

# 博士論文

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

平成 27 年度

崇城大学 大学院工学研究科

応用生命科学専攻 博士課程

生命情報科学講座

1319D02

山口 和 晃

## 目次

1. 要約 .....	1
2. 略語一覧及び命名及び略称表記法に関する規則 .....	3
3. 序論 .....	6
3-1. ヘビに関する生物学的知見	
3-2. 日本に生息するクサリヘビ科ヘビ	
3-3. ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ) の構造と機能	
3-4. ハブ属ヘビより単離された PLA <sub>2</sub> アイソザイム	
3-4-1. ホンハブ ( <i>Protobothrops flavoviridis</i> )	
3-4-2. トカラハブ ( <i>Protobothrops tokarensis</i> )	
3-4-3. サキシマハブ ( <i>Protobothrops elegans</i> )	
3-4-4. ヒメハブ ( <i>Ovophis okinavensis</i> )	
3-5. 生物進化のプロセスと現代の進化論	
3-6. 加速進化	
3-7. クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA <sub>2</sub> アイソザイムをコードする遺伝子とそのゲノム構造	
3-8. ゲノム内に散在するレトロトランスポゾン	
3-9. 研究の目的	
4. 材料と方法 .....	23
4-1. 試料と試薬	
4-1-1. 試料	
4-1-2. 試薬	
4-2. ゲノム構造解析	
4-2-1. ハブ組織からのゲノム DNA 抽出	
4-2-2. コスミドを用いたゲノムライブラリーの構築	
4-2-3. コロニーハイブリダイゼーション法による目的クローニングのスクリーニング	
4-2-4. コスミドクローニングの取扱いとその抽出及び塩基配列決定	
4-2-5. ゲノミック PCR	
4-2-6. Ligation-mediated PCR	
4-2-7. TOPO クローニング	
4-2-8. 形質転換及び大腸菌培養	

- 4-2-9. プラスミド DNA 抽出 (アルカリ SDS 法)
- 4-2-10. サイクルシーケンス法による塩基配列決定
- 4-3. 遺伝子及びタンパク質発現解析
  - 4-3-1. ハブ組織からの RNA 抽出
  - 4-3-2. 1st strand cDNA 合成
  - 4-3-3. 逆転写 PCR
  - 4-3-4. 5'/3' Rapid amplification of cDNA end (RACE)
  - 4-3-5. アフィニティークロマトグラフィー
  - 4-3-6. 大腸菌組換えタンパク質発現
  - 4-3-7. ウェスタンブロットティング
- 4-4. エピゲノム解析
  - 4-4-1. ゲノム DNA のバイサルファイト処理
  - 4-4-2. バィサルファイト PCR と TA クローニング
  - 4-4-3. バィサルファイトシーケンス
- 4-5. 遺伝子コピー数解析
  - 4-5-1. リアルタイム PCR
- 4-6. 染色体解析
  - 4-6-1. FISH 解析
- 4-7. バイオインフォマティクス手法を用いたドライな解析
  - 4-7-1. Local BLAST 環境の構築
  - 4-7-2. Local RepeatMasker 環境の構築
  - 4-7-3. RAxML を用いた系統解析
  - 4-7-4. codeml プログラムを用いた  $K_A/K_S$  解析
  - 4-7-5. mcmctree プログラムを用いた分岐年代推定
- 5. 結果と議論 ..... 107
  - 5-1. 比較ゲノム解析から明らかになった PLA<sub>2</sub> 遺伝子のゲノム構造とその進化
    - 5-1-1. ホンハブとヒメハブの PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域で見つかった新規グループの PLA<sub>2</sub> 遺伝子群
    - 5-1-2. ホンハブとヒメハブの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子及びそのクラスター領域のゲノム構造
    - 5-1-3. クサリヘビ科ヘビの PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域に頻繁に散

	在する IIE 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子に高い相同性を示す塩基配列	
5-1-4.	ホンハブとヒメハブの PLA <sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域のゲノム構造の比較から分かったヒメハブ PLA <sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域での大規模な欠失	
5-1-5.	PLA <sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域のゲノム構造の種間・種内比較から推定される分子進化過程	
<b>5-2.</b>	クサリヘビ科ヘビの[Lys <sup>49</sup> ]PLA <sub>2</sub> の比較から明らかになったハブ毒 PLA <sub>2</sub> の島嶼間多様性とその進化	
5-2-1.	クサリヘビ科ヘビの[Lys <sup>49</sup> ]PLA <sub>2</sub> の島嶼間多様性	
5-2-2.	トカラハブの[Lys <sup>49</sup> ]PLA <sub>2</sub> 遺伝子に見出された特徴的な挿入配列	
5-2-3.	トランスポゾンと AID/APOBEC ファミリータンパク質	
<b>5-3.</b>	クサリヘビ科ヘビ PLA <sub>2</sub> 遺伝子発現とそれを調節するエピジェネティクス	
5-3-1.	IB 及び IIA 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態比較	
5-3-2.	IB 及び IIA 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子の探索	
<b>5-4.</b>	研究の総括論議	
<b>6.</b>	<b>図表</b> .....	<b>142</b>
6-1.	Figures	
6-2.	Tables	
<b>7.</b>	<b>付録</b> .....	<b>251</b>
7-1.	プライマーリスト	
<b>8.</b>	<b>参考文献</b> .....	<b>253</b>
<b>9.</b>	<b>謝辞</b> .....	<b>280</b>

## 1. 要約

ヒト種をはじめとする哺乳類ゲノムに共通してコードされている 11 グループ (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIB) の分泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) のうち, IIA 型の PLA<sub>2</sub> はクサリヘビ科ヘビの毒中からも見出され, クサリヘビ科ヘビ毒の主要な成分の 1 つとしてよく知られている。クサリヘビ科ヘビの毒に含まれる IIA 型 PLA<sub>2</sub> は 49 番目のアミノ酸の違いから [Asp<sup>49</sup>]型と [Lys<sup>49</sup>]型の 2 つに大別され, それらをコードする遺伝子は重複により多重遺伝子ファミリーを形成し, 多重遺伝子に由来する複数のアイソザイムを有していることが報告されている。当研究室でもこれまでに日本南西諸島に棲息するクサリヘビ科マムシ亜科ヘビであるホンハブ (*Protobothrops flavoviridis*), トカラハブ (*P. tokarensis*), サキシマハブ (*P. elegans*), ヒメハブ (*Ovophis okinavensis*) の毒に含まれている PLA<sub>2</sub> アイソザイムの機能解析及び比較解析を行い, それらハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムをコードする遺伝子のタンパク質コーディング領域における突然変異が非同義座位と同義座位とで等しいもしくは上回る頻度で生じる加速進化によって多様化してきたこと, ホンハブではハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子がマイクロ染色体の 2 つの遺伝子座でタンデムに並んだ遺伝子クラスターを形成していること, ハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の多重化にはレトロトランスポゾンの 1 つとして知られている CR1-like LINE (Chicken repeat 1-like long interspersed nuclear element) が関与していることを明らかにしてきた。

本研究では, ハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の進化とその起源, そして遺伝子クラスター形成の過程を探るために, ホンハブとヒメハブの毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子クラスターのゲノム構造を明らかにし, その構造を哺乳類, 鳥類, ヘビ類の非毒性分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターと比較した。その結果, クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子クラスター内とその近傍に IIF, IID, IIE 型の PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子を見出し, ハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子クラスターと非毒性生物が普遍的に有する分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの間にはゲノムのシンテニーが保存されていることを見出した。即ち, クサリヘビ科マムシ亜科ヘビの毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子クラスターが, 非毒性生物から見出される分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターと起源を同じくすることを明らかにし, クサリヘビ科ヘビでは, IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のみが高度に多重化したゲノム構造を独自に形成していることが示された。さらに, 比較ゲノ

ム解析と分子系統解析によって、ヒメハブでは向かい合う 2 つの IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が同一 DNA 鎖上で相補的な塩基対結合をすることでステムループ構造を形成して欠落したことを明らかとし、クサリヘビ科ヘビにおける IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの起源とその形成過程の一端をひも解き、ホンハブとヒメハブの種分化プロセスを交えた新たな知見を報告する。

さらに、トカラハブとホンハブの [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイムの比較から、[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイムのサブタイプの種類が島嶼間集団特異的な多様性を示すことを見出した。また、トカラハブ[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子にのみ特異的に挿入されているレトロトランスポゾン LINE-1 の存在を明らかにし、クサリヘビ科ヘビの[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイムの島嶼間多様性を生み出す要因の 1 つとしてレトロトランスポゾンが関与していることを提案し、ハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子で見られる加速進化にもレトロトランスポゾンが関与している可能性についても提案した。加えて、クサリヘビ科ヘビの分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のエピジェネティクスについても報告する。

## 2. 略語一覧及び命名及び略称表記法に関する規則

ここで示す略語は本論文中で頻出するものを記載する。

略語	正式名称
ACTB	Actin, beta
AID	Activation-induced deaminase
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide
BLAST	Basic local alignment search tool
<i>C. m. pyrrhus, Cmp</i>	<i>Crotalus mitchellii pyrrhus</i>
cDNA	Complementary DNA
CDS	Coding sequence
CR1	Chicken repeat 1
CTCF	CCCTC binding factor
CYTB	Cytochrome b
<i>D. typus, Dt</i>	<i>Dispholidus typus</i>
DSB	Double strand break
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
EN	Endonuclease
EST	Expressed sequence tag
EtBr	Ethidium bromide
FISH	Fluorescence in situ hybridization
gDNA	Genomic DNA
<i>G. gallus, Gg</i>	<i>Gallus gallus</i>
INDEL	Insertion- Deletion
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
<i>H. sapiens, Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>L. madagascariensis, Lm</i>	<i>Leioheterodon madagascariensis</i>
LCR	Locus control region
LINE	Long interspersed nucleotide element
LM-PCR	Ligation-mediated PCR
LTR	Long Terminal Repeat
<i>M. musculus, Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
Mul1	Mitochondrial E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
ND4	NADH dehydrogenase, subunit 4
NTC	No Template Control
<i>O. hannah, Oh</i>	<i>Ophiophagus hannah</i>

---

<i>O. Okinavensis, Oo</i>	<i>Ovophois okinavensis</i>
ORF	Open reading frame
OTUD3	Ovarian tumor domain - containing protein 3
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
<i>P. elegans, Pe</i>	<i>Protobothrops elegans</i>
<i>P. flavoviridis, Pf</i>	<i>Protobothrops flavoviridis</i>
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
pI	Isoelectric point
<i>P. m. bivittatus, Pm</i>	<i>Python molurus bivittatus</i>
<i>P. tokarensis, Pt</i>	<i>Protobothrops tokarensis</i>
PCI	Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Mixed
PcRTF	PLA <sub>2</sub> gene-coupled reverse transcriptase fragment
PEG	Polyethylene glycol
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PPIH	Peptidylprolyl Isomerase H
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
rRNA	Ribosomal rna
RT	Reverse transcriptase
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
SD	Segmental Duplication
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SINE	Short interspersed nucleotide element
SNP	Single nucleotide polymorphism
sPLA <sub>2</sub>	Secretory PLA <sub>2</sub>
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
TSD	Target site duplication
UBXN10	Ubiquitin regulatory X domain (UBX) domain-containing protein 10
UTR	Untranslated region
<i>V. b. berus, Vb</i>	<i>Vipera berus berus</i>
VWA5B1	Von Willebrand Factor A Domain Containing 5B1
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside
YBX1	Y Box Binding Protein 1

---

ハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムの命名及び略称表記法に関する基準や規則が存在



せず、研究グループ間で名称が異なることもある。そこで、本論文では混乱を避けるために、本論文中で使用するハブ毒 PLA<sub>2</sub>アイソザイムの命名及び略称表記法は以下に従うこととする。

1. コードされるアミノ酸配列の構造が IIA 型の分泌型 PLA<sub>2</sub>に分類され、3章7節で後述する A, B 及び C 型の遺伝子構造をもつクサリヘビ科ヘビの PLA<sub>2</sub>アイソザイムを毒 PLA<sub>2</sub>アイソザイムと総称する。
2. A 型の遺伝子構造をもつクサリヘビ科ヘビの PLA<sub>2</sub>アイソザイムの中でも毒腺での発現が少なく、毒腺以外の体細胞組織で発現し、採食・捕食の際に明確に毒として機能していないとされる PLA<sub>2</sub>を非毒性 (体細胞性) PLA<sub>2</sub>と呼ぶ。
3. 遺伝子 (DNA, RNA) はイタリック、タンパク質はローマンで表記し、遺伝子名とタンパク質名の前に生物種の学名に由来する略称をイタリックで付す。遺伝子名及びタンパク質名は基本的に我々の研究グループで使用されている名称を用いるが、他の研究グループによって名付けられた別名がある場合には四角括弧“[ ]”内に併記する。
4. 前項に記した生物種の学名に由来する略称は属名のアルファベット表記の頭文字、種小名の頭文字を組み合わせて表記し、以下のように表記する。  
*Pe, Protobothrops elegans; Pf, Protobothrops flavoviridis; Pt, Protobothrops tokarensis; Oo, Ovophis okinavensis.*
5. 同定されてきたハブの棲息島を遺伝子名とタンパク質名の後に記される丸括弧“( )”内に以下に示すように島名に由来する略称を記し、由来する島が異なるがコードされるアミノ酸残基が同一であるものは島名に由来する略称をコンマで区切り、同括弧内に併記する。(A), Amami-Oshima island; (I), Iheya island; (K), Kume island; (O), Okinawa island; (T), Tokunoshima island.
6. 基本的にタンパク質名に準じて遺伝子名を定義するが、*pgPLA 1a, pgPLA 2a, pgPLA 1b, pgPLA 2b, PfPLA 1, PfPLA 2, PfPLA 3, PfPLA 4, PfPLA 5, PfPLA 6, PfPLA 7, PfPLA 8*などの遺伝子ライブラリーから獲得され、機能性に関連が無く、発見番号などが由来となったクローン名を持つ遺伝子に関しては四角括弧“[ ]”内にそのクローン名や別名を併記する。また、それらの推定される翻訳産物について記述する場合は、そのクローン名及び別名及びをローマンで表記する。

### 3. 序論

#### 3-1. ヘビに関する生物学的知見

ヘビは爬虫綱有鱗目ヘビ亜目 (Reptilia: Squamata: Serpentes) に分類される爬虫類の総称であり、細長く四肢の無い形態的特徴を有しており、統合分類学情報システムである ITIS (Integrated Taxonomic Information System) の 2015 年時点の分類によると盲蛇下目 (Scolocophidia) 3 科、真蛇下目 (Alethinophidia) 20 科の 2 下目 23 科からなる (Figure 1) (Integrated Taxonomic Information System, 2015)。いわゆる“毒ヘビ”と定義されるヘビは真蛇下目ナミヘビ上科 (Caenophidia) にのみ存在し、クサリヘビ科 (Viperidae), コブラ科 (Elapidae), モールバイパー科 (Atractaspidae), そして一部のナミヘビ科 (Colubridae) に属するヘビが毒ヘビとして知られている。クサリヘビ科はクサリヘビ亜科 (Viperinae), マムシ亜科 (Crotalinae), ナイトアダー亜科 (Causinae), コブラバイパー亜科 (Azemiopinae) の 4 亜科から構成され、本科ヘビによる咬傷は浮腫や筋壊死を伴った重篤な出血性障害を引き起こすことから、クサリヘビ科ヘビの毒は一般に出血毒と呼ばれている。ナミヘビ科毒ヘビの毒は主に血液凝固系に作用し、クサリヘビ科ヘビの毒に比べ、より強い出血障害を引き起こす。一方、コブラ科ヘビの毒は神経伝達を攪乱し、骨格筋を弛緩・収縮させる障害を引き起こすことから神経毒と呼ばれている。しかし、実際には出血毒を持つとされる種の毒にも神経毒の成分が一部含まれており、逆に神経毒を持つとされる種の毒にも出血毒の成分が一部含まれていることが分かっている (Borja-Oliveira et al., 2007; Chijiwa et al., 2003a; Faiz et al., 2010; Gutiérrez et al., 1992)。ヘビ毒は多彩な生理活性物質の複雑な混合物からなり、その構成成分や各成分比率が種の棲息環境や遺伝子流動などによって大きく異なることが分かっており (Casewell et al., 2009; Lomonte et al., 2014, 2012), ヘビ毒の機能的多様性を生み出す主要因は食餌の差異であると考えられている (Barlow et al., 2009; Daltry et al., 1996; Li et al., 2005)。ヘビ毒は捕食対象の抵抗力を低下させ採餌の成功率を上げると共に、摂食後に対象を効率的に分解し、消化活動を助けるといった二面的な機能を有し、環境の変化に適応する過程で、遺伝的多様性を獲得し、生存に有利に働いていると考えられる。

有毒種ヘビの毒は唾液腺から独自に分岐・形成された毒腺といわれる器官で生産・貯蔵されており、生産・貯蔵された毒は上顎に存在する特徴的な構造を持つ牙を介して対象の体内に注入される (Figure 2) (Jackson, 2003, 2002; Nagy et

al., 2013; Vonk et al., 2008)。一般に多くのコブラ科の毒は上顎の前牙に存在する溝状構造もしくは管状構造を通して対象の体内に注入され、一部の種では毒液を対象に向けて発射することも可能であり、このような牙構造を持つヘビは前牙類と呼ばれている。一方で、ほとんど全てのクサリヘビ科、一部のコブラ科、そしてモールバイパー科のヘビの上顎には可動性の前牙があり、その牙は閉口時には後方に向かって水平に近い状態に倒れているが、開口することで牙が下顎に突き刺さるように垂直方向に立ち上がることができ、毒液は可動性の前牙の内部に存在する管状構造を通して対象の体内に注入される。このような牙構造を持つヘビは管牙類と呼ばれている。そして、ナミヘビ科の中の有毒種ヘビは上顎後方に存在する牙の付け根もしくは溝状構造から毒液を送り出し、後牙類と呼ばれている。また、有毒種のナミヘビ科ヘビの中にはヒキガエルを好んで捕食することで、ヒキガエルに含まれるブフォトキシンを摂取・貯蔵し、毒として分泌・再利用しているものもある (Hutchinson et al., 2007)。

興味深い特徴を有するヘビの生態とその進化を解き明かそうとする動きは次世代シーケンサーの発展と共に近年急速に発展しており、2015年現在ではニシキヘビ科 (Pythonidae) のビルマニシキヘビ (*Python molurus bivittatus*) (Castoe et al., 2013), インドニシキヘビ (*Python molurus molurus*) (Castoe et al., 2011a), クサリヘビ科のヨーロッパクサリヘビ (*Vipera berus berus*) (Liu et al., 2014), サザンスペックルドラトルスネーク (*Crotalus mitchellii pyrrhus*) (Gilbert et al., 2014), コブラ科のキングコブラ (*Ophiophagus hannah*) (Vonk et al., 2013), ナミヘビ科のコモンガーターズネーク (*Thamnophis sirtalis*) (Warren and Wilson, 2015), コーンズネーク (*Pantherophis guttatus*) (Ullate-Agote et al., 2014) の7種のヘビの全ゲノムプロジェクトが進行中である。

### 3-2. 日本に生息するクサリヘビ科ヘビ

現在、日本には特定外来生物として指定され、定着・帰化が確認されているタイワンハブ (*Protobothrops mucrosquamatus*) を除くハブ属 (*Protobothrops*) 3種、ヤマハブ属 (*Ovophis*) 1種、マムシ属 (*Gloydius*) 2種、計6種類のクサリヘビ科マムシ亜科のヘビが棲息し、その棲息地は特異な地理的分布を示す (Figure 3)。

ハブ属のホンハブ (*Protobothrops flavoviridis*) は奄美大島以南の奄美群島から

沖縄諸島まで分布し、現在までに奄美大島、加計呂麻島、請島、与路島、徳之島、沖縄本島、伊平屋島、野甫島、屋我地島、古宇利島、伊江島、水納島、瀬底島、渡名喜島、久米島、奥端島、渡嘉敷島、儀志布島、城島、黒島、伊計島、宮城島、平安座島、浜比嘉島、浮原島、藪地島で棲息が確認されている (Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment, 2011)。体長は 100~200 cm で日本に棲息する毒へびでは最大種、体色は黄白色の地に黒褐色の複雑な模様を呈する個体が多いが、棲息する島間・地域間でその色・模様は大きく異なる。幼蛇のうちにはマウスやトガリネズミなどの小型哺乳類の他にも爬虫類や両生類も食餌とするが、成蛇になるとラットやマウスなどの哺乳類を好んで捕食するようになる (Mishima, 1966a, 1966b; Nishimura et al., 1991)。ホンハブの毒は分泌量、そしてその毒性が共に極めて高く、一回の排毒量は (乾燥重量) 300 mg に達し、マウスの腹腔内投与時の LD<sub>50</sub> 値はヒメハブの毒に比べ 3.75 倍ほど低く、咬傷時には重篤化しやすい (Mitsuhashi et al., 1961)。また、気性も荒いため人に対する咬傷被害も多い。これまで当研究室や柴田らによって行われた分子遺伝学的調査 (unpublished) によると、奄美群島に棲息するホンハブと沖縄諸島に棲息するホンハブの遺伝的距離よりも、奄美群島に棲息するホンハブとトカラハブの遺伝的距離の方が近いということが指摘されている。

トカラハブ (*Protobothrops tokarensis*) はトカラ列島の宝島と小宝島にのみ棲息し、両島は日本におけるハブ属へび分布の北限地である。体長は 60~100 cm であり、淡褐色・灰色の地に暗褐色の楕円形の斑紋が並ぶ体色を示す個体が多く、黒色型個体も良く見られる。ネズミ等の小型哺乳類、小型鳥類、爬虫類、両生類などを餌とし、毒の毒性はホンハブに比べると非常に弱いことが知られている。しかしながら近年、当研究室や柴田らによって行われた分子遺伝学的調査 (unpublished) を始めとして、トカラハブと奄美大島のホンハブは非常に近縁な系統であり、その 2 種を同種として扱って良いかもしれないとの提案もなされている。

サキシマハブ (*Protobothrops elegans*) は与那国島、波照間島を除く八重山諸島に分布し、石垣島、西表島、外離島、内離島、小浜島、竹富島、黒島、嘉弥真島に棲息し、沖縄本島には持ち込まれた個体が定着・帰化している (Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment, 2011)。体長 60~120 cm で茶褐色・灰褐色の地に暗褐色の斑紋が並ぶ体色を示す個体が多い。ネズミ等の小型哺乳類、小型鳥類、爬虫類、両生類などを餌とし、一回の排毒量は (乾燥重量) 124 mg

程度で、マウスの腹腔内投与時のLD<sub>50</sub>値はホンハブの毒に比べ1.2倍ほど高く、ホンハブの咬傷と比べると重篤な障害を引き起こすことは無いとされている (Mitsuhashi et al., 1961)。

ヤマハブ属 (*Ovophis*) のヒメハブ (*Ovophis okinavensis*) は奄美大島以南の奄美群島から沖縄諸島まで分布し、奄美大島、加計呂麻島、請島、与路島、徳之島、沖縄本島、伊平屋島、野甫島、具志川島、伊是名島、屋那覇島、屋我地島、伊江島、渡名喜島、久米島、座間味島、安室島、阿嘉島、慶留間島、外地島、屋嘉比島、久場島、渡嘉敷島、儀志布島、城島、黒島、前島、仲島、端島で棲息が確認されている (Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment, 2011)。全長 30~80 cm で茶褐色・灰白色の地に暗褐色の斑紋が並ぶ体色を示し、胴回りの太い形態的特徴を有する。水辺で良く見られ、幼・成蛇共にカエルを好んで捕食しており (Kadota, 2011; Mori and Toda, 2011; Mori et al., 2002), 一回の排毒量は (乾燥重量) 22.2 mg 程度であり、マウスの腹腔内投与時のLD<sub>50</sub>値はホンハブの毒に比べ 3.75 倍ほど高く、ホンハブの咬傷と比べると重篤な障害を引き起こすことは無いとされている (Mitsuhashi et al., 1961)。

マムシ属 (*Gloydus*) のニホンマムシ (*Gloydus blomhoffii*) はトカラ列島以南の南西諸島と対馬を除く日本全域に棲息し、体長は 45~65 cm で赤褐色・暗褐色の地に暗色の銭型の大きな斑紋が並んだ胴回りの太い形態的特徴を有する。舌色は暗褐色である。主にカエルやネズミを食し、ハブ属のへびに比べると牙も小さく、毒液の注入量も少ないが、その毒性はホンハブに比べ遥かに強い (Homma et al., 1967; Kosuge, 1968)。

ツシママムシ (*Gloydus tsushimaensis*) は対馬にのみ棲息しており、全長は 40~60 cm で灰褐色から赤褐色の地に淡黒色の銭型の小さな斑紋が並んだ胴回りの太い形態的特徴を有する。舌色は淡紅色である。大陸系種の特徴を有するマムシであり、主にカエルやネズミを食し、その気性はニホンマムシと比べると非常に神経質で攻撃的である。

一般に、クサリへび科へびの毒は主にホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), セリンプロテアーゼ (SP), メタロプロテアーゼ (MP), 高システインリ分泌タンパク質 (CRISP), C型レクチンタンパク質 (CTL), L-アミノ酸オキシダーゼ (LAO), 神経成長因子 (NGF), ディスインテグリン (ADAM) などからなり、これらをコードする遺伝子は多くの場合、遺伝子重複によって遺伝子コピー数を増やした多重遺伝子ファミリーを形成し、続く変異の蓄積によってアイソザイムの機能的

多様性を獲得している (Figure 4) (Aird et al., 2013; Casewell et al., 2009; Francischetti et al., 2004; Oda-Ueda et al., 2004; Rodrigues et al., 2012; Rokyta et al., 2013)。多彩な生理活性物質の複雑な混合物からなるヘビ毒は、ヘビ種間のみならず、種の棲息環境でもその構成成分や各成分比率が異なっている。その違いを生み出す理由としては、毒成分をコードする遺伝子の変異や、その構成と割合の変化が個体の生命活動に深刻ではなく致死性の影響を及ぼさない、つまり機能的制約が弱い、ということに加えて各棲息環境における捕食対象や採餌条件の変化に従って、生存に有利な集団が自然選択で生き残った適応進化の結果であると考えられている (Barlow et al., 2009; Daltry et al., 1996; Li et al., 2005)。隔絶された環境に棲息する生物はその環境に適応した独自の進化を辿ることが知られており、特に島嶼環境は地理的隔離によって異所的種分化が促進され、各集団の多様化が大きいとされる。日本南西諸島に棲息するハブ属ヘビの生態学的・進化学的な調査は、生物の進化と環境適応、遺伝子・ゲノムの進化、さらには近年新たに提唱されている“Venomics”と呼ばれる包括的な毒素学領域の理解を深める上で貴重な情報を提供すると期待される。

### 3-3. ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) の構造と機能

ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>) [EC 3.1.1.4] は広義にはグリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解して脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素群の総称である (Figure 5) (Dijkstra et al., 1983, 1981)。PLA<sub>2</sub> のよく知られた機能の一つとしてプロスタグランジン類、トロンボキサン類、ロイコトリエン類など一連の脂質メディエーター生合成の初発段階の制御が挙げられる。PLA<sub>2</sub> は細胞膜を構成するホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルクロリン、ホスファチジルイノシトールなどのリン脂質からアラキドン酸を遊離させ、その後遊離したアラキドン酸はアラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路でシクロオキシゲナーゼによりプロスタグランジン類やトロンボキサン類に変換される一方でリポキシゲナーゼによりロイコトリエン類に代謝され、合成されたエイコサノイドは生体内での様々な生理機能に関与することが分かっている (Figure 6) (Balsinde et al., 2002; Dennis et al., 2011; Korotkova and Jakobsson, 2014)。

近年のヒトゲノム計画をはじめとする大規模な遺伝子情報の集積により、哺

乳類ゲノムには 30 以上の PLA<sub>2</sub> 遺伝子が含まれていることが明らかとなった。見出された PLA<sub>2</sub> は、アミノ酸配列に基づいて現在までに I 型から XVI 型までの 16 グループに分類され、それらのグループは機能的特徴に基づいて分泌型 PLA<sub>2</sub> (secretory PLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub>), 細胞質型 PLA<sub>2</sub> (cytosolic PLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>), Ca<sup>2+</sup>非依存型 PLA<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>-independent PLA<sub>2</sub>, iPLA<sub>2</sub>), 血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (Platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH), リソソーム型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (Lysosomal phospholipase A<sub>2</sub>, LPLA<sub>2</sub>), アディポサイト型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (adipose-specific PLA<sub>2</sub>, AdPLA<sub>2</sub>) の 6 つに大別される (Table 1) (Dennis et al., 2011)。特に分泌型 PLA<sub>2</sub> に対する研究は歴史が古く、当初はコブラ科ヘビの毒から見出される N 末端のプロペプチドの限定分解によって活性型へ変換される特徴を持つ分泌型 PLA<sub>2</sub> は I 型、クサリヘビ科ヘビの毒から見出される C 末端に突出配列を持つ分泌型 PLA<sub>2</sub> は II 型 (Heinrikson et al., 1977), 加えてハチ毒から見出される分泌型 PLA<sub>2</sub> は III 型と定義されていた (Davidson and Dennis, 1990)。1980 年代になるとヒトをはじめとする哺乳動物からも I 型に相同な PLA<sub>2</sub> が膵臓消化液から、II 型に相同な PLA<sub>2</sub> が炎症侵出液からそれぞれ精製され、それらの構造が決定された (Fleer et al., 1978; Hara et al., 1989; Kramer et al., 1990; Seilhamer et al., 1989; Verheij et al., 1983)。そして、それら哺乳動物由来の 2 つの PLA<sub>2</sub> はそれぞれ IB 型, IIA 型と新たに分類, 定義され, さらにコブラ科ヘビの毒由来の PLA<sub>2</sub> は IA 型, クサリヘビ科アフリカアダー属 (*Bitis*) の毒由来の PLA<sub>2</sub> は IIB 型と新たに定義された (Davidson and Dennis, 1990)。さらに, 近年の次世代シーケンサーの急速な発展に伴う様々な生物種の大規模な遺伝子情報の集積を背景に, 現在までに分泌型 PLA<sub>2</sub> は一次構造の違い (pancreatic loop 構造, N 末端及び C 末端の延長配列), 分子内ジスルフィド結合を構成する Cys 残基の数と位置の違い, そして特定組織での局在などに従って, 18 グループ (IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XIIA, XIIB, XIII, XIV) に細分されている (Table 2, Figure 7) (Dennis et al., 2011; Schaloske and Dennis, 2006)。特に, ヒト種をはじめとする哺乳類ゲノムに共通してコードされているのは, 11 グループ (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIB) の分泌型 PLA<sub>2</sub> であり (Dennis et al., 2011; Murakami et al., 2011, 2010; Schaloske and Dennis, 2006), IB 型 PLA<sub>2</sub> は主に膵臓で発現し, 食餌のリン脂質の消化に関与することから膵 PLA<sub>2</sub> とも呼ばれている。前駆体タンパク質として分泌された IB 型 PLA<sub>2</sub> は腸管内でトリプシンによる N 末端プロペプチドの限定分解を受けて活性型として機能する。さら

に IB 型 PLA<sub>2</sub> は pancreatic loop と呼ばれる特徴的な構造を有している (Huang et al., 1997; Kini, 1997)。一般にコブラ科へびの毒に含まれる PLA<sub>2</sub> は IA 型に分類され、そのアミノ酸配列は IB 型に非常に高い相同性を示し、活性部位の  $\alpha$ -ヘリックス領域から  $\beta$ -wing 領域の間に特徴的な elapid loop 構造を有している (Alape-Girón et al., 1999)。IA 型 PLA<sub>2</sub> は主に神経毒として機能し、運動神経終末への結合、変性によって、シナプス小胞の枯渇及びアセチルコリン放出障害を引き起こす (Dixon and Harris, 1999; Harris, 2004; Prasarnpun, 2005; Ranawaka et al., 2013; Rigoni, 2004; Rosso et al., 1996)。IIA 型 PLA<sub>2</sub> は慢性関節リウマチの患者滑膜滲出液から見出され、炎症反応に関与することから炎症性 PLA<sub>2</sub> とも呼ばれる (Boilard et al., 2010; Hara et al., 1989; Touqui and Alaoui-El-Azher, 2001)。また、小腸などでも発現しており、感染性細菌の細胞膜破壊に関与しているとされる (Buckland et al., 2000; Foreman-Wykert et al., 1999; Grönroos et al., 2002)。アフリカアダー属 (*Bitis*) を除くクサリヘビ科へびの毒にはこの IIA 型の PLA<sub>2</sub> が多く含まれており、クサリヘビ科へびの毒 PLA<sub>2</sub> は一次構造がわずかに異なる構造をもつ分子群、アイソザイム系を構成する (Chijiwa et al., 2012; Nakashima et al., 1995, 1993; Ohno et al., 2002)。IIA 型のへび毒 PLA<sub>2</sub> は 49 位のアミノ酸残基の違いによって大きく [Asp<sup>49</sup>]型と [Lys<sup>49</sup>]型の 2 つに分けられる (Maraganore and Heinrikson, 1986; Maraganore et al., 1984)。49 位のアミノ酸残基は活性部位内に存在し、Ca<sup>2+</sup> との相互作用に関わっているため、[Lys<sup>49</sup>]型は [Asp<sup>49</sup>]型に比べて PLA<sub>2</sub> 活性が低い (Dhillon et al., 1987; Kihara et al., 1992; Yamaguchi et al., 1997)。一般にこれらの IIA 型 PLA<sub>2</sub> は筋毒素として定義されているが (Lomonte and Gutiérrez, 2011; Mora-Obando et al., 2014)、その機能は筋壊死や筋収縮などの筋細胞に対する障害のみならず、神経毒性、溶血毒性、浮腫誘導活性などの機能も発揮することが報告されている (Chijiwa et al., 2003a; Ferreira et al., 2013; Petrovič et al., 2004; Yamaguchi et al., 2001)。PLA<sub>2</sub> 活性の強い [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> は細胞膜のリン脂質を加水分解することで細胞への障害を引き起こすのに対して、触媒活性の低い [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> は自身の C 末端領域を介した細胞膜との相互作用で細胞に障害を与えるとされ、さらには [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> が細胞膜のリン脂質を加水分解した場所に [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> が入り込み、2 つの PLA<sub>2</sub> が協調して細胞に強い障害を引き起こすとも報告されている (Andrião-Escarso et al., 2000; Lomonte and Gutiérrez, 2011; Lomonte and Rangel, 2012; Montecucco et al., 2008; Mora-Obando et al., 2014)。

へび毒に含まれている PLA<sub>2</sub> に関する研究と解析は 1980 年代に盛んに行われ、



構造解析や生理機能解析が広く行われてきたが、他のグループの分泌型 PLA<sub>2</sub> に関してはトランスジェニックマウスによる機能亢進及び阻害による試みや免疫染色による組織内分布同定などが行われているものの、生体内での明確な生理機能や生体内基質及び酵素反応生成物に関しては現在でも不明とされる部分が多く残されている (Dennis et al., 2011; Murakami et al., 2015, 2011)。

### 3-4. ハブ属ヘビより単離された PLA<sub>2</sub>アイソザイム

IIA 型及び IIB 型の分泌型 PLA<sub>2</sub> に分類されるクサリヘビ科ヘビの毒 PLA<sub>2</sub> は、これまでに数多く研究されており、その多くが 119-124 アミノ酸残基からなることが明らかとされている (Brunie et al., 1985; Holland et al., 1990; Renetseder et al., 1985; Suzuki et al., 1995)。以下に、日本南西諸島に棲息する 4 種のクサリヘビ科マムシ亜科ヘビから見出された PLA<sub>2</sub> 分子の特徴を紹介する。

#### 3-4-1. ホンハブ (*Protobothrops flavoviridis*)

当初、当研究室では徳之島のホンハブを中心に、その毒に含まれる PLA<sub>2</sub> アイソザイムの体系的な調査研究が行われてきた。徳之島のホンハブ粗毒からは 122 アミノ酸残基からなる 6 つの異なる PLA<sub>2</sub> アイソザイム (*Pf*PLA<sub>2</sub>, *Pf*PLA-A, *Pf*PLA-B, *Pf*PLA-N, *Pf*BPI, *Pf*BPII) を単離・特徴付け、それらは全て IIA 型の分泌型 PLA<sub>2</sub> であることを明らかとした。さらに、それらアイソザイムの一次構造とそれに関連する生理活性に従って、中性[Asp<sup>49</sup>]タイプである *Pf*PLA<sub>2</sub> (pI 7.9, 低いリン脂質分解活性・筋壊死活性) (Kihara et al., 1992; Oda et al., 1990), 塩基性 [Asp<sup>49</sup>]タイプである *Pf*PLA-A と *Pf*PLA-B (pIs 8.5 と 8.6, 浮腫誘導活性) (Yamaguchi et al., 2001), 高塩基性[Asp<sup>49</sup>]タイプである *Pf*PLA-N (pI 10.3, 神経毒活性) (Chijiwa et al., 2003a), [Lys<sup>49</sup>]タイプである *Pf*BPI と *Pf*BPII (pIs 10.2 と 10.3, 極めて低いリン脂質分解活性・高い筋壊死活性) (Kihara et al., 1992; Liu et al., 1990; Yoshizumi et al., 1990), の 4 つのサブタイプに分類できることを明らかにした (Figure 8) (Chijiwa et al., 2003a)。加えて、徳之島ホンハブ毒腺 cDNA ライブラリーやゲノムライブラリーから、*Pf*PL-X', *Pf*[Thr<sup>37</sup>]PLA<sub>2</sub>, *Pf*pgPLA 1a, *Pf*pgPLA 2a, *Pf*pgPLA 1b, *Pf*pgPLA 2b といった PLA<sub>2</sub> アイソザイムをコードする cDNA や遺伝子を同定した (Figure 8, 9) (Nakashima et al., 1993; Oda et al., 1990; Ogawa et al., 1992)。

奄美大島のホンハブの粗毒からは, *PfPLA2* (Chijiwa et al., 2003b), *PfPLA-B'* (Chijiwa et al., 2003b), *PfPLA-N* (Chijiwa et al., 2003a), *PfBPI* (Chijiwa et al., 2003b), *PfBPII* (Chijiwa et al., 2003b), *PfBPIII* (Murakami et al., 2009), *PfPL-X* (Kini et al., 1986) が同定され, それらをコードする遺伝子も単離されている (Figure 10)。さらに, 奄美大島のホンハブからは 8 つの IIA 型の  $PLA_2$  アイソザイム遺伝子が並んだ約 45 kbp のコスミドクローンが単離され, 完全長の塩基配列が決定された (Chijiwa et al., 2012; Ikeda, 2011; Ikeda et al., 2010)。各  $PLA_2$  アイソザイム遺伝子は, *PfpgPLA 1b* をコードする *PfPLA 8*, *PfPLA2* [*PfpgPLA 1a*] をコードする *PfPLA 7*, *PfBPII* をコードする *PfPLA 2*, *PfPLA-N* をコードする *PfPLA 4*, *PfPLA-B* をコードする *PfPLA 5* 及び新規の  $PLA_2$  をコードする *PfPLA 1*, *PfPLA 3*, *PfPLA 6* とそれぞれ名付けられた (Figure 11) (Chijiwa et al., 2012; Ikeda, 2011; Ikeda et al., 2010)。

沖縄本島及びその属島である伊平屋島・久米島に棲息するホンハブからは *PfPLA2*, *PfPLA-N*, *PfPL-Y* の 3 つの  $PLA_2$  アイソザイムがそれぞれ単離され, その一次構造が決定された (Figure 12) (Chijiwa et al., 2013b, 2003a, 2003b)。

奄美大島, 徳之島, 沖縄本島, 伊平屋島, 久米島のホンハブの毒タンパク質のカラムクロマトグラフィー溶出プロファイルと比較したところ島嶼特異的であることが示され (Figure 13), 特に, [Lys<sup>49</sup>] $PLA_2$  アイソザイムのサブタイプのレパートリーは島嶼間での差が著しく, 徳之島のホンハブ毒では BPI と BPII に相当する 2 つのピークのみが確認できるのに対して, 奄美大島のホンハブ毒では BPI, BPII 及び BPIII に相当する 3 つピークが確認できる。一方, 沖縄本島及びその属島である伊平屋島及び久米島のホンハブ毒では [Lys<sup>49</sup>] $PLA_2$  アイソザイムが含まれるピークが一切存在していなかった。このことはゲノミック PCR とサザンブロット解析とサブタイプ特異的ポリモルフィズム解析によって, 沖縄諸島のホンハブでは BPI と BPII をコードする遺伝子が融合し, 偽遺伝子化してしまったためであることが示された (Figure 14) (Chijiwa et al., 2000)。

また, これら各島のホンハブのゲノムからは *PfPLA 6* とオーソログと考えられる祖先型 [Asp<sup>49</sup>] $PLA_2$  (Masuda, 2011), IB 型の隣  $PLA_2$  (Irie, 2009; Nakasone, 2006) をコードする遺伝子も同定されている。

### 3-4-2. トカラハブ (*Protobothrops tokarensis*)

トカラハブ粗毒からは, Tsai らによって 4 つのそれぞれ異なる  $PLA_2$  アイソザイムが同定されていたが, いずれも N 末端の 29 アミノ酸残基が解読されたのみ

であった (Tsai et al., 2004)。そこで、当研究室で改めてトカラハブの毒タンパク質の分画と解析及び毒腺 cDNA の解析を行い、中性[Asp<sup>49</sup>]タイプである *PtPLA*<sub>2</sub>, 塩基性[Asp<sup>49</sup>] タイプである *PtPLA*-B, 強塩基性[Asp<sup>49</sup>]タイプである *PtPLA*-N, そして[Lys<sup>49</sup>]タイプである *PtBPI* の 4 つであることを明らかとした。これらの N 末端のアミノ酸配列は Tsai らが報告したそれらとそれぞれ一致していた (Figure 15) (Hayama, 2005; Yatsui, 2006)。

また、トカラハブのゲノムからも *PfPLA* 6 とオーソログと考えられる祖先型 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> : *PtPLA* 6 (Masuda, 2011), IB 型の隣 PLA<sub>2</sub> (Irie, 2009; Nakasone, 2006) をコードする遺伝子も同定されている。

### 3-4-3. サキシマハブ (*Protobothrops elegans*)

サキシマハブの粗毒からは全体のアミノ酸配列が[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイムとほぼ一致するアイソザイムが 2 つ, *PeBP*(R)I と *PeBP*(R)II (pIs 9.2 と 9.3, 筋壊死活性・浮腫誘導活性) が同定されていたが、この 2 つのアイソザイムでは共通して 49 位のアミノ酸がアルギニンに置換しており、全アミノ酸残基数も 121 であることが明らかにされた (Figure 16) (Chijiwa et al., 2006)。さらにサキシマハブ毒腺 cDNA の解析から、中性[Asp<sup>49</sup>]タイプである *PePLA*<sub>2</sub> をコードする転写産物も見出された (Chijiwa et al., 2006)。また、サキシマハブのゲノムからも *PfPLA* 6 のオーソログと考えられる祖先型[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> : *PePLA* 6 (Masuda, 2011), IB 型の隣 PLA<sub>2</sub> (Chijiwa et al., 2013a; Irie, 2009; Nakasone, 2006) をコードする遺伝子も同定されている。

### 3-4-4. ヒメハブ (*Ovophis okinavensis*)

信久らによる毒腺 cDNA ライブラリー及びゲノムライブラリーの探索により、ヒメハブには毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムをコードする遺伝子が *OoPLA*<sub>2</sub>-o1, *OoPLA*<sub>2</sub>-o2 及び *OoPLA*<sub>2</sub>-o3 の 3 つが存在することが示されていた (Figure 17) (Nobuhisa et al., 1996)。一方で、Tsai らによるヒメハブの粗毒に対するカラムクロマトグラフィーによっても *OoPLA*<sub>2</sub>-o1 が単離・同定されている (Tsai et al., 2012)。ヒメハブで見つかる IIA 型 PLA<sub>2</sub> をコードする 3 つ遺伝子のうち、恒常的に発現しているのは *OoPLA*<sub>2</sub>-o1 のみであり、*OoPLA*<sub>2</sub>-o2 と *OoPLA*<sub>2</sub>-o3 は偽遺伝子化していると推測されている (Nobuhisa et al., 1996; Tsai et al., 2012)。さらに、ヒメハブゲノムからは IB 型の隣 PLA<sub>2</sub> (Irie, 2009; Nakasone, 2006) をコードする遺伝子も同定されてい

る。

### 3-5. 生物進化のプロセスと現代の進化論

生物の進化とは生物個体群の性質が世代を経るにつれて累積的に変化する現象のことを示し、個体群内の遺伝的変化と個体群内の遺伝子頻度の変化が進化と定義されることもある。

生物の進化を説明する上で根幹をなす“自然選択説” (Natural selection) はチャールズ・ダーウィンによって提唱され、現在では自然環境が生物に無目的に生じる突然変異を選別し、進化に一定の方向性を与える理論として知られている。自然選択説は適者生存 (Survival of the fittest) の概念に基づくことから自然淘汰説とも呼ばれ、自然選択による進化は適応を生み出すとされている。一方、木村らによって提唱された“中立進化説” (Neutral theory of molecular evolution) は分子レベルでの遺伝子の突然変異はそのほとんどが自然選択に対して有利でも不利でもなく中立的であり、それ以外はほとんどが有害な変異で有利な変異は稀であり、突然変異と遺伝的浮動が進化の主な要因であるとする理論のことである (Kimura and Ohta, 1971; Kimura and Ota, 1974; Kimura, 1969, 1968)。中立的な突然変異を起こした遺伝子の集団への広まりには運の良さ (Survival of the luckiest) が重要であるとされ、中立的な進化は前適応を生み出す原因であると考えられている。しかし、単純な中立説では生物集団の大きさに関わらずタンパク質の多様性がほぼ一定であることと、生物の世代時間と突然変異率の問題を解決することができなかつたため、太田らによって“ほぼ中立説” (Nearly neutral theory of molecular evolution) という概念が新たに提唱された (Ohta, 1973)。これは自然選択と遺伝的浮動の両効果のバランスが進化現象を司っているとするもので、自然選択の強さは集団の大きさに影響を受けるという予測に基づいて、有害な変異と中立な変異の間に生存に少しだけ不利な弱有害変異“ほぼ中立な変異”という概念を導入した理論である。ほぼ中立説では集団が大きいほど自然選択が有効に働いて変異は集団から除かれることが多くなり、集団が小さいと遺伝的浮動により中立な変異をもった個体が集団を担うようになって集団の遺伝子の置換速度が高まるとされ、単純な中立進化説だけでは説明できなかつた問題を解決している。

自然選択説と中立進化説はそれぞれ対立した理論ではなく、現在では自然選

択説，中立進化説，ほぼ中立分子生物学及び集団遺伝学等の考えを取り入れた説が広く受け入れられ，進化，種分化の一連のプロセスが理解されている。現在では，ほとんどの変異はほぼ中立的であり，その変異は次世代への遺伝を経て，遺伝的浮動による集団への固定・定着，集団が生殖的隔離を受けることで種分化が生じるとされている。

### 3-6. 加速進化

1つのアミノ酸は3つのヌクレオチドのトリプレット単位からなるコドンにコードされ，コドンのそれぞれの座位には，塩基置換が生じてもアミノ酸に変化を引き起こさない座位：同義座位 (Synonymous site)，とアミノ酸に変化を引き起こす座位：非同義座位 (Non-synonymous site)，がある。同義座位あたりの同義置換数は  $K_S$  または  $d_S$ ，非同義座位あたりの非同義置換数は  $K_A$  または  $d_N$  として，近似法 (Li et al., 1985; Nei and Gojobori, 1986; Zhang et al., 2006)，もしくは最尤法 (Goldman and Yang, 1994; Posada, 2003) に基づいたアルゴリズムを用いて算出される。そして， $K_A/K_S$  の値が 1 より大きい場合は正の自然選択 (Positive selection) が，1 より小さい場合は負の自然選択 (Negative selection) が，1 の場合は中立的な選択が，それぞれ働いたと推測される (Anisimova et al., 2001; Yang and Chen, 2012; Yang and Nielsen, 2000; Yang, 2006)。一般的に，機能的に重要な分子や領域は機能的制約が強いため置換速度が遅い傾向があり，逆に機能的に重要でない分子や領域では機能的制約が低いいため置換速度が速い傾向がある。特に，タンパク質をコードする遺伝子や領域での同義置換速度は非同義置換速度よりも圧倒的に速く，加えて，偽遺伝子やイントロンなどの領域での塩基置換速度はさらに速いことが分かっており，これらの観察は中立説を支持している。ところが，ヘビ類の Kunitz 型セリンプロテアーゼインヒビター (Doley et al., 2009)，ハブ属ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> (Kini and Chan, 1999; Nakashima et al., 1995, 1993; Nobuhisa et al., 1996; Ogawa et al., 1996; Ohno et al., 2002)，Fetuin (Tanaka et al., 2013)，ハブ毒セリンプロテアーゼ (Deshimaru et al., 1996)，コブラ科ヘビの Three-finger toxin (3FTx) (Gong et al., 2000)，魚類のガレクチン (Ogawa et al., 2002, 1999)，イソギンチャクの Blood depressing substance (BDS) (Nicosia et al., 2013)，イモガイの毒ペプチド (Olivera et al., 2012) に代表される分子では，(後述するが，これらは多重遺伝子に由来する複数のアイソザイムを有し，アイソザイム間比

較において  $K_A/K_S$  値が 1 を上回る),  $K_A/K_S$  値が 1 を上回ることが見出されている (Figure 18)。これら分子は機能的な多様性を獲得するために、遺伝子の重複により多重遺伝子ファミリーを形成し、多重遺伝子に由来する複数のアイソザイムを有し、それらは正の選択によって加速された進化速度をもつ分子であることから、それらは加速進化 (Accelerated Evolution) している遺伝子と呼ばれている。加速進化を引き起こす分子機構については、イントロンの特徴的なステムループ構造が関与する説 (Forsdyke, 1995), Accelerated segment switch in exons to alter targeting (ASSET) と呼ばれる構造が関与する説 (Doley et al., 2009), タンパク質構造内部ドメインの欠失が促進する説 (Casewell et al., 2011), DNA 複製の正確性を欠いた DNA ポリメラーゼが関与する説, エピジェネティックな塩基修飾が関与する説などが検討されているが未だ解明されてはいない。

### 3-7. クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムをコードする遺伝子とそのゲノム構造

クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムはおよそ 2 kbp の遺伝子にコードされているが、71 個の既知クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の塩基配列アラインメント解析から、それら全てが 4 エクソン、3 イントロンからなる共通構造をしており、第 1 エクソンと第 2 イントロンの特徴的な 3 つのインデル (Insertion-Deletion, INDEL) に従って A, B, C の 3 タイプに分類できることが示された (Figure 19) (Chijiwa et al., 2012)。この特徴的なインデルは短鎖散在反復配列 (Short interspersed nuclear element, SINE) に由来するものであると考えられ、S1EX 1, S2EX 1, 及び SINT 2 と名付けられた (S2EX 1 は S1EX 1 を内包している)。A タイプの構造をもつ遺伝子は *PfPLA 6*, *OoPLA<sub>2</sub>-o2* などであり、それらは B 及び C タイプの遺伝子で見られるような SINT 2 構造が見られず、毒腺での発現が見られないもしくは極めて低いことから、毒遺伝子としては「サイレント」な IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> の祖先型にあたるのではないかと推定された (Chijiwa et al., 2012)。加えて、S1EX 1 が欠失している構造をもつ B タイプの遺伝子はクサリヘビ亜科に属するヘビからのみ見出されており、一方で S2EX 1 が欠失している構造をもつ C タイプの遺伝子はマムシ亜科に属するヘビからのみ見出されることも示され、マムシ亜科に属するホンハブ、トカラハブ、サキシマハブ、そしてヒメハブで見つかった全てのハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が、「サイレン

ト」な祖先型 IIA 毒 PLA<sub>2</sub> をコードする *PfPLA 6* (ホンハブ), *PtPLA 6* (トカラハブ), *PePLA 6* (サキシマハブ) 及び *OoPLA<sub>2</sub>-o2* (ヒメハブ) を除く, この C タイプ構造を持つことも明らかとなった。

さらに, 日本南西諸島のクサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子はゲノム上でタンデムに並んで存在していることが見出されてきた。まず, 徳之島のホンハブでは 2 つのゲノム断片に *PfpgPLA 1a* と *PfpgPLA 1b* が, *PfpgPLA 2a* と *PfpgPLA 2b* が連なっていることが示された (Figure 9) (Nakashima et al., 1993)。奄美大島のホンハブゲノム約 45 kbp には 8 つの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子がタンデムに並んでいることも示された (Figure 11) (Chijiwa et al., 2012; Ikeda, 2011; Ikeda et al., 2010)。その上, ホンハブゲノムに対するサザンブロット解析からは毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子がハプロイドあたり 16~32 コピー存在し, それらがタンデムに連なり並んでいること (Nakashima et al., 1993), FISH 解析からはホンハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子がマイクロ染色体上の異なる 2 つの遺伝子座に局在することが示された (Ikeda et al., 2010)。一方ヒメハブでは, サザンブロット解析から *OoPLA<sub>2</sub>-o1*, *OoPLA<sub>2</sub>-o2*, 及び *OoPLA<sub>2</sub>-o3* の 3 つの PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子がタンデムに並んでおり, ホンハブのように長大なクラスター構造を形成しているわけではないことが示唆されている (Figure 17) (Nobuhisa et al., 1996)。

遺伝子が密に連なり合ったクラスター構造を形成する分子機構としては不等交叉による遺伝子重複が考えられ, 池田らによって *Scomb* と名付けられたヒト組換えホットスポット (recombinational hot spot, RHS) 様塩基配列が染色体組換えの足場として機能しているのではないかと指摘されている (Figure 20) (Ikeda et al., 2010)。また, 奄美大島のホンハブゲノム断片中には, IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とリンクして共に多重化したように見える CR1 (Chicken repeat 1) の逆転写酵素を部分的にコードする DNA 断片: PcRTF (PLA<sub>2</sub> gene-coupled reverse transcriptase fragment) が見出されており, 毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の多重化への長鎖散在反復配列 (Long interspersed nuclear element, LINE) の関与も指摘されている (Ikeda et al., 2010)。

### 3-8. ゲノム内に散在するレトロトランスポゾン

ヒトをはじめとする多くの生物のゲノムには転移因子 (Transposable element) と呼ばれる塩基配列が数多く存在している。ヒトでは全ゲノムの約 40%以上を

転移因子が占めるとされる (Hulme et al., 2009; Lander et al., 2001; Xing et al., 2013)。転移因子は2つの大きなクラスに分けられ、転写と逆転写の過程を経るRNA型のはクラス I, DNA断片が直接転移するDNA型のはクラス IIに分類されている (Figure 21) (Cordaux and Batzer, 2009)。前者はレトロトランスポゾン (Retrotransposon), 後者はDNAトランスポゾン (DNA transposon) と一般に呼ばれており、その転移機序も大きく異なる (Figure 22) (Levin and Moran, 2011)。クラス I のレトロトランスポゾンはさらに末端の長反復配列 (Long Terminal Repeat) の有無によりLTR型とNon-LTR型に分けられ、さらにLTR型で外殻構成タンパク質であるエンベロープをコードする遺伝子 (*Envelope*, *env*) を持つものは特にレトロウイルス (Retrovirus) と呼ばれる。Non-LTR型のレトロトランスポゾンはLINEとSINEに分けられ、LINEは2つの特徴的な読み枠 (open reading frame, ORF), ORF1とORF2, を持ち、ORF2には転移に必要な逆転写酵素 (Reverse transcriptase, RT) とエンドヌクレアーゼ (Endonuclease, EN) がコードされているのに対して、SINEは転移に必要な逆転写酵素やエンドヌクレアーゼをコードしておらず他の転移因子由来の逆転写酵素やエンドヌクレアーゼを利用することで転移を引き起こす。また、LINEの転写はRNAポリメラーゼ II を介して行われるが、SINEの転写はRNAポリメラーゼ III を介して行われるなどの違いがある (Ohshima and Okada, 2005)。現在、LINEは構造的な特徴に基づいてR2, Randl, L1, RTE, I, Jockeyの6グループに分けられている (Figure 23) (Kapitonov et al., 2009; Kojima and Fujiwara, 2005; Malik et al., 1999; Permanyer et al., 2006)。

2011年からようやく着手され始めたヘビのゲノムプロジェクト解析データから、ヘビゲノムにはRTEグループのBov-B, JockeyグループのCR1, L2などのLINEが多く含まれていることが明らかとなった (Castoe et al., 2013, 2011a, 2011b)。また、クサリヘビ亜科ヘビのIIA型毒PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の近傍にはBov-B LINEが存在しているという報告もある (Kordiš and Gubenšek, 1998, 1997; Župunski et al., 2001)。当研究室で解読した奄美大島ホンハブゲノムの約45 kbpの断片に含まれている8つのIIA型毒PLA<sub>2</sub>遺伝子のうち、4つの遺伝子：*PfPLA 2*, *PfPLA 3*, *PfPLA 4*, *PfPLA 5*, の3'下流にPcRTFと名付けたCR1様LINEが接続しており、IIA型毒PLA<sub>2</sub>遺伝子とPcRTFが1つのユニット構造を形成していることを見出した (Figure 11) (Ikeda et al., 2010)。Figure 11において*PfPLA 3* 遺伝子の第1エクソンから第2イントロンまでが欠失し、その5'上流に*PfPLA 2*



と PcRTF 2 が連なった構造は, *PfPLA 3* と PcRTF 3, *PfPLA 4* と PcRTF 4, *PfPLA 5* と PcRTF 5 の規則正しく並んだユニット構造と合わせて, 毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子と PcRTF が 1 つのユニットとなって転移し, この部位に挿入されたことを推測させる (Figure 24)。さらに, 確認された 4 つ全ての PcRTF はその塩基長の違いにより PcRTF-Long (PcRTF-L)と PcRTF-Short (PcRTF-S) の 2 グループに分類できることが示され, PcRTF 3 と PcRTF 5 は PcRTF-L グループ, PcRTF 2 と PcRTF 4 は PcRTF-S にそれぞれ分類された (Ikeda, 2011; Ikeda et al., 2010)。これら全ての PcRTF は共通して 5'UTR 及び ORF1 領域が失われ, 切り詰められた 5' truncated 構造を有していたことから, PcRTF-L と PcRTF-S の塩基長の差異と 5'UTR 及び ORF1 領域の欠失は PcRTF 内部の接続配列 (connective sequence) と RT ドメインに存在する相同断片配列を介した遺伝子変換 (gene conversion) によって生み出されたと予測された (Figure 25) (Ikeda et al., 2010)。毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を伴った PcRTF が 1 つのユニットとして重複する様子は LINE がその 5'側に存在する塩基配列を巻き込むレトロトランスポジション, いわゆる 5' Transduction が起きたことを想定させるが (Figure 26), これは極めて稀な現象であり (Damert et al., 2009; Hulme et al., 2009; Symer et al., 2002; Szak et al., 2002), 毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子と PcRTF の重複機構に関してはまだ検証が必要である。

### 3-9. 研究の目的

クサリヘビ科ヘビの IIA 型の毒 PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子は高度に重複し, ゲノムの特定領域に集積したクラスター構造を形成していることが報告されている (Chijiwa et al., 2012; Ikeda, 2011; Ikeda et al., 2010; Nobuhisa et al., 1996)。これまで, クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの特異なゲノム構造から, それらと哺乳類や鳥類でも保存されている II 型及び V 型 PLA<sub>2</sub> が存在する分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターとの関係性については, ヘビ毒 PLA<sub>2</sub> を扱う研究者の間でこれまで深く議論されてこなかった。加えて, 多重遺伝子ファミリーを形成する IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子ではオーソログの選定が困難であったため, クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> を取り扱った研究報告のほとんどで, オーソログな関係性を十分に考慮せずパラログを含めた比較がこれまで行われてきた。

本研究では, クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の起源と分子進化の過程を解明するために, 5 章 1 節の「比較ゲノム解析から明らかになった PLA<sub>2</sub> 遺

伝子のゲノム構造とその進化」の項において、クサリヘビ科マムシ亜科ヘビであるホンハブとヒメハブの毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターのゲノム構造を明らかにし、その構造を哺乳類、鳥類、ヘビ類の非毒性分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターと比較することで、毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の進化とその起源、そして遺伝子クラスター形成の過程の解明を試みた。さらに、ホンハブ、ヒメハブ、サザンスペックルドラトルスネークの 3 種のクサリヘビ科マムシ亜科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域のゲノム構造比較し、そこに存在する IIA 型 PLA<sub>2</sub> アイソザイムに対する分子系統学的な分類から、クサリヘビ科マムシ亜科ヘビ IIA 型 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子におけるオーソログな関係性を同定し、属間でシンテニーが保存されているのかを検証した。

奄美大島、徳之島、沖縄本島に棲息するホンハブとトカラハブの毒成分の比較解析から、[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイムのサブタイプの有無が島嶼集団特異的に変化していることが強く示唆されてきた (Chijiwa et al., 2003b; Murakami et al., 2009; Yatsui, 2006)。

本研究では、[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイムのサブタイプの集団特異的な増減の要因を解明するために、5 章 2 節の「クサリヘビ科ヘビの[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> の比較から明らかになったハブ毒 PLA<sub>2</sub> の島嶼間多様性とその進化」の項において、奄美大島、徳之島、沖縄本島に棲息するホンハブとトカラハブの[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイムをコードする遺伝子のサブタイプの有無の検証、コピー数の算定、及びトカラハブの[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の配列解析から、[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイムのサブタイプが島嶼集団特異的に変化する要因を探った。

クサリヘビ科ヘビの IIA 型の毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムは毒腺で特異的に発現していることが知られ、組織特異的な転写制御には恐らくエピジェネティクスが関与していることが推測されるが、爬虫類におけるエピジェネティクスに関しては未知な部分が多く、多重遺伝子である毒 PLA<sub>2</sub> の転写制御がどのような機構で制御されているかは非常に興味深い。

本研究では、クサリヘビ科ヘビの分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の転写制御にエピジェネティクスが関与しているのかを調べるために、5 章 3 節の「クサリヘビ科ヘビ PLA<sub>2</sub> 遺伝子発現とそれを調節するエピジェネティクス」の項において、IIA 型 PLA<sub>2</sub> である塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子と祖先型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子、及び IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態解析を行い、ヘビゲノムにおけるメチル化パターンの変化が転写制御にどう影響しているのかを検証した。

## 4. 材料と方法

### 4-1. 試料と試薬

#### 4-1-1. 試料

実験に用いたゲノム DNA は下部リストに示す, ホンハブ (個体番号: No. 1~6, 9) トカラハブ (No. 10~15), サキシマハブ (No. 16), ヒメハブ (No. 17~24) の各臓器から, [Blin and Stafford \(1976\)](#) の手法を用いて抽出された ([Blin and Stafford, 1976](#)).

また, Total RNA も下部リストに示す, ホンハブ (No. 7, 8), ヒメハブ (No. 25) の各臓器から抽出された。

種名	採集地	性別	発達段階	採取/抽出日	組織	個体番号
ホンハブ	奄美大島	♀	成蛇	11. 01. 21	肝臓	No. 1
ホンハブ	奄美大島	♂	成蛇	11. 01. 21	肝臓	No. 2
ホンハブ	奄美大島	♀	成蛇	11. 08. 29	毒腺, 肝臓	No. 3
ホンハブ	奄美大島	♀	成蛇	11. 08. 29	肝臓	No. 4
ホンハブ	奄美大島	不明	成蛇	10. 09. 16	肝臓	No. 5
ホンハブ	奄美大島	♀	成蛇	12. 09. 05	毒腺, 肺, 肝臓, 脾臓	No. 6
ホンハブ	奄美大島	♀	成蛇	12. 09. 05	脳, 頬肉, 心臓, 肺, 脾臓, 膵臓, 小腸, 卵巣	No. 7
ホンハブ	奄美大島	♂	成蛇	12. 09. 08	精巣	No. 8
ホンハブ	沖縄本島	♀	成蛇	11. 12. 08	膵臓	No. 9
トカラハブ	小宝島	♀	成蛇	08. 08. 21	肝臓	No. 10
トカラハブ	小宝島	不明	成蛇	13. 09. 14	肝臓	No. 11
トカラハブ	小宝島	不明	不明	05. 07. 23	肝臓	No. 12
トカラハブ	小宝島	不明	成蛇	11. 12. 08	肝臓	No. 13
トカラハブ	小宝島	不明	成蛇	13. 09. 14	毒腺	No. 14
トカラハブ	小宝島	不明	成蛇	13. 09. 14	毒腺	No. 15
サキシマハブ	石垣島	不明	不明	06. 03. 20	肝臓	No. 16
ヒメハブ	奄美大島	♀	成蛇	09. 09. 02	肝臓	No. 17
ヒメハブ	奄美大島	♀	成蛇	09. 09. 02	肝臓	No. 18

ヒメハブ	奄美大島	♂	成蛇	13. 12. 20	肝臓	No. 19
ヒメハブ	奄美大島	♀	成蛇	13. 12. 20	肝臓	No. 20
ヒメハブ	奄美大島	♀	成蛇	13. 12. 20	肝臓	No. 21
ヒメハブ	奄美大島	♀	成蛇	13. 12. 20	肝臓	No. 22
ヒメハブ	奄美大島	♂	成蛇	11. 12. 09	脾臓	No. 23
ヒメハブ	奄美大島	♂	成蛇	12. 09. 05	毒腺	No. 24
ヒメハブ	奄美大島	♀	成蛇	12. 09. 08	毒腺	No. 25

#### 4-1-2. 試薬

使用した試薬及び、一般試薬の組成、調製法を以下に示す。一般的でない特定実験にのみ用いる試薬は各実験項目の最初に記述しておく。なお、以降全ての実験に用いる水は特別な場合を除き、全て超純水グレードの水 (Milli-Q) をオートクレーブ滅菌したものを用いている。また、本実験で使用した合成オリゴDNAの詳細に関しては、第7章に別途記載している。

試薬名	メーカー	カタログ番号	保存場所*
30% (w/v) アクリルアミド溶液	和光純薬工業	018-25625	B
50% Ammonium hydrogensulfite solution (pH 4.5)	和光純薬工業	013-23931	A
6-Aminohexanoic acid	東京化成工業	A0312	A
Adenosine-5'-triphosphate	Roche	10127523001	B
Agarose for $\geq$ 1kbp fragment (Fine Powder)	ナカライテスク	02468-66	A
Ager, powder	ナカライテスク	01028-85	A
AG <sup>®</sup> 501-X8 Resin	Bio-Rad Laboratories	1426424	A
Alkaline Phosphatase, recombinant (Calf intestine) (CIP)	Nippon gene	312-08011	E
Ammonium acetate	ナカライテスク	02406-95	C
Ammonium peroxodisulfate (APS)	和光純薬工業	016-20501	A
Ammonium sulfate	ナカライテスク	02619-15	A
Ammonium sulfite, 1-hydrate	Sigma-Aldrich	358983-500G	B
Ampicillin sodium salt	ナカライテスク	02739-74	B
AmpliQ Gold <sup>®</sup> 360 Master Mix	Applied Biosystems	4398881	E

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche	11093274910	B
Bacto tryptone	BD Biosciences	211705	A
Bacto yeast extract	BD Biosciences	212750	A
Big Dye <sup>®</sup> Terminator 5× Sequencing Buffer	Applied Biosystems	4336697	B
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	4337455	E
Boric acid	ナカライテスク	05215-05	A
Bromophenol blue	ナカライテスク	05808-61	A
Calcium chloride, 2-hydrate	ナカライテスク	06731-05	A
Chloramphenicol	ナカライテスク	06285-94	B
D-Glucose	ナカライテスク	16806-25	A
Deoxycholic acid	ナカライテスク	10711-64	A
DIG DNA Labeling Mix, 10×	Roche	11277073910	E
Dimethyl pimelimidate dihydrochloride	東京化成工業	P0892	B
Disodium hydrogen phosphate, 12-hydrate	ナカライテスク	31723-35	A
Dithiothreitol	ナカライテスク	14128-91	B
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Competent Cells	Novagen	69450	F
<i>E. coli</i> JM109 Competent Cells	タカラバイオ	9052	F
<i>E. coli</i> Rosetta-gami <sup>™</sup> B (DE3) pLysS	Novagen	71137	F
<i>E. coli</i> DH5α Competent Cells	タカラバイオ	9057	F
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare	RPN2109	A
Ethanol	ナカライテスク	08948-25	A
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, 2-hydrate (EDTA 2Na · 2H <sub>2</sub> O)	ナカライテスク	15111-45	A
Ficoll 400	ナカライテスク	16006-92	A
Formamide	ナカライテスク	09890-35	C
Glacial acetic acid	ナカライテスク	00212-85	A
Glycerol	ナカライテスク	17045-65	A
Glycine	ナカライテスク	09591-55	A
Hexanucleotide Mix, 10×	Roche	11277081001	E
Hi-Di <sup>™</sup> Formamide	Applied Biosystems	4311320	D, E

High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche	11754777001	A
Hydrochloric acid	ナカライテスク	18321-05	A
Imidazole	ナカライテスク	09660-45	A
ISOGEN	Nippon gene	317-02503	B
Isopropanol	和光純薬工業	325-00045	A
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	ナカライテスク	19742-94	B
Kanamycin sulfate	和光純薬工業	133-92-6	B
Klenow Fragment (2 U/ $\mu$ L)	Nippon gene	312-00814	E
KOD -Plus-	TOYOBO	KOD-201	E
KOD -Plus- Neo	TOYOBO	KOD-401	E
KOD FX	TOYOBO	KFX-101	E
L-Arginine hydrochloride	Sigma-Aldrich	A92600	C
L-Cysteine	Sigma-Aldrich	168149-2.5G	C
L-Cystine	Sigma-Aldrich	C6727-25G	C
Ligation High	TOYOBO	LGK-101	E
Magnesium chloride, 6-hydrate	ナカライテスク	20909-55	C
Magnesium sulfate, 7-hydrate	ナカライテスク	21003-75	A
Methanol	ナカライテスク	21915-93	A
N-Lauroylsarcosine Sodium Salt	ナカライテスク	20117-12	A
N, N-dimethylformamide	ナカライテスク	13016-65	A
pET-20b Vector	Novagen	69739	E
Phenol, Saturated with TE Buffer	ナカライテスク	26829-96	B, C
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Mixed, pH 5.2	ナカライテスク	26058-96	B, C
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Mixed, pH 7.9	ナカライテスク	25970-56	B, C
Polyethylene glycol #6,000	ナカライテスク	28254-85	A
Polyoxyethylene (23) lauryl ether (Brij <sup>®</sup> -35)	和光純薬工業	160-11561	A
Potassium acetate	ナカライテスク	28434-25	A
Proteinase K	和光純薬工業	160-14001	B
pT7Blue T-Vector	Novagen	69820	E

pWEB-TNC™ Cosmid Cloning Kit	Epicentre	PC8805	E
QIAGEN Large-Construct Kit	QIAGEN	12462	A
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	TOYOBO	FSQ-301	E
RNase A (10 mg/mL)	ナカライテスク	30100-31	D
RNase Quiet	ナカライテスク	09147-14	A
SeaPlaque® GTG® Agarose	Lonza	50111	A
Skim Milk	ナカライテスク	31149-75	A
SMART™ cDNA Library Construction Kit	Clontech Laboratories	634901	E
Sodium acetate, 3-hydrate	ナカライテスク	31115-05	A
Sodium bisulfite	Sigma-Aldrich	243973-100G	A
Sodium chloride	ナカライテスク	31333-45	A
Sodium dihydrogen phosphate, 2-hydrate	ナカライテスク	31737-65	A
Sodium dodecyl sulfate	ナカライテスク	08933-05	A
Sodium hydroxide	ナカライテスク	06338-75	A
Sucrose	ナカライテスク	30406-25	A
TaKaRa LA PCR™ <i>in vitro</i> Cloning Kit	Takara Bio	RR015	E
Tetracycline hydrochloride	ナカライテスク	33031-64	B
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	ナカライテスク	33401-72	B
THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	TOYOBO	QPS-101	E
TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen	450071	E
Triethanolamine	東京化成工業	S0377	A
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	ナカライテスク	35434-05	A
Trisodium citrate, 2-hydrate	ナカライテスク	31430-65	A
Triton X-100	Roche	10789704001	B
Tween® 20	Sigma-Aldrich	P9416-100ML	A
Urea	ナカライテスク	35905-35	A
Wizard® DNA Clean-Up system	Promega	A7280	A
Xylene cyanol FF	ナカライテスク	36629-64	A
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Invitrogen	450245	E
X-gal	和光純薬工業	027-07854	B

\* 保存場所: A, 常温 (試薬棚及び薬品庫); B, 4°C (冷蔵庫); C, 4°C (低温室); D, -20°C (冷凍庫); E,

-30°C (冷凍庫); F, -80°C (ディープフリーザー)。

◦ 2 N, 6 N HCl

Milli-Q	41.6 mL,	25 mL
Hydrochloric acid (35-37%)	8.4 mL,	25 mL
	(2 N)	(6 N)

◦ 2 N, 5 N, 6 N NaOH

Sodium hydroxide	4 g, 10 g, 12g	(2 N, 5 N, 6 N)
Milli-Q で 50 mL にメスアップ	Total 50 mL	

◦ 1 M Tris-HCl (pH 8.0\*)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	30.3 g	(1 M)
6 N HCl (pH 調整用)	適量	
2 N HCl (pH 調整用)	適量	

↓ pH メーターで pH 8.0\*に調整 (\*pH は使用目的により適宜変更する。)

↓ Milli-Q で 250 mL にメスアップ      Total 250 mL      Autoclaved

◦ 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA 2Na · 2H <sub>2</sub> O	46.5 g	(1 M)
NaOH (顆粒) (pH 調整用)	適量	
5 N NaOH (pH 調整用)	適量	

↓ pH メーターで pH 8.0 に調整

↓ Milli-Q で 250 mL にメスアップ      Total 250 mL      Autoclaved

◦ TE バッファー (pH 8.0)

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	500 μL	(10 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 μL	(1 mM)
Milli-Q で 50 mL にメスアップ	Total 50 mL	

◦ 10×TAE バッファー

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	48.0 g	(40 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 mL	(0.4 M)



Glacial acetic acid	11.4 mL	(0.4 M)
Milli-Q・脱イオン水で 1 L にメスアップ 使用時は 10 倍希釈し, 1×濃度で使用する。	Total 1 L	
◦ 0.5×TBE バッファー		
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	53.9 g	(44.5 mM)
Boric acid	27.5 g	(44.5 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 mL	(1 mM)
脱イオン水で 10 L にメスアップ	Total 10 L	
◦ 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)		
Sodium acetate, 3-hydrate	40.8 g	(3 M)
Glacial acetic acid (pH 調整用)	適量	
↓ pH メーターで pH 5.2 に調整 ↓ Milli-Q で 100 mL にメスアップ	Total 100 L	Autoclaved
◦ 5 M 酢酸アンモニウム		
Ammonium acetate	3.85 g	(5 M)
↓ Milli-Q で 10 mL にメスアップ ↓ 小分けに分注し, -30°C で保存。	Total 10 mL	Filtered (0.22 μm)
◦ 5 M 酢酸カリウム		
Potassium acetate	49.1 g	(5 M)
Milli-Q で 100 mL にメスアップ	Total 100 mL	Autoclaved
◦ 10% (w/v) SDS 溶液		
Sodium dodecyl sulfate	10 g	(10%)
Milli-Q で 100 mL にメスアップ	Total 100 mL	
◦ 6×, 10× Gel loading dye (アガロースゲル電気泳動用)		
Ficoll 400	1.5 g, 2.5 g	(15, 25 %)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 μL	(1 mM)

Bromophenol blue	適量	
Xylene cyanol FF	適量	
Milli-Q で 10 mL にメスアップ	Total 10 mL	
◦ Solution I		
グルコース	0.9 g	(50 mM)
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	2.5 mL	(25 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2.0 mL	(10 mM)
Milli-Q で 100 mL にメスアップ	Total 100 mL	Autoclaved
◦ Solution II		
	(用時調製)	
Milli-Q	4 mL	
10% SDS	500 $\mu$ L	(1%)
2 N NaOH	500 $\mu$ L	(0.2 N)
	Total 5 mL	
◦ Solution III		
5 M 酢酸カリウム溶液	60 mL	(5 M, 3 M)
Glacial acetic acid	11.5 mL	
Milli-Q で 100 mL にメスアップ	to 100 mL	Autoclaved
◦ 20% PEG/2.5 M NaCl 溶液		
Polyethylene glycol #6,000	20 g	(5 M, 3 M)
NaCl	14.6 g	
Milli-Q で 100 mL にメスアップ	to 100 mL	Autoclaved
◦ 20 $\times$ SSC 溶液		
NaCl	175.3 g	(3 M)
Trisodium citrate, 2-hydrate	88.2 g	(0.3 M)
6 N HCl (pH 調整用)	適量	
2 N HCl (pH 調整用)	適量	
↓ pH メーターで pH 7.0 に調整		

↓ Milli-Q で 1 L にメスアップ Total 1 L Autoclaved

◦ 1 M リン酸ニ水素ナトリウム

Sodium dihydrogen phosphate, 2-hydrate 15.6 g (1 M)

Milli-Q で 100 mL にメスアップ Total 100 mL

◦ 1 M リン酸水素ニナトリウム

Disodium hydrogen phosphate, 12-hydrate 35.8 g (1 M)

Milli-Q で 100 mL にメスアップ Total 100 mL

◦ 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)

1 M リン酸ニ水素ナトリウム 約 25 mL (1 M)

1 M リン酸水素ニナトリウム 約 X mL (1 M)

↓ 25 mL の 1 M リン酸ニ水素ナトリウムに 1 M リン酸水素ニナトリウムを滴下し、pH を 7.0 に調整する。

↓ Autoclaved

◦ 1 M CaCl<sub>2</sub>

Calcium chloride, 2-hydrate 7.35 g (1 M)

Milli-Q で 50 mL にメスアップ Total 50 mL Autoclaved

◦ 1 M MgCl<sub>2</sub>

Magnesium chloride, 6-hydrate 10.2 g (1 M)

Milli-Q で 50 mL にメスアップ Total 50 mL Autoclaved

◦ 1 M MgSO<sub>4</sub>

Magnesium sulfate, 7-hydrate 12.3 g (1 M)

Milli-Q で 50 mL にメスアップ Total 50 mL Autoclaved

◦ 5 M NaCl

Sodium chloride 7.3 g (5 M)

Milli-Q で 25 mL にメスアップ Total 25 mL Autoclaved

◦ 1 M グルコース

Glucose	9 g	(1 M)
Milli-Q で 50 mL にメスアップ	Total 50 mL	Filtered (0.22 μm)

◦ 50% (v/v) グリセロール溶液

Milli-Q	50 mL	
Glycerine	50 mL	(50%)
	Total 100 mL	Autoclaved

◦ 1 M IPTG

Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	2.38 g	(1 M)
Milli-Q で 10 mL にメスアップ	Total 10 mL	Filtered (0.22 μm)

↓ 小分けに分注し, -20°C で保存。

↓ 使用時は 0.1 ~0.5 mM の範囲で使用する。

◦ 20 mg/mL X-gal

X-gal	100 mg	(20 mg/mL)
N, N-dimethylformamide で 5 mL にメスアップ	Total 5 mL	

↓ 小分けに分注し, -20°C で遮光保存。

↓ 使用時は培地 100 mL あたり 200 μL を添加して使用する。

◦ 100 mg/mL アンピシリン

Ampicillin sodium salt	500 mg	(100 mg/mL)
Milli-Q で 5 mL にメスアップ	Total 5 mL	Filtered (0.22 μm)

↓ 小分けに分注し, -20°C で保存。

↓ 使用濃度 100 μg/mL (20~200 μg/mL) で使用する。

◦ 20 mg/mL カナマイシン

Kanamycin sulfate	100 mg	(20 mg/mL)
Milli-Q で 5 mL にメスアップ	Total 5 mL	Filtered (0.22 μm)

↓ 小分けに分注し, -20°C で保存。

↓ 使用濃度 20 μg/mL (10~50 μg/mL) で使用する。

◦ 30 mg/mL クロラムフェニコール

Chloramphenicol	150 mg	(30 mg/mL)
-----------------	--------	------------

エタノールで 5 mL にメスアップ Total 5 mL

↓ 小分けに分注し, -20°C で保存。

↓ 使用濃度 30 µg/mL (30~170 µg/mL) で使用する。

◦ 20 mg/mL テトラサイクリン

Tetracycline hydrochloride	100 mg	(20 mg/mL)
----------------------------	--------	------------

Milli-Q で 5 mL にメスアップ Total 5 mL Filtered (0.22 µm)

↓ 小分けに分注し, -20°C で遮光保存。

↓ 使用濃度 20 µg/mL (10~50 µg/mL) で使用する。

◦ SOC 培地

Bacto tryptone	4 g	(2%)
Bacto yeast extract	1g	(0.5%)
NaCl	0.1 g	(0.05%)
5 N NaOH	40 µL	

蒸留水で 200 mL にメスアップ Total 200 mL Autoclaved

↓ 60°C 以下に冷めたら, 濾過滅菌済み 1 M グルコースを 4 mL 無菌的に加える。

↓ 60°C 以下に冷めたら, 滅菌済み 1 M MgCl<sub>2</sub> と 1 M MgSO<sub>4</sub> をそれぞれ 2 mL ずつ無菌的に加える。

↓ 小分けに分注し, -80°C で保存。

◦ LB 液体培地

NaCl	1 g	(1%)
Bacto tryptone	1 g	(1%)
Bacto yeast extract	0.5g	(0.5%)

蒸留水で 100 mL にメスアップ Total 100 mL Autoclaved

↓ 4°C で保存。

↓ 必要時に適当な抗生物質を必要量添加して用いる。

◦ 10 mM MgSO<sub>4</sub> 添加 LB 液体培地

NaCl	0.5 g	(1%)
------	-------	------

Bacto tryptone	0.5 g	(1%)
Bacto yeast extract	0.25 g	(0.5%)
蒸留水で 50 mL にメスアップ	Total 50 mL	Autoclaved

↓ 60°C 以下に冷めたら 1 M MgSO<sub>4</sub> を 500 μL 無菌的に加える。4°C で保存。

◦ LB 寒天培地

NaCl	2 g	(1%)
Bacto tryptone	2 g	(1%)
Bacto yeast extract	1 g	(0.5%)
Ager, powder	3 g	(1.5%)
蒸留水で 200 mL にメスアップ	Total 200 mL	Autoclaved

↓ 60°C 以下に冷めたら、適当な抗生物質及びカラーセレクション試薬等を必要量無菌的に加える。4°C で保存。

## 4-2. ゲノム構造解析

### 4-2-1. ハブ組織からのゲノム DNA 抽出

本項では組織からのゲノム DNA の抽出操作について記述する。以降の実験に用いるゲノム DNA は第 4 章 1 節 1 項で示したように、ホンハブ (個体番号: No. 1~6, 9), トカラハブ (No. 10~15), サキシマハブ (No. 16), ヒメハブ (No. 17~24) の各臓器から, [Blin and Stafford \(1976\)](#) の手法に従って, それぞれ抽出を行った ([Blin and Stafford, 1976](#))。なお, 使用した全ての器具類は可能な限り, 十分に洗浄し, 滅菌処理を施した。

◦ 細胞溶解バッファー

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	200 μL	(50 mM)
0.5 M EDTA	800 μL	(100 mM)
10% SDS	200 μL	(0.5%)
RNase A (10 mg/mL)	5 μL	(50 μg)
Milli-Q で 3 mL にメスアップ	Total 3 mL	

1. 清潔なポリプロピレン製スピッツ容器に, 細胞溶解バッファーを調製する。

2. 事前に冷却しておいた清潔な乳鉢・乳棒に液体窒素を注ぎ、乳鉢・乳棒及び薬さじ等の器具を良く冷却する。
3. 液体窒素が充填された乳鉢に適度な大きさに砕かれた組織片 (1 立方センチメートル程度) を投入し、液体窒素が完全に蒸発する前に、組織片を乳棒で叩き砕き、いくつかの小断片にしておく。
4. 液体窒素が蒸発後、素早く組織片を粉碎する。液体窒素の蒸発は超音波キャビテーションによるゲノム DNA の物理的断片化を引き起こすので、液体窒素の補充は避ける。
5. 手順 1 で調製した細胞溶解バッファーに粉碎された組織を素早く投入する。
6. 2 mg の Proteinase K をスピッツに素早く添加し、粉碎組織を速やかに懸濁し、均一化させる。
7. 60°C に温めておいた恒温水槽にスピッツを 10 分間浸し、粉碎組織を細胞溶解バッファーに馴染ませる。
8. 55°C に温めておいたエアークューバーにスピッツを移し、8 時間以上穏やかに震盪し、細胞溶解及びタンパク質の消化処理を行う。
9. 細胞溶解及びタンパク質の消化処理が完了した細胞溶解液は 6,000 rpm, 20°C で 5 分間遠心し、先端を切り落とした 1 mL サイズのピペットチップ (滅菌済み) を用いての上清を別スピッツへ移す。以降操作はゲノム DNA の物理的剪断を防ぐため、先端を切り落とした 1 mL サイズのピペットチップを使用する。
10. 分離した上清に等量の TE 飽和フェノールを添加し、5~15 分間穏やかに震盪する。
11. 6,000 rpm, 20°C で 5 分間遠心し、上清を別スピッツへ移す。この際、中間層の混入を避けるために、上清の回収は 8~9 割程度にしておく。なお、上清の回収量が減る場合には適宜 TE バッファーを添加し、回収率を上げる。
12. 手順 10, 11 の作業を再度行う。
13. 回収された上清に、等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (PCI), pH 7.9 を添加し、5~15 分間穏やかに震盪する。
14. 6,000 rpm, 20°C で 5 分間遠心し、上清を別スピッツへ移す。この際、中間層の混入を避けるために、上清の回収は 8~9 割程度にしておく。なお、上清の回収量が減る場合には適宜 TE バッファーを添加し、回収率を上げる。
15. 手順 13, 14 の作業を 4 回繰り返し行う。

16. 回収された上清の量に対して、0.2 倍量の 5 M 塩化ナトリウムを添加し、穏やかに転倒混和する。
17. 手順 16 の溶液に、等量のイソプロパノールを静かに添加し、穏やかに転倒混和する。
18. 析出したゲノム DNA を清潔なピペットチップで取り出し、70% エタノールで軽くリンスする。
19. 清潔なマイクロチューブにゲノム DNA を移し、5~15 分程度風乾を行う。
20. 適度に風乾させたゲノム DNA に TE バッファーを 50~1000  $\mu$ L 添加し、ゲノム DNA を穏やかに溶解させる。
21. ゲノム DNA 溶液を 65°C で 5~15 分間インキュベートし、ゲノム DNA 溶解促進と内在性デオキシリボヌクレアーゼ (deoxyribonuclease, DNase) の失活操作を行った。
22. 分光光度計で 260, 280, 320 nm の吸光度を測定し、核酸濃度、純度を算出し、適当な濃度に達するまで TE バッファーで希釈し、4°C にて保存した。

#### 4-2-2. コスミドを用いたゲノムライブラリーの構築

本項ではパルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) を用いたゲノム DNA のサイズセレクション、ゲノム DNA のコスミドへのライゲーション、ファージの *in vitro* パッケージング及び感染、コロニーライブラリー構築までの操作を記述する。以降の実験では pWEB-TNC™ Cosmid Cloning Kit (Epicentre, an Illumina company, Madison, WI, USA) を用いて、ホンハブ (奄美大島)、トカラハブ (小宝島)、ヒメハブ (奄美大島) のゲノムライブラリーをそれぞれ構築した。全ての操作は Epicentre が発刊する pWEB-TNC™ Cosmid Cloning Kit プロトコルに従って行った (Epicentre, 2012)。

##### ◦ ファージ希釈バッファー

1 M Tris-HCl (pH 8.3)	20 $\mu$ L	(10 mM)
5 M NaCl	40 $\mu$ L	(100 mM)
1 M MgCl <sub>2</sub>	20 $\mu$ L	(10 mM)
Milli-Q で 2 mL にメスアップ	Total 2 mL	

1. 10×TAE バッファーを 1 L 程度用意し、1×TAE バッファーを調製する。



2. PFGE ゲル作成用のキャスティングスタンドの上にプラットフォームを置き、横のネジの上にエンドプレートを乗せネジを締め、ゲルキャスティングセット一式を低温室へ持って行く。
3. 低融点ゲル SeaPlaque<sup>®</sup> GTG<sup>®</sup> Agarose (Lonza 社, Rockland, ME, USA) を 1.8 g 計り取り、1×TAE バッファーを約 180 mL 用意し、1% (w/v) 低融点アガロースゲルを作成する。
4. 完全に融解した低融点アガロースゲルを 60~70°C 程度まで冷まし、手順 2 で組み立てたゲルキャスティングセットに流し込む。
5. コームをキャスティングスタンドにセットし、低融点アガロースゲルが完全に固化するまで数時間放置する。この際、ゲル内に発生した気泡は適宜取り除く。
6. CHEF Mapper<sup>®</sup> XA (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) システムを起動させ、泳動槽内に蒸留水を 3 L 程度充填する。
7. ポンプ及びクーリングモジュールを起動させ、還流洗浄を行う。
8. 還流洗浄が完了したら、蒸留水を完全に廃水し、予めある程度冷やしておいた 3 L の 1×TAE バッファーを泳動槽内に充填・還流させ、1×TAE バッファーを十分に冷却させる。
9. ゲルキャスティングセットから、完全に固化した低融点アガロースゲルをプラットフォームごと取り出す。ゲルが壊れやすいので取扱いには注意する。
10. 低融点アガロースゲルをプラットフォームごと泳動槽内に沈める。
11. 10×Gel loading dye を用いて、サイズマーカー及び各種ゲノム DNA を調製し、ウェルにアプライする。
12. 「AUTO ALGORITHM」, 分離範囲 5~100 kbp, 14°C で泳動を開始する。なお、泳動槽内の白金線が切れていないか、正常に作動しているかもこの時確認する。
13. 泳動終了後、低融点アガロースゲルを慎重に取り出し、臭化エチジウム (EtBr) で 30 分以上染色し、蒸留水で脱色処理を行い、UV トランスイルミネーターを用いて泳動像を撮影する。
14. PFGE 泳動槽は手順 6 及び 7 で示した手順で槽内の洗浄を行い、システムを終了する。
15. 撮影した泳動写真は画像処理ソフトウェア Image J (National Institutes of

Health, Bethesda, MD, USA) を用いて、ゲノム DNA の平均塩基長を算出し、ゲノムライブラリー作製に用いるサンプルの選定及びのゲノム DNA 剪断のためのシェアリング回数の決定を行う。

16. 選定されたゲノム DNA を用いて、以下の組成で試薬を氷上で混合し、末端修復反応を行う。

• Milli-Q	to 80 $\mu$ L	
• 10 $\times$ End Repair Buffer	8 $\mu$ L	(1 $\times$ )
• 2.5 mM dNTP Mix	8 $\mu$ L	(0.25 mM)
• 10 mM ATP	8 $\mu$ L	(1 mM)
• End Repair Enzyme Mix	4 $\mu$ L	
• ゲノム DNA	20 $\mu$ g	

17. 室温で 45 分間インキュベートする。
18. 10 $\times$ Gel loading dye を添加し、70 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートし、末端修復酵素の失活処理を行う。
19. 再び、手順 1~12 に従い、PFGE によるゲノム DNA のサイズセレクションを行う。ただし、ゲノムライブラリーの構築に用いるゲノム DNA は EtBr による染色を避けたいため、手順 18 で準備した末端修復ゲノム DNA をアプライするウェルとは別に染色確認用のレーンを設け、そのウェルにはサイズマーカー及びゲノム DNA をアプライしておく。
20. 泳動終了後、末端修復ゲノム DNA レーンと染色確認用のレーンを切り分け、染色確認用レーンのみを手順 13 同様に染色、脱色、撮影を行う。末端修復ゲノム DNA レーンは 4 $^{\circ}$ C にて保存しておく。
21. 手順 14, 15 を行い、末端修復ゲノム DNA レーンの切り出し範囲を決定し、非 UV 照射による目視下で、ゲル体積が 500  $\mu$ L 程度に成るように適宜ゲルを切り出す。切り出したゲル片は清潔なマイクロチューブへ移し、使用時まで 4 $^{\circ}$ C で保存する。なお、今回は 30~45 kbp のサイズ領域を切り出した。
22. 今回は切り出したゲル片からゲノム DNA の回収及びその濃縮を行う。切り出した低融点アガロースゲルを 70 $^{\circ}$ C で 10~15 分間インキュベートし、アガロースゲルを完全に融解させる。
23. 直ちに 45 $^{\circ}$ C へ移し、5 分間平衡化させる。
24. アガロースゲル融解溶液 500  $\mu$ L に対して 10  $\mu$ L の 50 $\times$ GELase Buffer を事前に用意し、45 $^{\circ}$ C で加温しておき、平衡化終了後のアガロースゲル融解溶液

にこれを加える。

25. アガロースゲル融解溶液を 45°C に保ったまま, GELase enzyme を 3  $\mu$ L (3U) 加える。
26. 45°C で 30 分間インキュベートし, アガロースのカルボヒドロイトを分解する。
27. 70°C で 10 分間インキュベートし, GELase enzyme を失活させる。
28. 濃度測定用に 20  $\mu$ L を分取し, 残りの溶液に 5 M 酢酸アンモニウムを等量加え, 穏やかに転倒混和する。
29. 15,000 rpm, 20°C で 10 分間遠心し, 先端を切り落とした 1 mL サイズのピペットチップを用いて, 不溶性ペレットを吸わないように, 上清の 95%を慎重に回収し, 別マイクロチューブへ移す。
30. 回収した上清に対し, 二倍量の 100% エタノールを添加し, 転倒混和後, 4°C で 30 分間インキュベートする。
31. 15,000 rpm, 20°C で 10 分間遠心し, 上清を捨てる。軽く風乾させる。
32. 25  $\mu$ L の TE バッファーを加え, 再懸濁し, 使用時まで 4°C で保存する。
33. 回収したゲノム DNA の濃度測定を行うために, ミニゲルで 0.7% アガロースゲルを作製し, 手順 28 で回収した溶液及び手順 32 で再懸濁したゲノム DNA 濃縮溶液を泳動し, Image J を用いて濃度算出を行う。またこの際, ライゲーション反応に最も効率的なベクターとインサート DNA のモル比の算定もしておく。
34. 回収したゲノム DNA の濃度が算定されたら, 以下の組成で試薬を氷上で混合し, ライゲーション反応溶液を調製する。なお, 濃縮ゲノム DNA 量は手順 33 で算出した最も効率的なベクターとインサート DNA のモル比に基づいて適宜調節する。

• Milli-Q	to 20 $\mu$ L	
• 10 $\times$ Fast-Link Ligation Buffer	2 $\mu$ L	(1 $\times$ )
• 10 mM ATP	1 $\mu$ L	(0.5 mM)
• pWEB-TNC Vector (0.5 $\mu$ g, ~6 kbp)	1 $\mu$ L	
• 濃縮ゲノム DNA (0.3 $\mu$ g, 30~45 kbp)	0.3 $\mu$ g 程度	
• Fast-Link DNA Ligase	1 $\mu$ L	

35. 室温で 2 時間インキュベートし, ライゲーション反応を行う。
36. 70°C で 10 分間インキュベートし, Fast-Link Ligase の失活処理を行う。

37. 室温に戻し、使用時まで 4°C で保存する。
38. *in vitro* パッケージングを行う 2 日前に、EPI100-T1<sup>®</sup>大腸菌株のフリーズストックを起こし、白金耳を用いて抗生物質無添加 LB 寒天培地へ播種し、37°C で 12 時間、画線培養する。
39. *in vitro* パッケージングを行う 1 日前に、手順 38 で培養した EPI100-T1<sup>®</sup>大腸菌シングルコロニーをピックアップし、50 mL の 10 mM MgSO<sub>4</sub> 添加 LB 液体培地へ播種し、37°C で 12 時間、震盪培養する。
40. *in vitro* パッケージングを行う当日に、手順 39 で培養した大腸菌培養液を 5 mL 分取し、50 mL の抗生物質無添加 LB 液体培地へ播種し、OD<sub>600</sub> が 0.8~1.0 に達するまで 37°C で数時間、震盪培養する。
41. OD<sub>600</sub> が規定値に達したら、培養フラスコを直ちに氷上で冷やし、使用時まで 4°C で保存する。
42. 手順 37 のライゲーション産物 10 μL に氷上で解凍した MaxPlax<sup>™</sup> Lambda Packaging Extracts を 25 μL 添加し、パッケージング反応を行う。なお、MaxPlax<sup>™</sup> Lambda Packaging Extracts は 1 チューブあたり 50 μL 入っており、この時使用しなかった残った 25 μL は直ちに -80°C へ移し、再凍結させる。
43. 数回ピペッティング操作を行い、パッケージング反応溶液を穏やかに懸濁する。この際、気泡を発生させるとファージ粒子の構造が壊れるので、気泡を発生させないように注意する。
44. 軽くスピンドウンし、30°C で 90 分間インキュベートし、パッケージング反応を行う。
45. 90 分間のインキュベートが完了したら、手順 42 で再凍結させた残り 25 μL の MaxPlax<sup>™</sup> Lambda Packaging Extracts を再解凍し、これをパッケージング反応溶液に添加し、再び 30°C で 90 分間インキュベートし、パッケージング反応を行う。
46. ファージ希釈バッファを調製する。
47. パッケージング反応が完了したら、パッケージング反応溶液にファージ希釈バッファを 540 μL 添加し、穏やかにボルテックスする。
48. ファージ希釈溶液にクロロホルムを 25 μL 添加し、穏やかにボルテックス及び転倒混和する。もし一連の作業がうまく進んでいけば、クロロホルムと水層の境界面に白い澱が見られるはずである。ファージ希釈溶液は使用時まで 4°C で保存する。

49. 手順 41 の EPI100-T1<sup>®</sup>大腸菌培養液を 100  $\mu$ L ずつ清潔なマイクロチューブに分注し、そこに手順 48 のファージ希釈溶液を 10  $\mu$ L ずつ添加していく。この際、OD<sub>600</sub> 値が上がらないように操作を氷上で行い、かつ無菌操作で作業にあたる。
50. ファージ希釈溶液を加えた EPI100-T1<sup>®</sup>大腸菌培養液を 37°C で 20 分間インキュベートし、ファージを大腸菌に感染させる。
51. アンピシリン添加 LB 寒天培地に手順 50 のファージ感染 EPI100-T1<sup>®</sup>大腸菌を播種し、37°C で 14~16 時間インキュベートする。EPI100-T1<sup>®</sup>は DH5 $\alpha$  よりも増殖が遅いため、コロニー形成と培養時間に注視する。
52. 寒天培地上にコロニーが形成されたら、4°C にて保存する。
53. 区画番号で分けられた新たなアンピシリン添加 LB 寒天培地を用意し、ランダムに形成されたコロニーを無菌操作で 1 つずつピックアップし、区画化された培地上にコロニーを植え替えていく。これをマスタープレートとする。
54. 37°C で 8~14 時間インキュベートし、マスタープレート上にコロニーを形成させる。
55. コロニーが程良く育ったマスタープレートを 4°C で 30 分間冷却し、寒天表面を固化させる。
56. 滅菌処理を施したビロード布 (15×15 cm) を、レプリケーターの上に無菌操作でのせる。
57. マスタープレートのコロニー形成面をビロード布に対して垂直に均等に押しあて、コロニーをビロード布に定着させる。
58. 新たに準備したアンピシリン添加 LB 寒天培地をコロニーが定着したビロード布に押しつけ、コロニーの転写を行う。これをレプリカプレートとし、コロニーハイブリダイゼーションに用いる。この作業の際、プレートの向きやプレート番号をきちんと確認しながら一連の操作を行う。
59. 無菌操作を心掛けながら、手順 56~58 の一連の操作をプレートの枚数分繰り返す。
60. コロニーが転写されたアンピシリン添加 LB 寒天培地を 37°C で 8~14 時間インキュベートし、レプリカプレート上にコロニーを形成させる。コロニーが一部剥ぎ取られたマスタープレートは発泡スチロールの箱に入れ、低温室で保存し、コロニーが回復するのを待った。

61. コロニーが程良く育ったレプリカプレートは4°Cで保存する。

#### 4-2-3. コロニーハイブリダイゼーション法による目的クローンのスクリーニング

本項ではランダムプライムドラベリング法によるDIG (ジゴキシゲニン) 標識DNAプローブの作製, コロニーハイブリダイゼーション及びそのシグナル検出までを記述する。DIGシステムを用いたコロニーハイブリダイゼーション法を用いて, 第4章2節2項で獲得されたコロニーライブラリーから目的クローンのスクリーニングを行った。なお, 全ての操作はRoche Applied Science社が発刊するDIG Application Manual for Filter Hybridizationに従って行った (Roche Applied Science, 2008)。また, 大腸菌の培養時間に関してはオーバーコンフルエントにならないように, 培養の様子を逐次モニターしながら全て回収可能な最短時間で培養を停止させた。

◦ 変性溶液	(用時調製)	
5 M NaCl	30 mL	(1.5 M)
2 M NaOH	25 mL	(0.5 M)
<hr/>		
Milli-Q で 100 mL にメスアップ	Total 100 mL	
◦ 中和溶液		
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	12.11 g	(1.0 M)
NaCl	8.766 g	(1.5 M)
6 N HCl (pH 調整用)	適量	
2 N HCl (pH 調整用)	適量	
<hr/>		
↓ pH メーターで pH 7.4 に調整		
↓ Milli-Q で 1 L にメスアップ	Total 100 mL	Autoclaved
◦ 脱イオン化ホルムアミド	(用時調製)	
ホルムアミド	100 mL	
AG <sup>®</sup> 501-X8 Resin	5 g	
<hr/>		
↓ 4°C で 1 時間程度ゆっくりと震盪し, 脱イオン化処理を行う。		
↓ 細胞培養の培地濾過に使用するボトルトップ型フィルターユニットを用い		

て AG<sup>®</sup> 501-X8 Resin の除去及び濾過滅菌を行う。  
 ↓ 使用時まで 4°C で保存。ただし数時間以内に使い切る。

◦ 高 SDS バッファー	(用時調製)	
SDS	14 g	(7%)
N-Lauroylsarcosine Sodium Salt	0.2 g	(0.1% (w/v))
スキムミルク	4 g	(2% (w/v))
20×SSC 溶液	50 mL	(5×)
1 M リン酸 Na バッファー (pH 7.0)	10 mL	(50 mM)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	12.11 g	(1.0 M)
NaCl	8.766 g	(1.5 M)
脱イオン化ホルムアミド	100 mL	(50%)

↓ 脱イオン化ホルムアミド以外の試薬を適量の Milli-Q で溶かしておく。

↓ 脱イオン化ホルムアミドを使用直前に添加する。

↓ Milli-Q で 200 mL にメスアップ。100 mL ずつに分注しておく。

◦ 低ストリンジェント洗浄バッファー		
20×SSC 溶液	50 mL	(2×)
10% SDS	5 mL	(0.1%)
Milli-Q で 500 mL にメスアップ	Total 500 mL	

◦ 高ストリンジェント洗浄バッファー		
20×SSC 溶液	2.5 mL	(0.1×)
10% SDS	5 mL	(0.1%)
Milli-Q で 500 mL にメスアップ	Total 500 mL	

◦ 洗浄バッファー (Buffer I)		
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	36.3 g	(0.1 M)
NaCl	26.2 g	(0.15 M)
6 N HCl (pH 調整用)	適量	
2 N HCl (pH 調整用)	適量	

↓ pH メーターで pH 7.5 に調整

↓ Milli-Q で 3 L にメスアップ	Total 100 mL	Autoclaved
◦ ブロッキングバッファー (Buffer II)	(用時調製)	
Tween 20	250 $\mu$ L	(0.1%)
スキムミルク	12.5 g	(5%)
洗浄バッファーで 250 mL にメスアップ	250 mL	
◦ Anti-DIG 抗体希釈溶液	(用時調製)	
Tween 20	200 $\mu$ L	(0.2%)
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	5 $\mu$ L	(3.75 U)
洗浄バッファーで 100 mL にメスアップ	100 mL	
◦ 抗体洗浄バッファー溶液	(用時調製)	
Tween 20	2 mL	(0.2%)
洗浄バッファーで 1 L にメスアップ	1 L	
◦ 検出バッファー (Buffer III)		
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	12.1 g	(0.1 M)
NaCl	5.84 g	(0.1 M)
6 N HCl (pH 調整用)	適量	
2 N HCl (pH 調整用)	適量	
↓ pH メーターで pH 9.5 に調整		
↓ Milli-Q で 950 mL にメスアップ	Total 950 mL	Autoclaved
↓ 60°C 以下に冷めたら, 1 M MgCl <sub>2</sub> を 50 mL 添加する。		

1. DNA プローブに用いる核酸配列には, CHO5 と CHO3 プライマーを用いた PCR で以前獲得された *PfpgPLA 1a* (A) [*PfPLA 7*] と *OoPLA<sub>2-o3</sub>* 遺伝子の核酸配列をそれぞれ pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> ベクター (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, MA, USA) にライゲーションした構築済みのプラスミドを用いる。
2. 手順 1 のプラスミドを形質転換した DH5 $\alpha$  大腸菌株フリーズストックを起こし, 白金耳を用いてカナマイシン添加 LB 寒天培地へ播種し, 37°C で 12 時間, 画線培養する。



3. 手順 2 で培養した DH5 $\alpha$  大腸菌シングルコロニーをピックアップし、4 mL の LB 液体培地へ播種し、37°C で 12 時間、震盪培養する。
4. 今回は安定した収量と純度でプラスミドの抽出が可能な High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Life Science 社, Indianapolis, IN, USA) を用いて、大腸菌培養液からプラスミドを精製する。なお、アルカリ SDS 法による抽出でも問題は無い。
5. 大腸菌培養液全量を 9,000 rpm で 30 秒間遠心し、集菌を行う。
6. 事前に 0.1 mg/mL 濃度になるように RNase A を添加した Suspension Buffer 250  $\mu$ L を大腸菌ペレットに添加し、しっかりと再懸濁する。
7. 再懸濁溶液に Lysis Buffer を 250  $\mu$ L 添加し、穏やかに 4~6 回転倒混和する。
8. 室温で 5 分間インキュベートし、細胞溶解と内在性 RNA 分解を行う。
9. 手順 8 終了後、直ちに氷冷 Binding Buffer を 350  $\mu$ L 添加し、6~8 回転倒混和する。
10. 氷上で 5 分間インキュベートし、中和反応及び変性プラスミド DNA の巻き戻しを行う。
11. 15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心し、不溶性物質を沈殿させる。
12. Collection Tube に High Pure Filter Tube をセットし、そこに手順 11 で得られた上清を静かに添加する。
13. 13,000 rpm, 4°C で 1 分間遠心し、Collection Tube に溶出された液を捨て、High Pure Filter Tube に Wash Buffer I を 500  $\mu$ L 添加する。
14. 13,000 rpm, 4°C で 1 分間遠心し、Collection Tube に溶出された液を捨て、High Pure Filter Tube に Wash Buffer II を 700  $\mu$ L 添加する。
15. 13,000 rpm, 4°C で 1 分間遠心し、Collection Tube に溶出された液を捨て、再度 13,000 rpm, 4°C で 1 分間遠心する。
16. High Pure Filter Tube を Collection Tube から取り外し、清潔なマイクロチューブにセットして、100  $\mu$ L の Milli-Q を添加する。
17. 13,000 rpm, 4°C で 1 分間遠心し、得られたプラスミド抽出溶液は分光光度計を用いて、濃度を計測し、使用時まで 4°C で保存した。
18. 以下の組成で試薬を混合し、手順 17 で抽出したプラスミドを制限酵素で消化する。

• Milli-Q	to 50 $\mu$ L	
• 10 $\times$ H buffer	5 $\mu$ L	(1 $\times$ )

・抽出プラスミド溶液	5~20 $\mu\text{g}$	
・ <i>EcoR</i> I (12 U/ $\mu\text{L}$ )	1.67 $\mu\text{L}$	(20 U)
・ <i>EcoR</i> V (10 U/ $\mu\text{L}$ )	2 $\mu\text{L}$	(20 U)

19. 37°C で、1~3 時間程度インキュベートし、完全消化した。
20. ミニゲルで、0.5×TBE, 0.8% アガロースゲルを作製し、手順 19 の制限酵素処理溶液を全量電気泳動する。
21. 泳動終了後、EtBr で 5~30 分程度の染色し、5~10 分間脱色を行う。
22. 70% 光量に設定した UV トランスイルミネーターに染色及び脱色したアガロースゲルをのせ、UV 照射下目視で目的 DNA 断片を含む領域を素早く (10 秒以内が望ましい) 切り出す。この時、切り出したバンドサイズはそれぞれ *PfpgPLA 1a* (A) [*PfPLA 7*] 遺伝子で 1,206 bp, *OoPLA<sub>2</sub>-o3* 遺伝子で 1,217 bp である。
23. 熱したニードルで底面に穴を開けたマイクロチューブを用意し、そこに目的 DNA 断片を含むアガロースゲルを入れる。
24. 底面にニードルで穴を開けたマイクロチューブを別の新たなマイクロチューブの上ののせ、フラッシュ遠心を行い、ゲルを物理的に破碎する。
25. 十分に破碎できたゲル片に TE 飽和フェノールを等量加え、良くボルテックスし、均一化させる。
26. TE 飽和フェノールを加えたゲル片を -80°C で 30 分以上放置し、完全に凍結させる。
27. 完全に凍結したゲル片を室温に戻し、徐々に自然解凍させる。
28. 十分に解凍されたゲル片を 15,000 rpm, 20°C で 5 分間遠心し、上層の水層を回収する。
29. 回収された水層に等量の PCI を加え、良くボルテックスし、均一化させる。
30. 15,000 rpm, 20°C で 5 分間遠心し、上層の水層を回収する。
31. 手順 29, 30 を再度繰り返し、回収された水層に 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2~2.5 倍量の 100% エタノールを添加する。
32. 十分に転倒混和し、-80°C で 10 分もしくは -30°C で 1 時間、エタノール沈殿を行う。
33. エタノール沈殿が完了したら、15,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心する。
34. ペレットを崩さないように、上清を捨てる
35. 70% エタノールを適量加え、15,000 rpm, 4°C で 1~5 分間遠心し、DNA ペ

レットを軽くリンスする。

36. ペレットを崩さないように、上清を完全に除去し、風乾する。
37. 12  $\mu\text{L}$  の TE バッファーで DNA ペレットを再懸濁し、使用時まで 4°C で保存した
38. 手順 37 で獲得された DNA 溶液を 1  $\mu\text{L}$  電気泳動し、濃度算出を行った。
39. DNA プローブのラベリングは一度に 10~3,000 ng のテンプレート DNA 量が必要であるため、手順 38 で算出した濃度をもとにラベリング反応に用いる DNA 量を決める。今回は手順 38 時点で残っている 11  $\mu\text{L}$  全てを用いる。
40. 手順 37 で獲得された DNA 溶液に 4  $\mu\text{L}$  の Milli-Q を加え、総量 15  $\mu\text{L}$  とした DNA 溶液を 95°C に温めておいたサーマルサイクラーにセットし、95°C で 10 分間、DNA を熱変性させる。
41. 氷に食塩を適量加えた寒材を用意し、直ちに熱変性が完了した DNA 溶液を急冷する。そのまま氷上で 10 分間インキュベート。
42. 以下の組成で試薬を氷上で混合する。なお、Klenow Fragment は分子量が大きく活性を失いやすいため、ピペッティングによる混合や気泡を発生させるような激しい混合は避ける。

• Hexanucleotide Mix, 10 $\times$	2 $\mu\text{L}$	(1 $\times$ )
• DIG DNA Labeling Mix, 10 $\times$	2 $\mu\text{L}$	(1 $\times$ )
• Klenow Fragment (2 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	(2 U)
43. 手順 42 で調製した試薬に手順 41 で急冷した DNA 溶液を素早く加え、気泡が発生しないように穏やかに混合し、37°C で 20 時間インキュベートする。
44. インキュベート完了後、0.2 M EDTA を 2  $\mu\text{L}$  添加し、ラベリング反応を停止させた。
45. 4 M 塩化リチウムを 2  $\mu\text{L}$ 、氷冷 100% エタノールを 60  $\mu\text{L}$  添加し、-30°C で 30 分間インキュベートする。
46. 15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心し、ペレットを崩さないように上清を取り除く。
47. 氷冷 70% エタノールを 180  $\mu\text{L}$  添加し、15,000 rpm, 4°C で 2 分間遠心し、軽くリンスを行う。
48. 上清を完全に除去し、風乾を行う。
49. 風乾後に TE バッファーを 20  $\mu\text{L}$  添加し、再懸濁し、使用時まで -20°C で保存した。この時、テンプレート DNA の初期濃度及び反応時間から最終的に

獲得された DIG 標識 DNA プローブ濃度を概算で計算しておく。なお、事前にもしくは以降の実験と平行して、ドットプロットなどによってプローブが正常に機能するかの検証実験を行っておくと良い。

50. 第4章2節2項で作製したコロニーが程良く育ったレプリカプレートを4°Cで30分間しっかりと冷却し、寒天表面を固化させる。
51. 実験台をラップで丁寧に覆い、作業に則し手袋・マスクを着用する。以降の作業は手袋・マスクを着用し、塵などが混入しないように極力静かに作業を行う。
52. Hybond-N+ (GE Healthcare UK Ltd., little chalfont, UK) メンブレンを円盤状に切り抜き、認識番号、向き、大腸菌の区画番号等の情報をメンブレン端に油性ボールペンで記入する。メンブレンは決して素手で触らず、清潔なピンセットなどを用いて取り扱う。
53. メンブレンを冷却したプレートのコロニー形成面に静かにのせる。この時、ピンセットを用いて端の方からゆっくりと気泡が入らないようにのせる。
54. メンブレンにコロニーが転写されるまで1分間待ち、その後プレートから静かにメンブレンを引き剥がす。
55. ラップの上にキムタオルもしくはブロッキング用濾紙をのせ、その上にメンブレンを静かに置き、軽く吸水する。この時、コロニー転写面を必ず上に向け、キムタオルに接しないようにする。
56. 清潔なシャーレのフタに、変性溶液を1.5 mL 滴下し、その上にメンブレンを端からそっとのせ、変性溶液が全体に行き渡るようにし、15分間室温でそのままインキュベートし、菌体を変性させる。
57. 変性溶液に浸したメンブレンを新たなキムタオルの上へのせ、軽く吸水・風乾を行う。この時コロニー転写面を必ず上に向け、キムタオルに接しないようにする。
58. 清潔なシャーレのフタに、中和溶液を1.5 mL 滴下し、その上にメンブレンを端からそっとのせ、変性溶液が全体に行き渡るようにし、15分間室温でそのままインキュベートし、中和反応を行う。
59. 中和溶液に浸したメンブレンを新たなキムタオルの上へのせ、軽く吸水・風乾を行う。この時コロニー転写面を必ず上に向け、キムタオルに接しないようにする。
60. 清潔なシャーレのフタに、2×SSC 溶液を1.5 mL 滴下し、その上にメンブレ

ンを端からそつとのせ、2×SSC 溶液が全体に行き渡るようにし、10 分間室温でそのままインキュベートし、平衡化を行う。

61. シャーレから 2×SSC 溶液を軽く取り除き、メンブレンをシャーレに入れたまま、UV トランスイルミネーター (ゲル撮影用の UV トランスイルミネーターで可) にセットし、片面 1 分間ずつ UV を照射し、クロスリンク反応を行う。この作業は 80°C、30 分間ベーキングで代用しても良い。
62. 1 mg/mL の濃度となるように Proteinase K を 2×SSC 溶液に溶かし、Proteinase K 希釈溶液を調製し、メンブレンのコロニー転写面に Proteinase K 希釈溶液を 1.5 mL 滴下し、メンブレン全体に Proteinase K 希釈溶液を良く馴染ませる。
63. シャーレにフタをし、パラフィルムで側面をしっかりと密閉し、37°C で 1 時間以上インキュベートし、菌体に含まれるタンパク質の分解を行う。メンブレンが乾燥しないように定期的にメンブレンの状態を確認し、メンブレン全体に Proteinase K 希釈溶液が行き渡るようにする。
64. インキュベートが完了し、コロニーが十分に溶解したことを確認したら、メンブレンを取り出し、Milli-Q で湿らせたブロッキング用濾紙でメンブレンを挟み込み、上からガラスピペット等を転がし、ブロッキング用濾紙を上から強く押さえ、デブリスを取り除く。
65. ブロッキング用濾紙を静かに剥ぎ取り、デブリスが充分に取り除けているか確認する。デブリスが充分に取り除けるまで、手順 64 の操作を数回繰り返す。
66. デブリスが充分に除去できたメンブレンはハイブリダイゼーションの準備が整うまでの間、湿らせたブロッキング用濾紙に挟み込んで保存し、乾燥を防ぐ。中長期保存したい場合は湿らせた状態で 4°C 保存。
67. デブリスを除去したメンブレンをハイブリバックの中に投入し、ウォーターバスで 45°C に温めておいた高 SDS バッファーを 100 mL 投入し、45°C で 1 時間プレハイブリダイゼーションさせる。直径 90 mm 程度のメンブレンならば 8~12 枚まとめてハイブリバックに投入でき、一度に複数枚のメンブレンをハイブリダイゼーションすることが可能である。
68. 手順 49 で保存しておいた DIG 標識 DNA プローブを 98°C に温めておいたサーマルサイクラーにセットし、98°C で 5 分間インキュベートし、DIG 標識 DNA プローブを熱変性させる。

69. 氷に食塩を適量加えた寒材を用意し、熱変性が完了した DIG 標識 DNA プローブを直ちに急冷する。そのまま氷上で 10 分間インキュベート。
70. プレハイブリダイゼーション終了後、高 SDS バッファーを回収し、事前に 45°C で温めておいた 100 mL の高 SDS バッファーに急冷した DIG 標識 DNA プローブを加え、その溶液をメンブレンの入ったハイブリバックへ直ちに投入する。
71. 45°C で~12 時間程度、適度に震盪しながらハイブリダイゼーションを行う。
72. 適切な大きさの容器に低ストリンジェント洗浄バッファーを 250 mL 注ぎ、ハイブリダイゼーションの完了したメンブレンを素早く浸し、室温で 5 分間震盪しながら、メンブレンを洗浄する。
73. 洗浄後、低ストリンジェント洗浄バッファーを捨て、新たに低ストリンジェント洗浄バッファーを 250 mL 注ぎ、手順 72 同様にメンブレンの洗浄を行う。
74. 洗浄終了後、低ストリンジェント洗浄バッファーを捨て、68°C に温めておいた高ストリンジェント洗浄バッファーを 250 mL 注ぎ、68°C で 15 分間震盪しながら、メンブレンの洗浄を行う。
75. 洗浄終了後、高ストリンジェント洗浄バッファーを捨て、新たに高ストリンジェント洗浄バッファーを 250 mL 注ぎ、手順 74 同様にメンブレンの洗浄を行う。
76. 洗浄終了後、洗浄バッファーを 300 mL 注ぎ、1 分間震盪しながらメンブレンの洗浄を行う。この操作を 2 回繰り返す。
77. 洗浄終了後、250 mL のブロッキングバッファーにメンブレンを浸し、4°C で 90 分間震盪しながらブロッキング反応を行う。
78. ブロッキング完了後、洗浄バッファーでメンブレンを軽く濯ぎ、Anti-DIG 抗体希釈溶液が 100 mL 注がれた新たな容器に、メンブレンを浸し、室温で 30 分間震盪しながら抗体のクロスリンク反応を進めた。
79. クロスリンク反応完了後、抗体洗浄バッファーが 300 mL 注がれた新たな容器に、メンブレンを浸し、室温で 15 分間震盪しながら洗浄を行う。この作業を 2 回繰り返す。
80. 新たな容器に検出バッファーを 100 mL 注ぎ、メンブレンの平衡化を 5 分間行う。
81. 90 mm 直径のメンブレン 1 枚あたり、アルカリフォスターゼの化学発光基

質である CDP-Star (25 mM) を 1  $\mu$ L, 検出バッファを 1 mL 使用する。メンブレンの枚数に応じた CDP-Star と検出バッファを用意し、それを混合し、使用時まで氷上で保存する。

82. 使用済みの X 線フィルムもしくは下敷きの上にラップを丁寧に敷き、その上に平衡化が完了したメンブレンをシワが生じないように並べた。なお、以降の作業は暗室にて行う。
83. メンブレンに CDP-Star 希釈溶液を滴下し、その上からラップを静かに被せ、メンブレン隅々まで CDP-Star を行き渡らせる。以降、数分以内感光作業を完了する。
84. CDP-Star の余分な液を拭き取り、下敷き及びメンブレンをラップに包んだ手順 83 の状態で X 線フィルムカセットにセットし、暗室の電気を消灯した。以降作業は全て消灯下もしくは赤色灯下で行う。
85. X 線フィルムを X 線フィルムカセットにセットし、X 線フィルムカセットを閉じ、そのまま感光に移る。今回は 40 分間の感光を行った。
86. 感光完了後、現像液、停止液、定着液をトレイに出し、X 線フィルムを X 線フィルムカセットから取り出し、各液に数十秒~数分間浸し、現像作業を行う。現像が完了し、現像液等の片付けが全て完了したら、電気をつけ、フィルムを水洗いし、乾燥させる。
87. 現像したフィルムをもとに目的クローンを選定する。マスタープレートから目的クローンをもつコロニーを取り出し、画線培養、コロニーの純化、制限酵素を用いたクローンの均一性確認操作を行った。
88. 目的クローンを持つと予測された大腸菌コロニーをアンピシリン添加 LB 液体培地で 37°C, 8~12 時間震盪培養し、大腸菌培養液 1 mL に 50% グリセロール溶液を終濃度 12~15% になるように添加し、グリセロールストックを作製した。グリセロールストックは -80°C で保存した。
89. 手順 88 で使用した大腸菌培養液と以下の試薬を氷上で混合した。

• Milli-Q	4.62 $\mu$ L	
• 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX	10 $\mu$ L	(1 $\times$ )
• 2 mM dNTPs	4 $\mu$ L	(0.4)
• CHO5 プライマー (25 $\mu$ M)	0.24 $\mu$ L	(0.6 $\mu$ M)
• CHO3 プライマー (25 $\mu$ M)	0.24 $\mu$ L	(0.6 $\mu$ M)
• 大腸菌培養液	0.5 $\mu$ L	(2.5%)

• KOD FX DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ L)	0.4 $\mu$ L	(0.4 U)
Total 20 $\mu$ L		

90. 以下の条件で、コロニーPCRによる二次スクリーニングを実施した。

Pre-denature	94°C, 2 分間	
↓		
Denature	98°C, 10 秒間	× 25 サイクル
Annealing, Extension	68°C, 2 分間	
↓		
Preservation	4°C, $\infty$	

91. PCR 終了後、電気泳動を行い増幅産物の有無及び分子量から判定を行う。陽性クローンの PCR 産物は pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>ベクターにライゲーションし、以降サイクルシーケンスによる核酸配列の確認及び抽出コスミドの制限酵素処理による消化断片の比較も実施した。なお、ライゲーション～サイクルシーケンスの各種操作の詳細に関しては第4章2節7~10項に後述してあるので参考されたい。以上、全てのスクリーニングを経て、それぞれのライブラリーから最終的な陽性クローンを選別した。

#### 4-2-4. コスミドクローンの取扱いとその抽出及び塩基配列決定

本項では前項で獲得された陽性クローンからのコスミド DNA 抽出及び、その配列決定までを記す。なお、本項で記すのは主に QIAGEN Large-Construct Kit (QIAGEN 社, Hilden, Germany) を用いたラージスケールからのコスミド DNA 抽出法であり、アルカリ SDS (アルカリミニプレップ) 法によるコスミド DNA 抽出は第4章2節9項のプラスミド DNA 抽出を参照されたい。また、コスミド DNA の物理的剪断を避けるため、コスミド DNA の取扱いは全てデカントもしくは先を切り捨てた 1 mL ピペットチューブで行った。

##### ◦ 100 mM ATP 溶液

Adenosine-5'-triphosphate	0.3 g	(100 mM)
↓ 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) で 5 mL にメスアップ		
↓	Total 5 mL	Filtered (0.22 $\mu$ m)
↓ 小分けに分注し、-20°C で保存。		



1. 陽性クローンである大腸菌フリーズストックを起こし、白金耳を用いてアンピシリン添加 LB 寒天培地に播種し、37°C で 8~12 時間画線培養する。
2. 形成されたコロニーを 5 mL のアンピシリン添加 LB 液体培地に播種し、37°C で~8 時間震盪培養する。この時予備として数本、同時に振っておく。
3. 手順 2 で前培養した大腸菌培養液 1 mL を 500 mL の新たなアンピシリン添加 LB 液体培地に播種し、37°C で 12~16 時間震盪培養する。前培養の残り的大腸菌培養液と予備で振っていたものはそのまま 12~16 時間震盪培養し、ミニプレップアルカリ SDS 法でコスミド DNA を抽出し、制限酵素によるクローン間の均一性評価を行う。
4. 本培養が終了した 500 mL の大腸菌培養液を遠心瓶に入れ、6,000×g, 4°C で 15 分間遠心し、集菌を行う。
5. 事前に 100 µg/mL 濃度となるように RNase A 添加した Buffer P1 20 mL を大腸菌ペレットに添加し、しっかりと再懸濁する。
6. 十分に再懸濁した大腸菌再懸濁液に Buffer P2 を 20 mL 添加し、穏やかに 4~6 回転倒混和する。室温で 5 分間インキュベートし、細胞溶解と内在性 RNA 分解を行う。
7. 氷冷 Buffer P3 を手順 6 の細胞溶解液に素早く加え、4~6 回穏やかに転倒混和する。氷上で 10 分間インキュベートし、中和反応及び変性コスミド DNA の巻き戻しを行う。
8. 20,000×g, 4°C で 30 分間遠心し、コスミド DNA を含む上清を回収する。
9. Milli-Q で湿らせた Folded filters をコンカルチューブに折り畳んでセットし、コスミド DNA を含む上清を Folded filters に滴下し、濾過する。
10. 0.6 倍量のイソプロパノールを濾過された上清に加え、転倒混和し、直ちに 15,000×g, 4°C で 30 分間遠心する。
11. 上清を取り除き、70% エタノールを 5 mL 加え DNA ペレットを洗浄し、15,000×g, 4°C で 15 分間遠心し、DNA ペレットを崩さないように上清を取り除く。
12. DNA ペレットが沈殿しているコンカルチューブをキムタオルの上に逆さまにして置き、2~3 分間風乾を行う。風乾させ過ぎると、溶け難くなるので注意する。コンカルチューブ壁面に水分が残っている場合はキムワイプなどを利用して取り除く。
13. 風乾した DNA ペレットに Buffer EX を 9.5 mL 添加し、再懸濁を行う。ただ

し、コスミド DNA 懸濁は物理的剪断を防ぐため、穏やかに行う。

14. 200  $\mu$ L の ATP-Dependent Exonuclease と 300  $\mu$ L の 100 mM ATP 溶液を再懸濁 DNA 溶液に加え、穏やかに混ぜ、37°C で 1 時間インキュベートし、直鎖状 DNA の限定分解を行う。
15. QIAGEN-tip 500 に Buffer QBT を 10 mL 滴下し、平衡化を行う。
16. 直鎖状 DNA の限定分解が完了した DNA 溶液に Buffer QS を 10 mL 加え、それを Buffer QBT が自然流下で全て溶出し平衡化が完了した QIAGEN-tip 500 に全量滴下する。
17. QIAGEN-tip 500 から全ての液が溶出したら、30 mL の Buffer QC を QIAGEN-tip 500 に滴下し、洗浄を行う。この操作を 2 回繰り返す。
18. 事前に 65°C に温めておいた 15 mL の Buffer QF を QIAGEN-tip 500 に静かに滴下し、QIAGEN-tip 500 から DNA を溶出させる。
19. 0.7 倍量のイソプロパノールを溶出 DNA に加え、転倒混和し、直ちに 15,000 $\times$ g, 4°C で 30 分間遠心する。
20. 上清を取り除き、70% エタノールを 5 mL 加え DNA ペレットを洗浄し、15,000 $\times$ g, 4°C で 15 分間遠心し、DNA ペレットを崩さないように上清を取り除く。
21. DNA ペレットを 5~10 分間風乾させ、2 mL の TE バッファーで穏やかに再懸濁する。風乾させ過ぎると、溶け難くなるので注意する。コニカルチューブ壁面に水分が残っている場合はキムワイプなどを利用して取り除く。
22. 分光光度計を用いて、濃度及び純度を算出した。使用時まで 4°C で保存。
23. 精製したコスミド DNA の一部を適当な制限酵素で消化し、目的クローンが獲得できているか、サンプル間の均一性などを確認する。
24. 精製コスミドをテンプレートに M13 Forward (-47) と T7 Promoter シークエンスプライマーをそれぞれ用いて、サイクルシークエンスを行い、コスミドに挟まれたゲノム DNA の 5' と 3' 末端領域の配列決定を行った。サイクルシークエンス法に関しては第 4 章 2 節 10 項を参考されたい。
25. コスミド DNA 全長の一次構造決定は北海道システムサイエンス株式会社による次世代シークエンサーGS FLX+システム (454 Life Sciences, a Roche company, Branford, CT, USA) を用いた委託解析によって行われた。

#### 4-2-5. ゲノミック PCR

本項では KOD –Plus– DNA Polymerase (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いたゲノミック PCR の基本的な操作について記述する。本項と次項に記述する操作で増幅される DNA 断片は全て平滑末端構造を形成するため、第 4 章 2 節 7 項では TOPO システムを用いた平滑末端クローニングに関して記述をしている。突出末端構造を形成する Taq polymerase による PCR 及び突出末端クローニング法に関しては第 4 章 4 節 2 項を参考されたい。以降の操作で使用されるゲノム DNA はホンハブ (No. 3), トカラハブ (No. 10), サキシマハブ (No. 16), ヒメハブ (No. 7 と 24) からそれぞれ抽出されものである。なお、本実験で使用した合成オリゴ DNA の詳細とその組み合わせに関しては、第 7 章に別途記載しているので参照されたい。全ての PCR は事前に Amplify3 及び Amplify4 ソフトウェア (Bill Engels, 2015, University of Wisconsin) を用いて、PCR のシミュレーションとテスト、そしてプライマーダイマーの有無などの確認作業を行い、実施された。

1. 以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	to 50 $\mu$ L	
• 5 $\times$ PCR Buffer for KOD –Plus–	5 $\mu$ L	(1 $\times$ )
• 2 mM dNTPs	5 $\mu$ L	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ L	(1.5 mM)
• センスプライマー (25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• アンチセンスプライマー (25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• ゲノム DNA (100 ng/ $\mu$ L)	0.5~2.0 $\mu$ L	(1~4 ng/ $\mu$ L)
• KOD –Plus– DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	(1 U)

Total 50  $\mu$ L

2. 以下のサイクル条件で、ゲノミック PCR を行った。通常は 3 ステップで PCR を行うが、エキストラバンドが確認できた場合とプライマー T<sub>m</sub> 値が極端に高い場合は 2 ステップで PCR を行った。なお、3 ステップの Annealing 温度はプライマーセットの T<sub>m</sub> 値を参考に $\pm$ 5 $^{\circ}$ C を目安にその都度変更し行った。

◦ 3 ステップ

Pre-denature	94 $^{\circ}$ C, 2 分間	
↓		
Denature	98 $^{\circ}$ C, 10 秒間	
Annealing	X $^{\circ}$ C, 30 秒間	× 25 サイクル

Extension	68°C, 1 分/kbp
↓	
Preservation	4°C, ∞
◦ 2 ステップ	
Pre-denature	94°C, 2 分間
↓	
Denature	98°C, 10 秒間
Annealing, Extension	68°C, 1 分/kbp
↓	
Preservation	4°C, ∞

- 0.5×TBE バッファーを用いて、0.5~2% アガロースゲルを適宜作製し、PCR 産物を電気泳動した。
- アガロースゲルを EtBr で染色、脱色し、UV トランスイルミネーターで核酸の増幅を確認する。PCR 産物はクローニングまで 4°C で保存する。長期保存の場合は EDTA を加えるかもしくは増幅断片の精製を行っておく。アガロースゲルから特定バンドの切り出し・精製を行いたい場合は第 4 章 2 節 3 項 手順 20-38 を参考されたい。
- Image J ソフトウェアを用いて、増幅断片のサイズ及び DNA 濃度を推定する。またこの際、ライゲーション反応に最も効率的なベクターとインサート DNA のモル比の算定もしておく。

#### 4-2-6. Ligation-mediated PCR

本項では KOD-Plus-DNA Polymerase と TaKaRa LA PCR™ *in vitro* Cloning Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いた Ligation-mediated PCR の基本的な操作について記述する。本項と前項に記述する操作で増幅される DNA 断片は全て平滑末端構造を形成するため、第 4 章 2 節 7 項では TOPO システムを用いた平滑末端クローニングに関して記述をしている。突出末端構造を形成する Taq polymerase による PCR 及び突出末端クローニング法に関しては第 4 章 4 節 2 項を参考されたい。以降の操作で使用されるゲノム DNA はホンハブ (No. 3), トカラハブ (No. 10), サキシマハブ (No. 16), ヒメハブ (No. 7 と 25) からそれぞれ抽出されものである。なお、本実験で使用した合成オリゴ DNA の詳細とその組み合わせに関しては、第 7 章に別途記載しているので参照されたい。全ての PCR

は事前に Amplify3 及び Amplify4 ソフトウェア (Bill Engels, 2015, University of Wisconsin) を用いて、PCR のシミュレーションとテスト、そしてプライマーダイマーの有無などの確認作業を行い、実施した。

1. *EcoR I*, *Hind III*, *Pst I*, *Sal I*, *Sau3A I*, *Xba I* 及びそれら 6 つの制限酵素と対合末端を形成することが可能な制限酵素を使用でき、それぞれの制限酵素で 20  $\mu\text{g}$  のゲノム DNA を完全に消化する。消化時間及び消化温度などは制限酵素の性質に従う。
2. 制限酵素で完全消化された DNA 溶液に、等量の TE 飽和フェノールを添加し、良くボルテックスし、制限酵素の変性・失活処理を行う。
3. 15,000 rpm, 20°C で 5 分間遠心し、上清を清潔なマイクロチューブに移す。
4. 等量の PCI を回収した上清に加え、良くボルテックスし、制限酵素の変性・失活処理を行う。
5. 15,000 rpm, 20°C で 5 分間遠心し、上清を清潔なマイクロチューブに移す。
6. 手順 4, 5 を再度繰り返す。
7. 回収した上清に 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2~2.5 倍量の氷冷 100% エタノールを添加し、良く転倒混和する。
8. -80°C で 10 分間もしくは -30°C で 1 時間インキュベートし、エタノール沈殿を行う。
9. 15,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心し、DNA ペレットに注意しながら、上清を取り除く。
10. 70% エタノールを適量滴下し、15,000 rpm, 4°C で 2~5 分間遠心し、DNA ペレットに注意しながら、マイクロピペットを用いて上清を全て取り除く。
11. 制限酵素処理ゲノム DNA ペレットを 1~10 分間風乾させる。
12. 精製された制限酵素処理ゲノム DNA ペレットに Milli-Q を 10  $\mu\text{L}$  加え、再懸濁する。
13. 用いた制限酵素で切断・形成された末端配列に対合する Cassette を TaKaRa LA PCR™ *in vitro* Cloning Kit から取り出し、以下の組成で試薬を氷上で混合する。ただし、*Sau3A I* Cassette を 6 塩基対認識の制限酵素で消化したゲノム DNA にライゲーションする場合は *Sau3A I* Cassette を 10 倍希釈して使用する。

・制限酵素処理ゲノム DNA                      10  $\mu\text{L}$                       (~20  $\mu\text{g}$ )

- 各種対合 Cassette 溶液 (20 ng/μL)      2.5 μL                      (50 ng)
- Ligation High                                      56.25~12.5 μL      (0.5~1 倍量)

14. 16°C, 30 分間~1 時間インキュベートし, ライゲーションを行う。
15. 手順 2~11 同様に, フェノール・PCI 抽出, エタノール沈殿を行い, Cassette 付加ゲノム DNA を精製する。
16. 精製された Cassette 付加ゲノム DNA ペレットに 5 μL の TE バッファーを加え, 再懸濁する。使用時まで 4°C で保存する。
17. 以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	to 50 μL	
• 5×PCR Buffer for KOD –Plus–	5 μL	(1×)
• 2 mM dNTPs	5 μL	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 μL	(1.5 mM)
• Cassette Primer C1 (25 μM)	0.6 μL	(0.3 μM)
• ゲノム対応プライマー (25 μM)	0.6 μL	(0.3 μM)
• Cassette 付加ゲノム DNA	0.5~1.0 μL	
• KOD –Plus– DNA Polymerase (1 U/μL)	1 μL	(1 U)
Total 50 μL		

18. 以下のサイクル条件で 1st PCR を行った。
  - 2 ステップ
  - Predenature                      94°C, 2 分間
  - ↓
  - Denature                              98°C, 10 秒間
  - Annealing, Extension              68°C, 10 分間      × 20 サイクル
  - ↓
  - Preservation                      4°C, ∞
19. 0.5×TBE バッファーを用いて, 0.5~2% アガロースゲルを適宜作製し, PCR 産物を電気泳動した。
20. アガロースゲルを EtBr で染色, 脱色し, UV トランスイルミネーターで核酸の増幅を確認する。単一バンドの増幅が確認されたら, クローニングまで PCR 産物を 4°C で保存する。長期保存の場合は EDTA を加えるかもしくは増幅断片の精製を行っておく。増幅が確認できない場合は次のステップに進む。

21. 以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	to 50 $\mu$ L	
• 5 $\times$ PCR Buffer for KOD –Plus–	5 $\mu$ L	(1 $\times$ )
• 2 mM dNTPs	5 $\mu$ L	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ L	(1.5 mM)
• Cassette Primer C2 (25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• ゲノム対応 Nested プライマー(25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• 1st PCR 増幅産物	0.5~1.0 $\mu$ L	
• KOD –Plus– DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	(1 U)
<hr/>		
Total 50 $\mu$ L		

22. 以下のサイクル条件で 2nd PCR (Nested PCR) を行った。

◦ 2 ステップ

Pre-denature	94°C, 2 分間	
↓		
Denature	98°C, 10 秒間	× 25 サイクル
Annealing, Extension	68°C, 5 分間	
↓		
Preservation	4°C, $\infty$	

23. 0.5 $\times$ TBE バッファーを用いて、0.5~2% アガロースゲルを適宜作製し、PCR 産物を電気泳動した。

24. アガロースゲルを EtBr で染色、脱色し、UV トランスイルミネーターで核酸の増幅を確認する。単一バンドの増幅が確認されたら、最適伸長時間で再度 2nd PCR を行い、クローニングまで PCR 産物を 4°C で保存する。長期保存の場合は EDTA を加えるかもしくは増幅断片の精製を行っておく。増幅バンドが複数存在し、アガロースゲルから特定バンドの切り出し・精製を行いたい場合は第 4 章 2 節 3 項 手順 20-38 を参考されたい。

25. Image J ソフトウェアを用いて、増幅断片のサイズ及び DNA 濃度を推定する。またこの際、ライゲーション反応に最も効率的なベクターとインサート DNA のモル比の算定もしておく。

#### 4-2-7. TOPO クローニング

本項では KOD –Plus– DNA Polymerase で増幅された平滑末端をもつ DNA 断片

を pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>ベクター (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, MA, USA) にクローニングする操作を記述する。突出末端構造を形成する Taq polymerase で増幅された突出末端をもつ DNA 断片のクローニング法に関しては第 4 章 4 節 2 項を参考されたい。

- 以下の組成で試薬を氷上で混合する。本来、PCR 産物の添加量は事前に算出したライゲーション反応に最も効率的なベクターとインサート DNA のモル比に基づいて適宜調節する。TOPO クローニングにおける最も効率的なモル比は TOPO ベクター：インサート DNA = 1 : 0.5~2 である。また、通常は総体積 6  $\mu$ L の反応系であるが、試薬節約のため半分量で反応を行う。pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>ベクターの量はベクターとインサート DNA のモル比に基づいてさらに減らすことも可能である。

• Milli-Q	to 3 $\mu$ L	
• Salt Solution	0.5 $\mu$ L	
• Fresh PCR product	0.5 $\mu$ L	(Molar ratio, 0.5~2)
• pCR <sup>®</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup> vector (10 ng/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L	(Molar ratio, 1)
- 良く混合し、室温で 5~30 分間インキュベートする。
- 使用時まで 4°C で保存する。

#### 4-2-8. 形質転換及び大腸菌培養

本項では組換えプラスミド DNA の大腸菌コンピテントセル (DH5 $\alpha$ , JM109) への導入、及び形質転換体の培養に関して記述する。以降、操作に関しては無菌操作で行う。

- 事前に小分けに分注した大腸菌コンピテントセル 20  $\mu$ l を -80°C ディープフリーザーから取り出す。
- 大腸菌コンピテントセルを直ちに氷上へおき、素早く 2  $\mu$ L のライゲーション溶液またはプラスミド溶液を添加する。
- 軽く混合し、スピンドアウンを行い、氷上で 30 分間インキュベートする。
- 30 分間の氷上インキュベート完了後、直ちに大腸菌コンピテントセルの入ったマイクロチューブを事前に温めておいた 42°C ブロックインキュベーターで 45~60 秒間インキュベートし、ヒートショック処理を行う。



5. 大腸菌コンピテントセルを素早く氷上に戻し、氷上で 3 分間インキュベートする。
6. 3 分間の氷上インキュベート完了後、大腸菌コンピテントセルに、事前に融解させておいた SOC 培地を 100  $\mu$ L 添加し、30~60 分間 37°C で震盪しながら前培養を行う。なお、 $\beta$ -ラクタマーゼをコードするアンピシリン耐性遺伝子が組み込まれたプラスミドを用い、その形質転換体をアンピシリン添加培地に播種する場合、プレ培養の必要は無い。タンパク質の合成を阻害するカナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールを培地に添加した場合は必ず、このプレ培養を行う。
7. 適当な抗生物質とカラーセレクション試薬である X-gal が含まれた LB 寒天培地を用意し、プレ培養終了後の大腸菌培養液に無菌操作で 1 M IPTG を 20  $\mu$ L 添加し、軽く混合スピンドウンした後、培地に播種しコンラージ棒で塗り広げる。なお、DH5 $\alpha$  は LacIq 欠失変異体であるため、IPTG を添加する必要は無い。
8. 37°C で 10~14 時間インキュベートし、コロニーを形成させる。
9. コロニーが形成されたプレートは液体培地に植菌するまで 4°C で保存する。
10. 試験管に 4~5 mL ずつ分注されたオートクレーブ滅菌済みの LB 液体培地を必要本数用意し、適当な抗生物質を無菌操作で必要量滴下する。
11. 滅菌された爪楊枝でコロニーをピックアップし、抗生物質を添加した LB 液体培地へ播種する。
12. 37°C で 8~12 時間震盪培養する。
13. 培養終了後、試験管を回収し、プラスミド DNA 抽出に移るまで 4°C で保存する。

#### 4-2-9. プラスミド DNA 抽出 (アルカリ SDS 法)

本項ではアルカリ SDS 法によるプラスミド DNA の抽出操作に関して記述する。

1. LB 液体培地で一晚培養した大腸菌培養液を 1.5 mL マイクロチューブに適量移し、6,500 rpm、4°C で 5 分間遠心し、集菌を行う。
2. 菌体ペレットを崩さないように、上清をしっかりと取り除き、Solution I を 100  $\mu$ L 添加し、ボルテックスを 5 分間行い、しっかりと菌体ペレットを再懸濁する。

3. Solution II を用時調製する。
4. 菌体懸濁液に Solution II を 200  $\mu\text{L}$  添加し、4~6 回穏やかに転倒混和する。
5. 室温で 5 分間インキュベートし、細胞溶解を行う。
6. 5 分間のインキュベート後、直ちに氷冷 Solution III を 150  $\mu\text{L}$  添加し、穏やかに 6~8 回転倒混和する。
7. 氷上で 10 分間インキュベートし、中和反応とプラスミド DNA の巻き戻しを行う。
8. PCI を 100  $\mu\text{L}$  添加し、5 分間ボルテックスを行い、しっかりと混合する。
9. 15,000 rpm, 室温で 5 分間遠心し、中間層を吸わないように上清を 400  $\mu\text{L}$ , 清潔なマイクロチューブに回収する。
10. 回収した上清に 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2~2.5 倍量の 100% エタノールを添加し、転倒混和にて良く混合する。
11. 4°C もしくは室温で 5 分間インキュベートし、エタノール沈殿を行う。
12. 15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、核酸ペレットを崩さないように、上清をしっかりと取り除く。
13. 回収した核酸ペレットに 70% エタノールを適量加え、15,000 rpm, 4°C で 2 分間遠心し、核酸ペレットを軽くリンスする。
14. 上清をしっかりと取り除き、核酸ペレットを 10~15 分間風乾する。
15. 1:1000 の混合比で、RNase A (10 mg/mL) を TE バッファーで希釈し、RNase 希釈溶液 (10 ng/ $\mu\text{L}$ ) を氷上で調製する。
16. 風乾した核酸ペレットに RNase A 希釈溶液を 50  $\mu\text{L}$  添加し、ボルテックスにてペレットをしっかりと再懸濁する。
17. 以下の組成で試薬を氷上で混合し、制限酵素溶液を調製する。ここでは *EcoR* I を用いているが、使用する制限酵素はベクタープラスミド及び実験の内容に従い、適当なものを選ぶ。

• Mill-Q	to 7.75 $\mu\text{L}$	
• 10×H buffer	1 $\mu\text{L}$	(1×)
• <i>EcoR</i> I (12 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25 $\mu\text{L}$	(3 U)
18. RNase A 希釈溶液で再懸濁した核酸溶液 1  $\mu\text{L}$  を調製した制限酵素溶液に添加し、良く混合し、スピンドウンする。
19. RNase A 希釈溶液で再懸濁した核酸溶液とその核酸溶液を加えた制限酵素溶液を 37°C でそれぞれ 60 分間, 30 分間, インキュベートし、RNase A に

よる RNA の分解，及び制限酵素によるプラスミド DNA 配列内の限定分解を行う。

20. 0.5×TBE バッファーを用いて，1% アガロースゲルを作製する。
21. 制限酵素処理の完了した溶液に核酸溶液に，2  $\mu$ L の 6×Gel loading dye を添加し，アガロースゲルの各ウェルにサイズマーカー及び各種サンプルをそれぞれアプライし，電気泳動を開始する。
22. 電気泳動終了後，アガロースゲルを EtBr で 5~30 分程度染色し，脱色操作を行い，UV トランスイルミネーターを用いて泳動像を確認し，インサート DNA のサイズ算定及び核酸溶液の濃度算定などを行う。
23. 手順 22 の結果を考慮し，RNase A による RNA の分解処理が完了した核酸溶液に，20% PEG/2.5 M NaCl 溶液を 30  $\mu$ L 添加し，5 分間ボルテックスにて良く混合し，4°C で 1 時間以上 PEG 沈殿を行う。
24. PEG 沈殿が完了した核酸溶液を 15,000 rpm，4°C で 30 分間遠心する。
25. ペレットを崩さないように，上清をしっかりと取り除き，70% エタノールを適量添加し，15,000 rpm，4°C で 5 分間遠心し，ペレットのリンスを行う。
26. ペレットを崩さないように，上清をしっかりと取り除き，ペレットを 5~15 分程度風乾させる。
27. 精製されたプラスミド DNA ペレットに TE バッファーを 20  $\mu$ L 添加し，しっかりと再懸濁を行う。
28. 手順 22 の結果を考慮し，必要に応じてプラスミド DNA 溶液の濃度調製を適宜行い，使用時まで 4°C で保存する。

#### 4-2-10. サイクルシーケンス法による塩基配列決定

本項では BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, a Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を使用したサイクルシーケンス反応，及び Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, a Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) キャピラリー-DNA シークエンサーによる DNA シークエンシング操作に関して記述する。なお，以下の一般的なユニバーサルプライマー: M13 Forward (-20), M13 Reverse, T3 Promoter, T7 Promoter シークエンズプライマー，に関しては Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit 及び TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, MA, USA) に付属しているものを使用し，カスタムシーケンスプラ

イマーに関しては Genenet 社にその合成を依頼した。

1. シークエンスプライマーを Milli-Q で希釈し, 1.6 pmol/ $\mu$ L 濃度のシークエンスプライマー希釈溶液を調製する。Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit 及び TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit for Sequencing に付属している M13 Forward (-20), M13 Reverse, T3 Promoter, T7 Promoter シークエンスプライマーはそれぞれ 20.35, 19.25, 16.45, 16.40 pmol/ $\mu$ L で納品されており, Genenet 社に合成を依頼したカスタムシークエンスプライマーは 100 pmol/ $\mu$ L で調製してある。
2. サイクルシークエンス 1 反応あたり必要なテンプレート量はプラスミド DNA の場合 75~150 ng, コスミド DNA の場合 0.25~0.5  $\mu$ g, PCR 産物の場合 0.5~25 ng であるため, 濃度算出及び濃度調製等の作業を事前に必ず行う。なお, 高次構造を形成する DNA やコスミド DNA などのサイズの大きいテンプレートは事前に 98°C で 10 分間インキュベートし, 氷上で 5 分間の急冷を行い使用する。
3. 以下の組成で試薬を氷上で混合する。なお, BigDye Terminator の蛍光退色を抑えるために, 以降全ての操作は可能な限り遮光条件下で行い, 急激な温度上昇を避ける。可能な限り, BigDye Terminator v3.1 以外の試薬を予め混ぜておき, 最後に小分け分注の状態凍結保存された BigDye Terminator v3.1 ストック溶液を -30°C から取り出し, 氷上で解凍し, 速やかに BigDye Terminator v3.1 を添加し, 使用した BigDye Terminator v3.1 ストック溶液は -30°C へ速やかに戻し再凍結させる。

• Milli-Q	to 10 $\mu$ L	
• 5×Sequencing Buffer	2 $\mu$ L	(1×)
• シークエンスプライマー (1.6 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	(0.16 $\mu$ M)
• テンプレート DNA	X $\mu$ L	
• BigDye Terminator v3.1 (Pre-Mix)	0.5 $\mu$ L	

4. 以下のサイクル条件で, サイクルシークエンス反応を行った。なお, 反応終了後, 直ちに精製作業に進まない場合は, サンプルを回収し, -20°C で遮光保存する。

Pre-denature	96°C, 1 分間
↓	
Denature	96°C, 10 秒間

Annealing 50°C, 5 秒間 × 25 サイクル

Extension 60°C, 4 分間

↓

Preservation 4°C, ∞

5. 反応終了直前に、清潔な 1.5 mL マイクロチューブに 125 mM EDTA を 2.5  $\mu$ L 分注しておく。
6. 反応終了後、サンプルを氷上遮光下に回収し、サンプルを 125 mM EDTA が分注されたマイクロチューブに直ちに移し、反応を停止させた。
7. 100% エタノールを 30  $\mu$ L ずつ添加し、ボルテックスにて良く混合する。
8. 遮光下、室温で 15 分間インキュベートし、エタノール沈殿を行う。
9. エタノール沈殿の待ち時間を利用して、以下の組成に従いキャピラリー電気泳動用 Running Buffer を用時調製する。使用時まで 4°C で保存。
  - Milli-Q 45 mL
  - 10×Running Buffer 5 mL
10. エタノール沈殿の待ち時間を利用して、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer システムを起動させる。まず、接続パソコンの電源を入れ、Windows OS にログイン後、完全に立ち上がるまで待つ。パソコンが完全に立ち上がったら、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer 本体の電源を入れ、ステータスランプが緑色に点灯し、スタンバイ状態になるまで待つ。
11. エタノール沈殿が完了したら、15,000 rpm、室温で 20 分間遠心を行う。
12. 遠心分離の待ち時間を利用して、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer システム起動の準備を引き続き行う。パソコン、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer 本体が起動したら、Windows デスクトップの Run 3130xl Data Collection v3.0 ソフトウェアを起動させる。起動完了後、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer 本体の TRAY ボタンを押し、オートサンプラーを手前に移動させる。
13. オートサンプラーが完全に停止したら扉を開け、ウォーターリザーバー、陰極バッファリザーバーを静かに取り出し、内容物を捨て Milli-Q で壁面を良く濯ぎ、ウォーターリザーバーには Milli-Q を、陰極バッファリザーバーには事前に調製しておいた Running Buffer を充填する。この時、リザーバー壁面に水滴が付かないように注意する。
14. 陽極バッファリザーバーも同様に内容物を捨て Milli-Q で壁面を良く濯ぎ、

Running Buffer を充填する。この時、リザーバー壁面に水滴が付かないように注意する。

15. 乾燥した清潔なセプタをしっかりと陰極側の各リザーバーに被せ、全てのリザーバーを元の位置に戻し (左手前 1 番陰極バッファリザーバー, 左奥 2 番廃液用ウォーターリザーバー, 右手前 3 番予備ウォーターリザーバー, 右奥 4 番リンス用ウォーターリザーバー), 最後にポリマー残量の確認を行う。ポリマー残量が少ない場合は適宜交換充填を行う。扉を閉める。
16. 遠心分離が完了後、直ちに上清の除去を行う, この際ペレットを崩さないように注意しながら上清を完全に除去する。
17. 70% エタノールを 100  $\mu$ L 添加し, ペレットを崩さないように注意しながら指の腹で優しく数回タッピングし, ペレットの洗浄と未反応 Dye の除去を行う。
18. 15,000 rpm, 室温で 10 分間遠心し, 直ちに上清の除去を行う, この際ペレットを崩さないように注意しながら上清を完全に除去する。
19. 遮光下で 10~15 分程度風乾を行い, 事前に溶かしておいた Hi-Di Formamide を 20  $\mu$ L ずつ添加し, ペレットの再懸濁を行う。直ちに DNA シークエンシングに移行しない場合は風乾した状態で 4°C もしくは -20°C で遮光保存する。
20. Hi-Di Formamide 添加後, 30~90 秒ボルテックスを行い, 再懸濁を充分に行い, 96 穴マルチプレートにサンプルを丁寧にアプライする。空きウェルには Hi-Di Formamide を 20  $\mu$ L 充填する。最後にウェル内に気泡が発生していないか, 壁面に水滴がついていないか充分に確認する。
21. プレートベースにサンプルをアプライした 96 穴マルチプレートをのせ, その上に乾燥した清潔なセプタストリップ, プレートリテーナを順番にのせ, プレートアセンブリをしっかりと組み立てる。
22. TRAY ボタンを押し, オートサンプラーを手前に移動させ, オートサンプラーが完全に停止したら扉を開け, 組み立てたプレートアセンブリをオートサンプラーに設置し, 扉を閉める。
23. Run 3130xl Data Collection v3.0 ソフトウェアのナビゲーションペインから Plate Manager を選択し, 各項目を入力する。
24. 設定が完了すると, Sequencing Analysis Plate Editor が開き, サンプルをアプライしたウェル番号に対応する欄にサンプル名を入力し, データ出力先,

機器プロトコル，解析プロトコルを設定する。

25. 設定が完了すると，Plate Manager にプレートレコードが登録される。
26. Run Scheduler > Plate View > Find All と進み，先程登録したプレートレコードを選択し，リンク先の Plate Position Indicator を選択すると，Plate Position Indicator が黄色から緑色へ変わり，オートサンプラー上のサンプルプレートとのリンクが完了する。
27. リンクが完了すると Run View のツールバー上に Start Run ボタンが表示されるので，このボタンをクリックし，ランを開始する。
28. ラン完了後，TRAY ボタンを押し，オートサンプラーを手前に移動させ，オートサンプラーが完全に停止したら扉を開け，プレートアセンブリをオートサンプラーから取り外し，扉を閉める
29. プレートアセンブリを解体し，セプタストリップを Milli-Q で良く濯ぐ。
30. Sequencing Analyzer 5.2 ソフトウェアを開き，ログインする。
31. File > Add Samples と進み，自身のサンプルを出力フォルダから選択する。
32. 表示された自身のサンプル選択し，Show > Start ボタンをクリックすると，データの変換及び波形データの出力が行われる。
33. File > Exit と進み，Sequencing Analyzer 5.2 ソフトウェアを終了させる。その際に，全てのデータ保存をする。
34. Run 3130xl Data Collection v3.0 ソフトウェアの Service Console > Stop All を選択し，システムが完全に停止するまで待つ。
35. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer 本体の電源を落とし，続いてパソコンを終了する。
36. 波形データの解析及び修正は Finch TV ソフトウェア (Geospiza Inc., Seattle, WA, USA) を用いて行った。

#### **4-3. 遺伝子及びタンパク質発現解析**

##### **4-3-1. ハブ組織からの RNA 抽出**

本項では ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた組織からの RNA の抽出操作について記述する。以降の実験に用いる RNA は第 4 章 1 節 1 項で示したように，ホンハブ (個体番号 : No. 7, 8)，ヒメハブ (No. 25) の各臓器から，それぞれ抽出を行った。使用した全ての器具類は可能な限り，

RNase/DNase-Free のディスプレイザブルなものを用意し、使い捨てできない器具類に関しては十分に洗浄し、RNase Quiet (Nacalai tesque, Inc., Kyoto, Japan) による RNase 活性阻害処理及びオートクレーブ・紫外線照射による滅菌処理を十分に施した。なお、以降実験は全て清潔な手袋・マスク・白衣を着用し行う。

1. RNase-Free 環境を構築するために、RNase Quiet を用いてマイクロピペットマン、チップケース、乳鉢、乳棒、薬さじ、試薬瓶など全ての器具に RNase 不活性化処理を施した。マイクロピペットマンやチップケースなどは分解し、内部洗浄も施した。
2. オートクレーブ滅菌可能な器具類はアルミホイルで包装し、オートクレーブ処理を施した。RNase はオートクレーブでは活性を失わず、オートクレーブ釜内に残留する RNase の混入を避けるために、しっかりと包装した。オートクレーブ滅菌が不可能な器具類は紫外線照射を行い、滅菌処理を施した。
3. 隅々まで RNase Quiet で RNase 不活性化処理を施し、事前に冷却しておいた清潔な乳鉢・乳棒に液体窒素を注ぎ、乳鉢・乳棒及び薬さじ等の器具を良く冷却する。
4. 事前に RNase/DNase-Free なマイクロチューブに ISOGEN を 1 mL 添加しておく。
5. 液体窒素が充填された乳鉢に適度な大きさに砕かれた組織片 (0.5 立方センチメートル以下) を投入し、液体窒素が完全に蒸発する前に、組織片を乳棒で叩き砕き、ある程度いくつかの小断片にしておく。
6. 液体窒素が完全に蒸発しないうちに、素早く組織片を粉碎する。液体窒素の蒸発は超音波キャビテーションによる核酸の物理的断片化を引き起こすので、液体窒素の補充は避ける。
7. 粉碎した組織を速やかに ISOGEN が充填されたマイクロチューブへ移し、直ちにボルテックスを行い、組織片を ISOGEN に馴染ませ平衡化させる。液体窒素中では内在性 RNase の活性が抑えられるので液体窒素蒸発後は直ちに ISOGEN に組織を移す。
8. 粉碎した組織と ISOGEN を良く混合したら、室温で 5 分間インキュベートする。
9. 12,000×g, 4°C で 10 分間遠心し、組織片や脂質等を取り除く。



10. 組織片や脂質等の夾雑物を吸い上げないように上清を回収し, RNase/DNase-Free マイクロチューブに移し, そこにクロロホルムを 200  $\mu$ L 添加し, 15 秒間ボルテックスを行い, 室温で 2~3 分間インキュベートする。
11. 12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心し, 中間層を吸わないように上清を回収し, 新しい RNase/DNase-Free マイクロチューブに移す。
12. 等量のクロロホルムを加え, 15 秒間ボルテックスを行い, 室温で 2~3 分間インキュベートする。
13. 12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心し, 中間層を吸わないように上清を回収し, 新しい RNase/DNase-Free マイクロチューブに移す。
14. DNA やタンパク質などが充分に取り除けていない場合には手順 12, 13 を繰り返す。
15. 上清を回収し, 0.8 倍量のイソプロパノールを添加する。
16. 室温で 5~10 分間インキュベートする。
17. 12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し, 沈殿した RNA ペレットを崩さないように上清を取り除き, 70% エタノールを 1 mL 加える。
18. 穏やかにボルテックスを行い, 7,500 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心を行う。
19. 沈殿した RNA ペレットを崩さないように上清を全て取り除き, 風乾を行う。
20. 風乾完了後, RNase-Free の水を 50  $\mu$ L 添加し, RNA ペレットを再懸濁する。
21. 60 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートし, ペレットを完全に溶解させる。
22. 分光光度計で 260, 280, 320 nm の吸光度を測定し, Total RNA の核酸濃度, 純度を算出し, -80 $^{\circ}$ C にて保存した。

#### 4-3-2. 1st strand cDNA 合成

本項では SMART<sup>™</sup> cDNA Library Construction Kit (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) と ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いた 1st strand cDNA の合成法に関してそれぞれ前後半に分け記述する。SMART<sup>™</sup> cDNA Library Construction Kit は操作がやや煩雑であるが, 完全長 cDNA を得ることが可能であり, cDNA ライブラリーの構築, 5' RACE, 3' RACE などが行える。一方, ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover はわずか数十分で cDNA の合成が可能であり, 加えてゲノム DNA の除去を行えるため, 逆転写 PCR を用いた発現解析に有用である。本項の操作で使用した全ての器具類は可能な限り, RNase/DNase-Free のディスク

ポーザブルなものを用意し、使い捨てできない器具類に関しては十分に洗浄し、RNase Quiet (Nacalai tesque, Inc., Kyoto, Japan) による RNase 活性阻害処理及びオートクレーブ・紫外線照射による滅菌処理を十分に施した。なお、以降実験は全て清潔な手袋・マスク・白衣を着用し行う。

■ SMART™ cDNA Library Construction Kit を用いた cDNA 合成法

1. 以前に分光光度計を用いて求めた Total RNA 濃度をもとに、各組織の Total RNA を 1 µg とり、RNase/DNase-Free の 0.2 mL マイクロチューブに、以下の組成で試薬を氷上で混合しておく。

• RNase-Free Water	to 5 µL	
• Total RNA	X µL	(0.2 µg/µL)
• SMART IV Oligonucleotide (12 µM)	1 µL	(2.4 µM)
• CDS III/3' PCR Primer (12 µM)	1 µL	(2.4 µM)

2. 手順 1 で調製した試薬を 72°C に温めておいたサーマルサイクラーにセットし、72°C で 2 分間インキュベートし、RNA を熱変性させる。

3. 氷に食塩を適量加えた寒材を用意し、直ちに熱変性が完了した RNA 溶液を急冷する。そのまま氷上で 2 分間インキュベート。

4. 軽くスピンドウンを行い、チューブ底に内容物を集める。

5. 熱変性 RNA 溶液に、以下の組成で試薬を氷上で添加していく。

• 5×First-Strand Buffer	2 µL	(1×)
• 20 mM DTT	1 µL	(2 mM)
• 10 mM dNTP Mix	1 µL	(1 mM)
• SMARTScribe™ MMLV Reverse Transcriptase (100 U/µL)	1 µL	(100 U)

6. 調製した試薬をピペッティングにて、穏やかに混ぜ、軽くスピンドウンを行う。

7. サーマルサイクラーを用いて 42°C で 1 時間インキュベートし、逆転写反応終了後は氷上へ。ここで全ての作業を停止し、1st strand cDNA を保存する場合、25 mM NaOH を 1 µL 添加し、68°C で 30 分間インキュベートし、酵素反応を停止させ、-30°C で保存する。今回は後述する RACE 解析に向けて、合成した 1st strand cDNA を Long Distance PCR (LD-PCR) で増幅する。

8. 0.2 mL マイクロチューブに、以下の組成で試薬を氷上で混合していく。

• Milli-Q	to 100 $\mu\text{L}$	
• 1st strand cDNA	2 $\mu\text{L}$	
• 10 $\times$ Advantage 2 PCR Buffer	10 $\mu\text{L}$	(1 $\times$ )
• 50 $\times$ dNTP Mix	2 $\mu\text{L}$	(1 $\times$ )
• 5' PCR Primer (10 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{L}$	(0.2 $\mu\text{M}$ )
• CDS III/3' PCR Primer (10 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{L}$	(0.2 $\mu\text{M}$ )
• 50 $\times$ Advantage 2 Polymerase Mix	2 $\mu\text{L}$	(1 $\times$ )

9. 穏やかに混合し、スピンドウンを行い、軽くスピンドウンを行い、チューブ底に内容物を集める。

10. 以下のサイクル条件で、1st strand cDNA の増幅を行った。

Pre-denature	95°C, 20 秒間	
↓		
Denature	95°C, 5 秒間	× 20 サイクル
Annealing, Extension	68°C, 6 分間	
↓		
Preservation	4°C, $\infty$	

11. 増幅された 1st strand cDNA は使用時まで $-30^{\circ}\text{C}$  で保存する。

■ ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いた cDNA 合成法

1. 以前に分光光度計を用いて求めた Total RNA 濃度をもとに、各組織の Total RNA を 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  濃度に調製した Total RNA 希釈溶液 10  $\mu\text{L}$  を RNase /DNase-Free の 0.2 mL マイクロチューブに調製しておく。なお、希釈には RNase-Free の水を用いる。
2. 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  濃度に調製した Total RNA 希釈溶液 10  $\mu\text{L}$  を  $65^{\circ}\text{C}$  に温めておいたサーマルサイクラーにセットし、 $65^{\circ}\text{C}$  で 5 分間インキュベートし、RNA を熱変性させる。
3. 氷に食塩を適量加えた寒材を用意し、直ちに熱変性が完了した RNA 溶液を急冷する。そのまま氷上で 5 分間インキュベート。
4. 事前に、以下の組成で試薬を氷上で混合しておく。この作業は試薬開封時の初回のみで良い。

• 4 $\times$ DN Master Mix	220 $\mu\text{L}$
• gDNA Remover	4.4 $\mu\text{L}$

5. 手順 3, 4 で調製した溶液を用いて、以下の組成で試薬を氷上で混合する。
 

• 4×DN Master Mix (+ gDNA Remover)	2 μL	(1×)
• RNA 溶液 (0.1 μg/μL)	5 μL	(0.5 μg)
• RNase-Free Water	1 μL	
6. 37°C で 5 分間インキュベートし、ゲノム DNA の除去を行う。
7. ゲノム DNA の除去が完了した RNA 溶液に 5×RT Master Mix II を 2 μL 氷上で添加し、混合する。
8. サーマルサイクラーを用いて、以下の条件で逆転写反応を行った。
 

↓ Reverse transcription	37°C, 15 分間
↓ Reverse transcription	50°C, 5 分間
↓ Heat inactivation	98°C, 5 分間
↓ Preservation	4°C, ∞
9. 合成された 1st strand cDNA は−30°C で使用時まで保存する。

#### 4-3-3. 逆転写 PCR

本項では逆転写 PCR の実験操作に関して記述する。本項で用いるテンプレート DNA は第 4 章 3 節 2 項で SMART™ cDNA Library Construction Kit と ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて合成された cDNA を用いている。目的遺伝子のクローニングには SMART™ cDNA Library Construction Kit を、発現量比較では ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 由来の cDNA をそれぞれ使用した。また、発現量比較の内部標準遺伝子としては β アクチンをコードする *ACTB* 遺伝子を用いている。

1. 合成された 1st strand cDNA を用意し、0.2 mL マイクロチューブに、以下の組成で試薬を氷上で混合していく。また、標的遺伝子を増幅するプライマーセットとは別に *ACTB* 遺伝子の特異的に増幅させる SHU7 と SHU8 プライマーセットによる PCR も同時に行った。なお、全ての試薬調製はサンプル間での量的誤差が生じないように、可能な限り 1 つの系にまとめ、それをそれぞれのマイクロチューブに分注するように行った。
 

• Milli-Q	to 50 μL	
• 5×PCR Buffer for KOD –Plus–	5 μL	(1×)
• 2 mM dNTPs	5 μL	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 μL	(1.5 mM)

・センスプライマー (25 μM)	0.6 μL	(0.3 μM)
・アンチセンスプライマー (25 μM)	0.6 μL	(0.3 μM)
・ 1st strand cDNA	0.5~1.0 μL	
・ KOD –Plus– DNA Polymerase (1 U/μL)	1 μL	(1 U)

Total 50 μL

2. 以下のサイクル条件で逆転写 PCR を行う。Annealing 温度はプライマーセットの T<sub>m</sub> 値を参考に±3°C を目安にその都度変更し行った。なお、サイクル数は 10~45 サイクルの範囲では 5 サイクル刻みで、一度反応を停止し、その都度 5 μL ずつ分取し、サイクル毎の増幅をモニタリングした。

Pre-denature	94°C, 2 分間	
↓		
Denature	98°C, 10 秒間	
Annealing	X°C, 30 秒間	× 10~45 サイクル
Extension	68°C, 1 分/kbp	
↓		
Preservation	4°C, ∞	

3. 電気泳動を行い、増幅バンドの有無を確認し、どの組織で発現しているかまた、どの程度のサイクル数でバンドが確認できるかなども確認する。
4. 数回、同様の操作を行い、手順 3 で記述した項目を十分に確認し、実験の再現性などもチェックする。
5. 事前に行った PCR の結果をもとに、バンドが確認できるサイクル数を予測し、また各サンプルの *ACTB* 遺伝子増幅バンドの蛍光強度を Image J を用いて算出し、*ACTB* 遺伝子増幅バンドの蛍光強度に基づいてサンプル間で異なる 1st strand cDNA の初期濃度をある程度合わせておく。なお、伸長時間の最適化も行う。
6. 条件検討を充分に行い、事前に検討したサイクル数などの条件に基づいて再度逆転写 PCR を実施する。
7. 電気泳動を行い、EtBr で十分に染色し、しっかりと脱色操作を行い、UV トランスイルミネーターで泳動写真を撮影し、Image J で増幅バンドの蛍光強度を算出する。
8. *ACTB* 遺伝子増幅バンドの蛍光強度に基づいた定量値を算定し、目的遺伝子の蛍光強度を定量値補正した後、各サンプル間での発現量を相対的に比較

する。

#### 4-3-4. 5'/3' Rapid amplification of cDNA end (RACE)

本項では 5'/3' RACE による転写開始点及び転写終結点の同定操作に関して記述する。なお、本項で用いるテンプレート DNA は第 4 章 3 節 2 項で SMART™ cDNA Library Construction Kit を用いて合成・増幅された cDNA を用いている。

1. 5' RACE は第 4 章 3 節 2 項で cDNA の合成に用いた SMART IV Oligo-nucleotide に相補的な配列をもつ Universal Primer A Mix Long (5'-CTA ATA CgA CTC ACT ATA ggg CAA gCA gTg gTA TCA ACg CAg AgT -3') と標的遺伝子の内部配列に特異的なプライマーを設計し、以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	to 50 µL	
• 5×PCR Buffer for KOD –Plus–	5 µL	(1×)
• 2 mM dNTPs	5 µL	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 µL	(1.5 mM)
• Universal Primer A Mix Long (25 µM)	0.6 µL	(0.3 µM)
• カスタムプライマー (25 µM)	0.6 µL	(0.3 µM)
• 1st strand cDNA 増幅産物	0.5~2.0 µL	
• KOD –Plus– DNA Polymerase (1 U/µL)	1 µL	(1 U)
<hr/>		
Total 50 µL		

2. 以下のサイクル条件で 5' RACE 1st PCR を行う。

Pre-denature	94°C, 2 分間	
↓		
Denature	98°C, 10 秒間	× 25 サイクル
Annealing, Extension	68°C, 1 分/kbp	
↓		
Preservation	4°C, ∞	

3. 電気泳動を行い、増幅バンドの有無を確認する。もし増幅バンドが単一でなく不鮮明な場合は 2nd PCR (Nested PCR) を実施する。
4. 5' RACE の 2nd PCR (Nested PCR) は Universal Primer A Mix Long 配列内部に相補的な Nested Universal Primer A (5'-AAg CAg Tgg TAT CAA CgC AgA

gT-3') と 1st PCR で使用したカスタムプライマーよりもさらに内側の内部配列に特異的なプライマーを設計し、以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	to 50 $\mu$ L	
• 5 $\times$ PCR Buffer for KOD –Plus–	5 $\mu$ L	(1 $\times$ )
• 2 mM dNTPs	5 $\mu$ L	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ L	(1.5 mM)
• Nested Universal Primer A (25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• カスタムプライマー (25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• 1st PCR 増幅産物	0.1~1.0 $\mu$ L	
• KOD –Plus– DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	(1 U)
Total 50 $\mu$ L		

5. 以下のサイクル条件で 5' RACE 2nd PCR を行う。

Pre-denature	94°C, 2 分間	
↓		
Denature	98°C, 10 秒間	× 15-20 サイクル
Annealing, Extension	68°C, 1 分/kbp	
↓		
Preservation	4°C, $\infty$	

6. 電気泳動を行い、増幅バンドの有無を確認する。検出バンドが複数であればアガロースゲルからの切り出し精製を行い、TOPO クローニングを行い、以降、サイクルシーケンシング法による DNA シーケンシングを実施し、転写開始点を予測する。

7. 3' RACE は第 4 章 3 節 2 項で cDNA の合成に用いた CDS III/3' PCR Primer (もしくは Poly-T) と 標的遺伝子の内部配列に特異的なプライマーを設計し、以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	to 50 $\mu$ L	
• 5 $\times$ PCR Buffer for KOD –Plus–	5 $\mu$ L	(1 $\times$ )
• 2 mM dNTPs	5 $\mu$ L	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ L	(1.5 mM)
• CDS III/3' PCR Primer (25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• カスタムプライマー (25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• 1st strand cDNA 増幅産物	0.5~2.0 $\mu$ L	

• KOD –Plus– DNA Polymerase (1 U/μL) 1 μL (1 U)

---

Total 50 μL

8. 以下のサイクル条件で 3' RACE 1st PCR を行う。

Pre-denature	94°C, 2 分間	
↓		
Denature	98°C, 10 秒間	× 25 サイクル
Annealing, Extension	68°C, 1 分/kbp	
↓		
Preservation	4°C, ∞	

9. 電気泳動を行い、増幅バンドの有無を確認する。もし増幅バンドが単一でなく不鮮明な場合は 2nd PCR (Nested PCR) を実施する。

10. 3' RACE の 2nd PCR (Nested PCR) は CDS III/3' PCR Primer 配列内部に相補的な Poly-T と 1st PCR で使用したカスタムプライマーよりもさらに内側の内部配列に特異的なプライマーを設計し、以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	to 50 μL	
• 5×PCR Buffer for KOD –Plus–	5 μL	(1×)
• 2 mM dNTPs	5 μL	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 μL	(1.5 mM)
• Poly-T (25 μM)	0.6 μL	(0.3 μM)
• カスタムプライマー (25 μM)	0.6 μL	(0.3 μM)
• 1st PCR 増幅産物	0.1~1.0 μL	
• KOD –Plus– DNA Polymerase (1 U/μL)	1 μL	(1 U)

---

Total 50 μL

11. 以下のサイクル条件で 3' RACE 2nd PCR を行う。

Pre-denature	94°C, 2 分間	
↓		
Denature	98°C, 10 秒間	× 15-20 サイクル
Annealing, Extension	68°C, 1 分/kbp	
↓		
Preservation	4°C, ∞	

12. 電気泳動を行い、増幅バンドの有無を確認する。検出バンドが複数であれば



ばアガロースゲルからの切り出し精製を行い、TOPO クローニングを行い、以降、サイクルシーケンス法による DNA シークエンシングを実施し、転写終結点を予測する。

#### 4-3-5. アフィニティークロマトグラフィー

本項では抗血清からの IgG 抗体精製及び、精製 IgG 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーの実験操作に関して記述する。以降操作は全て低温室もしくは氷上で行った。また、本実験で用いたポリクロナール抗体を含む抗血清の作製は Operon biotechnologies 社 (Operon biotechnologies, a Eurofins genomics company, Tokyo, Japan) に委託し、手順 1 に示す方法で作製された。

##### ◦ 飽和硫酸溶液

Ammonium sulfate	50 g
↓ Milli-Q を 50 mL 添加	Total 50~ mL
↓ 45~50°C でインキュベートし Ammonium sulfate を溶解させる。	
↓ 室温で数日放置し、保存する。	

##### ◦ 0.1 M グリシン-HCl バッファー (pH 2.8)

Glycine	1.5 g	(0.1 M)
↓ pH メーターで pH 2.8 に調整		
↓ Milli-Q で 200 mL にメスアップ	Total 200 mL	
↓ 4°C で保存。		

##### ◦ 0.2 M トリエタノールアミン溶液 (pH 8.0)

Triethanolamine (7.53 M)	1,328 µL	(0.2 M)
↓ pH メーターで pH 8.0 に調整		
↓ Milli-Q で 50 mL にメスアップ	Total 50 mL	
↓ 4°C で保存。		

##### ◦ 20 mM DMP 溶液 (用時調製)

Dimethyl pimelimidate dihydrochloride (DMP)	51.8 mg	(20 mM)
↓ 0.2 M トリエタノールアミン-HCl (pH 8.3) 10 mL で溶解		

↓4°C で保存。

◦ 30% (w/v) Brij-35 溶液	(用時調製)	
Polyoxyethylene (23) lauryl ether (Brij-35)	0.3 g	(30%)
↓ Milli-Q で 1 mL にメスアップ	Total 1 mL	
◦ TBC/0.5 M NaCl バッファー	(用時調製)	
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	10 mL	(20 mM)
30% Brij-35 溶液	83 $\mu$ L	(0.005%)
CHAPS	0.5 $\mu$ g	(0.1%)
NaCl	14.61 g	(0.5 M)
↓ Milli-Q で 500 mL にメスアップ	Total 500 mL	

1. ホンハブの IIE 型 PLA<sub>2</sub> の C 末端領域 125-134 領域 (CPRWAPTKGG) のペプチドを合成し、その合成ペプチドに Keyhole limpet hemocyanin (KLH) をコンジュゲートした抗原をウサギに皮内に投与し、計 4 回免疫感作へ経てポリクロナール抗体を含む抗血清を得た。
2. 10 mL のウサギ抗血清に、0.2 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) を 1 mL 加え、ゆっくりと攪拌しながら 11 mL の飽和硫酸を少しずつ添加し、粗分画を行う (終濃度 50%飽和)。
3. 4°C で 1 時間ゆっくりと攪拌を続ける。
4. 10,000×g, 4°C で 20 分間遠心し、沈殿を回収する。なおこの時、表層のリポタンパク質が残らないように事前に充分除去しておいた。
5. 回収した沈殿に 50%飽和硫酸を少量加え、沈殿を砕く。
6. 15,000×g, 4°C で 10 分間遠心し、沈殿を回収する。
7. 10 mL の 20 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) で沈殿を再懸濁する。
8. 蒸留水を適量、清潔なガラス容器に入れ、その中に透析チューブ膜を適宜必要量入れ、オートクレーブにて煮沸し、透析チューブ膜の前処理を行う。
9. 前処理が完了した透析チューブ膜に再懸濁した血清粗分画液を加え、内容液が漏れないようにしっかりと透析チューブ膜を閉じ、20 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) を外液として、脱塩処理及びバッファー置換を充分に行った。外液量、外液交換回数、時間などは適宜必要に応じて決め

- る。
10. 脱塩処理及びバッファー置換を充分に行った血清粗分画液を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過する。
  11. HiTrap Protein G HP カラム (GE Healthcare UK Ltd., little chalfont, UK) に気泡を入れないように注意しながら、5 mL の Milli-Q を充填したシリンジをカラム上部に接続する。
  12. カラム下部のボトムキャップを外し、1 秒間に 1 滴のペースで送液し、カラム内部の洗浄を行う。
  13. 5 mL の 20 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) を充填したシリンジをカラム上部に接続し、先程と同様に送液を行い、カラムの平衡化を行う。
  14. フィルター濾過した血清粗分画液の半分量 (5 mL) をシリンジに充填し、1 分間に 0.2~1 mL のペースで送液する。
  15. 15 mL の 20 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) を 1 秒間に 1 滴のペースで送液し、非吸着成分の押出洗浄を行う。
  16. 清潔なマイクロチューブを 20 本程度用意し、それぞれに 1 M Tris-HCl (pH 9.0) を 50  $\mu\text{L}$  ずつ添加しておく。
  17. 0.1 M グリシン-HCl バッファー (pH 2.8) 10 mL を 1 秒間に 1 滴のペースで送液し、溶出液を手順 16 で準備したマイクロチューブに 0.5 mL ずつ回収していく。
  18. 5 mL の 20 mM リン酸ナトリウムバッファーでカラムの洗浄と再平衡化を行う。長期間使用しない場合は 20% エタノールを充填し保存する。
  19. 精製抗体フラクションは SDS-PAGE にて確認を行い、溶出画分を保存する。
  20. 精製抗体はウェスタンブロット解析などの他の実験操作で使用するのので、終濃度が 50%となるように滅菌したグリセロールを精製抗体に加え、使用量に応じて小分け分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存する。
  21. カラムに抗体を結合させ、アフィニティーカラムを作製する。手順 18 で十分に洗浄・再平衡化したカラムに手順 14 で使用しなかった残りの血清粗分画液を手順 14 同様に送液する。
  22. 手順 15 同様に非吸着成分の押出洗浄を行う。
  23. 20 mM DMP 溶液を 5 mL 用意し、1 分間に 0.2~1 mL のペースで送液する。
  24. カラム下部のボトムキャップを閉め、20 mM DMP 溶液をカラム内部に充填し、十分に DMP 溶液で満たされたら、カラム上部のフタを閉め、室温で 1

- 時間ゆっくりと震盪し、IgG と Protein G のクロスリンク反応を行う。
25. クロスリンク反応終了後、0.2 M エタノールアミン-HCl 溶液 (pH 8.0) を 15 mL カラムに送液する。
  26. カラム下部のボトムキャップを閉め、0.2 M エタノールアミン-HCl 溶液 (pH 8.0) をカラム内部に充填し、十分に 0.2 M エタノールアミン-HCl 溶液で満たされたら、カラム上部のフタを閉め、室温で 2 時間ゆっくりと震盪し、ブロッキング反応を行う。
  27. 25 mL の 0.1 M グリシン-HCl バッファー (pH 2.8) 20 mL を送液し、未架橋抗体分子を洗い出す。
  28. 25 mL の 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5) でカラムの洗浄を行う。アフィニティーカラムは以上で完成である。もしカラムを保存する場合は 50 mM Tris-HCl バッファーにアジ化ナトリウムを 0.02% (w/v) 濃度となるように加えた溶液をカラムに送液し、4°C で保存する。
  29. サンプルをアフィニティーカラムにロードし、目的タンパク質の抽出作業を行う。サンプルを調製し、TBC/0.5 M NaCl バッファーへ溶解させる。今回はホンハブ粗毒 0.2 g を TBC/0.5 M NaCl バッファーに溶解させた。
  30. 10 mL の TBC/0.5 M NaCl バッファーでカラムの平衡化を行う。
  31. サンプル溶液を 1 秒間に 0.5 滴のペースで送液する。
  32. 25 mL の TBC/0.5 M NaCl バッファーを 1 秒間に 1 滴のペースで送液し、非吸着成分の押出洗浄を行う。
  33. 15 mL の Milli-Q を 1 秒間に 1 滴のペースで送液し、脱塩を行う。
  34. 清潔なマイクロチューブを 5 本程度用意し、それぞれに 1 M Tris-HCl バッファー (pH 8.0) 60  $\mu$ L ずつ分注しておく。
  35. 10 mL の 0.1 M グリシン-HCl バッファー (pH 2.8) もしくは 0.05% (v/v) トリフルオロ酢酸溶液を 1 秒間に 1 滴のペースで送液し、溶出液を手順 34 で準備したマイクロチューブに 2 mL ずつ回収していく。溶出分画を凍結乾燥する際には 0.05% トリフルオロ酢酸溶液で溶出する。
  36. 25 mL の TBC/0.5 M NaCl バッファーでカラムを洗浄する。カラムを保存する場合は TBC/0.5 M NaCl バッファーにアジ化ナトリウムを 0.02% (w/v) 濃度となるように加えた溶液をカラムに送液し、4°C で保存する。
  37. 溶出分画の各フラクションの 280 nm 吸光度を測定し、加えて SDS-PAGE による確認を行う。

#### 4-3-6. 大腸菌組換えタンパク質発現

本項では大腸菌による組換えタンパク質の発現に関して記述する。なお、今回はホンハブ IIE 型 PLA<sub>2</sub> を pET-20b ベクター (Novagen Inc., a EMD Millipore company, Madison, WI, USA) に組み込み, Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS 及び BL21 大腸菌 (Novagen Inc., a EMD Millipore company, Madison, WI, USA) で発現させる。なお、大腸菌を扱う全ての工程は無菌操作で行う。

##### ◦ 50 mM CaCl<sub>2</sub>/20% (w/v) グリセロール

1 M CaCl <sub>2</sub>	500 μL	(50 mM)
50% (w/v) グリセロール	4 mL	(20%)
Milli-Q で 10 mL にメスアップ	Total 10 mL	Autoclaved

##### ◦ 菌体破碎バッファー

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	200 μL	(20 mM)
5 M NaCl	100 μL	(50 mM)
Milli-Q で 10 mL にメスアップ	Total 10 mL	Autoclaved

##### ◦ 細胞溶解バッファー

(用時調製)

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1 mL	(20 mM)
5 M NaCl	2 mL	(200 mM)
0.5 M EDTA	50 μL	(0.5 mM)
1 M Dithiothreitol (DTT)	500 μL	(10 mM)
Milli-Q で 50 mL にメスアップ	Total 50 mL	

##### ◦ 変性バッファー

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1 mL	(20 mM)
5 M NaCl	2 mL	(200 mM)
Urea	24.04 g	(8 M)
Milli-Q で 50 mL にメスアップ	Total 50 mL	

##### ◦ 4 M, 3 M Urea 透析バッファー

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1 mL	(20 mM)
5 M NaCl	2 mL	(200 mM)

Urea	12.0g, 9.0g	(4 M, 3 M)
1 M CaCl <sub>2</sub>	500 μL	(10 mM)
L-Cysteine	48 mg	(8 mM)
L-Cystine	12 mg	(1 mM)
Milli-Q で 50 mL にメスアップ		Total 50 mL

◦ 2 M, 1 M, 0.5 M Urea 透析バッファー

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1 mL	(20 mM)
5 M NaCl	2 mL	(200 mM)
Urea	6.0 g, 3.0 g, 1.5 g	(2 M, 1 M, 0.5 M)
1 M CaCl <sub>2</sub>	500 μL	(10 mM)
L-Arginine hydrochloride	4.21 g	(0.4 M)
L-Cysteine	48 mg	(8 mM)
L-Cystine	12 mg	(1 mM)
Milli-Q で 50 mL にメスアップ		Total 50 mL

◦ 0 M Urea 透析バッファー

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	1 mL	(20 mM)
5 M NaCl	2 mL	(200 mM)
1 M CaCl <sub>2</sub>	500 μL	(10 mM)
L-Cysteine	48 mg	(8 mM)
L-Cystine	12 mg	(1 mM)
Milli-Q で 50 mL にメスアップ		Total 50 mL

- はじめに発現ベクタープラスミドにライゲーションする遺伝子断片の獲得を行う。読み枠を十分に考慮し、5'側に *Nde* I と *Xho* I 制限酵素認識配列をそれぞれ組み込んだセンスプライマー (IIExp-1) とアンチセンスプライマー (IIExp-2) を設計し、以下の組成で試薬を氷上で混合する。なお、C 末端に His-tag を付加するので本来の終止コドンを取り除き、直後に *Xho* I 制限酵素認識配列を設定した。

• Milli-Q	to 50 μL	
• 5×PCR Buffer for KOD –Plus–	5 μL	(1×)

• 2 mM dNTPs	5 $\mu$ L	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ L	(1.5 mM)
• IIExp-1 プライマー (25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• IIExp-2 プライマー (25 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• 1st strand cDNA 増幅産物	0.5~2.0 $\mu$ L	
• KOD-Plus- DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	(1 U)

Total 50  $\mu$ L

2. 以下のサイクル条件で PCR を行う。

Pre-denature	94°C, 2 分間	
↓		
Denature	98°C, 10 秒間	
Annealing	60°C, 30 秒間	× 25~30 サイクル
Extension	68°C, 1 分間	
↓		
Preservation	4°C, $\infty$	

3. アガロースゲル電気泳動を行い、増幅を確認し、濃度算出を行う。十分な増幅が確認できたら、以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• PCR 産物	全量	
• 10×H buffer	6 $\mu$ L	
• <i>Nde</i> I (8 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	(8 U)
• <i>Xho</i> I (8 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	(8 U)

Milli-Q で 60  $\mu$ L にメスアップ Total 60  $\mu$ L

- 37°C で 1~2 時間インキュベートし、PCR 増幅断片の付着末端化を行った。
- 1.5% アガロースゲルで全量を泳動し、染色後アガロースゲルから目的の核酸を含むバンドの切り出し及び精製を行う。
- 風乾後、6  $\mu$ L の Milli-Q に再懸濁し、うち 1  $\mu$ L をアガロースゲル電気泳動に使用し、核酸の濃度算出を行う。使用時まで 4°C で保存する。
- 続いて、目的遺伝子を組み込む発現ベクタープラスミドの増幅とその精製を行う。閉環状の pET-20b (Novagen Inc., a EMD Millipore company, Madison, WI, USA) を DH5 $\alpha$  に形質転換し、アンピシリン添加 LB 培地で 37°C で 8~12 時間培養し、コロニーを形成させる。
- 形成されたコロニーから 1 つをピックアップし、50 mL のアンピシリン添加

LB 液体培地へ播種し、37°C で 8~12 時間震盪培養する。pET 系プラスミドは低コピープラスミドであり、pUC 系プラスミドの 4~10 倍の大腸菌が必要のため、今回は 50 mL で培養する。

9. 50 mL 大腸菌培養液からプラスミド DNA の抽出及び精製を行う。今回はアルカリ SDS 法により抽出を行った。

10. アガロースゲル電気泳動を行い、目的プラスミド DNA が精製できたことを確認し、濃度算出を行う。その後、以下の組成で試薬を氷上で混合する。

・精製済み pET-20b	1 µg	
・10×H buffer	6 µL	
・Nde I (8 U/µL)	1.5 µL	(12 U)
・Xho I (8 U/µL)	1.5 µL	(12 U)
Milli-Q で 30 µL にメスアップ	Total 30 µL	

11. 37°C で 1~2 時間インキュベートし、ベクターを完全消化する。
12. 制限酵素処理が完了したら、CIP (Alkaline Phosphatase, recombinant (Calf intestine) (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan)) を 1 µL 添加し、37°C で 15 分間インキュベートし、ベクターの脱リン酸化を行う。
13. 0.5~1% アガロースゲルで電気泳動を行い、pET-20b ベクターに相当するバンドをアガロースゲルから切り出し、精製を行う。
14. 風乾後、6 µL の Milli-Q で再懸濁し、濃度を算出する。
15. 脱リン酸化 pET-20b ベクター溶液を 50 ng/µL に調製し、-20°C で保存する。
16. 手順 6 と 15 で得た PCR 増幅産物と脱リン酸化 pET-20b ベクターをモル比が 3~10 : 1 となるように調製し、氷上で混合する。
17. 氷上で Ligation High を等量加え、16°C で 0.5~12 時間インキュベートし、ライゲーション反応を行う。完了後は 4°C で保存。
18. DH5α へ形質転換し、培養後、プラスミド抽出を行い、DNA シークエンシングにて、インサートした DNA に変異が無いか、インサートの向きやフレームシフトなどが生じていないか十分に確認する。
19. 続いて、組換えタンパク質を発現させる、Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS 及び BL21 大腸菌のコンピテントセルを CaCl<sub>2</sub> 法により作製する。各大腸菌フリーズストックを起こし、適当な抗生物質を含む LB 寒天培地で 37°C で 8~12 時間、画線培養を行い、コロニーを形成させる。
20. 5 mL の LB 液体培地に各大腸菌に対応する各種抗生物質を添加し、LB 寒天



培地からピックアップしたシングルコロニーを LB 液体培地に播種し、37°C で 8~12 時間、震盪培養を行う。

21. 100 mL の LB 液体培地が入った 500 mL 容量の三角フラスコに適当な抗生物質を必要濃度添加し、事前に LB 液体培地で震盪していた大腸菌培養液を 1 mL 分取し、100 mL の LB 液体培地へと播種する。
22. 37°C で震盪培養し、OD<sub>600</sub> 値が 0.5 に至るまで培養を続ける。
23. OD<sub>600</sub> 値が 0.5 に達したら、培養液を 50 mL コニカルチューブに移し、直ちに氷上で 30 分間冷却を行う。
24. 3,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、集菌を行う。
25. 上清を全て捨て、菌体ペレットが沈殿したコニカルチューブをキムタオルの上に逆さまにして 1 分間程度置き、上清を残らず取り除いた。
26. 菌体ペレットに氷冷 50 mM CaCl<sub>2</sub> を 25 mL 添加し、氷上で穏やかに良く懸濁した。ペレットが十分に懸濁できない場合は先を切り落とした 1 mL のピペットチップでピペッティングによる懸濁操作を行う。
27. 大腸菌懸濁液を氷上で 1 時間インキュベートし、インキュベート完了後に 3,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心する。
28. 上清を素早く取り除き、氷冷 50 mM CaCl<sub>2</sub>/20% (w/v) グリセロールを 5 mL 添加し、氷上でしっかりと懸濁する。
29. 清潔なマイクロチューブを 50 本程度用意し、無菌操作を心掛けながら、氷上で大腸菌懸濁液を 100 μL ずつ分注していく。
30. 分注した大腸菌懸濁液を液体窒素で急速冷凍し、-80°C で保存する。
31. 手順 18 で抽出、配列情報を十分に確認したプラスミド溶液 10 μL を手順 30 で作製・保存したコンピテントセルに添加し、形質転換を行う。
32. 適切な抗生物質を含む 4 mL の LB 寒天培地へ大腸菌を播種し、37°C で 16~20 時間程度インキュベートし、コロニーを形成させる。Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS の増殖は非常に遅いので培養時間を注視する。
33. 形成されたコロニーを適切な抗生物質を含む LB 液体培地へ播種し、37°C で 12~20 時間震盪培養する。初回は IPTG 誘導の濃度、時間などの条件検討を行う必要があるため、検討する条件に応じて培養数を設定する。
34. 新たな 4 mL の LB 液体培地を用意し、手順 33 で培養された大腸菌培養液を 100 μL 添加し、OD<sub>600</sub> 値が 0.4~0.6 に至るまで 37°C で震盪培養する。残り的大腸菌培養液は終濃度が 10~15% となるようにグリセロールを添加し、

フリーズストックとして保存する。

35. OD<sub>600</sub> 値が規定値に達したら、大腸菌培養液の入った試験管を直ちに氷上へ移し、30 分間インキュベートを行う。
36. タンパク質発現に適した IPTG 濃度を探るために、条件設定を行い。終濃度が 0~2 mM の範囲で、段階的に濃度を振り分け、それぞれの濃度で IPTG を添加していく。
37. 4~37°C で 0~48 時間震盪培養し、組換えタンパク質の発現誘導を行う。タンパク質発現に適した誘導条件を探るために、様々な条件を設定し、その都度検討する。
38. 培養液全量を 6,000 rpm で 1 分間遠心し、集菌を行う。
39. 菌体ペレットに菌体破砕バッファーを 400 μL 加え、良く懸濁する。
40. 氷上にてソニケーションを行い、菌体を破砕する。この際、菌体懸濁液の温度が上がらないように気をつける。
41. 菌体懸濁液が半透明になるまでソニケーションを数回繰り返す。
42. 14,000×g, 4°C で 30 分間遠心し、可溶性画分と不溶性画分に分離する。
43. 不溶性画分に 400 μL の菌体破砕バッファーを添加し、軽くソニケーションを行い、ペレットを懸濁する。
44. 可溶性画分と不溶性画分共に SDS-PAGE による組換えタンパク質の発現確認を行う。
45. 組換えタンパク質の発現誘導に最適な条件検討が完了したら、ラージスケールの培養へ移る。なお以降は不溶性画分からの発現タンパク質単離とそのリフォールディングに関して記述する。IPTG 濃度と誘導時間に関しては実施した数値で記述していく。
46. 手順 34 でフリーズストックした大腸菌を清潔なマイクロピペット先で突き、1 mL の SOC 培地で 15 分間回復させる。
47. 適切な抗生物質を含む LB 培地 50 mL に先の SOC 培地を全量添加し、37°C で 12~24 時間震盪培養を行う。
48. 新たな 600 mL の LB 液体培地を用意し、手順 46 で培養された大腸菌培養液を 10 mL 添加し、OD<sub>600</sub> 値が 0.6 に至るまで 37°C で震盪培養する。
49. OD<sub>600</sub> 値が 0.6 に達したら、IPTG を終濃度 0.4 mM と成るように添加し、37°C で 4 時間震盪培養し、発現の誘導を行う。
50. 誘導が終了した大腸菌培養液を遠心瓶に入れ、6,000×g, 4°C で 10 分間遠心

- し、集菌を行う。
51. 上清を取り除き、菌体湿重量を測定し、菌体ペレットに細胞溶解バッファーを 20 mL 加え、良く懸濁し、50 mL のコニカルチューブへ移す。
  52. 温度の上昇に注意し、大腸菌懸濁液が半透明になるまで氷上でソニケーションを行う。
  53. 大腸菌懸濁液を 12,000×g, 4°C で 30 分間遠心し、上清を全て取り除く。
  54. 1% Deoxycholic acid を含む細胞溶解バッファーを 30 mL 添加し、ペレットを洗浄する。
  55. 12,000×g, 4°C で 30 分間遠心し、上清を全て取り除く。
  56. 1% Triton X-100 を含む細胞溶解バッファーを 30 mL 添加し、ペレットを洗浄する。
  57. 12,000×g, 4°C で 30 分間遠心し、上清を全て取り除く。
  58. 手順 56, 57 を再度繰り返す。
  59. 洗浄された封入体を 40 mL の変性バッファーで再懸濁し、4°C で 12 時間穏やかに攪拌し、封入体の可溶化を行う。
  60. 12,000×g, 4°C で 30 分間遠心し、上清を回収し、上清に Imidazole を終濃度 20 mM となるように加える。
  61. HisTrap HP カラム (GE Healthcare UK Ltd., little chalfont, UK) の平衡化を 20 mM Imidazole を含んだ変性バッファー 5 mL で行う。
  62. 手順 60 の溶液をカラムにロードする。
  63. 20 mM Imidazole を含んだ変性バッファー 10 mL で非吸着画分を押し出し洗浄する。
  64. 50 mM Imidazole を含んだ変性バッファー 10 mL で非吸着画分を押し出し洗浄する。
  65. 250 mM Imidazole を含んだ変性バッファー 5 mL で吸着画分を溶出する。
  66. 変性バッファーを外液として、透析を行う。
  67. SDS-PAGE にて溶出画分の確認を行う。また、分光光度計を用いてタンパク質濃度を測定しておく。
  68. 溶出バッファーを用いて、溶出画分のタンパク質濃度を 0.1~0.2 mg/mL に調製する。
  69. 希釈した溶出画分 1 mL に Dithiothreitol を終濃度 10 mM となるように加え、4°C で 1 時間インキュベートする。

70. 4 M Urea 透析バッファー 50 mL で 6 時間透析を行う。
71. 3 M Urea 透析バッファー 50 mL で 6 時間透析を行う。
72. 2 M Urea 透析バッファー 50 mL で 12 時間透析を行う。
73. 1 M Urea 透析バッファー 50 mL で 12 時間透析を行う。
74. 0 M Urea 透析バッファー 50 mL で 6 時間透析を行う。この操作をあと 2 回繰り返す。
75. 透析内液を 5,800×g, 4°C で 30 分間遠心し, 上清を回収する。
76. SDS-PAGE 及び吸光度の測定を行い, 確認する。

#### 4-3-7. ウェスタンブロッティング

本項では SDS-PAGE とウェスタンブロッティングの実験操作に関して記述する。作製しているゲルは約 15%である。なお, ウェスタンブロッティングのシグナル検出には ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare UK Ltd., little chalfont, UK) を使用した。

##### ◦ 分離ゲルストック溶液

Milli-Q	1.89 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2 mL
10% SDS	80 μL

##### ◦ 濃縮ゲルストック溶液

Milli-Q	1.9 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	750 μL
10% SDS	30 μL

##### ◦ 10×泳動バッファー

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	3.03 g	(250 mM)
Glycine	14.4 g	(1.92 M)
Sodium dodecyl sulfate	1 g	(1%)
脱イオン水で 100 mL にメスアップ		Total 100 mL

##### ◦ 6×サンプルバッファー

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	7 mL	(0.35 M)
Sodium dodecyl sulfate	1 g	(10%)

Glycerine	3 mL	(30%)
Dithiothreitol	0.93 g	(6 mM)
<b>Bromophenol blue</b>	<b>適量</b>	
<hr/>		
↓ 脱イオン水で 10 mL にメスアップ	Total 10 mL	
↓ 小分け分注し, -20°C で保存する。		
◦ ブロッキング溶液 A		
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	3.63 g	(300 mM)
<b>Methanol</b>	<b>5 mL</b>	<b>(5%)</b>
<hr/>		
脱イオン水で 100 mL にメスアップ	Total 100 mL	
◦ ブロッキング溶液 B		
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	0.3 g	(25 mM)
<b>Methanol</b>	<b>5 mL</b>	<b>(5%)</b>
<hr/>		
脱イオン水で 100 mL にメスアップ	Total 100 mL	
◦ ブロッキング溶液 C		
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	0.3 g	(25 mM)
6-Aminohexanoic acid	0.52 g	(40 mM)
<b>Methanol</b>	<b>5 mL</b>	<b>(5%)</b>
<hr/>		
脱イオン水で 100 mL にメスアップ	Total 100 mL	
◦ TBS-T		
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	30 mL	(10 mM)
NaCl	17.53 g	(100 mM)
<b>20% Tween 20</b>	<b>15 mL</b>	<b>(0.1%)</b>
<hr/>		
脱イオン水で 3 L にメスアップ	Total 3 L	

1. SDS-PAGE ゲル作製のガラスプレートとシールガasketを70% エタノールとキムワイプで綺麗に拭き上げ, ガラスプレートにシールガasketをセットし, クリップで挟み込む。
2. 0.025 g の Ammonium peroxodisulfate を脱イオン水 100  $\mu$ L に溶かし, 25% APS

溶液を作製しておく。

3. 以下の組成で試薬を混合する。
  - ・分離ゲルストック溶液 3.97 mL
  - ・30% (w/v) アクリルアミド溶液 4 mL
  - ・Tetramethylethylenediamine (TEMED) 6.4  $\mu$ L
  - ・25% APS 溶液 50  $\mu$ L
4. 手順 1 で組み立てたゲルプレートに十分に混合した分離ゲル溶液を直ちに添加する。なお、濃縮ゲルを添加するスペース、上部から 1~2 cm, はゲルを注がない。
5. 静かに脱イオン水を 1 mL 上部から注ぎ、ゲルが固化するまで 15 分以上待つ。
6. 分離ゲルが固化したら、注いだ脱イオン水を取り除き、以下の組成で試薬を混合する。
  - ・濃縮ゲルストック溶液 2.68 mL
  - ・30% (w/v) アクリルアミド溶液 300  $\mu$ L
  - ・Tetramethylethylenediamine (TEMED) 2.4  $\mu$ L
  - ・25% APS 溶液 25  $\mu$ L
7. ゲルプレートに十分に混合した濃縮ゲル溶液を直ちに添加する。
8. コームを静かに濃縮ゲルに挿し、ゲルが固化するまで 15 分以上待つ。
9. 10 $\times$ 泳動バッファー 50 mL に脱イオン水を 450 mL 加える。
10. 泳動するサンプルと 6 $\times$ サンプルバッファーを混合し、98 $^{\circ}$ C で 3~5 分間の熱変性を行う。
11. ゲルが固化したら、ウェルにサンプル及び分子量マーカートをアプライし、適当な条件下で泳動を開始する。ウェスタンブロットティングへ移行しない場合は CBB などでゲルを染色し、泳動像を確認する。
12. 以降はウェスタンブロットトに関して記述する。泳動終了後、PVDF メンブレンを適当な大きさに切り、Methanol に 30 秒間浸し、その後ブロットティング溶液 B へ浸す。なお、以降操作は全て手袋を着用し、メンブレン及びゲルを直接触らないように気をつける。
13. メンブレンより大きく切り揃えた濾紙を 6 枚用意し、ブロットティング溶液 A に 2 枚、B に 1 枚、C に 3 枚、それぞれ浸す。
14. ブロッターにブロットティング溶液 A に浸した濾紙 2 枚を積層し、さらにそ

の上に B にブロッキング溶液 A に浸した濾紙 1 枚を積層する。なお、以降積層操作は気泡などが生じないように隙間無く設置する。

15. さらに、PVDF メンブレンを積層し、メンブレン上にブロッキング溶液 B を少量添加する。
16. ゲルをガラスプレートから外し、ブロッキング溶液 B に一瞬浸し、直ちに PVDF メンブレン上に静かに積層し、ゲル上にブロッキング溶液 C に浸した濾紙 3 枚をさらに積層する。
17. 積層した濾紙・メンブレン・ゲルがズレないように気を付けて、上から全体を押しつぶし圧着させる。
18. 最上層の濾紙にブロッキング溶液 C を少量添加し、ブロッターのフタを静かに閉じる。
19. 通電条件はメンブレン 1 平方センチメートルあたり、2 mA 定電流で 45~60 分間行う。
20. 転写が完了したら、メンブレンを取り外し、Blocking Agent が終濃度 5% (w/v) になるよう TBS-T で希釈したブロッキング溶液にメンブレンを浸し、室温で 45 分以上、もしくは 4°C で 12 時間程度穏やかに震盪する。
21. メンブレン 1 平方センチメートルあたり 4 mL の TBS-T を用意し、ブロッキングが完了したメンブレンを TBS-T で浸し、2 分間震盪しながら洗浄を行う。この洗浄を 2 回繰り返す。
22. 一次抗体を 0.1~1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で希釈した TBS-T を 50 mL 用意し、メンブレンを浸し、室温で 1~2 時間もしくは 4°C で 12 時間程度穏やかに震盪し、抗原に抗体を結合させる。
23. 手順 21 と同様にメンブレンの洗浄を 2 回行う。
24. TBS-T で 15 分間の洗浄を 1 回行い、さらに 5 分間の洗浄を 3 回行う。
25. 二次抗体を 5,000~10,000 倍希釈した TBS-T を調製し、室温で 1 時間抗原抗体反応を行う。
26. TBS-T で 2 分間の洗浄を 2 回行い、TBS-T で 15 分間の洗浄を 1 回行い、さらに 5 分間の洗浄を 3 回行う。
27. ECL Detection Reagent 1 と ECL Detection Reagent 2 を等量ずつ取り、これを混合する。
28. 洗浄したメンブレンをラップの上に設置し、調製した ECL 検出溶液を滴下し、上からラップを被せメンブレン隅々まで ECL 検出溶液を行き渡らせる。

29. 余分な ECL 検出溶液を除去し、X 線フィルムカセットにセットし、第 4 章 2 節 3 項に記した感光及び現像操作を行う。感光時間は 5~30 分程度であり、適宜調節する。また、検出後のメンブレンは TBS-T で濯ぎ、4°C で一週間ほど保存が可能であり、手順 27 から再度操作を行うこともできる。

#### 4-4. エピゲノム解析

##### 4-4-1. ゲノム DNA のバイサルファイト処理

本項では早津らの手法に従ったゲノム DNA へのバイサルファイト処理、及びバイサルファイト処理ゲノム DNA に対する PCR と DNA シークエンシングの操作方法に関して記述する (Hayatsu, 2008; Hayatsu et al., 2004; Shiraiishi and Hayatsu, 2004)。なお、今回は塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> (*PfPLA-B* [*PfPLA 5*], *PfPLA-B'*), *PfPLA 6*, IB 型膵 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を毒腺、膵臓、肝臓の各組織で比較検証した。以降の操作で使用されるゲノム DNA はホンハブ (No. 3, No. 6, No. 9) とヒメハブ (No. 23) の各組織からそれぞれ抽出されるものである。なお、本実験で使用した合成オリゴ DNA の詳細とその組み合わせに関しては、第 7 章に別途記載しているので参照されたい。

1. 効率的に標的遺伝子の解析領域を検出するため、それ以外の領域を制限酵素により消化し、またバイサルファイト変換効率をあげるために、ゲノム DNA の断片化を行う。DNA 20 µg を制限酵素で完全消化する (塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域解析時は *Hinc II*, *Stu I*, *Sty I*, *PfPLA 6* プロモーター領域解析時は *Bcl I*, *Afl II*, IB 型膵 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域解析時は *Msp I*, *Bst XI*)。
2. TE 飽和フェノールと PCI で除タンパクをし、エタノール沈殿後、Milli-Q で再溶解させる。
3. 制限酵素処理ゲノム DNA の濃度測定をし、0.08 µg/µL になるように調製する。
4. 以下に示す Sodium bisulfite 溶液を 90°C 条件下で調製し、遮光 70°C で使用時まで保存する。ただし、Sodium bisulfite 溶液は劣化しやすいので、用時調製を心掛ける。

• Sodium bisulfite 2.08 g



- Ammonium sulfite, 1-hydrate 0.67 g
  - 50% Ammonium hydrogensulfite solution (pH 4.5) 5 ml
5. 50  $\mu$ L のゲノム DNA 溶液に 6 N NaOH を 2.5  $\mu$ L 添加し, 37°C で 30 分間インキュベートし, ゲノム DNA を一本鎖化させる。
  6. 一本鎖化したゲノム DNA 溶液に上記調製の Sodium bisulfite 溶液 545  $\mu$ l を添加し, ピペティングにて穏やかに混合する。
  7. 遮光下, 95°C で 30 秒間インキュベートし, ゲノム DNA を熱変性させる。
  8. 続けて, 遮光下, 70°C で 40 分間インキュベートし, バイサルファイト処理を行う。
  9. バイサルファイト処理済みゲノム DNA に Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up system (Promega Corporation, Madison, WI, USA) の Resin を 1 ml を添加し, ピペティングにて穏やかに混合する。
  10. Minicolumn に Syringe Barrel をセットし, Resin を添加した DNA 溶液を穏やかに滴下する。
  11. シリコンチューブで Minicolumn 溶出口にシリンジを接続し, シリンジを引き滴下した DNA 溶液を Minicolumn に通し, 脱塩を行う。
  12. 2 mL の 80% Isopropanol を Syringe Barrel に添加し洗浄を行う。この操作を 2 回繰り返す。Minicolumn を Syringe Barrel から取り外し, Minicolumn を清潔なマイクロチューブにセットし, 15,000 rpm で 2 分間遠心し, Isopropanol を完全に除去する。
  13. Minicolumn を清潔なマイクロチューブにセットし, 70°C に温めた Milli-Q 90  $\mu$ L を Minicolumn に静かに滴下し, DNA の溶出を行う。
  14. 溶出 DNA 溶液に 2 N NaOH を 11  $\mu$ l 添加し, 37°C で 10 分間インキュベートし, 脱スルホン化させる。
  15. 脱スルホン化した溶出 DNA 溶液に 4 M 酢酸アンモニウム (pH 7.0) を 150  $\mu$ L, グリコーゲン溶液 (20 mg/ml) を 2  $\mu$ L, 100% エタノールを 750  $\mu$ L を加え, 穏やかに転倒混和する。
  16. 15,000 rpm, 室温で 20 分間遠心し, 沈殿した DNA ペレットを崩さないように上清をすべて取り除く。
  17. 沈殿した DNA ペレットに 70% エタノールを適量加え, 15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し, 沈殿した DNA ペレットを崩さないように上清をすべて取り除く。

18. 5~15 分間, 風乾を行い, バイサルファイト処理 DNA を 20  $\mu\text{L}$  の TE バッファーで溶解させる。使用時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存する。

#### 4-4-2. バイサルファイト PCR と TA クローニング

1. 配列内に CpG サイトをなるべく含まずシトシン残基をチミン残基に置換し設計されたセンスプライマーと配列内に GpC サイトをなるべく含まずグアニン残基をアデニン残基に置換し設計されたアンチセンスプライマーを用いて, バイサルファイト PCR を行う。なお, バイサルファイト処理した DNA は  $\alpha$  型 DNA ポリメラーゼでの増幅が難しいため, Pol I 型の Taq ポリメラーゼを用いて行う。以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	to 50 $\mu\text{L}$	
• AmpliTaq Gold <sup>®</sup> 360 Master Mix	25 $\mu\text{L}$	(1 $\times$ )
• GC Enhancer	2 $\mu\text{L}$	
• センスプライマー (25 $\mu\text{M}$ )	0.6 $\mu\text{L}$	(0.3 $\mu\text{M}$ )
• アンチセンスプライマー (25 $\mu\text{M}$ )	0.6 $\mu\text{L}$	(0.3 $\mu\text{M}$ )
• バイサルファイト処理 DNA	2 $\mu\text{L}$	
Total 50 $\mu\text{L}$		

2. 以下のサイクル条件でバイサルファイト PCR を行う。

Pre-denature	95 $^{\circ}\text{C}$ , 10 分間	
↓		
Denature	95 $^{\circ}\text{C}$ , 30 秒間	
Annealing	55 $^{\circ}\text{C}$ , 30 秒間	$\times$ 30~40 サイクル
Extension	72 $^{\circ}\text{C}$ , 40 秒間	
↓		
Extension, dA-attached	72 $^{\circ}\text{C}$ , 10 分間	
Preservation	4 $^{\circ}\text{C}$ , $\infty$	

3. アガロースゲル電気泳動を行い, 増幅バンドを確認する。
4. 目的の増幅バンドが確認できたら, アガロースゲルからの増幅 DNA 断片の切り出し, 精製を行う。
5. 回収された精製 DNA は Milli-Q で再懸濁し, 一部をアガロースゲル電気泳動し, 濃度算出を行う。
6. pT7Blue T-Vector (Novagen Inc., a EMD Millipore company, Madison, WI, USA)

と精製 DNA のモル比が 1 : 6~10 になるように調製し、以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	to 10 $\mu$ L	
• pT7Blue T-Vector (50 ng/ $\mu$ L)	X $\mu$ L	(1)
• 精製 DNA	X $\mu$ L	(6~10)
• <u>Ligation High</u>	2.5~5 $\mu$ L	(0.5~1 倍量)
Total 10 $\mu$ L		

- 16°C で 0.5~12 時間インキュベートし、ライゲーション反応を行う。完了後は 4°C で保存。
- 以降、大腸菌への形質転換及びプラスミド抽出を行う。なお、pT7Blue はアンピシリン耐性遺伝子を持っているため、アンピシリン添加培地で培養を行う。抽出したプラスミドは使用時まで 4°C で保存する。

#### 4-2-3. バイサルファイトシーケンス

- サイクルシーケンス法を用いて抽出したプラスミドの DNA シーケンシングを行う。シーケンスプライマーは T7 Promoter プライマーもしくは Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit に付属している M13 Forward (-20), M13 Reverse プライマーを使用した。
- DNA シーケンシング後のデータは Quantification tool for methylation analysis ([http://quma.cdb.riken.jp/top/quma\\_main\\_j.html](http://quma.cdb.riken.jp/top/quma_main_j.html)) を使って、メチル化のパターンなどを解析する。なお、バイサルファイト変換効率が 98.0%を下回るクローンに関しては解析から除外した。

### 4-5. 遺伝子コピー数解析

#### 4-5-1. リアルタイム PCR

本項では TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR による SNP (Single nucleotide polymorphism) ジェノタイプリングと濃度既知の標的遺伝子を組込んだプラスミドを用いた絶対定量による遺伝子コピー数の算定法について記述する。以降の操作で使用されるゲノム DNA はホンハブ (No. 1, 3, 4, 6, 9), トカラハブ (No. 10, 12, 14, 15) からそれぞれ抽出されるものである。なお、本実験で使用した合成オリゴ DNA 及び TaqMan プローブの詳細に関しては、第 7 章に別途記載し

ているので参照されたい。

#### ■ SNP ジェノタイピング

1. 標的遺伝子の SNP 領域を特異的に増幅させるセンスプライマーとアンチセンスをそれぞれ設計し、その増幅産物の中心付近にアレルを識別する TaqMan プローブを設計する。今回は[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の第3エクソン領域を特異的に増幅させる CNVBP-F2 と CNVBP-R1 プライマーと、*BP-I* 遺伝子を特異的に検出する FAM BP exon 3 G プローブと *BP-II* と *BP-III* 遺伝子を特異的に検出する HEX BP exon 3 A プローブをそれぞれ設計した。
2. 事前に通常のゲノミック PCR を行い、単一バンドが増幅されるか十分に確認を行い、条件検討を行う。
3. *BP-I* そして *BP-II* 遺伝子の第3エクソンをそれぞれ pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>ベクターに組み込んだ 3,610 bp のプラスミドを用意し、分光光度計を用いてその核酸濃度を算出した。さらに、以下の2つの数式を用いてプラスミドのコピー数を算出し、それぞれ適切なコピー数となるように調製した。

・分子量算出式：

$$\text{二本鎖 DNA 塩基長 (bp)} \times 330 \text{ daltons} \times 2 \text{ nt/bp} = \text{核酸の分子量 (g/mole)}$$

・コピー数算出式：

$$\text{Copy number}/\mu\text{L} = \text{核酸濃度 (ng}/\mu\text{L)} / \text{核酸の分子量 (g/mole)} \times 6.02 \times 10^{14}$$

4. 遮光下にて、以下の組成で試薬を氷上で混合する。サンプル間での誤差を少なくするために、ゲノム DNA 以外を先に調製しておき、それを各チューブへと分注した。なお、チューブはリアルタイム PCR の蛍光検出に対応した透過性の高いフラットキャップのものを使用した。今回はゲノム DNA, NTC (Non-template control), 及び *BP-I* そして *BP-II* 遺伝子をそれぞれ pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>ベクターに組込んだプラスミドをそれぞれテンプレートとして用いた。

・ Milli-Q	to 20 $\mu\text{L}$	
・ THUNDERBIRD <sup>®</sup> Probe qPCR Mix	10 $\mu\text{L}$	(1 $\times$ )
・ センスプライマー (10 $\mu\text{M}$ )	0.6 $\mu\text{L}$	(0.3 $\mu\text{M}$ )
・ アンチセンスプライマー (10 $\mu\text{M}$ )	0.6 $\mu\text{L}$	(0.3 $\mu\text{M}$ )
・ FAM BP exon 3 G プローブ (10 $\mu\text{M}$ )	0.4 $\mu\text{L}$	(0.2 $\mu\text{M}$ )
・ HEX BP exon 3 A プローブ (10 $\mu\text{M}$ )	0.4 $\mu\text{L}$	(0.2 $\mu\text{M}$ )
・ ゲノム DNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	(5 ng/ $\mu\text{L}$ )
		-----
		Total 20 $\mu\text{L}$

5. MiniOpticon™リアルタイム PCR システム (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) の本体背面の電源スイッチと接続 PC 端末の電源を押し起動させる。
6. 接続端末の OS 起動後, デスクトップの Bio-Rad CFX Manager™ソフトウェアを起動させ, MiniOpticon™リアルタイム PCR システム本体とのリンクが確立されているか確認する。
7. Startup Wizard ウィンドウを開き, 初回ログイン時には Create a new Run にチェックを入れ, 使用機種名に MiniOpticon を選択する。
8. File > Open > Protocol と進み, プロトコルの設定を行う。初回時には Create New... ボタンを押し, Express Load 欄の適当なプリセットプロトコルを選択し, Edit Selected... ボタンを押し, プロトコルの編集を行う。次回からは Select Existing... のボタンを押せば前回使用したプロトコルが呼び出される。
9. Sample Volume を 20  $\mu$ L に設定し, 各ステップの温度・時間を変更する。サイクル数の設定は GOTO ステップを押し, どのステップを何回繰り返すか (行いたいサイクル数-1) 入力する。プロトコルの編集が完了したら, OK を押し, 設定を保存する。今回は以下の設定で行った。

Predenature	95°C, 3 分間	
↓		
Denature	95°C, 15 秒間	× 40 サイクル
Annealing, Extension	60°C, 30 秒間	
+ Plate Read		
↓		
Preservation	4°C, $\infty$	

10. Run Setup ウィンドウの Next ボタンを押し, プレート情報の設定を行う。初回時には Create New... ボタンを押し, Express Load 欄の適当なプリセットプレート設定を選択し, Edit Selected... ボタンを押し, プレート設定の編集を行う。次回からは Select Existing... のボタンを押せば前回使用したプロトコルが呼び出される。
11. Plate Type ウィンドウメニューから Settings タブを選択し, Plate Type を押し, 実際に使用するプレートの色を選択する。今回は BR Clear を選択した。
12. Scan Mode タブから自身が使用する蛍光色素に対応する検出チャンネルを選択し, Select Fluorophores... タブから自身が使用する蛍光色素にチェックを

入れ選択する。今回は All Channels でスキャンし、蛍光色素は FAM と HEX を選択した。

13. ウェル情報を編集する。サンプルを入れるウェルをドラッグで一括選択し、Sample Type タブからウェルに添加したサンプルの種類及び測定する蛍光色素を選択し、Target Name に遺伝子名を入力する。
14. 続けて、個々のウェルを選択し、Sample Name にサンプル名称を入力する。
15. 実験誤差検出のためにレプリケートサンプルを用意している場合、レプリケートサンプルウェルをドラッグで一括選択し、Replicate Series タブを選択し、レプリケート数、開始番号、方向を選択し、レプリケート設定を行う。
16. 絶対定量で濃度既知のスタンダードサンプルを用いる場合、そのウェルをドラッグで一括選択し、Dilution Series タブから希釈系列の設定を行う。
17. プレート情報の編集が完了したら、OK を押し、設定を保存する。
18. MiniOpticon™リアルタイム PCR システムのサーマルサイクラー部のリッドをスライドさせ、各チューブをプレートにセットし、リッドを閉じる。
19. Start Run ボタンを押し、リアルタイム PCR を開始する。
20. PCR 終了後、Bio-Rad CFX Manager™ソフトウェアで増幅曲線の確認を行い、Allelic Discrimination 機能を用いて 35 サイクル時の FAM 及び HEX の両蛍光強度に基づくアレル分布図を作製する。

#### ■ 絶対定量による遺伝子コピー数の算定

1. 標的遺伝子の特異的に増幅させるセンスプライマーとアンチセンスをそれぞれ設計し、その増幅産物の中心付近に TaqMan プローブを設計する。今回は[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の第3エクソンから第4エクソン前半領域を特異的に増幅させる CNVBP-F2 と CNVBP-R2 プライマーと、ほとんど全ての IIA 型 PLA<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の第3イントロン領域を特異的に増幅させる NSP-F1 と NSP-R1 プライマー、そして IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子アイソザイムを特異的に検出する FAM PLA<sub>2</sub> gene プローブをそれぞれ設計した。
2. 事前に通常のゲノミック PCR を行い、単一バンドが増幅されるか十分に確認を行い、条件検討を行う。
3. BP-I 遺伝子を pCR®-Blunt II-TOPO®ベクターに組み込んだプラスミドを用意し、分光光度計を用いてその核酸濃度を算出し、コピー数に応じた段階希釈系列を調製する。

4. 遮光下にて、以下の組成で試薬を氷上で混合する。今回はゲノム DNA, NTC (Non-template control), 及び *BP-I* 遺伝子を pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>ベクターに組込んだプラスミドの段階希釈系列をそれぞれテンプレートとして用いた。

• Milli-Q	to 20 $\mu$ L	
• THUNDERBIRD <sup>®</sup> Probe qPCR Mix	10 $\mu$ L	(1 $\times$ )
• センスプライマー (10 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• アンチセンスプライマー (10 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ L	(0.3 $\mu$ M)
• FAM PLA <sub>2</sub> gene プローブ (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L	(0.2 $\mu$ M)
• ゲノム DNA (100 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	(5 ng/ $\mu$ L)

Total 20  $\mu$ L

5. 以下、前述同様の操作で MiniOpticon<sup>™</sup>リアルタイム PCR システムを起動させ、プロトコル、プレート情報の編集を行う。今回は以下の設定で行った。

Pre-denature	95°C, 3 分間	
↓		
Denature	95°C, 15 秒間	× 40 サイクル
Annealing, Extension	60°C, 30 秒間	
+ Plate Read		
↓		
Preservation	4°C, $\infty$	

6. 各チューブをプレートにセットし、リアルタイム PCR を開始する。
7. PCR 終了後、Bio-Rad CFX Manager<sup>™</sup>ソフトウェアで増幅曲線と検量線の確認を行い、検量線から各サンプルの初期量を求め、サンプル間での遺伝子の保有比率をそれぞれ比較する。

## 4-6. 染色体解析

### 4-6-1. FISH 解析

本項では FISH (Fluorescence in situ hybridization) 解析に用いたプローブ DNA の概要について記述する。なお、FISH 解析はクロモソームサイエンスラボ社 (Chromosome Science Labo Inc., Hokkaido, Japan) による委託解析によって行われた。

1. FISH 解析に用いる DNA プローブの準備を行う。ホンハブ (奄美大島) から IIE 型 PLA<sub>2</sub> の cDNA とゲノム DNA 核酸配列, *Pf*PLA2 [*Pf*pgPLA 1a (A)] の cDNA 核酸配列をそれぞれ逆転写 PCR とゲノミック PCR によって獲得する。今回は IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の第 2 エクソンから第 4 エクソンまでの領域を含む 405 bp の cDNA プローブ, 5' 及び 3' UTR までの領域を含む 2,616 bp の gDNA プローブをそれぞれ準備し, 加えて *Pf*pgPLA 1a (A) 遺伝子の 5' 及び 3' UTR までの領域を含む 530 bp の cDNA プローブを準備した。
2. pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> ベクターに組み込み, 必要量のプラスミドを抽出する。
3. ゲノム DNA プローブに関しては染色体を断片化させたゲノム DNA でマスクする必要があったため, 断片化ゲノム DNA も必要量準備した。
4. FISH 解析はホンハブ培養細胞の分裂期中期の染色体に対して行われた。

#### 4-7. バイオインフォマティクス手法を用いたドライな解析

##### 4-7-1. Local BLAST 環境の構築

本項では Local BLAST の導入とその検索操作に関して記述する。Local BLAST を導入することで高度な検索設定のもとで高速な検索が行え, 特定の配列情報のみを集積した独自のデータベースを構築することも可能である。なお, 以降バイオインフォマティクス関連のプログラムを使用するにあたり, 今回はプロセッサ 2.4 GHz Intel Core 2 Duo, メモリ 16 GB 1067 MHz DDR3, MacOS (ver. 10.6.8~10.9.5) を搭載した Macbook Pro を作業環境とし, 必要に応じて, 各々の解析ディレクトリには事前に PATH を通しておいた。

1. 付属するインストール CD から XcodeTools をインストールする。この作業は UNIX ベースのバイオインフォマティクス関連のプログラムをコンパイルするのに必要である。
2. NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) のダウンロードサイトより, Mac OSX 対応の ncbi-blast-2.2.27+.dmg ファイルをダウンロードする。
3. ncbi-blast-2.2.27+.dmg ファイルを解凍し, ncbi-blast-2.2.27+.pkg ファイルのインストール作業を進める。
4. ターミナルを起動させ, データベースを格納するためのフォルダを作成する。今回はホームディレクトリに BLAST 解析用のディレクトリを作成し,



その中にデータベース格納用のディレクトリを作成した。

5. データベースの配列情報を `fasta` 形式で準備し、データベース格納用のディレクトリに保存する。
6. ターミナルから `[makeblastdb -in (配列データ名) -dbtype nucl -hash_index]` と入力し、`makeblastdb` コマンドを実行し、データベースを作成する。なお、タンパク質データベースを作成する際は `-dbtype` を `prot` に変更する。丸括弧内は自身で指定し、適宜変更する。
7. データベース格納用のディレクトリに入力ファイルとして検索したい配列情報を `fasta` 形式で保存し、ターミナルから `[(任意の検索プログラムコマンド) -db (データベース名) -query (検索したい配列情報名) -out (任意の出力ファイル名)]` と入力し、検索プログラムコマンドを実行し相同性検索を行う。なお、必要に応じてコマンドオプションの変更を行い、また閾値設定なども加えて検索を行う。

#### 4-7-2. Local RepeatMasker 環境の構築

本項では Local RepeatMasker の導入とその検索操作に関して記述する。なお、RepeatMasker はリピート配列検索に特化したプログラムであり、導入に際して Perl (ver. 5.8.0 以上) と blast+ の導入が必要要件である (Smit et al., 1996)。

1. RepeatMasker のサイトから Mac OSX 対応の RepeatMasker-open-3-3-0.tar.gz ファイルをダウンロードし、任意のディレクトリ下で解凍作業を進める。今回は `/usr/local/` に RepeatMasker ディレクトリとその中に解析データの格納ディレクトリ (RepeatMasker\_File) を作成した。
2. Genetic Information Research Institute (Mountain View, CA, USA.) に申請を出し、反復配列データベースの配列データ (Rebase) を入手し、RepeatMasker 格納ディレクトリへ移しておく。
3. 検索エンジンである RMBlast (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) と Tandem Repeats Finder (trf) (Boston University, Benson, 1999) をダウンロードし、RepeatMasker 格納ディレクトリ下で解凍し、インストール作業を進める。
4. ターミナルから RepeatMasker 格納ディレクトリへ移動し、`[perl ./configure]` と入力し、perl の場所、RepeatMasker の場所、trf の場所、rmbblast の場所を設定する。

5. 解析データの格納ディレクトリに入力ファイルとして検索したい配列情報を `fasta` 形式で保存し、ターミナルから `[RepeatMasker -species (任意の生物種) -xsmall (検索したい配列情報名)]` と入力し、検索プログラムコマンドを実行し相同性検索を行う。なお、必要に応じてコマンドオプションの変更を行い、また閾値設定なども加えて検索を行う。

#### 4-7-3. RAxML を用いた系統解析

本項では RAxML の導入とその操作に関して記述する。RAxML は最尤法を用いて系統樹探索を行うプログラムであり、最尤法系統樹探索では現在最も速い計算速度を有し、精度も高いことから最尤法で系統樹探索を行う場合 RAxML プログラムの使用が推奨されている (Stamatakis, 2014)。アラインメントにより整えられた核酸・アミノ酸の配列データを用いて、RAxML による最尤法で系統樹探索を行い、同時に Bootstrap 検定を行う。

1. RAxML ダウンロードサイトより、Mac OSX 対応の RAxML-7.2.8-ALPHA ファイルをダウンロードし、解凍を行う。
2. ターミナルを起動させ、RAxML を格納するためのフォルダを作成する。今回はホームディレクトリに RAxML 解析用のディレクトリを作成した。
3. RAxML-7.2.8-ALPHA ファイルを RAxML 解析用のディレクトリへ移し、ターミナルを起動させ、ターミナルから `[make -f Makefile.SSE3.PTHREADS.gcc]` と入力し、`make` コマンドを実行する。
4. 出力ファイルとして、ClustalW などのアラインメントプログラムで十分にアラインメントした配列データを用意し、NEXUS 形式で一度保存し、OTU (Operational taxonomic unit) 数及び配列長のデータと配列データのみを残し、PHYLIP 形式に手動で変換していく。拡張子も `.nxs` から `.phy` へ変更しておく。この時、別途パーティションファイルを作ることで解析にパーティション設定を取り入れることも可能である。
5. 成形した配列データを RAxML 解析用のディレクトリへ移し、ターミナルから `[./raxmlHPC-PTHREADS -T (CPU 数) -f (任意のアルゴリズム) -x (任意の 5 桁の乱数) -p (任意の 5 桁の乱数) -# (任意の bootstrap 回数) -m (任意の進化モデル) -s (任意のファイル名.phy) -q (任意のパーティションファイル.txt) -o (任意の外群) -n (任意の出力ファイル名)]` と入力し、最尤法で系統樹探索を行う。

6. 出力されたファイルは FigTree などのソフトウェアを用いて、樹形の確認、及び編集を行う。

#### 4-7-4. codeml プログラムを用いた $K_A/K_S$ 解析

本項では PAML の導入と PAML に含まれる codeml プログラムの操作に関して記述する。PAML は最尤法に基づいて分子進化の仮説を解析するソフトウェアで、codeml は  $K_A/K_S$  検定を行うことができるプログラムである (Yang, 2007)。codeml では branch models, site models, branch-site models の 3 種類の解析が可能であり、対立仮説と帰無仮説の両方で codeml による各モデルを用いた  $K_A/K_S$  値を推定し、得られた尤度を用いて尤度比検定を行って、有意な結果が得られたかを確認する。なお、branch models は遺伝子系統樹のある枝での正の自然選択が働いたかを検定することができ、site models は枝間の  $K_A/K_S$  値を変化させず、サイト間での  $K_A/K_S$  値の変動を検出することができ、branch-site models は先の 2 つの解析モデルを組み合わせたものであり、ある特定の系統のある特定のサイトに働いている正の自然選択を検出することが可能である。ここでは site models での解析操作を記す。

1. PAML ダウンロードサイトより、Mac OSX 対応の paml4.8.macosx.tgz ファイルをダウンロードし、任意のディレクトリ下で解凍作業を進める。
2. ターミナルから paml4.8 を解凍したディレクトリに移動し、.o 拡張子ファイルを rm コマンドで全て取り除く。
3. src フォルダ下の Makefile を開き、2 行目を [CC=gcc] と書き換え、OS に対応する行の#マークを取り除き、アクティブにし、ターミナルから [make -f Makefile] と入力し、コンパイルを実行する。
4. [mv baseml basemlg codeml evolver pamp yn00 mcmctree chi2 ../bin] と入力し、展開されたファイルを上位ディレクトリへ移動させる。
5. codeml を実行するための入力ファイルを作成する。アラインメントした配列データを PHYLIP 形式に変換し、RAxML での系統樹探索を行い、簡易的な系統関係を推定する。site models では枝間の距離は解析に影響しないので、系統的な関係のみを最低限記述するだけでも構わない。ただし、配列情報のアラインメントは PAL2NAL などの Perl スクリプトを用いて、タンパク質コーディング領域の cDNA 配列を、アラインメントされたアミノ酸配列に合わせる作業を事前に行っておく。

6. `codeml` を実行するためのコントロールファイルを作成する。テンプレートの `codeml.ctl` ファイルを開き、`seqfile` を任意のアラインメントファイル名、`treefile` を任意の系統樹ファイル名、`outfile` を任意の出力ファイル名へ書き換える。
7. 続けて、`runmode` を 0, `seqtype` を 1, `CodonFreq` を 2, `clock` を 0, `model` を 0 へと書き換える。
8. 今回は正の自然選択の存在を仮定した進化モデルであるモデル 8 と正の自然選択の存在を仮定しない進化モデルであるモデル 7, それぞれの  $K_A/K_S$  値を推定するので、`NSsites` を 8 と 7 それぞれに書き換える。つまり、コントロールファイルは対立仮説のモデル 8 と帰無仮説のモデル 7, 2つのファイルを用意する必要がある。
9. 他の箇所はオプション設定であり、必要に応じて数値の書き換えを行う。
10. モデル 8 とモデル 7 それぞれのコントロールファイルを保存し、ターミナルから `codeml` 解析用のディレクトリへ移動し、`[./codeml codeml.ctl]` と入力し、プログラムを実行する。モデル 8 とモデル 7 それぞれで実施する。
11. モデル 8 とモデル 7 それぞれの `mlc` 出力ファイルから対数尤度関数  $\ln L$  を探し、 $2\Delta\ln L = (\text{モデル 7 } \ln L - \text{モデル 8 } \ln L) \times 2$  の値を算出する。
12. 自由度 2 の  $\chi^2$  (カイ 2 乗) 分布において、有意水準 5% ( $p=0.05$ ) の値を PAML ソフトウェアパッケージの `CHI2` アプリケーションで確認し、 $2\Delta\ln L$  の値と比較する。
13.  $2\Delta\ln L$  の値が自由度 2 の  $\chi^2$  分布において、有意水準 5% の値よりも大きければモデル 7 とモデル 8 の尤度が等しいという帰無仮説が棄却されるため、正の自然選択を受けているサイトが存在するという結果が得られる。その結果をもとにどのサイトが正の自然選択を受けているのかを `mlc` 出力ファイルから確認する。

#### 4-7-5. `mcmctree` プログラムを用いた分岐年代推定

本項では `mcmctree` プログラムの導入とその操作に関して記述する。`mcmctree` は PAML ソフトウェアパッケージに含まれており、ベイズ法に基づいて分岐年代推定を行うプログラムである (Yang, 2007)。`mcmctree` はアラインメントした配列データ、事前に推定した系統関係、化石制約などから分岐の年代を推定することができる。解析には近似尤度計算が用いられ、進化速度の大まかな推定、

樹長の勾配ベクトルと分散共分散行列の推定, `mcmctree` による分岐年代推定の 3 ステップにより行われる。

1. `mcmctree` を実行するための入力ファイルを事前に作成する。アラインメントした配列データを PHYLIP 形式に変換し, RAxML での系統樹探索を行い, 系統関係を推定する。
2. RAxML による系統樹探索で得られた系統樹の根幹に化石情報から知られている大まかな分岐年代を書き加える。190 Mya (Million years ago) に分岐した場合は `[@1.9]` と書き加える。
3. 続いて, データセット全体の進化速度を大まかに推定し, 事前確率の値を導く。解析ディレクトリに移動し, `baseml.ctl` ファイルを開き, `seqfile` を任意のアラインメントファイル名, `treefile` 任意の系統樹ファイル名 (手順 2 で大まかな分岐年代を書き加えたもの), `outfile` を任意の出力ファイル名へ書き換える。
4. 続けて, `verbose` を 1, `runmode` を 0, `model` を 7, `clock` を 1, `getSE` を 1 へと書き換える。他の箇所はオプション設定であり, 必要に応じて数値の書き換えを行う。今回は GTR+G モデルを用いた最尤法によって進化速度を推定する。
5. `baseml` のコントロールファイルを保存し, ターミナルから `baseml` 解析用のディレクトリへ移動し, `[./baseml baseml.ctl]` と入力し, プログラムを実行する。
6. `mlb` 出力ファイルに単位時間あたりの進化速度が出力される。
7. RAxML による系統樹探索で得られた系統樹の分岐に化石情報から分かっている分岐年代の範囲, 化石制約, を書き加える。下限制約はコーシー分布で制約を施すため, 事前にエクセルによる 97.5%分位点の計算と分布曲線の作成をしておき, その時の分布を制約と共に `[L (下限年代, ロケーションパラメーター値, スケールパラメーター値, 左テイル確率)]` と書き記す。また, 上限制約は `[U (上限年代, 右テイル確率)]`, ペア制約は `[B (下限年代, 上限年代, 左テイル確率, 右テイル確率)]` と書き記す (Inoue et al., 2010)。また, 各テイル確率は Hard bound と Soft bound が選べ, 分布の立ち上がりを設定できる。
8. 樹長の勾配ベクトルと分散共分散行列を推定する。解析ディレクトリに移動し, `mcmctree.ctl` ファイルを開き, `seqfile` を任意のアラインメントファイ

- ル名, `treefile` 任意の系統樹ファイル名 (手順 7 で化石制約を書き加えたもの), `outfile` を任意の出力ファイル名へ書き換える。
9. 続けて, `ndata` を 4, `usedata` を 3, `clock` を 2, `model` を 7 へと書き換える。他の箇所はオプション設定であり, 必要に応じて数値の書き換えを行う。GTR+G モデルを用いた最尤法によって推定を行う。今回は複数遺伝子座の解析を行ったので, `ndata` を 4 とした。
  10. 続けて, `rgene_gamma` に手順 6 で推定した進化速度, `sigma2_gamma` に手順 2 で入力した化石情報から知られている根幹の大まかな分岐年代へとそれぞれ書き換える。
  11. `mcmctree` のコントロールファイルを保存し, ターミナルから `mcmctree` 解析用のディレクトリへ移動し, `[./mcmctree mcmctree.ctl]` と入力し, プログラムを実行する。
  12. `out.BV` 出力ファイルに枝長ベクトル, 勾配ベクトル, 枝長の分散共分散行列の推定値が出力される。
  13. `out.BV` 出力ファイルのファイル名を `in.BV` と書き換える。
  14. 再び, 解析ディレクトリに移動し, 先程保存した `mcmctree.ctl` ファイルを開き, `outfile` を任意の出力ファイル名, `usedata` を 2 へと書き換える。他の箇所はオプション設定であり, 必要に応じて数値の書き換えを行う。
  15. `mcmctree` のコントロールファイルを保存し, ターミナルから `mcmctree` 解析用のディレクトリへ移動し, `[./mcmctree mcmctree.ctl]` と入力し, プログラムを実行する。
  16. ターミナル画面にスクリーンアウトされる採択率が 20~40%の値にある場合は解析が上手く進んでいることを示しており, もしこの値を大きく外れた場合は解析を中断し, `mcmctree.ctl` コントロールファイルの `finetune parameters` を調節する必要がある。
  17. `out_usedata2`, `mcmcout`, `FigTree.tree` ファイルが出力される。解析結果は `out_usedata2` 出力ファイルに保存されており, 分岐年代と 95%信頼区間が推定されている。
  18. 同様の解析を数回行い, 数回の `mcmctree` 解析の結果が収束しているか確認を行う。

## 5. 結果と議論

### 5-1. 比較ゲノム解析から明らかになった PLA<sub>2</sub> 遺伝子のゲノム構造とその進化

クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域の外縁領域のゲノム構造を明らかにするために、2012 年 3 月までに GenBank へ登録されているヘビ類の全 Expression sequence tag (EST) 塩基配列情報とホンハブの毒腺 EST 塩基配列情報 (九州大学 生体防御医学研究所 トランスオミクス医学研究センターの服巻保幸先生、柴田弘紀先生よりご提供)、加えて全ゲノム塩基配列情報が明らかとなっているビルマニシキヘビ (Castoe et al., 2013), キングコブラ (Vonk et al., 2013) の全ゲノム塩基配列情報をデータセットとしたデータベースをそれぞれ構築し、Local BLAST による検索環境を整え、哺乳類、鳥類、両生類で既に報告されている IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIB 型の分泌型 PLA<sub>2</sub> 及び、クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を Query 配列として、Local BLAST 上で tblastx による相同性検索を行った。その結果、ホンハブ毒腺 EST データベースから IIE 型 PLA<sub>2</sub> に高い相同性を示す 3 つのアイソティグ, isotig03504 (read 9), isotig03505 (read 7), isotig19327 (read 4), を見出した。isotig03504 の推定アミノ酸配列は哺乳類などの既知 IIE PLA<sub>2</sub> と 40~60%程度の相同性を示した一方で、isotig03505 と isotig19327 が示す相同性は 20~40%程度で、明らかに PLA<sub>2</sub> ではない配列を含み、さらに途中で分断されたような不完全な構造をしていた (Figure 27)。

ビルマニシキヘビ全ゲノムデータベースからはクサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子に高い相同性を示す遺伝子配列を含む 2 つのスキュフォールド, Scaffold259, Scaffold12688, 一方キングコブラ全ゲノムデータベースからは 1 つのスキュフォールド, Scaffold1015, をそれぞれ見出した。それらスキュフォールド内の配列情報を詳細に解析したところ、ビルマニシキヘビの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子は独立して Scaffold12688 に存在しており、Scaffold259 には Mitochondrial E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (MUL1) と Ovarian tumor domain-containing protein 3 (OTUD3) をコードする遺伝子に挟まれて IIF, IID, IIE 型の PLA<sub>2</sub> に高い相同性を示す遺伝子がタンデムに並んでいた。同様に、キングコブラでも Scaffold1015 には Mitochondrial E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (MUL1) と Ovarian tumor domain-containing protein 3 (OTUD3) をコードする遺伝子に挟まれて IIF, IID, IIA, IIE 型の PLA<sub>2</sub> に高い相同性を示す遺伝子がタンデム並んでいた。一方で、クサ

リヘビ科ヘビで見られるような重複した IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が集積するクラスター構造は見出せなかった (Yamaguchi et al., 2014) (Figure 28)。さらに、ヒト (GRCh37P.p13, NC\_000001, GPC\_000000025), マウス (GRCm38.p2, NC\_000070, GPC\_000000777), ニワトリ (Gallus\_gallus-4.0, NC\_006108, GPC\_000000738) の分泌型 PLA<sub>2</sub> をコードするゲノム領域を調べた結果、ビルマニシキヘビとキングコブラのゲノム領域で見出したように、II 型及び V 型の分泌型 PLA<sub>2</sub> が *OTUD3* 遺伝子の隣に並んでいることが分かった (Figure 29)。興味深いことに、ヘビ類の II 型分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子は *MUL1* と *OTUD3* 遺伝子に挟まれていたが、哺乳類と鳥類の II 型及び V 型分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子は *Ubiquitin regulatory X domain (UBX) domain-containing protein 10 (UBXN10)* 遺伝子と *OTUD3* 遺伝子に挟まれており、*MUL1*, *Von Willebrand Factor A Domain Containing 5B1 (VWA5B1)*, *UBXN10* 遺伝子を含む大規模なゲノム領域で逆位が生じているようであった。

一方、クサリヘビ科ヘビの IIA 型の毒 PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子は高度に重複し、ゲノムの特定領域に集積したクラスター構造を形成し、それらは一次構造がわずかに異なる構造をもつ分子、アイソザイムをコードしているために、現在主流であるショートリードの次世代シーケンサーを用いたホールゲノムショットガン法によるゲノム配列決定法ではアセンブリが非常に困難である。そのため、私は 30~45 kbp のゲノム DNA 断片を組み込むことが可能なコスミドを用いて、ホンハブ (奄美), トカラハブ (小宝島), ヒメハブ (奄美大島), それぞれのゲノムライブラリーを構築し、IIA 型ハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を含む長鎖ゲノム断片の獲得を目指した。

コスミドを用いたゲノムライブラリーの構築では *in vitro packaging* によりファージにベクターを取り込ませ宿主細胞へ導入するので、30~45 kbp サイズのゲノム DNA とコスミド DNA が交互に線状に連なったコンカテマーを形成する必要がある。そのため、パルスフィールドゲル電気泳動によってホンハブ (奄美大島), トカラハブ (小宝島), ヒメハブ (奄美大島), それぞれの抽出ゲノム DNA を分画し、ゲノムライブラリーの構築に最適な平均塩基長をもつ、ホンハブ No. 3, トカラハブ No. 10, ヒメハブ No. 17 のゲノム DNA を用いてそれぞれのゲノムライブラリーを構築することとした (Figure 30)。その結果、5,199 クローン (タイター:  $1.04 \times 10^5$  cfu/ml) からなるホンハブゲノムライブラリーと、1,380 クローン (タイター:  $2.76 \times 10^4$  cfu/ml) からなるヒメハブゲノムライブラリーをそれぞれ構築することができたが、トカラハブのゲノムライブラリーに関してはタイ



ター値が極めて低かったため、今回はその作成を見送った。続けて、構築した両ライブラリーから IIA 型ハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を含むクローンをスクリーニングするために、一次スクリーニングとして *PfpgPLA 1a* (A) [*PfPLA 7*] と *OoPLA<sub>2</sub>-o3* 遺伝子の第 1 エクソンから第 3 エクソンまでの領域を含む DIG 標識 DNA プロブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、ホンハブゲノムライブラリーからは 199 個、ヒメハブゲノムライブラリーからは 47 個の陽性反応を示すスポットが検出され、そのスポットに相当するクローンをピックアップした (Figure 31, 32)。さらに、IIA 型ハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の特異的に増幅することができる CHO5 と CHO3 プライマーを用いたコロニーPCR による二次スクリーニング (Figure 33, 34)、増幅された PCR 産物をクローニングし、その内部配列をサイクルシーケンシング法により決定した三次スクリーニング、抽出コスミドの制限酵素処理による消化断片の比較による四次スクリーニングを実施し、IIA 型ハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を含むゲノム断片をもつクローンをホンハブゲノムライブラリーから 2 つ、ヒメハブゲノムライブラリーから 1 つ見出した。ホンハブゲノムライブラリーの 11 番プレートの 78 番区画の陽性クローンを Pfl-1 クローン、46 番プレートの 93 番区画の陽性クローンを Pfl-2 クローン、ヒメハブゲノムライブラリーの 7 番プレートの 83 番区画の陽性クローンを Ovo-1 クローンとそれぞれ名付けた。また、三次スクリーニングでの DNA シーケンシングの結果から Pfl-1 クローンには *PfPLA 1*, *PfPLA-N* [*PfPLA 4*] に高い相同性を示す PLA<sub>2</sub> 遺伝子が、Pfl-2 クローンには *PfPLA 1*, *PfBPI* に高い相同性を示す PLA<sub>2</sub> 遺伝子が、Ovo-1 クローンには *OoPLA<sub>2</sub>-o2*, *OoPLA<sub>2</sub>-o3* に高い相同性を示す PLA<sub>2</sub> 遺伝子が、それぞれ含まれていることが示された。加えて、ベクタープライマーである T7 Promoter シーケンシングプライマーを用いてコスミド挿入ゲノム断片の末端に対する DNA シーケンシングを行ったところ、Pfl-1 クローンは *PfPLA 1* のプロモーター領域に高い相同性を示す配列、Pfl-2 クローンは *PfPLA 5* の第 1 イントロンに高い相同性を示す配列、Ovo-1 クローンは既知 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域外の配列を末端に持つことが明らかとなった。そこで、今回は PLA<sub>2</sub> 遺伝子のコピー数が少ないことから配列アセンブリが容易だと考えられる Ovo-1 クローンの一次構造決定を北海道システムサイエンス社に委託して、次世代シーケンサーGS FLX+システムでの解読と配列アセンブリを実施した。

#### 5-1-1. ホンハブとヒメハブの PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域で見つかった新

## 規グループの PLA<sub>2</sub> 遺伝子群

ホンハブ毒腺 EST データベースから見出された IIE 型 PLA<sub>2</sub> に高い相同性を示す isotig03504 の配列情報をもとに、日本南西諸島のクサリヘビ科ヘビの IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とその周辺配列のゲノム構造を決定した。まず、SPII-3 と SPII-2 プライマーを用いたゲノミック PCR ではホンハブ、トカラハブ、サキシマハブ、ヒメハブの全てのヘビゲノムから 4 つのエクソンと 3 つのイントロン構造をもつ約 2.6 kbp の IIE 型 PLA<sub>2</sub> に高い相同性を示す新規 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が増幅された (Figure 35)。これらクサリヘビ科ヘビの新規 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の塩基配列を Query として Web BLAST 上で blastn による相同性検索を行ったところ、2012 年にナミヘビ科毒蛇であるブームスラングヘビ (*Dispholidus typus*)、オオブタハナスベヘビ (*Leioheterodon madagascariensis*) の両ヘビから新たに単離された IIE 型 PLA<sub>2</sub> をコードする毒腺由来の cDNA クローン (JQ340882, JQ340883, JQ340884, JQ340885, JQ340886) に非常に高い相同性を示した (Fry et al., 2012)。今回単離された日本南西諸島のクサリヘビ科ヘビの新規 PLA<sub>2</sub> 遺伝子配列より推定されたアミノ酸配列は、ナミヘビ科毒蛇の IIE 型 PLA<sub>2</sub> と 60~80% 程度の相同性を示し、さらには成熟タンパク質配列に基づいた系統解析の結果からも今回単離されたクサリヘビ科ヘビの新規 PLA<sub>2</sub> 遺伝子は IIE 型 PLA<sub>2</sub> をコードしていることが明らかとなった (Figure 36, 37)。これらホンハブ、トカラハブ、サキシマハブ、ヒメハブの IIE 型 PLA<sub>2</sub> をそれぞれ *Pf*IIEPLA<sub>2</sub>, *Pt*IIEPLA<sub>2</sub>, *Pe*IIEPLA<sub>2</sub>, *Oo*IIEPLA<sub>2</sub> と名付けた (Yamaguchi et al., 2014)。さらに、ホンハブとヒメハブにおける IIE 型 PLA<sub>2</sub> の発現組織を同定するために SPIIRT-1 と SPIIRT-2 及び SPIIRT-3 のプライマーを用いて行った逆転写 PCR によって、ホンハブとヒメハブ共に毒腺での発現が顕著であること、肺でもわずかながら発現していることが分かった (Figure 38)。興味深いことに、ヘビ族の IIE 型 PLA<sub>2</sub> のアミノ酸配列の C 末端には哺乳類などの IIE 型 PLA<sub>2</sub> とは明らかに異なる 17 残基程度のヘビ族特異的なペプチドと 6~13 残基に渡る C 末端の延長配列が見出された (Figure 36)。この C 末端の差異が毒としての機能と関連する構造因子ではないかと期待される。また、この領域に含まれるシステイン残基の数と位置がハブ種間で異なっており、ヘビ族 IIE 型 PLA<sub>2</sub> の C 末端に関しては機能的制約が低く多様性を獲得しやすい領域であることも推測される。系統解析の結果からもヘビ族の IIE 型 PLA<sub>2</sub> のクレードは哺乳類のクレードよりも分散しており、進化速度が速いことが推測された (Figure 37)。そこで、IIE 型 PLA<sub>2</sub> オーソログ遺伝子間での  $K_A/K_S$  値を codeml

プログラムの site model で算定したが、正の選択を受けたことを示す有意な結果を得ることはできなかった (Figure 39)。つまり、ヘビ族の IIE 型 PLA<sub>2</sub> は哺乳類系統などと比べると比較的速い速度で多様性を獲得しているが、あくまでも中立的な範囲で多様性を獲得したと考えられる。クサリヘビ科の IIA 型 PLA<sub>2</sub> アイソザイムである [Lys<sup>49</sup>] 型の毒 PLA<sub>2</sub> は活性中心にアミノ酸置換があるため、PLA<sub>2</sub> 活性は低いとされるが、細胞膜表面への親和性を有する C 末端配列が細胞膜の構造的な不安定化を誘引することで細胞障害を引き起こすと考えられており (Andrião-Escarso et al., 2000; Lomonte and Gutiérrez, 2011; Lomonte and Rangel, 2012; Montecucco et al., 2008; Mora-Obando et al., 2014), 加えて、IIF 型 PLA<sub>2</sub> にも哺乳類でのみ見られる C 末端の延長配列が存在し、そこに含まれているシステイン残基の数も哺乳類種間で異なっており、この C 末端の延長配列は酵素活性を増大させるとの報告もある (Murakami et al., 2002a)。今回見出されたヘビ族 IIE 型 PLA<sub>2</sub> の C 末端の特徴的な構造も類似の機能を有し、同様な機構で細胞膜表面に親和し、集積するのかもしれない。マウスなどの哺乳動物では IIE 型 PLA<sub>2</sub> は IIA 型 PLA<sub>2</sub> の機能を補完することが示唆されており、特に肺などでの発現は感染性の細菌の細胞膜の破壊などに関与しているとされ (Murakami et al., 2002b; Touqui and Wu, 2003), 今回観察された肺でのわずかな発現は同様の機能を示唆するものかもしれない。

クサリヘビ科ヘビの IIE 型 PLA<sub>2</sub> の生理機能を調べるために、大腸菌による組換えタンパク質の発現を試みた。ホンハブの IIE 型 PLA<sub>2</sub> の組換えタンパク質は大腸菌内で十分量発現するものの、封入体を形成することが示され、低 IPTG 濃度での誘導、低温誘導、レアコドンやジスルフィド結合のフォールディングに高い改善効果を示す Rosetta-gami<sup>TM</sup> B (DE3) pLysS 大腸菌株の使用などによる対策を講じたが、可溶化は見込めなかった (Figure 40)。そこで段階透析法を利用した封入体のリフォールディングを試みたが、巻き戻しの効率は非常に悪く生理機能解析に用いるだけの十分な量を得ることはできなかった。元来、分泌型の毒 PLA<sub>2</sub> は分子内のシステイン残基が多いため、封入体を形成しやすい傾向があり、大腸菌での可溶化 PLA<sub>2</sub> の組換えタンパク質の発現や封入体のリフォールディングは難しいと考えられる。今後は酵母やカイコなどでの発現を検討していきたい。また、ホンハブ粗毒中に IIE 型 PLA<sub>2</sub> が存在するかを検証するために、ホンハブ IIE 型 PLA<sub>2</sub> の C 末端合成ペプチド (CPRWAPTKGG) に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを実施したが、粗毒からは IIE 型 PLA<sub>2</sub>

を単離することはできなかった (Figure 41)。ホンハブ毒腺の RNA-seq データでは IIA 型の [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> である BPI の RPKM (Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads) が 30.2 であるのに対して、IIE 型 PLA<sub>2</sub> は 4.3 であった。つまり、IIE 型 PLA<sub>2</sub> は発現量が非常に少なく、毒としてはマイナーな成分であると考えられる。また、クサリヘビ科ヘビの IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の染色体での遺伝子座を探るために、Ligation-mediated PCR と Long PCR 及び FISH 解析 (クロモソームサイエンスラボ社に委託) を行った (Figure 35, 42)。その結果、クサリヘビ科ヘビの IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の 3' 下流には共通して *OTUD3* 遺伝子が存在しており、このシンテニー (synteny) は既に全ゲノム情報が明らかになっている哺乳類、鳥類、キングコブラ、ビルマニシキヘビのゲノムの分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターでも保存されていることが分かった。加えて、IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の 5' 上流にはホンハブ (奄美大島) では *PfPLA-B* 遺伝子、トカラハブでは *PtPLA-B* 遺伝子、サキシマハブでは *PeBP(R)-II* 遺伝子、ヒメハブでは *OoPLA<sub>2</sub>-o3* 遺伝子がそれぞれ接続していることが分かった。FISH 解析でも、IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が IIA 型のハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とホンハブのマイクロ染色体に共局在していることが示された (Figure 42)。IIA 型のハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子がマイクロ染色体の 2 つの遺伝子座に局在することは以前に池田らによって報告されていたが (Ikeda et al., 2010), *PfIIEPLA<sub>2</sub>* と *PfpgPLA 1a* [*PfPLA 7*] cDNA をプローブとした FISH 解析でもそのシグナルは 2 つの遺伝子座に共局在していた。一方で、*PfIIEPLA<sub>2</sub>* の gDNA をプローブとした FISH 解析ではそのシグナルは 1 つの遺伝子座にしか確認されなかった。第 3 項で詳細に後述するが、クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の遺伝子間領域には IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子に高い相同性を示す配列が断片化して散在しており、cDNA プローブによる FISH 解析ではその IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子に相同な断片化配列を検出したのではないだろうか。つまり、ホンハブのマイクロ染色体における分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの構造は完全長をコードする *PfIIEPLA<sub>2</sub>* の 5' 上流に IIA 型の毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子と PcRTF、さらには IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子に相同な断片化配列がタンデムに連なったゲノム構造をしており、2 つの遺伝子座に存在する IIA 型の毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターは分断され離れた状態であることが考えられる。ホンハブにおける IIA 型の毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が集積する 2 つの遺伝子座のゲノム構造と遺伝子座間の関係性を知るためには、後述する分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターのクラスター境界周縁部に位置する IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子、*MUL1* 遺伝子、*OTUD3* 遺伝子のプローブを用いたホンハブ染色体に対する

FISH 解析, さらにはヒメハブ, トカラハブ, サキシマハブなどの他のクサリヘビ科ヘビやナミヘビ科・コブラ科などのヘビ染色体における分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの染色体局在を FISH 解析で調べるのが有効だと考えられ, 今後の検討課題としていきたい。

クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの特異なゲノム構造から, それらと哺乳類や鳥類でも保存されている II 型及び V 型 PLA<sub>2</sub> が存在する分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターとの関係性については, ヘビ毒 PLA<sub>2</sub> を扱う研究者の間でこれまで深く議論されてこなかった。しかし, 今回 IIA 型のハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子と IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子そして *OTUD3* 遺伝子がタンデムに連なって同一染色体上に局在していることがクサリヘビ科ヘビで示され, クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの原型が, 生物普遍的に保存されている非毒性の II 型及び V 型 PLA<sub>2</sub> が存在する分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターであることを初めて示唆した (Yamaguchi et al., 2014)。

以上の観察に基づいて, クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターとその近傍に潜むと推測される IID 型, IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子, 加えて IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の 3' 下流に存在すると考えられる *MUL1* 遺伝子の同定を行った。構築した Local BLAST データベースを参考に, ヘビ族の IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の特異的に増幅することができる pGIID-1 と pGIID-2 プライマー, ヘビ族の IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とその 5' 上流に存在すると予測される IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の特異的に増幅することができる CHO5 と SPIIF-1 プライマー, ヘビ族の IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とその 3' 上流に存在すると予測される *MUL1* 遺伝子の特異的に増幅することができる SPIIF-2 と Mul1-1 プライマーをそれぞれ用いて, ホンハブ, トカラハブ, サキシマハブ, ヒメハブのそれぞれのゲノムに対してゲノミック PCR を行った。その結果, IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の特異的に増幅することができる pGIID-1 と pGIID-2 プライマーを用いた PCR ではホンハブとトカラハブで約 1.5 kbp と約 0.9 kbp の DNA 断片が増幅された (Figure 43)。これらの塩基配列を解読したところ, ホンハブの当該断片の塩基配列は以前に池田らによって報告されている *PfPLA 8* と *PfPLA 7* のそれぞれの 5' 上流領域に一致する配列であることが見出された (Chijiwa et al., 2012; Ikeda, 2011)。そこで, *PfPLA 8* と *PfPLA 7* の両遺伝子の 5' 上流領域の塩基配列を詳細に調べたところ, 哺乳類の IID 型 PLA<sub>2</sub> に高い相同性を示す 2 つの新規 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が *PfPLA 7* を挟み込むようにゲノム上で向かい合い存在していることが明らかとなった。ただし, IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の転写産物

がヘビ族で未だ見つかっておらず、キングコブラとビルマニシキヘビの全ゲノム情報でもアノテーションされていなかったため、既知哺乳類 IID 型 PLA<sub>2</sub> のアミノ酸配列情報を参考にエクソンイントロンジャンクションと ORF を予測し、アミノ酸配列を推定した。その結果、*PfPLA 8* の 5' 上流領域に存在する塩基配列は新規 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の ORF が保存されているのに対して、*PfPLA 7* の 5' 上流領域に存在する塩基配列は新規 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の ORF が一部欠失し、いくつかのフレームシフトを含んでいるいわゆる偽遺伝子であることも分かった。この 2 つの予測された推定アミノ酸配列の成熟タンパク質配列に基づいた系統解析から、ホンハブの 2 つの新規 PLA<sub>2</sub> は確かに IID 型 PLA<sub>2</sub> のクレードに含まれるが、ヘビ類と哺乳類はさらに細かく別々のクレードを形成することが明らかとなった (Figure 44, 45)。そこで、ホンハブの *PfPLA 8* の 5' 上流領域に存在する新規 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を *PfIIDPLA<sub>2</sub>*、*PfPLA 7* の 5' 上流領域に存在する新規 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を *PfIIDPLA<sub>2</sub>* ( $\phi$ ) とそれぞれ名付けた。興味深いことに、ホンハブ *PfIIDPLA<sub>2</sub>* と *PfIIDPLA<sub>2</sub>* ( $\phi$ ) に含まれるシステイン残基は 3 箇所での他のヘビ族 IID 型 PLA<sub>2</sub> や哺乳類 IID 型 PLA<sub>2</sub> と異なる位置に存在し、タンパク質のフォールディングが異なることが考えられた (Figure 44)。また、ゲノミック PCR の増幅産物の分子量から推測するとトカラハブにも完全長をコードしている *PfIIDPLA<sub>2</sub>* に高い相同性を示す遺伝子と偽遺伝子をコードしている *PfIIDPLA<sub>2</sub>* ( $\phi$ ) に高い相同性を示す遺伝子が存在すると考えられ、サキシマハブでは 2 つの IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の間に挟まれる領域が 5~6 kbp に渡って欠失している可能性と考えられた (Figure 43)。一方でヒメハブでは IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子由来の増幅産物が一切確認できず、今回設計したプライマー増幅領域である第 1 イントロンから第 4 エクソンまでの領域が大規模に欠失している可能性が示唆された (Figure 43)。第 4 項で詳細は後述するが、ヘビ族における比較ゲノム解析の結果から、このヘビ族における IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のゲノム構造は非常に不安定であり、ビルマニシキヘビでは第 3 イントロンから第 4 エクソン及び 3' UTR を完全に欠失しており、ヨーロッパクサリヘビ (*Vipera berus berus*) とサザンスペックルドラトルスネーク (*Crotalus mitchellii pyrrhus*) のゲノムでも遺伝子コード領域の欠失が確認できた。ヘビ族 IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子は種によっては遺伝子コード領域が欠失しており、また転写産物がこれまでに見つからないことから、ヘビ族 IID 型 PLA<sub>2</sub> は恒常的な機能には関与しておらず、非毒性分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の名残としてゲノム上にコードされているだけに過ぎないのかもしれない。また、IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝

子オーソログ間での  $K_A/K_S$  値を *codeml* プログラムの *site model* で算定したが、正の選択を受けているという有意な結果を得ることはできなかった (Figure 46)。

ビルマニシキヘビ、キングコブラ、ヨーロッパクサリヘビのゲノム情報とのシンテニーを参考にして、日本南西諸島のヘビ族の IIF 型  $PLA_2$  遺伝子とその 5' 上流に存在すると予測される IIA 型  $PLA_2$  遺伝子の特異的に増幅することができる SPIIF-1 と CHO5 プライマーを用いたゲノミック PCR を行い、ホンハブ、トカラハブ、サキシマハブで約 6.5 kbp、ヒメハブで約 7 kbp の DNA 断片が増幅された (Figure 43)。ホンハブとヒメハブで獲得された塩基配列をそれぞれ解読したところ、ホンハブでは以前に池田らによって報告されている *PfPLA 8* (Ikeda, 2011) の 3' 下流に、ヒメハブでは以前に信久らによって報告されている *OoPLA<sub>2</sub>-ol* (Nobuhisa et al., 1996) の 3' 下流にそれぞれ哺乳類の IIF 型  $PLA_2$  に高い相同性を示す新規  $PLA_2$  遺伝子が繋がっていることが分かった。これらホンハブとヒメハブの新規  $PLA_2$  遺伝子の推定アミノ酸配列を、既知哺乳類 IIF 型  $PLA_2$  と比較したところ、ヘビ族 IIF 型  $PLA_2$  にはシステイン残基が 1 つだけ少なく、哺乳類 IIF 型  $PLA_2$  特有の C 末端の延長配列が見られなかったが (Figure 44)、推定されたアミノ酸配列の成熟タンパク質配列に基づいた系統解析から、ホンハブとヒメハブの新規  $PLA_2$  を含むヘビ族 IIF 型  $PLA_2$  が哺乳類の IIF 型  $PLA_2$  クレードに近接し、IIF 型  $PLA_2$  クレードに分類されることを見出した (Figure 45)。そこで、ホンハブとヒメハブの新規  $PLA_2$  遺伝子を *PfIIFPLA<sub>2</sub>* と *OoIIFPLA<sub>2</sub>* とそれぞれ名付けた。このクサリヘビ科ヘビ IIF 型  $PLA_2$  遺伝子の転写産物は精巣で確認することができたことから (data not shown)、哺乳類 IIF 型  $PLA_2$  と同様に精子形成過程に関与していると考えられるが (Masuda et al., 2004)、哺乳類 IIF 型  $PLA_2$  特有の C 末端の延長配列は酵素活性を増大させるとの報告もあり (Murakami et al., 2002a)、その機能活性に関しては哺乳類 IIF 型  $PLA_2$  とヘビ族 IIF 型  $PLA_2$  の間で大きな差があるかもしれない。また、ヘビ族 IIF 型  $PLA_2$  オーソログ遺伝子間での  $K_A/K_S$  値を *codeml* プログラムの *site model* で算定したが、正の選択を受けているという有意な結果を得ることはできなかった (Figure 46)。

日本南西諸島のクサリヘビ科ヘビの IIA 型毒  $PLA_2$  遺伝子の 3' 下流に IIF 型  $PLA_2$  遺伝子が存在することを見出したので (Figure 43)、さらに IIF 型  $PLA_2$  遺伝子の 3' 下流に続く分泌型  $PLA_2$  遺伝子クラスターのクラスター境界領域を同定するために、ヘビ族の IIF 型  $PLA_2$  遺伝子とその 3' 下流に存在すると予測される *MUL1* 遺伝子の特異的に増幅することができる SPIIF-2 と *Mul1-1* プライマーを

用いたゲノミック PCR を行い、ホンハブ、トカラハブ、サキシマハブ、ヒメハブで約 6 kbp の DNA 断片を増幅した。ホンハブとヒメハブの増幅 DNA 断片の 5' と 3' 末端の一部及び IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子内部の塩基配列を解読したところ、前述した *PfIIFPLA<sub>2</sub>* と *OoIIFPLA<sub>2</sub>* の塩基配列と一致し、さらに予測していたように *MUL1* 遺伝子の第 4 エクソンに相当する領域にそれぞれ一致していることを確認した (Figure 43)。加えて、九州大学 生体防御医学研究所 トランスオミクス医学研究センターの服巻保幸先生、柴田弘紀先生よりご提供して頂いた Illumina 社の Miseq と Roche 社 GS FLX の次世代シーケンサーでリードされたホンハブの全ゲノムショットガンシーケンスデータを解析すると、22,152 bp からなる scaffold 配列 : scaffold9571\_cov47 が IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の第 2 イントロンから *PfPLA 1* 遺伝子の第 4 エクソンまでをコードしていることが明らかとなり、さらには *PfIIFPLA<sub>2</sub>*, *PfIIDPLA<sub>2</sub>*, *PfPLA 8*, *PfPLA 7*, *PfIIDPLA<sub>2</sub>* ( $\phi$ ), *PfPLA 6*, *PfPLA 1* がタンデムに連なり並んでいることを確認した。即ち、クサリヘビ科ヘビでも *MUL1*, IIF 型 PLA<sub>2</sub>, IID 型 PLA<sub>2</sub>, IIA 型 PLA<sub>2</sub>, IIE 型 PLA<sub>2</sub>, *OTUD3* をそれぞれコードする遺伝子がタンデムに並んだ構造が保存されていることが示唆され、この領域におけるゲノムシンテニーはホンハブ個体間でも保存されていることが示された。

### 5-1-2. ホンハブとヒメハブの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子及びそのクラスター領域のゲノム構造

私はこれまでにホンハブにおける IIA 型の毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子がハプロイドあたり 16~32 コピー含まれること (Nakashima et al., 1993), それらがマイクロ染色体の短腕の 2 つの遺伝子座でタンデムに並んでいることを明らかにしてきた (Figure 11) (Chijiwa et al., 2012; Ikeda, 2011; Ikeda et al., 2010)。一方、ヒメハブにおける IIA 型の毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子はファージを用いたゲノムライブラリーのスクリーニングから 3 つが見出され、サザンブロット解析からその 3 つが 1 つの染色体上にタンデムに連なっていることが示唆されている (Figure 17) (Nobuhisa et al., 1996)。そこでクサリヘビ科ヘビ IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のクラスター形成過程を考察するために、私はコスミドを用いてヒメハブゲノムライブラリーを改めて作成し、IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を含む約 32 kbp のゲノム断片を含むクローン:Ovo-1 の塩基配列を解析した。その結果、IIA 型 PLA<sub>2</sub> をコードする *OoPLA<sub>2</sub>-o2* と *OoPLA<sub>2</sub>-o3* 遺伝子が並んでいることを見出し、その構造が信久らによって予



測されていた構造と一致することを確認した (Figure 47) (Nobuhisa et al., 1996)。また、これら 2 つの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の 3' 下流には OTUD3, Peptidylprolyl Isomerase H (PPIH), Y Box Binding Protein 1 (YBX1) をコードしている遺伝子が並んでいることも見出した。前述したように IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子, IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子, そして OTUD3 遺伝子がタンデムに並ぶゲノム構造はホンハブやキングコブラ, 哺乳類でも保存されており (Figure 28, 29) (Yamaguchi et al., 2014), このクローンはクサリヘビ科ヘビの分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターが載ったゲノムドメインの境界及び末端領域とさらにその外縁領域を含んでいることが分かった (Figure 47)。信久らによれば, 2 つのヒメハブ IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子: *OoPLA<sub>2</sub>-o2* と *OoPLA<sub>2</sub>-o3* の 5' 上流には *OoPLA<sub>2</sub>-o1* 遺伝子が 1 つ存在するだけと予測されており, *OoPLA<sub>2</sub>-o1* 遺伝子は前項でも示したように SPIIF-1 と CHO5 プライマーを用いたゲノミック PCR によって, *OoIIFPLA<sub>2</sub>* 遺伝子と共に 1 つのゲノム断片として獲得された。このゲノミック PCR によって獲得されたゲノム断片とゲノムライブラリーから獲得された Ovo-1 が, 同一染色体上に存在しているかを検証するために, SK8 と CHO3 プライマーを用いたゲノミック PCR をヒメハブに対してさらに行い, 3,539 bp の DNA 断片を獲得した。その 3,539 bp の塩基配列は先のゲノミック PCR で獲得された DNA 断片と 1,691 bp, Ovo-1 と 1,636 bp に渡って完全に一致したことをそれぞれ確認した。以上, ゲノミック PCR で獲得された 2 つの DNA 断片と Ovo-1 は塩基配列の一致性と信久らによる予測の 2 つの点から, これら DNA 断片は同一染色体上に位置し, 連なっていることが示唆された。そこで, ホンハブとヒメハブの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域における塩基配列の相同性を確認した。すると, ヒメハブの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターは, ホンハブの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター内の *PfPLA 8* 遺伝子領域に高い相同性を示す領域, *PfPLA 6* 遺伝子領域に高い相同性を示す領域, *PfPLA 2* 遺伝子領域に高い相同性を示す領域の計 3 つの領域から構成されるゲノム構造を持つことが示され, ヒメハブの *OoPLA<sub>2</sub>-o1* は *PfPLA 8* に, *OoPLA<sub>2</sub>-o2* は *PfPLA 6* に, *OoPLA<sub>2</sub>-o3* は *PfPLA 2* に, それぞれ相同性を示すことが示唆された (Figure 48)。さらに, IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターのゲノム配列情報が部分的に明らかとなっているサザンスペックルドラトルスネークの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターに対しても同様にホンハブの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターとの相同性の確認を行った。サザンスペックルドラトルスネークの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターは, ホンハブの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター内の *PfPLA 7* 遺伝子領域に高い相

同性を示す領域, *PfPLA 6* 遺伝子領域に高い相同性を示す領域, *PfPLA 2* 遺伝子領域に高い相同性を示す領域, *PfPLA 2* 遺伝子の 3' 下流に高い相同性を示す領域の計 4 つの領域から構成されるゲノム構造を持つことが示され, *PfPLA 7*, *PfPLA 6*, *PfPLA 2* のそれぞれに相同性を示す PLA<sub>2</sub> 遺伝子の存在が示唆された (Figure 48)。そこで, ホンハブ, ヒメハブ, サザンスペックルドラトルスネークの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターで見つかった PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子から推定されたアミノ酸配列をアラインメントし, Expert Protein Analysis System (ExPASy) の Compute pI/Mw tool による成熟タンパク質の pI 値及び分子量を推定し (Figure 49), さらに成熟タンパク質に基づく系統解析を行ったところ, これら 3 種のマムシ亜科ヘビから見つかった IIA 型 PLA<sub>2</sub> は独立した 6 つのサブグループを形成することが示され, [Asp<sup>49</sup>]型の PLA<sub>2</sub> は祖先型 (Ancestral type), 酸性[Asp<sup>49</sup>]型 (Acidic[Asp<sup>49</sup>] type), 中性[Asp<sup>49</sup>]型 (Neutral[Asp<sup>49</sup>] type), 塩基性[Asp<sup>49</sup>]型 (Basic[Asp<sup>49</sup>] type), 強塩基性[Asp<sup>49</sup>]型 (Highly basic[Asp<sup>49</sup>] type) の 5 つのサブグループを形成し, [Lys<sup>49</sup>]型の PLA<sub>2</sub> は独立した[Lys<sup>49</sup>]型 ([Lys<sup>49</sup>] type) の 1 つのサブグループを形成することが明らかとなった (Figure 50)。つまり, ゲノム構造の類似性, そこにコードされる PLA<sub>2</sub> のアミノ酸配列が示す pI 値及び分子系統学的な分類により, ①ホンハブの *PfPLA 8* とヒメハブの *OoPLA<sub>2</sub>-o1* がオーソログ関係であること, ②ホンハブの *PfPLA 7* とサザンスペックルドラトルスネークの中性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子がオーソログ関係であること, ③ホンハブの *PfPLA 6* とヒメハブの *OoPLA<sub>2</sub>-o1*, サザンスペックルドラトルスネークの祖先型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子がそれぞれオーソログ関係であること, ④ホンハブの *PfPLA 2* とヒメハブの *OoPLA<sub>2</sub>-o2*, サザンスペックルドラトルスネークの[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子がそれぞれオーソログ関係であること, を見出した。これまでホンハブの酸性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> はその転写及び翻訳産物が見出されていなかったことから, 偽遺伝子化していると考えられてきたが (Ikeda, 2011; Ikeda et al., 2010), 上田・中村らによって酸性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> である *PfpGLA 1b/2b* がホンハブの幼蛇では発現していることが近年新たに示されており, ホンハブにおける酸性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> は成長段階での時期特異的な発現をしていることが見出されている (unpublished)。また, 系統解析では以前に千々岩らによって IIA 型ハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の祖先型遺伝子であると予測された A タイプ遺伝子構造を有する *PfPLA 6* と *OoPLA<sub>2</sub>-o2* (Chijiwa et al., 2012) が形成する祖先型 PLA<sub>2</sub> クレードは他のサブグループが形成するいずれのクレードよりもその分散が小さいことが示された。それは即ち,

祖先型に分類される IIA 型の PLA<sub>2</sub> は機能的制約が強く、種間で高く保存されていることを示しているのだろう。私は、このクサリヘビ科ヘビで見出された祖先型に分類される IIA 型の PLA<sub>2</sub> が毒としての機能するのではなく、哺乳類の非毒性 IIA 型 PLA<sub>2</sub> と同様に、生体の恒常性を維持するリン脂質代謝やシグナル伝達を司っているのではないかと考えた。そこで、*PfPLA 6* 遺伝子を特異的に増幅することができる MS5-1 と MS3-1 プライマーを用いた逆転写 PCR を行って発現組織を検証した。その結果、ホンハブの *PfPLA 6* 遺伝子転写産物は毒腺においても顕著に発現していたが、脳、心臓、肺、脾臓、精巣、卵巣の発現もわずかながら確認することができた (Figure 51)。このことからクサリヘビ科ヘビの祖先型 IIA 型 PLA<sub>2</sub> は毒としての機能も有するが、その一方で毒腺以外の組織で発現し、生体の恒常性を維持するリン脂質代謝やシグナル伝達に関与していることが強く示唆された。ただし、ヒメハブの *OoPLA<sub>2</sub>-o2* 遺伝子は第 3 エクソン内に存在する一塩基挿入によるフレームシフトにより偽遺伝子化していることから、このクサリヘビ科ヘビの祖先型 IIA 型 PLA<sub>2</sub> の毒腺以外での機能とその生理活性については今後の検討課題としたい。

クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> は多重遺伝子ファミリーを形成しているので、オーソログの選定が困難であり、クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> を取り扱った研究報告のほとんどで、オーソログな関係性を十分に考慮せずパラログを含めた比較がこれまで行われてきた。今回新たに比較ゲノムの観点とタンパク質の構造及びその生理機能の観点を組み合わせることで、クサリヘビ科マムシ亜科ヘビの IIA 型 PLA<sub>2</sub> で明確なオーソログ遺伝子の選定が可能となり、その比較が可能となった。そこでホンハブ、ヒメハブ及びサザンスペックルドラトルスネークの 3 種のマムシ亜科ヘビの祖先型 PLA<sub>2</sub>、酸性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>、[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> のオーソログ遺伝子間での  $K_A/K_S$  値を codeml プログラムの site model で算定した (Figure 52)。その結果、いずれも正の選択を受けたとする有意な値は得られなかったことから、これらオーソログ遺伝子は種間で保存され、中立的に進化していることが示された。ホンハブとヒメハブのそれぞれで、IIA 型 PLA<sub>2</sub> のインパラログ (In-paralog) 間の  $K_A/K_S$  値は 1 を上回ることが報告されているが (Nakashima et al., 1993; Nobuhisa et al., 1996)、今回行ったオーソログ間における  $K_A/K_S$  値は 1 を下回った。それは祖先型、酸性[Asp<sup>49</sup>]型、[Lys<sup>49</sup>]型の PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子がハブ属 (*Protobothrops*)、ヤマハブ属 (*Ovophis*)、ガラガラヘビ属 (*Crotalus*) の属分化以前に獲得・保存されてきたこと、少なくともこの

3 つ PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子に関しては属分化以降には加速進化が生じていないことを示しており、クサリヘビ科ヘビの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子における加速進化がマムシ亜科ヘビの属分化以前に生じた現象であることを想像させる。

現在、日本南西諸島に棲息するハブ属ヘビの偽遺伝子化していない IIA 型 PLA<sub>2</sub> は 122 もしくは 121 アミノ酸残基からなりエクソン部分の ORF が高度に保存されているように考えられているが、アミノ酸アラインメント及び PAL2NAL による対応コドンの解析によると第 4 エクソンでの塩基挿入や欠失によるフレームシフトと組換えが生じていることが伺える解析結果を得た (Figure 49, 53)。特に、*PfPLA 1* の第 1 エクソンから第 4 エクソン前半に存在するコーディング領域の核酸配列は *PfPLA 6* の相当領域に 93% と高い相同性を示すのに対して、第 4 エクソン後半に存在するコーディング領域の核酸配列は 75% の相同性しか示さない。しかし、*PfPLA 2* [*PfBP-II*] の第 4 エクソン後半に存在するコーディング領域の核酸配列に対しては 94% と高い相同性を示す (Figure 53)。おそらく *PfPLA 1* は祖先型 PLA<sub>2</sub> である *PfPLA 6* 遺伝子と [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> である *PfPLA 2* 遺伝子の重複とつづく組換えで派生した産物なのであろう。それはヒメハブとサザンスペックルドラトルスネークの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの構造解析で祖先型 PLA<sub>2</sub> と [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子が隣同士タンデムに連なっているゲノムの構造的特徴からも (Figure 47, 48), *PfPLA 1* が重複した *PfPLA 6* と *PfPLA 2* 遺伝子の組換えで派生した産物であることを期待させる。*PfPLA 1* のオーソログ遺伝子はヤマハブ属のヒメハブとガラガラヘビ属のサザンスペックルドラトルスネークでは見出せないことから (Figure 47, 48), 少なくとも日本南西諸島周辺に存在するハブ属の共通祖先もしくはホンハブとトカラハブの共通祖先で形成された比較的新しい遺伝子構造産物であると考えられる。

### 5-1-3. クサリヘビ科ヘビの PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域に頻繁に散在する IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子に高い相同性を示す塩基配列

ホンハブの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターにおける遺伝子間領域を詳細に調べたところ、IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とその近傍配列に高い相同性を示す 3 種類の塩基配列が見出されることが分かった (Figure 54)。それぞれを、IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の 5' 上流領域に高い相同性を示す Alpha, Alpha の 3' 下流の領域に高い相同性を示す Beta, IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子コード領域の第 1 インtron から第 3 インtron までの領域に高い相同性を示す Chai と名付けた。特に IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の第 2

エクソンと第3エクソンを含む Chai 配列が, IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の 3'下流に接続している構造は, 既に報告されている IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の 3'下流に IIE 型 PLA<sub>2</sub> がタンデムに連なる高等脊椎動物ゲノム共通の構造と照らし合わせると非常に興味深い (Figure 28, 29, 47)。PfPLA 6 の 3'下流で見出される Chai 配列は最も IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の構造の名残を残しており, それは当該遺伝子が IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の多重化以前より存在した祖先型であることと関連があるのではないだろうか。そして, ヒメハブ, サザンスペックルドラトルスネーク, ヨーロッパクサリヘビの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターでも Alpha, Beta, Chai 配列が同様のパターンで見出されることから (Figure 48), これらはクサリヘビ科ヘビの種分岐以前のゲノムイベントの名残であると言える。第5章1節で述べた不完全な IIE 型 PLA<sub>2</sub> をコードする2つアイソティグ: isotig03505 と isotig19327, はこの散在する IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子相同断片化配列から転写された産物ではないかと考えられる。

また, コードされる DNA 鎖と塩基配列の向きの特徴から PfPLA 7 と PfPLA 6 の遺伝子間領域で見出した Beta 配列は PfPLA 6 に, Chai 配列は PfPLA 7 に関連付けられる。さらに, PfPLA 8 と PfPLA 7 は PfPLA 1, PfPLA 2, PfPLA 3, PfPLA 4, PfPLA 5, PfPLA 6 がコードされている DNA 鎖とは逆鎖にコードされていることを合わせて考えると, ちょうどこの Beta 配列と Chai 配列の間にゲノム構造の不連続点すなわちクラスター境界があると考えられる (Figure 47, 54)。さらに, Chai 配列を The mfold Web Server の DNA Folding Form ツールを用いて解析したところ, 2つの領域が強固なステムループ構造を形成することが予測された。この2つの領域は IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の第1イントロンと第2イントロンにそれぞれ存在していた (Figure 55)。ゲノム DNA 内に潜むステムループ形成配列は十字架 (Cruciform) 構造を形成し, しばしば DSB (Double Strand Break) による染色体乗換え (Chromosomal crossover) と再編 (rearrangement) 時の足場として働くことが報告されている (Bi et al., 2003; Inagaki et al., 2013; Lemoine et al., 2005; Mukherjee and Storici, 2012)。一方で, IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子がホンハブほど多重化をしていないヒメハブでは, 祖先型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子: OoPLA<sub>2</sub>-o2, の 3'下流に Chai 配列が見出せない。これらの観察結果は, Chai 配列が染色体乗換えや再編を介して, クサリヘビ科ヘビ IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の多重化に関わった可能性を示しているのではないだろうか (Figure 47, 48)。池田らは PcRTF による 5' Transduction が毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子多重化に関与したのではないかと提案しているが

(Ikeda, 2011; Ikeda et al., 2010), 多くの生物種で見ついている LINE のほとんどが 5' truncated な構造を有し, 5' Transduction が非常に稀な現象であること (Damert et al., 2009; Hulme et al., 2009; Symer et al., 2002; Szak et al., 2002), 毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の重複がゲノム上で無作為的に生じているのではなく, 特定の遺伝子座に集積していることから, 毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の多重化が LINE 配列を介して生じたと断言するには, 検証すべき課題が未だ残っている。

#### 5-1-4. ホンハブとヒメハブの PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域のゲノム構造の比較から分かったヒメハブ PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域での大規模な欠失

ホンハブとヒメハブの PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの塩基配列を比較したところ, ホンハブ PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターに存在する 2 つの IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子に相同な遺伝子をヒメハブのクラスター中に見出すことができなかった。IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を特異的に増幅することができるプライマーを用いたゲノミック PCR でもヒメハブでは増幅産物を一切確認することができなかったことから, ヒメハブゲノムには完全長をコードする IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が無いと考えられる (Figure 43, 47)。そこで, ヒメハブゲノムで IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が存在すると推測される領域の塩基配列を詳細に調べたところ, ホンハブゲノムの *PfIIDPLA<sub>2</sub>* の第 1 イントロン後半部から *PfIIDPLA<sub>2</sub>* ( $\psi$ ) の第 1 イントロン後半部までの領域に相当する塩基配列が, ヒメハブゲノムでは抜け落ちていることが分かった (Figure 47)。その名残として, ホンハブの *PfIIDPLA<sub>2</sub>* の第 1 エクソンから第 1 イントロン前半部までの 532 bp の塩基配列と, *PfIIDPLA<sub>2</sub>* ( $\psi$ ) の第 1 エクソンから第 1 イントロン前半部までの 653 bp の塩基配列と, それぞれ 94%と 93%一致する 520 bp と 628 bp の 2 つの塩基配列をヒメハブゲノムから見出した。即ち, この 2 つの塩基配列は過去ヒメハブゲノムに存在していた *OoIIDPLA<sub>2</sub>* と *OoIIDPLA<sub>2</sub>* ( $\psi$ ) それぞれの第 1 エクソンから第 1 イントロン前半部に相当する断片であると考えられる。さらに, ヒメハブで欠失していると考えられる領域に相当するホンハブゲノム領域を詳細に解析したところ, 向かい合う 2 つの IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が同一 DNA 鎖上で相補的な塩基対結合をすることで約 7.9 kbp に渡る巨大なステムループ構造を形成することが予測された (Figure 56)。このステムループ構造を形成すると予測された塩基配列をホンハブゲノムから除き, その前後の塩基配列 712 bp とヒメハブゲノムでそこに相当する領域の塩基配列 687 bp とをアライメントしたところ, それらの配列は 91%の一致を示した (Figure 56)。また,

このステムループ構造を形成すると予測された塩基配列の中には IIA 型の中性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> である *PfPLA2* をコードする *PfPLA 7* が含まれていた (Figure 47, 56)。これまでの解析からヒメハブでは中性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子が欠失していることが分かっているが (Figure 47, 48, 50), 以上の新たな知見を合わせて考えると, かつてヒメハブゲノムでも向かい合う 2 つの IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とその 2 つの遺伝子に挟まれた中性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子からなる構造が存在したが, それがステムループ構造を形成してゲノム上から欠失したと予測される (Figure 57)。以上の観察と 5 章 1 節 2 項の観察を合わせると, 少なくともハブ属, ヤマハブ属, ガラガラヘビ属の属分化以前の共通祖先ヘビのゲノムには酸性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>, 中性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub>, 祖先型 PLA<sub>2</sub>, [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> をコードする 4 つの遺伝子がこの順番でゲノム上にタンデムな状態で並び, クラスターを形成していたことが考えられる。

また, *PfIIDPLA<sub>2</sub>* の第 1 イントロンに挿入された状態で見出された IIA 型の酸性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> である *PfpgPLA 1b* をコードする *PfPLA 8* の 5' と 3' のすぐ外側には 2 つの互いにほぼ一致する短い塩基配列 5'- ATG TAA TTC TGG GAA CTG AAG TCC ACA AGT CT -3' と 5'-ATG TAA TTC TGG GAA CTG AAG CCC ACA AGT CT -3' が見出された。このような短い配列が同一 DNA 鎖上に 2 つ並んでいる構造としてはトランスポゾンなどの転移因子が宿主 DNA 鎖に挿入した際に生じる TSD (Target site duplication) が知られている (Kazazian, 2004; Kojima, 2010; Naville et al., 2014; Szak et al., 2002)。即ち, *PfPLA 8* は *PfIIDPLA<sub>2</sub>* 遺伝子が形成された後に, その第 1 イントロンに挿入されたことになる。ところが, *PfPLA 8* の遺伝子周辺配列にはトランスポゾンなどの転移因子由来の塩基配列やその痕跡も, Chai 配列なども一切発見することができなかった。従って, 一体, *PfPLA 8* がどうやって現在の遺伝子座に現れたかはとても興味深い。

#### 5-1-5. PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域のゲノム構造の種間・種内比較から推定される分子進化過程

哺乳類, 鳥類, ヘビ類の分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターがシンテニーを示すことから, その塩基配列を詳細に比較することでクサリヘビ科ヘビの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子がいつ頃またどのように多重化したのかを考察した。まず, IIC 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子は哺乳類特異的であること, IIF, IID, IIA, IIE 型の PLA<sub>2</sub> 遺伝子は哺乳類とヘビ類ゲノムに共通して含まれることを確認した (Figure 58)。一方, 鳥類であ

るニワトリのゲノムでは IIA, V, IIE 型の PLA<sub>2</sub> 遺伝子がアノテーションされているが、哺乳類やヘビ類とのシンテニーと食い違う部分が見出されることからニワトリゲノムプロジェクトのデータベースのアノテーションの信頼度は高くないと考え、比較ゲノム学的手法による考察を掘り下げないことにした。続いて、各分泌型 PLA<sub>2</sub> の系統的な距離を推測するために、成熟タンパク質に基づく系統解析を行った。その結果、今回ヘビ類で新たに見出された IIF, IID, IIE 型の PLA<sub>2</sub> は推測していた通り哺乳類 IIF, IID, IIE 型の各クレードに含まれた (Figure 59)。また、ヘビ類の IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> は哺乳類 IIA 型 PLA<sub>2</sub> のブランチから大きく離れて独自のクレードを形成し、[Asp<sup>49</sup>]型、[Lys<sup>49</sup>]型及び祖先型の 3 つのサブクレードを形成することが分かった。また、ニワトリの IIA 型 PLA<sub>2</sub> は IIC 型 PLA<sub>2</sub> のクレードに近接し、系統的には明らかに IIC 型 PLA<sub>2</sub> であると判定された (Figure 59)。また、Figure 59 では、ニワトリの V 型 PLA<sub>2</sub> は哺乳類 V 型 PLA<sub>2</sub> のクレードに近接して見えるが、ノードとそこからの距離を検討すると IID 型 PLA<sub>2</sub> クレードに近接させることもトポロジーとしては可能であることが見て取れる (Figure 60)。即ち、先ほど予測したニワトリ PLA<sub>2</sub> 遺伝子に対するアノテーションの不確かさが系統解析によっても示され、今回の考察をもとにニワトリの IIA 型と V 型 PLA<sub>2</sub> をそれぞれ IIC 型と IID 型 PLA<sub>2</sub> と置き換えれば、分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域のシンテニーは哺乳類、鳥類及びヘビ類で保存されていることになる。全ゲノムシーケンスを目的としたゲノムプロジェクトでは膨大かつショートリードのデータを幾重にもアセンブルして構成されるゲノム Contig や Scaffold の塩基配列に対して RNA-seq などのデータをそこにマッピングすることで遺伝子領域の同定作業が行われる。RNA-seq のデータ量も膨大であるため、現在では既知核酸及びタンパク質データベースに対する BLAST 検索と GO (Gene Ontology) 解析による遺伝子の機能を階層化して分類・整理して遺伝子の同定とアノテーションが行われているが、予想以上に多重遺伝子のファミリーやスーパーファミリーが見出されている現在、閾値設定や照会するデータベースの生物種設定が不十分であるとミスアノテーションが生じやすい。近年、ゲノム比較を行う研究者の間では鳥類を含む主竜類のゲノムはヘビ類を含む双竜類に比べるとその構造が極めて変化に富んでおり、哺乳類ゲノムとの比較を行うには余り適していないとの話題がある。特に、ニワトリのゲノムサイズは約 1.0 Gbp であり (Hillier et al., 2004)、ヘビ類のゲノムサイズである約 1.3~1.5 Gbp (Castoe et al., 2013; Ullate-Agote et al., 2014; Vonk et al., 2013) よりも



遥かにコンパクトなサイズを有している。*MUL1* もしくは *UBXN10* と *OTUD3* 遺伝子に挟まれる分泌型  $PLA_2$  遺伝子クラスター領域の長さもビルマニシキヘビとキングコブラでは約 19~20 kbp であるのに対して、ニワトリでは 12 kbp とコンパクトであることも分かった (Figure 58)。さらに、キンカチョウ (Warren et al., 2010), セキセイインコ (Jarvis et al., 2014), シチメンチョウ (Dalloul et al., 2010) のゲノム情報も調べたが、そこには哺乳類・ヘビ類の IIA, IIF 型  $PLA_2$  に相当する遺伝子は一切存在していなかった (data not shown)。それら遺伝子がなぜ鳥類特異的に見出せないのかについては今後、鳥類の比較ゲノム解析をより詳細に行うことで解決されるだろう。今回、私が行ったような比較ゲノム学的手法と分子系統学的手法を組み合わせたような解析の重要度は今後ますます増えていくものと思われる。

一般に種の異なる生物種のゲノム間でシンテニーが見出されるということは、その生物種のゲノム構造が共通祖先のゲノムの同領域に由来することを示している。従って、単純なシンテニー領域の比較からそこに存在する遺伝子が獲得された共通祖先にまで遡ることができる。これを踏まえてシンテニーの解析を改めて実施すると、IIC, IIF, IID, IIA, IIE 型の  $PLA_2$  をコードする遺伝子は哺乳類、鳥類、ヘビ類の共通祖先が既に有していたと示唆される。さらに V 型  $PLA_2$  は哺乳類系統が分岐して獲得された哺乳類独自の  $PLA_2$  であると考えられ、IID 型  $PLA_2$  との系統的な距離から、それは IID 型  $PLA_2$  のコピーが原型となり形成されたと推測できる。この考えは予測でしかないがホンハブゲノムで見出した *PfIIDPLA<sub>2</sub>* ( $\psi$ ) のような逆位を生じた IID 型  $PLA_2$  遺伝子が V 型  $PLA_2$  へと派生したのではないだろうか。ここで化石記録から分かっている生物の種分化を考慮すると (Benton et al., 2009, 2015; Donoghue and Benton, 2007; Head, 2015), IIC, IIF, IID, IIA, IIE 型の  $PLA_2$  遺伝子は哺乳類、鳥類、爬虫類が分岐する以前の石炭紀後期 (3 億 3,290 万年~3 億 1,800 万年前) には、それらの共通祖先である有羊膜類 (Amniotes) で獲得されていたと考えられる。さらにそれら  $PLA_2$  遺伝子は *UBXN10* と *OTUD3* をコードする両遺伝子に挟まれるように存在していたと考えられ、その後有羊膜類から分岐した哺乳類では逆位を生じた IID 型  $PLA_2$  遺伝子のコピー産物が原型となり哺乳類系統独自の V 型  $PLA_2$  をコードする遺伝子が形成されたと推定できる。さらに、鳥類系統のゲノムでは哺乳類・ヘビ類の IIA, IIF 型  $PLA_2$  に相当する遺伝子が一切存在していなかったことから、ペルム紀後期から三畳紀初期 (2 億 6,020 万年~2 億 4,710 万年前) にかけて分岐した鳥類と

ワニ類の共通祖先である主竜類 (Archosaurs), 特に鳥類 (Aves), では IIF 型 PLA<sub>2</sub> と本来の IIA 型 PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子の欠失が生じたと考えられる。さらに, キングコブラとビルマニシキヘビのドラフトゲノムデータの解析結果, 及びクサリヘビ科ヘビ分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域の解析結果から, IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の 3' 下流の *MUL1* 遺伝子, *VWA5B1* 及び *UBXN10* 遺伝子がこの順に並んでいることを見出した (Figure 61)。即ち, この領域のゲノム断片が爬虫類 (Reptilias) もしくは有鱗類 (Squamates) が分岐した後に逆位を起こしたと考えられる。その逆位イベントが生じた際に IIC 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が喪失したと考えられる (Figure 61)。この逆位イベントによる分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの周辺に存在すると考えられている LCR (Locus control region) や CTCF (CCCTC binding factor) による遺伝子発現制御に関与する障壁としてゲノムの機能的な構造体の変化がヘビ類の分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターに及ぼした影響を今後考察することは大変興味深く, 分岐前は恐らく常染色体に存在した分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターがマイクロ染色体に転座した機構とクサリヘビ科ヘビでは IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が多重化と加速進化を受けた機構に関連性があるのか興味深い。

また, ナミヘビ科毒蛇であるオオブタハナスベヘビとブームスラングヘビでは異なる配列をもつ複数の IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子転写産物が見つかっており, ナミヘビ科毒蛇では IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が多重化していることが示唆されている (Fry et al., 2012)。ウシでは IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター内で多重化していることが報告されている (Golik et al., 2006)。アナウサギゲノムデータを解析したところ, IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター内で多重化していることも見出した (data not shown)。これまでクサリヘビ科ヘビの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の多重化は特異なケースであると考えられてきたが, 分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の多重化は種特異的ではあるが普遍的な現象であるかもしれない。今後さらに多様なゲノム配列の比較解析によって, その分子機構や機能配列を一層明らかにできると考えている。

さらに, 私はクサリヘビ科ヘビの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子がどのぐらいの年代に重複を起こしたのかを調べるために, 化石記録とミトコンドリアの 16S rRNA, 12S rRNA, ND4 (NADH dehydrogenase, subunit 4), CYTB (Cytochrome b) をコードする遺伝子の配列情報に基づいて, クサリヘビ科ヘビの分岐年代を推定した。これまでハブ属及びヤマハブ属ヘビの日本南西諸島への渡来時期及びその経路は,

岩盤や断層などの地質学的な研究手法から主に鮮新世末から更新世初期の約200~100 万年前に大陸から台湾及び日本南西諸島を繋ぐ第四紀陸橋を渡り北上してきたとされてきた (更新世陸橋仮説) (Figure 62) (Kimura, 2000, 1996)。しかし、近年の日本南西諸島に生息する様々な生物集団と大陸に生息する集団の分子遺伝学的・系統学的な調査から、両者の隔離期間は約1,800~250 万年とする報告もあり (Honda et al., 2008; Matsui et al., 2005; Ota, 2012), 加えて、寒冷期に寒さに耐性の無いハブ属及びヤマハブ属ヘビが北上するという矛盾が指摘されている。そこで、16S rRNA, 12S rRNA, ND4, CYTB をコードする遺伝子の配列情報に基づく系統解析を RAxML プログラムで実施し、系統間の分岐関係を推定し、分岐のノードに今回は8つの化石記録に基づく制約を施した (Figure 63) (Benton et al., 2015; Head, 2015; Holman and Tanimoto, 2004; Parmley and Holman, 2007; Rage et al., 2008; Sanders et al., 2010)。その際、最近の地質調査により、小宝島を含む南部トカラ列島は85万年前までに奄美大島から分離したことが示されたことから (Osozawa et al., 2012), トカラハブと奄美大島に棲息するホンハブの分岐を考慮する上で、海溝形成と島嶼分離を制約として加えたデータセットも別に準備した。下限制約に関しては事前にエクセルで97.5%分位点の計算とコーシー分布曲線の作成を行い (Figure 63) (Inoue et al., 2010), 作成したコーシー分布曲線の分散を確認した上でそれぞれ適切だと考えられるコーシー分布と共に制約を施し、mcmctreeによる分岐年代推定を実施した (Figure 64, 65, Table 3, 4)。今回、海溝形成と島嶼分離の制約を施さない場合 (Figure 64, Table 3) と、施した場合 (Figure 65, Table 4) の2つのデータセットで解析を行ったが、そのどちらの結果からも、中琉球に棲息するホンハブとトカラハブの共通祖先が南琉球及び中国大陸に棲息する大陸系種ハブ (サキシマハブ, タイワンハブ, マオランハブ (*Protobothrops maolanensis*)) の祖先種より分岐した時期は約1,190万年前であることが推定され、この種分化と分岐年代に関してはHundsdoerferら, MalhotraとThorpeら, Wüsterらの分子系統解析の結果とも一致した (Table 5) (Hundsdoerfer et al., 2011; Liu et al., 2012; Malhotra and Thorpe, 2000, 2004; Wüster et al., 2008)。また同じく、中琉球に棲息するヒメハブと揚子江以南に棲息するキクチハブ (*Trimeresurus gracilis*) が分岐した年代が約1,140万年前と推定されたことから、その年代、恐らく約1,500~800万年頃に地理的隔離イベントが生じ、現在の中琉球に棲息するホンハブとトカラハブ, ヒメハブは中新世中期から後期にかけて大陸系種のヘビから分岐したことを伺わせる。しかしながら、今回の分子遺

伝学的・系統学的な手法を用いて推定された種分化年代と地質学的な調査観察により報告されている日本南西諸島の原型となった付加体 (海洋プレートが海溝で大陸プレートの下に沈み込む際に、海洋プレートの上の堆積物がはぎ取られ、陸側に付加したもの) の形成・拡大の年代 (200 万年~150 万年前) (Kimura, 2000, 1996; Kizaki and Oshiro, 1980, 1977) 及び台湾の形成年代 (約 500 万年前) (Osozawa et al., 2012; Sibuet and Hsu, 2004) の間には大きな開きがあり、更新世陸橋仮説で示されたハブ属・ヤマハブ属ヘビの渡来経路ではこれらヘビで観察された遺伝的距離を説明できない。そこで、当時の中国大陸に存在したと考えられる古黄河と古揚子江による地理的な隔離が、現在の中琉球と南琉球それぞれで見られる生物を反映しているとする服部、太田らの報告、服部によって予測された付加体の移動と日本南西諸島の形成の報告 (Figure 66) (Hattori, 2014; Ota, 2012), これまで行われた日本南西諸島形成に関する調査報告、加えて、今回の推定されたヘビの種分化年代に基づいて、日本南西諸島のハブ属・ヤマハブ属ヘビの日本南西諸島への渡来時期及びその経路を新たに推測した。①地球の気温が次第に低下し始めた 1,500 万年頃から (Zachos, 2001), ユーラシア大陸の東部に棲息していた多くの生物は暖流の影響で比較的温暖であった中国大陸沿岸部を目指して南下を始めた (Hattori, 2014; Ota, 2012)。②約 1,500~800 万年前に古黄河と古揚子江に挟まれた領域に辿り着いた種がホンハブとトカラハブの祖先種とヒメハブであり、古揚子江以南の沿岸部へ辿り着いた種が大陸系種ハブ (サキシマハブ, タイワンハブ, マオランハブ) の祖先種とキクチハブであった。③約 500 万年前に台湾が形成され始めた (Osozawa et al., 2012; Sibuet and Hsu, 2004)。④200~150 万年前に、フィリピン海プレートがユーラシアプレートの下に沈み込む際に形成される付加体が徐々に拡大し、現在の日本南西諸島の原型が中国大陸沿岸近くに形作られた (Figure 66) (Hattori, 2014; Ota, 2012)。⑤古黄河と古揚子江に挟まれた領域に棲息していたホンハブとトカラハブの祖先種とヒメハブがより温暖な気候を求め、陸地となった中琉球 (沖縄諸島・奄美群島) の付加体に渡来した。サキシマハブとタイワンハブの祖先種も台湾を経由し、台湾と南琉球 (八重山列島) の付加体に渡来した。⑥約 150 万年前から沖縄トラフが形成・拡張を始め、中国大陸と日本南西諸島の間に黒潮が流入し、日本南西諸島の地理的な隔離が次第に始まった。⑦約 117 万年前に奄美大島のホンハブとトカラハブが種分化を始め、85 万年前には完全に奄美大島と南部トカラ列島が地理的に分離した (Osozawa et al., 2012)。以上の説ではこれまでに指摘されて

いた中国大陆と日本南西諸島に棲息する生物種の遺伝的距離と地質学的な調査による矛盾を解決することが可能であり、現在の中琉球と南琉球に棲息する生物種が古揚子江によって地理的に隔離されていたということはクワガタムシ科の遺伝的距離の調査結果からも支持されている (Hosoya and Araya, 2005)。また、今回、私は 2013 年に Zhang らによって報告されている Тайワンハブのミトコンドリア DNA 配列情報 (GenBank: KC438281.1) を系統解析に使用したが、この Тайワンハブの採取地は中国南西部であり、台湾に棲息する Тайワンハブとは異なる分岐を示すことが考えられる (Zhang et al., 2013)。2012 年に Liu らが報告しているマオランハブの系統解析では今回、私が示した結果と同様に、先に Тайワンハブが分岐し、その後でマオランハブとサキシマハブが分岐している様子が示されているが、Liu らはベトナム産と台湾産の Тайワンハブを 1 つのデータセットとして用いたため、樹枝の誘引が生じている可能性が考えられた (Liu et al., 2012)。そこで、2015 年に Chen らによって新たに報告された台湾産の Тайワンハブのミトコンドリア DNA 配列情報 (GenBank: KT447436.1) を用い、さらに樹枝の誘引が生じないように他地域で採取された同種の配列情報を除き、最尤法による系統解析を実施した。すると、マオランハブが先に分岐し、その後で Тайワンハブとサキシマハブが分岐している様子が確認された (data not shown)。へびの採取地とその遺伝的距離を考慮することでハブ属・ヤマハブ属へびの渡来時期とその経路がより詳細に明らかになると考えられるので、今後の検討課題としていきたい。

また、私はこの年代推定に使用したいくつかのへびがこういった種類の IIA 型 PLA<sub>2</sub> を有するのか系統解析で検証した (Table 6)。その結果、クサリへび亜科の IIA 型 PLA<sub>2</sub> はマムシ亜科の IIA 型 PLA<sub>2</sub> との相同性が低く系統分類が困難であったが、コブラバイパー亜科であるコブラバイパー (*Azemiops feae*) の IIA 型 PLA<sub>2</sub> は酸性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> と祖先型 PLA<sub>2</sub> のクレードに分布すること明らかとなり、先の分岐年代推定に従うと少なくとも 2,719 万年前頃には酸性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> がコブラバイパー亜科及びマムシ亜科系統の共通祖先で既に形成され、存在していたことが示された (Figure 63, 65, Table 4)。興味深い報告として、キクチハブの粗毒からはこれまでに中性、塩基性、強塩基性の[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> は見つかっておらず、それらをコードする転写産物も一切見出されていない (Tsai et al., 2012)。ヒメハブとキクチハブは系統的に非常に近縁であり、そのゲノム構造も非常に高い類似性を示すことが考えられる。恐らくは、キクチハブでも向かい合った 2 つの

IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が形成する相補的な塩基対結合で形成されるステムループ構造によって中性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子が欠失したと考えられる。ヘビ毒の機能的多様性を生み出す主な要因は食餌の差異であると考えられているが (Barlow et al., 2009; Daltry et al., 1996; Li et al., 2005), 遺伝子の構造的な変化や増減が食性へ影響したのか, それとも, ある種の偏った食性により使用頻度の少ない遺伝子が偽遺伝子化したのか, 即ち, 遺伝的な変化と食性の変化のどちらが原因であり結果であるかを検証することは非常に困難である。しかしながら, 現在見つかる多くのヘビ種の, その毒の組成は主食となる食餌の捕食及び分解消化のためにリファインされ, 適応していると考えられ, 毒組成と食性に相関性があるのかを考察した。ホンハブは幼蛇期にはマウス・トガリネズミ 60.6%, トカゲ 36.3%, 両生類 3%と捕食しているが, 成蛇になるとラット・マウス 91.7%, 鳥類 7.9%, トカゲ 2.4%以下, 両生類 0.9%以下のように, 成長に従って, 哺乳類中心の食生活へと徐々に移行する (Nishimura et al., 1991)。一方, ヒメハブは幼・成蛇共に主にカエルを好んで食し, 胃の内容物の 93%をカエルが占めているとの報告があり (Mori and Toda, 2011; Mori et al., 2002), キクチハブの幼蛇も主にトカゲやカエルを食しているとされる (Lin and Tu, 2008)。カエルやトカゲはマウスや鳥などの哺乳類・鳥類に比べると脂質の割合が少なく, 高タンパク質な食餌である (カエル肉 100 g あたり 22.3 g のタンパク質, 0.4 g の脂質が含まれており, スズメ肉 100 g あたり 18.1 g のタンパク質, 5.9 g の脂質が含まれている (Ministry of education, culture, sports, science and technology, Japan, 2014))。ここで, 興味深い1つの観察として, ホンハブとヒメハブの毒腺から見出される毒タンパク質をコードする転写産物の網羅的解析の報告がある (Aird et al., 2013)。その報告では, ホンハブの全毒タンパク質成分中における PLA<sub>2</sub> とセリンプロテアーゼの割合が 32.14%と 11.06%であるのに対して, ヒメハブではセリンプロテアーゼが全体の 93.11%を占め, PLA<sub>2</sub> はわずか 0.65%しか見出されなかった。この組成の著しい差異はヒメハブの毒組成が脂質分解よりもタンパク質分解に最適化されたカエル食への適応の結果であると考えられる。ヒメハブの IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のうち *OoPLA<sub>2</sub>-o1* 遺伝子以外の 2 つは偽遺伝子化していること, 中性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子がゲノム領域から完全に欠失している観察もヒメハブの低脂質食, カエル食への完全な適応を裏付けている。今後, ヒメハブの近縁種であるキクチハブやマムシ属であるニホンマムシ, さらにホンハブの近縁種であるトカラハブ, サキシマハブの毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターのゲノム構造を解

読・比較することで毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の起源やバリエーションの違いをゲノム構造の変化と食性及び生態に関連付けてより詳細に説明できると期待している。

## **5-2. クサリヘビ科ヘビの [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> の比較から明らかになったハブ毒 PLA<sub>2</sub> の島嶼間多様性とその進化**

日本南西諸島とは独立して火山性隆起で後成した小宝島と小宝島の生物相は、ほぼ奄美大島のそれを反映していることは十分考えられる。ところが、ホンハブとトカラハブはその体長も背中の模様も大きく異なっており、その毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムも独自の進化を遂げていることが期待される。そこで、本項では、両ハブの毒タンパク質のクロマトグラフィーや遺伝子・ゲノム構造の比較を行い、特に [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子の数とサブタイプの組成が棲息する島嶼間や種間で大きく異なることを報告し、背景にある分子機構を議論する。

### **5-2-1. クサリヘビ科ヘビの [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> の島嶼間多様性**

[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> は主に筋収縮や筋壊死などを引き起こすことが知られており、これまでに徳之島ホンハブの粗毒から BPI と BPII の 2 つ (Kihara et al., 1992; Liu et al., 1990; Yoshizumi et al., 1990), 奄美大島ホンハブの粗毒から BPI, BPII, BPIII の 3 つ (Chijiwa et al., 2003b; Murakami et al., 2009) のサブタイプが見出され、沖縄本島及び沖縄属島のホンハブでは偽遺伝子化して 1 つもサブタイプがない (Chijiwa et al., 2013b, 2000), ことが見出されている (Figure 67)。今回、トカラハブの粗毒について、定法に従ってその中分子量画分を陽イオンクロマトグラフィーで分画したところ、毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムに関しては、中性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> である PLA<sub>2</sub>, 塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> である PLA-B, [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> である BPI と、それぞれ同一のアミノ酸配列をもつ、*Pt*PLA<sub>2</sub>, *Pt*PLA-B, *Pt*BPI と名付けたタンパク質を見出した。この結果は、奄美大島と小宝島、宝島との地理的関連性を反映した妥当なものと言える。一方で、徳之島や奄美大島ホンハブ毒から見出されるような BPII や BPIII などの他の [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> のサブタイプが見出されることはなかった (Yatsui, 2006)。さらに、トカラハブの毒腺 cDNA ライブラリーを作成し、IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> をコードする転写産物を網羅的に探索したところ *Pt*PLA<sub>2</sub>, *Pt*PLA-B, *Pt*BPI をコードする転写産物に加えて、高塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> である PLA-N と一致する推定アミノ酸配列をもつ、*Pt*PLA-N と名付けたタンパク質を

コードする転写産物が新たに同定された。一方で、BP<sub>II</sub> や BP<sub>III</sub> など[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> サブタイプをコードする転写産物は見出されなかった (Hayama, 2005; Yatsui, 2006)。2004 年に, Tsai らによってトカラハブから 4 つのそれぞれ異なる PLA<sub>2</sub> アイソザイムの native タンパク質の N 末端 29 アミノ酸残基が報告されているが, それらは本研究の *Pt*PLA<sub>2</sub>, *Pt*PLA-B, *Pt*PLA-N, *Pt*BPI の N 末端アミノ酸配列と一致していた (Tsai et al., 2004)。PLA<sub>2</sub> アイソザイムの島嶼間多様は, タイプごとその特徴が異なる。例えば, PLA<sub>2</sub> は全ての島でそのアミノ酸配列は 100% 一致する。PLA-N は奄美, 徳之島タイプと沖縄タイプで 1 残基ポリモルフィズムがある。PLA-B は, それぞれの島で特異的なアミノ酸置換が含まれている。一方で, [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> は BPI, BP<sub>II</sub>, BP<sub>III</sub> のサブタイプ間で特異的なアミノ酸置換がそれぞれに 1 残基含まれているが, 例えば奄美大島の BPI と徳之島の BPI のアミノ酸配列は 100% 一致する。即ち[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子は, 島間でそのサブタイプが消えたり, 獲得されたりしているように見える。その原因を探るために, 先ず私は BP<sub>II</sub> や BP<sub>III</sub> などの他の[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> サブタイプ遺伝子がトカラハブゲノムに含まれていないのか, または[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> サブタイプ遺伝子の間にコピー数の差がないのかを, TaqMan プローブを用いた SNP ジェノタイピングで検証した (Figure 68)。[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子の第 3 エクソン領域には *BP-I* 遺伝子にはグアニン, *BP-II* と *BP-III* 遺伝子にはアデニン, と遺伝子座を区別できる一塩基非同義置換が含まれている。この多型を標的とした SNP ジェノタイピングを, 各ヘビゲノム DNA に対して行った (Figure 68)。その結果, トカラハブには *BP-II* 及び *BP-III* 遺伝子の第 3 エクソン領域の SNP に対するシグナルが検出できず, トカラハブゲノムでは *BP-I* 遺伝子以外の *BP-II* 及び *BP-III* 遺伝子が存在しないことが分かった (Yamaguchi et al., 2015)。さらに, [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子と IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の相対的なコピー数を比較するために, 各ヘビゲノム DNA に対して各 PLA<sub>2</sub> アイソザイム特異的な一塩基多型を標的として SNP ジェノタイピングを行った (Figure 69, 70)。その結果, 個体差はあるが, トカラハブの[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子のコピー数は奄美大島に棲息するホンハブよりも約 2.74 倍少ないこと, 一方の IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のコピー数はホンハブが約 1.38 倍多いこと, が分かった。即ち, トカラハブと奄美大島のホンハブでは IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の総コピー数はほぼ変わらないが[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子に関しては明らかにトカラハブでその数が少ないことが分かり, トカラハブでは[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子のコピー数増加が阻害されていることが予想された。



### 5-2-2. トカラハブの[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子から見つかった特徴的な挿入配列

そこで、トカラハブの[Lys<sup>49</sup>]型 PLA<sub>2</sub> である *PtBPI* をコードする *PtBP-I* 遺伝子のゲノム構造を調べるために、*PtBP-I* 遺伝子の 5', 3' 周辺領域も含めて特異的に増幅することができるプライマー PfPLA2-5'Flr1 と PfPLA2-3'Flr3 を用いたトカラハブゲノムへの PCR を行った。その結果、4,271 bp の *PtBP-I* 遺伝子を載せたゲノム断片が増幅された。塩基配列を解読したところ、この断片には 5' 及び 3' UTR を含む第 1 から第 4 までの全てのエクソンを含めた *PtBP-I* 遺伝子とその 3' 下流に PcRTF がコードされていることを見出した (Figure 71)。しかも興味深いことに、この *PtBP-I* 遺伝子の第 2 イントロンには、既知の IIA 型ハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子にはない 1,487 bp の大きな挿入配列が含まれることが分かった。私はこの 1,487 bp の挿入配列にトカラハブでの[Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子のコピー数増加を阻害する要因があると考え、この挿入配列の詳細なアノテーションを行った。その結果、当該挿入配列の両端に 5'- GGA AAA CGA TTG GGG -3' の TSD 配列とポリ A 鎖 (poly-A-tail) とと思われる特徴的な構造を見出した。そこで、改めてこの当該配列をリピート配列や転移因子配列検索に特化した RepeatMasker プログラムで解析したところ、この挿入配列はアノールトカゲ (*Anolis carolinensis*) で報告されているレトロトランスポゾン LINE-1 に高い相同性を示すことが分かった。そこで、既知アノールトカゲ LINE-1 配列と詳細なアライメント解析を行ったところ、この挿入配列が *PtBP-I* 遺伝子と転写方向が逆向きに、LINE の ORF2 に含まれる逆転写酵素 (RT) の後半領域から 3' UTR までをコードしていることが分かった (Figure 71)。多くの LINE がそうであるように、この挿入配列は、LINE の 5' UTR や ORF1 そして ORF2 の前半領域に相当する領域を欠損していた。さらに、コードされた RT ドメインはナンセンス変異なども見出されなかったことから、推定される RT ドメインのアミノ酸配列をもとに他の既知の LINE から報告されている逆転写酵素様配列の相当する部分とともに系統解析を行ったところ、この挿入配列にコードされる RT ドメインは LINE-1 のそれらのクレードに含まれたことから、*PtBPI* 遺伝子に挿入されている 1,487 bp 配列はクサリヘビ科ヘビの LINE-1 であることが分かったので、それを *PtLINE-1* と名付けた (Figure 71) (Yamaguchi et al., 2015)。

### 5-2-3. トランスポゾンと AID/APOBEC ファミリータンパク質

2013 年に田中らがホンハブ血清因子様タンパク質 (habu serum factor like

protein, HLP) をコードする *HLP* 遺伝子に挿入された LINE-1 を報告しているが (Tanaka et al., 2013), その塩基配列と *Pt*LINE-1 のそれとの間に相同性は見いだせなかった。LINE-1 はヒトゲノム中に 17% も含まれている non-LTR 型 LINE の主要なメンバーである (Lander et al., 2001)。一方で, 2012 年より数件明らかになったヘビゲノムドラフトシーケンスデータを調べたところ, ヘビゲノムにおける LINE-1 の存在率は非常に低く, non-LTR 型 LINE の大部分を占めているものは CR1 (Ikeda et al., 2010), Bov-B (Kordiš and Gubenšek, 1998, 1997), LINE-2 (Lovšin et al., 2001) であった (Castoe et al., 2013; Suh et al., 2014)。

ところで, 翻訳産物の多様性獲得の機構として RNA エディティングという現象の解明が進んでいる。例えば, AID (Activation-induced deaminase) は免疫グロブリン遺伝子可変部の体細胞高頻度突然変異 (somatic hypermutation) と重鎖定常部のクラススイッチの両方に関与し, APOBEC (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide) はアポリポタンパク質 B の mRNA のエディティングに関与することが分かっている。これらのタンパク質は AID/APOBEC ファミリーと総称され, シチジンを脱アミノ化することでウリジンへ変化するシチジндеアミナーゼとして知られている (Conticello et al., 2005)。一方で, AID/APOBEC ファミリータンパク質は HIV などのレトロウィルスの抗ウイルス (複製阻害) 因子としてもよく知られている。HIV などレトロウィルスの遺伝情報に Hypermutation を引き起こすことでその複製を阻害することが報告されているが (Alt and Honjo, 2007; Bélanger et al., 2013; Conticello, 2008; Holmes et al., 2007), シチジндеアミナーゼ活性非依存的な経路でもその複製を阻害することができるとの報告もされている (Bélanger et al., 2013; Horn et al., 2014; Iwatani et al., 2007)。また, レトロウィルスの原初型とも言うべき LINE や Alu などのレトロトランスポゾンの転移活性をシチジндеアミナーゼ活性非依的に阻害することも報告されている。特に LINE-1 に対する複製阻害の機構に関しては広く研究が行われ, レトロトランスポゾン由来の RNA に結合することでその複製を阻害することが分かっている (Horn et al., 2014; Ikeda et al., 2011; Koito and Ikeda, 2013; Lovin and Peterlin, 2009; Metzner et al., 2012; Muckenfuss et al., 2006)。さらに, レトロトランスポゾンの進化及びその拡散は, その阻害因子である AID/APOBEC ファミリータンパク質の進化との協調的であることが報告されており (Li et al., 2012), AID/APOBEC ファミリータンパク質とレトロトランスポゾンとの機能的及び進化的な関連性が強く伺われる。

即ち、AID/APOBEC ファミリータンパク質がトカラハブ *PtBP-I* 遺伝子の第 2 イントロンに含まれる LINE-1 を標的とし、そのレトロトランスポジションが抑制されたのではないだろうか (Figure 72)。その結果、*PtBP-I* 遺伝子は重複できず、その派生物である BPII や BPIII をコードする [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> のサブタイプをコードする遺伝子が形成されなかったのではないだろうか。一方で、*PtBP-I*、*PtPLA-B* 遺伝子の下流には CR1 の逆転転写酵素様塩基配列の断片である PcRTF が含まれることから (Figure 71) (Yamaguchi et al., 2014)、トカラハブでも IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の多重化は PcRTF と関連して生じたと考えられる。以上の仮説は、先述した SNP ジェノタイピングの結果からも支持される。さらに、LINE-1 はヘビゲノムで非常にマイナーな成分であることから、LINE-1 の複製とレトロトランスポジションには強い抑制が働いていることが考えられる。ホンハブ毒腺の RNA-seq の配列情報データ中で見つかる LINE-1 転写産物の量は PcRTF に比べると圧倒的に少なく、加えて *PtBP-I* 遺伝子内で見つかった *PtLINE-1* の配列にはシチジンデアミナーゼ活性による Hypermutation を受けた痕跡は見つけられなかったことから、ヘビゲノム内の LINE-1 の複製阻害はシチジンデアミナーゼ活性非依存的な経路で生じているのであろう (Figure 72)。一方、PcRTF の配列は今回見つかった LINE-1 のようにタンパク質コード領域が 1 つのフレームシフトも無く保存されているということはなく、その殆ど全てで塩基の挿入や欠失及び置換がかなりの頻度で生じており、レトロトランスポゾンのタンパク質コード領域は偽遺伝子化されており (Figure 73)、さらには PcRTF の転写産物も各組織で非常に多く発現している。以上の観察から AID/APOBEC ファミリータンパク質は PcRTF に対しては、シチジンデアミナーゼ活性非依存的な経路ではなく、活性依存的な Hypermutation を引き起こすことで、偽遺伝子化を誘導し、複製を制御していると考えられる (Figure 72)。AID/APOBEC ファミリータンパク質による複製阻害効果は non-LTR 型 LINE の種類に応じてディファレンシャルであるという報告があり (Lindič et al., 2013)、もしかすると、クサリヘビ科ヘビで観察されている加速進化は、PcRTF を標的とした AID/APOBEC ファミリータンパク質によるシチジンデアミナーゼ活性依存的な Hypermutation の影響を副次的に受けた結果なのかもしれない。また、例えば、AID/APOBEC ファミリータンパク質の生物種系統による違いがレトロトランスポゾンのゲノム内における勢力の優劣に関与するのかもしれない。それは、トカラハブにおける CR1 と LINE-1 のような LINE 間での「綱引き」のようなものが高等真核生物のゲノム

の複雑化と特異な組織化に働いているのかもしれない。手始めに、IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が多重化しているホンハブと寡数のヒメハブで AID/APOBEC ファミリータンパク質と LINE 類の比較解析を行うことは興味深い。

### 5-3. クサリヘビ科ヘビ PLA<sub>2</sub> 遺伝子発現とそれを調節するエピジェネティクス

LINE 類を始めとして、クサリヘビの毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の形成・制御に様々な現象が関わっていることが浮かび上がってきた。そこで、PLA<sub>2</sub> 遺伝子の発現制御に関わるエピジェネティクスを調べてみることにした。まずは、動物普遍的な IB 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化状態をホンハブとヒメハブの種間で比較する。一方で、ホンハブの組織間で発現パターンとメチル化状態を比較する。さらに、IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> をコードする塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子 (*PfPLA-B* と *PfPLA-B'*) と先祖型 *PfPLA 6* 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化状態をホンハブの組織間で比較する。

#### 5-3-1. IB 及び IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態比較

IB 型毒 PLA<sub>2</sub> の逆転写 PCR を用いた半定量的発現比較から、その相対的な発現量はヒメハブ、サキシマハブ、トカラハブ、ホンハブの順で少なくなっていることが分かっている (Nakasone, 2006)。これは IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> の活性の強さとその量に反比例しているためと考えられ、クサリヘビ科ヘビの食餌中のリン脂質分解の機能的補完現象と推測された。そこで、私はまずホンハブとヒメハブの IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域におけるメチル化状態を比較した。その結果、ホンハブとヒメハブの IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域におけるメチル化状態に大きな差は見られなかったことから、種間における IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の発現量を調節する因子は上流の転写因子、もしくは転写因子が特異的に結合する機能配列が存在すると考えられる (Figure 74)。また、ホンハブの様々な体組織における IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域におけるメチル化状態も調査したところ、毒腺では解析領域の 84.2%、膵臓では 49.6%、肝臓では 69.2%がメチル化されていた (Figure 75)。これは、毒腺では IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の発現がプロモーター領域のメチル化により抑制されている一方で膵臓ではプロモーター領域の非メチル化状態が保たれることで恒常的な発現が生じているためと考

えた。一方、肝臓でメチル化と非メチル化の状態がモザイク様だった。そこで、プロモーター領域のメチル化と転写活性との関連性を調べるために、各組織から抽出された Total RNA を鋳型に IB 型 PLA<sub>2</sub> の逆転写 PCR を行ったところ、予想に反して脾臓における発現量は毒腺と頬肉を除く全ての組織よりも低く、プロモーター領域のメチル化状態がモザイク様であった肝臓では転写量が非常に高いことが分かった (Figure 76)。改めて、別個体から脾臓と小腸を採取し、その Total RNA を用いた検証実験を行ったが、同様の結果が得られ、IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子に関しては今回調べた領域でのメチル化と発現量に相関性は見出せなかった。

次に、私は IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> をコードする塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子 (*PfPLA-B* と *PfPLA-B'*) と先祖型 *PfPLA 6* 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化状態をホンハブの組織間で比較した。個体番号 No. 3 の毒腺と肝臓における塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態は、毒腺では解析領域の 65.5%、肝臓では 88.9%がメチル化されていた (Figure 77)。詳細に毒腺での非メチル化パターンを検証したところ、プロモーター領域を中心にコアを形成している様子が確認できた。また、メチル化されているアレルとメチル化されていないアレルに 2 分できるようなパターンも確認することができた。個体番号 No. 6 では、毒腺で 88.5%、脾臓で 87.2%、肝臓で 91.7%がメチル化されており、毒腺でもプロモーター領域のメチル化が高レベルであることが分かった (Figure 78)。これらの結果は、塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> の遺伝子発現状態には個体差があることを示しているのかもしれない。または、塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> は恒常的に毒として産生されているのではなく、ガラガラヘビ属、ヒメガラガラヘビ属 (*Sistrurus*)、ヤジリハブ属 (*Bothrops*) のヘビで報告されているような性別、成長段階、季節を反映した発現をしているのかもしれない (Gregory-Dwyer et al., 1986; Menezes et al., 2006; Zelanis et al., 2010)。

先祖型 *PfPLA 6* 遺伝子のプロモーター領域では、毒腺では解析領域の 54.9%、脾臓では 62.7%、肝臓では 71.6%がメチル化されていた。先の塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> と同じく、毒腺での非メチル化のパターンが他の組織に比べてプロモーター領域を中心にコアを形成している様子が確認できた (Figure 79)。今回実験では、プロモーター領域のメチル化状態と発現量に相関性が見られた (Figure 51, 79)。こうしたプロモーター領域のメチル化感受性の転写因子などを調べるのが今後の課題となろう。近年、極地に棲息する魚のゲノムは熱帯に棲息する魚より

も 5'メチル化シトシンの割合が有意に高いと報告され (Varriale and Bernardi, 2006a), 加えて変温動物である爬虫類に関しては, ヘビ類とトカゲ類のゲノムメチレーションレベルがカメ類とワニ類よりも高く, 温帯・熱帯魚と哺乳類との間に分布していることも報告されており (Varriale and Bernardi, 2006b), 生物種の棲息環境の温度や体温とゲノム DNA のメチル化状態に関連があることが示唆されている。クサリヘビ科ヘビでも幼蛇特異的な毒因子や季節特異的な因子の存在が示唆されているが, プロモーター領域のメチル化がそれらの発現制御をしているのかもしれない。特に, 外気温の変化がスイッチングとなった季節依存的な毒性成分の変化とゲノム DNA のメチル化には興味深い関係性が予期され, 日本南西諸島に棲息するマムシ亜科ヘビでも今後, 季節, 性別, 成長段階特異的に発現している毒成分が見つかることを期待したい。

### 5-3-2. IB 及び IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子の探索

ホンハブとヒメハブの IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域におけるメチル化状態に大きな差は見られなかったことから, メチル化状態解析に使用したプロモーター領域の配列を JASPAR データベースでスキャンした。すると, ホンハブでは 133 種類の転写因子が 490 の結合部位に, ヒメハブでは 140 種類の転写因子が 535 の結合部位に結合する可能性があると予測された。この結合予測された転写因子群を絞り込むために, ヒトとマウスの膵臓 EST データベースを構築し, 膵臓で発現している転写因子をデータセットから抽出した (Table 7, 8)。続けて, 非メチル化の割合の高かった領域に結合する Score 値が 6.5 以上の転写因子をさらに抽出した (Table 9, 10)。その結果, 特に転写開始点から約 220~250 bp 上流と約 150 bp 上流に ETS ファミリーが結合する部位が集積していることが示された (Figure 80)。加えて, STAT ファミリーが結合する部位も約 150 bp 上流に位置していた。IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の発現調節を担う転写因子としては ESE-3 (Table 7-10 中では EHF と表示している) が中村らによって同定されているが, この ESE-3 の結合部位も当該領域には含まれていた (Nakamura et al., 2014)。さらに解析を進めると, 転写開始点から 60~80 bp 上流の領域にはホンハブでは Tcfcp211 という転写因子が, ヒメハブでは MZF1\_5-13, Tcf12, RFX5 という異なる転写因子がそれぞれ結合する部位を見出した (Figure 80)。もしかするとホンハブとヒメハブでの IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の発現量の差はこの領域に原因があるの

かもしれない。

さらに、塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子 (*PfPLA-B* と *PfPLA-B'*) と *PfPLA 6* 遺伝子のプロモーター領域においても、メチル化状態解析に使用したプロモーター領域の配列を JASPAR データベースでスキャンした。塩基性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子では 146 種類の転写因子が 711 の結合部位に、*PfPLA 6* 遺伝子では 133 種類の転写因子が 500 の結合部位に結合する可能性があると予測された。そこで、ホンハブの毒腺 EST データベースを用いて、先と同様の手法で毒腺特異的に発現している転写因子を抽出した (Table 11, 12)。続けて、非メチル化の割合の高かった領域に結合する Score 値が 6.5 以上の転写因子をさらに抽出した (Table 9, 10)。その結果、特に転写開始点から約 170~180 bp 上流と約 70 bp 上流に Helix-Loop-Helix ファミリーが結合する部位が集積していることが示されたが (Figure 81)、この Helix-Loop-Helix ファミリーが集積している部位は IB 型 PLA<sub>2</sub> プロモーター領域では見出すことはできなかった。さらに、その約 170~180 bp 上流に位置する Helix-Loop-Helix ファミリー結合部位の直後には ETS ファミリー結合部位があり、これは中村らによって同定された ESE-3 結合部位 (Nakamura et al., 2014) よりも約 100 bp 上流にあたり、*PfPLA 6* ではそこに ETS ファミリーが結合するとの予測はされなかったので、*PfPLA 6* のユビキタスな発現はその部位に関連があるのかもしれない。今後は、ゲルシフトアッセイなどのウェットな手法を用いた転写因子と DNA の相互作用を検討していく必要がある。

#### 5-4. 研究の総括論議

クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムに対する研究の歴史は長いですが、これまでそれらアイソザイムをコードする遺伝子の起源やその分子進化の過程について言及した報告はほぼ無く、特にクサリヘビ科ヘビの毒 PLA<sub>2</sub> と哺乳類や鳥類でも保存されている非毒性型の II 型及び V 型 PLA<sub>2</sub> との比較から毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の起源と、その分子進化にまで言及した研究はこれまでに存在しなかった。そこでヘビの進化学的な考察を交え、分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の分子進化の過程とゲノムにおけるクラスター構造の形成の過程を本研究論文で示した。

本論文において、クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターとその近傍領域に、IIF, IID, IIE 型の分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子、加えて II 型の分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が集積するゲノムクラスター構造の両端に *MUL1* 遺伝子と *OTUD3* 遺伝子が

それぞれ存在していることを明らかにした。それはクサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が集積する領域とその周辺部を含めたゲノム領域が、高等脊椎動物が普遍的に有する分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターと起源を同じくすること、そして当該領域ではクサリヘビ科ヘビでのみ特異的に IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が高度な重複を繰り返し、クサリヘビ科ヘビ独自の IIA 型 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子が集積するゲノムドメイン構造を形成していることを示した。また、ヘビ類の II 型分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの側方に位置する *UBXN10* 遺伝子、*VWA5B1* 遺伝子、*MUL1* 遺伝子を含む領域は過去に生じた逆位によって、現在のゲノム構造が形成されたことも示し、過去に *UBXN10* 遺伝子の側方に位置していた IIC 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子が領域の逆位事象の副次的な影響を受け、ヘビ類ゲノムでは欠失したことを推測した。

クサリヘビ科マムシ亜科の属間における IIA 型 PLA<sub>2</sub> の系統解析とそれら遺伝子が集積するクラスター領域の比較解析から、酸性[Asp<sup>49</sup>]型、中性[Asp<sup>49</sup>]型、塩基性[Asp<sup>49</sup>]型、強塩基性[Asp<sup>49</sup>]型、祖先型、[Lys<sup>49</sup>]型の計 6 つのサブグループを形成し、少なくとも酸性[Asp<sup>49</sup>]型、中性[Asp<sup>49</sup>]型、祖先型、[Lys<sup>49</sup>]型の PLA<sub>2</sub> をコードする遺伝子のシンテニーはハブ属、ヒメハブ属、ガラガラヘビ属の属を超えて保存されていることを明らかにした。さらに、酸性[Asp<sup>49</sup>]型、祖先型、[Lys<sup>49</sup>]型の PLA<sub>2</sub> の  $K_A/K_S$  値を算定したところ、それらの値は全て 1 を下回り中立的に進化してきたことを示した。しかしながら、遺伝子の 3'下流に PcRTF が接続する[Lys<sup>49</sup>]型の PLA<sub>2</sub> の  $K_A/K_S$  値が酸性型と祖先型の PLA<sub>2</sub> と比べ 3 倍以上も高く算定されたことは、大変興味深く、毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムの多様性獲得に PcRTF が関与している可能性を示唆した。さらに、3 属ヘビのゲノム構造の比較とヒメハブゲノムで見つかる IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の第 1 エクソンから第 1 イントロン前半部までの残骸の様子から、ヒメハブゲノムでは向かい合う 2 つの IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とそれに挟まれた中性[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子を含む領域がステムループ構造を形成し、大規模に欠失していたことを明らかにした。また、クサリヘビ科ヘビの分岐年代を推定し、日本南西諸島へのハブ属及びヤマハブ属ヘビの更新世陸橋渡来仮説を否定し、古黄河と古揚子江による地理的隔離が種分化と島嶼特異的に棲息するハブ属及びヤマハブ属の分布を特徴付けた。これら結果は特異性のみに関心がいきがちであった毒 PLA<sub>2</sub> に関する研究に、非毒性 PLA<sub>2</sub> との比較を導入したことで、分泌型 PLA<sub>2</sub> の起源と分子進化の理解に普遍的な知見を与えたと期待される。また、今後はクサリヘビ科ヘビの属間・種間における分泌



型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの構造比較をさらに行うことで、多様な毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の出現の様子が見えてくると想像する。

毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムの多様性獲得とサブタイプの増減に関与する分子機序を同定するために、島嶼集団間でサブタイプのレパトリーに違いが見られる [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイムに着目し、それらをコードする遺伝子の解析を行ったところ、トカラハブでは *BP-I* 遺伝子以外の [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子が存在しないこと、トカラハブ *BP-I* 遺伝子の第 2 イントロンにはレトロトランスポゾン LINE-1 が特異的に挿入していることが示された。即ち、この LINE-1 が [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の多様性獲得とコピー数増加に抑制的に働いていること、その作用機序に AID/APOBEC ファミリータンパク質が関与していること、さらに PcRTF に対する Hypermutation が毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムの多様性獲得に影響したことを提案する。

この結果はこれまで毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターに散在して見つかったレトロトランスポゾンと遺伝子の多重化及び加速進化を説明できる新たな仮説であり、レトロトランスポゾンとその阻害因子が宿主ゲノム内で協調的に進化し、ゲノム形成に関わっていることを示す例になると思われる。

IIA 型 PLA<sub>2</sub> である塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子と祖先型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子、及び IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態解析を行った結果、ヘビゲノムにおいてもメチル化パターンの変化が遺伝子の転写調節に関与している結果が示された。しかしながら、メチル化パターンの変化だけでは説明できない遺伝子発現の様子から、多重遺伝子である PLA<sub>2</sub> の転写制御は LCR のような包括的な制御を担う転写調節領域が関与することが予想される。この結果は未だに解明されていない毒タンパク質の発現制御や毒腺特異的な発現様式及び多重遺伝子の発現制御を理解する役割を果たし、これまであまり研究が行われてこなかった毒タンパク質遺伝子、多重遺伝子、そして爬虫類ゲノムに対するエピジェネティクス研究に基盤となるフレームワークを提案した。

## 6. 図表

6-1. Figures ..... 143 ~ 236

6-2. Tables ..... 237 ~ 250

爬虫綱有鱗目へビ亜目 (Reptilia: Squamata: Serpentes)

- 盲蛇下目 (Scolecophidia)
  - メクラヘビ上科 (Typhlopoidea)
    - アメリカメクラヘビ科 (Anomalepididae) 4 属 15 種
    - ホソメクラヘビ科 (Leptotyphlopidae) 2 属 87 種
    - メクラヘビ科 (Typhlopidae) 6 属 203 種
- 真蛇下目 (Alethinophidia)
  - ムカシヘビ上科 (Henophidia)
    - サンゴパイプヘビ科 (Aniliidae) 1 属 1 種
    - ドワーフボア科 (Tropidophiidae) 2 属 19 種
    - ツメナシボア科 (Bolyeriidae) 2 属 2 種
    - サンジニアボア科 (Sanziniidae) 2 属 4 種
    - ジムグリパイソン科 (Calabariidae) 1 属 1 種
    - ラバーボア科 (Charinidae) 2 亜科 4 属 7 種
    - ナンヨウボア科 (Candoiidae) 1 属 5 種
    - スナボア科 (Erycidae) 1 属 13 種
    - ボア科 (Boidae) 5 属 29 種
    - ミミズサンゴヘビ科 (Anomochilidae) 1 属 2 種
    - パイプヘビ科 (Cylindrophidae) 1 属 8 種
    - ミジカオヘビ科 (Uropeltidae) 8 属 47 種
    - サンビームヘビ科 (Xenopeltidae) 1 属 2 種
    - メキシコパイソン科 (Loxocemidae) 1 属 2 種
    - ニシキヘビ科 (Pythonidae) 8 属 31 種
  - ナミヘビ上科 (Caenophidia)
    - ヤスリヘビ科 (Acrochordidae) 1 属 3 種
    - クサリヘビ科 (Viperidae) 4 亜科 32 属 224 種
    - モールバイパー科 (Atractaspididae) 12 属 64 種
    - コブラ科 (Elapidae) 61 属 235 種
    - ナミヘビ科 (Colubridae) 304 属 1,938 種

毒蛇はこの4科に属する。

Figure 1. 爬虫綱有鱗目へビ亜目の分類

へビ亜目の分類が近年大幅に修正され、いくつかの亜科・属が科に昇格し、新たな科が設けられた。正式な分類名称が日本語にまだ対応していない場合は以前の亜科・属の日本語名称を科名として表記している。"Serpentes". Integrated Taxonomic Information System. 2015, [http://www.its.gov/servelet/SingleRpt/SingleRpt?search\_topic=TSN&search\_value=174118]

クサリヘビ科  
(Viperidae)



コラブ科  
(Elapidae)



ナミヘビ科有毒種  
(Colubridae, venomous)

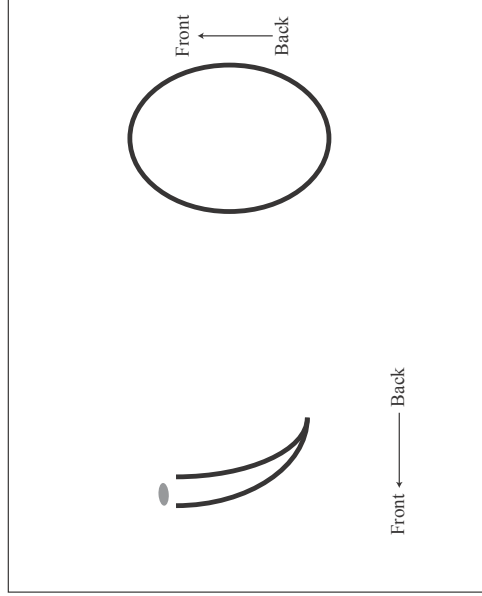
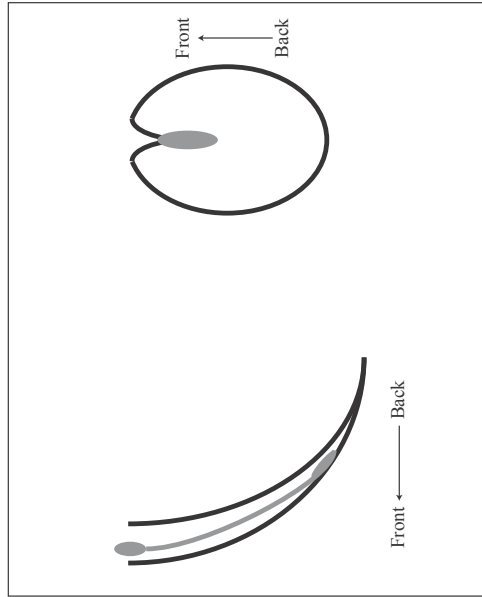
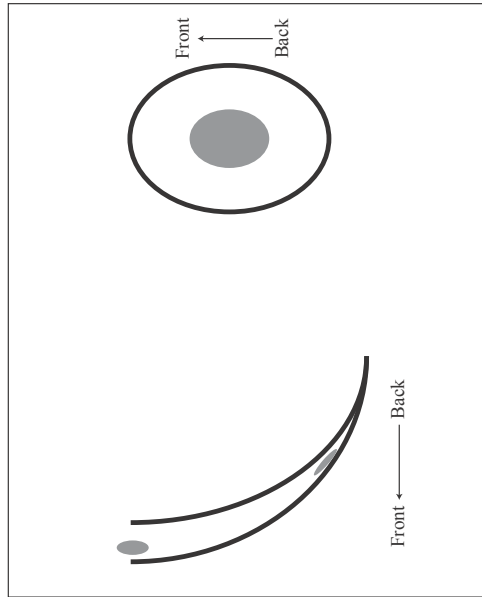
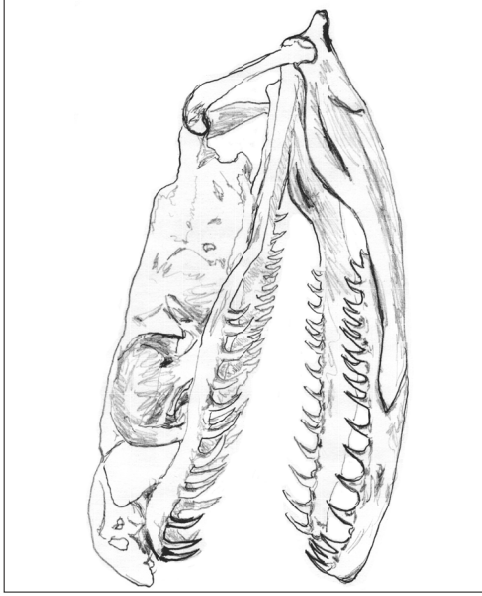


Figure 2. ヘビ頭骨と毒牙の構造

上段に頭骨，下段に毒牙をそれぞれ示す。毒牙の灰色領域は毒液が通る中空構造及び溝構造を示す。



Figure 3. 日本南西諸島に棲息するクサリヘビ科へビ

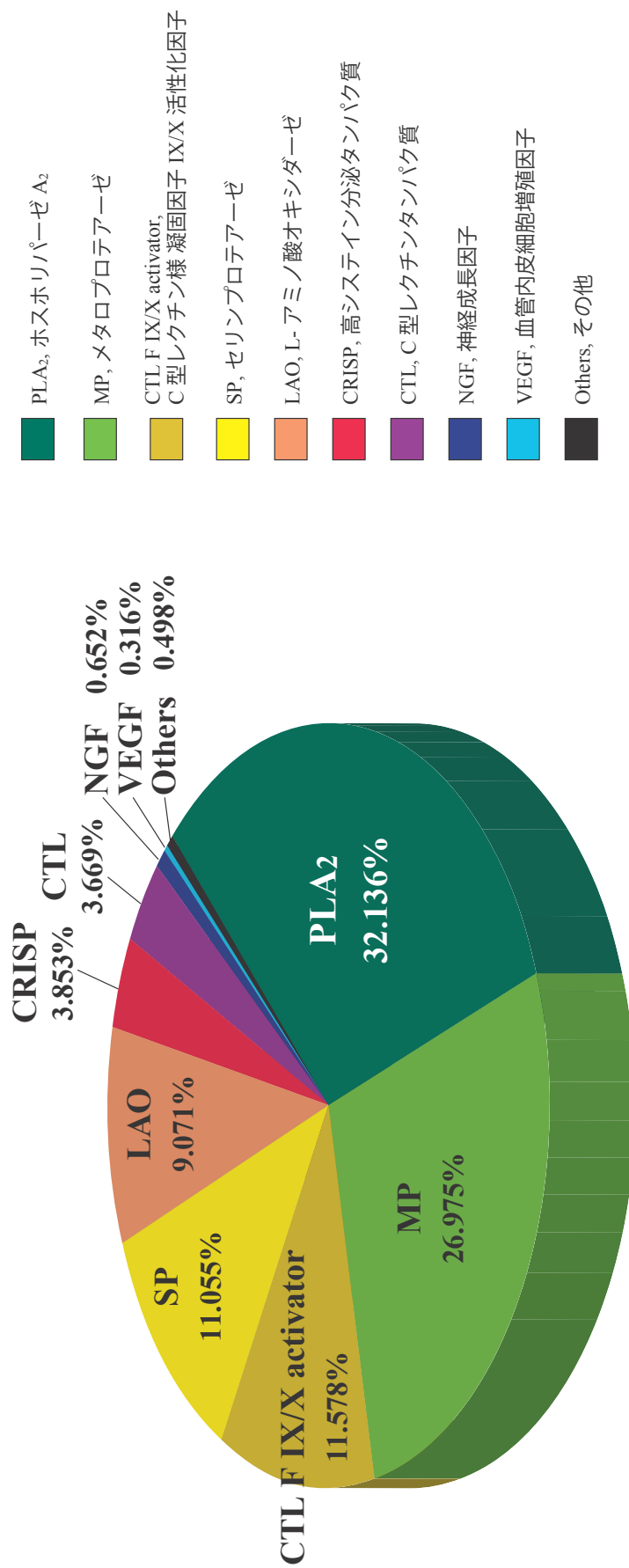


Figure 4. ホンハブ毒腺転写産物中から見つかる毒成分転写産物

出典：Aird et al., BMC Genomics 2013, 14(1), 790 (一部修正)。

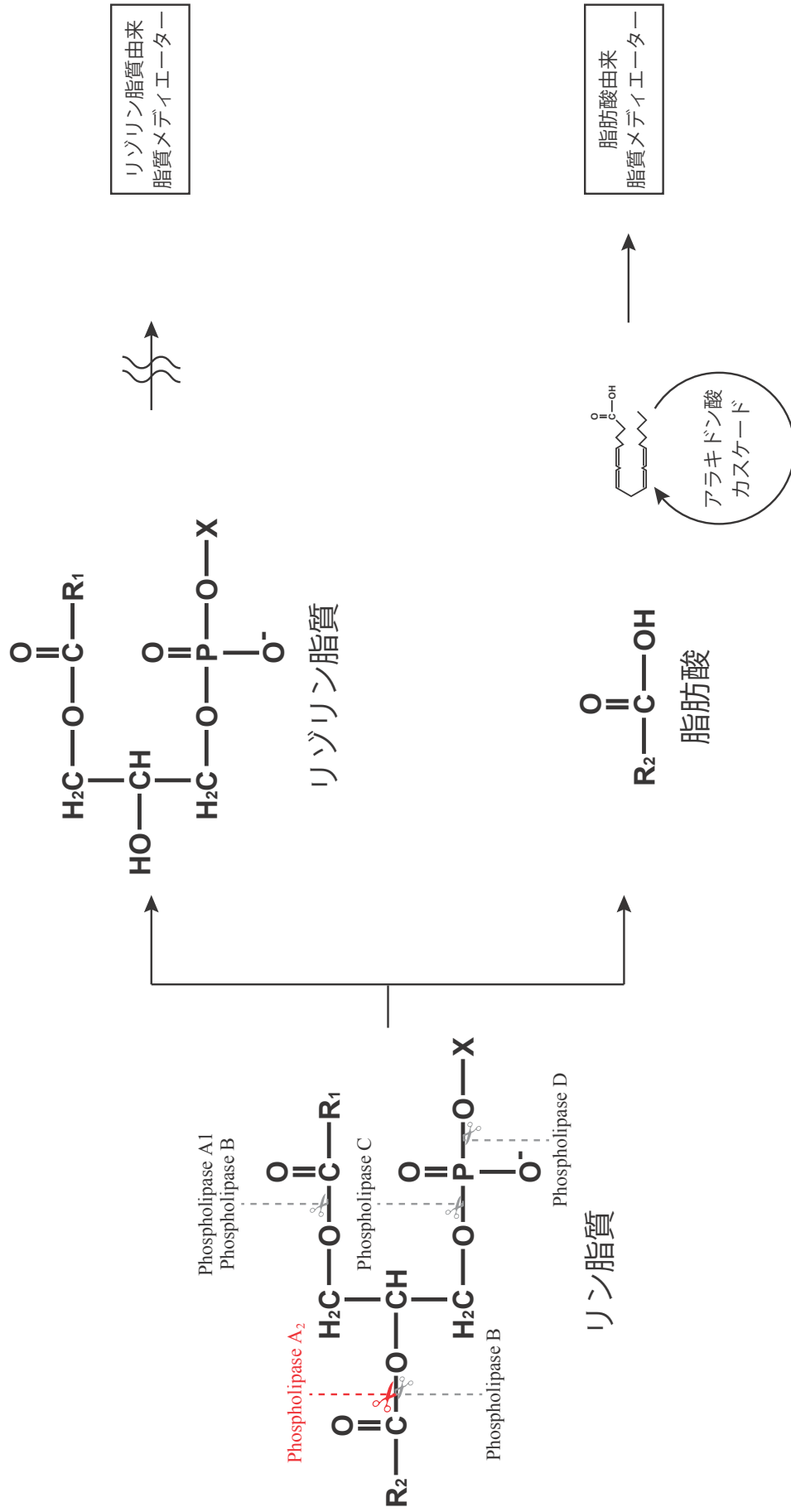


Figure 5. リン脂質の *sn*-2 位エステル結合を加水分解する PLA<sub>2</sub>

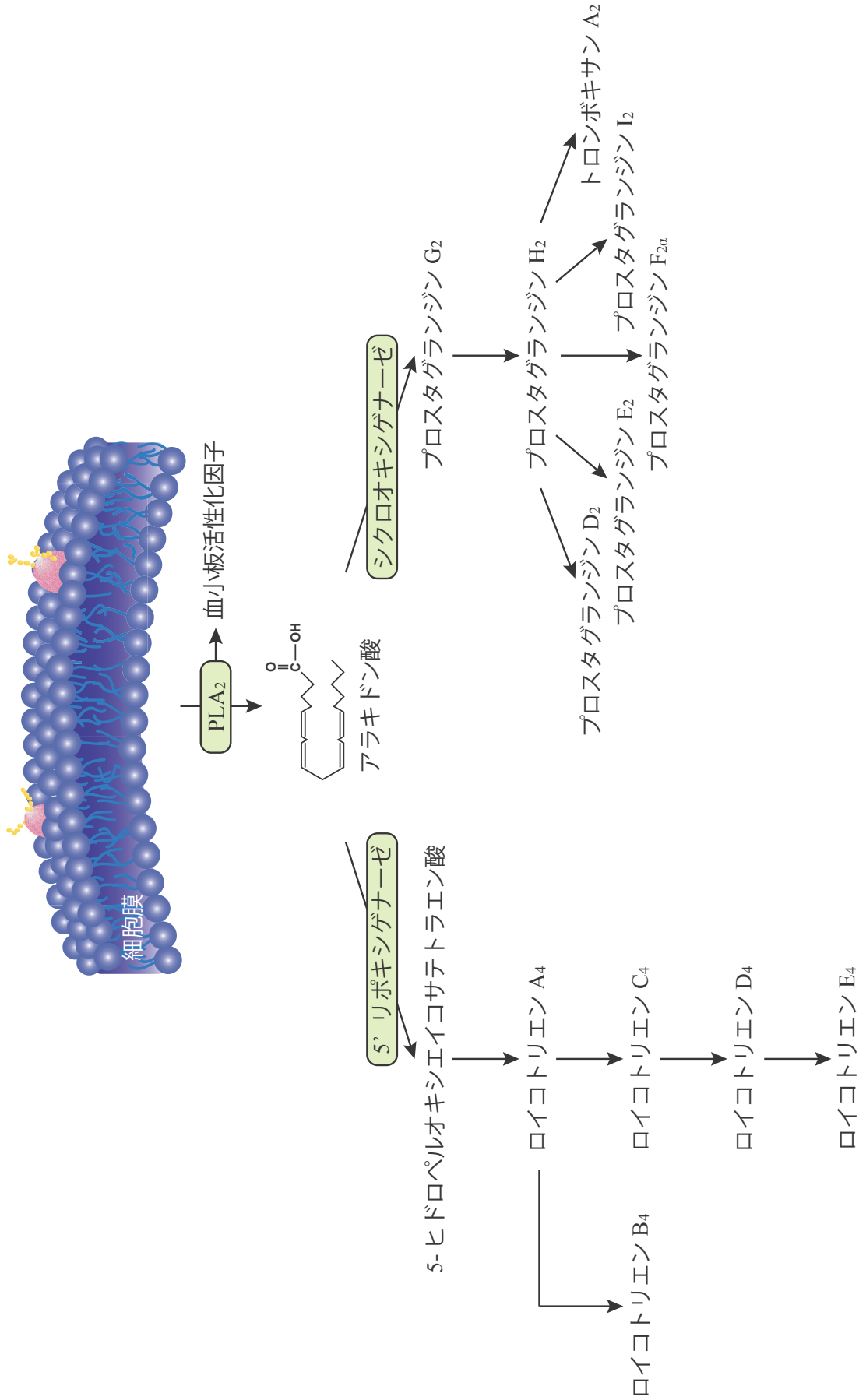


Figure 6. アラキドン酸カスケード



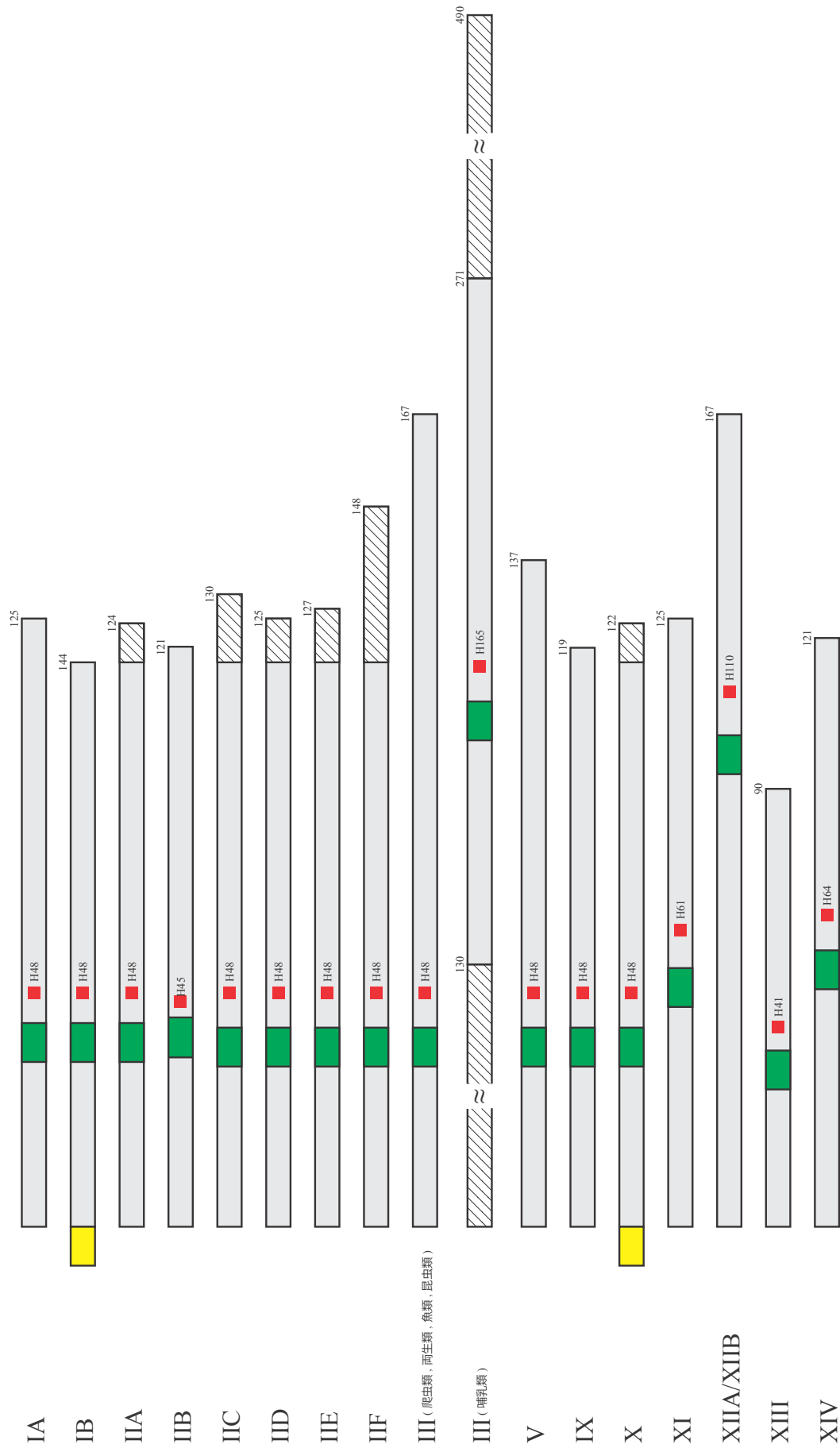


Figure 7. 分泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の構造

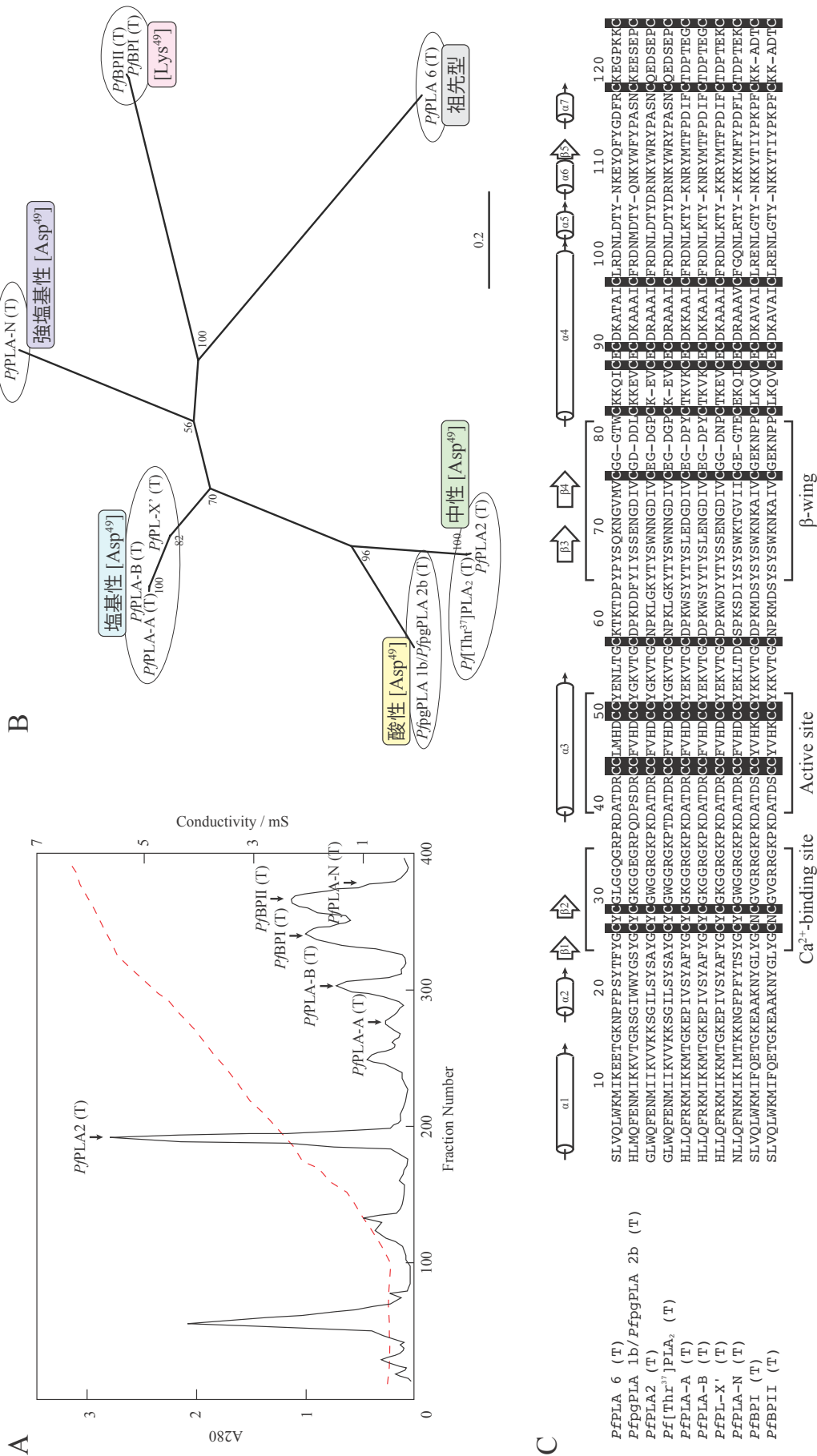


Figure 8. 徳之島に棲息するホンハブから見出された毒 PLA<sub>2</sub> アインゾザイム

(A) 粗毒中分子量画分の陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出プロファイル。(B) 毒 PLA<sub>2</sub> アインゾザイムのアミノ酸配列に基づく系統樹。  
 (C) 毒 PLA<sub>2</sub> アインゾザイムのアミノ酸配列アライメント。黒塗りはシステイン残基を示す。◀α1▶: はαヘリックス, ◀α2▶: はβシートをそれぞれ示す。

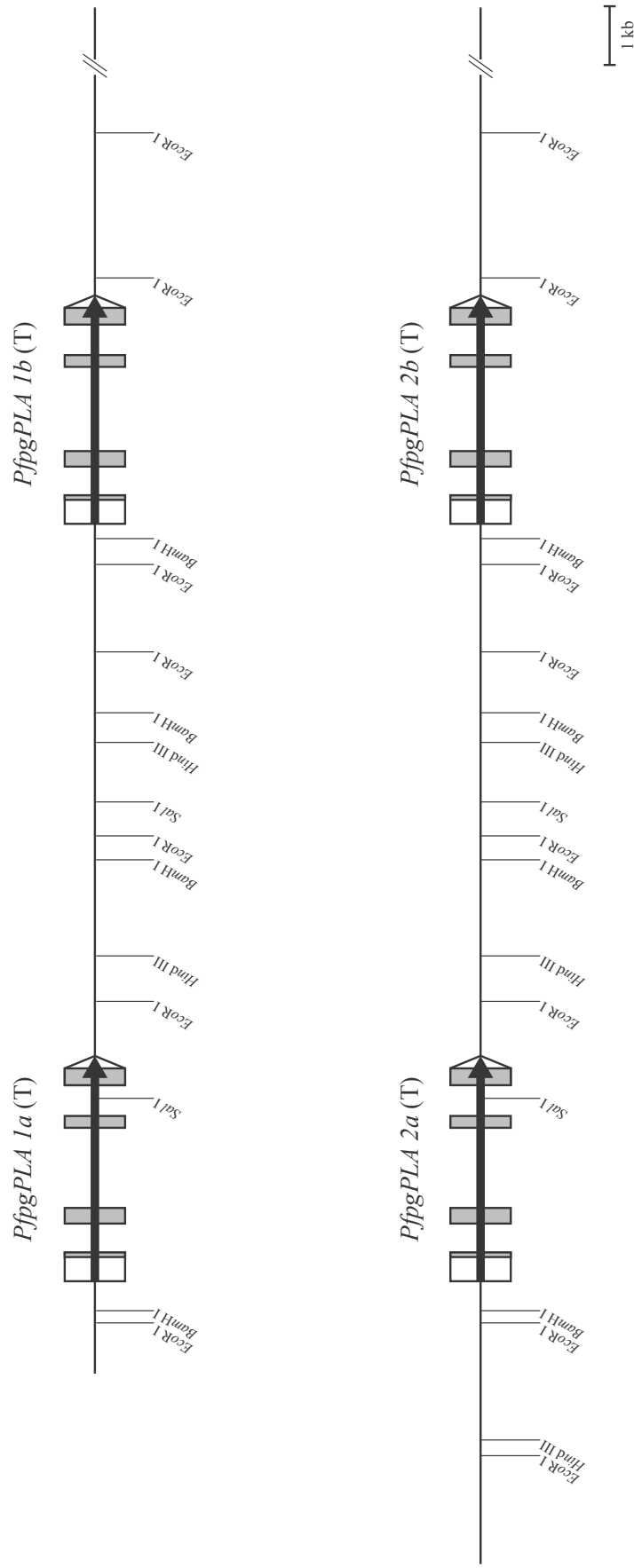


Figure 9. ホンハブ (徳之島) より獲得された毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子を含むゲノム断片  
 ▲ : 遺伝子領域, □ : コーディング領域, □ : 5' UTR, □ : 3' UTR.  
 出典 : Nakashima et al., 1993. Proc Natl Acad Sci U S A. 90, 13, 5964-5968 (一部修正).

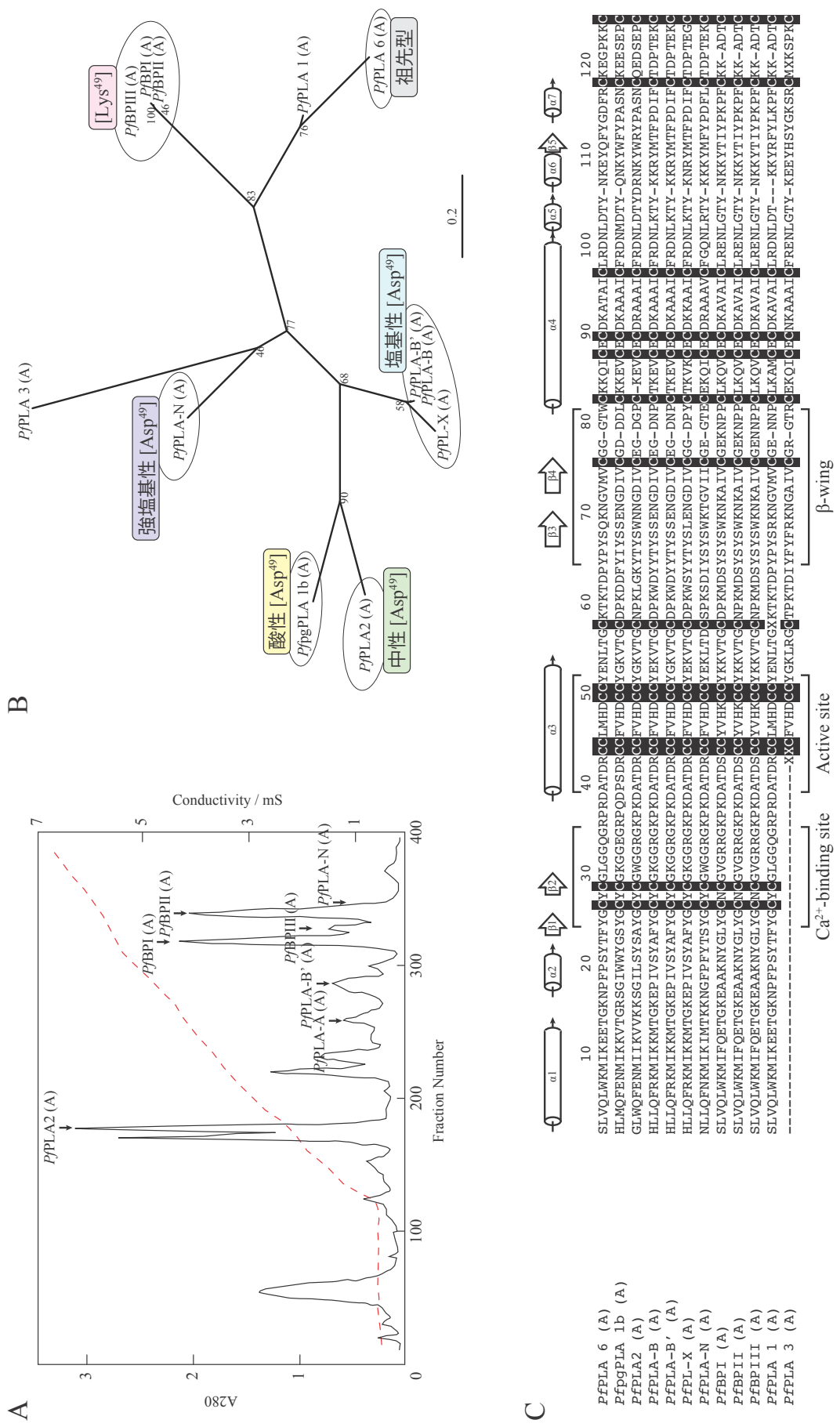


Figure 10. 奄美大島に棲息するホンハブから見出された毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム

(A) 粗毒中分子重量画分の陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出プロファイル。(B) 毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムのアミノ酸配列に基づく系統樹。  
 (C) 毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムのアミノ酸配列アライメント。黒塗りはシステイン残基を示す。◀α1▶: はαヘリックス, ◀β1▶: はβシートをそれぞれ示す。

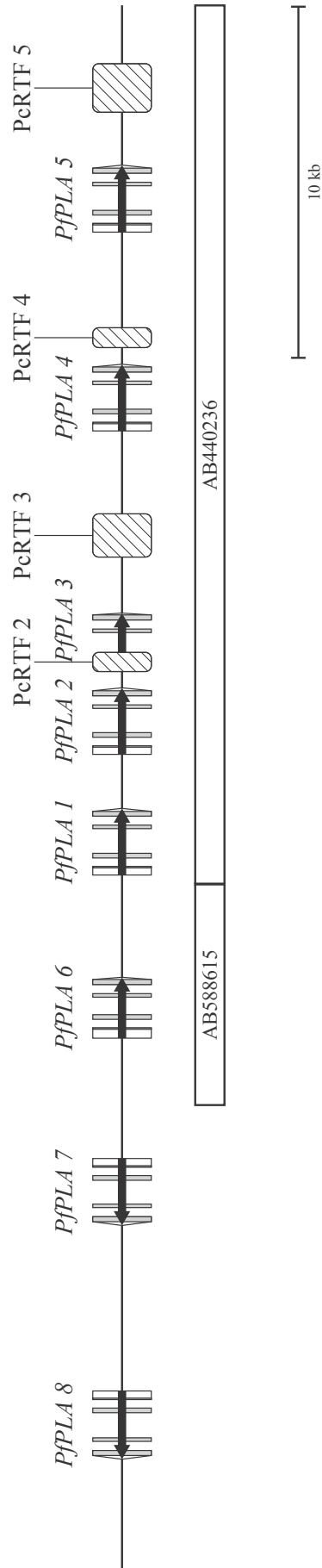


Figure 11. ホンハブ (奄美大島) より獲得された毒 PLA<sub>2</sub> アインザイム 遺伝子を載せたゲノム断片

▲ : 遺伝子領域, ■ : コーディング領域, □ : 5' UTR, ▣ : 3' UTR, ▨ : PcRTF。遺伝子構造図の下の番号と枠はアクセッション No. とその領域を示す。  
 出典 : Ikeda et al., 2010. Gene 461, 1-2, 15-25 (一部修正), Chijiwa et al., 2012. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76, 3, 551-558 (一部修正).

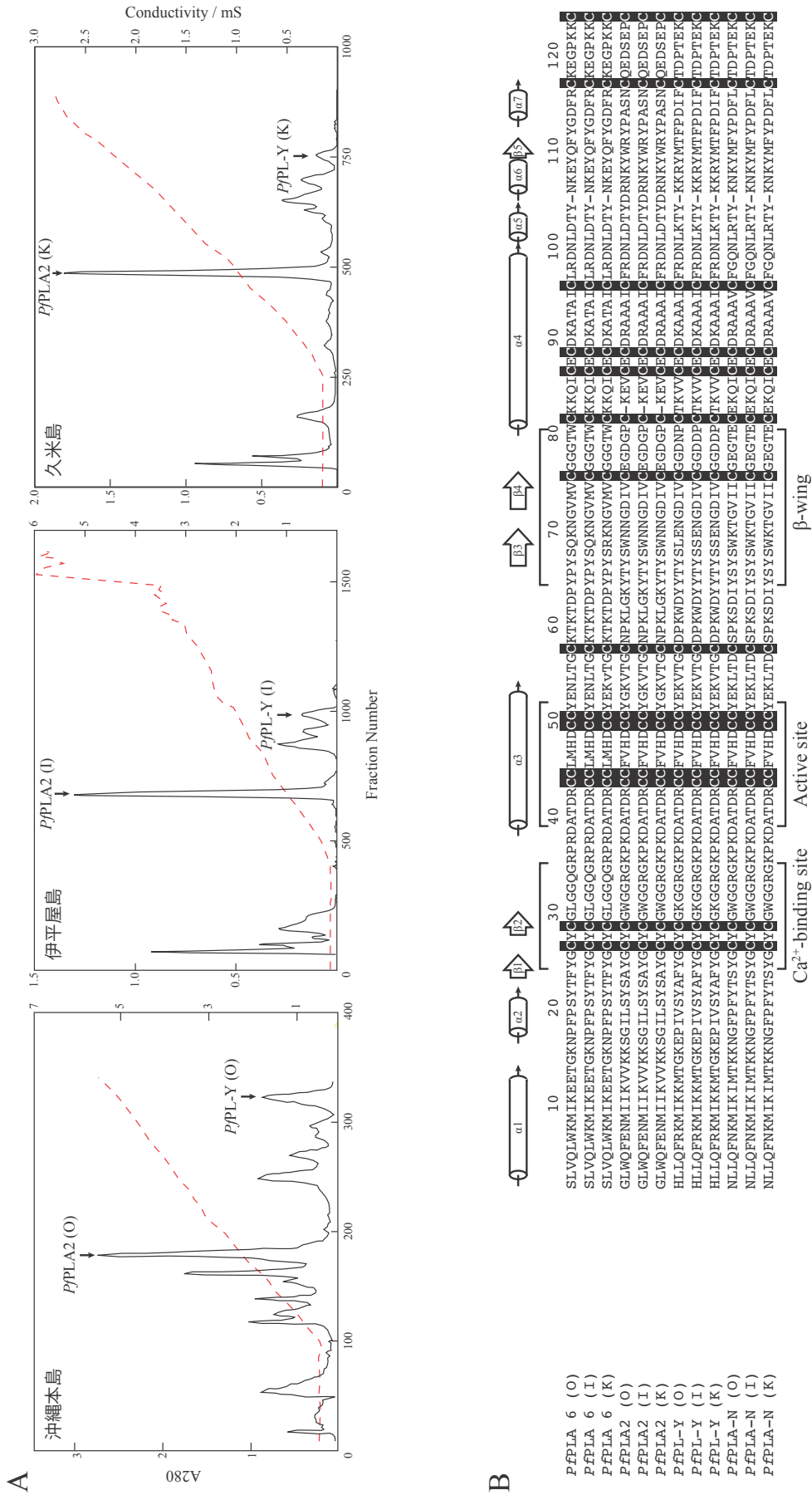


Figure 12. 沖縄本島, 伊平屋島, 久米島に棲息するホンハブから  
見出された毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム

(A) 粗毒中分子重量分の陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出プロファイル。(B) 毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムのアミノ酸配列アライメント。黒塗りはシステイン残基を示す。  
 ◻ : はαヘリックス, ◻ : はβシートをそれぞれ示す。

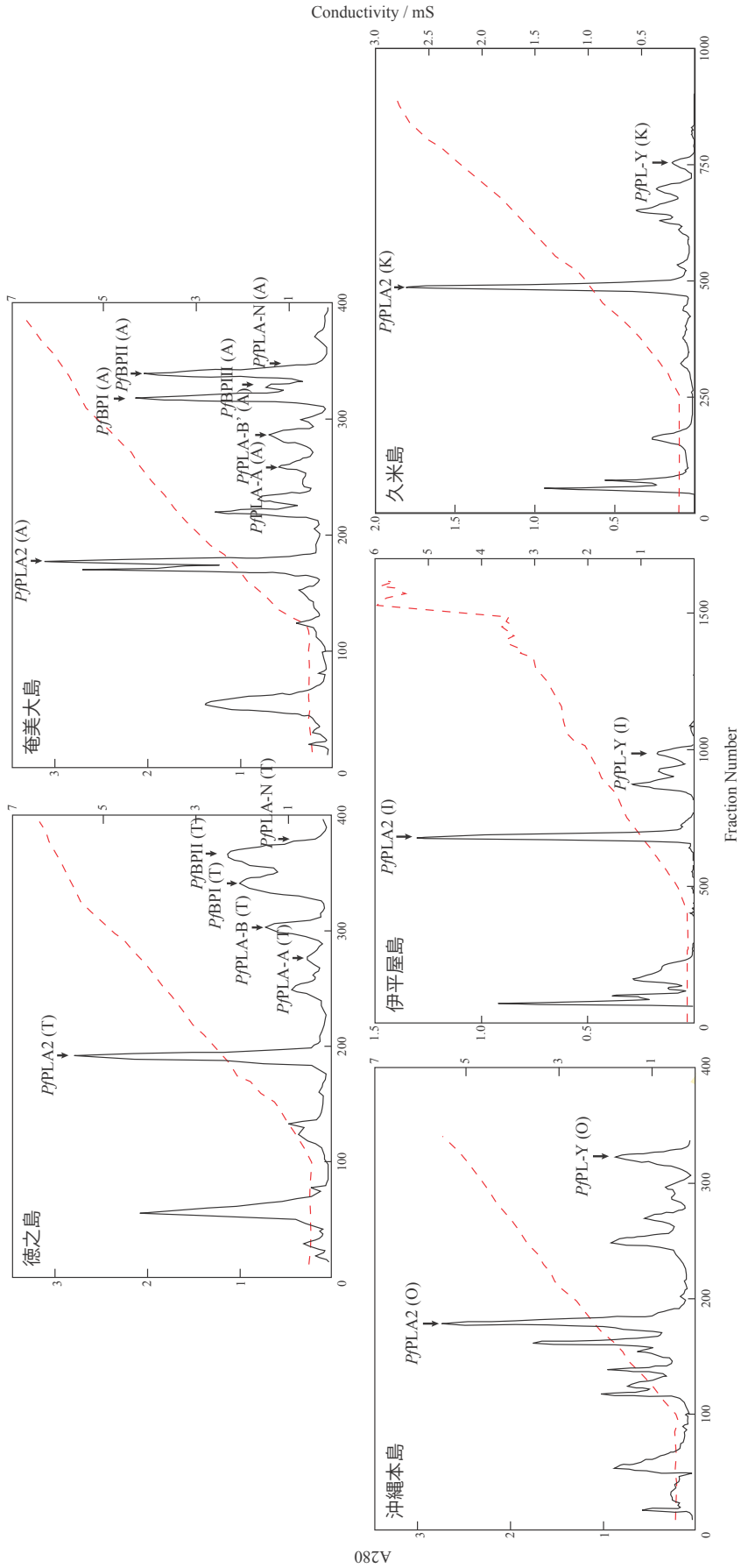


Figure 13. ホンハブ粗毒中分子量画分の陽イオンクロマトグラフィーの  
溶出プロファイル島嶼間比較

ホンハブ  
(奄美大島)



ホンハブ  
(徳之島)



ホンハブ  
(沖縄本島)

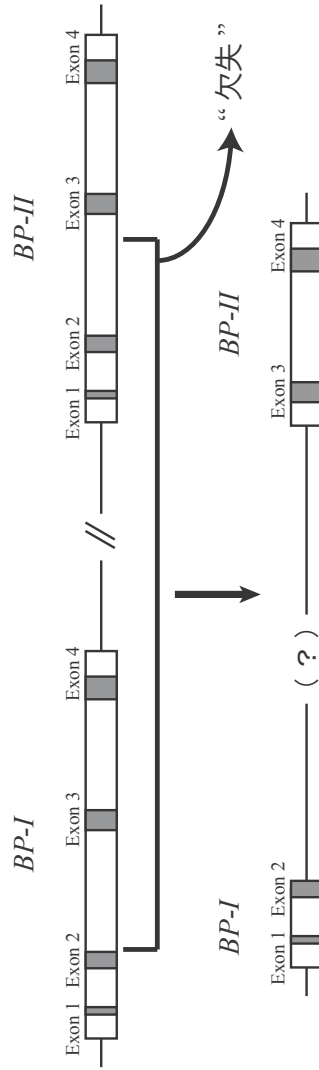


Figure 14. 島嶼特異的なホンハブから見出された [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子群の構造



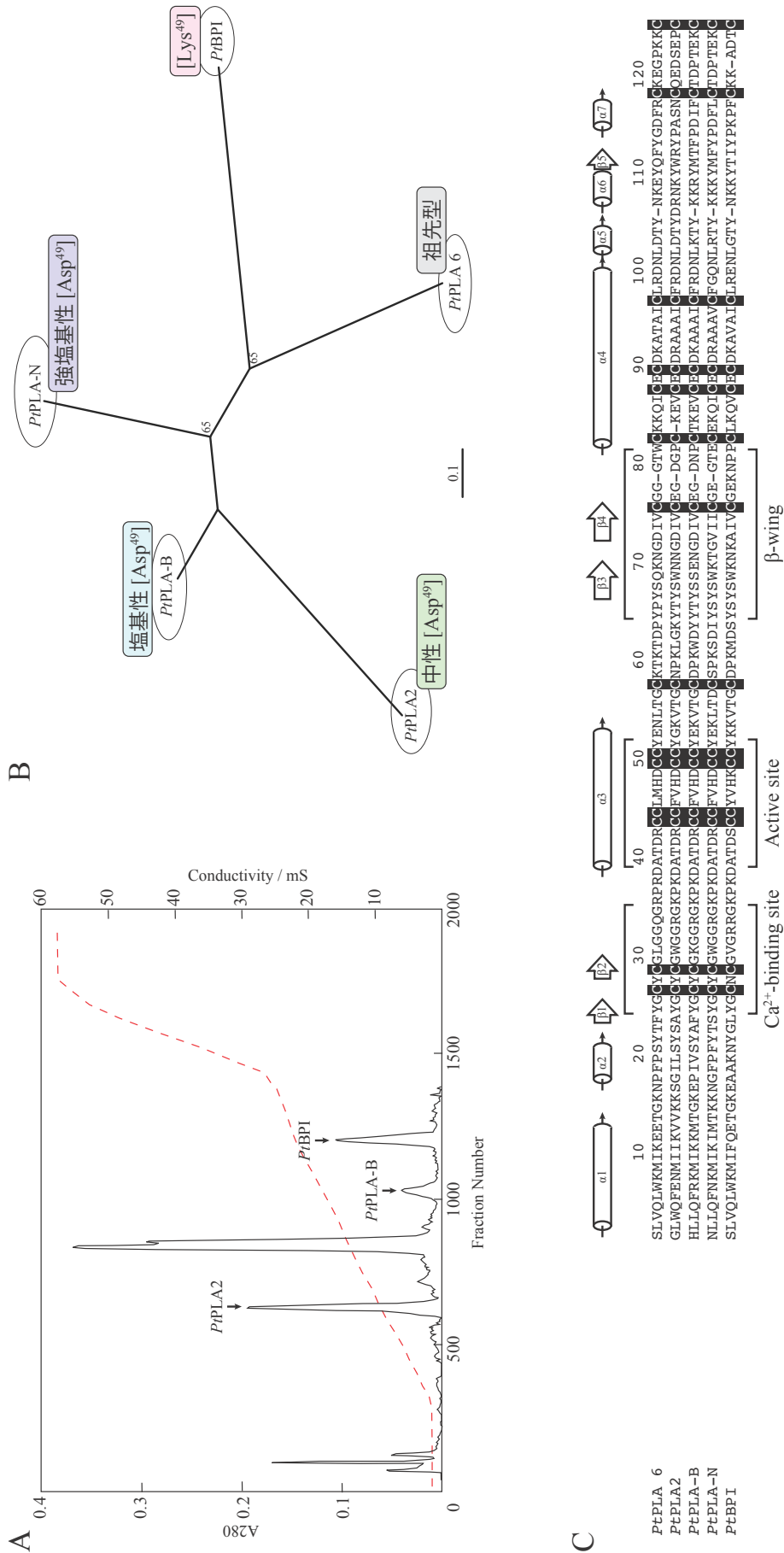


Figure 15. トカラハブから見出された毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム

(A) 粗毒中分子量画分の陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出プロファイル。(B) 毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムのアミノ酸配列に基づく系統樹。  
 (C) 毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイムのアミノ酸配列アライメント。黒塗りはシステイン残基を示す。◻: はαヘリックス, ◻: はβシートをそれぞれ示す。

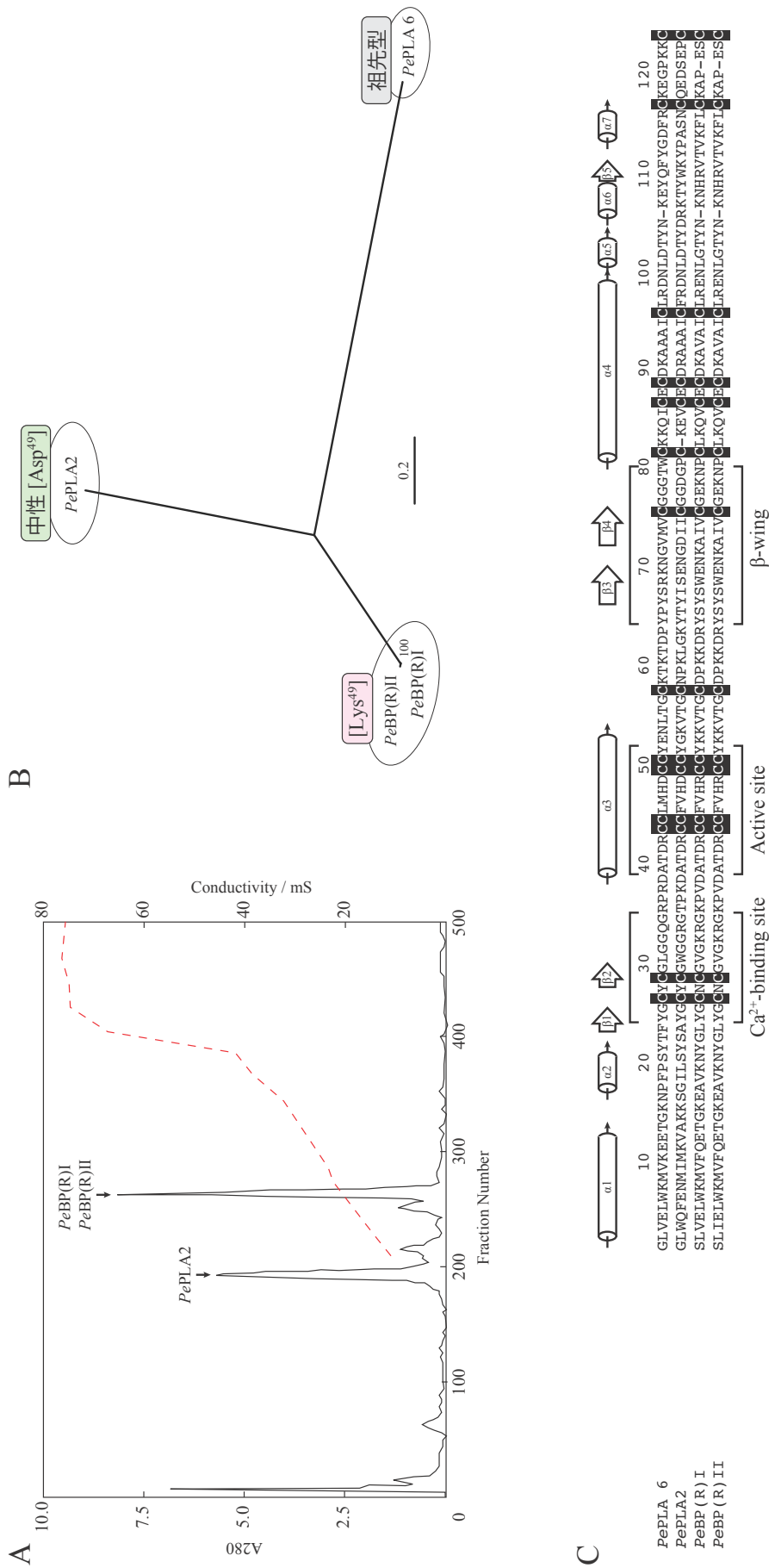


Figure 16. サキシマハブから見出された毒 PLA<sub>2</sub> アインザイム

(A) 粗毒中分子画面分の陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出プロファイル。(B) 毒 PLA<sub>2</sub> アインザイムのアミノ酸配列に基づく系統樹。  
 (C) 毒 PLA<sub>2</sub> アインザイムのアミノ酸配列アライメント。黒塗りはシステイン残基を示す。☐はαヘリックス、☐はβシートをそれぞれ示す。

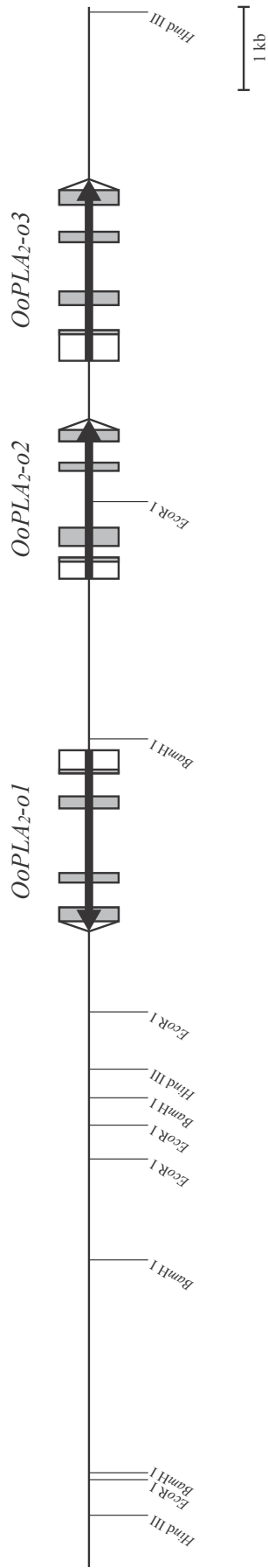


Figure 17. ヒメハブより獲得された毒 PLA<sub>2</sub> アインザイム遺伝子を含むゲノム断片予測図

▲ : 遺伝子領域, ■ : コーディング領域, □ : 5' UTR, ◇ : 3' UTR.  
 出典 : Nobuhisa et al., 1996. Gene 172, 2, 267-272 (一部修正)

<i>K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub> ratio</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>PpPLA 6</i>										
2. <i>PfpgPLA 1b (A)</i>	1.2193									
3. <i>PpPLA2 (A)</i>	1.0929	0.8366								
4. <i>PpPLA-B (A)</i>	1.0872	1.2135	0.8997							
5. <i>PpPLA-B' (A)</i>	1.1132	1.1950	0.8871	Infinity						
6. <i>PpPLA-N (A)</i>	1.0411	0.9838	0.8669	1.0464	1.0754					
7. <i>PfBP-II (A)</i>	1.1186	1.7969	1.1016	1.1626	1.1900	1.1043				
8. <i>PfBP-III (A)</i>	1.2010	1.8068	1.1797	1.2583	1.2879	1.1843	0.0000			
9. <i>OoPLA<sub>2</sub>-o1</i>	1.1463	0.4670	0.6462	1.1969	1.1821	1.0813	1.0520	1.1183		
10. <i>OoPLA<sub>2</sub>-o2</i>	0.2146	1.2044	1.5547	1.7295	1.7701	1.2201	1.3035	1.4059	1.3040	
11. <i>OoPLA<sub>2</sub>-o3</i>	1.4899	1.4441	1.0484	1.4211	1.4565	1.7453	0.9495	1.0505	1.1948	1.5591

<i>K<sub>A</sub> value</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>PpPLA 6</i>										
2. <i>PfpgPLA 1b (A)</i>	0.2853									
3. <i>PpPLA2 (A)</i>	0.3052	0.1705								
4. <i>PpPLA-B (A)</i>	0.2471	0.1908	0.2078							
5. <i>PpPLA-B' (A)</i>	0.2518	0.1871	0.2039	0.0031						
6. <i>PpPLA-N (A)</i>	0.2279	0.2627	0.2318	0.1855	0.1897					
7. <i>PfBP-II (A)</i>	0.2806	0.3203	0.2908	0.2538	0.2586	0.2908				
8. <i>PfBP-III (A)</i>	0.2810	0.3207	0.2911	0.2541	0.2589	0.2911	0.0000			
9. <i>OoPLA<sub>2</sub>-o1</i>	0.3120	0.1300	0.1970	0.2343	0.2303	0.3007	0.3448	0.3452		
10. <i>OoPLA<sub>2</sub>-o2</i>	0.0290	0.2884	0.2990	0.2500	0.2547	0.2249	0.2930	0.2934	0.3202	
11. <i>OoPLA<sub>2</sub>-o3</i>	0.2624	0.2351	0.2592	0.2241	0.2287	0.3079	0.1452	0.1453	0.2808	0.2609

<i>K<sub>S</sub> value</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>PpPLA 6</i>										
2. <i>PfpgPLA 1b (A)</i>	0.2340									
3. <i>PpPLA2 (A)</i>	0.2793	0.2038								
4. <i>PpPLA-B (A)</i>	0.2273	0.1573	0.2309							
5. <i>PpPLA-B' (A)</i>	0.2262	0.1565	0.2298	0.0000						
6. <i>PpPLA-N (A)</i>	0.2189	0.2670	0.2674	0.1773	0.1764					
7. <i>PfBP-II (A)</i>	0.2509	0.1782	0.2639	0.2183	0.2173	0.2908				
8. <i>PfBP-III (A)</i>	0.2339	0.1775	0.2468	0.2020	0.2010	0.2458	0.0118			
9. <i>OoPLA<sub>2</sub>-o1</i>	0.2722	0.2784	0.3049	0.1958	0.1949	0.2781	0.3278	0.3087		
10. <i>OoPLA<sub>2</sub>-o2</i>	0.1352	0.2395	0.1923	0.1445	0.1439	0.1844	0.2248	0.2086	0.2455	
11. <i>OoPLA<sub>2</sub>-o3</i>	0.1761	0.1628	0.2472	0.1577	0.1570	0.1764	0.1529	0.1383	0.2350	0.1674

Figure 18. ハブ毒 PLA<sub>2</sub> アインザイム遺伝子の非同義置換と同義置換の比 (*K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub>*)

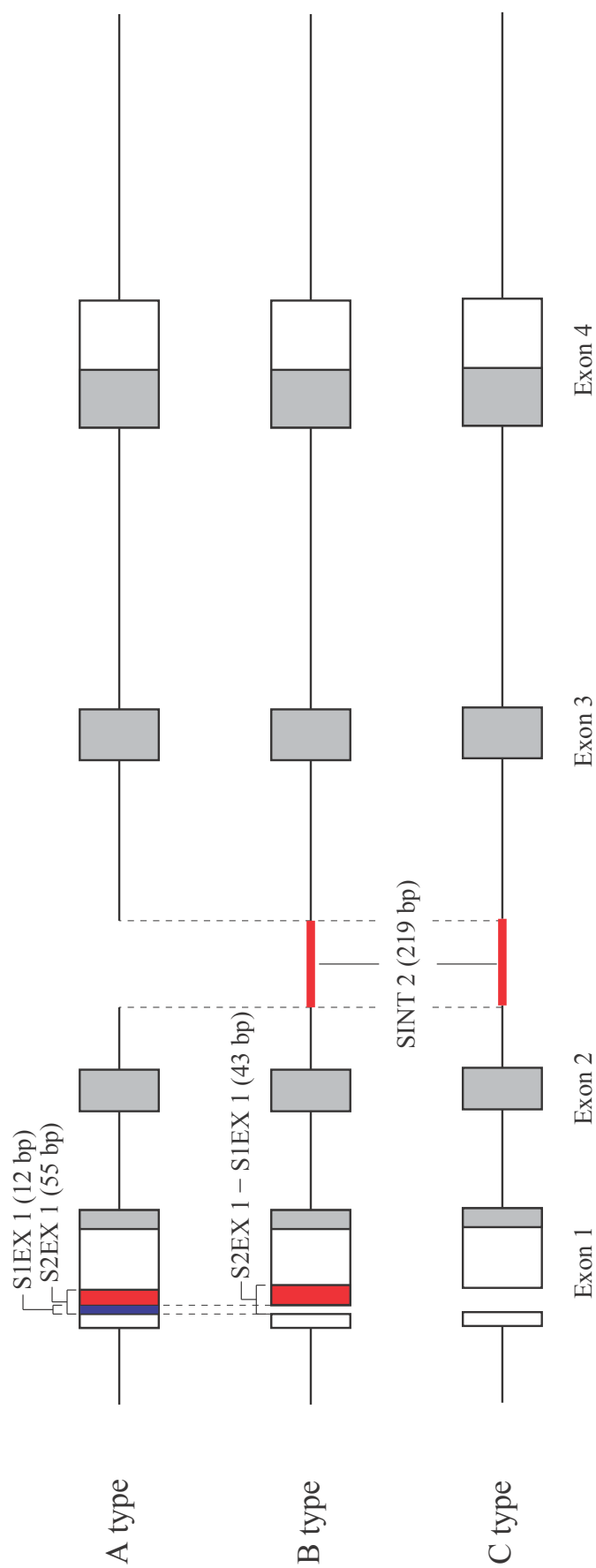


Figure 19. クサリヘビ科ヘビの IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の構造

■ : コーディング領域, □ : UTR. 出典 : Chijiwa et al., 2012. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76, 3, 551-558 (一部修正).

A

<i>Scomb-4</i>	12283	GGGAGGGGGCTGCAGAGAGGAGGAGGGAGGGAGGGA	12319
<i>Scomb-5</i>	17944	.....	17980
<i>Scomb-Mj</i>	513	.....	549

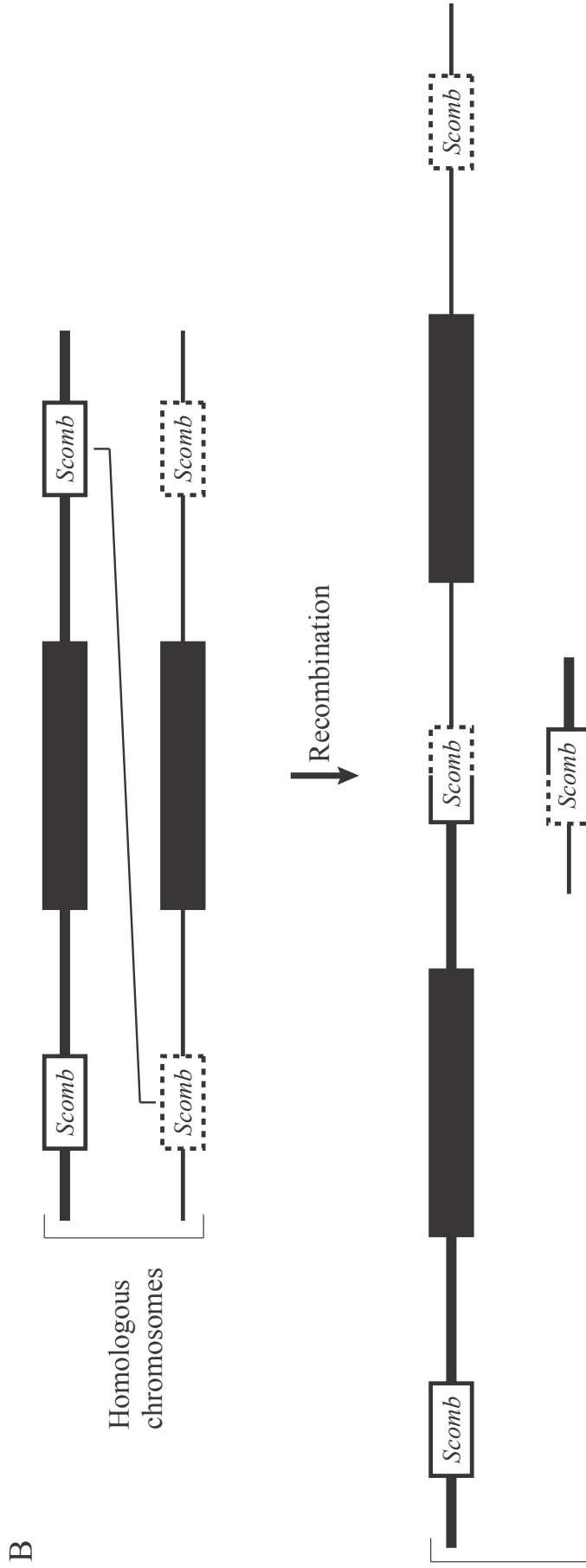


Figure 20. *Scomb* 配列による組み換えモデル

(A) *Scomb* 配列アラインメント。 *Scomb-4* と *Scomb-5* はそれぞれ *PPPLA 4* と *PPPLA 5* 遺伝子の上流に存在する。 *Scomb-Mj* はモハーベガラガラヘビ (*Crotalus scutulatus*) の *Mojave toxin* 遺伝子上流に存在する。(B) *Scomb* 配列を介した組み換えモデル。黒塗りは *Scomb* に挟まれている毒 *PLA<sub>2</sub>* 遺伝子と *PeRTF* を示す。  
 出典： Ikeda et al., 2010. Gene 461, 1-2, 15-25 (一部修正)

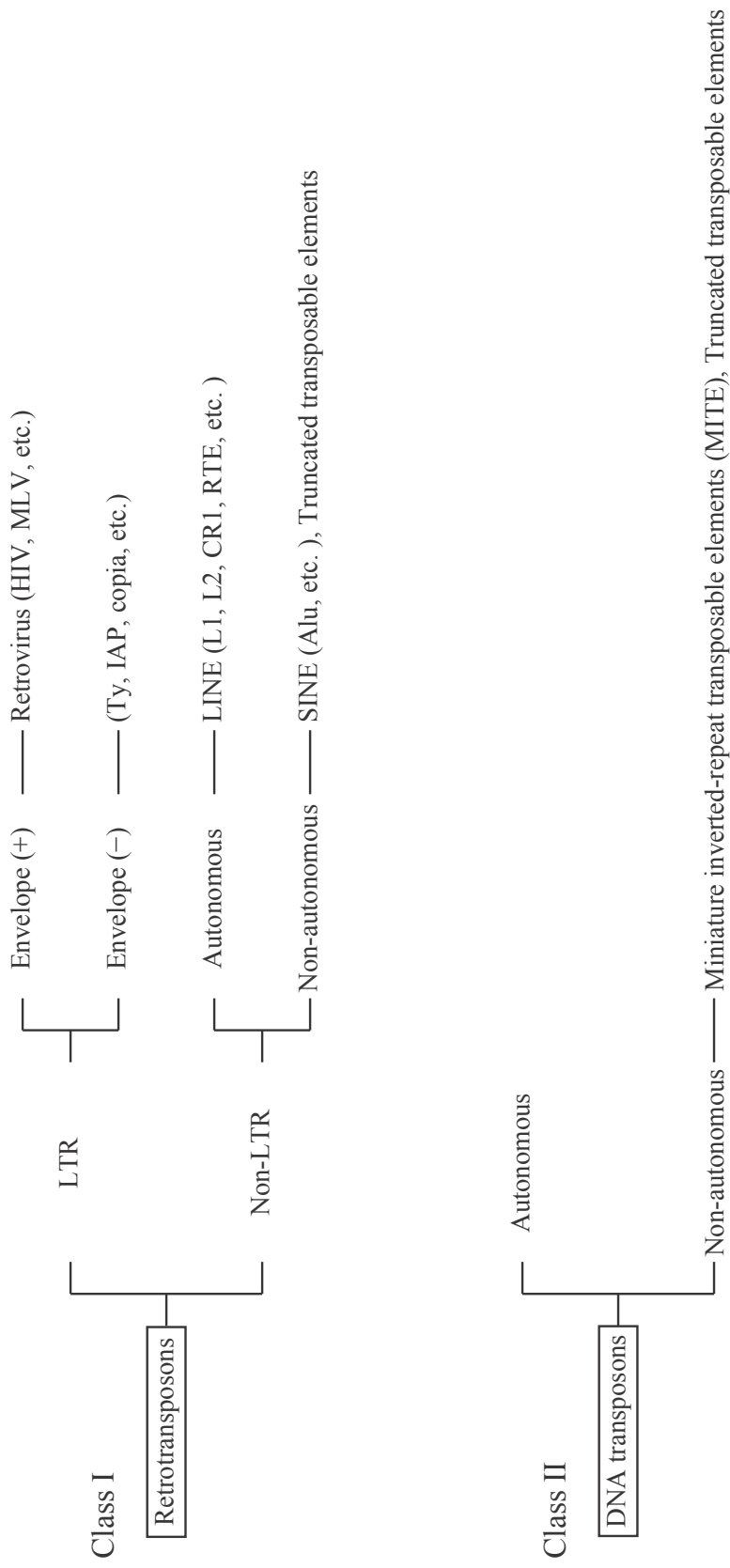


Figure 21. ゲノムに含まれる転移因子群の分類

出典：Cordaux and Batzer, 2009. Nat. Rev. Genet. 10, 10, 691-703 (一部修正)。

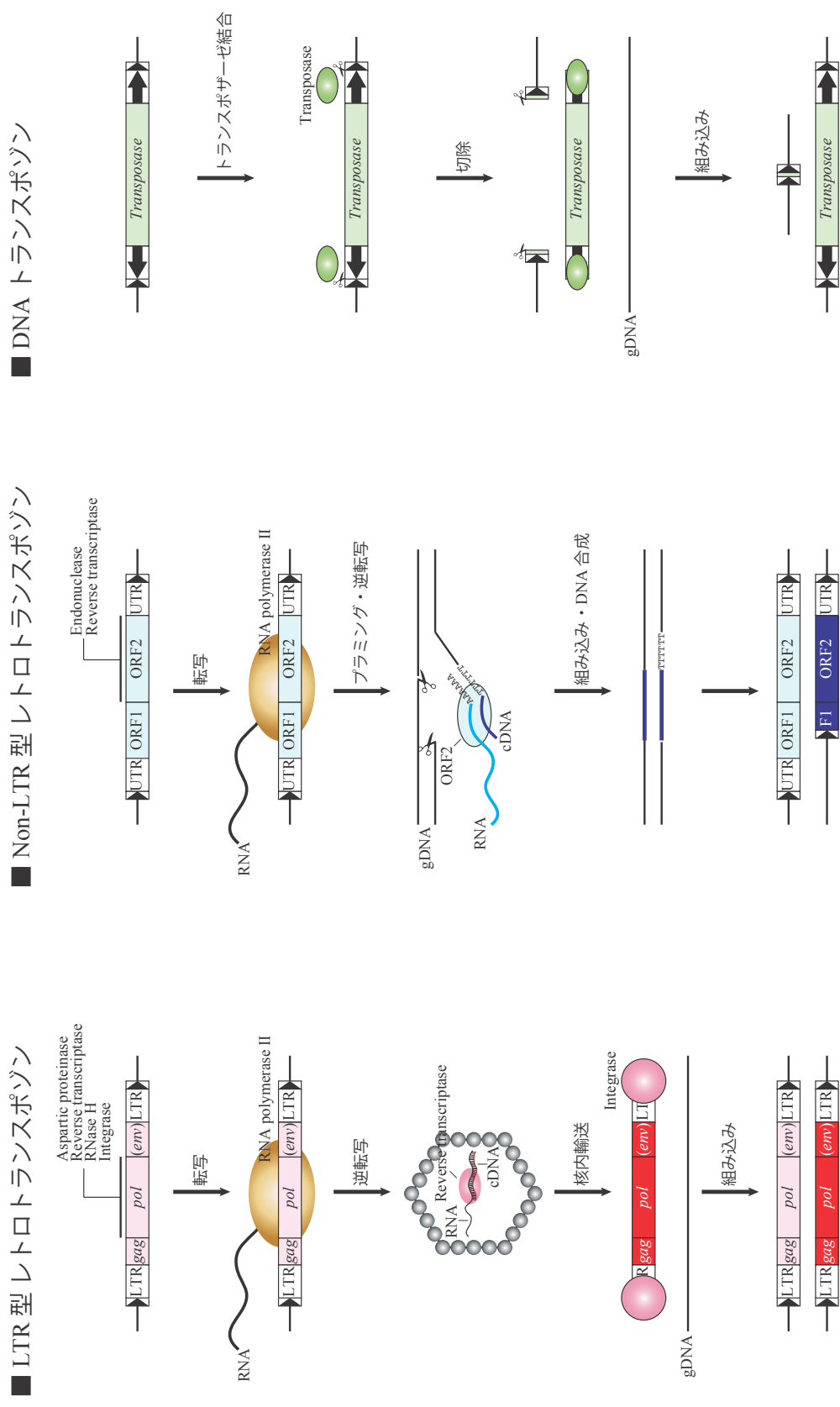


Figure 22. トランスポゾンの転移機序

*env*, *Envelope*; *gag*, *group specific antigen*; LTR, Long Terminal Repeat; ORF, Open reading frame; *pol*, *polymerase*; UTR, Untranslated region. 矢印は ITR, Inverted terminal repeat, 三角形は TSD, Tandem site duplication を示す。出典：Levin and Moran, 2011.Nat. Rev. Genet. 12, 9, 615-627 (一部修正)。



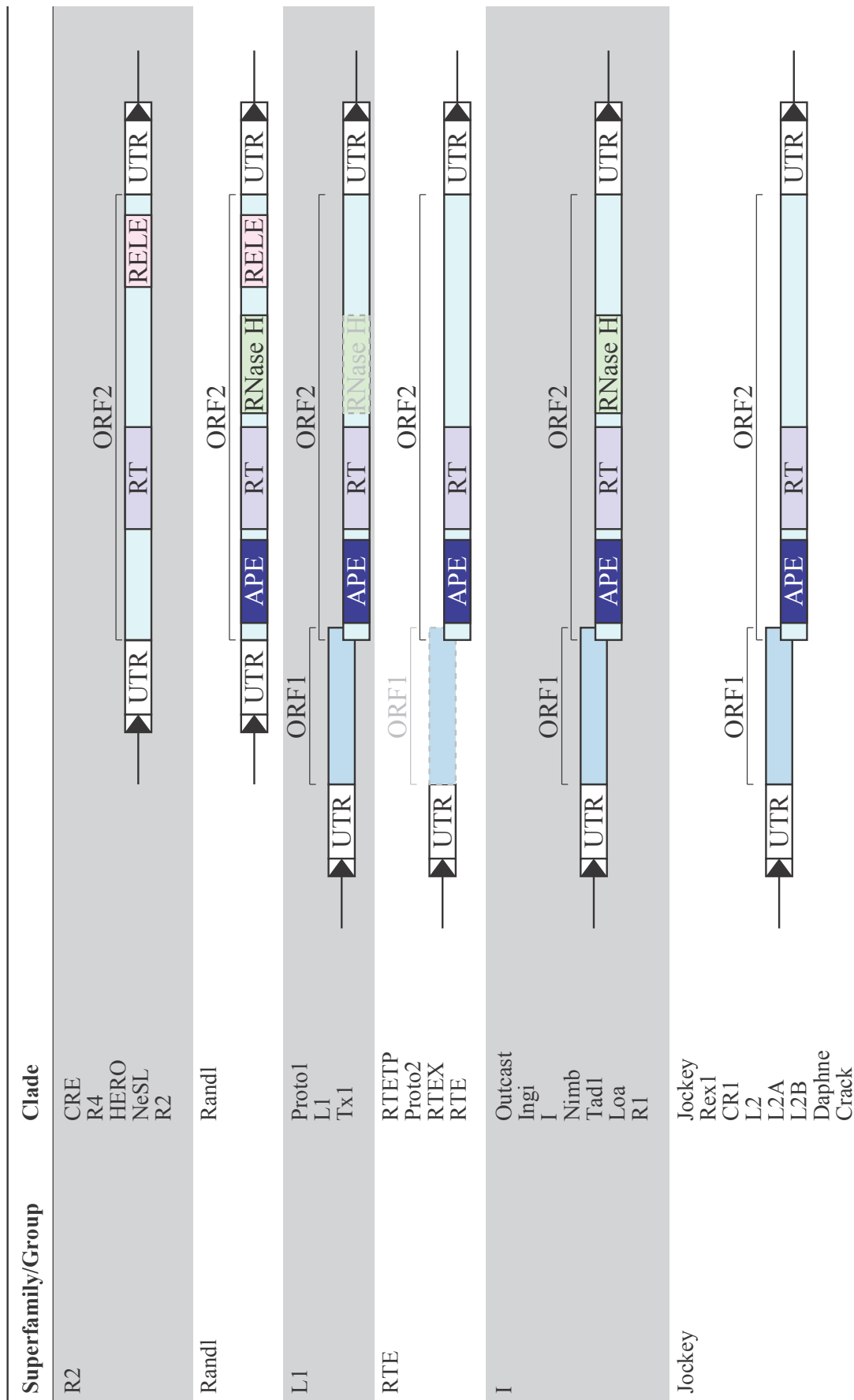


Figure 23. Non-LTR 型 LINE の分類と構造

APE, Apurinic/apyrimidinic endonuclease; RELE, Restriction enzyme like endonuclease. 出典 : Kapitonov et al., 2009. *Gene* 448, 2, 207-213. (一部修正), Kojima and Fujiwara, 2005. *Genome Res.* 15, 8, 1106-1117. (一部修正), Malik et al., 1999. *Mol. Biol. Evol.* 16, 6, 793-805. (一部修正), Permyer et al., 2006. *Int. J. Biol. Sci.* 2, 2, 48-53. (一部修正).

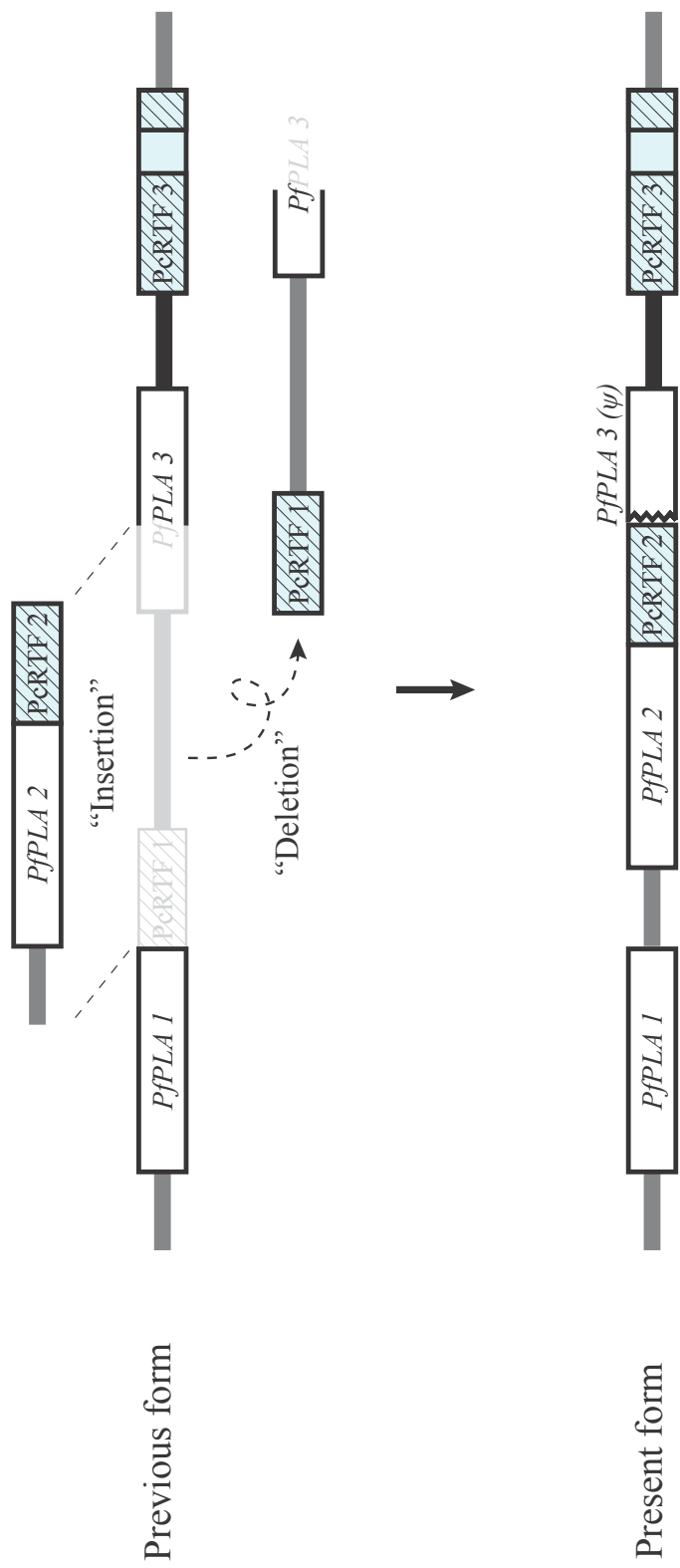


Figure 24. ハブ毒 PLA2 アインザイム遺伝子の挿入と欠失モデル

出典：Ikeda et al., 2010. Gene 461, 1-2, 15-25 (一部修正).

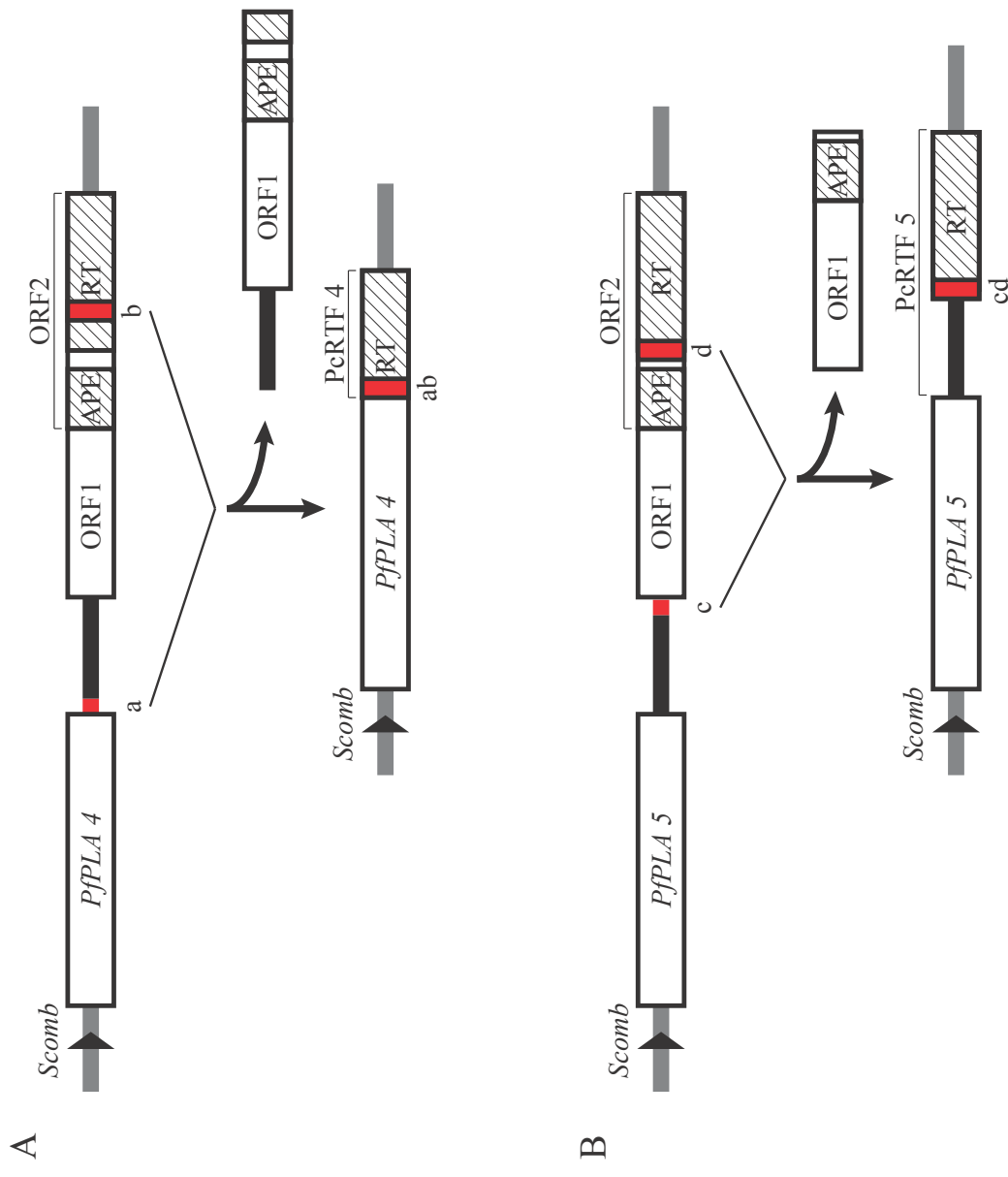


Figure 25. PcRTF 4 及び PcRTF 5 の Truncate プロセスのモデル

黒太線は接続配列 (connective sequence) を示し、赤領域は接続配列及び RT ドメインに存在する相同断片配列を示す。  
 出典：Ikeda et al., 2010. Gene 461, 1-2, 15-25 (一部修正)

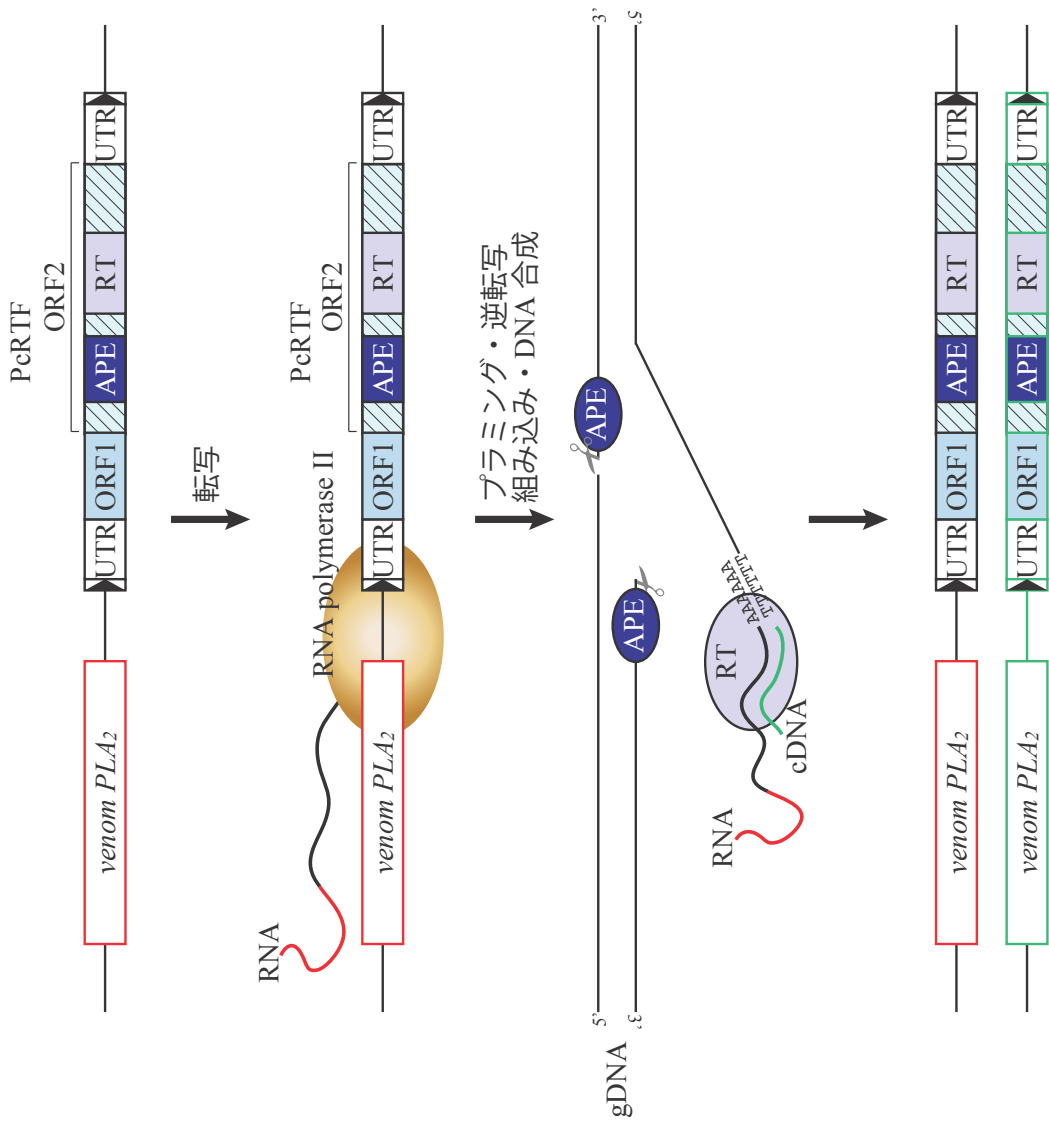
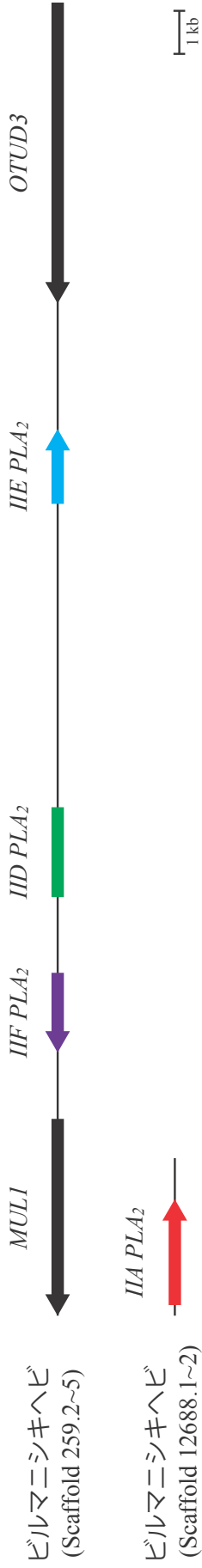


Figure 26. 5' Transduction によるハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム遺伝子の多重化モデル





ビルマニシキヘビ  
(Scaffold 12688.1~2)

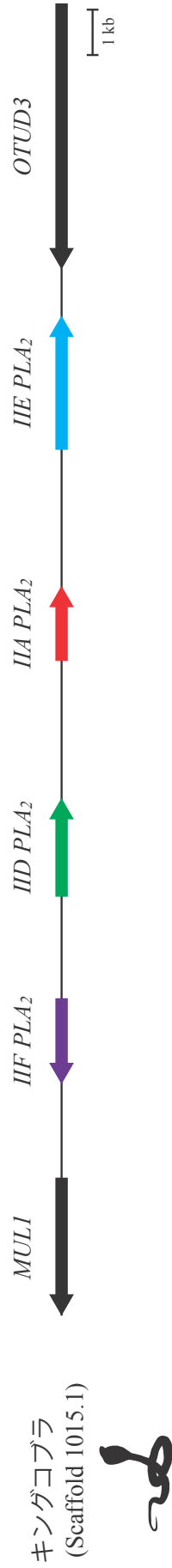


Figure 28. ビルマニシキヘビとキングコブラの分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター

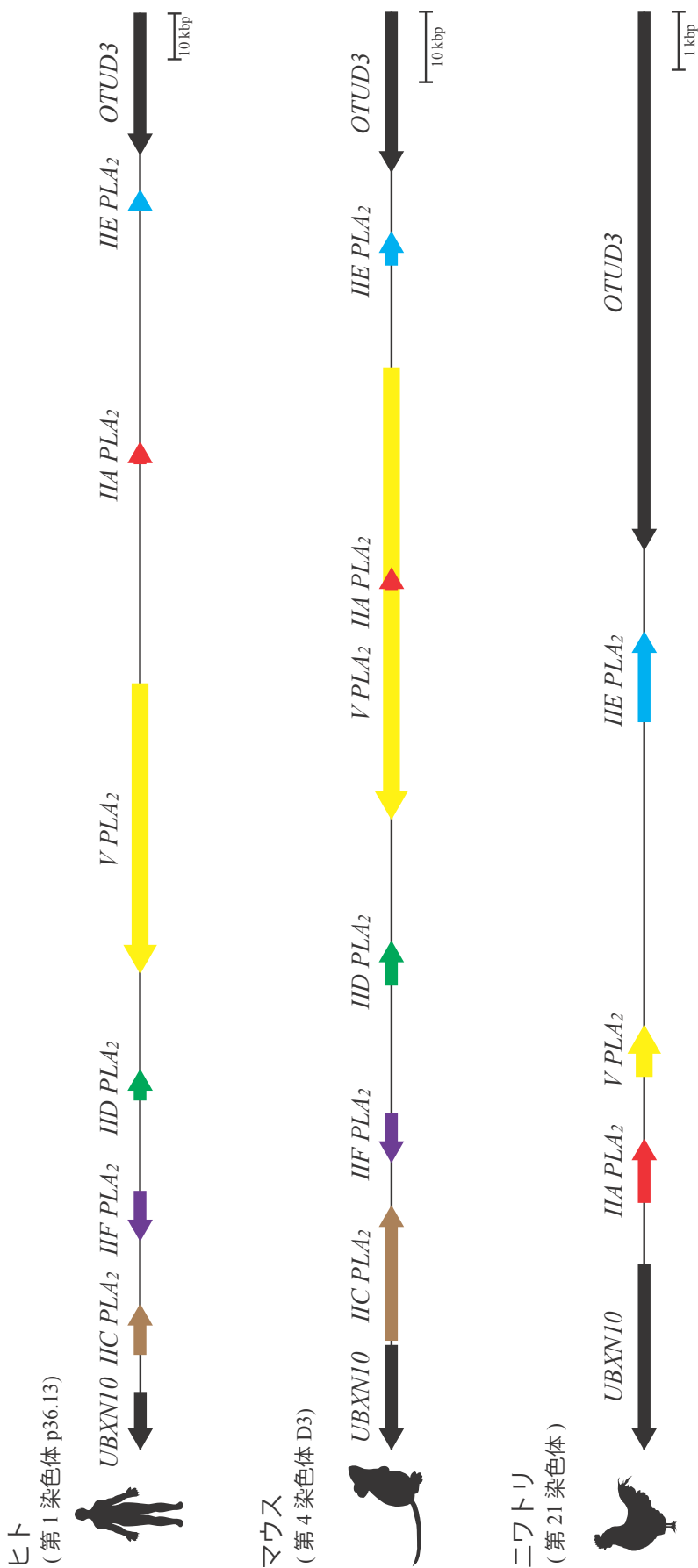
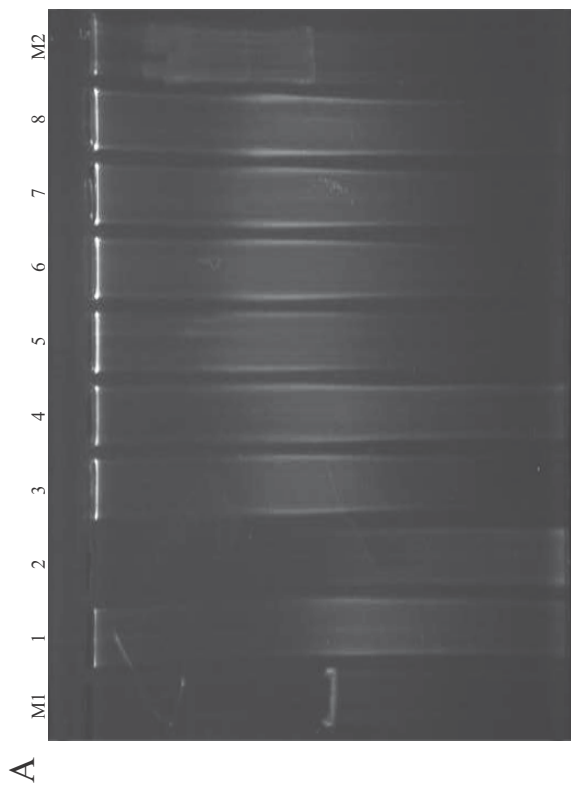
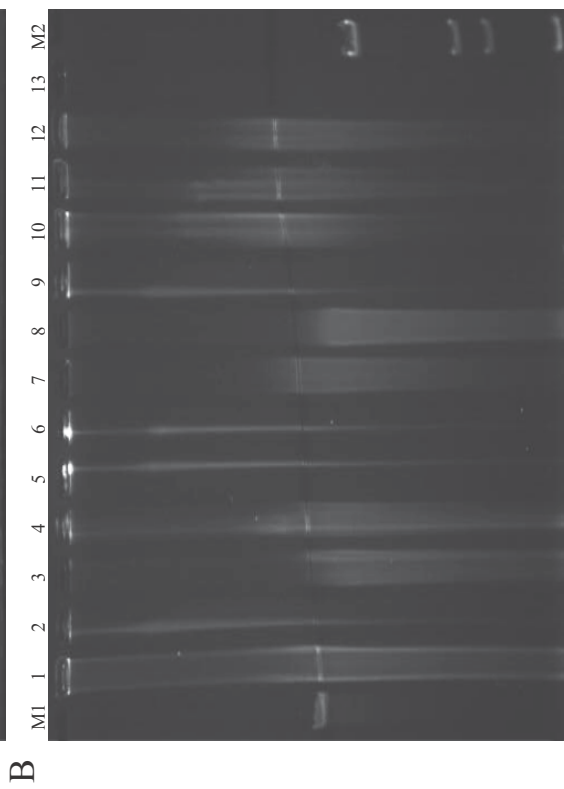


Figure 29. 哺乳類・鳥類の分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター



ゲル : SeaPlaque® GTG® Agarose  
 ゲル濃度 : 1% (w/v)  
 泳動バッファー : 1×TAE / バッファー  
 泳動温度 : 16°C  
 分画サイズ : 5~100 kb  
 泳動時間 : 15 時間 16 分

M1:	T7 control DNA	分子量マーカー (40 kb)	100 ng
1:	ホシハブ (奄美大島)	No. 1	ゲノム DNA
2:	ホシハブ (奄美大島)	No. 2	ゲノム DNA
3:	ホシハブ (奄美大島)	No. 3	ゲノム DNA
4:	ホシハブ (奄美大島)	No. 4	ゲノム DNA
5:	ホシハブ (奄美大島)	No. 5	ゲノム DNA
6:	ホシハブ (奄美大島)	No. 5	ゲノム DNA シェアリング 2 回
7:	ホシハブ (奄美大島)	No. 5	ゲノム DNA シェアリング 3 回
8:	ホシハブ (奄美大島)	No. 5	ゲノム DNA シェアリング 4 回
M2:	λDNA (48.5 kb)	300 ng	



M1:	T7 control DNA	分子量マーカー (40 kb)	100 ng
1:	トカラハブ (小宝島)	No. 10	ゲノム DNA
2:	トカラハブ (小宝島)	No. 11	ゲノム DNA
3:	トカラハブ (小宝島)	No. 12	ゲノム DNA
4:	トカラハブ (小宝島)	No. 13	ゲノム DNA
5:	トカラハブ (小宝島)	No. 14	ゲノム DNA
6:	トカラハブ (小宝島)	No. 15	ゲノム DNA
7:	ヒメハブ (奄美大島)	No. 17	ゲノム DNA
8:	ヒメハブ (奄美大島)	No. 18	ゲノム DNA
9:	ヒメハブ (奄美大島)	No. 19	ゲノム DNA
10:	ヒメハブ (奄美大島)	No. 20	ゲノム DNA
11:	ヒメハブ (奄美大島)	No. 21	ゲノム DNA
12:	ヒメハブ (奄美大島)	No. 22	ゲノム DNA
13:	ヒメハブ (奄美大島)	No. 23	ゲノム DNA
M2:	λSty I 分子量マーカー	0.2 μg	

Figure 30. PFGE によるゲノムサイズの確認



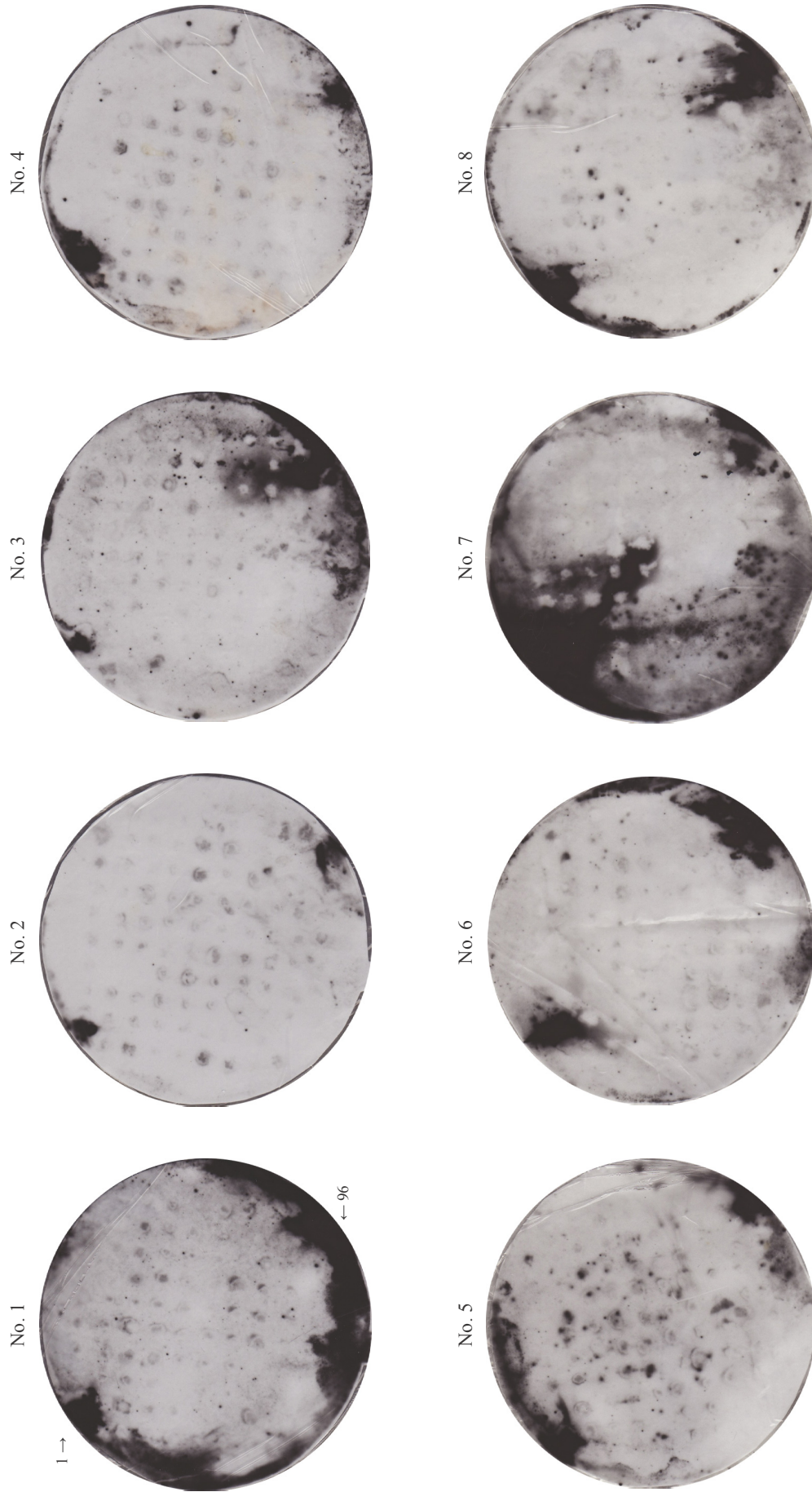


Figure 31. ホンハブゲノムライブラリーに対するコロニーハイブリダイゼーション

プレート No. 1~25 の左上と右下, プレート No. 21~55 の上と下の陽性スポットはポジティブコントロール (NIS-1 クローン) のシグナルである。

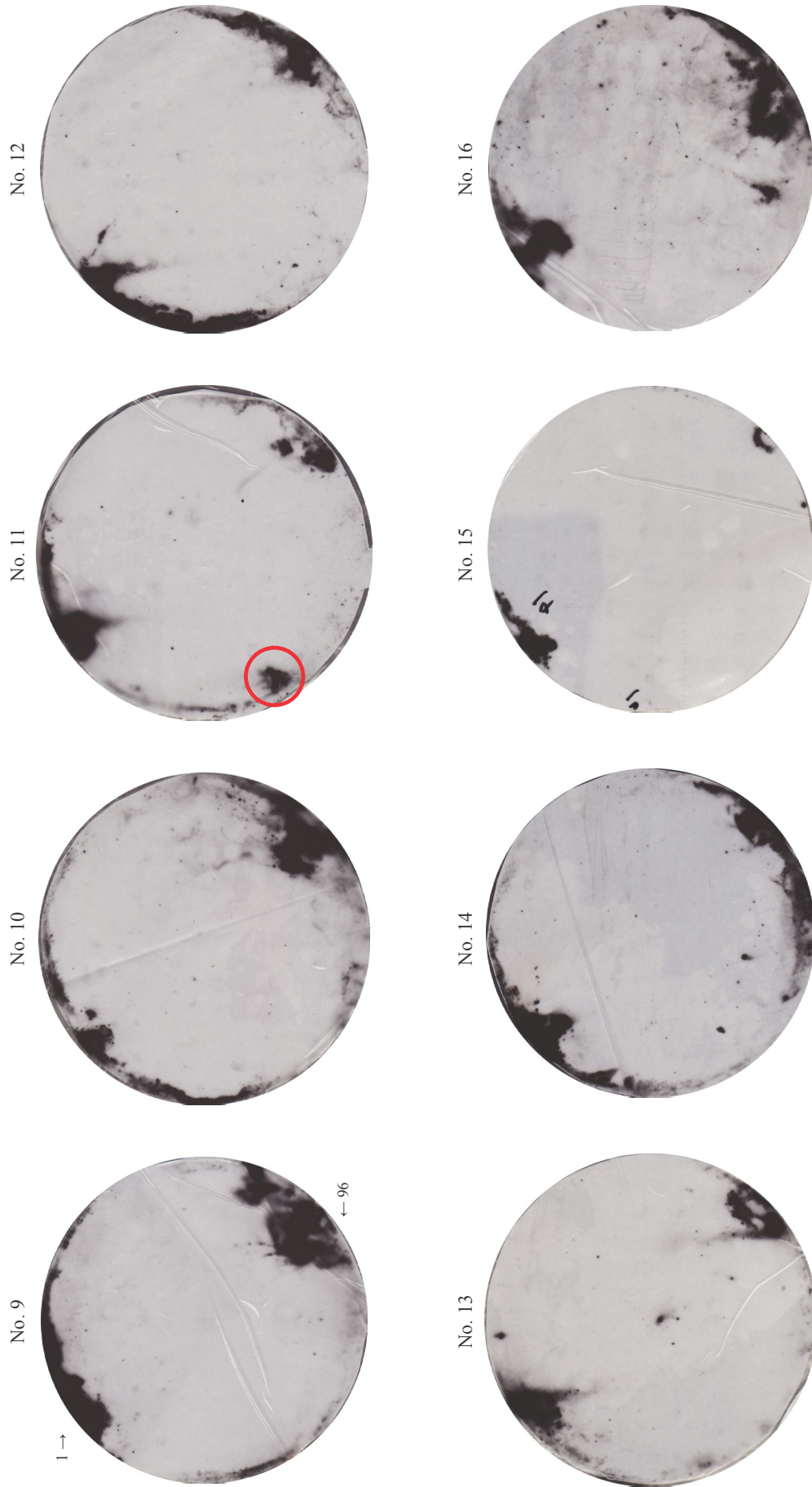


Figure 31. ホンハブゲノムライブラリーに対するコロニーハイブリダイゼーション

プレート No. 1~25の左上と右下, プレート No. 21~55の上と下の陽性スポットはポジティブコントロール(NIS-1 クローム)のシグナルである。

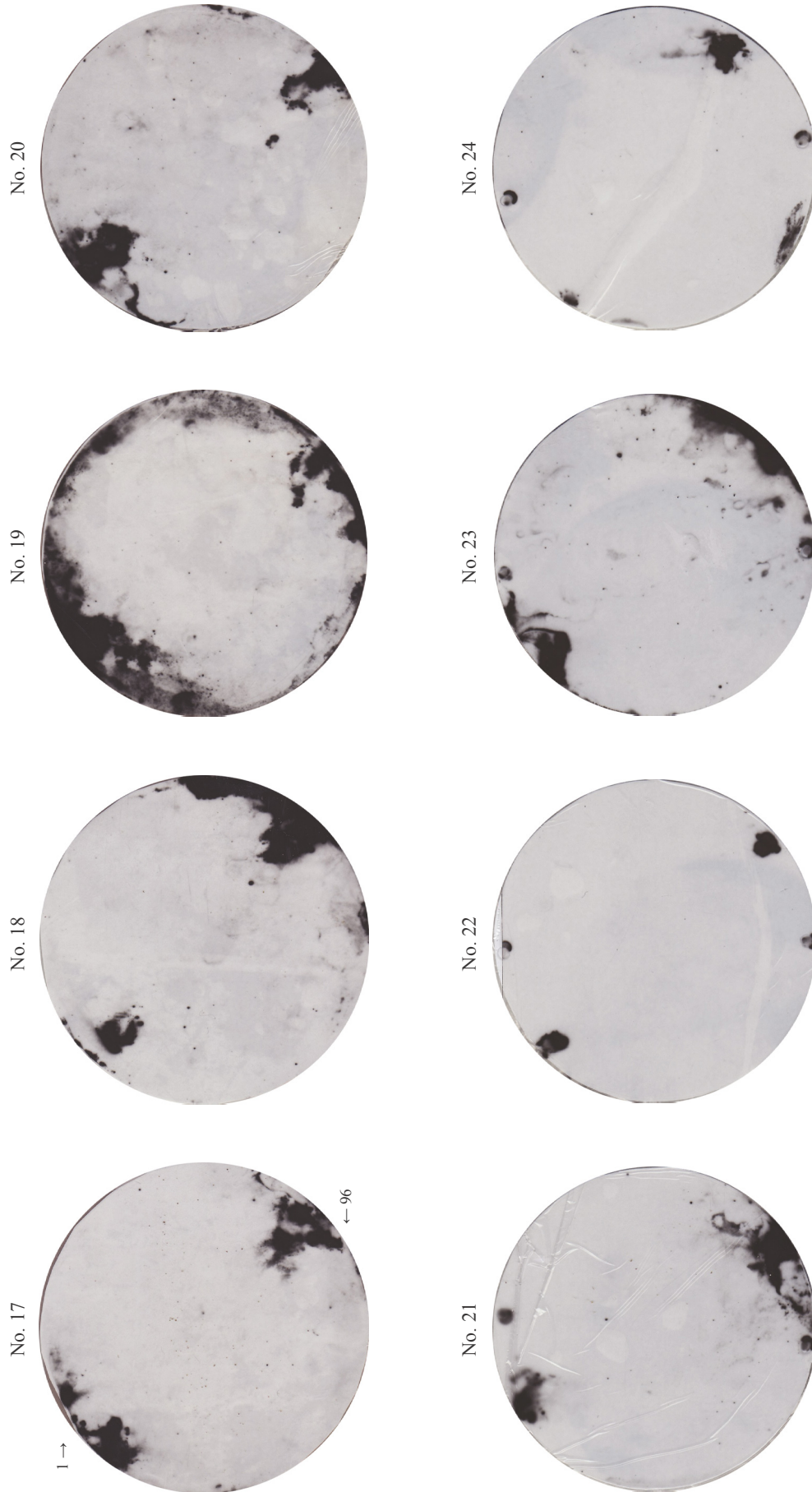


Figure 31. ホンハブゲノムライブラリーに対するコロニーハイブリダイゼーション

プレート No. 1~25 の左上と右下, プレート No. 21~55 の上と下の陽性スポットはポジティブコントロール (NIS-1 クローム) のシグナルである。

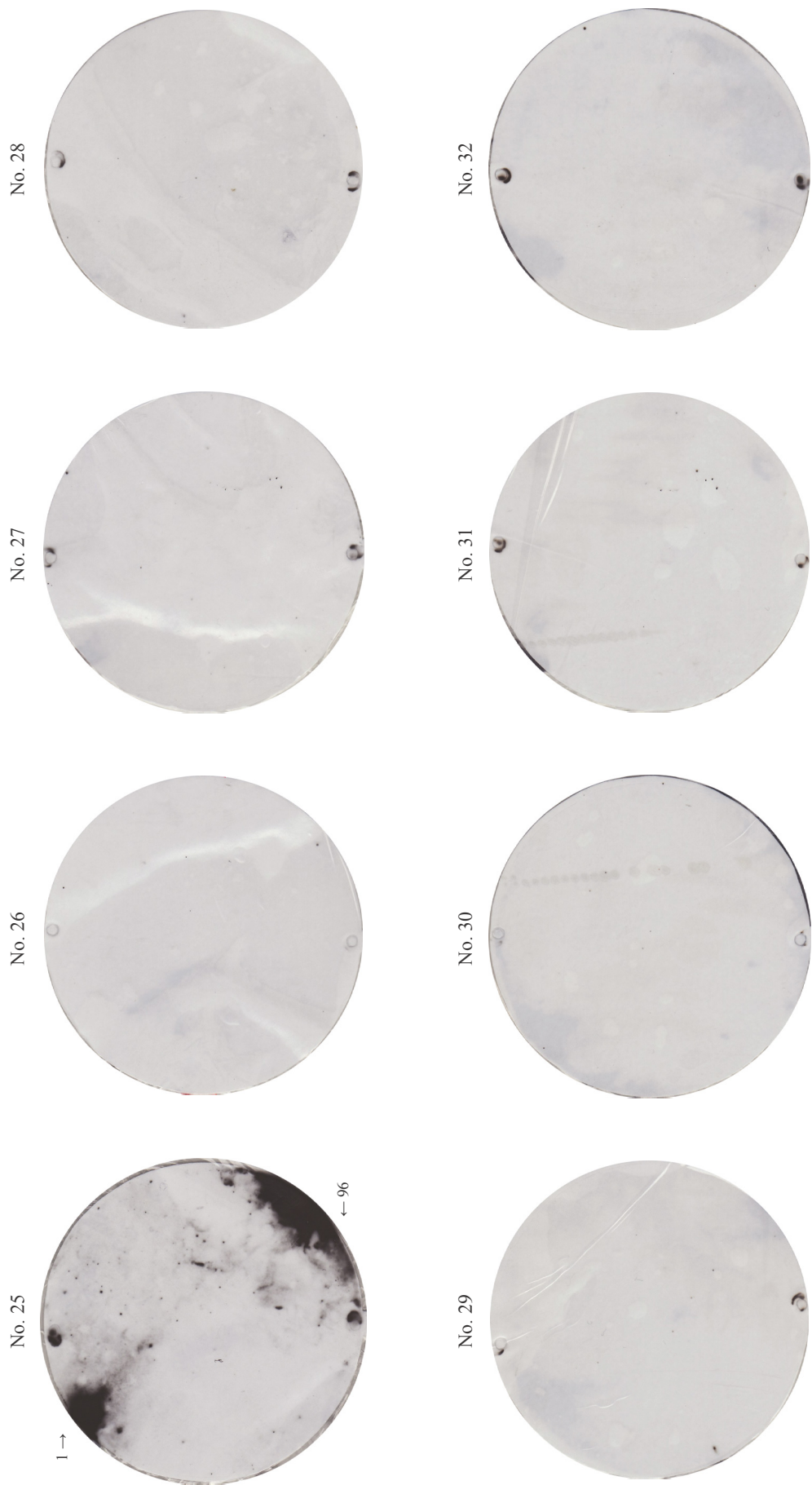


Figure 31. ホンハブゲノムライブラリーに対するコロニーハイブリダイゼーション

プレート No. 1~25 の左上と右下, プレート No. 21~55 の上と下の陽性スポットはポジティブコントロール (NIS-1 クローム) のシグナルである。

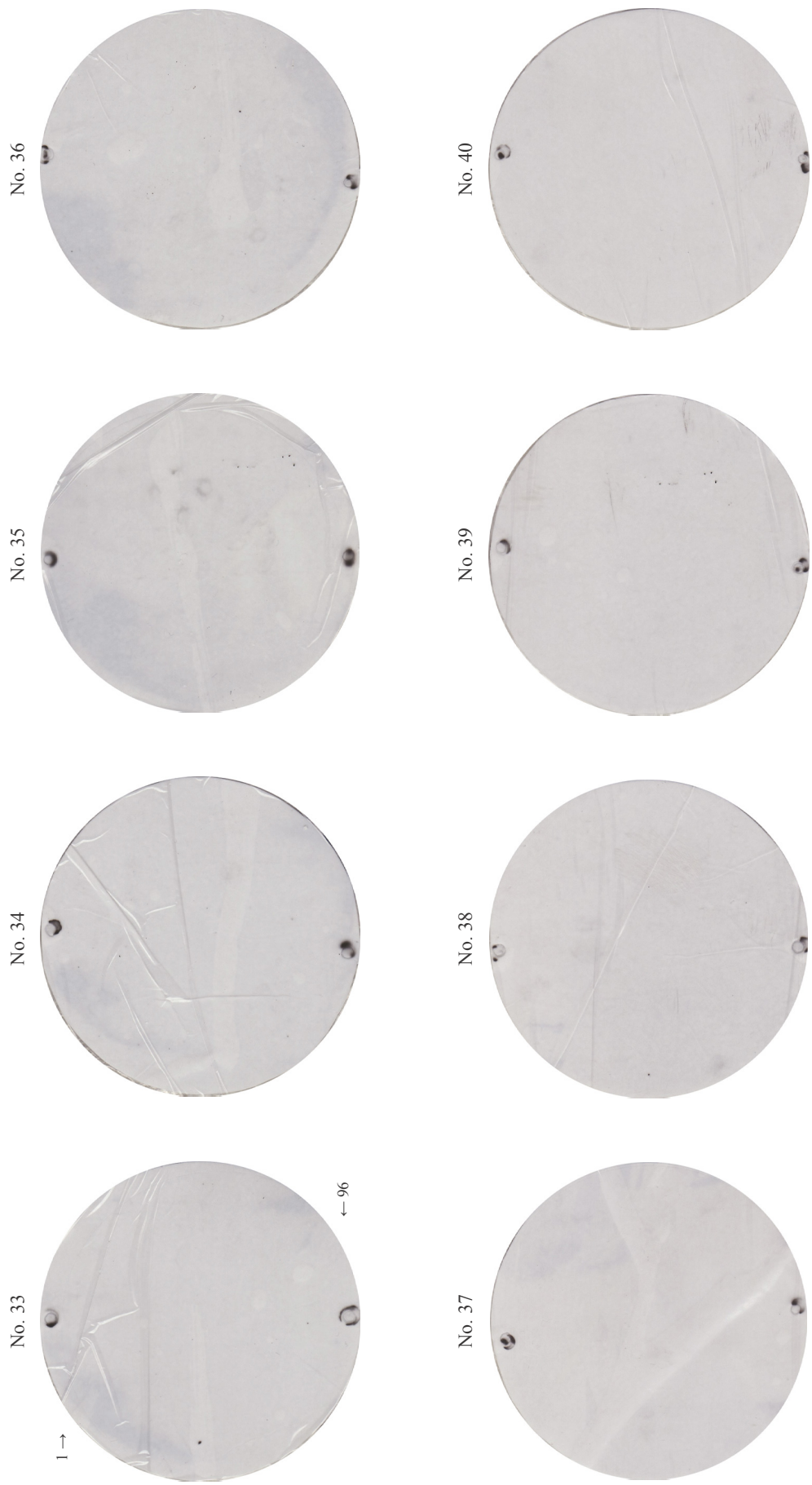


Figure 31. ホンハブゲノムライブラリーに対するコロニーハイブリダイゼーション

プレート No. 1~25 の左上と右下, プレート No. 21~55 の上と下の陽性スポットはポジティブコントロール (NIS-1 クローム) のシグナルである。

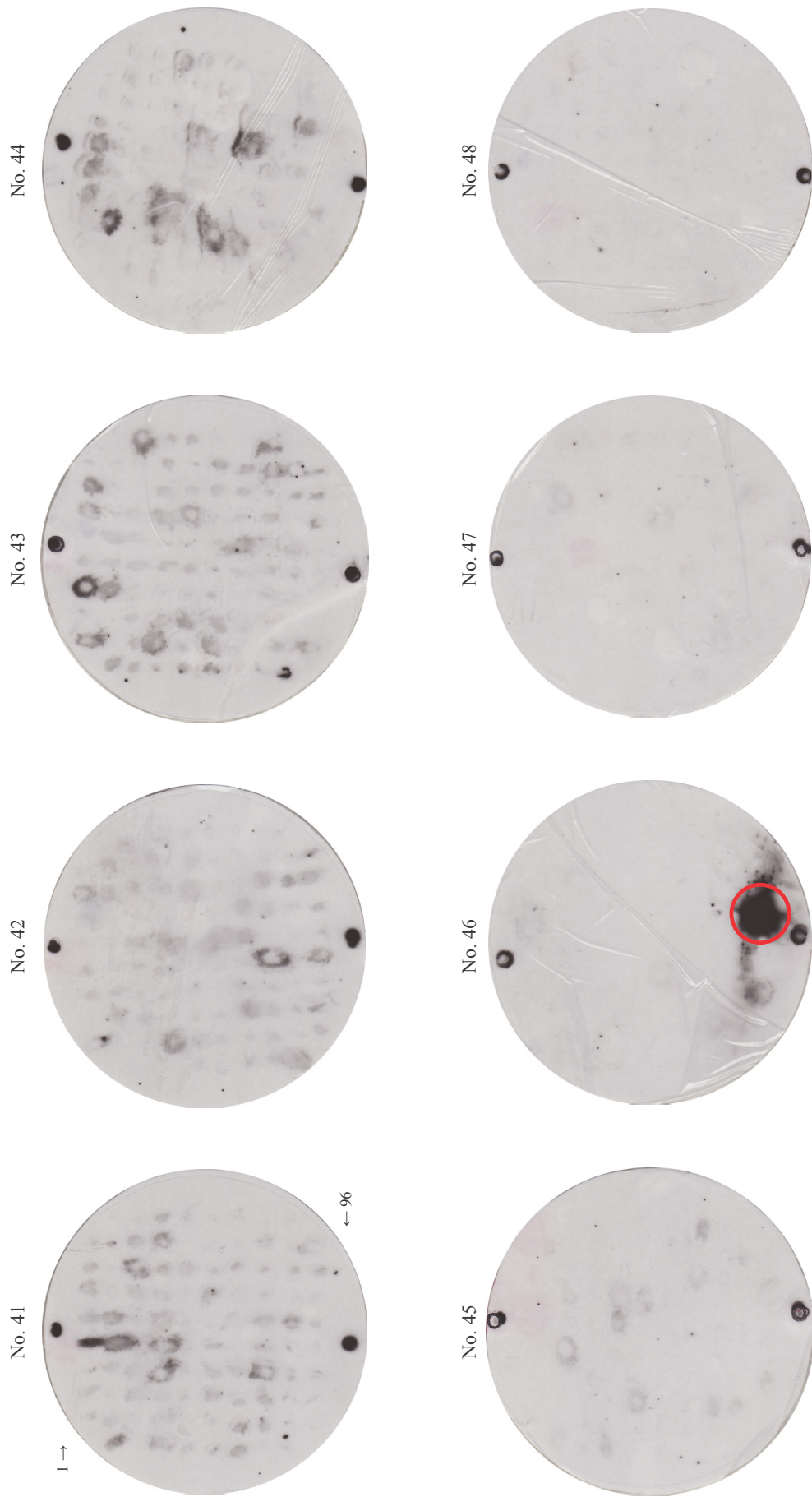
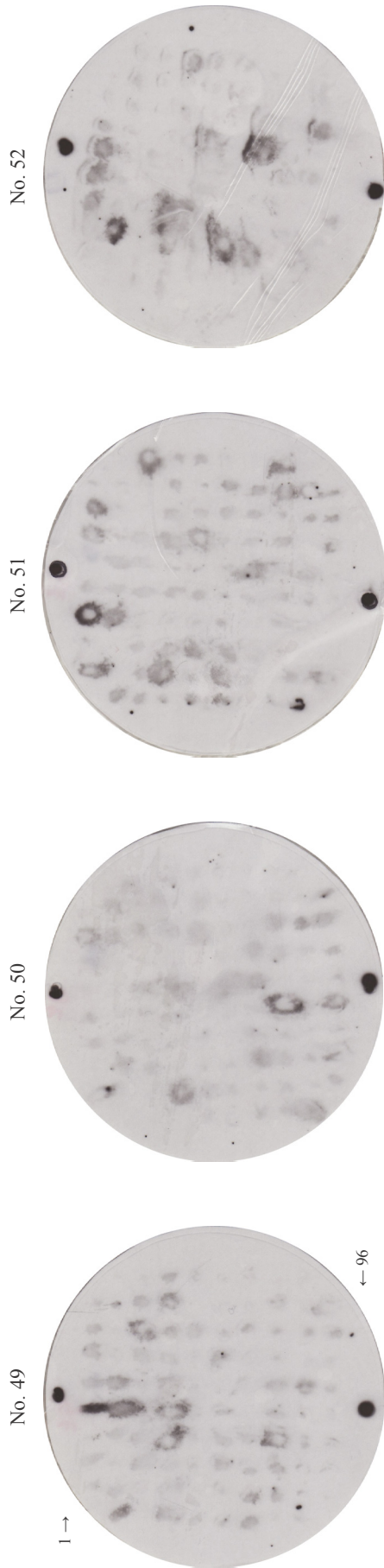


Figure 31. ホンハブゲノムライブラリーに対するコロニーハイブリダイゼーション

プレート No. 1~25 の左上と右下, プレート No. 21~55 の上と下の陽性スポットはポジティブコントロール (NIS-1 クローン) のシグナルである。



プレート区画

1	2	3	4	5	6	7	8		
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
89	90	91	92	93	94	95	96		

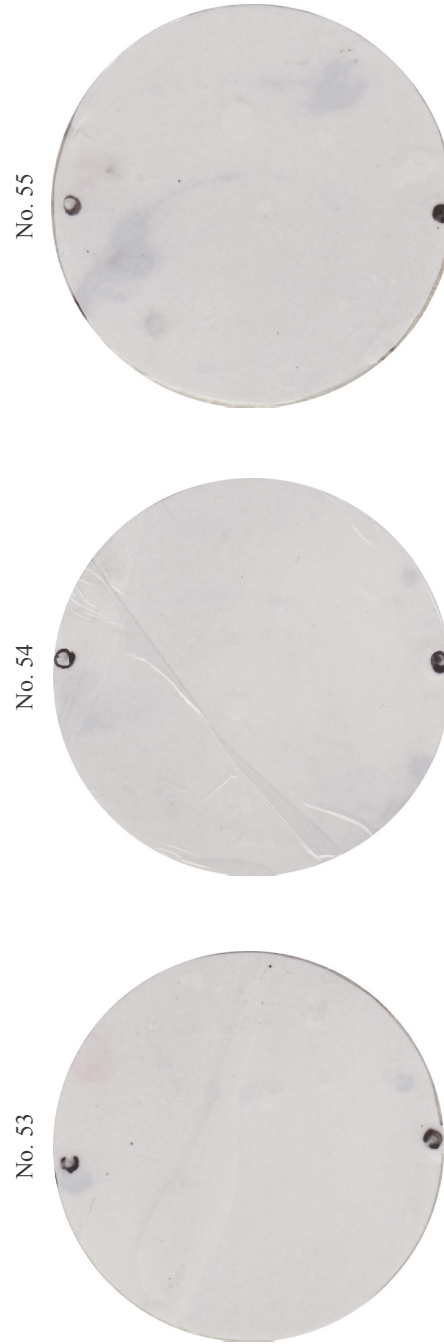


Figure 31. ホンハブゲノムライブラリーに対するコロニーハイブリダイゼーション

プレート No. 1~25 の左上と右下, プレート No. 21~55 の上と下の陽性スポットはポジティブコントロール (NIS-1 クローン) のシグナルである。

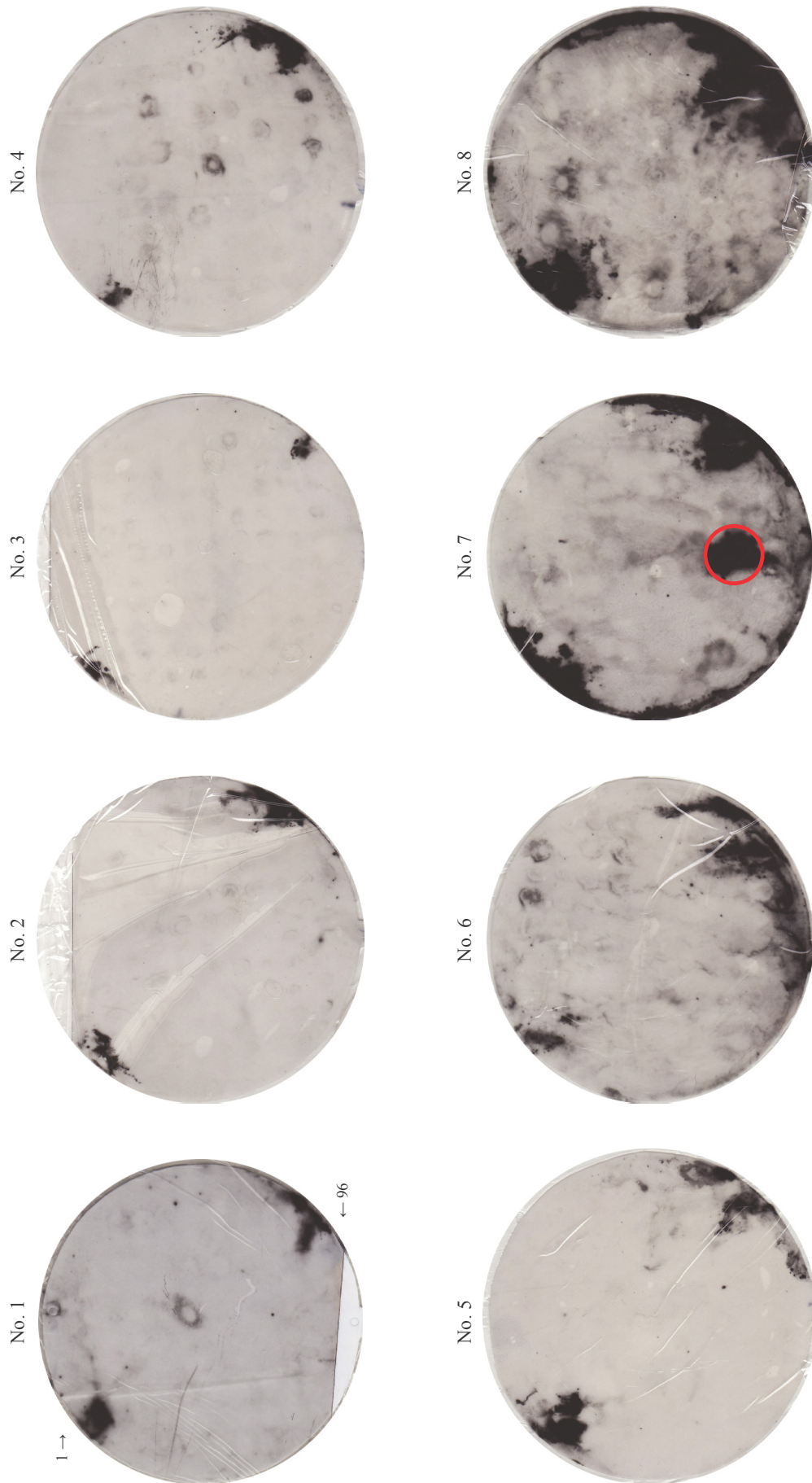
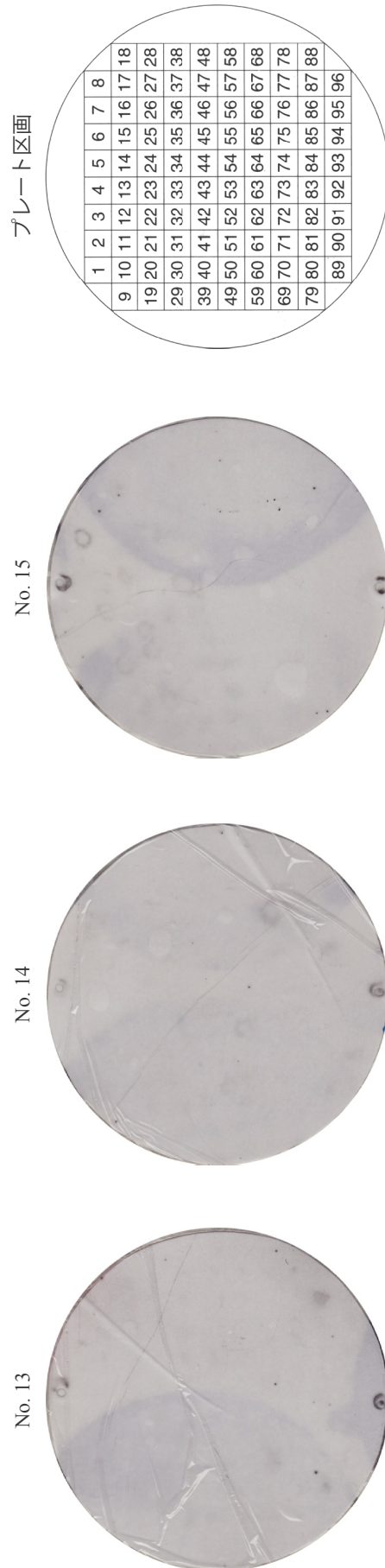
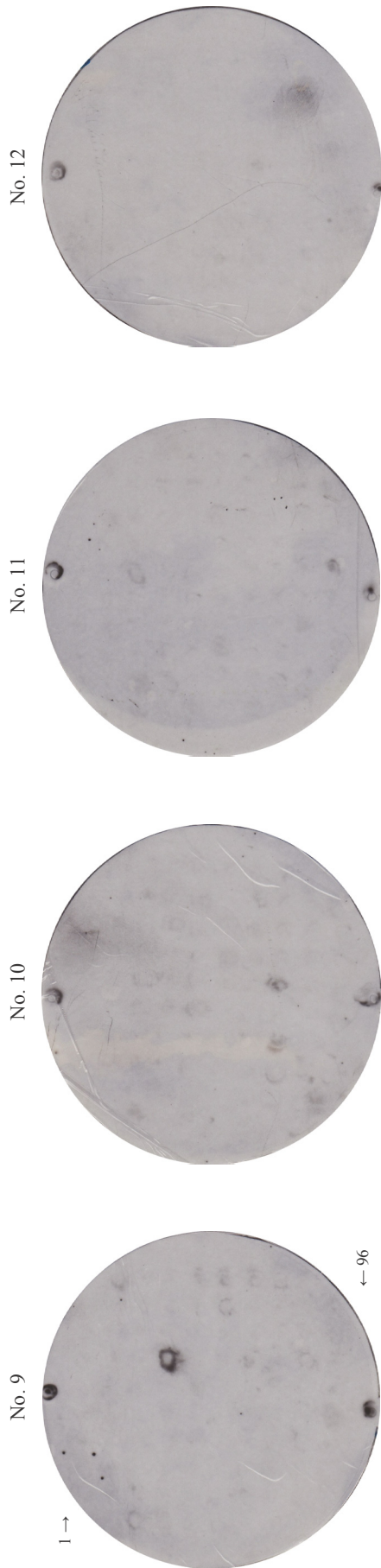


Figure 32. ヒメハブゲノムライブラリーに対するコロニーハイブリダイゼーション

プレート No. 1~8 の左上と右下, プレート No. 9~15 の上と下の陽性スポットはポジティブコントロール (NIS-1 クローン) のシグナルである。





プレート区画

1	2	3	4	5	6	7	8		
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
89	90	91	92	93	94	95	96		

Figure 32. ヒメハブゲノムライブラリーに対するコロニーハイブリダイゼーション

プレート No. 1~8 の左上と右下, プレート No. 9~15 の上と下の陽性スポットはポジティブコントロール (NIS-1 クローン) のシグナルである。



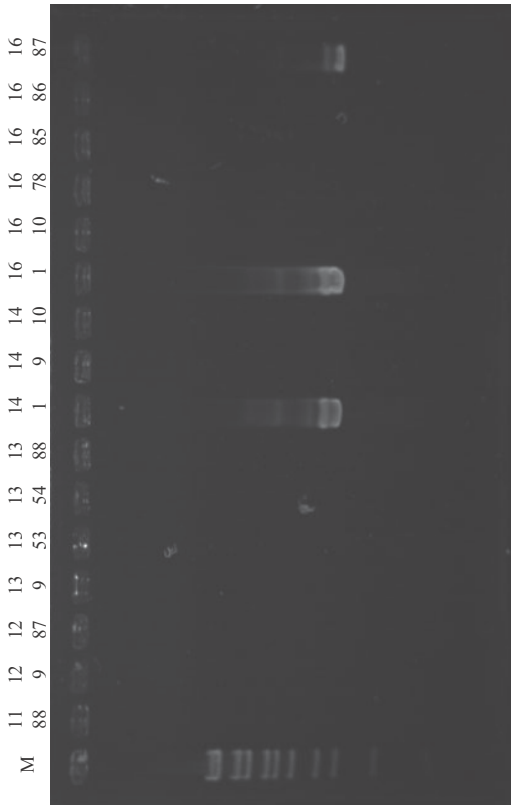
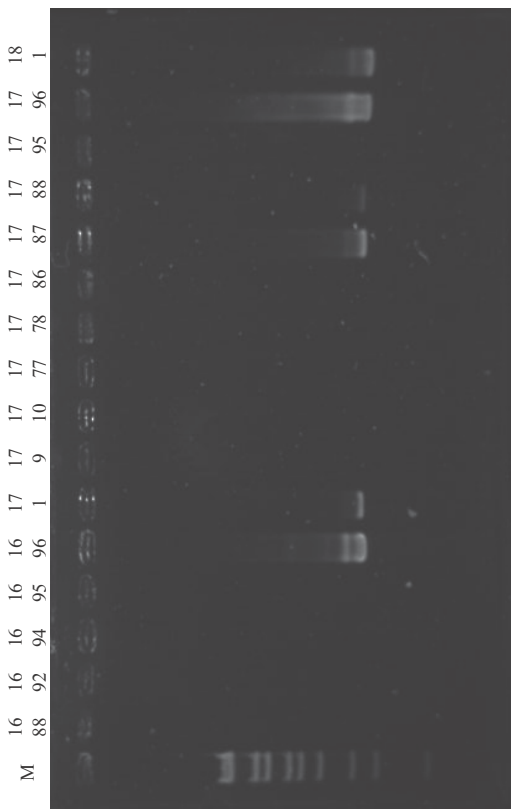


Plate No.  
Section No.

2nd スクリーニング陽性  
 Plate No. 14, Section 1  
 Plate No. 16, Section 1  
 Plate No. 16, Section 87  
 Plate No. 16, Section 96  
 Plate No. 17, Section 1  
 Plate No. 17, Section 87  
 Plate No. 17, Section 88  
 Plate No. 17, Section 96  
 Plate No. 18, Section 1  
 Plate No. 18, Section 88  
 Plate No. 19, Section 1  
 Plate No. 19, Section 87

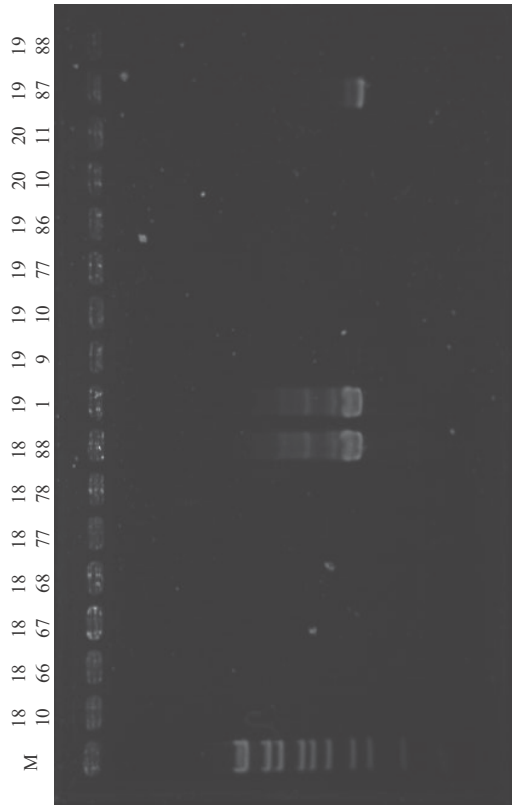


Plate No.  
Section No.

Figure 33. ホンハブゲノムライブラリーに対するコロニー PCR

M:  $\lambda$ /Sty I 分子量マーカー, Plate No.: プレート番号, Section No.: 区画番号



Plate No.  
Section No.

M 43 43 43 43 44 44 44 44 44 44 44 44 44 44 44 44 44 44  
64 78 79 89 3 4 5 11 13 31 32 51 52 61 65 86

M 34 41 45 45 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46 46  
34 41 45 68 75 91 92 93 94 95 28 36 47 47 47 49 49 49 49



Plate No.  
Section No.

M 49 50 50 52 52 52 52 52 55 55  
75 37 75 2 37 65 82 5 10



2nd スクリーニング陽性

Plate No. 46, Section 93

Plate No. 55, Section 10

Figure 33. ホンハブゲノムライブラリーに対するコロニー PCR

M:  $\lambda$ Sty I 分子重量マーカー, Plate No.: プレート番号, Section No.: 区画番号

Plate No.  
Section No.

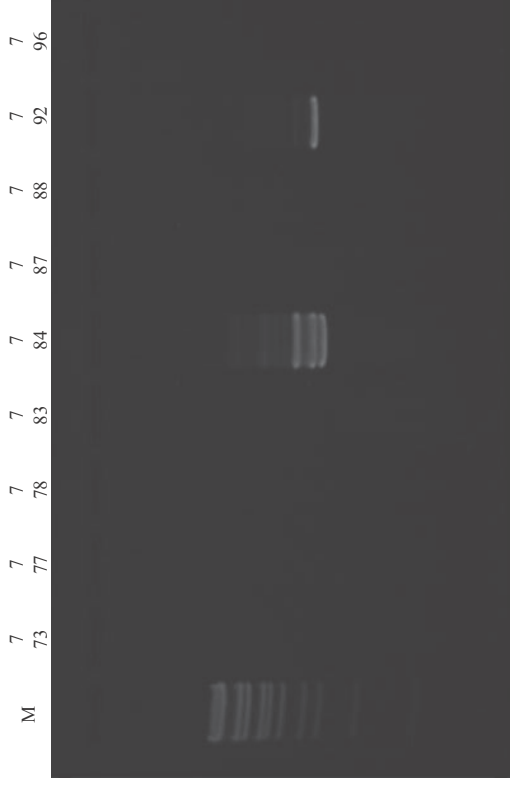
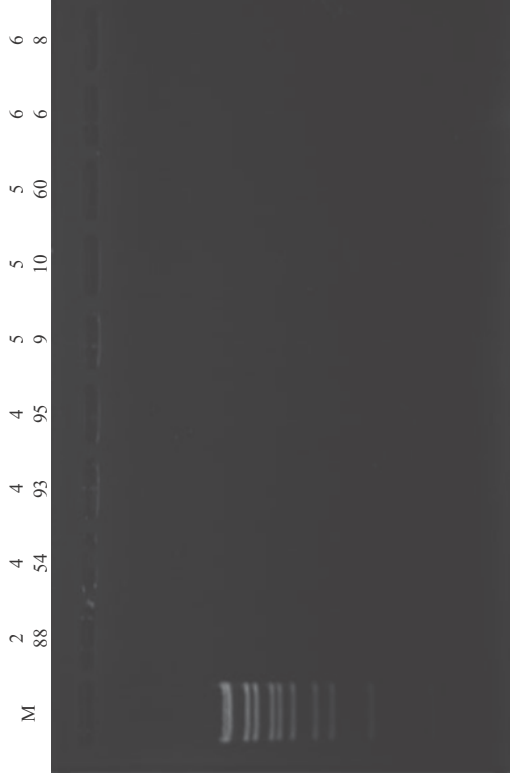
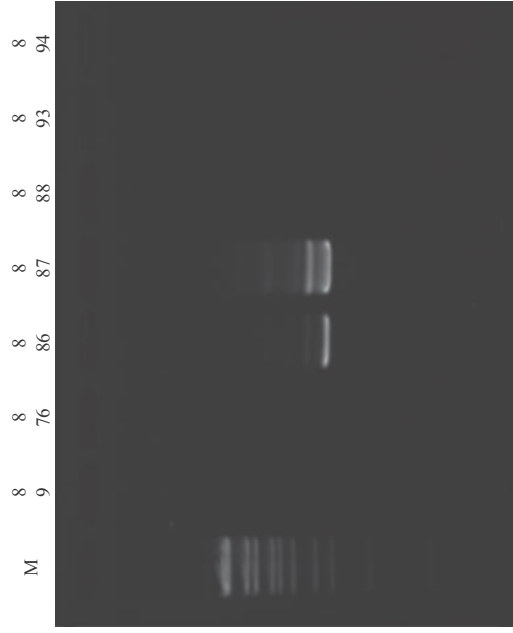


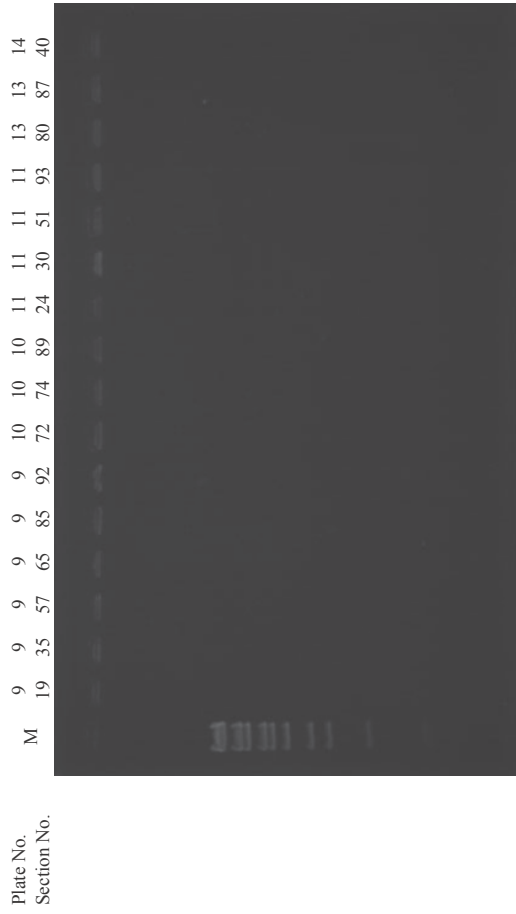
Plate No.  
Section No.



2ndスクリーニング陽性  
 Plate No. 7, Section 84  
 Plate No. 7, Section 92  
 Plate No. 8, Section 86  
 Plate No. 8, Section 87

Figure 34. ヒメハブゲノムライブラリーに対するコロニー PCR

M: λ/Sly I 分子量マーカー, Plate No. : プレート番号, Section No. : 区画番号




---

2nd スクリーニング陽性

---

なし

---

Figure 34. ヒメハブゲノムライブラリーに対するコロニー PCR

M: λ/Sty I 分子量マーカ- , Plate No. : プレート番号, Section No. : 区画番号

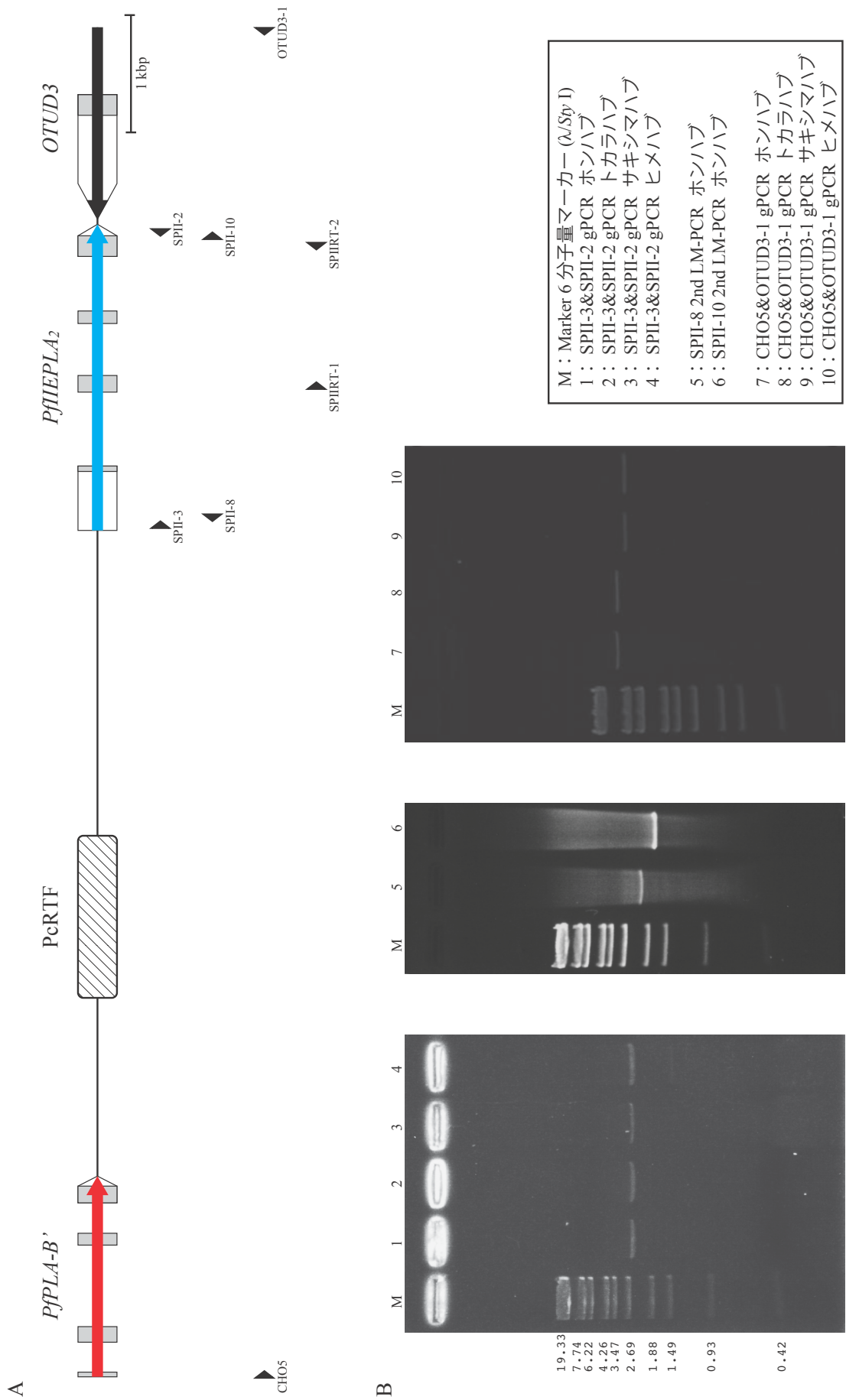


Figure 35. クサリヘビ科へビの IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の同定

(A) ホンハブ IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とその外縁領域のゲノム構造。矢頭は PCR プライマーを示す。  
 → : 遺伝子領域, ▨ : コーディング領域, □ : 5' UTR, ◻ : 3' UTR, ▩ : PcRTF。(B) 各種 PCR の泳動写真。



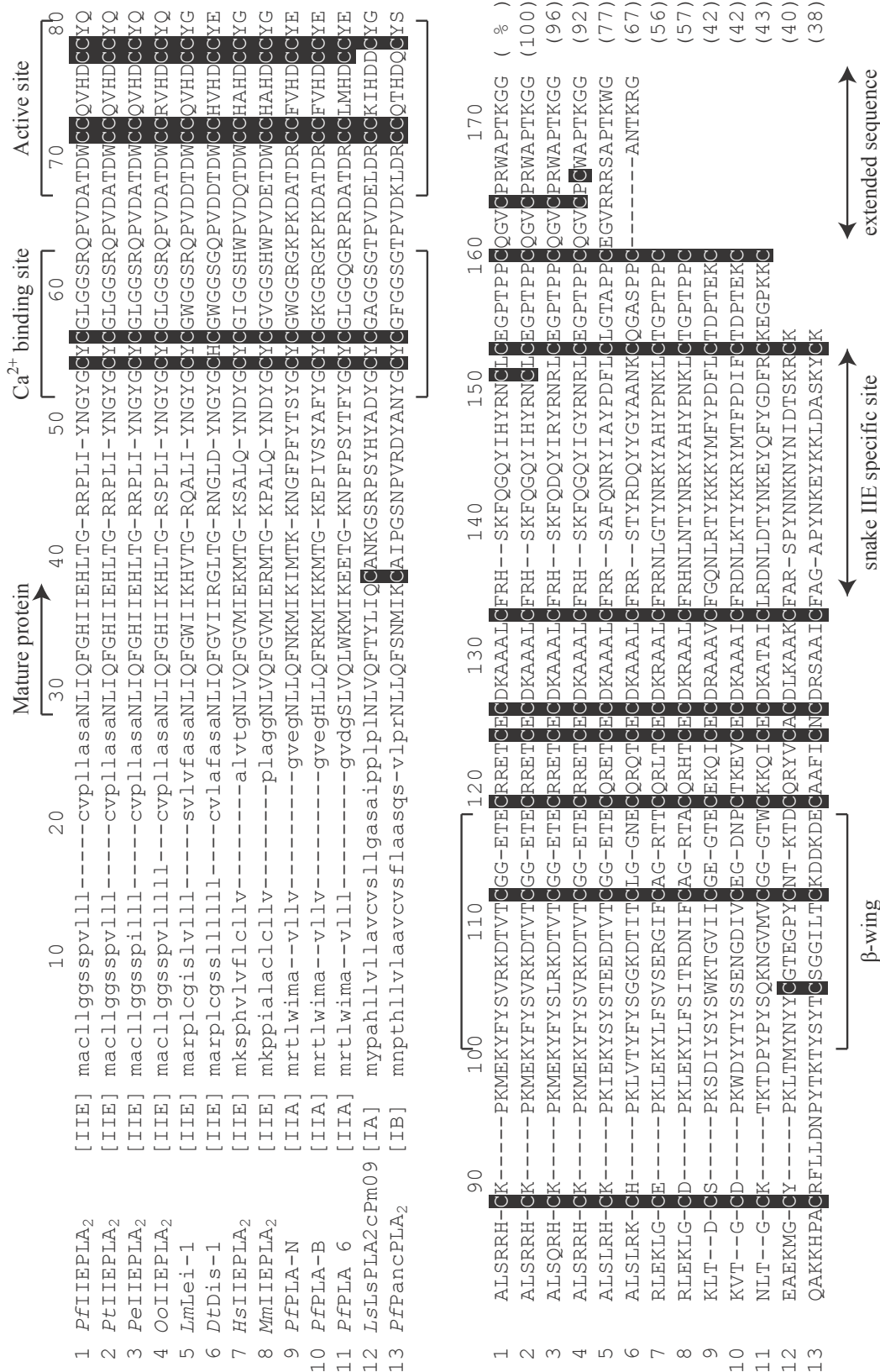


Figure 36. IIE 型 PLA<sub>2</sub> アミノ酸アラインメント

システイン残基は黒塗りです。四角括弧内には分泌型 PLA<sub>2</sub> のグループ、丸括弧内には PflEPLA<sub>2</sub> との相同値を示す。Pf, *P. flavoviridis*; Pt, *P. tokarensis*; Pe, *P. elegans*; Dt, *O. okinavensis*; Dt, *Dispholidus typus*; Lm, *Leioheterodon madagascariensis*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Ls, *Laticauda semifasciata*.

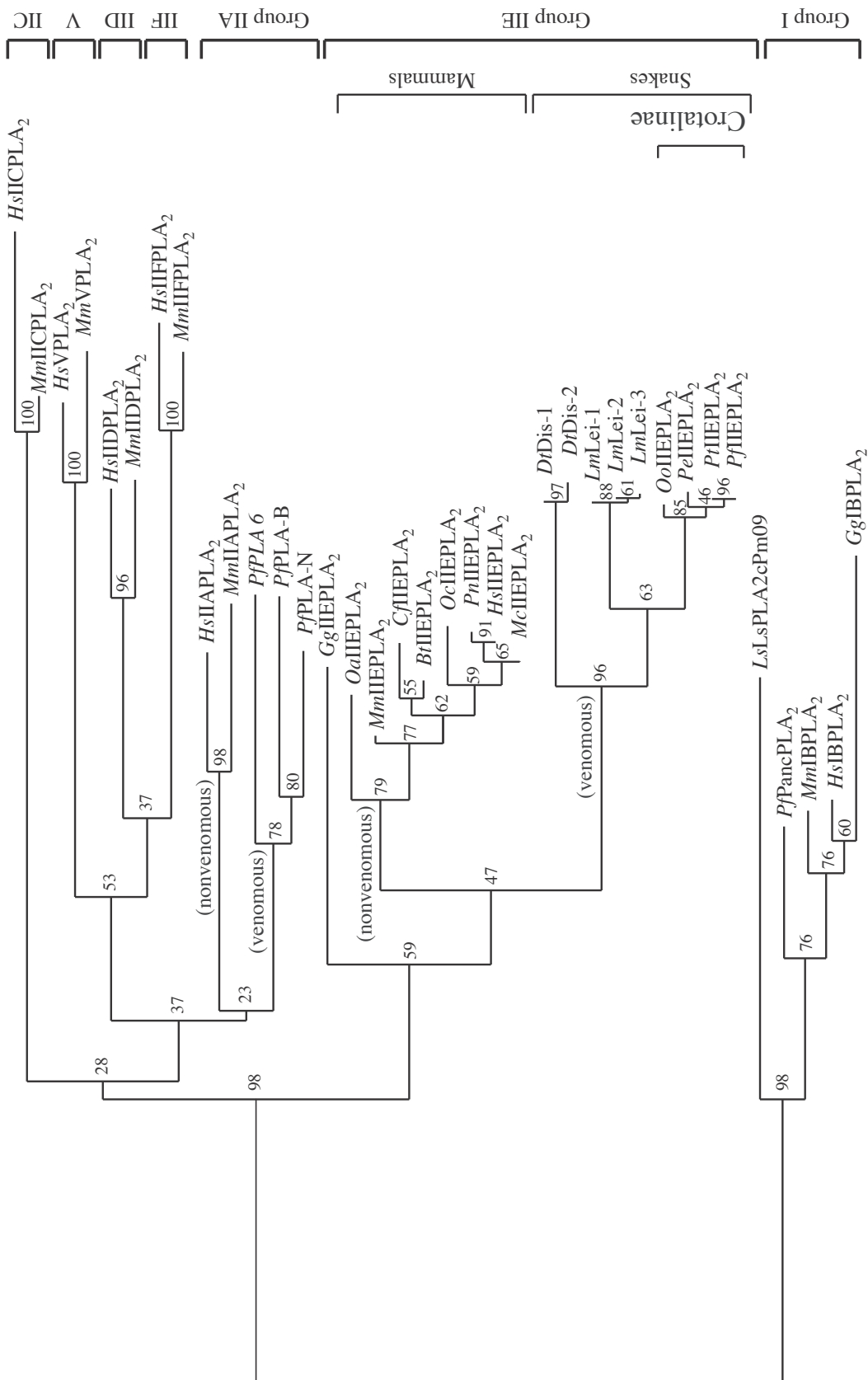


Figure 37. IIE 型及び他分泌型 PLA<sub>2</sub> の成熟タンパク質に基づく系統樹

ノードの数字はブートストラップ値を示す。  
 Bt, *Bos taurus*; Cf, *Canis lupus familiaris*; Gg, *Gallus gallus*; Mc, *Macaca mulatta*; Oa, *Ornithorhynchus anatinus*; Oc, *Oryctolagus cuniculus*; Pn, *Pan troglodytes*。

0.2

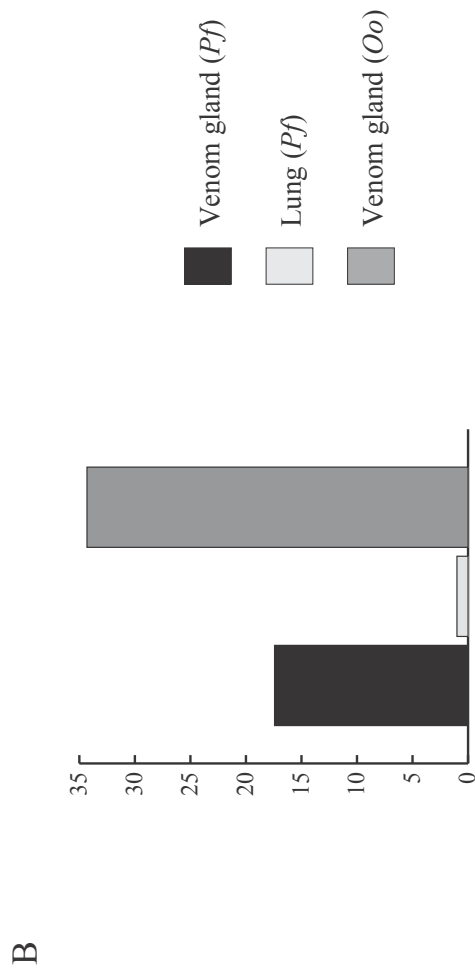
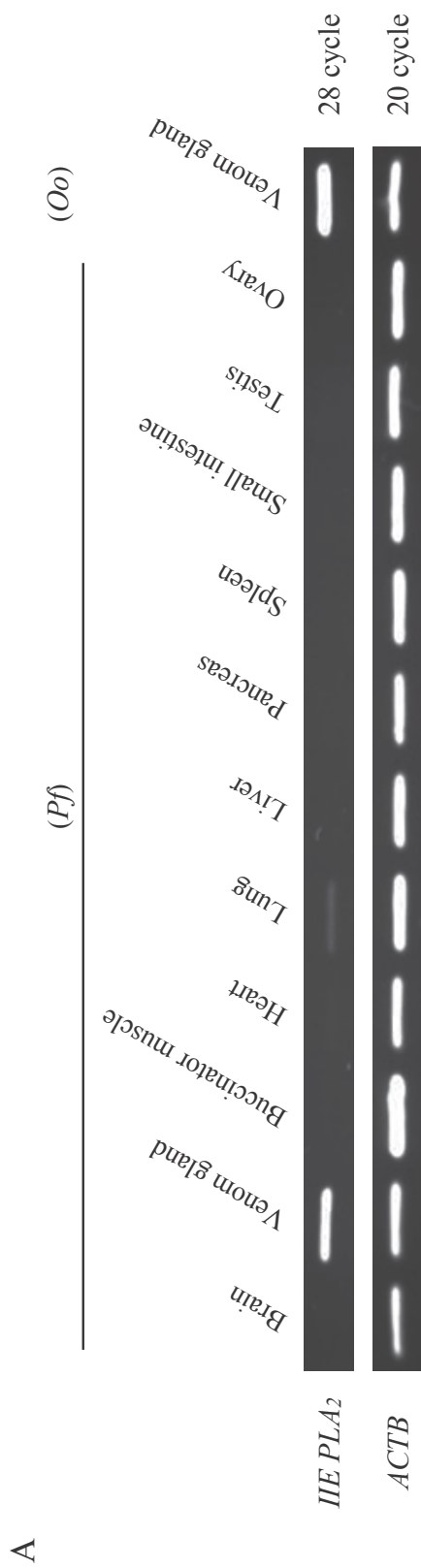


Figure 38. IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子転写産物の発現組織分布

(A) 逆転写 PCR による IIE PLA<sub>2</sub> 遺伝子転写産物発現組織ポディマップ。右数値は PCR サイクル数を示す。

(B) 半定量的発現量の比較。ACTB 遺伝子転写産物増幅バンドの蛍光強度に基づいた定量値を算定し、

IIE PLA<sub>2</sub> 遺伝子転写産物増幅バンドの蛍光強度を定量値補正した後、ホンハブ肺での定量値を 1 として、各サンプル間での発現量を相対的に比較した。

<i>K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub> ratio</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>PtIEPLA<sub>2</sub>, PtHIEPLA<sub>2</sub></i>								
2. <i>PeIEPLA<sub>2</sub></i>	0.6125							
3. <i>OoIEPLA<sub>2</sub></i>	0.1783	0.2145						
4. <i>CmpHIEPLA<sub>2</sub></i>	0.2661	0.2410	0.2697					
5. <i>VbIEPLA<sub>2</sub></i>	0.1873	0.1769	0.1565	0.1073				
6. <i>LmHIEPLA<sub>2</sub> (Lei-I)</i>	0.2891	0.3033	0.3273	0.2552	0.3721			
7. <i>DtHIEPLA<sub>2</sub> (Dis-I)</i>	0.4243	0.4257	0.4290	0.3872	0.4344	0.7869		
8. <i>OhIEPLA<sub>2</sub></i>	0.2136	0.1996	0.2241	0.1671	0.1810	0.3509	0.6167	
9. <i>PmHIEPLA<sub>2</sub></i>	0.2585	0.2598	0.2413	0.2120	0.2305	0.2243	0.3672	0.2201

<i>K<sub>A</sub> value</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>PtIEPLA<sub>2</sub>, PtHIEPLA<sub>2</sub></i>								
2. <i>PeIEPLA<sub>2</sub></i>	0.0179							
3. <i>OoIEPLA<sub>2</sub></i>	0.0180	0.0240						
4. <i>CmpHIEPLA<sub>2</sub></i>	0.0301	0.0300	0.0302					
5. <i>VbIEPLA<sub>2</sub></i>	0.0472	0.0471	0.0411	0.0286				
6. <i>LmIEPLA<sub>2</sub> (Lei-I)</i>	0.1509	0.1562	0.1557	0.1312	0.1456			
7. <i>DtIEPLA<sub>2</sub> (Dis-I)</i>	0.2392	0.2369	0.2260	0.2112	0.2193	0.1995		
8. <i>OhIEPLA<sub>2</sub></i>	0.1090	0.1005	0.1128	0.0855	0.0922	0.1110	0.1839	
9. <i>PmIEPLA<sub>2</sub></i>	0.1922	0.1977	0.1891	0.1883	0.1866	0.2272	0.3387	0.1916

<i>K<sub>S</sub> value</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>PtIEPLA<sub>2</sub>, PtHIEPLA<sub>2</sub></i>								
2. <i>PeIEPLA<sub>2</sub></i>	0.0292							
3. <i>OoIEPLA<sub>2</sub></i>	0.1008	0.1120						
4. <i>CmpHIEPLA<sub>2</sub></i>	0.1130	0.1247	0.1119					
5. <i>VbIEPLA<sub>2</sub></i>	0.2520	0.2664	0.2624	0.2660				
6. <i>LmIEPLA<sub>2</sub> (Lei-I)</i>	0.5220	0.5150	0.4756	0.5141	0.3912			
7. <i>DtIEPLA<sub>2</sub> (Dis-I)</i>	0.5639	0.5566	0.5267	0.5456	0.5048	0.2536		
8. <i>OhIEPLA<sub>2</sub></i>	0.5103	0.5033	0.5033	0.5119	0.5097	0.3162	0.2982	
9. <i>PmIEPLA<sub>2</sub></i>	0.7437	0.7611	0.7836	0.8881	0.8096	1.0130	0.9223	0.8705

Figure 39.  $\alpha$ -helix type III PLA<sub>2</sub> 遺伝子の  $K_A/K_S$  値

*Cmp*, *Crotalus mitchellii pyrrhus*; *Vb*, *Vipera berus berus*

A

```

ATGAATTTGATCCAGTTTGGCCACATCATCGAGCACTTGACCGGAAGACGCCCCCTGATTTACAACGGCTACGGCTGCTACTGCGGGCTG
M N L I Q F G H I I E H L T G R R P L I Y N G Y G C Y C G L
GGCGGTTCCCGGCAGCCGGTGGACGCCACCGATTGGTGTGCAAGTTCATGACTGCTGCTATCAGGCCCTGTCGCGGGCCACTGCAAAA
G G S R Q P V D A T D W C C Q V H D C C Y Q A L S R R H C K
CCCAAAATGGAGAAATATTTCTACTCCGTCAGGAAAGACACCGTCACTTGTGGTGGGAGACCGAGTGCCGGAGGGAACCTGCGAGTGT
P K M E K Y F Y S V R K D T V T C G G E T E C R R E T C E C
GACAAAGCCGAGCCCTCTGCTTCCGCCACTCGAAGTTTCAAGGCCAGTACATCCACTACCGCAACTGTCTGTGCGAAGGACCCACACCG
D K A A A L C F R H S K F Q G Q Y I H Y R N C L C E G P T P
CCTTGCCAGGGGCTGCCCCGTTGGGCCCCACGAAGGGGGCCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA
P C Q G V C P R W A P T K G G L E H H H H H H H *
  
```

B

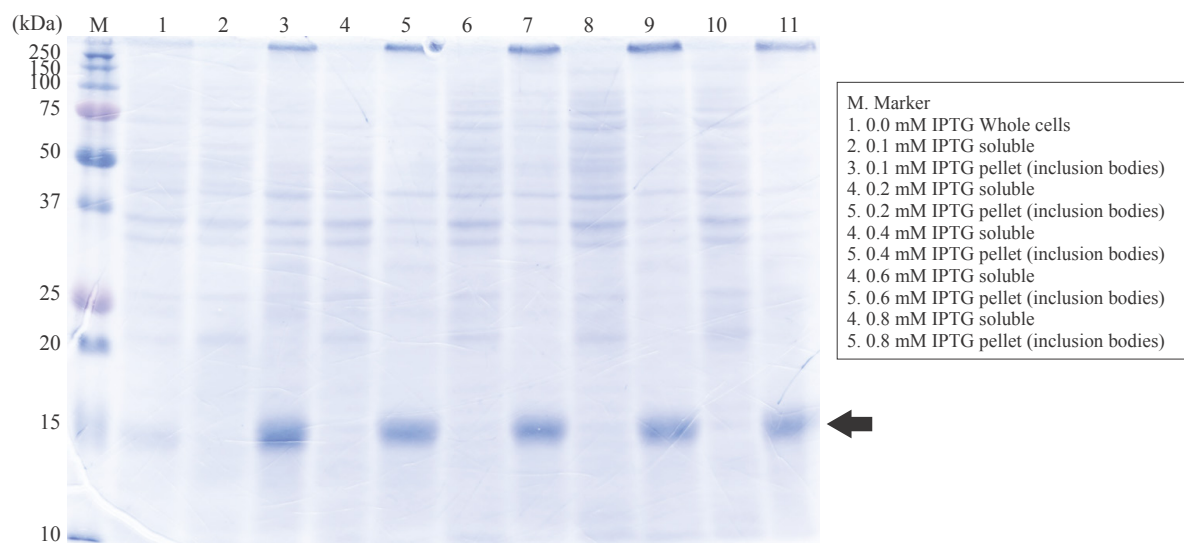
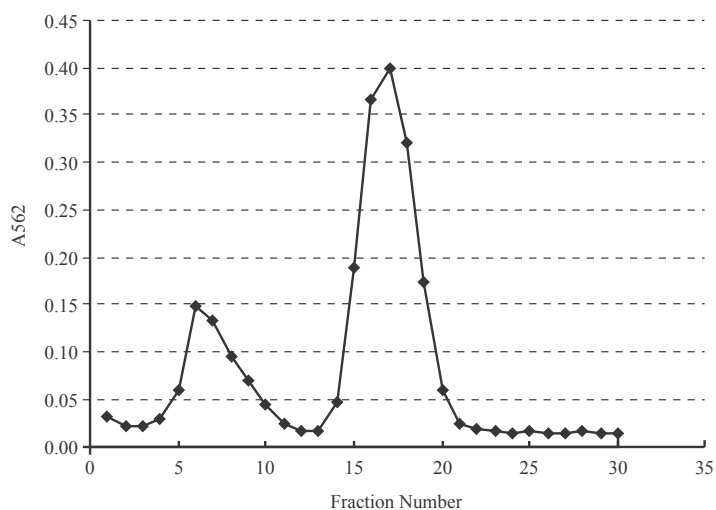


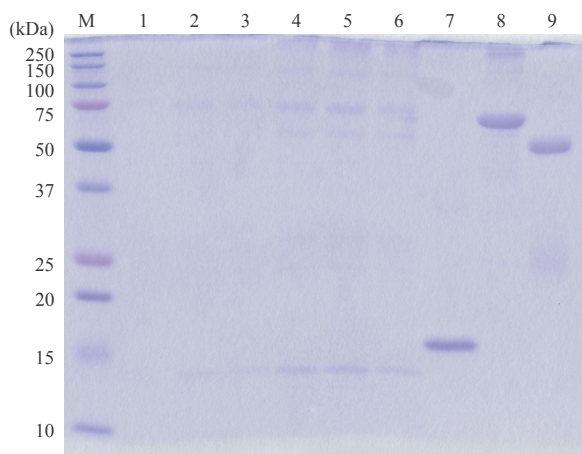
Figure 40. ホンハブの IIE 型 PLA<sub>2</sub> 組換えタンパク質の大腸菌発現

(A) ホンハブの IIE 型 PLA<sub>2</sub> 組換えタンパク質コンストラクト配列。(B) IPTG 誘導後の大腸菌粗抽出液の SDS-PAGE。

A

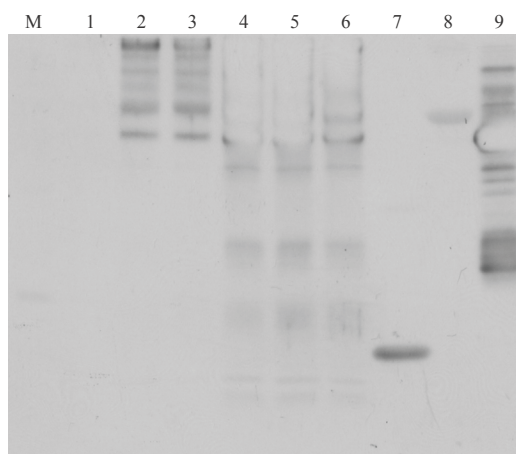


B



M: Marker  
 1: Fraction 5  
 2: Fraction 6  
 3: Fraction 7  
 4: Fraction 16  
 5: Fraction 17  
 6: Fraction 18  
 7: 6×His-tag fusion *Pf*IIEPLA<sub>2</sub>  
 8: BSA  
 9: Anti-rabbit IgG

C



M: Marker  
 1: Fraction 5  
 2: Fraction 6  
 3: Fraction 7  
 4: Fraction 16  
 5: Fraction 17  
 6: Fraction 18  
 7: 6×His-tag fusion *Pf*IIEPLA<sub>2</sub>  
 8: BSA  
 9: Anti-rabbit IgG

## Figure 41. IIE 型 PLA<sub>2</sub> 獲得のためのホンハブ粗毒に対する アフィニティークロマトグラフィーとウェスタンブロッティング

(A) ホンハブ IIE 型 PLA<sub>2</sub> の C 末端領域のペプチド抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー。  
 (B) アフィニティークロマトグラフィーで獲得した各フラクションの SDS-PAGE。  
 (C) アフィニティークロマトグラフィーで獲得した各フラクションのウェスタンブロット。

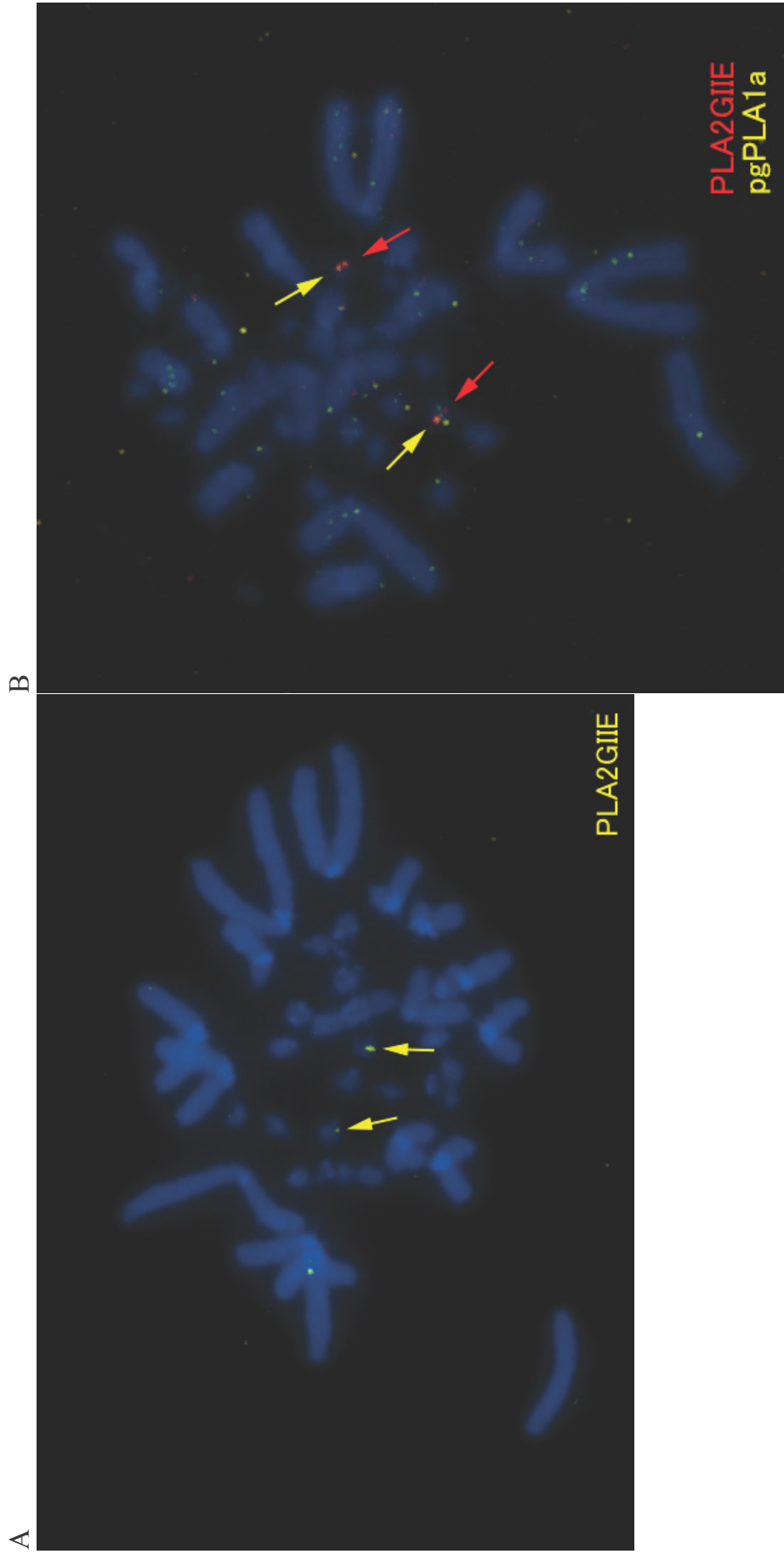
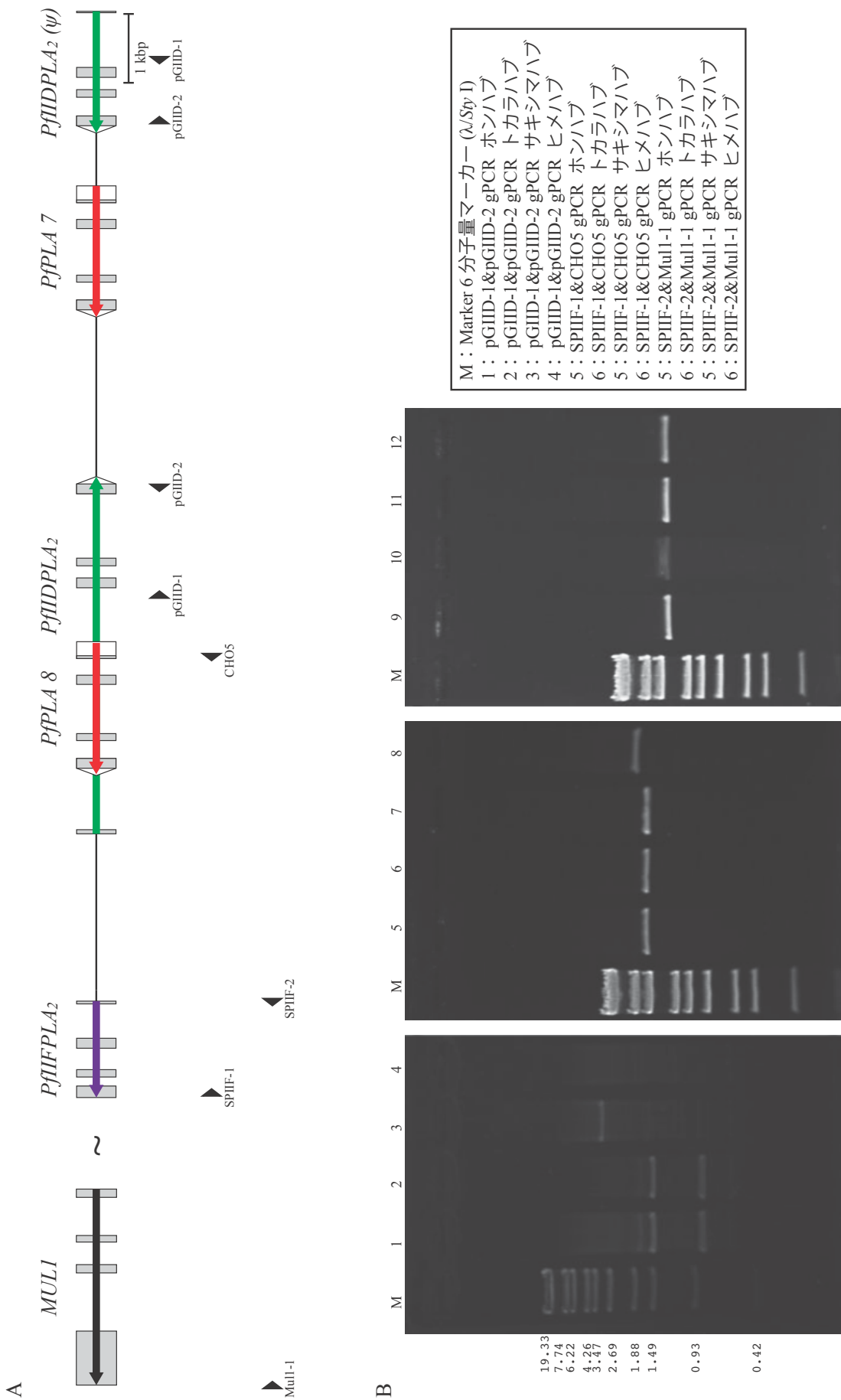


Figure 42. IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子と IIA 型ハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子のホンハブ染色体における局在

(A) IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子 (*PfHIEPLA<sub>2</sub>*) gDNA Probe (2,616 bp) を用いた FISH 解析。非特異的なシグナルを抑えるために、今回は断片化ゲノム DNA でマスクしている。黄色のシグナルは *PfHIEPLA<sub>2</sub>* を示す。  
 (B) IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子 (*PfHIEPLA<sub>2</sub>*) cDNA Probe (405 bp) と IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子 (*PfpgPLA 1a*) (A) [*PfPLA 7*] cDNA Probe (530 bp) を用いた FISH 解析。赤色のシグナルは *PfHIEPLA<sub>2</sub>*, 黄色のシグナルは *PfpgPLA 1a* (A) をそれぞれ示す。



**Figure 43. クサリヘビ科へビの IID・IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子及びその外縁領域の同定**

(A) ホンハブ IID 及び IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子とその外縁領域のゲノム構造。矢頭は PCR プライマーを示す。▲：遺伝子領域, □：コーディング領域, □：5' UTR, □：3' UTR。(B) ゲノミック PCR で増幅された IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子断片, IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子断片, MUL1 遺伝子断片の泳動写真。



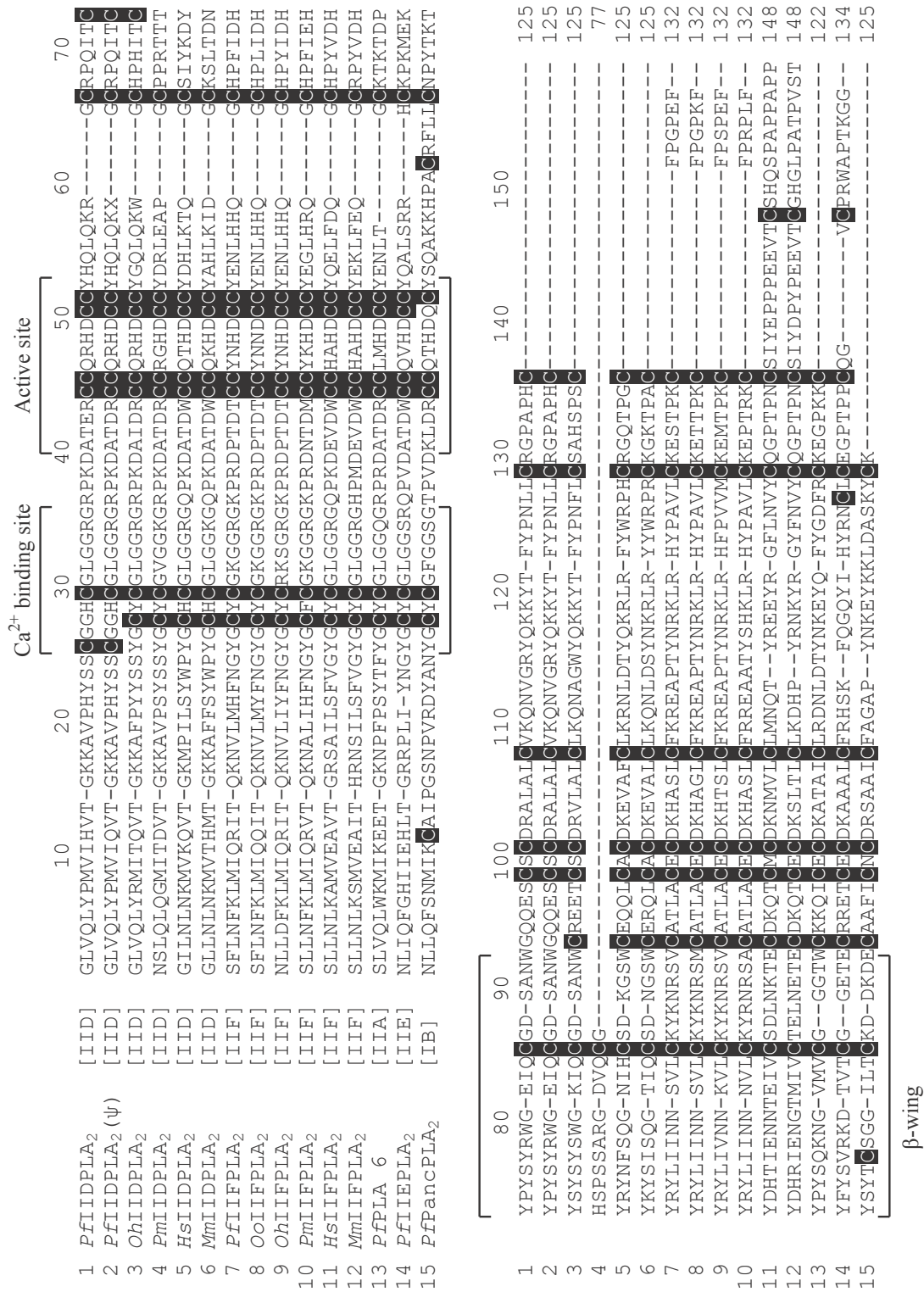


Figure 44. IID, IIF 型 PLA<sub>2</sub> アミノ酸アラインメント

システイン残基は黒塗りです。四角括弧内には分泌型 PLA<sub>2</sub> のグループを示す。

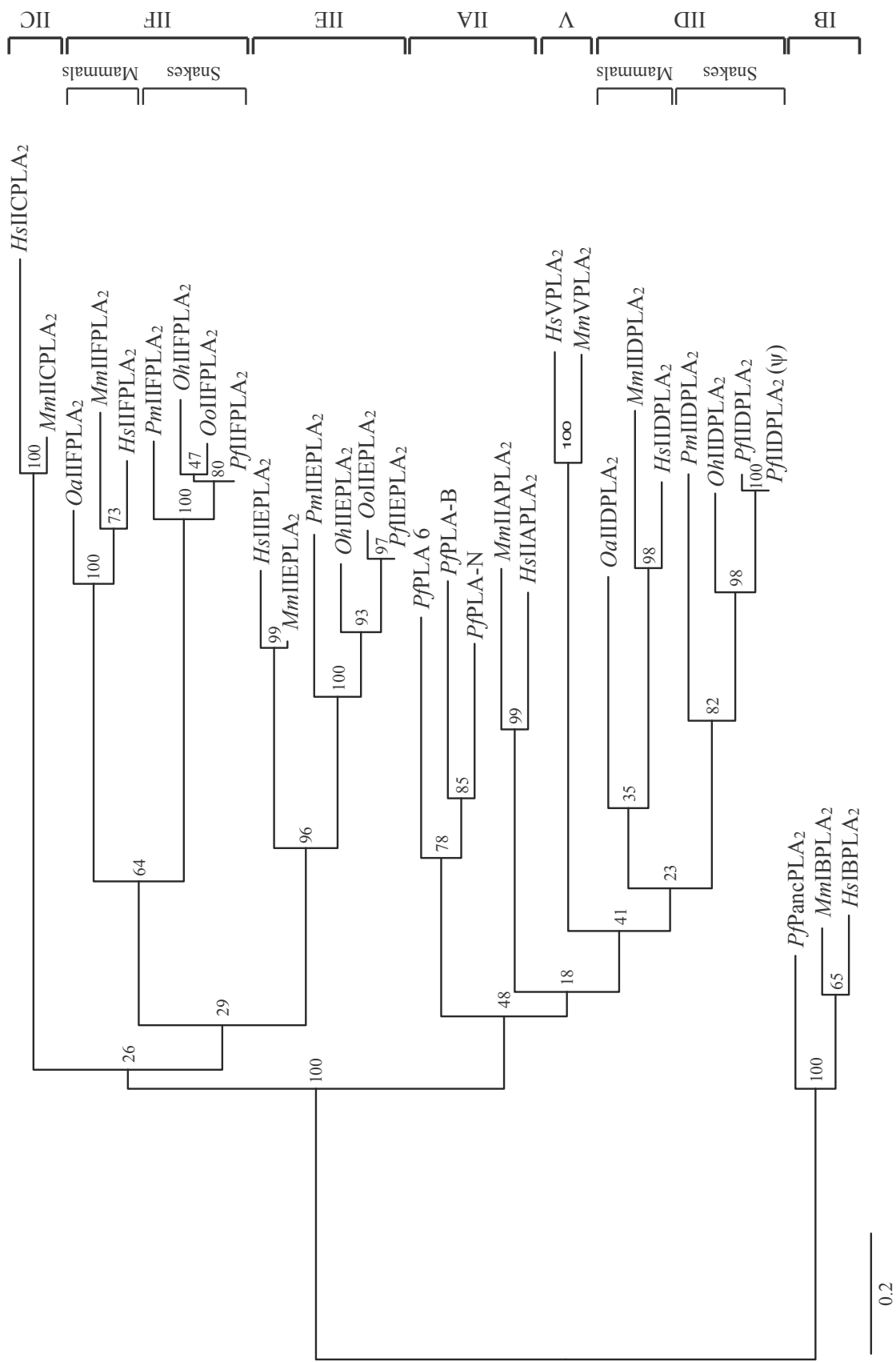


Figure 45. IID, IIF 型及び他分泌型 PLA<sub>2</sub> の成熟タンパク質に基づく系統樹

A				
$K_A/K_S$ ratio ( $K_A, K_S$ )	1	2	3	
1. <i>PfIIDPLA<sub>2</sub></i>				
2. <i>PfIIDPLA<sub>2</sub></i> ( $\psi$ )	0.1932 (0.0100, 0.0518)			
3. <i>OhIIDPLA<sub>2</sub></i>	0.4507 (0.1292, 0.2867)	0.3771 (0.1176, 0.3118)		
4. <i>PmIIDPLA<sub>2</sub></i>	0.6112 (0.2752, 0.4503)	0.5746 (0.2753, 0.4792)	0.7409 (0.2698, 0.3641)	
B				
$K_A/K_S$ ratio ( $K_A, K_S$ )	1	2	3	4
1. <i>PfIIFPLA<sub>2</sub></i>				
2. <i>OoIIFPLA<sub>2</sub></i>	0.4812 (0.0312, 0.0649)			
3. <i>VbIIFPLA<sub>2</sub></i>	0.4037 (0.0256, 0.0635)	0.5911 (0.0580, 0.0982)		
4. <i>OhIIEPLA<sub>2</sub></i>	0.1971 (0.0725, 0.3681)	0.2084 (0.0899, 0.4314)	0.2235 (0.0884, 0.3955)	
5. <i>PmIIEPLA<sub>2</sub></i>	0.1203 (0.1006, 0.8362)	0.1587 (0.1259, 0.7935)	0.1555 (0.1140, 0.7335)	0.2251 (0.1366, 0.6070)

Figure 46.  $\wedge$ ヒ類 IID, IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の  $K_A/K_S$  値

(A) IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の  $K_A/K_S$  値。(B) IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の  $K_A/K_S$  値。

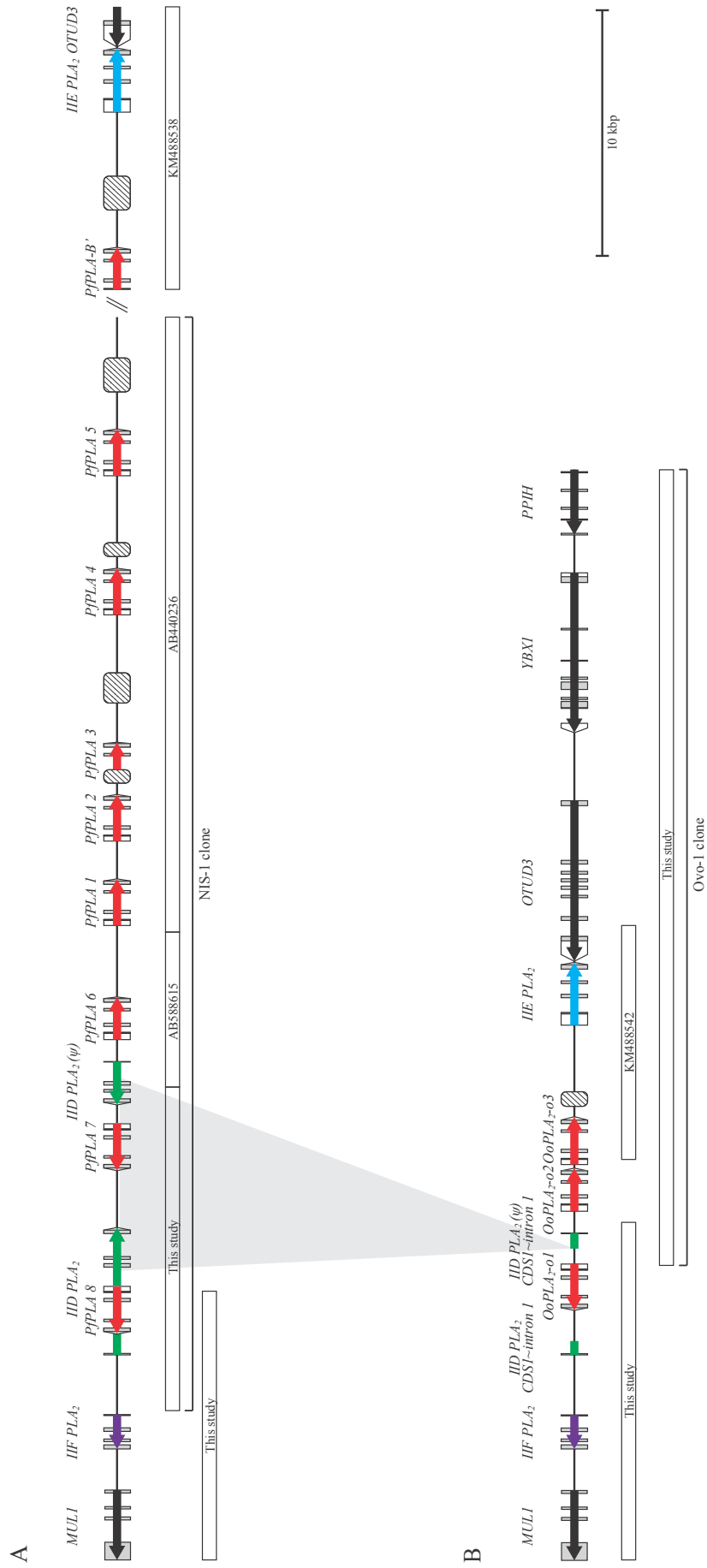


Figure 47. ホンハブとヒメハブのPLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域のゲノム構造

(A) ホンハブ PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター NIS-1 クローン, (B) ヒメハブ PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター。遺伝子構造図の下の番号と白枠はアクセッション No. とその領域を示す。  
 → : 遺伝子領域, ◻ : コーディング領域, □ : 5' UTR, ▭ : 3' UTR, ▨ : PeRTF。

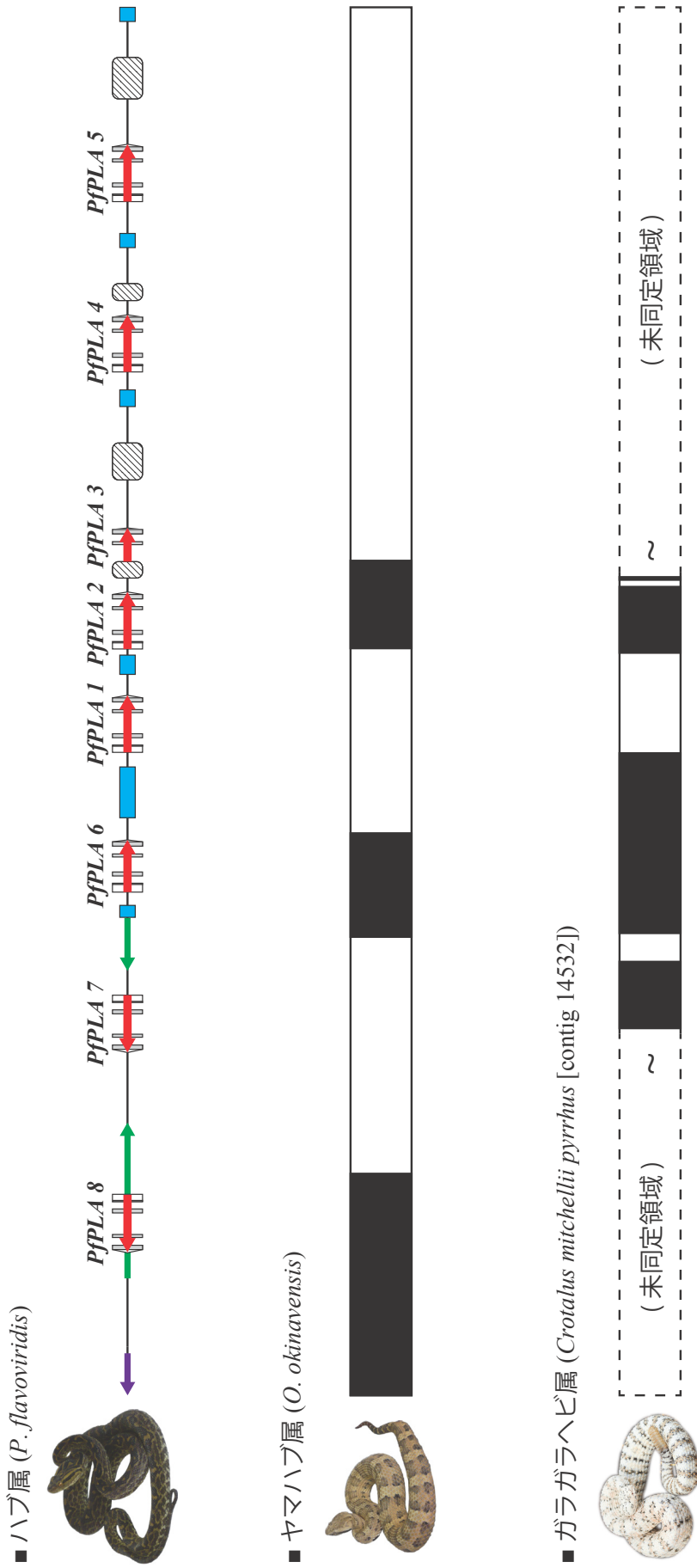


Figure 48. クサリヘビ科ヘビの毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域の相同関係

黒太線はホンハブ PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターに対するヒメハブとササンスペッククルドドラトルスネーク (*Crotalus michellii pyrrhus*) PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの相同領域を示す。赤、緑、紫色の各矢印は IIA 型、IID 型、IIF 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子を示す。青太線は IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子に高い相同性を示す Chai 配列を示す。

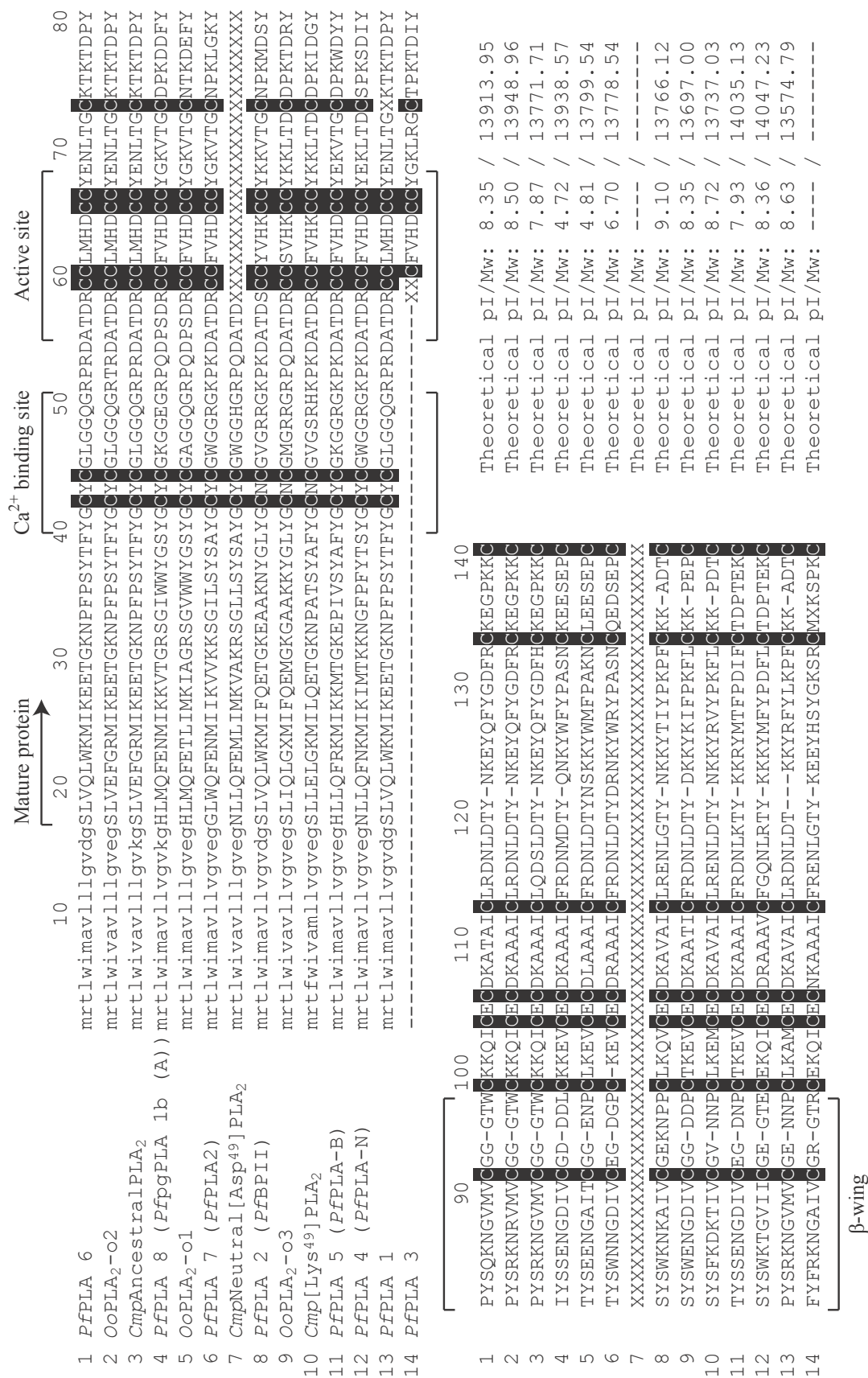


Figure 49. クサリヘビ科へビの毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域に含まれる IIA 型 PLA<sub>2</sub> アミノ酸アラインメント

システイン残基は黒塗りです。Cmp, *Crotalus mitchellii pyrrhus*. 理論上の pI 値と分子量は ExpASY (Expert Protein Analysis System) の Compute pI/Mw tool を用いて推定した。未同定箇所及び偽遺伝子に含まれるストップコドンやフレームシフトに相当する箇所のアミノ酸残基は X に置き換えて活性型 PLA<sub>2</sub> のアミノ酸配列を予測した。

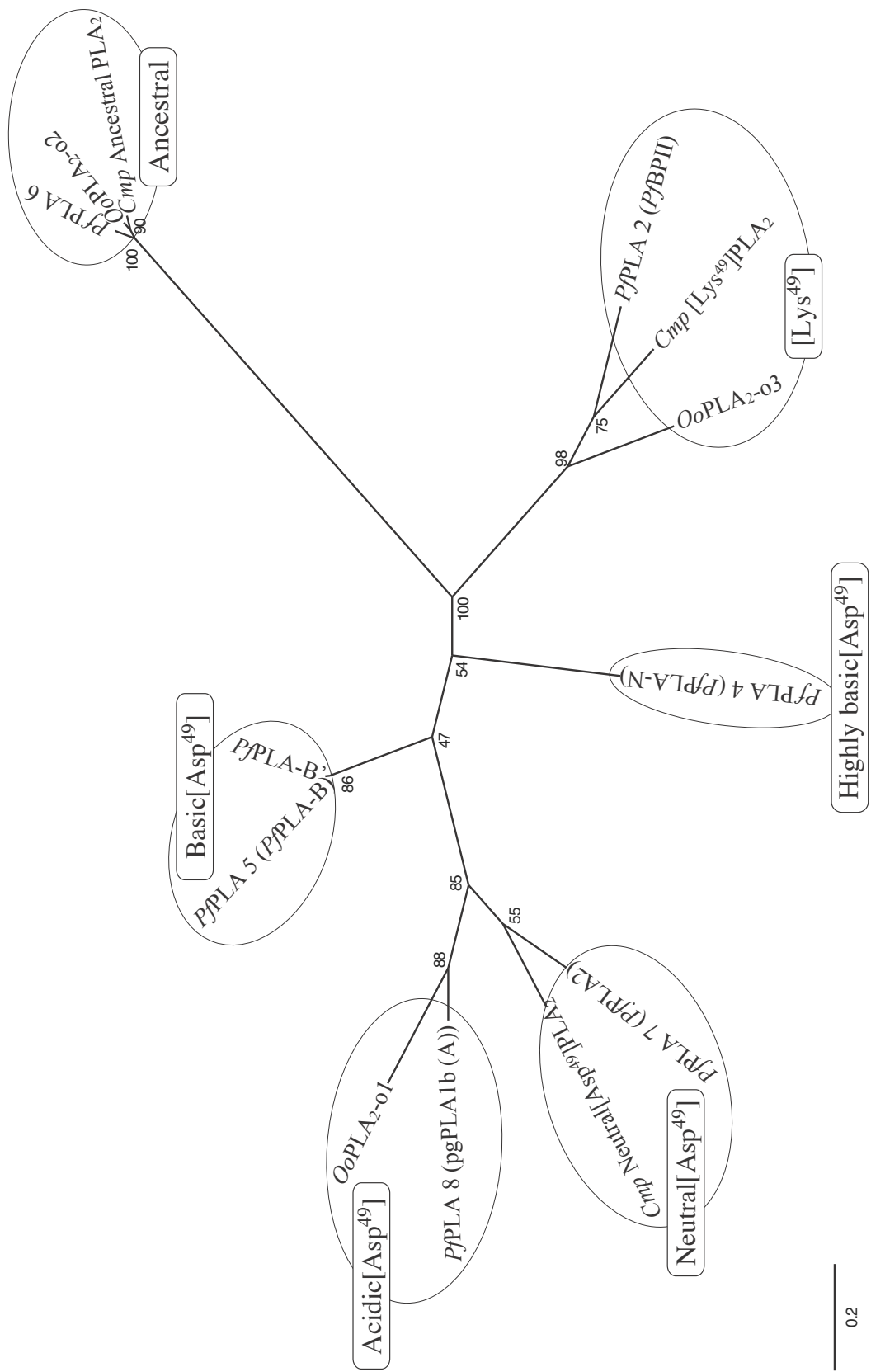


Figure 50. クサリヘビ科ヘビの毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域に含まれる IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> の成熟タンパク質に基づく系統分類

0.2

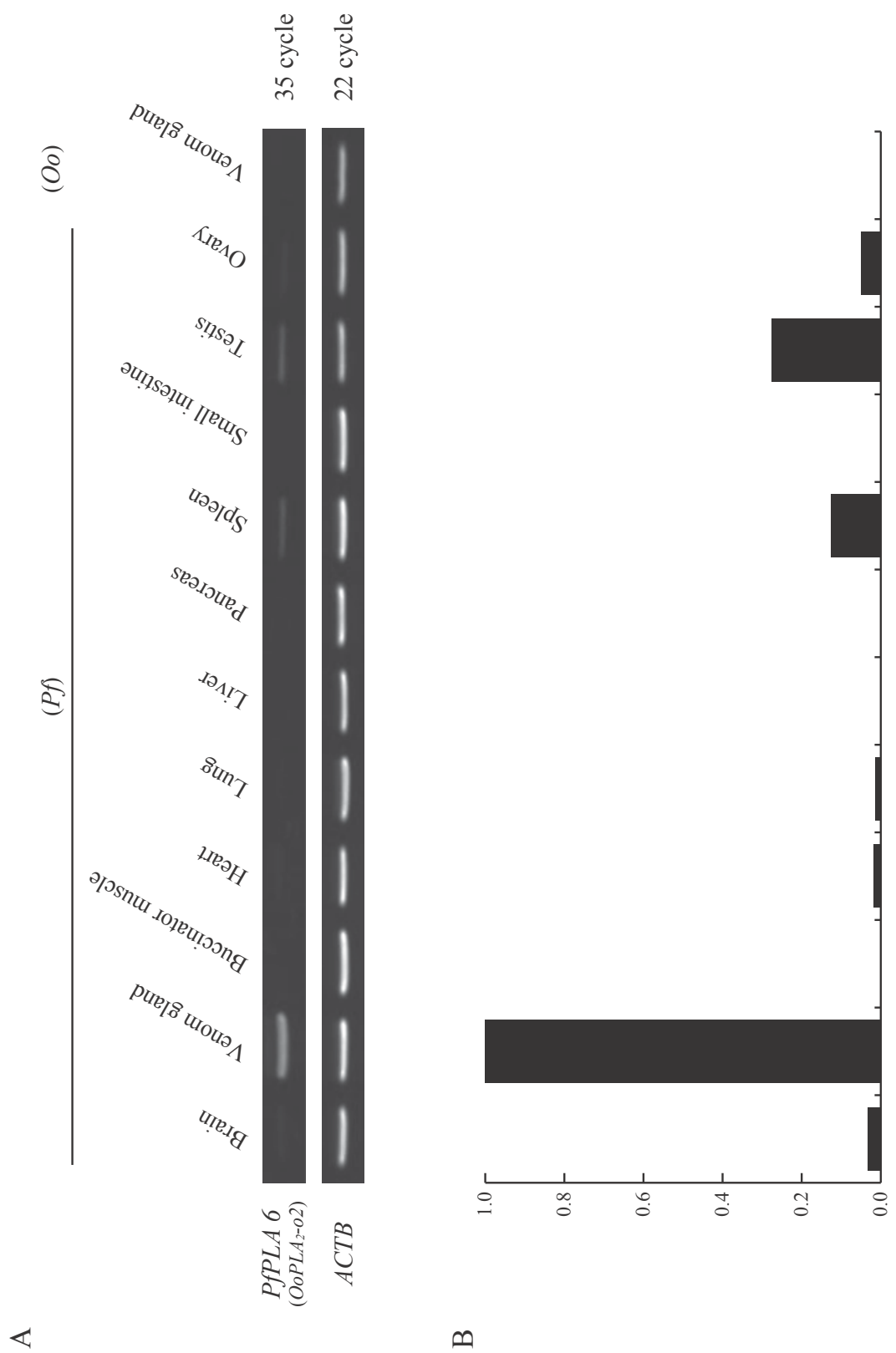


Figure 51. 祖先型 PLA<sub>2</sub>, PjPLA 6 と OoPLA<sub>2</sub>-o2, 遺伝子転写産物の発現組織分布

(A) 逆転写 PCR による祖先型 PLA<sub>2</sub>, PjPLA 6 と Oo-PLA<sub>2</sub>-o2, 遺伝子転写産物発現組織ポディーマップ。右数値は PCR サイクル数を示す。  
 (B) 半定量的発現量の比較グラフ。ACTB 遺伝子転写産物増幅バンドの蛍光強度に基づいた定量値を算出し、祖先型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子転写産物増幅バンドの蛍光強度を定量値補正した後、ホンハブ毒腺での定量値を 1 として、各サンプル間での発現量を相対的に比較した。



A				
<i>K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub></i> ratio ( <i>K<sub>A</sub></i> , <i>K<sub>S</sub></i> )	1	2	3	4
1. <i>Pf</i> PLA 6				
2. <i>Oo</i> PLA <sub>2</sub> -o2	0.2638 (0.0318 0.1205)			
3. <i>Oh</i> IIA <sub>2</sub> PLA <sub>2</sub>	0.4713 (0.1301 0.2761)	0.4061 (0.1141 0.2808)		
4. <i>Pm</i> IIA <sub>2</sub> PLA <sub>2</sub>	0.4365 (0.3143 0.7200)	0.4236 (0.3249 0.7671)	0.3781 (0.3125 0.8266)	
5. <i>Cmp</i> Ancestral PLA <sub>2</sub>	0.2358 (0.0382 0.1622)	0.1005 (0.0189 0.1884)	0.2493 (0.1066 0.4276)	0.3356 (0.3265 0.9730)
B				
<i>K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub></i> ratio ( <i>K<sub>A</sub></i> , <i>K<sub>S</sub></i> )	1			
1. <i>Pf</i> PLA 8 ( <i>Pf</i> pgPLA 1b (A))				
2. <i>Oo</i> PLA <sub>2</sub> -o1	0.2723 (0.0968 0.3555)			
C				
<i>K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub></i> ratio ( <i>K<sub>A</sub></i> , <i>K<sub>S</sub></i> )	1	2		
1. <i>Pf</i> PLA 2 ( <i>Pf</i> BP-II)				
2. <i>Oo</i> PLA <sub>2</sub> -o3	0.9652 (0.1504 0.1558)			
3. <i>Cmp</i> [ <i>Lys</i> <sup>49</sup> ]PLA <sub>2</sub>	0.7765 (0.1402 0.1805)	0.7826 (0.1750 0.2236)		

Figure 52. へび類 IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の *K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub>* 値

(A) Ancestral PLA<sub>2</sub> 遺伝子の *K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub>* 値。 (B) Acidic[Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子の *K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub>* 値。 (C) [*Lys*<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子の *K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub>* 値。

1. *PfPLA 1* m r t l w i m a v l l v g v d g s l v q l w k m i k e e t g k n p f  
 ATGAGGACTCTTTGGATAATGGCCGTGTTCCTGGTGGGCGTTCGATGGGAGCCTGGTCCAAATTTGTGGAAGATGATCAAGGAAGAGACGGGGAAAAACCCCATTT  
 2. *PfPLA 6* m r t l w i m a v l l l g v d g s l v q l w k m i k e e t g k n p f  
 ATGAGGACCGCTCTGGATAATGGCCGTGTTCCTGGTGGGCGTTCGATGGGAGCCTGGTCCAAATTTGTGGAAGATGATCAAGGAAGAGACGGGGAAAAACCCCATTT  
 3. *PfPLA 2* m r t l w i m a v l l v g v d g s l v q l w k m i f q e t g k e a a  
 ATGAGGACTCTCTGGATAATGGCCGTGTTCCTGGTGGGCGTTCGATGGGAGCCTGGTCCAAATTTGTGGAAGATGATCTTCCAAGAGACGGGGAAAAAGAGCTGTGCT

1. P S Y T F Y G C Y C G L G G Q G R P R D A T D R C C L M H D C C Y E N L  
 CCCTCTACACCTTTTACGGATGCTACTGTGGCCTGGGGGCCCAAGCCCGCCACGGGACGCCACTGACCCGCTGCTTGAATGCAATGACTGCTGTACGAGAAATCTG  
 2. P S Y T F Y G C Y C G L G G Q G R P R D A T D R C C L M H D C C Y E N L  
 CCCCTCACACCTTTTACGGATGCTACTGTGGCCTGGGGGCCCAAGCCCGCCACGGGACGCCACTGACCCGCTGCTTGAATGCAATGACTGCTGTACGAGAAATCTG  
 3. K N Y G L Y G C N C G V G R R G K P K D A T D S C C Y V H K C C Y K K V  
 AAAAACTACGGCTTATACGGATGCAACTGGGGCTGGGGAGGGCAAGCCAAAGGACGCTACTGACAGCTGCTGCTATGTGCAAAAATGCTGTACAAAAAAGTG

1. T G X K T K T D P Y P Y S R K N G V M V C G E - N N P C L K A M C E C D  
 ACCGGXGCAAGACCAAAAACGGACCCCTACAGCCGGAAAGACGGGGTTATGGTCTGGGAGAG---AATAACCCATGCCCTGAAGGGCGATGTGTGAGTGTGAC  
 2. T G C K T K T D P Y P Y S Q K N G V M V C G G - G T W C K K Q I C E C D  
 ACCGGTGC AAGACCAAAAACGGACCCCTACAGCCAGAAAGACGGGGTTATGGTCTGGGAGGG---GGCACCTGGTGC AAGAACAGCATTTGTGAGTGTGAC  
 3. T G C N P K M D S Y S Y S W K N K A I V C G E K N P P C L K Q V C E C D  
 ACCGGTGC AAAAAATGGACAGTACTCCTATAGCTGGAAGAACAAGGCCATCGTCTGGGGAGAGAAAAACCCACCATGCCCTGAAGCAGGTGTGTGAGTGGCAG

1. K A V A I C L R D N L D T - - K K Y R F Y L K P F C K K - A D T C \*  
 AAGGCCGTGGCAATCTGCCCTCCGAGACAAATCTGGACACG-----AAAAAATATAGGTTTACCTGAAAACCTTTTCTGCAAGAAG---GCAGATACATGCTAA  
 2. K A T A I C L R D N L D T Y N K E Y Q F Y G D F R C K E G P K K C \*  
 AAGGCCACGGCAATCTGCCCTCCGAGACAAATCTGGACACA TACAACAAAGAAATATCAGTTTTATGGGACITTCGTTGCAAGGAGGTCCTCAAAAGAAATGCTAA  
 3. K A V A I C L R E N L G T Y N K K Y T I Y P K P F C K K - A D T C \*  
 AAGGCCGTGGCAATCTGCCCTCCGAGAAAAATTTGGGCACGTACAACAAAAAATATACGATTTACCCGAAAACCTTTTCTGCAAGAAG---GCAGATACATGCTAA

Figure 53. *PfPLA 1*, *PfPLA 2*, *PfPLA 6* のコドンアラインメント

上段にアミノ酸、下段にそれに対応するコドンを記し、シグナルペプチドは小文字で示す。灰色の枠は第1, 3エクソンのコーディング領域を示す。赤字はそれぞれ高い相同性を示す領域を示す。

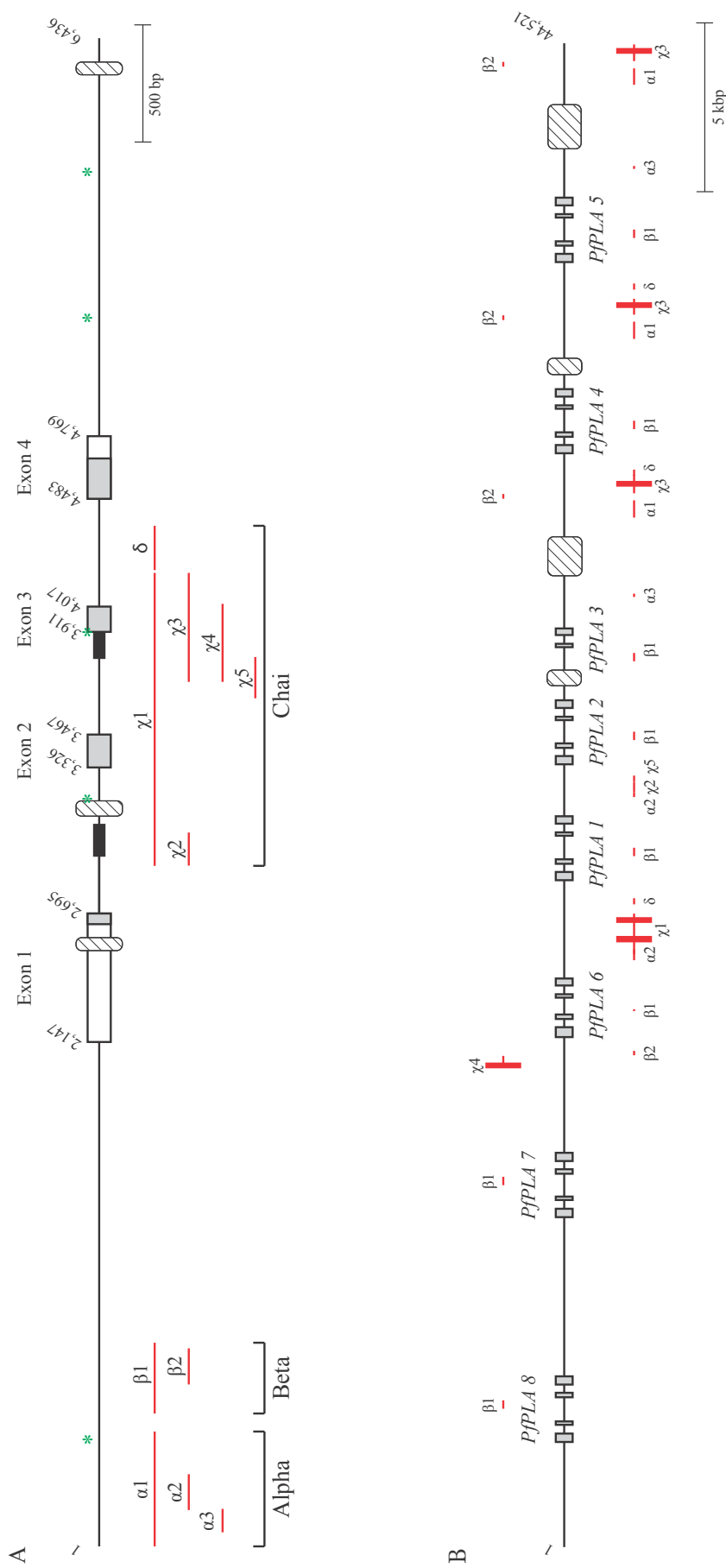


Figure 54. IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子相同配列断片が散在するホンハブ PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター

(A) ホンハブの IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子中に存在するホンハブ PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター相同配列断片。(B) ホンハブ PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域内に散在的に存在する IIE 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子相同断片。■：コードイング領域，□：コーディング領域，▨：UTR，■：ステムループ構造，▨：PeRTF 及びトランスポゾン配列，—：Alpha, Beta, Chai 配列，\*：CTCF モチーフ



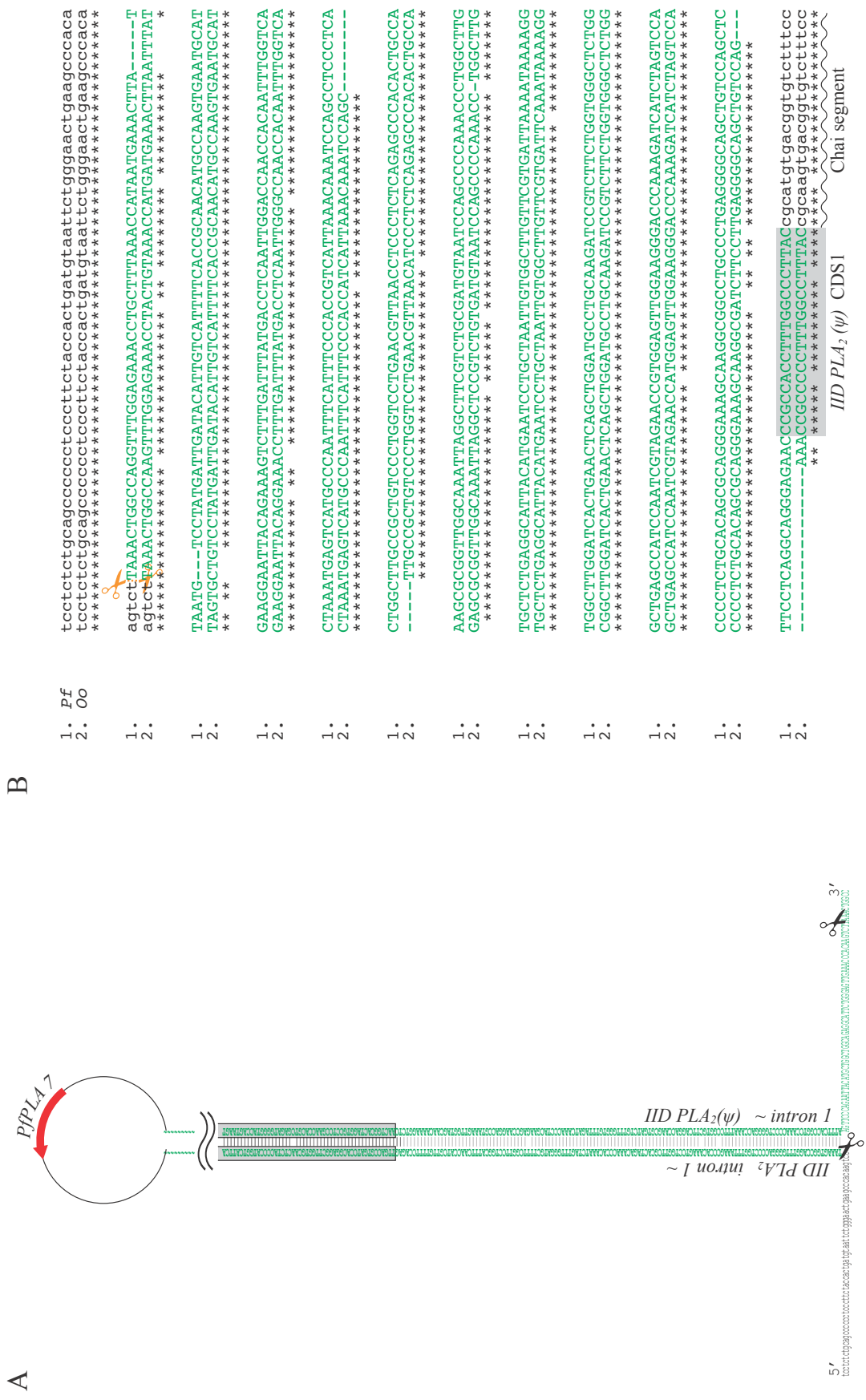


Figure 56. ホンハブの2つのIID型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子により形成されるステムループ構造

(A) ホンハブの PIPPLA<sub>2</sub>, PIPPLA<sub>3</sub>, PIPPLA<sub>4</sub>, PIPPLA<sub>5</sub> 遺伝子の相補的塩基対結合により形成されるステムループ構造。緑文字は IID 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子, 枠内はコーディング領域を示す。  
 (B) ステムループ構造を仮想的に取り除いたホンハブの核酸配列のアラインメント。橙色のハサミマークの箇所に本来はステムループ構造がある。

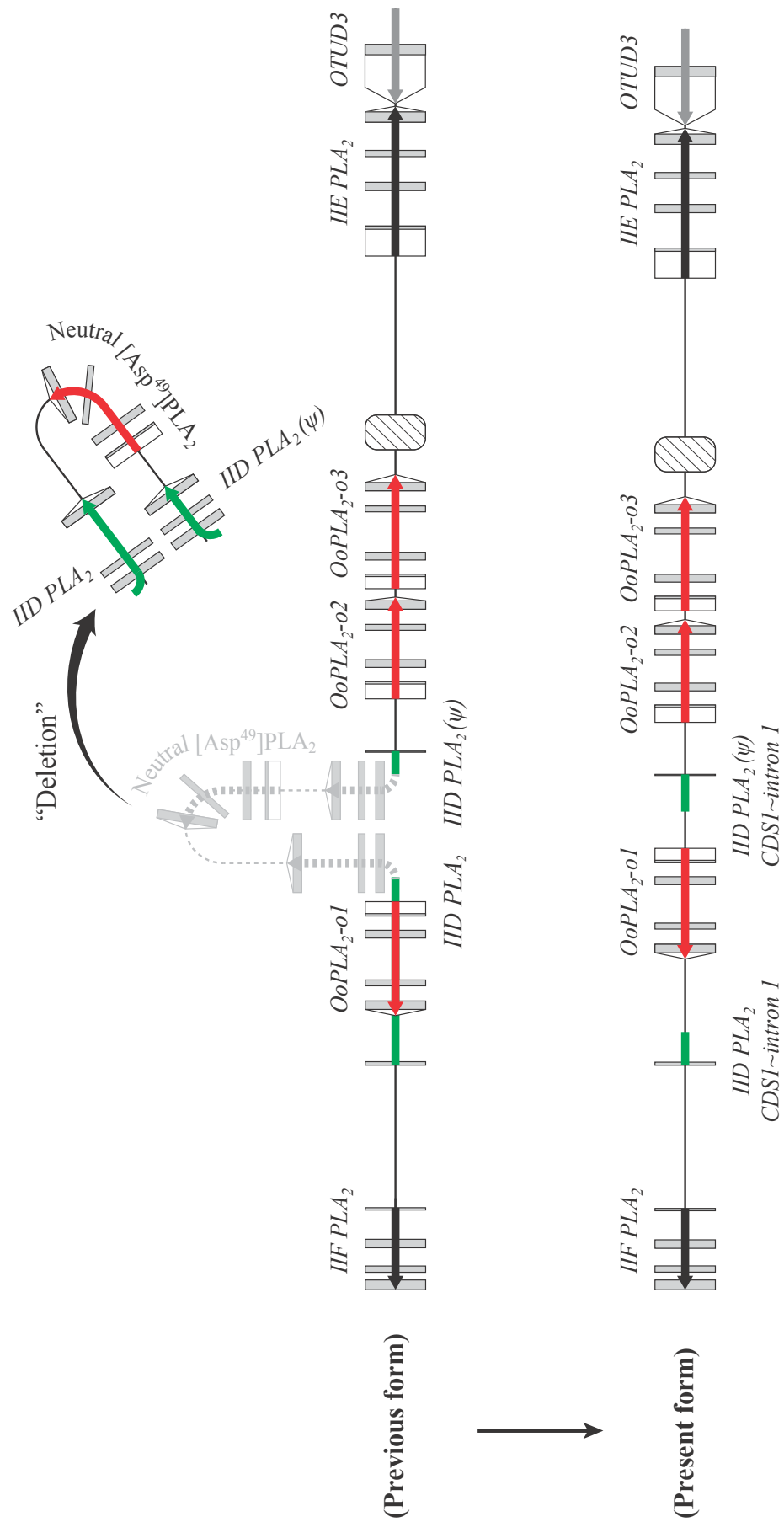


Figure 57. ヒメハブで生じた2つのIID型PLA<sub>2</sub>遺伝子により形成されるステムループ構造の欠失

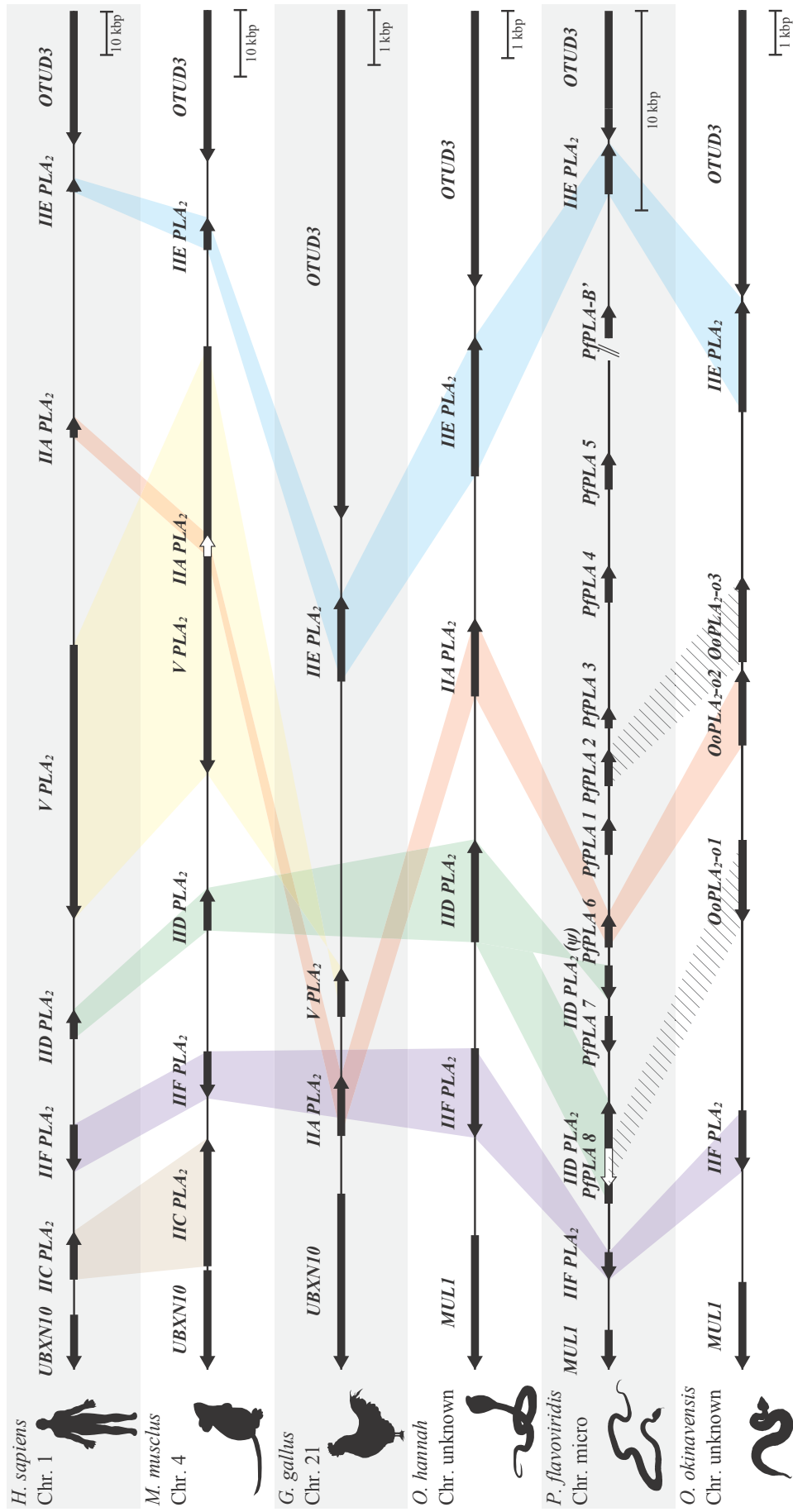


Figure 58. 分泌型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスター領域のゲノム構造比較

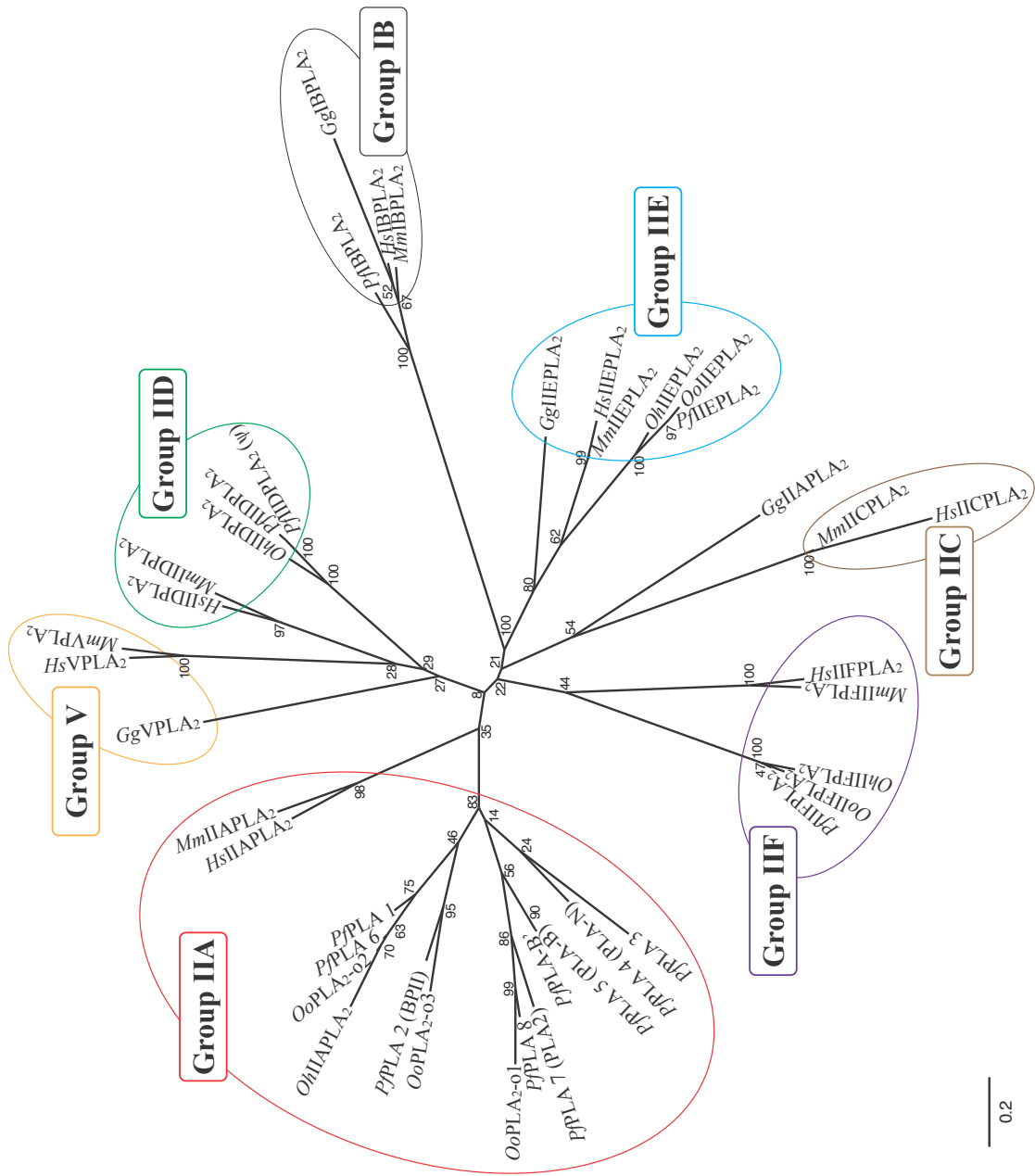


Figure 59. 分泌型 PLA<sub>2</sub> 成熟タンパク質に基づく系統解析



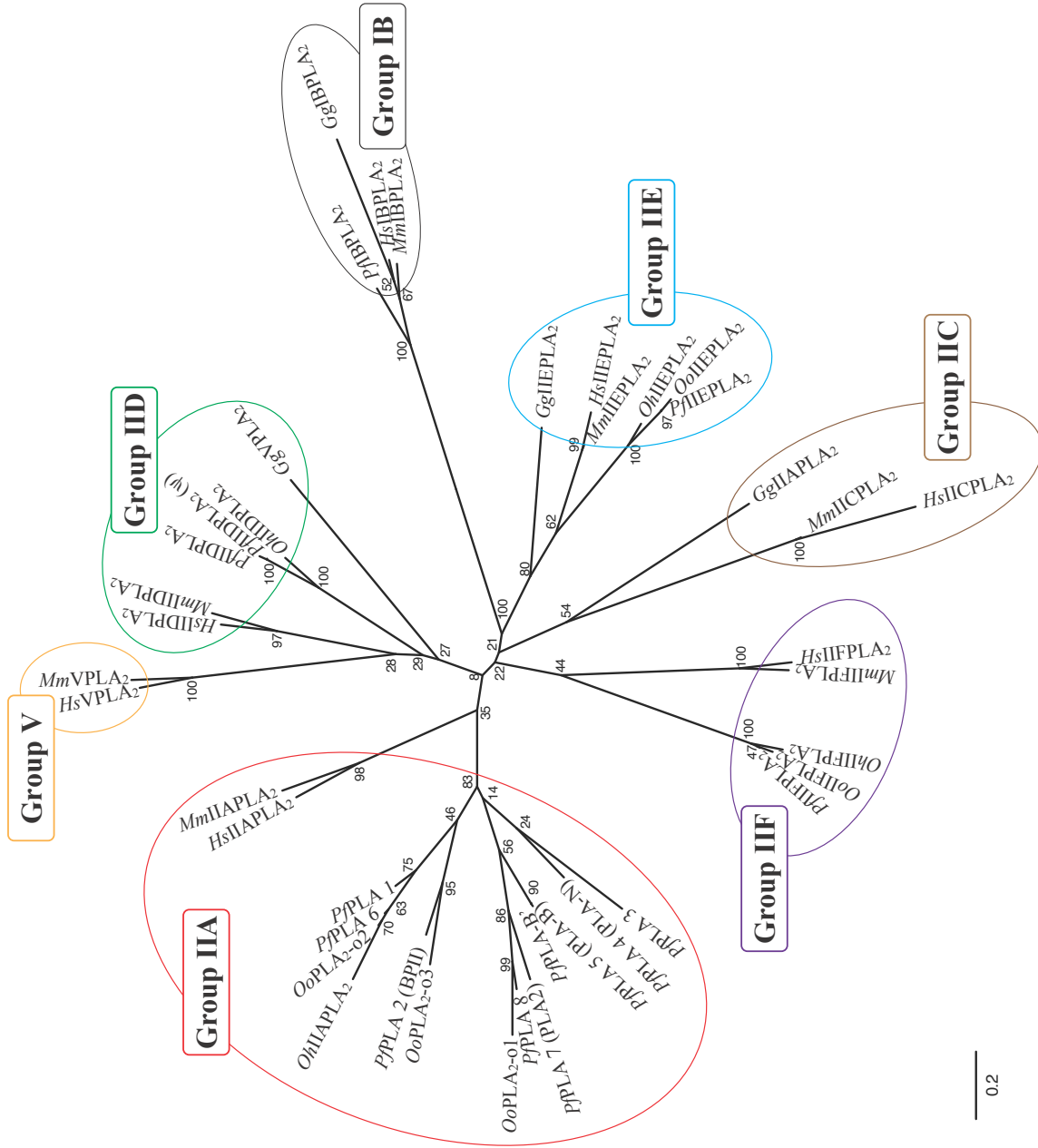


Figure 60. 分泌型 PLA<sub>2</sub> 成熟タンパク質に基づく系統解析

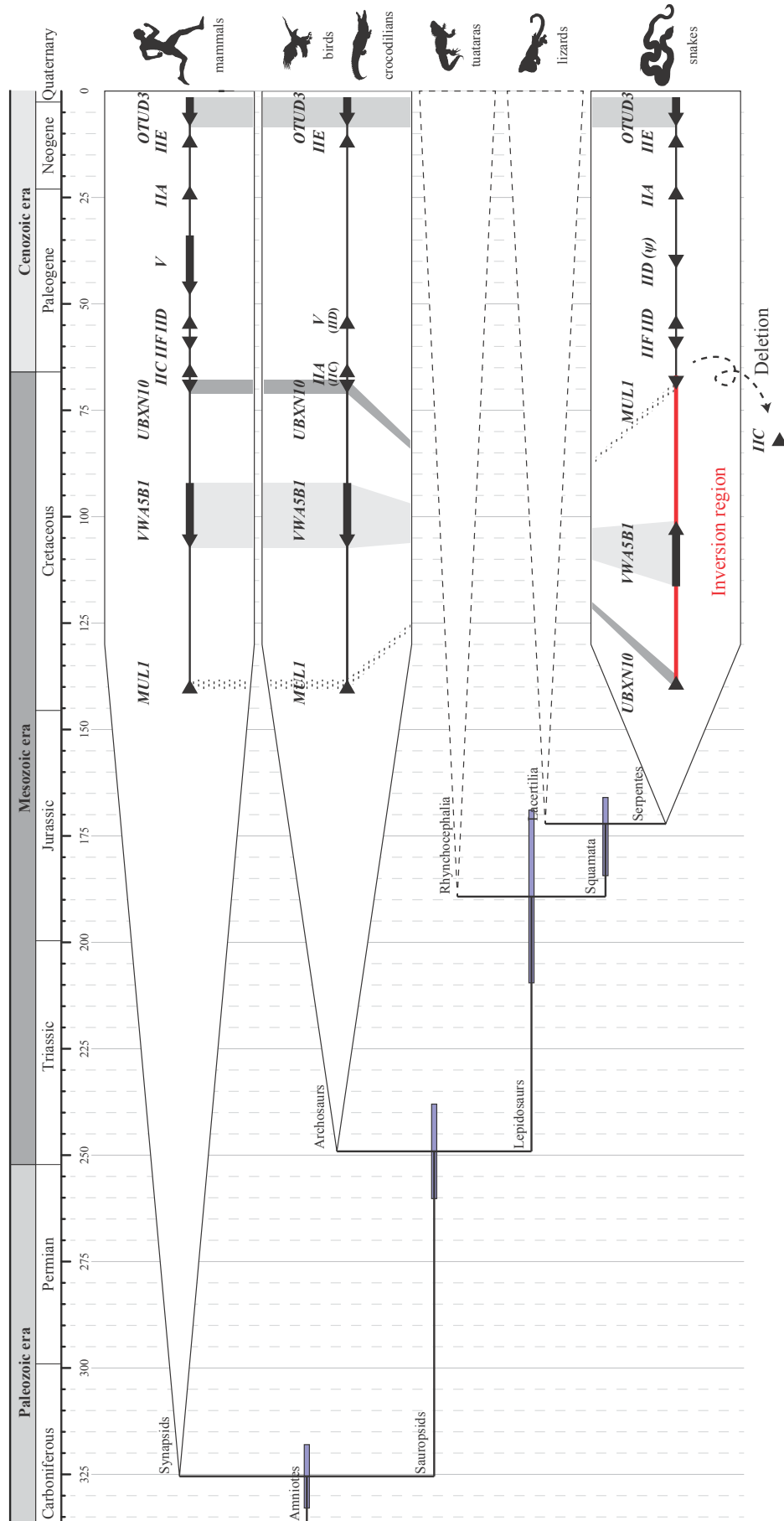


Figure 61. 生物の種の間でのPLA<sub>2</sub>遺伝子ファミリーの比較



Figure 62. 更新世陸橋仮説で示された  
ハブ属とヤマハブ属ヘビの日本南西諸島への渡来

黒領域は現在の陸地，緑領域は 170~150 万年前に存在したと木村によって推定された陸地及び陸橋，赤矢印はハブ属とヤマハブ属ヘビの日本南西諸島への渡来ルートを示す。

出典：Kimura., 1996. Journal of Geography (Chigaku Zasshi) 105, 3, 259-285 (一部修正).

Kimura., 2000. International Symposium The Ryukyu Islands 10, 1, 5-24 (一部修正).

制約	Reference
①. B (1.689, 2.095)	Benton et al., 2015
②. B (0.9832, 1.130)	Head, 2015
③. L (0.721, 0.1, 0.1, 0.025)	Head, 2015
④. B (0.9390, 1.005)	Head, 2015
⑤. B (0.580, 0.640)	Head, 2015
⑥. B (0.503, 0.554)	Rage et al., 2008; Sanders et al., 2010
⑦. L (0.17, 0.2, 0.02, 0.025)	Holman and Tanimoto, 2004
⑧. L (0.09, 0.4, 0.01, 0.025)	Parmley and Holman, 2007
*. B (0.0085, 0.02)	Osozawa et al., 2013, 2012

B

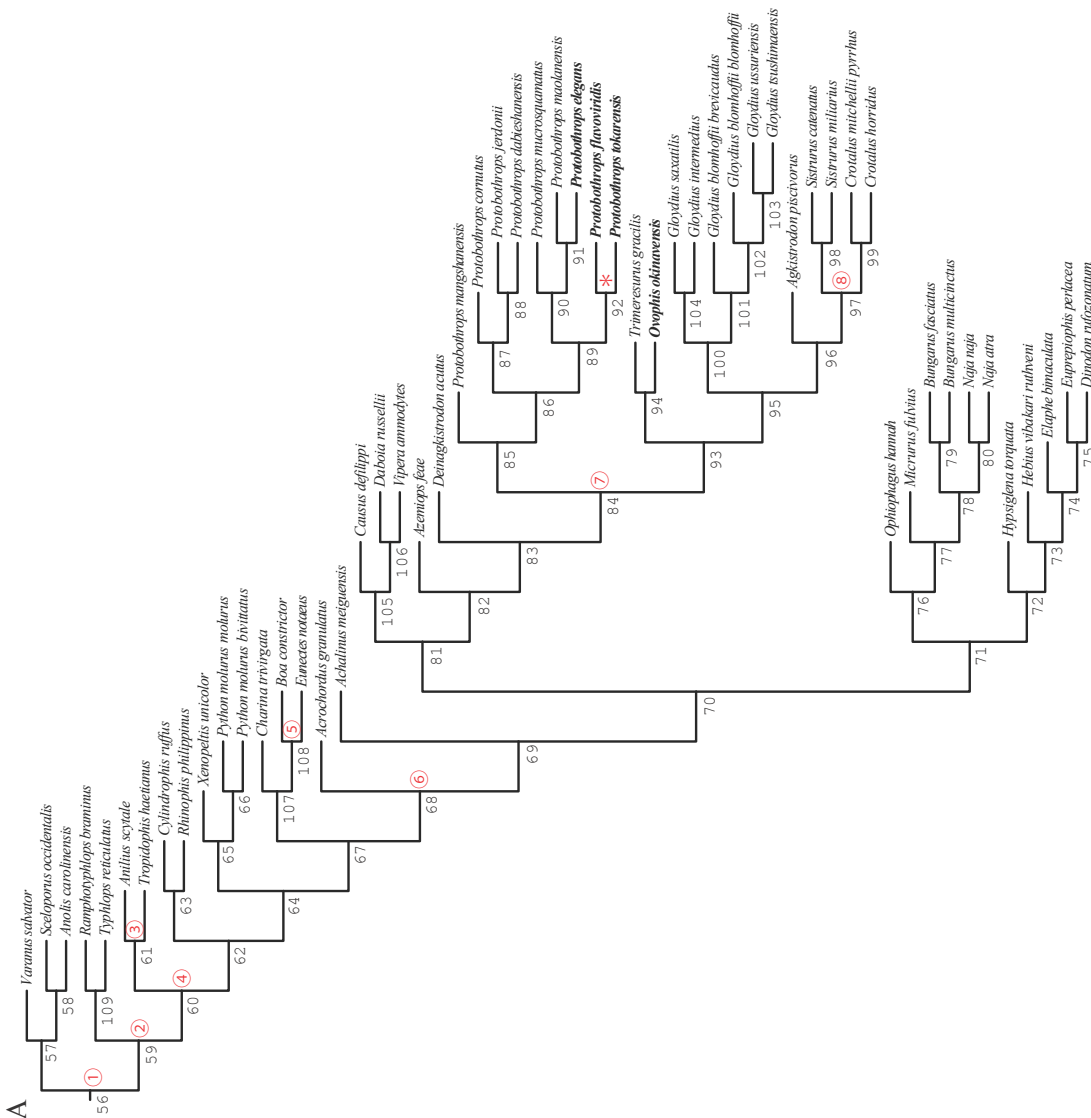
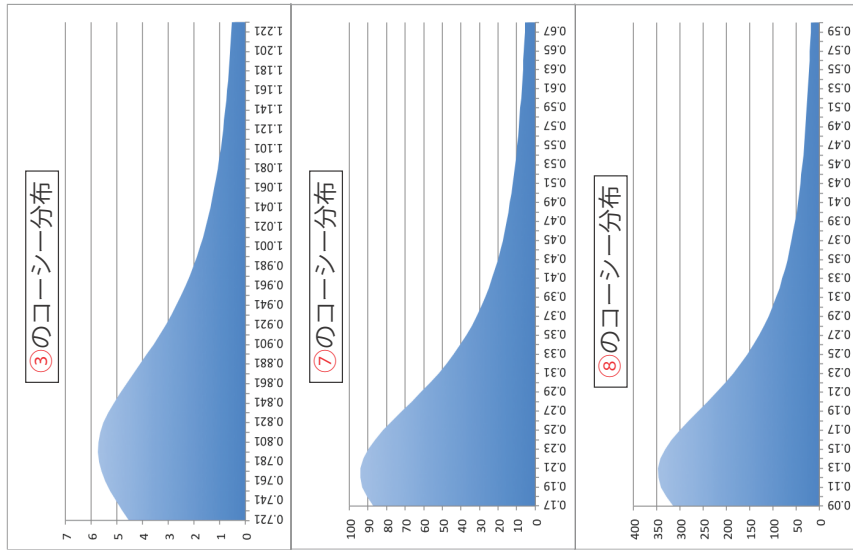


Figure 63. ミトコンドリアの *ND4*, *Cytb*, *16S* 及び *12S rRNA* 遺伝子配列に基づいて推定された系統の分岐と化石記録による制約の設定

(A) 最尤法で推定された系統分岐。赤数字で示したノードは化石記録による制約を施した箇所、黒字番号はノード番号。(B) 今回の解析に使用した化石記録による制約と下限制約のコーシー分布。

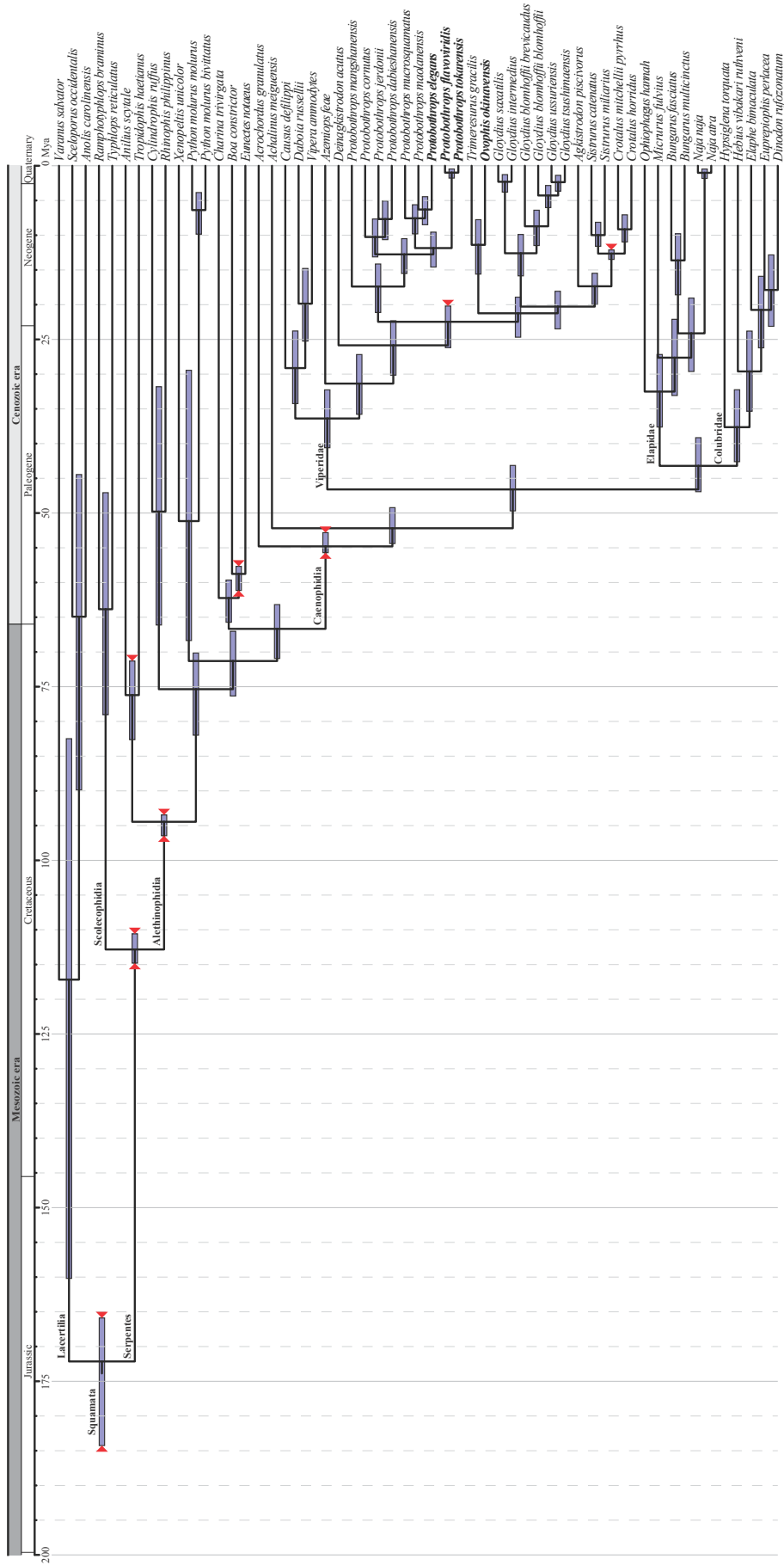


Figure 64. 琉球弧の地理的隔離を制約として採用しない場合の蛇族分岐年代推定

紫色のバーは 95% 信頼区間 (Confidence interval) を示し、赤色矢頭は化石記録に基づいて制約を施した分岐点を示す。Mya, Million years ago.

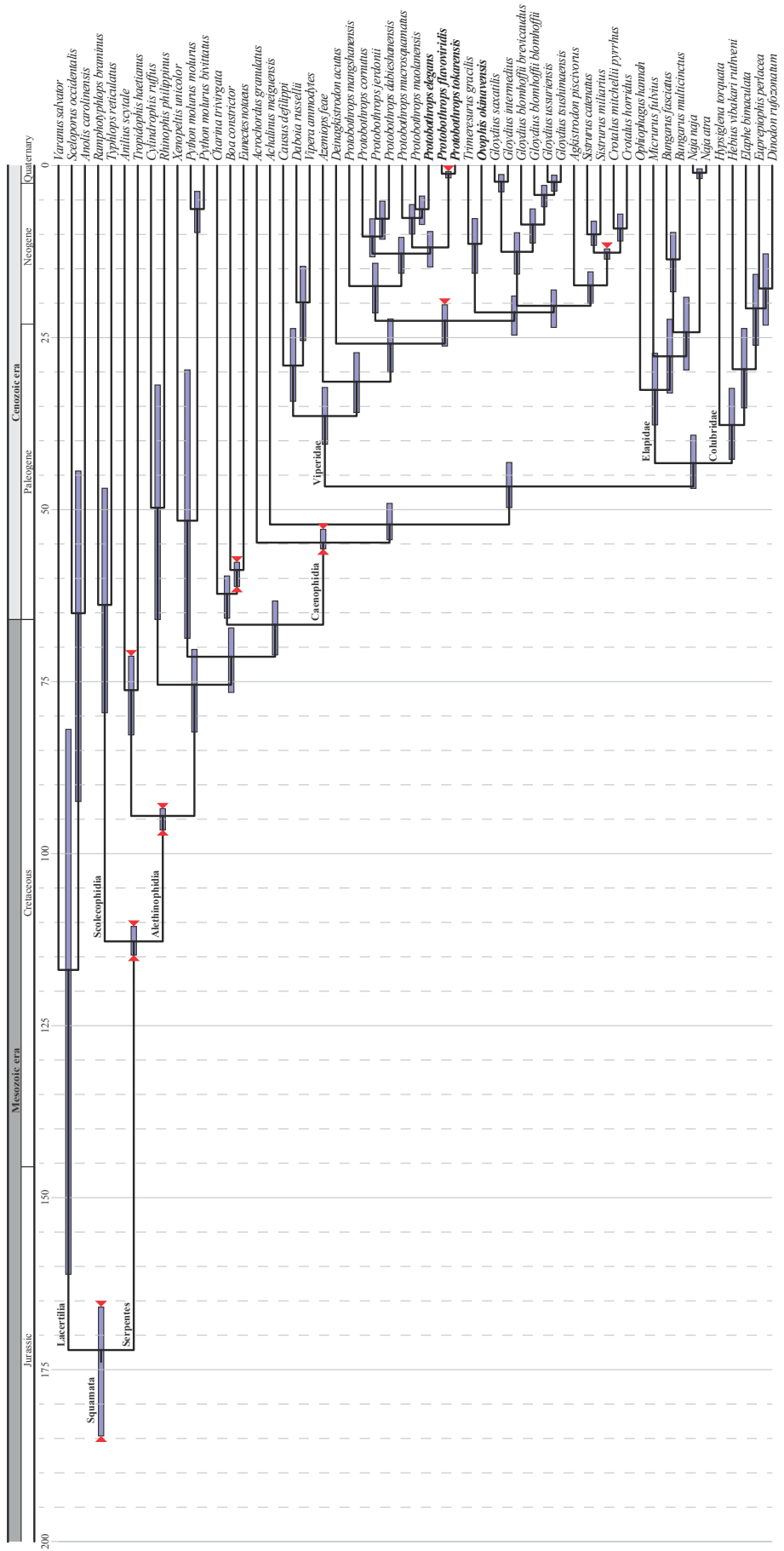


Figure 65. 琉球弧の地理的隔離を制約として採用した場合の蛇族分岐年代推定

紫色のバーは95%信頼区間 (Confidence interval) を示し、赤色矢頭は化石記録と琉球弧の地理的隔離に基づいて制約を施した分岐点を示す。Mya, Million years ago.

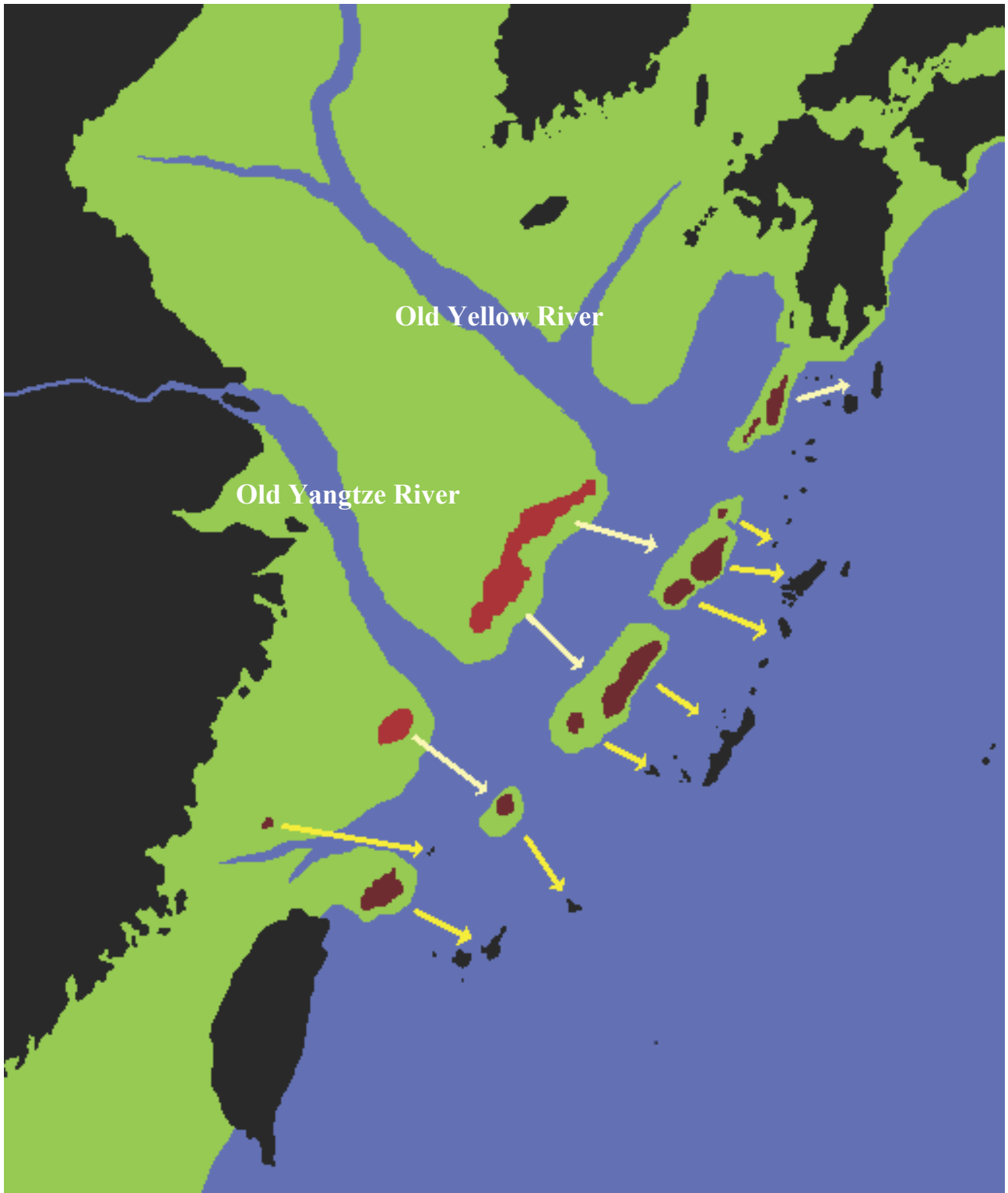


Figure 66. 付加体の移動と日本南西諸島の形成

黒領域は現在の陸地，緑領域は過去に存在したと服部によって推定された陸地，赤領域は大陸沿岸部に当時存在した日本南西諸島の付加体，黄矢印は付加体の移動を示す。  
 出典：Hattori., 2014. Horizon 40, 12 (一部修正).

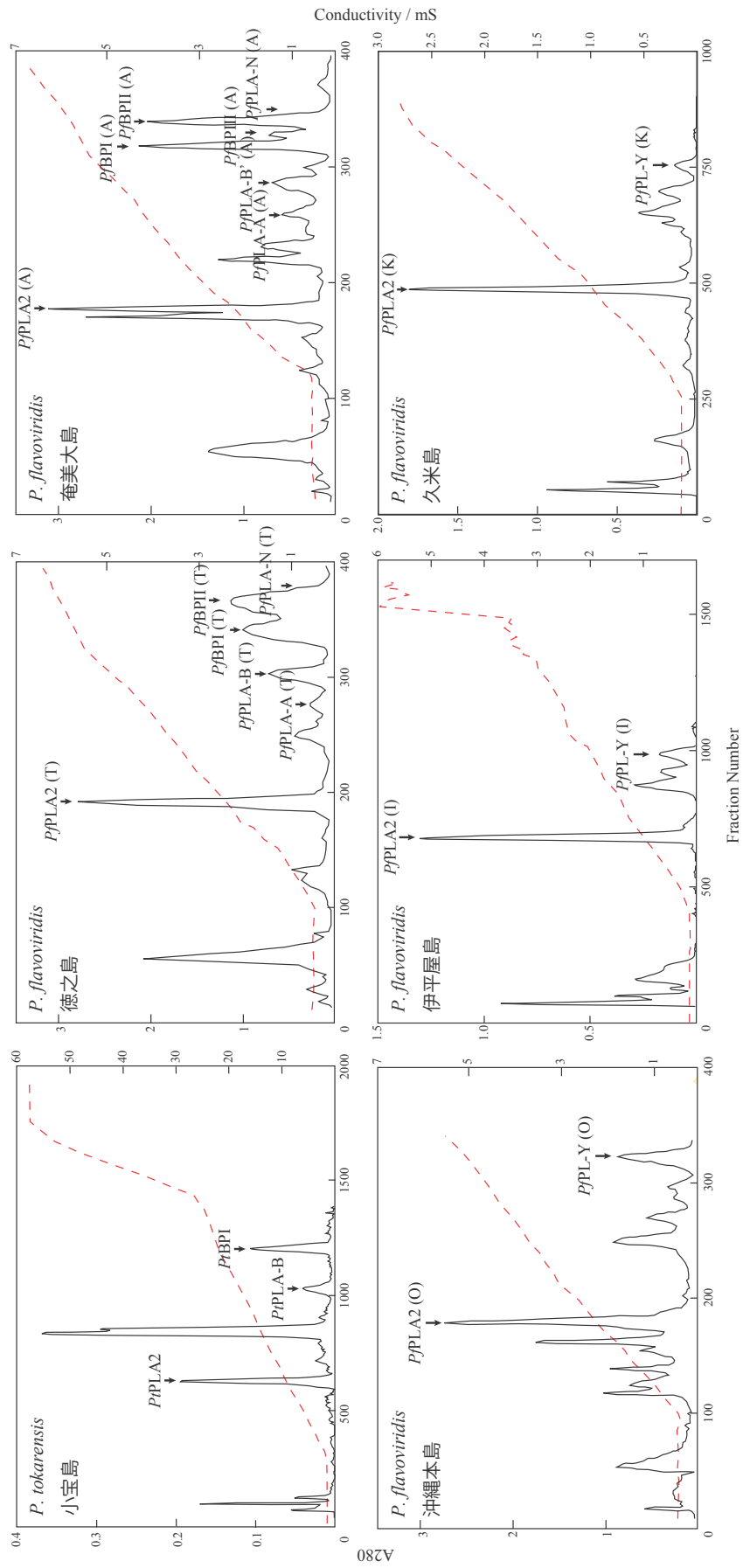
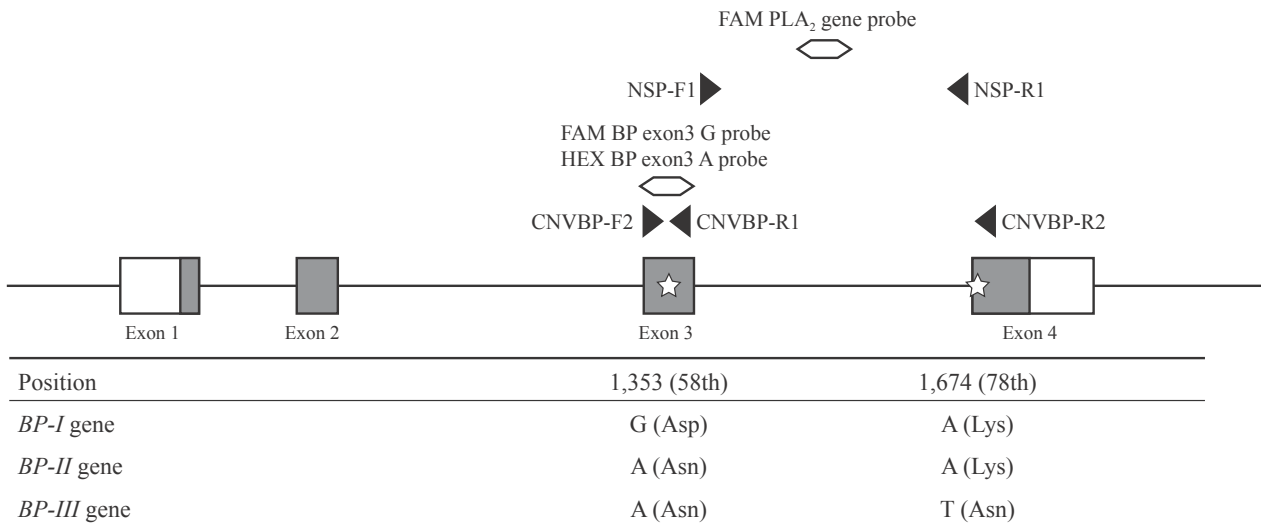


Figure 67. トカラハブとホンハブの粗毒クロマトグラフィー分画プロファイル比較



A



B

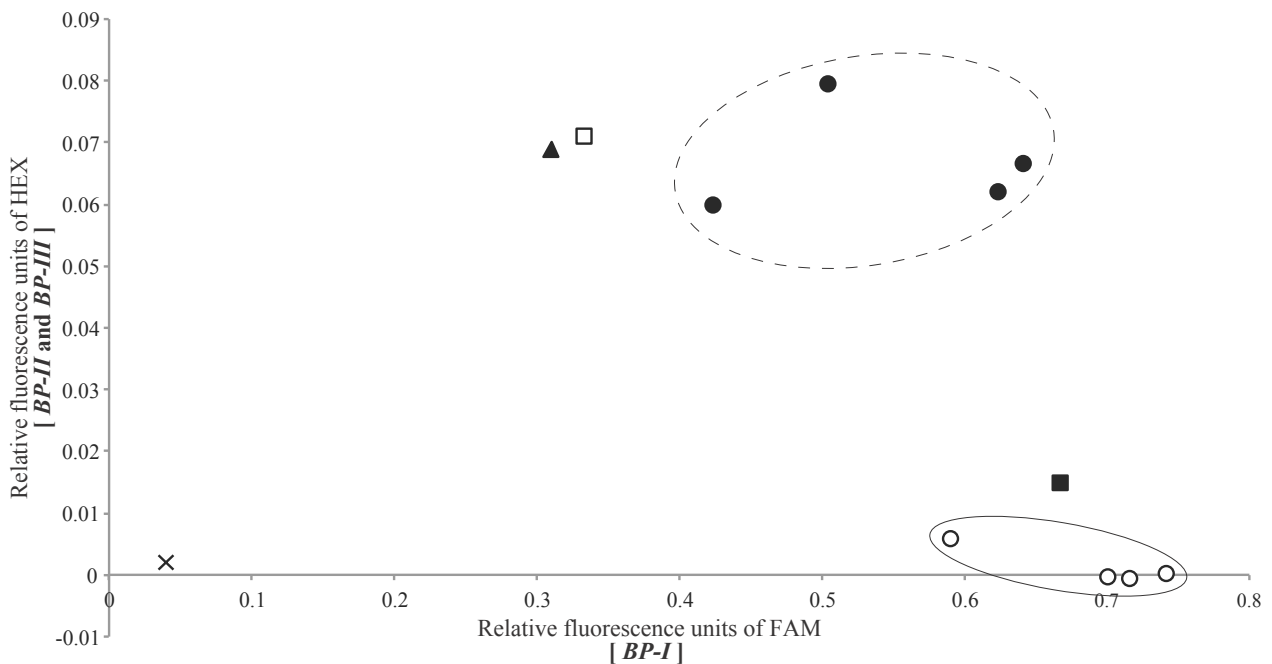


Figure 68. [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイズォイムをコードする遺伝子の第3エクソンに対する一塩基多型 (SNP) ジェノタイピング

(A) SNP ジェノタイピングの TaqMan プローブとプライマー。☆は SNP, 矢頭は PCR プライマー, 六角形は TaqMan プローブをそれぞれ示す。

(B) トカラハブとホンハブに対する SNP ジェノタイピング。●はホンハブ (奄美大島), ○はトカラハブ, ▲はホンハブ (沖縄本島), □は *BP-II* 及び *BP-III* ポジティブコントロール, ■は *BP-I* ポジティブコントロールをそれぞれ示す。値は同じ測定を 3 回繰り返すことで求めた。

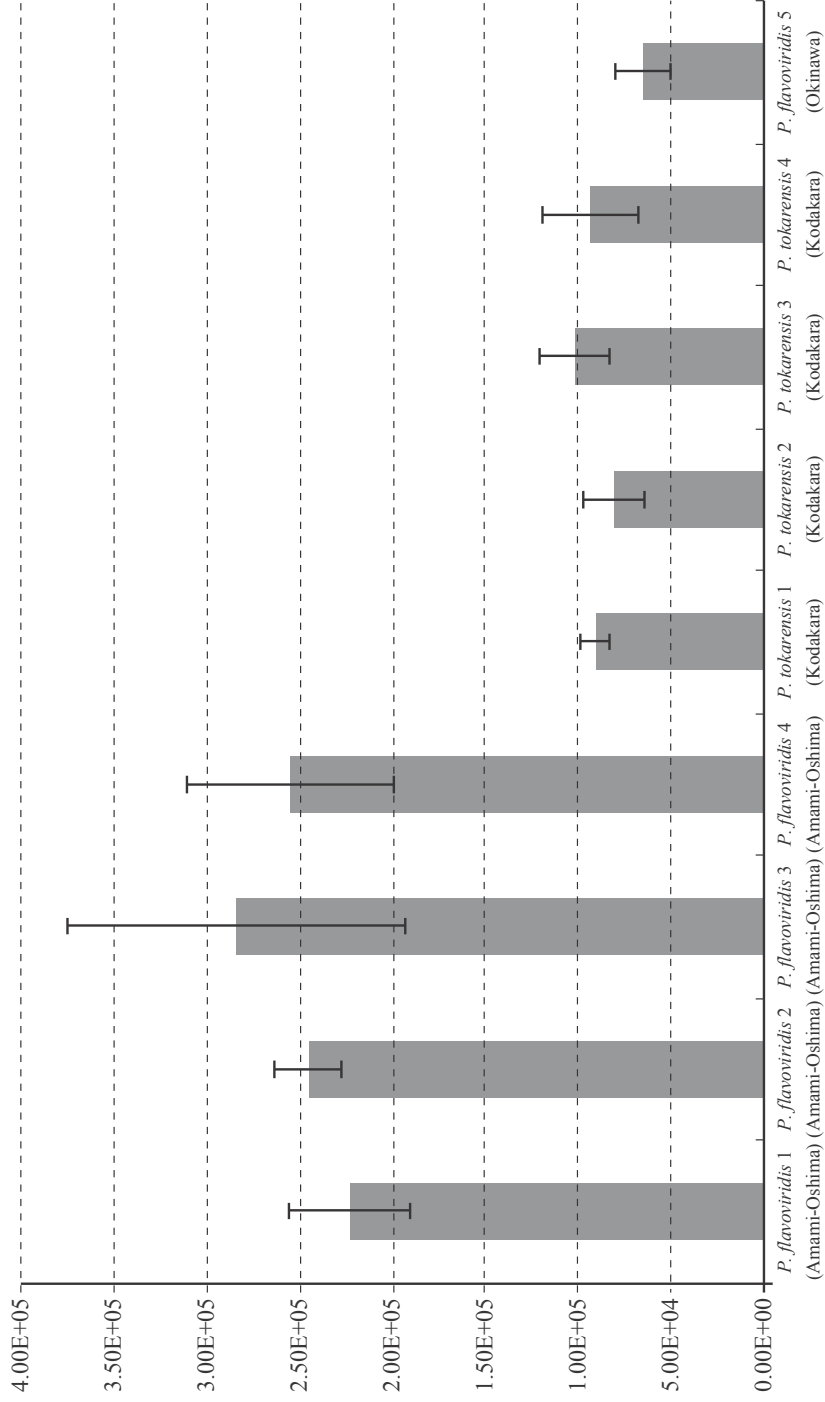


Figure 69. ホンハブとトカラハブの [Lys<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> アイソザム遺伝子のコピー数の比較

値は同じ測定を3回繰り返すことで求めた。バーは標準偏差を示す。

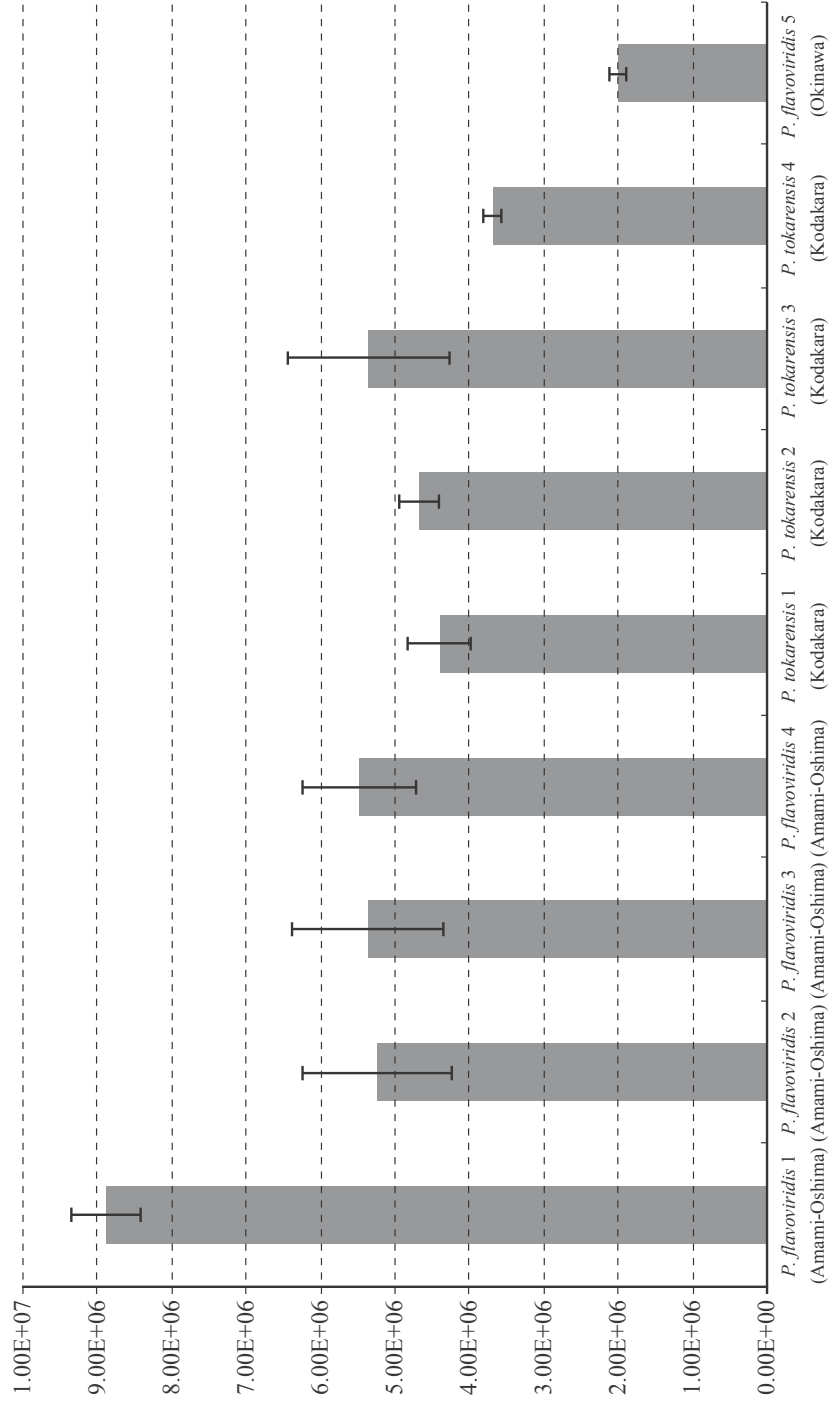
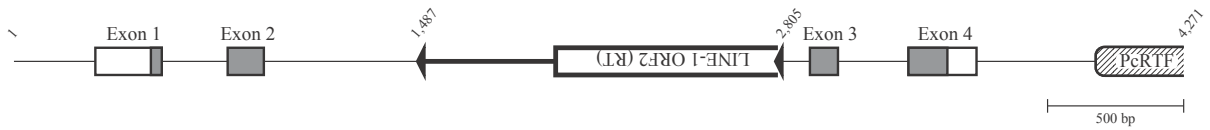


Figure 70. ホンハブとトカラハブのIIA型毒PLA<sub>2</sub>アインザム遺伝子のコピー数の比較

値は同じ測定を3回繰り返すことで求めた。バーは標準偏差を示す。

A



B

```

2805 GGAAAACGATTGGGCGATGAATTGAGAAAAGAGAAAGTGCCTTCAGTCTTGGTTCCTATATTCCCAATTGGCTGAAAGATGGTGTCTAGACC 2716
      X E L R K E K V L Q S W F L Y F Q L A E R W C L D
2715 AAAAGTGGTCTTATGTTGGAAGATGGGAATTTGATAAAGCAGATTAAGATCAAAGTAGAGCCCATATTAGAAGAATTTATAGTGTAT 2626
      Q K L G L M L E D G N L I K Q I K D Q S R A H I R R I Y S V
2625 TACTAGAGTTGGATTCGAAACAGAATTAGTCAAAGATTGTATGATTAAGTGGGCTCAAATATTTCAAGAACCAATTATGCTTGAGACTT 2536
      L L E L D S E T E L V K D C M I K W A Q N I Q E P I M L E T
2535 GGGAGACAATTTGGGTTAGAAATGTTAAGTTTACCCAAGCCCAGAACTTAAGGAAAAATTTTATAAAATGTTTATAGATGGCATTGG 2446
      W E T I W V R N V K F T Q A Q N L R E N F Y K M F Y R W H L
2445 ATCCTCAAATTTGCTTGCATGTATCCGAATTTGCAGCCAAATGTTGGAGATGTGATAATATGGATGCGACATATTATCATATTTGGT 2356
      D P Q K L S C M Y P N L Q P K C W R C D N M D A T T Y Y H I W
2355 GGACCTGCAGGGATGTCAAAGCCTTCTGGATCAAGATATGGTGAATATCCAACAGATTTCAAGAAAAAGATAAAATTTACACCGCAAT 2266
      W T C R D V K A F W I K I W W N I Q Q I F K K K I K F T P Q
2265 TATTCTTATGGGTATTATGGAGAACTTGGACCGAAAAGAAATGAATCTTATGTTGTATTCATCACAGCAGCAAGAACATGATTGCTC 2176
      L F L L G I M E N L D R K E M N L M L Y C I T A A R T L I A
2175 AGAATGGAAAAAAGACATTACCAACTATGGATGATTGGAGACAGAAAGTCTCATATTTGCAGAGATGGCTAAAATATCCGCATACC 2086
      Q N W K K K T L P T M D D W R Q K V S Y F A E M A K I S A Y
2085 TGAAGGATCATTCTCAAGAGAAATTTATCCTGATATGGAGAAGATGGATAGACTATATTTCAGAGAAAACATGACTTGAAAAATTTATTATC 1996
      L K D H S Q E K F I L I W R R W I D Y I Q R K H D L K N Y Y
1995 TTGCTTTTGATTAATTTATAAAATTTTATAAGTTTATTATTGATTTTTAGAGTTATAGTAAGTTTATACTTGTTTATCGTATGAATGGAT 1906
      L A F D *
1905 AGCTTTGGATAGATTAATAATTTATTTGTAATTTATCCTGGTTCAGTCTCGGGAAGTCCGGGGGGGGAGGGGGGAAAAGGATTAATA 1816
1815 TATAAAAATTTGATGTGATTATTAATTTATTTAGAAATATTTATGAGGATAATCCAGGCTGTATCCCAAACCTGCTCCGGCTGGTGC 1726
1725 TAGAGAAAAGGTTGAGAAGTAGGGGGGAGGAGGAAGGTGGAGTGGTTGGAGAATAGAGGGGAGGAAGGTTGGTAGGTGAAAGAGGGGG 1636
1635 AAGCGGGGAGGGGGCAGCCTGGAACATCCGTAAGTATTTGTGTATTAATGTTTTGTATCTATATGCATCATGTTTCATATTTATTTTTG 1546
1545 TAATATTTGAAAATAATAAAAATTTAATAAAAAAAAAAAAAAAGGAAAACGATTGGGG 1487
  
```

C

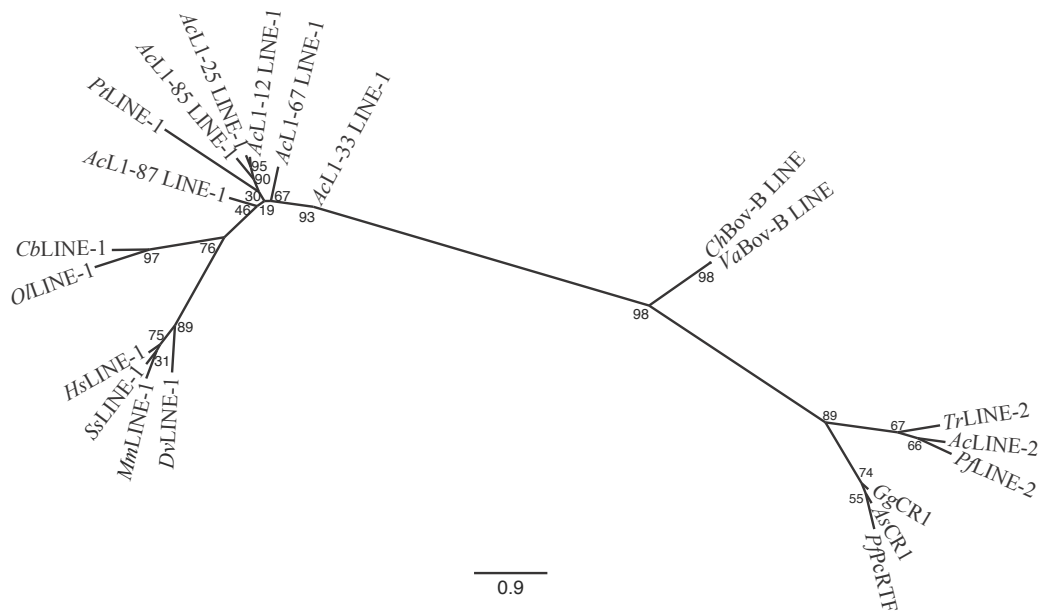


Figure 71. *PtBP-I* 遺伝子とそこで見出した LINE-1

(A) *PtBP-I* 遺伝子の第 2 イントロンに挿入している LINE-1。■: CDS, □: UTR, ▨: PcRTF, ◀: TSD, 黒太線は LINE を示す。(B) *PtBP-I* 遺伝子の第 2 イントロンに挿入している LINE-1 がコードする Reverse transcriptase ドメイン。(C) Non-LTR 型 LINE の Reverse transcriptase ドメインアミノ酸配列に基づく系統解析。Ac, *Anolis carolinensis*; As, *Acanthochelys spixii*; Cb, *Clarias batrachus*; Ch, *Crotalus horridus*; Dv, *Didelphis virginiana*; Gg, *Gallus gallus*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Ol, *Oryzias latipes*; Pf, *P. flavoviridis*; Pt, *P. tokarensis*; Ss, *Sus scrofa*; Tr, *Takifugu rubripes*; Va, *Vipera ammodytes*.

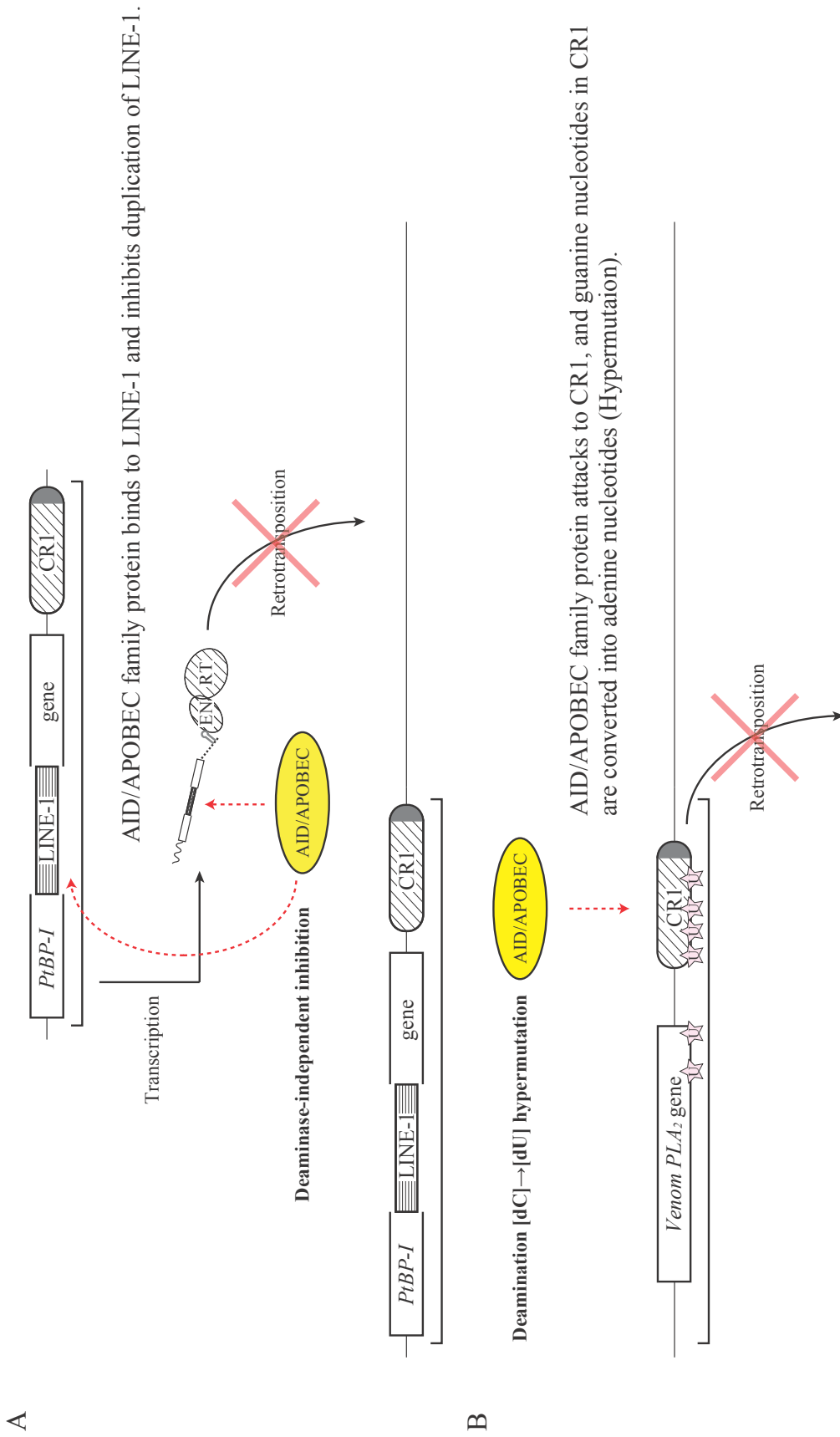


Figure 72. AID/APOBEC ファミリータンパク質のシチジンデアミナーゼ活性非依存／依存的な経路によるレトロトランスポゾンの複製阻害モデル

(A) シチジンデアミナーゼ活性非依存的な経路。(B) シチジンデアミナーゼ活性依存的な経路。この図では CR1 がシチシンデアミナーゼ活性依存的な経路で複製阻害を受けているように描いているが、AID/APOBEC ファミリータンパク質が実際に CR1 に対してどう影響するのかは未知である。

□: 遺伝子領域, ▨: LINE-1, ☆: CR1, ☆: Venom PLA<sub>2</sub> gene

PcCR1	1	AGTGAGCTCGCAACARAGGAGAGGCAACAGAAGGAGTTGCTGGGATCTGCTCCGAGAGAGCCAGGTGAGTGTACGTGAGGGGAGCTGTGTTGTGCTAGAGGGGTGAGTATCTG	120
PcCR1	121	AGAGACCATTGTTTGACTGGTGCAAGTTACAGCTGACTGTGTGTGTTGTGACTGGTGCAGTTACAGGGACTGTTTGRCAAGTTGACCGTGTGTGTATTGTTGAAAAGTGTGAATT	240
PcCR1	241	GGGAGTGCCTTGTTCAGGTRGGCCTTGAGTGGTGTGATTGCAGAGGGAGGCACTGAGCCGGGGCACTGCTTCGAGTCAAGCCTTATAAAGCAGCCAGTTGCGAACCAAGTGAAGCT	360
PcCR1	361	GCGAACAGAGGAGGCGCAACAGAAGGAGTTGCTGGGAGTTACCTTGGGGAGGCCAAYAGCGGGTTTTGCTTTTTCAGACTTAGCTGAGCAGTAAATACAGCATCTGAAGAGGCT	480
ORF1			
PcCR1	481	CTCAGAGGAAAGATATGAAAAGTGAAGCATCTGCTGTGTCACTGCACTGGATGTGCTATGTTGCTTTTCACAGGAYAGARCCGACTTCATCTGTGACGAAGTGCAGGTGGTTTT	600
M E S E R S A V V T C T G C A M F V F L P Q D R X D F I C T K C R L V			
PcCR1	601	CCATATTGGAAGAAGTAAAGGACTRGAGACCCAACTTCCGCTTTCATTAAGAAGAAATGARGTCTTTCTCGATCGAAGWCATGATTGTTTACTACAGGCACAGTGTGAGG	720
PcCR1	721	AAGATTCAGAGAAGGCARTGAGGGGACTGARGAATGGAGAAGRAATTGGCAGCATGTGACCTCCGAGWAAGAGAACCATAKCCCCCGTGCAGATAGAGTAAGGAATCGTT	840
PcCR1	841	TTCAGGCTCTGCACAGGTAMTACKCGGAGAATGATTGCAAGACTCATCTGAGGAAATGGATCAGAARGARCCCTGTTGATCAGAAGCAGWGGATGCATGTCCTAGGAGTGGG	960
PcCR1	961	GTTCCAGCACCACTCCCAAGAGGAAGAGAAGGTTGRTGTTGGTCCGGGACTCCCTCCGAGGAGGCGGARTCCATCTGCTCCGCTCCGACCCGGAACATARAAGTGTGCTGCT	1080
PcCR1	1081	TGCCTGGAGCTAGRATTGAGGATGTGACGGAGAGTCCGCCAGACTYATCAAGCCCTCAGACTGTAMCCCTTCTACTTCTCCAGTGGCCACCAATGACATGCCAAGATGACCTTG	1200
PcCR1	1201	AGCGGAYCAGTGCAGACTATGTGGCTCTGGGAAGAAGGATAAAGGAGTTTGGAGCCCAAGTGGTGTTCCTGTCACCTCCCTGTTGAAGGAAAAGCCAGGTGAGGACCGTCGMATTG	1320
PcCR1	1321	TGGAAGTAAATGCGTGGTTACGAGGTGTGTCGGAGAGAGGCTTTGGATTCTTCGATCATGGGATGTTGTTCCAGGAAGAAGGATTCAGGAAGAGACCGGATTACCTAACGAAGA	1440
V E V N A W L R R W C R R E R E G F G F F D H G M L F Q E E G L L G R D G I H L T K			
PcCR1	1441	GAGGAAGATATCTTCGACAGCAGGTGGTAACTAGTGGAGGGCTTTAACTAGTTCGATGGGGATGGAGACTTAAGCCGAGTAAAGTGGGAAGTGGGACCCASRAGGA	1560
R G K S I F A D R L A N L V R R A L N M G D G D L S P X V S G E V G H X X E			
PcCR1	1561	ACGAGAAGGAGGGTCAACAGGGGAGGCTCTGATTCCTACTGAGAAAGTGGGCAATCGCTAGTTCATCTYARGTCCCTGTACAAACCGCAAGAGCTGGGAAACAGCAGGA	1680
A E G G G C N R G G L L I R T E K V G Q S A S Y L X C L Y T N A R S L G N K Q E			
PcCR1	1681	GGAAATTGGAAGCTGGCAGTCACGGAACTAGCATGATTGRAAAACTGAGACTTGGTGGAAATAACACACAGACTGGAACACTGTATGGATGGGTATAAGCTRTTCAGGAAGGA	1800
E L E V L A Q S R N Y D M I X X T E T W W N N S H D W N T V M D G Y K L F R K D			
PcCR1	1801	CAGGCAAGGCGAAAGGTTGAGGAGTGCAGTGTATGTAAGAGACTCATATGATFKCTCTGAGCTCCAGTGTAAAATGGAGATACGCCAGTTCGAGACTCTGGTAAAGTAAAG	1920
R Q G R K G G G V A L Y V R E H Y D X S E L Q C E T G D T P V G E W K L R S			
PcCR1	1921	CAAGAACAATAAGGTTGTTGGTGGTGGTCTGTTAGACACAGGAGGATGAGTAGAGGCTTTCTTCAGTCACTAGGAAAAGTTTCAGTTCACAGGACTGAT	2040
K N N K G D V V V G V C Y R X P D Q E D E V D E A F F S Q L G K V S S S Q D L I			
PcCR1	2041	TCTCATGGGGACTTCATCACTGCATCTGCTGGAAGCAATACAGCAGAGCACAACAATCCAGGAAGTTTTRAGWGTGTTGGGACAACCTTCCTGGTCAAGTCTGAGGACA	2160
L M G D F N H P D I C W K S N T A E H K Q S R K F L X X V A D N P F L V Q V L E Q			
PcCR1	2161	ACCACTAGGGCCGTGCTCTTTGACCTGCTGCTCACAACAGGGAAGTTGTTAGGGAAGTGAAGAAGTGGGTGCAACCTAGGCAAGTGCAGTGCAGTGCAGGATTCAGGAT	2280
P T R X T G A X L D L L L L T N R E A D L E V E V G X N L G S S D H E M V E F R I			
PcCR1	2281	CCTGACAAAAGGAAGAAGGAACAGCAGGATACGGACACTGGACTTCAGAAAAGCAGACTTTCAGTCCCTCAGGAGCTGATGGCAGGATCCCCTGGGAGGCTAATAGRGGGAA	2400
L T K G R K E N S R I R T M D F R K A D F D S L R E L M G R I P W E A N M R G K			
PcCR1	2401	AGGAATCCAAAGGRGCTGGTGTATTTAAAGAAACCTTATGAGGGCCAGGAACAACAATCCCGATGTGCAGAAAAGATAGCAATATGGYAGGCACCAGTTCGGCTTAACARAGA	2520
G I Q G X W L Y F K E T L L R A Q E Q A T I P M C R K N S K Y G R R P A W L N X E			
PcCR1	2521	ARTCTCGTGTGAGCTTAAACACAAAAGGCTTACAAGAAGTGAAGTTCGGCAGTACTAGGAGGAKTATAAAAATACTGTCGAACATGACGAGTGAATCAGGAAGGCCAA	2640
X F G E L K H K K E A Y K K W K L G Q M T R E X Y K N T A R T C R X E I R K A K			
PcCR1	2641	AGCACAATTGGAGTTCAGCTAGCAAGGATGTGAAGGKAACAAGAAGGTTTCTACAGTATGTTAGCAACAGARGAAGRTYAGGAAAAGTGGGCCCCCTTACAGAAAGGGGAGG	2760
A Q L E L Q L A R D V K G N K K G F Y R Y V S N K X K X R E S V G P L Q N G G G			
PcCR1	2761	CAACCTAGTGACAGAKATGTGARAAGCTGARGTACTCAATGCCTTTTTGCTCTGTCTTCACAGACAAGTGCAGCTCCAGACTACTGCATGGGGCCAGATWGGGAGGAGG	2880
L N V T X D V E K A E V L N A F A S V P T D K V S S Q T T A L G G T X W G G G			
PcCR1	2881	TGAACAKCCTCAGTCTGAAGAACAGTTTCAGACTATTAGAAAGYTGACATRCACAAAGTCCATGGGGCMRGTGCAATSCAYCCGAGGGTCTGAGGAGTTRCTGATGTGAT	3000
E X P S V L K E Q V Q D Y L E R L D X H K S M G X D A X H P R V L R E L A D V I			
PcCR1	3001	TRCAGGCCATTGGYATTATCTTGAARCTCGTGGCGATGGGREGVTCCTGATGAYTGGAAAAGGCAATATAGTGCCCACTTYAARAAGGGAAGAARAGGATCCAGGGAA	3120
X E P L A I I F E X S W R L G E V P D D W K K A N I V P I F K K G K K E D P G N			
PcCR1	3121	CTACAGACCTCAGCTACCTCARTCCCTGGAAAATCATGGARCCAGGCTCCAGGAAATCCATTTAAGGCACTTGAAGAGAGGAGCTGATGAGGAGGAGTGCAGGACGATGCATGATTAC	3240
Y R P V S L T S X P G K I M E Q V L K E S I L R H L E E R K V I R X S Q H G F T			
PcCR1	3241	CAAGGCAAGTCAAGCTGACCAACTGATTTCTATGAAGAGGTGACTGGCTCTGGATGTTGGGAAAAGCGGTGGAGCTGATATACCTTACTTTAGCAAAAGCTTTTGTATACAGT	3360
K G K S C L T N L I A F Y E E V T G S V D V G K A V D V I Y L D F S K A F D T V			
PcCR1	3361	CTCYCACAGTATCTTATCAGCAAGTTAAARAAGTATGGTGGATGAATGGACTATAAATGGATAGAGAAATGGGTAGAKCATAGGGCTCAACAGTACTGATCAATGGCTCCATGTC	3480
S H S I L I S K L K K Y G L D E W T I K W I E N W L X H R A Q R V L V I N G S M S			
PcRTF 2		-----	
PcRTF 3	28807	-----	28814
PcRTF 4		-----	
PcRTF 5	41474	-----	41481
PcRTF B'	3231	-----	3238
A		-----	
B		-----	
C		-----	

Figure 73. IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターで見つかる PcRTF

PcRTF B' は *PjPLA-B'* の 3' 下流の PcRTF, A, B, C は *PjIIDPLA<sub>2</sub>* の 5' 上流の PcRTF 様断片を示す。  
PsCR1, *Acanthocheilus spixii* retrotransposon CR1-like LINE, complete sequence [AB005891]。

		Reverse transcriptase domain 4			
PsCR1	3481	TAGCTGGCAGCCGGTCAACAGTGGAGTGCCTCCAGGGGTCGGTCTGGGCGGGTTTGTTCACATCTTCATTAAATGATCTGGAGGATGGGGT-AGATTGCACCTCAGCAAGTTTGCA	3599		
PcRTF 2		S W Q P V T S G V P Q G S V L G P V L F N I F I N D L E D G V D C T L S K F A			
PcRTF 3	28815	TACATGGAGGGAAGTGTAGTGGGGTGCCTCCAGGGCTCCGTTCTGGGCCAGTGCTCTTCAACATCTTCATCAACAATTTGGATGAGGGAT-AGATGGGGAATCATCAAAATTTGCAG	28833		
PcRTF 4					
PcRTF 5	41482	TACATGGAGGGAAGTGTAGTGGGGTGCCTAGGGCTCCATTCGGGCCAGTGCTCTTCAACATCTTCATCAACAATTTGGACGAGGGGATAAGATGGGGAATCATCAAAATTTGCAG	41601		
PcRTF B'	3239	TACATGGAGGGAAGTGTAGTGGGGTGCCTAGGGCTCCATTCGGGCCAGTGCTCTTCAACATCTTCATCAACAATTTGGACGAGGGAT-GGATGGGGAATCATCAAAATTTGCAG	3357		
A					
B					
C					
		Reverse transcriptase domain 5		Reverse transcriptase domain 6	
PsCR1	3600	ATGACACTAAGCTAGGGGAGTGGTAGATACCCTGGAAGKAGGGATAGGA	TACAGAAGGACATAACAATTTGGAGATTGGGCCAAAAGAAATCTGATGAGGTTCAACAAGGACAAT	3719	
PcRTF 2		D D T K L G G V V D T L E G R D R	I Q K D L N K L E D W A K R N L M R F N K D K		
PcRTF 3	28934	ACAATACCAAGCTGGCAGGAATGCCAACCTCCAGAAGCAGGCTTAGGATACAGGAGGACTTGGACAGACTTGAACACTGGGCGCTATCTAACAAAATGAAATTCATGGTGA	28053		
PcRTF 4					
PcRTF 5	41602	ACGATACCAAGCTGGCAGGAATGCCAACCTCCAGAAGCAGGCTTAGGATACAGGAGGACTTGGACAGACTTGAACACTGGGCGCTATCTAACAAAATGAAATTCATGGTGA	41721		
PcRTF B'	3358	ACGATACCAAGCTGGCAGGAATGCCAACCTCCAGAAGCAGGCTTAGGATACAGGAGGACTTGGACAGACTTGAACACTGGGCGCTATCTAACAAAATGAAATTCATGGTGA	3477		
A					
B					
C					
		Reverse transcriptase domain 7			
PsCR1	3720	GCAGAGCTCTGCACCTTAGGATGGAAGAATCCCATGCACAGCTACAGACTGGGACCGCAGTTAGGCAGCAGTTCTGCAGAAAAGGATCTGGGGTTACAGTGGATAAGAAGCTG	3839		
PcRTF 2		C R V L H L G W K N P M H S Y R L G T D E L G S	S S A E K D L G V T V D K K L D		
PcRTF 3	29054	GTAAGTTCACATTTAGGCAAGAAAAACCAATGTACAGGTATAGTATAGGGGGTACCTTGTCAACAGTAGTAACTGTGAGAGGGATCTCGGACTCCTGGTGGCAATCATTTAAATA	29173		
PcRTF 4					
PcRTF 5	41722	GTAAGTTCAC- TTTAGGCAAGAAAAACCAATATACAGGTATAGTATAGGGGGTACCTTGTCAACAGTAGTAACTGTGAGAGGGATCTCGGACTCCTGGTGGCAATCATTTAAATA	41840		
PcRTF B'	3478	GTAAGTTCAC- TTTAGGCAAGAAAAACCAATATACAGGTATAGTATAGGGGGTACCTTGTCAACAGTAGTAACTGTGAGAGGGATCTCGGACTCCTGGTGGCAATCATTTAAATA	3596		
A					
B					
C					
		Reverse transcriptase domain 8			
PsCR1	3840	TGAGTCAACAGTGTCCCTGGTTGCCAAGAAGGCTAATGGCATATTTGGGTCGATAGTAAAGAGCATGCCAGCAGATCGAGGGAAGTGAATATTTCCCTATTCGGCATTTGGTGAAGC	3959		
PcRTF 2	25545	M S Q Q C A L V A K K A N G I L G C I S K S I A S R S R E V I I X	L Y S A L V R		
PcRTF 3	29174	TGAGCCAGCCGTGTGCTGCAGCTGCCAAAAAGCCAAACAGTGTAGGCTGCATGAACAGAGGGCAGAAATCAAGATCAGCTGAAGTATTAATACCACCTTACAAATTCCTTAGTAAGGC	25602		
PcRTF 4	34772				
PcRTF 5	41841	TGAGCCAGCAGTGTGCTGCAGCTGCCAAAAAGCCAAACAGTGTAGGCTGCATGAACAGAGGGCAGAAATCAAGATCAGCTGAAGTGTAAATACCACCTTACAAATTCCTTAGTAAGGC	29293		
PcRTF B'	3597	TGAGCCAGCAGTGTGCTGCAGCTGCCAAAAAGCCAAACAGTGTAGGCTGCATGAACAGAGGGCAGAAATCAAGATCAGCTGAAGTGTAAATACCACCTTACAAATTCCTTAGTAAGGC	34829		
A					
B					
C					
PsCR1	3960	CGCATTTGGAGTATTGTCTCCAGTTTTGGGCCCCCACTACAAAAAGGATGTGGAMA	4016		
PcRTF 2	25603	P H L E Y C V Q F W A P H Y K K D V X			
PcRTF 3	29294	CACACTTGGAACTACTGCATCCAGTTTTGGTCAACAGATGCAAAAAAGATGTTGAGA	29350		
PcRTF 4	34830	CACACTTGGAACTACTGCATCCAGTTTTGGTCAACAGATGCAAAAAAGATGTTGAGA	28814		
PcRTF 5	41961	CACACTTGGAACTACTGCATCCAGTTTTGGTCAACAGATGCAAAAAAGATGTTGAGA	34886		
PcRTF B'	3717	CACACTTGGAACTACTGCATCCAGTTTTGGTCAACAGATGCAAAAAAGATGTTGAGA	42080		
A					
B					
C					
PsCR1					
PcRTF 2					
PcRTF 3					
PcRTF 4					
PcRTF 5	42081	CTAAACCGGTCTGAAGCCAAAGGACTAAACCGGTCTGAAGTCGAGGACTAACTGGTCTGAAGTCGAGGACTACCCAACAGTCTGAAGTCGAGTACTTTCCCTGCCCCTGAGCCGCGCC	42200		
PcRTF B'	3597	CTAAACCGGTCTGAAGCCAAAGGACTAAACCGGTCTGAAGTCGAGGACTAACTGGTCTGAAGTCGAGGACTACCCAACCGGTCTGAAGTCGAGTACTTTCCCTGCCCCTGAGCCGCGCC	3956		
A					
B					
C					
PsCR1					
PcRTF 2					
PcRTF 3					
PcRTF 4					
PcRTF 5	42201	ATGCGTGGTTCCGCCCTGCACCGGCCGAGGCGTAGTTGGCAAGCGGCAGAGAGGAGCAGGCGACCACCAGCTGGCCAGCCCAAGGAGGTAAGGCACCCCGCGAAAAGGGGAAA	42320		
PcRTF B'	3957	ATGCGTGGTTCCGCCCTGCACCGGCCGAGGCGTAGTTGGCAAGCGGCAGAGAGGAGCAGGCGACCACCAGCTGGCCAGCCCAAGGAGGTAAGGCACCCCGCGAAAAGGGGAAA	4076		
A					
B					
C					
PsCR1	4017		AGTTGGAGAGTCCAG-CGGAGGCCAACAAAA	4048	
PcRTF 2	25660		K L E R V Q R R A T K		
PcRTF 3	29351		CTCTAGAAAGAGAAAAGAGAACGCAACAGAG	25690	
PcRTF 4	34887		CTCTAGAAAGAGAAAAGAGAACGCAACAGAG	29383	
PcRTF 5	42321	AAATGGCGGATAGCCTTGCTTGGCGACCCCGTGAATGGTGTATCGACCTCAAATGGGGTGCAGCCCATAGGTGAGAACCCTGCTCTAGAAAAGATACAG-AGAAGAGCAACAAG	34919		
PcRTF B'	4077	AAATGGCGGATAGCCTTGCTTGGCGACCCCGTGAATGGTGTATCGACCTCAAATGGGGTGCAGCCCATAGGTGAGAACCCTGCTCTAGAAAAGATACAG-AGAAGAGCAACAAG	42439		
A					
B					
C					
		Reverse transcriptase domain 9			
PsCR1	4049	ATGATWAGGGGGCTGGARCAACACTTATGAGGAGGGCTGAAGGAACTRGGCCGTTTAGTCTGCAGAAGAGAAGAATGAGGGGGGATTGTATAGCAGCCTTAACTACCTGAAAGGG	4168		
PcRTF 2	25691	M I R G L E H K T Y E E R L K E L G L F S L Q K R	R M R G D L I A A F N Y L K G		
PcRTF 3	29384	ATGATCAGGGGACTGGAGGCTAAAACATATAAGGAACGGTTGCTGGAATGGGTATGCTTAGTTTAAACGAAGAGAAGGACGAGGGGGGACATGATAGCCGTGTCCAATATCTCAGGGGC	25810		
PcRTF 4	34920	ATGATCAGGGGACTGGAGGCTAAAACATATAAGGAACGGTTGCTGGAATGGGTATGCTTAGTTTAAACGAAGAGAAGGACGAGGGGGGACATGATAGCCGTGTCCAATATCTCAGGGGC	29503		
PcRTF 5	42400	ATGATCAGGGGACTGGAGGCTAAAACATATAAGGAACGGTTGCTGGAATGGGTATGCTTAGTTTAAACGAAGAGAAGGACGAGGGGGGACGATAGCAGCCTTCCAATATCTCAGGGGC	35039		
PcRTF B'	4196	ATGATCAGGGGACTGGAGGCTAAAACATATAAGGAACGGTTGCTGGAATGGGTATGCTTAGTTTAAACGAAGAGAAGGACGAGGGGGGACGATAGCAGCCTTCCAATATCTCAGGGGC	42559		
A					
B					
C					

Figure 73. IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターで見つかる PcRTF

PcRTF B' は *PfPLA-B'* の 3' 下流の PcRTF, A, B, C は *PfIIDPLA<sub>2</sub>* の 5' 上流の PcRTF 様断片を示す。  
 PsCR1, *Acanthocheilus spixii* retrotransposon CR1-like LINE, complete sequence [AB005891].

PsCR1	4169	GGTTCCAGGGAGGATGGAGCTAGGCTGTTTTCAGTGGTGGCAGATGACAGAACAAGGAGCAATGGTCT-----	4236
		G S R E D G A R L F S V V A D D R T R S N G L	
PcRTF 2	25811	TCGCCAAAGAAGAGGGAGTCAAGCTATTTTCCAAAGCA-----GATG-----	25853
PcRTF 3	29504	TCCCATAAAGAAGAGGGAGTCAAGCTATTTTCCAAAGCACCTGAGGGCAGGACAGAAGCAATGGATAGAAACTAATCAAGGAGAGAAGCAACCTAGAACTAAGGAGAACTTCCTGGCA	29623
PcRTF 4	35040	TGCCCAAAGAAGAGGGAGTCAAGCTATTTTCCAAAGCACCTGAAGGCAGGACAGAAGCAATGGATA-----	35107
PcRTF 5	42560	TGCCCAAAGAAGAGGGAGTCAAGCTATTTTCCAAAGCACCTGAGGGCAGGACAGAAGCAATGGATA-----	42627
PcRTF B'	4316	TGCCCAAAGAAGAGGGAGTCAAGCTATTTTCCAAAGCACCTGAGGGCAGGACAGAAGCAATGGATA-----	4383
A		-----	
B		-----	
C	1423	-----TTCTCCGAAGCACCTGCGGGCAGGACGAAAAGTAACGGATT-----	1383
PsCR1		-----	
PcRTF 2		-----	
PcRTF 3	29624	GTTAGAGCAATTAACAGTGGAAACAACCTGCCTCCAGAAGCGGTGAATGCTCCAACTGGACAGCCATTGTCCGAAATGTCTAGTTTAATGAAGAGAAGGACGAGGGGGACATGATA	29743
PcRTF 4		-----	
PcRTF 5		-----	
PcRTF B'		-----	
A		-----	
B		-----	
C		-----	
PsCR1	4237	-----CAAGTTCAGTGGGGAGGTCTAGTTGGACATTAGGAAAAA-GTTTTTCACT	4288
		K L Q W G R S R L D I R K K F F T	
PcRTF 2	25854	-----GAACTAACCAAGAAGAAGCAACCTAGAACTAAGGAGAAA-CTTCTGACA	25905
PcRTF 3	29744	GCCGTGTTCCAAATATCTCAGTGGCTGCCCAAAGAAGAGGGAGTCAAGCTATTTTCCAAAGCAGATGAAACTGATCAAGGAGAGAAGCAACCTGGAACCTAAGGAGAAA-TTCTCTGACA	29862
PcRTF 4	35108	-----GAACTGATCAAGGAGAGAAGCAACCTGGAACCAAGGAGAAA-CTTCTCTGACA	35159
PcRTF 5	42628	-----GAACTAATCAAGGAGAGAAGCAACCTGGAACCAAGGAGAAA-CTTCTCTGACA	42679
PcRTF B'	4384	-----GAACTAATCAAGGAGAGAAGCAACCTGGAACCAAGGAGAAA-CTTCTCTGACA	4435
A	124	-----TAATTAATGAAGGAGAGAAGCAACCTAAAAATAAGGAGAAA-TTCTCTGACA	74
B	1142	-----AAAAATAAGGAGAAA-TTCTCTGACA	1119
C	1382	-----ATCAAAGAGAGATTTCAGCTAGAACTAAGAAAAAGTTTTCTCTGGCA	1337
		carboxyl-terminal conserved region (CTCR)	
PsCR1	4289	AGGAGGGTGGTGAAGCATTGGAATGGG-----TTACCTAGGGAGTGGTGGCATC-TCCATCTTTAGAGGTTTTTAAGCTGCGGCTTGACAAAACCCCTCGCTGGGATGATTAGCTRRGG	4402
		R R V V K H W N G L P R E V V A S P S L E V F K L R L D K T L A G M I *	
PcRTF 2	25854	GTGAGAACAATTAACAGTGGAAACAAC-----CTGCCCTCCAGAAGCGGTGAATGC-TCCAACACTGGAAGTTTTTAAGAAGAGACTGGACAGCCATTTTCCGAAATGGTATAG----	25905
PcRTF 3	29863	GTGAGAACAATTAACAGTGGAAACAAC-----CTGCCCTCCAGAAGCGGTGAATGC-TCCAACACTGGAAGTTTTTAAGAAGAGACTGGACAGCCATTTTCCGAAATGGTATAG----	29969
PcRTF 4	35160	GTTAGAGCAATTAACAGTGGAAACAAC-----CTGCCCTCCAGAAGCGGTGAATGC-TCCAACACTGGAAGTTTTTAAGAAGAGAACTGGACAGCCATTTTCCGAAATGGTATAG----	35269
PcRTF 5	42680	GTTAGAGCAATTAACAGTGGAAACAAC-----CTGCCCTCCAGAAGCGGTGAATGC-TCCAACACTGGAAGTTTTTAAGAAGAGAACTGGACAGCCATTTTCCGAAATGGTATAG----	42789
PcRTF B'	4436	GTTAGAGCAATTAACAGTGGAAACAAC-----CTGCCCTCCAGAAGCGGTGAATGC-TCCAACACTGGAAGTTTTTAAGAAGAGAACTGGACAGCCATTTTCCGAAATGGTATAG----	4545
A	73	ATGAGACCAATTTGATCAGTGGAACTACTGTAGTTGCCCTCCAGAAGTGTGGGTGCTCCATCACTGGAGGTTT-----	1
B	1118	GTGAGAACAATCAACAGTGGAAAGCGT-----TTCCCTCCAGAAGTGTGGCTGC-TCCAACCTGGAGGTTTTTCAGGAGAGATTGGACCTCCCTTTGTGTGAATGGTCTAG----	1009
C	1336	GTGAGAACAATTAACAGTGGATCGCC-----TTCTCCCTGGAAGTGGTGGTGA-TCCATCACTGGAGGCTGTAAAGAGAAACCGGACAGCCACTTCTCTGGAATGTATAG----	1227
PsCR1	4403	TTTGTCTGCTTTGAGCAGGGGTTGGACTAGATGACCTCCTGAGGTCCTTCCAACCTCT-AATATTCTATGATTCTAT-----	4480
PcRTF 2	26016	TT--TCCTGC-CTGAGCAGAGGGTTGGACTAGATGACCTC-TAAGGTCCCTTCCTACTTT-ATTATTATT--ATTATTA-----	26087
PcRTF 3	29970	TT--TCCTGC-CTGAGCAGTGGTGGACTTGATGACCTC-TAAGGTCCCTTCCAAGTTTTATTATTATT--ATTGCTC-----	30042
PcRTF 4	35270	TT--TCCTGC-CTGAGCAGTGGTGGACTTGATGACCTC-TAAGGTCCCTTCCAAGTTTTATTATTATT--ATTGCTC-----	35342
PcRTF 5	42790	TT--TCCTGC-CTGAGCAGTGGTGGACTTGATGACCTC-TAAGGTCCCTTCCAAGTTTTATTATTATT--ATTGCTC-----	42862
PcRTF B'	4546	TT--TCCTGC-CTGAGCAGTGGTGGACTTGATGACCTC-TAAGGTCCCTTCCAAGTTTTATTATTATT--ATTGCTC-----	4618
A		-----	
B	1008	TC--TCCTGC-TTG--AGAGGTTGGACTAGAAGACCTC-TGAGGTCCCTCTGACTTT-GTTGTCTGT-ATTCTGT-----	939
C	1226	TC--TCCTGC-TTGAGCAGGGGCTGGACTAGAAGACCTC-AAGGTCCCTTCCGACTCT-GTTATTTGT-ATTCTGA-----	1154

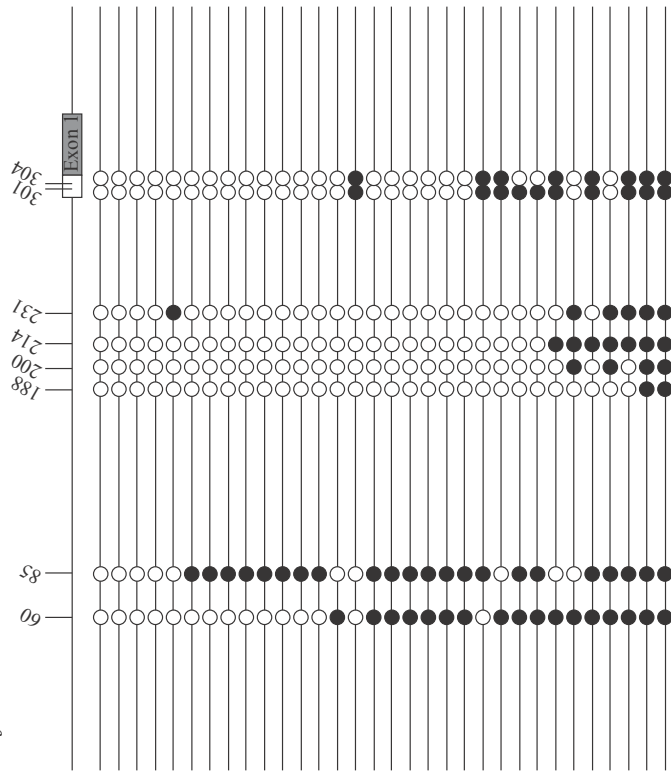
Figure 73. IIA 型毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子クラスターで見つかる PcRTF

PcRTF B' は *PfPLA-B'* の 3' 下流の PcRTF, A, B, C は *PfIIDPLA<sub>2</sub>* の 5' 上流の PcRTF 様断片を示す。  
PsCR1, *Acanthocheilus spixii* retrotransposon CR1-like LINE, complete sequence [AB005891]。



A

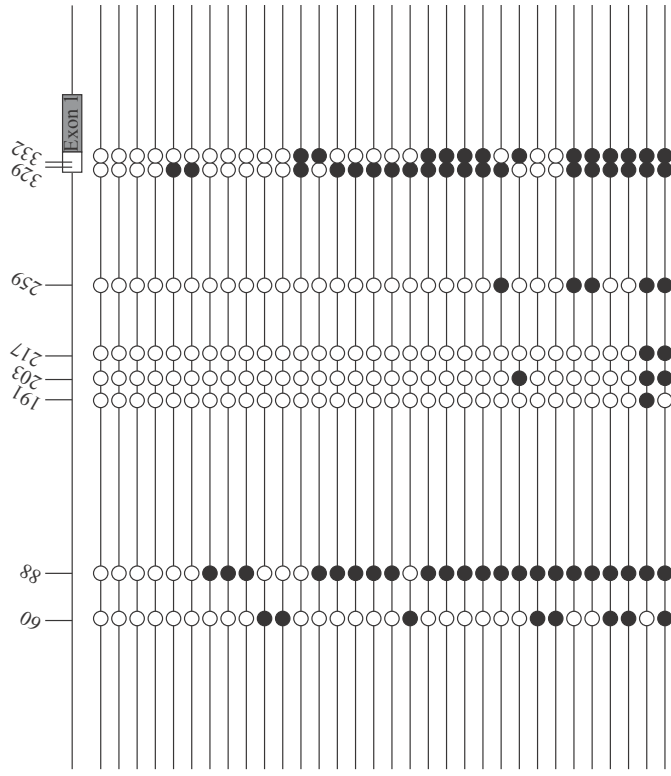
*P. flavoviridis*



B

CpG Position	60	85	188	200	214	231	301	304	Total
Pancreas Me-CpG	53.1	68.8	6.2	12.5	21.9	18.8	31.2	25.0	29.7%

*O. okinavensis*

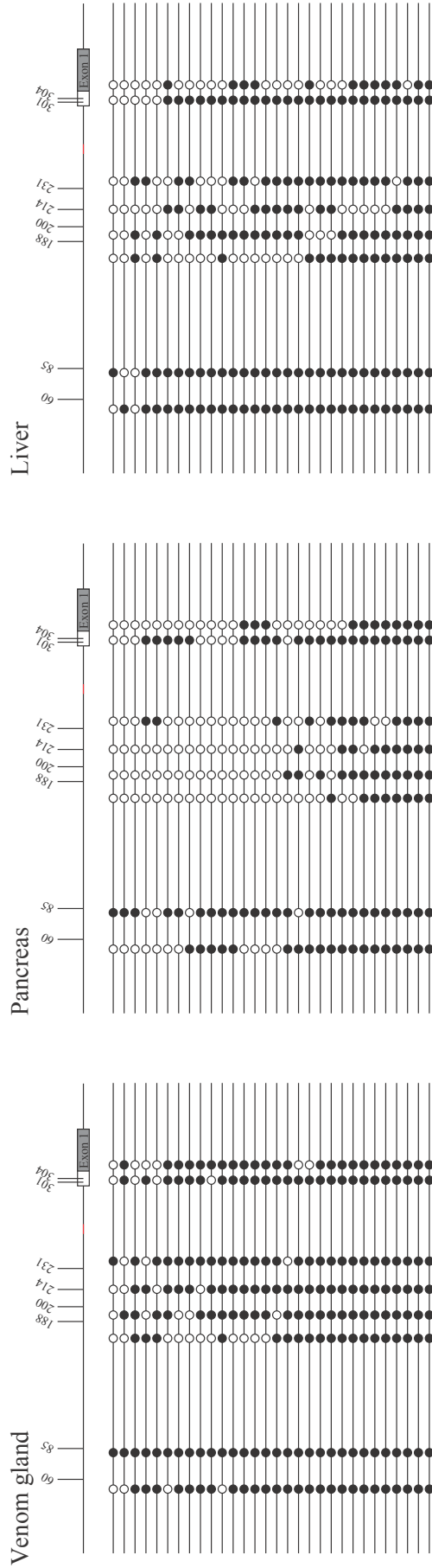


CpG Position	60	88	191	203	217	259	329	332	Total
Pancreas Me-CpG	25.0	68.8	3.1	9.4	6.2	15.6	65.5	40.6	29.3%

Figure 74. ホンハブとヒメハブの膵臓におけるIB型PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析

(A) ホンハブとヒメハブの膵臓におけるIB型PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析。●はメチル化シトシン, ○は非メチル化シトシンを示す。■ : CDS, □ : UTRを示す。(B) ホンハブとヒメハブの膵臓におけるIB型PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化シトシンの割合

A

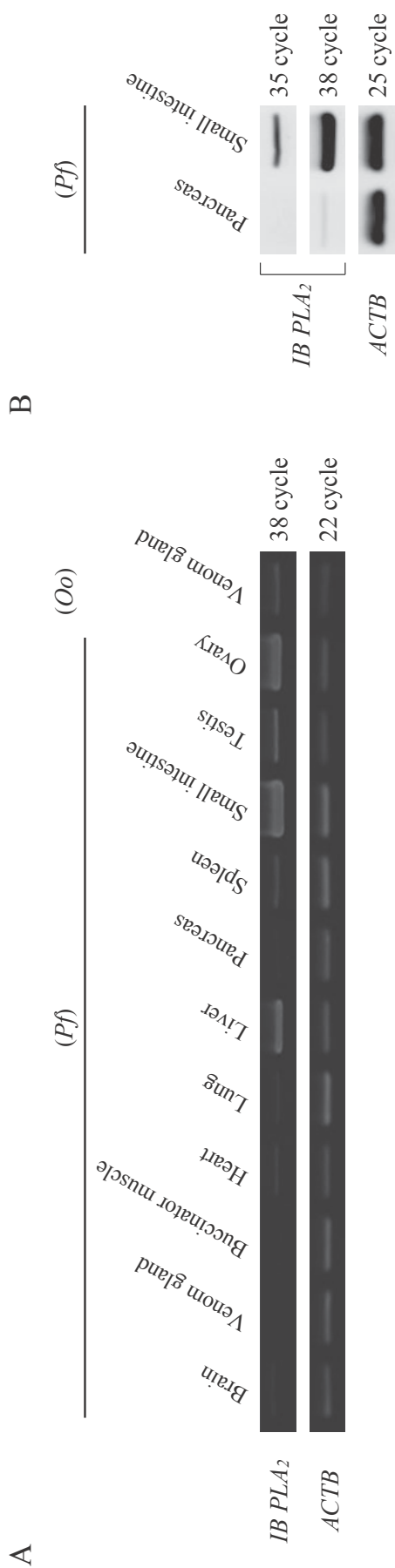


B

CpG Position	60	85	188	200	214	231	301	304	Total
Venom gland Me-CpG	86.7	100.0	60.0	83.3	86.7	90.0	86.7	80.0	84.2%
Pancreas Me-CpG	63.3	86.7	26.7	40.0	30.0	40.0	73.3	36.7	49.6%
Liver Me-CpG	93.3	93.3	50.0	73.3	50.0	70.0	83.3	40.0	69.2%

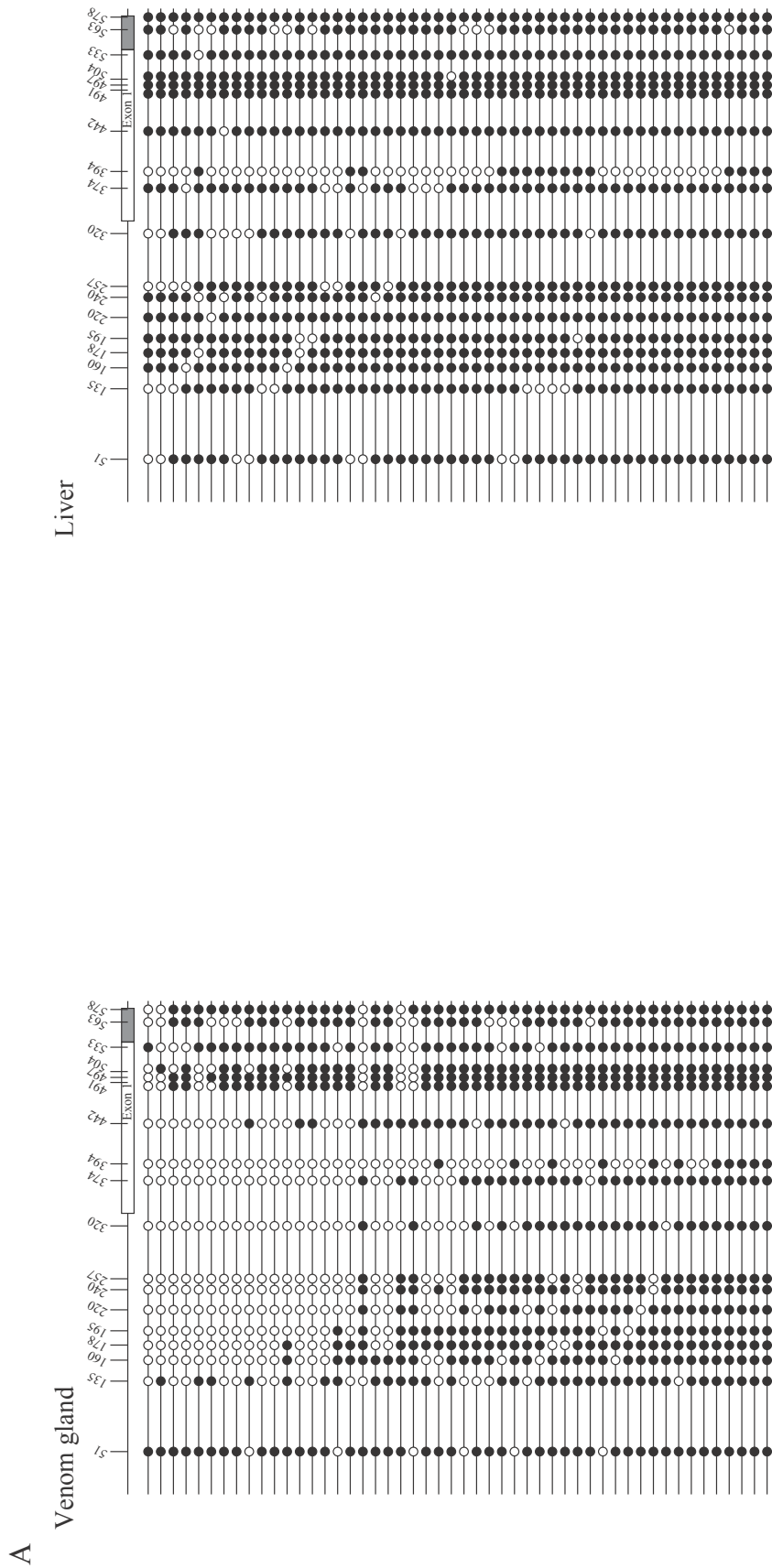
Figure 75. ホンハブの各組織別IB型PLA<sub>2</sub>遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析

(A) 各組織別IB型PLA<sub>2</sub>遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析。●はメチル化シトシン, ○は非メチル化シトシンを示す。■ : CDS, □ : UTRを示す。  
 (B) 各組織別IB型PLA<sub>2</sub>遺伝子プロモーター領域のメチル化シトシンの割合



**Figure 76. IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子転写産物の発現組織分布**

(A) 逆転写 PCR による IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子転写産物発現組織ボディーマップ。右数値は PCR サイクル数を示す。(B) 別個体で行った IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子発現の検証。(C) 半定量的発現量比較。ACTB 遺伝子増幅バンドの蛍光強度に基づいた定量値を算定し、IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子転写産物増幅バンドの蛍光強度を定量値補正した後、ホンハブ臓器での定量値を 1 として、各サンプル間での発現量を相対的に比較した。

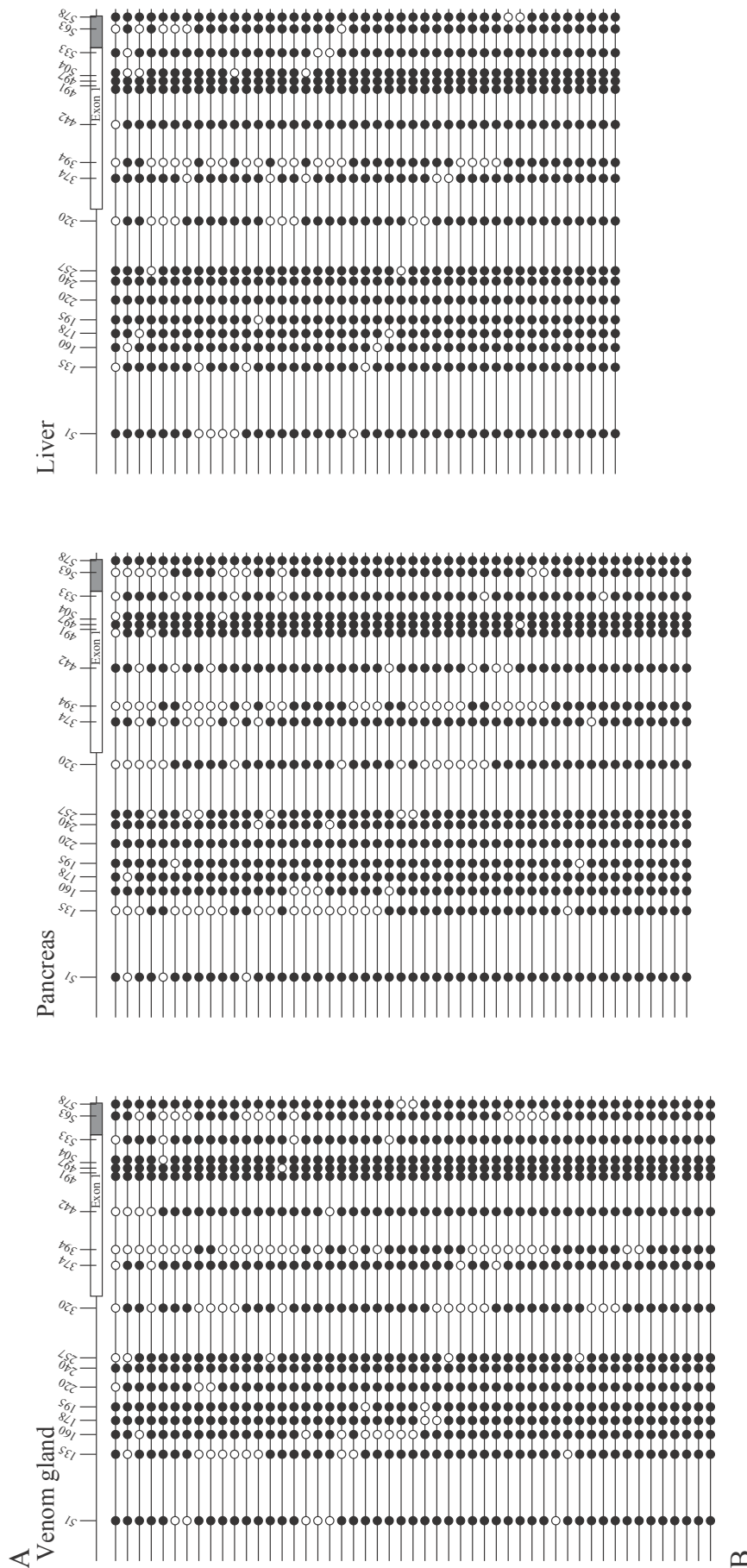


**B**

CpG Position	51	135	160	178	195	220	244	257	320	374	394	442	491	497	504	533	563	578	Total
Venom gland Me-CpG	88.0	66.0	62.0	64.0	60.0	48.0	54.0	50.0	46.0	54.0	22.0	68.0	84.0	88.0	82.0	82.0	70.0	92.0	65.6%
Liver Me-CpG	84.0	82.0	96.0	96.0	94.0	98.0	92.0	86.0	82.0	86.0	30.0	98.0	100.0	100.0	98.0	98.0	80.0	100.0	88.9%

**Figure 77. 塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析**

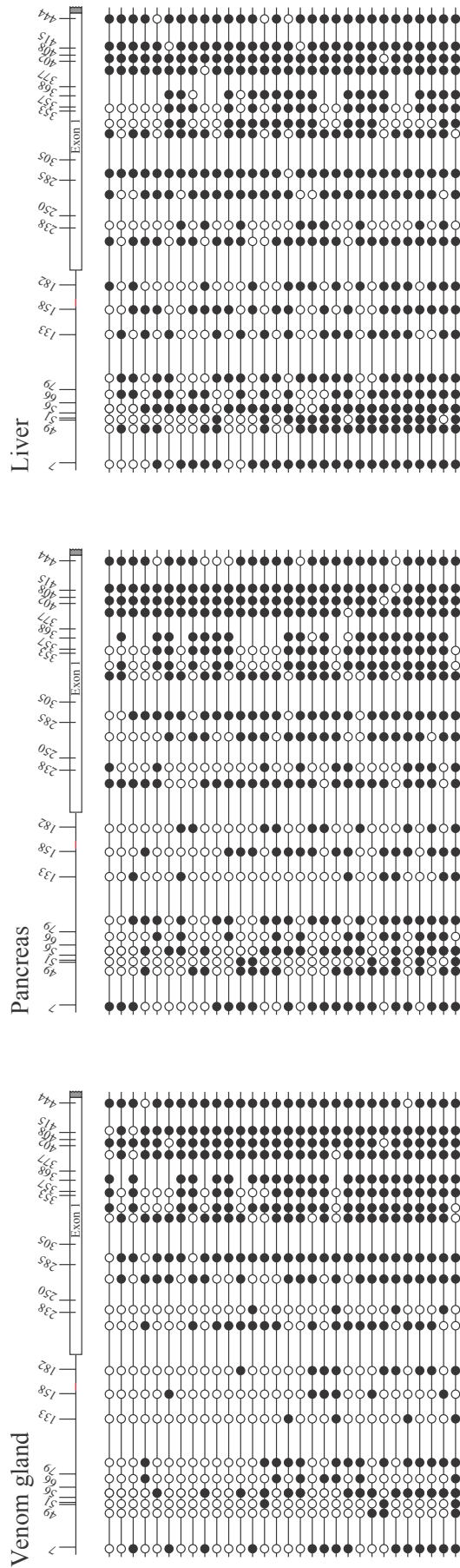
(A) 各組織別塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析。●はメチル化シトシン, ○は非メチル化シトシンを示す。  
 (B) 各組織別塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化シトシンの割合



**Figure 78. 塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析**

(A) 各組織別塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析。●はメチル化シトシン, ○は非メチル化シトシンを示す。■ : CDS, □ : UTR を示す。  
 (B) 各組織別塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域のメチル化シトシンの割合

A



B

CpG Position	7	49	51	56	66	79	133	158	182	238	250	285	305	353	357	368	377	402	408	415	444	Total
Venom gland Me-CpG	46.7	10.0	10.0	50.0	23.3	46.7	13.3	20.0	30.0	56.7	13.3	66.7	90.0	73.3	73.3	70.0	100.0	90.0	93.3	93.3	93.3	54.9%
Pancreas Me-CpG	63.3	53.3	20.0	56.7	40.0	66.7	23.3	53.3	33.3	83.3	33.3	60.0	83.3	70.0	63.3	63.3	90.0	96.7	96.7	96.7	80.0	62.7%
Liver Me-CpG	76.7	66.7	50.0	80.0	63.3	70.0	53.3	63.3	50.0	80.0	30.0	80.0	96.7	76.7	50.0	56.7	89.5	96.7	96.7	93.3	90.0	71.6%

Figure 79. *PpPLA6* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析

(A) 各組織別 *PpPLA6* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析。●はメチル化シトシン, ○は非メチル化シトシンを示す。  
 (B) 各組織別 *PpPLA6* 遺伝子プロモーター領域のメチル化シトシンの割合

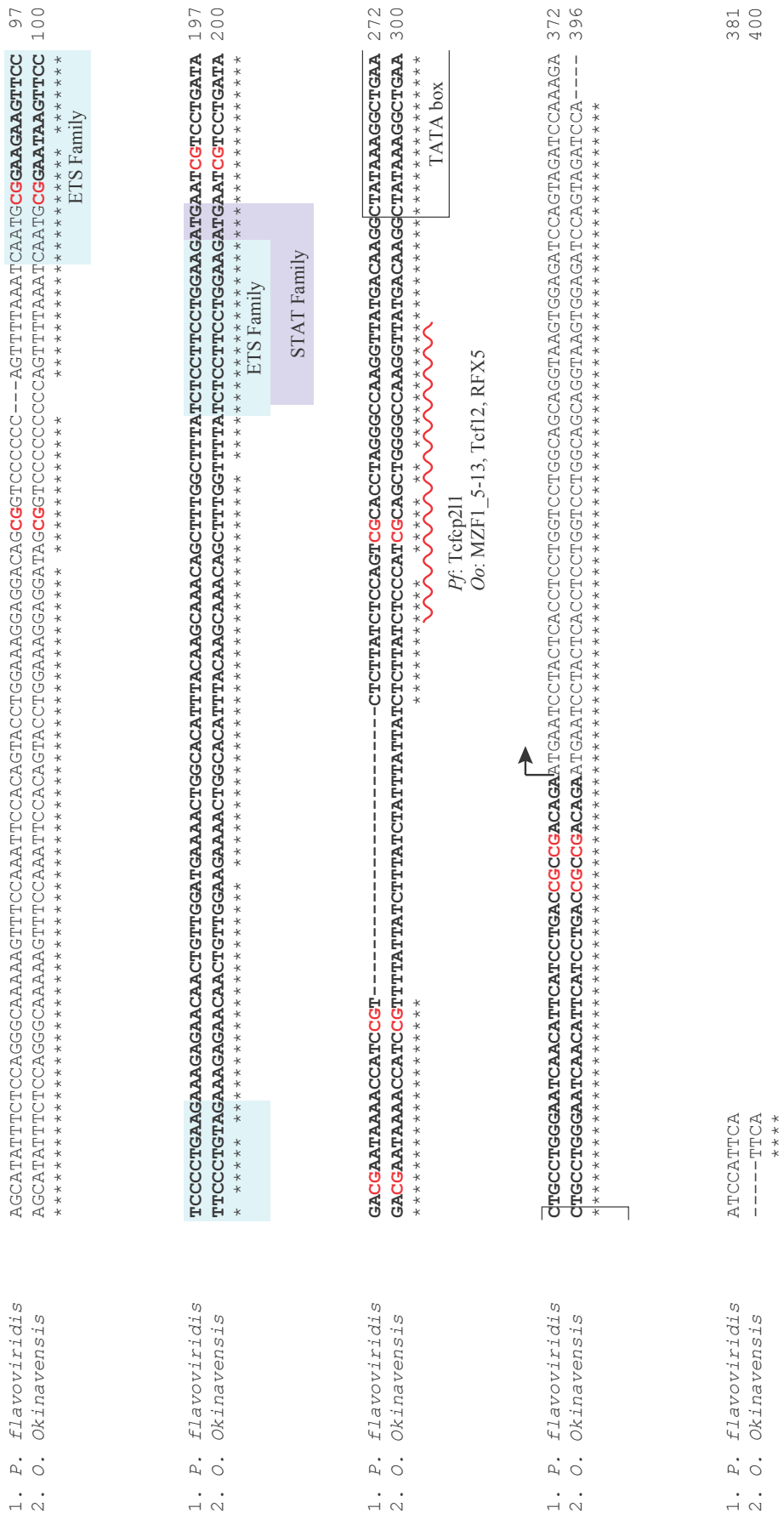


Figure 80. IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域とそこに結合すると予測された転写因子群  
 CpG は赤色で示し、メチル化状態解析を行った領域を太字で示す。矢印は転写開始点、青背景は ETS ファミリー、紫背景は STAT ファミリー、黒枠は TATA box 結合タンパク質、それぞれの結合サイトを示す。赤波線はホンハブとヒメハブで異なる転写因子が結合すると予測された場所を示す。

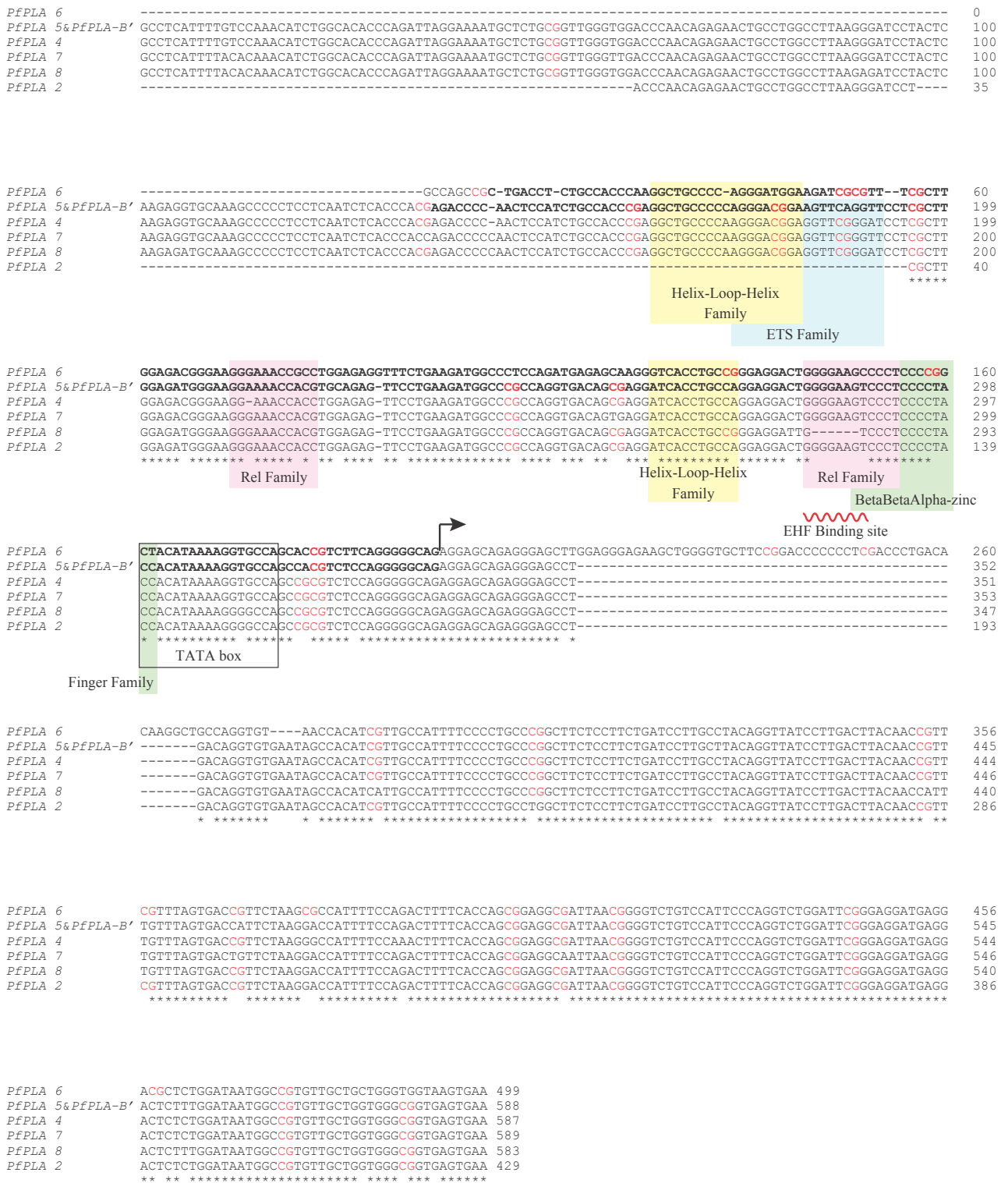


Figure 81. ホンハブ IIA 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子アイソザイムのプロモーター領域とそこに結合すると予測された転写因子群

CpG は赤色で示し、メチル化状態解析を行った領域を太字で示す。矢印は転写開始点、青背景は ETS ファミリー、黄背景は Helix-Loop-Helix ファミリー、赤背景は Rel ファミリー、緑背景は BetaBetaAlpha-zinc Finger ファミリー、黒枠は TATA box 結合タンパク質、それぞれの結合サイトを示す。赤波線は中村らによって予測された ESE-3 結合サイトを示す。



タイプ	グループ	サブグループ	分子量 (kDa)	触媒残基	
分泌型ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> (sPLA <sub>2</sub> )	I	A, B	13-15	His/Asp	
	II	A, B, C, D, E, F	13-17		
	III		15-18		
	V		14		
	IX		14		
	X		14		
	XI	A, B	12-13		
	XII	A, B	19		
	XIII		<10		
	XIV		13-19		
	細胞質型ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> (cPLA <sub>2</sub> )	IV	A(α), B(β), C(γ), D(δ), E(ε), F(ζ)	60-114	Ser/Asp
		VI	A(β), B(γ), C(δ), D(ε), E(ζ), F(η)	84-90	Ser/Asp
	Ca <sup>2+</sup> 非依存型ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> (iPLA <sub>2</sub> )	VII	A(Lp-PLA <sub>2</sub> ), B(PAF-AH II)	40-45	Ser/His/Asp
		VIII	A(α <sub>1</sub> ), B(α <sub>2</sub> ), β	26-40	
リソソーム型ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> (LPLA <sub>2</sub> )	XV		45	Ser/His/Asp	
アダプサイト型ホスホリパーゼ A <sub>2</sub> (AdPLA)	XVI		18	His/Cys	

Table 1. ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> スーパーファミリー

出典 : Dennis et al., 2011. Chem. Rev. 111, 6130-6185 (一部修正).

グループ	生物種 [発現組織]	分子量 (kDa)	ジスルフィド結合
IA	コブラ科ヘビ (Elapidae) [毒腺]	13-15	7
IB	哺乳類 [脾臓], 鳥類, 爬虫類, 両生類, 魚類, 昆虫類, 線虫類	13-15	7
IIA	哺乳類 [小腸, 脳, 卵巣], 鳥類, 爬虫類, クサリヘビ科ヘビ (Viperidae) [毒腺]	13-15	7
IIB	クサリヘビ科アフリカダヘビ (Viperidae, Viperinae, Bitis) [毒腺]	13-15	6
IIC	哺乳類 [精巣]	15	8
IID	哺乳類 [二次リンパ組織, 腎臓, 脾臓], 両生類	14-15	7
IIE	哺乳類 [心臓, 肺, 脳], 鳥類, 爬虫類, 両生類, ナミヘビ科ヘビ (Colubridae) [毒腺]	14-15	7
IIF	哺乳類 [心臓, 扁桃腺, 皮膚, 胚]	16-17	6
III	哺乳類 [骨格筋, 二次リンパ組織, 脳, 精巣]	55	8
	爬虫類 [毒腺], 両生類, 魚類, 昆虫類 [毒腺]	15-18	8
V	哺乳類 [心臓, 肺, 網膜, 卵巣], 鳥類	14	6
IX	貝類 [毒腺]	14	6
X	哺乳類 [肺, 結腸, 精巣, 一次・二次リンパ組織], 鳥類, 爬虫類, 両生類, 魚類	14	8
XIA	植物 [苗条]	12.4	6
XIB	植物 [苗条]	12.4	6
XIIA	哺乳類 [甲状腺, 前立腺, 骨格筋], 鳥類, 爬虫類, 両生類, 魚類	19	7
XIIB	哺乳類 [肝臓, 甲状腺], 鳥類, 爬虫類, 両生類, 魚類	19	7
XIII	パルボウイルス	<10	0
XIV	共生菌類, バクテリア	13-19	2

Table 2. 分泌型ホスホリパーゼ A2

出典: Schaloske et al., 2006. Biochim. Biophys. Acta. 1761, 1246-1259 (一部修正), Murakami et al., 2011. Prog. Lipid Res. 50, 152-192 (一部修正).

Poster 1						
Tree Node	mean	95% Equal-tail CI	95% HPD CI	HPD-CI-width	Jnode	
t_n56	1.7207	1.6589, 1.8426	1.6448, 1.8193	0.1745	Jnode 108	
t_n57	1.1713	0.8249, 1.6018	0.8338, 1.6084	0.7746	Jnode 107	
t_n58	0.6500	0.4445, 0.8987	0.4194, 0.8678	0.4485	Jnode 106	
t_n59	1.1284	1.1058, 1.1480	1.1065, 1.1485	0.0420	Jnode 105	
t_n60	0.9445	0.9347, 0.9645	0.9328, 0.9609	0.0280	Jnode 104	
t_n61	0.7622	0.7131, 0.8263	0.7112, 0.8232	0.1119	Jnode 103	
t_n62	0.7534	0.7015, 0.8198	0.6993, 0.8162	0.1169	Jnode 102	
t_n63	0.4976	0.3182, 0.6611	0.3238, 0.6651	0.3412	Jnode 101	
t_n64	0.7129	0.6702, 0.7634	0.6663, 0.7585	0.0922	Jnode 100	
t_n65	0.5110	0.2944, 0.6835	0.3027, 0.6878	0.3852	Jnode 99	
t_n66	0.0636	0.0385, 0.0984	0.0355, 0.0934	0.0578	Jnode 98	
t_n67	0.6667	0.6318, 0.7093	0.6290, 0.7052	0.0762	Jnode 97	
t_n68	0.5479	0.5282, 0.5570	0.5313, 0.5589	0.0276	Jnode 96	
t_n69	0.5218	0.4922, 0.5439	0.4958, 0.5464	0.0506	Jnode 95	
t_n70	0.4659	0.4315, 0.4969	0.4327, 0.4978	0.0651	Jnode 94	
t_n71	0.4318	0.3915, 0.4692	0.3916, 0.4693	0.0777	Jnode 93	
t_n72	0.3764	0.3225, 0.4261	0.3256, 0.4282	0.1027	Jnode 92	
t_n73	0.2960	0.2380, 0.3534	0.2404, 0.3555	0.1151	Jnode 91	
t_n74	0.2072	0.1591, 0.2621	0.1584, 0.2609	0.1025	Jnode 90	
t_n75	0.1786	0.1283, 0.2312	0.1256, 0.2280	0.1024	Jnode 89	
t_n76	0.3250	0.2717, 0.3761	0.2715, 0.3756	0.1041	Jnode 88	
t_n77	0.2763	0.2211, 0.3307	0.2195, 0.3287	0.1092	Jnode 87	
t_n78	0.2412	0.1905, 0.2962	0.1906, 0.2962	0.1056	Jnode 86	
t_n79	0.1365	0.0978, 0.1857	0.0958, 0.1825	0.0867	Jnode 85	
t_n80	0.0101	0.0046, 0.0182	0.0039, 0.0171	0.0131	Jnode 84	
t_n81	0.3639	0.3226, 0.4059	0.3223, 0.4054	0.0831	Jnode 83	
t_n82	0.3136	0.2718, 0.3578	0.2708, 0.3564	0.0855	Jnode 82	
t_n83	0.2587	0.2231, 0.3014	0.2218, 0.2989	0.0771	Jnode 81	
t_n84	0.2246	0.2019, 0.2618	0.2001, 0.2569	0.0568	Jnode 80	
t_n85	0.1737	0.1414, 0.2113	0.1419, 0.2116	0.0697	Jnode 79	
t_n86	0.1276	0.1049, 0.1551	0.1040, 0.1534	0.0494	Jnode 78	
t_n87	0.1027	0.0766, 0.1312	0.0761, 0.1305	0.0545	Jnode 77	
t_n88	0.0768	0.0506, 0.1063	0.0495, 0.1050	0.0555	Jnode 76	
t_n89	0.1186	0.0955, 0.1458	0.0952, 0.1450	0.0498	Jnode 75	
t_n90	0.0757	0.0561, 0.0980	0.0554, 0.0970	0.0416	Jnode 74	
t_n91	0.0630	0.0445, 0.0848	0.0445, 0.0848	0.0403	Jnode 73	
t_n92	0.0099	0.0046, 0.0177	0.0040, 0.0166	0.0126	Jnode 72	
t_n93	0.2123	0.1892, 0.2468	0.1878, 0.2439	0.0561	Jnode 71	
t_n94	0.1139	0.0776, 0.1560	0.0748, 0.1524	0.0776	Jnode 70	
t_n95	0.2028	0.1807, 0.2348	0.1789, 0.2315	0.0526	Jnode 69	
t_n96	0.1735	0.1548, 0.1999	0.1540, 0.1979	0.0440	Jnode 68	
t_n97	0.1264	0.1212, 0.1348	0.1207, 0.1340	0.0133	Jnode 67	
t_n98	0.0998	0.0814, 0.1159	0.0820, 0.1162	0.0342	Jnode 66	
t_n99	0.0914	0.0706, 0.1097	0.0706, 0.1097	0.0391	Jnode 65	
t_n100	0.1259	0.0989, 0.1585	0.0979, 0.1565	0.0586	Jnode 64	
t_n101	0.0871	0.0640, 0.1148	0.0623, 0.1123	0.0500	Jnode 63	
t_n102	0.0428	0.0284, 0.0602	0.0275, 0.0589	0.0314	Jnode 62	
t_n103	0.0236	0.0138, 0.0365	0.0132, 0.0355	0.0224	Jnode 61	
t_n104	0.0231	0.0127, 0.0379	0.0118, 0.0361	0.0243	Jnode 60	
t_n105	0.2912	0.2378, 0.3425	0.2394, 0.3435	0.1041	Jnode 59	
t_n106	0.1985	0.1479, 0.2524	0.1498, 0.2542	0.1044	Jnode 58	
t_n107	0.6222	0.5965, 0.6572	0.5943, 0.6534	0.0590	Jnode 57	
t_n108	0.5877	0.5767, 0.6114	0.5752, 0.6080	0.0329	Jnode 56	
t_n109	0.6385	0.4707, 0.7903	0.4686, 0.7878	0.3193	Jnode 55	
mu1	0.6261	0.5443, 0.7211	0.5410, 0.7161	0.1751		
mu2	0.9733	0.8474, 1.1177	0.8402, 1.1088	0.2685		
mu3	0.2447	0.2040, 0.2969	0.2011, 0.2915	0.0904		
mu4	0.3177	0.2605, 0.3891	0.2569, 0.3837	0.1268		
sigma2_1	0.2063	0.1309, 0.3069	0.1223, 0.2950	0.1727		
sigma2_2	0.2179	0.1387, 0.3252	0.1338, 0.3183	0.1846		
sigma2_3	0.3451	0.1897, 0.5725	0.1745, 0.5488	0.3742		
sigma2_4	0.3896	0.2382, 0.5940	0.2214, 0.5697	0.3484		
lnL	-202.8912	-230.127, -176.659	-230.132, -176.703	53.429		

Table 3. 琉球弧の地理的隔離を制約として採用しない場合の蛇族分岐年代推定

信頼区間 (CI, Confidence interval), 最高密度区間 (HPD, Highest Posterior Density)。各ノード番号は Figure 63 に従う。各年代時間は 1 億年を 1.000 と設定し表記している。

Poster 1							
Tree Node	mean	95% Equal-tail CI		95% HPD CI		HPD-CI-width	Jnode
t_n56	1.7216	1.6591,	1.8463	1.6485,	1.8250	0.1765	Jnode 108
t_n57	1.1702	0.8194,	1.6114	0.8265,	1.6181	0.7916	Jnode 107
t_n58	0.6506	0.4439,	0.9242	0.4182,	0.8790	0.4609	Jnode 106
t_n59	1.1275	1.1058,	1.1473	1.1058,	1.1472	0.0414	Jnode 105
t_n60	0.9451	0.9347,	0.9655	0.9326,	0.9622	0.0296	Jnode 104
t_n61	0.7622	0.7130,	0.8273	0.7084,	0.8216	0.1131	Jnode 103
t_n62	0.7543	0.7032,	0.8232	0.6965,	0.8140	0.1175	Jnode 102
t_n63	0.4982	0.3189,	0.6597	0.3262,	0.6648	0.3386	Jnode 101
t_n64	0.7137	0.6719,	0.7657	0.6710,	0.7644	0.0935	Jnode 100
t_n65	0.5152	0.2969,	0.6870	0.3050,	0.6927	0.3877	Jnode 99
t_n66	0.0630	0.0375,	0.0974	0.0356,	0.0949	0.0593	Jnode 98
t_n67	0.6672	0.6328,	0.7111	0.6310,	0.7087	0.0777	Jnode 97
t_n68	0.5480	0.5287,	0.5570	0.5323,	0.5586	0.0264	Jnode 96
t_n69	0.5215	0.4910,	0.5438	0.4944,	0.5454	0.0510	Jnode 95
t_n70	0.4662	0.4315,	0.4970	0.4334,	0.4981	0.0646	Jnode 94
t_n71	0.4324	0.3918,	0.4691	0.3923,	0.4693	0.0771	Jnode 93
t_n72	0.3768	0.3238,	0.4268	0.3254,	0.4282	0.1027	Jnode 92
t_n73	0.2955	0.2368,	0.3521	0.2370,	0.3523	0.1153	Jnode 91
t_n74	0.2072	0.1580,	0.2611	0.1562,	0.2588	0.1025	Jnode 90
t_n75	0.1786	0.1282,	0.2318	0.1285,	0.2320	0.1034	Jnode 89
t_n76	0.3260	0.2728,	0.3769	0.2731,	0.3770	0.1039	Jnode 88
t_n77	0.2771	0.2233,	0.3306	0.2238,	0.3310	0.1072	Jnode 87
t_n78	0.2421	0.1914,	0.2971	0.1901,	0.2954	0.1053	Jnode 86
t_n79	0.1362	0.0971,	0.1834	0.0944,	0.1800	0.0856	Jnode 85
t_n80	0.0105	0.0047,	0.0189	0.0041,	0.0177	0.0135	Jnode 84
t_n81	0.3638	0.3225,	0.4050	0.3234,	0.4054	0.0820	Jnode 83
t_n82	0.3140	0.2719,	0.3590	0.2695,	0.3562	0.0867	Jnode 82
t_n83	0.2587	0.2229,	0.3001	0.2219,	0.2982	0.0764	Jnode 81
t_n84	0.2255	0.2023,	0.2622	0.1995,	0.2573	0.0578	Jnode 80
t_n85	0.1752	0.1420,	0.2141	0.1405,	0.2122	0.0717	Jnode 79
t_n86	0.1279	0.1043,	0.1565	0.1033,	0.1549	0.0516	Jnode 78
t_n87	0.1031	0.0772,	0.1326	0.0761,	0.1312	0.0552	Jnode 77
t_n88	0.0773	0.0514,	0.1069	0.0512,	0.1064	0.0552	Jnode 76
t_n89	0.1190	0.0957,	0.1474	0.0948,	0.1459	0.0510	Jnode 75
t_n90	0.0760	0.0567,	0.0995	0.0563,	0.0988	0.0425	Jnode 74
t_n91	0.0633	0.0443,	0.0855	0.0429,	0.0839	0.0410	Jnode 73
t_n92	0.0117	0.0083,	0.0181	0.0078,	0.0172	0.0094	Jnode 72
t_n93	0.2132	0.1896,	0.2464	0.1881,	0.2442	0.0561	Jnode 71
t_n94	0.1140	0.0770,	0.1565	0.0764,	0.1556	0.0792	Jnode 70
t_n95	0.2037	0.1808,	0.2352	0.1790,	0.2324	0.0534	Jnode 69
t_n96	0.1741	0.1544,	0.2001	0.1528,	0.1981	0.0452	Jnode 68
t_n97	0.1266	0.1211,	0.1359	0.1198,	0.1338	0.0140	Jnode 67
t_n98	0.0999	0.0809,	0.1160	0.0810,	0.1160	0.0351	Jnode 66
t_n99	0.0914	0.0705,	0.1096	0.0713,	0.1101	0.0388	Jnode 65
t_n100	0.1254	0.0976,	0.1576	0.0972,	0.1566	0.0594	Jnode 64
t_n101	0.0857	0.0630,	0.1126	0.0619,	0.1109	0.0491	Jnode 63
t_n102	0.0427	0.0287,	0.0598	0.0274,	0.0579	0.0305	Jnode 62
t_n103	0.0239	0.0139,	0.0372	0.0130,	0.0357	0.0227	Jnode 61
t_n104	0.0235	0.0129,	0.0381	0.0122,	0.0369	0.0247	Jnode 60
t_n105	0.2902	0.2369,	0.3425	0.2376,	0.3431	0.1055	Jnode 59
t_n106	0.1982	0.1464,	0.2543	0.1441,	0.2509	0.1068	Jnode 58
t_n107	0.6224	0.5964,	0.6578	0.5945,	0.6545	0.0600	Jnode 57
t_n108	0.5877	0.5766,	0.6117	0.5748,	0.6073	0.0324	Jnode 56
t_n109	0.6391	0.4690,	0.7954	0.4619,	0.7867	0.3248	Jnode 55
mu1	0.6245	0.5431,	0.7231	0.5418,	0.7207	0.1790	
mu2	0.9707	0.8415,	1.1197	0.8304,	1.1058	0.2754	
mu3	0.2447	0.2030,	0.2970	0.2008,	0.2927	0.0919	
mu4	0.3174	0.2591,	0.3870	0.2575,	0.3843	0.1268	
sigma2_1	0.2084	0.1326,	0.3177	0.1247,	0.3032	0.1784	
sigma2_2	0.2177	0.1381,	0.3231	0.1342,	0.3167	0.1825	
sigma2_3	0.3480	0.1912,	0.5780	0.1667,	0.5385	0.3719	
sigma2_4	0.3899	0.2419,	0.5960	0.2308,	0.5743	0.3434	
lnL	-201.8791	-229.318,	-176.893	-228.999,	-176.659	52.34	

Table 4. 琉球弧の地理的隔離を制約として採用した場合の蛇族分岐年代推定

信頼区間 (CI, Confidence interval), 最高密度区間 (HPD, Highest Posterior Density)。各ノード番号は Figure 63 に従う。各年代時間は 1 億年を 1.000 と設定し表記している。

分岐年代 (95% 信頼区間)		
1,190 万年前 (1,474~957 万年前) [1,186 万年前 (1,458~955 万年前)]	<i>P. flavoviridis</i> , <i>P. tokarensis</i>	versus (vs.) <i>P. mucrosquamatus</i> , <i>P. maolanensis</i> , <i>P. elegans</i>
1,140 万年前 (1,565~770 万年前) [1,139 万年前 (1,560~776 万年前)]	<i>O. okinavensis</i>	vs. <i>Trimeresurus gracilis</i>
760 万年前 (995~567 万年前) [757 万年前 (980~561 万年前)]	<i>P. mucrosquamatus</i>	vs. <i>P. maolanensis</i> , <i>P. elegans</i>
633 万年前 (855~443 万年前) [630 万年前 (848~445 万年前)]	<i>P. maolanensis</i>	vs. <i>P. elegans</i>
117 万年前 (181~83 万年前) [99 万年前 (177~46 万年前)]	<i>P. flavoviridis</i>	vs. <i>P. tokarensis</i>

Table 5. 日本南西諸島とその周辺に棲息するマムシ亜科ヘビの分岐年代推定

推定された分岐年代は Figure 64, 65 及び Table 3, 4 に基づき、四角括弧内の分岐年代は Figure 64 と Table 3 での値である。

	Acidic [Asp <sup>49</sup> ]	Neutral [Asp <sup>49</sup> ]	Ancestral	[Lys <sup>49</sup> ]	Highly basic [Asp <sup>49</sup> ]	Basic [Asp <sup>49</sup> ]
<i>Azemiops feae</i>	○	N.D.	○	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	○	○	N.D.	○	○	○
<i>Protobothrops flavoviridis</i>	○	◎	○	◎	◎	◎
<i>Gloydia halys</i>	○	N.D.	N.D.	N.D.	○	○
<i>Trimeresurus gracilis</i>	○	N.D.	N.D.	○	N.D.	N.D.
<i>Ovophis okinavensis</i>	○	×	○	○	×	×
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	○	○	N.D.	○	N.D.	N.D.
<i>Crotalus mitchellii pyrrhus</i>	N.D.	○	○	○	N.D.	N.D.
<i>Crotalus horridus</i>	○	○	○	○	○	N.D.

Table 6. クサリヘビ科へビのIIA型PLA<sub>2</sub>の有無

N.D. は核酸及びタンパク質データベースにデータセットが存在しなかった場合, × はゲノム構造中から完全に遺伝子が次失している場合, ◎ は核酸及びタンパク質データベースのどちらか一方に該当配列が存在した場合, ◎ は核酸及びタンパク質データベースのどちらか一方に該当配列が存在した場合, ◎ は核酸及びタンパク質データベースのどちらか一方に該当配列が存在した場合を示す。

Name	Family	BLAST Hit sequence	Score	E-Value
Bcl6	BetaBetaAlpha-zinc Finger	BQ631869	287	7e-91
EHF	ETS	CV675730	266	7e-88
ELF1	ETS	BM508960	298	2e-96
ELK1	ETS	BI835063	344	4e-116
ELK4	ETS	CK821104	217	5e-67
Erg	ETS	BI713036	382	2e-130
Ets1	ETS	CK819846	226	1e-70
FEV	ETS	BI438572	277	3e-93
FLI1	ETS	BI713036	238	8e-75
Foxo1	Forkhead	CV675513	368	2e-122
FOXO3	Forkhead	CB177633	195	1e-57
Hltf	GATA	AA159301	250	1e-76
INSM1	BetaBetaAlpha-zinc finger	BM503821	182	1e-53
JUN::FOS	Leucine Zipper	CA772039	399	6e-138
		BU789358	294	2e-98
KLF5	BetaBetaAlpha-zinc Finger	CF579899	332	5e-110
Mafk	Leucine Zipper	BI466203	201	3e-62
MZF1_1-4	BetaBetaAlpha-zinc Finger	BG656540	354	9e-117
MZF1_5-13	BetaBetaAlpha-zinc Finger	BG656540	354	9e-117
NFIC	NFI CCAAT-binding	BP323089	388	1e-132
Nkx2-5	Homeo	BI834117	287	5e-95
Nr5a2	Hormone-nuclear Receptor	CK819760	388	7e-132
SOX10	High Mobility Group box (HMG)	BE226257	224	9e-71
Spi1	ETS	BM919205	219	8e-68
SPIB	ETS	BP324469	223	2e-71
STAT1	STAT	AA069801	319	3e-103
STAT3	STAT	CA772093	432	4e-145
Stat4	STAT	BM918571	478	4e-162
Stat6	STAT	BI521131	216	4e-63
TEAD1	Homeo	BM918968	321	3e-105
Tcfcp2l1	CP2	BM505800	323	1e-107
THAP1	THAP	BI833227	363	1e-125

Table 7. ホンハブ IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域に結合すると予測された転写因子群

ヒトとマウスの脾臓 EST データベースより抽出された転写因子群。  
転写因子の名称, ファミリー名, ヒットしたデータセットのアクセッション No., Score, E-Value を示す。

Name	Family	BLAST Hit sequence	Score	E-Value
Bcl6	BetaBetaAlpha-zinc Finger	BQ631869	287	7e-91
EHF	ETS	CV675730	266	7e-88
ELK1	ETS	BI835063	344	4e-116
ELK4	ETS	CK821104	217	5e-67
Erg	ETS	BI713036	382	2e-130
Ets1	ETS	CK819846	226	1e-70
FEV	ETS	BI438572	277	3e-93
FLI1	ETS	BI713036	238	8e-75
Foxo1	Forkhead	CV675513	368	2e-122
HLF	Leucine Zipper	BM021389	181	3e-55
Hltf	GATA	AA159301	250	1e-76
INSM1	BetaBetaAlpha-zinc finger	BM503821	182	1e-53
JUN::FOS	Leucine Zipper	CA772039	399	6e-138
		BU789358	294	2e-98
Mafb	Leucine Zipper	BI466203	201	3e-62
MZF1_5-13	BetaBetaAlpha-zinc Finger	BG656540	354	9e-117
NFIC	NFI CCAAT-binding	BP323089	388	1e-132
Nkx2-5	Homeo	BI834117	287	5e-95
Nr5a2	Hormone-nuclear Receptor	CK819760	388	7e-132
RFX5	RFX	BM313205	201	7e-60
SOX10	High Mobility Group box (HMG)	BE226257	224	9e-71
Spi1	ETS	BM919205	219	8e-68
SPIB	ETS	BP324469	223	2e-71
STAT1	STAT	AA069801	319	3e-103
STAT3	STAT	CA772093	432	4e-145
Stat4	STAT	BM918571	478	4e-162
Stat6	STAT	BI521131	216	4e-63
TEAD1	Homeo	BM918968	321	3e-105
Tcf12	Helix-Loop-Helix	CF579929	208	3e-60
THAP1	THAP	BI833227	363	1e-125

Table 8. ヒメハブ IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域に結合すると予測された転写因子群

ヒトとマウスの膵臓 EST データベースより抽出された転写因子群。  
転写因子の名称, ファミリー名, ヒットしたデータセットのアクセッション No., Score, E-Value を示す。



Name	Score	Position	Strand	Sequence
MZF1_5-13	6.564	80-89	+	CAATCGGAA
Spi1	6.922	79-93	+	TCAATCGGAGAAG
ELF1	9.118	80-92	+	CAATCGGAAAGAA
ELK1	7.255	81-90	+	AAATCGGAAG
ELK4	7.236	83-93	-	CTTCTTCGCA
SPIB	9.203	83-89	+	TGCGGAA
EHF	6.51	87-94	-	ACTTCTTC
Spi1	7.678	90-104	-	CAGGGAGGAACCTTC
EHF	6.51	92-99	+	AGTTCTTC
FEV	6.534	92-99	-	GAGGAAC
ELK1	6.611	98-107	+	TCCCTGAG
KLF5	9.193	93-102	+	GTTCTCTCCC
MZF1_1-4	7.939	98-103	-	AGGGA
SOX10	6.636	106-111	-	CTTTCT
FOXO3	8.036	127-134	+	TGAAAAC
NFIC	8.396	133-138	+	CTGGCA
Hltf	6.619	136-145	+	GCACATTTAC
STAT3	8.878	141-151	-	TTGCTTGTAAA
Foxo1	7.051	147-157	-	AGCTGTTTGT
NFIC	8.52	158-163	+	TTGGCT
Bcl6	7.93	168-181	-	CTCCAGGAAGGAG
Ets1	6.675	167-181	+	TCTCCTTCTGGAG
ELK4	7.902	168-178	+	CTCCTTCTGG
Erg	9.111	168-178	-	CCAGGAAGGAG
FLI1	10.006	168-178	-	CCAGGAAGGAG
EHF	13.827	170-177	+	CCTTCTGT
FEV	7.905	170-177	-	CAGGAAG
Bcl6	12.083	171-184	+	CTTCTGGGAAGATG
Stat4	15.858	171-181	-	CTTCCAGGAAGGAG
STAT1	14.938	171-181	-	CTTCCAGGAAG
STAT1	12.228	171-181	+	CTTCTGGAAAG
STAT3	13.85	171-181	-	CTTCCAGGAAG
STAT3	14.654	171-181	+	CTTCTGGAAAG
Stat4	12.041	171-184	+	CTTCTGGGAAGATG
THAP1	7.31	173-181	-	CTTCCAGGA
JUN:~POS	6.507	183-189	+	TGAATCG
TBP	7.478	201-215	+	GAATAAAACCATCCG
ELK1	7.236	210-219	-	GAGCGGATG
Nkx2-5	7.281	217-223	-	ATAAGAG
Tcfcp2l1	9.961	226-239	+	CCAGTCGCACCTAG
Nr5a2	11.559	238-252	+	AGGCCAAAGTTATG
Hltf	7.071	240-249	-	AACCTTGGCC

Name	Score	Position	Strand	Sequence
NFIC	7.969	240-245	-	TTGGCC
SOX10	7.094	253-258	-	CCTTGT
TBP	9.194	259-273	+	CTATAAAGGCTGAAC
Stat6	6.806	271-285	+	AACTGCCTGGGAATC
EHF	6.536	272-279	+	ACTGCCCTG
FEV	7.905	272-279	-	CAGGCAGT
TEAD1	8.765	286-297	+	AACATTCATCCT
INSM1	8.225	297-308	-	TGTCGGGGTCA
Mafk	6.901	302-309	+	CCCGACAG

Table 9. ホンハブIB型PLA<sub>2</sub>遺伝子プロモーター領域に結合すると予測されたと結合された転写因子群

青背景はETSファミリー，紫背景はSTATファミリーを示す。黒枠はTATA box結合タンパク質，青枠はEHFをそれぞれ示す。

Name	Score	Position	Strand	Sequence
HLP	7.139	83-94	-	TATTCGGATTG
MZF1_5-13	6.564	83-92	+	CAATCGGAA
H1tf	7.3	90-99	-	GAACTTATC
NKx2-5	6.961	92-98	+	ATAAGTT
SPIB	9.203	86-92	+	TGCGAA
Spi1	6.77	93-107	-	CAGGAAGGAACCTTA
FEV	7.144	95-102	-	AAGAACT
Stat4	7.172	97-110	-	CTACAGGAAAGGAA
STAT3	6.589	100-110	-	CTACAGGAAAG
SOX10	6.636	109-114	-	CTTTCT
THAP1	7.38	123-131	-	CTTCCAACA
NFIC	7.587	125-130	+	TTGGAA
NFIC	8.396	135-141	+	CTGGCA
H1tf	6.619	139-148	+	GCACATTTAC
STAT3	8.878	144-154	-	TTGCTTGTAAG
Foxo1	7.051	150-160	-	AGCTGTTGCT
Ets1	6.675	170-184	+	TCTCCTTCTGGAAG
ELK4	7.902	171-181	+	CTCCTTCTGG
Erg	9.111	171-181	-	CCAGGAAGGAG
FLI1	10.006	171-181	-	CCAGGAAGGAG
EHF	13.827	173-180	+	CCTTCTCTG
FEV	7.905	173-180	-	CAGGAAG
Stat4	15.858	171-184	-	CTTCCAGGAAGGAG
STAT1	14.938	174-184	-	CTTCCAGGAAG
STAT1	12.228	174-184	+	CTTCTGGAAG
STAT3	13.85	174-184	-	CTTCCAGGAAG
STAT3	14.654	174-184	+	CTTCTGGAAG
Stat4	12.041	174-187	+	CTTCTGGAAGATG
THAP1	7.31	176-184	-	CTTCCAGGA
JUN::FOS	6.507	186-192	+	TGAATCG
TBP	7.478	204-218	+	GAATATAACCATCCG
ELK1	6.658	213-222	-	aaaACGGATG
NKx2-5	7.281	245-251	-	ATAAGAG
MZF1_5-13	7.993	251-260	-	CGAtGGAGA
Tcf12	6.727	258-268	-	CCcAgcTGCGA
Tcf12	11.651	259-269	+	CGcAgcTgGGG
RFX5	7.144	263-277	-	AAcCTTGGCCcAGC
Nr5a2	11.534	266-280	+	9GGCCAAgGTTATG
H1tf	7.071	268-277	-	AAcCTTGGCC
NFIC	7.969	268-273	-	TTGGCC
SOX10	7.094	281-286	-	CCTTGT
TBP	9.194	287-301	+	CTATAAGGCTGAAC

Name	Score	Position	Strand	Sequence
Stat6	6.806	299-313	+	AACTGCCTGGGAATC
EHF	6.536	300-307	+	ACTGCCCTG
FEV	7.905	300-307	-	CAGGCAGT
TEAD1	8.765	314-325	+	AAcATTcATcCT
INSM1	8.225	325-336	-	TGTCGGCGGTCA
Mafb	6.901	330-337	+	GCCGACAG

Table 10. ヒメハブ IB 型 PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域に結合すると予測された転写因子群

青背景は ETS ファミリー, 紫背景は STAT ファミリーを示す。黒枠は TATA box 結合タンパク質, 青枠は EHF をそれぞれ示す。

Name	Family	BLAST Hit isotig	Score	E-Value
ARID3A	Arid	isotig17357	258	6e-82
Bcl6	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig09033	309	7e-99
Bhlhe40	Helix-Loop-Helix	isotig04518	468	7e-153
CTCF	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig05442	718	0.0
E2F3	E2F	isotig12623	176	2e-51
E2F6	E2F	isotig12623	269	8e-90
EBF1	Helix-Loop-Helix	isotig21664	299	3e-98
EGR1	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig13881	303	9e-100
EHF	ETS	isotig05227	503	3e-175
ELF1	ETS	isotig02486	630	0.0
ELF5	ETS	isotig01649	412	2e-136
ELK4	ETS	isotig03088	182	4e-51
FLI1	ETS	isotig15906	317	9e-107
GABPA	ETS	isotig08565	437	3e-153
HNF4A	Hormone-nuclear Receptor	isotig05389	264	1e-80
HNF4G	Hormone-nuclear Receptor	isotig05389	261	3e-80
MAX	Helix-Loop-Helix	isotig06931	244	1e-79
Meis1	Homeodomain	isotig23346	244	7e-80
Myc	Helix-Loop-Helix	isotig09553	244	3e-77
MZF1_1-4	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig00570	292	2e-87
MZF1_5-13	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig00570	292	2e-87
NFATC2	Rel	isotig03142	267	3e-78
NFIC	NFI CCAAT-binding	isotig04628	495	4e-164
NFKB1	Rel	isotig10963	236	9e-71
NR2F1	Hormone-nuclear Receptor	isotig17626	268	4e-88
NR4A2	Hormone-nuclear Receptor	isotig07234	428	6e-145
REL	Rel	isotig12550	303	2e-98
RELA	Rel	isotig12550	229	1e-70
Rfx1	RFX	isotig13306	404	9e-134
RUNX1	Runt	isotig18837	305	3e-102
RUNX2	Runt	isotig18837	285	1e-93
Rxra	Hormone-nuclear Receptor	isotig05389	614	0.0
SMAD2::SMAD3::SMAD4	MH1	isotig17549	259	4e-84
		isotig17549	294	4e-98
		isotig02634	896	0.0
SP1	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig05381	375	3e-119
SP2	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig18337	254	2e-80
SREBF1	Helix-Loop-Helix	isotig04460	903	0.0
STAT2::STAT1	STAT	isotig09154	282	2e-87
		isotig13338	318	3e-103
Tcf12	Helix-Loop-Helix	isotig06344	248	1e-73
Tcf3	High Mobility Group (Box)	isotig06071	509	2e-175
TCF7L2	High Mobility Group (Box)	isotig06071	410	4e-136
TFAP2A	Helix-Loop-Helix	isotig06952	656	0.0
TFAP2C	Helix-Loop-Helix	isotig06952	403	5e-137
USF1	Helix-Loop-Helix	isotig10551	336	5e-115
YY1	BetaBetaAlpha-zinc finger	isotig08015	338	2e-113
ZNF263	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig00570	276	4e-82
ZNF354C	BetaBetaAlpha-zinc finger	isotig00570	334	5e-105

Table 11. ホンハブ塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA<sub>2</sub> 遺伝子プロモーター領域に結合すると予測された転写因子群

ホンハブの毒腺 EST データベースより抽出された転写因子群。  
転写因子の名称, ファミリー名, ヒットしたデータセットのアクセッション No., Score, E-Value を示す。

Name	Family	BLAST Hit isotig	Score	E-Value
ARID3A	Arid	isotig17357	258	6e-82
Bhlhe40	Helix-Loop-Helix	isotig04518	468	7e-153
E2F6	E2F	isotig12623	269	8e-90
EBF1	Helix-Loop-Helix	isotig21664	299	3e-98
EGR1	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig13881	303	9e-100
EHF	ETS	isotig05227	503	3e-175
HNF4A	Hormone-nuclear Receptor	isotig05389	264	1e-80
MZF1_1-4	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig00570	292	2e-87
MZF1_5-13	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig00570	292	2e-87
NFATC2	Rel	isotig03142	267	3e-78
NFIC	NF1 CCAAT-binding	isotig04628	495	4e-164
NFKB1	Rel	isotig10963	236	9e-71
NR2F1	Hormone-nuclear Receptor	isotig17626	268	4e-88
NR4A2	Hormone-nuclear Receptor	isotig07234	428	6e-145
PPARG::RXRA	Hormone-nuclear Receptor	isotig05389	614	0.0
		isotig08048	440	7e-152
REL	Rel	isotig12550	303	2e-98
RELA	Rel	isotig12550	229	1e-70
Rfx1	RFX	isotig13306	404	9e-134
Rxra	Hormone-nuclear Receptor	isotig05389	614	0.0
SP1	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig05381	375	3e-119
SP2	BetaBetaAlpha-zinc Finger	isotig18337	254	2e-80
STAT2::STAT1	STAT	isotig09154	282	2e-87
		isotig13338	318	3e-103
Tcf12	Helix-Loop-Helix	isotig06344	248	1e-73
Tcf3	High Mobility Group (Box)	isotig06071	509	2e-175
TCF7L2	High Mobility Group (Box)	isotig06071	410	4e-136
TFAP2A	Helix-Loop-Helix	isotig06952	656	0.0
TFAP2C	Helix-Loop-Helix	isotig06952	403	5e-137
USF1	Helix-Loop-Helix	isotig10551	336	5e-115
YY1	BetaBetaAlpha-zinc finger	isotig08015	338	2e-113

Table 12. ホンハブ *PfPLA 6* 遺伝子プロモーター領域に結合すると予測された転写因子群

ホンハブの毒腺 EST データベースより抽出された転写因子群。  
転写因子の名称, ファミリー名, ヒットしたデータセットのアクセッション No., Score, E-Value を示す。

Name	Score	Position	Strand	Sequence
RUNX1	6.847	137-147	-	AGTTGGGGTCT
Tcf12	8.067	146-156	-	GGCAGATGGAG
Tcf3	7.026	147-157	+	TCCATCTGCCA
SMAD2::SMAD3::SMAD4	8.641	148-160	+	CCATCTGCCACC
Rxra	6.773	164-174	-	CTGGGGCAGC
TFAP2A	9.21	164-178	+	GCTGCCCCAGGGAC
TFAP2C	13.274	164-178	+	CTGCCCCAGGGAC
TFAP2A	13.4	166-180	-	CGTCCCTGGGGCA
TFAP2C	8.612	166-180	-	CGTCCCTGGGGCA
EBF1	15.877	167-177	+	GCCCCCAGGA
ELF1	7.944	173-185	+	AGGACGGAAGTT
ELK4	8.867	176-186	-	GAACTTCCGTC
FLI1	7.809	176-186	+	GACGGAAGTTC
ELF5	9.797	177-185	-	AAC TTCGT
GABPA	8.835	177-187	+	ACGGAAGTTCA
MZF1_5-13	6.961	202-211	+	AGATGGGAAG
E2F6	7.144	206-216	+	GGGAAGGAAAA
STAT2::STAT1	9.873	206-220	-	GTGGTTTTCCTTCCC
ELF5	6.955	209-217	-	GTTTTTCCTT
NFATC2	9.49	210-216	-	TTTTTCCT
REL	9.179	211-220	-	GTGGTTTTC
RELA	9.132	211-220	-	GTGGTTTTC
MAX	9.974	215-224	+	AACCACGTGC
Myc	11.986	215-224	-	GCAAGTGGTT
USF1	6.708	215-225	-	TGCACGTGGTT
ZNF354C	7.331	215-220	+	AACCAC
Bhlhe40	9.525	216-226	+	ACCACGTGCAG
Tcf3	7.344	216-226	+	ACCACGTGCAG
MAX	7.932	217-226	-	CTGCACGTGG
Myc	11.552	217-226	+	CCAGGTGCAG
HNFA	7.199	219-233	-	AGGAACCTGCACGT
NR2F1	10.354	219-232	-	GGAACTGCACGT
ELF5	6.831	226-234	+	GAGTTCCTG
EBF	6.536	227-234	+	AGTTCCTG
Bcl6	9.752	228-241	+	GTTCTGAAATGG
YY1	9.905	234-245	+	GAAGATGGCCCG
CTCF	10.595	240-258	+	GGCCCGCAGGTGACAGCG
Meis1	8.623	244-258	-	CGCTGTACCTGGCG
NFIC	6.936	244-249	-	CTGGCG
Tcf3	8.092	244-254	-	GTACACCTGGCG
USF1	11.417	245-255	+	GCCAGGTGACA
SMAD2::SMAD3::SMAD4	10.758	248-260	-	CTCGCTGCACCT

Name	Score	Position	Strand	Sequence
NR4A2	7.179	259-266	+	AGGATCAC
Tcf12	9.445	261-271	-	GGCAGGTGATC
USF1	10.7	261-271	-	GGCAGGTGATC
Bhlhe40	8.375	262-272	+	ATCACCTGCCA
SREBF1	6.712	262-271	+	ATCACCTGCC
TFAP2C	6.501	267-281	-	CAGTCCTCCTGGCAG
Tcf3	7.703	262-272	+	ATCACCTGCCA
NFIC	8.396	268-273	-	CTGGCA
MZF1_5-13	6.564	277-286	+	GACTGGGAA
MZF1_1-4	9.085	280-285	+	TGGGGA
EBF	6.51	281-288	-	ACTTCCCC
NFKB1	15.106	281-291	-	GGGACTTCCC
REL	8.045	281-290	+	GGGAACTCC
RELA	8.042	281-290	+	GGGAACTCC
REL	8.048	282-291	-	GGGACTTCCC
RELA	11.345	282-291	-	GGGACTTCCC
RELA	8.783	282-291	+	GGAAAGTCCC
REL	7.39	283-292	-	AGGGACTTCC
EGR1	10.138	287-300	+	GTCCCTCCCCTACC
SP1	13.881	287-297	+	GTCCCTCCCCT
SP2	13.002	287-301	+	GTCCCTCCCCTACCA
MZF1_5-13	8.823	290-299	-	GTAGGGGAGG
MZF1_1-4	7.939	292-297	-	AGGGGA
RUNX2	8.219	295-309	-	CTTTTATGTGGTAGG
RUNX1	7.003	296-306	-	TTATGTGGTAG
Tcf7L2	9.429	299-312	+	CCACATAAAGGTG
TBP	8.492	301-315	+	ACATAAAGGTGCCA
ARID3A	6.852	303-308	+	ATAAAA
SMAD2::SMAD3::SMAD4	15.254	308-320	-	GTGGCTGGCACCT
NFIC	8.396	311-316	-	CTGGCA
TFAP2C	8.345	318-332	+	CACGTCTCCAGGGGG
CTCF	11.321	319-337	+	ACGTCTCCAGGGGCAGAG
EBF1	14.136	321-331	+	GTCTCCAGGGG
Rfx1	8.383	321-334	-	TGCCCCCTGGAGAC
SP2	7.369	324-338	-	CTCTGCCCCCTGGA
EGR1	9.512	325-338	-	CTCTGCCCCCTGG
Rxra	10.308	326-336	+	CAGGGGCAGA
SP1	7.873	328-338	-	CTCTGCCCC
ZNF263	14.016	328-348	+	GGGGCAGAGGAGCAGAGGGA
ZNF263	9.453	329-349	+	GGGGCAGAGGAGCAGAGGAG
E2F3	8.798	335-349	-	CTCCCTCTGCTCCTC

Table 13. ホンハブ塩基性 [Asp<sup>49</sup>]PLA2 遺伝子プロモーター領域に結合すると予測された転写因子群

背景は ETS ファミリー, 黄背景は Helix-Loop-Helix ファミリー, 赤背景は Rel ファミリー, 緑背景は BetaBetaAlpha-zinc Finger ファミリー, 灰背景は RXR-related receptors (NR2), をそれぞれ示す。黒枠は TATA box 結合タンパク質, 青枠は EHF をそれぞれ示す。

Name	Score	Position	Strand	Sequence
Rxra	15.152	8-18	-	CAGAGGTCAGC
HNF4A	11.37	9-23	+	CTGACCTTGCCACC
NR4A2	8.842	9-16	-	GAGTCTCAG
NR2F1	11.759	10-23	+	TGACCTTGCCACC
PFARG:RXRA	14.549	10-24	-	GGTGGCAGAGGTCA
TFAP2A	11.736	27-41	+	GGTGTCCCAAGGAT
TFAP2C	12.931	27-41	+	GGTGTCCCAAGGAT
EBF1	13.559	30-40	+	TGCCCCAGGGA
TFAP2A	6.983	30-44	-	TCCATCCCTGGGCA
E2F6	6.725	37-47	+	GGGATGGAAGA
NFATC2	8.594	41-47	-	TCITCCA
Rfx1	6.618	53-66	+	TTTTCGTTGGAGAC
E2F6	7.694	63-73	+	AGACGGGAGG
EHF	6.578	66-73	-	CCTTCCCG
STAT2::STAT1	14.114	67-81	-	CGGGTTTCCCTTCCC
MZF1_5-13	7.224	68-77	+	GGAGGGAAA
NFKB1	6.732	72-82	-	GGCGFTTCCC
REL	8.2	73-82	-	GGCGFTTCC
RELA	9.392	73-82	-	GGCGFTTCC
YY1	11.034	96-107	+	GAAGATGGCCCT
Tcf3	7.278	106-116	-	CTCATCTGGAG
TCF7L2	7.588	108-121	+	CCAGATGAGACAA
PFARG:RXRA	12.576	113-127	+	TGAGAGCAAGGTCA
HNF4A	12.998	114-128	-	GTGACCTTGCTCTC
NR2F1	12.704	114-127	-	TGACCTTGCTCTC
EHF	6.552	116-123	-	CCTTGCTC
Rxra	10.8	119-129	+	CAAGGTCACC
NR4A2	8.782	121-128	+	AGGGTCAC
Tcf12	8.859	123-133	-	GGCAGGTGACC
USF1	12.532	123-133	-	GGCAGGTGACC
Bhlhe40	11.161	124-134	+	GTACCTGCCG
Tcf3	9.965	124-134	+	GTACCTGCCG
MZF1_5-13	6.564	139-148	+	GACTGGGAA
MZF1_1-4	9.085	142-147	+	TGGGA
NFKB1	14.171	143-153	-	GGGGTTCCC
REL	8.782	144-153	-	GGGGTTCCC
RELA	10.764	144-153	-	GGGGTTCCC
REL	6.587	145-154	-	AGGGCTTCC
EGR1	7.758	149-162	+	GCCCTCCCGGCT
SP1	13.931	149-159	+	GCCCTCCCGG
SP2	10.426	149-163	+	GCCCTCCCGGCTA
MZF1_1-4	8.51	154-159	-	CGGGA

Name	Score	Position	Strand	Sequence
TBP	6.878	161-175	+	CTACATAAAAGGTGC
TCF7L2	8.343	161-174	+	CTACATAAAAGGTG
TBP	8.492	163-177	+	ACATAAAAGGTGCCA
ARID3A	6.852	165-170	+	ATAAAA
NFIC	8.396	173-178	-	CTGGCA
TFAP2C	7.152	180-194	+	ACCGTCTTCAGGGGG

Table 14. ホンハブ *PfPLA* 6 遺伝子プロモーター領域に結合すると予測された転写因子群

青背景は ETS ファミリー、黄背景は Helix-Loop-Helix ファミリー、赤背景は Rel ファミリー、緑背景は BetaBetaAlpha-zinc Finger ファミリー、灰背景は RXR-related receptors (NR2), をそれぞれ示す。黒枠は TATA box 結合タンパク質、青枠は EHF をそれぞれ示す。

## 7. 付録

### 7-1. プライマーリスト

名称	配列	アニーリングサイト	用途
BSC-1	gTT TTA ggA AYg AAT TTT AAT TTA Tg	塩基性[Asp <sup>49</sup> ]PLA <sub>2</sub> 遺伝子 5'上流	メチル化状態解析
BSC-4	TAA CTA CCC ATT TTA CAA TTT TTC	塩基性[Asp <sup>49</sup> ]PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第1 イン トロン	メチル化状態解析
BSC-5	gAA gAg AgT TgT TTg Tgg AgA g	<i>PfPLA 6</i> 遺伝子 5'上流	メチル化状態解析
BSC-6	CRA CCA TTA TCC AAA ACR T	<i>PfPLA 6</i> 遺伝子 第1 エクソン	メチル化状態解析
CHO3	gCA AAg CTg gCA CCT gTT TAT TA	IIA 型毒 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 3'UTR	ゲノミック PCR
CHO5	gTA TCg ggA ggA TgA ggA CTC TC	IIA 型毒 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 5'UTR	ゲノミック PCR
CNVBP-F2	gCA CAA ATg CTg TTA CAA	[Lys <sup>49</sup> ]PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第3 エクソン	SNP ジェノタイピング
CNVBP-R1	ACC gCA gAC gAT ggC CTT	[Lys <sup>49</sup> ]PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第3 エクソン	SNP ジェノタイピング
CNVBP-R2	CAC CTg CTT CAg gCA Tgg Tg	[Lys <sup>49</sup> ]PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第4 エクソン	SNP ジェノタイピング
IIExp-1	ggA CAT ATg AAT TTg ATC CAg TTT ggC CAC	<i>PfIIIEPLA<sub>2</sub></i> 遺伝子 第2 エクソン	組換えタンパク質発 現
IIExp-2	gCA CTC gAg gCC CCC CTT CgT ggg ggC CCA	<i>PfIIIEPLA<sub>2</sub></i> 遺伝子 第4 エクソン	組換えタンパク質発 現
M13 Forward (-47)	CgC CAg ggT TTT CCC AgT CAC gAC	ベクタープライマー	サイクルシーケンス
M13 Forward (-20)	gTA AAA CgA Cgg CCA g	ベクタープライマー	サイクルシーケンス
M13 Reverse	CAg gAA ACA gCT ATg AC	ベクタープライマー	サイクルシーケンス
MS3-1	gAC CCT CCT TgC AAC gAA Ag	<i>PfPLA 6</i> 遺伝子 第2 エクソン	逆転写 PCR
MS5-1	gCC Tgg TCC AAT TgT ggA Ag	<i>PfPLA 6</i> 遺伝子 第4 エクソン	逆転写 PCR
Mul1-1	CTT TgT YDR TCT gTg CAA ASA gCT AgA g	<i>MUL1</i> 遺伝子 3'UTR	ゲノミック PCR
NSP-F1	ACC Cgg gTT CAA ATg CTC	IIA 型毒 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第3 インtron	定量 PCR
NSP-R1	gCA gAg CAA ACC CTg gTT A	IIA 型毒 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第3 インtron	定量 PCR
OTUD3-1	CCT Tgg TAg CCT CTT TgC CAT CAg	<i>OTUD3</i> 遺伝子 第8 エクソン	ゲノミック PCR
PBC-3	TTT TTT gTT Tgg gTT ATT TTA gTT	IB 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 5'上流	メチル化状態解析
PBC-4	AAT CAA AAA AAC CTA ACA TAT CCC	IB 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第1 インtron	メチル化状態解析
PfPLA2-3'Fl	TTT ggT TAg TTT CCA TCT gCT TTg g	<i>PfBP-I</i> 遺伝子 3'フランキン	ゲノミック PCR

r3			
PfPLA2-5'Fl	ggA CTA CTg gCT gTA gTC Tgg C	<i>PtBP-I</i> 遺伝子 5'フランキング	ゲノミック PCR
r1			
pGIID-1	gTT CCT ggC ATT TCA ACC ATC	IID 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第 1 イントロン	ゲノミック PCR
pGIID-2	TgC ACA ggA ggT TTg ggT Ag	IID 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第 4 エクソン	ゲノミック PCR
ppp20	ACC gCC gAC AgA Atg AAT CC	IB 型 PLA <sub>2</sub> 第 1 エクソン	逆転写 PCR
ppp21	ACA TCA gTg CCT CAC TTT ATT gTT C	IB 型 PLA <sub>2</sub> 3'UTR	逆転写 PCR
SHU7	CAg AgC AAg AgA ggT ATC CN	<i>ACTB</i> 遺伝子 第 2 エクソン	逆転写 PCR
SHU8	TAg ATg ggC ACA gTg Tgg gN	<i>ACTB</i> 遺伝子 第 3 エクソン	逆転写 PCR
SK8	CAC AgT ggC TgA gTg CAT g	<i>OoPLA2-o2</i> 遺伝子 5'上流	ゲノミック PCR
SPII-2	ggC CgA gTC CgT CgT AgC T	IIE 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 3'UTR	ゲノミック PCR
SPII-3	gTA gAC TgC gCg TAA TTT gTA g	IIE 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 5'UTR	ゲノミック PCR
SPII-8	CAg TCC TTC CAT AAA gCT C	IIE 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 5'UTR	ゲノミック PCR
SPII-10	CTT gCA CgT CTC Cgg ATT gTg	IIE 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 3'UTR	ゲノミック PCR
SPIIF-1	TCA RAA CHS ggg SCB Agg AAA ACA CTT g	IIF 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第 4 エクソン	ゲノミック PCR
SPIIF-2	ATg Agg CTg TCT CAC gTA gC	IIF 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第 1 エクソン	ゲノミック PCR
SPIIRT-1	CAC ATC ATC RAg CAC TTg AC	IIE 型 PLA <sub>2</sub> 遺伝子 第 2 エクソン	逆転写 PCR
SPIIRT-2	TCC TTC gCA CAg ACA gTT g	<i>PfIEPLA<sub>2</sub></i> 遺伝子 第 4 エクソン	逆転写 PCR
SPIIRT-3	TCC TTC gCA CAg gCg gTT A	<i>OoIEPLA<sub>2</sub></i> 遺伝子 第 4 エクソン	逆転写 PCR
T3 Promoter	ATT AAC CCT CAC TAA Agg gA	ベクタープライマー	サイクルシーケンス
T7 Promoter	TAA TAC gAC TCA CTA TAg gg	ベクタープライマー	サイクルシーケンス



## 8. 参考文献

- Aird, S.D., Watanabe, Y., Villar-Briones, A., Roy, M.C., Terada, K., Mikheyev, A.S., 2013. Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC Genomics* 14, 790. doi:10.1186/1471-2164-14-790
- Alape-Girón, A., Persson, B., Cederlund, E., Flores-Díaz, M., Gutiérrez, J.M., Thelestam, M., Bergman, T., Jörnvall, H., 1999. Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. *Eur. J. Biochem.* 259, 225–234. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00021.x
- Alt, F.W., Honjo, T., 2007. AID for immunoglobulin diversity: *Advances in Immunology*: 94. Academic Press. doi:10.1093/molbev/mss282
- Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Angulo, Y., Díaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2000. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82, 755–763. doi:10.1016/S0300-9084(00)01150-0
- Anisimova, M., Bielawski, J.P., Yang, Z., 2001. Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1585–1592. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003945
- Balsinde, J., Winstead, M. V, Dennis, E. a, 2002. Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531, 2–6. doi:10.1016/S0014-5793(02)03413-0
- Barlow, A., Pook, C.E., Harrison, R. a, Wüster, W., 2009. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 2443–2449. doi:10.1098/rspb.2009.0048
- Bélanger, K., Savoie, M., Rosales Gerpe, M.C., Couture, J.F., Langlois, M.A., 2013. Binding of RNA by APOBEC3G controls deamination-independent restriction of retroviruses. *Nucleic Acids Res.* 41, 7438–7452. doi:10.1093/nar/gkt527
- Benton, M., Donoghue, P.C.J., Asher, R.J., 2009. Calibrating and constraining molecular clocks, in: *The Timetree of Life*. pp. 35–86.
- Benton, M.J., Donoghue, P.C.J., Asher, R.J., Friedman, M., Near, T.J., Vinther, J., 2015.

- Constraints on the timescale of animal evolutionary history. *Paleontol. Electron.* 18, 1–107.
- Bi, W., Park, S.-S., Shaw, C.J., Withers, M. a, Patel, P.I., Lupski, J.R., 2003. Reciprocal crossovers and a positional preference for strand exchange in recombination events resulting in deletion or duplication of chromosome 17p11.2. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1302–1315. doi:10.1086/379979
- Blin, N., Stafford, D.W., 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3, 2303–2308. doi:10.1093/nar/3.9.2303
- Boilard, E., Lai, Y., Larabee, K., Balestrieri, B., Ghomashchi, F., Fujioka, D., Gobezie, R., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Thornhill, T.S., Divangahi, M., Remold, H., Lambeau, G., Gelb, M.H., Arm, J.P., Lee, D.M., 2010. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A<sub>2</sub> in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Mol. Med.* 2, 172–187. doi:10.1002/emmm.201000072
- Borja-Oliveira, C.R., Kassab, B.H., Soares, a. M., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., Re, L., Rodrigues-Simioni, L., 2007. Purification and n-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA<sub>2</sub>, neuwieditoxin-I and neuwieditoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada) venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 13, 103–121. doi:10.1590/S1678-91992007000100008
- Brunie, S., Bolin, J., Gewirth, D., Sigler, P.B., 1985. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A<sub>2</sub> at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. *J. Biol. Chem.* 260, 9742–9749.
- Buckland, A.G., Heeley, E.L., Wilton, D.C., 2000. Bacterial cell membrane hydrolysis by secreted phospholipases A<sub>2</sub>: a major physiological role of human group IIA sPLA<sub>2</sub> involving both bacterial cell wall penetration and interfacial catalysis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1484, 195–206. doi:10.1016/S1388-1981(00)00018-4
- Casewell, N.R., Harrison, R. a, Wüster, W., Wagstaff, S.C., 2009. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: *Echis*) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC Genomics* 10, 564. doi:10.1186/1471-2164-10-564
- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Harrison, R. a., Renjifo, C., Wüster, W., 2011. Domain loss

facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2637–2649.  
doi:10.1093/molbev/msr091

Castoe, T.A., de Koning, A.P.J., Hall, K.T., Card, D.C., Schield, D.R., Fujita, M.K., Ruggiero, R.P., Degner, J.F., Daza, J.M., Gu, W., Reyes-Velasco, J., Shaney, K.J., Castoe, J.M., Fox, S.E., Poole, A.W., Polanco, D., Dobry, J., Vandewege, M.W., Li, Q., Schott, R.K., Kapusta, A., Minx, P., Feschotte, C., Uetz, P., Ray, D.A., Hoffmann, F.G., Bogden, R., Smith, E.N., Chang, B.S.W., Vonk, F.J., Casewell, N.R., Henkel, C. V., Richardson, M.K., Mackessy, S.P., Bronikowski, A.M., Yandell, M., Warren, W.C., Secor, S.M., Pollock, D.D., 2013. The Burmese python genome reveals the molecular basis for extreme adaptation in snakes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 20645–20650.  
doi:10.1073/pnas.1314475110

Castoe, T.A., de Koning, A.P.J., Hall, K.T., Yokoyama, K.D., Gu, W., Smith, E.N., Feschotte, C., Uetz, P., Ray, D.A., Dobry, J., Bogden, R., Mackessy, S.P., Bronikowski, A.M., Warren, W.C., Secor, S.M., Pollock, D.D., 2011a. Sequencing the genome of the Burmese python (*Python molurus bivittatus*) as a model for studying extreme adaptations in snakes. *Genome Biol.* 12, 406. doi:10.1186/gb-2011-12-7-406

Castoe, T.A., Hall, K.T., Guibotsy Mboulas, M.L., Gu, W., de Koning, A.P.J., Fox, S.E., Poole, A.W., Vemulapalli, V., Daza, J.M., Mockler, T., Smith, E.N., Feschotte, C., Pollock, D.D., 2011b. Discovery of highly divergent repeat landscapes in snake genomes using high-throughput sequencing. *Genome Biol. Evol.* 3, 641–653. doi:10.1093/gbe/evr043

Chijiwa, T., Deshimaru, M., Nobuhisa, I., Nakai, M., Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K., Fukumaki, Y., Shimohigashi, Y., Hattori, S., Ohno, M., 2000. Regional evolution of venom-gland phospholipase A<sub>2</sub> isoenzymes of *Trimeresurus flavoviridis* snakes in the southwestern islands of Japan. *Biochem. J.* 347, 491–499.  
doi:10.1042/0264-6021:3470491

Chijiwa, T., Hamai, S., Tsubouchi, S., Ogawa, T., Deshimaru, M., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Kihara, H., Tsunasawa, S., Ohno, M., 2003a. Interisland mutation of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Trimeresurus flavoviridis* venom and evolution of Crotalinae group II phospholipases A<sub>2</sub>. *J. Mol. Evol.* 57, 546–554. doi:10.1007/s00239-003-2508-4

- Chijiwa, T., Ikeda, N., Masuda, H., Hara, H., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Ohno, M., 2012. Structural characteristics and evolution of a novel venom phospholipase A<sub>2</sub> gene from *Protobothrops flavoviridis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 551–558. doi:10.1271/bbb.110848
- Chijiwa, T., Nakasone, H., Irie, S., Ikeda, N., Tomoda, K., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Ohno, M., 2013a. Structural characteristics and evolution of the *Protobothrops elegans* pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> gene in contrast with those of *Protobothrops* genus venom phospholipase A<sub>2</sub> genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 77, 97–102. doi:10.1271/bbb.120595
- Chijiwa, T., Tokunaga, E., Ikeda, R., Terada, K., Ogawa, T., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Nozaki, M., Ohno, M., 2006. 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. doi:10.1016/j.toxicon.2006.06.021
- Chijiwa, T., Tomoda, K., Ban, Y., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Ohno, M., 2013b. Allopatry of *Protobothrops flavoviridis* (Viperidae, Crotalinae) venom proteins between Okinawa island and its outlying small islands, Iheyajima and Kumejima. *Biol. Mag. Okinawa* 51, 17–25.
- Chijiwa, T., Yamaguchi, Y., Ogawa, T., Deshimaru, M., Nobuhisa, I., Nakashima, K., Oda-Ueda, N., Fukumaki, Y., Hattori, S., Ohno, M., 2003b. Interisland evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom phospholipase A<sub>2</sub> isozymes. *J. Mol. Evol.* 56, 286–293. doi:10.1007/s00239-002-2400-7
- Conticello, S.G., 2008. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.* 9, 229. doi:10.1186/gb-2008-9-6-229
- Conticello, S.G., Thomas, C.J.F., Petersen-Mahrt, S.K., Neuberger, M.S., 2005. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol. Biol. Evol.* 22, 367–377. doi:10.1093/molbev/msi026
- Cordaux, R., Batzer, M.A., 2009. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat. Rev. Genet.* 10, 691–703. doi:10.1038/nrg2640
- Dalloul, R.A., Long, J.A., Zimin, A. V, Aslam, L., Beal, K., Blomberg, L.A., Bouffard, P., Burt, D.W., Crasta, O., Crooijmans, R.P.M.A., Cooper, K., Coulombe, R.A., De, S., Delany,

- M.E., Dodgson, J.B., Dong, J.J., Evans, C., Frederickson, K.M., Flicek, P., Florea, L., Folkerts, O., Groenen, M.A.M., Harkins, T.T., Herrero, J., Hoffmann, S., Megens, H.-J., Jiang, A., de Jong, P., Kaiser, P., Kim, H., Kim, K.-W., Kim, S., Langenberger, D., Lee, M.-K., Lee, T., Mane, S., Marcais, G., Marz, M., McElroy, A.P., Modise, T., Nefedov, M., Notredame, C., Paton, I.R., Payne, W.S., Pertea, G., Prickett, D., Puiu, D., Qioa, D., Raineri, E., Ruffier, M., Salzberg, S.L., Schatz, M.C., Scheuring, C., Schmidt, C.J., Schroeder, S., Searle, S.M.J., Smith, E.J., Smith, J., Sonstegard, T.S., Stadler, P.F., Tafer, H., Tu, Z.J., Van Tassell, C.P., Vilella, A.J., Williams, K.P., Yorke, J.A., Zhang, L., Zhang, H.-B., Zhang, X., Zhang, Y., Reed, K.M., 2010. Multi-platform next-generation sequencing of the domestic turkey (*Meleagris gallopavo*): genome assembly and analysis. PLoS Biol. 8, e1000475. doi:10.1371/journal.pbio.1000475
- Daltry, J.C., Wüster, W., Thorpe, R.S., 1996. Diet and snake venom evolution. Nature 379, 537–540. doi:10.1038/379537a0
- Damert, A., Raiz, J., Horn, A. V., Lower, J., Wang, H., Xing, J., Batzer, M. a., Lower, R., Schumann, G.G., 2009. 5'-Transducing SVA retrotransposon groups spread efficiently throughout the human genome. Genome Res. 19, 1992–2008. doi:10.1101/gr.093435.109
- Davidson, F.F., Dennis, E. a., 1990. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venom to human secreted forms. J. Mol. Evol. 31, 228–238. doi:10.1007/BF02109500
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. Chem. Rev. 111, 6130–6185. doi:10.1021/cr200085w
- Deshimaru, M., Ogawa, T., Nakashima, K., Nobuhisa, I., Chijiwa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Niwa, M., Yamashina, I., Hattori, S., Ohno, M., 1996. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. FEBS Lett. 397, 83–88. doi:10.1016/S0014-5793(96)01144-1
- Dhillon, D.S., Condrea, E., Maraganore, J.M., Heinrikson, R.L., Benjamin, S., Rosenberg, P., 1987. Comparison of enzymatic and pharmacological activities of lysine-49 and aspartate-49 phospholipases A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom. Biochem. Pharmacol. 36, 1723–1730. doi:10.1016/0006-2952(87)90059-1

- Dijkstra, B.W., Kalk, K.H., Hol, W.G.J., Drenth, J., 1981. Structure of bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 147, 97–123. doi:10.1016/0022-2836(81)90081-4
- Dijkstra, B.W., Renetseder, R., Kalk, K.H., Hol, W.G.J., Drenth, J., Huber, R., 1983. Structure of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> at 2.6 Å resolution and comparison with bovine phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Mol. Biol.* 168, 163–179. doi:10.1016/S0022-2836(83)80328-3
- Dixon, R.W., Harris, J.B., 1999. Nerve terminal damage by β-bungarotoxin. *Am. J. Pathol.* 154, 447–455. doi:10.1016/S0002-9440(10)65291-1
- Doley, R., Mackessy, S.P., Kini, R.M., 2009. Role of accelerated segment switch in exons to alter targeting (ASSET) in the molecular evolution of snake venom proteins. *BMC Evol. Biol.* 9, 146. doi:10.1186/1471-2148-9-146
- Donoghue, P.C.J., Benton, M.J., 2007. Rocks and clocks: calibrating the Tree of Life using fossils and molecules. *Trends Ecol. Evol.* 22, 424–31. doi:10.1016/j.tree.2007.05.005
- Epicentre, 2012. pWEB-TNC™ cosmid cloning kit protocol. Madison.
- Faiz, M.A., Ghose, A., Ahsan, M.F., Rahman, M.R., Amin, M.R., Hassan, M.M.U., Chowdhury, M. a W., Kuch, U., Rocha, T., Harris, J.B., Theakston, R.D.G., Warrell, D. a., 2010. The greater black krait (*Bungarus niger*), a newly recognized cause of neuro-myotoxic snake bite envenoming in Bangladesh. *Brain* 133, 3181–3193. doi:10.1093/brain/awq265
- Ferreira, F.B., Gomes, M.S.R., de Souza, D.L.N., Gimenes, S.N.C., Castanheira, L.E., Borges, M.H., Rodrigues, R.S., Yoneyama, K.A.G., Brandeburgo, M.I.H., Rodrigues, V.M., 2013. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxins (Basel)*. 5, 2403–2419. doi:10.3390/toxins5122403
- Fleer, E.A.M., Verheij, H.M., Haas, G.H., 1978. The primary structure of bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. *Eur. J. Biochem.* 82, 261–269. doi:10.1111/j.1432-1033.1978.tb12019.x
- Foreman-Wykert, A.K., Weinrauch, Y., Elsbach, P., Weiss, J., 1999. Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A<sub>2</sub> against Gram-positive bacteria. *J. Clin. Invest.* 103, 715–721. doi:10.1172/JCI5468
- Forsdyke, D., 1995. Conservation of stem-loop potential in introns of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> genes: an application of FORS-D analysis. *Mol. Biol. Evol.* 12,

1157–1165.

- Francischetti, I.M.B., My-Pham, V., Harrison, J., Garfield, M.K., Ribeiro, J.M.C., 2004. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene* 337, 55–69. doi:10.1016/j.gene.2004.03.024
- Fry, B.G., Scheib, H., de L M Junqueira de Azevedo, I., Silva, D.A., Casewell, N.R., 2012. Novel transcripts in the maxillary venom glands of advanced snakes. *Toxicon* 59, 696–708. doi:10.1016/j.toxicon.2012.03.005
- Gilbert, C., Meik, J.M., Dashevsky, D., Card, D.C., Castoe, T. a, Schaack, S., 2014. Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20141122–20141122. doi:10.1098/rspb.2014.1122
- Goldman, N., Yang, Z., 1994. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 11, 725–736. doi:10.1186/s13059-014-0542-8
- Golik, M., Cohen-Zinder, M., Loor, J.J., Drackley, J.K., Band, M.R., Lewin, H. a., Weller, J.I., Ron, M., Seroussi, E., 2006. Accelerated expansion of group IID-like phospholipase A<sub>2</sub> genes in *Bos taurus*. *Genomics* 87, 527–533. doi:10.1016/j.ygeno.2005.12.015
- Gong, N., Armugam, A., Jeyaseelan, K., 2000. Molecular cloning, characterization and evolution of the gene encoding a new group of short-chain  $\alpha$ -neurotoxins in an Australian elapid, *Pseudonaja textilis*. *FEBS Lett.* 473, 303–310. doi:10.1016/S0014-5793(00)01549-0
- Gregory-Dwyer, V.M., Egen, N.B., Bosisio, A.B., Righetti, P.G., Russell, F.E., 1986. An isoelectric focusing study of seasonal variation in rattlesnake venom proteins. *Toxicon* 24, 995–1000. doi:10.1016/0041-0101(86)90005-X
- Grönroos, J.O., Laine, V.J.O., Nevalainen, T.J., 2002. Bactericidal group IIA phospholipase A<sub>2</sub> in serum of patients with bacterial infections. *J. Infect. Dis.* 185, 1767–1772. doi:10.1086/340821
- Gutiérrez, J.M., Rojas, G., da Silva Junior, N.J., Nunez, J., 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon* 30, 1299–1302. doi:10.1016/0041-0101(92)90446-C

- Hara, S., Kudo, I., Chang, H., Wook, Matsuta, K., Miyamoto, T., Inoue, K., 1989. Purification and characterization of extracellular phospholipase A<sub>2</sub> from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Biochem.* 105, 395–399.
- Harris, J.B., 2004. Animal poisons and the nervous system: what the neurologist needs to know. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, iii40–iii46. doi:10.1136/jnnp.2004.045724
- Hattori, S., 2014. 奄美群島の生物はどこから来たか「中新世の方舟にのって」. *Horizon* 40.
- Hayama, S., 2005. トカラハブ毒腺ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) アイソザイムのcDNAクローニングと進化学的解析. 卒業論文.
- Hayatsu, H., 2008. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. *Mutat. Res.* 659, 77–82. doi:10.1016/j.mrrev.2008.04.003
- Hayatsu, H., Negishi, K., Shiraishi, M., 2004. DNA methylation analysis: speedup of bisulfite-mediated deamination of cytosine in the genomic sequencing procedure. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 80, 189–194. doi:10.2183/pjab.80.189
- Head, J.J., 2015. Fossil calibration dates for molecular phylogenetic analysis of snakes 1: Serpentes, Alethinophidia, Boidae, Pythonidae. *Palaeontol. Electron.* 18, 1–17.
- Heinrikson, R.L., Krueger, E.T., Keim, P.S., 1977. Amino acid sequence of phospholipase A<sub>2</sub>-α from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipase A<sub>2</sub> based on structural determinants. *J. Biol. Chem.* 252, 4913–4921.
- Hillier, L.W., Miller, W., Birney, E., Warren, W., Hardison, R.C., Ponting, C.P., Bork, P., Burt, D.W., Groenen, M.A., Delany, M.E., Dodgson, J.B., Chinwalla, A.T., Cliften, P.F., Clifton, S.W., Delehaunty, K.D., Fronick, C., Fulton, R.S., Graves, T.A., Kremitzki, C., Layman, D., Magrini, V., McPherson, J.D., Miner, T.L., Minx, P., Nash, W.E., Nhan, M.N., Nelson, J.O., Oddy, L.G., Pohl, C.S., Randall-Maher, J., Smith, S.M., Wallis, J.W., Yang, S.P., Romanov, M.N., Rondelli, C.M., Paton, B., Smith, J., Morrice, D., Daniels, L., Tempest, H.G., Robertson, L., Masabanda, J.S., Griffin, D.K., Vignal, A., Fillon, V., Jacobsson, L., Kerje, S., Andersson, L., Crooijmans, R.P., Aerts, J., Van Der Poel, J.J., Ellegren, H., Caldwell, R.B., Hubbard, S.J., Grafham, D. V, Kierzek, A.M., McLaren, S.R., Overton, I.M., Arakawa, H., Beattie, K.J., Bezzubov, Y., Boardman, P.E., Bonfield, J.K., Croning,



M.D., Davies, R.M., Francis, M.D., Humphray, S.J., Scott, C.E., Taylor, R.G., Tickle, C., Brown, W.R., Rogers, J., Buerstedde, J.M., Wilson, S.A., Stubbs, L., Ovcharenko, I., Gordon, L., Lucas, S., Miller, M.M., Inoko, H., Shiina, T., Kaufman, J., Salomonsen, J., Skjoedt, K., Wong, G.K., Wang, J., Liu, B., Yu, J., Yang, H., Nefedov, M., Koriabine, M., Dejong, P.J., Goodstadt, L., Webber, C., Dickens, N.J., Letunic, I., Suyama, M., Torrents, D., Von Mering, C., Zdobnov, E.M., Makova, K., Nekrutenko, A., Elnitski, L., Eswara, P., King, D.C., Yang, S., Tyekucheva, S., Radakrishnan, A., Harris, R.S., Chiaromonte, F., Taylor, J., He, J., Rijnkels, M., Griffiths-Jones, S., Ureta-Vidal, A., Hoffman, M.M., Severin, J., Searle, S.M., Law, A.S., Speed, D., Waddington, D., Cheng, Z., Tuzun, E., Eichler, E., Bao, Z., Flicek, P., Shteynberg, D.D., Brent, M.R., Bye, J.M., Huckle, E.J., Chatterji, S., Dewey, C., Pachter, L., Kouranov, A., Mourelatos, Z., Hatzigeorgiou, A.G., Paterson, A.H., Ivarie, R., Brandstrom, M., Axelsson, E., Backstrom, N., Berlin, S., Webster, M.T., Pourquie, O., Reymond, A., Ucla, C., Antonarakis, S.E., Long, M., Emerson, J.J., Betran, E., Dupanloup, I., Kaessmann, H., Hinrichs, A.S., Bejerano, G., Furey, T.S., Harte, R.A., Raney, B., Siepel, A., Kent, W.J., Haussler, D., Eyras, E., Castelo, R., Abril, J.F., Castellano, S., Camara, F., Parra, G., Guigo, R., Bourque, G., Tesler, G., Pevzner, P.A., Smit, A., Fulton, L.A., Mardis, E.R., Wilson, R.K., 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432, 695–716.

Holland, D.R., Clancy, L.L., Muchmore, S.W., Ryde, T.J., Einspahr, H.M., Finzel, B.C., Heinrikson, R.L., Watenpaugh, K.D., 1990. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 265, 17649–17656.

Holman, J.A., Tanimoto, M., 2004. cf. *Trimeresurus* LACÉPÈDE (Reptilia: Squamata: Viperidae: Crotalinae) from the late Early Miocene of Japan. *Acta Zool.* 47, 1–7.

Holmes, R.K., Koning, F. a., Bishop, K.N., Malim, M.H., 2007. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation: Comparisons with APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* 282, 2587–2595.  
doi:10.1074/jbc.M607298200

Homma, M., Kosuge, T., Abe, R., 1967. Biological toxicity of MAMUSHI-snake (*Agkistrodon halys blomhoffii*) venom. *日本熱帯医学雑誌* 8, 70–73.

doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2

- Honda, M., Okamoto, T., Hikida, T., Ota, H., 2008. Molecular phylogeography of the endemic five-lined skink (*Plestiodon marginatus*) (Reptilia: Scincidae) of the Ryukyu Archipelago, Japan, with special reference to the relationship of a northern Tokara population. *Pacific Sci.* 62, 351–362. doi:10.2984/1534-6188(2008)62[351:MPOTEF]2.0.CO;2
- Horn, A. V., Klawitter, S., Held, U., Berger, A., Jaguva Vasudevan, A.A., Bock, A., Hofmann, H., Hanschmann, K.M.O., Trösemeier, J.H., Flory, E., Jabulowsky, R. a., Han, J.S., Löwer, J., Löwer, R., Münk, C., Schumann, G.G., 2014. Human LINE-1 restriction by APOBEC3C is deaminase independent and mediated by an ORF1p interaction that affects LINE reverse transcriptase activity. *Nucleic Acids Res.* 42, 396–416. doi:10.1093/nar/gkt898
- Hosoya, T., Araya, K., 2005. Phylogeny of Japanese stag beetles (Coleoptera: Lucanidae) inferred from 16S mtrRNA gene sequences, with reference to the evolution of sexual dimorphism of mandibles. *Zoolog. Sci.* 22, 1305–1318. doi:10.2108/zsj.22.1305
- Huang, M.Z., Gopalakrishnakone, P., Chung, M.C., Kini, R.M., 1997. Complete amino acid sequence of an acidic, cardiotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra): a novel cobra venom enzyme with “pancreatic loop”. *Arch. Biochem. Biophys.* 338, 150–156. doi:10.1006/abbi.1996.9814
- Hulme, A.E., Kulpa, D.A., Perez, J.L.G., Moran, J. V., 2009. The impact of LINE-1 retro transposition on the human genome, in: *Genomic Disorders*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 35–55. doi:10.1007/978-1-59745-039-3\_3
- Hundsdoerfer, A., Zhou, L., Hitschfeld, E., Wang, F., Gong, S., Auer, M., Fritz, U., 2011. Is the horned pitviper *Ceratrimeresurus shenlii* Liang and Liu, 2003 from China a valid *Protobothrops*? *Amphibia-Reptilia*. doi:10.1163/017353710X541922
- Hutchinson, D. a, Mori, A., Savitzky, A.H., Burghardt, G.M., Wu, X., Meinwald, J., Schroeder, F.C., 2007. Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 2265–2270. doi:10.1073/pnas.0610785104
- Ikeda, N., 2011. ハブ毒ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) の遺伝子進化の分子機構. 博士論文.

- Ikeda, N., Chijiwa, T., Matsubara, K., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Matsuda, Y., Ohno, M., 2010. Unique structural characteristics and evolution of a cluster of venom phospholipase A<sub>2</sub> isozyme genes of *Protobothrops flavoviridis* snake. *Gene* 461, 15–25. doi:10.1016/j.gene.2010.04.001
- Ikeda, T., Abd El Galil, K.H., Tokunaga, K., Maeda, K., Sata, T., Sakaguchi, N., Heidmann, T., Koito, A., 2011. Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons. *Nucleic Acids Res.* 39, 5538–5554. doi:10.1093/nar/gkr124
- Inagaki, H., Ohye, T., Kogo, H., Tsutsumi, M., Kato, T., Tong, M., Emanuel, B.S., Kurahashi, H., 2013. Two sequential cleavage reactions on cruciform DNA structures cause palindrome-mediated chromosomal translocations. *Nat. Commun.* 4, 1592. doi:10.1038/ncomms2595
- Inoue, J., Donoghue, P.C.J., Yang, Z., 2010. The impact of the representation of fossil calibrations on Bayesian estimation of species divergence times. *Syst. Biol.* 59, 74–89. doi:10.1093/sysbio/syp078
- Integrated Taxonomic Information System, 2015. “Serpentes” [WWW Document]. URL [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=174118](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=174118)
- Irie, S., 2009. マムシ亜科毒ヘビ腓臓ホスホリパーゼA<sub>2</sub>遺伝子の比較解析. 修士論文.
- Iwatani, Y., Chan, D.S.B., Wang, F., Maynard, K.S., Sugiura, W., Gronenborn, A.M., Rouzina, I., Williams, M.C., Musier-Forsyth, K., Levin, J.G., 2007. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* 35, 7096–7108. doi:10.1093/nar/gkm750
- Jackson, K., 2003. The evolution of venom-delivery systems in snakes. *Zool. J. Linn. Soc.* 137, 337–354. doi:10.1046/j.1096-3642.2003.00052.x
- Jackson, K., 2002. How tubular venom-conducting fangs are formed. *J. Morphol.* 252, 291–297. doi:10.1002/jmor.1106
- Jarvis, E.D., Howard, J.T., Phillippy, A., Ganapathy, G., Warren, W., 2014. Draft genome of *Melopsittacus undulatus* (Budgerigar) Version 6.3. Unpublished.

- Kadota, Y., 2011. Is *Ovophis okinavensis* active only in the cool season? temporal foraging pattern of a subtropical pit viper in Okinawa, Japan. *Zool. Stud.* 50, 269–275.
- Kapitonov, V. V., Tempel, S., Jurka, J., 2009. Simple and fast classification of non-LTR retrotransposons based on phylogeny of their RT domain protein sequences. *Gene* 448, 207–213. doi:10.1016/j.gene.2009.07.019
- Kazazian, H.H., 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626–1632. doi:10.1126/science.1089670
- Kihara, H., Uchikawa, R., Hattori, S., Ohno, M., 1992. Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochem. Int.* 28, 895–903.
- Kimura, M., 2000. Paleogeography of the Ryukyu Islands. *Int. Symp. Ryukyu Islands* 10, 5–24. doi:10.3759/tropics.10.5
- Kimura, M., 1996. Studies of land bridges and the migration of men and other animals along them. *Quaternary Paleogeography of the Ryukyu Arc. J. Geogr. (Chigaku Zasshi)* 105, 259–285. doi:10.5026/jgeography.105.3\_259
- Kimura, M., 1969. The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 63, 1181–1188. doi:10.1073/pnas.63.4.1181
- Kimura, M., 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217, 624–626. doi:10.1038/217624a0
- Kimura, M., Ohta, T., 1971. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature* 229, 467–469. doi:10.1038/229467a0
- Kimura, M., Ota, T., 1974. On some principles governing molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 2848–2852. doi:10.1073/pnas.71.7.2848
- Kini, R.M., 1997. *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function and mechanism.* Chichester ; New York : John Wiley, c1997., England.
- Kini, R.M., Chan, Y.M., 1999. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *J Mol Evol* 48, 125–132. doi:10.1007/PL00006450
- Kini, R.M., Kawabata, S.I., Iwanaga, S., 1986. Comparison of amino terminal region of three

- isoenzymes of phospholipases A<sub>2</sub> (TFV PL-Ia, TFV PL-Ib, TFV PL-X) from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom and the complete amino acid sequence of the basic phospholipase, TFV PL-X. *Toxicon* 24, 1117–1129. doi:10.1016/0041-0101(86)90138-8
- Kizaki, K., Oshiro, I., 1980. 琉球列島のおいたち, in: Kizaki, K. (Ed.), 琉球の自然史. Tsukiji shokan, Tokyo, pp. 8–37.
- Kizaki, K., Oshiro, I., 1977. 琉球列島の古地理. *海洋科学* 9, 542–549.
- Koito, A., Ikeda, T., 2013. Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Front. Microbiol.* 4, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2013.00028
- Kojima, K.K., 2010. Different integration site structures between L1 protein-mediated retrotransposition in cis and retrotransposition in trans. *Mob. DNA* 1, 17. doi:10.1186/1759-8753-1-17
- Kojima, K.K., Fujiwara, H., 2005. An extraordinary retrotransposon family encoding dual endonucleases. *Genome Res.* 15, 1106–1117. doi:10.1101/gr.3271405
- Kordiš, D., Gubenšek, F., 1998. The Bov-B LINEs found in *Vipera ammodytes* toxic PLA<sub>2</sub> genes are widespread in snake genomes. *Toxicon* 36, 1585–1590. doi:10.1016/S0041-0101(98)00150-0
- Kordiš, D., Gubenšek, F., 1997. Bov-B long interspersed repeated DNA (LINE) sequences are present in *Vipera ammodytes* phospholipase A<sub>2</sub> genes and in genomes of Viperidae snakes. *Eur. J. Biochem.* 246, 772–779. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00772.x
- Korotkova, M., Jakobsson, P.-J., 2014. Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 229–241. doi:10.1038/nrrheum.2014.1
- Kosuge, T., 1968. Biological toxicity of MAMUSHI-snake venom (*Agkistrodon halys*) and morphological changes caused by the venom. *KITAKANTO Med. J.* 18, 353–379. doi:10.2974/kmj1951.18.353
- Kramer, R.M., Johansen, B., Hession, C., Pepinsky, R.B., 1990. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. *Adv Exp Med Biol* 275, 35–53.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczyk, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J.,

Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M. a, Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, a T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. a, Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N. a, Abola, a P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M. V, Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. a, Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. a, Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. a, Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T. a, Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E. V, Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V, Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, a F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P.,

- Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. a, Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921. doi:10.1038/35057062
- Lemoine, F.J., Degtyareva, N.P., Lobachev, K., Petes, T.D., 2005. Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase: A model for chromosome fragile sites. *Cell* 120, 587–598. doi:10.1016/j.cell.2004.12.039
- Levin, H.L., Moran, J. V, 2011. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat. Rev. Genet.* 12, 615–627. doi:10.1038/nrg3030
- Li, J., Hakata, Y., Takeda, E., Liu, Q., Iwatani, Y., Kozak, C. a., Miyazawa, M., 2012. Two genetic determinants acquired late in *Mus* evolution regulate the inclusion of exon 5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathog.* 8. doi:10.1371/journal.ppat.1002478
- Li, M., Fry, B.G., Kini, R.M., 2005. Eggs-only diet: Its implications for the toxin profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). *J. Mol. Evol.* 60, 81–89. doi:10.1007/s00239-004-0138-0
- Li, W.-H., Wu, C.-I., Luo, C.-C., 1985. A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol. Biol. Evol.* 2, 150–174.
- Lin, C., Tu, M., 2008. Food habits of the taiwanese mountain pitviper, *Trimeresurus gracilis*. *Zool. Stud.* 47, 697–703.
- Lindič, N., Budič, M., Petan, T., Knisbacher, B.A., Levanon, E.Y., Lovšin, N., 2013. Differential inhibition of LINE1 and LINE2 retrotransposition by vertebrate AID/APOBEC proteins. *Retrovirology* 10, 156. doi:10.1186/1742-4690-10-156
- Liu, Q.I.N., Myers, E.A., Zhong, G.H., Hu, J., Zhao, H.U.I., Guo, P., 2012. Molecular evidence on the systematic position of the lance-headed pitviper *Protobothrops maolanensis* Yang *et al.*, 2011. *Zootaxa* 3178, 57–62.
- Liu, S.Y., Yoshizumi, K., Oda, N., Ohno, M., Tokunaga, F., Iwanaga, S., Kihara, H., 1990. Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49-phospholipase A<sub>2</sub>

- with low activity, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *J. Biochem.* 107, 400–408.
- Liu, Y., Hughes, D., Dinh, H., Dugan, S., Jhangiani, S., Lee, S., Okwuonu, G., Santibanez, J., Bandaranaike, D., Chao, H., Dahdouli, M., Gnanaolivu, R., Gross, S., Hale, W., Javaid, M., Jones, J., Matakis, S., Munidasa, M., Narasimhan, A., Ngo, D., Nguyen, L., Skinner, E., Onger, F., Osuji, N., Puazo, R., Qi, S., Qu, C., Quiroz, J., Raj, R., Rajbhandari, K., Yun, X., Han, Y., Kovar, C., Reid, J., Doddapaneni, H., Muzny, D., Worley, K., Gibbs, R., 2014. Direct Submission. Hum. Genome Seq. Center, Dep. Mol. Hum. Genet. Baylor Coll. Med. One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2011. Phospholipases A<sub>2</sub> from viperidae snake venoms: How do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim. Slov.* 58, 647–659.
- Lomonte, B., Rangel, J., 2012. Snake venom Lys<sup>49</sup> myotoxins: From phospholipases A<sub>2</sub> to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520–530.  
doi:10.1016/j.toxicon.2012.02.007
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Tsai, W.-C., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2012. Snake venomomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: toxicological and taxonomical insights. *J. Proteomics* 75, 1675–1689. doi:10.1016/j.jprot.2011.12.016
- Lomonte, B., Tsai, W.C., Ureña-Díaz, J.M., Sanz, L., Mora-Obando, D., Sánchez, E.E., Fry, B.G., Gutiérrez, J.M., Gibbs, H.L., Sovic, M.G., Calvete, J.J., 2014. Venomomics of new world pit vipers: Genus-wide comparisons of venom proteomes across *Agkistrodon*. *J. Proteomics* 96, 103–116. doi:10.1016/j.jprot.2013.10.036
- Lovin, N., Peterlin, B.M., 2009. APOBEC3 proteins inhibit LINE-1 retrotransposition in the absence of ORF1p binding. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1178, 268–275.  
doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05006.x
- Lovšin, N., Gubenšek, F., Kordiš, D., Lovsin, N., Gubensek, F., Kordi, D., 2001. Evolutionary dynamics in a novel L2 clade of non-LTR retrotransposons in deuterostomia. *Mol. Biol. Evol.* 18, 2213–2224. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003768
- Malhotra, a, Thorpe, R.S., 2000. A phylogeny of the *Trimeresurus* group of pit vipers: new evidence from a mitochondrial gene tree. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 199–211.  
doi:10.1006/mpev.2000.0779



- Malhotra, A., Thorpe, R.S., 2004. A phylogeny of four mitochondrial gene regions suggests a revised taxonomy for Asian pitvipers (*Trimeresurus* and *Ovophis*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 83–100. doi:10.1016/j.ympev.2004.02.008
- Malik, H.S., Burke, W.D., Eickbush, T.H., 1999. The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol. Biol. Evol.* 16, 793–805. doi:mveb/16/604.793/805
- Maraganore, J.M., Heinrikson, R.L., 1986. The lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 261, 4797–4804.
- Maraganore, J.M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kézdy, F.J., Heinrikson, R.L., 1984. A new class of phospholipases A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 259, 13839–13843.
- Masuda, H., 2011. 先祖型ハブ毒腺ホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 遺伝子のゲノム構造解析. 修士論文.
- Masuda, S., Murakami, M., Matsumoto, S., Eguchi, N., Urade, Y., Lambeau, G., Gelb, M.H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kudo, I., 2004. Localization of various secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in male reproductive organs. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1686, 61–76. doi:10.1016/j.bbalip.2004.08.017
- Matsui, M., Shimada, T., Ota, H., Tanaka-Ueno, T., 2005. Multiple invasions of the Ryukyu Archipelago by Oriental frogs of the subgenus *Odorrana* with phylogenetic reassessment of the related subgenera of the genus *Rana*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 733–742. doi:10.1016/j.ympev.2005.04.030
- Menezes, M.C., Furtado, M.F., Travaglia-Cardoso, S.R., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T., 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* 47, 304–312. doi:10.1016/j.toxicon.2005.11.007
- Metzner, M., Jäck, H.M., Wabl, M., 2012. LINE-1 retroelements complexed and inhibited by activation induced cytidine deaminase. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0049358
- Ministry of education, culture, sports, science and technology, Japan, 2014. Food composition database [WWW Document]. URL <http://fooddb.mext.go.jp>
- Mishima, S., 1966a. Studies on the poisonous snake “Habu”, *Trimeresurus flavoviridis* II. *Med.*

Entomol. Zool. 7, 8–17. doi:[http://doi.org/10.14876/tmh1960.7.2\\_8](http://doi.org/10.14876/tmh1960.7.2_8)

- Mishima, S., 1966b. Studies on the poisonous snake “Habu”, *Trimeresurus flavoviridis flavoviridis*: I. Food habit of *Trimeresurus flavoviridis flavoviridis* on the Amami Islands. Japan Soc. Med. Entomol. Zool. 17, 1–21.
- Mitsuhashi, S., Maeno, H., Satoo, I., Tanaka, T., Kawakami, M., Yagi, S., Sawai, Y., Okonogi, T., Ono, T., Matsushita, J., 1961. Studies on HABU snake venom I) Comparative studies of several biological activities of snake venoms belong to *Trimeresurus*. Nippon Saikingaku Zasshi 16, 904–908. doi:[10.3412/jsb.16.904](https://doi.org/10.3412/jsb.16.904)
- Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. Cell. Mol. Life Sci. 65, 2897–2912. doi:[10.1007/s00018-008-8113-3](https://doi.org/10.1007/s00018-008-8113-3)
- Mora-Obando, D., Fernández, J., Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2014. Synergism between basic Asp<sup>49</sup> and Lys<sup>49</sup> phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins of viperid snake venom *In vitro* and *In vivo*. PLoS One 9, e109846. doi:[10.1371/journal.pone.0109846](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109846)
- Mori, A., Toda, M., 2011. Feeding characteristics of a Japanese pitviper, *Ovophis okinavensis*, on Okinawa Island: seasonally biased but ontogenetically stable exploitation on small frogs. Curr. Herpetol. 30, 41–52. doi:[10.5358/hj.30.41](https://doi.org/10.5358/hj.30.41)
- Mori, A., Toda, M., Ota, H., 2002. Winter activity of the hime-habu (*Ovophis okinavensis*) in the humid subtropics: foraging on breeding anurans at low temperatures, in: Gordon, W.S., Hoggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.), Biology of the Vipers. Eagle Mountain Pub Lc, Eagle Mountain, pp. 329–344.
- Muckenfuss, H., Hamdorf, M., Held, U., Perkovic, M., Löwer, J., Cichutek, K., Flory, E., Schumann, G.G., Münk, C., 2006. APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. J. Biol. Chem. 281, 22161–22172. doi:[10.1074/jbc.M601716200](https://doi.org/10.1074/jbc.M601716200)
- Mukherjee, K., Storici, F., 2012. A mechanism of gene amplification driven by small DNA fragments. PLoS Genet. 8, e1003119. doi:[10.1371/journal.pgen.1003119](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003119)
- Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., 2015. A new era of secreted phospholipase A<sub>2</sub>. J. Lipid Res. 56, 1248–1261. doi:[10.1194/jlr.R058123](https://doi.org/10.1194/jlr.R058123)

- Murakami, M., Taketomi, Y., Girard, C., Yamamoto, K., Lambeau, G., 2010. Emerging roles of secreted phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie* 92, 561–582. doi:10.1016/j.biochi.2010.03.015
- Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., Yamamoto, K., 2011. Recent progress in phospholipase A<sub>2</sub> research: From cells to animals to humans. *Prog. Lipid Res.* 50, 152–192. doi:10.1016/j.plipres.2010.12.001
- Murakami, M., Yoshihara, K., Shimbara, S., Lambeau, G., Gelb, M.H., Singer, A.G., Sawada, M., Inagaki, N., Nagai, H., Ishihara, M., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kudo, I., 2002a. Cellular arachidonate-releasing function and inflammation-associated expression of group IIF secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 277, 19145–19155. doi:10.1074/jbc.M112385200
- Murakami, M., Yoshihara, K., Shimbara, S., Lambeau, G., Singer, A., Gelb, M.H., Sawada, M., Inagaki, N., Nagai, H., Kudo, I., 2002b. Arachidonate release and eicosanoid generation by group IIE phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 689–696. doi:10.1006/bbrc.2002.6716
- Murakami, T., Kariu, T., Takazaki, S., Hattori, S., Chijiwa, T., Ohno, M., Oda-Ueda, N., 2009. Island specific expression of a novel [Lys<sup>49</sup>]phospholipase A<sub>2</sub> (BP111) in *Protobothrops flavoviridis* venom in Amami-Oshima, Japan. *Toxicon* 54, 399–407. doi:10.1016/j.toxicon.2009.05.003
- Nagy, Z.T., Adriaens, D., Pauwels, E., Hoorebeke, L. Van, Kielgast, J., Kusamba, C., Jackson, K., 2013. 3D reconstruction of fang replacement in the venomous snakes *Dendroaspis jamesoni* (Elapidae) and *Bitis arietans* (Viperidae). *Salamandra* 49, 109–113.
- Nakamura, H., Murakami, T., Hattori, S., Sakaki, Y., Ohkuri, T., Chijiwa, T., Ohno, M., Oda-Ueda, N., 2014. Epithelium specific ETS transcription factor, ESE-3, of *Protobothrops flavoviridis* snake venom gland transactivates the promoters of venom phospholipase A<sub>2</sub> isozyme genes. *Toxicon* 92, 133–139. doi:10.1016/j.toxicon.2014.10.001
- Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Nakai, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, M., Sakaki, Y., Hattori, S., 1995. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A<sub>2</sub>

- isozyme genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 5605–5609.  
doi:10.1073/pnas.92.12.5605
- Nakashima, K., Ogawa, T., Oda, N., Hattori, M., Sakaki, Y., Kihara, H., Ohno, M., 1993.  
Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A<sub>2</sub>  
isozymes. Proc Natl Acad Sci U S A. 90, 5964–5968. doi:10.1016/0041-0101(94)90138-4
- Nakasone, H., 2006. ハブ属毒ヘビの腭臓ホスホリパーゼA<sub>2</sub>の遺伝子解析 --島嶼・進化の  
観点から--. 修士論文.
- Naville, M., Chalopin, D., Volff, J., 2014. Interspecies insertion polymorphism analysis reveals  
recent activity of transposable elements in extant coelacanths. PLoS One 9, e114382.  
doi:10.1371/journal.pone.0114382
- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and  
nonsynonymous nucleotide substitutions. Mol. Biol. Evol. 3, 418–426.
- Nicosia, A., Maggio, T., Mazzola, S., Cuttitta, A., 2013. Evidence of accelerated evolution and  
ectodermal-specific expression of presumptive BDS toxin cDNAs from *Anemonia viridis*.  
Mar. Drugs 11, 4213–4231. doi:10.3390/md11114213
- Nishimura, M., Araki, Y., Ueda, H., Kawashima, Y., 1991. Frequencies of prey items of habu,  
*Trimeresurus flavoviridis* (Viperidae), in the Okinawa Islands 1. snake 23, 81–83.
- Nobuhisa, I., Nakashima, K., Deshimaru, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y.,  
Sakaki, Y., Hattori, S., Kihara, H., Ohno, M., 1996. Accelerated evolution of *Trimeresurus*  
*okinavensis* venom gland phospholipase A<sub>2</sub> isozyme-encoding genes. Gene 172, 267–272.  
doi:10.1016/0378-1119(96)00186-2
- Oda, N., Ogawa, T., Ohno, M., Sasaki, H., Sakaki, Y., Kihara, H., 1990. Cloning and sequence  
analysis of cDNA for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A<sub>2</sub>, and consequent  
revision of the amino acid sequence. J. Biochem. 108, 816–821.
- Oda-Ueda, N., Chijiwa, T., Ohno, M., 2004. ハブ毒を科学する：多様な生理機能と加速進  
化. 化学と生物 42, 687–693.
- Ogawa, T., Ishii, C., Kagawa, D., Muramoto, K., Kamiya, H., 1999. Accelerated evolution in  
the protein-coding region of galectin cDNAs, congerin I and congerin II, from skin mucus  
of conger eel (*Conger myriaster*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 1203–1208.

doi:10.1271/bbb.63.1203

Ogawa, T., Nakashima, K.I., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Sakaki, Y., Hattori, S., Ohno, M., 1996. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> isozymes for acquisition of diverse physiological functions, in: *Toxicon*. pp. 1229–1236.

Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K., Sasaki, H., Hattori, M., Sakaki, Y., Kihara, H., Ohno, M., 1992. Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A<sub>2</sub> isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8557–8561. doi:10.1073/pnas.89.18.8557

Ogawa, T., Shirai, T., Shionyu-Mitsuyama, C., Yamane, T., Kamiya, H., Muramoto, K., 2002. The speciation of conger eel galectins by rapid adaptive evolution. *Glycoconj. J.* 19, 451–458. doi:10.1023/B:GLYC.0000014074.38755.1d

Ohno, M., Ogawa, T., Oda-Ueda, N., Chijiwa, T., Hattori, S., 2002. Accelerated and regional evolution of snake venom gland isozymes., in: Ménez, A. (Ed.), *Perspectives in Molecular Toxinology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 387–400.

Ohshima, K., Okada, N., 2005. SINEs and LINEs: symbionts of eukaryotic genomes with a common tail. *Cytogenet. Genome Res.* 110, 475–490. doi:10.1159/000084981

Ohta, T., 1973. Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. *Nature* 246, 96–98. doi:10.1038/246096a0

Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment, 2011. ハブに注意!

Olivera, B.M., Watkins, M., Bandyopadhyay, P., Imperial, J.S., de la Cotera, E.P.H., Aguilar, M.B., Vera, E.L., Concepcion, G.P., Lluisma, A., 2012. Adaptive radiation of venomous marine snail lineages and the accelerated evolution of venom peptide genes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1267, 61–70. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06603.x

Osozawa, S., Shinjo, R., Armid, A., Watanabe, Y., Horiguchi, T., Wakabayashi, J., 2012. Palaeogeographic reconstruction of the 1.55 Ma synchronous isolation of the Ryukyu Islands, Japan, and Taiwan and inflow of the Kuroshio warm current. *Int. Geol. Rev.* 54, 1369–1388. doi:10.1080/00206814.2011.639954

Ota, H., 2012. 琉球列島を中心とした南西諸島における陸生生物の分布と古地理 –これ

までの流れと今後の方向性 -. 月刊地球 34, 427–436.

- Parmley, D., Holman, J.A., 2007. Earliest fossil record of a pigmy rattlesnake (Viperidae: *Sistrurus* Garman). *J. Herpetol.* 41, 141–144.  
doi:10.1670/0022-1511(2007)41[141:EFROAP]2.0.CO;2
- Permanyer, J., Albalat, R., González-Duarte, R., 2006. Getting closer to a pre-vertebrate genome: The non-LTR retrotransposons of *Branchiostoma floridae*. *Int. J. Biol. Sci.* 2, 48–53.
- Petrovič, U., Šribar, J., Pariš, A., Rupnik, M., Kržan, M., Vardjan, N., Gubenšek, F., Zorec, R., Križaj, I., 2004. Ammodytoxin, a neurotoxic secreted phospholipase A<sub>2</sub>, can act in the cytosol of the nerve cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 981–985.  
doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.144
- Posada, D., 2003. Using MODELTEST and PAUP\* to select a model of nucleotide substitution. *Curr. Protoc. Bioinformatics* Chapter 6, Unit 6.5. doi:10.1002/0471250953.bi0605s00
- Prasarnpun, S., 2005. Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain* 128, 2987–2996. doi:10.1093/brain/awh642
- Rage, J.-C., Folie, A., Rana, R.S., Singh, H., Rose, K.D., Smith, T., 2008. A diverse snake fauna from the early Eocene of Vastan Lignite Mine, Gujarat, India. *Acta Palaeontol. Pol.* 53, 391–403. doi:10.4202/app.2008.0303
- Ranawaka, U.K., Lalloo, D.G., de Silva, H.J., 2013. Neurotoxicity in snakebite - The limits of our knowledge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2302. doi:10.1371/journal.pntd.0002302
- Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B.W., Drenth, J., Sigler, P.B., 1985. A comparison of the crystal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.* 260, 11627–11634.
- Rigoni, M., 2004. Snake presynaptic neurotoxins with phospholipase A<sub>2</sub> activity induce punctate swellings of neurites and exocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell Sci.* 117, 3561–3570. doi:10.1242/jcs.01218
- Roche Applied Science, 2008. DIG application manual for filter hybridization. Mannheim.
- Rodrigues, R.S., Boldrini-França, J., Fonseca, F.P.P., de la Torre, P., Henrique-Silva, F., Sanz, L., Calvete, J.J., Rodrigues, V.M., 2012. Combined snake venomomics and venom gland

- transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. *J. Proteomics* 75, 2707–2720.  
doi:10.1016/j.jprot.2012.03.028
- Rokyta, D.R., Wray, K.P., Margres, M.J., 2013. The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom-gland transcriptomics. *BMC Genomics* 14, 394. doi:10.1186/1471-2164-14-394
- Rosso, J.-P., Vargas-Rosso, O., Gutierrez, J.M., Rochat, H., Bougis, P.E., 1996. Characterization of  $\alpha$ -neurotoxin and phospholipase A<sub>2</sub> activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major  $\alpha$ -neurotoxin from *Micrurus Nigrocinctus Nigrocinctus*. *Eur. J. Biochem.* 238, 231–239.  
doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0231q.x
- Sanders, K.L., Mumpuni, Hamidy, A., Head, J.J., Gower, D.J., 2010. Phylogeny and divergence times of filesnakes (*Acrochordus*): Inferences from morphology, fossils and three molecular loci. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 857–867. doi:10.1016/j.ympev.2010.04.031
- Schaloske, R.H., Dennis, E. a., 2006. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 1246–1259.  
doi:10.1016/j.bbalip.2006.07.011
- Seilhamer, J.J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J.A., Kloss, J., Johnson, L.K., 1989. Cloning and recombinant expression of phospholipase A<sub>2</sub> present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.* 264, 5335–5338.
- Shiraishi, M., Hayatsu, H., 2004. High-speed conversion of cytosine to uracil in bisulfite genomic sequencing analysis of DNA methylation. *DNA Res.* 11, 409–415.
- Sibuet, J.-C., Hsu, S.-K., 2004. How was Taiwan created? *Tectonophysics* 379, 159–181.  
doi:10.1016/j.tecto.2003.10.022
- Smit, A., Hubley, R., Green, P., 1996. RepeatMasker Open-3.0 [WWW Document].  
RepeatMasker Open-3.0. URL <http://repeatmasker.org>.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033
- Suh, a., Churakov, G., Ramakodi, M.P., Platt, R.N., Jurka, J., Kojima, K.K., Caballero, J., Smit, a. F., Vliet, K. a., Hoffmann, F.G., Brosius, J., Green, R.E., Braun, E.L., Ray, D. a.,

- Schmitz, J., 2014. Multiple lineages of ancient CR1 retroposons shaped the early genome evolution of amniotes. *Genome Biol. Evol.* 7, 205–217. doi:10.1093/gbe/evu256
- Suzuki, A., Matsueda, E., Yamane, T., Ashida, T., Kihara, H., Ohno, M., 1995. Crystal structure analysis of phospholipase A<sub>2</sub> from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake) venom at 1.5 Å resolution. *J. Biochem.* 117, 730–740.
- Symer, D.E., Connelly, C., Szak, S.T., Caputo, E.M., Cost, G.J., Parmigiani, G., Boeke, J.D., 2002. Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability *in vivo*. *Cell* 110, 327–338. doi:10.1016/S0092-8674(02)00839-5
- Szak, S.T., Pickeral, O.K., Makalowski, W., Boguski, M.S., Landsman, D., Boeke, J.D., 2002. Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biol.* 3, research0052.1. doi:10.1186/gb-2002-3-10-research0052
- Tanaka, Y., Oyama, S., Hori, S., Ushio, K., Shioi, N., Terada, S., Deshimaru, M., 2013. Accelerated evolution of fetuin family proteins in *Protobothrops flavoviridis* (habu snake) serum and the discovery of an L1-like genomic element in the intronic sequence of a fetuin-encoding gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 582–590. doi:10.1271/bbb.120829
- Touqui, L., Alaoui-El-Azher, M., 2001. Mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub> and their pathophysiological significance in inflammatory diseases. *Curr. Mol. Med.* 1, 739–754. doi:10.2174/1566524013363258
- Touqui, L., Wu, Y.-Z., 2003. Interaction of secreted phospholipase A<sub>2</sub> and pulmonary surfactant and its pathophysiological relevance in acute respiratory distress syndrome. *Acta Pharmacol. Sin.* 24, 1292–1296.
- Tsai, I.H., Chen, Y.H., Wang, Y.M., 2004. Comparative proteomics and subtyping of venom phospholipases A<sub>2</sub> and disintegrins of *Protobothrops pit* vipers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1702, 111–119. doi:10.1016/j.bbapap.2004.08.006
- Tsai, I.H., Tsai, T.S., Wang, Y.M., Tu, M.C., Chang, H.C., 2012. Cloning and characterization of *Trimeresurus gracilis* venom phospholipases A<sub>2</sub>: Comparison with *Ovophis okinavensis* venom and the systematic implications. *Toxicon* 59, 151–157. doi:10.1016/j.toxicon.2011.10.016
- Ullate-Agote, A., Milinkovitch, M.C., Tzika, A.C., 2014. The genome sequence of the corn



- snake (*Pantherophis guttatus*), a valuable resource for EvoDevo studies in squamates. *Int. J. Dev. Biol.* 58, 881–888. doi:10.1387/ijdb.150060at
- Varriale, A., Bernardi, G., 2006a. DNA methylation and body temperature in fishes. *Gene* 385, 111–121. doi:10.1016/j.gene.2006.05.031
- Varriale, A., Bernardi, G., 2006b. DNA methylation in reptiles. *Gene* 385, 122–127. doi:10.1016/j.gene.2006.05.034
- Verheij, H.M., Westerman, J., Sternby, B., De Haas, G.H., 1983. The complete primary structure of phospholipase A<sub>2</sub> from human pancreas. *Biochim.Biophys.Acta* 747, 93–99.
- Vonk, F.J., Admiraal, J.F., Jackson, K., Reshef, R., de Bakker, M. a. G., Vanderschoot, K., van den Berge, I., van Atten, M., Burgerhout, E., Beck, A., Mirtschin, P.J., Kochva, E., Witte, F., Fry, B.G., Woods, A.E., Richardson, M.K., 2008. Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature* 454, 630–633. doi:10.1038/nature07178
- Vonk, F.J., Casewell, N.R., Henkel, C. V, Heimberg, A.M., Jansen, H.J., McCleary, R.J.R., Kerkkamp, H.M.E., Vos, R.A., Guerreiro, I., Calvete, J.J., Wüster, W., Woods, A.E., Logan, J.M., Harrison, R.A., Castoe, T.A., de Koning, A.P.J., Pollock, D.D., Yandell, M., Calderon, D., Renjifo, C., Currier, R.B., Salgado, D., Pla, D., Sanz, L., Hyder, A.S., Ribeiro, J.M.C., Arntzen, J.W., van den Thillart, G.E.E.J.M., Boetzer, M., Pirovano, W., Dirks, R.P., Spaink, H.P., Duboule, D., McGlenn, E., Kini, R.M., Richardson, M.K., 2013. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20651–20656. doi:10.1073/pnas.1314702110
- Warren, W.C., Clayton, D.F., Ellegren, H., Arnold, A.P., Hillier, L.W., Kunstner, A., Searle, S., White, S., Vilella, A.J., Fairley, S., Heger, A., Kong, L., Ponting, C.P., Jarvis, E.D., Mello, C. V, Minx, P., Lovell, P., Velho, T.A.F., Ferris, M., Balakrishnan, C.N., Sinha, S., Blatti, C., London, S.E., Li, Y., Lin, Y.-C., George, J., Sweedler, J., Southey, B., Gunaratne, P., Watson, M., Nam, K., Backström, N., Smeds, L., Nabholz, B., Itoh, Y., Whitney, O., Pfenning, A.R., Howard, J., Völker, M., Skinner, B.M., Griffin, D.K., Ye, L., McLaren, W.M., Flicek, P., Quesada, V., Velasco, G., Lopez-Otin, C., Puente, X.S., Olender, T., Lancet, D., Smit, A.F.A., Hubley, R., Konkel, M.K., Walker, J.A., Batzer, M.A., Gu, W., Pollock, D.D., Chen, L., Cheng, Z., Eichler, E.E., Stapley, J., Slate, J., Ekblom, R.,

- Birkhead, T., Burke, T., Burt, D., Scharff, C., Adam, I., Richard, H., Sultan, M., Soldatov, A., Lehrach, H., Edwards, S. V., Yang, S.-P., Li, X., Graves, T., Fulton, L., Nelson, J., Chinwalla, A., Hou, S., Mardis, E.R., Wilson, R.K., 2010. The genome of a songbird. *Nature* 464, 757–762.
- Warren, W.C., Wilson, R.K., 2015. Direct Submission. Genome Institute, Washingt. Univ. Sch. Med. 4444 For. Park. St. Louis, MO 63108, USA.
- Wüster, W., Peppin, L., Pook, C.E., Walker, D.E., 2008. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 445–459. doi:10.1016/j.ympev.2008.08.019
- Xing, J., Witherspoon, D.J., Jorde, L.B., 2013. Mobile element biology: new possibilities with high-throughput sequencing. *Trends Genet.* 29, 280–289. doi:10.1016/j.tig.2012.12.002
- Yamaguchi, K., Chijiwa, T., Ikeda, N., Shibata, H., Fukumaki, Y., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Ohno, M., 2014. The finding of a group IIE phospholipase A<sub>2</sub> gene in a specified segment of *Protobothrops flavoviridis* genome and its possible evolutionary relationship to group IIA phospholipase A<sub>2</sub> genes. *Toxins (Basel)*. 6, 3471–3487. doi:10.3390/toxins6123471
- Yamaguchi, K., Chijiwa, T., Yamamura, T., Ikeda, N., Yatsui, T., Hayama, S., Hattori, S., Oda-Ueda, N., Ohno, M., 2015. Interisland variegation of venom [Lys<sup>49</sup>]phospholipase A<sub>2</sub> isozyme genes in *Protobothrops* genus snakes in the southwestern islands of Japan. *Toxicon* 107, 210–216. doi:10.1016/j.toxicon.2015.08.024
- Yamaguchi, Y., Shimohigashi, Y., Chijiwa, T., Nakai, M., Ogawa, T., Hattori, S., Ohno, M., 2001. Characterization, amino acid sequence and evolution of edema-inducing, basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Toxicon* 39, 1069–1076. doi:10.1016/S0041-0101(00)00250-6
- Yamaguchi, Y., Shimohigashi, Y., Chiwata, T., Tani, A., Chijiwa, T., Lomonte, B., Ohno, M., 1997. Lys-49-phospholipases A<sub>2</sub> as active enzyme for β-arachidonoyl phospholipid bilayer membranes. *IUBMB Life* 43, 19–26. doi:10.1080/15216549700203771
- Yang, Y., Chen, K., 2012. Molecular evolution of the *ent*-kaurenoic acid oxidase gene in *Oryzae*. *Genet. Mol. Biol.* 35, 448–454. doi:10.1590/S1415-47572012005000020
- Yang, Z., 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24,

- 1586–1591. doi:10.1093/molbev/msm088
- Yang, Z., 2006. Computational molecular evolution, Oxford University Press. Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:oso/9780198567028.001.0001
- Yang, Z., Nielsen, R., 2000. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* 17, 32–43. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026236
- Yatsui, T., 2006. 毒腺ホスホリパーゼA<sub>2</sub>アイソザイムからみる離島ハブの特異性と普遍性. 修士論文.
- Yoshizumi, K., Liu, S.Y., Miyata, T., Saita, S., Ohno, M., Iwanaga, S., Kihara, H., 1990. Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49-phospholipase A<sub>2</sub> with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). *Toxicon* 28, 43–54. doi:10.1016/0041-0101(90)90005-R
- Zachos, J., 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* (80-. ). 292, 686–693. doi:10.1126/science.1059412
- Zelanis, A., Tashima, A.K., Rocha, M.M.T., Furtado, M.F., Camargo, A.C.M., Ho, P.L., Serrano, S.M.T., 2010. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J. Proteome Res.* 9, 2278–2291. doi:10.1021/pr901027r
- Zhang, L., Huang, X., Li, Z., Hu, H., Zhang, B., 2013. Mitochondrial genome of *Protobothrops mucrosquamatus* (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Mitochondrial DNA* 24, 495–497. doi:10.3109/19401736.2013.770502
- Zhang, Z., Li, J., Yu, J., 2006. Computing Ka and Ks with a consideration of unequal transitional substitutions. *BMC Evol. Biol.* 6, 44. doi:10.1186/1471-2148-6-44
- Župunski, V., Gubenšek, F., Kordiš, D., 2001. Evolutionary dynamics and evolutionary history in the RTE clade of non-LTR retrotransposons. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1849–1863. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003727

## 9. 謝辞

本研究を遂行及び学位論文の作成にあたり、終始暖かく見守って下さり、様々な挑戦をさせて下さった恩師、千々岩崇仁 教授 (崇城大学大学院 工学研究科 応用生命科学科 生命情報科学講座) には深く感謝しております。

本研究を遂行及び学位論文の作成にあたり、多くの御助言を下された大野素徳 教授 (崇城大学大学院 工学研究科 応用生命科学科 生命情報科学講座)、武谷浩之 教授、宮原浩二 准教授、上田直子 教授 (崇城大学 薬学部 薬学科 生化学研究室)、中村仁美 助教、池田直樹 博士の各先生方には深く感謝しております。

次世代シーケンサーで解読したホンハブのゲノム配列及びRNA-seq配列情報をご提供して頂いた服巻保幸 教授 (九州大学 生体防御医学研究所 トランスオミクス医学研究センター) と 柴田弘紀 准教授、そしてハブ生体組織サンプル採取とハブ属・ヤマハブ属の日本南西諸島渡来時期と経路に関する研究に、ご協力頂いた服部正策 准教授 (東京大学 医科学研究所 奄美病害動物研究施設) と倉石武 特任助教の各先生方に心から御礼申し上げます。

また、学位論文の御校閲を賜りました、原島俊 教授 (崇城大学 生物生命学部 応用微生物工学科)、武谷浩之 教授に心から御礼申し上げます。

4回生の林みず紀さんとは共同で研究を進め、多くの刺激を受けることができたことを心から御礼申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり多大なご協力を頂きました生命情報科学講座の皆様には感謝致します。