

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	哺乳類におけるフェロモン受容機構の退化とV1R遺伝子の多様性
Title(English)	
著者(和文)	張子聡
Author(English)	Zicong Zhang
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11668号, 授与年月日:2020年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山村 雅幸,瀧ノ上 正浩,関嶋 政和,二階堂 雅人,廣田 順二
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11668号, Conferred date:2020/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和二年度 博士論文

哺乳類におけるフェロモン受容機構  
の退化と V1R 遺伝子の多様性

東京工業大学大学院 総合理工学研究科

知能システム科学専攻 張 子聡

指導教員 山村 雅幸 教授

# 目次

第一章: 序論.....	1
1.1 背景.....	1
1.1.1 哺乳類におけるフェロモン知覚.....	1
1.1.2 フェロモン受容体遺伝子の進化.....	3
1.1.3 データ駆動型研究と進化生物学.....	7
1.2 研究目的と論文構成.....	8
図表.....	9
第二章: 鋤鼻器マーカー遺伝子の偽遺伝子化.....	16
2.1 導入.....	16
2.2 材料と方法.....	17
2.2.1 データマイニングと配列アライメント.....	17
2.2.2 系統樹構築.....	18
2.2.3 選択圧解析.....	18
2.3 結果と考察.....	19
2.3.1 鋤鼻器退化が既知な種における偽遺伝子化.....	19
2.3.2 半水棲哺乳類における偽遺伝子化.....	21
2.3.3 陸棲哺乳類における偽遺伝子化.....	22
2.3.4 翼手目における偽遺伝子化.....	23
2.4 結論.....	25
図表.....	27
第三章: 哺乳類 V1R 遺伝子の探索と比較解析.....	48
3.1 導入.....	48
3.2 材料と方法.....	49
3.2.1 データマイニングとアライメント.....	49
3.2.2 系統樹構築と祖先の持つレパートリー推定.....	50
3.3 結果と考察.....	51
3.3.1 霊長目における V1R 遺伝子レパートリーの変化.....	51
3.3.2 齧歯目における V1R 遺伝子レパートリーの変化.....	53
3.3.3 鯨偶蹄目 V1R 遺伝子レパートリーの変化.....	56
3.3.4 食肉目における V1R 遺伝子レパートリーの変化.....	58
3.3.5 翼手目と真無盲腸目における V1R 遺伝子レパートリーの変化.....	60
3.3.6 異節上目・アフリカ獣上目・有袋類・単孔目の V1R 遺伝子レパートリーの変化.....	62

3.4 結論.....	63
図表.....	65
第四章: 総合討論.....	89
4.1 鋤鼻器マーカー遺伝子と V1R 遺伝子の探索による鋤鼻器退化の推定.....	89
4.1.1 鋤鼻器退化が既知な分類群の ancV1R と TRPC2 の偽遺伝子化と V1R 遺伝子の減衰.....	89
4.1.2 遺伝子探索による新規の鋤鼻器が退化した分類群の推定.....	91
4.2 哺乳類の収斂進化と嗅覚系遺伝子レパートリーの多様性.....	93
4.2.1 水棲適応と嗅覚系遺伝子の多様性.....	95
4.2.2 地中棲適応と嗅覚系遺伝子の進化.....	96
4.2.3 麝香腺の獲得と嗅覚系遺伝子の多様性.....	97
4.3 展望.....	97
図表.....	99
参考文献.....	104
謝辞.....	112

# 第一章: 序論

## 1.1 背景

### 1.1.1 哺乳類におけるフェロモン知覚

“Your nose is before your eyes, then trust it first.”とはシートン動物記の一節で、子ギツネに野生の知恵を教える母ギツネの観察からの一節である(Seton 1898)。動物の仕草を見ると様々な場面で嗅覚を用いていることがわかる。散歩中のイヌが尿によってマーキングしたり、マーキングされた電柱の匂いを嗅ぐ行動はよく知られている。また、イヌは他のイヌと出会うと互いに体を嗅ぎ回することで相手がどのような存在なのかの情報を得ることができる。野生のライオンやチーターは地面に残された匂いを辿って広大なサバンナから獲物となる草食動物の群れを見つける。ネズミなどの齧歯類のオスは匂いによってメスを引きつける。現在哺乳類で嗅覚がもっとも発達しているとされるゾウは匂いで人間を区別でき、遠方からでも密猟者を特定できると言われる。

ヒトは外界から情報を得るのを視覚に大きく依存しているため実感のしにくいことであるが、哺乳類の多くは目があまり良くないため嗅覚を発達させて外界の情報を得ている。これは哺乳類の祖先が恐竜の時代の長い期間を夜行性で過ごしたため視覚が退化したからである。爬虫類や鳥類は4つのフォトプシン遺伝子を持つ4色型色覚を持ち紫外線の波長域まで感受するのに対して(Yokoyama and Radlwimmer 2001)、哺乳類の多くは4つのフォトプシンのうち2つが壊れた2色型色覚である(Bowmaker 1998)。ヒトを含む狭鼻猿類が持つ3番目のフォトプシンは共通祖先が昼行性への進出の際に再獲得された(Bowmaker 1998)。視覚の代わりに哺乳類の祖先が発達させたのが嗅覚である。哺乳類の鼻器構造は複雑化しており、例えば特に嗅覚が鋭敏な哺乳類では鼻甲介と呼ばれる鼻腔中の軟組織をスポンジ状や多層状に発達させ、空気と接する表面積を増やしている(Owerkowicz et al. 2015)。また遺伝的に見ても、爬虫類では嗅覚受容体の遺伝子数は100個前後なのに対し(Steiger et al. 2009)、哺乳類はおよそ200-1000個ほどになる(Niimura and Nei 2007)。

哺乳類の嗅覚系は主嗅覚系と副嗅覚系の2つに分かれている(図 1.1)。主嗅覚系はいわゆる匂いを知覚する機構である。鼻腔の主嗅上皮(MOE)に発現する受容体に匂い物質(オドラント)が捕らえられると刺激が脳にある主嗅球(MOB)に伝達されることで匂いを知覚する(Firestein, 2001; Brennan and Zufall, 2006)。これに対して副嗅覚系はフェロモンを知覚する機構と考えられている。フェロモンは個体に対して特定の行動や生理的な変化を引き起こさせる同種間の通信分子として定義されている(Karlson and Lüscher 1959)。特にフェロモンは先天的な行動の誘発として社会的な行動や生殖行動に寄与する(Wyatt 2012)。またオドラントと違って微量でも作用することが特徴である。哺乳類は鼻腔先端部に鋤鼻器(VNO)を備えており、鋤鼻器官中の鋤鼻上皮に発現する受容体がフェロモンを捕らえると刺激が脳にある副嗅球(AOB)に伝達されることでフェロモンを知覚する(Chamero et al. 2012)。このように、匂いとフェロモンは異なるルートで知覚される。

フェロモンの研究は昆虫から端を発しており、現在も昆虫フェロモンの働きはよく研究が進んでいる。フェロモンという単語が初めて提案されたのは1959年のKarlsonとLüscherの論文においてであるが、同種間で作用する誘導物質の概念自体はハチやシロアリ等の社会性昆虫の研究や農学分

野の研究で古くから知られていた(Wyatt 2012)。最初に化学物質が同定されたフェロモンはボンビコールと呼ばれる高級アルコールで(図 1.2)、これはカイコガのメスがオスを誘引するのに用いる性誘引フェロモンの一つである(Butenandt et al. 1959)。性誘引の字の通り、ボンビコールを感知したオスのカイコガはフェロモンの発生源へと誘導される性質を持つ。このような性誘引フェロモンは他の昆虫でもいくつか単離されており、誘引性や微量で広い範囲に効く性質を逆手に取って害虫駆除に利用されている(Resh and Cardé 2009)。性誘引フェロモン以外にも、集合フェロモン、女王フェロモン、警報フェロモン、道しるべフェロモンといったフェロモンが昆虫から特定されており、フェロモンとなる具体的な分子の単離に成功している(Resh and Cardé 2009; 市川 2019)。

哺乳類で発見されているフェロモンが媒介する現象は生殖行動に変化をもたらすものが多いため、フェロモンという機構は哺乳類の生存戦略においても非常に重要な役割を果たしていることは確かである(Wyatt 2012)。例えば、哺乳類のフェロモンとして以下のブタ、ヤギ、マウスのフェロモンがよく知られている(図 1.2; 市川 2019)。アンドロステノン<sup>1</sup>はブタの唾液に含まれるステロイドの1つである。妊娠可能な雌ブタは雄ブタを前にするとロードシスという交尾姿勢を取ることが知られているが、これはアンドロステノンが誘導する行動である。そのため人工合成されたアンドロステノンはブタの繁殖の際に交尾可能かを判断する検査試薬として役立つ。4-エチルオクトナールという高級アルデヒドは雄ヤギや雄ヒツジの体臭に含まれる物質である。ヤギやヒツジは季節性繁殖であり、非繁殖期では雌個体の生殖腺が休止している。ヤギやヒツジは非繁殖期では雄と雌が分かれた群れで存在するが、非繁殖期の雌の群れに成熟した雄を入れると4-エチルオクトナールが作用して雌の内分泌を刺激し、排卵が起こる。フェロモンにはこうした揮発性の低分子化合物のみならず、ペプチドも用いられる。ESP1は70アミノ酸程度のタンパク質であり雄マウスの涙腺から分泌される。これは通常雌マウスに対する性誘引フェロモンであるが(Haga et al. 2010)、ブルース効果を引き起こすフェロモンの1つであることもわかっている(Hattori et al. 2017)。ブルース効果とは、交尾直後の雌が交尾した雄と異なる個体(系統)の雄のフェロモンに晒されると流産をしてしまう現象である。マウスにはESP1を分泌する系統と分泌しない系統が存在し、分泌しない系統の雌に対して交尾後に分泌する系統の雄を接触させるとブルース効果が生じる。この雌マウスに対してESP1を暴露して、ESP1分泌しない系統の雄を近づけると通常発生しないブルース効果が発生してしまうことが実験的に明らかになっている。またこれはESP1またはそれに協同する分子によって雌マウスの着床に必要なホルモン、プロラクチンが抑制されるからであることも示されている。

フェロモンと動物の嗅覚コミュニケーションの研究は具体的な分子や伝達経路の同定の手法的な難しさも手伝って、全体像の解明には遠い。1959年のフェロモンの提唱とカイコにおける具体的なフェロモン分子の同定以来、これと同様の単一で働くフェロモンが脊椎動物と無脊椎動物の両方で発見されてきた。それに加えて、近年の研究はフェロモンは混合物で働き、フェロモン混合物の比がある一定値となったときに作用することも示唆する(図 1.3)。例えば現在雌の蛾の性フェロモンは脂肪酸やアルコール、エステルなどを含む5-6種の混合物として同定されており(Cardé and Haynes 2004; de Bruyne and Baker 2008)、これらの組み合わせや混合比は一定である。哺乳類ではこのようなシナジー効果を持つフェロモンは同定されていないが、いくつかそれを示唆する例が見つかっている。上記のマウスにおけるブルース効果を起こすフェロモン、ESP1はその一例である。ESP1を妊娠中の雌に単体で暴露してもブルース効果を引き起こさないが、ESP1と雄との接触の両方を加え

るとブルース効果を示すため、雄の匂いや他のフェロモンが ESP1 と協同していると考えられる (Hattori et al. 2017)。さらに、フェロモンによる行動誘発は主嗅覚系つまり匂いと協同して使われ、脳内で情報を統合して処理されることを示す研究もある。ネズミやシカはストレスを受けると警報フェロモンとしてその場にフェロモンを放出して仲間に危険を知らせることが知られている (Wyatt 2012)。これはネズミは引っかけたネズミ捕り器に二度引っかけられないとしても経験的に古くから知られる。ラットを用いた実験により、警報フェロモンとなる必須の分子が2つ同定されているが、片方は従来のフェロモンのように副嗅覚系で受容されるのに対して、もう片方は匂いと同様に主嗅覚系で受容されることが示されている (Inagaki et al. 2014)。このような匂いとフェロモンの協同は、フェロモンのもたらす強制力に対する認証機構として、例えば近親交配への抑止力として進化してきた側面も持つであろう。

### 1.1.2 フェロモン受容体遺伝子の進化

前小節で記載の通り、哺乳類の嗅覚器官は匂いを担当する主嗅上皮とフェロモンを担当する鋤鼻器に分かれており (図 1.1)、それぞれには匂いおよびフェロモンの受容体を発現した神経細胞 (嗅神経細胞と鋤鼻神経細胞) がある。匂いの受容体は主に OR という遺伝子ファミリーであり、フェロモンの受容体は V1R と V2R の2ファミリーに分かれる (図 1.4)。脊椎動物におけるフェロモン受容は OR でも報告されていることや V1R と V2R のリガンドのほとんど不明であることから V1R と V2R をフェロモン受容体と断言することはまだできないが、フェロモンを受容していると実験的に確かめられた遺伝子のオーソログであることと鋤鼻器に発現しているという観点から本論文ではフェロモン受容体と記載する。OR、V1R、V2R はすべて7回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であるが、これらの遺伝子ファミリーは互いに系統関係はない (Nei et al. 2008)。V2R は Class C GPCR に所属していて味覚受容体 T1Rs などと近縁であるが (Cao et al. 2009)、OR と V1R は起源や類縁関係が現在でも不明である。V1R は揮発性の低分子や不揮発性のステロイド分子を受容しており、V2R はペプチドを受容することが前小節でも記載したマウスの実験によって確かめられている。昆虫を初めとする無脊椎動物のフェロモン受容体と脊椎動物のフェロモン受容体にも系統関係はなく (Brand et al. 2018)、フェロモン受容体の獲得はそれぞれで独立している。

主嗅上皮と鋤鼻器が組織として独立しているのは四足動物、つまり両生類、爬虫類、哺乳類に見られる特徴である。真骨魚類 (一般人がイメージするような魚) では主嗅上皮と鋤鼻器が未分化であり、その鼻器において哺乳類の嗅神経細胞と鋤鼻神経細胞に相同な神経細胞が混在している (Silva and Antunes 2017)。真骨魚類より原始的ないわゆる古代魚と呼ばれる魚 (ポリプテルス、ガー、チョウザメ) や軟骨魚類では不明である。四足動物の祖先に当たる肉鱗類シーラカンスでも詳しく同定されていないが、同じ肉鱗類である肺魚では嗅上皮から原始的な鋤鼻器に相同な領域が分化している (González et al. 2010; Nakamuta et al. 2012)。そのため鋤鼻器に相同する器官は肉鱗類の祖先で起こり、両生類の陸上進出に際して気相中の分子を検知するために発達したと考えられる。

このように鋤鼻器の出現は四足動物の祖先とされているが、フェロモン受容体遺伝子の起源は脊椎動物の祖先にまで遡る (分類用語は図 1.5 参照)。V1R と相同な遺伝子はヌタウナギのような無顎類 (円口類) から哺乳類まで脊椎動物全体に広く保持されている一方で、ホヤやナメクジウオといっ

た脊椎動物を除く脊索動物(頭索動物、尾索動物)では保持していない(Grus and Zhang 2009)。ヤツメウナギでは V1R は鼻器に発現しているため、V1R は誕生からすでに嗅覚系の一部を担っていたと考えられる。これに対して V2R の出現は顎口類の祖先つまり顎と味覚受容体の発明と重なり、起源が V1R よりも少し遅いことが示されている(Grus and Zhang 2009)。

V1R ファミリーは 6 つのサブファミリー(V1R1-V1R6)に分かれる(図 1.6; Saraiva and Korsching 2007; Pfister et al. 2007; Nikaido 2019)。サメではこれらの祖先型のようなクレードがいくつか見られているが(Sharma et al. 2019; 筆者未発表データ)、概ね 6 つのサブファミリーとして無顎類、サメから古代魚、真骨魚類まで保存されている(Nikaido 2019)。サメや真骨魚類では種特異的な重複はあるものの基本的に各サブファミリーに 1 つずつの 6 つの V1R を保持しており、レパートリーの多様性に乏しい。それに対して、ポリプテルスやガーと言った原始的な条鰭類からアロワナやウナギのような早い段階で分岐した真骨魚類に限っては V1R2(V1R1 の sister clade 全体をここでは便宜的に V1R2 呼ぶ)のみが非常に多くのコピーを持つ(Zapilko and Korsching 2016; 筆者未発表データ)。この原因は不明であるが、この膨大な V1R2 のコピー数が後に説明する肉鰭類の陸上進出につながる。原始的な魚類から上位の真骨魚類まで、6 つの V1R 遺伝子ファミリーはいずれも鼻器に発現しているが(Saraiva and Korsching 2007)、各サブファミリーが何を受容するのか、そもそもフェロモンの受容体なのかということさえまだわかっていない。フェロモンは一般的に他種に傍受されないよう種分化のたびにリガンドがマイナーチェンジする。そのため、それに応じて受容体遺伝子の系統の多くは種特異的な増減が哺乳類の V1R の進化や真骨魚類の V2R1 では観察されている(Grus and Zhang 2004; Grus et al 2005; Hashiguchi and Nishida 2006)。そのため魚類の全体が 6 つの V1R がフェロモンの受容体として祖先から高度に保持されているのは考えづらく、嗅覚系とは異なる機能を担っている可能性が高い。

一方で、魚類でフェロモン受容を含む嗅覚系を司るのは V2R であると考えられる。マウスの V2R がペプチドを受容することが実験的に確かめられているのに対して(Haga et al. 2010)、真骨魚類の V2R はアミノ酸を受容することが実験的に確かめられている(Speca et al. 1999; Sato et al. 2005; DaMaria et al 2013)。同時に、真骨魚類では種によって異なる V2R サブファミリーの遺伝子が増幅しており、種間でレパートリーに大きな多様性がある。真骨魚類の V2R のコピー数はおよそ 10-60 個であり(Hashiguchi and Nishida 2006;)、染色体上でタンデムに増幅してクラスターを形成している(Nikaido et al. 2013a; Yang et al. 2019)。このような V2R の遺伝子の振る舞いは軟骨魚類から真骨魚類まで広く共通する。そうしたことから、真骨魚類の V2R はアミノ酸のみでなく水溶性のペプチドも受容しフェロモン様の振る舞いを行うとも考えられており、実際に真骨魚類では恐怖反応の有無と V2R レパートリー増減の相関性が指摘されている(Yang et al. 2019)。

このような V1R と V2R の進化的特徴は軟骨魚類を含む古代魚から真骨魚類まで広く共通するが、陸上進出を果たした四足動物やその 1 つ手前の肉鰭類ではまったく異なる(図 1.7)。まず V1R ではシーラカンスが古代魚と同様の特徴を持つが(Nikaido et al 2013b)、両生類では V1R2 を除いたほとんどの V1R ファミリーが消滅している(Shi and Zhang 2007; Saraiva and Korsching 2007)。そして残った V1R2 の中から 1 系統のみが哺乳類や爬虫類の V1R につながる。また、V2R においても魚類の持つ多様な系統 V2R はシーラカンスでも保持されている一方(Picone et al. 2014)、古代魚のみで保持されていた V2R のある 1 系統がシーラカンスで爆発的に増加しそこから四足動物の持つ V2R

の系統が誕生している(筆者未発表データ)。このとき同様に両生類の時点で魚類特有の V2R の系統はすべて滅亡した。このような魚類の持つ V1R と V2R サブファミリーの大きな滅亡は、水中の化学物質を捕らえるのに適した受容体が整理された一方で、古代魚がわずかに持っていた気相中の化学物質を捕らえるに適した受容体の系統が繁栄したことによるものであろう。水陸両方の環境が必要な両生類は、一方でシーラカンスの持つ膨大な V1R2 と V2R 遺伝子の一部を引き継ぎ、一方でそこから陸上環境に用いる新規の V1R と V2R を開発した。これは完全陸棲となった有羊膜類(爬虫類と哺乳類の祖先)で再整理され生き残ったそれぞれ一つの系統から爬虫類と哺乳類の V1R、V2R へと繋がっていく。

シーラカンスから両生類を経て爬虫類で完全陸棲が実現した四足動物は、陸上で遭遇した新環境に応じてさらなるフェロモン受容体の取捨選択をしていった。そのため両生類から爬虫類、哺乳類ではそれぞれ V1R、V2R のコピー数及び V1R 対 V2R の比が大きく異なる(図 1.7)。両生類のフェロモン受容体の研究は少ないが、よく研究されているネッタイツメガエルでは V1R も V2R もリッチで V2R に至ってはおよそ 330 コピー存在する(Shi and Zhang 2007)。アカアシサンショウウオ(*Plethodon shermani*)の鋤鼻器は季節によってサイズが変形して繁殖や捕食に役立っていると考えられている(Dawley et al. 2000)。アカアシサンショウウオの場合は V2R のコピー数が 34 コピーとネッタイツメガエルよりは少ないが、魚類や他の四足動物と比べると少なくない数である(Kiemnec-Tyburczy et al. 2012)。これらのことからおそらく両生類はフェロモン受容が大きな地位を占めていると考えられる。

それに対して爬虫類ではおよそ生息環境によって異なる。爬虫類の中でも陸棲である有鱗目(トカゲやヘビ)は発達した鋤鼻器を持つ。有鱗目の鋤鼻器は左右一対で口腔とつながっており、口の中に入ってきたフェロモンを感知するようになっている。トカゲやヘビが盛んに舌を出し入れするのはそのためである。一方で有鱗目の V1R と V2R の比率は非常に偏っている。有鱗目は両生類から V1R を大きく減らしており 3 つ程度にとどまる。しかし V2R を非常に拡張させていて 100-200 コピー程度の遺伝子数を持つ(Brykczynska et al. 2013)。これは V1R が受容する低分子化合物か V2R が受容するペプチドフェロモンのせめぎ合いの中でペプチドフェロモンのほうが有鱗目にとって大きく適応的だったからだと考えられるが、詳しいことはわかっていない。一方、カメ目とワニ目では鋤鼻器は退化しており、痕跡器官しか残っていない(Døving and Trotier 1998; Silva and Antunes 2017)。カメやワニは水棲に二次適応した種であるため、爬虫類祖先で完全に陸棲適応した結果水棲用のフェロモン受容体が失われたが、陸棲から水棲に再適応したときに今度は陸棲用のフェロモン受容体が失われてしまったのだろう。カメとワニには V1R と V2R 遺伝子もほとんど残っていない(Silva and Antunes 2017)。また恐竜から進化してきた鳥類では鋤鼻器が完全に失われており、V1R も V2R もゲノムから見つけることができない。これは同様に飛行能力を獲得したコウモリでもほとんどの種で鋤鼻器が失われていることから、空へと適応拡散した結果と考えられているが確たる説はない。

哺乳類の祖先は三畳紀の後期に単弓類(古くは哺乳類型爬虫類として爬虫類に含まれたが現在は爬虫類とは別群)から分岐した。フェロモン受容という観点における哺乳類と爬虫類の違いは、哺乳類が成立直後から非常に V1R を発達させていることである。これに加えて進化の進んだ有胎盤類では齧歯目や下位の霊長目などのごく一部の目を除いて V2R が消滅しているという爬虫類と真逆の道を辿っている。現生哺乳類の中でも最も成立が早いのは単孔目(カモノハシやハリモグラ)である。ゲ

ノムが公開されているカモノハシでは、フェロモン受容体遺伝子が V1R を約 300 コピーへ爆発的に増加している一方で V2R は 15 コピーにまで減少していることが特徴的である (Shi and Zhang 2007)。現生哺乳類の中で次に分岐の早いのは有袋類であるが、オポッサムでは V1R も V2R も 90 コピー程度持っておりカモノハシと違って V2R も相当量保持している。これらのことから、哺乳類成立直後でも V1R の低分子受容と V2R のペプチド受容とで大きなせめぎ合いがあったことがわかる。哺乳類の祖先で嗅覚系の大きな発達があったのは、哺乳類祖先の存在した三畳紀から白亜紀は恐竜が繁栄した時代であるため、昼世界に棲む大型恐竜の生息条件を避けるように夜間に適応したためと考えられている。

白亜紀末の大絶滅に生き残った哺乳類の祖先は、恐竜などの大型動物がいなくなった世界へと爆発的に拡散した。特に有胎盤類は現在もっとも繁栄している哺乳類である。有胎盤類の進出は昼の大地のみならず、空や海洋、樹林、地中にまで及ぶ。こうした哺乳類の適応拡散によって、感覚器官の大きな進化が起こったこととそれに伴うトレードオフで重要度が低下した器官の退化が起こったことはよく知られており、フェロモン知覚と鋤鼻器もその例外ではない。クジラ類は陸棲であった祖先が進化して完全水棲となった種である。クジラでは前述のカメとワニと同様に水棲適応の過程で鋤鼻器は退化しきっており構造的にも残っていない (Meisami and Bhatnagar 1998)。同時に V1R もほぼ存在せず残った僅かなコピーは消滅の真っ只中と考えられる (本文第三章)。その代替のコミュニケーション手段としてクジラが発達させたのは音波を用いた反響定位能力である。これはイルカ等の音波による捕食や仲間同士の通信手段として用いられている。音波の解析のためにクジラは骨格組織や独自組織であるメロン体等様々な組織を発達させた。またメロン体を持たないヒゲクジラ類でも低周波の音波を状況把握や交信に用いるとされる。ヒトや類人猿からオナガザル (日本人に馴染みの深いところではニホンザル) までを含む上位の霊長類ではこれらの共通祖先の段階で鋤鼻器の退化が始まり、V1R のコピー数も大きく減衰している (第三章: 0-5 コピー程度)。これは上位の霊長類における 3 色覚の獲得等により視覚への依存性が増したためと言われるが (Zhang and Webb 2003)、それを否定する研究も存在する (Webb et al. 2004)。ただ、実際の動物を見てみればオナガザルのオスは派手な色合いでメスにアピールすることが多いし、我々ヒトも異性に惹かれるときはまず見た目からである。コウモリは大部分の科で鋤鼻器が退化しており、鋤鼻器が残存している科は 2 科程度に留まる (Bhatnagar and Meisami 1998; 後述の筆者の研究では 3 科である)。これは鳥類と同様に飛行能力の獲得により嗅覚への依存性が低下し、視覚や聴覚への依存性が増したとも言われるが相関のレベルでしかわかっていない。またコウモリは科によって個別に超音波を獲得し、クジラ類とは違って聴覚を発達させて反響定位能力を獲得しているが、これは鋤鼻器の退化との相関性は薄いことが示されている (Yohe et al. 2017)。ちなみに聴覚を発達させたためかコウモリのオスは歌でメスにアピールする。

爆発的な適応拡散を誇る哺乳類であるが、その適応進化に対してフェロモン知覚がどのように進化していったのかは解剖学や行動学的な知見に依存しているのが現状である。これは V1R がゲノム中に散在しているため、ゲノム情報が得られなければ全容を解析するのは困難なことに起因する。しかし近年のシーケンシングの低価格化や高速化によって、全ゲノムが得られる種はどんどん増加している。フェロモン受容体遺伝子の研究もこれに伴って、1995 年のマウスとラットでの発見から (Dulac and Axel 1995)、2005 年では 6 種 (Grus et al. 2005)、2010 年では 37 種と (Young et al.

2010)、哺乳類における遺伝的な多様性を発見してきた。だが近年の研究は霊長目、クジラ亜目、コウモリ目といった既に鋤鼻器の退化がわかっている種とその周辺の種との比較という文脈で行われており (Yoder et al. 2014; Kishida 2015; Moriya-Ito et al. 2018; Yohe et al. 2019)、他の哺乳類ではサンプル数の増大に対して研究数が乏しい。現存の哺乳類の多様性を考えれば、例えば鋤鼻器を保持している種間でもそれぞれの適応進化の結果でフェロモン関連遺伝子に大きな多様性があるといった、解剖学的な手法では発見できなかった潜在的な多様性が遺伝子解析の側面から発見できるかもしれない。

### 1.1.3 データ駆動型研究と進化生物学

生物の多様性は遺伝子の変異によってもたらされるが、具体的にどのような変異や分子機構から生み出されるものかは現在も部分的な理解に留まる。このような問題に対してはゲノム情報を網羅的に比較し解析するアプローチが必要不可欠である。シーケンシング技術が確立された当初はゲノムの決定が非常に高コストであったためにモデル動物のゲノムが中心として読まれた。そのためゲノム情報を用いた研究は主に社会貢献度のわかりやすい疾患関連遺伝子に対して行われていた。しかし次世代シーケンサーの開発競争が加熱するとゲノムを決定するコストが格段に下がったことにより、世界中の研究機関で低コストにゲノムを決定することができるようになった。そして現在では哺乳類のほぼすべての分類群を網羅した比較ゲノム解析が可能になりつつある。2019年10月に筆者が調べたところでは、NCBIに登録されている哺乳類の全ゲノムの数でおよそ330種存在する。これは哺乳類の総種数のおよそ6000には遠い数であるが、科にすると115科と現存の156科の70%以上を含んでいる計算となり、目レベルでは有袋類の一部を除くすべての哺乳類の目を含む。こうして大量に読まれた動物のゲノム情報はデータベースに登録されビッグデータとなっている。

科学研究の方法論はしばしば仮説駆動型とデータ駆動型の2つに分けられる。すなわち設定した仮説に対して実験的に検証するアプローチと、データベースの中から発見的な探索を行うアプローチである。生物学におけるデータ駆動型研究はゲノム情報が読まれる頃から提唱された。これは具体的にはゲノムやトランスクリプトームを始めとするオミックス情報を統合的に解析することで生命科学の発展に役立てる研究を指す。現在、生命科学に関するデータベースの大規模化や多様化が進んでいることから、データ駆動型の研究はこれからの生命科学における中核分野の一つとして期待される。

データ駆動型研究は仮説生成研究であるという指摘もある通り、仮説駆動型研究の前段階の研究として位置づけられる(科研費.com 2017)。仮説生成の重要性としては例えば種や個体の差異を生み出す遺伝的変異が何かについて事前に当たりをつけなければ無駄な検証に時間を費やされることが挙げられる。こうした仮説生成を行うデータ駆動型研究は生物のデータベース化の拡張とともに重要度が増すであろう。

こうしたデータ駆動型研究の営みは博物学によく似ている。かつての博物学者は自然界に存在する生物や鉱石、さらには天体などのあらゆる物の性質を記録し分類した。そして整理した記録を元に自然を支配する法則を推定した。これはひとえに人間が自然に対してまったく無知であったことに起因しており、そのために徹底的な調査を必要としたのだ。博物学は現代では古典的という印象

を受けるが、21世紀に入ってから次世代シーケンサーに端を発する新たな観察手段が考案され続けていると共に未知である領域はむしろ広がり続けている。そこで研究者たちは博物学で用いられたアナログな情報取得と処理の手段を、データ駆動型研究で用いられるデジタルな情報取得と処理の手段へと変化させて未知へと挑むことになった。生物学における博物学の営みは配列解析やオミックス解析という形で現代でも受け継がれておりそこにあるのは手段の違いしかない。

進化生物学は博物学的なアプローチが重要な地位を占める研究分野の一つである。これは生物の進化が実験的に証明できないという性質から来ている。生物の進化は遺伝子にかかるランダムな変異と表現型にかかる生存バイアスによって規定されるため、表現型の変化はときには非合理的で、再現性がない。また、個体の寿命と比べたら非常に多くの時間を必要とする。進化の法則を実証できない以上は実際に存在する生物から証拠を集め分析する必要がある。

現代では前述の通り、次世代シーケンサーの登場により地球上のあらゆる生物のゲノム配列が現在得られるようになり始めている。これは進化生物学の研究にはおいては、あらゆる生物の多様な表現型を遺伝子型の違いに落とし込んで理解する研究の潮流が形成され始めていることを意味する。本研究は、現代の博物学研究またはデータ駆動型の研究手法を駆使した進化生物学研究の先駆けとして、哺乳類の中でも遺伝子型の多様性が特に豊かなフェロモン受容体遺伝子群の網羅的な比較解析をすることで、今後の科学的発見に役立てたい。

## 1.2 研究目的と論文構成

本研究の目的は、哺乳類の多様な適応進化とフェロモン知覚の関係を明らかにすることである。そのために研究当時に公開されている全哺乳類のゲノム情報に対して、①鋤鼻器マーカー遺伝子と②フェロモン受容体遺伝子 V1R の網羅的な探索と比較解析を行った。フェロモン知覚の退化は鋤鼻器の退化から考察されてきたが、鋤鼻器の退化は解剖による構成組織の退化の観察から決定されてきた。これに対して、①では鋤鼻器で中心的な機能を担うと考えられる ancV1R と TPRC2 の 2 遺伝子の配列を探索して配列に含まれる有害な変異と自然選択圧の消失の両方を吟味することで偽遺伝子化を決定し、そこから潜在的な鋤鼻器の退化および適応進化との関係を考察した。②では多重重複遺伝子である V1R を包括的に取得してそれぞれの系統関係を解析することで、哺乳類進化のどの時点で V1R のコピー数が増加または減少したのかを解析した。その結果から V1R の増減が哺乳類の適応進化とどのように相関するのかを考察した。

本論文では、第二章と第三章の導入で①と②についてそれぞれ先行研究について述べた後に研究結果と考察を述べる。第四章では①と②の結果を総括し、鋤鼻器が退化した種におけるフェロモン知覚の退化と適応進化の関係および、鋤鼻器を保持した種間における嗅覚コミュニケーションの多様性と適応進化の関係を考察する。さらに、こうして網羅的な解析で得られた仮説の数々は検証されることによってどのような科学的発見に役立てることができるかの展望を述べる。

図表

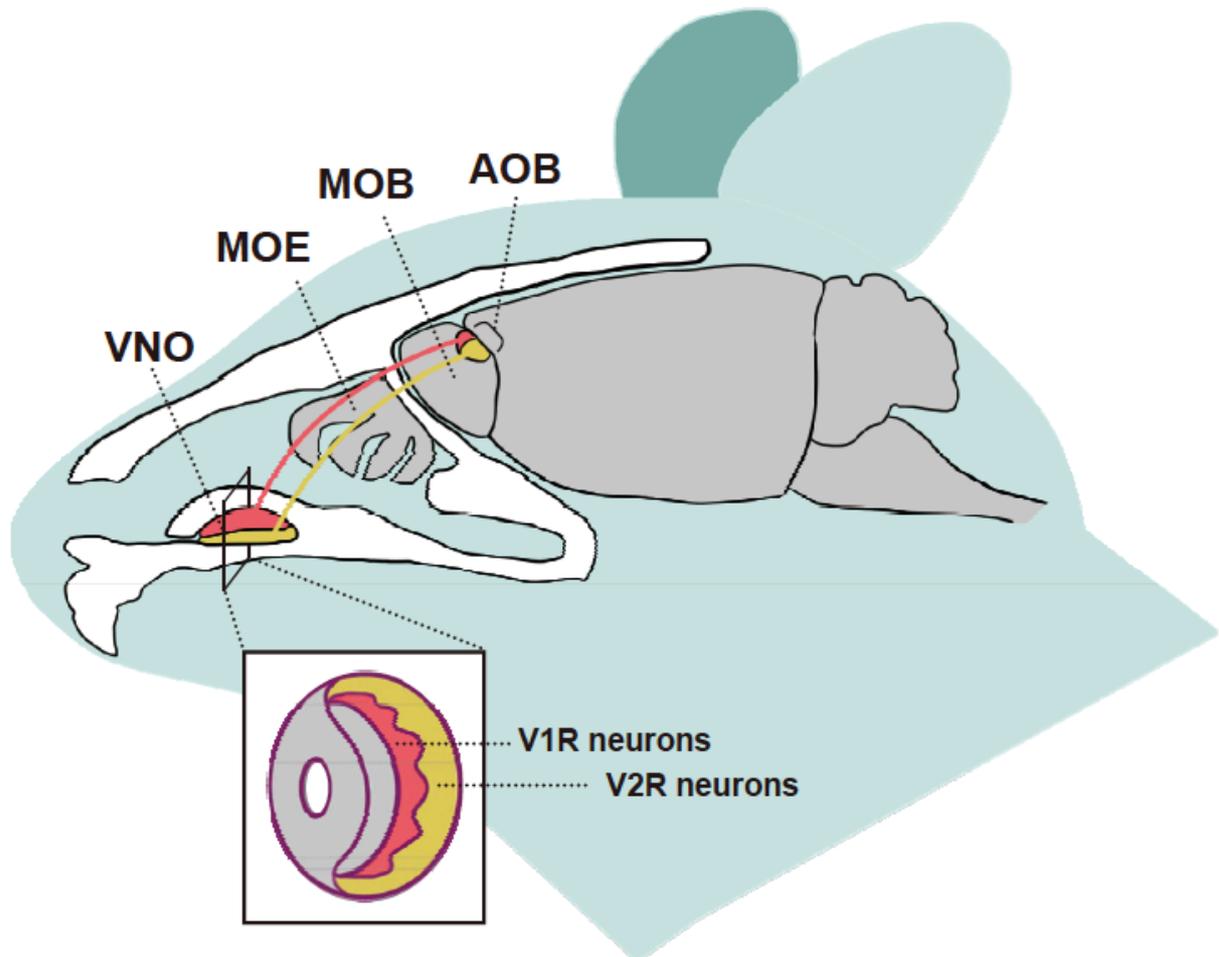


図 1.1 主嗅覚系と副嗅覚系の組織図。主嗅覚系は鼻腔から入った物質が主嗅上皮(MOE)で受容され、その刺激が脳の一部である主嗅球(MOB)に伝わるのに対して、副嗅覚系は鋤鼻器(VNO)で受容され、その刺激が副嗅球(AOB)へ伝わる。図では鋤鼻器に通じる穴(鼻口蓋管や切歯管、内鼻孔と分野によって呼ばれ方が異なる)が鼻腔側に開口しているが、これは齧歯目において見られる特徴であり、爬虫類や哺乳類の大部分は口腔内に開口している。画像は Nikaido et al. 2019 より。

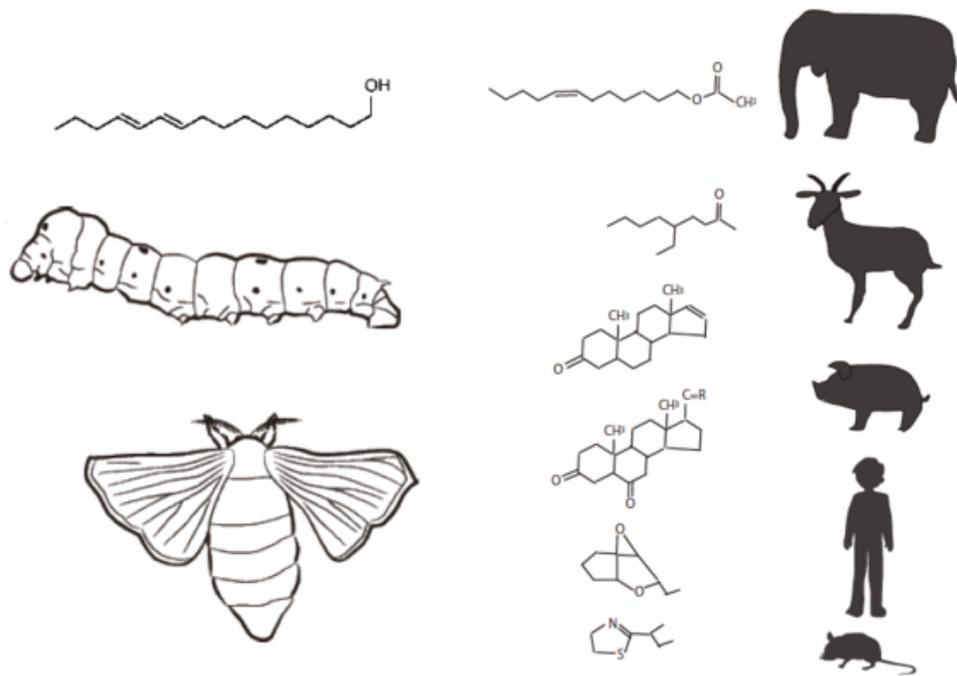


図 1.2 実際に物質として単離されているフェロモン。フェロモン研究は昆虫から始まっており多くの揮発性物質がフェロモンとして無脊椎動物で単離されている(左)。哺乳類のフェロモンは特定があまり特定が進んでいないが、実際にいくつかのフェロモンが知られており主に農学分野に役立てられている(右)。画像は市川 2019 より。

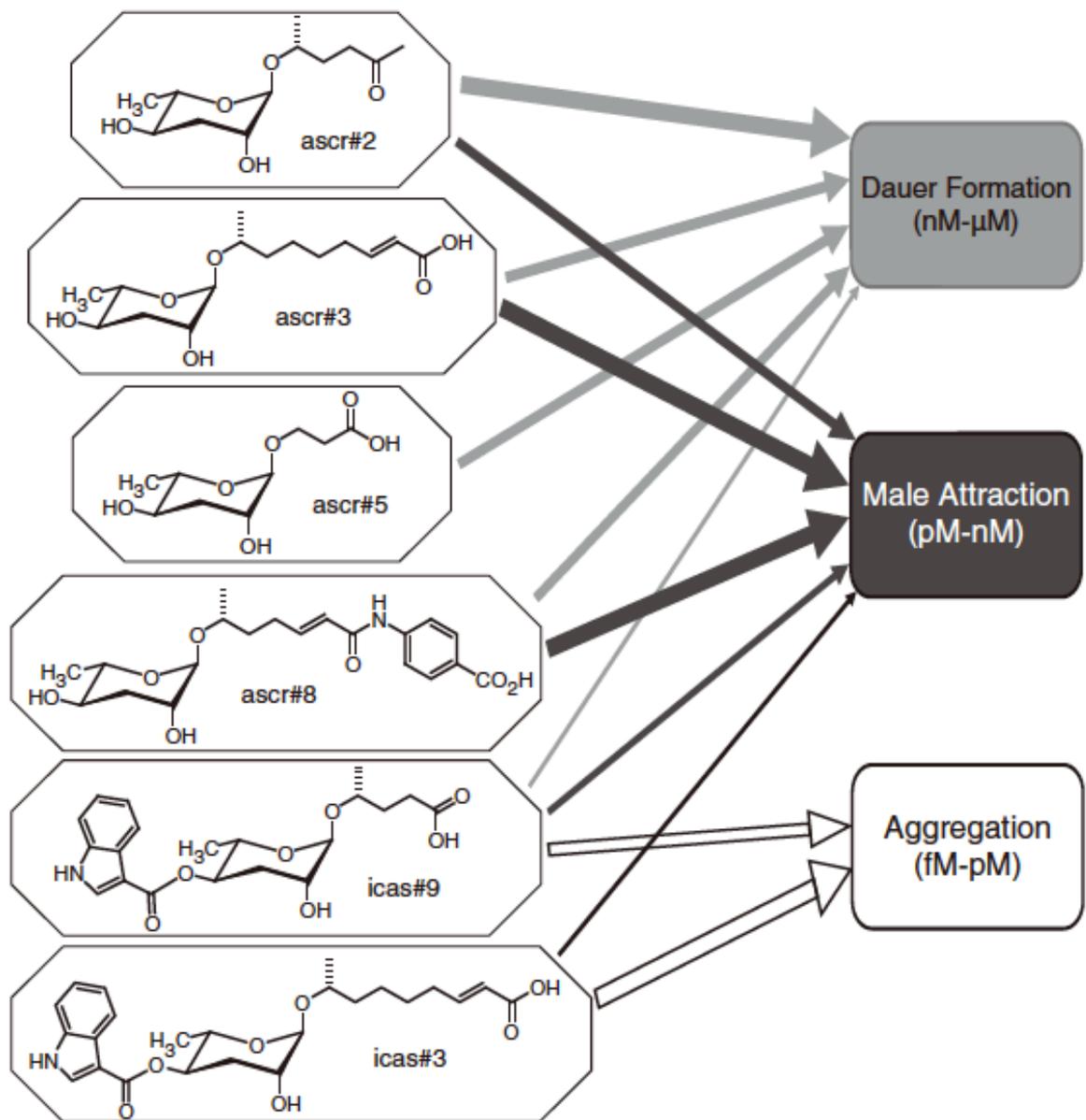


図 1.3 線虫において発見されているフェロモンの多重性。特に研究の進んでいる無脊椎動物のフェロモンの分野では図のようないくつかのフェロモン物質による複合効果が知られる。このような複合的なフェロモンは哺乳類では発見例に乏しいが、将来的には哺乳類フェロモン研究においても重要な分野になることが予想される。画像は Wyatt et al. 2014 より。

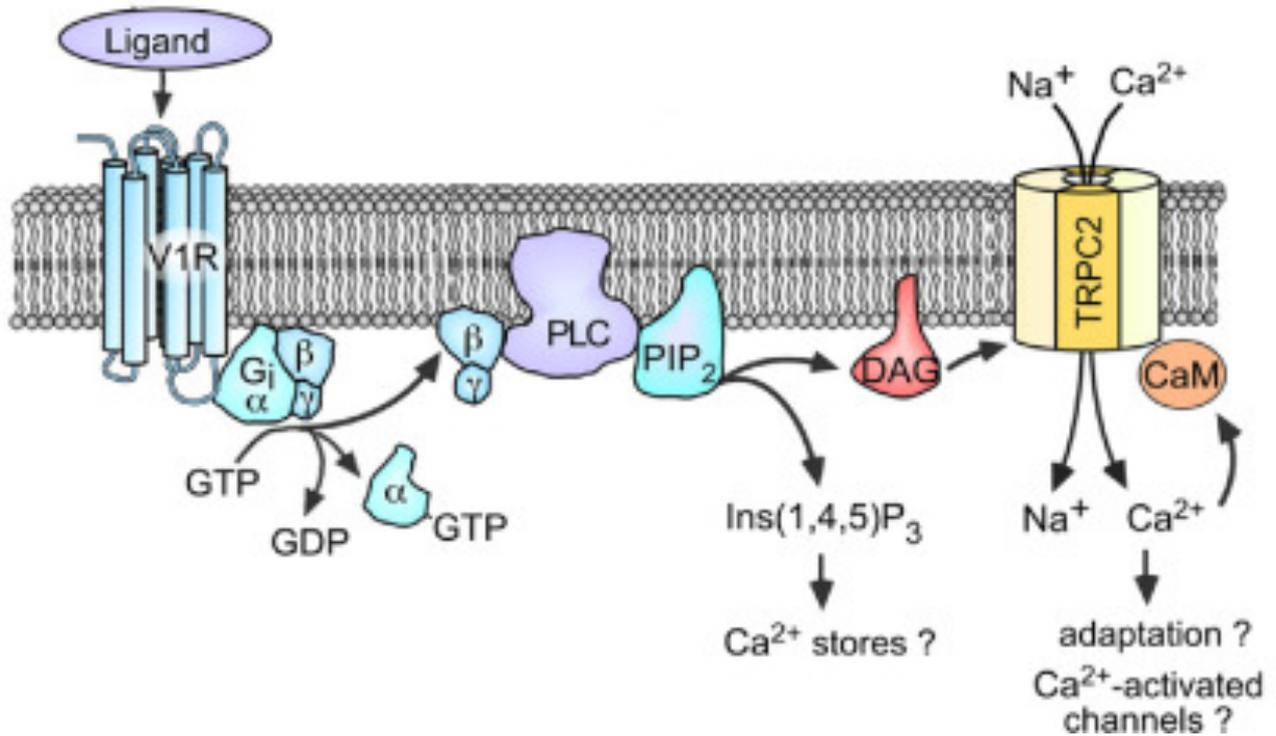


図 1.4 鋤鼻神経細胞における神経伝達系のモデル図。鼻腔に入ったフェロモン(Ligand)は V1R 受容体によって捕えられると G タンパク質を介して刺激が下流に伝わり、最終的には TRPC2 がイオンチャンネルとして駆動し鋤鼻神経細胞の脱分極が行われる。画像は Zufall et al. 2005 より。

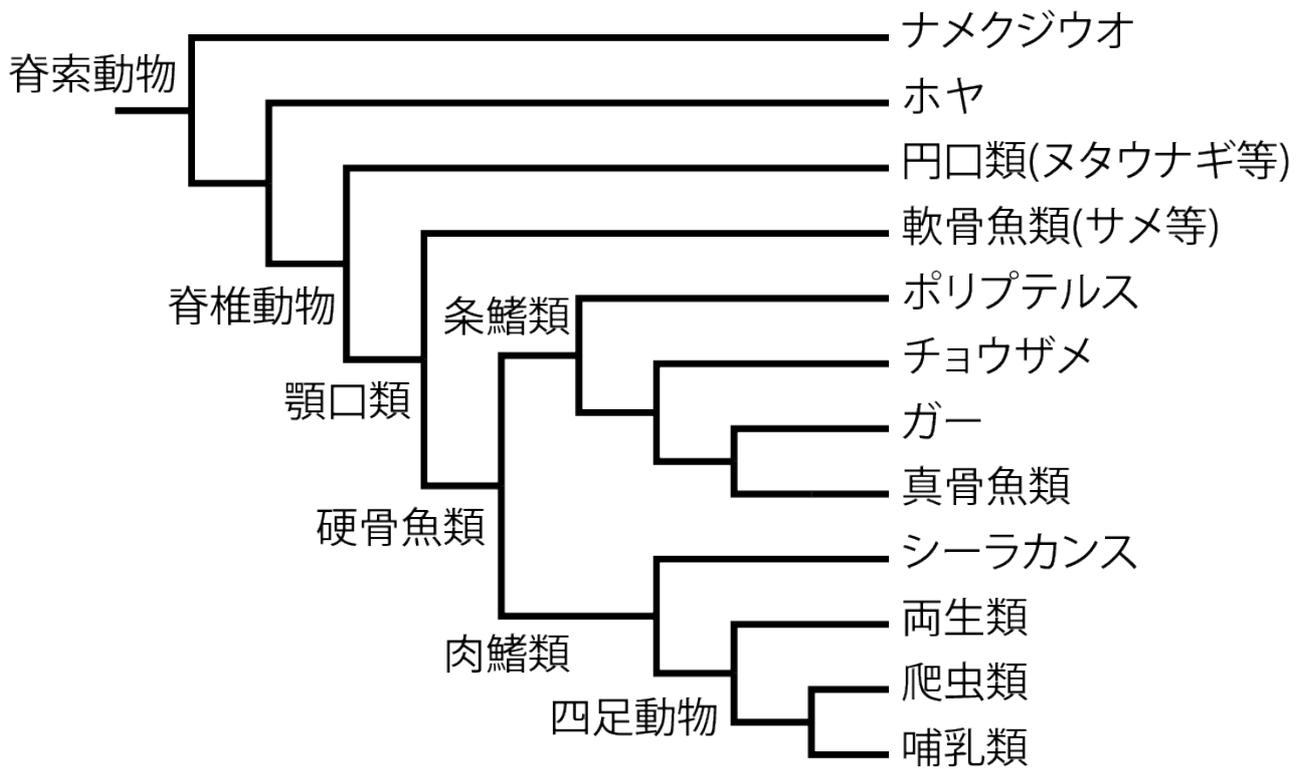


図 1.5 脊椎動物の系統樹。本論文に用いた系統学用語とその系統関係をまとめた。フェロモン受容体遺伝子である V1R 遺伝子は脊椎動物の共通祖先で、V2R 遺伝子は顎口類の共通祖先で誕生しており、脊椎動物の進化にしたがって V1R 数対 V2R 数の比率を大きく遷移させている。フェロモン受容器官とである鋤鼻器が組織として独立するのは四足動物以降である。具体的な V1R と V2R のコピー数の遷移については図 1.7 を参照。

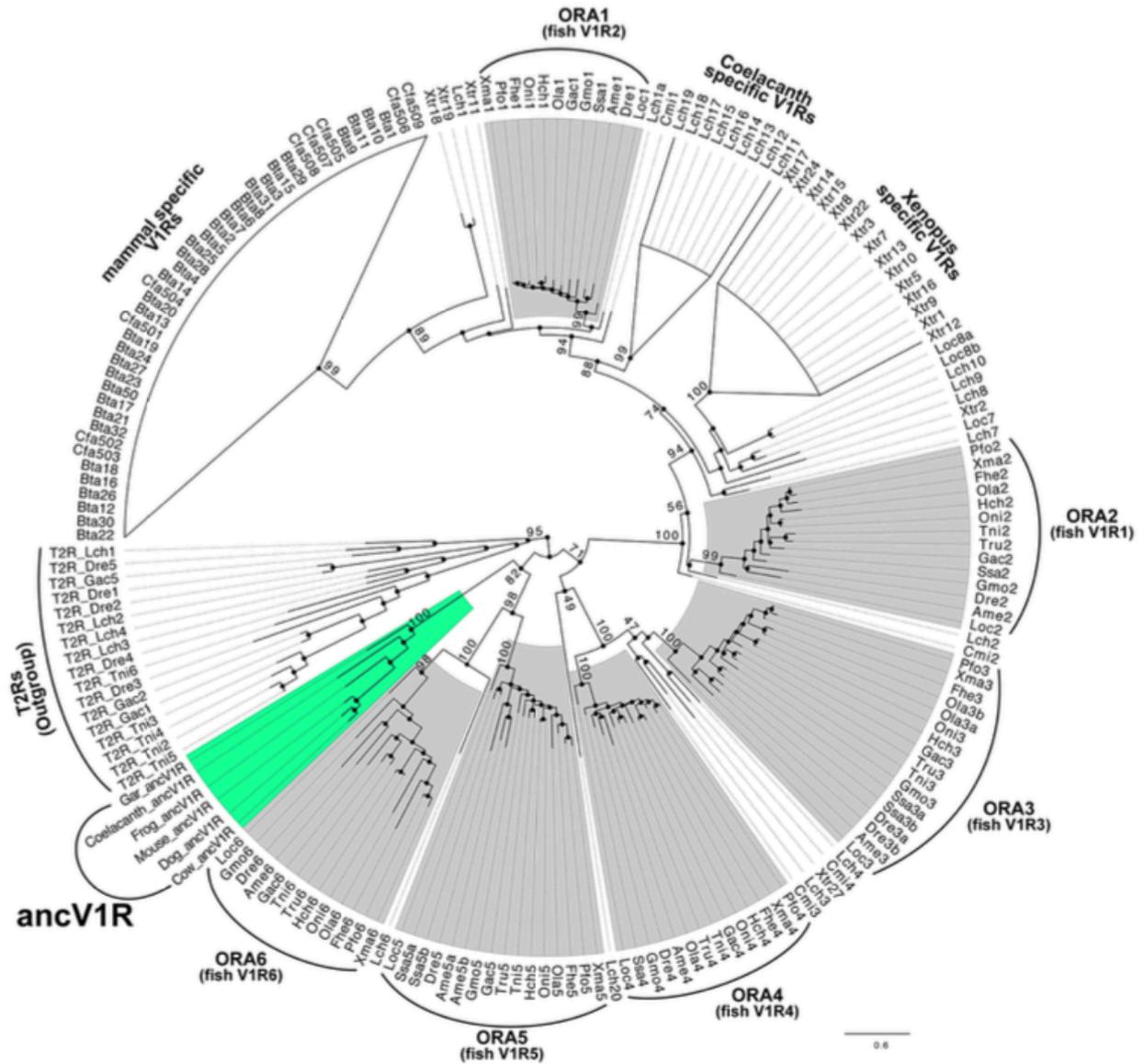


図 1.6 V1R 遺伝子の進化系統樹。V1R 遺伝子の起源は脊椎動物の共通祖先であり、およそ 6 つのサブファミリー (V1R1-V1R6) として脊椎動物の共通祖先から条鰭類まで保存されている。四足動物などの陸上で用いるとされる V1R 遺伝子のレパートリーは V1R2 サブファミリーから出現しており特に完全陸棲を達成した爬虫類と哺乳類では V1R2 サブファミリー以外のサブファミリーが消滅している。例外的に ancV1R サブファミリーだけは一部の分類群を除く硬骨魚類で全体で保持されている。画像は Suzuki et al. 2018 より。

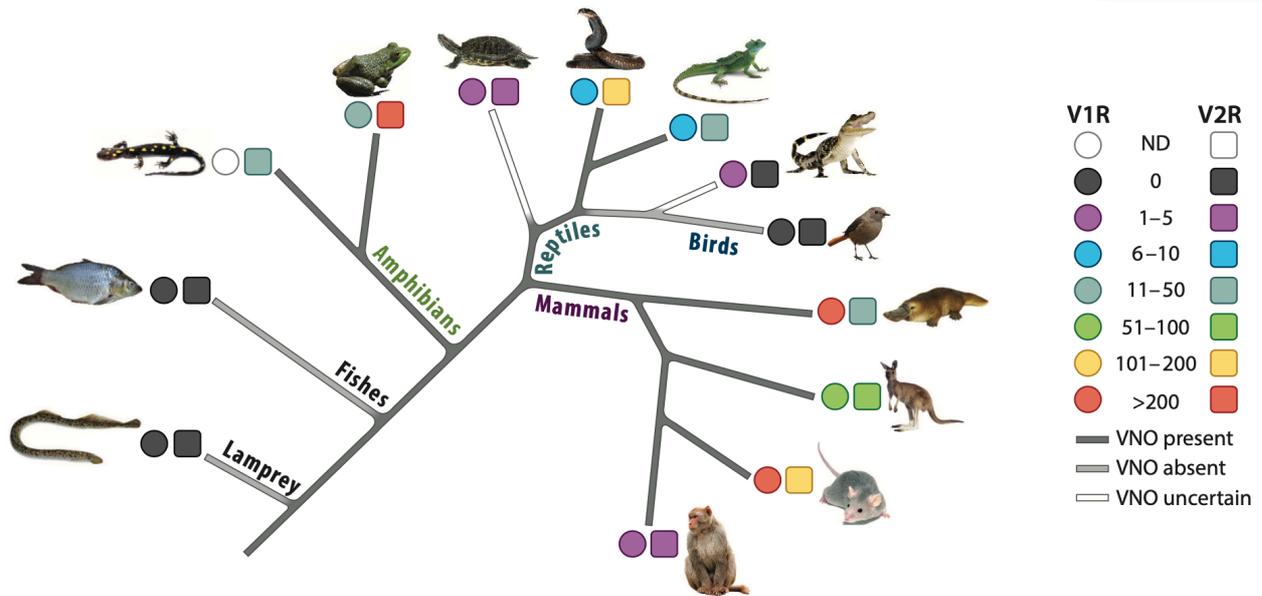


図 1.7 V1R 遺伝子と V2R 遺伝子の比率の変遷。低分子化合物を受容するとされる V1R 遺伝子とアミノ酸やペプチドを受容するとされる V2R 遺伝子のレパートリーは脊椎動物の進化とともに比率を大きく変えている。脊椎動物共通祖先から条鰭類までの水棲動物は、V1R 遺伝子がおよそ 6 コピー前後で高度に保持されているのに対して、V2R 遺伝子は種によって多様でありおよそ 10-50 コピー程度保持する。しかし水陸両棲の両生類では V1R 遺伝子が爆発的に増加した結果、V1R 遺伝子も V2R 遺伝子もリッチである。完全陸棲を達成した爬虫類と哺乳類では、爬虫類では V1R 遺伝子がほとんど退化しているのに対して V2R 遺伝子が多い。逆に哺乳類では有袋類や齧歯目を除くほとんどの分類群で V2R 遺伝子が退化しており代わりに V1R 遺伝子がメジャーである。図は Silva and Antunes 2017 より。

## 第二章: 鋤鼻器マーカー遺伝子の偽遺伝子化

### 2.1 導入

鋤鼻器(VNO)の解剖学的な説明と哺乳類での退化については 1.1 節で書いた通りである。鋤鼻器は鼻器の先端にあるフェロモンを捕らえる組織で、匂いを捕らえる主嗅上皮(MOE)とは組織として独立している(Firestein 2001; Brennan and Zufall 2006)。MOE でもいくつかのフェロモンを捕らえることが示唆されているが(Mandiyani et al. 2005; Ohara et al. 2009)、フェロモン受容は主に鋤鼻器で行われていると考えられており、その機能は生存に欠かせないものである。例えばマウスを用いた実験では鋤鼻器の存在が特に生殖行動や社会的な行動において重要であることが示されている(Meredith 1986; Wysocki and Lepri 1991)。そのため、鋤鼻器は多くの哺乳類が保持しているが(Doving and Trotter 1998)、一方でいくつかの種では退化していることが知られる(図 2.1)。クジラ類やジュゴン、マナティのような海牛類では水棲適応によって鋤鼻器を失っている(Lowell and Flanigan 1980; Switzer et al. 1980; Mackay-Sim et al. 1985; Oelschläger 1989)。半水棲哺乳類である鰭脚類(アザラシ科、アシカ科、セイウチ科)ではアシカ科とセイウチ科では鋤鼻器を保持している一方、アザラシ科では鋤鼻器が失われており、同じ鰭脚類の中でも差がある(Mackay-Sim et al. 1985)。狭鼻猿類は昼行性への移行と3色覚の獲得によって視覚の重要性が増したトレードオフで鋤鼻器を失ったとされる(Dixson 1983; Bhatnagar and Meisami 1998)。狭鼻猿類の近縁である広鼻猿類は鋤鼻器を保持するが、いくつかの組織の縮小が指摘されている(Hunter et al. 1984; Smith et al. 2011)。コウモリ類では Phyllostomidae と Miniopteridae の 2 科を除くすべての種で鋤鼻器が退化している(Wible and Bhatnagar 1996)。コウモリ類における鋤鼻器は各科ごとに独立して退化したとされるが、退化した理由については未だはっきりしない。

TRPC2(transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2)は鋤鼻神経細胞に特異的に発現するチャンネル遺伝子であり、鋤鼻器の機能に欠かせないことが示されている(Stowers et al. 2002; Liman and Dulac 2007)。TRPC2 の探索を行った先行研究では、狭鼻猿類(Liman and Innan 2003; Zhang and Webb 2003)、クジラ類(Yu et al. 2010)、コウモリ類(Zhao et al. 2011; Yohe et al. 2017, 2018)、カワウソ類とアザラシ類(Yu et al. 2010, Hecker et al. 2019)において TRPC2 の偽遺伝子化と鋤鼻器の退化がよく相関している(図 2.1)。そこで、TRPC2 は鋤鼻器が機能しているかどうかを判定する遺伝子マーカーとして用いられてきた。

最近、ancV1R という鋤鼻器特異的に発現する遺伝子が新たに同定され、鋤鼻器の遺伝子マーカーとして提案されている(Suzuki et al. 2018)。ancV1R は V1R 遺伝子ファミリーに属しているが、ほとんどの硬骨魚類で 1 コピーとして保存され、また鋤鼻神経細胞で他の V1R 遺伝子と同時に発現しているという通常の V1R 遺伝子とは極めて異なる特徴を持つ(Suzuki et al. 2018)。このことから、ancV1R は通常の V1R 遺伝子のようなフェロモン受容体ではなく TRPC2 と同様に鋤鼻器の機能の中枢を担う遺伝子だと考えられる。

本章の研究では、研究当時に NCBI データベースに登録されたすべての脊椎動物のゲノム情報を用いて ancV1R 遺伝子を網羅的に取得し解析した。配列の解析では以下の 2 点の検出を遺伝子機能

の損失として定義した: ①遺伝子機能を破壊する有害な変異(フレームシフト変異、ナンセンス変異)の探索、②遺伝子にかかる選択圧の弛緩( $d_n/d_s$ 値の上昇)と統計有意性の検定。この2点は機能が失われた遺伝子に見られる特徴であり、片方だけでは偽陽性の可能性がある(①はアッセンブリーエラー等に起因する可能性があり、②はランダム変異によるノイズや正の自然選択に起因する可能性がある)。そのため一般的には偽遺伝子と言え、①のみを指す場合が多いが、本稿では偽遺伝子化を元々は機能的だった遺伝子が現在機能が失われている状態であると定義してこの2点に基づいた判定を行った。この判定基準に基づいて、まずは鋤鼻器退化が既知なクジラ類、海牛類、狭鼻猿類、コウモリ類で解析を行ったところ、基準として設けた両方が検出された。これにより、ancV1Rの機能が損失していることは鋤鼻器が退化していることを示すのに十分であることを示した(図2.1)。これによって ancV1R が新規の遺伝子マーカーとして TRPC2 と同様に有効であることを確認した。次にこの2点が検出された種を網羅的に探索したところ、アザラシ科、カワウソ亜科、フォッサ、ヨザルとハーテビースト亜科で ancV1R の遺伝子機能が失われているを発見した。これらの種では鋤鼻器の機能や退化が未知または十分に研究されていない種である。これらの種における鋤鼻器退化の可能性をより深く評価するために、TRPC2 の配列も取得し同様の解析を行ったところ、TRPC2 も ancV1R と同様に機能が失われていることが示唆された。以上のことにより、本章の研究ではこれらの種を鋤鼻器が退化した種として新たに提案する。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 データマイニングと配列アライメント

ancV1R の配列取得には、先行研究(Suzuki et al. 2018)で特定された ancV1R の配列をクエリーとし、NCBI whole-genome shotgun contig database に登録されたすべての脊椎動物のゲノム配列に対して tBLASTn で検索をかけた。tBLASTn の検索は目ごとに行い、検索を行った目に所属する代表1種の配列をクエリーとしてそれぞれ用いた。その結果、ancV1R は古代魚4目(ポリプテルス、ガーパイク、チョウザメ、シーラカンス)、両生類2目、爬虫類4目、哺乳類23目を含む全341種で特定された(表2.1)。さらに取得できた配列の中から下記の配列を解析から取り除いた。まず、配列中にNを含む種はアッセンブリー時にエラーがあるため除いた。次に、同属に属する種同士の配列は冗長性を排除するため代表1種の配列を残しすべて除いた(表2.1)。その結果、残った298種の配列を解析に用いた。解析に用いた配列はすべてアミノ酸に翻訳し、配列途中で終止コドンが含まれる配列は偽遺伝子化した配列候補として振り分けた。この操作は Biopython (Cock et al. 2009) で自動化し、有害な変異を持つ配列は目で見て確認をした。配列途中で終止コドンを含まない配列は完全な配列(intact)として MAFFT(Katoh et al. 2002)の linsi(Katoh et al. 2005)のデフォルトパラメータを用いて配列アライメントをした。アライメントしたアミノ酸配列は PAL2NAL(Suyama et al. 2006)で元の核酸配列と照合してコドンのアライメントデータを生成した。有害な変異が入っていた種の核酸配列は MAFFT の --add オプション(Katoh and Frith 2012)を用いてこのコドンアライメントへと挿入した。この統合したアライメントを用いてフレームシフト変異やナンセンス変異などをもたらした変異を特定した。このような変異はアッセンブリーエラーに起因する場合があるので、

各種のゲノム情報の元となった次世代シーケンサーの生データである DNA 断片(NCBI short read archive [SRA] data: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>)を megaBLAST で検索し、生データ上に所定の変異が本当に存在するかをすべての種で調べた。

ancV1R に有害な変異の入った種が TRPC2 でも変異しているのかを確かめるために同様の操作を TRPC2 についても行った。TRPC2 はイントロン-エキソン構造が複雑なため、1 エキソンとしては最も長く保存性も高い exon 12 の配列を用いた。TRPC2 exon 12 は 720bp かつ翻訳フェイズが 0 から始まる。配列の取得では Ensembl データベース上にあるウシとマウスの TRPC2 の配列データ (Ensembl ID: ENSBTAE00000396459 and ENSMUSE00001323118)をクエリーとしてアフリカ獣上目、霊長目、食肉目、コウモリ目のゲノム配列上を検索した。取得した TRPC2 の配列は ancV1R と同様にアライメントし変異を確認した。

## 2.2.2 系統樹構築

ancV1R 遺伝子の系統樹は RAxML 8.2.4 (Guindon and Gascuel 2003)を用いて構築した。系統樹構築に用いる塩基置換モデルの推定には jModelTest2 (Darriba et al. 2012)を用い、その結果 GTR+I+G モデルが AIC(Akaike Information Criterion)スコア上もっとも適するモデルとして推定された。各ノードにおける分岐の信頼性は bootstrap 法で 1000 個のブートストラップを生成して評価した(図 2.2 および図 2.4)。ancV1R 遺伝子の外群には先行研究(Suzuki et al. 2018)に基づいて V1R5 と V1R6 を用いた。

## 2.2.3 選択圧解析

遺伝子に対する変異は、アミノ酸配列を変える変異である非同義置換とアミノ酸配列を変えない同義置換に分けることができる。非同義置換が起こり得る場所の数に対する実際の非同義置換数( $d_n$ )と同義置換が起こり得る場所の数に対する実際の同義置換数( $d_s$ )を考えるとする。遺伝子は常に変異に晒されているが、非同義置換は遺伝子の機能に悪影響を与える確率が高いため、機能を持つ遺伝子に非同義置換が入った個体は集団から排除される確率が高く、その結果置換が起きてもその集団全体の平均的な遺伝子配列として残らない。それにより、遺伝子配列を観察すると非同義置換が排除されている力が働いているように見えるので、この見かけ上の力を選択圧という。機能を持つ配列は選択圧が働いているため遺伝子配列を観察すると  $d_n < d_s$  となる。しかし遺伝子が機能を失った場合、遺伝子の領域には自由かつランダムに変異が入るため、理論上  $d_n = d_s$  となる。また、適応進化によって遺伝子の機能が刷新される場合、集団の平均的な配列としては非同義置換が多く導入されるため、 $d_n > d_s$  となる。

ancV1R 遺伝子と TRPC2 遺伝子にかかる選択圧( $\omega$  値、 $d_n/d_s$  値)の最尤推定には PAML4.8(Yang 2007)を用いた。偽遺伝子化に伴う  $d_n/d_s$  値の上昇の有意性を検定するために、PAML 中に実装されている branch model (Yang 1998; Yang and Nielsen 1998)を用いた。branch model は系統樹上で機能を失った種(または類)の枝を foreground branch とし、機能を維持している種の枝を background branch としたときの両者の値が異なると仮定してそれぞれの  $d_n/d_s$  値を推定としたときの尤度、つ

まり  $d_N/d_S$  値が foreground branch で上昇したと仮定したとき(対立仮説)の尤度と、foreground branch と background branch の  $d_N/d_S$  値が同じ値である、つまり  $d_N/d_S$  値の上昇が発生しなかったと仮定したとき(帰無仮説)の尤度を尤度比検定し、統計的有意性を調べる方法である。これら一連の選択圧解析は、偽遺伝子化した ancV1R または TRPC2 を持つ種を含む目単位で行った。つまり foreground には偽遺伝子化した分類群を設定し、background には機能を維持していると考えられる intact な配列を持つ同目内の種すべてを設定した。

各目ごとのデータセットは配列のアライメントと系統樹で構成される。配列アライメントは前述のアライメントから任意の目に所属する種の配列を抜き出して目ごとの配列アライメントを再構築した。配列アライメントの入力はコドンアライメントでなければいけないため、フレームシフト挿入変異が入ったカラムはアライメントから削除した。各系統樹の樹形は ancV1R や TRPC2 の遺伝子から構築された系統樹ではなく Open Tree of Life database (Hinchliff et al. 2015)に登録されている全ゲノム情報などに基づいて構築された種の系統樹を用いた(図 2.5)。ハーテビースト亜科を含むアンテロープの樹形は Open Tree of Life database に登録されていなかったため Bärman et al. (2013)と Chen et al. (2019)で決定した樹形を参照した。

$d_N/d_S$  値の最尤推定に用いるコドン頻度のモデルは、以下 4 つのモデルの尤度を求め AIC 値に基づいて最適なモデルを決定した: CF0 (どのコドンの頻度も均等であると仮定する)、CF1(コドンの頻度を塩基の出現頻度の平均値から算出する)、CF2(コドンの頻度を第三コドンに登場する塩基の頻度から算出する)、CF3(コドン頻度もフリーパラメーターとして推定する)。コドン頻度モデルの決定には intact な配列を持つ哺乳類の種全体を用いた。その結果、CF0 が ancV1R(表 2.4)で支持され、CF1 が TRPC2(表 2.5)で支持された。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 鋤鼻器退化が既知な種における偽遺伝子化

本章の研究では、合計で脊椎動物 298 種の ancV1R の配列を解析した。先行研究(Suzuki et al. 2018)同様に、真骨魚類と鳥類では ancV1R は発見できなかった。また、ワニ類とカメ類では ancV1R の配列に多くの挿入と欠失が入っており遺伝子としての機能を失っていた(表 2.3)。これらの分類群における結果は解剖学的にこれらの分類群では鋤鼻器(VNO)を保持していないことによく合致している(Silva and Antunes, 2017)。一連の配列取得では ancV1R はほとんどすべての生物で 1 コピーで保存されており遺伝子重複が起きていないことを確認した。例外はアフリカツメガエルであり、アフリカツメガエルでは intact な遺伝子(機能を保持している遺伝子)を 1S 染色体に、偽遺伝子化した遺伝子を 1L 染色体に保持していた。これはアフリカツメガエルが異種交配によって誕生したが異種の染色体がそのまま倍数体として存在し続けた結果、2 つのサブゲノムが混在していることによると考えられる。

ancV1R 遺伝子が intact であると判定された哺乳類 201 種うち、長さの最頻値は 972bp であり 167 種の哺乳類はこの長さで保存されている(表 2.2)。残りの 34 種はインフレームな挿入や欠失が見られた。ancV1R の遺伝子から作成した最尤系統樹(図 2.2)は偽遺伝子を含む状態でも概ねゲノム情報

全体から構築された種の系統樹と一致している。一般に遺伝子から作成した系統樹は種の分化について十分な情報量を持たないため上目や目単位でもまとまりが崩れやすい。ancV1R の遺伝子から作成した系統樹は少なくとも上目単位の分岐は確立された種の系統樹と一致しており、目単位のすべてが単系統としてクラスタリングされているため、1kbp 弱の長さの遺伝子としては系統に対する情報量が豊富であると言える。また、遺伝子の系統樹は特に遺伝子重複が起きると樹形が種の系統樹から崩れてしまうことが知られている。そのため今回の系統樹推定の結果は ancV1R が遺伝子重複を経験せずに 1 コピーで保存されていることおよび今回取得した遺伝子はすべてオーソログであることを示す。

哺乳類において鋤鼻器が退化している種としては海牛目、クジラ亜目、狭鼻猿類(狭鼻小目)が知られており(コウモリである翼手目については後述)、これらの分類群で ancV1R に有害な変異が入っていることが先行研究で示されている(図 2.1; Suzuki et al. 2018)。本研究ではより詳細に各偽遺伝子化をもたらした変異を特定した。海牛目のマナティは 2 つのフレームシフト挿入と 1 つのフレームシフト欠失および 2 つのナンセンス変異が入っている(図 2.3A)。クジラ亜目では各系統で個別に多くの変異が入っているが、亜目内で一つのフレームシフト欠失を共有している(図 2.3B)。狭鼻小目では 3 つの科(ヒト科、テナガザル科、オナガザル科)それぞれで独立に変異が入っている(図 2.3C)。ヒト科は 1 つのナンセンス変異を共有する。テナガザル科は 1 つのフレームシフト欠失と 1 つのナンセンス変異を持つ。オナガザル科は 1 つのフレームシフト欠失と 1 つのフレームシフト挿入を共有する。

本章の研究では変異に加えて、鋤鼻器が退化した分類群の持つ配列にかかる選択圧( $\omega = d_N / d_S$ )の最尤推定とこれらの分類群で選択圧が有意に弛緩していることを解析した。選択圧の比較解析では(i)偽遺伝子を持つ分類群と(ii)intact な遺伝子を持つ分類群の 2 カテゴリーで  $d_N / d_S$  値を推定したときの尤度と、(i)と(ii)の  $d_N / d_S$  値をイコールとして  $d_N / d_S$  値を推定した 1 カテゴリーでの尤度を尤度比検定して、(i)における選択圧弛緩の統計的な有意性を確認した(図 2.3A-C)。2 カテゴリーで推定したときの(i)であるマナティ(1.99)、クジラ亜目(1.09)、狭鼻小目(1.08)の  $d_N / d_S$  値はいずれも(ii)であるアフリカ獣上目(0.38)、鯨偶蹄目(0.46)、霊長目(0.44)よりも上昇していた。尤度比検定の結果いずれの  $d_N / d_S$  値の上昇も有意( $P = 2.7 \times 10^{-4}$ ,  $1.4 \times 10^{-7}$  および  $1.0 \times 10^{-5}$ ; 表 2.6)であった。偽遺伝子には機能的制約による選択圧がかからないため、 $d_N / d_S$  値の理論値は 1 である( $d_N = d_S$ , 完全ランダムに変異が種内で保存される場合)。クジラ亜目と狭鼻小目の  $d_N / d_S$  値はほぼ 1 になっておりおおよそ理論値の通りになっていることがわかる。マナティの  $d_N / d_S$  値は 1.99 と 1 よりも 2 倍大きい値であるがこれはおそらく最尤推定時のパラメーター推定(枝の長さの推定、核酸やコドンの置換率の推定等)に誤りがあったからであろう。

海牛目、クジラ亜目、狭鼻小目において、TRPC2 遺伝子(12 番エキソンのみ)についても同様の解析を行い、ancV1R の結果を補強した。TRPC2 における各分類群の変異と  $d_N / d_S$  値は図 2.6A-C の通りである。これらの分類群における  $d_N / d_S$  値の上昇はすべて有意であるため( $P = 5.0 \times 10^{-6}$ ,  $3.2 \times 10^{-21}$  および  $1.4 \times 10^{-21}$ ; 表 2.7)、ancV1R と同様に TRPC2 においても機能的制約による選択圧が失われていることがわかる。TRPC2 の  $d_N / d_S$  値は偽遺伝子と intact な配列の両方で ancV1R よりも低い値が出ているが、これは TRPC2 にかかる選択圧が ancV1R よりも強いことを示しているであろう。

これらの結果から、ancV1R の機能は未だ不明であるが ancV1R の偽遺伝子化は TRPC2 の偽遺伝子化と強く相関しており、TRPC2 と同様に鋤鼻器における重要な機能を担うと考えられる。このことは ancV1R の偽遺伝子化が鋤鼻器の退化を推定するのに十分であることを示している。

### 2.3.2 半水棲哺乳類における偽遺伝子化

前小節で示したような ancV1R の先行研究(Suzuki et al. 2018)で変異が示されている種に対する偽遺伝子化の判定に加え、今回の探索では新たに半水棲哺乳類であるカワウソ亜科とアザラシ科で ancV1R の偽遺伝子化を発見した。

カワウソ亜科では、オオカワウソとラッコの両方ともフレームシフト変異によって遺伝子配列が壊れていた。この変異はどちらも 1 塩基の挿入であるが、オオカワウソとラッコで異なる場所に入っていることから、ancV1R は水棲適応が行われたカワウソ亜科の共通祖先よりも後に独立して変異が入ったことが示唆される(図 2.3D)。カワウソ亜科全体の  $d_N/d_S$  値(0.88)は background である食肉目全体の推測値(0.40)よりも大きく、 $P < 0.05$  水準で有意である( $P = 0.029$ ; 表 2.6)。そのため偽遺伝子化はカワウソ亜科の共通祖先が水棲適応した後に起きたが、変異はあくまでランダムに入るためたまたま共通祖先のときに配列を壊すような変異が入らなかったのだろう。

アザラシ科では解析に用いた 4 種のうち 1 種(キタゾウアザラシ)にフレームシフト欠失があるが、他の 3 種の配列は intact であった(図 2.3E)。そのため、選択圧解析では変異が入っているキタゾウアザラシのみが偽遺伝子化して他のアザラシでは偽遺伝子化していない可能性を考慮するために、キタゾウアザラシ、他のアザラシの枝、background(他の鰭脚類および食肉目)の 3 つのカテゴリーに分けて  $d_N/d_S$  値を最尤推定しその尤度を求めた。キタゾウアザラシの  $d_N/d_S$  値の推定値である 999 はキタゾウアザラシに同義置換が見つからず非同義置換しか存在しないことを示す。配列の変異は非同義置換となる場合の数のほうが多いため、分岐から時間が十分に経過していない枝ではこのように同義置換が見つからない場合がある。他のアザラシ科の枝では  $d_N/d_S$  値が 1.28 と background(0.40)より高く、アザラシ科での選択圧の弛緩は有意である( $P = 0.0068$ , 表 2.6)。そのためアザラシ科では配列の見た目が intact でも偽遺伝子化して機能を失っていると考えられる。なお、アザラシ科の近縁であるアシカ科とセイウチ科も同様に水棲適応しているが、ancV1R の配列は intact であり  $d_N/d_S$  値も 0.40 前後で background と同等である(data not shown)ため、アシカ科とセイウチ科の ancV1R は機能を保っている。このアザラシ科とアシカ科、セイウチ科の鋤鼻器機能退化の違いは、水棲適応度合いの違いが反映されていると考えられる。

次にカワウソ亜科とアザラシ科について TRPC2 でも同様の解析を行った。カワウソ亜科では配列を壊す変異は 2 種とも見られなかったが、カワウソ亜科の  $d_N/d_S$  値(0.49)は background(0.12)と比べて有意に上昇している( $P = 4.2 \times 10^{-4}$ ; 表 2.7)。先行研究ではカワウソ亜科について本研究で用いた TRPC2 の 12 番エキソン以外の場所での変異が報告されている。Yu et al. 2010 ではユーラシアカワウソ(*Lutra lutra*)の 11 番エキソンにナンセンス変異があることを指摘している。また、Hecker et al. 2019 ではラッコ TRPC2 の 1 つのスプライシングサイトに変異があることを指摘している。これらのことから、カワウソ亜科の TRPC2 が偽遺伝子化していることがわかる。一方アザラシ科では、1 つのナンセンス変異が 4 種すべてに共通しており(図 2.6D)、 $d_N/d_S$  値が有意に上昇している

( $P = 8.7 \times 10^{-7}$ ; 表 2.7)ため、TRPC2 の偽遺伝子化は明らかである。このように、TRPC2 の結果は ancV1R の結果と一致しており、ancV1R での知見を補強する。

### 2.3.3 陸棲哺乳類における偽遺伝子化

陸棲哺乳類では新たにフォッサ(マダガスカルマンゲース科)、ヨザル(ヨザル科)、ハーテビースト亜科で ancV1R の偽遺伝子化を発見した。TRPC2 や ancV1R の先行研究においてもこれらの種での偽遺伝子化は確認されていないため、これらの種における遺伝子の側面からの鋤鼻器退化の示唆は新規の結果である。水棲哺乳類では水棲適応に伴って鋤鼻器が退化するのに対して、陸棲哺乳類での鋤鼻器の退化には体系的な因果関係を見いだせない。例えば、先行研究までに(飛行可能なコウモリを除く)陸棲哺乳類で唯一鋤鼻器の退化が指摘されている霊長目では、他の哺乳類に対して際立った生態的特徴は 3 色覚の獲得等の視覚の発達である。この視覚の進化によって視覚の重要性が増したトレードオフのために鋤鼻器が不必要になったと考えられるが、発達した鋤鼻器を持つ有袋類でも 3 色覚は独立に獲得している。そのため陸棲哺乳類での鋤鼻器の退化は、体系的な因果関係を持つというよりは各系統における個別の事情による結果という側面が強いであろう。

フォッサは食肉目マダガスカルマンゲース科に属する大型の肉食動物である。マダガスカルマンゲースはマダガスカル島に渡ったマンゲース科の祖先が適応拡散した一群であり(Yoder et al. 2003)、生態も形態もネコ科に類似する。ネコ科はフレーメン反応や様々なフェロモン様の仕草で知られるので発達した鋤鼻器を持つと考えられるが、フォッサでは鋤鼻器が退化しているという示唆は驚きである。フォッサの ancV1R は 1 つのナンセンス変異と 1 つのフレームシフト欠失によって壊れている(図 2.3F)。フォッサの  $d_N/d_S$  値(1.52)は background の食肉目(0.40)より上昇しているが、これは  $P < 0.05$  水準では有意でなかった( $P = 0.055$ ; 表 2.6)。一方フォッサの TRPC2 では、一つのナンセンス変異を確認した(図 2.6E)。また、その  $d_N/d_S$  値(0.45)は background(0.12)と比較して有意に上昇している( $P = 0.0055$ ; 表 2.7)。よって ancV1R と TRPC2 の両方の結果から、フォッサではどちらの遺伝子も機能を失っており鋤鼻器が退化していると考えられる。フォッサにおける鋤鼻器退化の因果関係は不明であり鋤鼻器の解剖学的な研究も存在しない。また、マダガスカルマンゲース科のゲノムデータがフォッサしか存在しないため、マダガスカルマンゲース科と鋤鼻器退化の関係を探るためにはさらなるサンプルが必要である。

ヨザルは新世界ザル(広鼻小目)と呼ばれる南米で適応拡散した霊長目の一群である。新世界ザルはアジア・アフリカ大陸で適応拡散した旧世界ザル(狭鼻猿類)と同様に昼行性であるが、旧世界ザルと違い大部分の種が 2 色型色覚である。新世界ザルの中でもヨザル科は夜行性に再適応していることで知られる。そのためヨザルの視覚は更に退化した 1 色型色覚である。夜行性適応は 1.2 節で哺乳類祖先に言及したときに触れたように、一般的には視覚の退化と嗅覚の発達を伴うが、ヨザルでの鋤鼻器退化の示唆はこの結果と逆行している。ヨザルの ancV1R の配列一つのフレームシフト欠失が入っており(図 2.3G)、その  $d_N/d_S$  値(0.83)は background である霊長目(0.40)と比較して上昇し TRPC2 における  $d_N/d_S$  値の上昇は先行研究(Liman and Innan 2003)でも指摘されている。以上の結んでいるが、この上昇は有意でない( $P = 0.26$ ; 表 2.6)。ヨザルの TRPC2 には変異はなかったが、 $d_N/d_S$  値(0.83)が background(0.13)と比べて有意に( $P = 0.0055$ ; 表 2.7)上昇している。このヨザルの果

から、ヨザルの ancV1R には有害な変異が入っているが、ancV1R と TRPC2 のどちらも変異か有意な  $d_N/d_S$  値の片方しか見られないため偽遺伝子化しているとは確定できない。

ハーテビースト亜科(鯨偶蹄目ウシ科)は他のアンテロープ(ウシ科からウシ亜科とヤギ亜科を除いた分類群)と同様にアフリカ大陸の特にサバンナに生息する。ハーテビースト亜科は 4 属(ハーテビースト属、ダマリスキス属、ヒロラ属、ヌー属)で構成される。ハーテビースト亜科で特徴的なのはフレーメン反応の消失である。フレーメン反応は哺乳類において見られる匂い(フェロモン)を嗅ぎ取った際に唇を引き上げたり舌を晒したりする生理現象であり、イエネコでは変顔を作る反応として知られる。一般にウシ科は発達した鋤鼻器を保持し実際にフェロモンが特定されている科でもある。ハーテビースト亜科では 4 属のうち、ヌー属を除く 3 属でフレーメン反応の消失が確認されており、口腔から鋤鼻器へと通じるトンネル(鼻口蓋管)が退化して閉じている(ハーテビースト属)またはごく小さなものになっている(ダマリスキス属; ヒロラ属は未確認)ことが確認されている(Hart et al. 1987)。他に鋤鼻器の退化とつながるようなハーテビースト亜科の特性は現在報告されていない。ハーテビースト亜科 4 属はどれも 1 種ずつゲノム配列が登録されている。研究に用いたハーテビースト亜科 4 種のうち、ハーテビーストの ancV1R にはスタートコドン変異(図 2.3H)が見られ、このスタートコドンの前後 100bp 以内に代わりとなるインフレームな ATG が見つからなかったため、この変異によってハーテビーストの ancV1R の機能が失われていると推測できる。他の 3 種では配列が intact であった。フレーメン反応の消失と鋤鼻器関連器官がヌーを除く 3 属で見られるのに対して ancV1R の変異はハーテビーストでのみ発見されたため、 $d_N/d_S$  解析は(i)ハーテビースト、(ii)残り 2 属(ヒロラ: ヒロラ属; トピ: ダマリスキス属)、(iii)オグロヌー(blue wildebeest; ヌー属)、(iv)background(鯨偶蹄目)、の 4 カテゴリーでそれぞれ  $d_N/d_S$  値を推定した。ハーテビーストの  $d_N/d_S$  値は 999 でこれは同義置換が存在しなかったことを示しており、ハーテビーストの分岐から十分な時間が経っていないためにうまく  $d_N/d_S$  値が推定できなかったことを意味する。トピとヒロラの枝では 1.77 と大きく上昇している。これに対してオグロヌーでは 0.44 であり background の値が 0.45 であることを考えるとほとんど同じ値である。しかしながらこの  $d_N/d_S$  値変化は  $P < 0.05$  水準で有意ではない( $P = 0.091$ ; 表 2.6)ので、ancV1R が偽遺伝子化しているとは断定できない。また、トピとヒロラでは配列が intact であり  $d_N/d_S$  値の上昇には噛み合っていない。これに加えて TRPC2 もほぼ同じ結果を示している。TRPC2 の配列は 4 種すべてで intact であり変異が見つからなかった。しかしながら  $d_N/d_S$  値は ancV1R と同様にヌー属を除くハーテビースト亜科 3 属で上昇しておりこの上昇は統計的に有意である( $P = 0.001$ ; 表 2.7)。以上の結果からハーテビースト亜科におけるそれぞれの  $d_N/d_S$  値はハーテビースト亜科におけるヌー属を除くフレーメン反応の消失をよく反映しているが、ancV1R と TRPC2 のいずれの結果も配列に対する変異と  $d_N/d_S$  値上昇が明確に一致しているわけではない。ancV1R と TRPC2 の両方の結果からハーテビースト属では鋤鼻器が退化しているかもしれないが、トピ(ダマリスキス属)とヒロラ(ヒロラ属)ではさらなる検証が必要である(第 3.3.3 小節)。

### 2.3.4 翼手目における偽遺伝子化

コウモリ(翼手目)は前肢が翼に変形し哺乳類の中で唯一飛行可能な分類群である。飛行能力の獲

得により世界中に適応拡散した結果、コウモリは現存の哺乳類の中で 2 番目に大きな分類群でもあり豊富な多様性を持つ。コウモリの特徴としては飛行能力の他に超音波による反響定位能力が挙げられる。この反響定位能力のためにコウモリの聴覚が大きく発達しており、周囲の状況確認から捕食まで用いられる。しかし反響定位能力はコウモリの共通祖先で獲得したわけではなく、おおよそコウモリの科ごと、場合によっては種ごとに独立して獲得したと言われる(Yohe et al. 2017)。そのため科同士や科内でも複雑な多様性がある。同様に、2 科(Miniopteridae: ユビナガコウモリ科, Phyllostomidae: ヘラコウモリ科)を除くコウモリの大部分で鋤鼻器は退化しているが、おおよそ科ごとに独立して鋤鼻器が退化しているとされる(Yohe et al. 2017)。鋤鼻器退化の原因は反響定位能力の獲得とも飛行能力の獲得とも言われるが、いずれも鋤鼻器のありなしとは相関しないため定説はない。

ancV1R についての先行研究(Suzuki et al. 2018)では解析した 8 種 5 科(下記 3 科+ Miniopteridae, Phyllostomidae)のうち 3 科(Vespertilionidae, Rhinolophidae, Pteropodidae)で配列の変異を発見した。今回の研究では 11 科 33 種のより広い探索を行った。その結果、ancV1R および TRPC2 の偽遺伝子化はいくつかの種で鋤鼻器退化と相関しているが、いくつかの種ではそうではなく、複雑なコウモリの進化過程を伺わせる(表 2.8)。ancV1R に偽遺伝子化をもたらす変異の入った科は Vespertilionidae, Molossidae, Noctilionidae, Rhinolophidae, Pteropodidae の 5 科である(図 2.3I)。Vespertilionidae(ヒナコウモリ科)では同一のサイトに種ごとに異なる塩基数のフレームシフト挿入が入っている。Molossidae (オヒキコウモリ科)ではスタートコドン変異と終止コドン変異の両方が存在する(それぞれの代替候補は 16bp 下流、25bp 下流である)。Noctilionidae(ウオクイコウモリ科)では終止コドン変異があり、100bp 下流以内には代替候補が存在しない。Rhinolophidae(キクガシラコウモリ科)と Pteropodidae(オオコウモリ科)ではそれぞれ異なる位置にフレームシフト挿入が入っている。残りの 6 科は配列レベルでは intact であった。TRPC2 の変異については煩雑なため結果のみを表 2.8 に記述した。ancV1R と TRPC2 では変異の結果が 3 科(+種)で食い違っている。TRPC2 では ancV1R で有害な変異が入っていた 5 科に加えて、Mormoopidae(クチビルコウモリ科)、Hipposideridae(カグラコウモリ科)、Megadermatidae(アラコウモリ科)の 3 科で変異が見つかるが、これらの科の ancV1R は intact である。また、鋤鼻器を保持する Miniopteridae と Phyllostomidae に加えて鋤鼻器の存在が不明な Craseonycteridae(ブタバナコウモリ科)の 3 科が ancV1R と TRPC2 の両方で intact である。

このようにコウモリにおける鋤鼻器退化の過程には不明な点が多いので、ancV1R と TRPC2 の  $d_N/d_S$  値の推定にはそれぞれの科にカテゴリーを割り当てて科ごとの  $d_N/d_S$  値を計算した。この科ごとに  $d_N/d_S$  値を分割したモデルは ancV1R と TRPC2 の両方で統計的に有意であり( $P=4.8 \times 10^{-4}$ ,  $2.3 \times 10^{-13}$ ; 表 2.7)、それぞれの科が分岐後に十分な変異を蓄積していると考えられる。まずは ancV1R と TRPC2 で配列にかかる変異の結果が両方とも有害な変異が入っている 5 科と両方とも intact である 3 科について記載する。ancV1R では background(比較的近縁な奇蹄目を用いた)の 0.43 の値と比較して、配列に変異の入っている Pteropodidae (0.90), Rhinolophidae (0.73), Molossidae (1.93)と Vespertilionidae (1.06)では大きく  $d_N/d_S$  値が上昇しており変異によって偽遺伝子化していることが確認された(図 2.3I)。TRPC2 でも background が 0.11 なのに対して Pteropodidae (0.86), Rhinolophidae (0.83), Molossidae (1.56)のすべてが大きく  $d_N/d_S$  値が上昇しているところは ancV1R

と同様である(Vespertilionidae では TRPC2 の配列が未発見)。しかし Noctilionidae は ancV1R も TRPC2 も  $d_N/d_S$  値の上昇が微量で(0.56, 0.27)で判別が難しい。また、配列が両方 intact な Phyllostomidae(0.54, 0.15), Miniopteridae(0.48, 0.10), Craseonycteridae(0.63, 0.12)ではそれぞれの background と比較して微量もしくはほとんど変わらない値である。これらの種は鋤鼻器を保持していることを考えるとこれらの種における  $d_N/d_S$  値の微量な上昇はノイズによるものであろう。同時に Craseonycteridae は鋤鼻器の解剖学的記述が存在しないが、これらの結果からおそらくコウモリの中で鋤鼻器を保持する 3 番目の科であると推測できる。

ancV1R と TRPC2 とで有害な変異があるかないかが食い違う 3 科の結果はいずれもはっきりしない。Hipposideridae(0.62, 0.54)と Megadermatidae(0.55, 0.35)は ancV1R が intact で TRPC2 には変異が入っているが、それらの  $d_N/d_S$  値はいずれも background や鋤鼻器を保持する 3 科と比較して上昇が軽微である。この 2 つの科はいずれも鋤鼻器を保持していないため、ancV1R も TRPC2 も偽遺伝子化していると考えられるが、配列からだけでは決めるのが難しいため鼻器における遺伝子発現解析などが必要である。Mormoopidae では科内で多様性がある。今回用いた Mormopidae に所属する 2 種のうち Parnell's mustached bat は鋤鼻器を保持しており、Antillean ghost-faced bat では鋤鼻器が退化していると報告されている(Yohe et al. 2017)。これに対して、ancV1R は両種で intact である。TRPC2 は今回の調べた範囲ではどちらも intact であるが、Antillean ghost-faced bat では有害な変異があるという報告がある(表 2.8)。また ancV1R と TRPC2 の  $d_N/d_S$  値は Parnell's mustached bat では 0.92 と 0.25 で、Antillean ghost-faced bat では 0.68 と 0.63 であり  $d_N/d_S$  値の上昇と ancV1R, TRPC2 の配列への変異および鋤鼻器の保持とが相関していない。そのため、Mormopidae においても遺伝子発現解析や他の関連遺伝子の探索による再検討が必要と考える。

## 2.4 結論

本研究では偽遺伝子化を遺伝子配列が機能を失うことと定義し、ancV1R と TRPC2 という 2 つの鋤鼻器マーカー遺伝子に対する (i)有害な変異と(ii)  $d_N/d_S$  値上昇の統計的な有意性の 2 つの観点から偽遺伝子化の判定を行うことで鋤鼻器の退化を推測した。(i)はアッセムブリエラーに起因する可能性があり、(ii)はランダム変異によるノイズや正の自然選択に起因する可能性があるため、この 2 点両方を基準とする理由は偽陽性をなるべく減らすための措置である。

哺乳類全体を網羅的に探索したところ、海牛目、クジラ亜目、狭鼻小目、翼手目といった解剖学的に鋤鼻器の喪失が示されている種以外にも、水棲哺乳類であるカワウソ亜科、アザラシ科および陸棲哺乳類であるフォッサ(マダガスカルマンゲース科)、ヨザル(ヨザル科)、ハーテビースト亜科で偽遺伝子化の兆候を発見した。同時に、翼手目内でも鋤鼻器の退化に関するさらなる多様性を発見した。この中で、(i)と(ii)の両方の基準を満たすのは鋤鼻器退化が既知な種以外ではカワウソ亜科、アザラシ科およびフォッサであり、ヨザルとハーテビースト亜科は今回の探索では不十分であったため更なる鋤鼻器関連遺伝子の比較解析が必要である。

ヨザルは ancV1R が(i)を満たすが(ii)を満たさず、TRPC2 が(i)を満たさず、(ii)を満たす。この場合、ancV1R の(i)変異がゲノムデータ生成時のアッセムブリエラーである可能性があるため、例

例えばヨザルの生体サンプルから ancV1R の領域を取ってシーケンシングし、実際に変異が入っているかどうかを確認する必要がある。

ハーテビースト亜科はもっと複雑である。生態としてハーテビースト亜科ではヌー属を除く 3 属でフレーメン反応の消失と鋤鼻器の組織の一部縮小が確認されている。しかし ancV1R ではハーテビースト(属)のみが(i)を満たし(ii)を満たさない。TRPC2 では(i)を満たさず(ii)を満たす。ハーテビースト亜科 3 属はヌー属からの分岐を考えると分岐から有意性を確保するだけの十分な変異が蓄積していない可能性が高い。また、ancV1R への変異がハーテビースト属にのみ入っていることがハーテビースト属のみ鼻口蓋管が退化していることに合致することから、ハーテビースト 3 属内にも鋤鼻器退化における多様性がある可能性がある。

翼手目では、鋤鼻器を保持している既知の 2 科に加えて、新たに 1 科(Craseonycteridae)で鋤鼻器を保持している可能性を示した。他の翼手目では鋤鼻器の退化が示されているが、ancV1R と TRPC2 ではいくつかの科で(i)変異における食い違いがあり、また退化が示されている科でも(ii)  $d_N/d_S$  値がすべて中立進化の理論値までは上昇しておらず値もまばらである。これは翼手目内での多様化における鋤鼻器退化時期のばらつきを示唆するかもしれない。

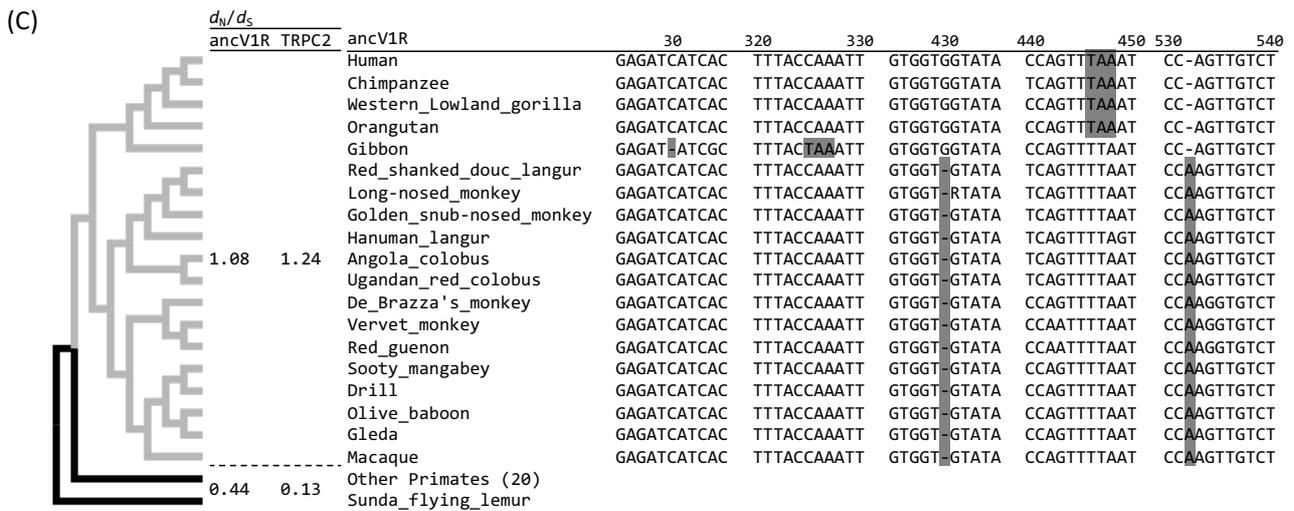
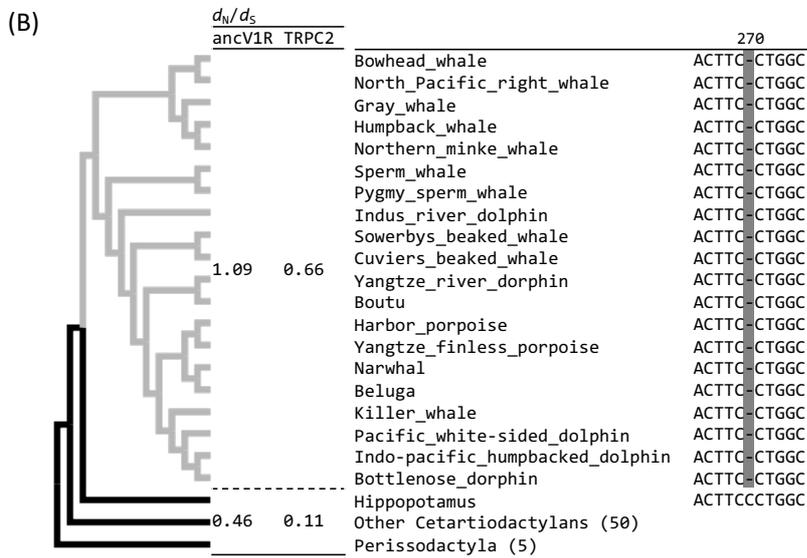
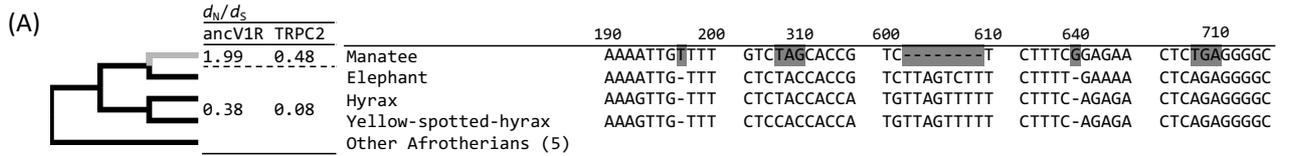
図表

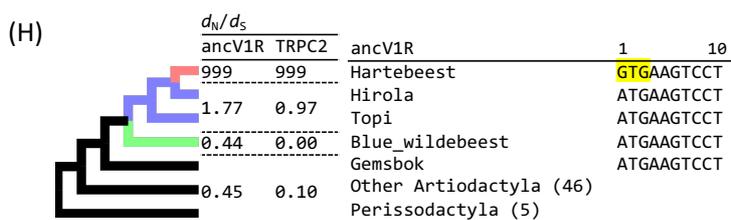
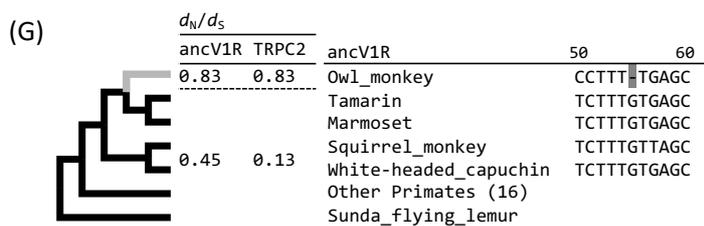
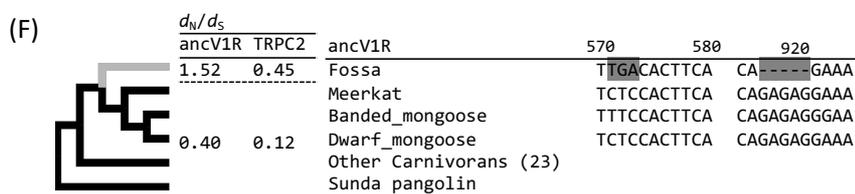
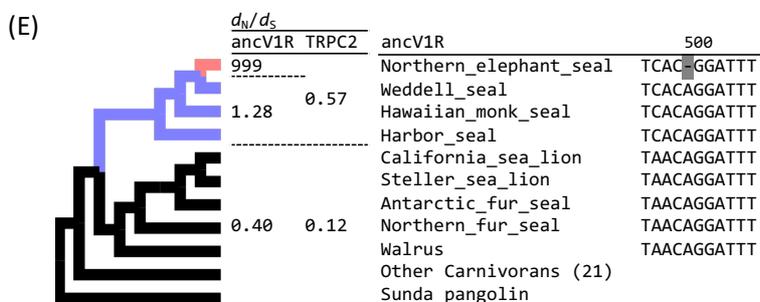
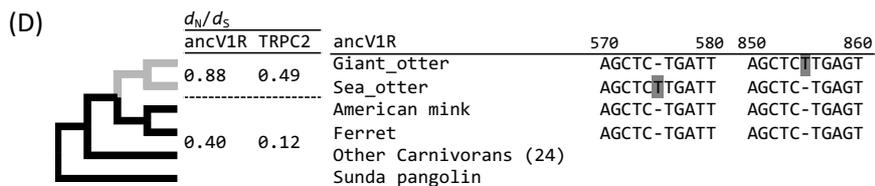
	VNO	TRPC2		ancV1R	
		previous studies	This study	Suzuki et al. (2018)	This study
Manatee	absent				
Otters					
Seals	absent				
Fossa					
Bats	various	various	various	various	various
Whales	absent				
Alcelaphine antelopes (topi, hartebeest, hirola)	present				
Catarrhine primates	absent				
Owl monkey	controversial				

 : nonfunctional (inactivating mutation, elevated  $d_N/d_S$ )  
 : putatively nonfunctional (elevated  $d_N/d_S$ )  
 : no data

図 2.1 哺乳類の鋤鼻器の退化と TRPC2・ancV1R の偽遺伝子化。本研究における ancV1R 遺伝子と TRPC2 遺伝子の探索結果を図示し鋤鼻器退化の知見と比較した。偽遺伝子化は配列の翻訳を阻害する変異と  $d_N/d_S$  値の上昇の両方が観測されたときに配列を”nonfunctional”として機能を失っているとした。また、片方しか見られない場合は”putatively nonfunctional”として判定を保留した。アザラシ科では鋤鼻器が退化していると総括的な論文で表記されているため absent としたが、解剖学的に調査した論文に行き当たらなかった。”VNO”の列および”previous studies”の列における具体的な参考文献はより詳しく比較した表 2.3 を参照。







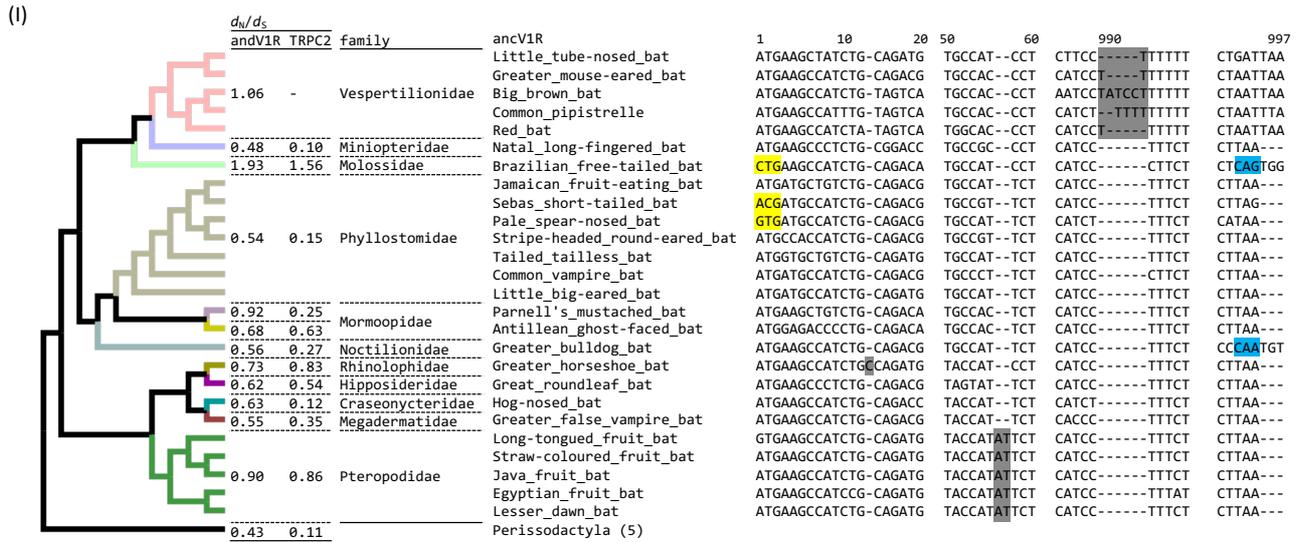


図 2.3 ancV1R の偽遺伝子化。(A)マナティ、(B)クジラ亜目、(C)狭鼻小目、(D)カワウソ亜科、(E)アザラシ科、(F)フォッサ、(G)ヨザル、(H)ハーテビースト亜科、(I)翼手目における ancV1R の変異を図示した。濃い灰色は遺伝子に入っている有害な変異を示す。黄色と青色はそれぞれスタートコドンに対する変異と終止コドンに対する変異で、必ずしも有害とは限らないが前後に代替となるコドンがなければその遺伝子は正常に翻訳できないため偽遺伝子化していると見なされる。黒色の枝は ancV1R または TRPC2 の  $d_N/d_S$  値を最尤推定するときの "background" を示しており、機能的な遺伝子配列であるときの  $d_N/d_S$  値の基準値を表す。色付きの枝(灰色など)は "background" と比べて  $d_N/d_S$  値が変化したと仮定している "foreground" の枝である。各 "background" と "foreground" の  $d_N/d_S$  値は表中に示されている。

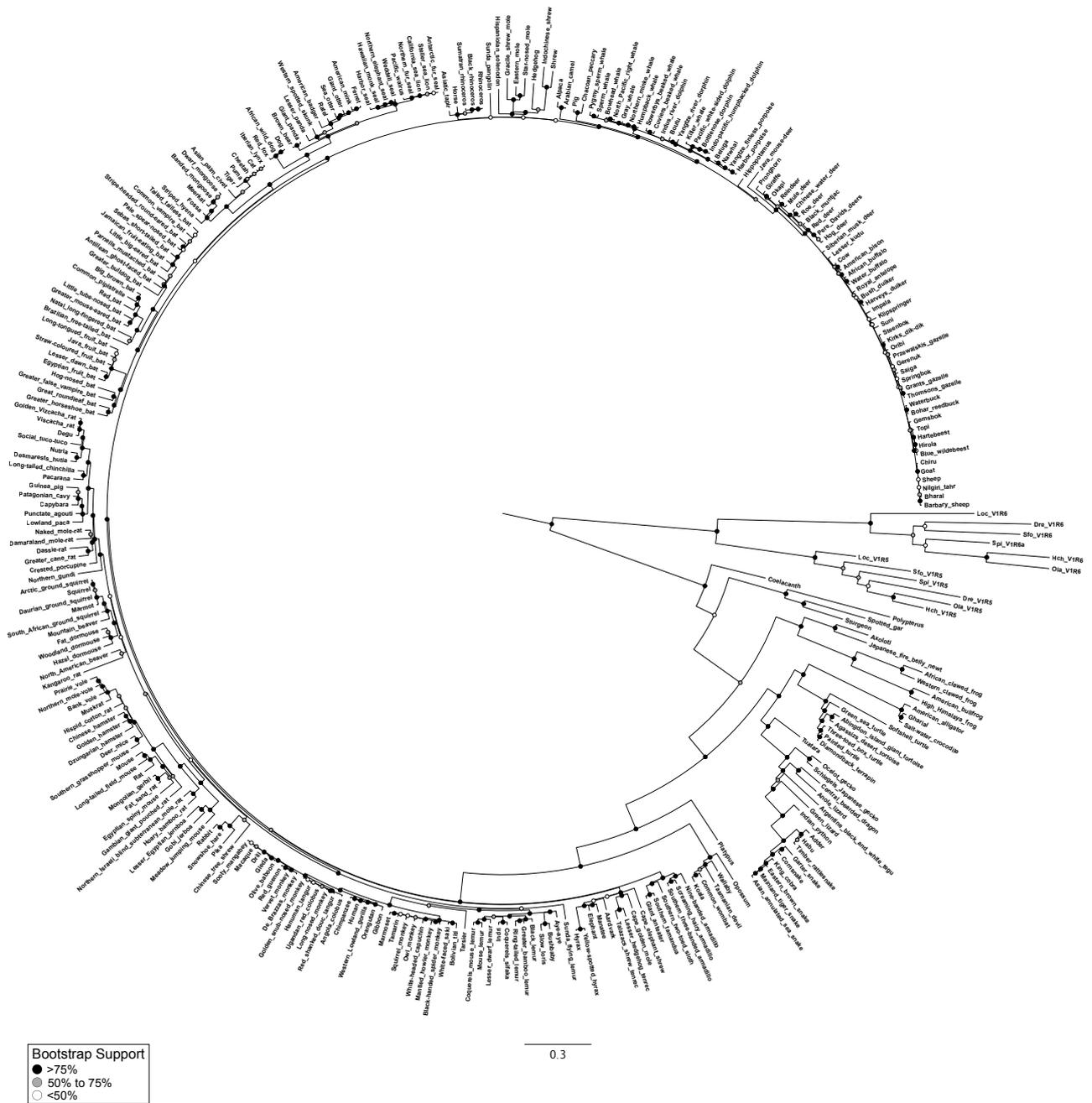
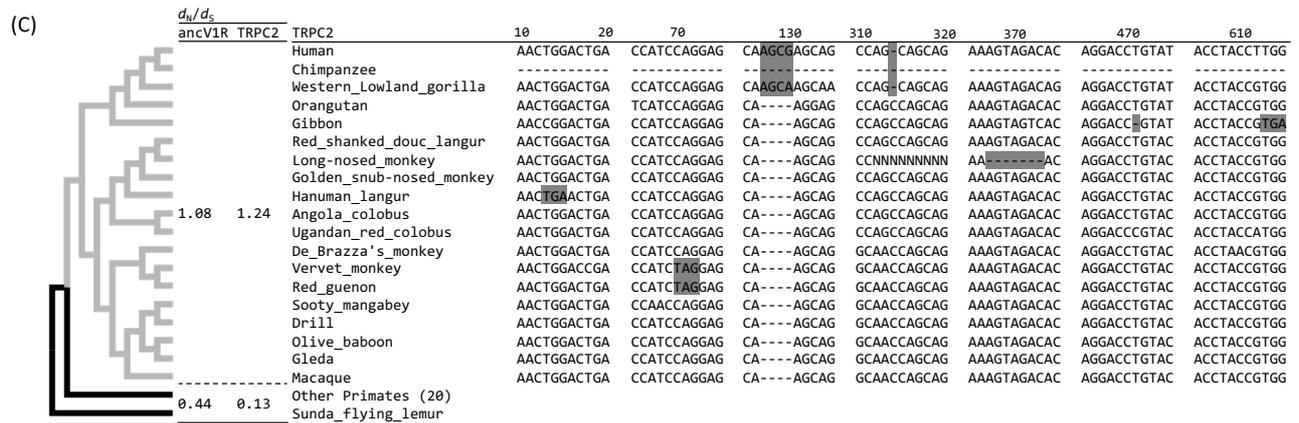
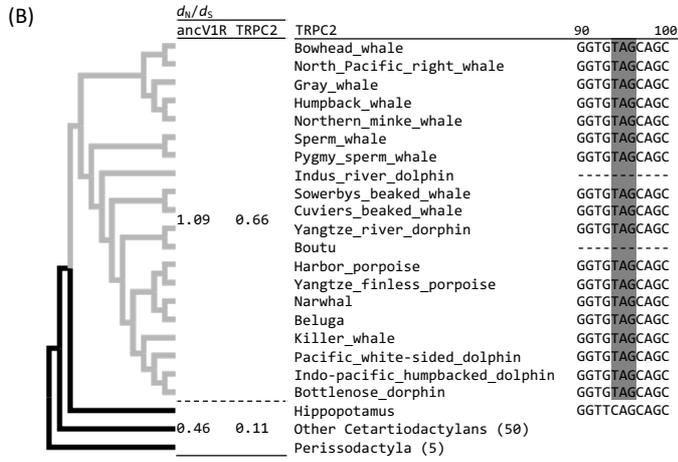
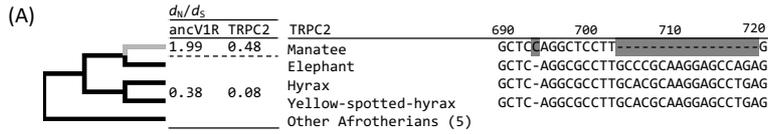


図 2.4 ancV1R の遺伝子配列から作成した脊椎動物の系統樹。今回探索した脊椎動物すべての ancV1R を用いて系統樹を最尤推定した。ancV1R の外群としては先行研究(Suzuki et al. 2018)から ancV1R と系統的に近いことがわかっている魚類の V1R5 と V1R6 遺伝子を用いた。図 2.2 の哺乳類の系統樹はこの系統樹から哺乳類の系統群を抜き出して再描写したものである。スケールバーと凡例は図 2.2 と同様にそれぞれ枝の置換率とブートストラップによるノードの信頼性を示す。





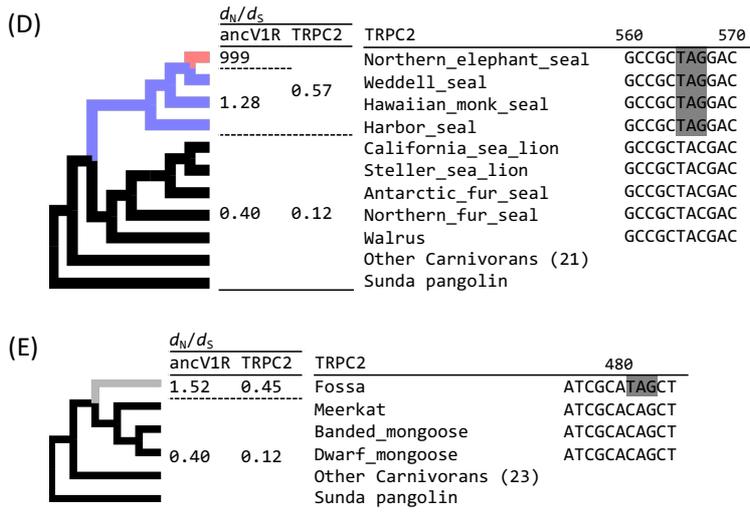


図 2.6 TRPC2 exon 12 の偽遺伝子化。(A) マナティ、(B) クジラ亜目、(C) 狭鼻小目、(D) アザラシ科、(E) フォッサの TRPC2 における有害な変異(濃い灰色)を図示した。TRPC2 はエキソンとイントロンを複数持つため、簡単のために TRPC2 の中でも最長(720bp)のエキソンである 12 番エキソンのみを用いた。図 2.3 の場合と異なり、今回探索した TRPC2 の範囲ではカワウソ亜科、ヨザルおよびハーテビースト亜科における有害な変異を見つけることができなかった。枝の色および表は図 2.3 と同様に  $d_N/d_S$  値推定に用いた”background”と”foreground”の位置とそれぞれの値を示す。

表 2.1 今回用いたすべての種とゲノムアッセムブリの一覧表

Latin name	Common name	ancV1R	Genome assembly name
<b>Mammalia</b>			
<b>Primates</b>			
<i>Alouatta palliata</i>	Mantled howler monkey	intact	AloPal_v1_BIUU
<i>Aotus nancymaae</i>	Owl monkey	pseudogene	Anan_2.0
<i>Ateles geoffroyi</i>	Black-handed spider monkey	intact	AteGeo_v1_BIUU
<i>Callithrix jacchus</i>	Marmoset	intact	C_jacchus3.2
<i>Carlito syrichta</i>	Tarsier	intact	tarSyr2
✓ <i>Cebus albifrons</i>	White-fronted capuchin	intact	CebAlb_v1_BIUU
<i>Cebus capucinus</i>	White-headed capuchin	intact	Cebus_imitator-1.0
<i>Cercocebus atys</i>	Sooty mangabey	pseudogene	Caty_1.0
<i>Cercopithecus neglectus</i>	De Brazza's monkey	pseudogene	CertNeg_v1_BIUU
<i>Cheirogaleus medius</i>	Lesser dwarf lemur	intact	CheMed_v1_BIUU
<i>Chlorocebus sabaues</i>	Vervet monkey	pseudogene	ChlSab1.1
<i>Colobus angolensis</i>	Angola colobus	pseudogene	Cang.pa_1.0
<i>Daubentonia madagascariensis</i>	Aye-aye	intact	DauMad_v1_BIUU
<i>Erythrocebus patas</i>	Red guenon	pseudogene	EryPat_v1_BIUU
✓ <i>Eulemur flavifrons</i>	Blue-eyed black lemur	intact	Eflavifrons33QCA
✓ <i>Eulemur fulvus</i>	Brown lemur	intact	EulFul_v1_BIUU
<i>Eulemur macaco</i>	Black lemur	intact	Emacaco_refEf_BWA_oneround
<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Western Lowland gorilla	pseudogene	gorGor4
<i>Homo sapiens</i>	Human	pseudogene	GRCh38.p7
<i>Indri indri</i>	Indri	intact	IndInd_v1_BIUU
<i>Lemur catta</i>	Ring-tailed lemur	intact	LemCat_v1_BIUU
✓ <i>Macaca fascicularis</i>	Crab-eating macaque	pseudogene	M_fascicularis_5.0
✓ <i>Macaca fuscata</i>	Japanese macaque	pseudogene	macFus_1.0
<i>Macaca mulatta</i>	Macaque	pseudogene	Mmul_8.0.1
✓ <i>Macaca nemestrina</i>	Southern pig-tailed macaque	pseudogene	Mnem_1.0
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	Drill	pseudogene	Mleu.le_1.0
<i>Microcebus murinus</i>	Mouse lemur	intact	Mmur_3.0
<i>Mirza coquereli</i>	Coquerel's mouse lemur	intact	MizCoq_v1_BIUU
<i>Nasalis larvatus</i>	Long-nosed monkey	pseudogene	Charlie1.0
<i>Nomascus leucogenys</i>	Gibbon	pseudogene	Nleu_3.0
<i>Nycticebus coucang</i>	Slow loris	intact	NycCou_v1_BIUU
<i>Otolemur garnettii</i>	Bushbaby	intact	OtoGar3
✓ <i>Pan paniscus</i>	Bonobo	pseudogene	panpan1.1
<i>Pan troglodytes troglodytes</i>	Chimpanzee	pseudogene	Pan_tro_3.0
<i>Papio anubis</i>	Olive baboon	pseudogene	Panu_3.0
<i>Ptilocolobus tephrosceles</i>	Ugandan red colobus	pseudogene	ASM277652v1
<i>Pithecia pithecia</i>	White-faced saki	intact	PitPit_v1_BIUU
<i>Plecturocebus donacophilus</i>	Bolivian titi	intact	CalDon_v1_BIUU
<i>Pongo abelii</i>	Orangutan	pseudogene	PPYG2.0.2
<i>Prolemur simus</i>	Greater bamboo lemur	intact	Prosim_1.0
<i>Propithecus coquereli</i>	Coquerel's sifaka	intact	Pcoq_1.0
<i>Pygathrix nemaeus</i>	Red shanked douc langur	pseudogene	PygNem_v1_BIUU
<i>Rhinopithecus roxellana</i>	Golden snub-nosed monkey	pseudogene	Rrox_v1
✓ <i>Rhinopithecus bieti</i>	Black snub-nosed monkey	pseudogene	ASM169854v1
<i>Saguinus imperator</i>	Tamarin	intact	SagImp_v1_BIUU
<i>Saimiri boliviensis</i>	Squirrel monkey	intact	SaiBol1.0
<i>Semnopithecus entellus</i>	Hanuman langur	pseudogene	SemEnt_v1_BIUU
<i>Theropithecus gelada</i>	Gleda	pseudogene	Tgel_1.0
<b>Dermoptera</b>			
<i>Galeopterus variegatus</i>	Sunda flying lemur	intact	G_variegatus-3.0.2

表 2.1(続き)

<u>Rodentia</u>		
<i>Acomys cahirinus</i>	Egyptian spiny mouse	intact AcoCah_v1_BIUU
<i>Allactaga bullata</i>	Gobi jerboa	intact AllBul_v1_BIUU
<i>Aplodontia rufa</i>	Mountain beaver	intact AplRuf_v1_BIUU
✓ <i>Apodemus speciosus</i>	Large Japanese field mouse	intact Aspe_assembly01
<i>Apodemus sylvaticus</i>	Long-tailed field mouse	intact ASM130590v1
<i>Capromys pilorides</i>	Desmarest's hutia	intact CapPil_v1_BIUU
<i>Castor canadensis</i>	North American beaver	intact C.can genome v1.0
✓ <i>Cavia aperea</i>	Brazilian guinea pig	intact CavAp1.0
<i>Cavia porcellus</i>	Guinea pig	intact cavPor3
✓ <i>Cavia tschudii</i>	Montane guinea pig	intact CavTsc_v1_BIUU
<i>Chinchilla lanigera</i>	Long-tailed chinchilla	intact ChiLan1.0
<i>Cricetomys gambianus</i>	Gambian giant pouched rat	intact CriGam_v1_BIUU
<i>Cricetulus griseus</i>	Chinese hamster	intact CriGri_1.0
<i>Ctenodactylus gundi</i>	Northern gundi	intact CteGun_v1_BIUU
<i>Ctenomys sociabilis</i>	Social tuco-tuco	intact CteSoc_v1_BIUU
<i>Cuniculus paca</i>	Lowland paca	intact CunPac_v1_BIUU
<i>Dasyprocta punctata</i>	Punctate agouti	intact DasPun_v1_BIUU
<i>Dinomys branickii</i>	Pacarana	intact DinBra_v1_BIUU
<i>Dipodomys ordii</i>	Kangaroo rat	intact Dord_2.0
✓ <i>Dipodomys stephensi</i>	Stephens's kangaroo rat	intact DipSte_v1_BIUU
<i>Dolichotis patagonum</i>	Patagonian cavy	intact DolPat_v1_BIUU
✓ <i>Ellobius lutescens</i>	Transcaucasian mole vole	intact ASM168507v1
<i>Ellobius talpinus</i>	Northern mole-vole	intact ETalpinus_0.1
<i>Fukomys damarensis</i>	Damaraland mole-rat	intact DMR_v1.0
<i>Glis glis</i>	Fat dormouse	intact GliGli_v1_BIUU
<i>Graphiurus murinus</i>	Woodland dormouse	intact GraMur_v1_BIUU
<i>Heterocephalus glaber</i>	Naked mole-rat	intact HetGla_female_1.0
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capybara	intact HydHyd_v1_BIUU
<i>Hystrix cristata</i>	Crested porcupine	intact HysCri_v1_BIUU
<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	Squirrel	intact spetri2
<i>Jaculus jaculus</i>	Lesser Egyptian jernboa	intact JacJac1.0
✓ <i>Marmota flaviventris</i>	Yellow-bellied marmot	intact ASM367607v1
<i>Marmota marmota marmota</i>	Marmot	intact marMar2.1
<i>Meriones unguiculatus</i>	Mongolian gerbil	intact MunDraft-v1.0
<i>Mesocricetus auratus</i>	Golden hamster	intact MesAur1.0
<i>Microtus ochrogaster</i>	Prairie vole	intact MicOch1.0
✓ <i>Mus caroli</i>	Ryukyu mouse	intact CAROLI_EIJ_v1.1
<i>Mus musculus</i>	Mouse	intact GRCm38.p4
✓ <i>Mus pahari</i>	Gairdner's shrewmouse	intact PAHARI_EIJ_v1.1
✓ <i>Mus spicilegus</i>	Steppe mouse	intact MUSP714
✓ <i>Mus spretus</i>	Algerian mouse	intact SPRET_Eij_v1
<i>Muscardinus avellanarius</i>	Hazel dormouse	intact MusAve_v1_BIUU
<i>Myocastor coypus</i>	Nutria	intact MyoCoy_v1_BIUU
<i>Myodes glareolus</i>	Bank vole	intact ASM436859v1
<i>Nannospalax galili</i>	Upper Galilee mountains blind mole rat	intact S.galili_v1.0
<i>Octodon degus</i>	Octodon	intact OctDeg1.0
<i>Octomys mimax</i>	Viscacha Rat	intact Oct_mimax_AO248_v1
<i>Ondatra zibethicus</i>	Muskrat	intact OndZib_v1_BIUU
<i>Onychomys torridus</i>	Southern grasshopper mouse	intact OnyTor_v1_BIUU
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	Deer mice	intact Pman_1.0
✓ <i>Peromyscus polionotus subgriseus</i>	Oldfield mouse	intact HU_Ppol_1.3
<i>Petromus typicus</i>	Dassie-rat	intact PetTyp_v1_BIUU
<i>Phodopus sungorus</i>	Dzungarian hamster	intact Psun0.5
<i>Psammomys obesus</i>	Fat sand rat	intact ASM221593v1
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat	intact Rnor_6.0
<i>Rhizomys pruinosus</i>	Hoary bamboo rat	intact RhiPru_v1_BIUU
<i>Sigmodon hispidus</i>	Hispid cotton rat	intact SigHis_v1_BIUU
<i>Spermophilus dauricus</i>	Daurian ground squirrel	intact ASM240643v1
<i>Thryonomys swinderianus</i>	Greater cane rat	intact ThrSwi_v1_BIUU
<i>Tympanoctomys barrerae</i>	Golden vizcacha rat	intact Tym_barrerae_AO245_v1
<i>Urocitellus parryii</i>	Arctic ground squirrel	intact ASM342692v1
<i>Xerus inauris</i>	South African ground squirrel	intact XerIna_v1_BIUU
<i>Zapus hudsonius</i>	Meadow jumping mouse	intact ZapHud_v1_BIUU
<u>Lagomorpha</u>		
<i>Lepus americanus</i>	Snowshoe hare	intact LepAme_v1_BIUU
<i>Ochotona princeps</i>	Pika	intact OchPri3.0
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Rabbit	intact OryCun2.0
<u>Scandentia</u>		
<i>Tupaia chinensis</i>	Chinese Tree Shrew	intact TupChi_1.0

表 2.1(続き)

Cetartiodactyla			
<i>Ammotragus lervia</i>	Barbary sheep	intact	A_lervia_NAZ_v1.0
<i>Aepyceros melampus</i>	Impala	intact	IMP
<i>Alcelaphus buselaphus</i>	Hartebeest	pseudogene	HBT
<i>Antidorcas marsupialis</i>	Springbok	intact	SGB
<i>Antilocapra americana</i>	Pronghorn	intact	AntAmePen_v1_BIUU
<i>Axis porcinus</i>	Hog deer	intact	ASM379854v1
<i>Balaena mysticetus</i>	Bowhead whale	pseudogene	*http://www.bowhead-whale.org
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Northern minke whale	pseudogene	BalAcu1.0
✓ <i>Balaenoptera bonaerensis</i>	Southern minke whale	pseudogene	ASM97880v1
<i>Beatragus hunteri</i>	Hirola	intact	BeaHun_v1_BIUU
<i>Bison bison</i>	American bison	intact	Bison_UMD1.0
✓ <i>Bos grunniens</i>	Domestic yak	intact	LU_Bosgru_v3.0
✓ <i>Bos indicus</i>	Zebu	intact	Bos_indicus_1.0
✓ <i>Bos mutus</i>	Yak	intact	BosGru_v2.0
<i>Bos taurus</i>	Cow	intact	Bos_taurus_UMD_3.1.1
<i>Bubalus bubalis</i>	Water buffalo	intact	UMD_CASPUR_WB_2.0
✓ <i>Camelus bactrianus</i>	Bactrian camel	intact	Ca_bactrianus_MBC_1.0
<i>Camelus dromedarius</i>	Arabian camel	intact	PRJNA234474_Ca_dromedarius_V1.0
✓ <i>Camelus ferus</i>	Wild Bactrian camel	intact	CB1
✓ <i>Capra aegagrus</i>	Wild goat	intact	CapAeg_1.0
<i>Capra hircus</i>	Goat	intact	ARS1
✓ <i>Capra sibirica</i>	Siberian ibex	intact	ASM318261v2
<i>Capreolus capreolus</i>	Roe Deer	intact	kmer631
<i>Catagonus wagneri</i>	Chacoan peccary	intact	CatWag_v1_BIUU
<i>Cephalophus harveyi</i>	Harvey's duiker	intact	HVD
✓ <i>Cervus albirostris</i>	White-lipped deer	intact	WLD
<i>Cervus elaphus hippelaphus</i>	Red deer	intact	CerEla1.0
<i>Connochaetes taurinus</i>	Blue wildebeest	intact	BWD
<i>Damaliscus lunatus</i>	Topi	intact	CTB
<i>Delphinapterus leucas</i>	Beluga	pseudogene	ASM228892v2
<i>Elaphurus davidianus</i>	Pere David's deer	intact	Milu1.0
<i>Eschrichtius robustus</i>	Gray whale	pseudogene	EschrichtiusRobustus1.0
<i>Eubalaena japonica</i>	North Pacific right whale	pseudogene	EubJap_v1_BIUU
<i>Eudorcas thomsonii</i>	Thomson's gazelle	intact	TMG
<i>Giraffa camelopardalis</i>	Giraffe	intact	ASM165123v1
<i>Hemitragus hylacrius</i>	Nilgiri tahr	intact	HemHyl_v1_BIUU
<i>Hippopotamus amphibius</i>	Hippopotamus	intact	ASM299558v1
<i>Hydropotes inermis</i>	Chinese water deer	intact	NPU_HINE_1.0
<i>Inia geoffrensis</i>	Boutu	pseudogene	IniGeo_v1_BIUU
<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Waterbuck	intact	DFW
<i>Kogia breviceps</i>	Pygmy sperm whale	pseudogene	KogBre_v1_BIUU
<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	Pacific white-sided dolphin	pseudogene	ASM367639v1
<i>Lipotes vexillifer</i>	Yangtze river dolphin	pseudogene	Lipotes_vexillifer_v1
<i>Litocranius walleri</i>	Gerenuk	intact	GRK
<i>Madoqua kirkii</i>	Kirk's dik-dik	intact	KDD
<i>Megaptera novaeangliae</i>	Humpback whale	pseudogene	megNov1
<i>Mesoplodon bidens</i>	Sowerby's beaked whale	pseudogene	MesBid_v1_BIUU
<i>Monodon monoceros</i>	Narwhal	pseudogene	MonMon_v1_BIUU
✓ <i>Moschus berezovskii</i>	Chinese forest musk deer	intact	FMD
✓ <i>Moschus chrysogaster</i>	Alpine musk deer	intact	NPU_MCHR_1.0
<i>Moschus moschiferus</i>	Siberian musk deer	intact	MosMos_v1_BIUU
<i>Muntiacus crinifrons</i>	Black muntjac	intact	BMJ
✓ <i>Muntiacus muntjak</i>	Muntjak	intact	CMJ
✓ <i>Muntiacus reevesi</i>	Reeves' muntjac	intact	CIJ
<i>Nanger granti</i>	Grant's gazelle	intact	GTG
<i>Neophocaena asiaeorientalis</i>	Yangtze finless porpoise	pseudogene	Neophocaena_asiaeorientalis_V1
<i>Neotragus moschatus</i>	Suni	intact	SUN
<i>Neotragus pygmaeus</i>	Royal antelope	intact	RAL
<i>Odocoileus hemionus hemionus</i>	Mule deer	intact	UofA_Ohem_1.0
✓ <i>Odocoileus virginianus</i>	White-tailed deer	intact	Ovir.te_1.0
<i>Okapia johnstoni</i>	Okapi	intact	ASM166083v1
<i>Orcinus orca</i>	Killer whale	pseudogene	Oorc_1.1
<i>Oreotragus oreotragus</i>	Klipspringer	intact	KSP
<i>Oryx gazella</i>	Gemsbok	intact	UCDavis_Ogaz_1
<i>Ourebia ourebi</i>	Oribi	intact	ORB
✓ <i>Ovis ammon</i>	Argali	intact	O_ammon_KGZ_v1.0
<i>Ovis aries</i>	Sheep	intact	Oar_v4.0
✓ <i>Ovis canadensis</i>	Bighorn sheep	intact	OviCan_v1_BIUU
<i>Pantholops hodgsonii</i>	Chiru	intact	PHO1.0
<i>Phocoena phocoena</i>	Harbor porpoise	pseudogene	ASM307100v1
<i>Physeter catodon</i>	Sperm whale	pseudogene	Physeter_macrocephalus-2.0.2
<i>Platanista minor</i>	Indus river dolphin	pseudogene	PlaMin_v1_BIUU
<i>Procapra przewalskii</i>	Przewalski's gazelle	intact	PLG
<i>Pseudois nayaur</i>	Bharal	intact	ASM318257v1
<i>Rangifer tarandus</i>	Reindeer	intact	RanTarSib_v1_BIUU
<i>Raphicerus campestris</i>	Steenbok	intact	SNB
<i>Redunca redunca</i>	Bohar reedbuck	intact	BHR
<i>Saiga tatarica</i>	Saiga	intact	SaiTat_v1_BIUU
<i>Sousa chinensis</i>	Indo-pacific humpbacked dolphin	pseudogene	ASM352133v1
<i>Sus scrofa</i>	Pig	intact	Sscrofa11.1
<i>Sylvicapra grimmia</i>	Bush duiker	intact	CMD
<i>Syncerus caffer</i>	African buffalo	intact	ABF
✓ <i>Tragelaphus buxtoni</i>	Mountain nyala	intact	MTN
✓ <i>Tragelaphus eurycerus</i>	Bongo	intact	BNG
<i>Tragelaphus imberbis</i>	Lesser kudu	intact	LEK
✓ <i>Tragelaphus oryx</i>	Eland	intact	CME
✓ <i>Tragelaphus scriptus</i>	Bushbuck	intact	BUB
✓ <i>Tragelaphus spekii</i>	Sitatunga	intact	STG
✓ <i>Tragelaphus strepsiceros</i>	Greater kudu	intact	GTK
<i>Tragulid javanicus</i>	Java mouse-deer	intact	TraJav_v1_BIUU
✓ <i>Tragulid kanchil</i>	Lesser mouse-deer	intact	LMD
✓ <i>Tursiops aduncus</i>	Indo-pacific bottlenose dolphin	pseudogene	ASM322739v1
<i>Tursiops truncatus</i>	Bottlenose dolphin	pseudogene	NIST_Tur_tru_v1
<i>Vicugna pacos</i>	Alpaca	intact	Vicugna_pacos-2.0.1
<i>Ziphius cavirostris</i>	Cuvier's beaked whale	pseudogene	ZipCav_v1_BIUU

表 2.1(続き)

<b>Perissodactyla</b>			
✓ <i>Ceratotherium simum cottoni</i>	Northern white rhinoceros	intact	CerCot_v1_BIUU
<i>Ceratotherium simum simum</i>	Rhinoceros	intact	CerSimSim1.0
<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>	Sumatran rhinoceros	intact	ASM284483v1
<i>Diceros bicornis</i>	Black rhinoceros	intact	DicBicMic_v1_BIUU
✓ <i>Equus asinus</i>	Donkey	intact	ASM130575v1
<i>Equus caballus</i>	Horse	intact	Equ Cab 2
✓ <i>Equus przewalskii</i>	Przewalski's wild horse	intact	Burgud
<i>Tapirus indicus</i>	Asiatic tapir	intact	TapInd_v1_BIUU
✓ <i>Tapirus terrestris</i>	Brazilian tapir	intact	TapTer_v1_BIUU
<b>Chiroptera</b>			
<i>Anoura caudifer</i>	Tailed tailless bat	intact	AnoCau_v1_BIUU
<i>Artibeus jamaicensis</i>	Jamaican fruit-eating bat	intact	ArtJam_v1_BIUU
<i>Carollia perspicillata</i>	Seba's short-tailed bat	intact	CarPer_v1_BIUU
<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	Hog-nosed bat	intact	CraTho_v1_BIUU
<i>Desmodus rotundus</i>	Common vampire bat	intact	ASM294091v2
<i>Eidolon helvum</i>	Straw-coloured fruit bat	pseudogene	ASM46528v1
<i>Eonycteris spelaea</i>	Lesser dawn bat	pseudogene	Espe.v1
<i>Eptesicus fuscus</i>	Big brown bat	intact?	EptFus1.0
<i>Hipposideros armiger</i>	Great roundleaf bat	intact	ASM189008v1
✓ <i>Hipposideros galeritus</i>	Cantor's roundleaf bat	intact	HipGal_v1_BIUU
<i>Lasiurus borealis</i>	Red bat	pseudogene	LasBor_v1_BIUU
<i>Macroglossus sobrinus</i>	Long-tongued fruit bat	pseudogene	MacSob_v1_BIUU
<i>Megaderma lyra</i>	Greater false vampire bat	intact	ASM46534v1
<i>Micronycteris hirsuta</i>	Little big-eared bat	intact	MicHir_v1_BIUU
<i>Miniopterus natalensis</i>	Natal Long-fingered bat	intact	Mnat.v1
✓ <i>Miniopterus schreibersii</i>	Schreibers' long-fingered bat	intact	MmSch_v1_BIUU
<i>Mormoops blainvillei</i>	Antillean ghost-faced bat	intact	MorMeg_v1_BIUU
<i>Murina aurata feae</i>	Little tube-nosed bat	pseudogene	MurFea_v1_BIUU
✓ <i>Myotis brandtii</i>	Brandt's bat	pseudogene	ASM41265v1
✓ <i>Myotis davidii</i>	David's myotis	pseudogene	ASM32734v1
✓ <i>Myotis lucifugus lucifugus</i>	Little brown bat	pseudogene	Myoluc2.0
<i>Myotis myotis</i>	Greater mouse-eared bat	pseudogene	MyoMyo_v1_BIUU
<i>Noctilio leporinus</i>	Greater bulldog bat	intact	NocLep_v1_BIUU
<i>Phyllostomus discolor</i>	Pale spear-nosed bat	intact	mPhyDis1_v1.p
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Common pipistrelle	pseudogene	PipPip_v1_BIUU
<i>Pteronotus parnellii</i>	Parnell's mustached bat	intact	ASM46540v1
✓ <i>Pteropus alecto</i>	Black flying fox	pseudogene	ASM32557v1
<i>Pteropus vampyrus</i>	Java fruit bat	pseudogene	Pvam_2.0
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Greater horseshoe bat	pseudogene	ASM46549v1
✓ <i>Rhinolophus sinicus</i>	Chinese rufous horseshoe bat	pseudogene	ASM188883v1
<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Egyptian fruit bat	pseudogene	Raegyp2.0
<i>Tadarida brasiliensis</i>	Brazilian free-tailed bat	pseudogene	TadBra_v1_BIUU
<i>Tonatia saurophila</i>	Stripe-headed round-eared bat	intact	TonSau_v1_BIUU
<b>Carnivora</b>			
<i>Acinonyx jubatus</i>	Cheetah	intact	aciJub1
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Panda	intact	ASM200744v1
<i>Ailuurus fulgens</i>	Lesser panda	intact	ASM200746v1
<i>Arctocepalus gazella</i>	Antarctic fur seal	intact	ArcGazv1.4
<i>Callorhinus ursinus</i>	Northern fur seal	intact	ASM326570v1
✓ <i>Canis lupus dingo</i>	Dingo	intact	ASM325472v1
<i>Canis lupus familiaris</i>	Dog	intact	CanFam3.1
<i>Cryptoprocta ferax</i>	Fossa	pseudogene	CryFer_v1_BIUU
<i>Enhydra lutris</i>	Sea otter	pseudogene	ASM228890v2
<i>Eumetopias jubatus</i>	Steller sea lion	intact	ASM402803v1
<i>Felis catus</i>	Cat	intact	Felis_catus_8.0
✓ <i>Felis nigripes</i>	Black-footed cat	intact	FelNig_v1_BIUU
<i>Helogale parvula</i>	Dwarf mongoose	intact	HelPar_v1_BIUU
<i>Hyaena hyaena</i>	Striped hyena	intact	ASM300989v1
<i>Leptonychotes weddellii</i>	Weddell Seal	intact	LepWed1.0
<i>Lycan pictus</i>	African wild dog	intact	LycPicSAfr1.0
<i>Lynx pardinus</i>	Iberian lynx	intact	*http://denovo.cnag.cat/genomes/iberian_lynx
<i>Mellivora capensis</i>	Ratel	intact	MelCap_v1_BIUU
<i>Mirounga angustirostris</i>	Northern elephant seal	pseudogene	MirAng_v1_BIUU
<i>Mungos mungo</i>	Banded mongoose	intact	MunMun_v1_BIUU
<i>Mustela putorius furo</i>	Ferret	intact	MusPutFur1.0
<i>Neomonachus schauinslandi</i>	Hawaiian monk seal	intact	ASM220157v1
<i>Neovison vison</i>	American mink	intact	NNQGG.v01
<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	Pacific walrus	intact	Oros_1.0
✓ <i>Panthera onca</i>	Jaguar	intact	PanOnc_v1_BIUU
✓ <i>Panthera pardus</i>	Leopard	intact	PanPar1.0
<i>Panthera tigris</i>	Tiger	intact	PanTig1.0
<i>Paradoxurus hermaphroditus</i>	Asian palm civet	intact	ParHer_v1_BIUU
<i>Phoca vitulina</i>	Harbor seal	intact	GSC_HSeal_1.0
<i>Pteronura brasiliensis</i>	Giant otter	pseudogene	PteBra_v1_BIUU
<i>Puma concolor</i>	Puma	intact	PumCon1.0
<i>Spilogale gracilis</i>	Western spotted skunk	intact	SpiGra_v1_BIUU
<i>Suricata suricatta</i>	Meerkat	intact	SurSur_v1_BIUU
<i>Taxidea taxus jeffersonii</i>	American badger	intact	ASM369799v1
✓ <i>Ursus americanus</i>	American black bear	intact	ASM334442v1
<i>Ursus arctos horribilis</i>	Brown bear	intact	ASM358476v1
✓ <i>Ursus maritimus</i>	Polar bear	intact	UrsMar_1.0
✓ <i>Vulpes lagopus</i>	Arctic fox	intact	VulLag_v1_BIUU
<i>Vulpes vulpes</i>	Red fox	intact	VulVul2.2
<i>Zalophus californianus</i>	California sea lion	intact	zalCal2.2
<b>Pholidota</b>			
✓ <i>Manis pentadactyla</i>	Chinese pangolin	intact	M_pentadactyla-1.1.1
<i>Manis javanica</i>	Sunda pangolin	intact	ManJav1.0
<b>Eulipotyphla</b>			
<i>Condylura cristata</i>	Star-nosed mole	intact	ConCri1.0
<i>Crocodyura indochinensis</i>	Indochinese shrew	intact	CroInd_v1_BIUU
<i>Erinaceus europaeus</i>	Hedgehog	intact	EriEur2.0
<i>Scalopus aquaticus</i>	Eastern mole	intact	SeaAqu_v1_BIUU
<i>Solenodon paradoxus woodi</i>	Hispaniolan solenodon	intact	ASM290108v1
<i>Sorex araneus</i>	Shrew	intact	SorAra2.0
<i>Uropsilus gracilis</i>	Gracile shrew mole	intact	UroGra_v1_BIUU

表 2.1(続き)

<u>Sirenia</u>			
<i>Trichechus manatus</i>	Manatee	pseudogene	TriManLat1.0
<u>Hyracoidea</u>			
<i>Heterohyrax brucei</i>	Yellow-spotted hyrax	intact	HetBruBak_v1_BIUU
<i>Procavia capensis</i>	Hyrax	intact	Pcap_2.0
<u>Proboscidea</u>			
<i>Loxodonta africana</i>	Elephant	intact	Loxaf3.0
<u>Macroscelidea</u>			
<i>Elephantulus edwardii</i>	Cape elephant shrew	intact	EleEdw1.0
<u>Afrosericida</u>			
<i>Chrysochloris asiatica</i>	Cape golden mole	intact	ChrAsi1.0
<i>Echinops telfairi</i>	Lesser hedgehog tenrec	intact	EchTel2.0
<i>Microgale talazaci</i>	Talazac's shrew tenrec	intact	MicTal_v1_BIUU
<u>Tubulidentata</u>			
<i>Orycteropus afer afer</i>	Aardvark	intact	OryAfe1.0
<u>Pilosa</u>			
✓ <i>Choloepus hoffmanni</i>	Sloth	intact	C_hoffmanni-2.0.1
<i>Choloepus didactylus</i>	Southern two-toed sloth	pseudogene?	ChoDid_v1_BIUU
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Giant anteater	intact	MyrTri_v1_BIUU
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Southern tamandua	intact	TamTet_v1_BIUU
<u>Cingulata</u>			
<i>Chaetophractus vellerosus</i>	Screaming hairy armadillo	intact	ChaVel_v1_BIUU
<i>Dasyops novemcinctus</i>	Nine-banded armadillo	intact	Dasnov3.0
<i>Tolypeutes matacus</i>	Southern three-banded armadillo	intact	TolMat_v1_BIUU
<u>Diprotodontia</u>			
<i>Macropus eugenii</i>	Wallaby	intact	Meug_1.1
<i>Phascolarctos cinereus</i>	Koala	intact	phaCin_unsw_v4.1
<i>Vombatus ursinus</i>	Common wombat	intact	bare-nosed wombat genome assembly
<u>Dasvuromorphia</u>			
<i>Sarcophilus harristii</i>	Tasmanian devil	intact	Devil_ref v7.0
<u>Didelphimorphia</u>			
<i>Monodelphis domestica</i>	Opossum	intact	monDom5
<u>Monotremata</u>			
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Platypus	intact	Ornithorhynchus_anatinus-5.0.1
<u>Sirenia</u>			
<i>Trichechus manatus</i>	Manatee	pseudogene	TriManLat1.0
<u>Hyracoidea</u>			
<i>Heterohyrax brucei</i>	Yellow-spotted hyrax	intact	HetBruBak_v1_BIUU
<i>Procavia capensis</i>	Hyrax	intact	Pcap_2.0
<u>Proboscidea</u>			
<i>Loxodonta africana</i>	Elephant	intact	Loxaf3.0
<u>Macroscelidea</u>			
<i>Elephantulus edwardii</i>	Cape elephant shrew	intact	EleEdw1.0
<u>Afrosericida</u>			
<i>Chrysochloris asiatica</i>	Cape golden mole	intact	ChrAsi1.0
<i>Echinops telfairi</i>	Lesser hedgehog tenrec	intact	EchTel2.0
<i>Microgale talazaci</i>	Talazac's shrew tenrec	intact	MicTal_v1_BIUU
<u>Tubulidentata</u>			
<i>Orycteropus afer afer</i>	Aardvark	intact	OryAfe1.0
<u>Pilosa</u>			
✓ <i>Choloepus hoffmanni</i>	Sloth	intact	C_hoffmanni-2.0.1
<i>Choloepus didactylus</i>	Southern two-toed sloth	pseudogene?	ChoDid_v1_BIUU
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Giant anteater	intact	MyrTri_v1_BIUU
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Southern tamandua	intact	TamTet_v1_BIUU
<u>Cingulata</u>			
<i>Chaetophractus vellerosus</i>	Screaming hairy armadillo	intact	ChaVel_v1_BIUU
<i>Dasyops novemcinctus</i>	Nine-banded armadillo	intact	Dasnov3.0
<i>Tolypeutes matacus</i>	Southern three-banded armadillo	intact	TolMat_v1_BIUU
<u>Diprotodontia</u>			
<i>Macropus eugenii</i>	Wallaby	intact	Meug_1.1
<i>Phascolarctos cinereus</i>	Koala	intact	phaCin_unsw_v4.1
<i>Vombatus ursinus</i>	Common wombat	intact	bare-nosed wombat genome assembly
<u>Dasvuromorphia</u>			
<i>Sarcophilus harristii</i>	Tasmanian devil	intact	Devil_ref v7.0
<u>Didelphimorphia</u>			
<i>Monodelphis domestica</i>	Opossum	intact	monDom5
<u>Monotremata</u>			
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Platypus	intact	Ornithorhynchus_anatinus-5.0.1

表 2.1(続き)

<b>Amphibia</b>		
<b>Anura</b>		
<i>Rana catesbeiana</i>	American bullfrog	intact RCv2.1
<i>Nanorana parkeri</i>	High Himalaya frog	intact ASM93562v1
<i>Xenopus tropicalis</i>	Western clawed Frog	intact Xenopus_tropicalis_v9.1
<i>Xenopus laevis</i>	African clawed frog	intact Xenopus_laevis_v2 chromosome 1S
<b>Caudata</b>		
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Axolotl	intact ASM291563v1
<i>Cynops pyrrhogaster</i>	Japanese fire belly newt	intact * <a href="http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori/">http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori/</a>
<b>Ancient fishes</b>		
<b>Coelacanthiformes</b>		
<i>Latimeria chalumnae</i>	Coelacanth	intact LatCha1
<b>Lepisosteiformes</b>		
<i>Lepisosteus oculatus</i>	Spotted Gar	intact LepOcu1
<b>Acipenseriformes</b>		
<i>Acipenser sp.</i>	Sturgeon	intact *PCR amplified at Suzuki et al. (2018)
<b>Polypteriformes</b>		
<i>Polypterus senegalus</i>	Polypterus	intact *PCR amplified at Suzuki et al. (2018)

\*チェックの入った種は同属に同一の配列があるため解析に用いなかった種

表 2.2 intact な ancV1R 配列の長さ

Sequence length (bp)	Number of species	Taxon
924	1	Bolivian titi
936	1	White-faced saki
939	1	Marmoset
954	1	Asian palm civet
957	1	Cape Golden Mole
963	3	Hispaniolan solenodon, Wallaby, Gracile shrew mole
966	3	Star-nosed Mole, Shrew, Natal Long-fingered Bat
969	5	Eastern mole, Pale spear-nosed bat, Sebas short-tailed bat, Sunda flying lemur, Tarsier,
972	167	Most mammals
975	10	Aardvark, Koala, Great roundleaf bat, Perissodactyls (5 species), Ratel, Southern grasshopper mouse
978	2	Gambian giant pouched rat, Parnell's Mustached Bat
990	1	Southern three-banded armadillo
993	4	Xenathra (4 species)
1044	1	Greater bulldog bat

表 2.3 脊椎動物の鋤鼻器の退化と TRPC2・ancV1R の偽遺伝子化

			VNO	ancV1R(This study)					
Chondrichthyes			-	not found					
Teleostei			-	not found					
Gar			-	intact					
Polypterus			-	intact					
Sturgeon			-	intact					
Lungfish			P <sup>g,k,l</sup>	-					
Coelacanth			-	intact					
Osteichthyes	Amphibians	Anura	P <sup>a</sup>	intact					
		Caudata	P <sup>a</sup>	intact					
		Gymnophiona	-	-					
	Tetrapods	Reptiles	Squamates	P <sup>a</sup>	intact				
			Crocodylians	R <sup>a</sup>	vestigial				
			Testudines	R <sup>a</sup>	vestigial				
		Birds		A <sup>i</sup>	not found				
	Mammals			see below					

					TRPC2		ancV1R (This study)			
					VNO	sequence	selective pressure	sequence	selective pressure	
Platypus					P <sup>a</sup>	intact <sup>h</sup>		intact		
Marsupials					P <sup>a</sup>	intact <sup>h</sup>		intact		
Mammals	Afrotheria	Manatee		A <sup>b</sup>	pseudogene <sup>n</sup>	neutral <sup>n</sup>	pseudogene	neutral		
		other afrotherians		P <sup>c</sup>	intact <sup>n</sup>		intact			
	Xenarthra			P <sup>c</sup>	intact <sup>n</sup>		intact			
		Otters		-	pseudogene <sup>h,n</sup>	neutral <sup>h,n</sup>	pseudogene	neutral		
	Carnivora		walrus		P <sup>d</sup>	intact <sup>n</sup>	negative <sup>n</sup>	intact	negative	
			fur seals		P <sup>d</sup>	intact <sup>h</sup>	negative <sup>h</sup>	intact	negative	
			true seals		A <sup>d</sup>	pseudogene <sup>h</sup>	neutral <sup>h</sup>	both	neutral	
			Fossa		-	-	-	pseudogene	neutral	
			other carnivorans		P <sup>d</sup>	intact <sup>h</sup>		intact		
	Laurasiatheria	Chiroptera			various <sup>c</sup>	various <sup>l</sup>	various <sup>j</sup>	see Table S8		
					A <sup>d,f</sup>	pseudogene <sup>h</sup>	neutral <sup>h</sup>	pseudogene	neutral	
		Cetartiodactyla	Cetaceans		P <sup>m</sup>	-	-	both	neutral	
			Artiodactyls	Topi, Hartebeest, Hiriola		P <sup>d,m</sup>	intact <sup>h</sup>		intact	
		Perissodactyla			P <sup>d</sup>	intact <sup>h</sup>		intact		
			Other laurasiatherians		P <sup>d</sup>	intact <sup>n</sup>		intact		
		Euarchontoglires	Primates	Catarrhines		R <sup>a</sup>	pseudogene <sup>j</sup>	neutral <sup>j</sup>	pseudogene	neutral
					owl monkey		R <sup>? a-g</sup>	intact <sup>j</sup>	neutral <sup>j</sup>	pseudogene
				New world monkeys		R <sup>? a-g</sup>	intact <sup>j</sup>		intact	
				other New World monkeys		R <sup>? a-g</sup>	intact <sup>j</sup>		intact	
			other primates		P <sup>a</sup>	intact <sup>j</sup>		intact		
Rodentia			P <sup>a</sup>	intact <sup>j</sup>		intact				
Other Euarchontoglires			P <sup>a</sup>	intact <sup>n</sup>		intact				

\* P: Present; A: Absent; R: Rudimentary  
a Bhatnagar and Meisami 1998  
b Mackay-Sim et al. 1985  
c Meisami and Bhatnagar 1998  
d Switzer et al. 1980  
e Wible and Bhatnagar 1996  
f Oelschläiger 1989  
g Smith et al. 2011  
h Yu et al. 2010  
i Yohe et al. 2017  
j Liman and Innan 2003  
k González et al. 2010  
l Nakamuta et al. 2012  
m Heart et al. 1987  
n Hecker et al. 2019

表 2.4 ancV1R の  $d_N/d_S$  解析における最適なコドン置換モデルの探索

	lnL	np <sup>a</sup>	AIC <sup>b</sup>	ΔAIC	Relative weight <sup>c</sup>
CF0	-42295.31	0	84590.61	0	1
CF1	-42930.30	3	85866.61	-1275.99	8.35E-278
CF2	-42962.92	9	85943.85	-1353.24	1.41E-294
CF3	-43405.77	60	86931.54	-2340.92	0

表 2.5 TRPC2 の  $d_N/d_S$  解析における最適なコドン置換モデルの探索

	lnL	np <sup>a</sup>	AIC <sup>b</sup>	ΔAIC	Relative weight <sup>c</sup>
CF0	-11268.84	0	22537.69	-64.84	8.3E-15
CF1	-11233.43	3	22472.85	0	1
CF2	-11292.30	9	22602.60	-129.75	6.7E-29
CF3	-11281.71	60	22683.43	-210.58	1.9E-46

Abbreviations,

CF0 = frequencies for each codon are assumed to be equal; CF1 = codon frequencies are calculated from average nucleotide frequencies; CF2 = codon frequencies are calculated from average nucleotide frequencies at each of three codon positions; CF3 = codon frequencies are treated as free parameters.

<sup>a</sup> Number of free parameters

<sup>b</sup>  $AIC = 2*np - 2*lnL$

<sup>c</sup>  $Relative\ weight = \exp(0.5*\Delta AIC)$

表 2.6 偽遺伝子化した ancV1R の  $d_N/d_S$  値上昇の統計的有意性

foreground		lnL	np <sup>a</sup>	<i>P</i> value
manatee	model0: one $d_N/d_S$ category	-3453.81	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-3447.17	1	model0 vs model1 2.7E-04
cetaceans	model0: one $d_N/d_S$ category	-7539.31	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-7525.44	1	model0 vs model1 1.4E-07
otters	model0: one $d_N/d_S$ category	-5350.47	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-5348.07	1	model0 vs model1 0.029
true seals	model0: one $d_N/d_S$ category	-5386.64	0	
	model1: three $d_N/d_S$ categories	-5381.64	2	model0 vs model1 0.0068
fossa	model0: one $d_N/d_S$ category	-5216.94	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-5215.11	1	model0 vs model1 0.055
catarrhines	model0: one $d_N/d_S$ category	-5505.28	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-5495.53	1	model0 vs model1 1.0E-05
owl monkey	model0: one $d_N/d_S$ category	-4659.74	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-4659.10	1	model0 vs model1 0.26
alcelaphine antelopes	model0: one $d_N/d_S$ category	-6182.77	0	
	model1: four $d_N/d_S$ categories	-6179.59	3	model0 vs model1 0.095
chiropterans	model0: one $d_N/d_S$ category	-7660.35	0	
	model1: thirteen $d_N/d_S$ categories	-7642.88	12	model0 vs model1 4.8E-04

<sup>a</sup> Number of free parameters relative to each one  $d_N/d_S$  category model.

表 2.7 偽遺伝子化した TRPC2 の  $d_N/d_S$  値上昇の統計的有意性

foreground		lnL	np <sup>a</sup>	<i>P</i> value
manatee	model0: one $d_N/d_S$ category	-2310.67	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-2300.25	1	model0 vs model1 5.0E-06
cetaceans	model0: one $d_N/d_S$ category	-5143.43	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-5098.73	1	model0 vs model1 3.2E-21
otters	model0: one $d_N/d_S$ category	-3044.20	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-3037.99	1	model0 vs model1 4.2E-04
true seals	model0: one $d_N/d_S$ category	-3180.58	0	
	model1: three $d_N/d_S$ categories	-3168.47	2	model0 vs model1 8.7E-07
fossa	model0: one $d_N/d_S$ category	-2972.72	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-2968.87	1	model0 vs model1 0.0055
catarrhines	model0: one $d_N/d_S$ category	-3801.31	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-3742.13	1	model0 vs model1 1.4E-27
owl monkey	model0: one $d_N/d_S$ category	-2744.00	0	
	model1: two $d_N/d_S$ categories	-2741.60	1	model0 vs model1 0.028
alcelaphine antelopes	model0: one $d_N/d_S$ category	-4201.17	0	
	model1: four $d_N/d_S$ categories	-4193.13	3	model0 vs model1 0.0010
chiropterans	model0: one $d_N/d_S$ category	-3638.00	0	
	model1: thirteen $d_N/d_S$ categories	-3595.92	11	model0 vs model1 2.3E-13

<sup>a</sup> Number of free parameters relative to each one  $d_N/d_S$  category model.

表 2.8 翼手目における鋤鼻器の退化と TRPC2・ancV1R の偽遺伝子化

	VNO or AOB <sup>a,b</sup>	TRPC2		ancV1R	Assembly name		
		Yohe et al. 2017	This study*				
Vespertilionidae	<i>Murina aurata feae</i>	Little tube-nosed bat			pseudogene MurFea_v1_BIUU		
	<i>Myotis davidii</i>	David's Myotis			pseudogene ASM32734v1		
	<i>Myotis myotis</i>	Greater mouse-eared bat			pseudogene MyoMyo_v1_BIUU		
	<i>Myotis lucifugus</i>	Little Brown Bat	absent	?	not found	pseudogene Myoluc2.0	
	<i>Myotis brandtii</i>	Brandt's Bat				pseudogene ASM41265v1	
	<i>Eptesicus fuscus</i>	Big Brown Bat				intact?? EptFus1.0	
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Common pipistrelle				pseudogene PipPip_v1_BIUU	
	<i>Lasiurus borealis</i>	Red bat				pseudogene LasBor_v1_BIUU	
Miniopteridae	<i>Miniopterus natalensis</i>	Natal Long-fingered Bat	present	?	intact	intact	Mnat.v1
	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Schreibers' long-fingered bat		intact	intact	intact	MinSch_v1_BIUU
Molossidae	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Brazilian free-tailed bat	absent	pseudogene	pseudogene	intact(pseu)	TadBra_v1_BIUU
Phyllostomidae	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Jamaican fruit-eating bat		intact	intact	intact	ArtJam_v1_BIUU
	<i>Carollia perspicillata</i>	Seba's short-tailed bat		intact	truncated	intact	CarPer_v1_BIUU
	<i>Phyllostomus discolor</i>	Pale spear-nosed bat		?	intact	intact	mPhyDis1_v1.p
	<i>Tonatia saurophila</i>	Stripe-headed round-eared bat	present	?	intact	intact	TonSau_v1_BIUU
	<i>Anoura caudifer</i>	Tailed tailless bat		intact	intact	intact	AnoCau_v1_BIUU
	<i>Desmodus rotundus</i>	Common vampire bat		intact	intact	intact	ASM294091v2
	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Little big-eared bat		?	intact	intact	MicHir_v1_BIUU
Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	Parnell's mustached bat	present	intact	intact	intact	ASM46540v1
	<i>Mormoops blainvillei</i>	Antillean ghost-faced bat	absent	pseudogene	intact	intact	MorMeg_v1_BIUU
Noctilionidae	<i>Noctilio leporinus</i>	Greater bulldog bat	absent	pseudogene	pseudogene	intact(pseu)	NocLep_v1_BIUU
Rhinolophidae	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Greater Horseshoe Bat	absent	pseudogene	pseudogene	pseudogene	ASM46549v1
	<i>Rhinolophus sinicus</i>	Chinese rufous horseshoe bat		?	pseudogene	pseudogene	ASM188883v1
Hipposideridae	<i>Hipposideros galeritus</i>	Cantor's roundleaf bat	absent	?	intact	intact	HipGal_v1_BIUU
	<i>Hipposideros armiger</i>	Great roundleaf bat		pseudogene	pseudogene	intact	ASM189008v1
Craseonycteridae	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	Hog-nosed bat	?	?	intact	intact	CraTho_v1_BIUU
Megadermatidae	<i>Megaderma lyra</i>	Greater false vampire bat	absent	pseudogene	pseudogene	intact	ASM46534v1
Pteropodidae	<i>Macroglossus sobrinus</i>	Long-tongued fruit bat		?	pseudogene	pseudogene	MacSob_v1_BIUU
	<i>Eidolon helvum</i>	Straw-coloured fruit bat		?	not found	pseudogene	ASM46528v1
	<i>Pteropus alecto</i>	Black Flying Fox		?	pseudogene	pseudogene	ASM32557v1
	<i>Pteropus vampyrus</i>	Java Fruit Bat	absent	?	pseudogene	pseudogene	Pvam_2.0
	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Egyptian Fruit Bat		?	not found	pseudogene	Raegyp2.0
	<i>Eonycteris spelaea</i>	Lesser dawn bat		pseudogene	not found	pseudogene	Espe.v1

<sup>a</sup> Bhatnagar and Meisami 1998    \*based on exon 12 (720bp)

<sup>b</sup> Wible and Bhatnagar 1996

## 第三章: 哺乳類 V1R 遺伝子の探索と比較解析

### 3.1 導入

V1R は非常に動的に変異する遺伝子で、遺伝子重複や遺伝子欠失、偽遺伝子化、リガンドの遷移といった変異蓄積の速度が非常に速い。そのため近縁種同士で比べてもまったく同じレパートリーを持っていることはほぼない(Grus and Zhang 2004)。このような V1R の性質は V1R の進化とフェロモン受容の多様化が哺乳類の種分化に大きく貢献していることを示している。また、種の現在のフェロモン依存性に迅速に対応して V1R 遺伝子レパートリーが増減するために、その種のフェロモン依存度合いとも相関すると考えられる。

V1R 遺伝子はゲノム中に分散しているため、その全容の解明には全ゲノムの解読が必要である。そのために、様々な種で研究されだしたのも 2000 年代初頭に哺乳類のゲノムが解読され始めてからとなる。2005 年に Grus らは当時ゲノムが解読されたばかりのマウス、ラット、ヒト、ウシ、イヌ、オポッサムの 6 種について V1R 遺伝子を解析し、V1R 遺伝子のレパートリーは種によって大きく異なることおよびそれらの系統も複雑に入り組んでいることを発見した。この研究では哺乳類の中でより発達した鋤鼻器を持つマウス、ラット、オポッサムではコピー数が 50-190 個程度と非常に多いのに対して、鋤鼻器の構造がそれらに比べて単純なウシでは 30 個程度、イヌでは 8 個、鋤鼻器が退化しているヒトでは 4 個と鋤鼻器の構造的複雑さとの相関が見られた。2010 年に Young らはより広範な 37 種(17 目)のゲノム情報を探索した。この結果は 2005 年の Grus らの結果を概ね支持するが、V1R 遺伝子レパートリーの減衰と鋤鼻器の退化は強く相関する一方、レパートリー増加と鋤鼻器の発達はあまり相関していないことを示した。例えば鋤鼻器の退化した上位の霊長類、コウモリ、クジラでは V1R が 0-4 個程度に減衰しており、鋤鼻器の退化に伴って V1R 遺伝子も全体的に退化の途中であることが伺える。一方で、鋤鼻器の発達がウシと同程度にカテゴライズされている原猿類(ガラゴやコビトキツネザル等)では、鋤鼻器が最も発達した齧歯目と同程度に V1R が大きく増加している(100 個程度)のに対して、鋤鼻器の発達が原猿類と同程度とされる新世界ザル(リスザルやマーモセット等)では V1R が 10 個程度である。こうした哺乳類における包括的な解析は、V1R 遺伝子の増減は様々な生態や条件が複雑に絡み合った結果であり、何かしらの条件一つで説明できるものではないことを示している。

近年では次世代シーケンサーの普及により様々な哺乳類ゲノムが登録されるようになってきている。それによって、鋤鼻器退化以外の要因においても V1R 遺伝子レパートリーが大きく変化していることがわかり始めている。齧歯目はハダカデバネズミ、メクラネズミ、モグラレミングの 3 系統で収斂的に地中適応していることが知られる。これらの種ではモグラのように地中適応によって視覚が退化しており、代わりに嗅覚や聴覚を発達させて捕食や仲間同士の通信に用いてると考えられている。しかし、V1R 探索の結果、こうした地中適応している系統は通常の齧歯目が V1R を 50-100 個程度持つのに対してどれも 20 個程度まで減少していた(Jiao et al. 2019)。一方でこうした地中適応した齧歯目は社会性を発達させ、その媒介としてフェロモンを用いていることが知られる。そのためこうした地中適応した種における V1R コピー数の減少は、フェロモン知覚の退化を示すものでは

なく従来の陸上で用いていたレパトリーが一部不要となったからと推測できる。霊長目は原猿類と真猿類の大きく2つに分かれる。原猿類は霊長目の中でも早くに分岐した一群でありキツネザルやロリス等を含む。またこれらと単系統ではないがメガネザルも含まれる。真猿類は原猿類以外の霊長目の総称でサルと言われてイメージするのは通常こちらである。原猿類の一部には昼行性から夜行性に再適応した種が存在する。これら夜行性に再適応した種ではV1Rが50-100個程度に大きく増えているのに対して、昼行性の原猿類ではV1Rが20-30個程度である(Hunnicut et al. 2019)。こうした夜行性と昼行性での違いは、夜行性による視覚の重要性の低下と嗅覚の重要性の上昇と考えられるが、他の哺乳類ではこのような昼行性と夜行性による差は見られない。

哺乳類のゲノム情報は整備され始めたばかりであるため、V1R遺伝子のレパトリーは未だ多く種で未知である。V1R遺伝子の進化の過程を辿ることで、哺乳類の適応拡散においてフェロモン知覚が感覚系の一部として進化戦略にどのように関連したのかを知ることができる。本章の研究では、研究当時にNCBIに登録された哺乳類の全ゲノム332種115科23目分すべてにおいてV1R遺伝子を探索した。哺乳類全27目のうち齧歯目、翼手目、霊長目、鯨偶蹄目、食肉目の5目は特に適応拡散しており、この5目に属する種数だけで哺乳類全体の種数の8割以上を占める。そしてゲノム情報の登録も非常に盛んである。今回はこの5目とその近縁の目で1つのグループとして、それぞれのグループにおいて科からそれぞれ代表1種を選んでそれぞれの持つV1Rの系統関係を最尤推定した。さらに各グループ内でV1R遺伝子のレパトリーが種の分岐に際してどのように変化したのかを最節約的に求めた。こうしたV1R遺伝子の進化の解析によって、鋤鼻器退化によるV1R遺伝子の減少のみならず、鋤鼻器を保持している種においても適応進化に応じてV1R遺伝子レパトリーが多様な変化を遂げていることがわかった。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 データマイニングとアライメント

V1Rを取得するクエリーには既知のマウスV1Rの配列を用いた。アノテーション済みのマウスV1Rの配列はARSA DDBj(<http://ddbj.nig.ac.jp/arsa/>)で検索をした結果、1183件のヒットを得た。これには多くの重複した配列が多く含まれるので、CD-HIT(Li and Godzik 2006)を用いて、80%の類似度にクラスタリングしてそれぞれのクラスタの代表の配列(最も長い配列)をクエリーとした(48個)。検索先である哺乳類のゲノムアッセムブリーはNCBI Assemblyに登録された同種を除く哺乳類のゲノムアッセムブリーすべてをダウンロードし(表3.1)、以下の手順で各種のゲノムアッセムブリーに対して検索を実行した。まずは(i)マウスの配列をクエリーとしてゲノムアッセムブリーに対してtBLASTnで検索した。(ii)この検索でヒットした領域を対象に遺伝子予測をかけ(Exonerate; Slater and Birney 2005)、遺伝子の取得と分類(intactな配列、偽遺伝子や不完全な配列の3種類)を行った。(iii)これらの核酸配列をクエリーとして、タンパク質のデータベース(Uniref50)に対してGHOSTZ(Suzuki et al. 2015)で類似性検索をかけ、もし検索のヒット上位10位以内の既知の配列に「V1R」「vomeronasal」のキーワードが含まれていればその検索に用いた配列をV1Rの候補遺伝子とし、含まれていなければ捨てた。(iv)出力されたV1R候補遺伝子の配列のうち800bp

より長く配列内に配列を intact な配列と判定しこれより短い配列は見かけ上 intact でも偽遺伝子として判定した。(v)この intact として判定された配列をクエリーとして同じゲノムアセンブリーに再度 tBLASTn の検索をかけた。(ii)から(v)の過程を 3 回繰り返す、最終的な出力結果をその種の結果として解析に用いた(表 3.1)。これらの操作は FATE (<https://github.com/Hikoyu/FATE>)および shell スクリプトで自動化した。

OR の探索でも同様の操作を行って配列を取得した。OR の場合は既存研究でアノテーションされている哺乳類の OR の配列を 80%類似性でクラスタリングしたものをクエリーとして(i)からの操作を行った。(iii)の段階のキーワードとしては「olfactory」の単語を用いた。

サンプリングの均一性を保つために、ゲノムアセンブリーの質(Scaffold N50 値)を元に各科からそれぞれ代表 1 種を選び、解析にはこれらの種の配列を用いた(115 科分)。配列のアライメントには核酸配列をアミノ酸配列に翻訳し、MAFFT(Katoh et al. 2002)の linsi(Katoh et al. 2005)のデフォルトパラメーターを用いてアライメントを行ったあとに PAL2NAL(Suyama et al. 2006)で核酸配列へと戻してコドンのアライメントを構築した。サンプルのうちわけとしては霊長目、齧歯目、偶蹄目、食肉目、翼手目の 5 つがメジャーな集団であり、これらだけでサンプルのほとんどすべてを占めているため、(A)霊長目+皮翼目、(B)齧歯目+ウサギ目+ツパイ目、(C)鯨偶蹄目+奇蹄目、(D)食肉目+有鱗目、(E)翼手目+真無盲腸目の近縁同士の目を同じカテゴリーとしこれらの分類群に含まれない分類群の集合を(F)単孔目+有袋類+アフリカ獣上目+異節目として、それぞれのカテゴリーごとに intact な配列のみをアライメントし、一連の解析に用いた。

### 3.2.2 系統樹構築と祖先の持つレパートリー推定

V1R の遺伝子系統樹は上記の A-F の各カテゴリーごとに推定した。系統樹の構築には種特異的な挿入を削除したコドンアライメントを入力として、RAxML(Guindon and Gascuel 2003)で GTR+I+G モデルを用いて最尤推定を行った。各ノードにおける分岐の信頼性は 1000 個のブートストラップを生成し評価した。V1R 遺伝子系統樹のルートを確定するため、外群には魚類の V1R2 遺伝子を用いた。

V1R は多重重複遺伝子であるため、進化によってレパートリーが遷移する。そのため、どの祖先の時点でどれだけ V1R が重複したのか(または欠失したか)を推定すれば進化と V1R 重複の相関を調べることができる。祖先枝での増減数の推定には Notung 2.9(Chen et al. 2000)を用いた(表 3.2 の gain と loss の列)。Notung 2.9 はルート付き遺伝子系統樹に表れる局所的な遺伝子の系統関係と、種の系統樹における系統関係を比較することで、種の系統樹の各ノードで遺伝子がどれほど重複または欠失したのかを再節約的に推定する。入力として用いる各カテゴリーの V1R 遺伝子系統樹はブートストラップ値が 70%以下の部分を多分岐として系統関係の束縛を緩めた。また、各カテゴリーにおける種の系統樹は Open Tree of Life (<https://tree.opentreeoflife.org/>)から全ゲノム情報に基づいて構築された種の系統関係をダウンロードして用いた(図 3.4)。

さらに V1R 遺伝子の増減を評価するために、系統樹の各枝での遺伝子の増減速度定数を推定した。このとき、Notung 2.9 からの推定データでノードごとの遺伝子の増加数と減少数がすでにわかっているため(図 3.4, 表 3.2)、簡単のために遺伝子の増加速度定数と減少速度定数を互いに独立に計算

する。遺伝子の増減速度定数は以下のように定義した。まずある  $t$  時点のノードの遺伝子数を  $x_t$  としたときにその一つ前の祖先のノードの遺伝子数を  $x_{t-t'}$  とする。 $x_{t-t'}$  からの遺伝子数の増加量を  $\alpha$ 、減少量を  $\beta$  とし ( $x_t = x_{t-t'} + \alpha - \beta$  である)、速度定数は増加速度定数  $a_i$ 、減少速度定数を  $a_d$  とすると増加側と減少側をそれぞれ

$$\frac{dx}{dt} = a_i x, \quad \frac{dx}{dt} = -a_d x$$

とモデル化した。これを時間  $t-t'$  から  $t$  までを積分すると

$$\int_{x_{t-t'}}^{x_{t-t'}+\alpha} \frac{1}{x} dx = \int_{t-t'}^t a_i dt, \quad \int_{x_{t-t'}}^{x_{t-t'}-\beta} \frac{1}{x} dx = \int_{t-t'}^t -a_d dt$$

より

$$a_i = \frac{\log(x_{t-t'} + \alpha) - \log(x_{t-t'})}{t'}, \quad a_d = \frac{\log(x_{t-t'}) - \log(x_{t-t'} - \beta)}{t'}$$

となる。定性的に言えば  $x_t$  は注目する種(ノード)の遺伝子数で  $x_{t-t'}$  が一つ手前の祖先が持つ遺伝子数であり、 $t'$  が祖先から注目する種(ノード)への分岐時間である。ノードからノードへの分岐時間は分岐時間のデータベースである TimeTree (<http://www.timetree.org/>) から用いる種名をクエリーとして取得した(表 3.2)。

計算したノードごとの増加速度定数や減少速度定数は正規分布にはならないため、箱ひげ図としてカテゴリごとにプロットした(図 3.2)。このとき

$$\text{区間 } [Q_{1/4} - 1.5\text{IQR}, Q_{3/4} + 1.5\text{IQR}] \text{ where } \text{IQR} = Q_{3/4} - Q_{1/4}$$

よりも外にある値を外れ値とし、外れ値となった枝を他の枝と比べて有意に V1R の増減速度が変化した枝として定義した。 $t' < 3\text{Mya}$  のときは増減速度定数に  $t'$  の値が大きく影響してしまうため、 $t' < 3\text{Mya}$  となる枝はプロットから除外した。また鋤鼻器が退化した種は、鋤鼻器を保持する種とは明らかに V1R の増減の仕方に変化が生じていると考えられるため、プロットからは除外した。(F)グループは互いに系統関係が遠いその他の集合であり  $t'$  の値が枝によって大きく異なるため、増減速度定数および有意性は求めていない。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 霊長目における V1R 遺伝子レパートリーの変化

霊長目の中でも狭鼻小目(通称上位の霊長目)は鋤鼻器が退化していることはこれまでの章でも述べてきた通りである。狭鼻小目はヒト科、テナガザル科、オナガザル科の 3 科に分かれるが、すべての科で intact な V1R 遺伝子が大きく減衰しているため、鋤鼻器の退化と V1R 遺伝子の減衰の相関がはっきり見て取れる(図 3.1A; ヒト科: Human、テナガザル科: Gibbon、オナガザル科: Ugandan red coclobus)。祖先枝における V1R レパートリーの推定では鋤鼻器を持たない狭鼻小目とその近縁で鋤鼻器を持つ広鼻小目との共通祖先では 20 個の V1R を持つと推定される。これに対して狭鼻小目の共通祖先では V1R が 8 個まで減少しており、またそこから各科に分岐した後も、鋤鼻器を保持

している分類群で見られるようなV1R遺伝子の重複による増加を経験せずに減少し続ける(図3.3A)。これらのことから狭鼻小目での鋤鼻器の退化と共にV1R遺伝子は機能を失い、時間経過によるランダムな変異によって偽遺伝子化していていると考えられる。しかし狭鼻小目が含む3科ではそれぞれの科でV1R遺伝子の減衰度合いが微妙に異なる。ヒト科では3-6個と完全には失われておらずどの種でもいくつかのV1R遺伝子を残している(表3.1A中Hominidae)。テナガザル科(Hylobatidae)では2個であるが1種しかゲノム情報がなかったため科全体としてどうなっているかわからない。オナガザル科(Cercopithecidae)ではほとんどの種(19種中17種)でV1R遺伝子が消滅または1個のみを残している状態であることから、V1R遺伝子が消滅の途中にあることがわかる。こうした各科での違いの原因はよくわからないが、ヒト科ではV1R遺伝子が鋤鼻器の代わりに主嗅上皮で発現しているという報告がある(Rodriguez et al. 2000)。また、ヒト科は他の科と比較して嗅覚受容体が100個ほど多いことが報告されており(ヒト科: 293-398 個, オナガザル科: 143-375 個; Niimura et al. 2018)、今回の研究におけるOR遺伝子の探索でもヒトで552個なのに対してテナガザルでは250個、コロブスでは236個ほどと大きな差が見られた(表3.3A)。これらの比較から、ヒト科では主嗅覚系を独自に発達させていると考えられている(Niimura et al. 2018)。そのためヒト科でV1R遺伝子が完全には失われておらず主嗅覚系で発現していることは、ヒト科の主嗅覚系の発達によってV1R遺伝子が主嗅覚系の遺伝子としてリクルートされていることを示すのかもしれない。

2.3.3 小節での研究結果より、霊長目で新たにヨザル科の鋤鼻器の退化が示唆された。本小節ではV1R遺伝子の側面からこれを検証する。第二章での記載の通り、ヨザル科は新世界ザル(上記の広鼻小目の通称)と呼ばれる南米に適応拡散したサルの中でも唯一昼行性から夜行性に適応した種である。哺乳類の祖先がそうであったように、一般的に夜行性適応には視覚の退化と嗅覚の発達を伴うが、ヨザルでも視覚の退化が観察されている。そのため、嗅覚系の一部である鋤鼻器の退化の示唆はこうした予想から外れる。ヨザルのV1R遺伝子を調べてみると12個ほどである(図3.1A中Owl monkey)。しかし新世界ザルのV1R遺伝子数の変化を見ると、昼行性の種でも8-16個と全体的に少ない(表3.1A中Callitrichidae, Cebidae, Atelidae, Pitheciidae)ことがわかる。新世界ザルの祖先枝での遺伝子数の推移を見ると、広鼻小目と狭鼻小目の共通祖先から広鼻小目へは+8個-5個の増減と異常は見られないが、そこから各科へと分岐するに従ってV1R遺伝子が減少の一辺倒であることがわかる(図3.3A)。この原因は生態学的にもわかっていないが、新世界ザルの鋤鼻器は全体的に縮小傾向であるという解剖学的知見(Hunter et al. 1984; Smith et al. 2011)に一致する。そのためヨザルのV1R遺伝子数はこれら昼行性の科と比較して多いとも少ないとも言えない数値である。しかし、ヨザルのV1R遺伝子はヨザル科への分岐後でも遺伝子重複が観察されており、これは鋤鼻器の機能が失われていないことを示すと考えられ、2.3.3小節でのancV1Rから示唆されたヨザル鋤鼻器の退化を否定するものである。

古典的な分類では、霊長目は真猿類と原猿類の2つに分かれる。この2つの形態学的な大きな違いは、原猿類は真猿類と比べて嗅覚が大きく発達しており嗅覚組織が複雑化しているのに対して、真猿類は嗅覚組織が単純化しておりその代わり視覚が真猿類と比較して発達していることである。原猿類は嗅覚の発達と相関して嗅覚系遺伝子もよく発達しており、ORもV1Rも真猿類と比較するとコピー数が全体的に2倍以上多い(Niimura et al. 2018; Hunnicut et al. 2019)。現在では分子系統学の発展により、かつて原猿類とされていたメガネザルは現在真猿類と単系統となっている。その

ため真猿類と原猿類というのは正式な分類群ではなくなったのだが、嗅覚の進化について言及するときには便利である。

これまでの本小節の研究は、狭鼻小目と広鼻小目という真猿類の 2 つの大きな分類群における V1R 遺伝子の変遷を述べてきた。さらに鋤鼻器退化以外による V1R 遺伝子数の多様性を探索したところ、夜行性の原猿類で V1R が有意に増えていることがわかった。原猿類には昼行性の科と夜行性に再適応した科が存在する。今回用いた原猿類のなかでは、コビトキツネザル科(図 3.3 中: Mouse lemur)、アイアイ科(Aye-aye)、ロリス科(Slow loris)、ガラゴ科(Bushbaby)が夜行性適応した科に当たる。メガネザル科(Tarsier)も夜行性である。これらの科はその系統関係からロリス科とガラゴ科以外はそれぞれが独立に夜行性適応したと考えられる。昼行性適応している科はインドリ科(Coquerels sifaka)とキツネザル科(Ring-tailed lemur)である。鋤鼻器を保持している種のうちで V1R 遺伝子の増加速度が有意に大きい枝はコビトキツネザル科の枝および、ロリス科とガラゴ科の祖先枝であることにより(図 3.3A、表 3.2A)、V1R 遺伝子の増加とこれらの分類群の夜行性適応が相関している可能性は非常に高い。アイアイ科の枝の増加速度定数は有意となる範囲から外れているものの、一つ前の祖先が 39 個の V1R を持つと推定されるのに対して、そこからアイアイ科の枝で 18 個もの V1R を増やしている。また、メガネザル科も祖先枝の 28 個と比較して 21 個の増加と大部分の V1R 遺伝子が刷新されている。メガネザル科と真猿類の共通祖先では有意に V1R が減少しているため、おそらくここで昼行性適応が起きてメガネザル科で夜行性に再適応したのだろう。こうした原猿類の夜行性適応による V1R 遺伝子の増加は、夜行性による嗅覚への依存度増加によく合致している。昼行性適応しているインドリ科とキツネザル科は V1R のコピー数が他の原猿類と比較して明らかに少なく(図 3.1A)、遺伝子重複も夜行性の種と比較して少ない。真猿類でも昼行性の新世界ザル(広鼻小目)は鋤鼻器を保持しながらも V1R 遺伝子数を減少させていっていることを合わせると、昼行性における鋤鼻器の重要度の低下は霊長目全体に言えるように思える。一般に霊長目は熱帯や亜熱帯の森林に生息する種であるが、昼の樹上生活と V1R の(ゆっくりとした)減少の因果関係はよくわからない。昼行性真猿類における嗅覚の重要度低下は果実を見分けるために視覚の依存性が増したためと考えられるが、昼行性原猿類もこうした捕食やコミュニケーションの様式の変化によるものかもしれない。

### 3.3.2 齧歯目における V1R 遺伝子レパートリーの変化

齧歯目は哺乳類の中でも爆発的に多様化した種で、その種数は哺乳類全体の約半数に及ぶ。その生息域は陸上のほぼすべてに及び様々な環境に適応しており、例えば地中棲のハダカデバネズミや半水棲に適応したビーバーなどが有名である。しかしながら少なくとも鋤鼻器についてはすべての種が鋤鼻器を退化させることなく所持していると考えられる。また、これらを支持する事実として、齧歯目は哺乳類の中でも嗅覚を大きく発達させており、どの種もおおよそ 1000 個程度の OR 遺伝子のレパートリーを持つ(OR 遺伝子多様性については後に V1R 遺伝子と共に議論する)。そのため、齧歯目は V1R 遺伝子レパートリーも多く持つと考えられており、実際に探索されたマウスの V1R 遺伝子は 200 個超と哺乳類の中でカモノハシを除いて最多であり、齧歯目も全体としておおよそ 100 個程度と他の目と比較しても明らかに多くの V1R 遺伝子を持つ(図 3.1B)。このように嗅覚の発達し

た齧歯目において、V1R 遺伝子がどのように多様化しているのかを本小節では探索した。

V1R 遺伝子の増減数を推定した結果、今回探索した目の中でも齧歯目の増加速度定数の中間値がもっとも大きかった(図 3.2)。齧歯目における大きな V1R 遺伝子数とその増加速度定数は齧歯目の種分化のたびに V1R 遺伝子のレパートリーの大きな割合で変化していることを意味し、フェロモンのレパートリー変化が近縁種との種分化に大きく貢献していることを示唆する。こうした中で、V1R 遺伝子が有意に増減している枝はまばらに現れているため(図 3.3B)、その増減の有意性と生態の相関性を見出すことができなかった。しかしマウス(*Mus musculus*)の枝は有意に V1R 遺伝子が増加している枝の一つだが、*Mus* 属を詳しく調べると属内でマウスのみが V1R を大きく増加させていることがわかった。マウス以外の *Mus* 属では 100 個程度(103-122)の V1R を保持しているが、マウスのみが倍の 222 個の V1R を保持している(表 3.1B)。V1R 遺伝子レパートリーが拡張されてもそれは即座にフェロモン依存の行動の拡張を意味するとは限らないが、こうしたマウスの種特異的に大きなレパートリーは、マウスから更に細かく種分化するのに貢献するかもしれない。例えばマウスでは実験用マウスで発見されているフェロモン依存の行動が野生型では観察できないといった実験用と野生型の違いが報告されているが(Hattori et al. 2017)、実験用マウスと野生型マウスの地理的隔離が進めば、マウス特異的なこの大きなレパートリーはこのような実験用マウスにのみ見られるフェロモン依存の行動を生み出すのを促進することで、将来の実験用マウスと野生型マウスの生殖的隔離に貢献するかもしれない。

鋤鼻器の退化と哺乳類の適応進化を調べるにあたり、第二章では水棲適応による鋤鼻器の退化を示した。齧歯目には完全水棲に適応した種はいないが、いくつかの種が水辺に生息し半水棲に適応した形態を持つ。このような半水棲の齧歯目はビーバー科(図 3.3 中: Northern American beaver)、ヌートリア科(*Nutria*)、テンジクネズミ科カピバラ属(図 3.3 中表記なし; 表 3.3)の 3 科(属)において独立して存在する。これらの種は主に外敵から身を守るために水中生活へと適応したと考えられており、ほとんどの時間を水中で過ごして水棲植物などを捕食する。形態的に収斂しているのは水かきや潜水性能の発達である。第二章の内容から水棲適応が鋤鼻器の退化に強く相関することを示したが、一方で半水棲である鰭脚類はアザラシ科とアシカ科・セイウチ科で差が見られた。こうした科では水棲適応を果たした共通祖先で V1R 遺伝子のコピー数が大きく減少しており(3.3.4 小節参照)、水棲適応と V1R 遺伝子レパートリー減少の強い相関関係が伺える。

しかしながら、水辺に生息する齧歯目 3 種の V1R 遺伝子数の特定と解析の結果、いずれの種も近縁種や祖先枝と同水準であり系統特異的な減少が見られなかった。ビーバー科は齧歯目の中でも最小の 17 個の V1R 遺伝子しか持たなかったが(図 3.1B)、これは V1R 遺伝子の増減解析の結果、一つ前の祖先枝で大幅な減少があったことに由来しており(図 3.3B)、ビーバー科の分岐後では祖先と比較して大きな変化はないことがわかった。ビーバー科の祖先で起こった有意な V1R 遺伝子減少の原因は不明であるが、ビーバー科の近縁であるポケットマウス科(図 3.3B 中: Kangaroo rat)が祖先で 20 個まで減ったレパートリーから 67 個へと大きく V1R 遺伝子を増やしていることから、もしかしたら水棲適応はビーバー科とポケットマウス科を含むビーバー小目の共通祖先で起き、その後ポケットマウス科が陸棲へと再適応したのかもしれない。これを検証するためには他のビーバー小目の科および種の V1R 遺伝子レパートリーを調べる必要があるだろう(現時点では他種のゲノムは読まれていない)。ヌートリア科の V1R 遺伝子の数は 58 個であり近縁種のフチア科(*Desmarests hutia*)

が 86 個持つのと比較すると少ないが絶対数としては多い。祖先からヌートリア科への分岐による V1R 遺伝子の増加は 9 個でありこれは齧歯目として見ればかなり少ない増加量であるが、水棲適応との相関と見るには厳しい。テンジクネズミ科カピバラ属の保持する V1R 遺伝子数は 78 個でありこれは他の陸棲のテンジクネズミ科(Guinea pig)の 85 個と同程度である。カピバラは水陸両方で生活をするが、嗅覚系のふるまいとしては陸棲のテンジクネズミ科と変化はないように思える。

陸棲から大きく生育環境を変える哺乳類の適応進化として、水棲適応や飛行能力の獲得以外では地中棲適応が挙げられる。地中への適応は真無盲腸目のモグラやアフリカ獣上目のキンモグラの他に齧歯目のいくつかの科や属で独立に進化している。この小節では齧歯目で地中棲適応を果たしたキヌゲネズミ科モグラレミング属(図 3.3B 中:Transcaucasian mole vole)、メクラネズミ科(Northern Israeli blind subterranean mole rat)、デバネズミ科(Damaraland mole-rat)について扱う。地中への適応で見られる収斂的な特徴としては視覚の退化である。その代わりとして、地中棲の種は嗅覚や触覚が発達させて捕食やコミュニケーションに役立てていると考えられており、例えばハダカデバネズミは女王を頂点とした社会を構築してハチのようにフェロモンで社会性を維持していると考えられている。そのため、地中棲はフェロモン知覚を発達させていると考えられてきた。しかし実際に V1R 遺伝子の数を調べると一般的な齧歯目と比較して非常に少ないことがわかる(図 3.1B)。

先行研究では単に地中棲種の V1R 遺伝子のレパトリーが少ないことのみが指摘されたが(Jiao et al. 2019)、本研究では近縁種との比較や祖先枝の推定結果を含めて議論する。今回の V1R 遺伝子特定の結果は先行研究と同様、これら地中棲適応をした 3 科(属)は近縁種と比較して少ないレパトリーを持つことを示す(図 3.1B)。また、これらの種での増減数の推定では、種へと分岐する過程で V1R 遺伝子が半減したのと同時に 4-6 個の遺伝子重複を経験していること示した(図 3.3B)。これらのことから、地中棲適応によって鋤鼻器の重要性が低下し、機能が縮小していると推定する。また、地中棲適応によって新しい V1R がほとんど誕生していないことから、地中棲適応には鋤鼻器を介したフェロモン行動は適応的ではないことを示唆する。地中棲適応と嗅覚系の関係をさらに調べるために、OR 遺伝子を探索したところこの 3 科(属)で異なる進化の兆候を発見した(表 3.3B)。まずモグラレミングの OR 遺伝子数(552 個)は所属するキヌゲネズミ科(Deer mice)の OR 遺伝子数(1030 個)と比較して大きく減少している。他の近縁種でも同様に 1000 個程度の OR 遺伝子を持つことからこの減少はモグラレミング属に特有のものである。V1R 遺伝子の結果も合わせると、モグラレミングでは地中棲適応に際して嗅覚系が全体的に退化していることを示す。これに対して、メクラネズミ科(1133 個)では近縁のアシナガマウス科(Gambian giant pouched rat; 1061 個)と比較して、OR 遺伝子が同等または微増しており地中棲適応の影響は見られない。デバネズミ科(1198 個)では近縁種のヨシネズミ科(Greater cane rat; 595 個)やアフリカイワネズミ科(Dassie-rat; 647 個)と比較して大きく OR 遺伝子を増加させている。これらのことから、地中棲適応によって 3 科(属)はそれぞれ異なった進化戦略を持っていることがわかる。モグラレミングではおそらく嗅覚系以外の感覚系(触覚や聴覚)に対する依存度を強めた結果、嗅覚系にはそれに伴う依存性の低下が生じていると考えられる。これは 3.3.5 小節でも議論するが、真無盲腸目のモグラ科でも同様の傾向が見られる。これに対してメクラネズミ科とデバネズミ科は触覚などを発達させながらも引き続き嗅覚に依存していると考えられる。特にハダカデバネズミで見られるフェロモンを用いた社会性の媒体は V1R 遺伝子ではなく、OR 遺伝子が主体であると推定する。

### 3.3.3 鯨偶蹄目 V1R 遺伝子レパートリーの変化

鯨偶蹄目は偶数個の蹄を持つ動物の分類群で地球上のあらゆる場所に拡散し豊富な多様性を持つ。その中でもクジラ類は鯨偶蹄目の一部から水棲へと進化した分類群として知られる。クジラ類は完全水棲であるため、鋤鼻器が完全に退化しており痕跡も残っていない。クジラ類に対する V1R 遺伝子の先行研究では V1R 遺伝子がすべて偽遺伝子化しており intact なものは見つからなかった(Young et al. 2010)。しかし今回の探索ではクジラ類全体においていくつかの intact な V1R 遺伝子を発見している(図 3.1C; 0-3 個)。クジラ類の V1R 遺伝子は同科内などのごく近縁でも 0 個の種とわずかな種でまばらに分布している(表 3.1C; Lipotidae から Balaenidae)。クジラ類はハクジラ小目とヒゲクジラ小目の 2 つに分かれているが、ハクジラ小目では主嗅覚系も完全に退化しているのに対して、ヒゲクジラ小目は主嗅覚系を保持しており水中での捕食に用いると考えられている(Springer and Gatesy 2017)。このようにクジラ内でも嗅覚に差があるが、V1R 遺伝子の個数はどちらの小目でも差が見られなかった。そのため、クジラ類で見られる V1R 遺伝子は何かしらの機能を持つわけではなく壊れていく過程にあるのだろう。V1R 遺伝子数の増減推定の結果、クジラ類の共通祖先では 28 個から 6 個に大きく減少しており(図 3.3C)この減少速度定数(0.076)も陸棲の鯨偶蹄目全体と比較してもはるかに大きい(図 3.2)。クジラ類と最も近縁なのはカバ科である。カバ科は水中と陸上の両方に生息しているがカバ科は 32 個とウシ亜目と同程度に V1R 遺伝子を発達させており、水棲適応の影響は見られない。

クジラ類を除く鯨偶蹄目において、2.3.3 小節ではハーテビースト亜科の 3 属における鋤鼻器の退化を示唆した。ancV1R と TRPC2 の解析から、ハーテビースト亜科 3 属の鋤鼻器には機能制約に弛緩が見られるが、配列に変異が見られるのはハーテビースト属のみであった。そのためこれら 3 属に見られる選択圧の弛緩は潜在的な鋤鼻器の退化を示すのかははっきりしなかった。V1R 遺伝子の解析の結果、ハーテビースト亜科の持つ V1R 遺伝子のレパートリーとその増減は、ハーテビースト属での鋤鼻器退化のみを支持した(図 3.3C)。ハーテビースト亜科のうち鋤鼻器を保持するヌー属(Blue wilde beest)は 32 個の V1R 遺伝子を保持しておりこれはウシとほぼ同等である(図 3.1C)。これに対してダマリスクス属(Topi)とヒロラ属(Hirola)はそれぞれ 19 と 14 個まで減少しており、ハーテビースト属では更に減少して 2 個しか残っていない。これらハーテビースト亜科内での V1R 遺伝子レパートリーの差に対して、V1R 遺伝子の増減解析はこの 3 属内での段階的な減少を示唆する。最初の減少はヌー属からこれら 3 属への分岐の枝でありこの段階で 32 個から 21 個へ減少したと推定され(図 3.3C)、これは 3 属でのフレーメン反応の消失や鼻口蓋管の縮小に相関する(Hart et al. 1987)。しかしこの減少が起きた直後に分岐したダマリスクス属では V1R に種特異的な重複が観測されているためダマリスクス属では鋤鼻器が機能を保持していることを示唆する。そのため、この 3 属の祖先枝で起きた大きな V1R 遺伝子の減少とフレーメン反応の消失は鋤鼻器の退化を意味しないと考えられる。次の大きな減少はハーテビースト属の分岐においてであり、ヒロラ属とハーテビースト属の共通祖先の 15 個から 2 個に減少している。これはハーテビースト属における鼻口蓋管の閉鎖に相関し、また第二章の解析における ancV1R の変異が入った時期に一致する。以上ハーテビースト亜科における V1R 遺伝子と第二章の結果を総括すると、ハーテビースト亜科における鋤鼻器退

化はハーテビースト属においてのみ起こっており、ダマリスクス属とヒロラ属では鋤鼻器組織が縮小傾向でありながらも機能を維持していることを示唆する。ただし、ハーテビーストのゲノムの質は荒く、intactなV1R遺伝子が2個に対してtruncated(途中で遺伝子が切れている配列)となっている遺伝子が17個も存在するのに注意が必要である(表3.1C)。ハーテビーストのOR遺伝子を調べてもintactな遺伝子が116個(truncatedで500個)しかない(表3.3C)これは水棲哺乳類のように嗅覚が大きく退化していないとありえない数字である。そのため、ハーテビーストゲノムの読み直しが必要である。

こうした鋤鼻器退化とV1R遺伝子減少の相関の他にもV1R遺伝子の多様性をいくつかの分類群で発見した。鯨偶蹄目で最大のV1R遺伝子レパトリーを持つ種はシカ(図3.1C中: Hog deer)であったが、本研究で用いたシカ科12種ではV1R遺伝子の数が11-59個と種によって大きく異なった(表3.1C中 Cervidae)。同様に、ウシ科45種においてもV1R遺伝子の数が7-52個(表3.1C中 Bovidae; ハーテビースト亜科は含まず)と多様性があった。このような科内における多様性は、属や種の分岐という比較的短い時間の中でV1R遺伝子のレパトリーが大きく変化していることを示しており、こういった分類群の種分化がフェロモン知覚に強く影響されていることを示唆する。

さらに、鯨偶蹄目の中にはコミュニケーション手段として匂いを司る器官を発達させた種であるジャコウジカ科がある。ジャコウジカはシカ科ではなくウシ科の近縁として単独で一つの科として成立する。ジャコウジカの雄は下腹部に麝香腺と呼ばれる芳香物質を溜める器官を持つ。この芳香物質は繁殖期のメスを引きつけるフェロモンであると言われている。しかしながら、ジャコウジカのV1R遺伝子の21個であり(図3.1C中 Siberian musk deer)、近縁のシカ科やウシ科と比較すると少ない。V1R遺伝子の増減推定では、ジャコウジカ特異的に増えているV1R遺伝子は4コピーであり、逆にウシ科との共通祖先からジャコウジカに分岐するに当たり20コピーと約半数のV1R遺伝子が消滅している(図3.3C)。また、OR遺伝子の解析ではジャコウジカは852個のOR遺伝子を持つ(表3.3C)、これはウシ科(1060個)やシカ科(1201個)と比較すると、嗅覚が特異的に発達しているとは言えない。そのため、ジャコウジカの麝香腺の発達によって、芳香物質が多様化しているのではなく特定芳香物質の検出感度が上昇したり等、受容体とは異なる部分で進化をしているのかもしれない。また、現在発表されているジャコウジカのゲノムは荒く、truncatedとされるV1R遺伝子が109個、OR遺伝子の方が804個と大量のtruncatedな遺伝子が見られる。将来的にゲノムの質がよくなればこれらのジャコウジカからV1R遺伝子やOR遺伝子の有意な増加が発見できるかもしれない。

ジャコウジカと同様の匂いを分泌する組織を発達させた鯨偶蹄目としてはブタ科とペッカリー科が挙げられる。ブタ科とペッカリー科はそれぞれ姉妹群の近縁であり、どちらの肛門の周りに臭腺を発達させている。臭腺から分泌する匂いは個体を識別するのに用いると言われており、動物が互いの肛門を嗅ぐ仕草をするのはよく知られていることであろう。また、ブタは実際にフェロモンが特定され化学合成したものが市販されている種でもある(第一章)。そのため、鋤鼻器を用いたコミュニケーションも発達していると考えられるが、ブタ科もペッカリー科もV1R遺伝子が17個と16個と鋤鼻器を保持する鯨偶蹄目の中ではもっとも少ない(図3.1C)。V1R遺伝子の増減予測ではブタ科とペッカリー科の共通祖先へと分岐した段階で35個から16個へと大きく減少している(図3.3C、表3.2C)。一方でブタ科ではOR遺伝子が1434個に増加しており、これは鯨偶蹄目の中でもっとも多

い(表 3.3C)。ペッカリー科の OR 遺伝子は intact なもので 784 個であったが、truncated なものが 775 個あるため、ゲノムアセンブリーがきれいなものになればブタ科と同等の OR 遺伝子の数になる可能性が高い。このようにブタ科(もしくはペッカリー科かもしれない)は主嗅覚がもっとも発達しているが、V1R 遺伝子が減少していることから、主嗅覚と鋤鼻器の間で何かしらのトレードオフがあるのかもしれない。

### 3.3.4 食肉目における V1R 遺伝子レパートリーの変化

食肉目では 2.3.2 小節においてカワウソ亜科とアザラシ科の半水棲動物 2 種の鋤鼻器退化を示唆した。アザラシ科とその近縁であるアシカ科とセイウチ科を加えた鰭脚類は足をヒレ状に進化させて海中での遊泳に適応した動物である。しかしアザラシ科で鋤鼻器マーカー遺伝子の偽遺伝子化が見られる一方で、アシカ科とセイウチ科は鋤鼻器マーカー遺伝子の偽遺伝子化が見られなかった。それに対して、カワウソ亜科は鰭脚類と比較すると四肢がしっかりしていて水棲適応度合いは低いが、鋤鼻器マーカー遺伝子は偽遺伝子化していた。そのため、前小節ではクジラの完全水棲適応による鋤鼻器の退化と同時に V1R 遺伝子がほぼすべて失われたことを示したが、食肉目の半水棲動物の適応進化にはそれぞれの分類群での戦略に違いがあることが伺える。

カワウソ亜科(図 3.1D 中: Sea otter)の V1R 遺伝子レパートリーはカワウソとラッコのいずれも 7 個である。カワウソ亜科はイタチ科の動物が水棲適応した種であるが、他のイタチ科が 7-12 個の V1R 遺伝子を持つことを考えると(表 3.1D)水棲適応によって明確に V1R 遺伝子が減少しているとは言えない。むしろイタチ科が含まれるイヌ亜目は全体的に V1R 遺伝子が減少傾向であり、カワウソ亜科を含むイタチ科の少ない V1R 遺伝子の数はこうした祖先から続いている減少傾向に影響されているように思える(図 3.3D 上半分)。しかし OR 遺伝子を見ると、イタチ科(Ferret)とその近縁のレッサーパンダ科(Lesser panda)やスカンク科(Western spotted skunk)では 809-867 個程度の OR 遺伝子を持つのに対してカワウソ亜科では 500 個に減少していることから、水棲適応の影響は V1R 遺伝子よりもむしろ OR 遺伝子で強く現れている(表 3.3D)。水棲適応における OR 遺伝子への影響とカワウソ亜科では鋤鼻器が退化しているという前提に立てば、おそらく V1R 遺伝子は退化の途中にあると考えられる。しかし、そもそもカワウソ亜科の陸棲祖先の時点で V1R 遺伝子が少なくなっていた可能性とカワウソ亜科が分岐からあまり時間が経過していない(6.6-15.4Mya; Beichman et al. 2019)ことを考えると減少数としては明確に表れていないのかもしれない。

アザラシ科では解析に用いた 4 種のうち Northern elephant seal では V1R 遺伝子が 0 個で消滅しており、他の 3 種でも 1-2 個であることから、アザラシ科すべてで V1R 遺伝子は消滅の途中にあると考えられる(表 3.1D 中 Phocidae)。これに対して、アシカ科 4 種(Otariidae)では 3-12 個、セイウチ科(Odobenidae)1 種では 6 個であることからアシカ科とセイウチ科でも V1R 遺伝子が減少しているがアザラシ科とは減少の度合いが異なる。鰭脚類の共通祖先の枝では V1R 遺伝子が 18 個から 10 個に減少しており、このときの減少速度定数は約 0.59 である(図 3.3D、表 3.2D)。これは他の食肉目の枝と比べて有意な値であることから、鰭脚類共通祖先時点での水棲適応と V1R 遺伝子減少の強い相関を示す。同様に OR 遺伝子においてもアザラシ科で 296 個なのに対して、アシカ科とセイウチ科でも 367 個と 404 個と V1R 同様に水棲適応によって大きく減少している(表 3.3D)。一方で、ア

ザラシ科の枝の V1R 減少速度定数が 0.053 で有意な値なのに対して、アシカ科とセイウチ科では減少速度定数が 0.015 と他の食肉目と同程度の値になっていることから、アシカ科とセイウチ科で V1R の減少速度が減速していることを支持する。アザラシ科で鋤鼻器が退化しており、アシカ科とセイウチ科で鋤鼻器が維持されていることを考えると、アシカ科とセイウチ科で残っている V1R 遺伝子は生存戦略に必要な最低限な機能を持つ V1R 遺伝子であることが考えられる。

第 2.3.3 節における陸棲哺乳類の遺伝子マーカーの研究から、食肉目ではフォッサの鋤鼻器退化を示した。生態の観点からフォッサはおよそ鋤鼻器の退化と結びつくような生態は見つからないのだが、鋤鼻器の退化は V1R 遺伝子の観点からも支持された。フォッサの V1R 遺伝子レパートリーは 5 個であり(図 3.1D)、近縁種であるマングース科(Banded mongoose)との共通祖先から 13 個の減少しておりフォッサ分岐後では新規に V1R 増加していない(図 3.3D)。このときの減少速度定数は 0.052 でありこれは他の食肉目と比較して有意に大きな値である。これに対してフォッサの OR 遺伝子は 752 個であり(表 3.3D)これは近縁種であるマングース科の 1088 個やハイエナ科の 778 個と比較すると少なくとも大きな減少は起きていない。そのため、フォッサの嗅覚系の退化は、フェロモン知覚のみに見られる現象であり、水棲哺乳類や霊長目に見られるような主嗅覚系の退化を伴わない。これは既知の鋤鼻器が退化した種のどれとも状況が異なる。フォッサを含むマダガスカルマングース科は希少動物であり解剖学的な研究や生態の研究が少ないためさらなる研究が期待される。

食肉目は大きくイヌ亜目とネコ亜目の 2 つに分かれる(図 3.3D 中イヌ亜目は Ferret から Dog でネコ亜目は Banded mongoose から Cat)。カワウソ亜科の議論で一度触れたことだが、食肉目の V1R 遺伝子のレパートリー全体を見渡したときに、ネコ亜目とイヌ亜目ではイヌ亜目のほうが明らかに V1R 遺伝子が少ないことがわかる。実際に V1R 遺伝子の減少速度を見ても、イヌ亜目の共通祖先で V1R 遺伝子が有意に減少している(図 3.3D)。さらに、イヌ亜目のどの枝を見てもほとんど V1R 遺伝子の増加が起きておらず、イヌ亜目全体で単調に減少していることがわかる。この現象に対して、以前はイヌ亜目の長く伸びた鼻腔とネコ亜目の短く平たい鼻腔から、主嗅覚系の拡張と鋤鼻器の縮小のトレードオフ関係が提唱されていたが、現在はイヌ亜目でもネコ亜目でも同様な OR 遺伝子数を持っていることから否定されている(Montague et al. 2014 および表 3.3D)。そのためイヌ亜目での V1R 遺伝子減少を説明できる定説はない。

イヌ亜目の中では唯一クマ科(Brown bear)が V1R 遺伝子を大きく増加させており、増減数で見るとクマ科への分岐で 20 個から+17 個-10 個の増減が推定される(図 3.3D)。つまりクマ科は 27 個(パンダを除いて 23-27 個)のレパートリーのうち半分以上がクマ科特有の V1R 遺伝子であり、この増加は有意である。ジャイアントパンダのみが 10 個と V1R 遺伝子が他のクマ科と比べてかなり少ない(表 3.1D)。ジャイアントパンダの増減数推定の結果、ジャイアントパンダでは V1R 遺伝子が減少したのではなく増えなかったことが推定される(data not shown)。そのため、V1R 遺伝子の大きな増加はクマ科の中でも Ursus 属特有のものである。Ursus 属では鋤鼻器の形がわん曲しており独特に発達しているため(Tomiyasu et al. 2017)、この V1R 遺伝子の増加はこの観察に合致する。また、OR 遺伝子探索の結果、クマ科では 989 個に増加しており(表 3.3D)同じイヌ亜目内のイヌ科の 790 個やスカンク科の 867 個と比べても 100 個以上多い。そのため、クマ科ではジャイアントパンダを除いて全体的に主嗅覚系が独自に発達していると考えられる。同様の種特異的な V1R 遺伝子と OR 遺伝子の増加として、ネコ亜目のマングース科でも観測された。マングース科での V1R 遺伝子の増加も

他と比較して有意であり、また OR 遺伝子も近縁と比較して 300 個ほど増加している。マングース科における詳細な鋤鼻器の知見は見当たらなかったため、今後の解剖学的な研究が期待される。

第 3.3.3 小節のジャコウジカの項目で触れたように、哺乳類ではいくつかの種で麝香腺と呼ばれる分泌腺を収斂的に獲得している。食肉目ではジャコウネコ科(図 3.3D 中: Asian palm civet)がこれに該当する。ジャコウネコは性器周辺に麝香腺を持ち、ジャコウジカ同様に性誘引フェロモンであると考えられるが生態については詳しくわかっていない。ジャコウネコの V1R 遺伝子は 29 個であるがこれは近縁のネコ科と比べても同程度で、ジャコウネコ科への分岐で大規模な遺伝子重複も観察されなかった。その代わりジャコウネコの OR 遺伝子は近縁種と比較して発達しており、ネコ科の 766 個やハイエナ科の 778 個に対して 1015 個である(表 3.3D)。そのため、鯨偶蹄目のブタ科とペッカリー科の臭腺の発達と同様に麝香腺の発達は V1R 遺伝子ではなく OR 遺伝子に関連している。

### 3.3.5 翼手目と真無盲腸目における V1R 遺伝子レパートリーの変化

翼手目ことコウモリは多くの科で鋤鼻器を失っており、鋤鼻器の保持が確認されている科はユビナガコウモリ科とヘラコウモリ科の 2 科しかない(Bhatnagar and Meisami 1998; Yohe et al. 2017)。第 2.3.4 小節の鋤鼻器マーカー遺伝子における探索では、これら 2 つにブタバナコウモリ科を加えた 3 科が鋤鼻器を維持していると推定した。他の科では科内で鋤鼻器の進化に多様性がある場合があり、例えば今回解析に用いたクチビルコウモリ科では Parnell's mustached bat が鋤鼻器を保持しているとされる一方、同科の Antillean ghost-faced bat では鋤鼻器を失っているとされる(Yohe et al. 2017)。こうした翼手目の複雑な鋤鼻器退化の判定や過程を知るために、本小節の V1R 遺伝子の探索は役に立つであろう。また、本小節では翼手目と同じくローラシア獣上目であり、ローラシア獣上目で最も早くに分岐した(翼手目はその次に早い)真無盲腸目も扱う。

翼手目で鋤鼻器を失っている科の V1R 遺伝子レパートリーはすべて 0-3 個程度であり(図 3.1E、表 3.1E)、鋤鼻器を失っていることに合致する。こうした科に残存している V1R 遺伝子はクジラ類などのときと同様に消滅の過程にあると考えられる。ヒナコウモリ科(表 3.1E 中 Vespertilionidae)、オヒキコウモリ科(Molossidae)、キクガシラコウモリ科(Rhinolophidae)の 3 科では V1R 遺伝子が完全に消滅している。

鋤鼻器を保持していると推定される 3 科(ヘラコウモリ科、ユビナガコウモリ科、ブタバナコウモリ科)では V1R 遺伝子の個数に多様性があるが、いずれの枝においても V1R 遺伝子の重複が見られた(図 3.3E 中 Pale spear-nosed bat、Natal long-fingered bat、Hog-nosed bat)。第 2.3.4 小節で鋤鼻器を保持している可能性を提示したブタバナコウモリ科での V1R 遺伝子の重複は鋤鼻器マーカー遺伝子の結果を支持する。V1R 遺伝子をもっとも多いヘラコウモリ科(Phyllostomidae)では同科内でも 8-24 個と多様性がある(表 3.1E)。ヘラコウモリ科は競合相手の少ない新大陸(南米)に渡って爆発的に適応拡散した科であり、例えば食性は一般的なコウモリの食性である虫食に加えて果実食や吸血食と多様である。ヘラコウモリ科は科内でも鋤鼻器を保持する種としない種が混在するが、鋤鼻器を保持しない種は今回の解析に含まれていないので今後鋤鼻器を保持しないヘラコウモリを解析することでコウモリにおける鋤鼻器退化の謎に迫れるかもしれない。こうした V1R 遺伝子の多様性はこのようなヘラコウモリ科の多様性を直接反映していると考えられる。

同科内で鋤鼻器保持に多様性があるクチビルコウモリ科では、鋤鼻器を保持するとされる Parnell's mustached bat でも V1R 遺伝子の重複は見られず(図 3.3E)、そのレパートリーも 4 個と少ないため、V1R 遺伝子重複の観点からは機能的な鋤鼻器保持が疑わしい。

真無盲腸目は哺乳類の中でも齧歯目と翼手目に次いで多様な分類群である。その形態はネズミに類似するが進化的な起源はまったく異なる。その種の多様性に反して、全ゲノム情報は現在 10 種程度しか解かれていないので今後の研究が期待される。今回取り扱うのは真無盲腸目のうちソレノドン科、ハリネズミ科、トガリネズミ科、モグラ科の 4 つであるが、いずれも大きく異なる形態と V1R 遺伝子レパートリーを持つ。

形態として最もネズミに似るトガリネズミ科(図 3.3E 中: European shrew)では 53 個の V1R 遺伝子を持つがそのうち 44 個が種特異的であり、他の真無盲腸目と同じ V1R 遺伝子をほとんど共有していない。また、これはハリネズミ科でも同様で、ハリネズミ科(Western European hedgehog)の場合は V1R 遺伝子 60 個のうち 50 個が種特異的である。こうした V1R 遺伝子の種特異性は科での種分化に V1R 遺伝子レパートリーが大きく貢献することを示す。この 2 科に対して、ソレノドン科(Hispaniolan solenodon)では V1R 遺伝子が大きく減少しており、そのレパートリーは 4 個に留まる。トガリネズミ科とハリネズミ科のような大きな種特異性に対して、ソレノドン科での重複は 1 つのみであることから、鋤鼻器には最低限の機能しか残っていないことが示唆される。ソレノドン科の鋤鼻器に関しては記述がないものの、ソレノドンの鼻器は前面に大きく突出しておりこの長い鼻器で獲物の探索や土を掘り返す。そのためいかにも嗅覚が発達していそうであるが、ソレノドンの OR 遺伝子も 763 個でありトガリネズミの 1129 個やハリネズミの 1001 個と比較すると多くはない(表 3.3E)。こうしたソレノドンの形態と嗅覚系遺伝子のギャップは魅力的な研究対象であるが、ソレノドンはカリブ地域の希少動物であるため鼻器の詳細な解剖調査は難しそうだ。

モグラ科は地中棲適応した哺乳類の中でも最も有名であろう。3.3.2 節で触れた齧歯目の地中棲適応種と同様、モグラ科では視覚が退化している代わりに触覚などの他の感覚系が発達している。V1R 遺伝子の側面から見るとモグラ科の V1R 遺伝子は 8-14 個であり(表 3.1E)、およそ発達しているとは言えない。ただトガリネズミ科やハリネズミ科ほどではないが、モグラ科の V1R 遺伝子は 14 個のうち 7 個が種特異的であるため(図 3.3E)、鋤鼻器の機能としては保持されていると考えられる。モグラ科の OR 遺伝子については 662 個であり真無盲腸目の中では最も少ないが(表 3.3E)、水棲適応種などの嗅覚が明らかに退化した哺乳類と比較すると少なくない。そのため議論は難しいが、もしかしたら触覚や聴覚の進化によって嗅覚系全体の重要性の低下が起きているのかもしれない。

ジャコウジカやジャコウネコと同様、真無盲腸目トガリネズミ科にはジャコウネズミと呼ばれる麝香腺を獲得した種が存在する。今回用いた Asian musk shrew と Indochinese shrew の 2 種(2 属)がこれに当たるが(表 3.1E)、この 2 属は単系統でありトガリネズミ科の中では最も早くに分岐した。ジャコウジカやジャコウネコのときは V1R 遺伝子の増加が見られなかったことから、これらの種の麝香の受容体は OR 遺伝子にあると考えたが、ジャコウネズミ 2 属の持つ V1R 遺伝子は 108 個と 104 個でありどちらもトガリネズミと比べて倍加している(表 3.1E)。また、OR 遺伝子で比較してもジャコウネズミ 2 属の持つ OR 遺伝子はそれぞれ 1227 個と 996 個である(表 3.3E)。トガリネズミの OR 遺伝子が 1129 個であることを考えるとおおよそジャコウネズミでは OR 遺伝子が微増しており、これが麝香の発達とどこまで関連するかはわからない。そのため、少なくとも麝香腺と V1R

遺伝子の重複には相関が見られることはジャコウジカやジャコウネコの麝香腺とジャコウネズミの麝香腺との潜在的な違いを示唆するだろう。

### 3.3.6 異節上目・アフリカ獣上目・有袋類・単孔目の V1R 遺伝子レパトリーの変化

これまでの小節で述べてきた分類群はすべて北方真獣類と呼ばれる有胎盤類の中でも特に多様化した分類群である。この他にも有胎盤類にはアフリカ大陸で多様化したアフリカ獣上目、南米大陸で多様化した異節上目がある。また、現世哺乳類の主流である有胎盤類とは異なり、胎盤ではなく育児嚢で子育てをする有袋類や卵生である単孔目も現存する。これらの分類群は北方真獣類よりは現存する種数がかかなり少ないものの、それぞれの種は特殊性が強く独自の進化を遂げている(特殊なもの以外は北方真獣類との生存競争に負けて絶滅したと言うほうが適切か)。

アフリカ獣上目はアフリカで誕生し現在も主にアフリカに生息する分類群である。おもしろいことにアフリカ獣上目内ではほとんど形態の類似性がなくむしろそれぞれが北方真獣類に強く収斂している。そのため、形態を用いた系統分類では多くの誤りを招いた。現在も命名にその名残があり、例えばハネジネズミはジネズミやトガリネズミの仲間ではないし、キンモグラはモグラの仲間ではない。アフリカ獣上目の単系統性が示されたのは DNA を用いた系統分類が確立してからである。嗅覚系の研究としてはゾウ目が長い鼻に相関して哺乳類でも最も多い 2000 個程度の OR 遺伝子を持つことで有名である(Niimura and Nei 2007)。しかしゾウの嗅覚系の発達には鋤鼻器の発達は伴っていない(表 3.3F)。今回の探索の結果、ゾウは 35 個の V1R 遺伝子を保有しており、これは近縁のイワダヌキ(Hyrax)と同程度である。アフリカ獣上目でもっとも多くの V1R 遺伝子を保持しているのはハネジネズミ(Cape elephant shrew)の 67 個であり、このうち 50 個がハネジネズミ特有である(図 3.3F)。齧歯目やトガリネズミ科でも多くの V1R 遺伝子が種特異的で増えていたように、これらに形態が収斂しているハネジネズミでは V1R 遺伝子の増加やその依存性も収斂しているようだ。

アフリカ獣上目において鋤鼻器退化が観察されているのは海牛目のみである。海牛目はジュゴンやマナティという完全水棲に適応した分類群なのでクジラ亜目と同様に鋤鼻器が退化している。また、2.3.1 小節でも確かめたように、鋤鼻器の遺伝子マーカーも偽遺伝子化している。そのため、V1R 遺伝子もクジラ亜目同様にほとんど消滅しているものと考えられる。しかし今回の結果ではマナティの V1R 遺伝子は機能していることが示唆された。マナティの V1R 遺伝子は 9 個で、これはアフリカ獣上目の中でも最も少ないが、水棲哺乳類全体で比較すると最も多い。海牛目の水棲適応はクジラ亜目と同様に 5000 万年前と推定されるので、これほどの数の機能を持たない遺伝子がまだ偽遺伝子化していないとは考えにくい。また、V1R 遺伝子の増減推定では海牛目祖先の水棲適応と同時に多くの V1R 遺伝子が消滅したと推定されるが、同時にマナティの分岐後でも特異的な遺伝子重複が起きていることが確認された(図 3.3F 中 Manatee)。そのため、他の水棲哺乳類と違ってマナティの V1R 遺伝子は機能を持つと考えられる。マナティの鋤鼻器は退化しており、また鋤鼻器の遺伝子マーカーも鋤鼻神経細胞で中心的な役割を果たすので、鋤鼻神経細胞が残存しているとは考えづらい。肉食で嗅覚が(ほぼ)退化したクジラ亜目とは異なり、海牛目は草食性で嗅覚を用いて捕食をする。これに加えてマナティの OR 遺伝子の探索では 478 個と水棲哺乳類としては大きな数を確認した(表 3.3F)。そのため、マナティの V1R 遺伝子は主嗅覚系の発達とともにその一部に組み込まれているかもしれない。

アフリカ獣上目でも北方真獣類のモグラや齧歯目の一部と同様に、地中棲適応した種が存在する。アフリカトガリネズミ目キンモグラ科がこれに当たり、モグラ科などと収斂して目が退化している。キンモグラ(Cape golden mole)の V1R 遺伝子レパートリーは 18 個であり、北方真獣類の地中棲適応種と同様に少なく、またアフリカ獣上目の中ではマナティの次に少ない(図 3.1F)。遺伝子重複によってキンモグラで特異的なレパートリーが 6 個見られることから、鋤鼻器への依存度は低いが機能的であると考えられる(図 3.3F)。キンモグラの保有する OR 遺伝子は 1101 個であるがこれは近縁であるテンレックの 1152 個やハネジネズミの 941 個と比較して同程度である(表 3.3F)。そのため、キンモグラの地中棲適応において嗅覚系ではフェロモン受容の重要性のみが低下して主嗅覚系の重要性は特に変化はないと考えられる。

有袋類と単孔目はどちらも主にオーストラリア大陸と南米大陸にのみ生息する分類群である。これらはオーストラリア大陸や南米大陸の分裂によりユーラシア大陸などから隔絶された結果、有胎盤類との生存競争から生き残った種として知られる。こうした分類群は哺乳類の古い形態を維持しており独自に適応拡散している。V1R 遺伝子の側面から見ると、有袋類も単孔目も多くの V1R 遺伝子を維持しておりフェロモンによるコミュニケーションが活発であることが伺える(図 3.1F)。単孔目のカモノハシは 256 個の V1R 遺伝子を持ちこれは哺乳類の中でも最大である。これらの V1R 遺伝子はほとんど有胎盤類とは単系統のものがなく、カモノハシ特異的である(data not shown)。また、カモノハシと有胎盤類の共通して持つごく少数の V1R 遺伝子から有胎盤類の用いる V1R 遺伝子の系統が爆発的に広がったことが示唆される。単孔目のゲノムは現在カモノハシしか公開されていないが、ハリモグラのゲノムが直近で読まれているため、ハリモグラの V1R 遺伝子とも比較解析することで有胎盤類の V1R 遺伝子の起源がより鮮明になるだろう。有袋類は V1R 遺伝子が最少のもので 41 個のコアラ、最大のものでオポッサムの 94 個まで分布しており V1R 遺伝子の増減も多い(図 3.3F)。こうした有袋類での V1R 遺伝子の増減は有袋類全体での活発なフェロモン活動を示唆しており、有胎盤類ほどの鋤鼻器への依存性に多様性が無いと考えられる。

### 3.4 結論

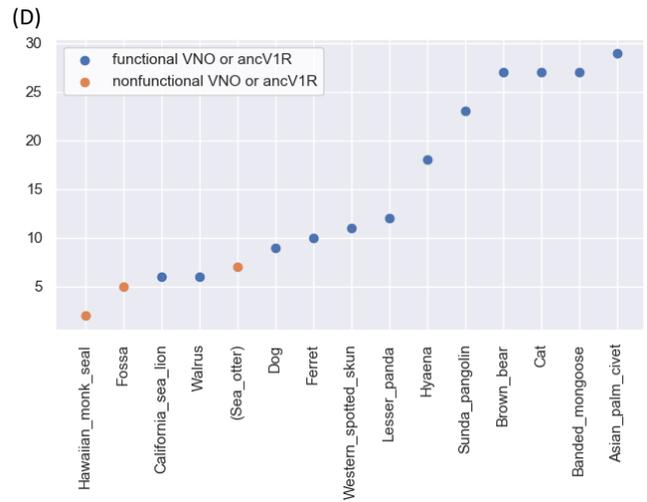
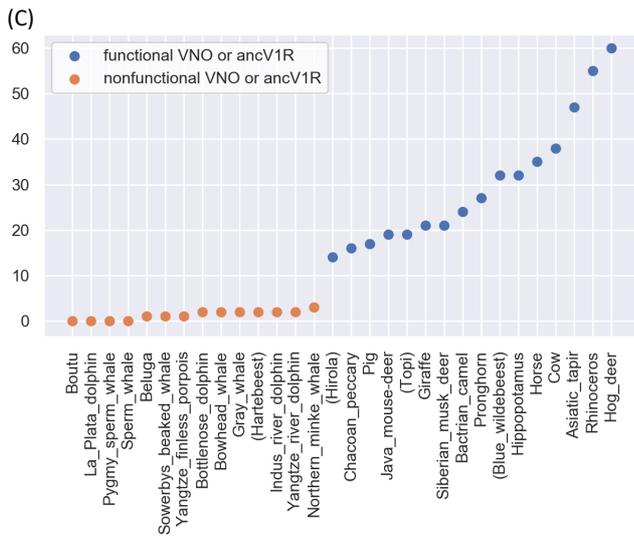
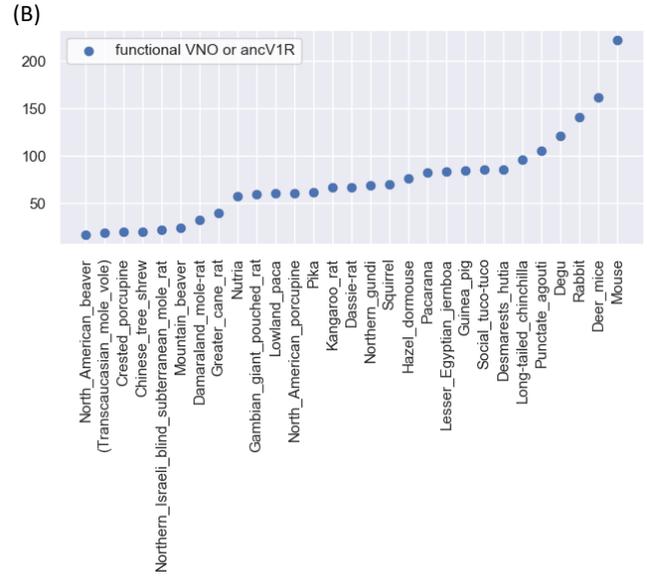
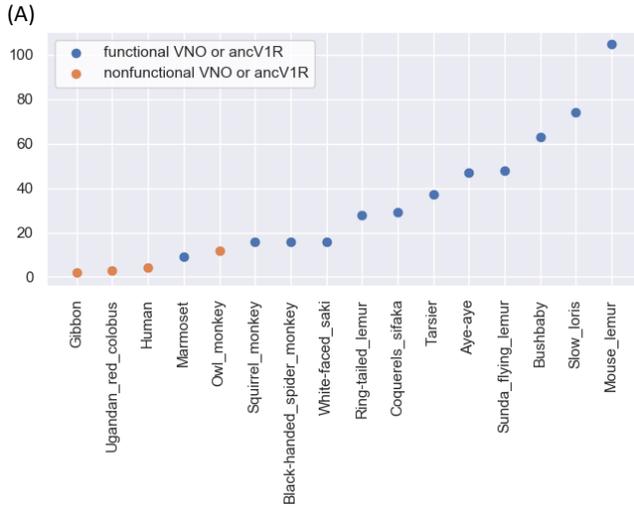
この章では、現在公開されているすべての哺乳類ゲノムに対して V1R 遺伝子の網羅的な探索と系統解析、系統関係を元にしたレパートリーの増減推定を行うことで、哺乳類の多様化による V1R 遺伝子レパートリーの遷移やフェロモン知覚への依存性が多様化する過程を明らかにした。

鋤鼻器が退化している海牛目、クジラ亜目、霊長目狭鼻猿類、翼手目の大部分では近縁の鋤鼻器が機能している種と比較して V1R 遺伝子の数が少ない。また、V1R 遺伝子のレパートリーの遷移を推定すると、翼手目以外は鋤鼻器が退化した時点で V1R 遺伝子レパートリーが大きく減少していた。これに対して翼手目では目の成立後にそれぞれの枝で独立に V1R 遺伝子が減少していた。これらの V1R 遺伝子の大きな減少はそれぞれの水棲適応、3 色覚獲得、飛行能力獲得などの適応進化に強く相関している。この結果は既知の知見を遺伝子の増減解析の観点からも確認したとともに、V1R 遺伝子の増減で十分適応進化に対する V1R 遺伝子レパートリーの影響を明らかにすることができることを示す。

また、二章の結果から新たに鋤鼻器退化が示唆されたヨザル科、フォッサ科、ハーテビースト亜科の3つの分類群について V1R 遺伝子から検討したところ、フォッサとハーテビーストでは V1R 遺伝子全体の退化の兆候が確認されたが、ヨザルとハーテビースト亜科の他の種では V1R 遺伝子の重複などが確認されたことから V1R 遺伝子が機能していると考えられる。これらの種では二章で用いた遺伝子マーカーの再検討や解剖学的な検討が必要である。

こうした鋤鼻器退化と V1R 遺伝子減少の相関関係に加え、本章では鋤鼻器を保持する種においても V1R 遺伝子進化がの多様性を明らかにした。例えば、霊長目では夜行性適応と昼行性適応による V1R 遺伝子レパートリーの大きな差、齧歯目では Mus 属の中でもマウス(*Mus musculus*)のみに見られる種特異的な V1R 遺伝子重複、鯨偶蹄目ではシカ科、ウシ科内での V1R レパートリーの多様性やブタとペッカリーでの主嗅覚の発達とフェロモン知覚のトレードオフ、食肉目ではイヌ亜目とネコ亜目での V1R 遺伝子レパートリーの大きな違いやクマ科とマンゲース科での種特異的な V1R 遺伝子と OR 遺伝子の拡張、真無盲腸目ではソレノドンの鼻器の発達に反する嗅覚系遺伝子の減少などが挙げられる。こうした鋤鼻器を保持する種における V1R 遺伝子レパートリーの多様性は、それぞれの種の適応進化によるフェロモン知覚に対する依存性の変化の結果だと考えられる。また、シカ科やウシ科などの科内部での多様性はこうした分類群の進化には種分化の原因としてフェロモン知覚が大きく関わっていることを示唆する。

# 図表



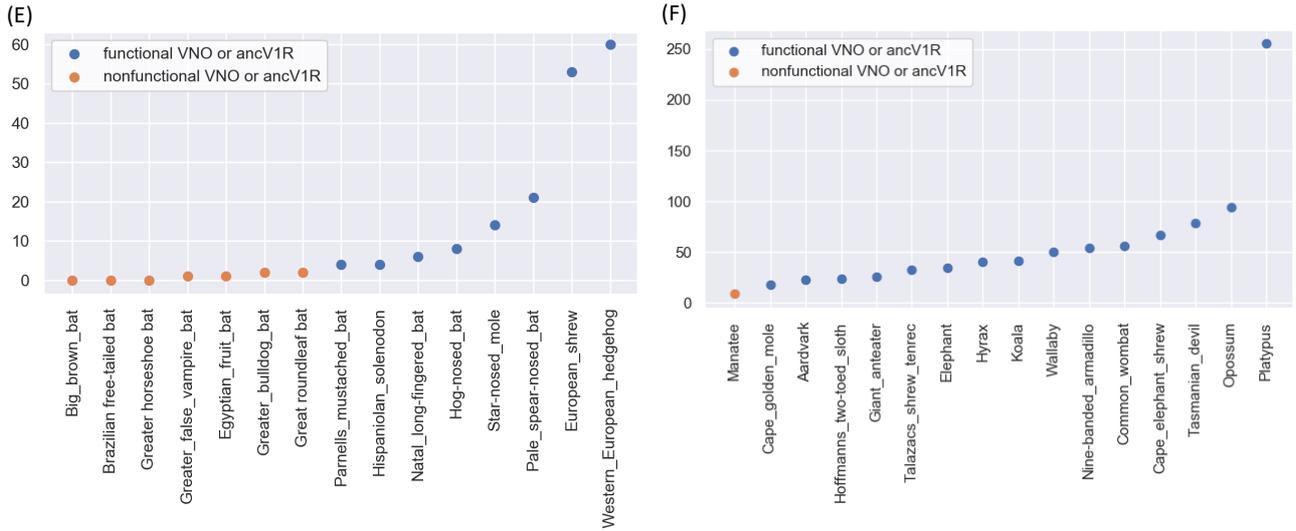


図 3.1 各分類群における V1R 遺伝子のレパートリー。(A)霊長目+皮翼目、(B)齧歯目+ウサギ目+ツパイ目、(C)鯨偶蹄目+奇蹄目、(D)食肉目+有鱗目、(E)翼手目+真無盲腸目、(F)単孔目+有袋類+アフリカ獣上目+異節目の V1R 遺伝子のコピー数を図示した。縦軸は V1R 遺伝子のコピー数を示している。各点の色は凡例に従い第二章で探索した ancV1R 遺伝子が壊れている種とそうでない種とで色分けした。各グループで左からコピー数が少ない順に並べたところ、ancV1R 遺伝子が壊れている種はほとんどが集団内で最も少ない V1R 遺伝子レパートリーを持つことがわかる。

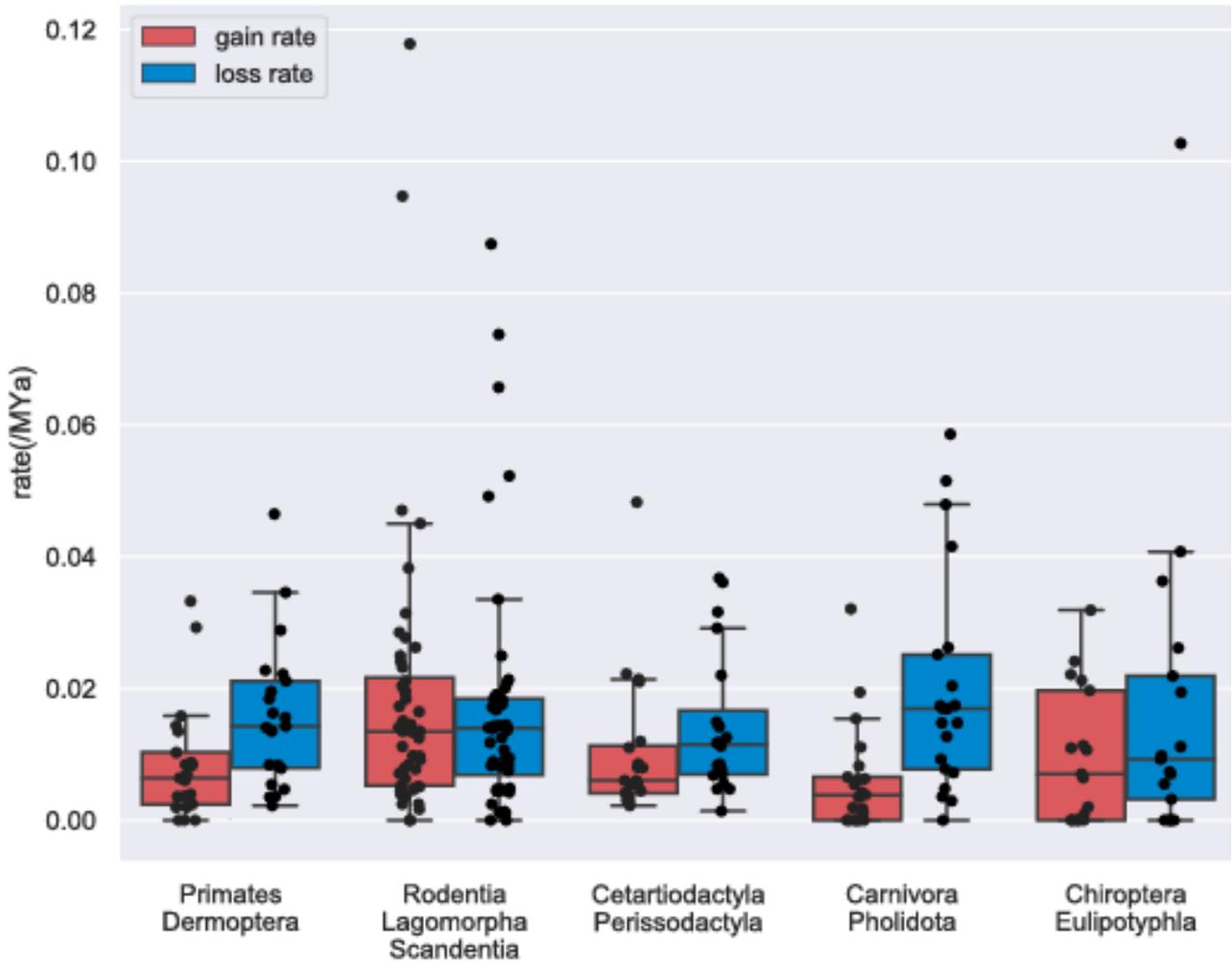
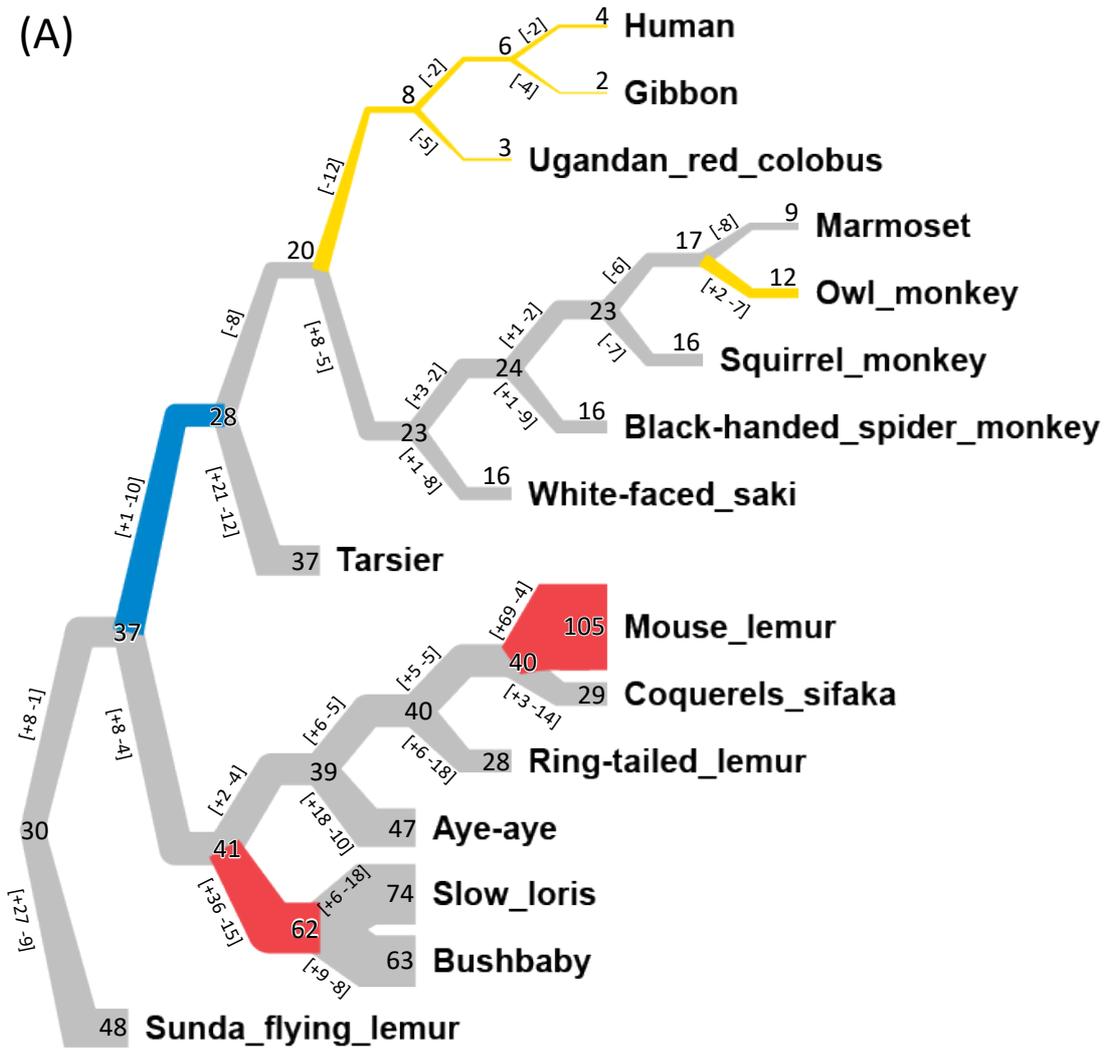
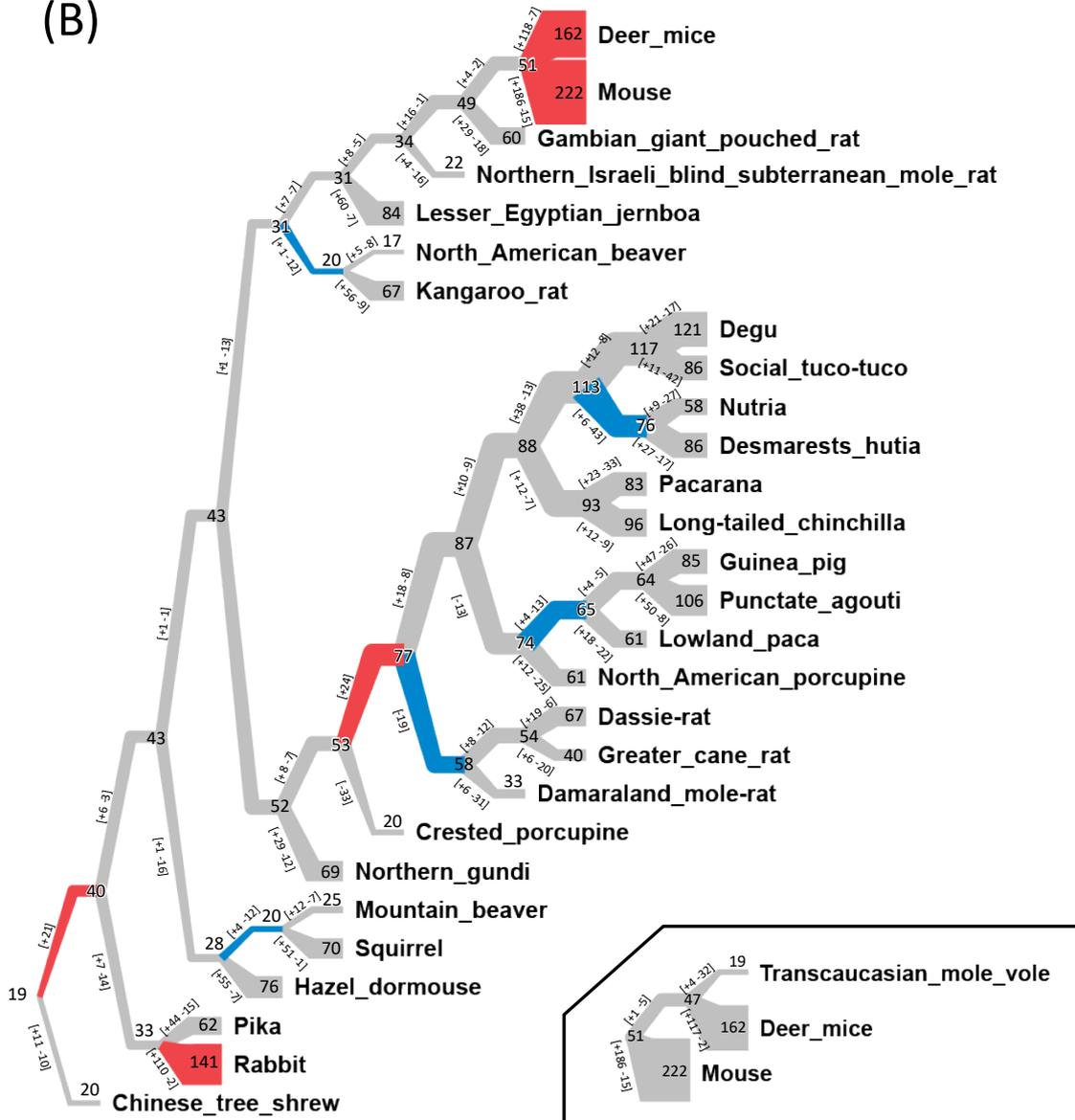


図 3.2 哺乳類の各グループにおける V1R 遺伝子の増減速度定数。それぞれのグループ(A-E グループまで)の系統樹の各枝における V1R 遺伝子の増減速度定数(赤の箱は増加速度定数、青の箱は減少速度定数)をそれぞれ箱ひげ図でプロットした。各点はそれぞれの実際の速度定数の値を示している。今回の解析では各箱ひげ図のそれぞれの第一四分位点を  $Q_{1/4}$ 、第三四分位点を  $Q_{3/4}$  とし IQR を  $Q_{3/4} - Q_{1/4}$  としたときに、区間  $[Q_{1/4} - 1.5IQR, Q_{3/4} - 1.5IQR]$  より外の値を外れ値として定義している。この外れ値は他の枝と比較して V1R 遺伝子が有意に増減している枝として図 3.3 で図示した。

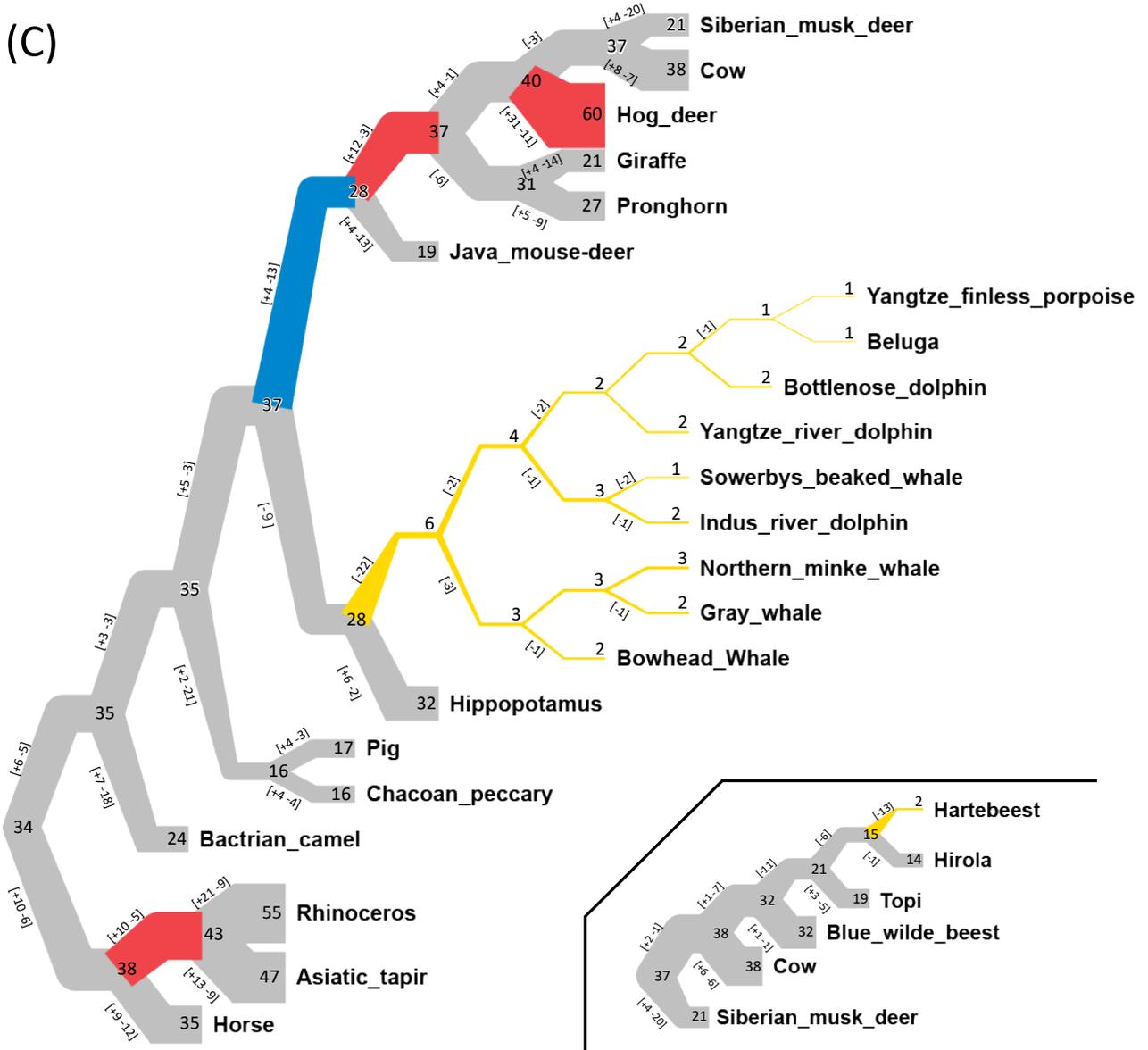
(A)



(B)

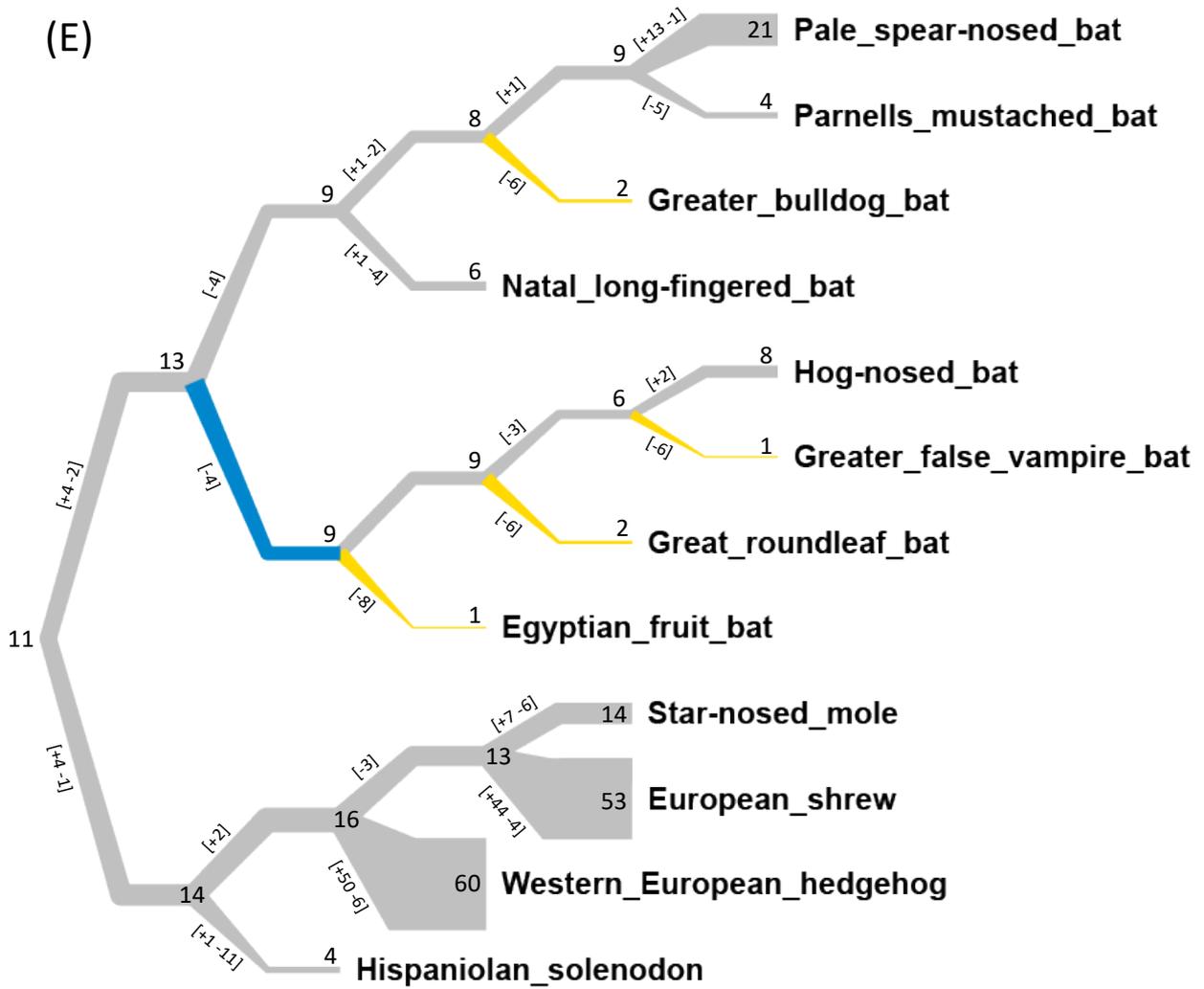


(C)





(E)



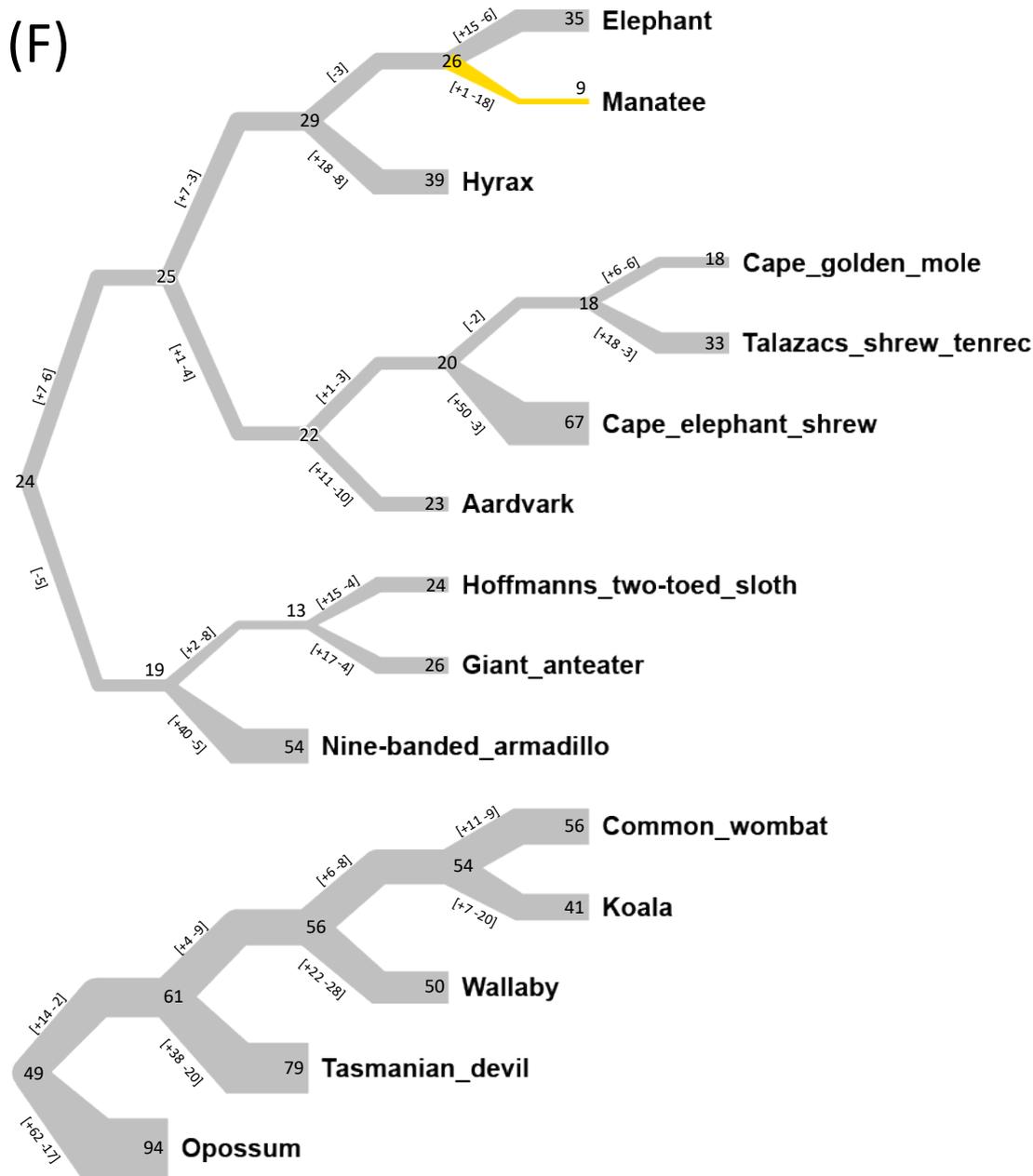


図 3.3 哺乳類の V1R 遺伝子レパートリーの変化。(A)霊長目と皮翼目(B)齧歯目とウサギ目(C)鯨偶蹄目と奇蹄目(D)食肉目と有鱗目(E)翼手目と真無盲腸目(F)アフリカ獣上目、異節上目、有袋類、単孔目における V1R 遺伝子のレパートリーと系統樹の各ノードにおける増減数の推定結果。黄色は鋤鼻器が退化した枝や ancV1R が偽遺伝子化した枝を示す。赤色は図 3.2 にて V1R 遺伝子が有意に増加していると判定された枝、青色は V1R 遺伝子が有意に減少していると判定された枝を示す。(F)グループは A-E に含まれないその他のグループでありそれぞれの種の系統的な距離の差が大きいため有意性については求めている。



図 3.4 V1R 遺伝子の増減推定に用いた樹形とノード名。ノードごとの V1R 遺伝子コピー数の推定と増減速度を求めるために便宜上各ノードに名前をつけている。この名前は表 3.2 で使用している。

表 3.1 解析した全種と V1R 遺伝子レパートリーの一覧表(分類群 A-F のグループごと)

(A)

family	Latin name	common name	assembly name	scaffold N50	intact	truncated	pseudogene
Homnidae	<i>Pan paniscus</i>	Bonobo	panpan1.1	8,197,324	3	2	89
	<i>Pan troglodytes troglodytes</i>	Chimpanzee	Pan_tro_3.0	26,972,556	5	0	147
	<i>Homo sapiens</i>	Human	GRCh38.p7	67,794,873	4	0	139
	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Western Lowland gorilla	gorGor4	81,227,029	4	6	141
	<i>Pongo abelii</i>	Orangutan	Susie_PABv2	98,475,126	6	1	117
Hylobatidae	<i>Nomascus leucogenys</i>	Gibbon	Nleu_3.0	52,956,880	2	1	81
Cercopitheidae	<i>Macaca mulatta</i>	Macaque	Mmul_8.0.1	4,193,270	0	1	67
	<i>Macaca fuscata</i>	Japanese macaque	macFus_1.0	94,905	0	1	60
	<i>Macaca fascicularis</i>	Crab-eating macaque	M_fascicularis_5.0	88,649,475	0	0	64
	<i>Macaca nemestrina</i>	Southern pig-tailed macaque	Mnem_1.0	15,219,753	0	3	67
	<i>Theropithecus gelada</i>	Gleda	Tgel_1.0	130,230,028	0	1	69
	<i>Papio anubis</i>	Olive Baboon	Panu_3.0	585,721	1	5	70
	<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandrill	BGI_mandrill_1.0	3,577,924	0	7	64
	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	Drill	Mleu.le_1.0	3,186,748	0	4	65
	<i>Cercocebus atys</i>	Sooty mangabey	Caty_1.0	12,849,131	0	4	61
	<i>Erythrocebus patas</i>	Red guenon	EryPat_v1_BIUU	34,535	1	18	88
	<i>Chlorocebus sabaues</i>	Vervet monkey	ChlSab1.1	81,825,804	1	0	71
	<i>Cercopithecus neglectus</i>	De Brazza's monkey	CertNeg_v1_BIUU	10,270	2	18	75
	<i>Ptilocolobus tephrosceles</i>	Ugandan red colobus	ASM277652v2	10,172,280	3	1	82
	<i>Colobus angolensis</i>	Angola colobus	Cang.pa_1.0	7,840,981	0	1	47
	<i>Semnopithecus entellus</i>	Hanuman langur	SemEnt_v1_BIUU	29,955	1	11	71
	<i>Rhinopithecus roxellana</i>	Golden snub-nosed monkey	Rrox_v1	1,549,224	1	2	70
	<i>Rhinopithecus bieti</i>	Black snub-nosed monkey	ASM169854v1	2,225,337	1	6	73
	<i>Nasalis larvatus</i>	Long-nosed monkey	Charlie1.0	137,426,304	0	7	46
	<i>Pygathrix nemaeus</i>	Red shanked douc langur	PygNem_v1_BIUU	68,569	1	2	85
Callitrichidae	<i>Saguinus imperator</i>	Tamarin	SagImp_v1_BIUU	65,636	8	50	179
	<i>Callithrix jacchus</i>	Marmoset	ASM275486v1	129,239,660	9	2	59
Aotidae	<i>Aotus nancymaae</i>	Owl monkey	Anan_2.0	8,268,663	12	0	59
Cebidae	<i>Saimiri boliviensis</i>	Squirrel monkey	SaiBol1.0	18,744,880	16	1	44
	<i>Cebus albifrons</i>	White-fronted capuchin	CebAlb_v1_BIUU	31,156	12	3	81
	<i>Cebus capucinus</i>	White-headed capuchin	Cebus_imitator-1.0	5,274,112	12	1	68
Atelidae	<i>Ateles geoffroyi</i>	Black-handed spider monkey	AteGeo_v1_BIUU	73,111	16	1	59
	<i>Alouatta palliata</i>	Mantled howler monkey	AloPal_v1_BIUU	72,427	11	6	84
Pitheciidae	<i>Pithecia pithecia</i>	White-faced saki	PitPit_v1_BIUU	83,104	16	9	79
	<i>Plecturocebus donacophilus</i>	Bolivian titi	CalDon_v1_BIUU	46,445	9	10	84
Tarsiidae	<i>Carlito syrichta</i>	Tarsier	Tarsius_syrichta-2.0.1	401,181	37	25	270
Cheirogaleidae	<i>Microcebus murinus</i>	Mouse lemur	Mmur_3.0	108,171,978	105	13	129
	<i>Mirza coquereli</i>	Coquerel's mouse lemur	MizCoq_v1_BIUU	79,947	87	75	108
	<i>Cheirogaleus medius</i>	Lesser dwarf lemur	CheMed_v1_BIUU	118,572	95	114	135
Indriidae	<i>Propithecus coquereli</i>	Coquerel's sifaka	Pcoq_1.0	5,604,909	29	11	77
	<i>Indri indri</i>	Indri	IndInd_v1_BIUU	28,620	29	89	310
Lemuridae	<i>Eulemur flavifrons</i>	Blue-eyed black lemur	Eflavifrons33QCA	413,352	23	14	81
	<i>Eulemur fulvus</i>	Brown lemur	EulFul_v1_BIUU	22,561	30	72	411
	<i>Eulemur macaco</i>	Black lemur	Emacaco_refEf_BWA_oneround	405,987	25	11	91
	<i>Prolemur simus</i>	Greater bamboo lemur	Prosim_1.0	2,710,671	24	25	176
	<i>Lemur catta</i>	Ring-tailed lemur	LemCat_v1_BIUU	215,715	28	9	130
Daubentonidae	<i>Daubentonia madagascariensis</i>	Aye-aye	DauMad_v1_BIUU	379,919	47	23	193
Lorisidae	<i>Nycticebus coucang</i>	Slow loris	NycCou_v1_BIUU	19,724	74	185	292
Galagidae	<i>Otolemur garnettii</i>	Bushbaby	OtoGar3	13,852,661	63	9	59
(Dermoptera)	<i>Galeopterus variegatus</i>	Sunda flying lemur	G_variegatus-3.0.2	245,189	48	39	119

(B)

family	Latin name	common name	assembly name	scaffold N50	intact	truncated	pseudogene	
Muridae	<i>Mus caroli</i>	Ryukyu mouse	CAROLI_EIJ_v1.1	122,627,250	103	10	96	
	<i>Mus musculus</i>	Mouse	GRCm38.p6	54,517,951	222	3	143	
	<i>Mus pahari</i>	Gairdner's shrewmouse	PAHARI_EIJ_v1.1	111,406,228	110	8	89	
	<i>Mus spicilegus</i>	Steppe mouse	MUSP714	2,198,966	122	21	140	
	<i>Mus spretus</i>	Algerian mouse	SPRET_EiJ_v1	131,945,496	109	57	141	
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Long-tailed field mouse	ASMI30590v1	245,982	8	241	76	
	<i>Apodemus speciosus</i>	Large Japanese field mouse	Aspe_assembly01	49,031	65	39	82	
	<i>Rattus norvegicus</i>	Rat	Rnor_6.0	14,986,627	107	6	129	
	<i>Grammomys surdaster</i>	African woodland thicklet rat	NIH_TR_1.0	8,094,907	150	12	119	
	<i>Meriones unguiculatus</i>	Mongolian gerbil	MunDraft-v1.0	374,687	92	37	106	
	<i>Psammomys obesus</i>	Fat sand rat	ASM221593v1	76,398(contig)	114	22	98	
	<i>Acomys cahirinus</i>	Egyptian spiny mouse	AcoCah_v1_BIUU	65,411	110	28	62	
	Cricetidae	<i>Stigmodon hispidus</i>	Hispid cotton rat	SigHis_v1_BIUU	101,373	162	174	227
		<i>Onychomys torridus</i>	Southern grasshopper mouse	OnyTor_v1_BIUU	20,878	104	376	445
		<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	Deer mice	Pman_1.0	3,760,915	162	20	149
<i>Peromyscus polionotus subgriseus</i>		Oldfield mouse	HU_Ppol_1.3	117,603,569	115	45	125	
<i>Phodopus sungorus</i>		Dzungarian hamster	Psun0.5	2,392(contig)	28	101	41	
<i>Mesocricetus auratus</i>		Golden hamster	MesAur1.0	12,753,307	54	26	81	
<i>Cricetulus griseus</i>		Chinese hamster	CriGri_1.0	1,147,233	92	57	96	
<i>Myodes glareolus</i>		Bank vole	ASM436859v1	1,590,265	94	7	95	
<i>Microtus ochrogaster</i>		Prairie vole	MicOch1.0	17,270,019	95	17	73	
<i>Ellobius talpinus</i>		Northern mole-vole	ETalpinus_0.1	15,246	20	25	61	
<i>Ellobius lutescens</i>		Transcaucasian mole vole	ASM168507v1	242,123	19	15	65	
<i>Ondatra zibethicus</i>		Muskrat	OndZib_v1_BIUU	89,093	41	63	71	
Nesomyidae		<i>Cricetomys gambianus</i>	Gambian giant pouched rat	CriGam_v1_BIUU	110,049	60	44	59
Spalacidae		<i>Rhizomys pruinosus</i>	Hoary bamboo rat	RhiPru_v1_BIUU	2,627	33	168	289
		<i>Nannospalax galili</i>	Northern Israeli blind subterranean mole rat	S_galili_v1.0	3,618,479	22	2	80
Dipodidae	<i>Jaculus jaculus</i>	Lesser Egyptian jernboa	JaJaC1.0	22,080,993	84	16	68	
	<i>Allactaga bullata</i>	Gobi jerboa	AllBul_v1_BIUU	36,308	73	278	51	
	<i>Zapus hudsonius</i>	Meadow jumping mouse	ZapHud_v1_BIUU	26,350	87	309	99	
Heteromyidae	<i>Dipodomys stephensi</i>	Stephens's kangaroo rat	DipSte_v1_BIUU	36,811	58	10	169	
	<i>Dipodomys ordii</i>	Kangaroo Rat	Dord_2.0	11,931,245	67	6	131	
Castoridae	<i>Castor canadensis</i>	North American beaver	C.can genome v1.0	317,708	17	4	143	
Ctenomyidae	<i>Ctenomys sociabilis</i>	Social tuco-tuco	CteSoc_v1_BIUU	49,073	86	6	83	
Octodontidae	<i>Octodon degus</i>	Degu	OctDeg1.0	12,091,372	121	8	83	
	<i>Tympanoctomys barrerae</i>	Golden vizcacha rat	Tym_barrerae_AO245_v1	4,698	74	117	104	
	<i>Octomys mimax</i>	Viscacha rat	Oct_mimax_AO248_v1	4,874	92	105	92	
Capromyidae	<i>Capromys pilorides</i>	Desmarest's hutia	CapPil_v1_BIUU	4,081	86	126	109	
Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i>	Nutria	MyoCoy_v1_BIUU	35,982	58	66	49	
Chinchillidae	<i>Chinchilla lanigera</i>	Long-tailed chinchilla	ChiLan1.0	21,893,125	96	14	74	
Dinomyidae	<i>Dinomys branickii</i>	Pacarana	DinBra_v1_BIUU	77,918	83	125	149	
Cuniculidae	<i>Cuniculus paca</i>	Lowland paca	CunPac_v1_BIUU	3,892	61	335	157	
Dasyproctidae	<i>Dasyprocta punctata</i>	Punctate agouti	DasPun_v1_BIUU	43,703	106	152	78	
Erethizontidae	<i>Erethizon dorsatum</i>	North American porcupine	GSC_porc_1.0	16,680,019	61	21	93	
Caviidae	<i>Cavia porcellus</i>	Guinea pig	cavPor3	27,942,054	85	4	165	
	<i>Cavia aepaea</i>	Brazilian guinea pig	CavAp1.0	27,928,671	30	98	75	
	<i>Cavia tschudii</i>	Montane guinea pig	CavTsc_v1_BIUU	91,436	85	49	204	
	<i>Dolichotis patagonum</i>	Patagonian cavy	DolPat_v1_BIUU	31,026	171	239	494	
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capybara	HydHyd_v1_BIUU	202,224	78	109	286	
Bathyergidae	<i>Fukomys damarensis</i>	Damaraland mole-rat	DMR_v1.0	5,314,287	33	4	46	
	<i>Heterocephalus glaber</i>	Naked mole-rat	HetGla_female_1.0	20,532,749	20	1	46	
Thryonomyidae	<i>Thryonomys swinderianus</i>	Greater cane rat	ThrSwi_v1_BIUU	21,523	40	44	70	
Petromuridae	<i>Petromus typicus</i>	Dassie-rat	PetTyp_v1_BIUU	35,766	67	50	38	
Hystriidae	<i>Hystrix cristata</i>	Crested porcupine	HysCri_v1_BIUU	64,768	20	10	56	
Ctenodactylidae	<i>Ctenodactylus gundi</i>	Northern gundi	CteGun_v1_BIUU	354,548	69	14	45	
Sciuridae	<i>Marmota marmota marmota</i>	Marmot	marMar2.1	31,340,621	58	3	123	
	<i>Marmota flaviventris</i>	Yellow-bellied marmot	GSC_YBM_2.0	11,407,078	61	17	181	
	<i>Marmota himalayana</i>	Himalayan marmot	ASM528016v1	1,497,034	49	5	110	
	<i>Urocitellus parryii</i>	Arctic ground squirrel	ASM342692v1	3,964,291	46	25	112	
	<i>Ichthyomys tridecemlineatus</i>	Squirrel	SpeTri2.0	8,192,786	70	26	177	
	<i>Spermophilus dauricus</i>	Daurian ground squirrel	ASM240643v1	1,761,345	61	51	173	
	<i>Xerus inauris</i>	South African ground squirrel	XerIna_v1_BIUU	83,865	79	217	108	
Aplodontiidae	<i>Aplodontia rufa</i>	Mountain beaver	ApLRuf_v1_BIUU	37,811	25	115	63	
Gliridae	<i>Graphiurus murinus</i>	Woodland dormouse	GraMur_v1_BIUU	28,463	116	64	115	
	<i>Glis glis</i>	Fat dormouse	GliGli_v1_BIUU	30,338	60	15	109	
	<i>Muscardinus avellanarius</i>	Hazel dormouse	MusAve_v1_BIUU	59,013	76	109	198	
Leporidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Rabbit	OryCun2.0	35,972,871	141	10	172	
	<i>Lepus americanus</i>	Snowshoe hare	LepAme_v1_BIUU	16,725	108	237	123	
Ochotonidae	<i>Ochotona princeps</i>	Pika	OchPri3.0	26,863,993	62	21	47	
Tupaiaidae	<i>Tupaia chinensis</i>	Chinese tree shrew	TupChi_1.0	3,670,124	20	22	54	

(C)

family	Latin name	common name	assembly name	scaffold N50	intact	truncated	pseudogene	
Bovidae	<i>Tragelaphus imberbis</i>	Lesser kudu	LEK	1,775,046	53	34	71	
	<i>Tragelaphus oryx</i>	Eland	CME	1,262	12	177	62	
	<i>Tragelaphus streptoceros</i>	Greater kudu	GTK	511,483	50	68	110	
	<i>Tragelaphus scriptus</i>	Bushbuck	BUB	890,554	52	14	59	
	<i>Tragelaphus speki</i>	Sitatunga	STG	46,427	29	136	85	
	<i>Tragelaphus buxtoni</i>	Mountain nyala	MTN	7,367	9	210	70	
	<i>Tragelaphus eurycerus</i>	Bongo	BNG	12,574	13	151	50	
	<i>Syncerus caffer</i>	African buffalo	ABF	2,316,376	38	5	46	
	<i>Bubalus bubalis</i>	Water buffalo	UOA_WB_1	1,412,388	34	0	37	
	<i>Bison bison</i>	American bison	Bison_UMD1.0	7,192,658	28	47	51	
	<i>Bos taurus</i>	Cow	ARS-UCD1.2	103,308,737	38	0	43	
	<i>Bos grunniens</i>	Domestic yak	LU_Bosgru_v3.0	114,386,978	30	0	43	
	<i>Aepyceros melampus</i>	Impala	IMP	344,542	7	0	53	
	<i>Neotragus moschatus</i>	Suni	SUN	952,090	20	7	42	
	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Waterbuck	DFW	779,552	31	2	30	
	<i>Redunca redunca</i>	Bohar reedbuck	BHR	423,407	27	5	33	
	<i>Oryx gazella</i>	Gemsbok	UCDavis_Ogaz_1	1,579,191	25	5	36	
	<i>Connochaetes taurinus</i>	Blue wildebeest	BWD	366,224	32	1	34	
	<i>Damaliscus lunatus</i>	Topi	CTB	1,166,796	19	3	38	
	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	Hartebeest	HBT	12,034	2	17	15	
	<i>Beatragus hunteri</i>	Hirela	BeaHun_v1_BIUU	69,303	14	2	36	
	<i>Pantholops hodgsonii</i>	Chiru	PHO1.0	2,772,860	28	1	40	
	<i>Hemitragus hylocrius</i>	Nilgiri tahr	HemHyl_v1_BIUU	85,340	28	8	35	
	<i>Ovis aries</i>	Sheep	Oar_v4.0	100,009,711	32	0	38	
	<i>Ovis ammon</i>	Argali	O_ammon_KGZ_v1.0	72,289,505	22	2	24	
	<i>Ovis canadensis</i>	Bighorn sheep	OviCan_v1_BIUU	69,397	28	9	33	
	<i>Ammotragus lervia</i>	Barbary sheep	ALER1.0	1,301,762	31	3	33	
	<i>Capra hircus</i>	Goat	ARS1	87,277,232	31	0	33	
	<i>Capra aegagrus</i>	Wild goat	CapAeg_1.0	91,317,560	28	8	38	
	<i>Capra sibirica</i>	Siberian ibex	ASM318261v2	15,190,720	31	5	35	
	<i>Pseudois nayaur</i>	Bharal	ASM318257v1	21,385	28	3	39	
	<i>Neotragus pygmaeus</i>	Royal antelope	RAL	363,895	24	9	39	
	<i>Oreotragus oreotragus</i>	Klipspringer	KSP	339,390	32	2	25	
	<i>Philantomba maxwellii</i>	Maxwell's duiker	MXD	383,899	26	9	23	
	<i>Cephalophus harveyi</i>	Harvey's duiker	HVD	365,466	20	1	23	
	<i>Sylvicapra grimmia</i>	Bush duiker	CMD	583,330	20	6	29	
	<i>Madoqua kirkii</i>	Kirk's dik-dik	KDD	27,730	12	5	49	
	<i>Raphicerus campestris</i>	Steenbok	SNB	537,161	21	8	37	
	<i>Procapra przewalskii</i>	Przewalski's gazelle	PLG	5,522,907	18	0	26	
	<i>Ourebia ourebi</i>	Oribi	ORB	1,259	9	64	40	
	<i>Saiga tatarica</i>	Saiga	SaiTat_v1_BIUU	6,453	22	22	43	
	<i>Nanger granti</i>	Grant's gazelle	GTG	528,456	29	5	36	
	<i>Eudorcas thomsoni</i>	Thomson's gazelle	TMG	1,581,717	27	2	36	
	<i>Litocranius walleri</i>	Gerenuk	GRK	3,126,223	31	1	37	
	<i>Antidorcas marsupialis</i>	Springbok	SGB	694,905	24	4	41	
Cervidae	<i>Elaphurus davidianus</i>	Pere David's deer	Milu1.0	2,844,142	43	32	52	
	<i>Cervus elaphus hippelaphus</i>	Red deer	CerElal1.0	107,358,006	19	12	51	
	<i>Axis porcinus</i>	Hog deer	ASM379854v1	20,764,858	59	22	61	
	<i>Odocoileus virginianus</i>	White-tailed deer	Ovir.te_1.0	850,721	29	1	33	
	<i>Odocoileus hemionus hemionus</i>	Mule deer	UofA_Ohem_1.0	838,758	29	0	29	
	<i>Capreolus capreolus</i>	Roe Deer	kmer631	10,458	11	110	41	
	<i>Rangifer tarandus</i>	Reindeer	RanTarSib_v1_BIUU	89,062	29	12	49	
	<i>Hydropotes inermis</i>	Chinese water deer	NPU_HINE_1.0	13,818,975	25	4	35	
	<i>Muntiacus crinifrons</i>	Black muntjac	BMJ	1,305,444	33	5	70	
	<i>Przewalskium albirostris</i>	White-lipped deer	WLD	3,769,372	54	34	88	
	<i>Muntiacus reevesi</i>	Reeves' muntjac	CIJ	1,221,377	35	25	49	
	<i>Muntiacus muntjak</i>	Muntjak	CMJ	1,258,210	41	16	45	
	<i>Tragulus javanicus</i>	Java mouse-deer	ASM402496v2	14,082,842	19	40	29	
	<i>Tragulus kanchil</i>	Lesser mouse-deer	LMD	243,497	15	16	52	
	Moschidae	<i>Moschus moschiferus</i>	Siberian musk deer	MosMos_v2_BIUU_UCD	11,728,851	21	109	51
		<i>Moschus berezovskii</i>	Chinese forest musk deer	FMD	2,509,225	17	3	28
		<i>Moschus chrysogaster</i>	Alpine musk deer	NPU_MCHR_1.0	100,428	11	8	32
	Giraffidae	<i>Giraffa tippelskirchi</i>	Giraffe	ASMI65123v1	212,164	21	4	31
		<i>Okapia johnstoni</i>	Okapi	ASMI66083v1	111,538	24	25	33
	Antilocapridae	<i>Antilocapra americana</i>	Pronghorn	AntAmePen_v2_BIUU_UCD	18,845,065	27	91	70
Lipotidae	<i>Lipotes vexillifer</i>	Yangtze river dolphin	Lipotes_vexillifer_v1	2,419,148	2	1	48	
Iniidae	<i>Inia geoffrensis</i>	Boutu	IniGeo_v1_BIUU	26,707	0	0	32	
Delphinidae	<i>Sousa chinensis</i>	Indo-pacific humpbacked dolphin	S_chinensis_fine_genome_map	9,008,636	1	0	28	
	<i>Tursiops truncatus</i>	Bottlenose dolphin	NIST_Tur_tru_v1	26,555,543	2	1	31	
	<i>Tursiops aduncus</i>	Indo-pacific bottlenose dolphin	ASM322739v1	1,235,788	1	1	33	
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	Pacific white-sided dolphin	ASM367639v1	28,371,583	2	1	38	
	<i>Orcinus orca</i>	Killer whale	Oorc_1.1	12,735,091	1	0	26	
Phocoenidae	<i>Phocoena phocoena</i>	Harbor porpoise	ASM307100v1	27,499,337	0	7	20	
	<i>Neophocaena asiakorae</i>	Yangtze finless porpoise	Neophocaena_asiakorae_V1	6,341,296	1	0	39	
Pontoporiidae	<i>Pontoporia blainvilliei</i>	La Plata dolphin	PonBla_v1_BIUU	2,541	0	1	28	
Platanistidae	<i>Platanista minor</i>	Indus river dolphin	PlaMin_v1_BIUU	23,933	2	0	35	
Monodontidae	<i>Delphinapterus leucas</i>	Beluga	ASM228892v2	19,885,328	1	1	50	
	<i>Monodon monoceros</i>	Narwhal	MonMon_v1_BIUU	88,921	2	0	49	
Physeteridae	<i>Physeter catodon</i>	Sperm whale	ASM283717v2	122,182,240	1	0	39	
Kogiidae	<i>Kogia breviceps</i>	Pygmy sperm whale	KogBre_v1_BIUU	28,812	0	2	45	
Ziphiidae	<i>Mesoplodon bidens</i>	Sowerby's beaked whale	MesBid_v1_BIUU	33,532	1	6	66	
	<i>Ziphius cavirostris</i>	Cuvier's beaked whale	ZipCav_v1_BIUU	3,608	0	16	39	
Balaenopteridae	<i>Megaptera novaeangliae</i>	Humpback whale	megNov1	9,138,802	0	4	40	
	<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	Southern minke whale	ASM97880v1	20,082	2	2	44	
	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Northern minke whale	BalAcu1.0	12,843,668	3	0	51	
Eschrichtiidae	<i>Eschrichtius robustus</i>	Gray whale	EscRob_v1_BIUU	94,414	2	0	53	
Balaenidae	<i>Balaena mysticetus</i>	Bowhead whale	Bowhead_Whale_genome_resource_v1.0	876,686	2	2	38	
	<i>Eubalaena japonica</i>	North pacific right whale	EubJap_v1_BIUU	39,813	2	3	48	
Hippopotamidae	<i>Hippopotamus amphibius</i>	Hippopotamus	HipAmp_v2_BIUU_UCD	4,444,377	32	3	72	
Suidae	<i>Sus scrofa</i>	Pig	Sscrofa11.1	88,231,837	17	0	58	
Tayassuidae	<i>Catagonus wagneri</i>	Chacoan peccary	CatWag_v1_BIUU	91,723	16	0	27	
Camelidae	<i>Vicugna pacos huacaya</i>	Alpaca	VicPac3.1	24,022,313	20	4	27	
	<i>Camelus dromedarius</i>	Arabian camel	Cdrom64K	1,482,444	27	2	31	
	<i>Camelus bactrianus</i>	Bactrian camel	Ca_bactrianus_MBC_1.0	8,812,066	24	1	34	
	<i>Camelus ferus</i>	Wild Bactrian camel	CB1	2,005,940	28	0	30	
Rhinocerotidae	<i>Ceratotherium simum cottoni</i>	Northern white rhinoceros	CerCot_v1_BIUU	23,005	58	25	185	
	<i>Ceratotherium simum simum</i>	Rhinoceros	CerSimSim1.0	26,277,727	55	5	106	
	<i>Dicerorhinus sumatrensis</i>	Sumatran rhinoceros	ASM284483v1	614,498	50	26	137	
	<i>Diceros bicornis</i>	Black rhinoceros	DicBicMic_v1_BIUU	115,504	54	28	215	
Equidae	<i>Equus asinus</i>	Donkey	ASMI130575v1	3,776,412	36	1	66	
	<i>Equus caballus</i>	Horse	EquCab2	46,749,900	35	1	61	
	<i>Equus przewalskii</i>	Przewalski's wild horse	Burgud	513,800	33	2	60	
Tapiridae	<i>Tapirus indicus</i>	Asiatic tapir	TapInd_v1_BIUU	308,930	47	16	97	
	<i>Tapirus terrestris</i>	Brazilian tapir	TapTer_v1_BIUU	186,384	50	51	122	

(D)

family	Latin name	common name	assembly name	scaffold N50	intact	truncated	pseudogene
Mustelidae	<i>Gulo gulo</i>	Wolverine	Gulo_2.2_annotated	178,272	7	6	48
	<i>Enhydra lutris</i>	Sea otter	ASM228890v2	38,751,465	7	1	54
	<i>Pteronura brasiliensis</i>	Giant otter	PteBra_v1_BIUU	119,023	7	0	55
	<i>Mustela putorius furo</i>	Ferret	MusPutFur1.0	9,335,154	10	2	57
	<i>Neovison vison</i>	Mink	NNQGG.v01	6,814,223	10	3	47
	<i>Taxidea taxus jeffersonii</i>	American badger	ASM369799v1	54,556	12	2	46
	<i>Mellivora capensis</i>	Ratel	MelCap_v1_BIUU	59,143	10	8	64
Ailuridae	<i>Ailurus fulgens</i>	Lesser panda	ASM200746v1	2,983,736	12	3	44
Mephitidae	<i>Spilogale gracilis</i>	Western spotted skunk	SpiGra_v1_BIUU	85,970	11	1	57
Ursidae	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Giant panda	ASM200744v1	9,947,519	10	0	87
	<i>Ursus americanus</i>	American black bear	ASM334442v1	189,900	23	7	89
	<i>Ursus arctos horribilis</i>	Brown bear	ASM358476v1	36,708,181	27	4	78
	<i>Ursus maritimus</i>	Polar bear	UrsMar_1.0	15,940,661	25	9	85
Phocidae	<i>Neomonachus schauinslandi</i>	Hawaiian monk seal	ASM220157v1	29,518,589	2	1	60
	<i>Leptonychotes weddellii</i>	Weddell seal	LepWed1.0	904,031	2	4	49
	<i>Phoca vitulina</i>	Harbor seal	GSC_HSeal_1.0	41,024,070	1	0	56
	<i>Mirounga angustirostris</i>	Northern elephant seal	MirAng_v1_BIUU	64,640	0	3	48
Otariidae	<i>Callorhinus ursinus</i>	Northern fur seal	ASM326570v1	31,506,801	12	2	113
	<i>Arctocephalus gazella</i>	Antarctic fur seal	arcGaz3	139,181,869	3	2	62
	<i>Eumetopias jubatus</i>	Steller sea lion	ASM402803v1	14,018,600	6	5	61
	<i>Zalophus californianus</i>	California sea lion	zalCa1.2	143,424,588	6	1	69
Odobenidae	<i>Odobenus rosmarus</i>	Walrus	Oros1.0	2,616,778	6	1	71
Canidae	<i>Canis lupus dingo</i>	Dingo	ASM325472v1	34,446,301	8	0	47
	<i>Canis familiaris</i>	Dog	CanFam3.1	45,876,610	9	0	46
	<i>Lycan pictus</i>	Lycan	LycPicSAfr1.0	63,240,551	4	7	35
	<i>Vulpes vulpes</i>	Fox	VulVul2.2	12,472,085	6	3	53
	<i>Vulpes lagopus</i>	Arctic fox	VulLag_v1_BIUU	102,053	7	45	79
Felidae	<i>Felis catus</i>	Cat	Felis_catus_9.0	83,967,707	27	1	85
	<i>Felis nigripes</i>	Black-footed cat	FelNig_v1_BIUU	18,631	25	13	73
	<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>	Amur leopard cat	Prionailurus_bengalensis_euptilurus_v01	152,598	21	7	85
	<i>Puma concolor</i>	Puma	Pco_k61	193,865	24	9	75
	<i>Acinonyx jubatus</i>	Cheetah	aciJub1	3,122,036	22	4	77
	<i>Panthera pardus</i>	Leopard	PanPar1.0	21,701,857	21	16	96
	<i>Panthera tigris</i>	Tiger	PanTig1.0	8,860,407	18	4	82
	<i>Panthera onca</i>	Jaguar	PanOnc_v1_BIUU	116,574	22	13	111
Viverridae	<i>Paradoxurus hermaphroditus</i>	Asian palm civet	ParHer_v1_BIUU	71,823	29	2	72
Hyaenidae	<i>Hyaena hyaena</i>	Hyaena	ASM300989v1	2,001,327	18	1	65
Herpestidae	<i>Helogale parvula</i>	Dwarf mongoose	HelPar_v1_BIUU	179,119	25	29	49
	<i>Mungos mungo</i>	Banded mongoose	MunMun_v1_BIUU	236,501	27	14	53
	<i>Suricata suricatta</i>	Meerkat	meerkat_22Aug2017_6uvM2_HiC	141,453,419	14	8	47
Eupleridae	<i>Cryptoprocta ferox</i>	Fossa	CryFer_v1_BIUU	173,473	5	0	75
Manidae	<i>Manis pentadactyla</i>	Chinese pangolin	M_pentadactyla-1.1.1	117,920	17	13	49
	<i>Manis javanica</i>	Sunda pangolin	ManJav1.0	204,728	23	28	41
	<i>Manis tricuspis</i>	Tree pangolin	ManTri_v1_BIUU	25,241	18	143	52

(E)

family	Latin name	common name	assembly name	scaffold N50	intact	truncated	pseudogene
Vespertilionidae	<i>Murina aurata feae</i>	Little tube-nosed bat	MurFea_v1_BIUU	26,051	0	0	15
	<i>Myotis davidii</i>	David's myotis	ASM32734v1	3,454,484	0	0	10
	<i>Myotis myotis</i>	Greater mouse-eared bat	MyoMyo_v1_BIUU	21,824	0	0	23
	<i>Myotis lucifugus</i>	Little brown bat	Myoluc2.0	4,293,315	0	0	13
	<i>Myotis brandtii</i>	Brandt's bat	ASM41265v1	3,225,832	0	0	18
	<i>Eptesicus fuscus</i>	Big brown bat	EptFus1.0	13,454,942	0	1	9
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Common pipistrelle	PipPip_v1_BIUU	33,992	0	0	4
	<i>Lasiurus borealis</i>	Red bat	LasBor_v1_BIUU	38,543	0	0	6
Miniopteridae	<i>Miniopterus natalensis</i>	Natal long-fingered bat	Mnat.v1	4,315,193	6	0	5
	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Schreibers' long-fingered bat	MinSch_v1_BIUU	108,707	6	0	4
Molossidae	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Brazilian free-tailed bat	TadBra_v1_BIUU	24,311	0	0	18
Phyllostomidae	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Jamaican fruit-eating bat	ArtJam_v1_BIUU	35,347	15	33	36
	<i>Carollia perspicillata</i>	Seba's short-tailed bat	CarPer_v1_BIUU	10,739	11	24	38
	<i>Phyllostomus discolor</i>	Pale spear-nosed bat	mPhyDis1_v1.p	110,241,909	21	1	60
	<i>Tonatia saurophila</i>	Stripe-headed round-eared bat	TonSau_v1_BIUU	165,561	16	5	37
	<i>Anoura caudifer</i>	Tailed tailless bat	AnoCau_v1_BIUU	185,021	24	16	52
	<i>Desmodus rotundus</i>	Common vampire bat	ASM294091v2	26,869,735	12	3	18
	<i>Micronycteris hirsuta</i>	Little big-eared bat	MicHir_v1_BIUU	68,868	8	13	23
	Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	Parnell's mustached bat	ASM46540v1	22,675	4	8
<i>Mormoops blainvillei</i>		Antillean ghost-faced bat	MorMeg_v1_BIUU	156,292	3	3	21
Noctilionidae	<i>Noctilio leporinus</i>	Greater bulldog bat	NocLep_v1_BIUU	191,494	2	2	9
Rhinolophidae	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Greater horseshoe bat	mRhiFer1_v1.p	88,025,743	0	0	27
	<i>Rhinolophus sinicus</i>	Chinese rufous horseshoe bat	ASM188883v1	3,754,400	0	0	29
Hipposideridae	<i>Hipposideros galeritus</i>	Cantor's roundleaf bat	HipGal_v1_BIUU	37,985	5	28	38
	<i>Hipposideros armiger</i>	Great roundleaf bat	ASM189008v1	2,328,177	2	0	31
Craseonycteridae	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	Hog-nosed bat	CraTho_v1_BIUU	25,762	8	4	21
Megadermatidae	<i>Megaderma lyra</i>	Greater false vampire bat	ASM46534v1	16,881	1	2	37
Pteropodidae	<i>Macroglossus sobrinus</i>	Long-tongued fruit bat	MacSob_v1_BIUU	453,401	0	0	36
	<i>Eidolon helvum</i>	Straw-coloured fruit bat	ASM46528v1	27,684	0	0	38
	<i>Pteropus alecto</i>	Black flying fox	ASM32557v1	15,954,802	0	0	37
	<i>Pteropus vampyrus</i>	Java fruit bat	Pvam_2.0	5,954,017	0	0	31
	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Egyptian fruit bat	rouEgy_v1.4		1	0	37
	<i>Rousettus leschenaultii</i>	Leschenault's rousette	rouLes150624		1	0	38
	<i>Eonycteris spelaea</i>	Lesser dawn bat	Espe.v1	8,002,591	0	0	33
	Solenodontidae	<i>Solenodon paradoxus woodi</i>	Hispaniolan solenodon	ASM290108v1	110,915	4	3
Erinaceidae	<i>Erinaceus europaeus</i>	Western European hedgehog	EriEur2.0	3,264,618	60	4	45
Soricidae	<i>Sorex araneus</i>	European shrew	SorAra2.0	22,794,405	53	7	45
	<i>Suncus murinus</i>	Asian musk shrew	r150910	7,100,000	108	1	100
	<i>Crocidura indochinensis</i>	Indochinese shrew	CroInd_v1_BIUU	4,929	104	214	240
Talpidae	<i>Scalopus aquaticus</i>	Eastern mole	ScaAqu_v1_BIUU	94,879	14	52	16
	<i>Uropsilus gracilis</i>	Gracile shrew mole	UroGra_v1_BIUU	55,035	8	0	20
	<i>Condylura cristata</i>	Star-nosed mole	ConCri1.0	55,520,359	14	2	12

family	Latin name	common name	assembly name	scaffold N50	intact	truncated	pseudogene
<i>Ornithorhynchidae</i>	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Platypus	mOrnAna1.p.v1	83,338,043	256	6	444
<i>Macropodidae</i>	<i>Macropus eugenii</i>	Wallaby	Meug_1.1	36,602	50	33	97
<i>Phascolarctidae</i>	<i>Phascolarctos cinereus</i>	Koala	phaCin_unsw_v4.1	11,587,828	41	0	48
<i>Vombatidae</i>	<i>Vombatus ursinus</i>	Common wombat	bare-nosed wombat genome assembly	28,503,419	56	6	73
<i>Dasyuridae</i>	<i>Sarcophilus harrisii</i>	Tasmanian devil	Devil_ref v7.0	1,847,106	79	14	62
<i>Didelphidae</i>	<i>Monodelphis domestica</i>	Opossum	monDom5	59,809,810	94	2	38
<i>Trichechidae</i>	<i>Trichechus manatus</i>	Manatee	TriManLat1.0	14,442,683	9	1	87
<i>Procaviidae</i>	<i>Procapia capensis</i>	Cape rock hyrax	ProCapCap_v2_BIUU_UCD	9,071,062	39	40	108
	<i>Heterohyrax brucei</i>	Yellow-spotted hyrax	HetBruBak_v1_BIUU	67,904	38	22	78
<i>Elephantidae</i>	<i>Loxodonta africana</i>	Elephant	Loxaf3.0	46,401,353	35	1	108
<i>Macroscelididae</i>	<i>Elephantulus edwardii</i>	Cape elephant shrew	EleEdw_v1_BIUU	17,713	67	76	51
<i>Tenrecidae</i>	<i>Echinops telfairi</i>	Lesser hedgehog tenrec	EchTel2.0	45,764,842	10	4	23
	<i>Microgale talazaci</i>	Talazac's shrew tenrec	MicTal_v1_BIUU	65,143	33	16	35
<i>Chrysochloridae</i>	<i>Chrysochloris asiatica</i>	Cape golden mole	ChrAsi1.0	6,492	18	18	22
<i>Orycteropodidae</i>	<i>Orycteropus afer afer</i>	Aardvark	OryAfe1.0	7,875,832	23	10	55
<i>Megalonychidae</i>	<i>Choloepus hoffmanni</i>	Hoffmann's two-toed sloth	C_hoffmanni-2.0.1	366,442	24	4	46
	<i>Choloepus didactylus</i>	Southern two-toed sloth	ChoDid_v1_BIUU	7,289	16	41	56
<i>Myrmecophagidae</i>	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Giant anteater	MyrTri_v1_BIUU	41,255	26	75	194
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	Southern tamandua	TamTet_v1_BIUU	19,789	27	195	283
<i>Dasypodidae</i>	<i>Chaetophractus vellerosus</i>	Screaming hairy armadillo	ChaVel_v1_BIUU	1,606	44	515	289
	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Nine-banded armadillo	Dasnov3.0	1,687,935	54	12	139
	<i>Tolypeutes matacus</i>	Southern three-banded armadillo	TolMat_v1_BIUU	10,217	36	253	248

表 3.2 V1R 遺伝子増減速度定数の推定に用いたパラメーターと結果(分類群 A-E のグループごと)

(A)

node	X(t-t')	X(t)	gain	loss	MYa(t')	gain rate	loss rate
Aye-aye	39	47	18	10	54.70	6.94E-03	5.42E-03
Black-handed_spider_monkey	24	16	1	9	20.66	1.98E-03	2.27E-02
Bushbaby	62	63	9	8	37.79	3.59E-03	3.66E-03
Coquerels_sifaka	40	29	3	14	30.15	2.40E-03	1.43E-02
Gibbon	6	2	0	4	20.19	0	5.44E-02
Human	6	4	0	2	20.19	0	2.01E-02
Marmoset	17	9	0	8	18.40	0	3.46E-02
Mouse_lemur	40	105	69	4	30.15	3.32E-02	3.49E-03
Owl_monkey	17	12	2	7	18.40	6.04E-03	2.88E-02
Ring-tailed_lemur	40	28	6	18	38.36	3.64E-03	1.56E-02
Slow_loris	62	74	17	5	37.79	6.41E-03	2.23E-03
Squirrel_monkey	23	16	0	7	19.68	0	1.84E-02
Sunda_flying_lemur	30	48	27	9	76.00	8.45E-03	4.69E-03
Tarsier	28	37	21	12	67.06	8.35E-03	8.35E-03
Ugandan_red_colobus	8	3	0	5	29.44	0	3.33E-02
White-faced_saki	23	16	1	8	21.88	1.95E-03	1.95E-02
n6376	8	6	0	2	9.25	0	3.11E-02
n6378	20	8	0	12	13.71	0	6.68E-02
n6381	23	17	0	6	1.28	0	2.36E-01
n6383	24	23	1	2	0.98	4.17E-02	8.88E-02
n6385	23	24	3	2	1.22	1.00E-01	7.46E-02
n6387	20	23	8	5	21.27	1.58E-02	1.35E-02
n6388	28	20	0	8	23.91	0	1.41E-02
n6390	37	28	1	10	6.78	3.93E-03	4.65E-02
n6393	40	40	5	5	8.21	1.43E-02	1.63E-02
n6395	39	40	6	5	16.33	8.76E-03	8.40E-03
n6397	41	39	2	4	4.63	1.03E-02	2.22E-02
n6400	41	62	36	15	21.54	2.93E-02	2.11E-02
n6401	37	41	8	4	14.51	1.35E-02	7.88E-03
n6402	30	37	8	1	2.20	1.07E-01	1.54E-02

灰色: 鋤鼻器が退化または ancV1R が偽遺伝子化しているノードや  $t' < 3$  MYa のノードといった  
図 3.2 の箱ひげ図には含めていないノード

黄色: 箱ひげ図を用いた解析の結果、増加または減少が有意であった数値

\* n+数字と言ったノード番号が指すノードについては図 3.4 を参照

(B)

node	X(t-t')	X(t)	gain	loss	MYa(t')	gain rate	loss rate
Chinese_tree_shrew	19	20	11	10	90.00	5.08E-03	8.30E-03
Crested_porcupine	53	20	0	33	46.53	0	2.09E-02
Damaraland_mole-rat	58	33	6	31	40.12	2.45E-03	1.91E-02
Dassie-rat	54	67	19	6	26.94	1.12E-02	4.37E-03
Deer_mice	51	162	118	7	32.66	3.67E-02	4.52E-03
Degu	117	121	21	17	20.84	7.92E-03	7.53E-03
Desmarests_hutia	76	86	27	17	17.59	1.73E-02	1.44E-02
Gambian_giant_pouched_rat	49	60	29	18	32.99	1.41E-02	1.39E-02
Greater_cane_rat	54	40	6	20	26.94	3.91E-03	1.72E-02
Guinea_pig	64	85	47	26	28.28	1.95E-02	1.84E-02
Hazel_dormouse	28	76	55	7	59.00	1.84E-02	4.88E-03
Kangaroo_rat	20	67	56	9	63.25	2.11E-02	9.45E-03
Lesser_Egyptian_jernboa	31	84	60	7	54.80	1.97E-02	4.67E-03
Long-tailed_chinchilla	93	96	12	9	24.07	5.04E-03	4.23E-03
Lowland_paca	65	61	18	22	28.94	8.45E-03	1.43E-02
Mountain_beaver	20	25	12	7	48.29	9.73E-03	8.92E-03
Mouse	51	222	186	15	32.66	4.70E-02	1.07E-02
North_American_beaver	20	17	5	8	63.25	3.53E-03	8.08E-03
North_American_porcupine	74	61	12	25	32.86	4.57E-03	1.25E-02
Northern_gundi	52	69	29	12	57.10	7.76E-03	4.59E-03
Northern_Israeli_blind_subterranean_mole_rat	34	22	4	16	45.27	2.46E-03	1.40E-02
Nutria	76	58	9	27	17.59	6.36E-03	2.50E-02
Pacarana	93	83	23	33	24.07	9.18E-03	1.82E-02
Pika	33	62	44	15	51.43	1.65E-02	1.18E-02
Punctate_agouti	64	106	50	8	28.28	2.04E-02	4.72E-03
Rabbit	33	141	110	2	51.43	2.85E-02	1.22E-03
Social_tuco-tuco	117	86	11	42	20.84	4.31E-03	2.13E-02
Squirrel	20	70	51	1	48.29	2.62E-02	1.06E-03
n25426	49	51	4	2	0.33	2.38E-01	1.26E-01
n25428	34	49	16	1	12.28	3.14E-02	2.43E-03
n25430	31	34	8	5	9.53	2.41E-02	1.85E-02
n25432	31	31	7	7	15.10	1.35E-02	1.69E-02
n25435	31	20	1	12	6.64	4.78E-03	7.37E-02
n25436	43	31	1	13	2.98	7.71E-03	1.21E-01
n25439	113	117	12	8	4.04	2.50E-02	1.82E-02
n25442	113	76	6	43	7.29	7.10E-03	6.57E-02
n25443	88	113	38	13	7.97	4.50E-02	2.01E-02
n25446	88	93	12	7	8.79	1.45E-02	9.43E-03
n25447	87	88	10	9	2.92	3.73E-02	3.74E-02
n25450	65	64	4	5	0.65	9.19E-02	1.23E-01
n25452	74	65	4	13	3.93	1.34E-02	4.92E-02
n25454	87	74	0	13	2.92	0	5.54E-02
n25455	77	87	18	8	7.58	2.77E-02	1.45E-02
n25458	58	54	8	12	13.18	9.80E-03	1.76E-02
n25460	77	58	0	19	3.24	0	8.75E-02
n25461	53	77	24	0	3.17	1.18E-01	0
n25463	52	53	8	7	10.57	1.35E-02	1.37E-02
n25465	43	52	19	10	15.78	2.32E-02	1.68E-02
n25466	43	43	1	1	0		
n25469	28	20	4	12	10.71	1.25E-02	5.23E-02
n25471	43	28	1	16	13.88	1.66E-03	3.35E-02
n25472	40	43	6	3	9.26	1.51E-02	8.42E-03
n25475	40	33	7	14	30.71	5.25E-03	1.40E-02
n25476	19	40	21	0	7.86	9.47E-02	0
Transcaucasian_mole_vole	47	19	4	32			
n25424	51	47	1	5			
n25478			18	0			

(C)

node	X(t-t')	X(t)	gain	loss	MYa(t')	gain rate	loss rate
Cow	37	38	8	7	24.60	7.96E-03	8.53E-03
Siberian_musk_deer	37	21	4	20	24.60	4.17E-03	3.16E-02
Hog_deer	40	60	31	11	27.31	2.10E-02	1.18E-02
Java_mouse-deer	28	19	4	13	43.97	3.04E-03	1.42E-02
Giraffe	31	21	4	14	27.31	4.44E-03	2.20E-02
Pronghorn	31	27	5	9	27.31	5.48E-03	1.26E-02
Yangtze_river_dolphin	2	2	0	0	25.42	0	0
Bottlenose_dolphin	2	2	0	0	18.39	0	0
Yangtze_finless_porpois	1	1	0	0	14.29	0	0
Indus_river_dolphin	3	2	0	1	32.07	0	1.26E-02
Beluga	1	1	0	0	14.29	0	0
Sowerbys_beaked_whale	3	1	0	2	32.07	0	3.43E-02
Northern_minke_whale	3	3	0	0	15.54	0	0
Gray_whale	3	2	0	1	15.54	0	2.61E-02
Bowhead_Whale	3	2	0	1	25.90	0	1.57E-02
Hippopotamus	28	32	6	2	53.75	3.61E-03	1.38E-03
Pig	16	17	4	3	37.03	6.03E-03	5.61E-03
Chacoan_peccary	16	16	4	4	37.03	6.03E-03	7.77E-03
Bactrian_camel	35	24	7	18	64.18	2.84E-03	1.13E-02
Rhinoceros	43	55	21	9	49.56	8.02E-03	4.74E-03
Horse	38	35	9	12	54.40	3.91E-03	6.98E-03
Asiatic_tapir	43	47	13	9	49.56	5.33E-03	4.74E-03
n5944	40	37	0	3	2.71	0	2.88E-02
n5946	37	40	4	1	0		
n5949	37	31	0	6	0		
n5950	28	37	12	3	16.66	2.14E-02	6.80E-03
n5952	37	28	4	13	11.99	8.56E-03	3.61E-02
n5955	2	1	0	1	4.10	0	1.69E-01
n5957	2	2	0	0	7.03	0	0
n5959	4	2	0	2	7.62	0	9.10E-02
n5962	4	3	0	1	0.97	0	2.97E-01
n5963	6	4	0	2	0.46	0	8.79E-01
n5966	3	3	0	0	10.37	0	0
n5968	6	3	0	3	7.60	0	9.12E-02
n5969	28	6	0	22	20.25	0	7.61E-02
n5971	37	28	0	9	2.21	0	1.26E-01
n5972	35	37	5	3	6.01	2.22E-02	1.49E-02
n5975	35	16	2	21	24.94	2.23E-03	3.67E-02
n5976	35	35	3	3	2.22	3.70E-02	4.04E-02
n5978	34	35	6	5	13.57	1.20E-02	1.17E-02
n5981	38	43	10	5	4.84	4.83E-02	2.91E-02
n5983	34	38	10	6	23.35	1.10E-02	8.32E-03
Blue_wildebeest	32	32	1	1			
Topi	21	19	3	5			
Hartebeest	15	2	0	13			
Hirola	15	14	0	1			
n5936	21	15	0	6			
n5938	32	21	0	11			
n5940	38	32	1	7			
n5942	37	38	2	1			
n5984			33	0			

(D)

node	X(t-t')	X(t)	gain	loss	MYa(t')	gain rate	loss rate
Asian_palm_civet	28	29	8	7	39.90	6.30E-03	7.21E-03
Banded_mongoose	18	27	11	2	24.56	1.94E-02	4.80E-03
Brown_bear	20	27	17	10	39.89	1.54E-02	1.74E-02
California_sea_lion	8	6	0	2	19.47	0	1.48E-02
Cat	30	27	5	8	39.90	3.86E-03	7.77E-03
Dog	22	9	2	15	45.53	1.91E-03	2.52E-02
Ferret	16	10	1	7	33.98	1.78E-03	1.69E-02
Fossa	18	5	0	13	24.56	0	5.22E-02
Hawaiian_monk_seal	8	2	0	6	25.99	0	5.33E-02
Hyaena	26	18	1	9	33.40	1.13E-03	1.27E-02
Lesser_panda	16	12	4	8	33.98	6.57E-03	2.04E-02
Sunda_pangolin	17	23	10	4	75.00	6.17E-03	3.58E-03
Walrus	8	6	0	2	19.47	0	1.48E-02
Western_spotted_skun	15	11	5	9	34.95	8.23E-03	2.62E-02
n2626	15	16	1	0	0.97	6.65E-02	0
n2628	18	15	1	4	4.88	1.11E-02	5.15E-02
n2631	8	8	0	0	6.52	0	0
n2633	18	8	0	10	13.84	0	5.86E-02
n2634	20	18	0	2	0.07	0	1.51E+00
n2636	22	20	0	2	5.63	0	1.69E-02
n2638	32	22	1	11	8.79	3.50E-03	4.79E-02
n2641	26	18	0	8	8.85	0	4.16E-02
n2643	28	26	1	3	6.50	5.40E-03	1.74E-02
n2645	30	28	2	4	0		
n2647	32	30	2	4	14.42	4.20E-03	9.26E-03
n2648	17	32	16	1	20.68	3.21E-02	2.93E-03
n2624	16	15	1	2	4.30	1.41E-02	3.11E-02
Sea_otter	15	7	0	8	10.10	0	7.55E-02
n2650		17					

# (E)

node	X(t-t')	X(t)	gain	loss	MYa(t')	gain rate	loss rate
Egyptian_fruit_bat	9	1	0	8	58.08	0	3.78E-02
Great_roundleaf_bat	9	2	0	8	52.22	0	4.21E-02
Greater_bulldog_bat	8	2	0	6	43.04	0	3.22E-02
Greater_false_vampire_bat	6	1	0	5	41.05	0	4.36E-02
Hog-nosed_bat	6	8	2	0	41.05	7.01E-03	0
Natal_long-fingered_bat	9	6	1	4	52.64	2.00E-03	1.12E-02
Pale_spear-nosed_bat	9	21	13	1	37.06	2.41E-02	3.18E-03
Parnells_mustached_bat	9	4	0	5	37.06	0	2.19E-02
European_shrew	13	53	44	4	66.77	2.21E-02	5.51E-03
Hispaniolan_solenodon	14	4	1	11	79.27	8.70E-04	1.94E-02
Star-nosed_mole	13	14	7	6	66.77	6.45E-03	9.27E-03
Western_European_hedgehog	16	60	50	6	66.77	2.12E-02	7.04E-03
n2144	8	9	1	0	5.98	1.97E-02	0
n2146	9	8	1	2	9.61	1.10E-02	2.62E-02
n2148	13	9	0	4	9.02	0	4.08E-02
n2151	9	6	0	3	11.17	0	3.63E-02
n2153	9	9	0	0	5.86	0	0
n2155	13	9	0	4	3.58	0	1.03E-01
n2156	11	13	4	2	27.34	1.13E-02	7.34E-03
n2159	16	13	0	3	0		
n2161	14	16	2	0	12.50	1.07E-02	0
n2163	11	14	4	1	9.73	3.19E-02	9.80E-03
n2164			10	0			

表 3.3 V1R 遺伝子と OR 遺伝子のレパートリーの比較(分類群 A-F のグループごと)

(A)

family	Latin name	common name	V1R			OR		
			intact	truncated	pseudogene	intact	truncated	pseudogene
Hominidae	<i>Homo sapiens</i>	Human	4	0	139	552	2	679
Hylobatidae	<i>Nomascus leucogenys</i>	Gibbon	2	1	81	250	27	378
Cercopithecidae	<i>Ptilocolobus tephrosceles</i>	Ugandan_red_colobus	3	1	82	236	18	346
Callitrichidae	<i>Callithrix jacchus</i>	Marmoset	9	2	59	381	29	304
Aotidae	<i>Aotus nancymae</i>	Owl_monkey	12	0	59	410	31	267
Cebidae	<i>Saimiri boliviensis</i>	Squirrel_monkey	16	1	44	284	13	234
Atelidae	<i>Ateles geoffroyi</i>	Black-handed_spider_monkey	16	1	59	355	94	285
Pitheciidae	<i>Pithecia pithecia</i>	White-faced_saki	16	9	79	320	126	341
Tarsiidae	<i>Carlito syrichta</i>	Tarsier	37	25	270	426	67	724
Cheirogaleidae	<i>Microcebus murinus</i>	Mouse_lemur	105	13	129	797	33	415
Indriidae	<i>Propithecus coquereli</i>	Coquerels_sifaka	29	11	77	637	101	276
Lemuridae	<i>Lemur catta</i>	Ring-tailed_lemur	28	9	130	632	323	260
Daubentonidae	<i>Daubentonia madagascariensis</i>	Aye-aye	47	23	193	838	426	484
Galagidae	<i>Otolemur garnettii</i>	Bushbaby	74	185	292	776	161	797
Lorisidae	<i>Nycticebus coucang</i>	Slow_loris	63	9	59	654	447	265
Dermoptera	<i>Galeopterus variegatus</i>	Sunda_flying_lemur	48	39	119	684	556	865

(B)

family	Latin name	common name	V1R			OR		
			intact	truncated	pseudogene	intact	truncated	pseudogene
Muridae	<i>Mus musculus</i>	Mouse	222	3	143	1324	3	495
Cricetidae	<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	Deer_mice	162	20	149	1030	139	403
(Arvicolinae)	<i>Ellobius lutescens</i>	Transcaucasian mole vole	19	15	65	552	475	534
Nesomyidae	<i>Cricetomys gambianus</i>	Gambian_giant_pouched_rat	60	44	59	1061	958	426
Spalacidae	<i>Nannospalax galili</i>	Northern_Israeli_blind_subterranean_mole_rat	22	2	80	1133	378	6376
Dipodidae	<i>Jaculus jaculus</i>	Lesser_Egyptian_jernboa	84	16	68	459	75	331
Heteromyidae	<i>Dipodomys ordii</i>	Kangaroo_rat	67	6	131	842	126	479
Castoridae	<i>Castor canadensis</i>	North_American_beaver	17	4	143	729	5	2460
Ctenomyidae	<i>Ctenomys sociabilis</i>	Social_tuco-tuco	86	6	83	664	146	424
Octodontidae	<i>Octodon degus</i>	Degu	121	8	83	739	148	405
Capromyidae	<i>Capromys pilorides</i>	Desmarests_hutia	86	126	109	1153	1119	703
Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i>	Nutria	58	66	49	694	495	215
Chinchillidae	<i>Chinchilla lanigera</i>	Long-tailed_chinchilla	96	14	74	719	195	3661
Dinomyidae	<i>Dinomys branickii</i>	Pacarana	83	125	149	955	252	650
Cuniculidae	<i>Cuniculus paca</i>	Lowland_paca	61	335	157	905	1786	662
Dasyproctidae	<i>Dasyprocta punctata</i>	Punctate_agouti	106	152	78	2064	700	1948
Erethizontidae	<i>Erethizon dorsatum</i>	North_American_porcupine	61	21	93	813	129	622
Caviidae	<i>Cavia porcellus</i>	Guinea_pig	85	4	165	813	47	1869
(Caviidae)	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capybara	78	109	286	767	484	2353
Bathyergidae	<i>Fukomys damarensis</i>	Damaraland_mole-rat	33	4	46	1198	827	43208
Thryonomyidae	<i>Thryonomys swinderianus</i>	Greater_cane_rat	40	44	70	595	615	174
Petromuridae	<i>Petromus typicus</i>	Dassie-rat	67	50	38	647	430	226
Hystricidae	<i>Hystrix cristata</i>	Crested_porcupine	20	10	56	836	713	345
Ctenodactylidae	<i>Ctenodactylus gundi</i>	Northern_gundi	69	14	45	388	280	219
Sciuridae	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	Squirrel	70	26	177	977	347	805
Aplodontiidae	<i>Aplodontia rufa</i>	Mountain_beaver	25	115	63	823	270	369
Gliridae	<i>Muscardinus avellanarius</i>	Hazel_dormouse	76	109	198	760	166	256
Leporidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Rabbit	141	10	172	770	32	377
Ochotonidae	<i>Ochotona princeps</i>	Pika	62	21	47	545	129	292
Tupaiaidae	<i>Tupaia chinensis</i>	Chinese_tree_shrew	20	22	54	1183	387	1257

(C)

family	Latin name	common name	V1R			OR		
			intact	truncated	pseudogene	intact	truncated	pseudogene
Bovidae	<i>Bos taurus</i>	Cow	38	0	42	1060	2	1280
(Alcelaphinae)	<i>Connochaetes taurinus</i>	Blue wildebeest	32	1	34	810	110	807
(Alcelaphinae)	<i>Damaliscus lunatus</i>	Topi	19	3	38	936	212	1015
(Alcelaphinae)	<i>Alcelaphus buselaphus</i>	Hartebeest	2	17	15	116	500	180
(Alcelaphinae)	<i>Beatragus hunteri</i>	Hirola	14	2	36	756	183	645
Cervidae	<i>Axis porcinus</i>	Hog_deer	60	22	55	1201	454	1156
Tragulidae	<i>Tragulus javanicus</i>	Java_mouse-deer	19	40	29	1150	1033	476
Moschidae	<i>Moschus moschiferus</i>	Siberian_musk_deer	21	109	51	852	804	1023
Giraffidae	<i>Giraffa camelopardalis</i>	Giraffe	21	4	31	657	423	543
Antilocapridae	<i>Antilocapra americana</i>	Pronghorn	27	91	70	760	794	825
Hippopotamidae	<i>Hippopotamus amphibius</i>	Hippopotamus	32	3	72	1240	970	1090
Suidae	<i>Sus scrofa</i>	Pig	17	0	58	1434	12	2064
Tayassuidae	<i>Catagonus wagneri</i>	Chacoan_peccary	16	0	25	784	775	808
Camelidae	<i>Camelus bactrianus</i>	Bactrian_camel	24	2	35	610	157	439
Rhinocerotidae	<i>Ceratotherium simum simum</i>	Rhinoceros	55	5	106	1016	96	1322
Equidae	<i>Equus caballus</i>	Horse	35	1	61	1064	43	1945
Tapiridae	<i>Tapirus indicus</i>	Asiatic_tapir	47	16	97	1063	481	1357

(D)

family	Latin name	common name	V1R			OR		
			intact	truncated	pseudogene	intact	truncated	pseudogene
Mustelidae	<i>Mustela putorius furo</i>	Ferret	10	2	57	843	124	515
(Lutrinae)	<i>Enhydra lutris</i>	Sea otter	7	1	54	500	67	628
Ailuridae	<i>Ailurus fulgens</i>	Lesser_panda	12	3	44	809	62	377
Mephitidae	<i>Spilogale gracilis</i>	Western_spotted_skunk	11	1	57	867	558	498
Ursidae	<i>Ursus arctos horribilis</i>	Brown_bear	27	4	78	989	239	509
Phocidae	<i>Neomonachus schauinslandi</i>	Hawaiian_monk_seal	2	1	60	296	56	499
Otariidae	<i>Zalophus californianus</i>	California_sea_lion	6	1	69	367	88	546
Odobenidae	<i>Odobenus rosmarus</i>	Walrus	6	1	71	404	11	611
Canidae	<i>Canis familiaris</i>	Dog	9	0	46	790	17	460
Felidae	<i>Felis catus</i>	Cat	27	1	85	766	1	478
Viverridae	<i>Paradoxurus hermaphroditus</i>	Asian_palm_civet	29	2	72	1015	754	261
Hyaenidae	<i>Hyaena hyaena</i>	Hyaena	18	1	65	778	57	414
Herpestidae	<i>Mungos mungo</i>	Banded_mongoose	27	14	53	1088	644	366
Eupleridae	<i>Cryptoprocta ferox</i>	Fossa	5	0	75	752	586	354
Pholidota	<i>Manis javanica</i>	Sunda_pangolin	23	28	41	411	1528	1274

## (E)

family	Latin name	common name	V1R			OR		
			intact	truncated	pseudogene	intact	truncated	pseudogene
Vespertilionidae	<i>Eptesicus fuscus</i>	Big_brown_bat	0	1	9	401	66	172
Miniopteridae	<i>Miniopterus natalensis</i>	Natal_long-fingered_bat	6	0	5	355	49	178
Molossidae	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Brazilian free-tailed bat	0	0	18	389	613	317
Phyllostomidae	<i>Phyllostomus discolor</i>	Pale_spear-nosed_bat	21	1	60	667	1	385
Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	Parnells_mustached_bat	4	8	31	275	125	240
Noctilionidae	<i>Noctilio leporinus</i>	Greater_bulldog_bat	2	2	9	398	154	221
Rhinolophidae	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Greater_horseshoe_bat	0	0	27	385	1	311
Hipposideridae	<i>Hipposideros armiger</i>	Great roundleaf bat	2	0	31	305	88	241
Craseonycteridae	<i>Craseonycteris thonglongyai</i>	Hog-nosed_bat	8	4	21	165	73	218
Megadermatidae	<i>Megaderma lyra</i>	Greater_false_vampire_bat	1	2	37	208	93	234
Pteropodidae	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Egyptian_fruit_bat	1	0	37	624	83	526
Solenodontidae	<i>Solenodon paradoxus woodi</i>	Hispaniolan_solenodon	4	3	56	763	383	973
Erinaceidae	<i>Erinaceus europaeus</i>	Western_European_hedgehog	60	4	45	1001	118	379
Soricidae	<i>Sorex araneus</i>	European_shrew	53	7	45	1129	234	578
(Soricidae)	<i>Suncus murinus</i>	Asian_musk_shrew	108	1	100	1227	165	9379
(Soricidae)	<i>Crocidura indochinensis</i>	Indochinese shrew	104	214	240	996	824	295
Talpidae	<i>Condylura cristata</i>	Star-nosed_mole	14	2	12	662	103	252

## (F)

family	Latin name	common name	V1R			OR		
			intact	truncated	pseudogene	intact	truncated	pseudogene
Trichechidae	<i>Trichechus manatus</i>	Manatee	9	1	87	478	68	816
Elephantidae	<i>Loxodonta africana</i>	Elephant	35	1	108	1988	131	2696
Macroscelididae	<i>Elephantulus edwardii</i>	Cape elephant shrew	67	76	51	941	63	329
Tenrecidae	<i>Microgale talazaci</i>	Talazac's shrew tenrec	33	16	35	1152	496	458
Chrysochloridae	<i>Chrysochloris asiatica</i>	Cape golden mole	18	18	22	1101	295	692
Orycteropodidae	<i>Orycteropus afer afer</i>	Aardvark	23	10	55	1039	335	936

## 第四章: 総合討論

### 4.1 鋤鼻器マーカー遺伝子と V1R 遺伝子の探索による鋤鼻器退化の推定

哺乳類の形態や表現型の多様性を DNA レベルから理解するのは分子進化学の中心的な取り組みである。特定の遺伝子と特定の形態の特徴が同時に消失(または偽遺伝子化)するのはそのような形態の多様性をもたらした分子メカニズムの解明において重要な見識を与える(Sharma et al. 2018)。近年特に哺乳類のゲノム情報が整備されていくにつれてそうした研究がいくつかの遺伝子で報告され始めている。例えば C4orf26 遺伝子は歯の退化に(Springer et al. 2016)、MC5R 遺伝子は皮脂腺の退化に(Springer and Gatesy 2018)、OMP 遺伝子は嗅覚の退化に(Springer and Gatesy 2017)に相関していることが確かめられた。ancV1R は 2018 年に新規に発見された遺伝子である。その機能はまだ未解明であるが、鋤鼻器のほとんどの鋤鼻神経細胞で発現し、フェロモン受容体である V1R や V2R と共発現することから鋤鼻神経細胞において中心的な機能を果たすと考えられている(Suzuki et al. 2018)。ancV1R の偽遺伝子化と鋤鼻器の退化を比較することは、ancV1R が重要な機能を担うことを実証する意味と、鋤鼻器を解剖学的に調べられない種において退化を検証する意味との 2 つの点において重要である。

本研究では ancV1R 遺伝子を用いた研究時に取得できた全哺乳類ゲノムにおける ancV1R の網羅的な探索に加え、鋤鼻神経細胞における陽イオンチャネルとして中心的な機能を持つことが確認されている TRPC2(transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2)と、フェロモン受容体である V1R 遺伝子のコピー数の減少の探索をすることによって、より正確な検証を行った。こうした遺伝子の網羅的な探索によって ancV1R 偽遺伝子化と鋤鼻器退化の関係がより明確に示されたと共に、鋤鼻器の状態が未知または議論中である分類群において、鋤鼻器退化の分子進化学的証拠を新規に発見した。

#### 4.1.1 鋤鼻器退化が既知な分類群の ancV1R と TRPC2 の偽遺伝子化と V1R 遺伝子の減衰

霊長目のうち類人猿(ヒト上科)とオナガザル上科は単系統であり狭鼻猿類(狭鼻小目)と呼ばれる。私達がサルと言われて連想するものの多くはこの狭鼻猿類である。狭鼻猿類はすべての種が鋤鼻器と AOB(accessory olfactory bulb; 副嗅球)を失っていることから、狭鼻猿類の共通祖先において副嗅覚系の退化が起きたとされる(Wysocki 1979; Bhatnagar and Meisami 1998; Smith et al. 2014)。この鋤鼻器の退化は、樹上生活と果実食による 3 色覚の獲得などの視覚の進化により視覚への依存性を強めた結果起こった生殖などの個体間コミュニケーションにおけるフェロモン受容系の依存度の減少と考えられている。3 色覚の発達と鋤鼻器の退化の相関は薄いとする研究もあるが(Webb et al. 2004)、色覚を含む視覚の発達によって狭鼻猿類の生殖行動が大きく視覚依存になったことは、狭鼻猿類のオスの派手な色合いやヒトの行動を見ても明らかであろう。

狭鼻猿類の ancV1R と TRPC2 はすべての種で遺伝子に対する有害な変異と統計的に有意な  $d_n/d_s$  値の上昇が見られており、完全に機能を失っている。TRPC2 における偽遺伝子化は過去の研究とも

一致している(Liman and Innan 2003; Zhang and Webb 2003)。これらの遺伝子に対する有害な変異自体は科ごとに独立に入っているが、V1R 遺伝子が狭鼻猿類の共通祖先で大きく減少していることから、鋤鼻器自体は狭鼻猿類の共通祖先で不要になった結果 ancV1R と TRPC2 に対する機能制約が消滅し、その後各科への分岐後に直接的な変異が入ったと考えられる。また、狭鼻猿類のいくつかの種で現在も intact で残っている V1R 遺伝子は直接的な変異が入っていないが機能をすでに失っており、偽遺伝子化の途中にあると考えられる。ただし、ヒトの V1R 遺伝子は主嗅上皮で発現しているという研究もある(Rodriguez et al. 2000)。これを信じるならば、ヒト科はオナガザルと比べて主嗅覚が特異的に発達しているため(Niimura et al. 2018)、嗅覚発達の過程で V1R 遺伝子の一部が主嗅覚系の遺伝子としてリクルートされたのかもしれない。

クジラ類では ancV1R と TRPC2 のどちらもクジラ類の間で共通の有害な変異を持ち有意な  $d_N/d_S$  値上昇が示されたことから、クジラ類の共通祖先で両方の遺伝子が偽遺伝子化したと考えられる。TRPC2 の偽遺伝子化については過去の研究でもイルカについて報告されているが (Yu et al. 2010)、クジラ類全体に渡る解析をしたのは今研究が初である。また、V1R 遺伝子も同様にクジラ類の共通祖先で大きく減少しており、現在クジラ類ではいくつかの種で V1R 遺伝子が少量残っているが、系統的にもまばらであることから、V1R 遺伝子はクジラ類全体で機能を失っていて退化の途上にあるだろう。クジラ類の共通祖先での ancV1R と TRPC2 の偽遺伝子化は鋤鼻器や AOB の退化(Lowell and Flanigan 1980; Mackay-Sim et al. 1985)ともよく相関しており、これらはすべて水棲適応と同時に起こったと考えられる。ただし、副嗅覚系の退化がクジラ類の共通祖先で起きているのに対して、クジラ類の主嗅覚系の退化はハクジラのみで起きておりヒゲクジラでは部分的に主嗅覚の機能が残っていることが示されている(Kishida et al. 2015; Springer and Gatesy 2017)。このようなハクジラとヒゲクジラの間での嗅覚系の差は、ハクジラでは反響定位能力が発達して捕食を担う一方、ヒゲクジラでは反響定位能力が発達しておらず捕食が今も嗅覚依存であると考察されている(Springer and Gatesy 2017)。副嗅覚系はハクジラとヒゲクジラの両方で退化していることから、副嗅覚系の V1R 遺伝子は主嗅覚系の OR 遺伝子よりも揮発性物質に特化しており、水棲環境では機能しないことが考えられる。

翼手目も鋤鼻器が退化した種として多くの生物学者の興味を引いてきた。コウモリでの鋤鼻器の保持と退化は系統的にもまばらであるため、鋤鼻器の進化は科や種属による独自色が強いと考えられる。コウモリにおける ancV1R と TRPC2 の偽遺伝子化は煩雑であり、明確に解釈できるものではない。鋤鼻器が退化している種では ancV1R と TRPC2 の偽遺伝子化が一致するものもあれば一致しないものもあり、また  $d_N/d_S$  値の上昇も明瞭ではない種がある。ただし、鋤鼻器を保持が既知であるヘラコウモリ科(Phyllostomidae)、ユビナガコウモリ科(Miniopteridae)では V1R 遺伝子の重複が起きており、他の鋤鼻器が退化した種では V1R 遺伝子の重複がなく保持するコピー数も 0-3 個であることから、V1R 遺伝子の進化のほうに鋤鼻器マーカー遺伝子よりも明確にコウモリでの鋤鼻器の進化に相関していると考えられる。また、鋤鼻器マーカー遺伝子の結果から新たにブタバナコウモリ科(Craseonycteridae)が鋤鼻器を保持すると推定されており、V1R 遺伝子の重複の面からもこの推定は支持される。逆に、科内で鋤鼻器の保持と退化に多様性があるブタバナコウモリ科(Craseonycteridae)では、鋤鼻器を保持しているとされる Parnell's mustached bat の鋤鼻器マーカー遺伝子の配列は intact であるものの、選択圧の大きな弛緩が観察された。V1R 遺伝子ではこの種で

V1R 遺伝子の重複が見られずコピー数も 4 個と少ない。これらの結果から Parnell's mustached bat の鋤鼻器が機能していることは疑わしい。

コウモリの鋤鼻器退化に相関する適応進化については現在わかっていないが、考察するならばコウモリの完全飛行能力の獲得に関係しているだろう。同じく完全飛行能力を持つ鳥類でも鋤鼻器が退化しておりこれは鳥類の共通祖先で起きたと見積もられる。揮発性のフェロモンは空気中に拡散してしまうため、特に空中を移動する飛行動物には都合が悪いのではないだろうか。ただしコウモリでまばらに鋤鼻器が保持や退化が行われていることから、飛行能力による副嗅覚系の重要度低下は水棲適応ほど強いものではなく、コウモリの進化に従って徐々に起きたと考えられる。この飛行能力とフェロモン知覚の退化の関係についての考察は、フェロモンの研究がもともと昆虫で行われていることを考えると奇妙であるようにも思える。昆虫は飛んで移動するため、フェロモンの微量でも効くなどの性質はむしろそうした移動手段に対して都合が良いように思える。しかし無脊椎動物のフェロモンと脊椎動物のフェロモンは受容体の起源がそもそも異なるので、無脊椎動物のフェロモンと脊椎動物のフェロモンが同じ性質を持つとは限らない。コウモリにおけるフェロモン研究はこうした脊椎動物のフェロモンの性質を調べるという意味でもおそらく重要である。脊椎動物のフェロモンは大部分が未知なため今後の研究に期待する。

#### 4.1.2 遺伝子探索による新規の鋤鼻器が退化した分類群の推定

前小節で示した鋤鼻器退化が既知の分類群からの知見により、ancV1R と TRPC2 の偽遺伝子化は十分鋤鼻器の退化を反映していることがわかった。これらの遺伝子マーカーを用いたさらなる哺乳類ゲノムの網羅的探索によって、いくつかの鋤鼻器退化に関する新規の示唆を得た。また同時に、V1R 遺伝子レパートリーの増減推定の観点からもこれらの結果を検証した。鋤鼻器マーカー遺伝子が偽遺伝子化したと見込まれるのは水棲哺乳類ではアザラシ科とカワウソ亜科である。また、V1R 遺伝子からの検証も鋤鼻器マーカー遺伝子の結果を支持する。これら水棲哺乳類に加えて今回は陸棲哺乳類でも新規の発見があった。陸棲哺乳類で鋤鼻器マーカー遺伝子の退化が示唆されたのはヨザル科、フォッサ属、ハーテビースト亜科の 3 つである。しかし V1R 遺伝子からの検証ではヨザル科での退化を支持しない。また、ハーテビースト亜科内でも V1R 遺伝子が大きく減少しているのはハーテビースト属だけであった。そのため、本研究ではフォッサ属とハーテビースト属の鋤鼻器の退化を新規に提案する。

食肉目鰭脚類は水棲適応した代表的な哺乳類の一つである。その形態はクジラ類でも見られるように足がほとんど退化しており遊泳に適したヒレを形成している。クジラ類でも示した通り、水棲適応と鋤鼻器の退化は特に強く相関していると考えられているが、これに反して鰭脚類の鋤鼻器退化は多様性があり、アザラシ科では退化している一方、アシカ科とセイウチ科では鋤鼻器を保持していることが報告されている (Switzer et al. 1980; Meisami and Bhatnagar 1998)。しかし文献調査したところ、こうした文献にはアザラシ科での鋤鼻器がないと記述されているものの解剖学的な論文は見つからなかったため、鋤鼻器マーカー遺伝子から改めて検証をした。鰭脚類 3 科のうち、ancV1R と TRPC2 の偽遺伝子化はアザラシ科のみで見つかっており、鋤鼻器の報告結果と一致している。そのため、文献での記述の通り、アザラシ科では鋤鼻器が退化している一方、アシカ科とセイウチ

科では鋤鼻器を保持していると考えられる。V1R 遺伝子のレパートリーでは鰭脚類の共通祖先で V1R 遺伝子が大きく減少していることから、水棲適応の影響が伺える。しかしアザラシ科ではいくつかの種で V1R 遺伝子が 0 個まで減少しきっているのに対して、アシカ科とセイウチ科では 6 個程度の V1R 遺伝子がどの種でも残っている。そのため、アザラシ科では鋤鼻器が退化している一方で、アシカ科とセイウチ科では最低限の鋤鼻器機能が残っていると思われる。

カワウソ亜科も水棲適応をしているが鰭脚類に比べて適応の度合いが低く、解剖学的な鋤鼻器の退化も知られていない。検証に用いたカワウソ亜科 2 種ではどちらにも ancV1R の有害な変異と統計的有意な  $d_n/d_s$  値上昇が見られる。TRPC2 では今回探索したエキソンでは有害な変異を見つけれなかったが、先行研究(Yu et al. 2010; Hecker et al. 2019)では他のエキソンに変異が入っていると報告されている。TRPC2 の有意な  $d_n/d_s$  値の上昇は今回の研究でも示した。このことからこれまで示してきた水棲哺乳類と同様に、カワウソ亜科共通祖先では水棲適応によって鋤鼻器が退化したと考えられる。カワウソ亜科の V1R 遺伝子レパートリーはどちらも 7 個であるが、近縁種のイタチ科が 7-12 個とそもそも V1R 遺伝子が少ないため、水棲適応によって V1R 遺伝子が減少しているかどうかは判別ができない。しかし OR 遺伝子ではイタチ科などの近縁と比較して 300-350 個ほど少ないことから、水棲適応による嗅覚系への影響は受けていると考えられる。カワウソ亜科のうちラッコはフレーメン反応のような仕草が観察されているが、近縁種とルーチンが異なることから(Island et al. 2017)こうしたラッコのフレーメン反応は行動としては種に残っているがフェロモン受容の機能を失っているのかもしれない。

ヨザルはアメリカ大陸に拡散した霊長目の中でも夜行性に再適応した種である。同じ霊長目では原猿類の一部が夜行性に再適応していることが知られており、これらの原猿類では収斂的に V1R 遺伝子レパートリーが大きく増加しているのは 3.3.1 小節で示した通りである。このことから、霊長目の夜行性への適応と V1R 遺伝子の増加は相関すると考えられる。しかし、ヨザルを含む新世界ザルでは鋤鼻器を保持しているものの、鋤鼻器の部分機能の縮小が指摘されており(Smith et al. 2011)、原猿類と比べて V1R 遺伝子が大きく減少していることが示されている(Liman and Innan 2003; Yoder et al. 2014; Moriya-Ito et al. 2018)。そのため新世界ザルにおけるフェロモン知覚については現在はっきりとせず議論中の段階である。本研究における遺伝子マーカーの探索はヨザルでの ancV1R に有害な変異が入っており偽遺伝子化していることを示唆する。しかしこの ancV1R における  $d_n/d_s$  値の上昇は統計的に有意でない。逆に TRPC2 では有害な変異が発見されなかった一方で、有意な  $d_n/d_s$  値上昇が見られた。このようにヨザルの ancV1R と TRPC2 の結果からだけでは判別がしにくい。ヨザルの V1R 遺伝子レパートリーは近縁の新世界ザルと比較して同程度の数であり、大きな減少は見られない。さらに、ヨザルの V1R 遺伝子はヨザル分岐後に遺伝子重複を経験しているため、V1R 遺伝子が引き続き機能していることが見込まれる。そのため、V1R 遺伝子の観察結果は遺伝子マーカーの結果を否定している。こうした混乱が起きている原因としてはヨザルの ancV1R に入った変異がシーケンシングエラーに起因する人工物である可能性があるため、ヨザル科での生体サンプルを用いた検証や他属における検証が必要である。

フォッサは 2.3.3 小節でも記載の通り、マダガスカルマンゲース科というマダガスカル島で多様化した大型肉食動物である。フォッサの ancV1R には有害な変異が入っているが、 $d_n/d_s$  値の上昇は有意でなかった。しかし、TRPC2 では有害な変異も入っており  $d_n/d_s$  値の上昇も有意であるため、

ancV1R と TRPC2 の両方が偽遺伝子化していることが見込まれる。加えて、V1R 遺伝子レパートリーはフォッサ分岐後に大きく減少しており、おそらく退化の過程にある。以上のことからフォッサでは鋤鼻器の退化が示唆される。近縁であるマングース科は第 3.3.4 小節に記載の通り V1R 遺伝子を大きく増加させており、フォッサとは形態が似ているもののまったく対照的である。さらにフォッサの OR 遺伝子を調べるとマングース科以外の近縁と同程度であることからフォッサの進化ではこれまでの鋤鼻器が退化した種と違ってフェロモン知覚のみが退化しており主嗅覚系には影響がないことがわかる。マダガスカルマングース科(フォッサ)での鋤鼻器退化の要因は見つけることができなかったが、ネコ亜目全体の V1R 遺伝子の推移を見ていくとマングース科とマダガスカルマングース科の共通祖先において V1R 遺伝子が有意に減少していることがわかる。そのため、ここで何かしらのフェロモンへの依存性低下を引き起こすようなイベントが起きた可能性がある。こうしたフォッサでの鋤鼻器退化の発見は、そのネコ科に類似した形態に大きく反したマダガスカルマングース科の進化の特殊性を示しておりさらなる研究が期待される。

ハーテビースト亜科はウシ科に所属する種でサバンナを中心としたアフリカ大陸に生息する。通常ウシ科では鼻口蓋管(または切歯管、内鼻孔とも言う)が大きく開口しており口腔と鋤鼻器をトンネルのようにつなぐ。ハーテビースト亜科では解剖学的にすべての属で鋤鼻器を持つと見込まれるものの、ヌー属を除く 3 属(ハーテビースト属、ダマリスクス属、ヒロラ属)すべてで鼻口蓋管の縮小が見られており、特にハーテビースト属では閉口している(Hart et al. 1987)。また、フェロモン知覚による生理現象であるフレーメン反応がこの 3 属では消失している(Hart et al. 1987)。ハーテビースト亜科における ancV1R と TRPC2 では、有害な変異はハーテビースト属でのみ見つかったが、 $d_n/d_s$  値の上昇はフレーメン反応の有無に相関してダマリスクス属とヒロラ属の両方でも上昇している。このフレーメン反応が消失した 3 属はヌー属からの分岐後に十分な時間が経過していないため(3MYa 程度; Chen et al. 2019)、遺伝子マーカーに対して解析で明確な結果が出るほどの変異が蓄積していない可能性もある。そのためこの 3 属での解釈は難しい。これに対して、V1R 遺伝子ではハーテビースト属での大きな減少を示している一方、ダマリスクス属では遺伝子重複を、ヒロラ属では分岐後の変化はほぼないことを示している。この結果は ancV1R に対する変異に一致しており、ハーテビースト属のみでの鋤鼻器が退化していることを示唆する。しかし、ハーテビースト属は OR 遺伝子も 100 個程度と他のハーテビースト亜科と比較しても短期間で極端に減少しているため、ゲノムアッセムブリーの質自体が疑わしいことに注意が必要である。いずれにしろ、ハーテビースト亜科 3 属では嗅覚に関しては他のウシ科と比較したときに嗅覚系の退化につながるような生態の違いは見られないため、これからの詳細な研究が必要であろう。また、ウシ科は哺乳類の中でも適応拡散が進んだ種であり、V1R 遺伝子レパートリーから見ても 7-52 個と多様性に富む。ハーテビースト亜科での鋤鼻器退化の兆候はこうしたウシ科の適応拡散に関連しているかもしれない。

## 4.2 哺乳類の収斂進化と嗅覚系遺伝子レパートリーの多様性

4.1 節では鋤鼻器の退化と鋤鼻器マーカー遺伝子の関係を見てきた。第二章で見てきた ancV1R や TRPC2 のような動物の表現型の形成に重要と考えられる遺伝子は、多くが 1 対 1 のオーソログス

として種間で保存されている。そのため遺伝子配列の比較がしやすく偽遺伝子化やポジティブセレクションの探索がしやすい。こうしたオーソログスの比較解析は特に現代のゲノムワイドなスクリーニング研究で用いられており、様々な哺乳類の表現型の進化を遺伝子レベルで解明することに貢献してきた。4.1 節冒頭で挙げた各遺伝子の偽遺伝子化とそれに対応する動物の形態の退化の相関は、こうした進化において厳密に維持されてきたこうしたオーソログスの解析結果として非常に典型的でわかりやすい例である。

これに対して、嗅覚系の受容体は多重重複遺伝子であり種間での各遺伝子の系統関係も多対多であるため、種間で単純な配列比較ができずゲノムワイドなスクリーニングでは省かれている現状がある。そのため、嗅覚系の受容体の種間比較は個別に議論せねばならず、先に挙げたようなオーソログスの解析よりも研究例が少ない。本節で扱う哺乳類の適応進化と嗅覚コミュニケーションの多様性については未解明な部分が多い。

第三章では各分類群における個別の進化を扱ったが、本節では適応進化の中でも分類群に横断的な現象である収斂進化に着目する。収斂進化とは系統の異なる分類群の間で、同様の環境に適応することによって類似する形質や形態を獲得する現象である。異なる系統が同様の形質を獲得する(退化させる)現象であるため、収斂進化は環境への適応を研究する上で環境と進化の因果関係を考察しやすく進化生物学でも特に重要である。収斂進化のもたらす形態の類似性は特に束縛条件の強い環境への適応に際して見られる。例えば本章でも取り上げている水棲適応は、水棲哺乳類間における足の退化とヒレ獲得の収斂のみならず、魚類や爬虫類である魚竜とも非常に似た形態に進化する。こうした収斂進化による形態の類似は系統区分を混乱させてきた原因であるというのは第三章で地中棲適応の齧歯目やモグラ、キンモグラの部分でも触れた通りである。また、遺伝子やDNAレベルでの収斂進化も確認されている。本節で扱う遺伝子レベルでの収斂はそれぞれの小節でも取り上げるが、例えば聴覚を司る遺伝子であるプレスチンでは、反響定位能力を収斂的に獲得したココウモリとハクジラにおいて同様の変異が入っているため、プレスチン遺伝子で系統樹を描くとココウモリとハクジラが単系統であるという間違っただけの結果が導きだされる(Liu et al. 2010)。これは同一遺伝子の進化における同一サイトに起こる収斂進化として知られており、形態に基づいた系統分類から分子系統学に基づいて系統分類されるようになった現代でもなお収斂進化が進化学者を悩ませている一例である。

形態の収斂に対して遺伝子レベルではどれほど収斂しているのかは興味深い。本節ではV1R 遺伝子と OR 遺伝子を用いて哺乳類の収斂進化における形態の収斂と嗅覚系遺伝子レパートリーの進化の関係性を探った。哺乳類において鼻器の形状変化と関わりの深い水棲適応、地中棲適応や匂いの分泌腺の収斂進化である麝香腺の獲得を取り上げてV1R 遺伝子と OR 遺伝子の比較を行った。その結果、どの収斂進化においても鼻器の形状の類似性に反して、V1R 遺伝子と OR 遺伝子は系統によって異なる増減のパターンを示した。このことは哺乳類の形態の類似性に反する嗅覚コミュニケーションの多様性を示しており、嗅覚コミュニケーションは収斂進化の影響を受けていないことを示唆する。また、それぞれの収斂進化における視覚や聴覚、触覚における遺伝子レベルでの強い収斂進化に反して、嗅覚系では遺伝子レベルでの多様性を保持することを示している。

#### 4.2.1 水棲適応と嗅覚系遺伝子の多様性

哺乳類では海牛目、クジラ亜目、食肉目鰭脚類、食肉目カワウソ亜科といくつかの分類群で水棲適応に進化している(図 4.1AB)。水棲環境は束縛条件が強いため、水棲適応を果たした生物は収斂進化により特に同様の形態になりやすい(Uhen 2007)。短い手足や後脚の退化、ヒレの形成、濃い体色(水中での保護色)等、水棲適応した動物は様々な共通箇所が見られる(図 4.1A)。こうした形態的な収斂以外にも、特に水棲哺乳類では視覚を司る遺伝子が収斂して退化していることが知られており、例えばクジラ類と鰭脚類は通常の2色覚から1色覚まで減少していることで知られる(Emerling et al. 2014; 図 4.2A)。しかしゲノム比較の結果からは他に形態の変化に結びつく遺伝子的な収斂進化はほとんど発見されておらず、どのような遺伝子的な変化が収斂した形態をもたらしているのかは研究の途上にある(Foote et al. 2015)。また嗅覚系遺伝子の方面においても、水棲哺乳類は近縁の陸棲種と比較してどれも OR 遺伝子が大きく減少していることが知られている(Kishida et al. 2015; Beichman et al. 2019; Hughes et al. 2018)。また、4.1 節でも見てきた通り、マナティ、クジラ亜目、カワウソ亜科、アザラシ科等多くの水棲哺乳類の鋤鼻器マーカー遺伝子は偽遺伝子化しており V1R 遺伝子も水棲適応と同時期に大きく減少していることから、主嗅覚系に先立って副嗅覚系が退化している。このような水棲適応による副嗅覚系の退化は、V1R 遺伝子の大部分が揮発性物質を受容しており、それが水中環境では機能しないためと考えられる。そのため、見かけ上 intact な V1R 遺伝子が残っていてもそれはおそらく偽遺伝子化の過程にある配列である。

こうした水棲哺乳類の収斂的な鋤鼻器の退化に反して、鰭脚類では鋤鼻器の退化と鋤鼻器マーカー遺伝子の偽遺伝子化に差があることを 2.3.2 小節で示した。また、3.3.4 小節では鰭脚類の中でも鋤鼻器が退化しているアザラシ科とそうでないアシカ科およびセイウチ科に V1R 遺伝子レパートリーとその減少速度に差があることを発見した。アシカ科やセイウチ科は生殖時に陸に上がりハーレムを作ることが知られていることから、この生殖はフェロモン依存でありそのために水棲適応してもなお V1R 遺伝子が機能していると考えられる。しかし同様にアザラシ科も陸上でハーレムを作り生殖するため、生殖を始めとする生態においてアザラシ科とアシカ科やセイウチ科とでは潜在的な違いがあるかもしれない。

海牛目のマナティは完全水棲哺乳類であり、鋤鼻器が退化した動物として知られる。しかしながら水棲哺乳類の中ではもっとも V1R 遺伝子が残っており遺伝子重複も観測されるため、水棲哺乳類の中でも例外的に V1R 遺伝子が機能していることを示唆する。これはおそらくマナティの草食性で捕食のために嗅覚を用いることに関連している。同時期に完全水棲に移行したクジラ亜目の OR 遺伝子が 0-100 個程度に減少しているのに対して(Kishida et al. 2015)、マナティは OR 遺伝子を 478 個保持しているため、水棲での捕食活動等のために嗅覚系を独自に発達させている可能性がある。そのため鋤鼻器が退化しているものの、V1R 遺伝子の一部が主嗅覚系に組み込まれて機能していることを示唆する。

水棲に近い適応形態として、水辺生息への適応進化が挙げられる。水辺に生息する種は水中と陸上の両方の生活様式を取っており、水かきの獲得や潜水への適応といった水棲適応への前段階となる形態が観察される(図 4.1B)。こうした種は哺乳類に点在しており、本章は齧歯目ではビーバーやヌートリア、カピバラ、鯨偶蹄目ではカバを取り上げた。これらの種ではいずれも水陸両方の生活を営んでおり、日中の多くは水中に生息する。これは捕食や外敵から身を守るためである。また、鋤

鼻器の退化が見込まれているカワウソ亜科もこのような生活をしている。これらの種のうちカワウソ亜科以外の種は近縁種と V1R 遺伝子や OR 遺伝子のレパートリーが同程度であり、また遺伝子の増減にも影響が見られなかったため、水辺生息による嗅覚系への影響はないと考えられる。カワウソ亜科とこれらの水辺生息の分類群との違いは、おそらく水棲適応度合いによる違いであるが、こうした水棲適応度によって鋤鼻器が退化しているかはっきり分かれるのは興味深い。水棲適応のどの段階で嗅覚の退化が起きるかをゲノムレベルで比較解析することが次の研究として考えられる。

#### 4.2.2 地中棲適応と嗅覚系遺伝子の進化

哺乳類に見られる特別な環境への適応形態としては、地中棲適応も挙げられる。地中棲適応した種では形態的な変化として目が皮膚に覆われていたり小さくなっている代わりに皮膚が硬化していたり、触毛の発達や鼻器が前方に突き出している様子がよく収斂の結果として表れている(図 4.1C; Zuri et al 1999; Davies et al. 2018)。これらのことから視覚の退化と共に、他の感覚器官として特に触覚や嗅覚が進化していると考えられる。地中棲適応種の視覚の退化の収斂は遺伝子的にも知られており、多くの視覚系を司る遺伝子が地中棲適応種で収斂して偽遺伝子化していることが報告されている(図 4.2A)。またこれらの視覚系遺伝子の退化以外にも、聴覚系遺伝子の進化や耐低酸素ストレス遺伝子の進化といった機能の発達が見られる(図 4.2B; Davies et al. 2018)。しかし、こうした遺伝子群ではそれぞれの地中棲適応種で正の自然選択が見られるものの、地中棲適応種で収斂している遺伝子自体はほとんど見つかっておらず、地中棲適応による収斂は各系統で別々の遺伝子が進化することで達成している可能性が示されている(Davies et al. 2018)。

地中棲適応した種は齧歯目キヌゲネズミ科モグラレミング属、メクラネズミ科、デバネズミ科、真無盲腸目モグラ科、アフリカトガリネズミ目キンモグラ科と哺乳類で広く観察される。これらの種の V1R 遺伝子レパートリーを調べたところ、近縁種と比較してどれも少ないことがわかった。しかし V1R 遺伝子レパートリーの増減推定の結果を見ると必ずしも地中棲適応と V1R 遺伝子の減少が相関しているわけではなく、地中棲適応種の中でも嗅覚系の進化に多様性が見られる。各地中棲適応種の分岐後に大きな(祖先と比較して半分以上の V1R 遺伝子の消滅)が見られるのはモグラレミング属、メクラネズミ科、デバネズミ科の齧歯目 3 分類群に集中しており、モグラ科やキンモグラ科では祖先の段階で V1R 遺伝子レパートリーが少なく、そこから分岐後に大きな増加が行われなかった様子が観察された。また、OR 遺伝子のほうも調べると同様の多様性が見られた。モグラレミング属とモグラ科はどちらも V1R 遺伝子と OR 遺伝子の両方が近縁種と比較して少ない。このことは、他の感覚系の発達による嗅覚系の重要度低下を思わせる。メクラネズミ科とデバネズミ科、キンモグラ科は近縁種と比較して V1R 遺伝子のみが少なく、OR 遺伝子が同等または微増していることから、地中棲適応によってフェロモン知覚の重要性のみが低下しているが、主嗅覚系の重要度にはおそらく影響を与えていない。これらのことから地中棲適応種は形態としては強く収斂しているが、モグラレミング属とモグラ科およびメクラネズミ科、デバネズミ科、キンモグラ科の間には感覚器官の発達度合いに差があるかもしれない。

### 4.2.3 麝香腺の獲得と嗅覚系遺伝子の多様性

嗅覚系に関連する形態の進化としては一部の哺乳類で見られる麝香腺の発達も興味深い。麝香腺は匂い物質を貯蔵したり分泌したりする分泌腺であり腹部から局部に収斂して形成される。麝香腺から発せられる匂いは性誘引フェロモンの役割を持っていると考えられているが(Agosta 1992)、哺乳類の生態の研究では特異な匂いは基本的にどれも性誘引フェロモンと見なされるため、つまりは役割が未だに解明されていないのだろう。

麝香腺の収斂進化と嗅覚系の関係を明らかにするために、本研究では鯨偶蹄目ジャコウジカ科、食肉目ジャコウネコ科、真無盲腸目ジャコウネズミ属の3つの分類群を扱った(図 4.1D)。これらの分類群の V1R 遺伝子と OR 遺伝子の進化としては、麝香腺の収斂に反して3つの分類群それぞれで多様性があり、受容体側としては収斂していないところが興味深い。ジャコウジカは V1R 遺伝子が近縁と比較して半分弱に減少しており OR 遺伝子は近縁と同程度ある。そのため麝香腺の発達と嗅覚系遺伝子の拡張が相関していない。ジャコウジカの OR 遺伝子の先行研究では本研究と同等の 864 個の OR 遺伝子を発見しており、これらのうちのわずか 2 系統が麝香腺から分泌する匂いと相同な物質を受容することが示されている(Shirasu et al. 2014; Bu et al. 2019)。受容側に多様性がないとするとおそらく分泌側も多様な物質を分泌していないと考えられるので、なぜジャコウジカは特定の匂い分泌のためにわざわざ分泌腺を発達させたのか謎である。または、V1R 遺伝子や OR 遺伝子以外の遺伝子が受容体として働き、麝香を受容するのかもしれない。ジャコウネコでは V1R 遺伝子が近縁のネコ科と同程度であり大きな増減もない代わりに、OR 遺伝子がネコ科の 766 個やハイエナ科の 778 個に対して 1015 個と OR 遺伝子が大きく拡張している。ジャコウネコの OR 遺伝子の拡張と麝香腺の形成が相関しているかどうかはわからないが、率直に考えればジャコウネコの麝香の受容先は V1R ではなく OR であり、麝香も多様なオドラントを分泌しているのかもしれない。これに対して、ジャコウネズミでは OR 遺伝子が近縁と同程度である代わりに V1R 遺伝子レパトリーが系統特異的に拡張している。このことからジャコウネズミの麝香腺の発達はフェロモン受容に関与すると考えられる。こうした収斂的な麝香腺の発達に対して受容の様式が多様化していることは、麝香腺の潜在的な多様性を示唆する。

## 4.3 展望

本研究は進化生物学におけるデータ駆動型研究という立場から、鋤鼻器マーカー遺伝子やフェロモン受容体である V1R 遺伝子、嗅覚受容体である OR 遺伝子を哺乳類で網羅的に探索することによって哺乳類のフェロモン知覚に関する様々な示唆を得た。こうした一部の遺伝子の網羅的な解析から得た結果はまだ仮説に過ぎないので、これから嗅覚系に関連する遺伝子群の解析や動物行動学的な研究を行うことでより詳細な検証が行われることが期待される。それによってこれまで謎であった動物の生態や未解明だった進化戦略の発見などについて役立てることができよう。特に本研究で取り扱ったフェロモン知覚は、動物の種の保存に関わる社会行動に深く関与する感覚であるため、それを補完する感覚器官の進化や動物の社会行動の存在が示唆される。

第 4.1 節において本研究で新たに鋤鼻器退化を示唆したカワウソ亜科、アザラシ科はどちらも水

棲哺乳類であるため鋤鼻器退化が既知であるマナティやクジラ類と同様に鋤鼻器退化の因果関係がわかりやすい。しかし、本研究でも示したようにマナティが嗅覚を発達させているのに対してクジラ類は嗅覚全体を退化させ代わりに反響定位能力といった聴覚を発達させているように、束縛力が強い水棲適応においても異なる感覚系遺伝子の進化を遂げている。そのためカワウソ亜科やアザラシ科の感覚系遺伝子をさらに比較解析することによって、マナティやクジラ類とは違った感覚を発達させてフェロモン知覚の代わりに繁殖や捕食を担うといった発見があるかもしれない。

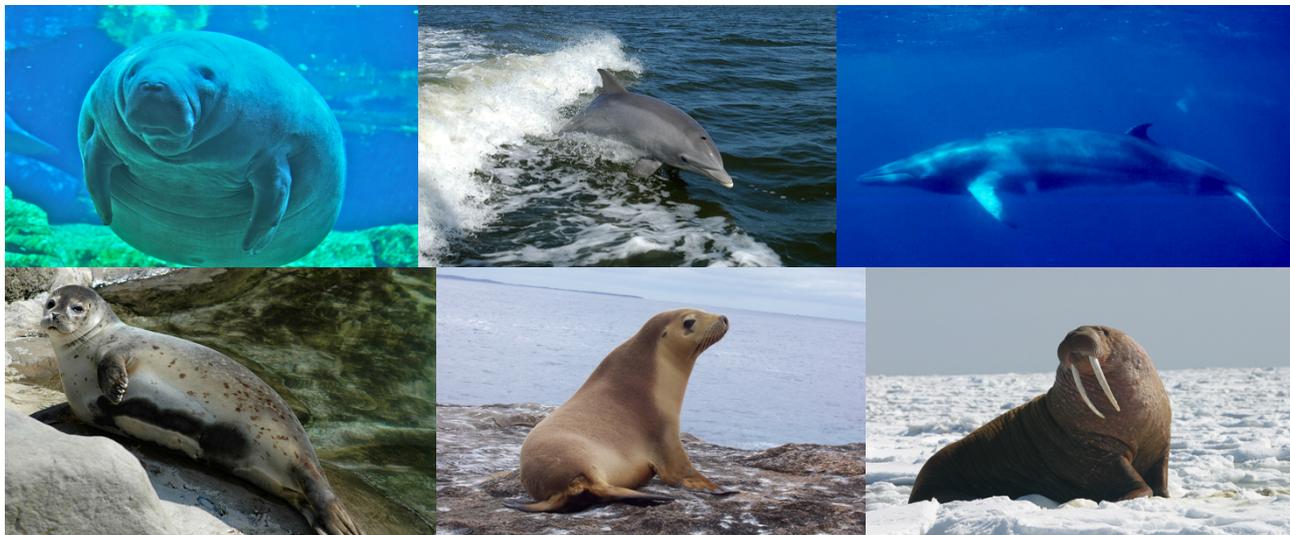
本研究で新たに鋤鼻器退化を示唆したフォッサとハーテビーストはどちらも希少動物であり生態があまり知られておらず実地調査も難しい。こうした希少動物における新たな進化の発見は、網羅的なゲノム探索によって思いもよらぬ発見があるかもしれないことを示している。また、本論文ではハーテビースト亜科についてフレーメン反応の消滅や鼻口蓋管の退化を示す文献を紹介した。この Hart らの研究は 1987 年に出版された以降後続の研究が存在せず、鋤鼻器マーカー遺伝子が盛んに探索され鋤鼻器の退化が遺伝子レベルで再確認され始めた近年の論文でもまったく触れられていないためおそらく近年では忘れられていた研究であった。筆者は文献調査の途中に偶然この論文を発見し、さらに最初に投稿した論文がリジェクトされ再投稿の原稿を書いている途中に偶然ハーテビースト亜科 4 属のゲノムを解読した研究者がいたことによって約 30 年ぶりにハーテビースト亜科の鋤鼻器退化が検証されるに至った。このように過去の研究を現在へとつなげることができるのも研究の魅力の一つである。動物行動学は過去から盛んに行われている研究の一つであるため、今後も遺伝子解析によって埋もれていた動物行動学研究の再発見ができるだろう。

こうした鋤鼻器退化への示唆に加え、第 3.3 節では鋤鼻器を維持している種でもそれぞれの分類群で V1R 遺伝子レパートリーの多様性があることを示した。こうした V1R 遺伝子レパートリーの多様性の原因はおおよそ 2 つ考えられる。例えばシカ科やウシ科のような同科内というごく近縁の同士で V1R 遺伝子レパートリーが大きく違うことは、科内での種分化にフェロモン知覚が大きく関わっていることを示唆する。こうした分類群ではフェロモンの単離や具体的な受容体の特定をすることによってフェロモンの進化原理に対する知見を深めることができるだろう。また、イヌ亜目やネコ亜目、夜行性霊長目と昼行性霊長目の V1R 遺伝子レパートリーの違いのような科以上の分類群における変化は適応進化の結果によってフェロモン知覚と何かしらの感覚とのトレードオフや重要性の変化が起きているかもしれない。こうした分類群対分類群での関係はさらなる感覚系遺伝子の比較解析や生態の研究によってこれまでの研究で気づけなかった進化の多様性を発見できるかもしれない。

今回の研究で示した動物の適応進化に対する遺伝子解析からのアプローチは、観察や解剖からではわからなかった遺伝子レベルでの多様性という動物に対する新たな側面の理解につながる。恐竜や巨鳥の時代から生き延びた哺乳類の祖先は、それらのいなくなった世界へ爆発的に拡散し、新天地へと適応するためにゲノムを書き換え形態を進化させていった。そうして現在に生きている哺乳類のゲノム情報には数々の環境で生き抜くための知恵と経験が詰まっているので、それらを解析することによって製薬や遺伝子治療へと役立つ知見を得ることができる。現在、DNA シーケンシングの発達によって様々な生物のゲノム情報が高解像度で得られるようになった。そのため今まで以上に生物の遺伝的な多様性が注目されるだろう。

図表

(A)



(B)



(C)



(D)



図 4.1 哺乳類の形態の収斂。(A)完全水棲のマナティ、クジラ類と半水棲の鰭脚類の収斂。マナティとクジラ類は完全水棲である一方、鰭脚類は生活の一部に陸上への依存性を残した半水棲である。しかし鰭脚類の遊泳能力は高く、生活の大半を水中で過ごすため形態が完全水棲の哺乳類に収斂している。これらの分類群に共通する形態的特徴として、後ろ足の完全退化、ヒレの獲得、耳介(耳の外側に出ている部分)の消滅などが上げられる。マナティと鰭脚類は体型がよく類似しており

どちらも胴長で手足が短い。これに対してクジラ類は魚や魚竜に近い流線型の体型をしている。(B)半水棲であるがより陸上での生活への依存度が強いカワウソ、ビーバー、カピバラ、ヌートリア。こうした動物は水辺に生息しており捕食や外敵から身を守るために生活の一部水中に依存する。共通して見られる形態の特徴としては手足に水かきの形成が挙げられる。また、水を弾く固くて長い体毛を持ち、水中での体温維持などにも役立っている。鰭脚類やマナティほどではないがどの動物も胴長であり手足が短い。耳介は縮小しているものの形が残っている。(C)地中棲適応へと進化したハダカデバネズミ、モグラレミング、メクラネズミ、モグラ、キンモグラ。形態の収斂としては第一に目が挙げられる。地中棲適応種の目は完全につぶれているか極端に縮小しており退化している。また手足が土を掘るために進化しており皮膚が硬化している。胴体はどれも胴長で手足が短い。これは地中のトンネルを行き来するのに便利な体型である。鼻腔は長く伸びており鼻面が前に突き出ている。(D)麝香腺を獲得したジャコウジカ、ジャコウネコ、ジャコウネズミ。姿勢は収斂していないが、共通して下腹部に麝香腺と呼ばれる芳香腺を持つ。ジャコウジカでは雄しか麝香腺を持たないことから麝香腺は雌への誘引物質と考えられている。しかし本文でも書いたとおり受容体側が種特異的に増加しているわけではなく、麝香腺から放つ芳香を受容する嗅覚受容体はごくわずかである。そのためなぜ特別に麝香腺という組織が形成されているのかはわかっていない。

画像出典:

(A)

マナティ (By NASA - Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=112006>)

イルカ (By NOAA - Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25240111>)

クジラ (By Ahodges7 - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9752992>)

アザラシ (By CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=461549>)

アシカ (By Brian M Hunt., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=227477>)

セイウチ (By Joel Garlich-Miller, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=31314788>)

(B)

カワウソ (By Bernard Landgraf - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=41335>)

ビーバー (By Steve from washington, dc, usa / CC BY-SA <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0>)

カピバラ (By Petar Milošević / CC BY-SA <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)

ヌートリア (By Bob Johnson / CC BY-SA <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)

(C)

ハダカデバネズミ (By Roman Klementschtz, Wien <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=252701>)

モグラレミング (By Bassem18, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3032473>)

メクラネズミ (By Didier Descouens, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25679841>)

モグラ (By Михайло Колесніков <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9973101>)

キンモグラ (By JonRichfield / CC BY-SA <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)

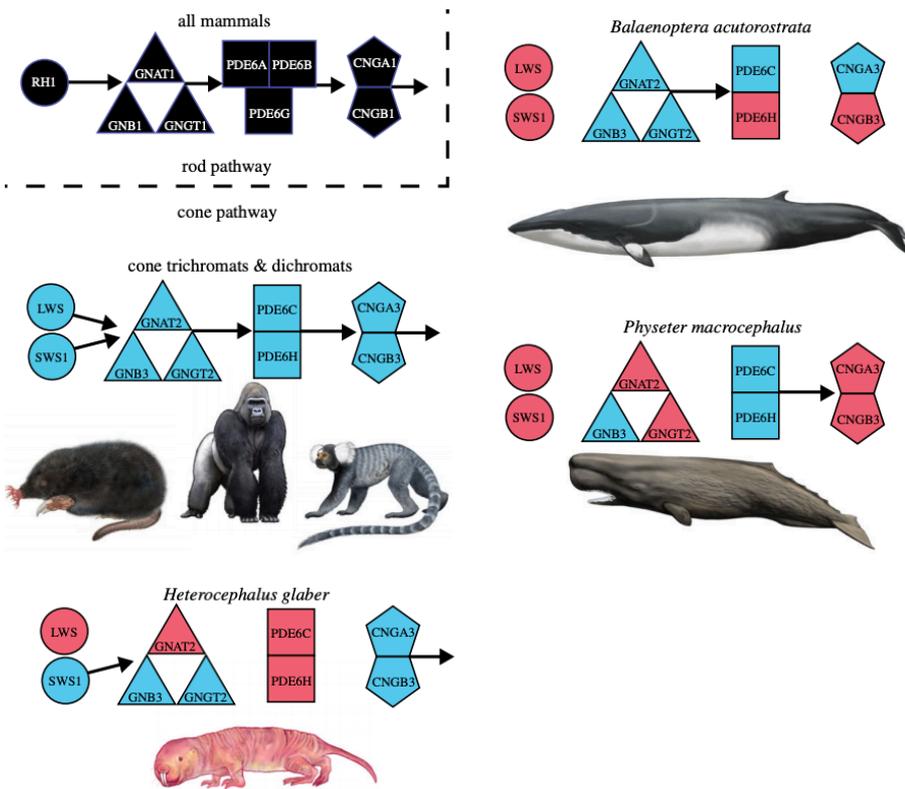
(D)

ジャコウジカ (By CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=657641>)

ジャコウネコ (By Dr. Raju Kasambe / CC BY-SA (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>))

ジャコウネズミ (By L. Shyamal / CC BY-SA (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5>))

(A)



(B)

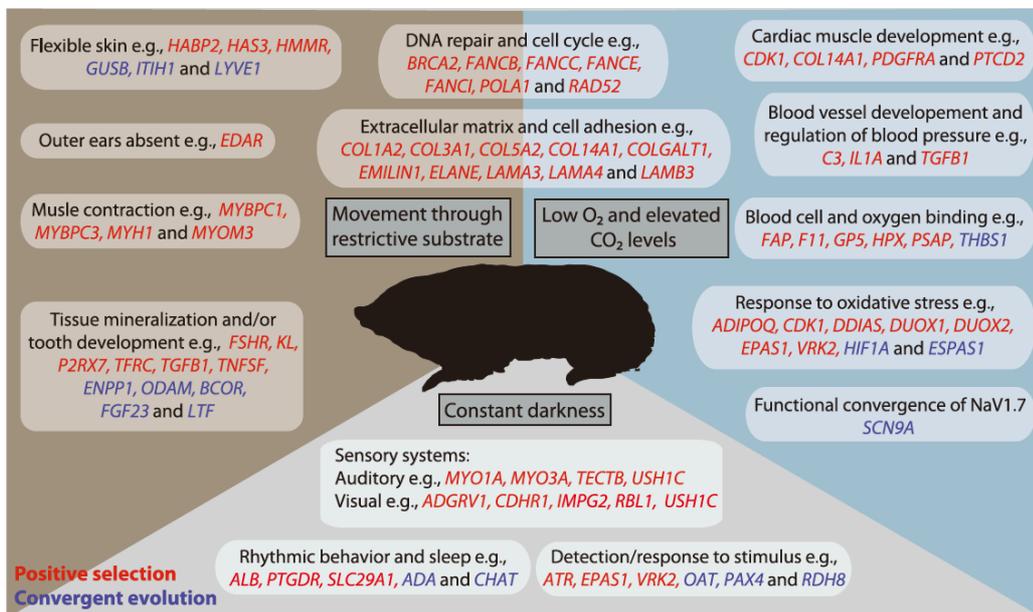


図 4.2 水棲哺乳類と地中棲哺乳類の遺伝子レベルでの収斂。(A)哺乳類における視覚伝達系遺伝子の退化。哺乳類の中では狭鼻猿類の視覚が発達しており 3 色覚を持つことが知られているが、多くの哺乳類は 2 色覚である。その中でも水棲哺乳類と地中棲哺乳類は目が退化しており、例えば鯨類とクジラ類は 1 色覚となっていることが知られている。遺伝子レベルで見ても水棲哺乳類と地中棲哺乳類は視覚伝達系における遺伝子の偽遺伝子化が共通して見られる。図中のホシバナモグラは表

記の遺伝子の範囲では偽遺伝子化が観測されていないが、ほぼ明暗しか見分けられないとされている。図は Emerling et al. 2014 より一部改訂。(B)地中棲適応種における遺伝子レベルでの収斂。赤文字は地中棲適応種のどれかで正の自然選択が見られる遺伝子、青文字は地中棲適応種すべてで正の自然選択が働いている遺伝子を指す。遺伝子の収斂進化は一部の機能では見られるものの、多くの遺伝子が種によって個別に進化しており共通するものは少ない。これは地中棲適応が遺伝子の収斂にまで及んでおらず、地中棲適応種はおおよそ別々の遺伝子を進化させて地中棲適応を達成していることを示す。画像は Davies et al. 2018 より。

## 参考文献

- Agosta, W.C. (1992). *Chemical Communication: The Language of Pheromones*. (New York: Sci. Am. Library).
- Bärmann EV, Rössner GE, Wörheide G. 2013. A revised phylogeny of Antilopini (Bovidae, Artiodactyla) using combined mitochondrial and nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol.* 67:484-493.
- Beichman AC, Koepfli KP, Li G, Murphy W, Dobrynin P, Kilver S, Tinker MT, Murray MJ, Johnson J, Lindblad-Toh K, Karlsson EK, Lohmueller KE, Wayne RK. (2019) Aquatic adaptation and depleted diversity: a deep dive into the genomes of the sea otter and giant otter. *Mol Biol Evol.* (in press)
- Bhatnagar KP, Meisami E. 1998. Vomeronasal organ in bats and primates: extremes of structural variability and its phylogenetic implications. *Microsc Res Tech.* 43:465–475.
- Bowmaker, J. K. (1998). Evolution of colour vision in vertebrates. *Eye.* 12 (3b): 541–547.
- Brand, P., Robertson, H. M., Lin, W., Pothula, R., Klingeman, W. E., Jurat-Fuentes, J. L., & Johnson, B. R. (2018). The origin of the odorant receptor gene family in insects. *Elife*, 7, e38340.
- Brennan PA, Zufall F. 2006. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444:308–315.
- Brykczynska, U., Tzika, A. C., Rodriguez, I., & Milinkovitch, M. C. (2013). Contrasted evolution of the vomeronasal receptor repertoires in mammals and squamate reptiles. *Genome Biology and Evolution*, 5(2), 389-401.
- Bu, P., Jian, Z., Koshy, J., Shen, Y., Yue, B., & Fan, Z. (2019). The olfactory subgenome and specific odor recognition in forest musk deer. *Animal genetics*, 50(4), 358-366.
- Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D. & Hecker, E. (1959) Über den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori* – reindarstellung und konstitution. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete* 14: 283–4.
- Cao, J., Huang, S., Qian, J., Huang, J., Jin, L., Su, Z., ... & Liu, J. (2009). Evolution of the class C GPCR Venus flytrap modules involved positive selected functional divergence. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 1-12.
- Cardé, R T & Haynes, K F (2004) Structure of the pheromone communication channel in moths. In: Cardé, R & Millar, J G (eds.) *Advances in Insect Chemical Ecology*. pp. 283–332. Cambridge: Cambridge University Press.
- Chamero, P., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2012) From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ. *Trends Neurosci.* 35, 597–606.
- Chen L, Qiu Q, Jiang Y, Wang K, Lin Z, Li Z, Bibi F, Yang Y, Wang J, Nie W, Su W, Liu G, Li Q, Fu W, Pan X, Liu C, Yang J, Zhang C, Yin Y, Wang Y, Zhao Y, Zhang C, Wang Z, Qin Y, Liu W, Wang B, Ren Y, Zhang R, Zeng Y, Fonseca RR, Wei B, Li R, Wan W, Zhao R, Zhu W, Wang Y, Duan S, Gao Y, Zhang YE, Chen C, Hvilsom C, Epps CW, Chemnick LG, Dong Y, Mirarab S, Siegismund HR, Ryder OA, M. Gilbert MTP, Lewin HA, Zhang G, Heller R, Wang W. 2019. Large-scale ruminant genome sequencing provides insights into their evolution and distinct traits. *Science* 364: eaav6202
- Chen, K., Durand, D., & Farach-Colton, M. (2000). NOTUNG: a program for dating gene duplications and optimizing gene family trees. *Journal of Computational Biology*, 7(3-4), 429-447.
- Cock PA, Antao T, Chang JT, Chapman BA, Cox CJ, Dalke A, Friedberg I, Hamelryck T, Kauff F, Wilczynski

- B, de Hoon MJL. 2009. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* 25:1422–1423.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9 :e772.
- Davies, K. T., Bennett, N. C., Faulkes, C. G., & Rossiter, S. J. (2018). Limited evidence for parallel molecular adaptations associated with the subterranean niche in mammals: a comparative study of three superorders. *Molecular Biology and Evolution*, 35(10), 2544-2559.
- Dawley EM, Fingerlin A, Hwang D, John SS, Stankiewicz CA. 2000. Seasonal cell proliferation in the chemosensory epithelium and brain of red-backed salamanders, *Plethodon cinereus*. *Brain Behav. Evol.* 56:1–13
- de Bruyne, M & Baker, T C (2008) Odor detection in insects: volatile codes. *J Chem Ecol* 34: 882–97.
- DeMaria, S., Berke, A. P., Heravian, A., Ferreira, T., & Ngai, J. (2013). Role of a ubiquitously expressed receptor in the vertebrate olfactory system. *Journal of Neuroscience*, 33(38), 15235-15247.
- Dixson AF. 1983. Observations on the evolution and behavioral significance of “sexual skin” in female primates. *Adv Study Behav.* 13:63–106.
- Døving KB, Trotier D. 1998. Structure and function of the vomeronasal organ. *J Exp Biol.* 201:2913–2925.
- Dulac, C., and Axel, R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83, 195–206.
- Emerling, C. A., & Springer, M. S. (2015). Genomic evidence for rod monochromacy in sloths and armadillos suggests early subterranean history for Xenarthra. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1800), 20142192.
- Firestein S. 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413:211–218.
- Foote, A. D., Liu, Y., Thomas, G. W., Vinař, T., Alföldi, J., Deng, J., ... & Khan, Z. (2015). Convergent evolution of the genomes of marine mammals. *Nature Genetics*, 47(3), 272-275.
- González A, Morona R, López JM, Moreno N, Northcutt RG. 2010. Lungfishes, like tetrapods, possess a vomeronasal system. *Front Neuroanat.* 1:e4.
- Grus WE, Shi P, Zhang YP, Zhang J. (2005). Dramatic variation of the vomeronasal pheromone receptor gene repertoire among five orders of placental and marsupial mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:5767–5772.
- Grus, W. E., & Zhang, J. (2004). Rapid turnover and species-specificity of vomeronasal pheromone receptor genes in mice and rats. *Gene*, 340(2), 303-312.
- Grus, W. E., & 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), 407-419.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst Biol.* 52:696–704.
- Haga S, Hattori T, Sato T, Sato K, Matsuda S, Kobayakawa R, Sakano H, Yoshihara Y, Kikusui T, Touhara K (2010) The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature* 466:118–123.

- Hart BL, Hart LA, Mania JN. (1987). Alteration in Vomeronasal System Anatomy in Alcelaphine Antelopes: Correlation With Alteration in Chemosensory Investigation. *Physiology and Behavior*. 42:155-162.
- Hashiguchi, Y., & Nishida, M. (2006). Evolution and origin of vomeronasal-type odorant receptor gene repertoire in fishes. *BMC evolutionary biology*, 6(1), 76.
- Hattori T, Osakada T, Masaoka T, Ooyama R, Horio N, Mogi K, Nagasawa M, Haga-Yamanaka S, Touhara K, Kikusui T (2017) Exocrine gland-secreting peptide 1 is a key chemosensory signal responsible for the Bruce effect in mice. *Curr Biol* 27(20):3197–201.
- Hecker N, Lächele U, Stuckas H, Giere P, Hiller M. 2019. Convergent vomeronasal system reduction in mammals coincides with convergent losses of calcium signalling and odorant-degrading genes. *Molecular Ecology* 28:3656–3668.
- Hinchliff CE, Smith SA, Allman JF, Burleigh JG, Chaudhary R, Coghill LM, Crandall KA, Deng J, Drew BT, Gazis R, Gude K, Hibbett DS, Katz LA, Laughinghouse HD 4th, McTavish EJ, Midford PE, Owen CL, Ree RH, Rees JA, Soltis DE, Williams T, Cranston KA. 2015. Synthesis of phylogeny and taxonomy into a comprehensive tree of life. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112:12764–12769.
- Hughes, G. M., Boston, E. S., Finarelli, J. A., Murphy, W. J., Higgins, D. G., & Teeling, E. C. (2018). The birth and death of olfactory receptor gene families in mammalian niche adaptation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1390-1406.
- Hunnicutt, K. E., Tiley, G. P., Williams, R. C., Larsen, P. A., Blanco, M. B., Rasoloarison, R. M., ... & Yoder, A. D. (2020). Comparative genomic analysis of the pheromone receptor Class 1 family (V1R) reveals extreme complexity in mouse lemurs (genus, *Microcebus*) and a chromosomal hotspot across mammals. *Genome Biology and Evolution*, 12(1), 3562-3579.
- Hunter AJ, Fleming D, Dixson AF. 1984. The structure of the vomeronasal organ and nasopalatine ducts in *Aotus trivirgatus* and some other primate species. *J Anat*. 138:217–225.
- Inagaki H, Kiyokawa Y, Tamogami S, Watanabe H, Takeuchi Y, Mori Y (2014) Identification of a pheromone that increases anxiety in rats. *Proc Natl Acad Sci*. 111(52): 18751-18756.
- Island HD, Wengeler J, Claussenius-Kalman, H. 2017. The Flehmen Response and Pseudosuckling in a Captive, Juvenile Southern Sea Otter (*Enhydra lutris nereis*). *Zoo Biology* 36: 30–39
- Jefferson TA, Webber MA, Pitman RL. 2008. Marine Mammals of the World: A Comprehensive Guide to Their Identification. *Academic Press/Elsevier*, 573 pp.
- Jiao, H., Hong, W., Nevo, E., Li, K., & Zhao, H. (2019). Convergent reduction of V1R genes in subterranean rodents. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1-9.
- Karlson, P., & Lüscher, M. (1959). ‘Pheromones’: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183(4653), 55-6.
- Katoh K, Frith MC. 2012. Adding unaligned sequences into an existing alignment using MAFFT and LAST. *Bioinformatics* 28:3144–3146.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res*. 33:511-518
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment

- based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30:3059–3066.
- Kelley, N. P., & Motani, R. (2015). Trophic convergence drives morphological convergence in marine tetrapods. *Biology Letters*, 11(1), 20140709.
- Kiemnec-Tyburczy KM, Woodley SK, Watts RA, Arnold SJ, Houck LD. 2012. Expression of vomeronasal receptors and related signaling molecules in the nasal cavity of a caudate amphibian (*Plethodon shermani*). *Chem. Senses* 37:335–46
- Kishida, T., Thewissen, J. G. M., Hayakawa, T., Imai, H., & Agata, K. (2015). Aquatic adaptation and the evolution of smell and taste in whales. *Zoological letters*, 1(1), 1-10.
- Li, W., Godzik, A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659.
- Liman ER, Dulac C. 2007. Trpc2 and the molecular biology of pheromone detection in mammals. In: Liedtke WB, Heller S, editors. TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades. Boca Raton: *CRC Press*. p. 45–53.
- Liman ER, Innan H. 2003. Relaxed selective pressure on an essential component of pheromone transduction in primate evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:3328–3332.
- Liu, Y., Cotton, J. A., Shen, B., Han, X., Rossiter, S. J., & Zhang, S. (2010). Convergent sequence evolution between echolocating bats and dolphins. *Current Biology*, 20(2), R53-R54.
- Lowell WR, Flanigan WF. 1980. Marine mammal chemo-reception. *Mamm Rev.* 10:53–59.
- Mackay-Sim A, Duvall D, Graves BM. 1985. The West Indian manatee (*Trichechus manatus*) lacks a vomeronasal organ. *Brain Behav Evol.* 27:186–194.
- Mandiyan VS, Coats JK, Shah NM. 2005. Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat Neurosci.* 8:1660–1662.
- Meisami E, Bhatnagar KP. 1998. Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc Res Tech.* 43:476–499.
- Meredith M. 1986. Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiol Behav.* 36:737–743.
- Montague, M. J., Li, G., Gandolfi, B., Khan, R., Aken, B. L., Searle, S. M., ... & Driscoll, C. A. (2014). Comparative analysis of the domestic cat genome reveals genetic signatures underlying feline biology and domestication. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 111(48), 17230-17235.
- Moriya-Ito, K., Hayakawa, T., Suzuki, H., Hagino-Yamagishi, K., & Nikaido, M. (2018). Evolution of vomeronasal receptor 1 (V1R) genes in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Gene*, 642, 343-353.
- Nakamuta S, Nakamuta N, Taniguchi K, Taniguchi K. 2012. Histological and ultrastructural characteristics of the primordial vomeronasal organ in lungfish. *Anat Rec.* 295:481–491.
- Nei, M., Niiimura, Y., and Nozawa, M. (2008) The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat. Rev. Genet.* 9, 951–963.
- Niiimura Y, Nei M. 2007. Extensive gains and losses of olfactory receptor genes in mammalian evolution. *PLoS One* 2(8):e708.
- Niiimura, Y., Matsui, A., & Touhara, K. (2018). Acceleration of olfactory receptor gene loss in primate evolution:

- possible link to anatomical change in sensory systems and dietary transition. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1437-1450.
- Nikaido (2019) Evolution of V1R pheromone receptor genes in vertebrates: diversity and commonality. *Genes Genet Syst.* 94:141–149
- Nikaido, M., Noguchi, H., Nishihara, H., Toyoda, A., Suzuki, Y., Kajitani, R., Suzuki, H., Okuno, M., Aibara, M., Ngatunga, B. P., et al. (2013) Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. *Genome Res.* 23, 1740–1748.
- Nikaido, M., Suzuki, H., Toyoda, A., Fujiyama, A., Hagino-Yamagishi, K., Kocher, T. D., ... & Okada, N. (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), 711-722.
- Oelschläiger H. 1989. Early development of the olfactory and terminalis system in baleen whales. *Brain Behav Evol.* 34:171–183.
- Ohara H, Nikaido M, Date-Ito A, Mogi K, Okamura H, Okada N, Takeuchi Y, Mori Y, Hagino-Yamagishi K. 2009. Conserved repertoire of orthologous vomeronasal type 1 receptor genes in ruminant species. *BMC Evol Biol.* 9:e233.
- Owerkowicz, T., Musinsky, C., Middleton, K. M., & Crompton, A. W. (2015). Respiratory turbinates and the evolution of endothermy in mammals and birds. *Great Transformations in Vertebrate Evolution*, 143-165.
- Pfister, P., Randall, J., Montoya-Burgos, J. I., and Rodriguez, I. (2007) Divergent evolution among teleost V1r receptor genes. *PLoS One* 2, e379.
- Picone, B., Hesse, U., Panji, S., Van Heusden, P., Jonas, M., & Christoffels, A. (2014). Taste and odorant receptors of the coelacanth—a gene repertoire in transition. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 322(6), 403-414.
- Prieto-Godino LL, Rytz R, Bargeton B, Abuin L, Arguello JR, Peraro MD, Benton R. 2016 *Olfactory receptor pseudo-pseudogenes*. *Nature* 539:93–97.
- Resh, V. H., & Cardé, R. T. (Eds.). (2009). Encyclopedia of insects. *Academic press*.
- Rodriguez, I., Greer, C. A., Mok, M. Y., and Mombaerts, P. (2000) A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nat. Genet.* 26, 18–19.
- Saraiva, L. R., and Korsching, S. I. (2007) A novel olfactory receptor gene family in teleost fish. *Genome Res.* 17, 1448–1457.
- Sato Y, Miyasaka N, Yoshihara Y. 2005. Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *J Neurosci.* 25:4889–4897.
- Seton, ET. (1898). Wild animals I have known: The Springfield Fox (II). *Internet Archive*. <https://archive.org/details/wildanimalsihave00seto>
- Sharma V, Hecker N, Roscito JG, Foerster L, Langer BE, Hiller M. 2018. A genomics approach reveals insights into the importance of gene losses for mammalian adaptations. *Nat Commun.* 9:e1215.
- Sharma, K., Syed, A. S., Ferrando, S., Mazan, S., & Korsching, S. I. (2019). The chemosensory receptor repertoire of a true shark is dominated by a single olfactory receptor family. *Genome Biology and Evolution*, 11(2), 398-405.

- Shi, P., and Zhang, J. (2007) Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land. *Genome Res.* 17, 166–174.
- Shirasu, M., Yoshikawa, K., Takai, Y., Nakashima, A., Takeuchi, H., Sakano, H., & Touhara, K. (2014). Olfactory receptor and neural pathway responsible for highly selective sensing of musk odors. *Neuron*, 81(1), 165-178.
- Silva L, Antunes A. 2017. Vomeronasal Receptors in Vertebrates and the Evolution of Pheromone Detection. *Annu Rev Anim Biosci.* 5:353-370.
- Slater, G.S., Birney, E., 2005. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 6, 31.
- Smith TD, Garrett EC, Bhatnagar KP, Bonar CJ, Bruening AE, Dennis JC, Kinzinger JH, Johnson EW, Morrison EE. 2011. The vomeronasal organ of new world monkeys (platyrrhini). *Anat Rec.* 294:2158–2178.
- Smith TD, Laitman JT, Bhatnagar KP. 2014. The shrinking anthropoid nose, the human vomeronasal organ, and the language of anatomical reduction. *Anat Rec.* 297:2196–2204.
- Specca, D. J., Lin, D. M., Sorensen, P. W., Isacoff, E. Y., Ngai, J., & Dittman, A. H. (1999). Functional identification of a goldfish odorant receptor. *Neuron*, 23(3), 487-498.
- Springer MS, Gatesy J. 2017. Inactivation of the olfactory marker protein (OMP) gene in river dolphins and other odontocete cetaceans. *Mol Phylogenet Evol.* 109:375–387.
- Springer MS, Gatesy J. 2018. Evolution of the MC5R gene in placental mammals with evidence for its inactivation in multiple lineages that lack sebaceous glands. *Mol Phylogenet Evol.* 120:364–374.
- Springer MS, Starrett J, Morin PA, Lanzetti A, Hayashi C, Gatesy J. 2016. Inactivation of C4orf26 in toothless placental mammals. *Mol Phylogenet Evol.* 95:34–45.
- Steiger, S. S., Kuryshev, V. Y., Stensmyr, M. C., Kempnaers, B., & Mueller, J. C. (2009). A comparison of reptilian and avian olfactory receptor gene repertoires: species-specific expansion of group  $\gamma$  genes in birds. *BMC Genomics*, 10(1), 446.
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G. 2002. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295:1493–1500.
- Suyama M, Torrents D, Bork P. 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.* 34:W609–W612.
- Suzuki H, Nishida H, Kondo H, Yoda R, Iwata T, Nakayama K, Enomoto T, Wu J, Moriya-Ito K, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Kishida T, Okabe M, Suzuki Y, Ito T, Hirota J, Nikaido M. 2018. A single pheromone receptor gene conserved across 400 million years of vertebrate evolution. *Mol Biol Evol.* 35:2928–2939.
- Suzuki, S., Kakuta, M., Ishida, T., Akiyama, Y., 2015. Faster sequence homology searches by clustering subsequences. *Bioinformatics* 31, 1183–1190.
- Switzer RC, Johnson JJ, Kirsch JAW. 1980. Phylogeny through brain traits: relation of lateral olfactory tract fibers to the accessory olfactory formation as a palimpsest of mammalian descent. *Brain Behav Evol.* 17:339–363.
- Tomiyasu, J., Kondoh, D., Sakamoto, H., Matsumoto, N., Sasaki, M., Kitamura, N., ... & Matsui, M. (2017). Morphological and histological features of the vomeronasal organ in the brown bear. *Journal of Anatomy*,

231(5), 749-757.

- Uhen, M. D. (2007). Evolution of marine mammals: back to the sea after 300 million years. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(6), 514-522.
- Webb, D. M., Cortés-Ortiz, L., & Zhang, J. (2004). Genetic evidence for the coexistence of pheromone perception and full trichromatic vision in howler monkeys. *Molecular Biology and Evolution*, 21(4), 697-704.
- Wible JR, Bhatnagar KP. 1996. Chiropteran vomeronasal complex and the interfamilial relationships of bats. *J Mammal Evol.* 3:285–314.
- Wyatt TD. (2012) Pheromones and animal behavior. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.
- Wysocki CJ, Lepri JL. 1991. Consequences of removing the vomeronasal organ. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 39:661–669.
- Wysocki CJ. 1979. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci Biobehav Rev.* 3:301–341.
- Yang Z, Nielsen R. 1998. Synonymous and nonsynonymous rate variation in nuclear genes of mammals. *J Mol Evol.* 46:409–418.
- Yang Z. 1998. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Mol Biol Evol.* 15:568–573.
- Yang Z. 2007. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol.* 24:1586–1591.
- Yang, L., Jiang, H., Wang, Y., Lei, Y., Chen, J., Sun, N., ... & He, S. (2019). Expansion of vomeronasal receptor genes (OlfC) in the evolution of fright reaction in Ostariophysan fishes. *Communications Biology*, 2(1), 1-12.
- Yoder AD, Burns MM, Zehr S, Delefosse T, Veron G, Goodman SM, Flynn JJ. 2003. Single origin of Malagasy Carnivora from an African ancestor. *Nature.* 421:734–737.
- Yoder, A.D., Larsen, P.A., 2014. The molecular evolutionary dynamics of the vomeronasal receptor (class 1) genes in primates: a gene family on the verge of a functional breakdown. *Front. Neuroanat.* 8, 153.
- Yohe LR, Abubakar R, Giordano C, Dumont E, Sears KE, Rossiter SJ, Dávalos LM. 2017. Trpc2 pseudogenization dynamics in bats reveal ancestral vomeronasal signaling, then pervasive loss. *Evolution* 71:923–935.
- Yohe LR, Hoffmann S, Curtis A. 2018. Vomeronasal and Olfactory Structures in Bats Revealed by DiceCT Clarify Genetic Evidence of Function. *Front Neuroanat.* 12: e32.
- Yohe, L. R., Davies, K. T., Rossiter, S. J., & Dávalos, L. M. (2019). Expressed vomeronasal type-1 receptors (V1rs) in bats uncover conserved sequences underlying social chemical signaling. *Genome Biology and Evolution*, 11(10), 2741-2749.
- Yokoyama, S., and Radlwimmer, BF. (2001). The molecular genetics and evolution of red and green color vision in vertebrates. *Genetics Society of America.* 158: 1697-1710.
- Young JM, Massa HF, Hsu L, Trask BJ. 2010. Extreme variability among mammalian V1R gene families.

*Genome Res.* 20:10–18.

- Yu L, Jin W, Wang JX, Zhang X, Chen MM, Zhu ZH, Lee H, Lee M, Zhang YP. 2010. Characterization of TRPC2, an essential genetic component of VNS chemoreception, provides insights into the evolution of pheromonal olfaction in secondary-adapted marine mammals. *Mol Biol Evol.* 27:1467–1477.
- Zapilko, V., & Korsching, S. I. (2016). Tetrapod V1R-like ora genes in an early-diverging ray-finned fish species: the canonical six ora gene repertoire of teleost fish resulted from gene loss in a larger ancestral repertoire. *BMC Genomics*, 17(1), 83.
- Zhang J, Webb DM. 2003. Evolutionary deterioration of the vomeronasal pheromone transduction pathway in catarrhine primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:8337–8341.
- Zhao H, Xu D, Zhang S, Zhang J. 2011. Widespread losses of vomeronasal signal transduction in bats. *Mol Biol Evol.* 28:7–12.
- Zufall, F., Ukhanov, K., Lucas, P., & Leinders-Zufall, T. (2005). Neurobiology of TRPC2: from gene to behavior. *Pflügers Archiv*, 451(1), 61-71.
- Zuri, I., Kaffe, I., Dayan, D., & Terkel, J. (1999). Incisor adaptation to fossorial life in the blind mole-rat *Spalax ehrenbergi*. *Journal of Mammalogy*, 80(3), 734-741.
- 科研費.com (2017) 仮説駆動型とデータ駆動型 <https://xn--w8yz0bc56a.com/hypothesis-driven/>
- 市川 眞澄. (2019) フェロモン. 脳科学辞典 <https://bsd.neuroinf.jp/wiki/フェロモン>

## 謝辞

本研究の当たり多大なるご支援とご指導を頂きました山村雅幸教授と二階堂雅人准教授に感謝いたします。博士課程3年生の後期から研究室を変えるという思い切った決断はお二方の理解がなければ実現しませんでした。このような決断を理解していただいた両親にも感謝いたします。本研究の遺伝子解析手法はマサチューセッツ工科大学 Dr. Greg P. Fournier に技術指導いただきました。感謝いたします。また、大学院生活の約10年間で誰よりも長い時間を一緒に過ごした山村研究室の在学生・卒業生の皆様に感謝いたします。