

## アカハライモリの陸上・水中飼育における嗅覚応答性変化の解析

丹羽文太郎（筑波大学 生物学類）

指導教員：櫻井啓輔（筑波大学 生命環境系）

## 【背景と目的】

嗅覚は、五感の一つの感覚である。我々生物において、嗅覚は外部環境に存在する化学物質を匂い情報として感知し、餌の確保や種の存続など生命活動に重要な役割を果たしている。また、これらの化学物質は空気中では揮発性化学物質、水中ではアミノ酸などがあり、環境により全く異なる分子を匂い物質としている。この化学物質を匂いとして感知する機能は、鼻腔の嗅上皮に存在する嗅細胞であることが明らかにされている。

陸上生物では嗅上皮に存在する嗅細胞でアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性があることが報告され、嗅覚の情報伝達経路のセカンドメッセンジャーに cAMP が関与していることが知られている。また、AC/cAMP 経路には G タンパク質の関与が考えられ、アデニル酸シクラーゼ活性のある G タンパク質が嗅細胞上に存在することが報告された。この G タンパク質は  $G_{\alpha olf}$  と命名された。一方、水生生物ではアミノ酸が匂い物質として受容されることが知られている。その情報伝達経路は、G タンパク質である  $G_{\alpha o}$  を仲介とした PLC/IP3 経路であると考えられている。

今回実験で使用するアカハライモリを含む両生類において、揮発性化学物質とアミノ酸の両方を匂い物質として感知していることが明らかになっている。またイモリは、生息環境が変わることによって嗅覚の応答性が変化させることが知られている。アカハライモリの生息環境を水中から陸上に変化させたところ、揮発性化学物質の応答性は変化しなかったのに対し、アミノ酸に対する応答性が高まることが示唆された。また、陸上への環境変化に伴い嗅細胞の繊毛が伸長することが報告されている。これらの結果から、アミノ酸の応答性の上昇に嗅細胞の伸長が関与する可能性が示唆される。本研究では、陸上と水中で飼育したイモリにおいて、揮発性匂い物質の受容を担う G タンパク質  $G_{\alpha olf}$  と、アミノ酸の受容を担う G タンパク質  $G_{\alpha o}$  を指標に、免疫組織化学染色で各条件下における両嗅細胞の分布と嗅細胞の長さを調べること、細胞の応答性の上昇と形態の変化の関連を明らかにすることを目的とした。

## 【材料と方法】

## 実験動物

業者から購入した千葉県産のアカハライモリを、2 つのグループに分け、次の条件下で飼育した後、解析を行なった。

## 陸上飼育：

水を抜いた水槽の底に湿らせたキッチンペーパーを置き、その上で摂餌させずに 5 日間飼育した。

## 水中飼育：

水を張った水槽中で、摂餌させずに 5 日間飼育した。

## 免疫組織化学染色

アカハライモリの嗅上皮を対象に、抗  $G_{\alpha olf}$  抗体および抗  $G_{\alpha o}$  抗体を用いた免疫組織化学的手法による染色を行なった。麻酔処理後、4% パラホルムアルデヒド液で固定し、脱灰液である 0.25

MEDTA (pH 7.4) に漬けた。その後、20%スクロース液に置換し、OCT コンパウンドで凍結包埋した。包埋したサンプルは、20  $\mu$ m 厚で薄切し、スライドガラスに貼り付けた。組織切片は PBS に浸し、OCT コンパウンドを除去した。その後でメタノール処理をし、PBS 洗浄を行った。次にブロッキング液 (2% BSA/PBS) を滴下し、モイスタチャーボックスに入れて、4°C で 24 時間ブロッキングした。次に、抗  $G_{\alpha olf}$  抗体、抗  $G_{\alpha o}$  抗体を用いて組織切片に対して、一次抗体溶液 (1/1000 倍希釈) を 4°C で 24 時間反応させた。次に、組織切片に対し二次抗体溶液を、室温で 1 時間反応させた。その後、PBS 洗浄を行い、スライドガラスを封入した。スライドは蛍光顕微鏡 (Olympus: IX83) により観察し、画像を取得した。

## 嗅細胞の単離と、嗅細胞の長さ測定

アカハライモリの嗅上皮から嗅細胞の単離を行った。まず、摘出した嗅上皮をコラゲナーゼ処理するため、1 mg/ml コラゲナーゼを含む二価イオンを除去生理的塩類溶液に移し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、生理的塩類溶液で洗浄し、嗅細胞を単離した。単離した嗅細胞は、コンカナバリンでコートされたディッシュに移し、細胞をディッシュ底に固着させるために 30 分間静置した。その後、顕微鏡により単離した嗅細胞の微分干渉像を取得し、画像解析ソフトウェアにより嗅細胞の長さを計測した。

## 【結果・今後の展望】

免疫組織化学染色より、アカハライモリを水中飼育した条件下では、嗅上皮において G タンパク質  $G_{\alpha o}$  が広く分布し、陸上飼育した場合は  $G_{\alpha olf}$  が広く分布する傾向が観察された。下の図は、嗅上皮上における抗  $G_{\alpha o}$  抗体の免疫組織化学染色例である。このような観察を今後、水中飼育、陸上飼育において行い  $G_{\alpha o}$  と  $G_{\alpha olf}$  の発現分布を解析する。

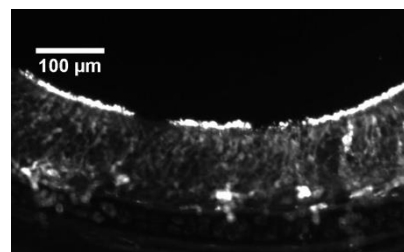


図1 イモリ嗅上皮における G タンパク質  $G_{\alpha o}$  の発現

また両条件下における嗅細胞の長さ測定も行っている。これらの結果は合わせて 2 月の発表時に報告する。