

原 著

シリケンイモリ (*Cynops ensicauda*) の嗅球における糖鎖分布の組織化学的同定田中久美子^{* **}, 松井利康^{*}, 小林 靖^{*}

防医大誌 (2017) 42 (3) : 119-129

要旨：有尾両生類は、主鼻腔の外側部に位置する原始的な鋤鼻器を有している。鋤鼻器とその一次中枢である副嗅球は、水棲から陸棲への移行期にある両生類で初めて出現したが、それらの副嗅覚系（鋤鼻嗅覚系）の形態や分子発現は有尾両生類も含めて不明な点が多い。本研究で、我々は半水棲の有尾両生類シリケンイモリの嗅球における糖鎖の分布様式をレクチン組織化学により決定した。その結果、7種類のレクチンが、嗅神経および鋤鼻神経の線維とその終止部である嗅糸球に特異的結合性を示した。これらレクチンのうち、succinylated wheat germ agglutinin (s-WGA), soybean agglutinin (SBA), *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I (BSL-I) およびpeanut agglutinin (PNA) は主嗅球の嗅糸球と副嗅球の嗅糸球との間で異なる反応性を示した。また、s-WGA, SBA, BSL-Iおよび*Pisum sativum* agglutinin (PSA) は主嗅球の吻側領域に分布する嗅糸球に対して尾側領域よりも強く結合し、主嗅球における機能的サブセットの存在を示唆した。以上の結果は、シリケンイモリ嗅球における領域特異的な糖鎖発現を示し、この糖鎖発現様式が一次嗅覚路の系統発生における形態および機能の分化を反映することを示唆している。

索引用語： 鋤鼻器 / 嗅球 / 糖鎖 / レクチン / 有尾両生類

緒 言

多くの四足動物は2つの嗅覚系、主嗅覚系と副嗅覚系（鋤鼻嗅覚系）を有している¹⁻⁴。主嗅覚系は鼻腔に存在する嗅上皮と、脳に存在する主嗅球から構成される。嗅上皮には、主嗅球へと投射する嗅感覚細胞が存在し、嗅覚受容体に結合した匂い分子の情報を脳へと伝達する。一方、副嗅覚系は鼻腔の憩室である鋤鼻器の鋤鼻上皮と脳の副嗅球から構成され、鋤鼻上皮の鋤鼻感覚細胞は副嗅球に投射する。両上皮の感覚細胞の軸索は、それぞれ主嗅球または副嗅球において僧帽細胞・房飾細胞の樹状突起とシナプスをつくり、嗅糸球と呼ばれる球形構造を形成する。匂いの伝達様式は主嗅覚系と副嗅覚系で似ているが、主嗅覚系が一般的な幅広い種類

の匂いを感知・伝達するのに対して、副嗅覚系はフェロモンの感知・伝達を行うため動物の生殖行動等に関与することが知られている^{2, 5-7}。

Bertmar (1981) は脊椎動物の鼻腔形態を魚類から哺乳類まで比較解剖学的に検討し、有尾両生類などが原始的な鋤鼻器を持つことから、鋤鼻器が水棲から陸棲への適応のために出現したとの仮説を立てた⁸。この仮説は、祖先が陸上生活に一旦適応したのち、二次的に水中へと進出したクロコダイル科、ウミガメ科、鯨類の鋤鼻器が退化または消失すること、とも一致する^{3, 8}。また、無尾両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は主憩室上皮、中憩室上皮、鋤鼻上皮と3種類の嗅覚上皮を有しており、中憩室上皮では魚類様の嗅覚受容体が、主憩室上

*防衛医科大学校解剖学講座
Department of Anatomy and Neurobiology, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

**防衛医科大学校学生
Student, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

平成29年2月13日受付
平成29年4月6日受理

皮では哺乳類様の受容体がそれぞれ発現する^{9, 10)}。この報告は、脊椎動物の進化において水棲から陸棲への生活環境の変化が、新しい嗅覚系の出現に強く関与することを示唆する。さらに有尾両生類では、主嗅覚系から独立した副嗅覚系の有無が完全水棲の種間で形態学的に異なる^{3, 11, 12)}。例えば、ホライモリ科のマッドパピー (*Necturus maculosus*) は副嗅覚系を欠くのに対して、トラフサンショウウオ科のアホロートル (*Ambystoma mexicanum*) では副嗅覚系の構造を形態学的に区分できる。この知見は、完全水棲の両生類においても原始的な副嗅覚系が主嗅覚系と異なる匂い分子の感知・伝達に機能する可能性を示唆する¹¹⁾ とともに、有尾両生類が系統発生的に副嗅覚系分化の初期段階に位置しており、両嗅覚系の機能を解明するうえで重要な種であることを示す。

我々はこれまでに、半水棲の有尾両生類であるアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の嗅覚器および嗅球について、レクチン組織化学を用いて糖鎖の発現様式を明らかにした^{13, 14)}。レクチンは糖に対する特異的結合活性を持ったタンパク質の総称で、細胞に発現する糖鎖の分布を可視化する目的で組織化学にも利用される^{15, 16)}。嗅球における糖鎖分布は、嗅球へと投射する感覚細胞の軸索上の分子または細胞膜の糖修飾の違いを反映しており、嗅球間での異なる糖鎖分布は機能的差異を反映する¹⁷⁻¹⁹⁾。その一例として、無尾両生類アフリカツメガエルでは、主憩室上皮の感覚細胞は主嗅球背側部に、中憩室上皮の感覚細胞は主嗅球腹側部にそれぞれ投射するが、その投射様式がレクチン反応性の違いとして示される²⁰⁾。アカハライモリは他の有尾両生類と同じく原始的な副嗅覚系を有する^{13, 21)} が、その嗅球の嗅系球はいくつかのレクチンについて主嗅球と副嗅球の間で異なる結合性を示した¹⁴⁾。一方で、別種の有尾両生類イタリアクシイモリ (*Triturus carnifex*) は成体において陸上生活を好むが、その主嗅球と副嗅球はより多くのレクチンについて結合性の違いを示すことが報告されている²²⁾。これらの知見は、半水棲の有尾両生類の種間においても主嗅球と副嗅球の糖鎖分布に生活環境を反映した多様性が存在することを示している。しかしながら、有

尾両生類の嗅球における糖鎖分布様式の報告は限られており^{12, 14, 22)}、主嗅覚系と副嗅覚系の機能分化と糖鎖分布との関係には不明な点が多い。

半水棲の有尾両生類シリケンイモリ (*Cynops ensicauda*) は沖縄諸島と奄美諸島だけに生息する日本固有種であり、九州、四国、本州などに生息するアカハライモリと分子系統解析において最も近縁の種である²³⁾。シリケンイモリは変態を終えて上陸すると、水辺近くの森林地帯で落葉に隠れて過ごすなど、アカハライモリと比較して陸棲傾向が強いことが知られている。一方、アカハライモリ成体は水中での生活を好むことから、近縁種のシリケンイモリ嗅球の組織形態学的特徴を決定することは、動物の環境適応と嗅覚系の機能分化を理解するうえで重要と考えられる。そこで本研究では、シリケンイモリの主嗅球および副嗅球における糖鎖分布を明らかにするため、10種類のレクチンを用いて免疫組織化学を行った。

材料と方法

本実験は防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認 (承認番号: 16072) を得て行われた。動物は体長11–16 cm (7.6–12.5 g) の成熟したオキナワシリケンイモリを購入 (東京実験動物, 東京) し、6匹 (雄, 雌各3匹) を実験に供した。動物は水槽にて、UV処理冷凍赤虫を与え飼育した。

1. レクチン組織化学

動物はEthyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222; 0.1% 水溶液; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) に浸漬して深麻酔したのち、心臓より生理食塩水を3 ml灌流し、続いて酢酸を加えないBouin液を12 ml流して灌流固定した。脳を摘出後、同じ固定液で浸漬固定 (室温, 12時間) を行った。脳は常法に従って脱水・パラフィン包埋を行い、5 μ m厚の水平断パラフィン切片を作製した。

レクチン組織化学には、レクチン・スクリーニングキットI–III (Vector, Burlingame, CA, USA) に含まれる10種類のビオチン化レクチンを用いた。各レクチンの使用濃度および結合糖

Table 1. Concentrations and binding specificities of lectins

Lectins (Abbreviation)	Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Binding specificity	
		Monosaccharides	Glycans
Wheat germ agglutinin (WGA)	1.0	GlcNAc, NeuNAc	GlcNAc β 4GlcNAc β 4GlcNAc β 4- GlcNAc β 4GlcNAc
Succinylated wheat germ agglutinin (s-WGA)	10.0	GlcNAc	Unknown
<i>Lycopersicon esculentum</i> lectin (LEL)	0.5	GlcNAc	GlcNAc β 4GlcNAc β 4GlcNAc
Soybean agglutinin (SBA)	10.0	GalNAc, Gal	No oligosaccharide known better than GalNAc
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin (DBA)	10.0	GalNAc	GalNAc α 3GalNAc α 3Gal β 4Gal β 4- Glc
<i>Bandeiraea simplicifolia</i> lectin-I (BSL-I)	2.0	GalNAc, Gal	GalNAc α 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4- Glc
<i>Sophora japonica</i> agglutinin (SJA)	10.0	GalNAc, Gal	GalNAc β 6Gal
Peanut agglutinin (PNA)	10.0	Gal	Gal β 3GalNAc
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin-I (UAE-I)	10.0	Fuc	Fuc α 6GlcNAc
<i>Pisum sativum</i> agglutinin (PSA)	5.0	Man, Glc	NeuNAc α 6Gal β 4GlcNAc β 2- Man α 6(NeuNAc α 6Gal β 4- GlcNAc β 2Man α 3)Man β 4- GlcNAc β 4(Fuc α 6)GlcNAc β Asn

Lectin-binding specificities to monosaccharides and glycans are modified from the review of Rüdiger and Gabius (2001). Asn: asparagine, Fuc: fucose, Gal: galactose, GalNAc: N-acetylgalactosamine, Glc: glucose, GlcNAc: N-acetylglucosamine, Man: mannose, NeuNAc: N-acetylneuraminic acid.

鎖の特異性をTable 1に示す。切片を脱パラフィン・再水和し、Triton-X添加0.02 Mリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4, 以下PBS) で洗浄したのち、0.3%過酸化水素/メタノールで内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。続いて、1%ウシ血清アルブミン/PBSでブロッキング (室温, 60分) し、それぞれの濃度に希釈したビオチン化レクチンを適用して4°Cで一晩インキュベートした。結合したレクチンの検出はABC Eliteキット (Vector) とDAB発色 (0.01% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.03% 過酸化水素/PBS) により行い、脱水・透徹したのちDPX (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) で封入した。また嗅球の細胞構築を観察するため、一部の切片にヘマトキシリン・エオジン染色またはボディアン染色を施した。

染色標本は顕微鏡 (ECLIPSE 80i, Nikon, 東京) で観察ならびに写真撮影して、各レクチンの反応強度を2名の目視判定により実施した。

2. レクチン反応強度 (グレー値) の計測

主嗅球において、レクチン反応強度の異なる

嗅糸球が観察された組織標本で、反応性をグレー値 (0-255階調) として計測した²⁴⁾。レクチン染色標本の画像をAdobe Photoshop (San Jose, CA, USA) に取り込み、グレースケールに変換したのち、階調反転を行った。続いて、各画像についてImageJ 1.50i (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD, USA) を用いて嗅球の嗅糸球および網状層のグレー値を計測した。嗅糸球のレクチン反応強度は、各切片における反応差を補正するため、嗅糸球のグレー値を網状層のグレー値で除した比率として示し、t検定を用いて領域間のグレー値を比較した。結果は比率の平均 \pm 標準誤差 (%) で表し、有意水準は $p < 0.05$ とした (両側検定)。

結 果

1. 嗅球の組織学的構造

シリケンイモリ嗅球の解剖学的構造を図1に示す (Fig. 1A)。嗅球は脳と十分に分離しておらず、前脳の前外側部を占めていた。嗅神経はよく発達しており、前脳の吻側端から外側面を覆うよう幅広く円錐状に広がっていた。主嗅

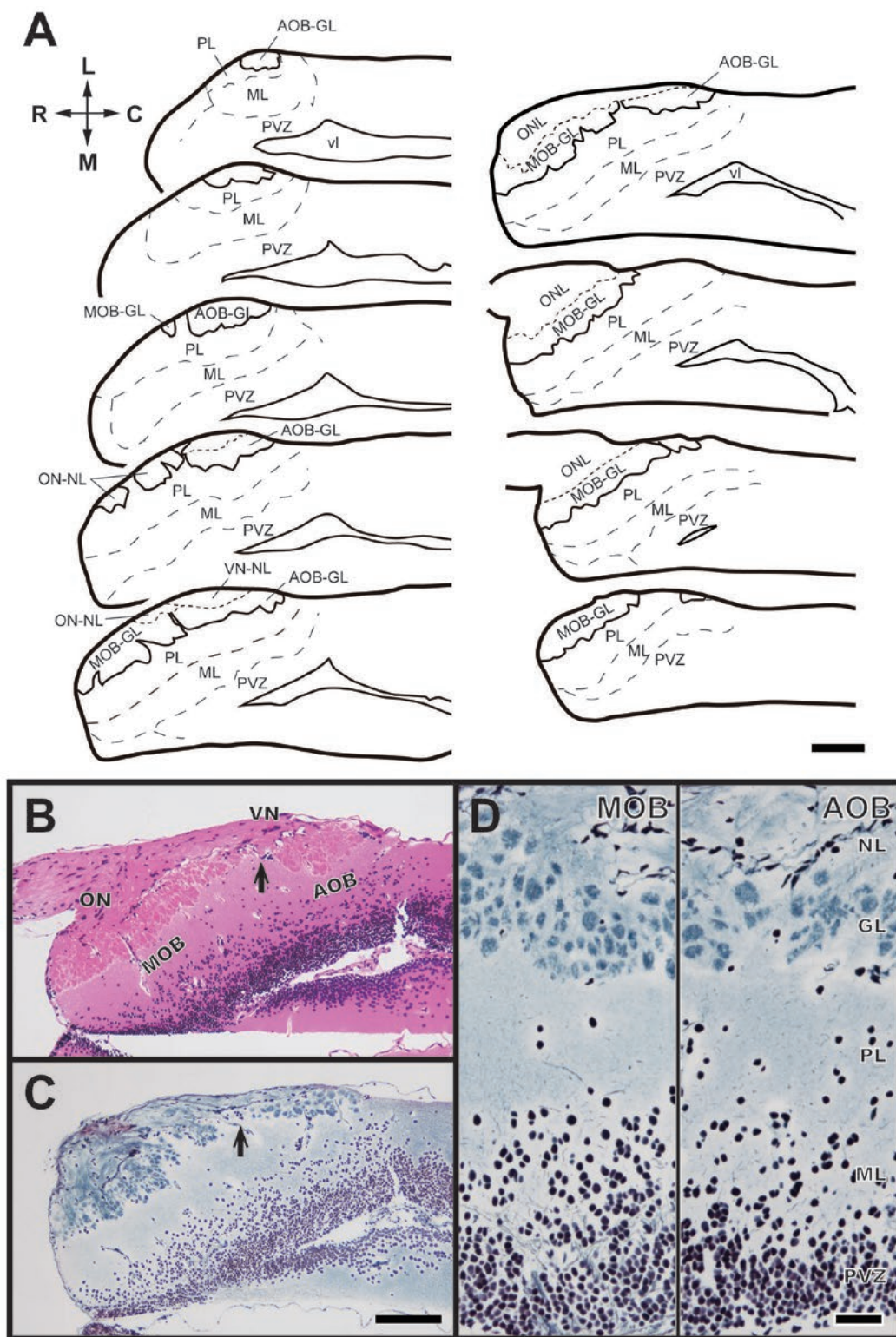


Fig. 1. Histological structure of the primary olfactory center of *Cynops ensicauda*. (A) Overview of the olfactory bulb is shown on horizontal sections through the main and accessory olfactory bulb (MOB and AOB) at 100 μm intervals. (B) The olfactory nerve (ON) terminated in the glomeruli of the main olfactory bulb (MOB-GL). The vomeronasal nerve (VN) terminated in the glomeruli of the accessory olfactory bulb (AOB-GL) that were located caudolateral to the MOB-GL. (C, D) Bodian-stained section showed five layers of the olfactory bulb in the following order: nerve layer (NL), glomerular layer (GL), plexiform layer (PL), mitral cell layer (ML), and periventricular zone (PVZ). Arrows in panels B and C indicate the border between the MOB and AOB. vl, ventricle. Bars: 250 μm (A-C), 50 μm (D).

Table 2. Lectin binding patterns in the olfactory bulb of *Cynops ensicauda*

Lectin	ONL	rMOB-GL	cMOB-GL	VNL	AOB-GL
WGA	++	+	+	++	+
s-WGA	+	++	+	++	+
LEL	+++	+++	+++	+++	+++
SBA	+	++	+	+	±
DBA	-	-	-	-	-
BSL-I	+++	+++	+	+++	++
SJA	-	-	-	-	-
PNA	±	++	++	-	±
UEA-I	-	-	-	-	-
PSA	±	+	±	+	±

-: negative labeling, ±: faint labeling, +: weak labeling, ++: moderate labeling, +++: strong labeling. AOB: accessory olfactory bulb, cMOB: caudal part of the main olfactory bulb, GL: glomeruli, ONL: olfactory nerve layer, rMOB: rostral part of the main olfactory bulb, VNL: vomeronasal nerve layer.

球は前脳吻側端から外側部までを占めており、嗅神経線維が各嗅糸球へと終止していた。一方、鋤鼻神経は嗅神経の外側に沿って走り、主嗅球の尾側に位置する副嗅球に投射していた。副嗅球は、主嗅球に比べて発達が悪かった。シリケンイモリの主嗅球と副嗅球は隣接しており、主嗅球の嗅糸球層と副嗅球の嗅糸球層との境界は不明瞭であったが、連続切片において嗅糸球を欠く小領域が両者の間に観察されたため、その構造を基準として主嗅球と副嗅球を区分した^{14, 22)} (Fig. 1 B, C)。

シリケンイモリの主嗅球および副嗅球は他の有尾両生類と同じく²⁵⁾、表層から順に①嗅神経線維 (ON) または鋤鼻神経線維 (VN) からなる神経線維層 (NL)、②嗅糸球層 (GL)、③網状層 (PL)、④僧帽細胞層 (ML)、⑤顆粒細胞が密集した傍脳室領域 (PVZ)、の5層に区分された (Fig. 1 D)。

2. 嗅球のレクチン結合様式

本研究で使用した10種類のレクチンのうち、7種類 (WGA, s-WGA, LEL, SBA, BSL-I, PNAおよびPSA) がシリケンイモリ嗅球の神経線維層ならびに嗅糸球層で反応性を示した。各レクチンの主嗅球および副嗅球の神経線維層、嗅糸球層における反応強度は、5段階 (+++: 強度, ++: 中等度, +: 弱度, ±: 微弱度, -: 反応性なし) で判定した (Table 2)。なお全てのレクチンについて、その結合性の雌雄差と個体差は観察されなかった。

WGAは、嗅球を構成する全ての層に対して反応性を示した (Fig. 2A)。このうち、主嗅球

の嗅神経線維層および副嗅球の鋤鼻神経線維層では中等度の反応性が、主嗅球と副嗅球の嗅糸球層では弱度の反応性が見られた。s-WGAは、主嗅球の嗅神経線維層で弱度の反応性を示したのに加えて、主嗅球の嗅糸球層において吻側領域 (rMOB) は中等度、尾側領域 (cMOB) は弱度と、異なるレクチン反応性を示した (Fig. 2B)。一方、s-WGAは副嗅球の鋤鼻神経線維層で中等度の、嗅糸球層で弱度の反応性を示した。LELは主嗅球と副嗅球の間で反応性の違いを示さず、嗅神経線維層、鋤鼻神経線維層と主嗅球および副嗅球の嗅糸球層において、均一に強度の反応性が見られた (Fig. 2C)。SBAは、主嗅球および副嗅球の神経線維層で弱度の反応性を示した一方で、嗅糸球層は主嗅球の吻側領域で中等度、尾側領域で弱度、副嗅球で微弱度の反応性をそれぞれ示した (Fig. 2D)。BSL-Iは、主嗅球および副嗅球の神経線維層でいずれも強度の反応性を示した一方で、嗅糸球層では主嗅球と副嗅球の間で異なる反応性が見られた (Fig. 2E)。すなわちBSL-Iは、主嗅球の嗅糸球層において吻側領域は強度の、尾側領域において弱度の反応性を示したのに対し、副嗅球の嗅糸球層では中等度の反応性を示したのに対し、副嗅球の嗅糸球層では中等度の反応性を示した。PNAは、主嗅球の嗅糸球層において中等度、副嗅球の嗅糸球層において微弱度と明瞭な反応性の違いを示すとともに、嗅神経線維層で鋤鼻神経線維層よりも強い反応性が見られた (Fig. 2F)。PSAは、主嗅球において嗅神経線維層で微弱度の、嗅糸球層の吻側領域で弱度の、尾側領域では微弱度の反応性を示したのに対して、副嗅球では鋤鼻

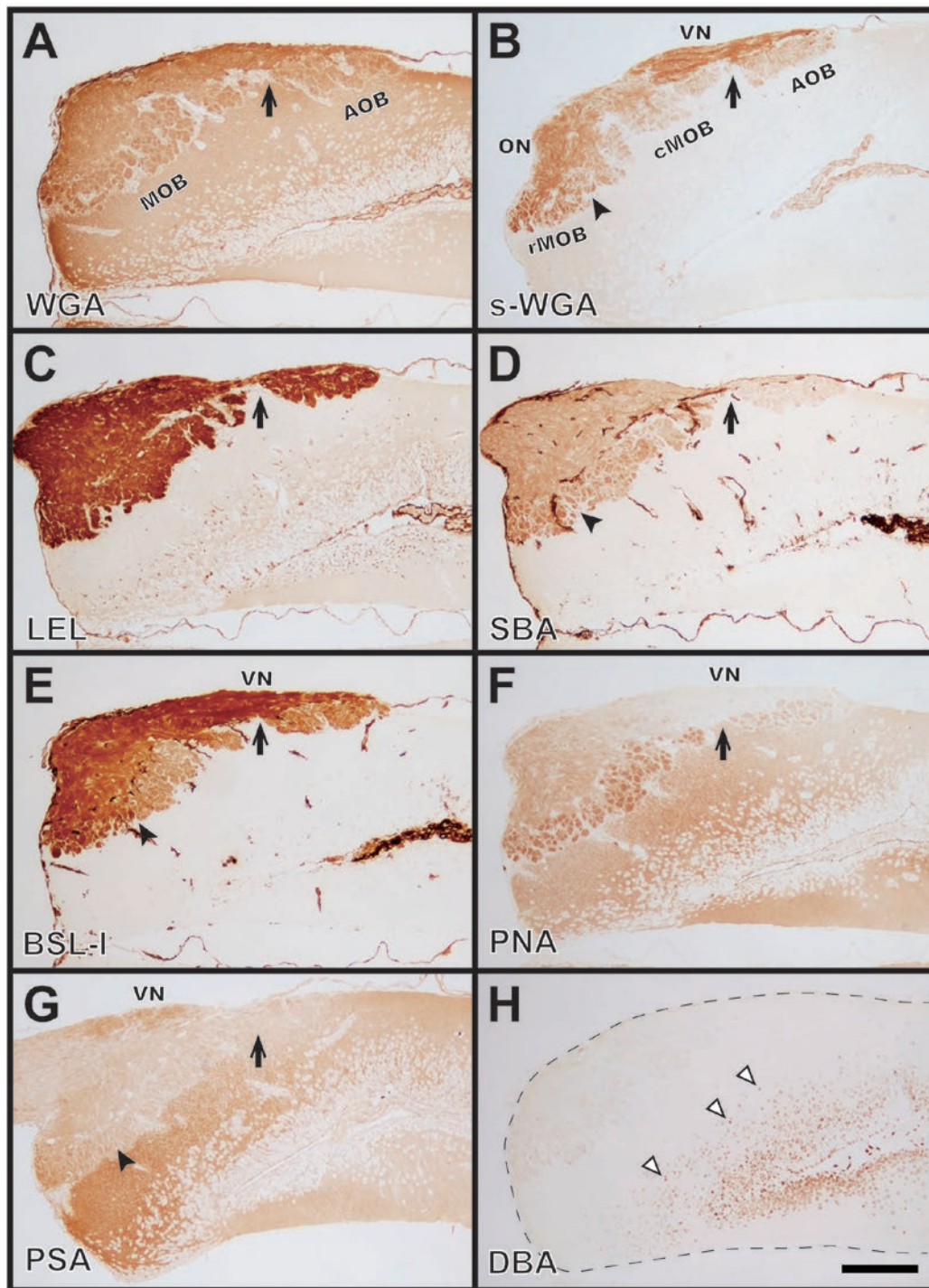


Fig. 2. Lectin binding patterns in the olfactory bulb of *Cynops ensicauda*.

(A-G) Olfactory nerve (ON), vomeronasal nerve (VN), and olfactory glomeruli were labeled specifically with 7 lectins: WGA (A), s-WGA (B), LEL (C), SBA (D), BSL-I (E), PNA (F), and PSA (G). These lectins excluding WGA and LEL showed different binding-patterns in primary projections of between the main and accessory olfactory systems. In addition, a subset of glomeruli in the main olfactory bulb was identified based on binding intensities of s-WGA, SBA, BSL-I, and PSA. Arrowheads in panels B, D, E, and G indicate the border of rostral (rMOB) and caudal subsets (cMOB) in the main olfactory bulb. (H) DBA stained nuclei of mitral (white arrowheads) and granular cells without labeling of the primary olfactory projection. AOB, accessory olfactory bulb. Bar: 250 μ m.

神経線維層で弱度の、嗅糸球層で微弱度の反応性を示した (Fig. 2G)。またPSAは網状層、僧帽細胞層および顆粒細胞層で反応性を示し、一

部の僧帽細胞ならびに顆粒細胞の細胞質でドット状の反応産物が観察された。残る3種類のレクチンDBA, SJAおよびUEA-Iは、いずれも嗅球

の神経線維層と嗅糸球層で反応性を示さなかったが、DBAが僧帽細胞と顆粒細胞の核に対して特異的な結合性を示した (Fig. 2H)。

3. レクチン結合性により同定された主嗅球のサブセット

主嗅球と副嗅球を横断する水平断切片においてs-WGA, SBA, BSL-IおよびPSAは、主嗅球吻側領域に位置する嗅糸球と尾側領域の嗅糸球との間で異なる反応性を示した。そこで連続切片を用いてs-WGAの免疫組織化学を行い、レクチンに対して強い結合性を示す嗅糸球の主嗅球内における分布を観察した (Fig. 3A)。その結果、主嗅球の背側部では、副嗅球に隣接して存在する小領域を除いて、s-WGAにより中等度に染色される嗅糸球が分布していた。s-WGAに対して中程度の結合性を示す嗅糸球は、主嗅球の腹方になると吻側部に集合して見られ、主嗅球の吻尾方向への広がりに対して約3分の1の領域を占めていた。続いて、主嗅球の吻側領域と尾側領域における2つの嗅糸球の集団がs-WGAの反応強度により区分できるのか、グレー値の計測を行った (Fig. 3B)。主嗅球吻側領域における嗅糸球のグレー値は、網状層のグレー値平均に対する比率として $161 \pm 14\%$ であったのに対し、尾側領域は $118 \pm 7\%$ であり、吻側領域において有意に高いs-WGA結合性 ($p < 0.001$) を示した。

考 察

本研究では、有尾両生類に属すシリケンイモリ嗅球の糖鎖分布を決定するため、免疫組織化学を用いてレクチンの結合様式を検討した。その結果、主嗅覚系・副嗅覚系を構成する主嗅球と副嗅球が異なるレクチン結合性を示すことを明らかにした。さらにシリケンイモリ主嗅球において、レクチン結合性に基づいたサブセットが存在することを同定した。

1. シリケンイモリ嗅球における糖鎖発現とその機能的役割

本研究で使用したレクチンのうちWGA, s-WGA, LEL, SBA, BSL-I, PNAおよびPSAが、シリケンイモリの嗅神経、鋤鼻神経、それらの終止部である嗅糸球に対して特異的結合性を示した。WGA, s-WGAおよびLELはN-acetylglucosamine

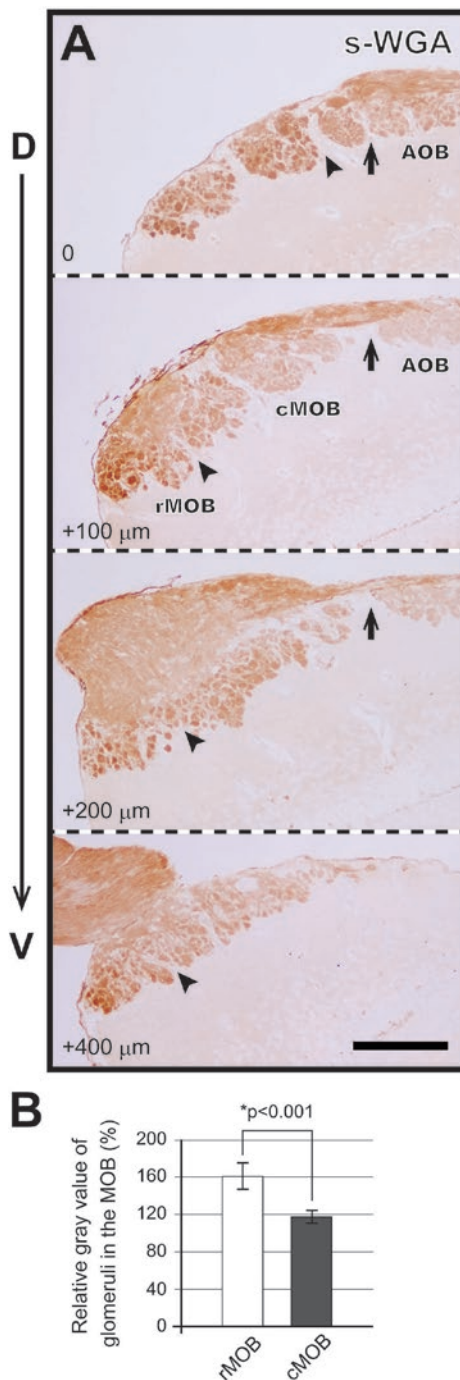


Fig. 3. Glomerular subsets isolated by lectin-binding in the main olfactory bulb.

(A) Lectin s-WGA showed dense labeling of glomeruli in the rostral part of the main olfactory bulb from dorsal to ventral levels in serial sections. Arrows and arrowheads represent the border between the main and accessory olfactory bulb (MOB and AOB) and the boundary between the rostral (rMOB) and caudal subsets (cMOB) of the MOB, respectively. (B) The relative gray value indicates the ratio of lectin-labeling density in olfactory glomeruli to that in the plexiform layer. Labeling intensity of s-WGA in the rMOB was significantly higher than in the cMOB. Bars in the graph represent mean \pm SD. Bar: 250 μ m (A).

を, SBA, BSL-IおよびPNAは N-acetylgalactosamine またはgalactoseを, PSAはmannoseとglucoseをそれぞれ認識することから, シリケンイモリの一次嗅覚路において多様な糖鎖が高発現することが明らかにされた。一方で, WGA, s-WGAおよびLELはいずれもN-acetylglucosamineに結合するにもかかわらず, 嗅球の神経線維または嗅糸球に対して強度から弱度と様々な反応強度を示した。加えて, DBAとSJAはN-acetylgalactosamineやgalactoseに結合するが, 同じ単糖を認識するSBAやBSL-Iとは異なり, 嗅球の神経層と嗅糸球層において反応性が見られなかった。レクチンは一般的に単糖に加えて, 複合糖鎖も認識することが知られている¹⁶⁾。例えば, SJAはN-acetylgalactosamine- β 6-galactoseに対して単糖の16倍の結合能を持つ一方で, SBAではN-acetylgalactosamineより強い結合能を示す複合糖鎖は報告されていない。したがって, 類似糖に結合するレクチンの間での反応様式の違いは, 各レクチンが結合する複合糖鎖の構造差や各糖鎖に対する結合能の差を反映すると考えられる。

本研究で使用したレクチンの多くが, 嗅神経と鋤鼻神経を構成する感覚細胞の軸索, 主嗅球と副嗅球の嗅糸球に対して結合性を示し, 僧帽細胞や房飾細胞に対しては結合性を示さなかった。このようなシリケンイモリ嗅球における特異的な糖鎖分布は, 両嗅覚系を構成する感覚細胞の軸索誘導や機能分化に関与すると考えられる。神経細胞で発現する糖タンパク質N-CAMは細胞接着分子として軸索の伸長や束化に機能し, N-CAMノックアウトマウスでは嗅球のサイズが著しく減少する^{26, 27)}。さらに無尾両生類の嗅覚系において, SBAならびにDBAがシアル酸修飾された特定のN-CAMを認識するとともに, 嗅球におけるN-CAMの領域特異的な発現解析に用いられている^{18, 28)}。またラット胎仔を用いた鋤鼻器の器官培養系では, VVA (*Vicia villosa* agglutinin) による糖鎖の障害は鋤鼻感覚細胞の軸索の束化を阻害することが報告されている²⁹⁾。本研究におけるs-WGA, SBA, BSL-I, PNA, PSAの反応性により, 主嗅球と副嗅球を構成する神経線維や嗅糸球における特異的な糖鎖発現が可視化された。これらのレクチンが結

合する糖タンパク質や糖脂質といった分子は不明であるが, 両嗅覚系における糖鎖分布が形態形成や機能と関連する可能性を示唆している。

2. シリケンイモリの主嗅覚系・副嗅覚系の分化とレクチン結合様式

哺乳類など高等な脊椎動物と異なり, 有尾両生類の嗅覚系における機能分子はアカハライモリで, わずかに報告されているのみである。抗Neurofilament 200抗体を用いた免疫組織化学では, その反応産物が鋤鼻上皮の感覚細胞とその軸索で豊富な分布を示す³⁰⁾。また最近, 嗅覚受容体と共役するGタンパク質 α サブユニットのアカハライモリ嗅覚系における局在が報告された³¹⁾。その報告によると, 多くの動物の鋤鼻器で発現するII型鋤鼻受容体と共役するサブユニットG α_0 陽性の神経線維は, アカハライモリにおいても副嗅球に対して特異的に投射する。本研究により我々は, シリケンイモリ嗅球に投射する嗅神経線維と鋤鼻神経線維, 両神経がシナプスを形成する嗅糸球において, レクチンが認識する糖鎖の発現は主嗅覚系と副嗅覚系の間で異なることを明らかにした。この結果は, シリケンイモリの副嗅覚系が主嗅覚系から機能的に分化していることを糖鎖発現の相違から裏付けている。また両生類の嗅覚系研究では, 機能分子の局在解析に利用できる抗体に限られる。そのため, 各機能分子が受ける糖鎖修飾の種差または糖鎖末端でのシアル酸修飾の種差などは不明であるが, 組織に分布する糖鎖を網羅的に可視化できるレクチンは嗅覚系研究において有用なツールと考えられる。

本研究で決定されたシリケンイモリ嗅球におけるレクチン反応性を, 近縁種であるアカハライモリの報告¹⁴⁾と比較すると, WGA, s-WGA, LEL, BSL-IおよびPNAに結合する糖鎖が両種の一次嗅覚路で共通して発現していた。一方で, SBAとPSAはシリケンイモリの嗅球のみで, SJAはアカハライモリの嗅球のみで, それぞれ反応性を示した。これらの知見は, 近縁種の有尾両生類の嗅球で多くの糖鎖が類似した分布を示す一方で, 種に特異的な糖鎖発現が存在することを示している。シリケンイモリの主嗅球と副嗅球の間で異なる反応性を示したレクチンのうち, s-WGAとBSL-Iは別種の有尾両生類イタ

リアクシイモリにおいて²²⁾、PNAはアカハライモリにおいて¹⁴⁾、それぞれ主嗅覚系/副嗅覚系における糖鎖発現の相違を検出することが報告されている。その一方で、シリケンイモリ嗅球のレクチン結合性は、陸棲期を持つイタリアクシイモリと比較して、多くのレクチンについて主嗅球（とくに尾側領域）と副嗅球の間に類似した反応強度と反応様式を示した。有尾両生類において、主嗅球と副嗅球で共通した糖鎖分布が見られる傾向は、完全水棲のアホロートルと半水棲のアカハライモリで報告されている^{12,14)}。

陸棲動物は空気中の多様な揮発・疎水性の匂い分子を主嗅覚系で認識し、不揮発性のフェロモン分子を副嗅覚系で認識する^{5,7)}。一方、水棲の両生類は主嗅覚系でもアミノ酸のような水溶性の匂い分子を認識する^{10,32)}とともに、副嗅覚系では水中での拡散に効果的なペプチドからなるフェロモン分子を認識する⁶⁾。半水棲のシリケンイモリは、アカハライモリと比べると陸上環境を好むが、水中での活動も多く見られる。したがって、水溶性の匂い分子の感知はシリケンイモリの主嗅覚系・副嗅覚系で共通して重要な機能であり、その類似性が主嗅球と副嗅球の共通した糖鎖発現に反映されたと推察される。

3. シリケンイモリ主嗅球におけるサブセット

類似した構造を持つ匂い分子に応答する嗅覚器の感覚細胞は、嗅球の特定の部位に集まって、サブセットと呼ばれる嗅糸球の集合体を形成する³³⁾。数種の両生類の主嗅球において、レクチン結合様式の相違に基づいたサブセットの存在が報告されている^{9,20,22,34)}。水棲の無尾両生類であるアフリカツメガエルでは、主嗅球を構成する嗅糸球がレクチン反応性により背側部と腹側部の2つのサブセットに区分される^{9,20)}。アフリカツメガエルは、主嗅覚系のなかに揮発性の匂い分子と水溶性の匂い分子を感知する2つの嗅覚路を有しており¹⁰⁾、揮発性分子を受容するニューロンは主嗅球背側部に、水溶性分子を受容するニューロンは主嗅球腹側部にそれぞれ投射する²⁰⁾。半水棲の有尾両生類イタリアクシイモリにおいても、無尾両生類に類似したサブセットが、レクチン反応性の異なる小領域として主嗅球の後部に存在する²²⁾。イタリアクシ

イモリ成体は陸棲期と水棲期を持っており、生活の4分の3を陸上で過ごすため、主嗅球におけるサブセットの存在はその生態に関連すると考えられている。実際、水中での活動を好むアカハライモリの主嗅球では、結合性を示した全てのレクチンが嗅神経層および嗅糸球に対して均一な染色性を示し、主嗅球において糖鎖発現に基づいたサブセットが存在しない可能性を示唆する¹⁴⁾。一方、本研究において、シリケンイモリ主嗅球の吻側部に位置する嗅糸球はs-WGA, SBA, BSL-I, PSAにより、尾側部の嗅糸球と異なる反応性を持つことが明らかになった。シリケンイモリにおける吻側部/尾側部の2つのサブセットの境界は、すでに報告されているイタリアクシイモリのサブセットの境界と比較して²²⁾、かなり吻側に位置していた。アカハライモリ鼻腔の嗅感覚上皮に対するトレーサー注入実験により、鼻腔の腹側に存在する嗅感覚細胞は主嗅球の後部領域と副嗅球に投射することが報告されている³¹⁾。この知見は、系統発生的な分化において主嗅球の後部領域と副嗅球が近い機能的性質、すなわち水溶性分子への応答に対応する領域である可能性を示唆する。シリケンイモリにおいて、アカハライモリでは観察されないレクチン反応性に基づく主嗅球のサブセットが存在することは、他の両生類で見られる揮発性分子/水溶性分子それぞれの受容に機能する2つの嗅覚路の分化過程にあることと関連すると考えられる。事実、陸棲期を持つイタリアクシイモリの主嗅球において、レクチン反応性に基づく吻側部/尾側部の2つのサブセット境界は尾方へとシフトしており、水溶性分子の受容に機能する領域の縮小を意味すると推察される。

総 括

本研究によって、s-WGA, SBA, BSL-IおよびPNAと特異的に結合する糖鎖の発現が、シリケンイモリの主嗅球と副嗅球では異なることが示された。さらに、主嗅球を構成する嗅糸球がレクチン反応性に基づいて、吻側領域と尾側領域の2つのサブセットに区分されることが明らかにされた。一方シリケンイモリ嗅球では、糖鎖修飾の多様性により同じ単糖を認識するレ

クチン間でも異なる結合様式を示したことから、今後、一次嗅覚路で発現する糖鎖構成の詳細を決定するため、より多くのレクチンを用いて糖鎖分布を同定する予定である。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、組織標本を作製していただいた解剖学講座 渡辺まゆみ 技官に感謝いたします。また本研究の一部は、防衛医科大学校 奨励研究経費（松井利康，平成28年度）および文部科学省科学研究費 若手研究B（松井利康，Grant No. 16K18985）の助成を受けたものです。

文 献

- 1) Allison, A.C.: The morphology of the olfactory system in the vertebrates. *Biol. Res.* 28: 195-244, 1953.
- 2) Halpern, M.: The organization and function of the vomeronasal system. *Ann. Rev. Neurosci.* 10: 325-362, 1987.
- 3) Eisthen, H.L.: Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain Behav. Evol.* 50: 222-233, 1997.
- 4) 齋藤正一郎: 嗅覚系の進化. *Clin. Neurosci.* 34: 1296-1298, 2016.
- 5) Estes, R.D.: The role of the vomeronasal organ in mammalian reproduction. *Mammalia* 36: 315-341, 1972.
- 6) Kikuyama, S., Yamamoto, K., Iwata, T. and Toyoda, F.: Peptide and protein pheromones in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 132: 69-74, 2002.
- 7) Eisthen, H.L. and Wyatt, T.D.: The vomeronasal system and pheromones. *Curr. Biol.* 16: R73-R74, 2006.
- 8) Bertmar, G.: Evolution of vomeronasal organs in vertebrates. *Evolution* 35: 359-366, 1981.
- 9) Key, B. and Giorgi, P.P.: Selective binding of soybean agglutinin to the olfactory system of *Xenopus*. *Neuroscience* 18: 507-515, 1986.
- 10) Freitag, J., Krieger, J., Strotmann, J. and Breer, H.: Two classes of olfactory receptors in *Xenopus laevis*. *Neuron* 15: 1383-92, 1995.
- 11) Eisthen, H.L.: Presence of the vomeronasal system in aquatic salamanders. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 355: 1209-1213, 2000.
- 12) Franceschini, V., Lazzari, M. and Ciani, F.: Surface glycoconjugates in the olfactory system of *Ambystoma mexicanum*. *J. Morphol.* 256: 301-305, 2003.
- 13) Saito, S., Matsui, T., Kobayashi, N., Wakisaka, H., Mominoki, K., Matsuda, S. and 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.
- 14) Matsui, T., Saito, S., Kobayashi, Y. and Taniguchi, K.: Lectin histochemical study on the olfactory bulb of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Anat. Histol. Embryol.* 40: 419-425, 2011.
- 15) Lis, H. and Sharon, N.: Applications of lectins. In: *The Lectins: Properties, Functions, And Applications In Biology and Medicine* (Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. eds.), Academic Press, San Diego, 1986, pp.293-308.
- 16) Rüdiger, H. and Gabius, H.J.: Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj. J.* 18: 589-613, 2001.
- 17) Breer, H.: Molecular reaction cascades in olfactory signal transduction. *J. Steroid Biochem.* 39: 621-625, 1991.
- 18) Key, B. and Akesson, R.A.: Delineation of olfactory pathways in the frog nervous system by unique glycoconjugates and N-CAM glycoforms. *Neuron* 6: 381-396, 1991.
- 19) Pestean, A., Krizbai, I., Bottcher, H., Párducz, Á., Joó, F. and Wolff, J.R.: Identification of the Ulex europaeus agglutinin-I-binding protein as a unique glycoform of the neural cell adhesion molecule in the olfactory sensory axons of adult rats. *Neurosci. Lett.* 195: 117-120, 1995.
- 20) Saito, S. and Taniguchi, K.: Expression patterns of glycoconjugates in the three distinctive olfactory pathways of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 153-159, 2000.
- 21) Jones, F.M., Pfeiffer, C.J. and Asashima, M.: Ultrastructure of the olfactory organ of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Ann. Anat.* 176: 269-275, 1994.
- 22) Franceschini, V. and Ciani, F.: Lectin histochemistry of cell-surface glycoconjugates in the primary olfactory projections of the newt. *Cell. Mol. Biol.* 39: 651-658, 1993.
- 23) Tominaga, A., Matsui, M., Yoshikawa, N., Nishikawa, K., Hayashi, T., Misawa, Y., Tanabe, S. and Ota, H.: Phylogeny and historical demography of *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela): taxonomic relationships and distributional changes associated with climatic oscillations. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66: 654-667, 2013.
- 24) Kato, K., Yamaguchi-Yamada, M. and Yamamoto, Y.: Short-term hypoxia increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in rat carotid body. *J. Histochem. Cytochem.* 58: 839-846, 2010.
- 25) Herrick, C.H.: The amphibian forebrain. II. The olfactory bulb of *Amblystoma*. *J. Comp. Neurol.* 37: 373-396, 1924.
- 26) Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U. and Magnuson, T.: Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11: 1163-1174, 1993.
- 27) Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwisch, S., Kreamer, P., Scheff, S., Barthels, D., Rajewsky, K. and Wille, W.: Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367: 455-459, 1994.

- 28) Key, B. and Akeson, R.A.: Olfactory neurons express a unique glycosylated form of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J. Cell Biol.* 110: 1729-1743, 1990.
- 29) Ichikawa, M., Osada, T. and Graziadei, P.P.C.: Vicia villosa agglutinin inhibits the fasciculation of vomeronasal axons in fetal rat vomeronasal organ culture. *Brain Res.* 668: 252-255. 1994.
- 30) Soeta, S., Izu, Y., Saito, T. R., Yamano, S. and Taniguchi, K.: Differential expression of neurofilament 200-like immunoreactivity in the main olfactory and vomeronasal systems of the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 701-706, 2005.
- 31) Nakada, T., Hagino-Yamagishi, K., Nakanishi, K., Yokosuka, M., Saito, T.R., Toyoda, F., Hasunuma, I., Nakakura, T. and Kikuyama, S.: Expression of G proteins in the olfactory receptor neurons of the newt *Cynops pyrrhogaster*: Their unique projection into the olfactory bulbs. *J. Comp. Neurol.* 522: 3501-3519, 2014.
- 32) Ngai, J., Dowling, M.M., Buck, L., Axel, R. and Chess, A.: The family of gene encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell* 72: 657-666, 1993.
- 33) Adam, Y. and Mizrahi, A.: Circuit formation and maintenance-perspectives from the mammalian olfactory bulb. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20: 134-140, 2010.
- 34) Saito, S., Kobayashi, N. and Atoji, Y.: Subdivision of the accessory olfactory bulb in the Japanese common toad, *Bufo japonicas*, revealed by lectin histochemical analysis. *Anat. Embryol.* 211: 395-402, 2006.

Histochemical identification of glycoconjugate distribution in the olfactory bulb of *Cynops ensicauda*

Kumiko TANAKA^{*,**}, Toshiyasu MATSUI^{*} and Yasushi KOBAYASHI^{*}

J. Natl. Def. Med. Coll. (2017) 42 (3) : 119 – 129

Abstract: Amphibian urodele species have a primitive vomeronasal organ that occupies the lateral part of the principal nasal cavity. Vomeronasal organ and its primary center, accessory olfactory bulb, have first appeared in amphibians during the phylogenetic transition from aquatic to terrestrial, but morphological and molecular organizations of the amphibian olfactory system remain largely unknown, especially in urodeles. Here we examined glycoconjugate distribution in the olfactory bulb of a semi-aquatic urodele, *Cynops ensicauda*, by lectin histochemistry. Seven lectins showed specific bindings to olfactory and vomeronasal nerve fibers and olfactory glomeruli. Among them, succinylated wheat germ agglutinin (s-WGA), soybean agglutinin (SBA), *Bandeiraea simplicifolia* lectin-I (BSL-I), and peanut agglutinin showed obviously different binding-specificities in glomeruli between the main and accessory olfactory bulbs. We also revealed that s-WGA, SBA, BSL-I, and *Pisum sativum* agglutinin preferentially bound to glomeruli of the rostral region in the main olfactory bulb, suggesting a functional subset in the main olfactory system. Thus, our results demonstrated a regional-specific expression of glycoconjugates in the olfactory bulb of *Cynops ensicauda*, which may reflect morphological and functional segregations of the primary olfactory projection during phylogeny.

Key words: vomeronasal organ / olfactory bulb / glycoconjugate
/ lectin / urodele