# 科学研究費助成事業 研究成果報告書



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  $A_2$  ( $PLA_2$ ) 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 PLA2 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 PLA2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へビの毒アイソザイム(主に PLA2)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 7 ml/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)。

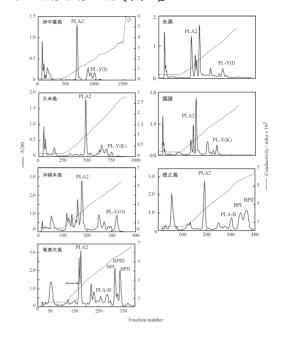


図 1

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クエ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  $PLA_2$  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  $PLA_2$  アイソザイムとして 2000 年に報告した、出血性・中性 $[Asp^{49}]PLA_2$  と浮腫誘導・塩基性 $[Asp^{49}]PLA_2$  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 $[Asp^{49}]PLA_2$ 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 )。

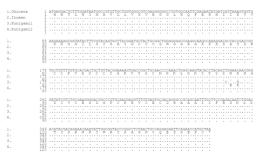


図 2-1

出血性・中性[Asp<sup>49</sup>]PLA2はクサリヘビ科ヘビ 毒に普遍的に含まれる毒 PLA2 アイソザイム で、そのアミノ酸配列はハブ属ヘビでは 100%保存され、コードする遺伝子の塩基配列 の相互比較でも 1~3 塩基の同義置換が含まれ るだけであることがわかっていた。そのため、 この毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムはクサリヘビには 不可欠の毒タンパク質であり、高度に保存さ れていることが予測されていた。このアイソ ザイムのサブタイプが見出されたのは今回 が初めてであり、今後はこのサブタイプをコ ードする遺伝子を中心にゲノム構造を比較 することで、毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の 分子進化過程を検証する。さらに、浮腫誘 導・塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>をコードする cDNA も、 沖縄島固有のアイソザイムをコードするク ローンに加え、2013年に沖縄島の属島である 伊平屋島ハブと久米島ハブから報告した1非 同義座位塩基置換1アミノ酸残基置換のサブ タイプをコードする cDNA も見出した(図 2-2 )

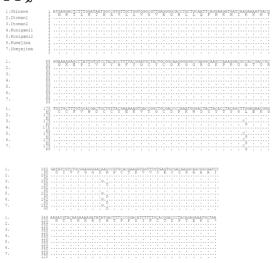


図 2-2

これらの結果は、各島では集団としての固有 の毒タンパク質の組成が固定されているが、 個体ごとでは毒タンパク質の組成に揺らら があることを示している。遺伝子の多重化と 選択と適応の過程を通して、止 現在の状態となったことは広く受け れているが、個体の多様さとある一定 とも事実である。本研究は、多様な 団のパターンに収束する過程を、遺伝 実 重化と適応という目に見えるもので を 重化と適応という目に見えるもので に検証できる に検証できる。 りに 検体数を増やし、背景環境との比較 めて、分子進化の駆動力を考察する。

日本南西諸島ハブ属ヘビの生物学的系統関係を明らかにすると同時に、集団の地域的な近さを明らかにするために、トカラハブ、奄美大島/徳之島/沖縄ハブ、サキシマハブのそれぞれ数個体よりミトコンドリア DNA を抽出し、その塩基配列を比較解析した(発表論文、図3)。

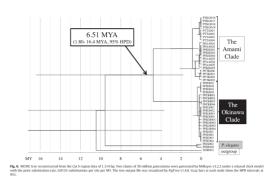


図 3

一方で、日本南西諸島ハブ属ヘビ(トカラハブ、奄美大島/徳之島/沖縄ハブ、サキシマハブ)において、筋壊死毒[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>の遺伝子の組成とコピー数が島嶼特異的であることを見出し、その遺伝子コピー数の制御の関わったと考えられるレトロトランスポゾンを同定した(発表論文 、図4)。

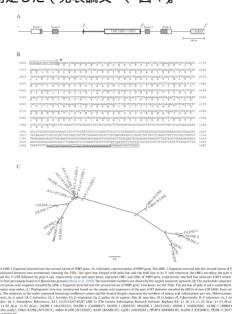


図 4

渡嘉敷島ハブは駆除捕獲されなかった。代表者と高田爬虫類研究所および沖縄県衛生研究所の研究員と共に捕獲に赴く予定。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

## [雑誌論文](計 2 件)

Shibata H, Chijiwa T, Hattori S, Terada K, Ohno M, Fukumaki Y., The taxonomic position and the unexpected divergence of the Habu viper, *Protobothrops* among Japanese subtropical islands. Mol Phylogenet Evol., 2016, 91-100, DOI: 10.1016/j.ympev.2016.04.027.

Yamaguchi K, <u>Chijiwa T</u>, Yamamura T, Ikeda N, Yatsui T, Hayama S, Hattori S, Oda-Ueda N, Ohno M. Interisland variegation of venom [Lys(49)]phospholipase A2 isozyme genes in

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、<u>千々岩崇仁</u>、他 6 名、クサリヘビ科ヘビの分泌型ホスホリパーゼ  $A_2$  ( $PLA_2$ )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、<u>千々岩崇仁</u>、他20名、毒蛇八プ(Ptorobothrops 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、<u>千々岩崇仁</u>、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 回トキシンシンポジウム、2016年7月14日、天童温泉 山形県 天童市

中村仁美、<u>千々岩崇仁</u>、他 4 名、毒蛇八 ブ幼蛇と成蛇の毒成分の比較解析、第 63 回トキシンシンポジウム、2016 年 7 月 14 日、天童温泉 山形県 天童市

柴田弘紀、<u>千々岩崇仁</u>、他 18 名、日本固有の毒蛇八ブ ( Protobothrops flavoviridis ) の全ゲノム配列決定と遺伝子モデルの作製、第 63 回トキシンシンポジウム、2016年7月14日、天童温泉 山形県 天童市柴田弘紀、<u>千々岩崇仁</u>、他 18 名、日本固有の毒蛇八ブ ( 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、神戸ホートアイランド 兵庫県 神戸市中村仁美、<u>千々岩崇仁</u>、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、<u>千々岩崇仁</u>、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 $[Lys^4]$ ホスホリパーゼ $A_2$  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 $A_2$ 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、<u>千々岩崇仁</u>、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 回トキシンシンポジウム、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、<u>千々岩崇仁</u>、他6名、ハブ毒腺で発現する転写因子 ESE-3 は毒型PLA2 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、<u>千々岩崇仁</u>、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  $A_2[Lys^{49}]PLA_2$  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、<u>千々岩崇仁</u>、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