

氏名(本(国)籍)	近藤大輔(岩手県)		
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376号		
学位授与年月日	平成25年3月13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	爬虫類有鱗目の嗅覚器に関するレクチン組織化学的並びに免疫組織化学的研究		
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

主嗅覚系(嗅上皮と主嗅球)と鋤鼻系(鋤鼻上皮と副嗅球)が同一の行動を仲介するヘビ類において、主嗅覚系と鋤鼻系における匂い刺激の受容および伝導、処理の各過程が類似する可能性が考えられる。本研究では、シマヘビの主嗅覚系と鋤鼻系の類似性ないし相違性を組織学的手法並びにレクチン組織化学、免疫組織化学によって解析した。また、冬眠中の嗅覚器と繁殖期の嗅覚器におけるレクチン組織化学的特徴を比較し、ヘビ類の嗅覚系に発現する分子(複合糖質)が季節変化する可能性について検証した。

嗅上皮と鋤鼻上皮において、HE染色並びにシュモール反応で示された感覚細胞の細胞体や樹状突起、軸索の組織学的特徴は類似した。しかしながら、透過型電子顕微鏡を用いた解析によって、嗅上皮の感覚細胞は線毛を、鋤鼻上皮の感覚細胞は微絨毛を自由縁に有することが示された。また、PAS並びにアルシアン青染色によって、嗅上皮の支持細胞は酸性ムコ多糖類を含む分泌顆粒を、鋤鼻上皮の支持細胞は中性ムコ多糖類を含む分泌顆粒を有することが示された。その一方で、主嗅球と副嗅球において、クリューバー・バレラ染色で示された層構造などの組織学的特徴は類似した。嗅球における層構造の複雑さは匂い刺激処理の能力と相関するため、シマヘビの主嗅覚系と鋤鼻系が同程度に発達していることが示唆された。

繁殖期の個体における21種類のレクチンを用いた組織化学では、結合パターンに著しい個体差が認められた Succinylated-wheat germ agglutinin (s-WGA) を除く20種類のレクチンが、上皮内の感覚細胞(樹状突起と細胞体、軸索)において主嗅覚系と鋤鼻系とで類似した結合パターンを示した。しかしながら、4種類のレクチン、*Bandeiraea simplicifolia* lectin-II (BSL-II)、*Dolichos biflorus* agglutinin (DBA)、*Sophora japonica* agglutinin (SJA)、*Erythrina cristagalli* lectin (ECL) が、上皮内の支持細胞において主嗅覚系と鋤鼻系とで異なる結合パターンを示した。また、*Vicia villosa* agglutinin (VVA) は、嗅上皮自由縁と結合したが鋤鼻

上皮自由縁とは結合しなかった。その一方で、用いた全てのレクチンが、嗅球において主嗅覚系と鋤鼻系とで類似した結合パターンを示した。レクチンは複合糖質（糖タンパク質など）と結合するタンパク質であり、主嗅覚系と鋤鼻系において、感覚細胞や嗅球に発現する複合糖質は類似し、支持細胞と自由縁に存在する複合糖質は異なることが示された。

主嗅覚系および鋤鼻系に発現する嗅覚受容体ファミリーを特定するために、両系に発現する G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$) を免疫組織化学によって同定した。嗅覚受容体は匂い物質受容体 (OR) および 1 型鋤鼻受容体 (V1R), 2 型鋤鼻受容体 (V2R) の 3 ファミリーに大別され、OR は $G\alpha_{olf}$ と、V1R は $G\alpha_{i2}$ と、V2R は $G\alpha_o$ と共役することから、発現する $G\alpha$ を同定し嗅覚受容体ファミリーを特定する手法が広く用いられる。はじめに、シマヘビ $G\alpha_{olf}$ 並びに $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_o$ をクローニングしてアミノ酸配列の部分配列を決定し、それらは哺乳類の $G\alpha$ と高い相同性を有した ($G\alpha_{olf}$: 93%, $G\alpha_{i2}$: 94%, $G\alpha_o$: 94%)。また、ウエスタンブロット法によって免疫組織化学に用いる抗体がそれぞれの抗原に特異性を有することを確認した。その後、免疫組織化学並びに免疫電顕法を用いた解析によって、嗅上皮感覚細胞の線毛と主嗅球の糸球体層は $G\alpha_{olf}$ を発現し、鋤鼻上皮感覚細胞の微絨毛と副嗅球の糸球体層は $G\alpha_o$ を発現することが示された。これらの結果から、シマヘビ主嗅覚系および鋤鼻系はそれぞれ OR- $G\alpha_{olf}$ および V2R- $G\alpha_o$ を発現することが示唆された。

嗅覚器の組織化学的特徴が季節変化する可能性を検証するために、冬眠直前および冬眠中、冬眠終了直後の嗅上皮および鋤鼻上皮における一般組織化学 (PAS 並びにアルシアン青染色, シュモール反応) 並びにレクチン組織化学を行った。冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮において、支持細胞に含まれる分泌顆粒の量は他の季節のものよりも顕著に多く、冬眠終了直後の嗅上皮および鋤鼻上皮において、感覚細胞に含まれるリポフスチン顆粒の量は他の季節よりも顕著に少なかった。これらの結果から、冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮の粘液層は他の季節よりも粘性に富み、冬眠終了後の感覚細胞は細胞分化して間もない細胞であることが示唆された。また、冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮において、用いた全てのレクチンが繁殖期のものよりも弱い結合パターンを示したが、シアル酸を除去した後は、全てのレクチンが繁殖期のものと同程度の強度の結合パターンを示した。したがって、冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮では、多量のシアル酸残基が感覚細胞や支持細胞内の分泌顆粒に含まれる複合糖質の糖鎖末端を覆っていることが示された。

以上より、ヘビ類では主嗅覚系と鋤鼻系とで発現する嗅覚受容体は異なるが、それぞれの一次投射経路に発現する複合糖質が類似することが判明した。さらに、ヘビ類の主嗅覚系および鋤鼻系の組織化学的特徴は季節変化することが示された。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文では、主嗅覚と鋤鼻系が同一の行動を仲介するヘビ類において、両系に発現する分子の類似性ないし相違性を明らかにするために、シマヘビの主嗅覚系と鋤鼻系を組織化学的手法並びにレクチン組織化学、免疫組織化学によって解析している。また、申請者は嗅覚系の組織化学的特徴が季節変化する可能性を検証するために、冬眠中の嗅覚系と繁殖期の嗅覚系をレクチン組織化学によって比較した。

組織学的手法では、感覚細胞の細胞体や樹状突起、軸索および 1 次中枢である嗅球の形態学的特徴は主嗅覚系と鋤鼻系とで類似することを明らかにした。その一方で、受容体が発現する感覚細胞の自由縁領域における微細構造は両系で異なり、主嗅覚系は線毛を、鋤鼻系は微絨毛を有することを示した。

繁殖期の個体を用いたレクチン組織化学では、感覚細胞と嗅球におけるレクチン結合パターンは主嗅覚系と鋤鼻系とで類似し、支持細胞と上皮自由縁におけるレクチン結合パターンは両系で異なった。このことから、申請者は主嗅覚系と鋤鼻系とで、感覚細胞および嗅球に発現する複合糖質は類似し、支持細胞や上皮自由縁に発現する複合糖質は異なることを示唆した。

さらに、申請者は嗅覚受容体と共役する G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$) に対する免疫

組織化学において、主嗅覚系は匂い物質受容体ファミリー (OR) と共役する G α olf を、鋤鼻系は 2 型鋤鼻受容体ファミリー (V2R) と共役する G α o を発現することを示した。OR は低分子の揮発性物質を受容し、V2R は高分子の非揮発性物質を受容することから、シマヘビの主嗅覚系と鋤鼻系は異なる性質の匂い物質を受容することを示唆した。

冬眠中の嗅覚器におけるレクチン組織化学では、用いた 21 種類のレクチン全てが、繁殖期の嗅覚器と比較して弱い結合強度を示す。この反応は、脱シアル酸処理によって冬眠中の嗅覚器と繁殖期の嗅覚器とでレクチンの結合強度が同程度となることから、申請者は冬眠中の嗅覚器では多量のシアル酸が複合糖質の糖鎖末端をキャッピングしていることを示唆した。

申請者は本研究において、ヘビ類の主嗅覚系と鋤鼻系は異なる性質の匂い物質を受容するが、匂い物質受容後の匂い刺激の伝導や処理過程は主嗅覚系と鋤鼻系とで類似することを示唆した。さらに、冬眠中の嗅覚系は繁殖期のものよりもシアル酸の負の電荷によって匂い刺激の受容機能が低下している可能性を示した。

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価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目: Lectin histochemical studies on the olfactory epithelium and vomeronasal organ in the Japanese striped snake, *Elaphe quadrivirgata*
著 者 名: Kondoh, D., Yamamoto, Y., Nakamuta, N., Taniguchi, K. and Taniguchi, K.
学術雑誌名: Journal of Morphology
巻・号・頁・発行年: 271 (10) : 1197-1203, 2010
- 2) 題 目: Seasonal changes in the histochemical properties of the olfactory epithelium and vomeronasal organ in the Japanese striped snake, *Elaphe quadrivirgata*
著 者 名: Kondoh, D., Yamamoto, Y., Nakamuta, N., Taniguchi, K. and Taniguchi, K.
学術雑誌名: Anatomia Histologia Embryologia
巻・号・頁・発行年: 41 (1) : 41- 53, 2012
- 3) 題 目: Identification of G protein α subunits in the main olfactory system and vomeronasal system of the Japanese striped snake, *Elaphe quadrivirgata*
著 者 名: Kondoh, D., Koshi, K., Ono, H. K., Sasaki, K., Nakamuta, N. and Taniguchi, K.
学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年: in press
- 4) 題 目: Histological and lectin histochemical studies on the main and accessory olfactory bulbs in the Japanese striped snake, *Elaphe quadrivirgata*
著 者 名: Kondoh, D., Wada, A., Endo, D., Nakamuta, N. and Taniguchi, K.
学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年: in press

既発表学術論文

1) 題 目 : Ultrastructural and histochemical properties of the olfactory system in the Japanese jungle crow, *Corvus macrorhynchos*

著 者 名 : Kondoh, D., Nashimoto, M., Kanayama, S., Nakamuta, N. and Taniguchi, K.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 73 (8) : 1007-1014, 2011