

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340095

研究課題名(和文) 日本南西諸島に分布するホンハブの島嶼環境適応の検証

研究課題名(英文) Verification of the insular adaptation of *Protobothrops flavoviridis* (Hon habu) distributed in the southwestern islands of Japan.

研究代表者

千々岩 崇仁 (CHIJIWA, TAKAHITO)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：30331060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄本島で土壌などの棲息環境が互いに独立している国頭村と糸満市で捕獲したハブについて、ホスホリパーゼA2 (PLA2) を中心とした毒アイソザイムの組成と一次構造を比較した。その結果、沖縄島ハブ固有の毒アイソザイムの組成や一次構造は共通していたが、地域固有のサブタイプが含まれることも見出した。本研究は、個体の可塑性や小さい地域に由来する多様さと、それらが集団としての表現型へ収束するダイナミクスをタンパク質と遺伝子で実験的に観察・検証している。

研究成果の概要(英文)：The composition and the primary structures of the venom isozymes, mainly phospholipase A2s (PLA2), of Okinawa *Protobothrops flavoviridis* were compared among the snakes captured in different places. The places were Kunigami village and Itoman city, whose environment such as soil are independent each other. As a result, the composition and primary structures of the PLA2 isozymes were common as inherent to *P. flavoviridis* of Okinawa district, but also the area-specific subtypes of PLA2 isozymes were included. In this study, the structural analysis of the proteins and the genes demonstrates the plasticity of individuals, the diversity of small groups specific to the area, and the dynamics where such specimens converge to a large group phenotype.

研究分野：環境学

キーワード：生物多様性 適応

1. 研究開始当初の背景

1980年代に九州大学大野徳素研究室によって始まった日本のハブ毒研究は、ハブ毒成分タンパク質の構造と機能相関研究を多数報告してきた。1993年には、中島等がハブ毒ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) が遺伝子の多重化と加速進化によって多様なアイソザイム系を確立してきたことを発見した。

2000年には、研究の場を崇城大学へと移し、千々岩等が奄美大島、徳之島、沖縄本島のハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムの組成と構造が異なる「ヘビ毒アイソザイムの島嶼特異的進化」を発見した。

以降、小宝島のトカラハブ、西表島のサキシマハブ、沖縄諸島の伊平屋島、久米島のハブ、の毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムの組成と構造を比較解析し、それぞれが島嶼の環境に特異的に進化(多様化)してきたことを見出してきた。

2. 研究の目的

これまでに日本南西諸島の島嶼ごとにハブ属ヘビの毒アイソザイム(主に PLA<sub>2</sub>)の組成と一次構造が異なっていることを明らかとしてきた。

本研究では、沖縄本島の中で棲息地が独立している北部(国頭)と南部(糸満)で捕獲したハブの毒タンパク質およびそれらをコードする転写産物の組成と一次構造を比較解析することで、沖縄本島ハブ集団の毒タンパク質が棲息環境に沿って多様化していく過程を実験的に検証する。加えて、中部(北谷町)と人為的影響が少ないと期待される渡嘉敷島のハブも解析して、より詳細な比較を試みる。

3. 研究の方法

沖縄島北部(国頭)と南部(糸満)で駆除捕獲したハブをそれぞれ3匹ずつ沖縄県衛生研究所にて馴致飼育し、個体別に採毒する。約7ml/匹採集した粗毒はゲル濾過、イオン交換、疎水性などのクロマトグラフィーを用いて分画し、精製する。各標品はアミノ酸配列をエドマン法にて完全解読する。一方で、採毒済みのヘビより毒腺と肝臓を採取し、該当する毒アイソザイムをコードするcDNAおよびゲノムクローンを単離する。

また、生物学的な系統関係を確認するためにミトコンドリアDNAの塩基配列を基に系統樹解析を主に九州大学の柴田准教授が中心となって行う。

4. 研究成果

沖縄島北部(国頭)と南部(糸満)でそれぞれ3匹ずつ駆除捕獲したハブを沖縄県衛生研究所で馴致飼育した。約4か月飼育中、回復を待つために3週間おきに採毒し、地域別に数ミリリットルの粗毒を得た。採毒を終えた個体からは、mRNAおよびゲノムDNAを抽出するために毒腺および肝臓を摘出した。

(1) 粗毒は条件を揃えてSephadex G-100ゲル濾過で分画した中分子量画分を、さらにCM52陽イオン交換クロマトグラフィーにて

分画した。その結果、中性領域に溶出されるピークの本数とプロファイルが異なっていることがわかった(図1)

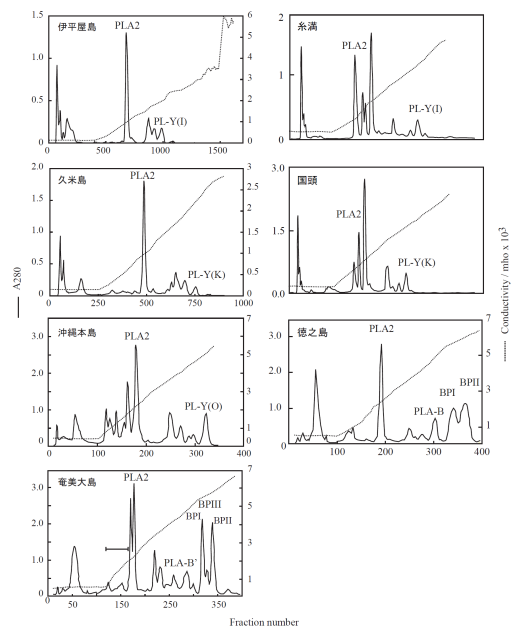


図 1

これら中性領域のピーク(糸満4本、国頭4本)タンパク質を、さらにHPLCで分画したところ、どれも主要ピーク1本のプロファイルを形成することが分かった。それらの溶出時間を比較して、糸満、国頭でそれぞれ固有のピークを2本ずつ同定した。

その後、各ピークタンパク質のアミノ酸配列を決定する予定だったが、地震によりアミノ酸シーケンサーが損傷を受けたのを始めとして、ほぼ半年作業が停滞した。

(2) 毒腺より mRNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成し、毒 PLA<sub>2</sub> をコードする cDNA クローンを網羅的にスクリーニングした。その結果、国頭ハブも糸満ハブも沖縄島ハブ固有 PLA<sub>2</sub> アイソザイムとして2000年に報告した、出血性・中性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>と浮腫誘導・塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>および神経毒性・高塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>の組成であり、それぞれのcDNAの塩基配列とそれらがコードするアミノ酸配列が保存されていることが分かった。ただし、国頭ハブ毒腺からは、出血性・中性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>に1非同義座位塩基置換1アミノ酸残基置換が起きたサブタイプをコードするクローンを見出した(図2-1)。

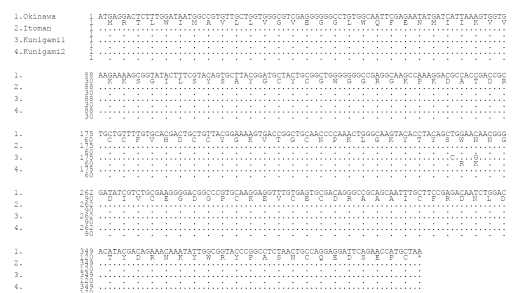


図 2-1



*Protobothrops* genus snakes in the southwestern islands of Japan., *Toxicon*, 査読有、2015、210-216. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.08.024.

〔学会発表〕(計 16 件)

稲丸賢人、千々岩崇仁、他 6 名、クサリヘビ科ヘビの分泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) をコードする遺伝子クラスター領域の解析、第 39 回日本分子生物学会年会(招待講演)、2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市

柴田弘紀、千々岩崇仁、他 20 名、毒蛇ハブ(*Protobothrops flavoviridis*)の全ゲノム配列決定から明らかになった毒液関連遺伝子群の多重化および加速進化と染色体構造との関係、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市

稲丸賢人、千々岩崇仁、他 7 名、ヒメハブ分泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) をコードする遺伝子クラスター領域の解読と解析、第 63 回トキシシンポジウム、2016 年 7 月 14 日、天童温泉 山形県 天童市

中村仁美、千々岩崇仁、他 4 名、毒蛇ハブ幼蛇と成蛇の毒成分の比較解析、第 63 回トキシシンポジウム、2016 年 7 月 14 日、天童温泉 山形県 天童市

柴田弘紀、千々岩崇仁、他 18 名、日本固有の毒蛇ハブ(*Protobothrops flavoviridis*)の全ゲノム配列決定と遺伝子モデルの作製、第 63 回トキシシンポジウム、2016 年 7 月 14 日、天童温泉 山形県 天童市

柴田弘紀、千々岩崇仁、他 18 名、日本固有の毒蛇ハブ(*Protobothrops flavoviridis*)の全ゲノム配列決定と遺伝子モデルの作製、BMB2015、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド 兵庫県 神戸市

中村仁美、千々岩崇仁、他 7 名、ハブ毒腺における幼蛇特異的ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の発現、BMB2015、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド 兵庫県 神戸市

清水安奈、千々岩崇仁、他 4 名、ハブ毒由来不活性型セリンプロテアーゼ様タンパク質の構造と機能、BMB2015、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド 兵庫県 神戸市

千々岩崇仁、他 8 名、日本南西諸島クサリヘビ科ヘビの毒[Lys<sup>49</sup>]ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の島嶼多様性、BMB2015(招待講演)、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド 兵庫県 神戸市

山口和晃、千々岩崇仁、他 7 名、クサリヘビ科ヘビの毒ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 遺伝子の形成と起源、BMB2015、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド 兵庫県 神戸市

柴田弘紀、千々岩崇仁、他 8 名、Whole

genome sequencing of a Japanese endemic pit viper, habu, *Protobothrops flavoviridis* and whole genome annotation., 日本遺伝学会第 87 回大会、2015 年 9 月 26 日、東北大学 宮城県 仙台市

中村仁美、千々岩崇仁、他 6 名、毒腺で発現する転写因子 ESE-3 はハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のプロモーターを活性化する、第 62 回トキシシンポジウム、2015 年 7 月 10 日、エクシード合歓の郷 三重県 志摩市

中村仁美、千々岩崇仁、他 6 名、ハブ毒腺で発現する転写因子 ESE-3 は毒型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のプロモーターを活性化する、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市

山口和晃、千々岩崇仁、他 6 名、クサリヘビ科ヘビの分泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの起源と分子進化、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市

千々岩崇仁、他 7 名、クサリヘビ科ヘビの筋壊死活性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子の分子進化、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 神奈川県 横浜市

柴田弘紀、千々岩崇仁、他 9 名、日本固有の毒蛇ハブ(*Protobothrops flavoviridis*)の全ゲノム配列決定の現状と展望、第 51 回沖縄生物学会、2014 年 5 月 25 日、琉球大学 沖縄県 中頭郡

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千々岩 崇仁 (CHIJIWA, TAKAHITO)  
崇城大学・生物生命学部・教授  
研究者番号：30331060