

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659049

研究課題名（和文）単一ニューロンにおけるマウスの系統認識記憶機構の解析

研究課題名（英文）Single-neuron analysis of strain recognition memory in mice

研究代表者

梶 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

研究成果の概要（和文）：本研究で我々はマウス脳スライス標本を用いてフェロモン記憶の座として重要視されている副嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞からシナプス電流を記録し、その電流に対する代謝型グルタミン酸受容体 mGluR2 の薬理的及び遺伝的操作の効果を検討した。その結果、mGluR2 の活性化は僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達を抑制することによって僧帽細胞の樹状突起間抑制を減少させることが判明した。現在、記憶を蓄えている僧帽細胞と顆粒細胞の特性を明らかにするための実験を行っている。

研究成果の概要（英文）：We examined the effects of pharmacological and genetic manipulations of mGluR2, a metabotropic glutamate receptor, on synaptic currents measured from mitral or granule cells in slices of the accessory olfactory bulb (AOB), which is a critical site for mate recognition memory in mice. The results indicate that mGluR2 reduces dendrodendritic inhibition of mitral cells by inhibiting excitatory transmission from mitral cells to granule cells in the AOB. We are currently undertaking an experiment to characterize the properties of mitral and granule cells that store the mate recognition memory.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	390,000	2,990,000

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：フェロモン、交尾、副嗅球、僧帽細胞、顆粒細胞、ホールセルクランプ法、c-fos プロモーター、ドキシサイクリン

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、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誘導、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

雌マウスに形成される交配雄フェロモンの記憶は、交配雄フェロモンシグナルと交尾シグナルが副嗅球において連合することによって特定の僧帽細胞と顆粒細胞との間の樹状突起間シナプスに誘導される可塑的变化に支えられている。しかし、副嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞との間の樹状突起間シナプス伝達の制御機構については未だ不明な点が多い。また、フェロモン刺激に応答した僧帽細胞と顆粒細胞を同定し、かつそのニューロン間のシナプスの可塑的变化を捉えること、言い換えれば単一細胞レベルで記憶の変化を捉えることはできていない。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。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（交尾刺激）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を用いて各種薬物の相反性シナプス電流に対する効果を調べると共に、フェロモン刺激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。本研究の成果は、神経細胞間の情報伝達の強弱を調節する機構（シナプス機構）やネットワークとしての動作を制御する機構（ネットワーク機構）の解明に大きく貢献する。

3. 研究の方法

実験には Balb/c マウス (23~35 日齢) を用いた。僧帽細胞からの応答は、厚さ 250 μm の副嗅球切片を作成し、常套的もしくは *nystatin* 穿孔パッチによる whole-cell clamp 法を用いて細胞体から記録した。各刺激物質に対する応答は、膜電流固定下または膜電位固定下（保持膜電位 -70 mV）で測定した。応答の値は、平均値 \pm 標準誤差として表した。実験動物の取り扱いについては高知大学動物実験委員会の規定に則って行った。

Tetrodotoxin (TTX), picrotoxin, (2S, 1' R, 2' R, 3' R)-2-(2, 3-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV), (α S)- α -amino- α -[(1S, 2S)-2-carboxycyclopropyl]-9H-xanthine-9-propanoic acid (LY341495) は Ringer 液 (mM: 125 NaCl, 3 KCl, 1 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 15 glucose, pH 7.4. 常時 95% O_2 -5% CO_2 を通気) に溶解し、使用した。電極内液には Cs^+ -内液 (mM: 140 CsCl, 5 NaCl, 1 MgCl_2 , 1 EGTA, 10 HEPES, 2 Na_2ATP , 0.2 Na_3GTP , pH 7.4.) を使用した。常套的 whole-cell 記録では Cs^+ を等モルの K^+ で置換した溶液 (K^+ -内液) を電極内液として用いた。穿孔パッチ記録では、 Cs^+ -内液または K^+ -内液に 5 mM N-methyl-D-glucamine, 5 mM methanesulfonic acid, 0.5 mM phenol red, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nystatin を含む内液を用いた。

本実験においては、細胞外液および細胞内液の Cl^- 濃度がほぼ同いため、 GABA_A 受容体を介する電流応答の逆転電位は約 0 mV となる。したがって保持電位が負の場合、抑制性シナプス後電流 (IPSC) は内向き電流として、抑制性シナプス後電位 (IPSP) は脱分極性 IPSP として、それぞれ記録される。

4. 研究成果

僧帽細胞に脱分極性の電位刺激 (0 mV, 5~20 ms) を与えると大きな一過性の内向き電流に続いて IPSC が生じる。先に我々は、この僧帽細胞に生じる IPSC は樹状突起間の相互作用のみで生じ得ること、および GABA_A 受容体を介して生じることを報告した。

副嗅球の顆粒細胞樹状突起には mGluR2 が多数発現していることがラットで報告されている。そこで、mGluR2 作動薬の相反性シナプス電流に対する効果を調べた。 Mg^{2+} 非存在下において、DCG-IV の細胞外投与により相反性シナプス電流は $470 \pm 109 \text{ pA}\cdot\text{s}$ から $74.8 \pm 13.0 \text{ pA}\cdot\text{s}$ (Mg^{2+} 非存在下で記録された電荷の $23.2 \pm 4.2\%$, $n=14$) へ顕著に抑制された。同様の実験を mGluR2 のノックアウトマウスを用いて行ったところ、DCG-IV の細胞外投与による相反性シナプス電流の増加はみられなかった (Mg^{2+} 非存在下で記録された電荷の $130 \pm 29\%$; $n=6$)。このことは mGluR2 の欠損により DCG-IV の持つ IPSC 抑制作用が阻害されることを示した。

次に、LY341495 (mGluR2 阻害薬) の相反性シナプス電流に対する効果について調べた。 Cs^+ を含む溶液を細胞内液に、 Mg^{2+} を含まない Ringer 液を細胞外液に用い、LY341495 を細胞外に投与すると、投与前に比べ大きな IPSC が流れた。しかし、過剰な内向き電流が持続するために細胞がすぐに run down を

起こしてしまい、IPSC を繰り返し測定することができなかった。

そこで僧帽細胞の電気刺激に対する興奮性を少し抑えるため、Cs⁺を K⁺に置換した細胞内液 (K⁺-内液) を用いて僧帽細胞からの IPSC を記録した。Mg²⁺非存在下での LY341495 の細胞外投与により相反性シナプス電流は 69.2 ± 17.6 pA・s から 162 ± 41 pA・s (Mg²⁺非存在下で記録された電荷の 263 ± 36%; n=9) に増加した。同様の実験を mGluR2 のノックアウトマウスを用いて行ったところ、LY341495 を細胞外投与しても相反性シナプス電流には顕著な変化はみられなかった (Mg²⁺非存在下で記録された電荷の 101 ± 21%; n=6)。このことは mGluR2 の欠損により LY341495 の持つ IPSC 増強作用が阻害されることを示した。

本実験条件では細胞外は低 Mg²⁺環境にあるため、顆粒細胞膜上に存在する NMDA 受容体が活性化され易い状態にあると考えられる。この状態は、*In vivo* においては、僧帽細胞の興奮が十分に起こり顆粒細胞上の AMPA 受容体が活性化され、NMDA 受容体の Mg²⁺ブロックが外れた状態に相当する。したがって最初の結果は、僧帽細胞が少なくともある一定のレベル以上に興奮している場合は、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体のみならず mGluR2 も同時に活性化されていることを示唆している。つまり、僧帽細胞の興奮に引き続いて内因性に放出されるグルタミン酸によって、mGluR2 は充分活性化され得ることを示唆している。

ここまでの実験では僧帽細胞への刺激に電位刺激を用いた。次に我々は、mGluR2 の役割を多角的に調べるため、活動電位の発生に伴って生じる IPSP に対する LY341495 の効果を調べた。電流注入 (-70 pA, 200 ms) によって活動電位を誘発すると IPSP (今回の実験条件では脱分極性 IPSP として観察される) が発生した。この IPSP は LY341495 投与により増加した。この結果は、活動電位の発生により放出される内因性グルタミン酸によって mGluR2 が活性化され、それによって相反性シナプス伝達が抑制されることを示唆した。

ここまでの結果は、僧帽細胞を刺激して生じる IPSC あるいは IPSP に対する mGluR2 の作動薬および阻害薬の効果を調べたものであり、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達と、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達の両方が含まれている。顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達が mGluR2 作動薬の DCG-IV によって抑制されることはすでに、ラットを用いた他のグループにより明らかにされている。そこで我々は、Picrotoxin (100 μM) を用いて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、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達が mGluR2 作動薬の DCG-IV によって影響を受けるのかどうかを調べた。

顆粒細胞にパッチ電極を適用し、TTX 存在下において、僧帽細胞膜の自発性興奮により生じるグルタミン酸作動性 EPSC を膜電位固定下で記録した。DCG-IV の細胞外投与により mEPSC の発生頻度、大きさとも減少した (n=10)。mEPSC 発生頻度の累積確率は低い方へ、応答強度の累積確率は小さい方へ、それぞれ有意にシフトした (P < 0.05; Kolmogorov-Smirnov test)。これらの結果は、mGluR2 がシナプス前部とシナプス後部の双方に作用することにより、僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達を抑制することを示唆した。

本研究で dox のない餌と交尾刺激によって、副嗅球の一部の僧帽細胞と顆粒細胞が GFP の蛍光を発し、標識されることをスライス標本において確認してきた。これらの標識された僧帽細胞と顆粒細胞からホールセル記録を行い、それらの細胞の電気生理学的な基本特性の一部を得ることができた。しかし、相反作用を及ぼし合う僧帽細胞と顆粒細胞のペアで記録できる確率が低く、標識されたペア間のシナプス伝達の特徴を標識されていない僧帽細胞と顆粒細胞のペア間のシナプス伝達の特徴と比較し、交尾とフェロモン曝露によってこれらの神経細胞が神経回路の中でどのように動作 (可塑的に変化) して特定の化学シグナルを認識・記憶し、引いては妊娠の保障という特有な機能を発現するのかを明らかにするまでには至らなかった。今後、ペア間で記録できる確率をあげ、目的達成に繋げたいと考えている。

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 Muramoto, K., Hagino-Yamagishi, K., Tonosaki, K. & Kaba, H.: Accessory olfactory bulb neurons are required for maintenance but not induction of V2R vomeronasal receptor gene expression *in vitro*. *Neuroscience Letters* 査読有, 500, 6-9, 2011
- ② 柁秀人: 絆はどのように生まれるのか。別冊日経サイエンス 181「こころと脳のサイエンス」, 特集「赤ちゃんパワーが“親脳”を育てる」, 査読無, p30, 2011
- ③ 柁秀人: ヒトのフェロモンと脳内情報処理の性差. *日本医事新報*, 査読無, No. 4573, 50-51, 2011
- ④ Zhang, J.-J., Okutani, F., Huang, G.-Z.,

Taniguchi, M., Murata, Y. & Kaba, H.: Common properties between synaptic plasticity in the main olfactory bulb and olfactory learning in young rats. *Neuroscience* 査読有, 170, 259-267, 2010.

- ⑤ 梶 秀人 : 嗅覚の生理. *Clinical Neuroscience* 査読無, 28: 1251-1255, 2010
- ⑥ Kaba, H.: Neurobiology of mammalian olfactory learning that occurs during sensitive periods. *Current Zoology* 査読無, 56: 819-833, 2010

[学会発表] (計5件)

- ① 村田芳博, 梶秀人: 副嗅球シナプスの長期増強における遅延相の新規蛋白合成依存. 第89回日本生理学会大会, 2012年3月29~31日, 松本市
- ② 谷口睦男, 梶秀人: 内因性に放出されるグルタミン酸によって活性化される代謝型グルタミン酸受容体 mGluR2 を介したマウス副嗅球僧帽細胞-顆粒細胞間相反性シナプス伝達の抑制. 第89回日本生理学会年会, 2012年3月29~31日, 松本市
- ③ Murata, Y., Kaba, H.: Long-term potentiation at synapses in the mouse accessory olfactory bulb requires new protein synthesis. The 9th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2011年11月4~6日, 福岡市
- ④ Kaba, H.: Oxytocin and social recognition in mammals. The 3rd Global Sensory Branding Forum, October 11, 2011, Beijing, China
- ⑤ Taniguchi, M. & Kaba, H.: Suppression of the recurrent inhibition in the mouse accessory olfactory bulb by the metabotropic glutamate receptor mGluR2 through inhibition of high-voltage-activated Ca currents. The 8th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2010年11月6~7日, 福岡市

[図書] (計1件)

- ① 梶秀人, 他, 化学同人, 解剖生理学 [第2版], 2012, 263

[その他]

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_phs11/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶 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