

· 综述 ·

鱼类嗅觉受体基因研究进展

朱国利^{1,2}, 唐文乔^{1,2*}, 刘东^{1,2}

(1. 上海海洋大学鱼类研究室, 上海 201306;

2. 上海市海洋动物系统分类与进化重点实验室, 上海 201306)

摘要: 嗅觉是鱼类感知外界环境的重要器官, 参与觅食、定位、避敌以及生殖洄游等行为。嗅觉功能基于嗅觉信号通路并由嗅觉受体蛋白识别外界环境中的气味分子而实现。嗅觉受体基因编码 G 蛋白偶联受体蛋白, 在脊椎动物中已发现的嗅觉受体基因有 5 个家族, 即主嗅觉受体基因 (*MOR*)、犁鼻器 I 型受体基因 (*V1R/ORR*)、犁鼻器 II 型受体基因 (*V2R/OlfC*)、痕量胺相关受体基因 (*TAAR*) 和甲酰基肽受体基因 (*FPR*)。鱼类占脊椎动物所有种类的 50% 以上, 近年有关鱼类嗅觉受体基因的研究越来越多, 新的发现不断涌现, 但目前国内的相关文献甚少。本文总结了鱼类嗅觉受体基因家族的研究进展, 整理了研究中遇到的有关问题和相应对策, 并对研究前景作了展望, 旨在为国内鱼类嗅觉受体基因的研究提供参考资料。

关键词: 鱼类; 嗅觉受体基因; 基因家族; 基因结构

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

嗅觉是动物感知外部环境的主要器官之一, 在觅食、识别同类、寻找配偶和逃避敌害以及产卵地点选择等方面扮演重要角色^[1-2]。鱼类通过嗅觉受体蛋白识别周围水环境中的氨基酸、类固醇、前列腺素和胆酸等气味分子, 并通过嗅觉信号通路将信息传递到中枢神经系统, 进而完成嗅觉感受^[1,3-4]。

嗅觉受体 (olfactory receptor, OR) 基因首先由 Linda Buck 和 Richard Axel 于 1991 年在褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 中分离得到, 编码嗅觉受体蛋白^[5]。嗅觉受体是一种 G 蛋白偶联受体蛋白 (G-protein coupled receptors, GPCRs), 具有 7 个 α 螺旋跨膜结构域。嗅觉受体共分为 5 个在进化上相互独立的家族: 主嗅觉受体 (main olfactory receptors, MORs)^[5]、犁鼻器 I 型受体 (vomeronasal type-1 receptors, V1Rs)、犁鼻器 II 型受体 (vomeronasal type-2 receptors, V2Rs)^[6]、痕量胺相关受体 (trace amine-associated receptors,

TAARs)^[7] 以及甲酰基肽受体 (formyl peptide receptors, FPRs)^[8] (图 1)。

哺乳动物中, 主嗅觉受体和痕量胺相关受体在嗅觉上皮中表达, 犁鼻器 I 型受体 (V1Rs) 和犁鼻器 II 型受体 (V2Rs) 在犁鼻器系统 (vomeronasal nervous system, VNS) 中表达。由于鱼类不具备犁鼻器系统, 上述几种受体蛋白都在嗅觉上皮中表达^[9-11], 但表达于不同的感觉神经元中。V1R 在鱼类的对应基因被称为 *ORR* (olfactory receptors related to class A GPCRs), V2R 的对应基因称为 *OlfC* (olfactory receptors related to class C GPCRs)。MOR 在纤毛感受神经元 (ciliated sensory neuron) 中表达, *OlfC* 在微绒毛感受神经元 (microvillus sensory neuron) 中表达, 几乎所有的隐窝神经元 (crypt neuron) 都表达 *ORR4*, 而不表达其他的 *ORR*, 目前表达 *TAAR* 和 *FPR* 的感受神经元尚未确定^[12]。

嗅觉曾是感觉系统中最不受重视的研究内容

收稿日期: 2014-10-29 修回日期: 2015-04-09

资助项目: 国家自然科学基金 (31172407, 31472280); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20123104110006); 上海市高校水产学一流学科资助项目; 上海市交叉学科研究生拔尖创新人才培养平台建设项目

通信作者: 唐文乔, E-mail: wqtang@shou.edu.cn

之一,但自 2004 年诺贝尔生理学奖授予两位在气味受体和嗅觉系统组织方式研究中作出贡献的 Linda Buck 和 Richard Axel 之后,新的研究不断涌现。硬骨鱼类占全部脊椎动物种类之和的 50% 还多^[13],目前对鱼类嗅觉方面的研究也越来越多,新的发现不断出现。本文综述了鱼类嗅觉受体基因在分子生物学方面的研究进展,旨在为国内该领域的研究提供参考资料。

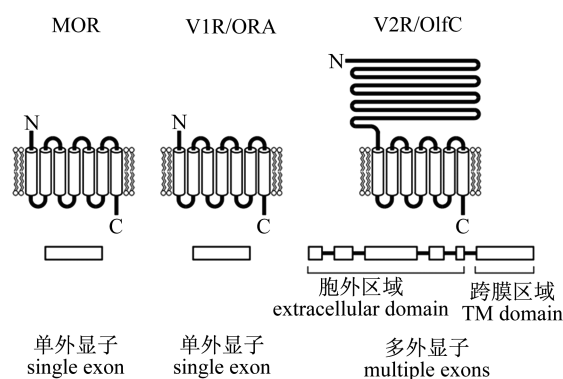


图 1 脊椎动物嗅觉受体蛋白 MOR、V1R/ORX 和 V2R/OlfC 以及所对应基因的结构^[14]

Fig. 1 Structures of MOR, V1R/ORX and V2R/OlfC and the corresponding genes in vertebrates^[14]

1 主嗅觉受体基因

主嗅觉受体基因首先发现于褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)^[5],被认为是哺乳动物基因组中数量最大的嗅觉受体基因亚家族^[15]。目前 MOR 基因已在一些鱼类中被鉴定出,如斑马鱼 (*Danio rerio*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、绿斑鲀 (*Tetraodon nigroviridis*)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 以及一些鲑属鱼类等(表 1)。

哺乳动物的 MOR 功能性基因大约有 1 000 个,如小鼠 (*Mus musculus*) 大约有 1 037 个功能基因。而鱼类 MOR 功能性基因则很少,大约只及哺乳动物的 1/5 ~ 1/10,最多的仅 100 多个成员^[2,16]。不同鱼类之间,嗅觉受体基因的数目差异也较大,斑马鱼含有目前已知最多的功能性 MOR 基因数目(154 个)(表 1)。但两栖类如非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 已发现的 MOR 基因有 824 个,表现出由水生的鱼类向两栖类和陆生的哺乳动物渐次递增的趋势,这或许是陆生物种

需要更多的 MOR 基因来适应更复杂的环境。虽然鱼类 MOR 基因数量与四足动物相比相差甚远,但鱼类的 MOR 基因具有更高的序列多样性,分化程度相对更高^[2,17-18],这或许意味着鱼类的 MOR 基因具有更显著的功能分化。

表 1 水生动物功能性(假基因) MOR 基因的数目
Tab. 1 The numbers of functional MOR genes (pseudogenes) from aquatic animals

物种名称 species	MOR 功能性(假) 基因数目		文献 references
	numbers of functional MOR genes	(pseudogenes)	
文昌鱼 <i>Branchiostoma floridae</i>	31		[18]
七鳃鳗 <i>Petromyzon marinus</i>	32 (26)		[18]
象鼻鲨 <i>Callorhynchus milii</i>	1		[18]
鲫 <i>Carassius auratus</i>	41		[19]
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	24 (2)		[20]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	154 (21)		[18]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	24 (24)		[12]
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	68 (24)		[18]
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	102 (55)		[18]
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	111		[21]
绿斑鲀 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	43 (10)		[18]
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	47 (39)		[18]
非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	824		[18]

嗅觉受体基因的数量与组成可反映嗅觉功能对该物种的重要性,而功能性与假基因性 MOR 基因的数量比也被认为与该物种的嗅觉水平相关联^[22]。如人类 (*Homo sapiens*) MOR 基因的假基因化达 52%,而小鼠则仅为 25%,狗 (*Canis familiaris*) 还不到 20%。这些差异与小鼠和狗具有灵敏的嗅觉相一致,同时也说明人类对嗅觉的依赖降低了。灵长类三色视觉的出现与其嗅觉受体的丢失相一致,说明三色视觉的出现可能减少了灵长类对嗅觉的依赖^[23]。

绝大多数脊椎动物的 MOR 为单外显子结构,编码区域约为 1 kb^[24](图 1)。MOR 保守区域位于第二个胞内环和胞外环以及跨膜区域 TMD2、TMD6 及 TMD7。而跨膜区域 TMD3、TMD4 及 TMD5 承受阳性选择压力,进化出较高的多样性^[16,25]。该变化区域正是结合气味分子的位点,而这一区域的多样性可能是为了分化出多种结构进而可以识别更多的气味分子,但目前鱼类中只鉴定到很少的序列或位点受到正向

选择^[26]。

哺乳动物的 *MOR* 基因按功能可分为两种类型: I 型和 II 型^[17,27]。每个类型又包括多个亚型, I 型可细分为 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ε 和 ζ 等 6 个亚型, II 型可细分为 η 、 θ 、 κ 和 λ 等 4 个亚型。其中亚型 θ 、 κ 和 λ 可能由于在嗅觉上皮中不表达而为非嗅觉受体基因^[17-18]。

I 型 *MOR* 可能用于识别水溶性气味分子, II 型 *MOR* 则用于识别挥发性气味分子^[28]。鱼类的功能性 *MOR* 多为 I 型,所以 I 型基因又被称为“鱼类相关 *MOR* 基因”。大部分哺乳动物的功能性 *MOR* 基因属于 II 型基因,而鱼类的 II 型 *MOR* 大多已变成假基因或消失,所以 II 型 *MOR* 基因被称之为“哺乳动物相关基因”。鲫仅存在 I 型 *MOR*,但“活化石”矛尾鱼 (*Latimeria chalumnae*) 这两种 *MOR* 都存在,只是 II 型 *MOR* 都为假基因。条纹原海豚 (*Stenella coeruleoalba*) 中发现的 *MOR* 基因都为 II 型,但全为假基因^[28]。而在非洲爪蟾中,两种类型的 *MOR* 都存在^[29]。

II 型 *MOR* 可能参与到原始四足动物的起源,并且在四足动物中承受选择压力,但在返回海洋的哺乳动物中呈现假基因现象。

研究表明,*MOR* 基因起源于脊索动物进化的早期,在文昌鱼 (*Branchiostoma lanceolatum*) 中即已存在^[30-31],然后分化出不同的家族和亚家族。I 型和 II 型基因的分化发生在有颌类与无颌类的分化以前^[18,31]。现存鱼类的 *MOR* 基因从辐鳍鱼类 (*Actinopterygii*) 的共同祖先中进化而来,在继承祖先基因的基础上,通过分化而独立出来。*MOR* 基因在硬骨鱼类中的进化关系和硬骨鱼类本身的进化关系相一致^[21]。在这一过程中,发生了基因的复制、丢失以及假基因化^[18,32]。

2 犁鼻器 I 型受体基因

鱼类 *ORA* 基因是哺乳动物 *V1R* 基因的同源基因,是嗅觉受体基因家族中成员最少的。第 1 个 *ORA* 基因首先于 2005 年在多种鱼类中被鉴定出^[9],目前有更多的 *ORA* 基因被分离出(表 2)。

表 2 鱼类的 *ORA* 基因(括弧中为假基因)
Tab. 2 The *ORA* genes in fish (pseudogenes are shown in brackets)

物种名称 species name	<i>ORA1</i>	<i>ORA2</i>	<i>ORA3</i>	<i>ORA4</i>	<i>ORA5</i>	<i>ORA6</i>	总数 total number	文献 references
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	1	1	1	1	1	1	6	[33]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	1	1	2	1	2	(1)	7(1)	[12]
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	1	1	1	1	1	1	6	[33]
绿斑鲷 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	0	1	1	1	1	1	5	[33]
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	0	1	1	1	1	1	5	[33]
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	1	1	1	1	1	1	6	[33]
大唇朴丽鱼 <i>Haplochromis chilotes</i>	1	1	1	1	1	1	6	[36]

ORA 基因已发现有 6 个成员,依次为 *ORA1*、*ORA2*、*ORA3*、*ORA4*、*ORA5* 和 *ORA6*^[33](表 2),这要远远小于哺乳动物的 *V1R* 基因数目(如大老鼠有 106 个 *V1R*,负鼠有 98 个)^[34-35]。这 6 个基因根据序列归类分为 3 个基因对,分别为 *ORA1-ORA2*、*ORA3-ORA4* 和 *ORA5-ORA6*^[33]。鱼类基因组中这些基因大多都存在,但绿斑鲷和红鳍东方鲀 *ORA1* 缺失。大西洋鲑的 *ORA3* 和 *ORA5* 分别有两个拷贝 (*ORA3a* 和 *ORA3b*; *ORA5a* 和 *ORA5b*)^[12](表 2),这是鱼类中首次发现 *ORA* 基因的复制现象。这是否与大西洋鲑的生殖洄游相关联需深入研究。

鱼类 *MOR* 基因在基因组内通常为簇状分布,并头尾相接。*ORA* 基因的结构和在基因组内的分布形式则各不相同^[33,36](图 2 和图 3)。如 *ORA1* 和 *ORA2* 多为单外显子基因,且为头对头分布;*ORA3* 和 *ORA4* 基因则为多外显子结构,其中 *ORA3* 有 4 个大小大致一样的外显子,而 *ORA4* 有 2~3 个外显子,*ORA3* 和 *ORA4* 在基因组中为尾对尾分布;*ORA5* 和 *ORA6* 在大多数鱼类中为单外显子结构(红鳍东方鲀和大西洋鲑中 *ORA6* 为多外显子),但未发现这两个基因在基因组内毗邻。*ORA1-ORA2* 和 *ORA3-ORA4* 的不同排列方式,这可能是由于它们不同的局部基因组复制。

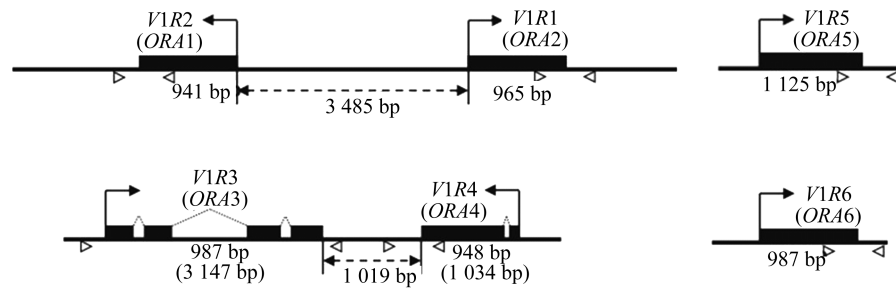


图2 鱼类 *ORA* 基因的分布 (以大唇朴丽鱼 *H. chilotes* 为例)^[36]

外显子和内含子分别由黑色图形和线条代表,图形下方数字为基因编码和间隔区域的长度,剪接位点由虚线指示,黑色三角形箭头代表基因转录方向,白色三角形箭头指示原文章中 RT-PCR 和原位杂交制备探针时所用引物的位置

Fig. 2 Genomic structure of the V1R genes in teleost fish (*H. chilotes*)^[36]

Black lines and boxes represent the exons and introns respectively. Numbers below the schematic represent the lengths of coding regions or intergenic regions. Dashed lines represent the splice sites. Black triangular arrowheads represent the direction of gene transcription. White triangular arrowheads represent the locations of primers used for RT-PCR and preparation of probes for in situ hybridization in original article

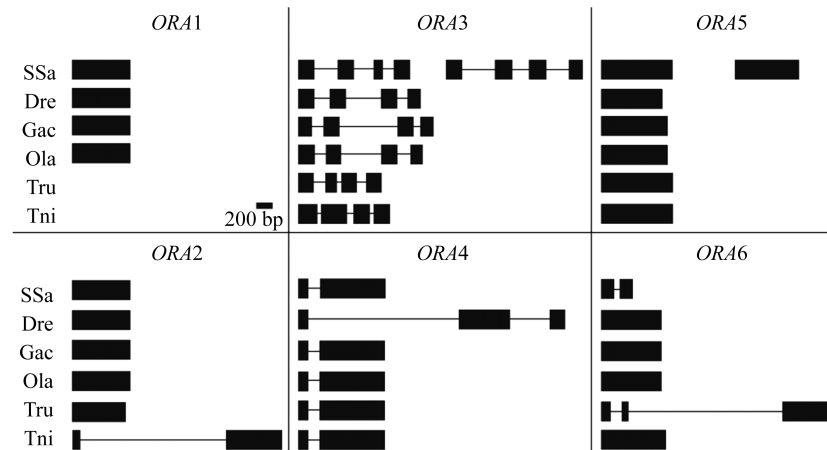


图3 鱼类 *ORA* 基因家族各成员的基因结构示意图^[12]

黑色图形代表外显子,线段代表内含子。Ssa. 大西洋鲑; Dre. 斑马鱼; Gac. 三刺鱼; Ola. 青鳉; Tru. 红鳍东方鲀; Tni. 绿斑魮

Fig. 3 Genetic structures of the members in *ORA* gene family from fish^[12]

Exons are indicated by black boxes and introns are indicated by black lines. Ssa. *Salmo salar*; Dre. *Danio rerio*; Gac. *Gasterosteus aculeatus*; Ola. *Oryzias latipes*; Tru. *Takifugu rubripes*; Tni. *Tetraodon nigroviridis*

ORA 基因家族可能起源于一个或一对 *ORA* 样基因。在所调查的鱼类中,发现 *ORA3* 和 *ORA4* 外显子/内含子的边界十分保守,但 *ORA4* 的唯一一个外显子/内含子边界不同于任何一个 *ORA3* 的外显子/内含子边界。这一发现可能说明 *ORA3* 和 *ORA4* 基因的内含子是在 *ORA* 基因家族的 3 个亚分支以及 3 个基因对产生以后才形成的^[33]。

ORA3-ORA4 在七鳃鳗 (*Petromyzon marinus*) 中被发现,表明 *ORA* 基因家族悠久的进化历

史^[33]。同时,鱼类所有 *ORA* 基因构成一个单系分支,形成于硬骨鱼类物种分化事件发生前并与哺乳动物中所有的 *V1R* 基因具有同源的进化关系^[37]。*ORA* 基因在鱼类中进化较慢,直系同源 *ORA* 基因在所有已调查的鱼类中序列都高度保守,未发现经受阳性选择,这一点和其他的嗅觉受体基因家族不一致^[33]。通过对 *ORA* 基因家族 6 个成员的调查,发现总的 dN/dS 比值都很低,约为 0.2,表明它们承受着很大的选择压力。对每个密码子进行分析,也未发现阳性选择位点。

ORA 基因在洞穴鱼类的远缘物种间以及鲑科鱼类间也高度保守^[38-39],这和嗅觉受体基因其他家族的基因截然不同(*MOR*、*V2R*、*TAAR* 等由于发生了广泛的谱系扩张,导致基因数目出现差异、序列多样性增加)^[17,33,40-42]。虽然鱼类的 *ORA* 序列高度保守,但四足动物的同源基因 *V1R* 却发生了扩张,这与四足动物广泛的辐射进化相一致^[33]。

通过反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 和原位杂交分析,发现 *ORA* 基因各成员在斑马鱼嗅觉器官中特异地表达,说明了这些基因参与了嗅觉功能^[33,36,43]。根据 *ORA* 基因所编码的蛋白氨基酸序列的高度保守性,推测鱼类 *ORA* 用于识别一些在进化上保守的化学物质,如信息素^[44]。已被证实老鼠的 *V1R* 可识别信息素^[44-45],斑马鱼的 *ORA1* 基因能够识别 4-邻羟基苯乙酸^[46]。实验还发现,低浓度的 4-邻羟基苯乙酸能够提高斑马鱼“交配对”的排卵频率,而当鼻孔被堵塞时,该现象消失。因此 4-邻羟基苯乙酸可能是一种参与斑马鱼繁殖行为的信息素,也即斑马鱼的 *ORA1* 基因能够识别 4-邻羟基苯乙酸^[46]。

3 犁鼻器 II 型受体基因

鱼类的类 *V2R* 基因被命名为 *OlfC*^[47]。*OlfC* 最早在鲫和鲃类中分离到^[48-49],目前已在绿斑鲃、斑马鱼、大西洋鲑、鳟、青鳉、大唇朴丽鱼等鱼类中被鉴定出,但数目随物种而有差异(表 3)。

表 3 水生动物的 *OlfC* 基因数目
Tab. 3 The numbers of *OlfC* genes from aquatic animals

物种名称 species	<i>OlfC</i> 功能性(假)	
	基因数目 functional <i>OlfC</i> genes (pseudogenes)	文献 references
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	45(9)	[50]
矛形水田鳉 <i>Tanakia lanceolata</i>	54(2)	[51]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	29(26)	[12]
大唇朴丽鱼 <i>Haplochromis chilotes</i>	61	[52]
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	17(19)	[50]
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	23	[40]
绿斑鲃 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	11(11)	[50]
红鳍东方鲃 <i>Takifugu rubripes</i>	27(12)	[50]
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	249(448)	[35]

鱼类 *OlfC* 基因的假基因化率为 19% ~ 47%^[50,53],在基因组内成簇分布,但基因簇的大小因物种而异^[53]。基因组学研究发现,斑马鱼具有 2 个基因簇,覆盖基因组 4Mb 的区域;青鳉和绿斑鲃具有 1 个基因簇,长度小于 300 kb;大西洋鲑中有 2 个基因簇(分别位于 9 号和 20 号染色体)^[53];而红鳍东方鲃具有 4 个基因簇。由于基因组组装还不完全,以上基因簇很可能可以合并。

OlfC 含有一个长的 N 末端胞外区域,且具有很丰富的序列多样性,该区域对识别与结合配体具有重要作用^[54]。这一点和 *ORA* 不同,*ORA* 的 N 末端胞外区域很短,该差别说明二者识别结合不同的配体(气味分子)^[35]。*OlfC* 基因具有 5 个保守的内含子/外显子边界,将其结构分为 6 个外显子,呈“短-短-长-短-短-长”排列形式^[47](图 1)。

OlfC 被认为用于识别水溶性气味分子。通过比较基因组学分析,发现脊椎动物从水生向陆生的演化过程中,发生着 *OlfC* 向 *ORA* 的转变(即陆生动物的 *ORA/OlfC* 比值大于水生动物)^[35]。与 *ORA* 基因不同的是,*OlfC* 基因在鱼类基因组中发生了扩张^[52-53]。由于 *OlfC* 基因数目和扩张的亚家族在不同鱼类中不尽相同(表 3),被普遍认为可多少反映该物种的嗅觉能力。如大唇朴丽鱼中,亚家族 4、8、14 和 16 发生了特异扩张^[52];大西洋鲑中,亚家族 4 和 11 发生了扩张,而亚家族 17 却为大西洋鲑所特有^[53]。

研究发现,鲫和斑马鱼两个直系同源 *OlfC* 基因(分别为 *OlfC* 5.24 和 *OlfC* ZO6)所编码的蛋白能够被氨基酸所激活^[55-56],而蛋白质是鱼类食物的目标信号^[57-59]。进一步分析发现,斑马鱼 *OlfC* 基因所编码的蛋白质中有 8 个氨基酸是保守的,而这一结构正是识别氨基酸配体结合受体的标志结构域。另外的研究还发现,有 7 个 *OlfC* 基因在洄游性大西洋鲑的幼鱼和洄游中的成鱼中有差异表达,而在非洄游群体中却无此差异^[60]。

对哺乳动物的研究发现,*V2R* (*OlfC*) 能够识别生物个体释放的多肽,进而用于个体间的化学通讯。比如,雄性老鼠的外泪腺分泌的一种多肽类性激素就能被 *V2R* 识别^[61]。有一种小多肽可作为主要组织相容性复合体 (MHC) 分子的配基,而 *V2R* 就可以作为该多肽的受体蛋白^[62]。鱼类基于 MHC 的性别选择被认为有嗅觉机制的参

与^[63-64]。比如,雄性三刺鱼被认为通过感受 MHC 的配基——多肽来评估其潜在配偶的 MHC 多样性水平^[65]。因此,鱼类的 OlfC 可能通过识别一些小多肽如 MHC 配基来进行化学通讯。

4 痕量胺相关受体

鱼类的痕量胺相关受体 (TAAR) 研究始于 2005 年^[66],2006 年被确定为新的化学感应受体^[7],可识别胺类物质^[67]。

自 TAAR 基因在哺乳动物中被克隆以来^[68],在许多低等动物中也陆续被发现^[66-69]。与嗅觉受体基因其他家族不同的是,鱼类 TAAR 基因家族的数量大于哺乳动物^[66-69](表 4)。

表 4 水生动物的 TAAR 基因数目
Tab. 4 The numbers of functional TAAR genes from aquatic animals

物种名称 species name	TAAR 功能基因数目(I型、II型和III型) numbers of functional TAAR genes (Class I, Class II and Class III)	文献 references
七鳃鳗 <i>Lampetra japonicum</i>	0(0,0,0)	[41]
腔棘鱼 <i>Latimeria chalumnae</i>	18(1,17,0)	[70]
象鼻鲨 <i>Callorhynchus milii</i>	2(1,1,0)	[70]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	112(7,18,87)	[41]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	27(5,0,22)	[70]
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	25(6,0,19)	[41]
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	48(4,0,44)	[41]
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	18(7,0,11)	[41]
绿斑鲀 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	18(9,0,9)	[41]
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	3(1,2,0)	[41]
短鼻鳄 <i>Alligator mississippiensis</i>	8(1,7,0)	[70]

与其他嗅觉受体基因家族相比,TAAR 基因家族在进化上较年轻。TAAR 基因家族可分为 3 类,分别为 I 型、II 型和 III 型,并且在鱼类中持续扩张^[41]。有研究发现,TAAR 基因的所有亚型(除 TAAR1 外)在老鼠的嗅觉上皮中都有表达,说明痕量胺和 TAAR 蛋白都有可能参与嗅觉功能^[41,71]。通过对已知物种构建的 TAAR 进化树发现,I 型较古老,II 型仅存在于非硬骨鱼类中(斑马鱼除外),III 型仅存在于硬骨鱼中,并且发生了基因扩张。据推测,I 型和 II 型在有颌类和无颌类的分化后才出现,III 型可能起源于 II 型^[41,70],可能在四足动物和硬骨鱼分化之后才出现^[41]。

大部分的 TAAR 基因为单外显子结构,但在 III 型中发现了 4 个内含子的获得和丢失事件。III 型的胺能配体结合区域整体缺失,并承受着较强的正向选择压力,而这一区域在 I 和 II 型中高度保守^[41]。这些迹象表明,III 型 TAAR 亚家族可能正在孕育新的嗅觉受体基因家族^[41]。

四足动物的 TAAR 基因基本成簇分布在单一的染色体上,这可能来源于减数分裂中染色体的不等价交换。而鱼类的 TAAR 基因在多个染色体上都有分布,一些游离的 TAAR 基因和 TAAR 小集团也有发现^[69]。这可能来源于硬骨鱼早期谱系分化阶段所发生的全基因组复制事件,毕竟基因组复制在鱼类中是很常见的现象^[72]。随着基因组数据的日趋精细,对 TAAR 分布形式的解析会更加透彻。

5 甲酰基肽受体基因

甲酰基肽受体基因 (FPR) 首先于 2009 年在老鼠中被鉴定出具有嗅觉功能,其 7 个 FPR 基因位于 17 号染色体的 2.7 巨碱基区域内^[8,73]。但到目前为止,在鱼类中还未见 FPR 基因的研究报道。

6 存在的问题

目前对嗅觉受体基因所编码的嗅觉受体蛋白的研究面临着如下问题:

第一,对嗅觉受体基因的认识尚有待于深入。由于以往所参照的基因组质量不同,难免会导致所分离的嗅觉受体基因数量统计的不准确。

第二,相应配体的鉴定。配体的鉴定是验证受体蛋白功能的前提。但目前绝大部分嗅觉受体基因的 GCPR 配体还未被发现,被称为孤儿受体 (orphan receptor)^[74]。要找到与某种蛋白质相互结合的小分子,目前还没有好的技术手段。而对嗅觉 GPCR 来说,配体来自大自然,种类繁多复杂,数量巨大,目前尚无科学的验证方法。所以,嗅觉受体蛋白的“脱孤”将是一个长期的任务。

第三,异源系统的表达。嗅觉受体蛋白是一类膜蛋白,只有定位于细胞膜上才能发挥功能。其在异源系统中的表达十分困难,即使表达了,大部分蛋白也只能在细胞内发现,成功定位到细胞膜上的蛋白量也非常少^[75]。因此利用传统的细胞培养系研究嗅觉受体基因及其相关的信号通路

将十分困难^[76]。

第四,特异嗅觉蛋白抗体的获得。由于嗅觉受体基因由几个大的家族组成,家族内各成员间的序列极其相似,所编码的蛋白序列也基本一致,高质量特异嗅觉蛋白抗体的合成将十分困难。

第五,功能性嗅觉受体基因的验证。目前文献报道的嗅觉受体基因,多来自对基因组数据的筛选,局限于 DNA 层面,其是否为功能性嗅觉受体基因,尚需验证。

7 展望

嗅觉受体基因的分选,目前主要从基因组内,运用生物信息学方法进行筛选和鉴定。由于各家族内嗅觉受体基因序列的高度相似性,常规的分

子生物学方法难以高效分离。但目前基于高通量测序以及基因组学、转录组学等方法所得到的海量组学数据,为筛选和鉴定嗅觉受体基因提供了广阔的来源^[14,77-79](图4)。随着更多物种基因组信息的全图乃至精细图谱的发布和不断完善,以及基因组的测序完成,相信会有越来越多物种的嗅觉受体基因的信息获得,使我们对嗅觉受体的认识和研究得到进一步深入。

GPCR 相应配体的鉴定因无捷径,只能大面积排查。因 GPCR 是潜在的药物靶基,已有制药公司加入到这项艰巨的研究工作中,“孤儿受体”的脱孤研究已进入到工业化的发展轨道,效率将大大提高。

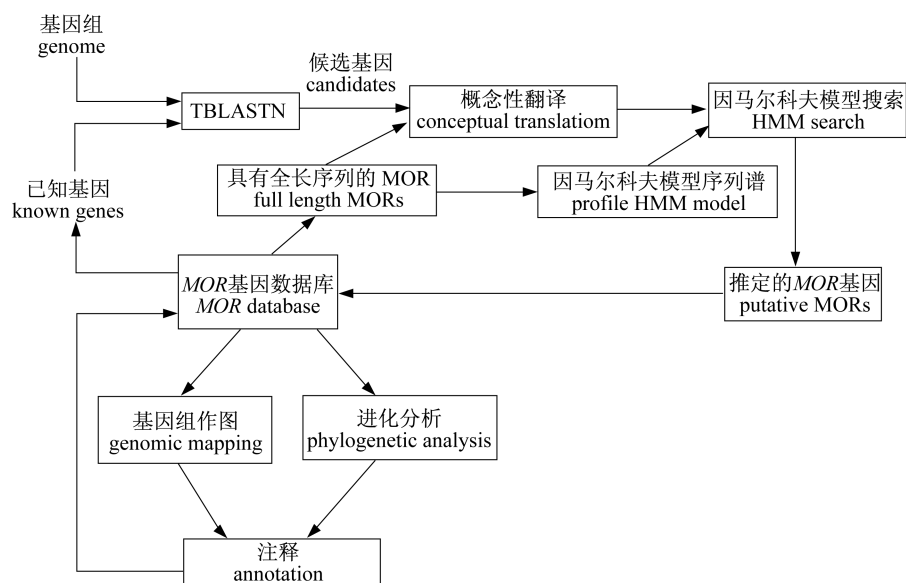


图4 嗅觉受体基因的数据挖掘策略(以 MOR 基因为例)^[81]

Fig.4 Strategy for genomic data mining of olfactory receptor genes(MOR genes)^[81]

普遍认为,由于异源细胞培养系统中缺少某些 GPCR 正确转运和定位所必需的重要物质而使转染的嗅觉受体蛋白难以表达。但目前已发现,气味反应异常蛋白 4(odorant response abnormal protein 4, ODR-4)参与了秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)嗅觉受体蛋白 ODR-10 的正确定位^[80],这为弄清嗅觉受体基因的表达机制提供了新的线索。

随着蛋白提纯技术的进一步发展和抗体制备技术的进步,高质量抗体的制备将成为可能。由于嗅觉受体基因序列的高度相似性,建立全面的嗅觉受体蛋白抗体库,无疑会对嗅觉受体基因功

能的研究产生积极的意义。对基于组学分析所得到的嗅觉受体基因序列进行进一步的实验验证(诸如 RT-PCR、northern-blotting、原位杂交以及体外表达等技术),进而分析其表达也十分必要。

近年来,有人将嗅觉受体和生物传感器结合,构建仿生嗅觉传感器,这在生物医学、疾病诊断及医药分析、环境保护等方面,具有很大的应用空间,但该技术还不够成熟^[82]。

上海海洋大学严继舟教授帮助修改英文摘要,特此致谢!

参考文献:

- [1] Laberge F, Hara T J. Neurobiology of fish olfaction; A review [J]. Brain Research Reviews, 2001, 36 (1) : 46 - 59.
- [2] Niimura Y. Olfactory receptor multigene family in vertebrates: From the viewpoint of evolutionary genomics [J]. Current Genomics, 2012, 13 (2) : 103 - 114.
- [3] Hino H, Miles N G, Bandoh H, *et al.* Molecular biological research on olfactory chemoreception in fishes [J]. Journal of Fish Biology, 2009, 75 (5) : 945 - 959.
- [4] Fuss S H, Ray A. Mechanisms of odorant receptor gene choice in *Drosophila* and vertebrates [J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2009, 41 (2) : 101 - 112.
- [5] Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors; A molecular basis for odor recognition [J]. Cell, 1991, 65 (1) : 175 - 187.
- [6] Ryba N J, Tirindelli R A. A new multigene family of putative pheromone receptors [J]. Neuron, 1997, 19 (2) : 371 - 379.
- [7] Liberles S D, Buck L B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium [J]. Nature, 2006, 442 (7013) : 645 - 650.
- [8] Rivière S, Challet L, Fluegge D, *et al.* Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors [J]. Nature, 2009, 459 (7246) : 574 - 577.
- [9] Pfister P, Rodriguez I. Olfactory expression of a single and highly variable V1r pheromone receptor-like gene in fish species [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (15) : 5489 - 5494.
- [10] Cao Y, Oh B, Stryer L. Cloning and localization of two multigene receptor families in goldfish olfactory epithelium [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95 (20) : 11987 - 11992.
- [11] Asano-Miyoshi M, Suda T, Yasuoka A, *et al.* Random expression of main and vomeronasal olfactory receptor genes in immature and mature olfactory epithelia of Fugu rubripes [J]. Journal of Biochemistry, 2000, 127 (5) : 915 - 924.
- [12] Johnstone K A, Lubieniecki K P, Koop B F, *et al.* Identification of olfactory receptor genes in Atlantic salmon *Salmo salar* [J]. Journal of Fish Biology, 2012, 81 (2) : 559 - 575.
- [13] Bazúes A, Olivares J, Schmachtenberg O. Properties, projections, and tuning of teleost olfactory receptor neurons [J]. Journal of Chemical Ecology, 2013, 39 (4) : 451 - 464.
- [14] Niimura Y. Identification of chemosensory receptor genes from vertebrate genomes [J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 1068 : 95 - 105.
- [15] Alioto T S, Ngai J. The odorant receptor repertoire of teleost fish [J]. BMC Genomics, 2005, 6 : 173.
- [16] Ngai J, Dowling M M, Buck L, *et al.* The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish [J]. Cell, 1993, 72 (5) : 657 - 666.
- [17] Niimura Y, Nei M. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (17) : 6039 - 6044.
- [18] Niimura Y. On the origin and evolution of vertebrate olfactory receptor genes: Comparative genome analysis among 23 chordate species [J]. Genome Biology and Evolution, 2009, 1 : 34 - 44.
- [19] Kolmakov N N, Kube M, Reinhardt R, *et al.* Analysis of the goldfish *Carassius auratus* olfactory epithelium transcriptome reveals the presence of numerous non-olfactory GPCR and putative receptors for progestin pheromones [J]. BMC Genomics, 2008, 9 : 429 - 445.
- [20] Irie-Kushiyama S, Asano-Miyoshi M, Suda T, *et al.* Identification of 24 genes and two pseudogenes coding for olfactory receptors in Japanese loach, classified into four subfamilies: A putative evolutionary process for fish olfactory receptor genes by comprehensive phylogenetic analysis [J]. Gene, 2004, 325 : 123 - 135.
- [21] Zhou Y S, Yan X J, Xu S L, *et al.* Family structure and phylogenetic analysis of odorant receptor genes in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. BMC Evolutionary Biology, 2011, 11 : 237.
- [22] Hayden S, Bekaert M, Crider T A, *et al.* Ecological adaptation determines functional mammalian olfactory subgenomes [J]. Genome Research, 2010, 20 (1) : 1 - 9.
- [23] Gilad Y, Przeworski M, Lancet D. Loss of olfactory receptor genes coincides with the acquisition of full trichromatic vision in primates [J]. PLoS Biology, 2004, 2 (1) : e5.
- [24] Mombaerts P. Molecular biology of odorant receptors in vertebrates [J]. Annual Review Neuroscience,

- 1999,22:487-509.
- [25] Zhao H Q, Firestein S J. Vertebrate odorant receptors [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1999, 56: 647-659.
- [26] Chen M, Peng Z G, He S P. Olfactory receptor gene family evolution in stickleback and medaka fishes [J]. Science China Life Sciences, 2010, 53 (2): 257-266.
- [27] Hoover K C. Evolution of olfactory receptors [J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 1003: 241-249.
- [28] Freitag J, Ludwig G, Andreini I, et al. Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates [J]. Journal of Comparative Physiology, 1998, 183 (5): 635-650.
- [29] Freitag J, Krieger J, Strotmann J, et al. Two classes of olfactory receptors in *Xenopus laevis* [J]. Neuron, 1995, 15(6):1383-1392.
- [30] Putnam N H, Butts T, Ferrier D E, et al. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype [J]. Nature, 2008, 453 (7198): 1064-1071.
- [31] Churcher A M, Taylor J S. Amphioxus (*Branchiostoma floridae*) has orthologs of vertebrate odorant receptors [J]. BMC Evolutionary Biology, 2009, 9:242.
- [32] Niimura Y. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates Interaction between environments and genomic contents [J]. Human Genomics, 2009, 4(2):107-118.
- [33] Saraiva L R, Korsching S I. A novel olfactory receptor gene family in teleost fish [J]. Genome Research, 2007, 17(10):1448-1457.
- [34] Grus W E, Shi P, Zhang J Z. Largest vertebrate vomeronasal type 1 receptor gene repertoire in the semiaquatic platypus [J]. Molecular Biology Evolution, 2007, 24(10):2153-2157.
- [35] Shi P, Zhang J Z. Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land [J]. Genome Research, 2007, 17(2):166-174.
- [36] Ota T, Nikaido M, Suzuki H, et al. Characterization of V1R receptor (*ora*) genes in Lake Victoria cichlids [J]. Gene, 2012, 499(2):273-279.
- [37] Korsching S. The molecular evolution of teleost olfactory receptor gene families [J]. Results and Problems in Cell Differentiation, 2009, 47:37-55.
- [38] Johnson M A, Banks M A. Sequence conservation among orthologous vomeronasal type 1 receptor-like (*ora*) genes does not support the differential tuning hypothesis in Salmonidae [J]. Gene, 2011, 485(1): 16-21.
- [39] Johansson M L, Banks M A. Olfactory receptor related to class A, type 2 (V1r-like *Ora2*) genes are conserved between distantly related rockfishes (genus *Sebastes*) [J]. The Journal of Heredity, 2011, 102: 113-117.
- [40] Hashiguchi Y, Furuta Y, Nishida M. Evolutionary patterns and selective pressures of odorant/pheromone receptor gene families in teleost fishes [J]. PLoS One, 2008, 3(12):e4083.
- [41] Hussain A, Saraiva L R, Korsching S I. Positive Darwinian selection and the birth of an olfactory receptor clade in teleosts [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(11):4313-4318.
- [42] Nei M, Niimura Y, Nozawa M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: Roles of chance and necessity [J]. Nature Reviews Genetics, 2008, 9(12):951-963.
- [43] Pfister P, Randall J, Montoya-Burgos J I, et al. Divergent evolution among teleost V1r receptor genes [J]. PLoS One, 2007, 2(4):e379.
- [44] Boschat C, Pélofi C, Randin O, et al. Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor [J]. Nature Neuroscience, 2002, 5(12):1261-1262.
- [45] Del Punta K, Leinders-Zufall T, Rodriguez I, et al. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes [J]. Nature, 2002, 419(6902):70-74.
- [46] Behrens M, Frank O, Rawel H, et al. ORA1, a zebrafish olfactory receptor ancestral to all mammalian V1R genes, recognizes 4-hydroxyphenylacetic acid, a putative reproductive pheromone [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(28):19778-19788.
- [47] Alioto T S, Ngai J. The repertoire of olfactory C family G protein-coupled receptors in zebrafish: Candidate chemosensory receptors for amino acids [J]. BMC Genomics, 2006, 7:309.
- [48] Cao Y X, Oh B C, Stryer L. Cloning and localization of two multigene receptor families in goldfish olfactory epithelium [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

- America,1998,95(20):11987-11992.
- [49] Naito T, Saito Y, Yamamoto J, *et al.* Putative pheromone receptors related to the Ca^{2+} -sensing receptor in *Fugu* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1998,95(9):5178-5181.
- [50] Hashiguchi Y, Nishida M. Evolution and origin of vomeronasal-type odorant receptor gene repertoire in fishes[J]. BMC Evolutionary Biology,2006,6:76.
- [51] Hashiguchi Y, Nishida M. Screening the V2R-type putative odorant receptor gene repertoire in bitterling *Tanakia lanceolata* [J]. Gene, 2009, 441 (1-2): 74-79.
- [52] Nikaido M, Suzuki H, Toyoda A, *et al.* Lineage-specific expansion of vomeronasal type 2 receptor-like (*OlfC*) genes in cichlids may contribute to diversification of amino acid detection systems[J]. Genome Biology and Evolution, 2013, 5 (4): 711-722.
- [53] Johnstone K A, Ciborowski K L, Lubieniecki K P, *et al.* Genomic organization and evolution of the vomeronasal type 2 receptor-like (*OlfC*) gene clusters in Atlantic salmon, *Salmo salar* [J]. Molecular Biology and Evolution,2009,26(5):1117-1125.
- [54] Han G M, Hampson D R. Ligand binding to the amino-terminal domain of the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274 (15): 10008-10013.
- [55] Specia D J, Lin D M, Sorensen P W, *et al.* Functional identification of a goldfish odorant receptor [J]. Neuron,1999,23(3):487-498.
- [56] Luu P, Acher F, Bertrand H O, *et al.* Molecular determinants of ligand selectivity in a vertebrate odorant receptor[J]. The Journal of Neuroscience, 2004,24(45):10128-10137.
- [57] Hara T J. Olfaction and gustation in fish: An overview[J]. Acta Physiologica Scandinavica,1994, 152(2):207-217.
- [58] Sorensen P W, Caprio J. Chemoreception [M] // Evans D H. The Physiology of Fishes, 2nd edition. Boca Raton;CRC Press,1998,375-405.
- [59] Hara T J. Olfaction in fish [J]. Progress in Neurobiology,1975,5(4):271-335.
- [60] Johnstone K A, Lubieniecki K P, Koop B F, *et al.* Expression of olfactory receptors in different life stages and life histories of wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Molecular Ecology, 2011, 20 (19):4059-4069.
- [61] Kimoto H, Haqa S, Sato K, *et al.* Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons [J]. Nature, 2005, 437 (7060):898-901.
- [62] Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, *et al.* MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ [J]. Science, 2004, 306 (5698): 1033-1037.
- [63] Reusch T B, Häberli M A, Aeschlimann P B, *et al.* Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism [J]. Nature,2001,414(6861):300-302.
- [64] Aeschlimann P B, Häberli M A, Reusch T B H, *et al.* Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to optimize MHC allele number during mate selection [J]. Behavioral Ecology and Sociobiology,2003,54:119-126.
- [65] Milinski M, Griffiths S, Wegner K M, *et al.* Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2005,102(12):4414-4418.
- [66] Wallrabenstein I, Kuklan J, Weber L, *et al.* Human trace amine-associated receptor TAAR5 can be activated by trimethylamine [J]. PLoS One, 2013, 8 (2):e54950.
- [67] Gloriam D E, Bjarnadóttir T K, Yan Y L, *et al.* The repertoire of trace amine G-protein-coupled receptors: Large expansion in zebrafish [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 35 (2):470-482.
- [68] Borowsky B, Adham N, Jones K A, *et al.* Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2001,98(16):8966-8971.
- [69] Hashiguchi Y, Nishida M. Evolution of trace amine associated receptor (TAAR) gene family in vertebrates: Lineage-specific expansions and degradations of a second class of vertebrate chemosensory receptors expressed in the olfactory epithelium [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007,24(9):2099-2107.
- [70] Tessarolo J A, Tabesh M J, Nesbitt M, *et al.* Genomic organization and evolution of the trace amine-associated receptor (TAAR) repertoire in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. G3 (Bethesda),

- 2014,4(6):1135-1141.
- [71] Liberles S D. Trace amine-associated receptors are olfactory receptors in vertebrates [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, 1170: 168-172.
- [72] Nakatani Y, Takeda H, Kohara Y, *et al.* Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates [J]. *Genome Research*, 2007, 17(9): 1254-1265.
- [73] Migeotte I, Communi D, Parmentier M. Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2006, 17(6): 501-519.
- [74] Mombaerts P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004, 5(4): 263-278.
- [75] McClintock T S, Sammeta N. Trafficking prerogatives of olfactory receptors [J]. *Neuroreport*, 2003, 14(12): 1547-1552.
- [76] Bush C F, Hall R A. Olfactory receptor trafficking to the plasma membrane [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(15): 2289-2295.
- [77] Dehara Y, Hashiguchi Y, Matsubara K, *et al.* Characterization of squamate olfactory receptor genes and their transcripts by the high-throughput sequencing approach [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2012, 4(4): 602-616.
- [78] Flegel C, Manteniotis S, Osthold S, *et al.* Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55368.
- [79] Zhu G L, Wang L J, Tang W Q, *et al.* *De novo* transcriptomes of olfactory epithelium reveal the genes and pathways for spawning migration in Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103832.
- [80] Dwyer N D, Troemel E R, Sengupta P, *et al.* Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein [J]. *Cell*, 1998, 93(3): 455-466.
- [81] Zhang X H, Firestein S. Genomics of olfactory receptors [J]. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 2009, 47: 25-36.
- [82] Du L P, Wu C S, Liu Q J, *et al.* Recent advances in olfactory receptor-based biosensors [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 42: 570-580.

Research progress of olfactory receptor genes in fishes

ZHU Guoli^{1,2}, TANG Wenqiao^{1,2*}, LIU Dong^{1,2}

(1. *Laboratory of Ichthyology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;*

2. *Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 201306, China*)

Abstract: Olfaction is essential for fish to detect odorant elements in environment. The sense of smell plays an important role in locating food, navigating, detecting predators, and spawning migration. The olfactory function is produced by the olfactory transduction pathway and activated by the olfactory receptors through binding of odorant elements. In vertebrates, the olfactory receptor gene families are recently classified into five families, the main olfactory receptor (MOR), vomeronasal type-1 receptor (V1R/ORR), vomeronasal type-2 receptor (V2R/OlfC), trace amine-associated receptor (TAAR) and formyl peptide receptor (FPR). More than 50% of vertebrates are fishes, which own important biological status. However, there are few articles published in this field in China, although more and more attention has been focused and many findings have been reported. This review describes the recent advance in studying the five olfactory receptor gene families in fishes, and makes a discussion and a summary of the problems encountered during the research, as well as the corresponding measures to resolve them. Finally we open an outlook to the further study in olfactory receptor genes. We aim to provide references for the research on olfactory receptors of fish in China.

Key words: fish; olfactory receptor gene; gene family; gene structure

Corresponding author: TANG Wenqiao. E-mail: wqtang@shou.edu.cn