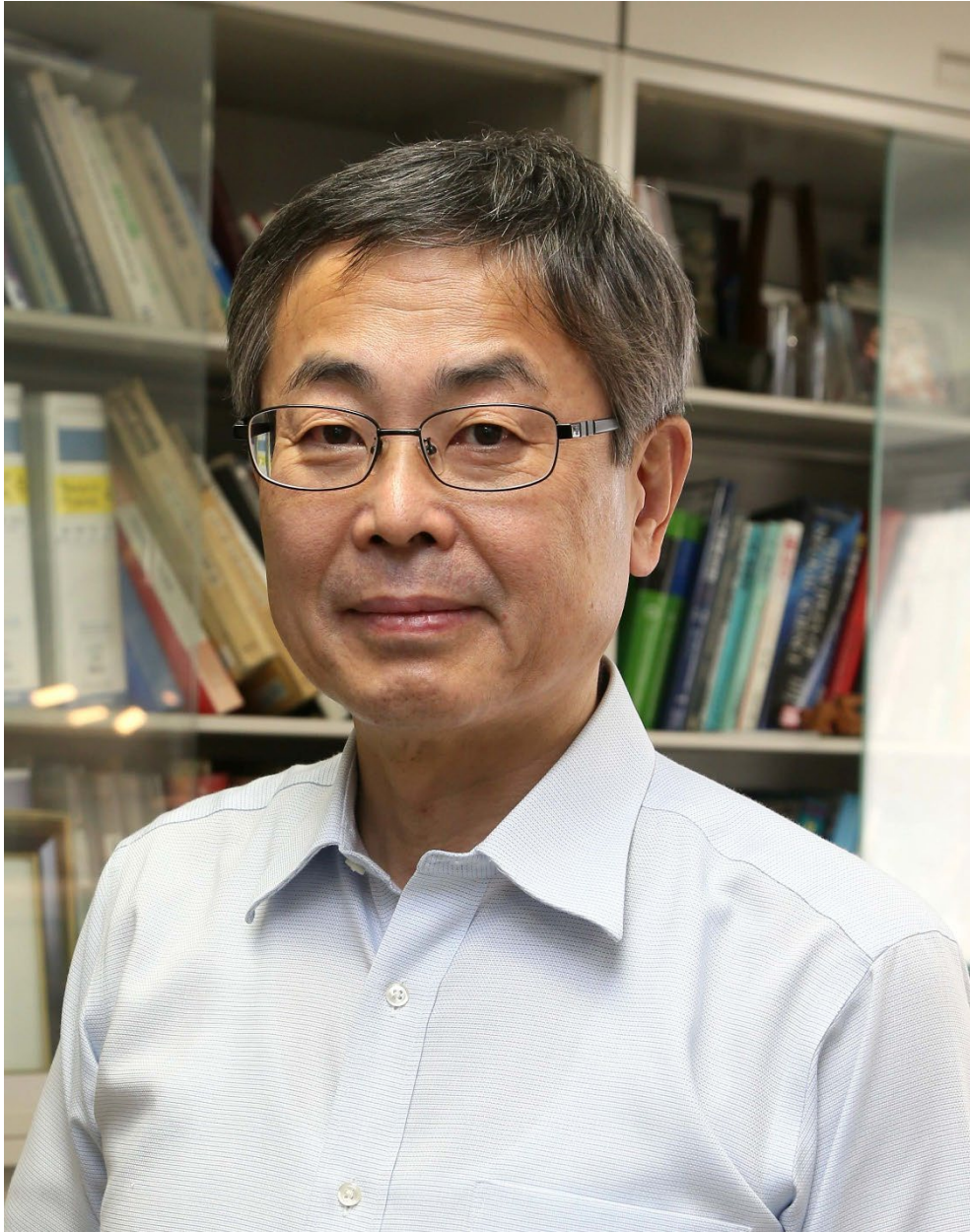


渡辺雅彦教授 退職記念誌

北海道大学 大学院医学研究院

解剖学分野 解剖発生学教室



目次

1. 略歴
2. 退職にあたって
3. 北大に赴任する 33 年前を振り返って
4. 最終講義
5. 分子解剖学と形態生物学の道を歩んで
6. 主な研究業績
7. 解剖発生学教室での活動のまとめ

1. 略歴

学歴

1978 年 3 月 山形県立山形東高等学校卒
1978 年 4 月 東北大学医学部入学
1984 年 3 月 東北大学医学部卒（医師免許取得）
1984 年 4 月 筑波大学大学院医学研究科博士課程入学
1988 年 3 月 筑波大学大学院医学研究科博士課程修了（博士（医学）取得）

職歴

1988 年 4 月 金沢大学医学部 助手（解剖学第 1 講座）
1990 年 1 月 東北大学医学部 助手（解剖学第 2 講座）
1992 年 2 月 北海道大学医学部 助教授（解剖学第 1 講座）
（1993 年 10 月～1994 年 7 月 文部省在外研究員として米国ノースカロライナ大学「相同組み換えによる実験モデル動物の作成と解析に関する研究」に従事）
1998 年 11 月 北海道大学医学部 教授（解剖発生学講座（旧解剖学第 2 講座））
2025 年 3 月 北海道大学大学院医学研究院 解剖発生学教室 定年退職
2025 年 4 月 北海道大学 名誉教授

主な役職（学内）

脳科学研究教育センター長（2016 年～2022 年）
医学部附属動物実験施設長（2017 年～2023 年）
北海道大学動物実験委員会委員長（2021 年～2023 年）

主な役職（学会等）

日本解剖学会
理事（2009 年～2017 年、2021 年～2023 年）
常務理事（2011 年～2017 年）
理事長（2021 年～2023 年）
日本神経科学学会
理事（2017 年～2023 年）
日本学術会議
会員（2020 年～2026 年）

受賞歴

1992 年 東北医学会奨励賞

「14-3-3 蛋白の遺伝子解析とその脳内発現」

1996 年 日本解剖学会奨励賞

「中枢神経系の発達と NMDA 型グルタミン酸受容体発現調節」

2006 年 北海道大学医学研究科優秀研究賞

「小脳シナプス回路網の競合的発達を制御する分子機構の解明」

2015 年 北海道大学総長研究賞（優秀賞）

2015 年 時実利彦記念賞（日本神経科学学会）

「神経活動依存的な 神経回路発達と回路機能発現に関する分子解剖学的研究」

2019 年 伊藤太郎学術賞（伊藤医薬学術交流財団）

「グルタミン酸伝達系による神経回路発達の分子細胞基盤」

2023 年 秋山財団賞（秋山記念生命科学振興財団）

「グルタミン酸情報伝達系によるシナプス回路発達の分子解剖学的基盤」

2024 年 日本顕微鏡学会学会賞（瀬藤賞）（公益社団法人日本顕微鏡学会）

「活動依存的シナプス回路発達の分子細胞基盤の解明」

2. 退職にあたって

1992年に北海道大学医学部の解剖学第1講座の助教授として赴任し、解剖学第2講座(その後、生体構造解析学分野、解剖発生学教室に改称)の第5代教授に就任したのが1998年である。それまでの人類学的研究から遺伝子や分子を基盤とした分子解剖学・形態生物学へと、研究の方向性は大きく変わった。以来27年間の経過し、世界の研究の潮流も日本の立ち位置も大きく変化し、今春定年退職を向かえた。教授となってから、私は以下のような記録を残してきた。これらの情報をつなぎ合わせると、解剖学やその教育研究者としての私や教室の歩みについて、大体調べがつくようになっている。

・フラテ(年刊の学内誌)

2000年発刊の「フラテ86:教室だより」では、医学部創立以来の人類学の教室から分子神経解剖学の教室へと変わることを宣言し、「さて、これから、このメンバーからなる生体構造解析学分野はどのようなハーモニーを奏でることになるのでしょうか……」で稿を終えている。

2009年発刊の「フラテ95:教室だより」では、担当教授となって10年目の節目として、また神経解剖学研究を歩み始めた1992年から定年を迎える2024年までの折返し地点として、それまでの往路としての「自分史」を振り返った。そして、「これからの復路で向かうところが不毛の砂漠となるのか、厳寒の極地となるのか、豊穡な大地となるのかはわからない。しかし、往路の始まりの時と大きく異なるのは、今は一人ではないことである。研究室の内部にはこれから伸びゆく技量を持った若い仲間が育っており、また外部の優れた研究者たちとも強い絆で結ばれている。」で締めている。

2025年発刊の「フラテ111:教室だより」では、「私の学修簿」としてこれまでの解剖発生学教室の活動実績をまとめた。さらに、「退職によせて」では、北大赴任の経緯についてまとめた。

・北大医学部100周年記念誌(2021年発刊)

旧解剖学第2講座から現在の解剖発生学教室に至るまでの歴史と経緯についてまとめた。

・コラム「分子解剖学と形態生物学の道を歩んで」

これまで行ってきた解剖学研究の2つの柱をニットーボーメディカル株式会社のホームページ(<https://nittobo-nmd.co.jp/column/>)に掲載している。これをもとにした内容をこの退職記念誌に掲載した。

・解剖学雑誌

「私はなぜ解剖学を選んだか」シリーズの執筆者として、医学部学生時代に解剖学に興味をもち、進路として選択した経緯をまとめた(2022年発行、第97巻65-66頁)。さらに、第100巻発刊記念特集号「日本の解剖学の過去・現在・未来」において、「1980s:分子生

物学の荒波が押し寄せた時代の解剖学」として、この年代に起きた解剖学を含む生命科学研究の地殻変動について記した（2025 年発行、第 100 巻 13 頁）。

・北海道医学雑誌、北海道大学医学部同窓会新聞、北海道大学医学部広報

退職教授の寄稿として、北海道医学雑誌第 100 巻第 1 号に「退任教授寄稿：北大での 33 年間の振り返って」、同窓会新聞に「退職にあたって」、医学部広報に「退任教授挨拶」をまとめた。

今後、これらの情報に主な研究業績を載せた「退職記念誌」を PDF 版としてまとめ、解剖発生学教室のホームページ <https://aande.hokkaido.university/> に掲載する予定である。冊子体ではなく PDF 版としてまとめる形式は、私の恩師である故井上芳郎先生のやり方を踏襲したものである。井上先生の退職記念誌を記録した DVD も預かっているので、並べてアップロードしたいと考えている。井上先生は第 1 解剖の第 5 代教授であり私は第 2 解剖の第 5 代教授であるため人事的な繋がりはないが、北大における神経解剖学研究の流れとしてしっかりと繋がっている。

東北大学医学部学生のとときに解剖学に進むことを考え始めた時から今日まで、導いていただいたメンターや、研究をともに行った研究室内外の仲間、解剖学実習をきっかけとして教室での芋煮に参加してくれた北大の医学部生たちに、心から感謝している。また、放っておくと研究室に行きたがる夫や父親を今日まで支えてくれた家族にも、心から感謝する次第である。

2025 年 3 月吉日 渡辺 雅彦

3. 北大に赴任する 33 年前を振り返って

フラテ 111 号の「退職によせて」に寄稿する機会をいただいたので、これまで文章化することがなかった 33 年前の北大赴任の経緯についてまとめることにした。

料亭「八百条」

1991 年 10 月の夕方、前日の電話で教えられた読めない店の名前と住所を頼りに、三条町にある東北大の公務員住宅から自転車で向かった。着いてみると、そこは、宮城県庁、仙台市役所、青葉区役所に囲まれた一等地に構える、薄黄色の城郭のような塀に囲まれ、竹林をはさんで同じ色の建物が立つ料亭であった。遊郭のような作りであるため、塀の外はすぐ車道になっていて、自転車を止める場所が見つからなかった。仕方なく、オンボロ自転車と一緒に店名が書かれた灯籠がついた門をくぐり、結局、黒塗りの車が乗り付ける重厚な玄関に収容してもらうことになった。

後日、ここが明治 43 年 (1910 年) 創業の仙台市青葉区二日町にある老舗の料亭「八百条 (やおくめ)」であり、2004 年に閉店したことを知った。

井上芳郎先生との出会い

廊下を通して 20 畳ほどの広い座敷に案内されると、そこに北海道大学医学部解剖学第 1 講座の井上芳郎教授が待っていた。井上先生とは 1 週間前と前日の電話で話ただけで、実はこれが初対面であった。最初の一杯目はお酒をつぎ合い、あとはそれぞれ手酌でという井上スタイルで酒宴が始まった。美しい皿や碗で差し出される美味しい料理を頂きながら、3 時間ほどいろいろな話をした。

井上先生が一番興味を示したのが、これからの研究のことを話した時であった。この時期、グルタミン酸受容体のクローニングを進めている新潟大学脳研究所の三品先生らの研究グループと個人的に (内緒で) 共同研究をしていたことから、「これからグルタミン酸受容体の遺伝子発現解析と抗体を作ってシナプスにおける分子局在解析を始めたい」という計画を話した。すると、神経解剖学に深い理解と見識を持つ井上先生は、「グルタミン酸は王道だから、分子もエレキ (電気生理のこと) も解剖も一緒になって面白おかしくやればいい。それを始めるにはどの位の研究費を用意すればいい?」。「ざっと計算して、500 万円程あれば」。「わかった。グルタミン酸の研究をやる限り、研究費は後からどんどんついてくるから」。

私は、空になるお銚子の数をカウントしていた。料亭で出される 1 合徳利は、実際には 0.7 合程度とはいえ、二人で合わせて 27 本飲んだ。3 時間かけて一人当たり 1 升の日本酒を飲んだことになる。東北大の学生時代から、私はクラスでも一位二位と言われる程のお酒に強い (飲まれない) タイプである。これは父親譲りの遺伝的特性である。中学校の教員であった父親は、自宅に教員仲間を招いてしばしば酒宴を開いた。次々と酔っ払ってだらしない客人の中で、父親だけはいつも凛としていた。井上先生のような、自分と同じくらい酒に強い人とサシで酒を飲んだのは、この時が初めてだったように思う。

最後に、「渡辺君は北大に来ますか?」、「よろしくお願いします」。一週間前に解剖をやめることを決意したばかりの研究人生が、この瞬間、場所を北海道に移して続くことが決まった。3人目の子どもの出産予定日の1ヶ月先(1992年2月)を赴任時期として人事異動の手続きを進めることも打ち合わせて、その日の酒宴を終えた。

想定外の困難を伴った北大赴任

1992年2月1日田邊達三医学部長から辞令を受取り、再び仙台に戻って引っ越しの手筈を整えた。2月9日、5人になった家族とカローラをフェリーに載せて、仙台港から苫小牧港に向かった。出港時は順調だったが、次第に西高東低の冬型の気圧配置が強まり、海が時化て船酔いが激しくなり、体を起こせない状況になった。2ヶ月目に入ったばかりの長男にミルクを与えるのも、吐き気との戦いになった。苫小牧港に近づくに連れ、暴風雪で路面は凍結し全道の高速道路が閉鎖になった、と館内放送が流れた。カーナビなど無い時代、頼りとなるのは車に積んでいる紙製のロードマップだけである。しかし吹雪で道路標識も見えない可能性があり、路肩を踏み外す危険性もある。着港前に船内に係留した車に戻るため通路に並んでいる間、不安が頂点に達した。すぐ前に並んでいた男性に事情を説明したら、自分も札幌に行くから、船から降りたら埠頭で待っているから、トラックの後についておいでと助けてくれた。ホワイトアウトでトラックの後ろ姿を見失いかけながらも、なんとか国道36号線を北上して無事札幌市内に入り、感謝の気持ちを込めてトラックの運転手と別れた。

災難は、さらに続いた。2月10日はちょうど雪まつりの最中で、市内の大通りの至る所に通行制限がかかっていた。予約している札幌駅前のホテルになかなかどり着けず、何度もトライアンドエラーを繰り返した。午後3時ようやくホテルに着くことができ、昨晩からの飲まず食わずの状態から解放された。厳冬の2月を赴任時期に設定したことによる困難な経験として、家族の記憶に深く刻み込まれた。

赴任後は、人に恵まれ、環境に恵まれ、時代にも恵まれた。お陰で、解剖学の研究教育を思いっきり展開でき、家族も健やかに成長し、順風満帆に日々を送れたことは、冒頭で紹介した記録が物語る。2025年3月の退職を迎えるにあたり、四季折々の北大キャンパスの風景を楽しんで過ごせたこと、充実した職業人生と家庭生活を送れたことに、心から感謝したい。

4. 最終講義：北大での 33 年間で振り返って

人生のクレバス

私には、内山安男先生（1981～1988 年の学生時代）、近藤尚武先生（1988～1992 年の助手時代）、井上芳郎先生（1992～1998 年の助教授時代）という 3 人の解剖学の師匠がいる。この過程で、私は人生のクレバスに二度落ちた。

東北大学医学部において、最も興味を持って取り組んだ科目が 3 年次の解剖学実習で、その指導教員が内山安男先生である。解剖学実習が終了すると、それ以後の基礎医学科目の実習は答えがわかっていることをただママゴトしているようなつまらなさを感じ、臨床系コースに入ると医学への興味を失った。すると、社会の矛盾や人生の意味などが気になり始め、ハンセン氏病や障害者が抱える問題や、差別問題が生まれる社会構造など、真剣に考えるようになった。辿り着いた答えが、現代の言葉で言う「無意識のバイアス」であった。医学部に現役で入るような学生には、自他ともに正のバイアスが無意識に働いていて、根拠など考えもせずに自身が世の中の役に立つと思い、前向きに生きることができる、反対に、ある社会的少数者に負のバイアスが構築されると、人として普通に生きることすら困難になり、その悲鳴は無視される。医学部に在籍していることに嫌悪を感じる一方、医学部をやめて生きていく自信も勇気もない、深いクレバスを落ちていくような心理状態に陥ってしまった。その時、引き上げてくれたのが内山先生で、解剖学教室に机をもらい毎日通うようになった。そこでは、カエルや鶏の卵の発生過程を観察し、組織切片を作って染色したりするうちに、手を動かして結果を見ることが好きなんだという自覚が生まれた。まもなく、内山先生が筑波大学の助教授に栄転すると、筑波大学で研究生生活を送り、試験が近づくと東北大学に戻るという生活サイクルになった。その間、解剖学会に連れて行ってもらい、当時先端を走っていた新潟大学医学部第 3 解剖の若手との交流を通じ、解剖学の大学院に迷うことなく進学した。

大学院を修了し、金沢大学の助手になると、時代は分子生物学の頂点を迎えていた。近藤先生の強い希望もあり、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法の開発に挑戦し、偶然も重なって成功した。その勢いに乗って、分子生物学の基本技術を習得しなければと思い立ち、1989 年夏の 2 ヶ月間、新潟大学脳研究所の神経薬理学教室に内地留学した。クローニング技術から塩基配列決定法までの基本を習得し、新規遺伝子の ISH 解析プローブ作成と解析において自立できるようになった。また、もうすぐ PCR 法という革命的な研究装置が登場し、これにより ISH 解析プローブも抗体作成のための抗原タンパク質も自在に作れるようになることを知った。この 2 ヶ月間で得た最大の収穫は、その後生涯の友人であり相談相手となる崎村建司先生との出会いである。まもなく、グルタミン酸受容体のクローニングと機能解析を掲げる三品昌美先生が神経薬理学教室の担当教授として赴任し、その発現解析を行う共同研究者として、崎村先生は私を推薦してくれた。この 2 ヶ月間の研修を通して、「グルタミン酸シグナル伝達系の遺伝子発現とシナプス局在解析」という研究テーマとその立ち上げのための技術的見通しがついた。

しかし、ここに至って、人生二度目のクレバスに落ちてしまい、「解剖やめます」の決意を固めてしまった。何故かその夜、北大医学部第3解剖の助教授をやっていた牛木辰男先生から電話が来た。北大医学部第1解剖の井上芳郎教授が講師を探しているので北大に来ないか、という誘いの電話であった。あまりにタイミングが良すぎて、一週間頭を冷やしてから返事をすることにした。1週間後、再び牛木先生から電話があり、北大に行きますと返答した。すると、井上先生が電話口に出て、明日仙台に行くから話は「やおくめ」でしようということになった。33年前の「八百条」での井上先生との出会いと北大赴任までの経緯は、前章で詳しく述べたのでここでは割愛する。どうして解剖やめます宣言の日に北大からの誘いが来たのか、ずっと疑問であった。20年もたってから、内山先生に聞くと、「お前が辞めると俺に電話をくれたから、急いで受け入れ先を探したんだ」ということがわかった。その日は頭が混乱していて、内山先生に電話で相談したことが記憶に残らなかったようである。

地の利、人の輪、時の運

孟子の言葉に「地の利、人の和、時の運」があり、戦に勝利し、よい治世を行うための3つの要件を指している。まさに、北大赴任とともにこの三要件が揃った。

私にとっての地の利とは、広大な北海道の地で、広い見識と人間味豊かな井上先生が主宰する教室において、自主的に研究する環境に置かれたことである。つまり、31歳の時から、現在の言葉でいうPI (principal investigator) として、研究計画の立案と遂行、研究費の獲得と使用、共同研究などの対外交渉を全て自分の判断で行うようになった。

人の和とは、まず、診療科が続々と派遣してくれた臨床系の大学院生である。精神科から中川伸君、泌尿器から柴田隆君、耳鼻科から栗原秀雄君、小児歯科から和田志麻さん、神経内科から山田恵子さんが来て、あっという間にグルタミン酸伝達系の発現解析や遺伝子ノックアウトマウスの表現型解析を立ち上げる研究グループが形成された。続いて、水産学修士学生の深谷昌弘君、理学部修士学生の宮崎太輔君、医学部学生の山崎美和子さんが研究室に出入りするようになり、第2解剖の教授就任後のスタッフになった。その後、今野幸太郎君と内ヶ島基政君もスタッフとなった。なお、この5人が私の27年間の教授生活で採用した全教員である。さらに、これまた個性豊かな技術職員、事務職員、大学院生、学部学生が教室員となり、「癖はあるけど、悪い人はいない」居心地の良い教室環境ができあがった。教室間の連携においても、分子生物学（三品先生と崎村先生）と神経生理学（狩野方伸先生）との間の研究のトライアングルが回り始め、それが核になって様々な共同研究の依頼が外から入るようになり、研究領域の裾野も広がった。

天の時については、分子生物学の隆盛の波及として、神経解剖学が解決すべき研究課題や研究材料が続々と到来する時代に遭遇したことである。さらに、三品先生が班長を務める重点領域研究「中枢シナプスの分子生物学」の計画班員にも加えてもらい、スタートアップの研究資金にも恵まれた。

芋煮を囲んでの医学生との楽しい思い出

研究活動に加え、解剖学実習を終えた学生さんとの芋煮を囲んでの宴会が私にとってのもう一つの楽しみであった。芋煮とは山形県民のソウルフードで、里芋、こんにゃく、豆腐、牛肉、ネギを材料とし、醤油味のシンプルで飽きのこない大鍋料理である。10 数人が3 杯お替りできる分量が数千円で作れ、飲み物やその他の料理を持ち寄れば、一人当たり千円程度で飲み食いできる学生向きのエコな宴会である。卒業までに10 回もやる学年もあり、卒業後数年経って同窓会的に開催することもあった。その思い出は、多くの写真やデジタル画像として保存している。私にとって、この楽しく愉快的な宴会には、「将来大先生になっていく人たちの若い頃と付き合っているのだ」という喜びがあった。また、卒業して大学を離れた後に、北大医学部の同窓であることを思い出す一つの共有体験になってほしい、という願いでもあった。

これからの第2の人生

2025 年3 月の退職を以って、教育と研究を柱とした第1 の人生は気持ちよく終了する。その上で、退職後に始まる第2 の人生では、次の3 つの活動を中心に、健康寿命が続く限り札幌の地で行って行く予定である。まず、北海道大学白菊会の会長として、北大の解剖学教育やサージカルトレーニングが適正に滞りなく行えるよう、北大での教育活動を側面から支援したい。2 つ目は、北海道大学の知的財産として販売してきた抗体供給を新たな枠組みで継続し、研究面でも引き続き関わっていきたいと考えている。3 つ目は、家庭菜園での野菜栽培を通じて、地域社会や知人・友人との繋がりも継続していきたい。

これまで皆様からいただいていたご厚意とご協力に心より感謝して、最終講義としたい。

5. 分子解剖学と形態生物学の道を歩んで

1992 年、グルタミン酸情報伝達系の分子解剖学と形態生物学の研究をスタートする意気込みを胸に秘めて、31 才で北海道大学医学部解剖学第 1 講座の助教授として赴任してきた。それが、自身の足で立つ研究の開始点となった。退職記念誌の作成にあたり、まず初回のコラムにこの 2 つの研究方向性を持つに至った道のりをまとめ、その後の分子解剖学との格闘の顛末を 2～5 回目のコラムとして、形態生物学の成果を 6～10 回目のコラムとしてまとめることにした。

1) 分子解剖学と形態生物学に至る道のり

筑波大学（大学院生）

私は、1984 年に筑波大学大学院博士課程に入学し、内山安男助教授（その後、岩手医科大学、大阪大学、順天堂大学教授）をボスとする解剖学系ラボで 4 年間の大学院生活を送った。東北大学医学部後半の 3 年間も筑波大学のラボに泊まり込んで研究をしていたので、実質 7 年間筑波大学にいたことになる。学部時代と大学院の前半は、専ら膵臓などの分泌組織の細胞小器官の日内変動を、電子顕微鏡写真の定量的形態計測法により解析していた。この時期は、ちょうど分子生物学が隆盛に向かって爆走し始める時期で、cDNA クローニングによる塩基配列とそれを用いた機能解析を示す論文がトップジャーナルに躍り出るようになっていった。当時の分子生物学は、日本はアメリカに次ぐ勢いがあり、特に神経情報伝達に関わる分野では、京都大学の沼正作先生、中西重忠先生、三品昌美先生らが綺羅星のように輝き、世界をリードしていた。その勢いは組織や細胞を扱ってきた解剖学、生理学、薬理学などの旧来からの学問体系にもパラダイムシフトを及ぼし、cDNA やプラスミドベクターを起点とする「遺伝子→分子→細胞」へのボトムアップ研究へ、生命科学の地殻変動を引き起こしていた。

そのような時代的潮流の中で、後半の大学院の研究テーマも大きく様変わりし、*in situ* ハイブリダイゼーション、光顕および電顕レベルでの免疫組織化学、タンパク質の単離精製と抗体作成など技術習得に邁進した。最終的に膵臓外分泌細胞の日内変動データとライソゾーム酵素の免疫組織化学データで博士（医学）の学位は修得できたものの、半減期が 12 年と長く放射活性の低い ^3H -dATP を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションではシグナルが出たのか出なかったのかも分からぬまま未達となり、タンパク質の精製と抗体作成も結果を見る前に、大学院生活は時間切れ終了となった。しかし、未練となって積み残した大学院時代の 2 つの研究課題は、いくつかの幸運との出会いにより、その後の研究の柱になっていったことは、実に不思議なものである。

金沢大学・東北大学（助手）

大学院を修了し、1988 年二人目のボスとなる金沢大学の近藤尚武教授（2 年後に東

北大学に異動)の下で解剖学教室の助手になった。そこで、発達期の小脳における神経特異的エノラーゼを組織化学研究する機会があり、プルキンエ細胞の樹状突起の見事な発育ぶりに感動し、現在に続くシナプス回路発達研究のきっかけとなった。1つ目の幸運は、近藤教授も *in situ* ハイブリダイゼーションの技術基盤確立を強く望み、そこに山形大学医学部を卒業したばかりのラガーマン後藤薫君(現在、山形大学教授)が大学院生として加わったことである。後藤君と二人で、当時は、ニクトランスレーションによる ^{35}S -dATP を用いた放射性標識 cDNA プローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション実験に取り組んだ。半減期が 87 日と短い ^{35}S を用いることで、プローブ作成から乳剤オートラジオグラフィー法を用いた露光・現像による結果判定まで 1~2 ヶ月と短縮したものの、半年過ぎても一向に特異的シグナルは得られなかった。そんな中、組織中の RNA 分解酵素が陰性結果の原因ではないかと考えた後藤君は、RNA 分解酵素阻害剤をリストアップし、1つずつその効果を確認していった。その阻害剤の1つに 2-メルカプトエタノールが含まれており、それをハイブリダイゼーション液に加えた実験において、CNPase の見事な発現シグナルが、オリゴデンドロサイトが分布する白質上に現れた。その他の阻害剤にはこのような効果は全く無いことから、その効果は RNA 分解酵素阻害によるものではなく、2-メルカプトエタノールの還元力による ^{35}S 標識プローブ同士の S-S 結合防止によるものであった。

新潟大学脳研究所(国内留学)

これにより *in situ* ハイブリダイゼーションの基本技術が確立すると、クローニング、シーケンシング、プラスミド作成などの分子生物学の基本的研究技術の修得とそれによる自由自在なプローブ作成が、次の目標になった。そこで、助手2年目の1989年7月から8月の2ヶ月間、新潟大学脳研究所の神経薬理学部門にて訪問研修することになった。要するに、幼子二人と奥さんを金沢に残し、助手2年目の夏のボーナスを全部もらって新潟市内に4畳半を間借りし、布団と扇風機と少しの着替えだけをカローラに積んで押しかけたのである。今から振り返っても、それを許してくれた家族に、また惜しみなくアドバイスとサポートをいただいた神経薬理のスタッフ、技術職員、大学院生の皆さんに御礼を述べたい。2つ目の幸運は、この2ヶ月間の滞在がその後の研究方向性を決定づける、連鎖反応を引き起こしたことである。

神経薬理で最もお世話になり親身に指導してくれたのが、当時助手であった崎村建司先生(神経特異エノラーゼ抗体も崎村先生が作成したもの)で、この出会いを通して生涯の研究仲間になった。その時、崎村先生から、間もなく PCR という遺伝子増幅法が世界中に広まり、プライマーという短い DNA を合成するだけで、欲しい遺伝子が誰でも手に入れることができるようになるという話を聞いた。これを聞いて、体に稲妻のような衝撃が走った。当時、組織化学に用いる一次抗体は主にそのタンパク質の単離精製を行った生化学者が作成し、その抗体を入手し研究に活用できるか否かは、生化学者との関係性にかかっていた。生化学者からしても、同じ研究目的で複数の研究者に同時供

与できないという倫理的縛りもあるため、自然とそうなるのである。そのため、一度抗体供与を受けたら重箱の隅を突つくまでその分子の発現局在解析をし続けるというのが当時の組織化学研究の仁義であった。しかし、PCR があれば抗原となるアミノ酸配列をコードする cDNA を自ら増幅でき、それをウサギなどの動物に免疫し、その抗血清から免疫グロブリンを抗原アフィニティー精製すれば、自由に抗体が作れるようになるのである。この夏を経て、分子解剖学的研究の方法論が実体化した。それは、クローニングや PCR 法により解析プローブを作成して転写物の発現情報を *in situ* ハイブリダイゼーションにより明らかにするとともに、その翻訳物の分子局在について、PCR を活用した抗体作成と免疫組織化学を駆使して明らかにするという研究戦略である。

新潟大学から金沢大学に戻って間もなく、神経薬理の担当教授として京都大学から三品先生が赴任してきた(図1)。それまで沼研の助教授としてニコチン性アセチルコリン受容体の分子生物学で名を轟かせていた三品先生は、脳研究所に着任するなりグルタミン酸受容体のクローニングを目標に定めた。三品研の崎村先生や大学院生が次々とクローニングした cDNA に「イロハの○番」という暗号が付され、その暗号遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション解析を担当することとなり、グルタミン酸シナプス伝達研究に足を踏み入れることになった。さらに、三品研では、グルタミン酸受容体の遺伝子ノックアウトマウス作成にも一早く乗り出し、その解剖学的な表現型解析においても協力することになった。

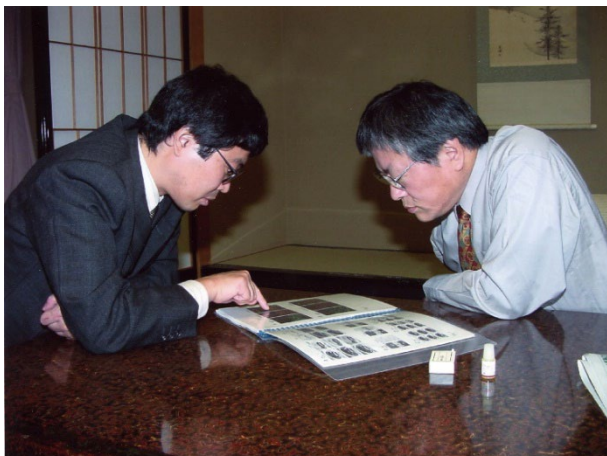
図1 Cold Spring Harbor Laboratory にて (2004 年 4 月)。

三品昌美先生(右)と筆者(左)。



ここに至って、研究戦略のもう一つの柱となるグルタミン酸情報伝達系の形態生物学的研究も立ち上がることになった。この形態生物学というのは、私が作った造語である。そのキッカケは、ノーベル賞学者の利根川進先生との会話であった(図2)。共同研究が縁となって金沢大学に利根川先生をお招きした際に、利根川先生は「分子生物学のツールを使う研究者は数多いが、バイオロジーをやる分子生物学者は少ない」と述べた。それまでどこか分子生物学に引け目を感じる所もあったのだが、利根川先生のこの言葉、そして昼夜を問わず研究に爆進する新潟大学脳研究所の分子生物学者の姿を見てきたことで、「そうだ、自分は形態学でバイオロジー(形態生物学)をやればいいんだ!」と、心の底から吹っ切れた。

図2 金沢の料亭にて（2000年頃）。
利根川進先生（右）と筆者（左）。



北海道大学（助教授、教授）

1992年、北海道大学医学部解剖学第1講座（井上芳郎教授は三人目のボス）の助教授として赴任すると同時に、グルタミン酸情報伝達系の分子解剖学と形態生物学の研究をスタートした。当初の予想では、分子解剖学研究は地味だが着実に積重ねることができ、一方形態生物学研究は形態学的表現型が出るか出ないかのギャンブル的研究になるだろうと予想した。ところが、結果は逆で、グルタミン酸情報伝達の形態生物学研究こそ興味深い形態学的表現型が次々を見つかり、順調に論文化できた。一方、グルタミン酸情報伝達の分子解剖学をスタートしてから、最初の7年間は鳴かず飛ばずの状況に陥ってしまった。

2) シナプス分子検出における問題点

1992年、北海道大学医学部解剖学教室の助教授として赴任するや、すぐに取りかかったのが、アイソトープ標識プローブによるイオンチャネル型グルタミン酸受容体の *in situ* ハイブリダイゼーションの立ち上げと、大腸菌による融合タンパク質の発現によるグルタミン酸受容体抗体作成とそれを用いた免疫組織化学である。まず、前半でこの2つの組織化学法の解析技術について解説し、後半でグルタミン酸シグナル伝達系という自身の研究テーマの推進とそこで出会った問題点について触れることにする。

in situ ハイブリダイゼーション

前回、 ^{35}S -dATP 標識の cDNA プローブに 2-メルカプトエタノールの添加を契機として、*in situ* ハイブリダイゼーションの基本技術が一気に確立したことを話した。その後、この解析技術はどんどん進化していった。

まず、使用できる放射性核種は半減期のより短いもの ($^3\text{H} \rightarrow ^{35}\text{S} \rightarrow ^{33}\text{P}$) が使用できるようになり、検出にかかる時間が短縮した。当初、ニックトランスレーションによる二本鎖 DNA プローブだったものが、相補的な合成オリゴヌクレオチドや cRNA 転写物による一本鎖プローブへと移行した。これにより、二本鎖 DNA 間のハイブリッド形成によるプローブの有

効濃度の低下が解消されて検出感度が増大し、安定的にシグナルを検出できるようになった。従来の感光乳剤をスライドガラスに塗布するマイクロオートラジオグラフィーに加え、X線フィルムにスライドガラスを密着してシグナルを検出するマクロオートラジオグラフィーも普及し、発現解析のスピードアップとともに時間的・空間的な発現変化を捉えやすくなった(Watanabe et al., 1992)。また、digoxigenin, fluorescein, biotinなどの非放射性標識cRNAプローブによる検出技術の改善により、今では放射性プローブを凌駕する特異性と感度を備えた発色性および蛍光性の検出技術へと進化した。特に、蛍光検出法により、細胞マーカーと目的遺伝子の多重標識が可能になり、発現細胞の特定や関連遺伝子の共発現情報も容易に得られるようになり、組織化学法としての有用性を倍加した(Yamasaki et al., 2010, 2011; Konno et al., 2014)。さらに、RNAscope™という増感系の新しい *in situ* ハイブリダイゼーションが開発され、驚くほど高感度でノイズの低い検出も実現している。

現在の生命科学研究は、シングルセル RNA 解析や Visium 空間トランスクリプトーム解析などによるオミックス研究が全盛期を向かえ、情報科学の研究分野へと発展している。最終的に細胞レベルでの発現を最終的に確定できる *in situ* ハイブリダイゼーションの有用性は、情報科学の進展に従ってより一層増大している。

免疫組織化学

特異的な一次抗体と標識二次抗体を用いた免疫組織化学は、タンパク質分子の発現と局在を確定する重要な組織化学であり、抗原を有する細胞の形態を観察する方法として最も汎用性に富む研究手法である(脳科学辞典 2014)。標識物質(レポーター分子)が蛍光物質であれば多重検出が可能な蛍光抗体法となり、酵素であれば酵素抗体法としてシグナルを増幅して検出できる。標識物質が重金属であれば電子顕微鏡で観察できる免疫電顕法となる。免疫電顕法には、樹脂包埋前に免疫反応を行う包埋前免疫電顕法と、樹脂切片に対して免疫反応を行う包埋後免疫電顕法があり、それぞれ相補うような長所と短所がある。

免疫組織化学は平気で嘘をつく

in situ ハイブリダイゼーションと免疫組織化学を比較すると、検出シグナルの特異性と信頼性は圧倒的に前者に軍配があがる。核酸の塩基配列の相補性を基盤とする *in situ* ハイブリダイゼーションのシグナル特異性は、反応液や洗浄液の塩濃度と温度という2つの物理化学的パラメーターによりコントロールできる。きちんと確立した1つのプロトコルを習熟することで、数多くの遺伝子の特異的シグナルを確実に得ることができる。もし、塩基配列の相同性の高いホモログが存在したとしても、ゲノムの全容解明が進んだ現在では、プローブ配列への留意と選択さえ怠らなければ特異的検出は可能である。極論すれば、*in situ* ハイブリダイゼーションができない唯一のことは、遺伝子発現レベルがその方法の検出限界以下の場合だけである。

これに対して、抗原抗体反応を原理とする免疫組織化学の特異性は、使用する一次抗体の良し悪しや研究者自身に依存する要素が高く、しばしば異なる結果と結論が出てくる。免疫

組織化学による研究成果は、ある意味で研究者としての生き方や姿勢を反映していると、私は思っている。要するに、免疫組織化学は平気で嘘をつくのである。それは、抗体が相互作用する抗原の数アミノ酸残基（抗原決定基）との間の静電力、ファンデルワールス力、水素結合等の総和による親和性や結合力は、固定剤や変性剤の使用や選択、抗体濃度、塩濃度、pHなどの諸条件で変化する。その典型例が、イムノブロットで使える抗体が免疫組織化学に使えないことだが、その逆のケースもある。この2つの解析法ではタンパク質の固定や変性に使用する試薬が異なり、共有結合する位置も異なり、それゆえ抗原決定基の立体構造に与える影響も異なり、抗体と抗原の間の親和性や結合力が変動するのは当然である。その結果、ホモログでもない全く予想外の分子とも相互作用することがあり、いわゆる非特異反応が生じる。そのような非特異反応が生じる免疫組織化学とどう向き合うのか、特異性と非特異性の境界を見分けようとするのか、しないのか、これが研究者としての生き方や姿勢を反映するという意味である。

グルタミン酸受容体の組織化学研究の立ち上げ

1992年の北大赴任が31才の時、「免疫組織化学が容易に嘘をつく」とか、「免疫組織化学は研究者としての生き方や姿勢を反映する」という認識は、未だ醸成されていなかった。前回触れた新潟大学脳研究所への国内留学をキッカケとしてグルタミン酸シナプス伝達研究に足を踏み入れ、北大に来てイケイケドンドンの気持ちで研究を立ち上げたのである。

その年は、NMDA型グルタミン酸受容体の機能的多様性を作り出す4種のGluN2サブユニット遺伝子が三品研から発表された記念すべき年である。それに追いつくべく、片方の腕でNMDA受容体サブユニットの*in situ*ハイブリダイゼーション解析を行い、毎月数百枚のスライドガラスのオートラジオグラフィー(p.20-21、メモ参照)を仕込んで論文にしていた。もう一方の腕は、それまでやったことのない大腸菌を用いた融合タンパク質発現の条件検討を行い、さまざまな発現系の中から、グルタチオンS転移酵素を融合タンパクとしその切断にトロンビンを用いるpGEX4Tプラスミド実験系を選んだ。その理由は、発現させた時に可溶性タンパク質になりやすいこと、グルタチオンセファロースカラムで免疫用抗原と抗体アフィニティー精製のタンパク質の両方を1回の実験で簡便に精製できること、トロンビンを安価で購入できること、が主な理由であった。以来30年以上に渡りこの融合タンパクを用いて抗体作成を続け、ニッポーボーメディカルの研究用抗体として販売している抗体のほとんどが、この方法で作成したものである。具体的な作成法については、このシリーズの最後の方で説明する予定である。

ところが、NMDA型グルタミン酸受容体の主要なサブユニットの免疫組織化学論文を出せたのは1998年である(Watanabe et al., 1998)。それまでの7年間、予想もしていなかった困難にぶつかり、悪戦苦闘していたのである。

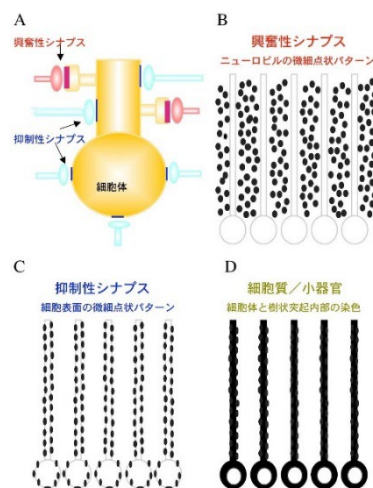
シナプス分子検出の問題点

抗体作成を開始した頃は、その特異性検定は、マウス脳タンパク質サンプルを用いたイム

ノブロットでのバンド検出と、免疫組織化学による染色パターンに頼るしかなかった。最初の5年間で、主要な3種のサブユニット(GluN1, GluN2A, GluN2B)のバンドを検出できる5～6種類の抗体ができてきた。私は、3種類の免疫染色パターンを予想していた(図3)。

図3 想定される免疫染色パターン

A, 興奮性シナプスと抑制性シナプスの形成部位。B, 興奮性シナプス分子のニューロピルの点状反応。C, 抑制性シナプス分子の細胞体・樹状突起の表面を縁取る反応。D, 可溶性タンパク質や細胞小器官分子の細胞質反応。



1つ目はイオンチャネル型グルタミン酸受容体などの興奮性シナプス分子の染色パターンのニューロピルの点状反応型、2つ目は GABA_A 受容体などの抑制性シナプス分子の細胞体・樹状突起の表面縁取り型、3つ目が可溶性タンパク質の細胞質型である。情報処理を高度に行う大脳皮質や小

脳皮質のニューロンは、興奮性入力を樹状突起上のスパインで受け取って情報処理の個別化を図り、抑制性ニューロンは細胞体や樹状突起幹の表面で受け取る。しかし、4%パラホルムアルデヒド(PFA)固定脳組織を用いて免疫組織化学を実施した結果、作成したすべての抗体は予想したニューロピル型の免疫染色パターンにはならなかったのである。

一方で、米国の Wenthold 研を皮切りに、欧米の研究室から NMDA 型グルタミン酸受容体の酵素抗体法による免疫組織化学論文が次々と発表された(Petralia et al., 1994a, b)。その染色パターンは、全て細胞質型の染色パターンで細胞体や樹状突起幹の内部が強く染色され、スパインが存在する樹状突起幹の間のニューロピルにはほとんど陽性シグナルは見られなかった。そのような写真を見て、ブロットでは特異性がある抗体でも組織化学には向かない抗体なのだと結論して、自身の抗体作成をあきらめず続けることにした。

1995 年頃から三品研において NMDA 型グルタミン酸受容体のノックアウトマウスが作成され、その形態学的解析のため輸送されてきた。当時はカルタヘナ条約もなく、遺伝子ノックアウトマウスはペットとして航空機で数千円の費用で自由に輸送できた、のどかな時代である。マウスがラボに来てから半年ほど経った頃、GluN2A のノックアウトマウスや GluN2B ヘテロマウスを陰性コントロールとして自作の抗体の特異性検定をすることを思い立った。やってみてわかったことは、①通常用いる 1 µg/ml かそれ以下の抗体濃度では、野生型マウスでもノックアウトマウスでもほとんど染色反応は出てこないこと、② Wenthold 研の論文で使用している、高い濃度により出てくる細胞質型の染色パターンはノックアウトマウスでも同様に出現すること、であった。つまり、7年間の奮闘の最初の5年間の努力の結果、「通常の検出法では、野生型マウスで出現し、ノックアウトマウスで消失する『特異的シグナル』を得ることはできない」という悲観的な結論に達してしまった。

30 代という独立した研究者として成長すべき重要な時期にこのような非生産的な状況に陥り、かなり落胆した。しかし、次第に、NMDA 型グルタミン酸受容体の抗体が悪いのではなく、グルタミン酸受容体という分子そのものの性質や有りようが問題ではないのか、と考えるようになった。ちょうどその頃、培養ニューロンのスパイン上の NMDA 型グルタミン酸受容体をきれいに染色する論文が報告され、その Discussion にこれらの分子の染色にはホルマリン固定よりもメタノール固定やアセトン固定を推奨するという一文を見つけた。これが、それまで一切疑うことがなかった、ホルマリン固定法に疑問を持つキッカケとなった。

メモ

スライドガラスのオートラジオグラフィー

Amersham や Kodak という会社名を聞いて、なつかしいと感じるご同輩やご年配の研究者は多いだろう。どちらもすでに消失した会社で、オートラジオグラフィーに不可欠な製品を販売していた。

英国 Amersham 社の Hyperfilm- β max はマクロオートラジオグラフィー用の X 線フィルムで、一方の面だけが感光面の、解像度の高いフィルムである。フィルムカセットに洗浄を終えたスライドガラスを敷き詰め、組織切片とフィルムの感光面を向かい合わせ、両者の間に隙間ができないように厚紙などを被せて密着させる。1～3 週間の露光の後、暗室で現像と定着を行う。写真投影機にフィルムを載せて拡大し、印画紙に焼き付けて画像データが得られる。

マクロオートラジオグラフィーを終えたスライドガラスは、次に米国 Kodak 社の NTB-2 という感光乳剤を塗布してマイクロオートラジオグラフィーを行う。100 ml 入で 10 万円もする高価な半固形乳剤で、これを暗室で葉さじを使って乳剤壺（図 4）に入れ、同量の水を加えて温浴 42 度で溶解する。乳剤の泡を丁寧に除去した後に、スライドガラスを乳剤壺に数秒ディップし、壁に立てかけて余分な乳剤を落とし乾燥を待つ。乾燥剤シリカゲルを入れた保管用暗箱にスライドガラス 20 枚を収納し、ビニールテープでシールして 1～2 ヶ月間露光する。その後、暗室で現像・定着を行い、必要に応じてヘマトキシリンなどの対比染色を施し、カバーガラスをかけて標本が完成する。写真投影機にスライドガラスを直接載せて印画紙に焼き付けたり、光学顕微鏡で撮影して画像データになる。数百枚のスライドガラスの乳剤塗布は、暗い赤色灯下での数時間の暗室作業となり、日の短い冬であれば暗室から出る頃には日は暮れている。

一連の作業により、*in situ* ハイブリダイゼーションからマイクロオートラジオグラフィーが終了してデータが得られるまで、半減期の短い ^{33}P を使用しても 3 ヶ月ほどかかる。研究競争が激しい状況では、毎月新ロットの放射性標識ヌクレオチドが届く度に、前回や前々回の結果を見ずに次の反応を仕込むのが常であった。その成果が、1992 年から 1994 年にかけて発表した NMDA 型グルタミン酸受容体の発現解析論文である (Watanabe et al., 1992, 1993, 1994a-e)。

図4 感光乳剤壺

乳剤壺はガラス製容器で、スタンドに立てた状態で温浴に入れ、容器内で乳剤と水を1：1で溶解させる。この容器は、指で摘んだスライドグラスを入れる上方部（半球部）と、乳剤液量を節約しつつスライドグラスに乳剤を塗布するための下方部（直方体部）からなる。



3) 抗原露出法・抗原賦活法

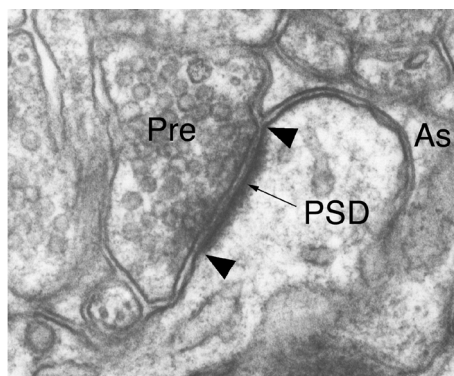
シナプス後細胞に対する強い脱分極作用から考えれば、NMDA 型グルタミン酸受容体が発現しているのは、シナプス後部がある樹状突起スパインのはずである。しかし、通常の免疫組織化学では、その染色パターンを反映する「ニューロピルの点状反応」は全く得られなかった。ここでは、その克服法としての抗原露出法と抗原賦活法に焦点を当てるが、その前にシナプスの分類の話から始めたい。

シナプスの分類

シナプスは、神経伝達物質を充填するシナプス小胞を蓄えたシナプス前部と、受容体が密集するシナプス後部とが、狭いシナプス間隙を挟んで向かい合う化学的情報伝達の接点である。電子顕微鏡が生物学に本格応用され始めた頃、ロンドン大学の解剖学者 Gray は、ジーマンス社の電子顕微鏡を用いてラット大脳皮質を観察し、シナプス後部の厚み（現在、シナプス後膜肥厚 postsynaptic density, PSD と呼ばれている）の違いなどに着目して、シナプスを2型に分類した(Gray, 1959)。シナプス前部のそれと比較して、シナプス後部の厚みと密度が非対称的に発達しているシナプスをタイプIと呼び、それらは樹状突起のシャフト上に axo-dendritic synapse や、スパイン上に axo-spinous synapse を形成する。また、そのシナプス間隙は30 nm とやや広く、間隙の中間帯には分子の集積を思わせるバンドも観察される。Gray はこれらの特徴が、ニコチン性アセチルコリンを介して興奮性シナプス伝達が行われる神経筋接合部とも類似していることに言及している。現代の電子顕微鏡で撮影されるタイプI型シナプス像を図5に示す。

図5 タイプI（非対称性）シナプスの電子顕微鏡像

シナプス前終末（Pre）とシナプス間隙を挟んでシナプスを形成する樹状突起スパインと、シナプスを被覆する星状膠細胞の薄片状突起（As）を観察することができる。2つの矢頭の間がシナプス接着部位で、そのシナプス後部には PSD と呼ばれる分厚いシナプス後膜肥厚が観察され、シナプス前部にも



ファジーだが少し電子密度の高いアクティブゾーンがある。シナプス外空間の電子密度も一様ではなく、特にシナプス間隙やアストロサイト突起とシナプスの間の電子密度は、他の細胞外空間よりも高い。高い電子密度は、そこに分子が密集していることを反映する。

シナプス後部の厚みが薄いタイプ II または対称性シナプスは、細胞体上に axo-somatic synapse や樹状突起のシャフトに axo-dendritic synapse を形成し、シナプス間隙の中間バンドも不明瞭である。Gray 自身はこの 2 つのタイプに関する機能的な考察はせずに、生理学研究との関連において新たな興味深い特徴であることを述べて論文を終えている。Gray が分類したタイプ I (非対称性)、タイプ II (対称性) シナプスは、彼の功績をたたえて Gray I 型、II 型シナプスとも呼ばれる。

一方、電気生理学者は、刺激するとシナプス後部に興奮性シナプス後電位を発生する興奮性シナプスと、抑制性シナプス後電位を発生する抑制性シナプスとに分類していた。分子生物学による神経伝達物質受容体の単離とそのイオン透過性、分子局在解析を経て、中枢神経系におけるタイプ I (非対称性) シナプスはグルタミン酸作動性の興奮性シナプスであり、タイプ II (対称性) シナプスは主に GABA 作動性もしくはグリシン作動性の抑制性シナプスであるという理解が得られた。

興奮性シナプスは抗体浸透を阻害する分子密集地帯

タイプ I (非対称性) シナプスの形態学的特殊化から、興奮性シナプスには多くの分子が密集していることは容易に想像できる。1980 年代後半からの分子生物学の怒涛の勢いは、まずグルタミン酸受容体の多種類のサブユニットやサブタイプを同定し、受容体と強固に結合してシナプス後部に密集させる足場タンパク質、細胞内情報伝達分子、シナプス間隙を架橋するシナプス接着分子、細胞外に放出されたグルタミン酸を回収するグリア膜上の細胞膜グルタミン酸トランスポーター、細胞質中のグルタミン酸をシナプス小胞に充填する小胞膜グルタミン酸トランスポーターなどの分子を、まさに一網打尽に明らかにした。これらの分子が、図 5 のような黒々としたシナプス電顕像を作り、神経情報の伝達と制御のための分子ネットワークを構成しているわけである。

この密集した分子環境にホルマリン固定が加わることで、ラッシュアワーの電車の混雑度合いがさらに増して、抗体の浸透と抗原への結合を邪魔しているのであろう。もしそうであるなら、分子密集度を緩和し、抗体の組織浸透を補助する操作を行えばよいと考えた。1990 年代、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の免疫組織化学的検出上の問題点に気づき、その解決法に取り組むラボが他にも 2 つあった。

1 つは、イギリスのオックスフォード大学の Somogyi らの研究グループである。彼らは、AMPA 型グルタミン酸受容体の検出において、通常の検出ではシナプス外膜やグリア細胞膜上の受容体しか捉えることができないこと、シナプス後部の受容体の検出には抗体の組織浸透操作を省ける包埋後免疫電顕法が不可欠であること、を世界で最初に報告した (Baude et al., 1994, 1995)。後年、そのグループの一員であった Nusser は、低濃度ホルマ

リンやホルマリン溶液の pH の酸性化により、それまで困難であった電位依存性ナトリウムイオンチャネルの樹状突起表面における組織化学検出に成功している (Lorincz et al., 2010)。

2 つ目のラボは、スイスのチューリッヒ大学の Fritschy のグループで、彼らは NMDA 型グルタミン酸受容体と GABA_A 受容体の検出において、固定せずに取り出した新鮮凍結脳をホルマリン溶液中でマイクロウェーブ照射固定を行うことにより、特異的な検出に成功した (Fritschy et al., 1998)。

次に、私が最初に取り組み、その後私のラボメンバーが継続して取り組んだ、有効な抗原露出法を紹介する。いずれのラボも、シナプス後部の受容体ならこう染まるはずであるというイメージを予想し、予想と異なる染色結果を受け入れることができず、納得できるシグナル取得法を追求したという点で共通していた。

有効な抗原露出法

ペプシン処理法が最初の有効な抗原露出法として発表してから (Watanabe et al., 1998)、その後 20 年に渡って様々な方法にトライしてきた。その中で、分子検出が困難に陥りやすいニューロンの部位が、シナプス後部やシナプス間隙に加え、活動電位発生に関わる軸索初節やランビエ絞輪にも共通していることがわかった。これらの特殊な部位に局在する分子検出に有効な 5 つの方法を、その適用範囲と効果の大きさを加味した 5 つのカテゴリの組み合わせとして紹介したい。そのカテゴリとは、「広く有効」、「時折有効」、「とても有効」、「ある程度有効」、「付加的」である。これらの多くは、実は病理学領域で営々蓄積されてきた抗原露出法・抗原賦活法と呼ばれるものを参照して、最適化を図ったものである。

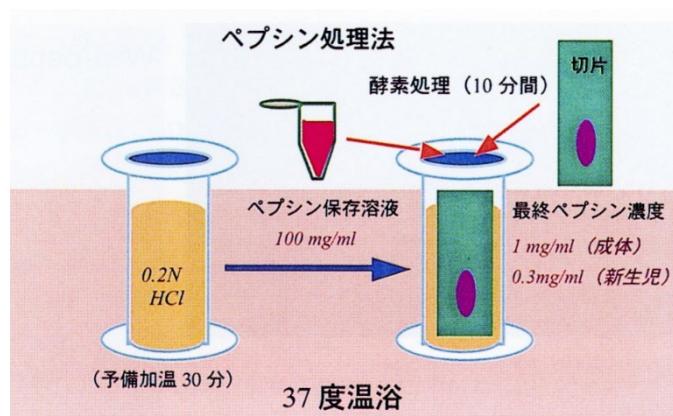
1. ペプシン処理法：光顕レベルでの「広く」「とても」有効な抗原露出法である。

タンパク質を検出する免疫組織化学において、タンパク質分解処理が効果的というのは一見パラドックスように感じるかもしれない。しかし、これをやることにより、シナプス、軸索初節、ランビエ絞輪の内部にまで抗体が到達するようになり、それまで見られなかったビビッドな強い陽性反応が現れる。様々なプロテアーゼが使用できるが、酸性条件で酵素活性を有し、中性に戻すと酵素活性がなくなるペプシンが最もコントロールしやすく、使い勝手がよい。

図 6 にプロトコルの概念図を示す。100 mg/ml のペプシン水溶液を 1 ml ずつ分注し、冷凍保存しておく。実験時に、温浴で予備加温していた 0.2 N 塩酸水溶液をいれた染色壺にペプシン保存液を加え、スライドグラスに載せた切片や、試験管内に浮遊させた切片を 10 分間 37 度でインキュベートする。至適なペプシン最終濃度は、成体組織の場合は概ね 1 mg/ml、新生児組織の場合は 0.3 mg/ml である。処理後、PBS に移して酵素処理を停止させ、通常の免疫組織化学のブロッキングから始める。

図6 ペプシン処理法

広くとても効果的な抗原露出法としてのペプシン処理法の概念図。手順と方法については本文参照。



NMDA 型グルタミン酸受容体の足場タンパク質の代表格である

PSD-95 の検出におけるペプシン処理による効果を図 7 に示す (Fukaya and Watanabe, 2000)。ペプシン濃度 1 mg/ml によって 0 分間～20 分間処理すると、10 分間をピークとした「ニューロピルの点状反応」が現れる。

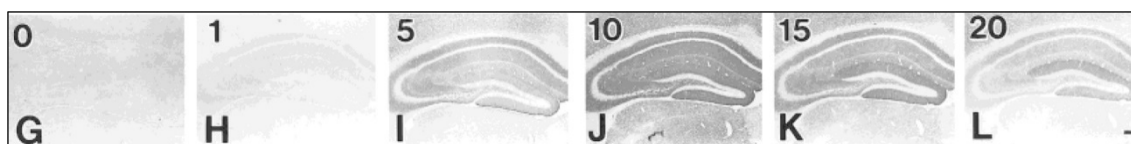


図7 ペプシン処理法の効果 (PSD-95)

ペプシン濃度 1 mg/ml による 0 分間～20 分間の処理で生じる、PSD-95 の染色性の変化に注目。Fukaya and Watanabe (2000)の投稿前の原図より作成。

この方法と条件を用いて、NMDA 型グルタミン酸受容体 GluN2A および GluN2B サブユニットを検出すると (図 8)、海馬に最も強く、大脳皮質にも広く反応が見える。このような野生型マウスの脳組織に特徴的な染色パターンは (左)、ノックアウトマウスやヘテロマウスで、消失もしくは著減する (右) ことから、特異的なシグナルを検出していることがわかる (Watanabe et al., 1998)。海馬を高倍率で検鏡すると、細胞体や樹状突起のシャフトの内部はほぼ陰性で、樹状突起と樹状突起の間のニューロピル領域に微細点状反応が密集していることがわかる (図 9)。

ペプシン処理法による特異的シグナルの検出は、さまざまなイオンチャネル型受容体とその足場タンパク質、シナプス接着分子、電位依存性イオンチャネルとその足場タンパク質など広範に及ぶ。しかし、タンパク質分解処理した組織は電子顕微鏡では観察できないということが最大の難点である。

図 8 ペプシン処理法の効果 (NMDA 受容体 GluN2A, GluN2B サブユニット) とその特異性

左側は野生型マウス脳、右側は GluN2A 欠損マウス脳 (上) と GluN2B ヘテロマウス (下)。図 8 と 9 は Watanabe et al. (1998) の投稿前の原図より作成。

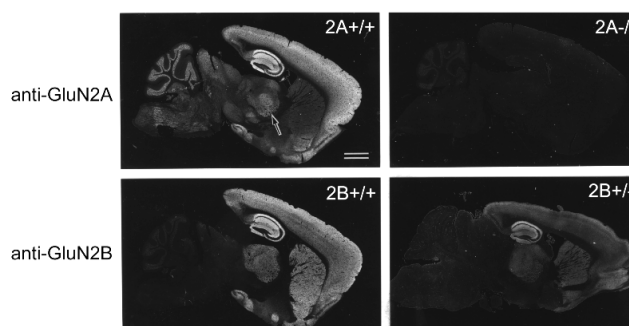
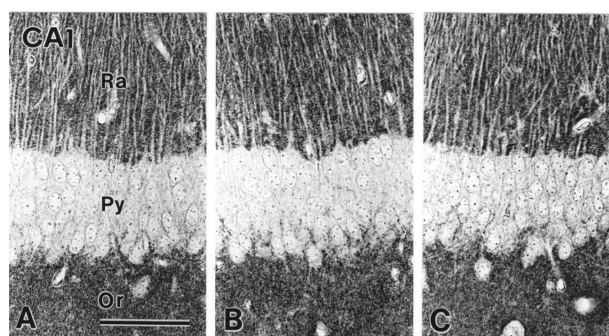


図 9 ペプシン処理法によるニューロピル点状反応の検出

野生型マウスの海馬 CA1 領域。左から GluN2A, GluN2B, GluN1 サブユニット。



2. 包埋後免疫電顕法：電顕レベルでの「広く」「とても」有効な抗原露出法である。

一方、電子顕微鏡レベルで上記のような分子を検出するには、最初に固定組織を樹脂に包埋し、ニッケルグリッドに載せた超薄切片に対して金コロイド標識による免疫反応 (包埋後免疫電顕法) を行うことが唯一の方法となる。この方法では、抗体の組織浸透のステップが不要になるため透過性問題が解消され、たまたま樹脂表面に露出している抗原を効率よく検出するのである。具体的な方法については、他の成書を参照されたい (Luján and Watanabe, 2021)。

3. 低濃度ホルマリン固定法：光顕・電顕レベルでの「広く」「ある程度」有効な抗原露出法である。

免疫組織化学のためのホルマリン固定といえば、4 %のパラホルムアルデヒド (PFA) 溶液によるものが世界のスタンダードである。しかし、シナプス後部、シナプス間隙、軸索初節、ランビエ絞輪に集積する分子のシグナルは、光顕および電顕レベルとも 1 %PFA で増強し、超微細構造もよく保たれる。

4. 新鮮凍結切片法：光顕レベルでの「時折」「とても」有効な抗原露出法である。

シナプス後部、シナプス間隙、軸索初節、ランビエ絞輪に分布する分子であっても、ペプシン処理や低濃度ホルマリン固定が全く役に立たない場合もある。なぜそのような判断されるのかと言えば、新鮮凍結切片が功を奏することがあるからである。その具体的な成功例が、成体では発現していないと思われ、長年無視されてきたオンチャネル型グルタミン酸受

容体 GluD1 であり、これはペプシン処理法を施しても全くシグナルが得られなかった（図 10；Konno et al., 2014）。このような例は数多いとは言えないが、どうしても検出できない場合に試す価値のある窮余の一策または 9 回裏のサヨナラ代打満塁ホームランである。

新鮮凍結切片とは、ホルマリン固定を行わずに脳組織を新鮮な状態に取り出し、ドライアイス粉末で凍結し、 -15 度程度のクリオスタット庫内温度で切片を作成しスライドグラスにマウントし、使用時まで超低温フリーザーで保管しておく。免疫組織化学を施す前に、凍結状態の切片を 4 %PFA 溶液に 15 分間浸漬定した後に、通常の免疫反応を施す。

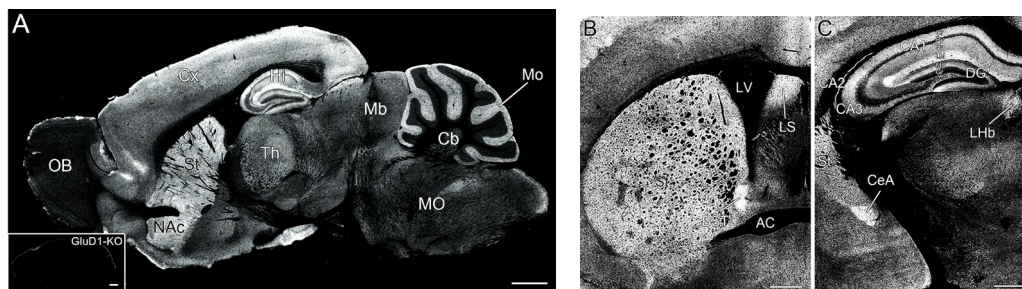


図 10 新鮮凍結切片法による GluD1 の特異的シグナルの検出

A, 野生型マウス脳における GluD1 の特徴的なシグナルは、GluD1 欠損マウス（インセット）では消失している。B と C, 特に分界条床核、扁桃体中心核、海馬、体性感覚野バレルにおいて著明な発現が観察される。Konno et al. (2014) の投稿前の原図より作成。

5. ボイル法：光顕レベルでの「広く」「付加的」な抗原賦活法である。

病理学領域ではパラフィン切片を長期間保存するのが一般的で、それによるシグナル低下や切片の劣化がしばしば問題になる。その有効な解決法が、抗原賦活法とよばれるクエン酸バッファーや EDTA バッファーに浸漬したスライドグラスを、オートクレーブや電子レンジなどで加熱して抗原性を復活させる方法である。ボイル法自体には、シナプス後部、シナプス間隙、軸索初節、ランビエ絞輪に分布する分子に対する抗原露出効果はないが、上記 1～4 の方法と組み合わせるとシグナルが増強する。問題は、加熱後に切片がスライドグラスから脱落したり、剥がれかけた状態になったりすることである。

この問題を解決する良いボイル法として、私の研究室では日新 EM 社が輸入販売しているイムノセイバーと、フナコシから販売されている抗原賦活化装置 BIO CARE（温度制御可能な炊飯ジャーに類似の機械）を組み合わせ用いている。200 倍希釈したイムノセイバー溶液とスライドグラスを専用の染色ラックにいれ、 95 度で 30 分間加熱する。これにより、切片が脱落せずに、シグナルの増強とノイズの低下の両方による S/N 比の改善が得られる。

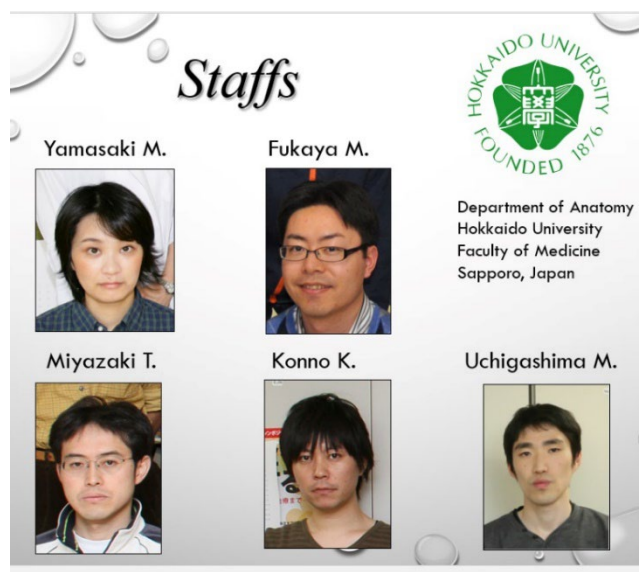
どの方法が有効かは、検出対象となる分子や抗体の種類によっても変わるため、実験者自身が検討する必要がある。その意味で、「広く」や「とても」とついたカテゴリーはまずトライすべき方法であり、それで十分な満足が得られない場合は、「時折」や「ある程度」や「付加的」な方法も試みるとよい。

4) 新規固定剤グリオキサールの威力

イオンチャネル型グルタミン酸受容体の検出問題に遭遇し、ペプシン処理法などの問題解決に取り組んだことで、抗体を使うことの難しさと恐ろしさが身にしみてしまった。そのため、私のラボでは、まず得られた抗体染色像が正しいかどうかをまず疑い、可能な限りその真偽を、遺伝子ノックアウトマウスを陰性コントロールとして確認してきた。遺伝子ノックアウトマウスの入手が困難な場合は、抗体染色像を *in situ* ハイブリダイゼーション法による転写物の発現パターンと比較、siRNA によるノックダウン組織でのシグナル低下の確認、抗体の抗原吸収によるシグナル消失、培養細胞の強制発現系による陽性所見の確認など、複数の陰性コントロールと陽性コントロールを組み合わせることで、嘘のデータを公表しないよう細心の注意を払ってきた。そのせいで、私の下でスタッフを務めた深谷昌弘（北里大学医療衛生学部教授）、山崎美和子（北海道大学医学研究院准教授）、宮崎太輔（北海道大学保健科学研究院准教授）、今野幸太郎（北海道大学医学研究院助教）、内ヶ島基政（新潟大学脳研究所准教授）の5人は、鋭い感性と経験豊富な神経組織化学者として成長した（図 11）。しかし、特殊化したニューロン部位に局在する分子検出における抗原露出法・抗原賦活法の必要性への理解は、残念ながら国内的にも国際的にも広がらなかった。

図 11 北海道大学大学院 医学研究院 解剖発生学教室のスタッフ

筆者が 1998 年にラボを開設してから、5 名の教員スタッフが解剖学の教育と研究を担当した。



私のメンターである内山安男先生（順天堂大学医学部特任教授）が研究を始めた 1970 年代は、酵素組織化学にせよ免疫組織化学にせよ、固定剤の選択から染色法の手順まで、検出条件の最適化のための予備検討を行うことが常道であり、私もその薫陶を受けた。それが、分子生物学の発展に伴い解析対象となる遺伝子・分子の種類が爆発的に増加すると、免疫組織化学は 4 %パラホルムアルデヒド（PFA）の固定組織を用いるシンプルなプロトコールとして、それぞれのラボに伝承される画一的なものになっていった。そのような研究環境の中で、経験の浅い学生や若いフタッフにとって自身が得た抗体染色像を疑う必要性を感じるだろうか？それを指導するメンターにもそのような見識と経験がなければ、得られた結果をそのまま無批判的に発表してしまうのではないだろうか？

前回紹介したイオンチャネル型グルタミン酸受容体の免疫組織化学的検出上の問題点に気づいた欧州の研究者の一人である Zoltan Nusser とシチリア島のタオルミーナで会った時に、彼が「世の中のグルタミン酸受容体の組織化学論文や研究発表のほとんどは嘘だよ」と絶望的な状況を憂いていたことを覚えている、もうすぐ 60 歳代になるという時に、世界に向かって警鐘を鳴らしても現実は何も変わらないという半ば諦めの境地になっていた時に、今回のコラムのテーマであるグリオキサールと出会ったのである。

グリオキサールの化学構造

グリオキサール glyoxal は、アルデヒド基（-CHO）を有する化学物質の 1 つで、その仲間で実験に活用されるものにホルムアルデヒド formaldehyde とグルタルアルデヒド glutaraldehyde（GLA）がある（図 12）。

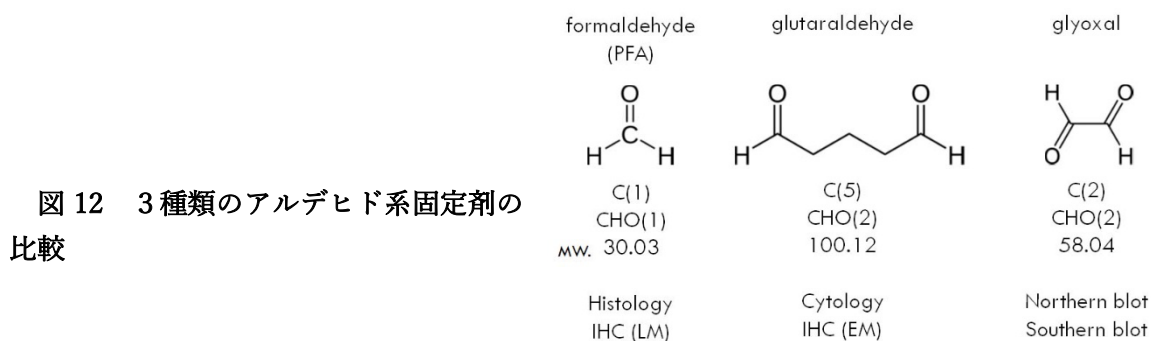


図 12 3 種類のアルデヒド系固定剤の比較

それぞれの名称、化学式、炭素原子数、アルデヒド基数、分子量、用途をまとめる。

ホルムアルデヒドは、アルデヒド基 1 個に水素原子が結合した最小のアルデヒド（化学式 CH_2O 、構造式 HCHO ）で、免疫組織化学や in situ ハイブリダイゼーションなどの光学顕微鏡レベルの組織化学に用いられる、最も標準的な化学固定剤である。この固定液の実験での使用に際して、2 通りの作り方がある。1 つはホルムアルデヒドが重合した粉末の PFA を加水分解して 4 % 水溶液として使用するため、「4 % PFA」と呼ばれる。もう一つが、38 % のホルムアルデヒドを含有したホルマリン溶液を購入し、それを使用時に 10 倍希釈して用いるため、「10%ホルマリン」と呼ばれる。いずれも、ホルムアルデヒドを約 4 % 含有する

という点では同じであるが、作り方の違いにより2通りの呼称で通用している。

一方、電子顕微鏡観察に使用されるもう一つのアルデヒド系固定剤が GLA である。こちらは分子の両端に2つのアルデヒド基を有するジアルデヒドで、その間を3個の炭素原子がリンカーとして繋いでいる（化学式 $C_5H_8O_2$ 、構造式 $CHO(CH_2)_3CHO$ ）。この官能基の標的であるアミノ基に結合して分子間の重合を促進するため、GLA は代表的なクロスリンカーであり、これが細胞小器官やシナプスなどの超微細構造の保持に役立つと考えられている。一方、GLA は分子の抗原性を著しく低下させることも広く知られている。このため超微細構造の観察用には2%PFA/2%GLA を用い、免疫電顕用には4%PFA/0.1%GLA を使うなど、使用目的に応じて GLA 濃度を調節する。

これに対して、グリオキサールは2つのアルデヒド基が背中合わせに結合した、ジアルデヒドとしては最小の分子である（ $C_2H_2O_2$ 、構造式 $CHO-CHO$ ）。従来、グリオキサールは、ゲノム DNA や RNA の検出（サザンブロット、ノザンブロット）の際に行われる核酸の電気泳動ゲル用変性剤として使用され、組織化学を目的とした化学固定剤として使用されることはなかった。

グリオキサールの有用性に関する Rizzoli 研からの報告

組織化学におけるグリオキサールの有用性を最初に報告したのは、ゲッティンゲン大学のシルビオ・リゾーリ Silvio Rizzoli のラボから EMBO Journal に出版された2018年の論文、「Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy (免疫染色および超解像度顕微鏡におけるホルムアルデヒドの代替固定剤としてのグリオキサール)」(Richter et al., 2018)である。彼らは、3%グリオキサール・8%エタノール・0.75%酢酸を混合した固定液と4%PFAを用いて、主に培養細胞におけるシグナル強度の比較から、以下の点を明らかにした。

1. グリオキサール固定液の方が、タンパク質や核酸に対する固定速度、固定力、クロスリンク能が高い。例えば、細胞活動が低下・停止するにつれ細胞内に取り込まれる propidium iodide や FM1-43 の色素取り込み速度を比較すると、グリオキサール固定細胞の方が早く取り込む。この効果は pH 依存的で、固定液を pH4-5 に調製することが必要である。
2. 最も重要な発見は、多くの分子において蛍光抗体染色の強度が増強することを見出したことである。その効果を、欧米4カ国の有名ラボにも依頼して、細胞小器官や細胞膜、細胞質などに分布する合計82種類の抗体による蛍光強度を客観的に比較検定した。その結果、グリオキサールの方が勝る抗体が51、4%PFAの方が勝る抗体が12、両者同等が19という結果であった。この中に、シナプス後部分子である Homer-1 と PSD-95 に対する3種類の抗体が含まれ、グリオキサールの方が勝る抗体が2つ、両者同等が1つという軍配であった。

グリオキサール固定法に関する我々の研究成果

抗原露出法・抗原賦活法に長年取り組んできた我々の立場からすると、抗体の浸透が最も

阻害されているチャンピオンが NMDA 型グルタミン酸受容体とその足場タンパク質 PSD-95 である。我々は、グリオキサールの方が勝る抗体に PSD-95 抗体が含まれていたことに注目し、ラボの今野幸太郎助教を中心として、グリオキサールの可能性を検証することにした。選んだ抗体は NMDA 受容体 GluN1 抗体と PSD-95 抗体であり、早速翌日その威力を目にすることになった。4 %PFA 固定脳組織なら、抗原露出法なしでは全くシグナルが出てこないこれらの分子シグナルが、グリオキサール固定を用いると抗原露出法なしでも容易にシグナルを検出でき、しかもそのシグナル強度が高いのである。その後、6 年間の検討結果を重ねて出版した論文のタイトルが、「Glyoxal fixation: An approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research (グリオキサール固定: 神経科学研究における免疫組織化学上の問題を解決するアプローチ) (Konno et al., 2023) である。後日、この論文を査読し評価してくれた 3 名のレフリーの一人が Rizzoli 自身であったことを知り、研究という営みを通して生産的なキャッチボールができたことを、心から嬉しく感じた。

グリオキサール固定法の効果

主にマウス脳組織切片を用いて明らかにした、この論文の要点を列挙する。

1. 固定液の組成や検出手順を最適化した結果、9 %グリオキサール・8%酢酸による灌流固定と、抗体希釈液と洗浄液への界面活性剤 (0.1% Triton-X100) の添加が標準プロトコールとして確立された。
2. 4 %PFA 固定組織では抗原露出法・抗原賦活法を必要としていた分子 (例えば、NMDA 型グルタミン酸受容体や PSD-95) の検出は、グリオキサール固定組織では一切不要となる。つまり、通常の免疫組織化学のプロトコールで検出できるようになった。
3. 4 %PFA 固定組織では抗原露出法・抗原賦活法なしでも普通に検出可能な分子 (例えば、神経終末の化学的マーカーとなる小胞膜伝達物質輸送体や代謝型受容体) の多くが、グリオキサール固定組織により蛍光シグナル強度が有意に増強する。1 と 2 の効果により、検討した 53 分子のうち 47 分子で有意な増強効果が得られた (図 13)。
4. 上記のシグナル増強効果は、包埋前および包埋後の免疫電顕法、パラフィン包埋切片においても確認できた。
5. 上記のシグナル増強効果は、マウスだけでなく霊長類のコモンマーモセットの脳組織においても得られた。
6. 4 %PFA 固定組織に比べ、グリオキサール固定組織における抗体浸透度は著明に上昇した。さらに、組織透明化法と組み合わせてレーザー光の散乱を防止すると、100 μm 厚の切片の全層にわたり、一様な蛍光シグナルを取得できた。
7. 従来、特異抗体ではないと判断されてきた一次抗体を、グリオキサール固定組織を用いて再検討すると、「野生型組織で検出され、ノックアウト組織では検出されない『特異的シグナル』」を得ることができた。論文ではそのような例として、ニューロロジン 1 抗体、GABA_A 受容体 $\gamma 2$ 、GABA_B 受容体 2 を紹介したが、実はもっともっとある。

図 13 グリオキサル固定組織における蛍光輝度の増強効果

検討した 53 分子中、47 分子においてグリオキサル固定が勝り、その統計学的有意性を * ~ * * * * で示す。n.s.、有意な差はなし。

Ionotropic receptors		GA/PFA
GluA2	**	
GluA3	**	
GluK2	**	
GluN1	****	
GluN2B	***	
GluN2C	****	
GluD1	****	
GluD2	****	
GABAA α 1	**	
GABAA α 2	**	
Voltage-gated ion channels		GA/PFA
Nav1.1-1.9 (pan-Nav1.x)	**	
Kv1.1	****	
Ca v 2.1	**	
Channel/receptor-associated proteins		GA/PFA
TARPy2	**	
TARPy8	****	
Shank2	****	
Homer-1	****	
gephyrin	****	
ankyrin-G	****	
PSD-95	****	
PSD-102	****	

Metabotropic receptors and related molecules		GA/PFA
mGluR1	n.s.	
GABA β R2	**	
mACHR1	n.s.	
D1R	****	
PLCB1	****	
IP $_3$ R1	****	
Vesicular transporters		GA/PFA
VGluT1	**	
VGluT2	****	
VGluT3	***	
VIAAT	**	
VACHT	***	
VMA2	****	
Plasma membrane transporters		GA/PFA
GLAST	****	
GAT1	****	
GlyT2	****	
CHT	**	
DAT	***	
NET	****	
HTT	***	

Vesicle-associated and active zone proteins		GA/PFA
basoon	**	
CAST	**	
synapsin-1	n.s.	
Cell adhesion molecules		GA/PFA
Cttn1	****	
Cttn3	**	
Nrxn1a	**	
Neuroigin1 (NL1)	****	
Neuroigin2 (NL2)	**	
Neuroigin3 (NL3)	**	
Neuropeptide precursors		GA/PFA
pro-somatostatin	n.s.	
pro-VIP	n.s.	
Cytosolic Ca $^{2+}$ -binding proteins		GA/PFA
calbindin	*	
calretinin	**	
parvalbumin	n.s.	
Glial proteins		GA/PFA
Iba1	n.s.	
GFAP	****	
CNPase	****	

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001

47 out of 53 molecules

今後のインパクトと問題点

神経科学研究が対象とする神経組織は活発な情報伝達を行うため、シナプス後部、シナプス間隙、軸索初節、ランビエ絞輪などにイオンチャンネルが密集し、そこに足場タンパクや補助サブユニットなどの多様な分子群がタイトに相互作用している。従来のホルマリン固定法では、抗原露出法・抗原賦活法が必要な分子と、不要な分子を同時に検出しようとすると、得られるシグナルの深度に違いが生じた。例えば、抗原露出法・抗原賦活法が必要なシナプス後部のイオンチャンネル型グルタミン酸受容体と、不必要なシナプス前部の小胞膜グルタミン酸輸送体を同時に検出すると、ペプシン処理などで組織表面を削られて露出し検出可能になる受容体のシグナルピークは、輸送体のそれと比べて切片の表面側に位置する。このため、本来はプレシナプスの輸送体とポストシナプスの受容体に向かい合うように検出されるはずなのだが、実際にはなかなか向かい合ってくれないのである。このため、論文に掲載する画像の取得には、字面には記載できないような深い経験と洞察を通して厳選された代表例を掲載しているのである。ところが、グリオキサル固定法により抗原露出法・抗原賦活法の要・不要がなくなると、関連分子がキチンと隣り合い、ピッタリと向かい合って検出できるようになった。今後、超解像顕微鏡法や膨張顕微鏡法などの高解像度イメージングと組み合わせることで、神経科学や細胞生物学の解析精度の向上が期待される。

パラフィンへの包埋過程で組織に加えられる加熱や収縮等により、パラフィン切片を用いた免疫組織化学は凍結切片などを用いるものと比べて、シグナルが低下するのが一般的である。また、長期に渡るパラフィン切片の保存による組織の劣化で、さらに抗原性が低下する。この克服のため、病理学領域ではさまざまな抗原露出法・抗原賦活法が開発され、発展してきたのである。シグナル増強効果がパラフィン切片でも確認でき、霊長類のマーモセット脳組織でも確認でき、抗体の特異性を向上させる効果を考え合わせると、グリオキサル固定法が応用されるべきもう一つの大きな領域が、ヒトパラフィン切片を豊富に抱える病理学研究領域であると考えられる。これにより、病理診断の精度や信頼性の向上が期待される。

一方、グリオキサール固定には、改善すべき問題点もある。従来の PFA や GLA による固定組織の電子顕微鏡像では、細胞膜などの脂質二重層が黒く、それ以外の構成成分は白から黒までの間のさまざまな濃淡からなる電子顕微鏡特有のイメージ（これを灰調とよぶ）になる。優れた灰調を備えた電顕写真を撮影し提示できることが、電顕学者の冥利なのである。ところが、グリオキサール固定組織の電子顕微鏡像は膜系のコントラストが増強しすぎて灰調が損なわれ、さらに細胞質中に空白の領域が出現する。分子検出感度が上がるのはよいが、超微細形態像に劣るとというのが、現時点でのグリオキサール固定法の最大の難点である。

もう一つの問題点は、固定後の組織が柔らかいことである。これは抗体の組織浸透性が良い特性と表裏一体なのかもしれない。しかし、免疫組織化学の反応中に切片が破れるという実際上の問題がしばしば生じる。特に、脳組織では白質が破損しやすい。原法に比べてグリオキサールと酢酸の濃度それぞれ 9 % と 8 % に上げた理由が、シグナル損失を防ぎつつ組織硬度を上げることで、切片脆弱性も問題解決の一助とした訳である。

研究者人生の駆け出しの頃に遭遇した大きな困難が、研究者人生の終わり近くになって氷解したという、私にとってはまるで小説「ぼっぼや」の主人公・佐藤乙松のような感慨に浸っていることを、ご理解いただけたら幸いである。

5) 私の抗体作成法

私が抗体作成を初めて行ったのは 1987 年、筑波大学での大学院生時代である。当時は PCR が普及する時代の前夜で、抗原タンパク質は生化学的に精製するかペプチドを有機合成するしかなく、それぞれ時間と労力とお金がかかった。1 回目のコラムでも触れたが、1989 年夏に新潟大学脳研究所に国内留学し、そこで間もなく PCR が登場し、抗原タンパク質を大腸菌に発現させ自在に入手できる時代になることを知った。以来、大腸菌の発現タンパク質と合成ペプチドを使い分けながら、40 年近くポリクローナル抗体を作成してきた。これまで行ってきた抗体作成法の考え方について紹介したい。

まず始めに、抗原を動物に注射して得られる抗体に 4 種類あることをまず理解してほしい（図 14）。最も頻繁に遭遇する抗体作成のアウトカムは、目的とするタンパク質を認識せず、目的外のタンパク質を非特異的に認識する「有害な抗体 harmful antibody-1」で、次に多いのは内在性のタンパク質をほとんど認識しない「無用な抗体」である。これに対して、最も希少な結果が、目的の内在性タンパク質だけと特異的に結合する「有用な抗体 useful antibody」であるが、それに目的外のタンパク質を認識する成分も含まれていればたちまち「有害な抗体-2」に豹変してしまう。学術研究において最も危険なのは「有害な抗体-2」で、報告された真正データに混じり込む偽陽性データを第三者が反証することは困難を極める。有用な抗体の通算成功率は、私の場合、せいぜい 5 % である。この数値は、成功率が極めて低い受容体やチャネルのような複雑な立体構造を有する膜タンパク質から、成功率の高い低分子量の可溶性タンパク質までの平均値である。

抗体作成のアウトカム

図 14. 抗体作成のアウトカム

	目的の分子と結合する特異抗体	目的外の分子と結合する非特異抗体		頻度
有用な抗体 useful antibody				± (5%)
無用な抗体 useless antibody				+
有害な抗体-1 harmful antibody-1				+++
有害な抗体-2 harmful antibody-2				++

特異抗体の作成効率を上げるために、抗原配列の選択から抗体の精製まで、思いつく限りの工夫と試行錯誤を踏んできた。この経験を通して、多少なりとも

抗体作成のコツも体得してきた。次に、経験とコツを織り込んだポリクローナル抗体の作成法として、大腸菌融合蛋白と合成ペプチドを組合せた手順や方法について紹介する。詳細については、参考文献や書籍に譲るとして、特に重要と思われる考え方や実験戦略については、関連する箇所においてメモとして取り上げる。実際に私が使用している器具などについて記載があるが、それはたまたま私が使用している物品という意味であり、それを推奨・宣伝しているわけではないことをお断りしておく。

1. 抗原タンパク質とアフィニティー精製用タンパク質の調製

合成ペプチドと大腸菌発現蛋白の使い分け

抗体作成に用いる合成ペプチドと大腸菌発現蛋白それぞれに長所や短所があり、上手に使い分けことが重要なポイントである。合成ペプチドの利点は抗原分子が均質になり、有用な抗体ができた場合には高品質の抗体が期待できる。また、リン酸化やスルホン化など、特定のアミノ酸残基を化学修飾した配列も抗原として使える。

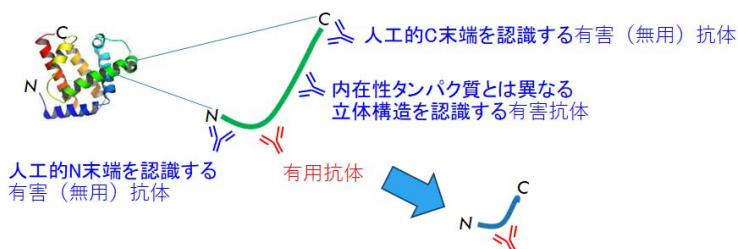
これに対し、大腸菌を用いた発現タンパク質の利点は安価で大量に作れることであるが、分子生物学的実験技術や手間が必要になることや、不均質な抗原になってしまうことなど問題点もある。

私は、ポリクローナル抗体作成のための抗原として、大腸菌によるグルタチオン S 転位酵素 (GST) との融合タンパク質を第一選択として使用してきた。その理由は、GST 融合蛋白が精製の際に使うグルタチオンセファロースゲルと結合性が強く安定であり、可溶性蛋白になりやすく、他の混入大腸菌蛋白との非特異的吸着が低いことである。

準備した抗原が大腸菌発現蛋白か合成ペプチドの種類に関わらず、抗体は N 末端や C 末端を認識するものができやすい。用いた抗原ペプチドがある分子の途中にある部分シーケンスであれば、その N 末端や C 末端は内在性タンパク質には存在しない人工的に作出された末端構造となる。しばしば、人工的な末端部を認識する抗体成分がバックグラウンドや非特異反応の原因となる。従って、このような状況が発生した場合、抗原ペプチドとアフィニティー精製用ペプチドの開始点と終点のアミノ酸を 1～2 残基ずらすだけで、有害抗体の除去に極めて効果的である。

抗原蛋白の選択における2つの戦略として注意したいのは、初心者ほど長い抗原タンパク質の方が抗体作成の成功率が上がると信じて、100 アミノ酸残基以上の長い抗原蛋白を発現しようと考えてしまうことである。しかし、大腸菌を用いた発現実験では大きな蛋白を発現させることは容易ではなく、たとえ発現させても不溶化して回収と精製が困難になったり、翻訳が途中で停止したラダータンパク質になったりする。このようなラダータンパク質を抗原とすれば、さまざまな人工的末端に対する無用な抗体や有害な抗体が出来上がってしまう。また、長い抗原タンパク質ほど、有害な抗体が生成される確率も上がることに留意すべきである。そのような理由から、大腸菌で発現させる分子の部分ペプチドの多くは20～50 アミノ酸残基に限定している。もし、100 アミノ酸残基の領域を抗原に使いたいなら、3本の30数残基配列として抗原免疫し、それぞれのアフィニティー精製抗体の中から、有害成分を含まない有用な抗体を見つける方が成功への近道である。さらに必要であれば、アミノ酸配列の開始点と終点のアミノ酸を1～2残基ずらした合成ペプチドを利用して、人工的な末端抗体を取り除く。このようなアフィニティー精製の段階で特異性を上げる方針を、「有用抗体釣り上げ戦略 the *gold-dust-fishing strategy*」(図15)と呼んでいる。

図 15 有用抗体釣り上げ戦略 the *gold-dust-fishing strategy*



対照的に、全長のアミノ酸残基数が300以下の可溶性タンパク質の抗体を狙うなら、その全長を大腸菌に発現させるとよい。細胞質のCa²⁺結合タンパク質やGFPなどの蛍光タンパク質は大腸菌でも完全長の翻訳がなされ、その立体構造も真核細胞のそれに近似することが多いため、よい抗原となる。その具体的事例として、蛍光タンパク質を大腸菌で発現誘導すると、その蛍光を発するきれいな色のタンパク質溶液を得ることができ、それを抗原に用いた有用抗体作成率はほぼ100%である。このような中途半端な長さの抗原を避ける方針を、「全鎖か短鎖の戦略 the *whole-or-short strategy*」と呼んでいる。

前述のように抗原部位の選択は、タンパク質のN末端やC末端に対して特異抗体ができる確率が高いため、内在性タンパク質の末端配列は抗原部位の第一選択になる。恐らく、末端部は遊離端となるため、抗原分子の立体構造が内在性蛋白のそれと類似しやすいのだろう。しかし、末端部に対して特異抗体が取れない場合には、第二選択として分子内部の配列を抗原とする。抗原部位の選択には、内部配列の中から親水性アミノ酸を多く含む領域を選ぶことが重要である。親水性の高い領域は細胞質と接する分子表面に露出していることが多く、ここに対して有用な抗体ができれば分子へのアクセスもよく組織化学に適した抗体となる。

2. 抗原精製と抗体精製

筆者が良く利用しているカラムは、エコノカラム (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) である。このエコノカラムの他に、シリコンチューブ (内径 1.5 mm × 外径 3 mm) とフィッティングキットを用意しておけば、抗原精製回収作業と、抗体のアフィニティー精製作業が効率よくできる。18G 針*シリコンチューブ*カラムキャップーカラム本体ー二方活栓*シリコンチューブ (*には、フィッティングキットに含まれる適合するフィッティングを選択して使用する) をスタンドにセットアップすれば、18G 針から洗浄用 PBS や抗血清を静水圧でカラムに送り込むことができる。

抗原アフィニティーによる抗体精製

アフィニティー精製用抗原もしくは合成ペプチドをセファロースゲルにカップリングさせたアフィニティー精製用ゲルをエコノカラムに充填し、精製を行う。

考えられるすべての抗原ペプチドを試しても「有用な抗体」が得られない時にトライする窮余の一策がある。それは、抗原ペプチドの立体構造を変化させるために、抗原部位を保有する GST 融合蛋白を SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、そのタンパク質バンドをポリトロンホモゲナイザーで粉碎したものを抗原として免疫する。要するに、タンパク質を SDS 変性して強制的に立体構造を変化させることで、内在性タンパク質のそれと偶然に近似することを期待するという、まさに窮余の一策である。このようにして得られた有用な抗体の例として、ドーパミン受容体 D₂ 抗体、内在性カンナビノイド合成酵素 DGL α 、P/Q 型カルシウムチャネル α 1A 抗体、PSD-95 抗体など、重要な分子の良い抗体が取れた。

内在性タンパク質の方の立体構造を変化させることで、「無用な抗体」と思われていた抗体が「有用な抗体」に様変わりすることは、4 回目のコラム「新規固定剤グリオキサールの威力」で概説した。組織化学において多様な固定剤や固定法にトライすることの重要性は、まさにここにある。

3. 特異性検定

イムノブロットや免疫沈降などの生化学的解析に用いるのか、免疫組織化学に用いるのかなど、用途により抗体特異性の検定の種類や比重は異なる。しかし、生体の免疫系を利用して人工的な抗原蛋白に対する抗体を作らせるのであるから、予想外のさまざまな特性 (特異性と力価) を備えた抗体が生まれてくるのは当然である。また、電気泳動と組織化学で使用する固定剤 (変性剤) が異なるためタンパク質の立体構造への影響も異なることから、イムノブロットで使えても組織化学では全く使えない抗体は多く存在し、その逆も真である。ブロットで使える抗体であるから免疫組織化学の結果も正しいとか、免疫組織化学のシグナルが特異的であるから、ブロットでの検出バンドも本物であるという決めつけは、非科学的な思い込みに過ぎない。さらに、有用抗体が認識する分子と有害抗体が認識する分子の発現量は組織や細胞により異なることを考慮すれば、この組織で染色性の特異性が証明されているから、別の組織における染色性も正しいと考える科学的根拠はない。常に、免疫組織化学

シグナルの特異性判断は、抗体を使う研究者の姿勢や見識が問われていると考えるべきである。ノックアウト動物を用いた陰性コントロールがあればよいが、それがなければ原理の異なる2種類以上の方法で検定することを推奨する。

遺伝子ノックアウト動物や組織の陰性コントロール

イムノブロット、免疫組織化学、免疫沈降実験で野生型動物から得られる反応が、遺伝子ノックアウト動物や組織で消失することを確認できれば、これに勝る特異性証明はない。

ノックダウン組織の陰性コントロール

プラスミドベクターやウイルスベクターを用いてRNAiやマイクロRNAを導入したノックダウン組織において、野生型動物の組織で得られる反応が著明に減弱することを確認できれば、有力な特異性証明となる。ただし、用いたRNAi配列により、ノックダウン効率が異なるので、培養細胞などで事前により配列を選択しておく必要がある。

正常動物における基本的な染色パターン

遺伝子ノックアウト動物やノックダウン実験系がない場合、染色パターンの特異性を証明することは困難である。ただし、研究者が対象とする細胞や組織の高倍率のイメージだけでなく、組織の広範な領域を含む全体的な染色パターンも提示しておくことは、後日その染色性の特異性について第三者が比較検討する際の材料提供となり、研究者として評価されるべき姿勢であると考えられる。

真核細胞の強制発現による陽性コントロール

COS細胞やHEK293T細胞などライン化された培養細胞に、目的とする遺伝子をリポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、プラスミドベクター、ウイルスベクターなど様々な方法で導入できる。導入細胞で陽性シグナルがあり、非導入細胞でそれが陰性であれば、抗体の特異性を示すことができる。しかし、組織や細胞によってはmRNAのスプライシングや翻訳後修飾が異なることで分子サイズも変化し、必ずしも解析対象の組織におけるブロットバンドの特異性を証明するとは限らない。また、実際には組織化学の使用には耐えないような低力価の抗体であっても、大量に強制発現させた細胞では強く反応して見えるので要注意である。

抗原吸収テストによる陰性コントロール

最終的に使用する濃度に希釈した抗体に、抗原として用いたペプチドやタンパク質を過剰添加した吸収抗体と、加えない非吸収抗体を用意する。それぞれをイムノブロットや免疫組織化学に適用して吸収抗体で消失もしくは著明に減弱すれば、そのシグナルの特異性を示すことができる。もし、消失もしくは著明に減弱しない部位や細胞が残っていれば、それは非特異的反応となる。ただし、その抗体が相同もしくは類似した配列を有する別の分子を認識

している場合は、抗原吸収により偽陽性シグナルも消失もしくは減弱して、特異的なシグナルと判断される危険性もある。

***in situ* ハイブリダイゼーションの mRNA 発現パターンと免疫組織化学の染色パターンの相関性**

特定の組織や領域・細胞に発現する遺伝子であれば、*in situ* ハイブリダイゼーションによる mRNA 発現パターンと免疫組織化学による染色パターンの相関性は、特異性を考える上での重要な示唆を与える。しかし、広範な領域に同じようなレベルで発現するハウスキーピング遺伝子に対しては、このパターン比較は参考にならない。

(以上、分子解剖学への道)

6) シナプス回路発達の形態生物学

後半の5回のコラムでは、シナプス回路発達の「形態生物学」研究について紹介したい。

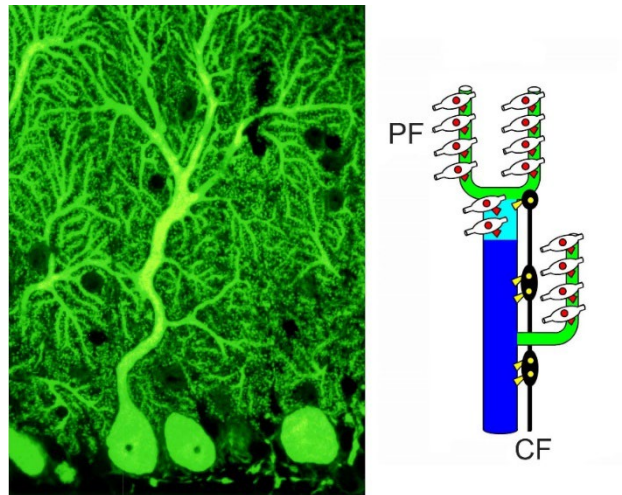
小脳プルキンエ細胞のシナプス回路の特徴

まず初めに、形態生物学の主な解析対象としてきた小脳プルキンエ細胞とそのシナプス回路の特徴について説明する。

プルキンエ細胞は小脳情報処理系における中心的なニューロンで、精緻な運動や、練習や訓練による運動の上達や学習を可能にする。この高次神経機能の実現のため、プルキンエ細胞の樹状突起の近位部は、一本の登上線維（図16右のCF）による‘司令官的’な強い支配を受け、これが運動のプランと実行した結果の間のズレを誤差信号としてプルキンエ細胞に伝える。一方、樹状突起の遠位部はマウスでは十万本、ラットでは十数万本、ヒトではおそらく数十万本にも及ぶ平行線維（図16右のPF）による‘群衆的’な支配を受けている。平行線維は、大脳皮質からの運動情報と運動実行により生じた末梢（筋や腱）からの感覚情報をプルキンエ細胞に届ける。

図16 小脳プルキンエ細胞と二種類の興奮性シナプス回路

左はカルビンジン抗体を用いたプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起の共焦点レーザー顕微鏡像。右は、プルキンエ細胞を支配する平行線維（PF）と登上線維（CF）。



このシナプス回路の特徴を端的に表現すれば、①遠近方向に分離した支配テリトリー、②登上線維の単一支配、ということになる。登上線維支配は、出生時の複数の登上線維による多重支配に始まり、その後の活動依存的なシナプス刈込みを経て、一本の優勢な登上線維による単一支配が確立する（図16）。単一線維による支配とはいえ、樹状突起に巻き付きながら数百個のシナプスを形成するため、単発の活動でもシナプスの同時多発的脱分極を招き、その結果生じる活動電位はプルキンエ細胞に複雑スパイクという、複合的な発火現象を発生させる。一方、個々の平行線維シナプスの活動が及ぼす脱分極作用は軽微であり、数十個の平行線維シナプスの活動が加重して初めて、単純スパイクという活動電位を発生させる。しかも、登上線維と同期して活動した平行線維シナプスには長期抑圧というシナプス可塑性が誘導され、さらに伝達効率が長期に渡って低下させられ、プルキンエ細胞に対する平行線維シナプスの影響力が弱められる。登上線維と平行線維の活動同期性に基づく長期抑圧は、運動プランと実行結果の間のズレを最小化させる小脳運動学習の基盤と考え

られている。

結局、この2つの回路特性がどのような発達過程と分子機構によって形作られるのかを、三十余年をかけて形態生物学的に追求して来たのだと今になって気付いた。

どうしてプルキンエ細胞なのか？

どうして研究対象がプルキンエ細胞になったのか？いくつかの要因を並べてみる。

まず、筑波大学大学院において腭臓の研究で博士（医学）の学位取得後、二人目のボスである近藤尚武先生の下で助手として始めた最初の研究が、ラット生後発達期小脳における神経特異的エノラーゼの発現解析であった（Watanabe et al., 1990）。そこで、勢いよく樹状突起を伸ばし分岐するプルキンエ細胞を観察し、心の底から美しい、すごいと感じた。その後、共焦点レーザー顕微鏡が登場してまもなく取得したプルキンエ細胞の蛍光画像（図16の左）が、研究者人生の中で最も“映える”顕微鏡写真になった。要するに、プルキンエ細胞に“一目惚れ”してしまったのである。

研究の技術的環境も自然とプルキンエ細胞のシナプス回路に導いてくれた。学部学生から大学院にかけて最も時間をかけた解析技法は、最初のボスである内山安男先生の下での電子顕微鏡写真撮影とその定量形態解析であった。現在でも、プルキンエ細胞の平行線維シナプスの形態学的評価法において、電子顕微鏡が最も精度と解像度が高い解析方法である。1992年に北海道大学に赴任して3人目のボスとなった井上芳郎先生は、神経研究には電子顕微鏡と神経トレーサーと電気生理（これをエレキと呼んでいた）が必要だという信念の持ち主であった。特に、神経トレーサーを普段に使う研究環境や同僚に市川量一先生がいたことが、登上線維支配の形態学的解析に大きく貢献した。さらに、井上先生はリーラーマウス、ウィーバーマウス、スタゲラーマウスなどの自然発症の小脳奇形マウスを多種類飼育し研究に用いていたことから、遺伝子改変マウスが登場する前から、小脳シナプスの形態学的解析を始めていた。

このような準備状況が整いつつある段階で、生命科学研究にパラダイムシフトが起きた。つまり、遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究の時代が到来したのである。そこで、プルキンエ細胞シナプス回路発達研究へと進む直接的な引き金となったのが、1990年新潟大学脳研究所に赴任し、グルタミン酸受容体研究を立ち上げた三品昌美先生との共同研究の始まりであり、そこで開発され1995年に報告されたGluD2（GluRδ2）欠損マウスとの出会いであった（Kashiwabuchi et al., Cell, 1995）。このマウスに自身の将来を賭けるつもりで、それまでの思いと経験を全力で投入した（Kurihara et al., 1997; Ichikawa et al., 2002）。

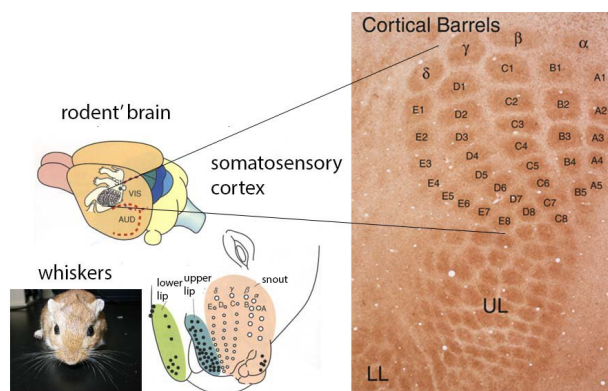
グルタミン酸は興奮性シナプス回路発達のキーワード

げっ歯類の大脳皮質の体性感覚野には、バレルと呼ばれる顔面の触覚毛に対応するシナプス回路構築があり、活動依存的な回路発達を調べるよいモデルとして世界中で解析されている（図17）。バレルも活動依存的なシナプスの刈り込み過程を経て形成される。しかも、臨界期（敏感期）とよばれる生後早期に入力線維の活動性に違いがあると、優勢なバレル皮

質は拡大し、近傍の劣勢なバレル皮質は縮小する“臨界期可塑性”と呼ばれる興味深い現象も観察できる。

図 1 7 げっ歯類の洞毛と体性感覚野のバレル

げっ歯類の上顎部には長い洞毛 whisker、上唇・下唇には短い洞毛が、鋭敏な触覚毛として機能している。その 1 本 1 本の配列に対応して番地付けもできる。大脳皮質の体性感覚野には、バレル barrel と呼ばれる特定の洞毛の体性感覚を処理するシナプスが集合体を形成している。同様の配列パターンは視床 VPM 核と三叉神経核にも観察され、それぞれバレイド barreloid バレレット barrelette と呼ばれる。



GluD2 欠損マウス解析と同時進行していた三品先生との共同研究に、NMDA 型グルタミン酸受容体 GluN2B (GluR2) 欠損マウスにおけるバレルの形成障害があった (Kutsuwada et al., 1996)。この研究がきっかけとなって、小脳と並行しつつ大脳皮質のシナプス回路発達研究にも参画することになった (Takasaki et al., 2008; Yamasaki et al., 2014)。

ここで重要なことは、平行線維シナプスも登上線維シナプスも、バレルを構築するシナプスも、グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスである。つまり、シナプス前部からグルタミン酸が放出され、シナプス後部のグルタミン酸受容体が活性化される。その結果、イオンチャネル型グルタミン酸受容体を活性化し、陽イオンが流入して興奮性シナプス後部電位を発生させる。プルキンエ細胞に豊富に発現する代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 や大脳皮質に豊富な mGluR5 を活性化すれば、細胞内 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} 放出が起こる。つまり、異種シナプス間や同種シナプス間の発達競合が活動依存的であるならば、シナプス活動に伴って発生する膜電位変化や生化学的変化がその選別機構になりうることは予見可能である。しかし、実際に遺伝子欠損マウスの回路表現型を見るまでは半信半疑であった。

小脳と大脳におけるシナプス回路発達の相似性

現在までに、下表にまとめるような、小脳と大脳におけるシナプス回路発達の相似性が明確になっている。

活動依存的なシナプス刈り込みによる優勢なシナプスの強化と劣勢なシナプスの除去には、NMDA 型グルタミン酸受容体や P/Q 型カルシウムチャネルの活性化による Ca^{2+} 流入 (Li et al., 1994; Kutsuwada et al., 1996; Iwasato et al., 2000; Miyazaki et al., 2004, 2012; Yamasaki et al., 2014) や、グループ I 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1/mGluR5) の活性

化による Ca^{2+} 流入 (Kano et al., 1997; Ichise et al., 2000; Hannan et al., 2001) が鍵を握っている。シナプス間隙に放出されたグルタミン酸を速やかに除去する輸送体には、大脳皮質のアストロサイトに優勢な GLT1 と、小脳皮質のバークマングリアに優勢な GLAST があり、いずれも細胞外グルタミン酸濃度を低く保つことにより活動依存的なシナプス刈込みの環境基盤を整備している (Takasaki et al., 2008; Miyazaki et al., 2017)。換言すれば、これらの輸送体の発現や機能を阻害すると、 Ca^{2+} 依存的なシナプス回路の刈り込みや臨界期可塑性は起こらなくなる。

一方、シナプス回路発達の原理が活動依存的な刈り込みだけでは、プルキンエ細胞における平行線維シナプスのような活動性が低く設定されているシナプスは、その成長過程においてすべて駆逐されてしまえば元も子もない。そうならないよう、特定の入力線維とのシナプス接着を強化する分子機構として、プルキンエ細胞には入力選択的なシナプス接着分子 GluD2 が付与された (Kurihara et al., 1997; Yamasaki et al., 2011; Ichikawa et al., 2016)。現在、大脳皮質バレルに豊富に発現する GluD1 が、同様の機能を果たしているのではないかと考え、研究を進めている段階である。

次回以降のコラムでは、GluD2, mGluR1, P/Q 型カルシウムチャネル、GLAST の順番に、小脳プルキンエ細胞シナプス回路発達に関する私達の研究成果を紹介する。

	小脳	大脳
グルタミン酸受容体活性後の 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇による シナプス刈込み	NMDA 型 GluR 代謝型 mGluR1	P/Q 型カルシウムチャネル 代謝型 mGluR5
細胞外グルタミン酸除去による シナプス刈込みの最適化	Glu 輸送体 GLAST	Glu 輸送体 GLT1
シナプス接着による 特定の入力との結合強化	GluD2	GluD1

◆大脳と小脳に共通するシナプス回路発達の相似性◆

7) GluD2 と 平行線維シナプス形成

分子生物学の怒涛の展開は、1989 年に最初のイオンチャネル型グルタミン酸受容体の同定に辿り着いた (Heinemann et al., 1989)。これを契機として、米国の Heinemann 研、ドイツの Seeburg 研、京都大学の中西重忠研、新潟大学の三品昌美研を中心とするクローニング競争が幕を開け、瞬く間に 18 種に及ぶ遺伝子ファミリーが同定された。その構造的相同性および機能特性から、4 種が AMPA 型グルタミン酸受容体、5 種がカイニン酸型グルタミン酸受容体、7 種が NMDA 型グルタミン酸受容体の構成サブユニットであることが明ら

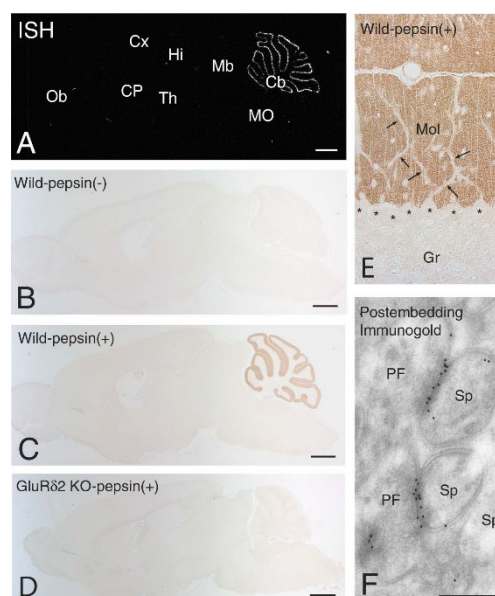
かとなった。残る GluR δ 1 と GluR δ 2 は、グルタミン酸との結合能もイオンチャネル活性もなく、機能的役割が不明なオーファン受容体として位置づけられた。今回のコラムで紹介する GluR δ 2 (統一的な命名法に従い、以後 GluD2 と表記) は、日本では三品研がドイツでは Seeburg 研がクローニングした (Araki et al., 1993; Lomeli et al., 1993)。

GluD2 の特異な発現特性

オーファン受容体であるにも関わらず、GluD2 が研究者の強い関心を引いたのは、その特異な発現特性である。それは、GluD2 は脳内では小脳プルキンエ細胞に極めて豊富に発現する細胞選択性と (Araki et al., 1993; Lomeli et al., 1993)、プルキンエ細胞が形成する二種類の興奮性シナプスのうち GluD2 は平行線維シナプスにのみ局在し登上線維シナプスには存在しないという入力選択性 (Takayama et al., 1995; Landsend et al., 1997) である (図 18)。

図 18 GluD2 の発現特性

A, *in situ* ハイブリダイゼーション法による GluD2 mRNA の検出。小脳プルキンエ細胞層に一致して白い発現シグナルが観察される。B-E, 免疫組織化学による GluD2 タンパク質の光顕レベルでの検出。ペプシン処理なしではシグナルを検出できないが (B)、ペプシン処理を加えると野生型マウスの小脳にシグナルが現れる (C)。D, GluD2 欠損マウスではシグナルは消失していることから、特異的なシグナルであることがわかる。E, 小脳 (C) の拡大図で、小脳分子層 (Mol) にシグナルが検出できる。F, 包埋後免疫電顕法により、GluD2 を標識する金コロイド粒子は、平行線維終末 (PF) とプルキンエ細胞のスパイン (Sp) の間のシナプス結合部に観察される。



前回のコラムにおいて、登上線維と同期して活動した平行線維シナプスには長期抑圧が誘導され、プルキンエ細胞に対するその‘誤った’平行線維シナプスの影響力が弱められ、これが運動プランと実行結果の間のズレを最小化させる小脳運動学習の基盤である、と紹介した。この小脳の長期抑圧は、東京大学医学部神経生理学の伊藤正男教授が理論と実験の両面から証明したシナプス可塑性であり (Ito, 2001)、この GluD2こそがその分子の実態では？と、小脳やシナプス回路の研究者の強い興味を引いたのである。

GluD2 欠損マウスの特徴的な表現型

当時、分子生物学に加え、生命科学にパラダイムシフトをもたらし始めていたもう一つの

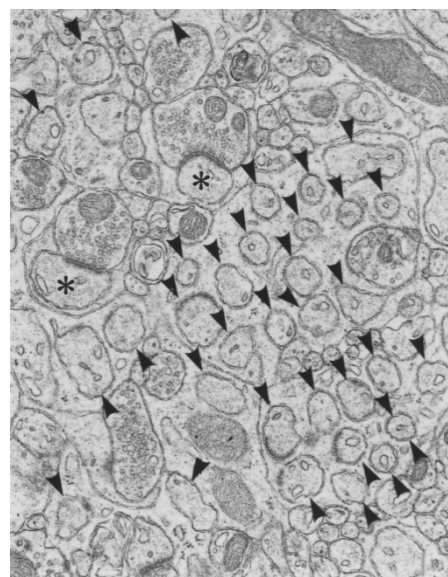
研究技法が、相同組換えを基盤とした遺伝子欠損マウスの作成である。三品教授らのグループは GluD2 のクローニングを終えると、直ちに GluD2 欠損マウスの作成に取り掛かり、その興味深い表現型を Cell 誌に報告した(Kashiwabuchi et al., 1995)。GluD2 欠損マウスは、重篤な小脳性運動失調症状を呈し、回転棒に乗せるとすぐに落下し、協調運動や運動学習に障害があった。シナプス回路を調べた結果、平行線維シナプス数が減少し、このシナプスに発現すべき長期抑圧も消失していた。また、登上線維による支配も、幼若型である多重支配のまま残存していた。これらの表現型から、GluD2 という単一の遺伝子が、シナプスの形成・成熟からシナプス可塑性・高次脳機能までを制御する鍵分子であることが証明されたのである。

GluD2 と平行線維シナプス形成

私は、GluD2 の局在が平行線維シナプスに特異的であることから、この分子の機能本質が平行線維シナプスにあると考え、それを証明するための形態生物学的解析を開始した。小脳皮質各層の面積、プルキンエ細胞や顆粒細胞の個数、スパインの密度や大きさ、シナプス結合の有無など、光顕および電顕レベルで定量形態学的解析を行った(Kurihara et al., 1997)。

図 19 GluD2 欠損マウス小脳の電子顕微鏡写真。

平行線維シナプス (*) は減少する一方、シナプス結合を持たないプルキンエ細胞の樹状突起スパイン (矢頭) が増加している



重篤な小脳失調の割には、GluD2 欠損マウスでは小脳のサイズが若干小さくなる程度で、小脳の組織像は正常で、樹状突起の枝ぶりやスパイン形成などプルキンエ細胞の形態分化もおおむね正常であった。ところが、電子顕微鏡で観察すると、シナプス結合を示さないスパインが多数出現していることが一目でわかった (図 19 の矢頭)。そこで連続電顕観察法を用いて、シナプス結合の有無を 1 つ 1 つのスパインについて調べてみた。すると、平行線維とシナプス結合を形成するスパインの割合 (結合率) は 63% で、残る 37% はシナプス結合を持たないフリースパインであった。これに対し、野生型マウスの結合率は 100% であった。このフリースパインの出現が主な原因となって、プルキンエ細胞 1 個当たりの平行線維シナプス数は野生型マウスの約半分にまで減少していることもわかった。この結合率は、小脳が未熟な生後第 1 週では欠損マウス・野生型マウスとも約 70% と低く、どちらにもフリースパインが同じレベルで存在することがわかった。シナプス形成がスピードアップする生後第 2 週になると、野生型では GluD2 のシナプス局在が顕在化し結合率もほぼ 100% に達したのに対して、GluD2 欠損マウスではむしろ低下することが明らかになった。

GluD2 欠損マウスの平行線維シナプスに現れるもう一つの形態学的表現型は、シナプス接着部位の目印となるプレシナプスのアクティブゾーンよりも、ポストシナプスのシナプス後膜肥厚の方が広いというプレ・ポスト接着のミスマッチである。これらの観察結果に基づき、GluD2 は平行線維とプルキンエ細胞の間のシナプス結合性を強化し、プレ・ポストの正確な向かい合わせ（アライメント）を媒介する分子であると結論した。この機能により、生後第 2 週を中心に作り出される莫大な数の平行線維とスパインを安定的にシナプス結合へと導き、小脳情報処理に十分な数の平行線維シナプスを生み出していると考えられる。

さらに、誘導型 GluD2 欠損マウスを用いて、正常なシナプスが完成した成体期にこの分子の欠損を誘導したところ、シナプスの GluD2 発現減少の時間的推移と一致して、樹状突起の遠位部にフリースパインとミスマッチが生じることから、成体期における平行線維シナプスの維持にも関わっていることがわかった (Takeuchi et al., 2005)。

このような GluD2 欠損マウスと相同な表現型は、平行線維を送り出す小脳顆粒細胞が産生し分泌する補体系分子 Cbln1 の遺伝子欠失マウスにも生じていることがわかった (Hirai et al., 2005)。この発見がキッカケとなり、2010 年、プルキンエ細胞のスパイン上の GluD2 と平行線維終末上のニューレキシンが、Cbln1 との選択的な分子結合を介して平行線維シナプスの接着を媒介していることが解明された (Uemura et al., 2010; Matsuda et al., 2010)。

GluD2 と登上線維支配の近位限局

GluD2 欠損マウスでは、GluD2 を発現しない登上線維側にも多重支配残存という形で表現型が起こる。一体、どこでどのような多重支配が起きているのかを知りたくて、これを次の回路研究のターゲットに決めた。

登上線維支配の古典的解析法として、登上線維の電気刺激によるプルキンエ細胞の電気生理学的応答を調べる機能的な方法と、下オリーブ核への順行性トレーサー注入(神経標識法)による形態学的方法の 2 つがある。2000 年、シナプス小胞にグルタミン酸を充填する小胞性グルタミン酸トランスポーターが同定され、そのうち VGluT2 が登上線維終末、VGluT1 が平行線維終末のマーカーとして利用できるようになり、VGluT2 免疫組織化学が第 3 の登上線維解析法となった。この目標達成のブレイクスルーとなったのが、トレーサー標識された単一の登上線維をプルキンエ細胞の細胞体から樹状突起先端部まで、千枚以上の超薄切片の連続電顕観察を行ったこと、その観察結果を光学顕微鏡レベルの VGluT2 染色で確認したことである (Ichikawa et al., 2002)。

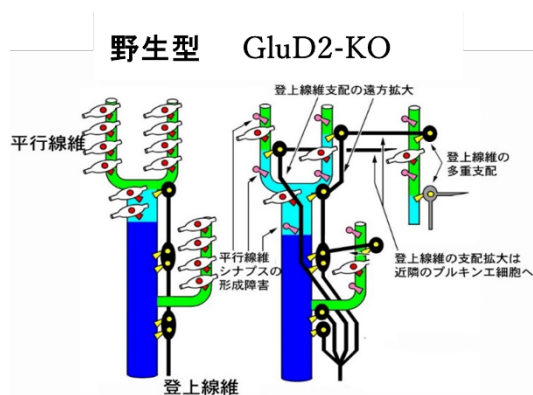
野生型では、登上線維は近位樹状突起のみを支配するため、登上線維終末は小脳分子層の約 80% に分布するが、遠位樹状突起からなる表層の 20% の分子層には及ばない。ところが、GluD2 欠損マウスでは、本来平行線維が支配する遠位樹状突起にフリースパインが出現し、このフリースパインを異所性支配する形で登上線維支配が遠位に拡大していた。さらに、この異所性支配が周囲のプルキンエ細胞にも拡大することにより、複数の登上線維による多重支配が生じていた (Ichikawa et al., 2002; 図 20)。この形態学的解析結果は、当時金沢大学にラボを構える狩野方伸教授らのグループが行ったカルシウムイメージングによる解析結

果とも一致した (Hashimoto et al.,2001)。

図 20 GluD2 欠損マウスにおけるプルキンエ細胞シナプス回路の表現型。

野生型では登上線維の単一支配と遠近に分離した平行線維と登上線維の支配テリトリーが完成している。一方、GluD2 欠損マウスでは平行線維シナプス形成が障害されてフリースパインが出現する。このフリースパインを標的として登上線維支配が遠位に拡大し、それが周囲のプルキンエ細胞にも及ぶことで多重支配が生じる。

この事例は、どのようにして登上線維の多重支配が起こるのかを電子顕微鏡レベルで 実証した世界で最初の例となった。十分な数の平行線維シナプス形成を保証する GluD2 は、同時に登上線維支配の過度な遠位化を抑止している。要するに、平行線維と登上線維はプルキンエ細胞の樹状突起支配をめぐって競合しており、GluD2 は平行線維側のシナプス強化分子として機能している。そうであるならば、登上線維側にもその支配を強化し平行線維支配の過度な近位化を抑止している分子機構があるはずであり、それに気づいたことで 9 回目のコラムの研究テーマにつながった。



8) mGluR1 とシナプス刈込み

1995 年、東京大学で開催された重点領域研究「神経可塑性の分子機構」の班会議の終了後、同大に異動していた班長である三品先生のラボを訪れた。そこで出会ったのがドイツ留学から帰って間もない狩野方伸先生で、帰りがけに東京駅の地下街で軽く飲んだ。彼との出会いはその時が初めてで、以前から付き合いのあった新潟大学の崎村先生も加わり、以後 30 年間続く発生工学—神経生理学—神経解剖学の濃密な連携によるシナプス回路発達の共同研究が始まった (図 21)。

図 21 発生工学 (崎村建司、左) —神経生理学 (狩野方伸、中央) —神経解剖学 (筆者、右) によるシナプス回路発達研究のトライアングル。

それぞれのラボメンバーも加えると、それなりの規模の研究体制が構築された。米国ワシントン DC にて撮影。

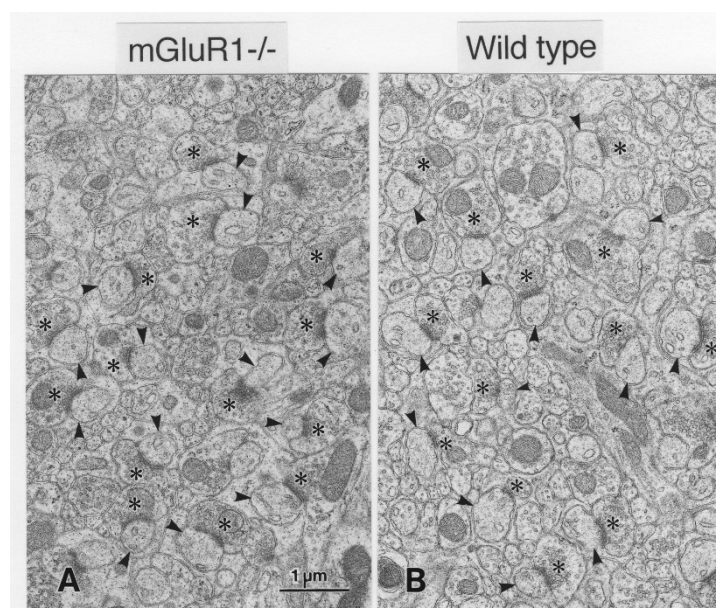


間もなく、私の下に遺伝子欠損マウスが次々と届けられ、瞬く間に「mGluR1(Kano et al., 1997)—Gαq(Offermanns et al., 1997)—PLCβ4 (Kano et al., 1998)—PKCγ(Kano et al., 1995) シグナル伝達系による登上線維シナプス刈込みの分子機構解明」という神経科学の金字塔的研究成果が組み立てられ、世界に冠たる狩野ラボが確立した。この一連の共同研究において私がやったことは、「平行線維シナプスは正常に形成されている」ことを示す電子顕微鏡解析のみで(図22)、それ以上何もすることがなかった。

今回のコラムは、平行線維シナプスの形成と登上線維シナプスの刈込みの関係から話を始めたい。

**図22 mGluR1 欠損マウス
(左)と野生型マウス(右)
小脳の電子顕微鏡写真。**

平行線維シナプス(矢頭はプルキンエ細胞スパイン、星印は平行線維終末を示す)の数的な違いは認められない。また、GluD2 欠損マウスに見られたようなフリースパインや、プレ・ポストの結合ミスマッチなどの形態の質的異常も認められない。



平行線維シナプスの形成と登上線維シナプスの刈込み

コラム6において、私が赴任した北大解剖学教室には、リーラーマウス、ウィーバーマウス、スタゲラマウスなどの自然発症の小脳奇形マウスがいて、研究に用いていたことに触れた。特定の遺伝子を人為的に改変した個体を作成する技術が一般化する1990年代よりも前の時代は、遺伝子の突然変異により表現型が変化したマウスやラットを維持し系統化し、これを愛玩動物として飼育し(寺島、2020年)、天与の研究材料として用いていた(Sotelo, 1990)。上記の小脳奇形マウスは、細胞移動障害、小脳の顆粒細胞死、プルキンエ細胞樹状突起の分化異常とそれぞれ病因は異なるものの、顆粒細胞とプルキンエ細胞の間のできる平行線維シナプスの形成障害が起こるという共通点があった。フランスの研究者たちがこれらの小脳奇形マウスの登上線維支配を電気生理学的に調べたところ、幼若期に見られる多重支配が残存していることを発見した(Crepel, 1982; Mariani, 1982)。これにより、「余剰な登上線維シナプスの刈込みには平行線維シナプス形成が必須である」という概念が提唱され、樹立されていた。平行線維シナプス数が半減し登上線維の多重支配が残存するGluD2欠損マウスも、これら古典的小脳奇形マウスと同じ部類に属する。

これに対して、狩野先生らが明らかにした mGluR1 シグナル伝達系の欠損マウスは、「平行線維シナプス形成が正常であっても、登上線維シナプスの刈込み障害が起こる」ことを示す最初のモデル動物となった。この発見により、余剰な登上線維シナプスの刈込みを駆動する機能的分子実体が mGluR1 シグナル伝達系であり、その活性化のために十分な数の平行線維シナプスの形成が必要であったと理解できる。要するに、登上線維シナプスの刈込みを駆動する分子機構は、GluD2 に代表される平行線維シナプス形成を促進するシナプス接着機構と、平行線維終末から放出されるグルタミン酸により活性化される mGluR1 シグナル伝達機構の二段階からなっていることが判明したのである。

mGluR1 シグナル伝達系

mGluR1 はプルキンエ細胞に豊富な代謝型グルタミン酸受容体で、その活性化は細胞内カルシウムストアからの Ca^{2+} 放出や、蛋白リン酸化反応を引き起こす。シナプス後電位の発生に関わるイオンチャネル型グルタミン酸受容体がシナプス結合部のシナプス後膜に密集するのに対して、mGluR1 はスパインのシナプス外膜に存在し、特にシナプスの後膜と外膜の境界部（ペリシナプス）に密集するという特異な分布特性を有する (Baude et al., 1993)。

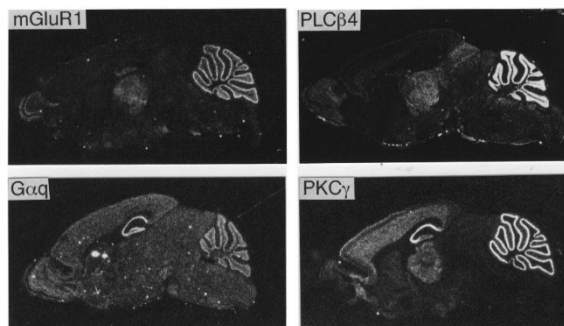
mGluR1 に共役する Gq タンパク質と、Gq タンパク質 α サブユニットにより駆動される効果器酵素のホスホリパーゼ C β (PLC β) には、それぞれ4種のサブタイプがある。そのうち G α_q と PLC β_4 がプルキンエ細胞にドミナントなサブタイプである (図 23)。いずれも、mGluR1 と同様にペリシナプスに集積する分子局在を示し、ここで情報伝達のためのシグナロームを形成している (Tanaka et al., 2000; Watanabe et al., 1998; Nakamura et al., 2004)。PLC β_4 により細胞膜のイノシトールリン脂質が分解され、ジアシルグリセロール (DAG) とイノシトール 3 リン酸 (IP $_3$) という2つのセカンドメッセンジャーが生成される。IP $_3$ は細胞内カルシウムストアである ER 膜上の IP $_3$ 受容体に結合し、 Ca^{2+} 放出を媒介する。一方、DAG と Ca^{2+} により C キナーゼ (PKC) が活性化し、蛋白リン酸化反応が亢進する。PKC にも数種類のサブタイプが存在するが、PKC α や PKC γ がプルキンエ細胞に豊富に発現し (図 23)、活性化に際して細胞質から細胞膜にトランスロケートして DAG と結合する。

これら mGluR1、G α_q 、PLC β_4 、PKC γ の遺伝子欠損により、平行線維シナプスは正常に形成されるにも関わらず、登上線維の多重支配が残存するという共通の表現型を捉えたということである。

図 23 プルキンエ細胞に豊富な mGluR1 シグナル伝達系

マウス脳矢状断切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析による mGluR1、G α_q 、PLC β_4 、PKC γ をコードする mRNA の発現。

mGluR1 シグナル伝達系と登上線維シナプス刈込み



生まれたばかりの新生児マウスでは、プルキンエ細胞の細胞体は同様のシナプス強度を持つ数本の登上線維により多重支配されている (Hashimoto and Kano, 2003)。生後 3 日目 (postnatal day 3, P3) から P7 までの間に、その中の一本の登上線維に選択的な機能強化が起こり、活動性に強弱差が現れる (Hashimoto and Kano, 2003; Kawamura et al., 2013)。P9 になると、強化された「勝者」の登上線維のみが、成長伸展する樹状突起を這い上がり、神経支配領域を拡大する (Hashimoto et al., 2009; Carrillo et al., 2013; Ichikawa et al., 2016)。一方、細胞体に残った「勝者」と「敗者」の登上線維シナプスは P8 から P17 頃までに排除される。この細胞体シナプスの刈込みにおいて、P12 前後から始まる後期刈込み過程において、平行線維シナプス形成とそれに引き続く mGluR1 シグナル伝達系の活性化が主要な役割を果たしているのである。

GluD2 欠損により多重支配を招く余剰な登上線維シナプスは、フリースパインが生じる遠位樹状突起を標的として異所性支配が生じ、いわゆる「遠位型」の多重支配が起きることは前回のコラムで紹介した。それでは、mGluR1 シグナル伝達系の欠損による登上線維の多重支配は、どこでどのようにして起こるのか？これに答えるための形態生物学的解析を開始して 20 年程を要し、定年退職を迎える 2025 年になって論文投稿の目処が立ち、受理に至った (Yamasaki et al., 2026)。

mGluR1 シグナル伝達系と平行線維シナプス刈込み

プルキンエ細胞における平行線維と登上線維による興奮性シナプス回路の特徴は、遠近方向に分離した支配テリトリーと登上線維の単一支配である。支配テリトリーの分離が、平行線維シナプスの刈込みにより生じることを見つけた (Ichikawa et al., 2016)。

野生型マウスのプルキンエ細胞を支配する平行線維シナプスと登上線維シナプスを、連続電子顕微鏡観察法により P7~P30 まで追求した。「勝者」の登上線維が樹状突起に這い上がる P9 よりも前の段階では、樹状突起のほぼ全域を平行線維シナプスが支配している。この状態は、「勝者」の登上線維が樹状突起に這い上がった後の P15 まで続くため、P9~P15 の樹状突起は平行線維支配と登上線維支配が仲良くオーバーラップしている。P20 になって初めて、樹状突起近位部から平行線維シナプスが刈込まれ、登上線維支配と平行線維支配が遠近方向に分離するのである。平行線維シナプスが刈込まれた証拠に、平行線維終末とのシナプス結合を失ったフリースパインが P15 から P20 の近位樹状突起に一過性に出現する。

一体、平行線維シナプスを刈込む分子機構は何であるのか？平行線維シナプス刈込みが起こる P15~P20 は、mGluR1 シグナル伝達系による登上線維シナプスの後期刈込み過程の時期と一致することから、この伝達系にねらいを定めた。そこで、いつものように東京大学の饗場篤先生に連絡すると、mGluR1 欠損マウスと PKC γ 欠損マウスが供与された。予想は当たり、これらの欠損マウスでは P15~P20 に起こるべき平行線維シナプス刈込みが障害され、P30 になっても支配テリトリーの分離は起こらなかった。反対に、ウイルスベクターを使って mGluR1 欠損マウスに mGluR1 を導入すると、平行線維シナプス刈込みは回復した。

これまでのこの伝達系の小脳回路発達研究や、mGluR1 の機能や発現の低下を病因とする

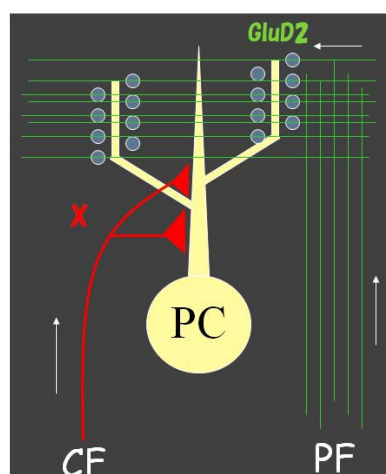
小脳脊髄変性症などの疾患研究を通して (Yamasaki et al., 2021)、シナプス刈込みやシナプス機能における mGluR1 シグナル伝達系の役割と重要性について、繰り返し思い知らされている。

9) P/Q 型カルシウムチャネルとシナプス刈込み

P/Q 型カルシウムチャネルに着眼したきっかけは、7 回目のコラムで紹介した GluD2 の研究に端を発する。GluD2 欠損マウスでは、平行線維が支配すべき遠位樹状突起にシナプス形成障害が起きて、そこに生じたフリースパインを標的として登上線維支配に遠位拡大が起こる (Kurihara et al., 1997; Ichikawa et al., 2001)。この現象から、平行線維と登上線維の2種類の興奮性入力によるシナプス形成は、互いに競合していることに気がついた。つまり、平行線維支配の強化分子である GluD2 がなくなると登上線維の支配が強まるならば、登上線維側にもその支配を強化する分子機構 X があり、平行線維支配の過度な近位拡大を抑止しているはずである (図 24)。運動会での綱引き競争に例えると、両チームの牽引力が釣り合うと綱の結節点は動かないが、一方の牽引力が弱くなれば結節点は牽引力の強い方へとズルズルと移動する。平行線維支配が遠位で登上線維支配が近位に分離しているという回路形態は、単に自然とそうになっているのではなく、競合という動的平衡の上に立って結果的にそうになっている。そう考えて、すぐに思い当たった分子機構 X の最有力候補が、P/Q 型カルシウムチャネルである。

図 24 登上線維支配の強化機構 X

平行線維支配の強化機構である GluD2 が欠損すると、平行線維支配が弱まり、登上線維支配が遠位に向かって拡大した。同様に、登上線維支配の強化機構 X が欠失すれば、登上線維支配が弱まり、平行線維支配が近位に向かって拡大するであろう、と予測できる。



P/Q 型カルシウムチャンネルに着眼した理由

この分子に着目したのは、以下の3つの特性による。

第1に、このカルシウムチャンネルはプルキンエ細胞に非常に豊富で、このニューロンのカルシウム電流の90%以上を占めている。そのため、P/Q型カルシウムチャンネルの欠損は、この細胞の Ca^{2+} 動態とそれに基づくニューロン機能を大きく変化する。

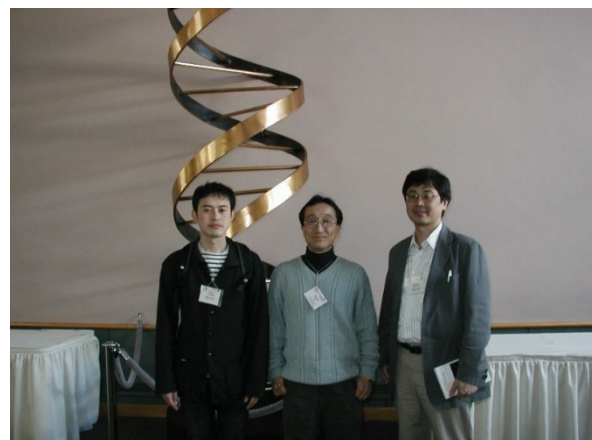
第2に、通常カルシウムチャンネルは軸索の終末部に分布して、プレシナプス側からの神経伝達物質の放出に関わっている。ところが、P/Q型カルシウムチャンネルはプルキンエ細胞の樹状突起にも豊富に分布して、細胞外からポストシナプス側への Ca^{2+} 流入も媒介する。一次視覚野や一次体性感覚野などの感覚性大脳皮質のシナプス回路発達において、視床皮質投射線維間の活動依存的なシナプス刈込みを駆動しているのが、NMDA型グルタミン酸受容体を介する Ca^{2+} 流入である (Li et al., 1993; Kutsuwada et al., 1996)。一方、プルキンエ細胞は、発達初期をすぎるとNMDA受容体を持たなくなる例外的なニューロンである (Watanabe et al., 1994c)。これらの状況証拠を考慮すると、P/Q型カルシウムチャンネルがプルキンエ細胞のシナプス刈込みにおいてその役割を担っているのではないかと考えた。

第3に、このカルシウムチャンネルは高閾値型に分類され、その活性化には強い脱分極が必要である。1本の登上線維は、プルキンエ細胞の近位樹状突起に巻き付きながら数百もの興奮性シナプスを形成することから、単発の登上線維の活動により数百個もの登上線維シナプスからグルタミン酸が同時放出され、複合スパイクと呼ばれる複合発火現象が生じる (Kano et al., 1992; Konnerth et al., 1992)。この強い脱分極作用が、平行線維に対抗する登上線維側の強化分子機構としてふさわしい、と考えた訳である。

そこで、P/Q型カルシウムチャンネルのチャンネル本体をコードする $\alpha 1A$ サブユニットのノックアウトマウスを韓国のShin教授から供与を受け、狩野方伸教授らと共同してP/Q型カルシウムチャンネル欠損マウスの解析を開始した (図25)。この研究を担当したのが当時博士課程大学院生の宮崎太輔君 (現、北海道大学保健科学研究院准教授) であり、学位論文提出締切りの前日となる2003年12月に論文受理の連絡が届き、無事医学博士の学位も取得にもつながった (Miyazaki et al., 2004)。

図25 2004年4月に開催された米国ワールド・スプリング・ハーバー研究所でのスナップショット

左から、宮崎太輔、Hee-Sup Shin 教授、筆者。この時、P/Q型カルシウムチャンネルの論文報告を行い、感謝の気持ちをShin教授に直接伝えることができた。



登上線維支配の形態学的解析法の開発

P/Q 型カルシウムチャネル欠損による表現型を紹介する前に、この研究のために宮崎先生が開発した登上線維支配様式可視化のための 3 重標識法を紹介したい (Miyazaki & Watanabe, 2011)。

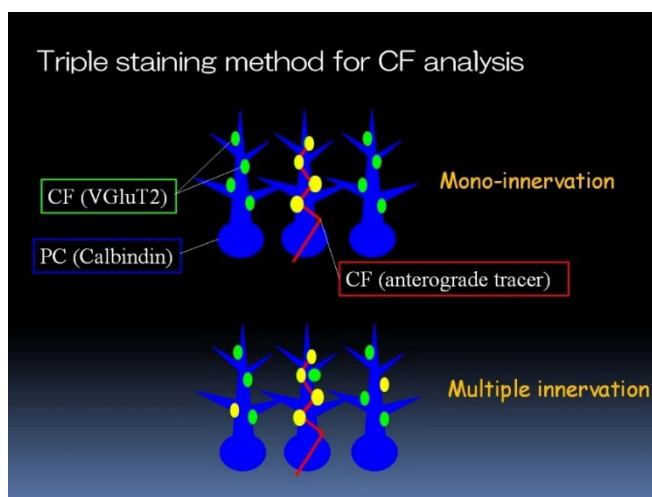
20 世紀における登上線維解析には生理学と解剖学の研究法があり、登上線維を選択的に可視化する解剖学研究法としては順行性神経トレーサーしかなかった。この方法では、まず登上線維の起始核である延髄下オリーブ核にトレーサーを注入し、数日後トレーサー標識された登上線維を小脳で観察する。先行して行っていた GluD2 欠損マウスの登上線維支配の解析では、トレーサー標識された登上線維を千数百枚の連続電子顕微鏡観察法により追跡することで、登上線維の多重支配を世界で初めて電顕レベルで示すことができた (Ichikawa et al., 2001)。

2000 年に入り、グルタミン酸をシナプス小胞に充填する小胞膜グルタミン酸輸送体が 3 種類同定され (Ni et al., 1994; Aihara et al., 2000; Gras et al., 2002; Takamori et al., 2000)、このうち VGluT2 が登上線維終末に VGluT1 が平行線維終末に発現することから、免疫組織化学的に両者を識別することが可能になった (Miyazaki et al., 2003)。そこで、トレーサー標識登上線維の連続電顕に代わる、より簡便な解析法として、VGluT2 の蛍光標識/登上線維のトレーサー蛍光標識/プルキンエ細胞樹状突起の蛍光標識にトライした。この方法により、登上線維の多重支配と単一支配の判別と、多重支配における余剰な登上線維シナプスの同定が容易に行えるようになり (図 26)、登上線維支配の新たな解剖学的解析法が確立した。

図 26 VGluT2 蛍光標識/トレーサー
蛍光標識/ プルキンエ細胞蛍光標識
による新たな登上線維解析法

蛍光標識デキストランビオチン (赤) を下オリーブ核に投与し、一部の登上線維とその終末を赤色に蛍光標識する。数日後、小脳の固定切片を作成し、すべての登上線維終末を VGluT2 抗体で緑色に、プルキンエ細胞の細胞体と樹状突起をカルビンジン抗体により青色に標識する。

単一支配であれば、トレーサー標識された登上線維により支配されるプルキンエ細胞上の登上線維終末は赤と緑の融合色である黄色に、トレーサー未標識の登上線維により支配されるプルキンエ細胞上の登上線維終末は緑色となって、細胞ごとに分離する (上段)。一方、多重支配であれば、黄色と緑色の登上線維終末が 1 個の細胞に混在し、その位置から余剰な登上線維支配の位置も特定できる (下段)。



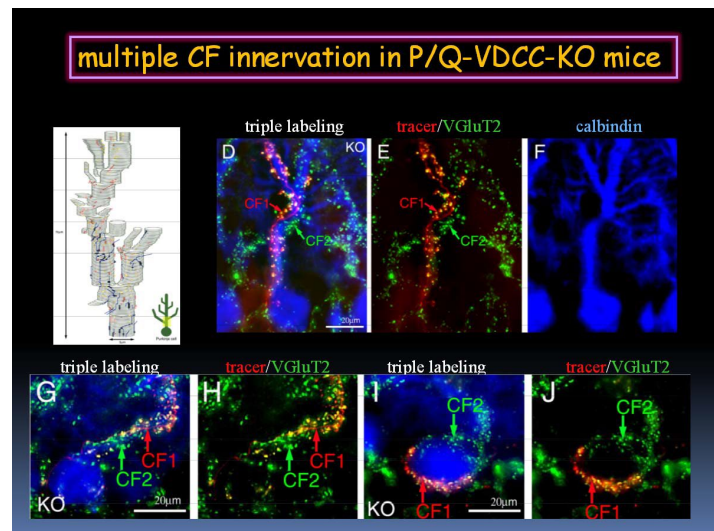
P/Q 型カルシウムチャネルとシナプス刈込み

P/Q 型カルシウムチャネル欠損マウスでは、GluD2 欠損マウスとは正反対の表現型、すなわち登上線維支配の近位退縮と平行線維支配の近位拡大を観察でき、予想は見事に的中した(Miyazaki et al., 2004)。

つまり、P/Q 型カルシウムチャネル欠損マウスでは、登上線維による近位樹状突起の支配が弱まり、登上線維の分布範囲も分子層の半分程度にまで減少した。一方、近位樹状突起や細胞体から異所性のスパインが多数派出し、その多くを VGluT1 陽性の平行線維終末が支配していた。前回のコラムにおいて、正常発生過程において平行線維シナプスはまず樹状突起の全域に形成され、生後 15—20 日の間に近位樹状突起から平行線維シナプスの刈込みが生じることを解説した。要するに、P/Q 型カルシウムチャネル欠損マウスでは、mGluR1 欠損マウスと同様にこの刈込みが障害される結果として、平行線維支配の近位拡大が生じたものと解釈することができる。

図 27 P/Q 型カルシウムチャネル欠損マウスにおける近位型の登上線維多重支配

黄色のトレーサー陽性/VGluT2 陽性登上線維と、緑色のトレーサー陰性/VGluT2 陽性の登上線維による多重支配が、近位樹状突起や細胞体で生じている。



P/Q 型カルシウムチャネル欠損マウスの小脳失調はきわめて重篤で、登上線維による多重支配の程度も電気生理学的解析では 80%以上、解剖学的解析では全てのプルキンエ細胞において生じていた。3 重染色による解析により、P/Q 型カルシウムチャネル欠損マウスでは、プルキンエ細胞の近位樹状突起と細胞体において、トレーサー陽性/VGluT2 陽性の登上線維とトレーサー陰性/VGluT2 陽性の登上線維が混在して多重支配する様子を観察した(図 27)。

これらの所見は、蛍光顕微鏡の画像のデコンボリューション処理による低解像度の画像で、解析したマウスも受精卵のときから遺伝子を欠損している完全欠失型遺伝子欠損マウスであるため、この表現型の原因の詳細は不明な点も多く残った。その後、三品教授や崎村教授らがプルキンエ細胞選択的な遺伝子欠損マウスを開発し、プルキンエ細胞選択的な P/Q 型カルシウムチャネル欠損マウスにおいて、完全欠失型でみられたほとんどの表現型が再現され、プルキンエ細胞のポストシナプス側への Ca^{2+} 流入が活動依存的なシナプス刈込みを

制御していることが明らかになった (Hashimoto et al., 2011; Miyazaki et al., 2012)。この間に顕微鏡も進歩していて、3 波長レーザーによる共焦点レーザー顕微鏡による高精細な解析により証明することができた。現在、薬剤誘導によるプルキンエ細胞選択的な成体期に P/Q 型カルシウムチャネル欠損マウスの解析も進めており、論文がまとまった段階で追加記載を行いたい。

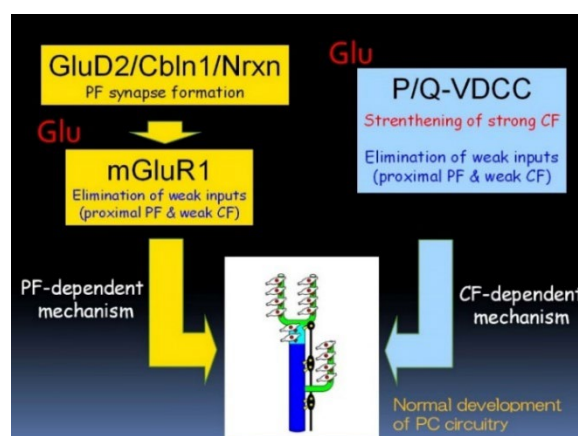
前回のコラムと合わせ、mGluR1 の活性化による細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出と P/Q 型カルシウムチャネルの活性化による細胞外からの Ca^{2+} 流入が、プルキンエ細胞における活動依存的なシナプス刈込みの駆動原理となっていることを解明できた。

10) グルタミン酸トランスポーターとシナプス刈込みの最適化

これまで取り上げてきた GluD2, mGluR1, P/Q 型カルシウムチャネルによる回路発達制御機構を入力経路に沿って整理すると、シナプス刈込みが平行線維側と登上線維側の二つの経路から成り立っていることがわかる (図 28)。ここでのシナプス刈込みとは、一本の「勝者」登上線維の支配を強化し、これが支配する領域から相対的に劣勢な入力 (余剰な登上線維と近位樹状突起を支配する平行線維) を除去する機構を指す。

図 28 入力選択的なシナプス刈込み機構による競合と協働

ペリシナプスに集積する mGluR1 の活性化には、頻回の平行線維活動によりシナプス間隙からシナプス外に漏れ出る十分な量のグルタミン酸放出が必要と考えられている (Baude et al., 1993)。一方、樹状突起を支配する「勝者」の登上線維は数百個のシナプスからグルタミン酸が同時放出され、P/Q 型カルシウムチャネルを活性化する。この二つの経路が健全に競合し協働することで、プルキンエ細胞のシナプス回路が正常に発達する。



入力選択的なシナプス刈込み機構

平行線維の経路は2ステップからなる。まず、平行線維終末とプルキンエ細胞スパインの間のシナプス間隙に GluD2/Cbln1/Neurexin からなる接着分子の分子架橋が構築され、平行線維シナプス形成を強化する。次に平行線維シナプスにおいて、mGluR1 の十分な活性化が起こることによって劣勢な入力刈込まれる。これに対し、数百からなる登上線維シナプスの同時発火による強い脱分極作用は P/Q 型カルシウムチャネルを活性化し、これが「勝者」登上線維の強化と劣勢な入力の刈込みを駆動する。シナプス刈込み機構がそれぞれの入力系

に装備され、どれか一つの分子でも欠損するとプルキンエ細胞のシナプス回路発達が障害される（ここでは、登上線維の単一支配と遠近方向に分離した支配テリトリーが発達しないこと）という事実は、この二つの経路は相互に競合しつつ協働していることを物語る。

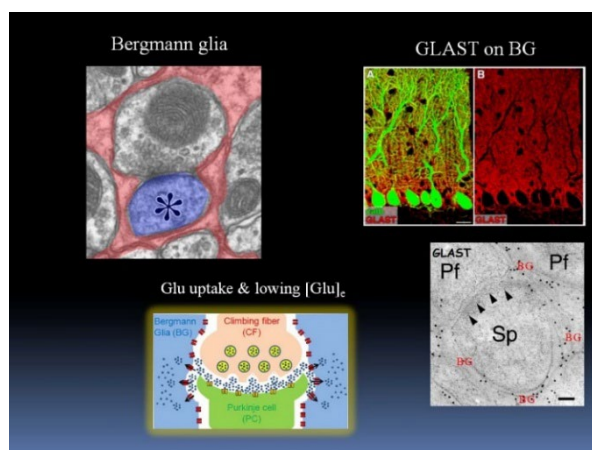
この構図において、次に問題となるのは、平行線維側の mGluR1 の活性化を引き起こすのも、登上線維側の P/Q 型カルシウムチャネルの活性化を引き起こすのも、それぞれの終末から放出されるグルタミン酸であることである。高密度のシナプス環境において、大量のグルタミン酸があちこちのシナプスから放出され、シナプス外にスピルオーバーしてクロストークが起これば、競合の入力選択性が損なわれることになる。例えるなら、静謐な環境であれば適切に聞き分けられる音や声が、ノイジーな環境では音源の位置から音圧の大小までも判別困難になってしまう。しかし、私達の聴覚系には、雑音の中でも自分が必要とする音声を選択し聞き取る処理能力が備わっていて、カクテルパーティー効果と呼ばれる。プルキンエ細胞にこのような入力選別機構があるなら、それはシナプス間隙に放出されたグルタミン酸を除去するグルタミン酸トランスポーターGLASTであろうと着眼した。

バーグマングリアと GLAST

バーグマングリアは、プルキンエ細胞の成長から機能発現までずっと寄り添い、特別なニューロン・グリア相互作用を築いているアストロサイトである。生後早期、プルキンエ細胞の樹状突起はバーグマングリアの放射状突起に沿って伸展し枝分かかれし、シナプスが形成されると忽ちグリアの薄片状突起でシナプスを包み込む (Yamada et al., 2000; Yamada & Watanabe, 2002)。その結果、プルキンエ細胞の細胞体、樹状突起、シナプスは完全にバーグマングリアの細胞突起により取り囲まれている。しかも、その細胞膜上に GLAST が高濃度に発現することから、平行線維シナプスや登上線維シナプスから放出されるグルタミン酸を速やかに除去する (図 29)。取り込まれたグルタミン酸は、グルタミン合成酵素によりグルタミンに転換されるため、グリア細胞内のグルタミン酸濃度は低く保たれ、取り込み能は飽和せずに維持される。変換されたグルタミンには伝達作用もなく、細胞外に排出され再び神経終末に取り込まれてグルタミン酸に再変換される。このリサイクルシステムはグルタミン酸・グルタミンサイクルと呼ばれ、高頻度刺激の状態でも神経終末におけるグルタミン酸の枯渇を防ぐと同時に、シナプス間隙や細胞外空間のグルタミン酸濃度を低く保ち、シナプス伝達機能を維持し、過度なグルタミン酸による興奮毒性からニューロンを守っている。

図 29 バークマングリアと GLAST

左上の電子顕微鏡写真は、平行線維シナプス（プルキンエ細胞の樹状突起スパインを青と*で示す）を、バーグマングリアの薄片状突起（赤）が完全に覆っていることを示



す。右上の蛍光顕微鏡写真は、カルビンジンにより染色されたプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起（緑）が、GLASTを発現するバグマングリアの細胞膜（赤）で完全に覆われていることを示す。

右下の免疫電顕写真は、平行線維シナプス（Pfは平行線維終末、Spはプルキンエ細胞の樹状突起スパイン）を取り囲むバグマングリアの薄片状突起にGLASTの局在を示す金コロイドが多数観察される。左下の模式図は、GLASTによるグルタミン酸の除去機能により、ペリシナプスやシナプス外のグルタミン酸受容体の活性化には、強い入力線維の活動によるシナプス外へのグルタミン酸漏出が必要であることを理解できる。

GLASTによるシナプス刈込みの最適化

シナプス回路発達におけるGLAST欠損マウスの表現型解析に、足掛け15年ほどかかった（Miyazaki et al., 2017）。その間、東京医科歯科大学（2024年10月から東京科学大学に改称）難治疾患研究所の田中光一教授にはずっとお世話になった。

GLAST欠損マウスにおけるプルキンエ細胞の回路表現型は、mGluR1欠損マウスやP/Q型カルシウムチャネル欠損マウスと共通で、シナプス刈込みに障害が起こっていた。つまり、「勝者」の登上線維の支配力が弱まり、劣勢な登上線維による多重支配が起こり、平行線維シナプスの刈込みも障害されていた。同様の表現型は、野生型マウスにグルタミン酸輸送体の阻害剤TBOAの投与により再現され、GLASTによるグルタミン酸除去機能がシナプス刈込みに必須であることを再確認できた。

一方、シナプス刈込み障害が現れる時期は異なっていた。mGluR1欠損マウスやP/Q型カルシウムチャネル欠損マウスでは、シナプス回路の発達期（生後3週間）から回路異常が発生したのに対して、GLAST欠損マウスにおける回路異常の多くは回路形成が完了した後に現れ、時間経過とともに増悪していった。この時間的表現型の違いや、GLASTがシナプス回路そのものではなくこれを取り囲むグリア細胞に発現している事実も考え合わせると、GLASTによる細胞外グルタミン酸除去機能は、mGluR1やP/Q型カルシウムチャネルによるシナプス刈込み機能を十分に発揮するための環境を用意している、つまり細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇機構によるシナプス刈込み機能を最適化していると解釈することができる。

グルタミン酸トランスポーターと活動性の格差付け

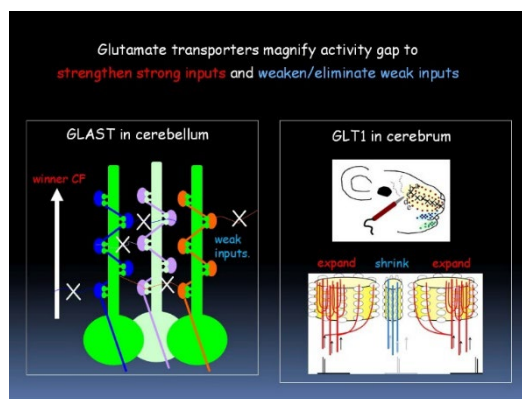
マウスやラットなどのげっ歯類大脳皮質の体性感覚野に構築されるバレルは、視床からの投射線維と皮質第4層の有棘星状細胞の間のシナプス刈込みよりも早期に形成される。また、生後から4～5日以内の時期は体性感覚野の臨界期として知られ、この時期に外界から刺激を脳に伝える感覚神経に傷害を与えると、活動性の高いバレルは拡大し、劣勢なバレルは縮小する。この現象は臨界期可塑性と呼ばれ、「三つ子の魂百まで」や「可愛い子には旅をさせよ」などの格言で知られる、幼少期の脳機能発達における環境・経験・教育・訓練などの重要性の神経学的基盤と考えられている。

我々は、バレルの発達過程において、大脳皮質のグリア細胞に高濃度に発現するグルタミ

ン酸トランスポーターGLT1 がこの臨界期可塑性を制御し、GLT1 が欠損すると優勢なバレルは拡大せず、劣勢なバレルは縮小しなくなることを報告した (Takasaki et al., 2008)。一方、シナプス刈込みによるバレルの形成にはイオンチャネル型の NMDA 型グルタミン酸受容体や代謝型の mGluR5 が制御することが知られていたが (Li et al., 1993; Kutsuwada et al., 1996; Iwasato et al., 2000; Hannan et al., 2001)、GLT1 欠損によるシナプス刈込みへの影響は見られなかった。

小脳と大脳では、グルタミン酸トランスポーターのシナプス刈込みへの関与は、一見すると異なっている。しかし、優勢な入力系を強化し、劣勢な入力系を弱化し除去するという、活動性の違いを効率的にシナプス刈込みに反映させるという点では共通している (図 30)。繰り返しになるが、細胞外グルタミン酸濃度を低く保つという機能は、小脳では「勝者」の登上線維の支配を拡大し、相対的に劣勢な登上線維や近位樹状突起の平行線維シナプスを刈込む。大脳皮質の体性感覚野では優勢な視床・皮質投射系の投射域を拡大し劣勢な投射系を縮小させている。おそらく、活動依存的なシナプス刈込みににおける細胞外グルタミン酸濃度制御系の寄与度が小脳と大脳で異なっているものの、それぞれの領域で入力線維間の活動性の違いを回路表現型として最大化 (最適化) して反映するためには、グルタミン酸トランスポーターの働きが同様に不可欠なのだろうと考える。

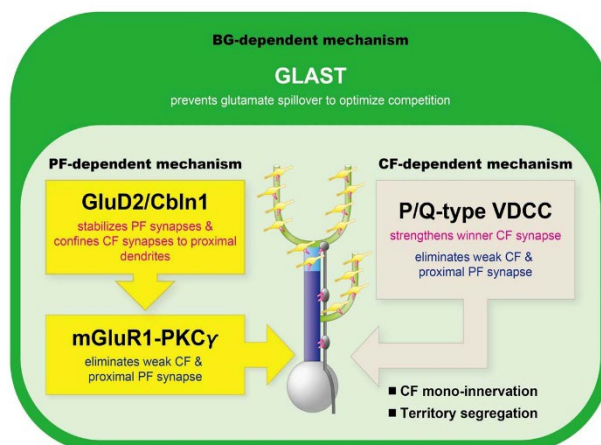
図 30 小脳と大脳の回路発達におけるグルタミン酸トランスポーターの役割



GLAST と GLT1 は、それぞれ小脳と大脳皮質に発現するグリア型グルタミン酸トランスポーターである。小脳プルキンエ細胞では「勝者」の登上線維の支配を促進し、それ以外の劣勢な入力を除去する。大脳皮質の体性感覚野では活動性の高い入力投射する優勢なバレルにおけるシナプス回路を拡大し、劣勢なものを縮小させる。

後半 5 回に渡り紹介してきた形態生物学のコラムを総括すると、図 28 に示す入力選択的なシナプス刈込み機構を、グルタミン酸のスピルオーバーを防ぐ GLAST を発現するバグマングリアがすっぽりと囲んでいる構図が完成する (図 31)。

図 31 グルタミン酸シグナル伝達系による小脳シナプス回路発達の制御機構



(以上、形態生物学への道)

文献

- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J. Molecular cloning of a novel brain-type Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 74:2622–2625, 2000.
- Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, Mishina M. Selective expression of the glutamate receptor channel $\delta 2$ subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 193:1267-1276, 1993.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA, Somogyi P. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11: 771-787, 1993.
- Baude A, Molnár E, Latawiec D, McIlhinney RA, Somogyi P. Synaptic and nonsynaptic localization of the GluR1 subunit of the AMPA-type excitatory amino acid receptor in the rat cerebellum. *J Neurosci* 14:2830-2843, 1994.
- Baude A, Nusser Z., Molnár E, McIlhinney RA, Somogyi P. High-resolution immunogold localization of AMPA type glutamate receptor subunits at synaptic and non-synaptic sites in rat hippocampus. *Neuroscience* 69:1031-1055, 1995.
- Carrillo J, Nishiyama N, Nishiyama H. Dendritic translocation establishes the winner in cerebellar climbing fiber synapse elimination. *J Neurosci*. 33:7641-7653, 2013.
- Crepel F. Regression of functional synapses in the immature mammalian cerebellum. *Trends Neurosci*. 5:266-269, 1982.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. Synapse-specific localization of NMDA and GABA_A receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 390:194-210, 1998.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22:5442–5451, 2002.

- Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex, An electron microscope study. *J Anat* 93:420–433, 1959.
- Hannan AJ, Blakemore C, Katsnelson A, Vitalis T, Huber KM, Bear M, Roder J, Kim D, Shin HS, Kind PC. PLC β 1, activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:282-288m 2001.
- Hashimoto K, Ichikawa R, Takechi H, Inoue Y, Aiba A, Sakimura K, Mishina M, Hashikawa T, Konnerth A, Watanabe M, Kano M. Roles of glutamate receptor δ 2 subunit (GluR δ 2) and metabotropic glutamate receptor subtype1 (mGluR1) in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J Neurosci.* 21:9701-9712, 2001.
- Hashimoto K, Kano M. Functional differentiation of multiple climbing fiber inputs during synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* 38:785-796, 2003.
- Hashimoto K, Ichikawa R, Kitamura K, Watanabe M, Kano M. Translocation of a "winner" climbing fiber to the Purkinje cell dendrite and subsequent elimination of "losers" from the soma in developing cerebellum. *Neuron* 63:106-118, 2009.
- Hashimoto K, Tsujita M, Miyazaki T, Kitamura K, Yamazaki M, Shin HS, Watanabe M, Sakimura K, Kano M. Postsynaptic P/Q-type Ca²⁺ channel in Purkinje cell mediates synaptic competition and elimination in developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:9987–9992, 2011.
- Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342:643-648, 1989.
- Ichikawa R, Miyazaki T, Kano M, Hashikawa T, Tatsumi H, Sakimura K, Mishina M, Inoue Y, Watanabe M. Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor δ 2. *J Neurosci* 22:8487-8503, 2002.
- Ichikawa R, Hashimoto K, Miyazaki T, Uchigashima M, Yamasaki M, Aiba A, Kano M, Watanabe M: Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1-dependent parallel fiber synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:2282-2287, 2016.

- Ichise T, Kano M, Hashimoto K, Yanagihara S, Nakao K, Shigemoto R, Katsuki M, Aiba A. mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* 288:1832-1835, 2000.
- Ito M. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol. Rev.* 81:1143-1195, 2001.
- Iwasato T, Datwani A, Wolf AM, Nishiyama H, Taguchi Y, Tonegawa S, Knöpfel T, Erzurumlu RS, Itohara S. Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature* 406:726-731, 2000

6. 主な研究業績

渡辺が筆頭著者・責任著者・最終著者となっている英文学術論文のみ掲載（2026 年 3 月現在）

1. Yamasaki M, Miyazaki T, Hashimoto K, Takei N, Aiba A, Kano M, Watanabe M: mGluR1 signaling is necessary for strengthening winner climbing fiber inputs in the developing mouse cerebellum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 123, e2425460123, 2026.
2. Konno K, Yamasaki M, Watanabe M: Advanced fixation techniques for high-sensitivity molecular imaging: effectiveness of glyoxal fixation for immunostaining. **Anat Sci Int**, 2025.
3. Nomura S, Yamasaki M, Miyazaki T, Konno K, Watanabe M: Preferential Localization of STIM1 to dendritic subsurface ER structures in Mouse Purkinje Cells. **J Neurosci**, 45, 2025.
4. Nitta A, Yamasaki M, Miyazaki T, Konno K, Yoshimura H, Watanabe M: Molecular and anatomical strengthening of "winner" climbing fiber synapses in developing mouse Purkinje cells. **J Neurosci**, 45, 2025.
5. Tsuzuki A, Yamasaki M, Konno K, Miyazaki T, Takei N, Tomita S, Yuzaki M, Watanabe M: Abundant extrasynaptic expression of $\alpha 3\beta 4$ -containing nicotinic acetylcholine receptors in the medial habenula-interpeduncular nucleus pathway in mice. **Sci Rep**14:14193, 2024.
6. Konno K, Yamasaki M, Miyazaki T, Watanabe M: Glyoxal fixation: An approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research. **Sci adv** 9: eadf7084, 2023
7. Miura E, Watanabe M: Coexpression of calcineurin A and B subunits in various subcellular and synaptic compartments of cerebellar neurons and glia with particular abundance at parallel fiber-Purkinje cell synapses. **Neurosci Res** 180:13-22, 2022
8. Yamasaki M, Aiba A, Kano M, Watanabe M: mGluR1 signaling in cerebellar Purkinje cells: Subcellular organization and involvement in cerebellar function and disease. **Neuropharmacology**, 194:108629, 2021.
9. Miyazaki T, Yamasaki M, Tanaka K, Watanabe M: Compartmentalized input-output organization of Lugaro cells in the cerebellar cortex. **Neuroscience**, 462:89-105, 2021.
10. Nakamoto C, Konno K, Taisuke Miyazaki, Nakatsukasa E, Natsume R, Abe M, Kawamura M, Yugo Fukazawa, Ryuichi Shigemoto, Yamasaki M, Sakimura K, Watanabe M: Expression mapping, quantification, and complex formation of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain. **J Comp Neurol**, 528:1003-1027, 2020.
11. Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Kohda K, Yuzaki M, Shimamoto K, Tanaka K, Kano M, Watanabe M; Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 114:7438-7443, 2017.
12. Ichikawa R, Hashimoto K, Miyazaki T, Uchigashima M, Yamasaki M, Aiba A, Kano M, Watanabe M: Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1-dependent parallel fiber synapse elimination. **Proc Natl Acad Sci USA** 113:2282-2287, 2016.

13. Uchigashima M, Ohtsuka T, Kobayashi K, Watanabe M: Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic postsynaptic structures. **Proc Natl Acad Sci USA** 113:4206-4211, 2016.
14. Yamasaki M, Fukaya M, Yamazaki M, Azechi H, Natsume R, Abe M, Sakimura K, Watanabe M: TARP γ -2 and γ -8 differentially control biased AMPAR density across Schaffer collateral/commissural synapses in the hippocampal CA1. **J Neurosci** 36:4296-4312, 2016.
15. Ichikawa R, Sakimura K, Watanabe M: GluD2 endows parallel fiber–Purkinje cell synapses with a high regenerative capacity. **J Neurosci** 36:4846-4858. 2016.
16. Omiya Y, Uchigashima M, Konno K, Yamasaki M, Miyazaki T, Yoshida T, Kusumi I, Watanabe M: VGluT3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling proteins in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains. **J Neurosci** 35:4215-4225, 2015.
17. Yamasaki M, Okada R, Takasaki C, Toki S, Fukaya M, Natsume R, Sakimura K, Mishina M, Shirakawa T, Watanabe M: Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation. **J Neurosci** 34:11534-11548, 2014.
18. Kudo T, Konno K, Uchigashima M, Yanagawa Y, Sora I, Minami M, Watanabe M: GABAergic neurons in the ventral tegmental area receive dual GABA/enkephalin-mediated inhibitory inputs from the bed nucleus of the stria terminalis. **Eur. J. Neurosci.**, 39:1796–1809, 2014.
19. Song X, Yamasaki M, Miyazaki T, Konno K, Uchigashima M, Watanabe M: Neuron type- and input pathway-dependent expression of Slc4a10 in adult mouse brains. **Eur J Neurosci**, 40:2797-2810, 2014.
20. Konno K, Matsuda K, Nakamoto C, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Sakimura K, Yuzaki M, Watanabe M: Enriched expression of GluD1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-interneuron synapse formation in the cerebellum. **J Neurosci** 34:7412-7424, 2014.
21. Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, Watanabe M: Ca(v)2.1 in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. **J Neurosci** 32:1311-1328, 2012.
22. Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki M, Yanagawa Y, Minami M, Watanabe M: Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. **J Neurosci**. 32:18035-18046, 2012.
23. Iwakura A, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Watanabe M: Lack of molecular-anatomical evidence for GABAergic influence upon axon initial segment of cerebellar Purkinje cells by the pinceau formation. **J Neurosci** 32:9438-9448, 2012.

24. Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, Watanabe M: $Ca_v2.1$ in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and biochemical cerebellar compartment. **J Neurosci** 32:1311-1328, 2012.
25. Watanabe M, Kano M: Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells. **Eur J Neurosci** 34:1697-1710, 2011.
26. Miyazaki T, Watanabe M: Development of anatomical technique visualizing the mode of climbing fiber innervation in Purkinje cells and its application to mutant mice lacking GluR δ 2 and $Ca_v2.1$. **Anat. Sci. Int.** 86:10-18, 2011.
27. Ichikawa R, Yamasaki M, Miyazaki T, Konno K, Hashimoto K, Tatsumi H, Inoue Y, Kano M, Watanabe M: Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. **J Neurosci** 31:16916-16927, 2011.
28. Yoshida T, Uchigashima M, Yamasaki M, Katona I, Yamazaki M, Sakimura M, Kano M, Yoshioka M, Watanabe M: Unique inhibitory synapse with particularly rich endocannabinoid signaling machinery on pyramidal neurons in basal amygdaloid nucleus. **Proc Natl Acad Sci USA** 108:3059-3064, 2011.
29. Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M: Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. **J Neurosci** 31:7700-7714, 2011.
30. Yamasaki M, Miyazaki T, Azechi H, Abe M, Natsume R, Hagiwara T, Aiba A, Mishina M, Sakimura K, Watanabe M: Glutamate receptor GluR δ 2 is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar Purkinje cells. **J Neurosci** 31:3362-3374, 2011.
31. Miyazaki T, Yamasaki M, Uchigashima M, Matsushima A, Watanabe M: Cellular expression and subcellular localization of Secretogranin II in the mouse hippocampus and cerebellum. **Eur. J. Neurosci.** 33:82-94, 2011.
32. Miyazaki T, Yamasaki M, Takeuchi T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe M: Ablation of glutamate receptor GluR δ 2 in adult Purkinje cells causes multiple innervation of climbing fibers by inducing aberrant invasion to parallel fiber innervation territory. **J Neurosci** 30:15196-15209, 2010.
33. Yamasaki M, Matsui M, Watanabe M: Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. **J. Neurosci.** 30: 4408–4418, 2010.
34. Yamazaki M, Fukaya M, Hashimoto K, Yamasaki M, Tsujita M, Itakura M, Abe M, Natsume R, Takahashi M, Kano M, Sakimura K, Watanabe M: TARPs γ -2 and γ -7 are essential for AMPA receptor expression in the cerebellum. **Eur J. Neurosci.** 31:2204-2220, 2010.

35. Takasaki C, Yamasaki M, Uchigashima M, Konno K, Yanagawa Y, Watanabe M: Cytochemical and cytological properties of perineuronal oligodendrocytes in the mouse cortex. **Eur. J. Neurosci.** 32:1326-1336, 2010.
36. Miura E, Matsuda K, Morgan JI, Yuzaki M, Watanabe M: Cbln1 accumulates and colocalizes with Cbln3 and GluR δ 2 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the mouse cerebellum. **Eur. J. Neurosci.** 29:693-706, 2009.
37. Akashi K, Kakizaki T, Kamiya H, Fukaya M, Yamasaki M, Abe M, Natsume R, Watanabe M, Sakimura K: NMDA receptor GluN2B (GluR ϵ 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. **J. Neurosci.** 29:10869-10882, 2009.
38. Takasaki C, Okada R, Mitani A, Fukaya M, Yamasaki M, Fujihara Y, Shirakawa T, Tanaka K, Watanabe M: Glutamate transporters regulate lesion-induced period plasticity in the developing somatosensory cortex. **J. Neurosci.** 28:4995-5006, 2008.
39. Watanabe M: Molecular mechanisms governing competitive synaptic wiring in cerebellar Purkinje cells. **Tohoku J. Exp. Med.** 214:175-190, 2008.
40. Fukaya M, Uchigashima M, Nomura S, Hasegawa Y, Kikuchi H, Watanabe M: Predominant expression of phospholipase C β 1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close allocation with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. **Eur. J. Neurosci.** 28:1744-1759, 2008.
41. Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M: Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. **J. Neurosci.** 27:3663-3676, 2007.
42. Takasaki C, Miura E, Watanabe M: Segmental and complementary expression of L-serine biosynthetic enzyme 3-phosphoglycerate dehydrogenase and neutral amino acid transporter ASCT1 in the mouse kidney. **Biomed. Res.**, 28:61-69, 2007.
43. Nomura S, Fukaya M, Tsujioka T, Wu D, Watanabe M: Phospholipase C β 3 is distributed in both somatodendritic and axonal compartments and localized around perisynapse and smooth endoplasmic reticulum in mouse Purkinje cell subsets. **Eur. J. Neurosci.** 25:659-672, 2007.
44. Fukaya M, Tsujita M, Yamazaki M, Kushiya E, Abe M, Akashi K, Natsume R, Kano M, Kamiya H, Watanabe M, Sakimura K: Abundant distribution of TARP γ -8 in synaptic and extrasynaptic surface of hippocampal neurons and its major role in AMPA receptor expression on spines and dendrites. **Eur. J. Neurosci.** 24:2177-2190, 2006.
45. Miura E, Iijima T, Yuzaki M, Watanabe M: Distinct expression of Cbln family mRNAs in developing and adult mouse brains. **Eur. J. Neurosci.** 24:750-760, 2006.
46. Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Kamiya H, Kano M, Watanabe M: Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production

- site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. **J. Neurosci.** 26:4740-4751, 2006.
47. Miura E, Fukaya M, Sato T, Sugihara K, Asano M, Yoshioka K, Watanabe M: Expression and distribution of JNK/SAPK-associated scaffold protein JSAP1 in developing and adult mouse brain. **J. Neurochem.** 97:1431-1446, 2006.
 48. Fukaya M, Yamazaki M, Sakimura K, Watanabe M: Spatial diversity in gene expression for VDCC γ subunit family in developing and adult mouse brains. **Neurosci. Res.** 53:376-383, 2005.
 49. Fukaya M, Hayashi Y, Watanabe M: NR2-to-NR3B subunit switchover of NMDA receptor in early postnatal motoneurons. **Eur. J. Neurosci.** 21:1432-1436, 2005.
 50. Nakamura M, Sato K, Fukaya M, Araishi K, Aiba A, Kano M, Watanabe M: Signaling complex formation of phospholipase C β 4 with mGluR1 α and IP3R1 at the perisynapse and endoplasmic reticulum in the mouse brain. **Eur. J. Neurosci.** 20:2929-2944, 2004.
 51. Oshima S, Yamada K, Shirakawa T, Watanabe M: Changes of high-affinity choline transporter expression during degeneration and regeneration of hypoglossal nerves in mice. **Neurosci. Lett.** 365:97-101, 2004.
 52. Abe M, Fukaya M, Yagi T, Mishina M, Watanabe M, Sakimura K: NMDA Receptor GluR ϵ /NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluR ζ 1/NR1 subunit. **J. Neurosci.** 24:7292-7304, 2004.
 53. Tachikawa M, Fukaya M, Terasaki T, Ohtsuki S, Watanabe M: Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases CK-Mi and CK-B suggest novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis. **Eur. J. Neurosci.** 20:144-160, 2004.
 54. Miyazaki T, Hashimoto K, Shin H-S, Kano M, Watanabe M: P/Q-type Ca²⁺ channel α 1A regulates synaptic competition on developing cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.** 24:1734-1743, 2004.
 55. Furuya S, Watanabe M: Novel neuroglial and glioglia relationships mediated by L-serine metabolism. **Arch. Histol. Cytol.** 66:109-121, 2003.
 56. Yamashita N, Sakai K, Furuya S, Watanabe M: Selective expression of L-serine synthetic enzyme 3PGDH in Schwann cells, perineuronal glia, and endoneurial fibroblasts along sciatic nerves and its upregulation after crush injury. **Arch. Histol. Cytol.** 66:429-436, 2003.
 57. Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, Watanabe M: Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. **Eur. J. Neurosci.** 17:2563-2572, 2003.
 58. Fukaya M, Kato A, Lovett C, Tonegawa S, Watanabe M: Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100:4855-4860, 2003.

59. Sakai K, Shimizu H, Koike T, Furuya S, Watanabe M: Neutral amino acid transporter ASCT1 is preferentially expressed in L-Ser-synthetic/storing glial cells in the mouse with transient expression in developing capillaries. **J. Neurosci.** 223:550-560, 2003.
60. Watanabe M: Glial processes are glued to synapses via Ca^{2+} -permeable glutamate receptors. **Trends Neurosci.** 25:5-6, 2002.
61. Yamada K, Watanabe M: Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. **Anat. Sci. Int.** 77:94-108, 2002.
62. Ichikawa R, Miyazaki T, Kano M, Hashikawa T, Tatsumi H, Sakimura K, Mishina M, Inoue Y, Watanabe M: Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor $\text{GluR}\delta 2$. **J. Neurosci.** 22:8487-8503, 2002.
63. Oshima S, Fukaya M, Nagashima M, Shirakawa T, Oguchi H, Watanabe M: Early onset of NMDA receptor $\text{GluR}\epsilon 1$ (NR2A) expression and its abundant postsynaptic localization in developing motoneurons of the mouse hypoglossal nucleus. **Neurosci. Res.** 43:239-250, 2002.
64. Yamasaki M, Yamada K, Furuya S, Mitoma J, Hirabayashi Y, Watanabe M: 3-phosphoglycerate dehydrogenase (3PGDH), a key enzyme of L-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. **J. Neurosci.** 21:7691-7704, 2001.
65. Yamada K, Fukaya M, Shimizu H, Sakimura K, Watanabe M: NMDA receptor subunits $\text{GluR}\epsilon 1$, $\text{GluR}\epsilon 3$, and $\text{GluR}\zeta 1$ are enriched at the mossy fiber-granule cell synapse in the adult mouse cerebellum. **Eur. J. Neurosci.** 13:2025-2036, 2001.
66. Fukaya M, Watanabe M: Improved immunohistochemical detection of postsynaptically-located PSD-95/SAP90 protein family by protease section pretreatment. A study in the adult mouse brain. **J. Comp. Neurol.** 426:572-586, 2000.
67. Tanaka J, Nakagawa S, Yamasaki M, Fukaya M, Iwanaga T, Sakimura K, Kano M, Simon MI, Inoue Y, Watanabe M: Gq protein α subunits $\text{G}\alpha_q$ and $\text{G}\alpha_{11}$ are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. **Eur. J. Neurosci.** 12:781-792, 2000.
68. Yamada K, Fukaya M, Shibata T, Kurihara H, Tanaka K, Inoue Y, Watanabe M: Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. **J. Comp. Neurol.** 418:106-120, 2000.
69. Fukaya M, Yamada K, Nagashima M, Tanaka K, Watanabe M: Down-regulated expression of glutamate transporter GLAST in Purkinje cell-associated astrocytes of reeler and weaver mutant cerebella. **Neurosci. Res.** 34:165-175, 1999.
70. Toki S, Watanabe M, Ichikawa R, Shirakawa T, Oguchi H, Inoue Y: Early establishment of lesion-insensitive mature barrelettes corresponding to upper lip vibrissae in developing mice. **Neurosci. Res.** 33:9-15, 1999.

71. Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Nagashima M, Tanaka K, and Inoue Y: Glutamate transporter GLT-1 is transiently localized on growing axons of the mouse spinal cord before establishing astrocytic expression. **J. Neurosci.** 18:5706-5713, 1998.
72. Nakagawa S, Watanabe M, Isobe T, Kondo H, Inoue Y: Cytological compartmentalization in the staggerer cerebellum, as revealed by calbindin immunohistochemistry for Purkinje cells. **J. Comp. Neurol.** 395:112-120, 1998.
73. Watanabe M, Nakamura M, Sato K, Kano M, Simon MI, Inoue Y: Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase C β in mouse brain. **Eur. J. Neurosci.** 10:2016-2025, 1998.
74. Watanabe M, Fukaya M, Sakimura K, Manabe T, Mishina M, Inoue Y: Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fiber-recipient layer) of the hippocampal CA3 subfield. **Eur. J. Neurosci.** 10:478-487, 1998.
75. Nakagawa S, Watanabe M, Inoue Y: Prominent expression of nuclear hormone receptor ROR α in Purkinje cells from early development. **Neurosci. Res.** 28:177-184, 1997.
76. Tanaka J, Ichikawa R, Watanabe M, Tanaka K, Inoue Y: Extra-junctional localization of glutamate transporter EAAT4 at excitatory Purkinje cell synapses. **Neuroreport** 8:2461-2464, 1997.
77. Kurihara H, Hashimoto K, Kano M, Takayama C, Sakimura K, Mishina M, Inoue Y, Watanabe M: Impaired parallel fiber-Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor $\delta 2$ subunit (GluRd2). **J. Neurosci.** 17:9613-9623, 1997.
78. Shibata T, Watanabe M, Tanaka K, Wada K, Inoue Y: Dynamic changes in expression of glutamate transporter mRNAs in developing brain. **Neuroreport** 7:705-709, 1996.
79. Nakagawa S, Watanabe M, Inoue Y: Regional variation in expressions of calbindin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type1 mRNAs in the cerebellum of the staggerer mutant mouse. **Eur. J. Neurosci.** 8:1401-1407, 1996.
80. Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Tanaka K, Wada K, Inoue Y: EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. **Neuroreport** 7:2013-2017, 1996.
81. Nakagawa S, Watanabe M, Inoue Y: Altered gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunits in Purkinje cells of the staggerer mutant mouse. **Eur. J. Neurosci.** 8:2644-2651, 1996.
82. Watanabe M, Miura Y, Ido A, Sakai M, Nishi S, Inoue Y, Hashimoto T, Tamaoki T: Developmental changes in expression of the ATBF1 transcription factor gene. **Mol. Brain Res.** 42:344-349, 1996.
83. Watanabe M, Moise IM, Inoue Y: Modified expression of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit emerges in reeler Purkinje cells after establishment of the adult wild-type expression. **Neurosci. Res.** 26:335-343, 1996.

84. Watanabe M, Nakagawa S, Takayama C, Nagashima M, Inoue K, Ichikawa R, Mishina M, Inoue Y: Cerebellum of the adult reeler mutant mouse contains two Purkinje cell populations with respect to gene expression for the N-methyl-D-aspartate receptor channel. **Neurosci. Res.** 22:335-345, 1995.
85. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda, N: Mice deficient in cystathionine β -synthase: Amino acid models for mild and severe homocyst(e)inemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:1585-1589, 1995.
86. Watanabe M, Isobe T, Ichimura T, Kuwano R, Takahashi Y, Kondo H, Inoue Y: Molecular cloning of rat cDNAs for ζ and θ subtypes of 14-3-3 protein and differential distributions of their mRNAs in the brain. **Mol. Brain Res.** 25:113-121, 1994.
87. Watanabe M, Tsutsui K, Tsutsui K, Inoue Y: Differential expressions of the topoisomerase II α and II β mRNAs in developing rat brain. **Neurosci. Res.** 19:51-57, 1994.
88. Watanabe M, Mishina M, Inoue Y: Distinct gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the mouse sensory ganglia and adrenal gland. **Neurosci. Lett.** 165:183-186, 1994.
89. Watanabe M, Mishina M, Inoue Y: Differential distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the mouse retina **Brain Res.** 634:328-332, 1994.
90. Watanabe M, Mishina M, Inoue Y: Distinct spatio-temporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the mouse cervical cord. **J. Comp. Neurol.** 345:314-319, 1994.
91. Watanabe M, Mishina M, Inoue Y: Distinct distributions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brainstem. **J. Comp. Neurol.** 343:520-531, 1994.
92. Watanabe M, Mishina M, Inoue Y: Distinct spatio-temporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum. **J. Comp. Neurol.** 343:513-519, 1994.
93. Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M: Distinct distributions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. **J. Comp. Neurol.** 338:377-390, 1993.
94. Watanabe M, Isobe T, Ichimura T, Kuwano R, Takahashi Y, Kondo H: Developmental regulation of neuronal expression for θ subtype of 14-3-3 protein, a putative regulatory protein for protein kinase C. **Dev Brain Res.** 3:225-235, 1993.
95. Watanabe M, Nagamine T, Sakimura K, Takahashi Y, Kondo H: A developmental study of the gene expression for α and γ subunits of enolase in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. **J. Comp. Neurol.** 327:350-358, 1993.
96. Watanabe M, Isobe T, Ichimura T, Kuwano R, Takahashi Y, Kondo H: Molecular cloning of rat cDNAs for β and γ subtypes of 14-3-3 protein and developmental changes in expression of their mRNAs in the nervous system. **Mol. Brain Res.** 17:135-146, 1993.
97. Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M: Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. **Neuroreport** 3:1138-1140, 1992.

98. Watanabe M, Kominami H, Yanaihara N, Kondo H: Localization of gastrin-releasing peptide (GRP)-like immunoreactivity in the lysosomal compartment of the trigeminal ganglion cells of the rat. **Histochemistry** 97:277-281, 1992.
99. Watanabe M, Yanaihara N, Kondo H: Partial down-regulation at post-transcriptional level of the gene expression for preproenkephalin in the superior cervical ganglion of the maturing rats. *Dev. Brain Res.* 59:113-116, 1991.
100. Watanabe M, Isobe T, Okuyama T, Ichimura T, Kuwano R, Takahashi Y, Kondo H: Molecular cloning of cDNA to rat 14-3-3 eta-chain polypeptide and the neuronal expression of the mRNA in the central nervous system. **Mol. Brain Res.** 10:151-158, 1991.
101. Watanabe M, Ono T, Kondo H: Immunohistochemical studies on the localisation and ontogeny of heart fatty acid binding protein in the rat. **J. Anat.** 174:81-95, 1991.
102. Watanabe M, Sakimura K, Takahashi Y, Kondo H: Ontogenic changes in expression of neuron-specific enolase (NSE) and its mRNA in the Purkinje cells of the rat cerebellum: Immunohistochemical and in situ hybridization study. *Dev. Brain Res.* 53:89-96, 1990.
103. Watanabe M, Uchiyama Y: Twenty-four hour variations in subcellular structures of rat pancreatic islet B-, A- and cells, and of portal plasma glucose and insulin levels. **Cell Tissue Res.** 253:337-345, 1988.
104. Watanabe M, Watanabe T, Ishii Y, Matsuba H, Kimura S, Fujita T, Kominami E, Katsunuma N, Uchiyama Y: Immunocytochemical localization of cathepsin B, H, and their endogenous inhibitor, cystatin B in islet endocrine cells of rat pancreas. **J. Histochem. Cytochem.** 36:783-791, 1988.

7. 解剖発生学教室での活動のまとめ

■担当学部教育科目

解剖学実習（6単位）、解剖発生学（2単位）、神経解剖学（1単位）を担当し、2012年の教育評価制度の開始以来、途切れることなく「優秀科目賞」と「優秀教員賞」を受賞してきた。

■大学院生と学部学生

旧解剖学第1講座（主任は井上芳郎教授）の助教授時代（1992～1998年）、主に臨床系講座から派遣されてた大学院生が中川伸、栗原秀雄、柴田隆、土岐（和田）志麻、田中淳、山田恵子で、分子生物学が生命科学のパラダイムシフトが起こる中、現在に続くグルタミン酸シグナル伝達の研究テーマを立ち上げることができた。

旧第二講座への移行期（1998～2002年）には、山田和之、大島昇平、山下登、深谷昌弘、岡田（横山）理恵子、高崎千尋、佐藤和則、中村美智子、山崎美和子、宮崎太輔、境和久と、多彩な大学院生や学生が集まり、当時第1解剖の助手であった市川量一も研究に加わり、研究レベルが上がり基盤も固まった。

その後（2003年～現在）、様々な形で研究に加わった学生が、立川正憲、三浦恵理子、大森優子、藤原百合、野村幸、内ヶ島基政、吉田隆行、江本美穂、湯浅寛加、岩倉淳、工藤健大、長路敬太、西川晃司、宋暁紅、森さくら、大宮友貴、板橋哲也、宮本哲慎、山田真司、大坪琴美、久本芽璃、中川舜介、久井漱誠、都築明日香、野村左京、新田麻子、新福伸久、張青圃、荒川泰璃、吉村榛人、三原緋依である。

■スタッフ

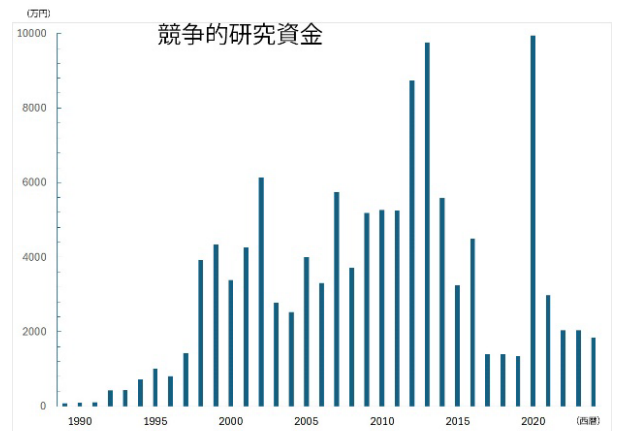
旧第二講座の教授就任後に一緒に研究教育を担当することになった教員は、深谷昌弘（現在、北里大学医療衛生学部教授）、宮崎太輔（北海道大学保健科学研究院准教授）、山崎美和子（北海道大学医学研究院准教授）、今野幸太郎（北海道大学医学研究院助教）、内ヶ島基政（新潟大学脳研究所准教授）の5名である（採用順）。技術職員として清水秀美と山形享子の2名が解剖体の処置と管理を、石村知子、小林（内沢）友子、戸ノ崎希、吉崎あゆ子の4名が教室事務を担当した。

■研究論文

神経情報伝達分子の発現解析を行う分子解剖学的研究と、遺伝子改変マウスを用いた神経回路発達の形態生物学的研究を中心に研究論文を公表してきた（記念誌に主要論文を掲載し、Researchmapに全論文を掲載（<https://researchmap.jp/masahikowatanabe>）。Web of Science (Clarivate)に登録の英文論文663編の総引用数は43,613回、H-indexは106である（2026年3月31日現在）。また、研究の流れと内容については、ニッポーボーメディカルのホームページにコラム「分子解剖学と形態生物学の道を歩んで」にまとめた（<https://nittobo-nmd.co.jp/column/>；記念誌に改訂の上、再録）。

■研究費

1989 年から 2024 年度までの競争的研究資金（代表・分担を含む）の獲得総額は 119,686 万円で、主要な研究費は科学技術振興調整費（1998～2002）、基盤研究（S）（2007～2011, 2012～2016）、CREST（2009～2014）などである。このグラフを俯瞰すれば、研究費の増減は研究者としての成長・成熟・老化を反映している。



■北大在職で最も楽しかったこと

北大医学部において教室員と一緒に解剖学の研究教育に携われたこと、そして、多くの医学部生と「芋煮」を囲んで酒を楽しく飲めたこと。

■退職後も続けたいもの

大学院から現在まで約 40 年間、神経系の情報伝達分子を中心にポリクローナル抗体作成を続けてきた。その結果得られた 300 以上の分子に対する特異抗体を、今後の学術研究においても多くの研究者が利用できるような仕組みを維持したい。