

崇城大学大学院
工学研究科委員会
研究科長 山 川 烈 殿

論文審査委員
主査 千々岩 崇仁



論文審査結果の報告（甲）

論文提出者	山 口 和 晃 （ 1 3 1 9 D 0 2 ）
論文題名	クサリヘビ科ヘビの毒ホスホリパーゼ A ₂ (PLA ₂) 遺伝子の起源と分子進化
審査委員	主査 教授 千々岩 崇仁 副査 教授 武谷 浩之 副査 教授 原島 俊

論文審査結果の要旨

本博士論文は、ハブ毒 PLA₂ アイソザイムの進化と起源および当該遺伝子がクラスターを形成する過程を明らかにすることを目的としている。

まず、山口君は2012年の哺乳類には18種類の分泌型 PLA₂ が含まれるという報告を参考にして、特に分子内ジスルフィド結合の数や組み合わせとアミノ酸配列が良く似ている II 型に属する PLA₂ は一つの祖先遺伝子から派生してきたのではないかと仮説を立てた。そして最もハブ毒 IIA PLA₂ とアミノ酸配列が似ている哺乳類の IIE PLA₂ のオルソログとなる遺伝子をハブゲノムで検索し、これを同定した。さらに、このハブ IIE PLA₂ 遺伝子の塩基配列を基に genomic PCR を行い、この遺伝子の周辺領域の塩基配列を約 6.5 kbp 決定した。その結果、ハブ IIE PLA₂ 遺伝子の 5' 上流に毒 IIA PLA₂ 遺伝子が並んでいることを見出した。このことは同研究室の池田等が見出したハブ毒 IIA PLA₂ 遺伝子が形成するクラスターの下流に IIE PLA₂ 遺伝子が並んでいることを示唆していた。さらに、その IIE PLA₂ 遺伝子の 3' 下流に毒とは無関係の OTUD3 遺伝子 (Ovarian tumor domain-containing protein 3) を見出し、分泌型 PLA₂ 遺伝子がクラスターを形成するゲノムドメインの 3' 境界領域の構造を明らかにした。さらにこの 6.5 kbp の塩基配列をレファレンスとして様々な動物のドラフトゲノム情報を解析したところ、この IIA PLA₂-IIE PLA₂-OTUD3 と並んだ構造が哺乳類からハ虫類 (ヘビ) まで保存されていることを発見した。しかも、ヒトからコブラのドラフトゲノム情報では、この 3 遺伝子の 5' 上流には分泌型の IIC、IIF、

IID、V型のPLA₂遺伝子が並んでクラスターを形成していることも明らかにした。これらの分泌型PLA₂のアミノ酸配列が相互に良く似ていることから、山口君はこれら一連の分泌型PLA₂遺伝子は、ある起源となる遺伝子の重複と変異によって生み出されたと仮定した。そこでハブのIIE PLA₂遺伝子と毒IIA PLA₂遺伝子の塩基配列を詳細に比較したところ、相互に80~90%一致する約0.4、0.5、1.4 kbpの塩基配列が5'プロモーターとイントロン2に存在することを見出し、両遺伝子の成立過程に関連性があることを示唆した。以上の内容は、2014年のToxinsに投稿・掲載された。

これらの発見を基に、山口君はハブ及びヒメハブで同様の分泌型PLA₂遺伝子のクラスターが形成されていることを予測し、当該ゲノムのPCRクローニングおよびゲノムライブラリーの解析を行った。その結果、両ゲノムで分泌型IIF、IID、IIE型PLA₂遺伝子が並んでクラスターを形成しており、哺乳類等の非毒IIA PLA₂遺伝子座がハブやヒメハブでは毒IIA PLA₂遺伝子へと変異し、その後挿入されたCR1 LINE様配列と共に当該遺伝子座で増幅して特異な遺伝子群列を形成したことを見出した。一方、ヒメハブでは毒IIA PLA₂遺伝子が3つしか重複していないことから、その遺伝子座の5'境界領域をハブゲノムのそれと詳細に比較解析した。その結果、互いに逆向きとなった約1.7、5.1 kbpのIID PLA₂遺伝子の3'末端配列を見出し、ハブゲノムの相当するゲノム断片がヒメハブゲノムではステムループ構造を形成して欠失し、そのためにそれ以上毒IIA型PLA₂遺伝子が多重化できなかったことを指摘した。以上の内容は、現在論文にまとめて投稿準備中である。

一方で、ハブと生物学的に非常に近縁とされながら、宝島、小宝島の2島にしか棲息しない独特の表現型をしたトカラハブの毒IIA PLA₂アイソザイムの解析にも取り組んだ。その結果、トカラハブではハブの毒IIA PLA₂と同じアイソザイムのアミノ酸配列と組成をしているが、筋毒性のPLA₂が1つしか含まれていないことを見出し、その遺伝子構造を解析した。そして、この遺伝子には増幅に関わるCR1 LINEと共に、イントロン2に他のPLA₂遺伝子には見出されなかったLINE-1が挿入されていることを見出した。即ち、このLINE-1の挿入が当該遺伝子の重複を阻害したのではないかと仮定した。そして、抗レトロウイルス因子として知られるシチジン脱アミノ酵素AID/APOBECがLINE-1のレトロトランスポジションも阻害することから、同様の阻害機構によってCR1による毒IIA PLA₂遺伝子のレトロトランスダクションが挿入LINE-1と共に阻害された可能性を提案した。この内容は、2015年のToxiconに投稿・掲載された。

これらの研究に加え、日本南西諸島に棲息するハブ類へビのミトコンドリアの塩基配列を系統解析し、ハブ類へビの分岐過程とそれぞれのハブ類へビ特異的な毒IIA型PLA₂遺伝子クラスター構造を獲得する過程が一致することを見出し、この結果も論文にまとめて投稿準備中である。

以上、学位が授与されるに十分な業績と判断する。ただ、全体を通して伝えたいことがわかりにくい書き方に思えた。他研究の引用や当該研究室の過去の成果と、山口君の成果との区別をもっと明確にするようにして、伝えたい結論へシンプルに導入するような書き方を工夫すると一層望ましい論文になったと思う。

(2,000字程度)

最終試験結果の要旨

山口君の最終試験を兼ねた公聴会での発表は、副査等の助言を受けて博士論文の内容を良く伝わるようにと話題の順序や提示するデータなどに工夫を加えたものようだった。だが、再調整するには時間が足りなかったためであろう、会場の全員に伝えたいことが十分には伝えることが出来なかったようだ。業績は十分なだけに、目的・焦点、何を行い、何を得、どう考察したのか、をよりシンプルに表現するよう心がけると一層望ましいものとなっただろうことが惜まれる。以上を総合して、本論文提出者は博士（工学）の学位を取得する能力があることを認める。提出論文について公開試験を行わせた後、論文内容および関連する分野についての口頭による試験を行い、専攻内会議を行った結果、最終試験において合格した者と認めた。

(200字程度)