

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580418

研究課題名(和文)キノボリトカゲのフェロモン受容機構に関する研究

研究課題名(英文)Study on the mechanisms to detect pheromones in Ryukyu tree lizards

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではオキナワキノボリトカゲのフェロモン受容器と考えられる鋤鼻器の形態学的特徴や、鋤鼻器とその投射先である副嗅球における糖鎖発現、および嗅覚受容体に共役するGタンパク質の発現を明らかにした。さらに、フェロモン産生部位と推測される肛門腺にオス特有な細胞内顆粒が存在し、季節変化することを見出した。また、フェロモン産生の調節に関わると思われる精巣について、細胞骨格タンパクの局在を指標に機能評価を試みた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the possible mechanisms to detect pheromones in Ryukyu tree lizards, *Japalura polygonata polygonata*. We revealed ultrastructural characteristics of the vomeronasal organ, which is considered to be the organ to detect pheromones. In addition, the expression of glycoconjugates and that of the G-proteins coupling to the olfactory receptors were demonstrated in the vomeronasal organ and in the accessory olfactory bulbs, the latter receive projections from the vomeronasal organ. Furthermore, we found the presence of male-specific cytoplasmic granules and their seasonal changes in the cloacal glands, the presumptive source of pheromones. We also tried to evaluate the activity of testis by using the localization of cytoskeletal proteins as indices, since the pheromone production is supposed to be under the control of testicular functions.

研究分野：農学

キーワード：鋤鼻器 肛門腺 トカゲ フェロモン

1. 研究開始当初の背景

(1) オキナワキノボリトカゲ *Japalura polygonata polygonata* は、爬虫綱有鱗目アガマ科に属するトカゲの一種であり、沖縄諸島や奄美諸島に生息する。日本に棲む他のトカゲと違って明瞭な社会構造をもつ特徴があり、キノボリトカゲのオスは縄張りに他のオスが近づくと腕立て伏せに似た動きで相手を威嚇する。1匹のオスの縄張りは1~数匹のメスの行動圏と重複しており、縄張りには交尾相手を確保する役割があると考えられている。キノボリトカゲはオスだけに発達した肛門腺を持ち、この腺の分泌物がメスに対する性フェロモンや、オス同士の縄張り行動に関わるフェロモンを含んでいると推測される。

(2) フェロモンは体外へ分泌され、同種他個体に受容されて何らかの変化を引き起こす化学物質と定義される。受け取った動物に生理的な変化を引き起こすプライマーフェロモンと、一定の行動を引き起こすリリーサーフェロモンとに大別され、性フェロモンや警報フェロモンなどは後者に含まれる。様々な動物においてフェロモンの関与する現象が観察されるが、そのほとんどはフェロモン活性の特異的なアッセイ法が確立されておらず、フェロモンの分子の実体やフェロモン受容に関わる情報伝達機構の解明には至っていない。

(3) 嗅覚系には主嗅覚系と鋤鼻系があり、フェロモンは主に鋤鼻系によって受容される。鋤鼻系は、鼻腔の腹側に位置する鋤鼻器から出た軸索が副嗅球へ投射し、嗅上皮から出た軸索が主嗅球へ投射する主嗅覚系からは解剖学的に分離独立している。系統発生上、鋤鼻器は両生類において初めて現れ、爬虫類特にヘビ・トカゲ類で最も発達している。ヘビ・トカゲ類の鋤鼻器は鼻腔との間に連絡が無く、口腔へ開口し、舌を出し入れすることによって外界から集めた物質を受容している。また、鋤鼻系の一次中枢である副嗅球は主嗅覚系の一次中枢である主嗅球に比べると一般的に不明瞭な系球体構造を持つが、ヘビ・トカゲ類では主嗅球と同様に明瞭な系球体構造が副嗅球に見られるのも特徴である。

(4) 鋤鼻器には鋤鼻受容体と呼ばれる嗅覚受容体が発現しており、この鋤鼻受容体は、嗅上皮に発現している匂い受容体と同じく、7回膜貫通構造を持ったGタンパク共役型受容体である。鋤鼻受容体をコードする遺伝子は、哺乳類以外の動物ではほとんど解析されておらず、ヘビ・トカゲなどの爬虫類も例外ではない。しかし、最近になってトカゲのゲノムが爬虫類の中でも初めて解読され、ヘビ・トカゲ類における鋤鼻受容体遺伝子の解析が可能になった。

2. 研究の目的

前述のように、フェロモンは同種他個体に作用し、生理的变化や特定の行動を引き起こす物質であるが、その分子の実体やフェロモンの受容機構については良く分かっていない。本研究では、オキナワキノボリトカゲの肛門腺に含まれるフェロモンの受容体を同定し、爬虫類フェロモンの実体と鋤鼻系を介した情報伝達機構の解明につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) キノボリトカゲの生体を用いて、オスとメスを1匹ずつ、あるいはオス同士、メス同士の組み合わせでケージに入れる行動観察実験を行った。

キノボリトカゲは実験に使用するまでの間、1個体ずつ分けて小ケージ(縦15センチメートル×横20センチメートル×高さ15センチメートル)に入れておいた。行動観察には縦20センチメートル×横35センチメートル×高さ30センチメートルの透明プラスチックケージを、実験が終了する度にエタノールを浸み込ませた脱脂綿で拭いて使用した。使い捨てポリエチレン手袋をはめてキノボリトカゲを観察用ケージに移し、体色の変化や行動を約10分間記録した。

一連の行動観察実験が終了した個体は、麻酔の後、パラホルムアルデヒドを灌流して固定し、免疫組織化学ならびにin situハイブリダイゼーション用試料とした。また、一部の個体からはRNAとDNAを採取し、RT-PCRならびにPCR用試料とした。

(2) オキナワキノボリトカゲにおける嗅覚系の特徴を明らかにする目的で、レクチン組織化学による染色性を鋤鼻上皮と嗅上皮とで比較した。

夏期(6月から8月)に捕獲したトカゲの鼻部パラフィン切片を作製し、10種類のビオチン化レクチンを用いてレクチン組織化学を行った。

(3) 脊椎動物の嗅覚系には主嗅覚系と鋤鼻系が区別され、それぞれの系には異なる種類のGタンパク質共役型受容体が発現している。動物種によって嗅覚系における受容体の発現には違いがあることから、オキナワキノボリトカゲの嗅覚系におけるGタンパク質の発現を調べた。

オキナワキノボリトカゲの成体および幼体から鼻部と嗅球を含んだ脳を採取し、嗅覚受容体と共役する3種類のGタンパク質、Gα、Gαi-2、Gαs/olfのそれぞれに対する抗体で免疫組織化学とウエスタンブロットを行った。

(4) オキナワキノボリトカゲにおける嗅覚

系の形態学的特徴をさらに明らかにするため、2012年5月に捕獲したオス成体から、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡用試料を作製し、嗅上皮と鋤鼻器の微細構造について調べた。

(5) オキナワキノボリトカゲの精巣における細胞骨格タンパクの局在を免疫組織化学的に調べた。

オキナワキノボリトカゲは季節繁殖動物であり、繁殖期と非繁殖期では精巣の大きさが有意に異なる。本研究では、宮崎県日南市において夏期に調査捕獲した成熟オス個体(n=10)を用いた。ペントバルビタールの腹腔内注射で安楽殺した後、20パーセント緩衝ホルマリン液によって灌流固定した。常法によりパラフィン包埋し、厚さ4マイクロメートルの連続切片を作製した。細胞骨格を標識する抗体には、抗 Desmin 抗体、抗 Actin 抗体、抗 Vimentin 抗体の3種類を用いた。

(6) オキナワキノボリトカゲのオスは縄張りをもつことが知られ、この社会性にはいわゆる「フェロモン」と呼ばれる様々な腺の分泌物が関与していると推測される。本研究ではオキナワキノボリトカゲ肛門腺の組織構造を調べて、その雌雄差や季節による変化の有無について検討した。

実験には宮崎県日南市で捕獲された雌雄合計15個体(オス10個体、メス5個体)を用いた。ペントバルビタールの腹腔内投与によって安楽殺した後、肛門腺を含んだ組織を切り出し、常法に従ってパラフィン切片を作製した。オスは7月から8月にかけて捕獲されたものを繁殖期の個体、10月から11月にかけて捕獲されたものを非繁殖期の個体とした。メスは繁殖期に捕獲された個体のみ実験に用いた。

4. 研究成果

(1) 現時点では肛門腺フェロモンを受容する鋤鼻受容体の同定には至っていないが、行動観察実験では雌雄の組み合わせに応じた一定の傾向を見出すことが出来た。引き続き研究を行って、キノボリトカゲの鋤鼻受容体遺伝子をクローニングし、各遺伝子の鋤鼻器における発現を解析する必要がある。

(2) 7種類のレクチンすなわちSBA、GSL-I、PSA、LCA、LEL、VVA、およびJacalinによって、鋤鼻上皮と嗅上皮を構成する細胞(支持細胞、感覚細胞、および基底細胞)が染色された。3つのレクチン、PSA、LCA、Jacalinによって、鋤鼻上皮の支持細胞は、核上部細胞質に大型顆粒状の陽性反応を示した。VVAによって、鋤鼻上皮の支持細胞は細胞質が泡沫状に染色され、嗅上皮の支持細胞は細胞質が顆粒状に染色された。3種類のレクチンGSL-II、DBA、PNAによっても、各上皮で異なる

染色像が観察された。

鋤鼻上皮と嗅上皮とでレクチンによる染色性に違いがあるから、各上皮に発現している複合糖質の組成や量は異なることが示唆された。

(3) ウエスタンブロットによって、抗Gao抗体と抗Gas/olf抗体は40キログルトンと45キログルトン付近にそれぞれ単一のバンドを形成し、抗Gai-2抗体はバンドを形成しなかった。

本トカゲ由来のGタンパク質に対し、交叉することが確認できたGao抗体とGas/olf抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ、鋤鼻上皮の感覚細胞と、副嗅球の系球体が抗Gao抗体で染色された。また、嗅上皮の嗅覚受容細胞と主嗅球の系球体が、抗Gas/olf抗体によって染色された。さらに、幼体でも成体と同様の結果が得られた。

本研究によって、オキナワキノボリトカゲの鋤鼻系にはGaoが、主嗅覚系にはGas/olfがそれぞれ発現していることが示された。性成熟に達していない幼体でも成体と同様の結果が得られたことは、幼体でも嗅覚系がある程度発達していることを示している。本トカゲの採食や繁殖などにとって嗅覚系が果たす役割については、今後の研究課題である。これらの成果の一部は第154回日本獣医学会学術集会において発表した。

(4) 鼻粘膜の嗅部は、ボウマン腺が存在することと、杯細胞が存在しない事によって、鼻粘膜の呼吸部と容易に区別できた。嗅上皮は線毛性の嗅細胞、支持細胞および基底細胞によって構成され、支持細胞は分泌顆粒を豊富に含んでいた。呼吸上皮は円柱細胞、杯細胞および基底細胞によって構成されていた。

鋤鼻器は鼻腔の腹側に位置し、骨と軟骨に囲まれ、導管によって口腔へ開口し、鼻腔との間に連絡は無かった。鋤鼻器を裏打ちする上皮には感覚上皮と非感覚上皮があり、両者は自由縁における線毛の有無によって明瞭に区別された。鋤鼻感覚上皮は微絨毛性の感覚細胞、支持細胞および基底細胞によって構成され、鋤鼻器の内側壁を裏打ちしていた。非感覚上皮は円柱細胞と基底細胞からなり、鋤鼻器の外側壁から突出するマッシュルームボディを覆っていた。鋤鼻感覚上皮の支持細胞や、非感覚上皮を構成する細胞に分泌顆粒はほとんど認められなかった。さらに、鋤鼻器に付属腺は見られなかった。

付属腺の有無に加えて、嗅上皮と鋤鼻感覚上皮とでは支持細胞等の分泌能に著しい違いのあることが分かった。嗅上皮の表面が支持細胞と付属腺由来の分泌物からなる粘液層で被われるのに対し、鋤鼻器の表面を覆う液体は内因性でなく外因性のものであることが示唆された。これらの成果の一部は、第156回日本獣医学会学術集会において発表した。

本獣医学会学術集会、2012.9、岩手大学
(盛岡)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

保田 昌宏 (YASUDA, Masahiro)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号：10336290

(5) 抗 Desmin 抗体によって、精巢間質と曲精細管周囲の筋様細胞が抗体陽性反応を示し、精上皮は染色されなかった。抗 Actin 抗体によって、筋様細胞や血管壁が標識された。抗 Vimentin 抗体では、曲精細管内のセルトリ細胞、精細管周囲の筋様細胞、および精巢間質のライディッヒ細胞が染色された。

本研究によって、オキナワキノボリトカゲの精巢における細胞骨格タンパクの局在が明らかになった。非繁殖期における本トカゲの精巢で、細胞骨格タンパクの局在に繁殖期のものとどのような差があるかは今後の研究課題である。これらの成果の一部は第 19 回日本野生動物医学会において発表した。

(6) 肛門腺は雌雄両方に存在したが、オスの肛門腺はメスのものに比べて大きな終末部を持っていた。オスの肛門腺をヘマトキシリン・エオジン染色した切片では、繁殖期のものには非繁殖期のものに比べて背の高い腺細胞が観察された。また、繁殖期と非繁殖期両方の個体で、肛門腺を構成する腺細胞は酸好性の細胞質顆粒を含んでおり、これらの顆粒は過ヨウ素酸シッフ染色やアルシアンブルー染色に陽性を示した。それに対し、メスではこのような顆粒がほとんど観察されなかった。

肛門腺の組織構造に雌雄差があることや、オスで季節による変化が見られたことから、肛門腺の機能は繁殖に関わっていることが示唆された。本分泌腺がオキナワキノボリトカゲの繁殖や社会性に与える影響については、さらに詳細な検討が必要である。これらの成果の一部は、第 20 回日本野生動物医学会大会において発表した。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

徳嶺耀子、保田昌宏、中牟田信明、那須哲夫、オキナワキノボリトカゲ排泄腔腺の組織構造、第 20 回日本野生動物医学会大会、2014.9、つくば国際会議場(つくば)

中牟田信明、保田昌宏、中牟田祥子、山本欣郎、那須哲夫、谷口和之、オキナワキノボリトカゲ嗅覚器の微細構造、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013.9、岐阜大学(岐阜)

徳嶺耀子、保田昌宏、中牟田信明、佐々木基樹、那須哲夫、オキナワキノボリトカゲ精巢における細胞骨格タンパクの局在、第 19 回日本野生動物医学会、2013.8-9、京都大学(京都)

武市知美、保田昌宏、那須哲夫、岩本俊孝、中牟田信明、谷口和之、オキナワキノボリトカゲの嗅覚系における $G\alpha_o$ および $G\alpha_s/olf$ の発現について、第 154 回日