

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	河村理輝		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	二階堂雅人	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

生物は視覚情報や化学情報をもとに同種の個体を識別する。このとき使われるシグナルとその受容器が種特異的であることによって同種と選択的に交配できるようになる。このシグナルと受容器の共進化は生物の多様性創出の重要な一端を担う。

東アフリカの湖に生息する熱帯魚シクリッドは少数の種から爆発的に多様化したことが知られており、種分化研究に最適なモデル生物であると考えられている。従来、シクリッドのオスが種ごとに異なる多彩な婚姻色を持っていることから視覚に着目した種分化研究が行われてきた。一方で様々な場面で嗅覚を利用することも知られており、嗅覚を介した選択的交配が行われることも報告されている。さらに当研究室が実施した分子系統解析から嗅覚受容体の多様化が明らかにされている。しかし、シクリッドにおいて嗅覚を介した種分化は実証されていない。

本研究ではまずシクリッドにおける匂い受容検出系の確立を目指した。魚類は嗅覚を利用して水中から様々な手がかりを得ており、特定の行動を引き起こす匂いとその受容体の解明は魚類の多様性の理解に不可欠である。しかし、そのような研究は一部のモデル生物に限定されている。そこで本研究ではシクリッドの嗅覚受容体のリガンド選択性を明らかにするため、神経活動マーカー *c-fos* のリポプローブを用いた 2 色 *in situ* hybridization による匂い受容の評価系を確立した。はじめに餌抽出物の曝露によってシクリッドの *c-fos*⁺細胞数が増加することを確かめた。また、他の真骨魚と同様にアミノ酸受容に微絨毛細胞 (*Trpc2*⁺細胞) が大きく寄与していることを示した。次に大多数の微絨毛細胞で発現していることが知られる 2 型鋤鼻受容体 V2R のアミノ酸に対する応答を検証し、V2R のサブファミリーごとのアミノ酸に対する応答性の違いを示した。特にシクリッドで系統特異的にコピー数が増加している V2R サブファミリー14 ではアルギニンに応答し、サブファミリー14 内のコピー間でアルギニンに対する応答性に違いがあることが分かった。これはシクリッドにおける嗅覚受容体のコピー数増加が識別できる匂いの増加を介して環境適応や種分化に貢献したことを示唆している。また本研究ではシクリッドの尿採取方法を確立し、シクリッドのオスの尿に対するリガンド応答を評価した。特に 1 型鋤鼻受容体 V1R が尿に反応していること示し、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。

次に本研究ではシクリッドの V1R2 受容体に着目した。哺乳類等でフェロモン受容体として知られる 1 型鋤鼻受容体 (V1R) は繰り返し重複することによって種ごとに極めて多様なレパートリーが存在しており、種特異的なフェロモン受容を担っている。一方で魚類の V1R は保存的であり、6 つのオーソログが種間で共有されている。そのことから魚類の V1R は魚類で共通した基盤的な機能を持つことが予想されるが明らかにはされていない。当研究室が実施した分子系統解析では東アフリカのシクリッドの V1R の一つ V1R2 遺伝子の大きく配列の異なる 2 種類のアリル (clade I と clade II) が遺伝子多型として存在することを明らかにしている。2 種類のアリル間で異なる残基は推定上のリガンド結合部位周辺に集合しており、異なるリガンドを受容することが示唆される。そのことから V1R2 の 2 種類のアリルがお互いに異なるフェロモンを受容することで選択的交配が生じ、東アフリカにおけるシクリッド

の多様性創出に寄与したことが予想される。

本研究ではゼブラフィッシュの V1R2 受容体のアゴニストとして知られる 4-ヒドロキシフェニル酢酸 (4HPAA) とその誘導体など、複数のリガンド候補を用いて V1R2 受容体のリガンド応答性を評価し、V1R2 のアレル間でリガンド選択性が異なることを明らかにした。また、シクリッドの尿の LC-MS/MS 解析から clade I 型 V1R2 がリガンド応答した化合物の一つ、3-ヒドロキシフェニル酢酸 (3HPAA) が clade I 型のシクリッドの尿中に多量に存在することも明らかになった。さらにシクリッド尿の画分に対するリガンド応答を評価したところ、V1R2 受容体は尿中の複数の化合物を受容することが示唆された。今後 V1R2 受容体のリガンド選択性のより詳細な解析や、尿中の V1R2 受容体のリガンド存在量の動態を明らかにしていくことで V1R2 の多型のシクリッドの多様性創出への寄与を明らかにできることが期待される。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	河村理輝		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	二階堂雅人	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

East African cichlids are a species of fish renowned for their striking example of adaptive radiation among vertebrates. Although the diversification of several olfactory receptor in cichlid is reported, the ligand specificity of each olfactory sensory neurons (OSN) in cichlids remains poorly understood. In this study, I performed *in situ* hybridization with a riboprobe of the neural activity marker gene *c-fos* to investigate the ligand specificity in cichlid. I demonstrated the ligand specificity of several OSNs such as microvillous neurons and $V2R^+$ OSNs. Notably, I uncovered a differential response to arginine in the genes in the cichlid-specifically diversified $V2R$ subfamily, suggesting that duplication of olfactory receptor genes may have contributed the adaptive radiation in cichlid though the expansion of detectable odorants. Furthermore, I established a new method for collecting urine directly from cichlid. I investigated the response of OSNs to male urine and showed a response of $V1Rs^+$ neurons suggesting the role of $V1R$ receptors as pheromone receptors.

Next, I focused on $V1R2$ (vomeronasal-type 1 receptor 2) receptor, a candidate pheromone receptor in teleosts. My laboratory previously revealed that cichlid possess highly diversified alleles of $V1R2$ (clade I, clade II). I examined the ligand responses of $V1R2$ against several ligand candidates, including 4-hydroxyphenyl acetate (4HPAA) and its derivatives, and demonstrated differing ligand selectivity between the two alleles of $V1R2$. I also performed LC-MS/MS analysis of cichlid urine and discovered that 3-hydroxyphenyl acetate (3HPAA), a compound to which clade I- $V1R2$ responded, was present in high concentrations in the urine of clade I-cichlid. Further analysis of the ligand response to a fraction of cichlid urine suggested that the $V1R2$ receptor responds to multiple compounds in urine. Further research into the ligand selectivity of the $V1R2$ receptor and the dynamics of ligand abundance in the urine of the $V1R2$ receptor is expected to clarify the contribution of $V1R2$ polymorphism to the creation of cichlid diversity.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).