

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	細胞構造学講座 (塩坂貞夫教授)		
氏 名	駒井 章治	提 出	平成 12年 1月 6日
題 目	神経可塑性における細胞外プロテアーゼ、ニューロプシンの機能		

要旨

本研究では長期増強に関連したスパイン構造変化の分子機構の解明を目的とし、当研究室で最初にクローニングされたセリンプロテアーゼ、ニューロプシンを中心に電気生理学的解析を行った。長期増強に関連したスパインの構造変化はHosokawaら (1995) やMaletic-Savaticら (1999) によりその実体が明かとされているが、この現象を担う分子機構については未だ明かとなっていない。現在、長期増強をスパインの構造変化という観点から修飾する分子と考えられるものにはアクチン等の細胞内分子や細胞接着因子やプロテアーゼ等の細胞外分子が考えられる。中でも細胞外プロテアーゼは細胞外からの情報に敏感に反応し、細胞外基質の切断を介して長期増強を俊敏に、且つより長期に修飾可能な分子であると考えられる。これまでの多くの研究からもっとも良く研究されているのが組織型プラスミノゲンアクティベーター (tPA) である。

tPAは長期増強誘発後、cAMP responsive element (CRE) によりその遺伝子発現が制御されている分子のひとつある。また tPAは脳内に広く分布し、活動依存的に細胞外に放出され、その酵素活性により何らかの細胞外分子を切断、修飾しすることにより長期増強後期を調節していると考えられている。しかし、前述のMaletic-Savaticらの研究結果から、長期増強誘発刺激により filopodiaの形態変化は刺激後10-20分の早い段階で実現されている。また、Staubliらは長期増強誘発刺激前後20分間に細胞接着因子であるインテグリンの接着阻害剤を海馬スライスに投与すると長期増強が阻害されるという結果を示している。これらのことから長期増強誘発刺激時に非常にダイナミックな細胞外環境 (細胞接着等) の変化が起こっており、それと同時にスパインの構造変化が誘導されていると考えられる。つまりtPAによる長期増強の修飾は非常に遅く (> 2時間)、スパインの構造変化とは関連が薄いと考えられる。

そこで私は我々の研究室で初めて単離されたニューロプシンに注目し、ニューロプシンによる長期増強の修飾作用に関する研究を行った。これまでの我々の研究室による研究結果により、ニューロプシンは辺縁系、特に海馬に豊富で局限したmRNAの発現を示し、長期増強誘発刺激によってその発現量を増加させることが明らかとなっている。また可塑性のモデルであるkindlingマウスの脳室内にニューロプシン中和抗体を投与するとkindling完成が遅れることも明らかとなっている。これらのことからニューロプシンが長期増強やkindling等可塑的現象時に何らかの作用を持つ可能性が示唆される。この可能性を検証するために、私は大きく2つの実験を行った。(i) ニューロプシン蛋白質の長期増強に対する作用を検討する目的で、長期増強誘発時にリコンビナント・ニューロプシン蛋白質や中和抗体を投与し、長期増強発現の変化を検討した。(ii) ニューロプシン欠損による神経回路形成や可塑性の変化を検討することにより、ニューロプシンの生理学的機能を解明する目的で、当研究室の平田らにより作成されたニューロプシン遺伝子欠損マウス(NPKO)より得た海馬スライスにおける神経細胞の入出力特性、発火パターン、長期増強等を検討した。

以上のような解析から本研究では以下のような結果を得た。(i) 抗ニューロプシン中和抗体投与やニューロプシン・アンチセンス・オリゴヌクレオチド投与により長期増強レベルが抑制された。また、その抑制レベルは中和抗体やアンチセンス・オリゴヌクレオチドにより抑制された酵素活性、蛋白質量に比例していた。低濃度(1-5 nM) リコンビナント・ニューロプシン蛋白質投与により長期増強レベルが増強され、高濃度(20-170 nM) 投与により長期増強レベルが抑制された。(ii) NPKO海馬スライスにおいて入力-出力関数の減少や5 Hz長期増強の減弱が見られた。また、細胞内記録法による結果からNPKO海馬錐体細胞はdurationの延長した活動電位を示し、その発火様式は順応の低下を示した。これらの結果はニューロプシンが神経間連絡を制御し、また神経可塑性に非常に重要な分子であることを示しており、その生化学的特性より長期増強に伴うスパイン構造変化を担う分子であることを示唆すると考えられる。

博士論文番号：9781052

神経可塑性における細胞外プロテアーゼ、ニューロプシンの機能

駒井章治

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座

(塩坂貞夫教授)

2000.1.06 提出

「序論」

記憶や学習などの脳機能は神経可塑性を基盤とすると考えられる (Eccles, 1979)。Hebb (1942) は「ある細胞集団 A と B が存在し、それらの集団が時空間的に非常に近傍で発火すると、それら集団間の結合が強められる」という説を提出した。当時この説に生物学的根拠はなかったが、Lloyd (1949) は筋紡錘に刺激を与え続けた後、無刺激下で筋収縮が持続するといったテタヌス後増強という現象を見いだし、末梢ではあるがある外界からの刺激を一定期間維持可能な記憶の原型とされる現象が明らかとなった。中枢神経系においては Bliss ら (Bliss et al., 1973, Bliss et al., 1973) によりウサギの海馬に於いてテタヌス後増強様の現象が見いだされ、入力刺激を一定期間維持される生理学的メカニズムが次第に明らかとなってきた。この現象は長期増強 (Long-term potentiation; LTP) と名付けられ、神経可塑性の生物学的モデルの 1 つであると考えられている。

長期増強は数時間から数日の持続時間を示すが (Bliss et al., 1973, Bliss et al., 1973)、より長期にわたる情報保持を説明するには長期増強現象自体に加え、これに随伴するスパイン構造変化等による微小回路の修飾・維持を考慮する必要がある (Eccles, 1986, Sejnowski, 1997)。これらの現象を誘導可能な分子は多数挙げられるが、その中でも細胞外プロテアーゼはシナプス周辺分子の修飾・分解を介した長期増強の調節に関すると考えられている (Qian et al., 1993, Sappino et al., 1993, Frey et al., 1996)。その中でもとりわけ組織型プラスミノゲンアクティベーター (tPA) は、脳内に広く分布し長期増強後期過程の修飾に関与すると考えられている (Huang et al., 1996)。一方 Maletic-Savatic ら (Maletic-Savatic et al., 1999) は 2 光子共焦点レーザー顕微鏡と電気生理学的解析を組み合わせた実験により、長期増強誘発後 10-20 分でスパインの構造変化が誘導されることを報告している。また、Staubli ら (Staubli et al., 1998) は長期増強誘発刺激前後 20 分間に integrin の阻害剤を投与することで長期増強が阻害されることを示している。以上のことは長期増強に伴う構造変化が従来想像されていたものとは異なり、非常に速く、長期増強誘発刺激 20 分までに誘導されていることを示している。しかし tPA の作用時間は長期増強後期といった非常に遅い段階であることから長期増強初期の構造変化を担う分子である可能性は低いと考えられる。また、tPA 遺伝子欠損マウスは海馬機能を反映すると考えられている行動試験には影響を及ぼさない (Huang et al., 1996)。これらは tPA が長期増強に伴う早期構造変化と関連が弱く、海馬に依存した記憶・学習課題との関連は弱いことを示している。一方、ニューロプシンは脳内でも記憶や学習に非常に重要である海馬を中心とした辺縁系に局在しており (Chen et al., 1995)、長期増強誘発刺激によってその発現量を増加させることが明らかとなっている (Chen et al., 1995, Yoshida et al., 1999)。また、キンドリン

グ形成過程における mRNA 増強、脳室内ニューロプシン投与によるキンドリング形成阻害など、可塑性への関与が示されている (Okabe et al., 1996, Momota et al., 1998)。これらのことからニューロプシンが長期増強および kindling 等可塑的現象時に何らかの作用を持つ可能性が示唆される。この可能性を検証するために、私は以下のような実験を行った。(i) 長期増強に対する各種細胞外プロテアーゼの作用を検討する目的で、ニューロプシン、tPA、トロンビン、トリプシンの4種のプロテアーゼを海馬スライスに灌流系より投与し、テタヌス刺激により誘導される長期増強の変化を興奮性シナプス後電場電位 (fEPSP) の変化として記録、解析した。(ii) ニューロプシンの長期増強に対する作用を検討する目的で、長期増強誘発時にリコンビナントニューロプシン蛋白質あるいは中和抗体を投与し、ニューロプシンによる長期増強修飾作用の濃度依存性を fEPSP 記録により検討した。(iii) ニューロプシン欠損による神経回路形成および可塑性の変化を検討する目的で、ニューロプシン遺伝子欠損マウス (NPK0) の海馬スライスを用いて神経細胞の入出力特性、発火パターンをガラス微小電極による細胞内記録により、長期増強等を fEPSP 記録により解析した。

「材料と方法」

海馬スライス標本の作製及び電気生理学

a. 使用動物

実験動物として 12h light/dark サイクル、自由給餌で育成した ddY アルビノマウス（雄性，4-6 週齢，SLC，Japan）及び NPKO と、野生型マウス（WT）（雄性，4-6 週齢）を用いた。

b. シナプス後電場電位の測定

Diethyl eter (Wako, Japan) による深麻酔下で頸椎脱臼により屠殺し、頭皮、頭蓋骨を剥離し大脳を摘出した。その後海馬体を分離し rotor slicer (DOSAKA, Japan) により 400 μm の海馬スライスを作製し、即座に事前に 4℃ で 95% O_2 /5% CO_2 により通気しておいた人工脳脊髄液 (ACSF; 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 2.4 mM CaCl_2 , 10 mM glucose) に浸し、1 時間以上の回復期間をおき、その後実験に使用した。記録チャンバー内を 30℃ に保った ACSF により灌流した状態で、Schaffer collateral を双極刺激電極により刺激し、誘発したシナプス後電場電位 (fEPSP) を海馬 CA1 領域の stratum radiatum より記録した。ガラス記録電極には 2 M NaCl を充填し使用した。すべての刺激強度は fEPSP が観察されはじめる最小強度（閾値）の 1.5 倍の電圧とした。テスト刺激は 0.1 Hz の頻度で、0.1 ms の矩形波としてあたえた。また、長期増強誘発のためには theta-burst 刺激 (TBS; 100 Hz で 4 発刺激を 10 回、これを 10 秒毎に 5 回繰り返す) を適用した。1 時間以上統計的に有為な増強の見られたものを長期増強と判断したが、この際統計的有意差の検定には標準化したデータに対し paired t 検定を行った。各濃度での長期増強レベルの検定には ANOVA を用い、有意水準は 5% とした。

c. 微小電極細胞内記録法

活動電位の計測にはガラス微小電極による細胞内記録法を用いた。スライス作成には上記実験時と同様の方法で海馬体を摘出し、micro slicer (DOSAKA, Japan) により 200 μm 厚のスライスを作成した。その後、人工脳脊髄液 (ACSF; 124 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 1.3 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 2.4 mM CaCl_2 , 10 mM glucose) にて灌流、1 時間以上の回復期間を設けた。電極内液は 2 M K-acetate を使用した。本内液充填時の電極抵抗は 80-100 $\text{M}\Omega$ であった。記録には interface 型記録チャンバーを使用し、スライスを ACSF にて灌流、スライス上には加湿した 95% O_2 /5% CO_2 を流しておいた。活動電位は海馬錐体細胞細胞体に刺入したガラス微小電極より矩形直流電流を通電し誘発した。細胞内電位は Axoclamp 2B (Axon Inc., USA) により増幅した。すべての実験において静止膜電位は微小電極刺入時の値に固

定した。得られた電位はブリッジバランスおよびDCCモードにより記録した。

d. ホールセルパッチクランプ法

スライス作成には上記実験時と同様の方法で海馬体を摘出し、micro slicer を使用し 200 μm 厚のスライスを作成した。その後、人工脳脊髄液 (ACSF; 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.3 mM MgSO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 26.2 mM NaHCO_3 , 2.5 mM CaCl_2 , 11 mM glucose) にて灌流、1 時間以上の回復期間を設けた。電極内液は 107.5 mM Cs-gluconate, 20 mM HEPES, 0.2 mM EGTA, 5 mM QX314-Br, 8 mM NaCl, 10 mM TEA-Cl, 4 mM Mg-ATP, 0.3 mM GTP; pH 7.2-3, 270-280 mOsm のものを使用した。本内液充填時の電極抵抗は 4-6 $\text{M}\Omega$ であった。電極先端はシリコンによるコートや研磨は行わず使用した。刺激電極にはタングステン双極刺激電極 (2 $\text{M}\Omega$) を用いた。Schaffer collateral に刺激電極を設置し 0.1 ms の矩形波を与えシナプス電流誘発を誘発した。刺激強度は最大強度の 1/2 倍の強度に設定した。

NMDA 電流記録では ACSF 内に 20 μM CNQX (Tocris, UK), 20 μM Bicuculine methobromide (Tocris, UK), 10 μM glycine (WAKO, Japan) を加え、薬理的に NMDA 成分を単離するとともに、膜電位を +40 mV に固定し電位依存性成分の混入を抑制した。刺激強度は通常 60-100 V であった。Series resistance (10-20 $\text{M}\Omega$) の補正は行わず、実験中継続的にモニターし、変化がないことを確認した (<20%)。Liquid junction potential は通常 5-10 mV であるが、今回の実験では補正は行わなかった。ホールセル電位は Axopatch 1D (Axon Inc., USA) により増幅した。シナプス電流は 2 kHz のフィルターで整流し、5 kHz でデジタル化し、IBM AT 互換機で記録、保存した。

リコンビナントニューロプシン

今回の実験で使用したリコンビナント・マウス・ニューロプシンはバキュロウィルス発現系 (Baculogold; Pharmingen, USA) により作製した。*Trichoplusia ni* より確立された昆虫培養細胞 (High Five; Invitrogen, USA) を 10% の熱非動化子ウシ血清 (Boehringer Mannheim, Germany) を含む TNM-FH 培養液により 27°C で培養した。また細胞の密度は $7 \times 10^6 / 75 \text{ cm}^3$ とした。リコンビナント・バキュロウィルスを $1 \times 10^6 \text{ cells} / \text{mL}$ の濃度の細胞に感染させ、3-5 日後に 4°C、500 x g の条件で 10 分間遠心し上清を回収した。これにより得られた上清を 4°C、25,000 x g の条件で 1 時間遠心し、10 mM HEPES バッファー (pH. 7.4) により 2 日間透析し、その後 Resource S カラム (6 mM, Pharmacia, Sweden) と Superdex 75 HR (10 x 300 mm, Pharmacia, Sweden) を通すことにより精製した。ここで得られた精製リコンビナントニューロプシン蛋白質を今回の生理学実験に使用した。また、生理実

験使用前にアミノ酸分解活性をニューロプシンの典型的な合成基質である Boc-Val-Pro-Arg-methyl coumarin により評価し、活性として 36 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であることを確認した。

抗体の作製

ウィスター系ラットにフロイントアジュバントと精製ニューロプシンとのエマルジョンを 50 g 腹腔内投与により免疫した。ウェスタンブロッティング法によるラット血清の抗体価測定後、細胞融合 2 日前に 50 g のリコンビナントニューロプシンを腹腔内投与した。免疫したラットから得た脾臓細胞を Y3Ag. 1. 2. 3 ラットミエローマ細胞と融合させた。hypoxanthine-aminopterin-thymidin 培地による選択後、ハイブリドーマ培養上清を回収、ウェスタンブロッティングやリコンビナントニューロプシンでコートしたマイクロプレートによる ELISA でニューロプシンに対する特異的抗体の産生をスクリーニングした。陽性クローンをプリステン刺激されたヌードラット (F344/N Jcl) に腹腔内投与し、その後得られる腹水を採取した。ここで得た腹水をプロテイン G セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、モノクローナル抗体 (mabB5) を得た。

ニューロプシン・アンチセンス・オリゴヌクレオチド (asODN) 慢性投与マウス及びその海馬スライスの作製

マウス側脳室に asODN を 3 日間 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で毎時 1 μL の速度で慢性投与することにより、ニューロプシン・蛋白質発現阻害マウスを作製した。このマウスより得た海馬体を上記と同様の方法でスライスを作製し、同様の方法で fEPSP を記録、解析した。また、センス・オリゴヌクレオチド (sODN) を同様の濃度で投与し作製したマウスより得た海馬スライスをコントロールとし、得られた fEPSP と asODN 投与マウスの fEPSP を比較検討した。

「結果」

(i) マウス海馬長期増強に対する各種細胞外プロテアーゼの作用

長期増強修飾作用の最も強いプロテアーゼを検索する目的で、脳内での存在が確認されており、可塑性に関連すると考えられている各種プロテアーゼの長期増強に対する効果を検討した。各種のプロテアーゼを 1 nM、5nM の濃度で灌流系より投与し、長期増強誘発後の fEPSP 変化を解析した。1 nM といった低濃度ではトロンビン (thrombin) や組織型プラスミノゲンアクティベーター (tPA)、ニューロプシンで長期増強レベルの増強作用が見られた。しかし、5 nM ではニューロプシン以外のプロテアーゼでは長期増強レベルの増強作用は見られなかった (図 1a, b)。トリプシンはどの濃度も長期増強レベルの増強作用は見られず、抑制作用が顕著であった (図 1a, b)。

(ii) ニューロプシンの長期増強に対する調節作用の検討

長期増強に対するニューロプシンの作用を更に検討するために、1-170 nM の各濃度のニューロプシンを灌流系より投与し、このときに見られる長期増強の変化を検討した。1 もしくは 2.5 nM のニューロプシンを灌流系より投与し長期増強を誘発したところ、刺激後約 10 分間で顕著な長期増強レベルの増強が見られた。ここでの長期増強レベルの増強は一過的で、刺激後 30-40 分以内に通常の長期増強レベルに戻ることが観察された (data not shown)。しかし 5-10 nM のニューロプシンを投与した場合 1 時間以上持続する安定な長期増強増強が観察された (図 2a, 5 nM; $189 \pm 3.0 \%$, $n=5$, $p < 0.0001$)。一方、更に高濃度の 20-170 nM のニューロプシンを投与した場合、1-10 nM ニューロプシン投与時の fEPSP 変化とは異なり、通常の長期増強と比べ有意に減弱した (図 2a, 20 nM; $123 \pm 3.6 \%$, $n=4$, $p < 0.0001$)。また、170 nM 投与ではほぼ完全に長期増強が阻害された (図 2a, b, 170 nM; $103 \pm 0.4 \%$, $n=9$, $p < 0.0001$)。図 2b は長期増強に対するニューロプシンの濃度依存的影響をまとめたものである。低濃度のニューロプシン投与時には長期増強レベルが増強され、高濃度のニューロプシン投与時には長期増強が抑制されることが明らかとなった。更にその効果は刺激後 10-20 分といった長期増強の早い段階で有効であった (図 2b)。

以上のような作用が実際にニューロプシンの蛋白質分解作用に因るものかを確認する目的で、100℃で 30 分煮沸し不活性化したニューロプシンを投与し、この時長期増強を誘導したところ、何も与えない統制群や溶媒のみ投与群と有意な差が認められなかった (図 3a)。ニューロプシンによる長期増強の修飾がいかなるタイミングで行われているのかを検討するために、TBS10 分後にニューロプシンを投与したところ、通常の長期増強と比べ有為な差が見られなかった (図 3c)。また、

ニューロプシン単独では basal synaptic transmission に影響しないことから TBS 時がもっともニューロプシンに感受性であると考えられる (図 3b)。

長期増強は N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の活性化を引き金とし、誘発されることがこれまでの様々な実験結果から明らかとなっている (Bliss et al., 1993)。ニューロプシンがこの NMDA 受容体を直接修飾することによりその後に誘導される長期増強に影響を与えるのかを検討する目的で、ホールセル・パッチクランプ法を用い NMDA 電流を単離し、ニューロプシン投与時の変化の有無を検討した。ニューロプシンは NMDA 電流の振幅をわずかではあるが有意に減少させる (図 4; before 26 ± 3 pA, after 22 ± 4 pA, $P < 0.01$)。しかし initial slope や decay τ 等に全く変化が見られなかったことから (図 4)、ニューロプシンによる直接的な NMDA 電流への顕著な影響は見られないと考えられる。

以上のような結果からニューロプシン蛋白質が長期増強を外因性に修飾することが明らかとなった。そこで、次に内因性ニューロプシンが長期増強発現に必須の分子であるかどうかを検討するために中和抗体や asODN を用い、その酵素活性や発現量を抑制し、長期増強を誘発、その変化を検討した。

asODN によるニューロプシン産生量の減少を確認するため、慢性投与マウスから得られた海馬体を破碎し、酵素活性を指標に含有蛋白量を測定した。その結果、asODN 慢性投与により蛋白質産生量が約 50% の減少が見られた (図 5b)。asODN 慢性投与マウスの海馬スライス (図 5a) を同様の方法で長期増強を誘発し、得られた fEPSP を解析した。その結果 asODN の慢性投与により長期増強レベルの増強がニューロプシン蛋白質産生量と同様、約 50% に抑えられることが明らかとなった (図 5c)。さらに抗ニューロプシン中和抗体 (mabB5) 投与によりニューロプシンの酵素活性を阻害し、このとき誘発される長期増強に対する影響を検討した。その結果 mabB5 は TBS により誘発される長期増強レベルを約 50% に抑制する事が明らかとなった (図 6)。従ってニューロプシンの蛋白質量低下及び活性減少により明らかに長期増強誘発に重大な影響を及ぼすことが明らかとなった。また中和抗体による実験からその作用は酵素活性に起因するものと考えられた。

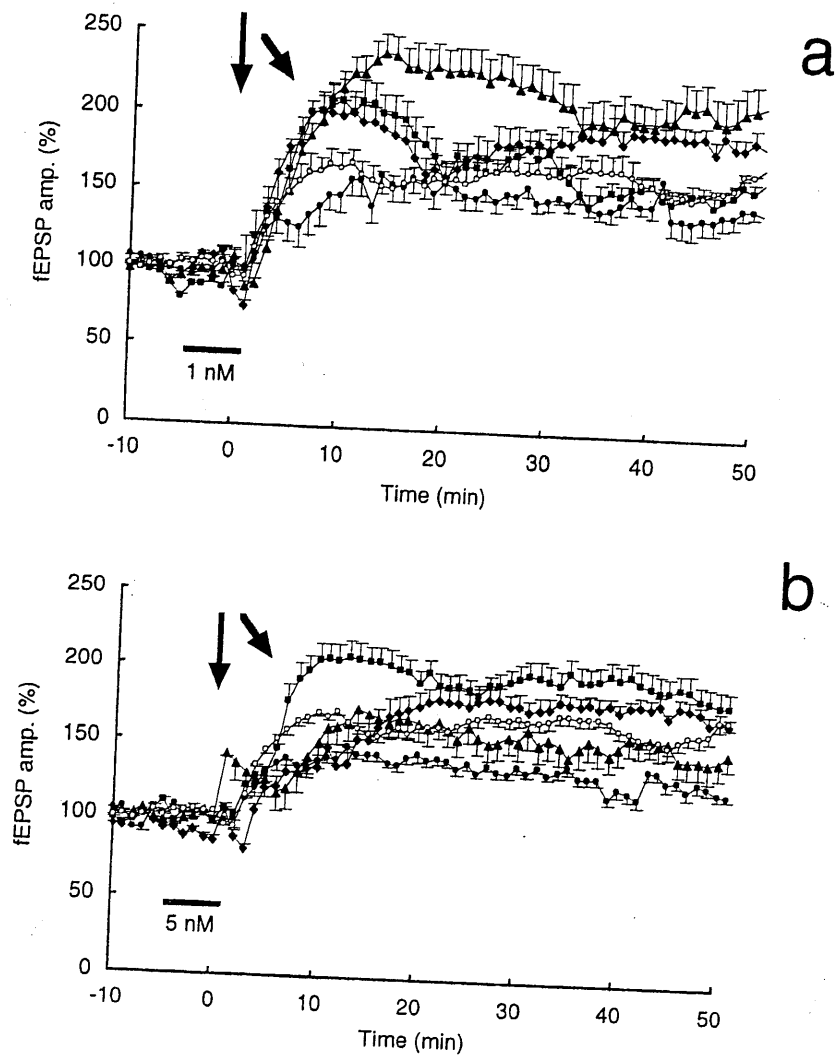


図1 ニューロブシンおよびその他のプロテアーゼによる長期増強修飾作用
 a, ニューロブシン (■) および組織型プラスミノゲンアクティベーター (tPA, ▲)、トリプシン (◆)、トリプシン (●) をバーで示した時間にそれぞれ1 nM投与し、TBS (矢印) を与え長期増強を誘導した。太い矢印は長期増強初期に見られたニューロブシンの長期増強レベルの増強作用。統制群 (○) に比較するとtPA、ニューロブシン、トリプシンの順に大きな増強作用が見られた。
 b, aで行った同じ手順をそれぞれのプロテアーゼの濃度を5 nMに示した結果。5 nMではニューロブシンがもっとも大きな増強効果を示した (太い矢印)。他のプロテアーゼは増強作用を示さなかった。トリプシンは顕著な抑制作用を示した。

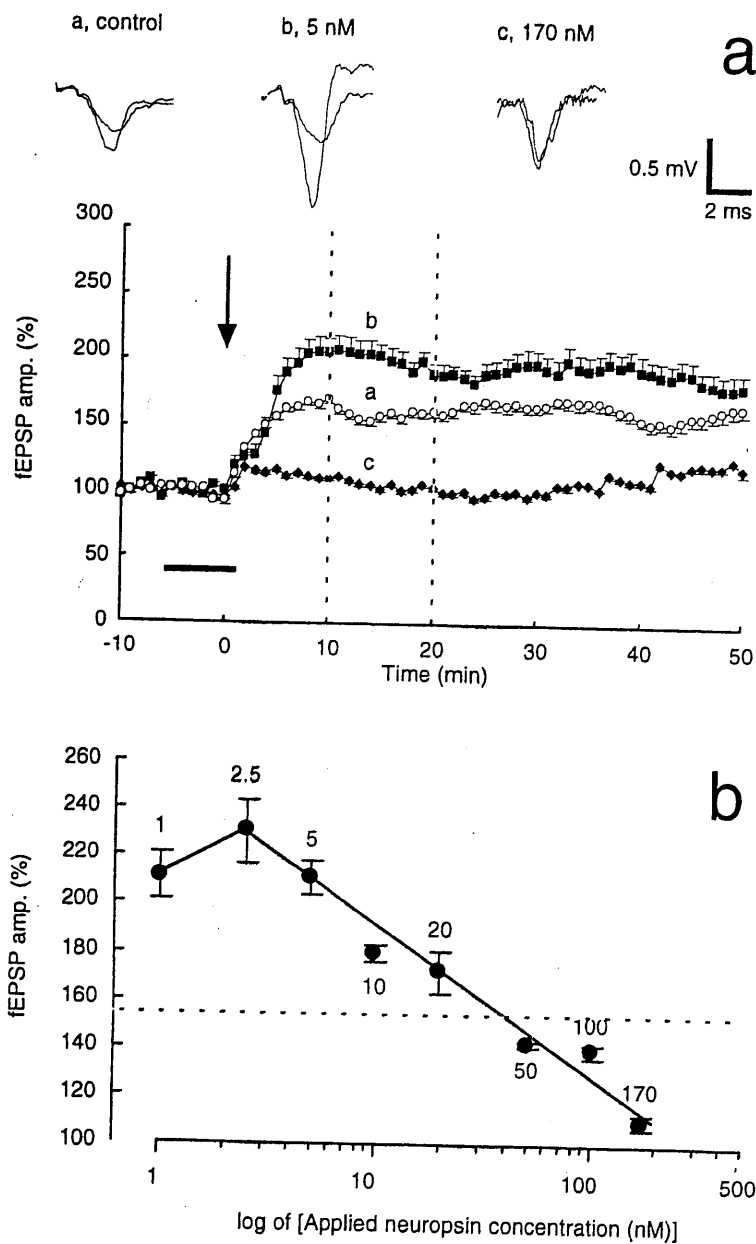


図2 海馬長期増強に及ぼす外来性リコンビナント・ニューロトロフィンの作用
a, 様々な濃度のリコンビナント・ニューロトロフィンを灌流系より投与し、このとき誘導した長期増強。何も加えない統制群 (○)、安定した増強を示す5nM (■) と完全に長期増強を阻害する作用を示す170nM (◆) を示した。矢印はtheta-burst刺激 (TBS) をバーはニューロトロフィン投与時間を示した。上段にはTBS直前とTBS後10-20分後 (点線間) の典型的波形を重ね書きしたものをそれぞれ示した。
b, aで示したデータのまとめ。1-170 nMのリコンビナント・ニューロトロフィンを灌流系より投与し、TBS後10-20分の間 (点線間) の長期増強レベルを片対数表示した。

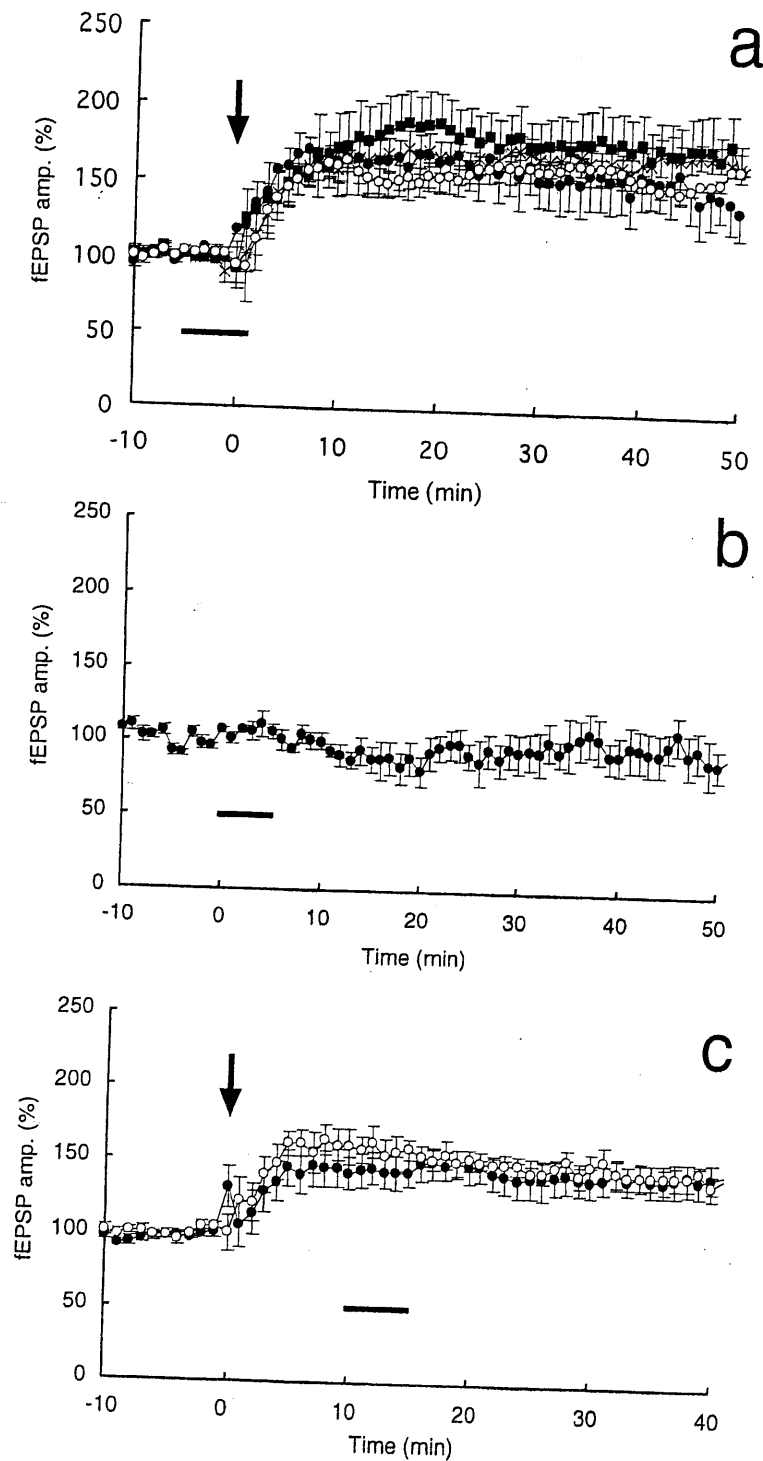


図3 ニューロトロフィンの生理作用を検証する3実験
a, 100°Cで30分煮沸し不活性化したニューロトロフィン (HIAニューロトロフィン) を投与し (バー)、このとき誘発される長期増強。HIAニューロトロフィンを1 nM (●)、5 nM (■) 投与しても、何も投与しない統制群 (○) や溶媒 (HEPES) 投与群 (*) との間には有意な差は認められなかった。
b, ニューロトロフィンをTBSなしで投与し (バー)、basal synaptic transmissionに対するニューロトロフィンの作用を検討した。ニューロトロフィン単独投与ではbasal synaptic transmissionの修飾は見られなかった。
c, ニューロトロフィン投与のタイミングをTBSの10分後 (バー) としたところ、何も投与しない統制群 (○) と優位な差は見られなかった。

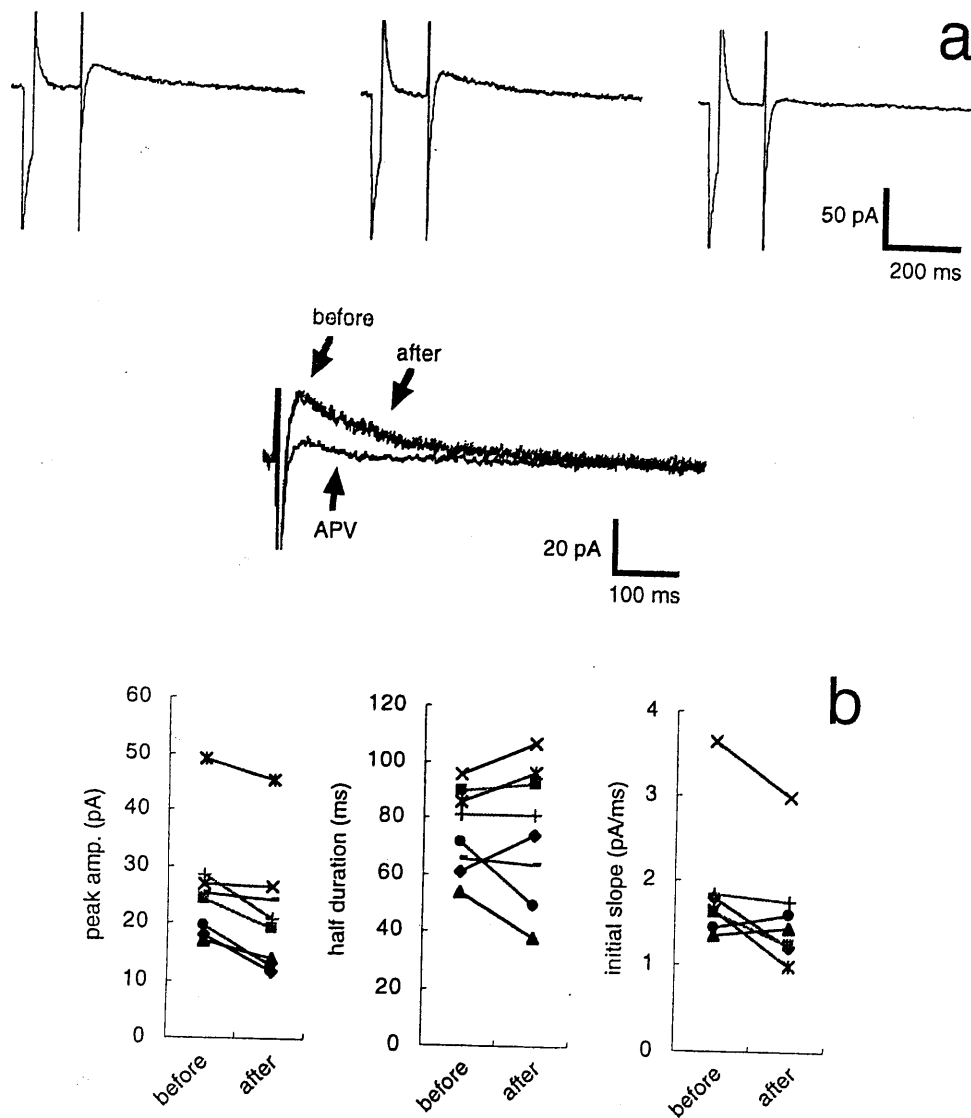


図4 NMDA電流に対するニューロトロフィンの修飾作用
 a, ホールセル・パッチクランプ法により薬理的に単離したNMDA電流を計測し、そのときニューロトロフィン (5 nM) を投与した。ニューロトロフィン投与直前 (上段左, 下段灰色) 直後 (上段中, 下段黒) のNMDA電流変化を示した。ここで見られた電流はNMDA受容体の拮抗剤であるAPVにより消去される (上段右)。これらの波形を重ね書きしてみると (下段) 若干ニューロトロフィン投与後にpeak amplitudeの減少が見られるものの、NMDA電流のkineticsに変化は見られなかった。
 b, aで見られたNMDA電流を統計的にpeak amplitudeではわずかながら、統計的に有意な差が見られた (図左 $P < 0.01$)。しかしながら、half duration (図中) や initial slope (図右) には統計的に有意な差は見られなかった。

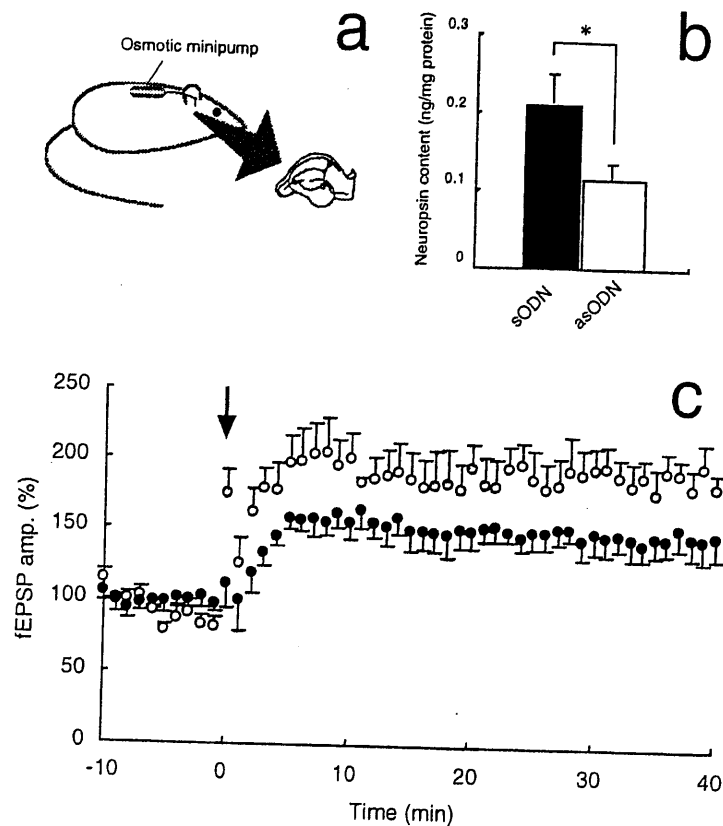


図5 ニューロトロフィン・アンチセンス・オリゴヌクレオチド (asODN) 慢性投与
 a, 浸透圧ミニポンプを背部皮下に装着, asODNやsODNの慢性投与を行った (材料と方法参照)。このマウスより得た海馬スライスを長期増強誘発実験に用いた。
 b, asODNによりニューロトロフィン産生量が減少しているか否かを検討するために酵素反応を指標にニューロトロフィン含有量を算定した。asODNにおいてニューロトロフィン含有量が統計学的に有意に減少していた ($P < 0.05$)。
 c, ここで得られたasODN慢性投与海馬スライスにおける長期増強 (●) とsODN慢性投与海馬スライスにおける長期増強 (○) を比較したところ、有意にasODN慢性投与海馬スライスの長期増強レベルが減弱していることが明らかとなった ($P < 0.001$)。

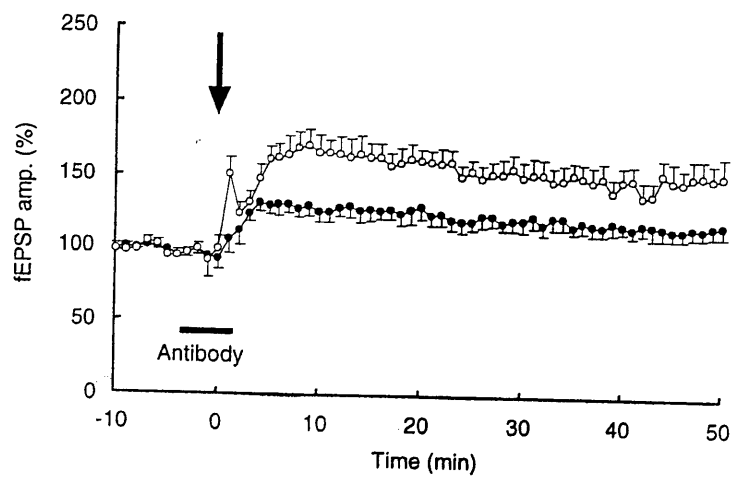


図6 ニューロブシン中和抗体投与による酵素活性阻害が及ぼす長期増強に対する影響
中和抗体を投与し (バー) このとき長期増強を誘発すると、何も投与しない統制群
(○) に比べ約50%にまで長期増強レベルが減少した (●)。

(iii) NPKO 海馬 CA1 領域における神経細胞の活動様式

これまでに得られた結果からニューロプシンが神経可塑性を修飾することが示された。神経可塑性は発生段階においても非常に重要な役割を持つと考えられることから、NPKO におけるシナプス伝達や活動電位の発火パターンを解析し、その変化を検討した。

NPKO より得た海馬スライスにおけるシナプス伝達を検討する目的で、様々な強度の刺激を与え、そのときに得られた fEPSP や集合スパイク (pspike) を、それぞれ stratum radiatum、stratum pyramidale において記録した (図 7a)。それぞれの電位を入力の強さを示す presynaptic fiber volley (PSFV) に対してプロットしたところ WT に比べ NPKO では同一入力に対する応答性が明らかに減弱していた (図 7c, $P < 0.05$)。

ニューロプシン遺伝子欠損により応答性の現象が観察されたことから、神経細胞固有の活動電位の発火様式にも変化がある可能性が考えられる。そこでこの可能性を検討するため、細胞内記録法により海馬 CA1 領域錐体細胞の活動電位を記録、解析した。NPKO より得た海馬スライスの CA1 錐体細胞に微小電極を刺入し、直流矩形電流 (5 ms) を通電することにより単一活動電位を誘発した。誘発された活動電位を解析した結果、静止膜電位や入力抵抗には変化が見られなかったが、活動電位の amplitude (WT 102.0 ± 1.5 mV, NPKO 94.8 ± 3.5 mV, $P < 0.05$) と half duration (WT 1.8 ± 0.1 ms, NPKO 2.1 ± 0.1 ms, $P < 0.05$) に有意な差が見られた (図 8)。この結果は NPKO の活動電位はやや小さく長い特性を持ち、連続発火への影響を示唆する。そこで、連続発火様式を検討する目的で矩形電流刺激 (500 ms) を通電し、spike accommodation を検討した。NPKO、WT 各々由来の海馬錐体細胞に対しそれぞれ 1.8 nA の矩形電流を通電したところ、WT に比べ NPKO において spike accommodation の減少がみられ、発火様式に有意な差が認められた (図 9, $P = 0.0009$)。以上のようなニューロプシン遺伝子欠損による神経活動の発火様式が変化は、海馬における情報処理に非常に重大な影響を与えるものであると考えられる。

前述の結果よりニューロプシンが長期増強を修飾することが示された。これにより NPKO において長期増強に何らかの影響が想定される。そこで NPKO における長期増強の変化を検討する目的で、WT、NPKO 両マウスより得た海馬スライスに TBS により長期増強を誘導し、その差を比較検討した。しかし NPKO 海馬スライスにおいて長期増強は確実に誘発可能であり、WT 海馬スライスにおける長期増強とも有意な差は見られなかった (図 10)。TBS による誘導では長期増強に有意な差が見られなかったことから、様々な頻度で与えることにより長期増強誘発し、これを WT と NPKO で比較した。通常 WT では誘発刺激の頻度により長期増強レベルが増加するが、NPKO において低頻度刺激 (1-20 Hz) での長期増強に減少が見られた (図 11, $P < 0.05$)。

以上のことからニューロプシンは増強自体を調節するのではなく、その他の因子を調節することにより長期増強を修飾していることが示唆される。

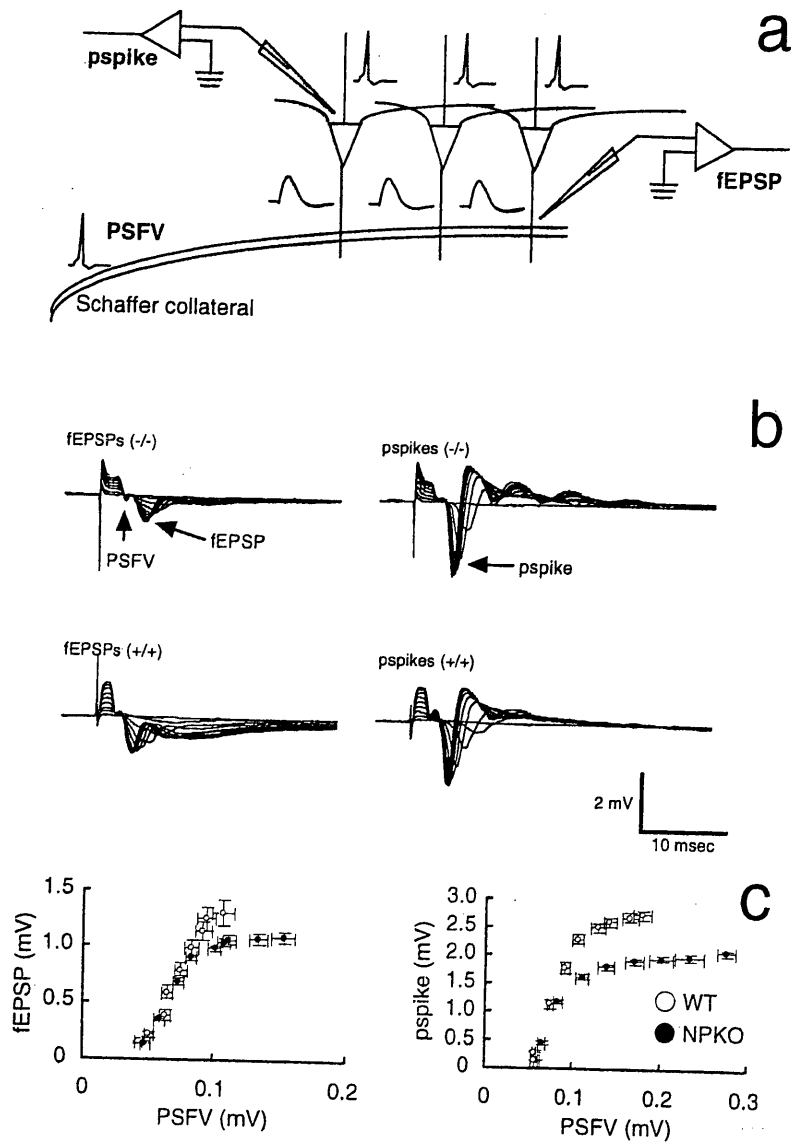


図7 ニューロトロフィン遺伝子欠損マウスの海馬CA1領域における入出力関数特性
a, 実験方法と得られる波形を示した模式図。Schaffer collateralをタングステン双極電極により刺激し、順行性に伝導する活動電位 (PSFV) が得られる。これに遅れてstratum radiatumにおいてEPSPの集合電位としてfEPSPが、stratum pyramidaleにおいて活動電位の集合電位としてpspikeが得られる。
b, 波形は上段がNPKOより得た海馬スライスのfEPSPおよびpspike。下段はWTより得たfEPSPおよびpspike。入力をpresynaptic fiber volleyの振幅とし、これに対する出力をfEPSPおよびpspikeとしてプロットした結果がcのグラフである。
c, WT (○) に比べNPKO (●) は強い入力に対しての応答性が脆弱であることがあきらかとなった (fEPSP, 刺激強度 4 V以上で $P < 0.05$; pspike, 刺激強度 2.5以上で $P < 0.05$)。

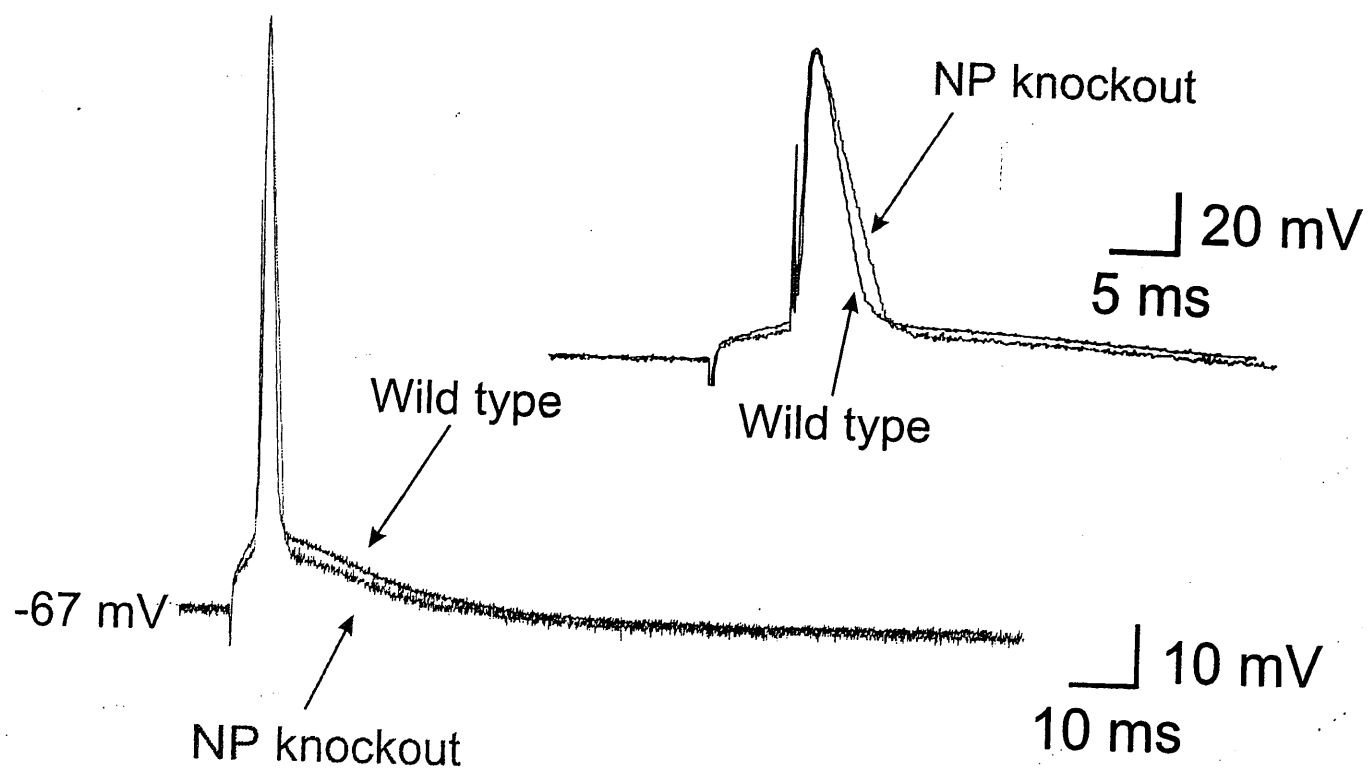


図8 NPKOで見られた活動電位のhalf durationの延長
 ガラス微小電極による細胞内記録法で得られた活動電位の一例。WTに比べNPKOで活動電位のhalf durationの延長が見られた (inset)。静止膜電位は微小ガラス電極を刺入した時にはじめに得られた膜電位を用いた。

Wild type

NP knockout

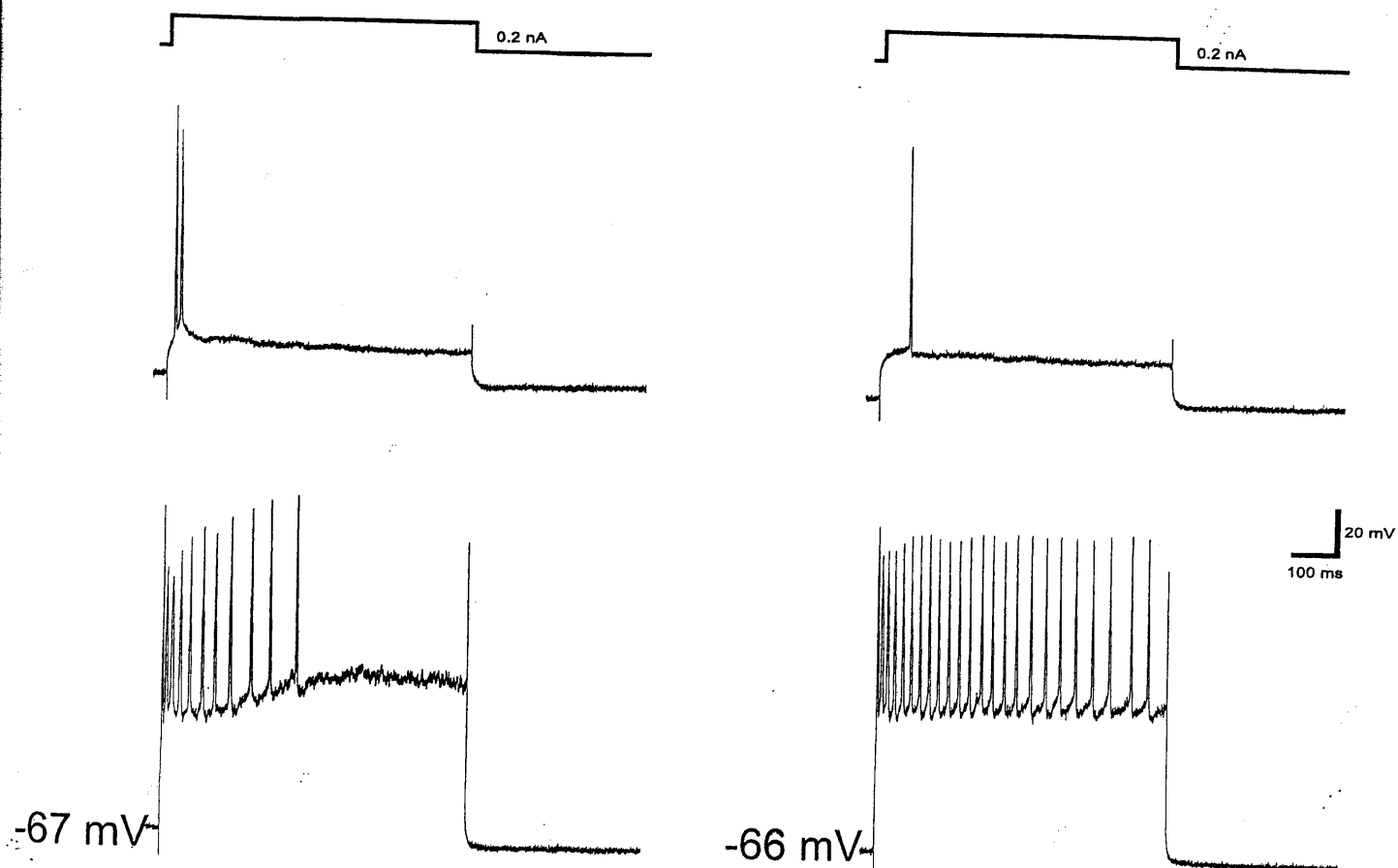


図9 矩形波直流電流を注入したときに得られた連続発火の様式
 NP KO (右列) では WT (左列) に比べ spike accommodation の減弱が観察された。最上
 段は注入した矩形波直流電流を、中、下段は 0.2 nA、0.8 nA を注入したときに得られ
 た連続発火の様式。

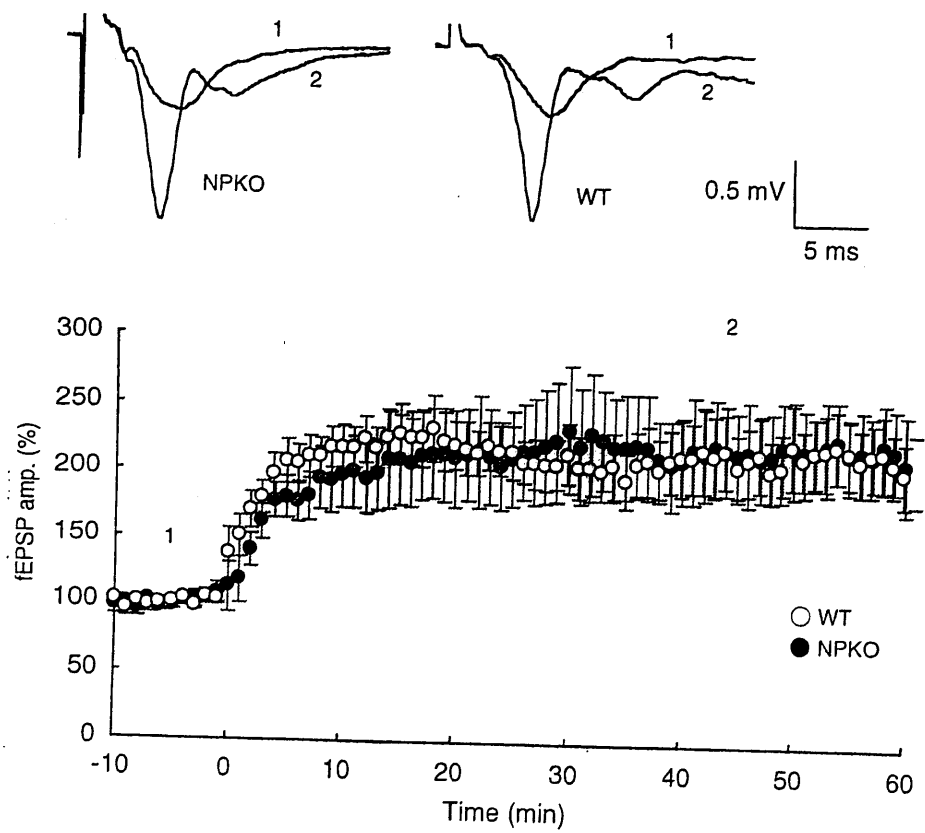


図10 TBSによりNPKO海馬スライスで誘発した長期増強
TBSにより誘発した長期増強にWT,NPKO群間で有意な差は認められなかった。またそれぞれの海馬スライスで見られたfEPSP波形に差は認められなかった(上段)。

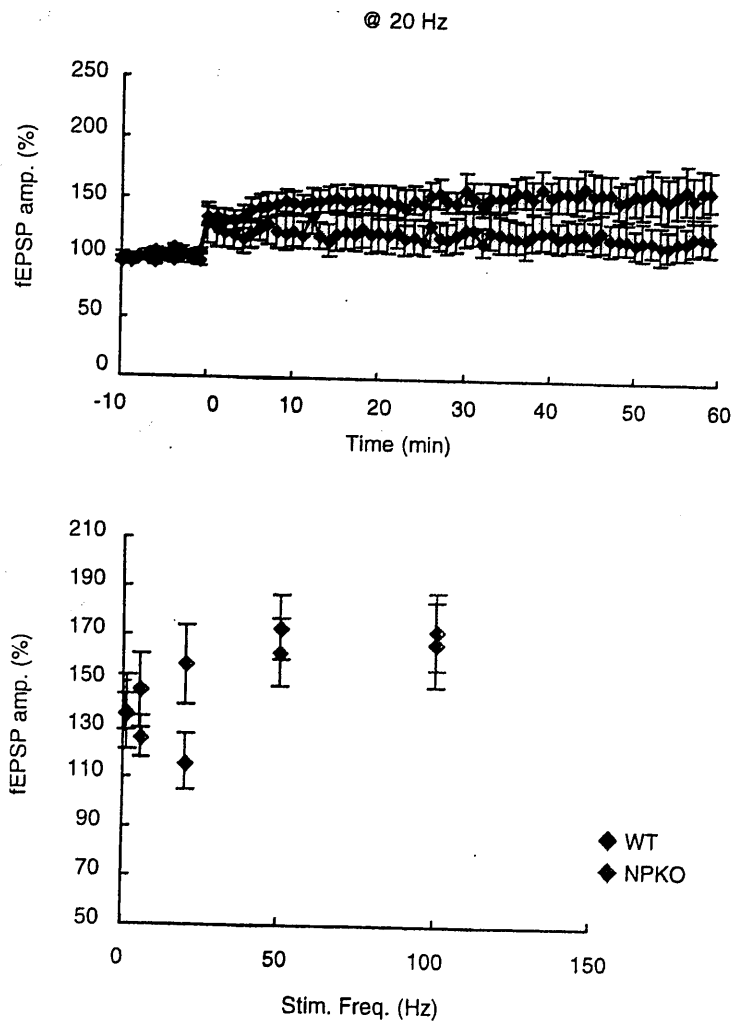


図11 低頻度刺激長期増強
長期増強誘発刺激の頻度を1, 5, 20, 50, 100 Hzに変化させ、そのときに見られた長期増強の変化を検討した。刺激回数はずべて100発に固定した。統計検定には利便性のため1, 5, 20 Hzの低頻度刺激群と50, 100 Hzの高頻度刺激群に分け検定を行った。高頻度刺激群では統計的有意な差が見られなかったものの、低頻度刺激群ではNPKOにおける長期増強レベルが有意に減少していた ($P < 0.05$)。特に差の顕著な20 Hz刺激群の長期増強を典型例として図上段に示した。

「考察」

本研究では長期増強誘発のためにTBS刺激を用いた(Larson et al., 1986)。Schaffer collateral 刺激により、fEPSP の振幅の著しく(コントロールの 150%)、安定した増加を引き起こした。本研究においてニューロプシンの投与による効果が長期増強の非常に早期に見られた。大きな post-tetanic potentiation (PTP) により長期増強の early phase が隠され、解析が困難となるのを防ぐために、長期増強誘導には PTP を最小限にするような方法を用いた。PTP を最小限にとどめ、長期増強を誘導する為に、(1)刺激電極と記録電極の距離をやや近くし、(2) ACSF 中の K^+ 濃度をやや高めに設定した(6.2 mM)。電極間距離の近接や K^+ 濃度の増加により電極周辺細胞の活動性の増加が誘導され、シナプス前細胞における Ca^{2+} 流入が増加し、利用可能な伝達物質の枯渇が起こることにより PTP の減少が見られたものと考えられる。しかしながら、PTP の欠如によって長期増強は阻害されないことが示されている(Lee et al., 1980)。更に Kauer は、記録電極と刺激電極の距離を近位(<200 μm)、遠位(500 μm)に設定し、長期増強を解析した。近位での TBS 刺激により PTP は阻害されたが、安定した長期増強が観察された(Kauer, 1999)。以上の理由から、本研究では上記の条件で長期増強初期の検討を行った。

ニューロプシンの長期増強に対する影響

本研究において、主な長期増強へのニューロプシンの影響は、高頻度刺激後の初期(<20 分)に見られた。それゆえニューロプシンは2、3時間は必要と考えられる蛋白新生を介するのではなく、速い活性化により制御されているものと考えられる。我々の以前の研究において示されたように、ニューロプシンは海馬 CA1, 3 領域の錐体細胞に限局して発現しており、軸索末端に輸送、貯蔵、放出されると考えられている(Chen et al., 1995, Suzuki et al., 1995, Kato, in preparation)。またニューロプシンは不活性型の前駆体(プロニューロプシン)から活性型へ急速に変換される(Shimizu et al., 1998)。このことから、ニューロプシンは軸索末端よりプロニューロプシンの形で活動依存的に放出され、シナプス間で活性型に変換されると考えられる。これに対し tPA の選択的阻害剤である tPA STOP により長期増強後期は明らかに阻害されるが、長期増強初期は全く影響を受けないことが明らかとなっている(Baranes et al., 1998)。それゆえ、tPA は Schaffer collateral 長期増強の後期に非常に重要であることが考えられる(Qian et al., 1993, Seeds et al., 1995, Frey et al., 1996, Huang et al., 1996, Mizutani et al., 1996, Baranes et al., 1998)。Maletic-Savatic ら(Maletic-Savatic et al., 1999)は共焦点顕微鏡を用い、長期増強誘発刺激による NMDA 受容体の活性化を介した海馬錐体細胞の filopodia 形態変化が刺激後 10-20 分の間に誘発されることを報告している。本研究の結果は、ニューロプシンは NMDA current には影響しないことを示している(図 4)。このことからニューロプシンが NMDA 受容体の機能を直接修飾する可能性は低く、NMDA 受容体の活性化の下流で制御されていると考えられる。更に、Staubli ら

(Staubli et al., 1998)は長期増強誘発刺激前後 20 分間に細胞接着因子であるインテグリンの接着阻害剤を海馬スライスに投与すると長期増強が阻害されるという結果を示している。これらのことから長期増強誘発刺激後の早期に神経細胞間で非常にダイナミックな接着の変化が起こっており、それと同時にスパインの構造変化が誘導されていると考えられる。以上のことからニューロプシンが長期増強初期の構造変化に関与する可能性が考えられる。

清水らによりニューロプシンが細胞外マトリックス (ECM) プロテアーゼとして作用していることが示されていることから (Shimizu et al., 1998)、活性型ニューロプシンを投与および内因性ニューロプシンの抑制により長期増強に対するニューロプシンの作用を検討した。リコンビナントニューロプシンの濃度を変化させることにより (1-170 nM)、2.5 nM でピークを示すベル型の dose-dependent カーブが得られた。この明らかな濃度依存性、特に 2.5-170 nM の範囲における直線性は、ニューロプシンが ECM 蛋白質 (fibronectin、及び他の未確認基質蛋白質) の分解とそれに伴う再配置によって長期増強の修飾に重要な役割を果たすことを示唆する。長期増強の誘発には integrin-ECM の相互作用が重要であることを示す以下のような結果が示されている。(i) fibronectin、及び vitronectin に対する受容体である $\alpha 5$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、及び、 $\alpha v \beta 3$ の integrin isoforms の海馬における存在が免疫組織化学的に示された (Bahr et al., 1991, Bahr et al., 1991)。(ii) ペプチドによる integrin 接着阻害により、長期増強の誘導が抑制される (Bahr et al., 1997)。(iii) integrin を介する短期記憶が *Drosophila* の記憶突然変異体を用いて解明された (Grotewiel et al., 1998)。ニューロプシンは、ECM プロテアーゼであり、ECM 蛋白質分解を行い、ECM-integrin 相互作用を調節し得る (Shimizu et al., 1998)。それゆえ、ニューロプシンによる長期増強初期の制御はシナプス結合を調節する ECM 分子の調節による可能性が考えられる。ECM プロテアーゼである tPA は Schaffer collateral と mossy fiber 系における長期増強後期に重要であると考えられている (Qian et al., 1993, Frey et al., 1996, Huang et al., 1996, Baraban et al., 1997)。Muller and Griesinger (Muller et al., 1998) は、閉眼処理した仔猫を後に開眼し、このとき見られる大脳皮質視覚野における眼優位性反応の変化 (reverse-occlusion plasticity) が tPA、または plasmin の阻害により影響を受けることを示している。Chen らは (Chen et al., 1997) tPA が plasminogen を plasmin に変換、これが laminin 切断を引き起こすことにより、excitotoxin による神経細胞死に関連していることを示した。従って、可塑性をコントロールするために tPA が生理学的条件下で laminin を切断する否かに関する知見は重要である。ニューロプシンは laminin を切断しないことが明らかとなっている (Shimizu et al., 1998)。ニューロプシン mRNA はマウス海馬 CA1, 3 領域に豊富に存在するが、歯状回顆粒細胞には存在しない (Chen et al., 1995, Suzuki et al., 1995, Okabe et al., 1996)。興味深いことに、tPA mRNA は CA1 領域と歯状回に存在することが示されている (Tsirka et al., 1995)。このような分布の差異は、これらのセリンプロテアーゼの役割の違いを示唆すると考えられる。

以上のような基質特異性、特異的分布、生理学的効果を考え合わせると、海馬における可塑性は異なる特性を持つ数種のセリンプロテアーゼにより制御されていることが考えられる。

ニューロプシン欠損による長期増強への影響

本実験によりニューロプシンは長期増強を修飾していることが示された。このことから NPKO において完全な長期増強の欠失が期待されたが、NPKO において TBS による長期増強に障害は見られなかった。NPKO において paired pulse facilitation に変化が見られなかったことから（駒井ら未発表データ）、ニューロプシンがシナプス前細胞からの quanta の放出を修飾するとは考え難い。また井上らは電子顕微鏡を用い海馬 CA1 領域における興奮性シナプス数を計測し、NPKO において興奮性シナプスの減少および不完全な結合様式のシナプスの増加を示している（井上ら未発表データ）。一つの可能性としてシナプスの turn over の障害によるものと考えられ、ニューロプシンがシナプスの生理学的距離を制御している分子であることを示唆している。

ニューロプシン欠損による組織学的、生理学的影響

NPKO の組織学的解析の結果から、NPKO 海馬において GABA 作動性細胞数の変化は見られないものの、parvalbumin (PV) 陽性細胞の細胞数が増加していることが明らかとなっている（平田ら未発表データ）。PV 陽性細胞は GABA 作動性細胞の一部であり、発生段階で GABA 作動性細胞の一部が PV 陽性に変化するものと考えられる (Solbach et al., 1991, Baimbridge, 1992)。PV 陽性細胞数を規定する要因として神経細胞の活動性が考えられており、PV 陽性細胞はフィードバックおよびフィードフォワード抑制を行っているものと考えられている (Kiss et al., 1996, Philpot et al., 1997, Idrizbegovic et al., 1999)。このことからニューロプシンは個体発生段階でシナプス結合を修飾することにより一時的に神経回路の活動性上昇が引き起こし、これにより PV 陽性細胞数の増加が誘導されたものと考えられる。PV 陽性細胞は chandelier cell もしくは basket cell であると考えられており、錐体細胞の近位の樹状突起に多くシナプスを形成している。その作用として樹状突起への Ca^{2+} 電流の逆伝播の抑制が挙げられる (Ribak et al., 1993, Freund et al., 1996, Kiss et al., 1996)。NPKO では TBS による長期増強に変化はなかったものの（図 10）5-20 Hz 刺激による長期増強の減少が観察された（図 11）。TBS 刺激による長期増強では刺激が高頻度であるためにシナプス後細胞の興奮が減衰する前に再び刺激入力が入ってくる。しかし 5 Hz 長期増強では樹状突起への電流の逆伝播と前シナプスからの入力の同期無くしてはシナプス前後の連合が成立しない (Thomas et al.,

1996, Thomas et al., 1998)。ニューロプシン欠損による PV 陽性細胞の増加により、樹状突起への電流の逆伝播が阻害され、同期の検知が困難となり、NPKO では 5 Hz 長期増強の抑制がみられたものと考えられる。

NPKO より得た海馬スライスにおいて入力-出力関数の減少が観察された (図 7)。この結果は軸索や興奮性シナプス数の減少を示すと考えられ、井上らによる観察結果と合致している。大脳皮質視覚野における眼優位性カラムの研究からシナプス前、後細胞の活動性のバランスの不均衡によりシナプス形成が障害されることが明らかとなっている (Hata et al., 1994)。NPKO では個体発生段階よりニューロプシンを欠損していることから、シナプス前、後細胞間の活動性バランスが不均衡を生じ、シナプス数が減少したという可能性が考えられる。これらの可能性を検証するためには NPKO における神経回路の発達とその活動性の変化を検討する必要があると考えられる。

ニューロプシン欠損による発火様式の変化

ニューロプシンがある種の amiloride 感受性陽イオンチャネル (BNaC) を可逆的に修飾することが示されている (島田ら未発表データ)。amiloride 感受性陽イオンチャネルは Na^+ をはじめ、各種陽イオンを透過することにより、細胞内の浸透圧や pH の調節を行っていることが明らかとなっている (Price et al., 1996, Tombaugh et al., 1997)。また、浸透圧や pH の変化により活動電位の発火パターンが変化することも明らかとなっている (Azouz et al., 1997, Church, 1999)。NPKO において CA1 錐体細胞の活動電位の half duration の延長や発火頻度の有意な増加が見られた (図 8, 9)。このような変化は K^+ conductance の修飾が考えられる。中でも small conductance K^+ channel (SK チャネル) がもっとも有力な候補であると考えられる (Pedarzani et al., 1993, Hirschberg et al., 1999, Sah et al., 1999)。この SK チャネルは浸透圧や pH の変化や、さまざまな分子により影響を受けることが明らかとなっている (Sah, 1996, Baraban et al., 1997, Pedarzani et al., 1998, Brodie et al., 1999, Church, 1999, Ping et al., 1999)。故に NPKO において CA1 錐体細胞の活動電位発火頻度に有意な増加が見られたのは (図 9)、浸透圧や pH 変化により誘導された可能性が考えられる。細胞体に比べスパイン頭部は浸透圧変化により影響を受けやすく、その容積が変化しやすいことから (Andrew et al., 1994)、シナプス伝達の修飾にも影響している可能性が考えられる。

NPKO の行動学的変化

NPKO では行動学的異常が認められた (Hirata et al., in preparation)。NPKO は open-field 試験において活動性の上昇を示し、驚愕反射試験においては馴

化し難いことおよび試験初期段階で刺激に対する過敏性が観察された。また水迷路試験では学習は可能ではあるものの、学習速度はWTに比べ有意に遅延していた。これらの行動試験は海馬機能を反映すると考えられており、NPKOが何らかの海馬機能異常を有していることを示唆している。中隔核の機能を反映すると考えられている能動的回避学習ではWTとの間に有意な差は認められなかった。これらの行動学的変化は海馬破壊実験による結果とよく一致しており、このことから海馬機能障害によるものであると考えられる(Myhrer, 1975, Myhrer, 1975)。海馬で見られるオシレーションは、PV陽性細胞と考えられている chandelier cell や basket cell といった interneuron により制御されていることが示されている(Traub et al., 1996, Wang et al., 1996, Buzsaki, 1997, Whittington et al., 1997, Penttonen et al., 1998)。このことはNPKOでみられた行動上の変化とニューロプシンの欠損によるPV陽性細胞を介した海馬のオシレーション活動の異常との関連性を予測させる。

結論

長期増強により放出されたニューロプシンがスパイン周辺の結合の弱化と再編を誘導し、これにより神経可塑性時のスパイン構造変化を効率的に誘導すると考えられる。本研究においてニューロプシンが長期増強の early phase において著しい作用を示したことから、この反応は極めて速いものと推察できる。

「謝辞」

今回の実験においてご指導していただいた以下の先生方に心より感謝し、お礼を申し上げます。

本研究を進める上で様々な面でご指導していただいた先生方

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、吉田成孝助教授、岡（加藤）啓子助手、松本和政助手、平田昭夫氏

共同研究としてアンチセンス・オリゴヌクレオチド慢性投与マウスを作成して下さった先生方

兵庫医科大第五内科

松山知弘講師、小畠恭子さん

電気生理学的手法や解析等に関してご指導ご鞭撻をいただいた先生方

大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門

渡辺恭良部長、今村一之副部長、小林真之先生、山本正男先生

大阪大学医学部医学系研究科神経生理学研究部

木村文隆先生、安田浩樹先生

神戸大学医学部生理学第一講座

真鍋俊也先生

そして、研究活動以外の様々な面で支えてくれた母やかおりに心から感謝します。

「参考文献」

- Andrew, R. D., and MacVicar, B. A. 1994. Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience*. **62**. 371-83.
- Azouz, R., Alroy, G., and Yaari, Y. 1997. Modulation of endogenous firing patterns by osmolarity in rat hippocampal neurones. *J Physiol (Lond)*. **502 (Pt 1)**. 175-87.
- Bahr, B. A., Sheppard, A., and Lynch, G. 1991. Fibronectin binding by brain synaptosomal membranes may not involve conventional integrins. *Neuroreport*. **2**. 13-6.
- Bahr, B. A., Sheppard, A., Vanderklish, P. W., Bakus, B. L., Capaldi, D., and Lynch, G. 1991. Antibodies to the alpha v beta 3 integrin label a protein concentrated in brain synaptosomal membranes. *Neuroreport*. **2**. 321-4.
- 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**. 1320-9.
- Baimbridge, K. G. 1992. Calcium-binding proteins in the dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl*. **7**. 211-20.
- Baraban, S. C., Bellingham, M. C., Berger, A. J., and Schwartzkroin, P. A. 1997. Osmolarity modulates K⁺ channel function on rat hippocampal interneurons but not CA1 pyramidal neurons. *J Physiol (Lond)*. **498 (Pt 3)**. 679-89.
- 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**. 813-25.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. **361**. 31-9.
- Bliss, T. V., and Gardner-Medwin, A. R. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)*. **232**. 357-74.
- 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 (Lond)*. **232**. 331-56.
- Brodie, M. S., McElvain, M. A., Bunney, E. B., and Appel, S. B. 1999. Pharmacological reduction of small conductance calcium-activated potassium current (SK) potentiates the excitatory effect of ethanol on ventral tegmental area dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. **290**. 325-33.
- Buzsaki, G., 1997. Functions for interneuronal nets in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol*. **75**. 508-15.

- Chen, Z. L., and Strickland, S. 1997. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell*. **91**. 917-25.
- 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**. 5088-97.
- Church, J. 1999. Effects of pH changes on calcium-mediated potentials in rat hippocampal neurons in vitro. *Neuroscience*. **89**. 731-42.
- Eccles, J. C. 1979. Synaptic plasticity. *Naturwissenschaften*. **66**. 147-53.
- Eccles, J. C. 1986. Mechanisms of long-term memory. *J Physiol (Paris)*. **81**. 312-7.
- Freund, T. F., and Buzsaki, G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. **6**. 347-470.
- 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**. 2057-63.
- Grotewiel, M. S., Beck, C. D., Wu, K. H., Zhu, X. R., and Davis, R. L. 1998. Integrin-mediated short-term memory in *Drosophila*. *Nature*. **391**. 455-60.
- Hata, Y., and Stryker, M. P. 1994. Control of thalamocortical afferent rearrangement by postsynaptic activity in developing visual cortex. *Science*. **265**. 1732-5.
- Hirata, A., Yoshida, S., Matsuyama, T., Inoue, N., Iso, H., Komai, S., Matsumoto, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Imamura, K., Kato, K., Iizasa, H., Yoshida, N., and Shiosaka, S. Neuropsin regulates synaptic homeostasis of Schaffer-collateral pathway and its deficiency caused behavioral discordance in mouse. (in preparation).
- Hirschberg, B., Maylie, J., Adelman, J. P., and Marrion, N. V. 1999. Gating properties of single SK channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biophys J*. **77**. 1905-13.
- 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., Collen, D., and Carmeliet, P. 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**. 8699-704.
- Idrizbegovic, E., Bogdanovic, N., and Carlon, B. 1999. Sound stimulation increases calcium-binding protein immunoreactivity in the inferior colliculus in mice. *Neurosci Lett*. **259**. 49-52.
- Kato, K., Oka, T., Sakurai, K., Matsumoto, K., Okabe, A., Akisada, M., and Shiosaka, S. Neuropsin modulates neurite outgrowth induction and fasciculation of hippocampal neurons in culture. (in preparation).
- Kauer, J. A. 1999. Blockade of hippocampal long-term potentiation by sustained tetanic

- stimulation near the recording site. *J Neurophysiol.* **81**. 940-4.
- Kiss, J., Buzsaki, G., Morrow, J. S., Glantz, S. B., and Leranth, C. 1996. Entorhinal cortical innervation of parvalbumin-containing neurons (Basket and Chandelier cells) in the rat Ammon's horn. *Hippocampus*. **6**. 239-46.
- Larson, J., Wong, D., and Lynch, G. 1986. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* **368**. 347-50.
- Lee, K. S., Schottler, F., Oliver, M., and Lynch, G. 1980. Brief bursts of high-frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus. *J Neurophysiol.* **44**. 247-58.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., and Svoboda, K. 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*. **283**. 1923-7.
- Mizutani, A., Saito, H., and Matsuki, N. 1996. Possible involvement of plasmin in long-term potentiation of rat hippocampal slices. *Brain Res.* **739**. 276-81.
- 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**. 760-4.
- Muller, C. M., and Griesinger, C. B. 1998. Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci.* **1**. 47-53.
- Myhrer, T. 1975. Locomotor, avoidance, and maze behavior in rats with selective disruption of hippocampal output. *J Comp Physiol Psychol.* **89**. 759-77.
- Myhrer, T. 1975. Locomotor and avoidance behavior in rats with partial or total hippocampal perforant paths sections. *Physiol Behav.* **15**. 217-24.
- Okabe, A., Momota, Y., Yoshida, S., Hirata, A., Ito, J., Nishino, H., and Shiosaka, S. 1996. Kindling induces neuropsin mRNA in the mouse brain. *Brain Res.* **728**. 116-20.
- Pedarzani, P., Krause, M., Haug, T., Storm, J. F., and Stuhmer, W. 1998. Modulation of the Ca^{2+} -activated K^{+} current sIAHP by a phosphatase-kinase balance under basal conditions in rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* **79**. 3252-6.
- Pedarzani, P., and Storm, J. F. 1993. PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K^{+} current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron*. **11**. 1023-35.
- Penttonen, M., Kamondi, A., Acsady, L., and Buzsaki, G. 1998. Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis in vivo. *Eur J Neurosci.* **10**. 718-28.
- Philpot, B. D., Lim, J. H., and Brunjes, P. C. 1997. Activity-dependent regulation of calcium-binding proteins in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* **387**. 12-26.

- Ping, H. X., and Shepard, P. D. 1999. Blockade of SK-type Ca^{2+} -activated K^{+} channels uncovers a Ca^{2+} -dependent slow afterdepolarization in nigral dopamine neurons. *J Neurophysiol.* **81**. 977-84.
- Price, M. P., Snyder, P. M., and Welsh, M. J. 1996. Cloning and expression of a novel human brain Na^{+} channel. *J Biol Chem.* **271**. 7879-82.
- Qian, Z., Gilbert, M. E., Colicos, M. A., Kandel, E. R., and Kuhl, D. 1993. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature.* **361**. 453-7.
- Ribak, C. E., Seress, L., and Leranth, C. 1993. Electron microscopic immunocytochemical study of the distribution of parvalbumin-containing neurons and axon terminals in the primate dentate gyrus and Ammon's horn. *J Comp Neurol.* **327**. 298-321.
- Sah, P. 1996. Ca^{2+} -activated K^{+} currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* **19**. 150-4.
- Sah, P., and Clements, J. D. 1999. Photolytic manipulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reveals slow kinetics of potassium channels underlying the afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* **19**. 3657-64.
- Sappino, A. P., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J. Z., Wohlwend, A., and Vassalli, J. D. 1993. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest.* **92**. 679-85.
- Seeds, N. W., Williams, B. L., and Bickford, P. C. 1995. Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science.* **270**. 1992-4.
- Sejnowski, T. J. 1997. The year of the dendrite [comment]. *Science.* **275**. 178-9.
- 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**. 11189-96.
- Solbach, S., and Celio, M. R. 1991. Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl).* **184**. 103-24.
- Staubli, U., Chun, D., and Lynch, G. 1998. Time-dependent reversal of long-term potentiation by an integrin antagonist. *J Neurosci.* **18**. 3460-9.
- Suzuki, J., Yoshida, S., Chen, Z. L., Momota, Y., Kato, K., Hirata, A., and Shiosaka, S. 1995. Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the mouse brain. *Neurosci Res.* **23**. 345-51.
- Thomas, M. J., Moody, T. D., Makhinson, M., and O'Dell, T. J. 1996. Activity-dependent beta-adrenergic modulation of low frequency stimulation induced LTP in the hippocampal CA1 region. *Neuron.* **17**. 475-82.

- Thomas, M. J., Watabe, A. M., Moody, T. D., Makhinson, M., and O'Dell, T. J. 1998. Postsynaptic complex spike bursting enables the induction of LTP by theta frequency synaptic stimulation. *J Neurosci.* **18**. 7118-26.
- Tombaugh, G. C., and Somjen, G. G. 1997. Differential sensitivity to intracellular pH among high- and low- threshold Ca^{2+} currents in isolated rat CA1 neurons. *J Neurophysiol.* **77**. 639-53.
- Traub, R. D., Whittington, M. A., Colling, S. B., Buzsaki, G., and Jefferys, J. G. 1996. Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo. *J Physiol (Lond)*. **493** (Pt 2). 471-84.
- Tsirka, S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., and Strickland, S. 1995. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature*. **377**. 340-4.
- Wang, X. J., and Buzsaki, G. 1996. Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J Neurosci.* **16**. 6402-13.
- Whittington, M. A., Stanford, I. M., Colling, S. B., Jefferys, J. G., and Traub, R. D. 1997. Spatiotemporal patterns of gamma frequency oscillations tetanically induced in the rat hippocampal slice. *J Physiol (Lond)*. **502** (Pt 3). 591-607.
- Yoshida, S., and Shiosaka, S. 1999. Plasticity-related serine proteases in the brain (review). *Int J Mol Med*. **3**. 405-9.