

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08120

研究課題名(和文) カメ嗅覚系の発生機構：水中から陸上まで多様な生息環境への適応

研究課題名(英文) Development of the olfactory system in turtles

研究代表者

中牟田 祥子 (Nakamuta, Shoko)

岩手医科大学・歯学部・技術員

研究者番号：70724532

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)：一般にカメ嗅覚器は空気中のにおいを受容する上憩室上皮と、水中のにおいを受容する下憩室上皮からなり、それらの大きさの比率は生息環境によって異なる。本研究では、カメ胚嗅覚器において Bcl11bは上憩室上皮に、Fezf2は下憩室上皮に、Fezf1は両上皮に発現することを見出し、水生、陸生、半水生のカメの間でそれらの遺伝子発現を比較した。生息環境による両上皮の大きさの比率の違いは胚発生初期から生じていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物は進化の過程で水中から陸上へと生息環境を変えるのに伴い、その嗅覚系は水のにおいを受容するものから、空気中のにおいを受容するためのものへと変化した。本研究で水生・陸生・半水生カメの嗅覚系の発生過程を比較することにより、生息環境に応じた嗅覚系の多様性が生じるメカニズムの一端が明らかになった。この結果は脊椎動物における嗅覚系の進化を解明する手掛かりになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In general, turtle olfactory organs consist of the upper chamber epithelium (UCE) detecting air-borne odorants and lower chamber epithelium (LCE) detecting water-borne odorants. The size ratio between them varies depending on their habitats. In this study, we found expression of Bcl11b in the UCE, Fezf2 in the LCE, and Fezf1 in both epithelia in the olfactory organ of turtle embryos, and compared their gene expression among aquatic, terrestrial and semi-aquatic turtles. It has been shown that difference in the size ratio of both epithelia depending on the habitats occurred from the early stage of embryonic development.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：発生・分化 嗅覚系 カメ 爬虫類 in situ ハイブリダイゼーション 嗅上皮 鋤鼻器 嗅覚器

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの哺乳類は嗅上皮と鋤鼻器という 2 つの互いに独立した嗅覚器を持つ。嗅上皮には匂い受容体(OR)を発現する線毛性嗅細胞、鋤鼻器には鋤鼻受容体を発現する微絨毛性嗅細胞が集合し、各々主嗅球と副嗅球へ軸索を投射する。げっ歯類胚嗅覚器においては、嗅覚器の発生・発達に関わるいくつかの転写因子が同定されている。B-cell lymphoma/leukemia 11B (Bcl11b)は細胞の運命決定に関わる転写因子であり、哺乳類胚の嗅上皮や鋤鼻器に発現すること[引用文献①]や、鋤鼻受容体の発現制御に関わること[引用文献②]が知られている。げっ歯類胚嗅覚器において嗅上皮は Fez family zinc finger (Fezf1) 鋤鼻器は Fezf2 をそれぞれ発現し、Fezf1 は嗅上皮に含まれる嗅細胞の正常な発達に、Fezf2 は鋤鼻器の正常な発達に、それぞれ不可欠であることが示されている[引用文献③]。

一方、カメ嗅覚器は上憩室上皮と下憩室上皮からなり、ほとんどの場合上憩室上皮には線毛性嗅細胞、下憩室上皮には微絨毛性嗅細胞が集合し、各上皮から出た軸索は嗅球の腹側部と背側部へと分かれて投射することから、前者は嗅上皮、後者は鋤鼻器に相当するとみなされてきた。しかし哺乳類の場合と異なり、両上皮ともにほぼすべての嗅細胞は OR を発現する。また、スッポンは例外的に上憩室上皮と下憩室上皮のいずれも線毛性嗅細胞を含む[引用文献④]。

カメは種によって水生、陸生、半水生と生息環境が多様である。上憩室上皮は空気中の匂い、下憩室上皮は水中のにおいを受容すると考えられており、上憩室上皮と下憩室上皮の大きさの比率はカメの生息環境によって異なる。水生傾向が強い種ほど下憩室上皮が大きく、陸生傾向が強い種ほど上憩室上皮が大きい傾向にある。完全水生であるスッポンモドキの嗅覚器は形態的に上憩室上皮と下憩室上皮の区別がつかない単一の感覚上皮からなる。

発生については、上憩室上皮は鼻窩背側壁、下憩室上皮は鼻窩腹内側壁に由来するが、哺乳類の場合と異なり、嗅覚系の発生過程について分子レベルでの解析がほとんどなされていない。従って、哺乳類で報告されている嗅覚器の発生に関わる遺伝子の発現パターンは未解明なままである。

2. 研究の目的

カメ嗅覚系の発生機序を分子レベルで解析し、哺乳類やカメ同士の比較を通して、生息環境に応じた嗅覚系の多様性が生じるメカニズムを明らかにすることを目的とする。

(1) カメ胚嗅覚系の発生プログラム

カメ胚において嗅覚系の形態や機能を決定する分子基盤を明らかにする。

(2) カメ嗅覚系の多様性を生むメカニズム

水生、陸生、半水生のカメにおいて嗅覚系の多様性を生じるメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) カメ胚嗅覚系の発生プログラム

様々な発生ステージのカメ胚嗅覚器についてニューロンマーカー等の抗体を用いた免疫組織化学的検索を行い、上憩室上皮および下憩室上皮の発生機序を形態学的に明らかにする。

哺乳類において嗅覚器の発生に関わることが知られている転写因子、Bcl11b, Fezf1, Fezf2 について、全ゲノム情報が公開されている半水生カメであるスッポンの胚嗅覚器におけるそれらの遺伝子発現を解析する。具体的には、スッポンゲノム情報を元に設計したプライマーを用いて、スッポン嗅覚器由来 RNA から RT-PCR で上記遺伝子の部分配列をクローニングし、さらに DIG 標識アンチセンスプローブを作製する。Bcl11b, Fezf1, Fezf2 の in situ hybridization を行う。

(2) カメ嗅覚系の多様性を生むメカニズム

水生(スッポンモドキ)、陸生(ケヅメリクガメ、ヒョウモンガメ)、半水生(アカミミガメ)について、(1)と同様に胚嗅覚器における Bcl11b, Fezf1, Fezf2 の発現を解析し、カメ間で比較する。これらのカメのゲノム情報は不明なので、公開されているスッポン、ニシキガメ、アオウミガメのゲノム情報を元に設計したプライマーを用いた RT-PCR により当該遺伝子の部分配列をクローニングし、塩基配列を決定する。クローニングで得られた cDNA を鋳型とした DIG 標識アンチセンスプローブを作製し in situ hybridization に用いる。

4. 研究成果

(1) カメ嗅覚器の発生機序 (免疫組織化学的検索)

下憩室上皮の微細形態が互いに異なる 2 種のカメ (スッポンとクサガメ) の胚嗅覚器について、ニューロンマーカーを用いた免疫組織化学的解析を行い、上憩室上皮および下憩室上皮の発生起源および発生機序はそれらのカメの間で共通していることを明らかにした。

(2) Fezf1 発現 (カメと哺乳類の相違点)

調べたカメすべてに共通して、Fezf1 は胚嗅覚器の上憩室上皮と下憩室上皮の両方においてほぼすべての嗅細胞に発現していた。この結果は哺乳類胚嗅覚器において Fezf1 が主に嗅上皮に

発現するのと異なる。哺乳類嗅上皮の発生において Fezf1 が果たす役割が、カメでは上憩室上皮と下憩室上皮両方の発生において重要であることが示唆される。Fezf1 ノックアウトマウスの胚の嗅上皮では嗅細胞マーカー (OR など) の発現が減弱し、鋤鼻マーカー (鋤鼻受容体など) の発現が亢進する[引用文献③]ことから、「Fezf1 は嗅上皮における嗅細胞の正常な発達に不可欠な転写因子」と考えられている。カメと哺乳類間の Fezf1 発現パターンの相違は、哺乳類では嗅上皮だけに OR が発現するのに対し、カメでは上憩室上皮と下憩室上皮の両方に OR を発現することと関係があるのかもしれない。

(3) Fezf2 発現 (下憩室上皮マーカー)

スッポン、アカミミガメ、ケヅメリクガメ、ヒョウモンガメにおいて、Fezf2 は胚嗅覚器において下憩室上皮特異的に発現していた。これは哺乳類胚嗅覚器において Fezf2 が鋤鼻器特異的に発現する[引用文献③]のと共通する。哺乳類の鋤鼻器の発生において Fezf2 が果たす役割が、カメの下憩室上皮の発生においても重要であることが示唆される。哺乳類の鋤鼻器には鋤鼻受容体が発現し、カメの下憩室上皮には OR が発現するという違いがあるが、いずれも Fezf2 を発現することから、Fezf2 は嗅覚受容体の発現には無関係であることがわかった。Fezf2 の発現によって、カメの下憩室上皮が哺乳類の鋤鼻器に相当することが裏付けられた。

さらに、カメと近縁で鋤鼻器を欠き嗅上皮だけをもつ鳥類 (ニワトリ) の胚嗅覚器には Fezf2 の発現が見られないことを明らかにした。この結果は、鋤鼻器のない動物の嗅覚器の発生に Fezf2 は必要でないことを示唆する。

(4) Bcl11b 発現 (上憩室上皮マーカー)

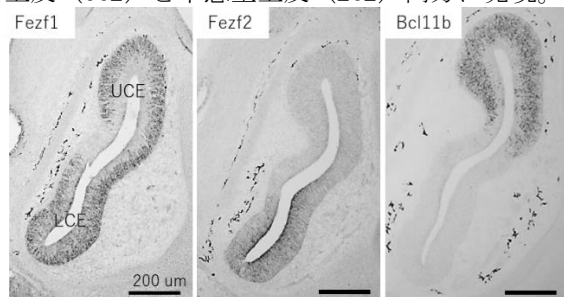
スッポン、アカミミガメ、ケヅメリクガメ、ヒョウモンガメの胚および成体嗅覚器において、Bcl11b は上憩室上皮のほぼすべての嗅細胞に発現し、下憩室上皮に発現はほとんど見られなかった。OR には class I と II の 2 種類があり、class I OR は水中の匂い、class II OR は空気中の匂いを受容する。哺乳類の嗅上皮において Bcl11b は class I OR の発現を抑制することにより class II OR を発現させることが報告されている[引用文献⑤]。スッポンおよびアカミミガメ成体嗅覚器において、上憩室上皮には主に class II OR、下憩室上皮には主に class I OR を発現する。これらのことは、哺乳類同様、カメ嗅覚器において Bcl11b は class I OR の発現を抑制する働きを持つことを示唆する。

(5) カメ間の多様性

完全水生のスッポンモドキ嗅覚器は形態的に上憩室上皮と下憩室上皮に区別できないが、スッポンモドキ胚嗅覚器について Bcl11b と Fezf2 の発現を調べたところ、鼻窩背内側壁が Bcl11b 陽性 Fezf2 陰性、それ以外の部分は Bcl11b 陰性 Fezf2 陽性であったことから、背内側壁が上憩室上皮に相当し、それ以外の部分が下憩室上皮に相当することが示唆された。また、Bcl11b は胚だけでなく成体のカメの上憩室上皮においても *in situ hybridization* による発現が確認できるが、成体スッポンモドキ嗅覚器の鼻腔尾側部背内側壁に Bcl11b 発現部位が認められた。このようにカメの種類によっては、遺伝子発現によって上憩室上皮と下憩室上皮を区別可能であっても、形態的には両者を区別できない場合もあることが分かった。

半水生 (スッポン、アカミミガメ) と陸生 (ケヅメリクガメ、ヒョウモンガメ) の胚嗅覚器について、Bcl11b と Fezf2 の発現を比較したところ、下憩室上皮予定域 (Fezf2 発現) に対する上憩室上皮予定域 (Bcl11b 発現) の大きさの比率について、発生初期 (ステージ 14-15) ですでに陸生ガメでは半水生ガメよりも大きいという傾向が認められ、発生が進むに従いその傾向はさらに強くなった。陸生ガメでは上憩室上皮が大きく、半水生ガメでは下憩室上皮が大きくという傾向は以前から報告されているが、この傾向は、嗅覚器の発生において上憩室および下憩室上皮予定域が作られ始めた時期ですでに生じていることが示唆された。

図 スッポン胚 (ステージ 18-19) 嗅覚器における Fezf1, Fezf2, Bcl11b 発現。Fezf1 は上憩室上皮 (UCE) と下憩室上皮 (LCE) 両方に発現。Fezf2 は LCE, Bcl11b は UCE に発現。



<引用文献>

①Leid M, Ishmael JE, Avram D, Shepherd D, Fraulob V, Dollé P. (2004) CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns*. 4, 733-

- ②Enomoto T, Ohmoto M, Iwata T, Uno A, Saitou M, Yamaguchi T, Kominami R, Matsumoto I, Hirota J. (2011) Bcl11b/Ctip2 controls the differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice. *J Neurosci.* 31, 10159-10173.
- ③Eckler MJ, McKenna WL, Taghvaei S, McConnell SK, Chen B. (2011) Fezf1 and Fezf2 are required for olfactory development and sensory neuron identity. *J Comp Neurol.* 519, 1829-1846.
- ④ Nakamuta S, Yokosuka M, Taniguchi K, Yamamoto Y, Nakamuta N. (2016) Immunohistochemical analysis for G protein in the olfactory organs of soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *J Vet Med Sci.* 78, 245 - 250.
- ⑤Enomoto T, Nishida H, Iwata T, Fujita A, Nakayama K, Kashiwagi T, Hatanaka Y, Kondo H, Kajitani R, Itoh T, Ohmoto M, Matsumoto I, Hirota J. (2019) Bcl11b controls odorant receptor class choice in mice. *Commun Biol.* 2, 296.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamuta S, Kusuda S, Yokosuka M, Taniguchi K, Yamamoto Y, Nakamuta N.	4. 巻 120
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of the development of olfactory organs in two species of turtles <i>Pelodiscus sinensis</i> and <i>Mauremys reevesii</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 806-813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.acthis.2018.09.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中牟田祥子、加藤英明、野田英樹、谷口和美、横須賀誠、山本欣郎、中牟田信明
2. 発表標題 カメ胚嗅覚器における転写因子Fezf2の発現
3. 学会等名 第161回日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中牟田祥子、加藤英明、谷口和美、横須賀誠、山本欣郎、中牟田信明
2. 発表標題 カメの嗅覚器における転写因子Bcl11bの発現解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamuta, S., Araki, I., Yamamoto, Y. and Nakamuta N.
2. 発表標題 Analysis of the Fezf1 and Fezf2 expression in the olfactory organ of chick embryos.
3. 学会等名 The 6th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中牟田祥子、加藤英明、野田英樹、谷口和美、横須賀誠、山本欣郎、中牟田信明
2. 発表標題 カメ脳嗅覚器における転写因子Fezf1の発現：カメの下憩室上皮は鋤鼻器か嗅上皮か
3. 学会等名 第160回日本獣医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中牟田祥子、加藤英明、谷口和美、横須賀誠、山本欣郎、中牟田信明
2. 発表標題 スポンモドキ嗅覚器の構造 Bcl11bとFezf2遺伝子発現解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shoko NAKAMUTA, Hideki NODA, Makoto YOKOSUKA, Kazumi TANIGUCHI, Yoshio YAMAMOTO, Nobuaki NAKAMUTA
2. 発表標題 Immunohistochemical and gene expression analyses in the olfactory organ of embryonic and neonatal African spurred tortoise
3. 学会等名 The 7th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中牟田祥子、中牟田信明
2. 発表標題 主嗅覚系と鋤鼻系
3. 学会等名 第125回日本解剖学会 (誌上開催) 企画シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷口 和美 (Taniguchi Kazumi) (00171843)	北里大学・獣医学部・准教授 (32607)	
研究分担者	横須賀 誠 (Yokosuka Makoto) (90280776)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授 (32669)	
研究分担者	中牟田 信明 (Nakamuta Nobuaki) (00305822)	岩手大学・農学部・准教授 (11201)	