

氏名 (本 (国) 籍)	Sayed Sharif Abdali (アフガニスタン・イスラム共和国)		
主指導教員氏名	岩手大学 准教授 中牟田 信 明		
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第569号		
学位授与年月日	令和2年9月18日		
学位授与の要件	学位規則第4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	Studies on the Distribution of Cells Expressing Vomeronasal Receptors in the Olfactory Organ of Turtles (カメ嗅覚器における鋤鼻受容体発現細胞の分布に関する研究)		
審 査 委 員	主査	岩手大学 教授	宇塚 雄 次
	副査	帯広畜産大学 教授	佐々木 基 樹
	副査	岩手大学 准教授	中牟田 信 明
	副査	東京農工大学 教授	柴 田 秀 史
	副査	岐阜大学 教授	齋 藤 正 一 郎

学位論文の内容の要旨

一般に、四足動物は嗅上皮と鋤鼻器の二つの嗅覚器をもつ。嗅上皮は鼻腔の尾背側部を裏打ちし、鋤鼻器は鼻中隔の基部に位置する。嗅覚受容はGタンパク共役型受容体である匂い受容体、1型鋤鼻受容体、2型鋤鼻受容体等の嗅覚受容体を介して行われる。哺乳類では、嗅上皮に分布する線毛性細胞がGαolfと共役する匂い受容体を発現し、鋤鼻器に分布する微絨毛性嗅細胞がGαi2と共役する1型鋤鼻受容体や、Gαoと共役する2型鋤鼻受容体を発現する。カメの嗅覚器は上憩室上皮と下憩室上皮からなる。上憩室上皮に分布する嗅細胞は樹状突起の先端に線毛と微絨毛の両方をもつが、下憩室上皮に分布する嗅細胞は線毛を欠き、樹状突起の先端に微絨毛だけをもつ。嗅細胞の微細形態に基づくと、上憩室上皮に分布する嗅細胞は匂い受容体と鋤鼻受容体の両方を発現し、下憩室上皮に分布する嗅細胞は鋤鼻受容体だけを発現すると考えられる。しかし、カメ嗅覚器の免疫組織化学的解析では、GαolfとGαoの発現が上憩室上皮と下憩室上皮の両方で示されている。さらに、Gαi1-3の発現が下憩室上皮で示されており、これらの知見は上憩室上皮に匂い受容体と2型鋤鼻受容体、下憩室上皮に鋤鼻受容体と匂い受容体が発現していることを示唆する。カメの下憩室上皮における嗅細胞の微細形態とGタンパク発現から予想される嗅覚受容体発現の矛盾を解消するには、カメ嗅覚器における嗅覚受

容体遺伝子の発現を解明する必要がある。そこで、本研究ではカメ嗅覚器における鋤鼻受容体遺伝子の発現を調べた。

カメでは、鋤鼻受容体は2つの2型鋤鼻受容体遺伝子と2つの1型鋤鼻受容体遺伝子にコードされる。はじめに、RT-PCR解析によってミシシippアカミミガメの嗅覚器に2型鋤鼻受容体遺伝子が発現しているか調べたところ、嗅覚器におけるV2R1遺伝子とV2R26遺伝子の発現が示された。さらに、*in situ* hybridization解析ではV2R1遺伝子とV2R26遺伝子が主に下憩室上皮に発現することが示された。次に、スッポンの嗅覚器におけるV2Rをコードする遺伝子の発現を調べた。スッポンの嗅覚器に微絨毛性嗅細胞は見つからないが、RT-PCR解析は嗅覚器における両方のV2R遺伝子の発現を示した。さらに、*in situ* hybridization解析ではV2R26発現細胞が主に下憩室上皮で見つかり、V2R1発現細胞は上憩室上皮と下憩室上皮のどちらにも検出されなかった。

次に、カメ嗅覚器におけるV1R遺伝子の発現を調べた。RT-PCR解析はアカミミガメ嗅覚器でV1R3遺伝子が発現することを示したが、V1RA14遺伝子の発現は検出されなかった。一方、スッポンはV1R3遺伝子を欠いており、スッポン嗅覚器にV1RA14遺伝子の発現は認められなかった。さらに、*in situ* hybridization解析ではアカミミガメの上憩室上皮と下憩室上皮で少数の嗅細胞にV1R3が発現することが示された。

アカミミガメの下憩室上皮には微絨毛性嗅細胞が分布していることから、多くの嗅細胞が鋤鼻受容体遺伝子を発現すると予想される。しかし、鋤鼻受容体遺伝子は少数の嗅細胞で発現していることから、カメ嗅覚器における未知の鋤鼻受容体遺伝子の存在が推測された。この推論を検証するために、アカミミガメ嗅覚器において鋤鼻受容体のシグナル伝達に参与するTRPC2をコードする遺伝子の発現を調べた。TRPC2遺伝子は主に下憩室上皮の少数の嗅細胞で発現していた。TRPC2発現細胞の密度は、鋤鼻受容体発現細胞の密度とほぼ同じであった。これらの結果から、カメ嗅覚器に発現する未知の鋤鼻受容体遺伝子はおそらく存在せず、少数の嗅細胞だけが鋤鼻受容体遺伝子を発現することが示唆された。最後に、カメ嗅覚器で多くの嗅細胞に発現する嗅覚受容体の種類を確認するため、匂い受容体のシグナル伝達に参与するCNGA2をコードする遺伝子の発現を調べた。*In situ* hybridization解析でアカミミガメの上憩室上皮と下憩室上皮の広い範囲にCNGA2の発現が示され、カメ嗅覚器において多くの嗅細胞は匂い受容体遺伝子を発現していることが示唆された。

本研究の結果は、鋤鼻受容体遺伝子は限られた数の嗅細胞で発現することや、上憩室上皮、下憩室上皮ともに線毛性嗅細胞が分布するスッポンだけでなく下憩室上皮に微絨毛性嗅細胞が分布するアカミミガメでも多くの嗅細胞に匂い受容体が発現することを示唆している。従って、カメにおける嗅覚受容は鋤鼻受容体よりも匂い受容体に依存していると考えられる。さらに、嗅細胞の微細形態と嗅覚受容体との遺伝子発現の関係はカメと他の脊椎動物との間で保存されていないと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

嗅覚受容体にはGai2と共役する1型鋤鼻受容体(V1R)やGαoと共役する2型鋤鼻受容体(V2R)を含む鋤鼻受容体、Gαolfと共役する匂い受容体(OR)等が存在する。哺乳類では嗅上皮の線毛性嗅細胞がORを発現し、鋤鼻器の微絨毛性嗅細胞がV1Rや

V2R を発現する。カメの嗅覚器は鼻腔の背側に位置する上憩室上皮と腹側に位置する下憩室上皮で構成される。上憩室上皮に分布する嗅細胞は樹状突起の先端に線毛と微絨毛をもち、下憩室上皮に分布する嗅細胞は微絨毛だけをもつ。嗅細胞の微細形態に基づくと、上憩室上皮に分布する嗅細胞は OR と鋤鼻受容体の両方を発現し、下憩室上皮に分布する嗅細胞は鋤鼻受容体だけを発現すると予想される。しかし、免疫組織化学的解析では、 $G\alpha_{olf}$ と $G\alpha_o$ の発現が上憩室上皮と下憩室上皮の両方で示され、さらに、 $G\alpha_{il-3}$ の発現が下憩室上皮で示されている。これらの知見は上憩室上皮で OR と V2R、下憩室上皮で OR と V1R および V2R の発現を示唆する。カメの下憩室上皮における嗅細胞の微細形態と G タンパクから予想される嗅覚受容体発現との矛盾を解消するため、本研究ではカメ嗅覚器における鋤鼻受容体遺伝子の発現を解析した。カメにおいて、鋤鼻受容体は2つの V2R 遺伝子 (V2R1, V2R26) と2つの V1R 遺伝子 (V1R3, V1RA14) によってコードされる。アカミミガメ嗅覚器では主に下憩室上皮に分布する少数の嗅細胞が V2R を発現していた。さらに、スッポン嗅覚器では微絨毛性嗅細胞が見つからないにも関わらず、下憩室上皮に分布する少数の嗅細胞が V2R26 を発現していた。一方、V2R1 発現細胞は上憩室上皮と下憩室上皮のどちらにも検出されなかった。また、アカミミガメ嗅覚器では上憩室上皮と下憩室上皮で V1R3 が発現していたが、V1RA14 の発現は認められなかった。一方、スッポンは V1R3 遺伝子を欠き、さらに、スッポン嗅覚器で V1RA14 の発現は認められなかった。鋤鼻受容体のシグナル伝達に関わるイオンチャネル TRPC2 の発現は少数の嗅細胞で鋤鼻受容体遺伝子が発現していることを示唆し、一方、OR のシグナル伝達に関わるイオンチャネル CNGA2 の発現はカメ嗅覚器における OR の発現を示唆した。従って、カメの嗅覚受容は鋤鼻受容体よりも OR に依存し、嗅細胞の微細形態と嗅覚受容体遺伝子発現との関係はカメと他の脊椎動物との間で保存されていないと考えられる。以上の結論はカメを始めとする爬虫類と他の脊椎動物の嗅覚機能の違いを解明する貴重な手掛かりとなり、今後の嗅覚研究の基礎となる有用な知見である。

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価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Distribution of cells expressing vomeronasal receptors
In the olfactory organ of turtles
著 者 名 : Abdali, S.S, Nakamuta, S. Yamamoto, Y. and Nakamuta, N.
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 : Number of olfactory receptor neurons in the Chinese soft-shelled turtle
著 者 名 : Abdali, S.S, Kurasawa, K., Nakamuta, S. Yamamoto, Y. and Nakamuta, N.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年 : 79 (9) : 1569-1572, 2017