

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440189

研究課題名(和文) 広範な脊椎動物に共通の新規フェロモン受容体の解析

研究課題名(英文) Molecular evolutionary study on a novel pheromone receptor gene common in most vertebrates from fish to mammals

研究代表者

二階堂 雅人(Nikaido, Masato)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：70432010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は広範な脊椎動物ゲノム中に存在するフェロモン受容体候補遺伝子(ancV1R)を発見した。本研究では、脊椎動物の生殖行動におけるancV1Rの機能やフェロモン受容システムの進化的起源を明らかにするために、哺乳類や両生類、原始的な魚類の嗅(鋤鼻)上皮におけるancV1Rの発現場所を調べると共に、広範な脊椎動物ゲノム中におけるancV1Rの偽遺伝子化パターンを解析した。その結果、ancV1R mRNAが鋤鼻器官の全体に発現していること、ancV1Rの偽遺伝子化が鋤鼻器の退化と相関していることが明らかとなった。また、培養細胞を用いた発現実験系の構築や、ノックアウトマウス作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：We recently found one pheromone receptor gene, which is common in most vertebrates (named it ancV1R). To understand the evolutionary origin and the contribution of ancV1R receptor in reproductive behavior of vertebrates, we analyzed this receptor gene from several aspects. First, mRNA of ancV1R gene was shown to be expressed in the entire region of the vomeronasal organ. Furthermore, the pseudonization of ancV1R gene was apparently correlated with the degeneration of vomeronasal organ in most cases we investigated. The above results imply that the ancV1R has the central role in pheromone detection through vomeronasal sensory neurons. We also succeeded in the expression of ancV1R in cultured cell and in the construction of ancV1R-knock-out mice. These experimental systems will be used for the future functional elucidation.

研究分野：進化生物学

キーワード：フェロモン受容体 嗅上皮 鋤鼻上皮 脊椎動物 ancV1R

1. 研究開始当初の背景

現在の地球上には実に多様な生物が存在しているが、この莫大な種多様性は生物が互いに同種・異種を認知することによって巧妙に維持されてきた神秘の産物ともいえる。そして、脊椎動物において非常に古くから存在するフェロモン感覚は、この同種認知を含めた生殖活動に不可欠であることが分かっている。我々は、ポリプテルスやシーラカンスに代表される古代魚から陸生哺乳類まで、ほぼ全ての脊椎動物ゲノム中に共通して存在するフェロモン受容体候補遺伝子(新規に発見された未同定遺伝子: ancV1R と名付けた)が存在することを明らかにした。新規に発見した ancV1R については、既存のフェロモン受容体 V1R 遺伝子群と系統樹上で近縁な位置関係にあり、それ以外の受容体遺伝子とは近縁ではないことや、マウスやヤギの鋤鼻組織の凍結切片に対する *in situ* hybridization によると、ancV1R の mRNA は鋤鼻組織全体に広く発現していたことから、この遺伝子はフェロモン受容体タンパク質をコードしていると予想された。このことは、脊椎動物の進化の過程において水生から陸生へのダイナミックな環境変化があったにも関わらず、5億年以上もの間、共通のフェロモン受容システムが維持されてきたこと、さらには魚から哺乳類まで共通の生殖システム(フェロモン)が存在する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

魚類から哺乳類までに共通なフェロモン受容体遺伝子があることは、進化学・生理学的に極めて驚くべき発見である。本研究では、この新規に単離されたフェロモン受容体 ancV1R の機能を明らかにする目的で、進化学的、分子生物学的な解析を進めていく。具体的には以下について研究を進めた。1. 広範な脊椎動物の嗅(鋤鼻)上皮における ancV1R の遺伝子の発現パターンを調べた。2. ゲノムデータベースを用いて、ancV1R がどの脊椎動物

種のゲノム中に存在しているのか(もしくは偽遺伝子化しているのか)を網羅的に調べた。3. 培養細胞を用いた ancV1R 受容体の発現系構築をおこなった。4. ancV1R ノックアウトマウスを作製した。

3. 研究の方法

ancV1R の発現は、研究対象となる生物種の嗅覚(鋤鼻)器官の凍結切片に対して DIG ラベルした ancV1R の mRNA を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなうことで確認した。凍結切片の作製が困難な種については、各器官から mRNA を抽出した後に、RT-PCR をおこなうことで、その発現確認をおこなった。各生物種における ancV1R 遺伝子の有無は、Ensemble Genome Browser 上に登録されている全ゲノム配列に対して BLAST search をおこなうことで検証した。発現系構築については、マウスもしくはネッタイツメガエルの ancV1R 配列を組み込んだプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションさせることにより、その機能発現の可能性の検証からおこなった。ancV1R ノックアウトマウスについては、CRISPR/Cas9 システムを用いた。

4. 研究成果

4-1. 広範な脊椎動物における ancV1R 遺伝子の発現パターン。ancV1R が嗅(鋤鼻)上皮においてどのような発現パターンを示すかを、マウスやヤギの他にも広範な脊椎動物種を対象に調べた。まずマーモセット、ネコ、ネッタイツメガエルの鋤鼻上皮切片において *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなったところ、鋤鼻上皮全体に渡る ancV1R の発現が細胞レベルで確認された。現生の硬骨魚類の中で系統的にもっとも原始的であるポリプテルスについても、嗅上皮から抽出した RNA を鋳型とした逆転写 PCR にて ancV1R の組織特異的な発現が確認された。つまり、ancV1R は広範な脊椎動物全般の嗅(鋤鼻)上皮におい

て特異的な発現をしていることが明らかとなった。注)陸上四足動物では一般に鋤鼻上皮と嗅上皮が器官として分化しているが、魚類ではその分化が見られず嗅上皮のみが存在する。そのため、嗅(鋤鼻)上皮と記載した。

4 - 2 . 脊椎動物各種のゲノム中における ancV1R 遺伝子の有無の網羅的探索。次に我々は全ゲノム DNA 配列が登録されている哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類を網羅するようにして、そのゲノム中における ancV1R 遺伝子の有無を調べた。その結果、原始的な魚類から哺乳類までのほとんどの脊椎動物種のゲノム中に ancV1R が存在したが、真猿類、鯨類、ラッコ、コウモリ、鳥類、カメ、ワニで ancV1R の偽遺伝子化が確認された。興味深いことに上記の種は鋤鼻器官が退化していることが知られているという共通性があった。つまり、鋤鼻器官の退化と ancV1R の偽遺伝子化が強く関連しており、これは ancV1R が鋤鼻器官の機能(フェロモンの受容)において不可欠な役割をもつことを示唆している。

4 - 3 . 培養細胞中における ancV1R の発現系の構築。これまで V1R 受容体タンパク質のリガンド探索は難航しているが、それは培養細胞中における既知 V1R 受容体タンパク質の膜移行効率が極めて低いため、その実験系を用いることができないことが原因であった。しかしこれまでの予備的な実験では、マウスやネッタイツメガエルの ancV1R が、HEK293 細胞中において極めて高い効率で膜表面へ移行することが明らかとなった。これは、ancV1R が既存の V1R とは異なるメカニズムで膜移行をしているためだと考えられ、今後のリガンド探索や機能解析が効率的に進むことが期待される。

4 - 4 . ancV1R ノックアウトマウスの作出。ancV1R の機能を解明する上でその機能欠失個体の解析は重要となる。我々は近

年になり手法の開発が進んだ CRISPR/Cas9 システムを利用した ancV1R ノックアウトマウスを作出することに成功し、現在では ancV1R 遺伝子が欠失した系統を複数維持している。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計7件) 全て査読有

1. Suzuki H, **Nikaido M**, Hagino-Yamagishi K, Okada N (2015) Distinct functions of two olfactory marker protein genes derived from teleost-specific whole genome duplication. BMC Evol. Biol. 15:e245.
2. Kudo Y*, **Nikaido M***, Kondo A, Suzuki H, Kikuchi K, Okada N (2015) A microsatellite-based genetic linkage map and putative sex determining regions in Lake Victoria cichlids. GENE 560:156-164. (*equally contributed, #corresponding author)
3. Brawand D et al. (**Nikaido M**, 75人中45番目) The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. Nature 513:375-381, 2014.
4. **Nikaido M**, Ota T, Hirata T, Satta Y, Saito Y, Aibara M, Mzighani SI, Hagino-Yamagishi K, Sturmbauer C, Okada N. (2014) Multiple episodic evolution events in V1R receptor genes of East-African cichlids. Genome Biol. Evol. 6:1135-1144.
5. **Nikaido M** et al. (27 co-authors) (2013) Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. Genome Res. 23:1740-1748.
6. **Nikaido M**, Suzuki H, Toyoda A, Fujiyama A, Hagino-Yamagishi K, Kocher TD, Carleton KL, Okada N. (2013) Lineage specific expansion of V2R receptor (OlfC) genes in cichlids may contribute to diversification in amino acid detection. Genome Biol. Evol.5: 711-722.
7. Kawashima Y, Nishihara H, Akasaki T, **Nikaido M**, Tsuchiya K, Segawa S, Okada N. (2013) The complete mitochondrial genomes of deep-sea squid (*Bathyteuthis abyssicola*), bob-tail squid (*Semirossia patagonica*) and four giant cuttlefish (*Sepia apama*, *S. latimanus*, *S. lycidas* and *S. pharanois*), and their application to the phylogenetic analysis of Decapodiformes. Mol. Phylogenet. Evol. 69:980-993.

〔学会発表〕(計10件)

1. **二階堂雅人**『ほぼ全ての脊椎動物に存在する新規フェロモン受容体 ancV1R の進化』第3回ケモビ研究会(2015年11月14日, 箱根)
2. 鈴木彦有、西田秀史、廣田順二、**二階堂雅人**『全ての脊椎動物に共通な新規フェロモ

- ン受容体の機能解明』日本動物学会第 86 回大会 (2015 年 9 月 17 日、新潟大学)
3. **二階堂雅人** 『シクリッド V1R 遺伝子の多様化とそれに伴う種分化の可能性』第 10 回化学生態学研究会 (2015 年 6 月 12 日、函館)
 4. 鈴木彦有、**二階堂雅人** 『脊椎動物に保存された新規 V1R 遺伝子の機能と進化』第 2 回ケモビ研究会 (10 月 24-26 日、箱根)
 5. **Nikaido M.**, Okada N. “Evolution of the chemo-receptor genes in coelacanth.” 第 16 回日本進化学会 (2014 年 8 月 21 日-24 日、高槻・現代劇場)
 6. 鈴木彦有、西田秀史、廣田順二、**二階堂雅人** 「脊椎動物に保存された新規 V1R 遺伝子の機能と進化」第 16 回日本進化学会 (2014 年 8 月 21 日-24 日、高槻・現代劇場)
 7. **Nikaido M.** “Highly dimorphic diversity of V1R receptor genes on the sex chromosome of East-African cichlids.” Workshop on Sensory Systems (30th Jan. 2014, Tokyo Institute of Technology, Yokohama)
 8. 鈴木彦有、**二階堂雅人** 『ほぼ全ての脊椎動物に共通な新規 V1R の機能と進化』『真骨魚類特異的ゲノム重複による OMP 遺伝子の重複と機能分化』第 1 回ケモビ研究会 (2013 年 9 月 27 日-29 日、箱根)
 9. **Nikaido M.** “Molecular evolutionary study of the east African cichlids: textbook example of Adaptive Radiation and Parallel Evolution” Summer school at Fudan University (9th Sep – 11th Sep 2013, Fudan Univ., Shanghai)
 10. 鈴木彦有、**二階堂雅人**、柴田朋子、野澤昌文、重信秀治、西山智明、岡田典弘 『比較ゲノム解析で迫るアフリカ三大湖産シクリッドの進化メカニズム』第 15 回日本進化学会 (2013 年 8 月 28 日-30 日、筑波大学)
 11. **二階堂雅人**、颯田葉子、相原光人、菊池潔、山岸公子、岡田典弘 『シクリッド V1R 遺伝子の多様化と性決定領域との関連性』第 15 回日本進化学会 (2013 年 8 月 28 日-30 日、筑波大学)

〔図書〕(計 6 件)

全て査読無し

1. **二階堂雅人** 「生きた化石シーラカンス」『Re』建築保全センター No.189. pp58-59. (2016)
2. **二階堂雅人**、岡田典弘 (2015) 「絶滅危惧種のゲノム解読とその利用」『次世代シーケンサー活用術』化学同人 143-156.
3. **二階堂雅人**、岡田典弘 (2014) シーラカンスゲノム進化: 進化速度・嗅覚・前適応『生物の科学遺伝』 Vol. 68. pp. 256-260.
4. **二階堂雅人**、岡田典弘 (2014) シーラカンスのもう一つの繁殖地: タンザニア『生物の科学遺伝』 Vol. 68. pp. 210-214.

5. **二階堂雅人**、岡田典弘 (2014) 「シーラカンスゲノム中に隠されていた脊椎動物陸上化のカギ」『バイオサイエンスとバイオインダストリー(財)バイオインダストリー協会』 Vol. 72. pp. 134-136.
6. **二階堂雅人** (2013) 「シーラカンスの全ゲノムが語る脊椎動物の陸上化」Nature ダイジェスト 12 月号 pp. 28-29.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nikaido.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二階堂雅人 (Nikaido, Masato)

東京工業大学・生命理工学研究科

准教授

研究者番号: 70432010