

平成22年 6月 3日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591282  
 研究課題名（和文） 新生仔による母の匂いの記憶成立における  
 エピジェネティックメカニズム  
 研究課題名（英文） Epigenetic mechanism underlying olfactory learning in young animal  
 研究代表者  
 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

研究成果の概要（和文）：新生仔は、生後母親のにおいと母性行動による体性感覚刺激を対提示されることにより、速やかに母のにおいを記憶する。この神経基盤の一つは嗅球におけるシナプス可塑性である。今回さらに細胞内におけるエピジェネティックメカニズムを解明するため、染色体の再構築を誘導するヒストンのアセチル化に注目し、行動薬理学実験およびウェスタンブロッティングを行った。学習の成立に伴いヒストンのアセチル化がおこり、また脱アセチル化酵素を阻害することにより、においの学習が増強されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Preweanling young rats prior to eye opening depend on somatosensory and olfactory function for survival, as they can learn their dam's odor and approach her without visual information. In order to establish olfactory learning, the pairing of odor and somatosensory stimulation is crucial. We have previously shown that synaptic plasticity in the OB underlies aversive olfactory learning. Particularly as cellular mechanisms, chromatin structure is remodeled by modification of histone acetylation during the early stages of long-term memory formation. Behavioral pharmacology shows that HDAC inhibition consolidates aversive olfactory learning in young rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：新生児医学、記憶・学習、幼若ラット、嗅覚、ヒストン、脱アセチル化

## 1. 研究開始当初の背景

新生児が生後速やかに母親のにおいを記憶する能力をもつことが広く知られている。幼若動物はにおい刺激に体性感覚・味覚・聴覚刺激を対提示する古典的条件づけにより、においを学習する。これは生存戦略上不可欠な機能である。私は幼若ラットでは短い臨界期で学習が成立することに着目しこれをモデルとして、においの学習成立のメカニズムを行動学的に解析してきた。

嗅球において嗅覚情報は以下のように処理される。鼻腔内嗅神経細胞の興奮は糸球体において2次リニューロンである僧帽細胞に伝達される。僧帽細胞の活動はインターニューロンである糸球体周辺細胞や顆粒細胞と形成される樹状突起間シナプスにおいて相反性に抑制される。

これまでに私は、嗅球内に GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬である bicuculline を注入し僧帽細胞を脱抑制させると学習成立が促進されること (Okutani et al., 1999, Okutani et al., 2002)、可塑性に関与が知られている CREB (cyclicAMP response element-binding protein) の合成を阻害すると学習成立が阻害されること (Zhang et al., 2003) から、嗅球内シナプス可塑性がにおいの記憶の神経基盤であることを示した。さらに電気生理学的な解析を加え、嗅球内シナプス可塑性は僧帽細胞-顆粒細胞の樹状突起間シナプスで誘導されることを証明した (Zhang et al., in press)。

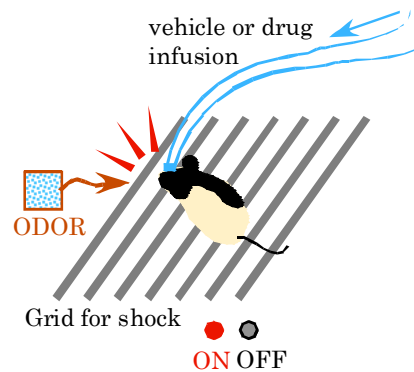
活性化型 CREB は CBP (CREB binding protein) を coactivator として、細胞内染色体を構成するヒストンに作用し、アセチル化を起こす (Levenson & Sweatt, 2005)。この過程が、記憶・学習および海馬で観察される長期増強 (LTP) の誘導への関与することが報告されていることから、より劇的な変化がおこりやすい幼若動物を用いて、ヒストンのアセチル化の、においの嫌悪学習への関与を検索するに到った。

## 2. 研究の目的

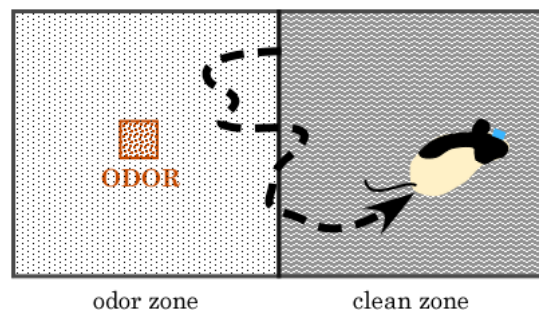
このモデルにおける、においの嫌悪学習成立時の活性化された phosphorylated CREB の下流に当たる ヒストンのアセチル化・脱アセチル化 といった エピジェネティック・メカニズム の解明をめざす。

## 3. 研究の方法

私が用いているにおいの学習モデルは以下のようなものである。日々成長する幼若動



物を用いた行動薬理学的実験において、古典的条件づけのトレーニングはなるべく短期間に済ませる必要がある。これまでの実験では、生後 11 日 (postnatal day: PND11) のラットに 30 分間のにおいと電撃の対提示トレーニング (上図) を施すことにより、PND12 のテスト (下図) でにおいに対して嫌悪反応



を示すようになり、におい分画上の滞留時間の有意な短縮が認められる (Okutani et al., 1999)。

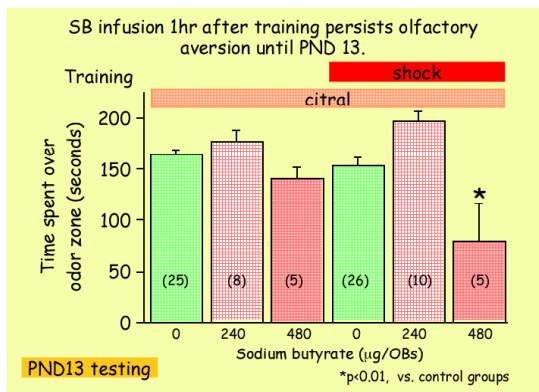
トレーニングに際して、ヒストンを脱アセチル化する酵素 histon deacetylases (HDACs) の阻害剤である、酪酸ナトリウム および trichostatin A を嗅球に注入する。これらは HDACs を抑制することにより記憶の形成を増強すると予想されるため、におい嗜好性テストは通常の 1 日後のみならず、翌日も実施し、ヒストンのアセチル化が記憶の形成に関わるかを明らかにする。また注入時期をトレーニング後からずらすことにより、ヒストンアセチル化反応の時期を明らかにする。

## 4. 研究成果

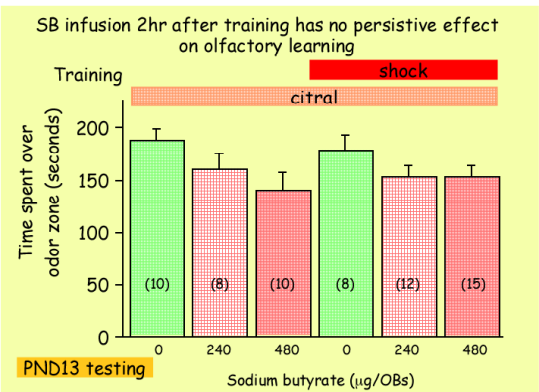
【1】酪酸ナトリウムを嗅球内注入した行動薬理学的研究

においと電撃の対提示トレーニングから 1 時間後に嗅球内に酪酸ナトリウムを注入すると、濃度依存性に学習成立が促進されることが明らかとなった。すなわち、トレーニングから 2 日後の PND13 にはにおいの嫌悪学習は消去されるが、酪酸ナトリウムの注入によ

りラットはにおいに対する嫌悪反応を示した。



しかしながら、注入時間をトレーニング後2時間とするとその学習促進効果は認められず、ヒストン脱アセチル化反応がトレーニング後1時間程度で起こっていることが推測された。



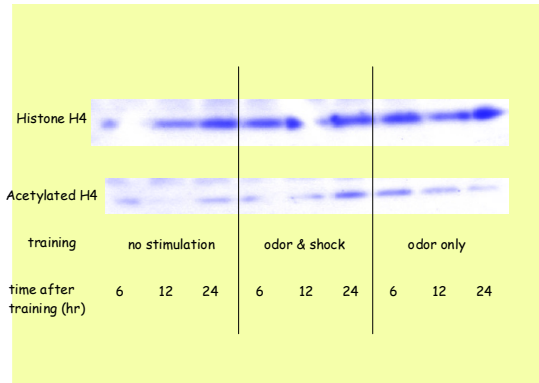
## 【2】ウェスタンブロッティング

トレーニング条件を全く刺激なし・においのみ・においと電撃の対提示の3条件とし、



トレーニング後6・12・24時間後に嗅球を摘出し、ヒストンを抽出した。それサンプルに抗H3およびH4抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

上図のようにヒストン総発現量は全体で差が見られなかったが、におい単独トレーニング12時間後およびにおいと電撃の対提示

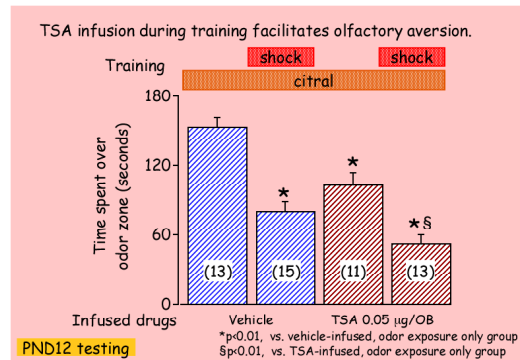


トレーニング6時間後ではアセチル化ヒストンH3の発現量が増えていた。

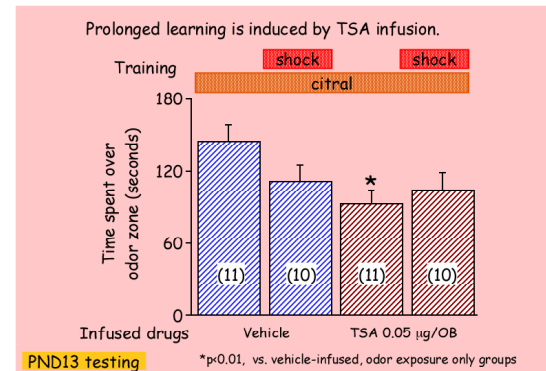
またH4に関してはにおいと電撃の対提示トレーニング12時間後で発現量の増加が認められた。

## 【3】trichostatin Aを嗅球内注入した行動薬理学的研究

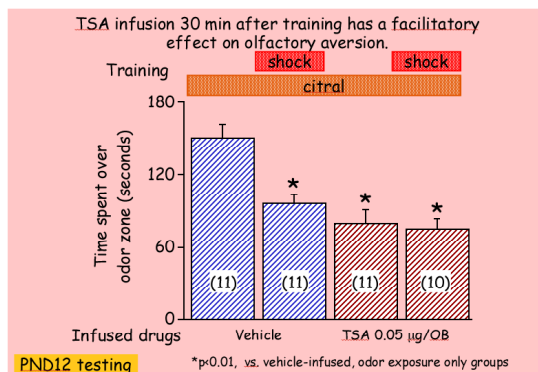
においと電撃の対提示トレーニングの際にHDAC阻害薬であるtrichostatin Aを嗅球内注入した。下図のようににおい単独トレーニングでもラットはにおいに対する嫌悪学習が成立した。



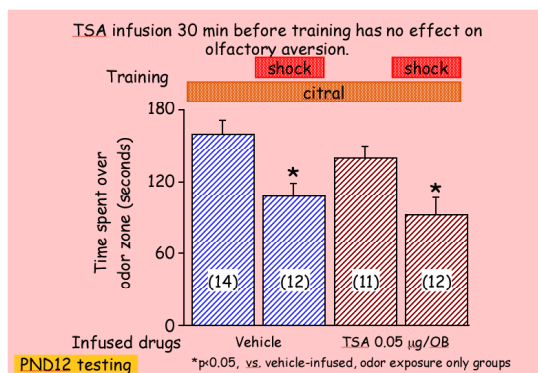
この学習促進効果は、学習の成立のみならず保持も延長させた。さらに1日後のPND13でテストを行った場合でもにおい単独トレーニング後に成立した嗅覚嫌悪学習は維持されていた。(下図)この促進効果には濃度依存性が認められた。



一方 trichostatin A の注入時期をにおいと電撃の対提示トレーニングから 30 分後とするとやはり同様の学習促進効果が認められた。



しかし注入を 30 分前とすると促進効果は認められず、嗅覚刺激によって活性化された嗅球内僧帽細胞-顆粒細胞において HDAC の作用が特異的に誘導されるといえる。



#### 【4】総括

以上のように、幼若動物における嗅覚嫌悪学習のエピジェネティックメカニズムの解明は未だ端緒にある状況である。今後さらに実験を重ね、本メカニズムの全容解明を達成したいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① 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 in press
- ② 奥谷文乃, 村田和子, 島皮質と嗅覚, *CLINICAL NEUROSCIENCE*, 査読無 2010, 388-390
- ③ 王宇杰, 奥谷文乃, 難波利治, 梶秀人, 嗅球内トリコスタチン A 注入はにおいの学習成立を促進する, *日本味と匂学会誌*, 査読有, 2009, 555-558

④ Murata, Y., Okutani, F., Nakahira, M., Ushida, T., Ikemoto, T., Yokoe, I., Takeda, T., Kaba, H., Tani, T. & Ogawa, Y. Effects of olfactory stimulation with isoamyl acetate on brain activation in informed and naive conditions: A functional MRI study. *Auris Nasus Larynx*, 査読有 34, 2007, 465-469

⑤ 奥谷文乃, 匂い学習の分子・学習メカニズム *実験医学* 査読無 24, 2006, 2380-2386

⑥ 奥谷文乃, 嗅覚嫌悪学習の神経基盤 *日本味と匂学会誌* 査読有, 13, 2006, 41-46

〔学会発表〕(計 10 件)

① 奥谷文乃, 弘瀬かほり, 宋碩柱, 青井二郎, 梶秀人, 兵頭政光, 正常者を対象とした嗅覚同定能力研究用カードキット「Open Essence」の使用経験, 第 111 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2010 年 5 月 22 日, 宮城県 仙台国際センター

② 奥谷文乃, 弘瀬かほり, 宋碩柱, 青井二郎, 梶秀人, 兵頭政光, 嗅覚同定能力研究用カードキット Open Essence の使用経験, 第 35 回日本耳鼻咽喉科学会四国四県地方部会連合学会, 2009 年 12 月 6 日, 徳島県 徳島大学長井記念ホール

③ Y.-J. Wang, F. Okutani, and H. Kaba, Intrabulbar Infusion of Trichostatin A, a HDAC Inhibitor Facilitates Olfactory Learning in Young Rats, Beijing International Meeting on Research in Taste and Smell, 2009 年 11 月 16 日, 中華人民共和国 Marriott Hotel, City Wall

④ Y.-J. Wang, F. Okutani, and H. Kaba, Intrabulbar Infusion of Trichostatin A, a HDAC Inhibitor Facilitates Olfactory Learning in Young Rats, The 7th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2009), 2009 年 11 月 4 日, 福岡県 九州大学コラボレーション

⑤ 王宇杰・奥谷文乃・難波利治・梶秀人, 嗅球内トリコスタチン A 注入は記憶の学習成立を促進する, 日本味と匂学会第 43 回大会, 2009 年 9 月 3 日, 北海道 旭川市民文化会館

⑥ F. Okutani, Y.-J. Wang, and H. Kaba, INTRABULBAR INFUSION OF HDAC INHIBITORS MODULATES OLFACTORY LEARNING IN YOUNG RATS, International Union of Physiological Sciences, Teaching workshop, 2009 年 8 月 3 日, 兵庫県 ニチイ学館神戸ポータア

イランドセンター

⑦ F. Okutani and H. Kaba, HDAC INHIBITION FACILITATES AVERSIVE OLFATORY LEARNING IN YOUNG RATS. International Union of Physiological Sciences, 2009年7月28日、京都府 国際会議場

⑧ 奥谷文乃, 川久保真衣, 椛秀人、においの嫌悪学習はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の嗅球内注入により促進される、第85回日本生理学会大会、2008年3月26日、東京都 京王プラザホテル東京

⑨ 奥谷文乃, 川久保真衣, 椛秀人、混合ハーブエキスの摂取は仔の記憶を促進する、第59回日本生理学会中国四国地方会、2007年11月10日、徳島県 徳島大学蔵本キャンパス

⑩ 奥谷文乃, 川久保真衣, 村田和子, 中平光彦, 牛田享宏, 椛秀人、嫌いなにおいの情報処理過程、日本味と匂学会第41回大会、2007年7月28日、東京都 タワーホール船堀

[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

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