

---

スズキ類ノトセニア亜目魚類における集団動態  
—適応進化と中立進化の検証—

---

16570187

平成16年度—平成18年度科学研究費補助金  
基盤研究（C）研究成果報告書

平成19年6月

研究代表者 大田 竜也

総合研究大学院大学先導科学研究科助教授

はしがき

ノトセニア亜目魚類は南極海およびその周辺領域で繁栄し極限環境の中で最も適応してきた生物の一つである。本研究の目的は、地球レベルでの自然環境の変化にともなって進化してきたノトセニア亜目魚類を分子進化学および集団遺伝学的の視点から解明することにある。ここでは本研究の成果をノトセニア亜目魚類の紹介を交えて以下のように報告する。

1. ノトセニア亜目魚類について
2. AFGP 遺伝子
3. ヘモグロビン遺伝子
4. 免疫グロブリン遺伝子
5. ミトコンドリア遺伝子
6. MHC 遺伝子

ノトセニア亜目魚類は 1960 年代半ばから漁業の対象として注目を浴び始め、最近では急激な漁獲量の増大および水産資源の減少、違法操業を含めた乱獲、などの問題が浮上している。ノトセニア亜目魚類の保全には、クジラ、アザラシ、オットセイ、オキアミなど他の生物を含めた南極海の生態系を理解するとともに個々の種での集団構造や遺伝的な多様性を探る基礎研究を進めていくことが大切である。今回の研究が少しでもその役を担えれば幸いである。

本報告書をまとめるにあたり、お世話になった研究者の方々、ご指導を受け賜った諸先生にこの場を借りて感謝の意を表したい。

平成19年6月

大田 竜也

## 研究組織

研究代表者：大田 竜也（総合研究大学院大学先導科学研究科助教授）

## 交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	1,500,000	0	1,500,000
平成17年度	1,000,000	0	1,000,000
平成18年度	1,100,000	0	1,100,000
総計	3,600,000	0	3,600,000

（合計単位 円）

## 研究発表

### 口頭発表

1. Ota T., Cheng C.-H., Miyake T., Amemiya C.T. “Characterization of MHC class II beta genes in Antarctic toothfish” Annual meeting of the society for molecular biology and evolution. June 17-20, 2004.
2. 大田竜也 「正の淘汰：実例と今後の問題」 日本遺伝学会第77回大会  
平成17年9月27日—29日
3. 大田竜也 「スズキ類ノトセニア亜目魚類における多重遺伝子族の進化」  
日本分子生物学会2006フォーラム 平成18年12月6日—8日

### 出版物

1. 大田竜也 「ノトセニア亜目魚類をとりまく環境と進化」  
総研大ジャーナル 10:8-10、2006年9月30日

## 第1章 ノトセニア亜目魚類について

約2.5億年前の地球には一つの巨大大陸パンゲアがあったが、そのパンゲア大陸の一部であったゴンドワナ大陸はジュラ紀にアフリカ大陸-南アメリカ大陸と南極大陸-オーストラリア大陸-インド亜大陸へと分裂した。新生代に入ると南極大陸がオーストラリア大陸から離れ、それぞれの大陸や海洋の環境条件は大きく変わった。大陸移動にともない発生した南極大陸を周回する周極流は暖かな海流が南極大陸周辺へ流れ込むことを妨げ比較的温暖だった大陸の気候を寒冷なものへと変えている。そこでは、環境の変化に適応できなかった多くの生物が消し去られ、なんとか生きのびた生物の一部が、新たに開けた場に放散した。

南極海で生きるスズキ類ノトセニア亜目の硬骨魚類（以下、ノトセニアとする）は、このような地球の歴史や南極周辺の自然環境の変化に応じ非常に特異な進化を成し遂げ、他の生物にはみられないシステム生命機構を作り上げた。浮き袋をもたず底生あるいは近底生であったと考えられている祖先種にとって、他の大陸の大陸棚から隔離された状況では変わりつつある環境に適するしか生きのびる道がなかったのかもしれない。しかし最終的にはノトセニアの魚類は運良く生きのびることができた。その一つの要因は進化の過程で耐凍結糖ペプチド **AntiFreeze GlycoPeptide** を獲得したことにあると考えられている。一般に南極大陸近辺では含まれる塩分などの効果により海水の温度が-1.9度近くになる。哺乳類などはエネルギー消費により熱を発生し体温を維持することができるが、いわゆる変温動物ではそう簡単にはいかない。ノトセニアのような魚類にとっては生体分子の合成機械として働く酵素や細胞を構築するタンパク質が低温でも機能するように進化することが生きのびる一つの要件であり、酸素や栄養などの分子が体のすみずみまで行きわたるよう血液などが凍結しないように循環器系を改変させることも大切であったと考えられる。そのなかでノトセニアは偶然にも遺伝子重複およびオリゴヌクレオチドの重複によって **AFGP** という遺伝子を発明し、それを利用して体液が凍りつかないようにするシステムを開拓し南極海という特殊な環境で適応放散してきたのである(図1. 1)。

ノトセニア亜目の魚類に特徴的な点は **AFGP** の獲得だけではない。ノトセニア亜目コオリウオ科に属する魚には血中に赤血球がほとんど存在せず、また存在してもヘモグロビンがない。これは脊椎動物のなかでも例外的である。この現象がヘモグロビン遺伝子を失った結果生じたものであることはノースイースタン大学の **Detrich** 教授によって明らかにされている。しかし、なぜこのような変化が生じたかは定かでない。「低温になることで血液の粘性が増したが、赤血

球を失うことでその粘性を和らげた」と考えることもできれば、「低温になり液体中の酸素含有量が増え赤血球を維持する必要がなくなった」とも考えられる。環境や他の生物との関係が変化し一部の機能がなくても生きていくことができるようになると、その機能に関わる遺伝子を失うことがある。このような場合、原因となった突然変異は生物の適応度に影響せず、偽遺伝子が中立的に種集団内で（偶然により）広がった、と考えるのが普通である。では本当にコオリウオ科の祖先種でもヘモグロビン遺伝子を中立的に失ったのであろうか？これらの魚の中には、鱗がなく皮膚の下の毛細血管が密になったり、血液の流量が増すように循環器系の進化が生じている。それらを考えると、単にヘモグロビン遺伝子の欠失が中立的に生じたとは考えにくい。ヘモグロビン遺伝子の欠失が進化上の適応変化であったのか、あるいは、祖先集団が小さかったために「ヘモグロビンが作られないという異常な遺伝子」が集団へ広がってしまったのか、このような様々な説のどれが正しいかを判断するには集団遺伝学的な観点から進化を研究し各説を検証していく必要がある。ノトセニアの集団遺伝学的な研究は一部のミトコンドリア遺伝子やマイクロサテライトの解析で集団内の構造や遺伝的な多様性を少数の種で調べているくらいである。一般に分子進化学的あるいは集団遺伝学的に生物の過去を探るには、異なる進化様式をもつ遺伝子を解析することが役立つ。たとえば、主要組織適合遺伝子複合体 **Major Histocompatibility Complex** の解析はヒトの進化研究で重要な知見をもたらしている。ミトコンドリアやMHC 遺伝子あるいはその他の遺伝子の情報を総合して集団遺伝学的な観点を含めた上でノトセニア亜目の適応進化を追求することが大切である。本研究では以上を踏まえ様々な塩基配列やアミノ酸配列の分子データを解析しノトセニア亜目魚類の進化を集団遺伝学的・進化遺伝学的な観点から明らかにしていく。

ノセニア亜目魚類の進化

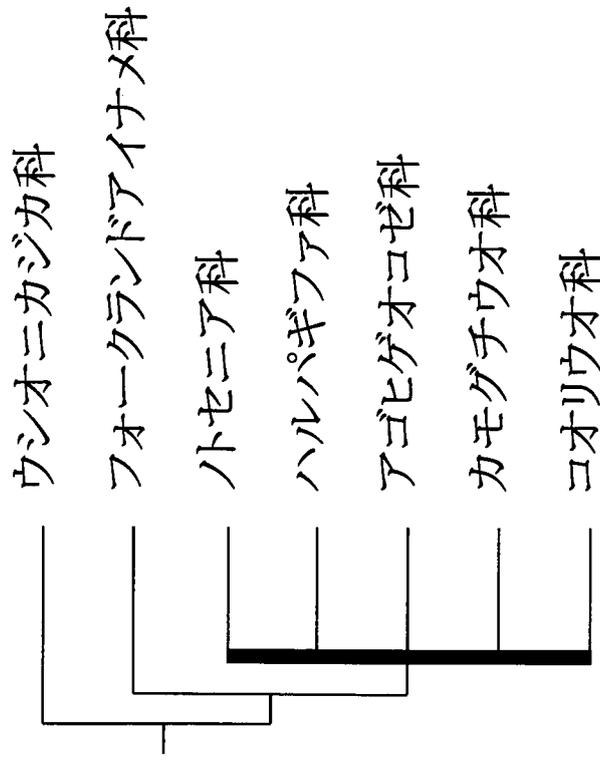
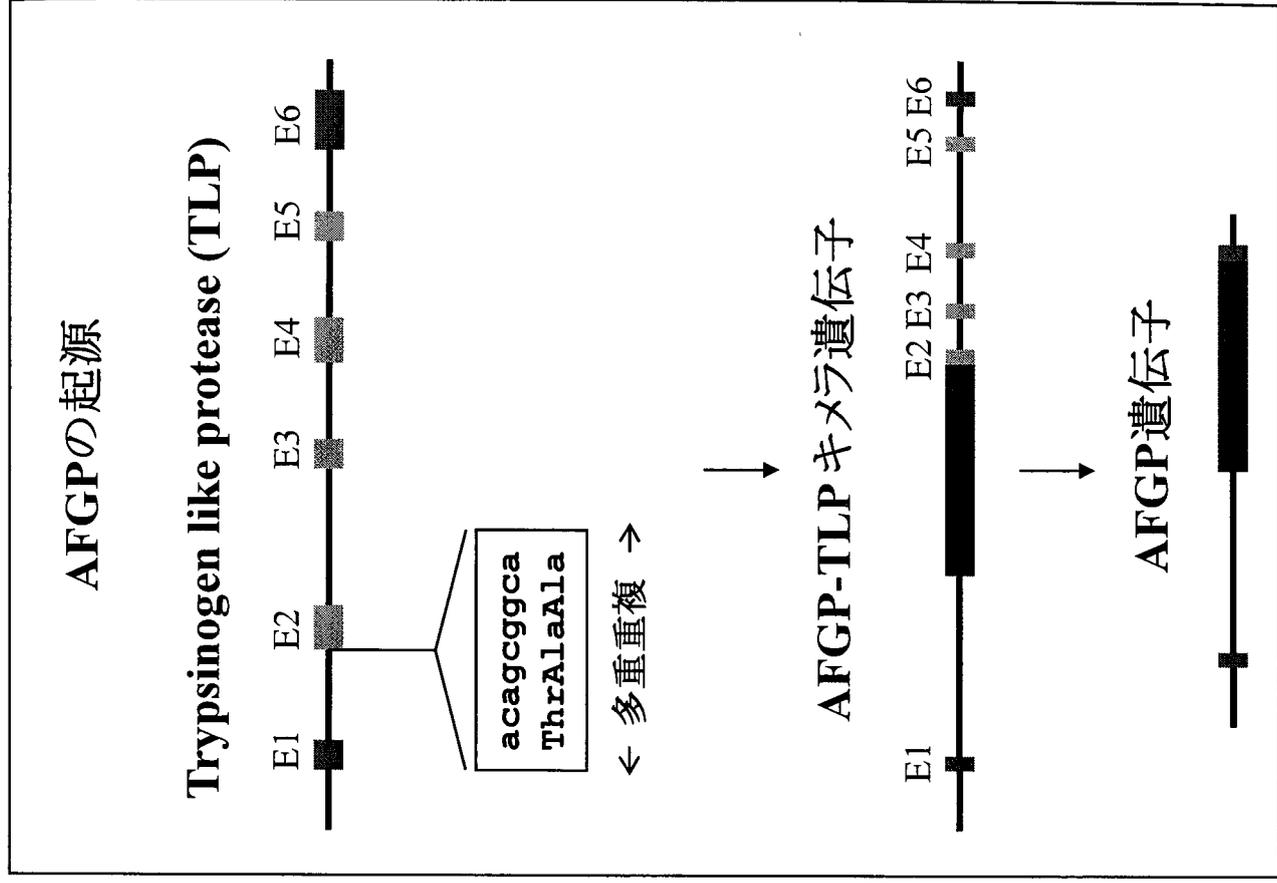


図1.1 ノセニア亜目魚類の進化と AFGPの進化



## 第2章 AFGP 遺伝子

はじめに

ノトセニア亜目魚類の特徴の一つは約 100 近くの種が南極海域という極限環境で生息していることである。それを可能にした一つの大きな進化的な要因は、体液中に耐凍結糖ペプチド **AntiFreeze GlycoPeptide** を獲得したことにあると考えられている。AFGP によって 0 度以下の条件にあっても血液などの体液が凍結せず、既存の循環系を用いることで様々な化学物質を末端器官へ分配し不必要な化学物質を適切な排泄器官・貯蔵器官へ輸送できるのである。例えば、ボウズハゲギス *Pagothenia borchgrevinki* は血液中に存在する NaCl の凝固点降下で -0.82 度、またその他のイオン等の効果を合わせて -1.00 度までしか氷点降下を示さない。しかし AFGP があるとさらに -1.20 度の効果が生じ -2.20 度でも血液は凍らなくなる (DeVries et al. 1982)。そのためボウズハゲギスは生息する海水温が -1.90 度という低温であっても問題なく生息することができる。

AFGP は構造的に非常に単純で、アラニン・アラニン・スレオニンあるいはプロリン・アラニン・スレオニンの三つのアミノ酸を基本とする構造が反復したものである。AFGP の生体内での生成過程については、遺伝子発現によって生じた大きなペプチドが細断されサイズの異なる AFGP が作成されることは分かっていた。その後の研究で AFGP はすい臓で生成された後に消化管に分泌されそれが再吸収され体液を循環すると考えられるようになった (Cheng et al. 2006)。

この AFGP の複雑な発現機構はその進化的な起源に大きく関係している。AFGP の進化については Chen と Cheng (1997) らが、(1) AFGP と **Trypsinogen Like Protease** 遺伝子の 5' 側、および 3' 側の塩基配列の相同性が非常に高く (94-96%)、また (2) TLP のイントロン 1 とエクソン 2 の領域にスレオニン・アラニン・アラニンのコドンに対応するオリゴヌクレオチド配列 (acagCGGCA) が存在することから、TLP 遺伝子の重複後オリゴヌクレオチドの重複および一部の領域の欠失で AFGP が生まれたという仮説をたてた。その後、進化的な中間型である AFGP と TLP のキメラ遺伝子が存在することが示され (Cheng and Chen 1999)、TLP 遺伝子から AFGP 遺伝子が進化してきたことはほぼ間違いないと考えられている。本研究では、この AFGP 起源についてより詳細な分子進化学的な解析を行い、さらなる進化過程の解明を試みた。

マゼランアイナメおよびカサゴの TLP 遺伝子について

ライギョダマシの AFLP・TLP 遺伝子および TLP 遺伝子の塩基配列はすでに公表されている。これらの情報を利用しながらより詳細な解析を行うために、

外群としてカサゴの TLP 遺伝子の塩基配列を明らかにし、ライギョダマシと同属にあるマゼランアイナメの TLP 遺伝子を含めた解析を行った。この解析で用いた配列は GENBANK に登録されている配列と我々の研究室で決定したカサゴ *Sebasticus marmoratus* とマゼランアイナメ *Dissostichus eleginoides* の配列である。ここでカサゴの TLP 遺伝子は腓臓由来の RNA に対する cDNA の塩基配列を、またマゼランアイナメの TLP 遺伝子は筋肉由来のゲノム DNA の塩基配列を用いた。(マゼランアイナメは日本国内の一般市場で購入したギンムツのゲノム DNA を用いて決定された。ただしギンムツあるいはメロとして流通している魚類はマゼランアイナメの他にまれにライギョダマシを含んでいることもあるので、ミトコンドリア配列の D ループ領域を用い生物種を確認している。) 図 2. 1 にはこれら TLP 遺伝子のコード領域の配列を、図 2. 2 にはマゼランアイナメの TLP 遺伝子のゲノム構造を示す。さらに、これらの配列とデータベースから得られた配列を用いて系統関係を推定したものを図 2. 3 に示す。ここでマゼランアイナメおよびライギョダマシ *Dissostichus mawsoni* の TLP の系統の末端までの長さ、さらには *Notothenia coriiceps* の TLP の系統の末端までの長さがほぼ同じであることに注意して欲しい。これは *Dissostichus* 属を含めたノトセニア科では TLP 遺伝子の進化速度が一定であると仮定できることを示している。一方で、AFGP・TLP 遺伝子 (AF134124) の枝の長さは他の系統よりも短い。すなわち TLP 遺伝子と AFGP・TLP キメラ遺伝子の進化速度はかなり違っている。さらにこの系統樹から、ライギョダマシの AFGP・TLP キメラ遺伝子には 2 種類の遺伝子が存在することも明らかである。一つの AFGP・TLP キメラ遺伝子 (AF134124) はノトセニア科の分化以前に TLP 遺伝子と分岐しており、他の AFGP・TLP キメラ遺伝子 (AF134322) の起源はより最近、おそらく *Dissostichus* 属の種分化の後に生じている。AFGP がノトセニア科、ハルパギファ科、アゴヒゲオコゼ科、カモグチウオ科、コオリウオ科に存在することを考えると AFGP の起源はこれらの科の分化以前に生じていることが想定され、第一番目に分岐した AFGP・TLP キメラ遺伝子 (AF134124) が TLP 遺伝子の重複によって生じた本来の AFGP・TLP キメラ遺伝子と考えられる。また多重遺伝子族に属する遺伝子はたびたび遺伝子変換により多重遺伝子族間での塩基配列の交換を行うことが知られており、第二番目の AFGP・TLP キメラ遺伝子 (AF134322) は *Dissostichus* 属の 2 種が分化した後に *Dissostichus mawsoni* の系統で本来の AFGP・TLP キメラ遺伝子あるいは AFGP 遺伝子と TLP 遺伝子が組み換えをおこなったものであると考えられる。実際に AFGP・TLP キメラ遺伝子 (AF134322) を詳細に解析すると、コード領域以外の領域においても 5' 側は AFGP 遺伝子と相溶性が高く、3' 側は AFGP・TLP 遺伝子よりも TLP 遺伝子と相溶性が高い。よって AFGP・TLP キメラ遺伝子 (AF134322) 自身は異なる進化経路を経た DNA

領域によって構成されたと考えられる。ただ注意しておかなければならないのは AFGP・TLP キメラ遺伝子(AF134322)は cDNA の塩基配列であり、RNA のスプライシングによって AFGP・TLP キメラ遺伝子のエクソンと TLP 遺伝子のエクソンに由来する mRNA が合成されたために生じた可能性も残る。これらについては今後のライギョダマシにおけるゲノム解析が必須である。以上の結果は AFGP・TLP 遺伝子の起源が一回の遺伝子重複で生じたと単純な進化過程で説明できるのではなく、その後の遺伝子変換などの複雑な過程を経て生じていることを物語っている。

### AFGP の起源の年代推定について

これまでの研究から AFGP は、ノトセニア科、ハルパギファ科、アゴヒゲオコゼ科、カモグチウオ科、コオリウオ科に属する種に観察され、ウシオニカジカ科、シュウドアフリティス科、フォークランドアイナメ科には観察されていない。そのため、AFGP はノトセニア亜目の種分化の過程で獲得されたと考えられる。しかし、南極海域から離れた場所で生息する種である *Notothenia angustata* では AFGP の遺伝子発現量が少なくタンパクは体液中にほとんど存在せず、*Patagonotothen tessellata* では AFGP 遺伝子そのものが存在しない(Cheng et al. 2003)。また先にあげたノトセニア科、ハルパギファ科、アゴヒゲオコゼ科、カモグチウオ科、コオリウオ科の全ての種で AFGP がタンパクあるいは遺伝子レベルで観察されているわけではなく、ウシオニカジカ科でも南極海域に生息している種が存在する (Eastman 2005)。これらのことを考慮すると、AFGP の起源がいつなのか (ノトセニア亜目の起源以前か、あるいはノトセニア科、ハルパギファ科、アゴヒゲオコゼ科、カモグチウオ科、コオリウオ科の共通祖先がフォークランドアイナメ科と分化する前後なのか) は一概に決められない。Cheng ら (2003) は AFGP の起源について大雑把な推定を行っているが、核遺伝子に対してミトコンドリア遺伝子の進化速度を用いるなど不適切な仮定が設けられ正確な結果は得られていない。

そこでここでは、AFGP の起源について TLP と AFGP・TLP キメラ遺伝子の分岐年代を分子進化学的に推定してみた。ただ TLP 遺伝子と AFGP・TLP キメラ遺伝子では進化速度が異なることから TLP の進化系統での情報をもとに時間推定を行った。すなわち (1) TLP 遺伝子や AFGP・TLP 遺伝子の塩基配列から祖先の塩基配列を推定、(2) TLP の進化過程で生じた塩基置換数を計算、(3) 推定されているライギョダマシとマゼランアイナメの種の分岐年代 (1450 万年) から TLP 系統での進化速度を推定、という手順を踏まえ (4) TLP 遺伝子と TLP・AFGP キメラ遺伝子の分岐年代の推定を行った。これらの結果を図 2. 4 に示す。エクソン 2-6 のコード領域の比較からライギョダマシとマゼランアイナメの

間で平均 22.5 個の塩基置換が生じており、それから TLP 遺伝子の進化速度が  $1.1 \sim 1.15 \times 10^{-9}$  であることが示される。さらに TLP 遺伝子と AFGP・TLP キメラ遺伝子の分岐時点までの塩基置換を考え、現在までに明らかになっている最古の AFGP・TLP キメラ遺伝子の誕生は 2180 ~2430 万年前と推定された。この値は Near (2004) が推定したノトセニア科、ハルパギファ科、アゴヒゲオコゼ科、カモグチウオ科、コオリウオ科に属する種々が分化し始める時代に相当する。

大陸の移動と大きく関与した南極海域の環境変化は未だ明らかになっていないことも多い。たとえば南極大陸が他の大陸と離れ、流れの強い南極周極流が生じた時期には異なる説がいくつか存在する。Scher と Martin(2006)は魚類の歯に含まれるネオジウムの同位体元素の解析から南米と南極が離れドレーク海峡が生まれたのは 4100 万年前であると推定している。Pfuhl と McCave (2005)は、オーストラリア・タスマニアの海底地層の解析から約 2400 万年前ごろに強い流れの南極周極流が生じたと結論している。最初に南極周極流が発生した時期と、その流れが速くなり温暖な中緯度の海流が南極周辺に入りにくくなった時期が異なるのは必ずしも相反することではない。南極周辺の寒冷化に大きく寄与したと考えられるのは后者であり、今回の AFGP の研究で明らかにされた年代がたとえ大きな誤差をもつとはいえ Pfuhl と McCave (2005)の提唱している地質学的な年代と一致していることは非常に興味深い。

- Chen L., DeVries A.L., Cheng C.-H. C. (1997) Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:3811-3816.
- Cheng C.-H. C & Chen. L (1999) Evolution of an antifreeze glycoprotein. *Nature* 401:443-444.
- Cheng C.H. C., Chen L., Near T.J., Jin Y. (2003) Functional antifreeze glycoprotein genes in temperate-water New Zealand nototheniid fish infer an antarctic evolutionary origin. *Mol. Biol. Evol.* 20:1897-1908.
- Cheng C.-H. C, Cziko P.A., Evans C.W. (2006) Nonhaptic origin of notothenioid antifreeze reveals pancreatic synthesis as common mechanism in polar fish freezing avoidance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:10491-10496.
- DeVries A.L. (1982) Biological antifreeze agents in cold water fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 73A:627-640.
- Eastman J.T. (2005) The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Polar Biol.* 28:93-107.
- Near T.J. (2004) Estimating divergence time of notothenioid fishes using a fossil-calibrated molecular clock. *Antarctic Sci.* 16:37-44.

Scher H.D., Martin E.E. (2006) Timing and climatic consequences of the opening of Drake passage. *Science* 312:428-430.

Pfuhl H.A., McCave I.N. (2005) Evidence for late Oligocene establishment of the Antarctic circumpolar current. *Earth Planet. Sci. Lett.* 235:715-728.

M R L L A L L L L L I G A A A A V P R E D G R I I G G W E C Y P H S  
 Sebasticus marmoratus ATG AGA CTG GCT CTG CTG TTG ATC GGA GGT GCT GCG GCA GTT CCC CGT GAA GAT GGA AGG ATC ATT GGC GGG TGG GAG TGT TAT CCT CAC TCT  
 Dissostichus eleginoides 1 . . . . . C . . . . . C . . . . . C . . . . . C . . . . . C . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . AT . . . . . CA . . . . .  
 Dissostichus eleginoides 3 . . . . . C . . . . . C . . . . . C . . . . . A . . . . . T . . . . . AAT . . . . . T . . . . . AAT . . . . . CA . . . . . CA . . . . .

R P Y M A S L N Y G Y H F C G G V L I N N Q W V L S V A H C W Y N  
 Sebasticus marmoratus CGT CCA TAC ATG GCC TCC CTC AAC TAC GGT TAC CAC TTC TGT GGT GGG GTG CTC ATC AAC AAT CAG TGG GTG CTC TCC GTC CAT TGT TGG TAC AAT  
 Dissostichus eleginoides 1 . . . . . G . . . . . G . . . . . A . . . . . G . . . . . C . . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . . C . . . . .  
 Dissostichus eleginoides 3 . . . . . G . . . . . G . . . . . A . . . . . A . . . . . G . . . . . C . . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . . C . . . . .

P Y S M Q I M L G E H D L R V F E G T E Q L M K T E N I I W H P S  
 Sebasticus marmoratus CCC TAT TCC ATG CAG ATC ATG CTG GGA GAA CAC GAT CTG CGA GTG TTC GAG GGT ACA GAG CAG CTC ATG AAG ACC GAA AAC ATC ATC TGG CAC CCT AGT  
 Dissostichus eleginoides 1 . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . .  
 Dissostichus eleginoides 3 . . . . . A . . . . . G . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . A . . . . . T . . . . . A . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . C . . . . .

Y D Y Q T L D F D I M L I K L F H P V E V T D A V A P I P L P T G  
 Sebasticus marmoratus TAT GAC TAC CAG ACT CTG GAT TTT GAC ATC ATG CTG ATC MAG CTC TTC CAC CCG GTG GAG GTG ACC GAC GCA GTC GGA ACC CCA ATC CCA TTG CCC ACA GGG  
 Dissostichus eleginoides 1 . . . . . . . . . . C . . . . . C . . . . . G . . . . . A . . . . . G . . . . . G . . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . . G . . . . . A . . . . .  
 Dissostichus eleginoides 3 . . . . . . . . . . C . . . . . C . . . . . G . . . . . A . . . . . G . . . . . A . . . . . G . . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . . G . . . . . A . . . . .

C P M G G L P C S V S G W G N T A L G G E A V M P T L L Q C L D V  
 Sebasticus marmoratus TGC CCA ATG GGG GGG CTC CCC TGC TCT GTG TCT GGC TGG GGA AAC ACT GCC CTC GGG GGC GAG GCG GTG ATG CCC ACC CTT CTG CAG TGT TTG GAC GTG  
 Dissostichus eleginoides 1 . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . AA . . . . . TT . . . . . TA . . . . .  
 Dissostichus eleginoides 3 . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . AA . . . . . TT . . . . . TA . . . . .

P I V D Q D C K N A Y P N M I S P R M V C A G F M D G G R D A C  
 Sebasticus marmoratus CCC ATA GTG GAC GAC CAG GAC TGT AAG AAC GCC TAT CCT AAC ATG ATC TCA CCC AGG ATG GTG TGT GCC GGA TTC ATG GAT GGA GGC AGA GAC GCA TGC  
 Dissostichus eleginoides 1 . . . . . C . . . . . G . . . . . T . . . . . G . . . . . G . . . . . A . . . . . C . . . . . G . . . . . A . . . . . G . . . . . A . . . . .  
 Dissostichus eleginoides 3 . . . . . C . . . . . G . . . . . T . . . . . G . . . . . G . . . . . C . . . . . G . . . . . C . . . . . A . . . . . G . . . . . A . . . . .

N G D S G S P L V C A G E V H G L V S W G Q G C A L P N Y P G V Y  
 Sebasticus marmoratus AAT GGC GAC TCC GGC AGC CCT CTG GTG TGT GGC GGA GAG GTC CAC GGC CTG GTC TCA TGG GGT CAG GGA TGT GCT CTG CCA AAC TAC CCC GGA GTT TAC  
 Dissostichus eleginoides 1 . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . G . . . . . A . . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . . G . . . . . C . . . . . GA . . . . .  
 Dissostichus eleginoides 3 . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . G . . . . . A . . . . . T . . . . . T . . . . . C . . . . . G . . . . . C . . . . . GA . . . . .

V K V C E F L Y W I E E T L A A N P  
 Sebasticus marmoratus GTC AAA GTG TGT GAG TTC CTC TAC TGG ATT GAA GAA ACC CTG GCA ACC GCA AAC CCC  
 Dissostichus eleginoides 1 . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . . GT . . . . . C . . . . . T . . . . .  
 Dissostichus eleginoides 3 . . . . . C . . . . . C . . . . . T . . . . . A . . . . . C . . . . . T . . . . . G . . . . . GT . . . . . C . . . . . T . . . . .

図2.1 カサゴおよびマゼランアイナメの TLP 遺伝子の塩基配列

*D. mawsoni* trypsinogen-like protease gene



*D. eleginoides* trypsinogen-like protease gene



*D. mawsoni* chimeric AFGP-protease gene

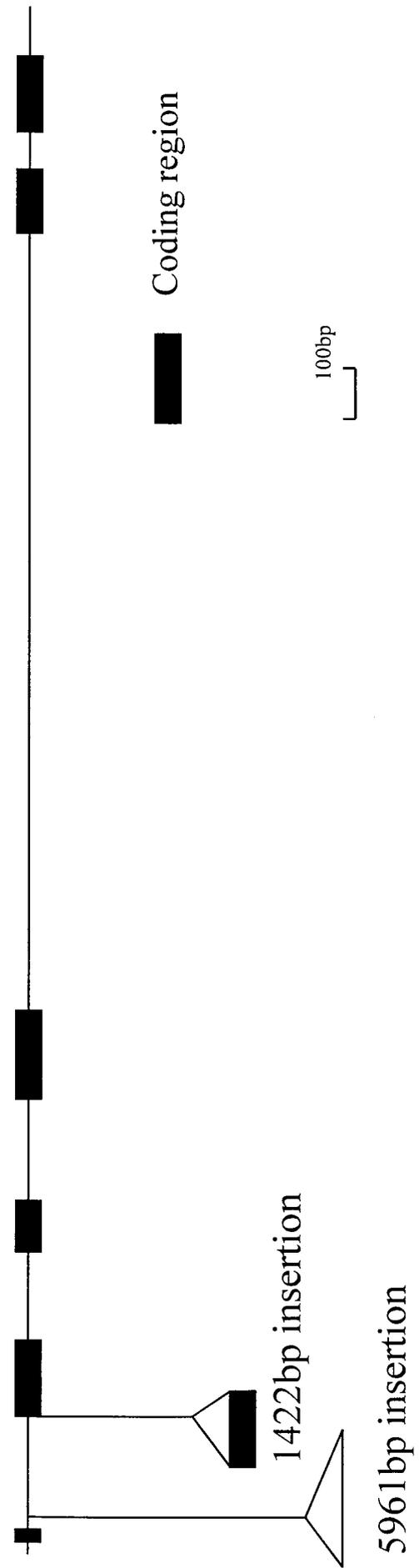


Fig. 2. 2 Genomic organization of trypsinogen-like protease gene and chimeric AFGP-protease genes. Nucleotide sequences of trypsinogen-like protease gene and chimeric AFGP-protease genes of *D. mawsoni* were taken from Genbank. The accession numbers are U58835 and AF134320-21, respectively.

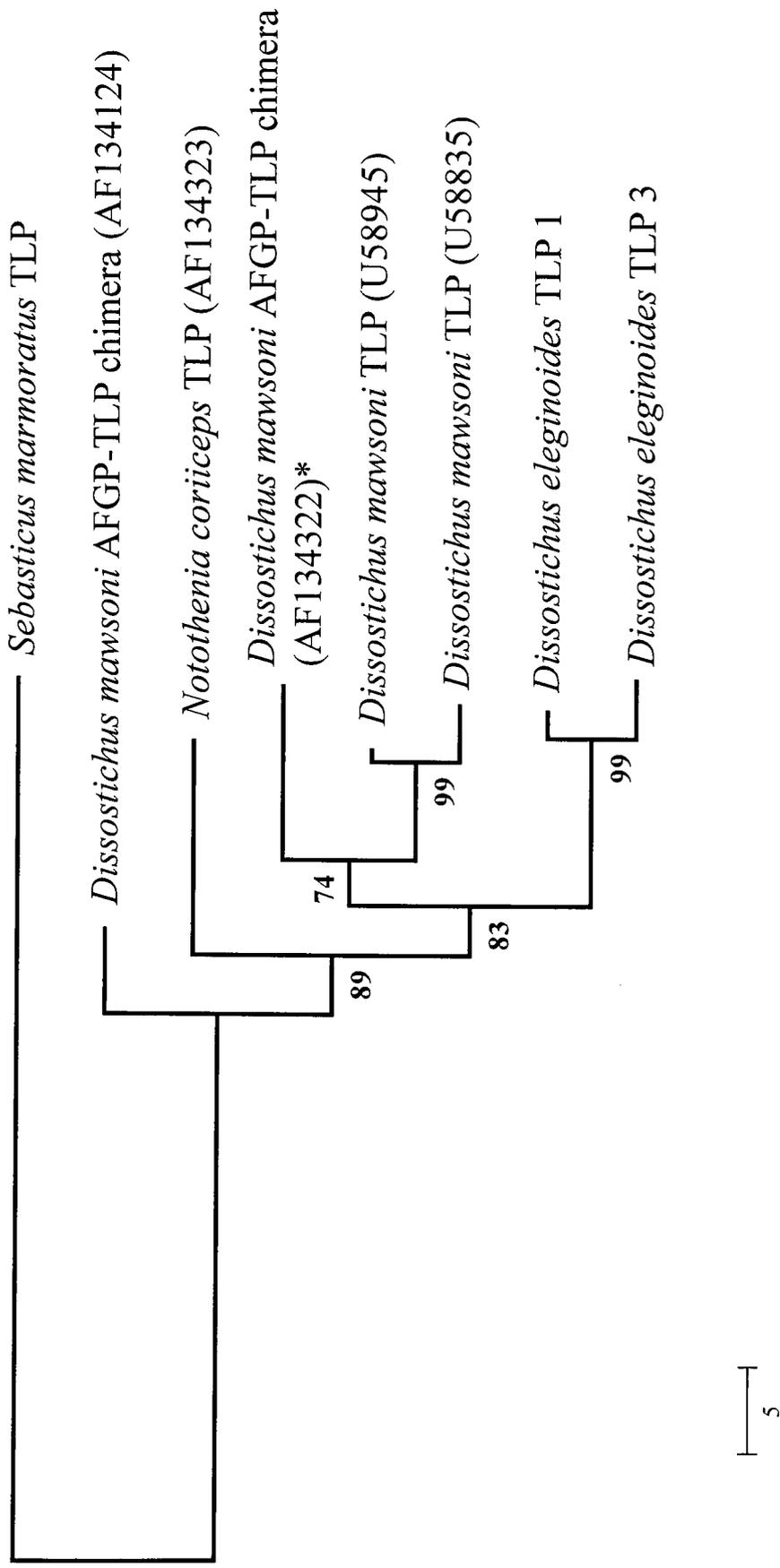
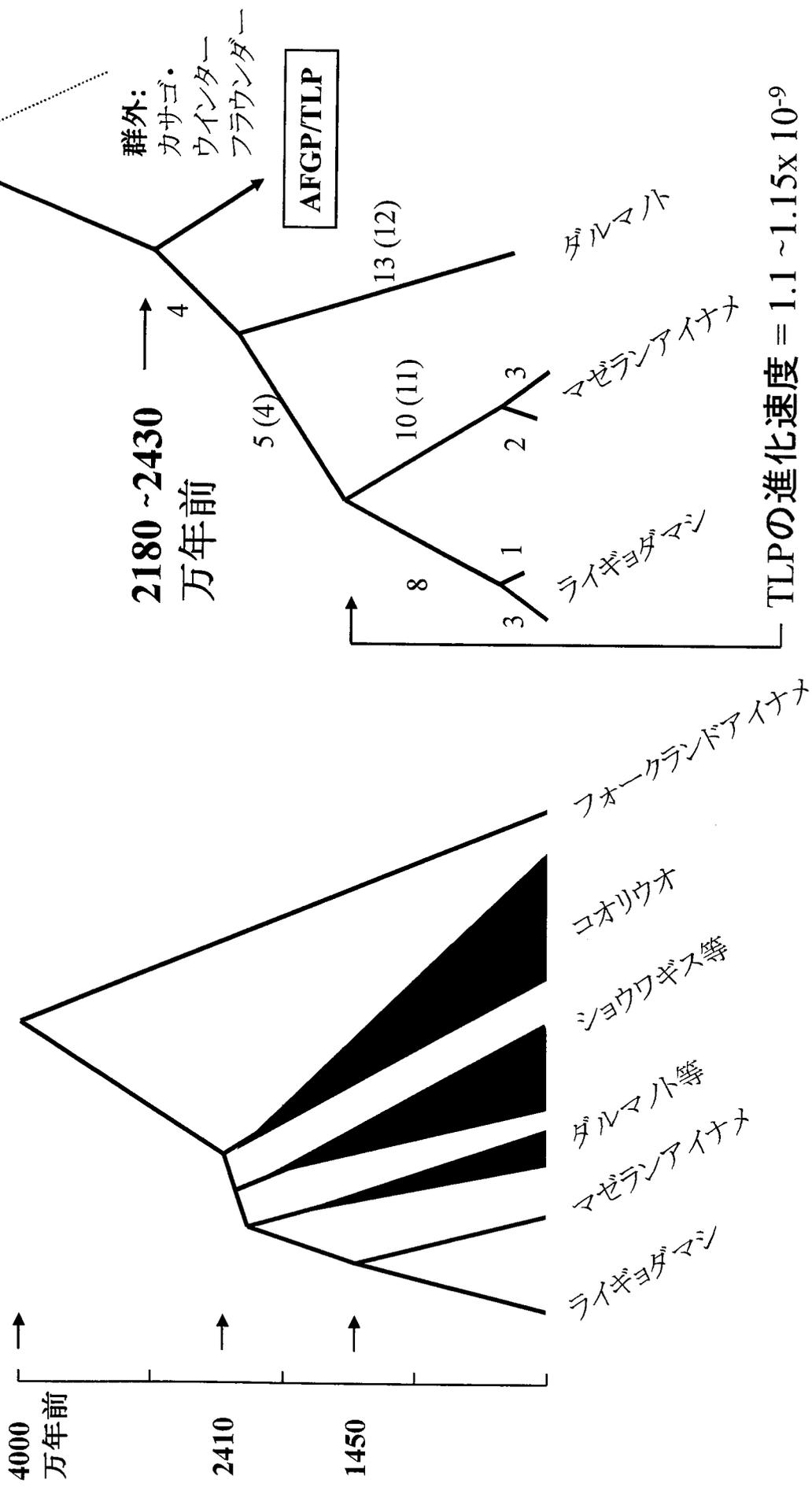


Fig. 2. 3 NJ tree constructed for exons 2-5 region of TLP and AFGP-TLP chimeric genes with using the number of nucleotide differences as evolutionary distances.



12Sと16S rRNAに基づいた系統樹 (Near 2004) TLPとTLP/AFGPの系統樹

図2.4 AFGPの起源

### 第3章 ヘモグロビン遺伝子

#### はじめに

脊椎動物の赤血球に存在するヘモグロビン **Hemoglobin** は、肺や鰓など外部の環境と接することのできる器官において酸素と結合し、酸素濃度の低い場所で酸素と解離する分子である。ヘモグロビンの基本的な構造は $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の4量体であり、これらのサブユニットが協調的に構造を変化させながら周りの酸素濃度など影響を受け酸素と結合・解離を行い非常に効率よく酸素の運搬を行っている。ヘモグロビン分子は二酸化炭素の分圧が上昇したり pH が低下したり温度が上昇したりすると、酸素結合能が変化し酸素が解離しやすくなる。これはボーア効果と呼ばれ、末端組織のように酸素を消費して二酸化炭素を発生する場所でヘモグロビン分子からの酸素の解離を促進している。ボーア効果はアルカリ性あるいは中性近くの pH で観察され酸性が強くなるとその効果が逆転するのが普通である。しかし、硬骨魚類ではより低い pH の条件下でもこのようなボーア効果がみられる。これはルート効果と呼ばれボーア効果の極端な場合として考えられており、低い pH 下でデオキシ・ヘモグロビン分子の構造が安定し協調的な酸素結合能が失われることによって生まれる効果だと考えられている。

ヘモグロビン遺伝子の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖は遺伝子重複によって生じたものである。これら二つの遺伝子はヒトを含む哺乳類では異なる遺伝子座によってコードされている。個体発生の段階で酸素結合能が異なるサブユニットが用いられ、哺乳類では発生の初期の段階で $\zeta$ 鎖や $\epsilon$ 鎖が、その後の出産前後までは $\alpha$ 鎖や $\gamma$ 鎖が用いられる、これらの $\alpha$ 鎖を含む $\alpha$ 鎖型の $\zeta$ 鎖および $\theta$ 鎖は $\alpha$ 遺伝子と連鎖した領域に、また $\beta$ 鎖を含む $\beta$ 鎖型の $\epsilon$ 鎖、 $\gamma$ 鎖、 $\delta$ 鎖は $\beta$ 遺伝子と連鎖した領域に存在し、発生段階に応じた発現制御を示す。数種類の $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖型のサブユニットが存在するのは硬骨魚類においても同じである。たとえば、メダカでは3種類の $\alpha$ 鎖型と4種類の $\beta$ 鎖型サブユニットが知られている。このなかで少なくとも2種類の $\alpha$ 鎖型と1種類の $\beta$ 鎖型サブユニットは発生初期のみで発現する一方、従来から知られていた $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖サブユニットは成魚で発現している。ただし成魚型の $\beta$ 鎖に関しては発生初期にも発現していることが知られている (Maruyama et al. 2002)。このような遺伝子構成およびその発現パターンはすべての硬骨魚類にみられるのではなく、フグやサケなど異なるグループによって $\alpha$ 型および $\beta$ 型の遺伝子の数も違えばその発現様式も異なっている。

## ノトセニア亜目魚類におけるヘモグロビン

ヘモグロビンは赤血球で主要なタンパク質であり、ほぼ脊椎動物すべてに存在する。唯一の例外はノトセニア亜目のコオリウオ科に属する魚類で、これらの魚類ではヘモグロビンが生成されない。また、他のノトセニア亜目魚類においても、血液中の赤血球の数が少ないことも知られている。いわゆるヘマクリット値は多くの魚類で 30-40%なのに対し、ノトセニア亜目の魚類では 14-39%である (川口 2005)。このような特性から多くの研究者がノトセニア亜目のヘモグロビンに注目し研究を行ってきた。現在までに以下のことが明らかになっている。

(1) ダルマノト *Notothenia coriiceps* の成魚には、Hb1 と Hb2 と呼ばれる 2 種類のヘモグロビンが存在し、Hb1 がその 95%、Hb2 が 5%を占める。この Hb1 と Hb2 の  $\beta$  鎖は共通しているが、 $\alpha$  鎖は異なる。このほかにも同種には発生初期に発現する別の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖が存在している。

(2) ダルマノトの成魚型の  $\alpha$  鎖 (Hb1 型) および  $\beta$  鎖の遺伝子は近傍に座上し互いの 5' 側が近接する、いわゆる 5'—5' の配置にある。そのため、二つの遺伝子の間では発現制御領域が共有されている (Zhao et al. 1998)。また同種において、成魚型とは別に胚型のヘモグロビンの  $\alpha$  型と  $\beta$  型遺伝子座が存在する (Cocca et al. 2000)。この胚型でも  $\alpha$  型と  $\beta$  型の遺伝子は 5'—5' に位置するが、そこでは全体が重複して 2 つのクラスターがタンデムに配置し計 4 個の遺伝子で構成されている (図 3. 1. (A))。

(3) コオリウオ科の魚類である *Chionodraco hamatus* と *Channichthys rhinoceratus* には胚型のヘモグロビンが存在しない。また Near ら(2006)が示したように、コオリウオ科の 16 種のうち 15 種では成魚型の  $\beta$  遺伝子および  $\alpha$  遺伝子のエクソン 1 と 2 がゲノムから欠失している (図 3. 1. (B))。コオリウオ科としては例外的に *Neopagetopsis ionah* で  $\alpha$  遺伝子と二つの  $\beta$  遺伝子がゲノム上に存在するが、一つの  $\beta$  遺伝子はエクソン 1 と 2 が欠けており、また他の一つの  $\beta$  遺伝子ではイントロン 1 とエクソン 2 の境域で正常なスプライシングを妨げる突然変異が生じ正常な  $\beta$  鎖は生成できない(図 3. 1. (C))。

(4) ノトセニア亜目魚類のヘモグロビンの酸素に対するアフィニティは比較的低い (di Prisco et al. 1988)。

(5) ノトセニア亜目の成魚では、複数のヘモグロビン種が存在する生物種とほぼ 1 種類のヘモグロビンが生物種する場合がある (表 3. 1)。複数の種類のヘモグロビンがある場合はそのサブユニットの構成が異なり、 $\alpha$  サブユニットに数種類がある場合、 $\beta$  サブユニットに数種類がある場合、また  $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットに数種類ある場合が存在する。またここで異なる種類の Hb が異なる性質を示す場合がある。*Trematomus newnesi* の場合、Hb1 や Hb2 は生理的な条件

下で協調的に酸素と結合するがその酸素結合能は pH や有機リン酸によって変わらない。一方 HbC は pH や有機リン酸によって酸素と結合する能力が変化しボーア効果を示す (D'Avino et al 1994)。コオリイワシ *Pleuragramma antarcticum* の場合、Hb1、Hb2、Hb3 のすべてが著しいボーア効果およびルート効果を示し酸素に対するアフィニティも比較的高い (Tamburrini et al. 1996)。しかし三種類のヘモグロビンは温度によって、その性質を異にする。季節的な移動によって比較的広範囲に生息するコオリイワシにとって温度で異なる性質を示す Hb が存在することが適応的なのではないかと疑われている。一方コオリイワシと近縁である *Aethotaxis mitopteryx* では主要な Hb が一つだけで、ボーア効果もさほど強くなくルート効果は全く見られない (D'Avino et al. 1992)。このように生物種および構成サブユニットによってヘモグロビンの性質はかなり異なっている。

#### ヘモグロビン遺伝子の系統関係について

ヘモグロビンのアミノ酸配列は多くのノトセニア亜目魚類から得られており、図 3. 2 に遺伝子データベースに登録された、あるいはすでに文献で発表された  $\alpha$  型および  $\beta$  型ヘモグロビン・タンパクのアミノ酸配列を示す。これらの配列に基づいて、またメダカの配列を外群として系統解析(図 3. 3 と図 3. 4)を行うと  $\alpha$  遺伝子および  $\beta$  遺伝子の両方で (1) 成魚で主要な Hb で使用されるサブユニットのグループと (2) 成魚では比較的量の少ない Hb で使用されるサブユニットあるいは胚期一稚魚で使用されている Hb のサブユニット、の二つのグループに大きく分けられる(図 3. 3. (C) と図 3. 4. (C))。例外はウシオニカジカ科に属する *Cottonperca gobio* の  $\beta$  鎖で、成魚で主要な Hb を構成するサブユニットにあるにも関わらず第二番目のグループに属している。これについては Verde ら (2007) が、*Cottonperca gobio* の系統で  $\beta$  グロビン遺伝子の発生段階におけるスイッチの制御機構に突然変異が生じ胚期一幼魚期で使用されるヘモグロビン  $\beta$  遺伝子が成魚で使用されることとなったためではないかと類推している。*Cottonperca gobio* の成魚の Hb1 と Hb2 は共に酸素に対するアフィニティが高いことが知られている。もしかすると酸素に対するアフィニティを高めるために胚期一幼魚期で使用されるヘモグロビン  $\beta$  遺伝子が成魚でも使用されることとなったのかもしれない。またここで、第一番目のグループ(成魚で主要な Hb) と第二番目のグループ(発生初期あるいは成魚で比較的稀に使用されている Hb) はメダカにも存在し、それらの系統の分化はノトセニア亜目魚類の誕生の前に始まっていることに注意して欲しい。すなわちコオリウオの一部の種で第一番目のグループあるいは第二番目のグループに属するヘモグロビン遺伝子が観察されないのは、これらの系統の進化の過程でゲノムから失われたことを意味している。

また図 3. 3. (A)と図 3. 4(A)には成魚型の  $\alpha$  遺伝子および  $\beta$  遺伝子について推測された系統関係も示されている。ここでは進化的に短期間で分岐した配列を比較しているため、最節約法で系統樹を推定した。ただここで示されているコンセンサス系統樹の一部の系統関係はあまり信頼のおけるものではない。というのも、アミノ酸配列では一つのサイトで並行置換や復帰置換がしばしば観察されているからである。実際に同じ配列を用い NJ 法などで配列の差異や PAM 距離などを用いて系統樹を作成してみると、ここで示されている系統樹とは系統関係の異なるものが得られる。しかし、次の点は様々な結果で一様に観察されている。(1) ウシオニカジカ科 *Bovichtidae*、そしてシュウドアフリティス科 *Pseudaphritidae* はノトセニア亜目魚類で最初に分化した種であり、これらの種のヘモグロビン遺伝子はノトセニア亜目魚類のヘモグロビン遺伝子の中で最も早い段階で分岐している。(ただし *Cottoperca gobio* の  $\beta$  遺伝子については先にあげた点に注意すること。)(2) ノトセニア科の  $\alpha$  および  $\beta$  遺伝子は側系統性を示す。(3) カモグチウオ科 *Bathydraconidae* の  $\alpha$  遺伝子はノトセニア科の魚類とグループを形成するものとアゴヒゲオコゼ科 *Artedidraconidae* とグループを形成するものの 2 種類が存在する。(4) アゴヒゲオコゼ科のヘモグロビン遺伝子はカモグチウオ科の (すくなくとも一部の種の) ヘモグロビン遺伝子に最も近縁である。(5) コオリウオ科の  $\alpha$  遺伝子 (と  $\beta_{\text{CHAN}}$  遺伝子) はそれぞれ、カモグチウオ科の相同遺伝子と近縁である。Near ら (2006) が示しているように、コオリウオ科の  $\beta_{\text{NOTO}}$  遺伝子 (gi 番号 84313789) はアゴヒゲオコゼ科やカモグチウオ科の  $\beta$  遺伝子とノトセニア科の  $\beta$  遺伝子の分岐以前に分岐しており、 $\beta_{\text{CHAN}}$  と  $\beta_{\text{NOTO}}$  の遺伝子重複は古いと考えられる。以上から、ヘモグロビン遺伝子から推測された系統関係はノトセニア亜目の種の系統関係を反映しているものであるが、必ずしも一致していないことが示される。なぜこのようなことになっているのかについては様々な理由があり、(1) アミノ酸配列が短くここで調べた遺伝子の系統関係を明らかにするための情報が少ないこと、(2) 平衡置換や復帰置換などが多く存在し系統関係を類推するにあたり問題となっていること、のような系統樹の推測での問題とともに、(3) 遺伝子のイントログレーション、(4) 祖先における多型配列の存在、(5) 遺伝子の組換え、などの分子進化学的な要因や集団遺伝学的な要因も関与していることが考えられる。実際に *Trematomus newnesi* の  $\beta$  遺伝子の二つの塩基配列を他の *Trematomus* 属の塩基配列と比較すると、一つの  $\beta$  遺伝子 (gi 番号 62484128) の 3' 側は他の一つの *Trematomus newnesi* (gi 番号 3372855) と似ており、5' 側は *Trematomus hansonii* (gi 番号 3372860) の配列と似ている (図 3. 5)。これは (1) *Trematomus newnesi* と *Trematomus hansonii* の種分化以前に分岐した対立遺伝子が両種で保存され、それらの組み換えによって新たな対立遺伝子が生じたか、(2) *Trematomus*

*hansoni* と *Trematomus newnesi* で種間交雑が生じ、それに起因する遺伝子のイントログレッションの後に対立遺伝子間での組み換えによって新たな対立遺伝子が生じたためだと考えられる。

#### ヘモグロビン遺伝子での塩基置換について

公表されているヘモグロビンの塩基配列はアミノ酸配列に比べてその数が少ない。しかし配列の数が少なくてもアミノ酸配列の解析では得られない情報が塩基配列の解析で得られるので、次に塩基配列の解析を行った。全コード領域の塩基配列が明らかになっている配列は、成魚の主要な Hb の  $\alpha$  遺伝子 (gi 番号) では *Notothenia angustata* (7110163)、*Notothenia coriiceps* (7212778)、*Trematomus newsoni* (62484126)、*Parachaenichthys charcoti* (84105263)、*Neopagetopsis ionah* (84313789) で、 $\beta$  遺伝子 (gi 番号) では、*Notothenia angustata* (7110163)、*Notothenia coriiceps* (7212778)、*Trematomus newsoni* (3372855;ただし 62484128 は組み換えによって生じた可能性がある) での利用しない)、*Trematomus bernacchii* (3372857)、*Trematomus hansoni* (3372860)、*Pagothenia borchgrevinski* (3372849)、*Gymnodraco acuticeps* (3372852)、*Cygnodraco mawsoni* (3372846)、*Parachaenichthys charcoti* (84105260, 84105263)、*Neopagetopsis ionah* (84313789) がある。これらの遺伝子配列の系統関係を NJ 法によって求め、またその系統関係に基づいて Zhang らの方法で推定した祖先配列から得られた分子進化学的変化を図 3. 6 および図 3. 7 に示す。この結果で、転移型の塩基置換と転換型の塩基置換の数は同義塩基置換についてはほぼ同数の置換が、また非同義塩基置換数については転換型の置換が転移型の置換の 1.5- 2.3 倍生じていることが示され、転移転換のバイアスがさほど強くないことが示された (表 3. 2)。また  $\alpha$  鎖においては *Parachaenichthys charcoti* につながる系統と *Neopagetopsis ionah* につながる系統で、 $\beta$  鎖においては *Neopagetopsis ionah*、*Pagothenia borchgrevinski*、*Gymnodraco acuticeps* につながる系統で非同義塩基置換数が同義置換数に比して多いことが観察された。同義置換サイト数と非同義置換サイト数を考慮した上での Fisher の正確法による検定では、これらの系統の中では  $\alpha$  鎖における系統節 8 - *Neopagetopsis ionah* での非同義置換数が有意に (5% レベルで) 同義置換数に比して多いことが示された (図 3. 8)。*Neopagetopsis ionah* の  $\beta$  鎖が、エクソンの欠失やイントロン・エクソンの境界域での突然変異によりタンパク質として生成されないことを考えると、このように  $\alpha$  鎖で非同義置換が有意に多いのは一見奇妙な結果である。

コオリウオ科ではヘモグロビン遺伝子の欠失により赤血球中のヘモグロビンが存在せず、また赤血球が少ない (他のノトセニア亜目魚類の 100 分の 1 程度) ために、低温条件下においてもその血液の粘性は低く抑えられている。そ

ここで、「心臓の構造変化や動脈球の発達などに伴う血流量の増加やうろこを失うことで皮膚呼吸の効率を高め、さらに低温により血液中の溶存酸素供給が高まることでヘモグロビン遺伝子を維持する（負の）選択圧が弱まる一方、血液の粘性を下げることで酸素以外の成分の供給・排出を促進することに対し正の選択がかかり、この選択圧のもとでコオリウオ科のヘモグロビンが様々な非同義塩基置換を蓄積し最終的には偽遺伝子化となった」という説が提唱できる。Nearら(2006)らは、二つの対立遺伝子、すなわち（１） $\alpha$  遺伝子のエクソン 1 と 3、および  $\beta$  遺伝子を欠失したハプロタイプと（２）一つの  $\alpha$  遺伝子と二つの  $\beta$  遺伝子をもつハプロタイプ（一つの  $\beta$  遺伝子はエクソン 1 と 2 が欠けており、また他の一つの  $\beta$  遺伝子ではイントロン 1 とエクソン 2 の境域で正常なスプライシングを妨げる突然変異が生じている。）が、コオリウオ科の種分化の間で数百万年にわたる長期間維持されてきたことを提唱している。もしかするとコオリウオ科の種分化の時期では、機能的なヘモグロビンをコードするハプロタイプと偽遺伝子をもつハプロタイプが共存し全体のヘモグロビン量および赤血球の数を調整していたのかもしれない。そして、その過程において唯一残った対立遺伝子に対し酸素結合やタンパク質の安定性などに関する性質にそれまでとは異なる淘汰圧がかかり非同義的な塩基置換が蓄積したのかもしれない。*Neopagetopsis ionah* への系統で生じたアミノ酸置換のうち、 $\alpha$  遺伝子の A19,C53,R69,T89,S136 や  $\beta$  遺伝子の Q6,Y15,V18,S82,P146 は他のノトセニア亜目魚類で観察されていないアミノ酸であり、その中でも  $\alpha$  遺伝子の A19、C53,T89 や  $\beta$  遺伝子の Y15,S82,P146 などは近縁の硬骨魚類でも観察されていない。この中で  $\alpha$  遺伝子の A19 は哺乳類などで観察されているものの、C53 はヘモグロビン・タンパク質の表面に位置し他のペプチドとジスルフィド結合によって結合する可能性がある。また  $\alpha$  遺伝子の T89 に至ってはヘモグロビンで最も重要な役割を果たすヘムと結合するヒスチジン残基 H88 に隣接し A89→T89 のアミノ酸の変化はヘモグロビンの酸素結合能力に大きく影響する可能性がある。

ここでも示されたようにコオリウオ科以外でもヘモグロビン遺伝子に多くの非同義的な塩基置換が生じている場合がある。一つの例は *Gymnodraco mawsoni* の  $\beta$  遺伝子にいたる系統で、これについては今までの研究で正の淘汰が働いていたかどうか議論されてきている (Bargelloni et al. 1998, Nunny and Schuenzel 2006)。今まで用いられた解析方法は大量検定に基づいた検定法が多く必ずしも多くの置換が生じていない場合には適切でない。ここで行った検定はそのような問題はなく、また検定を保守的に行うように同義サイトや非同義サイトの数を推定している。その結果、同義サイトや非同義サイトを考慮すると 5% レベルでは非同義塩基置換の数が同義置換の数よりも多いとは必ずしも言えないと結論された。

- Bargelloni L, Marcato S., Paternello T. (1998) Antarctic fish hemoglobins: evidence for adaptive evolution at subzero temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8670-8675.
- Cocca E., Detrich III H.W., Parker S.K., di Prisco G. (2000) A cluster of four globin genes from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*. *J. Fish Biol.* 57:33-50.
- di Prisco G., Giardina B., D'Avino R., Condo S.G., Bellelli A., Brunori M. (1988) Antarctic fish hemoglobin: An outline of the molecular structure and oxygen binding properties – II Oxygen binding properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B:585-591.
- D'Avino R., Caruso C., Tamburrini M., Romano M., Rutigliano B., de Laureto P.P., Camardella L., Carratore V., di Prisco G. (1994) Molecular characterization of the functionally distinct hemoglobin of the Antarctic fish *Trematomus newnesi*. *J. Biol. Chem.* 269:9675-9681.
- D'Avino R., Fago A., Kunzmann A., di Prisco G. (1992) The primary structure and oxygen-binding properties of the single hemoglobin of the high-Antarctic fish *Aethotaxis mitopteryx* Dewitt. *Polar Biol.* 12:135-140.
- Maruyama K, Yasumasu S, Iuchi I (2002) Characterization and expression of embryonic and adult globins of the teleost *Oryzias latipes* (Medaka). *J. Biochem.* 132:581-589.
- Near T.J., Parker S.K., Detrich III H.W. (2006) A genomic fossil reveals key steps in hemoglobin loss by the Antarctic icefishes. *Mol. Biol. Evol.* 23:2008-2016.
- Nunney L., Schuenzel E.L. (2006) Detecting natural selection at the molecular level: a reexamination of some “classic” examples of adaptive evolution. *J. Mol. Evol.* 62:176-195.
- Tamburrini M., D'Avino R., Fago A., Carratore V., Kunzmann A., di Prisco G. (1996) The unique hemoglobin system of *Pleuragramma antarcticum*, an antarctic migratory teleost. Structure and function of the three components. *J. Biol. Chem.* 271:23780-23785.
- Verde C., Lecointre G., di Prisco G. (2007) The phylogeny of polar fishes and the structure, function and molecular evolution of hemoglobin. *Polar Biol.* 30:523-539.
- Zhao Y., Ratnayake-Lecamwasam M, Parker S.K., Cocca E., Camardella L., di Prisco G., Detrich III H.W. (1998) The major adult  $\alpha$ -globin gene of Antarctic teleosts and its remnants in the hemoglobinless icefishes. Calibration of the mutation clock for nuclear genes. *J. Biol. Chem.* 273:14745-14752.

川口弘一 (2005) 南極の自然史—ノトセニア魚類の世界から— 東海大学出版

表3.1 ノトセニア亜目魚類におけるヘモグロビン

種名 Speice name	成魚での Hb の種類の数	異なる Hb サブユニットの構成(成魚における割合)
<i>Cottoperca gobio</i>	2	Hb1( $\alpha_1, \beta$ ; 50%), Hb2( $\alpha_2, \beta$ ; 50%)
<i>Pseudaphritis urvillii</i>	2	Hb1( $\alpha, \beta_1$ ; 95%), Hb2( $\alpha, \beta_2$ ; 5%)
ダルマノト <i>Notothenia coriiceps</i>	2	Hb1( $\alpha_1, \beta$ ; 95%), Hb2( $\alpha_2, \beta$ ; 5%)
イトヒキギンムツ <i>Aethotaxis mitopteryx</i>	1	Hb( $\alpha, \beta$ ; 99%)
ナンキョクカジカ <i>Gobinotothen gibberifrons</i>	2	Hb1( $\alpha_1, \beta_1$ ; 90%), Hb2( $\alpha_2, \beta_2$ ; 10%)
コオリイワシ <i>Pleuragramma antarcticum</i>	3	Hb1( $\alpha_1, \beta_1$ ; 30%), Hb2( $\alpha_1, \beta_2$ ; 20%), Hb3( $\alpha_2, \beta_1$ ; 50%), HbC(微量)
ハゲギス <i>Trematomus newnesi</i>	3	Hb1( $\alpha_1, \beta_1$ ; 75%), HbC( $\alpha_1, \beta_2$ ; 20%), Hb2( $\alpha_2, \beta_1$ ; 5%)
ボウズハゲギス <i>Pagothenia borchgrevinski</i>	5	Hb1( $\alpha, \beta_1$ ; 70%), Hb0( $\alpha, \beta_2$ ; 10%), Hb2(10%), Hb3(10%), HbC(微量)
メガネカモグチウオ <i>Cygnodraco mawsoni</i>	2	Hb1( $\alpha, \beta_1$ ; 95%), Hb2( $\alpha, \beta_2$ ; 5%)
<i>Racovitia glacialis</i>	2	Hb1( $\alpha, \beta_1$ ; 95%), Hb2( $\alpha, \beta_2$ ; 5%)
キバゴチ <i>Gymnodraco acuticeps</i>	1	Hb( $\alpha, \beta$ ; 99%)
<i>Pogonophryne scotti</i>	1	Hb( $\alpha, \beta$ ; 99%)

表3.2 ヘモグロビン遺伝子における塩基置換のパターン

α鎖での塩基置換

β鎖での塩基置換

非同義塩基置換

非同義塩基置換

塩基置換前

塩基置換前

	A	T	C	G
A		2	6	4
T	1		4	4
C	2	0		3
G	3	2	5	

塩基置換後

	A	T	C	G
A		2	12.5	15
T	4		9	5
C	4	4		3
G	3	4	4	12

塩基置換後

同義塩基置換

同義塩基置換

塩基置換前

塩基置換前

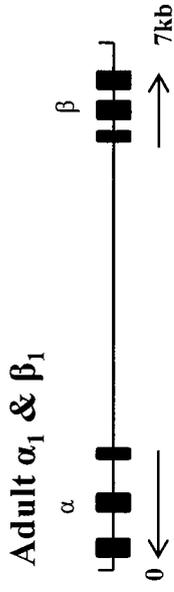
	A	T	C	G
A		1	0	2
T	2		4	1
C	0	2		1
G	0	1	1	

塩基置換後

	A	T	C	G
A		0	1.5	0
T	1		6	1
C	0	0		1
G	0	0	0	1

塩基置換後

(A) *Notothenia coriiceps*

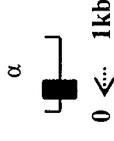


Adult  $\alpha_2$

..... ?

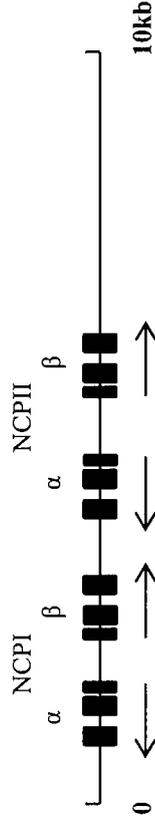
(B) *Chaenocephalus aceratus*

Adult pseudo  $\alpha_1$  (exon 3 only)

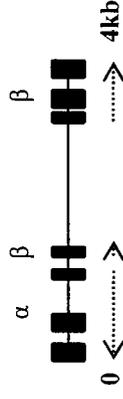


(C) *Neopagetopsis ionah*

Embryonic  $\alpha_{\text{NCPI}}$  &  $\beta_{\text{NCPI}}$  and  $\alpha_{\text{NCPH}}$  &  $\beta_{\text{NCPH}}$



Adult pseudo  $\alpha_1$ , pseudo  $\beta_{\text{CHAN}}$  (exon 3 only) & pseudo  $\beta_{\text{NOTO}}$



☒ 3. 1 Genome structure of notothenioid fish hemoglobin genes.

(A) *Notothenia coriiceps*: Data taken from genbank (gi numbers 7212778 and 13122449)

(B) *Chaenocephalus aceratus* : (gi number 3258654)

(C) *Neopagetopsis ionah* (gi number 84313789)

図3. 2 ヘモグロビンのアミノ配列(続く)

Major Adult  $\alpha$  globin genes

Cottoperca gobio $\alpha_1$	-SLTEKDCAA VRALWGKISK SADA-IGADA LSRMLFVYPQ TKTYFTHWPD LSPGSHVHKK
Pseudaphritis urvillii $\alpha_1$	-... D... T... K... ..-V... VG... IV... .. S... .. A... N... P... T
Pleuragramma antarcticum $\alpha_1$	-... SV... .. K... .. L... G... .. -... N... .. IV... .. S... .. VA... .. P... I... A
Notothenia coriiceps $\alpha_1$	-... SD... .. K... .. S... G... .. -... N... .. IV... .. S... .. S... VT... HPDI... A
Notothenia angustata $\alpha_1$	-... SD... .. K... .. S... G... .. -... N... .. IV... .. S... .. S... VT... A... I... A
Aethotaxis mitopteryx $\alpha_1$	-... SD... .. D... S... G... .. T-... N... .. VV... .. I... N... .. V... P... IRA
Gobionotothen gibberifrons $\alpha_1$	-... SV... .. S... .. S... -... N... .. IV... .. S... .. VT... A... I... A
Trematomus newnesi $\alpha_1$	-... SD... .. S... G... .. S... -... N... .. IV... .. I... S... .. VT... PNI... A
Trematomus bernacchii $\alpha_1$	-... SD... .. S... G... .. -... N... .. IV... .. S... .. VT... P... I... A
Pagothenia borchgrevinki $\alpha_1$	-... S... N... .. K... .. S... G... .. S... -... N... .. IV... .. S... .. E... VT... P... I... A
Neopagetopsis ionah $\alpha_1$	-... SD... .. ST... A... .. -... D... .. IV... .. I... S... .. KE... VT... CA... I... A
Gymnodraco acuticeps $\alpha_1$	-... SD... .. ST... .. S... -... N... .. IV... .. I... S... .. E... VI... I... I... E
Parachaenichthys charcoti $\alpha_1$	-... SD... .. K... IT... .. -... N... .. IV... .. S... .. VT... T... IRD
Gerlachea australis $\alpha_1$	... IT... .. S... Q-... N... .. V... IV... .. I... S... .. VT... TNIRD
Cygnodraco mawsoni $\alpha_1$	-... SD... .. K... TT... .. S... -... N... .. IV... .. S... .. VT... T... IRD
Racovitzia glacialis $\alpha_1$	-... SD... .. K... S... G... .. V-... N... .. IV... .. S... .. VT... P... I... A
Prionodraco evansi $\alpha_1$	... K... S... .. V-... N... .. IV... .. S... .. E... VI... D... P... I... A
Bathyrdraco marri $\alpha_1$	-... SD... S... K... S... .. S... A... N... .. IV... .. S... .. VT... A... I... A
Bathyrdraco macrolepis $\alpha_1$	... S... .. S... -... N... .. IV... .. S... .. VT... A... I... A
Akarotaxis nudiceps $\alpha_1$	... S... .. S... -... N... .. IV... .. S... .. VT... P... I... A
Artedidraco orianae $\alpha_1$	-... SD... .. K... S... A... .. V-... N... .. V... IV... .. A... .. T... TNI... A
Pogonophryne marmorata $\alpha_1$	... N... .. V-... D... V... IV... .. A... .. T... T... I... A
Pogonophryne scotti $\alpha_1$	-... SD... S... K... S... N... .. V-... N... .. V... IV... .. A... .. T... T... I... A
Dolloidraco longedorsalis $\alpha_1$	... V-... N... .. V... IV... .. S... .. VT... P... I... D
Cottoperca gobio $\alpha_1$	HGKNVMGGIA LAVSKIDDLT NGLMELSEQH AYQLRVDPAN FKILSHCILV VVSIMYPKDF
Pseudaphritis urvillii $\alpha_1$	... T... T... .. L... .. E... .. KM... .. M... .. IAT... F... E
Pleuragramma antarcticum $\alpha_1$	... K... .. A... SD... .. K... .. N... .. IG... F... ..
Notothenia coriiceps $\alpha_1$	... K... L... I... .. N... K... A... SN... Q... .. K... .. N... .. I... T... F... N
Notothenia angustata $\alpha_1$	... K... .. K... A... SD... .. K... .. N... .. I... T... F... ..
Aethotaxis mitopteryx $\alpha_1$	... K... .. IK... A... SD... .. K... .. S... .. N... .. I... F... E
Gobionotothen gibberifrons $\alpha_1$	... K... .. N... A... L... .. K... .. N... .. I... T... F... ..
Trematomus newnesi $\alpha_1$	... K... .. K... T... .. K... .. S... .. N... .. I... T... F... E
Trematomus bernacchii $\alpha_1$	... K... .. K... T... .. K... .. N... .. I... T... F... E
Pagothenia borchgrevinki $\alpha_1$	... K... .. T... .. K... T... S... .. K... .. T... N... .. I... T... F... E
Neopagetopsis ionah $\alpha_1$	... K... .. E... R... T... .. K... T... SD... .. TFK... .. N... .. IAT... F... TE
Gymnodraco acuticeps $\alpha_1$	... K... .. E... .. K... T... F... .. FK... .. G... .. N... .. IAT... F... E
Parachaenichthys charcoti $\alpha_1$	... K... .. S... .. K... S... F... .. FK... .. N... .. IAT... F... E
Gerlachea australis $\alpha_1$	... K... S... N... .. K... T... S... .. K... .. FK... .. N... .. IAT... F... E
Cygnodraco mawsoni $\alpha_1$	... K... .. S... .. K... T... F... .. FK... .. N... .. IAT... F... E
Racovitzia glacialis $\alpha_1$	... IK... .. K... T... SD... .. FK... .. N... .. IG... F... ..
Prionodraco evansi $\alpha_1$	... IK... .. K... T... FD... .. FK... .. S... .. N... .. IG... F... ..
Bathyrdraco marri $\alpha_1$	... IK... .. T... SD... .. FK... .. N... .. I... F... ..
Bathyrdraco macrolepis $\alpha_1$	... IK... .. I... SD... .. FK... .. N... .. I... F... ..
Akarotaxis nudiceps $\alpha_1$	... IK... .. N... T... SD... .. FK... .. N... .. I... F... ..
Artedidraco orianae $\alpha_1$	... K... .. K... A... SD... .. FK... .. N... .. M... .. I... S... F... ..
Pogonophryne marmorata $\alpha_1$	... K... .. K... A... SD... .. FK... .. N... .. M... .. I... S... F... ..
Pogonophryne scotti $\alpha_1$	... K... .. K... A... SN... .. FK... .. N... .. M... .. I... S... F... ..
Dolloidraco longedorsalis $\alpha_1$	... K... .. K... A... SD... .. FK... .. N... .. M... .. I... S... F... ..

図3. 2 ヘモグロビンのアミノ配列(続く)

<i>Cottoperca gobio</i> $\alpha_1$	TPEAHVSLDK FLSGVSLALA ERYR
<i>Pseudaphritis urvillii</i> $\alpha_1$	.....C... ..CA.....S.....
<i>Pleuragramma antarcticum</i> $\alpha_1$	.....A.A.....
<i>Notothenia coriiceps</i> $\alpha_1$	..Q.....N.....A....Q...
<i>Notothenia angustata</i> $\alpha_1$	.....A.....
<i>Aethotaxis mitopteryx</i> $\alpha_1$	.....A.....
<i>Gobionotothen gibberifrons</i> $\alpha_1$	.....A.....
<i>Trematomus newnesi</i> $\alpha_1$	.....A.....
<i>Trematomus bernacchii</i> $\alpha_1$	.....A.....
<i>Pagothenia borchgrevinki</i> $\alpha_1$	.....A....D...
<i>Neopagetopsis ionah</i> $\alpha_1$	.....A.A.S...D...
<i>Gymnodraco acuticeps</i> $\alpha_1$	.....A.....
<i>Parachaenichthys charcoti</i> $\alpha_1$	.....A.....
<i>Gerlachea australis</i> $\alpha_1$	.....A..
<i>Cygnodraco mawsoni</i> $\alpha_1$	.....A.....
<i>Racovitzia glacialis</i> $\alpha_1$	.....A.A.....
<i>Prionodraco evansi</i> $\alpha_1$	.....
<i>Bathyraco marri</i> $\alpha_1$	.....A.A....K..
<i>Bathyraco macrolepis</i> $\alpha_1$	.....A.A..
<i>Akarotaxis nudiceps</i> $\alpha_1$	.....A.
<i>Artedidraco orianae</i> $\alpha_1$	.....I.....A.A....K..
<i>Pogonophryne marmorata</i> $\alpha_1$	.....
<i>Pogonophryne scotti</i> $\alpha_1$	.....A.A....K..
<i>Dolloidraco longedorsalis</i> $\alpha_1$	.....

Major adult  $\alpha$  globin genes used (gi number): *Cottoperca gobio*  $\alpha_1$  (115502220), *Pseudaphritis urvillii*  $\alpha_1$  (55583774), *Pleuragramma antarcticum*  $\alpha_1$  (Tamburrini et al. 1996), *Notothenia coriiceps*  $\alpha_1$  (122276), *Notothenia angustata*  $\alpha_1$  (232226), *Aethotaxis mitopteryx*  $\alpha_1$  (D'Avino et al. 1992), *Gobionotothen gibberifrons*  $\alpha_1$  (41017077), *Trematomus newnesi*  $\alpha_1$  (1170173), *Trematomus bernacchii*  $\alpha_1$  (122452), *Pagothenia borchgrevinki*  $\alpha_1$  (17366395), *Neopagetopsis ionah*  $\alpha_1$  (84313789), *Gymnodraco acuticeps*  $\alpha_1$  (232228), *Parachaenichthys charcoti*  $\alpha_1$  (84105263), *Gerlachea australis*  $\alpha_1$  (84105250), *Cygnodraco mawsoni*  $\alpha_1$  (122389), *Racovitzia glacialis*  $\alpha_1$  (Stam et al. 1997), *Prionodraco evansi*  $\alpha_1$  (84105256), *Bathyraco marri*  $\alpha_1$  (256806), *Bathyraco macrolepis*  $\alpha_1$  (84105246), *Akarotaxis nudiceps*  $\alpha_1$  (84105242), *Artedidraco orianae*  $\alpha_1$  (118572473), *Pogonophryne marmorata*  $\alpha_1$  (84105248), *Pogonophryne scotti*  $\alpha_1$  (118572474), *Dolloidraco longedorsalis*  $\alpha_1$  (84105244)

図3. 2 ヘモグロビンのアミノ配列(続く)

Minor adult  $\alpha$  and embryonic  $\alpha$  globin genes

Notothenia coriiceps NCPI      TTLTAKDKQT VKAFWAKVSG KSED-IGAAA VARMLVVYPQ TKTYFSHPD QSPNSAARK  
 Notothenia coriiceps  $\alpha_2$       -S. ST. . . E. . . . . S. . . . . - . . ND. LS. . . . . KE LT. G. . PV. .  
 Gobionotothen gibberifrons  $\alpha_2$       -S. ST. . . E. . . . . S. . . . . A. - . . ND. LS. . . . . KE LT. G. . PV. .  
 Trematomus newnesi  $\alpha_2$       -S. ST. . . E. . . . . S. . . . . T. - . . ND. LS. . . . . I. . . . . KE LT. G. . PV. .  
 Pleuragramma antarcticum  $\alpha_2$       -S. ST. . . EA . . . . . S. . . . . H. . E- . . ND. LS. . . . . KE LT. G. . PV. .

Notothenia coriiceps NCPI      HGITVMVGVG DAVTKIDDLK EGLKELSQLH AFTLRVDPAN FKILSHCILV VMVMFPTDF  
 Notothenia coriiceps  $\alpha_2$       . . M. . . K. . . . . S. . E. . T A. . M. . E. . . . . - . . N. . . . F. I. . . KE.  
 Gobionotothen gibberifrons  $\alpha_2$       . . M. . . K. . . . . S. . E. . T A. . M. . E. . . . . N. . . . F. I. . . N. .  
 Trematomus newnesi  $\alpha_2$       . . M. . . K. . . . . S. . E. . T A. . T. . E. . . . . G. . . . . N. . . . F. I. . . N. .  
 Pleuragramma antarcticum  $\alpha_2$       . . M. . . N. . . . . S. . . . . T A. . A. . E. . . . . N. . . . F. I. . . N. .

Notothenia coriiceps NCPI      TPEVHVSLDK FLAAVSLALA EKYR  
 Notothenia coriiceps  $\alpha_2$       . A. . . . M. . . . . LAR. . S . . . .  
 Gobionotothen gibberifrons  $\alpha_2$       . . D. . . M. . . . . LGR. . S . . . .  
 Trematomus newnesi  $\alpha_2$       . . Q. . . M. . . . . L. R. . S . . . .  
 Pleuragramma antarcticum  $\alpha_2$       . . . . . V. . . . . LAR. . . . .

Embryonic  $\alpha$  globin gene (gi number): Notothenia coriiceps NCPI (13122449)  
 Minor adult  $\alpha$  globin gene (gi number): Notothenia coriiceps  $\alpha_2$ (55584059) , Gobionotothen gibberifrons  $\alpha_2$ (41017079),  
 Trematomus newnesi  $\alpha_2$  (1170174), Pleuragramma antarcticum  $\alpha_2$  (Tamburrini et al. 1996)



図3. 2 ヘモグロビンのアミノ配列(続く)

Pseudaphritis urvillii $\beta_1$	GFTPETQAAF QKFLAVVSA LGKQYH
Aethotaxis mitopteryx $\beta_1$	A . A . . G . . . . . Y . . . . . V
Pleuragramma antarcticum $\beta_1$	A . A . I . G . L . . . . .
Pagothenia borchgrevinki $\beta_1$	A . A . I . G . . . . .
Trematomus bernacchii $\beta_1$	A . A . . G . . . . .
Trematomus newnesi $\beta_1$ (3372855)	A . A . . G . . . . . A . . . . .
Trematomus newnesi $\beta_1$ (62484128)	A . A . . G . . . . . A . . . . .
Trematomus hansonii $\beta_1$	A . A . . G . . . . .
Gobionotothen gibberifrons $\beta_1$	A . A . . G . L . . . . .
Notothenia angustata $\beta_1$	A . . . . . V . . . . .
Notothenia coriiceps $\beta_1$ (7212778)	A . . . . I . G . . . . .
Notothenia coriiceps $\beta_1$ (122648)	A . . . . I . C . . . . .
Bathyraco marri $\beta_1$	A . A . I . . . . . GA . . . . .
Gymnodraco acuticeps $\beta_1$	A . A . . T . . . . GA . M . . . . .
Racovitzia glacialis $\beta_1$	A . A . . . . . . . . . .
Cygnodraco mawsoni $\beta_1$ (3372846)	A . A . . . . . . . . . .
Cygnodraco mawsoni $\beta_1$ (14195588)	A . A . . . . . M . . . . .
Parachaenichthys charcoti $\beta_1$ (84105260)	A . A . S . . . . . - - - - -
Parachaenichthys charcoti $\beta_1$ (84105263)	A . A . S . . . . . - - - - -
Artedidraco orianae $\beta_1$	A . . . . . GA . MF . . . . .
Pogonophryne scotti $\beta_1$	A . . . . . H . . . . .
Neopagetopsis ionah $\beta_{\text{NOTO}}$	A . A . . . . . . . . . . P

Major adult  $\beta$  globin genes used (gi number): Pseudaphritis urvillii  $\beta_1$  (55583815), Aethotaxis mitopteryx  $\beta_1$  (D'Avino et al 1992), Pleuragramma antarcticum  $\beta_1$  (Tamburrini et al. 1996), Pagothenia borchgrevinki  $\beta_1$  (3372849), Trematomus bernacchii  $\beta_1$  (3372857), Trematomus newnesi  $\beta_1$  (3372855), Trematomus newnesi  $\beta_1$  (62484128), Trematomus hansonii  $\beta_1$  (3372860), Gobionotothen gibberifrons  $\beta_1$  (41017078), Notothenia angustata  $\beta_1$  (7110163), Notothenia coriiceps  $\beta_1$  (7212778), Notothenia coriiceps  $\beta_1$  (122648), Bathyraco marri  $\beta_1$  (256807), Gymnodraco acuticeps  $\beta_1$  (3372852), Racovitzia glacialis  $\beta_1$  (Stam et al. 1997), Cygnodraco mawsoni  $\beta_1$  (3372846), Cygnodraco mawsoni  $\beta_1$  (14195588), Parachaenichthys charcoti  $\beta_1$  (84105260), Parachaenichthys charcoti  $\beta_1$  (84105263), Artedidraco orianae  $\beta_1$  (Stam et al. 1997), Pogonophryne scotti  $\beta_1$  (Stam et al. 1997), Neopagetopsis ionah  $\beta_{\text{NOTO}}$  (84313789)



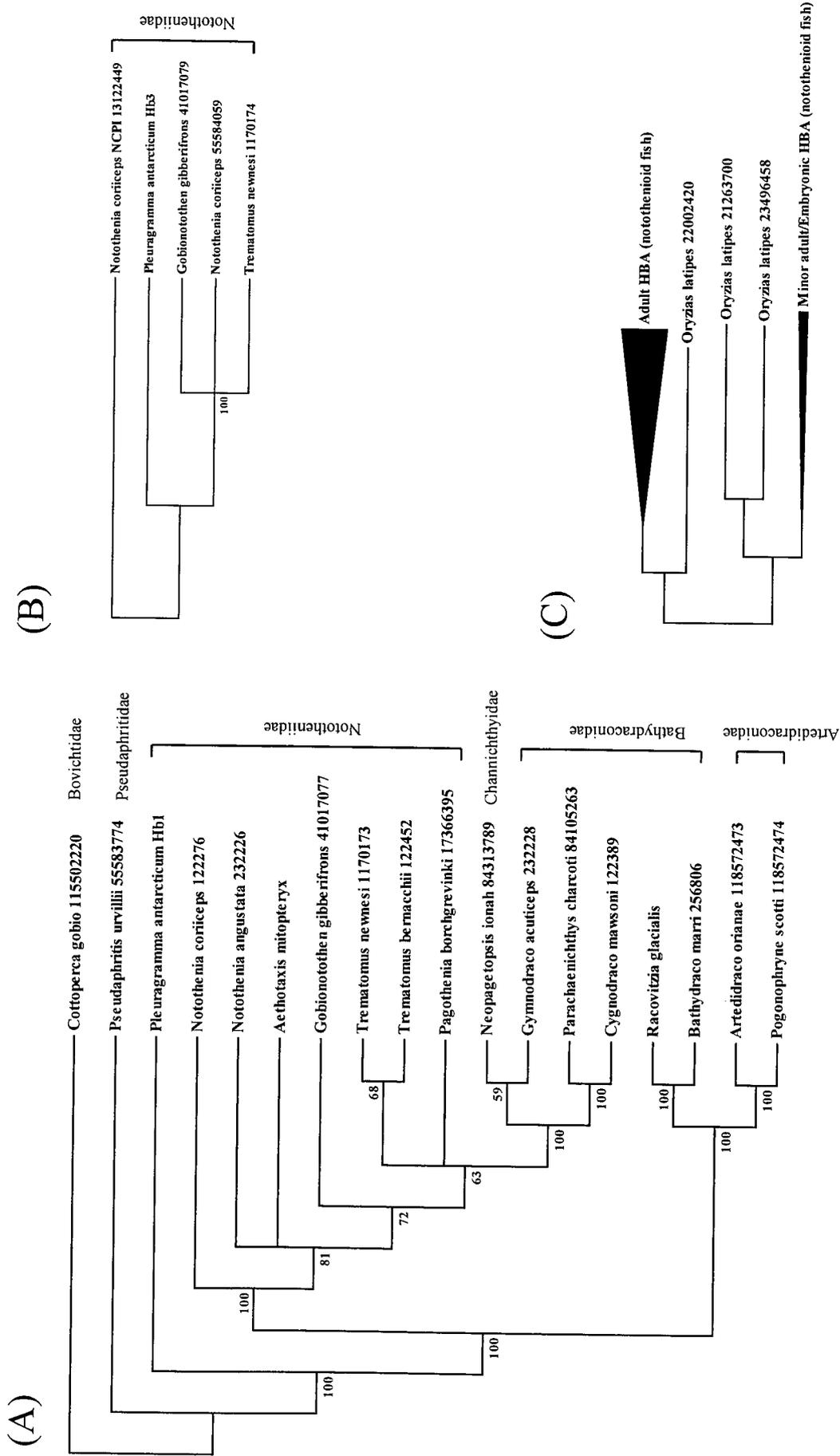


Fig. 3. 3 Bootstrap consensus MP tree for (A) adult and (B) minor/embryonic hemoglobin alpha genes based on amino acid sequences. The distances used are the number of amino acid differences. Search Options : CNI (level=3) with initial tree by random addition (100 reps) (A) 33 trees detected. (B) 3 trees detected (C) Neighbor-joining tree for notothenioid hemoglobin alpha gene with *Oryzias latipes* HbA sequences. The numbers of amino acid differences were used for constructing the trees and notothenioid fish sequences are compressed for each group.

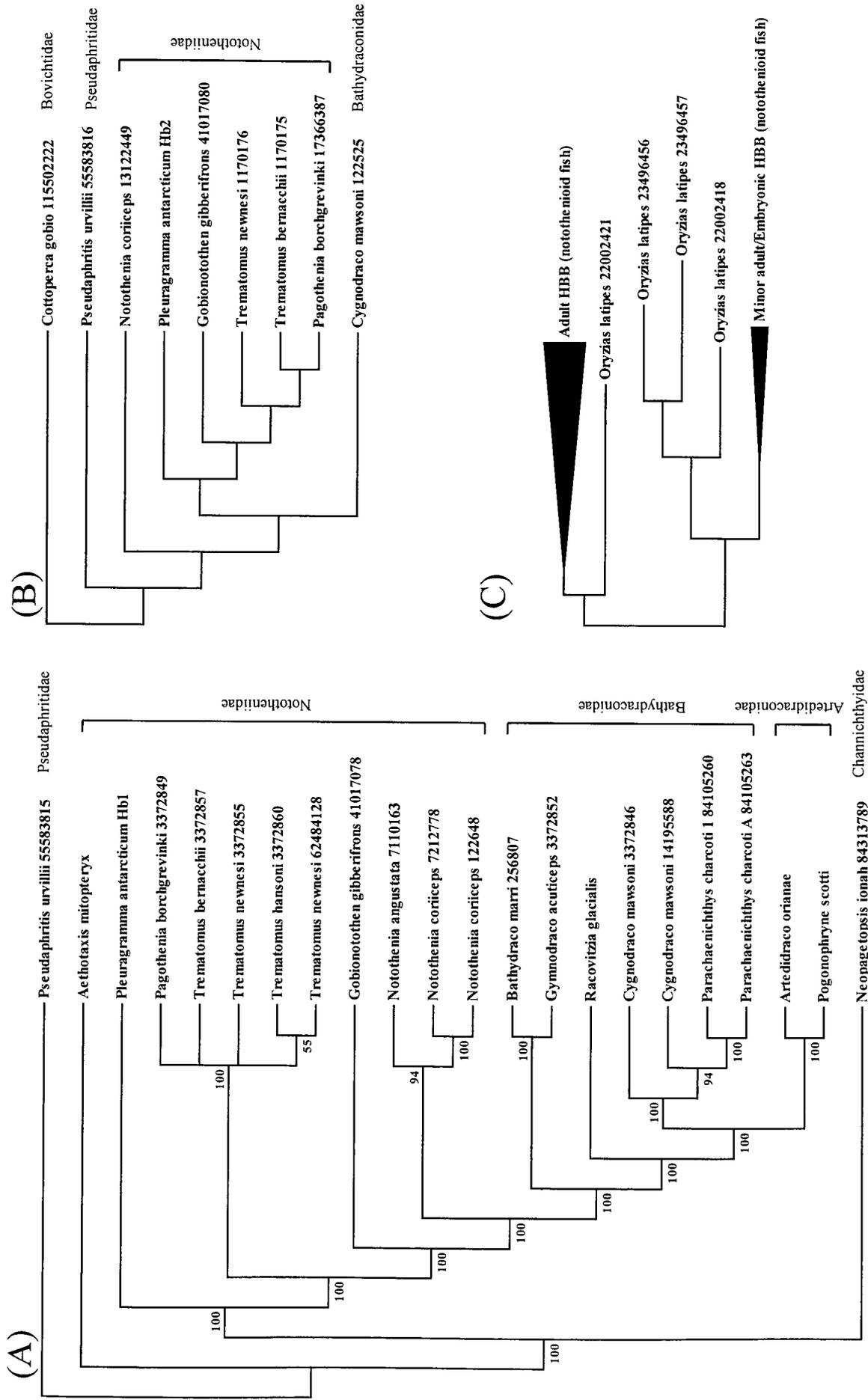


Fig. 3. 4 Bootstrap consensus MP tree for (A) adult and (B) embryonic hemoglobin beta genes based on amino acid sequences. The distances used are the number of amino acid differences. Search Options : CNI (level=3) with initial tree byRandom addition (100 reps) (A) 34 trees detected. (B) only one tree detected (C) Neighbor-joining tree for notothenioid hemoglobin beta gene with *Oryzias latipes* HbB sequences. The numbers of amino acid differences were used for constructing the trees and notothenioid fish sequences are compressed for each group.

☒ 3. 5 Major adult hemoglobin beta genes for *Trematomus* Species

<i>Trematomus bernacchii</i>	GTT GAG TGG ACC GAT AAG GAG CGC TCC ATT ATC AGC GAC ATC TTC TCC CAC ATG GAC TAT
<i>Trematomus hansonii</i>	.....
<i>Trematomus newnesi</i> (62484128)	..A .....
<i>Trematomus newnesi</i> (3372855)	.....T .....
<i>Trematomus bernacchii</i>	GAT GAC ATC GGA CCC AAG GCT CTC AGC AGG TGT CTG ATC GTT TAC CCC TGG ACT CAG AGG
<i>Trematomus hansonii</i>	.....G.....
<i>Trematomus newnesi</i> (62484128)	.....G.....
<i>Trematomus newnesi</i> (3372855)	.....
<i>Trematomus bernacchii</i>	CAC TTC AGC GGC TTT GGA AAC CTC TAC AAT GCT GAG GCC ATC ATC GGC AAC GCC AAC GTG
<i>Trematomus hansonii</i>	T.....G.....G A.....
<i>Trematomus newnesi</i> (62484128)	T.....G.....G A.....
<i>Trematomus newnesi</i> (3372855)	.....T.....
<i>Trematomus bernacchii</i>	GCA GCG CAC GGC ATC AAG GTG CTG CAC GGC CTG GAC CGC GGC GTG AAG AAC ATG GAC AAC
<i>Trematomus hansonii</i>	.....
<i>Trematomus newnesi</i> (62484128)	.....A.....
<i>Trematomus newnesi</i> (3372855)	.....A.....
<i>Trematomus bernacchii</i>	ATC GCG GCC ACC TAC GCC GAC CTG AGC ACC CTG CAC TCC GAG AAG CTG CAC GTC GAC CCC
<i>Trematomus hansonii</i>	.....
<i>Trematomus newnesi</i> (62484128)	.....A. G. . . . A. . . . .
<i>Trematomus newnesi</i> (3372855)	.....A. G. . . . A. . . . .
<i>Trematomus bernacchii</i>	GAC AAC TTC AAG TTG CTG TCT GAC TGC ATC ACC ATC GTC TTG GCC GCC AAA ATG GGA CAC
<i>Trematomus hansonii</i>	.....
<i>Trematomus newnesi</i> (62484128)	.....
<i>Trematomus newnesi</i> (3372855)	.....
<i>Trematomus bernacchii</i>	GCT TTC ACT GCA GAG ACA CAG GGC GCC TTC CAG AAG TTC CTG GCC GTC GTG GTG TCC GCC
<i>Trematomus hansonii</i>	.....
<i>Trematomus newnesi</i> (62484128)	.....CA.....
<i>Trematomus newnesi</i> (3372855)	.....CA.....
<i>Trematomus bernacchii</i>	CTG GGA AAG CAG TAC CAC
<i>Trematomus hansonii</i>	.....
<i>Trematomus newnesi</i> (62484128)	.....
<i>Trematomus newnesi</i> (3372855)	.....

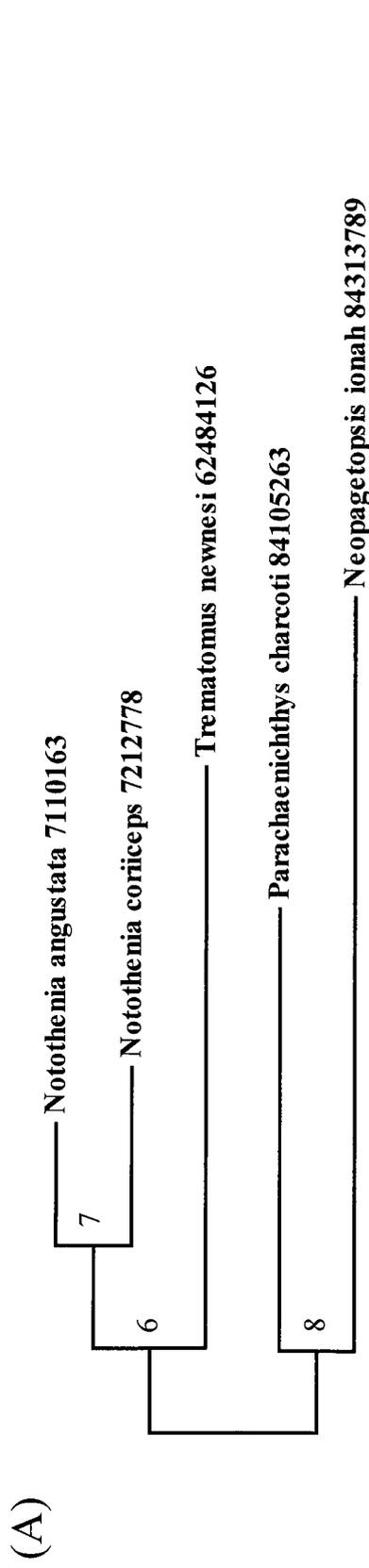
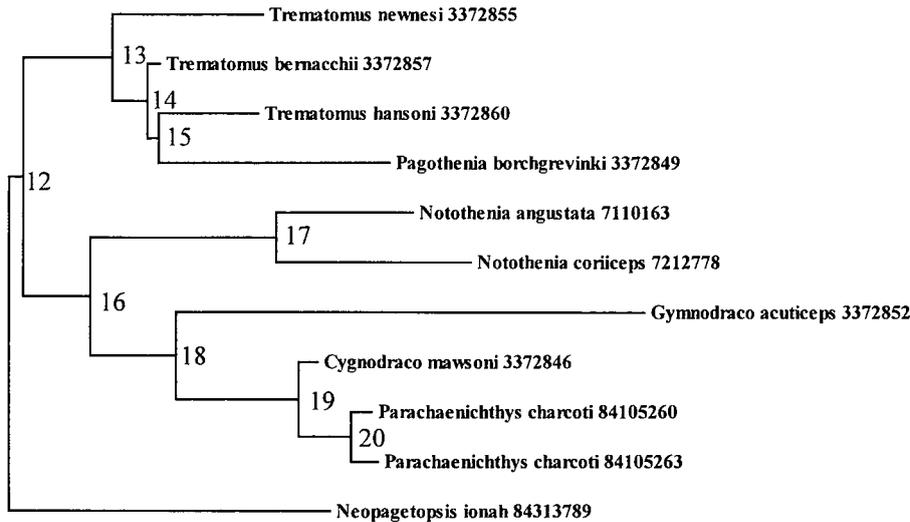


Fig. 3. 6 (A) NJ tree for major adult hemoglobin alpha genes based on nucleotide sequences.

The distances used are the number of nucleotide differences.

(B) Codon changes observed between nodes.

(A)

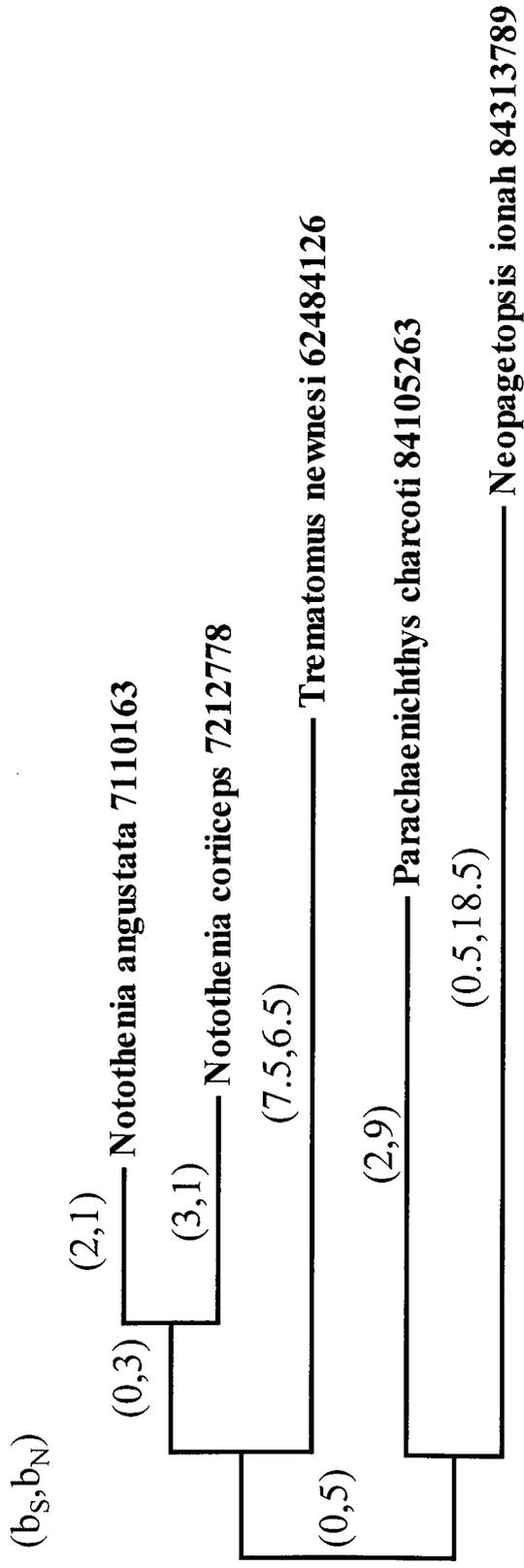


(B)

Branch	$b_N, b_S$	Codon site: Substitutions
Node 12—Node 13	5, 0	6:ACG(T)→AAG(K),9:GCC(A)→TCC(S),12:ACC(T)→AGC(S),87:GAG(E)→GAC(D),128:GCC(A)→GGC(G)
Node 12—Node 16	0, 2	6:ACG(T)→ACC(T),113:GTC(V)→GTT(V)
Node 12→ <i>Neopagetopsis ionah</i>	15, 2	5:GAT(D)→GAG(E),6:ACG(T)→CAG(Q),13GAC(D)→AGC(S),15TTC(F)→TAC(Y),18:ATG(M)→GTG(V),43:AGC(S)→GGC(G),44:GGC(G)→AGC(S),54:ATC(I)→ATT(I),55:ATC(I)→ATG(M),82:GCG(A)→TCG(S),111:ACC(T)→ATC(I),114:TTG(L)→CTG(L),118:ATG(M)→CTG(L),120:CAC(H)→AAC(N),146:CAC(H)→CCC(P),31: deletion
Node 13→Node 14	1, 0	84:GCC(A)→ACC(T)
Node 13→ <i>Trematomus newnesi</i>	5, 2	9:TCC(S)→ACC(T),59:AAC(N)→AAT(N),75:GTG(V)→ATG(M),83:GCC(A)→GAC(D),86:GCC(A)→ACC(T),136:GTC(V)→GCA(A)
Node 14→Node 15	0, 0	
Node 14→ <i>Trematomus bernacchii</i>	0, 0	
Node 15→ <i>Trematomus hansonii</i>	5, 0	33:ATC(I)→GTC(V),41:CAC(H)→TAC(Y),53:GCC(A)→GGC(G),55:ATC(I)→ATG(M),56:GGC(G)→AGC(S)
Node 15→ <i>Pagothernia borchgrevinkii</i>	9, 2	18:ATG(M)→CTG(L),21:GAT(D)→GAG(E),53:GCC(A)→AGC(S),74:GGC(G)→GGT(G),75:GTG(V)→TTG(L),82:GCG(A)→GAG(E),100:CCC(P)→CCT(P),107:TCT(S)→GCT(A),120:CAC(H)→CAA(Q),126:ACA(T)→ATA(I)
Node 16→Node 17	6, 3	2:GAG(E)→AAG(K),4:ACC(T)→AGC(S),6:ACC(T)→TCC(S),8:CGC(R)→CGT(R),35:TAC(Y)→TAT(Y),55:ATC(I)→CTC(L),114:TTG(L)→GTG(V),119:GGA(G)→GGT(G),124:GCA(A)→CCA(P)
Node 17→ <i>Notothenia angustata</i>	4.5, 1.5	82:GCG(A)→GCT(A),84:GCC(A)→ACC(T),90:ACC(T)→ATC(I),120:CAC(H)→CAG(Q),130:TTC(F)→GTG(V)
Node 17→ <i>Notothenia coriiceps</i>	7.5, 2.5	2:AAG(K)→AAT(N),62:GCG(A)→GCC(A),80:AAC(N)→AAA(K),82:GCG(A)→GTG(V),83:GCC(A)→GAC(D),90:ACC(T)→ATG(M),126:ACA(T)→ATT(I),128:GCC(A)→GGC(G)
Node 16→Node 18	5, 0	5:GAT(D)→AAA(K),75:GTG(V)→CTG(L),82:GCG(A)→GTG(V),118:ATG(M)→CTG(L)
Node 18→ <i>Gymnodraco acuticeps</i>	21.5, 1.5	2:GAG(E)→AAC(N),8:CGC(R)→AAA(K),10:ATT(I)→ACT(T),18:ATG(M)→TTG(L),41:CAC(H)→TAC(Y),43:AGC(S)→AGT(S),52:GAG(E)→GCG(A),59:AAC(N)→AAG(K),62:GCG(A)→GAG(E),73:CGC(R)→CTC(L),77AAC(N)→AAA(K),82:GTG(V)→GAG(E),87:GAG(E)→GAT(D),90:ACC(T)→AGC(S),120:CAC(H)→AGC(S),129:GCC(A)→ACC(T),135:GCC(A)→GGC(G),136:GTC(V)→GCC(A),138:GTG(V)→ATG(M)
Node 18→Node 19	8, 0	2:GAG(E)→AAG(K),4:ACC(T)→AGC(S),8:CGC(R)→CTC(L),9:GCC(A)→ACC(T),12:ACC(T)→AAC(N),83:GCC(A)→GAC(D),120:CAC(H)→AAG(K)
Node 19→ <i>Cygnodraco mawsoni</i>	1, 0	18:ATG(M)→TTG(L)
Node 19→Node 20	1, 1	12:AAC(N)→AAT(N),126:ACA(T)→TCA(S)
Node 20→ <i>Parachaenichthys charcoti</i>	1, 0	44:GGC(G)→AGC(S)
Node 20→ <i>Parachaenichthys charcoti</i>	1, 0	12:AAT(N)→GAT(D)

3. 7 (A) NJ tree for major adult hemoglobin beta genes based on nucleotide sequences. The distances used are the number of nucleotide differences.

(B) Codon changes observed between nodes.



The average number of synonymous sites ( $N_S$ ) and nonsynonymous sites ( $N_N$ )

Method	$N_S$	$N_N$
NG method	103.07 (102.5-103.67)	322.93(322.33-323.50)
*mNG method	125.09(124.73-125.58)	311.92(300.42-301.27)

\*With transition/transversion ratio = 1

Fisher's exact test for branch node 8 – *Neopagetopsis ionah*

$$P_{(0,19)} + P_{(1,18)} = 0.0048 + 0.0355 = 0.0403 < 0.05$$

With assuming  $N_S = 102$  and  $N_N = 324$

Fig. 8 The number of synonymous and nonsynonymous changes inferred for each phylogenetic branch.

## 第4章 免疫グロブリン遺伝子

### はじめに

免疫グロブリンは、脊椎動物の適応免疫で重要なタンパク質である。免疫グロブリンはウイルスや細菌などの病原菌と結合しその存在を免疫システムに伝える役割を担っており、液性免疫において自己・非自己の認識するために欠如することのできないタンパク質である。適応免疫はヤツメウナギやメクラウナギなどの無顎類を除いた脊椎動物全般にみられる。しかし免疫グロブリンをとりまく分子環境が脊椎動物で同じであるわけではない。重鎖と軽鎖のヘテロダイマーで構成される免疫グロブリンだが、重鎖および軽鎖の種類およびその数は脊椎動物によって異なる。重鎖の種類によって分けられる免疫グロブリンのクラスは哺乳類などでは IgM、IgD、IgG、IgA、IgE の 5 種類、硬骨魚類では IgM、IgD、IgZ (あるいは IgT) の 3 種類が知られている。IgD の構造も哺乳類と硬骨魚類では大きく異なり、哺乳類の重鎖は免疫グロブリン・ドメインが 1 つの可変領域 (V) ドメインと 2 つあるいは 3 つの定常領域 (C) ドメインで構成されるのに対して、硬骨魚類では 1 つの V ドメインと 8 つの C ドメインで構成される。V,D,J,C の異なる領域遺伝子で構成される点で遺伝子構造はすべての脊椎動物で同じであるが、軟骨魚類は V-D-J-C の全体が重複するクラスター構造を、その他の脊椎動物では V,D,J,C の各々が重複して Vn-Dn-Jn-Cn の構造をとるトランスロコン型をとる (Stavnezer and Amemiya 2004)。

これまでの研究からノトセニア亜目の免疫グロブリン重鎖もトランスロコン型の構造をとることが示されている (Ota et al. 2003)。またノトセニア亜目魚類は他の硬骨魚類と比べ特異的な点もあり、その一つは IgM の重鎖の C<sub>H</sub>2 と C<sub>H</sub>3 のドメインの間にプロリンとシステインを含んだスペーサーの領域いわゆるヒンジ様構造が存在することである (Coscia et al. 2000、Ota et al. 2003)。ヒンジ構造は哺乳類で IgA や IgG に観察されシステイン間のジスルフィド結合で免疫グロブリンのサブユニットを結合しながら免疫グロブリン全体のフレキシビリティをあげている。Coscia ら(2000)はヒンジに似た構造が C<sub>H</sub>2 - C<sub>H</sub>3 間にあることで、血液あるいは体液の粘性が低温下によって増すことに対抗しているのではないかと考えている。Ota ら(2003)は、他のノトセニア亜目の魚類でも同様のヒンジ様の構造が存在し、ヒンジ様領域を囲む免疫グロブリン・ドメインでアミノ酸の変化が促進され正の淘汰がかかってきたことを示した。他のノトセニア亜目魚類の免疫グロブリンでの特徴的な点は膜型の免疫グロブリンの構造である。*Trematomus bernacchii* ではノトセニア亜目以外の硬骨魚類のように膜型 IgM の重鎖は一つの V ドメイン、三つの C ドメインで構成されるが、*Notothenia*

*coriiceps* では一つの V ドメイン、二つの C ドメインで構成される。すなわち C ドメインの数が一つ少ない。その一方膜貫通領域と最後の免疫グロブリン・ドメインの間に、オリゴヌクレオチドの重複によって生じた 2 種類のアミノ酸の反復配列が存在し、比較的長いスペーサーの領域を構成している。本研究では、ライギョダマシ、マゼランアイナメ、カサゴの免疫グロブリンの重鎖の塩基配列の解析を行い、ノトセニア亜目の免疫グロブリンの進化についてさらなる詳細を調べた。

#### カサゴの免疫グロブリン重鎖

図 4. 1 にカサゴ *Sebasticus marmoratus* の免疫グロブリン重鎖の C 領域の塩基配列の示す。カサゴの重鎖で特徴的な点は、 $C_H1 - C_H2$  間にプロリンとシステインを含んだスペーサーの領域が存在し、 $C_H2 - C_H3$  間にはヒンジ様の構造はないことである。 $C_H1 - C_H2$  間のスペーサーの領域はノトセニア亜目魚類の  $C_H2 - C_H3$  間のヒンジ様構造と比べ、プロリンの数が多く明確なヒンジ構造をとる。このようなヒンジ構造がカサゴの IgM に存在することはヒンジ構造そのものが必ずしも低温への耐性ではないことを示している。しかしカサゴには  $C_H2 - C_H3$  間にヒンジ様構造が存在しない。その意味で、 $C_H2 - C_H3$  間のヒンジ様構造はノトセニア亜目の魚類に特異的で特殊な機能を果たしている可能性も残る。よりノトセニア亜目に近縁なスズキ類やウシオニカジカ科、シュウドアフリティス科、フォークランドアイナメ科のようなノトセニア亜目魚類での解析が今後重要となる。

#### ライギョダマシの免疫グロブリン重鎖

図 4. 2 にライギョダマシ *Dissostichus emawsoni* の免疫グロブリン重鎖の塩基配列を示す。ここで得られたライギョダマシの免疫グロブリンは、RT-PCR 法によって得られたものである。また C 遺伝子領域の他に 5' RACE で V 領域、D 領域、J 領域も調べている。図 4. 2 (A) に示すように、ライギョダマシの IgM 型の重鎖の  $C_\mu$  領域は他のノトセニア亜目魚類の免疫グロブリンの  $C_\mu$  と構造が似ておりヒンジ様の構造もある。免疫グロブリンの重鎖の V ( $V_H$ ) 領域については塩基配列の異なるものがいくつか得られ、アミノ酸配列は抗原の認識部分であると考えられる相補決定領域 CDR (complementarity determining region) に多様性がみられた。しかし  $\beta$  鎖で形成される基礎構造部のフレームワーク領域 Framework region はお互いに似ている。そのため 70% の塩基の相同性をもって  $V_H$  遺伝子族を定義するとすべての  $V_H$  遺伝子は一つの  $V_H$  遺伝子族に属することとなった。ノトセニア亜目魚類の  $V_H$  遺伝子族の数は現在まで二つしか知られておらず、ゼブラフィッシュなどの 13 の  $V_H$  遺伝子族と比べて非常に限られてい

る。また6つの発現遺伝子を調べた中で3種類の  $J_H$  領域遺伝子と6種類の  $D_H$  領域遺伝子が観察され、免疫グロブリンの多様性には V,D,J 遺伝子の組み合わせ、特に  $D_H$  領域遺伝子の遺伝子の多様性が貢献していることが示唆された。

#### ライギョダマシの免疫グロブリン重鎖 $V_H$ 遺伝子領域の系統解析

図4. 3にライギョダマシ *Dissostichus emawsoni* およびその他のノトセニア亜目魚類の  $V_H$  遺伝子領域とゼブラフィッシュの  $V_H$  遺伝子領域を含めた系統解析の結果を示す。ここでゼブラフィッシュはゲノム DNA に由来するもので、ノトセニア亜目魚類の  $V_H$  遺伝子領域は発現した遺伝子の cDNA 由来である。ゼブラフィッシュについてはゲノム解析が進み、 $V_H$  遺伝子領域はほぼその全容が解明されており、一つの種での  $V_H$  遺伝子のゲノムでの多様性を代表している。この系統樹からも明らかなようにノトセニア亜目魚類で発現している遺伝子は似かよっており  $V_H$  遺伝子族の数では多様性はあまりない。(ただこれは抗原を認識するための多様性が低いことを示しているわけではない。) また抗原認識部である CDR のアミノ酸の組成ではゼブラフィッシュに比べて Cys、Asp、Gly、Asn の割合が低く、Pro、Ser の割合は高い傾向にみられるが、その差は顕著ではなかった (図4. 4)。

#### マゼランアイナメの免疫グロブリン重鎖の $CH_2$ と $CH_3$ のドメイン間のゲノム領域の塩基配列

ノトセニア亜目魚類の免疫グロブリンの重鎖の  $C_H2$  -  $C_H3$  間のヒンジ様構造がなぜ多様であるかを調べるにはイントロンを含めたゲノム構造を解析することが大切である。図4. 5にはマゼランアイナメの免疫グロブリン重鎖の  $C_H2$  -  $C_H3$  間の塩基配列の一部が示されている。そこでは、エクソン・イントロンの境界領域のオリゴヌクレオチドが重複しアミノ酸配列を大きく変えていることが示された。ノトセニア亜目魚類の進化で  $C_H2$  -  $C_H3$  間のヒンジ様構造は大きな変化を遂げており、また  $C_H2$  ドメインと  $C_H3$  のドメインでアミノ酸が正の淘汰によって蓄積してきたことが示されている。今回得られた結果も点突然変異のみならずオリゴヌクレオチドの重複がタンパクの構造を変えるのに重要であったことを示している。免疫グロブリンの進化において膜貫通領域付近のスペーサーや  $C_H2$  -  $C_H3$  間のスペーサーで AFGP の進化のようにオリゴヌクレオチドの重複が関与していることは非常に面白い。このようなオリゴヌクレオチドがゲノム全体の特性なのか否か、またそこに DNA の複製あるいは修復機構に大きな変化があったのかどうかは興味ある問題で、今後のノトセニア亜目魚類の分子進化にとって重要な課題の一つであると考えられる。

- Coscia M.R., Morea V., Tramontano A., Oreste U. (2000) Analysis of a cDNA sequence encoding the immunoglobulin heavy chain of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*. *Fish Shellfish Immunol.* 10:343-357.
- Ota T, Nguyen T.-A., Huang E., Detrich III H.W., Amemiya C.T. (2003) Positive Darwinian selection operating on the immunoglobulin heavy chain of Antarctic fishes. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 295B:45-58.
- Stavnezer J., Amemiya C.T. (2004) Evolution of isotype switching. *Sem. Immunol.* 16:257-275.

☒4. 1 Marbled rockfish (*Sebasticus marmoratus*) IgM heavy chain constant region

P S A P T V Y P L Q Q C G S G A G D M V T L G C L A T G F S P S S  
CCATCTGCACCAACGGTGTATCCTCTGCAGCAATGTGGCTCCGGGGCTGGAGATATGGTCACTCTTGGCTGCCTCGCCACCGGCTTCTCGCCCTCCTCAG  
V T Y A W N K N G V A L A D F I Q Y P A V Q K N N V Y T G V S Q I R  
TGACCTACGCATGGAACAAAAATGGCGTTGCCTTGGCGGACTTCATTCAGTACCTGCAGTACAGAAAAACAACGTCTATACGGAGTCAGTCAAATCCG  
V R R Q D W E S R V P I K C V V T N S A G T A Q C D F T P P P P P  
AGTGAGGAGACAGGACTGGGAGTCCAGGGTGCCCATCAAGTGTGTGACCAATTACGGGGAACCTGCCAGTGTGATTTACACCACCACCACCACCA  
T L P P L P I Y Q L P T E L K V L A S C G E E A K A S F S C Y A K  
ACACTACCACCAGTCCGATATATCAGTTGCCAACTGAACCTAAAGTGTGGCCTCCTGTGGTGAAGAAGCAAGGCTTCTTCTCCTGCTATGCCAAAG  
D F S P D V Y E F K W L K N E V E I N T K T N E F T T P S K G R K V  
ATTTTCCACCAGCGTTTATGAGTCAAATGGCTGAAAAATGAAGTGAAATCAACACCAAAACAAACGAGTTCACAACACCTTCTAAGGGAAGAAAGGT  
T N G T L Y S A A S F L T L D S S E W T L N T K I R C D F K G I G  
CAGGAATGGAACACTGTACAGCGCGGCCAGTTTTCTCAGTTAGATTCCAGTGAGTGGACTCTCAACACGAAGATTAGATGCGATTTCAAGGGATAGGT  
K E D I P T S M N S S V T H E D S K G P R E G C E E A D V V V T I  
AAAGAAGCATTCCAACATCCATGAATTCATCTGTGACACATGAGGACAGTAAAGGTCCAGTGAGGGATGTGAGGAAGCAGATGTGTTGTTACGATCA  
I E P N L E D M F L K R K G T V I C R V N I N N P P V E K I F W E N  
TTGAACCAATTTGAGGAGCATGTTTTGAAGAGAAAAGGAACGTGAATTTGTCGAGTCAACATAAATAATCCACCTGTGAAAAAGATTTTTTGGGAAAA  
A K G D P V A D S S T I P T K G S T S V V D L P L E I S Y D E W S  
CGGAAAGGAGATCCAGTGGCTGATTCGTCAACGATCCCAACTAAAGGAAGTACAAGTGTAGTAGACCTTCCACTCGAGATCTCGTACGACGAATGGAGC  
R G E T F V C I V E H R D L Y N R L K T P Y T R T I G G Q I Q R P  
CGAGGGAAACGTTCTGTCTGATTTGGAACACAGAGATTTATACAACAGACTGAAGACACCCCTACACGAGGACTATTGGAGGTCAGATTCAGCGTCCT  
S V F M L P P L E H T T Q E R V T L S C Y V K D F S P Q E V F V S W  
CCGTGTTTATGCTACCTCCACTAGAACATACTACACAAGAAAGGGTGACCCTGTCTTGCTATGTGAAAGACTTCTCCCTCAGGAGTTTTTGTGTCTTG  
L V D D E Q A D S Q Y E F H T T N P V E S Q G S Y S A Y S Q L S L  
GCTTGTGATGACGAGCAAGCGGACTCACAGTACGAGTTCCATACCACAACCCCGTAGAAAGCCAAGGATCCTATTGCGCTTACAGCCAGTTATCTCTC  
S L E Q W K N K D T V Y S C V V Y H E S V A N S T K A I V R S I G  
AGCCTCGAGCAGTGGAAAAACAAGGACAGGTTATAGCTGTGTAGTTTACCACGAGTCTGTGGCTAACTCAACTAAAGCTATCGTCAGGTCATCGGGC  
Q R S F D R T N L V N L N M N I P E T C R A Q  
AAAGATCGTTTACAGAACCAACCTGGTCAACCTCAACATGAACATCCCTGAAACGTGCAGGGCCAGTAGACGTCAGTGTGTGTGCTGTGTCTTCT  
GCTGTTTGTGTTGTTGAATGTTTGTGCTGTGATGACATTGTGTTTCTTTTAAATGCAGATTCAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

☒4. 2 (A) Antarctic toothfish (*Dissostichus mawsoni*) IgM heavy chain constant region

A T K P T V F P L M Q C D S G T G G T V T L G C L A T G F A P S A  
GCCACTAAACCAACTGTGTTTCTCTGATGCAATGTGACTCCGGGACCGGAGGCACAGTCACTCTCGGCTGCTTGGCCACCGGCTTCGCACCGTCTGCTC  
L T Y G W T K N G A D L P L T D F I Q Y P P V Q K N N F Y Q G V S Q  
TGACCTACGGATGGACAAAAACGGGGCAGACTTGCCTTGACAGACTTCATTTCAGTACCCCCCGTACAGAAGAACAACCTCTATCAGGGTGTGAGTCA  
I Q V S R A D W D A K D K F Q C T V T H Q T G M A Q I I F T K P V  
AATCCAAGTGAGTAGAGCGGACTGGGATGCCAAGGATAAATTCGAATGTACCGTGACACATCAAACAGGAATGGCGCAGATTATCTTCACAAAGCCAGTG  
V V Y R V P T L K V L S S S S S Y E D N E A Y F S C L A S D F S P  
GTGGTTTATAGAGTTCACACTCTAAAGTGTTAAGCTCCTCCTCTTATGAAGACAATGAGGCTTACTTCTCCTGCTTGGCCAGTGATTTTTCACCTA  
K E Y E I K W L T N N Q E I T T K I H E I K T L S V E R M D E N G T  
AAGAATATGAGATCAAATGGCTGACAAACAATCAAGAAATCACAAACAAAATCCACGAGATCAAAACTCTTTCTGTGGAAAGAATGGACGAGAATGGAAC  
P L Y S A A S F x x M N T S D S T S D I R L T C L F E A K G E K G  
TCactgtacagcgcagcaagtttconnnnmatgaataCCAGTGACTCGACTTCGGACATCCGTCACATGTCTGTTTGGGGCAAAGGGAAAAAGGT  
P S T V N G T I S V K C P V I I G G T D C P E A D A D V H I I E P  
CCAAGTACCGTGAATGGAACAATCAGCGTTAAATGTCCGGTAATTATCGGGGCACAGATTGCTCTGAAGCAGATGCGGATGTACATATCATCGAACCT  
S M E D M L L H H K G T V Y C Q V K V N R P S L D K I S W E T E T G  
CAATGGAGGACATGTTATTACACCACAAGGAACGGTATATTGTCAAGTCAAGGTTAACAGACCATCTCTGGATAAGATTTCTGGGAGACCGGAGACTGG  
N P I L G A D P I T N L E G R K G V F N A E L T I T Y E E W I K G  
AAATCCAATACTTGGTGCCGACCCAATTACCAACCTTGAGGGCCGTAAGGGAGATTTAATGCTGAACTTACCATCACGTATGAAGAATGGATAAAGGGC  
T K F V C K V E H K D W L E P V T K S F Q R I N G G T T Q R P S V  
ACCAAGTTTGTCTGCAAGGTGGAACATAAAGATTGGTTGGAACCAAGTTACAAAATCCTTCCAAGGATCAATGGAGGAACGACTCAGCGTCCATCAGTGT  
F M L P P L E H T K K E T V T L T C L V K D F Y P K Y V F V A W L V  
TTATGCTACCTCCCCTAGAACAATAAAAAAGAAACGGTGACCCTGACTTGCTTAGTGAAAGACTTCTACCCGAAGTATGTGTTTGGCTTGGCTTGT  
D D Q E S G L Q Y N T T S P I E N Q G S Y S A Y G Q L T L S L E Q  
TGATGATCAGGAATCAGGCTTACAATACAACACCACAAGCCCTATAGAAAACCGGGATCCTATTCTGCTTATGGCCAGTTAACTCTCAGCCTCGAACAG  
W N N N D T V Y G C V V Y H E S M V N T G T K A I V R S I G H R T  
TGGAAACAACATGACACTGTGTATGGCTGTGTTGTTTACCATGAGTCTATGGTCAACACAGGAACAAAGCCATTGTGAGATCCATTGGGCACAGAACAT  
F E R T N L V N L N M N I P D T C N A C N  
TTGAAAGAACCAACCTGGTCAACCTCAACATGAACATCCCCGATACGTGCAATGCCTGCAATTAGATGTGATTCTGTGCTACTGTGCTTCGGCTGTTTG  
TTGTTAATGTTTGTGCTTGTATATCACATTGTGTTTGTGCTTTAATGCAGATTCAAAATAAAAAAAGCTCTTTGCAACTCA

(B) V<sub>H</sub> region

Q T L T E S E P V T K R P G E S H R L T C T A S G F T F S S S H M  
#3 CAGACTCTGACAGAATCTGAACCAAGTACTAAAAGGCGTGGAGAATCTCAGATTGACCTGTACAGCCTCTGGATTACATTCAGTAGCTCCCATGA  
S H W  
#12 ..... T ..... T ..... CA. TGG .....  
V N G W  
#4 ..... A ..... G. T. AC. TG. .... TTGG. . G  
Y G  
#7 ..... A. GG. ....  
I A V R K T N G G V W  
#2 ..... CA. A. T. G. .... CAGTC. GG. AA. .... C. C. .... C. A. A. .... AC. TG. AG. .... AGTATG. .  
I A V R K T N G G V W  
#11 ..... CA. A. T. G. .... CAGTC. GG. AA. .... C. C. .... C. A. A. .... AC. TG. AG. .... AGTATG. .  
N W V R Q A P G K G L E W I A Y I H P T S S A H I Y Y S E S V K G R  
#3 ACTGGGTCAGACAGGCTCCTGGGAAAGGACTGGAGTGGATCGCTTATATCCACCCTACTAGCAGTGCCACATCTACTACTCTGAGTCAGTAAAGGCCG  
L S T V  
#12 ..... A. .... TG. .... G. .... AG. AC. G. ....  
A I V I E Y D - D R F  
#4 CT. . A. .... G. T. . GAT. . TG. ATA. GA. --- . AT. GT. . T. ....  
S V - C S P S Q Q  
#7 G. .... A. .... G. ---TGC. . A. .... T. T. CG. .... CT. .... C. .... CC. G. . TA.  
I D L - A T P Q Q  
#2 ..... A. .... A. .... TA. A. ---. AGCT. . A. T. CG. .... T. .... C. .... G. CC. G. . TA.  
I D L - A T P Q Q  
#11 ..... A. .... A. .... TA. A. ---. AGCT. . A. T. CG. .... T. .... C. .... G. CC. G. . TA.  
F T I S R D N N R Q Q L Y L Q M S S L T A V D S A V Y Y C A R  
#3 GTTACCATCTCCAGAGACAACAACAGACAGCAGCTGTATCTGCAGATGAGCAGTCTGACGGCTGTAGACTCTGCTGTTTACTGTGCCAGG  
E  
#12 ..... G. .... TC. A  
#4 ..... TC. A  
D S S S K V N K E T  
#7 A. .... T. .... TG. . TC. . CAGTA. AG. .... A. .... A. . C. AG. . A. A. . G. . G. .... A  
D S S S K V N K E T  
#2 A. .... T. .... TG. . TC. . CAGTA. AG. .... A. .... A. . C. AG. . A. A. . A. . G. .... A  
D S S S K V N K E I  
#11 A. .... T. .... TG. . TC. . CAGTA. AG. .... A. .... A. . C. AG. . ATA. . A. . G. .... A

(C) D region

A S S G S	A T G R
#2 GCTAGCAGTGGCTCC	#12 GCAACGGGGCGC
V Y G D A	H G G G H H D
#11 GTGTACGGGGACGCT	#4 CACGGGGGGGGCACCACGAC
G G H Y	R V Y S S G S A
#3 GGGGGGCACTAT	#7 AGAGTATATAGCAGTGGCTCCGCT

(D) J<sub>H</sub> region

Y F D Y W G K G T M V T V T T A S V T  
#2, #4, #12 TACTTTGACTACTGGGAAAAGGAACAATGGTGACCGTCACAACAGCCTCTGTCAT  
A S  
#7, #11 GCT-----T-----C-----T-A-----T-----  
A S S  
#3 GCT-----C-----C-----GCT-----

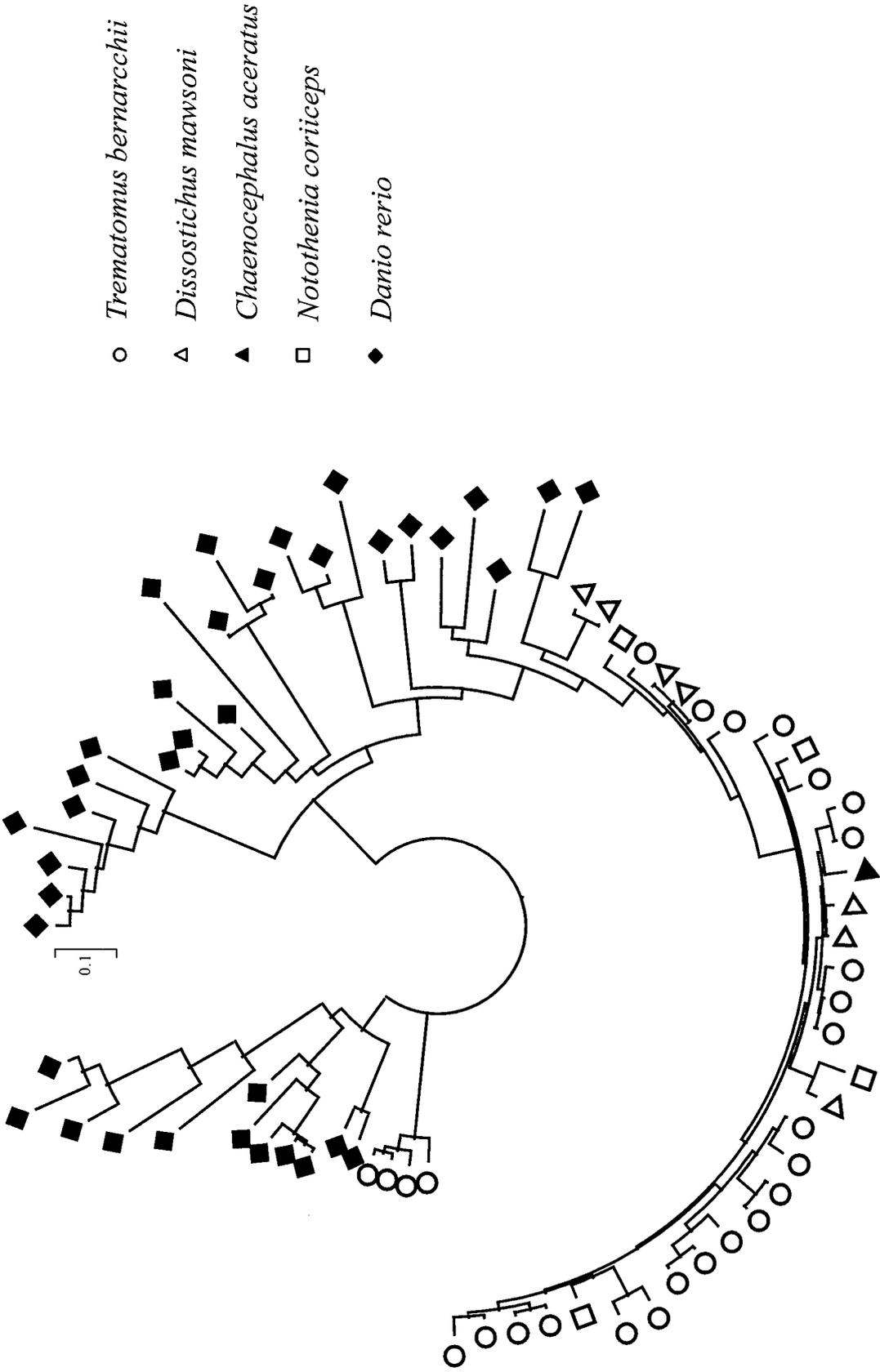


图 4. 3 NJ tree for teleost Ig  $V_H$  framework region with using Poisson distances.

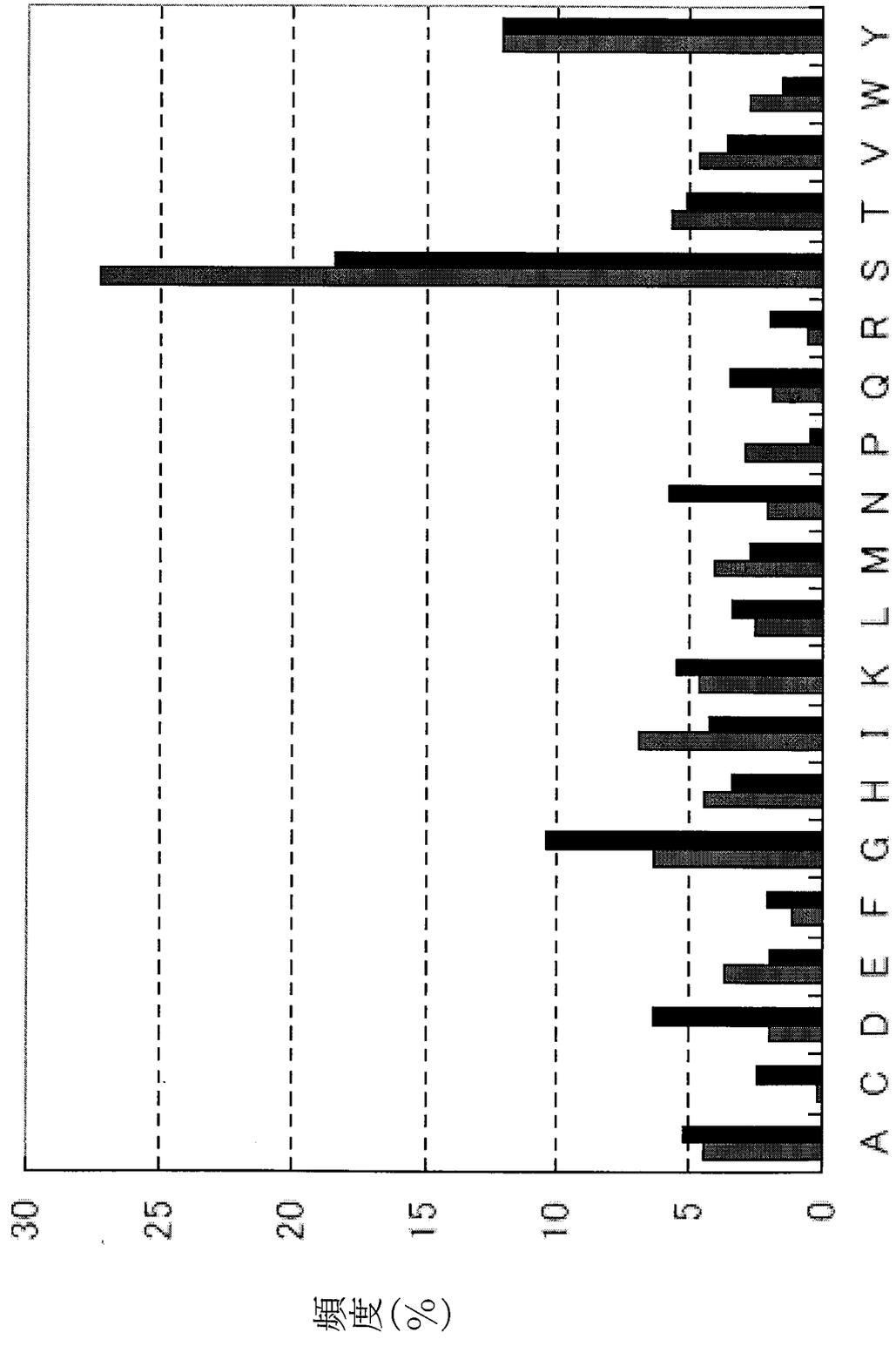


図4.4 免疫グロブリン重鎖の CDR1とCDR2 領域におけるアミノ酸の組成  
 左:ノトセニア亜目魚類 右:ゼブラフィッシュ

C<sub>H</sub>2末端領域のヒンジ様構造で観察されたオリゴヌクレオチドの重複

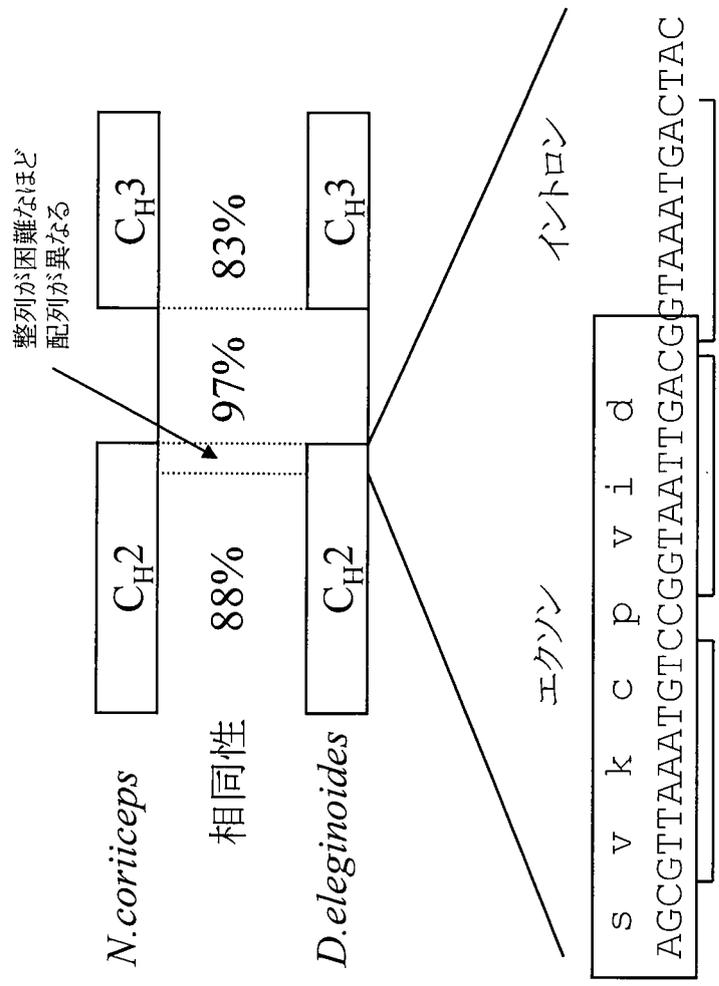


図4.5 免疫グロブリンにおけるオリゴヌクレオチドの重複

## 第5章 ミトコンドリア遺伝子

はじめに

ミトコンドリア遺伝子は一般に進化速度が速く種内の多型や近縁種間の進化関係を推定するために用いられている。またミトコンドリア遺伝子は母系遺伝を示し一般に組み換えを起こさないため核遺伝子とは異なった特徴をもつ。魚類におけるミトコンドリアの遺伝子の進化速度は必ずしも哺乳類ほど速くはないが、ノトセニア亜目の研究においてもミトコンドリア遺伝子あるいはミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の情報を合わせて、系統進化を推測したり (Bargelloni et al. 2000, Derome et al. 2002, Chen et al. 2003, Near et al. 2003, Dettai and Lecointre 2004, Sanchez et al. 2007)、集団内の多型を研究すること (Patarnello et al. 2003, Kuhn and Gaffney 2006, Rogers et al. 2006, Shaw et al. 2004, Smith and Gaffney 2005, Zane et al. 2006) が試みられている。ここではサンプル数は少ないながらも *Dissostichus* 属のミトコンドリアの D ループ領域の塩基配列を決定し、データベースにある配列と共に集団遺伝学の観点から解析を行った。

### *Dissostichus* 属のミトコンドリアの D ループ領域の塩基配列

ミトコンドリア遺伝子の中でもコントロール領域あるいは D ループ領域は多様性が高く集団遺伝学的な解析に頻繁に用いられている。ここでは、我々が持っている *Dissostichus* 属のサンプル (アメリカ合衆国のベナヨラ研究所の Amemiya 主任研究員の共同研究によって提供を受けたライギョダマシ *Dissostichus emawsoni* 3 個体、日本の市場で入手したマゼランアイナメ *Dissostichus eleginoides* 2 個体) について塩基配列を決定した。その結果は図 5.1 に示すとおりである。ライギョダマシ 3 個体の塩基配列についてはデータベースに登録されているものと全く同じであった。最近 Smith と Gaffney(2006)はライギョダマシで多型がほとんど存在しないことを示しており、今回の結果はそれと一致するものである。一方マゼランアイナメでは公表されているデータを含め三つのハプロタイプが発見され、そこには分離しているサイトが四か所あった。Shaw ら(2004)は、ライギョダマシよりもマゼランアイナメで集団内の遺伝的な変異は大きく、またマゼランアイナメの種内では地理的な距離および海流や南極前線帯などの影響を受け一部の集団間の分化が進んでいることを示している。

これまでのミトコンドリア遺伝子を用いた集団遺伝学

*Dissostichus* 属の集団解析 (Shaw et al. 2004, Smith and Gaffney 2005) ではマゼ

ランアイナメにおいて南極前線帯の南北で集団が分化していた。しかし、それ以外では集団間の分化はあまり進んでいなかった。またライギョダマシにいたっては遺伝的な多型がほとんどみられなかった。それでは、その他のノトセニア亜目の種類ではどうなっているのでしょうか？ Patarnello ら(2003)はコオリウオ科に属する *Chionodraco* 属の三種について集団内の多型を調べたが、その結果すべての種で多型が観察された。また *Chionodraco hamatus* では分集団間でいくつかの種のハプロタイプが共有される一方で個々の集団でしか発見されなかったハプロタイプも数多く、分集団間での分化が観察された。Zane ら(2006)はノトセニア科のコオリイワシ *Pleuragramma antarcticum* では分集団間の分化の程度はさほど進んでいないが集団内の多型は存在することを示している。Kuhn と Gaffney (2006) は *Champscephalus gunnari* では分集団間の分化が進んでいることを示している。これらのことはノトセニア亜目の魚類の種によってそれぞれの生態・生息環境が異なり、それに応じ遺伝的な集団内構成も異なることを示している。

#### D ループ領域塩基配列の解析

先にあげたようにDループの領域については、*Chionodraco* 属の三種 (Patarnello et al. 2003) および *Pleuragramma antarcticum* (Zane et al. 2006) において数多くの個体を調べハプロタイプが調べられている。Patarnello ら(2003)によって調べられた *Chionodraco* 属の三種のハプロタイプについて、そのハプロタイプ間の関係をネットワークとして表しそこで生じた塩基置換を図 5. 2 に示す。ここでは、3種の塩基配列の比較から *Chionodraco myersi* の祖先型はハプロタイプ A であり、*Chionodraco rastrispinosus* の祖先型はハプロタイプ D、*Chionodraco hamatus* の祖先型はハプロタイプ T と考えられた (Patarnello et al. 2003 も参照)。またここで、祖先型からのハプロタイプの派生については *Chionodraco myersi* と *Chionodraco rastrispinosus* については比較的簡単で二分岐型の系統関係で推定できたが、*Chionodraco hamatus* については複雑なネットワーク型となった (ネットワークの形については Patarnello et al. 2003 とは一部が異なる)。このネットワーク上でどの経路で新たなハプロタイプが生じたかについては、現在調べられているハプロタイプの個体数を考慮すると図 5. 2 (C) において実線で表示されているのが最も可能性が高かったのではないかと考えられる。

これらをもとに、ミトコンドリア D ループ領域で生じている塩基置換のパターンをまとめたのが表 5. 1 および表 5. 2 である。そこで明らかのように転移型の塩基置換は転換型の塩基置換よりも多く、その速度には約 3 倍程度の差があった。(転換型の塩基置換は転移型の塩基置換に比べてその種類が倍であるため、塩基置換速度が同じであると潜在的に転換型の塩基置換数は転移型の塩

置換数の2倍になることに注意。) また、塩基の欠失も頻繁に生じていることも示された。表5. 2には一つのサイトでいくつの塩基置換が生じたか、その数を示しており、その分布はサイト間で塩基速度が $\gamma$ 分布に従い異なっていると仮定すると負の二項分布に従う。哺乳類などの研究ではDループ領域は塩基置換速度がサイト間によって著しく異なっており、 $\gamma$ パラメーターは非常に低い値を示す。しかし、ここで推定された $\gamma$ パラメーターは1.1であり、サイト間での塩基置換速度の差は顕著ではない。よって今回調べた領域についてはノトセニア亜目の魚類で転移型転換型塩基置換のバイアスについても、またサイト間での塩基速度のばらつきについてもあまり強くない。

一般に集団内の多型の程度と調べた遺伝子の進化速度が分かると、そこから遺伝的に有効な集団の大きさが求められる。その中の一つの方法は多型サイト(集団内で分離しているサイト)の数から有効な集団の大きさを求める方法である。ここでは先にあげた文献で発表されているデータをもとに集団の大きさを推定した。表5. 3にノトセニア亜目の生物種について得られているDループ領域でのデータ、すなわち調べられている種のサンプル数、ハプロタイプの数、分離しているサイトの数、そしてそこから得られた $2N_e\mu$ の値を示す。(Neは雌集団の大きさの数x一世代の時間とし、 $\mu$ は単位時間あたりの塩基置換数とする。ただしミトコンドリアの母系遺伝を仮定する。) ここで遺伝子の進化速度については、共通している218サイトでの*Dissostichus*属の2種の塩基配列の差、およびこれら2種の分岐年代を約1450万年前と仮定して求める。今、*Dissostichus*属の2種のDループ領域において観察された塩基差異数の平均が $(21+23+24)/3$ なので、塩基置換速度はおおよそ、

$$[\{(21+23+24)/3\} / 218] / [1.450 \times 10^7 \times 2] = 0.36 \times 10^{-8}$$

と推定される。これから $2N_e$ の値は表5. 3のように推定される。この $2N_e$ の値についてはライギョダマシを除いては比較的大きく $0.85-10.5 \times 10^6$ であることが推定される。これらの種では一世代が数年-数十年であることを考えると遺伝的にみて集団の大きさは十万から百万の桁で比較的大きなことが類推される。その一方でライギョダマシの多型の程度は非常に低い。

Patarnelloら(2003)、Zaneら(2006)、KuhnとGaffney(2006)は、各々のデータ解析で、それぞれの種でここ数万年の環境の変化に伴い集団の大きさが拡張してきたことを示唆している。そこで次に、有効な集団の大きさを分離しているサイトの数ではなく塩基多様度から求めてみた。塩基多様度はハプロタイプの遺伝子頻度なども考慮した値なので、分離しているサイトの数ほど最近の集団の拡張の影響を受けない。この解析結果を示したのが表5. 4である。ここではコオリイワシのデータには遺伝子頻度の情報が発表されていなかったのので*Chionodraco*属の三種の解析結果のみを示す。(また、ここで用いた塩基配列

の数は 241bp で、これらのサイトで推定した進化速度  $0.38 \times 10^{-8}$  を用いて解析している。) その結果  $2N_e$  の値が  $0.78-2.7 \times 10^6$  と推定され、これらの値は先に推定して値よりは低い値となった。しかしここでも、有効な集団の大きさは十万から百万の桁でノトセニア亜目の有効な集団の大きさが比較的大きい(遺伝的交流少ない分集団間が長い間維持されている場合も考えられるが) ことを示唆した。

- Bargelloni L., Marcato S., Zane L., Patarnello T. (2000) Mitochondrial phylogeny of Notothenioids: A molecular approach to Antarctic fish evolution and biogeography. *Syst. Biol.* 49:114-129.
- Chen W.-J., Bonillo C., Lecointre G. (2003) Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26:262-288.
- Derome N., Chen W.J., Dettai A., Bonillo C., Lecointre G. (2002) Phylogeny of Antarctic dragonfishes (Bathdraconidae, Notothenioidei, Teleostei) and related families based on their anatomy and two mitochondrial genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24:139-152.
- Dettai A. and Lecointre G. (2004) In search of notothenioid (Teleostei) relatives. *Antarctic Sci.* 16:71-85.
- Kuhn K.L., Gaffney P.M. (2006) Preliminary assessment of population structure in the mackerel icefish (*Channosocephalus gunnari*). *Polar Biol.* 29:927-935.
- Near T.J., Pesavento J.J., Cheng C.-C. (2003) Mitochondrial DNA, morphology, and the phylogenetic relationships of Antarctic icefishes (Notothenioidei: Channichthyidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 28:87-98.
- Patarnello T., Marcato S., Zane L., Varotto V., Bargelloni L. (2003) Phylogeography of the *Chionodoraco* genus (Perceformes, Channichthyidae) in the Southern ocean. *Mol. Phylogenet. Evol.* 28:420-429.
- Rogers, A.D., Morley, S., E. Fitzcharles, Jarvis K., Belchier M.(2006) Genetic structure of Patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides*) populations on the Patagonian shelf and Atlantic and western Indian ocean sectors of the Southern ocean. *Marine Biol.* 149:915-924.
- Sanchez S., Dettai A., Bonillo C., Ozouf-Costaz C., Detrich III, H.W., Lecointre G. (2007) Molecular and morphological phylogenies of the Antarctic teleostean family Nototheniidae, with emphasis on the Trematominae. 30:155-166.
- Shaw P.W. Arkhipkin A.I., Al-Khairulla H. (2004) Genetic structuring of Patagonian toothfish populations in the Southwest Atlantic Ocean; the effect of the Antarctic

Polar Front and deep-water troughs as barriers to genetic exchange. *Mol. Ecol.* 13:3293-3303.

Smith, P.J., Gaffney P.M. (2005) Low genetic diversity in the Antarctic toothfish (*Dissostichus mawsoni*) observed with mitochondrial and intron DNA markers. *CCAMLR Science* 12:43-51.

Zane L., Marcato S., Bargelloni L., Bortolotto E., Papetti C., Simonato M., Varotto V., Patarnello T. (2006) Demographic history and population structure of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*. *Mol. Ecology* 15:4499-4511.

表5. 1 The number of nucleotide substitutions and indels observed.

species	transition(21)	transversion(13)	deletion(5)	insertion(0)
<i>C. myersi</i>	3	2	1	0
<i>C. rastrospinosus</i>	4	2	0	0
<i>C. hamatus</i>	14	9	4	0

表5. 2 The number of sites with  $n$  nucleotide substitutions.

$n$	0	1	2	3	4
the number of sites	223	22	1	2	1
if deletion is counted as nucleotide substitution	221	21	4	2	1

表5. 3 The number of segregating sites observed at mtDNA D loop region (218 sites)

Species	#sample	#haplotype	#sites	$2N_e\mu$	$2N_e$
<i>Pleurogramma antarcticum</i>	256	110	50	0.0375	$1.05 \times 10^7$
<i>Dissostichus eleginoides</i>	3	3	3	0.0092	$2.56 \times 10^6$
<i>Dissostichus mawsoni</i>	4	1	0	0	0
<i>Chionodraco myersi</i>	51	7	3	0.0031	$0.85 \times 10^6$
<i>Chionodraco rastrispinosus</i>	63	7	4	0.0039	$1.09 \times 10^6$
<i>Chionodraco hamatus</i>	74	24	13	0.0122	$3.41 \times 10^6$

Ne: Effective population size x generation time

表5. 4 Estimation of population parameters for mtDNA D loop region (241 sites)

Species	#sample	# segregating	$2N_e\mu$	$\pi(2N_e\mu)$	$2N_e$
<i>Chionodraco myersi</i>	51	4	0.0037	0.0015	$0.78 \times 10^6$
<i>Chionodraco rastrispinosus</i>	63	6	0.0053	0.0038	$1.97 \times 10^6$
<i>Chionodraco hamatus</i>	74	21	0.0178	0.0052	$2.69 \times 10^6$

Ne: Effective population size x generation time

Dissostichus mawsoni gi:95062579	TGTA	CTTGA	AGTGCATCTA	ITGGCTACTA	ACACTCATAT	ATATTAACCA	CTTCATGGGC	AATCAGGGAT	AAAAGTGATT	GIATGGCAGA	ATTGACTTG
Dissostichus mawsoni 12	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus mawsoni 13	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus mawsoni 14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus eleginoides gi:22652753	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus eleginoides 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus eleginoides 4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus mawsoni gi:95062579	ACACACAAT	ATATCAAAA	TAACAGTAGG	TATACATAAA	GCATTTGAGA	AACCTTACAT	AATCCAAGTT	AATGACAGGC	GAGACTTAAG	ACCGAACCCA	
Dissostichus mawsoni 12	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus mawsoni 13	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus mawsoni 14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus eleginoides gi:22652753	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus eleginoides 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus eleginoides 4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus mawsoni gi:95062579	CAC	TTCA	TTG	TTA	AGT	TAT	ACG	TTT	AC	CC	CGC
Dissostichus mawsoni 12	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus mawsoni 13	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus mawsoni 14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus eleginoides gi:22652753	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus eleginoides 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dissostichus eleginoides 4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

図5. 1 *Dissostichus* 属 mtDNA D ループ領域

(A) *Chionodraco myersi* mtDNA D-loop

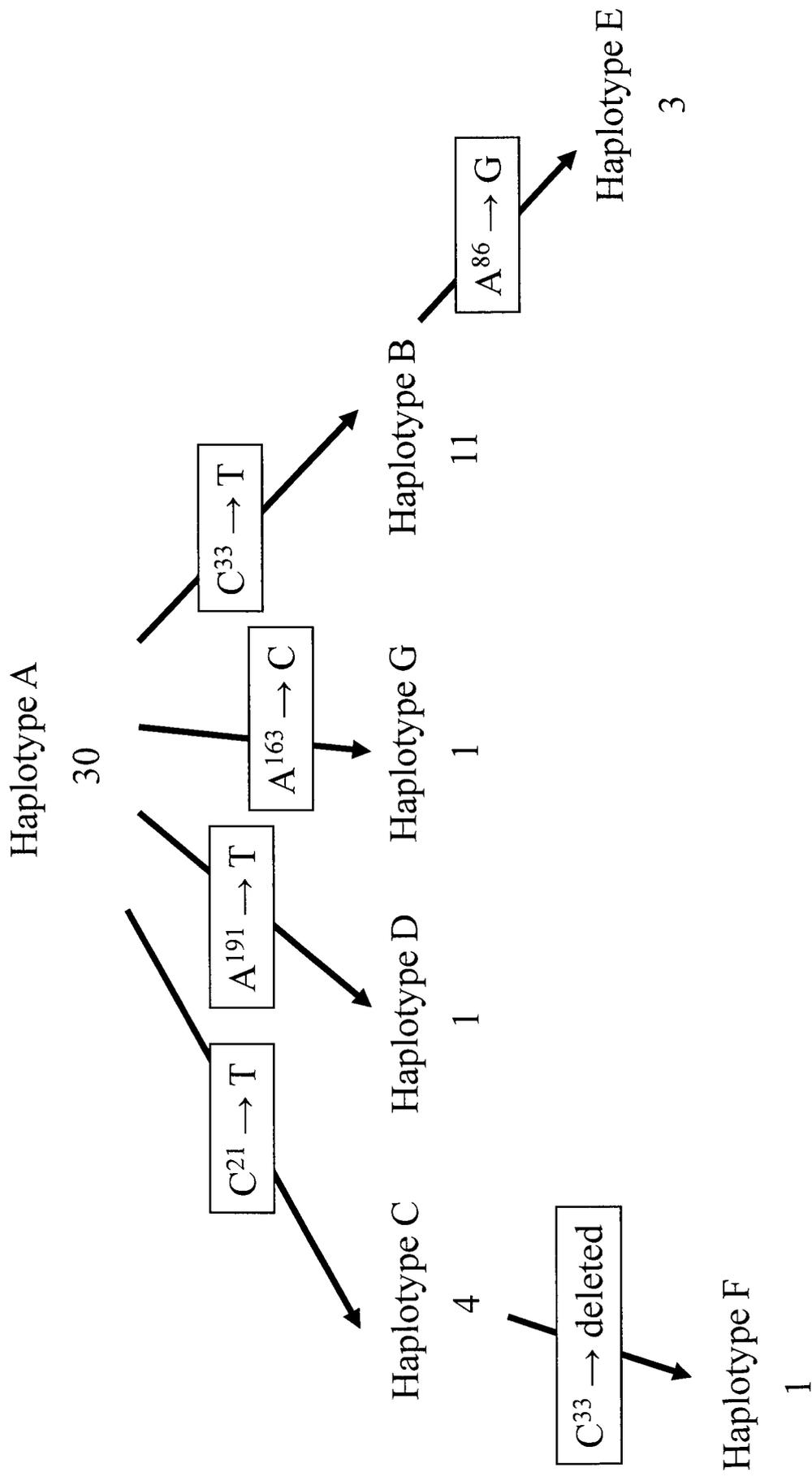
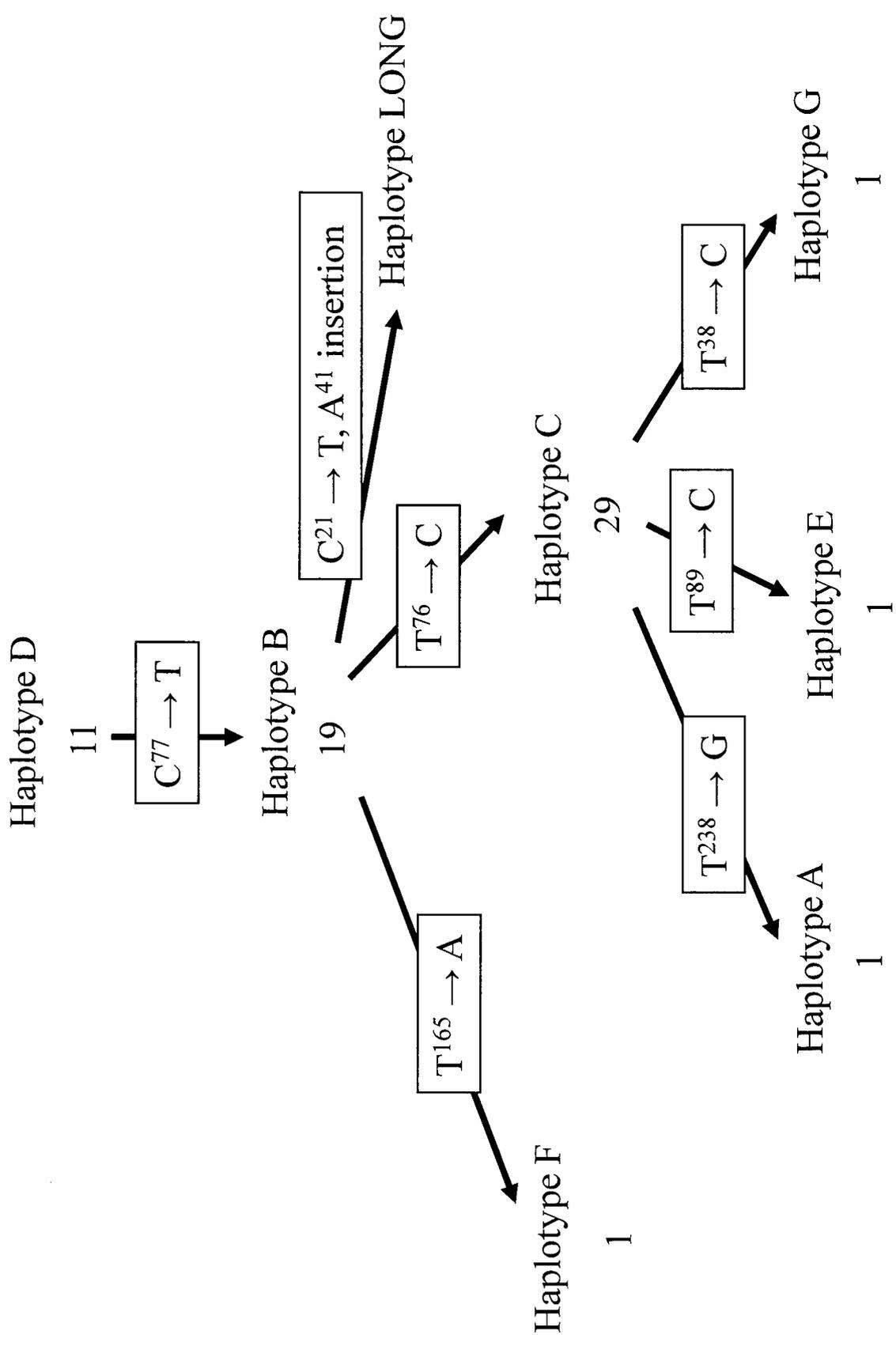


Fig 5.2 Haplotype evolution inferred for *Chionodraco* mt DNA D loop  
The numbers indicate the number of haplotype observed (Patarnello et al. 2003)

(B) *Chionodraco rastrispinosus* mtDNA D-loop





## 第6章 MHC 遺伝子

はじめに

主要組織適合遺伝子複合体 **Major Histocompatibility Complex** は、免疫グロブリン遺伝子とならび脊椎動物の適応免疫で非常に重要なタンパク質である。免疫グロブリンが体液中の抗原を認識するのに対して、MHC は細胞内に存在するウイルスや細菌などに由来するタンパクの分解ペプチドを細胞表面に輸送し T 細胞などの免疫細胞に提示する。一般に MHC 分子は多重遺伝子族を形成し、その進化様式は複雑である。免疫系にかかわる遺伝子で直接抗原を認識するので MHC は自然選択の対象となり、アミノ酸の変化を促進するような正の淘汰がかかっている例が数多く報告されている。生物および遺伝子によっては対立遺伝子が数百万間にわたって集団中に保持され、種をこえて多型状態が維持される。このような自然選択は抗原を認識する部分である **Antigen Recognition Site** にみられ、類例のない特異的な進化様式を示している。MHC は集団内で高い多型を示すため、集団内の分化や過去の集団の容態を調べるのにも重要で、数少ない遺伝子座の情報でも有用な進化的情報をえることができる。ただ集団遺伝の観点から適切な解析を行うためにはゲノム構造を明らかにし、多重遺伝子族間の関係をおさえておくことが大切である。

本研究ではノトセニア亜目魚類における進化研究および集団遺伝学の研究の基礎を固めるために MHC 遺伝子の塩基配列の解析を行った。

### ライギョダマシの MHC クラス II $\beta$ 遺伝子

ライギョダマシ *Dissostichus emawsoni* の 3 個体 (#12,#13,#14) から得られた MHC クラス II  $\beta$  遺伝子の配列を図 6. 1 に示す。これらの配列は Venkatesh ら (1999) が決めた配列の一部をもとに RACE 法を行い、得られた情報に基づいて RT-PCR 法を行って塩基配列を決めた結果である。これらの 3 個体については、それぞれ 5 ʼ RACE および RT-PCR 法を合わせて 30 以上のクローンをみたが、観察された MHC クラス II  $\beta$  の種類は 1 個体あたり 2 - 4 種類であった。そのため最小限必要な遺伝子座の数は 2 つであったが、実際の遺伝子座の数は明らかでない。また 7x ゲノムの BAC ライブラリーをスクリーニングしたところ 26 - 28 個のクローンが得られ、これも MHC クラス II  $\beta$  の遺伝子座が少数個 (4 遺伝子座程度) あることを示唆している。サザンブロット解析では 2 - 5 のバンドが観察され遺伝子座の数はあまり多くないことが確認されたが、その数は個体によって異なることも示された。これらの結果はノトセニア亜目魚類においても MHC クラス II  $\beta$  遺伝子は多重遺伝子族を形成し遺伝子重複によってその

数が個体によって変わりつつあることを示している。MHC 遺伝子がいわゆる出生死亡過程を経て進化していることは哺乳類などでも観察されており、そのため今後 MHC クラス II  $\beta$  遺伝子を用いて集団遺伝学的な解析を行うに当たっては遺伝子座がオーソログスかパラログスかを明らかにすることが大切である。今回 3 個体から得られた塩基配列については 3' の非コード領域にある反復配列の有無で 2 種類に分けられ、これらが異なる遺伝子座に由来する可能性が高い。さらに、これらの塩基配列をそのコードしているアミノ酸に注意してみるとアミノ酸の異なっている部位は ARS に多くみられ、サイトあたりの非同義塩基置換の数が同義塩基置換数に比べて多いことが示された (表 6. 1)。これはノトセニア亜目魚類においても、正の淘汰が働いており ARS での多様性を促進していることを意味している。これが平衡淘汰によるものかどうかは対立遺伝子の関係が分からないために定かではないが 2 種類に分けられたグループ内でサイトあたりの非同義塩基置換の数が同義塩基置換数に比べて多いことからその可能性が高いと考えられる。ライギョダマシにおいてはミトコンドリア遺伝子において多型がほとんどないことを考えると今後の集団遺伝学的解析に MHC 遺伝子の多型解析が有用と考えられる。またライギョダマシにおいて多型 (塩基配列やサザンプロットのバンドパターン) が観察されたことは、この種でも過去にある程度の大きさの集団があり現在は集団が縮小した (ボトルネック) 可能性が高いことを示している。

#### 硬骨魚類の MHC クラス II $\beta$ 遺伝子の系統関係

図 6. 2 に硬骨魚類の代表的な MHC クラス II  $\beta$  遺伝子に対して行った系統樹の推測結果を示す。ここには、スズキ類の魚類の MHC 遺伝子もそれ以外の硬骨魚類の MHC 遺伝子も含んでいる。この系統樹ではスズキ類の魚類の MHC 遺伝子のクラスターの中にスズキ類以外の MHC 遺伝子が入り込んでおり、種の系統関係とは対応していない。すなわちこれらの遺伝子は、オーソログスな遺伝子ではなく、パラログスな遺伝子の系統関係を示している可能性が高いと考えられる。今回得られたノトセニア亜目の MHC 遺伝子がスズキ類と他の目の硬骨魚類のクラスターの外側に位置することはこの MHC 遺伝子が今まで得られているスズキ類の遺伝子とはオーソログスなものではなくパラログスな関係にあることを示している。そのためノトセニア亜目魚類においても今まで得られているスズキ類の遺伝子とオーソログスな遺伝子が存在する可能性を残した。

Smith, P.J., Gaffney P.M. (2005) Low genetic diversity in the Antarctic toothfish (*Dissostichus mawsoni*) observed with mitochondrial and intron DNA markers. *CCAMLR Science* 12:43-51.

Venkatesh B., Ning Y., Brenner S. (1999) Late changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:10267-10271.

12-1	GAGTTTGAAGTCAAGAGAGGATCATGGCTTCTTTCCTCAGCGTCTGCCTGCTCTTCCCTCAGCGTCTACACAGCAGATGGATATCTGGAATATATGACT
13-5	.....
14-6	.....
13-2	.....
12-2	.....G
14-2	.....G
13-15	.....C.T
14-F3	.....C.T
14-5RACE-3	.....C.T
12-1	TTCCGCTGTGAGTTCACCTCCTCTGAGCTGAGGACATCCAGTTCATAGAGTCATACCATTACAACACTACTTGGAGTACATCAGGTTCCGACAGCAGAGTGG
13-5	.....
14-6	.....
13-2	.....
12-2	.C.....
14-2	AC.....A.C
13-15	AC.....C.A.G...CT
14-F3	GC.....C.C...T
14-5RACE-3	.C.....A.G...CT
12-1	GGAAGTTTGTGGATACACTGAGCATGGGGTGTACAACGCAGAGAACTGGAAACAAGGATCCTTCAATCCTGAACCGGGGAGAAAGCGGAGGAGACGTA
13-5	.....
14-6	.....
13-2	.....T
12-2	.....A...C.AA
14-2	.....A.G
13-15	.TG...A.G...A...G...C.AA
14-F3	.TG...A.G
14-5RACE-3	.TG...A.G...A...G...C.AA

Fig. 6. 1 *Dissostichus mawsoni* MHC class II  $\beta$  genes (continued)

12-1 CTGCCAACACAACATTAAGAACTACGAGCAGATTACCCCTGCCTTTCTCAGCGAAGCCCTAGGTCCGGCTTCACTCCACGGTCTCTCCAGTGGATCACAT  
13-5 .....  
14-6 .....  
13-2 .....  
12-2 C...CT...TA.....  
14-2 C...CT...TA.....  
13-15 C...CT...TA.....  
14-F3 .....  
14-5RACE-3 C...CT...TA.....

12-1 CCAGCGATGCTGGTCTGCAGGCTACGAGTTCTACCCCAAACCTCAAAAGTGAGCTGGATCAGGAA CGGACAGGAAGTCACCTCTGATGTCACCTTCCT  
13-5 .....  
14-6 .....  
13-2 .....  
12-2 .....  
14-2 T.....  
13-15 C.....  
14-F3 .....  
14-5RACE-3 C.....

12-1 CTGAGAGGCTGGCTGACAGGGACTGGTACTACCAGGTCCACTCCACCTGGAGTACAGCCCCAGGTCTGGAGACAAGATCTCCTGCATGGTGGAGCAGGT  
13-5 .....  
14-6 .....  
13-2 .....  
12-2 .....  
14-2 .....  
13-15 G..T.....  
14-F3 G..T.....  
14-5RACE-3 G..T.....

Fig. 1 *Dissostichus mawsoni* MHC class II  $\beta$  genes (continued)



12-1	GATCCTGGTCCCGAGCAGCTGATCCTGGTCCCTGGTCCCGAGC
13-5	.....
14-6	.....
13-2	.....
12-2	.....
14-2	.....
13-15	GATCCTGGTCCTGGTCCCGAGCAGGGGTCCCTGGTCCCGAGCAGCTGGTCCT. G.
14-F3	GATCCTGGTCCTGGTCCCGAGCAGGGGTCCCTGGTCCCGAGCAGCTGGTCCT. G.
14-5RACE 3	.....
12-1	AGCTGGTCCTGGTCCCGAGCAGGGGTCCCTGGTCCCTGGTGTGCTTCAAACCGCTTCATGTGCTGCTAGCTGGTTCCTGGTGAATCTGAG
13-5	.....
14-6	.....
13-2	.....
12-2	.....G.
14-2	.....
13-15	.....
14-F3	.....
14-5RACE-3	.....
12-1	CTCTGATACTGCGGGTCTGAACCTGATCCAGGACTCTGGTCAATCATGACTCTGTTGGGAATTAGGGGCTCCTTATAAACCAATTATAGCAGATATA
13-5	.....
14-6	.....
13-2	.....
12-2	.....G.
14-2	.....
13-15	.....T.....A.....G.....
14-F3	.....A
14-5RACE-3	.....

Figure 6. 1 *Dissostichus mawsoni* MHC class II  $\beta$  genes (continued)

12-1	GTGCAGGGGGGGG---	TATTTACTCTGACAGTCCTGGACCAGGTT	CAGTCTGGACTCTGCTAGTCTTT	GTGTGAAATCAATATTTACTCATA	TCCAAA
13-5	.....	GG-	.....	.....	.....
14-6	.....	G--	.....	.....	.....
13-2	.....	G--	.....	.....	.....
12-2	.....	G--	.....	.....	.....
14-2	.....	GGG	.....	.....	.....
13-15	.....	.....	.....	.....	.....
14-F3	.....	.....	.....	.....	.....
14-5RACE-3	.....	.....	.....	.....	.....
12-1	GGTCTGTTTCTAAATCTATGTACTCCAGGTAGTTT	AAGGCCTCCTCCAGGGTTGGTGATT	GTGAGACTTTTCAATAAACGCTTGAGACT	.....	.....
13-5	.....	.....	.....	.....	.....
14-6	.....	.....	.....	.....	.....
13-2	.....	.....	.....	.....	.....
12-2	.....	.....	.....	.....	.....
14-2	.....	.....	.....	.....	.....
13-15	.....	.....	.....	.....	.....
14-F3	.....	.....	.....	.....	.....
14-5RACE-3	.....	.....	.....	.....	.....

图6.1 *Dissostichus mawsoni* MHC class II  $\beta$  genes

表6. 1 Proportion of synonymous( $p_s$ ) and nonsynonymous( $p_n$ ) nucleotide differences (%)

Group I	Entire region		ARS		Remaining	
	$p_s$	$p_n$	$p_s$	$p_n$	$p_s$	$p_n$
*Com vs 14-2	0.55	2.13	0.00	19.9*	0.61	0.20
13-2	0.00	0.17	0.00	1.75	0.00	0.00
12-2	0.00	1.95*	0.00	17.9	0.00	0.20
14-2 vs 13-2	0.55	2.30	0.00	21.6*	0.61	0.20
12-2	0.55	1.60	0.00	12.8	0.61	0.40
13-2 vs 12-2	0.00	2.13*	0.00	19.6*	0.00	0.20
Average	0.28	1.71	0.00	15.6	0.30	0.20
Group II						
13-15 vs 14-F3	0.55	2.31	0.00	15.9	0.60	0.80

\*Com; 12-1, 13-5, 14-6

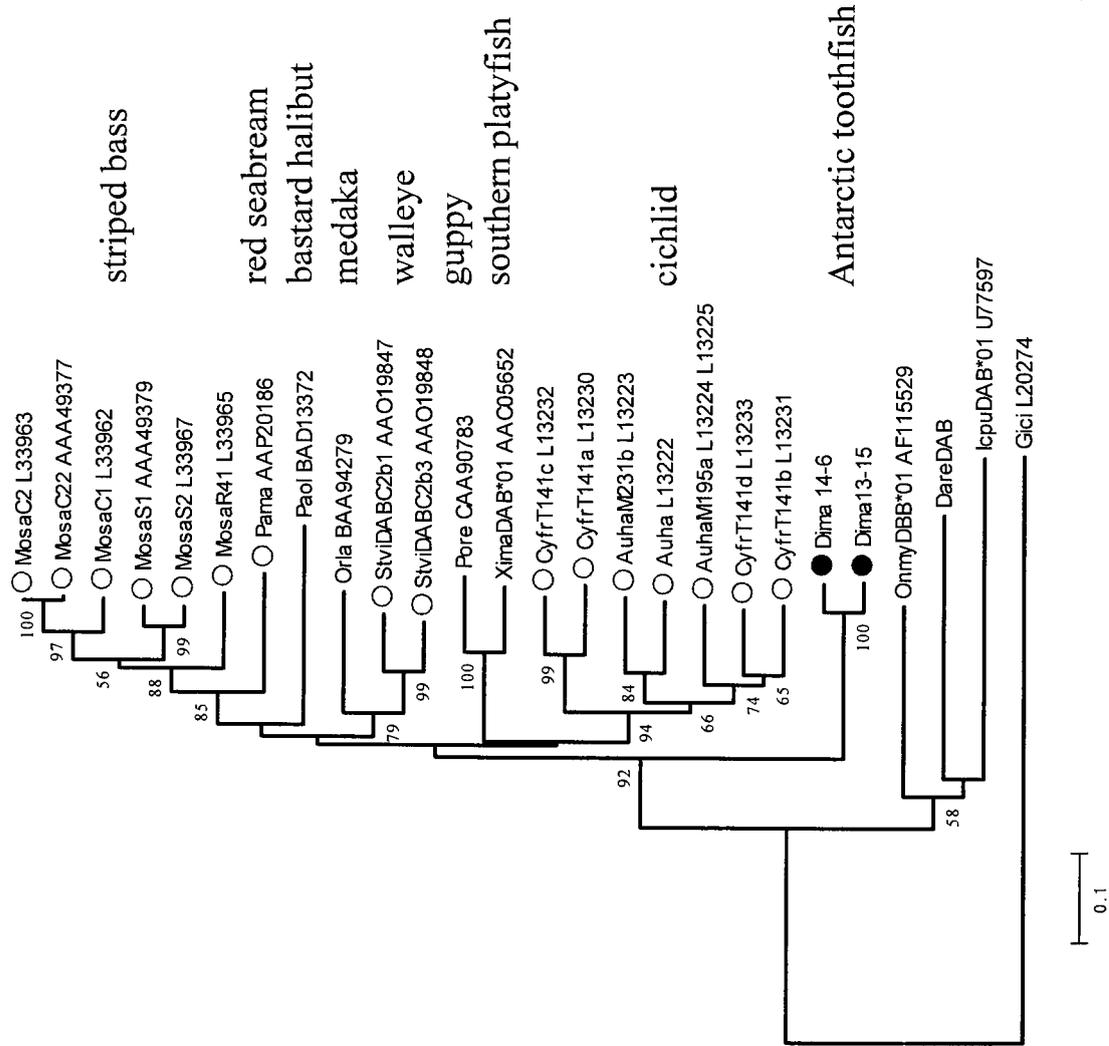


Fig. 2 NJ tree of teleost MHC class II beta

## 要約

スズキ類ノトセニア亜目の魚類が極限環境で生息できるのは AFGP を進化の過程で獲得したことが一つの要因である。今回、塩基配列の解析で AFGP 遺伝子の起源はノトセニア科、ハルパギファ科、アゴヒゲオコゼ科、カモグチウオ科、コオリウオ科が分化し始める頃の 2180 ~2430 万年前と推定された。

Near ら (2006) はノトセニア亜目コオリウオ科の 15 種で成魚型のヘモグロビン遺伝子がゲノムからほぼ失われているのに対し 1 種で  $\alpha$  遺伝子が残っていることを発見しコオリウオ科の種分化の過程で多型対立遺伝子が維持されたと結論した。偽遺伝子であるこれら二つのハプロタイプが数百万年にわたる種分化の間で中立的に維持され続けるには非常に大きな集団が遺伝的に必要となる。現在のミトコンドリアの配列解析からはいくつかの種で十万から百万の桁の有効な集団の大きさが推定されるが、現在の集団は比較的最近拡張したものであること、数百万年もの間対立遺伝子を中立的に存続するために必要な有効な集団の大きさは現在でも上限に近いこと、さらにその間に生物の種分化が数度起きていたことを考えると観察されたハプロタイプが中立的に多型対立遺伝子として長期存在した可能性は低いと考えられる。ヘモグロビンの塩基配列解析からコオリウオ科の系統で正の自然選択が見出されたことから、これらの多型対立遺伝子の維持にも自然選択がかかったことも考えられる。

ミトコンドリア遺伝子での研究からライギョダマシは遺伝的に均一であることが示されたが、主要組織適合遺伝子複合体においては多型が観察され過去により大きな集団を構成していたことが類推された。また免疫グロブリン遺伝子の解析ではオリゴヌクレオチドの重複が AFGP と同様に重要な役割を果たしていることが示された。