「脳を知る」
平成9年度採択研究代表者

市川　眞澄

（(財)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(相反シナプスとは、僧帽房飾(MT)細胞から顆粒細胞の方向性を有する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細胞への方向性を有する GABA を伝達物質とする抑制性シナプスが並立して存在するシナプスである)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)副嗅球のスライス標本を用いてシナプスの可塑性を生理学的に解析した結果、相反シナプスのうち興奮性シナプス伝達の長期増強（LTP）が明らかになった。このLTP の誘導には、比較的低頻度で比較的長時間の刺激を与える必要があった。(2)交尾後1日目で確認できた相反シナプスのうちの興奮性シナプスの可塑的変化は、交尾後 10 日には消失し、代わって抑制性シナプスのサイズが大きくなり、その変化は交尾後少なくとも 20 日まで維持されることを確認した。このような相反シナプスにおける二つのシナプスの連続的な変化が動物の長期記憶を維持していることが示唆された。(3)培養系の研究により、副嗅球培養ニューロンに pEGFP-actin を導入し、薬理学的に培養ニューロンを脱抑制して樹状突起上のスパイン様構造の変化を観察したところ、スパイン様構造の増加が観察された。この変化は、シナプス形成や可塑性と密接な関係があると思われる。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

解剖学および形態学的解析

これまでの研究により雌マウスの交尾時に生じる記憶形成には相反シナプスの興奮性シナプスに可塑的変化が伴うことを確認している。この記憶は時間経過とともに 50 日前後で消失することが知られている。本年度は相反シナプスの興奮性シナプスがこの記憶を長期間維持しているのか、長期的には他のカスケードが存在するのかを検討した。その結果、興奮性シナプスの可塑的変化は交尾後 10 日には消失し、代わって抑制性シナプスサイズが大きくなりその変化は交尾後少なくとも 20 日まで維持されることを確認した。このような相反シナプスにおける二つのシナプスの連続

的な変化が動物の長期記憶を維持していることが示唆された。

交尾刺激によって副嗅球内で代謝回転が高まるノルアドレナリン（NA）により MT 細胞の脱抑制が起こることがフェロモンの記憶形成には必須である。副嗅球における NA システム（NA 神経終末や NA 受容体の分布）について形態学的な解析を行った。In situ hybridization 法により、α2cNA 受容体の陽性反応は MT 細胞においてのみ検出することができたことなどから、フェロモンの記憶形成時に NA が影響を及ぼしているのは、MT 細胞であることが示唆された。

bicuculline の副嗅球投与はマウスに交尾刺激なしに匂いの記憶を形成させることができる。この効果を副嗅球培養ニューロンで検証する為に、Ca イメージング装置を用いて細胞内 Ca 濃度変化を観察した。その結果、比較的大型の MT 細胞を含む約 50%程度のニューロンで、bicuculline 添加後に細胞内 Ca 濃度変化が観察された。薬理学的処理後の副嗅球培養ニューロンにおけるシナプス変化を観察する為に、コンフォーカルレーザー顕微鏡のタイムラプスシステムを開発した。培養ニューロンに pEGFP-actin を導入し、bicuculline 添加後の樹状突起上のスパイン様構造の変化を観察したところ、スパイン様構造の増加が観察された。この形態変化は、シナプスの形成および可塑性と重要な関係があると思われる。

鋤鼻系の *in vitro* での再構築を目的に、副嗅球と鋤鼻器の共培養系を確立した。共培養によって、チロシン水酸化酵素（TH）含有ニューロン数が有意に増加することを明らかにした。さらに、この細胞分化誘導現象の特異性について検討した。主嗅球と鋤鼻器との共培養では、TH 含有細胞数の増加は認められなかった。一方、嗅上皮と、主嗅球では既報の通り TH 含有細胞の有意な増加が認められ、副嗅球では TH 含有細胞数に有意な変化は認められなかった。このことは感覚器とその投射先の間に特異的な分化誘導のメカニズムが働いていることを示唆している。また、特異的なシナプスが形成されている可能性が高い。

分子生理学的解析

副嗅球のスライス標本を用いて、フェロモン記憶の電気生理学的相関、すなわち MT 細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達の長期増強（LTP）を捉えた。この LTP の誘導には、海馬で一般的に用いられる 100 Hz の刺激はあまり有効ではなく、比較的低頻度、すなわち θ 波（10 Hz）で、かつ、比較的長時間の刺激を与えることが必要であった。この LTP は NMDA 受容体依存性に成立し、ノルアドレナリンにより促進された。ノルアドレナリンによる LTP の促進効果は α-2 受容体を介していた。副嗅球のスライス標本を用いて、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ホールセル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（樹状突起間抑制）に顆粒細胞の代謝型グルタミン酸受容体 mGluR2 が、NMDA 受容体とは逆に、抑制的に作用することを明らかにした。

電気生理学的研究

副嗅球スライス標本を用いて、スライスパッチ法を中心に、形態学的手法を併用して、MT 細胞に注目し、細胞の詳しい形態ならびに生理的特性を検索した。その結果、副嗅球の MT 細胞は非常に多様な形態を示したが、1次樹状突起が複雑に分岐し複数の糸球体から入力を受けているこ

と、2次樹状突起はあまり発達していないという基本的な特徴をもっていた。1次樹状突起を介して1つの糸球体のみから入力を受け、2次樹状突起の発達の著しい、主嗅球の僧帽細胞とは明らかに異なっていた。副嗅球の MT 細胞では、複数の入力が樹状突起において統合され、Ca スパイクにより増幅され、さらに、細胞体での最終的な情報処理を経て Na スパイクにより出力するという情報処理の流れが示唆された。また、嗅覚情報処理の上で重要な役割を果たしている相反シナプスが、MT細胞の1次樹状突起と顆粒細胞の樹状突起間に存在していることを電顕により明かにした。電気生理学の手法により、副嗅球のMT細胞と顆粒細胞の樹状突起間の相反性シナプス伝達は、主嗅球同様 GABAA あるいは NMDA 受容体が関与しているが、主嗅球にみられる僧帽細胞細胞間のグルタミン酸のスピルオーバーが副嗅球では見られないことも明らかにした。

分子生物学的解析

偶蹄類の一種であるヤギフェロモン受容体遺伝子ホモログを単離し、それら遺伝子群の発現を RT-PCR, in situ hybridization 等で解析した。その結果、2型受容体群は存在するが機能せず、1型受容体群のみが機能している可能性が高いことがわかった。しかも1型受容体は鋤鼻神経細胞ばかりでなく嗅覚神経細胞でも発現している。すなわちフェロモンが鋤鼻系、主嗅覚系という2つの独立した経路で認識される可能性が示された。これは、これまで知られているマウス・ラットのシステムとは異なる。このことは、動物種がその環境に応じてフェロモンの受容伝達機構を変化させてきた結果生じたものであろうと考えられる。

行動学的解析

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を行うため、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が可能な生物検定系を用いて、シバヤギ雄性フェロモン物質の探索を行った。その結果、雄ヤギに特異的なにおい物質である 4-ethyl octanoic acid に類縁の化合物がフェロモンである可能性が示唆された。このフェロモンの受容機構について、げっ歯類で報告されているフェロモン受容体候補遺伝子のホモログ遺伝子のクローニングを試みたところ、数種の遺伝子が見いだされ、そのうち1種が鋤鼻神経細胞と嗅上皮の感覚神経細胞層に発現していることが明らかになった。更にこのフェロモンは雄ヤギ皮脂腺においてジヒドロテストステロン（DHT）の作用により産生されていることから、テストステロンから DHT への転換酵素である5αリダクターゼの、mRNA の発現を調べた結果、5αリダクターゼ typeI が皮膚で発現していた。

3. 研究実施体制

（Ⅰ）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
市川眞澄（東京都神経科学総合研究所）

（Ⅱ）フェロモン記憶の分子生物学および生理学的解析
椛秀人（高知医科大学第一生理学教室）

(Ⅲ) フェロモンの記憶学習の行動学的解析

森裕司(東大大学院農学部生命科学研究科獣医動物行動学教室)

(Ⅳ) 鋤鼻系シナプスの電気生理学的解析(平成11年度より参加)

佐原資謹(東京医科歯科大学大学院医歯総合研究所顎顔面生理学教室)

(Ⅴ) フェロモンレセプターの分子生物学的研究(平成12年度より参加)

山岸公子(東京都臨床医学総合研究所超微形態研究部門)

(Ⅵ) 鋤鼻系シナプスの解剖学的研究(平成13年度より参加)

松岡勝人(新潟大学大学院医歯学総合研究科神経生物学・解剖学教室)

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

○ Sahara, Y., Kubota, T. and Ichikawa, M. Cellular localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1, 2/3, 5 and 7 in the main and accessory olfactory bulb of the rat. Neurosci. Lett., 312, 59-62 (2001)

○ Wakabayashi, Y., Mori, Y., Ichikawa, M., Yazaki, K., and Hagino-Yamagishi, K. A putative pheromone receptor gene is expressed in two distinct olfactory organs in goats. Chem Senses, 27,207-213 (2002)

○ Hagino-Yamagishi, K., M. Matsuoka., Ichikawa, M., Wakabayashi, Y., Mori, Y. and Yazaki, Y. The mouse putative pheromone receptor was specifically activated by stimulation with male mouse urine. J. Biochem., 129, 509-12 (2001)

○ Yoshida-Matsuoka, J., Matsuoka, M., Norita, M. and Ichikawa, M. Long-term recovery of rat vomeronasal system after nerve transection. Acta Medica et Biologica, 49,67-72(2001)

○ 市川眞澄 脳機能への環境の影響 科学, 71,712-718(2001)

○ 市川眞澄 鋤鼻系の構造とそのはたらき Aroma Research, 2, 249-256(2001)

○ 市川眞澄 フェロモン作用のメカニズム AERA Mook, 73, 14-17(2001)

○ 瀧上周、森裕司、市川眞澄:哺乳類のフェロモン受容・情報処理機構に関する比較形態学的研究 日本味と匂学会誌, 9, 3-17 (2002)

○ Otsuka, T., Hashida, M., Oka, T. and Kaba, H. Activation of $GABA_A$ receptors in the accessory olfactory bulb does not prevent the formation of an olfactory memory in mice. Journal of Veterinary Medical Science, 63, 807-809 (2001)

○ Otsuka, T., Ishii, K., Osako, Y., Okutani, F., Taniguchi, M., Oka, T. and Kaba, H. Modulation of dendrodendritic interactions and mitral cell excitability in the mouse accessory olfactory bulb by vaginocervical stimulation. European Journal of Neuroscience, 13, 1833-1838 (2001)

○ Taniguchi, M. and Kaba, H. Properties of reciprocal synapses in the mouse accessory olfactory bulb. Neuroscience, 108, 365-370 (2001)

○ 椛　秀人　嗅球における匂い情報処理　AROMA RESEARCH 臨時増刊 No.1, 25-30 (2001)

○ 奥谷文乃　幼若ラットを用いたにおい学習研究法　日本味と匂学会誌,8,79-86(2001)

○ Iwata E., Wakabayashi Y., Matsuse S., Kikusui T., Takeuchi Y.and Mori Y. Induction of Primer Pheromone Production by Dihydrotestosterone in the Male Goat. J. Vet. Med. Sci., 63, 347-348 (2001)

○ Kikusui T., Takigami S., Takeuchi Y. and Mori Y. Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats. Physiol.　Behav., 72, 45-50 (2001)

○ Akutsu, H., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Sano, K., Hatanaka, A., and Mori, Y. Alleviating effects of plant-derived fragrances on stress-induced hyperthermia in rats. Physiol. Behav., 75,355-360 (2002)

○ Sahara, Y. and Takahashi, T. Quantal components of the excitatory postsynaptic currents at a rat central auditory synapse. J. Physiol., 536,189--197(2001)

○ Jones, M.V., Janas, P., Sahara, Y. and　Westbrook, G,L. GABAA receptor agonists perform more work at the binding site than agonists. Biophysic. J., 81, 2660-2670 (2001)

(2)　特許出願

平成13年度はなし