

ニューロブシン依存的及び非依存的シグナル  
による海馬パルブアルブミン陽性終末の調節

鈴木春満

奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 神経機能科学  
(塩坂貞夫 教授)

平成 26 年 11 月 12 日提出

## 目次

序論.....	4
ヒトの記憶研究から明らかとなった海馬の役割について.....	4
動物の記憶研究から示された海馬の空間的記憶での役割.....	4
電気生理学的手法で誘導される長期増強と記憶の関連性について.....	5
電気生理学的に誘導される記憶形成過程で観察される神経細胞レベルでのダイナミックな形態学的変化.....	6
神経細胞レベルで形態学的変化を引き起こす細胞外プロテアーゼと記憶形成過程で生じる神経可塑性について.....	7
細胞外プロテアーゼニューロプシンが誘導する神経可塑性.....	8
パルブアルブミン陽性細胞の機能的役割.....	9
本研究の目的.....	10
材料と方法.....	11
動物.....	11
組織の調整と免疫組織化学.....	11
パルブアルブミン陽性細胞の解析と蛍光デンスイオメトリー.....	12
ルシファーイエローインジェクション.....	12
環境条件設定.....	13
社会的な環境刺激.....	13
RNA抽出とリアルタイム RT-PCR.....	13
統計解析.....	14
結果.....	15
第1章 パルブアルブミン陽性細胞の組織学的解析.....	15
ErbB4 発現細胞は主にパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞.....	15
ニューロプシン欠損マウスにおける歯状回の顆粒細胞層および CA3 領域の錐体細胞層でのパルブアルブミン陽性細胞数の変化.....	16
興奮性錐体細胞に投射するパルブアルブミン陽性終末.....	16
ニューロプシン欠損マウスにおける興奮性錐体細胞を取り囲むパルブアルブミン陽性終末の変化.....	17
野生型とニューロプシン欠損マウスにおける海馬での抑制性プレシナプスマーカー小胞型 GABA トランスポーターの分布.....	17
ニューロプシン欠損マウスにおける GABA <sub>A</sub> 受容体.....	18
第2章 環境刺激による野生型とニューロプシン欠損マウスにおけるパルブアルブミン陽性終末の変化.....	18
環境刺激による海馬ニューロプシン mRNA の発現の上昇.....	18
自発運動による海馬パルブアルブミン陽性終末の変化.....	19
社会的な環境変化にパルブアルブミン陽性終末の変化.....	20

第3章 パルブアルブミン陽性細胞による興奮性神経細胞の制御 .....	20
パルブアルブミン陽性細胞によるニューロプシン発現興奮性細胞の調節 .....	20
考察 .....	22
第1章 ニューロプシンシグナルにおけるパルブアルブミン陽性細胞 .....	22
第2章 パルブアルブミン陽性抑制性神経細胞 .....	23
環境刺激によるニューロプシン mRNA の発現上昇 .....	23
野生型とニューロプシン欠損マウスにおけるパルブアルブミン陽性終末の比較観察について .....	24
野生型とニューロプシン欠損マウスにおける抑制性シナプスの比較観察について .....	28
第3章 パルブアルブミン陽性細胞によるニューロプシン発現細胞の制御 .....	30
ニューロプシンと統合失調症 .....	30
謝辞 .....	52
参考文献 .....	53

## 序論

### ヒトの記憶研究から明らかとなった海馬の役割について

心理学的研究によると、記憶には、言葉などで説明できる陳述記憶と意識上に内容を想起することができない非陳述記憶がある(Squire, 1986; Squire and Zola, 1996)。陳述記憶には個人的な体験や出来事の記憶であるエピソード記憶と言葉の意味についての記憶である意味記憶がある。また、非陳述記憶には、自転車の乗り方、鏡にうつった図形をなぞる技能学習などの同じ経験を何度も反復して獲得する手続き記憶などがある。認知症やアルツハイマー病の初期段階から陳述記憶が障害を受けること、また患者の死後脳では海馬および周辺部位に病変や委縮が認められることから海馬が陳述記憶に重要な役割を果たすことが、想定された(Köhler et al., 1998; Libon et al., 1998; de Toledo-Morrell et al., 2000; Anderson et al., 2006)。

海馬は側頭葉の内側部にあり、難治性てんかん治療のため両側側頭葉を切除した患者 HM は、術後、新しい記憶を獲得できない順行性記憶障害を引き起こしたことから、偶然海馬が記憶の獲得に関係することが明らかとなった(Annese et al., 2014; Corkin, 2002; SCOVILLE and MILNER, 1957)。HM は、術後、数年間以上の過去の記憶は障害されなかったことおよび、新しく陳述記憶である意味記憶やエピソード記憶を形成することができなかったことから、海馬は、近時記憶に重要な役割を果たしていると考えられた(Squire, 2009)。一方、非陳述記憶は、鏡に映った図形を見てそれをなぞる課題を与えると、反復することで上達することから小脳や線条体部位で形成される手続き記憶は獲得できることが明らかとなった(Squire, 2009)。

### 動物の記憶研究から示された海馬の空間的記憶での役割

海馬ではげっ歯類を用いた実験から場所細胞と呼ばれる細胞が発見され、特定の場所や方向、道順ごとに特定の細胞が発火パターンを示し、様々な知覚を空間情報と連合してエピソード記憶を形成すると考えられ(Muller et al., 1987; O'Keefe and Dostrovsky, 1971; Wood et al., 1999)、マウスのモリスの水迷路を用いた場所探索研究から海馬は空間的なエピソード記憶の獲得と維持に関係すると考えられてきた(D'Hooge and De Deyn, 2001; Morris, 1984)。

さらに、実験動物を用いた研究では、新規な環境への本能的な探索行動を利用して、きわめて短時間保持される記憶（人の作業記憶に類似の記憶）の存在も示唆された(Paul et al., 2009)。—以下便宜的に作業記憶と記述する。作業記憶とは、作業遂行中

に、必要な情報を一時的に記憶し、その情報を活用して、作業を達成する過程の概念をさす。例えば、空間的な作業記憶をテストするもののひとつとして Y 字迷路が知られている。3 つのアームからなる Y 字型迷路の一端にマウスを置くと、探索行動をはじめ、Y 字型の 2 か所のアームを探索後、直前までに探索したアームを空間的に記憶していることで、まだ探索していない 3 か所目のアームを探索する。探索行動時間内で連続して 3 か所の異なるアームを探索した回数を測定して空間的な作業記憶を評価する。様々な薬剤を用いて海馬を損傷させると作業記憶が低下することから、海馬は作業記憶の形成に関与していることが示された(Conrad et al., 1996)。

## 電気生理学的手法で誘導される長期増強と記憶の関連性について

上記のように海馬は空間的な作業記憶の形成に関与していると考えられるが、形態学的には吻側から尾側方向に細長い構造をもち、長軸方向に沿って特徴的な層構造が見られる。海馬の特徴的な断面構造から、海馬内の各領域に名称がつけられた。広義の海馬はアンモン角 (CA) 1 領域と CA3 領域と歯状回を含む領域を、狭義の海馬は CA1 と CA3 領域を意味し、歯状回を含めて海馬体と呼ばれる。海馬体の神経回路は、嗅内皮質から貫通線維が歯状回の顆粒細胞に投射している。顆粒細胞は、苔状線維を歯状回門と、海馬 CA3 (アンモン角) 領域の錐体細胞に投射している。海馬 CA3 領域の錐体細胞は、シェーファー側枝を海馬 CA1 領域の錐体細胞に投射している。海馬 CA1 領域の錐体細胞から、嗅内皮質に戻る回路がある。この回路はトリシナプス回路と呼ばれ、興奮性神経細胞の回路網からなる (図 1)。海馬内のトリシナプス回路は、入力線維を受容する神経細胞群の方向性が比較的単純な線維連絡であり、刺激電極と記録電極を用いて記憶の形成過程を解明するための研究が行われている。

Bliss らがウサギの海馬体を用いた研究から、電氣的に貫通線維を刺激し、投射先の歯状回での神経細胞の電氣的な応答を観察し、のちに長期増強 (LTP) と呼ばれる数時間程度の長期的な神経細胞の集合電位の増加を観察した(Bliss and Lomo, 1973)。長期増強は刺激された軸索から放出される神経伝達物質が増加し、神経伝達物質を受容する神経細胞でも受容体の増加やイオンの流入量が増えることで、結果として神経細胞間での神経伝達効率の増加が起きる。この反応は、記憶を保持する過程で起こると考えられる神経細胞間での代謝的や構造的変化を通じて可塑的に神経伝達効率を変化させる過程と類似することから、長期増強は記憶を形成する一過程を示すと考えられた。その後の研究によって、長期増強には、刺激条件が 1 回のテタナス刺激 (100Hz、1 秒間の高頻度刺激) に誘導されるタンパク質合成を伴わない前期長期増強 (E-LTP) と 4 回以上のテタナス刺激によって誘導されるタンパク質合成を伴う後期長期増強 (L-LTP) があることが明らかとされた(Bliss and Collingridge, 1993; Frey et al., 1988; Malenka, 1999)。

長期増強と記憶の関連性では、記憶にも記憶を保持する時間の長さから、大きく分

けて2つの記憶が考えられている。1つはタンパク合成を伴わない、数秒から数十分程度の作業記憶と2つめはタンパク質合成を伴う、6時間から1日程度の短期記憶があることが示され、記憶を保持する過程においても、長期増強との分子的な相関が示された。動物実験を用いた研究から、長期増強と記憶で相関性が見られた行動学習試験がある。それは、場所や音などのそれだけでは恐怖を与えない条件刺激と電気ショックのような恐怖を与える非条件刺激を組み合わせることで、条件刺激と非条件刺激が関連付けられ、場所（文脈）を提示すると電気ショックが想起され、呼吸以外の動きがない状態（すくみ反応）が観察され、このような恐怖反応が見られる学習を文脈恐怖条件付けと呼ぶ。マウスを床に電気グリットが敷かれたチャンバーにいれ、探索行動させた最後の数秒間に電気ショックを与えると、マウスはチャンバーを電気ショックが与えられた場所であると記憶し、1日後に同じ場所にもどすとマウスのすくみ反応が観察され、条件付が成立した記憶を確認することができる。そこで、文脈恐怖条件付けを指標に、タンパク質合成を阻害すると、動物個体レベルでの文脈恐怖条件付けの成立が阻害されることが報告され、さらに、タンパク質合成を阻害した条件下では、作業記憶の成立は阻害されないが、短期記憶が阻害される結果も報告され、短期記憶の形成に作業記憶が依存しない可能性が示唆された(Abel et al., 1997; Ammassari-Teule et al., 2001; Huang et al., 1996; Nagy et al., 2006; Scharf et al., 2002)。以上のことから長期増強と作業記憶および短期記憶には分子レベルや動物の行動レベルで相関が示されている。しかしながら、人工的な電気刺激から誘導される長期増強は1日程度しか観察されないが実際の記憶は数日から数週間程度保持されることから長期増強はシナプスで誘導される初期段階の現象であると考えられる。つまり、記憶の形成は、海馬体内の神経回路での可塑的な変化であり、長期増強は、神経細胞レベルでの記憶の形成過程で起こる現象を示すと考えられる(Hölscher, 1997, 1999; Mayford et al., 2012)。

## 電気生理学的に誘導される記憶形成過程で観察される神経細胞レベルでのダイナミックな形態学的変化

以上のように長期増強と記憶との関連は分子化学的な解析を中心に行われてきたが、神経細胞どうしが接合する部位すなわちシナプス構造に着目し、この部位が記憶の形成過程において、形態学的に変化し、神経伝達効率を上昇させる考えがこの数十年の間に新たに導入された。長期増強刺激を実験動物に与え、シナプス部位の構造変化を電子顕微鏡、光学顕微鏡レベルで調べたところ、入力を受容する樹状突起にあるスパイン（棘突起）が長期増強誘導後、形態学的に大きく変化していた(Calverley and Jones, 1990; Van Harrevelde and Fifkova, 1975; Pawlak et al., 2005; Popov et al., 2004)。その後のコンフォーカル顕微鏡を用いた研究により、樹状突起にあるスパイ

ンがダイナミックに構造変化する様子や、光刺激により局所的に神経伝達物質グルタミン酸を放出することで、スパインを刺激し、スパインの構造変化が観察された (Engert and Bonhoeffer, 1999; Matsuzaki et al., 2004; De Roo et al., 2008; Zhang et al., 2008)。同様に、薬理的な長期増強の阻害や電気生理学的に低頻度の刺激で誘導される長期抑圧では、樹状突起のスパイン構造が変化しないことやスパインの退縮などが観察された (Nägerl et al., 2004; Okamoto et al., 2004; Zhou et al., 2004)。以上のことから、スパイン構造は神経活動に依存してダイナミックに変化し、構造的変化は可塑的な神経伝達効率の変化を引き起こすと考えられ、この変化をシナプス構造可塑性と呼ぶ。このスパインの構造的変化の際に、シナプス内ではアクチン線維の重合・脱重合や、シナプス膜上の細胞接着因子の変化、グルタミン酸受容体の増加など機能的な分子の変化も観察された (Honkura et al., 2008; Okamoto et al., 2004; Shi et al., 2001; Whitlock et al., 2006; Yuste and Bonhoeffer, 2001)。このことから、神経活動依存的に、スパインの形態的变化や細胞接着因子などの分子の変化を引き起こす分子が神経可塑性に関与することが想定された。

## 神経細胞レベルで形態学的変化を引き起こす細胞外プロテアーゼと記憶形成過程で生じる神経可塑性について

当研究室では、シナプス構造可塑性には、セリンプロテアーゼによるシナプス付近の細胞外マトリックスや細胞接着因子の生理的な分解によって、シナプスの形態的な変化や神経効率の増加が起こる可能性について検討してきた。Chen らは海馬に特異的に局在している新規セリンプロテアーゼを発見し、ニューロプシンと名付けた (Chen et al., 1995)。その後、ニューロプシン (カリクレイン 8/KLK8) は、神経活動依存的に活性化され、活動依存的な神経可塑性に関わることを報告した。例えば、前期長期増強や脳内で繰り返し電気刺激を与えることによって発作を誘発するキンドリングによるてんかんの発症 (Chen et al., 1995; Okabe et al., 1996; Tamura et al., 2006)、リコンビナント活性型ニューロプシンを海馬スライスに投与すると長期増強を促進することや (Komai et al., 2000)、リコンビナント活性型ニューロプシンを投与後に長期増強を誘導すること (Tamura et al., 2006) などニューロプシンが神経可塑性を誘導することを示した。一方、ニューロプシン特異的な阻害剤やニューロプシンモノクローナル中和抗体の投与によって酵素活性を無効化すると、結果として前期長期増強が減少した (Tamura et al., 2006)。モノクローナル中和抗体を *in vivo* 投与した場合、キンドリングてんかん発症の発作レベルが改善した (Momota et al., 1998)。従って、ニューロプシンはその酵素反応によって神経可塑性関連のシグナル系を制御するキ一分子と考えられた。

他にも、海馬で機能が報告されているセリンプロテアーゼとして、組織プラスミノ

ーゲンアクチベーター (t-PA) とニューロトリプシンがある。t-PA が、シナプスに与える作用としてタンパク質分解活性依存的なものと非依存的なものの2種類あることが知られている。

タンパク質分解活性依存的なものとして、プラスミノーゲンをプラスミンにするカスケードやグルタミン酸の受容体である NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 受容体サブユニット GluR1 を切断し、NMDA シグナルを増強することが報告されている(Nicole et al., 2001)。タンパク質分解非依存的なものとして GluR2B サブユニットと結合してリン酸化を誘導することが報告された(Norris and Strickland, 2007; Pawlak et al., 2005)。電気生理学的な実験から、t-PA とプラスミンのカスケードは L-LTP に重要であることが報告されている(Frey et al., 1996; Pang et al., 2004)。

ニューロトリプシンは神経活動依存的にプレシナプスから放出され、細胞外プロテオグリカンの一種アグリンが基質として同定された(Matsumoto-Miyai et al., 2009; Reif et al., 2007)。ニューロトリプシンは精神遅滞の原因遺伝子の1つとして報告された(Molinari et al., 2002)。

セリンプロテアーゼ以外にも、マトリックスメタロプロテアーゼ-9 はスパインに発現する  $\beta$  ジストログリカンや細胞接着因子 ICAM5 を基質とし、神経可塑性に関与することや電気生理学的に L-LTP に関与することが報告された(Michaluk et al., 2007; Nagy et al., 2006; Tian et al., 2007)。以上のように様々な細胞外プロテアーゼが海馬内で働き神経可塑性に寄与している。

## 細胞外プロテアーゼニューロプシンが誘導する神経可塑性

当研究室では、ニューロプシンの新規基質として、統合失調症脆弱因子であるニューレグリン-1 (NRG-1) を同定し、この機構が、興奮性シナプスを介した GABA 作動性抑制性ニューロンの活動制御に通じることを見出した(Tamura et al., 2012)。これまで、神経栄養因子として知られている膜貫通型タンパク質 NRG-1 (pro-NRG-1) は、細胞膜近傍において、メタロプロテアーゼによって切断され、成熟型 NRG-1(mNRG-1)としてシナプス間隙に放出される。その後リガンドとして受容体 ErbB4 に結合すると考えられている。しかしながら、mNRG-1 は、ErbB4 受容体に結合する EGF (epidermal growth factor) 様ドメインだけでなく、N 末端側にヘパリン結合ドメインを持つため、細胞外に放出された後、細胞膜上に存在するヘパリン硫酸プロテオグリカン (HSPG) にトラップされることが示唆されている(Loeb et al., 1999)。このため、mNRG1 が ErbB4 受容体へと結合するには HSPG から NRG-1 を遊離させる経路が示唆されていたが、これまで明らかとされていなかった。近年、当研究室では、ニューロプシンが、mNRG-1 のヘパリン結合ドメインを切断することで、mNRG-1 と HSPG との結合を解除し、EGF ドメインを遊離させることが明らかにした。また、EGF ドメインの標的となる、ErbB4 受容体の多くは、抑制性神経細

胞の一種である、パルブアルブミン陽性細胞に局限して発現している。このことから、ニューロプシンによる切断を介した、NRG-1-ErbB4 シグナルはパルブアルブミン細胞を標的としていることが明らかとされた。また、電気生理学的手法を用いた解析において、ニューロプシン欠損マウスは、抑制神経細胞の機能が障害されていることも明らかとされた(Tamura et al., 2012)。以上のことから、ニューロプシンによる切断を介した、NRG-1-ErbB4 シグナルは抑制性神経細胞の機能維持に重要であることが考えられている。

## パルブアルブミン陽性細胞の機能的役割

これまでの研究において、NRG-1、ErbB4 やニューロプシンは統合失調症、双極性障害、ヒト認知機能への関与が報告されている(Buonanno, 2010; Izumi et al., 2008; Marballi et al., 2012)。パルブアルブミン細胞の電気生理学な特徴として、高頻度に発火することがあげられる。このことから、パルブアルブミン陽性細胞は **fast spiking** 抑制性神経細胞として知られており、特に、抑制性神経細胞は、興奮性神経細胞の活動を制御し、ガンマ波などの認知機能に重要な同期発火の生成に重要な役割を果たしている。また、統合失調症患者の死後脳において、パルブアルブミンの発現量の低下が報告されており、近年では、抑制神経細胞の機能低下が病因の1つであることが考えられている。統合失調症患者の主な症状として、作業記憶の低下や、ガンマ波の低下が報告されているが、パルブアルブミン陽性細胞に発現する ErbB4 受容体を欠損させたマウスで統合失調症様の症状が出ることや、ErbB4 受容体も神経活動の同期やガンマ波に貢献することが報告されており(Hou et al., 2014; Klausberger et al., 2005; Del Pino et al., 2013; Sohal et al., 2009; Volman et al., 2011)、このことは、統合失調症の病因に、パルブアルブミン陽性細胞の機能不全が関与していることを示唆している。

また、パルブアルブミンの発現量は、環境刺激に応じて、変動することが報告されている。環境刺激として、例えば、豊かな環境がある。豊かな環境とは、マウスが遊ぶためのおもちゃや、自発運動可能なランニングホイール、トンネルなど、様々な環境刺激を与えるものである(Van et al., 2000)。このような豊かな環境で飼育されたマウスは、興奮性神経細胞の樹状突起の発達や学習効率の上昇などが示されている(Bekinschtein et al., 2011; Leggio et al., 2005)。さらに、豊かな環境刺激や文脈付恐怖条件づけによって、海馬内のパルブアルブミンの発現量が変化することが報告された(Donato et al., 2013)。パルブアルブミン発現量は、豊かな環境刺激において、発現量が低下する一方で、恐怖条件付刺激などの学習成立後には、発現量が上昇することが示された。また、これらのパルブアルブミンの発現量と GABA 合成酵素である GAD-67 の発現量には相関が見られており、経験依存的に変化するパルブアルブミンは、パルブアルブミン陽性細胞の抑制性神経細胞としての機能的な役割を果たしてい

ると考えられる。

近年では、脳の神経ネットワークは、興奮性細胞と抑制細胞との協調的な活動によって構成され、興奮と抑制のバランスが適切に調節されることが重要であると考えられている。このことから、パルブアルブミンの発現量の変動に伴う、抑制性ニューロンの機能が可塑的に変化する機構は、学習や記憶といった高次脳機能の実現に大きな役割を持っている。

## 本研究の目的

近年ニューロプシンによる NRG1 の修飾が、NRG-1-ErbB4 シグナルを介した抑制性神経細胞の機能維持に重要であることが見出された。そこで、本研究では、ニューロプシンシグナルを受容するパルブアルブミン陽性細胞に着目し、パルブアルブミン陽性細胞に対してどのように作用するのか形態学的に観察することを目的とした。初めにパルブアルブミン陽性細胞の分布及び終末を野生型とニューロプシン欠損マウスを用いて組織学的に比較検討した。また、ニューロプシンの発現量が上昇するような刺激や環境下における、ニューロプシンシグナルが抑制性神経細胞の可塑的な変化に与える影響をパルブアルブミンの発現量によって比較検討を行った。

その結果、ニューロプシン欠損マウスで歯状回や CA3 の一部の層においてパルブアルブミン陽性細胞数に変化を及ぼしたが、海馬全体での総数に変化は与えないことから、ニューロプシンはパルブアルブミン陽性細胞の一部の層での分布に必要である可能性を見出した。また通常飼育時には、ニューロプシン欠損マウスで、パルブアルブミン陽性終末の蛍光強度が野生型マウスよりも低下しており一方、環境刺激を与えた条件下では、ニューロプシン欠損マウスの方が、野生型よりパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度が上昇したことから、ニューロプシン遺伝子欠損マウスでは抑制性神経細胞における可塑的な変化が野生型マウスと異なる可能性を見出した。

## 材料と方法

### 動物

実験には C57BL/6J とニューロプシン欠損マウスを用いた。ニューロプシン欠損の作製方法は以前の論文で報告されている (Hirata et al., 2001)。ニューロプシン欠損マウスは C57BL/6J と 12 回バッククロスしたものをを用いた。GAD67-GFP マウスは頂いたものを系統維持し、実験に使用した (Tamamaki et al., 2003)。BAC-k1k8 (NP)-EGFP マウスは MMRRC (Mutant Mouse Regional Resource Centers) から凍結精子を購入し、奈良先端科学技術大学院大学でマウスを作製し、系統維持したものをを用いた。実験に用いた全てのマウスは奈良先端科学技術大学院大学の動物実験に対するガイドラインに則り、取り扱った。

### 組織の調整と免疫組織化学

雄マウス (~10 週齢) の腹腔内に 10%ウレタン (1.5mg/kg) を投与し、麻酔する。上行大動脈を介して、0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で脱血を行い、続けて、2%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で還流固定を行った。脳を取り出し、同成分の固定液に 1 晩反応させ、後固定を行った。70、80、90、95、100%エタノール液で各 1 時間処理した後、100%エタノール液で 1 晩処理した。50、75%ポリエステルワックス (VMR international Ltd. city) とエタノール混合液を各 1 時間 42 度で処理をし、100%ポリエステルワックス液に 2 回各 1 時間 42 度で処理をした。その後、脳を 100%ポリエステルワックス液で包埋した。切片は厚さ 6  $\mu\text{m}$  と 50  $\mu\text{m}$  をマイクロトーム (Leica) で作製した。

切片は 100%エタノールで 10 分、3 回脱ポリエステルワックス処理をした後、PBS で洗い、0.3% Triton-X100 で 30 分透過処理を行った。次に、5% ウシ血清アルブミン (BSA) でブロッキング処理を 2 時間行い、1 次抗体 (1% BSA) で 1 晩反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体 (1% BSA) で 1 晩反応させた。PBS 洗浄後、蛍光退色防止剤 Prolong Gold (Invitrogen) を用い封入した。

後固定サンプルは一部、30%スクロース/PBS で置換し、トリミング後、Tissue-Tek (サクラファインテック) で包埋し、ドライアイスで急速に凍結した。サンプルは、 $-13^{\circ}\text{C}$  クリオスタッド内でマイクロトームを用い、30 $\mu\text{m}$  で作製した。

使用した抗体は下記の通りである。1 次抗体：マウスモノクローナル抗パルブアルブミン抗体 (Sigma-Aldrich, 1:3000 希釈)、ウサギポリクローナル抗パルブアルブミン抗体 (abcam, 1:1500 希釈)、ウサギポリクローナル抗小胞 GABA 輸送体抗体 (井上

研究室、1:400 希釈)、マウスモノクローナル抗 ErbB4 抗体 (Thermo scientific, 1:500 希釈)、ウサギポリクローナル抗 ErbB4 抗体 (Santacruz, 1:500 希釈)、ウサギポリクローナル抗 GABA 受容体  $\alpha$  1 サブユニット抗体、2 次抗体: ヤギ抗マウス Alexa488 標識、Alexa594 標識 IgG 抗体、ヤギ抗ウサギ Alexa594 標識 IgG 抗体、ロバ抗ウサギ Alexa488 標識 IgG 抗体 (Molecular Probes, 1:500 希釈) ,

ヤギ抗マウスビオチン化 IgG 抗体、ヤギ抗ウサギビオチン化 IgG 抗体 (Vector, 1:1000 希釈)。ビオチン化 2 次抗体で処理した後、切片は ABC キット (Vector) を室温 2 時間で処理し、PBS で洗浄後、50mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄した。

次に、切片を 0.05% 3,3' - diaminobenzidine (DAB, Wako) (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.01 %  $H_2O_2$ ) で 5 分間反応させた。

## パルブアルブミン陽性細胞の解析と蛍光デンシオメトリー

海馬内のパルブアルブミン陽性細胞を図 5A に示す境界線で分けした領域ごとに数え、各切片で各領域の面積を画像解析ソフト ImageJ を用いて測定し、単位面積当たりの数を算出した。蛍光デンシオメトリーは、CA1/CA2, CA3, DG 各領域の細胞層で単位面積辺り (200×200 ピクセル) の蛍光強度を ImageJ を用いて測定し、野生型マウスとニューロプシン欠損マウスで比較した。グラフは野生型マウスを基準としたときの相対強度で示している。

## ルシファーイエローインジェクション

GAD67-GFP ノックインマウスの腹腔内に 10%ウレタン (1.5mg/kg) を投与し、麻酔する。上行大動脈を介して、95%  $O_2$ /5%  $CO_2$  を通気させた氷冷人口脳脊髄液 (ACSF ; NaCl, 125; KCl, 2.6;  $H_2PO_4$ , 1.24;  $NaHCO_3$ , 26; グルコース, 10;  $MgSO_4$ , 1.3;  $CaCl_2$ , 2.4 mM) で脱血を行い、脳を取り出し、素早く氷冷 ACSF (95%  $O_2$ /5%  $CO_2$ ) に入れ 5 分間放置した。脳はビブラトーム (Leica City, Germany) を用いて、冠状段のスライス (300 $\mu$ m) を作製した。スライスは室温の ACSF (95%  $O_2$ /5%  $CO_2$ ) に入れ 30 分間放置した。その後、4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で 30 分間固定した。蛍光顕微鏡を用いて GFP でラベルされた抑制性神経細胞に 10%ルシファーイエロー/PBS 溶液を 15 分間で注入した (Patch clamp amplifier MODEL 2400(A-M systems, Inc.))。注入が成功したスライスは氷冷 4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で後固定した。スライスは、さらに、パルブアルブミン抗体とルシファーイエロー抗体を用いて免疫染色し、ヘキストを用いて核を染色した。

## 環境条件設定

購入した7週齢の雄マウスを行動実験開始まで個別で飼育した。2週間環境に順応させた後、マウスを豊かな環境条件下に移した。ケージの中に配置する物体は実験期間中同じ場所に固定した。豊かな環境刺激として、大きいケージ(28 cm×33cm×16 cm)の中に、プラスチック製ランニングホイール(三晃商会)を自由に自発運動できるように配置した(RUN)か、ランニングホイールとプラスチック製不透明なチューブを配置しより豊かな環境にした(EE)ものを用意した。コントロールとして、何も物体を配置しない同じサイズのケージ(CONT)と回転しないように固定したホイールを配置した同じサイズのケージ(LOCK)を用意した。マウスのランニングホイールでの走行距離は、ホイールが回転した数とホイールの円周(直径11cm)から計算した。回転数は、10時にチェックを行い、マウスが1日10000回(距離3.5 km)より少ない場合は実験から除外した。

## 社会的な環境刺激

同腹のマウス3匹をホームケージに入れて1週間飼育した。そこに社会的弱者になるように、体のサイズが小さく、週齢が若いこれまで接触したことがないマウスをストレンジャーマウスとして、3匹のマウスがいるケージに入れて、3日後に、社会的な環境刺激を受けた3匹をサンプルとして用いた。

## RNA抽出とリアルタイムRT-PCR

マウスから海馬を取り出し、総RNAの抽出にはTRIzol試薬(Invitrogen)を用いた。相対mRNA発現量は、LightCycler480(Roche Diagnostics)によって測定した。Cp値は2次微分最大値法を用いて決定した。GAPDHを内在性コントロールとして用いた。ニューロプシン遺伝子のプライマー配列は、フォワードが5'-CCCACTGCAAAAAACAGAAG-3'、リバーズが5'-TGTCAGCTCCATTGCTGCT-3'、GAPDHのプライマー配列は、フォワードが5'-CGGGAAGCCCATCACCATC-3'、リバーズが5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTT-3'。プライマーの濃度は0.2 $\mu$ Mで両遺伝子に使用した。サンプルは、95°Cで10分間事前にヒートした。PCRの条件は、95°C10秒、アニーリング温度60°C10秒、伸長反応72°C14秒で行った。サンプルの濃度は、3回測定したものを平均して計算した。

## 統計解析

統計的有意差はスチューデント t 検定、one way ANOVA ポストホック Dunnet で行った。すべてのデータは平均±SEM で示している。マウスの匹数は n で示しており、差は  $p<0.05$  ものを有意であるとした。

# 結果

## 第1章 パルブアルブミン陽性細胞の組織学的解析

### ErbB4 発現細胞は主にパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞

当研究室では近年、ニューロプシンが proNRG-1 の HB ドメインの切断を介して、NRG1-ErbB4 シグナルの制御に関わることを見出した。ErbB4 受容体は、抑制性神経細胞に特異的に発現が認められることから、(Fazzari et al., 2010; Vullhorst et al., 2009) ニューロプシンが GABA 伝達を介した神経活動の制御を行うと考えられる(図 2) (Tamura et al., 2012)。まず初めに、ニューロプシンシグナルを受容する ErbB4 陽性神経細胞が抑制性神経細胞に限局されるかを、GABA 合成酵素 (GAD67) –GFP トランスジェニックマウスを用いて確かめた。GAD67 は抑制性神経細胞のマーカーとして知られており、GAD67 のプロモーター領域下に EGFP を挿入したノックインマウスは、8 割の細胞が GAD67 抗体陽性かつ GFP 発現細胞であることが分かっている(Tamamaki et al., 2003)。GAD67-GFP マウスを ErbB4 で染色したところ、確かに ErbB4 陽性神経細胞、GFP 陽性細胞と一致しており、これまでの報告通り抑制性神経細胞に発現することが確認できた(図 3) (Bean et al., 2014; Vullhorst et al., 2009)。海馬体の各領域で ErbB4 陽性神経細胞が観察された。一部 GAD67 陽性で ErbB4 非陽性細胞が観察されたことから、ある種の抑制性神経細胞に ErbB4 が発現すると考えられる。これまでに、ErbB4 受容体を発現する抑制性神経細胞にはいくつかの種類が報告されている(Neddens and Buonanno, 2010; Yau et al., 2003)。なかでも、パルブアルブミン陽性が主な細胞であり(Bean et al., 2014; Fazzari et al., 2010; Yau et al., 2003)、他に CCK 陽性細胞や nNOS 陽性細胞、SOM 陽性細胞などが報告されている(Neddens and Buonanno, 2010)。

ニューロプシンを介した NRG-1-ErbB4 シグナルが ErbB4 陽性かつパルブアルブミン陽性細胞を活性化することが報告されていることから(Tamura et al., 2012)、ニューロプシンシグナルを受容する抑制性神経細胞は、主にパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞であると考えられる。

そこで次に、ニューロプシンシグナルの影響を受けると考えられるパルブアルブミン陽性細胞に着目し、海馬体でのパルブアルブミン陽性細胞の分布を観察した。

## ニューロプシン欠損マウスにおける歯状回の顆粒細胞層および CA3 領域の錐体細胞層でのパルブアルブミン陽性細胞数の変化

海馬体の各領域での、ErbB4 陽性かつパルブアルブミン陽性細胞の分布を野生型マウスとニューロプシン遺伝子欠損マウスで比較した (図 4)。当研究室ではこれまでにニューロプシン欠損マウスを作製した際、表現系解析のために一般的な病理組織学的解析を行った (Hirata et al., 2001)。その結果、CA1 領域での GAD67 陽性抑制性神経細胞数に差認められなかった。一方、パルブアルブミン陽性抑制性神経細胞の分布を観察したところ、ニューロプシン遺伝子欠損マウスの海馬 CA1 領域の上昇層においてパルブアルブミン陽性細胞数の上昇が認められたが、海馬 CA1 領域の錐体細胞層にあるパルブアルブミン陽性細胞数に大きな変化は観察されなかった。本研究では、海馬全体でのパルブアルブミン陽性細胞の分布と領域の各層ごとの分布を野生型とニューロプシン欠損マウスを用いて組織学的に比較した。図 5A は、抗パルブアルブミン抗体と DAB 法を用いて可視化したパルブアルブミン陽性反応を示す。歯状回は青の破線で、CA1/CA2 領域は緑の破線で CA3 領域は赤の破線で示し、各層の略称を図に示した (図 5A)。

前回の研究結果と同様に、各領域においてパルブアルブミン陽性細胞の細胞の総数に有意な差は見られなかった (図 5C)。また、各領域に分けて観察を行ったところ、歯状回の顆粒細胞層 (GC) でパルブアルブミン陽性細胞数には有意な差が見られた。このことから、ニューロプシンシグナルが一部のパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞の各領域の各層への局在に影響を及ぼすと考えられるが、パルブアルブミン陽性神経細胞の総数に変化は見られないことから、ニューロプシンシグナルはパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞の各領域への細胞移動には影響を及ぼさないと考えられる。次に、パルブアルブミン陽性神経細胞の神経終末を観察することとした。

### 興奮性錐体細胞に投射するパルブアルブミン陽性終末

パルブアルブミン陽性細胞の分布に大きな違いが認められなかったため、次にパルブアルブミン陽性終末を観察することにした。パルブアルブミン陽性バスケット細胞は、興奮性神経細胞の細胞体に主に投射しており、1つの抑制性神経細胞で多数の興奮性神経細胞を神経支配していることが知られている。そこで、ニューロプシン遺伝子欠損マウスとの比較検討を行う前に、興奮性神経細胞を囲むパルブアルブミン陽性軸索投射を観察することにした。GAD67-GFP トランスジェニックマウスの海馬スライスを作製し、錐体細胞付近に GFP を発現している抑制性神経細胞に蛍光色素 LY 注入し、その後、蛍光染色を行いパルブアルブミン陽性神経細胞の軸索投射を観察した。その結果、パルブアルブミン陽性細胞の軸索は、細胞層内で1つの細胞体に1つか2つのコンタクトサイトと予想されるブートン状の構造を形成していることが観察さ

れた (図 6)。さらに、複数の興奮性細胞にコンタクトしていることも観察された。

### **ニューロプシン欠損マウスにおける興奮性錐体細胞を取り囲む パルブアルブミン陽性終末の変化**

パルブアルブミン陽性細胞の分布に大きな変化が認められなかったため、次に興奮性錐体細胞を取り囲むパルブアルブミン陽性終末に着目し観察を行った。野生型のマウスでは、密なパルブアルブミン陽性繊維網が歯状回の顆粒細胞層や CA1-3 領域の錐体細胞層で観察された (図 7A, C, E)。一方、ニューロプシン欠損マウスでは、パルブアルブミン陽性繊維の蛍光強度の減少が、特に歯状回の顆粒細胞層と CA3 領域の錐体細胞層で観察された (図 7B, D, F)。ニューロプシン欠損マウスにおける歯状回の顆粒細胞層と CA3 領域の錐体細胞層でのパルブアルブミン陽性反応の蛍光強度の減少は、野生型と比べると有意な差であった (図 7A, B, E, F と 9A, C)。一方、CA1 領域では蛍光強度に有意な差は認められなかった (図 7C, D と 9B)。

さらに、詳細にパルブアルブミン陽性終末を観察するために、微分干渉フィルターを用い光学顕微鏡によって DAB 法で可視化したパルブアルブミン陽性細胞を観察した。その結果、野生型のマウスでは、顆粒細胞層と錐体細胞層の細胞体を取り巻いている免疫反応性が高いパルブアルブミン陽性軸索の太い線維やドット状の終末を観察した (図 7G, I, K, 矢印)。しかしながら、ニューロプシン欠損マウスにおいては、免疫反応性は残しているものの、太いパルブアルブミン陽性線維は見られず、ドット状の免疫陽性反応が顆粒細胞および錐体細胞の周りで観察された (図 7H, J, L 矢頭)。

### **野生型とニューロプシン欠損マウスにおける海馬での 抑制性プレシナプスマーカー小胞型 GABA トランスポーターの分布**

ニューロプシン欠損マウスでは、興奮性神経細胞を取り囲むパルブアルブミン陽性終末が減少していた。そこで、軸索の末端にある抑制性プレシナプスが変化していないか検討した。プレシナプスマーカーとして用いられる小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) は抑制性シナプス小胞への GABA の集積を調節しており、抑制性プレシナプス軸索に局在している (Chaudhry et al., 1998)。そこで、VGAT をプレシナプスの指標として、抗 VGAT 抗体を用いて免疫染色して野生型とニューロプシン欠損マウスを比較した。

予想に反して、歯状回の顆粒細胞層、CA1 領域と CA3 領域の錐体細胞層で明らかな違いは観察されなかった (図 8A-F)。さらに、拡大図からドット状の免疫反応構造 (図 8B, D, F 差し込み図) は、ニューロプシン欠損マウスのパルブアルブミン陽性反応構造 (図 7H, J, L) と類似していることが見られた。次に、蛍光像を用いて定量的解

析を ImageJ で行った。顆粒細胞層と錐体細胞層の各領域内で面積 200×200 ピクセル内の蛍光強度を測定し、野生型とニューロプシン欠損マウスで比較したところ、どの領域においても同程度の相対強度を示した (図 9D-F)。

そこで、さらに詳細にパルブアルブミン陽性終末と VGAT を観察するために、2 重染色を行った (図 10)。ニューロプシン欠損マウスでは、パルブアルブミン陽性終末の免疫陽性反応が低下していたが、VGAT の免疫陽性反応が見られた (図 10)。

以上のことから、ニューロプシン欠損マウスにおいても、プレシナプス末端におけるパルブアルブミン量が減少しているが、抑制性プレシナプスは正常に形成されていることが示唆された。

### ニューロプシン欠損マウスにおける GABA<sub>A</sub> 受容体

続いてポストシナプスについても同様の解析を行うため、抑制性シナプスのポストシナプスのマーカーである GABA<sub>A</sub> 受容体を用いて検討することにした。パルブアルブミン陽性終末を受容する GABA<sub>A</sub> 受容体は  $\alpha 1$  サブユニットを含む受容体であることが報告されていたために、 $\alpha 1$  サブユニットに対する抗体を用いてパルブアルブミンと 2 重染色を行った (Klausberger et al., 2002)。野生型マウスでは、パルブアルブミン陽性線維に沿って、GABA<sub>A</sub> 受容体がドット状に均一分布していた (図 11)。ニューロプシン欠損マウスにおいても、パルブアルブミン陽性反応が強いところでは GABA<sub>A</sub> 受容体の陽性反応が観察された (図 11)。しかしながら、野生型と比べると、GABA<sub>A</sub> 受容体の陽性反応が細胞質と考えられる付近に拡散していた。また CA3 領域では、パルブアルブミン陽性反応が弱いところでは、GABA<sub>A</sub> 受容体のドット状の反応が低下していた。以上のことから、ニューロプシン欠損マウスにおいて、パルブアルブミン陽性終末を受容する GABA<sub>A</sub> 受容体が拡散することで、GABA 伝達効率が低下している可能性が示唆された。

## 第 2 章 環境刺激による野生型とニューロプシン欠損マウスにおける

### パルブアルブミン陽性終末の変化

#### 環境刺激による海馬ニューロプシン mRNA の発現の上昇

これまで、ニューロプシンが神経活動依存的に活性化され、神経可塑性に関与していることが知られている。そこで、刺激依存的なニューロプシンの発現上昇と抑制性神経細胞における可塑的な変化を観察することとした。まず、はじめに、ニューロプシンの発現誘導を促す環境刺激として下記の環境を用意した (図 12)。

- A 豊かな環境：ランニングホイールとプラスチックトンネル

B ラン環境 : ランニングホイール

C ロック環境 : ホイールを固定したランニングホイールとプラスチックトンネル

D コントロール環境 : 何も物体をいれていない

そこで、豊かな環境やラン環境で育てたマウスを用いて、海馬ニューロプシン mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR で mRNA 量を解析した。豊かな環境とラン環境で野生型のマウスを飼育すると、飼育日数ごとにランニングホイールの走行距離が増え、1 週間で平均 9 km/day まで日々増加する (図 13A)。走行距離は回転数×ランニングホイールの円周から算出した。コントロール環境で飼育したマウスと比べると、ニューロプシン mRNA の発現は 1 週間と 2 週間、豊かな環境で飼育した野生型のマウスで増加し、3 週間後にはコントロールレベルまで戻った (図 13B)。さらに、豊かな環境とラン環境で育てたマウスで海馬ニューロプシン mRNA の発現量を比較した。どちらの条件においても、コントロールに対して、ニューロプシン mRNA は 1 週間後に有意な差が見られ、ニューロプシン mRNA はアップレギュレーションされた (図 13C)。対して、ランニングホイールが回転できないように固定したホイールを配置したロック環境 (LOCK) で育てた野生型のマウスでは、ニューロプシン mRNA の発現量はコントロール (CONT) と同じレベルであった (図 13C)。

以上のことから、活発な自発運動はニューロプシン mRNA の発現を短期的にアップレギュレーションすることが明らかとなった。

### 自発運動による海馬パルブアルブミン陽性終末の変化

環境刺激によって、自発運動による海馬ニューロプシン mRNA の発現がアップレギュレーションされることから、ニューロプシンの発現上昇を促す環境刺激を用いて、野生型とニューロプシン欠損マウスを用いて、パルブアルブミン陽性反応の変化を調べることにした。そこで、ラン環境で 2 週間飼育した後のマウスを用いて (図 12)、パルブアルブミン陽性反応の発現量を観察した。

自発運動したマウスでは、歯状回の顆粒細胞層と CA3 領域の錐体細胞層でパルブアルブミン陽性線維の発現の増加が観察された (図 14、15)。一方、CA1 領域の錐体細胞層ではコントロールと比較して差は見られなかった (図 14、15)。一方、予想外なことに、ニューロプシン欠損マウスにおいても、歯状回の顆粒細胞層と CA3 領域の錐体細胞層でパルブアルブミン陽性線維の発現の増加が観察された。そこで、各領域の細胞層における蛍光強度を ImageJ によって定量的に測定したところ、野生型とニューロプシン欠損マウスともに歯状回の顆粒細胞層と CA3 領域の錐体細胞層でパルブアルブミン陽性反応の発現が有意に上昇していることが示された (図 15)。

次に、各領域におけるパルブアルブミン陽性反応の蛍光強度をラン環境で飼育した野生型とニューロプシン欠損マウスを用いて比較してみた。すると、野生型マウスに

比べて、ニューロプシン欠損マウスにおけるパルブアルブミン陽性蛍光強度の方が、20%以上強いことが分かった (図 16)。また、CA1 領域においてもパルブアルブミンの蛍光強度が上昇していることが示された。

パルブアルブミン陽性反応の上昇が観察されたために、パルブアルブミン陽性終末で変化が起きている可能性が考えられる。プレシナプスが影響を受けていないかを調べるためにプレシナプスのマーカーである VGAT の免疫反応像を観察した (図 17)。結果として、野生型とニューロプシン欠損マウスを比較すると、大きな変化は観察されなかった。そこで、各領域におけるパルブアルブミン陽性反応の蛍光強度を比較すると、パルブアルブミンの発現量が上昇しても、野生型とニューロプシン欠損マウスにおいて、VGAT の蛍光強度に有意な差が認められなかった (図 16)。以上のことから、自発運動によって野生型のマウスは、ニューロプシン mRNA 量が増加し、パルブアルブミン陽性終末の蛍光強度が増加する。ニューロプシン欠損マウスでは、ニューロプシンシグナルは伝達されないが、パルブアルブミン終末の蛍光強度が増加することから、ニューロプシンシグナルとは別な経路が平行に存在すると考えられる。また、終末でのパルブアルブミンの増加が観察されたが、VGAT に大きな変化みられないことから、パルブアルブミンの発現上昇がプレシナプスへの変化に与える影響は低いと考えられる (図 17)。

### 社会的な環境変化にパルブアルブミン陽性終末の変化

刺激によるパルブアルブミン陽性反応の変化がニューロプシンの有無によって異なるのかを調べるために、他の環境刺激を与えることにした。そこで、ニューロプシン欠損マウスの行動解析から、ニューロプシン欠損マウスはソーシャルインタラクション時に、1 回あたりの接触時間と接触総時間が減少することが報告されている (堀井、2008)。そこで、ストレンジャーマウスを飼育ケージに入れることで、社会的な環境変化の刺激を与えてみた。野生型とニューロプシン欠損マウスはそれぞれ同腹 3 匹のマウスを飼育し、そのケージに社会的に弱いストレンジャーマウスを加え、3 日間一緒に飼育した。社会的な環境変化によって、野生型とニューロプシン欠損マウスを比較すると、ニューロプシン欠損マウスにおいて、パルブアルブミン陽性線維の増加が CA1 と CA3 の錐体細胞層で観察された (図 18)。ImageJ を用いた蛍光強度解析によって、CA1 領域と CA3 領域で有意な差が観察された (図 18)。

## 第 3 章 パルブアルブミン陽性細胞による興奮性神経細胞の制御

### パルブアルブミン陽性細胞によるニューロプシン発現興奮性細胞の調節

ニューロプシンはパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞を介して興奮性神経細胞を制御すると考えられるが、しかしながら免疫組織化学的にニューロプシンを分泌す

る細胞の同定には未だにいたっていない。

まずはじめに分泌細胞について、続いて、ニューロプシン分泌細胞とパルブアルブミン陽性細胞の組織学的な解析を行うことにした。本解析には、BAC (bacterial artificial chromosome) トランスジェニックマウスを用いた。このマウスは、BAC (bacterial artificial chromosome) ベクターシステムにより、150 キロベースの巨大なゲノム DNA を挿入したトランスジェニックマウスで(Gong et al., 2003)、KLK8(kallikrein8/ニューロプシン)-EGFP(enhanced GFP)マウスを使用した。

実際に、このトランスジェニックマウスでは、海馬、扁桃核、前頭前野、嗅内皮質などで EGFP 発現細胞が観察された (data not shown)。続いて、BAC トランスジェニックマウスを用いて EGFP 発現細胞とパルブアルブミン陽性細胞の分布を海馬と歯状回で調べた (図 19)。チオニン (Thionine) 染色は、神経細胞のニッスル小体を染色する化学染色法であり、領域を特定するために用いた。海馬 CA1 領域と CA3 領域では、錐体細胞層に、BAC - EGFP 発現細胞がゴルジ染色様に観察された (図 19A,B)。歯状回では、歯状回門で BAC - EGFP 発現細胞が観察された (図 19C)。海馬における BAC - EGFP 発現細胞の局在は、*in situ* hybridization の結果と一致することから (Chen et al., 1995)、ニューロプシン発現細胞を示すと考えられる。

海馬 CA1 領域の BAC - EGFP 発現細胞は、樹状突起が上昇層 (SO)、放線層 (SR)、網状分子層にわたって観察された。海馬 CA3 領域の BAC - EGFP 発現細胞は、樹状突起が上昇層、透明層、放線層で観察された(図 19B)。歯状回 (DG) では、顆粒細胞で挟まれた領域に BAC - EGFP 細胞の樹状突起が広がっていた。

一方、パルブアルブミン陽性反応は、CA1 錐体細胞層付近が強く陽性反応が観察された。パルブアルブミン陽性樹状突起は上昇層から網状分子層まで観察されたことから、錐体細胞とパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞では受容野が異なることが示唆された (図 19A)。

パルブアルブミン陽性反応は、CA3 錐体細胞層付近で強い反応が観察された(図 19B)。パルブアルブミン陽性細胞は、上昇層、錐体細胞層、透明層、放線層で観察された。パルブアルブミン陽性細胞は、顆粒細胞層と歯状回門で観察された。それぞれ、顆粒細胞層に局在するパルブアルブミン陽性細胞の樹状突起が分子層と歯状回門に、また、顆粒細胞層に強い陽性反応が観察され、歯状回門に局在するパルブアルブミン陽性細胞の樹状突起は歯状回門内に見られた。

錐体細胞層に、パルブアルブミン陽性反応が観察され、錐体細胞がパルブアルブミン陽性繊維に取り囲まれていることが分かる。さらに、BAC - EGFP 発現細胞がパルブアルブミン陽性終末に取り囲まれていることが、CA1 領域と CA3 領域で確認された (図 20、差し込み図)。以上のことから、パルブアルブミン陽性細胞が組織学的に、BAC-EGFP 発現細胞を制御し得ることが示唆された。

## 考察

近年ニューロプシンによる NRG1 の修飾が、NRG-1-ErbB4 シグナルを介した抑制性神経細胞の機能維持に重要であることが見出された。本研究では、ニューロプシンシグナルを受容するパルブアルブミン陽性細胞に着目し、ニューロプシンシグナルが抑制性神経細胞に与える影響を、①海馬の各領域におけるパルブアルブミン陽性細胞の分布と②抑制性神経細胞の可塑的な変化をパルブアルブミン陽性終末の変化によって検討した。その結果、ニューロプシン欠損マウスで歯状回の一部の層においてパルブアルブミン陽性細胞数に差が認められたが、海馬全体での総数に差は認められなかった。

また抑制性神経細胞の可塑的な変化を比較検討したところ、通常飼育時には、ニューロプシン欠損マウスで、パルブアルブミン陽性終末の発現量が野生型マウスよりも低下しており一方、環境刺激を与えた条件下では、ニューロプシン欠損マウスの方が、野生型よりパルブアルブミン陽性終末の発現量が上昇したことから、ニューロプシン欠損マウスでは抑制性神経細胞における可塑的な変化が野生型マウスと異なる可能性を見出した。

### 第 1 章 ニューロプシンシグナルにおけるパルブアルブミン陽性細胞

野生型マウスとニューロプシン欠損マウスでパルブアルブミン陽性細胞の分布に一部の領域で変化が見られたが、パルブアルブミン総数に変化は見られなかった。過去の研究においても、GAD67 陽性細胞数には変化が見られなかったこと (Hirata et al., 2001) からニューロプシンシグナルは、各領域におけるパルブアルブミン陽性細胞の分布に大きな影響を与えないと考えられる。しかしながら、各層では一部変化が見られる領域があったことから、各領域内での分布に影響を与えている可能性がある。前回の研究では CA1 上昇層でパルブアルブミン陽性細胞数の変化を報告しているが、今回は CA1 領域の一部の領域を測定し、今回は海馬スライス全体の CA1/CA2 を含む領域で測定した違いのためだと考えている。

ErbB4 を欠損した場合に、ニューロプシン欠損マウスより顕著なパルブアルブミン陽性細胞数の変化が見られることから、パルブアルブミン陽性細胞に発現する ErbB4 がパルブアルブミン陽性細胞の分布に重要であると考えられる。また、ErbB4 は細胞移動に必要と報告があるため、ErbB4 欠損マウスの場合に、各領域の各層においてパルブアルブミン陽性細胞数の変化が見られるのは細胞移動による影響もあると考えられる (Yau et al., 2003)。今回の結果では、ニューロプシン欠損マウスにおいて、海馬体内でパルブアルブミン陽性細胞の総数に大きな変化が見られなかったことから、パルブアルブミン陽性細胞は発達段階では正常に細胞移動していると考えられる。

ErbB4 受容体は、ErbB2, ErbB3 受容体とヘテロ 2 量体を形成するか、ホモ 2 量体を形成すると報告されており、ErbB4 受容体は、NRG-1 以外にも、NRG-2, NRG-3 などの他の分子が結合して活性化することが報告されていることから、ニューロプシン欠損マウスでパルブアルブミン陽性細胞の分布に大きな影響が認められない理由は他のシグナルによる補償作用もあることが考えられる。

GAD67-GFP トランスジェニックマウスを用いた LY インジェクション実験結果より、パルブアルブミン陽性細胞の軸索は興奮性錐体細胞の間に投射しており、1つの細胞に複数個のコンタクトサイトと見られるブートンが観察されたが、1つのパルブアルブミン陽性細胞の軸索からは、興奮性錐体細胞を軸索が取り巻いている様子は観察されなかった。これまでの報告から、パルブアルブミン陽性細胞が1つの錐体細胞に6個程度のコンタクトサイトを持ち、25個のバスケット細胞が1つの錐体細胞を制御していると予想されている (Buhl et al., 1994; Tamás et al., 1997)。以上のことから、興奮性錐体細胞を取り囲む軸索末端は、複数のパルブアルブミン陽性細胞から投射されたコンタクトサイトと軸索線維であると考えられる。

パルブアルブミン陽性細胞には、興奮性神経細胞の細胞体に投射しているバスケット細胞、興奮性神経細胞の軸索起始部に投射している axo-axonic 細胞、細胞体が上昇層 (SO) に局在し、網状分子層 (SLM) に投射している O-LM 細胞と錐体細胞の基底樹状突起と先端樹状突起に投射している bistratified 細胞があると報告されている (Freund and Buzsáki, 1998; Klausberger and Somogyi, 2008)。

田村らの研究から、ニューロプシンシグナルは、ErbB4 発現パルブアルブミン陽性細胞を介して、興奮性神経細胞を制御していることから、今回の実験では、興奮性神経細胞の細胞体に投射するパルブアルブミン陽性バスケット細胞に着目した。また、パルブアルブミン陽性細胞の軸索線維は CA1、CA3 領域の錐体細胞層や DG の顆粒細胞層で強く観察されることから、ErbB4 発現パルブアルブミン陽性細胞は興奮性神経細胞を制御していると考えられる (図 4)。

ニューロプシン欠損マウスで細胞体周辺のパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度が減少していたことから、主に細胞体に投射しているバスケット細胞が影響を受けていることが観察された。

## 第 2 章 パルブアルブミン陽性抑制性神経細胞

### 環境刺激によるニューロプシン mRNA の発現上昇

ニューロプシン mRNA の経時的変化を測定したところ、豊かな環境で 1、2 週間飼育している間にはニューロプシン mRNA は上昇しているが、3 週間後にはコントロールレベルに戻ったことから、新規環境での刺激や運動によって、ニューロプシンは発現誘導されるが、外部環境からの刺激にマウスがなれるとニューロプシンはそれ以上発現上昇続けていないことになる。つまり、ニューロプシンは新規環境に適応して

いると考えられる期間に発現上昇が見られ、その環境に適応すると発現量がコントロールレベルに戻ると考えられ、新規環境に適応するときに重要な働きをしている可能性が考えられる。

ランニングホイールを回転しないように固定したロック環境で1週間、マウスを飼育したところ、ニューロプシン mRNA の上昇が観察されなかったことから、自発運動がニューロプシン mRNA の発現を誘導する1つの要因であると考えられる。豊かな環境やラン環境でニューロプシン mRNA が増加したこと、および、豊かな環境で2週間飼育するとニューロプシンのタンパク量も増加すること(小暮、2009)から、ニューロプシン mRNA が増加している期間にニューロプシンは機能的に働いていると考えられ、自発運動によって、ニューロプシンシグナルが増加していると考えられる。

### 野生型とニューロプシン欠損マウスにおけるパルブアルブミン陽性終末の比較観察について

通常飼育した場合、ニューロプシン欠損マウスで、CA3の錐体細胞層とDGの顆粒細胞層でパルブアルブミン陽性終末の顕著な減少が観察された。一方、環境刺激を与えると、ニューロプシン欠損マウスで野生型マウスよりもパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度の増加が観察された。環境刺激を与えると、ニューロプシン欠損マウスの方でパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度の増加が観察されたことから、ニューロプシン非依存的シグナルによるパルブアルブミン陽性終末の変化が起きると考えられる。

通常飼育時にも、野生型とニューロプシン欠損マウスともにニューロプシン非依存的シグナル経路からのパルブアルブミン陽性終末のコンテンツの量を調節する可能性は考えられるが、その経路からの調節があるとする野生型とニューロプシン欠損マウスともにパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度は同程度になるはずである。しかしながら、実際は通常飼育時に野生型マウスでパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度が高いことから、ニューロプシンシグナルはパルブアルブミン陽性終末が正常に機能するためにパルブアルブミン陽性終末のパルブアルブミン発現量を一定にするために重要な役割をしていると考えられる。また、今回観察されたニューロプシン非依存的シグナルによるパルブアルブミン陽性終末の調節は環境刺激に応じて可塑的に変化が起きるときに働いていると考えられる。

以上のことから、通常飼育時に見られるような恒常的にパルブアルブミン陽性終末のパルブアルブミン発現量を調節する機構と環境刺激に応じて可塑的な変化が起きるときのパルブアルブミン陽性終末のパルブアルブミン発現量の調節する機構は異なる可能性が示唆された。

海馬バスケット細胞のパルブアルブミンの発現量はパルブアルブミン陽性細胞の細胞体と終末で相関し、パルブアルブミンの発現量が低い細胞は記憶形成や構造可塑性(塑性状態)を起こしやすい状態で、一方、パルブアルブミンの発現量が高い細胞

は低可塑性状態（記憶固定後）との報告から (Donato et al. 2013)、パルブアルブミン陽性終末の発現量の変化はパルブアルブミン陽性細胞の可塑性状態を表していると考えられる。通常飼育時には、ニューロプシン欠損マウスで観察されたパルブアルブミン陽性終末は蛍光強度が低いことから、可塑性の高いパルブアルブミン陽性細胞であると考えられる。ニューロプシン欠損マウスの興奮性錐体細胞のスパインでは、未成熟なシナプスが多く (Nakamura et al., 2006)、可塑的な変化を誘導することができれば、成熟なシナプスが形成されると考えられる。実際に、ニューロプシン欠損マウスに、リコンビナントニューロプシンやEGF様ドメイン（ニューロプシンによるmNRG-1の切断断片）を投与することによって、E-LTPの回復が見られることから、可塑的な変化の潜在的な能力は保持していると考えられる。

パルブアルブミン陽性細胞の樹状突起に入力する興奮性シナプスの割合が増加するとパルブアルブミンの発現量が高い細胞にシフトすると報告されている (Donato et al., 2013)。このことは、パルブアルブミン陽性細胞の樹状突起に対して興奮性入力が増加するとパルブアルブミンの発現量がシフトすると考えることができる。ニューロプシンは興奮性神経細胞のプレシナプスから放出され、細胞外マトリックスにトラップされたmNRG-1を切断し、パルブアルブミン陽性細胞の樹状突起に発現するErbB4受容体を介してシグナルを伝えると考えられている。もし、パルブアルブミン陽性細胞の樹状突起への興奮性シナプスが増加し、ニューロプシンが放出される場所が増え、興奮性入力が増加すると、パルブアルブミン陽性終末の発現量が増加すると考えることができる。さらに、歯状回のパルブアルブミン陽性細胞の軸索は、遺伝子工学的にパルブアルブミン陽性細胞の樹状突起への興奮性入力を取り除くと、パルブアルブミン陽性終末が減少することが報告され、神経活動依存的な興奮性入力によってパルブアルブミン陽性軸索が調節を受けることが示された (Pieraut et al., 2014)。以上のことから、パルブアルブミン陽性終末の調節は神経活動依存的に起こり、パルブアルブミン陽性細胞が受容する興奮性入力が重要であることが示された。このことから、ニューロプシンシグナルは神経活動依存的なパルブアルブミン陽性終末の可塑的な調節に少なくとも一部関与していると考えられる。

近年、転写因子NPAS4は、通常飼育時には発現が観察されないが、豊かな環境で飼育したマウスや神経活動を活発にするためのカイニン酸を投与したマウスでは、神経活動が上昇し、NPAS4の発現上昇も観察され、興奮性神経細胞の細胞体に入力する抑制性シナプスが増加することが報告された (Bloodgood et al., 2013)。さらに、神経活動依存的に制御される転写因子NPAS4の標的遺伝子として神経栄養因子BDNFが少なくとも興奮性神経細胞の細胞体へ入力される抑制性シナプスを増加させる経路の一部であることが示された (Bloodgood et al., 2013)。以上のことから、少なくとも神経活動依存的な興奮性神経細胞の細胞体への抑制性シナプス終末の増加にはBDNFが関与していると考えられる (Marty et al., 2000)。

一方、通常飼育時にはNPAS4の発現が見られないことから、通常飼育時に行われる細胞体へ入力される恒常的な抑制性シナプスの調節と神経活動依存的に増加する興

奮性神経細胞の細胞体への抑制性シナプスの調節では、関与する機構が異なると考えられる。また、BDNF を直接カニューレを用いてマウスに投与すると、パルブアルブミンの発現量が高い状態にシフトすることや(Donato et al., 2013)、パルブアルブミン陽性細胞に BDNF 受容体である TrkB が発現することが報告されており(Nieto-Gonzalez and Jensen, 2013; Zheng et al., 2011)、BDNF 経路がパルブアルブミンの発現量を増加させ、結果としてパルブアルブミン陽性終末の可塑的变化にも関与していると考えられる。以上のことから、ニューロプシン欠損マウスにおいても、神経活動依存的に NPAS4-BDNF 経路を介してパルブアルブミン陽性終末の調節が行われている可能性が考えられる。今回の実験系で BDNF が本当に関与しているかどうかを今後確認する必要がある。

野生型とニューロプシン欠損マウスの腹腔内にカイニン酸を投与すると、どちらのマウスともてんかん発作を起こす。野生型のマウスでは投与して 4 時間後から NRG-1 とリン酸化した ErbB4 受容体の発現量が増加しはじめ、リン酸化した ErbB4 受容体は NRG-1-ErbB4 シグナルが伝達している指標となり、そのときに、活性型ニューロプシンの量も増加することから、ニューロプシンシグナルが NRG-1-ErbB4 を介して伝わっていることが分かる。このとき、ニューロプシン欠損マウスでは ErbB4 受容体のリン酸化が野生型マウスと比較して減少しており、過興奮によって NRG-1-ErbB4 シグナルは活性化していないことが分かる(未発表データ)。しかしながら、カイニン酸投与後のパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度を野生型とニューロプシン欠損マウスで比較すると、ニューロプシン欠損マウスの方がパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度が強いことが分かった(未発表データ)。以上のことからニューロプシンシグナルが伝達されていないことが確認できた場合でも、神経活動依存的にニューロプシン非依存的シグナルがパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度を上昇させることが示唆された。

NRG-1-ErbB4 シグナルが、パルブアルブミン陽性細胞を介して、神経活動や神経可塑性を制御することが報告されている(Chen et al., 2010; Li et al., 2007; Tan et al., 2012; Wen et al., 2010; Yin et al., 2013)。このような可塑的な変化にパルブアルブミンの発現量や陽性終末の変化が関係していると考えられる。

NRG-1 ヘテロマウスの解析から、NRG-1 の発現量が減少するとパルブアルブミンタンパク量の減少することや、薬剤投与によって、NRG-1 mRNA が増加し、パルブアルブミン発現量も増加することやパルブアルブミンの発現量が減少する薬剤を投与後、NRG-1 を加えると、パルブアルブミンの発現量がコントロールレベルまで回復することが報告されている(Pei et al., 2014; Wang et al., 2014)。このように、NRG-1 の発現変動とパルブアルブミンの発現量に相関が見られることから、ニューロプシンシグナルによるパルブアルブミン陽性細胞の発現量の調節は NRG-1-ErbB4 シグナルを介していることが示唆される。

電気生理学的な結果から、ニューロプシン欠損マウスは弱い刺激で誘導される E-LTP の減弱が見られるが、一方強い刺激で誘導される L-LTP に障害が見られない

(Ishikawa et al., 2008)ことから、ニューロプシンはE-LTP誘導時に重要であり、ニューロプシンに依存した系と依存していない系があることが示された。一方、tPA/plasminによるproBDNFから成熟型BDNFへの活性化がL-LTPに重要であることが報告されていることから、ニューロプシン欠損マウスでは、この経路が働いていることが考えられる。さらに、野生型とニューロプシン欠損マウスにおけるパルブアルブミン陽性終末の可塑的变化を詳細に調べるためには、マウスにおいて弱い刺激になる実験系を考える必要があり、今回与えた環境刺激は、ニューロプシンシグナル依存的及び非依存的経路の両方を活性化する強い刺激であると考えられる。

パルブアルブミン陽性細胞にはGABAを放出する化学シナプスと細胞間がイオンなどを通過させる分子で接着された電気シナプスによって、興奮性神経細胞を制御している(Tamás et al., 2000)。今回観察されたパルブアルブミン陽性終末は形態から化学シナプスであると考えられ、陽性線維上に電気シナプスがあると考えられる。通常飼育時には、陽性終末と線維ともにニューロプシン欠損マウスで蛍光強度が低下していたことから、機能が低下している可能性が考えられる。一方、ラン環境で飼育すると、野生型とニューロプシン欠損マウスともに陽性終末と陽性線維の蛍光強度が増加している。しかしながら、パルブアルブミン陽性終末と陽性線維の蛍光強度の増加がニューロプシン欠損マウスで機能的に働いているかは未だに調べていないために、今後さらなる検討が必要である。

運動は海馬での可塑的变化を誘導し(Bekinschtein et al., 2011; Leggio et al., 2005)、10日間か45日間の自発運動(か慢性運動)はパルブアルブミンの発現を増加する報告がある(Arida et al., 2004, 2007; Gomes da Silva et al., 2010)。これらの研究と一致して、ラン環境で飼育したマウスで錐体細胞や顆粒細胞を取り巻くパルブアルブミン陽性終末の増加を観察した。運動によって、ニューロプシンmRNA量は発現上昇するが3週間後では観察されない。一方、長期的な運動でもパルブアルブミンの発現上昇が観察されていることから、他の分子が3週間以降では主に働くと考えられる。運動によって、経時的に変化する分子に着目すると、ニューロプシンが発現上昇するとき起こる短期的な変化とそこから、ニューロプシンの発現量が正常時におこる長期的な変化を観察すると、どのようにパルブアルブミン陽性細胞に対するシグナルが変化をするのかを知る手がかりになると考えられる。

ニューロプシン欠損マウスは、不安様行動やうつ様行動を示すことが知られており、恐怖の感受性が亢進していると考えられている(堀井, 2008)。文脈的恐怖条件付け刺激をマウスに行うとパルブアルブミンの発現量が高い状態にシフトする報告(Donato et al., 2013)と考え合わせると、ニューロプシン欠損マウスは新規環境にさらされると、恐怖やストレスを野生型マウスより感じやすいことが考えられ、パルブアルブミン陽性終末の蛍光強度が増加したことの原因である可能性も考えることができる。

社会環境刺激では、歯状回でのパルブアルブミン陽性終末の発現上昇は見られなかったことから、パルブアルブミン陽性終末が変化する領域が刺激に依存して異なる可

能性も見られ、与える環境刺激によって、様々な経路によるパルブアルブミン陽性終末の調節がある可能性が示唆された。社会環境刺激でも、パルブアルブミン陽性終末が変化したことから、ニューロプシン欠損マウスで見られる不安様行動にもパルブアルブミン陽性細胞が関与することが考えられ、今後さらに詳細に調べる必要がある。

今回の実験では、ストレンジャーマウスを入れたことによるストレスが原因でパルブアルブミンの発現が増加した可能性も考えられるが、実験で用いたストレンジャーマウスは社会的に弱者になるように、週齢が実験対象のマウスよりも幼く体も小さいものを選んだため、実験対象のマウスがいじめられている様子は観察されなかった。しかしながら、同腹マウス以外と同じケージにいるだけでも、弱いストレスにはなる可能性もあるため、ストレスのマーカーになるコレチゾールなども一緒に確認するとストレスの影響かそれ以外かを判断しやすいと考えられる。

ニューロプシンシグナルがパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度を変化させるか調べるために、マウスを用いた *in vivo* の実験や *in vitro* で脳スライスにリコンビナントニューロプシンや NRG-1 の EGF ドメイン投与し、実際にパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度の変化が見られるのか、ソーシャルインタラクション刺激時にニューロプシン mRNA とタンパク質は増加しているのか、ニューロプシンシグナルが伝達された指標となる ErbB4 のリン酸化は起きているのかなどを今後調べる必要がある。

### 野生型とニューロプシン欠損マウスにおける抑制性シナプスの比較観察について

Fast spiking パルブアルブミン陽性細胞で ErbB4 欠損させると、シャンデリア細胞とバスケット細胞ともに、GABA<sub>A</sub> 受容体とクラスターを作る軸索末端が減少することが報告されており、NRG-1-ErbB4 シグナルがパルブアルブミン陽性終末のシナプス形成に重要であると考えられる。(Neddens and Buonanno, 2010; Pei et al., 2014; Del Pino et al., 2013; Wang et al., 2014)。ニューロプシン欠損マウスでパルブアルブミン陽性終末の蛍光強度は減少していたが、抑制性プレシナプスのマーカーである VGAT は野生型とニューロプシン欠損マウスで蛍光強度に差は認められなかった。また、ニューロプシン欠損マウスにおいて、パルブアルブミン陽性反応が減少している部位でも、VGAT 陽性反応が観察されたことから、抑制性プレシナプスの数は減少せずに、プレシナプスにおけるパルブアルブミンの発現量が減少している可能性が考えられる。一方、ラン環境で飼育後も、VGAT は、野生型とニューロプシン欠損マウスの間で、差が認められなかったことから、抑制性プレシナプスの数は変化していないと考えられる。以上のことから、抑制性プレシナプスの数の変化を伴わない可塑的な変化がパルブアルブミン陽性終末で起きていると考えられる。fast spiking パルブアルブミン陽性バスケット細胞の ErbB4 を欠失させたマウスで、細胞体周辺のブートンの大きさに変化が見られない報告があることから、プレシナプスの大きさには NRG-1-ErbB4

シグナルは大きな影響を与えないことが考えられる (Del Pino et al., 2013)。

プレシナプスに異常が見られないことから、ポスト側に変化が見られないか観察するためにパルブアルブミン陽性終末の GABA を受容する GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$  サブユニット (Klausberger et al., 2002) について蛍光免疫染色を用いて調べた。野生型とニューロプシン欠損マウスを比較すると、野生型マウスでは、パルブアルブミン陽性軸索線維に沿って、細胞体周辺に受容体が観察される。一方、ニューロプシン欠損マウスでは、パルブアルブミン軸索線維が観察されるところでは GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$  サブユニットの陽性反応も強く、逆にパルブアルブミン陽性反応が弱いところでは GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$  サブユニットの陽性反応が細胞質内に拡散して、GABA<sub>A</sub> 受容体として機能していないような像が観察された。電気生理学的に、ニューロプシン欠損マウスでは、GABA の伝達効率が低下していること、ニューロプシンシグナルは、GABA<sub>A</sub> 受容体を介して、神経可塑性に関与することから (Tamura et al., 2012)、ニューロプシン欠損マウスで GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$  サブユニットの局在に変化が見られることで、GABA の伝達効率が低下すると考えられる。

Fast spiking パルブアルブミン陽性バスケット細胞の ErbB4 を欠損させると、細胞体周辺の GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$  サブユニットを含むブトンの数が減少し、パルブアルブミン陽性終末とクラスターを形成する GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$  サブユニットの数も減少すると報告がある (Del Pino et al., 2013)。しかしながら、GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$  サブユニットのタンパク質量に変化が見られないことや、パルブアルブミン陽性終末とクラスターを形成しない GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$  サブユニットの数はコントロールと差が見られないことから (Del Pino et al., 2013)、クラスターを形成していない受容体として機能的でない GABA<sub>A</sub> 受容体  $\alpha 1$  サブユニットが細胞体の膜表面や細胞質内に存在していると考えられる。この実験系ではパルブアルブミン陽性終末の減少が報告されているが、一章でも述べたように、ErbB4 受容体は他のリガンドも結合して機能することから、ErbB4 をパルブアルブミン陽性細胞から欠損させると他のリガンドからの補償作用がなくなり、よりシビアな表現系が観察されるためだと考えられる。

電気生理学的な研究結果から、ニューロプシンの神経活動依存的な活性化が起こる時間は、短時間であり、カイニン酸の刺激実験からも神経活動が活発化してから 4 時間から 6 時間程度の間がもっともニューロプシンが活性化していることから、より短時間の刺激による変化を観察するか、よりニューロプシンに依存的な行動実験を与えた時にパルブアルブミン陽性終末の発現量がどのように変化するかを観察する必要があると考えられる。

ニューロプシンは濃度依存的に神経伝達効率を変化させ、低濃度から神経伝達効率が上昇し、高濃度では神経伝達効率が減少するベル型カーブの反応を示す (Komai et al., 2000)。

さらに、NRG-1 も濃度依存的にベル型カーブを描き、低濃度でも高濃度でも神経活動を阻害する効果があることが報告されている (Agarwal et al., 2014; Role and Talmage, 2007)。ニューロプシン発現量が上昇し、NRG-1 の切断断片が増え続けると

ある濃度以上で、神経活動を阻害すると考えられ(Agarwal et al., 2014; Role and Talmage, 2007)、これは、抑制性神経細胞の機能として考えられているフィードバック作用として抑制神経細胞からの抑制効果が興奮性神経細胞の働きを抑制し、ニューロプシンや NRG-1 の発現量が低下すると、パルブアルブミン陽性細胞を介した抑制効果も減少し、正常時の神経活動レベルに戻ると考えられる。以上のことからニューロプシンシグナルは興奮性と抑制性のバランスを保つために重要であると考えられる。

### 第3章 パルブアルブミン陽性細胞によるニューロプシン発現細胞

#### の制御

パルブアルブミン陽性バスケット細胞は、興奮性神経細胞の細胞体に主に投射しており、興奮性神経細胞を制御している。そこで、実際にパルブアルブミン陽性細胞が、ニューロプシン分泌細胞を直接制御しているのか BAC トランスジェニックマウスを用いて確認した。確かに、GFP 陽性細胞の周りにパルブアルブミン陽性軸索が取り巻いていることが観察された。パルブアルブミン陽性線維のコンテンツの変化によって、GABA 伝達効率が変化し最終的に、ニューロプシンの発現量の変化を伴う可能性が考えられる。このことから、パルブアルブミンの発現量の変化は、ニューロプシン分泌細胞からのフィードバック制御を受ける可能性もあると考えられる。

BAC トランスジェニックマウスでは、GFP 陽性細胞は、海馬体内を正常に分布していた。CA1 領域では GFP 陽性細胞の樹状突起分布とパルブアルブミン陽性細胞の樹状突起の分布では、GFP 陽性細胞は網状分子層に密な突起が見られるが、パルブアルブミン陽性細胞の突起はほとんど見られないことから、樹状突起に入力する神経回路にも違いがあると考えられる。

#### ニューロプシンと統合失調症

NRG-1 と ErbB4 は統合症脆弱因子として知られ、近年注目を集めている。統合失調症では、作業記憶の低下やガンマ波の低下(Light et al., 2006)、死後脳において、パルブアルブミン陽性細胞の減少、パルブアルブミン mRNA の減少、パルブアルブミン陽性シナプスの減少などが報告されている(Konradi et al., 2011; Zhang and Reynolds, 2002)。

今回の研究では、ニューロプシン欠損マウスは、海馬の興奮性神経細胞を取り囲むパルブアルブミン陽性終末の減少が見られた。また、ニューロプシン欠損マウスでは、Y 字迷路での作業記憶の低下(Tamura et al., 2006)やガンマ波の低下(未発表データ)などの統合失調症様な症状が認められる。

ガンマ波はT字迷路などでマウスがアームを選択するとき（認知行動）に、強く発火するなど行動との相関が報告されている(Yamamoto et al., 2014)。また、パルブアルブミン陽性細胞はガンマ波の発生源であると考えられており(Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009; Tukker et al., 2007)、パルブアルブミン陽性細胞の機能不全によって、これらの症状が起こる原因であると考えられる(Curley and Lewis, 2012; Lewis et al., 2012)。

同様に、パルブアルブミンの減少やFast-spikingニューロンのシナプス異常がガンマ波を減少させることを計算モデルで示されている(Volman et al., 2011)。これは、統合失調症のような脳機能障害と類似している(Lewis et al., 2012)。

以上のことから、ニューロペプチン-NRG-1-ErbB4 シグナルは統合失調症との関連が深いと考えられ、今後、さらなるシグナル系の解明が統合失調症の原因解明の一助になると考えている。

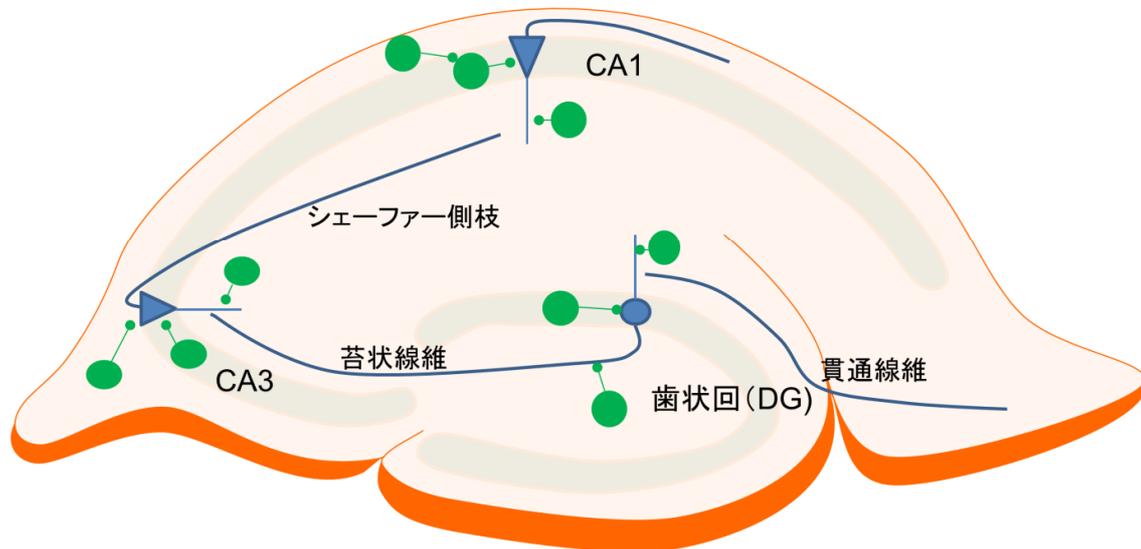
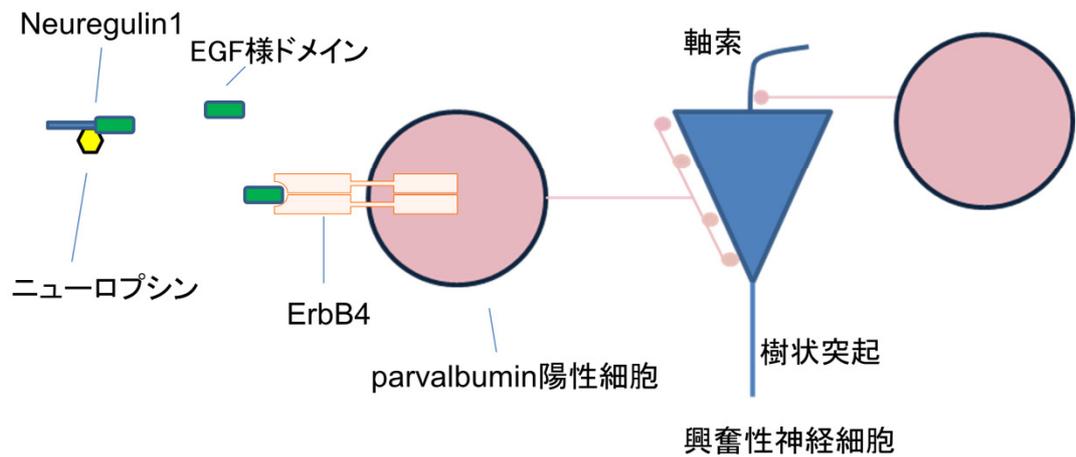


図1 海馬体の神経回路の模式図

海馬体は、アンモン角 (CA) 1 と CA3 領域と歯状回 (DG) からなる。歯状回への入力線維として貫通線維が嗅内皮質から投射している。貫通線維を受容する顆粒細胞は苔状線維を CA3 の錐体細胞に投射している。CA3 の錐体細胞はシェーファー側枝を CA1 の錐体細胞へ投射している。CA1 錐体細胞から嗅内皮質に戻る回路がある。この回路はトリシナプス回路と呼ばれ、興奮性神経回路網である。それぞれの領域内で、抑制性神経細胞 (緑) が、神経細胞の活動を調節する。興奮性と抑制性のバランスが神経活動を正常に維持するために重要である。



(Tamura et al. The Journal of Neuroscience 2012)

図2 ニューロピリン-ニューレグリン1-ErbB4 シグナル経路

細胞外セリンプロテアーゼ・ニューロピリンは、統合症脆弱因子ニューレグリン-1を切断し、その切断配列(EGF様ドメイン)がErbB4受容体を発現するパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞を介して興奮性神経細胞を制御する。

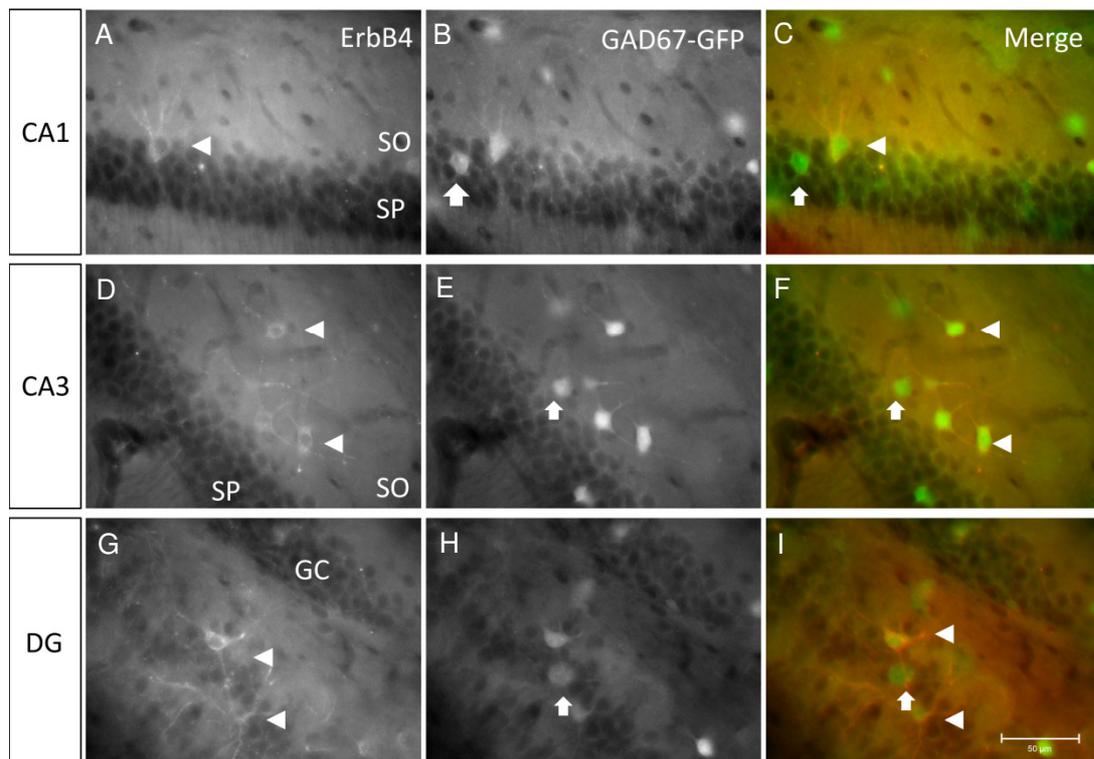


図3 ErbB4 受容体は抑制性神経細胞に発現する

GABA 合成酵素 (GAD67) -GFP トランスジェニックマウスを用いて、ErbB4 発現細胞を確認した。これまでに報告されているように ErbB4 発現細胞は、抑制性神経細胞である(Vullhorst et al., 2009)。ErbB4 発現抑制性細胞 (矢頭) と ErbB4 非発現抑制性細胞 (矢印)。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

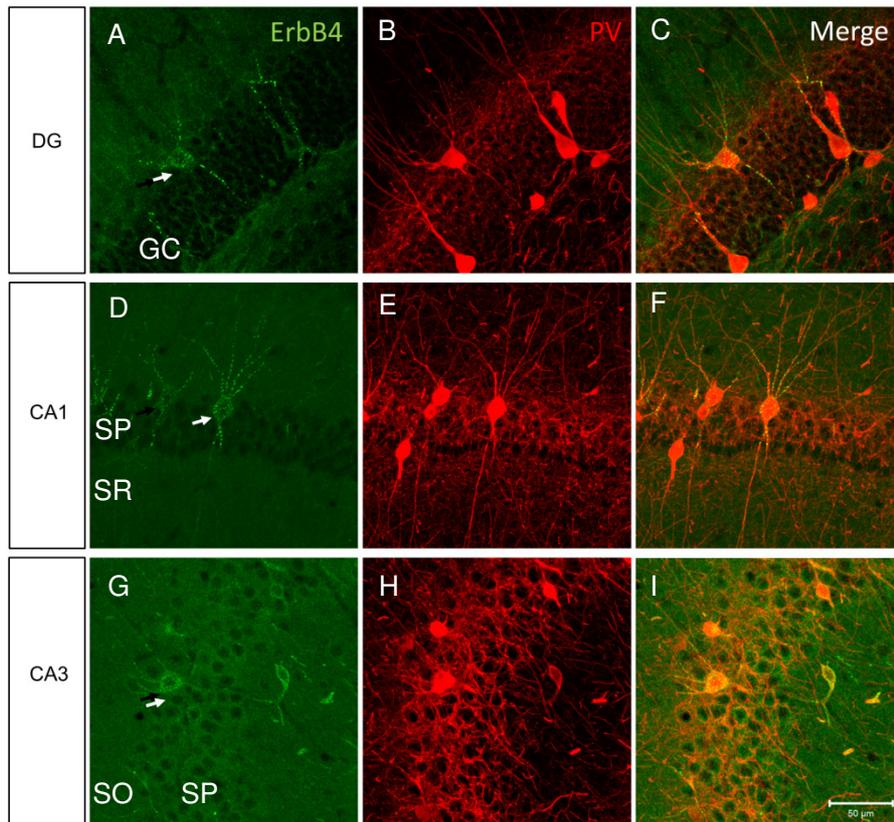


図4 ErbB4 発現 PV 陽性細胞

ErbB4 発現細胞のうちに主な抑制性神経細胞は、PV 陽性細胞と報告されている (Neddens and Buonanno, 2010; Yau et al., 2003)。確認のために ErbB4 と PV の共染色を行って、各領域を観察した。確かに、ErbB4 発現細胞の多くは PV 陽性細胞である。矢印が ErbB4 発現 PV 陽性細胞を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

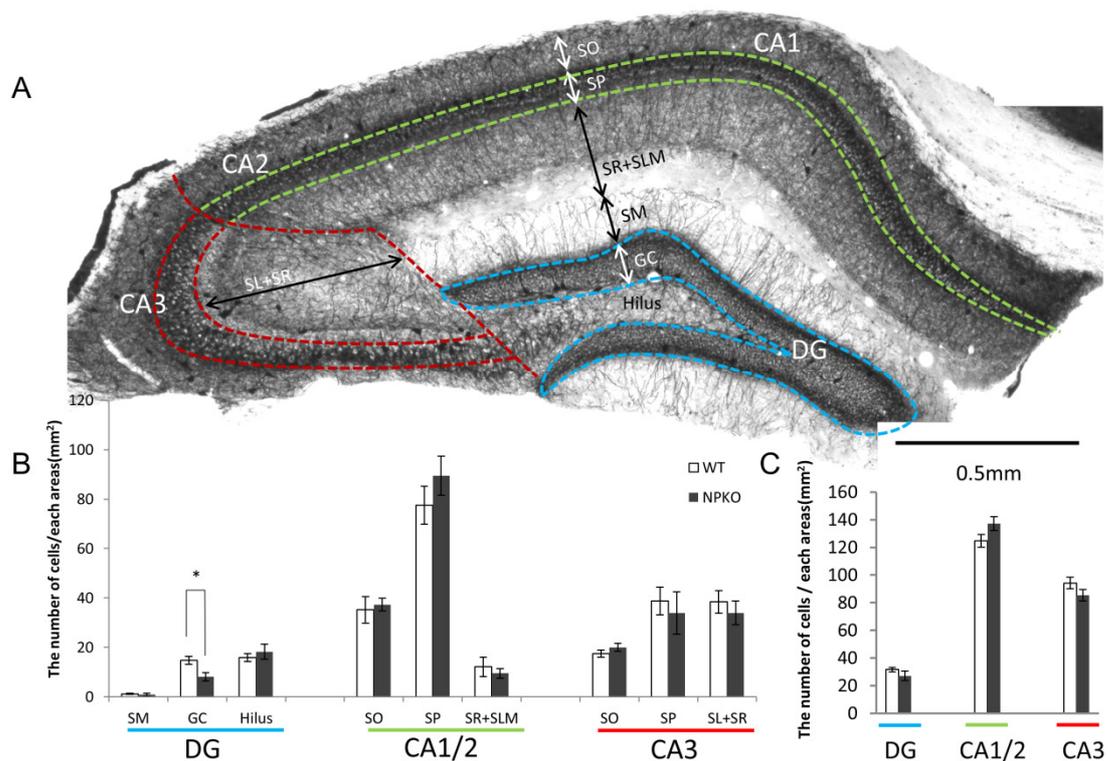


図5 野生型とニューロプシン欠損マウスにおけるパルブアルブミン免疫陽性神経細胞の定量解析

(A) 抗パルブアルブミン抗体によって免疫染色された切片上に赤の破線と青の破線で海馬の各領域と各層の境界線を示している。スケールバーは 0.5 mm を表している。(B) パルブアルブミン陽性神経細胞の数を歯状回 (DG)、CA1 と CA2、CA3 の海馬の各領域で層ごとに単位面積当たりで測定した (n=40 切片、各 10 切片を 4 匹のマウスから)。(C) パルブアルブミン陽性神経細胞の各領域での総数を示す。野生型とニューロプシン欠損マウスの間にパルブアルブミン陽性細胞の総数には有意差が見られなかった。略語: CA1, CA1 領域、CA2, CA2 領域、CA3, CA3 領域、DG、歯状回、GC、顆粒細胞層、SL、透明層、SM、分子層、SO、上昇層、SP、錐体細胞層、SR、放線層、SLM, 網状分子層。アスタリスクは有意差を示している。\* p<0.05。スチューデント t 検定。青が野生型、赤がニューロプシン欠損マウスを示す。エラーバーは標準誤差 (SEM) を示す。

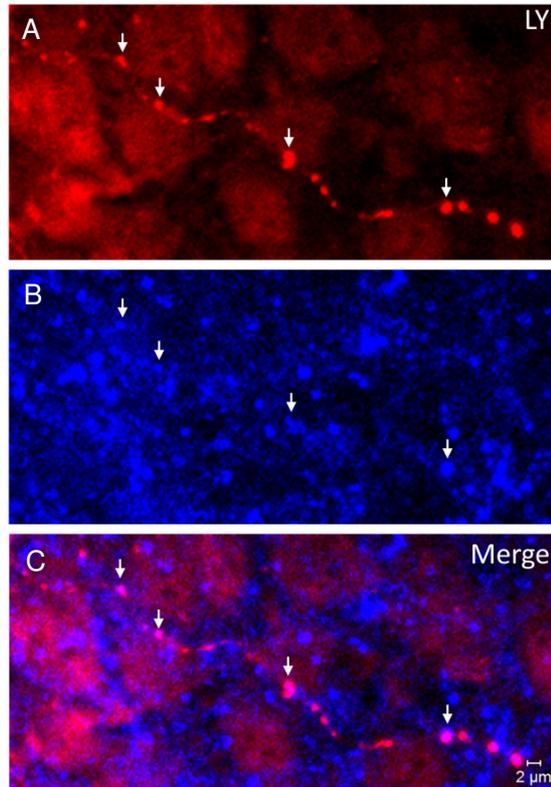


図6 ルシファーイエローを用いたパルブアルブミン陽性軸索終末の可視化

GAD67-GFP マウスのスライスを用いて、GAD67 陽性細胞にルシファーイエローを注入した。抗ルシファーイエロー抗体と抗パルブアルブミン抗体を用いて免疫染色し、観察した。ルシファーイエロー陽性軸索は、細胞層の周り中で、各細胞でシナプス様構造が見られた。矢印で示した部位はシナプス様構造部位で、パルブアルブミン陽性反応とルシファーイエロー陽性反応が共局在している場所を示す。スケールバーは 2  $\mu\text{m}$  を示す。

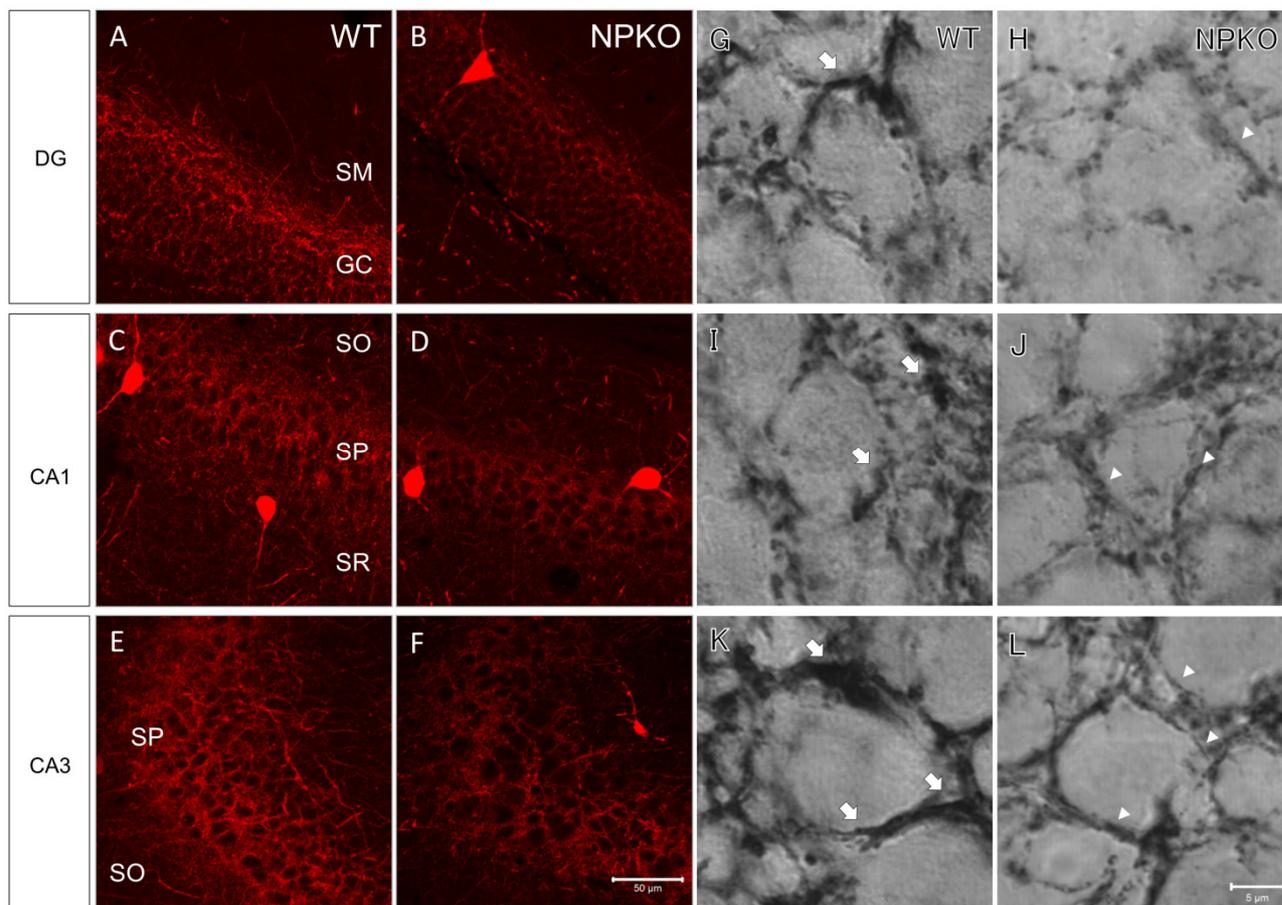


図7 ニューロプシン欠損マウスにおけるパルブアルブミン免疫陽性反応の  
ダウンレギュレーション

共焦点顕微鏡で撮影した蛍光画像 (A,B,C,D,E,F) と微分干渉フィルターを用いた光学画像 (G,H,I,J,K,L) を示す。密なパルブアルブミン陽性繊維網が顆粒細胞層 (GC、A) と CA1 と CA3 領域の錐体細胞層 (SP) (C と E) で観察された。パルブアルブミン陽性反応の減少が GC (B) と CA3 領域の SP (F) で顕著に見られた。CA1 領域の SP でわずかな減少が見られた (D)。顆粒細胞と錐体細胞を取り囲むパルブアルブミン陽性繊維の中に太い繊維束 (G,I,K の矢印) が観察され、一方、ニューロプシン欠損マウスでは、弱い免疫反応の線維 (H,J,L の矢頭) が見られた。n=3。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  (A-F) と 5  $\mu\text{m}$ (G-L)を示す。

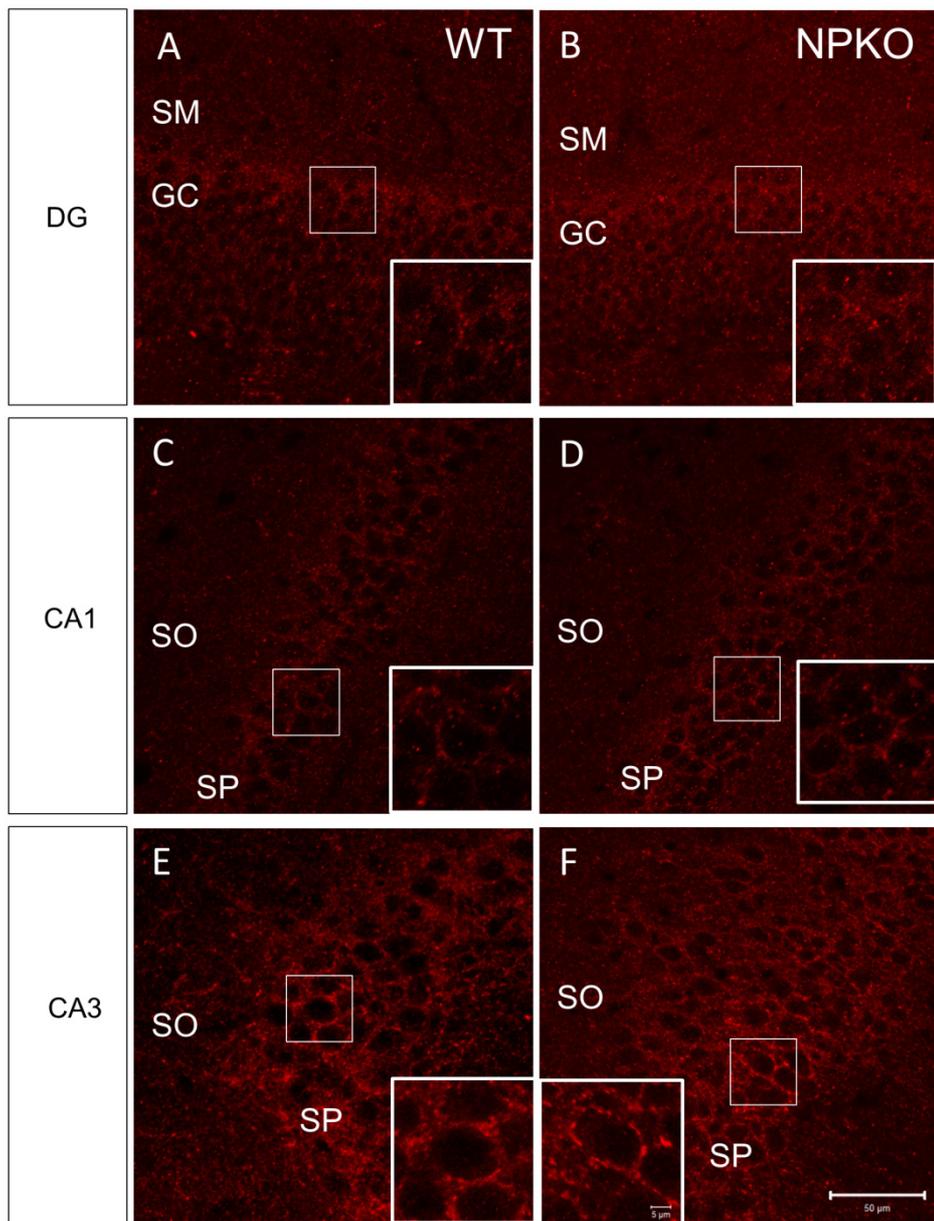


図 8 野生型とニューロトロフィン欠損マウスにおいて小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) の免疫反応性は変化なし

野生型 (A,C,E) とニューロトロフィン欠損マウス (B,D,F) の蛍光像を示す。歯状回、CA1、CA3 領域の染色は類似していた。ニューロトロフィン欠損マウスにおいても、抑制性神経線維の末端に含まれる VGAT が変化しないため、抑制性シナプス構造は変化していない可能性がある。差し込み図は線で囲った部位を拡大したものがある。n=5。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  と 5  $\mu\text{m}$  を示す。

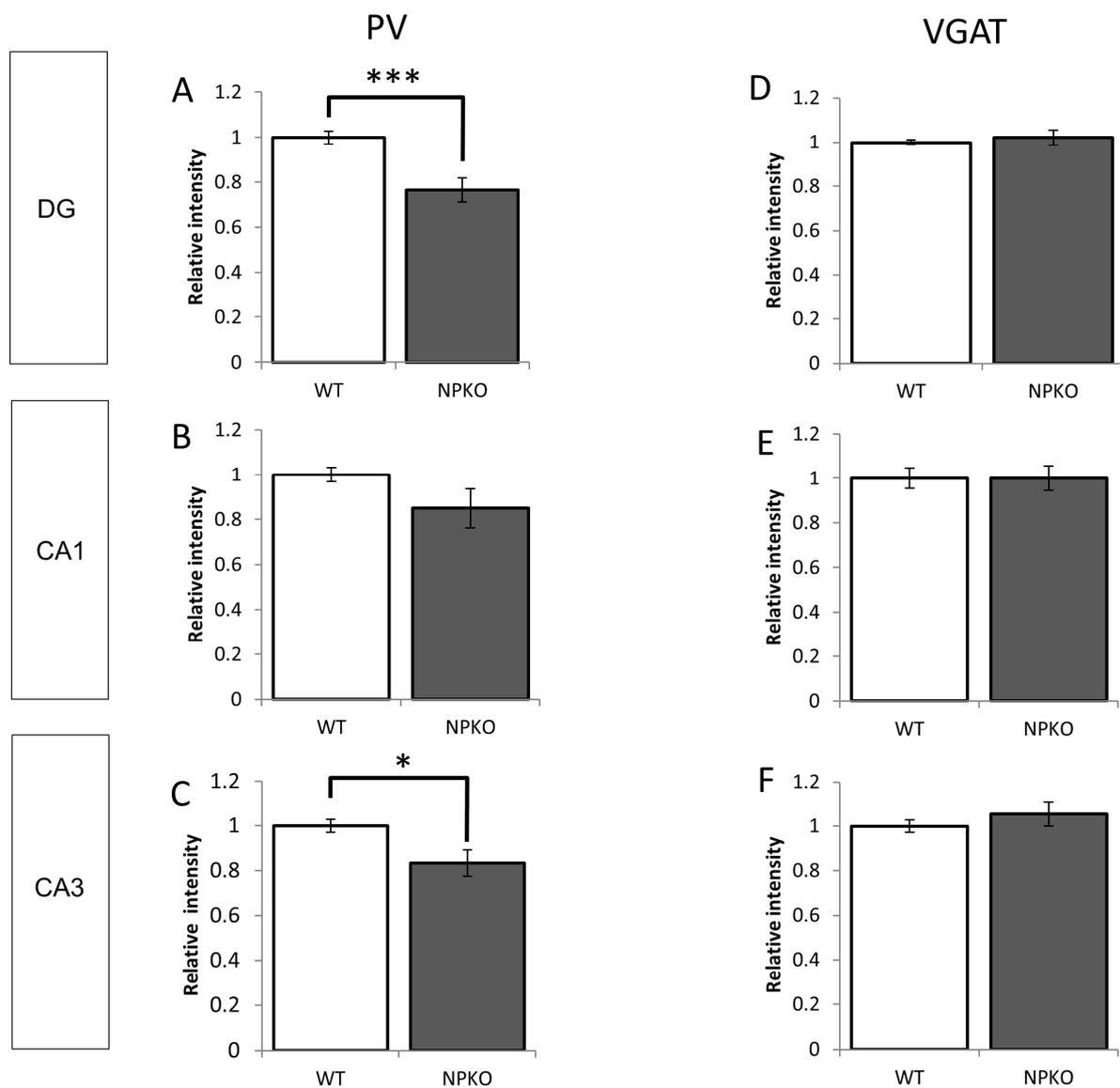


図9 野生型とニューロプシン欠損マウスにおける海馬パルブアルブミン陽性反応とVGAT陽性反応の蛍光強度解析

パルブアルブミン陽性反応 (A-C) と VGAT 陽性反応(D-F)の相対蛍光強度を測定し、野生型とニューロプシン欠損マウスと比較した。ニューロプシン欠損マウスにおいてパルブアルブミン陽性繊維の顕著なダウンレギュレーションが歯状回 (A)と CA3 領域 (C)で観察された。パルブアルブミン陽性反応の有意な減少は CA1/2 領域では観察されなかった (B)。n=3。

野生型とニューロプシン欠損マウスにおける VGAT 陽性反応にどの領域においても差は観察されなかった。n=5。エラーバーは平均±標準誤差を示す。パルブアルブミン陽性反応と VGAT 陽性反応の相対強度は ImageJ によって解析した。

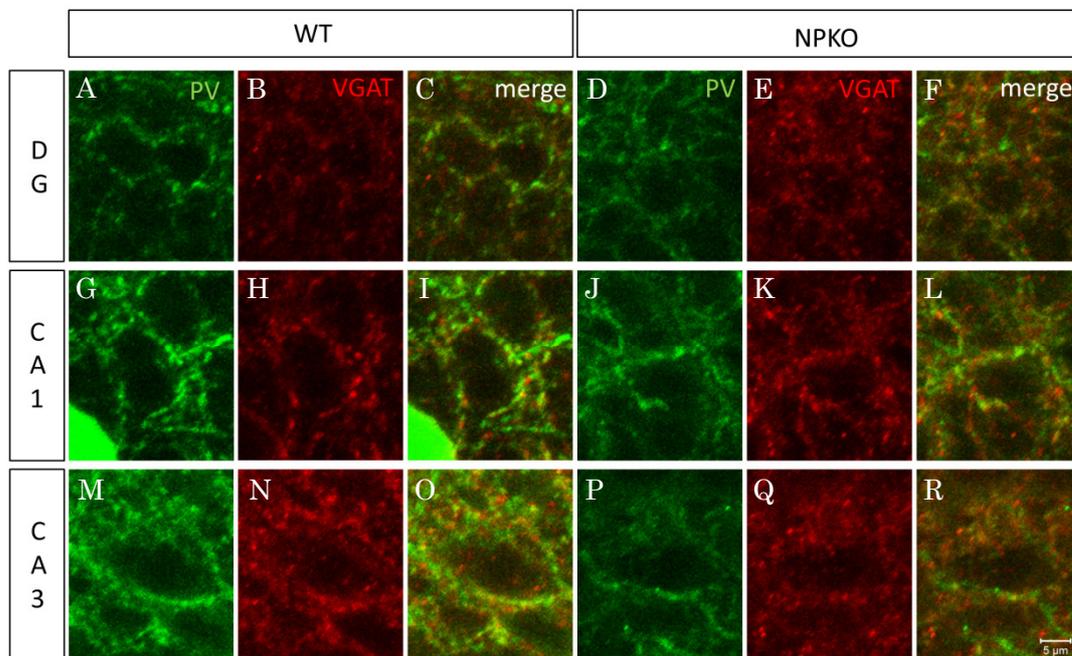
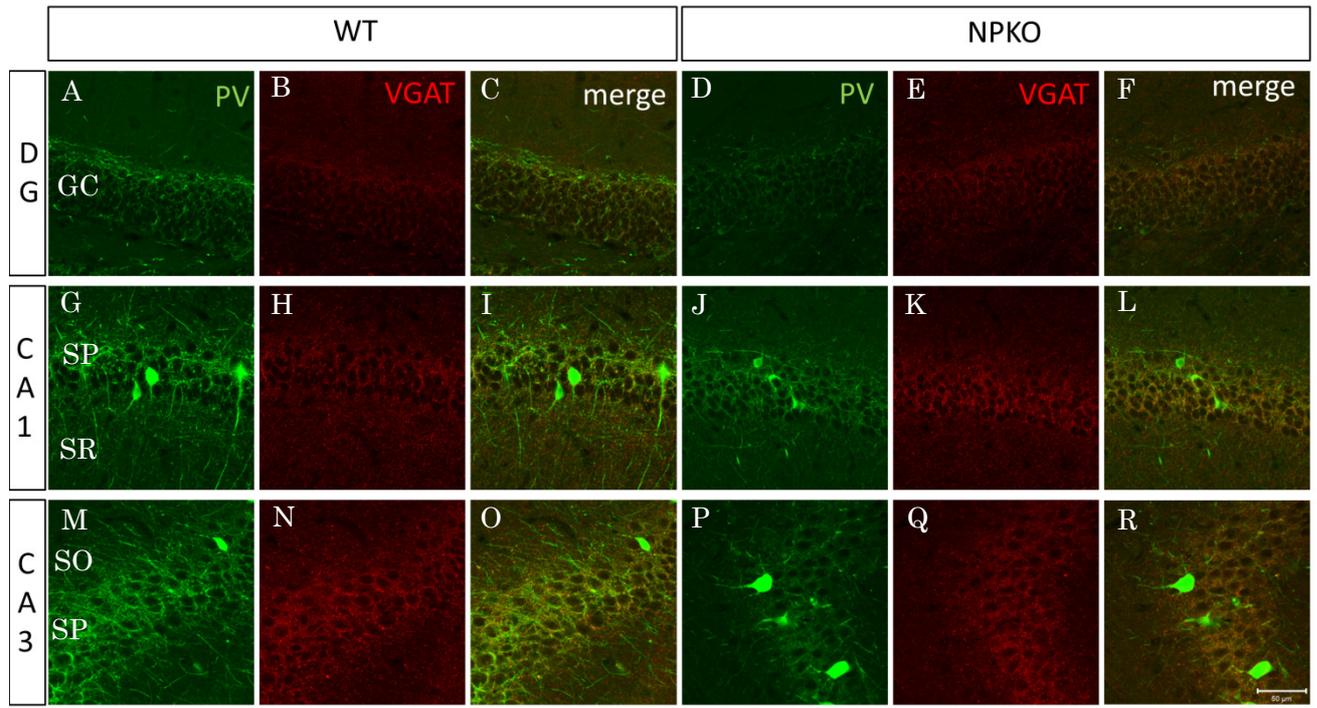
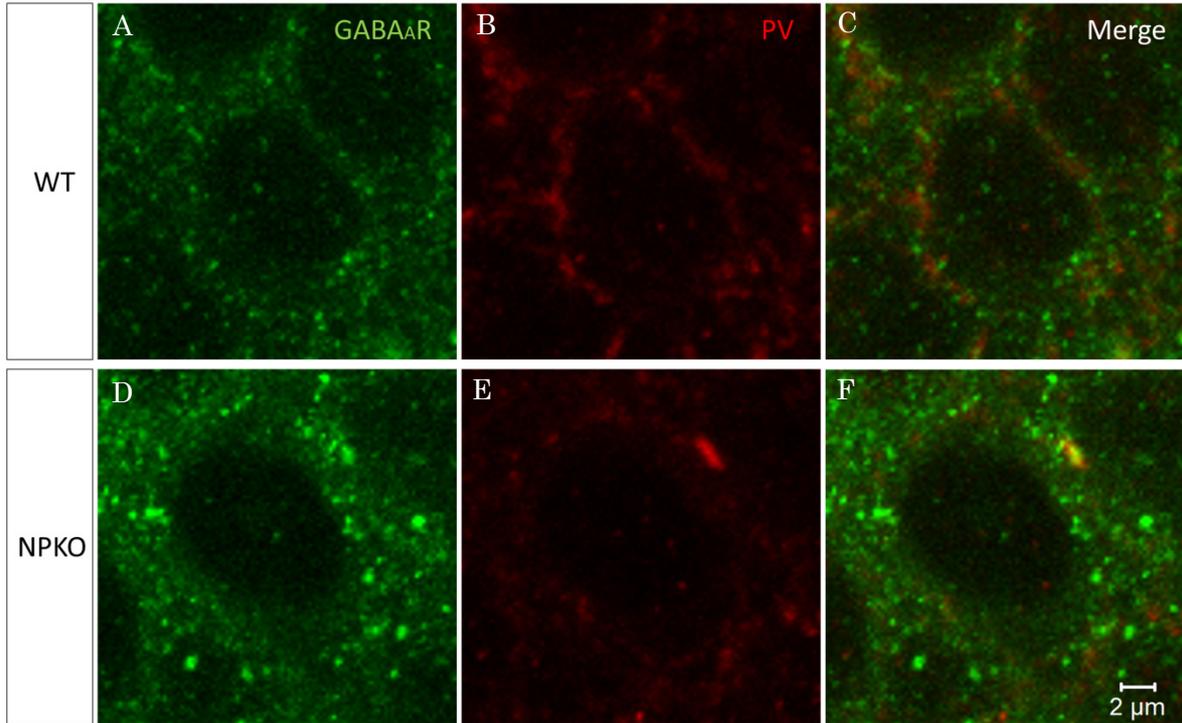


図 10 PV と VGAT 共染色像

野生型とニューロプシン欠損マウスにおけるパルブアルブミン陽性終末における VGAT を比較するために、共染色を行った。PV の蛍光強度は、ニューロプシン欠損マウスで減少しているが、VGAT の蛍光強度は野生型と同程度である。

PV 陽性線維や終末がニューロプシン欠損マウスで減少しているところでも、VGAT 陽性終末は観察される。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  と 5  $\mu\text{m}$  を示す。

## CA1



## CA3

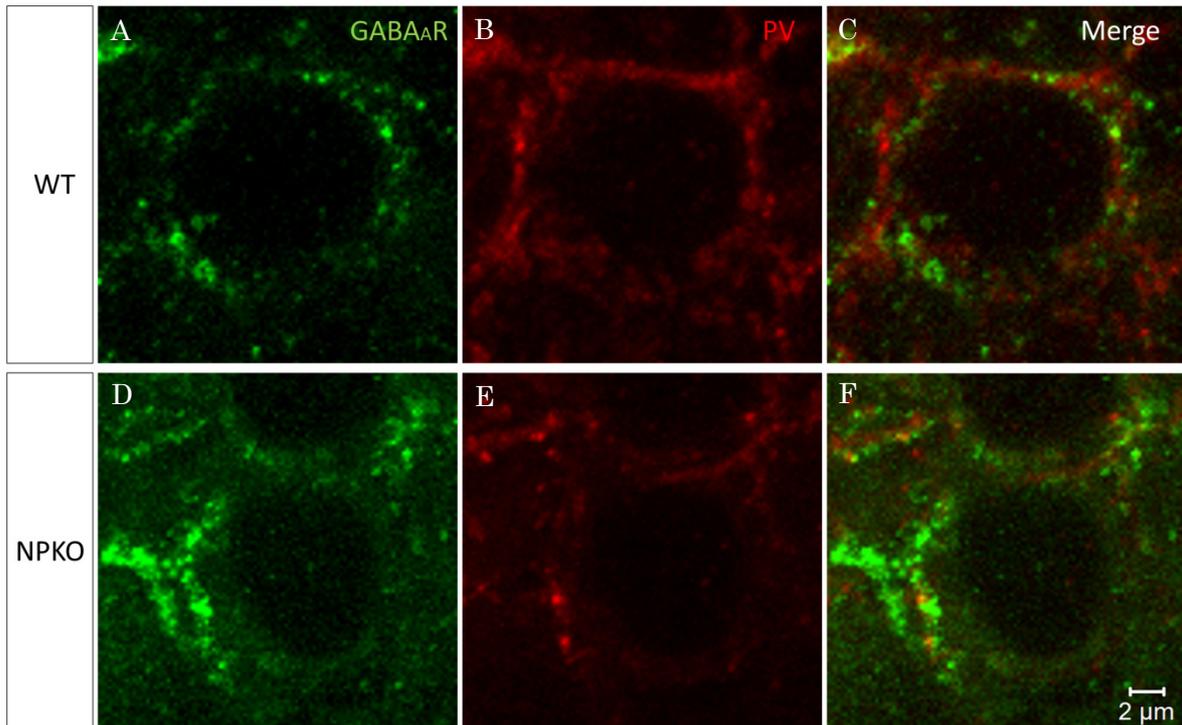


図 11 CA1 領域と CA3 領域の PV と GABA<sub>A</sub> 受容体の共染色像

プレシナプス側で異常が認められなかったために、ポスト側での変化を確認するために GABA<sub>A</sub> 受容体と PV を共染色した。パルブアルブミン陽性反応に沿って、GABA<sub>A</sub> 受容体の陽性反応がドット状に観察された。ニューロプシン欠損マウスでは、GABA<sub>A</sub> 受容体の陽性反応が拡散している。スケールバーは 2 μm を示す。

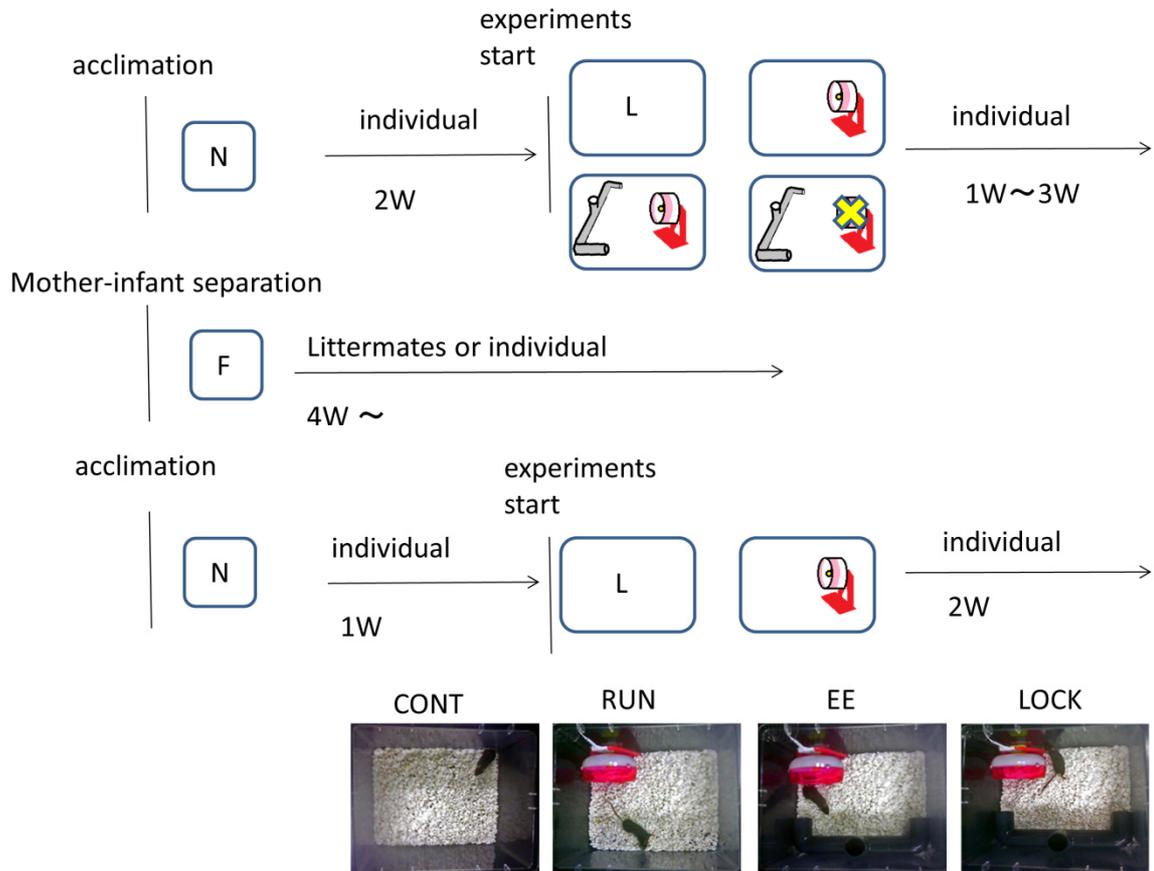


図 12 環境刺激の実験条件設定

購入マウスを新規ケージ (N) で 2 週間、個別で飼育し、大ケージ (L) に 4 つの環境条件を設定した。大ケージに物体を設置しないコントロール環境 (CONT)、自発運動可能なランニングホイールのみの RUN 環境、ランニングホイールとプラスチックトンネルを設置した豊かな環境 (EE)、ランニングホイールを固定した LOCK 環境で、各実験期間、個別にマウスを飼育した (A)。母子分離後、ファミリアな環境 (F) で飼育したマウス (B)。自発運動による影響を知るための実験条件。新規ケージ (N) に 1 週間、マウスを個別飼育し、大ケージに 2 つの環境条件を設定した。物体を設置しないコントロールとランニングホイールを設置した RUN 環境で 2 週間、マウスを個別飼育し、実験に用いた (C)。

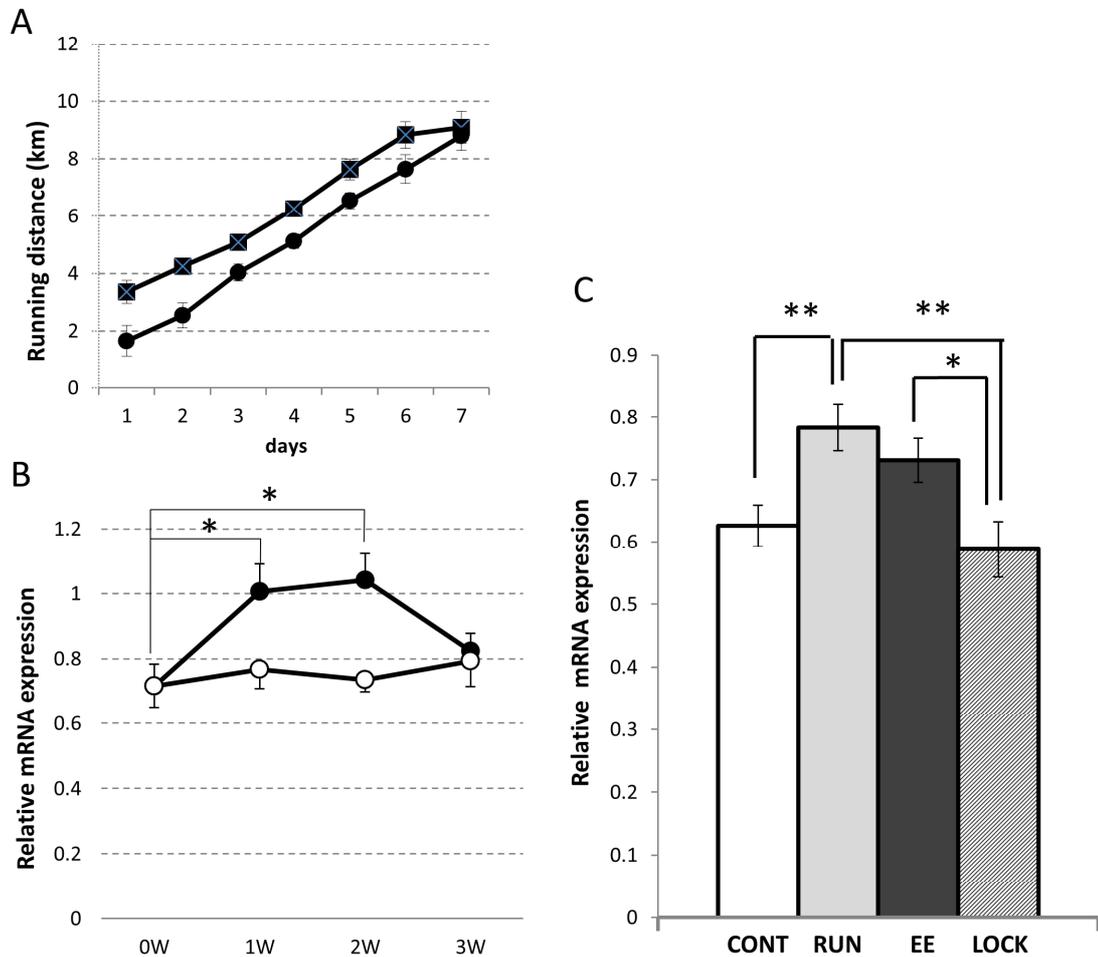


図 13 環境刺激による海馬ニューロトロフィン mRNA の発現上昇

豊かな環境 (EE、ランニングホイールとトンネル、黒丸) と自発運動環境 (RUN、ランニングホイールのみ、四角) 下で飼育したときのマウスの走行距離 (1 日あたりの回転数×ホイールの円周) は、日ごとに増加した (A)。マウスを豊かな環境で 1 週間および 2 週間飼育するとニューロトロフィン mRNA が増加した (EE : ●、CONT : ○) (B)。有意差はコントロール (Cont、灰色) と豊かな環境 (EE、白色) 間のグループで ANOVA によって決定した。n=7。1 週間(1W)と 2 週間(2W)の有意差は t 検定によって求めた。豊かな環境で 3 週間飼育すると、海馬でのニューロトロフィンの発現上昇は、コントロールレベルまで戻った (B)。豊かな環境でマウスを育てると短期の刺激 (1W) でニューロトロフィン mRNA のアップレギュレーション起こった (C)。海馬のニューロトロフィン mRNA 発現の有意な増加は、豊かな環境と RUN で見られた。また、ランニングホイールを固定した (LOCK) の環境では、ニューロトロフィン mRNA の増加は見られなかった。エラーバーは平均±標準誤差で示す。有意差は、\* p<0.05, \*\* p<0.01 を表す。

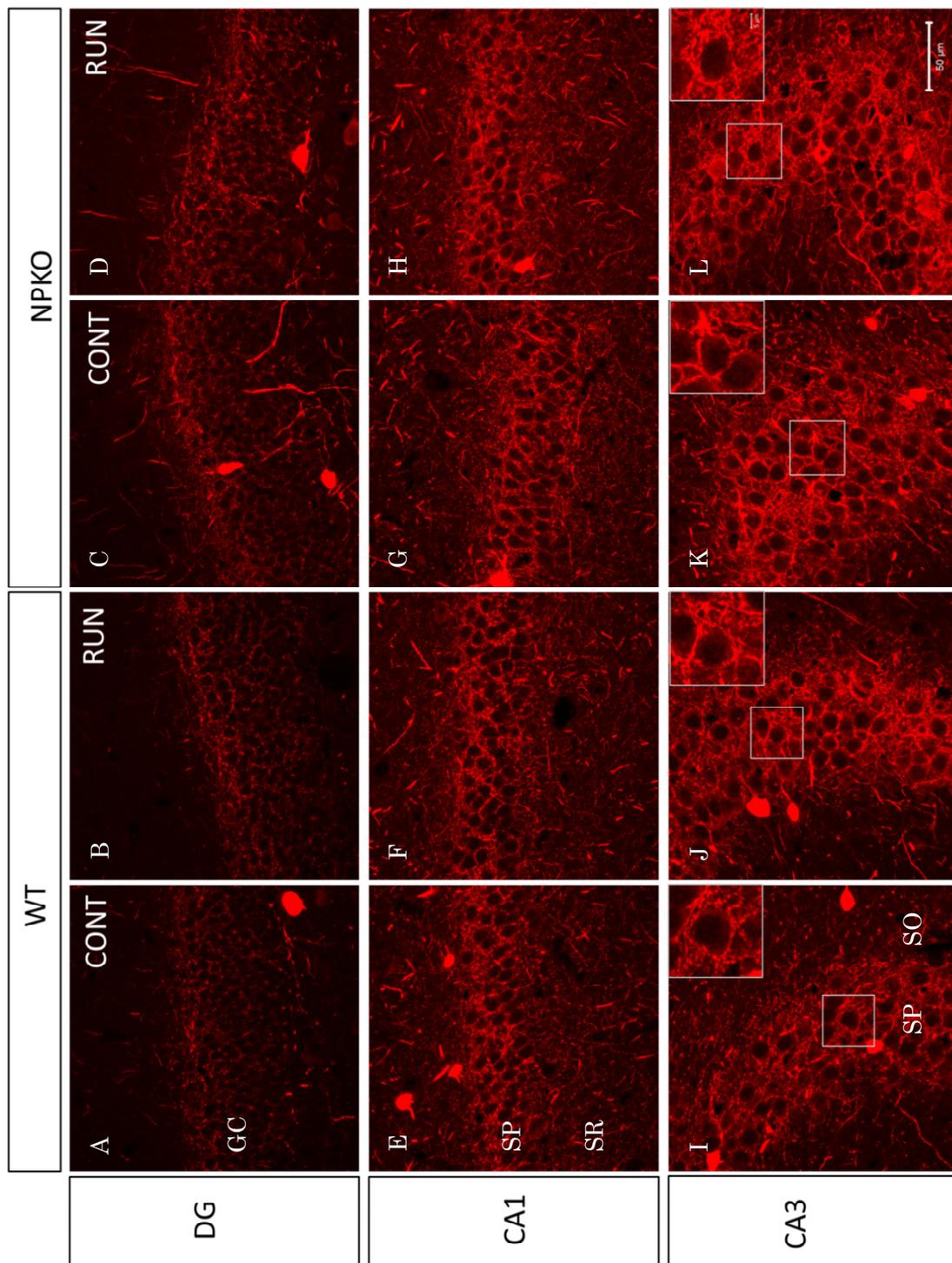


図 14 自発運動は海馬パルブアブルブミン陽性繊維をアップレギュレーションする  
 コントロール (CONT) に比べて、ランニングホール (RUN)がある環境で 2 週間育ったマウスでは、海馬パルブア  
 ルブミン陽性繊維が増加した (B,J,D,L)。自発運動したマウスの海馬でパルブアブルブミン陽性反応の蛍光強度の増加が  
 歯状回の顆粒細胞層と CA3 領域の錐体細胞層で観察された。CA1 領域ではパルブアブルブミン陽性反応の蛍光強度に大  
 きな差は見られなかった (E-H)。CONT、n=4、RUN、n=3 スケールバーは 50μm を示す。

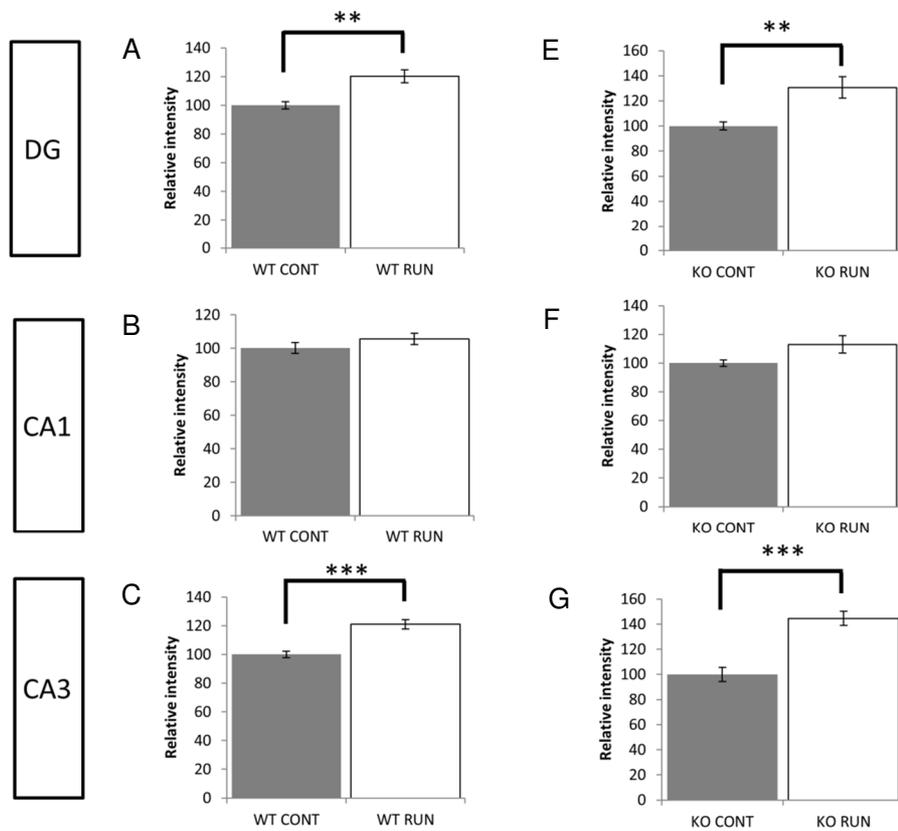


図 15 自発運動によるパルブアルブミン陽性蛍光強度の上昇

パルブアルブミン陽性反応の相対強度を ImageJ によって算出した。RUN グループではパルブアルブミン陽性反応の有意な増加が歯状回 (DG) と CA3 領域で増加が見られた(A,E,C,G)。CA1 の錐体細胞では、RUN グループと CONT グループの間に有意な差は見られなかった。有意差は、t 検定で求めた。\*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ 。エラーバーは平均±標準誤差を示す。CONT n=4, RUN n=3

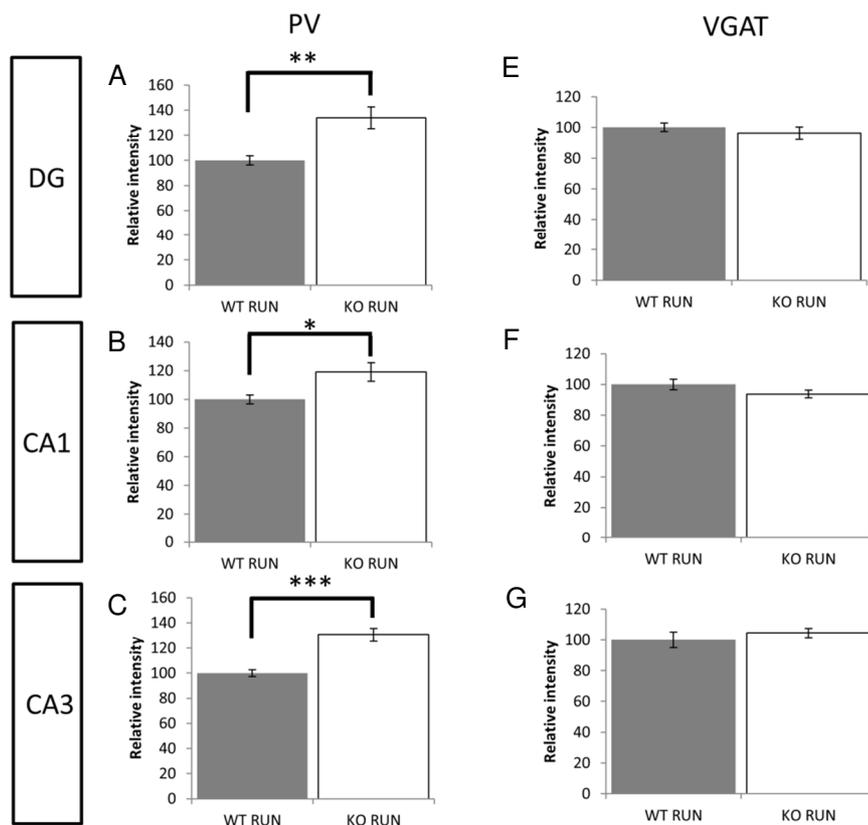


図 16 自発運動によるニューロプシンシグナル非依存的なパルブアルブミン陽性蛍光強度の上昇

パルブアルブミン陽性反応の相対強度を ImageJ によって算出した。KO RUN グループではパルブアルブミン陽性反応の有意な増加が歯状回 (DG)、CA1 領域、CA3 領域で増加が見られた(A-C)。一方、VGAT 陽性反応の蛍光強度では、WT RUN グループと KO RUN グループの間に有意な差は見られなかった。有意差は、t 検定で求めた。\*,  $p<0.05$ , \*\*,  $p<0.01$ , \*\*\*,  $p<0.001$ 。エラーバーは平均±標準誤差を示す。RUN n=3

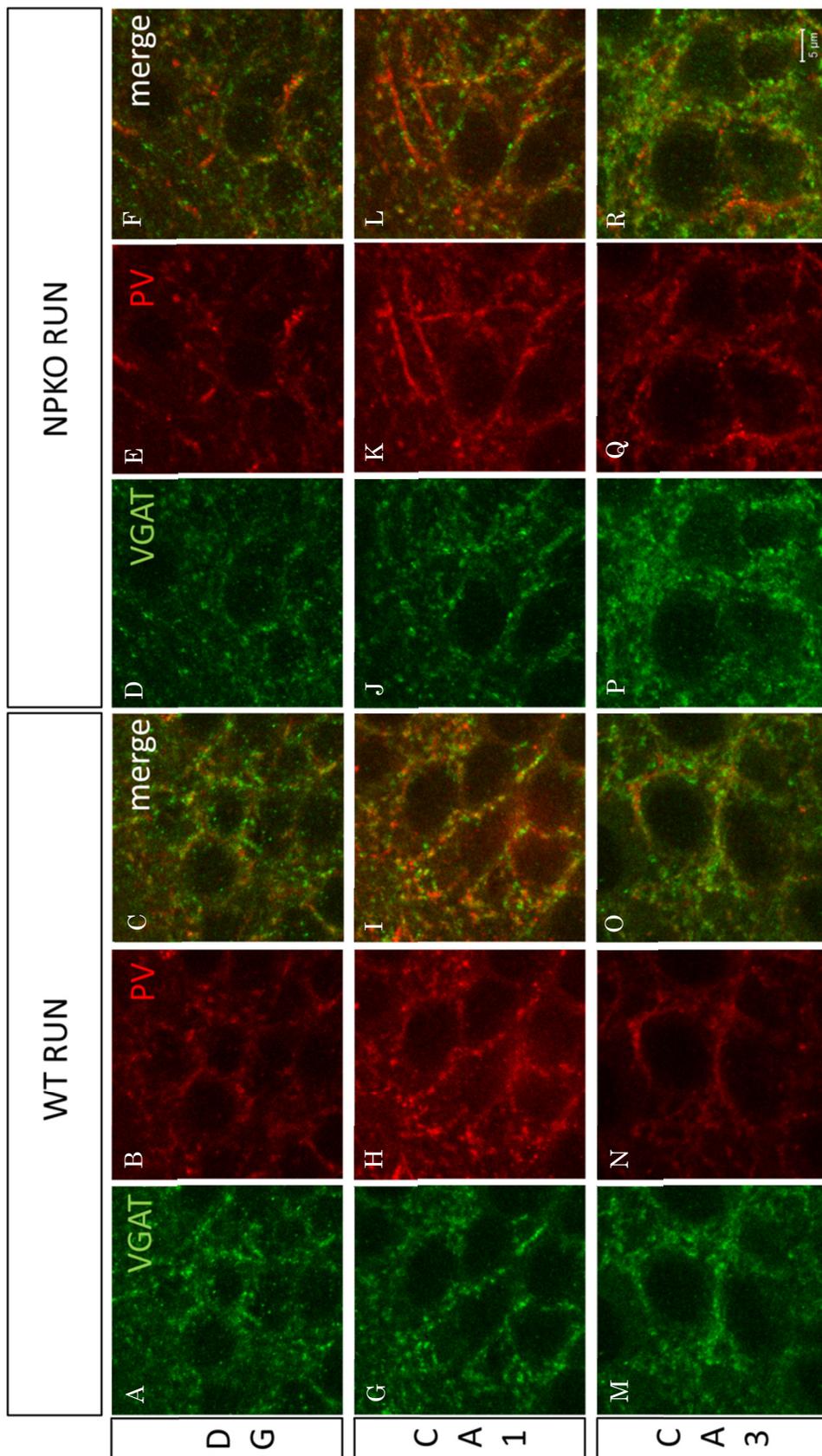


図 17 海馬パルブアルブミン陽性繊維と小胞型 GABA トランスポーターの 2 重染色  
 コントロール (CONT) に比べて、ランニングホール (RUN) がある環境で 2 週間育ったマウスでは、海馬  
 パルブアルブミン陽性繊維が増加した。自発運動したニューロブ損マウスでパルブアルブミン陽性反応  
 の蛍光強度の増加が歯状回の顆粒細胞層と CA1 と CA3 領域の錐体細胞層で観察された。小胞型 GABA トラン  
 スポーターの蛍光強度は自発運動した野生型とニューロブ損マウスで差は認められなかった。n=3。ス  
 ケールバーは 5  $\mu\text{m}$  を示す。

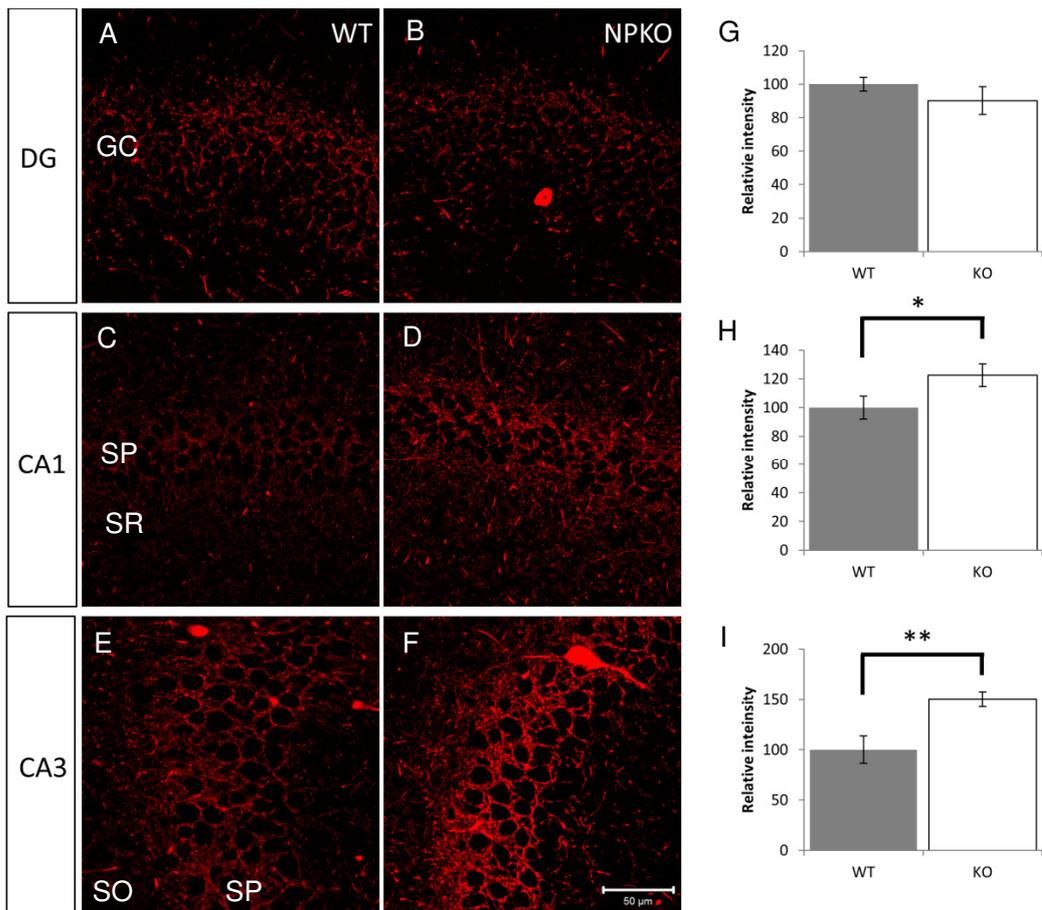


図 18 ソーシャルインタラクションによるニューロプシン非依存的なパルブアルブミンの発現上昇

野生型とニューロプシン欠損マウスの同腹マウス 3 匹を飼育し、そのケージにストレンジャーマウスを 1 匹入れて、3 日間同じケージで飼育した。野生型に比べて、ニューロプシン欠損マウスでは、CA1 領域と CA3 領域でパルブアルブミン陽性反応が上昇した。n=3。スケールバーは 50 μm を示す。

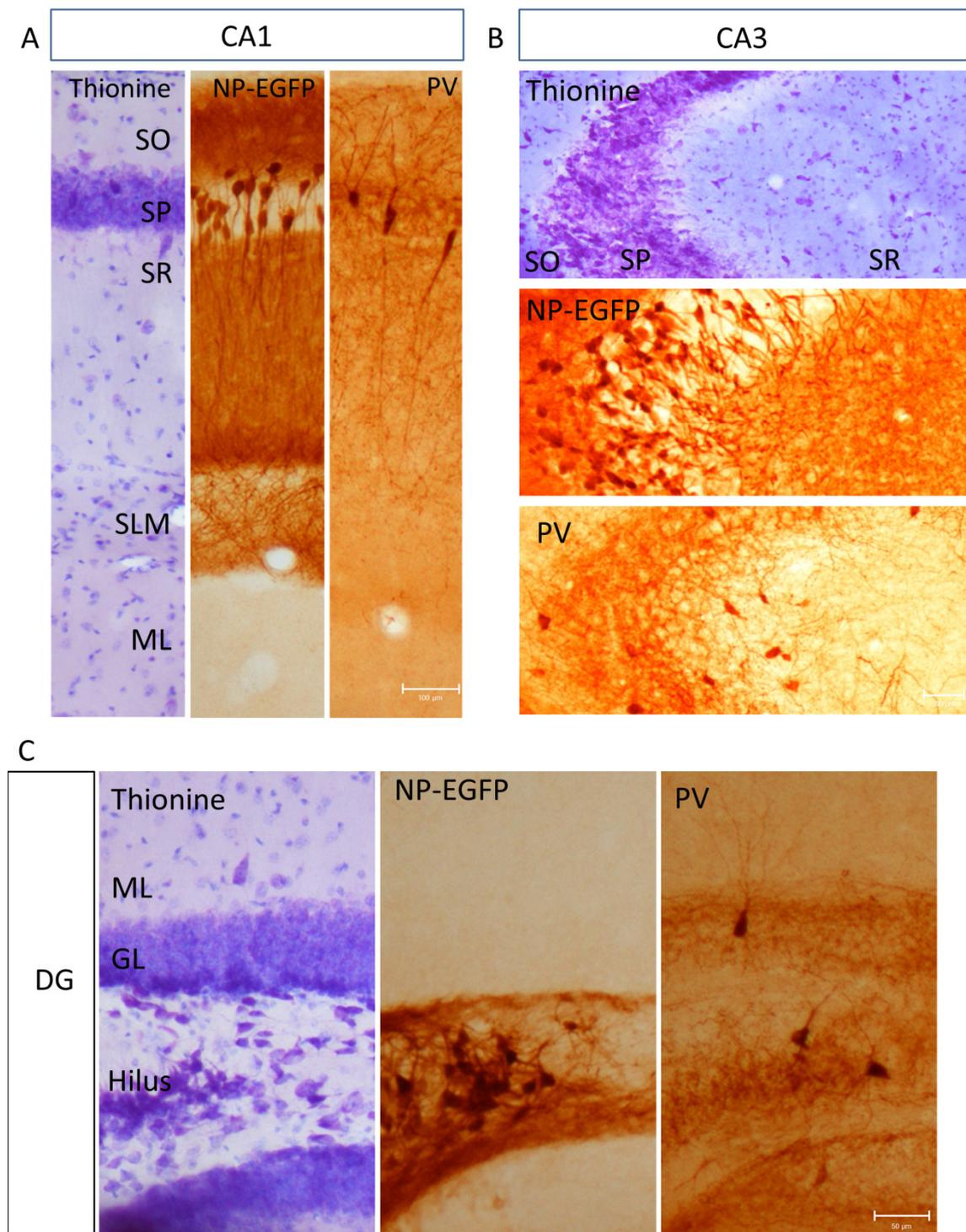


図 19 海馬 CA1 領域、CA3 領域と歯状回における興奮性錐体細胞とパルブアルブミン陽性細胞の分布

チオニン染色、ニッスル小体（粗面小胞体とリボソーム）を染色する。NP-EGFP はゴルジ様に興奮性神経細胞に発現する。パルブアルブミン染色、パルブアルブミン陽性抑制性神経細胞を示す (A-C)。スケールバーは 100 μm、50 μm、50 μm を示す。

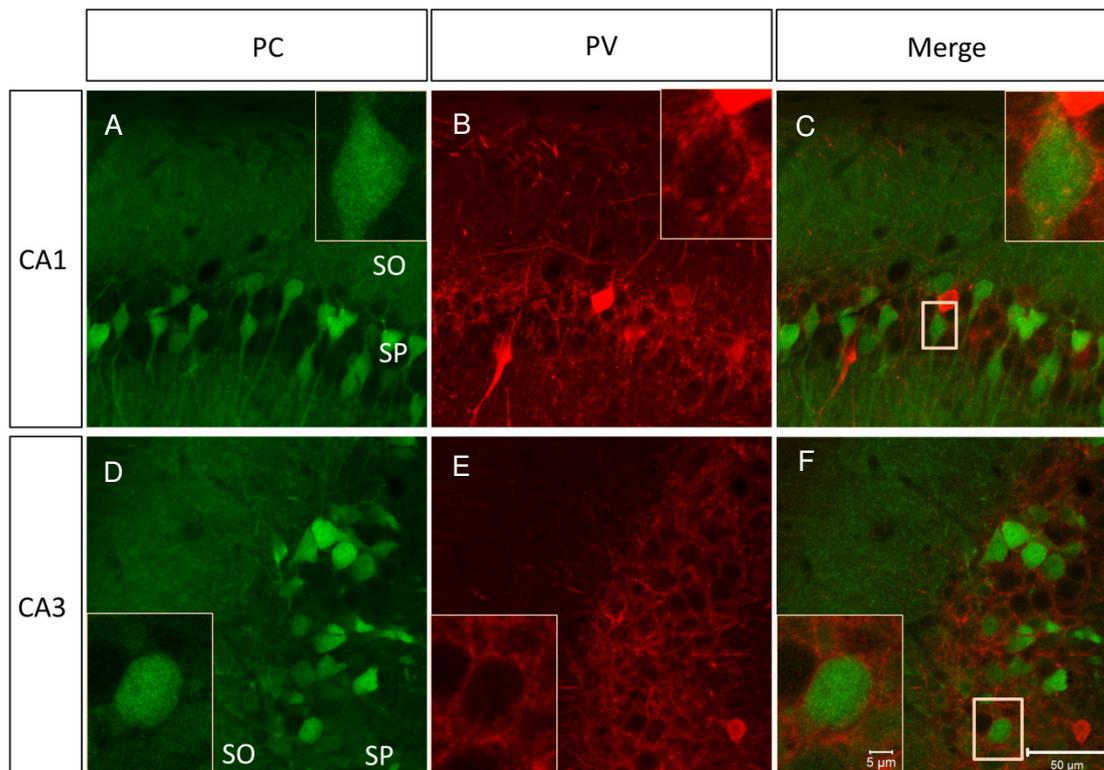


図 20 パルブアルブミン陽性細胞はゴルジ様 NP-EGFP 発現興奮性細胞を取り囲む  
 NP-EGFP 発現細胞はゴルジ様に興奮性錐体細胞に観察された。NP-EGFP 発現細胞はパルブアルブミン陽性繊維に取り囲まれている(差し込み図、白枠を拡大したもの)。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

## 謝辞

本博士論文は、筆者が奈良先端大学科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科の博士後期課程在学中に神経機能科学研究室で行った研究をまとめたものである。

本研究に関しては熱心にご指導ご鞭撻を頂きました本学 塩坂貞夫教授に心より感謝いたします。また、本論文を精読頂きました本学 別所康全教授、稲垣直之准教授に深謝いたします。

本研究にあたって、実験の指導とアドバイスを頂いた前橋工科大学 石川保幸准教授、星薬科大学 田村英紀博士に感謝いたします。実験に必要な VGAT 抗体を提供して頂いた琉球大学 高山千利教授およびアドバイスなどを頂きました清水千草博士に感謝いたします。

1章で用いたルシファーイエローインジェクションの実験は、本学 物質創成科学研究科 太田淳教授の研究室の徳田崇准教授に実験装置を使用させて頂き感謝いたします。

本論文の推敲や実験に関するアドバイスや実験の補助などを親身にして頂いた本学の助教である中澤瞳博士に感謝いたします。本研究に対してアドバイスや実験の補助をして頂き、研究生活を一緒に過ごした金河大さんに感謝いたします。実験のアドバイスや研究に必要な事務的な仕事して頂いた俵佳江さんと秘書の高尾布由子さんに感謝いたします。また、本論文に対して有益な助言をして頂いた本研究室 廣芝和之君に感謝いたします。

本研究に対して、様々なアドバイスや議論をして頂いた方々へ感謝したいと思います。

研究を続ける上で支えて下さり、研究生活を共に過ごして頂いた本学で公私ともに交流があった方々、研究室の職員、先輩、同期、後輩のみなさんに感謝いたします。特に、研究生活を過ごす上でお世話になった大阪大学 中村雪子博士、星薬科大学 田村英紀博士、上島恒平君、増永あずささんにお礼申し上げます。

最後になりましたが、学生生活を続ける上で様々な支援をして下さった両親に深く感謝いたします。

## 参考文献

- Abel, T., Nguyen, P. V, Barad, M., Deuel, T.A., Kandel, E.R., and Bourtchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88, 615–626.
- Agarwal, A., Zhang, M., Trembak-Duff, I., Unterbarnscheidt, T., Radyushkin, K., Dibaj, P., Martins de Souza, D., Boretius, S., Brzózka, M.M., Steffens, H., et al. (2014). Dysregulated Expression of Neuregulin-1 by Cortical Pyramidal Neurons Disrupts Synaptic Plasticity. *Cell Rep.* 8, 1130–1145.
- Ammassari-Teule, M., Restivo, L., Pietteur, V., and Passino, E. (2001). Learning about the context in genetically-defined mice. *Behav. Brain Res.* 125, 195–204.
- Annese, J., Schenker-Ahmed, N.M., Bartsch, H., Maechler, P., Sheh, C., Thomas, N., Kayano, J., Ghatan, A., Bresler, N., Frosch, M.P., et al. (2014). Postmortem examination of patient H.M.'s brain based on histological sectioning and digital 3D reconstruction. *Nat Commun* 5.
- Arida, R.M., Scorza, C.A., da, A. V, and Scorza..., F.A. (2004). Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci.* ....
- Arida, R.M., Scorza, C.A., Scorza, F.A., Gomes da Silva, S., da Graça Naffah-Mazzacoratti, M., and Cavalheiro, E.A. (2007). Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 814–822.
- Bean, J.C., Lin, T.W., Sathyamurthy, A., Liu, F., Yin, D.-M., Xiong, W.-C., and Mei, L. (2014). Genetic Labeling Reveals Novel Cellular Targets of Schizophrenia Susceptibility Gene: Distribution of GABA and Non-GABA ErbB4-Positive Cells in Adult Mouse Brain. *J. Neurosci.* 34, 13549–13566.
- Bekinschtein, P., Oomen, C.A., and Saksida..., L.M. (2011). Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Semin. Cell* ....
- 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.

- Bloodgood, B.L., Sharma, N., Browne, H.A., Trepman, A.Z., and Greenberg, M.E. (2013). The activity-dependent transcription factor NPAS4 regulates domain-specific inhibition. *Nature*.
- Buhl, E.H., Halasy, K., and Somogyi, P. (1994). Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* *368*, 823–828.
- Buonanno, A. (2010). The neuregulin signaling pathway and schizophrenia: from genes to synapses and neural circuits. *TL - 83. Brain Res. Bull.* *83 VN - r*, 122–131.
- Calverley, R.K.S., and Jones, D.G. (1990). Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res. Rev.* *15*, 215–249.
- Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H.H., and Moore, C.I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *TL - 459. Nature* *459 VN -*, 663–667.
- Chaudhry, F.A., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Danbolt, N.C., Osen, K.K., Edwards, R.H., and Storm-Mathisen, J. (1998). The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J. Neurosci.* *18*, 9733–9750.
- Chen, Y.-J., Zhang, M., Yin, D.-M., Wen, L., Ting, A., Wang, P., Lu, Y.-S., Zhu, X.-H., Li, S.-J., Wu, C.-Y., et al. (2010). ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 21818–21823.
- Chen, Z.L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., and Kiyama, H. (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J. Neurosci.* *15*, 5088–5097.
- Conrad, C.D., Galea, L.A.M., Kuroda, Y., and McEwen, B.S. (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine treatment. *Behav. Neurosci.* *110*, 1321–1334.
- Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci* *3*, 153–160.
- Curley, A.A., and Lewis, D.A. (2012). Cortical basket cell dysfunction in schizophrenia. *J. Physiol.* *590*, 715–724.
- D'Hooge, R., and De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* *36*, 60–90.

- Donato, F., Rompani, S.B., and Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272–276.
- Engert, F., and Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66–70.
- Fazzari, P., Paternain, A. V., Valiente, M., Pla, R., Luján, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marín, O., and Rico, B. (2010). Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* 464, 1376–1380.
- Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1998). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470.
- Frey, U., Krug, M., Reymann, K.G., and Matthies, H. (1988). Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* 452, 57–65.
- Frey, U., Müller, M., and Kuhl, D. (1996). A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J. Neurosci.* 16, 2057–2063.
- Gomes da Silva, S., Doná, F., da Silva Fernandes, M.J., Scorza, F.A., Cavalheiro, E.A., and Arida, R.M. (2010). Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. *Brain Dev.* 32, 137–142.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E., et al. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425, 917–925.
- Van Harreveld, A., and Fifkova, E. (1975). Swelling of dendritic spines in the fascia dentata after stimulation of the perforant fibers as a mechanism of post-tetanic potentiation. *Exp. Neurol.* 49, 736–749.
- 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.
- Hölscher, C. (1997). Long-term potentiation: A good model for learning and memory? *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 21, 47–68.
- Hölscher, C. (1999). Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *J. Neurosci. Res.* 58, 62–75.

Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C.R., and Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719–729.

Hou, X.-J., Ni, K.-M., Yang, J.-M., and Li, X.-M. (2014). Neuregulin 1/ErbB4 enhances synchronized oscillations of prefrontal cortex neurons via inhibitory synapses. *Neuroscience* 261, 107–117.

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.* 93, 8699–8704.

Ishikawa, Y., Horii, Y., Tamura, H., and Shiosaka, S. (2008). Neuropsin (KLK8)-dependent and -independent synaptic tagging in the Schaffer-collateral pathway of mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 28, 843–849.

Izumi, A., Iijima, Y., Noguchi, H., Numakawa, T., Okada, T., Hori, H., Kato, T., Tatsumi, M., Kosuga, A., Kamijima, K., et al. (2008). Genetic variations of human neuropsin gene and psychiatric disorders: polymorphism screening and possible association with bipolar disorder and cognitive functions. *Neuropsychopharmacology* 33, 3237–3245.

Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321, 53–57.

Klausberger, T., Roberts, J.D., and Somogyi, P. (2002). Cell type- and input-specific differences in the number and subtypes of synaptic GABA(A) receptors in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 2513–2521.

Klausberger, T., Marton, L.F., O'Neill, J., Huck, J.H.J., Dalezios, Y., Fuentealba, P., Suen, W.Y., Papp, E., Kaneko, T., Watanabe, M., et al. (2005). Complementary roles of cholecystinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J. Neurosci.* 25, 9782–9793.

Köhler, S., Black, S.E., Sinden, M., Szekely, C., Kidron, D., Parker, J.L., Foster, J.K., Moscovitch, M., Winocour, G., Szalai, J.P., et al. (1998). Memory impairments associated with hippocampal versus parahippocampal-gyrus atrophy: an MR volumetry study in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 36, 901–914.

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.

Konradi, C., Yang, C.K., Zimmerman, E.I., Lohmann, K.M., Gresch, P., Pantazopoulos, H., Berretta, S., and Heckers, S. (2011). Hippocampal interneurons are abnormal in schizophrenia. *TL - 131. Schizophr. Res.* *131 VN -*, 165–173.

Leggio, M.G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F., and Petrosini, L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav. Brain Res.* *163*, 78–90.

Lewis, D.A., Curley, A.A., Glausier, J.R., and Volk, D.W. (2012). Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci.* *35*, 57–67.

Li, B., Woo, R.-S.S., Mei, L., and Malinow, R. (2007). The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *TL - 54. Neuron* *54 VN - r*, 583–597.

Libon, D.J., Bogdanoff, B., Cloud, B.S., Skalina, S., Giovannetti, T., Gitlin, H.L., and Bonavita, J. (1998). Declarative and procedural learning, quantitative measures of the hippocampus, and subcortical white alterations in Alzheimer's disease and ischaemic vascular dementia. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* *20*, 30–41.

Light, G.A., Hsu, J.L., Hsieh, M.H., Meyer-Gomes, K., Sprock, J., Swerdlow, N.R., and Braff, D.L. (2006). Gamma band oscillations reveal neural network cortical coherence dysfunction in schizophrenia patients. *Biol. Psychiatry* *60*, 1231–1240.

Loeb, J.A., Khurana, T.S., Robbins, J.T., Yee, A.G., and Fischbach, G.D. (1999). Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development. *Development* *126*, 781–791.

Malenka, R.C. (1999). Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? *Science* (80- ). *285*, 1870–1874.

Marballi, K., Cruz, D., Thompson, P., and Walss-Bass, C. (2012). Differential neuregulin 1 cleavage in the prefrontal cortex and hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder: preliminary findings. *TL - 7. PLoS One* *7 VN - re*.

Marty, S., Wehrlé, R., and Sotelo, C. (2000). Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus. *TL - 20. J. Neurosci.* *20 VN - r*, 8087–8095.

- Matsumoto-Miyai, K., Sokolowska, E., Zurlinden, A., Gee, C.E., Lüscher, D., Hettwer, S., Wölfel, J., Ladner, A.P., Ster, J., Gerber, U., et al. (2009). Coincident pre- and postsynaptic activation induces dendritic filopodia via neurotrypsin-dependent agrin cleavage. *TL - 136. Cell 136 VN -*, 1161–1171.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature 429*, 761–766.
- Mayford, M., Siegelbaum, S.A., and Kandel, E.R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4*, a005751–.
- Michaluk, P., Kolodziej, L., Mioduszevska, B., Wilczynski, G.M., Dzwonek, J., Jaworski, J., Gorecki, D.C., Ottersen, O.P., and Kaczmarek, L. (2007). Beta-dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *TL - 282. J. Biol. Chem. 282 VN -*, 16036–16041.
- Molinari, F., Rio, M., Meskenaite, V., Encha-Razavi, F., Augé, J., Bacq, D., Briault, S., Vekemans, M., Munnich, A., Attié-Bitach, T., et al. (2002). Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science 298*, 1779–1781.
- 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.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods 11*, 47–60.
- Muller, R.U., Kubie, J.L., and Ranck, J.B. (1987). Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *J. Neurosci. 7*, 1935–1950.
- Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., and Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron 44*, 759–767.
- Nagy, V., Bozdagi, O., Matynia, A., Balcerzyk, M., Okulski, P., Dzwonek, J., Costa, R.M., Silva, A.J., Kaczmarek, L., and Huntley, G.W. (2006). Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Hippocampal Late-Phase Long-Term Potentiation and Memory. *J. Neurosci. 26*, 1923–1934.
- Nakamura, Y., Tamura, H., Horinouchi, K., and Shiosaka, S. (2006). Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *J. Cell Sci. 119*, 1341–1349.
- Neddens, J., and Buonanno, A. (2010). Selective populations of hippocampal interneurons express ErbB4 and their number and distribution is altered in ErbB4 knockout mice. *Hippocampus 20*, 724–744.

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaill, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D., and Buisson, A. (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* 7, 59–64.

Nieto-Gonzalez, J.L., and Jensen, K. (2013). BDNF Depresses Excitability of Parvalbumin-Positive Interneurons through an M-Like Current in Rat Dentate Gyrus. *PLoS One* 8, e67318.

Norris, E.H., and Strickland, S. (2007). Modulation of NR2B-regulated contextual fear in the hippocampus by the tissue plasminogen activator system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13473–13478.

O'Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.

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, 116–120.

Okamoto, K.I., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.*

Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491.

Paul, C.-M., Magda, G., and Abel, S. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav. Brain Res.* 203, 151–164.

Pawlak, R., Melchor, J.P., Matys, T., Skrzypiec, A.E., and Strickland, S. (2005). Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 443–448.

Pei, J.-C., Liu, C.-M., and Lai, W.-S. (2014). Distinct phenotypes of new transmembrane-domain neuregulin 1 mutant mice and the rescue effects of valproate on the observed schizophrenia-related cognitive deficits. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 126.

Pieraut, S., Gounko, N., Sando, R., Dang, W., Rebboah, E., Panda, S., Madisen, L., Zeng, H., and Maximov, A. (2014). Experience-dependent remodeling of basket cell networks in the dentate gyrus. *Neuron* 84 VN - r, 107–122.

Del Pino, I., García-Frigola, C., Dehorter, N., Brotons-Mas, J.R., Alvarez-Salvado, E., Martínez de Lagrán, M., Ciceri, G., Gabaldón, M.V., Moratal, D., Dierssen, M., et al. (2013). *ErbB4* deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. *Neuron* 79, 1152–1168.

Popov, V.I., Davies, H.A., Rogachevsky, V. V., Patrushev, I. V., Errington, M.L., Gabbott, P.L.A., Bliss, T.V.P., and Stewart, M.G. (2004). Remodelling of synaptic morphology but unchanged synaptic density during late phase long-term potentiation (LTP): a serial section electron micrograph study in the dentate gyrus in the anaesthetised rat. *Neuroscience* 128, 251–262.

Reif, R., Sales, S., Hettwer, S., Dreier, B., Gisler, C., Wölfel, J., Lüscher, D., Zurlinden, A., Stephan, A., Ahmed, S., et al. (2007). Specific cleavage of agrin by neurotrypsin, a synaptic protease linked to mental retardation. *FASEB J.* 21, 3468–3478.

Role, L.W., and Talmage, D.A. (2007). Neurobiology: new order for thought disorders. *Nature* 448, 263–265.

De Roo, M., Klauser, P., and Muller, D. (2008). LTP promotes a selective long-term stabilization and clustering of dendritic spines. *PLoS Biol.* 6 *VN* - re.

Scharf, M.T., Woo, N.H., Lattal, K.M., Young, J.Z., Nguyen, P. V., and Abel, T. (2002). Protein Synthesis Is Required for the Enhancement of Long-Term Potentiation and Long-Term Memory by Spaced Training. *J Neurophysiol* 87, 2770–2777.

SCOVILLE, W.B., and MILNER, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.

Shi, S.-H., Hayashi, Y., Esteban, J.A., and Malinow, R. (2001). Subunit-Specific Rules Governing AMPA Receptor Trafficking to Synapses in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Cell* 105, 331–343.

Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459 *VN* - , 698–702.

Squire, L.R. (1986). Mechanisms of memory. *Science* 232, 1612–1619.

Squire, L.R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron* 61, 6–9.

Squire, L.R., and Zola, S.M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13515–13522.

- Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J.-I., Obata, K., and Kaneko, T. (2003). Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* *467*, 60–79.
- Tamás, G., Buhl, E.H., and Somogyi, P. (1997). Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J. Physiol.* *500 ( Pt 3)*, 715–738.
- Tamás, G., Buhl, E.H., Lörincz, A., and Somogyi, P. (2000). Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat. Neurosci.*
- Tamura, H., Ishikawa, Y., Hino, N., Maeda, M., Yoshida, S., Kaku, S., and Shiosaka, S. (2006). Neuropilin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus in vivo. *J. Physiol.* *570*, 541–551.
- Tamura, H., Kawata, M., Hamaguchi, S., Ishikawa, Y., and Shiosaka, S. (2012). Processing of Neuregulin-1 by Neuropilin Regulates GABAergic Neuron to Control Neural Plasticity of the Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* *32*, 12657–12672.
- Tan, G.-H.H., Liu, Y.-Y.Y., Hu, X.-L.L., Yin, D.-M.M., Mei, L., and Xiong, Z.-Q.Q. (2012). Neuregulin 1 represses limbic epileptogenesis through ErbB4 in parvalbumin-expressing interneurons. *Nat. Neurosci.* *15 VN - r*, 258–266.
- Tian, L., Stefanidakis, M., Ning, L., Van Lint, P., Nyman-Huttunen, H., Libert, C., Itohara, S., Mishina, M., Rauvala, H., and Gahmberg, C.G. (2007). Activation of NMDA receptors promotes dendritic spine development through MMP-mediated ICAM-5 cleavage. *J. Cell Biol.* *178 VN -*, 687–700.
- De Toledo-Morrell, L., Dickerson, B., Sullivan, M.P., Spanovic, C., Wilson, R., and Bennett, D.A. (2000). Hemispheric differences in hippocampal volume predict verbal and spatial memory performance in patients with Alzheimer's disease. *Hippocampus* *10*, 136–142.
- Tukker, J.J., Fuentealba, P., Hartwich, K., Somogyi, P., and Klausberger, T. (2007). Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo. *J. Neurosci.* *27 VN - r*, 8184–8189.
- Van, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev.* ....
- Volman, V., Behrens, M.M., and Sejnowski, T.J. (2011). Downregulation of parvalbumin at cortical GABA synapses reduces network gamma oscillatory activity. *J. Neurosci.* *31*, 18137–18148.

Vullhorst, D., Neddens, J., Karavanova, I., Tricoire, L., Petralia, R.S., McBain, C.J., and Buonanno, A. (2009). Selective expression of ErbB4 in interneurons, but not pyramidal cells, of the rodent hippocampus. *J. Neurosci.* *29*, 12255–12264.

Wang, N., Zhang, G.-F., Liu, X.-Y., Sun, H.-L., Wang, X.-M., Qiu, L.-L., Yang, C., and Yang, J.-J. (2014). Downregulation of Neuregulin 1-ErbB4 Signaling in Parvalbumin Interneurons in the Rat Brain May Contribute to the Antidepressant Properties of Ketamine. *J. Mol. Neurosci.* *54*, 211–218.

Wen, L., Lu, Y.-S.S., Zhu, X.-H.H., Li, X.-M.M., Woo, R.-S.S., Chen, Y.-J.J., Yin, D.-M.M., Lai, C., Terry, A. V., Vazdarjanova, A., et al. (2010). Neuregulin 1 regulates pyramidal neuron activity via ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons. *TL - 107. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107 VN -*, 1211–1216.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., and Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *TL - 313. Science* *313 VN -*, 1093–1097.

Wood, E.R., Dudchenko, P.A., and Eichenbaum, H. (1999). The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* *397*, 613–616.

Yamamoto, J., Suh, J., Takeuchi, D., and Tonegawa, S. (2014). Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. *TL - 157. Cell* *157 VN -*, 845–857.

Yau, H.-J., Wang, H.-F., Lai, C., and Liu, F.-C. (2003). Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences *TL - 13. Cereb. Cortex* *13 VN - r*, 252–264.

Yin, D.-M.M., Sun, X.-D.D., Bean, J.C., Lin, T.W., Sathyamurthy, A., Xiong, W.-C.C., Gao, T.-M.M., Chen, Y.-J.J., and Mei, L. (2013). Regulation of spine formation by ErbB4 in PV-positive interneurons. *TL - 33. J. Neurosci.* *33 VN - r*, 19295–19303.

Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *TL - 24. Annu. Rev. Neurosci.* *24 VN - r*, 1071–1089.

Zhang, Z.J., and Reynolds, G.P. (2002). A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *TL - 55. Schizophr. Res.* *55 VN - r*, 1–10.

Zhang, Y.-P., Holbro, N., and Oertner, T.G. (2008). Optical induction of plasticity at single synapses reveals input-specific accumulation of CaMKII *TL - 105. Proc. Natl. Acad. Sci.* *105 VN -*, 12039–12044.

Zheng, K., An, J.J., Yang, F., Xu, W., Xu, Z.-Q.D., Wu, J., Hökfelt, T.G.M., Fisahn, A., Xu, B., and Lu, B. (2011). TrkB signaling in parvalbumin-positive interneurons is critical for gamma-band network synchronization in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17201–17206.

Zhou, Q., Homma, K.J., and Poo, M.M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* *44*, 749–757.

Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. (2006). *The Hippocampus Book* (Oxford University Press). 13

小暮 洋子 豊かな環境が及ぼすマウス海馬ニューロプシン発現変化 2009

堀井 陽一郎 ニューロプシン遺伝子欠損マウスの行動学的解析 2008