

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500319

研究課題名(和文) フェロモン記憶機構にかかわるシナプスのリアルタイムイメージング解析

研究課題名(英文) Real-time imaging of synapse underlying pheromonal memory

研究代表者 市川 眞澄 (ICHIKAWA MASUMI)

財団法人東東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：20124414

研究成果の概要(和文)：フェロモン記憶形成にかかわるシナプス可塑性のメカニズムを検討するために、培養副嗅球ニューロンについて共焦点レーザー顕微鏡を駆使しリアルタイムイメージングを行った。樹状突起上の棘突起およびシナプスの動態について定量的に解析した。ノルアドレナリンで薬理的にニューロンが興奮すると、棘突起の数を増すタイプとサイズが増大するものがある。この結果は記憶のシナプス機構を解析するため重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：

To determine the neuronal mechanism underlying pheromonal memory, we applied real-time imaging of cultured accessory olfactory bulb neurons. The effect of plastic change of spines on the dendrites following noradrenalin stimulation is examined. It is revealed that two types of spines are identified. One is enlargement of the spine size and the other is increment of the spine number. This result is important for study of synapse mechanism underlying memory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖・神経病理

キーワード：神経再生・神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

フェロモンによるコミュニケーションは、昆虫のみならず、哺乳類でも生殖戦略の一つとして雌雄のコミュニケーションに使われており、種の保存に重要な役割を演じている。フェロモン情報は、鋤鼻器というフェロモン

受容のための特殊器官で受容され、鋤鼻系という神経系を経由して、視床下部に送られ、生殖腺刺激ホルモン放出ニューロン等をコントロールすることにより、内分泌系を調節し、様々な機能発現に関与する。

このなかで、特徴的な機能は、フェロモン

の記憶機構である。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。この記憶は交尾妊娠後30-50日間保持され、その後消去される。このように雌マウスには高度なフェロモン認識機能と記憶機構、さらに消去機構が存在している。さらに、フェロモン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明らかにされている。フェロモンのセンサーである鋤鼻器からの鋤鼻神経は副嗅球内の糸球体で僧帽/房飾(MT)細胞と興奮性シナプスを形成する。またMT細胞と顆粒細胞は樹状突起間で相反シナプスを形成する。相反シナプスとは、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。糸球体でMT細胞の樹状突起に興奮が生じた際に、その興奮は相反シナプスのうち興奮性シナプスを介して顆粒細胞に伝えられる。顆粒細胞の興奮は相反シナプスの抑制性シナプスを介して即座にMT細胞を抑制すると推定されている。これまでの研究から、雌マウスの記憶にはこの相反シナプスの機構が関わることを明らかにしつつある(Ichikawa 2003, Matsuoka 他 2004, 市川 2004)。

2. 研究の目的

我々の研究から交尾後のフェロモン記憶形成期に副嗅球の相反シナプスのうち興奮性シナプスのサイズが大きくなることを電子顕微鏡で明らかにした(Matsuoka 他 1997)。シナプスには受容体の他様々な機能分子が局在する。しかしながら、機能分子に可塑的

変化が生じているか不明である。分子レベルでの可塑的变化を明らかにすることが必要である。

一方、我々はこれまでに、鋤鼻器と副嗅球の共培養系を確立した(Muramoto 他 2003, Moriya-Ito 他, 2005, 守屋、市川 2005) Ishimatsu 他 2006)。この培養系を用いることにより、フェロモン物質で鋤鼻器を刺激し、その反応を副嗅球ニューロンにおいて観察可能である。また、交尾刺激は、脳幹の青斑核からのノルアドレナリン線維により運ばれる。従って、培養系にノルアドレナリンを添加することにより、交尾刺激と類似の刺激を起こすことが可能である。さらに、副嗅球の相反シナプスの機能分子を遺伝子工学的に可視化することにより、リアルタイムに観察し、シナプス機能分子の動態を解析することができる。このような研究を総合的におこない、個体レベルでは解析の困難な、記憶を含めたフェロモンの記憶機構におけるシナプスの機能分子の動態を明らかにすることにより、記憶のシナプスメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 鋤鼻器と副嗅球ニューロンの共培養
ラット胎仔(15日齢)から鋤鼻器をとりだし、一方胎齢20日のラットから副嗅球を採取し細胞を培養する。培養2週間後に、培養鋤鼻小塊を、副嗅球の培養系に移植することにより共培養をおこなった。これまでの研究により確立している手法をさらに発展させた。

(2) GFPにより可視化された副嗅球ニューロンのリアルタイムイメージング
GFP遺伝子をリポフェクション法で培養副嗅球ニューロンに導入し、ニューロンを可視化し、共焦点レーザー顕微鏡システムで観察した。小型培養装置を顕微鏡観察システムに組み込むことによって長期観察をおこない、さ

らに、time-lapse システムとの組み合わせによりリアルタイムで棘突起やシナプスの形態を観察し変化を解析した。

(3) 副嗅球ニューロン刺激後の棘突起の形態変化の解析

交尾刺激と類似刺激を行う目的で、培養副嗅球ニューロンにノルアドレナリン (NA) を添加して、ニューロン上のシナプスにどのような変化が生じるかを共焦点レーザー顕微鏡システムで観察し、リアルタイムでシナプスレベルの変化を観察した。特に、シナプス形成部位である、棘突起の動態を解析した。

(4) 電子顕微鏡を用いた樹状突起上のシナプスの三次元解析

色素を特定のニューロンに注入し、免疫組織学的に標識ニューロンを可視化した。この際、蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を同一ニューロンでおこなうことを可能にするため、蛍光物質と金粒子を用いて可視化した。可視化した MT 細胞および顆粒細胞樹状突起上のシナプスについて電子顕微鏡を用いて三次元構築をおこない観察した。シナプス形態・分布密度を計測した。

4. 研究成果

(1) 鋤鼻器と副嗅球ニューロンの共培養
末梢神経である鋤鼻器内に存在する鋤鼻ニューロンと中枢の副嗅球ニューロンは最適培地が異なるため、通常は同時に培養しにくい、これまでのわれわれの結果 (Moriya-Ito 他 2005, Ishimatsu 他 2006) を基に、培地の組成を工夫することにより鋤鼻器と副嗅球ニューロンの共培養を長期に培養することが確立できた。

そこで、共培養によって、それぞれのニューロンがどのように変化するか解析した。

① 鋤鼻器の場合 共培養により、単独培養ではほとんど見る事の出来なかった鋤鼻ニューロンの微絨毛が内腔に突出している像が電子顕微鏡で観察できた。共培養により、鋤鼻ニューロンの成熟が促されて結果であ

る。

② 副嗅球ニューロンの場合 樹状突起の長さや分枝数には差がなかったが、樹状突起上の棘突起の大きさおよびその分布密度に差が見られた。棘突起はシナプスを形成する部位であることから、棘突起の構造および分布密度の変化はシナプスの機能に差が生じていることを示唆するものである。

これらの変化は液性因子のみの影響は受けないことから、共培養の結果、鋤鼻ニューロンと副嗅球ニューロン間のシナプス形成により引き起こされると推察される (守屋、市川、2008) 。

(2) GFP により可視化された副嗅球ニューロンのリアルタイムイメージング

生きたままシナプスの動態を解析するため、培養槽を備えた共焦点システムを構築して、三次元構築およびタイムラプスにより長期間にわたる画像の取得を試みた。共培養開始後 4 週間後に、副嗅球ニューロンを GFP など遺伝子工学的に蛍光色素で標識し、そのニューロンを共焦点レーザー顕微鏡で、数十分、数時間および 48 時間以上におこる変化を観察した。この結果、フィロポディアと呼ばれる細い突起は変化が早く、短時間で伸びたり縮んだりすることが明白になった。一方、棘突起と呼ばれる太い突起はゆっくりした変化を示し、しかも、樹状突起から直接形成される像が認められ、これまで考えられていた、フィロポディアから棘突起への移行とは異なる変化の動態が確認できた (守屋、市川、2008 学会発表)。

(3) 副嗅球ニューロン刺激後の棘突起の形態変化の解析

交尾刺激は、脳幹の青斑核からのノルアドレナリン (NA) 線維により運ばれる。従って、培養系に NA を添加することにより、交尾刺激と類似の刺激を起こすことが可能である。そこで、NA の作用をリアルタイムイメー

ジングにより解析した。まず、Ca イメージングにより NA の副嗅球ニューロンに作用する動態を解析した。MT 細胞および顆粒細胞の約3割がNAに反応することが明らかになり、さらにMT細胞と顆粒細胞への異なった作用がMT細胞と顆粒細胞の間のシナプスの変化に重要な役割を演じていることを示唆する結果を得た(守屋、市川、2009 学会発表)。さらに、ニューロンの形態を解析するため、Ca イメージングの前にGFPトランスフェクションをおこない、Ca 応答を示すニューロンの樹状突起のスパインの変化を解析した。この結果、NA 濃度および時間依存的に大型のスパインが増加することを明らかにした(守屋、市川、2010 学会発表)。これは、NA がシナプスの可塑性を誘導していることを示唆する貴重な結果である。

交尾時に、フェロモン刺激が鋤鼻ニューロン経路で副嗅球に入力する。このとき同時に、青斑核経路でNA線維によりNAが作用することにより、フェロモン記憶が成立する。今回の研究結果により、NAは副嗅球ニューロンのシナプスの可塑性を高めることが確かめられた。NAにより可塑性が高められた副嗅球ニューロンのうち、鋤鼻ニューロン経路でフェロモン情報を同時に受けたニューロンが、ダイナミックに反応し、記憶に関わる変化を引き起こすと推定される。このような機構によりフェロモン記憶が成立すると推測される。このように本研究結果は記憶メカニズムの解析に貢献している。

(4) 電子顕微鏡を用いた樹状突起上のシナプスの三次元解析

記憶に関わるニューロンを抽出して、調べるための準備として、電子顕微鏡を用いた樹状突起上のシナプスの三次元解析をおこ

なった。金粒子標識MT細胞より、糸球体近位部の一次樹状突起を電子顕微鏡で観察し、連続画像より三次元再構築を行った。この結果、樹状突起10 μ mあたり、相反性シナプスは 1.54 ± 0.47 個存在していた。それ以外に非対称性シナプス前終末が 2.11 ± 0.64 個、対称性シナプス後膜肥厚が 1.16 ± 0.50 個存在していた。

相反性シナプスは顆粒細胞との間に形成していると推察でき、顆粒細胞の大型棘突起(芽球)との間での形成が多く認められた。この芽球上には非対称性：対称性シナプスの比が1：2の相反性シナプスが複数観察され、MT細胞がより抑制を受けやすい構造であることが推測された。その他のシナプスとしては、MT細胞樹状突起の単独非対称性シナプスは小型棘突起上に形成されるものが多かった。MT細胞樹状突起への入力は、観察されたすべてが単独対称性シナプスであった。単独対称性シナプスの中には、樹状突起幹同士で形成しているものも観察された。一方、MT細胞は無棘突起性ニューロンであることが知られているが、実際には小型の突起物が観察された。しかし、その部分に非対称性シナプス前終末は形成されず、一部で対称性シナプス後膜肥厚が観察されたのみであった。(遠藤 他、2009, 学会発表)

糸球体で鋤鼻神経からの入力を受ける副嗅球MT細胞の一次樹状突起上には、顆粒細胞との相反性シナプスのほかに、単独の非対称性シナプス前終末(興奮性の出力)と対称性シナプス後膜肥厚(抑制性の入力)が観察された。相反性シナプス数は、樹状突起間の誤差が少ないことから、単位長さあたりに均一に配置していることが予想される。一方、それ以外のシナプスは、誤差範囲が大きいことから、ニューロン特異性・部位特異性がある可能性が示唆された。単

独の非対称性シナプスの後膜側は、顆粒細胞の相反性になる前段階の棘突起とも考えられるが、近年、副嗅球 MT 細胞層にも小型の介在ニューロンの存在が確認されているため、他のニューロンとの間に形成されている可能性が考えられる。同様に、非対称性シナプスの受容側は顆粒細胞とは限らない。今回の観察では、明らかに軸索である構造物は確認できなかったが、遠心性の抑制性入力が副嗅球に入っている可能性もある

今後は、刺激を受けて興奮し変化をしたニューロンのみを抽出する方法を開発し、さらに、リアルタイムイメージングによる解析と電子顕微鏡の三次元解析による詳細な研究とを組み合わせることにより、定量的なシナプスの可塑的变化をしらべ、フェロモンの記憶機構の解明に役立てる計画である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Yokosuka M, Takagi S, Katou M, Pudcharaporn K, Gizurarson S, Ichikawa M, Saito TR (2008) p-Chloroamphetamine induced rat ejaculation is not associated with the preoptic nucleus or medial nucleus amygdala. *Reproductive Medicine Biology* 7:37-43.
- (2) Wakabayashi Y, Ichikawa M (2008) Localization of G protein alpha subunits and morphology of receptor neurons in Reeves turtle, *Geoclemys reevesii*, olfactory and vomeronasal epithelia. *Zoological Science* 25:178-187 (2008)
- (3) 守屋敬子, 市川真澄 (2008) 培養系を

用いた鋤鼻器・副嗅球の形態解析 *Aroma Research* 9:6-9.

- (4) Date-Ito A, Ohara H, Ichikawa M, Mori Y, Hagino-Yamagishi K (2008) Xenopus V1R vomeronasal receptor family is expressed in the main olfactory system. *Chemical Senses* 33 : 339-346
- (5) Moriya-Ito K, Endo K, Ichikawa M (2009) Vomeronasal neurons promote synaptic formation on dendritic spines but not dendritic shafts in primary culture of accessory olfactory bulb neurons. *Neurosci letters* 451:20-24
- (6) Makino N, Ookawara S, Katoh K, Ohta Y, Ichikawa M, Ichimura K (2009) The morphological change of supporting cells in the olfactory epithelium after bulbectomy. *Chemical Senses* 34:171-179.

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Moriya-Ito K, Ichikawa M, Dendritic morphology and spine motility of interneurons in accessory olfactory bulb. *Neuro2008*, 東京国際フォーラム, (2008-07-11)
- (2) 守屋敬子, 市川真澄, ラット副嗅球介在ニューロンの形態的特徴と樹状突起ダイナミズム. 日本動物学会第 79 回大会, 福岡大学, (2008-09-05)
- (3) 森泰隆, 守屋敬子, 町田武生, 市川真澄, フェロモン記憶形成に関わるオキシトシン作用の解明. 第 61 回日本動物学会関東支部大会, 埼玉大学, (2009-03-20)
- (4) 遠藤堅太郎, 守屋敬子, 塚本葉子, 市川真澄. 副嗅球・僧帽/房飾細胞の樹状突起におけるシナプスの三次元的配置. 日本味と匂学会第 43 回大会, 旭川市,

(2009-09-03)

(5) 遠藤堅太郎、守屋敬子、塚本葉子、市川眞澄，ラット副嗅球におけるシナプス結合様式の三次元的電子顕微鏡解析．日本動物学会第80回大会，静岡市，(2009-09-17)

(6) 守屋敬子、市川眞澄，ノルアドレナリンにより調節される副嗅球ニューロン内カルシウム変動の解析．第32回日本神経科学大会，名古屋市，(2009-09-18)

(7) 守屋敬子、市川眞澄，副嗅球におけるノルアドレナリン神経修飾とシナプス可塑的变化．日本味と匂学会第44回大会，小倉市 (2010-9-10)

[図書] (計3件)

(1) 市川眞澄 (2008) フェロモンセンサー 鋤鼻器 フレグランスジャーナル社 pp 135

(2) 市川眞澄 (2008) なぜあの上司は虫が好かないか 小学館 pp 204

(3) Ichikawa M (2008) Synaptogenesis (*Encyclopedia of Neuroscience*) Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U (eds) Springer pp 3979-3982.

[産業財産権]

○ 出願状況 (計0件)
なし

○ 取得状況 (計0件)
なし

[その他]

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 眞澄 (ICHIKAWA MASUMI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
研究者番号：20124414

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

守屋 敬子 (MORIYA KEIKO)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：70392371