

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	シクリッドのフェロモン受容体候補V1R2の多型を介した選択的交配の可能性
Title(English)	Possibility of assortative mating of cichlid via polymorphism of V1R2, a candidate pheromone receptor
著者(和文)	河村理輝
Author(English)	Riki Kawamura
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12336号, 授与年月日:2023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,立花 和則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12336号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和4年度 博士論文

シクリッドのフェロモン受容体候補 V1R2 の 多型を介した選択的交配の可能性

東京工業大学 生命理工学院
生命理工学系 生命理工学コース
二階堂研究室
河村理輝

指導教員 二階堂雅人 准教授

目次

令和4年度 博士論文.....	1
目次.....	2
第1章 序論.....	5
生物の多様性創出.....	5
シクリッド.....	5
嗅覚に基づく選択的交配の可能性.....	6
シクリッドの嗅覚受容体の多様性.....	8
第2章 シクリッドにおける匂い受容の検出系の確立.....	10
背景.....	10
材料・方法.....	12
シクリッド.....	12
匂い刺激剤.....	13
尿採取.....	14
曝露と切片作製.....	15
リボプローブの作製.....	16
蛍光 <i>in situ</i> hybridization (ISH).....	16
画像処理.....	17
系統樹作成.....	18
結果.....	18
シクリッドの <i>c-fos</i> 遺伝子は神経活動マーカーとして有用.....	18
微絨毛細胞における <i>c-fos</i> の発現.....	19
アミノ酸曝露に対する V2R 陽性細胞の <i>c-fos</i> 発現.....	20

V1R 陽性細胞の <i>c-fos</i> 発現.....	22
考察.....	23
シクリッド嗅神経細胞のリガンド応答は <i>c-fos</i> のリボプローブを用いた ISH によって評価が可能.....	23
V2R 遺伝子の重複がシクリッドの受容できる匂い物質の増加につながったことを示唆.....	24
嗅上皮におけるシクリッド尿中物質の検出.....	25
結論.....	26
第3章 シクリッド V1R2 のアレル間のリガンド分化の検証.....	27
背景.....	27
材料・方法.....	30
シクリッド.....	30
尿採取.....	31
匂い刺激剤・曝露・切片作製.....	31
リボプローブの作製と 2 色蛍光 <i>in situ</i> hybridization (ISH) と画像.....	32
LC-MS/MS 解析.....	32
進化圧解析.....	33
交配実験.....	34
結果.....	35
cladeII は cladeI と比較して 4HPAA、LCA に対する応答性が低かった.....	35
オスの尿中に V1R2 受容体のリガンドが存在.....	35
尿中から 4HPAA 誘導体の検出.....	36
LCA を尿中から検出.....	37
尿画分に対する V1R2 陽性細胞の応答.....	37

新たなリガンド候補物質である 3HPAA のリガンド応答性の違い	38
4HPAA/3HPAA 誘導体に対するリガンド応答性の違い	39
考察	39
3HPAA は祖先型アシルである cladeI型の V1R2 受容体の有力なリガンド候補	39
cladeIと cladeIIはリガンド選択性が異なる可能性	40
V1R2 のリガンド分化がもたらすのは?	42
結論	44
第4章 総論	45
図	47
表	73
引用文献	84
謝辞	93
報文目録	94

第 1 章 序論

生物の多様性創出

この地球上には約 175 万もの種が知られており、脊椎動物だけでも約 6.6 万種見つまっている。このような種多様性を生み出すメカニズムを解明することは進化生物学ひいては生物学の最も重要な課題の一つである。種分化は何らかの要因によって生殖的隔離が生じ、二集団間で遺伝子交流が行われなくなることによって生じる。生殖的隔離は主に交配前隔離と交配後隔離に分類される。特に分化が進んでいない種間では交配前隔離が重要になる。交配前隔離の主なメカニズムとしては種間での配偶シグナルの違いが挙げられる。これはすなわち同種と異種の配偶シグナルを区別し、同種とだけ選択的に交配することで隔離が生じる。このような選択的交配の進化では配偶シグナルが進化するときにそれに合わせてシグナルを受容する形質も同時に進化する必要があり、片方だけが進化した場合にはシグナルを受容が行われず、適応度が低下する。しかし、生物がいかにかこの「適応度の谷」を乗り越えるかを説明する実証的な研究は未だ少ない。

シクリッド

シクリッドは極めて多様な形態や生態を持つことで知られるカワスズメ（シクリッド）目カワスズメ科に分類される淡水性の熱帯魚である。シクリッドの興味深い特徴の一つとしては、口内で卵や稚魚を守る口内保育や兄弟が子育てに参加する共同繁殖 (Hert, 1985) などの独特な子育てが挙げられる。シクリッドはアフリカから中南米、アジア、マダガスカルなど世界中に広く生息しており、魚種の約 10% を占める約 3000 種 (Kocher, 2004) が知られている。

特に東アフリカの三大湖、ヴィクトリア湖、マラウイ湖、タンガニーカ湖では独立に

少数の種から短期間で爆発的な適応放散が生じており、それぞれの湖で 500 種、240 種、800 種 (図 1, Seehausen, 1996; J. Snoeks, 2000; Ronco *et al.*, 2020) もの固有種が生息していることから生物多様性創出メカニズムを解明するための最適なモデル生物として知られている。なかでも 2 つの大地溝帯に囲まれたヴィクトリア湖は一度干上がって現在の湖が成立してからわずか 14,600 年 (Johnson, Kelts and Odada, 2000) しか経過していないため、種間ではゲノムがほとんど遺伝的に分化しておらず (Samonte *et al.*, 2007)、逆に種分化に寄与したゲノム領域は種間で遺伝的に大きく分化している可能性が高く、生物多様性創出の分子基盤の解明に最適な生物である。

嗅覚に基づく選択的交配の可能性

遺伝的分化の小さい東アフリカのシクリッドでは主に生殖前隔離によって隔てられている (Van Der Sluijs *et al.*, 2008)。シクリッドは湖のような地理的な隔離が起こりづらい環境で急速に種分化していることから地理的隔離だけでなく、性選択や選択的交配による隔離を考慮する必要がある。

シクリッドのオスは種ごとに多様な婚姻色を持っていることから婚姻色と色覚を介した選択的交配がこれまで注目されてきた。実際 LWS や SWS、RH などの複数のオプシン遺伝子で遺伝子配列や発現量の多様性が示されてきた (Terai *et al.*, 2002; O'Quin *et al.*, 2010; Smith and Carleton, 2010; Schulte *et al.*, 2014)。また、透明度の低いヴィクトリア湖では短波長の光が吸収されやすく、水深によって光環境が大きく異なっており、オプシンの多様性はこうした光環境への適応にもつながっている (Terai *et al.*, 2006, 2017; Wright *et al.*, 2020)。この婚姻色に対する選好性と環境への適応は結びついて進化することで種分化した例も報告されている (Seehausen *et al.*, 2008)。オスが赤い婚姻色を呈する *Pundamilia nyererei* と青い婚姻色を呈する *P. pundamilia* は LWS オプシンについてそ

それぞれ短波長光に適応的なアシルと、長波長光に適応的なアシルを持っており、メスがより鮮やかに見えるオスを好むことから選択的交配が生じる。さらにこの2つのアシルは *P. nyererei* が生息する短波長光の優勢な深場と *P. pundamilia* が生息する短波長光の優勢な深場にそれぞれ適応しており、これが上記の選好性の結びつくことによって生殖前隔離が成立する。このように感覚の環境適応と選好性が結びついた進化は感覚駆動 (Sensory drive) と呼ばれ、急速な種分化を引き起こすと考えられている (Endler, 1992)。さらに LWS オプシンの多型によって促される種分化は一度では終わらず、繰り返し生じると考えられている。一度種分化した *P. nyererei* と *P. pundamilia* は非常に濁った環境において交雑し、再び水深に応じて赤い婚姻色を持つ *P. sp.* “nyererei-like” と *P. sp.* “pundamilia-like” に分化した (Meier *et al.*, 2017)。これらの新たな未記載種においても LWS オプシンの多型は広がっており、繰り返し種分化していることが示唆される (Meier *et al.*, 2018)。

一方でシクリッドは様々な場面で嗅覚を利用することが分かっている (Keller-Costa, Canário and Hubbard, 2015)。例えばマラウイ湖のシクリッド *Pseudotropheus emmiltos* と *P. fainzilberi* は同種認知に嗅覚を利用する (Plenderleith *et al.*, 2005)。*P. emmiltos* のメスは視覚と嗅覚の両方が使える条件下では、同種のオスと、見た目がよく似た *P. fainzilberi* のオスを識別し選択的交配する。一方で嗅覚が使えない、視覚のみの条件下では同種を認知することができなくなり、選択的交配を行わなくなった。これはメスがオスのフェロモンを嗅いで同種を識別していることを示唆している。また、口内保育をするヴィクトリア湖のシクリッド *P. nyererei* と *P. pundamilia* を用いた口内の卵を別の親に移し替える実験では、娘シクリッドは同種異種に関わらず、自分が育ててもらっていた母親と同種のオスを好むようになった (Verzijden and Ten Cate, 2007)。これは母親のフェロモンによる刷り込みが行われることを示唆している。さらにティラピアのオスがメスの尿中物

質から成熟度合を評価すること (Miranda *et al.*, 2005) や、ティラピアのオスの尿に含まれるグルクロン酸抱合ステロイドが少なくとも2つの異なる受容体で受容され、同種他個体の神経内分泌に変化を及ぼすプライマーフェロモンとして機能すること (Keller-Costa, Canario and Hubbard, 2014; Keller-Costa *et al.*, 2014) が示されている。

シクリッドの嗅覚受容体の多様性

筆者の所属研究室が行った分子系統解析からはシクリッドの嗅覚受容体の多様性が示されている。例えば餌の匂いの受容などに役立つと考えられる2型鋤鼻受容体(V2R) 遺伝子について遺伝子重複によってシクリッドは他の真骨魚よりも多くのコピー(62個)を保持している(Nikaido *et al.*, 2013)。遺伝子重複によって生じた新規受容体は新規機能獲得することによってシクリッドがより幅広い匂いを認知するのに貢献できる。また、魚類におけるフェロモン受容体候補 (Behrens *et al.*, 2014) の一つと考えられている1型鋤鼻受容体(V1R) 遺伝子において複数のコピーで大きく配列の異なる多型が見つまっている (Nikaido *et al.*, 2014)。特に V1R2 の多型は東アフリカの三大湖のシクリッドにおいて広く見つかっており、長期間多型が維持されている。LWS や V1R2 のように集団内で固定されずに維持され続けている多型は Standing Genetic Variation (SGV) と呼ばれ、SGV に選択が働くことで急速な種分化が可能となる (Hermisson and Pennings, 2005; Barrett and Schluter, 2008)。すなわち V1R2 も LWS オプシンと同様に選択的交配を担うことでシクリッドの多様性創出に寄与している可能性がある(詳細は第二章にて後述)。

以上のように嗅覚がシクリッドの多様性に寄与している可能性は十分に予想されるが、シクリッドの嗅覚受容体のリガンドを調べた研究や関連する行動を調べた研究はこれまで行われていない。シクリッドにおいて嗅覚が多様性創出に果たした役割を明らか

にするにはリガンドの解明が欠かせないと考え、本研究では個々の嗅覚受容体のリガンド応答を検出する実験系を確立した（第2章）。次に6つあるV1R受容体の一つ、V1R2遺伝子に着目し、V1R2受容体のリガンド応答を検証し、多型がシクリッドの選択的交配を促進する可能性を検証した（第3章）。

第2章 シクリッドにおける匂い受容の検出系の確立

背景

動物は嗅覚を利用して、探餌行動や配偶相手の探索、なわばりの認識、回遊行動、捕食者の回避など、様々な行動をおこなう。嗅覚は嗅覚器にある末梢神経で発現する嗅覚受容体が匂い物質を受容し、脳の中枢神経に投射することによって生じる。したがって動物の様々な行動を理解するためには特定の受容体とそのリガンドとなる匂い物質の両方を同定することが重要である。

魚類では水溶性の匂い物質を嗅上皮（OE）で検出する。魚類の探餌行動に関連する匂い物質は複数知られている。例えば、ゼブラフィッシュやサケ類においてアミノ酸 (Valenticič, Lamb and Caprio, 1999; Hara, 2006; Koide *et al.*, 2009)、キンギョにおいてポリアミン (Rolen *et al.*, 2003)、ゼブラフィッシュにおいてヌクレオチド (Wakisaka *et al.*, 2017) が探餌行動を誘導することが報告されている。これらの匂い物質は他の働きも持つこともあり、例えばアミノ酸がサケ類で母川シグナルや性フェロモン (Shoji *et al.*, 2003; Yambe *et al.*, 2006; Yamamoto, Hino and Ueda, 2010)、ティラピアで社会的地位を示すシグナルとして働いたり、ポリアミンがゼブラフィッシュで回避行動を誘起したりもする。性ステロイドやプロスタグランジンはキンギョでフェロモンとして働く (Dulka *et al.*, 1987; Sorensen *et al.*, 1988; Stacey *et al.*, 1989)。プロスタグランジンはゼブラフィッシュにおいてもフェロモンとして働くことが示されている (Yabuki *et al.*, 2016)。胆汁酸は嗅電図の実験からいくつかの魚種で匂い物質として受容されることや、ヤツメウナギでは回遊行動を誘起することが報告されているが、他の多くの魚種でその機能は明らかになっていない (Li, Sorensen and Gallaher, 1995; Michel and Lubomudrov, 1995; Zhang, Brown and Hara, 2001; Huertas *et al.*, 2010)。

魚類の嗅覚受容体は4つの嗅覚受容体ファミリー: 匂い受容体 (Buck and Axel, 1991); 微

量アミン関連受容体 (Liberles and Buck, 2006); 1 型鋤鼻受容体 (Dulac and Axel, 1995); 2 型鋤鼻受容体 (Herrada and Dulac, 1997) に分けられる。その他にもアデノシン受容体 (A2c) が嗅上皮で発現することもゼブラフィッシュで報告されている (Wakisaka *et al.*, 2017)。これらの受容体はいくつかの種類の嗅神経 (OSN) で発現している。例えば繊毛細胞は OR 受容体や TAAR 受容体を発現し (Hansen *et al.*, 2003; Sato, Miyasaka and Yoshihara, 2005)、アミノ酸、性ステロイド、プロスタグランジン、胆汁酸、ポリアミンなど、幅広い匂い物質を受容する (Sato and Suzuki, 2001; Hansen *et al.*, 2003; Yabuki *et al.*, 2016; Sato and Sorensen, 2018)。TAAR 受容体は特にポリアミンを受容する (Hussain *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015)。もう一つの主要な嗅神経細胞である微繊毛細胞は主に V2R を発現し (図 4A)、V2R 受容体共にアミノ酸を受容することが示されている (Sato and Suzuki, 2001; Hansen *et al.*, 2003; Luu *et al.*, 2004; Koide *et al.*, 2009; DeMaria *et al.*, 2013; Sato and Sorensen, 2018)。V1R 受容体も少数の微繊毛細胞で発現しており (図 4B)、チロシンの代謝産物である 4-ヒドロキシフェニル酢酸 (4HPAA) や胆汁酸類を受容することが報告されている (Behrens *et al.*, 2014; Cong *et al.*, 2019)。また、真骨魚では哺乳類で見つからないタイプの嗅神経 crypt 細胞が存在し、単一の V1R 受容体 (V1R4/OR4) が特異的に発現することがゼブラフィッシュで報告されている (Oka, Saraiva and Korsching, 2012)。さらにはアデノシン受容体である A2c を発現する pear-shaped 神経 (Wakisaka *et al.*, 2017) や、kappe 細胞なども見ついている (Ahuja *et al.*, 2015)。

これら嗅覚受容体のリガンドの解明などの研究は少なく、ゼブラフィッシュやサケ、キンギョなどの一部の魚種に限られており、魚類の 60% を占める新真骨魚類では嗅覚の研究がなされていない。魚類の多様性を理解するためにはこの非モデル生物で構成される大きなグループで研究を行うことが重要になる。

本研究では脊椎動物のなかでも最も多様化した系統の一つであるシクリッドに着目した。シクリッドは特に東アフリカの湖で顕著な適応放散を起こした (Kocher, 2004)。序章で上述

のようにシクリッドの嗅覚研究は視覚研究と比較して進んでいないが、シクリッドは様々な場面で嗅覚を利用している (Miranda *et al.*, 2005; Plenderleith *et al.*, 2005; Verzijden and Ten Cate, 2007; Keller-Costa, Canario and Hubbard, 2014; Keller-Costa *et al.*, 2014; Keller-Costa, Canário and Hubbard, 2015)。また、筆者の所属研究室は東アフリカ産シクリッドの V2R 遺伝子のコピーが増加し、他の真骨魚よりも多くのコピー数を持っていること (Nikaido *et al.*, 2013) や、複数の VIR 遺伝子に大きく配列の異なる多型が存在すること (Nikaido *et al.*, 2014) を明らかにしており、シクリッドの多様性創出に嗅覚の多様性が関わっていることを示唆している。しかし、他の魚種と同様、シクリッドの個々の嗅覚受容体の機能については研究されていない。

本研究ではヴィクトリア湖産シクリッド *Haplochromis chilotes* の嗅上皮 (OE) の匂い物質に対するリガンド応答を神経活動マーカー遺伝子 *c-fos* のリボプローブを用いた *in situ* hybridization で検証した。*H. chilotes* は比較的成長が早く維持・繁殖が容易であり、高解像度ゲノム (Nakamura *et al.*, 2021) が利用可能であり、嗅覚受容体遺伝子の同定も行われている (Nikaido *et al.*, 2013, 2014)。筆者はいくつかの匂い物質に対して 3 種類の嗅神経細胞 (OSN)、微絨毛細胞、V2R⁺ 細胞、VIR⁺ 細胞のリガンド応答を検証した。また、アミノ酸に対する V2R⁺ 細胞の応答や、シクリッドのオスの尿に対する VIR⁺ 細胞応答を報告する。本研究はシクリッドがどのように匂いを受容するかについての重要な基礎的基盤を提供し、今後の研究において嗅覚に基づく多様性創出機構の解明に貢献すると思われる。

材料・方法

シクリッド

本実験に用いた *Haplochromis chilotes* (Boulenger, 1911) は 2018 年に二階堂研究室が中心

となってタンザニアのムワンザ湾で実施された野外調査で採集された。魚は 27°C で明時間:

12 時間、暗時間: 12 時間のサイクルで維持・繁殖させた。6~12 個体 (オス 1~3 個体) をプラスチック水槽 (40cm×25cm×36cm) で飼育し、1 日 2 回飼料ペレットを与えた。実験条件を揃えるため、明白な婚姻色が見られる成熟したオスのみを実験に使用した。

動物を用いたすべての実験は大学および政府の ARRIVE ガイドラインに従って実施された。

匂い刺激剤

タンパク質構成アミノ酸 20 種 (アルギニン、ヒスチジン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、バリン)、4-ヒドロキシフェニル酢酸 (4HPAA)、リトコール酸 (LCA) は、富士フィルム和光純薬および Sigma Chemical Co. から購入した。各アミノ酸 (チロシンを除く) および 4HPAA は超純水に溶解し、12 mM (mmol/L) のストック溶液を調製した。チロシンと LCA は、6 mM NaOH 水溶液に溶解して 12 mM ストック溶液を調製した。3 種の抱合ステロイド、デヒドロエピアンドロステロン 3-硫酸 (DHEA-s)、 β -エストラジオール 17-(β -D-グルクロニド) (E 2-17g) および β -エストラジオール 3,17-ジスルフェート (E2-3,17s) は、それぞれ東京化成工業、Cayman Chemical、Santa Cruz Biotechnology から購入し、DMSO に溶解して 10 mM ストックを調製した。餌抽出物は、以下の手順で調製した。まず、粉碎した飼料ペレット (おとひめ EP1、丸紅日清飼料) 2 g に超純水 14 mL を加え、約 30 秒ボルトテックスした。室温で 5 分間インキュベートした後、8000×g で 5 分間遠心分離し、上清を餌抽出物のストック溶液とした。各ストック溶液は曝露実験を行う 1 ヶ月以内に調製し、4°C で保存した。ストック溶液は、曝露前に超純水で希釈し、15 mL の希釈液を実験に用い

た。各液の希釈倍率は、アミノ酸ミックス（20種）/アミノ酸群 A-D を 30 倍希釈して 400 μM （槽内の終濃度 2 μM ）、抱合ステロイドミックスを 1500 倍希釈して 6.6 μM （槽内の終濃度 33 nM）とした。アルギニン/リシン/グルタミン酸/アスパラギン酸/4HPAA は 6 倍希釈して 2 mM（槽内での最終濃度 10 μM ）、LCA は 3 倍希釈して 4 mM（槽内での最終濃度 20 μM ）とした。餌抽出物は 75 倍に希釈した（槽内で 15,000 倍希釈、9.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

尿採取

尿は成熟したオスのシクリッドから採取した。これまで魚類から希釈されていない尿を採取した研究はいくつかあるが、サクラマスやニジマス、モザンビークティラピア、セネガルシタビラメなどの大型種に限られていた (Yambe, Shindo and Yamazaki, 1999; Sato and Suzuki, 2001; Keller-Costa *et al.*, 2014; Fatsini *et al.*, 2017)。本研究では Yambe *et al.*, 1999 でサクラマスに対して行われた尿採取方法を応用し、体長が約 6~9 cm のシクリッドから致死させない直接的な採取法を開発した (図 2A, B)。採取に用いたカテーテルは歯科用根管洗浄プローブ針 (28G、490703、B.S.A. サクライ) を利用した (図 2A)。この針は側面に穴が開いており、先端に穴の開いた針に比べ目詰まりしにくい。これを先端から約 0.5~1.2 cm の位置で、穴が向いている側が内側になるように、(中空構造を潰れないように) ゆるやかに約 90°曲げた (図 2A)。この曲げた針をシリコンチューブ (外径 10 mm; 内径 0.5 mm) に接着剤 (アロンアルファ EXTRA 速効性万能型、コニシ) で固定し、さらにチューブを氷上に置かれた 15 mL 遠心管に接続した。さらに遠沈管をアスピレーター (DAS-01、アズワン) に接続して減圧し、尿を吸引して遠心管にトラップした。

シクリッドは氷水につけて氷冷麻酔した。カテーテルを総排泄口から膀胱に挿入した。カテーテルに接続するシリコンチューブは針金で尻ビレに固定し、目玉クリップでさらに固定した。カテーテルを挿入したシクリッドは動きを制限するためにポリエチレン製のネ

ットチャンバーに入れ、水中に投入した。尿はカテーテルを通して3~5時間吸引し、約500~1000 μL の尿を氷上の遠心管で回収した。最初の30分間で採取した尿は体腔液の混入を防ぐために廃棄した。採取した尿サンプルの10 μL はインドフェノールアッセイ (Tetra Test Ammonia Reagent, Tetra, Blacksburg, VA, USA) に用い、アンモニアの含有を検証することで採取したサンプルが尿であることを確かめた。採取した尿は -30°C で保存した。曝露実験前に100 μL を超純水で150倍希釈し、希釈した尿15 mLを曝露した(槽内で希釈倍率30000倍)。

曝露と切片作製

シクリッドは曝露前日に隔離され、絶食させた(図2C)。翌日、シクリッドは遮光された曝露用の水槽(30 cm \times 11 cm \times 9 cm, 3 L)に移された。水槽の一端からは脱塩素水が流入し、反対側から流出した。1.5~3時間後、水の流入を一時的に停止し、ペリスタポンプ(SJ-1211H-H, アトー)を用いて水の流入と同じ端に15 mLの匂い刺激剤を送り込んだ。ネガティブコントロールでは超純水を曝露した。匂い刺激剤は約1分間かけて水槽内に投与され、その後に脱塩素水の流入を再開した。最初期遺伝子(*c-fos*)を発現させるため、曝露後20分間は水槽にシクリッドを留まらせた。その後、シクリッドを5分間氷冷麻酔し、速やかに断頭し、4%パラホルムアルデヒド(PFA, Wako) / リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中でOEを摘出した。摘出したOEは4% PFA/PBS (4°C)で7.5時間固定し、20% sucrose/PBS (4°C)で一晩処理して凍結保護した。さらにO.C.T. compound(サクラファインテック)に包埋し、液体窒素で凍結させた。凍結ブロックはクライオスタットで厚さ10 μm の凍結切片(水平面)を作製し、スライドガラス(MAS-01, 松浪硝子工業)上に載せた。凍結切片は使用するまで -80°C で保存した。

リボプローブの作製

蛍光 *in situ* hybridization (蛍光 ISH) 用のリボプローブは、コーディング領域または非翻訳領域に設計した。各配列は、OE の cDNA から各プライマー (表 1) を用いて Ex-Taq (タカラバイオ) で増幅させた。PCR 産物は pGEM-T (Promega) または pBluescript SKII (-) に DNA Ligation kit (タカラバイオ) を用いてライゲーションし、大腸菌 (DH5 α) でクローニングされた。配列はサンガーシーケンスにより確認された。プラスミドは大腸菌から QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) で抽出し、適切な制限酵素 (Takara) を用いて直鎖化した。さらにこの切断プラスミドを鋳型に DIG または FITC RNA labeling mix (Roche) と、T7、T3 または SP6 RNA polymerase (Roche) を用いて DIG/FITC 標識リボプローブが合成された。

蛍光 *in situ* hybridization (ISH)

単色、または 2 色蛍光 ISH は、(Suzuki *et al.*, 2015) の方法にいくつかの修正を加えて実施した。以下に簡潔に記述する。

単色 ISH の場合、切片をプロテイナーゼ K (5 μ g/mL) で 37 $^{\circ}$ C \cdot 8 分間処理し、DIG 標識リボプローブ (5 ng/ μ g) を 60 $^{\circ}$ C で一晩ハイブリダイゼーションさせた。次に切片を SSC で洗浄し、RNase A/TNE (2 μ g/mL) で 37 $^{\circ}$ C \cdot 30 分間処理し、ストレプトアビジン/ビオチンブロッキングキット (Vector Laboratories)、さらに 1% ブロッキング試薬 (PerkinElmer) /TBS で室温 1 時間ブロッキングした。シグナルはペルオキシダーゼ標識抗 DIG 抗体 (1: 100, 11207733910, Roche) で検出し、TSA Plus Biotin kit (PerkinElmer) でシグナル増幅し、Alexa Fluor 488 標識ストレプトアビジン (1: 200, Thermo Fisher Scientific) で蛍光標識した。切片は Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories 社) で封入した。

2 色 ISH の場合、切片を DIG および FITC 標識リボプローブ (各 2.5 ng/ μ g) と 60 $^{\circ}$ C で一晩ハイブリダイズさせた。DIG 標識リボプローブからのシグナルはペルオキシダーゼ標識

抗 DIG 抗体 (1: 100, 11207733910, Roche) で検出し、TSA Plus DIG kit (PerkinElmer) で増幅し、DyLight 594- conjugated anti-DIG 抗体 (1: 150, DI-7594-.5, Vector Laboratories) で蛍光標識した。次に、FITC 標識リポプローブからのシグナルを抗フルオレセイン-POD Fab fragment (1: 80, 11426346910, Roche) を用いて検出した。DIG に標識されたペルオキシダーゼ活性を 15% H₂O₂/TBS で 30 分間処理することで不活性化させた後、TSA Plus Biotinkit (PerkinElmer) でシグナル増幅して Alexa Fluor 488- conjugated streptavidin (1: 200, Thermo Fisher Scientific) で蛍光標識した。切片は Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories) で封入した。すべての画像は Zeiss Axiocam 503 カラー CCD カメラ (Carl Zeiss) を備えた Zeiss Axioplan SP 蛍光顕微鏡を用いて取得された。画像は Adobe Photoshop CC を用いてレベル補正、コントラスト調整、擬似カラー化 (DIG シグナルはマゼンタ、FITC シグナルは緑)、そして重ね合わせが行われた。

画像処理

神経活動マーカー遺伝子の決定には、シクリッドに餌抽出物を曝露し、30 分後に OE を摘出して 1 色 ISH を行い、陽性細胞の増加が最も大きく、信号強度が最も高い初期のマーカー遺伝子を探した。陽性の判定には、先行研究で報告されている OSN の典型的な形状 (Hamdani and Døving, 2007; Ahuja *et al.*, 2015; Wakisaka *et al.*, 2017) を参照基準として用いた。また、*c-fos* 陽性 (*c-fos*⁺) については輝度値が 85 を超えるシグナルを陽性とした。単色 ISH、2 色 ISH ともに、個体あたりの切片数、個体数は図の凡例に記載した。神経細胞数の正規化に用いた面積は、OE 切片の DAPI 像から測定した。両方の遺伝子が同じ位置で陽性と判断され、同じ細胞の形状をしていると判断された場合に二重陽性とみなした。これらの手順は、すべて Adobe Photoshop CC を用いて行った。統計解析は、図の凡例に示すように Tukey-Kramer 多重比較、Welch の t 検定、Student の t 検定および分散の等質性の F 検定を用いた。

有意性は $p \leq 0.05$ で決定した。

系統樹作成

真骨魚 6 種（シクリッド [*Haplochromis chilotes*], ゼブラフィッシュ [*Danio rerio*], タイセイヨウサケ [*Salmo salar*], トゲウオ [*Gasterosteus aculeatus*], トラフグ [*Takifugu rubripes*], ミドリフグ [*Tetraodon nigroviridis*], メダカ [*Oryzias latipes*]) のすべてのアミノ酸配列は (Nikaido *et al.*, 2013) で取得された配列を用いた。配列は MAFFT7 (Katoh and Standley, 2013) でアラインメントされ、RAxML-NG (Kozlov *et al.*, 2019) の PROTGTR+G+I モデル、ブートストラップ試行回数 100 回で最尤系統樹が作成された。

結果

シクリッドの *c-fos* 遺伝子は神経活動マーカーとして有用

はじめにシクリッドに餌抽出物を曝露し、OE において 5 つの最初期遺伝子 *c-fos*, *egr1*, *c-jun*, *fra1*, *junb* の発現上昇を ISH によって評価し、シクリッドの OE における最適な神経活動マーカーを決定した。その結果、*c-fos* で最も大きくシグナル強度の上昇と陽性細胞数の増加が見られたため、*c-fos* をシクリッド OE に最も適した神経活動マーカーとして決定した (図 3A)。次にシクリッドの OE における *c-fos* の発現上昇を定量的に評価するため、食物抽出液の曝露後の時間 (曝露から氷冷麻酔までの時間; コントロール, 10/20/30 分; 図 3B,C; 表 2) に応じて *c-fos*⁺ 細胞の数が増加するかどうかを検証した。各個体から垂直 z 軸の上から下までの 5 等分して各区間からランダムに選んだ 5 枚の切片における *c-fos*⁺ 細胞数の総数を比較したところ、曝露後 20 分、30 分での数がコントロールに比べて有意に多かった (3 個体; $p=0.014$, $p=0.020$; Tukey-Kramer test; 図 3B; 表 3)。そこで以降の実験では曝露

から氷冷麻酔までの時間を 20 分とした。

微絨毛細胞における *c-fos* の発現

次に微絨毛細胞のリガンド応答を検証した。いくつかの真骨魚では微絨毛細胞がアミノ酸に応答することが知られている(Sato and Suzuki, 2001; Hansen *et al.*, 2003; Sato and Sorensen, 2018)。微絨毛細胞では *V2R* が発現しており (図 4A)、*V2R* 受容体も同様にアミノ酸を受容することが示唆されている (Koide *et al.*, 2009; DeMaria *et al.*, 2013)。ここでは上述した *c-fos* の発現を用いた手法が OSN のリガンド選択性の評価に有用であるかを検証するため、アミノ酸混合物 (20 種のタンパク質構成アミノ酸, 終濃度: 各 2 μM) と、アミノ酸に富んだ餌抽出物 (終濃度: 15,000 倍希釈) に対する微絨毛細胞の *c-fos* 発現を評価した。また、シクリッドのオス尿 (終濃度: 6000 倍希釈) と抱合ステロイド混合物 (DHEA-s, E2-17g, E2-3,17s, 終濃度: 各 33 nM) に対する *c-fos* 発現を評価した。尿はシクリッドにおけるフェロモンの主な供給源と考えられており (Maruska and Fernald, 2012; Keller-Costa *et al.*, 2014)、抱合ステロイドはシクリッドのフェロモンの候補として知られる (Miranda *et al.*, 2005; Keller-Costa *et al.*, 2014)。特に試験に用いた 3 つの抱合ステロイドは東アフリカ産シクリッド *Astatotilapia burtoni* においてそれぞれが別々の受容体によって検出されることが報告されている (Cole and Stacey, 2006)。まず、上記 4 種の匂い刺激物への曝露によって *c-fos*⁺ 細胞の数がコントロールと比較して優位に増加することを確認した (4 個体; それぞれ $p=0.047$, $p=0.035$, $p=0.024$, $p=0.043$; Welch の *t* 検定、図 5A, B; 表 2 および表 3)。次に各匂い刺激物質の検出に対する微絨毛細胞の寄与を評価するために *c-fos*⁺ 細胞の中で *Trpc2*⁺ (微絨毛細胞のマーカ一遺伝子) の割合を算出した (図 5C, 各 4 個体)。*c-fos*⁺ 細胞中での *Trpc2*⁺ の割合はアミノ酸混合物曝露時に最も高くなり (55 \pm 8.8%)、シクリッドオス尿と (35 \pm 5.7%) 抱合ステロイド混合物曝露時 (24 \pm 3.0%) よりも有意に高かった (それぞれ $p=0.0080$, $p=6.1\times 10^{-4}$; student's

t 検定; 図 5C; 表 2、表 3)。また、餌抽出物の曝露時にも割合が高くなった ($48 \pm 11\%$; 図 5C; 表 2)。一方で抱合ステロイド混合物の曝露時に最も割合が低く、アミノ酸混合物、餌抽出物、シクリッドのオス尿曝露時と比較して有意に低かった (それぞれ $p=6.1 \times 10^{-4}$, $p=0.0095$, $p=0.022$; 図 5C; 表 3)。さらに OSN のもう一つの主要な細胞種である繊毛細胞 (図 6C; Jones and Reed, 1989; Koide *et al.*, 2009) の匂い刺激物に対する *c-fos* 発現 (各 1 個体) を繊毛細胞のマーカー遺伝子である *Golf2* を用いて評価した。その結果、微繊毛細胞とは対照的に *c-fos*⁺ 細胞の中で *Golf2*⁺ の割合は抱合ステロイド混合物曝露時に最も高く (67%)、アミノ酸混合物 (42%) 及び餌抽出物曝露時 (41%) には他の処理 (シクリッドのオス尿で 58%) と比較して低くなり、水では 29%であった (図 6A, B; 表 2)。

アミノ酸曝露に対する V2R 陽性細胞の *c-fos* 発現

東アフリカ産シクリッドでは V2R 多重遺伝子族の系統特異的な拡大を経験したことによって少なくとも 61 個のインタクトな V2R 遺伝子を保有しており、これは真骨魚の中で最大級のレパートリーである (Nikaido *et al.*, 2013)。この V2R 遺伝子数の拡大が識別可能な匂いの拡大につながり、シクリッドの多様化に貢献したと予想される。シクリッドにはこれまでに真骨魚で同定された 16 の V2R サブファミリーのうち 13 が存在する (Hashiguchi and Nishida, 2006) (図 7)。これら 13 の V2R サブファミリーのうち、特に 4 つのサブファミリー (4、8、14、16) はタンDEM重複によってコピー数が拡大している。ここではこれら拡大した 4 つのサブファミリー (4、8、14、16) に加え、拡大していないシングルコピーのサブファミリーとして 2-1、7-1 について、アミノ酸混合物 (20 種のタンパク質構成アミノ酸, 終濃度: 各 $2 \mu\text{M}$) 曝露による *c-fos* 発現を評価した (図 8A, B; 表 2)。各サブファミリーのリポプローブはサブファミリーに含まれるすべてのコピー遺伝子に対して 80%以上の相同性をもつように設計した。あらかじめこれらの 4 つのサブファミリーはお互いに共局在しな

いことを確認した (図 4C)。V2R⁺ 細胞のリガンド応答率は V2R⁺ 細胞の中で *c-fos*⁺ の割合として算出した。その結果、魚類は V2R 受容体を介してアミノ酸を検出するという仮説を裏付けるように V2R⁺ 細胞の多くがアミノ酸に応答した (図 8A, B; 表 2)。V2R サブファミリー 14 と 16 (V2R *sub. 14, sub. 16*) の発現細胞では比較的大きな割合が応答し (28%/16%)、V2R 2-1, V2R 7-1 の発現細胞では 8.8%の神経が応答した。一方で V2R *sub. 4* と *sub. 8* では、ごく一部の発現神経しかアミノ酸に応答していなかった (3.6%/0.9%)。

V2R *sub. 14*⁺ と *sub. 16*⁺ 細胞がどのアミノ酸を受容しているかを調べるためにタンパク質構成アミノ酸 20 種を 4 つのグループ — A: 非極性または中性アミノ酸 (Gly, Ala, Ser, Pro, Thr)、B: 芳香族またはカルバミン酸 (Phe, Tyr, Trp, His, Asn, Gln)、C: 分岐または含硫アミノ酸 (Val, Ile, Leu, Met, Cys)、D: 荷電アミノ酸 (Arg, Lys, Asp, Glu) (最終濃度: それぞれ 2 μM) に分けてリガンド応答を検証した。このグループ分けはゼブラフィッシュのアミノ酸に対する電気応答パターンのクラスタリング解析にもとづいている (Friedrich and Korsching, 1997)。V2R *sub. 14*⁺ 細胞は荷電性アミノ酸を含むアミノ酸 D 群に最も高い応答率で強く応答した (16%; 図 8C,D; 表 2)。V2R *sub. 14*⁺ 細胞は他のアミノ酸群にも応答したが D 群と比較すると低かった (コントロール: 0.9%、A: 2.3%、B: 4.0%、C: 3.9%、図 8C,D)。一方、V2R *sub. 16*⁺ 細胞は、分岐アミノ酸や含硫アミノ酸を含む C 群に最も高い割合で応答した (対照: 0.12%、A: 2.9%、B: 2.8%、C: 9.2%、D: 4.7%; 図 9A, B, 表 2)。

V2R *sub. 14*⁺ 細胞の応答を引き起こしたアミノ酸をさらに絞り込むために、D 群の 4 つのアミノ酸 (終濃度: 10 μM) をそれぞれシクリッドに曝露したところ、V2R *sub. 14*⁺ 細胞は塩基性アミノ酸、特にアルギニンに高い応答率を示した (アルギニン: 46%、リジン: 26%、グルタミン酸: 0.33%、アスパラギン酸: 0.87%、図 8E, F)。さらに、V2R *sub. 14* に属する 2 つの受容体 (14-1, 14-2) のアルギニンに対するリガンド応答率を検証した (図 8G, H)。その結果これら 2 つの受容体のアルギニンに対する応答率は、それぞれ 14-1 が 0%、14-2 が 28%

と大きく異なっていた (図 8G, H)。

また、*V2R sub. 16* に属する 3 つの受容体 (16-1, 16-3, 16-6) の C 群アミノ酸に対するリガンド応答率を調べた。しかし、いずれの受容体においても受容体と *c-fos* の共局在は観察されなかった (図 9C、表 2)。これは *V2R* サブファミリー 16 のうち 16-1/3/6 以外の *V2R* を発現する OSN においてアミノ酸 C 群を受容していることが示唆される。

また、アミノ酸にあまり反応しない *V2R* サブファミリーが社会行動等に関与している可能性を検討するため、4 つのサブファミリーの *V2R*⁺ 細胞 (各 1 個体) のシクリッドのオスの尿に対するリガンド応答率を検証した。しかし、オスの尿に反応した *V2R*⁺ 細胞はいずれのサブファミリーにおいても少数であった (sub. 4: 1.5%, sub. 8: 1.7%, sub. 14: 1.6%, sub. 16: 1.0%; 図 10A, B)。

V1R 陽性細胞の *c-fos* 発現

最後に、*V1R*⁺ 細胞の匂いに対するリガンド応答を評価した。ゼブラフィッシュの *V1R* 受容体は 4HPAA と胆汁酸類を受容することが報告されている (Behrens *et al.*, 2014; Cong *et al.*, 2019) が、その機能は依然として不明である。まず 6 つすべての *V1R* のプローブの混合を用いて 4 つの匂い刺激物—アミノ酸混合物 (20 種のタンパク質構成アミノ酸, 終濃度: 各 2 μ M)、餌抽出物 (終濃度: 15,000 倍希釈)、シクリッドのオス尿 (終濃度: 6000 倍希釈)、抱合ステロイド混合物 (DHEA-s, E2-17g, E2-3,17s, 終濃度: 各 33 nM) —に対する *V1R*⁺ 細胞のリガンド応答を評価した (図 11A-C; 表 2)。*V1R*⁺ 細胞はシクリッドのオス尿に最も高いリガンド応答率を示し (16 \pm 5.7%; 図 11A,B)、コントロールよりも有意に高かった ($p=0.038$; Tukey-Kramer test; 表 3)。一方、アミノ酸混合物 (5.5 \pm 1.3%)、餌抽出物 (5.5 \pm 2.8%)、抱合ステロイド混合物 (4.3 \pm 3.4%) に反応した *V1R*⁺ 細胞はオス尿と比較すると少数で、コントロールと有意差はなかった。さらに、オス尿に曝露したときの *c-fos*⁺ 細胞中で *V1R*⁺ の割合

はコントロールと比較して有意な差はなかったが ($p = 0.067$)、アミノ酸混合物、餌抽出物および抱合ステロイド混合物の曝露時よりは有意に高かった(図 11A, C; それぞれ $p = 0.026$, $p = 0.030$, $p = 0.028$; Tukey-Kramer test; 表 3)。さらに 6 つの *VIR* のそれぞれについてオス尿に対するリガンド応答を評価したところ、*VIR2/ORAI*⁺ 細胞と *VIR5/ORAI*⁺ 細胞でリガンド応答がみられた (それぞれ 33%、40%; 図 11D-G; 表 2)。

考察

シクリッド嗅神経細胞のリガンド応答は *c-fos* のリボプローブを用いた ISH によって評価が可能

本研究では匂いに対するシクリッド OSN の神経応答を評価するために *c-fos* のリボプローブを用いた ISH を実施した。*c-fos* のような最初期遺伝子は有用な神経活動マーカーとして真骨魚で活用されている(Okuyama *et al.*, 2011; Kress and Wullimann, 2012; Hussain *et al.*, 2013; Yabuki *et al.*, 2016)。シクリッドでは *c-fos* (Butler and Maruska, 2016; Field and Maruska, 2017) と *egr1* (Burmeister and Fernald, 2005; Burmeister, Jarvis and Fernald, 2005) がともに脳の神経活動マーカーとして用いられていることが報告されているが、OE では *c-fos* のみで餌抽出物曝露後に発現細胞が有意に増加し、シグナルが増強した。また、シクリッドの *Trpc2*⁺ 細胞と *V2R*⁺ 細胞の多くがアミノ酸に反応し、これは他の真骨魚での先行研究を支持している (Sato and Suzuki, 2001; Hansen *et al.*, 2003; Koide *et al.*, 2009; DeMaria *et al.*, 2013; Sato and Sorensen, 2018)。一方、アミノ酸に曝露したとき *c-fos*⁺ 細胞の 41%は *Trpc2* 陰性であり (図 5C)、42%は *Golf2*⁺ であることから (図 6B)、繊毛細胞もアミノ酸に応答していることが示唆された。これは、ニジマス、アメリカナマズ、キンギョで実施された電気生理学的研究 (Sato and Suzuki, 2001; Hansen *et al.*, 2003; Sato and Sorensen, 2018) と一致している。これらの

結果は匂い曝露による *c-fos* の発現上昇が適切に検出されていることを示唆している。

V2R *sub. 14*⁺および *sub. 16*⁺ 細胞の多くが大部分はタンパク質構成アミノ酸に応答したのに対し、V2R *sub. 4*⁺および *sub. 8*⁺ 細胞は少数しか応答しなかった。このことは V2R *sub. 4* や *sub. 8* 受容体 は非タンパク質構成アミノ酸やペプチドなどの他の化合物を受容していることを示唆している。他の真骨魚ではサケで非タンパク質性アミノ酸であるキヌレニンが性フェロモンとして受容されることや (Yambe *et al.*, 2006)、トゲウオやゼブラフィッシュで 9-mer の MHC ペプチドを OE で受容すること (Milinski *et al.*, 2005; Hinz, Namekawa, *et al.*, 2013) が報告されている。ペプチドなどは種特異的なシグナルとして有用であると考えられ、V2R *sub. 4* と *sub. 16* のように魚類の複数の系統で独立して多様化しているサブファミリーで受容される可能性が考えられる。実際 V2R *sub. 4* はタンパク質構成アミノ酸にわずかししか応答せず、*sub. 16* を構成する受容体の少なくとも 3 つの受容体ではタンパク質構成アミノ酸に応答しなかった (図 8B; 図 9C)。

V2R 遺伝子の重複がシクリッドの受容できる匂い物質の増加につながったことを示唆

また、*sub. 14* に属する 2 つの V2R 受容体のうち、アルギニンに受容性を示すのは片方だけであることも明らかとなった (図 8G,H)。さらに *sub. 16* の V2R 受容体全体ではアミノ酸 C 群にリガンド応答を示したが、少なくとも *sub. 16* に属する 3 つの V2R 受容体では応答が見られなかった (図 9C)。このようにコピー数が拡大した V2R サブファミリーでリガンド選択性が異なり、V2R のコピー数の拡大が検出可能な匂いの拡大につながったことが示唆された。先行研究においてもリガンド選択性に関係すると予測される残基 (Luu *et al.*, 2004; Alioto and Ngai, 2006) が、シクリッドで特異的にコピー数が増加した V2R サブファミリーにおいて他の真骨魚と比較して多様であるという知見からもこの仮説は支持される (Nikaido *et al.*, 2013)。この仮説をさらに検証するためには、アミノ酸と V2R の組み合わせ

を追加して検証する必要がある。

嗅上皮におけるシクリッド尿中物質の検出

これまで尿に対する嗅覚応答は真骨魚において電気生理学的研究によって示されてきた (Sato and Suzuki, 2001; Frade *et al.*, 2002; Keller-Costa *et al.*, 2016; Fatsini *et al.*, 2017)。本研究では、*c-fos* の発現を用いて尿に対する OSN の応答を評価した。その結果、シクリッドのオス尿の曝露により誘導された *c-fos*⁺ 細胞の 35% は微絨毛細胞 (*Trpc2*⁺)、58% は繊毛細胞 (*Golf2*⁺)、0% は crypt 細胞 (*V1R4/OR4A4*⁺) であることが判明した。尿の検出に繊毛細胞が最も寄与することはニジマスにおける繊毛細胞の尿に対する応答を示した電気生理学的研究からも支持される (Sato and Suzuki, 2001)。キンギョでは繊毛細胞が抱合ステロイドを検出することを考えると (Sato and Sorensen, 2018)、シクリッドのオス尿による繊毛細胞のリガンド応答は尿に含まれる抱合ステロイドに起因していた可能性が考えられる。

さらに、*V1R*⁺ 細胞の 15.8% がシクリッドのオス尿に反応した。少なくとも *V1R2* は *Trpc2* と共局在していることから (図 4B)、尿に反応する微絨毛細胞の一部には *V1R*⁺ 細胞が含まれている可能性がある。しかし、*V1R*⁺ 細胞の集団は *V2R*⁺ 細胞の集団よりもはるかに小さく、オス尿に曝露したときの *c-fos*⁺ 細胞中で *V1R*⁺ の割合は 5.8% であったため (図 11C)、*V2R*⁺ 細胞もオス尿に反応していると考えられる。検証に用いた 4 つの *V2R* サブファミリーではオス尿に反応が見られなかったが (図 10A,B)、他のサブファミリーの *V2R* が反応していた可能性がある。実際、ニジマスやティラピアの尿には、ミリモル単位のアミノ酸濃度が含まれていることが知られており (Sato and Suzuki, 2001; Kutsyna *et al.*, 2016)、尿中のアミノ酸等を *V2R* 受容体が受容していることが示唆される。

6 つの *V1R* 受容体のうち、*V1R2(ORA1)*⁺ と *V1R5(ORA5)*⁺ 細胞においてシクリッドのオス尿に対して反応が見られた (図 11D-G)。*V1R2* と *V1R5* 以外では反応が見られなかったが、

メス尿や糞など他の匂い源に対する反応を担っている可能性がある。また、9%の *VIR*⁺ 細胞が餌抽出物に反応したことから、それらが食物の探索に使われている可能性や、代謝された尿中から排出された餌の代謝物の受容に使われている可能性が考えられる(図 11B)。*VIR2* は他の *VIR* と比較して、OE における発現細胞数が多く、尿の検出に特に重要であることが示唆される。以前の研究ではゼブラフィッシュの *V1R2* 受容体のアゴニストである 4HPAA の曝露がゼブラフィッシュの産卵を誘発すること(Behrens *et al.*, 2014)や、*VIR2* が魚類間でよく保存されていること(Saraiva and Korsching, 2007)から基盤的な機能を持つ可能性が考えられる。

結論

以上より、(1) 匂い曝露により *c-fos*⁺ 細胞の数が増加すること、(2) 微絨毛細胞がアミノ酸と餌抽出物に応答し、これはゼブラフィッシュで行われた先行研究と一致していることから *c-fos* リボプローブを用いた ISH が、シクリッド OSN の匂い物質によるリガンド応答を評価するのに有用であることを示した。また、(3) *V2R* サブファミリーごとにアミノ酸に対する応答性が異なること、(4) *V2R* sub. 14 に属する 2 受容体間でアルギニンに対する応答性に差があることを示し、シクリッドにおいて *V2R* の重複が検出可能な匂い物質の拡大につながった可能性を示唆した。さらに、(5) シクリッドから尿を非致死的に採取する方法を確立し、(6) *VIR*⁺ 細胞 (特に *V1R2*、*V1R5*) を含む様々な OSN がシクリッドのオス尿に応答することを明らかにした。本研究の結果は、シクリッドの OSN における匂い物質に対するリガンド特異性を検証するものであり、この極めて生物多様性に富んだ魚種における適応放散に対する嗅覚の寄与を実験的に明らかにしていくと予想される。

第3章 シクリッド V1R2 のアリル間のリガンド分化の検証

背景

多くの生物は視覚・化学情報に基づいて同種を認知し、選択的に交配する。これによって異種間交雑が防がれ、種の多様性が維持される。化学情報に基づいた選択的交配ではフェロモンが大きな役割を果たす。哺乳類や両生類、爬虫類などの陸上脊椎動物のフェロモン受容体としては I 型鋤鼻受容体 (Dulac and Axel, 1995) や II 型鋤鼻受容体 (Herrada and Dulac, 1997) が知られている (Boschat *et al.*, 2002; Del Punta *et al.*, 2002; Loconto *et al.*, 2003)。多くの陸上脊椎動物において鋤鼻器で発現する V1R 受容体や V2R 受容体がフェロモンを受容するとシグナルは副嗅球の糸球体を通じて高次中枢神経に投射され、交尾や縄張り行動などの配偶行動や、様々な神経内分泌の変化を誘導する。V1R 遺伝子や V2R 遺伝子は種ごとに大きく数やレパートリーが異なっており、種ごとに異なって分泌されるフェロモンの混ぜ合わせを受容すること (Sorensen, Christensen and Stacey, 1998; Malnic *et al.*, 1999) で種特異的な応答を誘導することができる。V1R 遺伝子は特に哺乳類で遺伝子コピーの重複と喪失を繰り返しており、種ごとに数やレパートリーが大きく異なる (Grus *et al.*, 2005; Nikaido, 2019)。例えばマウスやラットはインタクトな V1R 遺伝子を 239・108 個持つのに対し (Young *et al.*, 2010)、イヌはわずか 8 個しか持たず (Young *et al.*, 2005)、コウモリやイルカなどは 1 つも持たないことが知られている。そのことから哺乳類では V1R 遺伝子が種特異的なフェロモン応答に大きく貢献していると予想される。

一方で魚類ではほとんどの種で V1R 遺伝子 (真骨魚においては ORA 遺伝子とも) をわずか 6 コピーしか有しない (Saraiva and Korsching, 2007)。魚類 V1R 遺伝子は極めて保存的で魚類約 2 万種のほぼ全てで同じ 6 コピーが共有されており、V1R2 遺伝子や、V1R3/V1R4 の共通祖先遺伝子のオーソログは軟骨魚やヤツメウナギでも見つかる (Grus *et al.*, 2005)。この

ことから魚類 *VIR* 遺伝子は種間で共通した基盤的な機能を担っていると考えられるが、陸上脊椎動物のようにフェロモン受容体を担っているかどうかは明らかにされていない。唯一、*V1R2* 受容体については、アゴニストである 4-ヒドロキシフェニル酢酸 (4HPAA) がゼブラフィッシュの産卵を促すことが報告されていることからフェロモン受容体であることが示唆されている (Behrens *et al.*, 2014)。また、オスのシクリッドの尿中に *V1R2* 受容体のリガンドが含まれることも示唆されている (Kawamura and Nikaido, 2022)。さらに魚類 *V1R2* 遺伝子は陸上脊椎動物の *VIR* 遺伝子ファミリーの共通祖先遺伝子であることが明らかにされている (Nikaido, 2019)。これは魚類 *V1R2* 受容体が陸上脊椎動物がもつ複雑なフェロモン受容システムの起源的な機能を担っていることを示唆している。

筆者の所属研究室は東アフリカのシクリッドの *VIR* 遺伝子に対して分子系統解析を実施し、複数の *VIR* 遺伝子に大きく配列の異なる多型が存在することを明らかにした (Nikaido *et al.*, 2014)。特に東アフリカの湖全域で見つかる *V1R2* 遺伝子の 2 種類のアリル、clade I と clade II は約 14 アミノ酸も異なり、祖先的なアリルである clade I から clade II が分岐する枝では正の自然選択が検出された ($dN/dS = 6.24$) (図 12A, B)。さらにアミノ酸置換の多くが推定上のリガンド結合部位に近接しており (図 12C)、アリル間で異なるリガンドを受容することが示唆される。

V1R2 のように長期間固定されずに維持され続けている変異は standing genetic variation (SGV) と呼ばれ、東アフリカ産シクリッドのゲノム上で数多く発見されている (Brawand *et al.*, 2014; Svardal *et al.*, 2020; Nakamura *et al.*, 2021)。SGV は環境変化などの際に有益なアリルの急速な固定を可能にする (Hermisson and Pennings, 2005; Barrett and Schluter, 2008)。実際に視覚受容体である LWS オプシンの SGV は環境に応じて異なって固定されることでヴィクトリア湖産シクリッドの種分化を引き起こしている (Seehausen *et al.*, 2008)。さらに交雑による LWS の SGV の再生と、分断選択による種分化を何度も繰り返していることも示唆され

ており(Meier *et al.*, 2017, 2018)、SGV がシクリッドの多様性創出に大きく寄与していると示唆される。すなわち *VIR2* 遺伝子の多型は異なるフェロモンを受容することでシクリッドの選択的交配・種分化を引き起こすと仮説が立てられる (図 13)。

シクリッドは他の魚類と同様に尿中からフェロモンを排出すると考えられている (Keller-Costa, Canário and Hubbard, 2015)。例えば *Astatotilapia burtoni* のオスはメスが飼育されていた水に曝すことで求愛行動を開始したり、排卵期のメスと出会うことで排尿の頻度を高くしたりすることが知られている (de Caprona, 1974; Maruska and Fernald, 2012)。また、マラウイ湖のシクリッド *Pseudotropheus emmiltos* と *P. fainzilberi* では嗅覚を用いて同種を認知し、交配する (Plenderleith *et al.*, 2005)。さらにモザンビークティラピアのオスはメスの尿中の匂いから性成熟段階を推定し (Miranda *et al.*, 2005)、そのメスはオスの尿中に含まれるグルクロン酸抱合ステロイドに曝されることで成熟誘起ステロイドホルモン 17,20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (17,20 β -P) の放出する (Keller-Costa *et al.*, 2014)。抱合ステロイドは魚類においてホルモナルフェロモンとして使われており (Stacey and Sorensen, 2002; Stacey, 2011)、シクリッドでは系統ごとに異なる抱合ステロイドの組み合わせを受容することが知られている (Cole and Stacey, 2006; Keller-Costa, Canário and Hubbard, 2015)。さらにモザンビークティラピアのオスのヒエラルキーによって尿中のアミノ酸濃度が変化することも報告されている (Kutsyna *et al.*, 2016)。行動面においても、三大湖の多くのシクリッドでは交配行動においてお互いの総排泄腔に鼻を近づけて匂いを嗅ぐような行動が観察される。このサークリングと呼ばれる配偶行動において産卵→卵の口内への回収→放精という工程を 2 匹で回りながら繰り返す (図 14A)。その工程の中でオスとメスはお互いの総排泄腔に鼻を近づけ、尿中の匂いを嗅ぐような行動が観察される。メスがオスの総排泄腔に近づく際にはオスが放精し、メスの口内の卵を受精させる。従来の説ではメスがオスの尻ビレにあるエッグスポットと呼ばれる模様を卵と間違えて啜えようとした

結果の行動だとも言われているが、オスでも鼻を総排泄腔に近づける行動が見られることや、エッグスポットを切り取ってしまっても受精が上手く行われること (Theis, Salzburger and Egger, 2012) からお互い尿中のフェロモンを嗅いでいることが示唆される。さらに筆者が行った予備実験ではヴィクトリア湖産シクリッド *H. chilotes* において暴露されたオス尿に誘引される行動も観察された (図 14B)。以上のようにシクリッドにおいてもフェロモンは尿中から排出されると考えられ、V1R2 受容体のリガンドに関しても尿中から排出されることが予想される。

本研究ではヴィクトリア湖のシクリッドを用いてフェロモン受容体候補である V1R2 受容体について、4HPAA の誘導体を中心にリガンド選択性を検証した。シクリッドの抱合ステロイドについては OR 受容体や TAAR 受容体を発現する繊毛細胞で受容される可能性が高く、V1R2 受容体はリガンド応答しないと考えられるため、除外した (Nikaido *et al.*, 2014)。その結果、clade I と clade II のアリル間でリガンド選択性が異なることを示した。また、シクリッドのオスの尿に V1R2 受容体が発現することを示した。さらにシクリッドの尿のメタボローム解析から有力なリガンド候補として 4HPAA の誘導体である 3-ヒドロキシフェニル酢酸 (3HPAA) を特定した。今後、より詳細な解析を行うことでシクリッドの新たな多様性創出メカニズムが解明されることが期待される。

材料・方法

シクリッド

本実験に用いた *Haplochromis chilotes* (Boulenger, 1911) と *Haplochromis sauvagei* (Pfeffer, 1896; Seegers, 2008) は 2018 年に二階堂研究室が中心となってタンザニアのムワンザ湾で実施された野外調査で採集された。魚は 27°C で明時間: 12 時間、暗時間: 12 時間のサイクルで

維持・繁殖させた。6～12 個体（オス 1～3 個体）をプラスチック水槽（40 cm×25 cm×36 cm）で飼育し、1 日 2 回飼料ペレットを与えた。実験条件を揃えるため、明白な婚姻色が見られる成熟したオスのみを実験に使用した。

動物を用いたすべての実験は大学および政府の ARRIVE ガイドラインに従って実施された。

尿採取

尿は成熟したオスとメスのシクリッドから採取した。オスのシクリッドからの尿採取は第 2 章の材料・方法の尿採取（13 ページ）に記載した通りである。メスのシクリッドからの尿採取においてもオスと同様に歯科用根管洗浄プローブ針（28G、490703、B.S.A. サクライ）をカテーテルとして用いた。メス用ではさらに側面の穴のすぐ根本にシリコンの栓を取り付けた（図 14C, D）。このシリコンの栓はひょうたん型をしており、総排泄腔からの脱落と周囲の水の流入を防止する。シリコンは接着剤（アロンアルファ EXTRA 速効性万能型、コニシ）で固定した。その後の工程は第 2 章の材料・方法の尿採取（14 ページ）に記載したとおりである。採取した尿は-30℃で保存した。尿は LC-MS/MS 解析、もしくは暴露実験に用いた。暴露実験前には尿 100 μL を超純水で 150 倍希釈し、希釈した尿 15 mL を暴露した（槽内で希釈倍率 30000 倍）。

匂い刺激剤・曝露・切片作製

4-ヒドロキシフェニル酢酸 (4HPAA)、リトコール酸 (LCA)、2-ヒドロキシフェニル酢酸 (2HPAA)、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (3,4DHPAA)、ホモゲンチジン酸 (HGA)、4-ヒドロキシフェニルエタノール (4HPE)、3-フェニルプロピオン酸 (3PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4HPPyA)、バニリン酸 (VA) は富士フィルム和光純薬および Sigma

Chemical Co.から購入した。4HPAA, 3HPAA, 2HPAA, 4HPE, 3PPA, VA は超純水に溶解し (3 mM)、溶液 10 mL を曝露した (30 μ mol; 槽内の終濃度 10 μ M)。4HPPyA と HGA は DMSO に溶解し (100 mM)、さらに超純水で 3 mM に希釈して溶液 10 mL を曝露した (30 μ mol; 槽内の終濃度 10 μ M)。LCA は、6 mM NaOH 水溶液に溶解し (12 mM)、さらに超純水で 6 mM に希釈して溶液 10 mL を曝露した (60 μ mol; 槽内の終濃度 20 μ M)。シクリッドへの匂い刺激剤の曝露の手順は第 2 章の材料・方法の曝露と切片作製 (15 ページ) に記載したとおりである。

リボプローブの作製と 2 色蛍光 *in situ* hybridization (ISH) と画像

リボプローブ作製の手順は第 2 章の材料・方法のリボプローブの手順 (16 ページ) に記載したとおりである。また 2 色蛍光 ISH の手順は第 2 章の材料・方法の蛍光 *in situ* hybridization (16 ページ) に記載したとおりである。第 3 章の 2 色蛍光 ISH における変更点としては DIG 標識 *c-fos* リボプローブと FITC 標識 *VIR2* リボプローブを用い、*c-fos* で先に染色して (マゼンタ) 次に *VIR2* で染色した (緑)。染色後の処理も 17 ページに記載したとおりの手順で行われた。画像処理も 17 ページに記載した通りである。

LC-MS/MS 解析

LC-MS/MS (液体クロマトグラフィータンデム質量分析) 解析は東京大学の生物化学研究室にて、村田健助教が実施した。装置は Orbitrap LC-MS/MS Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) を用いた。超高速パフォーマンス液体クロマトグラフィー (UPLC) を通過したサンプルはエレクトロスプレー法 (ESI) によって陰イオン化し、四重極型質量分析装置でフィルタリングされて、イオンが検出された。4HPAA やその誘導体の検出を行うために用いた尿 (#23, #24, #25, #30) については尿 700 μ L に 2.5 M-HCl を 12 μ L を加

え、1000 μL の酢酸エチルで3回抽出した。さらに SpeedVacTM (Thermo Fisher Scientific) で乾燥させ、80 μL の蒸留水で溶解してシリンジフィルター 0.22 μm に通過させて 600 μL 相当にあたる 70 μL を LC-MS/MS 解析に用いた (図 18A)。胆汁酸類の検出を行うために用いた尿(#31, #34)については尿 800 μL を限外ろ過 (Amicon Ultra-0.5, PLBC Ultracel, 3 kDa) し、フィルターを通過した画分を固相抽出 (Sep-Pak C18 6 cc Vac Cartridge, 1 g Sorbent per Cartridge, 55-105 μm) に用いた (図 19A)。固相抽出フィルターに残留した画分は PBS 200 μL で溶出して HMW 画分とした。固相抽出はメタノール 10.8 mL でアクティベーションし、超純水 10.8 mL で平衡化して、LMW 画分 800 μL +超純水 1 mL をカラムに通した。超純水 3.6 mL でウォッシュし、アセトニトリル 3.6 mL で溶出した。溶出画分を 120 μL の 25%アセトニトリル/超純水に溶解し、100 μL を LC-MS/MS 解析に用いた。さらにスプリッターを用いて 1:18 に分離し、1 を LCMS 測定、18 を LC-MS 分取として画分実験に用いた。

得られた結果は MS-DIAL(Tsugawa *et al.*, 2015)を用いて解析、アノテーションを用いた。アノテーションには理化学研究所の環境資源科学研究センターが公開しているライブラリ (http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/download/msp/MSMS_Public_ExpBioInsilico_NEG_VS17.msp) を用いた。さらに MS-FINDER(Tsugawa *et al.*, 2016)を用いて化合物同定をおこなった。

進化圧解析

魚類 76 種の *VIR2* 遺伝子のコーディング領域はシクリッドの *VIR2* をクエリーとして TBLASTN 探索によって単離した。*VIR2* 遺伝子のアミノ酸配列を MAFFT7 (Katoh and Standley, 2013) でアラインメントし、tranalign (Rice, Longden and Bleasby, 2000)でコドンアラインメントを取得した。*VIR2* 遺伝子はほぼすべての種で重複しておらずオーソログスの関

係にあるため、系統樹のトポロジーは魚類の系統関係 (Rabosky *et al.*, 2018) から構築した。系統樹上の各枝について、PAML (Yang, 1997) の *codeml* (model = 1, CodonFreq = 0) を用いて進化圧の指標となる dN/dS (ω) を推定し、R のパッケージ GGTREE (Yu *et al.*, 2017) で系統樹 (枝長: 塩基長、色: ω)。さらに clade II が分岐する枝に性の自然選択が働いていることを検定するため、*codeml* (model = 2, CodonFreq = 0) を用いて帰無仮説: 「clade II が分岐する枝の ω がほかの枝の ω と差がない」のもと、尤度比検定をおこなった。上記と同様のことを推定リガンド結合部位でもおこなった。リガンド結合部位は、(Cong *et al.*, 2019)で行われた *in silico* ドッキングモデリングにおいてゼブラフィッシュの VIR5 受容体とリガンド (LCA) の間の距離が 3Å 以内となった残基とその前後 2 残基の領域と定義し、保存されたモチーフをもとに VIR2 と VIR5 をアラインメントして (Cong *et al.*, 2019) VIR2 のリガンド結合部位を決定した。

交配実験

異なる VIR2 の遺伝子型 (clade I, clade II) をもつシクリッド間の選好性を評価するため、3 つに区切った水槽 (図 23A) を用い、交配実験を行った (Plenderleith *et al.*, 2005)。シクリッドは交配においてメスがオスを選択するため、真ん中の区画には clade I か clade II の遺伝子型を持つメスを複数匹入れ、その両隣の区画に入れた clade I のオスと clade II のオスのどちらかを選択できるようにした。区画は匂いが透過するように穴の開いた透明なアクリル板で仕切られており、仕切り越しに交配が行われると卵が底面の網の下に落ちるように設計した。この産み落とされた卵の数でメスの選好性の評価を試みた。本研究にはヴィクトリア湖産のシクリッドであり、clade I と clade II どちらの遺伝子型も存在する種である *Haplochromis sauvagei* を用いた。

結果

clade II は clade I と比較して 4HPAA、LCA に対する応答性が低かった

魚類の *V1R2* 遺伝子は非常に保存的な遺伝子であることから真骨魚全体でリガンド選択性が保存的であることが予想される (Saraiva and Korsching, 2007; Grus and Zhang, 2009)。

実際、条鰭類の *V1R2* の全長、または推定上のリガンド結合部位 (Cong *et al.*, 2019) の dN/dS 解析のどちらにおいてもシクリッドの clade II が分岐する枝やサケ類の枝を除いてほとんどすべての枝で純化選択が働いていると推測された (図 15A, B)。そこでゼブラフィッシュの *V1R2* 受容体が応答することが報告されている 4HPAA と胆汁酸の一種であるリトコール酸 (LCA) (Behrens *et al.*, 2014; Cong *et al.*, 2019) を祖先型アリルである clade I 型の *V1R2* を持つ *Haplochromis chilotes* に曝露して *c-fos* の *in situ* hybridization でリガンド応答を検証をおこなった。その結果、4HPAA と LCA を曝露したどちらの場合においてもコントロール (水) と比較して高いリガンド応答率 (= *V1R2* 陽性細胞中、*c-fos* 陽性である割合) となった (control: $0.32 \pm 0.55\%$; 4HPAA: $32 \pm 0.98\%$ ($P < 0.001$; Student's *t*-test); LCA: 17%; 図 16A-C; 表 4)。これは clade I 型の *V1R2* 受容体が 4HPAA や LCA を受容することを示している。同様に clade II (*Haplochromis sauvagei*) についても 4HPAA に対するリガンド応答を検証したところ、clade I と比較して有意に低いリガンド応答率が得られた ($0 \pm 0\%$ (control), $4.0 \pm 3.3\%$ (4HPAA); $p = 0.0028$; Student's *t*-test; 図 16A, B; 表 5)。また、clade I の場合と異なり、4HPAA でのリガンド応答率はコントロールでのリガンド応答率と比較して有意差はなかった ($p = 0.17$)。同様に LCA に対しても clade I と比較すると低い応答率となった (3.2%; 図 16A, C; 表 5)。これらの結果は clade I と clade II 間でリガンド選択性が異なることを示唆している。

オスの尿中に *V1R2* 受容体のリガンドが存在

次に実際にシクリッドの尿中に *V1R2* 受容体のリガンドが含まれるか検証するため、シク

リッド (clade I, *H. chilotes*)にオスの尿 (100 μ L, 終濃度 30000 倍希釈) を曝露し、V1R2⁺細胞のリガンド応答を検証した。その結果、尿によってリガンド応答率にばらつきがあるもののコントロールと比較して有意に高いリガンド応答率が得られた (39 \pm 23%; p = 0.0024; Student's *t*-test; 図 17A, B)。これはシクリッドのオスの尿中に V1R2 受容体のリガンドが含まれることを示している。

尿中から 4HPAA 誘導体の検出

次に V1R2 受容体のリガンドの候補である 4HPAA がシクリッド尿中に含まれるかを検証するため、LC-MS/MS 解析 (ネガティブモード) を実施した (図 18A)。*H. chilotes* のメス (#23) から採取した尿 600 μ L を解析に用い、4HPAA に対応する m/z = 151.04 でマスクロマトグラムを抽出したところ、複数のピークが得られた (図 18B)。このピークを理化学研究所の環境資源科学研究センターが公開しているライブラリ (http://prime.psc.riken.jp/comps/msdial/download/msp/MSMS_Public_ExpBioInsilico_NEG_VS17.msp) に対してアノテーションを行ったところ、保持時間 21.1 分に 4HPAA がアノテーションされた (ピーク面積: 4.9×10^9 ; 図 18C)。このピークが 4HPAA 由来のものであることを確認するため、4HPAA の標準物質の LC-MS/MS スペクトルと比較したところ、保持時間約 21 分のピークが一致し、MS/MS スペクトルもピークの位置が一致した。この結果から尿の m/z = 151.04、保持時間 21.1 分のピークが 4HPAA であることが確かめられた (図 18D)。また、 m/z = 151.04 のマスクロマトグラムで 4HPAA 以外にも 4HPAA の誘導体である 3-ヒドロキシフェニル酢酸 (3HPAA) や 2-ヒドロキシフェニル酢酸 (2HPAA)、メチルパラベン、バニリンなどもアノテーションされた (ピーク面積: 1.2×10^9 (メチルパラベン), 2.3×10^9 (バニリン), 9.2×10^9 (2HPAA), 5.0×10^{10} (3HPAA); 保持時間 (分) : 24.4 (メチルパラベン), 31.4 (バニリン), 34.3 (2HPAA), 36.4 (3HPAA); 図 18C; 表 6A)。特に 3HPAA は 4HPAA の位置異性体 (メタ、パ

ラ)であるだけでなく、ピーク面積が4HPAAや2HPAAよりも5-10倍高く、尿中から検出された化合物のなかでも5番目にピーク面積が大きかった(表6B)。これは3HPAAが尿中に高濃度で存在することを示唆している。さらに複数の*H.chilotes*の尿30 µL(#23[メス]、#24[オス]、#25[メス-排卵期]、#30[オス])で同様に解析を行ったところ、#24の尿を除いて4HPAA、2HPAA、3HPAAが検出され、3HPAAが特に高濃度で検出された(図18E)。

LCAを尿中から検出

さらにLCA等の胆汁酸類の含有の検証のため、抽出の条件(図19A)を変えて*H. chilotes*の尿800 µL(#31[オス]、#34[オス])とLCAの標準物質のLC-MS/MS解析を行った。その結果、MS/MSスペクトルは取得されなかったが、標準物質と同様に $m/z = 375.29$ 、保持時間約35分にピークが得られた(ピーク面積: 1.1×10^7 (#31), 1.9×10^6 (#34); 図19B, C、表6)。また、LCA以外の胆汁酸としてタウロアロコール酸とケノデオキシコール酸-硫酸がアノテーションされた(ピーク面積: 1.0×10^8 (タウロアロコール酸, #31), 1.6×10^8 (ケノデオキシコール酸, #31); 表6)。

尿画分に対するVIR2陽性細胞の応答

#31、#34の尿で行ったLC-MS/MS解析においても3HPAA等の4HPAAの誘導体が検出されるかどうか検証したところ、アノテーションはされなかったが、MS/MSスペクトルから保持時間19.6分のピーク、もしくは保持時間24.7分のピークが3HPAAであることが予想された(ピーク面積: 1.5×10^9 (19.6 min, #31), 1.4×10^9 (24.7 min, #31), 1.1×10^9 (19.6 min, #31), 8.9×10^8 (24.7 min, #31); 図20A, B)。

次に#31、#34の尿を分画し、その画分(100 µL相当、)を*H. chilotes*に曝露して*c-fos*の*in situ hybridization*によってVIR2⁺細胞のリガンド応答を検証した。#31の尿は保持時間5-12

分、12–19分、26–33分、33–40分で分画し、#34の尿は5–12分、12–19分、26–33分、33–40分で分画した。はじめに尿にVIR2のリガンドが含まれることを検証するため、全画分を混ぜて実験し、VIR2⁺細胞がリガンド応答することを確認した(リガンド応答率:72%(#31), 59%(#34); 図20A, 表4)。次にそれぞれの画分でリガンド応答率の検証をおこなった。その結果、どちらの尿においても複数の画分に対してVIR2⁺細胞のリガンド応答が見られた(図20A)。保持時間5–12分の画分はどちらの尿においてもリガンド応答(リガンド応答率:12%(#31), 6.7%(#34))、保持時間12–19分の画分は#34のみリガンド応答(0%(#31), 17%(#34))、3HPAAが含まれることが予想される保持時間19–26分の画分はどちらの尿においてもリガンド応答(17%(#31), 5.7%(#34))、保持時間26–33分の画分は#31においてリガンド応答(15±5.7%, n=3)、LCAが含まれると予想される保持時間33–40分の画分は#31においてリガンド応答が見られ(5.3±7.4%, n=3)、#34の保持時間26–40分の画分はリガンド応答が見られなかった(0%)。限外ろ過によって分けた3kD以上の画分(HMW)にはどちらの尿においてもリガンド応答が見られなかった。

新たなリガンド候補物質である3HPAAのリガンド応答性の違い

尿中に高濃度で存在していた3HPAAについても4HPAAと同様にVIR2受容体によって受容されるかを検証するため、VIR2の種内多型(clade Iとclade II)が存在する*H. sauvagei*に3HPAA(終濃度10 μM)を曝露して*c-fos*の*in situ* hybridizationによってVIR2⁺細胞のリガンド応答を検証した。その結果、祖先的なclade I型ではコントロールと比較して有意に高いリガンド応答率が得られた(43±19%; $p=0.013$; Student's *t*-test; 図21A, B, 表4)。一方でclade II型は3HPAAにリガンド応答せず、clade Iと比較して有意に低いリガンド応答率となった(1.1±0.93%; $p=0.035$; Student's *t*-test; 図21A, B, 表4)。(Nikaido *et al.*, 2013)

4HPAA/3HPAA 誘導体に対するリガンド応答性の違い

さらに詳細に clade I と clade II 型の V1R2 受容体のリガンド選択性を検証するため、チロシンの代謝経路 (Kanehisa and Goto, 2000) に含まれる 4HPAA や 3HPAA の誘導体、2-ヒドロキシフェニル酢酸 (2HPAA)、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (34DHPAA)、ホモゲンチジン酸 (HGA)、4-ヒドロキシフェニルエタノール (4HPE)、3-フェニルプロピオン酸 (3PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4HPPyA)、バニリン酸 (VA) に対する V1R2 発現細胞のリガンド応答を *H. saugei* を用いて *c-fos* の *in situ* hybridization によって検証した (すべて終濃度 10 μ M, 図 22 A, B, 表 4)。その結果、clade I はヒドロキシ基と C2 のカルボキシ基を有する 2HPAA、34DHPAA、HGA にリガンド応答し (リガンド応答率: 24%, 42%, 29%)、この 2 つの残基を持たない 4HPA、3PPA、4HPPyA、VA にはリガンド応答しなかった (0%, 0%, 0%, 0%)。一方で clade II は 2HPAA にのみリガンド応答し、他の誘導体にはほとんどか全くリガンド応答しなかった (22% (2HPAA), 0% (34DHPAA), 1.5% (HGA), 0% (4HPE), 3.1% (3PPA), 0% (4HPPyA), 2.0% (VA))。

考察

3HPAA は祖先型アリルである clade I 型の V1R2 受容体の有力なリガンド候補

c-fos の *in situ* hybridization を用いたリガンド受容の検証によって少なくとも祖先型アリルである clade I 型の *H. chilotes* のオスの尿中には clade I 型の V1R2 受容体のリガンドが含まれることが示唆された。そこで尿中に V1R2 受容体のリガンド候補である 4HPAA が含まれているかどうか尿のメタボローム解析を実施したところ、4HPAA に加え、その誘導体である 3HPAA や 2HPAA も尿中に含まれることが分かった。特に 3HPAA は高濃度で尿中に存在しており、V1R2 発現細胞のリガンド応答も引き起こすことから clade I 型の V1R2 受容体の

有力なリガンド候補であると考えられる。また、3HPAA は 4HPAA と同様にチロシンの代謝産物 (Kanehisa and Goto, 2000) であることから体内での合成が可能である。一方で尿の画分に対するリガンド応答の検証では 3HPAA を含むと考えられる画分を含めて複数の画分に対してリガンド応答が見られた。これは clade I の V1R2 受容体が尿中の複数のリガンドを受容していることを示唆している。実際、全画分の混合には #31 と #34 いずれも画分単体と比較して高いリガンド応答率が得られており (図 20A)、複数のリガンドによる効果が加算されていると予想される。3HPAA 以外のリガンド候補としては 4HPAA や 2HPAA のほか、カルボキシ基とヒドロキシ基を持ち、スペクトルのピーク面積が高かった 3-ヒドロキシ安息香酸や 12-ドデカン酸 (表 6B) が挙げられる。LCA などの胆汁酸類も検出されているが、LCA は 3HPAA とみられるピークと比較するとピーク面積が 100~500 倍低く、リガンド応答率も 3HPAA より低く、またほかに見つかったタウロアロコール酸とケノデオキシコール酸-硫酸などは官能基の種類からリガンド応答を引き起こさないことが予想されるため、リガンド応答への寄与は小さいと考えられる。

これらの検証のために今後の展望としては、生体の情報 (性別、性周期段階、生殖腺重量指数など)・尿やその画分に対するリガンド応答の検証・LC-MS/MS によるメタボローム解析を組み合わせて解析をしていく必要がある。

clade I と clade II はリガンド選択性が異なる可能性

c-fos の *in situ* hybridization を用いたリガンド受容の検証により、シクリッドの V1R2 受容体の 2 種類のアリル、clade I と clade II でリガンド選択性が異なる可能性が示された (図 16, 21, 22、表 7)。祖先型のアリルである clade I 型は幅広い化合物 (4HPAA、3HPAA、2HPAA、34DHPAA、HGA、LCA) にリガンド応答した。これらの化合物の共通点としては (C2 の) カルボキシ基やヒドロキシ基を有していることが挙げられる。この 2 つの官能基を備えて

いない 4HPE と 3PPA はリガンド応答を誘起しなかったことからカルボキシ基とヒドロキシ基は clade I のリガンド応答に重要であることが示唆される。実際、先行研究においても 4HPAA からこの 2 つの官能基のどちらかを変えることでゼブラフィッシュの V1R2 受容体を発現する培養細胞の応答が弱くなり、EC₅₀ は高くなった (Behrens *et al.*, 2014)。また、4HPPyA と VA がリガンド応答しなかったことからこの 2 つの官能基の近くにメトキシ基やカルボニル基にあることでリガンドの受容が阻害されることが示唆され、これも Behrens *et al.*, 2014 で同様のことが報告されている。一方でゼブラフィッシュと同様 (Cong *et al.*, 2019) にステロイド骨格をもつ LCA にもリガンド応答していることからリガンドがベンゼン骨格であることやステロイド骨格であることは重要ではないことが示唆される。上述のようにゼブラフィッシュの V1R2 受容体とシクリッドの祖先型アシルである clade I 型の V1R2 受容体のリガンド選択性は類似していることから同じリガンドの受容に利用されていることが予想される。実際、真骨魚全体で V1R2 遺伝子は保存的であり、遺伝子全体も推定上のリガンド結合部位 (Cong *et al.*, 2019) も dN/dS 値が低い (図 15A, B)。また、本研究では複数の化合物にリガンド応答したことから clade I 型はリガンド選択性が厳密ではなく、複数のリガンドを受容する可能性がある。実際、clade I-V1R2 発現細胞は複数の保持時間の尿分画に応答していた (図 20A)。しかし、V1R2 遺伝子が真骨魚全体で保存的で推定上リガンド結合部位も保存的であることはリガンドと受容体の厳密な 1:1 対応を示唆しており、また本研究では検証した化合物の数が少なく、リガンド応答の定量を実施していないことから特異的に低濃度で強くリガンド応答を誘起する化合物が存在する可能性があり、今後さらなる検証が不可欠である。

一方で clade II 型の V1R2 は 2HPAA にのみリガンド応答した。そのことから clade II ではカルボキシ基とヒドロキシ基の相対的な位置関係の選択性がより厳密になったことが示唆される。また、ベンゼン環のパラ位やメタ位が開いていることが必要である可能性も考えら

れる。clade I と同様にカルボキシ基、ヒドロキシ基と相互作用すると推測される残基 (R61^{2.57} と、A184^{5.42} もしくは D189^{5.47}) (Cong *et al.*, 2019) は保存されていることからカルボキシ基とヒドロキシ基は受容されるのに必要なことが予想される。

本研究により clade II 型の V1R2 受容体は clade I 型とリガンド選択性が異なる可能性は示されたが、リガンド選択性の違いを解明するにはより広範な化合物での検証や定量解析が必要である。具体的にはより 4HPAA や 3HPAA の誘導体に関してより広範に検証するほか、尿中から高濃度で検出されたヒドロキシ基とカルボキシ基を持つがベンゼン骨格を持たない化合物、さらには 2 つの官能基を兼ね備えない化合物についても検証する必要がある。

V1R2 のリガンド分化がもたらすのは？

尿中の化合物に応答したことから、V1R2 受容体は性周期の同調、性行動の誘起、他個体のステータス (性周期段階、ヒエラルキー) の推定など、フェロモン受容体様の機能が予想される。尿中の餌の匂いに応答している可能性も考えられるが V1R2 が魚類全体で保存された遺伝子であることから可能性は低いと考えられる。V1R2 受容体の機能の解明は今後の課題の一つである (リガンド曝露における行動解析、血中ホルモン測定、リガンド曝露における脳における *c-fos* 発現解析など)。V1R2 受容体がフェロモンの受容を担っている場合、V1R2 とそのリガンドの分化によって選択的交配が生じる可能性が考えられる。しかし、受容体とリガンドの分化は同時に起こらなければ V1R2 受容体の機能が損なわれ、不適応になる。これを解決する説明の一つとしては、V1R2 と、リガンド産生に関わる領域が連鎖している場合が挙げられる。しかし、そのような連鎖する領域はこれまで見つかっておらず、また V1R2 の種内多型を持つヴィクトリア湖産シクリッドで Hardy-Weinberg 平衡から著しく逸脱しておらず、ヘテロ接合体の適応度が低下しないことを示唆していること (Nikaido *et al.*, 2014) から可能性は低いと考えられる。もう一つの説明は V1R2 受容体がリガンドを

受容できなくても影響が小さい場合が挙げられる。例えばもともと尿中の複数のリガンドを幅広く受容していた祖先型の clade I の V1R2 が、派生型の clade II になるともともと受容できた特定のリガンドの受容に特化、clade I のリガンド選択性と clade II のリガンド選択性が一部重なって尿中のリガンドを変わず受容できる場合である。この場合、受容体が変化しても尿中のリガンドを受容できるため、機能が損なわれる度合いは小さい。ほかの例としては V1R2 受容体が嗅覚を介した刷り込みに寄与している場合である。この場合、V1R2 受容体が尿中リガンドを受容できなくなっても刷り込みに寄与するほかの嗅覚受容体によって刷り込みが行われるため、直ちに不適応になることはない。嗅覚を介した刷り込みはサケやゼブラフィッシュで知られており (Hasler and Wisby, 1951; Dittman and Quinn, 1996; Gerlach *et al.*, 2008; Hinz, Kobbenbring, *et al.*, 2013)、ヴィクトリア湖のシクリッドで存在が示唆されている (Verzijden and Ten Cate, 2007; Verzijden, Korthof and Ten Cate, 2008)。これらの例が当てはまる場合、尿中のリガンドは後に V1R2 受容体と同調するようになると考えられる。実際、累代が重ねられてゲノムが均一になっていると考えられるヴィクトリア湖のシクリッドを用いて予備的に実施した交配実験では、V1R2 のアレル間で明白な選好性は確認されなかった (図 23B, C)。V1R2 のリガンド産生に関わる領域は新規に変異が導入されるのではなく、V1R2 と同様にゲノム上に数多く存在する SGV (Brawand *et al.*, 2014; Svardal *et al.*, 2020; Nakamura *et al.*, 2021) として存在することで素早く V1R2 と同調する可能性が考えられる。

V1R2 の多型をもつことの利益として考えられる可能性の一つとしては V1R2 受容体が環境と結びついたほかの機能を持っている場合が挙げられる。つまりある環境下では clade II の V1R2 をもつことが適応的になる場合である。このような場合には sensory drive によって急速に種分化が進むと考えられる (Endler, 1992)。また、V1R2 受容体が嗅覚を介した刷り込みに寄与している場合には、ある程度分化が進んで雑種不稔が生じている種間での交雑を回避するための選択的交配に寄与できる可能性がある。このように雑種不稔を回避するた

めに強化 (Dobzhansky, 1937) によって嗅覚を介した選択的交配が進化する例はハツカネズミで報告されている (Turner and Harr, 2014; Smadja *et al.*, 2022)。

今後これらの可能性を検証するため、ヴィクトリア湖のシクリッドだけでなく、種分化からある程度時間が経過しており、V1R2 受容体に合わせたリガンド産生をおこなうようになっていることが期待されるようなシクリッド (タンガニーカ産のシクリッドなど) で clade I、clade II それぞれの尿中リガンドの検証を実施する必要がある。

結論

本研究は東アフリカのシクリッドで広く存在する V1R2 受容体の 2 種類のアリル、clade I と clade II の間でリガンド選択性が異なる可能性を示した。また clade I 型のアリルをもつシクリッドの尿中に clade I 型の V1R2 のリガンドが存在し、アゴニストの一つである 3HPAA が高濃度で存在することを示した。さらに V1R2 受容体が複数の尿中化合物を受容していることを示唆した。今後の研究において V1R2 受容体の機能を明らかにし、clade II 型の V1R2 受容体も明らかにしていくことでシクリッドにおける新たな多様性創出機構を提唱できることが期待される。

第4章 総論

本研究では顕著な多様性で知られる東アフリカのシクリッドの嗅上皮におけるリガンド応答の検出に *c-fos* のリボプローブを用いた2色ISHが有用であることを示した。この実験系を用いることで微絨毛細胞やV2R受容体のリガンド応答性を検証した。特にシクリッドでコピー数が拡大したV2R受容体のサブファミリー14のコピー間でアルギニンに対する受容能に差があることを示唆した。これはシクリッドにおけるV2Rなどの嗅覚受容体のコピー数拡大が受容できる匂いの増加につながり、それがシクリッドの環境適応や多様化の助けになった可能性を示している。今後ほかのコピーでのリガンド選択性の検証や、シクリッドの幅広い種でのV2Rの系統・進化圧解析、さらに真骨魚の幅広い種のV2Rでのリガンド選択性を検証することでV2Rのコピー数の拡大やリガンド分化の時期を明らかにし、V2R受容体の多様化とシクリッドの多様化の関係を明らかにできると考えられる。

本研究ではまたシクリッドからの尿採取に成功し、シクリッドのオスの尿に対するリガンド応答を検証した。特にV1R受容体がシクリッドのオスに応答することを明らかにし、魚類ではまだ機能が明らかになっていないV1R受容体がフェロモンの受容などを担う可能性を示した。本研究ではさらに6つあるV1Rの一つ、V1R2に着目した。シクリッドのV1R2は東アフリカの三大湖全域で配列の大きく異なる2種類のアリル、clade Iとclade IIが見られる。これに対し、*c-fos*を用いた実験系を用いて複数のリガンド候補に対するリガンド応答性を検証し、アリル間でリガンド選択性が異なることを明らかにした。祖先型のclade I型のV1R2受容体は4HPAAや3HPAAなど幅広い4HPAA誘導体に応答していたのに対し、派生型の2HPAAのみで応答が見られた。さらにclade I型のシクリッドの尿のメタボローム解析を通じてclade I型のアゴ

ニストの一つ、3HPAA が尿中に高濃度で存在していることを示し、3HPAA が clade I 型の V1R2 受容体の有力なリガンドであることを示唆した。一方で V1R2 受容体が複数の尿中化合物を受容している可能性を示した。今後 V1R2 の機能を明らかにしていくとともにアレル間のリガンド選択性の違いを精査していくことで V1R2 受容体の多型がシクリッドの多様化にもたらした影響を明らかにできると考えられる。

以上のように本研究は嗅覚を介した多様性創出メカニズム解明の一助になることが期待される。

図

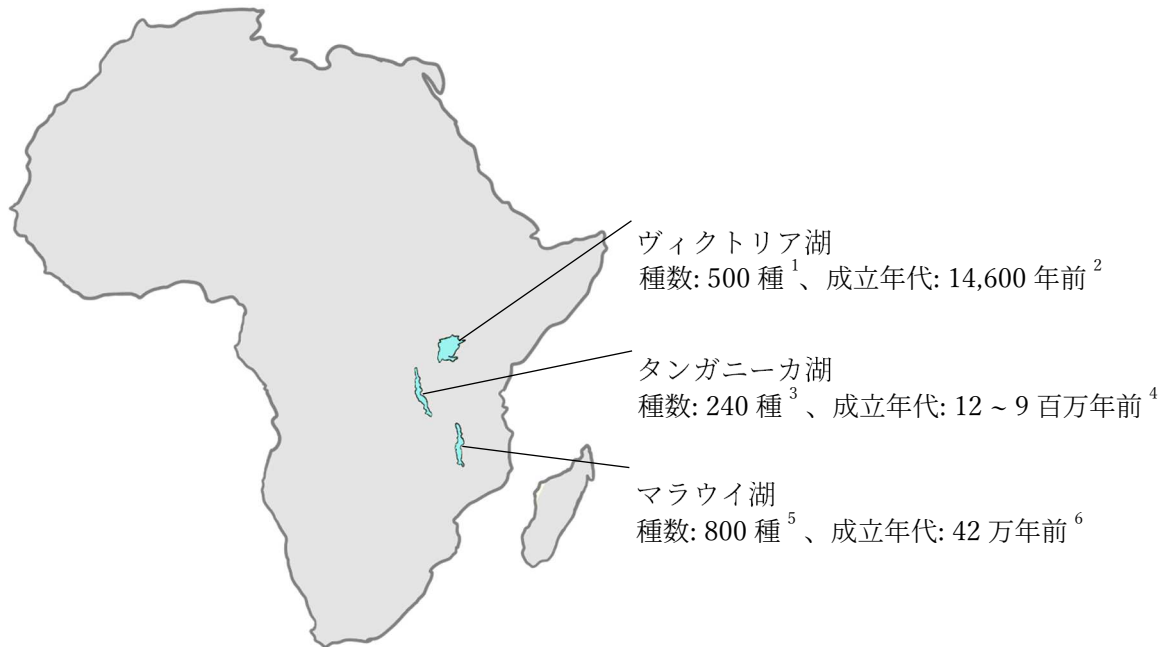


図 1. 東アフリカ三大湖とその成立年代、生息するシクリッドの種数

引用文献は¹ Seehausen, 1996; ² Johnson *et al.*, 2000; ³ Ronco *et al.*, 2019; ⁴ Cohen., *et al.*, 1993; ⁵ Snoeks, 2000; ⁶ Delvaux, 1995。

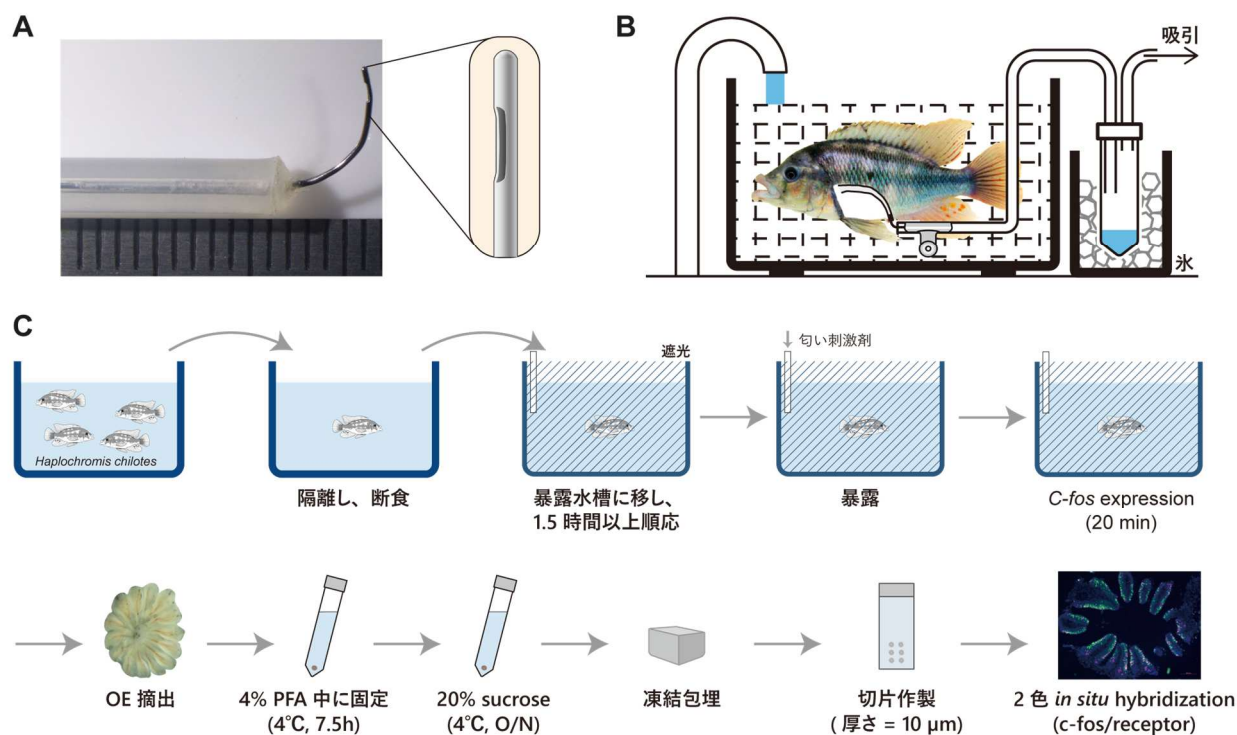


図 2. 手法の模式図

(A) 尿採取で用いるオス用のカテーテル。詰まりを防止するために側面についた穴を模式図で示す。(B) 尿採取法の模式図。(C) *c-fos* をマーカーとしたリガンド応答の検出系。シクリッドに匂いを曝露し、嗅上皮 (OE) を単離し、固定 (パラホルムアルデヒド中)、20%スクロースで置換し、凍結包埋した。さらに薄切切片 ($1 \mu\text{m}$) を作製し、*in situ* hybridization (ISH) に使用した。

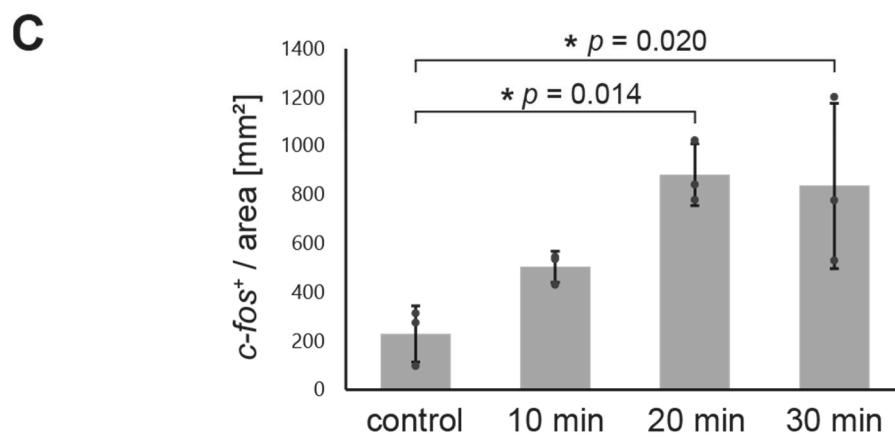
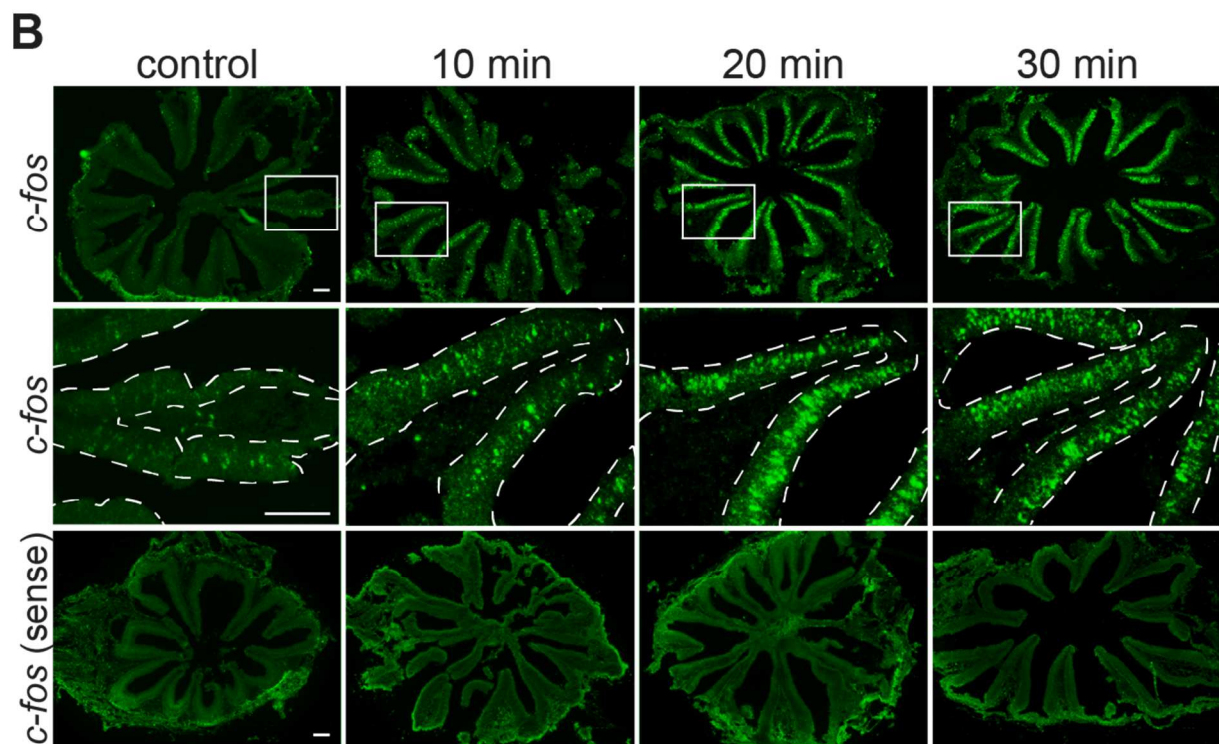
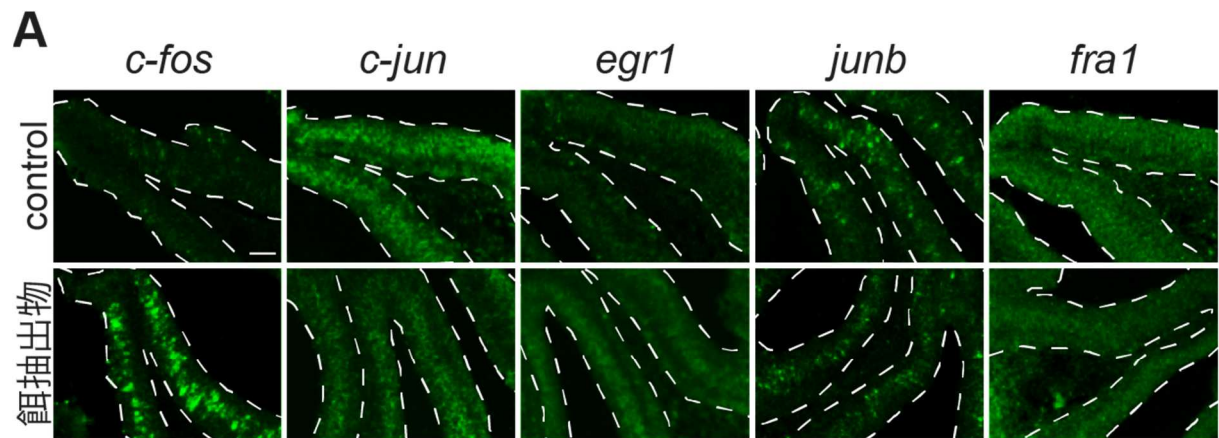


図 3. 餌抽出物の曝露によって OE で *c-fos* の発現が誘導される

(A-C) シクリッドに超純水（コントロール）または食物抽出物（終濃度：15,000 倍希釈）を曝露したシクリッドの OE 切片を用いた ISH。(A) 最初期遺伝子 *c-fos*, *c-jun*, *egr1*, *junb*, 及び *fra1* のリボプローブを用いた ISH の染色像。破線は OE の輪郭を示す。(B) *c-fos* のリボプローブを用いた ISH の染色像。横軸は匂い曝露から氷冷麻酔までの時間の長さを表す。中段は上段の枠で囲んだ領域の拡大画像。下段はネガティブコントロール（センスプローブ）。(C) 1 mm² 当たりの *c-fos* 陽性 (*c-fos*⁺) 細胞数の棒グラフ（平均 ± 標準偏差）。各個体について 5 切片の *c-fos*⁺ 細胞の総数を計測した（各 3 個体；Tukey-Kramer 検定；表 3）。**p* < 0.05。スケールバーは (A) で 20 μm, (B) で 100 μm。

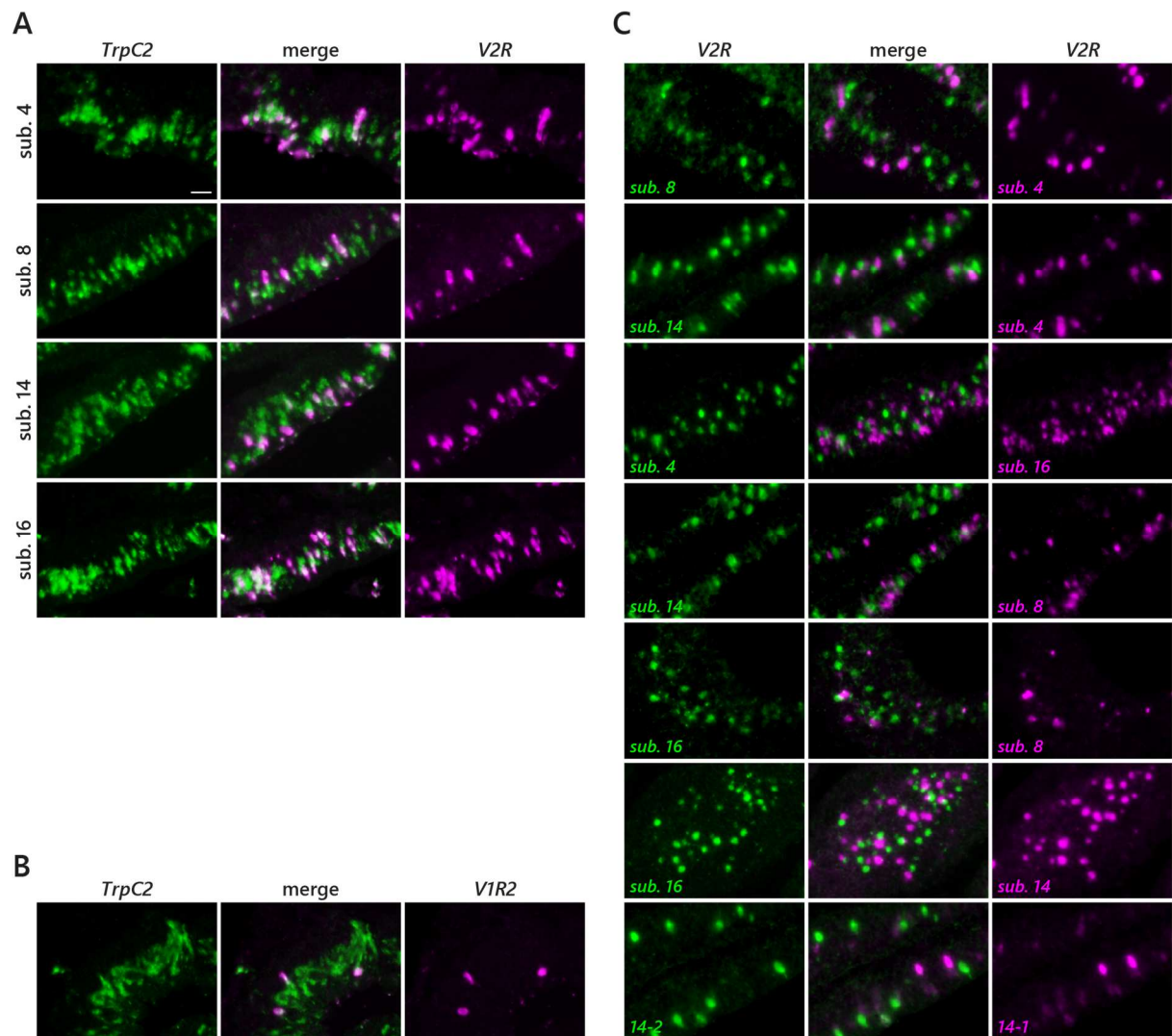


図 4. 受容体/受容体、受容体/*Trpc2* の共局在の検証

(A,B) シクリッドの OE 切片における、*Trpc2* (緑) と *V2R sub. 4/8/14/16* (A; マゼンタ) または *V1R2/ORAI* (B; マゼンタ) のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像。すべての *V2R* と *V1R2/ORAI* が *Trpc2* と共局在していた (A, B)。(C) 2 種類の *V2R* (緑とマゼンタ) に対するリボプローブを用いた 2 色 ISH。異なる *V2R* 同士はお互いに排他的に発現していた。スケールバーは 20 μm。

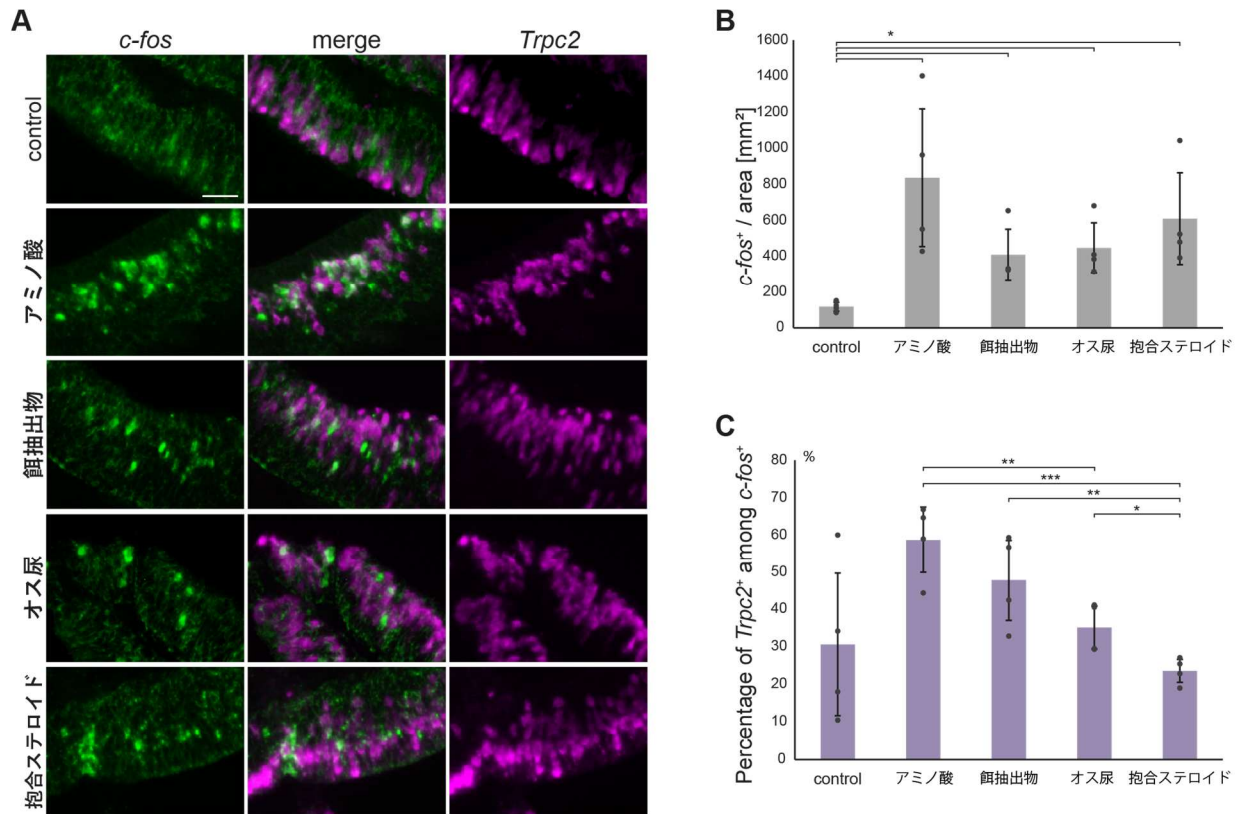


図 5. 微絨毛細胞のリガンド応答

(A-C) 超純水 (コントロール)、20 種類のタンパク質構成アミノ酸の混合物 (終濃度: 各 2 μM)、餌抽出物 (終濃度: 15000 倍希釈)、シクリッドのオス尿 (終濃度: 6000 倍希釈)、3 種類の抱合ステロイド混合物 (終濃度: 各 33 nM) を曝露したシクリッドの OE 切片の *c-fos* (緑) および *Trpc2* (マゼンタ) のリボプローブによる 2 色 ISH の染色像 (A)、および 1 mm² 中の *c-fos*⁺ 細胞数の棒グラフ (平均 \pm 標準偏差) (1 個体あたり 1 切片、各 4 個体; Welch の *t* 検定; 表 3) (B)、および *c-fos*⁺ 細胞中で *Trpc2*⁺ の割合の棒グラフ (平均 \pm 標準偏差) (1 個体あたり 1 切片、各 4 個体; Welch の *t* 検定、Student の *t* 検定; 表 3) (C)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。スケールバーは 20 μm 。

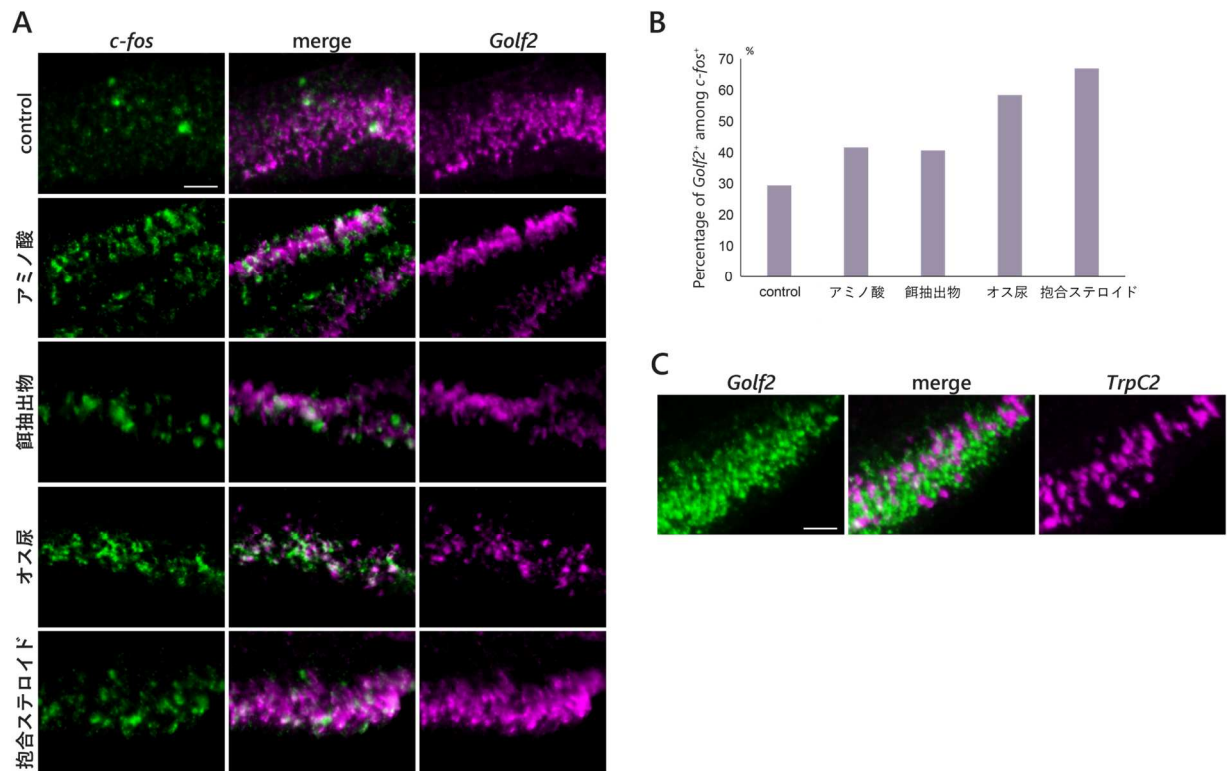


図 6. 繊毛細胞のリガンド応答

(A, B) 超純水 (コントロール)、20 種類のタンパク質構成アミノ酸の混合物 (終濃度: 各 2 μM)、餌抽出物 (終濃度: 9.5 mg/L)、オスの尿 (終濃度: 6000 倍希釈)、または 3 種の抱合ステロイドの混合物 (終濃度: 33 nM) を曝露したシクリッドの OE 切片 *c-fos* (緑) および *Golf2* (マゼンタ) のリボプローブによる 2 色 ISH の染色像 (A)、および *c-fos*⁺ 細胞の中で *Golf2*⁺ の割合の棒グラフ (各 1 個体、1 切片) (B)。(C) シクリッドの OE 切片の *Golf2* (緑) および *TrpC2* (マゼンタ) のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像。スケールバーは 20 μm 。

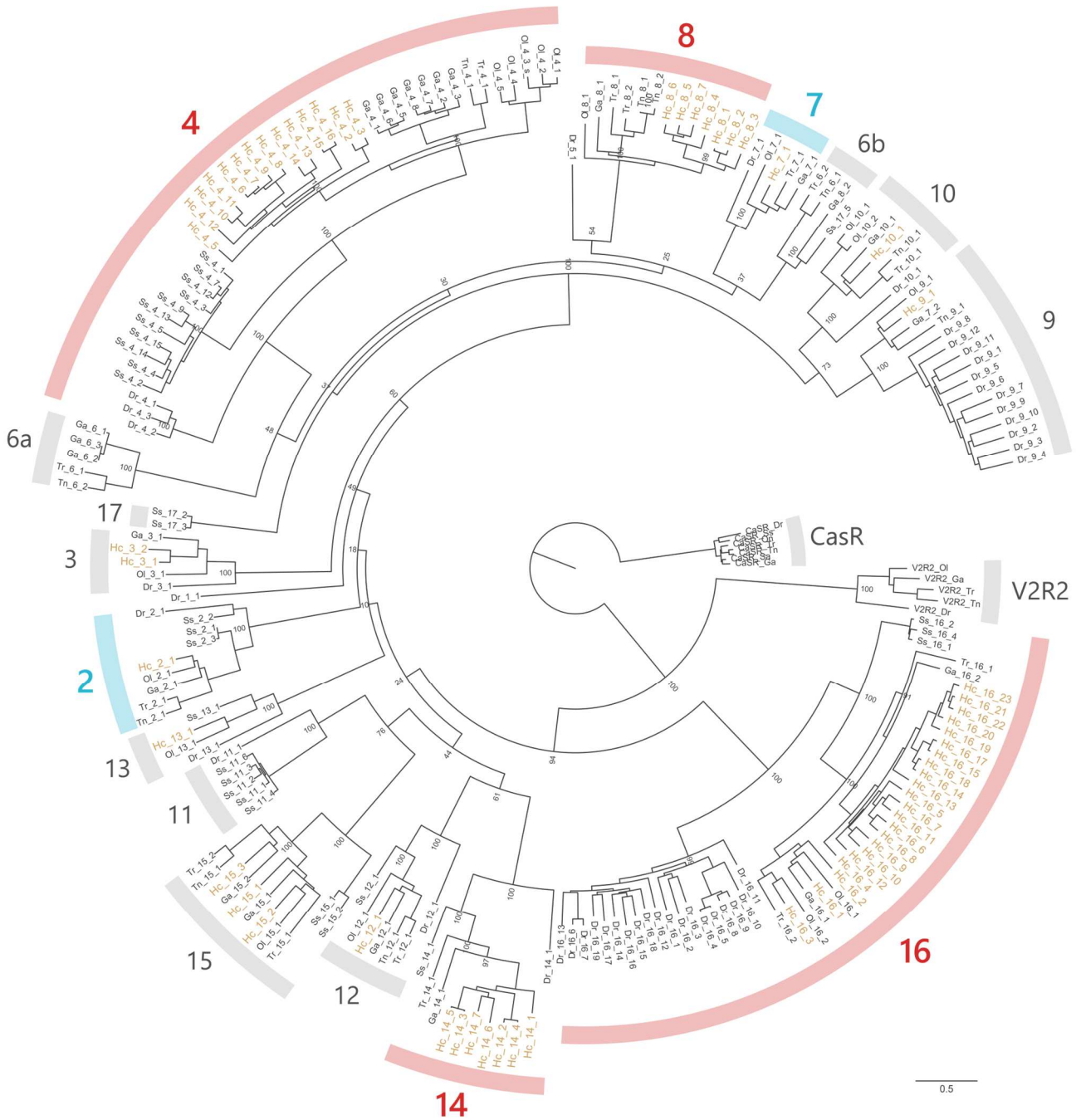


図7. 真骨魚7種のV2Rの最尤系統樹

円弧はV2Rの各サブファミリーを表す。一部のノードでブートストラップ値を示した。本研究で使用したV2Rのサブファミリーは、赤（シクリッドでコピー数が拡大）または青（シクリッドで拡大せず）で示した。シクリッドのV2Rはオレンジ色で示した。Hc:シクリッド (*Haplochromis chilotes*) ; Dr: ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) ; Ss: アトランティックサーモン (*Salmo salar*) ; Ga: トゲウオ (*Gasterosteus aculeatus*) ; Tr: トラフグ (*Takifugu rubripes*) ; Tn: ミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*) ; Ol: メダカ (*Oryzias latipes*) 。

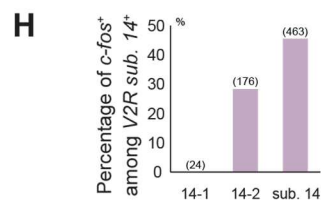
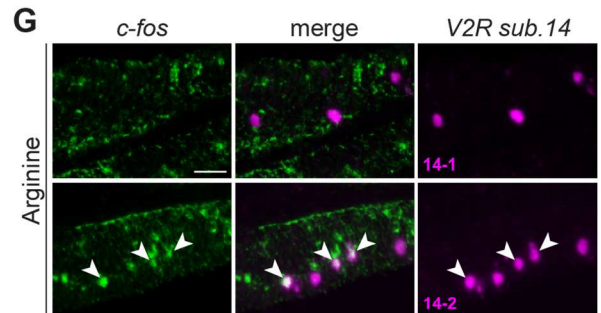
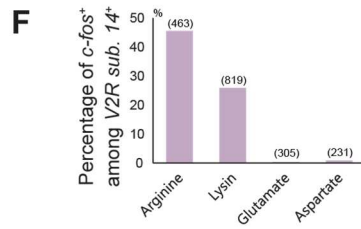
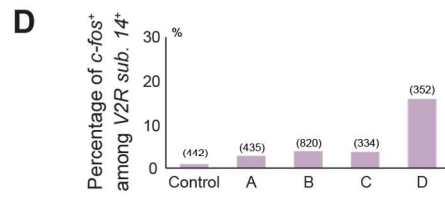
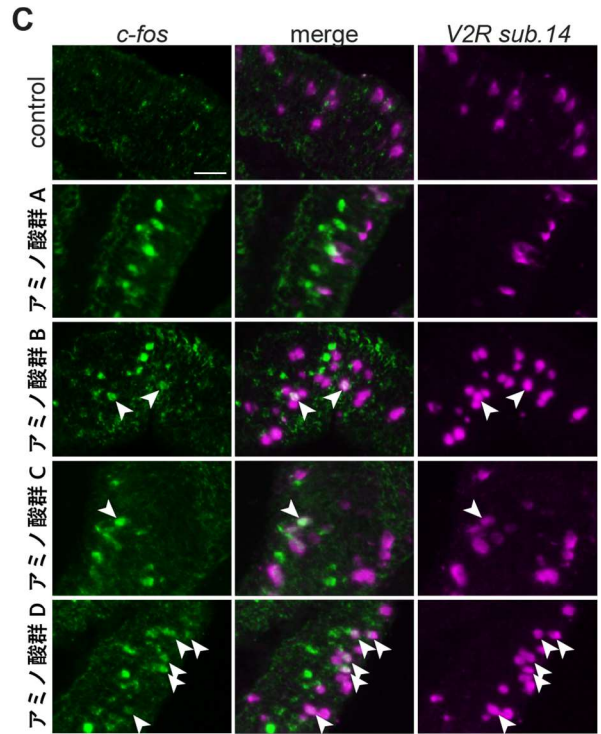
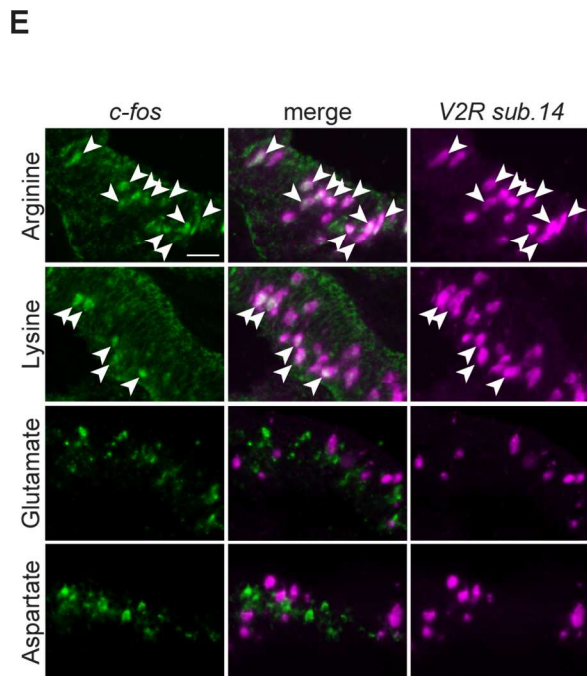
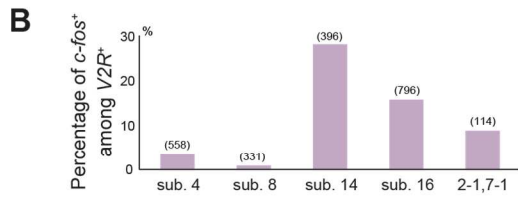
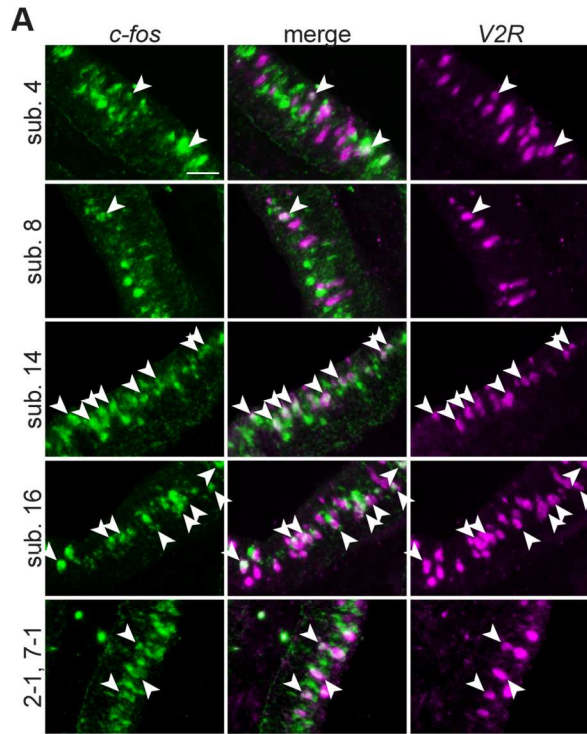


図 8. V2R 陽性細胞のリガンド応答

(A,B) 20 種類のタンパク質構成アミノ酸混合物（終濃度：各 2 μ M）に曝露したシクリッドの OE 切片の *c-fos*（緑）と *V2R sub. 4/8/14/16/2,7-1*（マゼンタ）のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (A)、および *V2R*⁺ 細胞中で *c-fos*⁺ の割合の棒グラフ(B)（各 1 個体）。(C,D) 4 群のアミノ酸混合物（A: Gly, Ala, Ser, Pro, Thr; B: Phe, Tyr, Trp, His, Asn, Gln; C: Val, Ile, Leu, Met, Cys; D: Arg, Lys, Asp, Glu; 終濃度：各 2 μ M）を曝露した OE 切片の *c-fos*（緑）と *V2R sub. 14*（マゼンタ）のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (C)、および *V2R sub. 14*⁺ 細胞（各 1 個体）中で *c-fos*⁺ の割合の棒グラフ (D)。(E,F) アミノ酸群 D を構成するアミノ酸、アルギニン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸（終濃度：2 μ M）に曝露したシクリッドの OE 切片の *c-fos*（緑）および *V2R sub. 14*（マゼンタ）のリボプローブによる 2 色 ISH 染色像 (E)、および *V2R sub. 14*⁺ 細胞の中で *c-fos*⁺ の割合を示す棒グラフ (F)（各 1 個体）。(G,H) アルギニン（終濃度：2 μ M）に曝露した OE 切片の *c-fos*（緑）と *V2R sub. 14-1/14-2*（マゼンタ）のリボプローブによる 2 色 ISH の染色像 (G)、および *V2R sub. 14*⁺ 細胞の中で *c-fos*⁺ の割合の棒グラフ(H)（各 1 個体）。矢頭は *c-fos* と *V2R* の共局在を表す。(B,D,F,H) 各バーの上に、1 つの切片でカウントされた *V2R*⁺細胞の数が示されている。スケールバーは 20 μ m。

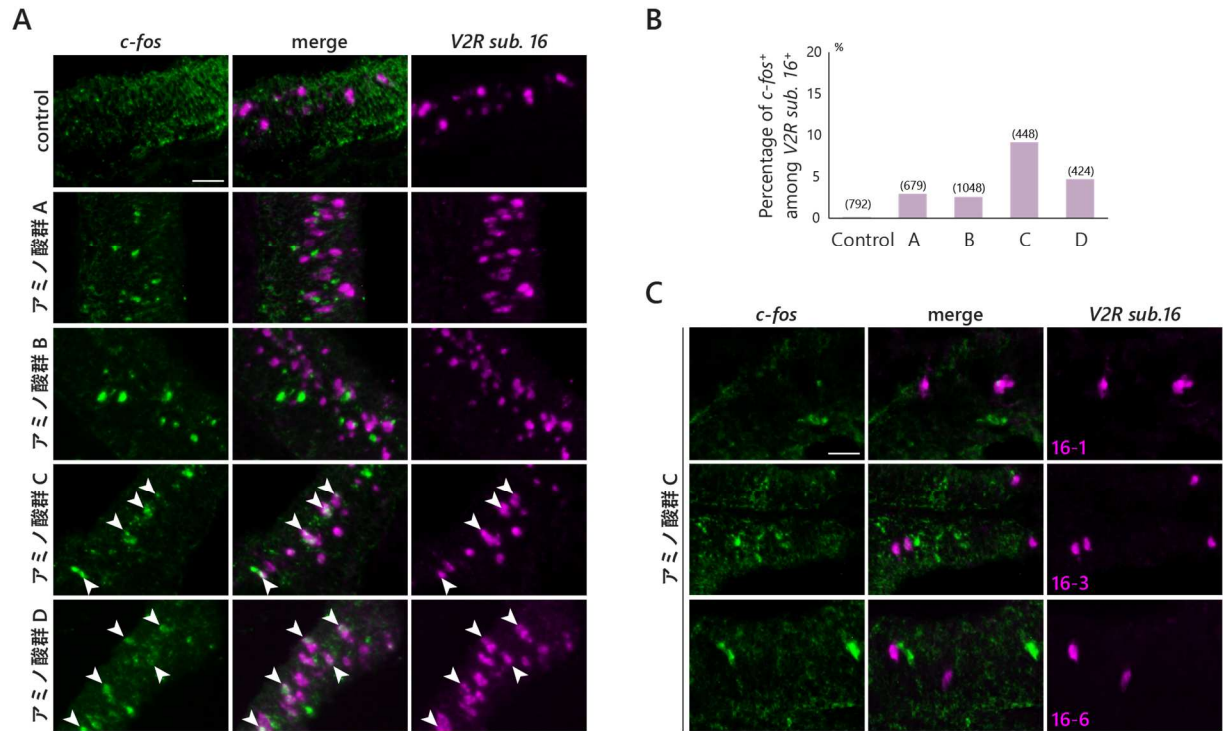


図 9. *V2R sub. 16* 陽性細胞のアミノ酸に対するリガンド応答

(A, B) 4 群のアミノ酸 A-D (A: Gly, Ala, Ser, Pro, Thr; B: Phe, Tyr, Trp, His, Asn, Gln; C: Val, Ile, Leu, Met, Cys; D: Arg, Lys, Asp, Glu; 終濃度: 各 2 μ M) に曝露したシクリッドの OE 切片の *c-fos* (緑) と *V2R sub. 16* (マゼンタ) のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (A)、および *V2R*⁺細胞の中で *c-fos*⁺の割合の棒グラフ (各 1 個体) (B)。各棒の上に 1 つの切片でカウントされた *V2R*⁺細胞の数を示す(B)。矢頭は共局在を示す(B)。(C) アミノ酸群 C (Val, Ile, Leu, Met, Cys; 終濃度各 2 μ M) に曝露したシクリッドの OE 切片の *c-fos* (緑) と *V2R 16-1/16-3/16-6* (マゼンタ) のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像。いずれのコピーにおいてもアミノ酸群 C の曝露による共局在は観察されなかった。スケールバーは 20 μ m。

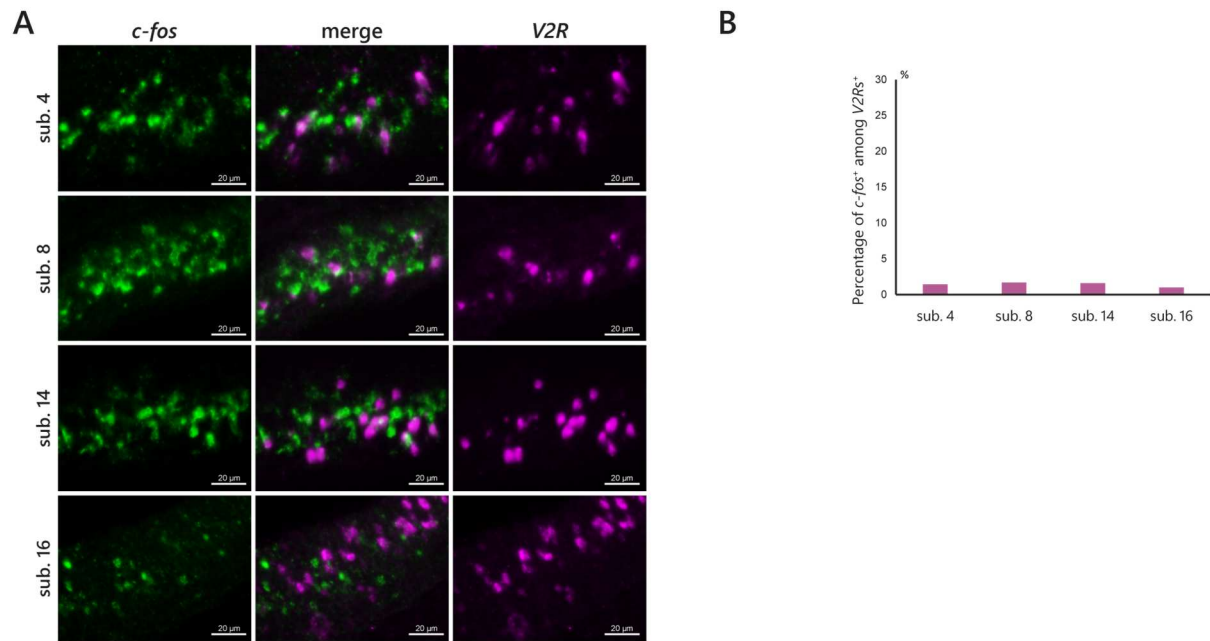


図 10. V2R 陽性細胞のオスの尿に対するリガンド応答

(A, B) オス尿（終濃度：6000 倍希釈）に曝露したシクリッドの OE 切片の *c-fos*（緑）および V2R（マゼンタ）のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (A)、および V2R⁺細胞の中で *c-fos*⁺の割合の棒グラフ（各 1 個体）(B)。オス尿曝露による共局在はほとんど観察されなかった。

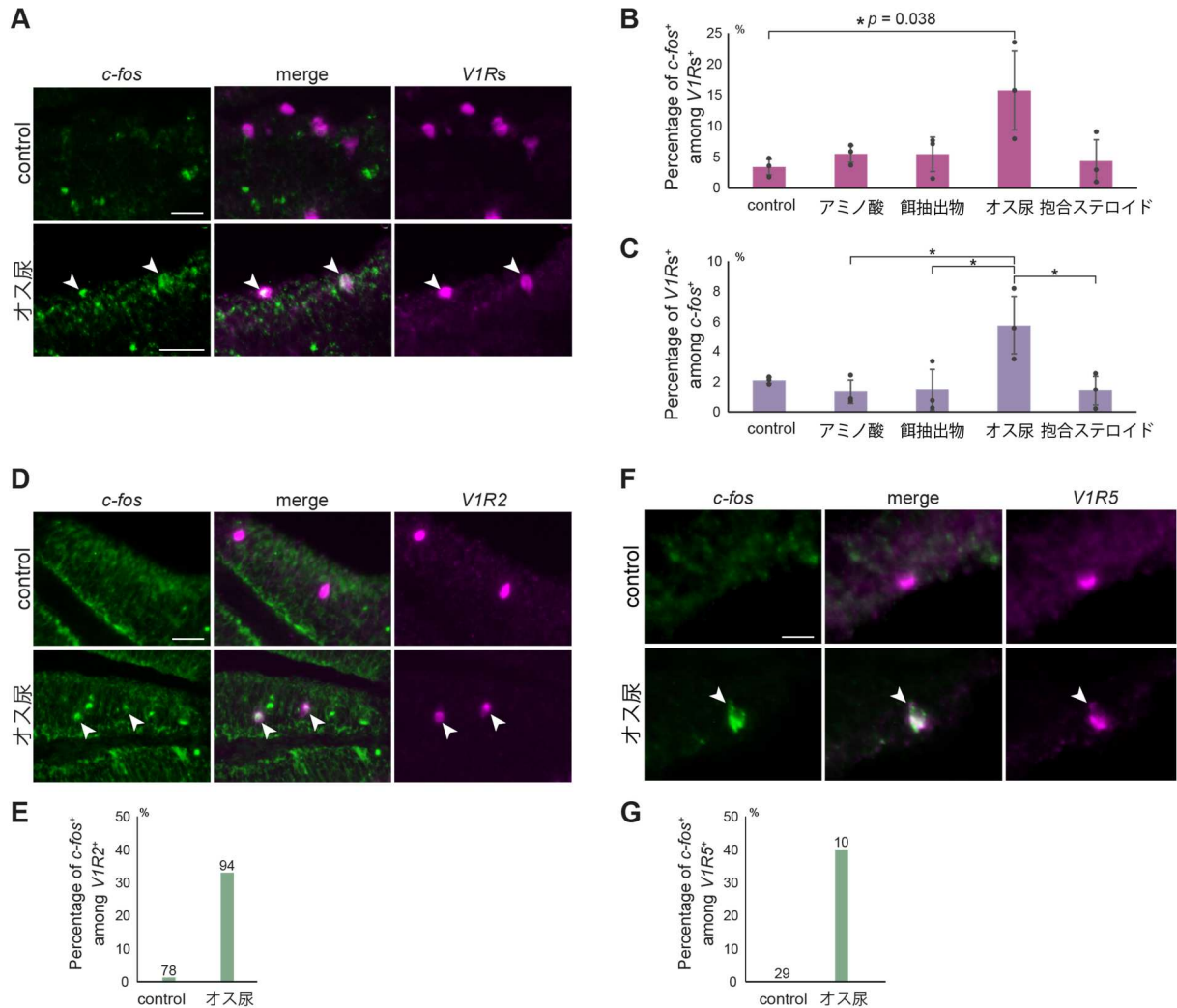


図 11. V1R 陽性細胞のリガンド応答

(A) オスの尿（終濃度：6000 倍希釈）に曝露したシクリッドの OE 切片の *c-fos*（緑）と *V1Rs*（マゼンタ）のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像。(B,C) 超純水（コントロール）、20 種類のタンパク質構成アミノ酸の混合物（終濃度：各 2 μ M）、餌抽出物（終濃度：9.5 mg/L）、オスの尿（終濃度：6000 倍希釈）、または 3 種類の抱合ステロイドの混合物（終濃度：33 nM）に曝露したシクリッドの OE において、*V1Rs*⁺ 細胞の中で *c-fos*⁺ の割合の棒グラフ（平均 \pm 標準偏差）(B)と *c-fos*⁺ 細胞の中で *V1Rs*⁺ の割合の棒グラフ（平均 \pm 標準偏差）(C)。(D,E) オス尿（終濃度：6000 倍希釈）に曝露したシクリッドの OE 切片の *c-fos*（緑）および *V1R2*（マゼンタ）のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (D) と、*V1R2*⁺ 細胞の中で *c-fos*⁺ の割合の棒グラフ(E)。(F,G) オス尿（終濃度：6000 倍希釈）に曝露したシクリッドの OE 切片の *c-fos*（緑）および *V1R5*（マゼンタ）のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (F) と、*V1R5*⁺ 細胞の中で *c-fos*⁺ の割合の棒グラフ (G)。矢頭は *c-fos* と *V1R* の共局在を表す。(B,C,E,G) 各棒の上に、1 つの切片でカウントされた *V1R*⁺細胞の数を示す。* $p < 0.05$ 。スケールバーは 20 μ m。

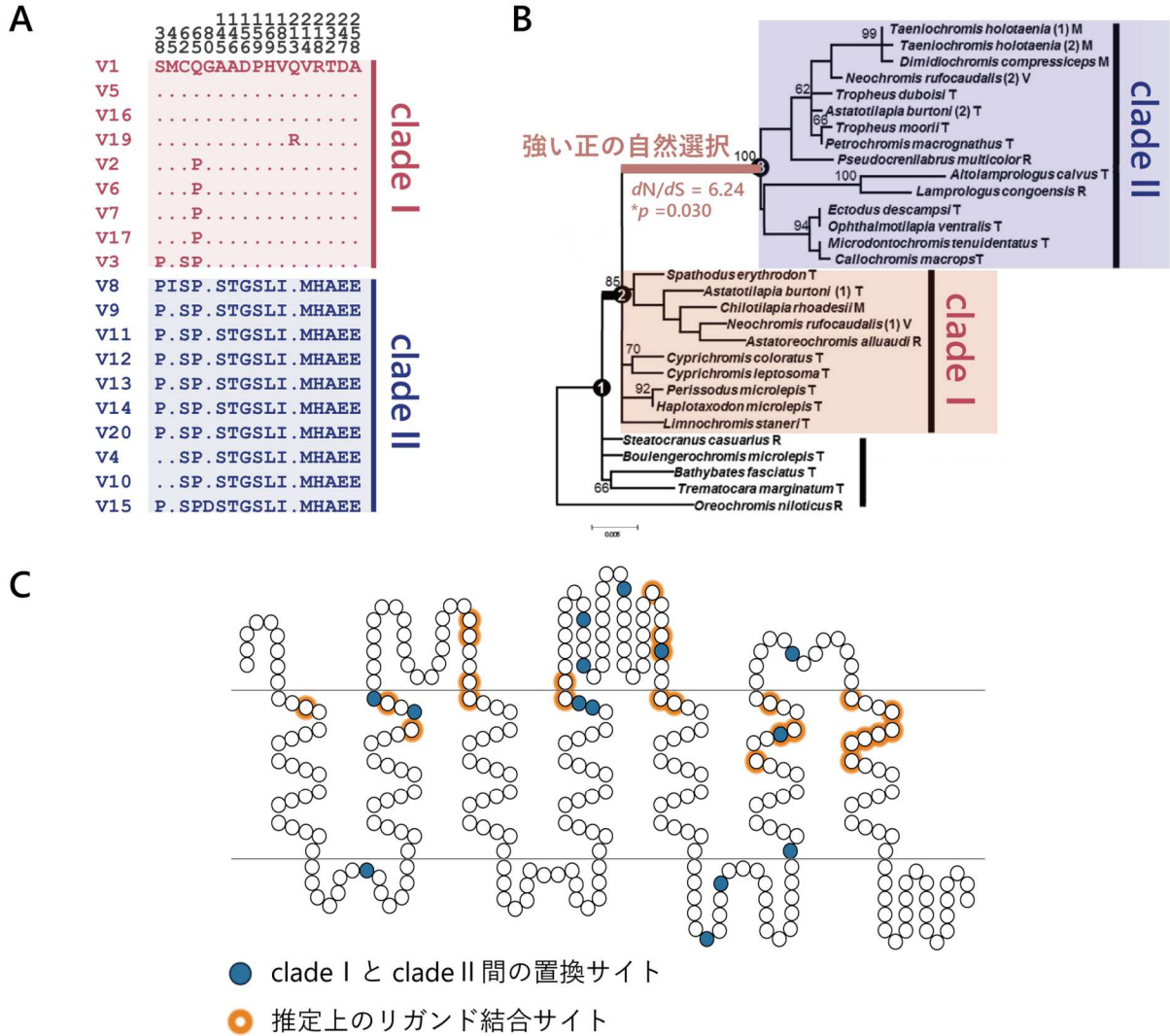


図 12. 東アフリカ産シクリッドの V1R2 の 2 種類のアリル

東アフリカの三大湖のシクリッドの V1R2 遺伝子は配列によって 2 種類のアリル、clade I (赤) と clade II (青) に分けられる (A,B)。(A) ヴィクトリア湖のシクリッドで見つかった V1R2 のアリルのアミノ酸アラインメント (Nikaido *et al.*, 2014 改変)。多型の見られたサイトだけを示す (上の数字)。一番上の参照配列 (V1 アリル) と同じアミノ酸残基だったサイトはドットで表す。(B) 三大湖のシクリッドの V1R2 の系統樹 (Nikaido *et al.*, 2014 改変)。種名の横のアルファベットは生息地を示す (V: ヴィクトリア湖、T: タンガニーカ湖、M: マラウイ湖、R: 河川)。祖先型の clade I (赤) から派生型の clade II (青) が分岐する枝で正の自然選択が検出された ($dN/dS = 6.24$)。 (C) V1 アリル (clade I) と V9 アリル (clade II) の置換サイト (青い丸) と推定上のリガンド結合サイト (オレンジの丸) の比較。リガンド結合サイトは Cong *et al.*, 2019 でゼブラフィッシュの V1R5 受容体とリガンド (LCA) の *in silico* ドッキングモデリングから推定された。2 本の水平線で示した膜貫通領域は TOPCONS (Bernsel *et al.*, 2009) で予測された。

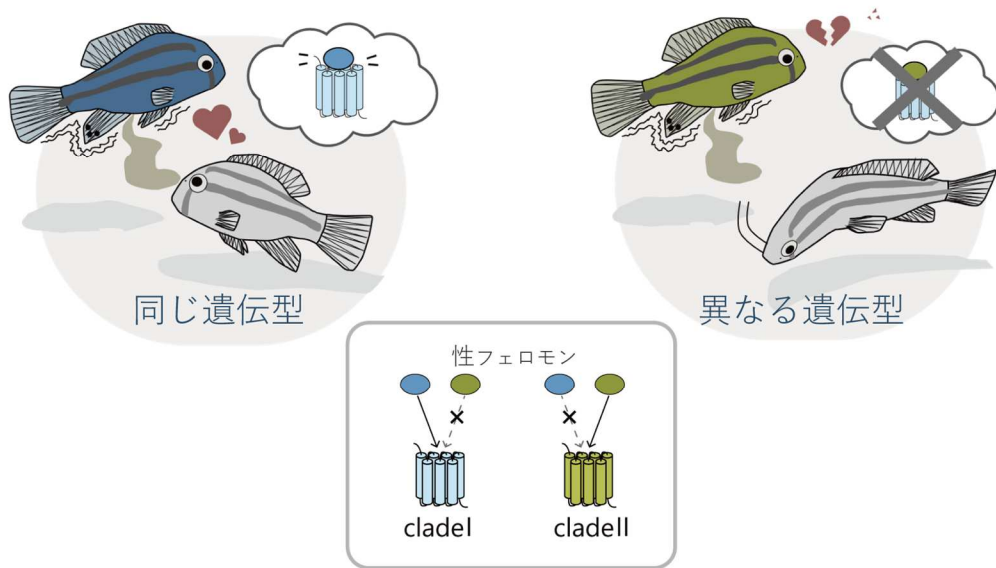
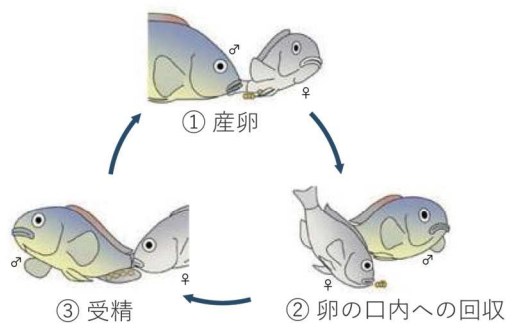


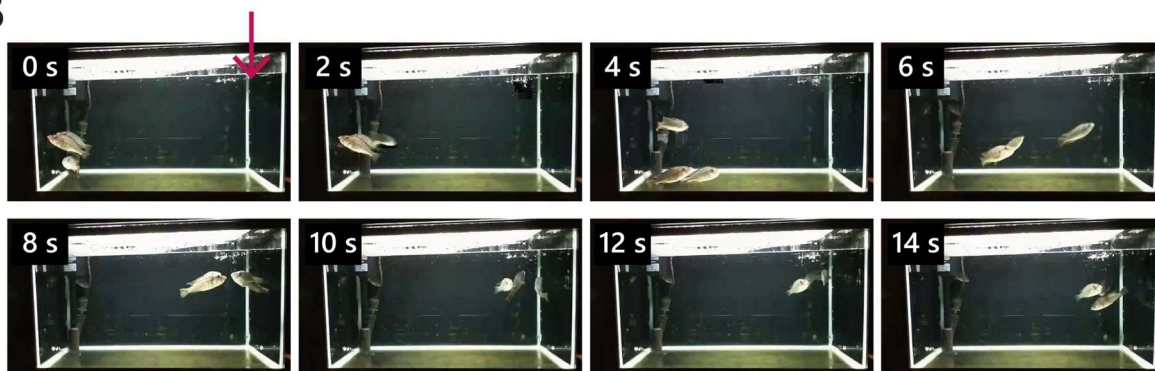
図 13. V1R2 の多型を介したシクリッドの選択的交配のモデル

V1R2 受容体の遺伝型とそれに対応したフェロモン型が一致した場合にのみ配偶行動が行われ、一致しない場合には配偶行動が行われない。

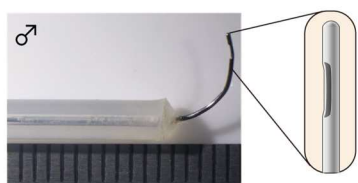
A



B



C



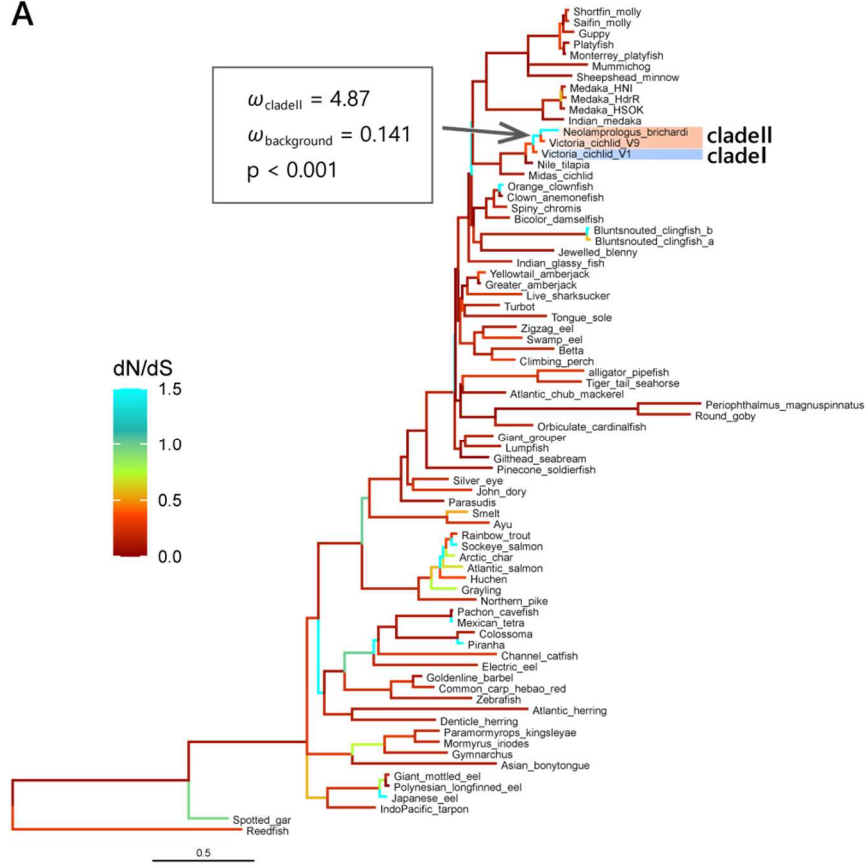
D



図 14. シクリッドは尿中からフェロモンを排出することが示唆される

(A) サークリングと呼ばれるシクリッドの配偶行動。オスに尻ビレを突かれるとメスは卵を生みとし (①)、メスはその卵を口に咥える (②)。続いてメスの方もオスの尻ビレを突き、その際にオスが放精して口内の卵を受精させる (③)。このプロセスを何度も繰り返す。オスとメスがお互いの尻ビレを突く行動は尿中の匂いに誘引されて起こると考えられる。(B) シクリッド (*Haplochromis chilotes*) のオスの尿 (100 μ L) の曝露によって観察されたシクリッド (オス 1 個体、メス 2 個体) の誘引行動。曝露した位置を赤い矢印で示す。(C, D) 尿採取用のカテーテル。オス用 (C) とメス用 (D)。メス用のカテーテルにはシリコンの栓が付属している。

A



B

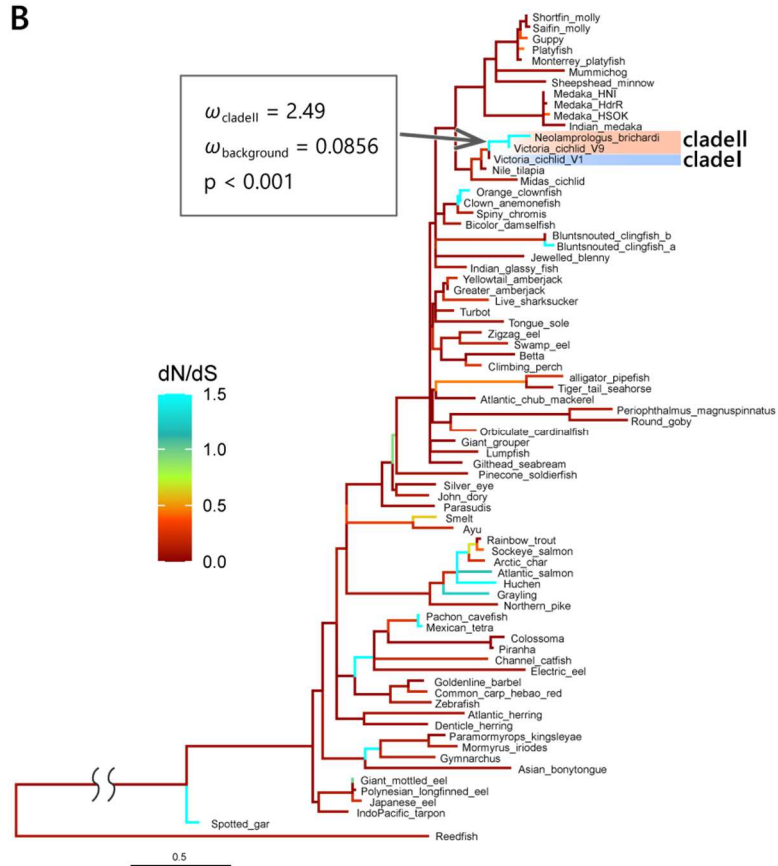


図 15. 魚類（条鰭類）76 種の *V1R2* 遺伝子の dN/dS 解析

条鰭類 76 種の *V1R2* 遺伝子の全長配列 (A) と推定リガンド結合部位 (B) の系統樹と $dN/dS(\omega)$ の推定値。枝の長さは塩基置換数、枝の色は ω を表す。 ω が 1.5 を超える場合はすべて $\omega=1.5$ の場合の色（水色）で示す。*V1R2* 遺伝子はほぼすべての種で重複しておらずオーソログの関係にあるため、系統樹のトポロジーは種の系統関係 (Rabosky *et al.*, 2018) を元の構築した。矢印で示した clade II が分岐する枝に正の自然選択が働いていることを検定するため、帰無仮説：「clade II が分岐する枝の ω がほかの枝の ω と差がない」のもと、尤度比検定をおこなった（四角いボックスの中）。

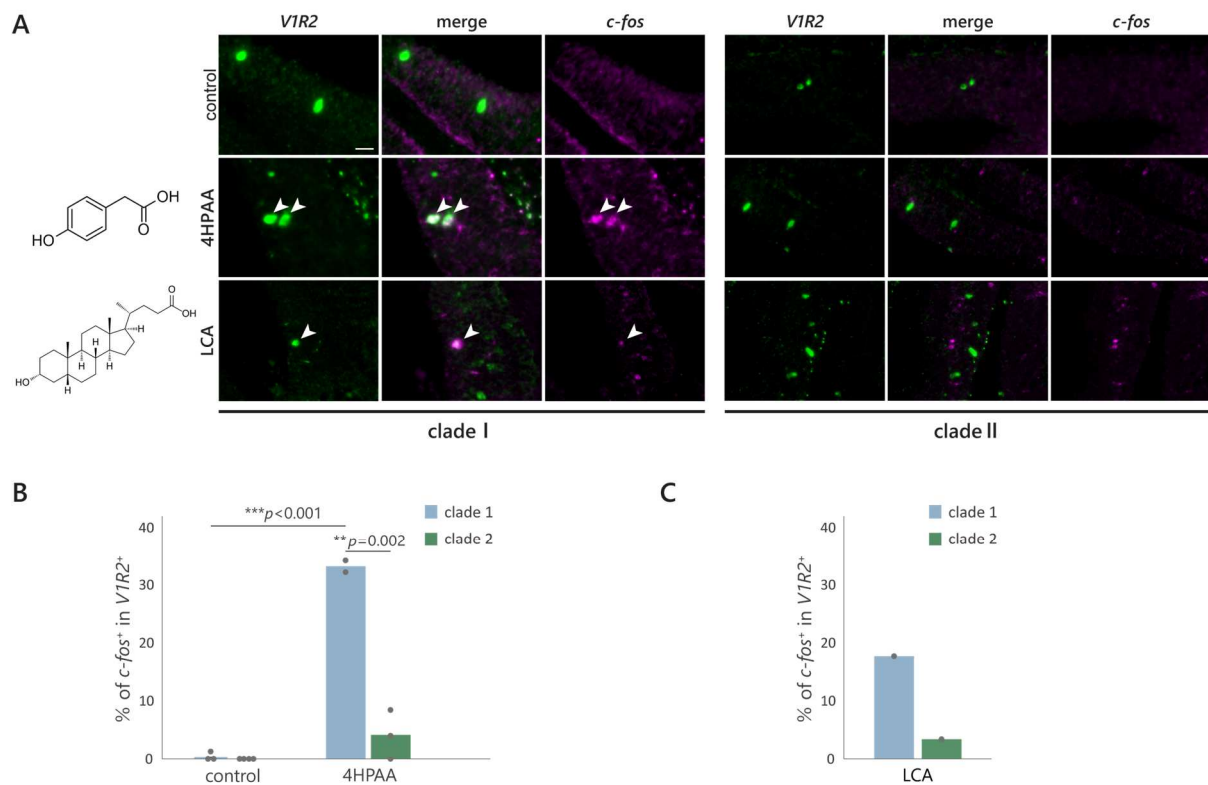


図 16. 4HPAA と LCA に対するリガンド応答

(A-C) 超純水 (コントロール)、4HPAA、LCA (終濃度 10, 20 μM) を曝露したシクリッド (*Haplochromis chilotis*; clade I、*Haplochromis sauvagei*; clade II) の OE 切片の *VIR2* (緑) と *c-fos* (マゼンタ) のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (A)、および *VIR2*⁺細胞の中で *c-fos*⁺の割合の棒グラフ (コントロール: 各 3~4 個体、4HPAA: 各 2~3 個体、LCA: 各 1 個体、1 個体当たり 5 切片) (B, C)。コントロールと 4HPAA 間、また 4HPAA のなかで clade I と clade II 間で Student の *t* 検定をおこなった (表 5) (B)。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。スケールバーは 20 μm 。

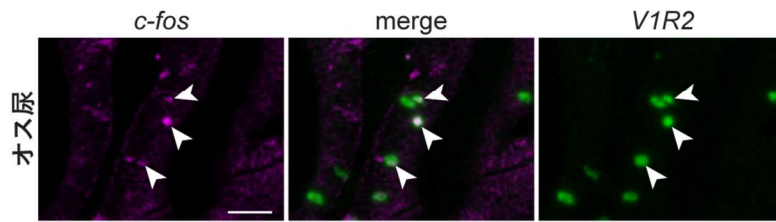
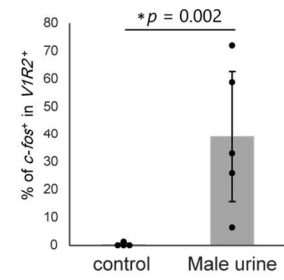
A**B**

図 17. clade I の V1R2 受容体はオスの尿にリガンド応答

(A, B) シクリッド (*Haplochromis chilotes*; clade I) のオスの尿 (終濃度: 30000 倍希釈) を曝露したシクリッド (*Haplochromis chilotes*; clade I) の OE 切片の *V1R2* (緑) と *c-fos* (マゼンタ) のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (A)、および *V1R2*⁺細胞の中で *c-fos*⁺の割合の棒グラフ (コントロール: 4 個体、オス尿: 5 個体; Student の *t* 検定) (B)。* $p < 0.05$ 。スケールバーは 20 μm 。

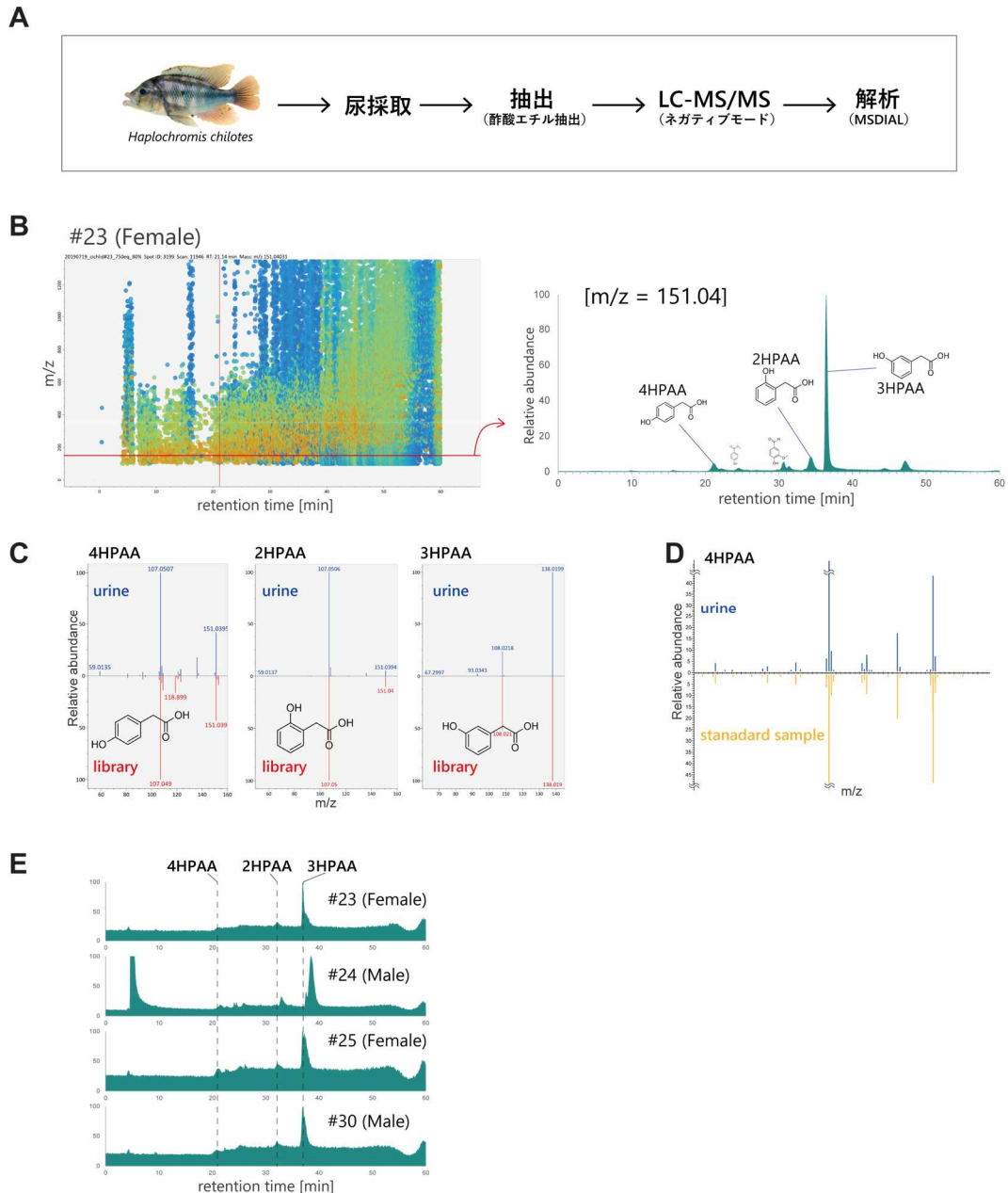


図 18. シクリッドの尿のメタボローム解析

(A) 4HPAA 誘導体を検出するためのシクリッドの尿のメタボローム解析の流れ。(B) シクリッドの尿#23 で検出されたすべての化合物。縦軸が質量電荷比 (m/z)、横軸が保持時間を表す。 $m/z = 151.04$ (赤い線) で抽出したマスクロマトグラムを右側に示す。構造式はそれぞれアノテーションされた化合物を表す。(C) 4HPAA、2HPAA、3HPAA がアノテーションされた保持時間についてそれぞれ抽出した MS/MS スペクトル (青; 保持時間 21.1 分, 34.3 分, 36.4 分)。下側の赤いスペクトルはライブラリから取得したそれぞれの化合物の MS/MS スペクトルである。(D) 4HPAA の標準物質の MS/MS スペクトル ($m/z = 151.04$, 保持時間 21 分) と尿のスペクトルの比較。(E) 複数の尿 (#23 [メス]、#24 [オス]、#25 [メス-排卵期]、#30 [オス]) における $m/z = 151.04$ のマスクロマトグラム。4HPAA、2HPAA、3HPAA が検出されると予想される保持時間をそれぞれ点線で示す。

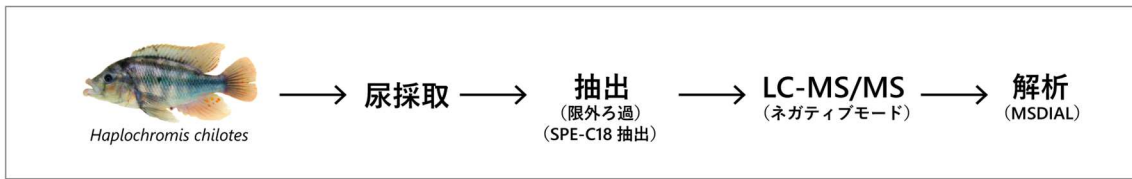
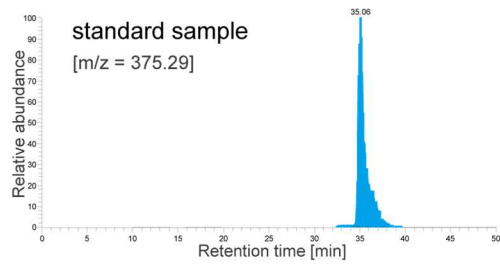
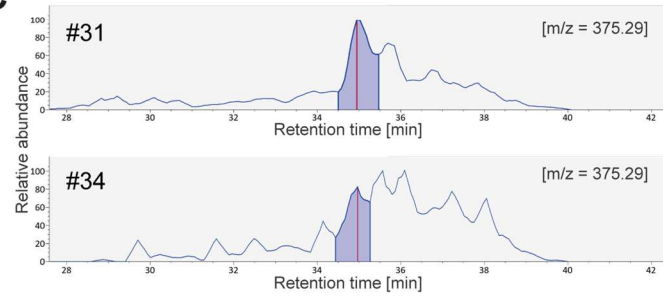
A**B****C**

図 19. 尿中からリトコール酸の検出

(A) 胆汁酸類を検出するためのシクリッドの尿のメタボローム解析の流れ。(B) 胆汁酸の 1 種リトコール酸 (LCA) の標準物質の LC-MS/MS 解析の $m/z = 375.29$ で抽出したマスクロマトグラム。MS/MS スペクトルは取得されなかった。(C) シクリッドの尿 (#31[オス], #34[オス]) 800 μL の LC-MS/MS 解析の $m/z = 375.29$ で抽出したマスクロマトグラム。LCA の標準物質での解析と同様に保持時間約 35 分にピークが見られた。

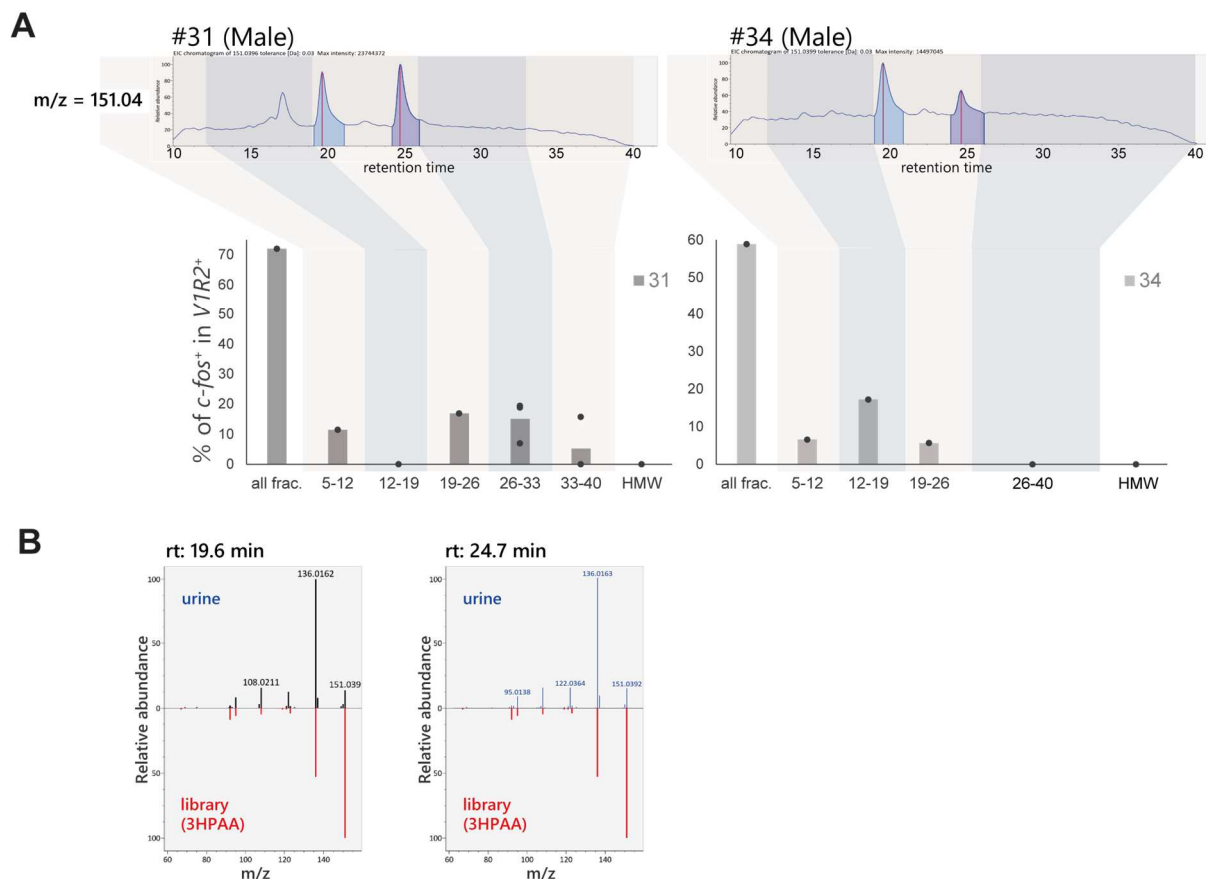
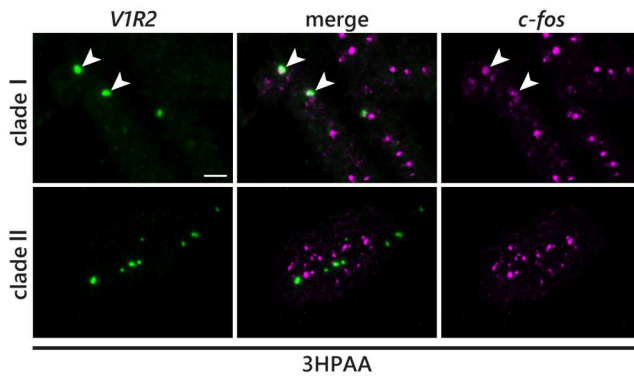


図 20. 複数の尿画分に対する clade I の V1R2 受容体のリガンド応答

(A) シクリッドの尿（#31[オス], #34[オス]）800 μ L の LC-MS/MS 解析（図 19A）の m/z = 151.04（3HPAA 等に対応）で抽出したマスクロマトグラム（上段）と、分取 LC-MS によって得られた画分 100 μ L 相当（#31 の尿は保持時間 5–12 分、12–19 分、26–33 分、33–40 分、#34 の尿は 5–12 分、12–19 分、26–33 分、33–40 分で分画）を暴露した (*Haplochromis chilotes*; clade I) の 2 色 ISH における V1R2⁺細胞の中で c-fos⁺の割合の棒グラフ（下段）。複数の画分に対してリガンド応答が見られた。3HPAA だと予想されるピーク（水色：19.6 分、もしくは紫色：24.7 分）は保持時間 12–19 分の画分に含まれる。all frac.は全画分の混合、HMW は限外ろ過によって分離された 3kD 以上の画分を表す。(B) 3HPAA だと予想されるピーク（図 20A の水色：19.6 分、もしくは紫色：24.7 分）の LC-MS/MS スペクトル（上段）とライブラリから取得した 3HPAA の MS/MS スペクトル（下段）。

A



B

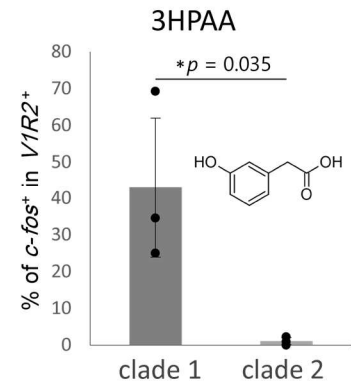


図 21. 3HPAA に対するリガンド応答

(A, B) 3HPAA (終濃度 10 μ M) に曝露したシクリッド (*Haplochromis savagei*) の OE 切片の *VIR2* (緑) と *c-fos* (マゼンタ) のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (A)、および *VIR2*⁺細胞の中で *c-fos*⁺の割合の棒グラフ (3 個体、1 個体当たり 5 切片; Student の *t* 検定) (B)。**p* < 0.05 。スケールバーは 20 μ m。

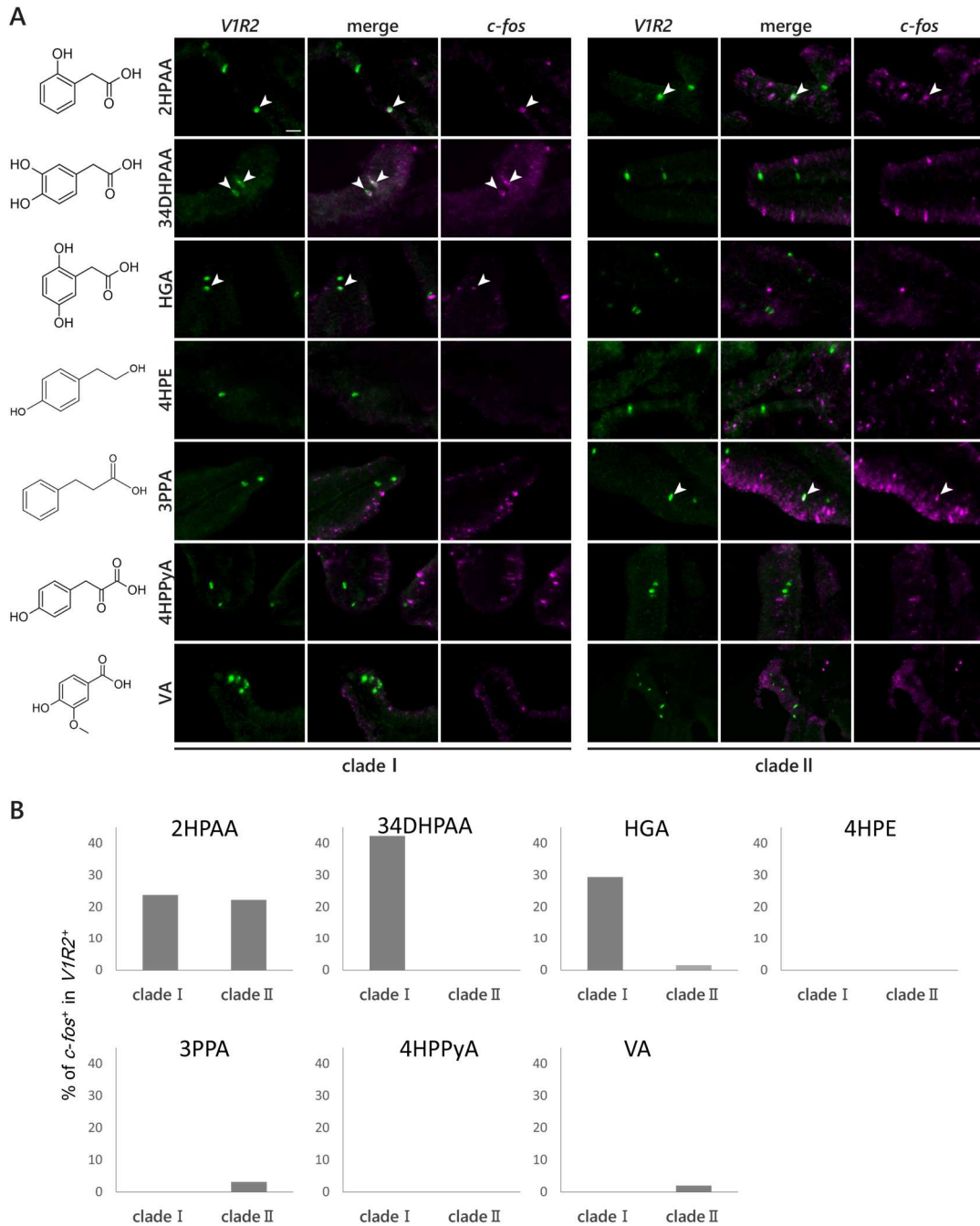


図 22. 4HPAA 誘導体に対するリガンド応答

(A, B) 4HPAA の誘導体：2-ヒドロキシフェニル酢酸 (2HPAA)、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (34DHPAA)、ホモゲンチジン酸 (HGA)、4-ヒドロキシフェニルエタノール (4HPE)、3-フェニルプロピオン酸 (3PPA)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4HPPyA)、バニリン酸 (VA) (終濃度 10 μ M) に曝露したシクリッド (*Haplochromis sauvagei*) の OE 切片の VIR2 (緑) と *c-fos* (マゼンタ) のリボプローブを用いた 2 色 ISH の染色像 (A)、および VIR2⁺細胞の中で *c-fos*⁺の割合の棒グラフ (1 個体、1 個体当たり 5 切片) (B)。スケールバーは 20 μ m。

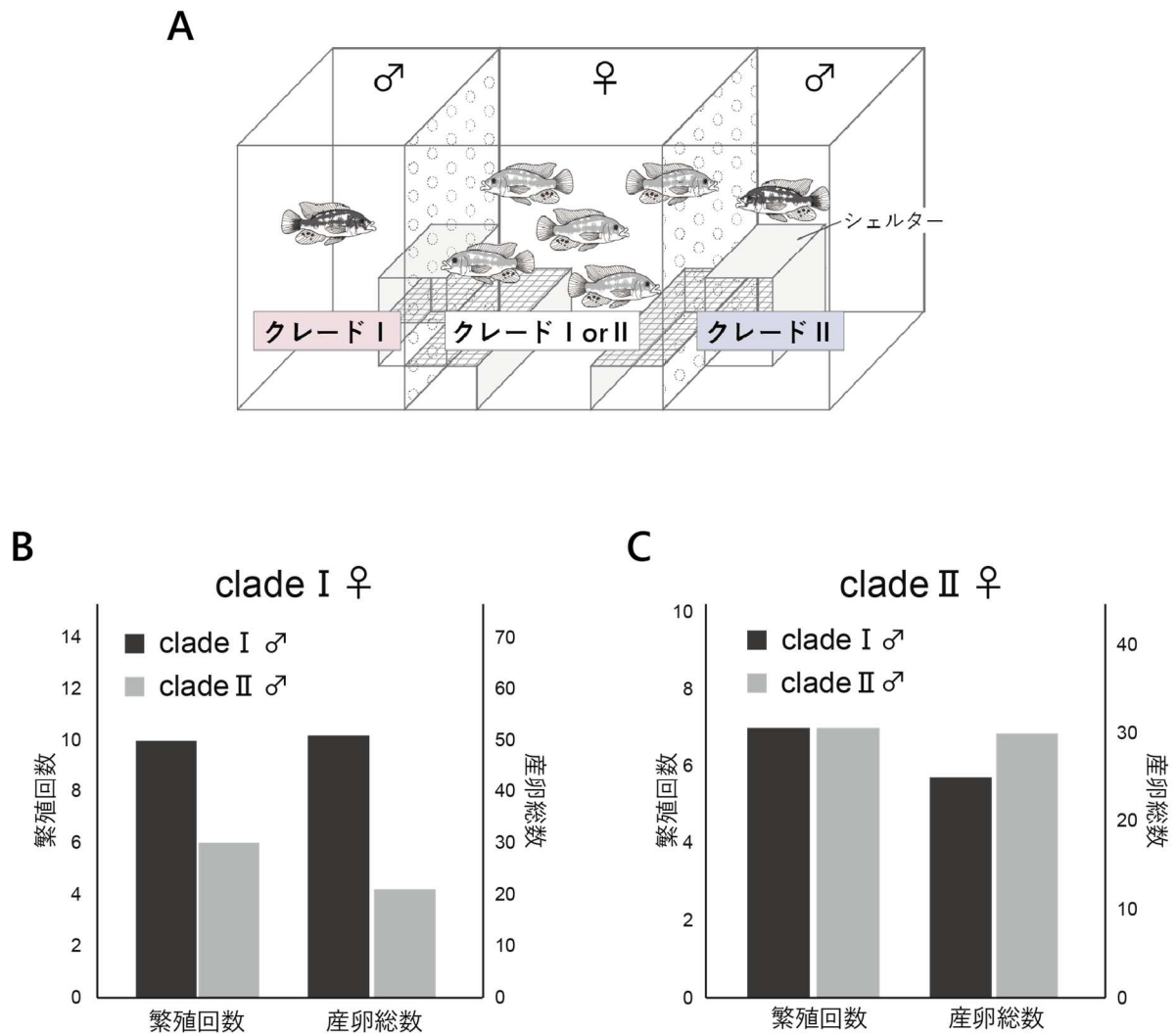


図 23. 交配実験に選好性の違い検証

(A) 交配実験用水槽の模式図。3つの区画に分け、左右の区画にそれぞれ clade I と clade II のオス (*Haplochromis sauvagei*)、真ん中の区画には clade I のメス (*H. sauvagei*)、もしくは clade II のメス (*H. sauvagei*) を 10~12 匹入れた。区切りには穴が空いており、真ん中の区画のメスが匂いを用いてオスを選ぶことができるようになっている。繁殖が行われると卵が底面の網の下にトラップされる。(B,C) 一連の配偶行動が行われた回数 (繁殖回数) と産み落とした卵の数 (産卵回数) を選好性の評価に用いた。(B) clade I のメスの選好性。(C) clade II のメスの選好性。

表

表 1. プローブ作製に用いたプライマー

Gene	Forward primer	Reverse primer	length	vector
c-fos	TCTCAGGATTTACAGACCT	GGGAAGGTGAATACAAATGA	905bp	pBluescript II SK-
c-jun	GACTCACTCAACGCTTTCTC	TACGTGGTTCATCACCTTCT	903bp	pGEM-T
egr1	GATATCCCTTCAACTGTGA	GTGTGTCTTTTCTCTCGTC	956bp	pGEM-T
junb	ATGGAACAGCCTTTTATGA	CGTCATGACTTTCTGTTTGA	927bp	pGEM-T
fra1	TGTATCGAACTTTGGGAGT	ACTTCCCTGGTGTGATGTAA	929bp	pGEM-T
Trpc2	GATCGCTCTGTTGACAACCTC	GATGAGAAACCACAGGTAGG	762bp	pGEM-T
Golf2	AAAAGGCAAAGAGAGAAGCA	TGTTCCAGGAAGAGATCACT	864bp	pBluescript II SK-
V2R sub.4	TCCAGGAACTCGTAAAGTGT	TTGCAAAAATCTCCACAACT	881bp	pGEM-T
V2R sub.8	CCCAGGAACACACAAGGTA	TTAGCAGTCCAAAAGTGGAA	908bp	pGEM-T
V2R sub.14	AGTATGGACAACAAGACAGTCA	ACAGAAAATTTCCAGGAC	924bp	pGEM-T
V2R sub.16	AGTCACCTCAATCGGTATGT	CAACAGTGTGATCAAAGA	957bp	pGEM-T
V2R sub.2-1	TTCCTTAGGTATAGCCCTGAC	ACAGCACAGAAGATCAGCAT	621bp	pBluescript II SK-
V2R sub.7-1	TGGGTATACTGTTGGTCTCC	TGCACAGAATATCAACATGC	614bp	pBluescript II SK-
V2R sub.14-1	GATTATGTTGGAGATGCATTG	GAACCTTCAGACTGGTGTGG	521bp	pGEM-T
V2R sub.14-2	ACCAAAGCCAGGAAACTG	GGTCACAGCTGTCCATAATTC	533bp	pGEM-T
V2R sub.16-1	AGCTTTCTGCTAGCATTTCT	CTTCTTCAGGGAGGAAGC	428bp	pGEM-T
V2R sub.16-3	TTGTCCCTGCTTATGTCAAC	CATCTTCTGCAACTCCTTTG	490bp	pGEM-T
V2R sub.16-6	CAGGGTCAGAAAATCTGAAAG	AACTGGAGGATTTCCAACAC	479bp	pGEM-T
V1R1	CTATTTGGCCTTTGTGTTCC	TCAAAGACAGAATAACCGATGC	681bp	pBluescript II SK-
V1R2	CTTCACTTCCATCCCTGGTT	ATAAGGTCTGATAGAACAACCTCTGC	646bp	pBluescript II SK-
V1R3	TCGTGAGCTGTTAAACTCC	TCTCCAGAGCTTTTGCAGAG	673bp	pBluescript II SK-
V1R4	GTGGCCTTTGGACCTTTAC	CGGCACCTTACTGTGACAT	634bp	pBluescript II SK-
V1R5	GGTCTTCAGCGTCCCACACT	AACAGTGAAGCGTTTGATA	579bp	pBluescript II SK-
V1R6	ACTTGCTGCAGCCAACCTTGT	AAAATCAGGTAGGTAGTCCAGTCC	645bp	pBluescript II SK-

表2. c-fos アッセイのまとめ (第2章)

A. 図3Cに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	time length(min)	# of a section (depth)	c-fos+ number in section	area (mm ²)	number/area
19_11_9	m	6.6	control	0	2	51	0.17	300.2
19_11_9	m	6.6	control	0	16	63	0.37	171.3
19_11_9	m	6.6	control	0	23	61	0.36	169.3
19_11_9	m	6.6	control	0	30	181	0.39	462.8
19_11_9	m	6.6	control	0	37	155	0.34	449.7
19_09_3	m	8.0	control	0	14	56	0.33	168.7
19_09_3	m	8.0	control	0	16	62	0.38	161.3
19_09_3	m	8.0	control	0	23	132	0.44	303.0
19_09_3	m	8.0	control	0	37	115	0.35	329.6
19_09_3	m	8.0	control	0	51	115	0.25	468.0
22_03_7	m	10.0	control	0	5	21	0.29	71.8
22_03_7	m	10.0	control	0	12	14	0.51	27.6
22_03_7	m	10.0	control	0	19	137	0.89	153.9
22_03_7	m	10.0	control	0	26	37	0.69	53.6
22_03_7	m	10.0	control	0	33	76	0.56	135.5
19_11_10	m	7.2	food extract	10	3	53	0.22	244.1
19_11_10	m	7.2	food extract	10	9	147	0.32	460.4
19_11_10	m	7.2	food extract	10	21	186	0.26	719.8
19_11_10	m	7.2	food extract	10	33	225	0.35	639.0
19_11_10	m	7.2	food extract	10	39	155	0.30	517.4
19_06_2	m	9.2	food extract	10	8	132	0.31	430.4
19_06_2	m	9.2	food extract	10	15	244	0.45	543.4
19_06_2	m	9.2	food extract	10	22	193	0.47	414.0
19_06_2	m	9.2	food extract	10	29	142	0.37	378.9
19_06_2	m	9.2	food extract	10	36	184	0.48	380.1
19_12_2	m	6.9	food extract	10	9	210	0.39	545.3
19_12_2	m	6.9	food extract	10	15	264	0.59	447.8
19_12_2	m	6.9	food extract	10	21	272	0.46	587.2
19_12_2	m	6.9	food extract	10	27	320	0.50	633.9
19_12_2	m	6.9	food extract	10	33	206	0.44	473.0
19_09_6	m	8.0	food extract	20	14	379	0.60	636.2
19_09_6	m	8.0	food extract	20	16	536	0.71	752.6
19_09_6	m	8.0	food extract	20	23	616	0.54	1137.2
19_09_6	m	8.0	food extract	20	30	662	0.57	1154.3
19_09_6	m	8.0	food extract	20	37	796	0.50	1590.3
19_06_3	m	9.3	food extract	20	8	61	0.14	437.8
19_06_3	m	9.3	food extract	20	24	274	0.34	799.6
19_06_3	m	9.3	food extract	20	40	371	0.43	868.9
19_06_3	m	9.3	food extract	20	48	372	0.54	688.4
19_06_3	m	9.3	food extract	20	56	571	0.51	1114.7
19_12_1	m	7.1	food extract	20	3	340	0.33	1039.5
19_12_1	m	7.1	food extract	20	10	358	0.48	752.1
19_12_1	m	7.1	food extract	20	17	477	0.67	711.5
19_12_1	m	7.1	food extract	20	24	354	0.45	783.6
19_12_1	m	7.1	food extract	20	31	183	0.27	666.7
19_11_11	m	7.4	food extract	30	10	341	0.42	814.6
19_11_11	m	7.4	food extract	30	16	227	0.52	435.8
19_11_11	m	7.4	food extract	30	24	497	0.53	930.0
19_11_11	m	7.4	food extract	30	30	412	0.61	679.5
19_11_11	m	7.4	food extract	30	44	401	0.34	1183.3
19_09_4	m	7.7	food extract	30	11	455	0.47	963.2
19_09_4	m	7.7	food extract	30	19	640	0.58	1103.6
19_09_4	m	7.7	food extract	30	27	493	0.45	1091.1
19_09_4	m	7.7	food extract	30	42	660	0.53	1241.4
19_09_4	m	7.7	food extract	30	50	886	0.57	1557.1
19_07_5	m	7.4	food extract	30	7	287	0.61	468.9
19_07_5	m	7.4	food extract	30	14	252	0.49	512.8
19_07_5	m	7.4	food extract	30	21	236	0.40	584.0
19_07_5	m	7.4	food extract	30	28	209	0.47	443.4
19_07_5	m	7.4	food extract	30	35	167	0.20	850.7
19_07_5	m	7.4	food extract	30	35	167	0.20	850.7

B. 図5BCに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	# of a section (depth)	c-fos+ number in section	area (mm ²)	c-fos+/area	overlap	TrpC2+ / c-fos+ (%)
20_06_1	m	7.7	control	16	40	0.48	84.2	24	60.0
21_02_1	m	9.1	control	16	79	0.52	151.4	27	34.2
21_03_1	m	9.0	control	16	50	0.46	109.1	9	18.0
21_03_2	m	8.9	control	16	67	0.54	124.3	7	10.4
20_08_2	m	8.1	amino acids	17	799	0.57	1401.6	471	58.9
21_01_4	m	9.2	amino acids	16	608	0.63	963.1	393	64.6
21_01_1	m	9.1	amino acids	16	327	0.59	552.3	145	44.3
21_04_1	m	9.3	amino acids	19	199	0.46	429.1	133	66.8
19_11_11	m	7.4	food extract	18	410	0.63	654.0	174	42.4
19_09_6.1	m	8.0	food extract	16	140	0.42	329.7	83	59.3
21_02_2	m	8.9	food extract	16	195	0.59	332.6	64	32.8
21_04_3	m	9.1	food extract	19	180	0.56	323.6	102	56.7
20_07_7	m	8.0	male urine	16	217	0.56	384.8	88	40.6
20_09_1	m	7.2	male urine	16	249	0.61	410.2	73	29.3
20_3_2.2	m	6.9	male urine	17	209	0.31	681.7	86	41.1
21_04_4	m	9.5	male urine	19	200	0.63	316.7	59	29.5
21_01_2	m	8.8	conjugated steroids	27	96	0.09	1043.1	26	27.1
21_01_3	m	9.3	conjugated steroids	16	330	0.63	524.0	84	25.5
21_01_5	m	9.2	conjugated steroids	33	254	0.53	480.3	58	22.8
21_04_2	m	9.5	conjugated steroids	19	163	0.41	393.1	31	19.0

C. 図6Bに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	# of a section (depth)	c-fos+ number in section	overlap	Golf2+/c-fos+ (%)
20_06_1	m	7.7	control	24	85	25	29.4
21_01_1	m	9.1	Amino acids	20	161	67	41.6
19_11_8	m	6.9	Food extract	12	133	54	40.6
21_10_1	m	10.4	Male urine	6	161	94	58.4
21_01_3	m	9.3	conjugated steroids	12	124	83	66.9

D. 図8Bに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	# of a section (depth)	c-fos+ number in section	receptor+ in section	receptor	overlap	c-fos+ /receptor+ (%)
20_08_2	m	8.1	amino acids	9	302	558	V2R sub.4	20	3.6
20_08_2	m	8.1	amino acids	17	288	331	V2R sub.8	3	0.9
20_08_2	m	8.1	amino acids	11	582	396	V2R sub.14	111	28.0
20_08_2	m	8.1	amino acids	19	607	796	V2R sub.16	125	15.7
20_08_2	m	8.1	amino acids	6	294	114	V2R sub.2, 7	10	8.8

図8DFに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	# of a sections (depth)	c-fos+ number in section	receptor+ in section	receptor	overlap	c-fos+ /receptor+ (%)
21_02_1	m	9.1	control	13	91	442	V2R sub.14	4	0.9
20_10_1	m	8.9	AA group A	15	174	476	V2R sub.14	11	2.3
20_10_3	m	8.9	AA group B	17	378	820	V2R sub.14	33	4.0
20_10_4	m	8.6	AA group C	15	256	334	V2R sub.14	13	3.9
20_11_1	m	8.8	AA group D	15	337	352	V2R sub.14	56	15.9
20_12_1	m	8.7	Arginine	15	393	463	V2R sub.14	211	45.6
19_10_1	m	7.0	Lysin	15	586	819	V2R sub.14	212	25.9
21_08_4	m	10.2	Glutamate	12	176	305	V2R sub.14	1	0.3
21_08_3	m	10.1	Aspartate	5	105	231	V2R sub.14	2	0.9

図8Hに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	# of a sections (depth)	c-fos+ number in section	receptor+ in section	receptor	overlap	c-fos+ /receptor+ (%)
20_12_1	m	8.7	Arginine	17	210	24	V2R 14-1	0	0.0
20_12_1	m	8.7	Arginine	18	278	176	V2R 14-2	50	28.4

図9Bに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	# of a sections (depth)	c-fos+ number in section	receptor+ in section	receptor	overlap	c-fos+/receptor+ (%)
21_03_2	m	8.9	control	13	102	792	V2R sub.16	1	0.1
20_10_1	m	8.9	AA group A	16	255	679	V2R sub.16	20	2.9
20_10_3	m	8.9	AA group B	18	438	1048	V2R sub.16	27	2.6
20_10_4	m	8.6	AA group C	16	396	448	V2R sub.16	41	9.2
20_11_1	m	8.8	AA group D	16	402	424	V2R sub.16	20	4.7
20_12_1	m	8.7	Arginine	16	476	687	V2R sub.16	56	8.2
19_10_1	m	7.0	Lysin	16	368	841	V2R sub.16	44	5.2
20_10_4	m	8.6	AA group C	17	-	23	V2R 16-1	0	0.0
20_10_4	m	8.6	AA group C	18	-	14	V2R 16-3	0	0.0
20_10_4	m	8.6	AA group C	19	-	39	V2R 16-6	0	0.0

E. 図10Bに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	# of a sections (depth)	c-fos+ number in section	receptor+ in section	receptor	overlap	c-fos+/receptor+ (%)
21_10_1	m	8.9	Male urine	17	157	345	V2R sub.4	5	1.4
20_10_1	m	8.9	Male urine	14	267	178	V2R sub.8	3	1.7
20_10_1	m	8.9	Male urine	8	259	252	V2R sub.14	4	1.6
20_09_1	m	7.2	Male urine	18	274	1099	V2R sub.16	11	1.0

F. 図11BCに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	# of a section (depth)	c-fos+ number in section	V1Rs+ in section	receptor	overlap	c-fos+/receptor+ (%)	receptor+/c-fos+ (%)
21_03_1	m	9.0	control	16	173	83	V1Rs	4	4.8	2.3
22_03_7	m	10.0	control	25	84	164	V1Rs	3	3.6	1.8
22_04_1	m	9.7	control	15	167	141	V1Rs	3	1.8	2.1
21_01_4	m	9.2	amino acids	17	289	101	V1Rs	7	6.9	2.4
21_01_1	m	9.1	amino acids	18	51	346	V1Rs	3	5.9	0.9
21_04_1	m	9.3	amino acids	12	27	139	V1Rs	1	3.7	0.7
19_09_6	m	8.0	food extract	17	60	26	V1Rs	2	7.7	3.3
19_09_4	m	7.7	food extract	15	65	366	V1Rs	1	1.5	0.3
19_11_8	m	6.9	food extract	10	14	134	V1Rs	1	7.1	0.7
20_09_1	m	7.2	male urine	20	244	85	V1Rs	20	23.5	8.2
22_03_8	m	10.2	male urine	25	88	201	V1Rs	7	8.0	3.5
22_04_2	m	9.3	male urine	15	76	215	V1Rs	12	15.8	5.6
21_01_3	m	9.3	conjugated steroids	17	79	199	V1Rs	2	1.0	2.5
21_01_5	m	9.2	conjugated steroids	17	34	442	V1Rs	1	2.9	0.2
21_01_2	m	8.8	conjugated steroids	10	11	68	V1Rs	1	9.1	1.5

G. 図11Eに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	Number of sections	c-fos+ number in section	receptor+ in section	receptor	overlap	c-fos+/receptor+ (%)
20_03_1	m	7.4	control	4	244	78	V1R2	1	1.3
20_07_7	m	8.0	Male urine	6	946	94	V1R2	31	33.0
20_09_1	m	7.2	Male urine	6	869	85	V1R2	22	25.9
20_07_1	m	8.2	4HPAA	7	757	55	V1R2	23	41.8
20_07_3	m	7.7	LCA	7	596	58	V1R2	10	17.2

H. 図11Gに用いたデータ

id	sex	standard length (cm)	stimulant	Number of sections	c-fos+ number in section	receptor+ in section	receptor	overlap	c-fos+/receptor+ (%)
20_10_2	m	9.3	control	6	639	29	V1R5	0	0.0
20_09_1	m	7.2	Male urine	3	-	10	V1R5	4	40.0

表 3. c-fos アッセイの検定 (第 2 章)

A. 図3Cにおける検定

pair	diff	lwr	upr	p-value
control-10 min	275.15	-230.64	780.94	0.36
control-20 min	652.24	146.44	1158.03	0.014*
control-30 min	608.02	102.23	1113.82	0.020*
10 min-20 min	377.09	-128.71	882.88	0.16
10 min-30 min	332.87	-172.92	838.67	0.23
20 min-30 min	-44.21	-550.00	461.58	> 0.99

Tukey-Kramer multiple comparisons of means of number of c-fos⁺ neurons in 1 mm²

B. 図5Bにおける検定

5

pair	t	df	p-value
control-amino acids	3.26	3.02	0.047*
control-food extract	3.54	3.18	0.035*
control-male urine	4.06	3.18	0.024*
control-conjugated steroids	3.34	3.06	0.043*

Welch's t-test of number of c-fos⁺ between control and odorants

C. 図5Cにおける検定

5

pair	Student's t-test			Welch's t-test			F test to compare two variances			
	t	df	p-value	t	df	p-value	F	num df	denom df	p-value
control-amino acids	2.32	6	0.059	2.32	4.22	0.078	0.21	3	3	0.24
control-food extract	1.36	6	0.22	1.36	4.75	0.23	0.32	3	3	0.38
control-male urine	0.39	6	0.71	0.39	3.54	0.72	0.09	3	3	0.080*
control-conjugated steroids	-0.64	6	0.55	-0.64	3.15	0.57	0.03	3	3	0.013*
amino acids-food extract	-1.36	6	0.22	-1.36	5.76	0.22	1.51	3	3	0.74
amino acids-male urine	-3.90	6	0.0080**	-3.90	5.16	0.011*	0.43	3	3	0.50*
amino acids-conjugated steroids	-6.55	6	< 0.001***	-6.55	3.71	0.0036**	0.12	3	3	0.11*
food extract-male urine	-1.80	6	0.12	-1.80	4.57	0.13	0.28	3	3	0.33*
food extract-conjugated steroids	-3.75	6	0.0095**	-3.75	3.48	0.026*	0.08	3	3	0.067
male urine-conjugated steroids	3.01	6	0.022*	3.01	4.57	0.031*	3.53	3	3	0.32*

t-test of the percentage of Trpc2⁺ among c-fos⁺ between two odorants

D. 図11Bにおける検定

pair	diff	lwr	upr	p-value
control-amino acids	-2.11	-13.83	9.61	0.97
control-food extract	2.06	-9.66	13.78	0.98
control-male urine	12.36	0.64	24.08	0.038*
control-conjugated steroids	-0.95	-12.67	10.77	> 0.99
amino acids-food extract	10.30	-1.42	22.02	0.092
amino acids-male urine	-0.05	-11.77	11.67	> 0.99
amino acids-conjugated steroids	10.25	-1.47	21.97	0.094
food extract-male urine	-1.16	-12.88	10.56	> 0.99
food extract-conjugated steroids	1.11	-10.61	12.83	> 0.99
male urine-conjugated steroids	11.41	-0.31	23.13	0.057

Tukey-Kramer multiple comparisons of percentage of c-fos⁺ among V1Rs⁺ between two odorants

E. 図11Cにおける検定

pair	diff	lwr	upr	p-value
control-amino acids	0.75	-3.15	4.66	0.97
control-food extract	-0.64	-4.55	3.27	0.98
control-male urine	3.66	-0.24	7.57	0.067
control-conjugated steroids	0.68	-3.23	4.59	0.98
amino acids-food extract	0.11	-3.79	4.02	> 0.99
amino acids-male urine	4.42	0.51	8.32	0.026*
amino acids-conjugated steroids	0.07	-3.83	3.98	> 0.99
food extract-male urine	4.30	0.40	8.21	0.030*
food extract-conjugated steroids	0.04	-3.87	3.95	> 0.99
male urine-conjugated steroids	4.34	0.44	8.25	0.028*

Tukey-Kramer multiple comparisons of percentage of V1Rs⁺ among c-fos⁺ between two odorants

表 4. *c-fos* アッセイのまとめ (第 3 章)

A. 図16BCに用いたデータ

id	sex	V1R2 allele	species	standard length (cm)	stimulant	V1R2+	overlap	c-fos+/receptor+ (%)
20_03_1	m	1	H.chilotes	7.4	control	78	1	1.3
20_10_2	m	1	H.chilotes	9.3	control	29	0	0.0
22_03_3	m	1	H.chilotes	6.3	control	12	0	0.0
22_03_5	m	1	H.chilotes	6.8	control	10	0	0.0
20_09_3	m	1	H.chilotes	8.0	4HPAA	21	7	33.3
20_07_1	m	1	H.chilotes	8.2	4HPAA	51	16	31.4
20_07_3	m	1	H.chilotes	7.7	LCA	58	10	17.2
22_03_4	m	2	H.sauvagei	6.4	control	67	0	0.0
22_03_6	m	2	H.sauvagei	6.6	control	26	0	0.0
22_03_6	m	2	H.sauvagei	8.1	control	71	0	0.0
20_07_2	m	2	H.sauvagei	6.4	4HPAA	50	0	0.0
20_07_6	m	2	H.sauvagei	5.9	4HPAA	61	5	8.2
20_09_4	m	2	H.sauvagei	7.0	4HPAA	78	3	3.8
20_07_4	m	2	H.sauvagei	6.2	LCA	91	3	3.3

B. 図17Bで用いたデータ

id	sex	V1R2 allele	species	standard length (cm)	stimulant	V1R2+	overlap	c-fos+/receptor+ (%)
20_03_1	m	1	H.chilotes	7.4	control	78	1	1.3
20_10_2	m	1	H.chilotes	9.3	control	29	0	0.0
22_03_3	m	1	H.chilotes	6.3	control	12	0	0.0
22_03_5	m	1	H.chilotes	6.8	control	10	0	0.0
20_07_7	m	1	H.chilotes	8.0	Male urine#35	94	31	33.3
20_09_1	m	1	H.chilotes	7.2	Male urine#41	85	22	31.4
21_07_1	m	1	H.chilotes	8.5	Male urine#43	47	3	6.4
22_04_3	m	1	H.chilotes	9.8	Male urine#31	37	27	73.0
22_04_4	m	1	H.chilotes	8.8	Male urine#34	77	42	54.5

C. 図20Aに用いたデータ

id	sex	V1R2 allele	species	standard length (cm)	stimulant	V1R2+	overlap	c-fos+/receptor+ (%)
22_06_5	m	1	H.chilotes	7.4	MU_5-12#31	52	6	11.5
22_09_3	m	1	H.chilotes	9.3	MU_5-12#34	15	1	6.7
22_06_6	m	1	H.chilotes	6.3	MU_12-19#31	36	0	0.0
22_09_4	m	1	H.chilotes	6.8	MU_12-19#34	29	5	17.2
22_06_7	m	1	H.chilotes	8.6	MU_19-26#31	53	9	17.0
22_09_5	m	1	H.chilotes	7.8	MU_19-26#34	35	2	5.7

22_06_8	m	1	H.chilotes	8.9	MU_26-33#31	37	7	18.9
22_06_8	m	1	H.chilotes	8.9	MU_26-33#31	36	7	19.4
22_09_6	m	1	H.chilotes	8.2	MU_26-33#31	43	3	7.0
22_09_8	m	1	H.chilotes	7.5	MU_26-40#34	48	0	0.0
22_07_1	m	1	H.chilotes	8.4	MU_33-40#31	28	0	0.0
22_07_1	m	1	H.chilotes	8.4	MU_33-40#31	38	6	15.8
22_09_7	m	1	H.chilotes	7.4	MU_33-40#31	42	0	0.0
22_07_2	m	1	H.chilotes	8.1	MU_HMW_#31	9	0	0.0
22_07_5	m	1	H.chilotes	7.5	MU_HMW_#34	9	0	0.0
22_05_1	m	1	H.chilotes	9.7	AllFrac#31	25	18	72.0
22_05_2	m	1	H.chilotes	9.5	AllFrac#34	51	30	58.8

D. 図21Bで用いたデータ

id	sex	V1R2 allele	species	standard length (cm)	stimulant	V1R2+	overlap	c-fos+/ receptor+ (%)
22_08_1	m	1	H.sauvagei	6.8	3HPAA	26	9	34.6
22_02_1	m	1	H.sauvagei	6.8	3HPAA	20	5	25.0
22_03_1	m	1	H.sauvagei	6.7	3HPAA	26	18	69.2
22_02_2	m	2	H.sauvagei	7.2	3HPAA	44	1	2.3
22_03_2	m	2	H.sauvagei	7.0	3HPAA	21	0	0.0
21_08_2	m	2	H.sauvagei	8.5	3HPAA	105	1	1.0

E. 図22Bで用いたデータ

id	sex	V1R2 allele	species	standard length (cm)	stimulant	V1R2+	overlap	c-fos+/ receptor+ (%)
22_08_1	m	1	H.sauvagei	6.8	2HPAA	21	5	23.8
22_08_2	f	1	H.sauvagei	7.8	2HPAA	21	5	23.8
22_08_2	m	2	H.sauvagei	7.8	2HPAA	45	10	22.2
22_08_7	m	1	H.sauvagei	7.4	HGA	17	5	29.4
22_08_8	m	2	H.sauvagei	6.3	HGA	65	1	1.5
22_08_9	m	1	H.sauvagei	7.1	34DHPAA	26	11	42.3
22_08_10	m	2	H.sauvagei	6.3	34DHPAA	35	0	0.0
22_08_3	m	1	H.sauvagei	6.6	3PPA	14	0	0.0
22_08_4	f	2	H.sauvagei	8.3	3PPA	64	2	3.1
22_08_5	m	1	H.sauvagei	7.0	VA	14	0	0.0
22_08_6	m	2	H.sauvagei	6.2	VA	51	1	2.0
22_07_3	m	1	H.sauvagei	7.6	4HPE	18	0	0.0
22_07_4	m	2	H.sauvagei	7.6	4HPE	15	0	0.0
22_09_1	m	1	H.sauvagei	6.8	4HPPyA	21	0	0.0
22_09_2	m	2	H.sauvagei	6.4	4HPPyA	38	0	0.0

表 5. *c-fos* アッセイの検定 (第 3 章)

A. 図16における検定

pair	Student's t-test			Welch's t-test			F test to compare two variances			
	t	df	p-value	t	df	p-value	F	num df	denom df	p-value
control-4HPAA (clade 1)	-41.65	4	1.987e-06	-31.06	1.22	0.01018*	0.00	3	1	0.2385
control-4HPAA (clade 2)	-1.70	4	0.1652	-1.70	2.00	0.23	0.00	2	2	< 0.001***
4HPAA(clade 1)-4HPAA(clade2)	9.02	3	0.003**	11.06	2.59	0.003**	0.11	1	2	0.465

t -test of the percentage of *c-fos* + among *V1R2* + between two odorants

B. 図17における検定

pair	Student's t-test			Welch's t-test			F test to compare two variances			
	t	df	p-value	t	df	p-value	F	num df	denom df	p-value
control-Male urine (clade 1)	-2.92	7	0.022*	-3.31	4.01	0.030*	0.00	3	4	< 0.001***

t -test of the percentage of *c-fos* + among *V1R2* + between two odorants

C. 図21における検定

pair	Student's t-test			Welch's t-test			F test to compare two variances			
	t	df	p-value	t	df	p-value	F	num df	denom df	p-value
control-3HPAA (clade 1)	-3.79	5	0.013*	-31.06	-3.17	0.086	0.00	3	2	< 0.001***
control-3HPAA (clade 2)	-1.63	4	0.1781	-1.63	2.00	0.24	0.00	2	2	< 0.001***
3HPAA(clade 1)-3HPAA(clade2)	3.11	4	0.036*	3.11	2.01	0.089	415	2	2	0.005**

t -test of the percentage of *c-fos* + among *V1R2* + between two odorants

表 6. LC-MS/MS 解析のまとめ

A. m/z = 152.03 でアノテーションされた化合物 (尿 #23)

ID	RT	m/z	Type	name	Height	Area	Gaussian	S/N
2632	15.56637	151.04	[M-H]-	w/o MS2:RESORCINOL MONOACETATE	1.65E+07	4.59E+08	0.902733	13.76065
3199	21.13519	151.0403	[M-H]-	4-hydroxyphenylacetic acid	9.28E+07	4.87E+09	0.85854	131.4924
3457	22.173	151.0403	[M-H]-	C8H8O3; PlaSMA ID-105	3.50E+07	1.57E+09	0.74535	25.96262
4425	24.44942	151.0403	[M-H]-	w/o MS2:Methylparaben	3.95E+07	1.11E+09	0.742814	39.58424
5578	27.02024	151.0403	[M-H]-	C8H8O3; PlaSMA ID-105	1.75E+07	4.94E+08	0.889514	5.636988
8033	30.67527	151.0402	[M-H]-	w/o MS2:C8H8O3; PlaSMA ID-105	1.08E+08	3.99E+09	0.833743	135.0686
8709	31.36035	151.0403	[M-H]-	Vanillin	6.00E+07	2.26E+09	0.80955	57.10452
11137	34.32294	151.0402	[M-H]-	2-Hydroxyphenylacetic acid	1.62E+08	9.18E+09	0.884768	217.1571
12917	36.43908	151.0398	[M-H]-	3-Hydroxyphenylacetic acid	1.93E+09	4.97E+10	0.867015	2886.512
24054	44.33429	151.0402	[M-H]-	w/o MS2:Mandelic acid	3.80E+07	1.31E+09	0.859098	19.159
29995	47.16689	151.0399	[M-2H]2-	w/o MS2:3-HYDROXYPHENYLACETATE	1.20E+08	7.32E+09	0.849087	154.9319

B. 尿中 (#23) でピーク面積が高かった上位20の化合物

ピーク面積が高い順に並べてある。ヒドロキシ基とカルボキシ基をともにもつ化合物を黄色でハイライトした

ID	RT	m/z	Type	name	Height	Area	Gaussian	S/N
10558	33.65496	135.0453	[M-H]-	3-Methylbenzoic acid	1.57E+09	8.40E+10	0.711464	4559.724
25610	44.92274	221.0823	[M-H]-	Diethyl-phthalate	1.72E+09	7.18E+10	0.909225	5109.456
13698	37.25601	138.0195	[M-H]-	4-Nitrophenol	1.92E+09	6.56E+10	0.780083	2193.549
2885	16.33876	137.0241	[M-H]-	3-HYDROXYBENZOATE	1.81E+09	4.99E+10	0.615233	917.6526
12917	36.43908	151.0398	[M-H]-	3-Hydroxyphenylacetic acid	1.93E+09	4.97E+10	0.867015	2886.512
2730	15.83029	137.0245	[M-H]-	3-HYDROXYBENZOATE	1.88E+09	3.68E+10	0.568418	2171.67
8207	30.82845	206.0823	[M-H]-	N-ACETYLPHENYLALANINE	8.98E+08	2.68E+10	0.772494	4003.557
11521	34.72504	174.0559	[M-H]-	Indolacetic acid	4.94E+08	2.36E+10	0.827306	4063.017
29542	46.92131	213.1496	[M-H]-	FA 12:1+10	6.01E+08	2.14E+10	0.981298	1136.18
9249	32.23539	160.0404	[M-H]-	Indole-3-carboxylic acid	1.04E+09	1.87E+10	0.699031	3938.161
26903	45.48169	215.1651	[M-H]-	12-HYDROXYDODECANOIC ACID	6.48E+08	1.64E+10	0.950416	14747.29
6284	28.31677	190.0514	[M-H]-	5-HYDROXYINDOLEACETATE	3.87E+08	1.50E+10	0.775187	3053.102
13824	37.36952	187.1339	[M-H]-	10-Hydroxydecanoic acid	4.91E+08	1.48E+10	0.909616	729.6675
5296	26.47157	172.0981	[M-H]-	N ACETYL L LEUCINE	4.27E+08	1.42E+10	0.84534	1007.991
23709	44.16482	221.0822	[M-H]-	Diethyl-phthalate	4.87E+08	1.38E+10	0.837419	1950.438
2281	13.95901	122.0247	[M-H]-	Nicotinic acid	2.81E+08	1.33E+10	0.955762	997.04
9277	32.25396	173.1181	[M-H]-	FA 9:0+10; PlaSMA ID-176	3.77E+08	1.15E+10	0.850238	357.9217
2364	14.34389	218.1036	[M-H]-	D-PANTOTHENIC ACID	3.00E+08	9.97E+09	0.642256	1969.746
3125	20.65449	181.0504	[M-H]-	3-(4-HYDROXYPHENYL)LACTATE	1.64E+08	9.67E+09	0.856153	568.2949
7117	29.20544	163.04	[M-H]-	trans-4-Coumaric acid	3.08E+08	9.45E+09	0.883155	315.5253

C. 尿中 (#31) からアノテーションされた胆汁酸

ピーク面積が高い順に並べてある。リトコール酸 (LCA) を黄色でハイライトした

ID	RT	m/z	Type	name	Height	Area	Gaussian	S/N
21404	36.813	391.2876	[M-H]-	w/o MS2:Hyodeoxycholic acid	1.00E+09	5.65E+10	0.93235	1352361
21405	36.813	391.2877	[M-H]-	w/o MS2:Hyodeoxycholic acid	1.00E+09	5.65E+10	0.940042	1352361
18278	32.11386	391.2877	[M-H]-	w/o MS2:Hyodeoxycholic acid	6.42E+08	4.12E+10	0.511341	1038398
22214	37.70734	421.2992	[M-H]-	w/o MS2:Cholic Acid, Methyl Ester	2514473	2.13E+08	0.613093	48633.29
5691	20.94982	471.2413	[M-H]-	SCDCA - Sulfochenodeoxycholic acid	4796681	1.58E+08	0.866536	95602.02
21411	36.813	421.2992	[M-H]-	w/o MS2:Cholic Acid, Methyl Ester	2868387	1.46E+08	0.553136	7614.069
6220	21.39374	514.2822	[M-H]-	w/o MS2:Tauroallocholic acid	2033750	9.98E+07	0.689834	40675
6221	21.39374	514.2876	[M-H]-	w/o MS2:Tauroallocholic acid	2033750	9.98E+07	0.813936	40675
5454	20.72911	514.2823	[M-H]-	Tauroallocholic acid	2551436	8.39E+07	0.847778	51028.73
5455	20.72911	514.2827	[M-H]-	Tauroallocholic acid	2551436	8.39E+07	0.85752	51028.73
5456	20.72911	514.2855	[M-H]-	Tauroallocholic acid	2551436	8.39E+07	0.627665	51028.73
22151	37.63188	498.2967	[M-H]-	w/o MS2:Taurodeoxycholic acid	834674.9	6.74E+07	0.648905	14698.51
22152	37.63188	498.2969	[M-H]-	w/o MS2:Taurodeoxycholic acid	834674.9	6.74E+07	0.544464	14698.51
8565	22.28277	407.2794	[M-H]-	w/o MS2:Cholic acid	1234787	4.72E+07	0.861212	22624.4
21602	37.03772	498.2968	[M-H]-	w/o MS2:Taurodeoxycholic acid	880478.9	2.90E+07	0.491137	4132.954
18186	31.9647	805.5542	[M-H]-	w/o MS2:hyodeoxycholic acid	513167.6	1.99E+07	0.738368	10263.35
24003	39.13371	965.5995	[M-H]-	w/o MS2:tauroolithocholic acid	372865.6	1.71E+07	0.805162	6452.105
20173	34.94869	375.2901	[M-H]-	w/o MS2:lithocholic acid	288396.1	1.13E+07	0.660541	4635.481
20680	35.6958	401.2327	[M-H]-	w/o MS2:Dehydrocholic acid	337429.4	1.11E+07	0.687299	1047.065
5384	20.65549	498.2891	[M-H]-	w/o MS2:taurohyodeoxycholic acid	205228.5	6972769	0.850825	4104.57


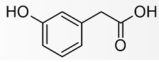
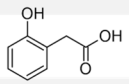
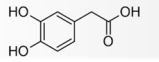
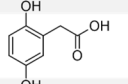
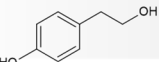
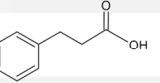
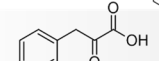
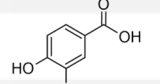
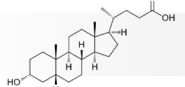
24365	39.59285	805.5674	[M-H]-	w/o MS2:deoxycholic acid	126529	3890354	0.891931	2400.509
16312	29.42781	481.9944	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	23098.5	413491.8	0.941729	461.97
10792	23.31947	783.5799	[M-H]-	w/o MS2:chenodeoxycholic acid	16015.5	285004.6	0.94133	320.31
14799	27.11653	562.0007	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	15204.25	271915.7	0.945393	304.085
3113	18.45404	562.0005	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	13789.5	245909.8	0.940997	275.79

D. 尿中 (#34) からアノテーションされた胆汁酸

ピーク面積が高い順に並べてある。リトコール酸 (LCA) を黄色でハイライトした

ID	RT	m/z	Type	name	Height	Area	Gaussian	S/N
19182	32.48708	391.2876	[M-H]-	w/o MS2:Hyodeoxycholic acid	4.59E+08	5.72E+10	0.494755	3675231
22274	37.67296	391.2875	[M-H]-	w/o MS2:Hyodeoxycholic acid	6.55E+08	5.68E+10	0.585789	1.25E+07
21682	36.92068	391.2877	[M-H]-	w/o MS2:Hyodeoxycholic acid	6.53E+08	3.96E+10	0.923504	1344556
19711	33.38712	391.2876	[M-H]-	w/o MS2:Hyodeoxycholic acid	4.95E+08	1.74E+10	0.536674	659983.8
21071	35.79315	465.327	[M-H]-	w/o MS2:Deoxycholic acid methyl ester	9.11E+07	7.28E+09	0.757501	616302.4
22462	37.82427	465.3269	[M-H]-	w/o MS2:Deoxycholic acid methyl ester	1.20E+08	7.08E+09	0.865309	383413.4
22447	37.82427	407.2811	[M-H]-	w/o MS2:Cholic acid	3.36E+07	2.77E+09	0.584156	658279.6
22280	37.67296	421.299	[M-H]-	w/o MS2:Cholic Acid, Methyl Ester	3055469	2.35E+08	0.780746	16390.87
23424	38.65729	498.2979	[M-H]-	w/o MS2:Taurodeoxycholic acid	465279.3	2.48E+07	0.783711	9021.131
18779	31.81082	805.5564	[M-H]-	w/o MS2:hyodeoxycholic acid	542904.6	2.08E+07	0.745323	10858.09
23611	38.80993	887.6099	[M-H]-	w/o MS2:glycolithocholic acid	217037.8	1.48E+07	0.93958	3163.992
4931	20.14126	487.236	[M-H]-	w/o MS2:SCA - Sulfocholic acid	269413	1.44E+07	0.865026	5388.26
6084	21.26277	514.282	[M-H]-	w/o MS2:Tauroallocholic acid	238682	8961640	0.759106	4617.453
6085	21.26277	514.2826	[M-H]-	w/o MS2:Tauroallocholic acid	238682	8961640	0.742304	4617.453
3846	19.17645	487.2366	[M-H]-	w/o MS2:SCA - Sulfocholic acid	194586	7649227	0.84909	3891.72
1415	16.5414	471.2431	[M-H]-	w/o MS2:SDCA - Sulfodeoxycholic acid	157093.6	6131966	0.841191	3141.871
17179	29.25364	805.5572	[M-H]-	w/o MS2:hyodeoxycholic acid	223047.7	5742897	0.860993	4460.954
5554	20.74031	471.2409	[M-H]-	w/o MS2:SDCA - Sulfodeoxycholic acid	170320.1	5220524	0.649954	3406.403
21894	37.22121	375.29	[M-H]-	w/o MS2:lithocholic acid	51190.81	2205826	0.944432	519.7662
20591	34.96464	375.2899	[M-H]-	w/o MS2:lithocholic acid	54472.19	1988374	0.663613	740.0637
22608	37.89979	514.2822	[M-H]-	w/o MS2:Tauroallocholic acid	53545.81	1528568	0.75195	1070.916
20072	34.06388	887.6152	[M-H]-	w/o MS2:glycolithocholic acid	42788.06	1205264	0.725943	483.2325
21008	35.71764	514.2821	[M-H]-	w/o MS2:Tauroallocholic acid	44996.75	1039907	0.740453	899.935
21832	37.14544	514.282	[M-H]-	w/o MS2:Tauroallocholic acid	40029.88	954143.6	0.643698	800.5975
17915	30.5348	562.0004	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	28339.75	572065.7	0.70098	566.795
16572	28.34611	561.9973	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	23883.75	568895.6	0.811262	477.675
14111	25.17832	562.0004	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	19156.5	428671.2	0.670773	383.13
24010	39.19202	514.282	[M-H]-	w/o MS2:Tauroallocholic acid	15654.38	420929.2	0.678003	313.0875
15946	27.51537	391.405	[M-H]-	w/o MS2:Chenodeoxycholic acid	21791.25	395271.4	0.932701	435.825
21501	36.62095	561.9942	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	21364.25	385741.4	0.934915	427.285
19784	33.5375	401.2326	[M-H]-	w/o MS2:Dehydrocholic acid	18567.5	334821.9	0.938759	371.35
21195	36.01869	562.0005	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	18236.25	329459.5	0.939834	364.725
4937	20.14126	562.0003	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	14863.75	265440.4	0.946828	297.275
11843	23.51791	562.0002	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	11765.25	239417	0.725534	235.305
11844	23.51791	562.0003	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	11765.25	239417	0.795461	235.305
12739	24.04439	1019.554	[M-H]-	w/o MS2:taurochenodeoxycholic acid	13172.75	238092.9	0.940794	263.455
15544	26.91088	562.0004	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	11874.5	219955.1	0.961251	237.49
6394	21.41301	562.0002	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	10112	181843.8	0.937049	202.24
15002	26.23316	562.0005	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	9280.25	167906.9	0.9374	185.605
15901	27.439	561.9973	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	9103	160001.4	0.912797	182.06
21344	36.31946	391.3977	[M-H]-	w/o MS2:Chenodeoxycholic acid	7784.5	140457.2	0.940619	155.69
12708	24.04439	562.0004	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	7411.75	137771.7	0.911079	148.235
49	11.78691	562.0004	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	5580.25	100991.7	0.938001	111.605
1338	16.39042	562.0004	[M-H]-	w/o MS2:Taurolithocholic acid	5442.5	98462.17	0.938406	108.85

表 7. V1R2 のリガンド選択性のまとめ

	-COOH	-OH	-OHの配置	I	II
 4HPAA	○	○	<i>p</i> -	○	△
 3HPAA	○	○	<i>m</i> -	○	×
 2HPAA	○	○	<i>o</i> -	○	○
 3,4DHPAA	○	○	<i>m</i> -, <i>p</i> -	○	×
 HGA	○	○	<i>o</i> -, <i>m</i> -	○	×
 4HPE	×	○	<i>p</i> -	×	×
 3PPA	○	×	—	×	×
 4HPPyA	○	○	<i>p</i> -	×	×
 VA	○	○	<i>p</i> -	×	×
 LCA(胆汁酸)	○	○	—	○	△

引用文献

- Ahuja, G. *et al.* (2015) “Kappe neurons, a novel population of olfactory sensory neurons,” *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 4(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/srep04037.
- Alioto, T. S. and Ngai, J. (2006) “The repertoire of olfactory C family G protein-coupled receptors in zebrafish: Candidate chemosensory receptors for amino acids,” *BMC genomics*, 7, pp. 1–18. doi: 10.1186/1471-2164-7-309.
- Barrett, R. D. H. and Schluter, D. (2008) “Adaptation from standing genetic variation,” *Trends in ecology & evolution*, 23(1), pp. 38–44. doi: 10.1016/j.tree.2007.09.008.
- Behrens, M. *et al.* (2014) “ORA1, a zebrafish olfactory receptor ancestral to all mammalian V1R genes, recognizes 4-hydroxyphenylacetic acid, a putative reproductive pheromone,” *The Journal of biological chemistry*, 289(28), pp. 19778–19788. doi: 10.1074/jbc.M114.573162.
- Boschat, C. *et al.* (2002) “Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor,” *Nature neuroscience*. Nature Publishing Group, 5(12), pp. 1261–1262. doi: 10.1038/nn978.
- Boulenger, G. A. (1911) “On a third collection of fishes made by Dr. E. Bayon in Uganda, 1909–1910,” *Ann Mus Civ Stor Nat Genova*, 45, pp. 64–78.
- Brawand, D. *et al.* (2014) “The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish,” *Nature*. nature.com, 513(7518), pp. 375–381. doi: 10.1038/nature13726.
- Buck, L. B. and Axel, R. (1991) “A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors: A Molecular Basis for Odor Recognition,” *Cell*, 65, pp. 175–187. doi: 10.1016/0092-8674(91)90418-X.
- Burmeister, S. S. and Fernald, R. D. (2005) “Evolutionary conservation of the Egr-1 immediate-early gene response in a teleost,” *The Journal of comparative neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 481(2), pp. 220–232. doi: 10.1002/cne.20380.
- Burmeister, S. S., Jarvis, E. D. and Fernald, R. D. (2005) “Rapid Behavioral and Genomic Responses to Social Opportunity,” *PLoS biology*, 3(11). doi: 10.1371/journal.pbio.0030363.
- Butler, J. M. and Maruska, K. P. (2016) “The Mechanosensory Lateral Line System Mediates Activation of Socially-Relevant Brain Regions during Territorial Interactions,” *Frontiers in behavioral neuroscience*, 10(May). doi: 10.3389/fnbeh.2016.00093.
- de Caprona, M. D. C. (1974) “The effect of chemical stimuli from conspecifics on the behavior of *Haplochromis burtoni* (Cichlidae, Pisces),” *Experientia*, 30(12), pp. 1394–1395. doi: 10.1007/BF01919654.
- Cole, T. B. and Stacey, N. E. (2006) “Olfactory responses to steroids in an African mouth-brooding cichlid, *Haplochromis burtoni* (Günther),” *Journal of fish biology*, 68(3), pp. 661–680. doi: 10.1111/j.0022-1112.2006.00944.x.
- Cong, X. *et al.* (2019) “Zebrafish Olfactory Receptors ORAs Differentially Detect Bile Acids and Bile Salts,” *The Journal of biological chemistry*, (12), p. jbc.RA118.006483. doi:

10.1074/jbc.ra118.006483.

- Del Punta, K. *et al.* (2002) “Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes,” *Nature*. Springer Science and Business Media LLC, 419(6902), pp. 70–74. doi: 10.1038/nature00955.
- DeMaria, S. *et al.* (2013) “Role of a Ubiquitously Expressed Receptor in the Vertebrate Olfactory System,” *Journal of Neuroscience*, 33(38), pp. 15235–15247. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2339-13.2013.
- Dittman, A. and Quinn, T. (1996) “Homing in Pacific salmon: mechanisms and ecological basis,” *The Journal of experimental biology*, 199(Pt 1), pp. 83–91. doi: 10.1242/jeb.199.1.83.
- Dobzhansky, T. (1937) “Genetic Nature of Species Differences,” *The American naturalist*. The University of Chicago Press, 71(735), pp. 404–420. doi: 10.1086/280726.
- Dulac, C. and Axel, R. (1995) “A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals,” *Cell*, 83(2), pp. 195–206. doi: 10.1016/0092-8674(95)90161-2.
- Dulka, J. G. *et al.* (1987) “A steroid sex pheromone synchronizes male-female spawning readiness in goldfish,” *Nature*, 325(6101), pp. 251–253. doi: 10.1038/325251a0.
- Endler, J. A. (1992) “Signals, Signal Conditions, and the Direction of Evolution,” *The American naturalist*. The University of Chicago Press, 139, pp. S125–S153. doi: 10.1086/285308.
- Fatsini, E. *et al.* (2017) “Olfactory sensitivity of the marine flatfish *Solea senegalensis* to conspecific body fluids,” *The Journal of experimental biology*, 220(11), pp. 2057–2065. doi: 10.1242/jeb.150318.
- Field, K. E. and Maruska, K. P. (2017) “Context-dependent chemosensory signaling, aggression and neural activation patterns in gravid female African cichlid fish,” *The Journal of experimental biology*. Company of Biologists Ltd, 220(24), pp. 4689–4702. doi: 10.1242/JEB.164574/262799/AM/CONTEXT-DEPENDENT-CHEMOSENSORY-SIGNALING.
- Frade, P. *et al.* (2002) “Olfactory sensitivity of the Mozambique tilapia to conspecific odours,” *Journal of fish biology*, 61(5), pp. 1239–1254. doi: 10.1006/jfbi.2002.2140.
- Friedrich, R. W. and Korsching, S. I. (1997) “Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging,” *Neuron*. Cell Press, 18(5), pp. 737–752. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80314-1.
- Gerlach, G. *et al.* (2008) “Kin recognition in zebrafish: a 24-hour window for olfactory imprinting,” *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. royalsocietypublishing.org, 275(1647), pp. 2165–2170. doi: 10.1098/rspb.2008.0647.
- Grus, W. E. *et al.* (2005) “Dramatic variation of the vomeronasal pheromone receptor gene repertoire among five orders of placental and marsupial mammals,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(16), pp. 5767–5772. doi: 10.1073/pnas.0501589102.
- Grus, W. E. and Zhang, J. (2009) “Origin of the genetic components of the vomeronasal

- system in the common ancestor of all extant vertebrates,” *Molecular biology and evolution*, 26(2), pp. 407–419. doi: 10.1093/molbev/msn262.
- Hamdani, E. H. and Døving, K. B. (2007) “The functional organization of the fish olfactory system,” *Progress in neurobiology*, 82(2), pp. 80–86. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.02.007.
- Hansen, A. *et al.* (2003) “Correlation between Olfactory Receptor Cell Type and Function in the Channel Catfish,” *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 23(28), pp. 9328–9339. doi: 10.1523/jneurosci.23-28-09328.2003.
- Hara, T. J. (2006) “Feeding behaviour in some teleosts is triggered by single amino acids primarily through olfaction,” *Journal of fish biology*, 68(3), pp. 810–825. doi: 10.1111/j.0022-1112.2006.00967.x.
- Hashiguchi, Y. and Nishida, M. (2006) “Evolution and origin of vomeronasal-type odorant receptor gene repertoire in fishes,” *BMC evolutionary biology*, 13, pp. 1–13. doi: 10.1186/1471-2148-6-76.
- Hasler, A. D. and Wisby, W. J. (1951) “Discrimination of Stream Odors by Fishes and Its Relation to Parent Stream Behavior,” *The American naturalist*. The University of Chicago Press, 85(823), pp. 223–238. doi: 10.1086/281672.
- Hermisson, J. and Pennings, P. S. (2005) “Soft sweeps: molecular population genetics of adaptation from standing genetic variation,” *Genetics*, 169(4), pp. 2335–2352. doi: 10.1534/genetics.104.036947.
- Herrada, G. and Dulac, C. (1997) “A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution,” *Cell*, 90(4), pp. 763–773. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80536-X.
- Hert, B. E. V. A. (1985) “Individual Recognition of Helpers by the Breeders in the Cichlid Fish *Lamprologus bridardi* (Poll, 1974),” *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 325, pp. 313–325.
- Hinz, C., Kobbenbring, S., *et al.* (2013) “Kin recognition in zebrafish, *Danio rerio*, is based on imprinting on olfactory and visual stimuli,” *Animal behaviour*. Elsevier, 85(5), pp. 925–930. doi: 10.1016/j.anbehav.2013.02.010.
- Hinz, C., Namekawa, R., *et al.* (2013) “Olfactory imprinting is triggered by MHC peptide ligands,” *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 3(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/srep02800.
- Huertas, M. *et al.* (2010) “Olfactory sensitivity to bile fluid and bile salts in the European eel (*Anguilla anguilla*), goldfish (*Carassius auratus*) and Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) suggests a ‘broad range’ sensitivity not confined to those produced by conspecifics a,” *The Journal of experimental biology*. The Company of Biologists Ltd, 213(2), pp. 308–317. doi: 10.1242/jeb.033142.
- Hussain, A. *et al.* (2013) “High-affinity olfactory receptor for the death-associated odor cadaverine,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(48), pp. 19579–19584. doi: 10.1073/pnas.1318596110.

- J. Snoeks (2000) "How Well Known is the Ichthyodiversity of the Large East African Lakes ?," *Advances in ecological research*, 31, pp. 17–38.
- Johnson, T. C., Kelts, K. and Odada, E. (2000) "The Holocene History of Lake Victoria," *Ambio*, 29(1), pp. 2–11.
- Jones, D. T. and Reed, R. R. (1989) "Golf ; An Olfactory Neuron Specific-G Protein," *Science*, 244(4906), pp. 790–795. doi: 10.1126/science.2499043.
- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes," *Nucleic acids research*. academic.oup.com, 28(1), pp. 27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27.
- Katoh, K. and Standley, D. M. (2013) "MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability," *Molecular biology and evolution*. Oxford Academic, 30(4), pp. 772–780. doi: 10.1093/MOLBEV/MST010.
- Kawamura, R. and Nikaido, M. (2022) "c-fos expression in the olfactory epithelium of the East African cichlid (*Haplochromis chilotes*) in response to odorant exposure," *The Journal of experimental biology*. The Company of Biologists, 225(20), p. 2013. doi: 10.1242/jeb.244737.
- Keller-Costa, T. *et al.* (2014) "Identity of a tilapia pheromone released by dominant males that primes females for reproduction," *Current biology: CB*, 24(18), pp. 2130–2135. doi: 10.1016/j.cub.2014.07.049.
- Keller-Costa, T. *et al.* (2016) "A Multi-Component Pheromone in the Urine of Dominant Male Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Reduces Aggression in Rivals," *Journal of chemical ecology*, 42(2), pp. 173–182. doi: 10.1007/s10886-016-0668-0.
- Keller-Costa, T., Canario, A. V. M. and Hubbard, P. C. (2014) "Olfactory sensitivity to steroid glucuronates in Mozambique tilapia suggests two distinct and specific receptors for pheromone detection," *The Journal of experimental biology*, 217(23), pp. 4203–4212. doi: 10.1242/jeb.111518.
- Keller-Costa, T., Canário, A. V. M. and Hubbard, P. C. (2015) "Chemical communication in cichlids: A mini-review," *General and comparative endocrinology*. Elsevier Inc., 221, pp. 64–74. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.01.001.
- Kocher, T. D. (2004) "Adaptive evolution and explosive speciation: The cichlid fish model," *Nature reviews. Genetics*, 5(4), pp. 288–298. doi: 10.1038/nrg1316.
- Koide, T. *et al.* (2009) "Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106(24), pp. 9884–9889. doi: 10.1073/pnas.0900470106.
- Kozlov, A. M. *et al.* (2019) "RAxML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference," *Bioinformatics*. Oxford University Press, 35(21), pp. 4453–4455. doi: 10.1093/bioinformatics/btz305.
- Kress, S. and Wullimann, M. F. (2012) "Correlated basal expression of immediate early gene *egr1* and tyrosine hydroxylase in zebrafish brain and downregulation in olfactory bulb after transitory olfactory deprivation," *Journal of chemical neuroanatomy*. Elsevier, 46(1–2), pp. 51–66. doi: 10.1016/J.JCHEMNEU.2012.09.002.

- Kutsyna, O. *et al.* (2016) “Variation in Urinary Amino Acids in the Mozambique Tilapia: A Potential Signal of Dominance or Individuality?,” *Chemical Signals in Vertebrates 13*, pp. 189–203. doi: 10.1007/978-3-319-22026-0_14.
- Li, Q. *et al.* (2015) “Non-classical amine recognition evolved in a large clade of olfactory receptors,” *eLife*. eLife Sciences Publications Ltd, 4(OCTOBER2015). doi: 10.7554/eLife.10441.
- Li, W., Sorensen, P. W. and Gallaher, D. D. (1995) “The olfactory system of migratory adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*) is specifically and acutely sensitive to unique bile acids released by conspecific larvae,” *The Journal of general physiology*. The Rockefeller University Press, 105(5), pp. 569–587. doi: 10.1085/jgp.105.5.569.
- Liberles, S. D. and Buck, L. B. (2006) “A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium,” *Nature*. Nature Publishing Group, 442(7103), pp. 645–650. doi: 10.1038/nature05066.
- Loconto, J. *et al.* (2003) “Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules,” *Cell*. Cell Press, 112(5), pp. 607–618. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00153-3.
- Luu, P. *et al.* (2004) “Molecular determinants of ligand selectivity in a vertebrate odorant receptor,” *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 24(45), pp. 10128–10137. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3117-04.2004.
- Malnic, B. *et al.* (1999) “Combinatorial Receptor Codes for Odors,” *Cell*. Cell Press, 96(5), pp. 713–723. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80581-4.
- Maruska, K. P. and Fernald, R. D. (2012) “Contextual chemosensory urine signaling in an African cichlid fish,” *The Journal of experimental biology*. The Company of Biologists Ltd, 215(1), pp. 68–74. doi: 10.1242/jeb.062794.
- Meier, J. I. *et al.* (2017) “Ancient hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations,” *Nature communications*. Nature Publishing Group, 8(May 2016), pp. 1–11. doi: 10.1038/ncomms14363.
- Meier, J. I. *et al.* (2018) “Genomics of Parallel Ecological Speciation in Lake Victoria Cichlids,” 35(6), pp. 1489–1506. doi: 10.1093/molbev/msy051.
- Michel, W. C. and Lubomudrov, L. M. (1995) “Specificity and sensitivity of the olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*,” *Journal of Comparative Physiology A*, 177(2), pp. 191–199. doi: 10.1007/BF00225098.
- Milinski, M. *et al.* (2005) “Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(12), pp. 4414–4418. doi: 10.1073/pnas.0408264102.
- Miranda, A. *et al.* (2005) “Olfactory discrimination of female reproductive status by male tilapia (*Oreochromis mossambicus*),” *The Journal of experimental biology*. The Company of Biologists Ltd, 208(11), pp. 2037–2043. doi: 10.1242/jeb.01584.
- Nakamura, H. *et al.* (2021) “Genomic Signatures for Species-Specific Adaptation in Lake Victoria Cichlids Derived from Large-Scale Standing Genetic Variation,” *Molecular*

- biology and evolution*. Edited by K. Tamura. Oxford University Press (OUP). doi: 10.1093/molbev/msab084.
- Nikaido, M. *et al.* (2013) “Lineage-specific expansion of vomeronasal type 2 receptor-like (OlfC) genes in cichlids may contribute to diversification of amino acid detection systems,” *Genome biology and evolution*, 5(4), pp. 711–722. doi: 10.1093/gbe/evt041.
- Nikaido, M. *et al.* (2014) “Multiple episodic evolution events in v1r receptor genes of East-African cichlids,” *Genome biology and evolution*, 6(5), pp. 1135–1144. doi: 10.1093/gbe/evu086.
- Nikaido, M. (2019) “Evolution of V1R pheromone receptor genes in vertebrates : diversity and commonality,” *Genes & genetic systems*, pp. 1–9.
- Oka, Y., Saraiva, L. R. and Korsching, S. I. (2012) “Crypt neurons express a single v1r-related ora gene,” *Chemical senses*, 37(3), pp. 219–227. doi: 10.1093/chemse/bjr095.
- Okuyama, T. *et al.* (2011) “Induction of c-fos transcription in the medaka brain (*Oryzias latipes*) in response to mating stimuli,” *Biochemical and biophysical research communications*. Elsevier Inc., 404(1), pp. 453–457. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.143.
- O’Quin, K. E. *et al.* (2010) “Parallel evolution of opsin gene expression in African cichlid fishes,” *Molecular biology and evolution*. academic.oup.com, 27(12), pp. 2839–2854. doi: 10.1093/molbev/msq171.
- Pfeffer, G. J. (1896) “Die Thierwelt Ost-Afrikas und der Nachbargebiete,” *Lieferung V. Die Fische Ost-Afrikas*.
- Plenderleith, M. *et al.* (2005) “Female preference for conspecific males based on olfactory cues in a Lake Malawi cichlid fish,” *Biology letters*, 1(4), pp. 411–414. doi: 10.1098/rsbl.2005.0355.
- Rabosky, D. L. *et al.* (2018) “An inverse latitudinal gradient in speciation rate for marine fishes,” *Nature*. Nature Publishing Group, 559(7714), pp. 392–395. doi: 10.1038/s41586-018-0273-1.
- Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000) “EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite,” *Trends in genetics: TIG*, 16(6), pp. 276–277. doi: 10.1016/s0168-9525(00)02024-2.
- Rolen, S. H. *et al.* (2003) “Polyamines as olfactory stimuli in the goldfish *Carassius auratus*,” *The Journal of experimental biology*, 206(10), pp. 1683–1696. doi: 10.1242/jeb.00338.
- Ronco, F. *et al.* (2020) “The taxonomic diversity of the cichlid fish fauna of ancient Lake Tanganyika, East Africa,” *Journal of Great Lakes research*. The Authors, 46(5), pp. 1067–1078. doi: 10.1016/j.jglr.2019.05.009.
- Samonte, I. E. *et al.* (2007) “Gene Flow between Species of Lake Victoria Haplochromine Fishes,” *Molecular biology and evolution*, 24(9), pp. 2069–2080. doi: 10.1093/molbev/msm138.
- Saraiva, L. R. and Korsching, S. I. (2007) “A novel olfactory receptor gene family in teleost fish,” *Genome research*, 17(10), pp. 1448–1457. doi: 10.1101/gr.6553207.

- Sato, K. and Sorensen, P. W. (2018) “The chemical sensitivity and electrical activity of individual olfactory sensory neurons to a range of sex pheromones and food odors in the goldfish,” *Chemical senses*, 43(4), pp. 249–260. doi: 10.1093/chemse/bjy016.
- Sato, K. and Suzuki, N. (2001) “Whole-cell Response Characteristics of Ciliated and Microvillous Olfactory Receptor Neurons to Amino Acids, Pheromone Candidates and Urine in Rainbow Trout,” *Chemical senses*. Oxford University Press, 26(9), pp. 1145–1156. doi: 10.1093/chemse/26.9.1145.
- Sato, Y., Miyasaka, N. and Yoshihara, Y. (2005) “Mutually Exclusive Glomerular Innervation by Two Distinct Types of Olfactory Sensory Neurons Revealed in Transgenic Zebrafish,” *Journal of Neuroscience*, 25(20), pp. 4889–4897. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0679-05.2005.
- Schulte, J. E. *et al.* (2014) “Interspecific Variation in Rx1 Expression Controls Opsin Expression and Causes Visual System Diversity in African Cichlid Fishes,” *Molecular biology and evolution*. Oxford Academic, 31(9), pp. 2297–2308. doi: 10.1093/MOLBEV/MSU172.
- Seegers, L. (2008) “The fishes collected by G. A. Fischer in East Africa in 1883 and 1885/86,” *Mitteilungen aus dem Museum fur Naturkunde in Berlin. Zoologische Reihe*. Wiley, 84(2), pp. 149–195. doi: 10.1002/zoos.200800003.
- Seehausen, O. (1996) *Lake Victoria Rock Cichlids*. Verduyn Cichlids.
- Seehausen, O. *et al.* (2008) “Speciation through sensory drive in cichlid fish,” *Nature*, 455(7213), pp. 620–626. doi: 10.1038/nature07285.
- Shoji, T. *et al.* (2003) “Amino acids in stream water are essential for salmon homing migration,” *Fish physiology and biochemistry*. Springer, 28(1–4), pp. 249–251. doi: 10.1023/B:FISH.0000030544.64774.f6.
- Smadja, C. M. *et al.* (2022) “Divergence of olfactory receptors associated with the evolution of assortative mating and reproductive isolation in mice,” *Peer Community Journal*. Peer Community In, 2(e72). doi: 10.24072/pcjournal.190.
- Smith, A. R. and Carleton, K. L. (2010) “Allelic variation in Malawi cichlid opsins: A tale of two genera,” *Journal of molecular evolution*. Springer, 70(6), pp. 593–604. doi: 10.1007/S00239-010-9355-X/FIGURES/10.
- Sorensen, P. W. *et al.* (1988) “F Prostaglandins Function as Potent Olfactory Stimulants that Comprise the Postovulatory Female Sex Pheromone in Goldfish1,” *Biology of reproduction*, 39(5), pp. 1039–1050. doi: 10.1095/biolreprod39.5.1039.
- Sorensen, P. W., Christensen, T. A. and Stacey, N. E. (1998) “Discrimination of pheromonal cues in fish: emerging parallels with insects,” *Current opinion in neurobiology*, 8(4), pp. 458–467. doi: 10.1016/s0959-4388(98)80032-9.
- Stacey, N. E. *et al.* (1989) “Direct evidence that 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a goldfish primer pheromone: Preovulatory release is closely associated with male endocrine responses,” *General and comparative endocrinology*. Academic Press, 75(1), pp. 62–70. doi: 10.1016/0016-6480(89)90008-7.
- Stacey, N. E. (2011) *Hormonally Derived Sex Pheromones in Fishes*. Elsevier, pp. 169–192.

doi: 10.1016/B978-0-12-375009-9.10009-8.

- Stacey, N. and Sorensen, P. (2002) “25 - Hormonal Pheromones in Fish,” in Pfaff, D. W. et al. (eds.) *Hormones, Brain and Behavior*. San Diego: Academic Press, pp. 375–434. doi: 10.1016/B978-012532104-4/50027-5.
- Suzuki, H. *et al.* (2015) “Distinct functions of two olfactory marker protein genes derived from teleost-specific whole genome duplication Evolutionary ecology and behaviour,” *BMC evolutionary biology*. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12862-015-0530-y.
- Svardal, H. *et al.* (2020) “Ancestral Hybridization Facilitated Species Diversification in the Lake Malawi Cichlid Fish Adaptive Radiation,” *Molecular biology and evolution*. *academic.oup.com*, 37(4), pp. 1100–1113. doi: 10.1093/molbev/msz294.
- Terai, Y. *et al.* (2002) “The effect of selection on a long wavelength- sensitive (LWS) opsin gene of Lake Victoria cichlid fishes,” 99(24).
- Terai, Y. *et al.* (2006) “Divergent selection on opsins drives incipient speciation in Lake Victoria cichlids,” *PLoS biology*, 4(12), pp. 2244–2251. doi: 10.1371/journal.pbio.0040433.
- Terai, Y. *et al.* (2017) “Visual adaptation in Lake Victoria cichlid fishes: Depth-related variation of color and scotopic opsins in species from sand/mud bottoms,” *BMC evolutionary biology*. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12862-017-1040-x.
- Theis, A., Salzburger, W. and Egger, B. (2012) “The Function of Anal Fin Egg-Spots in the Cichlid Fish *Astatotilapia burtoni*,” *PloS one*, 7(1), p. 29878. doi: 10.1371/journal.pone.0029878.
- Tsugawa, H. *et al.* (2015) “MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis,” *Nature methods*, 12(6), pp. 523–526. doi: 10.1038/nmeth.3393.
- Tsugawa, H. *et al.* (2016) “Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software,” *Analytical chemistry*, 88(16), pp. 7946–7958. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00770.
- Turner, L. M. and Harr, B. (2014) “Genome-wide mapping in a house mouse hybrid zone reveals hybrid sterility loci and Dobzhansky-Muller interactions,” *eLife*, 3. doi: 10.7554/eLife.02504.
- Valentinčič, T., Lamb, C. F. and Caprio, J. (1999) “Expression of a reflex biting/snapping response to amino acids prior to first exogenous feeding in salmonid alevins,” *Physiology and Behavior*. Elsevier Inc., 67(4), pp. 567–572. doi: 10.1016/S0031-9384(99)00112-2.
- Van Der Sluijs, I. *et al.* (2008) “A test of fitness consequences of hybridization in sibling species of Lake Victoria cichlid fish,” *Journal of evolutionary biology*, 21(2), pp. 480–491. doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01495.x.
- Verzijden, M. N., Korthof, R. E. M. and Ten Cate, C. (2008) “Females learn from mothers and males learn from others. The effect of mother and siblings on the development of female mate preferences and male aggression biases in Lake Victoria cichlids, genus *Mbipia*,” *Behavioral ecology and sociobiology*, 62(8), pp. 1359–1368. doi: 10.1007/s00265-

008-0564-x.

- Verzijden, M. N. and Ten Cate, C. (2007) "Early learning influences species assortative mating preferences in Lake Victoria cichlid fish," *Biology letters*, 3(2), pp. 134–136. doi: 10.1098/rsbl.2006.0601.
- Wakisaka, N. *et al.* (2017) "An Adenosine Receptor for Olfaction in Fish," *Current biology: CB*. Cell Press, 27(10), pp. 1437-1447.e4. doi: 10.1016/J.CUB.2017.04.014.
- Wright, D. S. *et al.* (2020) "Testing sensory drive speciation in cichlid fish: Linking light conditions to opsin expression, opsin genotype and female mate preference," *Journal of evolutionary biology*. Blackwell Publishing Ltd, 33(4), pp. 422–434. doi: 10.1111/jeb.13577.
- Yabuki, Y. *et al.* (2016) "Olfactory receptor for prostaglandin F₂α mediates male fish courtship behavior," *Nature neuroscience*, 19(7), pp. 897–904. doi: 10.1038/nn.4314.
- Yamamoto, Y., Hino, H. and Ueda, H. (2010) "Olfactory Imprinting of Amino Acids in Lacustrine Sockeye Salmon," *PloS one*. Edited by B. Brembs. Public Library of Science, 5(1), p. e8633. doi: 10.1371/journal.pone.0008633.
- Yambe, H. *et al.* (2006) "l-Kynurenine, an amino acid identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), pp. 15370–15374. doi: 10.1073/pnas.0604340103.
- Yambe, H., Shindo, M. and Yamazaki, F. (1999) "A releaser pheromone that attracts males in the urine of mature female masu salmon," *Journal of fish biology*, 55(1), pp. 158–171. doi: 10.1006/jfbi.1999.0980.
- Yang, Z. (1997) "PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood," *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, 13(5), pp. 555–556. doi: 10.1093/bioinformatics/13.5.555.
- Young, J. M. *et al.* (2005) "Divergent V1R repertoires in five species: Amplification in rodents, decimation in primates, and a surprisingly small repertoire in dogs," *Genome research*, 15(2), pp. 231–240. doi: 10.1101/gr.3339905.
- Young, J. M. *et al.* (2010) "Extreme variability among mammalian V1R gene families," *Genome research*, 20(1), pp. 10–18. doi: 10.1101/gr.098913.109.
- Yu, G. *et al.* (2017) "Ggtree : An r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data," *Methods in ecology and evolution / British Ecological Society*. Wiley, 8(1), pp. 28–36. doi: 10.1111/2041-210x.12628.
- Zhang, C., Brown, S. B. and Hara, T. J. (2001) "Biochemical and physiological evidence that bile acids produced and released by lake char (*Salvelinus namaycush*) function as chemical signals," *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 171(2), pp. 161–171. doi: 10.1007/s003600000170.

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究室に入ったばかりの頃から研究の立案・計画、実験の相談、発表、論文執筆まで細やかに指導して下さった指導教官である二階堂雅人准教授に深く感謝いたします。また、LC-MS/MS 解析やカルシウムイメージングなどの解析をしていただいた共同研究者である東京大学の東原和成教授、村田健助教に感謝いたします。さらに実験の相談から論文・申請書の執筆まで締め切りギリギリまで多くの相談に乗って下さった長澤竜樹助教、尿採取やシクリッドについて多くの助言を頂いた相原光人に御礼申し上げます。最後に生活面・経済面で支え、いつも応援して下さった家族の皆様、癒やしを通じて精神的に支えて下さったスナネズミのビル君、デグーのでぐ、コザクラインコのキョロちゃん、そして研究室生活で研究の話や遊びを通じて研究面でも精神面でも支えて下さった二階堂研究室の皆様感謝いたします。

報文目録

Kawamura, R. and Nikaido, M. (2022) “c-fos expression in the olfactory epithelium of the East African cichlid (*Haplochromis chilotes*) in response to odorant exposure,” *The Journal of experimental biology*. The Company of Biologists, 225(20), p. 2013. doi: 10.1242/jeb.244737.