

「脳を知る」  
平成9年度採択研究代表者

市川 眞澄

(東京都医学研究機構 神経科学総合研究所 主任研究員)

## 「フェロモンの記憶にかかわるシナプスメカニズムの解析」

### 1. 研究実施の概要

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。自然な刺激によるシナプスの可塑性と記憶との関わりを明らかにする目的で、フェロモンの記憶をつかさどる鋤鼻系副嗅球内の相反シナプスという機能的に重要なシナプスに注目して、フェロモン刺激とシナプスの可塑性との関連を総合的に解析している。本年度は、(1)雌マウスの交尾刺激により、副嗅球内のニューロンに脱抑制が起きることを示した。この脱抑制が、これまでに電子顕微鏡で明らかにした交尾後の記憶形成期におこる相反シナプスの形態変化の要因になると考えられる。(2)相反シナプスの機能には NMDA 型グルタミン酸受容体および GABA<sub>A</sub> 受容体が関わることを電気生理学的に明らかにした。(3)培養系の研究により、副嗅球の初代培養ニューロンにノルアドレナリンを添加するとシナプス形成が促進されることを明らかにした。交尾後副嗅球でノルアドレナリンが一過性に増えることから、シナプスはノルアドレナリンの強い影響を受け、可塑性を示すものと考えられる。今後、生体、スライス、培養系それぞれの利点を活かして研究を進めることにより、シナプスレベルでの記憶学習のメカニズムの解明を目指す。

### 2. 研究実施の内容

#### 1) 形態学的解析

フェロモンの記憶には、副嗅球の僧帽房飾 (MT) 細胞と顆粒細胞間の相反シナプス (MT 細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスと顆粒細胞から MT 細胞への GABA を伝達物質とする抑制性シナプスから構成されている) が重要な働きを演じている。これまでに、雌マウス交尾後のフェロモン記憶形成期に相反シナプスのうち興奮性シナプスの後膜肥厚のサイズが大きくなることを電子顕微鏡の解析で明らかにした。この変化により顆粒細胞の興奮性がたかまり、GABA を介した抑制性フィードバック機構を増強していると推測される。そこで、この興奮性シナプス変化がどのくらい長期にわたって維持されるのかについてさらに解析した結果、交尾後1日では有為に大きくなっていたものが、50日後には対照群と差はなかった。また、出産後はシナプスのサイズに

差は生じなかった。現在、さらに5日後、20日後のシナプスについて解析中である。シナプス後膜肥厚には、伝達物質の受容体の他、イオンチャンネルや様々な機能分子が存在すると云われている。グルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスの後膜肥厚のサイズの変化が如何なる物質により起こるのか、また肥厚内に存在するグルタミン酸受容体や機能分子などが量的変化を起こすのか。これらの問題を調べるため、現在、金粒子標識による免疫電子顕微鏡法で機能分子の動態を定量的に解析することを試みている。

交尾刺激にともなって、特定のニューロンが興奮し、この興奮したニューロン群に可塑的变化がおこっていると考えられる。そこで、交尾刺激に伴って興奮したニューロンを同定するのを目的として、最初期遺伝子にコードされる蛋白である Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) の発現を交尾後の雌ラット副嗅球内において免疫細胞化学的に観察した。その結果、交尾した雌グループでは副嗅球顆粒細胞に限局して Arc 陽性細胞数の増加が観察された。またこの Arc 陽性細胞数の増加は鋤鼻神経切断後の動物では消失した。これらのことから、この現象はフェロモン刺激に強く依存する。また Arc は核同様に樹状突起にもその陽性反応が観察され、今後 Arc により興奮したシナプス自体をラベルできる可能性を示した。

## 2) 生理学的解析

フェロモン記憶に関わる副嗅球の MT 細胞と顆粒細胞との樹状突起間シナプス伝達をスライスパッチクランプ法により解析し、顆粒細胞を介した MT 細胞のフィードバック抑制に顆粒細胞の NMDA 受容体がそして MT 細胞の GABA<sub>A</sub> 受容体が重要な役割を演じていることを明らかにした。一方、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR2 の活性化は逆にこのフィードバック抑制を抑制した。すなわち、脱抑制に関わっていると推測される。ペアパルス抑圧は、副嗅球の MT 細胞の投射部位である扁桃体を電気刺激しても誘起される。このペアパルス抑圧は MT 細胞の顆粒細胞によるフィードバック抑制 (樹状突起間抑制) を反映していると考えられている。雌マウスの膣内に挿入したバルーンカテーテルにより膣刺激を与えると、ペアパルス抑圧率は膣刺激開始 2 分後には膣刺激開始前に比べて有意に減少した。この結果は、膣刺激が MT 細胞の脱抑制をもたらすことを示唆している。以上から、交尾刺激が MT 細胞の単一ニューロン活動を促進することを明らかにした。

## 3) 培養系による解析

交尾刺激は脳幹からのノルアドレナリン線維によって副嗅球まで運ばれてくると考えられている。また、交尾後副嗅球内のノルアドレナリン量が増加するという報告がある。そこで、副嗅球培養ニューロンに対するノルアドレナリンの効果

について検討を始めた。胎生20日の副嗅球ニューロンを2週間培養して、ノルアドレナリンを添加した際に、シナプス量の増加を示す結果が preliminary に得られている。今後この現象についてはさらに詳細に検討する必要がある。また、鋤鼻ニューロンと副嗅球ニューロンとを共培養し、その影響について検討を行った。共培養によって、シナプスには量的・質的变化は確認できなかった。しかし、チロシン水酸化酵素 (TH) を含有しているニューロンの増加が認められた。嗅上皮からの入力遮断により、主嗅球では系球体層に位置する TH 陽性 periglomerular 細胞が消失すること、主嗅球と嗅上皮との共培養系で TH 陽性ニューロンが、単独培養に比べて増加するという報告がある。したがって、鋤鼻系においても鋤鼻ニューロンによる TH 陽性ニューロンを含め、副嗅球ニューロンの分化や成熟の調節機構が働いていることが考えられる。今後、鋤鼻ニューロンと副嗅球ニューロンの共培養系を用いて、シナプスの可塑性の研究を進める。

#### 4) フェロモンレセプターの研究

フェロモン分子は鋤鼻ニューロンに発現している特定のフェロモン受容体と特異的に結合する。哺乳類フェロモン受容体の機能を解析するため、単離したマウスフェロモン受容体遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んだキメラアデノウイルスを作成した。このウイルスをフェロモン受容細胞であるラット鋤鼻ニューロンに感染させ、フェロモン受容体遺伝子を強制的に発現させた。これらの細胞を、マウス尿分画で刺激し、カルシウムイメージングで解析したところ、オス尿特異的な反応が観察された。これは、導入したマウスフェロモン受容体と特異的に反応するリガンド、おそらくオス特異的なマウスフェロモンの結合活性を検出したと考えられる。ラットのプライマリーカルチャーを利用したアッセイ系を開発できた。今後、このアッセイ系を利用してフェロモンを特定することを試みる。

#### 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Takigami S, Mori Y, Ichikawa M, Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. *Chemical Senses* 25 : 387-393 (2000)

Matsuoka M, Yoshida-Matsuoka J, Costanzo RM, Ichikawa M, Surface changes in the rat vomeronasal epithelium during degeneration and regeneration of receptor cells. *Anatomy and Embryology* 201 : 467-473 (2000)

Yoshida-Matsuoka J, Matsuoka M, Costanzo RM, Ichikawa M, Morphological and histochemical changes in the regenerating vomeronasal epithelium. *J. Vet. Med. Sci.*, 62 : 1253-1261 (2000)

Muramoto K, Kato M, Matsuoka M, Kuroda Y, Ichikawa M, A primary culture system of rat olfactory bulb forming many synapses similar to intact ones and

spontaneously generating synchronous intracellular calcium oscillations. *Anatomy and Embryology*, 203, 9-21 ( 2001 )

Matsuoka M, Yoshida-Matsuoka J, Costanzo RM, Ichikawa M, Immunocytochemical study of Gi2a and Goa on the epithelium surface of the rat vomeronasal organ. *Chemical Senses*, 26, 161-166( 2001 )

Huang G-Z, Ujihara H, Takahashi S, Kaba H, Yagi T, Inoue S, Involvement of complexin II in synaptic plasticity in the CA1 region of the hippocampus : the use of complexin lacking mice. *Jpn J. Pharmacol.* 84, 179-187( 2000 )

Okere CO, Kaba H, Region-specific localization of glutamine synthetase immunoreactivity in the mouse olfactory bulb : implication for neuron-glia interaction in bulbar synaptic plasticity. *Brain Res.* 857, 308-312( 2000 )

Osako Y, Otsuka T, Taniguchi M, Oka T, Kaba H, Oxytocin depresses spontaneous  $\gamma$ -aminobutyric acid-ergic inhibitory postsynaptic currents in cultured mitral cells of the rat olfactory bulb by a presynaptic mechanism. *Neurosci. Lett.* 289, 25-28( 2000 )

Okere CO, Kaba H, Heterogenous immunohistochemical expression of microglia-specific ionized calcium binding adaptor protein ( Iba 1 ) in the mouse olfactory bulb. *Brain Res.* 877, 85-90( 2000 )

Iwata E, Wakabayashi Y, Kakuma Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y, Testosterone-dependent primer pheromone production in the sebaceous gland of male goat. *Biol. Reprod.* 62 : 806-810( 2000 )

Wakabayashi Y, Iwata E, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y, Regional differences of pheromone production in the sebaceous glands of castrated goats treated with testosterone. *J. Vet. Med. Sci.* 62 : 1067-1072( 2000 )

Iwata E, Wakabayashi Y, Kakuma Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y, Induction of primer pehromone production by dihydrotestosterone in the male goat. *J. Vet. Med. Sci.*, 63 : 347-348( 2001 )

Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y, Involvement of corticotropin-releasing factor in the retrieval process of fear-conditioned ultrasonic vocalization in rats. *Physiol. Behav.*, 71 : 323-328( 2000 )