

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659108

研究課題名(和文)可視化技術を用いたマウス系統認識記憶機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms underlying strain recognition memory in mice using visualization techniques

研究代表者

椋 秀人 (KABA, Hideto)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：50136371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、交配雄のフェロモンシグナルと交尾シグナルの副嗅球での連合によって活性化される僧帽細胞と顆粒細胞に活動依存的遺伝子c-fosとカップルしてGFPを安定して発現するトランスジェニックマウスを用いることにより、GFA陰性僧帽細胞がトニックに発火するのに対して、GFA陽性僧帽細胞がバースト状に発火することを認めた。本研究で我々はまた、正常マウスの副嗅球スライス標本において、代謝型グルタミン酸受容体mGluR2の活性化が僧帽細胞の電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルを抑制すること、バソプレッシンが僧帽細胞に誘発される樹状突起樹状突起間抑制を減少させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：By using transgenic mice that stably express the green fluorescent protein (GFP) coupled to the activity-dependent gene c-fos in mitral and granule cells naturally activated by the association of mating male chemosignals and mating signal in the accessory olfactory bulb (AOB), we found in AOB slices that GFP-positive mitral cells fired in burst mode in contrast to GFP-negative mitral cells that fired in tonic mode. In addition, we found in AOB slices prepared from normal mice that the activation of mGluR2 on mitral cells in the AOB inhibited voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, thereby suppressing the release of glutamate from the mitral cells and that vasopressin that enhances the induction of long-term potentiation at the mitral-to-granule cell synapse in the AOB reduced dendrodendritic inhibition of mitral cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

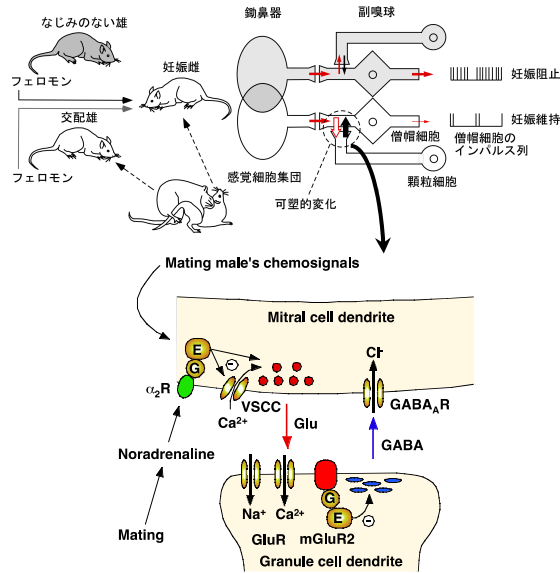
キーワード：匂い 記憶 副嗅球 可視化 発火パターン 代謝型グルタミン酸受容体 Ca<sup>2+</sup>チャンネル バソプレッシン

1. 研究開始当初の背景

我々は、マウスの妊娠を保障するフェロモンの記憶のメカニズムを解析してきた。これまでにフェロモン情報処理経路(鋤鼻系)及び各中継核で作用する神経伝達物質、フェロモン作用の神経内分泌機序、妊娠を保障するフェロモン記憶の形成、維持及び消去に関する特性、記憶形成の主座(副嗅球)、ここでの神経・シナプス・分子レベルのメカニズム等を明らかにしたほか、フェロモン記憶の超微形態学的相関及び電気生理学的相関(僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達における長期増強(LTP)の誘導)を示してきた。また、鋤鼻系の神経回路形成機構や機能発現制御機構を解析するための *in vitro* 再構成系を確立し、この共培養による鋤鼻ニューロンの成熟と鋤鼻受容体の発現維持、副嗅球ニューロンとの間の機能的なシナプスの形成を明らかにした。

2. 研究の目的

雌マウスは、交尾を引き金として交配雄フェロモンの記憶(系統特異的記憶)を形成し、妊娠保障を獲得する(図1)。本研究の目的は、系統認識記憶に帰結する脳機構、特に記憶神経細胞を *in vivo* で可視化することを可能にしたトランスジェニックマウスを用いて、その可視化された記憶神経細胞におけるシナプスの可塑的变化を直接捉えることであった。



$\alpha_2R$ ,  $\alpha_2$ -adrenergic receptor;  
 E, intracellular effector;  
 G, G protein;  
 GABA<sub>A</sub>R, GABA<sub>A</sub> receptor;  
 Glu, glutamate;  
 GluR, ionotropic glutamate receptor;  
 VSCC, voltage-sensitive calcium channel.

図1 妊娠を保障するフェロモン記憶は副嗅球の特定の僧帽細胞-顆粒細胞間相反性相互シナプスの可塑的变化によって支えられている

一方、計画どおりに進まない場合は、通常雌マウスの副嗅球スライス標本において、僧帽細胞と顆粒細胞との間の相反性シナプス伝達の制御機構を単一細胞レベルで解析すると共に、誘発電場電位の記録から得られる僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達効率のLTPを指標に、記憶・学習に関わる情報分子を捉え、それを行動薬理学的手法や遺伝子改変マウスなどを用いて検証するという方法論で追究できる。

3. 研究の方法

そこで、神経活動依存的に活性化される *c-fos* プロモーターの制御下でドキシサイクリン (dox) 発現調節システムを駆動することによって、時期特異的に活性化されたニューロンを持続的に標識することを可能にしたトランスジェニックマウスを用いてこの課題に挑戦した(図2)。神経活動に依存した GFP マーカーの発現は、dox のない餌と神経刺激(フェロモン刺激と交尾刺激の連合)によってトリガーされる。本研究では、マウス副嗅球のスライス標本を作製し、常套的もしくは *nystatin* 穿孔パッチによるホールセルクランプ法やルーズパッチ法を用いてフェロモン刺激と交尾刺激の連合によって可視化された僧帽細胞と顆粒細胞の電気生理学的特性を可視化されていない僧帽細胞と顆粒細胞の特性と比較検討することであった。

また、通常マウス副嗅球のスライス標本を作製し、ホールセルクランプ法を用いて僧帽細胞に発生する  $Ca^{2+}$  電流や相反シナプス電流を解析した。

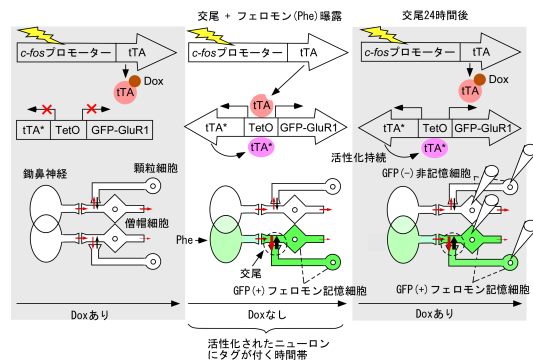


図2 記憶形成へと導く連合刺激(交尾 + フェロモン曝露)によって活動する神経細胞集団に選択的な可視化遺伝子操作が行えるトランスジェニックマウスを用いた記憶の単一神経細胞レベルでの解析

4. 研究成果

副嗅球スライス標本において共焦点レーザー顕微鏡で GFP により可視化された記憶神経細胞を捉え、その単一ニューロンからパッチクランプ法によりホールセル記

録を行うことに当初の予想より困難を伴った。可視化された僧帽細胞と可視化されていない僧帽細胞からルーズパッチ法で記録できた成功例では、可視化された僧帽細胞にはバースト発火が認められたのに対し、可視化されていない僧帽細胞にはバースト発火は明らかではなかった。

通常マウス副嗅球のスライス標本において、picrotoxin (50  $\mu$ M) で顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達を遮断しておき、僧帽細胞から  $Ca^{2+}$ チャネルを流れる  $Ba^{2+}$ 電流を記録した。代謝型グルタミン酸受容体 mGluR2 作動薬 (2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV) の細胞外投与により  $Ba^{2+}$ 電流は抑制された。この結果は僧帽細胞に発現する mGluR2 の活性化は電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネルを抑制することによってグルタミン酸の放出を抑制することを示唆している。

このフェロモンの記憶を支える副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達効率の LTP はバゾプレッシン (VP) によって促進される。僧帽細胞に発生する相反性シナプス電流における VP の影響を検討した。VP は相反性シナプス電流を抑制した。

#### 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)

椋秀人, 社会的絆を支える匂いの記憶・学習のメカニズム. 分子精神医学, 査読無, 13, 2013, 260-266. <http://www.sentan.com>

Taniguchi M, Yokoi M, Shinohara Y, Okutani F, Murata Y, Nakanishi S, Kaba H, Regulation of synaptic currents by mGluR2 at reciprocal synapses in the mouse accessory olfactory bulb. European Journal of Neuroscience, 査読有, 37, 2013, 351-358. doi: 10.1111/ejn.12059.

椋秀人, 嗅覚. *Clinical Neuroscience* 31, 70-72, 2013 URL <http://chugaiigaku.jp/> 査読無

[学会発表](計9件)

谷口睦男, 難波利治, 椋秀人, マウス副嗅球僧帽細胞-顆粒細胞間相反性シナプス伝達に対するバゾプレッシンの効果. 第91回日本生理学会大会. 2014.3.16~3.18, 鹿児島大学郡元キャンパス, 鹿児島  
難波利治, 谷口睦男, 村田芳博, 奥谷文乃, 椋秀人, オスマウス副嗅球におけるシナプス可塑性に対するバゾプレッシンの役割. 第91回日本生理学会大会. 2014.3.16~3.18, 鹿児島大学郡元キャンパス, 鹿児島  
村田芳博, 椋秀人, マウス副嗅球シナプスの長期増強におけるアクチン重合化の

関与. 第91回日本生理学会大会. 2014.3.16~3.18, 鹿児島大学郡元キャンパス, 鹿児島

椋秀人, 藤田博子, 吾妻 健, 奥谷文乃, 松波宏明, フェロモン記憶と個体認知. 日本味と匂学会第47回大会嗅覚シンポジウム「化学シグナルと嗅覚行動および脳機能」2013.9.5~9.7, 仙台市民会館, 仙台

椋秀人, 感受性期に成立する匂い学習の神経生物学. 日本味と匂学会第47回大会日本味と匂学会賞受賞講演. 2013.9.5~9.7, 仙台市民会館, 仙台

Taniguchi M, Kaba H, A suppressing mechanism of the recurrent inhibition by group II metabotropic glutamate receptors activated by endogenous glutamate release from mitral cells in the mouse accessory olfactory bulb. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, June 23-27, 2012, Stockholm Waterfront, Stockholm, Sweden

Kaba H, Fujita H, Matsunami H, Maternally inherited peptides function as strain identity chemosignals in mice. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, June 23-27, 2012, Stockholm Waterfront, Stockholm, Sweden

Murata Y, Kaba H, A functional role for protein synthesis in long-term potentiation at synapses in the mouse accessory olfactory bulb. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, June 23-27, 2012, Stockholm Waterfront, Stockholm, Sweden

Namba T, Taniguchi M, Murata Y, Okutani F, Kaba H, Vasopressin serves to promote the induction of synaptic plasticity in the mouse accessory olfactory bulb. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, June 23-27, 2012, Stockholm Waterfront, Stockholm, Sweden

[図書](計2件)

椋秀人, 羊土社, 脳神経科学イラストレイテッド-分子・細胞から実験技術まで, 2013, 229-234

椋秀人, 化学同人, 解剖生理学 [第2版], 2012, 85-106, 235-242

[その他]

ホームページ等

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff\\_phsl1/index.htm](http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_phsl1/index.htm)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

榎 秀人 (KABA, Hideto)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号：50136371

(2)研究分担者

奥谷 文乃 (OKUTANI, Fumino)  
高知大学・教育研究部医療学系・准教授  
研究者番号：10194490

谷口 睦男 (TANIGUCHI, Mutsuo)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：10304677

村田 芳博 (MURATA, Yoshihiro)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：40377031