

嗅覚系脳神経回路の解明：鼻閉モデルマウスを用いた 嗅入力遮断効果の解析

谷口 美季¹⁾, 清蔭 恵美²⁾, 小林 和人³⁾, 樋田 一徳²⁾

1)川崎医科大学第6学年, 〒701-0192 倉敷市松島577

2)同 解剖学

3)福島県立医科大学医学部附属生体情報伝達研究所生体機能研究部門, 〒960-1295 福島県福島市光が丘1番地

抄録 匂いの情報は嗅細胞軸索を介して、嗅球表面の糸球体に入り投射ニューロンの樹状突起とシナプスし、さらに糸球体を構成する様々な神経化学物質を含有するニューロンによって調整される。臨床の場において、慢性副鼻腔炎や鼻茸等で長期間鼻が遮蔽されると症状改善後に嗅覚異常を認めることがある。また、げっ歯類の片鼻閉実験では、糸球体近傍ニューロンの tyrosine hydroxylase (TH) の発現が低下・消失することが知られている。そこで本研究では、マウス及び TH 発現を green fluorescent protein (GFP) でモニターした遺伝子改変マウス (TH-GFP マウス) を用い、機能的遮断を施したモデルマウスを作製し、入力遮断によるその他の神経化学物質に対する影響を調べた。方法は、縫合によりマウスの左鼻腔を完全に鼻閉させ、3週間～6ヶ月後に灌流固定し、左右嗅球の連続スライス作製後各種抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、これまでの報告と同様3週間の鼻閉モデルマウスでは、鼻閉同側嗅球の TH 発現が著しく低下しており、左鼻腔の入力遮断がなされていたことが示された。また6ヶ月と長期の鼻閉モデルマウスでは、鼻閉同側だけではなく対側嗅球でも著しい TH 発現低下が確認された。TH-GFP マウスでは、TH の発現が低下しているにもかかわらず GFP 発現を維持する細胞が少数見られ、野生型鼻閉モデルマウスでも同様に TH 発現を維持するニューロンが稀に見られた。このような TH ニューロンは発現低下を示すものよりも比較的大きい細胞体を持つ傾向にあった。以上の結果、TH ニューロンが示す入力遮断に対する反応の多様性は、TH ニューロンが入力刺激に対して異なる電気特性を生じるという我々の最近の研究結果を支持するものと考えられる。今後、多様性を示す TH ニューロンが匂い入力調節にどのように関わるか解析を進めていきたい。

doi:10.11482/KMJ-J40(2)67 (平成26年4月14日受理)

キーワード：鼻閉，嗅球糸球体，嗅入力遮断，チロシン水酸化酵素，グルタミン酸脱炭酸酵素

緒言

感覚受容器には、視覚器、聴覚器・平衡覚、味覚器、嗅覚器そして触覚器がある。これらの感覚受容器で受け取られた外部環境の情報は感覚ニューロンにより中枢へと運ばれているが、

健全に感覚機能が働かなくなると、環境変化を察知することが困難になる。臨床の場で見られる、アレルギー性鼻炎や慢性副鼻腔炎、鼻茸などによって、ある一定期間、または長期間鼻閉状態になると、原疾患が治癒・改善したにもか

別刷請求先
清蔭 恵美
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学解剖学

電話：086 (462) 1111, 内線27520
ファックス：086 (462) 1199
Eメール：ekiyokage@med.kawasaki-m.ac.jp

かわらず、嗅覚異常が遷延することがある。

嗅覚の一次中枢である嗅球の表面には糸球体と呼ばれる構造があり、様々な化学神経物質を含有したニューロンによって構成されており、これらのニューロンは匂い入力情報の調整に関わると考えられている。チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) 発現ニューロンも糸球体を構成するニューロン群のひとつであり、 γ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) との共存率が80%以上と高く、カルシウム結合蛋白である calbindin (CB) や calretinin とは低い共存率を示している¹⁾。また、鼻腔への硫酸亜鉛注入や鼻腔縫合処置をしたラット及びマウスの実験では、THニューロンの発現が低下・消失することが知られている^{2,3)}。さらに、パーキンソン病患者の嗅覚異常は運動症状が出る数年前から出現することから、嗅球で発現するTHは匂い識別機能に関わると考えられている。そこで我々は、野生型マウス及びTHの発現を green fluorescent protein (GFP) で検出した TH-GFP トランスジェニックマウス (TH-GFP マウス) から、それぞれ鼻閉モデルマウスを作製し、機能的入力遮断による影響について、免疫細胞化学的手法を用いて細胞レベルでの観察を行った。

材料と方法

動物

本実験は、生後10~12週の C57BL/6J マウス (日本 SLC) 10匹 (雄5匹, 雌5匹) と B6. Cg-Tg (TH-GFP) 21-31 マウス (BRC No. 02095, 理研バイオリソースセンターより提供⁴⁾、川崎医科大学 DNA 組換え承認番号: 川換09-02, 2010), 5匹 (雄1匹, 雌4匹) を用いて鼻閉モデルマウスを作製し (次項)、各種抗体を用いた免疫染色を行った。すべての実験行程の前に、マウスはペンタバルビタールナトリウム (100 mg/Kg) を腹腔注射し、麻酔を行った。

外科的処置: 鼻閉モデルマウスの作製

マウスの左外鼻孔の外堤の表皮を眼科用ハサ

ミで切除し、ナイロン糸 (6-0) で縫合し外鼻孔を閉鎖した。一週間後、手術を行った左鼻に少量の水を滴下し、水滴量の変化の有無で縫合状態を確認した。縫合が不十分な場合は、もう一度切開し再度縫合を行い、一週間後に確認を行うという過程を完全に閉鎖を確認できるまで続けた。外鼻孔の完全閉鎖状態を確認後、3週間~6ヶ月経過したものを鼻閉モデルマウスとした。また本実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (09-074, 2010) 川崎医科大学動物実験指針に基づき実施されたものである。

免疫組織化学法

完全鼻閉後3週間以上経過した野生型及び TH-GFP マウスは、4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で灌流固定し、取り出した脳をビブラトーム (Leica VT 1000S) で冠状断面に 50 μ m 厚の連続スライスを作製した。以下の免疫染色は、自由浮遊法で行った。

免疫単染色: 鼻閉同側及び対側の嗅球スライスは、0.3% Triton X, 0.05% アジ化ナトリウム含有 1% 牛血清アルブミンリン酸ナトリウム緩衝液 (BSA-PBS) に入れ、20 $^{\circ}$ C, 1時間ブロッキング反応を行った。その後、各種一次抗体を加え (詳細は表1参照, ⁵⁻¹⁰⁾、20 $^{\circ}$ C, 1~2日間反応させた。スライスをリンスした後、ビオチン化二次抗体 (1:200希釈, Vector 社) BSA-PBS で、20 $^{\circ}$ C, 2時間、avidin-biotin complex PBS (ABC, 1:200希釈, Vector 社) 中で20 $^{\circ}$ C, 2時間で反応した。スライスは、リンス後0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 同仁化学) トリス緩衝液に浸し0.01% 過酸化水素を加え、室温で1~3分間発色反応を行った。免疫染色後のスライスは、0.05% オスミウム酸リン酸緩衝液で後固定を4 $^{\circ}$ C, 15分に行い、脱水後エポキシ樹脂 (TAAB 社) 包埋を行った。包埋されたスライスは、切片として光学顕微鏡で観察・撮影を行った (Olympus BX50)。

多重蛍光免疫染色: 糸球体を構成するニューロ

ン群が鼻閉による影響を受けているかどうかを調べるため, 各種ニューロンマーカーを用いて多重蛍光免疫染色を行った. 嗅球冠状断スライスは1% BSA-PBS でブロッキング反応後, 以下の一次抗体を組み合わせて20℃, 1~2日間

反応させた. (1)ウサギ抗 CB D28K 抗体(1:5,000 希釈)(2)マウス抗 TH 抗体(1:5,000)(3)ウサギ抗 glutamic acid decarboxylase 65/67 抗体(GAD, 1:5,000)(4)ニワトリ抗 GFP 抗体(1:5,000). 一次抗体反応後, 以下の蛍光標識二次抗体を組み

表1 使用抗体一覧

抗原	免疫動物	希釈濃度	供給元	参考文献	図
Tyrosine hydroxylase	マウス	1:5,000	Chemicon MAB318	Toida et al., 2000	図 2, 3, 4
Olfactory marker protein	ヤギ	1:10,000	gift from Dr. Margolis	Margolis, 1982	図 2
Calbindin D28K	マウス	1:5,000	Swant 300	Toida et al., 1998	図 2
Calbindin D28K	ウサギ	1:5,000	Millipore AB1778	Kawaguchi & Hirano, 2002	図 3
Glutamic acid decarboxylase 65/67	ウサギ	1:5,000	Sigma G5163	Erlander et al., 1991	図 2, 3, 4
Green Fluorescent Protein	ニワトリ	1:5,000	Molecular Probes A10262	Jessberger et al., 2008	図 4

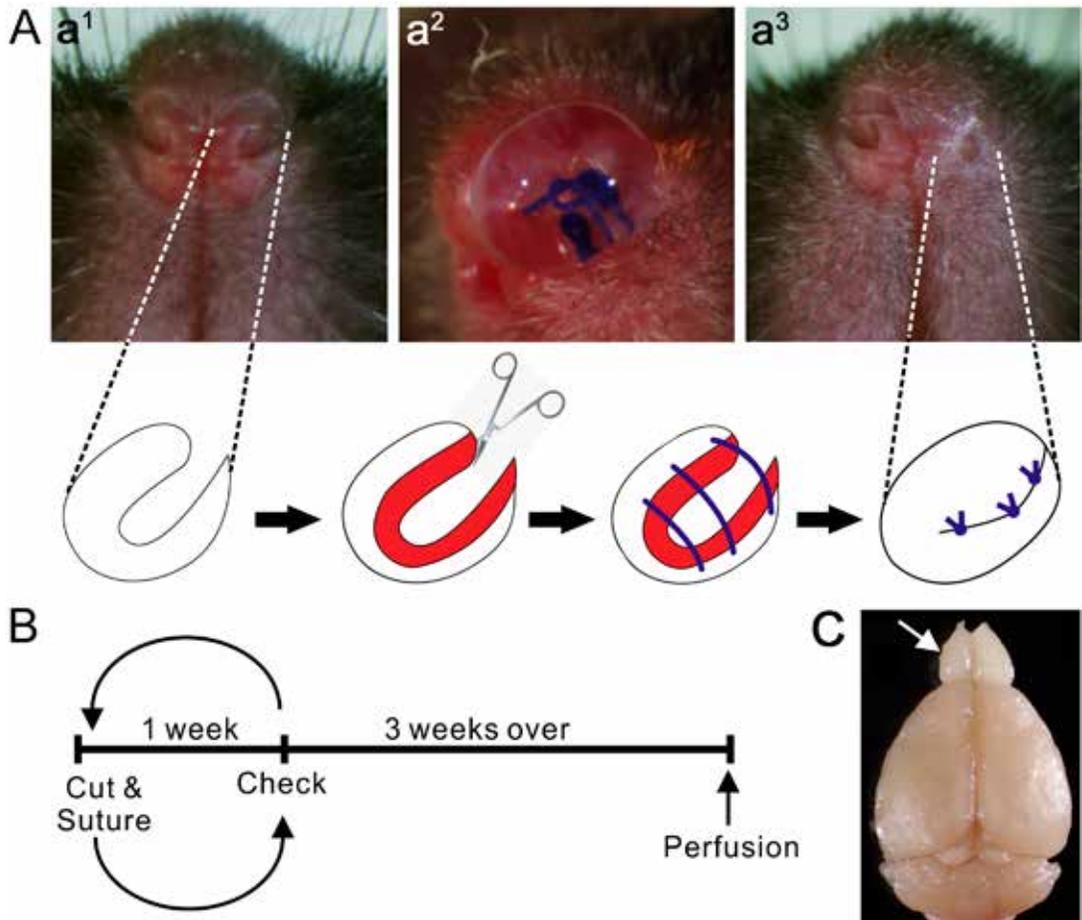


図1 鼻閉モデルマウスの作製. A: マウス左外鼻孔の外堤をC字状にハサミで切除(a¹). 縫合したマウスの鼻に水滴を乗せた状態(a²). 完全に閉鎖された左外鼻孔を示す(a³). B: 鼻閉モデルマウス作製の行程. C: 鼻閉後6ヶ月が経過したマウスの固定脳. 矢印は鼻閉同側嗅球を示す.

合わせ20℃, 2時間反応させた. (1) fluorescein isothiocyanate(FITC) 標識ロバ抗ウサギ IgG (1:200希釈, Jackson) (2) indocarbocyanine(Cy3) 標識ロバ抗マウス IgG(1:200希釈, Jackson) (3) Cy3標識ロバ抗ニワトリ IgY(1:200希釈, Jackson). それぞれのスライスは, 核染色のため Hoechst(1:5,000希釈, Sigma) で5分間反応させた後, Vector shield(Vector H-1000) で封入し, 蛍光顕微鏡(Olympus BX61) で染色性を確認後, 2光子レーザー顕微鏡(Leica SP-2) の共焦点モードで観察及び撮影を行った. 図3と4すべての画像は2光子レーザー顕微鏡の共焦点モードで得られたものである.

細胞カウント法

入力遮断による TH 免疫陽性細胞数の変化を定量化するため, 野生型及び TH-GFP 鼻閉モデル

マウスのスライスを用いてマウス抗 TH 抗体と Hoechst による多重蛍光染色(方法は上述と同様)を行った. レーザー顕微鏡(Leica SP-2)で撮影後, NeuroLucida(MBF, version 10)で糸球体層を含む単位面積当たり(縦150 μm ×横400 μm) に在る細胞をカウントした. TH 陽性細胞のうち TH 陽性/Hoechst 陽性のみをカウントした. また, カウンティングフレームの左端と下端(inclusion line)に細胞が触れているものはカウントし, 右端と上端(exclusion line)に触れているものはカウントしないという基準に従った¹¹⁾.

結果

鼻閉モデルマウス

匂い入力遮断による嗅球の糸球体を構成するニューロンへの影響を調べるため, 鼻閉モデルマウスを作製した. 図1 Aは鼻閉のための左外鼻

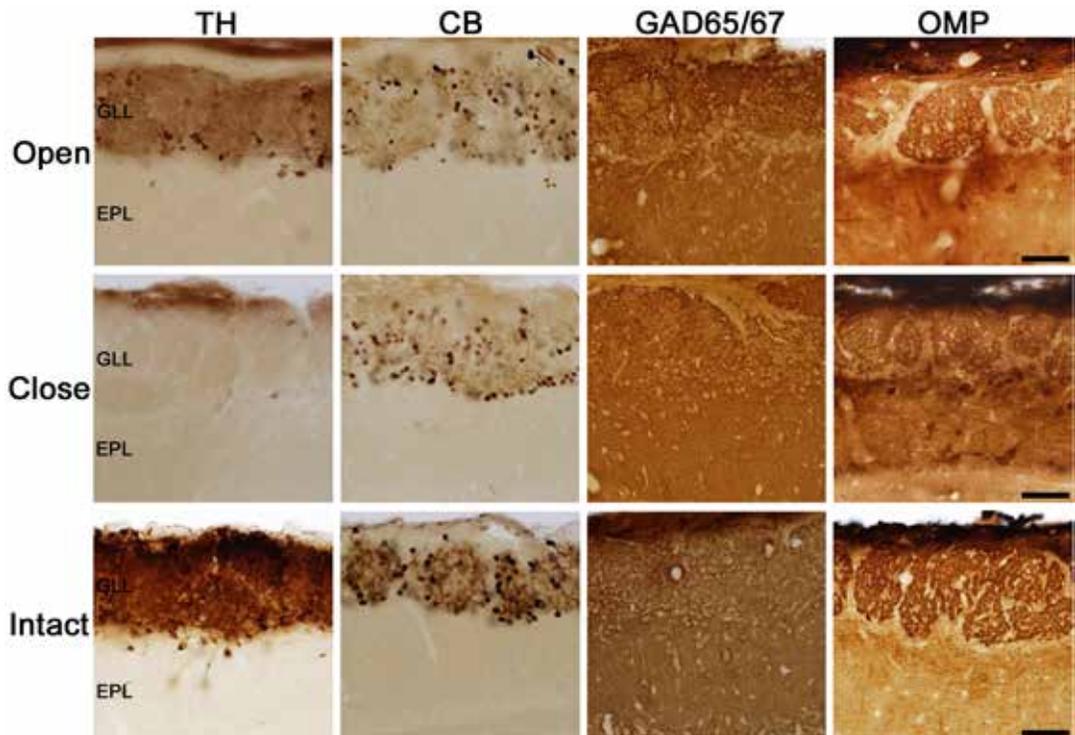


図2 野生型マウス鼻閉後の tyrosine hydroxylase (TH), calbindin (CB), glutamic acid decarboxylase (GAD), olfactory marker protein (OMP) の免疫反応. Open: 鼻閉対側嗅球, Close: 鼻閉同側嗅球, Intact: 未処置嗅球. 鼻閉同側嗅球糸球体層の TH 免疫反応性は, 著しく低下している. 鼻閉対側糸球体層の TH, CB の免疫陽性細胞数は未処置マウス糸球体層に比べて減少している. 一方, GAD 及び OMP の免疫反応性に変化は見られない. GLL: 糸球体層, EPL: 外網状層, All scale bars: 50 μm

孔外堤表皮の切除と縫合方法を, 図1 Bは鼻閉モデルマウス作製までのスキームを示した. 鼻閉6ヶ月後の脳を見ると, 鼻閉同側の嗅球のサイズは対側嗅球に比べ減少していた(図1 C, 矢印).

入力遮断によるタンパク発現への影響

免疫単染色による観察: THタンパク発現低下を匂い入力遮断の指標とし, 各種抗体を用いてABC-DAB免疫染色によるタンパク発現の変化を観察した. 図2は野生型鼻閉モデルマウスの免疫染色像を示す. 鼻閉同側(Close)

のTH免疫反応性は対側(Open)に比べて顕著に低下しているのに対し, CB, GAD, olfactory marker protein(嗅神経の特異的マーカー)の免疫反応性には変化が見られなかった. 興味深いことに, 鼻閉対側(Open)のTH, 及びCB免疫陽性細胞数は入力遮断されていないにもかかわらず, 未処置マウス(Intact)の嗅球よりも減少していた. また, TH-GFP鼻閉モデルマウスでも同様の所見が得られた(図は示さない).

TH陽性細胞の定量: 野生型およびTH-GFP

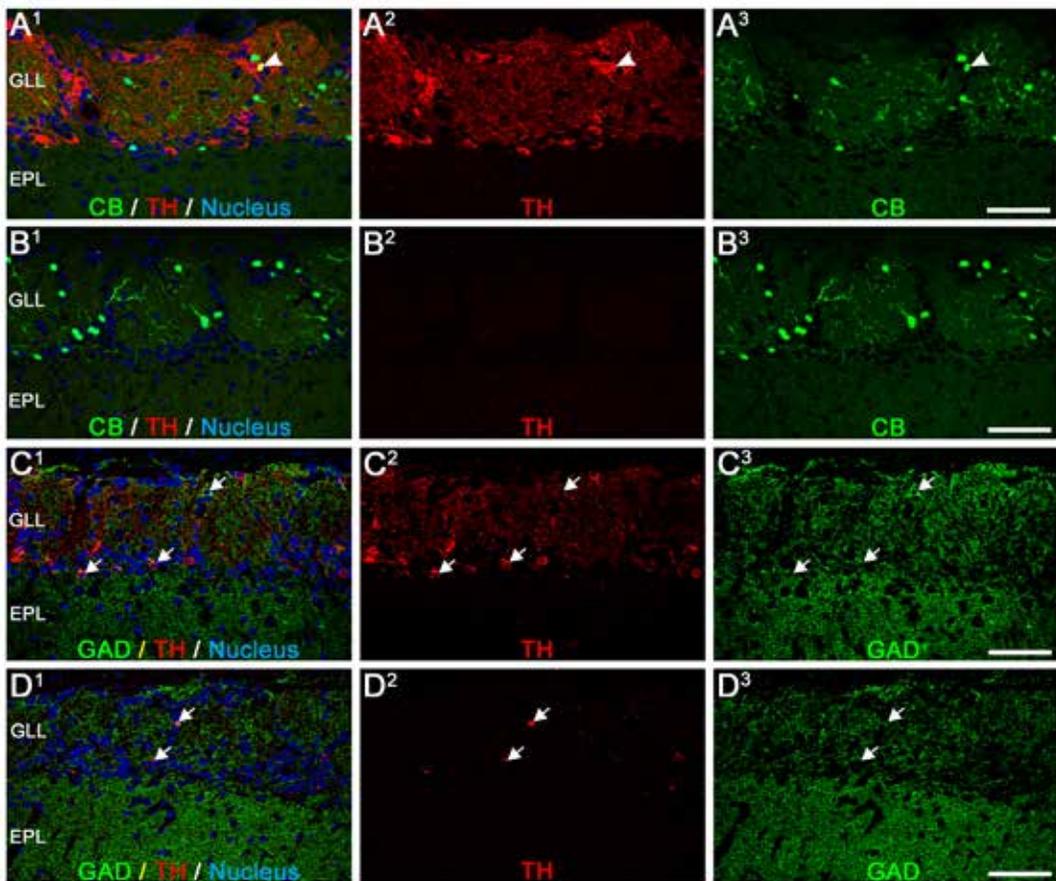


図3 野生型マウスの化学的共存関係に及ぼす入力遮断の影響. AとBは抗CB抗体(緑)/抗TH抗体(赤)/Hoechst(青)による多重蛍光免疫染色. A¹, B¹: 画像を重ね合わせたもの. A², B²: TH(赤)のみ. A³, B³: CB(緑)のみ. CとDは抗GAD抗体(緑)/抗TH抗体(赤)/Hoechst(青)による多重蛍光免疫染色. C¹, D¹: 画像を重ね合わせたもの. C², D²: TH(赤)のみ. C³, D³: GAD(緑)のみ. A¹-A³およびC¹-C³: 鼻閉対側嗅球, B¹-B³およびD¹-D³: 鼻閉同側嗅球. 鼻閉によるTHの免疫反応性は顕著に消失または低下していたが(B², D²), THと共存率の低いCB(A¹, A³, B¹, B³)と共存率の高いGAD(C¹, C³, D¹, D³)の免疫反応性に変化は見られなかった. 鎌はTH陽性/CB陽性細胞を示す(A¹-A³). 矢印はTH陽性/GAD陽性細胞を示す(C¹-C³, D¹-D³). TH: tyrosine hydroxylase, CB: calbindin, GAD: glutamic acid decarboxylase, GLL: 糸球体層, EPL: 外網状層, All scale bars: 50 μm

鼻閉モデルマウスの鼻閉対側糸球体層における TH 陽性細胞は、平均20.8個 / $60 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ であるのに対し、鼻閉同側では平均1.8個 / $60 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ であり、約90%の減少率を示した。

多重蛍光免疫染色による観察：野生型鼻閉モデルマウスを用いて、THと共存率の低いCB(図3 A, B)と共存率の高いGAD(GABAの合成酵素、図3 C, D)に対する入力遮断の影響に

ついて多重蛍光免疫染色を行って観察をした。その結果、THと共存率の低いCBだけではなく、THと高い共存率を示すGADの免疫反応性にも入力遮断による著しい変化はみられなかった(図3 A³, B³, C³, D³)。

次に、TH-GFP鼻閉モデルマウスを用いて入力遮断による影響を観察した(図4)。多重蛍光免疫染色の結果では、TH-GFPマウス鼻閉同側嗅球糸球体層のTH免疫反応性は、野生型鼻閉

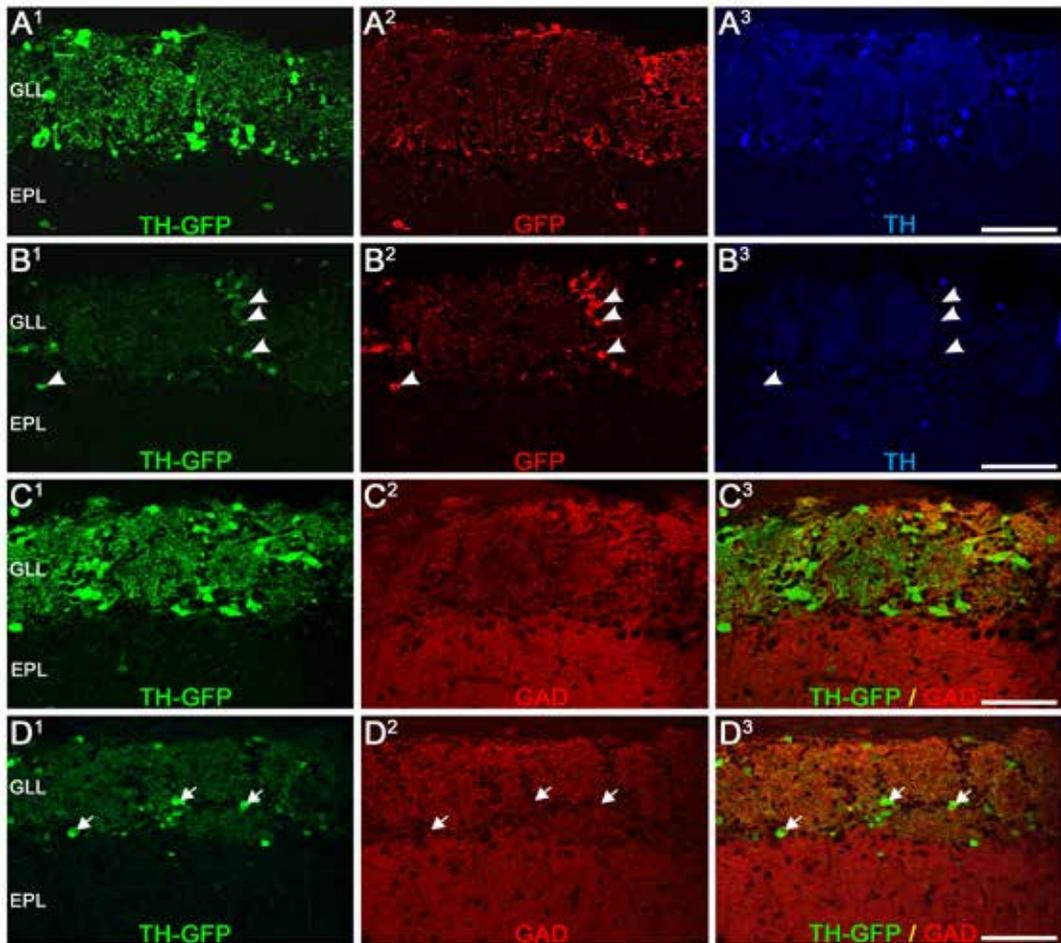


図4 TH-GFPマウスに及ぼす入力遮断の影響。AとBはTH-GFP(緑)/抗GFP抗体(赤)/抗TH抗体(青)による多重蛍光免疫染色。A¹, B¹: TH-GFP(緑)のみ。A², B²: GFP(赤)のみ。A³, B³: TH(青)のみ。THの免疫反応性が消失しているにもかかわらず(B³)、TH-GFPの発現(B¹)とGFPの免疫反応性を維持する(B²)細胞が見られる(B¹, B², 鎌)。CとDはTH-GFP(緑)/抗GAD抗体(赤)による多重蛍光免疫染色。C¹, D¹: TH-GFP(緑)のみ。C², D²: GAD(赤)のみ。C³, D³: 画像を重ね合わせたもの。鼻閉後もTH-GFPの発現が見られる細胞は、GAD陽性を示し、比較的大きな細胞体を示す(D¹-D³, 矢印)。A¹-A³およびC¹-C³: 鼻閉対側嗅球、B¹-B³およびD¹-D³: 鼻閉同側嗅球。TH: tyrosine hydroxylase, GFP: green fluorescent protein, GAD: glutamic acid decarboxylase, GLL: 糸球体層, EPL: 外網状層, All scale bars: 50 μm

モデルマウスと同様に著しく低下していたが(図4 A³, B³), GFPの発現は維持されていた(図4 B¹, B²). また, 鼻閉後も発現しているGFP陽性細胞のほとんどはGADを発現していた(図4 D¹, D², D³). さらに, THニューロンは細胞体の直径によって2種類に分類することができるが¹²⁾, 鼻閉後も見られるGFP陽性細胞は, 比較的大きな細胞体を持つものが多かった(図4 B¹, B², D¹).

考察

嗅球糸球体を構成するニューロンの一つであるTHニューロンは, そのタンパク発現において匂い入力遮断による影響を顕著に受けるニューロンである. 本研究では, 匂い入力遮断を目的に, 野生型及びTH-GFPマウスの片側鼻閉手術を行い, TH以外の神経化学物質に対する影響を知るため免疫染色を行った. 免疫単染色では細胞の特徴や局在を観察し, 多重蛍光染色では複数の神経化学物質を含有した単一のニューロンが入力遮断によって受ける影響を解析した.

3週間以上の長期入力遮断を続けた結果, 両マウスとも鼻閉同側嗅球糸球体層のTH発現が顕著に低下・消失し, また, 鼻閉同側の嗅球サイズが減少したことから鼻閉モデルマウスの作製に成功した. 嗅球サイズの減少は鼻閉後2週間に全層で見られ, 入力遮断による嗅細胞のターンオーバーが妨げられることで側脳室下帯から新生されるニューロンやグリアの供給が減少し, 嗅球内の細胞死が増加した結果引き起こされると考えられている^{13,14)}. さらに, 鼻閉対側嗅球のTH免疫反応性を未処置マウスと比べたところ, 入力遮断がなされていないにもかかわらず明らかに弱い反応性を示した.

左右の嗅球間は皮質にある前嗅核のニューロンが前交連を介して互いに投射していることが知られている¹⁵⁾. 特に嗅皮質の最も吻側部にある前嗅核のpars externaのニューロンは対側の嗅球顆粒細胞に投射し¹⁶⁾, 同側鼻孔からの匂い情報入力と対側鼻孔からの入力を比較すること

で匂いの方向探知に関与することが報告されている¹⁷⁾. つまり, 鼻閉同側嗅球から対側嗅球への入力遮断され, 鼻閉対側嗅球への入力刺激は通常よりも弱くなり, THの発現低下が起こることが示唆された. しかし, 対側嗅球からの匂い情報が, 顆粒細胞から糸球体層に在るTHニューロンに対してどのように伝達され調整されているかについては解明すべき課題である.

TH-GFPマウスの中脳黒質でのGFPの発現は, THの89%がGFP陽性でGFPの87%がTH陽性を示すことから⁴⁾, 内在のTHの発現とGFPの発現はほぼ一致しているが, 約10%程度は一致がみられない. 実際, TH-GFP鼻閉モデルマウスでもTHの発現が低下・消失しているにもかかわらず, GFPの発現が保たれたニューロンが少数存在した. この結果の説明として, トランスジーンが挿入されたゲノム領域の影響によって異所性発現を引き起こすこと, THプロモーターのGFP発現効率への影響, また合成と分解サイクルがTHとGFPで異なること等が可能性として考えられる. しかし, 現時点でこれらについて明らかにすることはできないため, 今後の課題として検討していきたい.

入力遮断の結果, TH-GFPマウスだけではなく野生型マウスにおいてもTHの発現を維持するニューロンは極少数見られることから, THニューロンは入力遮断に対して多様な反応を示すニューロンであると考えられる. さらに, THニューロンは嗅神経からの入力刺激に対して異なる興奮性後シナプス電位を生じることから, 嗅神経から直接入力を受けるTHニューロンと, 投射ニューロンである房飾細胞を介して入力を受けるものが在るという我々の最近の報告¹⁸⁾を支持すると考えられる. また, THニューロンは投射ニューロンである僧帽/房飾細胞間の側方抑制に関わる介在ニューロンであり, 匂いのコントラストを増強すると考えられている. 以前の鼻閉ラットを用いた電気生理学の報告では, ある匂いに対して興奮する投射ニューロンが鼻閉対側よりも同側の方が多いことを示した¹⁹⁾. これは, THニューロンから放出され

るドーパミンの減少による側方抑制が抑えられた結果、匂い識別が低下することが考えられる。また、鼻閉後再度鼻孔を開けると嗅球のサイズが元に戻る¹⁴⁾ことから、THの発現も上昇し、匂い識別も回復することが示唆される。今後は、嗅神経入力に対して多様な反応をしめすTHニューロンがどのように入力調節に関わるのか解析を進めていきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、川崎医科大学解剖学教室の研究補助員の方々に深く感謝いたします。また、数々の助言を頂いた西松 伸一郎 講師（川崎医科大学分子生物学1）と英文抄録の校正を快諾頂いた Renee E. Cockerham 博士（Department anatomy & Neurobiology, University of Maryland, School of Medicine, Baltimore, USA）に心より感謝いたします。

本研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費(22-A51)の援助を受けて行われました。

引用文献

- 1) Kosaka K, Kosaka T: Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 1167: 42-55, 2007
- 2) Stone DM, Grillo M, Margolis FL, Joh TH, Baker H: Differential effect of functional olfactory bulb deafferentation on tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase messenger RNA levels in rodent juxtglomerular neurons. *J Comp Neurol* 311: 223-233, 1991
- 3) Baker H, Morel K, Stone DM, Maruniak JA: Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb. *Brain Res* 614: 109-116, 1993
- 4) Sawamoto K, Nakao N, Kobayashi K, *et al.*: Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6423-6428, 2001
- 5) Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T: Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. *J Comp Neurol* 392: 179-198, 1998
- 6) Toida K, Kosaka K, Aika Y, Kosaka T: Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience* 101: 11-17, 2000
- 7) Margolis FL: Olfactory marker protein (OMP). *Scand J Immunol Suppl* 9: 181-199, 1982
- 8) Kawaguchi SY, Hirano T: Signaling cascade regulating long-term potentiation of GABA (A) receptor responsiveness in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 22: 3969-3976, 2002
- 9) Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ: Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7: 91-100, 1991
- 10) Jessberger S, Toni N, Clemenson GD Jr, Ray J, Gage FH: Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11: 888-893, 2008
- 11) Sterio DC: The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microscopy* 134: 127-136, 1984
- 12) Kosaka T, Kosaka K: Two types of tyrosine hydroxylase positive GABAergic juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb are different in their time of origin. *Neurosci Res* 64: 436-441, 2009
- 13) Brunjes PC: Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res Brain Res Rev* 19: 146-160, 1994
- 14) Cummings DM, Henning HE, Brunjes PC: Olfactory bulb recovery after early sensory deprivation. *J Neurosci* 17: 7433-7440, 1997
- 15) Davis BJ, Macrides F: The organization of centrifugal projections from the anterior olfactory nucleus, ventral hippocampal rudiment, and piriform cortex to the main olfactory bulb in the hamster: an autoradiographic study. *J Comp Neurol* 203: 475-493, 1981
- 16) Yan Z, Tan J, Qin C, Lu Y, Ding C, Luo M: Precise circuitry links bilaterally symmetric olfactory maps. *Neuron* 58: 613-624, 2008
- 17) Kikuta S, Sato K, Kashiwadani H, Tsunoda K, Yamasoba T, Mori K: From the Cover: Neurons in the anterior olfactory nucleus pars externa detect right or left localization of odor sources. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 12363-12368, 2010
- 18) Kiyokage E, Pan YZ, Shao Z, *et al.*: Molecular identity

of periglomerular and short axon cells. *J Neurosci* 30: 1185-1196, 2010
19) Wilson DA, Sullivan RM: The D2 antagonist spiperone

mimics the effects of olfactory deprivation on mitral/tufted cell odor response patterns. *J Neurosci*. 15: 5574-5581, 1995

Olfactory Brain Circuitry: Analysis of the odor deprivation effect using the naris closed mouse model

Miki TANIGUCHI¹, Emi KIYOKAGE^{1*}, Kazuto KOBAYASHI², Kazunori TOIDA¹

1) Department of Anatomy, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan.

2) Department of Molecular Genetics, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University School of Medicine, 1 Hikarigaoka Fukushima, 960-1295, Japan

ABSTRACT It is well known that one of chemical marker in juxtglomerular cells in the rodent olfactory bulb (OB), tyrosine hydroxylase (TH), is decreased in its expression after olfactory input deprivation. In the present study, we have made relatively long term olfactory deprivation models, more than 3 weeks to months, by doing nasal closure on wild type and transgenic mice. In combination with immunocytochemistry for neuronal markers such as glutamic acid decarboxylase, calbindin, and olfactory marker protein, we have confirmed that only TH-expression is decreased after deprivation. In our experiment, however, interesting findings were obtained from deprived transgenic mice which express green fluorescent protein (GFP) under the control of the TH promoter (TH-GFP mice). Although GFP-fluorescence indicating TH gene expression and immune-reactivity for TH were typically decreased, immune-reactivity for GFP was maintained. Longer deprivation had variable effects of expression of bulbar neurons not only on the deprived side but also on the non-deprived side. In addition, the neurons that expressed GFP even after deprivation have relatively large somata. These findings indicate possible heterogeneity in TH neurons in reaction to odor deprivation and support our recent report of heterogeneous reaction patterns of TH-neurons to olfactory nerve stimulation. We will continue this work by altering conditions of deprivation to clarify the heterogeneity of bulbar neurons organizing OB neural circuitry.

(Accepted on April 14, 2014)

Key words : **Naris closure, Olfactory glomeruli, Odor deprivation, Tyrosine hydroxylase, Glutamic acid decarboxylase**

Corresponding author
Emi Kiyokage
Department of Anatomy, Kawasaki Medical School, 577
Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111
Fax : 81 86 462 1199
E-mail : ekiyokage@med.kawasaki-m.ac.jp