

## 時間差を捉える哺乳類体内時計中枢

## The Mammalian Circadian Center Captures Environmental Time and Time Length

重吉 康史, 長野 護, 升本 宏平, 鯉沼 聡

Yasufumi Shigeyoshi, Mamoru Nagano, Koh-hei Masumoto and Satoshi Koinuma

近畿大学医学部解剖学

**要旨** 視交叉上核 (SCN) は、視交叉の直上に存在する一組の神経核であり、哺乳類概日リズムの中核である。SCN は末梢時計を制御することだけでなく、外界の光環境の変化を認識する機構を備えている。概日リズムはリミットサイクルとよばれる物理現象と考えられており、視交叉上核における概日リズム発振細胞の振る舞いに理論的裏付けを与えている。視交叉上核の時計の位相を大きく変動させる入力は光である。光反応部と非光反応部をそなえる視交叉上核の解剖学的構築が時差ぼけの原因となっている。非光反応部では概日リズムが最大で1日2時間程度しかシフトしないため環境の明暗周期に同期するのに日数を要する。これが時差ぼけ(時差症候群)である。また視交叉上核内部には位相波とよばれる現象が現れ、同期を維持しながら日長を振動子間の位相差として視交叉上核内に蓄えるシステムであることが明らかになって来た。

**キーワード**：概日リズム, 体内時計, 視交叉上核, 時差ぼけ, 位相波

## 1. 視交叉上核と概日リズム

視交叉直上に左右一対存在する視交叉上核は哺乳類体内時計の中核であり、生理現象の概日リズムや、末梢組織に存在する時計の位相を支配している。視交叉上核の側の核には約10,000個の細胞が含まれていると概算されている(図1)。またニューロンの2割程度が自立性の概日リズムを発振する能力を持つことが視交叉上核の細胞を分散培養することによって明らかになった<sup>1)</sup>。個々の細胞間で固有の周期は大きなばらつきが存在するが<sup>2,3)</sup>、視交叉上核全体では細胞間での同期が達成されており、一律な周期をもつリズムを発振することが可能である。視交叉上核は網膜からの投射のある腹外側部あるいはコア領域と、背内側部あるいはシェル領域の二つの領域が存在する(図2)。この二つの領域は外部からの神経投射の有無、細胞の大きさで区別される。しかし一般にこの二つの領域を弁別するマーカーとして用いられるのは領域を代表するペプチドの発現である。腹外側部には血管作動性腸管ペプチド(VIP)やガストリン放出ペプチド(GRP)発現細胞が密に存在する(図3)。一方、背内側部にはアルギニンバゾプレッシン(AVP)発現細胞が密集している(図3)。これらのうち最も明瞭に領域を示し、発現領域が時刻で最も変化しないものはVIP mRNAである。VIP mRNAやタンパクを発現する細胞を検出することで腹外側部、すな

わち光反応部を示すため、しばしば領域のマーカーとして用いられている。

視交叉上核へは主要な求心性の投射路が3種類ある。網膜からの投射(網膜視床下部路, RHT)、外側膝状体のIntergeniculate leaflet (IGL)と呼ばれる小領域からのNPY含有線維による投射、およびセロトニンを含有する脳幹縫線核からの投射である。面白いことにこれらの投射はすべて視交叉上核腹外側部に終止する。よって、視交叉上核に対する環境や末梢からの入力は第一次には視交叉上核の腹外側部、ある

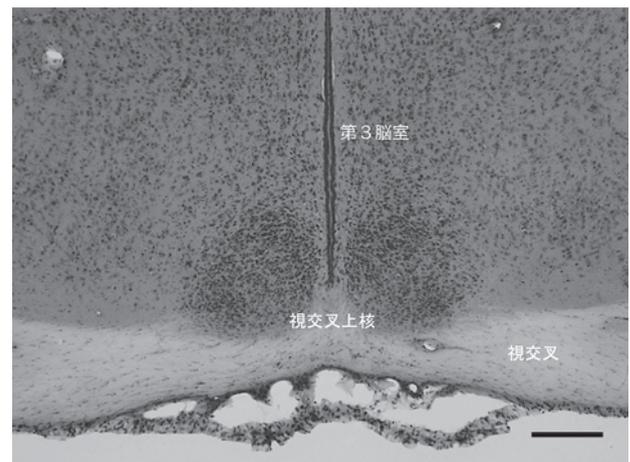


図1 ラット視床下部の視交叉上核(前額断20 $\mu$ m厚のスライスをHE染色した)を示す。正中部視交叉の直上で左右に一対存在する細胞の密集すなわち神経核が視交叉上核である。一側の視交叉上核に10,000個足らずの細胞が存在する。スケール=200 $\mu$ m。

〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東377-2  
TEL: 072-366-0221 (ex. 3243)  
E-mail: shigey@med.kindai.ac.jp  
2012年2月26日受付

いはコア領域に到達すると考えられる。その後、残りの部分すなわち背内側部あるいはシェル領域には腹外側部を介して時刻情報が蓄えられると考えられる。このような機能分化が必要な理由、すなわち光反応領域と非光反応領域を同時に備えることのメリットについては明らかになっていない。しかし後述するがこの構築は時差ぼけが生じることの原因となっている。

視交叉上核を環境の明暗周期に同期させるものは光であり、視交叉上核の概日リズムをシフトさせる最大の入力である。網膜神経節細胞の軸索末端は視交叉上核の細胞とシナプスを形成しグルタミン酸、PACAPなどの神経伝達物質を放出することによって、視交叉上核の位相をシフトさせる。光による体内時計の位相変位は夜間には数時間に達することもあるが、昼間にはほとんど変位しない。すなわち光の入力が遮

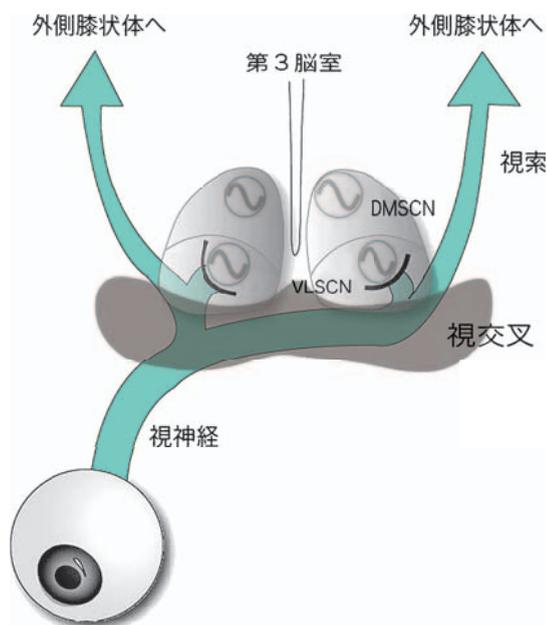


図2 視交叉上核の位置と網膜からの投射を示した。一側の眼球から出た視神経は視交叉で交叉する線維束と同側を進む線維束に別れ視索を形成する。視交叉上核は視交叉の後方の第3脳室に接してほぼ正中線で視交叉の直上に位置する。一側眼球の網膜神経節細胞から両側の視交叉上核に投射がある。視交叉上核への投射は腹外側部 (VLSCN) に限局し、背内側部 (DMSCN) への投射は認められない。

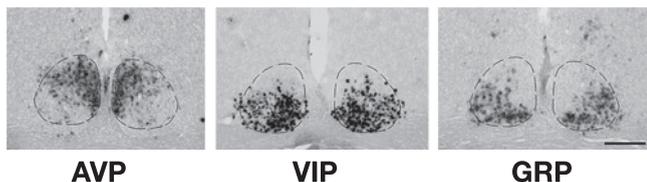


図3 ラット視交叉上核前額断において AVP, VIP, GRP mRNA を発現する細胞の局在を示す。Digoxigenin でラベルされた cRNA probe を用いた *in situ* hybridization. VIP mRNA, GRP mRNA 陽性細胞が腹側部に局在するのに対して、AVP mRNA は背側部に発現する。光反応領域の局在マーカーとしては、VIP が多く用いられる。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 。

られており、ゲート機構が働いている。この機構は生物が体内時計を環境の明暗リズムに同期するのに必須の機構であると思われる。すなわち、昼間の光で体内時計の位相がシフトすると、どの時点で光を浴びるかによって概日リズムの位相が1日1日激しく変動する事になり体内時計が機能を果たさない。

さて、概日リズムはどのように作り出されるのであろうか。詳細は別の総説<sup>4,5)</sup>に譲る。簡単に述べれば転写翻訳を介したフィードバックループによって約24時間のリズムが作られていると考えられている。このアイデアはショウジョウバエや哺乳類体内時計にも適用され *Period* 遺伝子 (*Per*) の転写が翻訳産物である PERIOD タンパク (PER) で抑制され、転写の活性化と抑制に時間差があれば振動を生じてかつ一周期を約24時間とすることができるという説がもっぱら通用している。この説が正しいことの裏付けの一つは数理的に現象を再現できることである<sup>6)</sup>。すなわちこのような仮定のもとに微分方程式で表現されたモデルを作成し、適当なパラメーターで数値計算を行えばリミットサイクルを再現することができる。しかし、シアノバクテリアではリン酸化・脱リン酸化のリズムがタンパク合成なしで生じることが明らかになっており<sup>7)</sup>、ショウジョウバエ、哺乳類研究で打ち立てられてきた転写翻訳フィードバックループ仮説は現在まで普遍的な支持をえていない。

振動を作る本質的な機構がわからなくても、リミットサイクルであると天下りの決めてしまうとそれだけで多くの数理的研究を可能にする。リミットサイクルは散逸開放系で現れる振動現象である。もっともよくみかけるリミットサイクルは時計の振り子であろう。また、メトロノームもよく例としてあげられる。振り子時計の振り子がかつてゼンマイの力で、現在では電力によって振動のためのエネルギーが供給されている。この振り子は、実験で使われる保存系の振り子とは全く異なったメカニズムをもち正確な周期および振幅を作り出している。振り子時計は外力によって一時的に周期や振幅が乱れてもしばらくたつと同一の周期振幅で振動を繰り返す。リミットサイクルの特徴である。

リミットサイクルが本当に生体内で実現されているのかについては疑いを抱く方がおられるかも知れない。しかし、1日最大10分ほどしか変動が生じないほどの周期の正確さ、外乱に対して同じ振幅周期に戻る性質、同期現象を生じることを考え合わせると、リミットサイクル以外の振動現象である可能性を考えにくいのである。よって、物理学者や数学者の多くは概日リズムがリミットサイクルであることを信じている。視交叉上核の概日リズムは外乱すなわち外部から振動を一時的に乱すような入力(視交叉上核の中核時計に対しては光がその最大の影響を持つものである)があっても何周期かの後にはもとの周期と振動数で振動を継続する。このような安定した振動はリミットサイクル以外に説明が困難である。身体に存在する非線形散逸系として数理的に再現可能な物理現象を我々は観察している。

リミットサイクルの特徴の一つが同期現象である<sup>8)</sup>。お互い(相互同期)にあるいは一方向性に(強制同期)相手の位相を変化させ、周期を同一としてある一定の位相差を保つ関係を維持することを同期という<sup>9)</sup>。固有周期の異なる振動子が同期する際にはお互いの作用によって周期を変動させ、同一の周期を持つことになる。この際、振動子同士が一定の位相差を保って同期してもよい。また、お互いが逆位相で同期しても良い(逆相同期 antiphasic synchronization と呼ぶ)。実際に視交叉上核内部では位相の異なる振動子の同期現象があり、位相波と呼ばれる現象が観察できる。これはあとで述べる。

## 2. 視交叉上核が体内時計中枢であることの証明

時計遺伝子が発見されるまで形態学は体内時計のリズムを探る手段をもたなかった。それまでは視交叉上核が概日リズムを発振していることは視交叉上核の電気的活動を測定することによって検討されていたのである。視交叉上核は昼間の電気活動が高く、夜間には電気活動は抑えられている(面白いことにこれは昼光性の動物も夜行性の動物においても同様である)。しかし一方、Moore 博士<sup>10)</sup> や川村博士<sup>11)</sup> らによって視交叉上核に体内時計の中枢があることが推定されていた。念入りな破壊実験によって視交叉上核を破壊したときのみ行動リズムが失われることが明らかになったのである。その後、視交叉上核を生体内で分離するアイランド実験<sup>12)</sup> や、視交叉上核を摘除して概日リズムを消失させた後に、別個体の視交叉上核を移植することによって視交叉上核に局在する発振能を証明するなどの実験によって<sup>13)</sup>、哺乳類では視交叉上核が体内時計の中枢であることが認められるようになった。

## 3. 時計遺伝子の発見と形態学技術による概日リズムの検出

ここからが形態学の出番である。1997年に発見された時計遺伝子 *Per1* は概日リズムの位相推定ツールとして素晴らしい切れ味を持っていた<sup>14)</sup>。

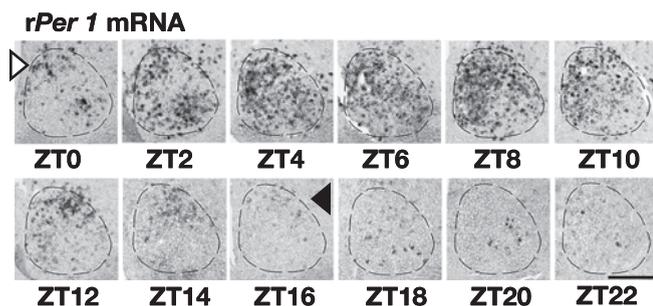


図4 ラット視交叉上核における *Per1* mRNA 発現の日周変動を示す。Digoxigenin でラベルされた *Per1* cRNA probe を用いた *in situ* hybridization. 写真の左側が内側、右側が外側である。明期 12 時間暗期 12 時間の光条件下での発現を捉えた。ZT (Zeitgeber) 0 は点灯時間、ZT12 は消灯時間である。*Per1* はほぼ明期に一致して発現している。背内側部から発現が始まり ZT14 には外側の発現を最後に背内側部で翌朝までほぼ発現しなくなる。腹外側での発現は ZT2 でピークを迎え ZT10 では失われている。白抜き三角はラット *Per1* 発現の背内側部での始まりを、黒塗り三角は背内側部での発現の終わりを示す。スケール = 200  $\mu$ m

しい切れ味を持っていた<sup>14)</sup>。 *in situ* hybridization を行うと、昼間は視交叉上核に強く発現し、夜間はほとんど発現がないという明瞭な結果が得られた(図4)。よってこの遺伝子発現の変動を追いかける事によって、体内時計の位相を知ることができる。時計遺伝子発見以後は、*in situ* hybridization 法で、mRNA を定量したり、時計遺伝子の翻訳産物である時計タンパクを免疫組織化学法で検出したり Western blot で計量することによって、体内時計の時刻を知ることができるようになった。さらに、様々な位相にピークをもつ時計遺伝子の発見によって体内時計の時刻推定が容易になっていった。たとえば、*Per1*, *Per2* は明期にピークがある。それに対して *Cry1*, *Cry2* といった遺伝子は夕刻に、*Bmal1* は夜間にピークが現れる。これらピークに時間差のある時計遺伝子の組み合わせによってより正確に体内時計の時刻を知ることができるようになった。*Per1* は夜間にはほとんど発現していない、一方朝には急激に発現量が上昇し夕刻は急激に発現が低下する。急激な発現量の上昇、下降によって朝と夕刻が明瞭に定義できる。すなわち体内時計の昼と夜を明瞭に切り分けることが出来る。また、ほぼ同時期に発見された *Per2* 遺伝子についてもはっきりした概日リズムが認められた<sup>15,16)</sup>。

*Per1/Per2* 遺伝子の誘導によって体内時計中枢がリセットされるという説も 1997 年に提唱されて現在にいたる<sup>17)</sup>。どうして *Per1* の誘導で概日リズムの位相が変化するのか。リミットサイクルの概念を持ち出せば理解が容易である。概日リズムはフィードバックループを持つと先に述べた。このアトラクターを二次元座標で表示する。横軸に *Per1* 遺伝子量、縦軸を PER タンパク量として 24 時間の発現量をプロットする。すると図のような軌道(アトラクター)を作ることが可能である(図5)。もちろん変数は *Per1*, PER1 のみではないのでこのアトラクターは *Per1*, PER1 を軸にした座標平面への写像である。さて、ここで光の入力があって *Per1* が誘導されるとこの座標での位置は一時的にアトラクターの外に飛び出すことになる。しかし数周期のうちには再びアトラクターに戻るが、元の位置とは全く異なる位相の点に戻るこ

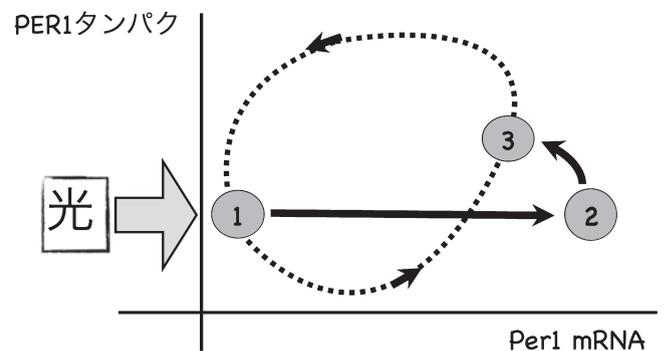


図5 光照射によって体内時計位相のシフトが生じる仕組みを示した。光照射後に *Per1* の誘導が生じリミットサイクルのアトラクターの点1から外に飛び出る(点2)。再びアトラクターに戻る際には光照射前の点とは大きく位相異なるアトラクター上の点3に移動する。

が起き得る。この時に一気に位相が進んだり遅れたりすることが生じる。このようなリミットサイクルに外乱が入力された際の振る舞いと光照射で誘導されるという事実から *Per1* あるいは *Per2* の視交叉上核誘導によって位相変位が生じるという仮説が生まれた<sup>17)</sup>。現在にいたっても大きな矛盾が生じておらずこの説は生き残っている。

*Per1/Per2* の誘導が時計をシフトさせることと、視交叉上核と網膜の解剖学的な結合様式を考えたときに疑問を抱いた。すなわち、網膜からの明暗情報は光反応部である視交叉上核の腹外側部にまず伝えられる。実際 *Per1* は腹外側部に限局して誘導される。すると *Per1* の腹外側部のみに位相変位が生じるのか。これを明らかにするためには人工的に明暗周期をシフトさせてラットの視交叉上核に発現する *Per1* 遺伝子の発現を腹外側部と背内側部に分けて経時的に観察すればよい。*Per1* は体内時計の位相を伝えてくれるので、視交叉上核内部の時刻を伝えてくれるはずである。またこの実験は動物に時差ぼけを作り出す実験でもある。同じ条件でラットの自発行動を観察した(図6)。すなわち、明暗周期を10時間後退させると夜間なのにほとんど活動を行わない時間帯が現れてくる。また明暗周期を6時間前進させるとふたたび活動が定常状態に戻るのに10日以上を要する<sup>18)</sup>。これはラットが時差ぼけを起こしていることを示している。すなわち本来は動き回っている夜間に動く気がしない時間帯が生じている。

#### 4. 時計遺伝子で体内時計の位相を推定する

時計遺伝子 *Per1* の発現を利用して視交叉上核の時計がどのような位相にあるのかを *in situ* hybridization 法を用いて検討した<sup>18)</sup>。その結果は非常に興味深いものであった。明暗周

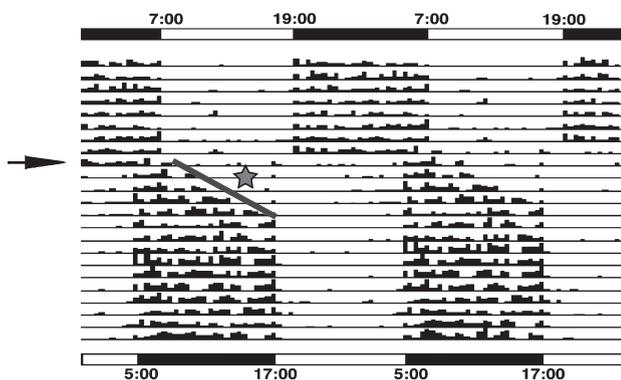


図6 時差ボケ実験でのダブルプロットアクトグラム

10分毎に活動回数をセンサーで観測し、おのおのの時刻における運動量を棒グラフで表して時間軸上に並べると活動期と休息期が明らかになる。2日分を一行に並べ、1日ずつずらして下に表示するダブルプロットで活動期、休息期を示している。ラットは12時間明期12時間暗期の光環境下で飼育していた。矢印で示した日に明暗周期を10時間後退させた。そのあと夜間であるのに活動量が少ない時間帯が生まれている(★)。活動期の終わりを直線でしめた。明暗サイクルのシフト後暗期における休息期は1日はほぼ2時間ずつ短縮する。このラインは *Per1* 発現の開始時刻の変遷と一致する。(J. Neurosci. Nagano et al. 2003 の図を改変。)

期のシフト後1日目から腹外側領域は環境の明暗周期に同調できたにもかかわらず、光入力のない背内側領域では、大きなシフトが生じず、1日2時間程度のシフトが生じたのみであった。図7にあるように明暗周期のシフト後2日目、3日目では暗期になっているのに *Per1* が背内側部に発現している時間帯がある。先に述べたように腹外側部では *Per1* は夜間の光照射によって誘導されるので振動子として *Per1* が発現しているのか、日々光で誘導されているのか判別が困難である。よって、*Per1* が光で誘導される際に同時に誘導される *c-fos* 遺伝子の発現を観察した<sup>18)</sup>。その結果二日目以降には *Per1* 誘導のマーカである *c-fos* は *Per1* 発現のオフセット時刻(AM5:00)に認められるのみであり、ほとんどの時間帯で *Per1* の発現は光によって誘導されたものではないことが示唆された。よって、腹外側部の概日振動子は2日目にはほぼ環境の明暗リズムへのシフトが完了したと考えられる。一方、背内側部のシフトは遅れるがようやく7日目になると腹外側部と背内側部が再同期してシフト前の定常状態をほぼ取り戻したように見える。

さらに背内側領域の再同調と行動リズムの再同調のパターンに強い相関関係を認めた(図6と図7を参照)。すなわち、背内側部の時計が昼であるときに、環境は夜であるにも関わらず、ラットの自発行動が抑制される。また、アクトグラムで示された活動期の開始が *Per1* の発現の終了と時差ぼけの回復まで明瞭に一致する。これらの観察から、時差ぼけの機序が以下のようにまとめられる。腹外側部、光反応部の時計は環境の明暗サイクルのシフトに対して迅速に同期するが背内側部の時計は、同期に日数を要する。背内側部は自発行動の制御を行っており、夜行性動物では昼間の自発行動を抑制する。このような状況で、背内側部の遅れた時計と環境の時刻のずれが生じ時差ぼけ症状が現れる。

#### 5. 視交叉上核に現れる位相波について

視交叉上核には同期現象の一形態として位相波が現れる<sup>19)</sup>。位相波とは隣接した領域間の位相差を保ちながら波がつつぎと伝えられていく現象である。視交叉上核の位相波は内側に現れ外側に向かって広がっていく。*In situ* hybridization でとらえた *Per1* の視交叉上核における発現は(図4)、明期の始まりに視交叉上核の最内側部に *Per1* が発現し、それが徐々に外側に広がり明期の終わりには最外側の発現がほぼ終わる位相波を示す。位相波は *Per2* プロモーターの制御下でルシフェラーゼを発現するラット (*Per2-dluc*) からの視交叉上核スライス培養によっても確認できる(図8)。その速度は *in situ* hybridization における位相波の速度とほぼ一致し、約 50  $\mu\text{m}/\text{時間}$  であった。このようなゆっくりとした波が視交叉上核の内部に現れる。位相差を作り出すメカニズムについての詳細は不明である。最近、位相波の生成に RGS16 遺伝子が必須であることが明らかになった<sup>20)</sup>。しかし、位相波がどうして視交叉上核の内側から現れるのか、どのような構造的基盤でゆっくりと進む波動現象が生まれるのか、その生物

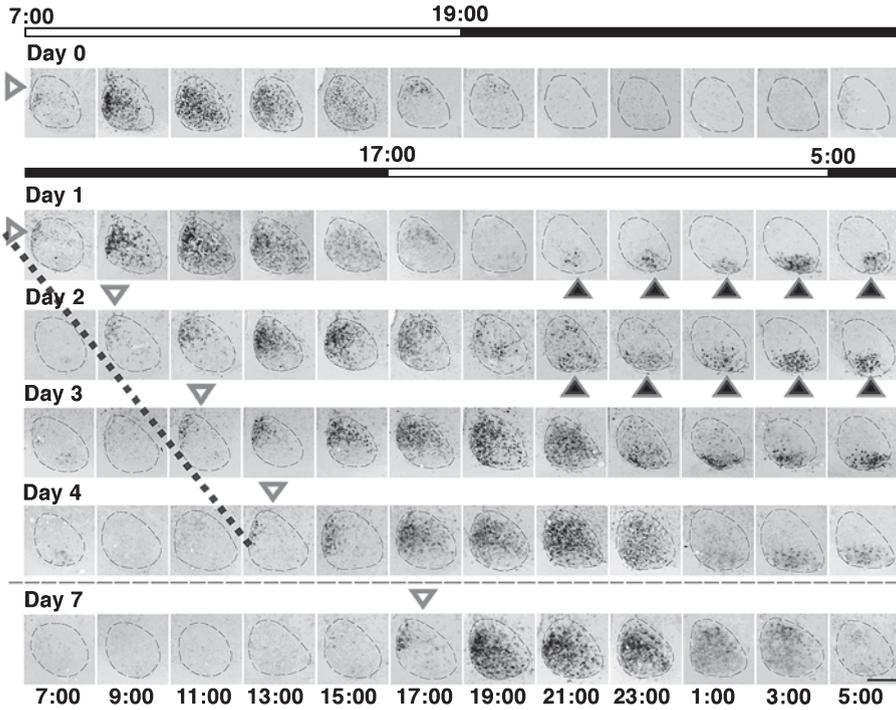


図7 *Per1* 遺伝子発現の視交叉上核における時差ぼけ実験時の変遷を示している。Digoxigenin でラベルされたラット *Per1* cRNA probe を用いた *in situ* hybridization を行った。2 時間おきにサンプルを採取した。Day0 は明期 12 時間暗期 12 時間の定常状態に 2 週間おいた後の視交叉上核。Day1 に明暗周期を 10 時間後退させた。Day1 が位相変位当日である。すでに腹外側部に *Per1* の発現が観察され、速やかに明暗サイクルに同期したと考えられる。一方背内側部は 1 日 2 時間程度シフトするのみである。白抜き矢頭で各日の背内側部の *Per1* の発現開始時刻を示している。点線は 1 日 2 時間ずつ規則的に位相後退する期間があることを示す。黒塗りの矢頭は Day1, Day2 の腹外側部の *Per1* の発現を示す。スケール = 200  $\mu\text{m}$  (Nagano et al. J. Neurosci. 2003 の図を改変。)

学的意義は何かといった問題は解決されていない。

我々は、視交叉上核内の発振細胞の細胞間同期を阻害することに成功した。*Per2* プロモーターの制御下でルシフェラーゼを発現するラットにて、視交叉上核の小領域を冷却 CCD カメラで観察した。Adenylate cyclase の活性を上昇させる Forskolin (FK) を加え、視交叉上核のスライス培養にてグリッドによって分けられた各領域の周期を計測した。すると視交叉上核内部に 22 時間から 28 時間にいたる周期のばらつきが現れた。さらに解析を進めると 24 時間より短い周期をも

つ領域と長い周期をもつ領域が明瞭な局在を示すことが明らかになった。興味深いことに 24 時間より短い周期を示す領域が視交叉上核背側部の最内側部に集積して認められた。この領域以外では FK 持続投与下において 25 時間より長い周期を示す。位相波の起点となる領域は同じく視交叉上核最内側部であり、我々が見いだした短周期を示す領域と一致していた。よって、この領域が、位相波形成の起点となる可能性が高い。位相波は同期を達成しながら内部に位相差、すなわち体内時計においては時間幅を保持することのできる仕組みであると考えられる。我々はこの仕組みが明期、すなわち“日の長さ”を測定する機構であることを示唆する実験結果を得ており、現在さらに検討を進めている。

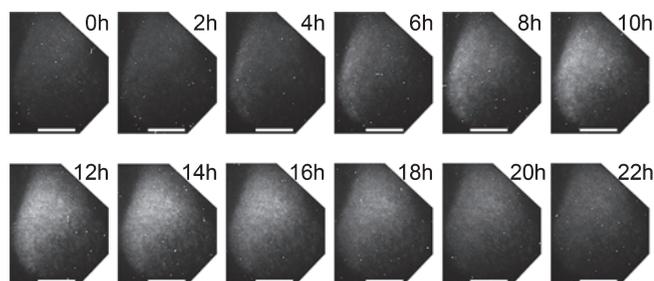


図8 *Per2-dLuc* ラット視交叉上核スライス培養における発光を示す。一側視交叉上核のルシフェリン：ルシフェラーゼ発光を捉えた。左が内側、右が外側である。位相波は内側から始まって外側に広がる。各々の写真の右肩の時刻は発光の最低値の時刻を 0 h とし、以降経過時間を示している。露光時間は 59 分。位相波は内側から始まって外側に終わる。スケール = 200  $\mu\text{m}$

#### 文 献

- 1) Webb, A.B., Angelo, N., Huettner, J.E. and Herzog, E.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 16493–16498 (2009)
- 2) Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M. and Reppert, S.M.: *Neuron*, 14, 697–706 (1995)
- 3) Honma, S., Shirakawa, T., Katsuno, Y., Namihira, M. and Honma, K.: *Neurosci. Lett.*, 250, 157–160 (1998)
- 4) Dunlap, J.C.: *Cell*, 96, 271–290 (1999)
- 5) Lowrey, P.L. and Takahashi, J.S.: *Annu. Rev. Genet.*, 34, 533–562 (2000)
- 6) Goldbeter, A.: *Proc. Biol. Sci. Royal Soc.*, 261, 319–324 (1995)

- 7) Kondo, T. and Ishiura, M.: *Bioessays*, **22**, 10–15 (2000)
- 8) 蔵本由紀：三村昌泰編, リズム現象の世界. 非線形・非平衡現象の数理, Vol. 1. 東京, 東京大学出版会 (2005)
- 9) 郡 宏, 森田善久：生物リズムと力学系. 現象を解明する数学, 東京, 共立出版株式会社 (2011)
- 10) Moore, R.Y. and Eichler, V.B.: *Brain Res.*, **42**, 201–206 (1972)
- 11) Kawamura, H. and Ibuka, N.: *Chronobiologia*, **5**, 69–88 (1978)
- 12) Inouye, S.T. and Kawamura, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **76**, 5962–5966 (1979)
- 13) Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P.A. and Lehman, M.N.: *Nature*, **382**, 810–813 (1996)
- 14) Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y. *et al.*: *Nature*, **389**, 512–516 (1997)
- 15) Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G. and Lee, C.C.: *Cell*, **91**, 1055–1064 (1997)
- 16) Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y. *et al.*: *Genes Cells*, **3**, 167–176 (1998)
- 17) Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S. *et al.*: *Cell*, **91**, 1043–1053 (1997)
- 18) Nagano, M., Adachi, A., Nakahama, K. *et al.*: *J. Neurosci.*, **23**, 6141–6151 (2003)
- 19) Yan, L. and Okamura, H.: *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 1153–1162 (2002)
- 20) Doi, M., Ishida, A., Miyake, A. *et al.*: *Nat. Commun.*, **2**, 327 (2011)