

キツネザル科における食性適応に伴う
苦味受容体 TAS2R16 の機能進化

Functional evolution of the bitter taste receptor TAS2R16
associated with dietary adaptation in the family Lemuridae.

京都大学霊長類研究所

Primate Research Institute, Kyoto University

糸井川 壮大

Akihiro Itoigawa

目次

目次.....	i
学位論文要旨.....	iv
謝辞.....	vi
略語一覧表.....	vii
1 章 序論.....	1
1.1. 哺乳類の味覚の分子機構.....	1
1.1.1. 基本五味と味覚受容細胞.....	1
1.1.2. 味覚受容体タンパク質とシグナル情報伝達.....	2
1.2. 哺乳類における味覚受容体の分子進化.....	4
1.3. キツネザル類の進化と採食生態.....	7
1.4. 研究全体の目的.....	9
2 章 果実中心食性キツネザルにおける TAS2R16 の機能.....	11
2.1. 研究の概要.....	11
2.2. 研究の背景.....	12
2.2.1. 霊長類における苦味受容体 TAS2R16 のリガンド応答性.....	12
2.2.2. キツネザル科の採食生態.....	12
2.2.3. 研究の目的.....	14
2.3. 研究の方法.....	14
2.3.1. 対象種のゲノム DNA 抽出と <i>TAS2R16</i> 配列の決定.....	14
2.3.2. <i>TAS2R16</i> 発現ベクターの構築.....	15
2.3.3. 培養細胞を用いた <i>TAS2R16</i> のカルシウムアッセイ.....	17
2.3.4. IP_1 アッセイ.....	18
2.3.5. リンゴ片を用いた食物選択アッセイ.....	18
2.3.6. <i>TAS2R16</i> 遺伝子の分子系統解析.....	19

2.3.7.	ホモロジーモデリングとリガンドドッキングシミュレーション	20
2.4.	研究の結果.....	20
2.4.1.	キツネザル TAS2R16 の β グルコシドに対する応答性	20
2.4.2.	摂食行動と TAS2R16 のリガンド応答性の相関	22
2.4.3.	arbutin 応答に関わるアミノ酸残基の同定	23
2.4.4.	282 番のアミノ酸置換の進化史	24
2.4.5.	分子モデリングによる arbutin の結合様式の解析	25
2.5.	考察	25
2.5.1.	霊長類における TAS2R16 の β グルコシド応答性の保存的進化	25
2.5.2.	果実中心食性のキツネザルにおける TAS2R16 の機能	26
2.5.3.	arbutin による TAS2R16 のインバースアゴニスト応答とその作用機序	27
3 章	竹食性キツネザルにおける TAS2R16 の機能低下	30
3.1.	研究の概要.....	30
3.2.	研究の背景.....	31
3.2.1.	ジェントルキツネザルの採食生態	31
3.2.2.	植物中の青酸化合物と苦味	32
3.2.3.	研究の目的	33
3.3.	研究の方法.....	33
3.3.1.	ジェントルキツネザル TAS2R16 の塩基配列決定	33
3.3.2.	TAS2R16 発現ベクターの構築	34
3.3.3.	培養細胞を用いた TAS2R16 のカルシウムアッセイ	35
3.3.4.	分子系統解析と祖先配列推定	35
3.4.	研究の結果.....	36
3.4.1.	ジェントルキツネザル TAS2R16 の β グルコシド感受性	36
3.4.2.	ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 の β グルコシド感受性	36
3.4.3.	β グルコシド低感受性の原因アミノ酸置換の同定	37

3.5. 考察	39
3.5.1. ジェントルキツネザルにおける TAS2R16 の機能低下の意義	39
3.5.2. ジェントルキツネザルにおける TAS2R16 の機能進化	40
3.5.3. 種固有のアミノ酸置換による β グルコシド感受性低下の作用機序	41
3.5.4. ジェントルキツネザルのタケ類への食性特殊化時期の検討	42
3.5.5. 青酸含有植物への適応に対する苦味感覚適応以外の必要要件	43
4 章 総合考察	45
4.1. 研究全体の要約と意義.....	45
4.2. 苦味受容体のリガンド応答性の保存的進化.....	46
4.3. キツネザル科から見る苦味受容体の機能進化と食性.....	48
4.4. 総括と今後の展望.....	53
引用文献.....	55
図表.....	67

学位論文要旨

哺乳類は、口腔内に発現する苦味受容体 TAS2R を介して食物中の潜在的な毒物を苦味として検知することで、適切な食物選択を行っている。*TAS2R* 遺伝子のレパートリーは種によって様々で、進化の過程で柔軟にレパートリーを変化させることで、生息環境に適応し、種固有の苦味感覚を形作っていると考えられている。これと同時に、個々の TAS2R のリガンド応答性の進化も食性適応には重要と考えられるが、こちらは遺伝子レパートリー研究と比べて知見がまだ多くない。そこで、本研究では、狭鼻猿類で青酸配糖体などの β グルコシド化合物を受容することが知られる苦味受容体 TAS2R16 について、果実中心食性（果実食性または果実・葉食性）の種と竹食性の種を含むキツネザル科を対象として「霊長類におけるリガンド応答性の進化傾向」と「リガンド応答性と食性の関連」の2点を受容体機能解析や行動アッセイによって検討した。

はじめに、果実中心食性のキツネザル3種（ワオキツネザル *Lemur catta*、クロキツネザル *Eulemur macaco*、クロシロエリマキキツネザル *Varecia variegata*）の TAS2R16 について salicin や arbutin などの β グルコシドに対する応答を細胞アッセイで測定した。その結果、*L. catta* は狭鼻猿類と同様にすべての β グルコシドで活性化される一方で、その他2種は salicin で活性化されるものの、arbutin で不活性化されることを発見した。*E. macaco* の行動アッセイで TAS2R16 の機能が摂食行動に大きく寄与していることを確認した。変異体解析によって、この応答の種間差は曲鼻猿類固有の282番アミノ酸の置換（L282S）が原因であり、*L. catta* は復帰突然変異（S282L）によって狭鼻猿類と同じ応答性を実現していることを明らかにした。これらの結果から、TAS2R16 は霊長類全体で β グルコシドに応答するという保存的傾向がある一方で、同一科内でも個々のリガンドに対する反応パターンは多様であることが示された。

次に、青酸配糖体を含むタケ類（タケ亜科 *Bambusoideae* に属する植物）を主食とするジェントルキツネザル3種（ヒロバナジェントルキツネザル *Prolemur simus*、キンイロジェントルキツネザル *Hapalemur aureus*、ハイイロジェントルキツネザル *H. griseus*）

の TAS2R16 について、 β グルコシドに対する応答を細胞アッセイで測定した。その結果、ジェントルキツネザル TAS2R16 が総じて β グルコシドに対して低い感受性を持つことを明らかにした。また、最尤推定したジェントルキツネザルの最近共通祖先 (last common ancestor: LCA) の TAS2R16 でも同様に β グルコシドに対する応答を測定し、現生ジェントルキツネザルと *L. catta* の中間程度の感受性を持っていたことを明らかにした。さらに、変異体解析によって、*P. simus* と *H. griseus* の低感受性がそれぞれの種固有のアミノ酸置換 (*P. simus*: S144L, *H. griseus*: L251S) によって実現されていることを明らかにした。これらの結果から、ジェントルキツネザルが竹食への適応として TAS2R16 の β グルコシド感受性が低下し、タケ類に苦味を感じにくくなっていることが示唆された。そして、ジェントルキツネザルにおける β グルコシド感受性の低下は、LCA の時点で始まっており、*Prolemur* 属と *Hapalemur* 属が分岐した後に並行的にさらに進行したものと考えられた。

本研究で示した霊長類 TAS2R16 における機能の保存的進化とキツネザルで見られた食性に応じた系統固有の機能変化は、食性適応の背景にある味覚適応の分子メカニズムの解明の重要な手がかりとなると考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、京都大学霊長類研究所ゲノム細胞研究部門ゲノム進化分野の今井啓雄教授には、指導教員として研究全体の指導をいただきました。早川卓志助教（北海道大学）、橋戸南美博士（中部大学創発学術院）、Fabrizio Fierro 博士、Masha Y. Niv 准教授（The Hebrew University）、Morgan E. Chaney 氏、Anthony J. Tosi 准教授（Kent State University）、M. Elise Lauterbur 博士（The University of Arizona）には、研究計画、実験、解析、論文執筆などを中心に、本研究の遂行に直接関わっていただきました。また、京都大学霊長類研究所ゲノム細胞研究部門の皆様には、セミナーでの議論や実験手技をはじめとして様々なご指導・ご助言をいただき、私の研究生活を支えていただきました。以上の皆様にまず、深く御礼申し上げます。

本研究の第2章及び第3章で実施した培養細胞を用いた細胞アッセイでは、東京大学の阿部啓子教授（現・同大特任教授）、三坂巧准教授、石丸喜朗特任助教（現・明治大学准教授）より培養細胞やベクターを提供していただきました。第2章及び第3章で実施した分子系統解析では、Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center が公開している *Propithecus coquereli* の未出版全ゲノムアセンブリデータを使用させていただきました。第2章で使用した曲鼻猿類の組織及び糞試料は、公益財団法人日本モンキーセンターとの連携研究（#2017-014、#2017-018）として同園よりご提供いただきました。また、メガネザルの糞試料は恩賜上野動物園との共同研究（#29-100）として同園の森久保秀氏、木岡真一氏に採材していただきました。キツネザルの行動アッセイは、日本モンキーセンターとの連携研究（#2017-014）として実施し、同園の田中ちぐさ氏、小泉有希氏、中久木愛氏はじめ多くの方にご助力いただきました。2章のホモロジーモデリングは、荒木望嗣特定准教授、岩田浩明特定助教（京都大学）、奥野恭史教授、馬彪博士、笹倉陽子氏（理化学研究所）に多大なるご協力をいただき実施することができました。そして、IP₁ アッセイや GPCR の構成的活性に関して、山下高廣助教（京都大学）にご助言いただきました。以上の皆様に深く御礼申し上げます。

略語一覧表

BH 補正	Benjamini-Hocheberg correction
blast	basic local alignment search tool
blastn	blast program searching nucleotide databases using nucleotide queries
BW 番号	Ballesteros-Weinstein numbers
DNA	deoxyribonucleic acid, デオキシリボ核酸
ECL	extracellular loop domain, 細胞外ループ領域
GPCR	G protein-coupled receptor, G タンパク質共役型受容体
GPT	gut passage time, 消化管通過時間
HEK293T 細胞	human embryonic kidney 293 T cell, ヒト胎性腎細胞
ICL	intracellular loop domain, 細胞内ループ領域
IP ₁	Inositol monophosphate, イノシトール一リン酸
IP ₃	Inositol triphosphate, イノシトール三リン酸
LCA	last common ancestor, 最近共通祖先
PCR	polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応
TAS1R	taste receptor type 1, 1 型味覚受容体
TAS2R	taste receptor type 2, 2 型味覚受容体
tblastn	blast program searching translated nucleotide databases using protein queries
TM	transmembrane domain, 膜貫通領域

1章 序論

1.1. 哺乳類の味覚の分子機構

1.1.1. 基本五味と味覚受容細胞

動物は自身の生命を維持するために、採食を通じて栄養を体内に取り込んでいる。しかし、環境中に存在するものすべてが動物の食物として、栄養源としてふさわしいということはない。そのため、動物は適切な食物選択を行うために様々な感覚を発達させてきた。採食行動を起こすに当たり、動物は視覚、嗅覚、触覚、味覚などの様々な感覚を用いて食物評価を行う。これらの感覚の中でも、味覚は食物を口から直接体内に取り込む直前に働き、食物の良し悪しを判断する重要な感覚である。

哺乳類の味覚は、5つの基本味（甘味、旨味、苦味、酸味、塩味）で構成される[1,2]。それぞれの基本味は主に、糖（甘味）、アミノ酸やヌクレオチド（旨味）、アルカロイドなどの毒物（苦味）、クエン酸などの酸（酸味）、塩化ナトリウムなどの塩（塩味）によって引き起こされ、味細胞によって検出される。味細胞は、味蕾と呼ばれる構造を形成し、舌乳頭、軟口蓋、喉頭蓋、咽頭に分布する。中でも、舌乳頭には味蕾が集中的に分布している。味蕾を持つ舌乳頭は、舌前部の茸状乳頭、側部の葉状乳頭、後部の有郭乳頭に分類される。舌前部3分の2に渡って分布する糸状乳頭は、味蕾を持たない。それぞれの味蕾には、第VII、第IX、第X脳神経が一次感覚ニューロンとして接続しており、延髄の孤束核に投射して味覚情報を脳に伝達する[3]。

主に有郭乳頭に分布する味蕾の分析から、味蕾は形態学的に区別可能な4種類の細胞（I型～IV型細胞）で構成されることがわかっている。I型細胞は、まだ研究が十分に進んでいないが、グリア様の支持細胞と考えられており、IV型細胞は、I～III型細胞の前駆細胞である。各基本味の検出は、II型細胞が甘味、旨味、苦味を、III型細胞が酸味をそれぞれ担っている。III型細胞の中に、複数の味質（甘味、旨味、苦味、酸味）に反応する広応答性味細胞（broadly responsive taste cells）も存在する[4]。塩味の検出経路は、

イオンチャネル阻害剤であるアミロライドによって阻害されるかどうかで区別されるアミロライド感受性 (Amiloride-Sensitive; AS) 経路とアミロライド非感受性 (Amiloride-Insensitive; AI) 経路の 2 つが存在し、それぞれ異なる細胞種で検出されると考えられている。AI 経路を介する塩味は忌避性を示し、苦味感受性 II 型細胞と酸味感受性 III 型細胞で検出される[5,6]。一方、AS 経路を介する塩味は嗜好性を示し、舌前方の茸状乳頭にある「塩味細胞 (AS 経路介在塩味細胞)」で検出される[7-9]。この塩味細胞は、分子細胞的特性から現行の 4 種類の細胞分類には当てはまらない未分類の細胞種であると考えられている[10]。

1.1.2. 味覚受容体タンパク質とシグナル情報伝達

これらの味物質を受容する細胞には、甘味、旨味、苦味物質を受容する G タンパク質共役型受容体 (G protein coupled receptor; GPCR) もしくは、酸味、塩味物質を受容するイオンチャネルが発現している。哺乳類の甘味受容体と旨味受容体は *TAS1R* 遺伝子ファミリーによってコードされている[11,12]。*TAS1R* には、*TAS1R1*、*TAS1R2*、*TAS1R3* の 3 種類があり、タンパク質に翻訳されたのち、*TAS1R2*/*TAS1R3* のヘテロダイマーが甘味受容体、*TAS1R1*/*TAS1R3* のヘテロダイマーが旨味受容体として機能する[11,12]。*TAS1R* はハエトリグサ様ドメイン (Venus fly trap domain: VFTD) と呼ばれる大型の細胞外ドメインを持ち、この部位が甘味、旨味物質と結合する主要な部位である[13-15]。甘味受容体は主に糖を、旨味受容体は主にアミノ酸とヌクレオチドを受容して、栄養となる食物の選択に用いられる。

もう一つの GPCR 型味覚受容体である苦味受容体は、*TAS2R* 遺伝子ファミリーによってコードされており、主に食物中の毒物の検知に用いられる[16,17]。*TAS2R* は、ヒト (*Homo sapiens*) ではゲノム中に 26 個存在し、多様な構造を持つ苦味物質に対して多対多の受容関係を構築することで、比較的少数の受容体で膨大な数の苦味物質を検出している[18-21]。ヒトやマウス (*Mus musculus*) では、各 *TAS2R* と苦味物質の関係が網羅的に調べられており、受容体ごとに特性が異なることがわかっている[22,23]。例えばヒト

では、salicin のような β -glucopyranoside 構造をもつ分子は TAS2R16 に、phenylthiocarbamide (PTC) のような S-C=N 構造を持つ分子は TAS2R38 に高い特異性を持ち、単一の TAS2R で受容される。一方で、caffeine や quinine の様に 5 つ以上の TAS2R によって受容されるものもある。こうした TAS2R の性質の違いは、各 TAS2R の変異が個体に与える影響が異なることを意味する。前者のような受容分子と一対一の関係にある TAS2R に機能的な変異を持つ個体は、苦味感覚（苦味の感知閾値や強度）が野生型個体と異なる可能性が高い[24,25]。一方で、caffeine や quinine を受容する TAS2R 群のひとつに変異があっても残りの TAS2R が機能を補償するため、こうした変異は、caffeine や quinine に対する個体の苦味感覚に簡単には影響しないと考えられる。

II 型細胞の GPCR 型味覚受容体に呈味物質が結合すると、受容体と共役する三量体 G タンパク質 (G_{α} サブユニットと $G_{\beta\gamma}$ 複合体から成る複合体タンパク質) の G_{α} サブユニットが活性化し、 $G_{\beta\gamma}$ 複合体と解離する。解離した $G_{\beta\gamma}$ 複合体は、PLC β 2 を活性化し、PI(4,5)P $_2$ を DAG と IP $_3$ に加水分解する[26]。そして、産生された IP $_3$ は、小胞体表面の IP $_3$ R3 に結合し、小胞体から Ca $^{2+}$ を細胞質に放出させる[27]。この細胞内 Ca $^{2+}$ 濃度上昇によって、細胞膜の TRPM5 チャンネルから Na $^{+}$ が流入し、膜電位の脱分極が起きる[28,29]。この脱分極を契機に引き起こされた活動電位によって、電位依存性チャンネル CALHM1/CALHM3 とこれに近接するミトコンドリアで構成されるチャンネル型シナプス (Channel synapse) から ATP が放出され、情報を P2X2/P2X3 を発現する感覚ニューロンに伝達する[30–34]。また、近年の研究で、TRPM4 を介した TRPM5 と独立したシグナル経路の存在も示唆されている[35]。

GPCR 型受容体が 2000 年代初頭に同定された一方で、イオンチャンネル型の味覚受容体は、2010 年以降に明らかになったものが多い。塩味は、前述の通り 2 種類あるが、AS 経路では、アミロライド感受性の上皮性ナトリウムチャンネル ENaC が塩味受容体と考えられている。ENaC は、 α 、 β 、 γ の 3 つのサブユニットで構成され、そのうち α サブユニットである ENaC α の必要性はノックアウト動物の実験から確認されている[9,10]。しかし、3 つのサブユニットすべてを共発現する味細胞がマウスでは見当たらず

ないとする報告もあり、塩味受容に関わる ENaC の構造は 3 サブユニットから成る通常の ENaC ではない可能性も示唆されている[36]。一方で、AI 経路の塩味受容体は現在まで明らかになっていない。また、酸味受容体は、PKD2L1/PKD1L3 をはじめとして複数の候補分子が挙げられていたが、2019 年にプロトンチャネル OTOPI が酸味受容体として確定された[37–39]。

塩味細胞の細胞内シグナル伝達は、ENaC からの Na^+ 流入による細胞膜の脱分極から始まる。そして、脱分極を契機に発生した活動電位によって、CALHM1/CALHM3 とこれに近接するミトコンドリアで構成されるチャネル型シナプス (Channel synapse) から ATP が放出され、情報を P2X2/P2X3 を発現する感覚ニューロンに伝達する[10,30]。塩味のシグナル伝達は II 型細胞と異なり、 Ca^{2+} を介さない。

III 型細胞 (酸味細胞) では、OTOPI から H^+ 流入が起こると、細胞内の pH 変化によって $\text{K}_{\text{ir}2.1}$ チャネルからの K^+ 流出が阻害される[37,40]。この OTOPI 自身による H^+ の取り込みと $\text{K}_{\text{ir}2.1}$ チャネルからの K^+ 流出停止の協調によって、細胞膜の脱分極が引き起こされる[37]。そして、電位依存性カルシウムチャネル (VGCC) から流入した Ca^{2+} によって、 Ca^{2+} 依存性のシナプス小胞の開口分泌が起こり、神経伝達物質をシナプス間隙に放出し、情報を感覚ニューロンに伝達する。

1.2. 哺乳類における味覚受容体の分子進化

基本五味は、多くの哺乳類が共通して持つものと考えられているが、食性や採餌様式が特殊な動物では、一部の味覚を失っている例が見つまっている。例えば、ネコ科動物は、*TASIR2* 遺伝子の偽遺伝子による甘味受容体の欠損によって糖への嗜好性が行動レベルで失われている[41]。また、竹食のジャイアントパンダ (*Ailuropoda melanoleuca*) とレッサーパンダ (*Ailurus fulgens*) は、近縁な肉食性のクマ下目動物 (Arctoidea) と分岐した後に、それぞれ独自に旨味受容体のサブユニットである *TASIR1* が偽遺伝子化している[42,43]。これは、旨味によるアミノ酸やヌクレオチド由来の栄養価の評価が不要になったためだと考えられている。また、頭部に熱源感知器官を持ち、吸血に特化した

ナミチスイコウモリ (*Desmodus rotundus*) では、すべての *TAS1R* が偽遺伝子化しており、甘味・旨味の両方を感じなくなっているとされている[44,45]。さらに、水棲や半水棲の哺乳類でも味覚受容体は失われている。鯨類では、ハクジラ亜目 (Odontoceti) のハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) が全ての *TAS1R*、*TAS2R* を偽遺伝子化している。また、これらの偽遺伝子化変異の多くは、ヒゲクジラ亜目 (Mysticeti) と共有している[46–48]。さらに、GPCR 型味覚受容体のシグナル伝達物質である G タンパク質 α サブユニットをコードする *GNAT3* も鯨類の共通祖先で偽遺伝子化しており、水棲適応した鯨類の共通祖先で味覚が不要になり、急速に味覚関連遺伝子の偽遺伝子化が進行したと考えられている[47]。半水棲のアザラシやアシカなどの鰭脚類 (Pinnipedia) でも、*TAS1R* と *TAS2R* の多くが偽遺伝子化している[49,50]。こうした水棲・半水棲哺乳類の味覚遺伝子の喪失の原因は、動物食性への移行と丸呑み型の採餌様式にあると考えられている[50]。

また、*TAS1R* によって作られる甘味・旨味受容体の甘味・旨味物質の感受性の差も食性との関連が示唆されている。例えば、葉食に特化した霊長類であるコロブス亜科 (Colobinae) では、姉妹群のオナガザル亜科 (Cercopithecinae) で雑食のアカゲザル (*Macaca mulatta*)・ニホンザル (*M. fuscata*) や広鼻猿類 (Platyrrhini) で果実・昆虫食のコモンリスザル (*Saimiri sciureus*) が甘味受容体 *TAS1R2*/*TAS1R3* を介して感知できる天然糖類に対して、甘味受容体が感受性を持たず、行動レベルでも嗜好性を持たない[51–55]。さらに、コロブス亜科の共通祖先で *TAS1R2* の選択圧の緩和が確認されている[56]。これは、葉食性と前胃発酵能力という独自の形質獲得との関連が指摘されており、食物選択に糖が重要な要素ではないためと考えられている。また、哺乳類ではないが、同様に *TAS1R* ファミリーを有する鳥類は、*TAS1R2* が失われており、一般に甘味感受性を持たないとされる。これは、鳥類の祖先が肉食性の獣脚類恐竜であった頃に甘味感覚が不要となって退化したためと推定されている。しかし、花蜜を主食とするハチドリ仲間は、通常旨味受容体として機能する *TAS1R1*/*TAS1R3* を糖が受容できるように機能変異させることで、糖に嗜好性を示すように進化している[57]。

一方で、苦味受容体遺伝子 *TAS2R* は、ゲノム中の遺伝子の数と組み合わせ (遺伝子レ

パートリー) が種間で大きく異なっており、進化の過程でレパートリーを柔軟に変化させている。比較ゲノム解析研究によると、ヒトの機能的な *TAS2R* 遺伝子は 26 個、マウスでは 40 個、ネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) では 50 個以上、ニワトリ (*Gallus gallus*) では 3 個と非常に変化に富んでいる[21,58]。多くの *TAS2R* は、いくつかの染色体上に連続的に並んでおり、類似した配列間での不等相同組み換えによって遺伝子数が変化しやすいと言われている[59]。苦味として認識すべき物質は、アルカロイドやテルペノイド、アミド、グルコシド、ペプチドなど非常に多様である[22,23]。そのため、*TAS2R* の遺伝子重複によるレパートリーの拡大・縮小や、重複した *TAS2R* 間の機能分化によって、それぞれの動物が生息環境に合わせて、受容する苦味物質の幅を変化させて適応していると考えられている[21,50,58]。例えば、毒物への接触機会が多い植物食動物 (herbivore) は、肉食動物よりも大きな *TAS2R* レパートリーを持つ傾向がある[58]。また、昆虫食者 (insectivore) は、同じ動物食者でも、肉食動物 (carnivore) や雑食動物 (omnivore) よりも *TAS2R* レパートリーが大きい傾向にある[50]。これは、捕食対象である昆虫がアルカロイドなどの毒物を用いた生体防御機構を持っているためだと考えられている。一方で、同じ昆虫食者でもミミセンザンコウ (*Manis pentadactyla*) のように僅か 2 つという極めて小さな *TAS2R* レパートリーを持つ例外も存在する。これは、食性が特定のアリ・シロアリに高度に特殊化し、丸呑み型の採餌様式をもつことが原因と考えられている[50]。霊長類でも、真猿類 (Anthropoidea) の共通祖先で *TAS2R* の顕著な増加が見られ、この時期に起こった嗅覚の退化に伴う適応 (感覚トレードオフ) の可能性が指摘されている[21]。

苦味受容体 *TAS2R* も甘味・旨味受容体 *TAS1R* と同様に、受容する物質 (リガンド) の種類や感受性に種間差がある。ヒトとマウスで行われたそれぞれの *TAS2R* レパートリーすべてを対象にした大規模なリガンドスクリーニング解析によると、一対一対応するオーソログ (one-to-one orthologs) のリガンド共通性は、最大でも 30%程度と低く、ヒトとマウスのオーソログ間の機能の保存性はそれほど高くない[22,23]。これ以外の哺乳類については、主に *TAS2R38* と *TAS2R16* でリガンド応答性に関する報告がある。前

述のように TAS2R38 は、ヒトでは PTC や 6-n-propylthiouracil (PROP) の受容体として知られている[60]。しかし、イエネコ (*Felis catus*) のオーソログは PTC には反応するが、PROP には反応せず、マウスのオーソログ Tas2r138 はこれら 2 つの物質には反応しない[23,61,62]。霊長類でもコロブス亜科は、姉妹群のオナガザル亜科の *Macaca* 属と比べて PTC 感受性が低く、特にアジアに生息するコロブスは、ほとんど PTC に反応しない[63,64]。これは、コロブスの葉食適応のひとつと考えられている。また、TAS2R16 は、ヒトでは植物の主要な二次代謝産物である β グルコシド (β グルコシド結合を持つグルコースに由来する配糖体) に非常に高い特異性を持つ苦味受容体として知られているが、このリガンド応答性は、狭鼻猿類 (Catarrhini) で共通である[65,66]。しかし、広鼻猿類のコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) の TAS2R16 や、マウスのオーソログである Tas2r118 は、 β グルコシドに反応しない[23,66]。また、狭鼻猿類における TAS2R16 の β グルコシド感受性には種間差があり、ニホンザル (*M. fuscata*) の TAS2R16 は、 β グルコシドの一種で、ヤナギの樹皮に含まれる salicin の感受性がヒトの 10 分の 1 程度しかなく、冬季の代替餌 (fallback food) である樹皮の利用に有利に働いている可能性が指摘されている[66]。このように哺乳類の TAS2R のリガンド応答性の知見は、ヒトやマウスのものがほとんどであり、比較的よく研究が進んでいる TAS2R16 と TAS2R38 ですら、リガンド応答性の進化的傾向の実態やリガンド応答性の種間差と食性の関係は狭鼻猿類での限定的知見に留まっている。

1.3. キツネザル類の進化と採食生態

キツネザル類 (キツネザル下目 Lemuriforms とアイアイ下目 Chiromyiforms を合わせた分類群) は、曲鼻猿類 (Strepsirrhini) の一系統で、ほぼすべての種がマダガスカル固有種である[67]。キツネザル類は、暁新世 (Paleocene) もしくは始新世 (Eocene) 前期に姉妹系統のロリス下目 (Lorisiforms) と分岐した後、一度だけモザンビーク海峡を渡ってマダガスカルに移入し、アイアイ下目とキツネザル下目に急速に分化したとこれまで考えられてきた[68–71]。しかし、アフリカ大陸で産出する始新世後期の化石霊長類

Plesiopithecus と中新世前期の化石霊長類 *Propotto* の系統的位置を再考した Gunnell et al., 2018 の研究によると、これらの大陸産化石霊長類は、現生のアイアイ (*Daubentonia madagascariensis*) と近縁で、アイアイ下目に属すると結論付けられ、アイアイ下目とキツネザル下目の2系統が他のマダガスカル固有の哺乳類(テンレックやマダガスカルマングース科)のマダガスカル移入時期と重複する2100~4000万年前の間にそれぞれ独立に移入してきた可能性が提示されている[72,73]。このようにキツネザル移入の歴史については現在でも議論が続いている。

マダガスカルに移入してきたキツネザル類は、現在2下目5科15属にまで多様化し、約100種が記載されている[67]。キツネザル類は、マダガスカルの様々な環境に適応し、多様な食性を獲得している。アイアイ科 (*Daubentoniidae*) のアイアイは、体重が2.5kgにもなる大型の夜行性霊長類だが、昆虫や *Canarium* 属の果実の胚に高く依存した特殊な食性を持つ[74-76]。また、イタチキツネザル科 (*Lepilemuridae*) とインドリ科 (*Indriidae*) は、コロブス亜科のような葉を中心とした食性を持つ[77-81]。一方で、コビトキツネザル科 (*Cheirogaleidae*) やキツネザル科 (*Lemuridae*) は科の中でも食性の多様化が進んでいる。例えば、コビトキツネザル科では、ネズミキツネザル属 (*Microcebus*) は果実や昆虫の雑食で、コビトキツネザル属 (*Cheirogaleus*) は果実食、フォークキツネザル属 (*Phaner*) は樹液食 (gummivore) である[82-85]。また、キツネザル科では、多くの種が果実食者であるが、ジェントルキツネザルと呼ばれる2属 (*Hapalemur* と *Prolemur*) が葉食化しており、さらに一部の種はタケ類 (タケ亜科 *Bambusoideae* に属する植物) に特化している[78,86-92]。

こうしたキツネザル類における霊長類の主要な食性を網羅するほどの食性多様化の背景には、味覚の適応進化が存在すると考えられ、キツネザル類は、味覚の適応進化機構の解明に適した対象であるといえる。加えて、これまで曲鼻猿類を対象とした味覚受容体の機能研究はほとんど行われてこなかったため、霊長類の味覚受容体の機能進化を明らかにするための重要な知見が得られることが期待できる。

1.4. 研究全体の目的

本研究では、数ある味覚受容体の中でも苦味受容体に着目した。苦味は、前述の通り、毒物の検知に重要な役割を果たしており、動物の生存に欠かせない感覚である。とりわけ新たな食性を獲得する際には、その食性にあった苦味感覚を進化させていくことが必要になると推測される。苦味受容体と食性の関係を明らかにするには、遺伝子レパートリーのゲノム進化と個々の苦味受容体のリガンド応答性の進化の双方からのアプローチが欠かせない。しかし、遺伝子レパートリー解析と比べて、リガンド応答性の研究はヒトやマウスに研究が集中しており、それ以外の動物はあまり調べられていない。そのため、進化の枠組みでの包括的な理解は進んでおらず、これ以外の哺乳類の知見は断片的であることが殆どである。しかし、その中でも TAS2R16 は霊長類において比較的研究が進んでおり、ヒトを含む狭鼻猿類の TAS2R16 は植物の主要な二次代謝産物である β グルコシドを特異的に受容することがわかっている[65,66]。 β グルコシドには、有毒な青酸配糖体なども含まれるため、TAS2R16 の機能は霊長類の食物選択に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、直鼻猿類と対をなす霊長類の二大系統のひとつである曲鼻猿類に関する知見は一切ない。そのため、霊長類における TAS2R16 のリガンド応答性、つまり β グルコシド応答性、がどの程度保存的な機能なのかは不明である。

曲鼻猿類に属するキツネザル類は、前述のように味覚の適応進化研究に適した分類群である。中でもキツネザル科は、内包する 5 属のうち 3 属 (*Lemur* 属、*Eulemur* 属、*Varecia* 属) が霊長類全体で一般的な果実食性 (frugivorous) または果実・葉食性 (frugivorous-folivorous) であり (本論文では、これらを総称して果実中心食性と呼ぶ)、その中からタケ類に特殊化した系統 (*Prolemur* 属と *Hapalemur* 属) が分岐しており、食性適応に伴った味覚受容体の進化を研究する上で特に適した分類群である (図 1)。さらに、タケ類に特殊化した系統は、青酸配糖体が高濃度に含まれているタケ類に強く依存しているため[89,93]、青酸配糖体の受容体候補である TAS2R16 が竹食と関連した機能進化を遂げている可能性が考えられる。

そこで、本研究では、曲鼻猿類の中でもキツネザル科の TAS2R16 に着目し、リガンド応答性を解析し、これまでの狭鼻猿類での知見と比較する。これによって、「①霊長類における苦味受容体のリガンド応答性の進化傾向」の解明を目指すと共に、科内で食性が多様であることを利用して、同科に属する竹食のジェントルキツネザルと果実中心食のキツネザルを比較することで「②苦味受容体のリガンド応答性と食性の関係」の解明に挑戦した。

2章 果実中心食性キツネザルにおける TAS2R16 の機能

2.1. 研究の概要

本章では、果実中心食性のキツネザル 3 種（ワオキツネザル *Lemur catta*、クロキツネザル *Eulemur macaco*、クロシロエリマキキツネザル *Varecia variegata*）における TAS2R16 の β グルコシド感受性を測定し、直鼻猿類（Haplorrhini）におけるこれまでの知見と比較することによって、霊長類における TAS2R16 のリガンド応答性の進化傾向を明らかにすることを目指した。また、次章に控える食性との関連の解明に向けたキツネザル科 TAS2R16 の β グルコシド感受性の基礎情報を得ることも目的とした。培養細胞を用いた一連の実験により、 β グルコシドの一種である salicin が 3 種すべての TAS2R16 を活性化することを確認した。一方で、構造が salicin とよく似た arbutin は、*L. catta* の TAS2R16 を活性化するものの、残り 2 種の TAS2R16 を不活性化した。さらに、*E. macaco* を対象にした食物選択アッセイでは、受容体を活性化する salicin は忌避され、不活性化する arbutin は忌避されないことを確認し、TAS2R16 のリガンド応答性と摂食行動に高い相関があることを明らかにした。また、部位特異的変異体解析と分子系統解析によって、arbutin に対する応答の種間差が、曲鼻猿類特異的な 282 番のアミノ酸置換 (L282S) によって引き起こされており、*L. catta* の系統で Serine から祖先型（直鼻猿類型）と同じ Leucine に復帰突然変異したことがわかった。以上の結果から、霊長類 TAS2R16 は、曲鼻猿類から直鼻猿類まで広く β グルコシド感受性を備えていることが明らかとなった。一方で、活性化されるリガンドの種類は、*L. catta* の方が他の 2 種よりも多く、より広範な苦味物質を感知できると考えられた。また、この検知範囲の拡大は、*L. catta* の系統で固有の現象であったため、彼らが採食する貧栄養で二次代謝産物を多く含む植物への適応と関連する可能性がある。

2.2. 研究の背景

2.2.1. 霊長類における苦味受容体 TAS2R16 のリガンド応答性

苦味受容体 TAS2R16 は、数ある苦味受容体の中でも TAS2R38 と並んで研究が比較的進んでいる苦味受容体である。ヒト TAS2R16 は、培養細胞を用いた機能解析実験によって、主に β グルコシド（グルコースに由来する配糖体）を受容することがわかっている[60,94,95]。 β グルコシドは、植物の主要な二次代謝産物のひとつであり、その中には有毒な青酸配糖体も含まれる。TAS2R16 は、青酸配糖体も受容することができるため、植物の被食防御物質の検知や過剰摂取による自身の中毒防止に欠かせない味覚受容体であると考えられる[96]。これは、TAS2R16 が殆どの霊長類で機能的な配列として保持されていることから推察できる（例外は、ポリビアリスザル *Saimiri boliviensis* のみ）[21]。さらに、この β グルコシド受容能は、真猿類数種の TAS2R16 の機能解析によって、少なくとも狭鼻猿類では保存的であることが確認されている[66]。リガンド感受性には狭鼻猿類内でも種間差が認められ、ニホンザル (*M. fuscata*) は、 β グルコシドの一種でヤナギの樹皮に含まれる salicin に対する感受性が、ヒトよりも約 10 倍低い[66]。一方で、広鼻猿類のコモンマーモセット (*C. jacchus*) や齧歯類のマウスの TAS2R16 オートソログは β グルコシドに応答しない[23,66]。このように、TAS2R16 は、霊長類の食性と関わりが示唆されているものの、TAS2R16 のリガンド応答性に関する知見は、広鼻猿類では昆虫や樹脂を主食とする *C. jacchus* に限られ、それよりも系統的にヒトから離れたグループ（メガネザルや曲鼻猿類）に関しては一切知見がない。そのため、現状では TAS2R16 の β グルコシド応答性がどの程度進化的に保存されているのかよく分かっていない。したがって、霊長類における TAS2R16 の β グルコシド応答性の進化をより深く理解するためには、これまで調べられてこなかった曲鼻猿類での調査が必須である。

2.2.2. キツネザル科の採食生態

1章で述べたような理由から、本研究では曲鼻猿類の中でもキツネザル科に着目する。

キツネザル科は、*Lemur*、*Eulemur*、*Varecia*、*Prolemur*、*Hapalemur* の 5 属によって構成され、現在 21 種が記載されている。前者 3 属が果実または果実・葉を中心とした食性を持ち、後者 2 属がタケ類や草本類を中心とした食性を持つ[67]。

Lemur 属にはワオキツネザル (*L. catta*) のみが属し、マダガスカル南部の有刺林 (spiny forest) やアンドリングチャ山塊 (Andringitra Massif) などの乾燥した地域に生息する[67]。ベレンティ私設保護区 (Berenty Private Reserve) とベザ・マハファリ特別保護区 (Beza Mahafaly Special Reserve) では、数種の主要な採食植物に加えて、日和見的に多くの植物を利用しており、それぞれ少なくとも 109 種、61 種の植物を採食している[97]。本種の採食時間は果実と葉が全体の約 80 % を占めるが、利用割合には明瞭な季節変動が見られる[90,98]。雨季には果実を最も利用するが、乾季には成熟葉が最もよく利用される。そのため、本種は一般に果実・葉食性 (frugivorous-folivorous) の霊長類と考えられている。

Eulemur 属には現在 12 種が記載されており、マダガスカル東部の多雨林、北部・西部の乾燥林に広く分布する。一方で、*L. catta* が分布する、より乾燥の強い有刺林には分布していない[67]。本属は、季節変動はあるもの採食時間の約 65~85 % を果実が占める果実食性 (frugivorous) の属である[78]。本研究で対象とするクロキツネザル (*E. macaco*) は、マダガスカル北部に位置するヌシベ島 (Nosy Be) とその周辺の島本土に生息する[67]。ヌシベ島のルクベ国立公園 (Lokobe National Park) と本土のアンバトゥ山塊 (Ambato Massif) では、*E. macaco* も乾季には果実以外 (葉や花) の利用割合がある程度高まるものの、総じて高い果実食性を示すという *Eulemur* 属に特徴的な採食様式を持つ[99,100]。

Varecia 属には、クロシロエリマキキツネザル (*V. variegata*) とアカエリマキキツネザル (*V. rubra*) の 2 種が属し、前者がマダガスカル東部の多雨林に、後者がマスアラ半島 (Masoala) 周辺の多雨林にのみ分布する[67]。本属も *Eulemur* 属と同様に高い果実食性を持ち、採食時間の 70~90 % を果実採食が占める[86,101-104]。

残る *Prolemur* 属と *Hapalemur* 属はジェントルキツネザルと呼ばれ、タケ類や草本類を主食とする葉食性の霊長類である[89,91,92,105,106]。*Prolemur* 属にはヒロバナジェントルキツネザル (*P. simus*) のみが属し、マダガスカル南東部から中東部の多雨林に分布

する。*Haplemur* 属には 5 種が含まれ、マダガスカル東部の多雨林や西部の乾燥林に広く分布する。中でも、本研究で対象とするキンイロジェントルキツネザル (*H. aureus*) とハイイロジェントルキツネザル (*H. griseus*) は、*P. simus* と共にマダガスカル南東部のラヌマファナ国立公園 (Ranomafana National Park) 周辺に同所的に生息しており、タケ類に特殊化した食性を持つことが明らかとなっている[89,105,107]。本グループの採食生態は、3 章にて詳述する。

2.2.3. 研究の目的

本章では、果実中心食性の 3 属 (*Lemur* 属、*Eulemur* 属、*Varecia* 属) から各 1 種ずつ (*L. catta*、*E. macaco*、*V. variegata*) を選び、TAS2R16 の β グルコシド応答性を、培養細胞を用いた機能解析と分子系統解析によって検証した。そして、曲鼻猿類の TAS2R16 の β グルコシド応答性とこれまで調べられてきた直鼻猿類 (狭鼻猿類と *C. jacchus*) と齧歯類の知見を統合して、霊長類の TAS2R16 の β グルコシド応答性を広く俯瞰し、その進化傾向を明らかにすることを目指した。また、3 章で実施する竹食性のジェントルキツネザルとの比較に向けて、キツネザル科における TAS2R16 の機能に関する基礎情報の蓄積を目的とした。

2.3. 研究の方法

2.3.1. 対象種のゲノム DNA 抽出と *TAS2R16* 配列の決定

日本モンキーセンターとの連携研究 (#2017-014、#2017-018) として提供を受けた *L. catta*、*E. macaco*、*V. variegata*、スンドスローロリス (*Nycticebus coucang*)、レッサーズローロリス (*N. pygmaeus*)、ポト (*Perodicticus potto*)、ショウガラゴ (*Galago senegalensis*) のエタノール浸潤筋肉試料から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出した。また、日本モンキーセンターとの連携研究 (#2017-014) として提供を受けたブラウンキツネザル (*Eulemur fulvus*) の糞便、恩賜上野動物園との共同研究 (No. 29-100) として提供を受けたスラウェシメガネザル (*Tarsius tarsier*)

の糞便から、それぞれ QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) と NucleoSpin DNA Stool Kit (TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan) を用いて糞中 DNA を抽出した。DNA の濃度は、分光光度計 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) または、DS-11 Spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE) を用いて定量した。用いた DNA の由来個体の詳細な情報は、表 1 に記載した。

これらの抽出したゲノム DNA を鋳型として、*TAS2R16* の全長 (開始コドンから終始コドンまで) を、上流と下流の非コード領域に相補的なプライマーを用いて PCR (polymerase chain reaction) 増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。プライマーは、*E. macaco*、ハイイロネズミキツネザル (*Microcebus murinus*)、ガーネットガラゴ (*Otolemur garnettii*)、フィリピンメガネザル (*Carlito syrichta*) の全ゲノムアセンブリの *TAS2R16* 近傍配列を元に設計した [108,109]。DNA ポリメラーゼは、Tsk Gflex DNA Polymerase (TaKaRa Bio) を用いた。25 μ l の混合液について、0.625U のポリメラーゼと反応バッファー、各 0.4 mM のプライマー、5-100 ng の鋳型 DNA の組成で反応を行った。増幅条件は、まず 1 分間 94°C で変性し、その後、変性 (98°C で 10 秒)、アニーリング (50-57°C で 15 秒)、伸長 (68°C で 30 秒) の条件で 35-40 サイクル反応させ、最後に 68°C で 5 分間伸長反応する形で実施した。アニーリング温度やサイクル数は、サンプルごとに適宜調整した。PCR 産物は、予め核酸染色試薬 GelRed (Bitotium Inc., Hayward, CA) を加えて作成した 1% アガロースゲルを用いて 100V で 30 分間電気泳動し、紫外光下で特異的な増幅に成功していることを確認した。残りの PCR 産物は、イソプロパノール沈殿法で精製した。最後に、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 及び、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) で PCR プライマーを用いてダイレクトシーケンスした。出力されたクロマトグラムデータから、FinchTV (Geospiza Inc., Seattle, WA) でヘテロ接合部位の有無も含めて視認し、塩基配列を決定した。

2.3.2. *TAS2R16* 発現ベクターの構築

TAS2R16 を培養細胞の細胞膜表面に効率よく発現し、発現タンパク質を免疫染色で

可視化できるような発現ベクターを先行研究に倣って、次の手順で作成した[66,94]。まず、2.3.1 項で取得した PCR 産物を鋳型として、エピトープ配列 1D4（ウシロドプシンの C 末端 8 アミノ酸）をコードする配列を PCR 法によって *TAS2R16* 配列の C 末端側に付加した。さらに、*TAS2R* の N 末端に付加することで細胞膜への移行効率を上昇させるラット (*Rattus norvegicus*) のソマトスタチン 3 受容体 (somatostatin receptor type 3) の N 末端 45 アミノ酸をコードする配列 (sst3) をラットのゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅した。これらの PCR 増幅には、DNA ポリメラーゼとして Tsk Gflex DNA Polymerase を用いた。混合溶液の組成と増幅条件は 2.3.1 と同様とし、アニーリング温度のみ 55°C に固定した。また、pEAK10 ベクター (Edge Biosystems Inc., San Jose, CA) は、制限酵素 EcoRV (TaKaRa Bio) で開環して線状化した。これらの PCR 産物と線状化ベクターは、2.3.1 項と同一組成のアガロースゲルを用いて、100V で 30 分間電気泳動し、目的産物の領域のゲルを切り出して FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd, Bunkyo-ku, Tokyo) を用いて精製した。これらの精製断片を用いて In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Fremont, CA) で pEAK10 ベクターに *TAS2R16* 配列を組み込んだ。作成したプラスミドは、ダイレクトシーケンスによって組み込み配列に変異がないことを確認した。その後、正しい配列を持つプラスミドを含む大腸菌株を、アンピシリンを加えた 50mL の 2xYT 培地 (BD, Franklin Lakes, NJ) で一晩振盪培養し、プラスミド (発現ベクター) を QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN) を用いて精製した。得られたプラスミドの濃度は、分光光度計を用いて定量した。

TAS2R16 の部位特異的変異体の発現ベクターは、野生型 *TAS2R16* の発現ベクターを鋳型として、Quikchange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)、Quikchange Lightning Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) または、Overlap Extension PCR 法によって作成した。変異部位は、ダイレクトシーケンスによって正しく変異導入されていることを確認した。その後、野生型発現ベクターと同様に、変異体プラスミドを含む大腸菌株を振盪培養したのち、QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製し、濃度を分光光度計で定量した。

2.3.3. 培養細胞を用いた TAS2R16 のカルシウムアッセイ

機能解析用の培養細胞は、SV40 Large T antigen が組み込まれたヒト胚性腎細胞 (HEK293T 細胞) を用いた。細胞は、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) 内で、10%ウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) を用いて培養した。6 穴プレートに HEK293T 細胞を撒種し、その翌日に、1 穴あたり TAS2R16 発現ベクター2000 ng、TAS2R と共役するキメラ G タンパク質 Gα16/gust44 [110]の発現ベクター500 ng を Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて遺伝子導入した。導入から 6 時間後に 10%FBS を添加した DMEM に培地交換し、96-well Black with Clear Flat Bottom Corning CellBIND Surface plate (Corning Inc., Corning, NY) に撒種し直し、更に 16~18 時間培養を続けた。培養が完了した細胞は、マイクロプレートウォッシャーBIO-WASHER 50 (DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan) を用いて HEPES バッファー (130 mM NaCl, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) で洗浄したのち、1 穴当たり 50 μl の HEPES バッファーを残留させた。そこに、カルシウム指示薬 FLIPR Calcium 4 (Molecular Devices Inc.) を 50 μl 加えて、遮光条件で 27°C、40 分間インキュベートした。蛍光の測定には、FlexStation3 Microplate Reader (Molecular Devices, LCC., San Jose, CA) を使用し、488 nm の励起光を照射した際の 525 nm における蛍光強度を 2 秒間隔で 120 秒間測定した。はじめに、定常状態の蛍光強度を 20 秒間測定し、その後 2 倍濃度のリガンド 100 μl を滴下してからさらに 100 秒間、蛍光強度の変化を測定した。リガンド (括弧内は、HEPES バッファーを用いて作った希釈列の最終濃度) には、salicin (0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20, 40 mM)、arbutin (0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0, 10 mM)、phenyl β-D-glucopyranoside (0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20, 40 mM)、4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0, 10 mM)、4-methoxyphenyl β-D-glucopyranoside (0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0, 10 mM)を用いた (すべて Sigma-Aldrich) (図 2)。得られた蛍光強度変化データを、定常状態の蛍光値 (F_0) に対するリガンド添加による定常状態からの蛍光値変化 ΔF (最大蛍光値 F - 定常状態蛍光値 F_0) の割合 $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$ で評価した。空の pEAK10 ベクタ

ーを TAS2R16 ベクターの代わりに導入した細胞の蛍光強度変化割合を TAS2R 非特異的反応 (mock response) と定義し、対応するすべての反応値から差し引き、その値を R (<https://www.r-project.org/>) の drc パッケージを用いて、非線形回帰モデル ($y = \min + [(\max - \min)/(1 + x/EC_{50})^h]$) にフィッティングし、ヒル係数 (回帰式の h に相当) と半数効果濃度 EC_{50} (阻害反応の時は IC_{50}) を推定した (回帰式の x はリガンド濃度) [111]。データは独立した 3~5 回の実験から取得した。推定したパラメータの比較には、ANOVA と BH 補正 (Benjamini-Hochberg correction) を行った多重 Welch's t test を用いた。

2.3.4. IP_1 アッセイ

TAS2R16 の活性化状態を評価するために、TAS2R シグナル伝達のセカンドメッセンジャー IP_3 の代謝物である IP_1 の定量を行った。 IP_3 は細胞中で非常に短命な分子で速やかに代謝されるため、LiCl によって IP_3 の脱リン酸化を IP_1 で停止させ、蓄積した IP_1 の量を IP-One-Gq Kit (Cisbio, Codolet, France) を用いて定量した。6 穴プレートに撒種した HEK293T 細胞に 2.3.3 項と同量の TAS2R16 ベクターと $G\alpha_{16}/gust44$ ベクターを遺伝子導入し、6 時間後に白色の 384 穴プレート (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) に再撒種し、更に 12-14 時間培養を続けた。培養後の細胞は、キット付属の Stimulation Buffer で洗浄し、20 μ l の Stimulation Buffer を添加した。そこに、8 μ l の 3.5 \times の arbutin を加えて、 CO_2 インキュベーター (37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2) 内で 60 分インキュベートした。その後、キット付属の lysis buffer に溶かした d2-conjugated IP_1 と Tb cryptate-conjugated anti- IP_1 antibodies を 4 μ l ずつ添加し、さらに 60 分間室温でインキュベートした。FlexStation3 Microplate Reader (Molecular Devices) を用いて、各サンプルの蛍光比 (668 nm/620 nm) を計測し、 IP_1 濃度既知の試料の蛍光比から作成したスタンダード曲線を元に、 IP_1 濃度を定量した。データは独立した 7~8 回の実験から取得した。 IP_1 産生量の比較には、BH 補正を行った多重 Welch's t test を用いた。

2.3.5. リンゴ片を用いた食物選択アッセイ

行動アッセイの対象は、日本モンキーセンター飼養の *E. macaco* のメス (推定 20 歳

以上) 1 頭である。アッセイ前に、屋外放飼場と室内放飼場の間の通路に誘導し、1 頭だけの状態にしてアッセイを行った。2 種類のリンゴ片 (15 mm × 8 mm × 8 mm) を食物選択アッセイに用いた。一方は、100 ml の蒸留水に、もう一方は 100 ml のテスト溶液 (蒸留水、5mM salicin、10 mM arbutin、mixture (salicin と arbutin の混合液) のいずれか) に一晩浸した。1 回のトライアルで、蒸留水漬けリンゴ片 (コントロール片) 5 個入れたカゴとテスト溶液漬けリンゴ片 (テスト片) 5 個を入れたカゴを同時に提示し、5 分間で食べたリンゴ片の数を計測した。テスト溶液の種類と 2 つのカゴの並び順はランダム化し、各テスト溶液について 8 回のトライアルを行った。得られたデータから、テスト片を食べた割合 (摂食率) を「トライアル中に食べたすべてのリンゴ片の数」に対する「食べたテスト片の数」として定義して、個体の忌避反応の程度を評価した。テスト溶液間の比較は、ANOVA と BH 補正を行った多重 Welch's t test を用いた。

本行動アッセイは、日本モンキーセンター研究倫理委員会による承認 (#2017-015) の下、同園研究倫理ガイドライン (2016 年 4 月 1 日発行) に従って同園との連携研究 (#2017-014) として実施した。

2.3.6. *TAS2R16* 遺伝子の分子系統解析

Hayakawa *et al.* 2014 と Liu *et al.* 2016 からそれぞれ真主齧上目 (Euarchontoglires) とローラシア獣上目 (Laurasiatheria) の機能的 (intact) な *TAS2R16* オースログの配列を取得した [21,50]。さらに、13 種の有胎盤類 (Eutheria) の全ゲノムアセンブリを公共データベース National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から取得した (取得した全ゲノムアセンブリは表 2 を参照) [108,109,112–116]。BLAST 2.8.0+を用いて、これらのゲノムアセンブリに対してヒト *TAS2R16* 配列を Query として blastn 検索を行い、得られた配列を Hayakawa *et al.*, 2014 に倣って分類した [21,117]。さらに、得られた配列を Query としてヒトゲノムアセンブリ GRCh38.p7 に対して相互 blastn 検索を行い、ベストヒット配列が *TAS2R16* であるものをその種の *TAS2R16* オースログと判定した。

得られた *TAS2R16* 配列のアミノ酸配列を元に、MAFFT v.7 を用いて多重配列アライメントを作成した[118]。この多重配列アライメントを基に、RAxML v8.2.10 を用いて最尤系統樹を推定した[119]。アミノ酸置換モデルには JTT モデルを用いた[120]。また、系統樹の確からしさを評価するために、ブートストラップリサンプリングを 1000 回行った[121]。

2.3.7. ホモロジーモデリングとリガンドドッキングシミュレーション

荒木望嗣博士、岩田浩明博士らのご協力の元、キツネザル *TAS2R16* のホモロジーモデルを構築し、リガンドドッキングシミュレーションを行った。モデリングの鋳型には、GPCR-I-TASSER サーバーで構築したヒト *TAS2R16* の構造を用いた[122]。*H. sapiens*、*L. catta*、*E. macaco*、*V. variegata* の *TAS2R16* のアミノ酸配列の多重配列アライメントを MAFFT v.7 を用いて作成し、それぞれのキツネザル *TAS2R16* の構造モデルを MODELLER [123]によって構築した。ドッキングシミュレーションには rDock を用いた[124]。リガンド結合サイトの構造がすべての種で類似していたため、*E. macaco* の構造を代表としてドッキングシミュレーションを実施した。ヒト *TAS2R16* の推定リガンド結合サイト[94]を元に、リガンドの結合サイトを Trp85 と His181 の α 炭素原子の midpoint から 10Å 以内の原子と定義し、salicin と arbutin をそれぞれ 50 種類の配置でドッキングした。ドッキングした複合体モデルを Amber12 の minab モジュールによってエネルギー最小化した後、タンパク質-リガンド結合の安定性を MMPBSA.py モジュールを用いて MM-PSBA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area) 法によって評価した[125–128]。イオン強度は 150 mM とした。これらの評価によって、最も安定性の高かったドッキングモデルを代表的なリガンド結合様式として解析に用いた。

2.4. 研究の結果

2.4.1. キツネザル *TAS2R16* の β グルコシドに対する応答性

キツネザル科 3 種 (*L. catta*、*E. macaco*、*V. variegata*) の *TAS2R16* について、数種の

β グルコシドに対する応答を、培養細胞を用いたカルシウムアッセイで評価した。テストしたキツネザルの TAS2R16 アミノ酸配列は、3 種どの組み合わせでも 90%以上の一致度であり、ヒト TAS2R16 とは 68~69%程度的一致度であった (表 3)。まず、 β グルコシドの中でも TAS2R16 との関係がヒトを中心に良く調べられている salicin に対する応答を計測した。その結果、3 種ともに salicin に対して濃度依存的な応答の増大が見られ、EC₅₀ 値はそれぞれ 1.1 + 0.15 mM (*L. catta*)、2.3 + 0.06 mM (*E. macaco*)、3.8 + 0.68 mM (*V. variagata*) であった (図 3a)。また、*L. catta* の EC₅₀ は *V. variagata* よりも有意に低く (Welch's t test, $p < 0.01$)、*L. catta* の方が、*V. variagata* よりも高い salicin 感受性を有していた。さらに、3 種すべてについて salicin を含まない HEPES バッファーを添加した場合でも弱い応答が見られた。そこで、TAS2R シグナル伝達のセカンドメッセンジャー IP₃ の代謝物 IP₁ の産生量をリガンドなしの状態に測定した。その結果、ヒト TAS2R16 や空 pEAK10 ベクターを遺伝子導入した細胞よりも IP₁ 産生量が有意に高いもしくは高い傾向にあることが明らかとなった (図 4a)。これらのことから、キツネザル 3 種の TAS2R16 は、リガンドがない状態 (定常状態) でも一定の活性を示す「構成的活性 (constitutive activity)」を持つ可能性が示唆された。

続いて、salicin と同様の手法によって arbutin に対する感受性をカルシウムアッセイで測定した。その結果、*L. catta* では、salicin と同様に濃度依存的な応答の増大が見られた (EC₅₀ : 3.1 + 0.59 mM)。しかし、*E. macaco* と *V. variagata* では、濃度依存的に応答が減少し、最高濃度付近では殆ど応答が見られなくなった (図 3b)。IC₅₀ (半数阻害濃度) は、0.31 + 0.08 mM (*E. macaco*)、0.52 + 0.23 mM (*V. variagata*) であった。さらに、arbutin の添加によって IP₁ の産生量の低下傾向も確認された (図 4b)。また、salicin と arbutin を同時に *E. macaco* と *V. variagata* の TAS2R16 に添加したところ、salicin 一定濃度下で arbutin 濃度依存的に salicin 由来の応答が減少した (図 3c-d)。これらのことから、salicin が 3 種すべてに対してアゴニスト (agonist: 活性剤) としてはたらくのに対して、arbutin は *L. catta* に対しては、アゴニストとしてはたらく、*E. macaco* と *V. variagata* に対しては、インバースアゴニスト (inverse agonist: 逆活性剤) としてはたらくことが示唆され

た。

さらに、3種類の人工 β グルコシドに対する応答をカルシウムアッセイで測定したところ、*L. catta*では、3種類すべてに対して濃度依存的な応答の増大が見られたのに対して、*E. macaco*と*V. variagata*では、応答しない、もしくは濃度依存的な応答の減少が見られた(図5a-c)。また、salicinとの同時添加アッセイでは、salicin由来の応答を濃度依存的に減少させた(図5d-e)。

以上の実験により、キツネザル3種のTAS2R16が β グルコシドに応答することを確認した。しかし、狭鼻猿類の場合と同様に、個々のリガンドに対する応答には種間差が認められた。また、arbutinのように種によってアゴニスト、いわゆる、苦味物質になったり、インバースアゴニストになったりする苦味分子の存在が新たに見いだされた。

2.4.2. 摂食行動とTAS2R16のリガンド応答性の相関

ここまでの細胞実験によって、キツネザルTAS2R16が β グルコシドに応答することが確認できた。そこで、本節では、TAS2R16のリガンド応答性が個体の苦味感覚に与える影響を、*E. macaco*を対象とした食物選択アッセイによって定性的に評価した。蒸留水に浸したリンゴ片(コントロール片)と各種苦味溶液または、蒸留水に浸したリンゴ片(テスト片)を同時に5個ずつ提示し、5分間で摂食したすべてのリンゴ片の数に対する摂食したテスト片の数の割合(摂食率)を算出し、リンゴ片を浸したテスト溶液間で平均値を比較した(図6)。その結果、salicinに対しては、蒸留水と比較して有意に摂食率が減少しており、摂食忌避が確認された(Welch's t test, $p < 0.001$)。一方で、arbutinに対しては、蒸留水と摂食率に大きな差は無かった($p = 0.39$)。そして、mixture (salicinとarbutinの混合液)に対しては、蒸留水よりも有意に摂食率が低かった($p < 0.05$)ものの、salicinと比較して有意に高い摂食率を示した($p < 0.01$)。以上の結果から、TAS2R16のリガンド感受性が個体の摂食行動に強く寄与していることが確認された。また、行動レベルでもarbutinはsalicinの苦味をマスクすることができることが明らかとなった。

2.4.3. arbutin 応答に関わるアミノ酸残基の同定

先行研究で明らかにされてきたヒトや非ヒト霊長類の TAS2R16 における β グルコシド感受性に関与するアミノ酸残基は、3 種のキツネザルで保存されていた[94,129]。そこで、キツネザル科で発見された arbutin の特異的な応答に重要なアミノ酸残基を特定するために、arbutin に対してアゴニスト応答した *L. catta* で特異的なアミノ酸置換をキツネザル 3 種の配列比較によって探索した。この配列比較によって、合計 10 箇所の *L. catta* 特異的なアミノ酸置換を発見した (図 7)。

続いて、これらの残基について *L. catta* TAS2R16 の部位特異的変異体を作成し、arbutin 応答に重要なアミノ酸残基を絞り込んだ。ヒト TAS2R におけるリガンド特異性に関わるアミノ酸置換の多くは、膜貫通領域 (transmembrane domain: TM) もしくは、細胞外ループ領域 (extracellular loop domain: ECL) に位置している[95]。そこで、TAS2R16 のホモロジーモデルからこれらの領域に位置していると考えられる 7 残基を部位特異的変異の対象とした (図 7)。導入した変異は、S75N, H76Y, L168V, R182K, I184V, V247I, L282S である。まず、7 残基変異体 (mutant-S75H/H76Y/L168V/R182K/I184V/V247I/L282S) と 3 残基異体 (mutant-S75N/H76Y/V247I) の arbutin に対する応答を測定した。その結果、7 残基変異体は *E. macaco*、*V. variagata* と類似の応答を示した (図 8a)。一方で 3 残基変異体は野生型 *L. catta* と類似の応答を示した。このことから、残りの 4 残基 (L168V, R182K, I184V, L282S) の中に重要なアミノ酸置換が含まれていると考えられた。次に、この 4 残基を L168V、R182K+I184V、L282S の 3 つに分け、この中から 2 つを選び変異させたもの (mutant-L168V/L282S 、 mutant-R182K/I184V/L282S 、 mutant-L168V/R182K/I184V) を作成し、arbutin に対する応答を測定した。その結果、mutant-L168V/L282S と mutant-R182K/I184V/L282S は *E. macaco*、*V. variagata* と類似の応答を示した (図 8b)。一方で、mutant-L168V/R182K/I184V は arbutin の濃度に依らず応答に変化は認められなかった。arbutin 濃度依存的な応答の減少が認められる 2 つの変異体には、282 番のアミノ酸置換 (L282S) が共通して含まれていることから、この残基が重要であることが示唆された。

そこで、282 番の 1 アミノ酸変異体 (mutant-L282S) を作成し、arbutin に対する応答を測定した。その結果、この変異体は、*E. macaco*、*V. variagata* と類似の応答を示した (図 9a)。さらに、salicin と arbutin の同時添加アッセイでは、salicin 由来の応答が arbutin 濃度依存的に減少した (図 10)。最後に、282 番を *L. catta* 型に変異させた *E. macaco* と *V. variagata* の逆変異体 (mutant-S282L) を作成し、arbutin に対する応答を測定した。その結果、これらの変異体は、*L. catta* と類似のアゴニスト応答を示した (図 9b-c)。これらの結果から、キツネザル科 3 種における arbutin 応答の種間差は、282 番のアミノ酸残基の置換が原因であることが明らかとなった。キツネザル TAS2R16 は、arbutin に対して 282 番のアミノ酸残基が Leucine ならアゴニスト応答、Serine ならインバースアゴニスト応答をすると考えられる。

2.4.4. 282 番のアミノ酸置換の進化史

前項で明らかになった 282 番のアミノ酸置換の進化史を明らかにするために、まず、霊長類の TAS2R16 遺伝子系統樹を作成した。さらに、多重アライメントを用いて、霊長類全体でキツネザル TAS2R16 の 282 番に対応するアミノ酸残基を比較した。その結果、282 番のアミノ酸は、直鼻猿類では、17 種すべてが Leucine である一方で、曲鼻猿類では、ガラゴ科 2 種 (*Galago senegalensis*、*Otolemur garnettii*) と *L. catta* を除いてすべて Serine であった (図 11)。また、有胎盤類全体での配列比較から、多くの有胎盤類において 282 番に対応するアミノ酸残基が Leucine であることが明らかとなった (表 3)。これらの結果から、arbutin に対する不活化応答を担う 282 番の Serine は、曲鼻猿類の最近共通祖先 (LCA) で獲得され、キツネザル類では広く保存されていることが示唆された。また、*L. catta* では、同じ Leucine でもコドンが他の哺乳類とは異なる。そのため、コドンが進化の過程で「CTG (Leucine) →TCG (Serine) →TTG (Leucine)」と変化すると最節約的に考えられ、系統特異的に Serine から再度 Leucine に変異した (復帰突然変異) と推察された。

2.4.5. 分子モデリングによる arbutin の結合様式の解析

282 番残基の効果をより詳細に検討するために、荒木望嗣博士、岩田浩明博士らのご協力の元、キツネザル TAS2R16 とリガンドのドッキングシミュレーションを実施した。その結果、結合した β グルコシドは、arbutin 応答に重要な 282 番残基が位置する第 7 膜貫通領域 (TM7) と 262 番のアミノ酸を介して直接相互作用していることが示唆された (図 12)。262 番のアミノ酸は、アグリコン (aglycon: 配糖体の非糖部分) の芳香環の側鎖と近接していたが、側鎖をパラ位に持つ arbutin の方が、オルト位に側鎖を持つ salicin よりも近接していた。*E. macaco*、*V. variagata* の TAS2R16 は、arbutin と同じようにパラ位に側鎖をもつ 4-nitrophenyl- β -D-glucoside や 4-methoxyphenyl- β -D-glucoside に対して arbutin 様の反応を示した (図 5)。このことから、芳香環の側鎖構造が活性化に重要な要素であることが推察された。さらに、キツネザル TAS2R16 の 262 番をヒト TAS2R16 と同じ Leucine に置換した変異体 (野生型は Phenylalanine) を用いてカルシウムアッセイを行ったところ、282 番のアミノ酸残基に依らず、すべての変異体でアゴニスト応答を示した (図 13)。このことから、262 番アミノ酸とリガンドの相互作用が TM7 の構造変化に重要な働きをしており、282 番の変異の影響は、262 番アミノ酸とリガンドの相互作用に依存する関係にあることが示唆された。さらに、霊長類全体で 262 番と 282 番のアミノ酸を比較した結果、F262+S282 の組み合わせを持つのがキツネザル類に限られたことから (図 11, 14)、arbutin による TAS2R16 のインバースアゴニスト応答は、キツネザル類に限られた現象であることが示唆された。

2.5. 考察

2.5.1. 霊長類における TAS2R16 の β グルコシド応答性の保存的進化

キツネザル 3 種の TAS2R16 についての機能解析により、曲鼻猿類のキツネザルでも TAS2R16 は β グルコシド応答性を持つことが明らかとなった (図 3)。先行研究から真猿類、特にヒトを含む狭鼻猿類では、TAS2R16 が β グルコシド応答性を持つことが知ら

れている[66]。このことから、TAS2R16の β グルコシド応答性は霊長類で広く保存されていること、そして霊長類のLCAも β グルコシド応答性を持つTAS2R16を保持していたことが示唆された。一方で、マウスではTas2r118 (TAS2R16のオーソログ)は β グルコシドに応答せず、Tas2r126 (TAS2R41のオーソログ)が β グルコシド応答性を有する[23]。そのため、TAS2R16の β グルコシド応答性の起源を明らかにするには、より広範な哺乳類(特に真主齧類以外)のTAS2R16の β グルコシド応答性を今後の研究で調べていく必要がある。

2.5.2. 果実中心食性のキツネザルにおけるTAS2R16の機能

2.4.1項及び、2.4.2項で*E. macaco*において、TAS2R16の β グルコシドに対する応答性が個体の摂食行動に強く寄与していることが示された(図3, 6)。arbutinとsalicinの混合液での摂食率はsalicinよりも有意に高く、arbutinとは大きな差はなかった(Welch's t test, $p=0.15$) が、蒸留水よりも有意に低かった。これは、arbutinがsalicinの苦味を部分的にマスクしたためだと考えられる。これにはアッセイで使用したarbutin濃度が5 mM salicinの苦味を完全にマスクするには不十分であった可能性が考えられる。この結果は、arbutinがsalicinをはじめとした植物の β グルコシド由来の苦味をマスク出来ることを示唆しており、摂食の組み合わせによっては、本来感じるはずの苦味を弱める可能性を示している。arbutinが含まれる植物が属するツツジ科(Ericaceae)やモチノキ科(Aquifoliaceae)は、マダガスカルをはじめとして、世界中に分布している[130–134]。また、キツネザルによる採食も報告されている。例えば、*Ilex mitis* (モチノキ科)は、アカネズミキツネザル(*Microcebus rufus*)において、いくつかのツツジ科植物は、アンドリンギチャ山塊の*L. catta*において採食記録がある[135,136]。しかし、採食記録も疎らである上に、マダガスカルの植物に含まれる化学物質の詳細な分析は少なく、arbutinの機能を推測するのに十分な情報があるとは言えない。キツネザルが採食する植物の化学分析を中心に更なる研究が待たれる。

有胎盤類全体を対象としたTAS2R16の多重配列アライメントと霊長類TAS2R16の

分子系統樹の構築により、282 番のアミノ酸残基が Serine に置換しているのは曲鼻猿類のみであることが明らかになった (図 11)。また、分子モデリングから 262 番残基の関与も見いだされ、S282+F262 の組み合わせを持つのは、キツネザル類のみであることが明らかとなった (図 14)。このことから、キツネザル類全体として arbutin に対して苦味を感じにくくなった可能性が見いだされた。262 番残基は、ヒト TAS2R16 の変異体研究によってリガンド特異性に関わる部位であることが示唆されている[95]。そのため、262 番が Tryptophan に置換しているロリス下目については、282 番は Serine であるものの 262 番の影響が未知数であるため、さらなる研究が必要である。キツネザル類は一般に arbutin の苦味を感じにくい可能性が示されたが、*L. catta* の系統では、282 番に起った系統固有の復帰突然変異 (S282L) によって arbutin の苦味を再度感じるできるようになったと考えられる (図 11)。また、*L. catta* の TAS2R16 は、*E. macaco* や *V. variagata* と比較すると、 β グルコシドの側鎖構造に対する特異性が低く、より多くの β グルコシドによって活性化されることが示唆された (図 3, 5)。多雨林に生息する *E. macaco* や *V. variagata* は、果実食傾向が非常に高い一方で、有刺林などの乾燥地に生息する *L. catta* は、これら 2 種と比べて葉食傾向が強く、貧栄養で二次代謝産物が多く含まれる植物部位 (葉など) を採食する機会が多いと考えられる[88,137]。そのため、*L. catta* は、採食品目の多くが果実である前者 2 種よりも多くの毒物に曝される可能性がある。そこで、TAS2R16 を活性化する苦味物質の種類が広がるように変化したが、毒物の過剰摂取を回避することに繋がり、生存に有利に働いたかもしれない。

2.5.3. arbutin による TAS2R16 のインバースアゴニスト応答とその作用機序

E. macaco 及び *V. variagata* で観察された arbutin によるインバースアゴニスト応答は、TAS2R の中では非常に珍しい現象である。インバースアゴニスト応答を観測するには受容体に構成的活性がある (リガンドによる刺激がない定常状態で一定の活性をもつ) 必要である。構成的活性は GPCR では一般的な現象であり、これまでに 60 以上の構成的活性を持つ野生型 GPCR が見つかっている[138]。しかし、これまでに野生型 TAS2R

で構成的活性を持つ例は知られておらず、ヒト TAS2R4 の変異体で数例見つかっているのみである[139,140]。構成的活性を持たない TAS2R では、インバースアゴニストに対する応答とアンタゴニスト (antagonist: 拮抗剤) に対する応答 (受容体に結合するが何も作用しない) とを区別するのが難しいため、TAS2R のインバースアゴニスト応答がこれまであまり見つかってこなかったと考えられる。ヒト TAS2R の変異体の解析から、構成的活性に関わるアミノ酸残基の多くは、第3細胞内ループ (ICL3) に位置することがわかっている[139,140]。キツネザル TAS2R16 の ICL3 には、いくつかのキツネザル固有のアミノ酸置換が存在するため、これらの残基がキツネザル TAS2R16 の構成的活性に重要なアミノ酸残基である可能性がある。構成的活性をもつ GPCR の多くが神経伝達に関わることが知られているが、TAS2R については当然知見はない。キツネザルでは、構成的活性によって TAS2R16 が関与する苦味反応が馴化している可能性もあるが、行動アッセイでは、細胞アッセイの EC₅₀ より少し高い濃度の salicin には十分な忌避反応を示した。そのため、より定量的な研究が必要ではあるが構成的活性が個体の苦味感覚に大きな影響を与えているとは考えにくい。近年 TAS2R は口腔外でも生体恒常性維持に関わる様々な機能を担っていることが明らかとなっている[141]。味覚に留まらず幅広い角度から生体での TAS2R の機能を調べていくことで、構成的活性を持つ意義を今後明らかにできるかもしれない。

他の GPCR では多くのインバースアゴニストが報告されているが、これまでに見いだされた TAS2R のインバースアゴニストは、ヒト TAS2R4 変異体に対する N α ,N α -bis(carboxymethyl)-L-lysine (BCML) のみである[138,142]。そのため、本研究で見いだされた arbutin は初めて同定された TAS2R の天然インバースアゴニストである。インバースアゴニストやアンタゴニストは、結合すると受容体を不活性化状態に安定化する働きがあるため、TAS2R の構造解析に非常に有用である。実際に多くの GPCR がアンタゴニストやインバースアゴニストを結合した状態で結晶構造が解かれている[143]。一方、TAS2R の結晶構造は未だに解かれておらず、TAS2R-リガンド相互作用に関する研究の多くが、他の GPCR の結晶構造を元にしたホモロジーモデリングを用いている。その

ため、今回の新規インバースアゴニストの同定は、比較的研究が進んでいる TAS2R16 の受容体ーリガンド相互作用研究や結晶構造解析に役立つ可能性がある。TAS2R のインバースアゴニストについても構成的活性と同様に生体での知見が一切ない。インバースアゴニストはアンタゴニスト同様に TAS2R の阻害剤として機能するため、苦味のマスク効果は得られると考えられる。しかし、アンタゴニストとの機能差については、更なる研究が必要である。また、口腔外の TAS2R でインバースアゴニストを受容した際の機能についても同様に検討していく必要がある。

arbutin に対する TAS2R16 の応答様式は、部位特異的変異体解析によって、282 番のアミノ酸残基によって決定されることが明らかとなった。282 番のアミノ酸は、TAS2R16 の TM7 の細胞内側末端に位置している(図 7)。arbutin をはじめとする β グルコシドは、TAS2R16 の膜貫通領域の上部(細胞外側)に結合するため、282 番のアミノ酸変異は、 β グルコシドの結合には直接関与していないと考えられる[94,144]。一方で、この部位は、GPCR の活性化による G タンパク質の結合ポケット形成に重要な部位である[145]。TAS2R が属すると考えられているクラス A の GPCR は、アゴニストの結合による活性化コンフォメーションへの構造変化の際に、TM7 の細胞内側末端が、内側に動くことが知られている(例:ロドプシン、 β_2 アドレナリン受容体、 μ オピオイド受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体) [145–149]。これらのことから、*E. macaco* や *V. variagata* の TAS2R16 では、282 番アミノ酸の変異によって arbutin の結合に伴う TM7 の構造変化の様式が変わり、G タンパク質結合ポケットの形成不全を引き起こしている可能性がある。282 番アミノ酸による G タンパク質と TAS2R の相互作用への影響については、3D モデリングなどを用いたさらなる研究が必要である。

3章 竹食性キツネザルにおける TAS2R16 の機能低下

3.1. 研究の概要

本章では、苦味受容体 TAS2R16 のリガンド応答性と食性の関係を明らかにすることを目的に、TAS2R16 のリガンドである青酸配糖体を多量に含むタケを主食とする 3 種のジェントルキツネザル（ヒロバナジェントルキツネザル *Prolemur simus*, キンイロジェントルキツネザル *Hapalemur aureus*, ハイイロジェントルキツネザル *H. griseus*）を対象として、青酸配糖体を含む β グルコシド 3 種類に対する TAS2R16 の応答を測定し、近縁種のワオキツネザル (*Lemur catta*) と比較した。その結果、ジェントルキツネザルの TAS2R16 は、ジェントルキツネザル間で感受性に差はあるものの、総じて *L. catta* よりも低い感受性を有することが明らかとなった。次に、感受性低下の進化史を明らかにするために、最尤法で推定したジェントルキツネザル全体、*Hapalemur* 属、それぞれの最近共通祖先 (LCA) の TAS2R16 の応答を測定したところ、現生のジェントルキツネザルと *L. catta* の中間的な感受性を示した。そこで、現生ジェントルキツネザル各種がもつ低感受性の主要因たるアミノ酸変異を部位特異的変異体解析で探索した。その結果、*P. simus* と *H. griseus* では、それぞれ種特異的なアミノ酸変異 (144 番と 251 番) が最も低感受性に寄与していることが明らかとなった。これらの結果から、ジェントルキツネザルは総じて青酸配糖体を含む β グルコシドに対してあまり苦味を感じないことが推察され、TAS2R16 が竹食に適した機能に進化していることが見いだされた。また、TAS2R16 の β グルコシド感受性の低下は、ジェントルキツネザル LCA の時点で始まっていた可能性があり、*Prolemur* 属と *Hapalemur* 属が分岐した後にそれぞれの種で種特異的なアミノ酸置換によって並行的に進行したことが示唆された。

3.2. 研究の背景

3.2.1. ジェントルキツネザルの採食生態

ジェントルキツネザル(*Prolemur* 属と *Hapalemur* 属)はタケ類(タケ亜科 Bambusoideae に属する植物)や草本を主食とし、ジャイアントパンダ (*A. melanoleuca*) やレッサーパンダ (*A. fulgens*) と類似の生態的ニッチを持つ特異な霊長類である。また、本種群は彼らと類似した歯の形態や腸内細菌叢構造を持つことが示唆されている[89,107,150–152]。

Prolemur 属には、ヒロバナジェントルキツネザル (*Prolemur simus*) のみが属し、マダガスカル南東部から中東部の多雨林に分布する[67]。本種は、タケ類に特化した食性を持ち、ラヌマファナ国立公園では採食時間の約 95 %を一種のタケ *Cathariostachys madagascariensis* の採食が占める[89,150,151]。本種は、タケの殆どの部位を採食するが、タケノコ (ground shoot) を最も好むため、採食品目は大きな季節変化をみせる。タケノコはその発生が集中する雨季に消費され、タケノコが少なくなってくると葉を並行して利用し、タケノコがほぼ得られない乾季には、タケの稈 (culm) を代替餌として採食する[89,150]。尚、*C. madagascariensis* が乏しい低地林などでは *Valiha diffusa* をはじめとした他のタケ類も利用し、攪乱された森林では生存のために農地の穀物など様々なものを食べる事が観察されている[107,151]。

Hapalemur 属には 5 種が属し、「キンイロジェントルキツネザル (*Hapalemur aureus*)」と「ハイイロジェントルキツネザル (*H. griseus*) と近年までその亜種とされていた 3 種 (キタジェントルキツネザル *H. occidentalis*、ミナミジェントルキツネザル *H. meridionalis*、アラオトラジェントルキツネザル *H. alaotrensis*)」の 2 グループに大別される。いずれもタケ類や草本類を主食とするが、*Prolemur* 属ほど明瞭な食物の季節変化は見られない[89,107]。*H. aureus* は、*Prolemur* 属との共通祖先から *Hapalemur* 属が分岐した後、現生種の中で一番初めに分岐した種である。*P. simus* と同様にタケ類のスペシャリストと考えられており、マダガスカル南東部と中南部の多雨林のごく限られた地域に生息する[67]。本種も採食時間の約 90 %をタケ類 (80 %程度が *C. madagascariensis*)

の採食が占め、利用可能性 (availability) の季節変動が比較的少ない枝芽 (branch shoot) や若葉の基部 (young leaf base) を主に利用し、雨季にはタケノコも利用する[89]。また、稀ではあるが果実も利用する。*H. griseus* は、マダガスカル南東部から中東部に広がる多雨林に加え、西部の乾燥林にも分布する[67]。生息地によって主食とするタケ類の種類は異なるものの、どの地域でも採食時間の約 80~90% をタケ類の採食が占め、枝芽や若葉の基部を主に利用する[89,105,107,153]。また、果実が豊富な雨季には果実もわずかに利用する。本種は、*H. aureus* や *P. simus* と比べて柔軟な食性をもつと考えられており、非タケ類植物も比較的利用しており、40 種類以上の植物を利用する[107]。近年まで *H. griseus* の亜種とされていた *Hapalemur* 属の残りの 3 種も *H. alaotrensis* 以外はタケ類の採食が確認されている[154,155]。さらに、*H. griseus* のような食性の柔軟性も見られる。例えば、島南東部に生息する *H. meridionalis* は、タケ類がほとんどないマンデナ保護区 (Mandena Conservation Area) の攪乱された沿岸林や湿地帯にも生息しており、当地ではイネ科 (Poaceae) とカヤツリグサ科 (Cyperaceae) の地上性草本を主に利用していることがわかっている[91,156,157]。一方、タケ類が生育しないアラウチャ湖 (Lake Alaotra) の湿地帯にのみ生息する *H. alaotrensis* は、イネ科 (Poaceae) とカヤツリグサ科 (Cyperaceae) の草本を主に採食する[92,106]。

3.2.2. 植物中の青酸化合物と苦味

ジェントルキツネザルが採食するタケ類には青酸化合物を含んでいるものがある[89,93,105,158–160]。中でも、ラヌマファナ国立公園周辺に同所的に生息する 3 種のジェントルキツネザル (*P. simus*、*H. aureus*、*H. griseus*) が年間採食の約 80% を依存するタケ類である *C. madagascariensis* は、植物界でも有数の高濃度青酸化合物を含む種である[93,160]。こうしたタケ類をはじめとして植物の中には、青酸化合物 (シアノ基-C≡N をもつ化合物) を植物食者に対する被食防御物質として用いるものがある[161,162]。青酸化合物含有植物は、細胞の損傷に反応して青酸化合物から酵素反応によってシアン化水素 (HCN) を放出し、これによって捕食者は急性青酸中毒を引き起こす。こうした植

物が産生する青酸化合物の多くは、青酸配糖体（シアノ基を含む分子をアグリコンとする配糖体）である。例えば、キャッサバには linamarin、linustatin、lotaustralin、タケ類には taxiphyllin、linamarin、lotaustralin、アーモンドには amygdalin、ユーカリには prunasin が含まれている[163–165]。こうした青酸配糖体の一部は、TAS2R16 が特異的に受容するリガンドとして知られている[96]。実際に、キャッサバの青酸配糖体濃度とヒトが感じる苦味強度には高い相関があり、動物はこの苦味によって引き起こされる生得的忌避反応によって青酸中毒を回避していると考えられる[166]。しかし、ジェントルキツネザルは青酸配糖体を多量に含むタケ類を主食としているため、青酸配糖体の苦味を感じにくいことが予想される。

3.2.3. 研究の目的

2章で、果実中心食性のキツネザル（キツネザル科）は、狭鼻猿類と同様に β グルコシドを TAS2R16 で受容し、苦味を感じ、忌避行動を引き起こすことを明らかにした。そこで、3.2.1 項で得た予想に対して、「ジェントルキツネザルは竹食への適応として、TAS2R16 が青酸配糖体を含む β グルコシドに対して感受性が低くなり、タケ類の苦味を感じにくくなった」という仮説を立てて検証することとした。本研究では3種のジェントルキツネザル（*P. simus*、*H. aureus*、*H. griseus*）について、培養細胞を用いた機能解析と分子系統解析を用いて TAS2R16 の β グルコシドに対する応答を解析し、最も近縁な果実中心食性のキツネザルであるワオキツネザル（*L. catta*）と比較解析した。

3.3. 研究の方法

3.3.1. ジェントルキツネザル TAS2R16 の塩基配列決定

公共データベース NCBI から *P. simus* を含む 9 種のキツネザルの全ゲノムアセンブリを取得し、Hayakawa *et al.*, 2014 に従って、TAS2R16 配列を決定した[21,109,167–169]。また、*H. aureus* と *H. griseus* の TAS2R16 配列は、Kent State University の Morgan E. Chaney 氏と University of Arizona の M. Elise Lauterbur 博士が構築した未発表の全ゲノムアセン

ブリから同様の方法で決定した（取得したゲノムアセンブリは表 5 を参照）。取得した配列のオーソロジーは、MEGA X を用いて近隣接合法で作成した遺伝子系統樹（ブートストラップリサンプリングは 1000 回）とヒトゲノムアセンブリ GRCh38.p13.に対する相互 tblastn 検索によって確認した（図 15） [170]。ジェントルキツネザル 3 種のゲノムアセンブリに対する tblastn 検索では、強く一致する配列が各アセンブリから一つだけしか得られなかったことから、ジェントルキツネザルの *TAS2R16* オーソログはゲノム中にシングルコピーで存在すると推察された。よって、ジェントルキツネザルの *TAS2R16* の機能解析には、ここで得られた各種につき 1 つの *TAS2R16* オーソログを用いた。

3.3.2. *TAS2R16* 発現ベクターの構築

発現ベクターに組み込む *P. simus*、*H. aureus*、*H. griseus* の *TAS2R16* 配列は、gBlocks Gene Fragment サービス（Integrated DNA Technologies, Coralville, IA）で合成した *TAS2R16* 配列には予め C 末端にエピトープ配列 1D4 をコードする塩基配列を付加した。そして、2.3.2 項と同様に、1D4 を付加した *TAS2R16* 配列と膜移行促進シグナル配列 sst3 を In-Fusion HD Cloning Kit（Clontech）を用いて pEAK10 ベクター（Edge Biosystems Inc.）に組み込んだ。ダイレクトシーケンスによって正しい配列で組み込まれていることを確認し、正しい配列を持つプラスミドを含む大腸菌株を、アンピシリンを加えた 50mL の 2xYT 培地（BD）で一晩振盪培養し、プラスミド（発現ベクター）を QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit（QIAGEN）を用いて精製した。発現ベクターの濃度は、2 章と同様に分光光度計を用いて定量した。変異体の発現ベクターは、野生型の発現ベクターを元にして、Quikchange Lightning Multi Site-directed Mutagenesis Kit（Agilent Technologies）と Overlap Extension PCR 法によって作成した。変異部位は、ダイレクトシーケンスによって正しく変異導入できていることを確認した。その後、野生型発現ベクターと同様に、正しい変異体プラスミドを含む大腸菌株を振盪培養したのち、QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドを精製し、濃度を分光光

度計で定量した。*L. catta* の発現ベクターは、2章で作成したものを用いた。

3.3.3. 培養細胞を用いた TAS2R16 のカルシウムアッセイ

2.3.3 項と同様の手続きによって培養した HEK293T 細胞に、ジェントルキツネザル 3 種と *L. catta* の TAS2R16 発現ベクターと *Gα16/gust44* 発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入し、2.3.3 項と同様の手続きでカルシウムアッセイを行った。リガンド（括弧内は、希釈列の最終濃度）には、salicin（0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20, 40 mM）、arbutin（0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0, 10 mM）、linamarin（0, 0.25, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 mM）を用いた。salicin と arbutin は、Sigma-Aldrich から、linamarin は Santa Cruz Biotechnologies（Dallas, TX）から購入した。カルシウム指示薬は、salicin 及び arbutin の計測には、FLIPR Calcium 4 を、linamarin の計測には、FLIPR Calcium 5（Molecular Devices）を用いた。濃度応答曲線の推定は、2.3.3 項と同様に R 上で動作する `drc` パッケージで実施した。閾値濃度（threshold concentrations; TH）を $\Delta F/F$ 値が 0 mM の $\Delta F/F$ よりも Dunnett's test で有意に高くなる（ $p < 0.05$ ）最低濃度と定義した。また、極大シグナル強度（maximal signal amplitudes; A_{max} ）を計測濃度域内で最大の $\Delta F/F$ 値と定義した。得られたパラメータの比較には、BH 補正を行った両側 Welch's t test を用いた。

3.3.4. 分子系統解析と祖先配列推定

3.3.1 項で同定したジェントルキツネザル 3 種の TAS2R16 配列と 2 章で用いたキツネザル科 4 種（*L. catta*、*E. macaco*、*E. fulvus*、*V. variagata*）の TAS2R16 配列を用いて、MAFFT v.7 でアミノ酸配列の多重配列アライメントを作成した。これを基に、最尤法で遺伝子系統樹を MEGA X を用いて作成した。アミノ酸置換モデルには、MEGA X のモデル選択プログラムによって AICc（corrected Akaike's information criterion）値が最小だった JTT+F+G モデルを採用した。ジェントルキツネザル LCA 及び、*Hapalemur* 属 LCA の TAS2R16 アミノ酸配列は、MEGA X を用いて最尤法による祖先配列推定によって決定した。

3.4. 研究の結果

3.4.1. ジェントルキツネザル TAS2R16 の β グルコシド感受性

ジェントルキツネザル 3 種 (*P. simus*, *H. aureus*, *H. griseus*) の TAS2R16 について β グルコシド (linamarin, salicin, arbutin) に対する応答をカルシウムアッセイで計測し、*L. catta* の TAS2R16 機能と比較を行った。なお、テストしたキツネザルの TAS2R16 アミノ酸配列は、どの組み合わせでも 90%以上の一致率であった。それぞれの配列と一致率は表 6 の通りである。

カルシウムアッセイの結果、ジェントルキツネザル 3 種の TAS2R16 は、3 種類のリガンドいずれに対しても *L. catta* の TAS2R16 よりも低い感受性を示した (図 16)。linamarin については、*P. simus* 以外の 2 種で濃度依存的応答が見られ、2 種とも閾値濃度 (TH) が *L. catta* よりも高い 10 mM であった (表 7)。また、極大シグナル強度 (A_{max}) も *L. catta* よりも有意に低い値であった (図 16a、表 7)。salicin については、*H. griseus* 以外の 2 種で濃度依存的応答が見られ、閾値濃度 (TH) が *L. catta* よりも高かった。また、 A_{max} も *L. catta* よりも有意に低い値であった (図 16b、表 7)。さらに、*H. aureus* では EC_{50} が推定できたが、*L. catta* よりも有意に高い値であった (図 16b、表 7)。arbutin については、*L. catta* では濃度依存的応答が確認できたが、ジェントルキツネザル 3 種では濃度依存的な応答が見られなかった (図 16c、表 7)。これらの結果から、ジェントルキツネザルの TAS2R16 が近縁の *L. catta* よりも低い感受性を持つことが示され、これによって青酸配糖体を含む β グルコシドの苦味を感じにくいことが推察された。

3.4.2. ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 の β グルコシド感受性

ジェントルキツネザル TAS2R16 の低感受性化の進化史を明らかにするために、ジェントルキツネザル 3 種の LCA の TAS2R16 (anc-Bamboo lemur TAS2R16) 及び、*Hapalemur* 属 LCA の TAS2R16 (anc-Hapalemur TAS2R16) の配列を最尤法で推定し、カルシウムアッセイで β グルコシドに対する応答を計測した。推定した LCA の TAS2R16 は、249 番

と 282 番のアミノ酸残基の推定確率が 90%未満 (L249 : 84.5%、S282 : 85.4%) であったため、これらの残基については最も推定確率が高いアミノ酸を採用し、機能解析に用いた。推定した LCA の TAS2R16 の全長配列は、図 17 の通りである。

カルシウムアッセイの結果、anc-Bamboo lemur TAS2R16 は、linamarin については、閾値濃度 (TH) は *L. catta* よりも高いものの、 A_{max} には両者で有意な差は認められなかった (図 18a、表 8)。salicin については、閾値濃度 (TH)、 EC_{50} いずれも *L. catta* よりも大きな値を示した (図 18b、表 8)。arbutin については、 EC_{50} は *L. catta* との間に有意な差は認められなかったものの、閾値濃度 (TH) は高く、 A_{max} は有意に低かった (図 18c、表 8)。anc-Hapalemur TAS2R16 の 3 種類の β グルコシドに対する感受性は、anc-Bamboo lemur TAS2R16 とほぼ同程度で、いずれのパラメータ (TH、 A_{max} 、 EC_{50}) でも両者の間に有意な差は見られなかった。また、*L. catta* と比較すると、linamarin と salicin については、閾値濃度 (TH) と EC_{50} は高く、 A_{max} は有意に低かった (図 18a-b、表 8)。arbutin については、anc-Bamboo lemur TAS2R16 と *L. catta* のパラメータの関係と同様であった (図 18c、表 8)。LCA の TAS2R16 と *L. catta* TAS2R16 における arbutin に対する応答の差異は、2 章で発見した 282 番のアミノ酸残基の差が関係している可能性がある。さらに現生のジェントルキツネザルと LCA の TAS2R16 の β グルコシド感受性について、パラメータを比較すると、すべての β グルコシドについて、どちらの LCA の TAS2R16 も *P. simus* と *H. griseus* よりも高い感受性を示した (表 9)。*H. aureus* と比較すると、arbutin については LCA の TAS2R16 の方が高い感受性を示し、残りの 2 つの β グルコシドについては、いずれのパラメータでも有意な差は認められなかった (表 9)。これらの結果から、ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 は、現生のジェントルキツネザルと *L. catta* の中間的な感受性を有していたことが示された。

3.4.3. β グルコシド低感受性の原因アミノ酸置換の同定

ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 は、現生のジェントルキツネザルと *L. catta* の中間的な感受性を示したが、現生のジェントルキツネザルは、LCA の TAS2R16 と比

較して極めて低い β グルコシド感受性を有している。そこで、この超低感受性を生み出す原因アミノ酸置換を同定するために、ジェントルキツネザル固有のアミノ酸置換部位を *L. catta* の残基に置換したジェントルキツネザル TAS2R16 の 1 アミノ酸変異体を作成し、salicin に対する応答で原因変異をスクリーニングした。キツネザル科の現生 5 属すべてを含む 7 種 (*P. simus*、*H. aureus*、*H. griseus*、*L. catta*、*Eulemur macaco*、*E. fulvus*、*Varecia variegata*) の TAS2R16 アミノ酸配列を比較し、合計 13 か所のジェントルキツネザル特異的なアミノ酸置換を同定した (図 19)。salicin を用いたスクリーニングの結果、13 個の 1 アミノ酸変異体のうち *P. simus* の 144 番のアミノ酸置換体と *H. griseus* の 251 番のアミノ酸置換体が、salicin 応答を野生型と比較して劇的に回復させた (図 20a-b, 表 10)。これ以外の残基では、*P. simus* の 140 番のアミノ酸置換や *H. griseus* の 147 番、178 番のアミノ酸置換で感受性の回復がわずかに見られた (図 20c, 表 10)。

続いて、144 番と 251 番のアミノ酸置換を加えた LCA の TAS2R16 変異体 (anc-Bamboo lemur TAS2R16-S144L、anc-Hapalemur TAS2R16-L251S) を作成し、3 種類の β グルコシドに対する応答を評価した。その結果、これらの変異体は、いずれの β グルコシドに対しても応答を低下させ、現生のジェントルキツネザル TAS2R16 より近い感受性を示した。anc-Bamboo lemur TAS2R16-S144L は、linamarin に対する応答をほぼ消失した (図 21a, 表 11)。salicin については、anc-Bamboo lemur TAS2R16 と比較して、閾値濃度 (TH) と EC_{50} が増大し、 A_{max} が優位に減少した (図 21b, 表 11)。また、arbutin についても閾値濃度 (TH) と EC_{50} の増大が認められた (図 21c, 表 11)。anc-Hapalemur TAS2R16-L251S は、anc-Hapalemur TAS2R16 と比較して linamarin に対する応答が減少傾向にあった (A_{max} : Welch's t test $p=0.057$) (図 21, 表 11)。salicin については閾値濃度 (TH) と EC_{50} が増大し、 A_{max} が優位に減少した (図 21e, 表 11)。また、arbutin に対する応答はほぼ消失した (図 21f, 表 11)。144 番のアミノ酸置換だけでは *P. simus* の salicin 応答を完全に模倣することはできなかったが、これは残りの *P. simus* 固有の変異の複合的な効果によるものである可能性がある。これらの結果から、*P. simus* が持つ β グルコシドに対する超低感受性は、*Hapalemur* 属と分岐した後に独自に獲得されたものであることが示され

た。また、*H. griseus* についても同様に、種固有のアミノ酸置換によって超低感受性を実現させていることが明らかとなった。

3.5. 考察

3.5.1. ジェントルキツネザルにおける TAS2R16 の機能低下の意義

カルシウムアッセイによる TAS2R16 の機能解析によって、ジェントルキツネザルの TAS2R16 は、 β グルコシドに対して総じて低い感受性を持つことが明らかとなった (図 16)。遺伝子重複により複数の *TAS2R16* パラログをもつコウモリ (*Myotis* 属) でも、一部のパラログが β グルコシド感受性を喪失している [171]。しかし、他の残ったパラログが β グルコシド感受性を残しており、*Myotis* 属は個体としての β グルコシド感受性は保持していると考えられる [171]。一方、ジェントルキツネザルでは、他の霊長類と同様に *TAS2R16* はシングルコピーの遺伝子である。 β グルコシドが TAS2R16 を特異的に活性化することは、霊長類では分子と行動の両面から支持されており、2 章で実施したジェントルキツネザルに近縁な *E. macaco* の行動アッセイでも TAS2R16 の機能と摂食行動に明瞭な対応が見られた [22,65,66]。これらのことから、ジェントルキツネザルは、個体の感覚レベルでも β グルコシドの苦味を比較的感じにくいことが示唆された。特に、TAS2R16 がテストしたいずれの β グルコシドにも反応しなかった *P. simus* は殆どこれらの苦味を殆ど感じないと推察された。

β グルコシド感受性は *P. simus* と *H. griseus* で低く、*H. aureus* で高かったが、野生下での青酸摂取量は *P. simus* と *H. aureus* で多く、*H. griseus* では比較的少ない [172]。つまり、ジェントルキツネザル 3 種における TAS2R16 の β グルコシド感受性と個体の青酸摂取量には明確な相関は見られない。この差が種間の食物選択戦略に関わるのか、もしくは 3 種の中で最も感受性が高い *H. aureus* 程度の感受性でも十分苦味を軽減できているのかは、本研究からは判断できないため、実際のタケに含まれる配糖体と TAS2R16 の関係に関して研究をさらに進める必要がある。

ジェントルキツネザルで見いだされた TAS2R16 の感受性低下に似た TAS2R の機能低下現象がジャイアントパンダの集団内でも見られる。中国の秦嶺（Qingling）に生息するパンダは他地域の個体よりもタケ類の葉をよく採食するが、この集団の多くの個体は、タケ類に含まれる quercitrin を受容する TAS2R20 の低感受型ハプロタイプを持っており、この低感受性が quercitrin リッチなタケ類の採食を可能にしていると考えられている[173]。こうしたタケ類の採食に関連した TAS2R の機能低下が系統的に離れた別種でも見られることから、今回ジェントルキツネザルで見出された TAS2R の機能低下は、竹食のための適応的な形質であることが推察された。ただし、*P. simus* が実際に採食しているタケ類の一種である *Bambusa vulgaris* には、taxiphyllin という青酸配糖体が含まれていることが知られているが、最も主要な食物源である *Cathariostachys madagascariensis* に含まれる青酸配糖体の構造はまだ明らかになっていない[159]。そのため、TAS2R16 の機能とジェントルキツネザルが実際に摂取している青酸配糖体との関係のより詳細な理解には、タケ類の抽出液や精製した青酸配糖体を用いた機能解析実験が必要である。

3.5.2. ジェントルキツネザルにおける TAS2R16 の機能進化

3.4.2 項の実験によって、ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 が、現生の *L. catta* とジェントルキツネザルの中間的な β グルコシド感受性を持っていたことが明らかになった（図 18）。この感受性は、2 章で確認した *E. macaco* と *V. variagata* の salicin 感受性（*E. macaco* : $EC_{50} = 2.3$ mM, *V. variagata* : $EC_{50} = 3.8$ mM）と同じかやや低い程度である。こうした機能特性から、ジェントルキツネザルの共通祖先は、現生の *L. catta* や果実食の *E. macaco*・*V. variagata* に近い、もしくはこれらの種と現生ジェントルキツネザルとの中間程度の苦味感覚を有していた可能性が示唆された。また、 β グルコシド感受性の低下が、ジェントルキツネザル LCA の時点で始まっていた可能性も示された。

部位特異的変異体解析では、*P. simus* では 144 番、*H. griseus* では 251 番の種特異的なアミノ酸置換によって、極めて低い β グルコシド感受性が生み出されていることが明らか

かとなった (図 20)。このことから、*P. simus* は *Hapalemur* 属との分岐後に 144 番のアミノ酸置換 (S144L) によって独自に β グルコシドに対する超低感受性を獲得したことが示された (図 21)。また、同時に *Hapalemur* 属内での β グルコシド感受性の種間差は、251 番のアミノ酸残基の違いによって引き起こされていることも明らかになった。これらの結果から、 β グルコシド感受性は、2 属が分岐してからそれぞれの系統独自に低下していったことが示唆された。

3.5.3. 種固有のアミノ酸置換による β グルコシド感受性低下の作用機序

共同研究者の Fabrizio Fierro 博士と Masha Y. Niv 博士が実施したホモロジーモデリングとドッキングシミュレーションによって、今回発見した 144 番、251 番のアミノ酸残基は、いずれも結合したリガンドには直接接していないことが示唆された (図 22)。従って、これらの残基の変異は、リガンドの結合ではなく、受容体の活性化やリガンドの結合部位へのアクセスに影響を与えていると考えられた。

144 番のアミノ酸は、第 2 細胞外ループ (eECL2) と第 4 膜貫通領域 (TM4) の境界に位置している。144 番のアミノ酸の β グルコシド感受性への影響は、ヒト TAS2R16 の変異体解析で明らかにされており、144 番の Serine (S144) を Leucine または Alanine に置換すると *P. simus* と同様にいくつかの β グリコシドに対する感受性が減少する [95]。ヒト TAS2R16 における分子動力学シミュレーションでは、144 番目のアミノ酸 (S144) は、細胞外水分子と相互作用しており、N148、Q151、E158 などの ECL2 に位置する他の親水残基と水素結合を形成することが示されている [144]。Q151 と E158 は、ヒトとキツネザルの間で保存されている。148 番アミノ酸はヒトでは Asparagine (N148) で、キツネザルでは Lysine (K148) であるが、K148 も親水性であり S144 と水素結合を作ることが可能である。そのため、*P. simus* では親水性の Serine が疎水性の Leucine へ置換したことによって、ECL2 の立体構造に影響を与え、リガンドの結合部位へのアクセス性に変化が生じた可能性が考えられる。

251 番のアミノ酸は、ECL3 と TM6 の境界に位置しており、ヒトを含む狭鼻猿類

TAS2R16 の 247 番のアミノ酸と対応する。ニホンザル (*M. fuscata*) の TAS2R16 は、ヒト、チンパンジー (*Pan troglodytes*)、ラングール (*Trachypithecus leucocephalus*) の TAS2R16 よりも β グルコシド感受性が低いことが知られているが、これは 247 番のアミノ酸が Leucine から Methionine に変異していることが一因である[129]。このように、 β グルコシド感受性に影響を与えうる 251 番 (狭鼻猿類の 247 番) のアミノ酸置換は、霊長類の進化過程で複数回独立に起こっている。尚、当該残基のアミノ酸置換の β グルコシド感受性への影響は、*H. griseus* での変異 (L251S) の方が *M. fuscata* よりも大きいと考えられる[66,129]。また、ホモロジーモデルでは、251 番のアミノ酸は、ECL2 と近接している。つまり、当該残基の性質が疎水性 Leucine から親水性 Serine に変異したことで、ECL2 との相互作用様式が変化し、*P. simus* の 144 番と同様にリガンドのアクセス性に影響を与えている可能性がある。

3.5.4. ジェントルキツネザルのタケ類への食性特殊化時期の検討

味覚受容体の機能減退や偽遺伝子化は、生態や食性適応との緊密な関係にあることが様々な研究で示唆されてきた[50,55,58,64]。とりわけ、並行的な味覚受容体の喪失は、並行的な生態・食性適応の痕跡と考えられることも多い。例えば、ジャイアントパンダとレッサーパンダは、並行的な食性特殊化の過程で旨味受容体遺伝子 *TAS1R1* をそれぞれ異なる塩基長変異によって独立に偽遺伝子化している[42]。また、アザラシ類 (Phocidae) とオットセイ類 (Otarioidea) でも *TAS1R* 遺伝子をそれぞれの系統で独立に喪失しており、この 2 グループがそれぞれ独自に二次的に水棲適応した可能性と対応している[49]。今回のジェントルキツネザル場合は、*TAS2R16* は偽遺伝子化していないものの、*Prolemur*、*Hapalemur* それぞれの属内で固有の変異による大幅な機能減退が見られた。では、ジェントルキツネザルは、個々の系統で別々に高濃度青酸植物に適応したのだろうか。

ジェントルキツネザル 2 属は、どちらも繊維質のタケ類を処理するのに特化した歯の形態を共有して持っている[89,174,175]。一方で、食物の消化管通過時間 (gut passage time,

GPT)には大きな差がある。*P. simus*が9時間ほどかかるのに対して、*Hapalemur*属では約3倍遅く通過する。ゆっくりとした消化は解毒戦略の一つとされるが、この解毒戦略は2属では完全には共有していないと考えられている[172,176–179]。現在、ジェントルキツネザルの祖先がどのように進化したのかは、産出化石がないため化石記録からはわからない。また、確度の高い祖先形質推定の結果も得られていない[160]。このような背景から未だ高濃度青酸含有タケ類への適応がジェントルキツネザルの共通祖先で一度起こったのか、系統ごとに別々に起こったのかは明らかではない。今回の研究では、ジェントルキツネザルの共通祖先は現生種ほど低い β グルコシド感受性を持たず、一部の果実食キツネザルと大きな差は無いこと、そして、3種のうち2種では独立に劇的な感受性低下を獲得していることが明らかとなった。しかし、この結果は、青酸含有タケへの適応時期を一意に強く示唆するようなものではなかった。そのため、今後は、食性に関わる遺伝子を包括的に比較し、祖先形質に迫るような研究の必要性が高まったと考えられる。

3.5.5. 青酸含有植物への適応に対する苦味感覚適応以外の必要要件

低苦味感受性は、苦い、すなわち毒性が疑われる植物を常食するのに有利にはたらくと考えられる。しかし、こうした毒性のある植物を摂取するためには、味覚の適応だけではなく、解毒機構の改良も欠かせない。体内に吸収された青酸化合物の代謝には rhodanese などの酵素が関わっている。竹食のジャイアントパンダについて、肝臓や腎臓での rhodanese の発現や酵素活性が調べられており、同じ食肉目で肉食のイエネコ (*F. catus*) よりも高く、アナウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) より低いことがわかっている[180]。ジェントルキツネザルでは青酸代謝関連酵素の研究は今のところ存在しないが、チオシアン酸 (thiocyanate) などのシアン誘導体がジェントルキツネザルの尿中に見られることがわかっており、摂取した青酸配糖体が消化管で吸収され、rhodanese などの酵素によって低毒性の誘導体に変換されていることが示唆されている[172]。そのため、ジャイアントパンダのような青酸代謝関連酵素の適応が、ジェントルキツネザルでも見られる

可能性がある。そこで、rhodanese をはじめとした青酸代謝関連酵素の進化研究を苦味受容体研究に組み合わせて、ゲノム、タンパク質それぞれのレベルから詳細に調べていくことで、ジェントルキツネザルの進化史の解明につながると考えられる。

4章 総合考察

4.1. 研究全体の要約と意義

本研究では、「①霊長類における苦味受容体のリガンド応答性の進化傾向の解明」と「②苦味受容体のリガンド応答性と食性の関係解明」の2つの課題を設定し、キツネザル科霊長類の TAS2R16 の機能を分子と行動の両面から調査した。

まず、果実中心食性のキツネザル科3種 (*L. catta*、*E. macaco*、*V. variegata*) について、5種類の β グルコシドに対する TAS2R16 の応答を、培養細胞を用いた機能解析系によって計測した。その結果、*L. catta* TAS2R16 は、すべての β グルコシドに対して活性化する一方で、*E. macaco* と *V. variegata* TAS2R16 は、salicin に対しては活性化するが、arbutin などのアグリコン側鎖が芳香環のパラ位にある β グルコシドに対して不活性化することを発見した。また、食物選択アッセイにより、*E. macaco* が、salicin を忌避する一方で arbutin は忌避しないことを確認し、TAS2R16 の機能が摂食行動に大きく寄与していることを明らかにした。そして、部位特異的変異体解析と分子系統解析により、キツネザル科3種で見られた arbutin 応答の差が、曲鼻猿類固有の282番アミノ酸の置換に由来すること、そして、*L. catta* の系統で同残基に復帰突然変異が起こり、真猿類のような β グルコシド感受性を再獲得したことを発見した。これらの結果から、種間差はあるものの曲鼻猿類でも TAS2R16 が β グルコシド応答性を持つことが示され、TAS2R16 のリガンド応答性は、霊長類全体で保存的であることが示唆された。

次に、キツネザル科の中でも竹食に特化したジェントルキツネザル3種 (*P. simus*、*H. aureus*、*H. griseus*) の TAS2R16 の β グルコシド応答を、培養細胞を用いた機能解析によって評価し、近縁種の *L. catta* と比較した。その結果、ジェントルキツネザル3種は、総じて *L. catta* よりも低い感受性を持っていることを発見した。また、ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 配列を推定し、機能解析を行うことで、TAS2R16 の機能進化史の解明を試みた。その結果、ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 は、現生の *L.*

catta とジェントルキツネザルの中間的性質を持つことを発見した。このことから、ジェントルキツネザル系統における TAS2R16 の機能低下は LCA の段階で始まっていた可能性を示した。さらに、種固有のアミノ酸置換部位に対する変異体解析により、現生種が持つ LCA の TAS2R16 よりも低い β グルコシド感受性は、*P. simus* と *H. griseus* のそれぞれの種で独自に獲得されたことを発見した。これらの結果から、ジェントルキツネザルが進化の過程で青酸配糖体を多量に含むタケ類の摂食に適した苦味感覚を獲得した、すなわち青酸配糖体の苦味を感じにくくなったことが示唆され、種の食性適応に伴って苦味受容体のリガンド感受性が適応進化したものと考えられた。

本研究は、これまであまりわかっていなかった苦味受容体のリガンド応答性の保存的進化の実態を明らかにした研究である。ヒトとマウスの間では、各苦味受容体のリガンドの一致度はあまり高くはないことが知られていたが、2章の研究によって、少なくとも霊長類という分類群の範囲では、苦味受容体のひとつ TAS2R16 の受容分子の種類は保存的であることを示した。霊長類全体でこうしたリガンド応答性の保存的傾向が示されたのは今回の TAS2R16 が初めてであり、味覚進化研究の発展に寄与するものである。また、特定のタケ類に特殊化した種に着目し、タケ類に含まれる苦味物質を受容する苦味受容体の機能が近縁種と異なることを見出した3章の研究は、苦味受容体のリガンド応答性の進化が霊長類の食性適応に重要な要素であることを示す例であり、多様な食性獲得を実現した霊長類の味覚の進化基盤解明の一助となる意義のある研究である。

4.2. 苦味受容体のリガンド応答性の保存的進化

先述した通り、ヒトとマウスの苦味受容体のリガンドの種類は一對一オーソログ間でさえ保存性は高くない[22,23]。しかし、本研究で少なくとも霊長類の範囲では TAS2R16 のリガンドの種類は進化的に保存されていることが示された。また、近年の研究によって、霊長類と齧歯類が属する真主齧上目の姉妹群であるローラシア獣上目に属するコウモリ数種の TAS2R16 の機能解析結果が報告され、salicin 及び arbutin 感受性を持つことが明らかになった[171]。従って、TAS2R16 における β グルコシド感受性は、北方獣類

(真主齧上目+ローラシア獣上目) (Boreoeutheria) で広く見られる形質である可能性が高まった。TAS2R16 は、有袋類と分岐した後、有胎盤類の共通祖先で起こった遺伝子重複で誕生し、鱗甲目 (Pholidota) や食肉目 (Carnivora) を除く多くの哺乳類で機能的な配列が保持されている[21,50]。また、多くの有袋類(Marsupialia)でも重複前の TAS2R705 (有胎盤類 TAS2R16・TAS2R62 と一対多オーソログの関係) が機能的な配列で保持されており、単孔類 (Monotremata) であるカモノハシ (*Ornithorhynchus anatinus*) やハリモグラ (*Tachyglossus aculeatus*) にもオーソロジーは不明瞭なものシンテニーが保存された TAS2R705 に系統的に近い TAS2R 群が存在する[181,182]。TAS2R16 が受容する β グルコシドには、前述のように植物の主要な被食防御分子であるシアン化水素 HCN の貯蔵形態である青酸配糖体が含まれる。青酸配糖体は、植物がその進化の過程で古くに獲得した被食防御分子である。現在、シダ植物、裸子植物、被子植物に跨る 130 科 2650 種以上の種から見つかっており、植物の青酸配糖体合成能力の起源は、少なくとも 3 億年前に遡ると考えられている[183]。また、分子系統解析や化石記録によると、現生哺乳類を含む単弓類 (Synapsida) と現生爬虫類を含む竜弓類 (Sauropsida) の分岐時期 (羊膜類の LCA) は 3 億 1000 万年前付近 (石炭紀後期 late Carboniferous) である [184,185]。そのため、哺乳類誕生の初期から青酸配糖体が含まれる植物が環境中に存在していた可能性は高く、TAS2R16 オーソログによる青酸配糖体をはじめとした β グルコシド感受性は哺乳類誕生初期にすでに存在していた非常に原始的な感覚であった可能性もある。この仮説を証明するには、ローラシア獣上目でのコウモリ以外の種での検証に加えて、アフリカ獣上目 (Afrotheria) や有袋類、単孔類での機能解析が必要である。

本研究により TAS2R16 はリガンド応答性が保存的進化をしていることが明らかとなったが、TAS2R のリガンド応答性は、TAS2R16 や TAS2R38 のようにリガンドの構造に対して特異性があるものから TAS2R10 や TAS2R14 のようにリガンド構造に依らず多様な分子を受容するものまで様々であるため、個々の TAS2R 毎にリガンド応答性の進化傾向が異なっている可能性がある。また、TAS2R 遺伝子レパートリーのサイズもリガンド応答性と関連しており、レパートリーサイズが大きい種では受容リガンドがごく限

られた TAS2R (narrowly-tuned TAS2R) が見られる一方、レパートリーサイズが小さい種では広範なリガンドを受容する TAS2R (broadly-tuned TAS2R) が大半になる傾向がある[23,186]。そのため、各種が持つ受容体のレパートリーとの関連も併せて検討していく必要がある。従って、TAS2R のリガンド応答性の進化傾向の全容を理解するためには、リガンド受容パターンが異なる TAS2R について幅広い種を対象とした個別の知見をさらに蓄積していくことが必要である。

4.3. キツネザル科から見る苦味受容体の機能進化と食性

本研究で、ジェントルキツネザルの TAS2R16 は、近縁のキツネザル科と比べて β グルコシド感受性が低く、竹食に適した形質に進化していることを明らかにした。これは、機能を喪失することが適応的であるという less-is-more 現象のひとつかもしれない[187]。葉食に特化したコロブス亜科 (Colobinae) でも TAS2R38 において less-is-more を示唆する現象が食性との関連で報告されている。コロブス亜科の TAS2R38 は、コロブス亜科の共通祖先から段階的に獲得されたアミノ酸置換によって、姉妹群のオナガザル亜科 (Cercopithecinae) の *Macaca* 属よりも低い PTC 感受性を獲得している[63,64]。これは、葉の苦味を感じにくくすることが、葉食という特殊化した食性に対して適応的な形質であるためと考察されている。また、哺乳類の集団間の遺伝子頻度の差からも同様の味覚に関連した less-is-more 現象を示唆する報告がある。ニホンザル (*M. fuscata*) では、紀伊半島集団で約 13000 年前に出現した TAS2R38 の偽遺伝子が正の選択を受けて当地で急速に頻度を上げている[188]。ここでは、TAS2R38 のリガンドとなる分子を含む柑橘類のタチバナ (*Citrus tachibana*) やアブラナ科栽培種の当地での急激な増加が、これらの苦味を感じにくい個体の適応度を上げたことが一つの可能性として提示されている。また、ジェントルキツネザルと同様に竹食であるジャイアントパンダでも集団間の食物の違いと関連した地域特有の TAS2R の機能低下型ハプロタイプが見られる。TAS2R20 (以前は T2R49 と呼ばれていた) が秦嶺 (Qinling) 集団で正の選択を受けており、A52V と Q296H の変異が拡大している[189]。この変異は、タケに含まれる quercitrin 感受性を

低下させる[173]。当地の個体は他地域の個体と比べて多くのタケ類を摂取することが知られており、この感受性低下が竹食に有利に働き、他地域個体よりもタケ類を好んで食べる要因になっていると考察されている。このように、葉やタケ類といった潜在的に毒性を持つ苦味物質 (β グルコシドやアルカロイド) が含まれる部位を主食とするようになった系統や集団では、less-is-more 様の苦味感覚の低下が見られる傾向にあると考えられる。

キツネザル科の TAS2R16 のリガンド応答性進化には、この less-is-more 様の機能低下とは異なる変化パターンがあることも本研究から明らかとなった。*L. catta* で見られたアゴニスト応答、つまり苦味反応を起こす苦味物質の種類を増やし、より苦味に敏感になる変化である。この変化は、less-is-more 様の機能低下と対照的に、葉食傾向を高める過程で新奇に遭遇する多様な毒物を避けるために起こした変化である。どちらも接触する可能性のある毒物への感覚適応だが、変化の方向性は真逆である。これには、それぞれの種が獲得した毒物への耐性の違いが大きく関係していると考えられる。二次代謝産物や毒物を含む植物部位の採食には、消化管の適応、並びに腸内細菌叢の適応が必要である。そのため、それぞれの種におけるこれらの味覚以外の採食に重要な形質の適応度が、苦味受容体のリガンド応答性進化の方向性と関連していると考えられる。

まず、消化管についてだが、キツネザル科の消化管の形態は系統ごとに異なっており、食性と関連した構造の変化が見られる。果実食の *Varecia* 属と *Eulemur* 属は、体重に対する腸管の重量比が小さく、比較的大きな囊状の盲腸を持つが、膨起 (haustra) は見られない (図 23a-b) [190,191]。さらに、果実食性種における食物の消化管通過時間 (GPT) は非常に短い[177,192,193]。そのため、二次代謝産物を含み、細胞壁の大量消化を要する葉などの処理にはあまり適しておらず、素早く排泄する戦略であると考えられている [190]。それに対して、*L. catta* は、果実食の 2 属と比べて長い消化管を持ち、膨起のある大きな盲腸を持つ (図 23c) [190]。しかし、葉食性の *Propithecus* 属 (インドリ科) と比較すると、消化管長も短く、盲腸の膨起も小さい (図 23d) [190]。GPT も *L. catta* (201-387 分) は、*Varecia* 属や *Eulemur* 属 (94-243 分) よりはやや長いもののコクレルシファ

カ (*Propithecus coquereli*) (24 時間) より短い[177–179,192,193]。このように *L. catta* は、野生での採食パターン (果実・葉食性) と対応して消化管形態と消化戦略の双方が果実食性種と葉食性種の間間的な状態である。一方で、*H. giriseus* はこれら 4 種とは大きく異なる消化管形態を持つ。腸管の全長はキツネザル科で最も短く、盲腸が短く、結腸には他種にはない明瞭な膨起が見られる (図 23) [190,194]。この形態的特徴は同属の *H. aureus* にも共通し、本属の腸内細菌による分解は大腸で盛んに行われていると考えられている[190]。消化管が短いという特徴はジャイアントパンダにも見られる共通の特徴である[152]。また、*H. griseus* の GPT は *Propithecus* 属と同程度かそれ以上の長さ (18.2-39.3 時間) を持ち、ジェントルキツネザルの中で最も短い *P. simus* でも 9 時間と非常に長い[176–179]。3.5.5 項でも述べたようにジェントルキツネザルの GPT は、2 属間に明確な差があり、ホストの解毒酵素や腸内細菌の能力などの差に起因した解毒戦略の違いを反映している可能性があると考えられている。現状キツネザル類の消化・解毒関連酵素の機能に関する系統横断的な知見は乏しいため、3.5.4 項で言及したようなジェントルキツネザルにおける解毒酵素 *rhodanese* の適応進化の可能性も含めて今後の研究の進展に期待したい。しかし、ジェントルキツネザルの中での差違が認められるものの、ジェントルキツネザルは他種には見られない特徴的な消化管形態と消化戦略を持っているといえる。

食物の消化や解毒に重要な役割を果たしている腸内細菌叢でも、キツネザル類のそれぞれの科において食性と関連する菌叢の特徴が野生、飼育下共に認められる[195–198]。キツネザル科の *V. variegata* と *L. catta* では、炭水化物やビタミンの代謝に関わる細菌グループが多いのに対し、葉食の *Propithecus* 属では、繊維の発酵、アミノ酸や短鎖脂肪酸の産生、二次代謝産物の代謝に関わる細菌グループが多くなっている[197–199]。しかし、*L. catta* は、菌叢や食性が *V. variegata* と近いにも関わらず、糞中に見られる代謝物組成は、*P. coquereli* と似た特徴を頻繁に示す[197]。これは、腸管の複雑化と GPT の延長と関連しており、*L. catta* は腸内細菌が持つ代謝機能も果実食と葉食の両方の特徴を備えていると考えられる。一方で、*H. griseus* は繊維の分解能をもつ細菌グループを含

むいくつかの細菌グループ (*Faecalibacterium*、*Fibrobacter*、*Ruminococcus*、*Phascolarctobacterium*)が *P. coquereli* と同様に他のキツネザル科(*L. catta* と *V. variegata*)よりも多く見られる。さらに、近縁の *L. catta* には見られないジャイアントパンダとレッサーパンダ双方と共通する細菌グループを含むという独特の菌叢を持つ。[152]。パンダの菌叢には青酸解毒関連酵素を持つと思われる細菌グループが他の植物食者よりも多いことがわかっており、ジェントルキツネザルでもこれらの細菌グループの一部 (*Enterobacteriaceae* や *Oxalobacteraceae*) がパンダと共通する細菌グループの中に見られる[152,163]。こうした事実から、ジェントルキツネザルは、腸内細菌叢のレベルでも竹食への適応がよく進んでいると考えられる。

ここまで見てきたように、*L. catta* は消化管形態や腸内細菌叢の特徴が果実と葉それぞれのスペシャリストの中間的な状態であり、どちらの特徴も備えたジェネラリストであるといえる。一方で、*P. coquereli* で見られるような二次代謝産物の代謝に関わる細菌グループの増加などはあまり見られず、葉食のスペシャリストほど高い消化・解毒能力を持っていない可能性がある。そのため、果実資源量の少ない乾燥した環境に進出し、二次代謝産物を多く含む葉を食物レパートリーに加えた *L. catta* は、新奇に接触する可能性が高まった様々な植物毒を適切に回避するために、感じられる苦味物質の種類を増やす方向に苦味受容体が進化したのかもしれない。実際に、体の大型化に伴って葉食傾向を高めた狭鼻猿類の祖先では、検知できる苦味物質の種類を遺伝子重複によって獲得された *TAS2R* パラログ (例：*TAS2R30*、*-R31*、*-R43*、*-R45*、*-R46*) がそれぞれ特異的な植物毒をリガンドとするという方法で増加させ、植物由来の毒の認識能力を高めた可能性が指摘されている[21]。一方で、*H. griseus* は消化管や腸内細菌叢が繊維質で毒性もある植物に適応した状態であり、竹食への特殊化が非常に進んでいるといえる。*P. simus* や *H. aureus* についても情報は断片的だが、消化・解毒機構が同様に特殊化傾向にある可能性が高い。そのため、タケ類の青酸化合物への耐性が高く、こうした植物毒を避ける必要がなくなったために、近縁種が感じるような植物毒 (特に β グルコシド) の苦味を感じにくくなるように苦味受容体が進化したのかもしれない。上述した less-is-

more 様の TAS2R の機能低下が消化管・腸内細菌ともに葉食に非常に適応したコロブス亜科で起こっていることもこの仮説を支持する現象と考えられる。

このように消化管や腸内細菌の適応から大きな影響を受けてキツネザル科の苦味感覚は進化してきたと考えられ、消化・解毒能力が十分に高くなれば、植物毒の苦味を感じない方向に、中程度のジェネラリスト様であれば、適切な回避ができるように受容分子の種類を増やしたり、感受性を高めたりする方向へ苦味受容体は進化するのかもしれない。しかし、消化・解毒に必要な酵素や腸内細菌は苦味物質・毒物の種類によって異なるため、一つの種の中ですべての苦味受容体が同一の進化傾向を示すとは限らない。従って、複数の苦味受容体についての個別の知見を積み重ねて、消化管や腸内細菌叢と比較しながら全体の傾向を見ていくことで、ある種における苦味受容体—解毒・消化機構—食性の関係の全容が明らかになっていくと考えられる。この点から見ても、消化器形態、腸内細菌叢研究が盛んに行われており、それぞれの理解が進んでいるキツネザル類（特にキツネザル科とインドリ科）は今後も味覚受容体と食性の研究を進めていく上で今後も優れたモデルであり続けるだろう。さらに、ここにホスト動物の消化・解毒酵素の知見が加わればさらに理解が深まると考えられる。

最後に、本研究を通じて明らかになった事実を考慮して、今回対象としなかった他のキツネザル類の系統を見てみると、葉食性のインドリ科 (*Propithecus* 属、*Indri* 属、*Avahi* 属) とイタチキツネザル科 (*Lepilemur* 属) では、ジェントルキツネザルやコロブス亜科で見られるような苦味受容体の機能低下が起こっている可能性が考えられる。これらの種は、それぞれの科が独立に葉食に適応したと考えられており、消化管は属間でも差異があるものの共通して葉食に適した構造を持っている[190,200–202]。また、利用する葉の種類（若葉か成熟葉）や量に応じて腸内細菌叢にも属間で差異が認められるが、それぞれが葉食に適した固有の菌叢をもつ[196,203]。そのため、それぞれ独立に葉食者になったインドリ科とイタチキツネザル科でも同じような現象が確認できれば、苦味物質を多く含む植物部位（葉など）を主食とするようになる進化過程で起こる霊長類の苦味感覚適応の共通性を見出すことにも繋がると考えられる。

4.4. 総括と今後の展望

本研究では、キツネザル科の TAS2R16 を対象として「①霊長類における苦味受容体のリガンド応答性の進化傾向」と「②苦味受容体のリガンド応答性と食性の関係」の理解を目指した。そして、これらの課題に対して「①TAS2R16 のリガンド応答性は霊長類全体で保存的である」、「②ジェントルキツネザルでは、タケ類に含まれる青酸配糖体に対して感受性が低くなるように TAS2R16 が進化した」という結論を出すことができた。

①については、Jiao *et al.*, 2018 の研究により、TAS2R16 の機能保存性はさらに広範な哺乳類でも維持されている可能性が見えている[171]。そのため、対象を哺乳類全体に拡大した研究が必要である。そして、苦味受容体の機能保存性の全体的傾向を理解するために、対象の TAS2R を増やしていくことも必要である。また、対象の TAS2R を増やして共通の傾向を探索することは、食性適応に伴う苦味受容体の進化傾向を理解する上でも重要なアプローチとなると考えられる。

②については、より実証的な解析が必要である。青酸配糖体を用いた実験こそ難しいものの、類似の感受性を持つ無毒な物質を用いた行動実験によって、実際の食物選択行動への影響を評価することが必要である。また、ジェントルキツネザルが主食とする *C. madagascariensis* から抽出した青酸配糖体の同定や、本物質と TAS2R16 の機能関係をカルシウムアッセイなどで確かめる必要がある。同時に、ジェントルキツネザルの集団内での遺伝子型構成の検討も重要である。今回は各種 1 個体の TAS2R16 配列（いずれもホモ接合体）を代表として解析を行ったため、今回機能を見出したハプロタイプや変異が野生集団中にどの程度保持されているのかは不明である。「発見した機能や変異が種として固定されているのかどうか」や、「機能の異なるハプロタイプがあるとすればその割合はどうなっているのか」といった解析を複数の野生集団で進めることでジェントルキツネザルの竹食適応への理解がより深まることが期待できる。

本研究では、苦味に着目した研究を行ってきたが、採食に関わる感覚は苦味だけではない。苦味は「食べられるかどうか」に関わる感覚だが、採食では、「食べたい」とい

う嗜好性に関わる味覚、すなわち甘味や旨味も重要である。実際に、過去の行動実験によって、キツネザル類の中でショ糖 (sucrose) 感受性に種間差があることがわかっている[204]。また、旨味受容体 TAS1R1/TAS1R3、甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 の双方について、霊長類の種間で機能差があることがわかっており、甘味受容体については、受容体の機能差が食物選択に直接影響を与えていることも行動実験で確かめられている[13,54,55]。そのため、今後は嗜好性味覚の比較解析も進めていくことが、ジェントルキツネザルの竹食獲得の背景にある味覚進化の全容を理解する上で重要になる。

本研究ではジェントルキツネザルを含むキツネザル科に着目した研究を実施したが、キツネザル類は冒頭でも述べたように霊長類の主要食性を網羅しており、味覚進化研究に最適な系統である。本研究で実施した内容や上述したような今後展開する実験の対象をキツネザル類全体に広げることで、キツネザル類をモデルとして霊長類味覚の進化の全容を理解することに繋がると考えている。

引用文献

1. Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJP, Zuker CS. 2006 The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **444**, 288–294. (doi:10.1038/nature05401)
2. Yarmolinsky DA, Zuker CS, Ryba NJP. 2009 Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell* **139**, 234–244. (doi:10.1016/j.cell.2009.10.001)
3. Ohla K, Yoshida R, Roper SD, Di Lorenzo PM, Victor JD, Boughter JD, Fletcher M, Katz DB, Chaudhari N. 2019 Recognizing Taste: Coding Patterns Along the Neural Axis in Mammals. *Chem. Senses* **44**, 237–247. (doi:10.1093/chemse/bjz013)
4. Dutta Banik D *et al.* 2020 A subset of broadly responsive Type III taste cells contribute to the detection of bitter, sweet and umami stimuli. *PLoS Genet.* **16**, e1008925. (doi:10.1371/journal.pgen.1008925)
5. Lewandowski BC, Sukumaran SK, Margolskee RF, Bachmanov AA. 2016 Amiloride-Insensitive Salt Taste Is Mediated by Two Populations of Type III Taste Cells with Distinct Transduction Mechanisms. *J. Neurosci.* **36**, 1942–1953. (doi:10.1523/JNEUROSCI.2947-15.2016)
6. Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJP, Zuker CS. 2013 High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* **494**, 472–475. (doi:10.1038/nature11905)
7. Ninomiya Y. 1998 Reinnervation of cross-regenerated gustatory nerve fibers into amiloride-sensitive and amiloride-insensitive taste receptor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 5347–5350. (doi:10.1073/pnas.95.9.5347)
8. Kretz O, Barbry P, Bock R, Lindemann B. 1999 Differential Expression of RNA and Protein of the Three Pore-forming Subunits of the Amiloride-sensitive Epithelial Sodium Channel in Taste Buds of the Rat. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 51–64. (doi:10.1177/002215549904700106)
9. Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJP, Zuker CS. 2010 The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* **464**, 297–301. (doi:10.1038/nature08783)
10. Nomura K, Nakanishi M, Ishidate F, Iwata K, Taruno A. 2020 All-Electrical Ca²⁺-Independent Signal Transduction Mediates Attractive Sodium Taste in Taste Buds. *Neuron* **106**, 816–829.e6. (doi:10.1016/j.neuron.2020.03.006)
11. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJP, Zuker CS. 2002 An amino-acid taste receptor. *Nature* **416**, 199–202. (doi:10.1038/nature726)
12. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. 2001 Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**, 381–90. (doi:10.1016/S0092-8674(01)00451-2)
13. Toda Y, Nakagita T, Hayakawa T, Okada S, Narukawa M, Imai H, Ishimaru Y, Misaka T. 2013 Two Distinct Determinants of Ligand Specificity in T1R1/T1R3 (the Umami Taste Receptor). *J. Biol. Chem.* **288**, 36863–36877. (doi:10.1074/jbc.M113.494443)
14. Mahalapbutr P, Lee VS, Rungtongmongkol T. 2020 Binding Hotspot and Activation Mechanism of Maltitol and Lactitol toward the Human Sweet Taste Receptor. *J. Agric. Food Chem.* **68**, 7974–7983. (doi:10.1021/acs.jafc.0c02580)
15. Mahalapbutr P, Darai N, Panman W, Opasmahakul A, Kungwan N, Hannongbua S, Rungtongmongkol T. 2019 Atomistic mechanisms underlying the activation of the G protein-coupled sweet receptor heterodimer by sugar alcohol recognition. *Sci. Rep.* **9**, 10205. (doi:10.1038/s41598-019-46668-w)
16. Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJP, Zuker CS. 2000 A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell* **100**, 693–702. (doi:10.1016/S0092-8674(00)80705-9)
17. Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJP. 2000 T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. *Cell* **100**, 703–711. (doi:10.1016/S0092-

8674(00)80706-0)

18. Conte C, Ebeling M, Marcuz A, Nef P, Andres-Barquin PJ. 2002 Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenet. Genome Res.* **98**, 45–53. (doi:10.1159/000068546)
19. Go Y, Satta Y, Takenaka O, Takahata N. 2005 Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics* **170**, 313–326. (doi:10.1534/genetics.104.037523)
20. Shi P. 2003 Adaptive Diversification of Bitter Taste Receptor Genes in Mammalian Evolution. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 805–814. (doi:10.1093/molbev/msg083)
21. Hayakawa T, Suzuki-Hashido N, Matsui A, Go Y. 2014 Frequent Expansions of the Bitter Taste Receptor Gene Repertoire during Evolution of Mammals in the Euarchontoglires Clade. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 2018–2031. (doi:10.1093/molbev/msu144)
22. Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M. 2010 The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors. *Chem. Senses* **35**, 157–70. (doi:10.1093/chemse/bjp092)
23. Lossow K, Hübner S, Roudnitzky N, Slack JP, Pollastro F, Behrens M, Meyerhof W. 2016 Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *J. Biol. Chem.* **291**, 15358–15377. (doi:10.1074/jbc.M116.718544)
24. Suzuki N, Sugawara T, Matsui A, Go Y, Hirai H, Imai H. 2010 Identification of non-taster Japanese macaques for a specific bitter taste. *Primates* **51**, 285–289. (doi:10.1007/s10329-010-0209-3)
25. Widayati KA, Yan X, Suzuki-Hashido N, Itoigawa A, Purba LHPS, Fahri F, Terai Y, Suryobroto B, Imai H. 2019 Functional divergence of the bitter receptor TAS2R38 in Sulawesi macaques. *Ecol. Evol.* **9**, 10387–10403. (doi:10.1002/ece3.5557)
26. Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJP. 2003 Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**, 293–301. (doi:10.1016/s0092-8674(03)00071-0)
27. Hisatsune C, Yasumatsu K, Takahashi-Iwanaga H, Ogawa N, Kuroda Y, Yoshida R, Ninomiya Y, Mikoshiba K. 2007 Abnormal Taste Perception in Mice Lacking the Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J. Biol. Chem.* **282**, 37225–37231. (doi:10.1074/jbc.M705641200)
28. Zhang Z, Zhao Z, Margolskee R, Liman E. 2007 The Transduction Channel TRPM5 Is Gated by Intracellular Calcium in Taste Cells. *J. Neurosci.* **27**, 5777–5786. (doi:10.1523/JNEUROSCI.4973-06.2007)
29. Liu D, Liman ER. 2003 Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15160–15165. (doi:10.1073/pnas.2334159100)
30. Taruno A, Nomura K, Kusakizako T, Ma Z, Nureki O, Foscett JK. 2020 Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **3**. (doi:10.1007/s00424-020-02464-4)
31. Taruno A *et al.* 2013 CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* **495**, 223–226. (doi:10.1038/nature11906)
32. Ma Z *et al.* 2018 CALHM3 Is Essential for Rapid Ion Channel-Mediated Purinergic Neurotransmission of GPCR-Mediated Tastes. *Neuron* **98**, 547-561.e10. (doi:10.1016/j.neuron.2018.03.043)
33. Romanov RA *et al.* 2018 Chemical synapses without synaptic vesicles: Purinergic neurotransmission through a CALHM1 channel-mitochondrial signaling complex. *Sci. Signal.* **11**, eaao1815. (doi:10.1126/scisignal.aao1815)
34. Finger TE. 2005 ATP Signaling Is Crucial for Communication from Taste Buds to Gustatory

- Nerves. *Science (80-)*. **310**, 1495–1499. (doi:10.1126/science.1118435)
35. Banik DD, Martin LE, Freichel M, Torregrossa AM, Medler KF. 2018 TRPM4 and TRPM5 are both required for normal signaling in taste receptor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E772–E781. (doi:10.1073/pnas.1718802115)
 36. Lossow K, Hermans-Borgmeyer I, Meyerhof W, Behrens M. 2020 Segregated Expression of ENaC Subunits in Taste Cells. *Chem. Senses* **45**, 235–248. (doi:10.1093/chemse/bjaa004)
 37. Teng B, Wilson CE, Tu Y, Joshi NR, Kinnamon SC, Liman ER. 2019 Cellular and Neural Responses to Sour Stimuli Require the Proton Channel Otop1. *Curr. Biol.* **29**, 3647–3656.e5. (doi:10.1016/j.cub.2019.08.077)
 38. Zhang J, Jin H, Zhang W, Ding C, O’Keeffe S, Ye M, Zuker CS. 2019 Sour Sensing from the Tongue to the Brain. *Cell* **179**, 392–402.e15. (doi:10.1016/j.cell.2019.08.031)
 39. Tu Y-H *et al.* 2018 An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science (80-)*. **359**, 1047–1050. (doi:10.1126/science.aao3264)
 40. Ye W *et al.* 2016 The K⁺ channel K_{IR} 2.1 functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E229–E238. (doi:10.1073/pnas.1514282112)
 41. Li X *et al.* 2005 Pseudogenization of a Sweet-Receptor Gene Accounts for Cats’ Indifference toward Sugar. *PLoS Genet.* **1**, e3. (doi:10.1371/journal.pgen.0010003)
 42. Hu Y *et al.* 2017 Comparative genomics reveals convergent evolution between the bamboo-eating giant and red pandas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 1081–1086. (doi:10.1073/pnas.1613870114)
 43. Zhao H, Yang JR, Xu H, Zhang J. 2010 Pseudogenization of the umami taste receptor gene *Tas1r1* in the giant panda coincided with its dietary switch to bamboo. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 2669–2673. (doi:10.1093/molbev/msq153)
 44. Zhao H, Zhou Y, Pinto CM, Charles-Dominique P, Galindo-González J, Zhang S, Zhang J. 2010 Evolution of the sweet taste receptor gene *Tas1r2* in bats. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 2642–2650. (doi:10.1093/molbev/msq152)
 45. Zhao H, Xu D, Zhang S, Zhang J. 2012 Genomic and Genetic Evidence for the Loss of Umami Taste in Bats. *Genome Biol. Evol.* **4**, 73–79. (doi:10.1093/gbe/evr126)
 46. Zhu K, Zhou X, Xu S, Sun D, Ren W, Zhou K, Yang G. 2014 The loss of taste genes in cetaceans. *BMC Evol. Biol.* **14**, 218. (doi:10.1186/s12862-014-0218-8)
 47. Kishida T, Thewissen J, Hayakawa T, Imai H, Agata K. 2015 Aquatic adaptation and the evolution of smell and taste in whales. *Zool. Lett.* **1**, 9. (doi:10.1186/s40851-014-0002-z)
 48. Feng P, Zheng J, Rossiter SJ, Wang D, Zhao H. 2014 Massive Losses of Taste Receptor Genes in Toothed and Baleen Whales. *Genome Biol. Evol.* **6**, 1254–1265. (doi:10.1093/gbe/evu095)
 49. Wolsan M, Sato JJ. 2020 Parallel loss of sweet and umami taste receptor function from phocids and otarioids suggests multiple colonizations of the marine realm by pinnipeds. *J. Biogeogr.* **47**, 235–249. (doi:10.1111/jbi.13749)
 50. Liu Z, Liu G, Hailer F, Orozco-terWengel P, Tan X, Tian J, Yan Z, Zhang B, Li M. 2016 Dietary specialization drives multiple independent losses and gains in the bitter taste gene repertoire of Laurasiatherian Mammals. *Front. Zool.* **13**, 28. (doi:10.1186/s12983-016-0161-1)
 51. Laska M, Kohlmann S, Scheuber HP, Salazar LTH, Luna ER. 2001 Gustatory responsiveness to polycose in four species of nonhuman primates. *J. Chem. Ecol.* **27**, 1997–2011. (doi:10.1023/A:1012286719241)
 52. Liu B, Ha M, Meng X-Y, Khaleduzzaman M, Zhang Z, Li X, Cui M. 2012 Functional characterization of the heterodimeric sweet taste receptor T1R2 and T1R3 from a New World monkey species (squirrel monkey) and its response to sweet-tasting proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 431–437. (doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.083)
 53. Cai C, Jiang H, Li L, Liu T, Song X, Liu B. 2016 Characterization of the Sweet Taste Receptor *Tas1r2* from an Old World Monkey Species Rhesus Monkey and Species-Dependent Activation

- of the Monomeric Receptor by an Intense Sweetener Perillartine. *PLoS One* **11**, e0160079. (doi:10.1371/journal.pone.0160079)
54. Nishi E, Tsutsui K, Imai H. 2016 High maltose sensitivity of sweet taste receptors in the Japanese macaque (*Macaca fuscata*). *Sci. Rep.* **6**, 39352. (doi:10.1038/srep39352)
 55. Nishi E, Suzuki-Hashido N, Hayakawa T, Tsuji Y, Suryobroto B, Imai H. 2018 Functional decline of sweet taste sensitivity of colobine monkeys. *Primates* **59**, 523–530. (doi:10.1007/s10329-018-0679-2)
 56. Liu G, Walter L, Tang S, Tan X, Shi F, Pan H, Roos C, Liu Z, Li M. 2014 Differentiated adaptive evolution, episodic relaxation of selective constraints, and pseudogenization of umami and sweet taste genes TAS1Rs in catarrhine primates. *Front. Zool.* **11**, 79. (doi:10.1186/s12983-014-0079-4)
 57. Baldwin MW, Toda Y, Nakagita T, O’Connell MJ, Klasing KC, Misaka T, Edwards S V., Liberles SD. 2014 Evolution of sweet taste perception in hummingbirds by transformation of the ancestral umami receptor. *Science (80-.)*. **345**, 929–933. (doi:10.1126/science.1255097)
 58. Li D, Zhang J. 2014 Diet Shapes the Evolution of the Vertebrate Bitter Taste Receptor Gene Repertoire. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 303–309. (doi:10.1093/molbev/mst219)
 59. Hayakawa T, Sugawara T, Go Y, Udono T, Hirai H, Imai H. 2012 Eco-Geographical Diversification of Bitter Taste Receptor Genes (*TAS2Rs*) among Subspecies of Chimpanzees (*Pan troglodytes*). *PLoS One* **7**, e43277. (doi:10.1371/journal.pone.0043277)
 60. Bufe B, Breslin PAS, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, Slack JP, Kim U-K, Drayna D, Meyerhof W. 2005 The Molecular Basis of Individual Differences in Phenylthiocarbamide and Propylthiouracil Bitterness Perception. *Curr. Biol.* **15**, 322–327. (doi:10.1016/j.cub.2005.01.047)
 61. Sandau MM, Goodman JR, Thomas A, Rucker JB, Rawson NE. 2015 A functional comparison of the domestic cat bitter receptors *Tas2r38* and *Tas2r43* with their human orthologs. *BMC Neurosci.* **16**, 33. (doi:10.1186/s12868-015-0170-6)
 62. Lei W, Ravoninjohary A, Li X, Margolskee RF, Reed DR, Beauchamp GK, Jiang P. 2015 Functional Analyses of Bitter Taste Receptors in Domestic Cats (*Felis catus*). *PLoS One* **10**, e0139670. (doi:10.1371/journal.pone.0139670)
 63. Purba LHPS, Widayati KA, Tsutsui K, Suzuki-Hashido N, Hayakawa T, Nila S, Suryobroto B, Imai H. 2017 Functional characterization of the *TAS2R38* bitter taste receptor for phenylthiocarbamide in colobine monkeys. *Biol. Lett.* **13**, 20160834. (doi:10.1098/rsbl.2016.0834)
 64. Purba LHPS, Widayati KA, Suzuki-Hashido N, Itoigawa A, Hayakawa T, Nila S, Juliandi B, Suryobroto B, Imai H. 2020 Evolution of the bitter taste receptor *TAS2R38* in colobines. *Primates* (doi:10.1007/s10329-020-00799-1)
 65. Bufe B, Hofmann T, Krautwurst D, Raguse J-D, Meyerhof W. 2002 The human *TAS2R16* receptor mediates bitter taste in response to β -glucopyranosides. *Nat. Genet.* **32**, 397–401. (doi:10.1038/ng1014)
 66. Imai H, Suzuki N, Ishimaru Y, Sakurai T, Yin L, Pan W, Abe K, Misaka T, Hirai H. 2012 Functional diversity of bitter taste receptor *TAS2R16* in primates. *Biol. Lett.* **8**, 652–656. (doi:10.1098/rsbl.2011.1251)
 67. Mittermeier RA *et al.* 2010 *Lemurs of Madagascar*. third edit. Washington, D.C.: Conservation International.
 68. Kistler L *et al.* 2015 Comparative and population mitogenomic analyses of Madagascar’s extinct, giant ‘subfossil’ lemurs. *J. Hum. Evol.* **79**, 45–54. (doi:10.1016/j.jhevol.2014.06.016)
 69. Herrera JP, Dávalos LM. 2016 Phylogeny and Divergence Times of Lemurs Inferred with Recent and Ancient Fossils in the Tree. *Syst. Biol.* **65**, 772–791. (doi:10.1093/sysbio/syw035)
 70. Yoder AD, Cartmill M, Ruvolo M, Smith K, Vilgalys R. 1996 Ancient single origin for Malagasy primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5122–5126. (doi:10.1073/pnas.93.10.5122)

71. Ali JR, Huber M. 2010 Mammalian biodiversity on Madagascar controlled by ocean currents. *Nature* **463**, 653–656. (doi:10.1038/nature08706)
72. Gunnell GF *et al.* 2018 Fossil lemurs from Egypt and Kenya suggest an African origin for Madagascar's aye-aye. *Nat. Commun.* **9**, 3193. (doi:10.1038/s41467-018-05648-w)
73. Poux C, Madsen O, Marquard E, Vieites DR, de Jong WW, Vences M. 2005 Asynchronous Colonization of Madagascar by the Four Endemic Clades of Primates, Tenrecs, Carnivores, and Rodents as Inferred from Nuclear Genes. *Syst. Biol.* **54**, 719–730. (doi:10.1080/10635150500234534)
74. Sefczek TM, Randimbiharirina DR, Raharivololona BM, Razafimahaleo H, Randrianarison O, Louis EE. 2020 Re-assessing the applicability of the Jarman/Bell model and Kay's threshold to the insectivorous aye-aye (*Daubentonia madagascariensis*). *Am. J. Phys. Anthropol.* **171**, 336–341. (doi:10.1002/ajpa.23963)
75. Iwano T. 1991 An Ecological and Behavioral Study of the Aye-Aye (*Daubentonia madagascariensis*). *Afr. Study Monogr.* **12**, 19–42. (doi:https://doi.org/10.14989/68071)
76. Iwano T, Iwakawa C. 1988 Feeding Behaviour of the Aye-Aye (*Daubentonia madagascariensis*) on Nuts of Ramy (*Canarium madagascariensis*). *Folia Primatol.* **50**, 136–142. (doi:10.1159/000156339)
77. Thalmann U. 2001 Food resource characteristics in two nocturnal lemurs with different social behavior: *Avahi occidentalis* and *Lepilemur edwardsi*. *Int. J. Primatol.* **22**, 287–324.
78. Sato H, Santini L, Patel ER, Campera M, Yamashita N, Colquhoun IC, Donati G. 2016 Dietary Flexibility and Feeding Strategies of *Eulemur*: A Comparison with *Propithecus*. *Int. J. Primatol.* **37**, 109–129. (doi:10.1007/s10764-015-9877-6)
79. Britt A, Randriamandratonirina NJ, Glasscock KD, Iambana BR. 2002 Diet and Feeding Behaviour of *Indri indri* in a Low-Altitude Rain Forest. *Folia Primatol.* **73**, 225–239. (doi:10.1159/000067455)
80. Norscia I, Ramanamanjato JB, Ganzhorn JU. 2012 Feeding Patterns and Dietary Profile of Nocturnal Southern Woolly Lemurs (*Avahi meridionalis*) in Southeast Madagascar. *Int. J. Primatol.* **33**, 150–167. (doi:10.1007/s10764-011-9562-3)
81. Ganzhorn JU, Abraham JP, Razanahoera-Rakotomalala M. 1985 Some aspects of the natural history and food selection of *Avahi laniger*. *Primates* **26**, 452–463. (doi:10.1007/BF02382459)
82. Radespiel U, Reimann W, Rahelinirina M, Zimmermann E. 2006 Feeding Ecology of Sympatric Mouse Lemur Species in Northwestern Madagascar. *Int. J. Primatol.* **27**, 311–321. (doi:10.1007/s10764-005-9005-0)
83. Hladik CM, Charles-Dominique P, Petter JJ. 1980 Feeding Strategies of Five Nocturnal Prosimians in the Dry Forest of the West Coast of Madagascar. In *Nocturnal Malagasy Primates*, pp. 41–73. Elsevier. (doi:10.1016/B978-0-12-169350-3.50007-1)
84. Lahann P. 2007 Feeding ecology and seed dispersal of sympatric cheirogaleid lemurs (*Microcebus murinus*, *Cheirogaleus medius*, *Cheirogaleus major*) in the littoral rainforest of south-east Madagascar. *J. Zool.* **271**, 88–98. (doi:10.1111/j.1469-7998.2006.00222.x)
85. Nash LT. 1986 Dietary, behavioral, and morphological aspects of gummivory in primates. *Am. J. Phys. Anthropol.* **29**, 113–137. (doi:10.1002/ajpa.1330290505)
86. Vasey N. 2000 Niche separation in *Varecia variegata rubra* and *Eulemur fulvus albifrons*: I. Interspecific patterns. *Am. J. Phys. Anthropol.* **112**, 411–431. (doi:10.1002/1096-8644(200007)112:3<411::AID-AJPA10>3.0.CO;2-R)
87. Sato H. 2012 Frugivory and Seed Dispersal by Brown Lemurs in a Malagasy Tropical Dry Forest. *Biotropica* **44**, 479–488. (doi:10.1111/j.1744-7429.2011.00838.x)
88. Simmen B, Bayart F, Marez A, Hladik A. 2007 Diet, nutritional ecology, and birth season of *Eulemur macaco* in an anthropogenic forest in Madagascar. *Int. J. Primatol.* **28**, 1253–1266. (doi:10.1007/s10764-007-9217-6)

89. Tan CL. 1999 Group composition, home range size, and diet of three sympatric bamboo lemur species (genus *Hapalemur*) in Ranomafana National Park, Madagascar. *Int. J. Primatol.* **20**, 547–566. (doi:10.1023/A:1020390723639)
90. Simmen B, Hladik A, Ramasiarisoa P. 2003 Food Intake and Dietary Overlap in Native *Lemur catta* and *Propithecus verreauxi* and Introduced *Eulemur fulvus* at Berenty, Southern Madagascar. *Int. J. Primatol.* **24**, 949–968. (doi:10.1023/A:1026366309980)
91. Eppley TM, Verjans E, Donati G. 2011 Coping with low-quality diets: a first account of the feeding ecology of the southern gentle lemur, *Hapalemur meridionalis*, in the Mandena littoral forest, southeast Madagascar. *Primates* **52**, 7–13. (doi:10.1007/s10329-010-0225-3)
92. Mutschler T, Feistner ATC, Nievergelt CM. 1998 Preliminary Field Data on Group Size, Diet and Activity in the Alaotran Gentle Lemur *Hapalemur griseus alaotrensis*. *Folia Primatol.* **69**, 325–330. (doi:10.1159/000021647)
93. Ballhorn DJ, Kautz S, Rakotoarivelo FP. 2009 Quantitative Variability of Cyanogenesis in *Cathariostachys madagascariensis* - the Main Food Plant of Bamboo Lemurs in Southeastern Madagascar. *Am. J. Primatol.* **71**, 305–315. (doi:10.1002/ajp.20653)
94. Sakurai T *et al.* 2010 Characterization of the β -D-Glucopyranoside binding site of the human bitter taste receptor hTAS2R16. *J. Biol. Chem.* **285**, 28373–28378. (doi:10.1074/jbc.M110.144444)
95. Thomas A, Sulli C, Davidson E, Berdougou E, Phillips M, Puffer BA, Paes C, Doranz BJ, Rucker JB. 2017 The Bitter Taste Receptor TAS2R16 Achieves High Specificity and Accommodates Diverse Glycoside Ligands by using a Two-faced Binding Pocket. *Sci. Rep.* **7**, 7753. (doi:10.1038/s41598-017-07256-y)
96. Soranzo N, Bufe B, Sabeti PC, Wilson JF, Weale ME, Marguerie R, Meyerhof W, Goldstein DB. 2005 Positive Selection on a High-Sensitivity Allele of the Human Bitter-Taste Receptor TAS2R16. *Curr. Biol.* **15**, 1257–1265. (doi:10.1016/j.cub.2005.06.042)
97. Simmen B, Sauther ML, Soma T, Rasamimanana H, Sussman RW, Jolly A, Tarnaud L, Hladik A. 2006 Plant Species Fed on by *Lemur catta* in Gallery Forests of the Southern Domain of Madagascar. In *Ringtailed Lemur Biology*, pp. 55–68. Boston, MA: Springer US. (doi:10.1007/978-0-387-34126-2_5)
98. Soma T. 2006 Tradition and Novelty: *Lemur catta* Feeding Strategy on Introduced Tree Species at Berenty Reserve. In *Ringtailed Lemur Biology* (eds A Jolly, RW Sussman, N Koyama, H Rasamimanana), pp. 141–159. Boston, MA: Springer US. (doi:10.1007/978-0-387-34126-2_10)
99. Birkinshaw CR. 1995 The importance of the black lemur, *Eulemur macaco* (Lemuridae, Primates), for seed dispersal in Lokobe Forest, Madagascar. University College London. See <https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10106686/>.
100. Colquhoun IC. 1997 A predictive socioecological study of the black lemur (*Eulemur macaco macaco*) in northwestern Madagascar. Washington University. (doi:10.13140/2.1.3772.4167)
101. Balko EA. 1998 A Behaviorally Plastic Response to Forest Composition and Logging Disturbance by *Varecia variegata variegata* in Ranomafana National Park, Madagascar. State University of New York. (doi:10.13140/2.1.4927.0401)
102. Morland HS. 1991 Social organization and ecology of black and white ruffed lemurs (*Varecia variegata variegata*) in Lowland Rain Forest, Nosy Mangabe, Eastern Madagascar. Yale University.
103. Britt A. 2000 Diet and Feeding Behaviour of the Black-and-White Ruffed Lemur (*Varecia variegata variegata*) in the Betampona Reserve, Eastern Madagascar. *Folia Primatol.* **71**, 133–141. (doi:10.1159/000021741)
104. Ratsimbazafy J. 2006 Diet Composition, Foraging, and Feeding Behavior in Relation to Habitat Disturbance: Implications for the Adaptability of Ruffed Lemurs (*Varecia variegata editorium*) in Manombo Forest, Madagascar. In *Lemurs*, pp. 403–422. Boston, MA: Springer US.

- (doi:10.1007/978-0-387-34586-4_19)
105. Grassi C. 2006 Variability in habitat, diet, and social structure of *Hapalemur griseus* in Ranomafana National Park, Madagascar. *Am. J. Phys. Anthropol.* **131**, 50–63. (doi:10.1002/ajpa.20423)
 106. Mutschler T. 1999 Folivory in a Small-Bodied Lemur. In *New Directions in Lemur Studies* (eds B Rakotosamimanana, H Rasamimanana, JU Ganzhorn, SM Goodman), pp. 221–239. Boston, MA: Springer US. (doi:10.1007/978-1-4615-4705-1_13)
 107. Tan CL. 2006 Behavior and Ecology of Gentle Lemurs (Genus *Hapalemur*). In *Lemurs* (eds L Gould, ML Sauther), pp. 369–381. Boston, MA: Springer US. (doi:10.1007/978-0-387-34586-4_17)
 108. Meyer WK, Venkat A, Kermany AR, Van De Geijn B, Zhang S, Przeworski M. 2015 Evolutionary history inferred from the de novo assembly of a nonmodel organism, the blue-eyed black lemur. *Mol. Ecol.* **24**, 4392–4405. (doi:10.1111/mec.13327)
 109. Lindblad-Toh K *et al.* 2011 A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. *Nature* **478**, 476–482. (doi:10.1038/nature10530)
 110. Ueda T, Ugawa S, Yamamura H, Imaizumi Y, Shimada S. 2003 Functional Interaction between T2R Taste Receptors and G-Protein α Subunits Expressed in Taste Receptor Cells. *J. Neurosci.* **23**, 7376–7380. (doi:10.1523/JNEUROSCI.23-19-07376.2003)
 111. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. 2015 Dose-response analysis using R. *PLoS One* **10**, 1–13. (doi:10.1371/journal.pone.0146021)
 112. Palesch D *et al.* 2018 Sooty mangabey genome sequence provides insight into AIDS resistance in a natural SIV host. *Nature* **553**, 77–81. (doi:10.1038/nature25140)
 113. Warren WC *et al.* 2015 The genome of the vervet (*Chlorocebus aethiops sabaeus*). *Genome Res.* **25**, 1921–1933. (doi:10.1101/gr.192922.115)
 114. Zhou X *et al.* 2014 Whole-genome sequencing of the snub-nosed monkey provides insights into folivory and evolutionary history. *Nat. Genet.* **46**, 1303–1310. (doi:10.1038/ng.3137)
 115. Fan Y *et al.* 2013 Genome of the Chinese tree shrew. *Nat. Commun.* **4**, 1426. (doi:10.1038/ncomms2416)
 116. Foote AD *et al.* 2015 Convergent evolution of the genomes of marine mammals. *Nat. Genet.* **47**, 272–275. (doi:10.1038/ng.3198)
 117. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402. (doi:10.1093/nar/25.17.3389)
 118. Katoh K, Standley DM. 2013 MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780. (doi:10.1093/molbev/mst010)
 119. Stamatakis A. 2014 RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313. (doi:10.1093/bioinformatics/btu033)
 120. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. 1992 The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* **8**, 275–282. (doi:10.1093/bioinformatics/8.3.275)
 121. Felsenstein J. 1985 CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution (N. Y.)*. **39**, 783–791. (doi:10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x)
 122. Zhang J, Yang J, Jang R, Zhang Y. 2015 GPCR-I-TASSER: A Hybrid Approach to G Protein-Coupled Receptor Structure Modeling and the Application to the Human Genome. *Structure* **23**, 1538–1549. (doi:10.1016/j.str.2015.06.007)
 123. Šali A, Blundell TL. 1993 Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815. (doi:10.1006/jmbi.1993.1626)
 124. Ruiz-Carmona S, Alvarez-Garcia D, Foloppe N, Garmendia-Doval AB, Juhos S, Schmidtke P,

- Barril X, Hubbard RE, Morley SD. 2014 rDock: A Fast, Versatile and Open Source Program for Docking Ligands to Proteins and Nucleic Acids. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003571. (doi:10.1371/journal.pcbi.1003571)
125. Miller BR, McGee TD, Swails JM, Homeyer N, Gohlke H, Roitberg AE. 2012 MMPBSA.py : An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3314–3321. (doi:10.1021/ct300418h)
126. Massova I, Kollman PA. 1999 Computational Alanine Scanning To Probe Protein - Protein Interactions : A Novel Approach To Evaluate Binding Free Energies. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8133–8143. (doi:10.1021/ja990935j)
127. Kollman PA *et al.* 2000 Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc. Chem. Res.* **33**, 889–897. (doi:10.1021/ar000033j)
128. Case DA *et al.* 2012 AMBER 12.
129. Imai H *et al.* 2016 Amino acid residues of bitter taste receptor TAS2R16 that determine sensitivity in primates to β -glycosides. *Biophys. Physicobiology* **13**, 165–171. (doi:10.2142/biophysico.13.0_165)
130. Pavlović RD, Lakušić B, Došlov-Kokoruš Z, Kovačević N. 2009 Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Pharmazie* **64**, 656–659. (doi:10.1691/ph.2009.9551)
131. Miura H, Inoue E, Kitamura Y, Sugii M. 1985 Extraction and determination of arbutin in the leaves of *Viburnum* and *Ilex* spp. *Shoyakugaku Zasshi* **39**, 181–184.
132. Choi YH, Sertic S, Kim HK, Wilson EG, Michopoulos F, Lefeber AWM, Erkelens C, Kricun SDP, Verpoorte R. 2005 Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1237–1245. (doi:10.1021/jf0486141)
133. Kim HK *et al.* 2010 Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry* **71**, 773–784. (doi:10.1016/j.phytochem.2010.02.001)
134. Schwery O, Onstein RE, Bouchenak-Khelladi Y, Xing Y, Carter RJ, Linder HP. 2015 As old as the mountains: The radiations of the Ericaceae. *New Phytol.* **207**, 355–367. (doi:10.1111/nph.13234)
135. Atsalis S. 1999 Diet of the brown mouse lemur (*Microcebus rufus*) in Ranomafana National Park, Madagascar. *Int. J. Primatol.* **20**, 193–229. (doi:http://dx.doi.org/10.1023/A:1020518419038)
136. Goodman SM, Langrand O. 1996 A high mountain population of the ring-tailed lemur *Lemur catta* on the Andringitra Massif, Madagascar. *Oryx* **30**, 259–268. (doi:DOI: 10.1017/S003060530002175X)
137. Simmen B, Peronny S, Jeanson M, Hladik A, Marez A. 2006 Diet Quality and Taste Perception of Plant Secondary Metabolites by *Lemur catta*. In *Ringtailed Lemur Biology* (eds A Jolly, RW Sussman, N Koyama, H Rasamimanana), pp. 160–183. Boston, MA: Springer US. (doi:10.1007/978-0-387-34126-2_11)
138. Seifert R, Wenzel-Seifert K. 2002 Constitutive activity of G-proteins-coupled receptors: Cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **366**, 381–416. (doi:10.1007/s00210-002-0588-0)
139. Pydi SP, Bhullar RP, Chelikani P. 2012 Constitutively active mutant gives novel insights into the mechanism of bitter taste receptor activation. *J. Neurochem.* **122**, 537–544. (doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07808.x)
140. Pydi SP, Singh N, Upadhyaya J, Bhullar RP, Chelikani P. 2014 The third intracellular loop plays a critical role in bitter taste receptor activation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 231–236. (doi:10.1016/j.bbmem.2013.08.009)
141. Jeruzal-Świątecka J, Fendler W, Pietruszewska W. 2020 Clinical Role of Extraoral Bitter Taste Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5156. (doi:10.3390/ijms21145156)

142. Pydi SP, Sobotkiewicz T, Billakanti R, Bhullar RP, Loewen MC, Chelikani P. 2014 Amino acid derivatives as bitter taste receptor (T2R) blockers. *J. Biol. Chem.* **289**, 25054–25066. (doi:10.1074/jbc.M114.576975)
143. Xiang J, Chun E, Liu C, Jing L, Al-Sahouri Z, Zhu L, Liu W. 2016 Successful Strategies to Determine High-Resolution Structures of GPCRs. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 1055–1069. (doi:10.1016/j.tips.2016.09.009)
144. Fierro F, Giorgetti A, Carloni P, Meyerhof W, Alfonso-Prieto M. 2019 Dual binding mode of “bitter sugars” to their human bitter taste receptor target. *Sci. Rep.* **9**, 8437. (doi:10.1038/s41598-019-44805-z)
145. Latorraca NR, Venkatakrisnan AJ, Dror RO. 2017 GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem. Rev.* **117**, 139–155. (doi:10.1021/acs.chemrev.6b00177)
146. Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauß N, Choe H-W, Hofmann KP, Ernst OP. 2008 Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**, 497–502. (doi:10.1038/nature07330)
147. Huang W *et al.* 2015 Structural insights into μ -opioid receptor activation. *Nature* **524**, 315–321. (doi:10.1038/nature14886)
148. Rosenbaum DM *et al.* 2011 Structure and function of an irreversible agonist- β 2 adrenoceptor complex. *Nature* **469**, 236–242. (doi:10.1038/nature09665)
149. Kruse AC *et al.* 2013 Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **504**, 101–106. (doi:10.1038/nature12735)
150. Eronen JT, Zohdy S, Evans AR, Tecot SR, Wright PC, Jernvall J. 2017 Feeding Ecology and Morphology Make a Bamboo Specialist Vulnerable to Climate Change. *Curr. Biol.* **27**, 3384–3389.e2. (doi:10.1016/j.cub.2017.09.050)
151. King T *et al.* 2013 Large-Culmed Bamboos in Madagascar: Distribution and Field Identification of the Primary Food Sources of the Critically Endangered Greater Bamboo Lemur *Prolemur simus*. *Primate Conserv.* **27**, 33–53. (doi:10.1896/052.027.0105)
152. McKenney EA, Maslanka M, Rodrigo A, Yoder AD. 2018 Bamboo Specialists from Two Mammalian Orders (Primates, Carnivora) Share a High Number of Low-Abundance Gut Microbes. *Microb. Ecol.* **76**, 272–284. (doi:10.1007/s00248-017-1114-8)
153. Overdorff DJ, Strait SG, Telo A. 1997 Seasonal variation in activity and diet in a small-bodied folivorous primate, *Hapalemur griseus*, in southeastern Madagascar. *Am. J. Primatol.* **43**, 211–223. (doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1997)43:3<211::AID-AJP2>3.0.CO;2-%23)
154. Mutschler T, Tan CL. 2003 Genus *Hapalemur*. In *The Natural History of Madagascar* (eds SM Goodman, JP Benstead), Chicago and London: University of Chicago Press.
155. Feistner ATC, Schmid J. 1999 Lemurs of the Réserve Naturelle Intégrale d’Andohahela, Madagascar. *Fieldiana Zool.* **94**, 269–284.
156. Eppley TM, Tan CL, Arrigo-Nelson SJ, Donati G, Ballhorn DJ, Ganzhorn JU. 2017 High Energy or Protein Concentrations in Food as Possible Offsets for Cyanide Consumption by Specialized Bamboo Lemurs in Madagascar. *Int. J. Primatol.* **38**, 881–899. (doi:10.1007/s10764-017-9987-4)
157. Eppley TM, Donati G, Ganzhorn JU. 2016 Determinants of terrestrial feeding in an arboreal primate: The case of the southern bamboo lemur (*Hapalemur meridionalis*). *Am. J. Phys. Anthropol.* **161**, 328–342. (doi:10.1002/ajpa.23034)
158. Glander KE, Wright PC, Seigler DS, Randrianasolo V, Randrianasolo B. 1989 Consumption of cyanogenic bamboo by a newly discovered species of bamboo lemur. *Am. J. Primatol.* **19**, 119–124. (doi:10.1002/ajp.1350190205)
159. Schwarzmaier U. 1976 Über die Cyanogenese von *Bambusa vulgaris* und *B. guadua*. *Chem. Ber.* **109**, 3379–3389. (doi:10.1002/cber.19761091016)
160. Ballhorn DJ, Rakotoarivelo FP, Kautz S. 2016 Coevolution of Cyanogenic Bamboos and Bamboo

- Lemurs on Madagascar. *PLoS One* **11**, e0158935. (doi:10.1371/journal.pone.0158935)
161. Vicari M, Bazely DR. 1993 Do grasses fight back? The case for antiherbivore defences. *Trends Ecol. Evol.* **8**, 137–141. (doi:10.1016/0169-5347(93)90026-L)
 162. Gleadow RM, Woodrow IE. 2002 Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense. *J. Chem. Ecol.* **28**, 1301–1313. (doi:https://doi.org/10.1023/A:1016298100201)
 163. Zhu L, Yang Z, Yao R, Xu L, Chen H, Gu X, Wu T, Yang X. 2018 Potential Mechanism of Detoxification of Cyanide Compounds by Gut Microbiomes of Bamboo-Eating Pandas. *mSphere* **3**, 1–11. (doi:10.1128/mSphere.00229-18)
 164. Gleadow RM, Haburjak J, Dunn JE, Conn ME, Conn EE. 2008 Frequency and distribution of cyanogenic glycosides in *Eucalyptus* L'Hérit. *Phytochemistry* **69**, 1870–1874. (doi:10.1016/j.phytochem.2008.03.018)
 165. Cressey P, Reeve J. 2019 Metabolism of cyanogenic glycosides: A review. *Food Chem. Toxicol.* **125**, 225–232. (doi:10.1016/j.fct.2019.01.002)
 166. Chiwona-Karltun L, Brimer L, Kalenga Saka JD, Mhone AR, Mkumbira J, Johansson L, Bokanga M, Mahungu NM, Rosling H. 2004 Bitter taste in cassava roots correlates with cyanogenic glucoside levels. *J. Sci. Food Agric.* **84**, 581–590. (doi:10.1002/jsfa.1699)
 167. Williams RC, Blanco MB, Poelstra JW, Hunnicutt KE, Comeault AA, Yoder AD. 2020 Conservation genomic analysis reveals ancient introgression and declining levels of genetic diversity in Madagascar's hibernating dwarf lemurs. *Heredity (Edinb)*. **124**, 236–251. (doi:10.1038/s41437-019-0260-9)
 168. Hunnicutt KE *et al.* 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 Biol. Evol.* **12**, 3562–3579. (doi:10.1093/gbe/evz200)
 169. Hawkins MTR, Culligan RR, Frasier CL, Dikow RB, Hagenon R, Lei R, Louis EE. 2018 Genome sequence and population declines in the critically endangered greater bamboo lemur (*Prolemur simus*) and implications for conservation. *BMC Genomics* **19**, 445. (doi:10.1186/s12864-018-4841-4)
 170. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018 MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549. (doi:10.1093/molbev/msy096)
 171. Jiao H, Wang Y, Zhang L, Jiang P, Zhao H. 2018 Lineage-specific duplication and adaptive evolution of bitter taste receptor genes in bats. *Mol. Ecol.* **27**, 4475–4488. (doi:10.1111/mec.14873)
 172. Yamashita N, Tan CL, Vinyard CJ, Williams C. 2010 Semi-quantitative tests of cyanide in foods and excreta of Three *Hapalemur* species in Madagascar. *Am. J. Primatol.* **72**, 56–61. (doi:10.1002/ajp.20751)
 173. Hu X, Wang G, Shan L, Sun S, Hu Y, Wei F. 2020 TAS2R20 variants confer dietary adaptation to high-quercitrin bamboo leaves in Qinling giant pandas. *Ecol. Evol.* **10**, 5913–5921. (doi:10.1002/ece3.6327)
 174. Milton K. 1978 Role of the Upper Canine and P2 in Increasing the Harvesting Efficiency of *Hapalemur griseus* Link, 1795. *J. Mammal.* **59**, 188–190. (doi:10.2307/1379890)
 175. Jernvall J, Gilbert CC, Wright PC. 2008 Peculiar Tooth Homologies of the Greater Bamboo Lemur (*Prolemur* = *Hapalemur simus*). In *Elwyn Simons: A Search for Origins*, pp. 335–342. New York, NY: Springer New York. (doi:10.1007/978-0-387-73896-3_22)
 176. Tan CL. 2000 Behavior and ecology of three sympatric bamboo lemur species (genus *Hapalemur*) in Ranomafana National Park, Madagascar. State University of New York, Stony Brook.

177. Cabre-Vert N, Feistner ATC. 1995 Comparative gut passage time in captive lemurs. *Dodo, Jersey Wildl. Preserv. Trust.* **31**, 76–81.
178. Campbell JL, Williams CV, Eisemann JH. 2004 Use of total dietary fiber across four lemur species (*Propithecus verreauxi coquereli*, *Hapalemur griseus griseus*, *Varecia variegata*, and *Eulemur fulvus*): Does fiber type affect digestive efficiency? *Am. J. Primatol.* **64**, 323–335. (doi:10.1002/ajp.20081)
179. Overdorff DJ, Rasmussen MA. 1995 Determinants of Nighttime Activity in “Diurnal” Lemurid Primates. In *Creatures of the Dark* (eds L Alterman, GA Doyle, MK Izard), pp. 61–74. Boston, MA: Springer US. (doi:10.1007/978-1-4757-2405-9_5)
180. Huang H *et al.* 2016 Dietary resources shape the adaptive changes of cyanide detoxification function in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Sci. Rep.* **6**, 34700. (doi:10.1038/srep34700)
181. Johnson RN *et al.* 2018 Adaptation and conservation insights from the koala genome. *Nat. Genet.* **50**, 1102–1111. (doi:10.1038/s41588-018-0153-5)
182. Zhou Y *et al.* 2021 Platypus and echidna genomes reveal mammalian biology and evolution. *Nature* (doi:10.1038/s41586-020-03039-0)
183. Bak S *et al.* 2006 Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450. *Phytochem. Rev.* **5**, 309–329. (doi:10.1007/s11101-006-9033-1)
184. Gemmell NJ *et al.* 2020 The tuatara genome reveals ancient features of amniote evolution. *Nature* **584**, 403–409. (doi:10.1038/s41586-020-2561-9)
185. Benton MJ, Donoghue PCJ. 2006 Paleontological Evidence to Date the Tree of Life. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 26–53. (doi:10.1093/molbev/msl150)
186. Behrens M, Korsching SI, Meyerhof W. 2014 Tuning Properties of Avian and Frog Bitter Taste Receptors Dynamically Fit Gene Repertoire sizes. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 3216–3227. (doi:10.1093/molbev/msu254)
187. Olson M V. 1999 When Less Is More: Gene Loss as an Engine of Evolutionary Change. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 18–23. (doi:10.1086/302219)
188. Suzuki-Hashido N *et al.* 2015 Rapid expansion of phenylthiocarbamide non-tasters among Japanese macaques. *PLoS One* **10**, 1–21. (doi:10.1371/journal.pone.0132016)
189. Zhao S *et al.* 2013 Whole-genome sequencing of giant pandas provides insights into demographic history and local adaptation. *Nat. Genet.* **45**, 67–71. (doi:10.1038/ng.2494)
190. Campbell JL, Eisemann JH, Williams C V., Glenn KM. 2000 Description of the gastrointestinal tract of five Lemur species: *Propithecus tattersalli*, *Propithecus verreauxi coquereli*, *Varecia variegata*, *Hapalemur griseus*, and *Lemur catta*. *Am. J. Primatol.* **52**, 133–142. (doi:10.1002/1098-2345(200011)52:3<133::AID-AJP2>3.0.CO;2-#)
191. Schwitzer C. 2009 Gastrointestinal Morphology of the Crowned Lemur (*Eulemur coronatus*). *Anat. Histol. Embryol.* **38**, 429–431. (doi:10.1111/j.1439-0264.2009.00964.x)
192. Ganzhorn JU. 1986 Feeding behavior of *Lemur catta* and *Lemur fulvus*. *Int. J. Primatol.* **7**, 17–30. (doi:10.1007/BF02692307)
193. Sato H. 2009 Gut Passage Time and Size of Swallowed Seeds in the Common Brown Lemur and the Mongoose Lemur. *Primate Res.* **25**, 45–54. (doi:10.2354/psj.25.45)
194. Perrin MR. 2013 The Gastrointestinal Anatomy of the Lesser Bamboo Lemur, *Hapalemur griseus*, with Comments on Digestive Function. *South African J. Wildl. Res.* **43**, 79–83. (doi:10.3957/056.043.0112)
195. Greene LK, Bornbusch SL, McKenney EA, Harris RL, Gorvetzian SR, Yoder AD, Drea CM. 2019 The importance of scale in comparative microbiome research: New insights from the gut and glands of captive and wild lemurs. *Am. J. Primatol.* **81**. (doi:10.1002/ajp.22974)
196. Greene LK, Williams C V., Junge RE, Mahefarisoa KL, Rajaonarivelo T, Rakotondrainibe H, O’Connell TM, Drea CM. 2020 A role for gut microbiota in host niche differentiation. *ISME J.*

- 14, 1675–1687. (doi:10.1038/s41396-020-0640-4)
197. McKenney EA, O’Connell TM, Rodrigo A, Yoder AD. 2018 Feeding strategy shapes gut metagenomic enrichment and functional specialization in captive lemurs. *Gut Microbes* **9**, 202–217. (doi:10.1080/19490976.2017.1408762)
198. McKenney EA, Rodrigo A, Yoder AD. 2015 Patterns of Gut Bacterial Colonization in Three Primate Species. *PLoS One* **10**, e0124618. (doi:10.1371/journal.pone.0124618)
199. Springer A, Fichtel C, Al-Ghalith GA, Koch F, Amato KR, Clayton JB, Knights D, Kappeler PM. 2017 Patterns of seasonality and group membership characterize the gut microbiota in a longitudinal study of wild Verreaux’s sifakas (*Propithecus verreauxi*). *Ecol. Evol.* **7**, 5732–5745. (doi:10.1002/ece3.3148)
200. Milne-Edwards A, Grandidier A. 1875 Histoire Naturelle des Mammifères, Tome I, Texte I. In *Histoire physique, naturelle, et politique de Madagascar* (eds A Grandidier, P Mabilie, H de Saussure, L Zehntner), Paris: Imprimerie nationale.
201. Milne-Edwards A, Grandidier A. 1875 Histoire Naturelle des Mammifères, Tome IV, Atlas I. In *Histoire physique, naturelle, et politique de Madagascar* (eds A Grandidier, P Mabilie, H de Saussure, L Zehntner), Paris: Imprimerie nationale.
202. Chivers DJ, Hladik CM. 1980 Morphology of the gastrointestinal tract in primates: Comparisons with other mammals in relation to diet. *J. Morphol.* **166**, 337–386. (doi:10.1002/jmor.1051660306)
203. Perofsky AC, Lewis RJ, Meyers LA. 2019 Terrestriality and bacterial transfer: a comparative study of gut microbiomes in sympatric Malagasy mammals. *ISME J.* **13**, 50–63. (doi:10.1038/s41396-018-0251-5)
204. Simmen, B, Hladik CM. 1998 Sweet and Bitter Taste Discrimination in Primates: Scaling Effects across Species. *Folia Primatol.* **69**, 129–138. (doi:10.1159/000021575)
205. Zoonomia Consortium. 2020 A comparative genomics multitool for scientific discovery and conservation. *Nature* **587**, 240–245. (doi:10.1038/s41586-020-2876-6)
206. 日本モンキーセンター霊長類和名編纂ワーキンググループ. 2018 日本モンキーセンター霊長類和名リスト 2018年11月版.
207. 川田伸一郎, 岩佐真宏, 福井大, 新宅勇太, 天野雅男, 下稲葉さやか, 樽創, 姉崎智子, 横畑泰志. 2018 世界哺乳類標準和名目録. *哺乳類科学* **58**, 1–53. (doi:https://doi.org/10.11238/mammalianscience.58.S1)
208. dos Reis M, Gunnell GF, Barba-Montoya J, Wilkins A, Yang Z, Yoder AD. 2018 Using Phylogenomic Data to Explore the Effects of Relaxed Clocks and Calibration Strategies on Divergence Time Estimation: Primates as a Test Case. *Syst. Biol.* **67**, 594–615. (doi:10.1093/sysbio/syy001)
209. Ballesteros JA, Weinstein H. 1995 [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure–function relations in G protein-coupled receptors. In *Methods in Neurosciences*, pp. 366–428. (doi:10.1016/S1043-9471(05)80049-7)

図表

表1 実験に使用したゲノム DNA の由来個体と行動アッセイの対象個体

遺伝資料

種名	学名	提供者	個体番号	性別
ワオキツネザル	<i>Lemur catta</i>	日本モンキーセンター	Pr5862	メス
クロキツネザル	<i>Eulemur macaco</i>	日本モンキーセンター	Pr6526	メス
クロシロエリマキキツネザル	<i>Varecia variegata</i>	日本モンキーセンター	Pr5649	メス
ブラウンキツネザル	<i>Eulemur fulvus</i>	日本モンキーセンター	不明	不明
スンダスローロリス	<i>Nycticebus coucang</i>	日本モンキーセンター	Pr6102	メス
レッサースローロリス	<i>Nycticebus pygmaeus</i>	日本モンキーセンター	Pr6568	オス
ショウガラゴ	<i>Galago senegalensis</i>	日本モンキーセンター	Pr5790	メス
ポト	<i>Perodicticus potto</i>	日本モンキーセンター	Pr6581	オス
スラウエシメガネザル	<i>Tarsius tarsier</i>	恩賜上野動物園	不明	不明

行動アッセイ

種名	学名	飼育施設	個体番号	性別	年齢
クロキツネザル	<i>Eulemur macaco</i>	日本モンキーセンター	5278 (サン)	メス	20 歳以上

表2 2章で使用した全ゲノムアセンブリ一覧

種名 ^a	学名	アセンブリ名	引用元
ヒト	<i>Homo sapiens</i>	GRCh38.p12	Genome Reference Consortium
スーティーマンガベイ	<i>Cercocebus atys</i>	Caty_1.0	[92]
グリーンモンキー	<i>Chlorocebus sabaues</i>	Chlorocebus_sabeus 1.1	[93]
キンシコウ	<i>Rhinopithecus roxellana</i>	Rrox_v1	[94]
テングザル	<i>Nasalis larvatus</i>	Chaelie1.0	[205]
ハイイロネズミキツネザル	<i>Microcebus murinus</i>	Mmur_3.0	[89]
アオメクロキツネザル	<i>Eulemur flavifrons</i>	Eflavifronsk33QCA	[88]
マレーヒヨケザル	<i>Galeopterus variegatus</i>	G_variegatus-3.0.2	[205]
キタツパイ (中国)	<i>Tupaia belangeri chinensis</i>	TupChi_1.0	[95]
アフリカゾウ	<i>Loxodonta africana</i>	Loxaf3.0	[89]
ニシインドマナティー	<i>Trichechus manatus</i>	TriManLat1.0	[96]
ケープハイラックス	<i>Procavia capensis</i>	Pcap_2.0	[89]
ヒメハリテンレック	<i>Echinops telfairi</i>	EchTel2.0	[89]

^a原則として和名は、霊長類は「日本モンキーセンター 霊長類和名リスト 2018年11月版」に、それ以外の哺乳類は「世界哺乳類標準和名目録」に準拠した[206,207]。

表3 キツネザル TAS2R16 とヒト TAS2R16 におけるアミノ酸配列一致度(%)

	<i>H. sapiens</i>	<i>L. catta</i>	<i>E. macaco</i>
<i>L. catta</i>	68.62	-	-
<i>E. macaco</i>	69.31	95.02	-
<i>V. variagata</i>	68.97	93.69	95.35

表4 有胎盤類 TAS2R16 オートログにおける 262 番及び 282 番アミノ酸残基

和名 ^a	学名	目	262 番	282 番	Accession 番号	引用元
ヒト	<i>Homo sapiens</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
ニシチンパンジー	<i>Pan troglodytes verus</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
ボノボ	<i>Pan panicus</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
ニシローランドゴリラ	<i>Gorilla</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
スマトラオランウータン	<i>Pongo abelii</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
キタホオジロテナガザル	<i>Nomascus leucogenys</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
スーティーマンガベイ	<i>Cercocebus atys</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu	NW_012002290.1:21536045-21536920	[112]
アヌビスヒヒ	<i>Papio anubis</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
アカゲザル	<i>Macaca mulatta</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
カニクイザル	<i>Macaca fascicularis</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
グリーンモンキー	<i>Chlorocebus sabaeus</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu	NC_023662.1:91783088-91783963	[113]
白頭葉猴	<i>Trachypithecus leucocephalus</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[66]
キンシコウ	<i>Rhinopithecus roxellana</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu	NW_010807527.1:195193-196068	[114]
テングザル	<i>Nasalis larbatus</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu	CM003011.1:147496274-147497149	[205]
コモンマーモセット	<i>Callithrix jacchus</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
ボリビアリスザル*	<i>Saimiri boliviensis</i>	霊長目	TTA/Leu	CTG/Leu		[21]
スラウエシメガネザル	<i>Tarsius tarsier</i>	霊長目	TTC/Phe	CTG/Leu	DDBJ accession [LC415000]	本研究
フィリピンメガネザル	<i>Calrito syricata</i>	霊長目	TTC/Phe	CTG/Leu		[21]
アイアイ	<i>Daubentonia madagascariensis</i>	霊長目	TTC/Phe	TCG/Ser		[21]

ハイイロネズミキツネザル	<i>Microcebus murinus</i>	霊長目	TTC/Phe	TCG/Ser	NW_012202341.1:735189-736094	[109]
クロシロエリマキキツネザル	<i>Varecia variegata</i>	霊長目	TTC/Phe	TCG/Ser	DDBJ accession [LC414993]	本研究
ブラウンキツネザル	<i>Eulemur fulvus</i>	霊長目	TTC/Phe	TCG/Ser	DDBJ accession [LC414995]	本研究
アオメクロキツネザル	<i>Eulemur flaviflons</i>	霊長目	TTC/Phe	TCG/Ser	LGHW01000662.1:100449-101354	[108]
クロキツネザル	<i>Eulemur macaco</i>	霊長目	TTC/Phe	TCG/Ser	DDBJ accession [LC414994]	本研究
ワオキツネザル	<i>Lemur catta</i>	霊長目	TTC/Phe	TTG/Leu	DDBJ accession [LC414992]	本研究
スンドスローロリス	<i>Nycticebus coucang</i>	霊長目	TAC/Tyr	TCG/Ser	DDBJ accession [LC414997]	本研究
レッサースローロリス	<i>Nycticebus pygmaeus</i>	霊長目	TAC/Tyr	TCG/Ser	DDBJ accession [LC414998]	本研究
ポト	<i>Perodicticus potto</i>	霊長目	TAC/Tyr	TCG/Ser	DDBJ accession [LC414996]	本研究
ショウガラゴ	<i>Galago senegalensis</i>	霊長目	TAC/Tyr	GCA/Ala	DDBJ accession [LC414999]	本研究
ガーネットガラゴ	<i>Otolemur garnettii</i>	霊長目	TAC/Tyr	GCA/Ala		[21]
マレーヒヨケザル	<i>Galeopterus variegatus</i>	皮翼目	TAC/Tyr	CTG/Leu	NW_007726231.1:755116-756025	[205]
キタツパイ (中国)	<i>Tupaia belangeri chinensis</i>	登木目	TTC/Phe	CTG/Leu	NW_006159737.1:2521943-2522848	[95]
キタツパイ	<i>Tupaia belangeri</i>	登木目	TTC/Phe	CTG/Leu		[49]
ハツカネズミ (マウス)	<i>Mus musculus</i> (C57BL/6J)	齧歯目	TTC/Phe	ATG/Met		[21]
ドブネズミ (ラット)	<i>Rattus norvegicus</i> (BN)	齧歯目	TTC/Phe	ATG/Met		[21]
モンゴルキヌゲネズミ	<i>Cricetulus griseus</i>	齧歯目	TTC/Phe	ATG/Met		[21]
ヒメミユビトビネズミ	<i>Jaculus jaculus</i>	齧歯目	TTT/Phe	CTG/Leu		[21]
テンジクネズミ	<i>Cavia porcellus</i>	齧歯目	TAC/Tyr	ATG/Met		[21]
チンチラ	<i>Chinchilla lanigera</i>	齧歯目	TTC/Phe	CTG/Leu		[21]
デグー	<i>Octodon degus</i>	齧歯目	TCC/Ser	CTG/Leu		[21]
ハダカデバネズミ	<i>Heterocephalus glaber</i>	齧歯目	TGC/Cys	CTG/Leu		[21]
ジュウサンセンジリス	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	齧歯目	TAC/Tyr	CTG/Leu		[21]

アナウサギ	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	兎形目	TTC/Phe	CTG/Leu	[21]
モウコノウマ	<i>Equus ferus przewalskii</i>	奇蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
シロサイ	<i>Ceratotherium simum</i>	奇蹄目	TAC/Tyr	CTG/Leu	[50]
ミンククジラ	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ヤギ (野生)	<i>Capra aegagrus</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ヤギ	<i>Capra aegagrus hircus</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ムフロ	<i>Ovis aries musimon</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ヒツジ	<i>Ovis aries</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ヤク	<i>Bos grunniens</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
チルー	<i>Pantholops hodgsonii</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
スイギュウ	<i>Bubalus bubalis</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
コブウシ	<i>Bos indicus</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ウシ	<i>Bos taurus</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
イノシシ	<i>Sus scrofa</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
アルパカ	<i>Vicugna pacos</i>	鯨偶蹄目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
オオクビワコウモリ	<i>Eptesicus fuscus</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ブラントホオヒゲコウモリ A	<i>Myotis brandtii</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ブラントホオヒゲコウモリ B	<i>Myotis brandtii</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ブラントホオヒゲコウモリ C	<i>Myotis brandtii</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
ブラントホオヒゲコウモリ D	<i>Myotis brandtii</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
デビッドホオヒゲコウモリ A	<i>Myotis davidii</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
デビッドホオヒゲコウモリ B	<i>Myotis davidii</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]
デビッドホオヒゲコウモリ C	<i>Myotis davidii</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu	[50]

トビイロホオヒゲコウモリ A	<i>Myotis lucifugus</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu		[50]
トビイロホオヒゲコウモリ B	<i>Myotis lucifugus</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu		[50]
トビイロホオヒゲコウモリ C	<i>Myotis lucifugus</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu		[50]
トビイロホオヒゲコウモリ D	<i>Myotis lucifugus</i>	翼手目	TTC/Phe	CTG/Leu		[50]
クロオオコウモリ	<i>Pteropus alecto</i>	翼手目	TTC/Phe	ATG/Met		[50]
ジャワオオコウモリ	<i>Pteropus vampyrus</i>	翼手目	TTC/Phe	ATG/Met		[50]
アフリカゾウ	<i>Loxodonta africana</i>	長鼻目	TTC/Phe	CTG/Leu	NW_003573425.1:92839824-92840705	[17]
ニシインドマナティー	<i>Trichechus manatus</i>	海牛目	TTC/Phe	CTG/Leu	NW_004444103.1:1665079-1665963	[96]
ケープハイラックス A	<i>Procavia capensis</i>	イワダヌキ目	TTC/Phe	CTG/Leu	KN676540.1:608280-609164	[89]
ケープハイラックス C	<i>Procavia capensis</i>	イワダヌキ目	TTA/Leu	GCT/Ala	KN676540.1:640492-641421	[89]
ケープハイラックス D	<i>Procavia capensis</i>	イワダヌキ目	TTC/Phe	CTG/Leu	KN676540.1:670412-671293	[89]
ケープハイラックス E	<i>Procavia capensis</i>	イワダヌキ目	TTC/Phe	CTG/Leu	KN676540.1:691196-692077	[89]
ケープハイラックス G	<i>Procavia capensis</i>	イワダヌキ目	TTC/Phe	CTA/Leu	KN676540.1:757022-757900	[89]
ケープハイラックス H	<i>Procavia capensis</i>	イワダヌキ目	TTC/Phe	CTG/Leu	KN676540.1:767557-768441	[89]
ケープハイラックス I	<i>Procavia capensis</i>	イワダヌキ目	TTC/Phe	CTG/Leu	KN676540.1:810168-811088	[89]
ケープハイラックス J	<i>Procavia capensis</i>	イワダヌキ目	TTC/Phe	CTG/Leu	KN676540.1:814538-815458	[89]
ケープハイラックス K	<i>Procavia capensis</i>	イワダヌキ目	TTC/Phe	CTG/Leu	KN676540.1:822452-823336	[89]
ヒメハリテンレック	<i>Echinops telfairi</i>	アフリカ トガリネズミ目	TTC/Phe	CTG/Leu	NW_004558729.1:15899598-15900497	[89]

*リスザル TAS2R16 は偽遺伝子している。

^a原則として和名・高次分類名は、霊長類は「日本モンキーセンター 霊長類和名リスト 2018年11月版」に、それ以外の哺乳類は「世界哺乳類標準和名目録」に準拠した[206,207]。

表5 3章で使用した全ゲノムアセンブリ一覧

和名 ^a	学名	アセンブリ名	データ元	引用元
ヒロバナジェントルキツネザル	<i>Prolemur simus</i>	Prosim_1.0	NCBI	[169]
キンイロジェントルキツネザル	<i>Hapalemur aureus</i>	-	Kent State University	未発表
ハイイロジェントルキツネザル	<i>Hapalemur griseus</i>	-	Kent State University	未発表
ハイイロネズミキツネザル	<i>Microcebus murinus</i>	Mmur_3.0	NCBI	[109]
セアカネズミキツネザル	<i>Microcebus griseorufus</i>	Mgri_1.0	NCBI	[168]
ミッターマイヤーネズミキツネザル	<i>Microcebus mittermeieri</i>	Mmit_1.0	NCBI	[168]
キタネズミキツネザル	<i>Microcebus tavaratra</i>	Mtav_1.0	NCBI	[168]
キンイロネズミキツネザル	<i>Microcebus ravelobensis</i>	Mrav_1.0	NCBI	[168]
キタオオネズミキツネザル	<i>Mirza zaza</i>	Mzaz_1.0	NCBI	[168]
フトオコビトキツネザル	<i>Cheirogaleus medius</i>	ASM8008673v1	NCBI	[167]
コクレルシファカ	<i>Propithecus coquereli</i>	Pcoq_1.0	NCBI	未発表

^a和名は「日本モンキーセンター霊長類和名リスト 2018年11月版」に準拠した[206]。

表 6 ジェントルキツネザル TAS2R16 におけるアミノ酸配列一致度 (%)

	<i>L. catta</i>	<i>P. simus</i>	<i>H. aureus</i>
<i>P. simus</i>	94.7	-	-
<i>H. aureus</i>	93.7	96.3	-
<i>H. griseus</i>	94.0	97.3	97.7

表7 ジェントルキツネザル TAS2R16 の β グルコシド応答に関するパラメータ

リガンド	種名	TH (mM)	A _{max}	EC ₅₀ (mM)
linamarin	<i>L. catta</i>	5.0	0.84 ± 0.070	> 5.0
	<i>P. simus</i>	-	-	n.d.
	<i>H. aureus</i>	10	0.52 ± 0.041*	> 10
	<i>H. griseus</i>	10	0.33 ± 0.031*	> 10
salicin	<i>L. catta</i>	1.0	0.97 ± 0.013	2.1 ± 0.38
	<i>P. simus</i>	40	0.16 ± 0.032**	> 40
	<i>H. aureus</i>	2.5	0.77 ± 0.062**	6.8 ± 1.1*
	<i>H. griseus</i>	-	-	n.d.
arbutin	<i>L. catta</i>	2.5	0.53 ± 0.048	2.3 ± 0.21
	<i>P. simus</i>	-	-	n.d.
	<i>H. aureus</i>	-	-	n.d.
	<i>H. griseus</i>	-	-	n.d.

n.d.は‘not detectable’を示す。EC₅₀とA_{max}について、*L. catta*との差をBH補正による両側 Welch’s t test で検定した (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; 統計量の詳細は表9を参照)。

表 8 ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 の β グルコシド応答に関するパラメータ

リガンド	種名	TH (mM)	A_{\max}	EC_{50} (mM)
linamarin	<i>L. catta</i>	5.0	0.84 ± 0.070^a	> 5.0
	anc-Bamboo lemur	10	0.72 ± 0.081^{ab}	> 10
	anc-Hapalemur	10	0.54 ± 0.048^b	> 10
salicin	<i>L. catta</i>	1.0	0.97 ± 0.013^a	2.1 ± 0.38^a
	anc-Bamboo lemur	2.5	0.70 ± 0.027^b	4.1 ± 0.34^b
	anc-Hapalemur	2.5	0.60 ± 0.014^b	4.5 ± 0.54^b
arbutin	<i>L. catta</i>	2.5	0.53 ± 0.048^a	2.3 ± 0.21^a
	anc-Bamboo lemur	5.0	0.22 ± 0.068^b	3.0 ± 0.62^a
	anc-Hapalemur	5.0	0.23 ± 0.047^b	3.6 ± 0.52^a

n.d.は‘not detectable’を示す。 EC_{50} と A_{\max} について、*L. catta* との差を BH 補正による両側 Welch’s t test で検定した。各リガンドの各パラメータについて、a と b の間で有意水準 $\alpha=0.05$ で有意差が認められた（統計量の詳細は表 9 を参照）。

表9 TAS2R16 の β グルコシド応答に関するパラメータの両側 Welch's t test の結果

	リガンド	1	2	df	t value	p value	q value ^a
EC ₅₀	salicin	<i>H. aureus</i>	<i>L. catta</i>	3.74	-4.12	0.017	0.034
		<i>L. catta</i>	anc-Bamboo lemur	5.89	-3.99	0.0075	0.026
		<i>L. catta</i>	anc-Hapalemur	6.75	-3.65	0.0088	0.026
		anc-Bamboo lemur	anc-Hapalemur	6.39	0.61	0.56	0.56
		<i>H. aureus</i>	anc-Bamboo lemur	3.56	2.39	0.083	0.12
		<i>H. aureus</i>	anc-Hapalemur	4.47	1.92	0.12	0.14
	arbutin	<i>L. catta</i>	anc-Bamboo lemur	4.87	-1.11	0.32	0.48
		<i>L. catta</i>	anc-Hapalemur	5.17	-2.36	0.063	0.19
		anc-Bamboo lemur	anc-Hapalemur	7.76	0.73	0.48	0.48
A _{max}	linamarin	<i>H. aureus</i>	<i>L. catta</i>	3.89	3.89	0.012	0.025
		<i>H. aureus</i>	<i>H. griseus</i>	5.6	-3.81	0.01	0.025
		<i>H. griseus</i>	<i>L. catta</i>	4.13	6.66	0.0024	0.024
		<i>L. catta</i>	anc-Bamboo lemur	5.86	1.06	0.33	0.37
		<i>L. catta</i>	anc-Hapalemur	5.35	3.55	0.015	0.025
		anc-Bamboo lemur	anc-Hapalemur	4.89	-1.98	0.11	0.13
		<i>H. griseus</i>	anc-Bamboo lemur	3.85	-4.53	0.012	0.025
		<i>H. griseus</i>	anc-Hapalemur	5.09	-3.6	0.015	0.025
		<i>H. aureus</i>	anc-Bamboo lemur	4.41	-2.2	0.087	0.12
		<i>H. aureus</i>	anc-Hapalemur	5.82	-0.2	0.85	0.85
	salicin	<i>H. aureus</i>	<i>L. catta</i>	3.27	3.2	0.044	0.063
		<i>H. aureus</i>	<i>P. simus</i>	4.36	-8.88	0.00059	0.0012
		<i>P. simus</i>	<i>L. catta</i>	2.67	-23.64	0.00035	0.0012
		<i>L. catta</i>	anc-Bamboo lemur	4.37	9.32	0.00048	0.0012
		<i>L. catta</i>	anc-Hapalemur	4.55	4.49	0.0081	0.013
		anc-Bamboo lemur	anc-Hapalemur	5.99	0.84	0.43	0.48
		<i>P. simus</i>	anc-Bamboo lemur	4.33	-13.02	0.00012	0.00061
		<i>P. simus</i>	anc-Hapalemur	5.96	-10.01	0.000006	0.0006
		<i>H. aureus</i>	anc-Bamboo lemur	4.08	1.12	0.33	0.41
		<i>H. aureus</i>	anc-Hapalemur	6.18	0.35	0.35	0.74
	arbutin	<i>L. catta</i>	anc-Bamboo lemur	5.64	4.42	0.0052	0.0093
		<i>L. catta</i>	anc-Hapalemur	5.2	4.44	0.0062	0.0093
		anc-Bamboo lemur	anc-Hapalemur	7.86	0.28	0.78	0.78

^a 両側 Welch's t test の結果を BH 補正した値

表 10 ジェントルキツネザル TAS2R16 の変異体の β グルコシド応答に関する
パラメータ

種名	TH (mM)	A_{\max}	EC ₅₀ (mM)
<i>P. simus</i> 野生型	40	0.16 ± 0.032	> 40
F129L	-	-	n.d.
A140T	20	0.39 ± 0.056*	> 20
L144S	1.0	0.94 ± 0.063***	4.3 ± 0.85
<i>H. aureus</i> 野生型	2.5	0.74 ± 0.032	6.8 ± 1.1
H71Y	5.0	0.87 ± 0.11	6.4 ± 0.39
L79W	2.5	0.78 ± 0.067	3.6 ± 0.79
N220D	5.0	0.84 ± 0.027	6.7 ± 1.2
L256F	5.0	0.55 ± 0.037	9.9 ± 2.9
V178L	2.5	0.83 ± 0.025	6.1 ± 2.4
K257R	1.0	0.88 ± 0.041	4.1 ± 0.10
<i>H. griseus</i> 野生型	-	-	n.d.
N147S	40	0.26 ± 0.021	> 40
S251L	2.5	0.51 ± 0.039	> 2.5
V178L	20	0.17 ± 0.0060	> 20
K257R	-	-	n.d.

n.d.は‘not detectable’を示す。 A_{\max} について、野生型との差を Dunnett’s t test で検定した
(*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; 統計量の詳細は表 12 を参照)。

表 11 ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 の変異体の β グルコシド応答に関するパラメータ

リガンド	種名	TH (mM)	A_{\max}	EC ₅₀ (mM)
linamarin	anc-Bamboo lemur	10	0.72 ± 0.081	> 10
	anc-Bamboo lemur S144L	-	-	n.d.
	anc-Hapalemur	10	0.54 ± 0.048	> 10
	anc-Hapalemur L251S	10	0.39 ± 0.038 [§]	> 10
salicin	anc-Bamboo lemur	2.5	0.70 ± 0.027	4.1 ± 0.34
	anc-Bamboo lemur S144L	10	0.45 ± 0.053*	> 10
	anc-Hapalemur	1.0	0.60 ± 0.014	4.5 ± 0.54
	anc-Hapalemur L251S	20	0.11 ± 0.021***	> 20
arbutin	anc-Bamboo lemur	5.0	0.22 ± 0.068	3.0 ± 0.62
	anc-Bamboo lemur S144L	10	0.14 ± 0.046	> 10
	anc-Hapalemur	5.0	0.23 ± 0.047	3.6 ± 0.52
	anc-Hapalemur L251S	-	-	n.d.

n.d.は‘not detectable’を示す。 A_{\max} について、野生型との差を両側 Welch’s t test で検定した (§: 0.05 < p < 0.1, *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001; 統計量の詳細は表 13 を参照)。

表 12 ジェントルキツネザル TAS2R16 の変異体の β グルコシド応答に関する
各パラメータの Dunnett's test の結果

	コントロール	比較対象	Est	Error	t value	p value
EC ₅₀	<i>H. aureus</i>	H71Y	-0.48	1.87	-0.25	1.00
		L79W	-3.2	2.02	-1.58	0.46
		N220D	-0.15	2.02	-0.072	1.00
		L256F	3.05	2.02	1.51	0.51
		V178L	-0.76	2.02	-0.38	1.00
		K257R	-2.74	2.02	-1.36	0.61
A _{max}	<i>H. aureus</i>	H71Y	0.099	0.091	1.09	0.78
		L79W	0.0031	0.091	0.035	1.00
		N220D	0.063	0.098	0.65	0.97
		L256F	-0.22	0.098	-2.25	0.16
		V178L	0.059	0.098	0.60	0.98
		K257R	0.11	0.098	1.08	0.79
	<i>P. simus</i>	A140T	0.23	0.073	3.19	0.033
		L144S	0.79	0.073	10.70	0.000072

表 13 ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 の変異体の β グルコシド応答の A_{\max} の両側 Welch's test の結果

	リガンド	LCA	LCA 変異体	df	t value	p value
A_{\max}	linamarin	anc-Bamboo lemur	anc-Bamboo lemur S144L	-	-	-
		anc-Hapalemur	anc-Hapalemur L251S	4.99	-2.45	0.057
	salicin	anc-Bamboo lemur	anc-Bamboo lemur S144L	4.44	-4.12	0.011
		anc-Hapalemur	anc-Hapalemur L251S	4.22	-13.65	0.00012
	arbutin	anc-Bamboo lemur	anc-Bamboo lemur S144L	7.00	-1.08	0.32
		anc-Hapalemur	anc-Hapalemur L251S	-	-	-

キツネザル科 (Lemuridae)

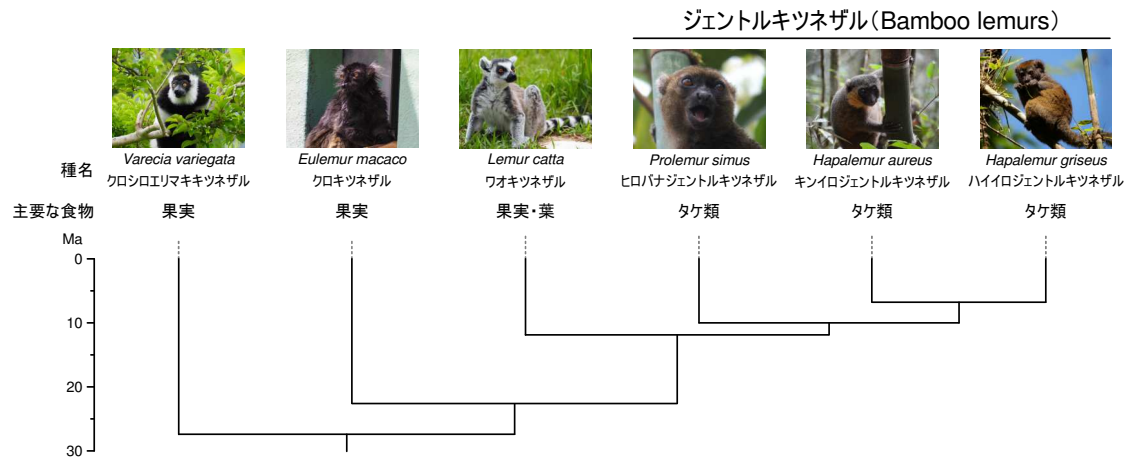
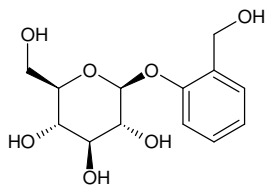
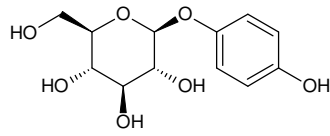


図1 キツネザル科の系統関係

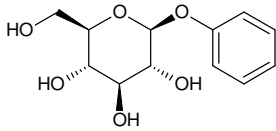
推定分岐年代は、dos Reis *et al.*, 2019 より引用[208]。写真撮影：Morgan E. Chaney (*H. aureus*)、M. Elise Lauterbur (*P. simus*)、糸井川壮大 (*V. variegata*、*E. macaco*、*L. catta*、*H. griseus*)



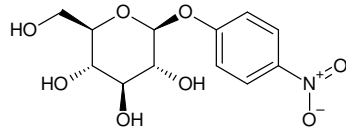
salicin



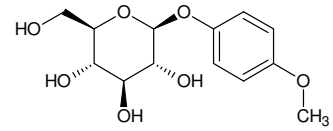
arbutin



phenyl- β -D-
glucopyranoside



4-nitrophenyl- β -D-
glucopyranoside



4-methoxyphenyl- β -D-
glucopyranoside

図2 実験に用いた β グルコシドの一覧

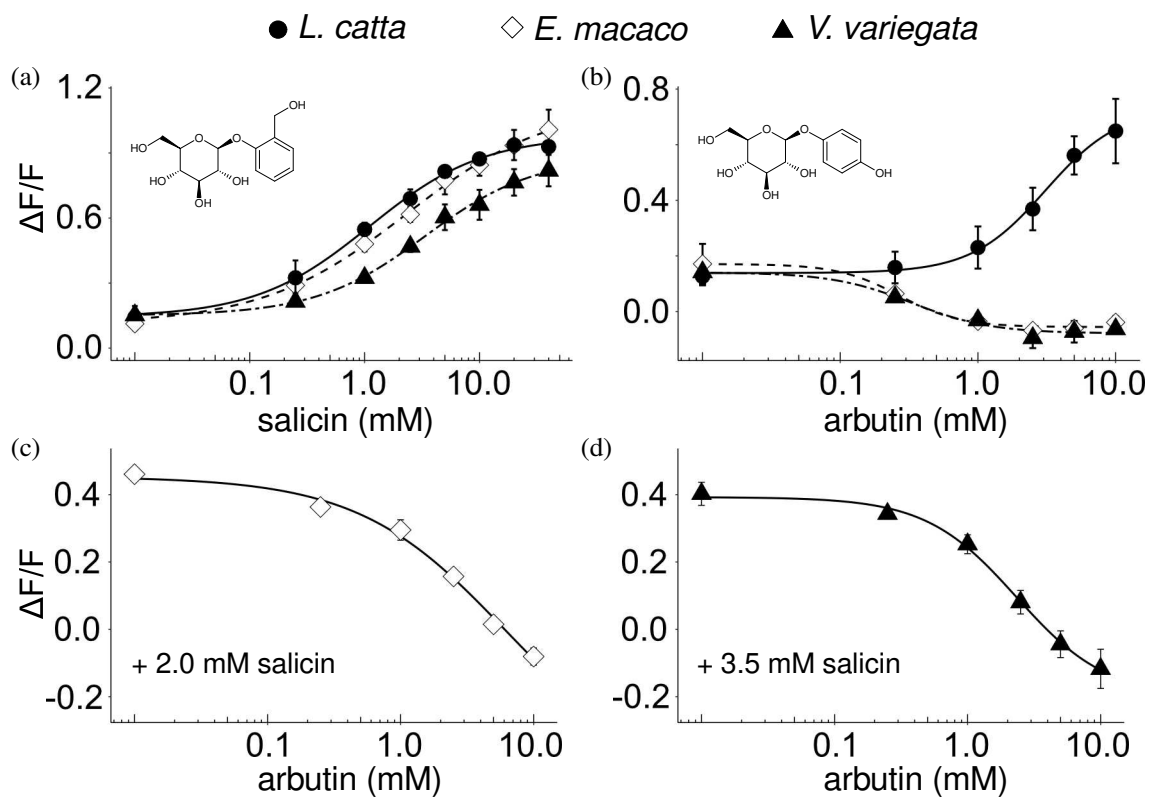


図3 キツネザル科3種における天然 β グルコシドに対するTAS2R16の応答

キツネザルTAS2R16の(a) salicin、(b) arbutinに対する応答。salicin存在下でのarbutinによる(c) *E. macaco* と(d) *V. variagata* TAS2R16の抑制。

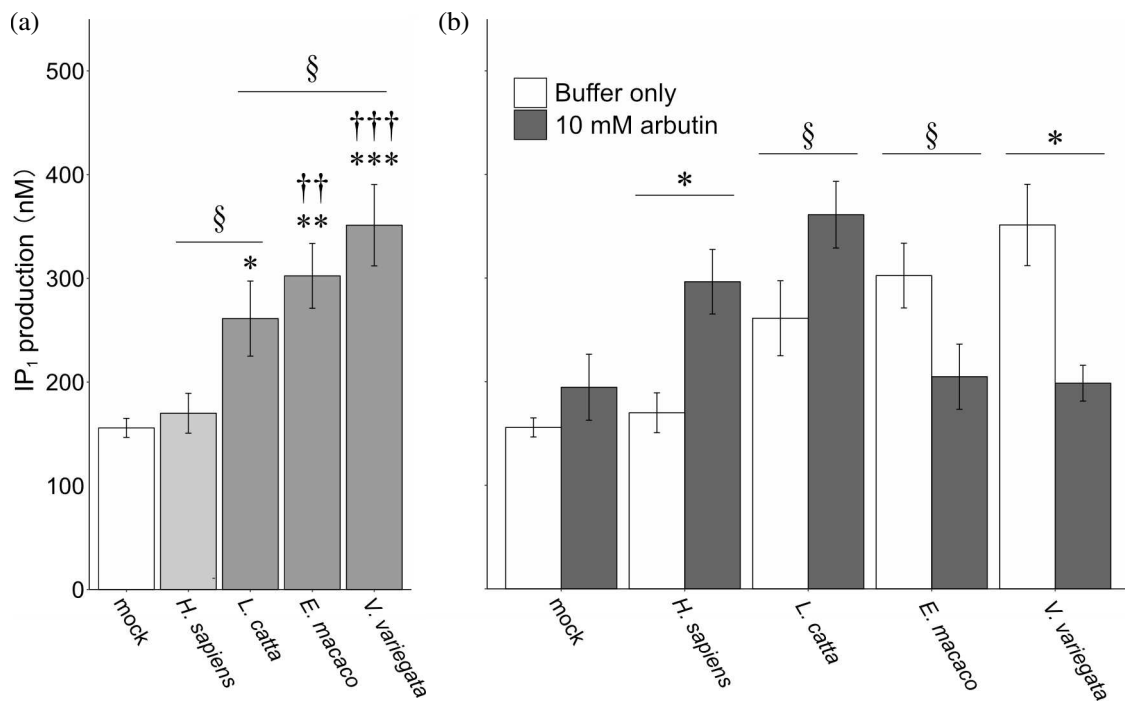


図4 キツネザル科3種における TAS2R16 の IP₁ 産生量

(a) Buffer のみ (リガンドなし) を添加した時の IP₁ 産生量。mock は空の pEAK10 ベクターを表す。統計的有意差は、ANOVA と BH 補正による多重両側 Welch's t test による (mock との比較: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, *H. sapiens* との比較: †: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$, †††: $p < 0.001$, §: $p < 0.1$)。 (b) 10 mM arbutin を添加した時の IP₁ 産生量。統計的有意差は、ANOVA と BH 補正による多重両側 Welch's t test による (§: $p < 0.1$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)。

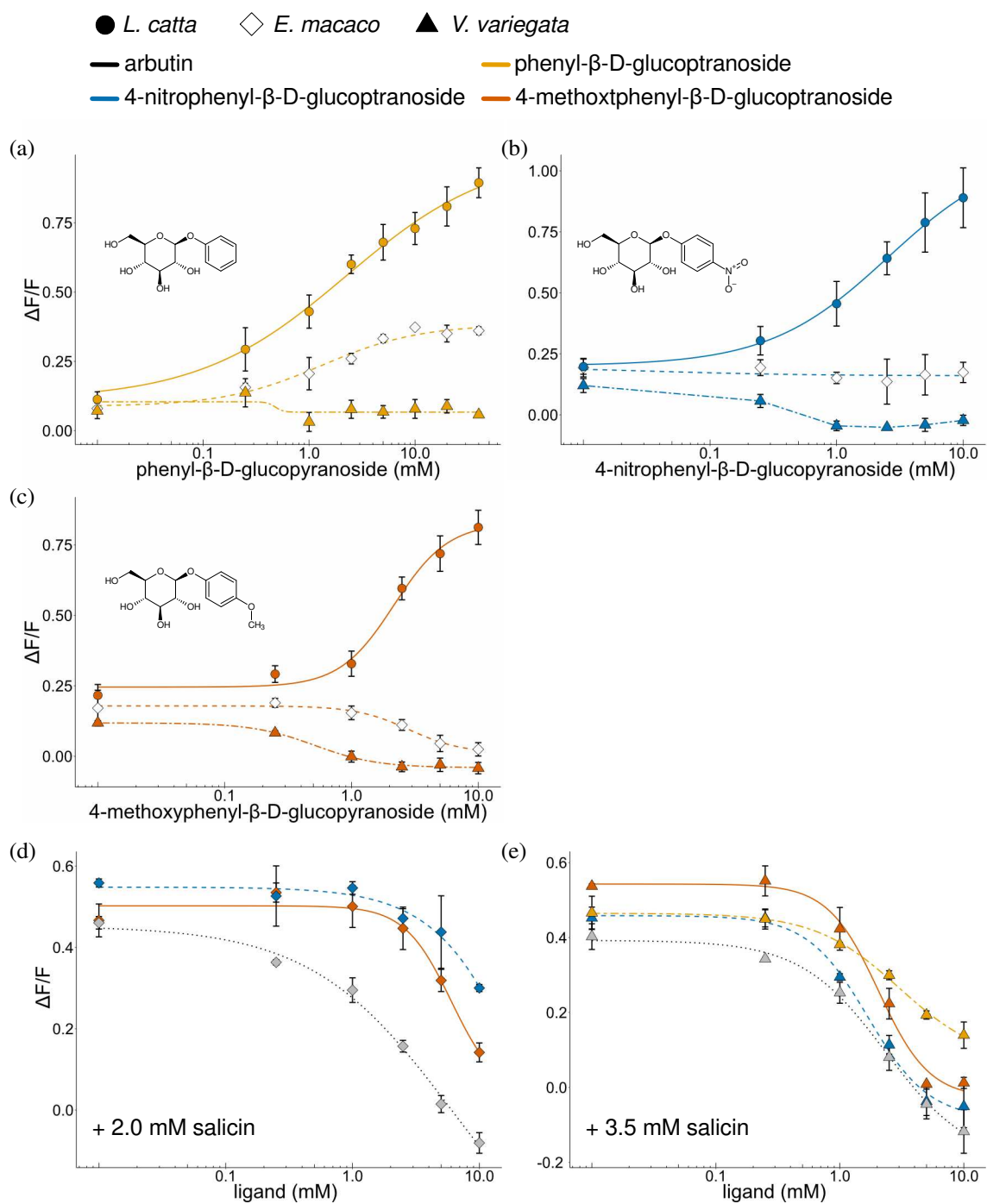


図5 人工βグルコシドに対するキツネザル TAS2R16 の応答

キツネザル TAS2R16 の (a) phenyl-β-D-glucopyranoside、(b) 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside、(c) 4-methoxyphenyl-β-D-glucopyranoside に対する応答。salicin 存在下での人工βグルコシドによる (d) *E. macaco* と (e) *V. variagata* TAS2R16 の抑制。

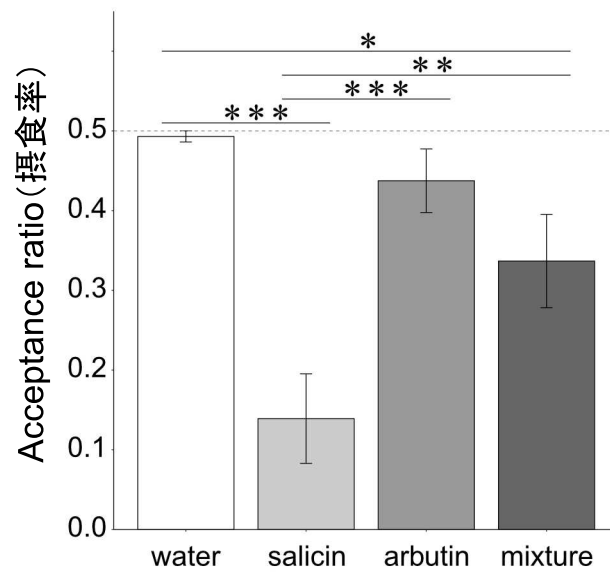


図6 クロキツネザルに対する食物選択実験

統計的有意差は、ANOVA と BH 補正による多重両側 Welch's t test による (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)。

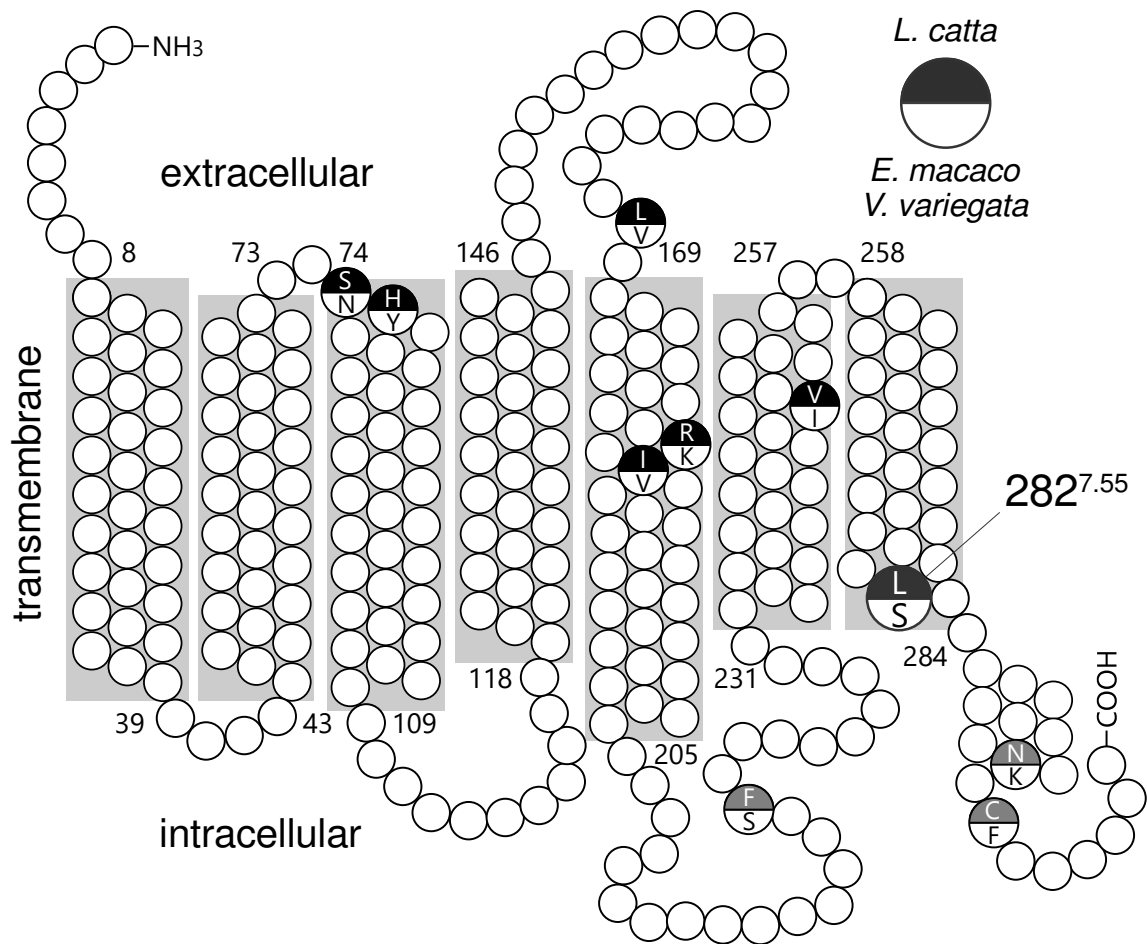


図7 *L. catta* 固有のアミノ酸置換の分布

L. catta 固有のアミノ酸置換部位のうち、変異体解析を実施した部位を黒、対象外の部位を灰色で表記した。BW 番号 (Ballesteros-Weinstein numbers) をアミノ酸番号に上付き数字として付記した[209]。

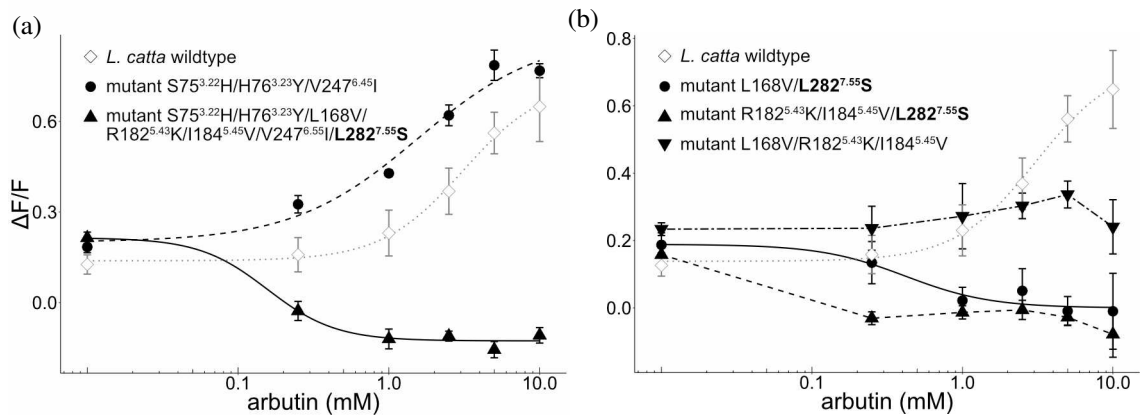


図8 arbutin 応答に寄与するアミノ酸残基のスクリーニング

(a) 7 残基変異体と 3 残基変異体の arbutin 応答。(b) 4 つの候補残基の組み合わせ変異体の arbutin 応答。BW 番号をアミノ酸番号に上付き数字として付記した。

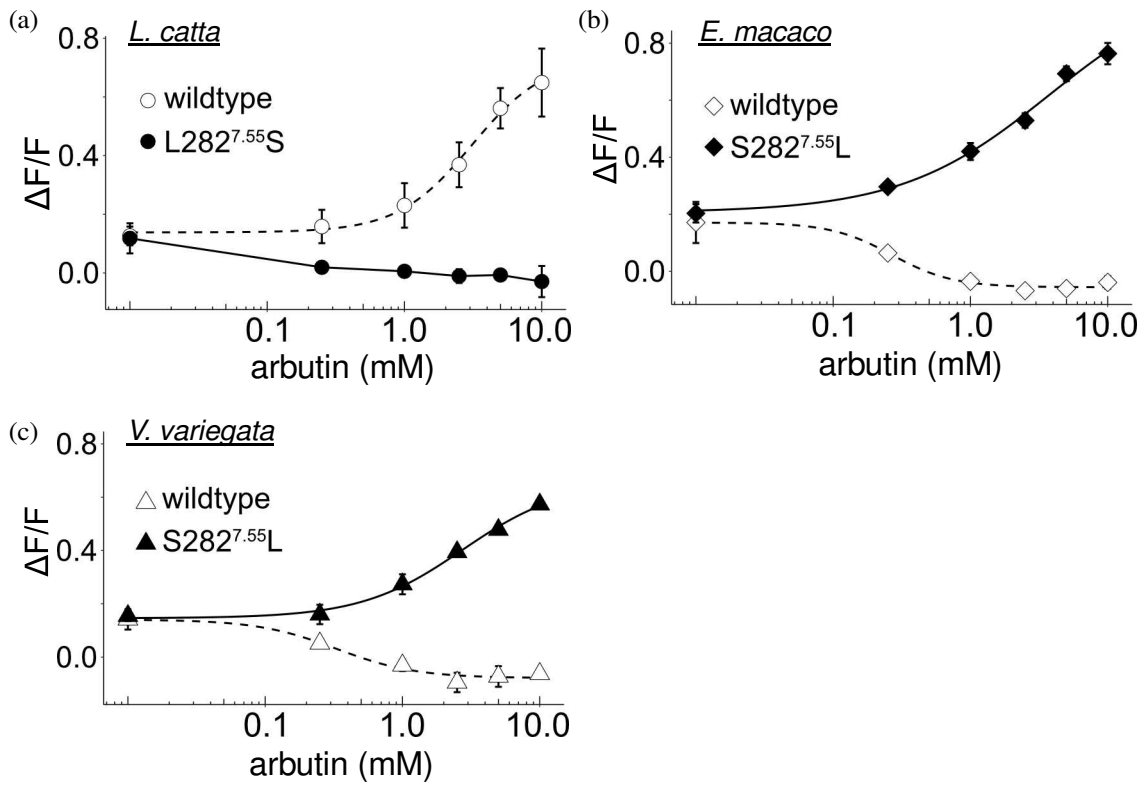


図9 282番アミノ酸残基の変異による arbutin 応答の変化

(a) *L. catta* の 282 番変異体(L282S)の arbutin 応答。(b) *E. macaco* の 282 番変異体(S282L)の arbutin 応答。(c) *V. variagata* の 282 番変異体 (S282L) の arbutin 応答。BW 番号をアミノ酸番号に上付き数字として付記した。

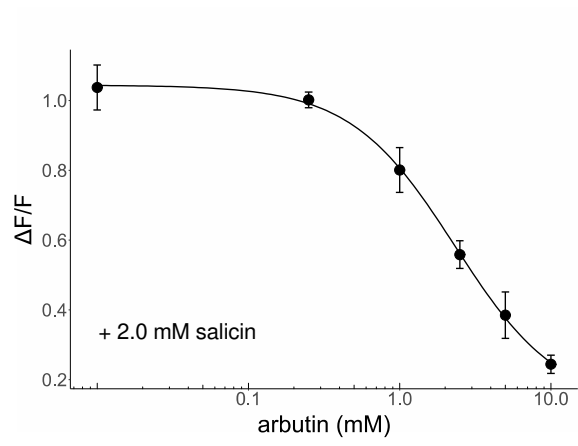


図 10 *L. catta* 282 番変異体における arbutin の TAS2R16 の抑制

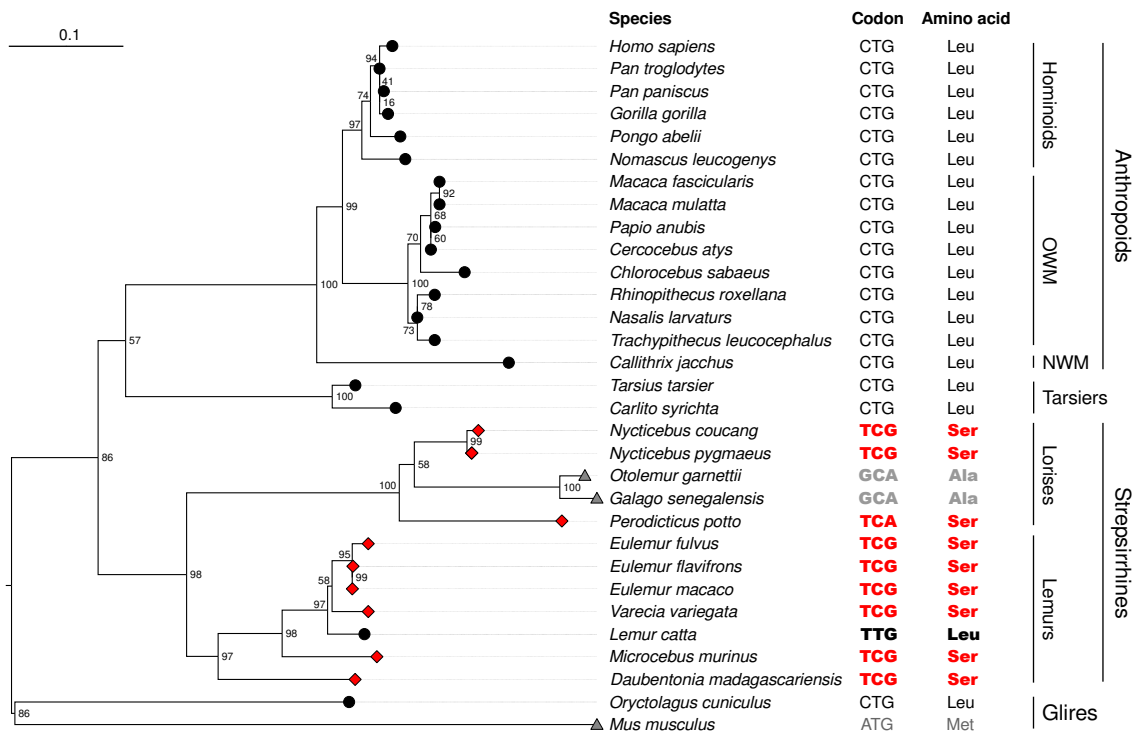


図 11 霊長類における TAS2R16 の 282 番残基の進化

系統樹は、TAS2R16 アミノ酸配列全長を用いて最尤法で作成した（ブートストラップリサンプリング 1000 回）。系統樹の枝先の記号は 282 番残基の種類を表し、赤ダイヤモンドが Serine、黒丸が Leucine、灰色三角は Alanine 又は Methionine を表す。種名の右には、282 番のアミノ酸残基とそれに対応するコドンに記載した。系統樹の各ノードの値はブートストラップ値を示す。OWM は旧世界ザル（Old World Monkey）、NWM は新世界ザル（New World Monkey）を表す。

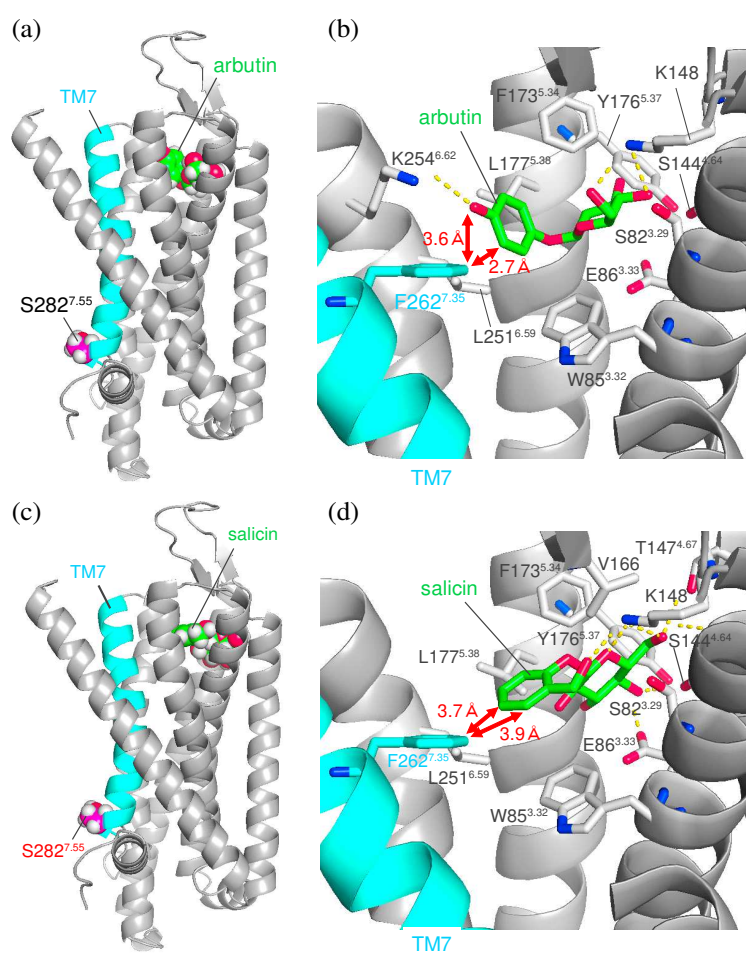


図 12 キツネザル TAS2R16 とリガンドの結合様式

キツネザル TAS2R16 と arbutin (a-b)及び salicin (c-d)の推定結合様式。(a)と(c)では、結合したリガンドと 282 番残基をスフィア (マゼンタ/緑：炭素原子、青：窒素原子、赤：酸素原子、白：水素原子) で表示した。(b)と(d)では、リガンドから 3 Å 以内のアミノ酸残基をスティックで表示した。水素結合は黄色の破線で表記した。BW 番号をアミノ酸番号に上付き数字として付記した。

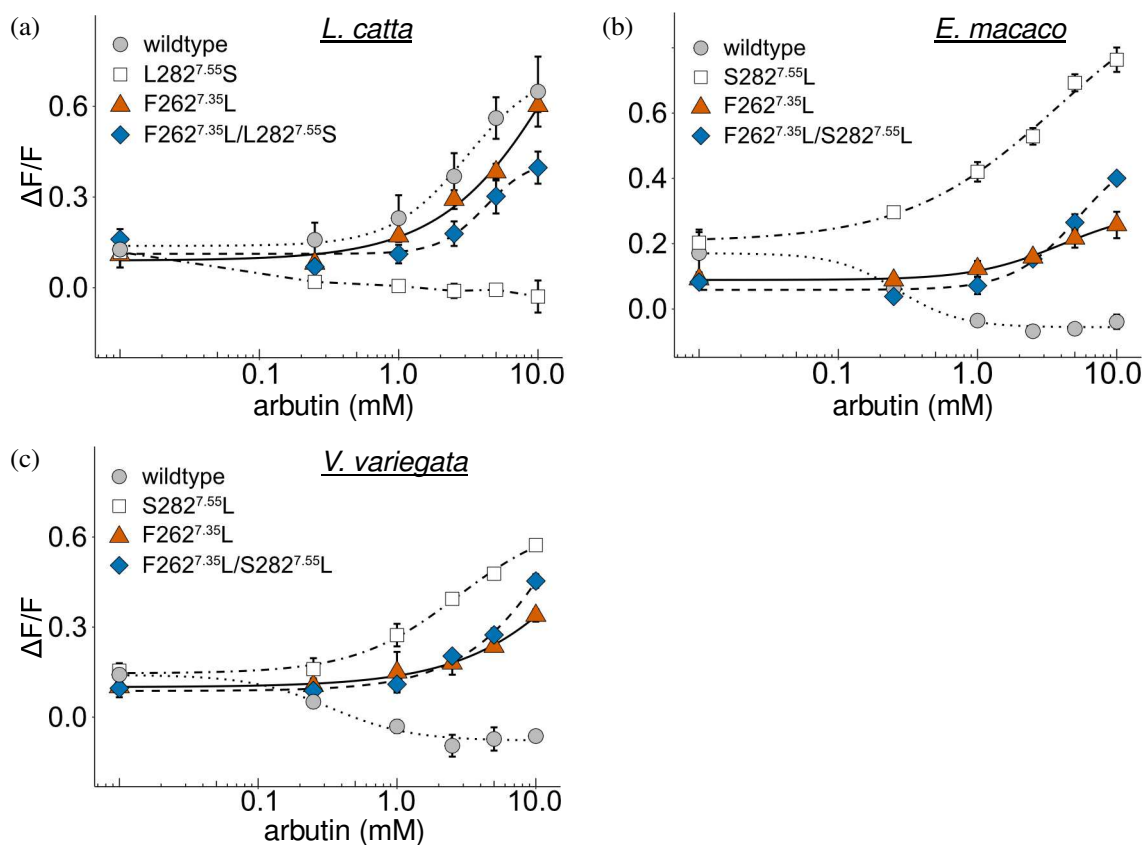


図 13 262 番アミノ酸残基の変異による arbutin 応答への変化

- (i) *L. catta* の 262 番変異体 (F282L) と 2 残基変異体 (F262L/L282S) の arbutin 応答。
(ii) *E. macaco* の 282 番変異体 (S282L) と 2 残基変異体 (F262L/S2S82L) の arbutin 応答。
(c) *V. variagata* の 282 番変異体 (S282L) と 2 残基変異体 (F262L/S2S82L) の arbutin 応答。BW 番号をアミノ酸番号に上付き数字として付記した。

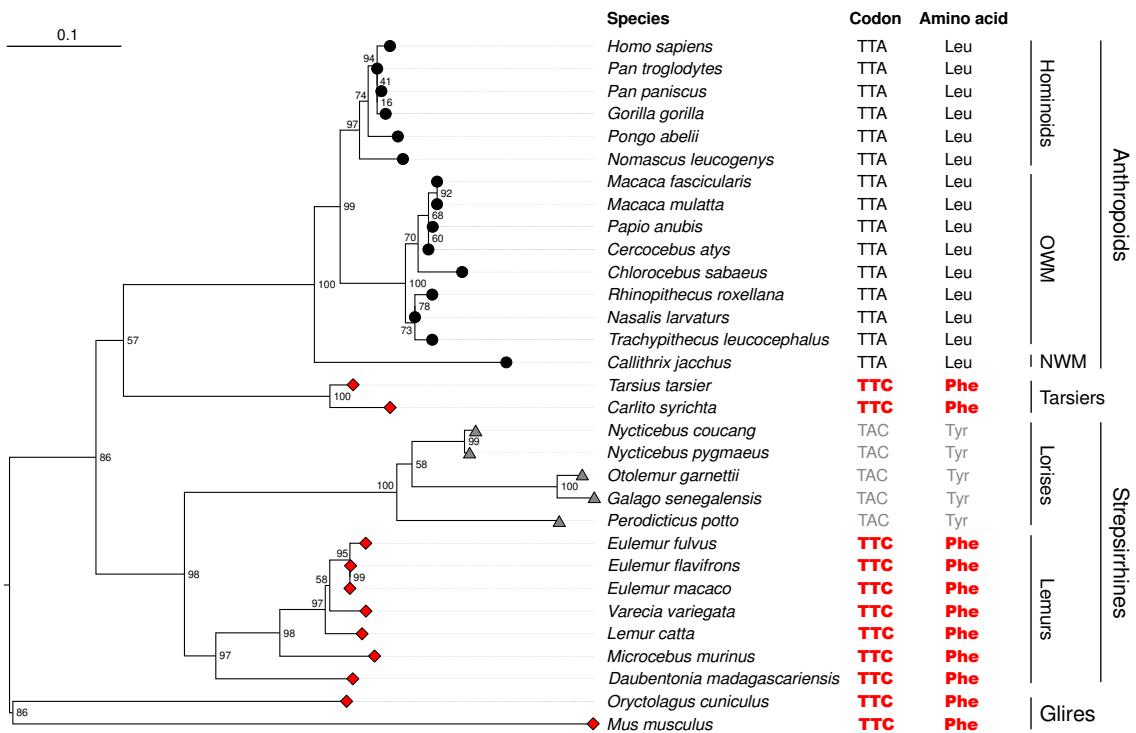


図 14 霊長類における TAS2R16 の 262 番残基

系統樹は、TAS2R16 アミノ酸配列全長を用いて最尤法で作成した（ブートストラップリサンプリング 1000 回）。系統樹の枝先の記号は 262 番残基の種類を表し、赤ダイヤモンドが Phenylalanine、黒丸が Leucine、灰色三角は Tyrosine を表す。種名の右には、262 番のアミノ酸残基とそれに対応するコドンに記載した。系統樹の各ノードの値はブートストラップ値を示す。OWM は旧世界ザル（Old World Monkey）、NWM は新世界ザル（New World Monkey）を表す。

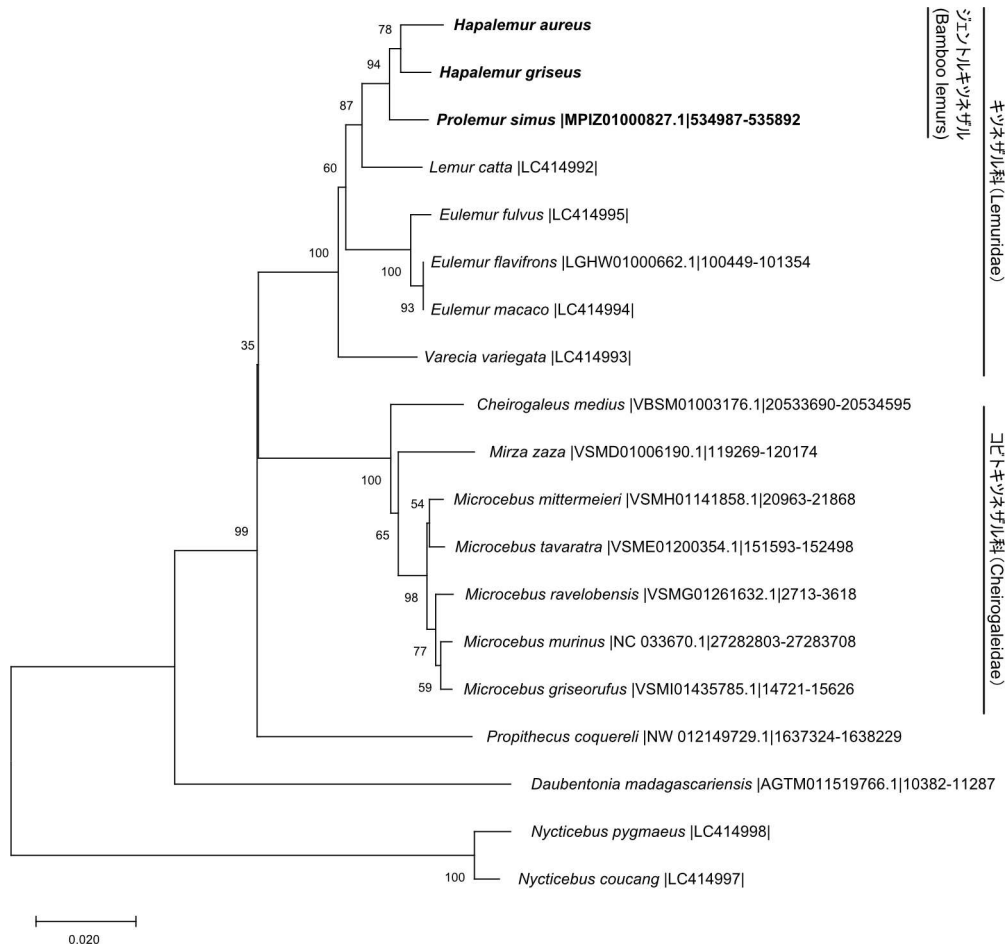


図 15 新規同定配列を含む曲鼻猿類 *TAS2R16* オーソログの近隣接合系統樹

系統樹は、*TAS2R16* 塩基配列全長を用いて近隣接合法で作成した（ブートストラップリサンプリング 1000 回）。各ノードの値はブートストラップ値を示す。新規に決定したジェントルキツネザル *TAS2R16* は種の系統を反映した位置にクラスタリングされた。

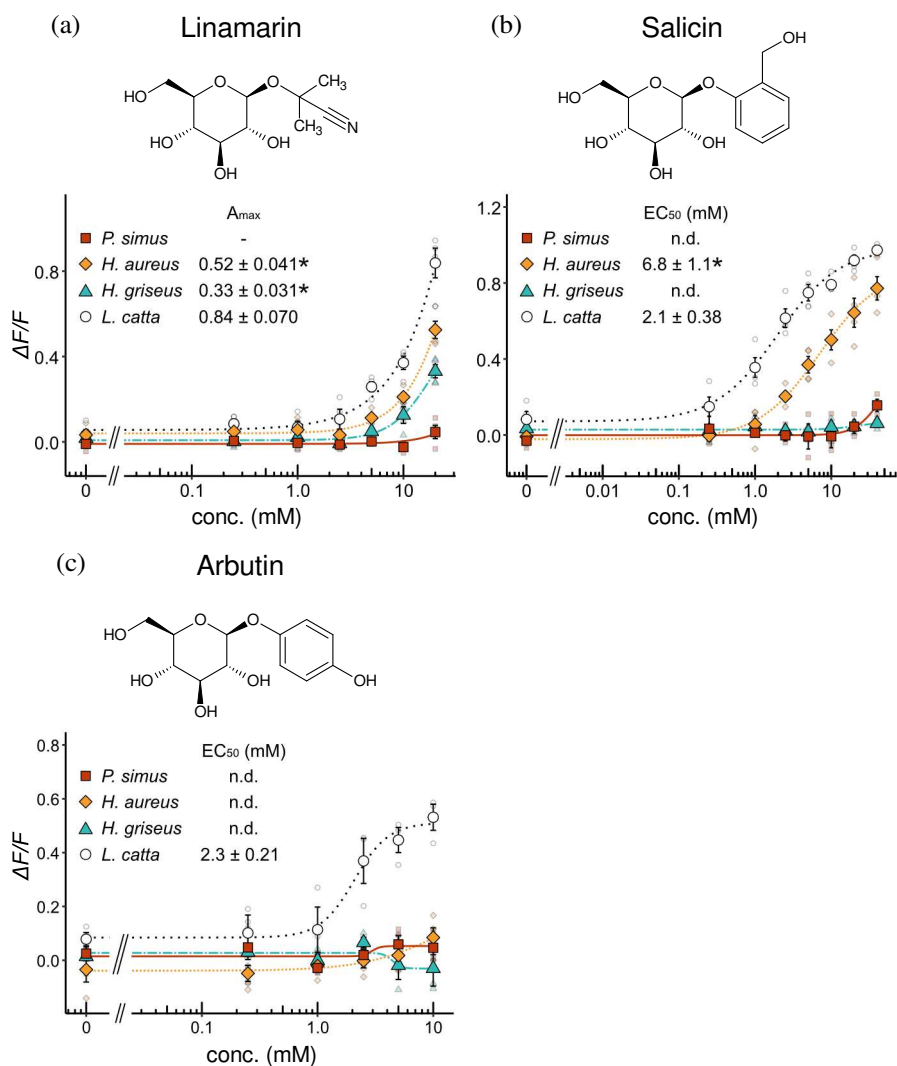


図 16 ジェントルキツネザル TAS2R16 の β グルコシド感受性

ジェントルキツネザル TAS2R16 の(a) linamarin、(b) salicin、(c) arbutin に対する応答。* は *L. catta* と比較して有意差があることを意味する (BH 補正による多重両側 Welch's t test; $p < 0.05$)。n.d.は'not detectable'を示す。パラメータの詳細は表 7、統計解析結果の詳細は表 9 を参照。

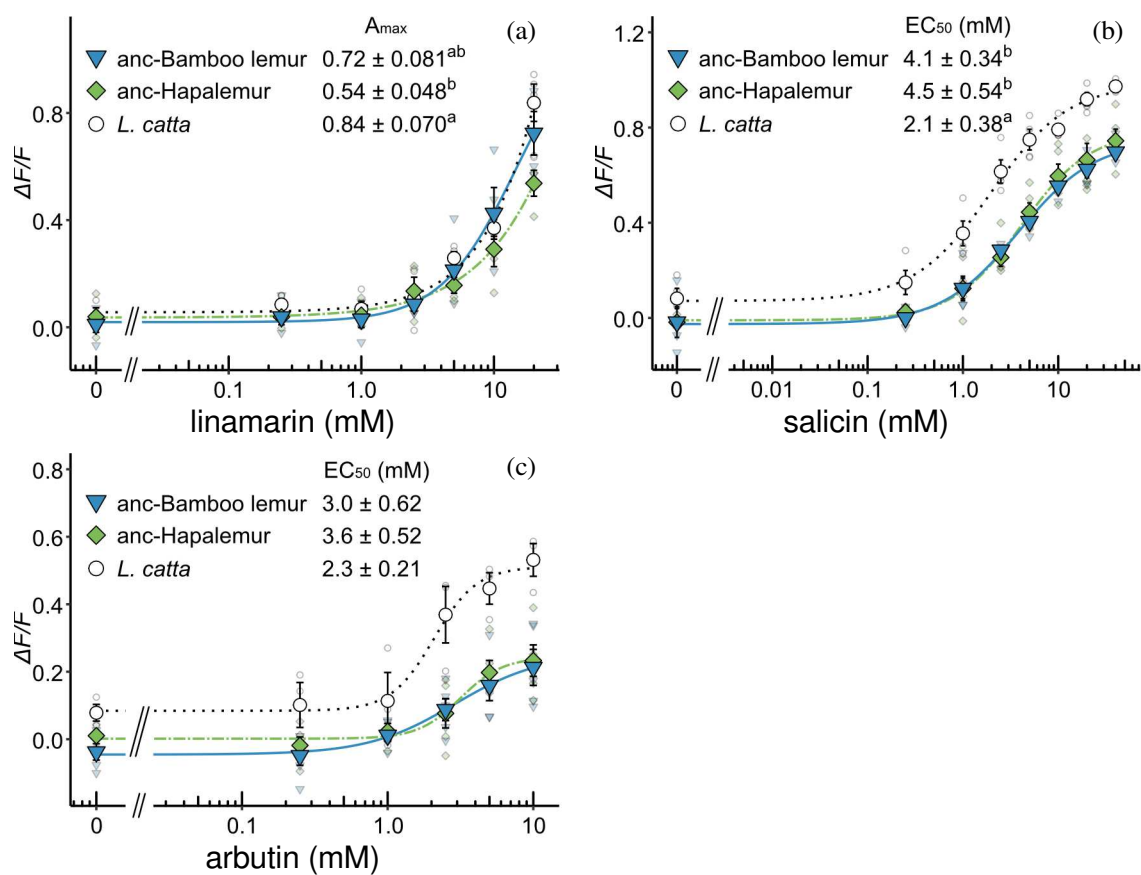


図 18 ジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 の β グルコシド感受性

推定したジェントルキツネザル LCA の TAS2R16 の (a) linamarin、(b) salicin、(c) arbutin に対する応答。統計的有意差は、BH 補正による多重両側 Welch's t test によって検証し、a と b でマークされた種間に有意差が認められた。パラメータの詳細は表 8、統計解析結果の詳細は表 9 を参照。

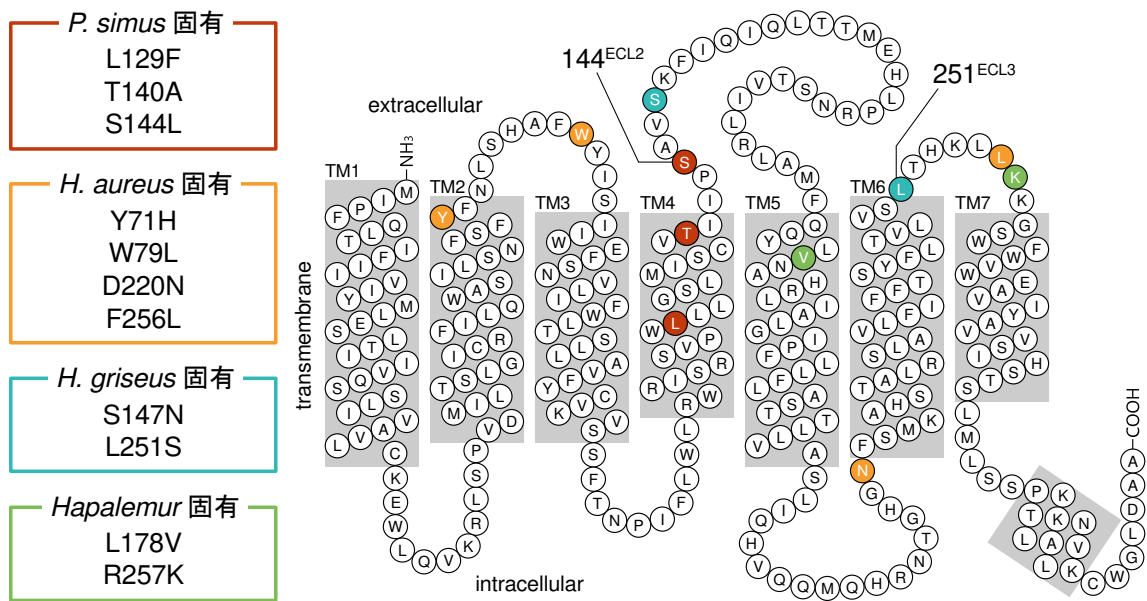


図 19 ジェントルキツネザル固有の amino 酸置換の分布

左に列挙した変異は「祖先型 amino 酸— amino 酸番号— 種固有の変異 amino 酸」の順で記載した (例: L129F は *P. simus* は 129 番 amino 酸が Leucine から Phenylalanine に変異していることを意味する)。右のスネークプロットに記載された各 amino 酸は、*L. catta* の配列である。スネークプロットは、F. Fierro 博士と MY. Niv 博士によって作成されたホモロジーモデルを元に作成した。

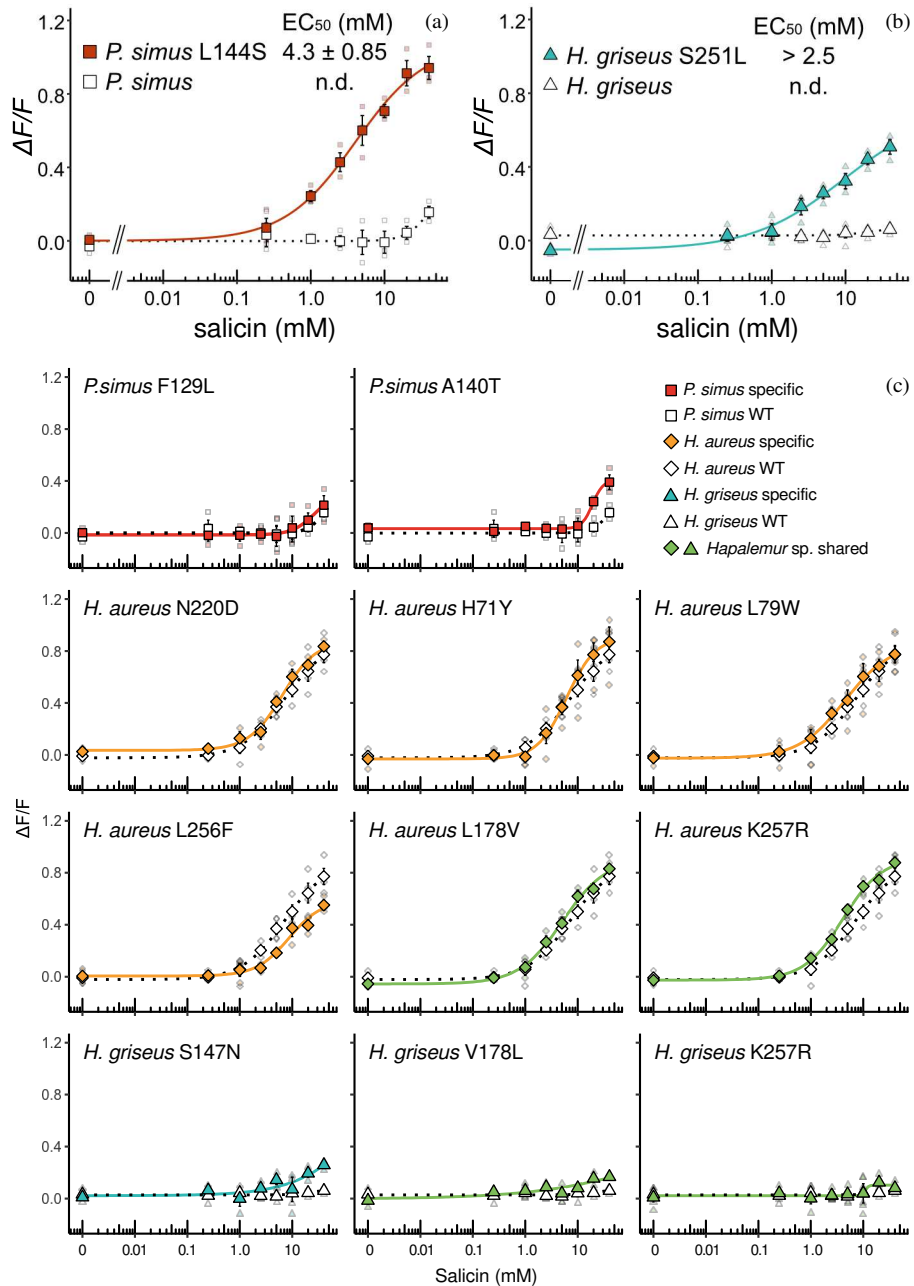


図 20 salicin 低感受性に寄与するアミノ酸残基の探索

(a) *P. simus* における 144 番変異体の salicin 応答。(b) *H. griseus* における 251 番変異体の salicin 応答。n.d.は‘not detectable’を示す。(c)その他の変異体の salicin 応答。赤が *P. simus*、橙が *H. aureus*、青が *H. griseus*、緑が *Hapalemur* 属の固有変異残基の変異体を表し、白抜きが野生型を表す。図形については、丸が *P. simus*、ダイヤモンドが *H. aureus*、三角が *H. griseus* を表す。パラメータの詳細は表 10、統計解析結果の詳細は表 12 を参照。

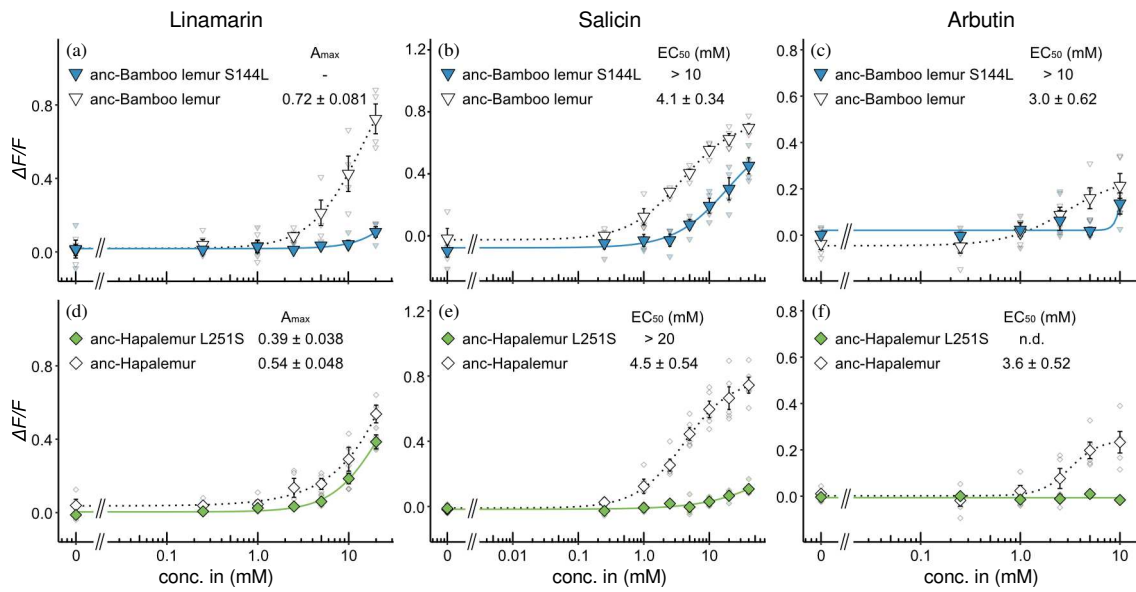


図 21 ジェントルキツネザル LCA における 144 番、251 番アミノ酸変異の効果

ジェントルキツネザル LCA (anc-Bamboo lemur TAS2R16) の 144 番変異体の (a) linamarin、(b) salicin、(c) arbutin に対する応答。Hapalemur 属 LCA (anc-Hapalemur TAS2R16) の 251 番変異体の (d) linamarin、(e) salicin、(f) arbutin に対する応答。n.d. は 'not detectable' を示す。パラメータの詳細は表 11、統計解析結果の詳細は表 13 を参照。

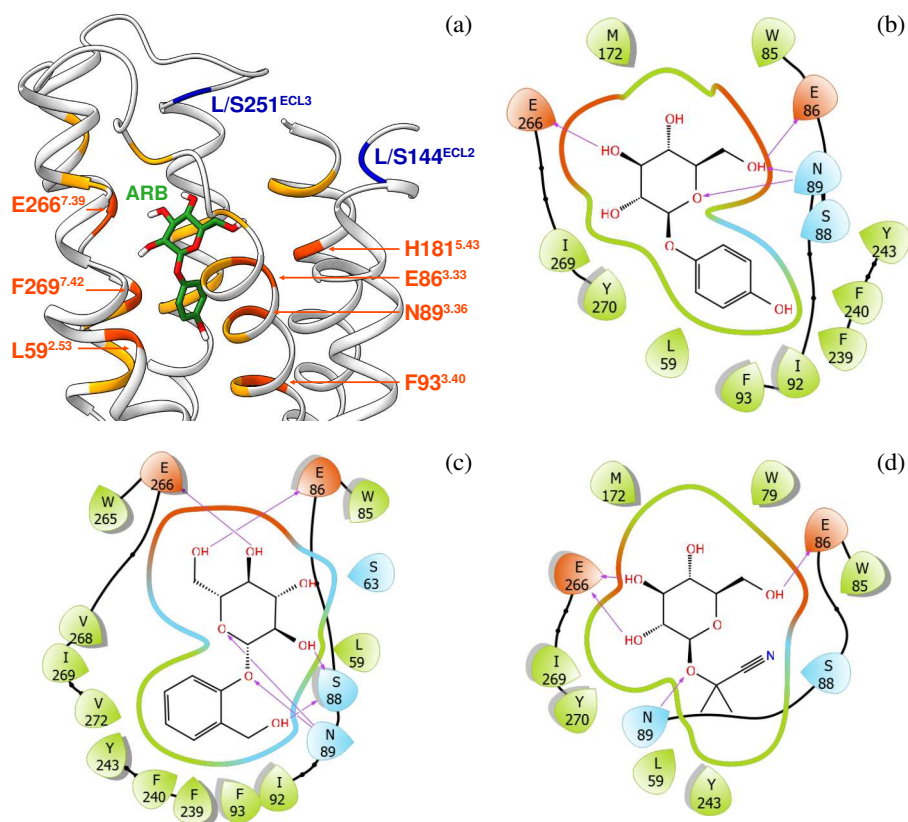
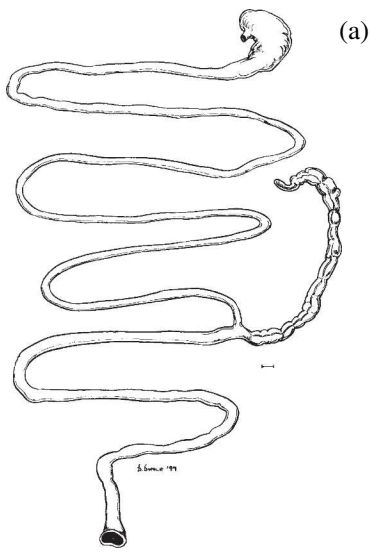
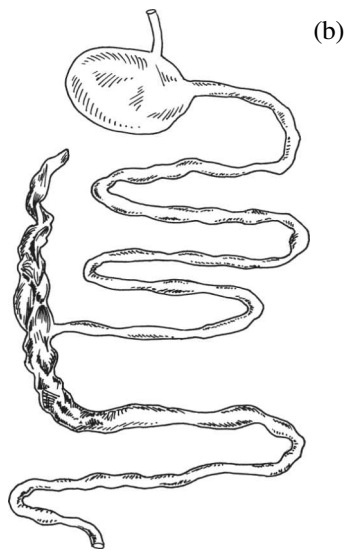


図 22 ジェントルキツネザル TAS2R16 とリガンドの結合様式

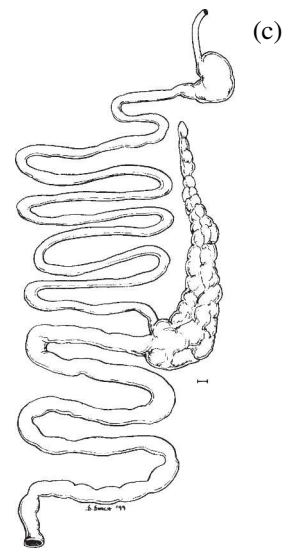
(a) *P. simus* の TAS2R16 モデルにおける arbutin の結合様式。リガンドから 5 Å 以内に位置するアミノ酸残基をオレンジに、更に変異体実験でリガンド結合に関与すると示唆されている残基を赤で表示した[94,95]。(b) arbutin, (c) salicin, (d) linamarin それぞれに 3 Å 以内に近接するアミノ酸残基（青：極性残基、橙：負電荷残基、緑：無極性残基）を示した。矢印は水素結合を表す。



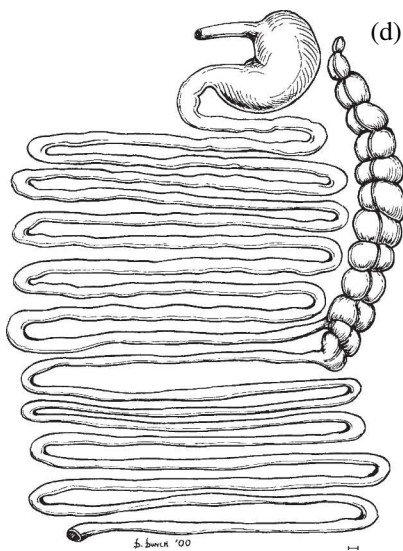
Varecia variegata



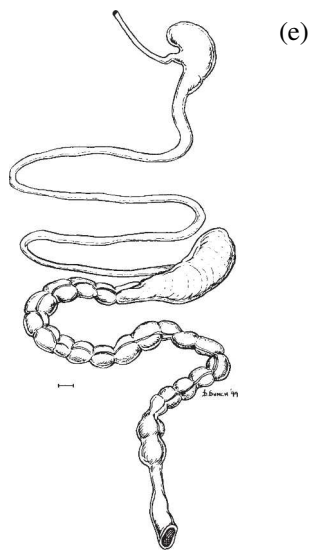
Eulemur coronatus



Lemur catta



Propithecus coquereli



Haplemur griseus

図 23 キツネザル科とインドリ科の消化管

消化管のイラストは *E. coronatus* を Schwitzer 2009 [191]、それ以外を Campbell *et al.*, 2000 [190]から引用。