

平成21年 6月 5日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18770002
 研究課題名（和文） Rh 式血液型遺伝子スーパーファミリーの進化
 研究課題名（英文） Evolution of the Rh superfamily genes
 研究代表者
 北野 誉（KITANO TAKASHI）
 茨城大学・工学部・准教授
 研究者番号：90400564

研究成果の概要：スナヤツメから3種類のRhスーパーファミリー遺伝子の塩基配列を決定した。そのうちの1つは、他の脊椎動物のRHBGと、また、残りの2つは他の脊椎動物のRHCGとそれぞれクラスターを形成した。一方、ナメクジウオからは2種類の遺伝子の存在が示され、これらは3' UTRに大きな構造的差異があった。系統解析から、これらはナメクジウオの系統で独自に重複したと考えられた。さらに、Rh 遺伝子スーパーファミリー全体の進化解析も行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	330,000	3,930,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：系統樹・多型・ゲノム・進化・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

Rh 遺伝子スーパーファミリーは RH、RHAG、RHBG、RHCG などから構成されている。また、RH と RHAG は赤血球に特異的に発現しているのに対して、RHBG と RHCG は主に腎臓に発現しているという特異的な分化が見られる。これら Rh 遺伝子スーパーファミリーは脊椎動物の進化の過程でゲノム重複によって形成されたと考えられている。しかしながら、脊椎動物の進化の過程を考察する上で鍵となるような、つまり、脊椎動物と無脊椎動物の間に系統的に位置する原索類のような動物における Rh 遺伝子スーパー

ファミリーに属する遺伝子の情報が存在せず、より詳細な解析もあまり行われてはいなかった。そのため、原索類であるナメクジウオや、無顎類であるナメクジウオから Rh 遺伝子スーパーファミリーの遺伝子の塩基配列を決定し、Rh 遺伝子スーパーファミリーの進化及び赤血球系の進化の解析を行う必要があった。

2. 研究の目的

Rh 遺伝子スーパーファミリーには、本来の血液型遺伝子である RH (1p36.11) 以外に、

RHAG (6p21.1-p11)、RHBG (1q21.3)、RHCG (1q31)が存在する。これらは、脊椎動物の進化の過程でゲノム重複によって形成されたと考えられている。本研究では、原索動物を中心に Rh 遺伝子スーパーファミリーの塩基配列決定及び解析を行い、Rh 式血液型遺伝子の起源に関する研究を行うことを目的としている。また、Rh タンパク質とともに赤血球膜表面上で複合体を構成する Glycophorin、Duffy などの遺伝子も原索動物を中心に配列決定及び解析を行う。そして、そのようにして得られた個々の遺伝子の系統樹を重ねあわせることによって、赤血球系がどのように進化してきたかを考察する。

3. 研究の方法

(1) 山形県最上郡鮭川村の用水路より採集されたスナヤツメ (*Lethenteron reissneri*) から total RNA を抽出して、逆転写酵素を用いて、cDNA を作成した。次に、さまざまな脊椎動物の Rh スーパーファミリー遺伝子の塩基配列比較から設計された縮重プライマーを用いて、スナヤツメの Rh スーパーファミリー遺伝子の一部分の増幅及び塩基配列決定を行った。また、フロリダナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) の Rh スーパーファミリー遺伝子の塩基配列の決定は、NIG DNA Sequencing Center より分与された6つの cDNA クローンを用いて行った。

(2) Rh 遺伝子スーパーファミリーの系統解析のために、ヒト (*Homo sapiens*)、マカク (*Macaca mulatta*)、マウス (*Mus musculus*)、ラット (*Rattus norvegicus*)、オポッサム (*Monodelphis domestica*)、カモノハシ (*Ornithorhynchus anatinus*)、ニワトリ (*Gallus gallus*)、ツメガエル (*Xenopus tropicalis*)、フグ (*Takifugu rubripes*)、及びゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を脊椎動物の代表として、それぞれの生物種から Rh 遺伝子スーパーファミリーに属する個々の遺伝子を取得して、塩基配列及びアミノ酸配列の比較解析を行った。

(3) 脊椎動物の RH、RHAG、RHBG、RHCG の4クラスターに加えて、ユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の3配列及びフロリダナメクジウオの2配列を用いて、近隣結合法、最尤法、ベイズ法でそれぞれ系統樹を作成した。また、系統ネットワーク法も解析に用いた。系統解析には、主として、ヒトの Rh 式血液型遺伝子のエクソン2からエクソン7に相当する領域とその相同領域のアミノ酸配列を用いた。進化速度の解析及び分岐年代の解析には以下のような既知の分岐年代 (MYA, million years ago, 100 万年前) を用いた：

ヒトとマカク (23 MYA)、マウスとラット (30 MYA)、霊長類とげっ歯類 (90 MYA)、有袋類と胎盤類 (148 MYA)、単孔類と有袋・有胎盤類 (166 MYA)、鳥類とほ乳類 (315 MYA)、両生類と鳥類・ほ乳類 (360 MYA)、魚類と四足動物 (450 MYA)。

4. 研究成果

(1) スナヤツメから3種類の Rh スーパーファミリー遺伝子の塩基配列を得ることができた。これらを仮に、LreRHR-1、LreRHR-2、LreRHR-3 とすると、それぞれの配列のアミノ酸レベルでの相同性は LreRHR-1 と LreRHR-2 間で67%程度、LreRHR-1 と LreRHR-3 間で69%程度、LreRHR-2 と LreRHR-3 間で83%程度であった。また、系統解析から、LreRHR-1 は、他の脊椎動物の RHBG とクラスターを形成するという可能性が示唆された。一方、LreRHR-2 と LreRHR-3 は、互いにクラスターを形成し、さらにこれらは、他の脊椎動物の RHCG とクラスターを形成した。一方、フロリダナメクジウオからは、2種類の Rh スーパーファミリー遺伝子の存在が示された。これらを仮に、Bf1RHR-1 と Bf1RHR-2 とした。それらのコード領域の塩基配列の相同性は67%程度であった。また、Bf1RHR-1 の3' UTR は300 bp 程度であったのに対して、Bf1RHR-2 のそれは1.6 kb ほどの長さを有しており、大きな構造的差異があるということがわかった。また、系統解析から、これら2つの遺伝子が互いにクラスターを形成するということが示された。

(2) 脊椎動物及び原索動物の Rh スーパーファミリー遺伝子の配列比較解析を行ったところ、ヒトの Rh 式血液型遺伝子のエクソン2からエクソン7に相当する領域が比較的良く保存されており、またそれらの前後のエクソン-イントロン境界の phase も脊椎動物及び原索動物において保存的であるということが示された。また、DNA データベースに登録されているそれぞれの遺伝子のゲノム配列と mRNA 配列の比較を行ったところ、フグの RHBG と RHCG にそれぞれコドンフレームが変化するような塩基のギャップが見られた。そのため、新たに抽出したゲノム DNA を用いて、該当部分の塩基配列決定を行うことによって、より確かなアミノ酸コード領域の塩基配列を得ることができた。

(3) 脊椎動物の Rh スーパーファミリー遺伝子の系統関係の解析も行った。最初に、原索動物の Rh 式血液型遺伝子スーパーファミリーの系統関係の概略を把握するために、昆虫3種 (キイロシヨウジョウバ: *Drosophila melanogaster*、ハマダラカ: *Anopheles*

gambiae、コクヌストモドキ: *Tribolium castaneum*) の相同遺伝子を外群として用いて、系統樹と系統ネットワークを作成した。その結果、系統樹と系統ネットワークのどちらにおいても、RH、RHAG、RHBG、RHCG の4クラスターが確認され、さらにそれぞれのクラスターには霊長類 (ヒト及びマカク) から魚類 (フグ及びゼブラフィッシュ) までの脊椎動物が含まれているということが示された。また、上記の4クラスター以外に RHP2 と表記される遺伝子のクラスターが確認された。また、原索動物であるユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) と棘皮動物であるアメリカムラサキウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) は4クラスターと外群の間に位置しているということが示唆された。次に、RH、RHAG、RHBG、RHCG の4クラスターの系統関係をより詳細に解析するために、4クラスターのすべての樹形を最尤法によって比較した (表1)。

表1 最尤法によるRh式血液型遺伝子スーパーファミリーの4クラスターの系統関係

- 1: (((RH, RHAG), (RHBG, RHCG)), outgroup) *
- 2: (((RHAG, RHCG), (RHBG, RH)), outgroup)
- 3: (((RHAG, RHBG), (RHCG, RH)), outgroup)
- 4: (((RHBG, RHCG), RHAG), RH), outgroup) **
- 5: (((RHBG, RHCG), RH), RHAG), outgroup) *
- 6: (((RHAG, RH), RHCG), RHBG), outgroup)
- 7: (((RHAG, RH), RHBG), RHCG), outgroup)
- 8: (((RHAG, RHCG), RHBG), RH), outgroup)
- 9: (((RHAG, RHCG), RH), RHBG), outgroup)
- 10: (((RH, RHBG), RHCG), RHAG), outgroup)
- 11: (((RH, RHBG), RHAG), RHCG), outgroup)
- 12: (((RHAG, RHBG), RHCG), RH), outgroup)
- 13: (((RHAG, RHBG), RH), RHCG), outgroup)
- 14: (((RH, RHCG), RHBG), RHAG), outgroup)
- 15: (((RH, RHCG), RHAG), RHBG), outgroup)

クラスター名 (RH, RHAG, RHBG, RHCG) と外群 (outgroup) のみを示す。

** : 最尤樹形

* : 最尤樹形と有為な差がない樹形

その結果、最尤系統樹は樹形4であったが、樹形1と樹形5は最尤系統樹と有為な差はなく、また、樹形1は上記の昆虫3種を外群に用いた系統樹解析とも矛盾しないので、樹形1がもっともらしい系統樹であると考えられた。さらに、RHP2のクラスターの系統的位

置についても同様に最尤法を用いて比較解析を行った。その結果、有為な差はなかったものの、RHP2はRHとクラスターを形成する結果が得られた。Rhスーパーファミリー遺伝子の多くが10個のエクソンから構成されているのに対して、RHP2の遺伝子は1~2個のエクソンから構成されている。RHP2クラスターの起源および系統的位

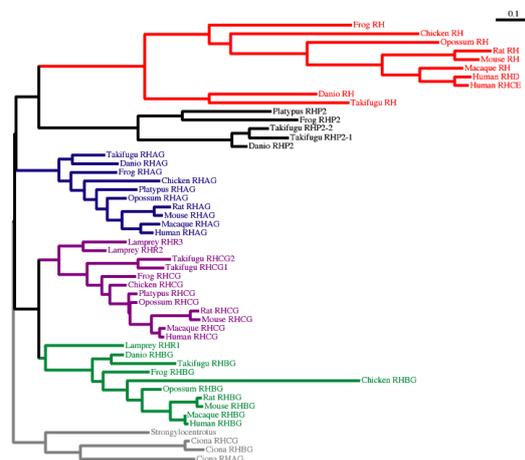


図1 Rhスーパーファミリー遺伝子の系統樹 RH (赤)、RHP2 (黒)、RHAG (青)、RHCG (紫)、RHBG (緑) 及び外群 (灰) を示す。

(4) 脊椎動物のRH、RHAG、RHBG、RHCGの4クラスターの分岐時間及び進化速度を解析するために、まず、それぞれの遺伝子におけるアミノ酸置換率を比較した。その結果RH遺伝子は他の3クラスターの遺伝子と比較して、3~4倍程度進化速度が速いということが確認された。この加速は遺伝子重複後に起こったということが系統樹 (図1) から示唆される。一方、RHAG、RHBG、RHCGの3クラスターは、ニワトリのRHBGが例外的に速い以外は、ほぼ同等の進化速度を持つということが示された。このことは、RHとRHAG、RHBGとRHCGのそれぞれの分岐がほぼ同時期に起こったことを示しており、これらの遺伝子がゲノム重複によって重複したことを示唆している。次に、RHAG、RHBG、RHCG

の3クラスターにおけるアミノ酸置換率と分岐年代の相関から、それぞれのクラスターの出現時期を概算した。RHは進化速度の加速がみられたため解析から除外した。その結果、それぞれのクラスターの出現時期 600~800 MYA であるということが示唆された。この年代は、ヤツメウナギと他の脊椎動物との分岐 (564 MYA) よりも古いので、ヤツメウナギにも RH、RHAG、RHBG、RHCG の4遺伝子が存在する (あるいは、存在した) ということを示唆している。これらの遺伝子の有無の確認のための更なる解析が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Iwata H, Kitano T, Umetsu K, Yuasa I, Yamazaki K, Kemkes-Matthes B, and Ichinose A. 2009. Distinct carboxy-terminus of the B subunit for factor XIII in a population-associated major phenotype: the first case of complete allele-specific alternative splicing products in the coagulation and fibrinolytic systems. Journal of thrombosis and haemostasis. In press. 査読あり.
- ② Kitano T, Noda R, Takenaka O, and Saitou N. 2009. Relic of ancient recombinations in gibbon ABO blood group genes deciphered through phylogenetic network analysis. Molecular Phylogenetics and Evolution. 51: 465-471. 査読あり.
- ③ Kitano T, Umetsu K, Tian W, Yamazaki K, and Saitou N. 2007. Tempo and mode of evolution of the Rh blood group genes before and after gene duplication. Immunogenetics. 59: 427-431. 査読あり.
- ④ Kitano T, Tian W, Umetsu K, Yuasa I, Yamazaki K, Saitou N and Osawa M. 2006. Origin and evolution of gene for prolactin-induced protein. Gene. 383: 64-70. 査読あり.

[学会発表] (計2件)

- ① 北野 誉 Rh式血液型遺伝子スーパーファミリーの進化 日本進化学会 2008年8月22日 東京
- ② 北野 誉 脊椎動物における Rh 遺伝子族の進化 日本進化学会 2006年8月30日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北野 誉 (KITANO TAKASHI)
茨城大学・工学部・准教授
研究者番号: 90400564