

# ハブ毒腺アイソザイムの加速進化 Accelerated Evolution of *Trimeresurus flavoviridis* Venom-gland Isozymes

大野 素徳

Motonori OHNO

崇城大学工学部応用生命科学科

Department of Applied Life Science, Faculty of Engineering, Sojo University

## はじめに

ハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) は奄美大島, 徳之島, 沖縄, 久米島などの南西諸島に棲息する. クサリヘビ科マムシ亜科に属する毒ヘビである. 毒成分として, ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), 金属 (亜鉛) プロテアーゼ, セリンプロテアーゼ, ヒアルロニダーゼ, L-アミノ酸酸化酵素, 血小板凝集阻害タンパク質など多くの生理活性成分を含む. PLA<sub>2</sub>, 金属プロテアーゼ, セリンプロテアーゼなどはアイソザイム系を構成している. これまでの研究から, これらアイソザイム系では, 遺伝子が加速進化をして, 多様な生理機能をもつアイソザイムをつくりだしてきたことを明らかとした<sup>1,2</sup>. ここではマムシ亜科ハブ属ヘビの毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイムの加速進化について述べる.

## 1. ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイムの構造と生理機能

ハブ毒より各種クロマトグラフィーを組合せて, PLA<sub>2</sub>, PLA-B, PLA-N, BPI 及び BPII と呼ぶ PLA<sub>2</sub>アイソザイムを精製し, アミノ酸配列を決めた. PLA<sub>2</sub>, PLA-B 及び PLA-N は [Asp<sup>49</sup>] PLA<sub>2</sub>型であり, BPI と BPII は [Lys<sup>49</sup>] PLA<sub>2</sub>型である. すべてのアイソザイムは122アミノ酸残基よりなり, 配列は55%以上の相同性を示す. 14ハーフシスチン残基の位置は同じであり, 高次構造も同じと考えられる<sup>3</sup>.

PLA<sub>2</sub>のリン脂質 (ミセル) 分解活性は高いが, BPI 及び BPII のリン脂質分解活性は PLA<sub>2</sub>の1-2%であった. 逆に, BPI と BPII をマウスに筋注したときの血液中のクレアチンキナーゼのレベルは PLA<sub>2</sub>を与えたときの数倍のレベルに達し, BPI 及び BPII の筋壊死活性は PLA<sub>2</sub>のそれより数倍高いことがわかった. BPI と BPII は59位のアミノ酸残基が Asp と Asn の違いのみであるが, 筋収縮作用において, BPII は BPI の10-100倍の活性を示した. BPI と BPII は筋細胞の脱分極を起こしたが, PLA<sub>2</sub>にはこの活性は認められなかった. PLA-B のみが浮腫を誘起し, PLA-N は神経毒性を示した. BPI と BPII はガン細胞に対してアポトシスを誘起したが, PLA<sub>2</sub>にはこの作用は認められなかった. このようにハブ毒 PLA<sub>2</sub>アイソザイムはそれぞれが特有の生理機能をもつことが明らかとなった.

## 2. PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の新規な構造

ハブ（徳之島）毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム（PLA 2, BPI, BPII, PL-X' 及び [Thr<sup>38</sup> PLA<sub>2</sub>）の cDNA をクローニングした<sup>4</sup>。塩基配列の相同性は 5' 及び 3' 非翻訳領域でそれぞれ 98 及び 89% であるのに対し、翻訳領域の相同性は 67% であった。通常のアイソザイム cDNA では翻訳領域の相同性が非翻訳領域のそれより高いので、ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム cDNA は全く逆の関係となっている。ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム cDNA が構造的に新規な特徴をもつことが明らかとなった。タンパク質翻訳領域のコドンの第 1, 第 2, 第 3 座位における塩基の置換率はそれぞれ 32, 30, 29% であった。通常のアイソザイム cDNA では第 1 及び第 2 座位の置換率は第 3 座位のそれよりかなり低いのが普通である。第 1 及び第 2 座位の塩基置換はほとんどの場合アミノ酸置換を起こす。ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム cDNA で第 1 及び第 2 座位の塩基置換率が高いことは、これらがコードするタンパク質に多くのアミノ酸置換があり、配列に多様性があることを意味している。

つぎにハブ（徳之島）毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子 6 種とグリーンハブ（台湾）毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子 4 種をクローニングした<sup>5,6</sup>。4 個のエキソンと 3 個のイントロンよりなる共通構造をもつ。ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム cDNA の 5' 及び 3' 非翻訳領域にみられたように、これら遺伝子間でイントロンの相同性は 93–99% と高いものであった。

## 3. PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の加速進化

PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子のすべての対について進化的な数値計算を行った<sup>5,6</sup>。非翻訳領域では座位あたりの塩基置換数  $K_N$  を求めた、翻訳領域では、同義座位あたりの塩基置換数  $K_S$  と非同義座位あたりの塩基置換数  $K_A$  を求めた。 $K_N/K_S$  値が 1 より小さいときは、タンパク質翻訳領域が非翻訳領域より塩基置換が多いことを意味する。 $K_A/K_S$  値が 1 より大きいか或いはそれに近いときにはタンパク質翻訳領域に加速進化が起こっていると考えられる。何故なら通常のアイソザイム遺伝子ではこの値は 0.2 程度であるからである。

ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子対について  $K_N/K_S$  値は 0.25 程度となり、翻訳領域が非翻訳領域より 4 倍ほど塩基置換が多いこと、すなわち翻訳領域の多様性を示した。 $K_A/K_S$  値は 0.75–1.8 であり翻訳領域に加速進化が起こっていることがわかった。ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイムの機能の多様性は加速進化によりもたらされているものと考えられる。

グリーンハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子内の比較でも、またハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子とグリーンハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子との比較でも同じ結論が導かれた。

クサリヘビ科ヘビ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム cDNA の 13 種についての  $K_A/K_S$  値は 1.19 で、一方哺乳類脾臓などからの PLA<sub>2</sub>アイソザイム cDNA の 4 種についての  $K_A/K_S$  値は 0.29 であった<sup>7</sup>。ヘビ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子のタンパク質翻訳領域が加速進化をしており、一方哺乳類内臓由来の PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子のタンパク質翻訳領域は中立的進化をしていることがわかる。

#### 4. 毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の加速進化の機構

ヘビ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の加速進化には2つの可能性が考えられる。1つは、非翻訳領域は通常の遺伝子と同じ程度の変化であるのに対し、タンパク質翻訳領域が速い変化をしている。2つめは、タンパク質翻訳領域は通常の遺伝子とおなじ変化速度であるのに対し、非翻訳領域が非常に遅い変化をしていて、みかけ上タンパク質翻訳領域が速い変化をしているように見えるというものである。この2つの可能性のいずれであるかを検討するために、対象の遺伝子として TATA ボックス結合タンパク質を選んだ。このタンパク質遺伝子は通常の進化速度をもつと考えられたからである。このためハブ（徳之島）とグリーンハブ（台湾）の肝臓を用いて TATA ボックス結合タンパク質遺伝子をクローニングした<sup>8</sup>。この2つの遺伝子を比較して、7個のイントロンの  $K_N$  値及び8個のエキシソンの  $K_S$  及び  $K_A$  値を求め、そしてハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子対の3個のイントロンの  $K_N$  値と4個のエキシソンの  $K_S$  及び  $K_A$  値と比較した<sup>6</sup>。ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子対の平均的  $K_N$  値 (0.07) と TATA ボックス結合タンパク質遺伝子対の平均的  $K_N$  値 (0.04) はほぼ同等であった。これよりハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子のイントロンの進化速度は TATA ボックス結合タンパク質遺伝子のイントロンの進化速度とほぼ同じといえる。一方ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子対の  $K_S$  値 (0.22–0.35) 及び  $K_A$  値 (0.25–0.43) は TATA ボックス結合タンパク質遺伝子対の  $K_S$  値 (<0.01) 及び  $K_A$  値 (0.00) に比べてはるかに大きい。これらのことよりハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の加速進化はタンパク質翻訳領域の速い進化に基づくものといえる。

TATA ボックス結合タンパク質遺伝子では  $K_N > K_S$  であり、ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子では  $K_N < K_S$  である。これはハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子のタンパク質翻訳領域における多様性を意味する。このハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の多様性の獲得は遺伝子変換によるものではないかとも考えられる。ヒメハブ（奄美大島）の毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子をクローニングしたところ、3種の PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子しか存在しなかった<sup>9</sup>。3種のアイソザイム遺伝子について数理計算をすると  $K_A/K_S$  値は1より大きく、加速進化を示した。僅か3種の遺伝子間で遺伝子変換が起こると、3種の遺伝子は均質化に向けて収斂し、 $K_A/K_S$  値は1よりはるかに小さい値となるはずである。したがって毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の多様性は遺伝子変換によるものではないと結論できる。毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子のタンパク質翻訳領域の多様性は点変異の蓄積により獲得されたものと考えられる。

#### 5. 毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイムの地域特異的進化

奄美大島、徳之島、沖縄のハブ毒の中分子量画分を CM セルロースカラムで分画したとき、奄美大島と徳之島ハブ毒に存在する BPI と BPII が沖縄ハブ毒には欠落していることが明らかとなった<sup>10</sup>。BPI cDNA を用いた奄美大島、徳之島、沖縄のハブ毒腺 RNA の Northern blot 解析から、沖縄ハブ毒腺には BPI と BPII をコードする mRNA が発現していないことが確認された。ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子由来の様々なプライマーを用いて沖縄ハブゲノムに対して PCR を行うと、BPI 遺伝子上流部分（第2エキソンの中程まで）と BPII 遺伝子下流部分（第2イントロンの中程以降）は増幅されたが、これらの間の部分は増幅することができなかった。これから沖縄ハブゲノムでは BPI 遺伝子と BPII 遺伝子が融合して偽遺伝子となっていることがわかった。沖縄古陸が水面下に

沈み、奄美大島、徳之島、沖縄などが島となって100-200万年経つ。沖縄が島となったとき、沖縄ハブは BPI 遺伝子と BPII 遺伝子をとともにもっていたが、その後両遺伝子は偽遺伝子となってしまった。奄美大島、徳之島両島と沖縄島のハブの棲息環境の違いが BPI 遺伝子と BPII 遺伝子の運命に影響を与えたことになる。近年の調査によると、奄美大島ハブの食性はネズミ86%、鳥、爬虫類、両生類あわせて14%である。一方、森に覆われた沖縄山原地域ではハブは90%以上ホルストガエル（沖縄県指定天然記念動物）を餌としているといわれている。山原地域は太古の沖縄の環境を反映しているものと思われる。沖縄ハブは主としてカエルを餌としているために強力な筋壊死活性をもつ BPI や BPII を毒成分として必要とせず、BPI 遺伝子と BPII 遺伝子を適応的に偽遺伝子にしてしまったものと考えられる。他のハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイムでも島間でアミノ酸置換がみられ、島特異的進化が観察されている。

## 6. おわりに

ハブ毒腺 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子が、加速進化により、タンパク質翻訳領域の全領域において点変異に基づく塩基置換を蓄積し、多様な生理機能をもつアイソザイムをつくりだしていることを述べた。この加速進化はハブ毒腺のセリンプロテアーゼアイソザイム遺伝子<sup>11</sup>や金属プロテアーゼアイソザイム遺伝子（未発表）にもみられる。ハブ毒腺アイソザイムにおける加速進化の発見は分子進化の分野で画期的なものである。近年コブラ科コブラ亜科ヘビの神経毒タンパク質遺伝子でも加速進化してきたことの証拠が提出されはじめており、加速進化はヘビ毒腺アイソザイム遺伝子に普遍的である。

## 参考文献

1. Ohno, M., Menez, R., Ogawa, T., Danse, J. M., Shimohigashi, Y., Fromen, C., Ducancel, F., Zinn-Justin, S., Le Du, M. H., Boulain, J. -C., Tamiya, T. and Menez, A. (1998) Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Moldave, K., ed. ), Vol. 59, pp. 307-364, Academic Press, New York
2. Ohno, M., Ogawa, T., Oda-Ueda, N., Chijiwa, T. and Hattori, S. (2002) Perspectives in Molecular Toxinology (Menez, A., ed. ), pp. 387-400, John Wiley & Sons, London
3. Suzuki, A., Matsueda, E., Yamane, T., Ashida, T., Kihara, H. and Ohno, M. (1995) J. Biochem. (Tokyo) 117, 730-740
4. Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K., Sasaki, H., Hattori, M., Sakaki, Y., Kihara, H. and Ohno, M. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8557-8561
5. Nakashima, K., Ogawa, T., Oda, N., Hattori, M., Sakaki, Y., Kihara, H. and Ohno, M. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5964-5968
6. Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Nakai, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, M., Sakaki, Y., Hattori, S. and Ohno, M. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 5605-5609
7. Ogawa, T., Kitajima, M., Nakashima, K., Sakaki, Y. and Ohno, M. (1995) J. Mol. Evol., 41, 867-877
8. Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Hattori, M., Sakaki, Y., Hattori, S. and Ohno, M. (1995) Gene, 152, 209-213
9. Nobuhisa, I., Nakashima, K., Deshimaru, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, S., Kihara, H. and Ohno, M. (1996) Gene, 172, 267-272
10. Chijiwa, T., Deshimaru, M., Nobuhisa, I., Nakai, M., Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K., Fukumaki,

- Y., Shimohigashi, Y., Hattori, S. and Ohno, M. (2000) *Biochem. J.*, 347, 491-499
11. Deshimaru, M., Ogawa, T., Nakashima, K., Nobuhisa, I., Chijiwa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Niwa, M., Yamashina, I., Hattori, S. and Ohno, M. (1996) *FEBS Lett.*, 397, 83-88

