

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770066

研究課題名(和文)両生類における新規の副嗅覚系(嗅陥凹上皮)の形態と機能

研究課題名(英文)Fine structure and function of the recessus olfactorius, a sensory epithelium of the accessory olfactory system, in the toad (*Bufo japonicus*)

研究代表者

中澤 英夫 (NAKAZAWA, Hideo)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30365465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：カエルの鼻腔には、嗅上皮に隣接して嗅陥凹(recessus olfactorius)と呼ばれる凹みが存在するが組織形態や機能については今まで不明であった。ヒキガエルの嗅陥凹の表面を覆う上皮を電子顕微鏡で観察したところ、感覚細胞には繊毛型と微絨毛型の両方がみられ、鋤鼻器の上皮(鋤鼻上皮)と似ていたが、神経の投射先である副嗅球における糸球体の分布を調べると、嗅陥凹上皮は鋤鼻上皮とは異なる神経投射領域をもっていた。嗅陥凹上皮の臭い刺激に対する応答を膜電位感受性色素を用いた光計測法で記録したところ、アミノ酸やシネオールなどの臭いに対し応答がみられた。

研究成果の概要(英文)：The recessus olfactorius (RO) is a small pouch observed in the antero-lateral olfactory epithelium of anuran amphibians. In Japanese toads the central projection from the epithelium lining RO (ROE) was observed by using fluorescent carbocyanine dye, and it revealed that the neuronal fibers from the ROE did not project to the main olfactory bulb (MOB) but to the accessory olfactory bulb (AOB). The projections from the ROE were found in the anterior region of the AOB and also in the anterior half of the posterior region. In electron microscopy the tissue collected from the ROE was compared with those from the vomeronasal epithelium (VNE) and the olfactory epithelium (OE). The ROE and the VNE contained both ciliated cells and microvillous cells. The odor response of ROE was measured by using voltage sensitive dye (di-8-ANEPPS). The ROE showed responses to airborne and waterborne odorants, such as cineole and amino acids.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：嗅覚 鋤鼻器 両生類 感覚

## 1. 研究開始当初の背景

### 申請時における背景、動機

両生類の中でも陸上生活に適応しているヒキガエルは、繁殖期になると産卵のため自分の生まれた特定の池へ集まるが、その際には嗅覚を使って目的地までたどり着くことが行動実験で示されている。また、繁殖期には嗅細胞数が一年で最も増加して、臭い刺激に対して嗅上皮で大きな電気応答が記録されるようになる。ヒキガエルの主嗅覚系感覚器の組織構造や機能についてはこの様にある程度研究が進んでいるが、副嗅覚系感覚器(鋤鼻器)については今まで詳細な解明は行われていなかった。

ヒキガエルの鼻腔には、外鼻孔付近に嗅上皮とは別に上皮に覆われた陥凹部(嗅陥凹上皮)が存在する。申請者が最近この嗅陥凹上皮の神経について脳の投射先を調べたところ、副嗅球に投射していることが判明した。今までの脊椎動物の研究では、鋤鼻器以外には副嗅球へ神経投射する感覚器は知られていないので、嗅陥凹上皮は新規な副嗅覚系感覚器であると考えられる。

そこでこの嗅陥凹上皮の組織構造と機能的特性を明らかにするために本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

### (1) 組織形態の観察

嗅陥凹上皮は鋤鼻器とは異なった今まで知られていないタイプの新規な副嗅覚系の感覚器であるので、この嗅陥凹上皮の組織構造を明らかにする。

### (2) 神経投射の解析

ヒキガエルの副嗅球は前後2つに区別化しており、嗅陥凹上皮からは前後両方の区分に投射していると推測されるが、副嗅球への神経投射分布の詳細を本研究で解明する。

### (3) 嗅陥凹上皮の機能

嗅陥凹上皮の臭い刺激に対する応答特性を細胞膜電位イメージング法で記録解析し、嗅陥凹上皮が果たす感覚機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織形態の観察

① 嗅陥凹上皮に分布する感覚細胞には、繊毛をもつタイプや微繊毛をもつタイプの存在が想定されるが、透過型電子顕微鏡で嗅陥凹上皮の組織を観察し細胞の微細構造を同定した。成体のヒキガエル (*Bufo japonicus*) を麻酔後、0.6% パラホルムアルデヒド、2% グルタルアルデヒド、0.02%  $\text{CaCl}_2$  / 35 mM カコジル酸緩衝液で灌流し、鼻部を採取して同じ固定液で1時間さらに固定した。嗅陥凹上皮、鋤鼻上皮および嗅上皮の組織片を切り出して、1% 四酸化オスミウムで後固定し、エタノールで脱水後 Quetol-812 に包埋した。

厚さ70 nmの超薄切片を作成後、電子染色を施して透過型電子顕微鏡 (JEM-1010, JEOL) にて観察した。

② 嗅覚系受容細胞のシグナル伝達に関わるG蛋白質 $\alpha$ サブユニットとして知られる、G $\alpha$ olf、G $\alpha$ o、G $\alpha$ i2を感覚細胞のマーカーとした。免疫組織化学法および免疫電子顕微鏡法により、組織を各G蛋白質 $\alpha$ サブユニットに対する抗体で標識し、それぞれの感覚細胞で発現するG蛋白質の局在を調べた。

免疫組織化学法では4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で固定した鼻部組織の凍結切片を作成し、抗G $\alpha$ olf抗体、抗G $\alpha$ o抗体あるいは抗G $\alpha$ i2抗体と反応させた。その後Alexa 488またはAlexa 555を結合した抗ウサギまたは抗マウス抗体 (Molecular Probes社) と反応させ、コンフォーカルレーザー顕微鏡 (Olympus FV300) で観察した。免疫電子顕微鏡法では、固定した組織の切片を各一次抗体と反応させた後、ナノゴールド標識二次抗体 (Nanoprobes社) と反応させ、銀増感処理後に0.5% 四酸化オスミウムで後固定し、エタノールで脱水後 Quetol-812 に包埋した。通常と同じ方法で超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡にて観察した。

### (2) 神経投射の解析

嗅陥凹上皮と鋤鼻上皮の神経投射先において、共通の糸球体がどの程度あるかを明らかにするために、蛍光波長の異なる2種類のカルボシアニン蛍光色素 (DiA, DiI) で各感覚上皮の神経を標識した。標識後の脳の水平断連続切片をコンフォーカルレーザー顕微鏡で観察し投射分布を比較した。

### (3) 嗅陥凹上皮の機能

嗅陥凹上皮の感覚細胞群が何の臭い刺激に対して応答性を示すか、嗅上皮と同時に鼻腔内での臭い応答の空間分布を調べた。膜電位感受性色素の溶液 (25  $\mu$ M di-8-ANEPPS, 0.5% DMSO, 0.05% Pluronic F-127 を含む両生類用生理的塩類溶液) を20分間ヒキガエルの鼻腔に満たして細胞に色素を定着させた後、過剰な色素溶液を生理的塩類溶液で洗浄した。臭い刺激はポンプにより送り出す一定流速の気体または液体を電磁バルブで制御する刺激装置を用いて行った。外鼻孔から流入した刺激物質を外側の内鼻孔周辺から排出するように管を配置したチャンバーに動物個体を固定し、臭い刺激を与えた。計測システム (MiCAM02, Brainvision社) のカメラを低倍レンズ (1.0 $\times$ ) を装着した蛍光実体顕微鏡 (THT-microscope) へ接続し、各種臭い刺激に対する応答記録を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 組織形態の観察

#### ① 電子顕微鏡による観察

嗅陥凹上皮では、細胞が円柱状に集まっている感覚上皮が呼吸上皮にはさまれるように

交互に並んでいた。微絨毛をもつ感覚細胞がみられない通常の嗅上皮とは対照的に、嗅陥凹上皮には絨毛をもつ細胞と微絨毛をもつ細胞の両方があり、このことは鋤鼻上皮と似ていた。しかし、嗅陥凹上皮に含まれる支持細胞には、分泌顆粒をもつ細胞と絨毛をもつ非分泌性細胞の両方が存在し、この点で嗅陥凹上皮は支持細胞が非分泌性である鋤鼻上皮、支持細胞が分泌性である嗅上皮のいずれとも区別された。

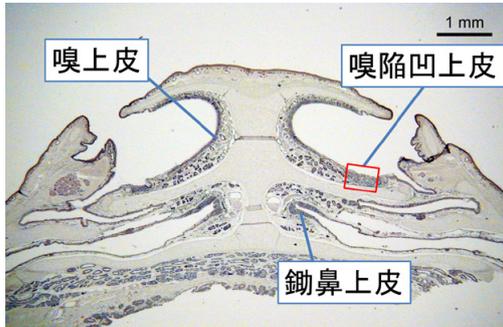


図1 ヒキガエル鼻腔の横断面

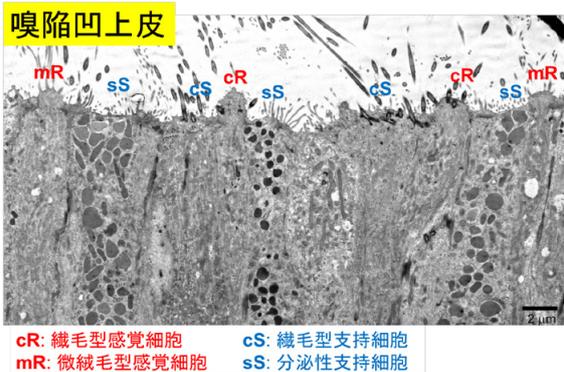


図2 嗅陥凹上皮の電子顕微鏡像

② G蛋白質の局在 (蛍光抗体法)  
 嗅覚情報伝達に関わるG蛋白質αサブユニットのうち、哺乳類では嗅覚受容体 OR と共役する  $G\alpha_{olf}$  および鋤鼻受容体 V2R と共役する  $G\alpha_o$  について組織内の発現と局在を調べた。その結果、嗅陥凹上皮では、上皮の表層側に  $G\alpha_{olf}$  を発現する細胞の細胞体が、上皮の基底層側に  $G\alpha_o$  を発現する細胞の細胞体が分布していた (図3)。これはヒキガエルの鋤鼻上皮での  $G\alpha_{olf}$  および  $G\alpha_o$  の発現パターンと同じである。 $G\alpha_{i2}$  については副嗅覚系の組織には発現がみられなかったが、脳の主嗅球の腹側には免疫陽性な神経軸索が認められたため、主嗅覚系の嗅上皮に  $G\alpha_{i2}$  を発現する感覚細胞が存在すると推測された。

③ Gタンパク質の局在 (免疫電子顕微鏡法)  
 嗅陥凹上皮では、 $G\alpha_{olf}$  は主に絨毛型感覚細胞の絨毛部分に局在し、 $G\alpha_o$  は主に微絨毛型感覚細胞の微絨毛部分に局在することが示された。

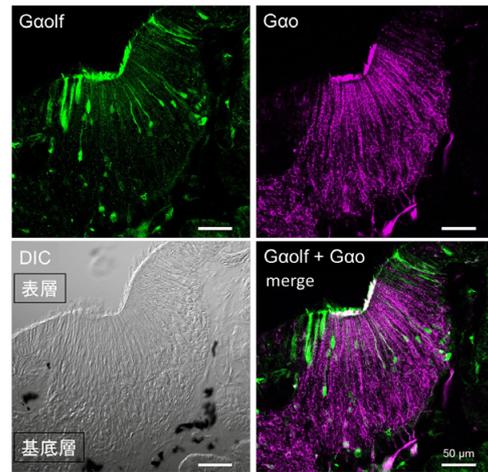


図3 嗅陥凹上皮におけるG蛋白質の局在

### (2) 神経投射の解析

DiI で嗅陥凹上皮の細胞を標識し、嗅陥凹上皮から出る神経軸索の投射先を調べた結果、主嗅球には投射せず、副嗅球へ投射していた。ヒキガエルの副嗅球は糸球体の分布が前後2領域に区分化しているが、その前部領域と後部領域の前半部分に神経投射がみられた (図4)。嗅陥凹上皮と鋤鼻上皮の投射先の違いは副嗅球前半部において顕著であった (図4 矢印)。以前の研究で副嗅球前半部には  $G\alpha_{olf}$  を発現する神経が投射し、副嗅球後半部には  $G\alpha_o$  を発現する神経が投射することがわかっているので、 $G\alpha_{olf}$  を発現する神経細胞において投射領域の違いが大きいことが示唆された。

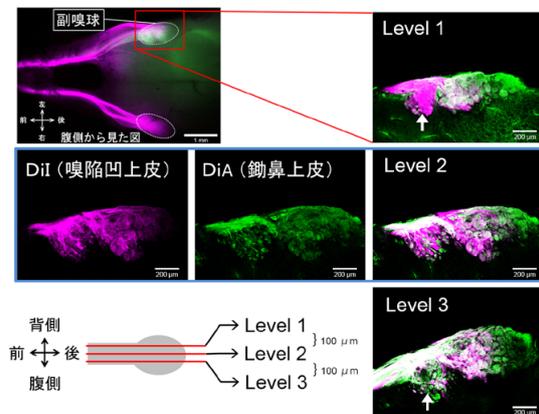


図4 副嗅球への神経投射

(副嗅球内の白色の部分は嗅陥凹上皮と鋤鼻上皮の両方から神経投射がある領域を示している)

### (3) 嗅陥凹上皮の機能

膜電位感受性色素 (di-8-ANEPPS) を使った臭い応答の測定を行った。嗅陥凹上皮では、アミノ酸混合液 (0.5~1.0 mM) の刺激に対して明瞭な過分極性の膜電位変化が記録された (図5 赤線)。その他の刺激では、シネオールやトリメチルアミンに対して微弱な脱分極性の膜電位変化が記録されたが、これらの刺激に対しては嗅上皮でも脱分極性の膜電位変化がみられた。嗅陥凹上皮だけが特異

的に応答する物質の特定には至らず、機能特性の解明については今後の研究課題として残った。アミノ酸混合液に対する応答は嗅上皮の腹外側部でもみられたが、膜電位変化は脱分極性であり(図5青線)、この領域の感覚細胞と嗅陥凹上皮の細胞とは異なるシグナル伝達メカニズムを介して膜電位変化が起きていることが示唆された。

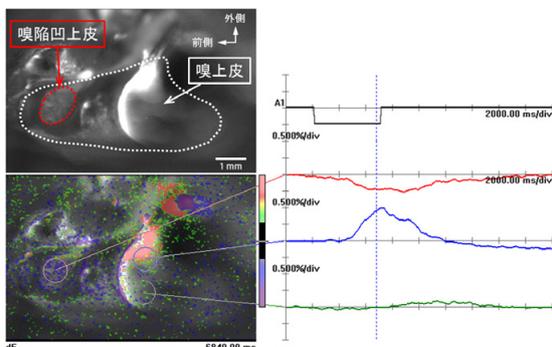


図5 アミノ酸混合液に対する嗅覚応答  
(右の鼻腔を露出し背側から見た蛍光像。波形は黒線: 5秒間の臭い刺激信号、赤線:嗅陥凹上皮、青線:嗅上皮腹外側部、緑線:嗅上皮腹内側部の膜電位変化を示す)

(4) 嗅上皮腹外側部の組織形態と神経投射  
アミノ酸に対する応答がみられた嗅上皮の腹外側部について、電子顕微鏡観察を行ったところ、この部分には繊毛型感覚細胞と微絨毛型感覚細胞が混在することが分かった。また、この嗅上皮腹外側部からの神経投射先をDiI標識で確認したところ、主嗅球の腹側に投射先が認められた。これらの結果から、微絨毛型感覚細胞を含む領域が主嗅覚系にも存在することが示された。

以上の結果より、ヒキガエルでは嗅上皮と鋤鼻上皮の間に両者の中間的な特徴を備えた嗅上皮腹外側部と嗅陥凹上皮が存在し、嗅覚系感覚器が4つの領域で構成されていることが明らかになった。

哺乳類の嗅覚系においても嗅上皮と鋤鼻器に加えて、鼻腔内にマセラ器、Grueneberg神経節といった感覚器があり、嗅覚系感覚器が4つの領域にわかれていることが知られているが、類似した鼻腔内の領域性が脊椎動物の進化上、両生類の段階ですでに発達していたことが今回の知見から示唆される。

水中生活に適応したアフリカツメガエルでは主嗅覚系の鼻腔が2つに分かれていて、通常の嗅上皮とは別に外腹側にある鼻腔(中憩室)には水溶性の臭い(アミノ酸)に感受性がある嗅細胞があり、それらの神経軸索は主嗅球の腹側に投射することが知られている。ヒキガエルの嗅上皮腹外側部もアミノ酸に感受性があり、主嗅球へ投射することから、アフリカツメガエルの中憩室に似た機能特性をもつと推測される。

ヒキガエルの嗅陥凹上皮は外鼻孔の直下に位置しており、フェロモンなど行動に直結

した物質の受容以外に、多様な臭い物質を手掛かりとした空間認識にも役立っているかもしれない。サケ科魚類は自分が生まれた川の臭いを記憶していて、繁殖期に母川回帰する際には水中のアミノ酸組成を臭いの手掛かりとして使っていることが知られている。ヒキガエルでも繁殖期に自分の生まれた池へ集まる際に、池の水のアミノ酸組成を手掛かりにしているのであれば、自分の目的の池かどうかを嗅陥凹上皮や嗅上皮腹外側部を使って識別していると推測される。

## 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1件)

- ① 中澤 英夫、山岸 公子、鈴木 忠、長井孝紀、ヒキガエル嗅陥凹上皮は新規の副嗅覚系受容器である、日本味と匂学会誌、査読有、18巻3号、2011、pp.509-510

[学会発表] (計6件)

- ① 中澤 英夫、吉田 直人、鈴木 忠、長井孝紀、ヒキガエルにおける2種類の副嗅覚系感覚上皮からの軸索投射、日本動物学会第84回大会、2013年09月26日~09月28日、岡山大学津島キャンパス(岡山県)
- ② 中澤 英夫、ヒキガエル嗅陥凹上皮から副嗅球への神経投射、第16回鋤鼻研究会、2012年07月06日~07月08日、盛岡つなぎ温泉ホテル(岩手県)
- ③ 山岸 公子、中澤 英夫、中田 友明、受容体の解析から考える嗅覚系の進化、第16回鋤鼻研究会、2012年07月06日~07月08日、盛岡つなぎ温泉ホテル(岩手県)
- ④ Hideo Nakazawa, Kimiko Hagino-Yamagishi, Atsushi C.Suzuki, Takatoshi Nagai, The accessory olfactory system in the Japanese toad (*Bufo japonicus*) consists of two types of sensory epithelia. XVI International Symposium on Olfaction and Taste. 2012年06月23日~06月27日、Stockholm Waterfront (Stockholm, Sweden)
- ⑤ 中澤 英夫、山岸 公子、鈴木 忠、長井孝紀、ヒキガエル嗅陥凹上皮は新規の副嗅覚系受容器である、日本味と匂学会第45回大会、2011年10月05日~10月07日、石川県立音楽堂(石川県)
- ⑥ 中澤 英夫、山岸 公子、鈴木 忠、長井孝紀、ヒキガエルにおける2種類の副嗅覚系受容器の組織構造、第15回鋤鼻研究会、2011年06月30日~07月02日、八王子セミナーハウス(東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中澤 英夫 (NAKAZAWA, Hideo)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 30365465