

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770053

研究課題名（和文） フェロモン記憶を司る副嗅球ニューロンの3次元超微細形態の解析

研究課題名（英文） 3D-microstructural analysis of accessory olfactory neurons encoding pheromonal memory

研究代表者

守屋 敬子 (MORIYA-ITO KEIKO)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号： 70392371

研究成果の概要： フェロモン記憶を司るとされる副嗅球ニューロンの形態的特徴を解析した。単一ニューロンを可視化して樹状突起形態の解析を行なったところ、投射ニューロンである僧帽房飾細胞は、副嗅球前側と後側では樹状突起伸展方向が異なっており、糸球体からの情報の入力形式に違いがあることが示唆された。介在ニューロンである顆粒細胞の形態は単一ではなく、複数のサブタイプが存在することが明らかとなった。これらサブタイプは、それぞれ独特の樹状突起スパインの形態をもち密度や流動性が異なっていた。また、MT 細胞—顆粒細胞間のシナプス特性を解析する目的で、電子顕微鏡の連続超薄切片の観察より三次元構築を行なう方法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	600,000	0	600,000
2008 年度	800,000	240,000	1040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1400,000	240,000	1640,000

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：鋤鼻系、副嗅球、フェロモン記憶、電子顕微鏡、三次元構築、相反シナプス、樹状突起スパイン、共焦点レーザー顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

齧歯類をはじめとした多くの哺乳類では、主嗅覚系と鋤鼻系という二つの嗅覚系が存在する。近年まで、主嗅覚系では空気中の揮発性分子を“匂い”として感知し、鋤鼻系では同種他個体の分泌物を“フェロモン”として感知すると考えられていたが、主嗅覚系においてもフェロモン分子を認識することが、明らかにされつつあり、単純には区分けすることは難しくなっている。しかし、鋤鼻系で

は大脳皮質を経由することなく視床下部へ働きかける神経回路であるため、敏速で直接的な内分泌変化に関わっていると考えられる。

哺乳類のフェロモン効果のうち、最も良く研究されているものの一つにマウスのブルース効果がある。これは交尾から受精卵着床までの期間に雌マウスが交尾相手と同系統の雄と接触しても問題なく着床へ至るが、それ以外の系統の雄と接触すると着床が阻

害される、というものである。着床阻害まで引き起こすのは特定系統のマウスに限られているが、この“交尾時に相手雄のフェロモンを覚える＝フェロモン記憶”は、哺乳類に共通してみられる現象であると考えられる。このフェロモン記憶は、副嗅球が記憶の座とされており、記憶形成によって、副嗅球から次の投射先である扁桃体へのアウトプットが調節されると考えられている。

副嗅球に存在するニューロンは、投射ニューロンである僧帽房飾細胞 (MT 細胞)、介在ニューロンである傍糸球体細胞、顆粒細胞の、大別して3種類のニューロンより構成されている。フェロモン記憶に特に重要な働きをされると考えられているのは、MT 細胞と顆粒細胞で、これらニューロンは、樹状突起間で相反シナプス (興奮性のシナプスと抑制性のシナプスが隣接したシナプス) を形成している。相反性シナプスは、生理的な実験や電子顕微鏡観察によって存在を確認されているが、樹状突起あたりの密度や、相反率 (形成しているシナプスが単独シナプスであるか、そう半シナプスであるか) は明らかでない。

また、主嗅球の形態学的・生理学的研究は多くなされており、副嗅球はこれに準ずる特性を持つと考えられてきたが、明らかに異なった特性をいくつか持ち備えている。

- ・ MT 細胞は複数の糸球体からの入力を受けること (主嗅球/僧帽細胞は単一糸球体より入力を受ける)
- ・ 主嗅球は secondary dendrite 上に相反シナプスが存在するが、副嗅球では primary dendrite に相反シナプスが存在すると推測されること

これら二つの特徴は、鋤鼻器からどのような入力があったときに、MT 細胞がどのような出力パターンを示すのかに深く影響を与えているが、現在のところあまり詳しいことは分かっていない。

2. 研究の目的

副嗅球より、通常とは異なった (強い?) 出力があった場合、動物は内分泌変化や行動変化を引き起こすと考えられる。本研究では、副嗅球がフェロモン情報の入力をどのようにとらえて、情報の出力をどのように決定しているかを理解する目的で、副嗅球のシナプスレベルの形態学的解析を行なった。

とくに、

- ① 樹状突起の形態
- ② 樹状突起上の突起物 (シナプスの足場となるスパイン構造など) の流動性
- ③ シナプス特性

の3つの観点から副嗅球ニューロンの特性を解析し、機能を考察した。

3. 研究の方法

《樹状突起形態の観察》

生後 20-27 日のラットより、嗅球矢状断切片を作製し、パッチクランプ法で単一細胞に biocytin を注入した。固定後、avidin-FITC-gold を用いて蛍光発色させて、共焦点顕微鏡で観察した。必要に応じて、スライスの再切断を行ない、切片深部まで発色出来るようにした。

《樹状突起ダイナミズム》

胎生 21 日目のラットより、副嗅球部分を採取し、分散培養を行なった。観察 2 日前に GFP 発現プラスミドをトランスフェクションし、28 日以上培養したものをを用いて実験をおこなった。CO₂ インキュベータ設置型の共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞にレーザー照射の影響が出ない程度の短時間インターバルの形態変化を観察し、無刺激条件下での流動的变化を観察した。

《シナプス特性の解析》

biocytin-avidin-FITC-gold で単一細胞が可視化されているスライス切片を用い、金粒子を銀増感した後に、脱水/包埋して電子顕微鏡観察切片を作製した。銀増感されている樹状突起を含む部分の連続切片を作製し、樹状突起部を 3 次的に再構築した。

4. 研究成果

《樹状突起形態の観察》

- ・ MT 細胞

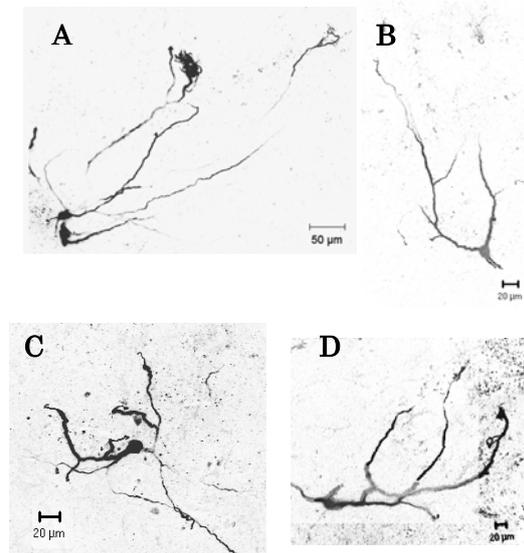


図 1 副嗅球 MT 細胞の形態的特徴

副嗅球前側に存在していたもの(A,B)と、後側に存在していたもの(C,D)。Cは 400 μm をそのまま染色したもの、Dは 100 μm に再薄切して画像をつなぎ合わせたもの。

これまでの研究より、副嗅球 MT 細胞は、複数の糸球体から入力を受けていること、ニューロンによって、それぞれ樹状突起の伸展方向が異なっていることなどは指摘されていたが、詳細な報告はされていなかった。今回の研究でも、これまでの結果と同様、複数の樹状突起が糸球体に向かって伸びているのが確認された。(図 1A, B) しかし、主に副嗅球後側に存在する MT 細胞は、樹状突起が途中で切れているものが多く、ニューロンの全貌が分かり難かった (図 1C)。そこで、パッチ用スライスを用いて更に薄切してから染色を行なうと、糸球体付近までの樹状突起が観察できた (図 1D)。

しかし、主に副嗅球後側に存在する MT 細胞は、樹状突起が途中で切れているものが多く、ニューロンの全貌が分かり難かった (図 1C)。そこで、パッチ用スライスを用いて更に薄切してから染色を行なうと、糸球体付近までの樹状突起が観察できた (図 1D)。このことは、前側の MT 細胞の多くは樹状突起を前後方向に伸ばしているため、矢状断切片を作製しても単一面でニューロン全貌が明らかにされるが、後側に存在する MT 細胞の多くは、内側外側方向に樹状突起を伸ばしているため、単一面では観察が困難であったと推測された。このことは、副嗅球前後では MT 細胞の情報処理機構が異なっていることを示唆している。

顆粒細胞は直径が $10\ \mu\text{m}$ ほどで、脳の中でもきわめて小型のニューロンであるため、パッチ作業は大変困難であった。しかし、一部の顆粒細胞を可視化することに成功した。

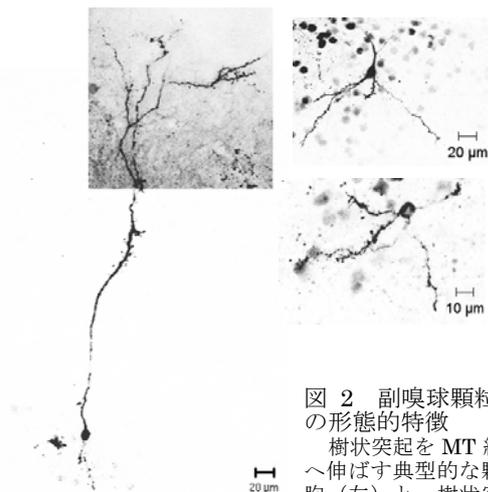


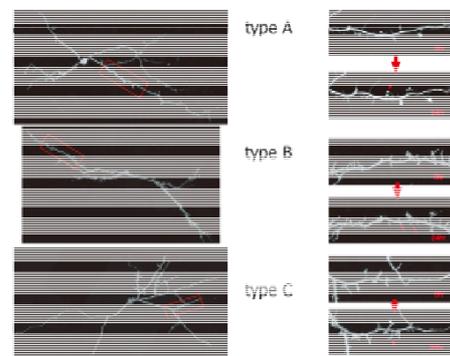
図 2 副嗅球顆粒細胞の形態的特徴
樹状突起を MT 細胞層へ伸ばす典型的な顆粒細胞 (左) と、樹状突起を主に顆粒細胞内に伸ばしているもの (右) がある。

顆粒細胞層に存在するニューロンは、すべて小型で、観察した範囲では、軸索を持って

いなかった。よって、すべて広義の顆粒細胞と言ってよいと思われる。観察したほとんどが典型的な顆粒細胞 (図 2 左) であったが、一部、樹状突起を垂直方向へは伸ばさず、水平方向へ伸ばしている顆粒細胞が存在していた。このタイプの顆粒細胞の存在は、過去の報告はわずかしかなかく、機能は全く分かっていない。樹状突起の伸展方向や樹状突起スパインの形状が一般的な顆粒細胞と異なっていることから、別の情報伝達を担っていると推測された。

《樹状突起ダイナミズム》

主に顆粒細胞の動的変化を解析する目的で、培養副嗅球を用いて、リアルタイムイメージングを行なった。



(図 6) 共培養下で確認された Gr 細胞サブタイプ
typeA: 典型的な Gr 細胞。スパインが大型で neck が細い。細かい filopodia が存在する。
typeB: 小型のスパインが多く、head と neck の区別がつかないものがほとんどである。単位長さ当たりのスパイン密度が高い。
typeC: 樹状突起の端りに構構があり、スパインなど突起物の流動性が高い。

(表 1) Gr 細胞サブタイプごとのスパイン形態と動態

	start			24hr					
	L-spine	S-spine	total	In-out/10min	stabil L	stabil S	L ₂ S	lost	gain
type A	5.5±1.0	6.5±1.0	12.0±0.8	1.3±1.3	4.8±0.6	5.8±0.8	1.3±0.9	0.5±0.5	3.8±1.2
type B	4.0±0.9	13.0±1.8	17.0±1.9	2.0±0.7	4.3±0.9	9.3±0.3	1.7±0.3	3.0±1.0	4.0±1.0
type C	2.1±0.4	7.6±0.9	9.8±1.1	1.9±1.0	1.7±0.3	6.0±1.5	1.0±0.7	1.3±0.7	4.3±2.6

Gr 細胞と推定される GFP 発現細胞。type A (start: n=4, 24hr: n=4), type B (start: n=5, 24hr: n=3) and type C (start: n=8, 24hr: n=3) を観察した。数値は $50\ \mu\text{m}$ 当たりのスパイン数を示す。スパインの形態は、L-spine (spine-head $\phi 1\ \mu\text{m}$)、S-spine (spine-head $\phi 1\ \mu\text{m}$ and filopodia) と定義した。In/out では、10mins に突出入を越えたスパインの数を示す。L=R (large=small) では、24hr で顕著に大きき変化を示したスパインの数を示す。*有意差あり (ANOVA, $p < 0.01$)

培養中においても、顆粒細胞にはいくつかのサブタイプが確認された。

典型的な顆粒細胞 type A は、芽球と呼ばれる大型のスパインを持ち、スパイン動的変化が少ない (図 3、表 1)。一方、そうではない顆粒細胞 type B、type C は、スパイン密度が異なっているもの、動的変化が大きいものなどがあった。これらのうち、生体では type C のものは現在までに確認できていないが、type B のものは、前項に記した水平方向へ樹状突起を伸ばす顆粒細胞と一致した。

《シナプス特性の解析》

共焦点レーザー顕微鏡でニューロン形態が確認された単一樹状突起の連続超薄切片

を作製し、3次元構築を行なった。連続超薄切片の作成は高い技術を必要とするので、技術の習得、条件の検討に時間がかかり、本研究期間中には、生理的な意義の問える成果は得られなかった。

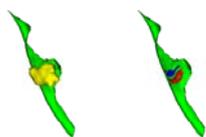


図4 副嗅球相反シナプス

MT細胞(緑)と顆粒細胞(黄)の間にある相反シナプス。興奮性シナプス(赤)と抑制性シナプス(青)が隣り合っている。

しかし、数例のMT細胞-顆粒細胞間の相反シナプスの3次元の構造を観察できた(図4)このシナプスは、MT細胞の樹状突起幹部と顆粒細胞樹状突起スパイン部の間で形成されていた。樹状突起あたりのスパイン密度や相反シナプス率などは今後明らかにしていきたいと考えている。

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2件)

- ① Moriya-Ito K, Endoh K, Ichikawa M. Vomeronasal neurons promote synaptic formation on dendritic spines but not dendritic shafts in primary culture of accessory olfactory bulb neurons. *Neurosci Lett.* **451**:20-24 (2009) 査読有
- ② 守屋敬子, 市川眞澄; 培養系を用いた鋤鼻器・副嗅球の形態解析 *AROMA RESEARCH* **9**:6-9 (2008) 総説: 査読無

[学会発表] (計7件)

- ① 守屋敬子, 遠藤聖太郎, 市川眞澄, 鋤鼻-副嗅球共培養条件下における副嗅球ニューロンのシナプス形態解析, 日本味と匂学会第41回大会, 江戸川区船堀, (2007-07-27)
- ② 星田千晴, 守屋敬子, 市川眞澄, 副嗅球ニューロンにおけるノルアドレナリン作用解析の解析, 日本味と匂学会第41回大会, 江戸川区船堀, (2007-07-28)
- ③ Moriya-Ito, K., Endo, K., Ichikawa, M., Synaptic characterization and dendritic spine motility of accessory olfactory bulb neurons in coculture with vomeronasal neurons., 2007 Neuroscience Meeting,

San Diego, (2007-11-04)

- ④ 星田千晴, 守屋敬子, 市川眞澄, 培養副嗅球を用いたノルアドレナリン作用の解析, 第60回動物学会関東支部大会, 東京, (2008-03-22)
- ⑤ Moriya-Ito, K., Ichikawa, M., Dendritic morphology and spine motility of interneurons in accessory olfactory bulb., Neuro2008, 東京国際フォーラム, (2008-07-11)
- ⑥ 守屋敬子, 市川眞澄, ラット副嗅球介在ニューロンの形態的特徴と樹状突起ダイナミズム, 日本動物学会第79回大会, 福岡大学, (2008-09-05)
- ⑦ 森泰隆, 守屋敬子, 町田武生, 市川眞澄, フェロモン記憶形成に関わるオキシトシン作用の解明, 第61回日本動物学会関東支部大会, 埼玉大学, (2009-03-20)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守屋 敬子 (MORIYA-ITO, KEIKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号: 70392371