

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	真骨魚類特異的ゲノム重複に伴うOlfactory Marker Protein遺伝子の倍化と進化
Title(English)	
著者(和文)	鈴木彦有
Author(English)	Hikoyuu Suzuki
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10083号, 授与年月日:2016年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:二階堂 雅人,木村 宏,本郷 裕一,廣田 順二,梶川 正樹,岡田 典弘
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10083号, Conferred date:2016/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成27年度 博士論文

**真骨魚類特異的ゲノム重複に伴う
*Olfactory Marker Protein*遺伝子の倍化と進化**

東京工業大学大学院 生命理工学研究科
生体システム専攻 鈴木 彦有
指導教員 二階堂 雅人 准教授

目次

目次	1
序論	4
遺伝子重複	4
脊椎動物の進化における全ゲノム重複	5
全ゲノム重複後の遺伝子進化	7
嗅覚	9
Olfactory Marker Protein	11
本研究の目的	13
材料・方法	14
データマイニング	14
配列アラインメント	15
分子系統解析	15
シンテニー解析	16
実験動物	16
RT-PCR	16
クローニング	17
標識RNA合成	18

組織切片標本作製	19
in situハイブリダイゼーション	19
ESTデータベース検索	22
トランスクリプトーム解析	22
抗OMP2抗血清の作製	23
大腸菌を用いたOMPの合成	24
SDS-PAGE	25
ウェスタンブロットティング	25
免疫染色	26
結果	27
OMPの配列解析	27
OMPの分子系統解析	28
OMP周辺のシンテニー解析	29
組織間におけるOMPの比較発現解析	29
細胞間におけるOMPの比較発現解析	32
嗅上皮におけるOMP2陽性細胞の特性解析	32
OMP2陽性細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子の探索	35
抗OMP2ポリクローナル抗体の作製	37
考察	40

3R以外の全ゲノム重複に由来するOMPの倍化	40
OMPの起源について	41
眼におけるOMP2の機能	41
四足動物におけるOMPの発現パターンの進化	42
嗅覚関連遺伝子に対する全ゲノム重複の影響	43
OMP2陽性細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子	44
subfunctionalizationによるOMPの保持	44
細胞群間でのsubfunctionalizationによる種多様性の獲得	46
展望	48
結論	51
謝辞	52
引用文献	53
講演目録	68
報文目録	69
付録	70
図表	71

序論

遺伝子重複

現代の進化学において遺伝子進化の重要性は疑う余地のない共通認識である。遺伝子配列が変異し、アミノ酸配列が変異することで、タンパク質の構造、そして機能が変化し、それによって個体が新たな表現型を獲得するという進化のメカニズムは単純かつ明快である。しかし、そのような変異は同時にこれまで長い年月を経て築き上げられてきた表現型の破棄にもなり得るため、むしろ新しい表現型が環境に適応できず、そうした変異が生物集団中に広がらないケースが多いと推測される。実際、遺伝子には通常、負の選択圧が働いていることが示唆されており^[1]、前述したメカニズムに従った遺伝子進化は通常あまり起きていないと考えられている。

しかし、遺伝子重複が起きた場合は様相が異なる。遺伝子重複とは既存の遺伝子と全く同じ配列を持ったコピーがゲノム上の別の座位に生じることであるが、このようなケースでは片方が元の遺伝子配列を担保することで、従来の表現型を維持しつつ他方の遺伝子配列が変化できることになる。つまり、重複した遺伝子のどちらか片方には前述したメカニズムに従った遺伝子進化が起こり得る。実際、重複遺伝子ではパラログの片方に正の選択圧が働いている例が報告されている^[1]。ただし、重複遺伝子が全てそのような進化を遂げるわけではなく、パラログの片方がそのまま偽遺伝子化してしまうケースもままある^[2]。

遺伝子重複が起こるメカニズムはいくつか知られているが、最も有名なものはタンDEM重複と全ゲノム重複であろう。前者は元の遺伝子の近傍に新たなコピーが生じるものであり、染色体間の不等交差などによって生じると考えられている^[3]。そ

のため、類似性の高い配列が繰り返し並んでいる遺伝子クラスターではタンDEM重複が起こりやすい。例えば、嗅覚受容体遺伝子クラスターなどが一例である^[4]。一方、後者ではゲノム全体が重複することにより、全ての遺伝子が一度に重複する。これは配偶子形成の際の減数分裂が正常に完了せず、通常の倍の染色体を持った配偶子同士が受精することによって起こると考えられている。全ゲノム重複の場合、遺伝子間のネットワークも重複するため、より複雑な進化が引き起こされると予想される。全ゲノム重複は植物でしばしば見られる現象であるが、動物では植物ほど頻繁には起きていないようである。

脊椎動物の進化における全ゲノム重複

1970年に大野乾は著書「Evolution by Gene Duplication」^[5]で、脊椎動物の進化の初期段階で全ゲノム重複が起きたとする仮説を提唱した。これはのちに、少なくとも2度の全ゲノム重複が起きたと考えられることから「2R仮説」と呼ばれるようになり^[6, 7]、その検証をめぐって現在もなお論争が続いているテーマである。近年ではシークエンス技術の進展により、ヤツメウナギやナメクジウオといった脊椎動物の系統では古くに分岐した種のゲノム配列が解読され^[8, 9]、2R仮説の検証が試みられている。2R仮説を端的に示す例としては*homeobox (hox)* 遺伝子クラスターが有名である^[10]。様々な脊椎動物種のゲノム解析によって、ヒトを含む多くの脊椎動物では4つの*hox*クラスターを持つことが明らかになってきた。また、前述したナメクジウオでは*hox*クラスターを1つしか持たないことも示されている^[9]。

しかし、脊椎動物の中にはより多くの*hox*クラスターを持つ生物種も知られている。それがゼブラフィッシュやメダカといった真骨魚類である。例えば、ゼブラフィッシュは*hox*クラスターを7つ持っている^[11-14]。これは当初、ゼブラフィッ

シュに限った*hox*クラスターのみ重複であると考えられた^[11]が、1998年のAmoresらの先行研究^[12]によって、真骨魚類の共通祖先において起こったものであることが示された。このことからAmoresらは真骨魚類の共通祖先において全ゲノム重複が起きたと推測している。その後、*hox*以外にも様々な遺伝子が真骨魚類において重複している^[15]ことが明らかになるにつれ、Meyerらによって真骨魚類は他の脊椎動物よりもさらに1度多く全ゲノム重複を経験したという仮説が強く主張されるようになってきた^[13-17]。この真骨魚類特異的な全ゲノム重複は、前述した2度の全ゲノム重複に次いで起きたものであることから「3R全ゲノム重複」または単に「3R」と呼ばれることがある^[16]。本論文においても真骨魚類特異的な全ゲノム重複をこれ以降「3R」と呼称する。脊椎動物の系統樹と全ゲノム重複が起きたとされる系統的位置を図1に示す。2004年のVandepoeleらの先行研究^[16]によると、真骨魚類の共通祖先において3Rが起きたのは少なくとも3億2千万年前と推定されている。また、条鰭類の中でも古くに分岐したポリプテルスやスポッテッド・ガーといった、いわゆる「古代魚」と称される種は3Rを経験していないことが知られている^[17]。なお、真骨魚類の中にはサケ類やコイ類のように、それぞれの系統でさらにもう1回全ゲノム重複を起こした生物群も存在し、これらの生物群における全ゲノム重複を「4R」と呼ぶことがある^[18]。ちなみに、サケ類の一種であるヒメマスには*hox*クラスターが13個も存在する^[19]。

全ゲノム重複は複雑な生物の進化に重要であろうと推測されるものの、実際どのように生物進化に影響を与えてきたのか、具体的なメカニズムについてはまだ解明されていない。近年では全ゲノム重複後に起こる遺伝子の機能分化および保持と、それに引き続く系統特異的な遺伝子の消失が重要であると考えられている。これについては次項で詳しく述べる。

全ゲノム重複後の遺伝子進化

全ゲノム重複では同時多発的な遺伝子の倍化が起こるが、これは同時にシス発現調節領域の倍化を伴うものである。このようなケースにおいて、倍化した遺伝子はその後、nonfunctionalization、neofunctionalization、subfunctionalizationのいずれかの進化プロセスを辿ると考えられている^[20]。その概要を図2に示す。なお、近年の研究ではこれ以外のより複雑な進化プロセスもあると考えられているが、本論では最も単純なモデルについて説明する。nonfunctionalizationとは倍化した遺伝子のうち、片方が転写調節領域の消失によって転写されなくなり、機能を失うことである。また、コーディング領域へのアミノ酸置換やフレームシフトを伴う変異が蓄積し、タンパク質をコードしない偽遺伝子に変化することもnonfunctionalizationに含まれる。neofunctionalizationとは新たな転写調節領域を獲得することによって、従来とは時空間的に異なる発現パターンへと変化し、新規機能を獲得することである。同時にコーディング領域へのアミノ酸置換を伴う変異の蓄積も起こる。subfunctionalizationとは倍化前の遺伝子の発現パターンを倍化後の2つの遺伝子によって時空間的に分け合うように変化することである。その結果、2つの遺伝子が保持されることになる^[21]。また、subfunctionalizationとneofunctionalizationは同時に進行していくとする考えもある^[22]。

neofunctionalizationとsubfunctionalization(はいずれも全ゲノム重複によって倍化した遺伝子が共に保持されるプロセスとして重要である。しかし、前者は一般に正の選択圧が必要とされるのに対し、後者は選択圧を必要とせず中立進化^[23]のみで起こり得ると考えられる^[20]。したがって、subfunctionalizationの方がneofunctionalizationに比べて起こりやすいと言えよう。

一般に、subfunctionalizationによって遺伝子が保持されるメカニズムは duplication-degeneration-complementation (DDC) モデル^[20]の一部として説明される。DDCモデルでは、まず時空間的に複数の発現領域を持つ遺伝子について、それぞれの発現領域における転写調節領域が存在することを前提とする。転写調節領域aは発現領域Aに置ける転写を、転写調節領域bは発現領域Bにおける転写を、それぞれ正に制御しているとする。ここで、全ゲノム重複によって遺伝子が倍化した後、遺伝子1と遺伝子2が生じた場合を考える。まず、遺伝子1の転写調節領域bに変異が入り、発現領域Bにおける転写活性を失った遺伝子1アリルが出現することがある。このアリルは、遺伝子2の発現領域Bにおける発現が担保されているため、選択圧を受けず中立的に進化できる。そのため、遺伝的浮動によって発現領域Bにおける転写活性を失った遺伝子1アリルが確率的に集団中に固定することがある。その後、遺伝子2の転写調節領域aに変異が入り、発現領域Aにおける転写活性を失った遺伝子2アリルが出現することがある。このアリルも、遺伝子1の発現領域Aにおける発現が担保されているため、やはり選択圧を受けず中立的に進化できる。そのため、遺伝的浮動によって発現領域Aにおける転写活性を失った遺伝子2アリルも確率的に集団中に固定することがある。このようにして、結果的に遺伝子1は発現領域A特異的に、遺伝子2は発現領域B特異的に、それぞれ発現するようになる。そして、このようなケースでは両方の遺伝子に再び負の選択圧が働くため、共に保持されることになる。

ここまで、全ゲノム重複によって倍化した遺伝子が保持されるプロセスについて説明してきたが、3Rを題材とした研究によって、実際は保持される遺伝子よりもパラログの片方が消失する遺伝子の方が多いたことが示唆されている^[24]。また、遺伝子が消失していくプロセスについて、全ゲノム重複後、比較的短期間のうちに大量の遺伝子が消失するフェーズに続き、長期間に渡って徐々に遺伝子が消失していく

フェーズがあると考えられている^[24, 25]。井上らの先行研究^[24]によると、第一のフェーズでは大規模な領域の欠失によって、ブロック単位で重複遺伝子が失われた結果、短期間のうちに大量の遺伝子が消失したとされている。一方、第二のフェーズではneofunctionalizationやsubfunctionalizationによって一旦は保持されていた遺伝子が、何らかの理由で徐々に消失していく過程であると考えられている。この遺伝子消失が地域集団間で独立に起こることで、遺伝的な種多様性が獲得されていくのではないかとする説もある^[24, 25]。

嗅覚

嗅覚とは外界の化学物質に対する感覚の一つで、空気や水を媒体として拡散してきた化学物質を、発生源に直接接触することなく捉えることができる感覚である。一般に嗅覚というと、匂い感覚のことを想像するが、その他に匂いとしては認識されないフェロモン感覚も嗅覚に含まれる。フェロモンとは匂いとしては認識されないが、同種他個体に対し、何らかの特異的行動や生理的变化を及ぼす化学物質の総称である。なお、ある化学物質がフェロモンとして作用するか、ただの匂いとして認識されるかは、その化学物質を受容する生物側の受容機構によって決まる。すなわち、匂いを受容する機構とフェロモンを受容する機構がそれぞれ存在する^[26]。

マウスでは、これらの機構が組織レベルで分化しており、前者は主嗅上皮から主嗅球を介する主嗅覚系が、後者は鋤鼻器から副嗅球を介する鋤鼻系が担っている。主嗅上皮・鋤鼻器には化学物質を受容する神経細胞がそれぞれ存在しており、その刺激を一次中枢の主嗅球・副嗅球へと伝達している。また、それらの神経細胞について、主嗅上皮に存在するものを嗅神経細胞、鋤鼻器に存在するものを鋤鼻神経細胞

胞と呼ぶ。これらはいずれも双極性の神経細胞であり、軸索を嗅球へと投射しているが、前者は繊毛を持ち、後者は微繊毛を持つことが知られている。

一方、魚類では、主嗅覚系と鋤鼻系が組織レベルで分化しておらず、花弁状の嗅上皮に両者が混在している^[27-29]。ゼブラフィッシュの嗅上皮の写真を図3に示す。嗅上皮を組織染色してみると、中心部は無数の感覚毛で覆われた感覚領域であり、外縁部はそのような感覚毛がない非感覚領域である（図3c）ことがわかる。Hansenらの先行研究^[27-29]から、嗅上皮には繊毛性嗅神経細胞と微繊毛性嗅神経細胞が混在しており、これらはマウスの嗅神経細胞と鋤鼻神経細胞にそれぞれ相同なものであると考えられている。また、嗅上皮において前者は深層に、後者は表層に、それぞれ局在することが知られている^[28-30]。魚類の嗅上皮にはこの他にクリプト細胞という第三の嗅神経細胞が存在する^[27-30]。クリプト細胞は嗅上皮の最表層にまばらに分布し、樹状突起が短く、繊毛性嗅神経細胞や微繊毛性嗅神経細胞に比べ細胞体が完全な球形に近い^[27-29]。

嗅神経細胞や鋤鼻神経細胞において、繊毛や微繊毛に存在し、化学物質を受容しているタンパク質が嗅覚受容体である。嗅覚受容体にはOdorant receptor (OR)^[31]、Vomeronasal type 1 receptor (V1R)^[32]、Vomeronasal type 2 receptor (V2R)^[33, 34]、Trace amine-associated receptor (TAAR)^[35]の4種類が存在している。マウスではORとTAARは嗅神経細胞に、V1RとV2Rは鋤鼻神経細胞に、それぞれ発現している。

一方、魚類ではこれらの遺伝子はいずれも嗅上皮に発現している^[30, 36-38]。2005年の佐藤らの先行研究^[30]によって、ゼブラフィッシュではORは深層に、V2Rは表層に、それぞれ発現していることが示されている。ゼブラフィッシュの嗅上皮で

は、深層には絨毛性嗅神経細胞が、表層には微絨毛性嗅神経細胞が、それぞれ分布しているため、*OR*は絨毛性嗅神経細胞に、*V2R*は微絨毛性嗅神経細胞に、それぞれ発現していると考えられている。また、2012年の岡らの先行研究^[39]によって、*V1R*の1つである*V1R4*がクリプト細胞特異的に発現していることが示されている。

Olfactory Marker Protein

Olfactory Marker Protein (OMP) は1972年にMargolisら^[40]によってマウスの嗅球から単離された分子量約19 kDaの比較的小さなタンパク質で、脊椎動物の成熟した嗅神経細胞に特異的な分子として知られている。OMPはその名が示す通り、成熟した嗅神経細胞を同定するためのマーカーとして有用であるため、その発現パターンをレポーター遺伝子によって可視化したトランスジェニック個体^[41-43]や、ポリクローナル抗体が作製されており、組織化学的な実験においてよく用いられている。

一方で、その機能については発見から40年以上経った現在でもあまり明らかにされていない。1996年にBuiakovaら^[44]によってOMPノックアウトマウスが作製され、表現系の解析が行われてきたが、OMPノックアウトマウスの匂いに対する感受性は野生型マウスに比べて低下するものの、完全に消失するわけではないことが明らかにされている。また、電気生理学的な実験から、OMPノックアウトマウスの嗅神経細胞は化学刺激に対する反応が野生型マウスと比べて緩やかになっていることも示されている^[44]。その後、2009年にKwonらの先行研究^[45]により、OMPノックアウトマウスの嗅神経細胞は化学刺激によって細胞内に流入したCa²⁺を排出する速度が野生型マウスと比べて遅くなっていることが示されている。同研究によれば、マウスの嗅神経細胞においてOMPはNa⁺/Ca²⁺-exchanger 1 (NCX1) と共局在していることも示されており、OMPがNCX1の機能を促進することで速やかなCa²⁺の排

出を実現しているのではないかと考えられている。しかしながら、それが嗅覚そのものにどのような影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。

また、2002年にはSmithら^[46]によってOMPのX線結晶構造解析が行われ、その立体構造が明らかにされた。この解析によって“Eph2B receptor-like loop”と名付けられた領域は、結晶構造上では領域の一部が内部に埋もれた状態であるが、コンフォメーションの変化によって、この領域全体が外部に露出することが示唆されている。おそらくこれによってOMPは他のタンパク質との相互作用を変化させ、分子スイッチとして働くのではないかと推測されている。また、同領域はオーソログ間で保存性が高いことも示されており、生物種を超えてOMPの機能に重要であることがうかがわれる。

OMPはこれまで、ヒト、マウス、ラット、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュなど、様々な脊椎動物でその遺伝子が単離されている^[47-49]が、ほとんどの種においてOMPは単一コピーであると考えられている。ただし、いくつかの種ではOMPを2コピー保持しており、例えば、1998年にRösslerら^[48]によって単離されたアフリカツメガエルのOMPは2コピー存在する。魚類では1999年に安岡ら^[50]によってメダカのOMP部分配列が2コピー単離されており、2009年には工藤ら^[51]によってヒメマスのOMP全長配列がやはり2コピー単離されている。一方で、2002年にCelicら^[49]によって単離されたゼブラフィッシュのOMPは1コピーだけであった。また、この報告ではゲノムサザンブロットィング法により、ゼブラフィッシュに存在するOMPは1コピーだけであろうと結論付けられていた。このように、先行研究に基づくと魚類はOMPを1コピーだけ保持する種と2コピー保持する種が混在する状況であった。

本研究の目的

当研究室では、アフリカ三大湖に生息するカワスズメ科魚類（シクリッド）をモデルとして、フェロモン等による嗅覚コミュニケーションを介した種分化モデルを着想し、その分子基盤解明のため研究が行われてきた^[37, 52, 53]。その一環として、前述した組織化学的な実験におけるマーカーとしての有用性から、シクリッドのOMPの単離が試みられた。当時はシクリッドのゲノムデータが未解読であったため、公開されていたゼブラフィッシュ、トゲウオ、フグ、メダカのゲノムデータからOMP配列を探索し、その部分配列を増幅するためのPCRプライマーの設計が行われた。その際、これらの魚種のいずれにおいてもOMPが2コピー存在することが見出されていた。

真骨魚類は3Rを経験したと考えられているため、OMPの倍化も3Rに起因するものであると予想された。この予想の通りならば、真骨魚類のOMPは倍化後3億年以上の間、どの魚種においても保持されてきたことを意味しており、2つのOMPの間には何らかの機能分化が起きている可能性が期待された。また、OMPは嗅神経細胞特異的に発現する遺伝子であるため、2つのOMPはいずれも嗅上皮で発現していることが予想されたが、仮に両者の発現パターンが異なっているとすれば倍化した遺伝子の機能分化の例として興味深い。それに加え、多様性に富む嗅神経細胞を分類するための新たな分子マーカーの開発にもつながることが期待された。そこで、私はOMPの倍化が3Rに由来するものであるかを検証するとともに、2つのOMPの機能分化の様相を明らかにする目的で研究を行った。

材料・方法

データマイニング

DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のARSA検索^[54]を用いて遺伝子データベースに登録されているヒト、マウス、アフリカツメガエル、ネツタイツメガエル、ゼブラフィッシュ、ヒメマスのOMP全長配列を取得した。それぞれのアクセッション番号を表1に示す。

次に、これらのアミノ酸配列をクエリーとし、Ensemblゲノムブラウザ^[55]のTBLASTN検索を用いて真骨魚類6種（ゼブラフィッシュ、トラフグ、トゲウオ、メダカ、プラティ、ティラピア）、スポッテッド・ガー、シーラカンス、ネツタイツメガエル、グリーンアノール、ニワトリのゲノムデータを探索し、ヒット領域とその上流・下流約300塩基を含むゲノムDNA配列を取得した。用いたゲノムデータの名称を表2に示す。さらに、取得したゲノムDNA配列について、GeneWise^[56]を用いてOMPの遺伝子構造を推定し、開始コドンから終始コドンまでのコーディング配列を取得した。

CAPN5についても同様の手法によりコーディング配列を取得した。遺伝子データベースから取得したヒト、マウス、アフリカツメガエル、ネツタイツメガエルのCAPN5全長配列のアクセッション番号を表3に示す。CAPN5については真骨魚類6種、スポッテッド・ガー、ネツタイツメガエル、ニワトリ、マウスのゲノムデータからコーディング配列を取得した。

配列アラインメント

*OMP*の配列アラインメントでは、真骨魚類6種、スポットド・ガー、シーラカンス、アフリカツメガエル、ネッタイツメガエル、グリーンアノール、ニワトリ、マウス、ヒトの*OMP*について、ClustalW2^[57]を用いてアミノ酸配列をアラインメントした。なお、パラメータはデフォルト値で実行した。出力されたアラインメントは一部、手作業でギャップの位置を修正した。また、Needle^[58]を用いたペアワイズのアラインメントにより、真骨魚類の*OMP*についての配列類似性を算出した。

*OR*の配列アラインメントでは、当研究室の先行研究^[59]においてゼブラフィッシュのゲノムデータから単離された*OR*について、ClustalW2を用いてアミノ酸配列をアラインメントした。なお、パラメータはデフォルト値で実行した。

分子系統解析

*OMP*の分子系統解析では、得られたアミノ酸配列アラインメントに基づき、MEGA6^[60]を用いて最尤法による系統解析を行った。アミノ酸置換モデルにはWAG+Fモデルを用い、ブートストラップテストの試行回数は10000回に設定した。その他のパラメータはデフォルト値で実行した。

*OR*の分子系統解析では、得られたアミノ酸配列アラインメントに基づき、MEGA6を用いて近隣結合法による系統解析を行った。アミノ酸置換モデルにはPoissonモデルを用い、ブートストラップテストの試行回数は10000回に設定した。その他のパラメータはデフォルト値で実行した。

シンテニー解析

真骨魚類6種、スポットド・ガー、ネツタイツメガエル、ニワトリ、マウスのゲノムデータに対してOMPおよびCAPN5のコーディング配列をクエリーとし、EnsemblゲノムブラウザのBLASTN検索を用いて各ゲノムデータ上でそれぞれの遺伝子のエキソンの位置を特定した。その後、1ピクセルを60塩基とした縮尺でエキソンの位置を図示した。

実験動物

実験には当研究室にて標準的な環境下で飼育されてきた生後1~2年のゼブラフィッシュ成魚 (Tü系統) を用いた。解剖する際には0.1% p-アミノ安息香酸エチルであらかじめ麻酔した。

RT-PCR

ゼブラフィッシュの雌雄各1個体を解剖し、脳、嗅上皮、眼、鰓、皮膚、精巣、卵巣の各組織を摘出した。その後、TRIzol (Invitrogen) を用いて各組織からtotal RNAを抽出した。次に、各total RNA溶液にRNase-free DNase I (TaKaRa) を加え、37℃で30分間処理した後、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿により精製した。

こうして得られた各total RNAを鋳型とし、SuperScript III RTase (Invitrogen) とオリゴdT₁₈プライマーを用いて50℃で60分間逆転写反応を行い、cDNAを合成した。次いで、各cDNAを鋳型とし、Ex Taq Polymerase (TaKaRa) と各遺伝子に特

異的なプライマーを用いてPCRを行った。プライマー配列の一覧を表4に示す。PCR条件は、94℃で3分間の熱変性に続き、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で40秒間の反応を35回繰り返した。OMP1についてはコントロールとしてRTaseを加えなかったサンプル (RT-) およびゲノムDNAを鋳型としたPCRを同時に行った。ゲノムDNAはDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて、ゼブラフィッシュの鰭から抽出した。なお、OMP2とGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) についてはイントロンをはさむようにプライマーが設計されており、長さからゲノムDNA由来の増幅断片を容易に区別できるため、RT-を鋳型としたPCRは行っていない。

PCR終了後、反応液を2%アガロースゲルを用いて100 mAで30分間電気泳動した。その後、ゲルを臭化エチジウムで染色し、Gel Doc EZ (BioRad) を用いて泳動像を撮影した。

クローニング

RT-PCRによって得られたDNA断片をエタノール沈殿により精製後、DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (TaKaRa) を用いてpBluescript II SK (-) ベクターに連結し、ヒートショックを与えて大腸菌DH5α株に導入した。なお、ここで用いたpBluescript II SK (-) ベクターは、あらかじめEcoR Vで切断後、Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TaKaRa) を用いて末端にddTTPを1塩基だけ付加し、A突出末端を持つPCR断片をそのまま連結可能な形状に加工しておいた。

ベクター導入後の大腸菌をアンピシリンを含む寒天培地に播種し、37℃で一晩培養後、コロニーピッキングを行った。その後、ピックしたコロニーからベクター上

のM13プライマー (M4/RV) を用いてPCRを行い、目的断片を含む領域を増幅した後、サンガーシークエンスによって塩基配列を確認した。これにより目的断片が導入されたコロニーを選抜し、アンピシリンを含む液体培地に植菌して37°Cで一晩振とう培養後、Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いてベクターを回収した。

標識RNA合成

回収したベクターを適切な制限酵素で処理し、線状化した後、Proteinase K (QIAGEN) と10% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を加え、37°Cで30分間処理した。その後、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿により精製した。これを鋳型とし、T7またはT3 RNA Polymerase (Roche) と、DIGまたはFluorescein RNA Labeling Mix (Roche) を用いて37°Cで120分間転写反応を行い、標識RNAを合成した。得られたRNA溶液にRNase-free DNase I (TaKaRa) を加え、37°Cで30分間処理した後、エタノール沈殿により精製した。精製した標識RNAは-80°Cで保存し、後述する*in situ*ハイブリダイゼーションに使用した。

また、OR遺伝子群の標識RNAカクテルについては次の手順で合成した。まず、各OR遺伝子群についてClustalW2を用いて塩基配列のアラインメントを行った後、配列が保存された領域を上流側と下流側についてそれぞれ探し出し、該当する領域にアニールする縮重プライマー配列を選定した。続いて、選定した上流側プライマー配列の5'側にはT7プロモーター配列を、下流側プライマー配列の5'側にはT3プロモーター配列をそれぞれ連結し、さらにそれぞれのプロモーターの5'側にNot I認識配列と余剰の2塩基を付加したものを設計した。設計したプライマー配列の一覧を表5に示す。次に、ゼブラフィッシュのゲノムDNAを鋳型とし、これらのプライマーとEx Taq Polymerase (TaKaRa) を用いてPCRを行った。PCR条件は、94°Cで3分間

の熱変性に続き、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で60秒間の反応を2回繰り返した後、94℃で30秒間、65℃で30秒間、72℃で60秒間の反応を30回繰り返した。その後、得られたPCR断片をフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿により精製し、Not I (TaKaRa) で処理した。その後の操作については、前述の線状化後の手順に従った。

組織切片標本作製

ゼブラフィッシュを解剖して嗅上皮と眼を摘出し、4% paraformaldehyde (PFA) /phosphate-buffered saline (PBS) 中に浸し、振とうさせながら4℃で一晩固定した。固定が完了した組織は20% ショ糖溶液に移し、組織が溶液中に沈むようになるまで十分に置換した後、クリオモルドプラスチック包埋皿 (Sakura Finetek) 上に展開したO.C.T. compound (Sakura Finetek) 中に、スライスする面が冠状面となるよう包埋した。次いで、液体窒素で包埋皿ごと急冷し、凍結ブロックを作製した。この凍結ブロックは-80℃で保存した。

クライオスタット (Leica) を用いて凍結ブロックを10 μmの厚さにスライスし、MASコートスライドガラス (Matsunami) 上に貼り付けて組織切片標本とした。作製した組織切片標本は風乾した後、-80℃で保存し、後述する*in situ*ハイブリダイゼーションに使用した。

*in situ*ハイブリダイゼーション

組織切片標本を室温に戻し、4% PFA/PBSで5分間、0.3% H₂O₂/PBSで15分間処理した後、Proteinase Kを添加した37℃のPBSで10分間処理した。続いて、4%

PFA/PBSで再度10分間処理し、0.2% グリシン/PBSで5分間、0.2 N 塩酸で20分間処理した後、0.03 N 塩酸/0.1 M トリエタノールアミンに浸し、無水酢酸を終濃度0.25%になるように1滴ずつ加えながら3分間アセチル化反応を行った。なお、各処理の間に随時PBSで5分間の洗浄を行った。次に、組織切片標本を湿箱に入れ、ハイブリダイゼーション液をスライドグラス1枚あたり100 μ lずつ、組織切片を覆うように滴下し、40分間処理した。なお、ハイブリダイゼーション液は50% ホルムアミド、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.6 M NaCl、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.25% SDS、1 \times デンハルト液、5% デキストラン硫酸ナトリウム、0.2 mg/ml Yeast tRNA (Invitrogen) から成る。その後、スライドグラス上のハイブリダイゼーション液を一度取り除き、終濃度5 ng/ μ lになるようDIG標識RNAプローブを添加したハイブリダイゼーション液をスライドグラス1枚あたり100 μ lずつ、組織切片を覆うように再度滴下し、60 $^{\circ}$ Cで一晩静置してハイブリダイゼーション反応を行った。

ハイブリダイゼーション反応完了後、スライドグラス上のハイブリダイゼーション液を5 \times saline-sodium citrate (SSC) で洗い流し、50 $^{\circ}$ Cの5 \times SSCで15分間洗浄した。続いて、50 $^{\circ}$ Cの50% ホルムアミド/5 \times SSCで15分間、2回処理し、37 $^{\circ}$ CのTNE溶液で10分間処理した後、終濃度2 μ g/mlになるようRNase A (SIGMA) を添加した37 $^{\circ}$ CのTNE溶液で30分間処理した。なお、TNE溶液は10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTAから成る。その後、50 $^{\circ}$ Cの2 \times SSCで15分間、2回洗浄した後、さらに0.2 \times SSCで15分間、2回洗浄し、TBS緩衝液で10分間処理した。なお、TBS緩衝液は100 mM Tris-HCl、150 mM NaClから成る。こうして洗浄された組織切片標本をStreptavidin/Biotin Blocking Kit (Vector) とブロッキング液で処理した後、Peroxidase標識抗DIG抗体 (Roche) を1:100の割合で添加したブロッキング液をスライドグラス1枚あたり100 μ lずつ、組織切片を覆うように滴下

し、4℃で一晩静置して抗原抗体反応を行った。なお、ブロッキング液は1%の Blocking Reagent (PerkinElmer) をTBS緩衝液に溶かしたものである。

抗原抗体反応完了後、スライドグラス上の反応液をTBST緩衝液で洗い流し、さらにTBST緩衝液で20分間、3回処理した後、TSA Plus Biotin Kit (PerkinElmer) で30分間処理した。なお、TBST緩衝液は100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.05% Tween 20 (SIGMA) から成る。その後、Alexa 594標識Streptavidin (ThermoFisher) を1:500の割合で添加したブロッキング液をスライドグラス1枚あたり100 μ lずつ、組織切片を覆うように再度滴下し、30分間静置してStreptavidinとBiotinを反応させた。反応が完了した組織切片標本はミリQ水で2回洗浄後、DAPIが添加されたVECTASHIELD mounting medium (Vector) を滴下し、カバーグラスを乗せた後、周囲をマニキュアで固めて封入した。封入完了後、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて組織切片標本の観察と撮影を行った。

標識の異なるRNAプローブを用いた2カラー*in situ*ハイブリダイゼーション法の場合は、以下の点を変更した。ハイブリダイゼーション反応にはDIG標識RNAプローブとFluorescein標識RNAプローブを等量混合してハイブリダイゼーション液に添加した。抗原抗体反応にはPeroxidase標識抗Fluorescein抗体 (PerkinElmer) を1:500の割合で添加したブロッキング液を用い、TSA Plus DNP System (PerkinElmer) で処理した。その後、15% H₂O₂/PBSで30分間処理してPeroxidaseを完全に失活させた。続いて、Peroxidase標識抗DIG抗体を1:100の割合で、Alexa 488標識抗DNP抗体 (ThermoFisher) を1:500の割合でそれぞれ添加・混合したブロッキング液をスライドグラス1枚あたり100 μ lずつ、組織切片を覆うように滴下し、4℃で一晩静置して抗原抗体反応を行った。その後は前述の手順に従って検出を行った。

ESTデータベース検索

取得した真骨魚類のOMP2全長配列をクエリーとし、DDBJのESTデータベースに対してBLASTN検索^[61]を行った。ヒットした配列は由来である生物種および組織ごとに集計した。

トランスクリプトーム解析

European Nucleotide Archive (ENA) ^[62]からゼブラフィッシュ、メダカ、トゲウオ、スポッテッド・ガー、マウスの各生物種について、眼におけるRNAシーケンズデータをFASTQ形式で取得した。それぞれのアクセッション番号を表6に示す。取得したシーケンズデータに対し、FastQC^[63]を用いてシーケンスクオリティの評価を行ったのち、FASTX-Toolkit^[64]に含まれるfastx_trimmerを用いて、全リードから5'端の15塩基を削除した。

次に、各生物種のゲノムデータをFASTA形式で、それらに対応するアノテーションデータをGTF形式で、Ensembleゲノムブラウザよりそれぞれ取得した。取得したゲノムデータの名称は表2に示したものと同一である。これらのデータに基づき、Bowtie2^[65]およびRSEM^[66]を用いて参照配列とするcDNAリファレンスを構築した後、Bowtie2を用いてクオリティコントロール済みのシーケンズデータをマッピングした。その後、RSEMを用いて各cDNAにマップされたリード数の集計およびFragments Per Kilobase of exon per Million fragments sequenced (FPKM) 値の算出を行った。最後に、OMPと*Ga_{ti}*のFPKM値の比率を求め、これをOMPの相対発現量とした。なお、マッピングからリード数の集計およびFPKM値の算出までの工程は、実際にはRSEMが内部的にBowtie2を呼び出すことで自動的に実行している。

また、これら一連の操作についてシェルスクリプトを作成し、解析作業をオートメーション化した。作成したシェルスクリプトについては付録の項に添付する。

解析環境にはXeon E3-1240L v3プロセッサ (Intel) と16 GB DDR3-1600 ECCメモリ (Transcend) を搭載し、Ubuntu 14.04 (Canonical) をインストールしたLinuxサーバーを用いた。また、使用したソフトウェアのバージョンを表7に示す。

抗OMP2抗血清の作製

OMPのアミノ酸配列のアラインメントに基づき、OMPパラログ間で配列が異なり、OMP2オーソログ間で配列が保存されている領域をターゲット候補として、ターゲット領域の選定とターゲットペプチドの合成および精製、ウイスター・ラットへの免疫および血清の採取、そして抗体価の測定をEurofins社に委託した。選定したターゲット領域の位置を図4の四角で囲った領域に示す。ターゲットペプチドはこの領域のゼブラフィッシュOMP2アミノ酸配列 (WRNAGDPEDSPIKC) に基づいて設計した。さらに、ターゲットペプチドにはキャリアタンパク質として一般的に用いられているKeyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を融合した。

以下の工程はEurofins社からの作業報告に基づく。ラットから免疫前の血清を採取後、ターゲットペプチドを0.1 mg投与し、その後は2週間おきに0.1 mgずつ投与した。4回目の投与から1週間後に100 μ lの血清を採取し、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) により抗体価を測定した。ここで十分な抗体価が確認されたため、さらに2回、ターゲットペプチドを2週間おきに0.1 mgずつ投与した後、累計で6回目の投与から1週間後に全採血し、抗OMP2抗血清を得た。

大腸菌を用いたOMPの合成

ゼブラフィッシュのOMP1およびOMP2の終始コドンを除く全長配列をRT-PCRによってそれぞれ増幅した。プライマー配列の一覧を表8に示す。増幅断片を*Kpn* Iおよび*Hind* IIIで処理した後、同じ制限酵素で処理したpCold TF DNAベクター (TaKaRa) にDNA Ligation Kit Ver. 2.1を用いて連結し、熱ショックを与えて大腸菌DH5α株に導入した。また、コントロールとして空ベクターについても同様に導入した。なお、ここで用いたpCold TF DNAベクターにはあらかじめFALGタグを発現するDNA配列を組み込んでおき、合成されたタンパク質のC末端にFLAGタグが融合するように設計しておいた。

ベクター導入後の大腸菌をアンピシリンを含む寒天培地に播種し、37℃で一晩培養後、コロニーピッキングを行った。その後、ピックしたコロニーからベクター上のプライマー (pCold-TF-F1/R) を用いてPCRを行い、目的断片を含む領域を増幅した後、サンガーシークエンスによって塩基配列を確認した。これにより目的断片が正しく導入されたコロニーを選抜し、アンピシリンを含む液体培地に植菌して37℃で約100分間振とう培養した。培養中は随時吸光度測定を行い、OD₆₀₀が0.5程度になったところで15℃に移し、30分間静置した。その後、終濃度0.1 mMになるよう Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を培地に添加し、15℃で24時間振とう培養した。

培養終了後、遠心分離によって大腸菌を回収し、2価の陽イオン含まないPBSに懸濁した後、氷冷しながら超音波処理を行った。その後、再度遠心分離を行い、上清を回収した。

SDS-PAGE

回収した上清を2× サンプルバッファーと等量混合し、約100℃の熱湯で5分処理した後、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて30 mAで約90分間電気泳動した。なお、マーカーとしてカレイドスコープスタンダード (BioRad) を用いた。泳動終了後、ゲルを50% メタノール/10% 酢酸に15分間浸して固定した後、クマシーブリリアントブルーで染色し、Gel Doc EZ (BioRad) を用いて泳動像を撮影した。

ウェスタンブロッティング

泳動終了後のSDS-ポリアクリルアミドゲルに電圧を加え、タンパク質をメンブレン (GE) に移した後、スキムミルク液に浸し、振とうしながら60分間処理した。次いで、抗血清を1:1000の割合で添加したスキムミルク液にメンブレンを浸し、振とうしながら4℃で一晩抗原抗体反応を行った。その後、Peroxidase標識抗ラットIgG抗体 (GE) を1:10000の割合で添加したスキムミルク液にメンブレンを浸し、振とうしながら60分間抗原抗体反応を行った。反応終了後、Luminata Forte Western HRP 基質 (Millipore) を1 ml滴下し、メンブレン上で反応させながら気泡が入らないようラップで包み撮影した。撮影終了後、15% H₂O₂/TBSで30分間処理し、メンブレン上に残ったPeroxidaseを完全に失活させた。続いて、0.15 mg/mlの抗FLAG抗体 (SIGMA) を1:100000の割合で添加したスキムミルク液にメンブレンを浸し、振とうしながら90分間抗原抗体反応を行った。続いて、Peroxidase標識抗マウスIgG抗体 (SIGMA) を1:10000の割合で添加したスキムミルク液にメンブレンを浸し、振とうしながら60分間抗原抗体反応を行った。反応終了後、前述した手順で基

質を反応させ、撮影を行った。なお、各処理の間に随時TBSで5分間、3回の洗浄を行った。

免疫染色

組織切片標本を室温に戻し、TBST緩衝液で5分間処理した後、クエン酸緩衝液に浸して電子レンジで約5分間加熱した。常温に戻るまで放置した後、TBST緩衝液で5分間、3回洗浄し、次いでブロッキング液で60分間処理した。その後、抗血清を1:25の割合で添加したブロッキング液をスライドグラス1枚あたり100 µlずつ、組織切片を覆うように滴下し、4℃で一晩静置して抗原抗体反応を行った。なお、コントロールとして免疫前のラットの血清を1:25の割合で添加したブロッキング液を用いた。反応終了後、TBST緩衝液で5分間、3回洗浄し、Alexa 594標識抗ラットIgG抗体 (ThermoFisher) を1:500の割合で添加したブロッキング液をスライドグラス1枚あたり100 µlずつ、組織切片を覆うように滴下し、120分間静置して抗原抗体反応を行った。反応が完了した組織切片標本はTBST緩衝液で5分間、3回洗浄した後、*in situ*ハイブリダイゼーションの項で前述した手順に従って封入し、蛍光顕微鏡を用いて組織切片標本の観察と撮影を行った。

結果

OMPの配列解析

既知のOMPのアミノ酸配列をクエリーとし、TBLASTN検索を用いて表2に示した脊椎動物各種のゲノムデータを探索した結果、いずれの種からもOMPと相同性のある配列が発見された。特に、当研究室の先行研究で示されていた通り、ゼブラフィッシュやメダカといった真骨魚類のゲノムデータからは2コピーずつOMPと相同性のある配列が発見された。魚類のOMPではCelicら^[49]によってゼブラフィッシュのOMP全長配列が1つ単離されていたため、これと比較して配列の類似性が高い方をOMP1、他方をOMP2と名付けた。なお、OMP1とOMP2はそれぞれ異なる染色体、連鎖群またはscaffold上に存在していた。一方、条鰭類の中でも3Rを経験していないスポッテッド・ガーのゲノムデータからはOMPと相同性のある配列は1つしか見つからなかった。

続いて、ゲノムデータ上のOMPの塩基配列をその上流・下流領域も含めて取得し、既知のOMPのアミノ酸配列に基づき、GeneWiseを用いて遺伝子構造を推定した。その結果、OMP1および真骨魚類以外のOMPは約170残基をコードする単一エキソンから成っていたのに対し、OMP2はN末端側約20残基をコードする短いエキソンとC末側約140残基をコードする長いエキソンから成っていた。OMPは従来、イントロンレスの遺伝子と考えられてきたが、この解析により、真骨魚類のOMP2にはエキソンが2つあり、これまで知られていたOMPとは遺伝子構造が少し異なることが示された。

次に、ゲノムデータから取得したOMPのアミノ酸配列について、ClustalW2を用いてアラインメントした上で配列比較を行った。その結果を図4に示す。この配列比較から、四足動物を含むオーソログ間で保存されている領域はOMP1とOMP2のパラログ間でも保存されていることが示された。特に、Smithら^[46]によるX線結晶構造解析により、OMPの分子スイッチとしての機能に重要と推測されたEph2B receptor-like loopは、オーソログ間のみならずパラログ間でもほぼ100%の配列類似性で保存されていることが明らかとなった。これらの結果は、OMP1とOMP2がタンパク質の構造的・機能的に類似している可能性を示唆している。なお、Needleを用いた配列比較では同種内におけるOMP1とOMP2のアミノ酸配列全長での配列類似性は57.8%~62.5%であった。

OMPの分子系統解析

ゲノムデータの解析によって、真骨魚類では解析したいずれの魚種においてもOMPを2コピー保持することが明らかとなった。真骨魚類はその共通祖先において3Rを経験したと考えられており^[12-17]、3Rより前に分岐した種とされるスポットテッド・ガー^[67]のゲノムデータからはOMPが1つだけしか見つからなかったことを考え合わせると、真骨魚類のOMPは3Rによって倍化したことが予想された。そこで、この予想を確かめるため、OMPのアミノ酸配列アラインメントを用いて分子系統解析を行った。なお、OMP2の第1エクソンは短いことに加えてパラログの当該領域との配列類似性も低く、この領域だけ進化的由来が異なる可能性が考えられた。そのため、この領域を含めると公平な比較にならないと判断し、解析から除外した。分子系統解析の結果を図5に示す。この解析から、真骨魚類のOMP1とOMP2はそれぞれ単系統群を形成し、かつOMP1クレードとOMP2クレードは姉妹群となることが示された。また、スポットテッド・ガーのOMPは、OMP1とOMP2の外群となることも示

された。なお、OMP1クレードの単系統性を示すブートストラップ値は66とやや低かったが、OMP2クレードの単系統性を示すブートストラップ値は99、OMP1クレードとOMP2クレードの姉妹関係を示すブートストラップ値も99といずれも高かった。この結果から、真骨魚類のOMP1とOMP2は、その共通祖先で重複したことが強く示唆された。さらに、本論からは外れるが、この解析によって、先行研究で報告のあったアフリカツメガエル^[48]とヒメマス^[51]に存在する2つのOMPはそれぞれの系統特異的に重複したことが示された。これについては考察の項にて後述する。

OMP周辺のシンテニー解析

分子系統解析によって、真骨魚類のOMPはその共通祖先において倍化したことが示された。しかしながら、その倍化が本当に3Rによるものなのか、OMPに限った遺伝子重複であるのかははっきりしていなかった。そこで、OMP周辺の別の遺伝子に着目し、パラログ間でシンテニーの相同性について調べた。その結果を図6に示す。興味深いことにOMPは別の遺伝子*Calpain 5 (CAPN5)* のイントロン中に存在しており、その構造はCAPN5を基準としたときのOMPの転写方向が真骨魚類と四足動物の間で逆転していた点を除き、脊椎動物種間で保存されていた。さらに、真骨魚類ではシンテニーを維持したままOMPとCAPN5が共に倍化していたことが明らかになった。この結果から3RによってOMPおよびCAPN5が倍化した可能性が強く示唆された。なお、CAPN5を基準としたときのOMPの転写方向は真骨魚類のパラログ間とスポットテッド・ガーにおいて同じであった。3Rはスポットテッド・ガーの分岐後に起きたと考えられているため、この結果も3RによるOMPの倍化を支持している。

組織間におけるOMPの比較発現解析

分子系統解析とシテニー解析の結果から、予想した通り真骨魚類の*OMP1*と*OMP2*は3Rによって倍化した可能性が強く示唆された。一方、ゲノムデータの探索から真骨魚類では、解析したいずれの魚種においても*OMP*を2コピー保持していることが明らかになっている。3Rが起きたとされるのは現在から少なくとも3億2千万年以上前^[16]であると思われており、倍化後それほど長い時間を経ても2コピーが保持されていることや、配列の保存性から、両者の間にはsubfunctionalizationが起きていることが期待された。そこで、両者の発現パターンを比較することでこれについて考えることにした。実験動物にはモデル生物として知見が豊富なゼブラフィッシュの成魚を用いた。

まず、ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮を含む7つの組織からtotal RNAを抽出し、それを鋳型として*OMP1*、*OMP2*にそれぞれ特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行った。なお、ポジティブコントロールとして*GAPDH*に特異的なプライマーも併せて用いた。RT-PCRの結果を図7に示す。*OMP1*は嗅上皮ではっきりとした増幅断片が検出されたのに対し、*OMP2*は嗅上皮に加え眼でも増幅断片が検出された。この結果から、*OMP2*が嗅上皮だけでなく眼でも発現している可能性が示唆された。なお、*OMP1*は脳でも微量に増幅断片が検出されたが、本研究では解析対象としなかった。

*OMP2*の眼での発現についてさらに詳しく調べるため、ゼブラフィッシュの眼の組織切片標本を作製し、*OMP2*に特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果を図8に示す。コントロールとしてセンスRNAプローブを用いた場合はシグナルが検出されなかった(図8a)のに対し、アンチセンスRNAプローブを用いた場合は網膜に特徴的なシグナルが検出された(図8b)。詳しく観察すると、シグナルは網膜の内顆粒層で最も外側の細胞層に出て

いることが明らかとなった。この領域には網膜水平細胞が分布していることが知られており、この結果から、*OMP2*は網膜水平細胞に発現していると考えられた。

これまでの解析で、ゼブラフィッシュでは*OMP2*が眼で発現していることが明らかになった。*OMP*は従来、嗅神経細胞特異的に発現すると考えられてきた遺伝子であるため、*OMP2*が眼で発現していたという事実は非常に興味深い。しかしながら、これは*OMP2*を保持する他の真骨魚類にも共通する発現パターンなのであろうか。そのことを確かめるため、真骨魚類の*OMP2*全長配列をクエリーとし、DDBJのESTデータベースに対してBLASTN検索を行った。その結果を表9に示す。ゼブラフィッシュのほかトゲウオやティラピアの眼由来の配列にヒットしたことから、他の魚種でもゼブラフィッシュと同様、*OMP2*が眼で発現している可能性が示唆された。

さらに、近年では次世代シーケンサーの普及により、様々な目的でRNAシーケンシングによるトランスクリプトーム解析が行われており、そのシーケンシングデータが公開されている。そこで、真骨魚類を含むいくつかの種の眼におけるRNAシーケンシングデータをENAから検索し、それらのデータに基づいて*OMP*の相対発現量を算出した。本研究の時点ではゼブラフィッシュ、トゲウオ、メダカ、スポッテッド・ガー、マウスの眼におけるRNAシーケンシングデータを取得できたため、それらの種間で*OMP*の相対発現量について比較を行った。ただし、遺伝子セットが大きく異なる生物種間で発現量を正規化する適当な方法が存在しないため、ロドプシンに共役するGタンパク質 α サブユニットであるトランスデュシン ($G_{\alpha t1}$) の発現量を種間で一定と仮定し、これに対する*OMP*の相対発現量で比較した。その結果を図9に示す。この解析から、いずれの魚種においても*OMP1*はほとんど発現していなかったが、*OMP2*はある程度発現していることが示された。また、興味深いことに3Rより

前に分岐した種であるスポッテッド・ガーにおいても、真骨魚類のOMP2と同程度にOMPが発現していることが示された。一方、四足動物であるマウスでは、OMPはほとんど発現していなかった。これらの結果はOMP2の眼における発現が真骨魚類に共通したものであることを示している。また、それと同時に、いずれの魚種においてもOMP1は眼にほとんど発現していなかったことから、OMP1とOMP2の発現パターンは少なくとも組織レベルで分化していると考えられた。

細胞間におけるOMPの比較発現解析

OMP1、OMP2ともに発現している嗅上皮においては両者の発現パターンは異なるのであろうか。これについて明らかにするため、ゼブラフィッシュの嗅上皮の組織切片標本を作製し、OMP1、OMP2にそれぞれ特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果を図10に示す。興味深いことに、OMP1は嗅上皮の深層に一様にシグナルが検出された（図10a）のに対し、OMP2は嗅上皮の表層にまばらにシグナルが検出され（図10b）、両者のシグナルはほとんど重ならなかった（図10c）。ただ、ごく一部重なるシグナルも見られた（図10矢頭）。この結果から、OMP1とOMP2は嗅上皮において細胞レベルで発現パターンが異なることが示された。

嗅上皮におけるOMP2陽性細胞の特性解析

Hansenらの先行研究^[27-29]によって、魚類の嗅上皮には繊毛性嗅神経細胞と微絨毛性嗅神経細胞が存在することが明らかにされており、前者は主に深層、後者は主に表層にそれぞれ分布していることが知られている。また、佐藤らの先行研究^[30]によって、深層にはOMP1が発現することが明らかにされており、このことから、

*OMP1*は繊毛性嗅神経細胞に発現すると考えられている。また、同研究によって、表層には*Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2 (TRPC2)*が発現することが明らかにされており、このことから、*TRPC2*は微絨毛性嗅神経細胞に発現すると考えられている。これを確認するため、ゼブラフィッシュの嗅上皮の組織切片標本において、*OMP1*、*TRPC2*にそれぞれ特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションを行った結果を図11に示す。確かに両者のシグナルは主に深層 (図11a) と表層 (図11b) に分かれ、重ならなかった (図11c)。ただし、*OMP1*の一部シグナルは表層にも検出された (図11矢印)。

*OMP2*は表層にシグナルが検出されたことから、微絨毛性嗅神経細胞に発現する可能性が考えられた。そこで、ゼブラフィッシュの嗅上皮の組織切片標本において、*TRPC2*、*OMP2*にそれぞれ特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果を図12に示す。驚いたことに、両者とも表層にシグナルが検出された (図12a, b) にも関わらず、そのシグナルは重ならなかった (図12c)。この結果から、*OMP2*は微絨毛性嗅神経細胞には発現しないと考えられた。また、嗅神経細胞以外の細胞に*OMP2*が発現する可能性を検証するため、ゼブラフィッシュの嗅上皮の組織切片標本において、神経細胞のマーカーである*Neural cell adhesion molecule (NCAM)* と*OMP2*にそれぞれ特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果を図13に示す。*NCAM*は嗅上皮の感覚野全体にシグナルが検出され (図13a)、両者のシグナルが重なった (図13c) ことから、*OMP2*はやはり嗅神経細胞に発現する可能性が高いと考えられた。

これまでの結果から、ゼブラフィッシュの嗅上皮におけるOMP2の発現パターンは、従来、嗅神経細胞のマーカーとして利用されてきたOMP1、TRPC2のいずれの発現パターンとも異なっており、これらとはほとんど共発現しなかった。一方で、神経細胞のマーカーであるNCAMとは共発現することから、OMP2陽性細胞は従来の分子マーカーでは同定できていない嗅神経細胞である可能性が予想された。嗅神経細胞にはいずれかの嗅覚受容体遺伝子が発現するため、OMP2陽性細胞がどの嗅覚受容体遺伝子を発現するのか明らかにしたいと考えた。

嗅覚受容体には大別してOR^[31]、V1R^[32]、V2R^[33, 34]、TAAR^[35]の4種類が存在することが知られている。また、佐藤らの先行研究^[30]によって、ゼブラフィッシュの嗅上皮では、深層にはOR、表層にはV2Rがそれぞれ発現することが示されている。ただし、魚類はV1R以外の嗅覚受容体遺伝子を数10~100コピー以上保持するため、これら1つ1つについて個別に調べることは労力的に困難であると思われた。そこで、これらの嗅覚受容体と共役するGタンパク質の α サブユニットをコードする遺伝子とOMP2の共発現について調べ、どのタイプの嗅覚受容体遺伝子が共発現するのか絞り込むことにした。なお、先行研究から、マウスではORおよびTAARはG α_{olf} と、V1RはG α_{i2} と、V2RはG α_o とそれぞれ共役することが知られている^[31, 33-35]。また、ゼブラフィッシュでは岡らの先行研究^[68]で、*in situ*ハイブリダイゼーションによりG α_{olf2} 、G α_{o1} 、G α_{o2} 、G α_{i1b} (別名: G α_{ia}) の4種類の遺伝子について嗅上皮における発現が確認されている。

まず、ゼブラフィッシュの嗅上皮の組織切片標本において、前述の先行研究で発現が確認されているG α_{olf2} 、G α_{o1} 、G α_{o2} 、G α_{i1b} とRT-PCRで増幅断片が検出されたG α_{i1a} 、G α_{i2a} 、G α_{i2b} 、G α_q の計8種類の遺伝子について、それぞれに特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。しかしなが

ら、はっきりとしたシグナルが検出されたのは Ga_{olf2} 、 Ga_{o2} 、 Ga_{i1b} の3種類のみだった。このうち、 Ga_{olf2} はORと、 Ga_{o2} はV2Rとそれぞれ共役していると考えられるため、前者は主に深層、後者は主に表層で発現していると予想された。そこで、ゼブラフィッシュの嗅上皮の組織切片標本において、 Ga_{olf2} 、 Ga_{o2} にそれぞれ特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションを行ったところ、図14に示すように Ga_{olf2} のシグナルは主に深層（図14a）、 Ga_{o2} のシグナルは表層（図14b）に検出され、両者のシグナルは重ならなかった。ただし、 Ga_{olf2} のシグナルの一部はOMP1と同様、表層にも検出された（図14矢印）。 Ga_{olf2} とOMP1はどちらも深層で主に発現が見られたことから両者は共発現すると考えられた。このことを確かめるため、 Ga_{olf2} とOMP1それぞれに特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行った結果、図15に示すように Ga_{olf2} とOMP1のシグナルはほとんど重なった（図15c）。

次に、ゼブラフィッシュの嗅上皮の組織切片標本において、 Ga_{olf2} 、 Ga_{o2} 、 Ga_{i1b} の3種類の遺伝子のいずれかとOMP2にそれぞれ特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果を図16に示す。OMP2のシグナルは Ga_{olf2} のシグナルと重なったが（図16c）、 Ga_{o2} や Ga_{i1b} のシグナルとは重ならなかった（図16f, i）。詳しく観察すると、OMP2のシグナルは表層に見られた Ga_{olf2} のシグナルと重なることが明らかになった。これらの結果から、表層にはORまたはTAARを発現する嗅神経細胞が分布しており、それがOMP2陽性細胞である可能性が示唆された。

OMP2陽性細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子の探索

前述したように、*OMP2*と*Ga_{olf2}*は共発現することから、*OMP2*陽性細胞には*OR*または*TAAR*が発現すると考えられた。そこで、遺伝子配列の多様性に富む*OR*に着目し、*OMP2*陽性細胞に発現する*OR*の探索を試みた。ただし、ゼブラフィッシュはゲノム中に150コピーを超える数の*OR*を保持しており、これまでに行ってきたように一つ一つの遺伝子に対して特異的なアンチセンスRNAプローブを作製し、発現パターンを解析していくことが労力的に困難であった。また、いくつかの*OR*については配列類似性が高く、そもそもクロスハイブリダイゼーションが不可避であると思われた。そこで、まずは複数の*OR*に対するアンチセンスRNAプローブカクテルを用いて、*OMP2*と共発現する*OR*を大まかに絞り込むことを考えた。プローブカクテルの合成に際し、効率化を図るため、PCRプライマーの5'側に転写プロモーターを付加し、得られたPCR断片をクローニングせずに転写反応の鋳型として用いることができるよう実験を計画した。また、多数の*OR*遺伝子配列を同時に増幅できるように、配列類似性の高い*OR*遺伝子群の保存された領域に縮重プライマーを設計した。このようにして、 $\delta 2a$ 、 $\delta 2b$ 、 $\epsilon 1$ 、 $\zeta 1a$ 、 $\zeta 1b$ 、 $\zeta 2$ 、 $\eta 1a$ 、 $\eta 2a$ の各*OR*遺伝子群についてプローブカクテルをそれぞれ合成した。なお、本研究で用いた*OR*遺伝子配列は当研究室の先行研究^[59]においてゼブラフィッシュのゲノムデータから単離されたものである。また、ギリシア文字で示した*OR*遺伝子群の大まかな分類群名については新村らの先行研究^[69, 70]に従ったが、本研究では分子系統樹に基づき、より詳細な分類群名を暫定的に設定した。プローブカクテルを合成した*OR*遺伝子群を、それらがコードされている染色体番号と共に分子系統樹上にプロットした結果を図17に示す。プローブカクテルを合成した*OR*遺伝子群は異なる染色体上にコードされているものが選ばれており、互いに離れた系統的位置に散在していることが確認できた。そこで、これらの*OR*遺伝子群と*OMP2*との共発現について調べることにした。各*OR*遺伝子群のプローブカクテルと*OMP2*に特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションを行った結果を図18に示す。 $\delta 2a$ 、 $\epsilon 1$ 、

$\zeta 1a$ 、 $\zeta 2$ 、 $\eta 2a$ の各OR遺伝子群についてはOMP2とシグナルが一部重なるものが認められ (図18c, i, l, r, x)、これらの中にOMP2陽性細胞に発現するORが存在することが示唆された。一方で、 $\delta 2b$ 、 $\zeta 1b$ 、 $\eta 1a$ の各OR遺伝子群についてはOMP2とシグナルが重なるものは認められなかった (図18f, o, u)。

真骨魚類の嗅覚受容体遺伝子のうち、V1Rに関してはいずれの魚種においても6コピー程度しか保持していない^[36, 37]ため、これらについてもOMP2との共発現を調べた。ゼブラフィッシュの嗅上皮の組織切片標本において、6種類のV1R遺伝子のいずれかとOMP2にそれぞれ特異的なアンチセンスRNAプローブを用いて2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションを行った結果を図19に示す。V1R1~V1R6のいずれの遺伝子のシグナルもOMP2のシグナルとは重ならなかった (図19c, f, i, l, o, r)。嗅上皮には繊毛性嗅神経細胞や微絨毛性嗅神経細胞以外にクリプト細胞が存在するが、岡らの先行研究^[39]により、クリプト細胞にはV1R4が特異的に発現していることが示されているため、OMP2陽性細胞はクリプト細胞ではないことが確かめられた。

抗OMP2ポリクローナル抗体の作製

これまでの結果から、嗅上皮におけるOMP2陽性細胞は表層にまばらに存在しており、従来の分子マーカーでは同定できていない、ORまたはTAARを発現する嗅神経細胞である可能性が示唆された。そこで、新規の分子マーカーとしてのOMP2の利便性を高めようと考え、OMP2特異的なポリクローナル抗体を作製することにした。

図4に示したOMPのアミノ酸配列のアラインメントに基づき、パラログ間で配列が異なり、OMP2オーソログ間で配列が保存されている領域をターゲット候補とし

て、ターゲットの選定とターゲットペプチドの合成および精製、ウイスター・ラットへの免疫および血清の採取、そして抗体価の測定をEurofins社に委託した。その結果、図4で四角で囲った領域におけるゼブラフィッシュのアミノ酸配列をターゲットペプチドとしたラットの抗血清が十分量得られた。Eurofins社が行ったELISAの結果から、得られた抗血清にはターゲットペプチドに対する抗体価が十分認められていたが、実際にこれがOMP2を特異的に検出できるか不明であったため、まずこの点について検証した。

大腸菌で合成したゼブラフィッシュのOMP1融合タンパク質とOMP2融合タンパク質について、SDS-PAGEを行った後、抗血清を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果を図20に示す。合成したOMP1融合タンパク質とOMP2融合タンパク質はベクター上にコードされている約48 kDaのTFタンパク質とFLAGタグが融合しているため、約70 kDaの分子量となるが、SDS-PAGEの結果（図20a）から、IPTGを添加して発現誘導をかけた場合に予想通りの分子量のタンパク質が得られていることが確認された。また、ウェスタンブロッティングの結果から、抗FLAG抗体を用いた場合はTFタンパク質とFLAGタグのみのコントロール、OMP1融合タンパク質、OMP2融合タンパク質のいずれも検出された（図20b）のに対し、抗血清を用いた場合はOMP2融合タンパク質のみが検出された（図20c）。この結果から、抗血清はOMP2を特異的に検出可能であることが示された。

次に、この抗血清が実際の生体組織中に存在するOMP2を検出できるか検証するため、ゼブラフィッシュの嗅上皮の組織切片標本において、抗血清を用いた免疫染色を行った。その結果を図21に示す。免疫前のラットの血清を用いた場合はシグナルが検出されなかったのに対し（図21a）、抗血清を用いた場合は、表層からのまばらなシグナルと嗅上皮表面からの一様なシグナルが検出された（図21b, c）。この

うち、表層に見られたシグナルは*in situ*ハイブリダイゼーションによって検出されたシグナル(図21d)と類似しており、この抗血清はゼブラフィッシュの嗅上皮においてOMP2を特異的に検出可能であると考えられた。なお、嗅神経細胞は嗅上皮表面に繊毛もしくは微繊毛を伸ばしているため、表層のシグナルは細胞体に、嗅上皮表面のシグナルは繊毛にそれぞれ由来するものと考えられた。マウスの嗅神経細胞に対する抗OMP抗体を用いた免疫染色の実施例^[71]では、繊毛および細胞体の両方からシグナルが検出されているため、この結果はよく一致している。

考察

3R以外の全ゲノム重複に由来するOMPの倍化

分子系統解析の結果、先行研究で報告のあったアフリカツメガエル^[48]とヒメマス^[51]のOMPについてもその倍化時期が推定された。アフリカツメガエルのOMPの倍化はネッタイツメガエルの分岐後、アフリカツメガエルの系統特異的に生じたことが推定された。また、ヒメマスのOMPは2つともOMP2クレードに含まれており、その倍化はヒメマスの系統特異的に生じたことが推定された。*Xenopus*属やサケ類は独自に全ゲノム重複を起こした^[18, 72]ことが知られているため、やはり全ゲノム重複に伴ってOMPが倍化したと考えられる。なお、ヒメマスのOMP1に相当する遺伝子はまだ単離されていないが、おそらくは2コピー存在すると予想される。これについて詳しく検証するためにはサケ類のゲノムデータの公開が待たれる。

また、アフリカツメガエルのOMPについては先行研究^[48]において発現解析が行われていた。それによると、OMP1は中憩室で強い発現を示すのに対し、OMP2は主憩室で強い発現を示すことが報告されている。中憩室は「water nose」、主憩室は「air nose」とも呼ばれており、前者は水中に溶けている匂い物質を、後者は空気中に揮発している匂い物質をそれぞれ受容する嗅覚器官と考えられている。この報告がなされた当時、subfunctionalizationという考え方はまだ一般に知られていなかったと思われるが、改めてこの結果を解釈してみるとアフリカツメガエルのOMPも全ゲノム重複に伴って倍化した後、組織間でのsubfunctionalizationが起きたのかもしれない。

OMPの起源について

本研究によって、四足動物、真骨魚類に加えてシーラカンスやスポッテッド・ガーにもOMPが存在することが明らかになった。OMPは脊椎動物全般に存在すると考えられているが、OMPは他の遺伝子と相同性がなく、いつ出現したのかも定かではない。現在、軟骨魚類のゾウギンザメ^[73]や円口類のヤツメウナギ^[8]、頭索動物のナメクジウオ^[9]のゲノムデータが公開されているが、これらに対するTBLASTN検索の結果からは既知のOMPと相同性のある配列は見つからなかった。ただし、この結果は単にゲノムデータが不完全であることによる可能性を否定できない。そこで、別の観点からOMPの起源について考えた。これまでに明らかになったところでは、少なくとも真骨魚類、アフリカツメガエル、ヒメマスにおいて独立に倍化したOMPがその後、いずれの種においても2コピーを保持している。これらを鑑みるに、OMPは何らかの理由で倍化後に消失しにくい遺伝子なのかもしれない。現生の脊椎動物種のほぼ全てが「2R仮説」に示されるように少なくとも2度の全ゲノム重複を経験していると考え、多くの脊椎動物種においてOMPが1コピーだけ存在するという事実は、2Rの後にOMPが誕生したことを示唆しているのかもしれない。

眼におけるOMP2の機能

発現解析の結果から、真骨魚類のOMP2は網膜水平細胞に発現していることが見出された。嗅神経細胞特異的なタンパク質であると考えられてきたOMPが網膜でも何らかの機能を持っているとすれば非常に興味深い。Kwonらの先行研究^[45]から、マウスの嗅神経細胞においてOMPはNCX1と共局在しており、匂い刺激によって細胞内に流入したCa²⁺の速やかな排出に寄与していると考えられている。また、別の研究^[74]によると、真骨魚類ではNCX1もOMPと同様に倍化しており、そのうちのー

つである*NCX1b*はゼブラフィッシュの眼において発現していることが示されている [75, 76]。これらのことを考え合わせると、OMP2は網膜水平細胞においても*NCX1b*と相互作用し、細胞内イオン濃度の速やかな調節に関与しているのかもしれない。網膜水平細胞は、光を受容して活性化した視細胞からのシグナルを受け、その周囲の視細胞に対し抑制的に働くことが知られており、これによって網膜に結ばれた像の境界線を際立たせる「エッジ効果」に関与していると考えられている。もしかすると、OMPは網膜水平細胞で機能することによって、網膜上に鮮明な像を作り出すことに寄与しているのかもしれない。

四足動物におけるOMPの発現パターンの進化

本研究からスポットテッド・ガーにおいてもOMPが眼で発現していることが見出された。すなわち、倍化以前の祖先型OMPも網膜水平細胞において機能している可能性が示唆された。一方で、マウスにおいてOMPはほとんど眼に発現していない。このことから、四足動物への進化の過程で、OMPは網膜水平細胞での発現を消失した可能性が新たに提起される。また、前述したように、もし仮にOMPが網膜上に鮮明な像を作り出すことに寄与しているとしたら、水棲の真骨魚類と陸棲の四足動物ではその機能の重要性が異なるのかもしれない。あるいはそのようなことを要因として、四足動物への進化の過程で、陸棲化に伴いOMPは網膜水平細胞での発現を消失した可能性も考えられる。

また、本研究から真骨魚類のOMP1、OMP2はいずれもTRPC2とは共発現しないことが示された。このことから、倍化以前の祖先型OMPもTRPC2とは共発現しないと考えられる。すなわち、祖先型OMPは繊毛性嗅神経細胞だけに発現しており、微絨毛性嗅神経細胞には発現していなかったのかもしれない。一方、マウスにおいて

*OMP*は主嗅上皮だけでなく鋤鼻器官においても発現が認められる^[71]。哺乳類の鋤鼻神経細胞と真骨魚類の微絨毛性嗅神経細胞は形態的特徴や分子的特性の類似点から相同な細胞であると考えられているため、倍化以前の祖先型*OMP*が微絨毛性嗅神経細胞に発現していなかったとすれば、おそらく四足動物への進化の過程で*OMP*は鋤鼻神経細胞での発現を獲得したと考えられる。この意義は今のところ不明であるが、例えば、*OR*遺伝子では真骨魚類と陸棲脊椎動物の間で大幅なレパートリーの減少が見られることから指摘されている^[69]ように、陸棲化が嗅覚に対して分子レベルで多大な影響を与えたことはおそらく間違いない。したがって、四足動物への進化の過程で、*OMP*が微絨毛性嗅神経細胞に発現を獲得したことも、やはり陸棲化と何か関係があるのかもしれない。

嗅覚関連遺伝子に対する全ゲノム重複の影響

本研究では主に*OMP*の倍化について論じてきたが、Gタンパク質の α サブユニット遺伝子の探索の際、これらの遺伝子にも倍化しているものが多数確認された。例えば、 $G\alpha_{o1}$ と $G\alpha_{o2}$ 、 $G\alpha_{i2a}$ と $G\alpha_{i2b}$ などである。こうした真骨魚類におけるGタンパク質の α サブユニット遺伝子の倍化については、岡らの先行研究^[68]でも論じられているが、やはり3Rの影響であると考えられる。このように、真骨魚類の嗅覚関連遺伝子の中には3Rによって倍化した遺伝子が多数含まれている可能性があるため、マウスなどで得られた知見をそのままゼブラフィッシュに当てはめるのは危険であると言えよう。例えば、哺乳類のタンパク質をターゲットとして作製された抗体を用いてゼブラフィッシュに対する免疫染色を行ったとしても、そのターゲットのタンパク質をコードする遺伝子が3Rによって倍化していた場合、検出できたシグナルが両方の遺伝子由来のタンパク質を検出できているのか、片方の遺伝子由来のタンパク質しか検出できていないのか精査し直す必要が生じるであろう。こうした観点から、

ゼブラフィッシュなどのモデル魚種を用いた組織化学的な実験手法において、分子マーカーに用いる遺伝子が3Rによる倍化を受けているか否かを確認するなどの措置を講じるべきである。

OMP2陽性細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子

本研究ではプローブカクテルを用いた探索法により、OMP2陽性細胞に発現する嗅覚受容体遺伝子をサブグループ単位で絞り込むことができた。しかしながら、OMP2陽性細胞に発現するORはそれらのうちのごく一部であり、遺伝子を同定するには至らなかった。また、OMP2陽性細胞に発現するORが含まれる遺伝子群は分子系統樹上の様々な位置に散在しており、分子系統学的分類とは無関係にいくつかのORがOMP2陽性細胞に発現している可能性が示唆された。さらに、OMP2陽性細胞に発現するORが含まれる遺伝子群がコードされている染色体についても一貫性はなく、特定の染色体上のOR遺伝子群だけがOMP2陽性細胞に発現しているわけではないことが示された。したがって、現在までのところ、OMP2陽性細胞に発現するORについて共通性は見出されていない。

subfunctionalizationによるOMPの保持

本研究の結果から推測される真骨魚類のOMPの倍化とその進化パターンについて図22に示す。公開されているRNAシーケンスデータを用いたトランスクリプトーム解析から、OMPが倍化していないスポットテッド・ガーにおいてもOMPが眼に発現していることが示された。このことは倍化以前からOMPが眼に発現していたことを示すとともに、倍化後にOMP1が眼での発現を失った可能性も示している。すなわち、OMP2は倍化以前と同じく眼での発現を維持していると考えられるのに対し、

OMP1は嗅上皮に発現を特化させたと推測される。このことは、両者の間に組織間でのsubfunctionalizationが起きつつあったことを示唆しているのかもしれない。

しかしながら、OMP2は嗅上皮での発現を完全には消失していない。その理由は、嗅上皮においても両者の発現がそれぞれ異なる細胞群に特化していったためだと考えられる。つまり、両者の間に同一組織内の細胞群間でのsubfunctionalizationが起きた可能性が示唆される。これまでwhole mountの発現解析によって、組織間でのsubfunctionalizationを示唆した報告は多数存在する^[77-81]が、組織科学的な発現解析により細胞群間でのsubfunctionalizationを示唆した例はおそらく本研究が初めてであろう。

では、細胞群間でのsubfunctionalizationはどのようにして起こるのであろうか。一般に、subfunctionalizationが起こるメカニズムはForceらによって提案されたDDCモデルによって説明されている^[20]。このモデルの特徴は、重複遺伝子が発現領域を特化させていく過程について、選択圧といった積極的な理由を必要とせず、中立進化のみで説明できることである。しかしながら、DDCモデルに基づくと、既存のエンハンサーが支配する発現領域の間でしかsubfunctionalizationが起こらないことになる。細胞群間でのsubfunctionalizationについて考えた場合、同一組織内の異なる細胞群ごとに発現を制御するエンハンサーの存在を前提とするDDCモデルはやや不自然であると思われる。

近年、*paired box (pax)* 遺伝子群に属する*pax2*と*pax8*のシス調節領域に着目した越智らの研究^[82]から、別のメカニズムによってもsubfunctionalizationが起こる可能性が提案された。これによると、*pax2*と*pax8*が遺伝子重複によって生じた後、組織特異的なサイレンサーの獲得によって、それぞれの遺伝子の発現領域が細分化

されたことが示された。すなわち、既存エンハンサーの喪失だけでなく、新規サイレンサーの獲得でもsubfunctionalizationが起こり得ることが示唆されている。このモデルの特徴は、複数の発現調節領域の存在を前提とせず、発現を細分化できる領域を遺伝子が倍化した後に自由に決められることである。したがって、細胞群間でのsubfunctionalizationを説明するには、おそらくこのモデルの方が妥当であろう。

嗅神経細胞について考えると、原則的に1つの嗅神経細胞が1つの嗅覚受容体遺伝子のみを発現するという「1細胞1受容体則」が当てはまると考えられており^[83]、嗅神経細胞の間で細胞接着因子や軸索投射の制御因子の発現も異なることが知られている^[84-87]。このように多様な嗅神経細胞の運命決定には様々なシス・トランス因子が関わっており^[88, 89]、複雑な発現制御機構が存在することがうかがえる。おそらくOMPもこうした複雑な発現制御機構の支配下にあり、3Rによる倍化後にサイレンサーの獲得によってそれぞれが異なる嗅神経細胞群に発現を細分化させたことで、細胞群間でのsubfunctionalizationが起きたのだと推測される。

細胞群間でのsubfunctionalizationによる種多様性の獲得

全ゲノム重複後に起こる進化について、倍化した遺伝子の急速な消失の後、保持されていた遺伝子が地域集団間で独立に消失することにより、種多様性が獲得されるとする考え方が近年提唱されている^[24, 25]。倍化後に保持される遺伝子の多くはsubfunctionalizationを起こしたものと考えられるが、中でもサイレンサーの獲得によって起こるsubfunctionalizationは、サイレンサーの二次的な喪失によって倍化前の発現パターンが再現されやすいと想像される。おそらく、そのようなケースにお

いて、一旦は保持されてきた遺伝子の消失が起こるのではないだろうか。これが倍化した遺伝子の急速な消失に続いて起こる、緩やかな消失の正体であると推測している。前述したように、細胞群間でのsubfunctionalizationはサイレンサーの獲得によるものが多いと考えられるが、ひょっとすると、全ゲノム重複によって倍化した遺伝子が細胞群間でのsubfunctionalizationによって一定期間保持されることで、やがてサイレンサーが二次的に失われた際に、地域集団間での独立した遺伝子消失へとつながり、その結果として種多様性が獲得されていくのかもしれない。

展望

本研究により、真骨魚類のOMPは3Rに伴って倍化したのち、組織間および嗅上皮の細胞群間においてsubfunctionalizationを起こした可能性が示唆された。しかしながら、このことを立証するためには、倍化以前のOMPがどのような発現パターンを示していたのかを理解しなくてはならない。そこで今後は、3Rを経験していないスポットテッド・ガーやポリプテルスなどの古代魚を用いてOMPの詳細な発現パターンを解析していく必要がある。具体的にはこれらの生物種で、OMPが網膜水平細胞に発現していることと、嗅上皮において $G\alpha_{olf}$ と共発現することを確認すべきである。

また、前述したように、本研究から推測された倍化以前の祖先型OMPの発現パターンは、現在マウスなどで確認されているOMPの発現パターンとは異なっており、四足動物への進化の過程において、OMPの発現パターンも進化した可能性が示唆された。このような四足動物への進化の過程におけるOMPの発現パターンの進化を検証するためには、前述のポリプテルスやスポットテッド・ガーに加え、肉鱗類のシーラカンスやハイギョ、両生類のカエルやイモリなど、系統的により広範に渡る生物種を用いて、組織化学的手法によりOMPの詳細な発現パターンを比較解析することが必要である。

近年ではCRISPR/Cas9システム^[90-92]に代表されるゲノム編集技術が急速に進展しており、ゼブラフィッシュやメダカにおいても遺伝子破壊が可能となっている^[91, 92]。こうした技術を用いてOMP2ノックアウト個体を作製することで、眼におけるOMP2の機能を逆遺伝学的に解析することが可能である。また、これまでOMPは嗅神経細胞特異的な分子と考えられてきたため、その機能解析は嗅神経細胞を用いて行われてきた。しかし、今後はモデル魚種の網膜水平細胞を用いてOMP2の機能解

析を行うことも可能であるため、これまでよくわからなかったOMPの機能解析が進展するのではないかと期待される。

また、本研究ではいくつかマーカー遺伝子とOMP2の比較発現解析によって、OMP2は繊毛性嗅神経細胞の一部に発現しており、 Ga_{olf2} と共発現することが示された。マウスにおける知見に基づけば、4種類の嗅覚受容体遺伝子の中でORおよびTAARが Ga_{olf} と共役していることが知られている^[31, 35]ため、OMP2陽性細胞にはORおよびTAARの一部が発現していることが予想される。新村らの先行研究^[69, 70]により、脊椎動物のORは大別して $\alpha\sim\eta$ までの7つに分類されているが、このうち、 α と γ を除く主に5つのサブグループを真骨魚類は保持している。また、Hussainらの先行研究^[38]により、脊椎動物のTAARは大別してクラスI~IIIまでの3つに分類されているが、真骨魚類はこれらを全て保持している。本研究ではこれらOR、TAARの分類群のうち、少なくともORに関しては分子系統学的に近縁なものだけがOMP2陽性細胞に発現しているわけではなく、むしろ分子系統学的分類とは無関係にいくつかのORが発現していることが示唆された。しかしながら、これらが具体的にどの遺伝子なのか本研究では明らかにできなかった。今後はその点について明らかにしていきたい。ただし、ORやTAARはいずれもコピー数が多いことに加え、配列類似性の高いパラログが多数存在するため、本研究で行ってきたアンチセンスRNAプローブを用いた*in situ*ハイブリダイゼーションに代わる解析方法が必要であろう。

そこで今後は、OMP2の発現パターンをレポーター遺伝子によって可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、OMP2陽性細胞群の単離およびRNAシーケンスによるトランスクリプトーム解析が有力であると考えている。これにより、OMP2陽性細胞に特徴的な分子、例えば、本研究では特定に至らなかった嗅覚受容体などが同定できるであろう。

さらに、将来的にはシングルセルRNAシーケンスによる1細胞レベルでのトランスクリプトーム解析によって、*OMP1*陽性細胞群と*OMP2*陽性細胞群について、それぞれの細胞群についての共通性や両者の差異を観測し比較することで、細胞群間でのsubfunctionalizationのメカニズムの一端が明らかにされると期待している。また、こうした嗅神経細胞の分子的特性に対する網羅的解析が行われることで、多様に富んだ嗅神経細胞の運命決定や軸索投射のメカニズムの解明にも貢献できると期待している。

結論

本研究によって、真骨魚類に存在する2つのOMPは3Rによって生じたことが強く示唆された。また、2つのOMPは組織間、細胞レベルでのsubfunctionalizationによって保持されてきたことが示唆された。具体的には、OMP1が眼での発現を消失したことで組織間でのsubfunctionalizationが進行し、それとともに嗅上皮においてOMP1が深層の繊毛性嗅神経細胞に、OMP2が表層の繊毛性嗅神経細胞にそれぞれ発現を細分化させたことで細胞群間でのsubfunctionalizationが起きたと推測された。組織間でのsubfunctionalizationについては報告も多く、これまでもよく論じられてきたが、本研究によって同一組織内の細胞群間でのsubfunctionalizationが起こり得ることが示唆された。あるいは、こうした細胞群間でのsubfunctionalizationが、全ゲノム重複後の種多様性の獲得に寄与しているのかもしれない。

謝辞

本研究にあたり多大なるご支援、ご助言をいただき、研究をご指導いただきました岡田典弘名誉教授と二階堂雅人准教授に感謝いたします。また、*in situ*ハイブリダイゼーション法などの組織化学的手法の技術指導と論文作成にあたって多くのご助言をいただきました東京都医学総合研究所の山岸公子先生に感謝いたします。最後に、日常の研究室生活の中で様々なディスカッションを通して実験や解析のヒントをくださった岡田・梶川研究室の皆様に感謝いたします。

引用文献

1. Zhang, J, Rosenberg, HF, Nei, M. **Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3708-13.
2. Li, WH, Gojobori, T. **Rapid evolution of goat and sheep globin genes following gene duplication.** *Mol Biol Evol* 1983;1(1):94-108.
3. Pall, ML. **Gene-amplification model of carcinogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(4):2465-8.
4. Niimura, Y, Nei, M. **Evolution of olfactory receptor genes in the human genome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12235-40.
5. Ohno S. **Evolution by gene duplication.** New York: Springer; 1970.
6. Holland, PW, Garcia-Fernàndez, J, Williams, NA, Sidow, A. **Gene duplications and the origins of vertebrate development.** *Dev Suppl* 1994;(0):125-33.
7. Kasahara, M. **The 2R hypothesis: an update.** *Curr Opin Immunol* 2007;19(5):547-52.
8. Smith, JJ, Kuraku, S, Holt, C, Sauka-Spengler, T, Jiang, N, Campbell, MS, Yandell, MD, Manousaki, T, Meyer, A, Bloom, OE, Morgan, JR, Buxbaum,

- JD, Sachidanandam, R, Sims, C, Garruss, AS, Cook, M, Krumlauf, R, Wiedemann, LM, Sower, SA, Decatur, WA, Hall, JA, Amemiya, CT, Saha, NR, Buckley, KM, Rast, JP, Das, S, Hirano, M, McCurley, N, Guo, P, Rohner, N, Tabin, CJ, Piccinelli, P, Elgar, G, Ruffier, M, Aken, BL, Searle, SM, Muffato, M, Pignatelli, M, Herrero, J, Jones, M, Brown, CT, Chung-Davidson, YW, Nanlohy, KG, Libants, SV, Yeh, CY, McCauley, DW, Langeland, JA, Pancer, Z, Fritzschn, B, de Jong, PJ, Zhu, B, Fulton, LL, Theising, B, Flicek, P, Bronner, ME, Warren, WC, Clifton, SW, Wilson, RK, Li, W. **Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution.** *Nat Genet* 2013;45(4):415-21, 421e1-2.
9. Putnam, NH, Butts, T, Ferrier, DE, Furlong, RF, Hellsten, U, Kawashima, T, Robinson-Rechavi, M, Shoguchi, E, Terry, A, Yu, JK, Benito-Gutiérrez, EL, Dubchak, I, Garcia-Fernández, J, Gibson-Brown, JJ, Grigoriev, IV, Horton, AC, de Jong, PJ, Jurka, J, Kapitonov, VV, Kohara, Y, Kuroki, Y, Lindquist, E, Lucas, S, Osoegawa, K, Pennacchio, LA, Salamov, AA, Satou, Y, Sauka-Spengler, T, Schmutz, J, Shin-I, T, Toyoda, A, Bronner-Fraser, M, Fujiyama, A, Holland, LZ, Holland, PW, Satoh, N, Rokhsar, DS. **The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype.** *Nature* 2008;453(7198):1064-71.
10. Pascual-Anaya, J, D'Aniello, S, Kuratani, S, Garcia-Fernández, J. **Evolution of Hox gene clusters in deuterostomes.** *BMC Dev Biol* 2014;13(0):26.

11. Meyer, A. **Hox gene variation and evolution.** *Nature* 1998;391(6664): 225, 227-8.
12. Amores, A, Force, A, Yan, YL, Joly, L, Amemiya, C, Fritz, A, Ho, RK, Langeland, J, Prince, V, Wang, YL, Westerfield, M, Ekker, M, Postlethwait, JH. **Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution.** *Science* 1998;282(5394):1711-4.
13. Meyer, A, Málaga-Trillo, E. **Vertebrate genomics: More fishy tales about Hox genes.** *Curr Biol* 1999;9(6):R210-3.
14. Hoegg, S, Meyer, A. **Hox clusters as models for vertebrate genome evolution.** *Trends Genet* 2005;21(8):421-4.
15. Meyer, A, Schartl, M. **Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions.** *Curr Opin Cell Biol* 1999;11(6):699-704.
16. Vandepoele, K, De Vos, W, Taylor, JS, Meyer, A, Van de Peer, Y. **Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(6):1638-43.
17. Hoegg, S, Brinkmann, H, Taylor, JS, Meyer, A. **Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish.** *J Mol Evol* 2004;59(2):190-203.

18. Berthelot, C, Brunet, F, Chalopin, D, Juanchich, A, Bernard, M, Noël, B, Bento, P, Da Silva, C, Labadie, K, Alberti, A, Aury, JM, Louis, A, Dehais, P, Bardou, P, Montfort, J, Klopp, C, Cabau, C, Gaspin, C, Thorgaard, GH, Boussaha, M, Quillet, E, Guyomard, R, Galiana, D, Bobe, J, Volff, JN, Genêt, C, Wincker, P, Jaillon, O, Roest Crolius, H, Guiguen, Y. **The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates.** *Nat Commun* 2014;5(0): 3657.
19. Moghadam, HK, Ferguson, MM, Danzmann, RG. **Evidence for Hox gene duplication in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a tetraploid model species.** *J Mol Evol* 2005;61(6):804-18.
20. Force, A, Lynch, M, Pickett, FB, Amores, A, Yan, YL, Postlethwait, J. **Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations.** *Genetics* 1999;151(4):1531-45.
21. Lynch, M, Force, A. **The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization.** *Genetics* 2000;154(1):459-73.
22. He, X, Zhang, J. **Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution.** *Genetics* 2005;169(2):1157-64.
23. Kimura, M, Ohta, T. **On some principles governing molecular evolution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71(7):2848-52.

24. Inoue, J, Sato, Y, Sinclair, R, Tsukamoto, K, Nishida, M. **Rapid genome reshaping by multiple-gene loss after whole-genome duplication in teleost fish suggested by mathematical modeling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(48):14918-23.
25. Sato, Y, Hashiguchi, Y, Nishida, M. **Temporal pattern of loss/persistence of duplicate genes involved in signal transduction and metabolic pathways after teleost-specific genome duplication.** *BMC Evol Biol* 2009;9(0):127.
26. Dulac, C, Torello, AT. **Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour.** *Nat Rev Neurosci* 2003;4(7):551-62.
27. Hansen, A, Zeiske, E. **The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study.** *Chem Senses* 1998;23(1):39-48.
28. Hansen, A, Rolen, SH, Anderson, K, Morita, Y, Caprio, J, Finger, TE. **Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish.** *J Neurosci* 2003;23(28):9328-39.
29. Hansen, A, Anderson, KT, Finger, TE. **Differential distribution of olfactory receptor neurons in goldfish: structural and molecular correlates.** *J Comp Neurol* 2004;477(4):347-59.

30. Sato, Y, Miyasaka, N, Yoshihara, Y. **Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish.** *J Neurosci* 2005;25(20):4889-97.
31. Buck, L, Axel, R. **A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition.** *Cell* 1991;65(1):175-87.
32. Dulac, C, Axel, R. **A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals.** *Cell* 1995;83(2):195-206.
33. Herrada, G, Dulac, C. **A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution.** *Cell* 1997;90(4):763-73.
34. Matsunami, H, Buck, LB. **A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals.** *Cell* 1997;90(4):775-84.
35. Liberles, SD, Buck, LB. **A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium.** *Nature* 2006;442(7103):645-50.
36. Saraiva, LR, Korsching, SI. **A novel olfactory receptor gene family in teleost fish.** *Genome Res* 2007;17(10):1448-57.

37. Ota, T, Nikaido, M, Suzuki, H, Hagino-Yamagishi, K, Okada, N. **Characterization of V1R receptor (ora) genes in Lake Victoria cichlids.** *Gene* 2012;499(2):273-9.
38. Hussain, A, Saraiva, LR, Korsching, SI. **Positive Darwinian selection and the birth of an olfactory receptor clade in teleosts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(11):4313-8.
39. Oka, Y, Saraiva, LR, Korsching, SI. **Crypt neurons express a single V1R-related ora gene.** *Chem Senses* 2012;37(3):219-27.
40. Margolis, FL. **A brain protein unique to the olfactory bulb.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69(5):1221-4.
41. Danciger, E, Mettling, C, Vidal, M, Morris, R, Margolis, F. **Olfactory marker protein gene: its structure and olfactory neuron-specific expression in transgenic mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(21):8565-9.
42. Mombaerts, P, Wang, F, Dulac, C, Chao, SK, Nemes, A, Mendelsohn, M, Edmondson, J, Axel, R. **Visualizing an olfactory sensory map.** *Cell* 1996;87(4):675-86.
43. Potter, SM, Zheng, C, Koos, DS, Feinstein, P, Fraser, SE, Mombaerts, P. **Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse.** *J Neurosci* 2001;21(24):9713-23.

44. Buiakova, OI, Baker, H, Scott, JW, Farbman, A, Kream, R, Grillo, M, Franzen, L, Richman, M, Davis, LM, Abbondanzo, S, Stewart, CL, Margolis, FL. **Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(18):9858-63.
45. Kwon, HJ, Koo, JH, Zufall, F, Leinders-Zufall, T, Margolis, FL. **Ca extrusion by NCX is compromised in olfactory sensory neurons of OMP mice.** *PLoS One* 2009;4(1):e4260.
46. Smith, PC, Firestein, S, Hunt, JF. **The crystal structure of the olfactory marker protein at 2.3 Å resolution.** *J Mol Biol* 2002;319(3):807-21.
47. Buiakova, OI, Krishna, NS, Getchell, TV, Margolis, FL. **Human and rodent OMP genes: conservation of structural and regulatory motifs and cellular localization.** *Genomics* 1994;20(3):452-62.
48. Rössler, P, Mezler, M, Breer, H. **Two olfactory marker proteins in *Xenopus laevis*.** *J Comp Neurol* 1998;395(3):273-80.
49. Celik, A, Fuss, SH, Korsching, SI. **Selective targeting of zebrafish olfactory receptor neurons by the endogenous OMP promoter.** *Eur J Neurosci* 2002;15(5):798-806.
50. Yasuoka A, Endo K, Asano-Miyoshi M, Abe K, Emori Y. **Two subfamilies of olfactory receptor genes in medaka fish, *Oryzias latipes*:**

Genomic organization and differential expression in olfactory epithelium. *J Biochem* 1999;126:866–73.

51. Kudo, H, Doi, Y, Ueda, H, Kaeriyama, M. **Molecular characterization and histochemical demonstration of salmon olfactory marker protein in the olfactory epithelium of lacustrine sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*).** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2009;154(1):142-50.
52. Nikaido, M, Suzuki, H, Toyoda, A, Fujiyama, A, Hagino-Yamagishi, K, Kocher, TD, Carleton, K, Okada, N. **Lineage-Specific Expansion of Vomeronasal Type 2 Receptor-like (OlfC) Genes in Cichlids May Contribute to Diversification of Amino Acid Detection Systems.** *Genome Biol Evol* 2013;(0):.
53. Nikaido, M, Ota, T, Hirata, T, Suzuki, H, Satta, Y, Aibara, M, Mzighani, SI, Sturmbauer, C, Hagino-Yamagishi, K, Okada, N. **Multiple episodic evolution events in V1R receptor genes of East-African cichlids.** *Genome Biol Evol* 2014;6(5):1135-44.
54. **DNA Data Bank of Japan ARSA search** [<http://ddbj.nig.ac.jp/arsa/>]
55. **Ensembl Genome Browser** [<http://www.ensembl.org/index.html>]
56. **GeneWise** [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/genewise/>]
57. **ClustalW2** [<http://www.clustal.org/clustal2/>]

58. **Needle** [http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/]
59. Nikaido, M, Noguchi, H, Nishihara, H, Toyoda, A, Suzuki, Y, Kajitani, R, Suzuki, H, Okuno, M, Aibara, M, Ngatunga, BP, Mzighani, SI, Kalombo, HW, Masengi, KW, Tuda, J, Nogami, S, Maeda, R, Iwata, M, Abe, Y, Fujimura, K, Okabe, M, Amano, T, Maeno, A, Shiroishi, T, Itoh, T, Sugano, S, Kohara, Y, Fujiyama, A, Okada, N. **Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land.** *Genome Res* 2014;23(10):1740-8.
60. Tamura, K, Stecher, G, Peterson, D, Filipski, A, Kumar, S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** *Mol Biol Evol* 2014;30(12):2725-9.
61. **DNA Data Bank of Japan BLAST search** [<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/>]
62. **European Nucleotide Archive** [<http://www.ebi.ac.uk/ena/submit/read-submission>]
63. **FastQC** [<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>]
64. **FASTX-Toolkit** [http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/]
65. **Bowtie2** [<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/>]

66. Li, B, Dewey, CN. **RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome.** *BMC Bioinformatics* 2011;12(0):323.
67. Inoue, JG, Miya, M, Tsukamoto, K, Nishida, M. **Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the "ancient fish".** *Mol Phylogenet Evol* 2002;26(1):110-20.
68. Oka, Y, Korsching, SI. **Shared and unique G alpha proteins in the zebrafish versus mammalian senses of taste and smell.** *Chem Senses* 2011;36(4):357-65.
69. Niimura, Y, Nei, M. **Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(17):6039-44.
70. Niimura, Y. **On the origin and evolution of vertebrate olfactory receptor genes: comparative genome analysis among 23 chordate species.** *Genome Biol Evol* 2009;1(0):34-44.
71. Farbman, AI, Margolis, FL. **Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization.** *Dev Biol* 1980;74(1):205-15.
72. Bisbee, CA, Baker, MA, Wilson, AC, Haji-Azimi, I, Fischberg, M. **Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*).** *Science* 1977;195(4280):785-7.

73. Ravi, V, Lam, K, Tay, BH, Tay, A, Brenner, S, Venkatesh, B. **Elephant shark (*Callorhinchus milii*) provides insights into the evolution of Hox gene clusters in gnathostomes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(38):16327-32.
74. On, C, Marshall, CR, Chen, N, Moyes, CD, Tibbits, GF. **Gene structure evolution of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX) family.** *BMC Evol Biol* 2008;8(0):127.
75. Liao, BK, Deng, AN, Chen, SC, Chou, MY, Hwang, PP. **Expression and water calcium dependence of calcium transporter isoforms in zebrafish gill mitochondrion-rich cells.** *BMC Genomics* 2007;8(0):354.
76. Langenbacher, AD, Dong, Y, Shu, X, Choi, J, Nicoll, DA, Goldhaber, JI, Philipson, KD, Chen, JN. **Mutation in sodium-calcium exchanger 1 (NCX1) causes cardiac fibrillation in zebrafish.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(49):17699-704.
77. Takamatsu, N, Kurosawa, G, Takahashi, M, Inokuma, R, Tanaka, M, Kanamori, A, Hori, H. **Duplicated Abd-B class genes in medaka hoxAa and hoxAb clusters exhibit differential expression patterns in pectoral fin buds.** *Dev Genes Evol* 2007;217(4):263-73.
78. Hurley, IA, Scemama, JL, Prince, VE. **Consequences of hoxb1 duplication in teleost fish.** *Evol Dev* 2007;9(6):540-54.

79. Davis, A, Stellwag, EJ. **Spatio-temporal patterns of Hox paralog group 3-6 gene expression during Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryonic development.** *Gene Expr Patterns* 2010;10(6): 244-50.
80. Lyon, RS, Davis, A, Scemama, JL. **Spatio-temporal expression patterns of anterior Hox genes during Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryonic development.** *Gene Expr Patterns* 2013;13(3): 104-8.
81. Kleinjan, DA, Bancewicz, RM, Gautier, P, Dahm, R, Schonhaler, HB, Damante, G, Seawright, A, Hever, AM, Yeyati, PL, van Heyningen, V, Coutinho, P. **Subfunctionalization of duplicated zebrafish pax6 genes by cis-regulatory divergence.** *PLoS Genet* 2008;4(2):e29.
82. Ochi, H, Tamai, T, Nagano, H, Kawaguchi, A, Sudou, N, Ogino, H. **Evolution of a tissue-specific silencer underlies divergence in the expression of pax2 and pax8 paralogues.** *Nat Commun* 2012;3(0): 848.
83. Serizawa, S, Ishii, T, Nakatani, H, Tsuboi, A, Nagawa, F, Asano, M, Sudo, K, Sakagami, J, Sakano, H, Ijiri, T, Matsuda, Y, Suzuki, M, Yamamori, T, Iwakura, Y, Sakano, H. **Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes.** *Nat Neurosci* 2000;3(7):687-93.

84. Serizawa, S, Miyamichi, K, Takeuchi, H, Yamagishi, Y, Suzuki, M, Sakano, H. **A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting.** *Cell* 2006;127(5):1057-69.
85. Fouquet, C, Di Meglio, T, Ma, L, Kawasaki, T, Long, H, Hirata, T, Tessier-Lavigne, M, Chédotal, A, Nguyen-Ba-Charvet, KT. **Robo1 and robo2 control the development of the lateral olfactory tract.** *J Neurosci* 2007;27(11):3037-45.
86. Imai, T, Yamazaki, T, Kobayakawa, R, Kobayakawa, K, Abe, T, Suzuki, M, Sakano, H. **Pre-target axon sorting establishes the neural map topography.** *Science* 2009;325(5940):585-90.
87. Takeuchi, H, Inokuchi, K, Aoki, M, Suto, F, Tsuboi, A, Matsuda, I, Suzuki, M, Aiba, A, Serizawa, S, Yoshihara, Y, Fujisawa, H, Sakano, H. **Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb.** *Cell* 2010;141(6):1056-67.
88. Hirota, J, Omura, M, Mombaerts, P. **Differential impact of Lhx2 deficiency on expression of class I and class II odorant receptor genes in mouse.** *Mol Cell Neurosci* 2007;34(4):679-88.
89. Enomoto, T, Ohmoto, M, Iwata, T, Uno, A, Saitou, M, Yamaguchi, T, Kominami, R, Matsumoto, I, Hirota, J. **Bcl11b/Ctip2 controls the**

differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice. *J Neurosci* 2011;31(28):10159-73.

90. Cong, L, Ran, FA, Cox, D, Lin, S, Barretto, R, Habib, N, Hsu, PD, Wu, X, Jiang, W, Marraffini, LA, Zhang, F. **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.** *Science* 2013;339(6121):819-23.

91. Hwang, WY, Fu, Y, Reyon, D, Maeder, ML, Tsai, SQ, Sander, JD, Peterson, RT, Yeh, JR, Joung, JK. **Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system.** *Nat Biotechnol* 2013;31(3):227-9.

92. Ansai, S, Kinoshita, M. **Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka.** *Biol Open* 2014;3(5):362-71.

講演目録

1. 鈴木彦有、二階堂雅人、山岸公子、岡田典弘 「真骨魚類特異的ゲノム重複(3R)によるOlfactory Marker Protein遺伝子の重複と機能分化」 日本進化学会 第14回大会 2012 東京 口頭発表
2. 鈴木彦有、二階堂雅人、山岸公子、岡田典弘 「真骨魚類特異的ゲノム重複で生じた二つのOlfactory Marker Protein遺伝子の機能分化」 日本味と匂学会 第45回大会 2011 金沢 ポスター発表
3. Suzuki, H, Nikaido, M, Hagino-Yamagishi, K, Okada, N. **A Paralog of Olfactory Marker Protein Gene in Teleost Fish: Another Candidate Marker for Unclassified Cells in Olfactory Rosette.** Society for Molecular Biology and Evolution 2011 Annual Meeting 2011 Kyoto, Japan Poster
4. 鈴木彦有、二階堂雅人、山岸公子、岡田典弘 「真骨魚類特異的ゲノム重複に伴うOMP遺伝子の重複と機能分化」 日本進化学会 第12回大会 2010 東京 ポスター発表

報文目錄

1. Suzuki, H, Nikaido, M, Hagino-Yamagishi, K, Okada, N. **Distinct functions of two olfactory marker protein genes derived from teleost-specific whole genome duplication.** *BMC Evol Biol* 2015;15(0):245.

付録

トランスクリプトーム解析にあたり、作成したシェルスクリプトを下記に示す。
なお、ここではマウスのゲノムデータ (GRCm38) を参照配列に用いた例を示す。

```
#!/bin/bash

# 依存ソフトウェア
# fastx_toolkit, samtools, bowtie2, rsem

# ファイル指定
input=`cat fastq_list.txt`
ref="GRCm38"

# オプション指定
threads=4
rsem_option=""

# マッピングとカウントの関数を定義
map_count () {
    # リードのトリミング
    gunzip -c fastq/$1.fastq.gz | fastx_trimmer -Q 33 -f 16 -o fastq/$1.qc.fq
#    gunzip -c fastq/$1_1.fastq.gz | fastx_trimmer -Q 33 -f 16 -o fastq/$1_1.qc.fq
#    gunzip -c fastq/$1_2.fastq.gz | fastx_trimmer -Q 33 -f 16 -o fastq/$1_2.qc.fq

    # マッピングとカウント
    rsem-calculate-expression -p $threads --bowtie2 $rsem_option fastq/$1.qc.fq ref/$ref bam/$1

    # 不要なファイルの削除
    rm -r bam/$1.transcript.bam bam/$1.stat fastq/$1.qc.fq

    # ファイルの移動
    mv bam/$1.transcript.sorted.bam bam/$1.bam
    mv bam/$1.transcript.sorted.bam.bai bam/$1.bam.bai
    mv bam/$1.genes.results bam/$1.isoforms.results result
}

# ディレクトリを作成
mkdir log bam result

# 準備
rsem-prepare-reference --bowtie2 --gtf ref/$ref.gtf ref/$ref.fa ref/$ref 1>log/rsem-prepare.$ref.log 2>&1

# マッピングとカウントを逐次実行
for prefix in $input ; do
    map_count $prefix 1>log/rsem.$prefix.log 2>&1
done
```

図表

表1 OMPのアクセッション番号

種	アクセッション番号	著者
ヒト	BC069365	Strausberg et al.
マウス	U02557	Brown et al.
アフリカツメガエル	AJ010978, AJ010979	Rössler et al.
ネッタイツメガエル	BC061304	Strausberg et al.
ゼブラフィッシュ	AF457189	Celik et al.
ヒメマス	AB490250, AB490251	Kudo et al.

表2 ゲノムデータの名称

種	学名	ゲノムデータ名
ゼブラフィッシュ	Danio rerio	Zv7
トラフグ	Takifugu rubripes	FUGU4.0
トゲウオ	Gasterosteus aculeatus	BROADS1
メダカ	Oryzias latipes	MEDAKA1
プラティ	Xiphophorus maculatus	Xipmac4.4.2
ティラピア	Oreochromis niloticus	Orenil1.0
スポッテッド・ガー	Lepisosteus oculatus	LepOcu1
シーラカンス	Latimeria chalumnae	LatCha1
ネッタイツメガエル	Xenopus tropicalis	JGI4.2
グリーンアノール	Anolis carolinensis	AnoCar2.0
ニワトリ	Gallus gallus	Galgal4
マウス	Mus musculus	GRCm38
ヒト	Homo sapiens	GRCm37

表3 CAPN5のアクセッション番号

種	アクセッション番号	著者
ヒト	BC018123	Strausberg et al.
マウス	BC014767	Strausberg et al.
アフリカツメガエル	BC048218	Strausberg et al.
ネツタイツメガエル	BC075496	Strausberg et al.

表4 RT-PCRに用いたプライマー配列

遺伝子	Forward	Reverse
OMP1	CAGTCTCTACAACAACGAGGA	TTCATAGGTCTTTAGGAACCC
OMP2	ATGGGTTCAGAAATGGAGC	CTAAACAAAGACTACGCATCTGA
GAPDH	GGAGTCTTCCTCAGCATTGA	ACAGACTCCTTGATGTTGGC
TRPC2	GCGSGAGATYGTGAACA	GACARRTAMGCACGGCTG
NCAM	GAGATCAGCGTYGGRGAGTC	ATGTCKGCAGTGGCRTT
Gaolf	AAGAAGATMGAGAAACAGTT	TTAAARCACTGAATCCATTT
Gao	ARAGCCATCGAGAARAACC	AGCAYYTGGTCGTATCC
Gai	CAGTCCATMATBGCCATC	GTSTCBGTRAACCACTTGTT
Gaq	GGCTCAGGCTATTCAGAAGA	TCTGAAACCAGGGGTATGTT
V1R1	GTGTCCCGCAGACTATGACT	ATCCAGATCACGTTATCGATG
V1R2	TCCACAATGTGTTTGACGAC	CAGTGAGGTGAAGAAGAGCC
V1R3	MAACCTGATGGTGTCTGTTG	AAGAGGATGTTGAGMGCCAG
V1R4	ACCTGTGTCTGGCTAACCTG	AGCCATGATGACGTGACC
V1R5	GTTTTTCATCAGACCTCTCGG	TACGGGACAAAACAGGTGTAT
V1R6	ATGGTGGATGTGTATGATGTTT	TGATGAAGAACTCCACCTCC

表5 標識RNAカクテル合成に用いたプライマー配列

遺伝子群	Forward	Reverse
OR $\delta 2a$	GGGCGGCCGCTAATACGACTCACTAT AGGGAATCTGCAYSATCCTATG	GGGCGGCCGCAATTAACCCTCACTAA AGGGTGGTACAATRTGRAACATT
OR $\delta 2b$	GGGCGGCCGCTAATACGACTCACTAT AGGGAACCTGCCSATYAATGA	GGGCGGCCGCAATTAACCCTCACTAA AGGGCCCACAYGTCTGMAGAGC
OR $\epsilon 1$	GGGCGGCCGCTAATACGACTCACTAT AGGGYTTTCCTGGRCTTCA	GGGCGGCCGCAATTAACCCTCACTAA AGGGCAGGTGGARAAAGTCTTCA
OR $\zeta 1a$	GGGCGGCCGCTAATACGACTCACTAT AGGGAGTCTGCACAGTSCWAAGTAC	GGGCGGCCGCAATTAACCCTCACTAA AGGGCAGTGCTTTTAAACGWCYTTC
OR $\zeta 1b$	GGGCGGCCGCTAATACGACTCACTAT AGGGAGGACATTTTCRTATGMAGC	GGGCGGCCGCAATTAACCCTCACTAA AGGGTATATGATRGGATTCAGCAT
OR $\zeta 2$	GGGCGGCCGCTAATACGACTCACTAT AGGGAACCATGATMTCAGTGCTG	GGGCGGCCGCAATTAACCCTCACTAA AGGGTTTCGCTCTGTYAMAGTCAA
OR $\eta 1a$	GGGCGGCCGCTAATACGACTCACTAT AGGGARACRTCTCGCTATATTC	GGGCGGCCGCAATTAACCCTCACTAA AGGGAATAACTTCTTGRAYAACTCCA
OR $\eta 2a$	GGGCGGCCGCTAATACGACTCACTAT AGGGAGACYTTTCAGGGACAC	GGGCGGCCGCAATTAACCCTCACTAA AGGGCATCATACCCAGAATCAG

表6 眼におけるRNAシークエンスデータのアクセッション番号

種	アクセッション番号	研究機関
ゼブラフィッシュ	SRR1562528	Johns Hopkins University
トゲウオ	SRR528551、SRR528554	Broad Institute
メダカ	DRR034600	Japan Aerospace Exploration Agency
スポットテッド・ガー	SRR1288001、SRR1288144	Broad Institute
マウス	SRR1691201-SRR1691203	Case Western Reserve University

表7 使用したソフトウェアのバージョン

ソフトウェア	バージョン	開発者
FastQC	0.11.3	S. Andrews et al.
FASTX-Toolkit	0.0.14	A. Gordon et al.
Bowtie2	2.2.6	B. Langmead et al.
RSEM	1.2.22	B. Li et al.

表8 発現ベクター作製に用いたプライマー配列

遺伝子	Forward	Reverse
OMP1	ACTGGTACCATGTCTCTGGAGTTGAC GTTC	ACTAAGCTTCTTGGAGGTCTGGAATT CA
OMP2	ACTGGTACCATGGGTTTCAGAAATGGA GC	ACTAAGCTTGTTTTTGCAGAAGGTCA GAGA

表9 ESTデータベースから見つかったOMP2のアクセッション番号

種	嗅上皮由来	眼・網膜由来	その他組織・全身由来
ゼブラフィッシュ	CO801427, CO812065, CO812860, CO958601, DV588230, DV590164, DV594271, DV597000	BF938258, CK352652, CK352729, CK355105, DT863878, DT865346, EB956090	CN317897, CO959420, EH438228, EH442981, EH449085, EH464176, EH468865, EH474918
トゲウオ	not found	DW606257	DW626232, DW626233, DW631572
ティラピア	GR669612	GR597376, GR602994	not found

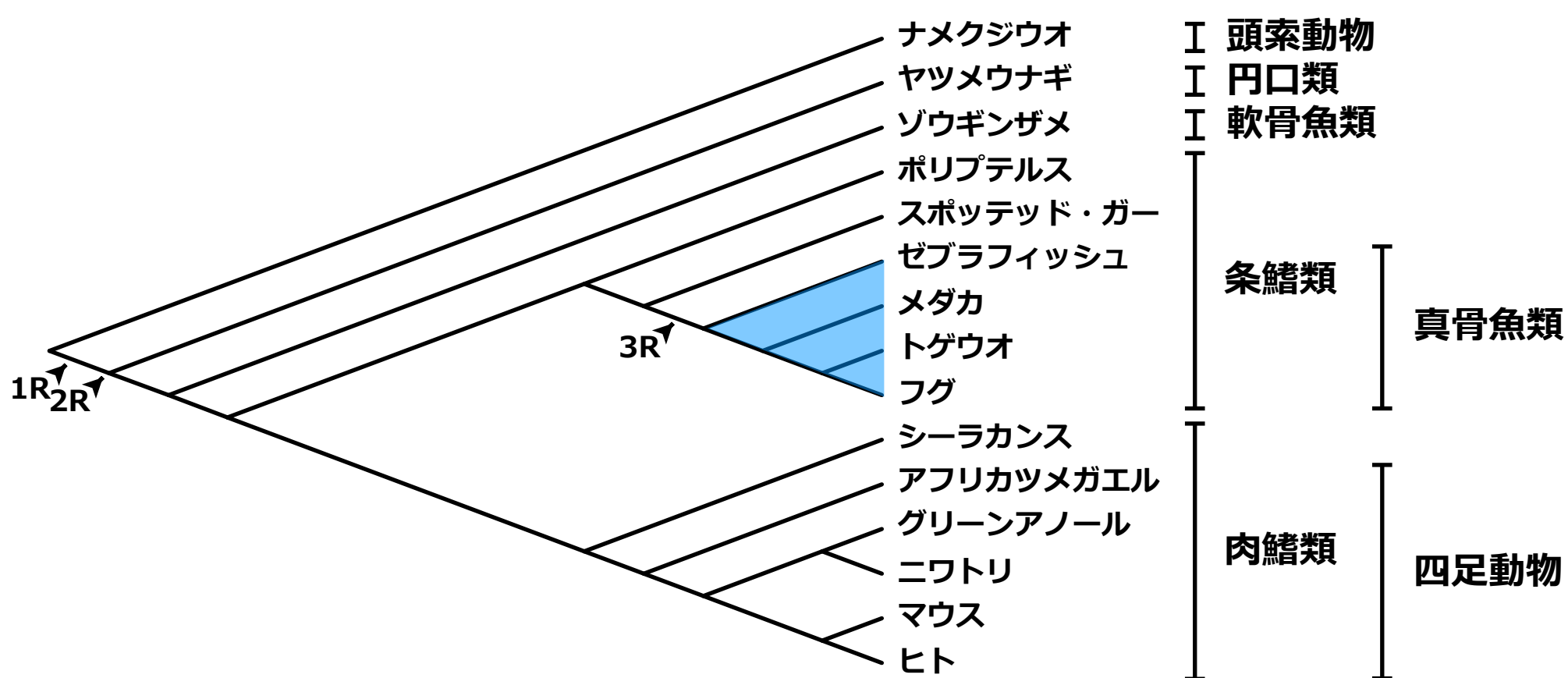


図1 脊椎動物の大系統樹と全ゲノム重複が起きたと推定される系統的位罫。真骨魚類の系統群を青で示す。

図2

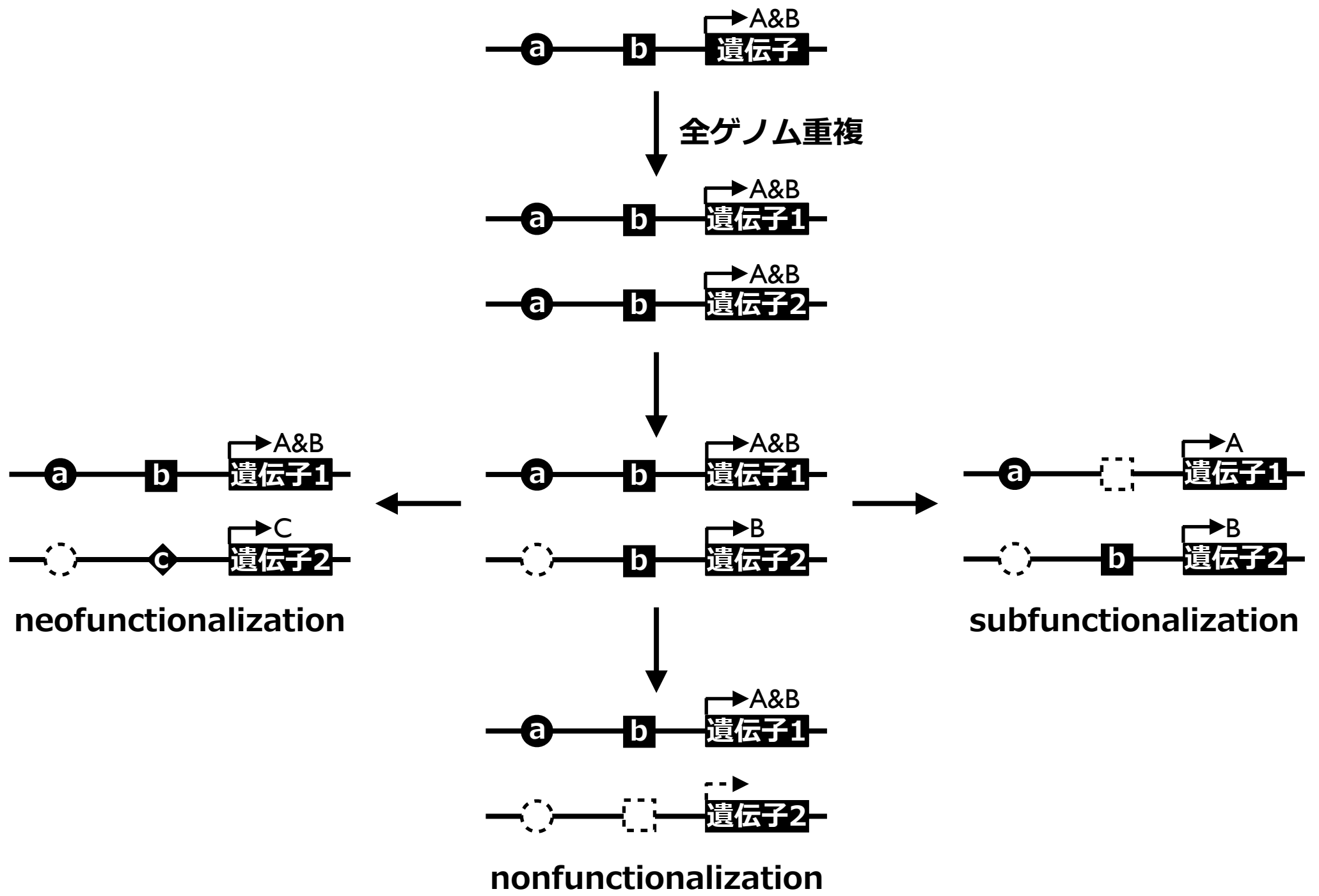


図2 全ゲノム重複後の遺伝子進化パターンを示した模式図。a、b、cはそれぞれ組織A、B、Cにおける遺伝子の転写を正に制御するエンハンサーを表す。点線の円および四角形は消失したエンハンサーを、点線の矢印は消失した転写をそれぞれ表す。

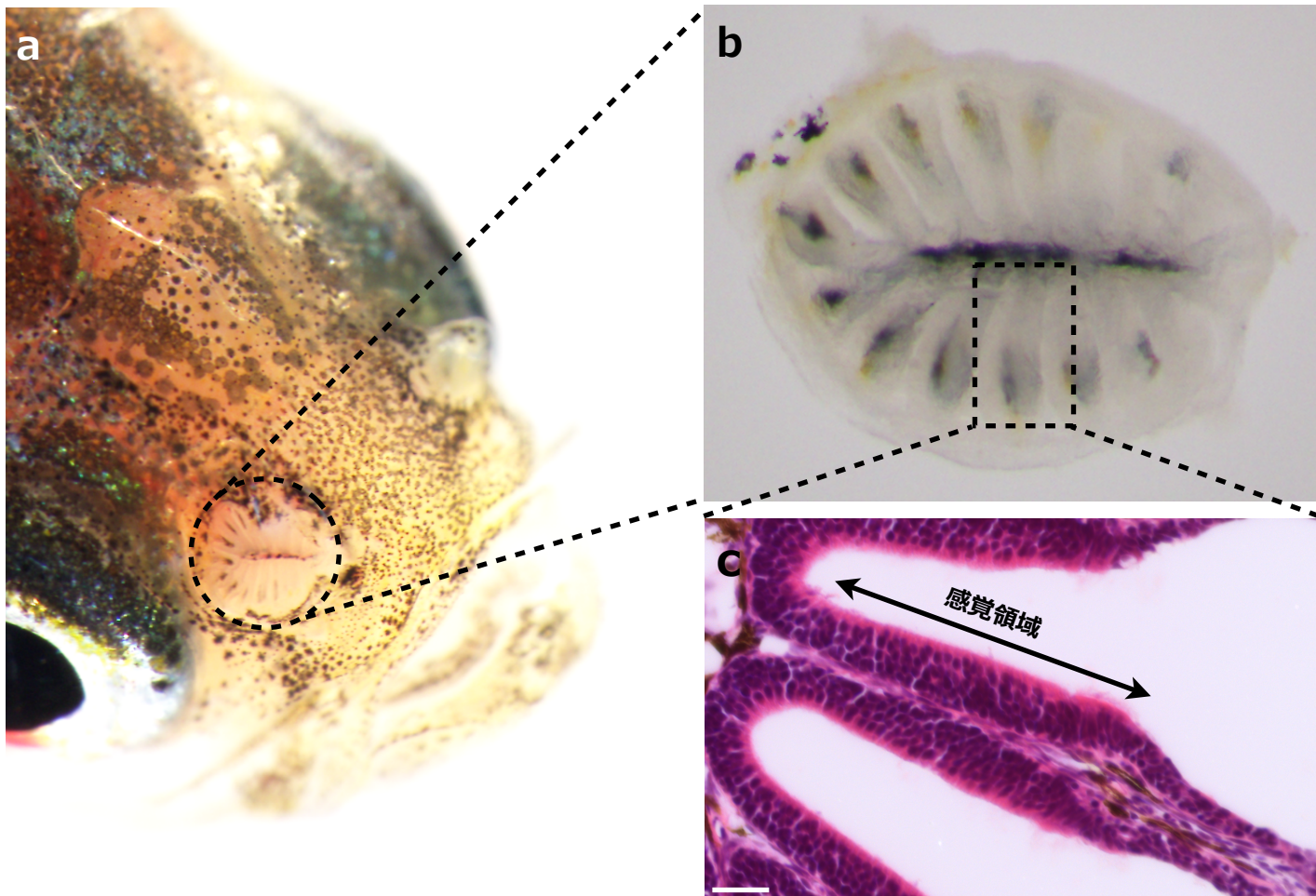


図3 ゼブラフィッシュの嗅上皮の写真。(a) 皮膚を剥き、嗅上皮を露出させたゼブラフィッシュ成魚の頭部。(b) 摘出した嗅上皮。(c) 嗅上皮の組織切片標本をヘマトキシリン・エオジン染色した結果。感覚領域を両矢印で示す。スケールバーは20 μm を表す。

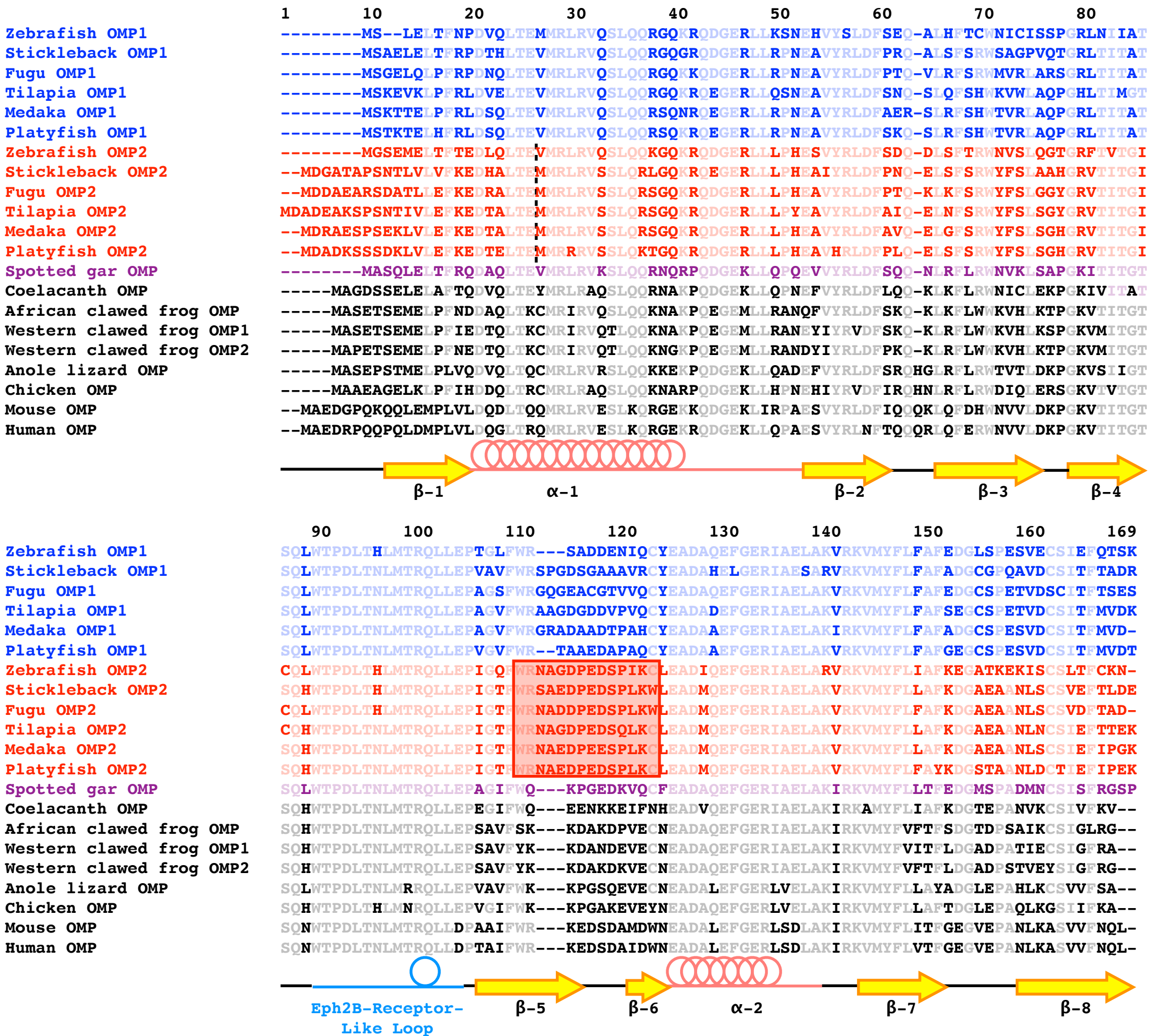


図4 OMPのアミノ酸配列のアラインメント。青色は真骨魚類のOMP1、赤色は真骨魚類のOMP2、紫色はスポットテッド・ガールのOMP、黒色はシーラカンスおよび四足動物のOMPをそれぞれ表す。アラインメントの下に二次構造 (Smithら、2002に基づく) を示す。オーソログ・パラログ間で保存されたアミノ酸残基を薄い色で示す。点線の左側はOMP2の第1エクソン、右側は第2エクソンにコードされる領域をそれぞれ示す。赤い四角形は抗OMP2抗体のターゲットとした領域を示す。

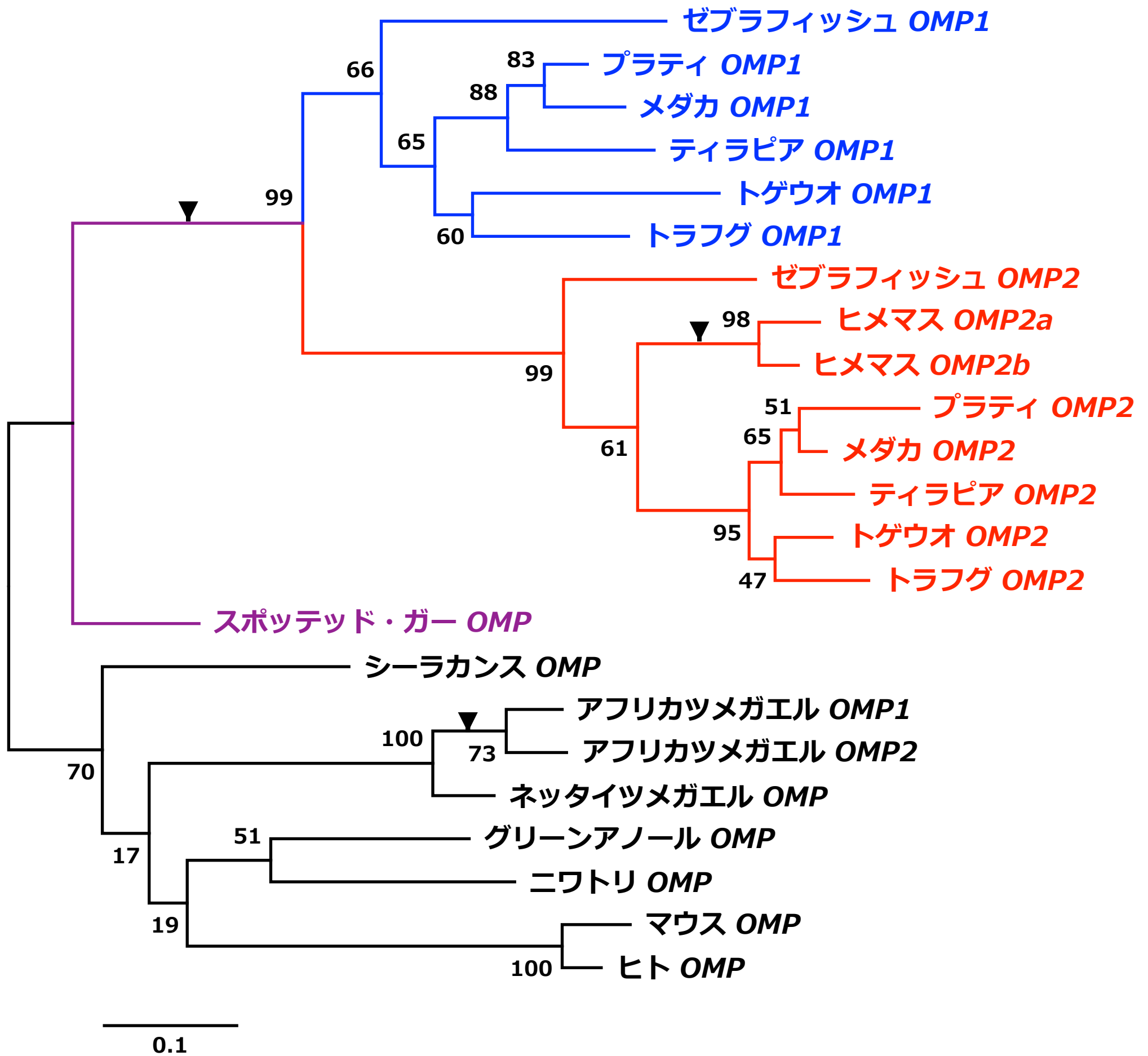


図5 OMPのアミノ酸配列アラインメントに基づく分子系統樹。青色は真骨魚類のOMP1、赤色は真骨魚類のOMP2、紫色はスポットテッド・ガーのOMP、黒色はシーラカンスおよび四足動物のOMPをそれぞれ表す。矢頭はOMPが倍化した系統的位置を示す。各分岐点の数値はブートストラップ値を示す。

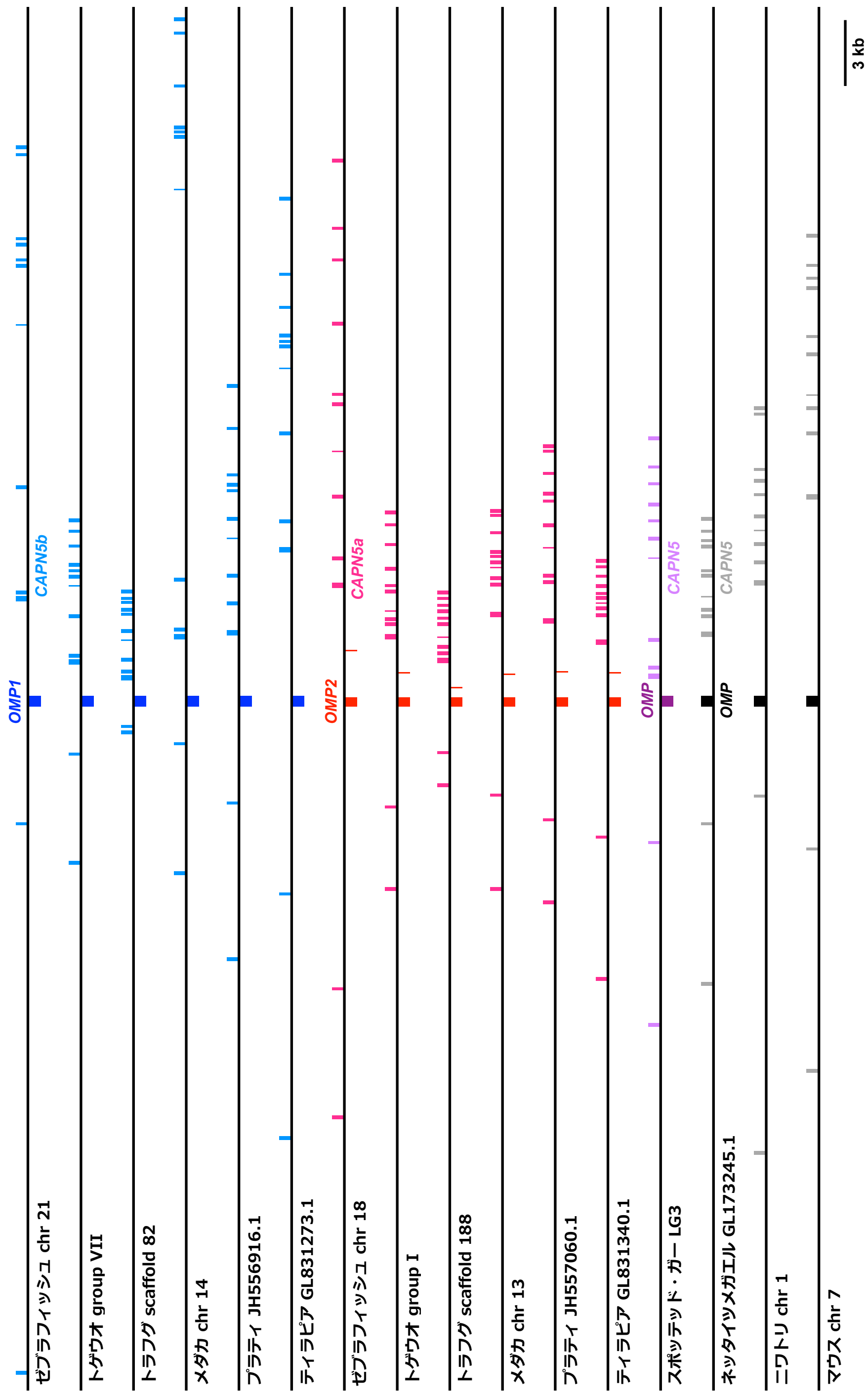


図6 OMP周辺のシンテニーの比較。四角形はエキソンを表し、線の上側の四角形は順鎖に、下側の四角形は逆鎖に、それぞれコードされていることを示す。青色は真骨魚類のOMP1、赤色は真骨魚類のOMP2、紫色はスポッテッド・ガーのOMP、黒色はシーラカンスおよび四足動物のOMP、水色は真骨魚類のCAPN5b、マゼンダ色は真骨魚類のCAPN5a、薄紫色はスポッテッド・ガーのCAPN5、灰色はシーラカンスおよび四足動物のCAPN5をそれぞれ表す。スケールバーは3 kbを表す。

図7

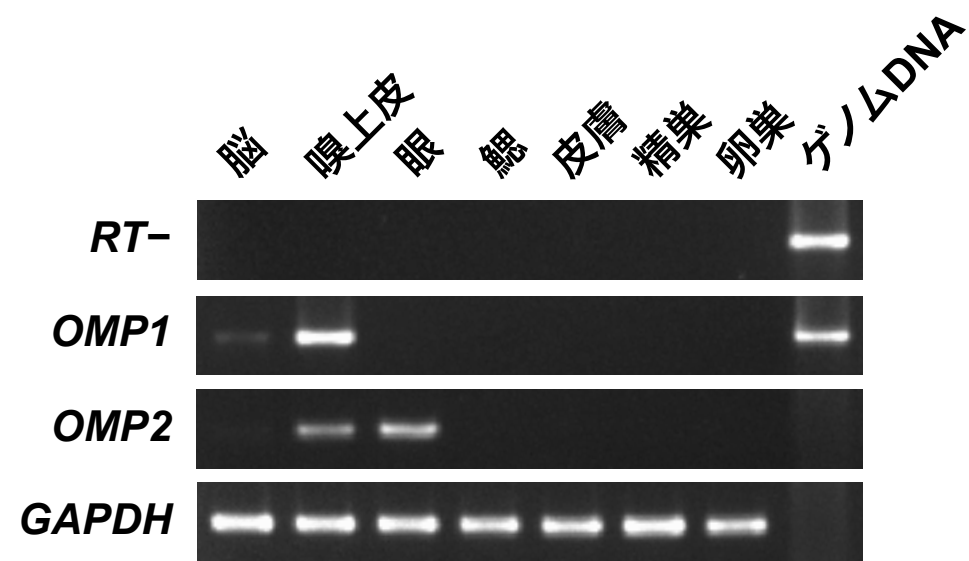


図7 ゼブラフィッシュ成魚の各組織から抽出したtotal RNAを鋳型に用いたRT-PCRの結果。RT-は逆転写酵素を添加せず、OMP1のプライマーを用いた結果を示す。OMP1、OMP2、GAPDHは逆転写酵素を添加し、それぞれのプライマーを用いた結果を示す。

図8

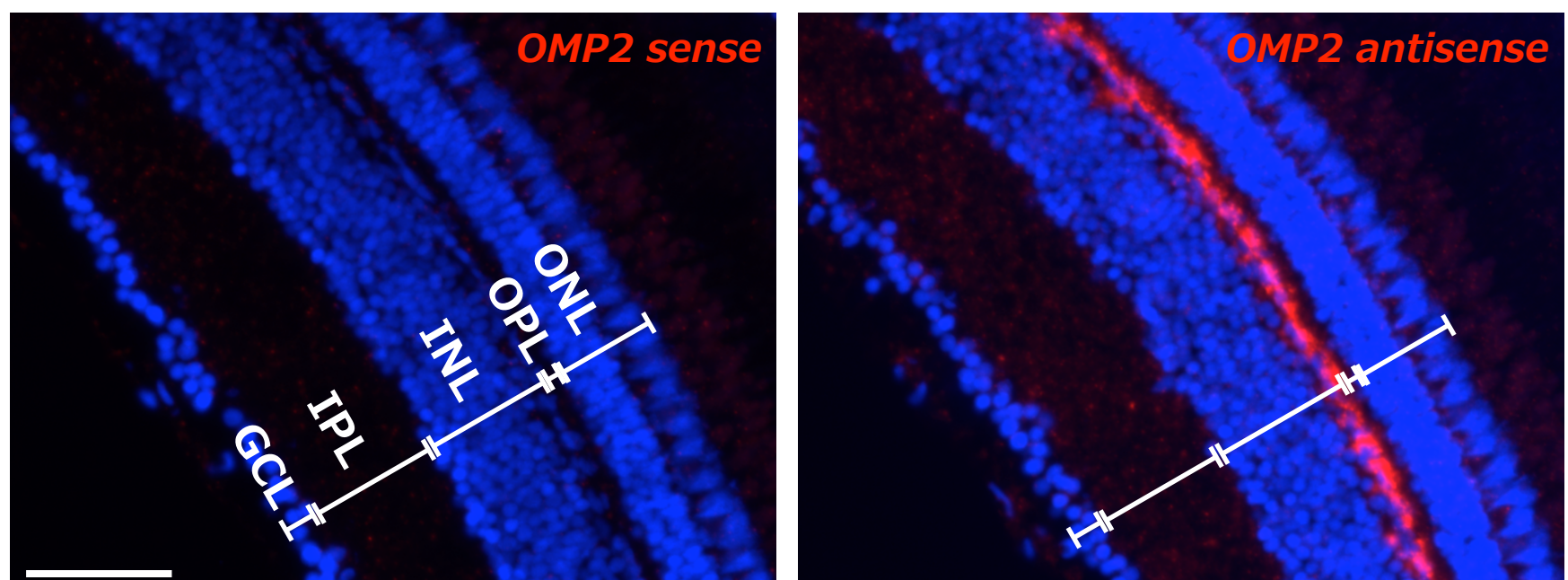


図8 ゼブラフィッシュ成魚の眼における*in situ*ハイブリダイゼーションの結果。赤色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、青色はDAPIによる核の対比染色をそれぞれ示す。(a) OMP2のセンスRNAプローブを用いた結果。(b) OMP2のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。白線の区画は各細胞層を示す。GCL: 神経節細胞層、IPL: 内網状層、INL: 内顆粒層、OPL: 外網状層、ONL: 外顆粒層。スケールバーは50 μ mを表す。

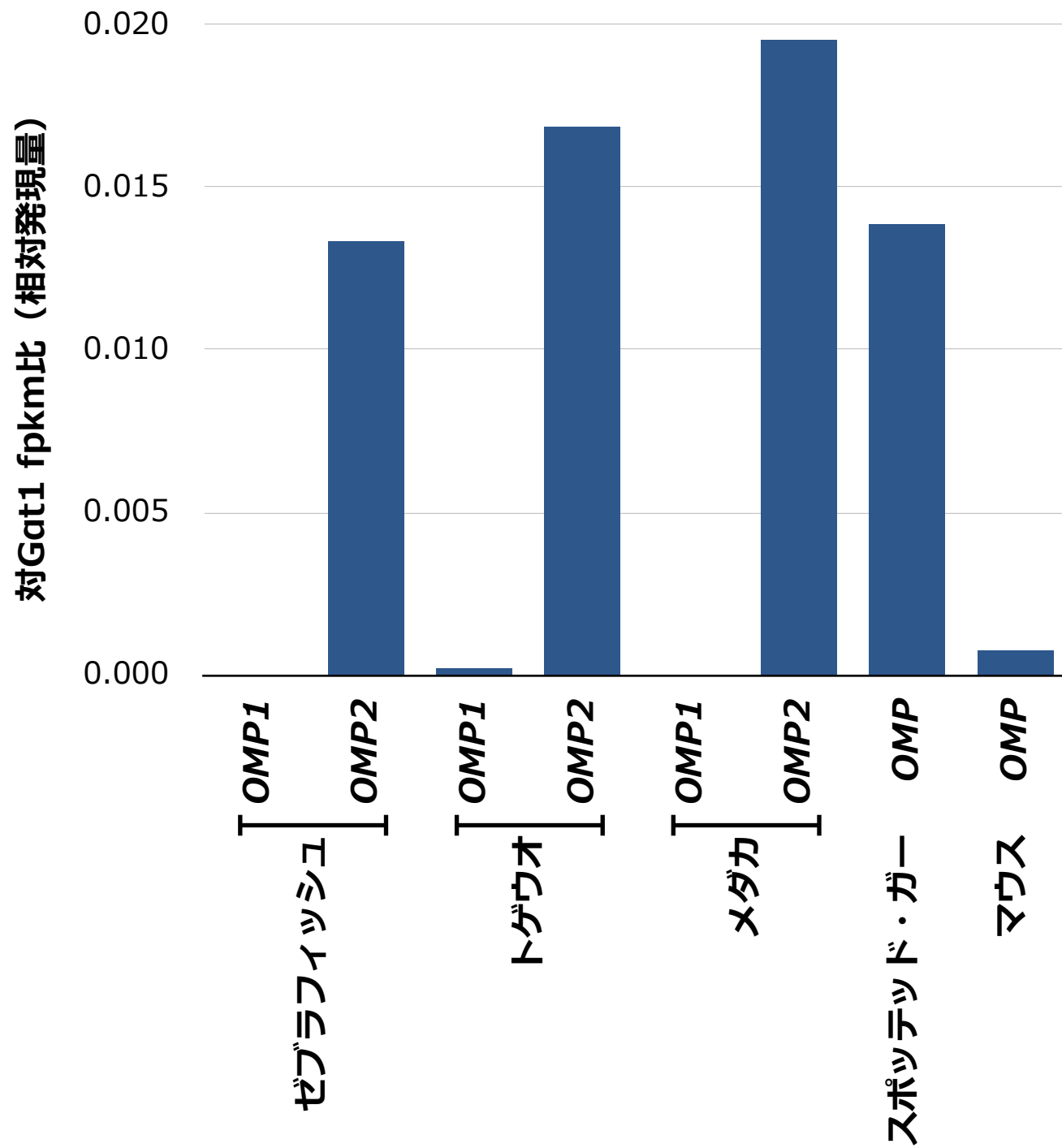


図9 各生物種の眼におけるトランスクリプトーム解析の結果。棒グラフは Ga_{t1} のfpkm値に対するOMPのfpkm値の比を示す。

図10

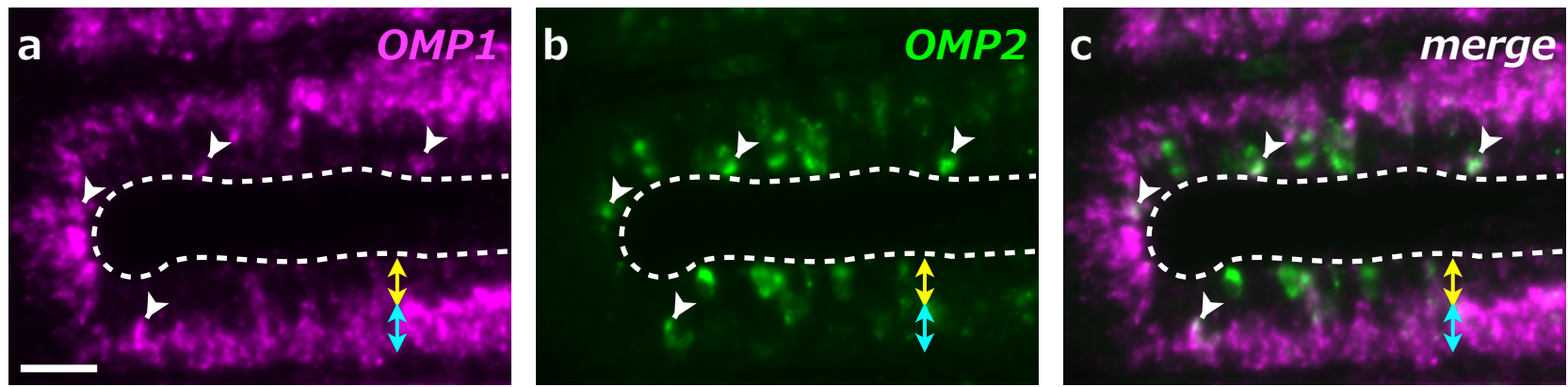


図10 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮における2カラー *in situ* ハイブリダイゼーションの結果。マゼンダ色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、緑色はFluorescein標識RNAプローブに由来するシグナルをそれぞれ示す。(a) *OMP1*のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(b) *OMP2*のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(c) 重ね合わせた結果。黄色の両矢印は表層、水色の両矢印は深層をそれぞれ表す。白い点線は嗅上皮と外界の境界面を示す。白い矢頭は *OMP1*と*OMP2*の重なったシグナルを示す。スケールバーは20 μm を表す。

図11

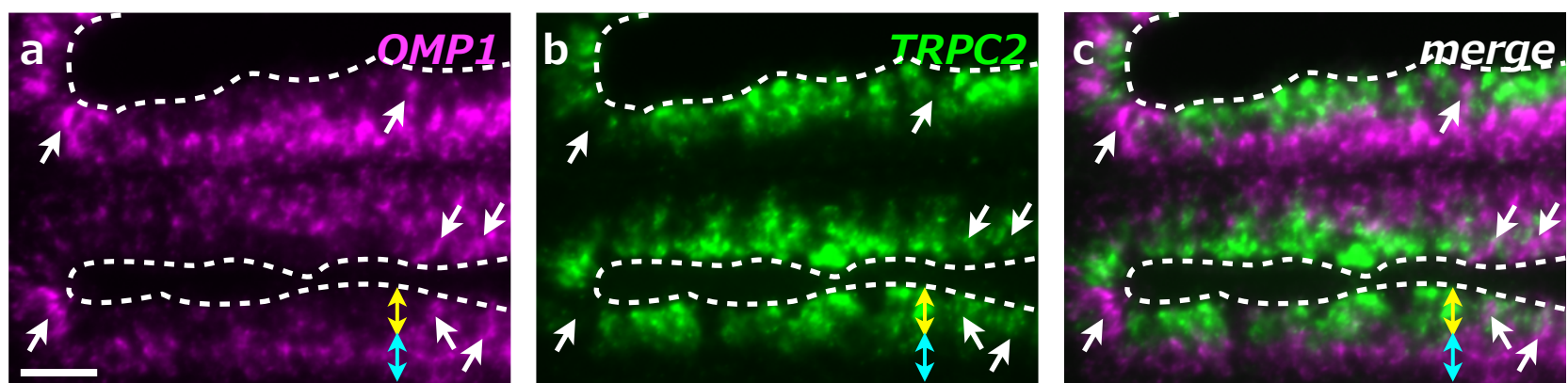


図11 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮における2カラー *in situ* ハイブリダイゼーションの結果。マゼンダ色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、緑色はFluorescein標識RNAプローブに由来するシグナルをそれぞれ示す。(a) *OMP1*のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(b) *TRPC2*のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(c) 重ね合わせた結果。黄色の両矢印は表層、水色の両矢印は深層をそれぞれ表す。白い点線は嗅上皮と外界の境界面を示す。白い矢印は表層に見られた *OMP1*のシグナルを示す。スケールバーは20 μm を表す。

図12

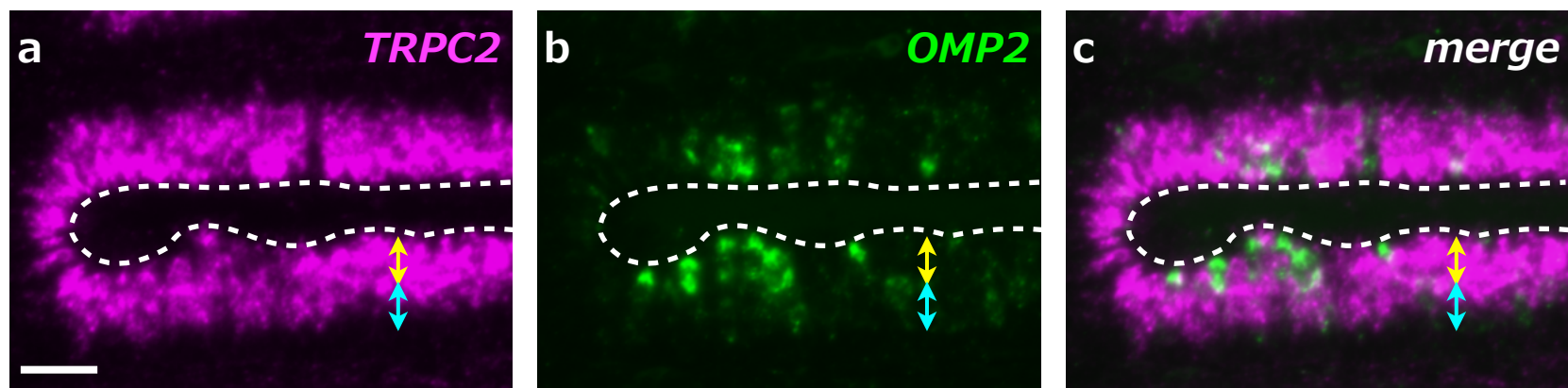


図12 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮における2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションの結果。マゼンダ色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、緑色はFluorescein標識RNAプローブに由来するシグナルをそれぞれ示す。(a) *TRPC2*のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(b) *OMP2*のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(c) 重ね合わせた結果。黄色の両矢印は表層、水色の両矢印は深層をそれぞれ表す。白い点線は嗅上皮と外界の境界面を示す。スケールバーは20 μm を表す。

図13

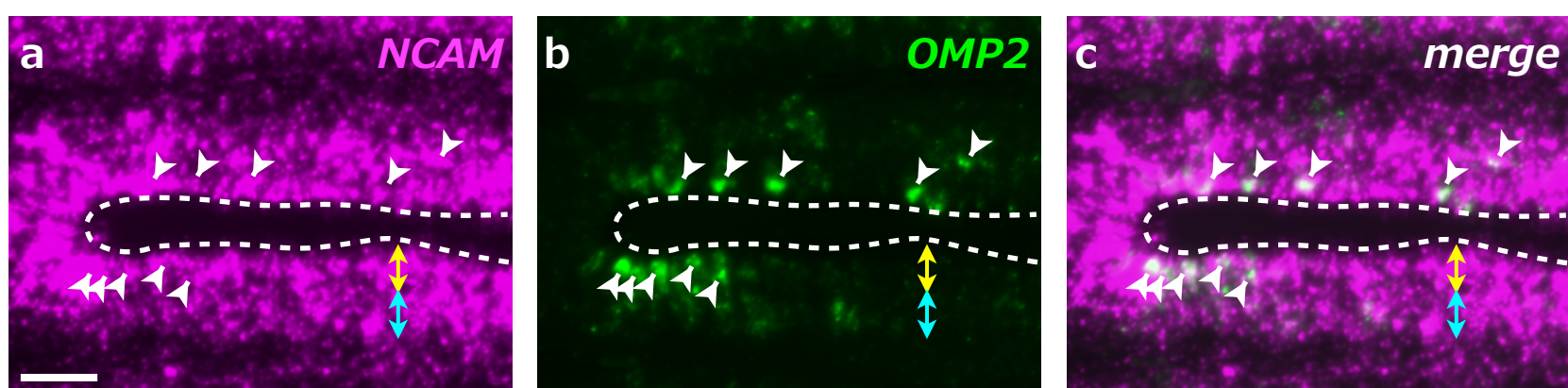


図13 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮における2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションの結果。マゼンダ色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、緑色はFluorescein標識RNAプローブに由来するシグナルをそれぞれ示す。(a) *NCAM*のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(b) *OMP2*のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(c) 重ね合わせた結果。黄色の両矢印は表層、水色の両矢印は深層をそれぞれ表す。白い点線は嗅上皮と外界の境界面を示す。白い矢頭は *NCAM*と *OMP2*の重なったシグナルを示す。スケールバーは20 μm を表す。

図14

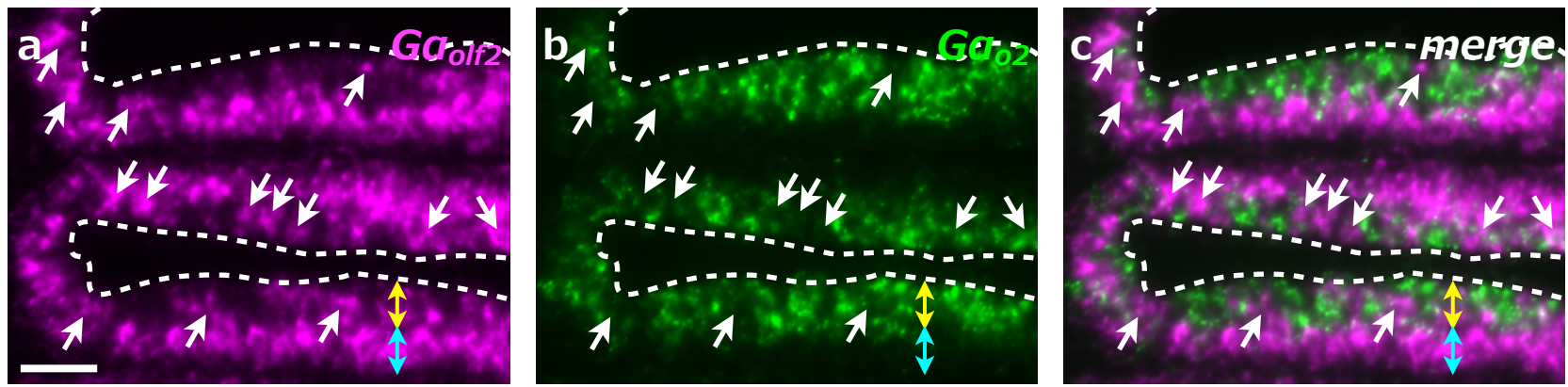


図14 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮における2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションの結果。マゼンダ色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、緑色はFluorescein標識RNAプローブに由来するシグナルをそれぞれ示す。(a) Ga_{olf2} のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(b) Ga_{o2} のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(c) 重ね合わせた結果。黄色の両矢印は表層、水色の両矢印は深層をそれぞれ表す。白い点線は嗅上皮と外界の境界面を示す。白い矢印は表層に見られた Ga_{olf2} のシグナルを示す。スケールバーは20 μm を表す。

図15

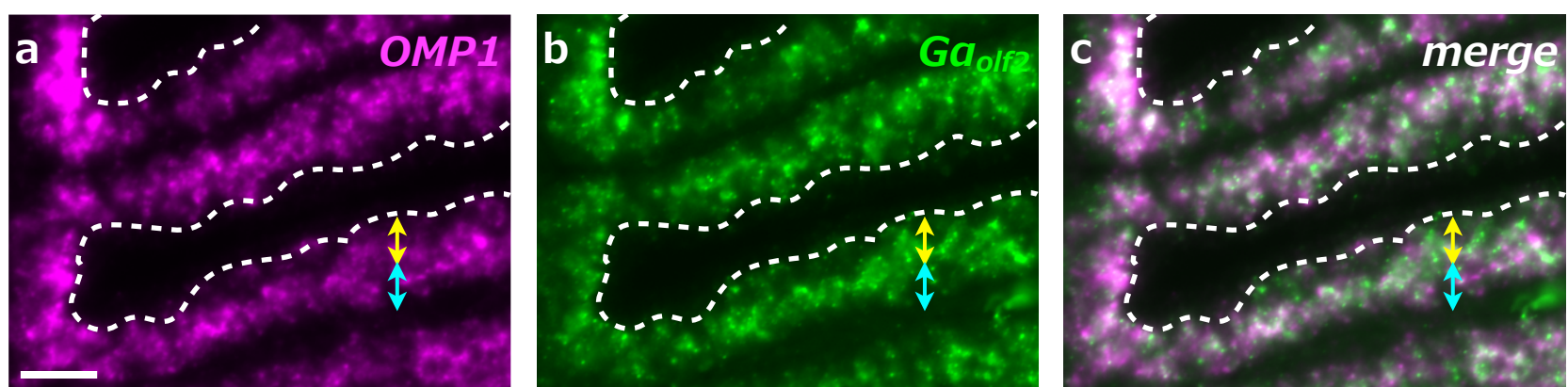


図15 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮における2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションの結果。マゼンダ色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、緑色はFluorescein標識RNAプローブに由来するシグナルをそれぞれ示す。(a) $OMP1$ のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(b) Ga_{olf2} のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(c) 重ね合わせた結果。黄色の両矢印は表層、水色の両矢印は深層をそれぞれ表す。白い点線は嗅上皮と外界の境界面を示す。スケールバーは20 μm を表す。

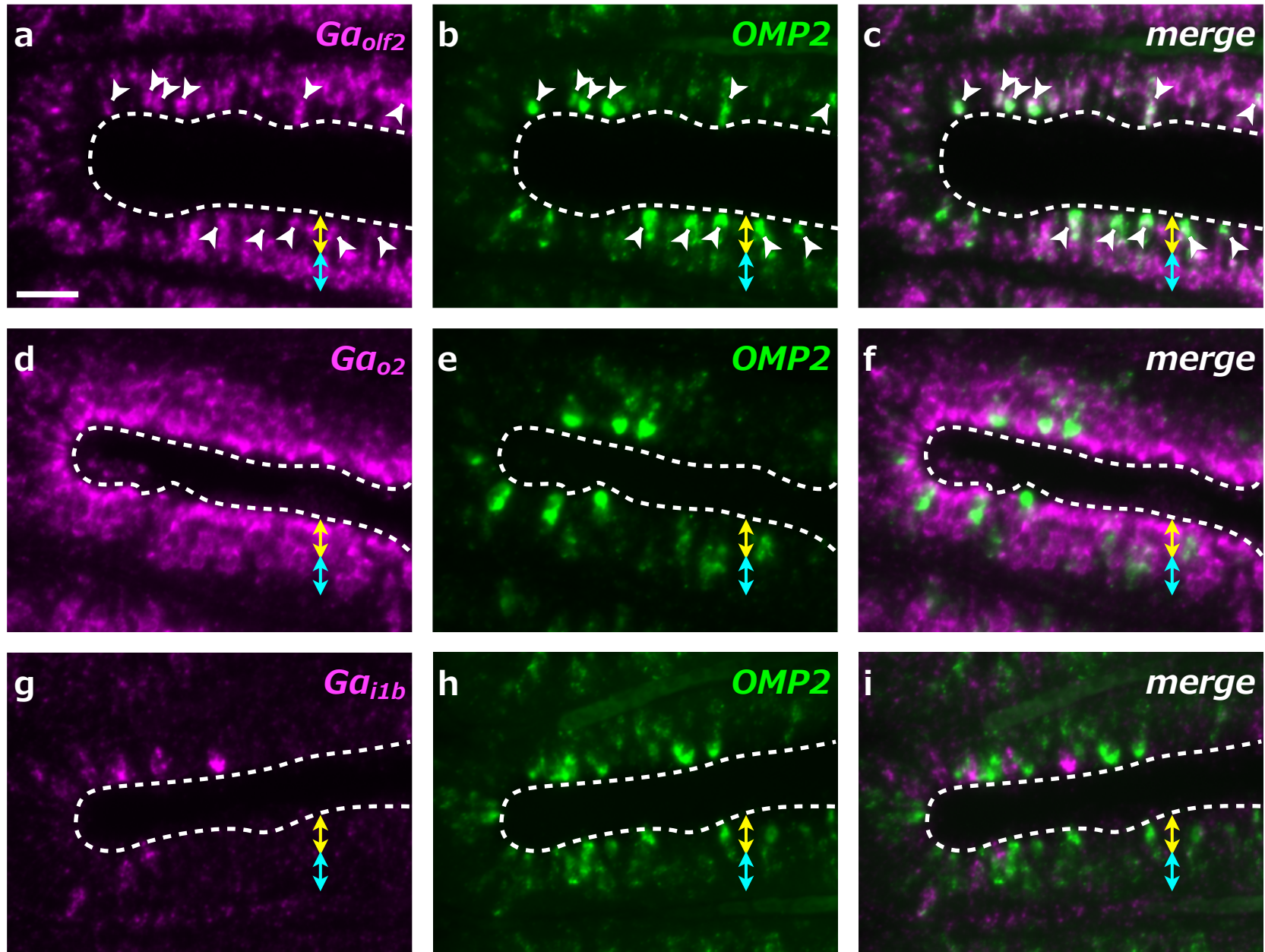


図16 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮における2カラー*in situ*ハイブリダイゼーションの結果。マゼンダ色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、緑色はFluorescein標識RNAプローブに由来するシグナルをそれぞれ示す。(a) $G\alpha_{olf2}$ のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(d) $G\alpha_{o2}$ のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(g) $G\alpha_{i1b}$ のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(b, e, h) $OMP2$ のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(c, f, i) 重ね合わせた結果。黄色の両矢印は表層、水色の両矢印は深層をそれぞれ表す。白い点線は嗅上皮と外界の境界面を示す。白い矢頭は $G\alpha_{olf2}$ と $OMP2$ の重なったシグナルを示す。スケールバーは20 μm を表す。

図17

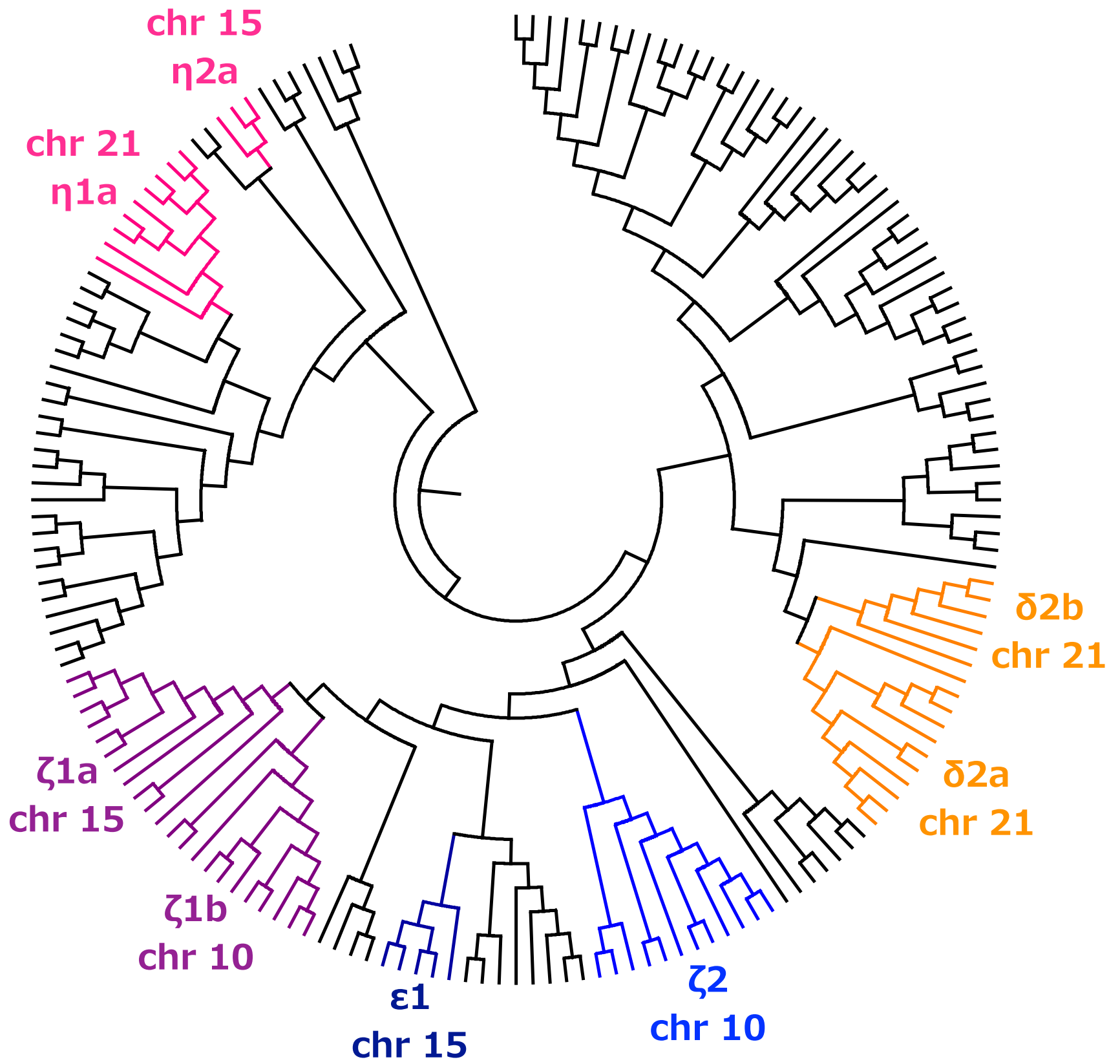


図17 ゼブラフィッシュのORの分子系統樹。色を付けた系統群はプローブカクテルを合成したOR遺伝子群をそれぞれ示す。各OR遺伝子群の名称およびコードされている染色体番号を併せて示す。

図18

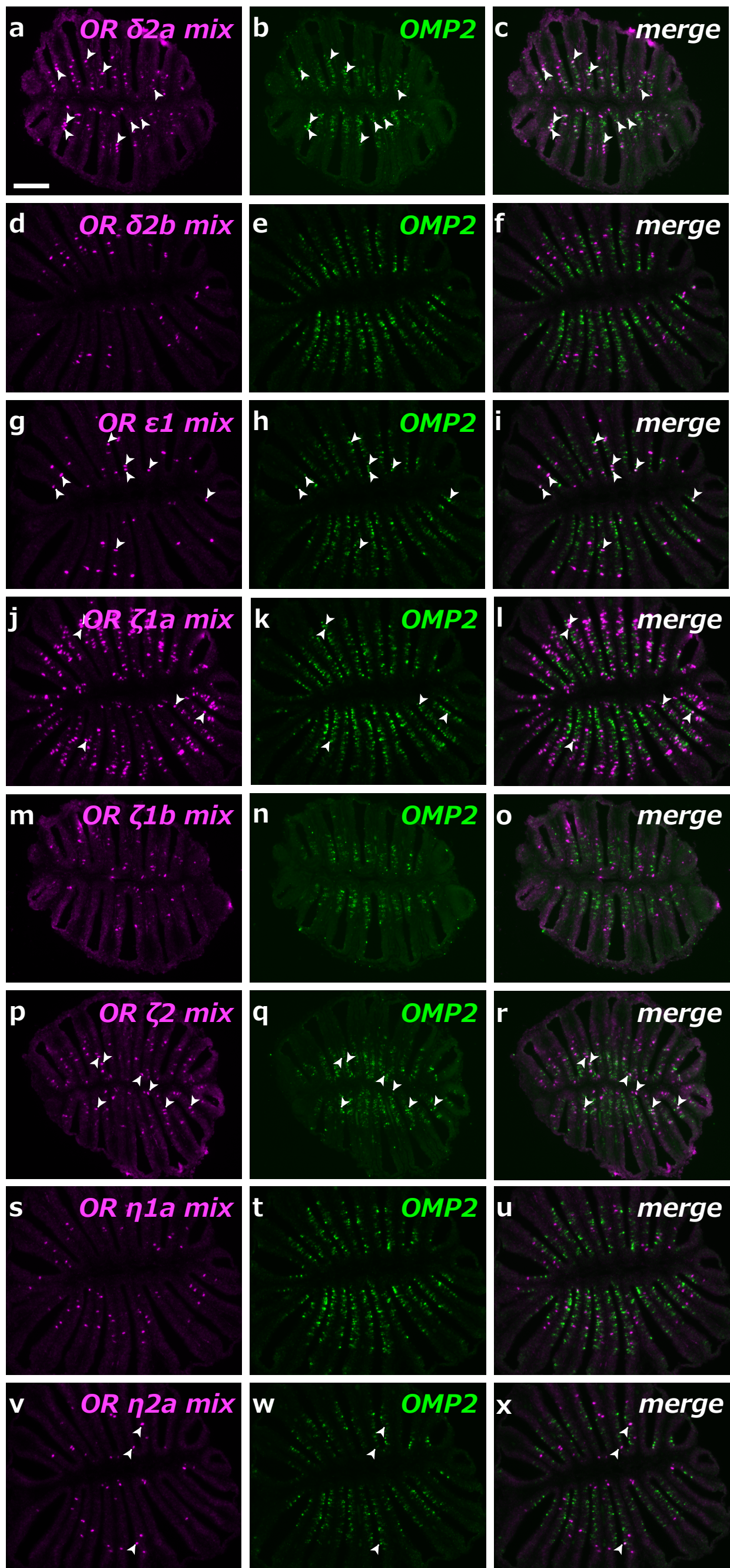


図18 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮における2カラー *in situ* ハイブリダイゼーションの結果。マゼンダ色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、緑色はFluorescein標識RNAプローブに由来するシグナルをそれぞれ示す。(a, d, g, j, m, p, s, v) *OR* $\delta 2a$ 、 $\delta 2b$ 、 $\epsilon 1$ 、 $\zeta 1a$ 、 $\zeta 1b$ 、 $\zeta 2$ 、 $\eta 1a$ 、 $\eta 2a$ の各アンチセンスRNAプローブカクテルを用いた結果。(b, e, h, k, n, q, t, w) *OMP2*のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(c, f, i, l, o, r, u, x) 重ね合わせた結果。白い矢頭は各*OR*と*OMP2*の重なったシグナルを示す。スケールバーは100 μm を表す。

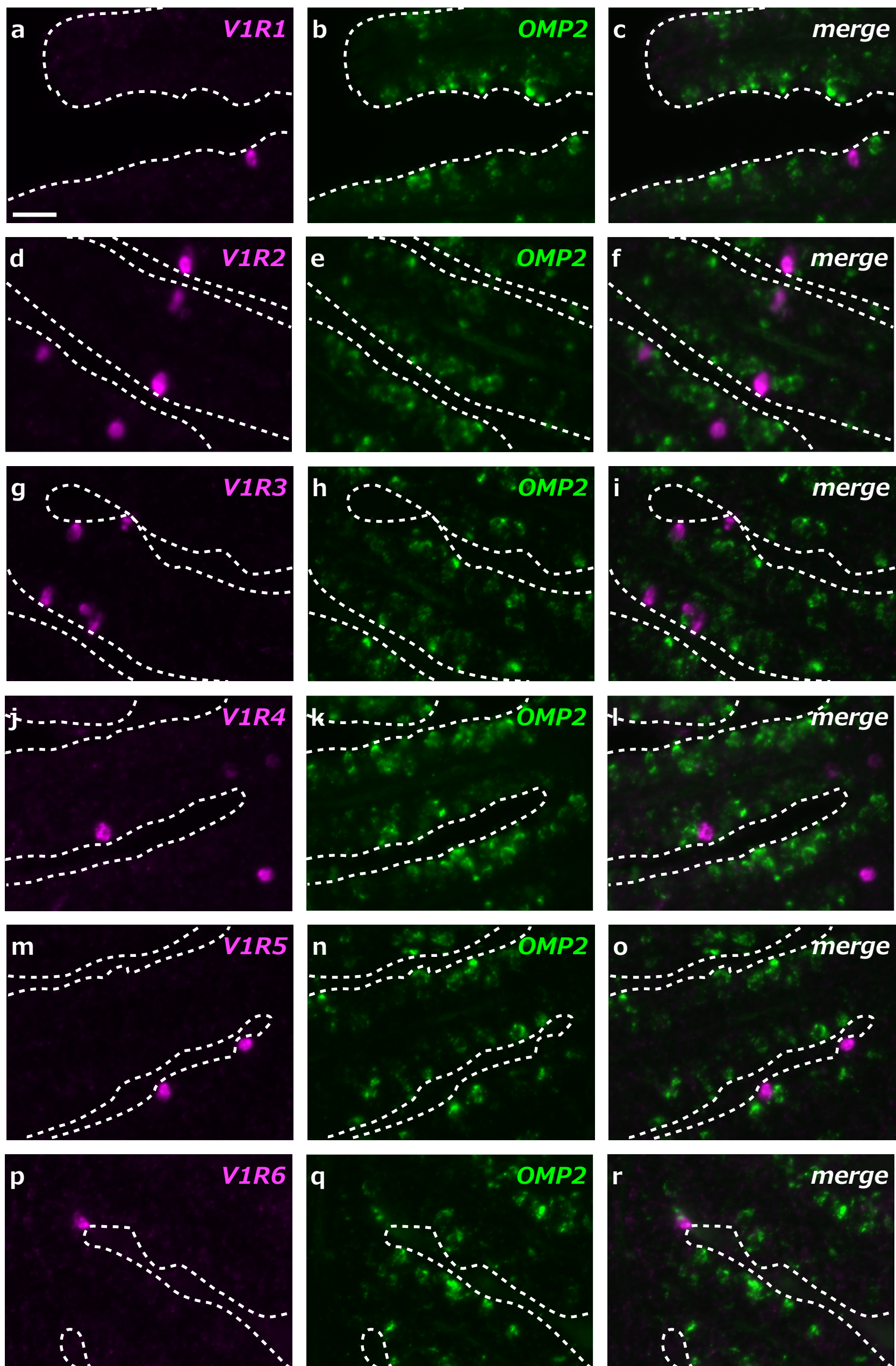


図19 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮における2カラー *in situ* ハイブリダイゼーションの結果。マゼンダ色はDIG標識RNAプローブに由来するシグナル、緑色はFluorescein標識RNAプローブに由来するシグナルをそれぞれ示す。(a, d, g, j, m, p) V1R1-6の各アンチセンスRNAプローブを用いた結果。(b, e, h, k, n, q) OMP2のアンチセンスRNAプローブを用いた結果。(c, f, i, l, o, r) 重ね合わせた結果。白い点線は嗅上皮と外界の境界面を示す。スケールバーは20 μm を表す。

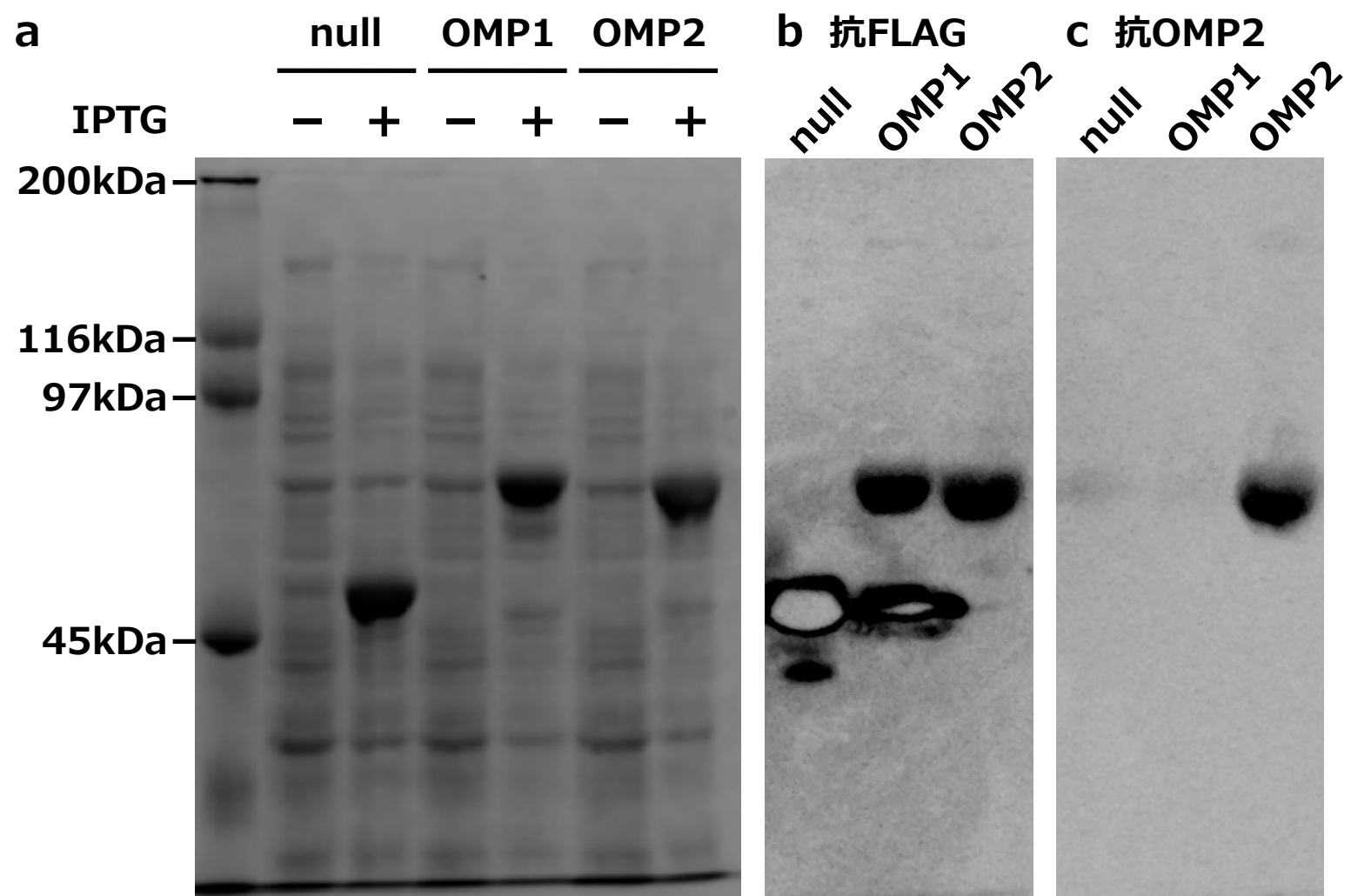


図20 合成したOMP1、OMP2のSDS-PAGEおよびこれらに対するウェスタンブロッティングの結果。nullのレーンには空ベクターを導入した細胞抽出液を泳動した。(a) SDS-PAGEの結果。(b) 抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロッティング結果。(c) 抗OMP2抗血清を用いたウェスタンブロッティング結果。

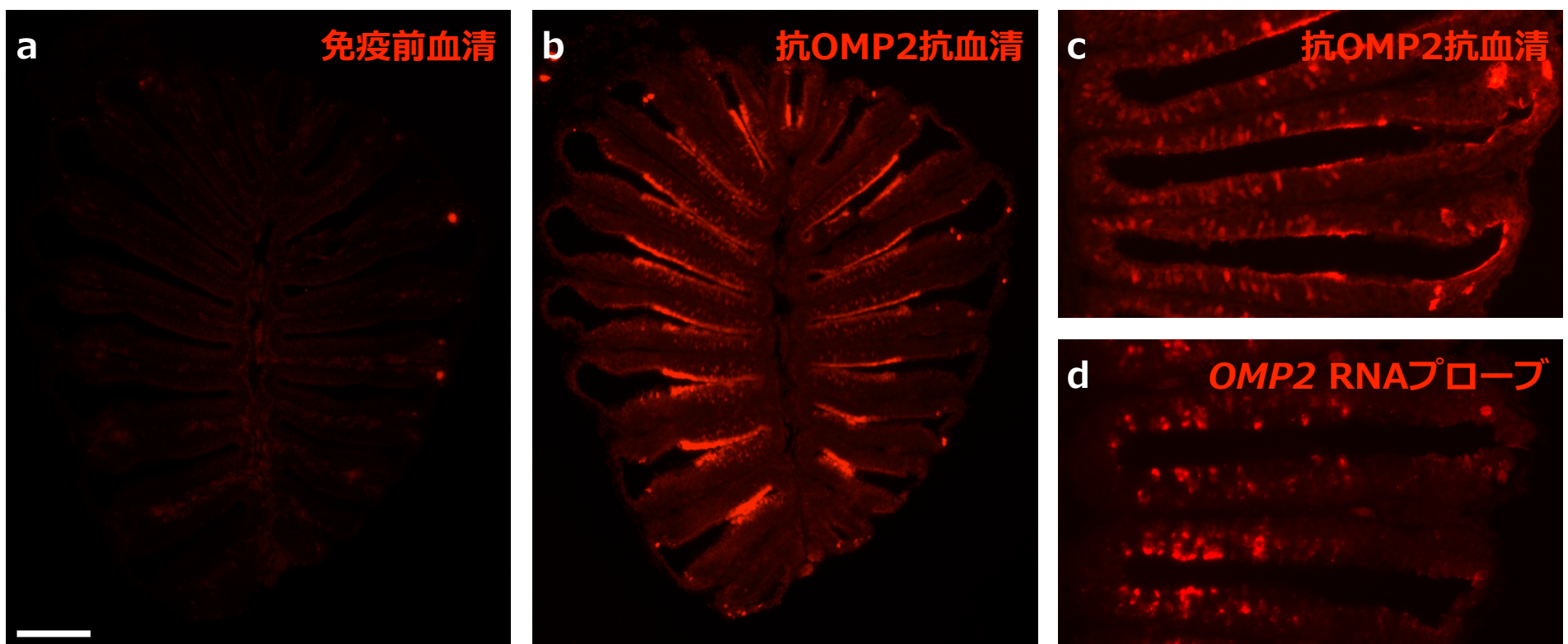


図21 ゼブラフィッシュ成魚の嗅上皮におけるOMP2の免疫染色の結果。(a) 免疫前のラット血清を用いた結果。(b, c) 抗OMP2抗血清を用いた結果。(d) OMP2のアンチセンスRNAプローブを用いた*in situ*ハイブリダイゼーションの結果。スケールバーはa, bでは100 μ m、c, dでは50 μ mをそれぞれ示す。

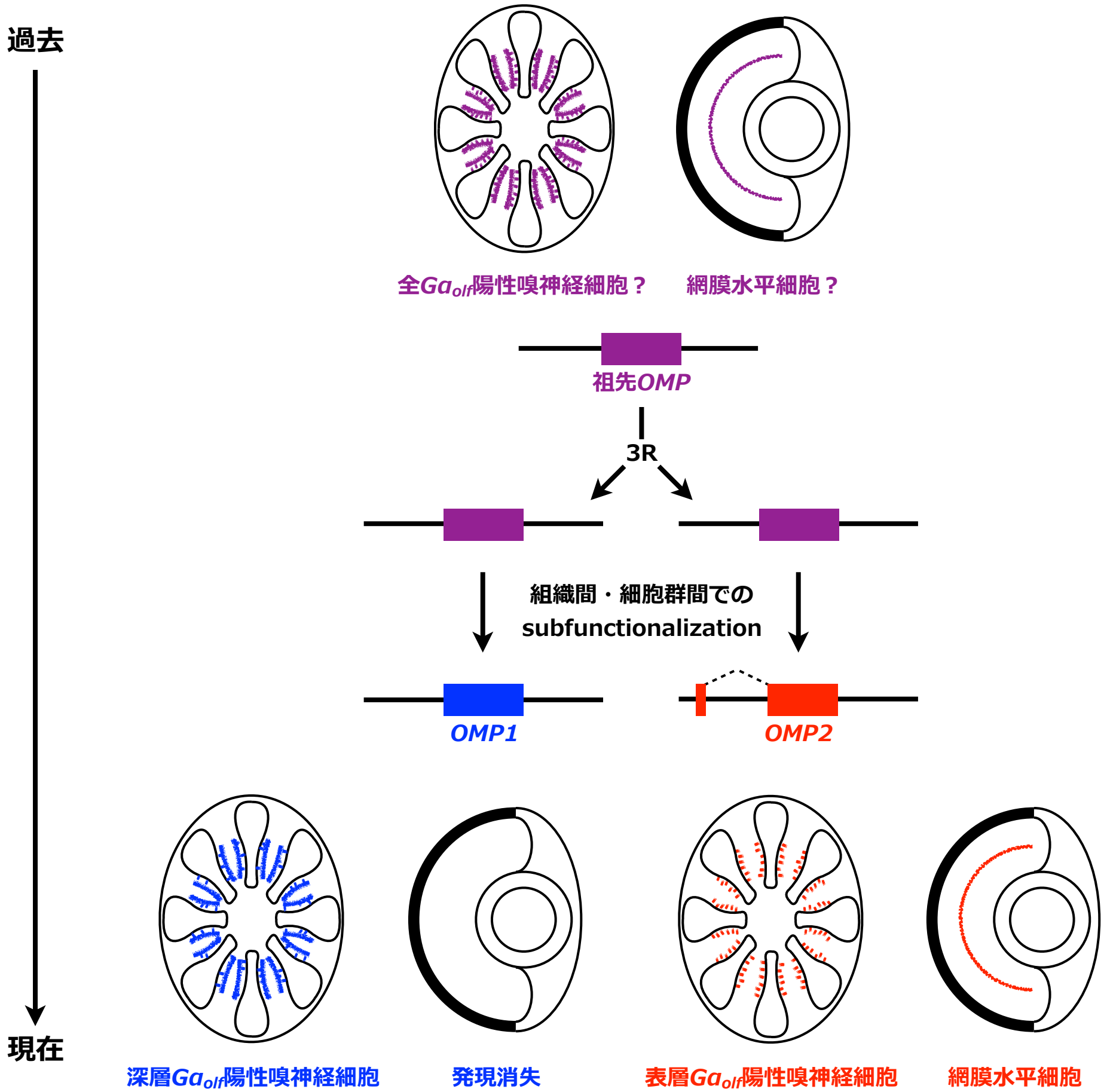


図22 真骨魚類のOMPの倍化および進化パターンの模式図。祖先OMPは嗅上皮の全 Ga_{olf2} 陽性細胞と網膜水平細胞に発現していたのであろう。3Rによって倍化したOMPのうち、OMP1は網膜水平細胞での発現を消失し、嗅上皮の深層に局在する Ga_{olf2} 陽性細胞に発現領域を縮小した。一方、OMP2は網膜水平細胞での発現を維持し、嗅上皮の表層に局在する Ga_{olf2} 陽性細胞に発現領域を縮小した。