

令和元年6月21日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08069

研究課題名(和文) カメにおける嗅覚受容体遺伝子の発現解析：脊椎動物の新しい嗅覚研究モデルの開発

研究課題名(英文) Expression analysis for the olfactory receptor genes in turtles

研究代表者

中牟田 信明 (Nakamuta, Nobuaki)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：00305822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚受容体の主なものには、匂い受容体(OR)と1型鋤鼻受容体(V1R)および2型鋤鼻受容体(V2R)がある。哺乳類の嗅覚器では嗅上皮の線毛性嗅細胞にOR、鋤鼻器の微絨毛性嗅細胞にV1RやV2Rが発現している。本研究ではカメの嗅覚器における嗅覚受容体遺伝子の発現解析によって、カメの嗅覚器でV1RやV2Rは一般に微絨毛性嗅細胞が分布する下憩室上皮だけでなく、線毛性嗅細胞が分布する上憩室上皮にも発現していることが示された。さらに、V1RやV2Rを発現しているのはごく少数の細胞で、ほとんどの嗅細胞は線毛性嗅細胞も微絨毛性嗅細胞もORを発現していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の嗅覚器でORが嗅上皮に、V1RやV2Rが鋤鼻器に発現しているのと異なり、カメの嗅覚器でORは上憩室上皮(嗅上皮)と下憩室上皮(鋤鼻器)の両方に発現していることが本研究で明らかになった。さらに、カメの嗅覚器においてクラスI OR(魚型OR)は下憩室上皮、クラスII OR(哺乳類型OR)は上憩室上皮に発現しており、上憩室上皮は空气中、下憩室上皮は水中で機能する嗅覚器であることが裏付けられた。また、本研究では生息環境の異なるカメの嗅覚器を比較することによって、それらの多様性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：Olfactory receptor neurons (ORNs) express several types of olfactory receptors including odorant receptors (ORs), type 1 vomeronasal receptors (V1Rs) and type 2 vomeronasal receptors (V2Rs). In the olfactory organ of mammals, ORs are expressed by ciliated ORNs in the olfactory epithelium, whereas V1Rs and V2Rs are expressed by microvillous ORNs in the vomeronasal organ. In the present study, expression analysis for the genes encoding olfactory receptors in the olfactory organ of turtle demonstrated that V1Rs and V2Rs are expressed in the upper chamber epithelium which contains ciliated ORNs, in addition to the lower chamber epithelium which contains microvillous ORNs. Furthermore, it has been shown that V1Rs and V2Rs are expressed by limited number of ORNs. Most ORNs, on the other hand, express ORs regardless of whether they are ciliated or microvillous.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：嗅覚器 嗅上皮 鋤鼻器 嗅細胞 匂い受容体 鋤鼻受容体 爬虫類 感覚器

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む哺乳類の鼻は嗅覚器と呼吸器を兼ねているが、魚の鼻は呼吸とは無関係で嗅覚器としてのみ機能する。脊椎動物が進化する過程で鼻が空気の通り道になったことにより、それまで水中の匂いを嗅いでいた嗅覚器は空気中の匂いを嗅ぐように変化した。さまざまな半水生動物の中には、水中で匂いを嗅ぐ嗅覚器と陸上で匂いを嗅ぐ嗅覚器の両方を備えたものがある。カメの嗅覚器は上憩室上皮と下憩室上皮からなり、上憩室上皮は空気中、下憩室上皮は水中の匂いを嗅ぐ嗅覚器と考えられている。

嗅細胞に発現し、匂いの元になる化学物質と結合して嗅細胞を興奮させる受容体を嗅覚受容体と呼ぶ。嗅覚受容体の主なものには、匂い受容体 (OR) と 1 型鋤鼻受容体 (V1R) および 2 型鋤鼻受容体 (V2R) があり、哺乳類の嗅覚器では OR が嗅上皮に、V1R および V2R が鋤鼻器に発現している。OR はさらにアミノ酸配列に基づいてクラス I OR (魚型 OR) とクラス II OR (哺乳類型 OR) とに分類される。ツメガエルの嗅覚器においてクラス I OR は水中の匂いを嗅ぐ中憩室上皮、クラス II OR は空気中の匂いを嗅ぐ嗅上皮に発現していることから、クラス I OR は水溶性、クラス II OR は揮発性の匂い物質を受容すると考えられている。

嗅覚受容の基礎となる分子メカニズムが種を超えて良く保存されている一方、嗅覚器に発現する嗅覚受容体遺伝子の数や種類は動物によって著しく異なる。嗅覚の研究には哺乳類とくに齧歯類が多くの場合に用いられている。しかし、脊椎動物が陸上に進出後、生息域の拡大に伴って様々な変化を遂げてきた嗅覚器の進化を理解するには、哺乳類以外の脊椎動物で嗅覚研究のモデル動物を確立することが重要である。

2. 研究の目的

本研究はカメの嗅覚に関する解剖学的・生理学的・行動学的研究で蓄積されてきた知見に、嗅覚受容体遺伝子の発現解析に基づく新たな知見を追加することを目的とした。

カメの嗅覚器は上憩室上皮と下憩室上皮に分かれており、両者は鼻腔の内側壁と外側壁の隆起を覆う非感覚上皮で隔てられている。上憩室上皮が鼻腔の背側部、下憩室上皮が腹側部に位置していることや、上憩室上皮には付属腺が存在し、下憩室上皮は付属腺を欠くことから、上憩室上皮は空気中、下憩室上皮は水中の匂いを嗅ぐ嗅覚器と考えられている。匂いの元となる物質が受容体に結合するには、付属腺の分泌物などの液体に溶けなければならないが、液体に囲まれた水中では付属腺が不要だからである。

上憩室上皮が空気中、下憩室上皮が水中の嗅覚器であることは、各上皮に含まれる嗅細胞数が生息環境の違うカメによって異なることから示唆されている。すなわち、半水生のカメでは上憩室上皮と下憩室上皮が同程度の大きさであり、ほぼ同数の嗅細胞を含んでいるが、陸生のカメでは下憩室上皮が小さい。

カメの嗅覚器における嗅覚受容体発現については、これまでシグナル伝達に関わる分子の発現から推測されているだけで、具体的なことが全く分かっていなかった。そこで本研究ではカメの嗅覚器における嗅覚受容体すなわち OR、V1R、V2R を発現した細胞の局在を明らかにし、カメ嗅覚器の特徴付けを試みた。

3. 研究の方法

RT-PCR と *in situ* ハイブリダイゼーションによって、カメの嗅覚器における嗅覚受容体遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 本研究ではまず、RT-PCR と *in situ* ハイブリダイゼーションによって、スッポン *Pelodiscus sinensis* の嗅覚器における嗅覚受容体遺伝子の発現解析を行った。スッポンのゲノムに存在する 1000 種類以上の嗅覚受容体遺伝子の中から、クラス I OR を 20、クラス II OR を 20、合計 40 の遺伝子を選んで嗅覚器における mRNA 発現を調べた。

上憩室上皮を含む組織と下憩室上皮を含む組織に切り分けたスッポン嗅覚器から RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った結果、上憩室上皮と下憩室上皮の両方に OR は発現していることが示された。さらに、OR の発現は上憩室上皮と下憩室上皮とで異なっていることや、クラス I OR とクラス II OR とで、発現に違いがあることも明らかになった。

また、ジゴキシゲニン標識した cRNA プローブを作製し、パラホルムアルデヒド固定の凍結切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った結果、各嗅覚受容体遺伝子を発現した細胞のスッポン嗅覚器における分布が明らかになった。

一般に上憩室上皮は空気中、下憩室上皮は水中の匂いを受容する嗅覚器と見なされているが、水溶性のリガンドに対する親和性が高いクラス I OR (魚型 OR) の多くが、予想通りスッポン嗅覚器では下憩室上皮に発現していることを示す結果が本研究で得られた。一方、揮発性のリガンドと結合するクラス II OR (哺乳類型 OR) については、スッポン嗅覚器では上憩室上皮に多く発現するものもあれば、主に下憩室上皮で発現するものもあることが本研究によって示され、スッポンでは上憩室上皮だけでなく、下憩室上皮もまた空気中の匂いを嗅ぐ機能を備えていることが示唆された。

(2) 次に本研究ではミシシippアカミミガメ *Trachemys scripta elegans* の嗅覚器における

嗅覚受容体遺伝子の発現を解析した。嗅覚受容体のうち OR はクラス I OR とクラス II OR に分類されるが、RT-PCR 解析によって、アカミミガメの嗅覚器では上憩室上皮にクラス II OR、下憩室上皮にクラス I OR が発現していることを示す結果が得られた。

さらに、in situ ハイブリダイゼーション解析で各嗅覚受容体遺伝子を発現した細胞の分布を調べたところ、クラス I OR 発現細胞が下憩室上皮、クラス II OR 発現細胞が上憩室上皮で観察され、RT-PCR の結果が裏付けられた。スッポンの解析結果と比較することにより、嗅覚受容体遺伝子の発現に関する、アカミミガメとスッポンとの違いが明確になった。アカミミガメは半水生のカメだが、スッポンはほとんどの時間を水中で過ごす水生傾向の強いカメである。両者の嗅覚器における嗅覚受容体発現の違いは、このような生態の違いを反映していると考えられた。

(3) V2R は嗅覚受容体の1つで、マウスでは微絨毛性嗅細胞が分布する鋤鼻器に発現している。カメの嗅覚器は上憩室上皮と下憩室上皮からなり、一般に線毛性嗅細胞が分布する上憩室上皮は嗅上皮、微絨毛性嗅細胞が分布する下憩室上皮は鋤鼻器と呼ばれている。マウスの V2R が鋤鼻器で発現しているように、カメの V2R が下憩室上皮に発現するか確かめるため、カメの嗅覚器における V2R の発現部位を in situ ハイブリダイゼーション解析した。

実験に用いたミシシippアカミミガメでは V2R 遺伝子の塩基配列が知られていなかったため、アカミミガメと近縁なニシキガメ *Chrysemys picta* の塩基配列に基づいてプライマーを設計し、PCR クローニングを行った。得られたアカミミガメの2つの V2R 遺伝子、V2R1 と V2R26 について、ジゴキシゲニン標識プローブを作製し、in situ ハイブリダイゼーション解析を行ったところ、これらの V2R 遺伝子はアカミミガメの嗅覚器で少数の嗅細胞に発現していることが分かった。V2R1 発現細胞と V2R26 発現細胞の分布は異なり、V2R26 発現細胞は上憩室上皮と下憩室上皮の両方に分布し、上憩室上皮よりも下憩室上皮に多く分布していたが、V2R1 発現細胞は下憩室上皮にだけ分布していた。

予想外に少数の嗅細胞にしか V2R が発現していなかったことから、どこか別の所に V2R 発現細胞が集まった領域がないか、嗅覚器の吻側部から尾側部まで隈なく探したが、V2R 発現細胞は嗅覚器全体にほぼ均一に分布し、V2R 発現細胞が多く集まった領域は見つからなかった。また、V2R1 と V2R26 の他に V2R 遺伝子が存在する可能性を検討するため、V2R のシグナル伝達に関わる TRPC2 の発現を調べたが、TRPC2 発現細胞の分布は V2R 発現細胞の分布とほぼ一致し、おそらく V2R1 と V2R26 の他に V2R は存在しないことが示唆された。

次にスッポン嗅覚器における V2R 遺伝子の発現を調べたところ、アカミミガメの嗅覚器と同様の結果が得られた。スッポンの嗅覚器では上憩室上皮と下憩室上皮の両方に線毛性嗅細胞が分布し、嗅細胞の微細形態学的特徴に基づいて鋤鼻器が存在しないと言うこともできる。しかし、アカミミガメでもスッポンでも、下憩室上皮に分布する嗅細胞のうち V2R 発現細胞の占める割合は小さいが、V2R 発現細胞は主として下憩室上皮に分布していることから、いずれのカメにおいても下憩室上皮は非典型的な鋤鼻器と見なせることが分かった。

(4) 哺乳類では鋤鼻器に発現する V1R が両生類では嗅上皮に発現し、鋤鼻器には発現しない。両生類から哺乳類に至る進化の過程で V1R 発現部位の変化がいつの段階で生じたのか検討するため、本研究ではミシシippアカミミガメの嗅覚器における V1R の発現を解析し、V1R3 が嗅上皮に相当する上憩室上皮と鋤鼻器に相当する下憩室上皮の両方に発現していることを明らかにした。V1R はごく一部の嗅細胞にしか発現しておらず、嗅覚器の吻側部から尾側部まで隈なく探しても、V1R 発現細胞が特に高密度で分布する場所は見つからなかった。上憩室上皮と下憩室上皮とで、V1R 発現細胞の密度がほぼ同じ個体もあれば、どちらか一方で高い個体もあった。

アカミミガメで嗅覚器に発現することが示された V1R の相同遺伝子はスッポンのゲノムには見つかっていない。また、アカミミガメで嗅覚器に発現が認められない V1R は、スッポンでも嗅覚器から検出されなかった。従って、スッポン嗅覚器に V1R を介した嗅覚受容メカニズムは存在しないと言える。おそらく V1R を介して伝えられる嗅覚情報は、アカミミガメのような半水生カメの生存にとって不可欠だが、スッポンのように水生傾向の強いカメには必須でないのだろう。もしもこの推測が正しいとしたら、カメ V1R のリガンドは空気中の匂い、すなわち揮発性の物質と予想される。

先行研究では両生類から哺乳類に至る進化の過程で V1R の発現部位が嗅上皮から鋤鼻器へ移ったと考えられているが、両生類と哺乳類の共通祖先では嗅上皮と鋤鼻器の両方に V1R が発現しており、進化の過程で嗅上皮と鋤鼻器の機能分化が進むにつれて、一方の嗅覚器における V1R の発現が失われた結果、両生類では嗅上皮に、哺乳類では鋤鼻器に V1R が発現しているのかもしれない。この考えが正しいとすれば、嗅上皮と鋤鼻器の両方に V1R が発現しているカメは、両生類と爬虫類と哺乳類の共通祖先に存在した嗅覚器の特徴を保存した動物と言うことができる。

(5) 本研究ではまた、カメの嗅覚器が生息環境に応じた多様性を示すことを確かめるため、光学顕微鏡および電子顕微鏡写真を用いてスッポンの嗅神経に含まれる軸索数を求め、上憩室上皮と下憩室上皮に分布する嗅細胞数を推定した。先行研究で示されているように、クサガメやイシガメなど、半水生のカメでは上憩室上皮と下憩室上皮にほぼ同数の嗅細胞が含まれている

のと異なり、スッポンのように水中で過ごす時間の長いカメでは、下憩室上皮の方が上憩室上皮よりも多くの嗅細胞を含んでいることを示す結果が得られた。

さらに、上憩室上皮と下憩室上皮の機能分担について追及するため、完全水生のカメであるスッポンモドキ *Carettochelys insculpta* の嗅覚系について形態学的特徴を調べたところ、それが単一の嗅覚系で構成されていることが明らかになった。

カメの嗅覚器は一般に上憩室上皮と下憩室上皮からなり、両者は非感覚上皮の隆起によって隔てられている。しかし、スッポンモドキの鼻腔は全体が感覚上皮で裏打ちされ、非感覚上皮で被われた隆起が発達していない。また、他のカメでは上憩室上皮に存在する付属腺がスッポンモドキの嗅覚器には見つからない。スッポンモドキはスッポンモドキ科スッポンモドキ属に分類され、産卵時を除いて上陸することのない完全水生のカメである。スッポンモドキにおける嗅覚器の形態学的特徴は、このような生態を反映したものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Abdali, S. S., Kurasawa, K., Nakamuta, S., Yamamoto, Y. and Nakamuta, N.: Number of olfactory receptor neurons in the Chinese soft-shelled turtle. *J. Vet. Med. Sci.* 79 (2017) 1569-1572. 査読有 DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0326>

Nakamuta, N., Nakamuta, S., Kato, H. and Yamamoto, Y.: Morphological study on the olfactory systems of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Tissue Cell* 48 (2016) 145-151. 査読有 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.03.011>

〔学会発表〕(計8件)

中牟田信明. カメの鼻: 脊椎動物嗅覚器の比較解剖学. 第162回日本獣医学会学術集会 2019.

Abdali S.S., Nakamuta, S., Yamamoto, Y. and Nakamuta, N.: Localization of V1R-expressing olfactory receptor neurons in the olfactory organ of turtles. The 2nd Joint Meeting of Veterinary Science in East Asia. 2019.

Sayed Sharif Abdali, 中牟田祥子, 山本欣郎, 中牟田信明. カメの嗅覚器における2型鋤鼻受容体遺伝子の発現解析: カメ嗅覚器の下憩室上皮は非典型的な鋤鼻器である. 第161回日本獣医学会学術集会 2018.

Nakamuta, N., Nakamuta, S. and Yamamoto, Y.: Olfactory receptor expression in the olfactory organ of red-eared sliders. The 6th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2017.

Sayed Sharif Abdali, Shoko Nakamuta, Yoshio Yamamoto, Nobuaki Nakamuta: Developmental changes in the number of olfactory receptor neurons in soft-shelled turtle. 第160回日本獣医学会学術集会 2017.

中牟田信明, 中牟田祥子, 加藤英明, 山本欣郎. スッポンモドキの嗅覚系. 日本解剖学会 第63回東北・北海道連合支部学術集会 2017.

中牟田信明, 中牟田祥子, 山本欣郎. スッポン嗅覚器における嗅覚受容体遺伝子の発現解析. 第159回日本獣医学会学術集会 2016.

Nakamuta, S., Miyazaki, M., Yamamoto, Y. and Nakamuta, N.: Gene expression of odorant receptors in the olfactory organ of the Chinese soft-shelled turtle. 17th International Symposium on Olfaction and Taste. 2016.