

令和元年5月30日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04820

研究課題名(和文) 全ての脊椎動物が共有する新規フェロモン受容体ancV1Rの機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis on novel pheromone receptor gene ancV1R, which is shared among most vertebrates

研究代表者

二階堂 雅人 (Nikaido, Masato)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70432010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は115種におよぶ生物種の全ゲノム配列を網羅的に解析することで、ほぼ全ての脊椎動物が共有する唯一のフェロモン受容体遺伝子を発見した。一般的に、フェロモンやその受容体は多様性が大きく、異なる種間での共通性は極めて低いと考えられてきたのに対し、今回発見された遺伝子は、古代魚のポリプテルスからシーラカンス、そして哺乳類におよぶ広範な脊椎動物の種間において共通であるという驚くべき特徴を備えていた。これは4億年に渡る脊椎動物の進化の歴史において、この受容体が太古の祖先から高度に保存されてきたことを意味し、フェロモン受容の要となる中心的な機能を担っている可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ほぼ全ての脊椎動物がもつフェロモン受容体遺伝子ancV1Rを発見し、その進化解析をすることで機能を推定した。そもそもフェロモン受容体はそれぞれの種に特異的であり、種間の共通性は低いと考えられていたが、ancV1Rはその予想に反し、驚くべき共通性を保持していた。この研究はこれまでのフェロモン受容体に関するいくつかの常識を覆したため、学術的価値は高い。またancV1Rが、今後の畜産動物の効率的な繁殖管理方法の開発にもつながると期待され社会的な意義も大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We found a novel pheromone receptor gene belonging to the V1R family, named ancV1R, which is shared among most Osteichthyes (bony vertebrates) from the basal lineage of ray-finned fishes to mammals. Phylogenetic and syntenic analyses of ancV1R using 115 vertebrate genomes revealed that it represents an orthologous gene conserved for >400 million years of vertebrate evolution. Interestingly, the loss of ancV1R in some tetrapods is coincident with the degeneration of the vomeronasal organ (VNO) in higher primates, cetaceans, and some reptiles including birds and crocodylians. In addition, ancV1R is expressed in most mature vomeronasal sensory neurons (VSNs) in contrast with canonical V1Rs, which are sparsely expressed in a manner that is consistent with the “one neuron one receptor” rule. Our results imply that a previously undescribed V1R gene inherited from an ancient Silurian ancestor may have played an important functional role in the evolution of vertebrate VNO.

研究分野：進化生物学

キーワード：V1R pheromone receptor vertebrates evolution

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物ゲノム中には、化学受容に関わる遺伝子がいくつか存在し、それぞれが多重遺伝子族 (multigene family) を形成することが知られている。中でも V1R 型フェロモン受容体群は、膜七回貫通型の G タンパク共役型受容体であり、哺乳類において揮発性のフェロモンを受容すると考えられている。また、それぞれの種における V1R 受容体遺伝子群のレパートリーに関しては共通性が極めて低い (それぞれの種に特異的である) ことや、1 つの鋤鼻神経細胞に発現するのは数ある V1R 遺伝子の中からただ 1 種類のみであること (1 neuron: 1 receptor rule) が定説となっている。我々はシーラカンス全ゲノムプロジェクトに参画し、その中でも特に陸上化に伴う嗅覚・フェロモン受容体遺伝子群のレパートリーの変遷を中心に解析をおこなってきた。その解析の結果、陸生である哺乳類やカエルのグループと、水生である魚のグループではまったく別のタイプの V1R 受容体遺伝子群がそれぞれのゲノム中に存在しているが、古代魚ポリプテルス、ガー、肉鱗類のシーラカンス、それからカエル、トカゲ、さらには哺乳類といったほぼ全ての脊椎動物に共通の V1R 受容体遺伝子がただ 1 つだけ存在することを発見した。進化的に考えると、この V1R 受容体遺伝子の起源は非常に古く、今から最低でも 4 億年も前に遡ることから、我々はこの遺伝子を ancV1R (ancient: 古い祖先に由来する、という意味を含めた) と名付け、さらなる解析を進めた。我々が注目する ancV1R は、その系統解析によると、これまで知られていた V1R 型フェロモン受容体ファミリーに含まれてはいるものの、まだアノテーションすらされていない新規遺伝子であった。

2. 研究の目的

本研究によって明らかにしたいことは、脊椎動物が古くから共通に保持してきた新規フェロモン受容体 (ancV1R) が、鋤鼻神経細胞において、何を受容し、どのような役割を担っているのか、ということである。これは、鋤鼻神経細胞のシグナル伝達系という、謎の多かった部分の多くを解明することにつながる可能性をもち、極めて重要な意義を持っている。さらに ancV1R は祖先が古く、古代魚から哺乳類までに広く保存されたオーソログス (単一で共通という意味) な遺伝子であることから、鋤鼻神経細胞の起源やその進化的変遷を追えることも重要なことであり、進化研究における波及効果は大きいと考えている。これまでに全ゲノム配列データが公開されている種に関して解析した結果によれば、鋤鼻器官の退化した種ではかならず ancV1R が偽遺伝子化していることも分かっており、ancV1R が鋤鼻器官における中心的な機能を果たしていることを示唆するだけでなく、これまでに鋤鼻器官に関する記載のない種や、その鋤鼻組織を判別するのが難しい種については、この遺伝子を鋤鼻神経細胞のマーカーとして利用できる可能性もある。

3. 研究の方法

① ancV1R 遺伝子の進化圧解析

データベース上登録された全ゲノム配列データを網羅的に探索し広範な脊椎動物種の ancV1R 遺伝子配列をすべて単離し、それらを進化圧解析した。具体的には ancV1R に働いた自

然選択が負の自然選択 (purifying selection) なのか、正の自然選択 (positive selection) なのかを dN/dS 解析することで、ancV1R が機能的制約を受けているのか ($dN/dS < 1$)、もしくは機能的刷新があったのか ($dN/dS > 1$) を検証した。さらには、ancV1R が偽遺伝子化により機能を失った可能性 ($dN/dS = 1$) も予想し、それらを検証した。まず、系統樹上の各枝における dN/dS 値を推定するために、最尤法 (LxML) を用いた ancV1R 系統樹の構築をおこない、続いて PAML を用いてその系統樹上の各枝における dN/dS 値の算出、その統計的有意差を検定した。これにより、脊椎動物の進化の過程における ancV1R の機能変化の有無やその時期を検証した。

② 鋤鼻器官の起源

鋤鼻器官は陸生動物が誕生した後に獲得されたものと考えられており、我々のこれまでの解析においては、鋤鼻器官全体に渡って ancV1R が発現していることが確認されていた。また、鋤鼻器官の退化したいくつかの陸生動物では ancV1R が偽遺伝子化していることが明らかとなっているため、ゲノム中に ancV1R を持つ種は鋤鼻器官が存在すると予想できる。そして、我々の研究によって ancV1R の存在が確認されているハイギョ (肉鰭類) に関しては、鋤鼻上皮には存在しないと考えられてきたが、近年の研究において通常の嗅上皮とは異なる区画化された鋤鼻上皮が存在する可能性が示唆されていた。また、ハイギョよりもさらに系統的に古くに分岐し、鋤鼻器官に相当する領域が見つからない下位真骨魚類 (ポリプテルスやガーなど) も ancV1R をもつことが我々の研究で分かっているため、脊椎動物の進化の過程で硬骨魚が誕生した段階 (もしくはそれより早い段階) で、すでに鋤鼻器官に相当する領域が存在していた可能性があり、その可能性を検証した。まず、下位真骨魚類や軟骨魚類の複数種についてそのゲノム中から ancV1R を探索した。さらに嗅覚器官を解剖し、ancV1R 配列をプローブとした *in situ* hybridization をおこない、ancV1R の発現や鋤鼻様の領域があるか否かを検証した。軟骨魚類ゲノム配列に関しては、工樂樹洋博士 (理研 CLST ユニットリーダー) に、イヌザメおよびトラザメの概要配列を探索していただいた。

ancV1R-KO 個体の作出

ancV1R の KO 個体の解析は、その機能解明へ向けた直接的なデータを得られる可能性が大きいいため、そのためマウスに関して CRISPR/Cas9 システムを用いた ancV1R-KO 個体を試みた。そして計画②、③の結果をもとに、ancV1R-KO の表現型を解析した。具体的には形態学的・組織化学的異常および行動解析 (フェロモンによって誘導される性、生殖、子育て、縄張り行動) を実施する。マウス鋤鼻器官における ancV1R の発現パターンが、鋤鼻特異的イオンチャネルである TRPC2 のパターンと似ており、ancV1R-KO 個体と TRPC2-KO 個体の表現型が似たものとなる可能性 (いくつかの生殖行動異常) を予想し、その検証をおこなった。

4. 研究成果

ancV1R 遺伝子の進化圧解析

まずデータベースに登録されている全ゲノム配列を利用して 115 種について ancV1R 配列を網羅的に探索し、古代魚ポリプテルス、ガーから哺乳類に渡る広範な脊椎動物の ancV1R を単離

することに成功した。この配列を用いて系統解析をおこなったところ、この ancV1R 遺伝子の系統樹は脊椎動物の系統関係と概ね一致していた。また、ancV1R 遺伝子のシンテニー（周辺の遺伝子の並び順）を調べたところ、どの種も SNCAIP 遺伝子のイントロンに存在することが分かった。つまり、今回単離された ancV1R が1つの遺伝子座に由来するオーソログな遺伝子であることが確認された。続いて、本系統樹のそれぞれの枝上における進化圧の指標となる dN/dS を推定したところ、ほぼ全ての枝において $dN/dS < 1$ という結果を得た。さらには、脊椎動物の陸上化のタイミングにおいても同様に $dN/dS < 1$ であり、機能的な制約が働いていたことを示唆した。ancV1R が広範な脊椎動物において4億年に渡って保持されてきたことを考えると、概ね負の自然選択が働いてきたことを示す本結果は順当であろうと考えられる。また、水中から陸上への移行段階では、フェロモン受容体も親水性から揮発性のフェロモンを受容するように機能刷新（その場合は $dN/dS > 1$ となる可能性大）があったのではないかと予想をしていたが、実際には $dN/dS < 1$ と推定された。つまり、陸上化を遂げる前後も機能的な制約が働いており、ancV1R の機能変化はなかったものと予想され、これは ancV1R の機能を予想する上で重要な知見となった。以上の成果は *Mol. Biol. Evol.* 誌において発表した（Suzuki et al. 2018）

鋤鼻器官の起源に関する解析

まず、硬骨魚類よりも進化的に早くに分岐している軟骨魚類（ゾウギンザメ、イヌザメ、トラザメ）や無顎類（ヤツメウナギ）に関して、ancV1R 配列の探索をおこなったが、これらの種には ancV1R は見つからなかった。BLAST 探索における配列相同性の低さが原因で検出されなかった可能性もあるため、実際に他の脊椎動物において ancV1R が位置する SNCAIP 遺伝子の周辺配列も詳細に探索したが、結果は変わらず ancV1R は見つからなかった。この結果より、ancV1R は軟骨魚類が分岐したあとの硬骨魚類の共通祖先において誕生した遺伝子であると予想される。次に、鋤鼻器官の起源を探る上で重要なポリプテルス（条鰭類でもっとも最初に分岐したグループ）の嗅上皮の凍結切片を作成し、ancV1R 配列をプローブとした *in situ* hybridization をおこなった。その結果、ancV1R は嗅上皮の基底側の特定の細胞における発現が観察されたが、哺乳類における鋤鼻器官のような特定の神経細胞が集中して存在するような場所を見出すには至らなかった。今後は作製する切片の方向や場所を詳細に検討しながら、ancV1R 陽性細胞が局在するような場所があるか否かを検証し、鋤鼻器官の起源がこのグループの祖先までさかのぼる可能性を探っていこうと考えている。

ancV1R-KO 個体の作出

分担者の廣田順二研究室にて、CRISPR/Cas9 システムを用いた ancV1R-KO マウスの作出に成功した。現在、その表現型解析を進めているところであるが、予備的な結果では ancV1R-KO メスマウスにおいて、オスからの交尾行動を拒否する行動が観察されており、これは統計的にも有意であることがわかっている。今後は、このメスによる生殖行動異常がどのような機序によって引き起こされるのかに関して、この ancV1R-KO マウス個体の鋤鼻神経細胞のより詳細な解析によって明らかにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

査読有り

1. **Nikaido, M.** (2019) Evolution of V1R pheromone receptor genes in vertebrates: diversity and commonality. *Genes Genet. Syst.* (in press)
2. Suzuki, H., Nishida, H., Kondo, H., Yoda, R., Iwata, T., Nakayama, K., Enomoto, T., Wu, J., Moriya-Ito, K., Miyazaki, M., Wakabayashi, Y., Kishida, T., Okabe, M., Suzuki, Y., Ito, T., **Hirota, J., Nikaido, M.** (2018) A single pheromone receptor gene conserved across 400 million years of vertebrate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 35: 2928–2939.
3. Moriya-Ito, K., Hayakawa, T., Suzuki, H., Hagino-Yamagishi, K., and **Nikaido, M.** (2018) Evolution of vomeronasal receptor 1 (V1R) genes in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *GENE* 642: 343–353.
4. Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., Murata, K., **Nikaido, M.**, Sado, T., Sato, Y., Takeshita, M., Iwasaki, W., Yamanaka, H., Kondoh, M., and Miya, M. (2017) Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources.*

査読無し

5. 二階堂雅人「脊椎動物の V1R 型フェロモン受容体遺伝子ファミリーの進化」
AROMARESEARCH Vol.17 pp230-235, 2016.

[学会発表](計 22 件)

1. **二階堂雅人**『哺乳類ゲノム解析から探る ancV1R への進化圧への緩みと鋤鼻器官の退化』第 6 回 ケモビ研究会(2019 年 3 月 11 日-13 日, ホテル マホロバ・マインズ三浦, 三浦市)
2. 河村理輝, **二階堂雅人**『シクリッドのフェロモン受容体候補 V1R2 の機能解明』第 6 回 ケモビ研究会(2019 年 3 月 11 日-13 日, ホテル マホロバ・マインズ三浦, 三浦市)
3. 佐久間敦丈, **二階堂雅人**『古代魚におけるフェロモン受容器官の探索』第 1 回遺伝学会分科会(2019 年 3 月 8 日, 国立遺伝学研究所 静岡県三島市)
4. 河村理輝, **二階堂雅人**『シクリッドのフェロモン受容体候補 V1R2 の機能解明』第 52 回日本味と匂学会(2018 年 10 月 30-11 月 1 日, 大宮ソニックシティ, さいたま市)
5. 依田涼太, 鈴木彦有, 岩田哲郎, 廣田順二, **二階堂雅人**『広範な脊椎動物に共通に存在するフェロモン受容体遺伝子の進化解析』日本進化学会第 20 回大会(2018 年 8 月 22-24 日, 東京大学)
6. 依田涼太, **二階堂雅人**『脊椎動物ゲノム探索から明らかとなったフェロモン受容体 V1R の多様性の起源』日本進化学会第 20 回大会(2018 年 8 月 22-24 日, 東京大学)
7. 鈴木彦有, 佐久間敦丈, 依田涼太, 岡部正隆, 伊藤武彦, 廣田順二, **二階堂雅人**『脊椎動物の 4 億年以上に渡る進化の過程で保持されてきたフェロモン受容体』第 8 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting(2018 年 8 月 4 日, 東京慈恵会医科大学)
8. **Nikaido, M.**, Suzuki, H., Ito, T., Hirota, J. 『A single pheromone receptor gene shared among most bony vertebrates』*SMBE* 2018(2018 年 7 月 8-12 日, パシフィコ横浜, 横浜市)
9. **二階堂雅人**『下位条鰭類ゲノム探索で明かされた脊椎動物 V1R の多様性』第 5 回 ケモビ研究会(2018 年 3 月 12 日-14 日, 熱海)
10. 畑島諒, **二階堂雅人**『硬骨魚類における苦味受容体遺伝子の多様性と共通性』第 5 回 ケモビ研究会(2018 年 3 月 12 日-14 日, 熱海)
11. 張子聡, **二階堂雅人**『鋤鼻器官の退化に伴う ancV1R 遺伝子に働く自然選択圧の緩みの検証』第 5 回 ケモビ研究会(2018 年 3 月 12 日-14 日, 熱海)
12. **Nikaido, M.** 『Evolution of V1R pheromone receptor genes in vertebrates: its diversity and generality』5th Advance in Neuroinformatics(2017 年 11 月 20 日, 理化学研究所, 和光市)
13. **二階堂雅人**『広範な脊椎動物に共通な新規フェロモン受容体の進化』日本味と匂学会第 51 回大会・嗅覚シンポジウム「身近な動物達の嗅覚」(2017 年 9 月 25-27 日, 神戸国際会議場)
14. 鈴木彦有, 依田涼太, 岩田哲郎, 廣田順二, **二階堂雅人**『広範な脊椎動物が共有する新規フェロモン受容体の進化と機能』日本動物学会第 88 回大会(2017 年 9 月 21-23 日, 富山県民会館)
15. 鈴木英里, **二階堂雅人**『古代魚における ancV1R 遺伝子の発現解析』日本動物学会第 88 回大会(2017 年 9 月 21-23 日, 富山県民会館)
16. 鈴木彦有, 岩田哲郎, 依田涼太, 廣田順二, **二階堂雅人**『広範な脊椎動物が共有する新規フェロモン受容体の進化と機能』日本進化学会第 19 回大会(2017 年 8 月 24-26 日, 京都大学)
17. 小郷卓博, 鈴木彦有, **二階堂雅人**『全ゲノム重複に伴う魚類 OMP の進化解析』日本進化学会第 19 回大会(2017 年 8 月 24-26 日, 京都大学)
18. 清水翔子, 河村理輝, **二階堂雅人**『シクリッドにおけるフェロモン受容体候補 V1R2 遺伝子の発現解析』日本進化学会第 19 回大会(2017 年 8 月 24-26 日, 京都大学)

19. **二階堂雅人** 『ほぼ全ての脊椎動物が共有するフェロモン受容体 ancV1R の進化解析』 第 4 回ケモビ研究会 (2017 年 2 月 18 日, 盛岡)
20. **Nikaido, M.** 「Evolution of V1R pheromone receptor genes in vertebrates: its diversity and generality」 The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan (2016 Nov. Okinawa, JAPAN)
21. 鈴木彦有、依田涼太、中山叶子、岩田哲郎、村田健、東原和成、廣田順二、**二階堂雅人** 『広範な脊椎動物に共有される新規 V1R 受容体遺伝子』 (2016 年 8 月 25 日-28 日、東京・東工大)"
22. **Nikaido, M.**, Suzuki, H., Satta, Y., Mzighani, S.I., Sturmbauer, C., Hagino-Yamagishi, K., Okada, N. 「Multiple episodic evolution events in V1R receptor genes of East-African cichlids」 17th International Symposium on Olfaction and Taste (2016 June, Yokohma , JAPAN)"

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

二階堂研究室

www.nikaido.bio.titech.ac.jp

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：廣田 順二

ローマ字氏名：Junji Hirota

所属研究機関名：東京工業大学

部局名：バイオ研究基盤支援総合センター

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 60405339

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。