

総説

ラットの鼻腔における内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現と局在

遠藤 大輔

要約

一酸化窒素 (NO) は生体内で主に一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって産生され, フリーラジカルの気体分子として様々な生理作用を持つ. 本研究では, 成体ラットの鼻腔において, NOSのマーカーであるNADPH-diaphorase反応および内皮型NOS (eNOS) の発現と局在を調べ, eNOSが嗅細胞の線毛に発現すること, そして, eNOS強陽性の嗅細胞が鼻腔粘膜の背内側部に多く分布することを明らかにした. それらの結果は, NOが鼻腔背内側部を覆う嗅上皮で多く産生され, 嗅細胞における嗅覚受容に関与することを示唆している.

キーワード: eNOS, NADPH-diaphorase, 一酸化窒素, 嗅上皮, ラット

緒論

一酸化窒素 (NO: nitric oxide) は, 単純な構造を持つフリーラジカルの気体分子であり, 生体内では, 心臓血管系, 免疫系, そして神経系において多様な機能を持っている. NOは生体内で, 一酸化窒素合成酵素 (NOS: nitric oxide synthase) によってL-arginineから合成される [1]. NOSは3つの主要なアイソフォーム, つまり, 神経型NOS (nNOS: neuronal NOS), 内皮型NOS (eNOS: endothelial NOS), そして誘導型NOS (iNOS: inducible NOS) に分けられる. すべてのNOSアイソフォームはNADPH-diaphorase活性を持ち, NADPH-diaphorase活性はNOSのマーカーとして広く用いられている [2, 3].

生体内におけるNOの主な働きは, 可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC: soluble guanylyl cyclase) を活性化し, セカンドメッセンジャーであるcGMPレベルを増加させることである [4]. ラット嗅細胞の線毛において, 匂い刺激はcGMPレベルの上昇を誘導し, 特異的なNOS阻害剤であるL-N^G-nitro arginine, あるいはNOのスカベンジャーであるヘモグロビンによって, cGMPレベルの上昇は阻害される [5]. また, Schmachtenbergら (2000, 2003) はラットの単離した嗅細胞を用いた実験を行い, NO刺激が嗅細胞に対して外向き電流あるいは内向き電流を誘導することを示した [6, 7]. さらに, ラット嗅細胞の線毛では, NO刺激によって嗅覚cyclic nucleotide-gated (CNG) チャネ

ルが活性化あるいは抑制されることも報告されている [7-9]. これらの報告は, NOが匂い刺激に反応して嗅細胞から産生され, 嗅細胞の興奮を増強または抑制させる効果を持つことを示唆している.

しかし, ラット嗅上皮において, NOがどのNOSアイソフォームによって産生されるのかは明らかになっていない. 近年, 成体のウシの嗅上皮にiNOSが発現することが報告され [10], さらに, 成体マウスの嗅上皮にはeNOSが発現することが報告されている [11]. 従って, 嗅上皮に発現するNOSアイソフォームは動物種において異なる可能性がある.

ラットの嗅上皮には, nNOSが胎子期から若齢期まで一時的に発現するが, 成体の嗅上皮ではnNOSを欠くことが知られている [12]. 一方, eNOSは内皮細胞だけでなく, 嗅球や小脳の顆粒細胞や海馬錐体細胞など, いくつかの神経系に発現することが報告されている [13]. そこで, 本研究では, ラットの嗅上皮に発現するアイソフォームとしてeNOSに着目して, その発現と局在を調べ, 鼻腔粘膜におけるNOの産生部位を特定することを目的として実験を行った.

材料と方法

本研究は, 岩手大学の動物実験委員会による承認を受け, 岩手大学動物実験に関する指針 (平成22年3月31日まで) と岩手大学動物実験等管理規則 (平成22年4月1日から) に従って行った. 実験には, 8週齢の雄のWistar系ラットを使用した.

1 動物と組織

動物をペントバルビタールの腹腔内投与 (60 mg/kg) によって麻酔し, リンゲル液を心臓から灌流した後, NADPH-diaphorase染色および *in situ* hybridizationでは4%パラフォルムアルデヒド (PFA: paraformaldehyde) を含ん

だ0.1 Mリン酸緩衝液 (PB: phosphate buffer, pH 7.4), 免疫組織化学ではザンボニ液 (4% PFA, 0.5% picric acid in 0.1M PB; pH 7.4), そして免疫電子顕微鏡法では0.1% グルタルアルデヒド, 4% PFAを含んだ0.1M PB (pH 7.4) を灌流した. 頭部を取り外し, 皮膚, 筋肉, そして鼻腔を囲む主要な骨を除去した. 篩骨を0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: phosphate buffered saline; pH 7.4) で10分間, 3回洗浄し, 30%スクロースを含んだPBSに4℃で一晩浸漬した. 材料をOCTコンパウンド (Sakura Finetech, Tokyo, Japan) に包埋し, 凍結させた. クリオスタットを用いて厚さ10 μmまたは50 μmの冠状断連続切片を作製した.

2 NADPH-diaphorase組織化学

NADPH-diaphorase染色はDellacorteらの方法を参考にした [2]. 10 μm厚の切片をPBSで5分間, 3回洗浄し, 1.45mMのβ-NADPH, 0.5mM nitroblue tetrazolium (NBT), そして0.3% Triton X-100を含んだ0.05M Tris-HCl (pH 7.6) を適用して, 暗所で37℃, 4時間インキュベートした. PBSで洗浄後, 切片を純水で5分間洗浄し, PBS-グリセリンで封入した.

3 免疫組織化学

免疫組織化学は, avidin biotin-peroxidase complex (ABC) 法 (Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いた. 10 μm厚の切片をPBSで5分間, 3回洗浄し, 0.3% H₂O₂を含んだメタノールに室温で20分間浸漬し, その後, PBSで5分間, 3回洗浄した. 非特異的結合を防止するため, dilution buffer (2mM NaH₂PO₄, 5mM Na₂HPO₄, 0.37M NaCl, 0.5% Triton X-100) で50倍希釈した正常ロバ血清中で, 室温で30分間処理し, PBSで5分間, 3回洗浄した. その後, dilution bufferで希釈した一次抗体と, 4℃で一晩インキュベートした. 一次抗体は抗eNOS抗体

(1 : 500, Polyclonal Rabbit anti-eNOS, Cayman, Ann Arbor, MI) を用いた。PBSで洗浄後, dilution bufferで希釈したビオチン化抗ウサギロバ血清 (1 : 500, Jackson Immuno Research, West Grove, PA) で30分間処理した。切片はPBSで3回洗浄後, ABC反応を30分間行った。PBSで3回洗浄後, 切片を0.006% H_2O_2 存在下で, 0.02% diaminobenzidine (DAB) を含んだTris-HCl緩衝液で5-10分間処理した。PBSで5分間洗浄後, 切片を純水で5分間, 2回洗浄し, アルコールで脱水, キシレンで透徹して封入した。

4 免疫電子顕微鏡法

50 μ m厚の切片をPBSに浮かべ, PBSで5分間, 3回洗浄した。非特異的結合を防止するために, 切片はPBSで1 : 100に希釈した正常ロバ血清で, 室温で1時間処理した。さらに, PBSで1 : 500に希釈した一次抗体で, 4°Cで3日間インキュベートした。一次抗体には免疫組織化学で用いた抗eNOS抗体と同じものを用いた。PBSで洗浄後, PBSで1,000倍希釈したビオチン化抗ウサギロバ血清 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) を4°Cで2時間処理した。PBSで6回洗浄した後, ABC反応を4°Cで1時間行った。PBSで6回洗浄した後, 0.02% DABを含んだTris-HCl緩衝液で1時間処理し, さらに, 0.006% H_2O_2 と0.02% DABを含んだTris-HCl緩衝液で10-15分間処理した。PBSで5分間, 3回洗浄した後, 後固定として, 切片を1% 四酸化オスミウム (OsO_4) を含んだPB内で4°C, 1時間インキュベートし, その後, アルコールで脱水, propylene oxideで置換し, エポキシ樹脂 (Epon 812, TAAB, UK) に包埋した。90nmの超薄切片をプラチナブルー [14] とクエン酸鉛で染色した後, 電子顕微鏡 (JEM-1010, JEOL, Tokyo, Japan) で観察した。

5. *In situ* hybridization

プローブの準備として, ラットのeNOSの塩基配列からPCRプライマーを設計し, RT-PCRによってeNOS cDNAを得た。50ngのcDNAをテンプレートとして, DIG RNA labeling kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いてdigoxigenine (DIG) 標識cRNAプローブを合成し, エタノール沈殿法で精製した。

In situ hybridizationは, Tsuboiらの方法で, 以下の点を改変して行った [15]。10 μ m厚の切片に, mRNA *in situ* hybridization solution (DAKO, Glostrup, Denmark) で希釈した5 ng/ μ l cRNAプローブを載せ, パラフィルムで覆った。0.5%カゼイン液で1,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark) と, 室温で1時間インキュベートした。そして, NBTと5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) を含んだ緩衝液 (0.05 M Tris-HCl pH9.5, 0.025 M $MgCl_2$, 0.05 M NaCl) で室温で1時間処理して発色させた。

結 果

1 嗅上皮におけるNADPH-diaphorase組織化学

嗅細胞は細胞によって異なるNADPH-diaphorase反応を示した。本研究では, その反応の程度によって, 嗅細胞を3つのタイプに分けた。タイプA細胞は細胞質全体が強陽性を示す嗅細胞, タイプB細胞は樹状突起と核周囲細胞質の一部が陽性を示す嗅細胞, タイプC細胞は核周囲細胞質の一部が弱い陽性を示す嗅細胞である。一方, 嗅上皮の全域にわたって, 支持細胞は核上部細胞質が陽性, 基底細胞は細胞質全体が陰性であった。さらに, ボウマン腺は嗅粘膜の全域にわたって陽性を示した。

嗅上皮におけるNADPH-diaphorase反応の強さは, 強陽性~弱陽性まで様々だった。強い陽性反応は鼻腔背内側を覆う嗅上皮で観察された (図1A)。この領域の嗅上皮は, 多くのタイプ

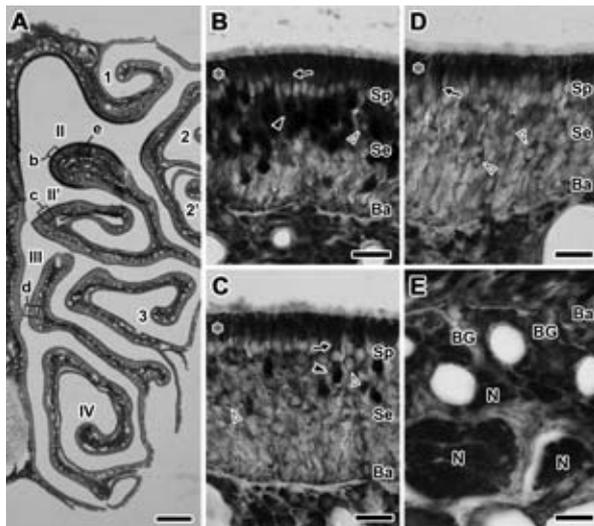


図1 嗅上皮のNADPH-diaphorase染色

A：左鼻腔の冠状断切片。鼻腔の背内側を覆う嗅上皮に、強いNADPH-diaphorase反応が見られる。B, C, DそしてEは四角で囲んだ場所の高倍像。B：多くのタイプA細胞（黒矢頭）と、少数のタイプB細胞（白抜き矢頭）が見られる。C：少数のタイプA細胞と、多くのタイプB細胞が見られる。D：少数のタイプB細胞が見られ、その周囲に多くのタイプC細胞が見られる。E：粘膜固有層では、ボウマン腺（BG）と嗅細胞の軸索束（N）が反応を示している。B, CそしてDの嗅上皮において、星印は支持細胞の上部細胞質に見られる陽性反応を示す。矢印は陽性の樹状突起を示す。支持細胞の核は表層に分布し（Sp）、嗅細胞の核は中間層に分布し（Se）、そして基底細胞は基底膜の直上に見られる（Ba）。鼻甲介の名称は、Liebichらの論文を参考にした[16]。II, II', III, IV：内鼻甲介, I', 1, 2, 2', 3：外鼻甲介。Scale bars=1 mm for A, 20 μ m for B-E.

A細胞と、少数のタイプB細胞を含んでいた（図1 B）。また、この領域の粘膜固有層では、NADPH-diaphorase陽性の嗅神経束が見られた（図1 E）。内鼻甲介II'の一部を覆う嗅上皮では弱い陽性反応が認められた。この領域の嗅上皮は、少数のタイプA細胞と多数のタイプB細胞を含んでいた（図1 C）。鼻腔の他の部分を覆う嗅上皮は、少数のタイプB細胞と多くのタイプC細胞を含んでいた（図1 D）。

異なるNADPH-diaphorase反応を示した3種類の嗅細胞の、鼻腔内における分布を調べるために、ラット鼻腔の吻側から尾側までの10枚の冠状断切片の模式図にNADPH-diaphorase反応の分布を示した（図2）。

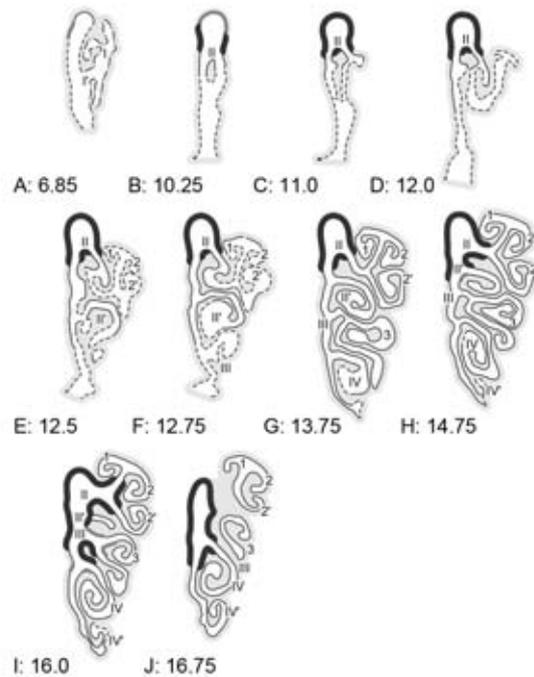


図2 ラット鼻腔の冠状断切片におけるNADPH-diaphorase反応の模式図

数字は鼻腔吻側端（=0）からの距離（mm）を示す。黒色の太い線は、多くのタイプA細胞と少数のタイプB細胞を含む嗅上皮を表す。灰色の中程度の太さの線は、少数のタイプA細胞と多くのタイプB細胞を含む嗅上皮を表す。細い線は、少数のタイプB細胞と多くのタイプC細胞を含む嗅上皮を表す。破線は呼吸上皮を表す。I, II, II', III, IV, IV'：内鼻甲介, I'：上顎甲介, 1, 2, 2', 3：外鼻甲介。

2 嗅上皮のeNOS免疫組織化学

嗅上皮の自由縁におけるeNOS免疫反応の強さは、鼻腔の部位によって強～弱まで様々だった。強いeNOS免疫反応は、鼻腔の背側領域を覆う嗅上皮の自由縁で観察された（図3 A）。この領域では、少数の嗅細胞の核周囲細胞質がかすかに陽性を示し、嗅神経束は陽性を示した。さらに、自由縁では、嗅細胞の嗅小胞から伸びる線毛の遠位部にeNOS免疫反応が観察された（図4 A）、その免疫反応は線毛の細胞膜に見られた（図4 B）。嗅細胞の樹状突起、嗅小胞、そして支持細胞の微絨毛は陰性を示した。鼻腔の背側領域に隣接した部分の嗅上皮の自由縁では、中程度のeNOS免疫反応が認められた（図3 B）。その他の領域では、自由縁とその直下

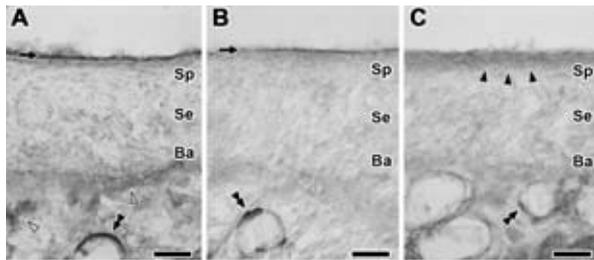


図3 ラット嗅上皮のeNOS免疫組織化学

A：鼻腔背側部を覆う嗅上皮。嗅上皮の自由縁（矢印）は強い陽性反応を示している。少数の嗅細胞において核周囲細胞質は微弱な陽性反応を示している。粘膜固有層では、嗅神経束（白抜き矢頭）が陽性反応を示している。B：内鼻甲介の背側部を覆う嗅上皮。嗅上皮の自由縁（矢印）は中程度の陽性反応を示している。C：鼻腔腹側部を覆う嗅上皮。嗅上皮の自由縁とその直下の細胞質（黒矢頭）が弱い陽性反応を示している。支持細胞の核は表層に分布し（Sp）、嗅細胞の核は中間層に分布し（Se）、そして基底細胞は基底膜の直上に見られる（Ba）。二重矢頭は血管内皮細胞における抗体陽性反応を示す。Scale bars=20 μm for A-C.

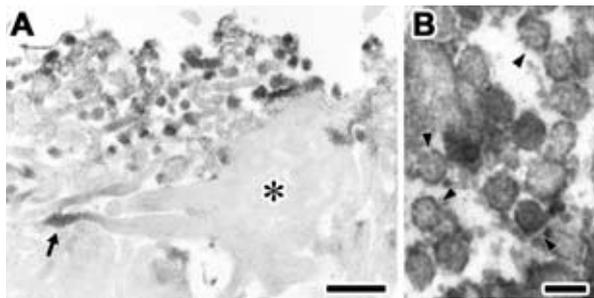


図4 ラット嗅上皮の表層におけるeNOSの免疫電子顕微鏡法

A：嗅細胞の嗅小胞（星印）から伸びる線毛の遠位部（矢印）に強いeNOS抗体陽性反応が見られる。B：嗅細胞の線毛と支持細胞の微絨毛によって占められた嗅上皮表層の強拡大像。線毛の細胞膜（黒矢頭）に陽性反応が見られる。Scale bars=500nm for A, 200 nm for B.

の嗅上皮上層に弱い免疫反応が観察された（図3C）。また、嗅粘膜の全域で、血管内皮細胞にeNOS免疫反応が認められた。

嗅上皮自由縁に見られたeNOS免疫反応の鼻腔内における分布を調べるために、ラット鼻腔の吻側から尾側までの10枚の冠状断切片の模式図にeNOS免疫反応の分布を示した（図5）。

3 eNOSプローブを用いた *in situ* hybridization

eNOSのアンチセンスプローブとハイブリダ

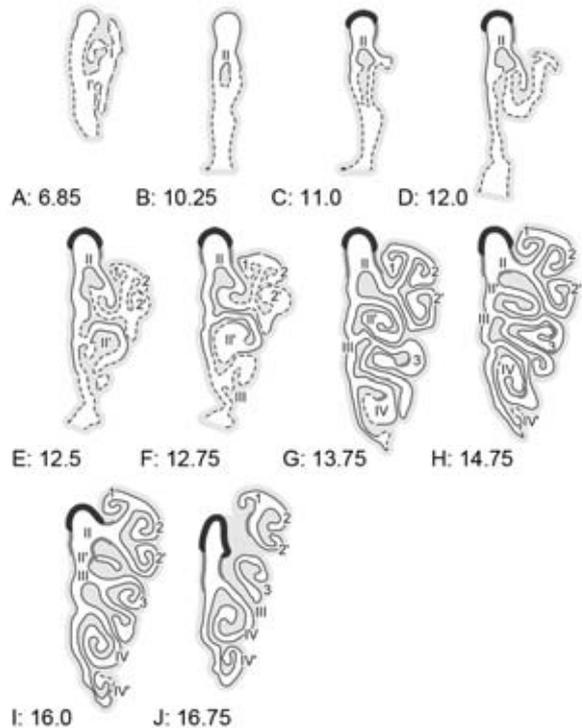


図5 ラット鼻腔の冠状断切片におけるeNOS免疫反応の模式図

数字は鼻腔吻側端（=0）からの距離（mm）を示す。黒色の太い線は、自由縁が強い陽性反応を示した嗅上皮を表す。灰色の中程度の太さの線は、自由縁が陽性反応を示した嗅上皮を表す。細い線は、自由縁とその直下の細胞質が弱い陽性反応を示した嗅上皮を表す。破線は呼吸上皮を表す。I, II, II', III, IV, IV': 内鼻甲介, I': 上顎甲介, 1, 2, 2', 3: 外鼻甲介。

イズさせた切片では、多くの嗅細胞の核が分布する嗅上皮の中間層と支持細胞の核が分布する表層に陽性反応が認められ、基底細胞が分布する基底層は陰性であった（図6A）。また、鼻腔の部位による反応強度の差は見られなかった。eNOSのセンスプローブを適用した切片では、いずれの層にも陽性反応は認められなかった（図6B）。

考 察

1 鼻腔におけるeNOSの発現

様々な組織において、NADPH-diaphorase活性とNOSタンパク質の局在は一致することが報告されており、NADPH-diaphorase反応はNOSタンパク質の局在を反映していることが知られている [10, 17]。本研究では、NADPH-

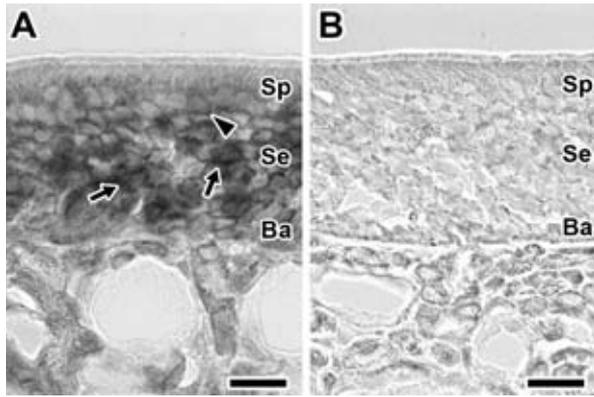


図6 嗅上皮におけるeNOS mRNAの局在

A: eNOSアンチセンスプローブとハイブリダイズさせた切片では、嗅細胞(矢印)と支持細胞(矢頭)にシグナルが観察されるが、基底細胞には見られない。B: eNOSセンスプローブとハイブリダイズさせた切片には、シグナルが観察されない。支持細胞の核は表層に(Sp)、嗅細胞の核は中間層に分布し(Se)、基底細胞は基底膜の直上に見られる(Ba)。Scale bars=20 μ m.

diaphorase反応に基づいて、嗅細胞を3つのタイプ、つまりタイプA、タイプBそしてタイプC細胞に分類した。嗅細胞間で異なるNADPH-diaphorase反応が見られたことは、これらの細胞間におけるNADPH-diaphorase活性が異なることを示唆している。一方で、eNOS免疫組織化学によって嗅上皮の自由縁にeNOSの免疫反応が観察され、その強さは、NADPH-diaphorase活性と同様に鼻腔の部位によって異なっていた。従って、嗅細胞においてもNADPH-diaphorase活性とNOSタンパク質が共局在し、NADPH-diaphorase活性が異なる嗅細胞間では、これらの細胞に発現するeNOSタンパク質の量も異なる可能性がある。

2 鼻腔におけるeNOSの分布

NADPH-diaphorase反応とeNOS免疫反応に強陽性の嗅細胞は鼻腔の背内側領域を覆う嗅上皮において多く見られた。鼻腔内の位置による違いが観察される理由として、嗅覚受容体との関係が考えられる。いくつかの嗅覚受容体は、ラット鼻腔の限定された領域に発現すること、そして嗅覚受容体OR14とOR16はラット鼻腔の

背内側領域を覆う嗅上皮に発現することが報告されている [18]。従って、OR14とOR16を発現する嗅細胞が、他の嗅覚受容体を発現する嗅細胞よりも多くのeNOSタンパク質を発現している可能性がある。

eNOSタンパク質の発現が鼻腔の背内側部に局限しているのに対し、eNOS mRNAは鼻腔内の位置によらず嗅上皮に一様に発現していた。eNOS mRNAは細胞内で安定しており、16~18時間の長い半減期を持つ [19]。新しく転写されたeNOS mRNAはプロセッシングや細胞内輸送の段階で転写後調節を受け、その翻訳速度や安定性はタンパク質に翻訳される前に変化する [19, 20]。本研究において、eNOS mRNAとeNOSタンパク質の発現部位が完全には一致しなかったことは、鼻腔において、eNOS mRNAからeNOSタンパク質への翻訳が促進されている領域と抑制されている領域が存在することを示唆している。

本研究において、NADPH-diaphorase反応は支持細胞とボウマン腺でも観察されたが、eNOSタンパク質の発現は認められなかった。これまでに、NOS以外にNADPHからの電子を要求するいくつかの酵素がラット嗅粘膜に発現していることが知られている [21, 22]。例えば、チトクロームP450酵素のアイソフォームであるNMa, NMbそしてCYP2Fは、ラット嗅粘膜の支持細胞の上部細胞質とボウマン腺に発現している [21, 22]。従って、支持細胞とボウマン腺で見られたNADPH-diaphorase反応は、eNOS以外のNADPH関連タンパク質の発現を反映していると考えられる。

3 嗅細胞内におけるeNOSの局在

免疫電子顕微鏡法によって、eNOSタンパク質は嗅細胞の線毛の遠位部に発現することが明らかになった。これまでに、ラットの嗅上皮において、Gタンパク質 α s/ α olf (Gs/olf)、アデニル酸シクラーゼ、そしてCNGチャネルな

ど、シグナル伝達に関与する多くの分子が嗅細胞の線毛遠位部に発現することが報告されている [23]. 従って、今回の実験で観察された eNOSタンパク質の局在とこれらのシグナル伝達物質の分布が一致したことは、NOが嗅細胞の線毛における嗅覚伝達経路に関与している可能性を示唆している。

また、eNOSタンパク質の発現は線毛の細胞膜において認められた。ラット嗅細胞において、カベオリンは線毛の細胞膜に存在すること、そして抗カベオリン抗体は、匂いに反応した cAMP形成や直接的な G タンパク質の活性化を阻害することが報告されている [24]. 血管内皮細胞では、カベオリンが eNOSタンパク質に結合し、その活性を調節している [25]. 嗅細胞の線毛でも、eNOSタンパク質はカベオリンに結合し、カベオリンが調節する経路を通じて嗅覚伝達経路に関わっている可能性がある。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、多大な御指導と御助言を賜りました岩手大学 谷口和之教授、山本欣郎教授、中牟田信明准教授ならびに山田美鈴准教授に深く感謝いたします。

引用文献

- [1] Bredt DS, Snyder SH : Nitric oxide : a physiologic messenger molecule, *Annu Rev Biochem*, 63, 175-195 (1994)
- [2] Dellacorte C, Kalinoski DL, Huque T *et al* : NADPH diaphorase staining suggests localization of nitric oxide synthase within mature vertebrate olfactory neurons, *Neuroscience*, 66, 215-225 (1995)
- [3] Zhao H, Firestein S, Greer CA : NADPH-diaphorase localization in the olfactory system, *Neuroreport*, 6, 149-152 (1994)
- [4] Bredt DS, Snyder SH : Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 9030-9033 (1989)
- [5] Breer H, Klemm T, Boekhoff I : Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system, *Neuroreport*, 3, 1030-1032 (1992)
- [6] Schmachtenberg O, Bacigalupo J : Calcium mediates the NO-induced potassium current in toad and rat olfactory receptor neurons, *J Membr Biol*, 175, 139-147 (2000)
- [7] Schmachtenberg O, Diaz J, Bacigalupo J : NO activates the olfactory cyclic nucleotide-gated conductance independent from cGMP in isolated rat olfactory receptor neurons, *Brain Res*, 980, 146-150 (2003)
- [8] Broillet MC, Firestein S : Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds, *Neuron*, 16, 377-385 (1996)
- [9] Lynch JW : Nitric oxide inhibition of the rat olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel, *J Membr Biol*, 165, 227-234 (1998)
- [10] Wenisch S, Arnhold S : NADPH-diaphorase activity and NO synthase expression in the olfactory epithelium of the bovine, *Anat Histol Embryol*, 39, 201-206 (2010)
- [11] Brunert D, Kurtenbach S, Isik S *et al* : Odorant-dependent generation of nitric oxide in mammalian olfactory sensory neurons, *PLoS One*, 4, e5499

- (2009)
- [12] Bredt DS, Snyder SH : Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium, *Neuron*, 13, 301-313 (1994)
- [13] Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ *et al* : Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells : implications for synaptic plasticity, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 4214-4218 (1994)
- [14] Inaga S, Katsumoto T, Tanaka K *et al* : Platinum blue as an alternative to uranyl acetate for staining in transmission electron microscopy, *Arch Histol Cytol*, 70, 43-49 (2007)
- [15] Tsuboi A, Yoshihara S, Yamazaki N *et al* : Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb, *J Neurosci*, 19, 8409-8418 (1999)
- [16] Liebich H : Zum Bau der oberen Luftwege der weissen Ratte (*Mus rattus norvegicus*, var. albinus), *Anat Anz*, 138, 170-179 (1975)
- [17] Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi, M *et al* : Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 7797-7801 (1991)
- [18] Iwema CL, Fang H, Kurtz DB *et al* : Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium, *J Neurosci*, 24, 356-369 (2004)
- [19] Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr *et al* : Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life, *Circ Res*, 73, 205-209 (1993)
- [20] Searles CD : Transcriptional and post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression, *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C803-816 (2006)
- [21] Chen Y, Getchell ML, Ding X *et al* : Immunolocalization of two cytochrome P450 isozymes in rat nasal chemosensory tissue, *Neuroreport*, 3, 749-752 (1992)
- [22] Genter MB, Yost GS, Rettie AE : Localization of CYP4B1 in the rat nasal cavity and analysis of CYPs as secreted proteins, *J Biochem Mol Toxicol*, 20, 139-141 (2006)
- [23] Menco BP : Ultrastructural aspects of olfactory transduction and perireceptor events. *Semin, Cell Biol*, 5, 11-24 (1994)
- [24] Schreiber S, Fleischer J, Breer H *et al* : A possible role for caveolin as a signaling organizer in olfactory sensory membranes, *J Biol Chem*, 275, 24115-24123 (2000)
- [25] Goligorsky MS, Li H, Brodsky S *et al* : Relationships between caveolae and eNOS : everything in proximity and the proximity of everything, *Am J Physiol Renal Physiol*, 283, F1-10 (2002)