

脳グリア細胞のアポトーシスとその制御

田熊一敬

神戸学院大学薬学部, 〒651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬 518

Delayed Apoptosis and Its Regulation in Astrocytes

Kazuhiro TAKUMA

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University,
518 Arise, Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe 651-2180, Japan*

(Received May 17, 2001)

Astrocytes, the most abundant glial cell type in the brain, are considered to have physiological and pathological roles in neuronal activities. We found that reperfusion of cultured astrocytes after Ca^{2+} depletion causes Ca^{2+} overload followed by delayed cell death and the Na^+ - Ca^{2+} exchanger in the reverse mode is responsible for this Ca^{2+} -mediated cell injury (Ca^{2+} paradox injury). The Ca^{2+} paradox injury of cultured astrocytes is considered to be an *in vitro* model of ischemia/reperfusion injury, since a similar paradoxical change in extracellular Ca^{2+} concentration is reported in ischemic brain tissue. This review summarizes the mechanisms underlying the Ca^{2+} -mediated injury of astrocytes and the protective effects of drugs against Ca^{2+} reperfusion injury. This study shows that Ca^{2+} reperfusion injury of astrocytes is accompanied by apoptosis as evidenced by DNA fragmentation and nuclear condensation. Calpain, reactive oxygen species, calcineurin, caspase-3, and NF- κ B are involved in Ca^{2+} reperfusion-induced delayed apoptosis of astrocytes. Several drugs including CV-2619, T-588 and ibudilast protect astrocytes against the delayed apoptosis. CV-2619 prevents astrocytes from the delayed apoptosis by production of nerve growth factor, resulting in an activation of mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase signal pathways. The protective effect of T-588 is mainly mediated by an activation of MAP/ERK signal cascade. Moreover, ibudilast prevents the Ca^{2+} reperfusion-induced delayed apoptosis of astrocytes via cyclic GMP signaling pathway. Further studies in this system will contribute to the development of new drugs that attenuate ischemia/reperfusion injury via modulation of astrocytes.

Key words—reperfusion injury; apoptosis; MAP kinase; cGMP; astrocyte

1. はじめに

脳グリア細胞の中で最も多いアストロサイトは、種々の神経栄養因子、神経生存因子を産生し、かつ多くの神経伝達物質・調節物質の受容体を発現している。本細胞は、神経細胞の支持細胞としてだけでなく、神経細胞との積極的な相互作用を通して神経細胞の生存・維持に関わっており、脳虚血、脳傷害時には本細胞が反応性アストロサイトとなり、病態の発現・修復に重要な役割を演じていると考えられている。^{1,2)} 筆者らは、本細胞に Na^+ - Ca^{2+} 交換系 (NCX) が存在することを明らかにし、その病態的意義に関する研究において、 Ca^{2+} パラドックス負荷によりアポトーシスを伴う遅発性細胞死が発現することを示した。³⁻⁷⁾ Ca^{2+} パラドックスと同様の細胞外 Ca^{2+} 濃度変化が脳虚血—再灌流時に見られる

ことより、⁸⁻¹⁰⁾ アストロサイトの本障害は、虚血—再灌流障害のメカニズムを追及するうえで有用なモデル系であると考えられる。本稿では、アストロサイトの Ca^{2+} パラドックス負荷によるアポトーシスに関する筆者らの成績を紹介し、そのシグナル制御機構について脳機能改善薬の標的分子としての観点より考察する。

2. アストロサイトの Ca^{2+} パラドックス障害

生体の組織はすべて、血液より供給される酸素及びグルコースを用いてエネルギー代謝を行っており、血液供給がなくなると急速に機能障害に陥る。したがって、脳虚血、心虚血など虚血性疾患の治療は発症後、可及的早期に血流を再灌流させることが重要であると考えられている。一方で、一定以上虚血状態が持続すると、再灌流によりかえって障害が

増強されるいわゆるパラドックス障害が認められる。この原因の1つとして細胞内外の Ca^{2+} 濃度変化が提唱されており、組織あるいは細胞を低 Ca^{2+} 溶液に短時間曝露後 Ca^{2+} を含む溶液でインキュベートすると細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加、乳酸脱水素酵素の遊離、ATP 含量の低下等の障害が起こることが知られている。この現象は一般に Ca^{2+} パラドックス障害と呼ばれており、心筋、平滑筋細胞において詳細な研究が行われている。^{11,12)} 中枢神経系においても同様の現象が報告されているが、その細胞由来など詳細については不明であった。筆者らは、本現象が中枢神経系においてはアストロサイトに選択的であることを示した。すなわち、培養ラットアストロサイトでは低 Ca^{2+} 溶液に短時間曝露後 Ca^{2+} を含む溶液でインキュベートすると細胞死が認められるが、培養ラット大脳皮質神経細胞では細胞死は見られない。この Ca^{2+} パラドックス障害の細胞特異性は株化細胞での研究においても認められている。¹³⁾ また筆者らは、NCX 阻害薬、アンチセンスを用いた実験より、NCX の逆モードを介する Ca^{2+} 過流入が本障害のトリガーになっていることを、細胞内 Ca^{2+} を動員させるタブシガルギンも同様の障害を発現することを示した。これらのことは、本障害が細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加に伴う Ca^{2+} 依存性の反応によって引き起こされることを示す。

虚血一再灌流モデル動物や培養神経細胞でのグルタミン酸毒性などにおいて活性酸素の産生が報告され、虚血障害発現における活性酸素の重要性が考えられている。¹⁴⁻¹⁸⁾ 筆者らは、 Ca^{2+} パラドックス負荷によりアストロサイトで活性酸素の1つである過酸化水素の産生が増加することを認めた。実際、アストロサイトを過酸化水素に短時間曝露後正常溶液でインキュベートすると、 Ca^{2+} パラドックス負荷の場合と同様の遅発性細胞死が見られる。 Ca^{2+} パラドックス負荷による過酸化水素の産生並びに細胞障害は、NCX 阻害薬、細胞内 Ca^{2+} キレーター BAPTA-AM、カルパイン阻害薬、キサンチンオキシダーゼ阻害薬、グルタチオン、カタラーゼにより抑制されるが、逆にキサンチンや細胞内グルタチオンを減少させる薬物により増大する。すなわち、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加により Ca^{2+} 依存性プロテアーゼであるカルパインが活性化とそれに引き続くキサンチンオキシダーゼの活性化が引き起こされ、

過酸化水素の産生増加と遅発性細胞死が起こると推測される。他の細胞系において、細胞内で病的に生じた過酸化水素は、スーパーオキシドアニオンあるいは鉄イオンの触媒のもとヒドロキシルラジカルに変換され、障害発現に寄与することが報告されている。¹⁹⁾ 筆者らは、 Ca^{2+} パラドックス負荷あるいは過酸化水素曝露による遅発性細胞死が、鉄イオンキレーターである 1,10-フェナントロリン及びデフェロキサミンにより抑制されることを認めた。これらの成績は、障害発現におけるカルパイン、活性酸素、鉄イオンの重要性を支持する。²⁰⁻²²⁾

活性酸素の下流シグナルとして NF- κ B の活性化が考えられる。²³⁾ 筆者らは、 Ca^{2+} パラドックス負荷あるいは過酸化水素曝露がアストロサイトの NF- κ B の活性化を引き起こすこと、この NF- κ B の活性化が NF- κ B 阻害薬ピロリジンカルボジチオ酸及び 1,10-フェナントロリンにより抑制されることを認めた。近年 NF- κ B は、細胞死シグナルとして²⁴⁻²⁸⁾ あるいは生存シグナルとして²⁹⁻³¹⁾ 機能するという相反する役割が報告されているが、アストロサイトの Ca^{2+} パラドックス障害発現においては NF- κ B 活性化は細胞死シグナルとして重要な役割を演じていると考えられる。さらに、過酸化水素曝露による NF- κ B の活性化並びに遅発性細胞死は、 Ca^{2+} 依存性蛋白脱リン酸化酵素カルシニューリンの阻害薬 FK506 及び熱ショック蛋白によっても抑制され、NF- κ B 活性化制御におけるこれらの因子の薬理学的重要性が考えられる。

3. アストロサイトのアポトーシス

アポトーシスの定義は、細胞の縮小、クロマチンの凝縮、核の断片化などの形態学的変化と生化学的な特徴であるクロマチン DNA のヌクレオソーム単位での断片化とされている。³²⁻³⁴⁾ この DNA の断片化が、アポトーシスの形態学的特徴であるクロマチンの凝縮と核の断片化のトリガーになっていると考えられている。DNA の断片化は、まず 50~200 kbp の巨大断片に切断された後、ヌクレオソーム単位での切断が起こるという2段階で進行する。^{35,36)} 過酸化水素に短時間曝露後正常溶液でインキュベートしたアストロサイトの DNA をアガロース電気泳動及びバイアス正弦電場ゲル電気泳動で解析すると、過酸化水素曝露 36 時間後に約 50 kbp の巨大断片が、3 日目以降に約 180 bp ピッチの DNA ラダー

が見られる。また、ヘキスト 33342 染色による形態解析においてクロマチンの凝縮が観察される。Ca²⁺ パラドックス負荷においても同様の生化学的及び形態学的変化が認められる。これらの成績は、Ca²⁺ パラドックス負荷によるアストロサイトの細胞死にアポトーシスが関与することを示す。

アポトーシスの実行過程において、カスパーゼファミリーと総称される一群のシステインプロテアーゼの連鎖的な活性化が重要な役割を演じていることが知られており、ヒト、マウスでは現在までに 14 種類のカスパーゼが報告されている。^{37,38)} 筆者らは、過酸化水素に短時間曝露後正常溶液でインキュベートしたアストロサイトにおいてカスパーゼ 3 活性が増加すること、カスパーゼ 3 阻害薬が Ca²⁺ パラドックス負荷あるいは過酸化水素曝露による DNA 断片化を用量依存的に抑制することを認めた。このカスパーゼ活性化に先行してミトコンドリアからのチトクロム c 遊離が観察されることより、活性酸素の産生増大によりアストロサイトがアポトーシスに至る経路においては、チトクロム c 遊離を介するカスパーゼ 3 の活性化が特に重要な役割を演じていることが考えられる。Figure 1 は、我々の

成績よりまとめたアストロサイトの Ca²⁺ パラドックス障害におけるアポトーシス発現メカニズムに関する仮説を示す。

4. アストロサイトのアポトーシスの制御

アストロサイト Ca²⁺ パラドックス障害におけるアポトーシス誘導のシグナルカスケードは、障害保護の標的となりうる。上述のように、実際、NCX、カルパイン、カルシニューリン、カタラーゼ、NF-κB、カスパーゼ等の阻害薬は保護作用を示す。^{4,7,39-41)} また、本障害は熱ショック蛋白質 (HSP) の発現により抑制される。⁴²⁾ さらに、本障害は神経成長因子 (NGF) あるいは種々の脳機能改善薬 (CV-2619, T-588, イブジラスト, インデロキサジン, メクロフェノキサート, ビフェメラン, ネブラセタム) によっても保護される。⁴³⁻⁴⁵⁾ 本障害の発現がいくつかの過程より成っていることより、これらの薬物の作用機序は多様であると思われる。

一方、神経細胞において、アポトーシスが細胞死シグナル系と生存シグナル系との伝達バランスによって決定されることが報告されている。⁴⁶⁻⁴⁹⁾ アストロサイト Ca²⁺ パラドックス障害においても同様の機構が存在することが考えられるが、その詳細に

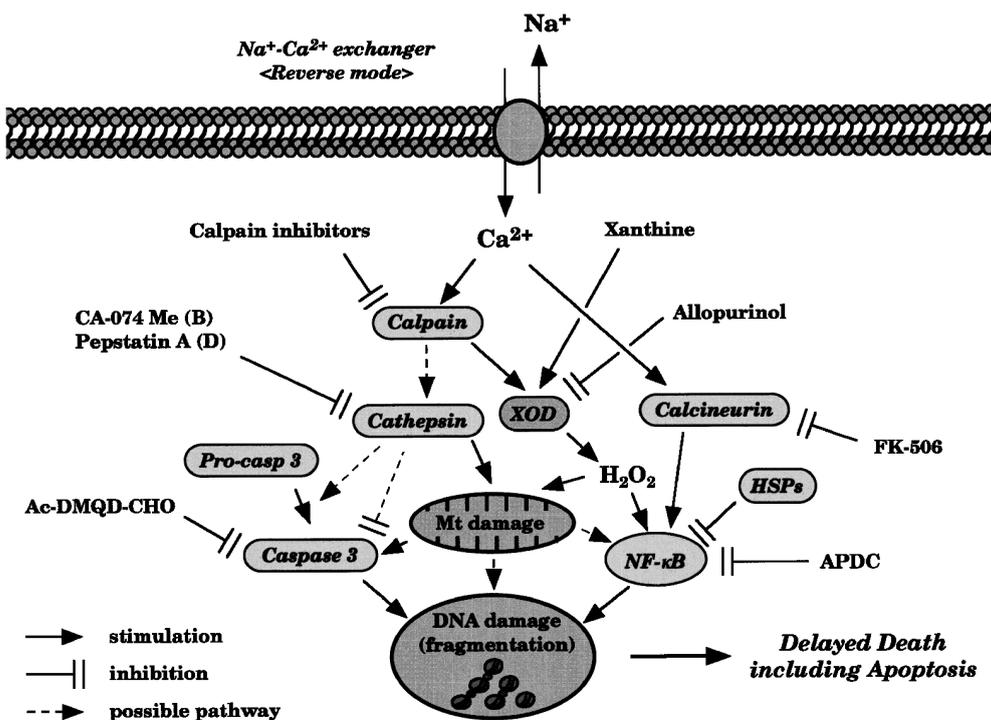


Fig. 1. Signal Cascade of Ca²⁺ Paradox-Induced Apoptosis in Cultured Rat Astrocytes

XOD: xanthine oxidase, H₂O₂: hydrogen peroxide, HSPs: heat shock proteins, Pro-casp 3: pro-caspase 3, NF-κB: nuclear factor κB, APDC: ammonium pyrrolidinedithiocarbamate, Ac-DMQD-CHO: acetyl-L-aspartyl-L-methionyl-L-glutaminy-L-aspart-L-aldehyde.

については不明である。筆者らは、生存シグナル系の促進という観点より、CV-2619, T-588 及びイブジラストの作用機序について検討を行った。Figure 2 は、我々の成績よりまとめた CV-2619 及び T-588 の作用メカニズムに関する仮説を示す。CV-2619 の作用は一般に抗酸化作用が重要と考えられているが、アストロサイトにおいてはその保護作用が NGF 抗体により抑制されることから、NGF 産生増加による NGF 受容体及びその下流シグナルである mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) キナーゼ系及び phosphatidylinositol-3 (PI3) キナーゼ系の増強が重要な役割を演じていると考えられる。実際、NGF はアストロサイト障害に対して保護作用を示し、この作用には MAP/ERK キナーゼ系シグナル及び PI3 キナーゼ系シグナルが関わっている。一方、T-588 の障害保護作用は PI3 キナーゼ阻害薬ウォルトマンニンでは影響を受けず、MEK 阻害薬 PD98059 により抑制されることから、NGF 受容体を介さず ERK を活性化するシグナル系の増強が関わっているものと考えられる。Figure 3 は、イブジラストの作用メカニズムに関する仮説を示す。イブジラストは、プロスタサイクリン増強作用を介した血管拡張

作用及び血小板凝集抑制作用により脳血流を改善し脳機能改善作用を発現すると考えられている。一方、アストロサイトにおいてイブジラストはチトクロム c 遊離抑制作用並びにカスパーゼ 3 活性化抑制作用を示し、本保護作用は、ロイコトリエン D4 拮抗薬及び cAMP 拮抗薬の影響を受けず、G キナーゼ阻害薬により抑制される。他の cGMP-ホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬ジピリダモール、ザプリナスト及び cGMP アナログによっても同様の障害保護効果が見られることから、イブジラストのアポトーシス抑制作用に cGMP-PDE 阻害による cGMP 産生増加及びその下流シグナルである G キナーゼ系の増強が重要な役割を演じていると考えられる。これらの知見は、CV-2619, T-588 及びイブジラストが、生存シグナル系の増強によりアストロサイトの障害発現を抑制することを示す。すなわち、アストロサイトにおいても、アポトーシスの発現とその保護は、細胞死シグナル系と生存シグナル系との伝達バランスにより決定されると考えられる。

5. おわりに

近年、脳虚血、アルツハイマー病及びパーキンソン病などの神経脱落疾患においてアポトーシスが関与することが見いだされ、病態機構の解明並びに新

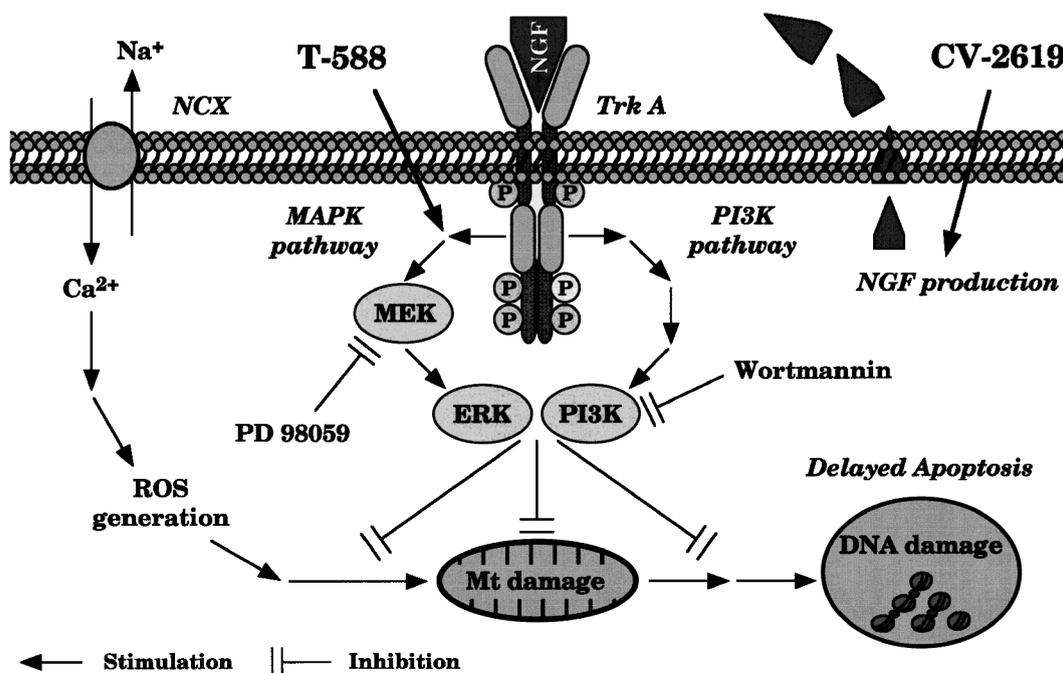


Fig. 2. Possible Mechanisms of the Effects of CV-2619 and T-588 in Cultured Rat Astrocytes

NCX: Na⁺-Ca²⁺ exchanger, ROS: reactive oxygen species, NGF: nerve growth factor, MAPK: mitogen-activated protein kinase, ERK: extracellular signal-regulated kinase, MEK: MAPK/ERK kinase, PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase.

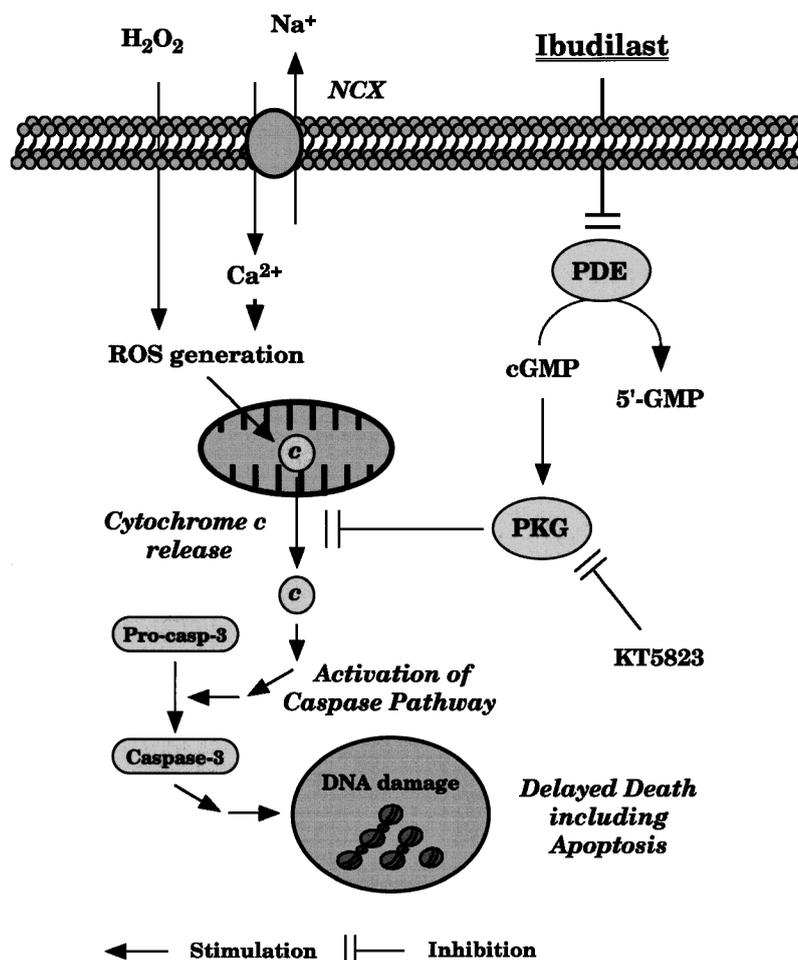


Fig. 3. Possible Mechanisms of the Effect of Ibudilast in Cultured Rat Astrocytes

NCX: Na^+ - Ca^{2+} exchanger, H_2O_2 : hydrogen peroxide, ROS: reactive oxygen species, Pro-casp 3: pro-caspase 3, PDE: phosphodiesterase, cGMP: guanosine-3',5'-cyclic monophosphate, 5'-GMP: guanosine-5'-monophosphate, PKG: protein kinase G.

しい治療法を開発するうえで、中枢神経系のアポトーシスの役割並びにその制御の解明が重要な課題と考えられている。このような背景の中、神経細胞のアポトーシスに関しては既に多くの研究があるが、グリア細胞に関する研究は少ない。筆者らは、脳の主要グリア細胞であるアストロサイトにおいて、*in vivo* 脳虚血—再灌流時に見られる Ca^{2+} パラドックス負荷により遅発性アポトーシスが発現することを認めた。また、本障害は NCX の逆モードによる Ca^{2+} 過流入をトリガーとし、カルパイン、活性酸素、カルシニューリン、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、カスパーゼなどが下流シグナルとして障害発現に関与することを示した。さらに、神経成長因子や脳機能改善薬の多くが本細胞障害に対して保護作用を示すことを認めている。したがって、本障害モデルは、アストロサイトのアポトーシス発現制御機構を明らかにするだけで

なく、脳虚血—再灌流障害の *in vitro* モデル系並びにアストロサイトを標的とする新規脳機能改善薬の *in vitro* スクリーニング系としても評価される。今後、神経細胞との相互作用を含めたアストロサイトアポトーシスの分子機構の解明が必要であり、これらの研究から、脳虚血障害をはじめアルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患に対する新しい治療薬の開発が期待される。

謝辞 本総説で紹介させて頂いた研究成果は、神戸学院大学薬学部薬品分析学教室において得られたものであり、ご協力を賜りました森浩一助教授並びに同研究室の皆様へ厚くお礼申し上げます。また、研究遂行に当たり、多大なご助力を賜りました大阪大学大学院薬学研究科馬場明道教授、同松田敏夫教授、神戸学院大学薬学部李英培助教授に深く感

謝いたします。なお、本研究の一部は文部省科学研究費、上原記念生命科学財団、ひょうご科学創造協会からの研究助成金によるものであり、併せて感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Eddleston M., Mucke L., *Neuroscience*, **54**, 15–36 (1993).
- 2) Montgomery D. L., *Vet. Pathol.*, **31**, 145–167 (1994).
- 3) Takuma K., Matsuda T., Hashimoto H., Asano S., Baba A., *Glia*, **12**, 336–342 (1994).
- 4) Matsuda T., Takuma K., Nishiguchi E., Hashimoto H., Azuma J., Baba A., *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 951–958 (1996).
- 5) Matsuda T., Takuma K., Baba A., *Jpn. J. Pharmacol.*, **74**, 1–20 (1997).
- 6) Matsuda T., Baba A., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **111**, 13–19 (1998).
- 7) Takuma K., Lee E., Kidawara M., Mori K., Kimura Y., Baba A., Matsuda T., *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 4204–4212 (1999).
- 8) Siemkowicz E., Hansen A. J., *Stroke*, **12**, 236–240 (1981).
- 9) Silver I. A., Erecinska M., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **12**, 759–772 (1992).
- 10) Kristian T., Katsura K., Gido G., Siesjo B. K., *Brain Res.*, **641**, 295–302 (1994).
- 11) Chapman R. A., Tunstall J., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **50**, 67–96 (1987).
- 12) Zimmerman A. N. E., Hulsmann W. G., *Nature*, **211**, 646–647 (1966).
- 13) Kim-Lee M. H., Stokes B. T., Yates A. J., *Glia*, **5**, 56–64 (1992).
- 14) Simonson S. G., Zhang J., Canada A. T. Jr., Su Y. F., Benveniste H., Piantadosi C. A., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **13**, 125–134 (1993).
- 15) Lancelot E., Callebert J., Revaud M. L., Boulu R. G., Plotkine M., *Neurosci. Lett.*, **197**, 85–88 (1995).
- 16) Dawson V. L., Dawson T. M., Bartley D. A., Uhl G. R., Snyder S. H., *J. Neurosci.*, **13**, 2651–2661 (1993).
- 17) Hyslop P. A., Zhang Z., Pearson D. V., Phebus L. A., *Brain Res.*, **671**, 181–186 (1995).
- 18) Atlante A., Gagliardi S., Minervini G. M., Ciotti M. T., Marra E., Calissano P., *J. Neurochem.*, **68**, 2038–2045 (1997).
- 19) Halliwell B., *J. Neurochem.*, **59**, 1609–1623 (1992).
- 20) Lee K. S., Frank S., Vanderklish P., Arai A., Lynch G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7233–7237 (1991).
- 21) Cheng Y., Sun A. Y., *Neurochem. Res.*, **19**, 1557–1564 (1994).
- 22) Papadopoulos M. C., Koumenis I. L., Yuan T. Y., Giffard R. G., *Neuroscience*, **82**, 915–925 (1998).
- 23) Flohé L., Brigelius-Flohé R., Saliou C., Traber M. G., Packer L., *Free Radical Biol. Med.*, **22**, 1115–1126 (1997).
- 24) Kessler J. A., Ludlam W. H., Freidin M. M., Hall D. H., Michaelson M. D., Spray D. C., Dougherty M., Batter D. K., *Neuron.*, **11**, 1123–1132 (1993).
- 25) Lin K. I., Lee S. H., Narayanan R., Baraban J. M., Hardwick J. M., Ratan R. R., *J. Cell Biol.*, **131**, 1149–1161 (1995).
- 26) Grilli M., Pizzi M., Memo M., Spano P., *Science*, **274**, 1383–1385 (1996).
- 27) Manna S. K., Zhang H. J., Yan T., Oberley L. W., Aggarwal B. B., *J. Biol. Chem.*, **273**, 13245–13254 (1998).
- 28) Clemens J. A., Stephenson D. T., Yin T., Smalstig E. B., Panetta J. A., Little S. P., *Stroke*, **29**, 677–682 (1998).
- 29) Beg A. A., Baltimore D., *Science*, **274**, 782–784 (1996).
- 30) Van Antwerp D. J., Martin S. J., Verma I. M., Green D. R., *Trends Cell Biol.*, **8**, 107–111 (1998).
- 31) Barger S. W., Horster D., Furukawa K., Goodman Y., Krieglstein J., Mattson M. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 9328–9332 (1995).
- 32) Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R., *Br. J. Cancer*, **26**, 239–257 (1972).
- 33) Wyllie A. H., *Nature*, **284**, 555–556 (1980).
- 34) Cohen J. J., *Immunol. Today*, **14**, 126–130 (1993).
- 35) Tanuma S., “Apoptosis in Normal Development and Cancer,” ed. by Sluysers M., Taylor & Francis, London, 1996, pp. 39–59.
- 36) Brown D. G., Sun X. M., Cohen G. M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 3037–3039 (1993).
- 37) Thornberry N. A., Rano T. A., Peterson E.

- P., Rasper D. M., Timkey T., Garcia Calvo M., Houtzager V. M., Nordstrom P. A., Roy S., Vaillancourt J. P., Chapman K. T., Nicholson D. W., *J. Biol. Chem.*, **272**, 17907–17911 (1997).
- 38) Van de Craen M., Van Loo G., Pype S., Van Crielinge W., Van den Brande I., Molemans F., Fiers W., Declercq W., Vandenabeele P., *Cell Death Differ.*, **5**, 838–846 (1998).
- 39) Matsuda T., Takuma K., Kishida Y., Azuma J., Baba A., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **403**, 491–497 (1996).
- 40) Matsuda T., Takuma K., Asano S., Kishida Y., Nakamura H., Mori K., Maeda S., Baba A., *J. Neurochem.*, **70**, 2004–2011 (1998).
- 41) Matsuda T., Arakawa N., Takuma K., Kishida Y., Kawasaki Y., Sakaue M., Takahashi K., Takahashi T., Suzuki T., Ota T., Hamano-Takahashi A., Onishi M., Tanaka Y., Kameo K., Baba A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (2001), in press.
- 42) Takuma K., Matsuda T., Kishida Y., Asano S., Seong Y. H., Baba A., *Brain Res.*, **735**, 265–270 (1996).
- 43) Takuma K., Fujita T., Kimura Y., Tanabe M., Yamamuro A., Lee E., Mori K., Koyama Y., Baba A., Matsuda T., *Eur. J. Pharmacol.*, **399**, 1–8 (2000).
- 44) Takuma K., Yoshida T., Lee E., Mori K., Kishi T., Baba A., Matsuda T., *Eur. J. Pharmacol.*, **406**, 333–339 (2000).
- 45) Takuma K., Lee E., Enomoto R., Mori K., Baba A., Matsuda T., *Br. J. Pharmacol.*, (2001), in press.
- 46) Yuan J., Yankner B. A., *Nature*, **407**, 802–809 (2000).
- 47) Casaccia-Bonnel P., Gu C., Chao M. V., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **468**, 275–282 (1999).
- 48) Tong L., Toliver-Kinsky T., Tagliatela G., Werrbach-Perez K., Wood T., Perez-Polo J. R., *J. Neurochem.*, **71**, 447–459 (1998).
- 49) Pettmann B., Henderson C. E., *Neuron*, **20**, 633–647 (1998).