

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	脊椎動物における鋤鼻器官の起源に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	佐久間敦丈
Author(English)	Atsuhiko Sakuma
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11714号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:二階堂 雅人,本郷 裕一,廣田 順二,加藤 明,中村 信大
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11714号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和 3 年度 博士論文

脊椎動物における鋤鼻器官の 起源に関する研究

東京工業大学 生命理工学院

生命理工学系 佐久間敦丈

指導教員 二階堂雅人 准教授

目次

目次	1
第一章：序論	4
脊椎動物の嗅覚器構造	4
嗅覚器における遺伝子発現	5
フェロモン受容体遺伝子の分類	6
<i>ancV1R</i> 遺伝子と鋤鼻器官	7
ポリプテルスの嗅覚器構造	8
第二章：手法	9
実験動物と組織サンプル	9
HE 染色	10
トランスクリプトーム解析	10
遺伝子データマイニング	11
Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH)	12

第三章：結果	15
ポリプテルスの嗅覚器の構造	15
ポリプテルス MOO と AOO のトランスクリプトーム解析.....	16
ポリプテルス嗅覚器における鋤鼻器官ランドマーク遺伝子発現パターン解析	17
ハイギョおよびスポッテッドガー嗅覚器における <i>ancV1R</i> の発現パターン	19
第四章：考察	21
ポリプテルスの MOO と AOO	21
鋤鼻器官の起源と鋤鼻神経系の進化	22
第五章：結論	25
謝辞	26
講演目録.....	27
報文目録.....	28

付録	29
図表	30
引用文献	51

第一章：序論

脊椎動物の嗅覚器構造

フェロモンとは、ある個体が放出し、同種他個体がそれを受容することで、先天的な社会行動や生殖行動が誘発される化学物質のことである。このフェロモン受容システムは雌雄間の同種認知などに用いられるため、種の多様性の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。

両生類、爬虫類、哺乳類などの陸棲の四足類において、嗅覚器は主嗅上皮（main olfactory epithelium, MOE）と鋤鼻器官（vomeronasal organ, VNO）という解剖学および機能的に分化した2つの器官に大別される。一般的な匂い物質は主に繊毛性の嗅神経細胞が集まる主嗅上皮で、フェロモンは主に微絨毛性の鋤鼻神経細胞が集まる鋤鼻器官で受容され、嗅神経細胞は主嗅球（main olfactory bulb, MOB）、鋤鼻神経細胞は副嗅球（accessory olfactory bulb, AOB）と呼ばれる脳領域にそれぞれの神経軸索を投射している（Vassar et al. 1994; Barber and Raisman 1974; 図1）。

一方で、水棲の真骨魚類の嗅覚器は主嗅上皮と鋤鼻器官に分化しておらず、嗅上皮（olfactory epithelium, OE）のみで構成されている（Døving and Trotier 1998; 図2）。それゆえ、陸棲の四足類には鋤鼻器官が存在し、水棲の真骨魚類には存在しないことから、鋤鼻器官は陸上環境への適応に伴って誕生したと考えられてきた（Bertmar 1981; Eisthen 1992）。しかし近年、水棲肉鰭類（ハイギョ）の嗅覚器において、遺伝子発現パターンや神経軸索投射パターンの観点から四足類の鋤鼻器官との類似性を示す神経細胞が集まる陥凹部上皮（recess epithelium, RecE）が発見されたことにより、鋤鼻器官が脊椎動物の進化における陸上適応よりも前に存在してい

たことが示唆された(González et al. 2010; Nakamuta et al. 2012; 2013; 図3)。しかし、この鋤鼻器官の誕生が水棲肉鰭類の祖先の段階であったのか、あるいはそれより遡って水棲条鰭類の祖先の段階であったのかについては定かではなく(図4)、脊椎動物の化学感覚の進化の分野において重要事項である鋤鼻器官の起源について調べる必要がある。そこで本研究では水棲の現生硬骨類の中で最も古くに分岐した下位条鰭類ポリプテルス(図4)に焦点を当て、その嗅覚器において鋤鼻領域が存在するか否かを調べることで、鋤鼻器官の起源が脊椎動物の進化の歴史のどこにあったのかを検証した。

嗅覚器における遺伝子発現

哺乳類では、フェロモン受容体遺伝子である7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体遺伝子のうち2種類が鋤鼻器官の微絨毛性神経細胞である鋤鼻神経細胞で発現していることが分かっている。それらは vomeronasal receptor type I (*V1R*) (Dulac and Axel 1995) および vomeronasal receptor type II (*V2R*) (Matsunami and Buck 1997) と呼ばれ、いずれも多重遺伝子族を形成している。

V1R と *V2R* は主に鋤鼻器官で発現しているが、嗅覚系の化学受容体遺伝子である7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体遺伝子 olfactory receptor (*OR*) (Buck and Axel 1994) および trace amine associated receptor (*TAAR*) (Liberles and Buck 2006) は主に主嗅上皮の絨毛性神経細胞である嗅神経細胞で発現している。真骨魚類における上記の4つの受容体ファミリー遺伝子の発現パターンは、*V1R* と *V2R* が微絨毛性神経細胞で、*OR* と *TAAR* が絨毛性神経細胞で発現するという点では哺乳類と似ているが、真骨魚類ではこれらはすべて嗅上皮において発現している(Sato, Miyasaka, and Yoshihara 2005; Hussain, Saraiva, and Korsching 2009; Oka, Saraiva, and Korsching 2012; Ota et al. 2012)。

微絨毛性神経細胞において *V1R* は G タンパク質遺伝子である *Gi2* と、*V2R* は同じく G タンパク質遺伝子である *Go* と共発現しており (Dulac and Axel 1995; Buck and Axel 1991; Herrada and Dulac 1997)、これらはさらに transient receptor potential cation channel subfamily C member 2 (*TRPC2*) 遺伝子とも共発現している (Liman, Corey, and Dulac 1999; Lucas et al. 2003)。絨毛性神経細胞においては *OR* と *TAAR* が G タンパク質遺伝子 *Golf* および cyclic nucleotide gated channel subunit alpha 2 (*CNGA2*) 遺伝子と共発現している (Brunet, Gold, and Ngai 1996)。以上に示した微絨毛性および絨毛性神経細胞の遺伝子共発現パターンは、鋤鼻器官の有無に関わらず、真骨魚類から四足類までの脊椎動物で共通している (表 1) が、真骨魚類においては *V1R* と *Gi2* が共発現せず、共役する G タンパク質が明確になっていないという例外もある (Date-Ito et al. 2008; Oka and Korsching 2011; Nakada et al. 2014)。また、現在までに行われたバイオインフォマティクス解析により、鋤鼻神経系の遺伝的要素 (*V1R*, *TRPC2*, *V2R*) が円口類 (ヤツメウナギ) から哺乳類までの幅広い脊椎動物において保存されていることも明らかになっている (図 4, Grus and Zhang 2009)。

フェロモン受容体遺伝子の分類

最新の包括的な系統解析により、前述の *V1R* および *V2R* ファミリーは、「四足類型 (tetrapod-type)」(*t-V1R*, *t-V2R*) と「魚類型 (fish-type)」(*f-V1R*, *f-V2R*) の 2 つの主要なグループにさらに細分化されることが明らかになっている (Nikaido 2019; Zhang et al. 2021 in press)。「四足類型」は元々哺乳類で、「魚類型」は元々真骨魚類で同定され、それぞれ系統樹上で明確に区別される。*t-V1R*, *t-V2R*, *f-V1R*, *f-V2R* は、それぞれ四足類と真骨魚類に特異的であるが、一部の例外として、*t-V1R* と *t-V2R* は水棲肉鰭類シーラカンス (Nikaido et al. 2013; Picone et al. 2014) やいくつかの水棲下位条鰭類 (Zapilko and Korsching 2016; Zhang et al. 2021 in press)

にも見られ、その起源が陸上適応よりも前であることが示唆されている。また、両生類（カエル）は「四足類型」と「魚類型」の両方の *V1R* を持つ。さらに、前述の系統解析により *V1R* ファミリーには *t-V1R*, *f-V1R* の他に、ancient *V1R* (*ancV1R*) と呼ばれる遺伝子が存在することも明らかになった（図5）。

ancV1R 遺伝子と鋤鼻器官

多重遺伝子族を形成し、1 神経細胞につき 1 コピーだけ発現するという one neuron-one receptor rule に従ったまばらな発現パターンを示す従来の *V1R* とは異なり、*ancV1R* は下位条鰭類から哺乳類に至るまでのあらゆる脊椎動物のゲノム中に 1 コピーだけ保存され、鋤鼻器官に存在するすべての鋤鼻神経細胞で発現する (Chess et al. 1994; Rodriguez et al. 2002; Suzuki et al. 2018)。類似の例としては、すべての *V2R-Go* 発現鋤鼻神経細胞に発現することが知られている *V2R* ファミリーの 1 種、*V2R2* が挙げられる (Martini et al. 2001; Silvotti et al. 2007)。

また、偽遺伝子化した *ancV1R* を持つ真猿類や鳥類、翼手類、鯨類などの脊椎動物の鋤鼻器官が軒並み痕跡化している一方で、ゲノム中に intact な状態で *ancV1R* 配列を保持している脊椎動物には鋤鼻器官が解剖学的に存在していることも明らかになっている (Zhang and Nikaido 2020)。以上のことから、*ancV1R* の詳細な機能は未だ明らかになってはならないが、*ancV1R* が鋤鼻器官の機能、つまりフェロモン受容システムを支える上で重要な役割を担っていると考えられると共に、intact な *ancV1R* を持つ脊椎動物には *ancV1R* を発現する神経細胞が集中する領域、つまり鋤鼻器官が存在するとも考えられる。この事実を考慮すると、intact な *ancV1R* を持つポリプテルス (Nikaido 2019) にも鋤鼻器官、もしくはハイギョ陥凹部上皮のような鋤鼻様器官が存在する可能性がある（図4）。

ポリプテルスの嗅覚器構造

現存する下位条鰭類の最下層グループに属するポリプテルスの嗅覚器は、主嗅覚器（main olfactory organ, MOO）と副嗅覚器（accessory olfactory organ, AOO）の2領域からなるユニークな特徴を持っているが、これら2領域間の機能的な違いは未だ不明のままである(Pfeiffer 1968; 図6)。ポリプテルスの嗅覚器に解剖学的に異なる領域が存在するという事実は、この2領域がそれぞれ四足類の主嗅上皮と鋤鼻器官にそれぞれ相当するという考えを想起させるに足るものであった。

そこで本研究ではポリプテルスの AOO と MOO において、前述の微絨毛性神経細胞、つまり鋤鼻器官のランドマークとなる遺伝子（*V1R*, *V2R*, *Go*, *Gi2*, *TRPC2*, *ancV1R*, *V2R2*）および絨毛性神経細胞、つまり主嗅上皮のランドマークとなる遺伝子（*Golf*, *CNGA2*）のトランスクリプトーム解析と *in situ* hybridization による発現パターン解析を行うことで、この2領域の機能推定を行った。その結果、鋤鼻神経細胞と嗅神経細胞は、AOO と MOO の両方に分布しており、フェロモンや匂い物質の受容という点では機能的に未分化であることが示唆された。一方で、AOO において運動性絨毛に関する遺伝子の発現レベルが有意に高かったことから、むしろこのトランスクリプトーム解析の結果は、AOO が化学物質感知以外の付加的な機能、すなわち、運動性絨毛を用いた鼻腔内への水の効率的な取り込み機能を持っていることを示唆している。また、ポリプテルス嗅覚器全体に着目しても鋤鼻様器官と考えられる領域は存在せず、下位条鰭類には鋤鼻器官が存在しないことが示唆された。以上の結果から、水棲の硬骨魚類の共通祖先の段階で陸棲四足類の鋤鼻器官に存在するような鋤鼻神経細胞の起源が誕生し、鋤鼻器官はその後に肉鰭類の系統で誕生したと推察される。

第二章：手法

実験動物と組織サンプル

すべての動物サンプルについて、鼻先から尾鰭までの長さの測定値をその体長とした。嗅覚器の凍結切片の作成および total RNA の抽出に用いた 11-25cm のポリプテルス (*Polypterus senegalus*) および 30cm のハイギョ (*Protopterus annectens*) は市販のものを使用し、実験操作を行うまでは熱帯魚の飼育に適した標準的な条件で飼育した。DNA 抽出に使用した 15cm のスポッテッドガー (*Lepisosteus oculatus*) も市販の国内繁殖個体を使用し、実験操作の前まで上記と同様の条件で飼育した。ただし、スポッテッドガーに関しては、関東地方環境事務所より特定外来生物の飼育等についての承認を得た上で飼育を行った。ポリプテルスとハイギョは氷上で麻酔をかけた後、断頭して安楽死させた。スポッテッドガーはヒレの一部を切断し、再び上記の飼育条件下に戻した。これらの動物を用いた全ての実験操作は東京工業大学が定める水棲動物等取扱いマニュアルに従い、同大学内で行った。嗅覚器の凍結切片作成に使用した 27.5~34cm のスポッテッドガーの PFA 固定頭部サンプルは、東京大学大気海洋研究所から提供された。ポリプテルスとハイギョの頭部から摘出した嗅覚器は、4%PFA/0.7xPBS 中において 4°C の条件で一晩固定した。PFA で固定した嗅覚器を 20%スクロース/0.7x PBS 中において 4°C の条件で一晩スクロース置換した。スクロース置換した嗅覚器を O.C.T コンパウンド（サクラファインテック）で包埋し、液体窒素で瞬間凍結した。凍結した嗅覚器のブロックをクライオスタットでスライスし、厚さ 14 μ m の凍結切片を作成した。これらの凍結切片は使用するまで -80°C で保存した。

HE 染色

-80℃で保存していたポリプテルスの凍結切片を室温に戻した後、水道水と蒸留水で洗浄して O.C.T.コンパウンドを除去した。各切片をヘマトキシリンで 4 分間染色し、水道水で洗浄した。その後エオシンで 10 分間染色し、70%エタノールで 1 分間、80%エタノールで 1 分間、90%エタノールで 1 分間、100%エタノールで 5 分間×3 回処理した。その後キシレンで 5 分×3 回処理し、ENTELLAN NEW (MERCK) で封入した。

トランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析に使用した total RNA は、TRIzol (Invitrogen) または TRI Reagent (Molecular Research Center) を用いてポリプテルス 3 個体とハイギョ 1 個体の嗅覚器から抽出した。ポリプテルスの嗅覚器の total RNA は、嗅覚器を AOO と MOO に分離してから抽出した。抽出した RNA サンプルは使用するまで -30℃で保存した。すべての RNA シークエンシングは、TruSeq stranded mRNA Library kit (Illumina) を用いてシーケンスライブラリを構築した後、Illumina NovaSeq6000 シーケンサーを用いて行った。各 RNA リード長は 101bp で、それらはすべてペアエンドでシークエンシングされた。得られたリードの総数は以下の通りである。MOO_1 : 43,966,110、MOO_2 : 51,993,914、MOO_3 : 41,642,906、AOO_1 : 41,003,732、AOO_2 : 59,561,386、AOO_3 : 52,225,820、ハイギョ嗅覚器 : 55,285,188。これらすべての RNA リードデータは、DDBJ Sequence Read Archive の Accession No.PRJDB12173 および PRJDB12387 に登録されている。ハイギョの RNA リードデータは、Trinity (ver.2.4.0) (Grabherr et al. 2011; Haas et al. 2013) または Bridger (ver.2014-12-01) (Chang et al. 2015) を用いた de novo アセンブルによるハイギョ嗅覚器の cDNA ライブラリーの構築に使用された。

ポリプテルスの RNA リードデータは Bowtie2 (ver.2.3.5.1) (Langmead and Salzberg 2012)によりポリプテルスゲノム配列データ

(https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/016/835/505/GCF_016835505.1_ASM1683550v1/GCF_016835505.1_ASM1683550v1_genomic.fna.gz) にマッピングされ、各遺伝子にマッピングした RNA リードの推定カウント数が算出された。このカウント数は TCC (ver.1.24.0) (Sun et al. 2013)により RPM に正規化され、AOO および MOO の各 3 サンプルの結果の多重比較検定による DEG

(differentially expressed genes) 解析が行われた。検出された DEG は、ポリプテルスゲノムのアノテーションデータ

(https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/016/835/505/GCF_016835505.1_ASM1683550v1/GCF_016835505.1_ASM1683550v1_genomic.gff.gz) をもとにアノテーションされた。アノテーションされた DEG に対し、WebGestalt (Web-based GEne SeT AnaLysis Toolkit: <http://www.webgestalt.org>)による GO 解析が行われた。

遺伝子データマイニング

Ensemble (https://asia.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Index) に登録されているマウス (*Mus musculus*) の配列をクエリーとし、ポリプテルスゲノムに対して TBlastN 検索を行い、四足類の鋤鼻器官および主嗅上皮のいくつかのランドマーク遺伝子 (*ancV1R*, *TRPC2*, *CNGA2*, *Gi2*, *Go*, *Golf*) を手動で同定した。*V1R* および *V2R* の配列は、所属研究室オリジナルのソフトウェア FATE(ver.2.7.1, <https://github.com/Hikoyu/FATE>)を用いて、ポリプテルスのゲノム配列との同一性検索により同定した。その際のクエリーとして、先行研究で同定された配列を用いた(Nikaido et al. 2013; Zapilko and Korsching 2016; Zhang et al.2021 in press)。

これらの同定された遺伝子の情報を前述のトランスクリプトーム解析の前にポリプテルスゲノムのアノテーションデータに反映させた。V1R および V2R のアミノ酸配列は MAFFT (ver.7.475) (Katoh and Standley 2013)を用いてアライメントされ、それらの系統樹は RAxML (ver. 8.2.12) (Stamatakis 2014)を用いて MEGAX(Kumar et al. 2018)に実装されている modeltest (<http://evomics.org/resources/software/molecular-evolution-software/modeltest/>)で推定したベストフィットモデルの下で最尤法により構築された。それらの系統樹は FigTree (ver. 1.4.4, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)で可視化され、それをもとに *t-V1R*, *t-V2R*, *f-V1R*, *f-V2R* の識別を行った。

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

ポリプテルスとハイギョの嗅覚器から抽出した total RNA を鋳型とし、SuperScript III RTase (Invitrogen) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。ゲノム DNA または合成した cDNA を鋳型として、表 2 に示すプライマーセットを用いて PCR を行い、各遺伝子断片を増幅した。増幅された PCR 産物は pGEM-*T*-Vector (Promega) と DH5 α 株の大腸菌を用いてクローニングした。クローニングされた PCR 産物の塩基配列はサンガー法によるシーケンスで確認された。大腸菌を用いた遺伝子組み換え実験は、東京工業大学の委員会の承認を得た後に、同大学で行われた。クローニングされた遺伝子配列を含むプラスミドベクターを大腸菌コロニーから抽出し、適切な制限酵素を用いて切断した。切断したプラスミドベクターを鋳型とした T7 または SP6 RNA Polymerase (Roche) と DIG または FITC RNA labeling mix (Roche) を用いた Polymerase 反応により、DIG (ジゴキシゲニン) または FITC (フルオレセイン) で標識された RNA プローブを合成した。これらのプローブは使用するまで-30°Cで保存した。

1 色 FISH の手法を以下に示す。-80°Cで保存していた各凍結切片を室温に戻し、4% PFA/0.7x PBS で 5 分、0.3% H₂O₂ / 0.7x PBS で 15 分、10 mg/ml proteinase K / 0.7x PBS で 10 分 (37°C)、4% PFA / 0.7x PBS で 10 分、0.2% glycine / 0.7x PBS で 5 分、0.2N HCl で 20 分処理した。その後、0.1M トリエタノールアミン-塩酸溶液中で 1ml の無水酢酸を 1 滴ずつ加えながら 5 分間攪拌することでアセチル化反応を行った。その後、50% ホルムアミド、0.01M Tris-HCl (pH7.5)、0.2mg/ml Yeast tRNA、5%硫酸デキストラン、1x Denhardt's reagent、0.6M NaCl、2.5% SDS、0.001M EDTA (pH8.0) を含むハイブリダイゼーション溶液で 30 分間処理し、プレハイブリダイゼーションを行った。その後のハイブリダイゼーションは、2.5 ng/μl の DIG または FITC 標識 RNA プローブ/ハイブリダイゼーション溶液を用いて 60°Cで一晩行った。ハイブリダイゼーション後、切片を 5x SSC で洗浄し、50°Cの 5x SSC / 50%ホルムアミド中で 15 分×2 回処理した。その後、37°Cの 2ug/ml RNase A (Sigma) / TNE で 30 分間処理した後、切片を 50°Cの 2x SSC と 0.2x SSC でそれぞれ 15 分間×2 回洗浄した。洗浄後、内因性ビオチンを Streptavidin/Biotin Blocking Kit (VECTOR)でブロッキングし、TBS に 1%のブロッキング試薬(キコーテック)を含むブロッキング液で 60 分間処理した。ブロッキング処理後、ブロッキング液で 100 倍希釈した Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments (Sigma-Aldrich)、またはブロッキング液で 500 倍希釈した Anti-Fluorescein-POD, Fab fragments (PerkinElmer)を用いて 4°Cで一晩抗体反応を行った。抗体反応後、切片を TNT で洗浄し、TSA plus Biotin kit (キコーテック社製)を用いて TSA 反応を 30 分間行った。TSA 反応後、ブロッキング液で 200 倍に希釈した Streptavidin, Alexa Fluor™ 488 conjugate (Thermo Fisher 社製)で 30 分間処理した後、DAPI 入りの VECTASHIELD mounting medium (VECTOR 社製)で封入した。封入された切片の遺伝子発現シグナルは蛍光顕微鏡 Axioplan (Carl Zeiss) 下で観察された。すべての蛍光シグナルの写真は AxioCam 503 color (Carl Zeiss) を用いて撮影され、Adobe Photoshop で明るさとコントラストを調整した。

2 色 FISH の手法を以下に示す。プレハイブリダイゼーションまでの操作は前述の通り行った。ハイブリダイゼーションは 2.5ng/ μ l の DIG と FITC 標識の RNA プロブ/ハイブリダイゼーション溶液を用いて、60°Cで一晩行った。ハイブリダイゼーション後の洗浄から抗体反応までの操作は前述の通り行った。抗体反応後、切片を TNT で洗浄し、TSA plus DIG キット（キコーテック）を用いて TSA 反応を 30 分行った。TSA 反応後、切片を 15% H₂O₂ / TBS で 30 分処理し、ハイブリダイズした RNA プロブの標識 DIG を失活させた。前述の通り内因性ビオチンのブロッキングを行った後、ブロッキング液で 500 倍希釈した Anti-Fluorescein-POD, Fab fragments (PerkinElmer) と DyLight® 594 Anti-Digoxigenin (VECTOR) の抗体溶液を用いて、4°Cで一晩抗体反応を行った。その後の封入以降の操作は 1 色 FISH の場合と同様にして行った。

第三章：結果

ポリプテルスの嗅覚器の構造

ポリプテルスの嗅覚器は左右一対で、それぞれが軟骨に覆われており、その尾側後端が嗅球へとつながっている（図 6 A, B）。環境中の化学物質は前鼻孔管から後鼻孔に向かって水が流れる際に、この嗅覚器で感知される(Pfeiffer 1968; 図 6 A)。この嗅覚器は過去の解剖学的知見と一貫して主嗅覚器（MOO）および副嗅覚器（AOO）の 2 つの構造体からなり、AOO は吻側に、MOO は尾側に位置していた（Pfeifer 1968; 図 6 B）。MOO は連続するヒダ構造からなる 5 つの房で、AOO は 2 つの房で構成されており、それらのヒダ構造は各房の中で放射状に広がっていた（図 6 C）。各ヒダを覆っている厚い上皮（ヒダの根元付近）と薄い上皮（ヒダの先端付近）は、それぞれ感覚上皮と非感覚上皮であると考えられる（図 6 D-G）。また、MOO と AOO のヒダ構造はお互いにつながっていなかった（図 6 C）。これは MOO と AOO が解剖学的に分離していることを意味しており、これらの 2 つの領域が異なる機能、例えばそれぞれ陸棲四足類の主嗅上皮と鋤鼻器官と同様の役割を持っているのではないかという考えを想起させ得るものである。

ポリプテルス MOO と AOO のトランスクリプトーム解析

ポリプテルスの MOO と AOO の機能的な違いを遺伝子発現レベルから調べるため、MOO および AOO の total RNA から得られた RNA リードをポリプテルスの参照ゲノムデータにマッピングし、各遺伝子配列にマッピングしたリード数を比較することで、2 領域間で有意に発現量差がある遺伝子を検出する differentially expressed genes (DEG) 解析を行った。この網羅的な DEG 解析を行う前に、ポリプテルスゲノムにも存在する嗅覚器のランドマーク遺伝子、鋤鼻器官特異的な遺伝子 (*ancV1R*, *TRPC2*, *Gi2*, *Go*, *V1Rs*, *V2Rs*) と主嗅上皮特異的な遺伝子 (*CNGA2*, *Golf*) の情報を取得し、その情報を公開されているポリプテルスのアノテーションファイルに反映させた。ここで得られたポリプテルスの V1R および V2R を含む 8 種の脊椎動物 (ポリプテルス、スポッテッドガー、メダカ、シクリッド、ゼブラフィッシュ、シーラカンス、ネッタイツメガエル、ウシ) の V1R および V2R の系統樹を図 7 および図 8 に示す。これらの系統樹上の V1R および V2R は、いずれも四足類型 (tetrapod-type; *t-V1R*, *t-V2R*) と魚類型 (fish-type; *f-V1R*, *f-V2R*) の 2 つの異なるクレード群に分けられることが確認され、ポリプテルスの V1R および V2R には四足類型と魚類型の両方が存在することが判明した (Nikaido et al. 2013; Nikaido 2019; Zhang et al. 2021 in press)。

まず初めに嗅覚器のランドマーク遺伝子の発現レベルを正規化されたリード数に基づいて比較した結果、特定の遺伝子の発現の有無などの明確な違いは見られなかったが、AOO よりも MOO における発現レベルが高い遺伝子が多い傾向が見られた (図 9 A)。また、V1R および V2R それぞれの発現量も MOO-AOO 間で顕著な違いは見られなかった (図 9 B, C)。以上の結果から、MOO と AOO は、予想に反して陸棲四足類の嗅覚器のように匂い受容機能とフェロモン受容機能の面では分化していないことが示唆された。

次に、上記の嗅覚器のランドマーク遺伝子以外もすべて含めた包括的な DEG 解析を行った結果、MOO-AOO 間で発現量が有意に異なる 825 個の DEG が得られた (MOO>AOO : 521 個、AOO>MOO : 304 個、FDR<0.05)。これら 825 個の DEG について WebGestalt を用いて GO 解析したところ、MOO>AOO の DEG には神経細胞（主に神経軸索）の形態維持や神経伝達に関する遺伝子が多く含まれていたことが分かった (図 10)。これは MOO として RNA 抽出に使用した組織サンプルに含まれる神経束の量が AOO のそれよりも多かったことに起因すると考えられ (図 6 C)、図 10 に見られるエンリッチメント率の低さにも実験手法的な問題が反映されている可能性がある。一方で AOO>MOO の DEG には運動性繊毛に関する遺伝子が多く含まれることが分かった (図 11)。これらの DEG 解析結果と前述の嗅覚器のランドマーク遺伝子の比較結果から、MOO と AOO は共に匂い受容とフェロモン受容機能を担っており、AOO はさらに鼻腔内に水を流入させる機能も持っていることが示唆された。この AOO の機能は、ポリプテルスが環境中の化学物質を効率的に検出する上で重要であると考えられる。

ポリプテルス嗅覚器における鋤鼻器官ランドマーク遺伝子発現パターン解析

トランスクリプトーム解析の結果、ポリプテルスの MOO も AOO も陸棲四足類で観察されるような鋤鼻器官に相当しないことが示唆された。しかし、ポリプテルスの嗅覚器内には鋤鼻器官のランドマーク遺伝子を発現する神経細胞が集中するような鋤鼻器官様の領域が存在する可能性がまだ残されていた。そこで、ポリプテルスの嗅覚器官における鋤鼻器官のランドマーク遺伝子の発現パターンを Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を用いて細胞レベルで調べた。その結果、図 12 に示すように *ancVIR*、*TRPC2*、*Gi2*、*Go* は MOO と AOO のヒダ構造を覆う感覚上皮の深層で発現していた (図 12 A-D, A'-D', A''-D'', 図 13)。一方、主嗅上皮のランドマーク遺伝子である *Golf* は、MOO と AOO のヒダ構造を覆う感

覚上皮の表層で発現していた（図 1 2 E, E', E'', 図 1 3）。以上の結果から、鋤鼻器官のランドマーク遺伝子の発現パターンが特定の領域に局在せず、MOO と AOO のヒダ構造の感覚上皮の深層に嗅覚器全体を通して発現していたことから、ポリプテルス嗅覚器には前述したような鋤鼻器官様の領域が存在しないことが示唆された。

次に、ポリプテルス嗅覚器内に広く存在していた鋤鼻器官のランドマーク遺伝子を発現する神経細胞について、それらの遺伝子の共発現パターンが陸棲四足類の鋤鼻器官に存在する鋤鼻神経細胞と共通性をもつかどうかを調べた。まず *ancV1R* と *TRPC2*、*Gi2*、*Go* の RNA プローブをそれぞれ組み合わせた 2 色 FISH を行ったところ、*ancV1R-TRPC2*、*ancV1R-Gi2*、*ancV1R-Go* のすべてのパターンの共発現性を示す鋤鼻神経細胞が確認された（図 1 4）。これらの鋤鼻様神経細胞の特徴をより詳しく調べるため、*t-V1R* (*t-V1R32*、*34*、*37*、*43*、*49*)、*f-V1R* (*f-V1R2*、*3*、*4*、*6*)（図 9 B）と *ancV1R*、*TRPC2*、*Gi2* との共発現性を、同様に 2 色 FISH で確認した。その結果、ポリプテルスの鋤鼻神経細胞において *t-V1R32*、*37*、*43*、*f-V1R2* と *ancV1R*、*TRPC2*、*Gi2* はそれぞれ共発現することが確認された（図 1 5）。*t-V1R34*、*49* と *f-V1R3*、*4*、*6* についてはシグナルが検出されなかったが（データ未掲載）、その理由はこれらの遺伝子の 1 細胞あたりの発現レベルが低かったため、あるいは実験操作的な要因が関係しているためと予想される。また、ポリプテルスの鋤鼻神経細胞における *t-V2R* (*t-V2R253*)、*f-V2R* (*f-V2R100*)、*V2R2*（図 9 C）と *ancV1R*、*TRPC2*、*Go* との共発現性についても同様に調べたところ、*V1R* の結果と同じくすべてのパターンの共発現性が確認された（図 1 6）。これらの遺伝子の共発現性に関する結果は、従来陸棲四足類で特徴づけられていた *t-V1R* や *t-V2R* によるフェロモン受容、およびそれらのシグナル伝達という典型的な鋤鼻感覚システムが、ポリプテルスの嗅覚系ではすべて機能していることを示唆している。

さらに興味深いことに、ポリプテルス嗅覚器に存在する神経細胞において *Gi2* との共発現の比率が *t-V1R* 発現細胞と *f-V1R* 発現細胞で異なっていた。より具体的に述べると、*t-V1R37* 発現細胞のほとんどが *Gi2* を共発現していた (98.8%) のに対し、*f-V1R2* 発現細胞では半数以下 (41.7%) であった (表 3)。また、*Go* はほとんどの *f-V2R100* および *t-V2R253* 発現細胞において共発現しており、*TRPC2* についてもほとんどの *f-V1R*、*f-V2R100*、*t-V1R*、*t-V2R253* 発現細胞において共発現していた。以上の結果から、ポリプテルスの嗅覚系では、*TRPC2-t-V1R-Gi2*、*TRPC2-t-V2R-Go* といった遺伝子セットが機能する陸棲四足類の鋤鼻感覚システムや、*TRPC2-f-V1R*-未同定 G タンパク 遺伝子、*TRPC2-f-V2R-Go* といった遺伝子セットが機能する水棲真骨魚類の感覚システムに加え、*TRPC2-f-V1R-Gi2* という遺伝子セットが機能する陸棲四足類にも水棲真骨魚類にも存在しない感覚システムが存在していることが示唆された。

ハイギョおよびスポッテッドガー嗅覚器における *ancV1R* の発現パターン

新規に発見された鋤鼻神経細胞のマーカー遺伝子である *ancV1R* (Suzuki et al. 2018; Zhang and Nikaido 2020) について、鋤鼻領域である陥凹部上皮 (RecE) をもつハイギョと、ポリプテルスと同じ下位条鰭類に属するスポッテッドガーの嗅覚器における発現パターンを調べた。

まずハイギョの嗅覚器で FISH を行ったところ、*ancV1R* は陥凹部上皮だけでなく、ハイギョ嗅覚器の大部分を占める、ヒダ構造を覆うラメラ嗅上皮 (lamellar olfactory epithelium, LOE) の深層にも発現していた (図 17)。これらの結果は、*ancV1R* 以外にも鋤鼻器官ランドマーク遺伝子が発現し、主嗅上皮関連遺伝子が発現しない陥凹部上皮が原始的な鋤鼻器官であるという仮説を支持するものである

(González et al. 2010; Nakamuta et al. 2012; 2013)。また、ハイギョのラメラ嗅上皮の深層における *ancVIR* の発現パターンは、ポリプテルスの MOO や AOO で観察されたものと類似しており、陥凹部上皮以外におけるハイギョ嗅覚器の神経細胞の分布はポリプテルス嗅覚器と同様であることが予想される。

次に、下位条鰭類ではあるが進化の過程でポリプテルスよりも後に分岐したため、系統的にポリプテルスより真骨魚類に近いスポッテッドガーの嗅覚器における *ancVIR* の発現パターンを調べた。その結果、スポッテッドガーの嗅覚器においては *ancVIR* がヒダ構造の凹部に発現している様子が観察された (図 1 8 A, A')。このことから、スポッテッドガーの嗅覚器のヒダ構造の凸部と凹部で主嗅上皮および鋤鼻器官のランドマーク遺伝子を発現する神経細胞の分布が偏っている、つまり凹部が鋤鼻領域となっている可能性があった。そこで、スポッテッドガーの嗅覚器における神経細胞の分布を特徴づけるために、感覚上皮全体で発現すると考えられる *OMP* 遺伝子の発現パターンを調べた (Sato, Miyasaka, and Yoshihara 2005)。その結果、*OMP* は *ancVIR* で観察されたのと同様に凹部に発現し、凸部に発現しないことが分かった (図 1 8 B, B')。以上の結果から、スポッテッドガーの嗅覚器は鋤鼻様神経細胞が特定の領域に集中しておらず、ポリプテルスの嗅覚器と同様に匂い受容機能とフェロモン受容機能の面では解剖学的に分化していないことが予想される。このことは、下位条鰭類において鋤鼻領域が普遍的に存在しないことを示唆している。

第四章：考察

ポリプテルスの MOO と AOO

いくつかの嗅覚器ランドマーク遺伝子の発現量比較、DEG 解析、そして FISH 解析により、解剖学的には分割されているポリプテルスの MOO と AOO はフェロモンや匂い物質の検出という点で機能的には分化していないことが示唆された。しかし DEG 解析の結果、AOO の DEG には運動性繊毛に関連する遺伝子が多く含まれていることが判明し、化学受容に加えて鼻腔内に水を取り入れる機能をもつ可能性が示唆された。ポリプテルスの嗅覚器は長い前鼻孔管を介して外部環境とつながっており、ヒダ構造を有するいくつかの房で構成されているが、これは真骨魚類の嗅覚器構造とは根本的に異なり、シーラカンスのそれに似ている (Pfeiffer 1968)。ポリプテルス嗅覚器はこのような特徴的な形態を持っているため、物質検知に十分な量の水を嗅覚器に送るためには強力な換水システムが必要であると予想される。実際、ゼブラフィッシュの鼻孔では運動性繊毛が観察されており、この運動性繊毛が水流を生み出すことで嗅上皮における化学刺激の感度を高めていることが示唆されている (Reiten et al. 2017)。水中において繁殖と摂食のために化学物質のシグナルに大きく依存しているポリプテルスは (Pfeiffer 1968)、AOO に存在する運動性繊毛による強力な換水システムを利用していると考えられるが、AOO の機能を完全に理解するためには、電子顕微鏡や組織学的手法を用いた観察により実際に AOO に運動性繊毛が存在しているか否かの検証をすることはもちろんのこと、流体力学と行動分析に基づいたより詳細な調査も不可欠である。なお、ポリプテルスの嗅覚原基が AOO と MOO へと分化する発生過程はまだ十分に解明されておらず、この発生システムが陸棲四足類の鋤鼻器官やハイギョの陥凹部上皮の発生システムと共通しているかどうかについては未だ議論の余地がある。

鋤鼻器官の起源と鋤鼻神経系の進化

今回の研究では、トランスクリプトーム解析および FISH 解析により、ポリプテルスの嗅覚器には鋤鼻神経細胞が集中する鋤鼻領域が存在しないことが明らかになった。この結果は、ポリプテルスの嗅覚器が鋤鼻器官の有無という観点からは、ハイギョや陸棲四足類などの肉鰭類の嗅覚器よりもむしろ真骨魚類の嗅覚器に近いことを示しており、硬骨類の系統樹におけるポリプテルスの祖先的な位置を反映している（図 19）。その一方で、今回我々が行った詳細な FISH 解析は、ポリプテルス嗅覚器に存在する神経細胞の一部が、陸棲四足類の鋤鼻神経系で共発現する遺伝子セットに対して同様の共発現性を示すことも明らかにした。この結果は、鋤鼻神経細胞が円口類から四足類への進化の過程で段階的に進化し、鋤鼻器官の出現に至ったことを理解する上で重要な知見も同時に与えるものであった。

現生の円口類であるヤツメウナギに陸棲四足類の鋤鼻神経系の遺伝的要素の一部（*f-V1R*、*TRPC2*）が存在することから、無顎類、つまり脊椎動物の共通祖先の段階でこれらの遺伝的要素がすでに存在していたと考えられている（Grus and Zhang 2009）。そしてその後、有顎類の共通祖先（*V2R*）と硬骨類の共通祖先（*ancV1R*、*t-V1R*、*t-V2R*）で追加の遺伝的要素が獲得されたことで、現生の陸棲四足類で観察されるような、より成熟した鋤鼻神経系が確立されたと予想される（Nikaido 2019; Zhang et al. 2021 in press; 図 19）。本研究ではポリプテルスの嗅覚器において、*ancV1R-TRPC2-t-V1R-Gi2* 共発現神経細胞と *ancV1R-TRPC2-t-V2R-Go* 共発現神経細胞が共に MOO と AOO のヒダ構造の上皮の深層に分布していることを示したが、この共発現パターンはハイギョのラメラ嗅上皮の深層に存在する神経細胞のものと共通であると予想される（図 12, 17）。一方、真骨魚類においては鋤鼻神経系の遺伝的要素である *ancV1R*、*t-V1R*、*t-V2R* はすでに失われ、そのゲノム中に存在していない。これまでに述べてきた遺伝的要素の種ごとのレパートリーを考慮

すると、ポリプテルスの鋤鼻神経細胞は、ヤツメウナギ、サメ、真骨魚類の嗅上皮の微絨毛性神経細胞（*V1R*または *V2R* 発現細胞）よりも、ハイギョのラメラ嗅上皮の微絨毛性神経細胞(Nakamuta et al. 2012)や四足類の鋤鼻器官の微絨毛性鋤鼻神経細胞に近い。

ここでさらに注目すべきは、ポリプテルス嗅覚器において *t-V1R* および *f-V1R* 発現細胞が、いずれも *Gi2* との共発現性を示したことである（表 3）。*t-V1R* 発現神経細胞のほぼ全てが *Gi2* との共発現性を示したのに対し、半数以下の *f-V1R* 発現神経細胞でしか *Gi2* との共発現性を示さなかったことから、ポリプテルス嗅覚器の *t-V1R* 発現神経細胞は陸棲四足類で観察される鋤鼻神経細胞と同等のものと考えられるが、*f-V1R* 発現神経細胞についてはそれより複雑な状況になっていると考えられる。より具体的に述べると、水棲真骨魚類のように *f-V1R* が未同定の G タンパク質と共役していると予想される細胞と、*f-V1R* と *Gi2* が共役する陸棲四足類も水棲真骨魚類も持たないような細胞が 2 種類混在している。*Gi2* と共役する *f-V1R* 発現細胞は *t-V1R* 発現細胞で用いられている分子機構を、そして共役しない *f-V1R* 発現細胞は真骨魚類の嗅上皮上の神経細胞で用いられている分子機構を介して機能していると予想されるが、真骨魚類においても *f-V1R* のリガンドや機能について現時点では明確になっていない。これら 2 種類の細胞の機能差や真骨魚類において *f-V1R* が *Gi2* と共役しなくなった理由を明らかにする上で、真骨魚類嗅上皮における *f-V1R* と共役する G タンパク質の同定に加えて、そのリガンドの特定と *f-V1R* の機能解析を行うことが重要である。

肉鰭類のハイギョでは、*ancV1R-TRPC2-V2R-Go* を共発現する鋤鼻神経細胞が集中して陥凹部上皮を形成しており (González et al. 2010; Nakamuta et al. 2012; 2013; 本研究)、これが鋤鼻器官の起源であると考えられる。*ancV1R-TRPC2-V2R-Go* を共発現する鋤鼻神経細胞の局所集中は、陸地に適応した後も両生類の鋤鼻器

官でも維持された(Date-Ito et al. 2008; Suzuki et al. 2018; Kiemnec-Tyburczy et al. 2012; Hagino-Yamagishi 2008)。しかし両生類は哺乳類とは異なり、鋤鼻器官において *V1R* 発現細胞がほとんど確認されず、むしろ背側と腹側の2領域に分かれる嗅上皮において多く確認される(Date-Ito et al. 2008)。このことから、鋤鼻器官、ないしは嗅覚器の分化・発生メカニズムは、肉鰭類の祖先で完全に成熟していたわけではなく、両生類、そして哺乳類へと進化していく過程で段階的に発達していったのではないかと考えられる。

また、鋤鼻神経細胞における鋤鼻器官ランドマーク遺伝子の発現パターンに加えて、ヒダ構造の感覚上皮における *Go* あるいは *Golf* 発現神経細胞の層の配置という点でもポリプテルスは真骨魚類よりもハイギョや四足類に類似している。なぜなら、真骨魚類においては *V2R-Go* 発現神経細胞は嗅上皮の表層に、*OR-Golf* 発現神経細胞は深層にそれぞれ観察される(Sato, Miyasaka, and Yoshihara 2005; Oka and Korsching 2011; Hansen et al. 2003; Hansen, Anderson, and Finger 2004)一方で、両生類では *V2R-Go* 発現神経細胞と *OR-Golf* 発現神経細胞は、それぞれ腹側嗅上皮の深層と表層に観察されるためである。哺乳類（マウス）では、*OR-Golf* 発現神経細胞が嗅上皮の全層に、*V2R-Go* 発現神経細胞と *V1R-Gi2* 発現神経細胞が鋤鼻器官の深層と表層にそれぞれ観察される。すなわち、両生類および哺乳類の嗅覚器における *V2R-Go* および *OR-Golf* の発現層の分布は真骨魚類のそれとは逆になっている(Date-Ito et al. 2008; Nakada et al. 2014; Berghard and Buck 1996)。そのため、*V2R-Go* と *OR-Golf* を発現する神経細胞層の逆転は、脊椎動物の陸上適応のタイミングで起こったと提唱されていた。しかし、今回の研究でポリプテルス嗅覚器の感覚上皮において *Go* 発現神経細胞と *Golf* 発現神経細胞がそれぞれ深層と表層に分布していることがわかり、この層の逆転が真骨魚類の共通祖先において起こったことが示唆された(図20)。

第五章：結論

今回の研究で行ったポリプテルス嗅覚器に対するトランスクリプトーム解析と FISH 解析により、大きく分けて以下の 2 点の重要な知見が得られた。1 点目としては、ポリプテルスの嗅覚器を構成する MOO と AOO は、匂い物質やフェロモンといった異なる化学物質の検出という点では機能分化していないが、AOO が鼻腔内に水を取り込むという付加的な機能を持っているという点で分化している可能性が示唆されたことである。2 点目としては、ポリプテルスの嗅覚器官には鋤鼻器官は見られなかったが、嗅覚系のランドマーク遺伝子の発現パターンを考慮すると、ポリプテルスの嗅覚器内に存在する *V1R/V2R* 発現細胞が、軟骨魚類や真骨魚類のものよりも肉鰭類や四足類のものに類似していたことである。この結果は、少なくとも硬骨類の共通祖先の段階で、高度に発達した陸棲四足類的な鋤鼻神経系がすでに存在していたことを示唆している。これまでの研究では、その対象がゼブラフィッシュなどの真骨魚類やマウスなどの四足類に限定されていたため、鋤鼻神経系の進化の過程について曖昧な説明しかされてこなかった。しかし、近年相次いで入手可能となった真骨魚類や下位条鰭類のゲノムを用いた研究により、魚類から哺乳類までの脊椎動物における鋤鼻神経系の詳細な進化史が明らかになることが期待される。

謝辞

まず、本研究を進めるにあたり、多大なるご支援とご指導をいただきました二階堂雅人准教授に深く御礼申し上げます。また、嗅覚器の解剖学的知見をご教授くださった中牟田信明先生と中牟田祥子先生、スポットテッドガーの嗅覚器の組織サンプルを提供してくださった神田真司先生、そして RNA-seq 解析の手法を 1 から丁寧にご教授くださった鈴木彦有様に心より感謝申し上げます。最後に、日常の研究生生活の中での様々なディスカッションや実験手法の指導を通じて本研究を最後まで支えてくださった二階堂研究室の皆様と長澤竜樹先生に厚く感謝申し上げます。

講演目録

1. [ポスター]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)
2. [ポスター]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起源の探索』 第9回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting(2019年7月20日, 東京慈恵会医科大学 東京都港区)
3. [ポスター]佐久間敦丈、二階堂雅人 『The finding the origin of vomeronasal organ in ancient fishes 古代魚における鋤鼻上皮の起源の探索』 日本進化学会第21回大会 (2019年8月7-10日, 北海道大学)
4. [ポスター]佐久間敦丈、二階堂雅人『古代魚嗅覚器を用いた鋤鼻上皮の起源の探索』 日本動物学会第91回大会 (2020年9月4-5日, オンライン大会)
5. [ポスター]佐久間敦丈、二階堂雅人『The finding the origin of vomeronasal organ in ancient fishes: 古代魚における鋤鼻上皮の起源の探索』 日本進化学会第22回大会 (2020年9月6-9日, オンライン大会)
6. [口頭]佐久間敦丈、二階堂雅人『古代魚嗅覚器を用いた鋤鼻器官の起源の探索』 第7回 ケモビ研究会(2021年3月11日-12日, オンライン大会)
7. [口頭] 佐久間敦丈, Zicong Zhang, 鈴木英里, 二階堂雅人.『トランスクリプトーム解析から紐解く古代魚ポリプテルスの嗅覚器の機能』 日本遺伝学会第93回大会 (2021年9月8-10日, オンライン)

報文目録

1. Sakuma, A., Zhang, Z., Suzuki, E., Nagasawa, T. and Nikaido, M. 2022. “A Transcriptomic Re-evaluation of the Accessory Olfactory Organ in Bichir (*Polypterus senegalus*).” *Zoological Letters* 8, 5 <https://doi.org/10.1186/s40851-022-00189-z>

付録

本文中の略式表記の英語表記と日本語表記について以下にまとめる。

略式表記	英語表記	日本語表記
AOB	accessory olfactory bulb	副嗅球（四足類）
AOO	accessory olfactory organ	副嗅覚器（ポリプテルス）
DEG	differentially expressed genes	有意に発現差のある遺伝子
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization	蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション
<i>f</i> -V1R	fish-type V1R	魚類型 type-1 フェロモン受容体
<i>f</i> -V2R	fish-type V2R	魚類型 type-2 フェロモン受容体
GO	gene ontology	所定の遺伝子群が示す生物学的意義
LOE	lamellar olfactory epithelium	ラメラ嗅上皮（ハイギョ）
MOE	main olfactory epithelium	主嗅上皮（四足類）
MOO	main olfactory organ	主嗅覚器（ポリプテルス）
OB	olfactory bulb	嗅球（四足類、真骨魚類、ポリプテルス、ハイギョ）
OE	olfactory epithelium	嗅上皮（真骨魚類）
RecE	recess epithelium	陥凹部上皮（ハイギョ）
<i>t</i> -V1R	tetrapod-type V1R	四足類型 type-1 フェロモン受容体
<i>t</i> -V2R	tetrapod-type V2R	四足類型 type-2 フェロモン受容体
VNO	vomer nasal organ	鋤鼻器官（四足類）

図表

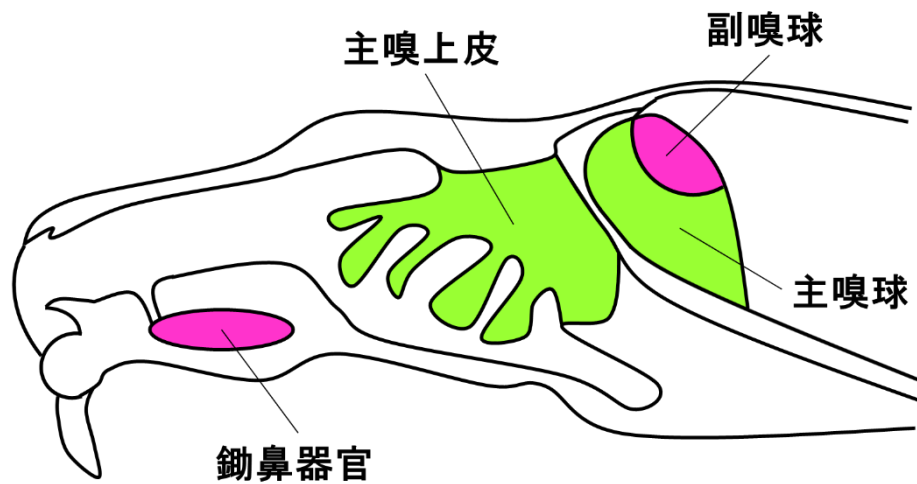


図 1．四足類（マウス）の頭部の矢状断面。嗅覚器は主に主嗅上皮と鋤鼻器官に分かれる。

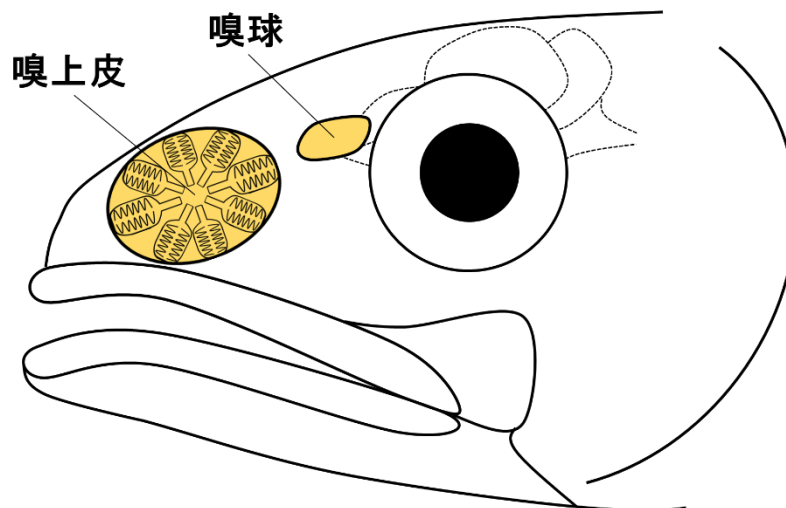


図 2．真骨魚類の頭部先端。嗅覚器は嗅上皮のみで構成される。

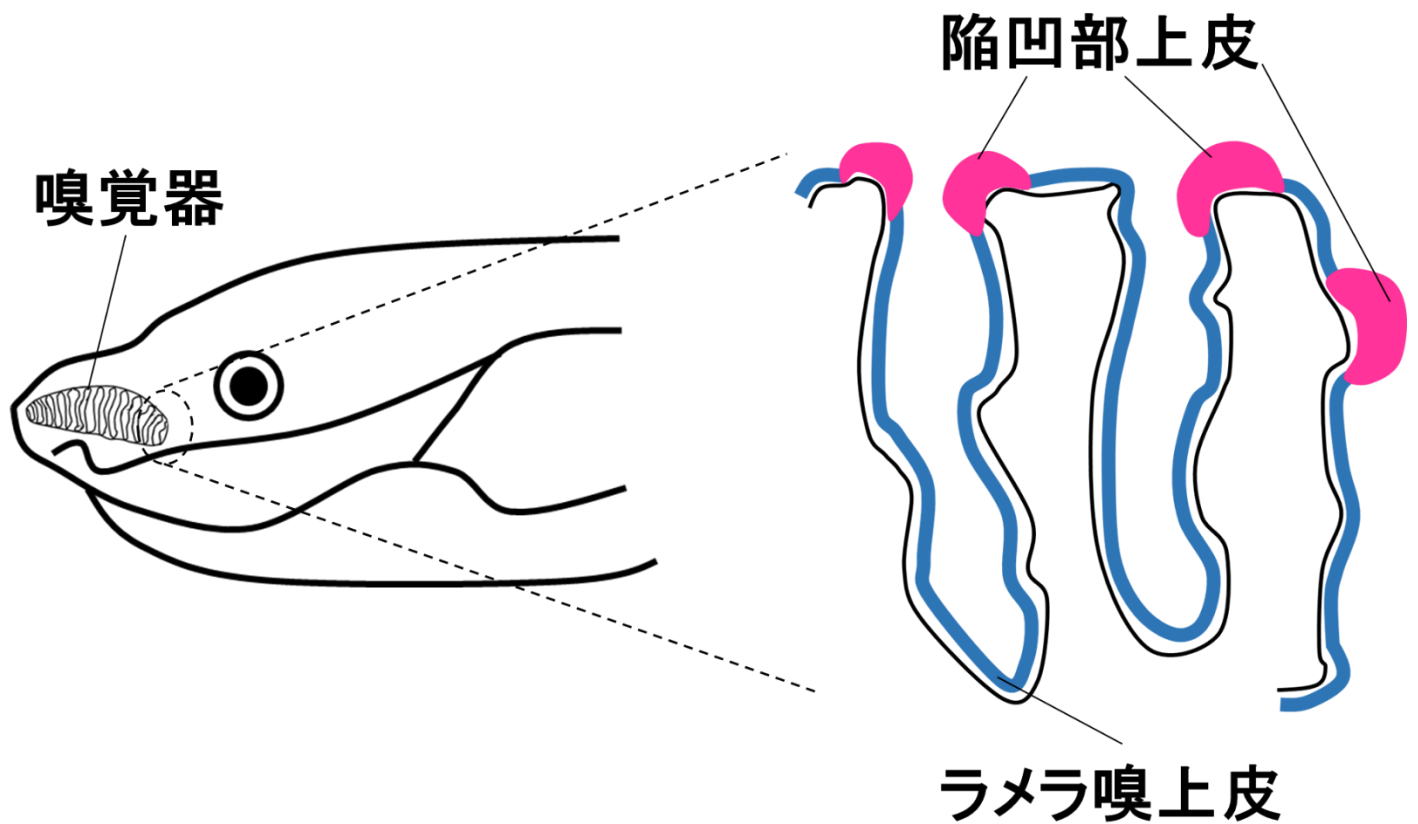


図 3. ハイギョの頭部先端と、その嗅覚器のヒダ構造の拡大図。ハイギョの嗅覚器を構成するヒダ構造はラメラ嗅上皮と呼ばれる感覚上皮で覆われているが、その他にヒダ構造の根元付近には陥凹部上皮と呼ばれる感覚上皮も存在する。この陥凹部上皮には鋤鼻器官に存在する神経細胞と類似の性質を持つ神経細胞が局在していることから、陥凹部上皮は原始的な鋤鼻器官であると考えられている。

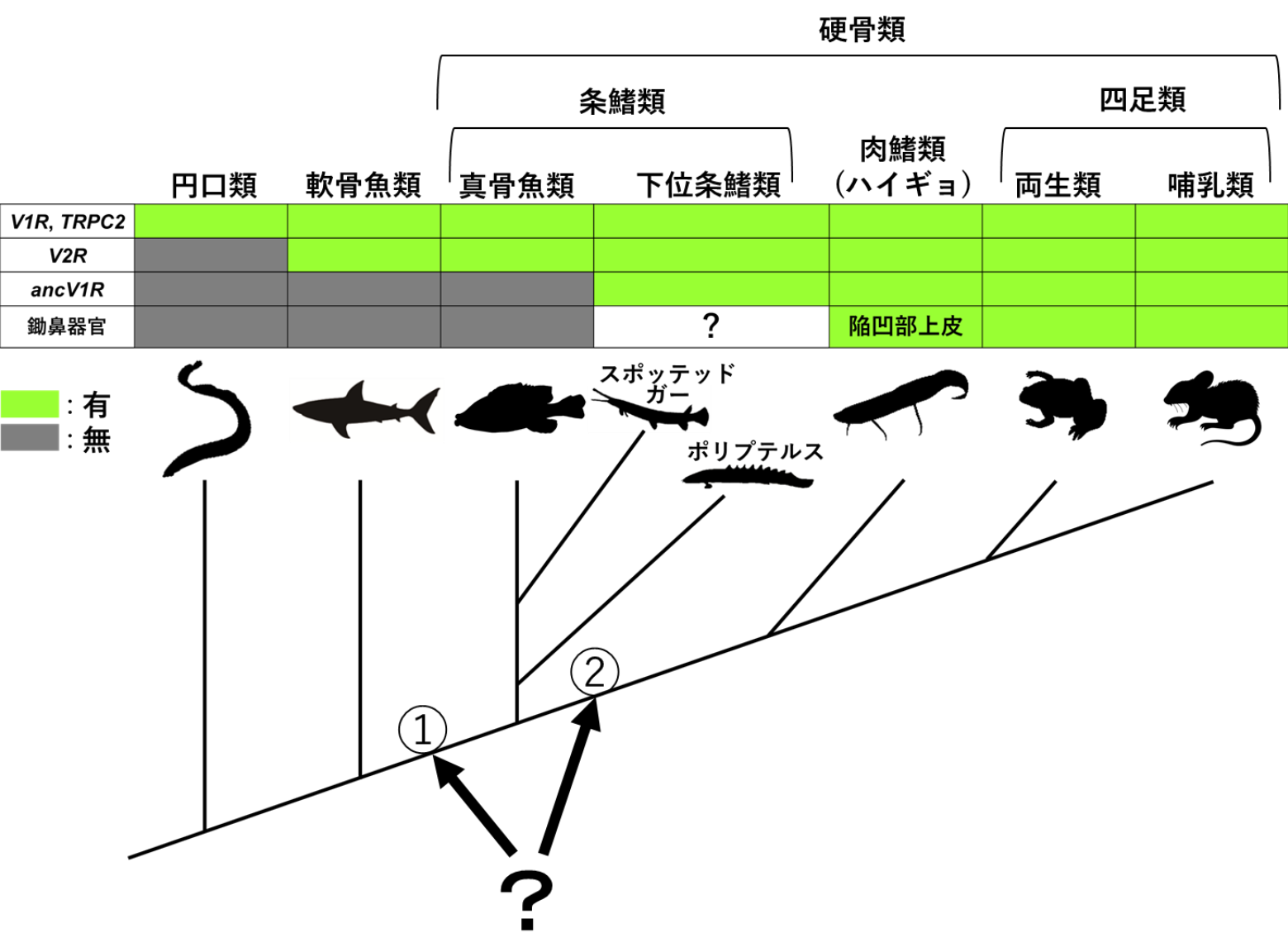


図 4. 脊椎動物の簡易的な系統樹。上図中の表は各脊椎動物における鋤鼻器官および一部の鋤鼻神経系関連遺伝子の有無を表す（緑色部：有、灰色部：無）。鋤鼻器官は肉鰭類（ハイギョ）～哺乳類までには存在し、円口類～真骨魚類には存在しない。鋤鼻器官の誕生が①条鰭類の祖先にあったのか、あるいは②肉鰭類の祖先にあったのかを明確にするためには下位条鰭類における鋤鼻器官の有無を明らかにする必要がある。

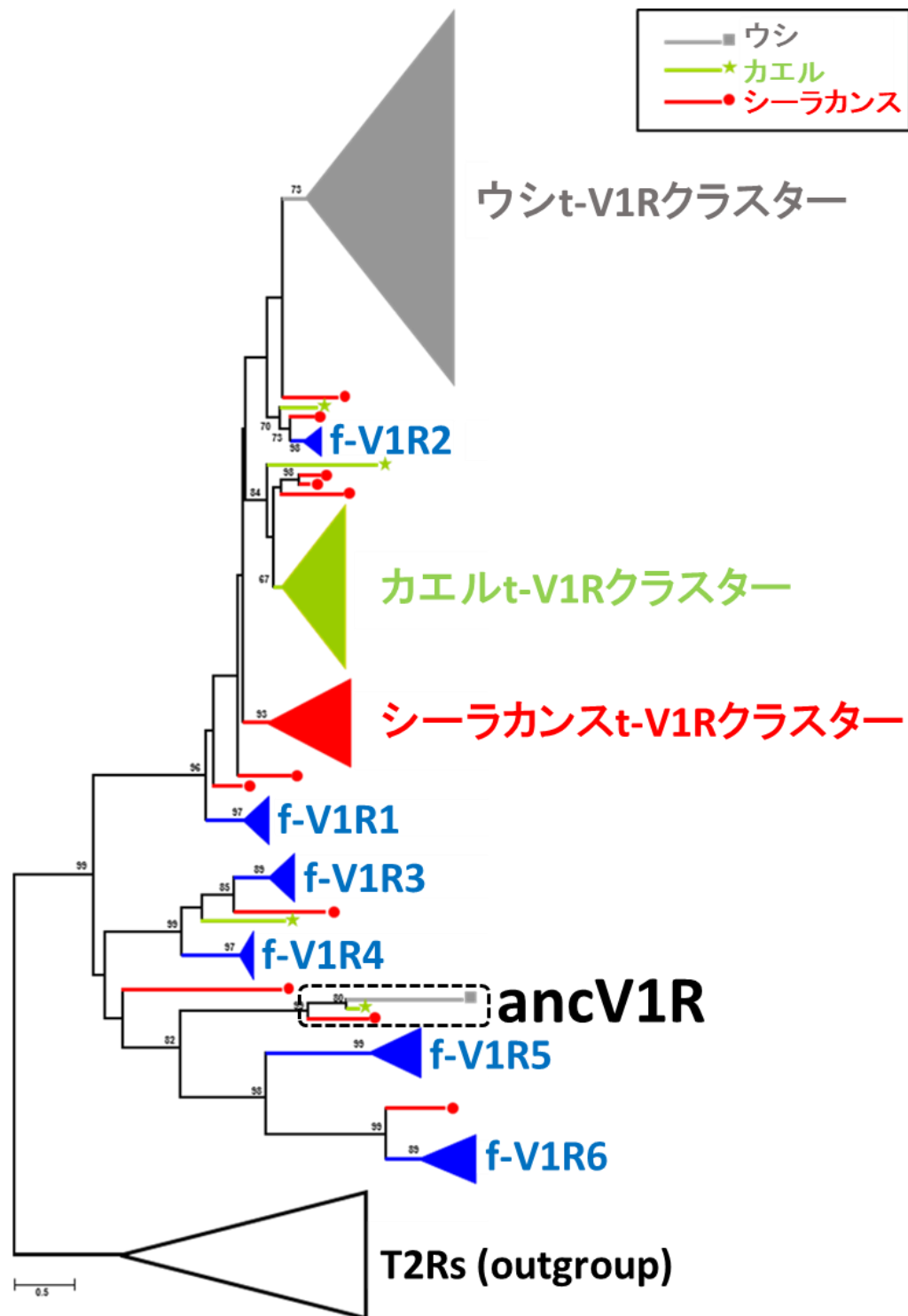


図 5. ウシ、カエル、シーラカンス、真骨魚類 5 種の V1R の系統樹 (Nikaido et al. 2013 改変)。ブートストラップ値は各枝の根本に部分的に示されている。スケールバーは各枝におけるアミノ酸置換数を表す。

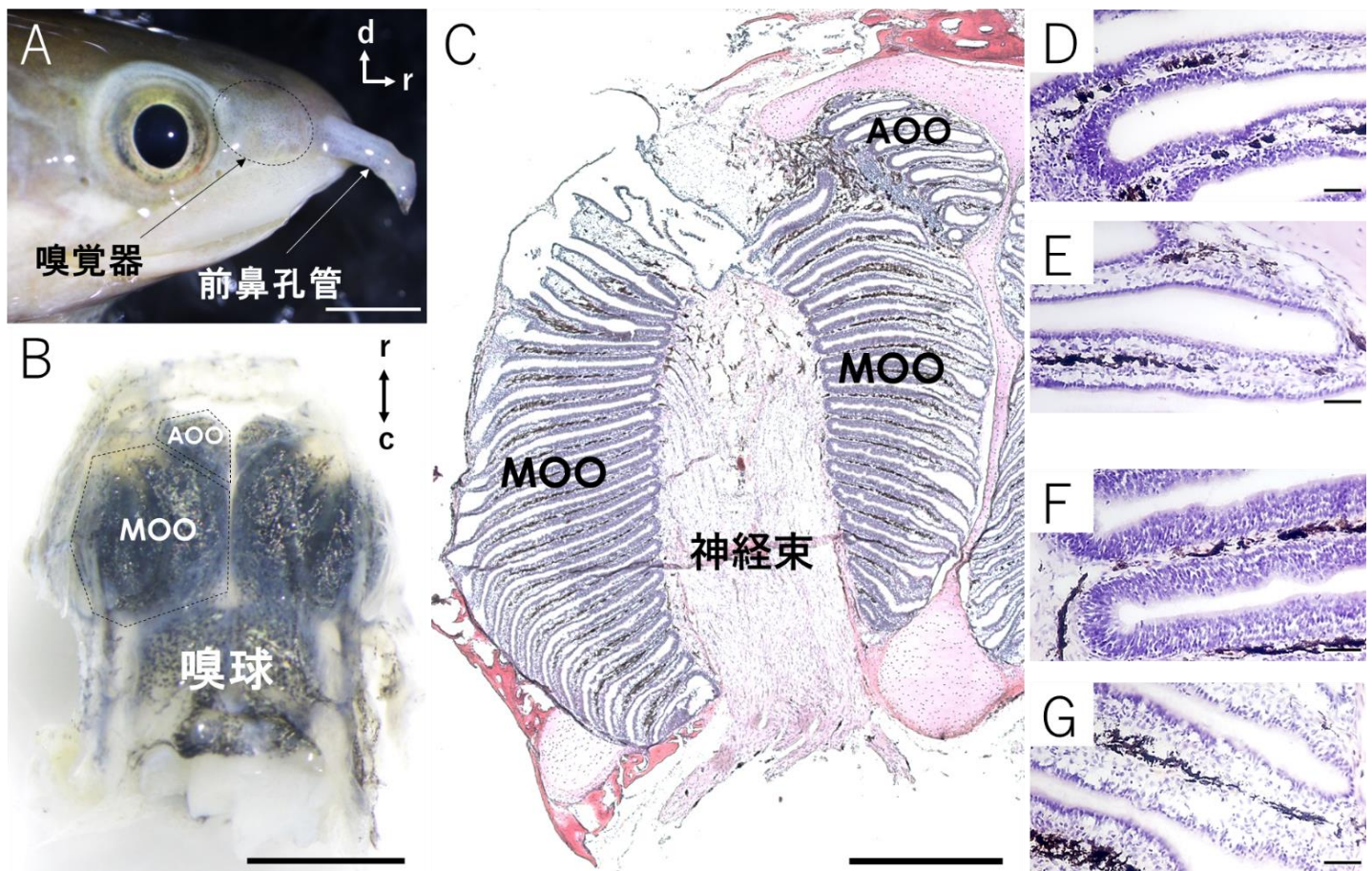


図 6. ポリプテルスの嗅覚器の構造。(A) ポリプテルスの頭部の先端を側面から見た図。嗅覚器は眼球と前鼻孔管の間に示した点線の円の部分にある。(B) 頭部から取り出した嗅覚器と脳の一部。左右の嗅覚器は、それぞれ MOO と AOO という 2 つの構造体からなる。MOO の尾側の後端は嗅球に接続している。(C) 嗅覚器の水平断面の切片を HE 染色した全体図。嗅覚器のヒダ構造を覆う上皮が青紫色に、神経束と軟骨が赤紫色に染色されている。(D-E) AOO のヒダ構造を覆う上皮の高倍率図。(F-G) MOO のヒダ構造を覆う上皮の高倍率図。厚い上皮 (D、F) と薄い上皮 (E、G) はそれぞれ感覚上皮と非感覚上皮となっている。スケールバーは、それぞれ 3mm (A、B)、1mm (C)、50 μ m (D-G) を示す。(A) および (B) における矢印の d は背側、r は口吻側、c は尾側方向を示す。

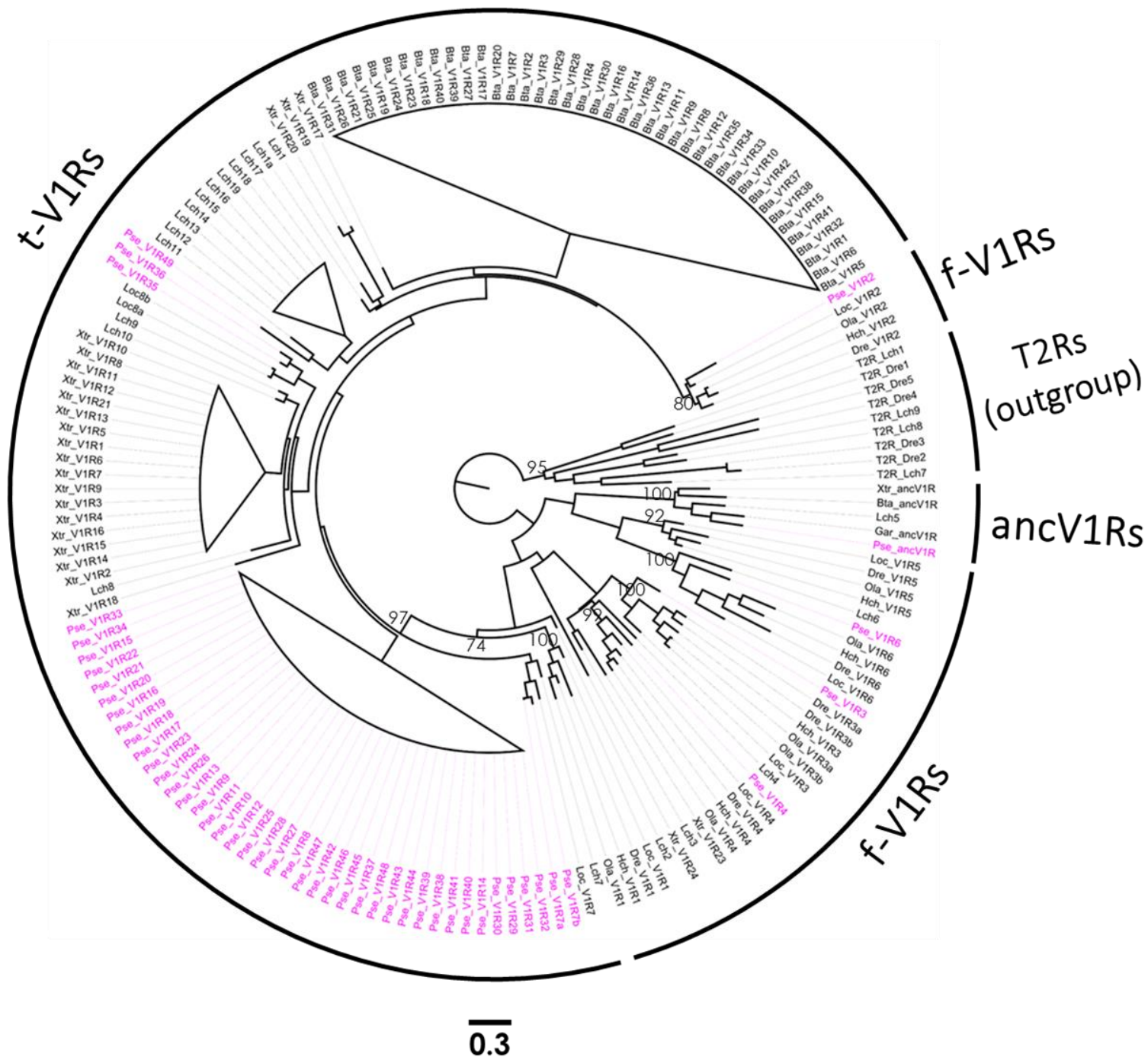


図 7. ポリプテルスを含む 8 種の脊椎動物の V1R の系統樹。図に示した脊椎動物 7 種の略式名は以下の通り。Pse (ポリプテルス)、Loc (スポッテッドガー)、Ola (メダカ)、Hch または Oni (シクリッド)、Dre (ゼブラフィッシュ)、Lch (シーラカンス)、Xtr (ネッタイツメガエル)、Bta (ウシ)。ポリプテルス V1R はマゼンダ色で示した。ブートストラップ値は各枝の根元に部分的に示されている。スケールバーは各枝におけるアミノ酸置換数を表す。

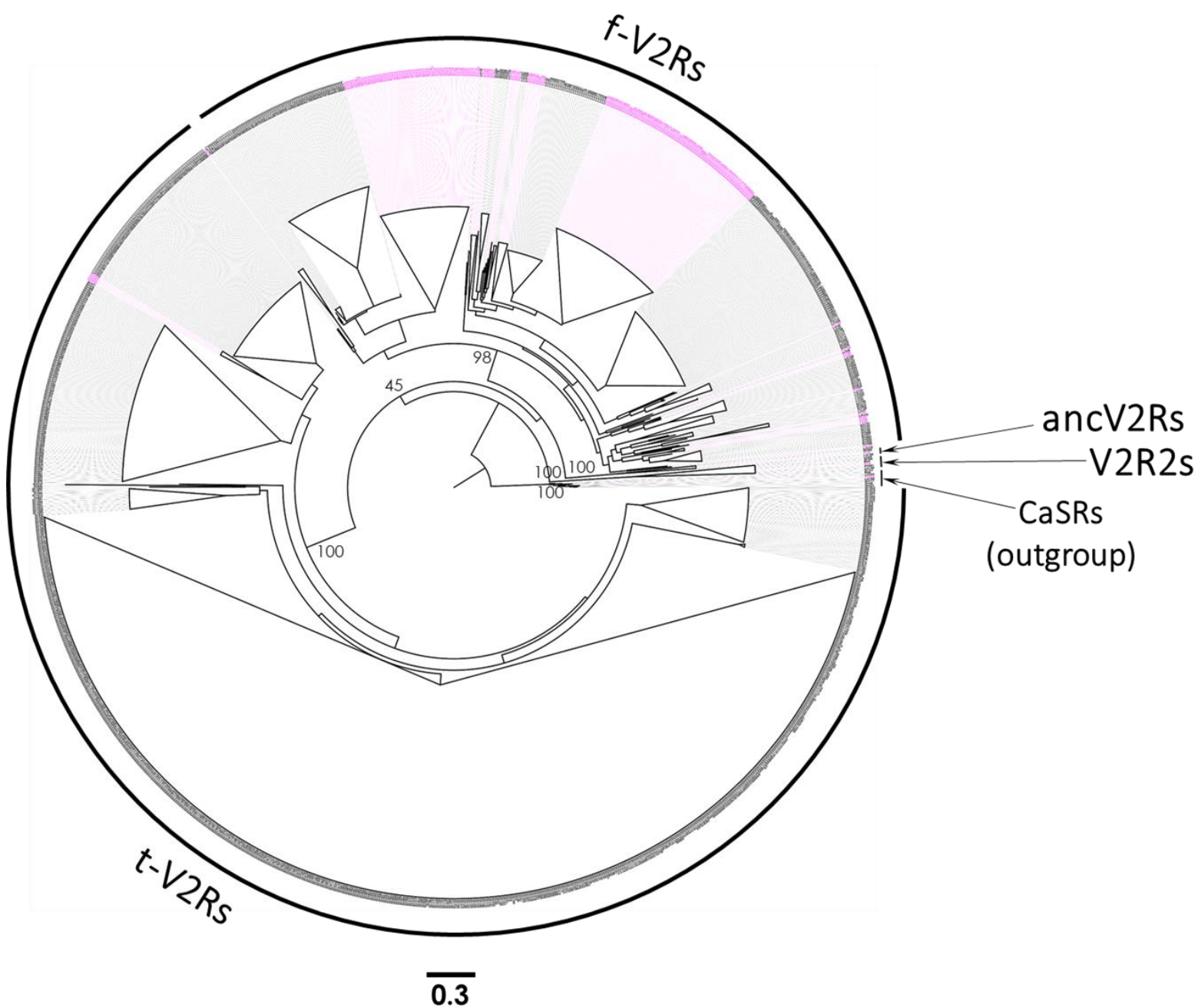


図 8. ポリプテルスを含む 8 種（図 6 と同様）の脊椎動物の V2R の系統樹。ポリプテルス V2R はマゼンダ色で示した。ブートストラップ値は各枝の根元に部分的に示されている。スケールバーは各枝におけるアミノ酸置換数を表す。

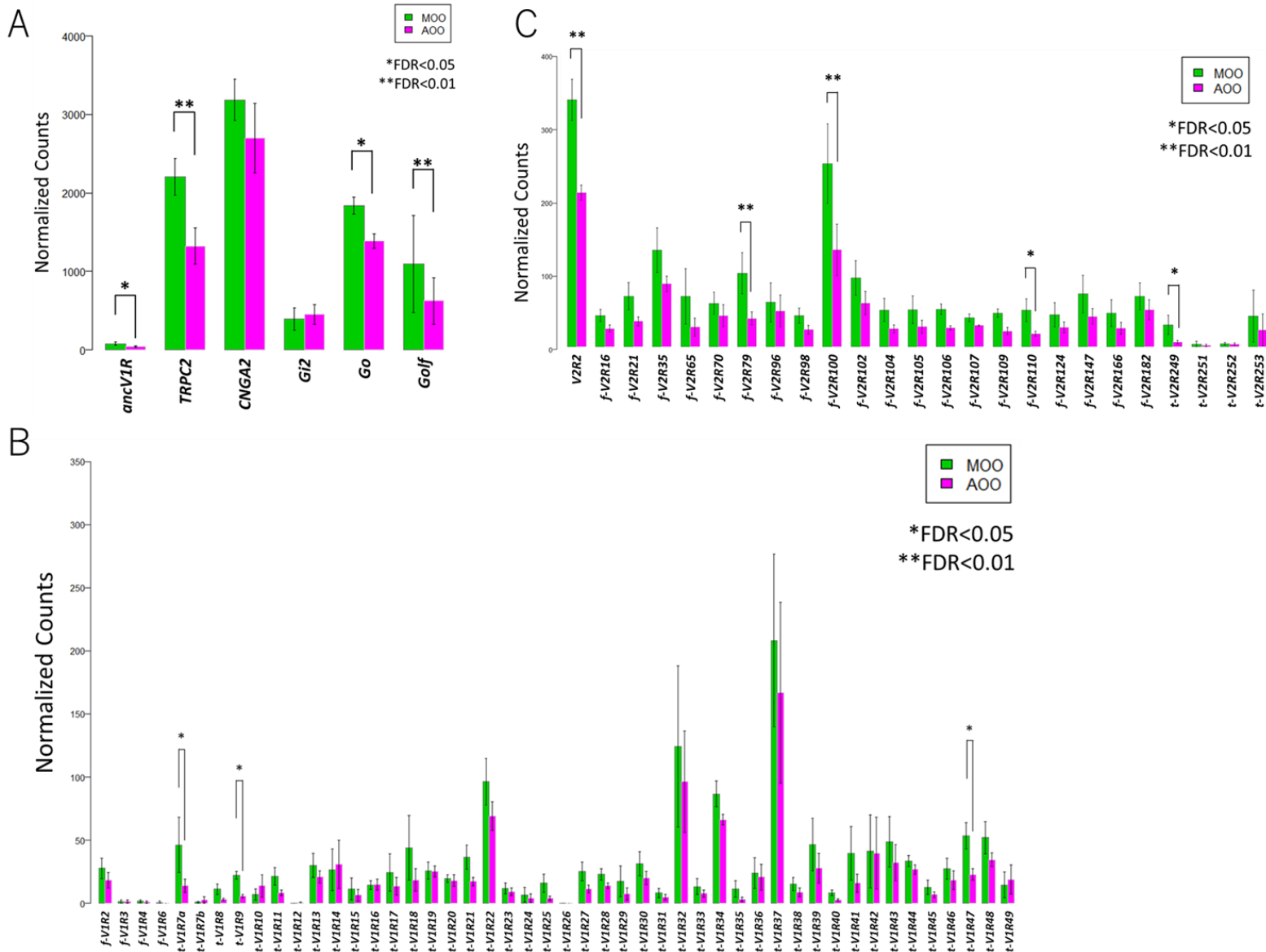


図 9. ポリプテルス MOO および AOO の RNA-seq 解析結果。それぞれ (A) 鋤鼻器官および主嗅上皮の一部のランドマーク遺伝子、(B) *V1R*、(C) *V2R* の発現レベルを示す。各グラフの縦軸は各遺伝子領域にマッピングされた正規化後の RNA リード数 (RPM)、横軸は各遺伝子名を表す。緑色のバーは MOO、マゼンダ色のバーは AOO における発現レベルを示す (*: FDR < 0.05, **: FDR < 0.01)。

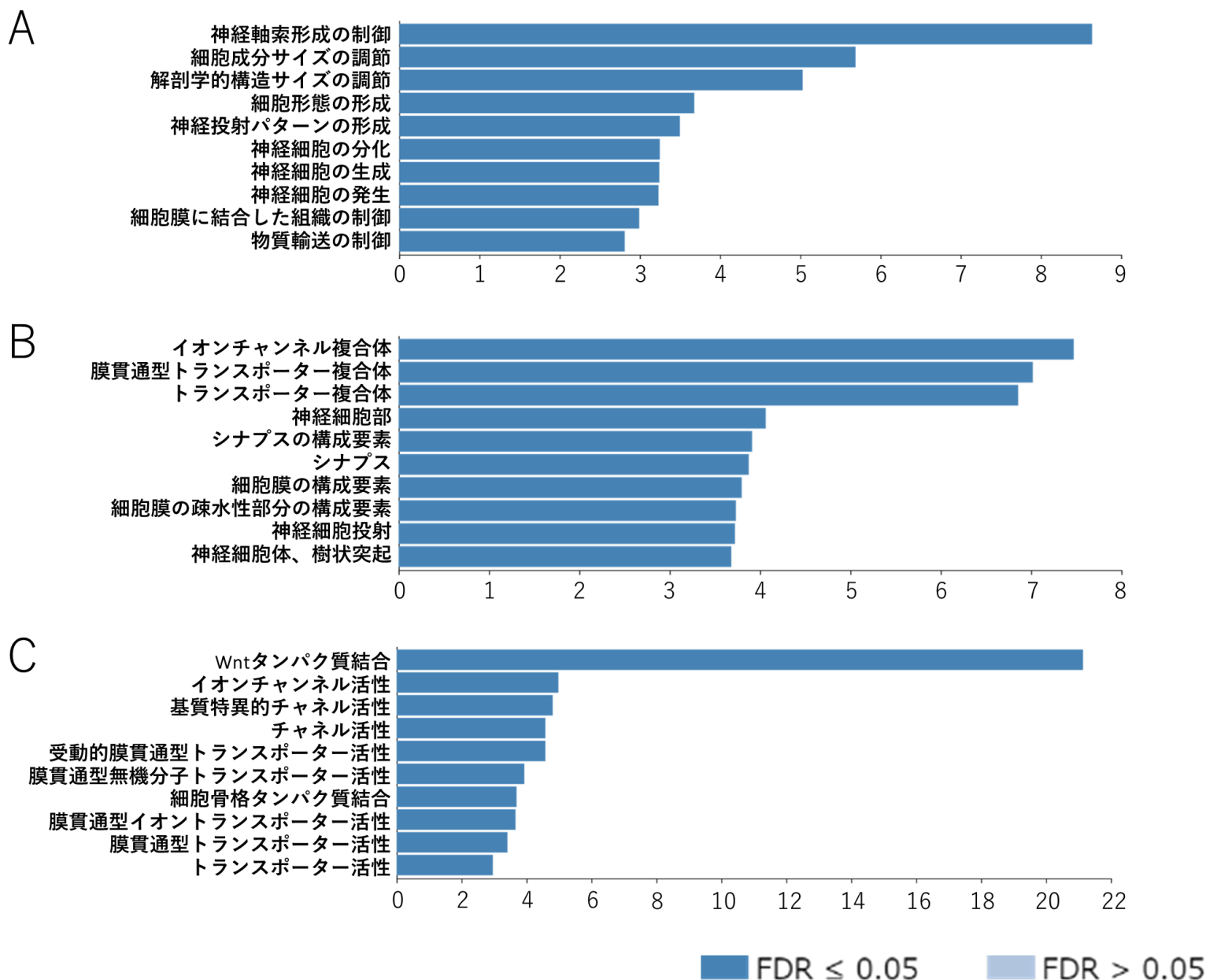


図 10. ポリプテルスの MOO で有意に多く発現していた DEG の Gene ontology (GO) 解析結果。それぞれ(A)生体内作用、(B)細胞構成要素、(C)分子機構に関する DEG の GO を示している。これらの結果は WebGestalt を用いて得られた。各グラフの縦軸は遺伝子カテゴリー、横軸はエンリッチメント率を表す（濃紺色のバーは $FDR \leq 0.05$ 、水色のバーは $FDR > 0.05$ を示す）。

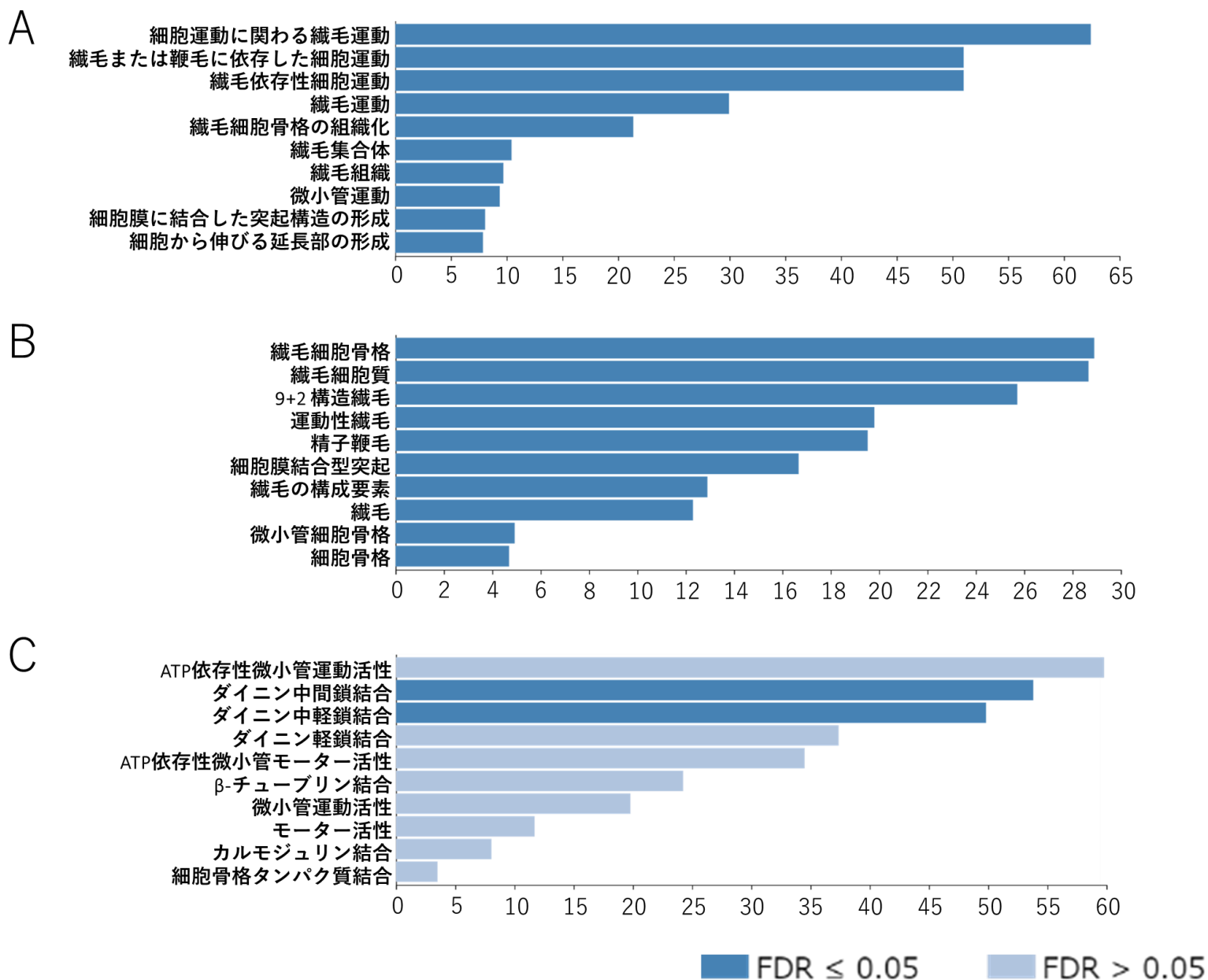


図 1 1. ポリプテルスの AOO で有意に多く発現していた DEG の Gene ontology (GO) 解析結果。それぞれ(A)生体内作用、(B)細胞構成要素、(C)分子機構に関する DEG の GO を示している。これらの結果は WebGestalt を用いて得られた。各グラフの縦軸は遺伝子カテゴリー、横軸はエンリッチメント率を表す（濃紺色のバーは $FDR \leq 0.05$ 、水色のバーは $FDR > 0.05$ を示す）。

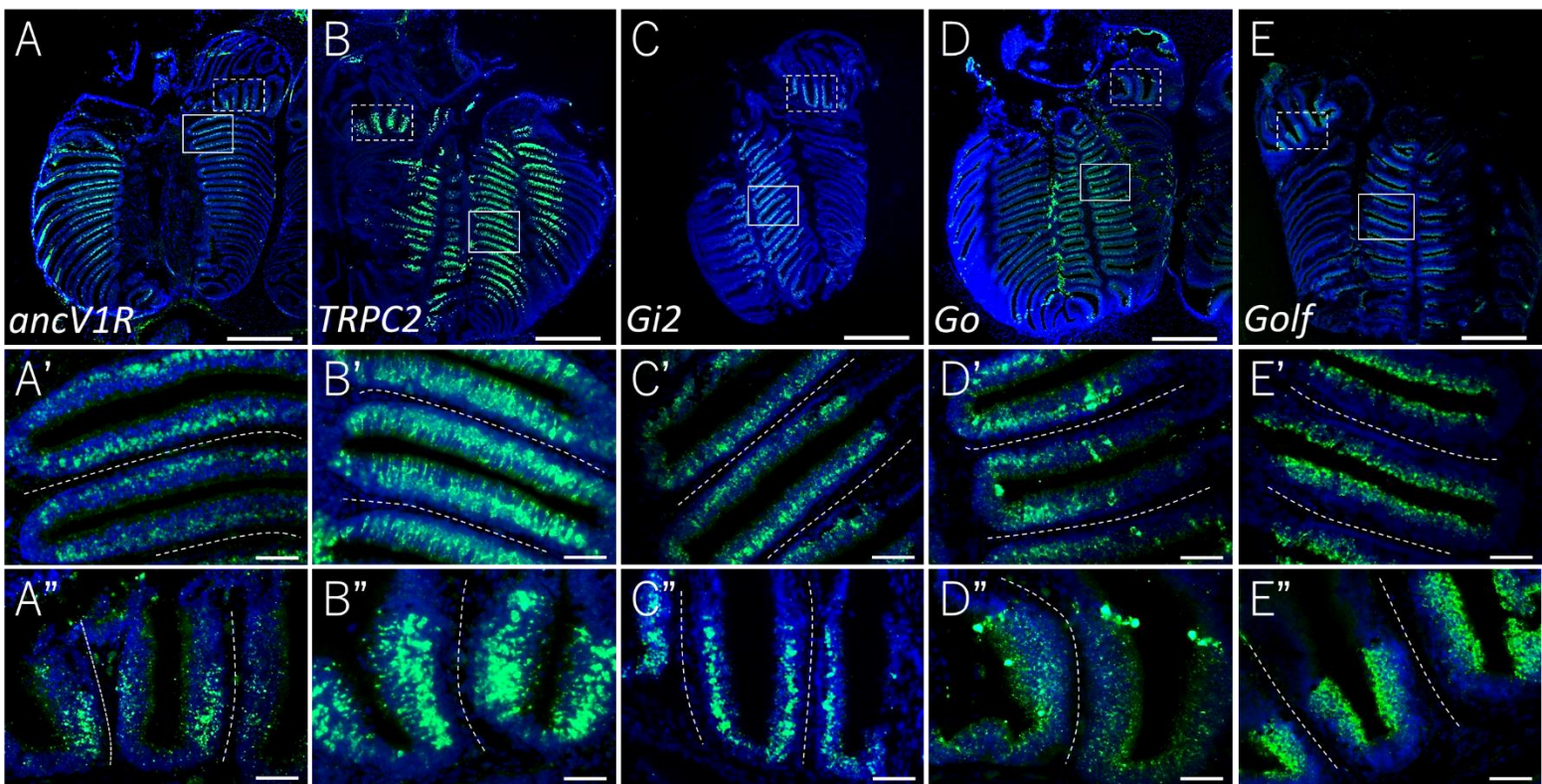


図 1 2. ポリプテルス嗅覚器の水平断面における遺伝子発現パターンの 1 色 FISH 解析結果。(A-E) 4 つの鋤鼻器官ランドマーク遺伝子 (*ancV1R*、*TRPC2*、*Gi2*、*Go*) と主嗅上皮ランドマーク遺伝子 (*Golf*) の発現パターンの全体図。(A'-E') (A-E) の実線の四角で囲んだ部分の MOO の高倍率図。(A''-E'') (A-E) の点線の四角で囲んだ部分の AOO の高倍率図。緑色蛍光は各遺伝子に対応する RNA プロブ由来のシグナルを示す。青色蛍光は DAPI により染色された細胞核を示す。図の点線はヒダ構造の深層側を表す。スケールバーはそれぞれ $500\mu\text{m}$ (A-E)、 $50\mu\text{m}$ (A'-E'、A''-E'') を示す。*ancV1R*、*TRPC2*、*Gi2*、*Go* はヒダ構造を覆う感覚上皮の深層に、*Golf* は表層に嗅覚器全体を通して発現していることがわかる。

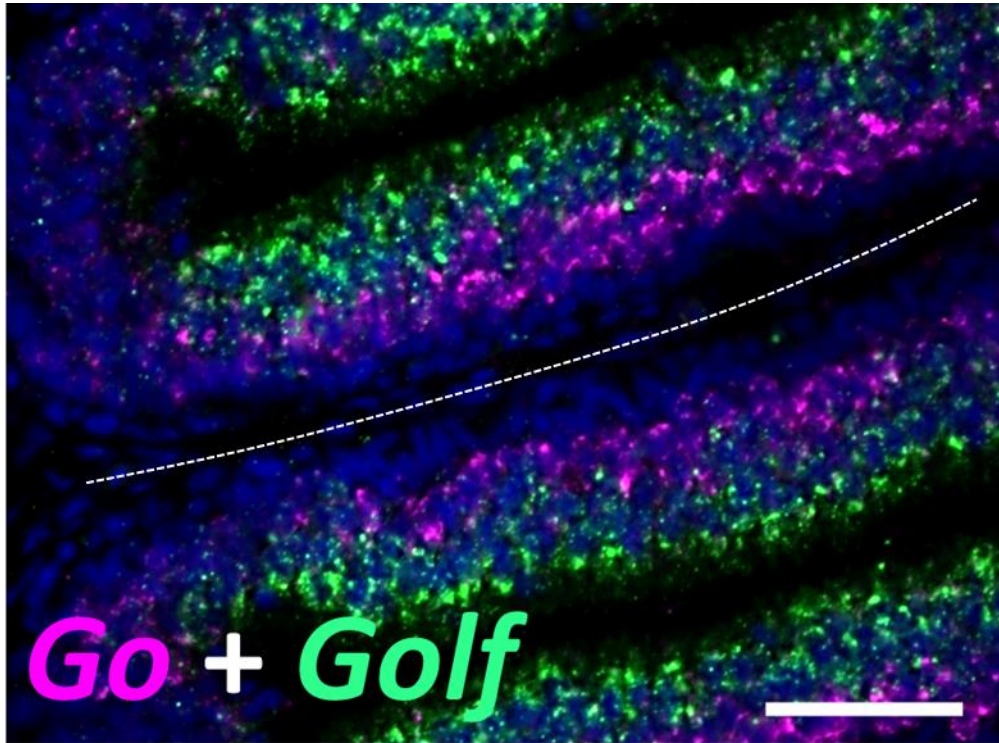


図 1 3. 2 色 FISH で確認した MOO の感覚上皮深層の *Go* と表層の *Golf* の発現パターンの違い。緑色蛍光は *Golf* 遺伝子、マゼンダ色蛍光は *Go* 遺伝子に対応する RNA プローブ由来のシグナルを示す。青色蛍光は DAPI により染色された細胞核を示す。図の点線はヒダ構造の深層側を表す。スケールバーは $50\mu\text{m}$ を示す。それぞれ対照的な発現パターンを示し、発現層が明確に分かれているのが確認できる。

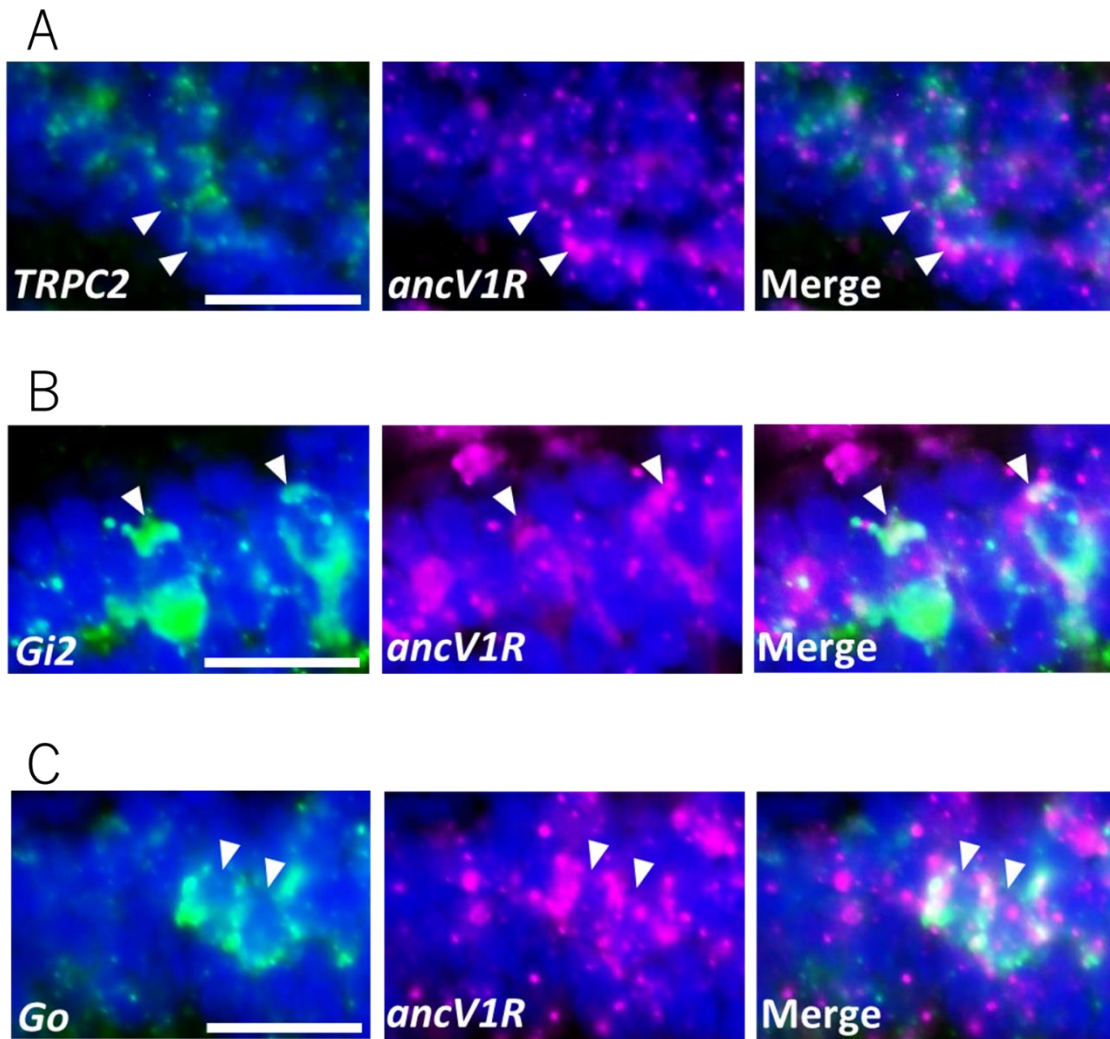


図 1 4 . *ancV1R* とその他の鋤鼻器官ランドマーク遺伝子 (*TRPC2*、*Gi2*、*Go*) との共発現パターン。図の矢頭はそれらの遺伝子が共発現している細胞を示す。緑色蛍光は *TRPC2*、*Gi2*、*Go* 遺伝子、マゼンダ色蛍光は *ancV1R* 遺伝子に対応する RNA プロブ由来のシグナルを示す。青色蛍光は DAPI により染色された細胞核を示す。スケールバーは 20 μ m を示す。

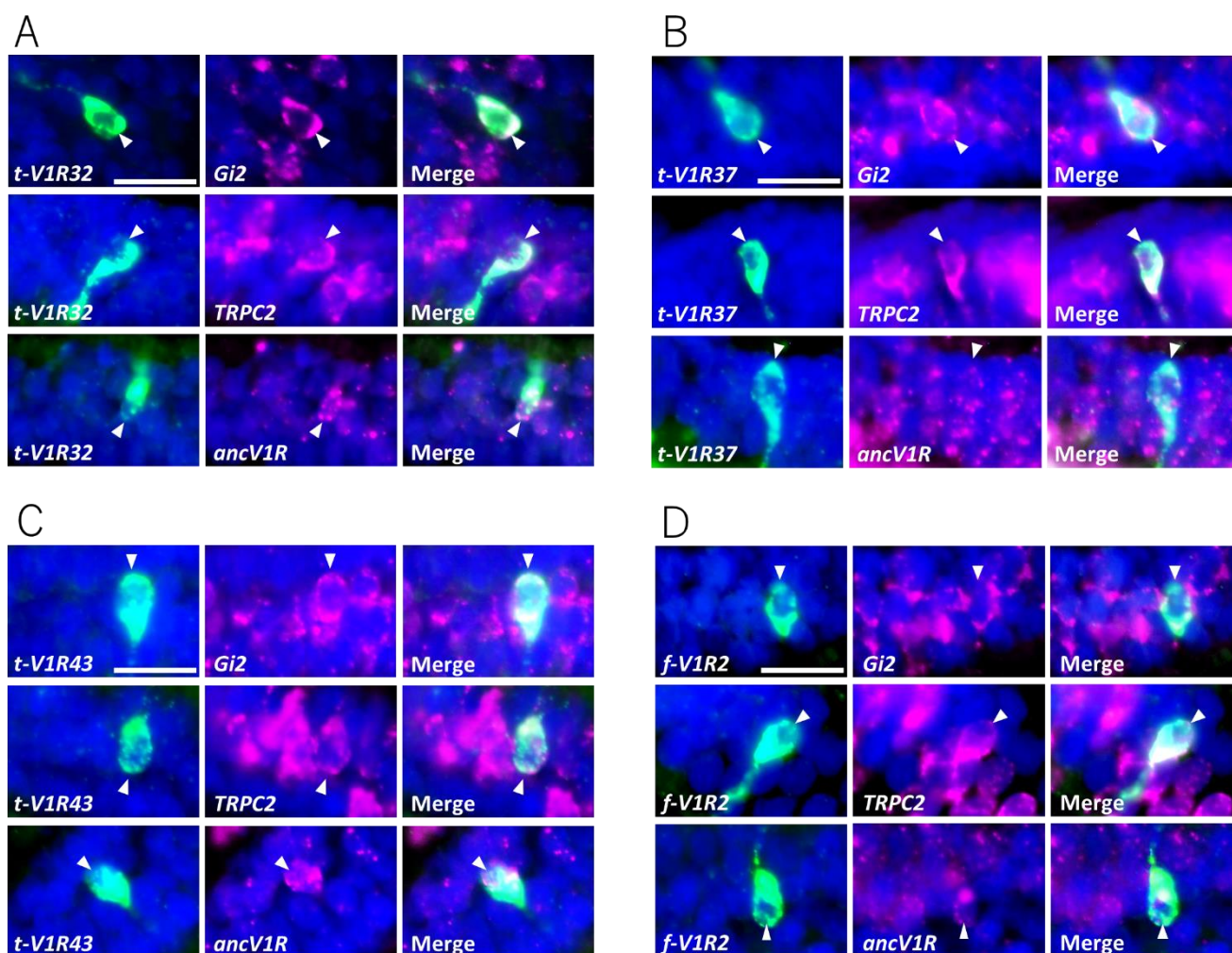


図 15. ポリプテルスの嗅覚神経細胞における (A) *t-V1R32*、(B) *t-V1R37*、(C) *t-V1R43*、(D) *f-V1R2* と鋤鼻器官ランドマーク遺伝子 (*ancV1R*、*TRPC2*、*Gi2*) との共発現パターン。図の矢頭はそれらの遺伝子が共発現している細胞を示す。緑色蛍光は各 *V1R* 遺伝子、マゼンダ色蛍光は *ancV1R*、*TRPC2*、*Gi2* 遺伝子に対応する RNA プローブ由来のシグナルを示す。青色蛍光は DAPI により染色された細胞核を示す。スケールバーは $20\mu\text{m}$ を示す。

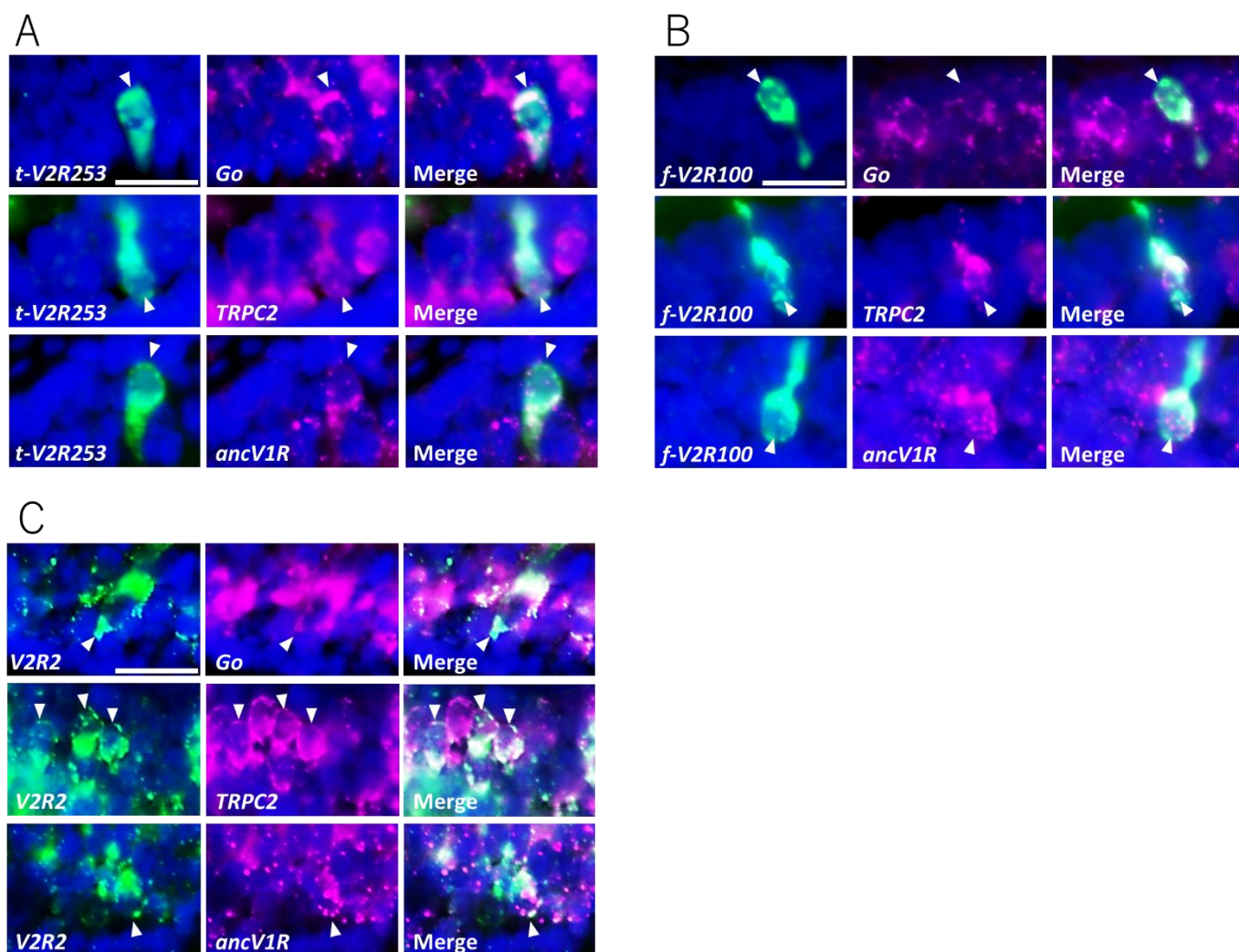


図 16. ポリプテルスの嗅覚神経細胞における (A) *t-V2R253*、(B) *f-V2R100*、(C) *V2R2* と鋤鼻器官ランドマーク遺伝子 (*ancV1R*、*TRPC2*、*Go*) との共発現パターン。図の矢頭はそれらの遺伝子が共発現している細胞を示す。緑色蛍光は各 *V2R* 遺伝子、マゼンダ色蛍光は *ancV1R*、*TRPC2*、*Go* 遺伝子に対応する RNA プローブ由来のシグナルを示す。青色蛍光は DAPI により染色された細胞核を示す。スケールバーは $20\mu\text{m}$ を示す。

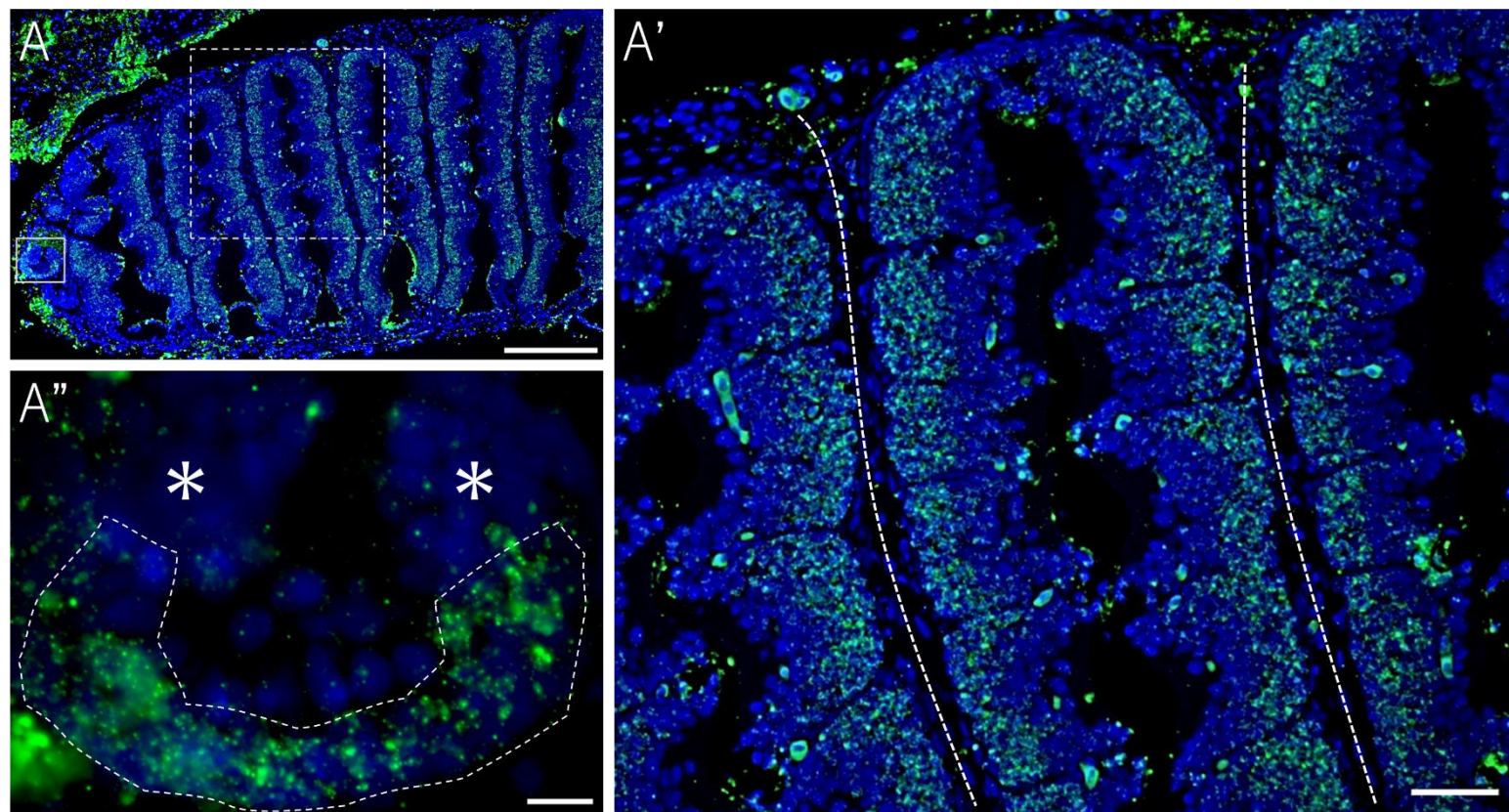


図 17. ハイギョ嗅覚器の矢状断面における *ancVIR* 遺伝子発現パターンの 1 色 FISH 解析結果。(A) *ancVIR* 遺伝子発現パターンの全体像。(A') (A)の点線の四角で囲んだラメラ嗅上皮部分の高倍率図。点線はヒダ構造の深層側を示す。(A'') (A)の実験の四角で囲んだ陥凹部上皮部分の拡大図。*は非感覚上皮の位置を示す。緑色蛍光は *ancVIR* 遺伝子に対応する RNA プロブ由来のシグナルを示す。青色蛍光は DAPI により染色された細胞核を示す。スケールバーはそれぞれ $500\mu\text{m}$ (A)、 $100\mu\text{m}$ (A')、 $20\mu\text{m}$ (A'') を示す。ラメラ嗅上皮の深層と陥凹部上皮の感覚上皮に *ancVIR* が発現していることがわかる。

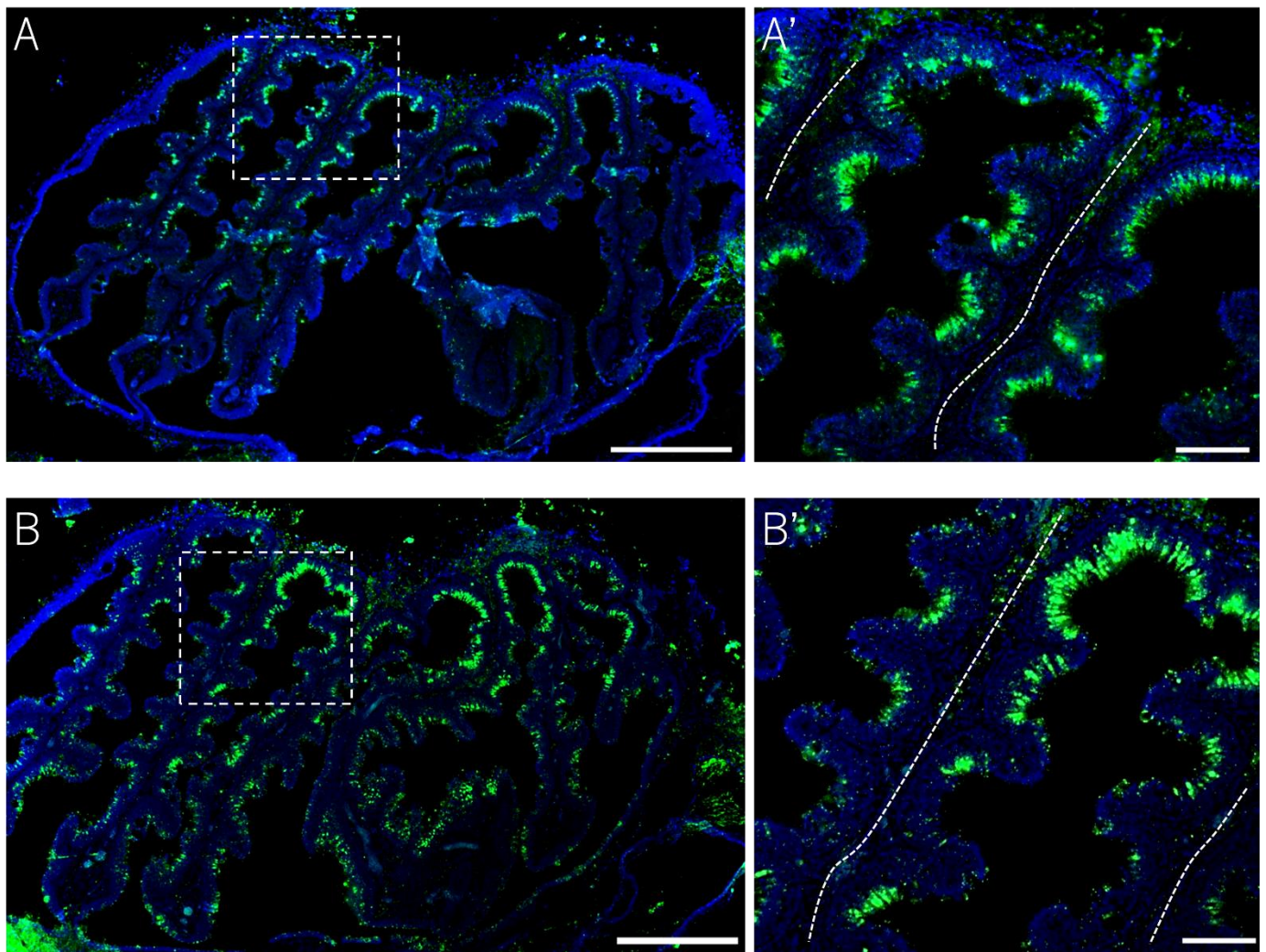


図 18. スポットテッドガー嗅覚器の水平断面における遺伝子発現パターンの 1 色 FISH 解析結果。(A) *ancV1R* および (B) *OMP* 遺伝子の発現パターンの全体像。(A'、B') (A) および (B) の点線の四角で囲んだ部分の高倍率図。点線はヒダ構造の深層側を示す。スケールバーはそれぞれ $500\mu\text{m}$ (A、B)、 $100\mu\text{m}$ (A'、B') を示す。どちらの遺伝子もヒダ構造の凹部に発現していることがわかる。

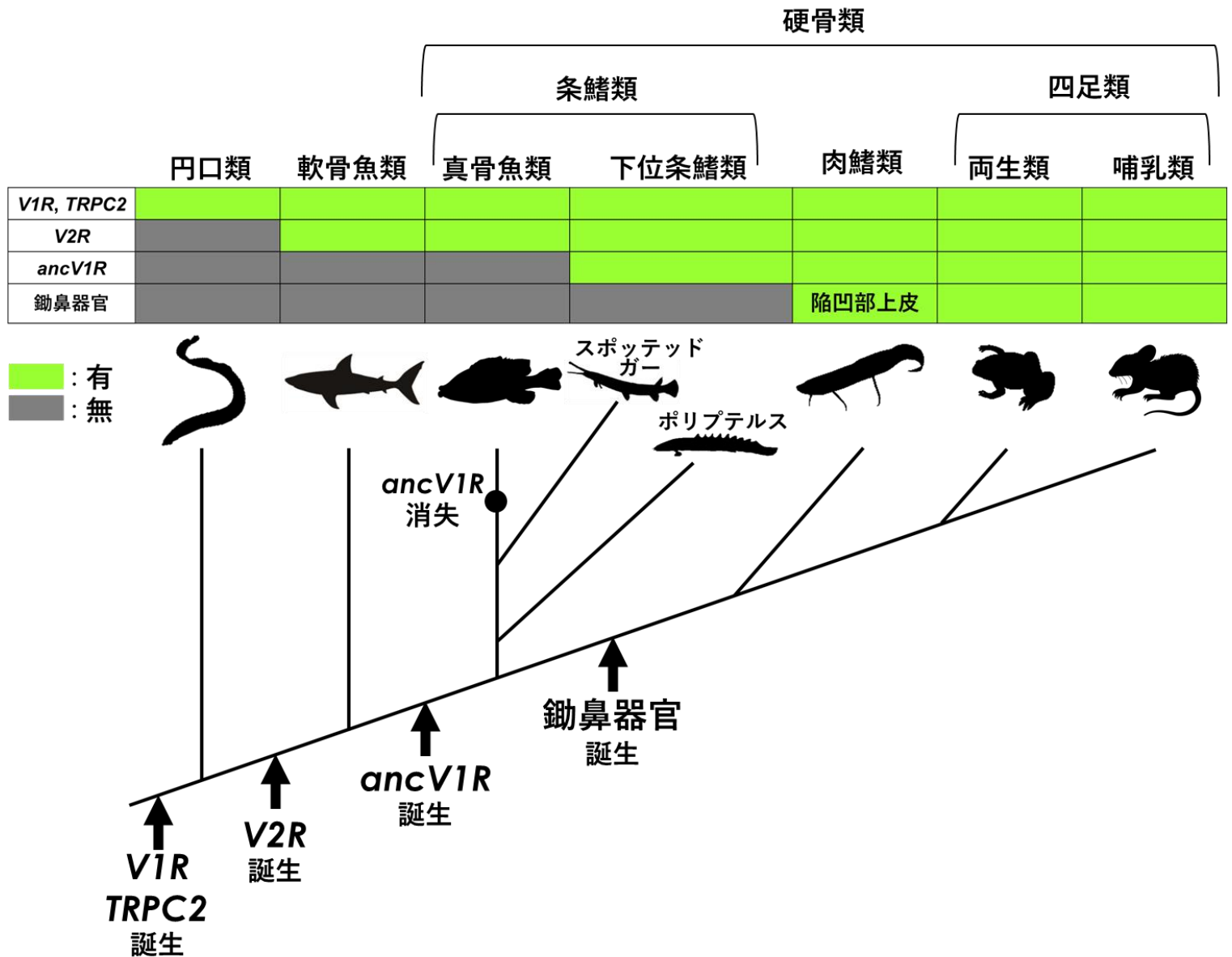


図 19. 脊椎動物における鋤鼻器官の誕生時期と鋤鼻神経系の段階的な進化について考えられるシナリオ。ポリプテルスやスポッテッドガーに鋤鼻領域が見つからなかったことを考慮すると、鋤鼻器官の誕生は肉鰭類の祖先の段階であったと考えられる。しかし、陸棲四足類に存在するような成熟した鋤鼻神経系の遺伝子セットは脊椎動物の祖先から徐々に整備され、硬骨類の祖先の段階ですでに揃っていたと想定される。

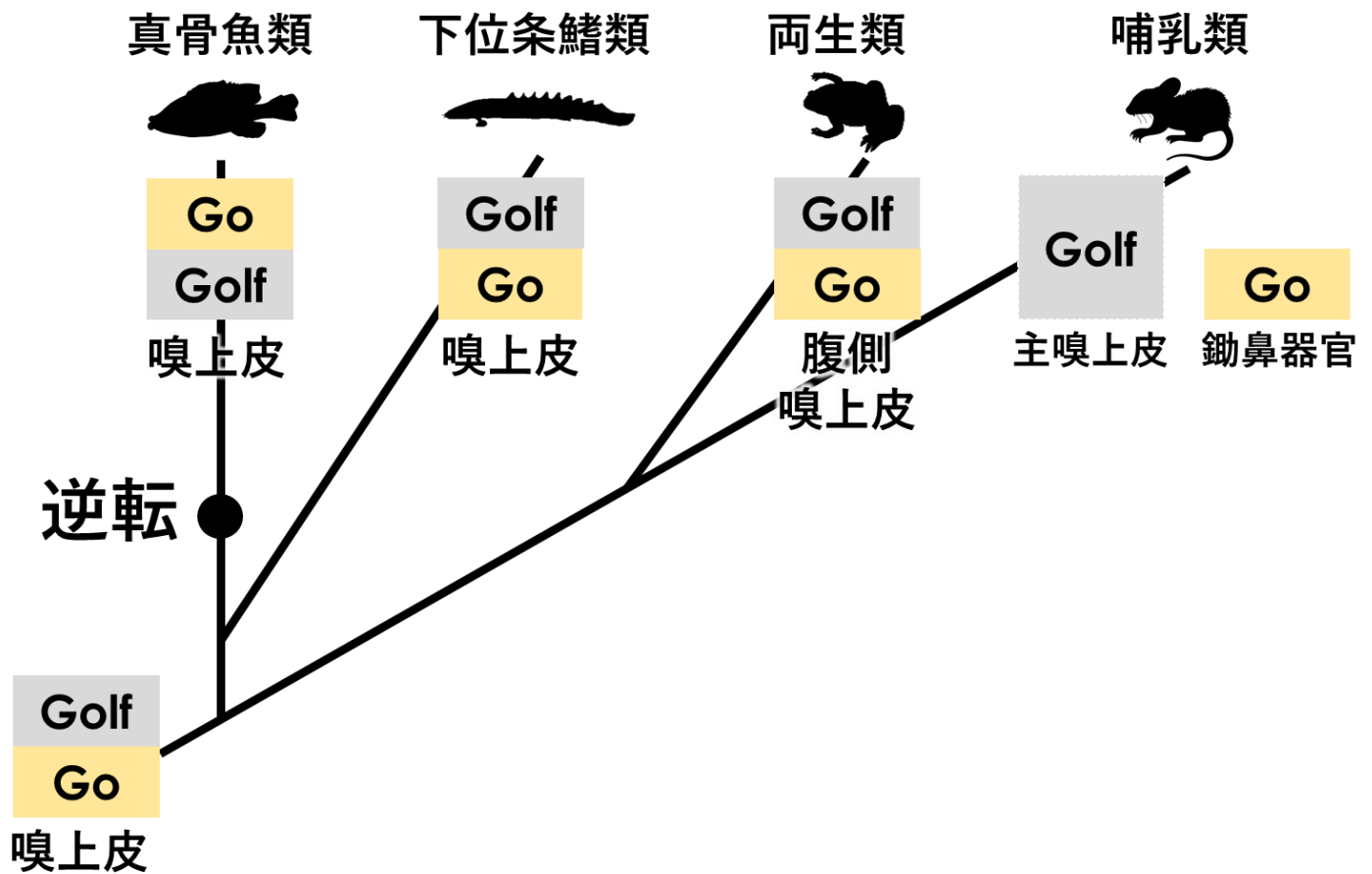


図 20. Go/Golf の発現パターンの逆転。ポリプテルス嗅上皮における Go（深層）と Golf（表層）の発現パターンは両生類のそれと類似している（一部は哺乳類の鋤鼻器官と類似している）。このことを考慮すると、Go/Golf の発現層の逆転は、真骨魚類の共通祖先において起こったと考えられる。

表 1. 四足類および真骨魚類の嗅覚器における代表的な発現遺伝子一覧

	四足類（マウス）			真骨魚類		
組織	主嗅上皮	鋤鼻器官		嗅上皮		
神経細胞	絨毛性	微絨毛性 （表層）	微絨毛性 （深層）	絨毛性 （深層）	?	微絨毛性 （表層）
受容体遺伝子	OR	<i>t-V1R</i>	<i>t-V2R</i>	OR	<i>f-V1R</i>	<i>f-V2R</i>
共役Gタンパク質 遺伝子	<i>Golf</i>	<i>Gi2</i>	<i>Go</i>	<i>Golf</i>	?	<i>Go</i>
その他関連遺伝子	<i>CNGA2</i>	<i>TRPC2</i> <i>ancV1R</i>	<i>TRPC2</i> <i>ancV1R</i>	<i>CNGA2</i>	?	<i>TRPC2</i>

表 2. 本研究で使したプライマー一覧

種名	遺伝子名	Forward	Reverse
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>ancV1R</i>	5'-GCAGAATAATGGTGGTGAAT-3'	5'-GGATTAATGGATCATTGGAA-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>TRPC2</i>	5'-TTTGCTGTGGAACCTTAGGAATGT-3'	5'-CCTTATTAAGTAGAAGATGGCCTTCG-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>Gi2</i>	5'-TTTACAGCAACACGATTACAG-3'	5'-CAGTAACTGCGTCAAAGACA-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>Go</i>	5'-GAAAGAGCACCATCGTAAAG-3'	5'-TCTCAAATTGTGCTTGAATG-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>Golf</i>	5'-CAGAGGAAAAGAAGCAGAAA-3'	5'-ACTCATCACGGATGAAAAAC-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>f-V1R2</i>	5'-CTGAAGATGGATCTCTGCAT-3'	5'-GTAACACCACATGTGAGCAG-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>f-V1R3</i>	5'-GGATTGCAGGTAATGGTCTAG-3'	5'-CTATGTCCTGCTGCCAGTAC-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>f-V1R4</i>	5'-CACATTACAAACAGCATCTC-3'	5'-TCGCATCTTACTATGTCCAAG-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>f-V1R6</i>	5'-CCAGCAACAGTTGTGATCTAC-3'	5'-CTGCTGAGATGAAGAAGTCAC-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>t-V1R11</i>	5'-GGACACAACAGATACAAGACAA-3'	5'-GCATACTGAAGTGACAGTGTG-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>t-V1R22</i>	5'-ATCCTAACAGTCATCAGTATCCC-3'	5'-CACATAGTTGAAGAGCTGGTATC-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>t-V1R30</i>	5'-CTGATCAGCACTCCATCC-3'	5'-GTAGTCTCTCAAGCTGAACCTT-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>t-V1R32</i>	5'-TGAAGTAACAATGGACACCA-3'	5'-CCAAGATGATGTTTATGTGT-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>t-V1R34</i>	5'-GAAGGTCGCTTCTTCTACAC-3'	5'-TGTACAGCTTCTGACTGAG-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>t-V1R37</i>	5'-GACAATCATCAGCATTCTTAC-3'	5'-TGTGTACTGCTCTCGTG-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>t-V1R43</i>	5'-ATGGACACCAGAGTTGTCA-3'	5'-AGTGGTGATGACCACAATG-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>t-V1R49</i>	5'-ACTCAAGGCAGCTGTATTC-3'	5'-TACAGTCTCGACTCGGTG-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>f-V2R65700</i>	5'-TGTATGACACTGCTGAAGTGC-3'	5'-CTTTCCGTGCATACCGATA-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>t-V2R56889</i>	5'-GCAGGTACTGAGATTGTGTAGG-3'	5'-CAATGCTGCTACTGACAGAC-3'
<i>Polypterus senegalus</i>	<i>V2R2</i>	5'-CCAACGTCTTCTGATTGTG-3'	5'-GACTCCGTGATGTTACTGCT-3'
<i>Protopterus annectens</i>	<i>ancV1R</i>	5'-GCTGTCAACAACCTATCTC-3'	5'-GCAACATACTGCTTATCACAG-3'
<i>Lepisosteus oculatus</i>	<i>ancV1R</i>	5'-CAAGTGATACAGAATGGATTGC-3'	5'-CGTATGGTGACCTGAGTACAGT-3'
<i>Lepisosteus oculatus</i>	<i>OMP</i>	5'-CTCGCAACTGGAGTTGAC-3'	5'-CCTGAAGCTTATGGAGCAG-3'

表 3. ポリプテルス嗅覚器における *V1R*、*V2R* 遺伝子と鋤鼻器官関連遺伝子との共発現率

	<i>TRPC2</i>	<i>Gi2</i>	<i>Go</i>
<i>f-V1R2</i>	95.3% (82/86)	41.7% (30/72)	-
<i>t-V1R37</i>	96.5% (276/286)	98.8% (480/486)	-
<i>f-V2R100</i>	88.6% (156/176)	-	87.0% (208/239)
<i>t-V2R253</i>	86.2% (112/130)	-	84.4% (233/276)

※括弧内の数字は 3 ～ 7 切片あたりの *V1R*-鋤鼻器官関連遺伝子（または *V2R*-鋤鼻器官関連遺伝子）共発現細胞数/全 *V1R*（または *V2R*）発現細胞数を表す。

引用文献

- Barber, P. C., and G. Raisman. 1974. "An Autoradiographic Investigation of the Projection of the Vomeronasal Organ to the Accessory Olfactory Bulb in the Mouse." *Brain Research* 81 (1): 21–30.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90476-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90476-4).
- Berghard, Anna, and Linda B. Buck. 1996. "Sensory Transduction in Vomeronasal Neurons: Evidence for $G\alpha_o$, $G\alpha_{i2}$, and Adenylyl Cyclase II as Major Components of a Pheromone Signaling Cascade." *Journal of Neuroscience* 16 (3): 909–18. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-03-00909.1996>.
- Bertmar, Gunnar. 1981. "Evolution of Vomeronasal Organs in Vertebrates." *Evolution* 35 (2): 359. <https://doi.org/10.2307/2407844>.
- Brunet, Lisa J., Geoffrey H. Gold, and John Ngai. 1996. "General Anosmia Caused by a Targeted Disruption of the Mouse Olfactory Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel." *Neuron* 17 (4): 681–93.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80200-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80200-7).
- Buck, Linda B., and Richard Axel. 1991. "A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors." *Cell* 65: 175–87.
- Buck, Linda B., and Richard Axel. 1994. "Information Coding in the Olfactory System: Evidence for a Stereotyped and Highly Organized Epitope Map in the Olfactory Bulb." *Cell* 79 (7): 1245–55. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90015-9.xel](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90015-9.xel)
- Chang, Zheng, Guojun Li, Juntao Liu, Yu Zhang, Cody Ashby, Deli Liu, Carole L. Cramer, and Xiuzhen Huang. 2015. "Bridger: A New Framework for de Novo Transcriptome Assembly Using RNA-Seq Data." *Genome Biology* 16

(1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0596-2>.

- Chess, Andrew, Itamar Simon, Howard Cedar, and Richard Axel. 1994. “Allelic Inactivation Regulates Olfactory Receptor Gene Expression.” *Cell* 78 (5): 823–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90562-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90562-2).
- Date-Ito, Atsuko, Hiromi Ohara, Masumi Ichikawa, Yuji Mori, and Kimiko Hagino-Yamagishi. 2008. “Xenopus V1R Vomeronasal Receptor Family Is Expressed in the Main Olfactory System.” *Chemical Senses* 33 (4): 339–46. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjm090>.
- Døving, Kjell B., and Didier Trotier. 1998. “Structure and Function of the Vomeronasal Organ.” *Journal of Experimental Biology* 201 (21): 2913–25.
- Dulac, Catherine, and Richard Axel. 1995. “A Novel Family of Genes Encoding Putative Pheromone Receptors in Mammals.” *Cell* 83 (2): 195–206. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90161-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90161-2).
- Eisthen, Heather L. 1992. “Phylogeny of the Vomeronasal System and of Receptor Cell Types in the Olfactory and Vomeronasal Epithelia of Vertebrates.” *Microscopy Research and Technique* 23 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070230102>.
- González, Agustín, Ruth Morona, Jesús M. López, Nerea Moreno, and R. Glenn Northcutt. 2010. “Lungfishes, like Tetrapods, Possess a Vomeronasal System.” *Frontiers in Neuroanatomy* 4 (SEP): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00130>.
- Grabherr, Manfred G., Brian J. Haas, Moran Yassour, Joshua Z. Levin, Dawn A. Thompson, Ido Amit, Xian Adiconis, et al. 2011. “Full-Length Transcriptome Assembly from RNA-Seq Data without a Reference Genome.” *Nature Biotechnology* 29 (7): 644–52. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>.
- Grus, Wendy E., and Jianzhi Zhang. 2009. “Origin of the Genetic Components

of the Vomeronasal System in the Common Ancestor of All Extant Vertebrates.” *Molecular Biology and Evolution* 26 (2): 407–19.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msn262>.

Haas, Brian J., Alexie Papanicolaou, Moran Yassour, Manfred Grabherr, Philip D. Blood, Joshua Bowden, Matthew Brian Couger, et al. 2013. “De Novo Transcript Sequence Reconstruction from RNA-Seq Using the Trinity Platform for Reference Generation and Analysis.” *Nature Protocols* 8 (8): 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>.

Hagino-Yamagishi, Kimiko. 2008. “Diverse Systems for Pheromone Perception: Multiple Receptor Families in Two Olfactory Systems.” *Zoological Science* 25 (12): 1179–89. <https://doi.org/10.2108/zsj.25.1179>.

Hansen, Anne, Karl T. Anderson, and Thomas E. Finger. 2004. “Differential Distribution of Olfactory Receptor Neurons in Goldfish: Structural and Molecular Correlates.” *Journal of Comparative Neurology* 477 (4): 347–59. <https://doi.org/10.1002/cne.20202>.

Hansen, Anne, Shane H. Rolen, Karl Anderson, Yasuhiro Morita, John Caprio, and Thomas E. Finger. 2003. “Correlation between Olfactory Receptor Cell Type and Function in the Channel Catfish.” *Journal of Neuroscience* 23 (28): 9328–39. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-28-09328.2003>.

Herrada, Gilles, and Catherine Dulac. 1997. “A Novel Family of Putative Pheromone Receptors in Mammals with a Topographically Organized and Sexually Dimorphic Distribution.” *Cell* 90 (4): 763–73. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80536-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80536-X).

Hussain, Ashiq, Luis R. Saraiva, and Sigrun I. Korsching. 2009. “Positive Darwinian Selection and the Birth of an Olfactory Receptor Clade in Teleosts.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11): 4313–18.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0803229106>.

Katoh, Kazutaka, and Daron M. Standley. 2013. “MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability.” *Molecular Biology and Evolution* 30 (4): 772–80.

<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

Kiemnec-Tyburczy, Karen M., Sarah K. Woodley, Richard A. Watts, Stevan J. Arnold, and Lynne D. Houck. 2012. “Expression of Vomeronasal Receptors and Related Signaling Molecules in the Nasal Cavity of a Caudate Amphibian (*Plethodon Shermanni*).” *Chemical Senses* 37 (4): 335–46.

<https://doi.org/10.1093/chemse/bjr105>.

Kumar, Sudhir, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, and Koichiro Tamura. 2018. “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.” *Molecular Biology and Evolution* 35 (6): 1547–49.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

Langmead, Ben, and Steven L. Salzberg. 2012. “Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2.” *Nature Methods* 9 (4): 357–59.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.

Liberles, Stephen D., and Linda B. Buck. 2006. “A Second Class of Chemosensory Receptors in the Olfactory Epithelium.” *Nature* 442 (7103): 645–50. <https://doi.org/10.1038/nature05066>.

Liman, Emily R., David P. Corey, and Catherine Dulac. 1999. “TRP2: A Candidate Transduction Channel for Mammalian Pheromone Sensory Signaling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10): 5791–96.

<https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5791>.

Lucas, Philippe, Kyrill Ukhonov, Trese Leinders-Zufall, and Frank Zufall. 2003. “A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron

Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction.” *Neuron* 40 (3): 551–61. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00675-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00675-5).

Martini, Sara, Lucia Silvotti, Arild Shirazi, Nicholas J.P. Ryba, and Roberto Tirindelli. 2001. “Co-Expression of Putative Pheromone Receptors in the Sensory Neurons of the Vomeronasal Organ.” *Journal of Neuroscience* 21 (3): 843–48. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-03-00843.2001>.

Matsunami, Hiroaki, and Linda B. Buck. 1997. “A Multigene Family Encoding a Diverse Array of Putative Pheromone Receptors in Mammals.” *Cell* 90 (4): 775–84. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80537-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80537-1).

Nakada, Tomoaki, Kimiko Hagino-Yamagishi, Koki Nakanishi, Makoto Yokosuka, Toru R. Saito, Fumiyo Toyoda, Itaru Hasunuma, Takashi Nakakura, and Sakae Kikuyama. 2014. “Expression of G Proteins in the Olfactory Receptor Neurons of the Newt *Cynops Pyrrhogaster*: Their Unique Projection into the Olfactory Bulbs.” *Journal of Comparative Neurology* 522 (15): 3501–19. <https://doi.org/10.1002/cne.23619>.

Nakamuta, Shoko, Nobuaki Nakamuta, Kazumi Taniguchi, and Kazuyuki Taniguchi. 2012. “Histological and Ultrastructural Characteristics of the Primordial Vomeronasal Organ in Lungfish.” *Anatomical Record* 295 (3): 481–91. <https://doi.org/10.1002/ar.22415>.

———. 2013. “Localization of the Primordial Vomeronasal Organ and Its Relationship to the Associated Gland in Lungfish.” *Journal of Anatomy* 222 (4): 481–85. <https://doi.org/10.1111/joa.12025>.

Nikaido, Masato. 2019. “Evolution of V1r Pheromone Receptor Genes in Vertebrates: Diversity and Commonality.” *Genes and Genetic Systems* 94 (4): 141–49. <https://doi.org/10.1266/ggs.19-00009>.

Nikaido, Masato, Hideki Noguchi, Hidenori Nishihara, Atsushi Toyoda, Yutaka

- Suzuki, Rei Kajitani, Hikoyu Suzuki, et al. 2013. "Coelacanth Genomes Reveal Signatures for Evolutionary Transition from Water to Land." *Genome Research* 23 (10): 1740–48.
<https://doi.org/10.1101/gr.158105.113>.
- Oka, Yuichiro, and Sigrun I. Korsching. 2011. "Shared and Unique G Alpha Proteins in the Zebrafish versus Mammalian Senses of Taste and Smell." *Chemical Senses* 36 (4): 357–65. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq138>.
- Oka, Yuichiro, Luis R. Saraiva, and Sigrun I. Korsching. 2012. "Crypt Neurons Express a Single V1r-Related Ora Gene." *Chemical Senses* 37 (3): 219–27. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr095>.
- Ota, Tomoki, Masato Nikaido, Hikoyu Suzuki, Kimiko Hagino-Yamagishi, and Norihiro Okada. 2012. "Characterization of V1R Receptor (Ora) Genes in Lake Victoria Cichlids." *Gene* 499 (2): 273–79.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.002>.
- Pfeiffer, Wolfgang. 1968. "Das Geruchsorgan Der Polypteridae (Pisces, Brachiopterygii)." *Zeitschrift Für Morphologie Der Tiere* 63 (1): 75–110.
<https://doi.org/10.1007/BF00343428>.
- Picone, Barbara, Uljana Hesse, Sumir Panji, Peter Van Heusden, Mario Jonas, and Alan Christoffels. 2014. "Taste and Odorant Receptors of the Coelacanth-A Gene Repertoire in Transition." *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 322 (6): 403–14.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.22531>.
- Reiten, Ingrid, Fazil Emre Uslu, Stephanie Fore, Robbrecht Pelgrims, Christa Ringers, Carmen Diaz Verdugo, Maximillian Hoffman, et al. 2017. "Motile-Cilia-Mediated Flow Improves Sensitivity and Temporal Resolution of Olfactory Computations." *Current Biology* 27 (2): 166–74.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.036>.

- Rodriguez, Ivan, Karina Del Punta, Andrea Rothman, Tomohiro Ishii, and Peter Mombaerts. 2002. "Multiple New and Isolated Families within the Mouse Superfamily of V1r Vomeronasal Receptors." *Nature Neuroscience* 5 (2): 134–40. <https://doi.org/10.1038/nn795>.
- Sato, Yuki, Nobuhiko Miyasaka, and Yoshihiro Yoshihara. 2005. "Mutually Exclusive Glomerular Innervation by Two Distinct Types of Olfactory Sensory Neurons Revealed in Transgenic Zebrafish." *Journal of Neuroscience* 25 (20): 4889–97. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0679-05.2005>.
- Silvotti, Lucia, Arianna Moiani, Rita Gatti, and Roberto Tirindelli. 2007. "Combinatorial Co-Expression of Pheromone Receptors, V2Rs." *Journal of Neurochemistry* 103 (5): 1753–63. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04877.x>.
- Stamatakis, Alexandros. 2014. "RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies." *Bioinformatics* 30 (9): 1312–13. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- Sun, Jianqiang, Tomoaki Nishiyama, Kentaro Shimizu, and Koji Kadota. 2013. "TCC: An R Package for Comparing Tag Count Data with Robust Normalization Strategies." *BMC Bioinformatics* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-219>.
- Suzuki, Hikoyu, Hidefumi Nishida, Hiro Kondo, Ryota Yoda, Tetsuo Iwata, Kanako Nakayama, Takayuki Enomoto, et al. 2018. "A Single Pheromone Receptor Gene Conserved across 400 My of Vertebrate Evolution." *Molecular Biology and Evolution* 35 (12): 2928–39. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy186>.
- Vassar, Robert, Steve K Chao, Raquel Sitcheran, M Nuiiez, Leslie B Vosshall, and Richard Axel. 1994. "Topographic Organization of Sensory

Projection to the Olfactory Bulb.” *Cell* 79: 981 – 991.

Zapilko, Veronika, and Sigrun I. Korsching. 2016. “Tetrapod V1R-like Ora Genes in an Early-Diverging Ray-Finned Fish Species: The Canonical Six Ora Gene Repertoire of Teleost Fish Resulted from Gene Loss in a Larger Ancestral Repertoire.” *BMC Genomics* 17 (1): 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2399-6>.

Zhang, Zicong, and Masato Nikaido. 2020. “Inactivation of AncV1R as a Predictive Signature for the Loss of Vomeronasal System in Mammals.” *Genome Biology and Evolution* 12 (6): 766–78.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evaa082>.

Zicong Zhang, Atsuhiko Sakuma, Shigehiro Kuraku, and Masato Nikaido. 2021. "Remarkable diversity of vomeronasal type 2 receptor (*OlfC*) genes of basal ray-finned fish and its evolutionary trajectory in jawed vertebrates." *Scientific Reports* : in press