

ヘビ類の主嗅覚系および鋤鼻系におけるレクチン組織化学的ならびに免疫組織化学的研究

近藤大輔

要約

多くの脊椎動物において、主嗅覚系は主に一般的な匂い物質を受容して捕食行動に関与し、鋤鼻系は主に種特異的なフェロモンを受容して繁殖行動に関与するが、ヘビ類では主嗅覚系と鋤鼻系の両方が捕食行動と繁殖行動の両方に関与することが知られている。本研究では、シマヘビの主嗅覚系と鋤鼻系に関して、一次投射経路におけるレクチン結合パターンが類似することを明らかにした。また、抗Ga免疫組織化学によって、主嗅覚系には匂い受容体 (OR) と共役するGaolfが発現し、鋤鼻系には鋤鼻受容体2型 (V2R) と共役するGaoが発現することを明らかにした。さらに、冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮が繁殖期のものよりも多くのシアル酸残基を含んでいることを明らかにした。これらの結果から、①ヘビ類の主嗅覚系と鋤鼻系は異なる物質を受容するが刺激伝導や情報の処理過程が類似する可能性、②冬眠中のヘビ類の嗅覚器は刺激受容よりも感染防御に有利な状態である可能性が考えられる。

キーワード：ヘビ類，主嗅覚系，鋤鼻系，嗅覚受容体，冬眠

動物は食物や周辺の環境を示す化学物質、さらに社会的行動や性行動を調節するシグナルを外部環境中で絶えず探索し、特異に分化した化学感覚神経細胞によってそれらを受容する。多くの脊椎動物において、この化学受容は一般的に2つの系、主嗅覚系と鋤鼻系とに大別され、前者は主に無数の揮発性匂い物質を、後者は主に種特異的な情報を含む物質 (フェロモン等) を受容すると考えられている [1]。主嗅覚系と鋤鼻系は共通の原基から発生過程で分化する [2, 3] が、主嗅覚系は鼻腔内の嗅上皮で受容した情報を主嗅球へ、鋤鼻系は鋤鼻器の鋤鼻上皮で受容した情報を副嗅球へ投射しており、両者の経路は完全に独立する [1, 4, 5]。系統発生的に、主嗅覚系は全ての脊椎動物に存在する一方で、鋤鼻系は両生類から発達する。脊椎動物の中で、爬虫類有鱗目に属するヘビ類や一部のトカゲ類は最も発達した鋤鼻系を有している [1, 2]。

ヘビ類は舌をフリッキングさせて環境中の化学物質を収集し、舌の先端を口腔に開口している鋤鼻器へ運ぶことによって、鋤鼻系で高濃度の化学物質を受容す

る。この舌のフリッキング行動は主嗅覚系と鋤鼻系の両方によって調節される [3, 4]。他の動物の場合と異なり、ヘビ類の鋤鼻系はフェロモンなどの種特異的な物質だけではなく捕食物や天敵由来の物質も受容し、主嗅覚系と同様に捕食行動や逃避行動などに関与する [6, 7]。さらに、ヘビ類の主嗅覚系はフェロモンを受容し、鋤鼻系と同様に繁殖行動に関与することが報告されている [8]。ヘビ類において、主嗅覚系と鋤鼻系は形態学的には完全に分離されるが、両系が同一の行動に関与することから、哺乳類などの動物種とは異なり主嗅覚系と鋤鼻系が完全に異なる分化をせず、主嗅覚系と鋤鼻系における匂い刺激の受容および伝導、処理の各過程が類似する可能性が考えられる。しかしながら、現在までに組織化学によってヘビ類の主嗅覚系と鋤鼻系を比較した研究は少ない。

また、ヘビ類は外温動物であり全ての行動を停止する冬眠という過酷な生活を過ごす。嗅覚器である嗅上皮や鋤鼻上皮は直接外部環境と接する部位であるため、冬眠中の動物は嗅覚受容よりもむしろ生存のために生

体防御機構を活性化させている可能性が考えられる。このような季節変化に関する知見は冬眠中の動物の生理学的な活動を理解する上で重要であると考えられるが、現在までに冬眠中の動物における嗅覚器に関する報告はない。

組織切片上で発現する複合糖質（糖タンパク質および糖脂質）の類似性を評価する手法として、糖鎖と結合するタンパク質であるレクチンを用いた組織化学が広く行われている [9]。また、発現する嗅覚受容体ファミリー（匂い物質受容体（OR）および鋤鼻受容体1型（V1R）、2型（V2R）の特定には、それぞれに共役するGタンパクの α サブユニット（G α ）を同定するための免疫組織化学が用いられる。すなわち、ORに対してはG α olfが、V1Rに対してはG α i2が、V2Rに対してはG α oが指標として用いられる [10, 11]。本研究では、レクチン組織化学によってシマヘビ（*Elaphe quadrigata*）の主嗅覚系と鋤鼻系に発現する複合糖質の類似性を検証し、さらに抗G α 免疫組織化学によって両系に発現する嗅覚受容体の特定を行い、これらを総合してヘビ類の嗅覚系における組織化学的特徴を考察した。また、シマヘビの嗅覚器におけるレクチン組織化学的特徴が冬眠によってどのように変化するのかについても詳細に観察した。

材料と方法

1 レクチン組織化学

繁殖期（5月～6月）の5個体を嗅覚器（嗅上皮および鋤鼻上皮）のレクチン組織化学に、他の繁殖期の6個体を嗅球（主嗅球および副嗅球）のレクチン組織化学に供した。また、冬眠中（2月）の4個体を嗅覚器のレクチン組織化学に供した。

動物は深麻酔下でザンボニ固定液による灌流固定を行い、嗅覚器および嗅球をパラフィン包埋後、5 μ mの厚さに前額断および水平断で薄切した。切片は内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS；10mM, pH 7.4）で洗浄し、1%ウシ血清アルブミンを含むPBSでブロッキングした。PBSで洗浄後、表1に示すlectin screening kit I～III（Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.）に含まれる21種類のビオチン化レクチンをそれぞれ4℃で18時間適用した。その後、avidin-biotin complex（ABC）reagent（Vector）を適用し、0.006%過酸化水素と0.02% 3-3'-ジアミノベンチジン（DAB）を加えたTris-HCl（pH 7.4）で発色させた。また、陰性対照切片として、1) 希釈した各レクチンに表1に示す阻害糖を500mMとなるように加え、室温で1時間静置した後に適用した切片、2) レクチンを加えず、0.5% Triton Xを含むPBSを適用した切片を作製した。

なお、糖鎖末端のシアル酸残基を除去するために、

表1 本研究に用いたレクチンとその特異性

レクチン	略 語	濃度 (mg/ml)	結合特異性
<i>Wheat germ agglutinin</i>	WGA	1.0×10^{-2}	GlcNAc, NeuAc
<i>Succinylated-wheat germ agglutinin</i>	s-WGA	1.0×10^{-2}	(GlcNAc) _n
<i>Lycopersicon esculentum lectin</i>	LEL	2.0×10^{-3}	(GlcNAc) ₂₋₄
<i>Solanum tuberosum lectin</i>	STL	1.0×10^{-2}	(GlcNAc) ₂₋₄
<i>Datura stramonium lectin</i>	DSL	4.0×10^{-3}	(GlcNAc) ₂₋₄
<i>Bandeiraea simplicifolia lectin-II</i>	BSL-II	4.0×10^{-3}	GlcNAc
<i>Dolichos biflorus agglutinin</i>	DBA	1.0×10^{-2}	Gal, GalNAc
<i>Soybean agglutinin</i>	SBA	1.0×10^{-2}	Gal, GalNAc
<i>Bandeiraea simplicifolia lectin-I</i>	BSL-I	4.0×10^{-3}	Gal, GalNAc
<i>Vicia villosa agglutinin</i>	VVA	4.0×10^{-3}	Gal, GalNAc
<i>Sophora japonica agglutinin</i>	SJA	2.0×10^{-2}	Gal, GalNAc
<i>Ricinus communis agglutinin-I</i>	RCA-120	2.0×10^{-3}	Gal, GalNAc
<i>Jacalin</i>		5.0×10^{-4}	Gal, GalNAc
<i>Peanut agglutinin</i>	PNA	4.0×10^{-3}	Gal
<i>Erythrina cristagalli lectin</i>	ECL	2.0×10^{-2}	Gal, GalNAc
<i>Ulex europaeus agglutinin-I</i>	UEA-I	2.0×10^{-2}	Fuc
<i>Concanavalin A</i>	ConA	3.3×10^{-3}	Man, Glc
<i>Pisum sativum agglutinin</i>	PSA	4.0×10^{-3}	Man, Glc
<i>Lens culinaris agglutinin</i>	LCA	4.0×10^{-3}	Man, Glc
<i>Phaseolus vulgaris agglutinin-E</i>	PHA-E	5.0×10^{-3}	Oligosaccharide
<i>Phaseolus vulgaris agglutinin-L</i>	PHA-L	2.5×10^{-3}	Oligosaccharide

Fuc：フコース，Gal：ガラクトース，GalNAc：N-アセチルガラクトサミン，Glc：グルコース，GlcNAc：N-アセチルグルコサミン，Man：マンノース，NeuAc：N-アセチルノイラミン酸。

いくつかの切片では *Clostridium perfringens* 由来のノイラミニダーゼ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.) 0.35 U/mlを37℃で18時間適用した後にブロッキング以降の反応を行った。

2 ウエスタンプロット法

シマヘビ3個体をウエスタンプロット法に供した。動物をペントバルビタールの過投与によって殺処分し、嗅上皮および鋤鼻上皮、脳をそれぞれタンパク質抽出緩衝液 (500mM Tris-HCl, 70 mMドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 6% β -メルカプトエタノール, 10%グリセロール) 中でホモジネートし, 95℃で5分間変性させた。抽出したタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) し, polyvinylidene fluoride membranes (PVDF; Pall Corporation, East Hills, NY, USA) へ転写した。転写したPVDF膜は10% EzBlock (ATTO, Tokyo, Japan) を含むTris緩衝食塩水-Tween 20 (TBST; 0.05% Tween 20, 25 mM Tris-HCl, 150mM 塩化ナトリウム; pH 7.4) でブロッキングし, 表2で示す一次抗体をそれぞれ含むTBSTを室温で1時間適用した。PBSで洗浄後, 表3で示すビオチン化二次抗体を室温で30分間適用し,

ABC reagentを適用した後, 0.006%過酸化水素と0.02% DABを加えたTris-HCl (pH 7.4) で発色させた。陰性対照は一次抗体を加えず, 正常ロバ血清を適用した。

3 免疫組織化学

シマヘビ8個体を免疫組織化学に供した。動物は深麻酔下で4%パラホルムアルデヒド液による灌流固定を行い, 嗅覚器および嗅球をOCT compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) に包埋後, 10 μ mの厚さに前額断および水平断で薄切した。

嗅上皮および鋤鼻上皮の免疫組織化学は蛍光法によって検出した。鼻部の切片をPBSで洗浄後, 5%ウシ血清アルブミンを含むPBSでブロッキングし, 表2で示す一次抗体をそれぞれ4℃で18時間適用した。PBSで洗浄後, 表3で示すAlexa Fluor 594標識二次抗体を室温で1時間適用し, 蛍光顕微鏡で観察した。

主嗅球および副嗅球の免疫組織化学はABC法で検出した。脳の切片をPBSで洗浄し, 内因性ペルオキシダーゼを失活させた後, 5%ウシ血清アルブミンを含むPBSでブロッキングし, 表2で示す一次抗体をそれぞれ4℃で18時間適用した。PBSで洗浄後, 表3で示

表2 本研究に用いた一次抗体リストおよび使用濃度

一次抗体	品番	抗原ペプチド	抗体由来動物, 抗体の種類 (製造元)	使用濃度		
				WB	IH	TEM
抗G α olf/s抗体	sc-383	ラットG α olfのC末端 (364-381; ラットGas のC末端領域と一致)	ウサギ, ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, U.S.A.)	1:1000	1:500	—
抗G α i2抗体	sc-80007	ラットG α i2の全配列	マウス, モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotech.)	1:1000	1:100	1:500
抗G α o抗体	sc-387	ラットG α oの特異性が 高い領域 (105-124)	ウサギ, ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotech.)	1:1000	1:200	1:500

IH: 免疫組織化学, TEM: 免疫電顕法, WB: ウエスタンプロット法。

表3 本研究に用いた二次抗体リストおよび使用濃度

二次抗体	品番	抗体由来動物, 抗体の種類 (製造元)	使用濃度		
			WB	IH	TEM
ビオチン化 抗ウサギIgG抗体	711-066-152	ロバ, ポリクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, PA, U.S.A.)	1:5000	1:500	1:1000
抗マウスIgG抗体	715-066-151	ロバ, ポリクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab.)	1:5000	1:500	1:1000
Alexa Fluor 594標識 抗ウサギIgG抗体	A-11037	ヤギ, ポリクローナル抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.)	—	1:100	—
抗マウスIgG抗体	A-11032	ヤギ, ポリクローナル抗体 (Molecular Probes)	—	1:100	—

IH: 免疫組織化学, TEM: 免疫電顕法, WB: ウエスタンプロット法。

すビオチン化二次抗体を室温で30分間適用し、ABC reagentを適用した後、0.006%過酸化水素と0.02% DABを加えたTris-HCl (pH 7.4) で発色させた。

陰性対照切片として、抗G α olf/s抗体および抗G α o抗体とそれぞれに対する同濃度のブロッキングペプチド (sc-383Pおよびsc-387P; Santa Cruz) を室温で1時間反応させた後に適用した切片を作製した。

4 免疫電顕法

シマヘビ3個体を免疫電顕法に供した。動物は深麻酔下で3%パラホルムアルデヒドと0.2%グルタルアルデヒドの混合液によって灌流固定した。頭部から鋤鼻上皮を摘出し、OCT compoundへ凍結包埋して25 μ m厚に薄切した。浮遊切片はPBSで洗浄後、2.5%ウシ血清アルブミンを含むPBSでブロッキングし、表2で示す2種類の一次抗体 (抗G α i2抗体および抗G α o抗体) を4℃で3日間適用した。PBSで洗浄後、表3で示すビオチン化二次抗体を4℃で2時間適用し、ABC reagentを適用した後、0.006%過酸化水素と0.02% DABを加えたTris-HCl (pH 7.4) で発色させた。その後、1%四酸化オスミウムを4℃で1時間適用して後固定した後、エポキシ樹脂包埋し、80nm厚の超薄切片を作製して透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1 繁殖期の嗅上皮および鋤鼻上皮におけるレクチン組織化学

嗅上皮と鋤鼻上皮はともに、感覚細胞および支持細胞、基底細胞の3種類の細胞から構成されていた。嗅上皮および鋤鼻上皮において、代表的な結合パターンを示した3種類のレクチン、DSLおよびVVA、DBAの染色像を図1に示し、用いた21種類全てのレクチン結合パターンを表4としてまとめた。なお、陰性対照では特異的な反応は認められなかった。

①感覚細胞
s-WGAを除く20種類のレクチンは、嗅上皮感覚細胞と鋤鼻上皮感覚細胞とで類似した結合パターンを示した (表4, 図1; 矢印)。嗅上皮感覚細胞および鋤鼻上皮感覚細胞において、s-WGAの結合パターンは個体によって異なり、明瞭な傾向は認められなかった。

②支持細胞

BSL-IIを除く20種類のレクチンが、嗅上皮支持細胞と鋤鼻上皮支持細胞の両方と結合した (図1A; 矢頭, B; 矢頭, G; 矢頭, H; 矢頭)。しかしながら4種類のレクチン、BSL-IIおよびDBA, SJA, ECLは、嗅上皮支持細胞と鋤鼻上皮支持細胞とで異なる結合パターンを示した (図1C; 矢頭, I)。またBSL-IIは、嗅上皮支持細胞のみと結合した。

③基底細胞

用いた全てのレクチンが、嗅上皮基底細胞および鋤鼻上皮基底細胞では、それぞれ嗅上皮感覚細胞および鋤鼻上皮感覚細胞と同様のパターンで結合した (図1A; 二重矢印, B; 二重矢印, C; 二重矢印)。

④自由縁

BSL-IIおよびDBA, VVA, SJAを除く17種類のレクチンは、嗅上皮自由縁と鋤鼻上皮自由縁の両方と結

表4 繁殖期のシマヘビ嗅上皮および鋤鼻上皮におけるレクチン結合パターン

レクチン	感覚細胞および基底細胞		支持細胞		自由縁	
	嗅上皮	鋤鼻上皮	嗅上皮	鋤鼻上皮	嗅上皮	鋤鼻上皮
WGA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
s-WGA	++	±~+	++	+++	++	+++
LEL	+++	+++	+++	+++	+++	+++
STL	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DSL	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BSL-II	++	++	++	—	—	—
DBA	+	+	+++	±	—	—
SBA	++	++	+++	+++	+++	+++
BSL-I	+	++	— or +++	— or +++	+	—~+++
VVA	++	+++	+++	±	++	—
SJA	+	+	++	±	—	—
RCA -120	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Jacalin	+++	+++	+++	+++	+++	++
PNA	++	+++	++	+	+	+++
ECL	±	±	++	±	++	+
UEA-I	++	+	±	±	±~++	±
ConA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PSA	++	+	±	±	±~++	+
LCA	+++	+++	+++	+	++	++
PHA-E	+++	++	+++	++	+++	+++
PHA-L	+++	++	+++	++	++	+++

—: 陰性, ±: 偽陽性, +: 弱陽性, ++: 中陽性, +++: 強陽性。

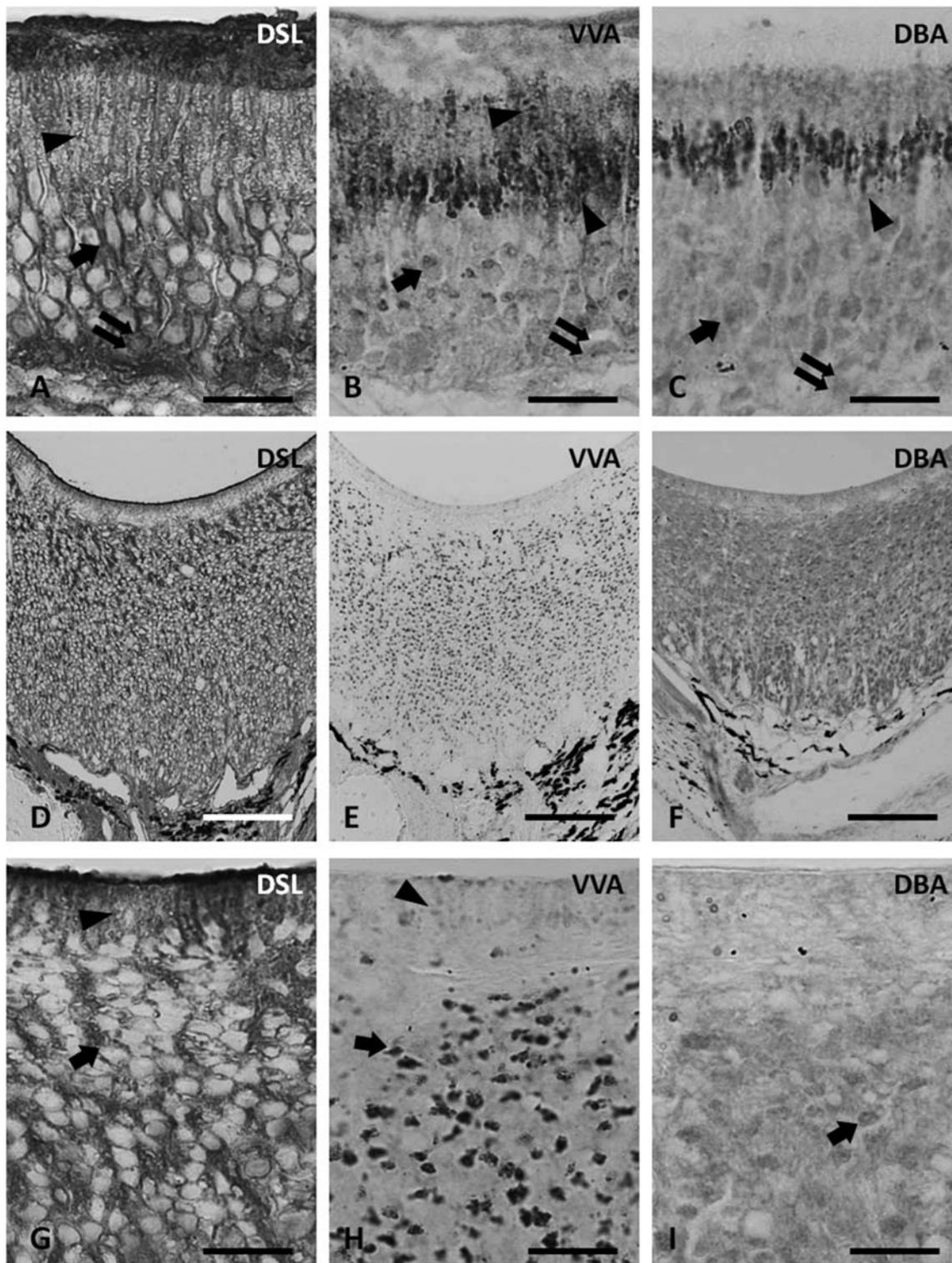


図1 繁殖期のシマヘビ嗅上皮および鋤鼻上皮におけるレクチン染色像
 A-C: 嗅上皮におけるDSL (A) およびVVA (B), DBA (C) 染色像. 矢印は感覚細胞の, 矢頭は支持細胞の, 二重矢印は基底細胞の染色像を示す. D-F: 鋤鼻上皮におけるDSL (D) およびVVA (E), DBA (F) 染色像. G-I: 鋤鼻上皮におけるDSL (G) およびVVA (H), DBA (I) 染色の自由縁領域における強拡大像. 矢印は感覚細胞の, 矢頭は支持細胞の染色像を示す. バーは (A-C, G-I) で20 μm , (D-F) で100 μm .

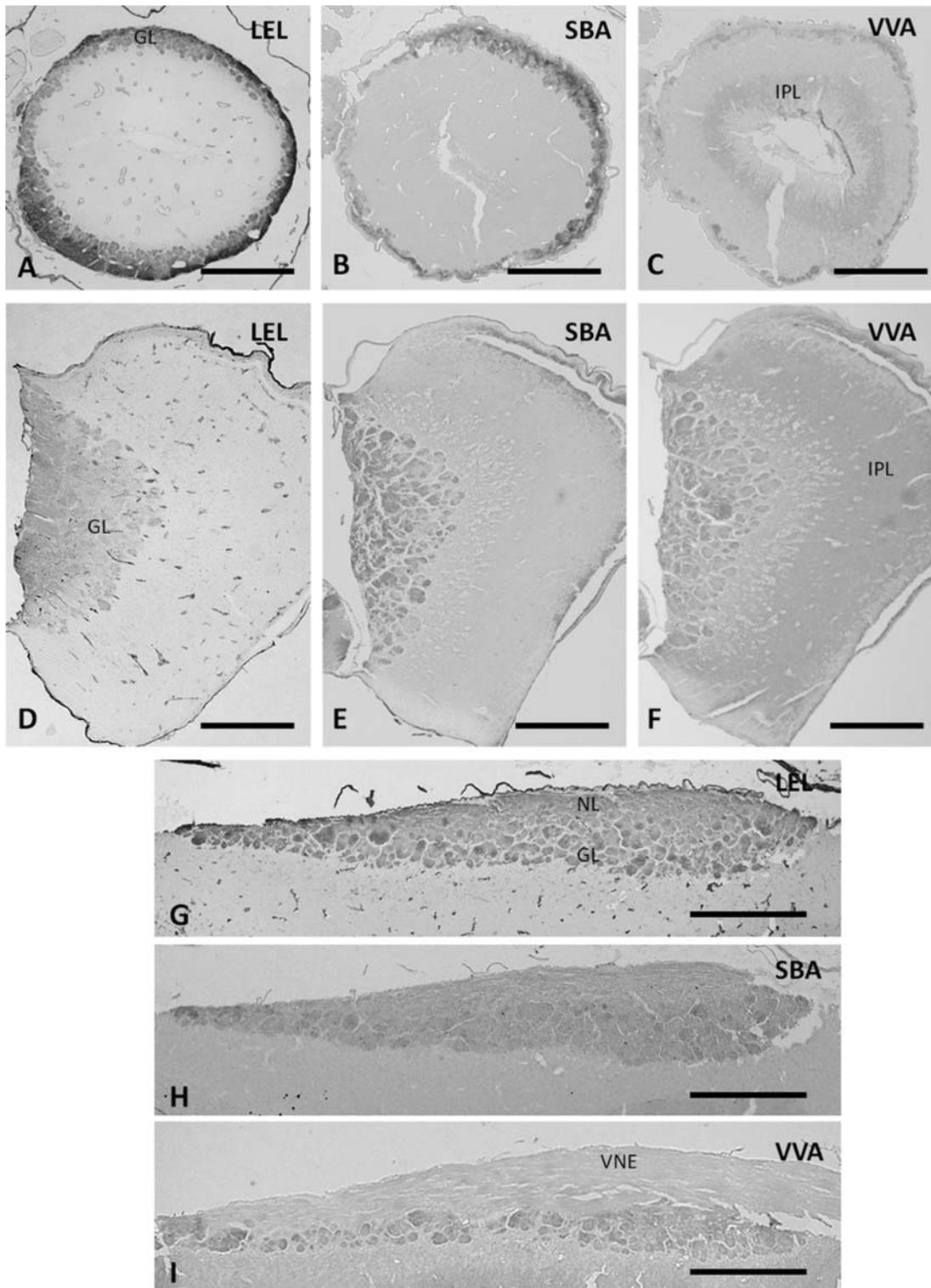


図2 繁殖期のシマヘビ主嗅球および副嗅球におけるレクチン染色像

A-C：主嗅球におけるLEL (A) およびSBA (B), VVA (C) 染色の前額断像。写真上部が背側を，右部が外側を示す。D-F：副嗅球におけるLEL (D) およびSBA (E), VVA (F) 染色の前額断像。写真上部が背側を，右部が外側を示す。G-I：副嗅球におけるLEL (D) およびSBA (E), VVA (F) 染色の水平断像。写真上部が内側を，右部が吻側を示す。GL:糸球体層，IPL：内網状層，NL：神経層，VNN：鋤鼻神経。バーは300 μ m。

表5 繁殖期のシマヘビ主嗅球および副嗅球におけるレクチン結合パターン

レクチン	神経層および糸球体層		僧帽細胞層および内網状層, 顆粒細胞層, 上衣細胞層	
	主嗅球	副嗅球	主嗅球	副嗅球
WGA	+	+	+	+
s-WGA	-	-	-	-
LEL	+++	++	-	-
STL	+++	++	-	-
DSL	++	++	++	++
BSL-II	-	-	-	-
DBA	-	-	-	-
SBA	++	++	+	+
BSL-I	-	-	-	-
VVA	± or ++ ^{a)}	± or ++ ^{a)}	± or + ^{b)}	± or + ^{b)}
SJA	-	-	-	-
RCA -120	+	+	+	+
Jacalin	++	++	++	++
PNA	++	++	+	+
ECL	±	±	±	±
UEA-I	-	-	-	-
ConA	++	++	++	++
PSA	±	±	±	±
LCA	±	±	±	±
PHA-E	++	++	++	++
PHA-L	++	++	+	+

- : 陰性, ± : 偽陽性, + : 弱陽性, ++ : 中陽性, +++ : 強陽性.

a) 神経層は偽陽性を, 糸球体層は中陽性を示した.

b) 内網状層は弱陽性を, 僧帽細胞層および顆粒細胞層, 上衣細胞層は偽陽性を示した.

合した (図1 A, C, G, I). VVAは, 嗅上皮自由縁のみと結合し (図1 B, H), PNAは, 嗅上皮自由縁よりも顕著に強く鋤鼻上皮自由縁と結合した. BSL-IおよびUEA-I, PSAは, 嗅上皮自由縁ないし鋤鼻上皮自由縁と個体によって異なる強度で結合した.

2 繁殖期の主嗅球および副嗅球におけるレクチン組織化学

主嗅球と副嗅球ともに, 神経層および糸球体層, 僧帽細胞層, 内網状層, 顆粒細胞層, 上衣細胞層の6層構造を示した. 主嗅球および副嗅球において, 代表的な結合パターンを示した3レクチン, LELおよびSBA, VVAの染色像を図2に示し, 用いた21種類全てのレクチン結合パターンを表5としてまとめた. 本研究で用いた全てのレクチンが, 6つの層全てにおいて, 主嗅球と副嗅球とで類似した結合パターンを示した. なお, 陰性対照では特異的な反応は認められなかった.

3 抗G α olf/sおよび抗 α i2, 抗G α o抗体を用いたウエスタンブロット法

抗G α olf/s抗体を用いたウエスタンブロット法では, 嗅上皮および脳において期待される分子量 (45kDa) 付近に特異的な単一バンドが得られた (図3 A). 抗G α i2抗体を用いたウエスタンブロット法では, 脳において期待される分子量 (40kDa) 付近に特異的な単

一バンドが得られた (図3 B). 抗G α o抗体を用いたウエスタンブロット法では, 嗅上皮および鋤鼻上皮, 脳の全てにおいて期待される分子量 (40kDa) 付近に特異的な単一バンドが得られた (図3 C). 陰性対照では特異的な反応は認められなかった (図3 D).

4 抗G α olf/sおよび抗G α i2, 抗G α o抗体を用いた免疫組織化学および免疫電顕法

嗅上皮では, 抗G α olf/s抗体は感覚細胞の線毛において強陽性を示し (図4 A; 矢頭), 樹状突起および細胞体, 軸索において弱陽性を示した (図4 A). 抗G α o抗体は感覚細胞の樹状突起および細胞体, 軸索において弱陽性を示した (図4 C) が, 線毛では陽性を示さなかった (図4 C; 矢頭). 抗G α i2抗体は嗅上皮において陽性を示さなかった (図4 B). 抗G α olf/s抗体とブロッキングペプチドを反応させた陰性対照では, 特異的な反応は認められなかった (図4 D).

鋤鼻上皮において, 抗G α o抗体は自由縁および感覚細胞の細胞体, 軸索において強陽性を示し, 非感覚上皮で被われるマッシュルームボディでは陽性を示さなかった (図4 G). 抗G α olf/s抗体および抗G α i2抗体は鋤鼻上皮において陽性を示さなかった (図4 E, F). 抗G α o抗体とブロッキングペプチドを反応させた陰性対照では, 特異的な反応は認められなかった (図4 H). 鋤鼻上皮における免疫電顕法において, 感覚細胞と支

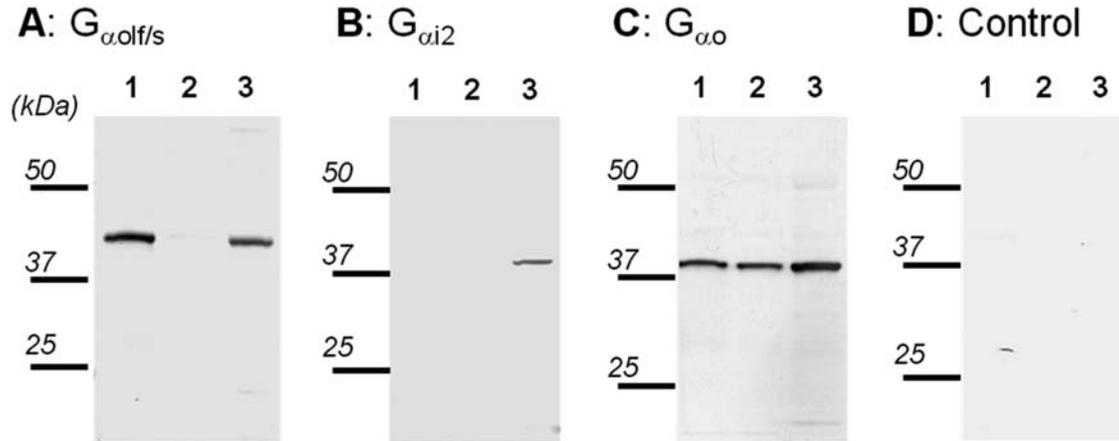


図3 シマヘビ由来組織における抗 $G\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロット像
 A: 抗 $G\alpha_{olf/s}$ 抗体. B: 抗 $G\alpha_{i2}$ 抗体. C: 抗 $G\alpha_o$ 抗体. D: 陰性対照. 1レーン: 嗅上皮, 2レーン: 鋤鼻上皮, 3レーン: 脳. 期待される蛋白質の分子量は (A) で約45kDa, (B, C) で約40kDa.

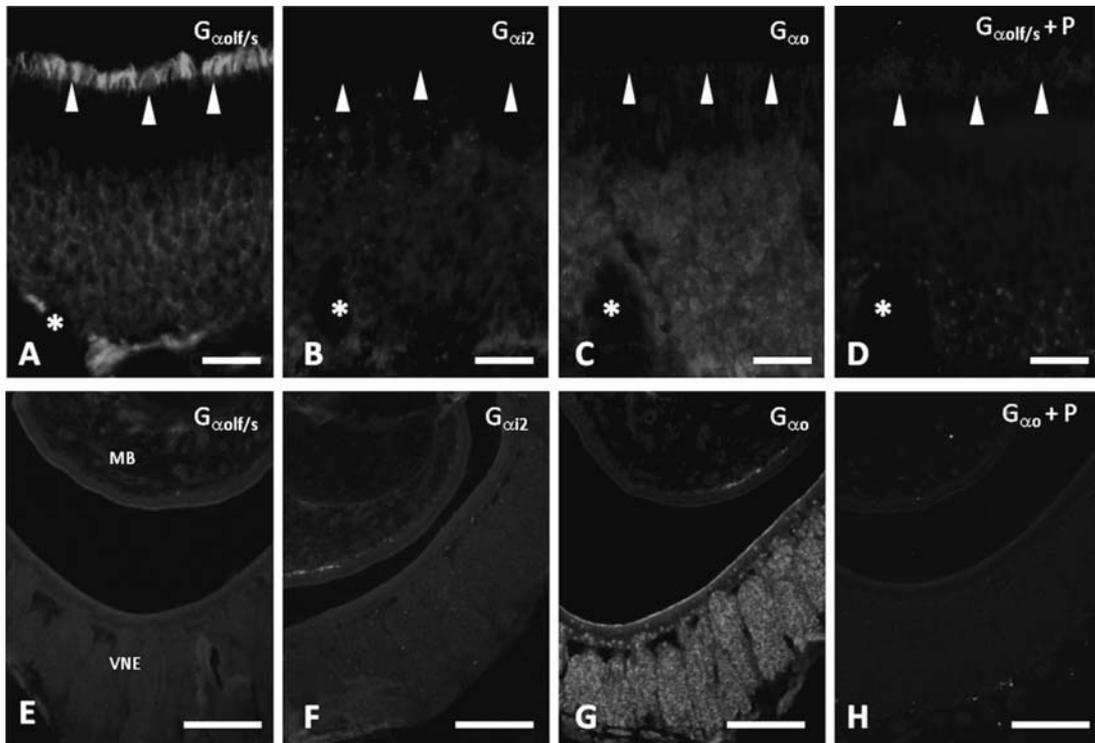


図4 シマヘビ嗅上皮および鋤鼻上皮における抗 $G\alpha$ 免疫組織化学像
 A-D: 嗅上皮における抗 $G\alpha_{olf/s}$ 抗体 (A) および抗 $G\alpha_{i2}$ 抗体 (B), 抗 $G\alpha_o$ 抗体 (C) を用いた免疫組織化学像ならびに陰性対照 (D). 矢頭は嗅上皮感覚細胞の線毛を, アスタリスクは嗅腺 (陰性対照部位) を示す. E-H: 嗅上皮における抗 $G\alpha_{olf/s}$ 抗体 (E) および抗 $G\alpha_{i2}$ 抗体 (F), 抗 $G\alpha_o$ 抗体 (G) を用いた免疫組織化学像ならびに陰性対照 (H). MB: マッシュルームボディー, VNE: 鋤鼻上皮. バーは (A-D) で20 μm , (E-H) で200 μm .

持細胞の両方が微絨毛を有したが, 抗 $G\alpha_o$ 抗体は感覚細胞の微絨毛において陽性を示し (図5A; 矢頭, B; 矢頭), 支持細胞の微絨毛では陽性を示さなかった (図5A; 矢印, B; 矢印). 対照的に, 抗 $G\alpha_{i2}$ 抗体は感覚細胞と支持細胞の両方の微絨毛において陽性を示さなかった (図5C).

嗅球において, 抗 $G\alpha_{olf/s}$ 抗体は主嗅球の神経層および糸球体層において陽性を示した (図6A; 矢印) が, 副嗅球のこれらの層では陽性を示さなかった (図6E; 矢印). 抗 $G\alpha_o$ 抗体は主嗅球と副嗅球の両方の神経層および糸球体層において陽性を示した (図6C; 矢印, G; 矢印). 抗 $G\alpha_{i2}$ 抗体は主嗅球と副嗅球の両

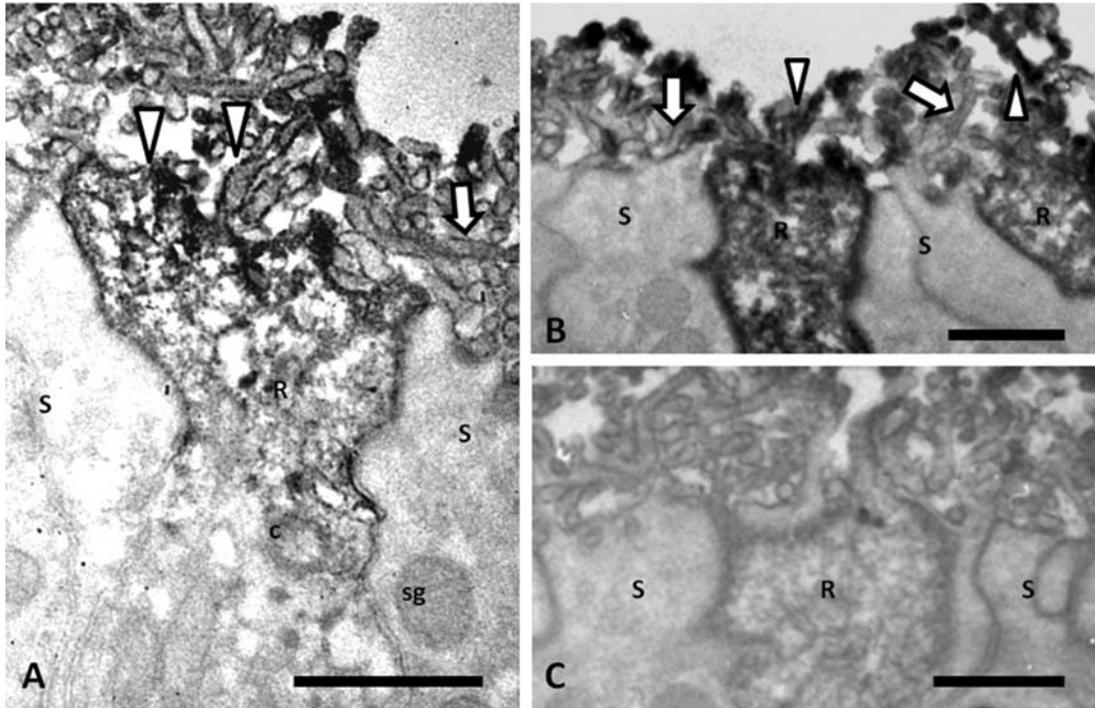


図5 シマヘビ鋤鼻上皮自由縁における抗 $G\alpha$ 免疫電顕像
 A, B: 抗 $G\alpha_o$ 抗体を用いた免疫電顕像. 矢頭は鋤鼻上皮感覚細胞の微絨毛を, 矢印は支持細胞の微絨毛を示す. C: 抗 $G\alpha_{i2}$ 抗体を用いた免疫電顕像. R: 感覚細胞, S: 支持細胞, c: 感覚細胞内のセントリオール, sg: 支持細胞内の分泌顆粒. バーは $1\ \mu\text{m}$.

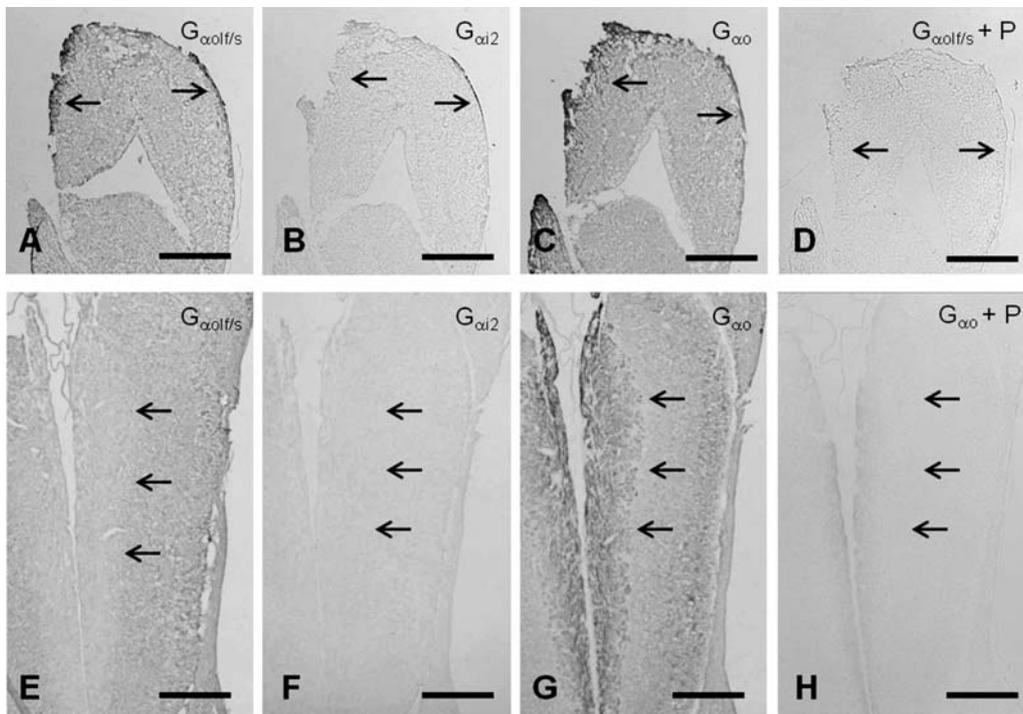


図6 シマヘビ主嗅球および副嗅球における抗 $G\alpha$ 免疫組織化学像
 A-D: 主嗅球における抗 $G\alpha_{olf/s}$ 抗体 (A) および抗 $G\alpha_{i2}$ 抗体 (B), 抗 $G\alpha_o$ 抗体 (C) を用いた免疫組織化学像ならびに陰性対照 (D). 矢印は糸球体層を示す. E-H: 副嗅球における抗 $G\alpha_{olf/s}$ 抗体 (E) および抗 $G\alpha_{i2}$ 抗体 (F), 抗 $G\alpha_o$ 抗体 (G) を用いた免疫組織化学像ならびに陰性対照 (H). 矢印は糸球体層を示す. バーは $300\ \mu\text{m}$.

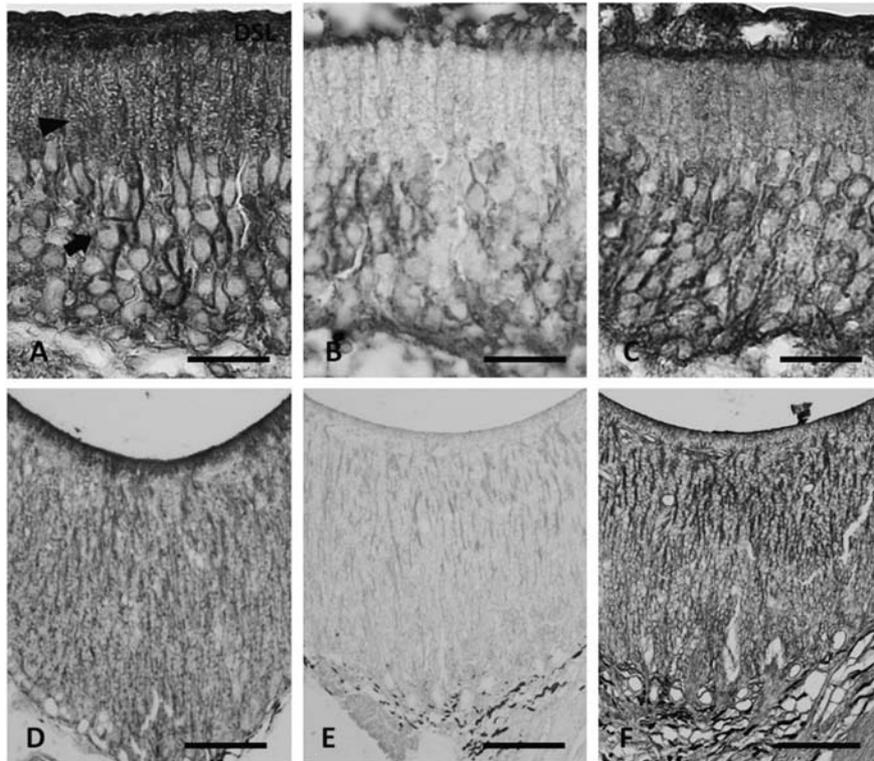


図7 シマヘビ嗅上皮および鋤鼻上皮におけるDSL染色像の季節変化
 A-C：繁殖期（A）および冬眠中（B）、シアル酸除去後の冬眠中（C）の嗅上皮におけるDSL染色像。矢印は感覚細胞を，矢頭は支持細胞を示す。D-F：繁殖期（D）および冬眠中（E）、シアル酸除去後の冬眠中（F）の鋤鼻上皮におけるDSL染色像。バーは（A-C）で20 μm ，（D-E）で100 μm 。

方の神経層および糸球体層において陽性反応を示さなかった（図6B；矢印，F；矢印）。抗G αo f/s抗体および抗G αo 抗体とブロッキングペプチドを反応させた陰性対照では，特異的な反応は認められなかった（図6D，H）。

5 冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮におけるレクチン組織化学

繁殖期および冬眠中，さらにシアル酸除去後の冬眠中の嗅上皮と鋤鼻上皮において，代表的な結合パターンを示したDSLの染色像を図7に，LCAの染色像を図8に示した。用いた21種類のレクチン全てが，冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮（感覚細胞および支持細胞，基底細胞，自由縁）と繁殖期の個体よりも弱く結合した（図7，8）。しかしながら，シアル酸除去後の冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮において，用いた21種類のレクチン全てが繁殖期の嗅上皮および鋤鼻上皮のものと類似した結合パターンを示した（図7，8）。

考 察

1 主嗅覚系と鋤鼻系の感覚細胞ならびに嗅球に発現する複合糖質の類似性

シマヘビにおいて，嗅上皮感覚細胞と鋤鼻上皮感覚

細胞のレクチン結合パターンはs-WGAを除く20種類で類似し，主嗅球と副嗅球における結合パターンも21種類全てのレクチンで類似した。このことから，シマヘビの主嗅覚系と鋤鼻系に発現する複合糖質（糖タンパク質や糖脂質）は類似していることが示唆された。多くの動物種において，主嗅覚系と鋤鼻系のレクチン結合パターンは異なることが報告されている [12-15]。しかしながら，ヘビ類と同様に非常によく発達した鋤鼻系を有するトカゲ類のミドリカナヘビ *Lacerta viridis* とイタリアカベカナヘビ *Podarcis sicula* では，いずれも主嗅覚系と鋤鼻系における5種類のレクチン（SBA，DBA，BSL-I，BSL-I-B4，LEL）で結合パターンが類似し，異なる結合パターンを示すレクチンは報告されていない [16]。対照的に，同じトカゲ亜目に属し，嗅覚刺激よりも視覚刺激の受容に優れたヒガシウォータードラゴン *Physignathus lesueurii* では，SBAとBSL-I-B4によって鋤鼻系が主嗅覚系よりも顕著に染色される [17]。したがって，主嗅覚系と鋤鼻系に存在する複合糖質が類似するという組織化学的特徴は，鋤鼻系が発達するヘビ類や一部のトカゲ類に特有のものであると考えられる。このことはヘビ類や一部のトカゲ類において，主嗅覚系と鋤鼻系が類似した行動（捕食行動および逃避行動，性行動など）を仲介する

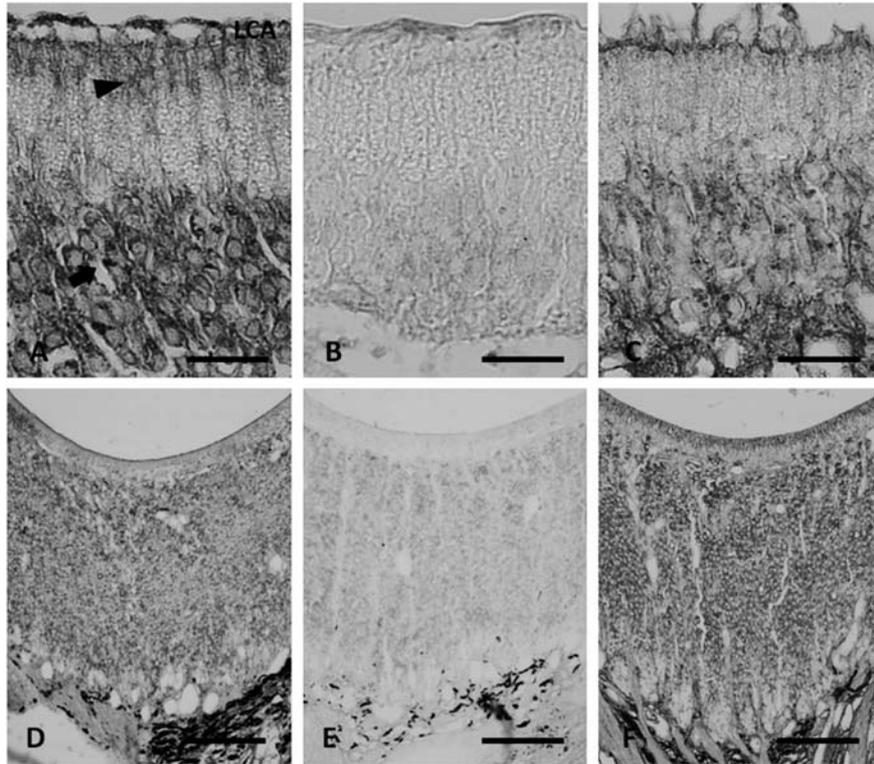


図8 シマヘビ嗅上皮および鋤鼻上皮におけるLCA染色像の季節変化

A-C：繁殖期 (A) および冬眠中 (B), シアル酸除去後の冬眠中 (C) の嗅上皮におけるLCA染色像。矢印は感覚細胞を, 矢頭は支持細胞を示す。D-F：繁殖期 (D) および冬眠中 (E), シアル酸除去後の冬眠中 (F) の鋤鼻上皮におけるLCA染色像。バーは (A-C) で20 μm , (D-E) で100 μm 。

[6-8] という他の動物種では認められない行動学的特徴と関連しているのかもしれない。

嗅覚系において, 複合糖質は匂い刺激の受容および伝導, 処理の各過程, あるいは連続的なターンオーバーや個体発生において重要な役割を担うことが知られている [18]. 嗅覚系による匂い刺激の伝導は, 匂い物質を受容した感覚細胞の樹状突起や細胞体, 軸索を介して行われ, 一次投射部位である嗅球で匂い刺激の処理が行われる. シマヘビの主嗅覚系と鋤鼻系において, 一次投射経路 (感覚細胞の樹状突起や細胞体, 軸索, さらに嗅球の各層) に発現する複合糖質が類似することから, ヘビ類の主嗅覚系と鋤鼻系における匂い刺激受容後の伝導や処理過程が類似する可能性が示された。

2 主嗅覚系と鋤鼻系に発現する嗅覚受容体ファミリー

ウエスタンプロット法によって, 用いた抗 $G_{\alpha\text{olf/s}}$ 抗体および抗 $G_{\alpha\text{i2}}$ 抗体, 抗 $G_{\alpha\text{o}}$ 抗体の全てがシマヘビ由来の組織で特異的な単一バンドを形成したことから, これらの抗体をシマヘビ G_{α} と特異的に反応すると判断して免疫組織化学に用いた。

嗅上皮感覚細胞において, 多数の線毛が抗 $G_{\alpha\text{olf/s}}$ 抗体にのみ陽性を示した. 嗅上皮において線毛を有する細胞は感覚細胞のみであり, 主嗅覚系において嗅覚

受容体と共役する G_{α} は $G_{\alpha\text{olf}}$ のみであると考えられる. なお, 細胞体は抗 $G_{\alpha\text{o}}$ 抗体に陽性を示したが, 神経系に発現する $G_{\alpha\text{o}}$ は嗅覚受容に関連する分子の他に軸索伸長やシナプス結合, 細胞間情報伝達などに関与することが知られ [19], 本研究で認められた陽性反応は嗅覚受容体と共役するものではないと判断した. 主嗅球の糸球体層全体が同様に抗 $G_{\alpha\text{olf/s}}$ 抗体に陽性を示したことも, 主嗅覚系が $G_{\alpha\text{olf}}$ を発現することを支持している. $G_{\alpha\text{olf}}$ は OR と共役する G_{α} である [11].

鋤鼻上皮感覚細胞において, 全ての微絨毛が抗 $G_{\alpha\text{o}}$ 抗体に陽性を示し, 抗 $G_{\alpha\text{olf/s}}$ 抗体および抗 $G_{\alpha\text{i2}}$ 抗体に陰性を示した. したがって, 鋤鼻系において嗅覚受容体と共役する G_{α} は $G_{\alpha\text{o}}$ のみであると考えられる. 副嗅球の糸球体層全体が抗 $G_{\alpha\text{o}}$ 抗体に陽性を示し, 抗 $G_{\alpha\text{olf/s}}$ 抗体および抗 $G_{\alpha\text{i2}}$ 抗体に陰性を示したことも, 鋤鼻系が $G_{\alpha\text{o}}$ のみを発現することを強く支持する. $G_{\alpha\text{o}}$ は V2R と共役する G_{α} である [10].

3 他の動物種の嗅覚系との比較

本研究において, シマヘビ主嗅覚系は OR- $G_{\alpha\text{olf}}$ のみを発現することが示唆された. 多くの動物種において, 主嗅覚系に発現する主な受容体は OR- $G_{\alpha\text{olf}}$ であり [11], シマヘビの主嗅覚系に発現する嗅覚受容体

は他の動物種のものと同様である。一方で、シマヘビ鋤鼻系はV2R-G α 0のみを発現することが示唆された。ツメガエルなどの両生類の鋤鼻系はV2R-G α 0のみを発現する [20] が、げっ歯類の鋤鼻系はV2R-G α 0とV1R-G α 2の両方を発現し [10]、多くの哺乳類の鋤鼻系はV1R-G α 2のみを発現する [21]。したがって、鋤鼻系におけるV1R-G α 2の発現は両生類から哺乳類への進化の間に生じたと考えられている。シマヘビの鋤鼻系に発現する嗅覚受容体は哺乳類よりも両生類のものと同様であり、このことはヘビ類（爬虫類有鱗目）が鋤鼻系におけるV1R-G α 2の出現よりも前の段階で哺乳類と異なる進化経路を辿った可能性を示している。

4 主嗅覚系と鋤鼻系が受容する匂い物質の性質

本研究において、シマヘビ主嗅覚系および鋤鼻系はそれぞれOR-G α olfおよびV2R-G α 0を発現することが示唆された。一般的に、OR-G α olf およびV1R-G α 2は分子量の小さな揮発性物質と高い親和性を有し [22]、V2R-G α 0はペプチドなど分子量の大きい非揮発性水溶性物質と高い親和性を有する [23]。したがって、シマヘビにおいて主嗅覚系は主に分子量の小さい揮発性物質を、鋤鼻系は主に分子量の大きい非揮発性水溶性物質を受容することが示唆される。すなわち、ヘビ類は単一の物体から生じる多様な匂い物質を2つの嗅覚系によって受容することで対象物を敏感に感知することができ、このことが類似した行動（捕食行動や逃避行動、繁殖行動など）に主嗅覚系と鋤鼻系の両方が関与する [6-8] ことの利点となっている可能性がある。

5 レクチン組織化学的特徴の季節変化

21種類全てのレクチンが冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮に対し繁殖期のものよりも弱く結合したが、シアル酸除去後では、それらは冬眠中の感覚細胞を繁殖期のものと同程度の強度で結合した。したがって、冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮では、感覚細胞や支持細胞において多量のシアル酸残基が複合糖質の糖鎖末端をキャッピングしていることが示唆される。嗅覚系を含む神経系において、糖鎖末端をキャッピングする多量のシアル酸は神経の可塑性を高め、神経細胞の再生や分化を調節し、負の電荷によって神経細胞の興奮を抑制することが知られる [24]。したがって、冬眠中の主嗅覚系および鋤鼻系は繁殖期のものよりも高い感覚細胞の可塑性を有し、シアル酸の負の電荷によって匂い刺激の受容機能が低下している可能性がある。また、分泌タンパク質（ムチンなど）に存在するシアル酸はいくつかの病原因子によって細胞受容体として認識され、粘液層や分泌顆粒内の複合糖質に含まれる多量のシ

アル酸残基は、「decoy function」によって上皮を感染から防御することが知られる [25]。したがって、冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮は繁殖期のものよりも感染からの一次生体防御に有利な状態である可能性がある。

総括

本研究では、シマヘビの主嗅覚系および鋤鼻系をレクチン組織化学ならびに抗G α 免疫組織化学によって解析した。レクチン組織化学の結果から、主嗅覚系と鋤鼻系の一次投射経路（感覚細胞の樹状突起から一次中枢である嗅球まで）に発現する複合糖質は類似することが示され、匂い物質受容後の匂い刺激の伝導や処理過程は主嗅覚系と鋤鼻系とで類似することが示唆された。この主嗅覚系と鋤鼻系における一次投射経路の類似性は、主嗅覚系と鋤鼻系の両方が類似した行動（捕食行動や逃避行動、繁殖行動など）に関与するというヘビ類の行動学的特徴と関連しているのかもしれない。また、抗G α 免疫組織化学の結果から、ヘビ類では主嗅覚系と鋤鼻系とで発現する嗅覚受容体は異なることが示され、ヘビ類の主嗅覚系と鋤鼻系は異なる性質の匂い物質を受容することが示唆された。この主嗅覚系と鋤鼻系における嗅覚受容体の相違性は、類似した行動（捕食行動や逃避行動、繁殖行動など）に主嗅覚系と鋤鼻系の両方が関与することの利点となる可能性がある。

さらに、ヘビ類の主嗅覚系と鋤鼻系における組織化学的特徴は季節変化することが示された。すなわち、冬眠中の嗅上皮および鋤鼻上皮感覚細胞および支持細胞内の分泌顆粒では、多量のシアル酸残基が繁殖期のものよりも多くの複合糖質の糖鎖末端をキャッピングしていることが示唆された。したがって、冬眠中の主嗅覚系および鋤鼻系は繁殖期のものよりもシアル酸の負の電荷によって匂い刺激の受容機能が低下し、さらに病原因子からの感染防御機能が亢進している可能性がある。

なお、本研究の一部はKondoh et al. J Morphol, 271, 1197-1203 (2010) ならびにKondoh et al. Anat Histol Embryol, 41, 41-53 (2012), Kondoh et al. J Vet Med Sci, (in press) に掲載および掲載予定されていますので、参照していただければ幸いです。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大な御指導を賜りました岩手大学 谷口和之教授ならびに山本欣郎教授に心より感謝いたします。また、本研究に供したシマヘビをご提供いただきました日本蛇族学術研究所 故鳥羽通

久博士に深く感謝いたします。

引用文献

- [1] Brennan PA : The vomeronasal system, *Cell Mol Life Sci*, 58, 546-555 (2001)
- [2] Doving KB, Trotter D : Structure and function of the vomeronasal organ, *J Exp Biol*, 201, 2913-2925 (1998)
- [3] Halpern M : The organization and function of the vomeronasal system, *Ann Rev Neurosci*, 10, 325-362 (1987)
- [4] Martinez-Marcos A, Lanuza E, Halpern M : Neural substrates for processing chemosensory information in snakes, *Brain Res Bull*, 57, 543-546 (2002)
- [5] Rodriguez I, Feinstein P, Mombaerts P : Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system, *Cell*, 97, 199-208 (1999)
- [6] Kubie JL, Halpern M : Chemical senses involved in garter snake prey trailing, *J Comp Physiol Psychol*, 93, 648-667 (1979)
- [7] Miller LR, Gutzke WH : The role of the vomeronasal organ of crotalines (Reptilia: Serpentes: Viperidae) in predator detection, *Anim Behav*, 58, 53-57 (1999)
- [8] Shine R, Mason RT : An airborne sex pheromone in snakes, *Biol Lett*, 8, 183-185 (2012)
- [9] Damjanov I : Lectin cytochemistry and histochemistry, *Lab Invest*, 57, 5-20 (1987)
- [10] Berghard A, Buck LB : Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G_{α_o} , $G_{\alpha_{12}}$, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade, *J Neurosci*, 16, 909-918 (1996)
- [11] Jones DT, Reed RR : G_{olf} : an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction, *Science*, 244, 790-795 (1989)
- [12] Mendoza AS, Kuhnel W : Lectin histochemical investigation on the region olfactoria and the vomeronasal organ of rat and golden hamster, *Acta Histochem*, 91, 173-184 (1991)
- [13] Nakajima T, Shiratori K, Ogawa K, Tanioka Y, Taniguchi K : Lectin-binding patterns in the olfactory epithelium and vomeronasal organ of the common marmoset, *J Vet Med Sci*, 60, 1005-1011 (1998)
- [14] Saito H, Ogawa K, Taniguchi K : Lectin-binding patterns of the olfactory receptors (olfactory epithelium, vomeronasal organ and septal olfactory organ of Maseru) in the rat, *Exp Anim*, 43, 51-60 (1994)
- [15] Saito S, Matsui T, Kobayashi N, Wakisaka H, Mominoki K, Matsuda S, Taniguchi K : Lectin histochemical study on the olfactory organ of the newt, *Cynops pyrrhogaster*, revealed heterogeneous mucous environments in a single nasal cavity, *Anat Embryol*, 206, 349-356 (2003)
- [16] Franceschini V, Lazzari M, Ciani F : Lectin cytochemical localisation of glycoconjugates in the olfactory system of the lizards *Lacerta viridis* and *Podarcis sicula*, *Anat Embryol*, 202, 49-54 (2000)
- [17] Franceschini V, Lazzari M, Ciani F : Lectin-binding patterns in the olfactory system of the lizard, *Physignathus lesueurii*, *J Morphol*, 247, 34-38 (2001)
- [18] Plendl J, Sinowatz F : Glycobiology of the olfactory system, *Acta Anat Basel*, 161, 234-253 (1998)
- [19] Jiang M, Bajpayee NS : Molecular mechanisms of G_o signaling, *Neurosignals*, 17, 23-41 (2009)
- [20] Date-Ito A, Ohara H, Ichikawa M, Mori Y, Hagino-Yamagishi K : Xenopus V1R vomeronasal receptor family is expressed in the main olfactory system, *Chem Senses*, 33, 339-346 (2008)
- [21] Takigami S, Mori Y, Tanioka Y, Ichikawa M : Morphological evidence for two types of mammalian vomeronasal system, *Chem Senses*, 29, 301-310 (2004)
- [22] Del Punta K, Leinders-Zufall T, Rodriguez I, Jukam D, Wysocki CJ, Ogawa S, Zufall F, Mombaerts P : Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes, *Nature*, 419, 70-74 (2002)
- [23] Kimoto H, Haga S, Sato K, Touhara K : Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons, *Nature*, 437, 898-901 (2005)
- [24] Rutishauser U, Landmesser L : Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions, *Trends Neurosci*, 19, 422-427 (1996)
- [25] Rose MC, Voynow JA : Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease, *Physiol Rev*, 86, 245-278 (2006)