

所属 (主指導教員)	バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座 (塩坂 貞夫 教授)		
氏名	田村 英紀	提出	平成 17年12月26日
題目	成熟マウス海馬および扁桃体のシナプス可塑性における <i>in vivo</i> でのニューロプシンの役割		
要旨 長期増強 (LTP) は、不確定の期間に、急速且つ持続的に発達するため、海馬依存的な記憶の獲得に、特に重要であると示唆されてきた。細胞外プロテアーゼによるプロテオリシスは、シナプス間の接着を修飾、つまりシナプスの形態を変化させることによって LTP に寄与すると考えられている。ここで私は、細胞外セリンプロテアーゼニューロプシン (NP) がシナプスの増強および海馬依存的な記憶形成の両方に重要な役割を果たしていることを明らかにした。NP ノックアウトマウスは、モリス水迷路および Y 迷路における空間認知記憶の障害および、単一テタヌス刺激によって誘導される LTP 早期過程が阻害されていた。また、海馬で LTP を誘導したところ、NP は高頻度刺激後早期に活性化し、この活性化は、NMDA 受容体阻害剤で抑制された。NP に対する特異的阻害剤およびモノクローナル中和抗体を側脳室内に投与し、NP の活性を抑制すると、LTP の早期過程は、完全に阻害された。興味深いことに、テタヌス刺激なしに、リコンビナント (r-) NP を海馬内に単独投与することで、長期持続的な増強および抑圧を、その濃度依存的に誘導した。この r-NP による増強は、シーターバースト刺激による LTP とお互い閉塞し合った。このことは、2 つの可塑性が共通のシグナル経路を介していることを示すものである。r-NP による増強は、電気刺激による LTP 時と、同じ AMPA 受容体 GluR1 サブユニットのサイトで、リン酸化を増大させた。一方、r-NP による抑圧は、電気刺激による長期抑圧時と、同様のサイトで、脱リン酸化を誘導した。以上のことから、<i>in vivo</i> で NP は、LTP の成立に必須であり、また、記憶獲得に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。 次に、扁桃体でのシナプス可塑性における NP の役割を検討した。野生型マウスの外側嗅内皮質 (LEC) に、高頻度刺激を与えたところ、扁桃体基底外側核 (BLA) で、安定な LTP が <i>in vivo</i> で誘導された。しかしながら、NP ノックアウトマウスの LEC-BLA 経路において、通常の興奮性シナプス伝達は、正常であったにもかかわらず、LTP は障害された。対照的に、NP ノックアウトマウスの BLA に、高頻度刺激を与えたところ、LEC で野生型マウスとほぼ同程度の LTP が誘導された。このように、<i>in vivo</i> で NP は、皮質－扁桃体経路の LTP に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。			

成熟マウス海馬および扁桃体のシナプス可塑性における
in vivo でのニューロプシンの役割

田村 英紀
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座
(塩坂 貞夫 教授)

平成17年12月26日提出

第 1 部

In vivo で、ニューロプシンは、成熟マウス海馬における記憶獲得および **Schaffer collateral** 長期増強の早期過程に必須である

序論

明示的な学習や記憶のモデルである海馬長期増強 (LTP) は (Bliss and Lomo, 1973)、早期過程 (E-LTP) と後期過程 (L-LTP) からなる (Krug et al., 1984)。この 2 つの相は独立に誘導され、別々のシグナル経路によって制御されている。つまり、E-LTP は、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体や calcium/calmodulin kinase II (CaMKII) の活性化が必須であり、一方、L-LTP は、新規タンパク合成へと続く protein kinase A (PKA) の活性化が必要である (Frey et al., 1993; Huang et al., 1994)。特に E-LTP は、動物が新しい環境に入った時、海馬 CA1 領域で起こる LTP の reversal (Hesse and Teyler, 1976) に重要である (Xu et al., 1998)。新しい情報を適切に記憶するために、選択的なシナプスの増強に作用すると考えられている LTP の脱増強は、LTP 誘導後の比較的短期間、つまり E-LTP の間にだけ起こり得る現象である (Xu et al., 1998)。

シナプス膜と細胞外マトリックス (ECM) の相互作用に、特に重要である接着分子が、LTP の安定化に重要な働きをしていることが示されてきた。マトリックスと細胞接着分子 (CAM) の細胞外部位のプロテオリシスは、ダイナミックなシナプスの再構成や構造可塑性に重要な役割を果たしているかもしれない (Matsumoto-Miyai et al., 2003)。キンドリングやカイニン酸による癲癇、LTP のようなある種のシナプス可塑性に、シナプス膜と ECM の相互作用が含まれるという可能性は、最近の知見により支持される。実際、CAM やインテグリンファミリーに属する接着受容体の細胞外相互作用を、ペプチドや抗体により阻害すると、LTP は減弱する (Bahr et al., 1997; Luthi et al., 1994; Ronn et al., 1995; Staubli et al., 1998)。さらに、活動依存的に分泌されるもしくは常に細胞外に存在している、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) やマトリックスメタロプロテアーゼおよびそれ以外の細胞外プロテアーゼは LTP と強く関連している (Baranes et al., 1998; Frey et al., 1996; Huang et al., 1996)。その中でニューロブシン (NP) (KLK8 ともいう) は、脳全体に均一に発現しておらず、海馬や扁桃体といった辺縁系に強く発現している (Chen et al., 1995) ということから、上記の関係において非常に興味深い。NP は、NMDA 受容体依存的にプレシナプスに局在している L1cam を分解し (Matsumoto-Miyai et al., 2003)、このことは、安定な LTP に必要なポストシナプスとプレシナプスの変化を連結させるものとして役立つ。NP が、L-LTP に関与する tPA (Baranes et al., 1998; Frey et al., 1996; Huang et al., 1996) と異なり、LTP の早期過程に含まれるということは、以前より示唆されていた (Komai et al., 2000; Momota et al., 1998; Yoshida and Shiosaka,

1999)。これは、おそらくプレシナプスの L1 の作用を介するものであり、事実、L1 の細胞外ドメインの分離が、E-LTP の成立に重要な役割を果たしていることが示された (Matsumoto-Miyai et al., 2003)。

これらの結果は、NP による接着分子の切断が、E-LTP 間のシグナル伝達経路の増強を、安定な記憶獲得へと変えていくことを強く示唆する。この可能性を検討するために、私は、NP ノックアウトマウスの作業記憶能力および電気生理学的なシナプス可塑性を調べた。その結果、NP ノックアウトマウスは、学習および E-LTP が有意に障害されており、また NP は、LTP 誘導早期に活性化し、その活性化した NP は、電気刺激による LTP と共通のメカニズムを介したシナプス増強を誘導することが明らかとなった。

材料と方法

実験動物

今回の研究で、156 匹の ddY 雄性マウス (9-12 週齢、日本 SLC) と 45 匹の NP +/+、+/- と -/- 雄性マウス (8-22 週齢) を用いた (Hirata *et al.*, 2001)。NP ノックアウトマウスは、C57BL/6J と 9 回以上バッククロスを行い、同腹の C57BL/6J をコントロールマウスとした。マウスは、12 時間 light/dark サイクル、自由給餌で育成した。生理実験終了後、マウスは pentobarbital を overdose 投与することで、動物に苦痛を与えないように殺した。以下に記した全ての実験プロトコルは、奈良先端科学技術大学院大学および日本生理学会の動物実験ガイドラインに従って行った。

モリス水迷路

円形の水槽 (直径 120 cm、高さ 30 cm) を用いて、水温 21-22 °C、水深 15 cm とした。水槽の端を東 (E)、南 (S)、西 (W)、北 (N) と 4 等分し、それぞれ 4 つの出発地点とした。プラットホーム (直径 8 cm) は、水槽を 4 等分した北西の真ん中に水面下 0.5 cm の高さで設置した。水槽を 4 等分する 4 つの出発地点のいずれかからランダムな順でマウスを入水させ (それぞれの出発地点は一日に 1 回だけ使用)、プラットホームに到達するまでの時間 (escape latency) を測定した。実験は、一日に 4 試行 (2 時間間隔)、連続 4 日間、実施した。測定時間は最大 100 秒とし、プラットホーム上で 30 秒間待機させた後、ホームケージに戻した。マウスが 100 秒以内に到達できなかった場合、マウスは、実験者によってプラットホーム上に導かれ、そのマウスに 100 秒の最大スコアを割り当てた。

Y 迷路

Y 迷路は 3 つのアームからなり、それぞれのアームは、長さ 40 cm、高さ 10 cm、下幅 3 cm、上幅 10 cm で、正三角形のセンターエリアで交差している。迷路未経験のマウスを Y 迷路のいずれかのアームの端に入れ、8 分間迷路内を自由移動させた。アームへの進入回数はマニュアルで記録した。マウスの後足が完全にアームに入ったとき、アームに進入したとみなした。マウスが各ア

ームに進入した回数の合計をアームに進入した総数 (Total arm entries) とし、この中で連続して異なる 3 つのアームを選択した組み合わせの数を、空間記憶の尺度である自発的交替行動数 (No. of alternation) とした (e.g., ACBABACBAB=5)。自発的交替行動率 (% Alternation) は起こりうる交替行動数 (Total number of arm entries - 2) に対する実際の交替行動数の割合に 100 を掛けたものであり、以下の等式のように示される。

$$\% \text{Alternation} = [(\text{Number of alternations}) / (\text{Total arm entries} - 2)] \times 100$$

また、全アームエントリー数は、マウスの活動量の指標ともなる。

電気生理学

ddY マウスは、ウレタンで麻酔後 (1.25 g/kg; i.p.)、脳定位固定台に固定し、実験中、直腸温をヒートジャケットパッド (BWT-100, Bio Research Center, Nagoya, Japan) を用いて 37 °C に維持した。細胞外電位記録は、以前のように行い (Matsumoto-Miyai et al., 2003)、双極形ステンレス鋼電極 (InterMedical Co., Tokyo, Japan) を二つの独立した Schaffer collateral-commissural 線維 (2.46 mm posterior and 2.30 mm lateral to bregma or 2.46 mm posterior and 0.4 mm lateral to bregma) を刺激するのに用いた。テスト刺激 (100 μ s duration) は、30 秒間隔で与え、刺激強度は最大値の約 50 % の細胞外興奮性シナプス後電位 (field excitatory postsynaptic potential: fEPSP) および集合活動電位を誘導するように調節した。両者は、単極形タングステン電極 (InterMedical Co.) を CA1 stratum radiatum および stratum pyramidale (2.46 mm posterior and 2.0 mm lateral to bregma) に刺入することで記録した。fEPSP は、最初の傾き (slope) の最大値を測定し、集合活動電位は、2 つの上向きのピークの平均値と下向きのピークとの差として数値を求めた。fEPSP や集合活動電位のタイムコースは、NP 阻害剤・抗 NP 抗体・リコンビナント (r-) NP の投与や、LTP 誘導刺激以前の 30 分間の平均ベースライン値からの変化率として表した。E-LTP は、単一のテタヌス刺激 (100Hz for 1 sec) を用いて誘導した。LTP を誘導するために、5 Hz で 10 発の高頻度刺激 (10 pulses at 200 Hz) からなるシーターバースト刺激 (TBS) を 30 秒間隔で 4 回与えた。長期抑圧 (LTD) は、低頻度 paired 刺激 (LFPS; 700 μ A, 150- μ s pulses, 50 ms 間隔の 2 発連続刺激を 1 秒間隔で 900 回) によって誘導した (Thiels *et al.*, 1994)。Paired-pulse facilitation (PPF) は、安定なベースラインの 20 分後と r-NP 投与 3 時間後にテストした。刺激間隔は、25, 50, 75, 100, 200 msec とした。

内在性 NP のタンパク分解活性の測定

TBS 実行後、ddY マウスから海馬を摘出し、電極を刺入した部位のみ切り出した。これを、450 ml の Lysis Buffer (1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 µg/ml leupeptin, and 50 mM HEPES, pH 7.4) を加え、ガラス-テフロンホモジナイザーで破碎した。(可逆的セリンプロテアーゼ阻害剤 Leupeptin を加えることで、活性化した NP と、内在性セリンプロテアーゼインヒビター SPI3 との結合を防ぐことができ (Supplemental figure 1)、それにより正確な NP の活性測定が可能である。) 可溶化した後、4 °C、14,000 ×g で 30 分間遠心し、上清を回収した。数回洗浄した上清をモノクローナル抗 NP 抗体 mAbF12 (Molecular and Biological Laboratories) で、免疫沈降した後、合成基質 Pro-Phe-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide (MCA; Peptide Institute, Osaka, Japan) と 37 °C、18 時間インキュベートした。

NMDA 受容体および NP 阻害剤、抗 NP 抗体、r-NP の投与

N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体阻害剤である 10 mg/kg CPP (3-[(±)-2-carboxypiperazin-4-yl]-propyl-1-phosphonic acid, Tocris Cookson, UK) と 1.0 mg/kg MK-801 ((+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,b]cyclo-hepten-5,10 -imine, Tocris Cookson, UK) を、TBS 実行 2 時間前に腹腔内 (i.p.) に投与した。

NP 特異的阻害剤 NP stop (Taisho Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) および活性中和モノクローナル抗 NP 抗体 (mAbB5; MBL, Nagoya, Japan) の側脳室内 (i.c.v.) 投与は以前のように行った (Momota *et al.*, 1998)。シリンジポンプ (CFV-2100; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) で駆動させた 10 µl のハミルトンシリンジを用いて、NP stop (1 µg/µl) を 0.05 µl/min の速さで 40 分間、mAbB5 (1.4 µg/µl) やコントロールとして rat IgG を 0.5 µl/min の速さで 10 分間投与した (0.22 mm anterior and 1.0 mm lateral to bregma; 2.3 mm ventral from surface of skull)。

r-NP は以前のように調整した (Shimizu *et al.*, 1998)。r-proNP (不活性前駆型) をまず、昆虫細胞から獲得し (Shimizu *et al.*, 1998)、それからリジルエンドペプチターゼによって活性化した (Kato *et al.*, 2001)。r-NP の酵素活性は Boc-Val-Pro-Arg-MCA (Peptide Institute, Osaka, Japan) で測定し、30 °C で 1 分間にこの基質を 1 µmol 加水分解するのに必要な量を 1 unit とした。r-NP は人工脳脊髄液 (ACSF; 127 mM NaCl, 1.6 mM KCl, 1.24 mM KH₂PO₄, 1.3 mM MgSO₄, 2.4 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃ and 10 mM glucose) で希釈した。r-NP およびそれと等量の ACSF は、10 µl のハミルトンシリンジで海馬 CA1 領域に 80 nl/min の速さで 10 分間投与した。コントロール実験として、r-NP (1.8 mU/ml) を 3

mM の phenyl methane sulfonyl fluoride (PMSF) (セリンプロテアーゼインヒビター) や 5 µg/ml の mAbB5 と 4 °C で一晩インキュベートし、不可逆的に不活性化し、活性型 r-NP の代わりに用いた。ハミルトンシリンジは、ポリエチレンチューブを通して薬物投与用カニューレに繋がっている。

ウエスタンブロット解析

r-NP 投与 90 分後に ddY マウスから海馬を取り出し、CA1 野の電極を挿入した部位のみ切り出した。このサンプルを 3 つ集め、Homogenization buffer (5 mM HEPES, pH7.4, 320 mM sucrose, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 1 µM okadaic acid and 5 µg/ml leupeptin) を加え、氷浴上でガラス-テフロンホモジナイザーを用いて破碎し、10 分間静置した。これを 4 °C、1,000 × g で 10 分間遠心し、脱核した。その上清を 4 °C、10,000 × g で 15 分間遠心し、得られた粗シナプトソーム分画を Homogenization buffer で洗浄し、再び 4 °C、10,000 × g で 15 分間遠心した。この粗シナプトソームを Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 1 % SDS, 1 µM okadaic acid and 5 µg/ml leupeptin) で可溶化した。蛋白質濃度は、BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL) を用いた BCA 法により定量した。等しいタンパク量を SDS-PAGE ゲル (7.5 %) に泳動し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜にブロッキングした。リン酸化した GluR1 サブユニットに対するウエスタンブロットは以前の方法で行った (Lee *et al.*, 1998)。ブロットした PVDF 膜を、4 % BSA と 0.05 % Tween-20 を含んだ PBS で 1 時間室温でブロッキングし、リン酸化サイト特異的な抗体 (1:300; a gift from Dr. K. Kameyama, National Institute of Bioscience and Human Technology, Japan) で 2 時間インキュベートした。1 % BSA と 0.05 % Tween-20 を含む PBS で 5 分間 5 回洗浄し、alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (1:2000) を加え 1 時間インキュベートした。免疫陽性バンドは Immun-Star (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いた化学発光で検出し、X 線フィルムに露光した。それから、抗体を 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2 % SDS と 100 mM 2-mercaptoethanol で、60 °C、30 分間インキュベートすることで膜から除去し、膜を再度ブロッキングし、GluR1 の全量を見積もるために、anti-C-terminal GluR1 antibodies (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) を用いて免疫染色した。バンドの解析は、Scion Image (Scion Co., Frederick, MD) を用いた。リン酸化 GluR1 免疫陽性量は、リン酸化非依存的な抗体を用いた GluR1 の全量に対して規格化した。

データ解析

全ての図表データは平均値 $\pm$ SEM として表示した。グループ間での統計処理は、一元および二元配置分散分析法 (ANOVA) 後の *post hoc* テストとして Scheffe's テストにより比較した。個々の比較には、unpaired *t* test によって解析した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

NP ノックアウトマウスにおける海馬依存的な学習能力の障害

学習や記憶およびシナプス可塑性におけるニューロブシン (NP) の役割を調べるために、NP 遺伝子を欠損させた NP ノックアウトマウスを作成した。まず私は、モリス水迷路試験を用いて NP ノックアウトマウスの海馬依存的な学習能力を評価した。この迷路は、一般的な記憶テストであり、マウスは、水面下にあるプラットホームの位置を学習する。図 1A、B に示すように、NP ノックアウトマウスは、野生型マウスに比べて、プラットホームに到達する時間が有意に長く (two-way ANOVA: $F_{(1,21)} = 6.22, P=0.021$)、また NP ヘテロマウスの到達時間も、野生型よりやや長い傾向が見られた (two-way ANOVA: $F_{(1,18)} = 4.19, P=0.056$) (図 1A と B)。しかしながら Visual task においては、NP ノックアウトマウスと野生型マウス間で有意な差は見られなかった (data not shown)。

次に私は、水迷路よりもストレスの少ない海馬依存的な学習試験である Y 迷路において、NP ノックアウトマウスの空間認識学習能力を調べた。マウスは先天的に新規探索行動を示すため、野生型マウスにおいては約 70 % の交替行動を示したが、NP ヘテロおよびノックアウトマウスにおいては、新規アームを選択する自発的交替行動率が低下していた (図 1C)。この 3 種のグループ間でアームに進出した総数に違いがなかったことから (図 1D)、NP ヘテロやノックアウトマウスにおける作業記憶障害は、歩行運動能力の低下によって引き起こされたものではない。それによって、NP ノックアウトマウスは、水迷路と Y 迷路における空間記憶能力が障害されていることがわかった。

赤外線活動測定装置を用いて 120 分間の自発的運動量を観察したところ、NP ノックアウト・ヘテロ・野生型マウスの 3 種間において有意な差は見られなかったことから (data not shown)、NP ノックアウトマウスの空間課題の障害は、運動量の差によるものではない。

NP ノックアウトマウスにおける E-LTP の障害

NP ノックアウトマウスの海馬依存的な記憶獲得能の障害に基づくシナプスメカニズムを吟味するために、まず私は、NP ノックアウトマウスを用いて海馬長期増強 (LTP) を解析した。図 2A に示すように、刺激電極により Schaffer-collateral を刺激し、それにより誘導される細胞外興奮性シナプス後電位

(field excitatory postsynaptic potential: fEPSP) を、海馬 CA1 領域の放線層に記録電極を刺入することで記録した。野生型マウスに、E-LTP を特異的に誘導する単一のテタヌス刺激 (100 Hz for 1 s) を与えたところ、少なくとも 60 分間は安定な E-LTP が誘導されたが、NP ノックアウトマウスにおいては、ほぼ完全に E-LTP は阻害された (60 min after tetanus: wild type, $120.5 \% \pm 4.5 \%$ of baseline, $n=6$; NP KO, $100.5 \% \pm 2.1 \%$ of baseline, $n=6$; t test, $P<0.003$; 図 2B)。

In vivo において NP は LTP 誘導早期に NMDA 受容体依存的に活性化する

次に、LTP 誘導時における内在性 NP のタンパク分解活性を調べた。その結果、シーターバースト刺激 (TBS) による LTP 誘導 5 から 6 分後に、一過的な活性上昇が見られた (5 min after TBS: $52.7 \text{ pg/mg protein}$, $n=9$, $p<0.007$ versus 0 min; 6 min after TBS: $102.3 \text{ pg/mg protein}$, $n=8$, $p<0.0001$ versus 0 min; 図 3A)。この活性は、7 分後には急激に減弱したが、コントロールレベルまでは戻らず、少なくとも 60 分間持続した (7 min after TBS: $28.8 \text{ pg/mg protein}$, $n=7$, $p<0.03$ versus 0 min; 60 min after TBS: $30.0 \text{ pg/mg protein}$, $n=9$, $p<0.05$ versus 0 min; 図 3A)。高頻度刺激は与えたが、LTP が誘導しなかった時には、NP は活性化されなかった (No LTP: $1.97 \text{ pg/mg protein}$, $n=7$, $p>0.7$ versus control; 図 3B)。また、高頻度刺激を与えた海馬領域以外では、NP の活性は見られなかった (Supplemental figure 2)。さらに、NMDA 受容体阻害剤 CPP および MK-801 を腹腔内に投与することにより、LTP の誘導を阻害し (Supplemental figure 3)、且つ NP の活性もほぼ完全に阻害した (CPP: $4.43 \text{ pg/mg protein}$, $n=8$, $P<0.03$ versus saline; MK-801: $1.38 \text{ pg/mg protein}$, $n=6$, $P<0.04$ versus saline; 図 3C)。以上のように、in vivo において神経可塑的変化の早期に、NP は、NMDA 受容体依存的に活性化することが明らかになった。

In vivo において NP 活性の抑制は、テタヌス刺激による E-LTP を阻害し、シーターバースト刺激による LTP を減弱させる

NP は、LTP の誘導に伴い NMDA 受容体依存的に活性化するため、私は活性中和モノクローナル抗 NP 抗体 mAbB5 および NP 特異的阻害剤 NP stop を用いて NP の活性を阻害することで、LTP が抑制できるかどうか検討した。その結果、E-LTP は、mAbB5 および NP stop の投与により完全に阻害された (60 min after tetanus: mAbB5, $103.7 \% \pm 3.5 \%$ of baseline, $n=3$; rat IgG, $125.1 \% \pm 2.9 \%$ of baseline, $n=3$; t test, $P<0.02$) (60 min after tetanus: NP stop, $100.5 \% \pm 1.8 \%$ of baseline, $n=5$; saline, $126.6 \% \pm 4.3 \%$ of baseline, $n=5$; t test, $P<0.0006$; 図 4A)。さ

らに、mAbB5 および NP stop の投与により、TBS による LTP も有意に減弱した (60 min after TBS: mAbB5, $112.7 \% \pm 6.6 \%$ of baseline, $n=5$; rat IgG, $138.5 \% \pm 7.9 \%$ of baseline, $n=5$; t test, $P<0.04$) (90 min after TBS: NP stop, $114.7 \% \pm 1.9 \%$ of baseline, $n=8$; saline, $140.2 \% \pm 6.6 \%$ of baseline, $n=6$; t test, $P<0.002$; 図 4B)。また、NP stop および mAbB5、rat IgG は通常のシナプス伝達には影響を与えなかった。以上のことから、内在性の NP、特にそのタンパク分解活性は、in vivo において E-LTP の誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

r-NP 単独投与により、In vivo において fEPSP slope および集合活動電位の振幅を増強させる。

海馬のシナプス伝達における NP のタンパク分解活性の役割を直接検討するために、活性型リコンビナント (r-) NP を作成し、これを海馬内に投与した後、in vivo において fEPSP slope および集合活動電位の振幅を測定した。(通常は不活性型である) 内在性の NP タンパク分解活性は、LTP を誘導する刺激によって一過的に活性化し、また r-NP によってその効果を模倣できる (Komai et al., 2000; Matsumoto-Miyai et al., 2003; Shimizu et al., 1998)。Schaffer-collateral 経路に 30 分間テストパルスを与えた後、r-NP 1.8 mU/ml を 10 分間投与したところ、fEPSP slope (180 min after application of 1.8-mU/ml r-NP: $137.5 \% \pm 5.8 \%$ of baseline, $n=5$; 図 5A) および CA1 野の錐体細胞層での集合活動電位の振幅 (180 min after application of 1.8-mU/ml r-NP: $191.7 \% \pm 7.0 \%$ of baseline, $n=5$; 図 5B) が長期的に増強した。この増加は、投与約 2.5 時間後にピークに達し、それから少なくとも 8 時間持続した (480 min after application of 1.8-mU/ml r-NP: $145.2 \% \pm 0.59 \%$ of baseline, $n=3$; 図 5C)。セリンプロテアーゼ阻害剤 PMSF や mAbB5 によって不活性化した r-NP (see Methods) では、このシナプス増強は見られなかった (180 min after application of 1.8-mU/ml r-NP: PMSF, $100.0 \% \pm 0.47 \%$ of baseline, $n=3$; 図 5D) (180 min after application of 1.8-mU/ml r-NP: mAbB5, $104.6 \% \pm 1.7 \%$ of baseline, $n=4$)。このように、高頻度刺激なしに、NP 単独でシナプス伝達の増強作用があることが明らかとなった。

低濃度の r-NP は LTP を誘導し、高濃度の r-NP は LTD を誘導する

低濃度 (0.18 mU/ml) および中濃度 (1.8 mU/ml)、高濃度 (3.6 mU/ml) の r-NP に対する fEPSP への効果を吟味した。その結果、r-NP は、通常のシナプス伝達に対して、濃度依存的な効果を示した ($F_{(3,14)}=25.3$, $P<0.001$)。低濃度の r-NP は、中濃度の r-NP よりも小さいながら fEPSP slope の増大を示した (60 min after

application of a low dose of r-NP: $112.3 \% \pm 1.8 \%$ of baseline, $n=5$; 図 6A と B)。興味深いことに、高濃度の r-NP は、低濃度および中濃度の r-NP と反対の効果を示し、有意にシナプス伝達を減弱させた (60 min after application of a high dose of r-NP: $85.0 \% \pm 3.8 \%$ of baseline, $n=4$; one-way ANOVA, $P<0.01$ versus ACSF; 60 min after application of ACSF; $104.0 \% \pm 1.1 \%$ of baseline, $n=4$; 図 6A と B)。それにより r-NP の単独投与は、濃度依存的に in vivo で LTP だけでなく LTD も誘導し得る。中濃度 (1.8 mU/ml) の r-NP は最も大きい LTP 様の増強を誘導したので、特に記載がない限り、以下の全ての実験にこれを用いた。

r-NP によるシナプス増強は Paired-pulse facilitation に影響を与えない

r-NP によるシナプス増強がプレシナプスの効果により引き起こされるのかどうかを検討するために、私は、r-NP 投与前後で Paired-pulse facilitation (PPF) の変化を調べた。PPF は、海馬 CA1 領域の神経細胞に対する興奮性線維に、短いパルス間隔で 2 発の連続する刺激を与えた時、最初の fEPSP slope に比べて 2 番目の fEPSP slope が増大する現象であり、これは主にプレシナプスの効果によるものである (Anwyl et al., 1989; McNaughton, 1982; Muller and Lynch, 1988; Zalutsky and Nicoll, 1990)。どのパルス間隔においても、r-NP の投与前後で PPF に差はみられなかった (25, 50, 75, 100, and 200 msec, $n=9$, two-way ANOVA, $F_{(1,80)}=2.09$, $P=0.15$; 図 7A)。また r-NP 投与前に得られた PPF のトレースと、投与 3 時間後の (r-NP 投与前の集合興奮性シナプス後電位の傾きと同じレベルまで刺激強度を下げて得られた) トレースは、ほぼ一致していた (図 7B)。このことは、r-NP によるシナプス伝達の増強は、少なくとも神経伝達物質の放出確率には影響を与えず、ポストシナプスの変化が寄与していることを示唆する。

電気刺激および r-NP によるシナプス増強はお互い閉塞し合う

r-NP は単独で、LTP および LTD 様のシナプス効率の変化を誘導するので (図 5E と F)、私は、電気刺激および r-NP による 2 つのシナプス増強がお互い閉塞し合うかどうかを検討した。まず、同じポストシナプスの細胞に対して、独立した二つの Schaffer collateral-commissural 線維をモニターした。一方の経路 (S1) で TBS を用いて LTP を誘導し、他方の経路はコントロールとした (S2) (図 8A)。S1 において、安定な LTP の誘導は、続く r-NP によるシナプス増強を阻害したが、コントロール経路では、r-NP による集合興奮性シナプス後電位の増大を誘導した (150 min after TBS: S1, $99.6 \% \pm 3.5 \%$ of baseline, $n=5$; S2, $133.1 \% \pm 6.2 \%$ of baseline, $n=5$, t test, $P<0.002$ versus control; 図 8A)。

逆に、r-NP によるシナプス増強がプラトーに達した後、30 分間の安定なベースラインを得て、TBS を適用したところ、有意に LTP レベルが減弱した。ACSF を投与したマウスにおいては、安定な LTP が誘導された (4 hr after TBS: r-NP, $117.7 \% \pm 5.6 \%$ of baseline, $n=5$; ACSF, $157.5 \% \pm 6.0 \%$ of baseline, $n=5$, t test, $P<0.002$ versus ACSF; 図 8A)。これらのデータは、2 つのシナプス可塑性は共通の細胞シグナル伝達経路を介していることを強く示唆するものである。

r-NP によるシナプス効率の変化は、AMPA 受容体 GluR1 サブユニットのリン酸化の変化を伴う

LTP および LTD に伴う AMPA 受容体のリン酸化および脱リン酸化 (LTP: Ser831; LTD: Ser845) を検出するために、GluR1 サブユニットのリン酸化サイトを特異的に認識する抗体を用いて、ウエスタンブロット解析を行った。電気刺激および r-NP 投与による 2 つのシナプス可塑性が共通した細胞シグナル伝達経路であることを確かめるために、AMPA 受容体のリン酸化状態をそれぞれの可塑性後に調べた。図 9 に示すように、中濃度の r-NP は、LTP 様のシナプス増強を伴って、Ser831 のリン酸化が増大したが ($155.3 \% \pm 13.8 \%$ of control phosphorylation, $n=5$, t test, $P<0.004$; 図 9)、Ser845 のリン酸化レベルは変化しなかった ($101.1 \% \pm 7.0 \%$ of control phosphorylation, $n=5$, t test, $P>0.8$; 図 9)。対照的に、LTD 様抑圧を誘導した高濃度の r-NP は、Ser 845 のリン酸化が有意に減少したが ($58.9 \% \pm 13.6 \%$ of control phosphorylation, $n=5$, t test, $P<0.02$; 図 9)、Ser831 のリン酸化には変化がなかった ($109.6 \% \pm 8.1 \%$ of control phosphorylation, $n=5$, t test, $P>0.2$; 図 9)。PMSF や mAbB5 によって不活性化した r-NP を投与したときでは、GluR1 のリン酸化の変化は見られなかった (PMSF: Ser831, $105.3 \% \pm 6.0 \%$ of control phosphorylation, $n=3$, t test, $P>0.4$; Ser845, $99.9 \% \pm 2.2 \%$ of control phosphorylation, $n=3$, t test, $P>0.9$; mAbB5: Ser831, $101.7 \% \pm 6.3 \%$ of control phosphorylation, $n=3$, t test, $P>0.7$; Ser845, $96.1 \% \pm 6.1 \%$ of control phosphorylation, $n=3$, t test, $P>0.5$; 図 9)。以上のことは、r-NP によるシナプス可塑性が、従来の電気刺激による LTP および LTD と同様の細胞メカニズムを共有していることを示す。

考察

海馬におけるシナプス伝達の LTP は、記憶の基礎過程と考えられている有用な実験モデルである。 プレシナプスおよびポストシナプスの同期的活動が、興奮性アミノ酸伝達物質の受容体への結合を介した細胞内シグナル伝達経路の増強を引き起こす (Bliss and Collingridge, 1993; Malenka and Nicoll, 1993)。 近年、数々の研究者がシナプス伝達の可塑的な変化に、シナプスの形態変化や新生、細胞外マトリックスの分解や再構成、細胞骨格の再編成などが伴うことを示してきた (Colicos et al., 2001; Cremer et al., 1998; Luthi et al., 1994; Tang et al., 1998)。 こうした構造変化のためには、細胞内骨格系の変化だけでなく、細胞外プロテアーゼによるシナプス周囲の細胞外マトリックス分子などのプロテオリシスが起これると考えられる。 それゆえ、細胞外マトリックス分子や細胞膜の生理活性タンパク質が、NP によるプロテオリシスやプロセッシングを受けることは、シナプス構造可塑性に重要な役割を果たしていると考えられる。 これまで我々は、NP がシナプス可塑性を調節する効果をもつことを示してきた (Komai et al., 2000; Matsumoto-Miyai et al., 2003)。 また今回の研究により、NP ノックアウトマウスは、水迷路や Y 迷路での海馬依存的な空間記憶が障害されていることが明らかとなった。 この記憶障害は、*in vivo* において NP 遺伝子の欠損や NP 活性を抑制すると LTP が阻害されるという知見から考えても、強く支持されるものである。 r-NP が TBS による LTP を閉塞することや LTP 特異的な AMPA 受容体のリン酸化を誘導することから、LTP において NP は、シナプス可塑性に対するシグナルカスケードの上流に位置する主要なエフェクターとして作用していると考えられる。 特に、NP の欠損や NP の活性を抑制することにより E-LTP を完全に阻害することから、NP は LTP の初期過程に重要であると思われる。 つまりこれらの結果は、細胞外プロテアーゼが、シナプス効率を決定付ける AMPA 受容体のリン酸化状態を制御する因子として機能していることを示唆する。

LTP は、E-LTP と L-LTP からなり、以前、数回のテタヌス刺激によって誘導される L-LTP が NP ノックアウトマウスでは正常であるということが報告された (Davies et al., 2001)。 今回の研究で、シナプス可塑性における NP の効果は、LTP の早期過程にはかなり重要であり、TBS による LTP の後期過程には強い効果を示さなかった。 NP は、LTP 誘導早期に活性化し、また NP 遺伝子の欠損および NP 阻害剤、モノクローナル抗 NP 抗体の投与より、E-LTP が強く障害されたため、NP は、L-LTP というよりはむしろ E-LTP に含まれると考え

られる。同様の傾向が今回の行動試験でも見られた。水迷路において、NP ノックアウトマウスは、テストの4日目よりもテスト2日目という早期において、野生型と顕著な差が見られた。このように NP は、記憶の保持ではなく、海馬依存的な学習過程の獲得に重要な役割をはたしていることが考えられる。

このような NP の生理的な働きは、どのようなメカニズムを介するのであるだろうか？ r-NP の投与により、PPF に有意な効果を示さなかったことから、NP は少なくともプレシナプスからの伝達物質の放出確率には影響を及ぼさないことがわかる。それゆえ、海馬における NP によって誘導される可塑性は、電気刺激による LTP および LTD 同様、ポストシナプスのメカニズムによるものであると考えられる。このことは、閉塞実験や、NP が、LTP や LTD に対する特異的なリン酸化サイトにおける AMPA 受容体の活性化を導くことからわかる。このように、NMDA 受容体のシグナルカスケードの下流に位置する細胞外からの NP 依存的なシナプス調節経路は、プレシナプスの機能には影響を与えず、ポストシナプスへ再度戻ってくる。このアウトサイドからインサイドへの turn-back シグナル経路は、ポストシナプスの増強シグナル経路の多様性や修飾に寄与するのかもしれない。また、NP は細胞外へ分泌するため、L1cam 陽性の未成熟で小さいシナプスや L1cam 陽性でまだシナプスを形成していない終末 (orphan bouton) の近接シナプスで、LTP が誘導し、これらのシナプスを活性化するということも推測できる (Nakamura et al., in press)。

細胞外から r-NP を投与することで、電気刺激による LTP と同様の細胞内シグナル経路の可塑的变化を引き起こせ、特に E-LTP の細胞外修飾因子として作用することが今回明らかとなった。この結果は、E-LTP 誘導刺激に続いて起こるポストシナプスのシグナル経路が、proNP (zymogen) を活性化するために細胞外スペースに出ることを意味する (Matsumoto-Miyai et al., 2003; Shimizu et al., 1998)。NP の活性化は、NMDA 受容体の下流シグナルを介して 4 アミノ酸 (QGSK) の切断によって起こる (Matsumoto-Miyai et al., 2003; Shimizu et al., 1998)。また、NP の活性を抑制すると、E-LTP が阻害され、TBS による LTP が部分的に抑制されるため、この NP の活性化経路は、E-LTP の成立および TBS による LTP に必須であると考えられる。

最後に、今回の研究により、おそらく ECM の再構成を誘導する NP によるシナプス修飾は、シナプス可塑性、特に E-LTP に重要なメカニズムであることが明らかとなった。また、このメカニズムは、LTD にも重要な役割を果たすだろう。NP による ECM のプロテオリシスは、E-LTP および記憶の獲得に必須であると思われる。

参考文献

- Anwyl, R., Mulkeen, D., and Rowan, M. J. (1989). The role of N-methyl-D-aspartate receptors in the generation of short-term potentiation in the rat hippocampus. *Brain Res* 503, 148-151.
- Bahr, B. A., Staubli, U., Xiao, P., Chun, D., Ji, Z. X., Esteban, E. T., and Lynch, G. (1997). Arg-Gly-Asp-Ser-selective adhesion and the stabilization of long-term potentiation: pharmacological studies and the characterization of a candidate matrix receptor. *J Neurosci* 17, 1320-1329.
- Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y. Y., Chen, M., Bailey, C. H., and Kandel, E. R. (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813-825.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- Bliss, T. V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.
- Chen, Z. L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., and et al. (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* 15, 5088-5097.
- Colicos, M. A., Collins, B. E., Sailor, M. J., and Goda, Y. (2001). Remodeling of synaptic actin induced by photoconductive stimulation. *Cell* 107, 605-616.
- Cremer, H., Chazal, G., Carleton, A., Goridis, C., Vincent, J. D., and Lledo, P. M. (1998). Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13242-13247.
- Davies, B., Kearns, I. R., Ure, J., Davies, C. H., and Lathe, R. (2001). Loss of hippocampal serine protease BSP1/neuropsin predisposes to global seizure activity. *J Neurosci* 21, 6993-7000.
- Frey, U., Huang, Y. Y., and Kandel, E. R. (1993). Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260, 1661-1664.
- Frey, U., Muller, M., and Kuhl, D. (1996). A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci* 16, 2057-2063.

Hesse, G. W., and Teyler, T. J. (1976). Reversible loss of hippocampal long term potentiation following electronconvulsive seizures. *Nature* 264, 562-564.

Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., *et al.* (2001). Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17, 600-610.

Huang, Y. Y., Bach, M. E., Lipp, H. P., Zhuo, M., Wolfer, D. P., Hawkins, R. D., Schoonjans, L., Kandel, E. R., Godfraind, J. M., Mulligan, R., *et al.* (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8699-8704.

Huang, Y. Y., Li, X. C., and Kandel, E. R. (1994). cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* 79, 69-79.

Kato, K., Kishi, T., Kamachi, T., Akisada, M., Oka, T., Midorikawa, R., Takio, K., Dohmae, N., Bird, P. I., Sun, J., *et al.* (2001). Serine proteinase inhibitor 3 and murinoglobulin I are potent inhibitors of neuropsin in adult mouse brain. *J Biol Chem* 276, 14562-14571.

Komai, S., Matsuyama, T., Matsumoto, K., Kato, K., Kobayashi, M., Imamura, K., Yoshida, S., Ugawa, S., and Shiosaka, S. (2000). Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. *Eur J Neurosci* 12, 1479-1486.

Krug, M., Lossner, B., and Ott, T. (1984). Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13, 39-42.

Lee, H. K., Kameyama, K., Huganir, R. L., and Bear, M. F. (1998). NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21, 1151-1162.

Luthi, A., Laurent, J. P., Figurov, A., Muller, D., and Schachner, M. (1994). Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372, 777-779.

Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 16, 521-527.

Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., and Shiosaka, S. (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23, 7727-7736.

- McNaughton, B. L. (1982). Long-term synaptic enhancement and short-term potentiation in rat fascia dentata act through different mechanisms. *J Physiol* 324, 249-262.
- Momota, Y., Yoshida, S., Ito, J., Shibata, M., Kato, K., Sakurai, K., Matsumoto, K., and Shiosaka, S. (1998). Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy. *Eur J Neurosci* 10, 760-764.
- Muller, D., and Lynch, G. (1988). Long-term potentiation differentially affects two components of synaptic responses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9346-9350.
- Nakamura, Y., Tamura, H., Horinouchi, K., and Shiosaka, S. (2006). Role of neuropsin in formation and maturation of the Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *J Cell Sci*, in press.
- Ronn, L. C., Bock, E., Linnemann, D., and Jahnsen, H. (1995). NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res* 677, 145-151.
- Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A., and Shiosaka, S. (1998). Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *J Biol Chem* 273, 11189-11196.
- Staubli, U., Chun, D., and Lynch, G. (1998). Time-dependent reversal of long-term potentiation by an integrin antagonist. *J Neurosci* 18, 3460-3469.
- Tang, L., Hung, C. P., and Schuman, E. M. (1998). A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 20, 1165-1175.
- Thiels, E., Barrionuevo, G., and Berger, T. W. (1994). Excitatory stimulation during postsynaptic inhibition induces long-term depression in hippocampus in vivo. *J Neurophysiol* 72, 3009-3016.
- Xu, L., Anwyl, R., and Rowan, M. J. (1998). Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus. *Nature* 394, 891-894.
- Yoshida, S., and Shiosaka, S. (1999). Plasticity-related serine proteases in the brain (review). *Int J Mol Med* 3, 405-409.
- Zalutsky, R. A., and Nicoll, R. A. (1990). Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 248, 1619-1624.

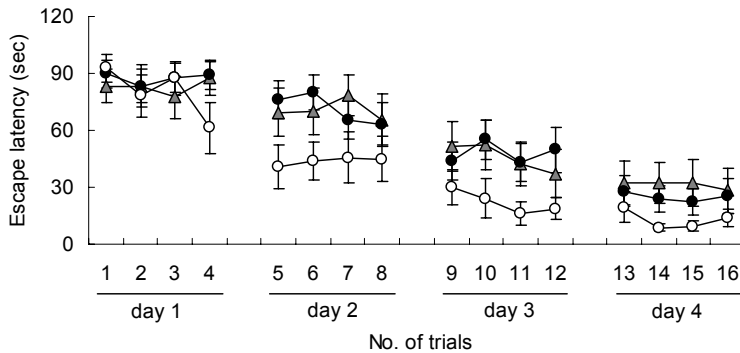
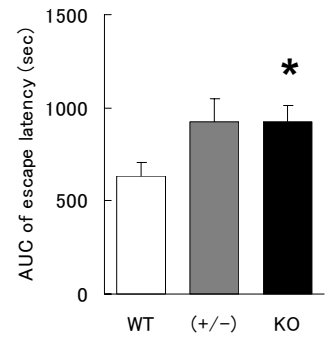
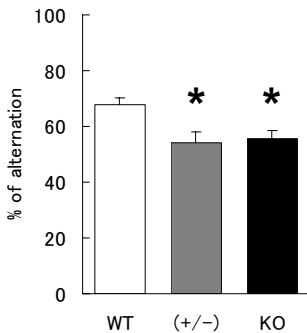
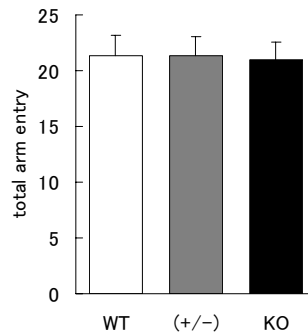
A**B****C****D**

図1. モリス水迷路およびY 迷路におけるNP ノックアウトマウスの海馬依存的な学習および記憶の障害

A, 訓練1-4 日目での、NP ノックアウト (filled circles, $n=13$)、ヘテロ (gray triangles, $n=10$)、野生型マウス (open circles, $n=10$) において、水面下プラットホームまでの到達時間。 **B**, NP ノックアウト (KO, filled bars)、ヘテロ (+/-, gray bars)、野生型マウス (WT, open bars) において、水面下プラットホームまでの総到達時間。 グラフA のカーブ下総面積 (Area under the curve: AUC)。 KO マウスは、WT マウスよりもプラットホームを探し出す時間が有意に長い (two-way repeated measures ANOVA: $F(1,21)=6.22$, $P=0.22$)。 **C**, **D**, Y 迷路におけるNP KO、ヘテロ、WTマウスの自発的交替行動。 NP KO とヘテロマウスは、WT マウスに比べて有意に交替率が低かったが (* $P<0.05$)、グループ間でアームの総進入数に有意な差はなかった。 データは、平均±SEM として示す。

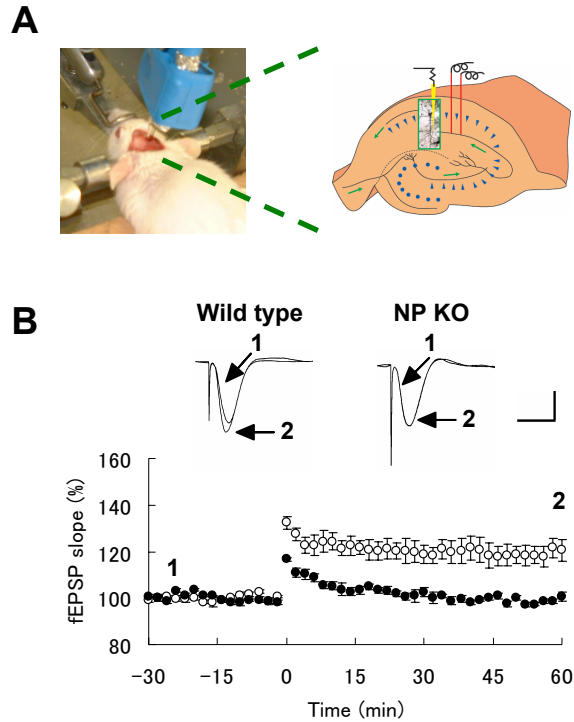


図2. NP 遺伝子の欠損は、E-LTP を阻害する

A, 成熟マウス海馬CA1 領域における刺激電極と記録電極の位置。

B, NP KO マウスでは、単一テタヌス刺激によって誘導されるE-LTP が障害されていた。 NP KO (NP KO, filled circles, n=6) と野生型 (Wild type, open circles, n=6) マウスのテタヌス刺激以前 (1) と 60 分後 (2) で記録されたfEPSP の波形を上部に示す。 fEPSP slope は、ベースラインに対する割合 (%) でプロットした。 スケールバーは、2 mV、10 ms である。 データは、平均± SEM で示す。

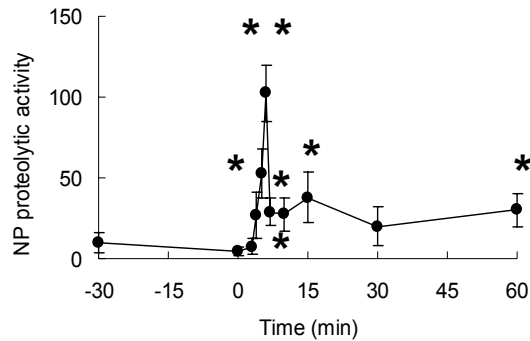
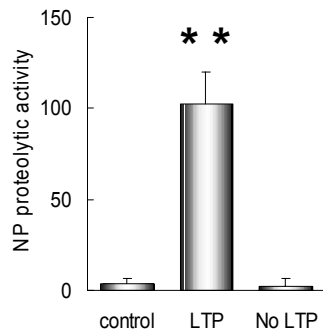
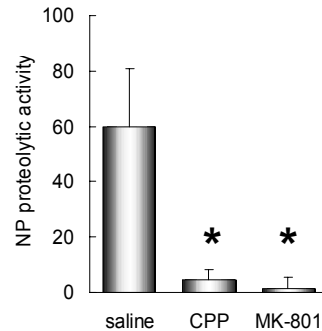
A**B****C**

図3. 海馬CA1 領域で、TBS 適用後、NP はNMDA 受容体依存的に活性化する
A, シーターバースト刺激 (TBS) 適用時におけるCA1 領域での、内在性NP の活性変動。 NP 活性は、TBS 適用後、5, 6, 7, 10, 15 および60 分後で有意に増加した (n=6-10)。

B, TBS を与えても、シナプス可塑性が誘導しなかった時 (No LTP)、NP の活性は増大しなかった (n=7)。

C, NP の活性は、NMDA 受容体阻害剤CPP (n=8) やMK-801 (n=6) によって完全に阻害された。* $P<0.05$ 、** $P<0.0001$ 。 データは、平均± SEM で示す。

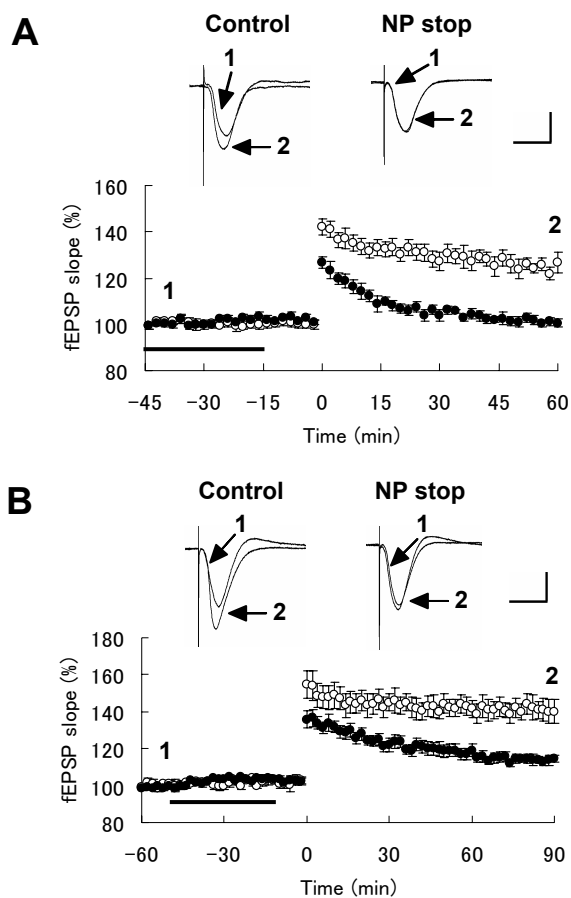


図4. NP の活性抑制は、E-LTP を阻害し、TBS によるLTP を減弱させる
A, B, NP stop によりE-LTP が完全に阻害され、TBS によるLTP が有意に抑制された。 NP stop (filled circles) やsaline (open circles) は、TBS やテタヌス刺激以前の40 分間、側脳室内に投与した。 刺激はそれから15 分後に、Schaffer-collateral 経路に与えた。 それぞれのパネルで、生理食塩水 (Control) およびNP 阻害剤 (NP stop) の存在下で、TBS やテタヌス刺激以前 (1) と90 分および60 分後 (2) で記録されたfEPSP の波形を上部に示す。 バーは、生理食塩水およびNP stop の投与期間を示す。 fEPSP slope は、ベースラインに対する割合 (%) でプロットした。 スケールバーは、2 mV、10 ms である。 データは、平均± SEM で示す。

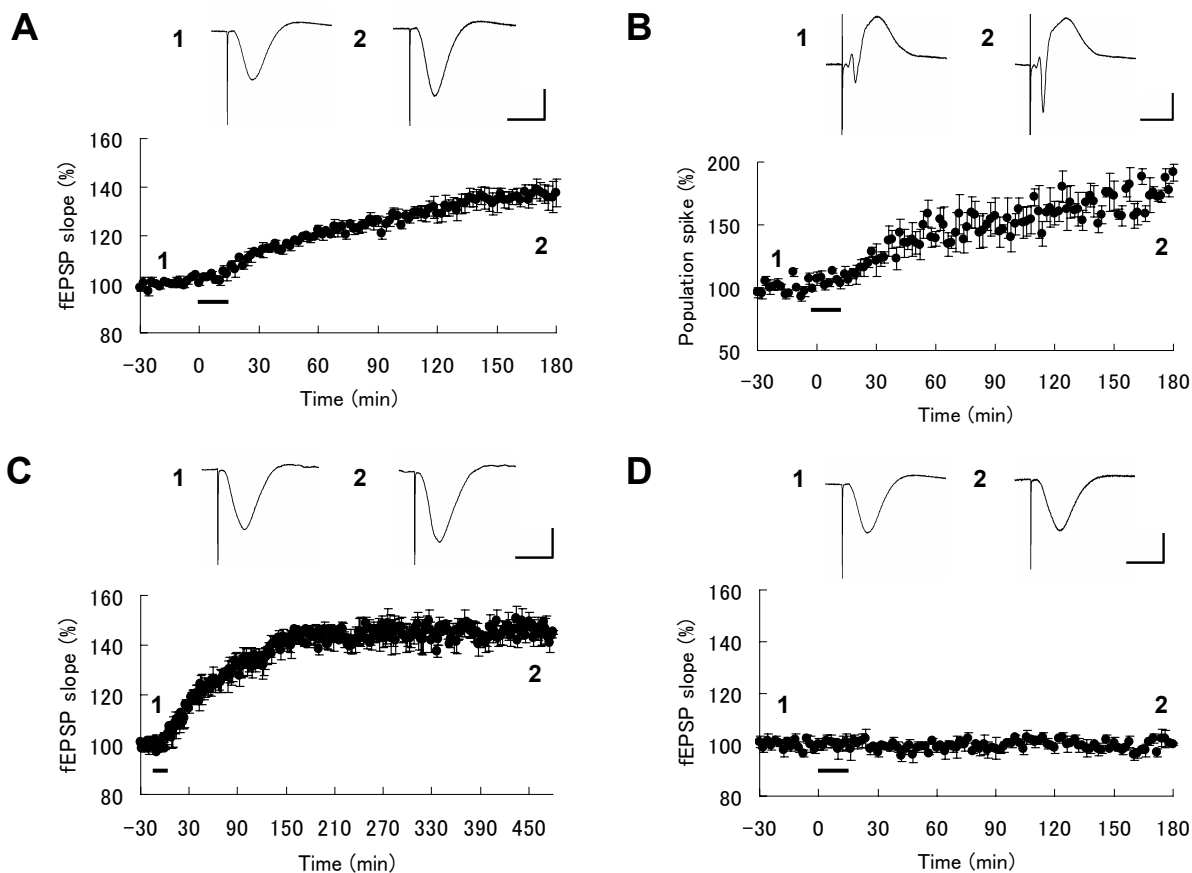


図5. Schaffer-collateral 経路のシナプス伝達におけるr-NP の効果

A, B, リコンビナントNP (r-NP; 1.8 μ M) は、fEPSP slope (n=5) と population spike の振幅 (n=5) を増強させる。

C, r-NP 投与後8時間のタイムコースを示す (n=3)。

D, PMSF によって不活性化したr-NP は、fEPSP slope の増強を誘導しなかった (n=3)。それぞれの波形は、r-NP 投与前 (1) と投与終了3時間および8時間後 (2) に得たものを示す。r-NP (A, B, C) およびPMSF-inactivated r-NP (D) は、バーによって示した期間投与した。fEPSP slope は、ベースラインに対する割合 (%) でプロットした。スケールバーは、2 mV、10 ms である。データは、平均 $\pm$ SEM で示す。

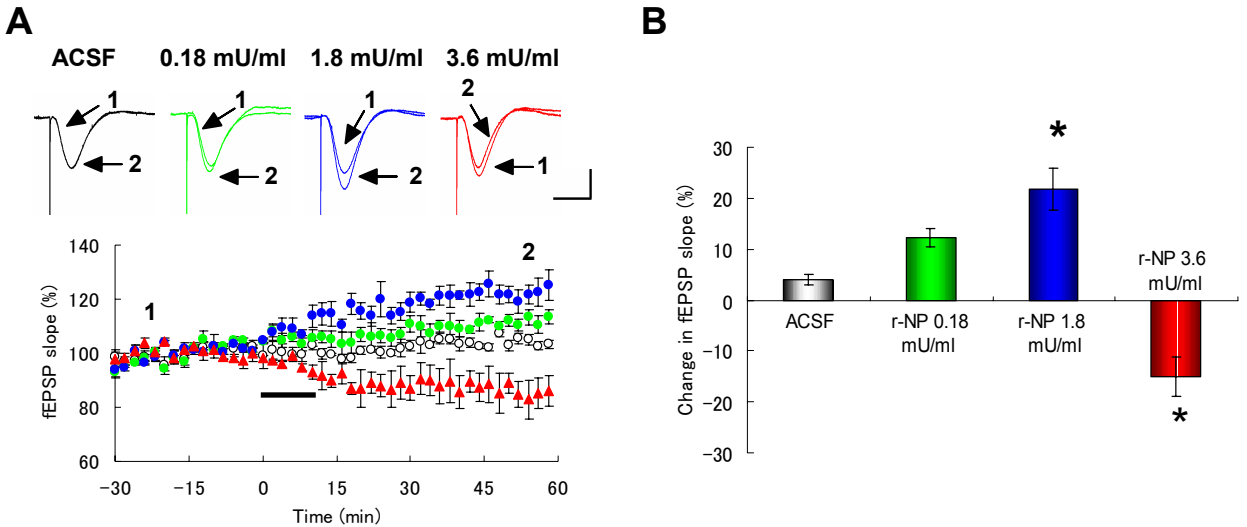


図6. Schaffer-collateral 経路においてr-NP は、濃度依存的にシナプス伝達を増強および抑圧する

A, それぞれの波形は、ACSF およびr-NP 投与 (low, middle, high) 投与前 (1) と60 分後 (2) に得たものを示す。 ACSF (open circles, $n=4$) やr-NP (green circles, low, $n=4$; blue circles, medium, $n=5$; red triangles, high, $n=4$) の投与後のfEPSP slope のタイムコースを示す。 ACSF およびr-NP は、バーによって示した期間投与した。fEPSP slope は、ベースラインに対する割合 (%) でプロットした。 スケールバーは、2 mV、10 ms である。

B, r-NP の効果は、ACSF (open) やr-NP low (green)、middle (blue)、high (red) 濃度で投与した60 分後のfEPSP slope の平均変化率 (%) で示す (* $P<0.01$ versus ACSF)。データは、平均 $\pm$ SEM で示す。

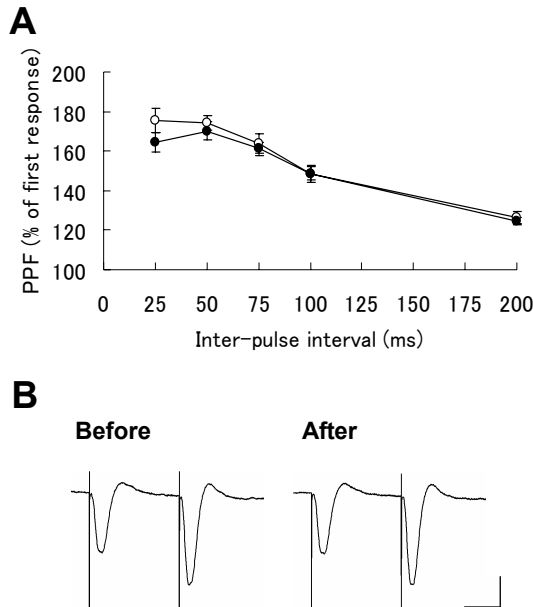


図7. r-NP の海馬内投与は、Paired-pulse facilitation に影響を与えない

A, r-NP 投与前後においてPaired-pulse facilitation (PPF) 率は、様々なパルス間隔で、変化がなかった (n=9)。PPF 率は、最初のfEPSP slope に対する2 番目のfEPSP slope の割合 (%) で示す。 r-NP 投与前 (open circles) と3 時間後 (filled circles) のPPF を示す。

B, r-NP 投与前と、3 時間後に刺激強度を下げた後記録したPPF (50-ms inter-pulse intervals) の波形を示す。 スケールバーは、2 mV、20 ms である。 データは、平均± SEM で示す。

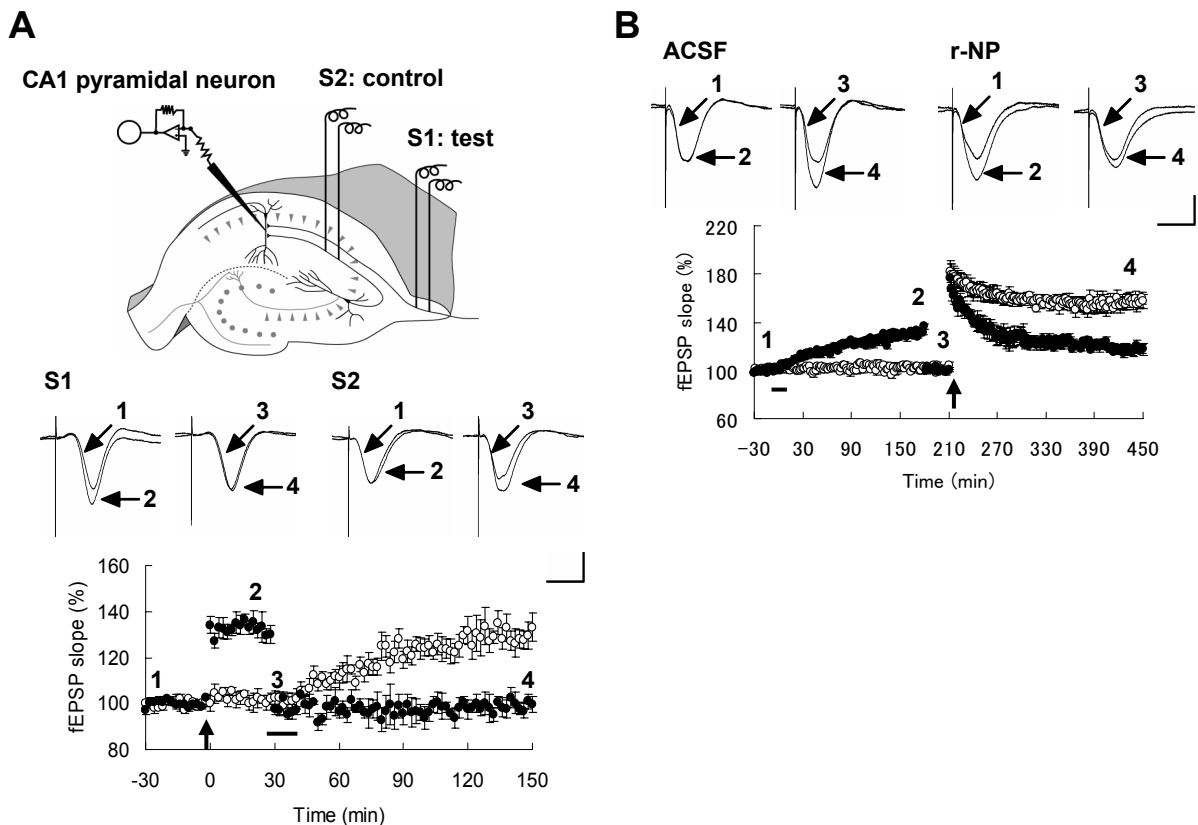


図8. TBS によるLTP とr-NP 投与によるシナプス増強はお互い閉塞し合う

A, 同じ神経細胞群上の2つの独立した入力線維 (S1 とS2) を刺激した。 S1 で TBS によるLTP を誘導し、S2 はコントロールとした。 TBS 後、fEPSP slope をベースラインレベルに一致するように、刺激強度を下げた。 続くr-NP の投与は、fEPSP slope の増強効果を示さなかったが (filled circles, n=5)、コントロール経路では、シナプス増強が起こった (open circles, n=5)。 バーは、r-NP を投与した期間を示す。

B, r-NP によるLTP が飽和した後に、TBS を与えても、fEPSP slope は、ほぼベースラインレベルまで減弱したが (filled circles, n=5)、ACSF を投与したときは、安定なLTP が誘導された (open circles, n=5)。 バーは、ACSF およびr-NP を投与した期間を示す。 それぞれの波形は、グラフに示す時間で記録したものを示す。 TBS は、矢印で示す時に与えた。 fEPSP slope は、ベースラインに対する割合 (%) でプロットした。 スケールバーは、2 mV、10 ms である。 データは、平均± SEM で示す。

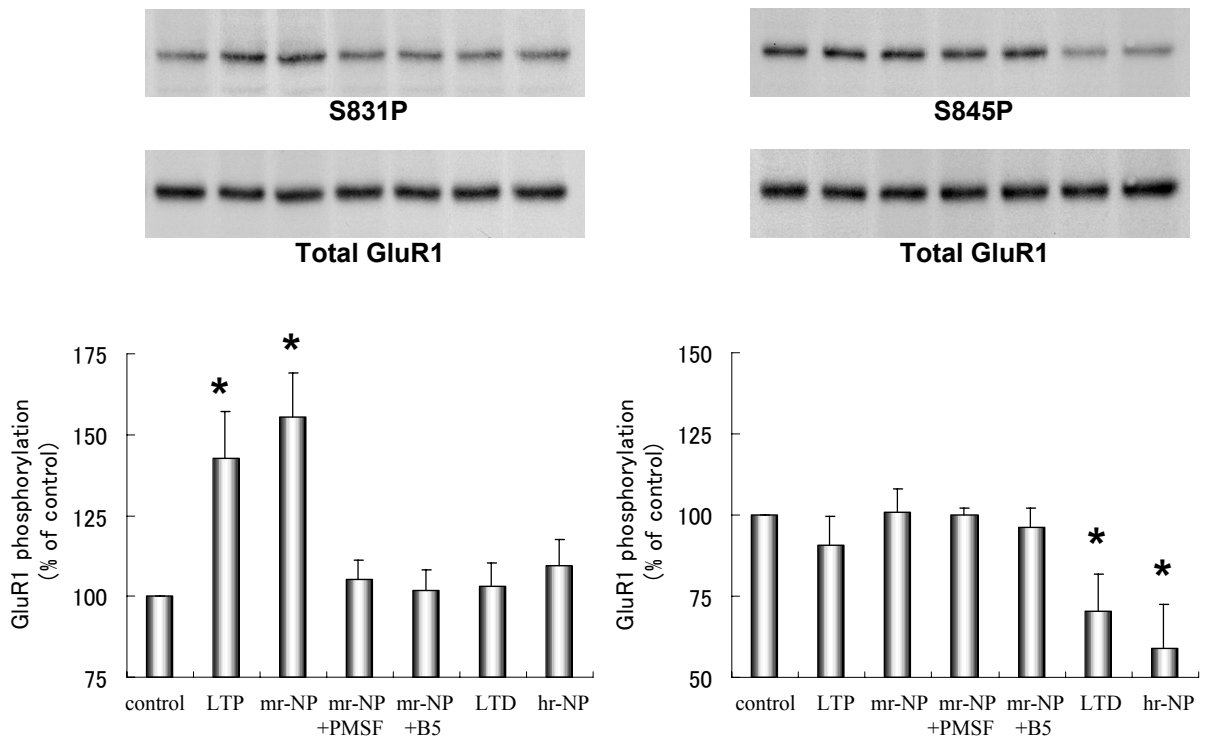
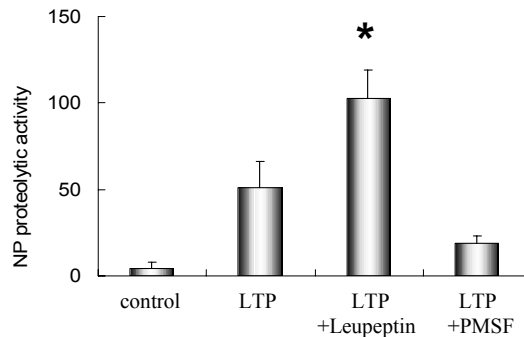
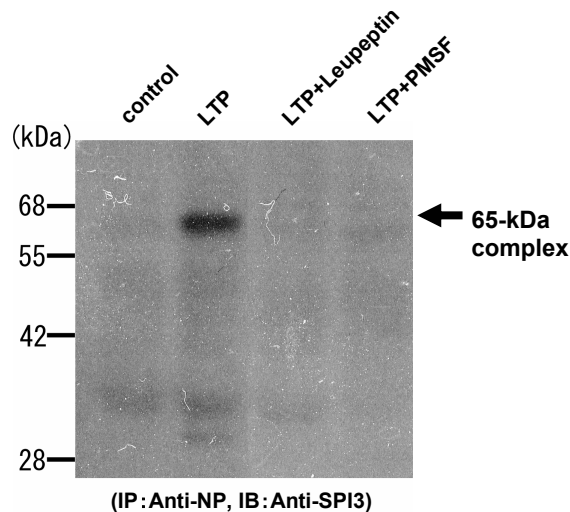


図9. r-NP の海馬内投与は、LTP とLTD の誘導時に伴う GluR1 サブユニットのリン酸化を変化させる

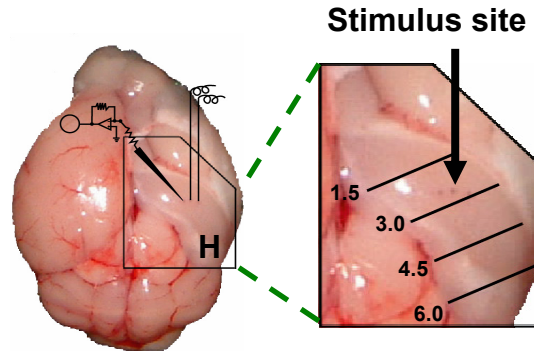
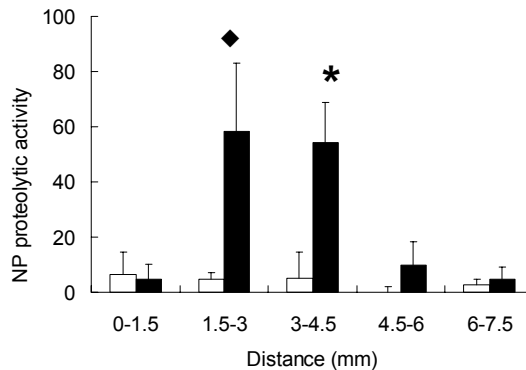
中程度のr-NP (mr-NP, n=5) の投与は、AMPA 受容体GluR1 サブユニットのSer845 (PKA site: S845P) のリン酸化状態には影響を与えず、Ser831 (CAMK II site: S831P) のリン酸化レベルを有意に増大させた (これはLTP 特異的な変化 (LTP) である) (* $P<0.05$ versus control)。一方、高濃度のr-NP (hr-NP, n=5) の投与は、Ser831 には影響を与えず、Ser845 で脱リン酸化を誘導した (これはLTD 特異的な変化 (LTD) である) (* $P<0.05$ versus control)。PMSF (mr-NP + PMSF, n=3) および mAbB5 (mr-NP + B5, n=3) によって不活性化したmr-NP では、GluR1 のリン酸化レベルは、変化しなかった。ACSF のみ投与した時も (control)、リン酸化の変化は見られなかった。全GluR1 の発現量 (Total GluR1) は、抗GluR1 C 末抗体でリブローブすることで求めた。下記のパネルは、LTP やLTD の誘導またはr-NP の投与前後における、GluR1のSer831 (left panel) とSer845 (right panel) におけるリン酸化レベルを示す。データは、平均± SEM で示す。

A**B**

Supplemental figure 1. 活性型NP は、セリンプロテアーゼインヒビターSPI3 と結合する

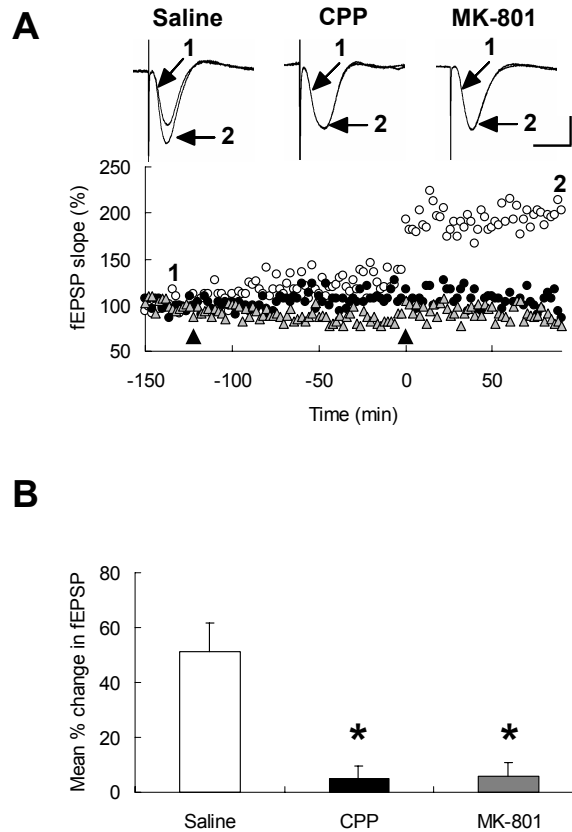
A, NP 活性測定時における可逆的または不可逆的セリンプロテアーゼ阻害剤 Leupeptin、PMSF の効果。 Leupeptin によりNP 活性は、有意に増加した (n=8, * $P < 0.05$ versus LTP)。 LTP は、海馬CA1 領域でTBS を与えてから6 分後のものを示す。 データは、平均± SEM で示す。

B, 抗NP 抗体で免疫沈降し、抗SPI3 抗体によるウエスタンブロットの後、65 kDa の複合体を検出。 Leupeptin やPMSF は、活性型NP とSPI3 の複合体形成を阻害した。

A**B**

Supplemental figure 2. LTP が誘導した部位のみで、NP の活性化は誘導される
A, LTP 誘導後、右大脳皮質を取り除いた成熟マウス全脳 (left) および強拡大 (right) 写真。海馬体の3つの穴は、左から記録電極、双極形刺激電極の刺入した跡である。Abbreviation: H, hippocampus.

B, 海馬Schaffer-collateral LTP 誘導後のNP 活性の分布。テストパルス (open bars, $n=7$) およびTBS (filled bars, $n=10$) を与えた後、海馬を中隔野側から1.5 mm 間隔で分割した。刺激部位周辺でNP の活性化が見られた ($\diamond P=0.08$, $*P<0.02$ versus test pulse)。データは、平均 $\pm$ SEM で示す。



Supplemental figure 3. NMDA 受容体阻害剤CPP およびMK-801 は、LTP の誘導を阻害する

A, CPP およびMK-801 投与後のLTP のタイムコースを示す。 Saline (open circles)、CPP (filled circles) およびMK-801 (gray circles) は、TBS 適用2 時間前に、腹腔内に投与した。 Saline、CPP やMK-801 を投与した以前 (1) とTBS 適用90 分後 (2) で記録されたfEPSP の波形を上部に示す。 fEPSP slope は、ベースラインに対する割合 (%) でプロットした。 スケールバーは、2 mV、10 ms である。

B, Saline (open bar, n=8)、CPP (filled bar, n=8) およびMK-801 (gray bar, n=6) を投与した後、TBS を与えて6 分後のfEPSP slope の平均変化率 (%) を示す (* $P<0.05$ versus LTP)。 データは、平均± SEM で示す。

第 2 部

In vivo で、ニューロプシンは、外側嗅内皮質 – 扁桃体基底外側核
経路の長期増強の誘導に必須である

序論

扁桃体は、黙示的な情動記憶に深く関わっており (LeDoux, 2000)、多くの皮質入力を受けている。特に、扁桃体基底外側核 (BLA) は、外側嗅内皮質 (LEC) を含む多様性感覚様態の皮質領域からの入力を受けおり、LEC で高度に修飾された感覚入力に応じて、適切な情動行動を示すのに重要である (McDonald, 1998; Pitkanen *et al.*, 2000)。そのため、LEC-BLA シナプスは、LEC で加工された認識の再現と、BLA で処理された情動とを連合させる機能をもつ。近年、この LEC を高頻度で刺激すると、BLA で N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体非依存な長期増強 (LTP) が誘導されることが示されたが (Yaniv *et al.*, 2003)、その分子メカニズムをほとんどわかっていない。LTP は恐怖記憶と密接に結びついており、恐怖学習時に LTP 様のシナプス増強現象が誘導され (McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997; Rogan *et al.*, 1997)、その学習成立後には、続く LTP の誘導を、共通のメカニズムを介して閉塞した (Tsvetkov *et al.*, 2002)。

扁桃体において、恐怖やストレスによるシナプス構造変化は、最近特に観察され (Mitra *et al.*, 2005; Vyas *et al.*, 2002)、細胞外プロテオリシスのメカニズムが注目されている。その中で、細胞外セリンプロテアーゼニューロプシン (NP) は、恐怖記憶において重要な役割をはたしている扁桃体 BLA に高濃度に局在しており (Chen *et al.*, 1995)、非常に興味深い。以前の私の研究により、NP ノックアウトマウスは、海馬依存的な空間記憶および LTP の早期過程が障害されていることが明らかとなった (Tamura *et al.*, in press)。また、LTP 誘導に伴い NP は一過的に活性化し、活性型の NP は、プレシナプスに局在する細胞接着分子 L1cam を切断することが報告された (Matsumoto-Miyai *et al.*, 2003)。このような NP によるプロテオリシスは、シナプスの新生や成熟を誘導する (Nakamura *et al.*, in press)。以上のように NP は、海馬において、活動依存的なシナプス構造可塑性に重要な役割を果たしていることが示されてきたが、NP の扁桃体における機能はほとんどわかっていない。そこで今回私は、*in vivo* で、LEC-BLA 経路のシナプス可塑性における NP の働きを検討した。

材料と方法

実験動物として、12 時間 light/dark サイクル、自由給餌で育成した 20 匹の野生型マウスと NP ノックアウトマウス (8-10 週齢) を用いた。実験終了後、マウスは、overdose の pentobarbital を投与し、苦痛を与えないように殺した。以下の実験は、奈良先端科学技術大学院大学および日本生理学会の動物実験ガイドラインに従って行った。

マウスは、ウレタン (1.25 g/kg; i.p.) による麻酔下で、脳定位固定台に固定した後、刺激電極および記録電極を、扁桃体基底外側核 (1.8 mm posterior and 3.2 mm lateral to bregma, and 4.5 mm ventral to dura) または、外側嗅内皮質 (3.0 mm posterior and 3.8 mm lateral to bregma, and 4.0 mm ventral to dura) に刺入した。テスト刺激 (100 μ s duration) は、30 秒間隔で与え、刺激強度は最大値の約 50 % の細胞外興奮性シナプス後電位 (field excitatory postsynaptic potential: fEPSP) を与えるように調節した。LTP を誘導するために、テタヌス刺激 (100Hz for 1 sec) を 30 秒間隔で 2 回与えた。実験中、マウスの直腸温をヒートジャケットパッド (BWT-100, Bio Research Center, Nagoya, Japan) を用いて 37 °C に維持した。入力-出力 (I-O) カーブは、LTP 誘導前後で 100-1000 μ A の範囲で獲得した。Paired-pulse facilitation (PPF) は、LTP 誘導前後で、刺激間隔 25, 50, 75, 100, 200 msec の範囲で比較した。統計的有意差の検定には、二元配置分散分析法 (ANOVA) 後のポストホックテストとして Scheffe's テストにより比較した。有意水準は $P<0.05$ とした。データは平均値 $\pm$ SEM として表した。

結果

NP は、扁桃体の基底外側核 (basolateral amygdala: BLA) に強く発現している。そこで私は、扁桃体における NP の生理的機能を調べるために、まず NP ノックアウトマウスを用いて BLA への入力経路におけるシナプス可塑性を検討した。刺激電極を、入力線維の起始部である外側嗅内皮質 (lateral entorhinal cortex: LEC) へ、記録電極を投射部位である BLA に刺入した (図 1A)。LEC へ単一パルスの刺激を与えると、BLA で下向きの細胞外電位が誘導される。30 分間テストパルスを与えた後、高頻度刺激 (100 Hz for 1 s, twice at an interval of 30 s) を実行した所、野生型マウスにおいては少なくとも 90 分間は安定な LTP が誘導されたが、NP ノックアウトマウスは、野生型に比べて有意に減弱し、刺激約 60 分後には、ベースラインレベルまで減弱した (60 min after tetanus: wild type, $129.4 \% \pm 8.3 \%$ of baseline, $n=7$; NP KO, $104.8 \% \pm 3.7 \%$ of baseline, $n=7$; t test, $P<0.02$; 図 1B)。しかしながら、刺激強度に対する細胞外興奮性シナプス後電位 (fEPSP) の slope や Paired-pulse facilitation (PPF) において、野生型マウスおよび NP ノックアウトマウスに有意な差は見られなかった (25, 50, 75, 100, and 200 msec, $n=7$, two-way ANOVA, $F_{(1,55)}=2.27$, $P=0.14$; 図 2A と B)。

逆に、NP ノックアウトマウスにおける扁桃体の出力経路のシナプス可塑性を検討するために、刺激電極を BLA に、記録電極を LEC へ刺入した (図 3A)。BLA へ単一パルスの刺激を与えると、LEC で下向きの fEPSP が誘導される。高頻度刺激を BLA へ与えた所、野生型マウスと NP ノックアウトマウス共に、少なくとも 90 分間は安定な LTP が誘導された (60 min after tetanus: wild type, $139.4 \% \pm 0.1 \%$ of baseline, $n=3$; NP KO, $133.6 \% \pm 12.0 \%$ of baseline, $n=3$; t test, $P>0.7$; 図 3B)。

考察

以前の解剖学的な研究により、BLA は、LEC から多数の直接投射を受けていることが明らかとされ (McDonald and Mascagni, 1997; Veening, 1978; Wyss, 1981)、また、この結合は生理学的にも証明された (Brothers and Finch, 1985; Ferry et al., 1997)。今回、この経路のシナプス可塑性において、NP が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。扁桃体の機能に關与する他の細胞外プロテアーゼとして、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) が知られており、tPA は、ストレスによる不安行動の促進に重要な役割を果たしていることが示された (Pawlak et al., 2003)。しかしながら、tPA は、扁桃体内側核および中心核に局在しており、BLA には発現していない (Pawlak et al., 2003)。そのため、それぞれの扁桃体核において、シナプスにおける分子メカニズムは同一ではなく、種々の情動によって關与する扁桃体核が、異なるのかもしれない。

NP は、扁桃体においても、海馬と同様のメカニズムを介しているかはわからないが、NP ノックアウトマウスと野生型マウスで PPF に差がなかったことから、NP ノックアウトマウスにおける LTP の障害は、ポストシナプスのメカニズムによるものであると示唆される。また、NP ノックアウトマウスにおいて、LEC-BLA 経路の LTP は、障害されたが、BLA-LEC 経路における LTP は、正常であった。NP は、LEC には、ほとんど発現しておらず、BLA に高濃度に発現していることから考えると、NP は、おそらくポストシナプスから分泌するのかもしれない。また、細胞外から NP 特異的阻害剤を投与することでも、LEC-BLA 経路の LTP が阻害されたことから (Tamura et al., preliminary data)、NP は、海馬同様、細胞外で、そのタンパク分解活性が重要な役割を果たしていると考えられる。電子顕微鏡観察により、BLA で、L1cam はプレシナプスに局在しており (unpublished observation)、また、L1cam は、LEC に高濃度に発現しているにも関わらず (Horinouchi et al., 2005)、BLA での L1cam の発現レベルは、他の扁桃体核に比べて顕著に低い (Munakata et al., 2003)。それにより、BLA においても NP による L1cam のプロテオリシスが LTP の発現に關与していることが示唆される。このことを証明するためには、NP ノックアウトマウスの扁桃体における更なる研究が必要である。

今回の研究により、私は、LEC-BLA 経路の LTP に、NP のような細胞外プロテアーゼが關与することを初めて示した。このことは、皮質からの多様性感覚様態の情報と扁桃体からの情動性入力が統合する時、つまり可塑性成立時に起こる有益な情報の選択決定は、プロテアーゼの働きによるのかもしれない。

謝辞

本研究に携わる機会を与えて下さり、ご指導ご鞭撻受け賜いました、奈良先端科学技術大学院大学細胞構造学講座、塩坂貞夫教授に深く感謝致します。

研究の遂行に際してご助言下さり、研究室生活をご支援下さいました、今泉和則教授、加藤啓子助教授、松本-宮井和政研究員、石川保幸助手、奥村雅代助手、駒井章治助手に深く感謝致します。

研究に対する惜しみ無いご助言を下さいました、二宮文子修士、大鳥久美さんに心から感謝致します。

また、電気生理学的手法に関してご指導ご鞭撻を頂いた、松木則夫教授、池谷裕二助手、中尾和人博士、柄本昌子修士、小山隆太修士そして東京大学大学院薬学系研究科医療薬学大講座薬品作用学教室の皆様に心から厚く御礼申し上げます。

抗リン酸化 **GluR 1** 抗体をご提供下さいました産業技術総合研究所の亀山仁彦博士、英文作成においてご指導下さいました **Ian Smith** 博士に心から厚く御礼申し上げます。

そして公私に渡り、楽しく実りある学生生活を支えて下さいました、細胞構造学講座の先輩、同期、後輩のみなさんに、心から感謝するとともに、お礼申し上げます。

研究活動の犠牲となり、研究の進行を助けてくれた実験動物に哀悼の意を表すると共に感謝致します。

最後に、長きに渡る研究生活を応援し、支えて下さいました両親に心から感謝致します。

参考文献

- Brothers, L. A., and Finch, D. M. (1985). Physiological evidence for an excitatory pathway from entorhinal cortex to amygdala in the rat. *Brain Res* 359, 10-20.
- Chen, Z. L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., and et al. (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* 15, 5088-5097.
- Ferry, B., Magistretti, P. J., and Pralong, E. (1997). High potency of the orally-active NMDA-receptor antagonist CGP 40 116 in inhibiting excitatory postsynaptic potentials of rat basolateral amygdala neurones in vitro. *Neuropharmacology* 36, 1555-1559.
- Horinouchi, K., Nakamura, Y., Yamanaka, H., Watabe, T., and Shiosaka, S. (2005). Distribution of L1cam mRNA in the adult mouse brain: In situ hybridization and Northern blot analyses. *J Comp Neurol* 482, 386-404.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155-184.
- Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., and Shiosaka, S. (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23, 7727-7736.
- McDonald, A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55, 257-332.
- McDonald, A. J., and Mascagni, F. (1997). Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 77, 445-459.
- McKernan, M. G., and Shinnick-Gallagher, P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390, 607-611.
- Mitra, R., Jadhav, S., McEwen, B. S., Vyas, A., and Chattarji, S. (2005). Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9371-9376.
- Munakata, H., Nakamura, Y., Matsumoto-Miyai, K., Itoh, K., Yamasaki, H., and Shiosaka, S. (2003). Distribution and densitometry mapping of L1-CAM immunoreactivity in the adult mouse brain--light microscopic observation. *BMC Neurosci* 4, 7.
- Nakamura, Y., Tamura, H., Horinouchi, K., and Shiosaka, S. (2006). Role of neuropsin in formation and maturation of the Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic

boutons. *J Cell Sci*, in press.

Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B., and Strickland, S. (2003).

Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 6, 168-174.

Pitkanen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., and Ylinen, A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911, 369-391.

Rogan, M. T., Staubli, U. V., and LeDoux, J. E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390, 604-607.

Tamura, H., Ishikawa, Y., Hino, N., Maeda, M., Yoshida, S., Kaku, S., and Shiosaka, S. (2006) Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer-collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus in vivo. *J Physiol*, in press.

Tsvetkov, E., Carlezon, W. A., Benes, F. M., Kandel, E. R., and Bolshakov, V. Y. (2002). Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. *Neuron* 34, 289-300.

Veening, J. G. (1978) Cortical afferents of the amygdaloid complex in the rat: an HRP study. *Neurosci Lett* 8, 191-195.

Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B. S., and Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22, 6810-6818.

Wyss, J. M. (1981). An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 199, 495-512.

Yaniv, D., Vouimba, R. M., Diamond, D. M., and Richter-Levin, G. (2003).

Simultaneous induction of long-term potentiation in the hippocampus and the amygdala by entorhinal cortex activation: mechanistic and temporal profiles. *Neuroscience* 120, 1125-1135.

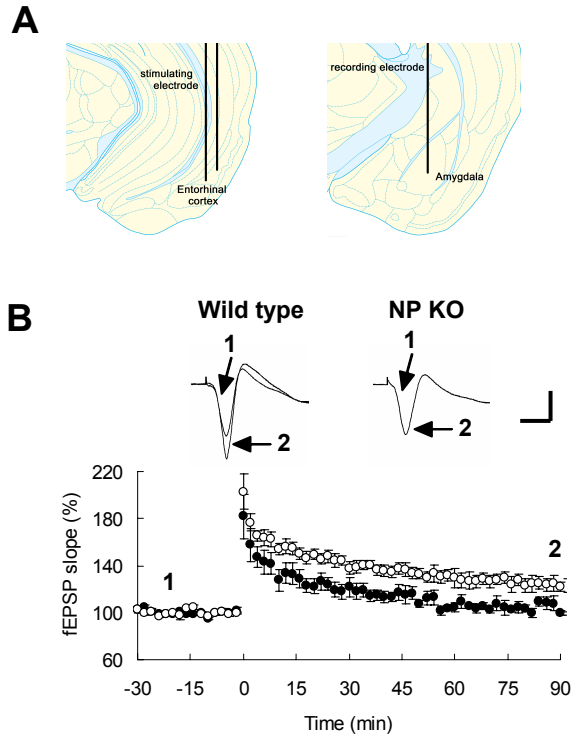


図1. NP 遺伝子の欠損は、LEC-BLA 経路においてテタヌス刺激によるLTP を阻害する

A, 外側嗅内皮質 (LEC, left) と扁桃体基底外側核 (BLA, right) における電極位置を示すマウス脳の冠状面図。

B, Neuropsin-knockout (NP KO; filled circles, $n=7$) と野生型 (Wild type; open circles, $n=7$) マウスにおけるBLA でのLTP のタイムコース。 NP KO と野生型マウスのテタヌス刺激以前 (1) と90 分後 (2) で記録されたfEPSP slope の波形を上部に示す。ベースラインの30 分後に、テタヌス刺激 (100 Hz for 1 s, twice at an interval of 30 s) を与えた。 fEPSP slope は、ベースラインに対する割合 (%) でプロットした。スケールバーは、1 mV、10 ms である。 データは、平均 $\pm$ SEM で示す。

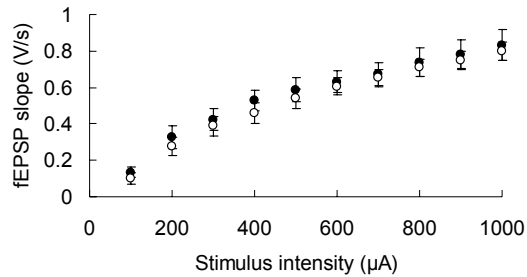
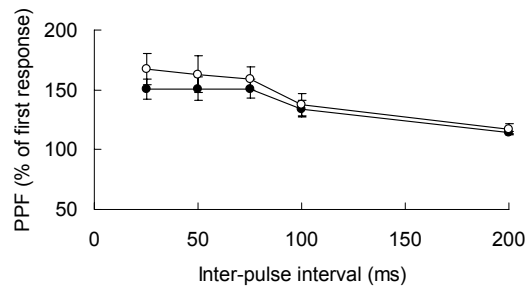
A**B**

図2. LEC-BLA 経路において、NP KO マウスの通常の興奮性シナプス伝達および Paired-pulse facilitation は正常レベルである

A, 刺激強度に対する fEPSP slope を示す入力-出力カーブにおいて、NP KO (filled circles, n=7) と野生型 (open circles, n=7) マウスで有意な差はなかった。

B, NP KO (filled circles, n=7) と野生型 (open circles, n=7) マウスにおける Paired-pulse facilitation (PPF) 率の比較。最初の fEPSP slope に対する 2 番目の fEPSP slope の割合 (%) を、25, 50, 75, 100 および 200 ms のパルス間隔で得た。2 つのグループ間で有意な差はなかった。データは、平均 ± SEM で示す。

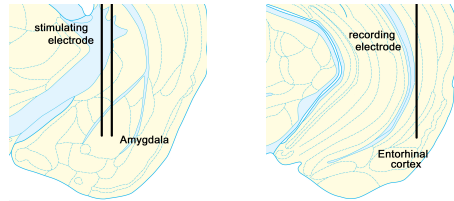
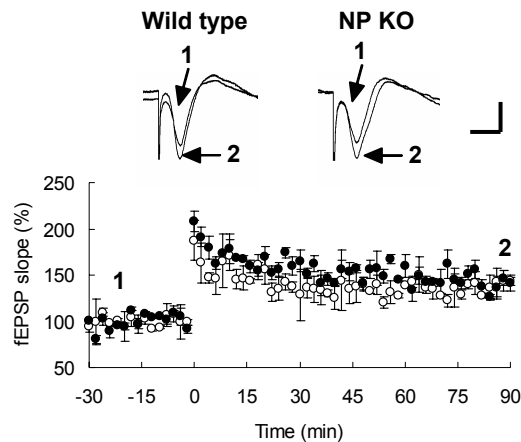
A**B**

図3. NP KO マウスにおいて、BLA-LEC 経路で、LTP は正常に誘導する

A, BLA (left) と LEC (right) における電極位置を示すマウス脳の冠状面図。

B, NP KO (NP KO; filled circles, $n=3$) と野生型 (Wild type; open circles, $n=3$) マウスにおける LEC での LTP のタイムコース。 NP KO と野生型マウスのテタヌス刺激以前 (1) と 90 分後 (2) で記録された fEPSP slope の波形を上部に示す。 ベースラインの 30 分後に、テタヌス刺激 (100 Hz for 1 s, twice at an interval of 30 s) を与えた。 fEPSP slope は、ベースラインに対する割合 (%) でプロットした。 スケールバーは、1 mV、10 ms である。 データは、平均 $\pm$ SEM で示す。