

氏 名 野 田 令 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第466号

学位授与の日付 平成12年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Evolutionary study of primate mitochondrial and
nuclear genes with special reference to the ABO
blood group genes

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 五條堀 孝
教 授 桂 勲
教 授 小原 雄治
助 教 授 藤澤 敏孝
教 授 高畑 尚之（総合研究大学院大学）

ABSTRACT

There are three common alleles (A, B, and O) at the human ABO blood group locus. The A and B alleles code for glycosyltransferases which transfer GalNAc and galactose, respectively, while O is a null allele incapable of coding for a functional glycosyltransferase. This difference of the glycosyltransferase activity between A and B is determined by the two amino acid substitutions in the downstream region of exon 7, and the same differences were observed for A and B alleles in non-human primates. Some kind of natural selection may be operating on this locus to maintain the polymorphism of A and B in primates. Therefore, it is interesting to determine the gene genealogy of this ABO gene, so as to see whether the parallel changes or ancestral polymorphism is responsible for the persistence of the ABO polymorphism in primates.

First I determined the nucleotide sequence of about 450bp region in exon 7 of 50 alleles for the following species; orangutan, agile gibbon, white-handed gibbon, siamang, Japanese macaque, moor macaque, Celebes crested macaque, barbary macaque, bonobo, gorilla, olive baboon, yellow baboon, and mantled baboon. Then I compared these results with the 64 published nucleotide sequence data of human, chimpanzee, gorilla, orangutan, rhesus macaque, crab-eating macaque, and yellow baboon. The phylogenetic network of this region was very complex, but in the macaques network, B type alleles of moor macaque was closely related to A type alleles of Celebes crested macaque rather than B type of Japanese, crab-eating, and rhesus macaque. In this case, B type allele was supposed to evolve in the moor macaque lineage independently from the lineage of Japanese, crab-eating, and rhesus macaque.

I then determined genomic nucleotide sequences of about 2kb region between ABO exon 5 to exon 7 of three species of gibbon (white-handed gibbon, agile gibbon, and siamang), bonobo, and gorilla, and also determined those of about 1.5kb region between exon 6 and exon 7 of orangutan, four species of macaque (Celebes crested macaque, moor macaque, barbary macaque, and Japanese macaque), and three species of baboon (yellow, olive, and mantled). I analyzed those newly determined sequences with other primate ABO blood group gene sequences.

The patterns of the variant sites in gibbon suggested that A and B alleles were already polymorphic in the ancestral species of white-handed and agile gibbons soon after speciation of siamang, and a recombination between these two alleles occurred before speciation of white-handed and agile gibbons. In the orangutan lineage, it is suggested that the gene introgression

occurred from the ancestral species of agile and white-handed gibbon, and the intragenic recombination or gene conversion event followed. I also found that in macaques, type B allele appeared both in the Japanese, crab-eating, and rhesus macaque lineages and in the Sulawesi macaque lineage independently. In the case of baboon, the relationship of A type and B type alleles was intermingled, suggesting the existence of ancestral polymorphism.

I also determined the sequence of the ABO intron 2 of the same genomic DNA samples of human, orangutan, agile gibbon, white-handed gibbon, siamang, Japanese macaque, Celebes crested macaque, barbary macaque, bonobo, gorilla, and olive baboon. The phylogenetic tree of this region was consistent with the species tree. This region is 5kb upstream of the ABO intron 5 region. So I can determine that the affected region of the gene introgression event between gibbon and orangutan may start between exon 3 and exon 6. The survival of a short fragment that introgressed from gibbon might have been influenced from the selection effect of the critical sites of A and B, because the region that survived in the orangutan lineage is tightly linked to critical sites.

The inconsistency between gene tree and species tree can occur as extensively studied for the human-chimpanzee-gorilla lineage. In this case the time between two speciation times was short, so ancestral polymorphism may cause this inconsistency. To resolve this for phylogenetic estimation, one must use multiple independent loci. In the case of gibbons and orangutan, I found the same problem as in the human-chimpanzee-gorilla relationship. There are 20 data sets that contain the orangutan and gibbon sequences and the orthologous ones for sequences in human and African apes in the DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Database, and 6 phylogenetic trees out of these 20 showed the trees inconsistent to the species tree. These inconsistent relationships may be caused by the ancestral polymorphism, the misplacement of the root, or the stochastic error based on short length. In some cases of these data sets, the length of sequence was too short to discuss the phylogenetic relationship between gibbon and orangutan to compare the ABO gene, and the amount of DNA data was not enough.

I therefore determined nucleotide sequences, those length are from 430bp to 1800bp, of mitochondrial DNA (16SrRNA) and five nuclear DNA genes (amelogenin X, amelogenin Y, N-formyl peptide receptor, FPR-like gene, and alpha-1,3-galactosyltransferase) using the genomic DNA samples of the same primate species used for the study of the ABO blood group gene. Mitochondrial DNA data suggested the separation of two orangutan subspecies (Bornean orangutan; *P. pygmaeus pygmaeus* and Sumatran orangutan; *P. p. abelii*). But three species of baboon were very similar to each

other not only for the ABO data but also for mitochondria and FPR1. In the case of baboon, the ancestral polymorphism was supported not only for the ABO blood group gene but also for the other regions of nuclear and mtDNA, so the effect of natural selection of ABO region is not clear from the result of baboon. In contrast, it is suggested by this study that the type changes between A and B occurred in the macaque lineage at least two times. In the case of human, chimpanzee and gorilla, the type change occurred more than once. Furthermore, in the gibbon lineage, the polymorphism of A and B was maintained more than 5 million years in ancestral species between agile and white-handed gibbons. These results suggest that the some kind of selection might act on the ABO locus.

The sequences newly determined and sequences retrieved from the DNA database are compatible with the species tree except for the region between exons 6 and 7 of the ABO blood group gene. Therefore, the region where the putative gene introgression event from ancestral gibbon to ancestral orangutan occurred can be narrowed to that DNA region of the orangutan genome. This result also suggests that some kind of selection might have acted in the ABO gene, especially in the critical sites. In conclusion, the existence of a Darwinian selection may be the reason why the evolutionary patterns of the ABO blood group gene is inconsistent with the species tree in various primate species.

ABO 式血液型を決定しているのは血球表面の糖鎖であり、その遺伝子は糖転移酵素によってコードされている。従来の研究において、ヒトの血液型 A と B における糖転移酵素活性の違いは、この遺伝子の第 7 エキソンに存在する 2 つのアミノ酸置換で決定されていることや、ヒト以外の霊長類においても同じ違いが A 型と B 型で存在することが知られている。しかしながら、たまたまこのような同じ塩基置換が進化の過程において独立に平行して生じたか、あるいは、霊長類においては A 型と B 型の多型現象を維持するようなある種の正の自然淘汰が働いているか等、霊長類におけるこの遺伝子の進化学的様相は謎に包まれたままであった。このため、本学位申請者は、ABO 型遺伝子の霊長類における進化学的様相を明らかにする目的で、この遺伝子の霊長類を中心とする分子系統関係を研究した。

まず申請者は、ABO 式血液型遺伝子の DNA 配列について、第 7 エキソン約 500bp の領域において既出の配列 64 本と、新たに決定したボノボ、ゴリラ、オランウータン、シロテテナガザル、アジルテナガザル、シアマン、ムーアザル、クロザル、ニホンザル、キイロヒヒ、マントヒヒ、アヌビスヒヒの 12 種計 50 本の対立遺伝子の配列を比較解析した。その結果、この領域の系統ネットワークが非常に複雑であり、第 7 エキシソンの限られた領域のみから進化過程を決定するのは困難であることを示した。また、マカクにおいてはムーアザルの B 型の配列が、同じスラウェシ島に分布するクロザルの A 型の配列と酷似しており、ニホンザル・カニクイザル・アカゲザルの B 型配列と比べると糖転移活性を決定する 2 つのアミノ酸サイト以外は似ていないことを明らかにして、ムーアザルの系統とニホンザル・カニクイザル・アカゲザルの系統で B 型が独自に生じた可能性を示した。

また、申請者は第 7 エキソン上流の領域の塩基配列についても、第 5 エキソンから第 7 エキソンまでの 2kb の領域をボノボ、ゴリラ、シロテテナガザル、アジルテナガザル、シアマンの 5 種で 16 配列決定し、第 6 エキソンから第 7 エキソンまでの 1.5kb の領域をムーアザル、クロザル、ニホンザル、キイロヒヒ、マントヒヒ、アヌビスヒヒの 6 種 18 配列を決定した。既に報告のあったヒトの配列とともに系統ネットワーク解析を行うことによって、霊長類の系統におけるこの遺伝子の進化過程を次のように明らかにした。まず、テナガザル 3 種においては、ABO 式血液型遺伝子の糖鎖の変異を規定する第 7 エキソン領域と、その上流の第 5、第 6 イントロン領域における塩基置換パターンが異なっていることを示すことによって、シロテテナガザルとアジルテナガザルの祖先集団において A 型と B 型遺伝子の多型が長い間種をこえて保存されてきた可能性を示唆した。さらに、シアマンとの種分化の時期と比較することで、遺伝子の分岐年代は約 600~800 万年前であると推定した。そしてその後生じた遺伝子内組み替えによって複雑なネットワークが得られた可能性の高いことを示した。

またオランウータンの DNA 配列は、通常の手法で系統樹を描いたとき、種系統樹とは異なりテナガザルとクラスターを作ることが明らかになった。そのブートストラップ確率は 100% であり、同様に申請者が解析を行った他の遺伝子座のデータとは全く異なっている。このため、この論理的帰結として、数百万年前に、テナガザルの系統からオラ

ンウータンの系統に遺伝子の移入が交雑によって生じた可能性を指摘した。このようなことが他の遺伝子でもどのくらいあてはまるのかを調べるために、DDBJデータベースからテナガザル、オランウータンとヒト・チンパンジー・ゴリラのDNA配列が報告されている20遺伝子座全てのデータを取得し、遺伝子系統樹を構築した。さらに、あらたにミトコンドリアDNAの16SrRNA全領域を含む1.6kbの塩基配列、性染色体上にあるアメロゲニン(AMGX及びAMGY)の第3イントロン約1.0kb、Nフォルミルペプチド受容体遺伝子とその近傍にあり配列に類似性の見られる遺伝子(FPR1とFPRL2)のコード領域1.0kb、およびABO式血液型遺伝子と同一の場所にマッピングされている α 1,3ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子コード領域約400bp、ABO式血液型の第7エキソンから約5kb離れた第2イントロン約700bpの7遺伝子領域についてそれぞれDNA配列を決定した。その結果、これら27遺伝子領域ともに、オランウータンがヒト・チンパンジー・ゴリラの系統に近いという通常の系統パターンから大きくはずれてはいなかった。このことから、遺伝子移入の痕跡が、ABO式血液型の第5イントロン～第7エキソンという限局したDNA領域にのみ残っていることを示した。このことから申請者はABO式血液型遺伝子の糖転移活性決定部位領域のみが遺伝子移入後オランウータンの系統で生き残るような正の自然淘汰が存在する可能性を指摘した。

そのほかにも、申請者は旧世界猿のマカク類及びヒヒ類においてもABO式血液型遺伝子の解析を行った結果、マカクの系統においてはA型とB型の間の型の変換が複数回生じていることを明らかにした。さらに、ヒヒの系統においては非常に複雑なネットワークが得られており、これもまたABO式血液型遺伝子座に正の自然淘汰が働いた可能性があることを指摘した。

このような申請者のABO式血液型遺伝子に関する分子系統学的研究は、オランウータンやテナガザル等の霊長類において、新しい数多くのこの遺伝子のDNA配列データを自身で決定しただけでなく、この遺伝子のもつ進化的様相や遺伝的多型の起源を明らかにした業績は高く評価されるものである。よって、本論文の内容は、申請者の研究能力を十分に反映しており、関係分野における貢献も十分と考えられることから、遺伝学専攻の博士論文としての条件を満たすものであると審査委員会委員で判断した。