

東京都神経科学総合研究所 主任研究員

市川 眞澄

「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. 研究実施概要

個体発生の過程で形成されたシナプスは、その後、外界の影響を受けて変化を起こす。これが、シナプスの可塑性と言われる現象で、記憶学習の基となっている。一方、フェロモンはケミカルコミュニケーションとして動物の社会生活重要な因子であり、鋤鼻神経系が受容および情報処理に関わっている。これまでのシナプス可塑性の研究の多くは、高頻度電気刺激や外科的手術による可塑的变化を調べる方法がほとんどで、自然刺激による研究が少なかった。本プロジェクトは、自然の刺激によるシナプスの可塑性を解析する目的で、フェロモン刺激が鋤鼻系シナプスの構造及び機能におよぼす影響について解析することを目的とした。

フェロモンのセンサーである鋤鼻器からの鋤鼻神経は副嗅球内の糸球体で僧帽/房飾 (MT) 細胞と興奮性シナプスを形成する。副嗅球はフェロモンの記憶を司る部位とされている。また MT 細胞と顆粒細胞は樹状突起間で相反シナプスを形成する。相反シナプスとは、MT 細胞から顆粒細胞の方向性を有するグルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスと顆粒細胞から MT 細胞への方向性を有する GABA を伝達物質とする抑制性シナプスが並立して存在するシナプスである。糸球体で MT 細胞の樹状突起に興奮が生じた際に、その興奮は相反シナプスのうち興奮性シナプスを介して顆粒細胞に伝えられる。顆粒細胞の興奮は相反シナプスの抑制性シナプスを介して即座に MT 細胞を抑制する事が明らかにされ、情報処理において、重要なシナプスであると考えられている。そこで、雌マウスの記憶にはこの相反シナプスの機構が重要であるとの仮説にもとづき、フェロモンの記憶との関わりを解析する事にした。また、鋤鼻系でシナプスの可塑性を調べる上で、刺激源であるフェロモンについての解析も必須である。そこで、フェロモンおよびフェロモンレセプターに関する研究を平行して行なった。

この結果、交尾刺激は MT 細胞を一過性に興奮させること、またテタヌス性電気刺激により MT 細胞に長期増強が引き起こされることが、生理学的研究により明らかにされた。また、交尾後、相反シナプスのうち興奮性シナプスに形態変化がおきることが電子顕微鏡の解析により明らかになり、この変化は交尾後 5 日まで維持される。一方、相反シナプスのうち抑制性シナプスは交尾後 5 日—20 日にわたって可塑的变化を示した。この相反シナプスの形態変化により MT 細胞は、抑制を受けやすくなると推測される。このように、まず、興奮性シナプスに変化し、引き続いて抑制性シナプスに変化するという一連の変化により、フェロモンの長期記憶が維持されていると思われる。交尾刺激は、脳幹の青斑核から副嗅球に投射するノルアドレナリン線維により伝えられる。副嗅球スライスを用いた生理学的解析により MT 細胞の脱抑制にノルアドレナリンが関わっていること、またノルアドレナリン受容体の局在に関する免疫細胞化学および *In situ* ハイブリダイゼーションなど形態学的研究の結果から、ノルアドレナリンは MT 細胞に作用している可能性が示唆された。おそらく、抑制シナプスの GABA 受容体に働いて、この機能を抑制しているのであろう。これらの結果を総合すると、雌マウスは、交尾時にフェロモン刺激と交尾刺激を同

時に受けることにより、副嗅球の MT 細胞は、脱抑制による一過性の興奮をうける、この一過性の興奮により相反シナプスが形態変化を引き起こし、長期記憶の形成に導いているものとおもわれる。フェロモンの情報処理を担う鋤鼻系の研究については、情報処理に関わる分子群は海馬などと共通のものが多く、フェロモンの記憶などの際と海馬などでの記憶・学習などとは多くの点で共通の分子メカニズムを利用していると考えられる。従って、鋤鼻系は記憶・学習といった、神経科学の一つのターゲットに対する良いモデル系として捉えることが可能である。本研究で得られた結果は、鋤鼻系での情報処理機構や記憶成立機構の詳細を明らかにする上で重要な役割を果たすと期待でき、またフェロモン情報処理の特殊性の興味だけでなく、一般の記憶・学習現象への外挿という側面からも今後発展することが期待される。

この研究を実施するにあたり、(I)フェロモン記憶にかかわる可塑性シナプスの形態学的解析グループ（研究代表者：市川眞澄、東京都神経科学総合研究所）、(II)フェロモン記憶の分子生物学および生理学的解析グループ（研究分担者：梶秀人、高知医科大学第一生理学教室）、(III)フェロモンの記憶学習の行動学的解析グループ（研究分担者：森裕司、東大大学院農学部生命科学研究科獣医動物行動学教室）、(IV)フェロモン物質およびフェロモンレセプターの解明グループ（研究分担者：長田俊哉、東工大大学院生命理工学研究科分子生命科学教室）の4つのグループで研究を開始した。平成11年度から(V)鋤鼻系シナプスの電気生理学的解析グループ（研究分担者：佐原資謹、東京医科歯科大学大学院医歯総合研究所顎顔面生理学教室（現、国立神経センター・神経研究所）、平成12年度から(VI)シナプスおよびフェロモンレセプターの分子生物学的研究グループ（研究分担者：山岸公子、東京都臨床医学総合研究所）が加わり、(I)のグループに属していた松岡勝人が新潟大学に移動したことにとともに、新たに平成13年度に、(VII)鋤鼻系シナプスの解剖学的研究グループ（研究分担者：松岡勝人、新潟大学大学院医歯学総合研究所）を組織し、同時に、(IV)フェロモン物質およびフェロモンレセプターの解明グループを終了した。各グループはそれぞれのテーマで研究をおこなうとともに、グループ間での共同研究を積極的におこなった。各グループの研究概要は以下の通りである。

(I) フェロモン記憶にかかわる可塑性シナプスの形態学的解析（市川）グループ：フェロモン記憶に関わるシナプスメカニズムを明らかにする目的で、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の可塑性に注目して形態学的手法を主にもちいて研究をおこない、以下の内容を明らかにした。(1) 交尾時にフェロモン刺激と交尾刺激を同時に受けることにより、僧帽房飾 (MT) 細胞は、から顆粒細胞への興奮性シナプスの後膜肥厚が変化する。この相反シナプスの形態変化により MT 細胞は、抑制を受けやすくなると推測される。(2) 交尾刺激がノルアドレナリン (NA) 線維により副嗅球に作用する機構を明らかにするため、NA 終末および NA 受容体の局在を調べ、NA は主に MT 細胞に作用している可能性を指摘した。(3) シナプスの可塑的变化をリアルタイムで解析するため、鋤

鼻ニューロンと副嗅球ニューロンの共培養系を確立して解析をおこなった。

(II) フェロモン記憶の分子生物学および生理学的解析（椛）グループ：交尾を契機として雌マウスに形成される雄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、記憶学習研究の優れたモデルとして有用である。なぜなら、フェロモン情報処理系（鋤鼻系）の最初の中継部位である副嗅球に生じるシナプスの可塑的变化と学習が直接に対応しているからである。交尾刺激により賦活されたノルアドレナリン神経の働きを引き金として、種々の情報分子が関わり、僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスに可塑的变化が生じることを明らかにした。また、副嗅球のグリア細胞がフェロモンの記憶形成に重要な役割を果たしていることも明らかにした。フェロモン記憶の特徴を理解するための比較研究モデルとして重要視される、主嗅球の働きで成立する匂いの嫌悪学習に CREB の発現とそのリン酸化が関わることを明らかにするとともに、CREB のリン酸化へと導くキナーゼ（CaMKII、MAPK、PI-3 Kinase、PKA）を同定した。

(III) フェロモンの記憶学習の行動学的解析（森）グループ：本研究の主たる目標は、これまでに成功例のなかった哺乳類におけるプライマーフェロモン分子の単離精製であった。研究モデルには、フェロモンによる明瞭な性腺刺激作用が証明されている反芻動物の“雄効果”現象を取り上げた。性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）ニューロンの神経内分泌活動をシバヤギの視床下部より覚醒下でリアルタイムにモニターする独自の生物検定系を開発して、フェロモン活性成分の絞り込みを行った。その結果、強力なフェロモン効果を持つ雄ヤギの被毛や皮膚といった生物材料から活性分画を抽出することができ、構造決定と合成を繰り返すことで、候補物質を数種類の化合物にまで絞り込むことに成功した。同時に、このプライマーフェロモンの合成・分泌調節機構やフェロモン受容機構についても知見を得た。また、こうした研究成果を基盤に、情動系や行動表出系に及ぼす嗅覚系・鋤鼻系の役割を解明するための齧歯類での神経行動学的研究モデルを開発し、警報フェロモンの存在を明らかにした。

(IV) フェロモン物質およびフェロモンレセプターの解明（平成 12 年度で終了）（長田）グループ：フェロモン受容の研究へのアプローチとして、フェロモン受容神経細胞の培養系開発が一つの有効な手段と考えられる。すぐれた培養系が開発できれば、そこにフェロモンやいろいろな試薬を加えたときのフェロモン受容神経細胞の変化を容易に観察でき、フェロモンとフェロモンレセプターによる情報伝達系の研究が可能になる。ラットの鋤鼻器より細胞を調製し、培養系でも鋤鼻神経細胞の変成再生を再現できる系を開発することが出来た。また、副嗅球培養系との共培養系を確立した。

(V) 鋤鼻系シナプスの電気生理学的解析（平成 11 年度より参加）（佐原）グループ：副嗅球における情報処理機構の解明とシナプスの可塑性の関与を明らかにするために、i) 副嗅球の僧帽・房飾細胞の形態と鋤鼻受容器からの入力の解析、ii) 副嗅球僧帽・房飾細胞と顆粒細胞の樹状突起間の相反シナプスでのシナプス電位の統合機構の解析、iii) 僧房・房飾細胞の 1 次樹状突起におけるシナプス伝達の修飾機構の解析、iv) シナプスの可塑性に関与する因子の解析を、副嗅球スライス標本を用いて、生理学と形態学的手法により行なった。

(VI) シナプスおよびフェロモンレセプターの分子生物学的研究（平成 12 年度より参加）（山岸）グループ：齧歯類の鋤鼻器特異的に 2 群の受容体遺伝子群が発現している。これらはフェロモン受容体と考えられているが、実際どのような分子を認識しているかは不明である。そこでこれら受容体のリガンドを検索する系を構築した。すなわち、アデノウイルスベクターに単離した受容体遺伝子を組み込み、鋤鼻神経細胞に効率よく感染させ、感染細胞内で受容体を発現させた。その細胞にフェロモンを含む分画を投与したところ、カルシウムイメージング法によって、雄尿特異的に反応する受容体感染細胞の反応を、検出することに成功した。次に、様々な脊椎動物における鋤鼻受容体遺伝子群のクローニングと発現解析を行った。その結果、両生類では 2 型受容体群が、偶蹄類では 1 型受容体が鋤鼻器の情報認識に関わっていることが示唆された。このことは、鋤鼻器における 2 群の鋤鼻受容体群の発現様式が、種によって異なり、それぞれの動物種で認識されるフェロモン分子群のタイプ、及び鋤鼻細胞内の情報認識機構もそれぞれの種毎に異なる可能性を示す

(VII) 鋤鼻系シナプスの解剖学的研究グループ（平成 13 年度より参加）（松岡）グループ：動物がどのように外界からの刺激を受け止め、それを記憶するのかは興味深い問題である。近年、記憶機構の解明は大きなターニングポイントを迎えつつある、というのは刺激に依存したシナプスの形態や伝達レベルの変化が記憶の本質である可能性が広く認められるようになった。われわれも雌マウスに交尾時に生じるフェロモン記憶形成をモデルとして研究をおこない。その結果、長期記憶が異なった種類のシナプスの連続的な形態変化によって維持されている可能性を示した。また動物の感覚器を経由した自然な刺激に反応してその活性の上昇したシナプスを標識する新しいマーカーを発見した。これらの解析は今後の記憶機構の研究に有効な情報をもたらすと考えられる。

## 2. 研究構想

脳は堅く固定された回路ではなく、より柔軟性を持ち、その内外の影響を受けて形態に変化を生じることが知られている。このいわゆる脳の可塑性は脳の高次機能である記憶学習の構造的基礎と考えられているが、これまでにその確たる証拠は示されていない。雌マウスは交尾妊娠後、交尾相手と異なる系統の雄の匂いを暴露されると妊娠阻止（いわゆる

着床阻害)が生ずる(ブルース効果とよばれる)。これは、雌が交尾相手のフェロモンを記憶し、記憶したフェロモンと異なるフェロモンに曝露されることによって起きる。このブルース効果は交尾妊娠後30-50日間保持され、その後消去される。このように雌マウスには高度なフェロモン認識機能と記憶機構、さらに消去機構が存在している。さらに、フェロモン記憶の部位が副嗅球という鋤鼻系の第1次中枢にあることが明らかにされている。したがって、鋤鼻系とくに副嗅球において、記憶のメカニズムを研究する事を計画した。

フェロモンのセンサーである鋤鼻器からの鋤鼻神経は副嗅球内の糸球体で僧帽/房飾(MT)細胞と興奮性シナプスを形成する。副嗅球はフェロモンの記憶を司る部位とされている。またMT細胞と顆粒細胞は樹状突起間で相反シナプスを形成する。相反シナプスとは、MT細胞から顆粒細胞の方向性を有するグルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスと顆粒細胞からMT細胞への方向性を有するGABAを伝達物質とする抑制性シナプスが並立して存在するシナプスである。糸球体でMT細胞の樹状突起に興奮が生じた際に、その興奮は相反シナプスのうち興奮性シナプスを介して顆粒細胞に伝えられる。顆粒細胞の興奮は相反シナプスの抑制性シナプスを介して即座にMT細胞を抑制する事が明らかにされて、情報処理において、重要なシナプスであると考えられている。そこで、雌マウスの記憶にはこの相反シナプスの機構が重要であるとの仮説にもとづき、フェロモン記憶との関わりを解析する事にした。

総合的に、形態学、生理学、分子生物学、行動学等異なった研究手法により副嗅球に関して研究をおこなうため、形態学および解剖学的解析のため市川眞澄(東京都神経科学総合研究所)グループを、分子生理学的解析のため、椛秀人(高知医科大学第一生理学教室)グループを、行動学的解析のため森裕司(東大大学院農学部生命科学研究科獣医動物行動学教室)グループを、分子生物学的解析のため長田俊哉(東工大大学院生命理工学研究科分子生命科学教室)グループの4つのグループを組織して研究を開始した。途中から、平成11年度から、副嗅球ニューロンの基本的な生理学的特性を明らかにする必要から、電気生理学的解析グループとして、佐原資謹(東京医科歯科大学大学院医歯総合研究所顎顔面生理学教室(現、国立神経センター・神経研究所))を組織に加え、また、鋤鼻系でシナプスの可塑性を調べる上で、刺激源であるフェロモンについての解析も必須であることから、開始時から市川グループにはいって共同研究をおこなっていた山岸公子(東京都臨床医学総合研究所)を、フェロモンレセプター研究グループとして組織した。また、市川グループから松岡勝人が新潟大学に移動したことにもない、平成13年度に解剖学的解析グループとして松岡勝人(新潟大学大学院医歯学総合研究所)グループを組織し相反シナプスの長期形態変化を解析した。同時に長田グループを終了し、市川グループで培養の研究を継続した。

椛グループにより、交尾刺激はMT細胞を一過性の興奮を引き起こすこと、またテタヌス性電気刺激によりMT細胞に長期増強が引き起こされることが、生理学的研究により明らかにされた。また、市川グループにより、交尾後、相反シナプスのうち興奮性シナプス

に形態変化がおきることが電子顕微鏡の解析により明らかになった。さらに、松岡グループとの共同研究により、この変化は交尾後5日まで維持され、一方、相反シナプスのうち抑制性シナプスは交尾後5日-20日にわたって可塑的变化を示す事が明らかになった。このように、まず、興奮性シナプスが変化し、引き続いて抑制性シナプスが変化するという一連の変化により、MT細胞は、長期間にわたり抑制を受けやすくなっていると推測される。このように興奮性シナプスと抑制性シナプスの協調による長期抑制機構により、フェロモンの長期記憶が維持されていると思われる。交尾刺激は、脳幹の青斑核から副嗅球に投射するノルアドレナリン線維により伝えられる。梶グループの、副嗅球スライスを用いた生理学的解析によりMT細胞の脱抑制にノルアドレナリンが関わっていること、また市川グループによる、ノルアドレナリン受容体局在に関する免疫細胞化学およびIn situ ハイブリダイゼーションなど形態学的研究の結果から、ノルアドレナリンはMT細胞に作用している可能性が示唆された。おそらく、MT細胞に存在する抑制シナプスのGABA受容体に働いて、この機能を抑制しているのであろう。

これらの結果を総合すると、雌マウスは、交尾時にフェロモン刺激と交尾刺激によるノルアドレナリンの作用を同時に受けることにより、副嗅球のMT細胞は、脱抑制による一過性の興奮をうける、この一過性の興奮により相反シナプスが長期間にわたり形態変化を引き起こし、長期記憶の形成に導いているものとおもわれる。

副嗅球スライスを用いてMT細胞の特性および相反シナプスの機能を電気生理学的に解析した結果、副嗅球のMT細胞では、できるだけ幅広い糸球体から複数の入力と同時に樹状突起において統合され、Caスパイクにより増幅され、さらに、細胞体での最終的な情報処理を経てNaスパイクにより出力するという情報処理の流れが示唆された。得られた僧帽・房飾細胞ならびに顆粒細胞の形態の情報、膜特性およびシナプス応答の情報をもとに、主嗅球と副嗅球の神経回路モデルを構築すること、そして、匂いの情報処理では、多数の匂い物質の中から1つを嗅ぎ分けているが、フェロモンの情報処理は、少数のフェロモン物質を少量で嗅ぎ分けているという差異を、そのシステムとしての作動から予測しうるか否か検証することが、嗅球での情報処理機構の解明する上で、1つの課題とされる。

一方、生体での研究の困難さを克服するため、培養系による研究をおこなうため、長田、市川両グループは共培養系による神経回路の再構築をこころみた、この結果、リアルタイムで観察し、形態変化とくにシナプス変化の解析を可能にし、さらに、改良を進めている。

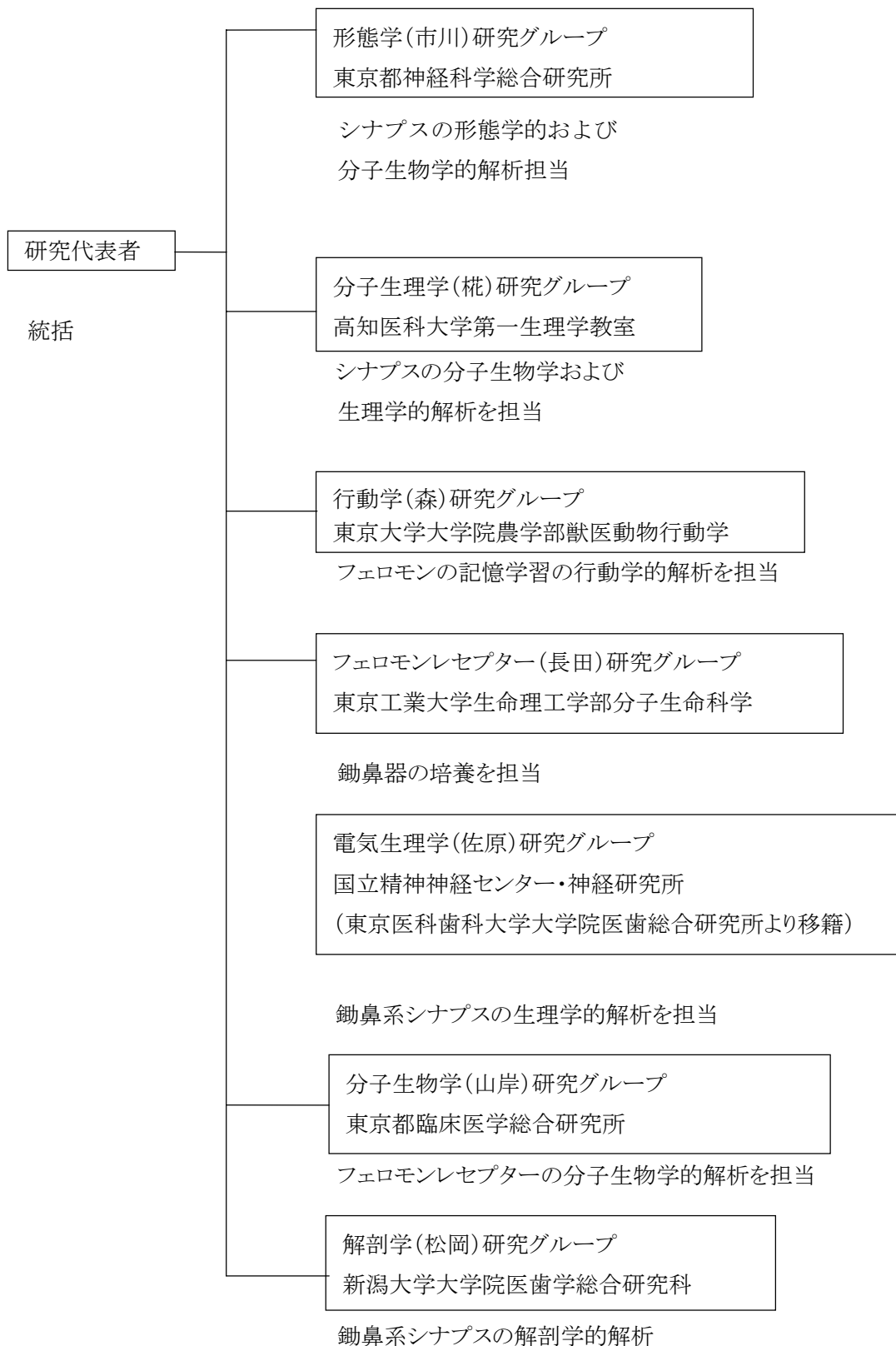
また、齧歯類の鋤鼻器の鋤鼻ニューロンには特異的に2群の受容体遺伝子群が発現しているが、実際どのようなフェロモン分子を認識しているかは不明である。そこで、山岸グループはこれら受容体のフェロモンを検索する系を構築する目的で、遺伝子工学的に、鋤鼻神経細胞に受容体を発現させ、その細胞にフェロモンを含む分画を投与したところ、カルシウムイメージング法によって、雄尿特異的に反応する受容体感染細胞の反応を検出することに成功した。この方法により、フェロモンの同定が可能となった。しかし、鋤鼻ニューロンの寿命が短いため、研究の効率が悪い。現在、増殖可能な細胞における受容体の

発現系の開発をおこなっている。マウスのフェロモンの同定できると、生体および培養系での刺激源として用いることにより、シナプス可塑性の研究が大いに進むことが期待される。一方、森グループは、これまでに成功例のなかった大型哺乳類におけるプライマーフェロモン分子の単離精製を目指した。その結果、強力なフェロモン効果を持つ雄ヤギの被毛や皮膚といった生物材料から活性分画を抽出することができ、構造決定と合成を繰り返すことで、候補物質を数種類の化合物にまで絞り込むことに成功した。同時に、このプライマーフェロモンの合成・分泌調節機構やフェロモン受容機構についても知見を得た。また、こうした研究成果を基盤に、情動系や行動表出系に及ぼす嗅覚系・鋤鼻系の役割を解明するための齧歯類での神経行動学的研究モデルを開発し、警報フェロモンの存在を明らかにした。これら、家畜など大型動物フェロモンの分離同定は、獣医・畜産の分野で注目されつつある。



### 3. 研究実施体制

#### (1) 体制



#### 4. 研究期間中の主な活動

##### (1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成10年6月22日 -23日	鋤鼻研究会	茨城県西茨城郡 岩間町 東大農学部附属 牧場	30人	国内の鋤鼻系に関する研究をおこなっている主な人を集め、研究発表と意見交換をおこなった。
平成11年6月25日 -26日	鋤鼻研究会	石川県羽咋郡志 賀町 日本勤労福祉セ ンター	30人	国内の鋤鼻系に関する研究をおこなっている主な人を集め、研究発表と意見交換をおこなった。
平成12年6月23日	チーム研究打ち 合わせ	東京都多摩市 パルテノン多摩	22人	チーム内各グループの研究発表と今後の研究のう ちあわせ
平成12年12月7日	シンポジウム(国 際鋤鼻研究会) A Neurobiological Approach for Vome-ronasal System	早稲田大学国際 会議場	105人	国内の鋤鼻系に関わる研 究者が国際交流を図る目 的で、CREST研究チ ームの研究者を中心に、海外 からの研究者も加え研究 発表した。
平成13年4月10日	相反シナプス研 究会	東京都神経科学 総合研究所	17人	研究チームのうち、相反 シナプスの研究に関わる 研究者が研究発表した。

#### 5. 主な研究成果

##### (I) 市川グループ

##### (1) 論文発表

1. Matsuoka M, Kaba H, Mori Y, Ichikawa M, Synaptic plasticity in olfactory formation in female mice. *NeuroReport*, 8, 2501-2504 (1997)
2. Matsuoka M, Mori Y, Ichikawa M, Morphological changes of synapses induced by urinary stimulation in the hamster accessory olfactory bulb. *Synapse*, 28, 160-166 (1998)
3. Ichikawa M, Osada T, Costanzo RM, Replacement of receptor cells in the hamster vomeronasal epithelium after nerve transection. *Chemical Senses*, 23, 171-179 (1998)
4. Osada T, Arakawa H, Ichikawa M, Ikai M, Atomic force microscopy of histological sections using a new electron beam etching method. *J.Microscopy*, 189, 43-49 (1998)
5. Yoshida-Matsuoka J, Osada T, Mori Y, Ichikawa M, A developmental study using three antibodies (VOBM1, VOBM2, and VOM2): Immunocytochemical and electron microscopical analysis of the luminal surface of the vomeronasal sensory epithelium. *Anatomy Embryol*, 199, 215-224 (1999)
6. Ichikawa M, Axonal growth of newly formed vomeronasal receptor neurons after nerve

- transection. *Anatomy Embryol*, 200, 413-417 (1999)
7. Ichikawa M, Shin T, Kang MS, Fine structure of the vomeronasal sensory epithelium of Korean goats (*Capra hircus*). *J.Reprod Dev.*, 45, 81-89 (1999)
  8. 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)
  9. 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 preammillary nucleus (Pmv) of the male mouse. *Physiology and Behaviour*, 68, 257-261 (1999)
  10. 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)
  11. Hagino-Yamagishi H, Minamikawa-Tachino R, Ichikawa M, Yazaki K, Expression of Brain-2 in the developing olfactory bulb. *Dev.Brain Res.*, 113, 133-137 (1999)
  12. Osada T, Takezawa S, Itoh A, Arakawa H, Ichikawa M, Ikai A, The distribution of sugar chains on the vomeronasal epithelium observed with the atomic force microscope. *Chemical Senses*, 24, 1-6 (1999)
  13. Osada T, Ikai A, Costanzo RM, Matsuoka M, Ichikawa M, Continual neurogenesis of vomeronasal neurons *in vitro*. *J Neurobiol.*, 40, 226-233 (1999)
  14. Takigami S, Mori Y, Ichikawa M, Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. *Chem. Senses*, 25, 387-393 (2000)
  15. Matsuoka M, Yoshida-Matsuoka J, Costanzo RM, Ichikawa M, Surface changes in the rat vomeronasal epithelium during degeneration and regeneration of receptor cells. *Anatomy and Embryology*, 201, 467-473 (2000)
  16. Hagino-Yamagishi K, Matsuoka M, Ichikawa M, Wakabayashi Y, Mori Y, Yazaki K, The mouse putative pheromone receptor was specifically activated by stimulation with male mouse urine. *J.Biochem.* 129, 509-512 (2001)
  17. Sahara Y, Nakamura T, Ichikawa M, Cellular localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1, 2/3, 5 and 7 in the main and accessory olfactory bulb of the rat. *Neurosci. Lett.* 312, 59-62 (2001)
  18. Yoshida-Matsuoka J, Matsuoka M, Norita M, Ichikawa M, Long-term recovery of the rat vomeronasal system after nerve transection. *Acta Medica et Biologica*, 49, 67-72 (2001).
  19. Matsuoka M, Yamagata K, Sugiura H, Yoshida-Matsuoka J, Norita M, Ichikawa M, Expression and regulation of the immediate-early gene product Arc in the accessory olfactory bulb after mating in male rat. *Neuroscience*, 111, 251-258 (2002)
  20. Wakabayashi Y, Mori Y, Ichikawa M, Yazaki K, Hagino-Yamagishi K, A putative pheromone receptor gene is expressed in two distinct olfactory organs in goats. *Chemical Senses*, 27, 207-213 (2002)
  21. Matsuoka M, Osada T, Yoshida-Matsuoka J, Ikai A, Ichikawa M, Norita M, Costanzo R, A comparative immunocytochemical study of development and regeneration of chemosensory neurons in the rat vomeronasal system. *Brain Res.*, 946, 52-63 (2002)

## (II) 梶グループ

### (1) 論文発表

1. Okutani, F., Kaba, H., Takahashi, S., Seto, K.: The biphasic effects of locus coeruleus noradrenergic activation on dendrodendritic inhibition in the rat olfactory bulb. *Brain Res.*, 783, 272-279 (1998)
2. Usui, M., Kawasaki, Y., Kaba, H.: Neurosteroid modulation of dendrodendritic inhibition in the mouse olfactory bulb. *Neurosci.Lett.*, 263, 185-188 (1999)
3. Takahashi, S., Ujihara, H., Huang, G.-Z., Yagyū, 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)
4. Okutani, F., Yagi, F., Kaba, H.: GABAergic control of olfactory learning in young rats. *Neuroscience*, 93, 1297-1300 (1999)
5. Okere, C. O., Kaba, H.: Region-specific localization of glutamine synthetase immunoreactivity in the mouse olfactory bulb: implication for neuron-glia interaction in bulbar synaptic plasticity. *Brain Res.*, 857, 308-312 (2000)
6. Osako, Y., Otsuka, T., Taniguchi, M., Oka, T., Kaba, H.: Oxytocin depresses spontaneous  $\gamma$ -aminobutyric acid-ergic inhibitory postsynaptic currents in cultured mitral cells of the rat olfactory bulb by a presynaptic mechanism. *Neurosci.Lett.*, 289, 25-28 (2000)
7. Okere, C. O., Kaba, H.: Heterogenous immunohistochemical expression of microglia-specific ionized calcium binding adaptor protein (Iba 1) in the mouse olfactory bulb. *Brain Res.*, 877, 85-90 (2000)
8. Huang, G.-Z., Ujihara, H., Takahashi, S., Kaba, H., Yagi, T., Inoue, S.: Involvement of complexin II in synaptic plasticity in the CA1 region of the hippocampus: the use of complexin lacking mice. *Jpn.J.Pharmacol.*, 84, 179-187 (2000)
9. Zhang, J.-J., Okutani, F., Yagi, F., Inoue, S., Kaba, H.: Facilitatory effect of ritanserin is mediated by dopamine D<sub>1</sub> receptors on olfactory learning in young rats. *Dev.Psychobiol.*, 37, 246-252 (2000)
10. Okere, C. O., Kaba, H.: Increased expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory recognition memory in mice. *Eur.J.Neurosci.*, 12, 4552-4556 (2000)
11. Osako, Y., Otsuka, T., Taniguchi, M., Oka, T., Kaba, H.: Oxytocin enhances presynaptic and postsynaptic glutamatergic transmission between rat olfactory bulb neurones in culture. *Neurosci.Lett.*, 299, 65-68 (2001)
12. Otsuka, T., Ishii, K., Osako, Y., Okutani, F., Taniguchi, M., Oka, T. & Kaba, H.: Modulation of dendrodendritic interactions and mitral cell excitability in the mouse accessory olfactory bulb by vaginocervical stimulation. *Eur.J.Neurosci.*, 13, 1833-1838 (2001)
13. Otsuka, T., Hashida, M., Oka, T., Kaba, H.: Activation of GABA<sub>A</sub> receptors in the accessory olfactory bulb does not prevent the formation of an olfactory memory in mice. *J. Vet. Med.Sci.*, 63, 807-809 (2001)
14. Okere, C. O., Higuchi, T., Kaba, H.: Stimulus-dependence of NO-mediated neuronal activation: a Fos expression study in the hippocampus and cortex of lactating rats. *NeuroReport*, 12, 2859-2864 (2001)
15. Taniguchi, M. & Kaba, H.: Properties of reciprocal synapses in the mouse accessory olfactory

bulb. Neuroscience, 108, 365-370 (2001)

16. Okutani, F., Zhang, J.-J., Yagi, F., Kaba, H.: Non-specific olfactory aversion induced by intrabulbar infusion of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline in young rats. Neuroscience, 112, 901-906 (2002)

(2) 特許出願（国内 1 件）

発明者：高橋聖一、八木 健、梶 秀人

発明の名称：学習・記憶障害モデル動物

出願番号：2000 年特許願第 17539 号

出願日：平成 12 年 1 月 26 日

(3) 新聞報道等

受賞

谷口睦男

第 35 回日本味と匂学会大会高砂研究奨励賞

平成 13 年 10 月 3 日

授賞タイトル「鋤鼻系におけるフェロモンの情報変換・処理機構」

奥谷文乃

第 36 回日本味と匂学会大会高砂研究奨励賞

平成 14 年 10 月 1 日

授賞タイトル「においの学習のシナプス・分子機構に関する研究」

黄 光哲、梶 秀人

第 36 回日本味と匂学会大会キリン研究奨励賞

平成 14 年 10 月 3 日

授賞タイトル「副嗅球におけるシナプス可塑性」

(III) 森グループ

(1) 論文発表

1. Matsuoka, M., Kaba, H., Mori, Y., Ichikawa, M.: Synaptic plasticity in olfactory memory formation in female mice. Neuroreport, 8, 2501-2504 (1997)
2. 森裕司、武内ゆかり：フェロモンと鋤鼻嗅覚神経系。Brain Medical, 9, 143-151 (1997)
3. Matsuoka, M., Mori, Y., Ichikawa, M.: Morphological changes of synapses induced by urinary stimulation in the hamster accessory olfactory bulb. Synapse., 28, 160-166 (1998)
4. 森裕司：ヒトのフェロモンをめぐる最近の話題。遺伝。52, 6-7 (1998)
5. 森裕司、武内ゆかり：脳内 GnRH と性行動。In: 脳と生殖。-GnRH 神経系の進化と適応-。市川真澄。学会出版センター181-200。(1998)

6. 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. Dev.*, 45, 243-248 (1999)
7. 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)
8. Nishihara, M., Takeuchi, Y., Tanaka, T., Mori, Y.: Electrophysiological correlates of pulsatile and surge gonadotropin secretion. *Rev. Reprod.*, 4, 110-116 (1999)
9. Takigami, S., Osada, T., Yoshida-Matsuoka, J., Matsuoka, M., Mori, Y., Ichikawa, M.: The expressed localization of rat putative pheromone receptors. *Neurosci. Lett.*, 272, 115-118 (1999)
10. Yoshida-Matsuoka, J., Osada, T., Mori, Y., Ichikawa, M.: A developmental study using three antibodies (VOBM1, VOBM2, and VOM2): immunocytochemical and electron microscopic analysis of the luminal surface of the rat vomeronasal sensory epithelium. *Anat. Embryol.*, 199, 215-224 (1999)
11. 菊水健史、岩田恵理、武内ゆかり、森裕司：シバヤギ雄性フェロモンの神経行動学的解析。日本味と匂いの学会誌。6, 23-32 (1999)
12. 菊水健史、武内ゆかり、森裕司：哺乳類のフェロモン行動。Brain Medical, 11, 30-39 (1999)
13. 森裕司：哺乳類の生殖生物学（分担執筆）学窓社(1999)
14. Iwata, E., Wakabayashi, Y., Kakuma, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y.: Testosterone-dependent primer pheromone production in the sebaceous gland of male goat. *Biol.Reprod.*, 62, 806-810 (2000)
15. Takigami, S., Mori, Y., Ichikawa, M.: Projection pattern of vomeronasal neurons to the accessory olfactory bulb in goats. *Chem.Senses*, 25, 387-393 (2000)
16. Wakabayashi, Y., Iwata, E., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y.: Regional differences of pheromone production in the sebaceous glands of castrated goats treated with testosterone. *J. Vet. Med. Sci.*, 62, 1067-1072 (2000)
17. 森裕司：匂いとフェロモン。日本生殖内分泌学会 NEWSLETTER. 12-14 (2000)
18. Hagino-Yamagishi, K., Matsuoka, M., Ichikawa, M., Wakabayashi, Y., Mori, Y., Yazaki, K.: The mouse putative pheromone receptor was specifically activated by stimulation with male mouse urine. *J. Biochem.*, 129, 509-512 (2001)
19. Ichimaru, T., Mori, Y., Okamura, H.: A possible role of Neuropeptide Y as a mediator of undernutrition to the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator in goats. *Endocrinology*, 142, 2489-2498 (2001)
20. Iwata, E., Wakabayashi, Y., Matsuse, S., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y.: Induction of primer pheromone production by dihydrotestosterone in the male goat. *J. Vet. Med. Sci.*, 63, 347-348 (2001)
21. Kikusui, T., Takigami, S., Takeuchi, Y., Mori, Y.: Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats. *Physiol. Behav.*, 72, 45-50 (2001)
22. 森裕司、哺乳類におけるプライマーフェロモン研究の現状。Aroma Research, 臨時増刊 61-67 (2001)
23. 武内ゆかり、森裕司：臨床獣医師のためのイヌとネコの問題行動治療マニュアル。フ

アームプレス (2001)

24. Akutsu, H., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Sano, K., Hatanaka, A., Mori, Y.: Alleviating effects of plant-derived fragrances on stress-induced hyperthermia in rats. *Physiol. Behav.*, 75, 355-360 (2002)
25. Wakabayashi, Y., Mori, Y., Ichikawa, M., Yazaki, K., Hagino-Yamagishi, K.: A putative pheromone receptor gene is expressed in two distinct olfactory organs in goats. *Chem. Senses*, 27, 207-213 (2002)
- 26 瀧上周、森裕司、市川眞澄：哺乳類のフェロモン受容・情報処理機構に関する比較形態学的研究。日本味と匂学会誌。 9, 3-17 (2002)

#### (IV) 長田グループ

##### (1) 論文発表

1. Osada, T., Arakawa, H., Ichikawa, M., and Ikai, A.: Atomic force microscopy of histological sections using a new electron beam etching method. *J. Microsc.*, 189, 43-49 (1998)
2. Ichikawa, M., Osada, T., and Costanzo, R. M.: Replacement of receptor cells in the hamster vomeronasal epithelium after nerve transection. *Chemical Senses*, 23, 171-179 (1998)
3. Yoshida-Matsuoka, J., Osada, T., Mori, Y., and Ichikawa, M.: 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)
4. Osada, T., S. Takezawa, A. Itoh, Arakawa, H., Ichikawa, M., and Ikai, A.: The distribution of sugar chains on the vomeronasal epithelium observed with the atomic force microscope. *Chemical Senses*, 24, 1-6 (1999)
5. Osada, T., Ikai, A., R. M. Costanzo, M. Matsuoka, and Ichikawa, M.: Continual neurogenesis of vomeronasal neurons in vitro. *J. Neurobiol.*, 40, 226-233 (1999)
6. Takigami, S., Osada, T., Yoshida-Matsuoka, J., Matsuoka, M., Mori, Y., and Ichikawa, M.: The expressed localization of rat putative pheromone receptors. *Neurosci. Lett.*, 272, 115-118 (1999)
7. Matsuoka, M, Osada, T, Yoshida-Matsuoka J, Ikai,, A., Ichikawa, M., Norita, M., and Costanzo, R.: A comparative immunocytochemical study of development and regeneration of chemosensory neurons in the rat vomeronasal system, *Brain Res.*, 946, 52-63 (2002)
8. Kim, H., Arakawa, H., Osada, T., and Ikai, A.: Quantification of Fibronectin and Cell Surface Interactions by AFM "Colloids and Surfaces B: Biointerfaces", 25, 33-43 (2002)
9. Ikai, A., Afrin, R., Itoh, A., Thogersen, H. C., Hayashi, Y., and Osada, T.: Force Measurement for Membrane Protein Manipulation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23, 165-171 (2002)
10. Kim, H., Arakawa, H., Osada, T., and Ikai, A.: Quantification of Cell Adhesion Interactions by AFM: Effects of LPS/PMA on the adhesion of C6 glioma cell to collagen type I, *Applied Surface Science*, 188, 493-498 (2002)
11. Sun, Y., Arakawa, H., Osada, T., and Ikai, A.: Tapping and Contact Mode Imaging of Native Chromosomes and Extraction of Genomic DNA using AFM Tips, *Applied Surface Science*, 188, 499-505 (2002)

(V) 佐原グループ

(1) 論文発表：(国内 2, 海外 10)

原著論文

1. Clements JD, Feltz A, Sahara Y, Westbrook GL: Activation kinetics of AMPA channels reveal number of functional agonist binding sites. *J. Neurosci.*, 18, 119-127 (1998)
2. Schoppa NE, Kinzie JM, Sahara Y, Segerson TP, Westbrook GL: Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors. *J. Neurosci.*, 18, 6790-6802 (1998)
3. Jones MV, Sahara Y, Dzubay JA, Westbrook GL: The microscopic determinants of GABAA receptor deactivation and affinity. *J. Neurosci.*, 18, 8590-8604 (1998)
4. Sahara Y, Gotoh M, Konno K, Miwa A, Tsubokawa H, Robinson H P C, Kawai N: A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current. *Eur. J. Neurosci.*, 12, 1961-1970 (2000)
5. Sahara Y, Kubota T, Ichikawa M: Cellular localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1, 2/3, 5 and 7 in the main and accessory olfactory bulb of the rat. *Neurosci. Lett.*, 312, 59-62 (2001)
6. Sahara Y, Takahashi T: Quantal components of the excitatory postsynaptic currents at a rat central auditory synapse. *J. Physiol.*, 536, 189-197 (2001)
7. Jones MV, nas P, Sahara Y, Westbrook GL: GABAA receptor agonists perform more work at the binding site than agonists. *Biophysic. J.*, 81, 2660-2670 (2001)
8. Ishikawa T, Sahara Y, Takahashi T: A single packet of transmitter does not saturate postsynaptic glutamate receptors. *Neuron*, 34, 613-621 (2002)
9. Gotoh M, Noro N, Sahara Y: Single-channel characterization and kinetics of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Med. Dent. Sci.*, 49, 43-55 (2002)

(VI) 山岸グループ

(1) 論文発表

1. K. Hagino-Yamagishi, Y. Saijoh, Y. Yamazaki, K. Yasaki, H. Hamada: Transcriptional regulatory region of Brn-2 required for its expression in developing olfactory epithelial cells. *Dev. Brain Res.*, 109, 77-86 (1998)
2. K. Hagino-Yamagishi, R. Minamikawa-Tachino, M. Ichikawa and K. Yazaki: Expression of Brain-2 in the developing olfactory bulb. *Dev. Brain Res.*, 113, 133-137 (1999)
3. K. Hagino-Yamagishi, M. Matsuoka, M. Ichikawa, Y. Wakabayashi, Y. Mori, and K. Yazaki: The mouse putative pheromone receptor was specifically activated by stimulation with male mouse urine. *J. Biochem.*, 129, 509-12 (2001)
4. Saito Y, Wang Z, Hagino-Yamagishi K, Civelli O, Kawashima S, Maruyama K: Endogenous Melanin-Concentrating Hormone Receptor SLC-1 in Human Melanoma SK-MEL-37 Cells.



BBRC, 289, 44-50 (2001)

5. Y.Wakabayashi, Y. Mori, M. Ichikawa, K. Yazaki, and K. Hagino-Yamagishi: A putative pheromone receptor gene is expressed in two distinct olfactory organs in goats. *Chemical Senses*, 27, 207-213 (2002)
6. 山岸公子 : フェロモン受容体. *Brain Medical* (1999) vol.11, 16-21, ブレインメディカル社
7. 山岸公子 : フェロモン受容体. *生化学* 73, 1128 (2001)

(VII) 松岡グループ

(1) 論文発表

1. Matsuoka, M., Yoshida-Matsuoka, J., Iwasaki, N., Norita, M., Costanzo, R.M. and Ichikawa, M.: Immunocytochemical study of Gi2 $\alpha$  and Go $\alpha$  on the epithelium surface of the rat vomeronasal organ. *Chemical Senses*, 26, 161-166 (2001)
2. Yoshida-Matsuoka, J., Matsuoka, M., Norita, M. and Ichikawa, M.: Long-term recovery of rat vomeronasal system after nerve transection. *Acta Medica et Biologica*, 49, 67-72 (2001)
3. 杉浦弘子、岩田健、松岡勝人、市川眞澄、山内卓、芳賀達也、山形要人 : Arc 結合蛋白 endophilin によるドーパミン D2 受容体エンドサイトーシスの調節。精神薬療研究年報、33, 83-91 (2001)
4. Matsuoka, M., Yamagata, K., Sugiura, H., Yoshida-Matsuoka, J., Norita, M. and Ichikawa, M.: Expression and regulation of the immediate-early gene product Arc in the accessory olfactory bulb after mating in male rat. *Neuroscience*, 111, 251-258 (2002)
5. Matsuoka, M, Osada, T., Yoshida-Matsuoka, J., Ikai A., Ichikawa, M., Norita, M. and Costanzo, R.M.: A comparative immunocytochemical study of development and regeneration of chemosensory neurons in the rat vomeronasal system, *Brain Res.*, 946, 52-63 (2002)