

脳回路システムにおける薬効評価系を目指した多ニューロン画像法

池谷 裕二^{a,b}

Large-scale Recordings for Drug Screening in Neural Circuit Systems

Yuji IKEGAYA^{a,b}

^aLaboratory of Chemical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan and ^bPrecursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency, 5 Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

(Received June 2, 2008)

Functional multineuron calcium imaging (fMCI) is a large-scale optical technique that records the suprathreshold activity from large neuron populations. fMCI has several advantages, including: i) simultaneous recording from hundreds of neurons, ii) single-cell resolution, iii) identifiable location of neurons, and iv) detection of non-active neurons during the observation period. I review the principle and detailed method of fMCI and also describe the effect of oseltamivir on neuronal network as an example for practical application of fMCI.

Key words—brain; network; neuron; action potential; imaging; calcium

1. はじめに

機能的多ニューロンカルシウム画像法は、複数のニューロンの活動を並列モニターする光学測定法である。この手法にはいくつかの利点があるが、とりわけ、1) 数百個のニューロンから一斉に記録ができること、2) ニューロン1つ1つを個々に識別可能であること、3) ニューロンの位置が明確に分かること、4) 観察時間中に発火しなかったニューロンも検出できること、などは特筆すべき特長である。本総説では、同画像法の原理と方法を紹介しながら、これを有効に活用した例として、オセルタミビル (oseltamivir) の薬理作用を検討した実験を紹介する。

2. 機能的多ニューロンカルシウム画像法の原理と特長

脳の機能は多様なニューロンが織りなす巨大なネットワークによって発揮される。ニューロンやシナプスの挙動については精力的な研究が行われている

ものの、いまだ神経回路の挙動については不明な点が多い。この理由の1つとして、神経回路の活動を正確に捉えるよい実験手技がなかったことが挙げられる。

現在得られている神経回路の情報処理に関する知見の多くは、個別に記録されたデータを加算的予測を行う方法 (個々のニューロンやシナプスに関する生理学的あるいは解剖学的知見の断片から帰納する方法) か、あるいは、既に平均化された集団活動をバルク測定する方法によって得られたものである。

しかし複雑なシステムでは、機能ユニットは協同的に作動し、線形予想を超えた集団ダイナミクスを示す。神経回路における統合的なシステム挙動もまた、個々の機能素子 (ニューロンやシナプスなど) の特性を単純に足し算するだけでは捉えることはできない。したがって、多数のニューロンから同時記録する大規模な実験手技が、回路研究には必須である。

過去20年、磁気共鳴画像法や陽電子放射断層撮影、内因性光学測定、電位感受性色素記録をはじめとした大規模な画像法は著しく発展した。これらの手法を通じて、神経情報の処理機構に関する知見は大きく進展している。しかし、こうした技術には共

^a東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1), ^bさきがけ研究員 (〒102-0075 東京都千代田区三番町 5)

e-mail: ikegaya@mol.f.u-tokyo.ac.jp

本総説は、平成20年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

通した欠点もある。それは空間分解能が貧弱で、単細胞の解像度を持っていないことである。

これを補完する実験手技が「機能的多ニューロンカルシウム画像法 (functional multineuron calcium imaging; fMCI)」である。¹⁾ fMCI は、単細胞レベルの高解像度で、ニューロン集団から活動を記録することが可能である。つまり、回路内の個々のニューロンが、いつ、どこで、どのように発火したのかを、正確に知ることができる。

fMCI は通常、カルシウムに感受性のある蛍光指示薬を多数のニューロンに負荷し、その蛍光変化を細胞体から記録するという方法を取る。細胞体における急速な一過性カルシウム上昇は活動電位 (スパイク) に由来するため、これを利用して、スパイクのタイミングを逆算する (Figs 1 and 2)。このカルシウム上昇は電位感受性カルシウムチャンネルからのカルシウム流入に由来している。カルシウム蛍光指示薬は、例えば電位感受性色素のシグナル変化が通

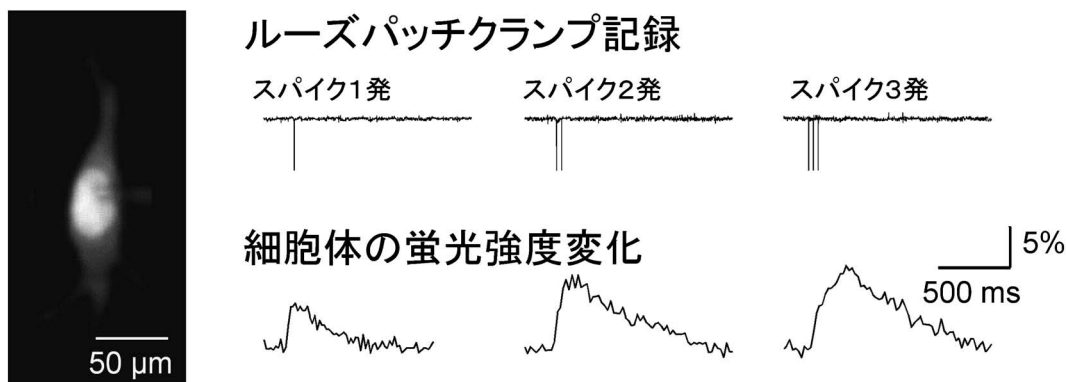


Fig. 1. Transient Calcium Rises in the Cell Body of a Neuron Report the Generation of Action Potentials

Spikes recorded by loose patch-clamp recording are compared to changes in the somatic fluorescence intensity of a CA3 pyramidal cell in a hippocampal slice culture loaded with Oregon Green 488 BAPTA-1AM. Firing spikes produces a fluorescence increase. Note individual spikes fired at high frequencies cannot be separated in changes in fluorescence, the amplitude of the evoked calcium transient increases as a function of the number of spikes involved in a burst.

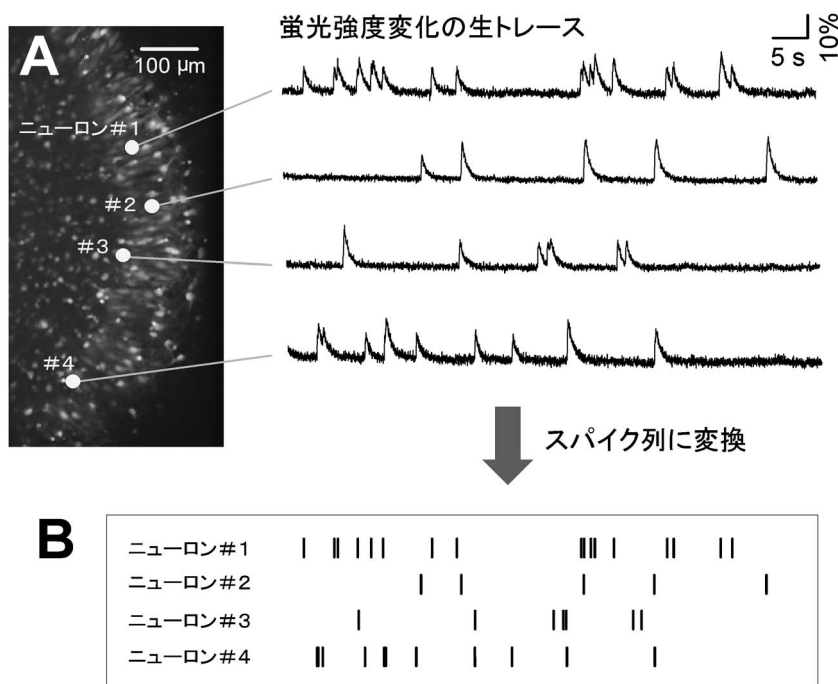


Fig. 2. fMCI Monitors the Spatial and Temporal Pattern of Multi-neuronal Network Activity

(A) In a hippocampal slice culture loaded with Oregon Green 488 BAPTA-1AM, the fluorescence in the CA3 region was time-lapse imaged. (B) Spike timings were reconstructed from the fluorescence traces of individual neurons.

常 1%以下であるのとは異なり、一発のスパイクでも 2-30%の蛍光強度変化が観察されるため高い SN 比が得られる。^{2,3)}

fMCI 以外の単細胞解像度を持った大規模記録法としては、多電極ユニット記録が広く用いられている。⁴⁾ 通常は数個から十数個のニューロンから同時記録が可能であるが、過去には 96 本の電極を局所刺入することで 260 個ものニューロンから記録したという報告もあり、fMCI に劣らない大規模記録が可能となっている。⁵⁾

多電極ユニットの利点は、安定した長期間記録と高い時間分解能にあるが、その一方、欠点も少なくない。とりわけ決定的な問題は、スパイク抽出にソーティングと呼ばれる独特な信号解析が欠かせないことである。ソーティングは数学的には不良設定問題であり、近似的な解法に頼らざるを得ない。したがって分離されたスパイクが、どこまで真のスパイクを反映しているのかは常に疑問視され、研究グループ間でも対応方法や態度が異なるのが実情である。

多電極ユニット記録のもう 1 つの重大な問題として、細胞の位置や細胞種が厳密に同定できないことがある。また、記録中にたまたま発火しなかったニューロンについては検出すらされない。

一方 fMCI では、記録後に標本を組織化学染色することで、細胞のタイプや位置を識別することができる。また、発火しない細胞の検出も可能であるため、例えば fMCI のデータでは「何%のニューロンが活性化したか」という問いにも答えることができる。

fMCI にも欠点はある。例えば何時間にも渡る長期測定が難しいことが挙げられる。これは蛍光指示薬を用いた光学的測定であるために、褪色や光毒性が避けられないためである。また、一過性カルシウム上昇をスパイクの間接的なレポーターとして利用しているため、その減衰定数の大きさも問題である。カルシウム蛍光強度の減衰定数は通常 300-500 ミリ秒（負荷した指示薬の濃度に依存する）であり、高頻度に発火するニューロンにおいては、残念ながら、個々のスパイクを分離することはできない (Fig. 1)。

3. fMCI の実験方法

fMCI の基本的なアイデアは、Yuste と Katz によ

って 1991 年に紹介された。⁶⁾ 彼らは、発達段階にある若い動物の脳皮質から作成したスライス標本を、カルシウム感受性指示薬である fura-2 溶液中でインキュベーションすることで、ニューロンに色素を負荷することに成功した。CCD カメラを用いて、数十のニューロンをライブ観察している。彼らは論文内で fMCI の有用性を強調しているが、fMCI の限界についても述べている。当時はまだ CCD カメラの感度が低く、毎秒 1 画像以下という低い時間分解能でしか撮影できなかった。彼らはまた、スライス標本への指示薬の負荷の難しさについても言及している。特に色素負荷効率が年齢依存的に低下する点は決定的である。

fMCI の将来性を重んじた筆者は、2002 年に上記の実験を行った Rafael Yuste の元に留学し、同手技の研鑽を積んだ。帰国後、色素負荷の方法や光学系の工夫を重ねることで、ニューロンへの色素の負荷効率を 90%以上で安定させることに成功し、また最新の共焦点スキャナユニットと高感度 CCD カメラを用いることで毎秒 2000 枚という超高速イメージングを達成した。本総説を執筆している現時点では、これが世界最速のフルスケール共焦点イメージング技術である。また同時に取得可能なニューロン数も最高で 1000 個を超え、その規模も世界最高レベルにある。

こうした努力の結果、現在では、fMCI の実験遂行には取り立てて大きな困難はなく、初心者でも実験を気楽に行うことができるようになった。以下、筆者が行っている手順について詳細に説明する。

3-1. ストック溶液の調製

3-1-1. 0.1% Oregon green BAPTA-1AM/DMSO

Oregon-green 488 BAPTA-1AM (Invitrogen, O-6807, special package) のチューブ 1 本 (50 μ g) に DMSO 50 μ l を加え、溶解させる。これを各 10 μ l ずつ 1.5 ml チューブに分注し、 -20°C で保存する。fura-2AM や fluo-4AM などの他のカルシウム指示薬についても同様に調整できる。

3-1-2. 10% Pluronic F-127/DMSO

Pluronic F-127 (Invitrogen, P-6867) 100 mg を 1.5 ml チューブに秤量し、DMSO 1 ml に溶解させる。室温で保存。保管中に結晶が析出することがあるが、この場合は使用しないこと。

3-1-3. 5% Cremophor EL/DMSO

Cremophor

EL (Sigma-Aldrich, C-5135) 0.5 ml を 15 ml チューブに秤量し, DMSO 9.5 ml に溶解させる. Cremophor EL は粘性が高いため, 慎重に計量すること. 室温で保存.

3-1-4. 100 mM (±) Sulfinpyrazone/DMSO

(±)Sulfinpyrazone (Sigma-Aldrich, S9509) 40 mg を 1.5 ml チューブに秤量し, DMSO 1 ml に溶解させる. 室温で保存.

3-2. 標本及び Ca^{2+} 指示薬溶液の調製

3-2-1. 急性脳スライス標本又は培養脳スライス標本 急性スライス標本では生後 3-16 日齢のラット又はマウスから作製することが望ましい. 日齢が高いと色素負荷効率が急激に低下する. 脳部位によって負荷効率が異なる.⁷⁾ 培養スライス標本は生後 6-7 日齢のラットより作製した脳スライスを 7-14 日間培養したものをを用いる.

3-2-2. 人工脳脊髄液 (artificial Cerebrospinal fluid, aCSF) aCSF の組成は NaCl: 127 mM, NaHCO_3 : 26 mM, KCl: 1.5 mM, KH_2PO_4 : 1.24 mM, MgSO_4 : 1.4 mM, CaCl_2 : 2.4 mM, Glucose: 10 mM. 実験当日に作成する. 使用中は O_2 95%/ CO_2 5% を常時通気すること.

3-2-3. Ca^{2+} 指示薬溶液 aCSF 2 ml にストック溶液 3-1-1 を 10 μl , ストック溶液 3-1-2-3-1-4 を各 2 μl ずつ加え, これを 2 秒間隔で約 50 回のソニケーション (各 1 秒間) を行う. 最終濃度は Oregon green BAPTA-1AM が 0.0005% (約 4 μM に相当), Pluronic F-127 が 0.01%, Cremophor EL が 0.005% (±) sulfinpyrazone が 100 μM , DMSO が 0.775% となる.

3-3. Ca^{2+} 指示薬の負荷

(1) 上記で作製した Ca^{2+} 指示薬溶液 2 ml を 35 mm 径のシャーレに移し, 数枚の脳スライス標本を浸す. 急性スライス標本の場合は 37°C に保温したチャンバー内で 95% O_2 /5% CO_2 を通気しながら 1 時間インキュベーションする.⁸⁾ 培養スライス標本の場合は 37°C の CO_2 インキュベータ中に 1 時間静置する. Ca^{2+} 指示薬の種類や使用する標本によっては, インキュベーション時間を短縮することも可能である.

(2) 標本を別のシャーレに移し, aCSF で数回洗浄したのち, O_2 / CO_2 を通気した aCSF 中で 30 分以上静置する.

(3) スライス標本を記録用チャンバーに移し, aCSF を 1-3 ml/min の速度で灌流する. 観察中に標本が動かないように, 金属グリッドなどで固定する.

(4) レーザーを照射し, イメージングを開始する. ニューロンの場合には毎秒 10-2000 枚, グリア細胞の場合には毎秒 0.5-2 枚の撮影速度で観察する.

3-4. イメージング装置

3-4-1. 顕微鏡 パッチクランプ記録と同時に実験するためには正立顕微鏡を使用するのが望ましい. 例: Zeiss AxioSkop2, Nikon FN1, Olympus BX51WI など.

3-4-2. 対物レンズ 広範囲から多数の細胞をモニターするために, できるだけ低倍率かつ高開口数の対物レンズを用いる. またパッチクランプ電極のアクセスを容易にするために長焦点距離のものが推奨される. 例: Zeiss Plan-Apochromat 20xW (NA 1.0, WD 1.8 mm), Nikon CFI75 16xW (NA 0.8, WD 3.0 mm), Olympus XLUMPLFL 20x W (NA 0.95, WD 2.0 mm), Olympus XLPlanN 25xW (NA 1.05) など.

3-4-3. 共焦点システム ニューロン活動の観察には高速イメージングは必須であり, ニポウディスク型の共焦点スキャナユニットが推奨される. Yokogawa CSU10, CSU22, CSUX1 など. ガルバノミラー方式の共焦点顕微鏡に比べて高速であるだけでなく, 褪色や光毒性が低いのも特長. しかも比較的安価である.

3-4-4. 冷却 CCD カメラ 目的に適ったカメラを用意する. 特に高速イメージングでは高感度の背面照射型の CCD 素子を用いたものが推奨される. 筆者は Andor iXonEM+ DV885, DU897, DU860 の 3 種を使用している. 200 Hz 以下の低速イメージングには 512 × 512 の画素数を持つ DV885 と DU897 を, それ以上の高速イメージングには 128 × 128 の DU860 を用いる. 空冷よりも水冷の方がノイズが低く, 挙動も安定する.

3-4-5. 画像取得ソフトウェア 筆者は MetaMorph (Molecular Devices) と Solis (Andor) を用いている.

4. オセルタミヴィルの神経回路活動に対する作用

薬理作用の検討に fMCI を用いた実例として, オ

セルタミビル（商品名：タミフル）の効果を調べた実験を取り上げる。⁹⁾

抗インフルエンザ薬であるオセルタミビルは、ウイルス型ノイラミニダーゼ（シアル酸分解酵素）を阻害することで、インフルエンザウイルスの発芽を抑止する薬物である。オセルタミビルは、ノイラミニダーゼの酵素活性部位に結合するシアル酸アナログの構造解析から戦略的にデザインされた。これはエステル型のプロドラッグであり、その代謝活性体が薬効を担う。

シアル酸は細胞膜に存在する糖タンパク質の構成成分であり、主に細胞接着を抑制することで、様々な生理機能調節に関与する。中枢神経系においては主に神経細胞接着因子（neural cell adhesion molecule; NCAM）の糖鎖として存在し、海馬体の歯状回から CA3 野に掛けて豊富に存在している。¹⁰⁾ ノイラミニダーゼはシアル酸鎖の長さを調節する酵素であると考えられ、その機能が異常を来すと神経回路はてんかん状態に陥る。¹¹⁾ 実際、ラット海馬 CA3 野の錐体細胞では、シアル酸化のレベルが変動すると、電位感受性 Na⁺ チャネルの機能変化を通じて発火しきい値が変わり、海馬回路の興奮性が変動することが知られている。¹²⁾

ヒトには4種類のノイラミニダーゼ HsNEU1-4 が存在している。このうち HsNEU2 は、オセルタ

ミビルの標的であるウイルス型ノイラミニダーゼと構造が似ており、活性部位についてはアミノ酸配列が完全に一致している。¹³⁾ 興味深いことに HsNEU2 には SNP を伴う遺伝多型があり、オセルタミビルへの結合活性が高いタイプが存在している。¹⁴⁾ この変異の浸透率はアジア系人種では人口の 9.29% に達するが、ヨーロッパ系及びアフリカ-アメリカ系では観察されない。したがって、アジア人にはオセルタミビルへの感受性が高い集団が存在する可能性がある。

ラット海馬急性スライス標本において、オセルタミビルがシナプス前終末の機能を亢進することも示されている。¹⁵⁾ 本総説ではオセルタミビルの海馬回路に対する効果を fMCI で検討したデータを紹介する。

ラット海馬由来の培養スライスを標本として用いた。まず CA3 野錐体細胞からルーズパッチクランプ記録することで発火パターンを観察した。2つのニューロンから同時記録し、両者のスパイクの同期性に着目したところ、コントロール群では両細胞間で顕著なスパイク同期はみられなかったが、オセルタミビル 100 μ M を適用すると同期性が有意に高まった [Fig. 3(A)]. 両細胞のスパイク列の相互相関を計算したところ、相関のピークは時間 0 ミリ秒に観察された。

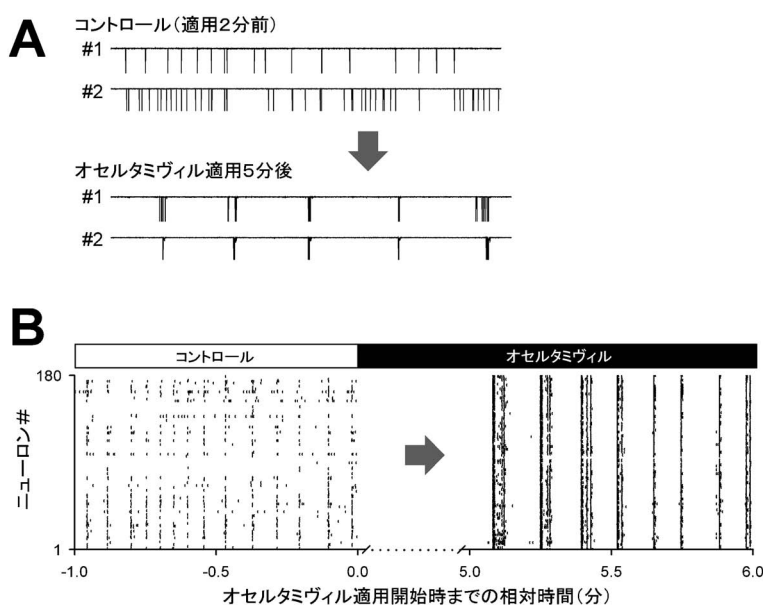


Fig. 3. Osetamivir Induces Synchronized Spike Oscillations (Population Bursts) in Hippocampal Networks

(A) Simultaneous loose patch-clamp recording from two CA3 pyramidal cells revealed that 100 μ M osetamivir enhanced the level of spike synchronization between these neurons. (B) fMCI revealed that 100 μ M osetamivir induced globally synchronized network oscillations.

CA3野の自発的な回路活動がオセルタミヴィルによってどう変調するかをfMCIで検討した。オセルタミヴィル $100 \mu\text{M}$ を適用すると、徐々に発火率が高まり、適用後3–20分には回路全体が同期振動発火した [Fig. 3(B)]。この現象を「集団バースト」と呼ぶ。集団バーストは1分間に数回生じる突発性のイベントである。集団バースト中はすべてのニューロンが引き込まれ、40 Hz の発火頻度で一斉に振動する。集団バーストの持続時間は1秒以上に渡り、長い場合には10秒を超えることもある。このような特異な振動発火は正常状態の回路では観察されないが、興味深いことに、オセルタミヴィルだけでなく、同じくノイラミニダーゼ阻害薬であるNADNA $100 \mu\text{M}$ によっても惹起されることが分かった。

続いて薬理学的定量を行った。オセルタミヴィルの濃度を幅広く検討したところ、 $0.3 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ の範囲で用量作用曲線を描くことが分かった。 $100 \mu\text{M}$ では検討したスライス標本8例の全ケースで、 $0.3 \mu\text{M}$ では5例中1例のスライスで、集団バーストが観察された。一次シグモイド曲線に最小2乗法で回帰したところ、 ED_{50} 値は $10.2 \mu\text{M}$ と算出された。オセルタミヴィルをエステル分解した代謝活性化体は、さらに低濃度から効果が認められ、 ED_{50} は $0.70 \mu\text{M}$ であった。以上のデータから、集団バーストは、オセルタミヴィルの（未知の）副作用ではなく、ノイラミニダーゼ阻害という主作用に依存した現象であることが示唆された。

集団バーストの内部構造が40 Hzの回路振動である点は注目し得る。40 Hzはガンマ周期の振動リズムに相当し、とりわけ海馬ではムスカリン受容体の活性化によって発生すると考えられている。¹⁶⁾ そこで、ムスカリン受容体拮抗薬であるアトロピン $10 \mu\text{M}$ の存在下で、オセルタミヴィル $100 \mu\text{M}$ を適用した。すると5例中2例で集団バーストが観察された。アトロピン非存在下では8例中全例で集団バーストが誘導されたことを考慮し、フィッシャーの正確確率検定で評定すると、アトロピンには集団バーストを有意に抑制する効果があると判断された ($p=0.035$)。

以上、オセルタミヴィルは集団バーストを濃度依存的に誘引することが分かった。集団バーストはガンマ振動を伴っており、少なくとも部分的にはコリ

ン作動性の神経調節機構が関与することが示唆された。介在ニューロンによる位相依存的なシャント抑制によってガンマ波が発生することを考えると、¹⁶⁾ オセルタミヴィルの作用標的は、海馬CA3野の興奮性ニューロンである錐体細胞ではなく、むしろ、抑制性介在ニューロンである可能性が浮かぶ。実際、海馬から単離培養した興奮性ニューロンを用いて行った予備的試行では、 1mM という高濃度のオセルタミヴィルを適用しても、膜電位の脱分極はなく、またグルタミン酸受容体への直接的な効果も観察されなかった。

実験動物を用いた薬物動態試験によれば、経口投与又は静脈内投与したオセルタミヴィルは脳血液関門を透過し、中枢神経系に到達することが報告されている。^{17,18)} 脳対血漿中濃度比は0.1–0.7に達し、大雑把に見積もれば、脳内濃度は $0.1\text{--}5 \mu\text{M}$ 程度に達することになる。これはオセルタミヴィルの集団バースト惹起効果の ED_{50} 値とほぼ一致する。

5. おわりに

ニューロン集団からの大規模記録は、脳回路機能を理解する上で必要不可欠である。この観点から筆者は以前からfMCIの有用性に着目し、数年に渡り技術的向上を施すことで、その汎用性を高めてきた。fMCIはその有用性の割に実験系としてシンプルであるため、同技術を多くの研究室に移植することを意図し、本総説では実験プロトコルを詳細に記載した。一助になれば幸いである。

fMCIは技術的に強力な実験ツールであることは疑いようもないが、その一方で、実験遂行上の問題点も浮上してきている。それは得られた大規模な回路活動データを扱うための数理基盤の欠如である。例えば、ある薬物を適用したところ、回路活動パターンがわずかに（しかし有意義に）変化したとしよう。しかし、こうした離散データをどう統計処理したらよいただろうか。大規模なスパイク時空系列を前にしたとき、そこからどんなパラメータを抽出したらよいか、あるいは、そもそも何が抽出可能なのかを判断することは極めて難しい。現時点では、有用な情報を掘り出すためのデータマイニング技術が未熟であり、せつかく得られたfMCIのデータが“宝の持ち腐れ”に終わっているという印象は否めない。

この問題を打破するために、実験系研究者と論理

系研究者のコラボレーションが必要であることは明確である。こうした共同研究開発を促進するための1つの解決策として、筆者は実験データの一部をホームページで公開している (<http://hippocampus.jp/data>)。このようなデータアーカイブの自由開架は、特許や先行権を視野に据えた戦略的な情報機密という近年の科学界の動向とは相容れない姿勢かもしれないが、新しい技術をいち早く有効なものとするためには重要なステップであると筆者は考えている。興味ある方はデータをダウンロードして、効果的な解析法の探索に挑戦して頂ければ幸いである。

fMCI を有効に活用した例として、本総説ではオセルタミヴィルの実験を取り上げた。fMCI を通じてオセルタミヴィルの薬理作用は明確に捉えられる。しかし単一細胞のみを調べるような従来の方法では、このような劇的な効果でさえそれを適確に捉えるのは難しい。たとえば Fig. 3 (A) において、ニューロン1つからパッチクランプ記録した場合を想像してみればよく理解できる。発火パターンがわずかに変化することはかろうじて検出できるかもしれないが、これが回路全体のグローバルな同期現象を反映したものであることは分からない。この意味で、fMCI は薬理作用のより本質的な部分を浮き彫りにすることが可能な手法であると言える。

以上のように、細胞や分子をミクロのまま扱うのではなく、また逆に、マクロな総体を平均的に漠然と扱うのではなく、むしろ、システムの観点から両者を有機的に結び付けようと試みる薬理学を、筆者は「システム薬理学 (systems pharmacology)」と呼んでいる。これは次世代の学問として、ますます重要になるだろうと考えている。fMCI はシステム薬理学の実験手技として、その一翼を担うだろうし、また、それが実現するためにもデータ解析をサポートする統計理論が成熟することを切に願いたい。

REFERENCES

- 1) Takahashi N., Sasaki T., Usami A., Matsuki N., Ikegaya Y., *Neurosci. Res.*, **58**, 219–225 (2007).
- 2) Helmchen F., Imoto K., Sakmann B., *Biophys. J.*, **70**, 1069–1081 (1996).
- 3) Smetters D., Majewska A., Yuste R., *Methods*, **18**, 215–221 (1999).
- 4) Buzsáki G., *Nat. Neurosci.*, **7**, 446–451 (2004).
- 5) Lin L., Osan R., Shoham S., Jin W., Zuo W., Tsien J. Z., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 6125–6130 (2005).
- 6) Yuste R., Katz L. C., *Neuron*, **6**, 333–344 (1991).
- 7) Namiki S., Sasaki T., Matsuki N., Ikegaya Y., *Int. J. Neurosci.* (in press).
- 8) Ikegaya Y., Bon-Jego M. L., Yuste R., *Neurosci. Res.*, **52**, 132–138 (2005).
- 9) Usami A., Sasaki T., Satoh N., Akiba T., Yokoshima S., Fukuyama T., Yamatsugu K., Kanai M., Shibasaki M., Matsuki N., Ikegaya Y., *J. Pharmacol. Sci.*, **106**, 659–662 (2008).
- 10) Cremer H., Chazal G., Lledo P. M., Rougon G., Montaron M. F., Mayo W., Le Moal M., Abrous D. N., *Int. J. Dev. Neurosci.*, **18**, 213–220 (2000).
- 11) Boyso A., Ayala J., Gutiérrez R., Hernández R. J., *Brain Res.*, **964**, 211–217 (2003).
- 12) Isaev D., Isaeva E., Shatskih T., Zhao Q., Smits N. C., Shworak N. W., Khazipov R., *J. Neurosci.*, **27**, 11587–11594 (2007).
- 13) Chavas L. M., Tringali C., Fusi P., Venerando B., Tettamanti G., Kato R., Monti E., Wakatsuki S., *J. Biol. Chem.*, **280**, 469–475 (2005).
- 14) Li C. Y., Yu Q., Ye Z. Q., Sun Y., He Q., Li X. M., Zhang W., Luo J., Gu X., Zheng X., Wei L., *Cell Res.*, **17**, 357–362 (2007).
- 15) Izumi Y., Tokuda K., O'Dell K. A., Zorumski C. F., Narahashi T., *Neurosci. Lett.*, **426**, 54–58 (2007).
- 16) Fisahn A., Yamada M., Duttaroy A., Gan J. W., Deng C. X., McBain C. J., Wess J., *Neuron*, **33**, 615–624 (2002).
- 17) Morimoto K., Nakakariya M., Shirasaka Y., Kakinuma C., Fujita T., Tamai I., Ogihara T., *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 6–9 (2008).
- 18) Ose A., Kusuhara H., Yamatsugu K., Kanai M., Shibasaki M., Fujita T., Yamamoto A., Sugiyama Y., *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 427–434 (2008).