

機関番号：32669

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20580328

研究課題名（和文）フェロモン情報の初期処理に関わる神経回路の解明

研究課題名（英文）The morphological analysis of the neural circuit about initial analysis zone of the pheromone information.

研究代表者

横須賀 誠 (YOKOSUKA MAKOTO)

(日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授)

研究者番号：90280776

研究成果の概要（和文）：マウス副嗅球の傍糸球体細胞（JG細胞）について、組織化学的な特性、樹状突起の形態特性、脳室周囲層（SVZ）での生後新生と移動について解析した。副嗅球のJG細胞は主嗅球と同様にGABA、tyrosine hydroxylase、カルシウム結合蛋白を含む細胞が存在し、SVZで生後新生して副嗅球に移動することが明らかとなった。一方、主嗅球とは異なり樹状突起は複数の糸球体へ投射していた。この類似点と相違点は、鋤鼻系が嗅覚系の一つであることを示す一方、主嗅覚系とは異なる情報処理を行っていることを示している。

研究成果の概要（英文）：We analyzed that the histological properties of the dendritic form and the histochemical characteristics of the juxtglomerular cells (JG cells) in the mouse accessory olfactory bulb (AOB), and those adult neurogenesis in the subventricular zone (SVZ) after birth periods. As same as the main olfactory bulb (MOB), JG cells of the AOB express GABA, tyrosine hydroxylase or calcium-binding proteins. Moreover, SVZ give rise to neurons that migrate to adjacent target zones of AOB. Those findings suggested that the maintenance mechanism of the vomeronasal system is almost the same with main olfactory system, but the neural analysis systems were different each other.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：マウス、副嗅球、糸球体、傍糸球体細胞、脳室周囲層、生後神経新生

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト科や旧世界ザルを除いた陸生哺乳類の多くには所謂「ニオイ」の受容と認知に関与する「主嗅覚系」とは別に、「鋤鼻系」と呼ばれる、鋤鼻器～副嗅球～扁桃体で構成される一連の神経回路が存在する（図1）。

それまで鋤鼻系は、生殖フェロモンの受容に特化した感覚系と考えられていた。しかし

近年では、危険の察知（警戒フェロモン）や闘争の抑制（安寧フェロモン）などにも関わることが報告され、広い意味での社会認知に関わる感覚系であることが示唆されて来ている。しかし、依然として鋤鼻系の神経回路に関する研究は少なく、その情報処理の神経基盤は十分には理解されていない。

## 2. 研究の目的

ニオイ分子の神経情報処理に関する基盤研究が先行している嗅覚系では、ニオイ情報の初期処理に主嗅球の「糸球体層」が極めて重要な役割をもつことが明らかとなりつつある (Nawroth et al., *J. Neurosci.*, 27: 9790-9800, 2007)。よって、鋤鼻系の情報処理を理解するためには、副嗅球の糸球体層 (図2) の機能を明らかにすることが必要である。形態学的に副嗅球の糸球体層を構成する細胞群を明らかにすることは、その後にく、電気生理学的・行動学的な手法によって鋤鼻系の生理機能を解析するための重要な基本データとなる。そこで本研究は、哺乳類の中で鋤鼻系の発達程度が極めて高いマウスをモデルとして、その副嗅球、中でも糸球体層を構成する神経細胞群の形態・生化学特性を明らかにすることに焦点を絞り、「フェロモン情報の初期処理に関わる神経回路の解明」のための第一歩とした。

## 3. 研究の方法

副嗅球の糸球体層を構成する傍糸球体細胞 (juxtglomerular cells: JG 細胞) の特性について以下の方法で解析を行った。

### (1) JG 細胞の生化学的性質・分布状態・形態の解析

①深麻酔したマウスを経心臓法で灌流固定して脳標本を取り出す。脳標本を凍結ミクロトームで副嗅球を含む脳切片 (厚さ 40 $\mu$ m) を作成し、 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)、tyrosine hydroxylase (TH)、カルシウム結合蛋白質 (CBP) に対する特異抗体を用いた免疫組織化学染色を施して、副嗅球の糸球体層を構成するニューロン群の組織化学的特性とその分布を解析した。

②深麻酔したマウスを断頭して未固定脳標本を取り出し、備品申請で導入したマイクロスライサー (ZERO-1; 堂阪イーエム) を用いて人工脳脊髄液中で副嗅球を含む未固定脳スライス標本 (厚さ 300 $\mu$ m) を作製した。人工脳脊髄液中で脳スライス標本を短期培養維持しながら、実体顕微鏡下で副嗅球の JG 細胞の細胞体を識別し、微小ガラス電極 (先端直径 5 $\mu$ m 以下) を用いて電気泳動的に神経トレーサー (ビオサイチン) を単一の JG 細胞に注入した。注入後、スライス標本を固定処理し、Alexa 付きストレプトアビジンを用いた組織化学染色によりトレーサー注入した JG 細胞を染色処理し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Zeiss) によって単一の JG 細胞の全体像を解析した。

### (2) 生後 PG 細胞の発生・分化と脳室周囲層から副嗅球への移動状態の解明。

主嗅球において JG 細胞の中でも糸球体周辺細胞 (PG 細胞) に分類される細胞は、顆粒細胞層の顆粒細胞 (Gr 細胞) と共に、生涯を通じて脳室周囲層 (SVZ) から発生・移動して定期的に入れ替わることが明らかになっている。しかし、副嗅球では立証されていない。本研究では SVZ で生後発生して副嗅球へ移動してくる PG 細胞の存在とその形態学的分化過程を解析した。

①保証実験として、新生ニューロンのマーカーである Doublecortin (DCX) タンパクに対する特異抗体 (抗 DCX 抗体) による免疫組織化学染色と、BrdU の腹腔内に注入と抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、副嗅球における生後新生ニューロンの存在とその分布領域の解析を行った。

②tau-green fluorescent protein (tau-GFP) を遺伝的に取り込ませたレトロウイルスを新生仔マウスの脳室周囲層 (SVZ) に注入・感染させ、1-3 週間の生存期間を置いた後、灌流固定を施し、免疫組織化学染色によって注入時に発生したニューロンを可視化し、その移動領域と PG 細胞への分化を解析した。

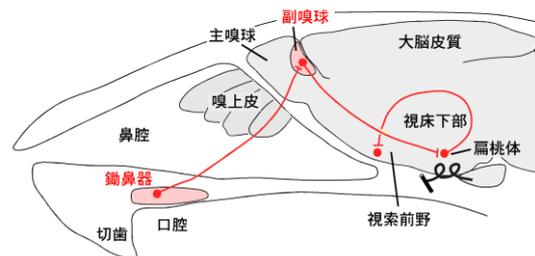


図1: 齧歯類の鋤鼻系の概要

### 副嗅球の組織

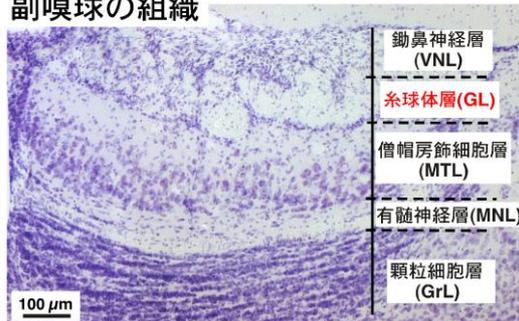


図2: マウス副嗅球の組織

## 4. 研究成果

### (1) JG 細胞の生化学的性質・分布状態・形態

#### ①: JG 細胞の性質と分布

先行研究で報告されているように、副嗅球

(以下 AOB)の個々の糸球体は主嗅球 (以下 MOB) と比べて小さく、propidium iodide による一般細胞染色 (PI 染色) を施した JG 細胞の分布のみから個々の糸球体を識別することは極めて困難であった (図 3-1 PI)。AOB の JG 細胞の生化学的性質は MOB と共通点が認められ、GABA 含有細胞のマーカである GAD67、tyrosine hydroxylase (TH)、カルシウム結合タンパク質である Calretinin (CR)、Paralbumin (Pa)、Calbindin (CB) 含有細胞の分布が認められた (図 3-1、図 3-2)。

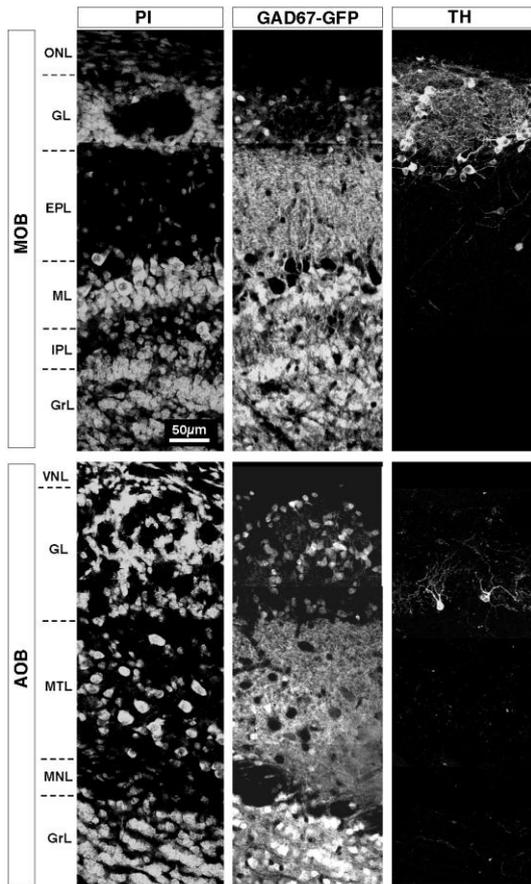


図 3-1 : MOB と AOB の比較 (その 1)

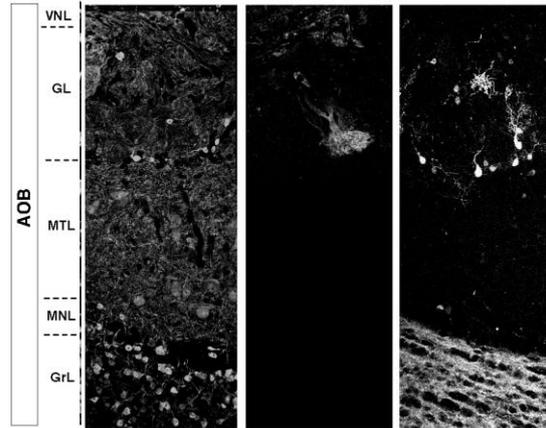
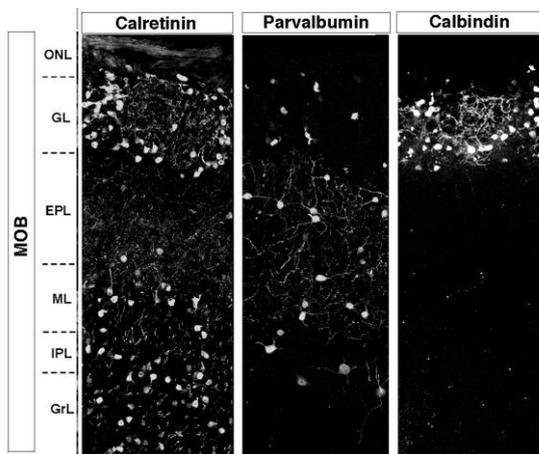


図 3-2 : MOB と AOB の比較 (その 2)

MOB と同様に AOB の糸球体層 (GL) に分布する JG 細胞の多くが (約 60%) GABA 細胞であった (図 3-1; GAD67-GFP)。しかし、AOB の糸球体層で TH、CR、Pa、CB 免疫陽性反応を示した JG 細胞は極めて少ないことが明らかとなった。その中でも、特に TH 陽性ニューロンの樹状突起における陽性反応の低さが顕著に認められた (図 3-1; TH)。

② : AOB の JG 細胞の形態

AOB の JG 細胞にビオサイチンを注入した後に、ストレプトアビジンによるトレーサの可視化と抗 VGLUT2 抗体 (糸球体内部の鋤鼻神経終末のマーカ) による免疫組織化学染色を同時に行い、JG 細胞の樹状突起と糸球体の関係を確認した。樹上突起の形態は多様であった。例えば、主として細胞体の近傍に位置する糸球体 (VGLUT2 陽性反応=図 4 の青紫の反応物) に対して樹上突起を投射させているタイプの JG 細胞 (図 4-1) が存在する一方で、細胞体の位置からは比較的離れている複数の糸球体にその樹状突起を投射させているタイプの細胞も認められた (図 4-2)。

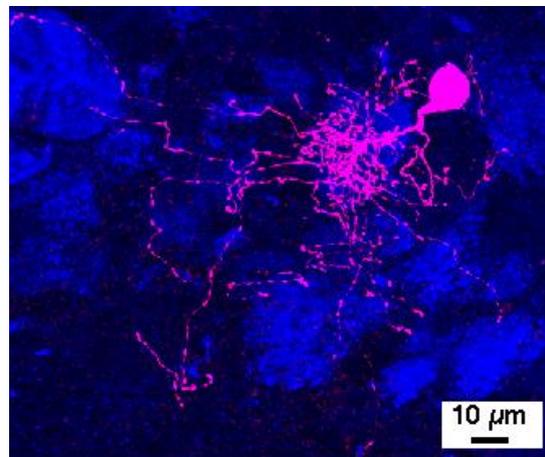


図 4-1 : AOB の JG 細胞 (その 1)

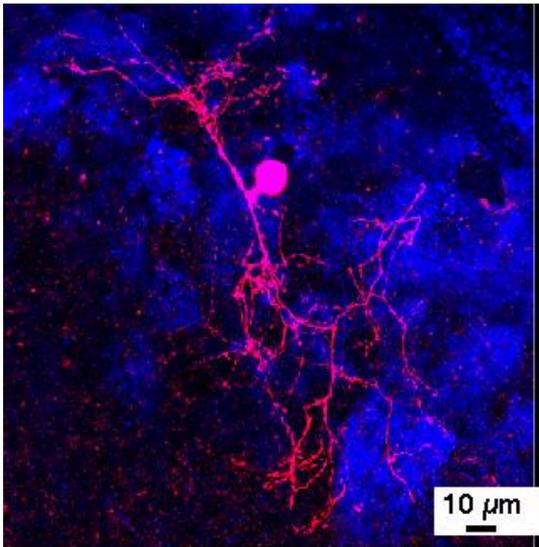


図4-2 : AOB の JG 細胞 (その2)

(2) AOB の JG 細胞の生後発生・移動・分化  
 ①マウス嗅球における発生後2週間以内の新生ニューロンのマーカーである Duplecortin (DCX) の陽性反応は、MOB のみならず AOB にも認められた (図5 : 緑色)

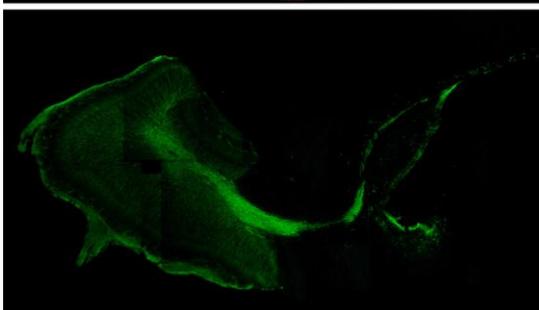
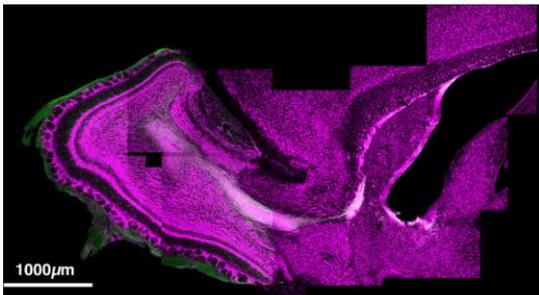


図5 : 生後21日齢マウス嗅球における DCX 免疫陽性反応 (緑色) の分布

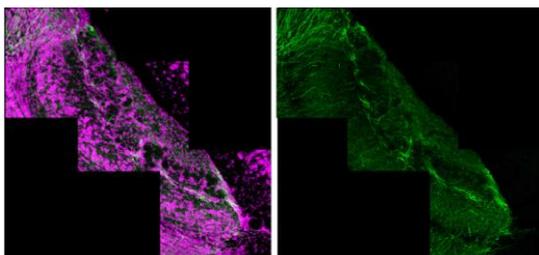


図6 : AOB における DCX 陽性反応の存在

また、AOB の糸球体層における DCX 陽性反応の分布は、前半分 (V1R ニューロンの投射領域) と後半分 (V2R ニューロンの投射領域) で優位な差は認められなかった (図6 : 緑色)。よって、AOB の糸球体層の JG 細胞も MOB と同様に、生後に脳室周囲層 (SVZ) で発生して2週間以内に移動してくることが確認できた。

②生後2日目の新生仔マウスの脳室周囲層 (SVZ) に tau-green fluorescent protein (tau-GFP) を遺伝的に取り込ませたレトロウイルスを注入し、1~3週間後の AOB の糸球体層に存在する JG 細胞の形態を解析したところ、実験(1)-②で確認した成熟後の JG 細胞とほぼ同様の形態を示す GFP-陽性の細胞を確認することが出来た (図7)。したがって、MOB と同様に AOB の JG 細胞も生後に SVZ で発生し、RMS を経由して AOB に移動し、樹上突起を分岐させて糸球体に投射する鋤鼻ニューロンとの神経連絡を持つようになることが示された。

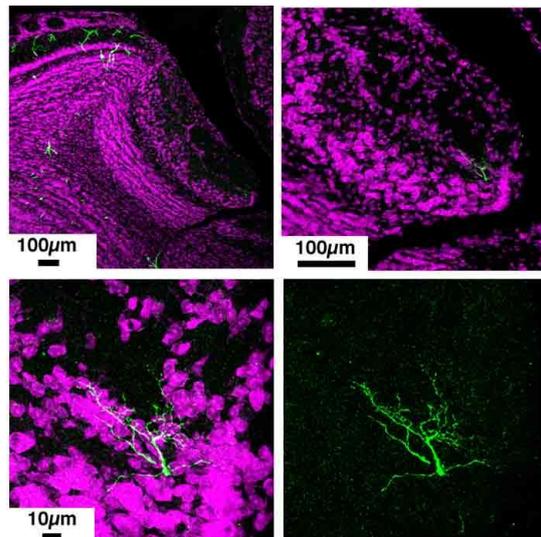


図7 : SVZ への tau-GFP-レトロウイルス感染後22日目 (生後23日齢) に AOB で認められた GFP 陽性を示す JG 細胞

成果のまとめ・考察

マウス副嗅球の糸球体層を構成する JG 細胞の特性として、半数以上が GABA 細胞で占められ、その他に TH 細胞やカルシウム結合蛋白含有細胞が分布するという主嗅球の JG 細胞と共通した特性を持つことが確認された。さらに、MOB と同様に AOB の JG 細胞も SVZ で生後新生して移動していることも確認された。その一方で AOB では、GABA 細胞以外の JG 細胞の割合 (特に TH 細胞) が極めて少ないこと、JG 細胞の樹状突起は複数の糸球体

へと投射している等、MOB とは異なる特性を併せ持つことが明らかとなった。

AOB の JG 細胞と MOB の JG 細胞の間に類似点が認められることは、AOB が基本的には MOB と同様に嗅覚神経系であることを改めて証明した結果といえる。

一方、AOB の JG 細胞の特性として、樹状突起が複数の糸球体へ投射しているという相違点が認められた。このことは、副嗅球の僧帽細胞の樹状突起は主嗅球とは異なり複数の糸球体からの情報入力を受容しているという特性と関連したものと考えられる。

さらに、副嗅球では TH 陽性の JG 細胞が少ないという特性が認められた。主嗅球へのニオイ情報の入力が抑制されると JG 細胞の TH 活性が低下すると報告されている。副嗅球の糸球体に TH 細胞が少ないという現象は、主嗅球と副嗅球ではニオイ情報の入力頻度が異なることを反映している可能性が考えられる。

#### 今後の展望

主嗅球（嗅球）の僧帽細胞がもつ「一つの僧帽細胞の樹状突起は一つの糸球体と連絡する」という特性は、（ヒトを含めた）哺乳類特有のものであり、哺乳類以外の動物の僧帽細胞は、副嗅球の僧帽細胞に類似した「複数の樹状突起により複数の糸球体からの入力を受ける」という形態を持っている。これと合わせるように、JG 細胞は哺乳類では顕著な発達を認める一方、副嗅球やその他の動物の主嗅球ではあまり発達をしていない。したがって、糸球体層の JG 細胞の形態学的特性は嗅覚神経系の発達・機能と極めて深い関係を持つことが予想される。本研究で明らかとしたマウス副嗅球の JG 細胞の特性が、他の哺乳類の副嗅球の JG 細胞にも当てはまるのか、さらには哺乳類以外の動物の嗅球の JG 細胞の特性とは関連性があるのか、等について研究を進めて行くことで、鋤鼻系の神経機能の解明、さらには脊椎動物における嗅覚系の機能発達についての理解を深めることが出来ると期待される。

#### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

横須賀 誠、中田 友明、斎藤 徹、市川 眞澄。マウス副嗅球の V1R と V2R の糸球体の形

態は異なっている。Neuroscience 2009（第 32 回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2009 年 9 月 18 日

〔図書〕（計 1 件）

横須賀 誠、斎藤 徹。種内コミュニケーション。脳とホルモンの行動学 -行動神経内分泌学への招待- 近藤保彦・小川園子・菊水健史・山田一夫・富原一哉 編。西村書店、2010。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

横須賀 誠（日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授）

研究者番号：90280776

##### (2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

守屋 敬子（東京都医学研究機構・研究員）

研究者番号：70392371