

「脳を知る」

平成9年度採択研究代表者

市川 眞澄

(財) 東京都神経科学総合研究所 主任研究員

「フェロモンの記憶に関わるシナプスメカニズムの解析」

1. 研究の概要

フェロモンは動物の社会生活に重要な因子であり、鋤鼻系が受容および情報処理に関わっている。雌マウスは交尾妊娠後、交尾相手と異なる系統の雄の匂いを曝露されると妊娠阻止が生ずる。これは、雌が交尾相手のフェロモンを記憶し、記憶したものと異なるフェロモンに曝露されることによって起きる。この記憶形成にともなって鋤鼻系の第一次中枢の副嗅球に存在する相反シナプスのなかで、興奮性シナプスが可塑的变化を示すことがすでに明白になった。さらに相反シナプスとフェロモンの記憶との関わりを総合的に解析している。

特にシナプスの可塑性を培養系で明らかにする目的で、これまでに副嗅球の培養系を確立した。今後培養系における相反シナプスの可塑性について薬理学的実験を中心に研究を行なう。また、鋤鼻系でシナプスの可塑性を調べる上で、刺激源であるフェロモンについての解析も必須である。そこで、フェロモンおよびフェロモンレセプターに関する研究を行なっている。

2. 研究実施内容

雌マウスは交尾妊娠後、交尾相手と異なる系統の雄の匂いを曝露されると妊娠阻止（流産）が生ずる（ブルース効果）。これは、雌が交尾相手のフェロモンを記憶し、記憶したフェロモンと異なるフェロモンに曝露されることによって起きる。このブルース効果は交尾後30－50日間保持され、その後消去する。このように雌マウスには高度なフェロモン認識と記憶、さらに消去機構が存在し、記憶の部位が副嗅球という鋤鼻系の第1次中枢にあることが確かめられている。副嗅球には相反シナプス（投射ニューロンと介在ニューロンとの間で相反する方向性を有する興奮性と抑制性のシナプスが隣接して存在するシナプス）が存在し、雌マウスの記憶にはこの相反シナプスの機構が重要であることが指摘されている。本研究課題では、相反シナプスの機能を中心に、フェロモンの記憶との関わりを以下の4つのプロジェクトで総合的に解析している。

フェロモン記憶の基礎現象としての可塑性シナプスの形態学的解析

1) フェロモン記憶形成及び消去の形態学的解析

フェロモン記憶の形態学的相関を明らかにした。交尾後1日では、非交尾群（記憶非形成群）に比較して交尾群（記憶形成群）では、僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスの後膜肥厚のサイズが有意に増大している。交尾群のシナプスのサイズの増大は出産によってなくなる。また、交尾後40日では、交尾群のシナプスのサイズの増加は認められなかった。この変化は、これまで報告されている行動学的証拠と一致する。さらに、この興奮性シナプスの伝達物質（グルタミン酸）受容体の変動について電子顕微鏡を用いて解析を進めている。

2) 培養系におけるシナプス可塑性の解析

フェロモンの記憶において重要なシナプス可塑性について、副嗅球の細胞培養系を用いて解析することを目指し、嗅球の初代培養細胞を調製し有用性の評価を行った。免疫細胞化学的に様々な抗体で培養細胞を染色し、生体内の嗅球で見られるものと同じ様なシナプスが、培養系内でも形成されているか検討をした。細胞内カルシウム計測法を応用した機能的な観察により、培養嗅球ニューロン間で、グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプス伝達が生じていることが示唆された。シナプス前終末の小胞タンパク質・シナプトフィジンに対する抗体、また GABA 作動性の抑制性シナプス終末に局在するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) に対する抗体などを用いた染色により、培養系内にも、興奮性のみならず、抑制性シナプスも多数形成されている像が得られた。さらに機能上重要と考えられる相反シナプスに類似した構造も見いだされた。

3) フェロモンレセプターの分子生物学的解析

哺乳類フェロモン分子を同定する目的で、フェロモン受容体候補遺伝子を利用した哺乳類フェロモン活性検出システムの開発を試みている。本年はマウスのフェロモン受容体候補遺伝子をいくつかクローニングし、それらのアミノ酸コーディング部分を神経細胞で発現のよいベクターに組み込んだ。それらDNAを鋤鼻ニューロンの primary culture にトランスフェクト後、部分精製したマウス尿を投与し、カルシウムイメージング法で観察している。

フェロモン記憶の分子生物学および生理学的解析

1) 相反シナプスの分子生物学的研究

副嗅球のメタボトロピックグルタミン酸受容体 (mGluR) のサブタイプの一つである mGluR2 を刺激することによって、交尾のときに形成される記憶の特徴を備えた記憶が形成されることをすでに証明している。そこで、mGluR2 欠損マウスのフェロモン記憶形成能を解析してきた。mGluR2 遺伝子の変異を Balb/c に6世代乗せ換えたマウスを用いて検討したところ、ミュータントマウスの記憶障害

が示唆されたが、さらに 12 世代乗せ換えたコンジェニックマウスで再検討している。

2) 相反シナプスの生理学的研究

脳内情報処理におけるグリア細胞の役割が注目されている。GABA—グルタミン—グルタミン酸サイクルは、グルタミン酸と GABA の神経伝達に重要であり、アストロサイトに依存している。そこで、フェロモンの記憶に副嗅球のグリア細胞が関わるか否かを検討した。副嗅球の glial fibrillary acidic protein の発現が記憶成立の条件下で増加した。グルタミン合成酵素阻害薬である L-methionine sulfoximine、グリア細胞の活動を抑制する fluorocitrate の副嗅球内注入はいずれも記憶障害をもたらした。本結果は、フェロモンの記憶形成に副嗅球のグリア細胞が関わることを示唆している。

刺激要因としてのフェロモン物質およびフェロモンレセプターの解明

(1) フェロモンとフェロモンレセプターの相互作用を解析する方法の開発

AFM (原子間力顕微鏡) は、探針にフェロモンを付けることによりフェロモンとフェロモンレセプターの相互作用を解析できるとともにフェロモンレセプターの分布も解明できる。現在のところラットのフェロモンについてはよくわかっていないので、今回の実験ではフェロモンレセプターが存在している微絨毛を特異的に染めるレクチン VVA を用いた。探針に VVA を結合させ、この探針を AFM に取り付け、溶液中で鋤鼻切片表面に接触させた。VVA が認識する糖である α -GalNAc が試料表面に存在すれば、糖とレクチンのあいだで比較的弱い結合ができ、レクチンと糖を引き離すのに必要な力を計算するとおよそ 20-40 ピコニュートンであることがわかった。1mM の GalNAc の存在下で同様な測定を行うと、これらの結合はほとんど観察されず、糖を除くことにより再び回復したことから、測定した力は糖とレクチンによるものである。今回用いた方法は、フェロモンとレセプターの相互作用を解析する上で AFM が有用である。現在、フェロモンレセプターに対する 2 種類の抗体をレクチンのかわりに用いて解析中である。

(2) フェロモン受容細胞の培養系の開発

フェロモン受容の研究へのアプローチとして、フェロモン受容神経細胞の培養系開発が有効な手段と考えられる。

鋤鼻神経細胞は外部と直接接しているため、神経毒性のある化学物質などにより障害を受けやすい。障害を受けた神経細胞は死滅し、前駆細胞から新たに神経細胞が生まれ、機能的に成熟する。この現象は生涯続くことから鋤鼻神経細胞は神経発生を調べるためのすぐれたモデルとしても注目されている。培養系で神経発生が再現できればフェロモン受容の研究だけでなく、神経発生の研究にも大きく貢献できると思われる。すでにラットの鋤鼻器より細胞を調製し培養を開始し、培養系でも

鋤鼻神経細胞の変成再生を再現できる系を確立した。今後、より生理的条件に近い培養系を開発する。

フェロモンの記憶学習の行動学的解析

1) フェロモン様物質曝露にともなう相反シナプス機能変化の行動学的解析

雄性ラットに雌性の尿を呈示すると、約 50KHz の超音波の発声反応が観測された。しかし、その発生頻度は低く、フェロモンの有効物質の生物検定に用いるには条件を再検討する必要がある。尿と同時に雌性ラットを導入することで、雄の超音波の発声頻度は著明に上昇した。また、マウス、ハムスターでもラットと同様の結果が得られた。現在雄ラットに様々な処置を施し、超音波発声にどのような影響を与えるかを検討中である。

2) 視床下部ニューロン活動を指標とする神経行動学的研究

シバヤギを実験に供試して、GnRHパルスジェネレーターの活動状態を多ニューロン発射活動 (MUA) として持続的にリアルタイム解析しうるシステムを開発し、被検材料のフェロモン活性をMUAの特異的上昇に与える影響を指標として評価しうる生物検定系を確立し、フェロモン活性をもつ被検材料の呈示方法について検討した。雄ヤギ体表の様々な部位から皮膚を採材し、フェロモン活性の生物検定を行った。頭部および頸部の皮膚にはフェロモン活性が認められたが、腹部および臀部の皮膚には認められず、雄性フェロモン合成能には部位特異性が有ることが示された。皮膚より皮脂腺のみを単離して抽出し、生物検定を行った結果、活性が認められ、フェロモンが頭部皮脂腺内で産生されることが示された。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Matsuoka M, Mori Y, Ichikawa M.: Morphological changes of synapses induced by urinary stimulation in the hamster accessory olfactory bulb. *Synapse*, 28, 160-166 (1998)
- Osada T, Arakawa H, Ichikawa M, and Ikai A.: Atomic force microscopy of histological sections using a new electron beam etching method. *J. Microscope.*, 189, 43-49 (1998)
- Ichikawa M, Osada T, and Costanzo RM.: Replacement of receptor cells in the hamster vomeronasal epithelium after nerve transection. *Chem Senses*, 23, 171-179 (1998)
- Osada T, Takezawa S, Itoh A, Arakawa H, Ichikawa M, Ikai A.: The distribution of sugar chains on the vomeronasal epithelium observed with the atomic force microscope. *Chemical Senses*, 24, 1-6 (1999)
- Ichikawa M, Shin T, Kang MS.: Fine structure of the vomeronasal sensory

- epithelium of Korean goats (*Capra hircus*). *Reprod Develop.*, 45, 81-89 (1999)
- Yoshida-Matsuoka J, Osada T, Mori Y, Ichikawa M.: A developmental study using three antibodies (VOBM1, VOBM2, and VOM2): Immunocytochemical and electron microscopical analysis of the luminal surface of the vomeronasal sensory epithelium. *Anatomy Embryol*, 199,215-224 (1999)
- Hagino-Yamagishi H, Minamikawa--Tachino R, Ichikawa M, Yazaki K.: Expression of Brain-2 in the developing olfactory bulb. *Develop. Brain Res.*, 113, 133-137 (1999)
- Osada T, Ikai A, Costanzo RM, Matsuoka M, Ichikawa M.: Continual neurogenesis of vomeronasal neurons in vitro. *J. Neurobiol.*, 40, 226-233 (1999)

他7件