

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460319

研究課題名(和文) フェロモン記憶を支える神経回路変化の解析

研究課題名(英文) Analysis of the synaptic changes underlying a long-lasting olfactory recognition memory of the pheromonal signal

研究代表者

谷口 睦男 (Taniguchi, Mutsuo)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号：10304677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000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-顆粒細胞間相反性シナプス伝達(IPSC)に対する各種薬物の効果を調べた。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バゾプレシンがIPSC抑制作用を有することを見出した。バゾプレシン受容体サブタイプの特異的阻害薬や作動薬を用いて調べた結果、バゾプレシンのIPSC抑制作用はV1a受容体を介して生じることが示唆された。僧帽細胞のGABAに対する応答を調べたところ、バゾプレシンの作用点はGABA作動性シナプス後膜ではないことが示唆された。以上からバゾプレシン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 AVP on reciprocal synaptic responses (DDI) measured from mitral cells in slice preparations from mice AOB with using the patch-clamp technique. We demonstrated that AVP significantly reduced the IPSCs triggered by applying a depolarizing voltage step from -70 mV in Mg<sup>2+</sup>-free solution. To determine the contribution of different AVP receptor subtypes (V1a and V1b) to reduce the IPSCs, effects of an agonist and antagonists for V1Rs on the IPSCs were tested. An agonist for V1a receptors, [Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>]-vasotocin mimicked the AVP action on the IPSCs. The suppressive effect of AVP on the IPSCs was diminished by an antagonist for V1a receptors, Manning compound, while an antagonist for V1b receptors, SSR149415 unaffected the effects of it. The present results suggest that AVP modulates reciprocal transmission between mitral and granule cells through AVP V1a receptors.

研究分野：環境生理学

キーワード：電気生理学 鋤鼻系 シグナル伝達 相反性シナプス

## 1. 研究開始当初の背景

学習記憶という高次の脳機能が、どの様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。

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、行動薬理学的実験などから上記シナプス伝達に関与することが示唆されている機能分子(各種Ca<sup>2+</sup>チャネル、下垂体後葉ホルモンなど)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(23~36日齢)を用いた。僧帽細胞からの応答は、厚さ300μmの副嗅球切片を作成し、常套的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、膜電位固定下(保持膜電位-70mV)で測定した。応答の値は、平均値±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(Ca<sup>2+</sup>チャネル、下垂体後葉ホルモン)のうち、バゾプレシン(AVP)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) バゾプレシンが上記相反性シナプス電流(IPSC)に対して作用を有するかを調べた。バゾプレシンを細胞外投与すると、IPSCはコントロールの46.0±4.7%に有意に抑制された。これに続くManning化合物(バゾプレシン1a受容体(V1a受容体)阻害薬)の共投与によって、バゾプレシンの単独投与で抑制されたIPSCは、コントロールの93.0±15.3%に回復した。一方、SSR149415(バゾプレシン1b受容体阻害薬)の共投与では回復しなかった(コントロールの41.1±9.4%)。次に、V1a受容体作動薬の[Phe<sup>2</sup>, Orn<sup>8</sup>]-vasotocinを細胞外単独投与では、IPSCはコントロールの28.2±6.1%に有意に抑制された。

以上から、バゾプレシンはV1a受容体を介して副嗅球僧帽細胞-顆粒細胞間相反性シナプス伝達を抑制すること、V1b受容体は副嗅球相反性シナプス伝達にはほとんど寄与しないことを明らかにした。

(2) (1)の結果は、僧帽細胞を刺激して生じるIPSCに対するバゾプレシン受容体の作動薬および阻害薬の効果を調べたものであり、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と、顆粒細胞から僧帽細胞へのGABA作動性シナプス伝達の両方が含まれている。より正確な知見を得るためには、片方ずつ分離して調べる必要がある。

そこで先ず、顆粒細胞から僧帽細胞へのGABA作動性シナプス伝達における、バゾプレシンの作用を調べた。具体的には、CNQX(10μM)およびAP5(50μM)を用いて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を遮断しておき、顆粒細胞から僧帽細胞へのGABA作動性シナプス伝達がバゾプレシンによって影響を受けるのかどうかを調べた。僧帽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<sup>+</sup>チャネル阻害薬)存在下において、顆粒細胞膜の自発性興奮により生じるGABA作動性IPSC(mIPSC)を膜電位固定下で記録した。バゾプレシンの細胞外投与によりmIPSCの発生頻度、大きさとも減少したが、有意差は検出できなかった(P>0.05; Kolmogorov-Smirnov test)。

(3) (2)の結果は、mIPSCの発生頻度、大きさに変化はあったものの有意差の検出までには至らなかった。個々の細胞ごとの結果は、バゾプレシンの細胞外投与によりmIPSCの発生頻度、大きさとも減少する細胞、どちらか一方だけ減少する細胞など、バゾプレシンの作用点は細胞ごとに異なった(作用点が僧帽細胞側にあるシナプス、顆粒細胞側にあるシナプス、両方にあるシナプス)。このように、

バゾプレシンの作用点は細胞ごとに異なることが示唆されたため、個々の細胞からの応答に加えて、より多くの細胞からの応答を記録できる集合電位記録も行った。

顆粒細胞に由来する集合電位応答にはバゾプレシンは影響しないことが明らかになった。この結果は、個々の細胞における作用点が異なる（バゾプレシンの影響が現れる細胞と現れない細胞の両方が存在する）ため、集合電位記録ではバゾプレシンの作用が平均化されたためと考えられ、上述の個々の細胞における結果を支持した。

(4) バゾプレシンの後膜側における作用点に関して重点的に調べた。(2)と同様に相反性シナプスのうちのグルタミン酸作動性伝達を CNQX (10  $\mu$ M) および AP5 (50  $\mu$ M) で遮断し、僧帽細胞の GABA 応答を直接測定した。

バゾプレシンの細胞外投与によって GABA 応答は影響を受けなかった。このことは、バゾプレシンの IPSC 抑制作用が顆粒細胞 - 僧帽細胞間の GABA 作動性シナプス伝達のシナプス後機構を介していないことを示唆した。

## 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 11 件)

- ① Guang-Zhe Huang, Mutsuo Taniguchi, Ye-Bo Zhou, Jing-Ji Zhang, Fumino Okutani, Yoshihiro Murata, Masahiro Yamaguchi, and Hideto Kaba (\*共同筆頭著者).  $\alpha$ 2-Adrenergic receptor activation promotes long-term potentiation at excitatory synapses in the mouse accessory olfactory bulb. *Learning & Memory*, 25:147-157, 2018, 査読有り (doi/10.1101/lm.046391.117)
- ② Jia Tong, Fumino Okutani, Yoshihiro Murata, Mutsuo Taniguchi, Toshiharu Namba, Yujie Wang, Hideto Kaba. Tunicamycin impairs olfactory learning and synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Neuroscience*, 344: 371-379, 2017, 査読有り pp. 371-379, 2017, 査読有り (doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.001.)
- ③ Toshiharu Namba, Mutsuo Taniguchi, Yoshihiro Murata, Jia Tong, Yujie Wang, Fumino Okutani, Masahiro Yamaguchi, Hideto Kaba. Activation of arginine vasopressin receptor 1a facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb of male mice. *Neuroscience Letters*, 634:107-113, 2016, 査読有り (doi: 10.1016/j.neulet.2016.09.056)

- ④ 村田芳博, 谷口睦男, 梶秀人, 匂い記憶のメカニズム. *Clinical Neuroscience* 34: 1324-1327, 2016, 査読有り

[学会発表] (計 18 件)

- ① 谷口睦男, 村田芳博, 山口正洋, 梶秀人: バゾプレッシンV1a受容体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伝達の抑制機構. 第95回 日本生理学会大会、2018年(高松市)
- ② 谷口睦男, 村田芳博, 山口正洋, 梶秀人: バゾプレッシンV1a受容体の活性化はマウス副嗅球相反性シナプス電流を抑制する. 第40回 日本神経科学大会、2017年(千葉市)
- ③ 谷口睦男: マウスフェロモン記憶を支える神経基盤 副嗅球内相反性シナプスの特徴、北海道から芽吹いた生命科学シンポジウム、2017年(旭川市)
- ④ 谷口睦男, 山口正洋, 梶秀人: V1a受容体を介したバゾプレッシン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伝達の抑制作用. 第94回 日本生理学会大会、2017年(浜松市)
- ⑤ Mutsuo Taniguchi, Toshiharu Namba, Hideto Kaba: Action of vasopressin on chemical signal processing at the reciprocal synapses between mitral cells and granule cells in the mouse accessory olfactory bulb through the V1 receptors, 17th International Symposium on olfaction and taste、2016年(横浜市)
- ⑥ Toshiharu Namba, Mutsuo Taniguchi, Yoshihiro Murata, Fumino Okutani, Hideto Kaba: Activation of the vasopressin 1a receptor is necessary for the induction of synaptic plasticity in the accessory olfactory bulb of male mice, 17th International Symposium on olfaction and taste、2016年(横浜市)
- ⑦ 谷口睦男: 哺乳動物におけるフェロモン情報処理. 平成27年度高知信用金庫・高知安心友の会学術賞 受賞講演会、2016年(南国市)
- ⑧ 谷口睦男, 難波利治, 梶秀人: V1受容体を介した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バゾプレッシンの抑制機構. 日本味と匂い学会 第49回大会、2015年(岐阜市)
- ⑨ 谷口睦男, 難波利治, 梶秀人: バゾプレッシンV1受容体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伝達の修飾作用. 第92回 日本生理学会大会、2015年(神戸市)
- ⑩ Mutsuo Taniguchi, Toshiharu Namba, Hideto Kaba: Effects of vasopressin receptor agonists and antagonists on recurrent inhibition in the mouse accessory olfactory bulb. The 12th

International Symposium on Molecular  
and Neural Mechanisms of Taste and  
Olfactory Perception (YR Umami Forum  
2014, AISCRIB2014)、2014年(福岡市)

- ⑪ 谷口睦男、難波利治、椛秀人：マウス副嗅  
球僧帽細胞-顆粒細胞間相反性シナプス伝  
達に対するバゾプレッシンの抑制作用。  
日本味と匂い学会 第48回大会、2014年  
(清水市)

## 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基礎医学部  
門・准教授

研究者番号：10304677