

「脳を知る」  
平成9年度採択研究代表者

市川 眞澄

(財)東京都医学研究機構神経科学総合研究所 主任研究員)

## 「フェロモンの記憶に関わるシナプスメカニズムの解析」

### 1. 研究実施の概要

フェロモンは動物の社会生活に重要な因子であり、鋤鼻系が受容および情報処理に関わっている。自然の刺激によるシナプスの可塑性と記憶との関わりを明らかにする目的で、フェロモンの記憶を司る鋤鼻系副嗅球内の相反シナプスという機能的に重要なシナプスに注目して、フェロモン刺激とシナプスの可塑性との関連を総合的に解析している。11年度は、雌マウス交尾後のフェロモン記憶形成期に副嗅球内の相反シナプスの形態変化がおきること、また副嗅球ニューロンの初代培養系が確立し興奮および抑制性シナプスが多数形成されていることをあきらかにした。今後、培養系での定量的研究が可能になり、シナプスレベルにおける記憶学習のメカニズムの研究の発展が期待できる。

### 2. 研究実施内容

#### (I) フェロモン記憶の基礎現象としての可塑性シナプスの形態学的解析

##### (A) フェロモン記憶に関わる可塑性シナプスの形態学的解析

雌マウスの交尾後のフェロモン記憶形成期に副嗅球内の相反シナプスの形態変化がおきることが明らかになった。そこで、この変化が長期間維持されるのかについて解析した。交尾後起きた形態変化は50日後および出産後には消失していることを示唆する結果を得た。

##### (B) 培養系におけるシナプス可塑性の解析

出生前後のラットから副嗅球を取り出し、細胞を調整し3～4週間後に培養副嗅球ニューロンを抗MAP-2、抗NMDA、あるいは抗GAD抗体などで免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、培養ニューロン間で興奮性シナプスのみならず、抑制性のシナプスも多数形成されるのが確認できた。

#### (II) フェロモン記憶の分子生物学および生理学的解析

##### (A) 副嗅球へ投射するノルアドレナリン作動性神経は交尾刺激により賦活される。invivoの実験において、扁桃体へ投射する僧帽/房飾細胞の一部が人工的な腔頸管刺激によって賦活されるとの知見を得た。

##### (B) 副嗅球のグリア細胞がフェロモンの記憶形成に重要であることを示唆してき

た。グリア細胞とニューロンの双方におけるグルタミン酸トランスポーター mRNA の発現と記憶との関連性を検討している。記憶・学習にミクログリアが役割を果たすとの知見が報じられている。そこで、ミクログリアに特異的に発現し、カルシウムシグナリングに関わると考えられている calcium binding adaptor protein (Iba-1) の副嗅球における発現を検討した。その結果、Iba-1 を発現しているミクログリアは、主として相反シナプスが形成される外叢状層に存在しており、かつ副嗅球の前、後部で発現パターンに差があるとの知見を得た。

### (Ⅲ) フェロモンの記憶学習の行動学的解析

#### (A) 警報フェロモンの作用に関する行動生理学的解析

哺乳類の社会的行動において、ケミカルコミュニケーションに用いられるフェロモン物質を探索・同定するために、まず生物検定系の開発を目指して以下の検討を行った。自由行動下のラットから心拍、体温、活動量を連続記録できるシステムを用いて、新奇環境に暴露するというストレス負荷によって生ずる自律機能の反応を検討した。その結果、体温の一過性の上昇が再現性高く観察されたので、これをパラメーターとする基礎モデルを採択した。この条件に警報フェロモンへの暴露を付加したところストレス反応の増強が観察され、警報フェロモンの生物検定系として有用であることが明らかとなった。

#### (B) 視床下部神経活動を指標とした生殖フェロモンの生物検定

視床下部 GnRH パルスジェネレーターの活動への効果を指標としたシバヤギ雄性フェロモンに対する生物検定系を開発し、これを用いて以下の結果を得た。まず去勢雄にジヒドロテストステロン (DHT) を移植したところ、テストステロン処置の場合とは異なり頭部および臀部の皮膚サンプルのいずれにおいてもフェロモン活性が認められた。雌シバヤギにおいても DHT によって雄と同様、皮脂腺サンプルにフェロモン活性が出現し、雌もフェロモン産生の潜在能力を有することが明らかとなった。また DHT を投与した雄ヤギの皮膚由来の気相成分を head-space GCMS を用いて解析したところ、フェロモン活性と平行して特異的に発現する幾つかの化合物が認められたので、現在フェロモン候補物質と考えて検討を進めている。

### (Ⅳ) フェロモン物質およびフェロモンレセプターの解明

我々の開発した鋤鼻神経細胞の培養系は、鋤鼻神経細胞の発生研究に大いに貢献した。培養鋤鼻神経細胞を、数ヶ月から 1 年にわたり、前駆細胞から分化、新生させることに成功した。ただ現在のところ、神経細胞が前駆細胞より新しく再生してくるが、未熟な神経細胞のまま 2 から 3 週間で死んでしまう。今後、特定のフェロモンレセプターを強制発現させたり、フェロモン情報伝達系を研

究するためには、鋤鼻神経細胞を成熟させる必要がある。そこで本年度は、いろいろな液性因子を加え、成熟のマーカであるOMPの発現を指標にした検索も試みた。NT-1,2,3,4やCNTFなどのneurotrophic factorはOMPの発現を誘導することはできなかった。NOやいろいろなモノアミン系の神経伝達物質についても結果は同様であった。今後はこれらの組み合わせや未知の因子の同定も含め成熟因子の検索を進める。

原子間力顕微鏡を使って、フェロモン受容の研究を行うため、フェロモン受容体に対する抗体を使って解析した。今回の研究から、検出されたフォースカーブの形から抗体抗原間の特異的結合と非特異的結合が区別できることが示唆された。また、基板上の抗原の数を制御することで、より生体内に近い環境で実験を行うことができれば、細胞表面や組織の受容体の数をさらに正確に検出できる可能性があることもわかった。

(V) 鋤鼻系シナプスの電気生理学的解析：佐原資謹（東医歯大）研究グループ

シナプス伝達の修飾に重要な役割を果たす、代謝型のグルタミン酸受容体の主嗅球ならびに副嗅球での分布を、この受容体に特異的な抗体を作成し、市川グループと共同して、光顕ならびに電顕レベルで比較検討した。その結果、主嗅球と副嗅球での情報処理の違いを反映すると考えられる差が明らかになった。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Ichikawa M, Shin T, Kang MS.: Fine structure of the vomeronasal sensory epithelium of Korean goats (*Capra hircus*). *J. Reprod. Develop.*, 45,81-89 (1999)

Osada T, Ikai A, Costanzo RM, Matsuoka M, Ichikawa M.: Continual neurogenesis of vomeronasal neurons in vitro. *J. Neurobiol.*, 40, 226-233 (1999)

Ichikawa M.: Axonal growth of newly formed vomeronasal receptor neurons after nerve transection. *Anatomy Embryol*, 200, 413-417 (1999)

Takigami S, Yoshida-Matsuoka J, Matsuoka M, Mori Y, Ichikawa M.: The expressed localization of rat putative pheromone receptors. *Neurosci. Lett.*, 272,115-118 (1999)

Yokosuka M, Matsuoka M, Ohtani-Kaneko R, Iigo M, Hara M, Hirata K, Ichikawa M.: Female-soiled bedding induced c-Fos immunoreactivity in the ventral part of the premammillary nucleus (Pmv) of the male mouse. *Physiol. Behaviour*, 68,257-261 (1999)

Matsuoka M, Yokosuka M, Mori Y, Ichikawa M.: Specific expression pattern of Fos in the accessory olfactory bulb of male mice after exposure to soiled bedding of females. *Neurosci. Res.*, 35, 189-195 (1999)

Usui, M., Kawasaki, Y. & Kaba, H.: Neurosteroid modulation of dendrodendritic

inhibition in the mouse olfactory bulb. *Neurosci. Lett.*, 263, 185-188, (1999)

Takahashi, S., Ujihara, H., Huang, G.-Z., Yagy, K., Sanbo, M., Kaba, H. & Yagi, T.: Reduced hippocampal LTP in mice lacking a presynaptic protein: complexin II. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 2359-2366 (1999)

Okutani, F., Yagi, F. & Kaba, H.: GABAergic control of olfactory learning in young rats. *Neuroscience*, 93, 1297-1300 (1999)

Ichimaru T., Takeuchi Y., Mori Y. Stimulation of the GnRH pulse generator activity by continuous exposure to the male pheromones in the female goat. *J.Reprod.Develop.*, 45, 243-248 (1999)

Kikusui T., Tonohiro T., Kaneko T. Simultaneous evaluation of spatial working memory and motivation by the allocentric place discrimination task in the water maze in rats. *J.Vet.Med.Sci.*, 61, 673-681 (1999)

Kikusui T., Tonohiro T., Kaneko T. Age-related working memory deficits in the allocentric place discrimination task: possible involvement of cholinergic dysfunction *Neurobiol. Aging*, 20, 629-636 (1999)

Kikusui T., Tonohiro T., Kaneko T. The allocentric place discrimination task is selectively and highly dependent on the central muscarinic system in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 65, 131-139 (2000)

Iwata E., Wakabayashi Y., Kakuma Y., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. Primer pheromone is produced testosterone-dependently in the sebaceous gland of male goat. *Biol.Reprod.*, 62, 806-810 (2000)

Yoshida-Matsuoka J, T. Osada, Y. Mori, and M. Ichikawa.: A developmental study using three antibodies (VOBM1, VOBM2, and VOM2): immunocytochemical and electron microscopical analysis of the luminal surface of the rat vomeronasal sensory epithelium. *Anat. Embryol.*, 199, 215-224 (1999)

Osada T, S Takezawa, A Itoh, H Arakawa, M Ichikawa, and A Ikai.: The distribution of sugar chains on the vomeronasal epithelium observed with the atomic force microscope. *Chemical Senses*, 24, 1-6 (1999)