

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570084

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形態学的解析

研究課題名(英文)Morphological analysis of synapse underlying pheromonal memory

研究代表者

市川 眞澄 (ICHIKAWA, Masumi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・副参事研究員

研究者番号：20124414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：フェロモンの記憶機構を解析するため、交尾にともなってフェロモンの記憶が形成される際に、副嗅球の相反性シナプスが形態変化を起こすことを、記憶に関わるニューロンを標識して電子顕微鏡で解析した。

神経活動依存的にニューロンをGFPで標識するTgマウスを用いて解析した。交尾後、GFP陽性(記憶ニューロン)MT細胞と陰性細胞(非記憶ニューロン)を確認して、それぞれの相反性シナプスを計測したところ、記憶ニューロンのシナプスのサイズが大きい傾向にあった(記憶ニューロン288.7nm、非記憶ニューロン266.4nm)。この解析により、記憶にともなっておこる形態変化を、ニューロンレベルでも確認できる。

研究成果の概要(英文)：Pregnancy in female mice is maintained by formation of pheromonal memory of partner male. The reciprocal synapse in the accessory olfactory bulb has been shown to play important role in this memory formation. The morphological change of this synapse is examined electron microscopically using transgenic mice in which the neuron is marked activity-dependently by GFP expression.

The size of synapse in these female mice was examined after mating. The size in GFP positive neuron was larger than those in GFP negative neuron. This result indicates that the morphological change of synapse take place in association with memory formation of pheromone. This study is expected to useful not only for research in olfaction but also for those generally in learning and memory.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：副嗅球 ニューロン 鋤鼻系 電子顕微鏡 シナプス可塑性 フェロモン マウス

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、記憶学習の基礎的現象といわれながら、脳内で特定の記憶に関わるシナプスが同定されていないため、記憶と直結したシナプスの可塑性の研究はほとんど無いと云って良い。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。このように雌マウスには高度なフェロモン記憶機構が存在している。さらに、フェロモン記憶の部位は副嗅球内の相反性シナプスにある。相反性シナプスとは、僧帽房飾 (MT) 細胞の樹状突起から顆粒細胞樹状突起の方向の興奮性シナプスと顆粒細胞からMT細胞への方向性の抑制性シナプスが同一突起内に並立して存在するシナプスである。これまでに我々は、フェロモン記憶形成時に相反性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。この変化は、同一情報が再度入力した際に抑制を受けやすくなる機構と考えられる。すなわち、既知情報を制御することにより記憶するメカニズムである。しかしながら、我々の研究では、フェロモン情報を受けたMT細胞(記憶ニューロン)を特定できないため、記憶および非記憶ニューロンの相反性シナプスを特定することなしに計測して、統計学的に特定のニューロンのシナプスに変化が起きていることを推測したものである。したがって、刺激を受けて記憶に関わるニューロン、すなわち、記憶ニューロンを特定し標識可視化することが強く必要とされていた。最近、ニューロンの活性特異的に発現する最初期遺伝子 c-fos のプロモータの下流にグルタミン酸受容体の GluR1 と GFP を導入した c-fos-GFP-GluR1 マウスが開発された。このマウスを用いると、刺激により活性化するニューロンを標識可能となるため、フェロモン記憶ニューロンと非記憶ニューロンを区別し、より詳細な解析が可能となる。今回は、このトランスジェニックマウスを利用することにより、フェロモン記憶ニューロンを選択的に可視化し、記憶活動依存的に変化した

可塑性シナプスの形態変化およびシナプスに存在する様々な機能分子の動態を解析しようとするものである。

### 2. 研究の目的

最初期遺伝子 c-fos のプロモータの下流にグルタミン酸受容体の GluR1 と GFP を導入した c-fos-GFP-GluR1 マウスを用い、フェロモン刺激を受けたニューロン(フェロモン記憶ニューロン)のみを選択的に可視化する。記憶と非記憶ニューロンのシナプスを比較解析することにより、記憶ニューロンのシナプスに特異的に起こる変化を明らかにする。また、変化した可塑性シナプスの樹状突起上の分布局在を解析する。交尾にともなって記憶形成時に起こるシナプスの形態変化を総合的に解析し、記憶に関わるシナプスの可塑性の形態変化を明らかにする。

### 3. 研究の方法

フェロモンの刺激を受けて、活動が高まったニューロン、すなわちフェロモン記憶ニューロンを標識可視化する目的で、c-fos-GFP-GluR1 トランスジェニックマウスの雌を交尾させ、24 時間後に副嗅球の標本作製する。

副嗅球スライスを GFP あるいは GluR1 の抗体を用いて、免疫組織学的に標識ニューロンを可視化する。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する。蛍光像を観察し記憶ニューロンを特定する。

同定した 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観察する。シナプス膜肥厚・棘突起(スパイン)のサイズ等を計測する。

記憶ニューロンと非記憶ニューロンのシナプスを比較解析することにより、記憶ニューロンのシナプスに特異的に起こる変化を明らかにする。

#### 4. 研究成果

ドキシサイクリン(Dox)依存のおよび神経活動依存的にGFP-GluR1を発現するトランスジェニックマウス(GFP-GluR1<sup>c-fos</sup>)を用いて実験を行なった。Dox経口投与下で飼育したメスのGFP-GluR1<sup>c-fos</sup>マウスを、Dox投与を停止してから交尾を行なわせた。交尾確認4時間後にオスマウスを引き離し、12時間経過後再びDox経口投与を開始する事で、交尾に関連したc-fos活性ニューロンのみをGFP-GluR1でラベルした。

3日目にサンプリングを行ない、抗GFP抗体を用いて免疫電子顕微鏡試料を作成した。そして、副嗅球の投射ニューロンである僧帽/房飾(MT)細胞樹状突起に形成された相反性シナプスを観察した。GFP陽性MT細胞は、副嗅球尾側中央部に多く存在した。その中でもGFP陽性MT細胞とGFP陰性MT細胞があるため、前者を記憶ニューロン、後者を非記憶ニューロンと仮定し、それぞれの樹状突起上の相反性シナプス(40~50)を計測したところ、GFP陽性ニューロン上に存在するシナプスの方が大きい傾向にあった(陽性シナプス288.7±0.3nm、陰性266.4±0.3nm)。サンプル数がまだ少ないため、現時点では明確な結論を出す事が出来ないが、これまで個体間で見られたシナプス変化がニューロンレベルでも確認できると考えている。

この研究結果は、嗅覚系の記憶の研究のみならず、中枢神経系一般の記憶・学習のメカニズムを解析するうえで重要な知見を提供することとなる。

#### 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 3 件)

- 1) Moriya-Ito K, Endoh K, Fujiwara-Tsukamoto Y, Ichikawa M (2013) Three-dimensional

reconstruction of electron micrographs reveals intrabulbar circuit differences between accessory and main olfactory bulb. *Frontiers in Neuroanatomy* 7: Article 5. (On line journal) 査読 有

- 2) Ohara H, Okamura H, Ichikawa M, Mori Y, Hagino-Yamagishi K (2013) Existence of G<sub>i2</sub>-expressing axon terminals in the goat main olfactory bulb. *J Vet Med Sci.* 75:85-88. 査読 有
- 3) Wu Y, Moriya-Ito K, Iwakura T, Tsuchiya A, Ichikawa M, Ohtani-Kaneko R (2011) Sexually dimorphic effects of estrogen on spines in cultures of accessory olfactory bulb. *Neurosci Letter* 500: 77-81. 査読 有

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 守屋敬子、山岸公子、田中いく子、市川眞澄、徳野博信 マーモセット鋤鼻器の形態学的解析 第3回日本マーモセット研究会大会、福岡市、(2013-12-12)
- 2) 守屋敬子、山岸公子、若林嘉浩、田中いく子、市川眞澄、徳野博信 鋤鼻器の形態学的解析より推察するコモナーモセットの鋤鼻感覚能 日本味と匂学会第47回大会、仙台市、(2013-09-04)
- 3) 守屋敬子、遠藤堅太郎、市川眞澄 齧歯類における副嗅球内微細形態と樹状突起 スパイン可塑的变化、日本動物学会第82回大会、シンポジウム“視覚と嗅覚における似て非なる神経機構のリーサーチフロント” 旭川、(2011-09-21)
- 4) 守屋敬子、遠藤堅太郎、塚元葉子、市川眞澄 副嗅球顆粒細胞の超微細形態とシナプス可塑性 第34回日本神経科学大会、横浜市、(2011-09-17)

#### 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
市川 眞澄 (ICHIKAWA, Masumi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤  
技術研究センター・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)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知  
症・高次脳機能研究分野・研究員  
研究者番号：70392371