

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770075

研究課題名（和文）妊娠を保障するフェロモン記憶の解明：副嗅球単一ニューロンの可塑的変化の解析

研究課題名（英文）Mechanisms of synaptic plasticity at the single neuron level for understanding a pheromonal memory stored in the mouse accessory olfactory bulb.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：副嗅球はフェロモンなど化学シグナルの受容を担う鋤鼻感覚系の一次中枢で、マウスなどでは個体間の心理的結びつきの神経基盤と考えられるフェロモン記憶の座である。副嗅球ニューロンにおけるシナプス伝達では、海馬などと同様、記憶の神経メカニズムと考えられる長期増強（LTP）が入力特異的に誘導される。本研究では、副嗅球シナプスのLTPの維持に新規蛋白合成が必須であること、プロテインキナーゼ阻害ペプチドの1つとして知られているZIPに対する感受性を持つことが分かった。

研究成果の概要（英文）：In mice, some urinary pheromones of the unfamiliar male block pregnancy of the female, but those of the mating male do not. The inability of the mating male to disrupt the pregnancy depends on the memory of his pheromones formed by the female. The pheromonal memory is based on the neural changes in the accessory olfactory bulb (AOB), the first relay in the vomeronasal system. Microcircuits in the AOB include the prominent reciprocal dendrodendritic synapse between mitral cells, a single class of projection neurons, and granule cell interneurons. Long-term potentiation (LTP) at the mitral-to-granule cell synapse is expected to underlie the pheromonal memory. In this study I showed that antidromic stimulation of mitral cell axons induces long-term potentiation (LTP) at the mitral-to-granule cell synapse in slice preparations of the AOB, and that the late-phase LTP is protein synthesis-dependent. I also examined the effects of a protein kinase M ζ pseudosubstrate inhibitory peptide (ZIP), which inhibits LTP maintenance in the hippocampus and the neocortex, on the late phase of LTP at synapses in the mouse AOB. The results indicate that the maintenance of LTP at synapses in the AOB depends on ZIP-sensitive mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物行動・生理

キーワード：神経科学、脳・神経、生理学、動物、行動学

1. 研究開始当初の背景

雄マウス尿中のある種のフェロモンは、妊娠を阻害する (Bruce, 1959)。すなわち、このフェロモンが鼻腔内にある鋤鼻器で受容

され、副嗅球へ伝達された後、扁桃体等を経由して視床下部のドーパミン作動性ニューロンを興奮させる。その結果、プロラクチン分泌が抑制され、黄体のプロジェステロン分

泌が低下する。この一連の情報伝達の結果、着床が阻害される。これに対して雌マウスでは、交尾刺激を引き金として交配相手のフェロモン記憶が形成される。そしてこの記憶が、フェロモン情報のうち交配相手のものに限って情報伝達を阻止し、妊娠を保障している。

交配相手のフェロモン記憶は、雌マウス脳のどこに形成されるのか。それは鋤鼻感覚系の一次中枢・副嗅球で、そのメカニズムは、ある特定の中継ニューロン（僧帽細胞）から介在ニューロン（顆粒細胞）への伝達効率が增強され、顆粒細胞からの GABA 放出が増大し、僧帽細胞の求心性シグナルが抑制されることだと考えられる。副嗅球スライス標本を用いた電気生理学的研究では、僧帽細胞へのテタヌス刺激によって、顆粒細胞に発生する EPSP は長期増強 (LTP) されることが分かっている。これには顆粒細胞の NMDA 受容体の活性化が必須で、交尾刺激で分泌されるノルアドレナリンで LTP が促進される (Kaba & Huang, 2005)。副嗅球内にノルアドレナリンが分泌されると、僧帽細胞の α 受容体に作用し、グルタミン酸の放出を適度に抑制する。この適度な抑制がグルタミン酸による顆粒細胞の脱分極を安定化し、持続的な発火を誘導し、LTP を誘導すると予想される。

ノルアドレナリンによる LTP の促進作用は主嗅球でも見られる (Zhang *et al.*, 2010)。すなわち、主嗅球顆粒細胞で生じる EPSP の LTP が、 β 受容体を介したノルアドレナリンの作用により促進され、 β 受容体阻害薬を嗅球に局所投与すると幼若ラットにおける嗅覚嫌悪学習が成立しなくなる。嗅覚嫌悪学習の成立には MAP キナーゼによる CREB のリン酸化が関与するとの報告が従来からあり (*e.g.* Okutani *et al.*, 1999)、ノルアドレナリンの作用はこの上流に位置すると考えられる。

2. 研究の目的

副嗅球顆粒細胞で生じる LTP において、特に遅延相では、記憶に関与する分子の活性や発現量に変化が生じているはずである。そこで本研究では、主嗅球で示されている MAP キナーゼと CREB や、この下流で発現上昇が予想される脳由来神経栄養因子 (BDNF) を始めとする種々の因子が、LTP の遅延相にどう関与するかを解析した。そのために、遺伝子改変マウスを用いて雄フェロモン曝露で活性化される副嗅球ニューロンを GFP で一斉標識し、電気生理学的、薬理的、組織学および分子生物学的に検証することを試みた。

3. 研究の方法

人工的に誘導される LTP の遅延相に対する

種々の因子の関与を、まず、薬剤を用いた電気背理学実験により解析した。すなわち、生後 28~45 日の雌マウス (BALB/c) を用いて、副嗅球の急性スライスを作製し、32° C 下で 90 分間インキュベートしてから電気生理学実験に供した。応答記録は 28° C 下で、外側嗅索に定電流パルス (0.04~0.12 mA, 50 μ s) を 30 s 間隔で与えて僧帽細胞を逆行性に刺激し、顆粒細胞樹状突起で発生する興奮性シナプス後電位の集合電位 (fEPSP) を記録した。LTP の誘導には、fEPSP 記録時と同じ定電流パルスを 100 Hz で 1 s 間与える操作を、3 min 間隔で 2 回 (100 Hz \times 2) もしくは 4 回 (100 Hz \times 4) 行った。このテタヌス刺激によって僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達強度が增強されたかどうかを調べるため、fEPSP の立ち上がり相の傾き (スロープ) について、HFS 前に対する HFS 後の割合を算出した。薬剤は灌流液へ投与した。

4. 研究成果

副嗅球スライス標本中の外側嗅索へ 100 Hz \times 4 のテタヌス刺激を与えると、直後の fEPSP スロープ値は増大した。その後 30 min、150 min でも、fEPSP のスロープ値はテタヌス刺激前に比べて高い値を示した。すなわち、LTP が誘導されたと考えられる。

雌マウスが記憶を獲得するには交尾後 4.5~6 時間のフェロモン曝露が必要だが、この時期の後半に副嗅球の蛋白合成を阻害するとフェロモン記憶が形成されなくなる (Kaba *et al.*, 1989)。そこで、蛋白合成を阻害することで副嗅球シナプスの LTP にどのような変化が生じるかを調べた。蛋白合成阻害薬・アニソマイシン存在下で同様の高頻度刺激を与えると、直後の fEPSP スロープ値は増大し、30 min 後でもテタヌス刺激前に比べて高い傾向を示した。しかし、150 min 後の fEPSP スロープ値は、テタヌス刺激前と同程度にまで抑制された。すなわち、LTP の遅延相のみが抑制された。このことは、副嗅球シナプスの蛋白合成は短期増強や LTP の初期相の発現には関与せず、LTP の遅延相の発現にのみ関与していることが分かった。

研究開始当初、ラットやマウスの海馬、扁桃核や新皮質での LTP の維持に関与し、アムフラシやショウジョウバエでも機能している分子として唯一示されていたのは、プロテインキナーゼ M $_{\zeta}$ である (*e.g.* Sacktor, 2012) これを阻害するとして当初合成されたペプチド・ZIP は海馬シナプスで誘導される LTP の遅延相のみを阻害するなど報告がなされていた。そこで本研究では、副嗅球スライス標本を用いて ZIP の効果を電気生理学的に検証した。テタヌス刺激 60 min 後から ZIP を灌流投与し続けると、LTP は維持されなくな

ることが分かった。

以上のことは、副嗅球シナプスで誘導されるLTPの遅延相は蛋白合成依存的であり、ZIPによって抑制される何らかの因子によるものであることを示している。今後、ZIPの標的因子を解明することによって、LTP維持のメカニズムの解明、すなわち記憶の維持のメカニズム解明につながることを期待される。

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4件)

- ① Taniguchi M, Yokoi M, Shinohara Y, Okutani F, Murata Y, Nakanishi S, Kaba H, Regulation of synaptic currents by mGluR2 at reciprocal synapses in the mouse accessory olfactory bulb, *The European Journal of Neuroscience*, 査読有, 37, 2013, 351-358, DOI: 10.1111/ejn.12059. Epub 2012 Nov 21.
- ② Wang YJ, Okutani F, Murata Y, Taniguchi M, Namba T, Kaba H, Histone acetylation in the olfactory bulb of young rats facilitates aversive olfactory learning and synaptic plasticity, *Neuroscience*, 査読有, 232C, 2012, 21-31, DOI:0.1016/j.neuroscience.2012.12.015.
- ③ 村田芳博、椛秀人、マウス副嗅球シナプスの長期増強に対する蛋白合成阻害薬の効果、*日本味と匂学会誌*、査読有、18、2011、515-516、<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009441284>
- ④ 難波利治、谷口睦男、村田芳博、奥谷文乃、椛秀人、バゾプレッシンによる副嗅球シナプス可塑性の誘導、*日本味と匂学会誌*、査読有、18、2011、521-522、<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009441286>

[学会発表] (計13件)

- ① 村田芳博、椛秀人、副嗅球シナプスの長期増強における遅延相のプロテインキナーゼMzeta依存性、第90回日本生理学会大会、2013年3月27日～29日、タワーホール船堀(東京)
- ② Murata Y, Kaba H, Maintenance of long-term potentiation at synapses in the mouse accessory olfactory bulb requires protein kinase M ζ , *The 10th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception*, 2012年11月3日～

4日、九州大学コラボレーション(福岡)

- ③ 村田芳博、椛秀人、プロテインキナーゼM ζ 阻害が副嗅球シナプスの長期増強に及ぼす影響、第64回日本生理学会中国四国地方会、2012年10月27日～28日、高知市文化プラザかるぼーと(高知)
- ④ 村田芳博、椛秀人、マウス副嗅球シナプスの長期増強に対するプロテインキナーゼM ζ 阻害薬の効果、*日本味と匂学会第46回大会*、2012年10月3日～5日、大阪大学コンベンションセンター(大阪)
- ⑤ Murata Y, Kaba H, *De novo* protein synthesis required for maintenance of long-term potentiation at synapses in thmouse accessory olfactory bulb, *日本比較生理生化学会第34回大会*、2012年7月6日～8日、総合研究大学院大学葉山キャンパス(神奈川)
- ⑥ Murata Y, Kaba H, A functional role for protein synthesis in long-term potentiation at synapses in the mouse accessory olfactory bulb, *The 16th International Symposium on Olfaction and Taste*, 2012年6月23日～27日, Radisson Blu Waterfront Hotel (Sweden)
- ⑦ 村田芳博、椛秀人、副嗅球シナプスの長期増強における遅延相の新規蛋白合成依存、第89回日本生理学会大会、2012年3月29日～31日、長野県松本文化会館(長野)
- ⑧ 難波利治、谷口睦男、村田芳博、奥谷文乃、椛秀人、バゾプレッシンは副嗅球におけるシナプス可塑性の誘導を促進する、第89回日本生理学会大会、2012年3月29日～31日、長野県松本文化会館(長野)
- ⑨ Murata Y, Kaba H, Long-term potentiation at synapses in the mouse accessory olfactory bulb requires new protein synthesis, *The 9th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception*, 2011年11月4日～6日、九州大学コラボレーション(福岡)
- ⑩ 村田芳博、椛秀人、蛋白合成阻害が副嗅球シナプスの長期増強に及ぼす影響、第63回日本生理学会中国四国地方会、2011年10月22日～23日、広島大学霞キャンパス広仁会館(広島)
- ⑪ 村田芳博、椛秀人、マウス副嗅球シナプスの長期増強に対する蛋白合成阻害薬の効果、*日本味と匂学会第45回大会*、2011年10月5日～7日、石川県立音楽堂(石川)
- ⑫ 難波利治、谷口睦男、村田芳博、奥谷文乃、椛秀人、バゾプレッシンによる副嗅球シナプス可塑性の誘導、*日本味と匂学*

会第45回大会、2011年10月5日～7日、石
川県立音楽堂（石川）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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