

氏名（本（国）籍）	中牟田 祥 子（福岡県）
主 指 導 教 員 名	岩手大学 教授 谷 口 和 之
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第364号
学 位 授 与 年 月 日	平成24年9月18日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	Histological and Cytochemical Studies on the Olfactory System in African Lungfish, <i>Protopterus annectens</i> (アフリカ肺魚 ( <i>Protopterus annectens</i> ) における 嗅覚系の組織細胞化学)
審 査 委 員	主査 岩手大学 教授 山本 欣 郎 副査 帯広畜産大学 教授 北村 延 夫 副査 岩手大学 教授 谷口 和 之 副査 東京農工大学 教授 渡 辺 元 副査 岐阜大学 教授 阿 閉 泰 郎

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

多くの脊椎動物には互いに独立した2つの嗅覚器, 嗅上皮と鋤鼻器が存在する。かつては, 嗅上皮が一般的な匂い, 鋤鼻器がフェロモンを各々受容すると考えられていたが, 最近の研究では, 嗅上皮と鋤鼻器はいずれも一般的な匂いとフェロモンの両方を受容することが明らかになってきている。嗅上皮は全ての脊椎動物に存在するが, 鋤鼻器は魚類には存在せず, 両生類以上のほとんどの脊椎動物に存在する。

嗅上皮と鋤鼻器は, 解剖学的, 微細構造的に互いに異なっている。嗅細胞の微細構造は動物種によって様々で, 例えばほとんどの硬骨魚類と数種の両生類の嗅上皮は線毛性嗅細胞と微絨毛性嗅細胞の両方を含むが, ほとんどの陸生動物の嗅上皮は線毛性嗅細胞のみを含む。一方, ほとんどの脊椎動物の鋤鼻器の感覚上皮(鋤鼻上皮)は微絨毛性鋤鼻感覚細胞のみを持つ。すなわち, 微絨毛性感覚細胞が集合していることは, 四足動物の鋤鼻上皮における決定的な特徴といえるかもしれない。

嗅細胞と鋤鼻感覚細胞を区別する手法として, レクチン組織化学やGタンパク発現解析が用いられている。レクチン組織化学は, 細胞に発現した各種糖鎖を検出しその局在を特定することができ, 多くの動物において嗅細胞と鋤鼻感覚細胞の間のレクチン結合パターンが異なることが報告されている。多くの脊椎動物において嗅細胞は匂い受容体(OR), 鋤鼻感覚細

胞は1型鋤鼻受容体(V1R)あるいは2型鋤鼻受容体(V2R)を発現し、OR, V1R, V2Rは各々異なるGタンパク $\alpha$ サブユニットG $\alpha$ olf, G $\alpha$ i2およびG $\alpha$ oに共役する。

硬骨魚から四足動物への進化の過程において、1つの嗅上皮に混在していた線毛性嗅細胞と微絨毛性嗅細胞が異なる2つの上皮に分かれて分布するようになった結果、2つの異なる嗅覚器、嗅上皮と鋤鼻器が出現したと考えることができる。硬骨魚類は条鰭類と肉鰭類に二分され、一般的な硬骨魚のほとんどは条鰭類に属し、現存種ではシーラカンスと肺魚だけが肉鰭類に属する。肺魚は系統学的にも遺伝子学的にも四足動物に最も近い魚であると考えられている。本研究ではアフリカ肺魚 *Protopterus annectens* において原始的な鋤鼻器の存在を実証することを目的とし、レクチン組織化学、免疫組織化学および透過型電子顕微鏡によりアフリカ肺魚の嗅覚系を観察した。

まずアフリカ肺魚嗅覚器の組織構造を明らかにした。鼻嚢背側、内側および外側の壁から多数のラメラが垂れ下がり、ラメラ表面は一般的な脊椎動物の嗅上皮と同様の構造を持つ嗅上皮で被われていた。便宜上、本研究ではラメラ表面を覆う嗅上皮を「ラメラ嗅上皮(lamellar OE)」と名付けた。鼻嚢の尾側壁とラメラ基部には、直径数100 $\mu$ mの陥凹部が分布していた。陥凹部は数層の細胞から成る上皮に内張りされていた。本研究ではこの上皮を「陥凹部上皮(recess epithelium)」と名付けた。

嗅覚器において6種類のレクチンは、ラメラ嗅上皮の嗅細胞に比べ陥凹部上皮の細胞を有意に強く染色した。これらのレクチンは、嗅神経束の一部の神経線維と、嗅球腹外側部の糸球体層をその他の部分よりも強く染色した。このデータは、陥凹部上皮から出た軸索がラメラ嗅上皮から出た軸索とは異なる独立した投射経路を持ち、嗅球腹外側部へ収束して投射することを示唆している。

免疫組織化学によると、ニューロンマーカーProtein Gene Product 9.5に対してラメラ嗅上皮と陥凹部上皮はいずれも陽性を示した。線毛マーカーであるアセチル化チュブリンに対してラメラ嗅上皮の自由縁には陽性を示す線毛が多数認められたが、陥凹部上皮に陽性反応は見られなかった。Gタンパク発現パターンについて、ラメラ嗅上皮は一般的な硬骨魚の嗅上皮と同様、G $\alpha$ olf陽性の線毛性嗅細胞とG $\alpha$ o陽性の微絨毛性嗅細胞の両方を含み、陥凹部上皮は両生類の鋤鼻器と同様、G $\alpha$ olf陽性細胞を含まずG $\alpha$ o陽性微絨毛性細胞を含んでいた。

最後に、透過型電子顕微鏡によりラメラ嗅上皮と陥凹部上皮の微細構造を観察した。ラメラ嗅上皮は過去の報告と一致して、線毛性嗅細胞、微絨毛性嗅細胞、線毛性支持細胞および微絨毛性支持細胞を含んでおり、これは一般的な硬骨魚の嗅上皮と共通していた。一方、陥凹部上皮は微絨毛性感覚細胞と微絨毛性支持細胞を含んでおり、これは一般的な硬骨魚の嗅上皮とは明らかに異なり、微絨毛性感覚細胞が集合する点で四足動物の鋤鼻上皮と共通していた。

Gタンパク発現パターンおよび微細構造的特徴の点から、肺魚のラメラ嗅上皮は硬骨魚の嗅上皮に相当するのに対し、陥凹部上皮は四足動物の鋤鼻上皮に相当することが示された。レクチン組織化学の結果は、陥凹部上皮から出た軸索が収束して嗅球腹外側部に投射することを示し、肺魚が四足動物の副嗅球に相当する部位を持つことを示唆した。以上の結果に基づき、肺魚鼻嚢の陥凹部は「原始的な鋤鼻器」と呼ぶにふさわしいと結論付けた。本研究は、脊椎動物の系統発生においてどのように鋤鼻器が出現したかを解明するための大きな手掛かりを提供すると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

多くの脊椎動物は一般的な匂いやフェロモンなどの体外環境中の化学物質を検出するために、互いに独立した2つの嗅覚器、嗅上皮と鋤鼻器を持つ。嗅上皮は全ての脊椎動物に存在するが、鋤鼻器は魚類には存在せず、両生類以上のほとんどの脊椎動物に存在する。肺魚は現存する魚類の中で、系統学的にも遺伝子学的にも四足動物に最も近い魚であると考えられている。申請者は、レクチン組織化学、免疫組織化学および透過型電子顕微鏡によりアフリカ肺魚 *Protopterus annectens* の嗅覚系を検索し、アフリカ肺魚における原始的な鋤鼻器の存在を実証した。

申請者は肺魚嗅覚器の中に、ラメラ表面を覆う嗅上皮と、ラメラ基部と鼻嚢壁に分布する陥凹部を内張りする感覚上皮という2種類の異なる感覚上皮を見出した。便宜上ここでは前者をラメラ嗅上皮、後者を陥凹部上皮と名付けている。レクチン組織化学によると、ラメラ嗅上皮の嗅細胞に比べ陥凹部上皮の細胞が有意に強く染まり、両上皮が異なる機能を持つことが示唆された。これらのレクチンで嗅神経束と嗅球を染色した結果、嗅神経束の一部の神経線維と、嗅球腹外側部の糸球体層がその他の部分よりも強く染まり、陥凹部上皮から出た軸索は、ラメラ嗅上皮から出た軸索とは異なる独立した投射経路を持ち、嗅球腹外側部へ収束して投射することが示唆された。匂い受容体と2型鋤鼻受容体に各々共役する Gaolf と Gao タンパクについての免疫組織化学によると、ラメラ嗅上皮には Gaolf 陽性の線毛性嗅細胞と Gao 陽性の微絨毛性嗅細胞が混在するが、陥凹部上皮には Gaolf 陽性細胞は含まれず Gao 陽性微絨毛性細胞が集合していた。透過型電子顕微鏡を用いた観察によると、ラメラ嗅上皮には線毛性嗅細胞と微絨毛性嗅細胞が混在するが、陥凹部上皮には微絨毛性感覚細胞が集合していた。

G タンパク発現パターンおよび微細構造的特徴の点から、肺魚のラメラ嗅上皮は硬骨魚の嗅上皮に相当するのに対し、陥凹部上皮は四足動物の鋤鼻上皮に相当することが示された。レクチン組織化学の結果は、陥凹部上皮から出た軸索の投射領域を示し、肺魚が四足動物の副嗅球に相当する部位を持つことを示唆した。申請者は以上の結果に基づき、肺魚鼻嚢の陥凹部は「原始的な鋤鼻器」と呼ぶにふさわしいと結論付けた。本研究は、脊椎動物の系統発生においてどのように鋤鼻器が出現したかを解明するための大きな手掛かりを提供すると考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分な価値があると認めた。

### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Histological and ultrastructural characteristics of the primordial vomeronasal organ in lungfish

著者名 : Nakamuta, S., Nakamuta, N., Taniguchi, K. and Taniguchi, K.

学術雑誌名 : The Anatomical Record

巻・号・頁・発行年 : 295 (3) : 481-491, 2012

### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Ultrastructure of the olfactory epithelium in a flatfish, barfin flounder (*Veraspermoseri*)

著者名 : Nakamuta, S., Nakamuta, N. and Taniguchi, K.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 72 (6) : 801-804, 2010

- 2) 題 目 : Distinct axonal projections from two types of olfactory receptor neurons in the middle chamber epithelium of *Xenopus laevis*

著者名 : Nakamuta, S., Nakamuta, N. and Taniguchi, K.

学術雑誌名 : Cell and Tissue Research

巻・号・頁・発行年 : 346 (1) : 27-33, 2011