

# 匂い学習記憶の分子機構

## Molecular Mechanism of Olfactory Memory

梶 秀人

Hideto KABA

高知医科大学、教授

Kochi Medical School, Professor

Female mice form an olfactory memory of the pheromones of the male with which they mate. The synaptic changes underlying this memory formation occur in the accessory olfactory bulb (AOB). In this study we have obtained the following results. 1) Exogenous administration of nitric oxide can induce a pheromone-specific olfactory memory without mating, and this memory is mediated, at least in part, by noradrenaline. In addition, activation of endogenous nitric oxide synthase activity produces the same effect. 2) Electron microscopic analysis shows that the size of the AOB mitral-to-granule asymmetrical synapse is significantly larger in the group that has formed the memory than in the group that has not formed the memory. 3) Behavioural and electrophysiological studies of genetically engineered mice lacking mGluR2 suggest that mGluR2 plays a critical role in the formation of an olfactory memory via its modulation of granule cell-mediated feedback inhibition of the mitral cells. 4) Behavioural and immunohistochemical analyses suggest that glia cells in the AOB are involved in the formation of the olfactory memory.

### 1. 研究目的

学習記憶という高次の脳機能が脳のどこのどういふメカニズムによって担われているのかという問題を解明することは、脳科学の最も重要な研究課題の一つである。申請者らが解析してきた、交尾刺激を引き金として雌マウスに形成される雄のフェロモンの記憶は、妊娠の成立に不可欠な、生存価の高い記憶であるとともに、学習記憶研究のモデルシステムとして有用である。なぜなら、記憶の座、すなわち記憶を蓄えるシナプスを捉えることができたため、記憶の形成・維持の分子メカニズムの解析がさらに可能になったからである。この記憶は30日間保持されるので長期記憶のモデルとなるとともに、妊娠によって積極的に消去されるので記憶の消去を解析するモデルとしても有用である。

研究代表者らは、この記憶の形成および保持に関する時間的特性、記憶形成の主座(副嗅球)、ここでの神経・シナプス・分子レベルのメカニズムの一部を明らかにしてきた[1-3]。鋤鼻系の最初の中継部位である副嗅球の僧帽細胞は副嗅球に内在する顆粒細胞との間に、樹状突起同士は双方向性シナプスをつくっている。鋤鼻器におけるフェロモン受容により興奮した僧帽細胞はグルタミン酸を放出して顆粒細胞を興奮させる。興奮した顆粒細胞はGABAを放出して僧帽細胞を抑制する(図1)。研究代表者らは、この僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスこそが可塑性の場であることを種々の角度から示してきた。

本研究の目的は、正常動物は勿論のこと、ジ-

ンターゲティング法により特定遺伝子を欠失させたマウスを用いて、フェロモン記憶の分子メカニズムを解明することであった。

### 2. 研究経過

#### 2.1 第1年度(平成8年度)

京都大学医学研究科生体情報科学講座の中西重忠教授らとの共同で、ジーンターゲティング法による mGluR2 遺伝子の破壊が鋤鼻系のフェロモン情報処理にいかなる影響を及ぼすかについて検討した。すなわち、鋤鼻系の働きによって雌マウスに誘起される雄フェロモンのプライマー効果、すなわち Vandenbergh 効果、Whitten 効果および Bruce 効果について mGluR2 欠損雌マウス(ホモマウス)と野生型雌マウスを比較検討した。野生型マウスにおいて、Vandenbergh 効果、Whitten 効果、Bruce 効果のいずれも有意に誘起されなかった。そのため、mGluR2 欠損が雄のフェロモンによるプライマー効果にいかなる影響を及ぼすかを評価することができなかった。この点に関して、フェロモンによる生殖内分泌効果にマウスの系統差があることが知られている。解析したマウスは、129Sv、C57BL/6J、および BDF1 の遺伝的背景を持つ。129Sv と C57BL/6J の両系統ともフェロモンによる生殖内分泌効果が起こりにくい系統として報じられている。この問題を克服するために、匂いの効果が明白に認められる系統、すなわち Balb/c に mGluR2 遺伝子の変異を乗せ換えたコンジェニックマウスを用いて再度検討する必要が生じた。

記憶形成には交尾直後の副嗅球におけるノルア

ドレナリン代謝回転率の増加が不可欠である。副嗅球ノルアドレナリン線維は青斑核に由来する。青斑核ノルアドレナリン神経は、嗅球に限らず、脊髄、小脳、海馬、大脳皮質などへ広く投射している。ところが、交尾直後のノルアドレナリン代謝回転率の増加は大脳皮質には認められない。すなわち、記憶形成に必要な副嗅球ノルアドレナリン代謝回転率の増加には、副嗅球内の局所回路がかかわると考えられる。研究代表者らは、この役割を果たす情報分子として一酸化窒素 (NO) の可能性を検討した。

正常 Balb/c マウスを用いて、記憶の形態学的相関を電顕レベルで検討した。

## 2.2 第2年度 (平成9年度)

第1年度の成果を踏まえて、mGluR2 遺伝子の変異を Balb/c に6世代乗せ換えた mGluR2 欠損マウスのフェロモン記憶形成能を再度検討した。また、副嗅球内情報処理における mGluR2 欠損の効果についても電気生理学的に解析した。

## 2.3 第3年度 (平成10年度)

フェロモンの記憶形成に副嗅球のグリア細胞が関わるか否かを行動薬理的及び免疫組織化学的に解析した。

フェロモンの記憶形成には交尾刺激が不可欠である。膣刺激の副嗅球内情報処理に対する作用を電気生理学的に解析した。

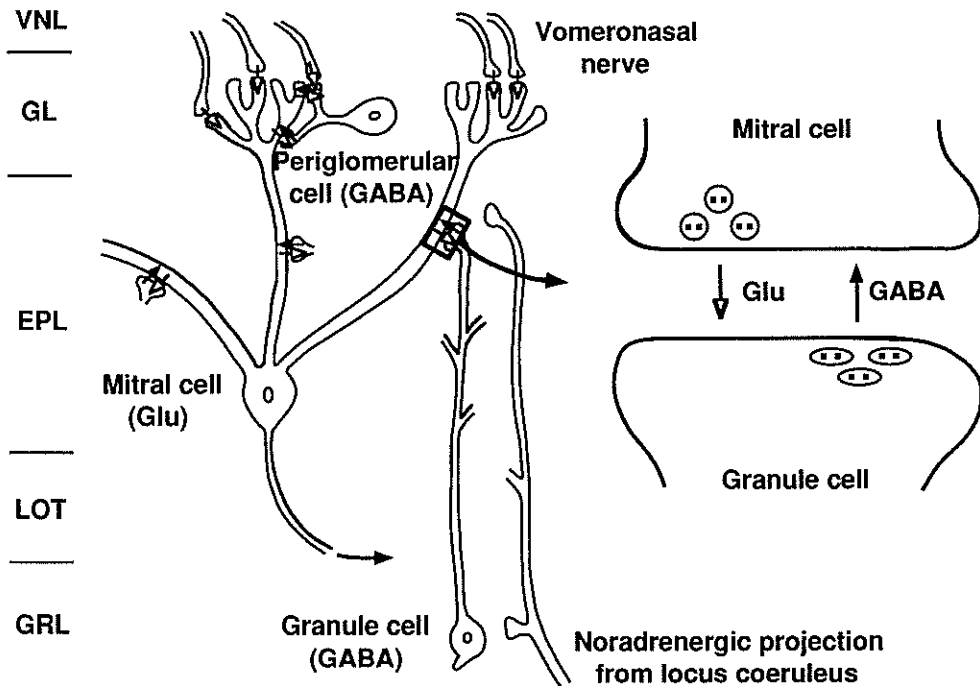


図1 副嗅球内神経回路網

矢印はシナプス伝達方向を示す。Glu: グルタミン酸、VNL: 鋤鼻神経層、GL: 糸球体層、EPL: 外叢状層、LOT: 外側嗅索、GRL: 顆粒細胞層。

## 3. 研究成果

### 3.1 フェロモン記憶形成における NO の役割[4,5]

NO 発生剤、あるいは NO 合成の基質である L-アルギニンを副嗅球へ注入すると、交尾刺激なしで、嗅がせたフェロモンに選択的な記憶が形成された。この NO 発生剤による記憶形成は、 $\alpha$ -ブロッカーであるフェントラミンで阻止された。また、交尾前に副嗅球のノルアドレナリン線維終末

を 6-ヒドロキシドーパミンで破壊しておくと、もはや NO 発生剤の記憶形成作用は認められなくなった。さらに、L-アルギニンによる記憶形成は、細胞内に取り込まれないヘモグロビン (NO スカベンジャー) によって阻止された。以上のことから、フェロモン受容により興奮した顆粒細胞で合成された NO が細胞外に出て、ノルアドレナリン線維終末に作用してノルアドレナリンの放出

を促進し、引いては記憶形成へと導くと考えられる。

### 3.2 mGluR2 欠損マウスのフェロモン記憶障害

mGluR2 遺伝子の変異を Balb/c に 6 世代乗せ換えたマウスの記憶障害が示唆された。

### 3.3 フェロモン記憶の形態学的相関[11]

鋤鼻神経は副嗅球の糸球体層で僧帽細胞の主樹状突起先端部と興奮性シナプス（伝達物質はグルタミン酸）を形成する（「糸球体シナプス」と呼ぶ）。僧帽細胞は外叢状層で顆粒細胞との間に樹状突起同士の間で双方向性シナプスを形成している（「相反性シナプス」と呼ぶ）。僧帽細胞から顆粒細胞へ向かうシナプスは興奮性（伝達物質はグルタミン酸）であり、シナプス前後膜肥厚に関して、後膜が優勢で非対称性シナプスを形成している。

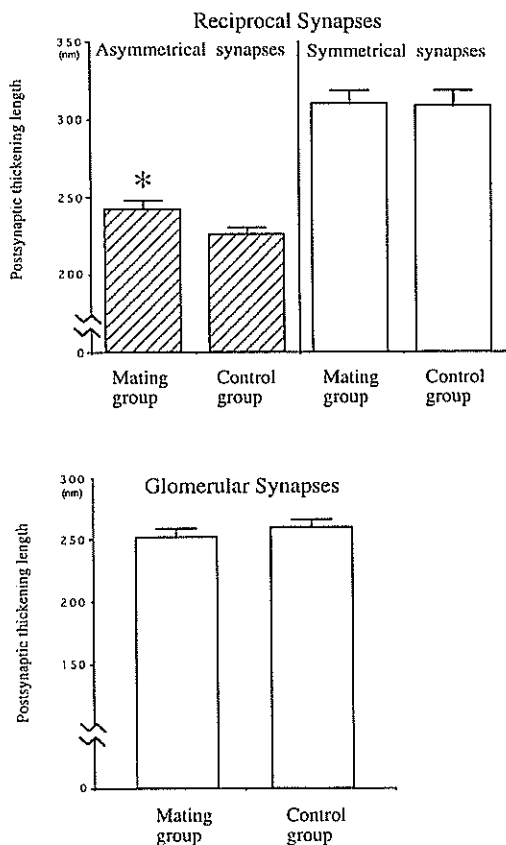


図2 フェロモンの記憶形成に伴う副嗅球内シナプスの形態変化

顆粒細胞から僧帽細胞へ向かうシナプスは抑制性（伝達物質は GABA）であり、シナプス前および後膜肥厚は同程度で対称性シナプスを形成している。糸球体シナプスおよび相反性シナプスの後膜肥厚のサイズを計測した。僧帽細胞から顆粒細胞へ向かうシナプスの後膜肥厚のサイズがフェロモンの記憶形成（mating group）に伴って選択的に大きくなっていった。

### 3.4 mGluR2 欠損マウスの副嗅球内情報処理

鋤鼻器を電気刺激すると、副嗅球の外叢状層において大きな陰性フィールド電位が記録される。同じ強度のペアパルスで刺激すると、初発に比較して 2 発目の刺激に対する反応は小さくなる。この現象はペアパルス抑圧（paired-pulse depression）と称し、副嗅球内情報処理機構の主軸をなすものとして重要視されている。野生型マウスに比較して mGluR2 欠損マウスのペアパルス抑圧率が有意に小さく、mGluR2 がペアパルス抑圧機構に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

方法論に関して、一次元電流源密度解析法が副嗅球に適用できることも示した[6]。

### 3.5 フェロモン記憶におけるグリア細胞の役割

脳内情報処理におけるグリア細胞の役割が注目されている。GABA—グルタミン—グルタミン酸サイクルは、グルタミン酸と GABA の神経伝達に重要であり、アストロサイトに依存している。そこで、フェロモンの記憶に副嗅球のグリア細胞が関わるか否かを検討した。副嗅球の glial fibrillary acidic protein の発現が記憶成立の条件下で増加した。グルタミン合成酵素阻害薬である L-methionine sulfoximine、グリア細胞の活動を抑制する fluorocitrate の副嗅球内注入はいずれも記憶障害をもたらした。本結果は、フェロモンの記憶形成に副嗅球のグリア細胞が関わることを示唆している。

### 3.6 副嗅球内情報処理に対する臆刺激の作用

上述したペアパルス抑圧は、副嗅球僧帽細胞の投射部位である扁桃体を刺激しても誘起される。雌マウスの臆内に挿入したバルーンカテーテルにより臆刺激を与えると、ペアパルス抑圧率は臆刺激開始 2 分後には臆刺激開始前に比べて減少した。これらの結果は、臆刺激が副嗅球僧帽細胞の脱抑制をもたらすことを示唆している。

以上の成果を含めて、最近の研究の進展についてまとめた[7-10,12,14-17]。

#### 4. 今後の課題と発展

mGluR2 が副嗅球のベアパルス抑圧に関わることが判明したが、その詳細なメカニズムは不明である。副嗅球のスライス、初代培養系を用いてその詳細なメカニズムを解析する必要がある。

フェロモンの記憶に副嗅球のグリア細胞が関わることが判明したが、これをさらに検証する目的で、グリア細胞のグルタミン酸トランスポーターと記憶形成との相関を検討している。また、glial fibrillary acidic protein を欠損したマウスを用いた解析も有効と思われる。

副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスがフェロモン記憶の座であることを行動薬理学的および形態学的に示してきたが、まだ電気生理学的相関が捉えられていない。これを捉えるべく副嗅球のスライス標本、初代培養系および *in vivo* における電気生理学的研究を行っている。

鋤鼻器の嗅細胞が生涯死滅、消失し、新しい細胞に入れ替わっていることはよく知られている。また、顆粒細胞も交替している。長期記憶が嗅細胞や顆粒細胞の交替に直面してどのように保持されるのであろうか。研究代表者らは、鋤鼻器嗅細胞の神経発生が記憶の持続時間を修飾する重要な因子であることを提唱しているが、この興味深い問題が未解決のまま残っている。

1995年、鋤鼻器に発現している2種類(I型とII型)のフェロモン受容体が発見され、それぞれ約100種類ある。I型を有する嗅細胞はGi2を発現し、鋤鼻粘膜の表層部に存在し、副嗅球の前部へ投射している。一方、II型を有する嗅細胞はGoを発現し、鋤鼻粘膜の基底部に存在し、副嗅球の後部に投射している。最近、マウスの尿中フェロモンの正体はmajor urinary protein (MUP)と揮発性物質の複合体であることも判明した。これらの知見がどのように機能と関連しているのかについては全く不明である。パッチクランプ法、Ca<sup>2+</sup>イメージング法、共焦点レーザー顕微鏡を駆使して、この問題の解明も目指したい。

研究代表者らは、匂い学習記憶の形成・維持・消去の分子カスケード機構の解明を目指している。この目的達成の手段として、行動、生体・脳スライス・培養系を用いた電気生理、神経化学、形態学、遺伝子工学などの手法を駆使して、正常マウスおよびジーンターゲットマウスを解析して行きたいと考えている。

#### 参考論文

- [1] Brennan, P., Kaba, H. & Keverne, E. B.: Olfactory recognition: a simple memory system. *Science* **250**, 1223-1226, 1990
- [2] Kaba, H., Hayashi, Y., Higuchi, T. & Nakanishi, S.: Induction of an olfactory memory by the activation of a metabotropic glutamate receptor. *Science* **265**, 262-264, 1994
- [3] Kaba, H. & Nakanishi, S.: Synaptic mechanisms of olfactory recognition memory. *Rev. Neurosci.* **6**, 125-141, 1995

#### 発表論文リスト

- [4] Okere, C. O., Kaba, H. & Higuchi, T.: Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. *Neuroscience* **71**, 349-354, 1996
- [5] Okere, C. O., Kaba, H., Takahashi, S. & Higuchi, T.: Intrabulbar infusions of (±)S-nitroso-N-acetylpenicillamine and L-arginine induce functional plasticity in the accessory olfactory bulb of female mice. *Neurosci. Lett.* **217**, 197-199, 1996
- [6] Kaba, H. & Kawasaki, Y.: A one-dimensional current source-density analysis is applicable to the mouse accessory olfactory bulb. *J. Vet. Med. Sci.* **58**, 485-488, 1996
- [7] 梶 秀人: グルタミン酸受容体と嗅覚情報処理. 日本味と匂学会誌 **3**, 77-82, 1996
- [8] 梶 秀人: 鋤鼻嗅覚神経系における匂いの記憶. 蛋白質核酸酵素 **41**, 2077-2083, 1996
- [9] 梶 秀人: 嗅覚の記憶とグルタミン酸受容体. 神経進歩 **40**, 911-918, 1996
- [10] Kaba, H.: Synaptic mechanism of an olfactory memory in mice. In: *Neural Control of Reproduction: Physiology and Behavior*, Maeda, K., Tsukamura, H. & Yokoyama, A. (eds), Japan Scientific Societies Press & Karger, pp. 165-174, 1997
- [11] Matsuoka, M., Kaba, H., Mori, Y. & Ichikawa, M.: Synaptic plasticity in olfactory memory formation in female mice. *NeuroReport* **8**, 2501-2504, 1997
- [12] 梶 秀人: 匂いの記憶・学習. 細胞工学 **17**, 1284-1294, 1998
- [13] Usui, M., Kawasaki, Y. & Kaba, H.: Neurosteroid modulation of dendrodendritic inhibition in the mouse olfactory bulb. *Neurosci. Lett.* **263**, 185-188, 1999
- [14] 梶 秀人: 匂いの絆: その刷り込みのメカニズム. 「脳を知る」久野 宗編, 秀潤社, 90-102頁, 1999
- [15] 梶 秀人: フェロモンの記憶. 特集「脳とフェロモン」*Brain Medical* **11**, 156-162, 1999
- [16] 梶 秀人: 哺乳動物のフェロモン、神経研究の進歩、印刷中
- [17] 梶 秀人: 脳と性衝動、医学のあゆみ 別冊「神経・精神疾患 state of arts」印刷中