

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06399

研究課題名(和文)ハイギョ嗅覚器における1型鋤鼻受容体の発現解析

研究課題名(英文) Expression of type1 vomeronasal receptors in the olfactory organ of lungfish

研究代表者

中牟田 祥子 (Nakamuta, Shoko)

岩手大学・農学部・特任研究員

研究者番号：70724532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの四足動物は嗅上皮(OE)と鋤鼻器(VNO)の2種類の嗅覚器を持つ。両生類に最も近い魚であるハイギョは、ラメラOEと原始的な鋤鼻器(陥凹部上皮、RecE)を持つ。我々は、現生ハイギョ6種のうちアフリカハイギョ4種と南米ハイギョ1種の計5種についてRNA-seqによりV1R遺伝子を同定し、ハイギョのV1R遺伝子のほとんどは四足動物型であること、V1R発現細胞の多くはラメラOEに分布するがわずかにRecEにも分布すること、幼体は成体に比べてラメラOEにおけるV1R発現細胞の密度が高いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚はVNOを持たず、OEにすべての嗅覚受容体が発現している。進化の過程で、匂い受容体と鋤鼻受容体の発現部位が分かれて四足動物のOEとVNOが生じたと考えられているが、その詳細な過程は不明であった。本研究成果はハイギョと両生類の共通祖先の嗅覚器に鋤鼻受容体(V1R/V2R)を発現する場として原始的VNOが誕生したが、進化の過程でV1Rの発現が失われ、両生類のVNO(V2Rだけを発現)が生じたことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Most tetrapods possess two distinct olfactory organs, the olfactory epithelium (OE) and the vomeronasal organ (VNO). Lungfish, the closest fish to amphibians, has the lamellar OE and a primitive VNO (the recess epithelium, RecE). We identified the V1R genes in five of the six extant species of lungfish (four African and one South American lungfish) by RNA-seq. Most V1Rs identified in these lungfish were classified as the tetrapod-type V1Rs initially found in tetrapods and distinct from fish-type V1Rs. In situ hybridization analysis indicated that lungfish V1Rs were expressed mainly in the lamellar OE and rarely in the RecE. In addition, the juveniles showed a higher density of V1R-expressing cells in the lamellar OE compared with the adults.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：1型鋤鼻受容体 ハイギョ 嗅上皮 鋤鼻器 in situ hybridization

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物は、嗅上皮と鋤鼻器、2種類の嗅覚器を持つ。嗅上皮がすべての脊椎動物に存在する一方で、鋤鼻器は魚にはなく、四足動物すなわち両生類以上の大半に存在する。肉鱗類に属し両生類に最も近縁な魚であるハイギョの嗅覚器には原始的鋤鼻器(陥凹部上皮、RecE)が存在し、ハイギョの嗅覚器は魚と両生類の中間型の形態を持つ。

脊椎動物が魚から四足動物へと進化し、水中から陸上へと生活の場を移した時、嗅覚器は水中の匂いを受容するものから、空気中の匂いを受容するものへと変化した。魚は水中の匂い、陸生哺乳類は空気中の匂いを受容するが、両生類などの半水生動物はその両方の匂いを受容する。半水生動物の嗅覚器は空気中の匂いを嗅ぐ部位(air-nose)と水中の匂いを嗅ぐ部位(water-nose)とに区画され、air-noseは付属腺を持ち、water-noseは付属腺を欠く。一般的な魚と異なり、ハイギョ嗅覚器では後鼻孔が口腔に開口し、肺呼吸の際に鼻腔が空気の通り道となっている。さらに、ハイギョ嗅覚器には付属腺が存在し、ラメラ基部の陥凹部において、RecEと隣接して存在する。これらの事実はハイギョ嗅覚器が水中の匂いだけでなく、空気中の匂いを受容している可能性が高いことを示唆する。

嗅上皮は匂い受容体(OR)、鋤鼻器は1型および2型鋤鼻受容体(V1R/V2R)を発現し、1つの嗅細胞はただ1つの受容体を発現する(1ニューロン1受容体ルール)。鋤鼻器を持たない魚の嗅上皮にはこれらの嗅覚受容体を発現する嗅細胞が混在する。魚から四足動物への進化の過程で、ORとV1R/V2Rの発現部位が分かれたことで四足動物の嗅上皮と鋤鼻器が生じたと考えられている。V1Rは揮発性分子、V2Rは水溶性分子を受容するといわれる。V1R遺伝子群は、脊椎動物の陸上生活への適応や鋤鼻器の発達と強く関連する。すなわち、陸上生活への適応に伴いV2R遺伝子数は減りV1R遺伝子数は増える傾向にあり、魚のV1Rは6種類しかなく、肉鱗類(シーラカンス)を境に約20種類と急に増加する。さらに、V1R遺伝子群は塩基配列によって魚型(f-V1R)と四足動物型(t-V1R)に分類することができ、魚はf-V1Rのみ、哺乳類はt-V1Rのみを持つが、両生類と肉鱗類はf-V1Rとt-V1Rの両方を持っている。

このように、肉鱗類であるハイギョの嗅覚器が原始的鋤鼻器を持つことに加え、水中と空気中両方の匂いを受容する可能性が高いことを考えると、ハイギョと、既知の魚や四足動物との間でV1R発現部位を比較し、その変遷を明らかにすることは、脊椎動物の嗅覚器が進化の中で鋤鼻器を獲得した過程だけでなく、陸上生活に適応した過程を解明するための重要な手がかりになると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、「魚から四足動物に進化する過程で、嗅覚器が陸上生活に適応し、鋤鼻器が獲得される間に、V1R発現部位はどう変化したのか」という学術的問いに対して、以下に挙げる3つの目的を通して解明の糸口を探る。

- (1) 5種類のハイギョ(アフリカハイギョ4種、南米ハイギョ1種)のV1R遺伝子を同定する。ハイギョ、魚、四足動物の間でV1R遺伝子を系統解析し、ハイギョ、魚、四足動物の間、およびハイギョ同士の関係性を明らかにする。
- (2) 各ハイギョの嗅覚器におけるV1R発現を調べ、両生類と同様にV1R細胞が嗅上皮だけに分布するか、あるいは嗅上皮と鋤鼻器の両方に分布するか、ハイギョの種類によってV1R発現パターンに違いがないかを明らかにする。
- (3) 嗅上皮(ラメラOE)と原始的鋤鼻器(RecE)の間の嗅覚受容体発現の違い、および幼体と成体間のV1R発現および陥凹部の数と分布の違いを明らかにする。

### 3. 研究の方法

【遺伝子解析】ハイギョの V1R 遺伝子群の mRNA の塩基配列は、嗅覚器から抽出した RNA の RNA-seq によって同定した。魚類や哺乳類の V1R 遺伝子と比較する系統樹を作成することによって、f-V1R(魚型)と t-V1R(四足動物型)とに分類した。5 種類のハイギョ間で V1R 遺伝子と比較した。

【クローニング】遺伝子解析で決定した V1R 塩基配列に基づいてプライマーを設計し、嗅覚器から抽出した RNA の RT-PCR によって各 V1R 遺伝子の部分配列を増幅した。得られた PCR 産物を TA クローニングして塩基配列を確認した後、in vitro transcription により各 V1R 遺伝子に対するアンチセンスプローブを作製した。

【in situ hybridization】各動物の嗅覚器は 4%PFA で固定し、コンパウンドで包埋し、クリオスタットで凍結切片を作製した。各 V1R に対するアンチセンスプローブを用いて in situ hybridization を行い、嗅覚器における V1R 発現細胞の分布を調べた。具体的には、各切片におけるラメラ (嗅上皮)と陥凹部 (鋤鼻器)の面積を計測するとともに、それぞれに含まれる V1R 発現細胞数を数え、発現細胞密度を算出した。

### 4. 研究成果

(1) 4 種類のアフリカハイギョと 1 種類の南米ハイギョの V1R 遺伝子を RNA-seq により同定した。各ハイギョの V1R 遺伝子は 20-50 個(29 in *P. annectens*, 50 in *P. amphibus*, 26 in *P. aethiopicus*, 21 in *P. dolloi*, 20 in *L. paradoxa*) であり、硬骨魚のそれよりも 3 倍以上多く、両生類のそれに匹敵していた。系統解析により魚型と四足動物型に分類したところ、ほぼすべてのハイギョ V1R 遺伝子は四足動物型に属していた。これらのことは、ハイギョの嗅覚器は、陸上生活への適応が両生類と同程度に高いことを示唆する。系統樹ではハイギョの V1R は種ごとにクラスターを形成する傾向があり、このことはハイギョの V1R が種特異的な遺伝子重複によって増えたことを示唆する。

(2) 各ハイギョの嗅覚器における V1R 発現を in situ hybridization 解析し、V1R 細胞のほとんどは嗅上皮 (ラメラ OE) に分布するが、少数の V1R 細胞は鋤鼻器 (RecE) に分布することがわかった。嗅上皮と鋤鼻器の V1R 発現の分離が不完全であるという特徴は、現生ハイギョ 6 種類のうち、少なくともすべてのアフリカハイギョ (4 種) と南米ハイギョ (1 種) で共有された形質であることが示された。

先行研究では、両生類(ツメガエル)の嗅覚器では V1R 遺伝子はすべて嗅上皮に発現し、鋤鼻器には発現しておらず、鋤鼻器には V2R だけが発現することが報告されている (Date-Itto et al. 2008)。本研究で明らかになったハイギョの V1R 発現解析により、陥凹部上皮が魚型嗅上皮 (OR、V1R、V2R が発現) と両生類の鋤鼻器 (OR や V1R は発現せず、V2R が発現) の途中段階 (OR は発現せず、V1R と V2R が発現) であることが示された。

ハイギョ V1R のほとんどが四足動物型に分類され、そのほとんどはラメラ OE に分布することから、嗅覚器の陸上生活への適応について以下のように推測できる：陸上生活へ適応し、水中の匂いだけでなく空気中の匂いも受容するようになった四足動物の共通祖先において、鋤鼻器は主に水中の匂いを受容し、嗅上皮は水中の匂いと空気中の匂いの両方を受容する。

ただし、V1R 以外で、魚型(水中の匂いを受容)と四足動物型(空気中の匂いを受容)に分類される嗅覚受容体に OR (Class I/Class II) があげられる。先述の推測を検証するため

に、将来的にはハイギョの嗅覚器における Class I および Class II OR の発現を明らかにする必要がある。

- (3) *P. aethiopicus* 幼体および成体（体長 21.5 cm ~ 80 cm）の嗅覚器に含まれる陥凹部（原始的鋤鼻器）の数と分布を調べた。陥凹部は嗅覚器の尾内側部に偏って分布し、個体の成長と共に陥凹部の数は増加し、かつ、分布する範囲を拡大させることが明らかになった。ハイギョの原始的鋤鼻器はラメラ基部に位置する多数の陥凹部であり、嗅上皮から独立した憩室あるいは管状構造をとる四足動物の鋤鼻器とは大きく異なる形態を持つ。さらに、四足動物の鋤鼻器が胚発生期のみで形成されるのに対し、ハイギョの陥凹部は生後個体において形成され続け、その数を増やしている。ハイギョ陥凹部と四足動物の鋤鼻器の間で、形態や形成の時期が異なる発生学的原因は不明であり、陥凹部における発生関連遺伝子の発現部位や発現のタイミングについて検索が必要である。

*P. aethiopicus* と *L. paradoxa* において、幼体のほうが成体よりもラメラにおける V1R 細胞の密度が高い傾向にあった。この結果は、幼若個体の方が成熟個体よりもラメラにおける V1R を介した嗅覚受容機能が高いことを示唆した。幼体と成体の間における生活様式の違いと、ラメラの V1R 発現細胞密度の違いとの間に関連があるかを検証することは今後の研究課題である。ただしハイギョ嗅覚器には V1R 以外の嗅覚受容体も発現しているため、全体像を理解するには V1R 発現解析だけでは不十分であり、将来的には OR や V2R 遺伝子の発現解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamuta Shoko, Yamamoto Yoshio, Nakamuta Nobuaki	4. 巻 84
2. 論文標題 Distribution of recesses in the olfactory organ of African lungfish <i>Protopterus aethiopicus</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 885 ~ 889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.22-0173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamuta Shoko, Yamamoto Yoshio, Miyazaki Masao, Sakuma Atsuhiko, Nikaido Masato, Nakamuta Nobuaki	4. 巻 531
2. 論文標題 Type 1 vomeronasal receptors expressed in the olfactory organs of two African lungfish, <i>Protopterus annectens</i> and <i>Protopterus amphibius</i> .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 116 ~ 131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamuta Shoko, Yamamoto Yoshio, Miyazaki Masao, Sakuma Atsuhiko, Nikaido Masato, Nakamuta Nobuaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Type 1 vomeronasal receptor expression in juvenile and adult lungfish olfactory organ	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-023-00202-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中牟田祥子、山本欣郎、中牟田信明
2. 発表標題 ハイギョ嗅覚器における1型鋤鼻受容体発現細胞の分布
3. 学会等名 第1回 日本獣医解剖アカデミア
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中牟田祥子
2. 発表標題 ハイギョ嗅覚器におけるV1R発現解析
3. 学会等名 第7回 ケモビ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中牟田祥子、二階堂雅人、山本欣郎、中牟田信明
2. 発表標題 Expression of type1 vomeronasal receptors in the olfactory organ of lungfish
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中牟田祥子、太田考陽、加藤英明、山本欣郎、中牟田信明
2. 発表標題 アフリカ肺魚プロトプテルス・エチオピクス嗅覚器における陥凹部の分布
3. 学会等名 第2回 日本獣医解剖アカデミア
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中牟田祥子、佐久間敦丈、二階堂雅人、山本欣郎、中牟田信明
2. 発表標題 アフリカハイギョProtopterus dolloiの原始的鋤鼻器に1型鋤鼻受容体は発現するか
3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中牟田 信明  (Nakamuta Nobuaki)  (00305822)	岩手大学・農学部・准教授   (11201)	
研究 分担者	二階堂 雅人  (Nikaido Masato)  (70432010)	東京工業大学・生命理工学院・准教授   (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------