T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ Science Tokyo Research Repository

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)	Atsuhiro 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 in situ 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
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
第四章:考察 21
ポリプテルスの MOO と AOO21
鋤鼻器官の起源と鋤鼻神経系の進化22
第五章:結論
謝辞26
講演目録27
報文目録

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、同種の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 的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)は主に主嗅上皮の繊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*が繊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 VIR 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)。繊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)。以上に示した微絨性および繊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 *VIR 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 (*VIR, 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 VIR 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*) および繊毛性神経細胞、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 において運動性繊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、運動性繊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、ボ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℃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℃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14µm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℃で保存した。

HE 染色

-80°C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°C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相同 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クエンスで確認された。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℃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分間撹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℃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℃の 5x SSC / 50%ホルムアミド中で 15 分×2 回処理した。その後、37℃の 2ug/ml RNase A (Sigma) / TNE で 30 分間処理した後、切片を 50℃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℃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/µl の DIG と FITC 標識の 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 プローブの標識 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6A, 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6A)。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6B)。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6C)。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6D-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6C)。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9A)。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9B, 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6C)、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 *ancV1R、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12A-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12E, E', E", 図13)。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14)。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-V1R*2、 3、4、6) (図9B) 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16)。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-VIR発現細胞と f-VIR発現細胞で異なっていた。より具体的に 述べると、t-VIR37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-VIR2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-VIR、f-V2R100、t-VIR、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、TRPC2t-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 *ancV1R*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18A,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18B,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-VIR、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(*ancVIR、t-VIR、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、 *ancVIR-TRPC2-t-VIR-Gi2*共発現神経細胞と *ancVIR-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 *ancVIR、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(VIR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 VIR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 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

- [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)
- [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)
- [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)
- [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

 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 in situ hybridization	蛍光 in situ 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	vomeronasal organ	鋤鼻器官(四足類)





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)、50µm(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。



0.3

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11. 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 ≤ 0.05 、水色のバーは FDR > 0.05 を示す)。



図12. 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。スケールバーはそれぞれ 500 μ m (A-E)、50 μ 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13.2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 µ 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14. 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 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 µ m を示す。

А			В		
				No.	
t-V2K253	Go	Merge	<i>f</i> -V2R100	Go	Merge
t-V2R253	TRPC2	Merge	f-V2R100	TRPC2	Merge
t-V2R253	ancV1R	Merge	f-V2R100	ancV1R	Merge
С					
V2R2	Go	Merge			
V2R2	TRPC2	Merge			

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 µ m を示す。

V2R2

ancV1R

Merge



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) の実践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。スケールバーはそれぞれ 500 µ m (A)、 100 µ m (A')、20 µ 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 µ m(A、B)、100 µ 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	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	繊毛性	微絨毛性 (表層)	微絨毛性 (深層)	繊毛性 (深層)	?	微絨毛性 (表層)
受容体遺伝子	OR	t-V1R	t-V2R	OR	f-V1R	f-V2R
共役Gタンパク質 遺伝子	Golf	Gi2	Go	Golf	?	Go
その他関連遺伝子	CNGA2	TRPC2 ancV1R	TRPC2 ancV1R	CNGA2	?	TRPC2

表2.本研究で使用したプライマー一覧

種名	遺伝子名	Forward	Reverse
Polypterus senegalus	ancV1R	5'-GCAGAATAATGGTGGTGAAT-3'	5'-GGATTAATGGATCATTGGAA-3'
Polypterus senegalus	TRPC2	5'-TTTGCTGTGGAACTCTTAGGAATGT-3'	5'-CCTTATTAAGTAGAAGATGGCCTTCG-3'
Polypterus senegalus	Gi2	5'-TTTACAGCAACACGATTCAG-3'	5'-CAGTAACTGCGTCAAAGACA-3'
Polypterus senegalus	Go	5'-GAAAGAGCACCATCGTAAAG-3'	5'-TCTCAAATTGTGCTTGAATG-3'
Polypterus senegalus	Golf	5'-CAGAGGAAAAGAAGCAGAAA-3'	5'-ACTCATCACGGATGAAAAAC-3'
Polypterus senegalus	<i>f-V1R2</i>	5'-CTGAAGATGGATCTCTGCAT-3'	5'-GTAACACCACATGTGAGCAG-3'
Polypterus senegalus	<i>f-V1R3</i>	5'-GGATTGCAGGTAATGGTCTAG-3'	5'-CTATGTCCTGCTGCCAGTAC-3'
Polypterus senegalus	<i>f-V1R4</i>	5'-CACATTCACAACAGCATCTC-3'	5'-TCGCATCTTACTATGTCCAAG-3'
Polypterus senegalus	<i>f-V1R6</i>	5'-CCAGCAACAGTTGTGATCTAC-3'	5'-CTGCTGAGATGAAGAAGTCAC-3'
Polypterus senegalus	t-V1R11	5'-GGACACAACAGATACAAGACAA-3'	5'-GCATACTGAAGTGTACAGTGTTG-3'
Polypterus senegalus	t-V1R22	5'-ATCCTAACAGTCATCAGTATCCC-3'	5'-CACATAGTTGAAGAGCTGGTATC-3'
Polypterus senegalus	t-V1R30	5'-CTGATCAGCACTCCATCC-3'	5'-GTAGTCTCTTCAAGCTGAACCTT-3'
Polypterus senegalus	t-V1R32	5'-TGAAGTAACAATGGACACCA-3'	5'-CCAAGATGATGTTCATGTGT-3'
Polypterus senegalus	t-V1R34	5'-GAAGGTCGCTTCTTCTACAC-3'	5'-TGTACAGCTTCCTGACTGAG-3'
Polypterus senegalus	t-V1R37	5'-GACAATCATCAGCATTCCTAC-3'	5'-TGTGTACTGCTCTCGCTG-3'
Polypterus senegalus	t-V1R43	5'-ATGGACACCAGAGTTGTCA-3'	5'-AGTGGTGATGACCACAATG-3'
Polypterus senegalus	t-V1R49	5'-ACTCAAGGCAGCTGTATTC-3'	5'-TACAGTCTCGACTCGGTG-3'
Polypterus senegalus	f-V2R65700	5'-TGTATGACACTGCTGAAGTGC-3'	5'-CTTTCCGTGCATACCGATA-3'
Polypterus senegalus	t-V2R56889	5'-GCAGGTACTGAGATTGTGTAGG-3'	5'-CAATGCTGTCACTGACAGAC-3'
Polypterus senegalus	V2R2	5'-CCAACGTCTTCTGATTGTG-3'	5'-GACTCCGTGATGTTACTGCT-3'
Protopterus annectens	ancV1R	5'-GCTGTCACAACCACTATCTC-3'	5'-GCAACATACTGCTTATCACAG-3'
Lepisosteus oculatus	ancV1R	5'-CAAGTGATACAGAATGGATTGC-3'	5'-CGTATGGTGACCTGAGTACAGT-3'
Lepisosteus oculatus	OMP	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

	TRPC2	Gi2	Go
f-V1R2	95.3% (82/86)	41.7% (30/72)	-
t-V1R37	96.5% (276/286)	98.8% (480/486)	-
<i>f-V2R100</i>	88.6% (156/176)	-	87.0% (208/239)
t-V2R253	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.
- Berghard, Anna, and Linda B. Buck. 1996. "Sensory Transduction in Vomeronasal Neurons: Evidence for G α o, G α 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Shermani)." *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 Ukhanov, 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.

- 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.
- 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 Pos*t*-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 O Rganization of Sensory

Projection to the O Lfactory 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, Atsuhiro 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