

海洋哺乳动物尿素转运蛋白关键基因 ——*SLC14A2* 的分子进化

曾 帆, 吴田振, 于振朋, 孙林霞, 郭天慧

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 趋同进化是进化生物学中的核心科学问题. 独立起源的海洋哺乳动物不同类群为了适应高渗的海洋环境, 产生了趋同的渗透调节适应机制, 能够产生高度浓缩的尿液. 本研究选取了编码尿素转运蛋白的 *SLC14A2* 基因为候选基因, 进化分析发现该基因在海洋哺乳动物中发生了显著的加速进化, 鉴定到 4 个正选择位点 (35、463、592、598) 至少被两种最大似然法 (maximum likelihood, ML) 方法检测到, 且这些位点位于或临近重要的结构域, 表明海洋哺乳动物可能通过增强肾脏对尿素的主动运输功能从而产生高度浓缩的尿液, 与先前的生理研究结果一致. 特别重要的是, 在海洋哺乳动物不同类群间鉴定了 6 个平行/趋同进化位点, 进一步为海洋哺乳动物产生高度浓缩的尿液以适应海洋环境提供趋同的分子证据. 另外, 正选择主要集中在鲸类进化谱系, 可能与鲸类完全营水生生活面临更大的渗透调节的压力有关. 本研究通过对 *SLC14A2* 基因的进化分析初步揭示了海洋哺乳动物为了适应高渗的海洋环境产生高度浓缩的尿液提供了趋同的分子机制.

[关键词] 海洋哺乳动物, 渗透调节, *SLC14A2* 基因, 正选择

[中图分类号] Q951+.3 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2022)03-0079-08

Molecular Evolution of *SLC14A2*, a Key Gene for Urea Transporters in Marine Mammals

Zeng Fan, Wu Tianzhen, Yu Zhenpeng, Sun Linxia, Guo Tianhui

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for
Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: Convergence evolution is the core scientific issue in evolutionary biology. In order to adapt to the hyperosmotic marine environment, independent-originated-marine mammals have evolved the convergent osmoregulation mechanism through producing highly concentrated urine. In this study, the *SLC14A2* gene encoding urea transporter was used as a candidate gene for evolutionary analysis. The results revealed that this gene has undergone significant accelerated evolution in marine mammals. Four positively selected sites (35, 463, 592, 598) were detected by at least two maximum likelihood (ML) methods, and these sites were located or near important functional domains. It indicates that marine mammals may produce highly concentrated urine from enhancing the active transport of urea by kidneys, which is consistent with what has been found in the previous physiological studies. Especially, the study identified 6 parallel/convergent evolutionary sites among different groups of marine mammals, which has provided convergent evidence of marine mammals producing highly concentrated urine to adapt to the marine environment at the molecular level. In addition, the positive selection is mainly focused on the evolutionary lineage of cetaceans, which may be related to cetaceans faced greater osmotic pressure than other marine mammals because cetaceans have adapted to fully aquatic life. In this study, the evolutionary analysis of the *SLC14A2* gene in marine mammals provides a convergent molecular mechanism of marine mammals to produce highly concentrated urine for adapting to the hypertonic marine environment.

Key words: marine mammals, osmoregulation, *SLC14A2* gene, positive selection

收稿日期: 2021-06-21.

基金项目: 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目 (JBCS[2021]034)、江苏省农业重大新品种创制项目 (PZC201744).

通讯作者: 郭天慧, 实验师, 研究方向: 哺乳动物适应性进化. E-mail: guotianhui@njnu.edu.cn

趋同进化(convergent evolution)是进化生物学的研究热点,是指亲缘关系较远的物种在自然选择的作用下,为了适应相似的生境而产生的相同或相似的表型、生理以及行为特征^[1]. 尽管自然界中趋同进化的例子很多,但是趋同进化的分子机制研究还很少. 大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)和小熊猫(*Ailurus fulgens styani*),亲缘关系较远,通过基因组的测定,鉴定了多个与肢体发育和蛋白消化相关的基因出现趋同信号,为大、小熊猫演化出趋同的食竹食性以及具有抓握竹子的伪拇指提供了分子证据^[2-3]. 蝙蝠和海豚在系统发生树上相距甚远,但均演化出回声定位的能力,是趋同进化的又一典型,近些年鉴定了与听觉相关的基因在二者之间具有平行/趋同进化位点,且在 *Perestin* 基因的系统发育树中聚在一起,为二者趋同进化提供了很强的分子证据^[4-5].

海洋哺乳动物(marine mammals),也称为“海兽”,是哺乳动物中进化十分独特的类群,它们由不同的陆生祖先分别从陆地重返海洋,亲缘关系较远,但为了适应海洋环境,进化出一系列趋同的表型和生理特征,是研究趋同进化的理想模型. 它们都拥有与鱼类类似的流线型体型以减少在水中游动时的阻力^[6];皮下脂肪层增厚用以保持体温,减少温度散失;渗透调节能力增强用以适应高渗的海洋环境;储氧能力提高用以增加在水中的屏息时长^[7];骨密度的变化用以适应不同的潜水深度^[8]. 除此以外,海洋哺乳动物普遍发生了味觉和嗅觉的丧失^[9];鲸类和海牛发生了毛发的缺失^[10],为趋同进化的研究提供了理想的模型.

渗透调节是生境转换后海洋哺乳动物共同面临的一个最主要的挑战. 形态学研究表明,许多海洋哺乳动物的肾脏演化出复肾结构,如鲸类、鳍足类、北极熊和水獭拥有数十甚至上千个小肾,且每一个小肾在形态结构和生理作用上都相当于陆生哺乳动物的独立肾,以此增加了肾脏的表面积,提高了肾脏的排泄能力,为海洋哺乳动物形成高浓度的浓缩尿提供了前提. 其中,完全营水生生活的鲸类的肾最为特殊,呈葡萄状,小肾数目在种间差别很大,体型较大的须鲸可达 6 000~7 000 个^[11-12],而体型较小的淡水豚类小肾一般仅有 65~170 个^[13]. 前人研究发现鲸类尿液的渗透浓度以及 Na^+ 浓度均显著高于大小与之相近或比之大的陆生哺乳动物,如鲸类尿液中尿素浓度比牛高 4 倍^[14],提示鲸类通过排高度浓缩的尿液以调节水盐平衡. 然而,海洋哺乳动物渗透调节的分子机制的研究才刚刚开始. 研究发现肾脏中与渗透调节相关的基因在海洋哺乳动物中出现了高表达的现象^[15],进一步为海洋哺乳动物具有高效的水盐调节提供了分子证据. Xu 等发现许多与渗透调节相关的基因在鲸类谱系中显著受正选择作用,如水通道蛋白 2(aquaporin2, AQP2)和尿素转运蛋白(urea transporters, UTA)编码基因 *SLC14A2* 显著受到正选择,提示鲸类可能通过增强对水和尿素的转运以产生高浓缩的尿液,以此适应高渗的海洋环境,进一步证实鲸类产生浓缩尿是维持体内水平衡的一个有效机制. 水盐调节系统——肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)中两个关键的成员管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)和管紧张素原(angiotensinogen, AGT)鉴定到多个正选择位点,特别是长江江豚中多个基因受正选择,提示鲸类水盐调节系统是维持渗透调节的又一重要机制^[16-17].

尿素转运蛋白(Urea transporters)是特异性转运尿素的膜转运蛋白,对机体的渗透调节起着关键性的作用^[18]. 其中,UT-A 是目前已克隆出的尿素转运蛋白亚家族之一,共 6 个成员(UT-A1 至 UT-A6),由同一基因 *SLC14A2* 编码并经过不同的启动子启动转录后剪接形成. 在 UT-A 亚家族的成员中,UT-A1、UT-A2、UT-A3 和 UT-A4 均在肾脏中表达,且 *SLC14A2* 基因敲除后尿素转运蛋白表达缺陷的小鼠表现出严重的尿素浓缩功能缺陷,说明此基因在机体渗透调节过程中发挥了及其重要的作用^[19-20]. 鲸类中该基因显著受正选择,提示鲸类通过提高尿素转运能力,从而增强了机体的水盐调节功能. 然而,该基因在其他海洋哺乳动物中的进化以及是否与鲸类一样具有趋同的排高浓缩尿液的渗透调节机制尚不清楚. 据此,本研究下载了 73 个哺乳动物的 *SLC14A2* 基因,运用比较基因组学方法探讨了以下科学问题:(1)渗透调节基因 *SLC14A2* 在海洋哺乳动物不同类群中是否受到相似的选择压力?(2)海洋哺乳动物间是否具有尿素转运的趋同分子机制?

1 材料与方法

1.1 *SLC14A2* 基因序列数据

本研究在哺乳动物中选取了 73 个物种,涵盖了 15 个目,其中海洋哺乳动物包括鲸类 25 个代表性物种,鳍足类 6 个物种以及海牛类的 1 个物种(海牛). *SLC14A2* 基因序列是在 NCBI 数据库和 OrthoMaM

(Orthologous Mammalian Markers, <http://orthomam2.mbb.univ-montp2.fr/OrthoMaM>) 数据库中下载得到. 对于基因组尚未注释的物种,通过本地 BLAST,最终获得了 73 个哺乳动物 *SLC14A2* 基因的序列. 由于本地 BLAST 可能会造成相邻外显子拼接处存在非 3 倍数碱基的插入或缺失,所以采用了一系列针对于存在移码突变的序列比对方法,运用 Macse 软件中的 AlignSequence、Exportalignment 程序、Hmmer 程序、Prank 程序以及 Gblocks 程序,确定获得序列为同源序列^[21-23].

1.2 选择压力分析

氨基酸的非同义替代(non-synonymous substitution rate, d_N)与同义替代(synonymous substitution rate, d_S)的比值 $\omega(d_N/d_S)$ 常用作选择压力(selective pressure)的检测指标(Kimura, 1979). 如果 $\omega = 1$ 为中性选择(neutral selection); $\omega > 1$ 为正选择(positive selection); $\omega < 1$ 为纯化选择(negative selection). 由于影响功能基因的选择作用往往都只是发生在一些特定的支系的特定位点上,因此,为了检测海洋哺乳动物进化过程中经历了怎样的选择压力,本研究采用了基于密码子的最大似然法(maximum likelihood, ML)的 PAML4.7 软件包中的 codeML 程序,检测特定支系或者位点上所受的选择压力^[24].

首先,仅针对 33 种海洋哺乳动物 *SLC14A2* 基因序列的数据集,运用位点模型(site model)中的三对模型(M7 vs M8、M8 vs M8a 和 M1a vs M2a)检测正选择位点. 运用似然率检测法(likelihood ratio tests, LRTs)评估两个模型之间是否存在显著差异,计算 $2\Delta L$ 值与自由度之间的卡方分布情况,若 P 值 < 0.05 ,则认为两个模型之间存在显著差异. 利用经验贝叶斯(bayes empirical bayes, BEB)方法计算 M8 和 M2a 模型中的正选择位点的后验概率(Posterior probability),如果后验概率 ≥ 0.8 ,即认为该位点是潜在的正选择位点^[25]. 另外,使用在线网站 Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>)中的固定效应似然法(fixed effects likelihood, FEL)进一步检测正选择位点,设置 FEL 显著性水平小于 0.2^[26]. 同时被两种 ML 方法检测的位点,为强烈的正选择位点.

其次,在所有哺乳动物 73 个物种的 *SLC14A2* 基因序列的数据集中,选择分支模型(branch model)和支位点模型(branch-site model)进一步探究正选择作用是否局限于某些特定的进化谱系. 分支模型主要包括 free ratio 模型和 two ratio 模型. Free ratio 模型允许系统发育树上每一个进化谱系具有不同的 ω 值,而 Two ratio 模型允许前景支(即所感兴趣的支系)与背景支之间存在不同的 ω 值. 运用 LRT 分别检测 Free ratio 和 Two ratio 模型与零假设 one ratio 模型(即假设系统发生树上所有支系具有相同的 ω 值)是否差异显著. 如果模型显著,则通过 Free ratio 检测 $\omega > 1$ 的正选择支系,运用 Two ratio 模型检测前景支海洋哺乳动物是否出现加速进化. 此外,进一步运用更加严格的分支位点模型(Ma)分析,该模型允许在特定支上的每一个位点都有独立的 ω 值,将进化谱系分为前景枝(foreground, 即感兴趣的枝系)和背景枝(background),使用 LRT 对备择假设 Ma(正选择模型: $0 < \omega_0 < 1, \omega_1 > 1$ 和 $\omega_2 \geq 1$)和零假设 Ma0(中性模型: $0 < \omega_0 < 1, \omega_1 = 1$ 和 $\omega_2 = 1$)进行比较. 当成对模型(Ma vs Ma0)差异显著且 $\omega > 1$ 时,接受正选择模型 Ma,且所检测的位点 $P > 0.8$ 时,被认为是强烈的正选择位点. 衡量枝位点模型显著性的 P 值则通过多重检验错误发现率(false discovery rate, FDR)予以矫正,校正后的 $P < 0.05$ 时则为模型显著.

1.3 海洋哺乳动物 *SLC14A2* 基因平行/趋同位点检测

为了验证海洋哺乳动物在二次入水过程中,是否发生了趋同进化,本研究使用 PAMLv4.7 中 Codeml 程序对每个基因进行祖先序列重建. 通过对海洋哺乳动物各枝系中尿素转运蛋白氨基酸的序列分析,寻找趋同氨基酸替代,得到海洋哺乳动物支系间从祖先到现生氨基酸变化. 根据预测的祖先位点的差异,编码区基因序列的氨基酸替换事件分为平行替换和趋同替换两种模式. 如果两个进化枝具有相同的祖先氨基酸状态,并衍生出相同的现生氨基酸,便认为该位点为平行替换位点;反之,如果两个进化枝具有不同的祖先氨基酸状态,并衍生出相同的现生氨基酸,则为趋同替换位点,这两种模式都被认为是海洋哺乳动物趋同进化的证据. 考虑到偶然氨基酸替代引起的干扰,本研究在 JTT-fgen 氨基酸替换模型下进行统计检验,比较实际观察到的趋同位点数目与随机期望出现的趋同位点数. 若观测值大于期望值,则认为存在氨基酸趋同或平行替换;反之,则不存在^[27].

1.4 蛋白质三维结构

位于关键区域的氨基酸改变可能会通过影响构型,进而对蛋白质的功能产生影响. 为深入探究这些正选择位点是否位于重要的功能域,本研究使用印太瓶鼻海豚(*Tursiops aduncus*) *SLC14A2* 基因的核苷酸

序列在 I-TASSER 网站上 (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 进行了蛋白三维结构的预测, 并将检测到的正选择位点用 PyMOL 软件 (<http://pymol.sourceforge.net/>) 定位到了其空间结构中. 使用 uniprot 网站 (<http://www.uniprot.org/>) 查阅获取更多功能域的信息.

2 结果与讨论

2.1 选择压力分析

首先,运用位点模型对 33 个海洋哺乳动物数据集进行选择压力分析,LRTs 结果显示在 *SLC14A2* 基因中正选择模型 M8 显著优于中性模型 M7 和 M8a ($P<0.001$), 且 $\omega=1.955$, 提示这个基因显著受正选择作用. 然后,在 M8 模型中,使用 BEB 方法在 *SLC14A2* 基因中鉴定到了 9 个显著受到正选择的位点(35、462、463、467、468、469、470、512、741)且后验概率均大于 0.8. 位点模型中的 M1a vs. M2a 较 M8 vs. M8a 模型所得到的结果更为稳定,因此又使用前者进一步检测,结果表明 M2a($\omega=6.517$)模型明显优于 M1a 模型($P<0.001$),并鉴定了 2 个正选择的位点(35、463),这两个位点同时也被 M8 模型鉴定到(表 1). 另外,进一步使用 DataMonkey 中的 FEL 模型鉴定了 4 个正选择位点(35、90、276、735). 综合以上 3 种 ML 方法,共有 2 个位点(35、463)至少被两种以上 ML 方法鉴定到,认为是强烈的正选择位点(表 1).

其次,为了检测 *SLC14A2* 基因受到的正选择是否局限于特定的进化谱系,在所有哺乳动物谱系 73 个物种中,LRT 检测发现 free ratio 模型显著优于 one ratio 模型 ($P<0.001$),且在鲸类的多个支系中检测到显著的正选择信号,即须鲸类的共同祖先支、瓶鼻海豚和印太瓶鼻海豚最近共同祖先以及鼠海豚和小头鼠海豚共同祖先($\omega>1, P<0.001$),而在其他海洋哺乳动物类群以及陆生哺乳动物中均没有鉴定出显著的正选择. 另外,以 32 种海洋哺乳动物作为前景支($\omega=0.17211$),其他陆生哺乳动物为背景支($\omega=0.13012$),运用 two ratio 模型检测发现 *SLC14A2* 基因在海洋哺乳动物支系具有显著的加速进化($P<0.001$)(图 1).

由于分支模型和位点模型并不能同时考虑位点和支系发生的正选择作用,因此进一步采用了更为严格的支位点模型检测选择压力. 结果在小须鲸鉴定到显著的正选择,且鉴定了 2 个显著的正选择位点(592、598,表 1). 综合 M8、M2a、FEL 以及支位点模型的方法,共有 4 个正选择位点(35、463、592、598)被认为是强烈的正选择位点.

表 1 在海洋哺乳动物中用两种 ML 方法检测到的正选择位点
Table 1 Positively selected sites detected using two maximum likelihood (ML) methods across cetacean phylogeny

gene	model	-lnL	2ΔLn L	Model compare	P value	ω values	Positively selected sites(P>80%)
<i>SLC14A2</i> (930aa)	Dataset I All marine mammals(33 sequences)						
	Site model						
	M8a	10 414.337 571				1.000 00	
	M8	10 408.563 693	11.547 76	M8 vs M8a	$P<0.001$	1.955 43	35 、462、 463 、467、468、469、470、512、741
	M7	10 431.936 113	46.744 84	M8 vs M7	$P<0.001$		
	M1a	10 414.496 711				1.000 00	
	M2a	10 406.141 82	16.709 78	M2a vs M1a	$P<0.001$	6.516 58	35 、 463
	Datamonkey:FEL model					$P<0.1$	35 、90、276、735
	Dataset II:marine and their relatives(38 sequences)						
	Branch site model						
Terminal branch of <i>Balaenoptera acutorostrata</i>							
	Null	-13 337.487 570				1.000 00	
	Alternative	-13 332.976 387	9.022 366	Ma vs Ma0	$P=0.002 667$	374.540 24	592、598

注:被两种 ML 方法检测到的正选择位点加粗表示.

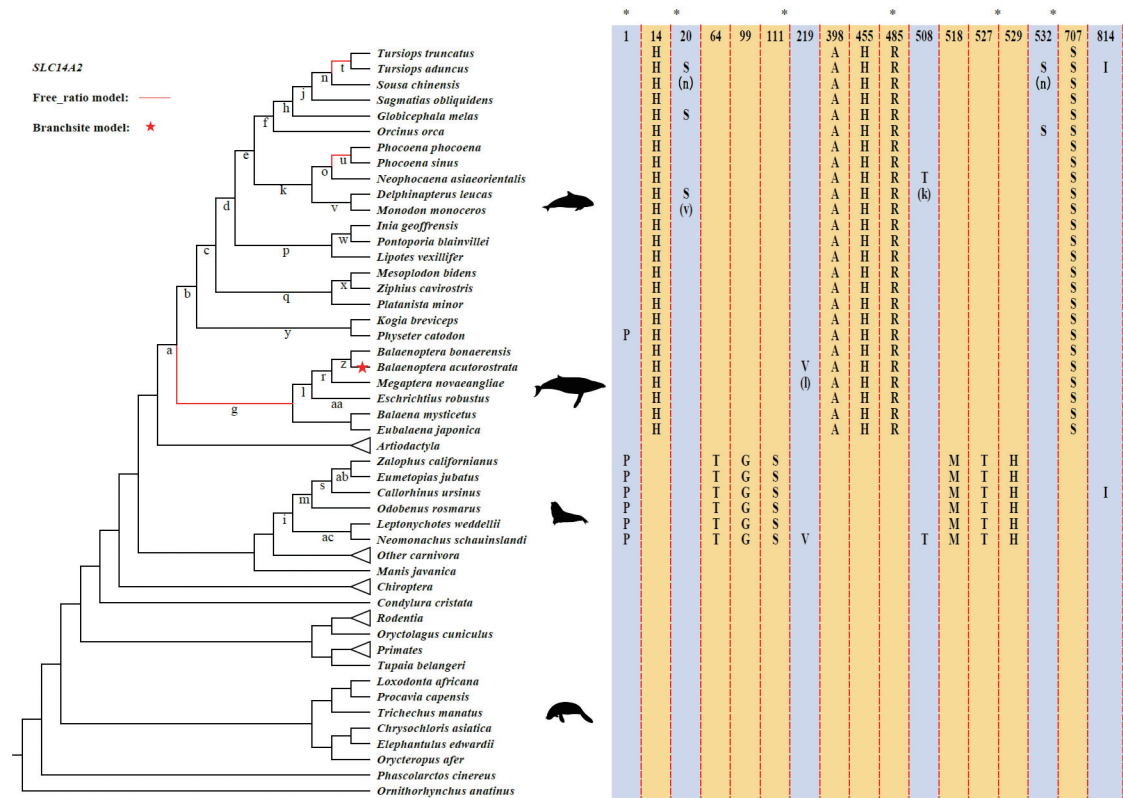
2.2 海洋哺乳动物 *SLC14A2* 基因特异氨基酸突变位点和平行/趋同进化分析

为了探究海洋哺乳动物适应高渗的海洋环境是否进化出了特异位点,对 *SLC14A2* 基因进行扫描后发现海洋哺乳动物具有 11 个特异的氨基酸突变位点. 其中,鲸类具有 5 个特异突变位点(Y14H、T398A、L455H、Q485R、A707S); 鳍足类具有 6 个特异突变位点(G64T、S99G、T111S、K518M、A527T、S529H,图 1),其中第 398、707 位氨基酸位于尿素转运蛋白的跨膜结构域中,提示海洋哺乳动物可能通过尿素转运蛋白

特异的氨基酸突变,提高机体在高渗环境下的适应能力。

进一步检测 *SLC14A2* 基因在海洋哺乳动物类群间是否存在趋同的分子机制,重建了该基因的祖先序列,并进行非同义平行/趋同氨基酸位点检测,鉴定了 6 个平行替换位点在海洋哺乳动物类群间表现出显著的趋同进化信号。如图 1 所示,在鲸类谱系中鉴定了 2 个平行替换位点(L20S、R532S),如在 20 位氨基酸位点处具有一个平行氨基酸替代,中华白海豚的最近共同祖先支(n)与白鲸和一角鲸最近共同祖先支(v)均为丝氨酸(S),而其他哺乳动物支系均为亮氨酸(L)。在鲸类和鳍足类两个海洋哺乳动物类群中共鉴定了 4 个平行替换位点(H1P、A219V、L508T、H814I),例如在第 1 位氨基酸位点处具有一个平行氨基酸替代,本研究使用的鳍足类所有物种和抹香鲸(*Physeter catodon*)支系均为 P,而其他哺乳动物物种此位点为 H;在 219 位点处,小须鲸(*Balaenoptera acutorostrata*)和夏威夷僧海豹(*Neomonachus schauinslandi*)鉴定了 1 个平行氨基酸替代(A219V)。这些位点经过 JTT-fgen 氨基酸替换模型统计检验,观测值大于期望值,表明检测到的位点是可靠的平行/趋同氨基酸替代位点。

不同海洋哺乳动物类群之间鉴定到的平行/趋同氨基酸提示为了适应共同的高渗环境海洋哺乳动物可能进化出了趋同的尿素转运机制,其中第 219 和 814 位氨基酸位点位于尿素转运蛋白重要的跨膜结构域,因此海洋哺乳动物可能通过跨膜结构域的改变,增强了对尿素的转运能力,从而对机体的水盐平衡进行调控。



Free-ratio 和支位点模型鉴定的正选择分别用红线和红五星标注。右侧为 *SLC14A2* 基因在海洋哺乳动物中检测到的特异氨基酸位点(黄色)和平行/趋同位点(蓝色)。字母表示祖先枝。作为外群的陆生哺乳动物包括鲸偶蹄目、食肉目、啮齿目等。

图 1 Free-ratio 和支位点模型鉴定的海洋哺乳动物 *SLC14A2* 基因的正选择
Fig. 1 Evidence of positive selection across the phylogeny of marine mammals identified by free-ratio and branch-site models in *SLC14A2* gene

2.3 *SLC14A2* 基因三维结构分析

印太瓶鼻海豚(*T. aduncus*)的 *SLC14A2* 基因核苷酸序列在 I-TASSER 网站上(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)进行了蛋白三维结构的预测,并运用 PyMOL 软件(<http://pymol.sourceforge.net/>)将强烈正选择位点和重要的特异氨基酸突变定位到 3D 结构中(图 2)。这些位点大多位于重要的结构域或结构域附近,如第 463 位正选择位点位于蛋白激酶 C 的磷酸化位点 S490 附近;第 35 位正选择位点位于蛋白的极性氨基酸(polar amino acid)区域,此区域使得此段蛋白稳定位于膜外,同时此位点也与蛋白激酶 C

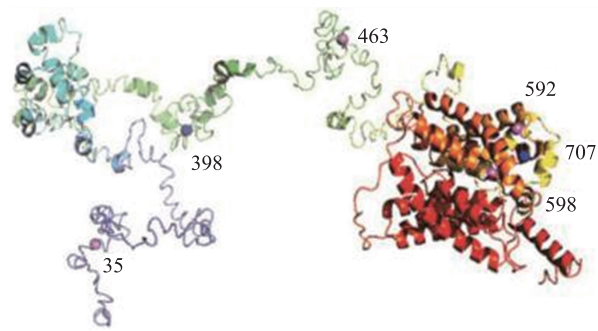
的磷酸化位点 S26 邻近^[28],提示正选择位点可能与蛋白尿素转运功能相关.另外,第 398、707 位特异的氨基酸位点存在于蛋白重要的跨膜结构域.跨膜结构域的改变通常与通道蛋白开放时间和转运效率密切相联系^[29-30].因此海洋哺乳动物可能通过跨膜结构域的改变,增强了对尿素的转运能力,从而对机体的水盐平衡进行调控.

3 结论

趋同进化是进化生物学中的核心科学问题.海洋哺乳动物不同类群是独立起源的,由不同的陆生祖先演化而来,亲缘关系相距甚远.但是,为了适应高渗的海洋环境,海洋哺乳动物产生了趋同的渗透调节适应机制,具有很强的排盐保水能力,且能够产生高度浓缩的尿液.先前的解剖学证据表明海洋哺乳动物具有复肾结构,通过增加肾脏表面积以提高肾脏的排泄能力^[11-12],为海洋哺乳动物形成高浓度的浓缩尿提供了前提.本研究发现尿素转运基因——*SLC14A2* 在海洋哺乳动物发生了显著的加速进化($P<0.001$),且有 2 个正选择位点至少被两种 ML 方法检测到,这两个氨基酸位点都位于蛋白激酶 C 的磷酸化位点附近,推测与蛋白尿素转运功能相关.因为高渗透的内环境主要通过蛋白激酶 C 介导增加 UT-A1 和 UT-A1A3 的磷酸化,从而增强尿素的转运,且已有研究证实敲除 *SLC14A2* 基因则出现不能浓缩尿液的生理缺陷^[19].因此本研究在海洋哺乳动物中鉴定的加速进化和正选择,提示可能增强了尿素转运能力从而维持了极高的渗透压以浓缩尿液,为海洋哺乳动物产生高浓缩尿液提供了分子证据.另外,本研究通过对 73 个物种的 *SLC14A2* 基因进行比较,在鲸类和鳍足类中共鉴定出 11 个特异的氨基酸位点,其中 2 个氨基酸位于蛋白质重要的功能结构域,提示海洋哺乳动物可能通过这些氨基酸突变使尿素转运蛋白功能发生适应性的改变,从而增强尿素转运能力以适应高渗的海洋环境.特别重要的是,在海洋哺乳动物三个类群间鉴定了 6 个平行/趋同进化位点,且其中两个位点位于蛋白质的跨膜结构域中,有研究表明跨膜结构域中单个氨基酸的改变即可改变通道蛋白的动力学和渗透特性^[29-30].因此,推测海洋哺乳动物可能通过改变跨膜结构域的三维结构进而影响通道蛋白打开的时间和尿素转运的效率,进一步为海洋哺乳动物尿素转运蛋白在渗透调节中发挥重要功能以产生高度浓缩的尿液提供趋同的分子证据.

特别需要指出的是,用 free-ratio 模型和更严格的支位点模型鉴定的正选择均发生在鲸类谱系,可能与鲸类完全营水生生活面临较强的渗透调节压力有关.之前生理学研究表明,鲸类尿液中尿素浓度比其近缘的陆生哺乳动物——牛高 4 倍^[14],说明鲸类通过排高度浓缩的尿液以调节水盐平衡.鲸类 *SLC14A2* 显著的正选择进一步证实鲸类通过增强尿素转运以产生高度浓缩的尿液.另外,比较基因组和转录组学也在长江淡水江豚和海生江豚中分别鉴定了与尿素转运蛋白 *SLC14A2*、ACE 相关基因的特异的 SNP,且发现两类江豚存在 *SLC14A2* 基因的表达差异,进一步为海生江豚产生高浓缩尿液(东亚江豚尿液: (74.96 ± 20.06) mmol/L;长江江豚 (40.7 ± 15.78) mmol/L)提供了分子证据^[17].先前研究已经证实水通道蛋白 AQP2 在鲸类中显著受正选择,AQP2 基因的表达定位于肾脏的集合管,通过主动运输对水分进行重吸收,该基因显著的正选择提示鲸类可能通过增强水通道蛋白的功能而增强集合管对水的重吸收的能力,进一步为产生高度浓缩尿液提供了分子证据.渗透调节是一个综合调控的过程,肾素—血管紧张素—醛固酮系统(RAAS)在哺乳动物水盐代谢调节中起重要作用.该系统关键基因血管紧张素转化酶 ACE 和血管紧张素原 AGT 在多个研究中均证实鲸类谱系显著受正选择^[16-17],表明鲸类可能还通过 RAAS 调节系统更高效地维持鲸类的水盐平衡.

综上,本研究通过对尿素转运蛋白编码基因 *SLC14A2* 在海洋哺乳动物中的进化分析,揭示海洋哺乳动物 *SLC14A2* 基因的进化与渗透调节机制的关系.分析结果表明海洋哺乳动物类群间 *SLC14A2* 基因的加速进化、正选择位点以及平行/趋同位点的鉴定,均为海洋哺乳动物趋同的产生高度浓缩尿液以保水提供了分子证据.另外,正选择主要集中在鲸类进化谱系,可能与鲸类完全营水生生活面临更大的渗透调节的



强烈正选择位点和位于跨膜结构域的特异氨基酸位点分别用紫色和蓝色圆球表示.

图 2 SLC14A2 蛋白质三维结构

Fig. 2 The three-dimensional structure of the SLC14A2 protein

压力有关. 当然,*SLC14A2* 基因在海洋哺乳动物中渗透调节的具体功能,将来还需要进一步的功能验证,以揭示该基因与渗透调节的关系.

[参考文献]

- [1] STORZ J F. Causes of molecular convergence and parallelism in protein evolution[J]. Nature reviews genetics,2016,17(4) : 239–250.
- [2] HU Y, WU Q, MA S, et al. Comparative genomics reveals convergent evolution between the bamboo-eating giant and red pandas[J]. Proceedings of the national academy of sciences,2017,114(5) :1081–1086.
- [3] 黄小富,张泽钧. 大熊猫与小熊猫生态习性的比较:食物、体型大小及系统发育的影响[J]. 四川动物,2008,27(4) : 212–217.
- [4] LI Y, LIU Z, SHI P, et al. The hearing gene Prestin unites echolocating bats and whales[J]. Current biology,2010,20(2) : 55–56.
- [5] KETTEN D R, SIMMONS J A, HUBBARD A E, et al. Dolphin and bat sonar: Convergence, divergence, or parallelism[J]. Journal of the acoustical society of America,2004,115(5) :2517–2517.
- [6] ZHOU X M, SEIM I, GLADYSHEV V N, et al. Convergent evolution of marine mammals is associated with distinct substitutions in common genes[J]. Scientific reports,2015,5(1) :16550–16550.
- [7] TIAN R, WANG ZF, NIU X, et al. Evolutionary genetics of hypoxia tolerance in cetaceans during diving[J]. Genome biology and evolution,2016,8(3) :827–839.
- [8] FOOTE A D, LIU Y, THOMAS G W, et al. Convergent evolution of the genomes of marine mammals[J]. Nature genetics, 2015,47(3) :272–275.
- [9] ZHU K L, ZHOU X M, XU S X, et al. The loss of taste genes in cetaceans[J]. BMC evolutionary biology,2014,14(1) :218.
- [10] SUN X H, ZHANG Z Z, SUN Y Y, et al. Comparative genomics analyses of alpha-keratins reveal insights into evolutionary adaptation of marine mammals[J]. Frontiers in zoology,2017,14(1) :1–8.
- [11] 陈万青. 海洋哺乳动物[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1992.
- [12] 王京真,于学颖,郭爱环,等. 鲸豚类的渗透调节研究进展[J]. 兽类学报,2012,32(2) :156–167.
- [13] 刘仁俊,哈里森 R J. 江豚皮肤的超微结构及其与其它豚类的比较[J]. 水生生物学报,1986,10(1) :105–106.
- [14] BIRUKAWA N, ANDO H, GOTO M, et al. Plasma and urine levels of electrolytes, urea and steroid hormones involved in osmoregulation of cetaceans[J]. Zoological science,2005,22(11) :1245–1257.
- [15] ORTIZ R M. Osmoregulation in marine mammals[J]. Journal of experimental biology,2001,204(Pt 11) :1831–1844.
- [16] XU S X, YANG Y X, ZHOU X M, et al. Adaptive evolution of the osmoregulation-related genes in cetaceans during secondary aquatic adaptation[J]. BMC evolutionary biology,2013,13(1) :189–189.
- [17] ZHOU X M, GUANG X M, SUN D, et al. Population genomics of finless porpoises reveal an incipient cetacean species adapted to freshwater[J]. Nature communications,2018,9(1) :1276.
- [18] 杨宝学. 尿素通道蛋白的分子生物学和药理学研究[C]//全国生化与分子药理学学术论文集. 山东:全国生化与分子药理学学术会议,2013.
- [19] FENTON R A, HOWORTH A, COOPER G J, et al. Molecular characterization of a novel UT-A urea transporter isoform (UT-A5) in testis[J]. American journal of physiology-cell physiology,2000,279(5) :1425–1431.
- [20] SANDS J M, NONOGUCHI H, KNEPPER M A, et al. Vasopressin effects on urea and H₂O transport in inner medullary collecting duct subsegments[J]. American journal of physiology-renal physiology,1987,253(5) :823–832.
- [21] FRANCO A, POUJOL R, BAURAIN D, et al. Evaluating the usefulness of alignment filtering methods to reduce the impact of errors on evolutionary inferences[J]. BMC evolutionary biology,2019,19(1) :21.
- [22] RANWEZ V, DOUZERY E J P, CAMBON C, et al. MACSE v2: toolkit for the alignment of coding sequences accounting for frameshifts and stop codons[J]. Molecular biology and evolution,2018,35(10) :2582–2584.
- [23] TALAVERA G, CASTRESANA J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments[J]. Systematic biology,2007,56(4) :564–577.
- [24] YANG Z H. PAML4: phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. Molecular biology and evolution,2007,24(8) :1586–1591.
- [25] YANG Z H, WONG W S, NIELSEN R. Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection[J].

- Molecular biology and evolution,2005,22(4):1107–1118.
- [26] POND S L, FROST S D. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments[J]. Bioinformatics, 2005, 21(10): 2531–2533.
- [27] ZOU Z T, ZHANG J Z. Are convergent and parallel amino acid substitutions in protein evolution more prevalent than neutral expectations[J]. Molecular biology and evolution, 2015, 32(8): 2085–2096.
- [28] SHAYAKUL C, HEDUGER M A. The SLC14 gene family of urea transporters[J]. European journal of physiology, 2004, 447(5): 603–609.
- [29] LONG L E, CHESWORTH R, HUANG X, et al. Transmembrane domain Nrg1 mutant mice show altered susceptibility to the neurobehavioural actions of repeated THC exposure in adolescence[J]. The international journal of neuropsychopharmacology, 2013, 16(1): 163–175.
- [30] ZHANG Z R, MCDONOUGH S I, MCCARTY N A. Interaction between permeation and gating in a putative pore domain mutant in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator[J]. Biophysical journal, 2000, 79(1): 298–313.

[责任编辑:黄 敏]