

氏名(本籍)	井上律子(北海道)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第5367号		
学位授与年月日	平成22年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Studies on Amino Acid Responses in Olfactory Receptor Neurons of the Newt, <i>Cynops pyrrhogaster</i></b> (イモリ嗅細胞におけるアミノ酸応答の研究)		
主査	筑波大学准教授	医学博士	中谷敬
副査	筑波大学教授	理学博士	山岸宏
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	千葉親文
副査	筑波大学准教授	理学博士	古久保-徳永克男

### 論文の内容の要旨

最近の研究によれば、イモリの嗅細胞は揮発性匂い物質のみならず、アミノ酸を匂い情報として受容することが報告されている。本研究では、アミノ酸応答に着目し、前半ではカルシウムイメージング法を用い、アミノ酸刺激によって引き起こされる嗅細胞内カルシウムイオン濃度の変化を観察し、アミノ酸応答の特性を検証した。後半では水中と陸とを行き来する両生類特有の生息環境が匂い応答にもたらす影響を検証した。

前半ではカルシウムイオン蛍光プローブ fura-2 AM を細胞内に導入し、カルシウムイメージング法を用いて、アミノ酸刺激によって引き起こされる嗅細胞内の遊離カルシウムイオン濃度の変化を観察した。単離嗅細胞 15 個に 4 種の性質の違うアミノ酸溶液(アルギニン、グルタミン酸、アラニン、プロリン)を投与した結果、細胞によってそれぞれのアミノ酸の受容パターンが異なった。この結果から、それぞれの細胞がアミノ酸の種類を区別している可能性が示唆された。また、1つの嗅細胞において解析部位を嗅小胞(knob)と細胞体(soma)の2つに分け、それぞれの蛍光強度を比較した。その結果、嗅小胞では細胞体にくらべて大きな濃度上昇が観察された。これは、揮発性匂い物質と同様に、アミノ酸刺激も cilia で局所的に受容され、一連のシグナル伝達経路を経て細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が起こるという考えを支持するものである。

後半では、一時的な生活環境の変化が嗅覚応答に与える影響を調べるため、水中で飼育したイモリ(land adaptation time: 0h)と水場がない環境で一定時間飼育したイモリ(land adaptation time: 30, 54, 90, 114 h)の嗅上皮から EOG 電位を記録し、応答の大きさの変化を観察した。イモリは成体雄のみを用いた。状態をなるべくそろえるため、どの個体にも実験の最低1日前はえさを与えなかった。匂い刺激としてアミノ酸(アルギニン、グルタミン酸、アラニン、プロリン)の4種混合液(各 1  $\mu$ M or 10  $\mu$ M)と揮発性匂い物質(イソアミルアセテート、nアミルアセテート、シネオール、リモネン)の4種混合液を用いた。land adaptation の時間経過と各匂い刺激に対する EOG 応答の最大振幅との関係を weighted linear model (重み付け線形モデル)を用いて統計的に解析した。その結果、アミノ酸に対する応答では、land adaptation の時間が長くなる(～114 h)につれて EOG 応答の最大振幅が大きくなった。すなわち陸地に相当する環境で飼育された時間が長

くなるほど、アミノ酸に対するイモリ嗅細胞の感受性が高くなることが示唆された。また、1  $\mu$ M アミノ酸混合液に対する EOG 応答における傾き推定値より 10  $\mu$ M アミノ酸混合液に対する応答の傾き推定値の方が有意に大きかった (by t-test,  $P < 0.05$ )。すなわち、land adaptation の影響が濃度依存的な効果によって増幅されていると考えられる。一方、揮発性匂い混合液に対する EOG 応答では land adaptation の影響はみられなかった。アミノ酸は餌刺激でもある。成体イモリの主なえさ場は水中だと考えられており、本実験の記録状態は自然界でいうとイモリが陸地から水中に戻った直後の状態に相当すると考えられる。したがって land adaptation の影響により、水中に戻った直後のイモリがえさを見つけやすくなる可能性があると考えられる。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、同じ形態の嗅細胞が揮発性匂い物質とアミノ酸の両方を受容する能力をもつイモリの匂い受容について、特にアミノ酸受容に注目し、細胞レベルでのアミノ酸受容の特性とシグナル伝達経路、および生息環境の違いによる応答性の変化を研究したものである。前半の研究では、細胞ごとにアミノ酸の応答パターンが異なることを示し、嗅細胞がアミノ酸の種類を区別できる可能性を示唆している。後半では、land adaptation を行った動物は、アミノ酸に対する応答だけが増大し、揮発性匂い物質に対する応答に変化がないことを明らかにした。これまでイモリを陸に上げると嗅繊毛が伸びるという報告があったが、本論文のアミノ酸受容だけが増大するという事実から、むしろ受容体の発現量の変化が重要であることが明らかになった。両生類の生活と行動を考えれば、ここに示された結果は学術的にも興味深くまた重要である。本論文は生息環境と生理機能の関係を明らかにしたユニークな研究であり、この知見はこの分野の研究に大いに貢献すると期待できる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。