

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590279

研究課題名(和文)フェロモン情報処理を介する学習・記憶の神経機構

研究課題名(英文) Mechanism of synaptic transmission underlying memory formation for male mouse pheromones

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：マウス副嗅球スライス標本を作製し、全細胞記録法を用いて僧帽細胞-顆粒細胞間グルタミン酸作動性シナプス伝達(mEPSC)に対する各種薬物の効果を調べた。代謝型グルタミン酸受容体II型(mGluR2)作動薬が有するEPSC抑制作用は、シナプス前・シナプス後の両機構によることを明らかにした。両機構の一部はCaチャンネルの抑制を介していることも明らかにした。さらに、顆粒細胞に発生するシナプス後電位の解析から、内因性に僧帽細胞から放出される微量のグルタミン酸のみでmGluR2が生理機能を十分発揮していることを明らかにした。以上からmGluR2の作用点をシナプスレベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2) on reciprocal synaptic responses (DDI) measured from mitral or granule cells in slice preparations from mouse AOB with using the patch-clamp technique. Miniature EPSCs recorded from granule cells were reduced in both their frequency and amplitudes by an agonist for mGluR2, DCG-IV, suggesting that mGluR2 can modulate the synaptic transmission from mitral to granule cells through both pre- and postsynaptic mechanisms. Additionally, DCG-IV inhibited Ca²⁺ currents in both mitral and granule cells. To see whether mGluR2 has similar effects on the DDI elicited by more physiological stimuli, IPSPs triggered by spike trains in mitral cells were recorded. LY341495, an antagonist for mGluR2, enhanced it. The present results suggest that mGluR2 can be activated by endogenous glutamate release from mitral cells, which results in the suppression of the synaptic transmission from mitral to granule cells in the AOB.

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：行動生理学

1. 研究開始当初の背景

学習記憶という高次の脳機能が、どのような機構によって行われているかという問題は、脳科学のみならず神経生物学において極めて重要な問題である。当研究室では学習記憶の神経機構を解明するため、交尾刺激を契機として雌マウスに形成される雄の匂いの記憶(フェロモン記憶)をモデルシステムとして用いてきた。

雄マウスのフェロモンは雌マウスに発情をもたらす、繁殖に必要な役割を果たしている。しかし、この効果が受胎して間もない雌に誘起されると雄フェロモンの発情促進作用により妊娠阻止が生じてしまう。そこで雌マウスは、雄フェロモンによる妊娠阻止を防ぐために、交尾刺激を引き金として交配雄のフェロモンを記憶し、この記憶によって妊娠を保障している。当研究室ではこのフェロモン記憶の座が副嗅球であることを明らかにしてきた。副嗅球はフェロモン情報の最初の中継核であり、この部位の僧帽細胞(感覚細胞からの入力を受けて興奮し、グルタミン酸を放出する)は顆粒細胞(僧帽細胞から放出されたグルタミン酸により興奮してGABAを放出し、僧帽細胞の興奮を抑制する)との間に相反性シナプスを形成している。この相反性シナプスは副嗅球の主要な神経回路であるにもかかわらず、細胞レベルでの電気生理学的性質(シナプス電流の特性等)については不明な点が多く個々の細胞レベルでの解析が切望されていた。

2. 研究の目的

本研究は、フェロモン記憶を支えている副嗅球内でのフェロモン情報の処理機構を電気生理学的手法を用いて解明することを目的とする。

当研究室の行動薬理学的研究から、代謝型グルタミン酸受容体 II 型 (mGluR2) がフェロモン記憶に重要な役割を果たすことが示唆されていた。そこで、上記副嗅球相反性シナプスの基本的性質を明らかにするため、特に mGluR2 の相反性シナプス伝達に及ぼす影響を重点的に調べ、上記相反性シナプスにおける mGluR2 の作用点を明らかにすることを具体的目標とした。

3. 研究の方法

実験には Balb/c マウス(23~35 日齢)を用いた。僧帽細胞からの応答は、厚さ 250 μm の副嗅球切片を作成し、常套的もしくは nystatin 穿孔パッチによる whole-cell clamp 法を用いて細胞体から記録した。各刺激物質に対する応答は、膜電流固定下または膜電位固定下(保持膜電位 -70 mV)で測定した。応答の値は、平均値 \pm 標準誤差として表した。

4. 研究成果

行動薬理学的実験からフェロモン記憶に関与することが示唆されている機能分子(各種グルタミン酸受容体、ノルアドレナリン、一酸化窒素など)のうち、代謝型グルタミン酸受容体 II 型 (mGluR2) に対する阻害薬および作動薬の相反性シナプス電流に対する効果を調べた。

(1) これまでの研究から、DCG-IV (mGluR2 作動薬) が上記相反性シナプス電流を抑制することを見出していた。そこで、DCG-IV の作用点を明らかにするため、顆粒細胞にパッチ電極を適用し、Tetrodotoxin (TTX; 軸索からの脱分極に由来するシナプス伝達成分を除外し、本研究の研究対象である樹状突起間シナプス伝達に由来する成分のみを記録するために加える Na^+ チャンネル阻害薬) 存在下において僧帽細胞膜の自発性興奮により、顆粒細胞に生じるグルタミン酸作動性興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を膜電位固定下で記録した。

DCG-IV の細胞外投与により mEPSC の発生頻度、大きさともに減少した。mEPSC 発生頻度の累積確率は低い方へ、応答強度の累積確率は小さい方へ、それぞれ有意にシフトした ($P < 0.05$; Kolmogorov-Smirnov test)。これらの結果は、mGluR2 が相反性シナプス電流を抑制すること、その作用点は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の前膜側、後膜側双方にあることを明らかにした。

(2) シナプス前機構によるグルタミン酸作動性シナプス伝達抑制機構を具体的に調べた。他の脳部位におけるシナプス前機構においては、機能分子による Ca^{2+} チャンネルの抑制が含まれていることが報告されている。そこで、DCG-IV (mGluR2 作動薬) が有する EPSC 抑制作用が、シナプス前膜(本研究の場合は僧帽細胞膜がこれに相当する)上の Ca^{2+} チャンネルの抑制を介して生じているかを検討した。

膜電位固定法を用いて僧帽細胞から記録した Ba^{2+} 電流 (Ca^{2+} の流入により副次的な細胞応答が起こるのを防ぐために、細胞外 Ca^{2+} を Ba^{2+} に置換して測定) は、DCG-IV 存在下では $-1.06 \pm 0.14 \text{ nA}$ から $-0.82 \pm 0.11 \text{ nA}$ ($p < 0.01$) に抑制された。

以上の結果は、DCG-IV の相反性シナプス電流抑制作用の一部は、シナプス前膜上の Ca^{2+} チャンネルの抑制を介して生じることを明らかにした。

(3) DCG-IV の後膜側における作用点に関して重点的に調べた。細胞外投与したグルタミン酸に対する顆粒細胞の応答は DCG-IV により $185 \pm 41 \text{ pA}$ から $106 \pm 26 \text{ pA}$ ($p < 0.01$) に阻害された。この結果は、上記興奮性シナプス伝達に対する DCG-IV の抑制作用の一部が、

シナプス後機構を介して生じることを示しており(1)の結果をさらに裏付けた。

(4) 上述の(3)の成果を踏まえ、mGluR2 作動薬の DCG-IV が有する EPSC 抑制作用が、顆粒細胞膜上の Ca^{2+} チャンネルの抑制を介して生じているかを検討した。

膜電位固定法を用いて顆粒細胞から記録した Ba^{2+} 電流は、DCG-IV 存在下では -0.52 ± 0.06 nA から -0.31 ± 0.05 nA ($p < 0.005$) に抑制された。以上の結果は、DCG-IV の相反性シナプス電流抑制作用の一部は、シナプス後膜上の Ca^{2+} チャンネルの抑制を介して生じることを明らかにした。

(5)(1) の冒頭で述べたように、研究代表者らは、これまでの研究から、DCG-IV (mGluR2 作動薬) が上記相反性シナプス電流を抑制することを見出していった。これらの研究では、僧帽細胞への刺激に電位刺激を用いていた。そこで、より生理条件に近い環境での mGluR2 の役割を調べるため、僧帽細胞への刺激は活動電位を誘発させる程度に留め、その僧帽細胞の発火に伴って顆粒細胞に生じる上記相反性シナプス伝達量 (IPSP) を測定した。Current-clamp 法を用いて記録した IPSP は、LY341495 (mGluR2 阻害薬) により 1.98 ± 0.35 mV·s から 4.84 ± 1.21 mV·s ($p < 0.05$) へ増加した。

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によって mGluR2 が活性化され、それによって相反性シナプス伝達が抑制されることを示唆した。したがって本研究は、内因性に僧帽細胞から放出される微量のグルタミン酸のみで mGluR2 が生理機能を発揮している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 10 件)

谷口睦男, Mineto Yokoi, Yoshiaki Shinohara, 奥谷文乃, 村田芳博, 中西重忠, 榎秀人. Regulation of synaptic currents by mGluR2 at reciprocal synapses in the mouse accessory olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 37, pp. 351-358, 2013, 査読有り (doi: 10.1111/ejn.12059)

王宇杰, 奥谷文乃, 村田芳博, 谷口睦男, 難波利治, 榎秀人. Histone Acetylation in the olfactory bulb of Young rats facilitates aversive olfactory learning and synaptic plasticity. *Neuroscience*, vol. 232, pp. 21-31, 2013, 査読有り (doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.015)

谷口睦男, 榎秀人. A mechanism of action of group II metabotropic glutamate

receptors on dendrodendritic inhibition in the mouse accessory olfactory bulb. *The Japanese Journal of Taste and Smell Research*, vol. 18, pp. 517-520, 2011, 査読有り

難波利治, 谷口睦男, 村田芳博, 奥谷文乃, 榎秀人. Induction of synaptic plasticity in the accessory olfactory bulb by vasopressin. *The Japanese Journal of Taste and Smell Research* vol. 18, pp. 521-522, 2011, 査読有り

[学会発表](計 13 件)

谷口睦男, 榎秀人: マウス副嗅球僧帽細胞-顆粒細胞相反性シナプス伝達に対するバソプレッシンの効果. 第91回 日本生理学会大会, 2014年3月18日, 鹿児島大学郡元キャンパス, (鹿児島市)

難波利治, 谷口睦男, 榎秀人: Vasopressin induction of long-term potentiation of synaptic transmission in the accessory olfactory bulb of male mice. The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2013), 2013年11月1日~2日, 九州大学コラボレーションI およびII(馬出キャンパス)(福岡市)

谷口睦男, 榎秀人: Inhibition of glutamatergic transmission by group II metabotropic glutamate receptors at the reciprocal synapse in the mouse accessory olfactory bulb. The 10th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2012), 2012年11月3日, 九州大学コラボレーションI およびII(馬出キャンパス)(福岡市)

谷口睦男, 榎秀人: A suppressing mechanism of the recurrent inhibition by group II metabotropic glutamate receptors activated by endogenous glutamate release from mitral cells in the mouse accessory olfactory bulb. 16th International Symposium on olfaction and taste, 2012年6月24日, Radisson Blu Waterfront hotel (スウェーデン王国ストックホルム市)

難波利治, 谷口睦男, 村田芳博, 奥谷文乃, 榎秀人, Vasopressin serves to promote the induction of synaptic plasticity in the mouse accessory olfactory bulb. 2012年6月25日, Radisson Blu Waterfront hotel (スウェーデン王国ストックホルム市)

谷口睦男, 榎秀人: 代謝型グルタミン酸受容体II型を介す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45回大会、
2011年10月7日、石川県立音楽堂(金沢市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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