

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770269

研究課題名(和文)脊椎動物の初期におけるRh式血液型遺伝子族の進化様式の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the evolution of the Rh blood group gene family during the early stage of vertebrate evolution

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：無顎類クロヌタウナギから、RhBG-like、RhBG-like2およびRhCGを得た。また、軟骨魚類アカエイのRhCGとネコザメのRhBGの配列も決定した。系統解析では、クロヌタウナギの2つのRhBG-likeは、他の脊椎動物のRhBGとRhCGとの共通祖先の枝に位置した。これは、クロヌタウナギのRhBG-likeにおいての収斂アミノ酸置換によるものであると考えられた。Rh遺伝子族は、脊椎動物の共通祖先ではアンモニウム排出に関与する器官で発現しており、2回の全ゲノム重複後に、RhBGやRhCGが本来の機能を担っているのに対し、RhやRhAGが血球系での発現に限定されてきたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：RhBG-like, RhBG-like2, and RhCG were obtained from brown hagfish species (*Cyclostomata*). RhCG and RhBG were determined from Red stingray and Japanese bullhead shark species (*Condriichthyes*), respectively. A phylogenetic tree shows that RhCG-like of brown hagfish formed a cluster with other vertebrate RhCG, though two RhBG-like genes were located on the common ancestral branch of vertebrate RhBG and RhCG. This is probably due to convergent amino acid substitutions occurred on RhBG-like genes of brown hagfish. During the evolution of the RH blood group gene family in vertebrates, the common ancestral gene of RH and RHAG, and the common ancestral gene of RHBG and RHCG had diverged by the first round of whole genome duplication. It is hypothesized that the former gene had begun to express erythrocytes in addition to original tissue, while the latter gene had kept expression in original tissue.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：分子進化 血液型 遺伝子重複 無顎類 脊椎動物

1. 研究開始当初の背景

1990年に発見されたRh式血液型遺伝子は、赤血球細胞表面に発現する12回膜貫通型タンパク質をコードしており、ヒトでは1p34-p36に位置している。このタンパク質の細胞膜外でのアミノ酸の差異が、表現型として抗体によって同定されて、Rh式血液型として認識されている。また、Rhは血液型抗原としての役割だけではなく、RhAG (Rh50)というタンパク質とヘテロ四量体を形成し、アンモニウムイオンのトランスポーターとしての働きも持つ。RhAG (Rh50)は、50kDの糖タンパク質をコードする遺伝子で、ヒトでは6p21.1-p11に位置し、Rhとはアミノ酸レベルで約35%の相同性がある。

これら遺伝子の研究は、しばらくの間、霊長類においてのみ行われていた。1998年になって、申請者らが初めて、マウスとラットにおけるRhとRhAG (Rh50)遺伝子を決定し、進化学的研究を行った。その1年後に、海外のいくつかのグループが同様の研究を発表し、これら遺伝子の齧歯類における研究が大きく進展した。また2000年には、申請者らが、アフリカツメガエルとメダカの相同遺伝子の塩基配列を決定し、Rh式血液型遺伝子族の長期進化研究の糸口を開いた。

その後、多くのゲノム配列解析が進むにつれて、RhとRhAG (Rh50)以外にもRhBGとRhCG (ヒトではそれぞれ1q21.3と15q25)の存在が明らかになってきた。また申請者は、2006~2008年度に科研費・若手研究(B)の補助を受け、スナヤツメとナメクジウオのRh関連遺伝子を決定して解析に加えた。その結果、脊椎動物のRh、RhAG (Rh50)、RhBG、RhCGの4遺伝子はそれぞれクラスターを形成した。また血液型遺伝子であるRhは他よりも進化速度が2~3倍速いことも示された。一方、これらの4クラスターは、脊椎動物の進化の過程で、2回のゲノム重複によって生じたということが示唆されたが、遺伝子近傍の明確なシンテニーが確認されておらず、それを裏付けるには更なる解析が必要であった。

脊椎動物の初期に分岐した遺伝子の進化を解析するためには、分岐点前後の生物の遺伝子を多く決定して、解析することが必須である。そこで、申請者は、脊椎動物の分岐直前に位置する無顎口上綱において、ヤツメウナギ類以外の動物であるヌタウナギや、脊椎動物の分岐直後で最初に分岐した軟骨魚類から、Rh式血液型遺伝子族の塩基配列を決定し、これら遺伝子の確かな系統関係を構築して、その進化を解析しようと考えた。また、これら遺伝子の発現場所は、RhとRhAG (Rh50)が赤血球表面に限定しているのに対し、RhBGとRhCGは腎臓などアンモニウムイオンを排出する器官に広く分布している。この違いは、遺伝子重複後に生じた機能分化によるものと考えられ、そのため、Rh式血液型遺伝子族は、新機能の獲得と機能分化を

経験した重複遺伝子の好例として考えられる。そこで、この遺伝子族の重複と分岐のタイミングを明確にしたのち、それぞれのプロモーター領域の配列を解析することによって、これら遺伝子族の配列変化に伴う機能的変化の進化的機構を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

脊椎動物のRh式血液型遺伝子族には、本来の血液型遺伝子であるRh以外に、RhAG (Rh50)、RhBG、RhCGといった遺伝子が存在する。本研究では、無顎類であるヌタウナギや軟骨魚類といった脊椎動物の初期に分岐した生物の相同遺伝子を決定することによって、Rh式血液型遺伝子族の重複と分岐のタイミングを明らかにする。その結果に基づき、さらにプロモーター領域の配列解析することによって、RhとRhAG (Rh50)が赤血球特異的発現パターンを獲得した進化的機構を明らかにする。

3. 研究の方法

静岡県駿河湾沖で採取された無顎類クロナタウナギ (*Eptatretus atami*) の鰓から、TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA を SuperScript II 逆転写酵素 (Invitrogen) による逆転写反応を行って 1st Strand cDNA を作製した。脊椎動物の主な種を用いた Rh 式血液型遺伝子族の CDS 配列の多重整列から、比較的保存されている領域を選択し、いくつかの degenerate (縮重) プライマーを作製した。作製したプライマーを用いて、PCR による増幅および塩基配列決定を行った。その結果、クロナタウナギの Rh 式血液型遺伝子族の遺伝子の部分配列を得ることができた。次に、得られた部分配列をもとに、5'RACE 法および 3'RACE 法を用いて、得られたクロナタウナギの Rh 式血液型遺伝子族の遺伝子の部分配列の上流部分と下流部分の塩基配列決定を行った。その後、この遺伝子の開始コドンよりも上流の位置に作製したプライマーと終止コドンよりも下流の位置に作製したプライマーを用いて、クロナタウナギの Rh 式血液型遺伝子族の遺伝子の CDS 全体の塩基配列を PCR 法およびダイレクトシーケンス法を用いて決定した。

茨城県那珂川河口で採取された軟骨魚綱アカエイ (*Dasyatis akajei*) の鰓から、TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA を SuperScript II 逆転写酵素 (Invitrogen) による逆転写反応を行って 1st Strand cDNA を作製した。魚類からヒトに至るまでの主な脊椎動物の RhCG 遺伝子の CDS 配列の多重整列から、比較的保存されている領域を選択し、いくつかのプライマーを作製した。作製したプライ

マーを用いて、アカエイの RhCG 遺伝子の部分配列について、PCR による増幅および塩基配列決定を行った。得られた部分配列をもとに、5'RACE 法および 3'RACE 法を用いて、アカエイの RhCG 遺伝子の上流部分と下流部分の塩基配列決定を行った。その後、アカエイの RhCG 遺伝子の開始コドンよりも上流の位置に作製したプライマーと終止コドンよりも下流の位置に作製したプライマーを用いて、アカエイの RhCG 遺伝子の CDS 全体の塩基配列を PCR 法およびダイレクトシーケンス法を用いて決定した。

一方、茨城県日立沖で採取された軟骨魚綱ネコザメ (*Heterodontus japonicus*) の鰓から抽出した total RNA を用いて、アカエイのときと同様の方法で、ネコザメの RhBG の CDS 全体の塩基配列を決定した。

さらに、クロヌタウナギの肝臓と鰓から抽出した total RNA を用いて、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った。まず、抽出した total RNA は、DNase I 処理を行った後、Agilent 2100 バイオアナライザを用いて RIN (RNA Integrity Number) 値を測定した。得られた RIN 値は、8.5~9.0 と、品質の良い total RNA が得られていることを示していた。次世代シーケンサーによる塩基配列解析は、Illumina HiSeq 2000 による *de novo* トランスクリプトーム配列解析によって、肝臓サンプルと鰓サンプルについて、別々に行った。

4. 研究成果

無顎類クロヌタウナギの鰓から得られた total RNA を用いて、5'RACE 法、3'RACE 法、PCR 法およびダイレクトシーケンス法を用いて決定した Rh 式血液型遺伝子族の遺伝子の CDS 全体の塩基配列は、DNA データベースに登録されている他の生物の RhBG と最も相同性があつたので、仮に RhBG-like とした。

クロヌタウナギの肝臓と鰓から抽出した total RNA を用いて行った *de novo* トランスクリプトーム配列解析では、配列決定した Raw reads からアダプターなどの不要な配列を除去し、Clean reads とした。Clean reads は肝臓サンプルから 44,603,820、鰓サンプルから 47,144,366 が得られた。次に、それぞれの clean reads を解析することによって、肝臓サンプルから 104,126 (平均 314 bp) と鰓サンプルから 115,795 (平均 378 bp) の contigs を得ることができた。得られたこれらの contigs について、相同性検索を用いた解析を行ったところ、28,520 の既知の CDS 配列とヒットし、これらのアノテーションを付けることができた。

得られたクロヌタウナギの cDNA 配列全体の GC 含有量は 46.1% であり、ヤツメウナギ類と比較しても、それほど高い GC 含有率ではなかった。また、アリル間での塩基置換

数を比較したところ、転位置換は全体の 66.0% であり、転換置換 (34.0%) よりも多くみられた。

一方、今回の次世代シーケンサーによって配列決定された contigs には、他の脊椎動物の RhBG と相同性のある配列が 2 つ (RhBG-like, RhBG-like2) と RhCG と相同性のある配列が 1 つ (RhCG-like) 得られた。

今回、配列決定されたアカエイの RhCG、ネコザメの RhBG、クロヌタウナギの RhBG-like、RhBG-like2、RhCG-like を含めて、脊椎動物全体における Rh 式血液型遺伝子族の系統樹を作成した。他の脊椎動物の Rh 式血液型遺伝子族の塩基配列は DNA データベースに登録されている主な生物のものを用いた。また、外群には、カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の 3 配列とナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) の 2 配列を用いた。Rh 式血液型遺伝子族の各遺伝子は、ヒトの RhD 遺伝子のエクソン 2 から 7 までに相当する領域の配列が、比較的良く保存されており、またそれらのエクソン-イントロン境界の phase も良く保存されているので、その領域のみを抽出して、系統解析に用いた。多重配列は、MUSCLE、ClustalW2、T-COFFEE および MAFFT の 4 つのプログラムを用いて、エクソンごとに行った。各プログラムによって得られた多重配列について、TrimAl プログラムを用いて、系統解析に適した保存領域を検出し、4 つのプログラム結果で共通して得られた部分だけを抽出して以降の解析に用いた。系統解析を行う際の最適な置換モデルを選択するために、MEGA5、MrBayes および Modelgenerator の各プログラムを用いてモデルテストを行った。系統樹作成法は、近隣結合法、最尤法およびベイズ法を用いて行った。さらに、複数の樹形を同時に示すことのできる系統ネットワーク法も用いて系統解析を行った。

各種系統解析の結果、アカエイの RhCG は、他の脊椎動物の RhCG とクラスターを形成した。また、ネコザメの RhBG は他の脊椎動物の RhBG とクラスターを形成した。これらは期待される系統的に位置に位置していた。一方、クロヌタウナギの RhCG-like は、他の脊椎動物の RhCG とクラスターを形成したが、クロヌタウナギの RhBG-like と RhBG-like2 は、脊椎動物の RhBG と RhCG の共通祖先の位置に位置した。つまり、RhCG からみると、クロヌタウナギを含む無顎類は、脊椎動物の共通祖先における 2 回の全ゲノム重複を受けている系統関係を示しており、一方、RhBG からみると、クロヌタウナギを含む無顎類は、脊椎動物の共通祖先における全ゲノム重複は 1 回しか受けていないということを示唆することになる。なお、クロヌタウナギの RhBG-like と RhBG-like2 はクラスターを形成しているため、これらはヌタウナギの系統で独自に遺伝子重複によって形成されたものであると考えられた。

クロスタウナギの RhCG-like が他の脊椎動物の RhCG と比較的高い信頼度でクラスターを形成するのに対し、クロスタウナギの RhBG-like と RhBG-like2 が脊椎動物の RhBG と RhCG の共通祖先の位置に位置するという樹形は、必ずしも信頼度が高いわけではない。そのため、クロスタウナギを含む無顎類は2回の全ゲノム重複を経験していると考えられる。もし、無顎類が2回の全ゲノム重複を経験していると考えれば、無顎類の RhBG-like は、本来は、他の脊椎動物の Rh、RhAG、RhBG のどれかとクラスターを形成するはずである。そこで、無顎類の RhBG-like が、他の脊椎動物の Rh、RhAG、RhBG のうち、どれとクラスターを形成したとき最も尤度が高いか、推測される3つの樹形における尤度比較を行った。その結果、無顎類の RhBG-like は、他の脊椎動物の RhAG もしくは Rh とクラスターを形成する樹形の方が、RhBG とクラスターを形成するよりも、統計的に有意ではないが、より高い尤度で支持されるということが示された。

各種系統解析の結果、無顎類の RhBG-like は、他の脊椎動物の RhAG もしくは Rh とクラスターを形成する可能性があるものの、明確な結果が得られなかった。その原因として、無顎類の RhBG-like の配列は、領域ごとに異なる系統的シグナルを持っているということが考えられた。そこで、多重整列を部分ごとに解析する Window 解析を行った。その結果、配列のある一部分以外のほとんどの領域で、無顎類の RhBG-like が他の脊椎動物の RhAG とクラスターを形成した場合の尤度が最も高かった。そのため、今回得られたクロスタウナギの2つの RhBG-like は、実際には RhBG のオルソログではなく、RhAG のオルソログである可能性が考えられた。

系統解析において真の樹形が得られない原因として、クロスタウナギの2つの RhBG-like には、一部分の領域中に他の脊椎動物の RhBG に類似するような変異があると考えられた。そこで、今回系統解析に用いたアミノ酸配列において、無顎類の RhBG-like と、他の脊椎動物の RhAG と RhBG とのサイトごとの比較を行った。その結果、複数のアミノ酸サイトで、無顎類の RhBG-like と他の脊椎動物の RhBG において、同じアミノ酸残基が観察された。これらのうちのいくつかのアミノ酸サイトはトランスポーターとしての機能に重要とされるサイトであり、そのようなサイトで起こった収斂的なアミノ酸置換が、真のクラスターを得ることを妨げている原因ではないかと考えられた。

一方、RT-PCR による、クロスタウナギの RhBG-like、RhBG-like2、RhCG-like の発現解析を行ったところ、RhBG-like、RhBG-like2 および RhCG-like の3遺伝子は、鰻で多く発現しているということが示された。鰻以外の組織では、RhBG-like は胆のう

や筋肉、肝臓で、RhBG-like2 は肝臓で、RhCG-like は胆のうと腸での、やや少ない発現がみられた。RhAG、RhBG および RhCG は硬骨魚類では、鰻において発現し、アンモニウムの排出を行っているということが知られている。そのため、無顎類と他の脊椎動物が分岐する以前の脊椎動物の共通祖先では、これらの遺伝子がすでに鰻で発現していたと考えられる。また、クロスタウナギの血液においては、RhBG-like と RhBG-like2 の発現がみられた。他の多くの脊椎動物において一般に、血球系で発現している Rh 式血液型遺伝子族の遺伝子は、Rh や RhAG であることが知られており、RhBG の血液での発現は、今のところ確認されていない。そのため、上記の系統解析の結果と同様に、今回得られたクロスタウナギの2つの RhBG-like は、実際には、他の脊椎動物 RhBG のオルソログではなく、Rh もしくは RhAG のオルソログである可能性が考えられた。さらに、硬骨魚類の RhAG においては血球系以外の、鰻や腎臓などでも発現がみられている。そのため、無顎類の RhBG-like は、Rh よりも RhAG のオルソログである可能性の方が高いと考えられた。

脊椎動物の RhAG は、ヒトでは赤血球膜表面で発現しているのに対して、硬骨魚類においては赤血球膜表面以外でも、鰻や腎臓などさまざまな組織で発現している。そのため、RhAG は脊椎動物の共通祖先においては、さまざまな組織で発現していたが、進化していくうちに、発現場所がより限定されていったと考えられた。過去の2回の全ゲノム重複を経験していない脊椎動物の共通祖先において、Rh 式血液型遺伝子族の共通祖先遺伝子がどこで発現していたかは明らかではないが、硬骨魚類においては、RhAG、RhBG、および RhCG が鰻や腎臓などのアンモニウム排出に関与するような器官で発現しているので、恐らく、2回の全ゲノム重複を経験していない脊椎動物の共通祖先においても、鰻や腎臓などでアンモニウムイオンのトランスポーターとして働いていたと考えられた。まず、1回目の全ゲノム重複後に、Rh と RhAG の共通祖先と、RhBG と RhCG の共通祖先となる遺伝子が形成され、RhBG と RhCG の共通祖先の遺伝子は、重複前と同様に、えらや腎臓などで発現していたのに対し、Rh と RhAG の共通祖先の遺伝子は、血球系にも発現場所を広げていったと考えられた。次に、2回目の全ゲノム重複後に、Rh、RhAG、RhBG、および RhCG の4つの遺伝子が形成され、そして、Rh の発現場所は赤血球膜表面に限定的になったと考えられた。Rh タンパク質は赤血球膜表面に存在するために、膜外に位置するアミノ酸が抗原となり、その多型が Rh 式血液型として検出されるようになったと考えられた。Rh 式血液型遺伝子は、ホスト-パラサイト相互作用タイプの正の自然淘汰を受けていると考えられており、

RhAG、RhBG、およびRhCGと比べて進化速度が速いのは、この淘汰によるものであると考えられる。またRhAGは、硬骨魚類では鰓などにおける発現がみられるが、ヒトやマウスにおいては、赤血球特有に発現しているので、もともとは鰓や腎臓、赤血球で発現していたが、硬骨魚類と四足動物の分岐後、四足動物の系統において発現場所が赤血球に限定していったと考えられた。一方、鰓や腎臓、肝臓などで発現しているRhBGとRhCGは、恐らく本来の役割を担ったまま現在に至っているのではないかと考えられた。

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6件)

Akinori Suzuki A, Kouhei Endo, Takashi Kitano. Phylogenetic positions of RH blood group-related genes in cyclostomes. *Gene*. 543: 22-27. 2014. 査読有.

Masaya Itou, Mitsuharu Sato, Takashi Kitano. Analysis of a Larger SNP Dataset from the HapMap Project Confirmed That the Modern Human A Allele of the ABO Blood Group Genes Is a Descendant of a Recombinant between B and O Alleles. *International Journal of Evolutionary Biology* 2013: 406209. 2013. 査読有.

Naruya Saitou, Takashi Kitano. The PNarec method for detection of ancient recombinations through phylogenetic network analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 66: 507-514. 2013. 査読有.

Kaoru Yamashita, Takashi Kitano. Molecular evolution of the oxytocin-oxytocin receptor system in eutherians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67: 520-528. 2013. 査読有.

Takashi Kitano, Antoine Blancher, Naruya Saitou. The Functional A Allele Was Resurrected via Recombination in the Human ABO Blood Group Gene. *Molecular Biology and Evolution*. 29: 1791-1796. 2012. 査読有.

[学会発表](計5件)

鈴木昭徳, 北野誉. 脊椎動物の初期におけるRH式血液型遺伝子族の進化. 第36回日本分子生物学会年会. 2013.12.03.

神戸.

鈴木昭徳, 北野誉. 無顎類のRH式血液型遺伝子族の解析. 日本遺伝学会第85回大会. 2013.09.21. 東京.

鈴木昭徳, 池谷弘伸, 遠藤康平, 北野誉. 無顎類のRH式血液型遺伝子族の解析. 日本進化学会. 2012.08.22. 東京.

Kaoru Yamashita, Takashi Kitano. Evolution of the Rh family genes and the AVPR-OXTR family genes expressing in the kidney. *Society for Molecular Biology and Evolution*. 2012.06.25. Dublin (Ireland).

Takashi Kitano, Antoine Blancher, Naruya Saitou. The functional A allele was resurrected via recombination in the human ABO blood group gene. *Society for Molecular Biology and Evolution* 2011.7.28. Kyoto (JAPAN).

[図書](計1件)

Takashi Kitano. 2012. Application of phylogenetic network. In: Hirohisa Hirai, Hiroo Imai, Yasuhiro Go, editors. *Post-Genome Biology of Primates*. Springer. p. 181-190.

[その他]

ホームページアドレス

<https://sites.google.com/site/kitanosite/>

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

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し