

論文内容の要旨

論文題目：Evolution of V2R-type Odorant Receptor Gene Family in Fishes (魚類 V2R 型匂い受容体遺伝子ファミリーの進化)

氏名 橋口 康之

脊椎動物の「嗅覚」は、鼻腔内の嗅上皮に存在する嗅細胞が細胞ごとに異なる物質を受容し、中枢へ伝達することによって起こる感覚である。個々の嗅細胞は異なる種類の化学物質受容体を 1 種類ずつ発現しており、そのような受容体が多数存在することによって、さまざまなにおいを区別することができる。実際、嗅覚受容体をコードする遺伝子は脊椎動物で最大の遺伝子ファミリーを構成しており、哺乳類では 1 種あたり数百～1,000 種類以上の嗅覚受容体遺伝子を持つことが知られている。

魚類では、嗅覚は視覚と並ぶ重要な感覚であり、同種個体の認識による生殖隔離に関与するおもな要因の一つでもあると推測される。また、水中生活をする魚類では、アミノ酸や核酸などの水溶性の物質を匂いとして認識しており、揮発性の物質を認識している哺乳類などの陸生の脊椎動物とは異なった形で匂いに対する適応をしていると考えられる。したがって、魚類の嗅覚受容体遺伝子ファミリーの実体を明らかにし、その進化過程を探ることは、生物の環境に対する適応のしくみについての重要な情報を提供するものと考えられる。しかし、魚類の匂い受容体遺伝子ファミリーの進化についての研究は少なく、どのくらいの規模の遺伝子ファミリーを形成しているのか、また系統的に離れた魚類種間でどの程度異なっているのか、といったことはほとんど知られていない。

本研究では、魚類の嗅覚受容体ファミリーの一つである V2R 型受容体遺伝子ファミリーに着目した。V2R 型受容体は、哺乳類ではペプチドフェロモンの受容体であることが示唆されており、同種個体の認識などに関わっている可能性が高い。本研究は、魚類の嗅覚受容体ファミリーの一つである V2R 型受容体遺伝子ファミリーに着目し、その実体を明らかにした上で、魚類 V2R 型匂い受容体遺伝子ファミリーの進化過程を

推定することを目的としている。

(1) ゼブラフィッシュ V2R 遺伝子ファミリーの実体と分子進化

魚類 V2R 遺伝子は、数十の遺伝子からなる多重遺伝子ファミリーを構成すると考えられている。しかし、ある 1 種の魚類が持つすべての V2R 遺伝子を特定した研究はなく、その全体像は必ずしも明らかではない。そこで、まず魚類 V2R 受容体遺伝子ファミリーの実体を明らかにするため、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* のゲノム配列データを対象に、既知の魚類、哺乳類 V2R 遺伝子をもとに TBLASTN 検索を行った。それにより、88 個の異なる V2R 遺伝子/偽遺伝子を特定した。遺伝子間の系統解析から、ゼブラフィッシュの V2R 遺伝子ファミリーは 12 のサブファミリーに分けられた。そのうち 11 は、魚類と四足動物の分岐以後に生じたものであった。これらのサブファミリーのうち 2 つは非常に多くの遺伝子/偽遺伝子からなり、それぞれ 17, 18 番染色体上で遺伝子クラスターを形成していた (図 1)。

遺伝子クラスター内では、類似した配列はお互いに近接しており、同じ転写方向にコードされていた。その他のサブファミリーはいずれも 1-4 の遺伝子から構成されており、その多くは 17, 18 番染色体の遺伝子クラスターにコードされていたが、まったく別の染色体上に存在するものも見られた。また例外的なものとして、魚類 (条鰭類) と四足動物の分岐以前に生じたと考えられるものも 1 遺伝子だけ見つかった。これらの結果から、ゼブラフィッシュの V2R 遺伝子ファミリーは、複数のサブファミリーから構成されており、そのうち 2 つがそれぞれ縦列重複によって大幅にコピー数を増加させていることが明らかになった。

(2) 魚類 V2R 受容体遺伝子ファミリーの種間比較

魚類 V2R 遺伝子ファミリーの進化過程について調べるため、ゼブラフィッシュと近縁なコイ科のヤリタナゴ *Tanakia lanceolata* の V2R 受容体遺伝子の部分配列をクローニングし、比較解析を行った。また系統的に離れたトラフグ *Takifugu rubripes*, ミドリフグ *Tetraodon nigroviridis*, およびメダカ *Oryzias latipes* の V2R 配列をそれぞれの概要ゲノム配列データの検索から特定し、比較に加えた。これらの V2R 遺伝子を用いた系統解析から、魚類 V2R 遺伝子ファミリーにはフグ、メダカを含む系統とゼブラフィッシュ、ヤリタナゴを含む系統が分岐する以前に分かれたグループが 10 前後存在すること、そのうち 2 つはゼブラフィッシュ、ヤリタナゴで共通に多様化していることなどがわかった (図 2)。一方、ゼブラフィッシュではグループ V (図 2, 遺伝子数: 34), ヤリタナゴではグループ I (遺伝子数: 33) がもっとも多くの遺伝子を含むなどの

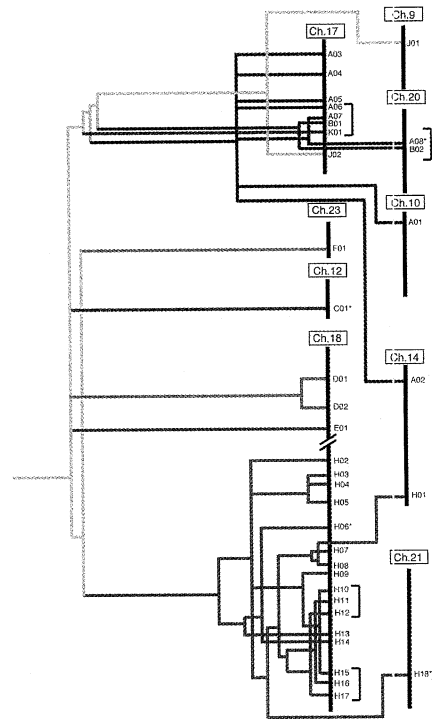


図 1. ゼブラフィッシュ V2R の系統関係と、染色体上の位置との関係。

違いも見られた。遺伝子の位置関係については、系統的に近いメダカとミドリフグではかなり保存されているように見える (図 3)。また、ゼブラフィッシュではゲノム内の複数の領域に V2R 遺伝子が分散していたのに対し、メダカ、ミドリフグでは 1 つの遺伝子クラスターにすべての V2R 遺伝子が含まれていた。以上より、魚類 V2R 遺伝子ファミリーは共通な単一の遺伝子クラスターに由来し、ゼブラフィッシュ、ヤリタナゴを含む系統では、染色体レベルでの遺伝子配置の大規模な変動が起こったと考えられた。



図 2. 魚類 V2R-type 匂い受容体遺伝子の Bayes 法による系統樹 (50% majority rule consensus tree). 青:トラフグ, 緑:メダカ, オレンジ:ゼブラフィッシュ, 赤:ヤリタナゴ. 青い矢印は魚類 4 種の共通祖先の位置を示す。

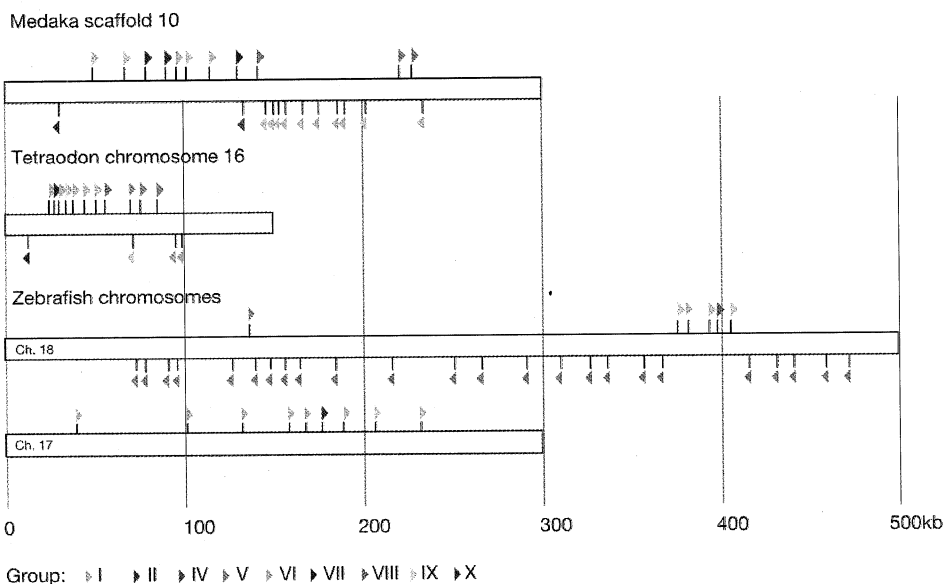


図 3. メダカ, ミドリフグ, およびゼブラフィッシュの V2R 遺伝子クラスターの物理地図. 矢印の色はそれぞれ V2R のグループ (図 2) を示す. 矢印の向きは転写方向を示す。

(3) *Danio* 属近縁種間での比較による、種特異的な V2R 受容体遺伝子の探索

近縁な 2 種の生物の間で、特定の匂いに対する感受性に違いが見られる場合、それは 2 種の間での生態的な違い（摂餌、繁殖など）を反映していると推測される。このような「匂いに対する感受性」の種間での違いは、どちらか一方の種のみが存在する、またはどちらかの種のみで失われているような匂い受容体に起因する可能性がある。そのような匂い受容体の遺伝子は、種分岐以後の遺伝子重複、偽遺伝子化、またはパラログ間での gene conversion によって生じる。分岐してあまり時間の経っていない種間で比較を行なうことによって、このような「種特異的」遺伝子を見つけることができると考えられる。そこで、魚類 V2R 遺伝子ファミリーにおいてそのような V2R 遺伝子を特定し、またそれらが受けている自然選択について調べるため、ゼブラフィッシュの近縁種の 1 つである *Danio albolineatus* という種を対象に、V2R 遺伝子部分配列を決定し、ゼブラフィッシュとの間での比較を行なった。

D. albolineatus の鼻の細胞由来の cDNA ライブラリに対して、ゼブラフィッシュのサブファミリー H（ゼブラフィッシュでもっとも多様性の高いサブファミリーで、37 の遺伝子/偽遺伝子からなる）から設計したプライマーを用いた PCR を行ない、約 400 クローンの配列を決定した結果、15 種類の V2R 遺伝子部分配列が得られた。また、これらのうち少なくとも 7 遺伝子に、複数のスプライシングバリエーションが存在していた。分子系統樹を作成したところ、11 のオーソログ遺伝子の組を特定することができた (図 4)。11 組のうち 5 組では、どちらかの種、または両種で重複か偽遺伝子化が起こっていた。特に一部のクレードでは、複数回の重複/偽遺伝子化が高い頻度で両種に起こっており、「多様化」しているように見える (図 4)。興味深いことに、スプライシングバリエーションが確認された 7 遺伝子のうち、4 つはこの「多様化している」クレード内の遺伝子であった (図 4: 灰色の矢印で示す)。

さらに、ゼブラフィッシュおよび *Danio albolineatus* 両種で、このクレードの遺伝子とその姉妹クレードの遺伝子との間での gene conversion が検出された (図 4: 赤または青の矢印)。また最尤法を用いた検定によって、*Danio* 属 2 種で「多様化している」クレードでは、機能的制約が低下していることが示唆された。多様化が起こっている V2R 遺伝子は、2 種のそれぞれで異なる環境への適応の途上にあるのかもしれない。

本研究により、魚類 V2R 遺伝子ファミリーの実体およびその進化のパターンについて多くの知見が得られた。今後は、個々の V2R 受容体が認識するリガンドの種類と受容体遺伝子の多様性との関係や、複数の異なる受容体遺伝子間の相互作用に対してはたらく自然選択について、研究を進める予定である。

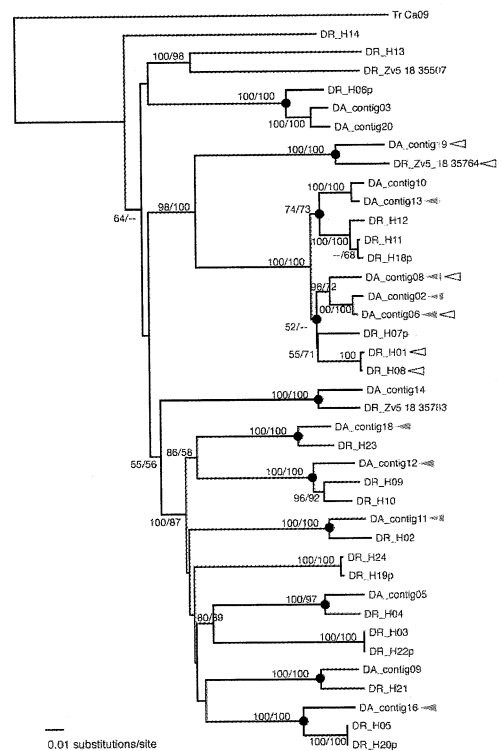


図 4. *Danio* 属 2 種の subfamily H V2R 遺伝子の系統関係 (NJ tree). DR: zebrafish (*Danio rerio*). DA: *D. albolineatus*. 黒い円は 2 種の種分化に伴う分岐の位置を示す。