

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間： 2006~2008

課題番号：18687016

研究課題名 (和文) 日本南西諸島ハブ属ヘビの種と毒腺アイソザイムの進化の関係

研究課題名 (英文) Evolutional study between speciation and venom gland isozymes of *Protobothrops* genus snakes inhabit 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・准教授

研究者番号：30331060

研究成果の概要：

日本南西諸島に棲息するハブ属ヘビの中でも、島同士が明らかに隔離しており、背中の模様や体長などが島特異的なハブ属ヘビ（トカラハブ、サキシマハブ、イヘヤジマハブ）を対象として、それぞれの粗毒に含まれる毒腺ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) アイソザイムの組成やアミノ酸配列を明らかにした。島特異的なこれらの分子進化と、ミトコンドリア DNA の塩基配列を基にした各ヘビの分岐関係を照らし合わせ、毒腺 PLA<sub>2</sub> は餌などの棲息環境因子に適応して進化してきたことを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	19,300,000円	5,790,000円	25,090,000円
2007年度	2,300,000円	690,000円	2,990,000円
2008年度	2,300,000円	690,000円	2,990,000円
年度			
年度			
総計	23,900,000円	7,170,000円	31,070,000円

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：ハブ (*Protobothrops flavoviridis*)、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)、アイソザイム、加速進化、生物多様性、環境適応、南西諸島

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、日本南西諸島ハブ属ヘビに関して以下の特異な現象を発見してきた。

- (1) ハブ属ヘビの粗毒には、共通の先祖分子から派生し、それぞれで突然変異を受けて異なる生化学的・生理的活性を発揮するようになったファミリー分子群「アイソザイム」が主要な構成因子として含まれている。

- (2) アイソザイムがそれぞれ多様なアミノ酸配列と機能を獲得するには、それらの遺伝子群に「加速進化」という特異な突然変異誘導機構が作用していた。
- (3) 南西諸島に分布するハブ属ヘビの毒アイソザイムは、それぞれの棲息地である島の環境に適応して島特異的組成とアミノ酸配列を獲得している。

## 2. 研究の目的

本課題は、主に背景 (3) の分子機構を解明するため、南西諸島の西表島、小宝島、伊平屋島にそれぞれ棲息する特異なハブ属ヘビ(サキシマハブ、トカラハブ、イヘヤジマハブ)を対象として、その毒に含まれる毒 PLA<sub>2</sub>アイソザイムを網羅的に特徴づけ、それらの分子進化とヘビの分岐過程の関連性を考察することを旨とした。

## 3. 研究の方法

以下の島嶼特異的なハブ属ヘビについて、その毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイムをタンパク質と cDNA の両面から網羅的に特徴づける。

- (1) 南西諸島ハブ属ヘビの棲息南限である西表島のヘビ：サキシマハブ
- (2) 南西諸島ハブ属ヘビの棲息北限である小宝島のヘビ：トカラハブ
- (3) 沖縄本島とは異なる独特の表現型を呈する伊平屋島のハブ：イヘヤジマハブ

さらに、これらハブ属ヘビのミトコンドリア DNA の塩基配列を決定し、系統関係を明らかにする。

## 4. 研究成果

上記の目的と方法に従い、以下の成果が得られた。

- (1) サキシマハブ粗毒には 3 種の PLA<sub>2</sub> アイソザイムが含まれること、特に筋毒性を発揮すると期待される強塩基性のアイソザイムは、これまでに全く未知の活性部位アミノ酸がアルギニンである新規のアイソザイムであることを見出した。また、それらの組成やアミノ酸配列は、日本のハブよりもむしろ台湾アオハブのそれらと近いことを見出した (ref. ④)。
- (2) トカラハブ粗毒には 4 種の PLA<sub>2</sub> アイソザイムが含まれること、特に筋毒性を担う [Lys<sup>49</sup>] PLA<sub>2</sub> アイソザイムは 1 種類しか含まれないことを見出した。また、それらの組成やアミノ酸配列は、奄美大島産のハブのそれらと最も近いことを見出した (投稿準備中)。
- (3) イヘヤジマハブ粗毒には 3 種の PLA<sub>2</sub> アイソザイムが含まれること、特に筋毒性を担う強塩基

性の PLA<sub>2</sub> アイソザイムは偽遺伝子となって欠失していることを見出した。また、塩基性 PLA<sub>2</sub> アイソザイムは、沖縄本島のハブ毒のそれとも異なるイヘヤジマハブ固有なものへと進化していたことを見出した (投稿準備中)。

- (4) これらのハブ属ヘビに加え、奄美大島、徳之島、久米島のハブ属ヘビのミトコンドリア DNA の全長を解読し、系統樹解析したところ、北部 (トカラ、奄美大島、徳之島)、中部 (沖縄)、南部 (先島諸島) の大きく 3 つのクレードを形成することがわかった。また、本島 (奄美大島、徳之島、沖縄) ではこれらハブ属ヘビと別にヒメハブというヘビがいるが、ハブとは遠縁でむしろ中国のタンビマムシと近いことがわかった。

以上の成果は、ハブ属ヘビが日本南西諸島でそれぞれ孤立するに伴い、その毒タンパク質が各環境へ適応・進化してきた過程を分子レベルで広範に調べたものであり、生物多様性の分野にあって国内外でも独特かつ貴重な先駆けの結果を提供したものとなった。この研究の独自性と優位性は、まさに日本南西諸島というモデルフィールドと、そこにそれぞれ孤立して棲息している日本固有のハブ属ヘビと言うモデル動物の存在が保証している。今後さらにフィールド調査を含めた詳細かつ丁寧な研究を進めることにより、加速進化という特異点を含んだ、日本独自の「島嶼生物の進化」に関する体系的な知見へと結実することが期待される。

## 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 4 件)

- ① 松原和純、山田和彦、梅本周、土屋公幸、池田直樹、西田千鶴子、千々岩崇仁、森脇和郎、松田洋一、Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the A and B chromosomes of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*, Muridae, Rodentia)、Chromosome Res., 16, 1013-1026 (2008) 有
- ② 宗修平、千々岩崇仁、池田直樹、信久幾夫、上田直子、服部正策、大野素徳、

Identification of the B subtype of  $\gamma$ -phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Protobothrops flavoviridis* serum and molecular evolution of snake serum phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors, *Journal of Molecular Evolution*, 66, 298-307 (2008)、有

- ③ 瀬戸美苗、小川智久、児玉教佑、金山徳孝、酒井康夫、千々岩崇仁、大野素徳、A novel recombinant system for functional expression of myonecrotic snake phospholipase A<sub>2</sub> in *Escherichia coli* using a new fusion affinity tag, *Protein Expression and Purification*, 58, 194-202 (2008)、有
- ④ 千々岩崇仁、徳永絵美、池田良、寺田考紀、小川智久、上田直子、服部正策、大野素徳、Discovery of novel [Arg<sup>49</sup>]phospholipase A<sub>2</sub> isozymes from *Protobothrops elegans* venom and regional evolution of Crotalinae snake venom phospholipase A<sub>2</sub> isozymes in the southwestern islands of Japan and Taiwan, *Toxicon*, 48, 672-682 (2006)、有

[学会発表] (計20件)

- ① 原弘昭、奄美大島ハブ毒腺 Phospholipase A<sub>2</sub> ゲノム領域の解説、BMB2008、2008年12月12日、神戸
- ② 高崎伸也、日本の南西諸島3島(奄美大島、徳之島、沖縄)のハブ(*Protobothrops flavoviridis*)毒成分の比較プロテオミクス、BMB2008、2008年12月11日、神戸
- ③ 村上達夫、日本の地域毎のマムシ毒の比較プロテオミクス、BMB2008、2008年12月11日、神戸
- ④ 入江紗己子、マムシ亜科毒ヘビ臓器ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 遺伝子の比較解析、BMB2008、2008年12月9日、神戸
- ⑤ 山村岳司、ミトコンドリア DNA の塩基配列を基にした奄美大島ホンハブの系統解析、BMB2008、2008年12月9日、神戸
- ⑥ 友田貫太郎、伊平屋島ハブ毒腺ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の網羅的解析、BMB2008、2008年12月13日、神戸
- ⑦ 千々岩崇仁、ハブ(*P. flavoviridis*)血清由来  $\gamma$ ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> インヒビターの遺伝子構造と分子進化、BMB2008、2008年12月10日、神戸
- ⑧ 千々岩崇仁、ハブ毒 Phospholipase A<sub>2</sub> 遺伝子の多重化に関わるレトロトランスポジション、「生体分子による生物間攻撃と防御」シンポジウム、2008年11月7日、東京

- ⑨ 千々岩崇仁、ハブ毒腺 Phospholipase A<sub>2</sub> 遺伝子の多重化に関わるレトロトランスポジション、日本遺伝学会、2008年9月5日、名古屋
- ⑩ 上田直子、ハブ毒中の単独で作用する補体活性化因子の構造と機能について、第55回毒素シンポジウム、2008年7月4日、山梨
- ⑪ 山村岳司、ミトコンドリア DNA による奄美大島ホンハブの系統解析、BMB2007、2007年12月14日、横浜
- ⑫ 友田貫太郎、本島系ハブから見るハブ毒 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) の進化解析、BMB2007、2007年12月14日、横浜
- ⑬ 村上達夫、奄美大島ハブ毒特異的な新規な[Lys<sup>49</sup>]ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>、BMB2007、2007年12月14日、横浜
- ⑭ 鈴木美緒、ハブ毒中の新規な C3/C5 コンベルターゼの精製と諸性質、BMB2007、2007年12月13日、横浜
- ⑮ 池田直樹、ハブ毒 phospholipase A<sub>2</sub> をコードするゲノム領域の解析、BMB2007、2007年12月11日、横浜
- ⑯ 千々岩崇仁、Retrotransposons had been possibly responsible for multiplication of venom phospholipase A<sub>2</sub> isozyme genes of *Protobothrops flavoviridis*、BMB2008、2008年12月11日、神戸
- ⑰ 宗修平、Identification of B subtype of  $\gamma$ -phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Protobothrops flavoviridis* serum and molecular evolution of snake serum phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors、第54回毒素シンポジウム、2008年9月5日、大阪
- ⑱ 村上達夫、奄美大島ハブ毒中の[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>の細胞死誘導機構、平成19年度日本生化学会九州支部会、2008年5月19日、宮崎
- ⑲ 鈴木美緒、徳之島ハブ毒中の補体活性化因子の精製と諸性質、平成19年度日本生化学会九州支部会、2008年5月19日、宮崎
- ⑳ 友田貫太郎、伊平屋島ハブ毒腺 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)の網羅的解析、平成19年度日本生化学会九州支部会、2008年5月19日、宮崎

## 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・准教授

研究者番号：30331060

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし