

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580329

研究課題名（和文） 個体発生においてフェロモン受容系の分化を司る分子制御機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanisms controlling the differentiation of the vomeronasal system during ontogeny

研究代表者

谷口 和之（TANIGUCHI KAZUYUKI）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：70148089

研究成果の概要（和文）：鋤鼻器は脊椎動物に見られる嗅覚受容器の一つであり、フェロモン受容系を構成するが、本研究では個体発生過程で鋤鼻器の分化発達を制御する分子機構について解析した。遺伝子発現の変化をDNAマイクロアレイによって、遺伝子発現細胞の局在をin situ ハイブリダイゼーションや免疫組織化学によって明らかにし、一般嗅覚系を構成する嗅上皮とフェロモン受容系を構成する鋤鼻器の機能的分担に関する有意義な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：The vomeronasal organ (VNO) is one of the olfactory organs in vertebrates and constituting the pheromone detecting system. In this study, we analyzed the molecular mechanisms controlling the differentiation and development of the VNO during ontogeny. We revealed the change of the gene expression by DNA microarray analysis, and the localization of cells expressing the genes by in situ hybridization and immunohistochemistry. We obtained useful findings about the functional division between the olfactory epithelium, constituting the general olfactory system, and the VNO, constituting the pheromone detecting system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：鋤鼻器

1. 研究開始当初の背景

(1) 嗅覚は一般嗅覚系とフェロモン受容系に大きく分かれ、一般嗅覚系では日常接する種々の匂い物質を知覚し、フェロモン受容系では種特異的に有効な種々の機能を発揮する物質（フェロモン）を知覚する。このうちフェロモン受容系の受容器の主体をなす鋤

鼻器を実験的に破壊すると、様々な行動的变化を起こすことが知られている。通常はマウスと同居してもマウスを殺さないノン・キラー・ラットから鋤鼻器を除去すると、このラットがキラー・ラットとなってマウスを殺すようになり、また本来のキラー・ラットから鋤鼻器を除去すると、このラットがノン・キ

ラー・ラットとなつてマウスを殺さないようになるのは、その一例である (Halpern, 1987, Ann Rev Neurosci)。一方、一般嗅覚系が障害を受けると味覚の精度が減退することは、風邪を引いて鼻が詰まると食物の味がよくわからなくなることから明らかである。このように、一般嗅覚系とフェロモン受容系との間には機能的分担が存在することは確かであるが、両者は機能的に完全に異なるのではなく、共通の機能を示す場合も多いことが知られている。このことは、各種の匂い物質に一般嗅覚系とフェロモン受容系の両者が反応するという電気生理学的データによって裏付けられている (Touhara et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA)。このような2系統の嗅覚系の相違と類似については、発生学的に両者が共通の原基に由来することによって説明出来るであろう。

(2) 嗅覚受容器の発生は、頭部外胚葉の一部が内部に向かって陥凹して原始鼻腔を形成し、これが原始嗅上皮に内張りされることに始まる。ついで、鼻腔内側壁を覆っている原始嗅上皮の一部が鼻中隔の基部内側へ陥凹し、鋤鼻器の原基が形成される。鋤鼻器は最終的に鼻中隔基部に埋め込まれた管状構造となり、その管腔の内側壁は嗅上皮に類似した感覚上皮、管腔外側壁は非感覚性の多列線毛上皮である呼吸上皮によって被われるようになる (Taniguchi et al., 1982, Nippon Juigaku Zasshi)。一方、原始鼻腔内側壁を覆っていた原始嗅上皮は、鼻中隔腹側部の付近で次第に非感覚性となり、最も腹側にある上皮はそのまま感覚性を保つので、原始嗅上皮は非感覚性の呼吸上皮によって、背側の嗅上皮と鼻中隔腹側部のマセラ器に分断される (Oikawa et al., 2001, J Vet Med Sci)。このような3種類の嗅覚受容器の発生については研究代表者らが免疫組織化学、電子顕微鏡などの手法によって明らかにしてきた (Taniguchi et al., 2008, J Vet Med Sci)。しかし、共通の原始嗅上皮が如何なる分子制御機構のもとで3種類の嗅覚受容器へと分化するのか、特にフェロモン受容系の嗅覚受容器については今のところ全く分かっておらず、今後の重要な課題となっている。そこで、原始嗅上皮から鋤鼻器への分化に焦点を絞り、DNA マイクロアレイ法による関連遺伝子の網羅的な検索、リアルタイム RT-PCR による発現量の解析、鋤鼻器分化の培養モデル系を用いた遺伝子機能の解析を行い、鋤鼻器分化の制御機構に関わる分子的基盤を明らかにする本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

鋤鼻器の分化過程において発生運命を決定する遺伝子と分子制御機構を解明するた

め、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析と、リアルタイム RT-PCR による候補遺伝子の絞込み、および培養鋤鼻モデルを用いた特定遺伝子の機能解析を行う。

(1) 鋤鼻器が原始嗅上皮から分化する際に変動する mRNA を網羅的に検索し、鋤鼻器の分化に関わる遺伝子群を同定する (DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析)。

(2) マイクロアレイで選ばれた候補遺伝子の中から鋤鼻器の分化にとって特に重要な遺伝子を決定するため、鋤鼻器が分化する前後で胎子組織における発現量がどれだけ変化するかをリアルタイム RT-PCR で解析する (リアルタイム RT-PCR による候補遺伝子の絞込み)。このようにして選ばれた最終候補遺伝子について、鋤鼻器予定域での発現細胞を特定するため、胎子頭部組織における *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学を行う。

(3) ラット胎子から鋤鼻器予定域を切り出し培養した鋤鼻器分化のモデル実験系を用いて、最終候補遺伝子のノックダウン細胞の表現型を観察し、インタクトな細胞と比較することによって、鋤鼻器の分化を制御する遺伝子とその作用機序を明らかにする (培養鋤鼻モデルを用いた遺伝子産物の機能解析)。

3. 研究の方法

初年度には鋤鼻器が原始嗅上皮から分化する際に変動する遺伝子発現を DNA マイクロアレイによって解析し、鋤鼻器の分化に関与することが示唆された遺伝子についてはリアルタイム RT-PCR で胎子組織における発現量の変化を調べた。並行して、培養鋤鼻モデルを用いた遺伝子機能解析のため、任意の遺伝子ノックダウン細胞を用いた予備実験を行い、生化学的・形態学的評価基準の明確化を試みた。次年度以降は、鋤鼻器の発生運命を決定する候補遺伝子について、胎子組織の鋤鼻器予定域における発現細胞を *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学によって確認した。

当初計画していた最終候補遺伝子のノックダウン細胞作製と培養鋤鼻モデルを用いた解析は、2011年3月に発生した大地震と、その後も頻発する余震の影響で実施が困難であったため計画が大幅に遅れる結果となった。さらに、研究分担者の1名が2012年5月に死亡したため、リアルタイム RT-PCR による候補遺伝子の絞込みは研究代表者が引き続き行うこととし、最終的に本研究は鋤鼻器における遺伝子発現の解析と、原始的鋤鼻器の形態学的解析や組織化学的解析が中心となった。

4. 研究成果

(1) アクアポリンは水の輸送に関わる膜内在性のタンパク質であるが、4種類の嗅覚器におけるアクアポリンの発現をラットで比較したところ、鋤鼻器においてのみ他の嗅覚器と異なることが免疫組織化学によって示された(2012年、第153回日本獣医学会学術集会にてポスター発表)。

さらに、ヒツジの鋤鼻器において感覚上皮の基底細胞にアクアポリン3が発現していることにヒントを得て、ラットの鋤鼻器におけるアクアポリン3の発現を細胞増殖マーカーのBrdU陽性細胞と比較したところ、鋤鼻感覚細胞の前駆細胞にアクアポリン3が発現していることを示唆する結果を得た(2012年、The 4th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomistsにてポスター発表)。鋤鼻感覚細胞の分化に関わるMash1、Ngn1、NeuroD、Meis2、Tcfap2e等とアクアポリン3との関係を明らかにすることは今後の課題である。

(2) 魚類の嗅覚器は一般に付属腺を欠くが、肺魚の原始的鋤鼻器には付属腺が存在することに着目し、原始的鋤鼻器と嗅上皮との違いを検索した。透過型電子顕微鏡による観察で、細胞質に充満した高電子密度の顆粒が認められ、付属腺は主にタンパク質を分泌すること、レクチン組織化学によって、感覚上皮に含まれる支持細胞とは異なる性状の糖タンパク質が付属腺では産生されている事などが明らかになった(Nakamuta et al., 2013, J. Vet. Med. Sci.; Nakamuta et al., 2013 J. Anat.; Nakamuta et al., 2012, Anat. Rec.; 2012年、AChemS XXXIV Annual Meetingにてポスター発表)。

付属腺を特異的に標識する数種類のレクチンによってレクチンプロット解析を行い、幾つかのバンドが検出されているが、おそらく原始的鋤鼻器の機能にとって重要な働きを持つと予想されるため、これらのタンパク質を精製し同定することが急がれる。

(3) 一般嗅覚系とフェロモン受容系を構成する嗅上皮と鋤鼻器との間の機能的分担が、嗅覚受容体と共役するGタンパク質の α サブユニットに対する抗体を用いて免疫組織化学的に可視化できることを確かめ(2010年、日本味と匂学会第44回大会にてポスター発表)、個体発生の過程でそれらが変化する様子を観察した(2010年、日本解剖学会第56回東北・北海道連合支部学術集会にて口頭発表; Nakamuta et al., 2011, Cell Tissue Res.)。

さらに、細胞死や細胞増殖の分子マーカー発現についても解析したが(2013年、第155

回日本獣医学会学術集会にてポスター発表)、Gタンパク質 α サブユニット発現との比較は、今後の課題として残った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- ① Nakamuta, N., Nakamuta, S., Taniguchi, K. and Taniguchi, K.: Analysis of glycoproteins produced by the associated gland in the olfactory organ of lungfish. J. Vet. Med. Sci. 75 (2013) 887-893. DOI: 10.1292/jvms.12-0547 (査読有)
- ② Nakamuta, S., Nakamuta, N., Taniguchi, K. and Taniguchi, K.: Localization of the primordial vomeronasal organ and its relationship to the associated gland in lungfish. J. Anat. 222 (2013) 481-485. DOI: 10.1111/joa.12025 (査読有)
- ③ Nakamuta, S., Nakamuta, N., Taniguchi, K. and Taniguchi, K.: Histological and ultrastructural characteristics of the primordial vomeronasal organ in lungfish. Anat. Rec. 295 (2012) 481-491. DOI: 10.1002/ar.22415 (査読有)

[学会発表] (計12件)

- ① Expression of aquaporin 3 in the progenitor cells of vomeronasal receptor cells. The 4th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. Phuket Graceland Resort & Spa, Thailand. 25 October, 2012. Nakamuta, N., Kashiwara, A., Okita, T., Shimizu, M. and Taniguchi, K.
- ② Morphological study on the glandular epithelium associated with the primordial vomeronasal organ in the lungfish. AChemS XXXIV Annual Meeting. Hyatt Huntington Beach, CA, U.S.A. 26 April, 2012. Nakamuta, S., Nakamuta, N., Taniguchi, K. and Taniguchi, K.
- ③ ラットの嗅覚器におけるアクアポリン発現の免疫組織化学的解析。第153回日本獣医学会学術集会 大宮ソニックシティ、大宮 (2012年3月28日) 沖田敏朗、柏原 篤、中牟田信明、谷口和之

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 和之 (TANIGUCHI KAZUYUKI)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：70148089

(2) 研究分担者

重茂 克彦 (OMOE KATSUHIKO)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：60224309
(H22～H23)

中牟田 信明 (NAKAMUTA NOBUAKI)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：00305822