

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15164

研究課題名（和文）初期脊椎動物における嗅覚受容メカニズムの進化的起源と多様化

研究課題名（英文）The Evolutionary Origin and Early Diversification of the Vertebrate Olfactory Mechanisms

研究代表者

鈴木 大地（Suzuki, Daichi）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：60866672

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：まず、ヌタウナギのゲノム情報から嗅覚受容体遺伝子を探索し、分子系統解析を行った。その結果、ヌタウナギの嗅覚受容体はヌタウナギの系統独自に著しく多様化していることがわかった。とりわけ、V2Rの多様化が顕著であった。次に、トランスクリプトーム解析およびin situ hybridization法による発現解析を実施した結果、上記の嗅覚受容体遺伝子のほとんどが嗅上皮で発現し少なくとも一部がとくに嗅細胞で発現していることが確かめられた。以上の結果により、ヌタウナギは脊椎動物の祖先の状態を引き継ぎつつ独自に嗅覚受容メカニズムを多様化させていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「原始的」な脊椎動物であるヌタウナギについて、嗅覚受容体（におい物質を受容するための分子）にどのようなものがあるのか調べた。その結果、ヌタウナギの系統だけで多様化した嗅覚受容体が多数見つかった。これらの受容体が、確かに嗅覚器に分布しており、嗅覚受容体としてはたらいっていることが示唆された。この発見は、嗅覚の進化的起源と初期の多様化を理解するうえで重要なヒントとなる。

研究成果の概要（英文）：First, we explored the olfactory receptor genes from the hagfish genome and conducted a molecular phylogenetic analysis. As a result, we found that the hagfish olfactory receptors show significant diversification, especially for V2R. Next, we performed transcriptome analysis and in situ hybridization. The results confirmed that most of the these olfactory receptor genes are expressed in the olfactory epithelium, and at least some of them are specifically expressed in the olfactory cells. These findings suggest that hagfish have diversified their olfactory reception mechanisms independently while retaining the ancestral state of vertebrates.

研究分野：進化形態学、神経行動学

キーワード：ヌタウナギ 嗅覚受容体

## 1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、距離の離れた知覚対象の情報を受容する遠距離感覚のひとつである。とりわけ光の減衰が空気中よりも激しい水中においては、もうひとつの遠距離感覚である視覚がさほどは有効でなく、嗅覚の重要性が相対的に高くなる。脊椎動物のステム群である無顎類も水中生活を送っていたため、嗅覚に大きく頼っていたらと考えられる。

ヌタウナギとヤツメウナギからなる円口類は、無顎類のなかで現生する唯一の系統である。円口類は他の脊椎動物と同様に嗅覚器を備える。一方で脊椎動物に近縁な無脊椎動物であるホヤやナメクジウオには明確な嗅覚器が認められない。したがって嗅覚器は脊椎動物の共通祖先の段階で新奇に獲得されたと考えられ、嗅覚それ自体も初期脊椎動物において大きく向上したと推測できる。しかしながら円口類における嗅覚受容に関する研究はヤツメウナギに限定されており、ヌタウナギの嗅覚受容についての研究はほとんどなされてこなかった。

円口類のうち、ヤツメウナギは発達した眼を備えている。一方でヌタウナギは深海に適応したために視覚が退化し、そのかわりに嗅覚が発達したとされる。ヌタウナギの嗅覚を調べることで、こうしたヌタウナギの系統での嗅覚受容の発達について理解できるだけでなく、ヤツメウナギとの共通点を探ることで、脊椎動物の嗅覚メカニズムの進化的起源について重要なヒントをもたらすことが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脊椎動物の嗅覚メカニズムの進化的起源と初期の多様化の理解を目指して、ヌタウナギの嗅覚受容体レパートリーと、におい物質への応答性を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究は、以下の(1)~(3)の研究課題に基づいて実施された。

### (1) 嗅覚受容体遺伝子の探索と系統解析

嗅細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子ファミリーとして、main odorant receptor (mOR), vomeronasal receptors (V1R, V2R), trace amine-associated receptor (TAAR) が知られている。これらのファミリーそれぞれについて、脊椎動物の他種の既知の配列をクエリとして、ヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) のゲノムデータベースに対し BLAST 検索をかけ、候補配列を抽出した。得られた候補配列は、他種の嗅覚受容体遺伝子配列とともに分子系統解析にかけた(最尤法)。

### (2) 嗅覚受容体遺伝子の発現解析

上記の探索で得られた候補配列について、ヌタウナギ成体の各組織から得られた RNAseq データを用いて、組織ごとでの発現量を調べた。さらに一部の遺伝子については、嗅上皮の凍結切片を作成し、*in situ* hybridization 法によってより詳細な空間的発現解析を実施した。

### (3) 嗅電図による嗅上皮の応答性の電気生理学的記録

ヌタウナギおよびカワヤツメ (*Lethenteron camtschaticum*) の嗅上皮を取り出して細胞外液(人工海水あるいは人工脳脊髄液)で還流維持した。参照電極を嗅上皮の下部に配置し、記録電極を嗅上皮表面に接触させその周辺の電位変化を記録した。におい物質としてアミノ酸溶液 (Gln/Arg,  $10^{-3}$  M) をガラスピペットに充填したうえで空気圧により記録電極付近の嗅上皮に微量噴射し、におい物質に対する嗅上皮の応答を調べた。

## 4. 研究成果

嗅覚受容体遺伝子の探索の結果、ヌタウナギのゲノムから 19 個の mOR、1 個の V1R、42 個の V2R、0 個の TAAR 候補配列を特定した。分子系統解析の結果、19 個の mOR 候補は脊椎動物 mOR サブファミリーのうち Type 1 の基部に位置し、1 個の候補は脊椎動物 V1R サブファミリーのうち ORA3/4 の基部に位置した。この結果は、これらの候補配列が確かにそれぞれ mOR、V1R であることを示唆する。42 個の V2R については、4 つの単系統群にわかれた。そのうちのふたつ(1 遺伝子、9 遺伝子)は、それぞれ外群である顎口類 CaSR と TASR と姉妹群を形成したため、それぞれヌタウナギ CaSR、TASR であると推測された。第 3 のグループ(1 遺伝子)はヤツメウナギ V2R-like と姉妹群を形成し、第 4 のグループ(31 遺伝子)はこれら円口類 V2R-like の内群として、顎口類 V2R と姉妹群をなした。

トランスクリプトーム解析の結果、19 個の mOR の候補遺伝子のほとんどは嗅上皮での発現が確かめられ、1 個の V2R 候補遺伝子も嗅上皮で発現していた。V2R 候補遺伝子について、まずヌタウナギ CaSR は嗅上皮での発現が見られない一方で他の組織(脳や腎臓、精

巢など)で発現が見られた。TASR は総じて脳で高発現しているか全身の各組織で発現し、嗅上皮での発現は弱かった。ヌタウナギ V2R-like は嗅上皮では発現していなかった。顎口類 V2R と姉妹群をなした第 4 のグループはほぼすべて嗅上皮で高発現していた一方、その他の組織での発現は一貫していなかった。

さらに *in situ* hybridization 法による発現解析により、mOR 遺伝子のひとつである mOR4、V1R、V2R 遺伝子のひとつである V2R31 が嗅上皮において嗅細胞で発現していることが確認できた。

以上の結果をまとめると、ヌタウナギには 19 個の mOR、1 個の V1R、32 個の V2R (第 4 のグループ) が真の嗅覚受容体として機能している可能性が示唆された。ヌタウナギにおいては TAAR は確認されなかった。ヤツメウナギにおいては、カワヤツメでは 6 個の V1R、2 個の V2R-like、51 個の TAAR が (mOR の個数は不明) ウミヤツメ (*Petromyzon marinus*) においては 27 個の mOR、6 個の V1R、1 個の V2R-like、32 個の TAAR が報告されている。このうちウミヤツメ V2R-like については、嗅上皮で発現していないことが明らかとなっている (Kowatschew & Korsching 2022)。本研究においてもヌタウナギ V2R-like が嗅上皮では発現していなかった点と合わせて考えると、これらの円口類 V2R-like は真の V2R ではない (嗅覚受容体として機能していない) 可能性が高い。一方でヌタウナギ V2R (第 4 のグループ) は顎口類 V2R と姉妹群をなし、嗅上皮で高発現していることから、これらの遺伝子は真の V2R であり、ヤツメウナギでは真の V2R は消失した可能性が示唆される。

したがってヌタウナギは一定数の mOR、少数の V1R、多数の V2R、0 個の TAAR を嗅覚受容体としてもつ一方で、ヤツメウナギは一定数の mOR、少数の V2R、0 個の V2R、多数の TAAR をもつことになる。この事実は、嗅覚受容体がそれぞれの系統で独自の多様化が起きたこと、おそらくは生息環境や成体の違いを反映していることを示唆する。

さらに今回、ヌタウナギに多数の真の V2R 遺伝子が見つかった一方で、円口類 V2R-like は真の V2R ではない可能性が示されたことは、もっぱらヤツメウナギのみを祖先的な脊椎動物のモデルとして研究が進められてきた従来の研究動向に一石を投じるものである。すなわち、脊椎動物の初期進化を正しく理解するためには、一見すると祖先的な形質を多く残しているように見えるヤツメウナギだけではなく、系統独自の改変を多く受けているように思われるヌタウナギの情報を合わせて考えなければならないのである。以上の研究成果は現在、論文としてまとめ、投稿準備中である。

また嗅電図については、ヌタウナギとヤツメウナギの両方でのおい物質の噴射による電位変化の記録に成功した。今後、におい物質の種類や濃度を変えて、より詳細な解析を継続する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Muramatsu Banri, Suzuki Daichi G., Suzuki Masakazu, Higashiyama Hiroki	4. 巻 Online First
2. 論文標題 Gross anatomy of the Pacific hagfish, <i>Eptatretus burgeri</i> , with special reference to the coelomic viscera	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Anatomical Record	6. 最初と最後の頁 155-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ar.25208	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 -
1. 著者名 大井雄介、鈴木大地	4. 巻 54
2. 論文標題 脊椎動物の嗅覚系の進化的起源と多様化	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 におい・かおり環境学会誌	6. 最初と最後の頁 117-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2171/jao.54.117	査読の有無 無
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 Tamura Motoki, Ishikawa Ryota, Nakanishi Yuki, Pascual-Anaya Juan, Fukui Makiko, Saitou Takashi, Sugahara Fumiaki, Rijli Filippo M., Kuratani Shigeru, Suzuki Daichi G., Murakami Yasunori	4. 巻 9
2. 論文標題 Comparative analysis of Hmx expression and the distribution of neuronal somata in the trigeminal ganglion in lamprey and shark: insights into the homology of the trigeminal nerve branches and the evolutionary origin of the vertebrate jaw	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-023-00222-9	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 大井 雄介, 加嶋 広武, 飯屋山 博文, 山口 陽子, 鈴木 大地
2. 発表標題 ヌタウナギ嗅覚受容体の分子系統解析および発現解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加嶋 広武, 大井 雄介, 鈴木 大地, 山口 陽子
2. 発表標題 ヌタウナギ嗅覚受容体レポーターおよび発現パターンの解明
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉本 賢一郎, 飯屋山 博文, 小薮 大輔, 鈴木 大地
2. 発表標題 ヤツメウナギ幼生の頭部筋形態の再検討
3. 学会等名 日本動物学会 関東支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Totoki Tamura, Ryota Ishikawa, Juan Pascual Anaya, Takashi Saitou, Filippo M. Rijli, Shigeru Kuratani, Daichi Suzuki, Yasunori Murakami
2. 発表標題 A study of the sensory trigeminal nerve homology between Cyclostomata and Gnathostomata
3. 学会等名 3rd Franco-Japanese Developmental Biology Meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 元樹, 鈴木 大地
2. 発表標題 ヌタウナギのドーパミン回路の解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2022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

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