

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390050

研究課題名(和文)匂いの絆：その刷り込みのメカニズム

研究課題名(英文)Neurobiological mechanisms underlying olfactory bonds

研究代表者

権 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) 13,100,000円、(間接経費) 3,930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、(1)副嗅球の僧帽細胞から放出された内因性グルタミン酸が僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達を、シナプス前部とシナプス後部の双方の代謝型グルタミン酸受容体mGluR2を活性化することにより抑制すること、(2)僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達効率の長期増強(LTP)の後期相(L-LTP)にプロテインキナーゼPKM ζ 及び新たなタンパク質の合成が必要であること、(3)新生子ラットにおける匂いの嫌悪学習と嗅球シナプス可塑性にヒストンアセチル化を含むエピジェネティック機構が関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study we demonstrate that (1) glutamate endogenously released from mitral cells in the accessory olfactory bulb suppresses synaptic transmission from mitral to granule cells by activating mGluR2, a metabotropic glutamate receptor on the pre- and postsynaptic sites, (2) the activation of the protein kinase PKM ζ and new protein synthesis are required for the late phase of long-term potentiation (L-LTP) at the mitral-to-granule cell synapse and (3) epigenetic mechanisms including histone acetylation are critical for aversive olfactory learning and synaptic plasticity at the mitral-to-granule cell synapse of the olfactory bulb in neonatal rats.

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 学習 嗅球 グルタミン酸受容体 プロテインキナーゼ タンパク質合成 ヒストンアセチル化

1. 研究開始当初の背景

人類はその誕生以来、親子や夫婦をはじめとする人と人の“絆”を求めてきた。しかし、その複雑さのために、近年まで脳科学の見地からの研究対象とはならなかった。一方、親子・夫婦の問題は、新しい世紀を迎えてますます困難になってきている。愛情で結びついたはずの家族の中で、時として命を奪うほどの暴力が起こる。全国の児童相談所に持ち込まれる児童虐待の件数は、年々増加の一途を辿っており、この問題への取り組みが社会的に強く求められている。人間における親子・夫婦の間の愛着行動を理解するためには、広範囲にわたる各種動物の詳細かつ正確な観察から学びとることが必要である。なぜかという、愛着行動は種の維持にかかわる基本的行動であり、人間とその他の動物は、互いに共通した行動パターンを進化させてきたと考えられるからである。事実、子どもに反応して活性化される母親の脳の活動部位は、人間と齧歯類で似ていることから、哺乳類の脳には普遍的な母性回路が存在すると考えられる。

2. 研究の目的

マウスやラットにおける母子間あるいは雌雄間の社会的絆の形成には嗅覚系による個体認識とその記憶学習が基盤となっている。我々はこれまでに、(1)雌マウスに形成される交配雄フェロモンの記憶(夫婦の絆モデル)、(2)新生子ラットにおける匂い学習(子から見た母子の絆モデル)、(3)ラットにおける母性行動(母から見た母子の絆モデル)の何れにおいても嗅球(主嗅球、副嗅球)が記憶学習に中心的な役割を果たす脳部位であることを特定し、神経・シナプス・分子レベルでそのメカニズムを解明してきた。本研究では、これらの神経科学的所見を基礎とし、絆や個体認識といった最終的な行動表現に帰結する脳機構、特に絆を支えるシナプス伝達の可塑的变化を捉え、その分子メカニズムを明らかにすることであった。

3. 研究の方法

(1) 雌マウスに形成される交配雄フェロモンの記憶

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。そこで、我々はマウス副嗅球のスライス標本作製し、nystatin 穿孔パッチによる whole-cell clamp 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た。

次に、僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シ

ナプス伝達効率の長期増強(LTP)のメカニズムを電気生理学的に解析した。

(2) 新生子ラットにおける匂い学習

この学習においては、生後11日目の子ラットに匂いと電撃を対提示することによって成立する匂いの嫌悪学習のメカニズムを解析してきた。この学習は、電撃により賦活されるノルアドレナリン作動性ニューロンの働きを引き金として、CREBの発現とそのリン酸化を介して主嗅球の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に可塑的变化が誘導され、成立する。しかも、主嗅球のCREBの発現は長期記憶にのみ必要で短期記憶には必要ではない。この知見は、CREBが短期記憶を長期記憶へ移行させる分子スイッチとして働いていることのほか、主嗅球がまさに記憶を蓄える場であることを示唆している。本研究の目的は、CREBのリン酸化はさらに、ヒストンのアセチル化というエピジェネティック機構を駆動して学習を成立させるか否かを行動薬理学的手法、ウェスタンブロット、免疫組織学的手法及び電気生理学的手法を駆使して明らかにすることであった。

4. 研究成果

(1) 雌マウスに形成される交配雄フェロモンの記憶

僧帽細胞に脱分極刺激を与えることにより生じる相反性シナプス電流、すなわち抑制性シナプス後電流(IPSC)は、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR2/mGluR3 アゴニストである DCG-IV の細胞外投与により顕著に抑制され、mGluR2/mGluR3 アンタゴニストである LY341495 の細胞外投与により増加した。mGluR2 遺伝子のノックアウトにより、DCG-IV および LY341495 の相反性シナプス電流に対する効果は、それぞれ阻害された。活動電位の発生に伴って生じる IPSC は、LY341495 存在下で増大した。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が mGluR2 を活性化することを示唆している。顆粒細胞に発生する mEPSC の大きさおよび発生頻度は、DCG-IV の細胞外投与により減少した。本研究結果から、mGluR2 は僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達を、シナプス前部とシナプス後部の双方に作用して抑制していることが示唆された。

今回、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のタンパク質合成依存性について検討した。副嗅球スライス標本を用いて、外側嗅索を100 Hz、1秒間のテタヌス刺激を3分間隔で4回反復すると、僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスにLTPが誘導される。このとき、テタヌス30分前からテタヌス後60分間、タンパク質合成阻害薬 anisomycin (20 μM) を

投与すると、LTP の初期相は影響を受けず、後期相 (L-LTP) が選択的に抑制された。この結果は、フェロモン記憶形成の感受性期の後半に anisomycin を副嗅球に投与すると、記憶障害がもたらされるとの行動学的知見と一致しており、LTP を解析することによってフェロモン記憶のメカニズムが検討できることを示唆している。

さらに、L-LTP の成立にプロテインキナーゼ C (PKC) の非典型のひとつである PKM が関わるか否かを明らかにするために、PKM の阻害薬である zeta inhibitory peptide (ZIP, 5 μ M)あるいは scrambled ZIP のテタヌス刺激 60 分後から 2 時間の投与の影響を検討した。L-LTP は scrambled ZIP には影響されず、ZIP によって選択的に阻害されたことから、L-LTP の成立に PKM が関わることを示唆された。

(2) 新生子ラットにおける匂い学習

まず行動薬理学手法を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) の嗅球内注入が古典的条件付け学習にどのような影響を与えるのかを検討した。匂いと電撃の対提示トレーニング時に TSA を注入すると濃度依存的に嗅覚嫌悪反応が促進され、また匂いのみでの単独トレーニングでも動物は嫌悪反応を示した。TSA による嫌悪反応の促進はトレーニング 30 分前の TSA 注入では認められなかったことから、時期特異的であった。TSA の注入はまた、嫌悪学習の保持時間を延長させた。

次にウェスタンブロットおよび免疫組織学的手法を用いて、匂いと電撃の対提示トレーニング後の嗅球におけるヒストンのアセチル化の経時的変化ならびに空間的パターンの検索を行った。ヒストン H4 のアセチル化が匂いと電撃の対提示トレーニング後 4 時間にわたり、嗅球内僧帽細胞および顆粒細胞の両方において、有意に増大していることが明らかとなった。一方、ヒストン H3 はトレーニング後 2 時間でコントロールレベルまで低下した。さらに学習成立を促進する TSA の注入により、H4 および H3 のアセチル化が増大し、トレーニング後 6 時間まで保持されることも明らかになった。

さらに嗅球スライス標本において *in vitro* の電気生理学的解析を行った。僧帽細胞から顆粒細胞への樹状突起間シナプス伝達効率の長期増強に対する TSA の添加の影響を検討した。顆粒細胞に発生する EPSP を反映したフィールド電位の初期相の傾きをシナプス伝達強度の指標とし、100Hz \cdot 1 秒 \times 5 回のテタヌス刺激によるシナプス伝達効率の長期増強を測定したところ、TSA の添加は増強の程度を増大させるのみならず、本来は長期増強をおこさない閾値下の 100Hz \cdot 1 秒 \times 3 回の弱いテタヌス刺激でも長期増強を誘導することが明らかとなった。

以上の成績は、TSA がヒストン H4 および H

3 のアセチル化を促進することにより、匂いの嫌悪学習の成立を促進することを証明している。すなわち、新生子ラットにおける匂いの嫌悪学習にはヒストン H4 及び H3 のアセチル化というエピジェネティック機構が関わることを証明している。本研究の結果は、ヒトにおける母児の絆の形成にもヒストンのアセチル化が関わり得ることを示唆している。DNA 塩基配列の変化を伴わない、DNA のメチル化やヒストンの修飾 (アセチル化、メチル化、リン酸化) さらに染色体の折りたたみ構造の変換などはエピジェネティック機構と総称され、世代を超えて伝わるため、後の児の行動に強い影響を及ぼす。ヒトにおいてこれらの機構が確認できれば、母児の絆の形成やその障害の診断・治療に大いに役立つことが予想される。母児の絆の形成障害へのより進んだ対応を行っていくために、今後もこの分野の研究が発展していくことが望まれる。

さらに、生後 7 日目に行った匂いと弱い電撃の対提示により成立する匂いの嗜好学習に対してもヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 trichostatin A の嗅球内注入が促進効果をもつことを明らかにした。

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 8 件)

Roth TL, Raineki C, Salstein L, Perry R, Sullivan-Wilson TA, Sloan A, Lalji B, Hammock E, Wilson DA, Levitt P, Okutani F, Kaba H, Sullivan RM, Neurobiology of secure infant attachment and attachment despite adversity: a mouse model. Genes Brain and Behavior, 査読有, 12, 2013, 673-680. doi: 10.1111/gbb.12067

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>

Wang YJ, Okutani F, Murata Y, Taniguchi M, Namba T, Kaba H, Histone acetylation in the olfactory bulb of young rats facilitates aversive olfactory learning and synaptic plasticity. Neuroscience, 査読有, 232, 2013, 21-31. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.015

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.

Okutani F, Hirose K, Kobayashi T, Kaba H, Hyodo M, Evaluation of “Open Essence” odor-identification test card by application to healthy volunteers. *Auris Nasus Larynx*, 査読有, 40, 2013, 76-80. doi: 10.1016/j.anl.2012.02.007.

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

Muramoto K, Hagino-Yamagishi K, Tonosaki K and 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, 2011, 6-9. doi: 10.1016/j.neulet.2011.05.232.

Muramoto K, Quan R-D, Namba T, Kyotani S, Miyamura M, Nishioka Y, Tonosaki K, Doi YL, Kaba H, Ameliorative effects of *Eriobotrya japonica* seed extract on cellular aging in cultured rat fibroblasts. *Journal of Natural Medicines*, 査読有, 65, 2011, 254-261. doi: 10.1007/s11418-010-0481-y.

[学会発表](計 17 件)

谷口睦男, 難波利治, 権秀人, 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, 権秀人, 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, 権秀人, 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

全加, 奥谷文乃, 権秀人, 嗅覚嫌悪学習はツニカマイシンの嗅球内注入によって阻害される. 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

権秀人, 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

権秀人, 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 b

y 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

Okutani F, Wang Y-J, Kaba H, Acetylation of histone is involved in the mechanism underlying olfactory learning in young rats. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, June 23-27, 2012, Stockholm Waterfront, Stockholm, Sweden

難波利治, 谷口睦男, 村田芳博, 奥谷文乃, 権秀人, バゾプレッシンは副嗅球におけるシナプス可塑性の誘導を促進する. 第 89 回日本生理学会大会. 2012年3月29~31日, 長野県松本文化会館, 松本

奥谷文乃, 王宇杰, 権秀人, 嗅球内シナプス可塑性成立のエピジェネティックメカニズム. 第 89 回日本生理学会大会. 2012年3月29~31日, 長野県松本文化会館, 松本

村田芳博, 権秀人, 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, 長野県松本文化会館, 松本

谷口睦男, 権秀人, 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 回日本生理学会大会. 2012年3月29~31日, 長野県松本文化会館, 松本

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 (YR Umami Forum 2011), November 4-6, 2011, Maidashi campus, Kyushu University, Fukuoka

Wang Y-J, Okutani F, Kaba H, A role for epigenetic mechanisms in olfactory learning. The 9th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2011), November 4-6, 2011, Maidashi campus, Kyushu University, Fukuoka

〔図書〕(計3件)

椋 秀人, 羊土社, 脳神経科学イラストレイテッドー分子・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

椋 秀人, 化学同人, 調理学, 2011, 16-19

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_phsl1/index.htm

6. 研究組織

(1) 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

(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