

ナメクジウオの環境因子の受容体に関する研究

2009 年 3 月 自然環境学専攻 海洋生命環境学分野 岩田尚之
指導教員 教授 窪川かおる

キーワード：脊索動物、嗅覚受容体、嗅覚、進化

【背景と目的】

生物は、外界の環境を知るために様々な感覚受容の様式を用いている。その一つに、空気中や水中の化学物質を感知する嗅覚がある。嗅覚は生物が採餌、繁殖、コミュニケーション、社会性行動などを行うために重要な役割を担う。脊椎動物の嗅覚は、匂い分子がまず嗅細胞にある受容体に結合し、その刺激が神経系を経て脳で認識されるという経路をとる。嗅覚受容体（Olfactory receptor、OR）は脊椎動物の中でも動物によって種類数やその分子構造に大きな違いがある。この違いは、無脊椎動物から脊椎動物への進化で、また脊椎動物が様々な環境に適応して生存していく中で起きてきたと考えられる。本研究で用いるナメクジウオは、脊椎動物に近縁な脊索動物で、頭索動物亜門に分類される無脊椎動物である。この系統分類上の位置は、無脊椎動物から脊椎動物への進化を考察する上で重要である。ナメクジウオのゲノム情報からは嗅覚受容体遺伝子が見つかり、また、繁殖行動で嗅覚を用いている可能性も示唆されている。

本研究ではナメクジウオの OR 遺伝子の存在とその発現部位を明らかにし、環境因子の受容にとって重要な嗅覚の進化を考えることを目的とする。

【材料と方法】

東京医科歯科大学 新村芳人博士は、フロリダナメクジウオ（*Branchiostoma floridae*）を含むさまざまな動物の OR をおもにゲノム情報を使って取得し、系統関係を解析している。フロリダナメクジウオの OR 遺伝子（BfOR 遺伝子）については、既知の OR 遺伝子との相溶性から OR 遺伝子の候補となるゲノム DNA を 35 配列得ている。配列の相溶性からこれらは 10 グループに分けられ、OR1~10 と名づけられている。本研究ではこれらの 35 個の配列情報を使って日本産ナメクジウオ（*B. belcheri*）の OR 遺伝子（BbOR 遺伝子）の研究を始めた。

まず、10 グループ 35 配列について、発現遺伝子の指標となる cDNA のデータベースへの登録がされているかどうかを調べ、発現している可能性のある遺伝子を選択した。次に脊椎動物の OR 遺伝子の中で機能をもつ可能性が報告されているものとの相溶性を比較し、機能の可能性のある遺伝子に絞り込んだ。これらの BfOR 候補遺伝子の配列をもとに PCR プライマーを設計し、*B. belcheri* の cDNA を鋳型として、PCR クローニングを行った。クローニングで得た遺伝子断片の配列の相溶性を BfOR 遺伝子と比較して確認し、相溶性のある配列のうち、BbOR5、BbOR5-2、BbOR6、BbOR8、BbOR10 の 5 遺伝子を選んで全長を決定した。最後に再び、全長を使って脊椎動物の OR 遺伝子との相溶性を確認した。

次に、ナメクジウオの体の 4 部位（頭部、胴体背側、胴体腹側、尾部）と組織（ヒゲ、表皮、エラ、筋肉）の RNA を抽出し、RT-PCR（逆転写 PCR）で増幅を調べた。さらに、*in situ* hybridization 法を用いて幼生と成体で遺伝子の発現解析を行った。

【結果と考察】

OR2 から OR8、OR10 の各グループから、クローニングで得られた遺伝子断片数は、4、4、3、4、1、1、1、1 であり、8 グループで 20 個の OR 候補遺伝子断片を得ることができた。これらのうちから全長を決定した BbOR5、BbOR5-2、BbOR6、BbOR8、BbOR10 の 5 遺伝子について、*B.floridiae* と *B.belcheri* との間で相同性を比較した。最も高い相同性は BbOR6 遺伝子の 95.8% で、最も低いものは BbOR5-2 遺伝子の 63.7% であった。このように遺伝子によって異なる理由として、相同性が高い OR は 2 種間で共通する化学物質をリガンドとしている可能性があり、相同性が低い遺伝子は 2 種間で OR の種類は対応してはいるが、OR に結合する化学物質が異なる可能性が考えられた。

脊椎動物の OR との系統関係を、系統樹を作成して比較すると、ナメクジウオと脊椎動物の OR は別のクレードを形成した。ナメクジウオの全ゲノムとヒトの全ゲノムを比較解析したところ、ナメクジウオは脊椎動物との共通祖先から進化し、互いによく似た遺伝子を持っていることが最近わかっている。本研究で解析した OR の系統関係も、ナメクジウオと脊椎動物とが共通祖先から分岐した可能性が示唆された。

ナメクジウオ成体の様々な組織で RT-PCR 法を使って OR 遺伝子の増幅の有無を調べた結果は次のようであった。まず、BbOR5-2、BbOR8、BbOR10 の 3 遺伝子は、いずれもヒゲに遺伝子増幅がみられた。また、各遺伝子はそれぞれ、頭部、筋肉と胴体腹側、表皮に増幅がみられた。BbOR5 と BbOR6 の 2 つの OR 遺伝子は全ての組織で増幅がみられた。このように実験に用いたナメクジウオの OR 遺伝子は、必ずヒゲに発現していた。一方、遺伝子発現が体の部位によって異なることは、部位によって OR 遺伝子の機能が異なっている可能性が考えられた。

幼生を用いた *in situ* hybridization の結果は、実験した OR 遺伝子すべてで、頭部に発現を示すシグナルが観察された。また、BbOR5、BbOR8、BbOR10 の 3 遺伝子は胴体の表皮に、BbOR5-2 遺伝子は特に口周辺に発現していた。また、成体を用いた実験は BbOR5-2 遺伝子のみの結果であるが、ヒゲと頭部の表皮で発現が認められた。成体でのヒゲや頭部は、普段底砂に潜って生息しているナメクジウオが、海水という外部環境にさらしている唯一の部分である。その部分での発現は、BbOR5-2 遺伝子が OR として機能している可能性を示唆するものである。

【まとめ】

BbOR5-2 遺伝子は先端で外界と接するヒゲと頭部の表皮に発現が限定されていることから、これらの遺伝子が OR としての機能をもつ可能性が高い。脊椎動物が鼻という嗅覚に特化した器官を持つことと、鼻をもたないナメクジウオの OR の発現部位が組織特異的であることの間には何らかの関係があると推測される。そして、脊椎動物の鼻の起源をナメクジウオの OR が存在する部分、例えばヒゲと口周辺の表皮に求められる可能性もある。しかし、本研究は端緒であり、これらの関係の解明にはさらなる研究が必要である。また、BbOR6 遺伝子のように体全体に発現が見られる OR は、生体内の物質を受容している可能性も考えられ、嗅覚の進化という観点からも重要な結果であると考えている。

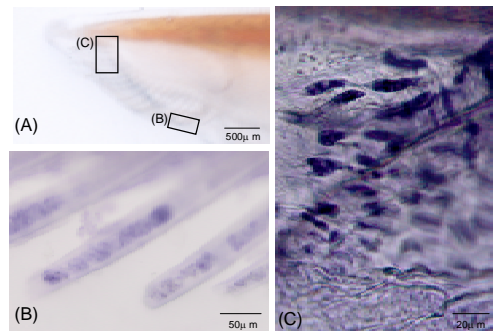


図1. *in situ* hybridization法を用いたBbOR5-2の成体での発現

(A): ナメクジウオ頭部写真で(B),(C)の範囲を示す。
(B),(C)は実験した個体で発現が見られた部分の拡大図。
(B): ヒゲ先端部、(C): 頭部表皮。

Study on the receptors for environmental factors in amphioxus

Mar. 2009, Department of Natural Environment Studies, 076706 IWATA Hisayuki

Supervisor; Professor, KUBOKAWA Kaoru

Keywords: Amphioxus, Olfactory receptor, Evolution, Diversity

Introduction

Living organisms have various sense organs to detect environmental information via chemicals present outside the body. The olfactory system detects molecules in air and water and plays important roles in activities necessary for continuance of life, such as finding food, mating, and social behavior. In the vertebrate olfactory system, the cue generated by detection of an odorant molecule is conveyed to the brain as an electrical signal. The odorant receptors present in the olfactory cells were first detected by molecular biological techniques. Olfactory receptors (OR) exist in different types and show various conformations in different species. Genes controlling these receptors are considered to have diverged during evolution from invertebrates to vertebrates and through adaptation from life in water to life in air.

Amphioxus is phylogenetically close to vertebrates and is important in the study of evolution from invertebrates to vertebrates. OR genes have been identified in the amphioxus genome. Furthermore, the spawning behavior of amphioxus is suspected to involve a pheromone that is detected by the olfactory system.

In this study, I focused on the ORs of amphioxus in order to study their evolutionary variability in relation to environmental change. I surveyed the genes encoding ORs in amphioxus *Branchiostoma belcheri*, and detected gene expression in the larva and the head of the adult.

Materials and methods

Candidate genes of ORs in amphioxus were surveyed in the *Branchiostoma floridae* genome database using unique sequences of ORs. For this purpose, the results of a bioinformatic strategy for surveying olfactory genes, established by Dr. Niimura of Tokyo Medical and Dental University, were used. The 35 candidate olfactory genes were divided into ten groups, designated BfOR (OR of *B. floridae*) 1–10.

I designed an experiment to clone cDNA from the Japanese amphioxus species *B. belcheri* using sequence information on 35 candidate *B. floridae* genes. First, the 35 candidate genes were confirmed to exist in a similar or identical form in the cDNA database, and were then compared with vertebrate ORs. Second, primers based on the candidate genes were designed and PCR cloning of the cDNAs of *B. belcheri* was attempted using the primers. The 39 gene fragments that were obtained were examined for homology with BfOR genes, and 20 fragments, representing the group OR2–10, showed homology. Third, full-length sequences of the genes BbOR5, 5-2, 6, 8, and 10 were determined and then aligned with vertebrate ORs to analyze the phylogenic tree.

Specimens of Japanese amphioxus were collected from Enshu Nada Sea and kept in the laboratory.

Results and discussion

Twenty genes were obtained as candidate olfactory genes in *B. belcheri*. The numbers of genes in the groups OR2, OR3, OR5, OR6, OR7, OR8, and OR10 were 4, 4, 3, 4, 1, 1, and 1, respectively. The full-length sequences of genes BbOR5, 5-2, 6, 8, and 10 were examined for identity between *B. belcheri* and *B. floridae*. The greatest homology (95.8%) was observed between BbOR6 gene and BfOR6 gene, and the lowest (63.7%) between BbOR5-2 gene and BfOR5 gene. These homologies suggest that OR6 may correspond to similar molecules in the two species. OR5 differed in structure between the two species and may correspond to different ligands.

In a phylogenetic analysis of OR genes among amphioxus and vertebrates, the amphioxus OR genes formed one clade. Analysis of the amphioxus draft genome confirmed that it is an ancient animal belonging to the phylum Chordata, a group that includes vertebrates. It is also possible that the amphioxus olfactory receptor genes are ancestral genes in Chordata.

Expression of the BbOR5, 5-2, 6, 8, and 10 genes was examined in various tissues of amphioxus by RT-PCR. The tissues where expression was found varied among genes. All genes were expressed in buccal cilia. BbOR5 gene and BbOR6 gene were expressed in all tissues that were examined. Amphioxus has no olfactory organs such as the vertebrate nose. The tissue-specific expression of the olfactory receptors of amphioxus suggests the development of an olfactory system and the origin of olfactory organs in the evolution of vertebrates.

The BbOR genes used in RT-PCR were also expressed in parts of the skin of the head and in some body parts of the larva, as detected by whole-mount *in situ* hybridization. *In situ* hybridization using the adult head samples showed BbOR5-2 gene's expression in the buccal cilia and the skin near the mouth. Amphioxus lives at the sea bottom, but often only the head protrudes from the bottom. Expression of this gene on the buccal cilia and the skin of the head may provide useful information to the olfactory system.

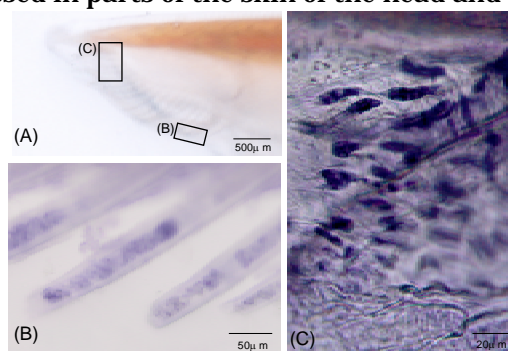


図1. *in situ* hybridization法を用いたBbOR5-2の成体での発現

(A):ナメクジウオ頭部写真で(B),(C)の範囲を示す。
(B),(C)は実験した個体で発現が見られた部分の拡大図。
(B):ヒゲ先端部、(C):頭部表皮。

Conclusion

Expression of BbOR5-2 gene was demonstrated on restricted parts of the body, such as the buccal cilia and head, which are close to the exterior environment. It is suggested that this gene encodes an olfactory receptor. No relationship between the body parts that expressed the olfactory receptor and the vertebrate nose was identified; however, in amphioxus, the expression of the gene on a limited number of body parts might provide a sense of the outside environment through the use of olfactory receptors. Therefore, in amphioxus, the buccal cilia and the skin of the head may carry a sense organ that is in some way connected to the origin of the vertebrate nose. The origin of olfactory system of vertebrates may be found in amphioxus.