

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390064

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

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、（1）前脳基底部からのコリン作動性入力から雌マウスのフェロモン記憶に関わる副嗅球の顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達を修飾すること、（2）ノルアドレナリンが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伝達効率の長期増強を誘導することが新生仔ラットにおける匂いの嫌悪学習成立に重要であること、（3）分娩時に放出されたオキシトシンが嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達効率の長期増強を誘導することによってラットの母性行動発現へと導く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) cholinergic inputs from the basal forebrain modulate GABAergic transmission from granule cells to mitral cells in the accessory olfactory bulb (AOB), where neural changes underlying pheromonal learning in female mice occur, (2) noradrenaline-induced long-term potentiation (LTP) at mitral to granule cell synapses in the olfactory bulb (OB) underlies aversive olfactory learning in neonatal rats, (3) oxytocin released at parturition facilitates the induction of LTP at mitral to granule cell synapses in the OB, thereby inducing maternal behavior.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：匂い、記憶、学習、副嗅球、嗅球、ノルアドレナリン、アセチルコリン、オキシトシン

1. 研究開始当初の背景

（1）雌雄ペア間の絆のモデル：雌マウスに形成される交配雄の匂い（フェロモン）の記憶

雄マウスの尿中フェロモンは元来、雌の鋤鼻系を刺激して血中プロゲステロン濃度を

低下させて発情をもたらす作用がある。雌マウスが交尾刺激を引き金として交配雄のフェロモンを記憶すると、その後はこのフェロモンによる発情（流産）が起こらなくなる。つまり、妊娠は保障されることになる。このフェロモン記憶は、鋤鼻系の最初の中継部位

である副嗅球に生ずるシナプスの可塑的变化によって支えられている。交尾刺激により賦活されたノルアドレナリン (NA) 神経の働きを引き金として、種々の情報分子が関わり、僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスに超微形態学的変化が生じることを示してきた。

(2) 母と子の絆のモデル I : 幼若ラットにおける匂い学習

新生仔ラットは、嗅覚と体性感覚に頼って外部環境との関係を発達させるため、この時期は匂いの条件付けが強く成立する感受性期なのである。事実、匂いと電撃を 30 分間 1 回対提示するだけで、この匂いに対する嫌悪学習が成立する。この匂い学習は、主嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞の相反性シナプスが深く関わり、転写因子 CREB(cyclic AMP response element binding protein)の発現とそのリン酸化を介して成立することを報告してきた。

(3) 母と子の絆のモデル II : ラットにおける母性行動

処女雌ラットは子どもの匂いをいやがり、これを避ける。我々はすでに、分娩時の産道刺激によって脳室にオキシトシン (OT) が放出され、嗅球に達して子の匂いシグナルを嗅球のレベルで抑制し、引いては母性行動の速やかな開始へと導くことを明らかにしていた。しかし、*in vitro*の実験において OT は嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達を促進することから、OT による母性行動の発現は OT によるシナプス可塑性誘導の結果ではないかと考えた。

2. 研究の目的

Spinoza が「人間は社会的な動物である」と述べているように、我々が求めて止まないものは人と人との絆である。しかし、愛情で結ばれ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。子どもの虐待問題についてみると、全国の児童相談所に持ち込まれる虐待の件数は、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。なぜならば、愛着行動は種の維持に関わる基本的なものであることから、人間及び他の動物は、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。本研究の目的は、種々の手法を多次元に併用することにより、特定の感受性期に匂いを手がかりとして形成される母と仔の絆、雌雄ペア間の絆のメカニズムを分子、細胞、システムレベルで解明することであった。

3. 研究の方法

(1) マウス副嗅球シナプス伝達に対するコリン作動性入力的作用

雌マウスにおける交配雄フェロモンの記憶形成に関わる副嗅球は前脳基底部からのコリン作動性ニューロンの投射を受けている。マウスの副嗅球スライス標本を作製し、副嗅球の僧帽細胞-顆粒細胞間のシナプス伝達に対するコリン作動薬カルバコールの影響をホールセルパッチクランプ記録法により検討した。

(2) 匂いの嫌悪学習の行動・電気生理学的解析

新生仔ラットにおける匂いの嫌悪学習は、匂い情報と電撃情報が嗅球で連合することによって成立する。電撃は青斑核から嗅球への NA 作動性投射ニューロンを活性化することが知られている。そこで、匂いと電撃の対提示トレーニング中にアドレナリン受容体アンタゴニストを嗅球に注入してその学習阻害効果を検討した。また、嗅球スライス標本を作製し、嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達における伝達効率の長期増強 (LTP) などの可塑的变化が誘導されるか、もし LTP が誘導されるようであれば、NA はその誘導を促進するかなどを検討した。

(3) 母性行動発現の行動・電気生理学的解析

すでに、GABA_A 受容体アンタゴニストである bicuculline を嗅球に注入すると、匂いの記憶・学習を成立させることを明らかにしている。そこで、母性行動発現に嗅球のシナプス可塑性に関わるか否かを明らかにするために、bicuculline を嗅球に注入して母性行動発現への効果を検討した。次に、嗅球のスライス標本を作製し、嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達の可塑性における OT の効果をホールセルパッチクランプ記録法により検討した。

4. 研究成果

(1) コリン作動薬カルバコールは副嗅球顆粒細胞のムスカリン受容体 M1 の活性化とそれに続く GABA 放出の促進を通して、僧帽細胞を抑制する

カルバコールは僧帽細胞から記録される微小 IPSCs の頻度を増加させた。この作用は、ムスカリン受容体タイプ 1 (M1) + タイプ 4 (M4) アンタゴニスト pirenzepine で減弱したが、M3 アンタゴニスト 4-DAMP でも M2 + M4 アンタゴニスト himbacine でも減弱しなかった。KCNQ チャネル開口薬 retigabine はカルバコールの作用を阻止した。以上の結果は、カルバコールが M1 受容体の活性化を介して KCNQ チャネルを閉じることによって顆粒細胞を脱分極させ、引いては GABA の放出確立を増大させることを示唆している。カルバコ

ールによる mIPSC 頻度の増加は、L 型、T 型カルシウムチャネルの阻害剤や細胞内ストアからのカルシウムの放出を阻害する薬物のいずれにも阻害されなかったが、Ni によって阻害されたことから、R 型のカルシウムチャネルの関与が示唆された。

(2) 匂いの嫌悪学習は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 という基礎過程によって支えられている

嫌悪学習は嗅球内に beta 受容体アンタゴニストを投与することによって阻害された。匂いと beta 受容体アンタゴニスト isoproterenol の嗅球内投与のペアリングを行うと、その匂いに対して嗜好反応かあるいは嫌悪反応が惹起された。これらの結果から、NA は学習を成立させるが、嗜好か嫌悪かの決定には他の因子が関わることが示唆された。次に、スライス標本を用いて、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伝達に LTP が誘導された。この LTP の誘導は NA によって促進され、その効果は beta 受容体アンタゴニストである timolol によって阻害された。以上の成果は、匂いの嫌悪学習が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伝達効率の LTP という基礎過程によって支えられていることを示唆している。

(3) OT は嗅球のシナプス伝達に可塑的变化を誘導し、母性行動の発現へと導く

エストロゲン前処置処女雌ラットの嗅球に bicuculline を注入すると、母性行動の発現が有意に促進された。また、嗅球スライス標本において、OT は嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達における LTP の誘導を促進することが判明した。以上の結果は、OT が嗅球のシナプス伝達に可塑的变化を誘導することによって母性行動の発現へと導くことを示唆している。

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 7 件)

- ① 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, 2011, 65, 254-261
- ② Kaba H, Neurobiology of mammalian olfactory learning that occurs during sensitive periods, *Current Zoology*, 査読有, 56, 2010, 819-833
- ③ 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, 2010, 170, 259-267

- ④ Takahashi Y, Kaba H, Muscarinic receptor type 1 (M1) stimulation, probably through KCNQ/Kv7 channel closure, increases spontaneous GABA release at the dendrodendritic synapse in the mouse accessory olfactory bulb, *Brain Research*, 査読有, 2010, 1339, 26-40
- ⑤ Inagaki H, Taniguchi M, Muramoto K, Kaba H, Takeuchi Y, Mori Y, The effect of vapor of propylene glycol on rats, *Chemical Senses*, 査読有, 35, 2010, 221-228
- ⑥ Fang L-Y, Quan R-D, Kaba H, Oxytocin facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb, *Neuroscience Letters*, 査読有, 438, 2008, 133-137

[学会発表] (計 39 件)

- ① Kaba H, Huang G-Z, Impairment of accessory bulb long-term potentiation and pheromonal learning in mGluR2-deficient mice, *Beijing International Meeting on Research in Taste and Smell*, November 15-17, 2009, Beijing, China
- ② Okutani F, Wang Y-J, Kaba H, Intrabulbar Infusion of Trichostatin A, a HDAC Inhibitor Facilitates Olfactory Learning in Young Rats. *Beijing International Meeting on Research in Taste and Smell*, November 15-17, 2009, Beijing, China
- ③ Taniguchi M, Kaba H, Modulation of the synaptic transmission between mitral cells and granule cells in the mouse accessory olfactory bulb by group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/mGluR3), *Beijing International Meeting on Research in Taste and Smell*, November 15-17, 2009, Beijing, China
- ④ Namba T, Muramoto K, Moriya-Ito K, Ichikawa M, Kaba H, Functional expression of V1R vomeronasal receptors using an adenoviral Cre/loxP system. *Beijing International Meeting on Research in Taste and Smell*, November 15-17, 2009, Beijing, China
- ⑤ Kaba H, Matsunami H, Mate recognition memory and maternally inherited peptides that convey strain identity, *The 7th International Symposium on*

Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2009), November 3-4, 2009, Fukuoka

- ⑥ Wang Y-J, Okutani F, Kaba H, Aversive olfactory learning is facilitated by HDAC inhibition in the olfactory bulb, The 7th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2009), November 3-4, 2009, Fukuoka
- ⑦ 梶秀人, マウスの系統認識, 日本解剖学会第 64 回中国・四国支部学術集会, 2009 年 10 月 24-25 日, 南国
- ⑧ 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 2-4 日, 旭川
- ⑨ 谷口睦男, 梶秀人, 代謝型グルタミン酸受容体 II 型によるマウス副嗅球僧帽細胞-顆粒細胞間相反性シナプス電流に対する抑制機構, 日本味と匂学会第 43 回大会, 2009 年 9 月 2-4 日, 旭川
- ⑩ 難波利治, 村本和世, 守屋敬子, 市川眞澄, 梶秀人, アデノウイルスベクターを用いた鋤鼻受容体の発現とフェロモン応答の再構成, 日本味と匂学会第 43 回大会, 2009 年 9 月 2-4 日, 旭川
- ⑪ Okutani F, Wang Y-J, Kaba H, Intrabulbar infusion of HDAC inhibitors modulates olfactory learning in young rats, International Union of Physiological Sciences, Teaching Workshop, August 1-4, 2009, Kobe
- ⑫ Kaba H, Huang G-Z, Zhang J-J, Yu G-Z, Okutani F, Oxytocin-induced synaptic plasticity in the olfactory bulb is required for the induction of maternal behaviour, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009, July 27-August 1, Kyoto
- ⑬ Okutani F, Kaba H, HDAC inhibition facilitates aversive olfactory learning in young rats, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009, July 27-August 1, Kyoto
- ⑭ Taniguchi M, Kaba H, Suppression of reciprocal synaptic currents by group II metabotropic glutamate receptors in the mouse accessory olfactory bulb, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009, July 27-August 1, Kyoto
- ⑮ Takahashi Y, Kaba H, Muscarinic receptor activation potentiates transmission from granule cells to mitral cells in the mouse accessory olfactory bulb, The 36th Congress of the

International Union of Physiological Sciences, 2009, July 27-August 1, Kyoto

- ⑯ Namba T, Muramoto K, Moriya-Ito K, Ichikawa M, Kaba H, Establishment of an in vitro forced expression system for vomeronasal receptors using a cre-loxP strategy, The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 2009, July 27-August 1, Kyoto
- ⑰ Kaba H, Matsunami H, Neurophysiology and neuropharmacology of pheromone action in mice. 1st International Symposium on Ecological Volatiles, 2009 年 7 月 3-4 日, 東京
- ⑱ 谷口睦男, 梶秀人, 代謝型グルタミン酸受容体 II 型によるマウス副嗅球僧帽細胞-顆粒細胞間相反性シナプス電流の調節, 第 60 回日本生理学会中四国地方会, 2008 年 11 月 15 日, 松山
- ⑲ 難波利治, 村本和世, 梶秀人, アデノウイルスベクターを用いた鋤鼻受容体の *in vitro* 発現・フェロモン応答評価系の確立, 第 60 回日本生理学会中四国地方会, 2008 年 11 月 15 日, 松山

〔図書〕 (計 3 件)

- ① Kaba H, 他、Springer-Verlag、Encyclopedia of Neuroscience、2009、1935-1939
- ② 梶秀人, 他、丸善出版、エッセンシャル神経科学、2008、306-316

〔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

(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 MUTUO)

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
(H21.4～H23.3)

(3) 連携研究者

村本 和世 (MURAMOTO KAZUYO)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：10301798