

3) 成熟に伴うマウス副嗅球 GABA 受容体サブタイプ  
の発現動態変化

研究代表者 笹島 仁

[研究目的]

フェロモンとは、同種他個体の内分泌や行動の変化を引き起こす生理活性物質である。げっ歯類においてフェロモンは主に鋤鼻器で受容され、一次中枢である副嗅球を経て、上位中枢へ情報伝達される。副嗅球の僧帽傍飾細胞は、鋤鼻器からの入力を上位へ伝達する出力神経として機能し、隣接する傍糸球体細胞や顆粒細胞から放出される GABA を介した抑制により調節を受けている。我々は、これまでの研究から、極初期応答因子である c-Fos の免疫染色を指標とする神経細

胞興奮性の解析により、マウス成熟過程において副嗅球でのフェロモン応答が変化することを見出している。本研究では、マウス副嗅球における GABA 受容体サブタイプの発現動態を解析し、成熟に伴う GABA 抑制の変化に関し探究した。

**【研究方法】**

未成熟メスマウスとして6週齢、および成熟メスマウスとして25週齢の C57BL/6 マウスより、副嗅球を含む嗅球を摘出し、RNAlater RNA stabilization Reagent (QIAGEN) に4℃にて12時間浸漬した。摘出サンプルより厚さ 200 μm の副嗅球切片を作製し、実体顕微鏡下にて、傍糸球体細胞層、僧帽細胞層および顆粒細胞層をそれぞれ採取した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、各細胞層より RNA を抽出、精製し、吸光度法による定量後、Omniscript RT kit (QIAGEN) を用いて逆転写反応を行い、HotStarTaq Plus DNA Polymerase (QIAGEN) により得られた cDNA をテンプレートとする半定量的 RT-PCR を行った。アガロースゲル電気泳動像は、ScionImage (Scion Corporation) によってデンストグラム解析を行った。

**【結果および考察】**

副嗅球における GABA 抑制が、成熟に伴い変化するならば、各細胞層における GABA 受容体の mRNA 発現様式は変化しうる可能性が考えられる。そこで、GABA 受容体 Aα1、Aα2、Aα3、Aα4 および Aα5 に関して RT-PCR 解析を行った。また、ラット嗅球において成熟に伴い発現が増加すると報告されている calbindin-1 についても成熟の指標として、コントロールである β-actin と併せて解析を行った。RT-PCR 産物をアガロース電気泳動し、デンストグラム解析を行った結果、成熟メスマウス副嗅球では顆粒細胞層において GABA 受容体 Aα1 および Aα3 の発現が有意に増加していた。また、成熟のマーカーである calbindin-1 は、いずれの細胞層においても成熟メスマウスで発現が増加していた。

我々はこれまでの研究から、c-Fos 陽性細胞を指標とするマウス副嗅球応答性の研究により、オスマウス尿中フェロモンに対するメスマウス副嗅球の全体的な応答性は、成熟に伴い低下することを見出した。さらに、全体的な応答性は低下するものの、未成熟メスマ

ウスに比べて、成熟したメスマウス副嗅球の僧帽傍飾細胞層は、性成熟したオスマウス尿中フェロモンに対する応答性が相対的に上昇しており、成熟メスマウス副嗅球はオスの性成熟を識別する能力を獲得している可能性を見出した。

これまで、マウス副嗅球における記憶の形成は、僧帽房飾細胞の GABA 抑制の増強によるものと考えられている。この GABA 抑制増強のメカニズムとして、僧帽傍飾細胞における GABA 受容体の発現増加が考えられる。しかし、本研究では成熟マウス僧帽房飾細胞における GABA 受容体発現の有意な増加は認められなかった。一方、本研究で見出された成熟に伴う顆粒細胞層での GABA 受容体 Aα1 並びに Aα3 サブタイプの発現増加は、顆粒細胞が、僧帽房飾細胞への GABA 抑制を担うのみならず、上位中枢から顆粒細胞への GABA 抑制、あるいは顆粒細胞間の GABA 抑制という、より複雑な記憶メカニズムの存在を示唆するものである。

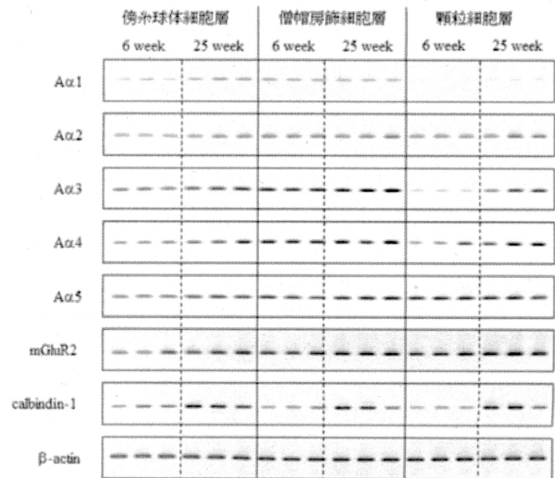


図1 RT-PCR による未成熟 (6 週齢) および成熟メスマウス (25 週齢) 副嗅球での mRNA 発現解析。

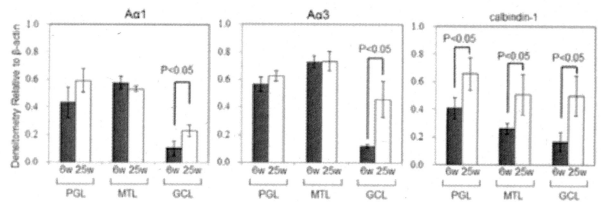


図2 デンストグラムによる mRNA 発現動態解析。GABA<sub>Aα1</sub> (左)、GABA<sub>Aα3</sub> (中) および calbindin-1 (右)。PGL: 傍糸球体細胞層、MTL: 僧帽房飾細胞層、GCL: 顆粒細胞層。Mean ± S.D. (n=3)