

博士論文

ハブ血清に含まれるハブ毒中和因子
: Small serum proteins (SSPs) をコードする
遺伝子の分子進化

令和3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
生命環境科学講座

1819D01

稲丸 賢人

目次

1. 要約	P. 1
2. 略称一覧	P. 2
3. 序論	P. 4
4. 試薬と方法	P. 11
5. 結果と考察	P. 30
6. 総合議論	P. 41
7. 図表	P. 44
8. 付録：プライマーリスト	P. 81
9. 参考文献	P. 83
10. 謝辞	P. 97

1. 要約

日本南西諸島に棲息するホンハブ (*Protobothrops flavoviridis*, Pf) は猛毒を有する毒蛇であり、その咬傷時には出血、浮腫、筋壊死といった症状を呈し、最悪の場合、死に至る。一方で、ホンハブは誤って互いを咬んでしまっても重症化しないことが知られている。これは、ハブ血清中にハブ毒タンパク質を阻害あるいは中和するタンパク質が含まれているからであり、HSF (Habu serum factor) や PLIs (Phospholipase A₂ inhibitor) 、 Small serum proteins (SSPs) がよく研究されている。SSP はヒト Prostatic secretory protein 94 (PSP94) のヘビホモログであり、ハブ血清から単離された5つの PfSSPs (PfSSP-1~PfSSP-5) は異なる親和性でハブ毒タンパク質と結合することが報告されている。また、PfSSP-1、PfSSP-2 をコードする遺伝子 (PfSSP-1、PfSSP-2) の数理解析から、タンパク質コード領域における突然変異が同義座位よりも非同義座位に蓄積していることが報告されていた。

本研究では、まず、ホンハブのゲノム断片 46,361 bp を解読し、1) 同じ染色体上に PfSSP-4、PfSSP-5、PfSSP-1、PfSSP-2、PfSSP-3、の順に並んでいること、2) PfSSP-4 の 12.4 kbp 5' 上流に新奇の SSP : PfSSP-6 をコードする遺伝子 (PfSSP-6) が、3) PfSSP-6 と PfSSP-4 の遺伝子間領域にかつて SSP をコードしていたと考えられる遺伝子 : PfSSP-7(ψ)、PfSSP-8(ψ) が存在し、SSP 遺伝子アレイを形成していることを明らかにした。また、ナンセンス変異が含まれずエクソンなどの欠損もない活性型と考えられる6つの PfSSPs の構造比較解析、7種類のヘビドラフトゲノムデータの解析から、ヘビ SSPs の祖先遺伝子から SSP 遺伝子アレイが形成された過程について考察した。

2. 略称一覽

略称	正式名称
BLAST	Basic local alignment search tool
cDNA	Complementary DNA
CDS	Coding sequence
CR1	Chicken repeat 1
<i>C. viridis, Cv</i>	<i>Crotalus viridis</i>
CTCR	Carboxy-terminal conserved region
<i>D. acutus, Da</i>	<i>Deinagkistrodon acutus</i>
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
EN	Endonuclease
EtBr	Ethidium bromide
hAT	hobo- <i>Ac</i> -Tam3
HSF	Habu serum factor
INDEL	Insertion-deletion
I-Reg	Intergenic region
LINE	Long interspersed nuclear element
<i>O. hannah, Oh</i>	<i>Ophiophagus hannah</i>
ORF	Open reading frame
<i>O. okinavensis, Oo</i>	<i>Ovophis okinavensis</i>
PCR	Polymerase chain reaction
PcRTF	PLA ₂ gene-coupled reverse transcriptase fragment
PEG	Polyethylene glycol
<i>P. bivittatus, Pb</i>	<i>Python bivittatus</i>
<i>P. elegans, Pe</i>	<i>Protobothrops elegans</i>
<i>P. flavoviridis, Pf</i>	<i>Protobothrops flavoviridis</i>
<i>P. mucrosquamatus, Pm</i>	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>
<i>P. tokarensis, Pt</i>	<i>Protobothrops tokarensis</i>
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLI	Phospholipase A ₂ inhibitor
PSP94	Prostatic secretory protein of 94 amino acids
RT	Reverse transcriptase
SSP	Small serum protein
<i>T. sirtalis, Ts</i>	<i>Thamnophis sirtalis</i>
UTR	Untranslated region

V. berus, Vb

X-gal

Vipera berus

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

3. 序論

3-1. 日本南西諸島に棲息するクサリヘビ科ヘビ

ハブはヘビ亜目 (*Serpentes*)、ナミヘビ上科 (*Colubroidea*)、クサリヘビ科 (*Viperidae*)、マムシ亜科 (*Crotalinae*)、ハブ属 (*Protobothrops*) に属するヘビであり、日本南西諸島にはハブ属 (*Protobothrops*) 3種、ヤマハブ属 (*Ovophis*) 1種、計4種のクサリヘビ科マムシ亜科のヘビが棲息している。ハブ属のホンハブ (*Protobothrops flavoviridis* : Pf) は奄美大島とその属島、徳之島、沖縄諸島とその属島、トカラハブ (*Protobothrops tokarensis* : Pt) はトカラ列島の小宝島と宝島、サキシマハブ (*Protobothrops elegans* : Pe) は先島諸島、ヤマハブ属のヒメハブ (*Ovophis okinavensis* : Oo) はホンハブとほぼ同じ地域にそれぞれ棲息している (Fig. 1)。

3-2. ハブ毒タンパク質

ハブ咬傷時の代表的な臨床知見は出血、壊死、溶血、浮腫などがあり、これら主要な生理活性を担う毒タンパク質としてホスホリパーゼ A₂ (Phospholipase A₂, PLA₂) (Brunie et al., 1985; Holland et al., 1990; Renetseder et al., 1985; Suzuki et al., 1995)、金属プロテアーゼ (Snake Venom Metalloprotease, SVMP) (Fox et al., 2005)、セリンプロテアーゼ (Serine protease) (Matsui et al., 2000)、triflin (Yamazaki et al., 2002) などが含まれる。2つの高分子量 SVMPs : HR1a と HR1b (Omori-Satoh T, 1979)、2つの中分子量 SVMPs : HR2a と HR2b (Takahashi T, 1970)、はアイソザイムであり、重篤な出血を引き起こす (Kini RM, 2003)。低分子量 SVMP : HV1 は血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する (Masuda S, 2001)。triflin は、筋収縮を阻害する神経毒素様タンパク質として知られている (Yamazaki Y, 2002)。

3-3. Phospholipase A₂ の機能と分類

ホスホリパーゼ A₂ (Phospholipase A₂ : PLA₂) は、細胞質の主成分であるグリセリン脂質の sn-2 位のエステル結合を Ca²⁺イオン依存的に加水分解し、リゾリン脂質と脂肪酸を産生する酵素である (Fig. 2) (Dijkstra et al., 1983, 1981)。PLA₂ は、アミノ酸配列に基づいて 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 PLA₂ (secretory PLA₂, sPLA₂)、細胞質型 PLA₂ (cytosolic PLA₂, cPLA₂)、Ca²⁺非依存型 PLA₂ (Ca²⁺-independent PLA₂, iPLA₂)、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 A₂ (Lysosomal phospholipase A₂, LPLA₂)、アディポサイト型ホスホリパーゼ A₂ (adipose-specific PLA₂, AdPLA₂) の 6 つに大別される (Table 1) (Dennis et al., 2011)。分泌型 PLA₂ 11 グループ (IB、IIA、IIC、IID、IIE、IIF、III、V、X、XIIA、XIIB) のうち (Dennis et al., 2011; Murakami et al., 2011, 2010; Schaloske and Dennis, 2006)、IIA 型の PLA₂ はハブなどクサリヘビ毒から複数種見出され、主要な成分として知られている。ヘビ毒成分として含まれる sPLA₂ は粗毒中に複数含まれており、いわゆるアイソザイム系を構成する。このヘビ毒 PLA₂ アイソザイムは、そのジスルフィド結合様式の違いから I 型と II 型に分けられる。I 型は主にコブラ科 (Elapidae) ヘビに見いだされ、神経毒性を発揮する。II 型はクサリヘビ科ヘビに見いだされ、出血毒性を主な活性とする。この II 型 PLA₂ は Ca²⁺ の結合部位である 49 番目のアミノ酸の違いにより、さらに大きく [Asp⁴⁹]PLA₂ と [Lys⁴⁹]PLA₂ に分けられ、さらに 4 種の生理活性に関連付けられるアミノ酸配列の違いから、溶血活性の中性 [Asp⁴⁹]PLA₂ : PLA₂ (Kihara et al., 1992; Oda et al., 1990)、浮腫誘導性の塩基性 [Asp⁴⁹]PLA₂ : PLA-B (Yamaguchi et al., 2001)、神経毒性の強塩基性 [Asp⁴⁹]PLA₂ : PLA-N (Chijiwa et al., 2003)、筋毒性の [Lys⁴⁹]PLA₂ : Basic protein I (BPI、筋壊死) と Basic protein II (BPII、筋肉収縮) (Kihara et al., 1992; Liu et al., 1990; Yoshizumi et al., 1990)、のサブタイプに分けられる (Fig. 3)。

3-4. ハブ毒 PLA₂ の地域多様性

当研究室ではこれまでに奄美大島、徳之島、沖縄本島に棲息するホンハブの粗毒に含まれるハブ毒 PLA₂ を比較解析してきた。その結果、ハブ毒 PLA₂ の組成がそれぞれ棲息する島で異なることを明らかにした。特に、筋毒性の [Lys⁴⁹]PLA₂ は、島嶼間での差が大きいことを示した。トカラハブは BPI のみ、奄美大島のホンハブは BPI、BPII、BPIII の 3 つ、徳之島のホンハブは BPI、BPII の 2 つ、をそれぞれ含んでいるのに対して、沖縄本島のホンハブの粗毒には筋毒性の [Lys⁴⁹]PLA₂ が含まれていなかった。

3-5. ハブ毒 PLA₂ アイソザイムをコードする遺伝子

ハブ毒 PLA₂ をコードする遺伝子 (*PfPLAs*) は、単離、解読されている。単離された *PfPLAs* の比較解析から、*PfPLAs* は 4 エクソン-3 イントロンの共通の遺伝子構造を有することが示された。また、サザンブロット解析から *PfPLAs* はハブロイド当たり 16~32 コピー存在することが明らかにされていた (Nakashima et al., 1993)。

2010年には、当研究室の池田らによって、新規の PLA₂ をコードする *PfPLA8*、PLA₂ をコードする *PfPLA7*、新規の PLA₂ をコードする *PfPLA6*、新規の PLA₂ をコードする *PfPLA1*、BPII をコードする *PfPLA2*、第2イントロンの途中から第4エクソンしか見出せない断片化した *PfPLA* : *PfPLA3*、PLA-N をコードする *PfPLA4*、PLA-B をコードする *PfPLA5*、が1つの染色体上にこの順に並んで約45 kbp上の遺伝子クラスターを形成していることが明らかにされた (Fig. 4) (Ikeda et al., 2010; 2011)。また、FISH解析からマイクロ染色体上に異なる2つの遺伝子座を形成していることが示され、残りの明らかにできていない遺伝子座の解明が期待された (Ikeda et al., 2010; 2011)。

さらに2014年には、山口らによって、ヒト、ニワトリ、キングコブラまで、非毒性の IIF、IID、IIA、IIE 型の分泌型 PLA₂ をコードする遺伝子が5'側からこの順にクラスターを形成し、その3'端には Ovarian tumor domain containing protein 3 (OTUD3) をコードする遺伝子 : *OTUD3* が並んでいる構造が保存されていることを見出し、ホンハブゲノムでも同様の構造が保存されていること、その IIA PLA₂ 遺伝子座で毒 IIA PLA₂ 遺伝子が多重化してクラスターを形成していたことが示された (Fig. 5) (Yamaguchi et al., 2014; 2015)。

3-6. 動物毒普遍的に観察される加速進化

各毒 PLA₂ をコードする遺伝子同士の塩基配列の数理解析の結果、イントロンやタンパク質非コード領域は通常の変異導入率を示すのに対し、タンパク質コード領域の非同義座位は異常に高い変異導入率を示すことがわかった。この特異な突然変異導入率によって毒 PLA₂ アイソザイムが多様なアミノ酸配列をもち、固有の生理活性を獲得したものと考えられる。このような現象を「加速進化」と名付けて、現在も詳細な解析が行われている (Fig. 6)。また、この加速進化はハブ毒 PLA₂ に特有の現象ではなく、イモガイ毒コノトキシン類 (Duda et al., 1999, 2000; Conticello et al., 2001; Olivera et al., 1999)、サソリ毒 (Frov et al., 1999; Zhu et al., 2004; Cao et al., 2005)、クモ毒 (Escoubas et al., 2000)、などの動物毒タンパク質をコードする遺伝子で普遍的に観察される現象である。

3-7. ハブ毒血清阻害タンパク質

ハブは誤って自身や互いを噛んでしまってもヒトと比べ重症化しないことが知られている。これは、ハブ血清中にはハブ毒を阻害するタンパク質を含んでいるからである。中でも PLA₂ inhibitor (PLI) (Nobuhisa et al., 1997; So et al., 2008; Oliveira et al., 2011; Serino-Silva et al., 2018) や Habu serum factor

(HSF) (Yamakawa et al., 1992; Deshimaru et al., 2003) がよく研究されている。

PLIはその一次構造の違いと PLA₂アイソザイムへの親和性に基づいて、 α PLI、 β PLI、 γ PLIの3種類に分類され (Dunn and Broady, 2001)、それぞれ A、B のサブタイプを持っている。各 PLI の分子量は α PLI が 20~25 kDa、 β PLI が 50 kDa、 γ PLI が 20~30 kDa である。ハブ血清には、 α PLI-A (Kogaki et al., 1989; Inoue et al., 1991; Nobuhisa et al., 1997)、 α PLI-B (Kogaki et al., 1989; Inoue et al., 1991; Nobuhisa et al., 1997)、 γ PLI-A (Nobuhisa et al., 1997)、 γ PLI-B (So et al., 2008) の4つの PLI が含まれている。 α PLI は PLA₂、 γ PLI は3つの塩基性 PLA₂ (PLA-B、BPI、BPII) を特異的に阻害する (Fig. 7)。HSF は出血性金属プロテアーゼ阻害活性を持つ約 48 kDa の非常に安定したタンパク質である。また、これらのハブ毒阻害タンパク質を単独で使用した場合よりも、ハブ血清そのものや混合物として使用した方が相乗効果により毒活性阻害活性が向上することが知られている (Chijiwa et al., 2013)。

近年、当研究室の宗等によりハブ毒 PLA₂アイソザイム : BPII と特異的に結合する PLI より小さい分子量の新規のハブ毒阻害タンパク質のハブ血清における存在が示唆された。解読されたその N 末端アミノ酸配列 21 残基は、2007 年に福岡大学の塩井らによって発見された Small serum protein 2 (SSP-2) と 94% の高い相同性を示すことがわかった (Chijiwa et al., 2013)。

3-8. ハブ血清から単離されたホンハブ SSPs : PfSSPs

SSP は、ハブ血清中に存在する分子量約 10,000 の低分子量タンパク質であり、現在までに 5 種の SSP (*Pf*SSP-1~*Pf*SSP-5) が単離されている

(Fig. 8) (Aoki et al., 2007; Aoki et al., 2008)。SSPs の成熟タンパク質中には、5つのジスルフィド結合を形成する 10 個のシステイン残基が存在する。この 10 個のシステイン残基の位置は、哺乳類の Prostatic secretory protein of 94 amino acid (PSP94) との間でよく保存されている。そのため、ハブ SSPs (*Pf*SSPs) は爬虫類で最初の PSP94 ファミリータンパク質として報告された (Fig. 8)。*Pf*SSPs は、ハブ血清中で HSF と複合体を形成しており (shioi et al., 2011)、様々なヘビ毒素を効果的に中和することが報告されている。*Pf*SSP-1 と *Pf*SSP-4 はハブ毒に含まれるアポトーシス誘導メタロプロテアーゼ HV1 (Shioi et al., 2013)、*Pf*SSP-2 と *Pf*SSP-5 はハブ毒に含まれる平滑筋収縮を阻害する triflin (Aoki et al., 2008)、*Pf*SSP-3 はハブ毒に含まれる非出血性メタロプロテアーゼ Flavorase (Shioi et al., 2015)、とそれぞれ結合する。

奄美ハブより造血組織である肝臓由来の cDNA ライブラリーから 5 つの *PfSSPs* をコードする cDNA が単離されている (Aoki et al., 2007; Aoki et al., 2008)。また、*PfSSP-1*、*PfSSP-2* をコードする遺伝子 (*PfSSP-1*、*PfSSP-2*) とその 2 つの遺伝子間領域 (Intergenic region : I-Reg) の塩基配列も決定されており、*PfSSP-1* と *PfSSP-2* が染色体上でタンデムに並んで存在していることが示唆されている (Tanaka et al., 2013)。さらに、*PfSSP-1* と *PfSSP-2* 同士の塩基配列の数理解析の結果から、*PfSSP-1* と *PfSSP-2* の間では加速進化が観察された (Tanaka et al., 2013)。

3-9. 生物普遍的に保存されている PSP94 ファミリータンパク質

PSP94 (Prostatic secretory protein of 94 amino acids、 β -microseminoprotein または prostatic inhibin peptide と呼ばれる) は、10.7 kDa、非グリコシル化の、システインリッチなタンパク質である (Dubé et al., 1987a)。PSP94 は、ヒト精漿から初めて単離された (Dubé et al., 1987a)。その後、ヒトの子宮、乳房、その他の女性生殖器組織及び子宮内膜がん細胞株でも PSP94 の転写産物が確認された (Bajjal-Gupta et al., 2000)。PSP94 は、前立腺上皮細胞から精液中に分泌されている (Dube et al., 1987a)。ヒト PSP94 は、精子運動能の制御 (Franchi et al., 2008)、精子の女性免疫監視機構からの保護 (Anklesaria et al., 2018)、性交後の精漿における殺菌作用 (Edström Hägerwall, et al., 2012)、前立腺癌細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導 (Garde et al., 1999)、などの機能が推定されている。しかし、ヒト PSP94 の真の機能は明らかにされていない。

アカゲザル (Nolet et al., 1991) やヒヒ (Xuan et al., 1997) などの旧世界ザル以外にも、ワタボウシタマリン (Mäkinen et al., 1999) やコモンマーモセット (Mäkinen et al., 1999) などの新世界ザルでも PSP94 のホモログが同定されている。また、ブタ (Fernlund et al., 1994; Tanaka et al., 1995)、ラット (Fernlund et al., 1996)、マウス (Xuan et al., 1999)、ダチョウ (Lazure et al., 2001)、ニワトリ (Warr et al., 1990; Karandikar et al., 2003) からもホモログが同定されている。さらに、哺乳類 PSP94、ダチョウの PSP94 のアミノ酸配列を用いたデータベース検索から、ウシ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、ニホンヒラメ、の PSP94 が同定されている (Lazure et al., 2001)。

3-10. ヘビ全ゲノムプロジェクト

近年、次世代シーケンサーの普及によって様々な生物のドラフトゲノム配列が決定されており、ヘビ類のドラフトゲノム配列も、本研究で解析したホンハブ (*P. flavoviridis*, *Pf*) (Shibata et al., 2018)、キングコブラ (*O. hannah*, *Oh*) (Vonk et al., 2013)、ビルマニシキヘビ (*P. bivittatus*, *Pb*) (Castoe et al.,

2013)、ガーターヘビ (*T. sirtalis*, *Ts*) (Warren et al., 2015)、ヨーロッパクサリヘビ (*V. berus*, *Vb*) (Liu et al., 2014)、セイブガラガラヘビ (*C. viridis*, *Cv*) (Pasquesi et al., 2018)、ヒヤッポダ (*D. acutus*, *Da*) (Yin et al., 2016)、タイワンハブ (*P. mucrosquamatus*, *Pm*) (Aird et al., 2017)、の他に 22 種類のヘビのドラフトゲノムデータが公開されている (Table 2)。

3-11. ゲノムに散在する反復配列

ヒトゲノムを始めとする多くの生物のゲノムには、ゲノム全体にわたって散在する反復配列がある。これら散在反復配列の多くは、DNA 断片がゲノム上のある位置から別の位置に移動する転移 (transposition) 機構によってその分布パターンが決まる。これらの移動可能な塩基配列は転移因子 (Transposable element)、あるいはトランスポゾン (Transposon) の塩基配列と呼ばれる。トランスポゾンは、転移の際に RNA 中間体を介して転移するものと DNA の塩基配列そのものが転移するものに分けられる。前者を RNA トランスポゾン (レトロトランスポゾン)、後者を DNA トランスポゾンと呼ぶ。また、RNA トランスポゾンが行う転移をレトロトランスポジションという。レトロトランスポゾンは、大きく末端の長鎖末端反復配列 (Long terminal repeat : LTR) をもつもの (LTR 型) と、もたないもの (non-LTR 型) に分けられる。さらに non-LTR 型のレトロトランスポゾンは、約 4~7 kbp の LINE (Long interspersed nuclear element) と約 200 bp~1 kbp SINE (Short interspersed nuclear element) に分けられ、LINE は 2 つの特徴的な読み枠 (Open reading frame、ORF)、ORF1 と ORF2、をもち、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、その転移には LINE のメカニズムを転用していると考えられている。

3-12. 研究の目的

非毒性の PLA₂ をコードする遺伝子が形成する遺伝子クラスターとクサリヘビ科ヘビの毒 PLA₂ 遺伝子をコードする遺伝子が形成する遺伝子クラスターのシンテニー解析から非毒タンパク質から毒タンパク質が獲得された分子進化過程について報告されている。

一方で、毒阻害タンパク質に関してはその生理活性を明らかにする研究が主でそれらをコードする遺伝子の分子進化過程についてはほとんど報告されていない。加えて、本研究の研究対象である *PfSSPs* は、2007 年に発見された新奇の阻害タンパク質であり、それらをコードする遺伝子 : *PfSSP* は *PfSSP-1*、*PfSSP-2* の 2 つを除いては単離・解読されていない。

かった。また、*PfSSPs* が生物普遍的に保存されている **PSP94** のホモログであることから進化的に関連があると考えられていた。今回、初めて爬虫類ゲノムで **PSP94** オルソログを見出したことにより、この2つの遺伝子の進化的な関係についても考察できるようになった。本研究では、本来、毒を中和する機能と無関係な構成性タンパク質をコードしていた遺伝子が毒を中和する機能を有するまでに至った過程について考察した。

4. 試薬と方法

4-1. 試薬

試薬名	会社名	カタログ No.
Agarose for ≥ 1 kbp fragment (Fine powder)	ナカライテスク	02468-66
Agar powder	ナカライテスク	01028-85
Ampicillin sodium salt	ナカライテスク	02739-74
Bacto tryptone	BD Biosciences	211705
Bacto yeast extract	BD Biosciences	212750
Big Dye® Terminator 5× Sequencing Buffer	Applied Biosystems	4336697
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	4337455
Boric acid	ナカライテスク	05215-05
Bromophenol blue	ナカライテスク	05808-61
Calcium chloride, 2-hydrate	ナカライテスク	06731-05
D-Glucose	ナカライテスク	16806-25
<i>E. coli</i> DH5 α Competent Cells	タカラバイオ	9057
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, 2-hydrate(EDTA 2Na · 2H ₂ O)	ナカライテスク	15111-45
Formamide	ナカライテスク	09890-35
Glacial acetic acid	ナカライテスク	00210-85
Glycerol	ナカライテスク	17045-65
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems	4311320
ISOGEN	Nippon gene	317-02503
Isopropanol	和光純薬工業	325-00045
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	ナカライテスク	19742-94
Kanamycin sulfate	和光純薬工業	133-92-6
KOD -plus-	TOYOBO	KOD-201
KOD -plus- Neo	TOYOBO	KOD-401
Magnesium chloride, 6-hydrate	ナカライテスク	20909-55
Magnesium sulfate, 7-hydrate	ナカライテスク	21003-75
Phenol, Saturated with TE Buffer	ナカライテスク	26829-96

Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Mixed, pH 5.2	ナカライテスク	26058-96
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Mixed, pH 7.9	ナカライテスク	25970-56
Polyethylene glycol #6000	ナカライテスク	28254-85
Potassium acetate	ナカライテスク	28432-25
Proteinase K	和光純薬工業	160-14001
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	TOYOBO	FSQ-301
RNase A (10 mg/mL)	ナカライテスク	30100-31
RNase Quiet	ナカライテスク	09147-14
SMART™ cDNA library Construction Kit	Clontech Laboratories	634901
Sodium acetate, 3-hydrate	ナカライテスク	31115-05
Sodium chloride	ナカライテスク	31333-45
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	ナカライテスク	35434-05
Xylene cyanol FF	ナカライテスク	36629-64
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Invitrogen	450245

・ 2 N, 6 N HCl	(2 N)	(6 N)
Milli-Q	41.6 mL,	25 mL
Hydrochloric acid (35-37%)	8.4 mL,	25 mL
Milli-Q で 50 mL にメスアップ		

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

・ 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

• 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA 2Na · 2H ₂ 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
↓オートクレーブ滅菌を行う

• 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

• 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 (pH8.0)	20 mL	(1 mM)

↓脱イオン水で 10 L にメスアップ

• 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
↓オートクレーブ滅菌を行う

• 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
↓オートクレーブ滅菌を行う

• 10% (w/v) SDS 溶液

Sodium dodecyl sulfate	10 g	(10%)
------------------------	------	-------

↓Milli-Q で 100 mL にメスアップ

• 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

↓オートクレーブ滅菌を行う

• Solution II (用時調整)

Milli-Q	4 mL	
10% SDS	0.5 mL	(1%)
2 N NaOH	0.5 mL	(0.2 N)

total 5 mL

• Solution III

5 M 酢酸カリウム溶液	60 mL	(3 M)
Glacial acetic acid	11.5 mL	

↓Milli-Q で 100 mL にメスアップ

↓オートクレーブ滅菌を行う

• 20% PEG/2.5 M NaCl 溶液

Polyethylene glycol #6,000	20 g	(50 mM)
NaCl	14.6 g	(2.5 M)

↓Milli-Q で 100 mL にメスアップ

↓オートクレーブ滅菌を行う

• 1 M CaCl₂

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

↓Milli-Q で 50 mL にメスアップ

↓オートクレーブ滅菌を行う

• 1 M MgCl₂

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

↓Milli-Q で 50 mL にメスアップ

↓オートクレーブ滅菌を行う

• 1 M MgSO₄

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

↓Milli-Q で 50 mL にメスアップ

↓オートクレーブ滅菌を行う

• 5 M NaCl

Sodium chloride	7.3 g	(5 M)
-----------------	-------	-------

↓Milli-Q で 25 mL にメスアップ

↓オートクレーブ滅菌を行う

• 1 M グルコース

Glucose	9 g	(1 M)
---------	-----	-------

↓Milli-Q で 50 mL にメスアップ

↓フィルター(0.22 μ m)滅菌を行う

• 20 mg/mL X-gal

X-gal	100 mg	(20 mg/mL)
-------	--------	------------

↓N, N-dimethylformamide で 5 mL にメスアップ

↓小分けに分注し、-20°Cで遮光保存。

• 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

↓小分けに分注し、-20°Cで保存。

• SOC 培地

Bacto tryptone	4 g	(2%)
----------------	-----	------

Bacto yeast extract	1 g	(0.5%)
---------------------	-----	--------

NaCl	0.1 g	(0.05%)
------	-------	---------

5 N NaOH	40 μ L	
----------	------------	--

↓蒸留水で 200 mL にメスアップ

↓オートクレーブ滅菌を行う

↓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。

↓滅菌済み 1 M MgCl₂ と 1 M MgSO₄ 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に保存。

• LB 液体培地

0.5 M EDTA	800 μ L	(100 mM)
10% SDS	200 μ L	(0.5%)
RNaseA (10 mg/mL)	5 μ L	(50 μ g)
Milli-Q で 4 mL にメスアップ		Total 4 mL

1. 清潔なポリプロピレン製スピッツ容器に、上記の組成で DNA 抽出バッファを調製した。
2. -80°C で保管しておいた清潔な乳鉢・乳棒に液体窒素を注ぎ、乳鉢・乳棒及び葉さじ等の器具をよく冷却した。
3. 液体窒素で満たした乳鉢の中に組織を入れ、乳棒で粉末状になるまですりつぶした。
4. 手順 1 で調製した DNA 抽出バッファに粉末状の組織を加え、液体窒素が十分に蒸発したのを確認した後、転倒混和を行った。
5. あらかじめ分取しておいた Proteinase K (2 mg) をスピッツに素早く添加し、転倒混和を十分行った。
6. 60°C に温めておいた恒温水槽にスピッツを 10 分間浸し、内因性ヌクレアーゼの失活を行った。
7. ビニールテープでスピッツを巻き、ハイブリバッグに入れてシーリングを行なった。
8. 55°C に温めておいたエアインキュベーターで 12 時間以上穏やかに振盪し、細胞溶解及びタンパク質の消化処理を行った。
9. TE 飽和フェノール 4 mL、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール, pH 7.9 (PCI) 4 mL を分注したスピッツをそれぞれ 2 本、3 本準備した。
10. 手順 8 の細胞溶解液は、 20°C 、6000 rpm で 5 分間遠心し、先太ブルーチップを用いて上清を TE 飽和フェノール入りのスピッツへ移した。以降の操作は、ゲノム DNA の物理的剪断を防ぐため、先太ブルーチップを使用する。
11. エアインキュベータを用いて室温で 20 分間穏やかに混合し、 20°C 、6000 rpm で 10 分間遠心した。
12. 遠心後、上清を新しい TE 飽和フェノール入りスピッツに移した。
13. 手順 11 を再度行なった。
14. 遠心後、上清をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール, pH 7.9 (PCI) 入りのスピッツに添加し、室温で 20 分間穏やかに混合した。
15. 20°C 、6000 rpm で 10 分間遠心し、上清を新しい PCI 入りスピッツに加えた。

16. 続けて手順 14、15 を 2 回繰り返した。
17. あらかじめ新しいスピッツに 5 M NaCl 800 μ L を加えておき、3 回目の PCI が終わった上清を 4 mL 添加した。
18. 4 mL (等量) のイソプロパノールを添加し、穏やかに転倒混和を行なった。
19. スピッツの中身をデカンテーションで半分程廃棄した。
20. 予め用意していた 70%エタノール入りエッペンチューブにイエローチップで析出したゲノム DNA を移して洗浄を行なった。
21. 析出したゲノム DNA を清潔なマイクロチューブに移し、風乾を行った。
22. 乾燥させたゲノム DNA に TE バッファーを加えて、ゲノム DNA を溶解させた。
23. ゲノム DNA 溶液を 65°C で 10 分間インキュベートし、内在性デオキシリボヌクレアーゼの失活を行った。
24. 分光光度計で 260、280、320 nm の吸光度を測定し、核酸濃度、純度を算出した。使用時まで 4°C で保存した。

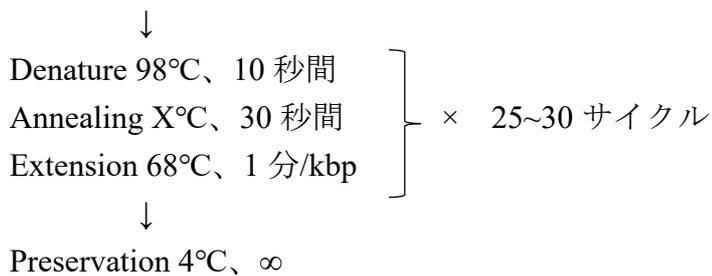
4-3. ゲノム断片の増幅 (Polymerase Chain Reaction: PCR)

本研究では、主に TOYOBO 社から販売されている KOD -Plus- DNA Polymerase (Cat. No. KOD-201) または KOD -Plus- Neo DNA Polymerase (Cat. No. KOD-401) を用いた。また、25 mM MgSO₄、プライマー、ゲノム DNA の濃度、アニーリング温度、伸長時間は適宜検討して実験を行った。以降の操作で使用されるゲノム DNA はホンハブの肝臓、タイワンハブの尻尾、キングコブラの尻尾、からそれぞれ抽出されたものを使用した。なお、本実験で使用したプライマーの詳細については、8 章に別途記載している。

1. 以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	up to 50 μ L	(-)
• 10×PCR Buffer for KOD -Plus-	5 μ L	(1×)
• 2 mM dNTPs	5 μ L	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO ₄	3 μ L	(1.5 mM)
• センスプライマー (10 μ M)	1 μ L	
• アンチセンスプライマー (10 μ M)	1 μ L	
• ゲノム DNA (100 ng/ μ L)	1 μ L	
• KOD -Plus- DNA Polymerase	1 μ L	
<hr/>		
Total	50 μ L	

2. 以下のサイクル条件で、ゲノミック PCR を行なった。
Pre-denature 94°C、2 分間



3. 0.5×TBE バッファーを用いて、1%アガロースゲルを作製し、電気泳動を行い、ゲノム断片の増幅を確認した。

4-4. TOPO クローニング

本研究では、Thermo Fisher SCIENTIFIC 社から販売されている Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Cat. No. 450245) を用いた。

1. 以下の組成で試薬を氷上で混合した。

• Milli-Q	3 μL
• Salt Solution	1 μL
• PCR product	1 μL
• pCR®-Blunt II-TOPO® vector (10 ng/μL)	0.5 μL

Total 5.5 μL

2. よく混合し、室温で 5~30 分間インキュベートした。
3. 反応液は使用時まで 4°C で保存した。

4-5. 形質転換

1. *E.coli* DH5α Competent Cell (タカラバイオ、Cat. No. 9057) 20 μL に、3-4 で調製したライゲーション反応物 2 μL を添加した。
2. 氷中で 30 分間インキュベートした。
3. 42°C、45 秒間ヒートブロックでインキュベートした。
4. 氷中で 3 分間インキュベートした。
5. SOC 培地を 1 mL 添加し、37°C で 1 時間振盪培養した。
6. 20°C、7500 rpm で 5 分間遠心し、上澄み 900 μL を廃棄した。
7. LB/Kan/X-gal 寒天培地にプレーティングした。
8. 37°C で 12~14 時間培養した。

4-6. 大腸菌の植菌

1. カナマイシン (20 mg/mL) 4 μL と Milli-Q 水 6 μL を混合したカナマイシン溶液を必要量調製した。

2. 4 mL の LB 液体培地が入った試験管に、カナマイシン溶液を 10 μ L 添加した。
3. オートクレーブ滅菌済みの爪楊枝を用いて、LB/Kan/X-gal 寒天培地に生えたホワイトシングルコロニーをつついて、手順 2 の試験管に播種した。
4. 37°C で 12~14 時間振盪培養した。

4-7. アルカリ SDS 法

1. コロニーを培養した LB 液体培地を適量 1.5 mL エッペンチューブに分注した。
2. 20°C、9000 rpm で 1 分間遠心した。
3. 上澄みを廃棄し、Solution I 100 μ L を添加しボルテックスで混合した。
4. Solution II 200 μ L を添加し 4-5 回転倒混和を行なった。
5. 素早く Solution III 150 μ L を添加し転倒混和を行なった。
6. PCI 100 μ L を添加し転倒混和を行った後、ボルテックスを 5 分間行いしっかり混合した。
7. 20°C、15000 rpm で 5 分間遠心した。
8. 100%エタノール 800 μ L が入った 1.5 mL マイクロチューブに上清 400 μ L を添加し、転倒混和した。
9. 20°C、15000 rpm で 5 分間遠心した。
10. 上澄みを廃棄し、70%エタノールを 1 mL 添加後、リンス操作を行なった。
11. 上澄みを廃棄し、風乾を 5 分間行なった。
12. 1 mL の TE Buffer に RNase A (10 mg/mL) 1 μ L を添加し、風乾後のマイクロチューブに 50 μ L 添加した。
13. 37°C で 1 時間インキュベートした。
14. 20%PEG 30 μ L を添加し、ボルテックスを 5 分間行なった。
15. 4°C で 30 分以上インキュベートした。
16. 4°C、15000 rpm で 15 分間遠心後、上清を廃棄した。
17. 70%エタノール 180 μ L 添加し、リンスを行なった。
18. 20°C、15000 rpm で 5 分間遠心後、上清を廃棄した。
19. 風乾を 5 分間行なった。
20. TE Buffer を 20 μ L 添加し、プラスミド DNA を溶解した。
21. 使用時まで 4°C で保存した。

4-8. 制限酵素処理

1. 以下の試薬を氷上で混合し、制限酵素反応液を調製する。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。

• Milli-Q	7.75 μ L
• 10 \times H Buffer	1 μ L
• <i>EcoR</i> I	0.25 μ L
• プラスミド DNA	1 μ L

Total 10 μ L

2. 37°Cで 30 分以上インキュベートした。
3. 1%アガロースゲルを作製し、電気泳動を行なった。

4-9. 一次構造の決定

本研究では、シーケンス反応は Thermo Fisher SCIENTIFIC 社から販売されている BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Cat. No. 4337455) を用い、シーケンスアナライザーは Applied Biosystems 社より販売されている ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer を用いた。

4-9-1. シーケンス反応

1. 以下の試薬を氷上で 0.2 mL エッペンチューブに混合した。

• Milli-Q	5.5 μ L
• 5 \times sequence buffer	2 μ L
• Primer (1.6 μ M)	1 μ L
• BigDye Terminator v3.1 (Pre-Mix)	0.5 μ L
• プラスミド DNA	1 μ L

Total 10 μ L

2. 以下のサイクル条件で、サイクルシーケンス反応を行なった。

Pre-denature 96°C、2 分間

↓

Denature 96°C、10 秒間

Annealing 50°C、5 分間 \times 25 サイクル

Extension 60°C、4 分間

↓

Preservation 4°C、 ∞

4-9-2. シーケンス反応溶液の精製

1. 清潔な 1.5 mL エッペンチューブに 125 mM EDTA を 2.5 μ L を分注した。

2. 手順 1 のエッペンにシークエンス反応後溶液を全量 (10 μ L) 添加し、反応を停止させた。
3. 100%エタノールを 30 μ L 添加し、ボルテックスでよく混合した。
4. 室温で暗所にて、15 分間インキュベートした。
5. 20°C、15000 rpm で 20 分間遠心後、上清を廃棄した。
6. 70%エタノールを 100 μ L 添加し、リンスを行なった。
7. 20°C、15000 rpm で 3 分間遠心後、上清を廃棄した。
8. 風乾を 5 分間行なった。
9. Hi-Di Formamide を 20 μ L 添加後、ボルテックスでペレットを溶解した。
10. スピンドアウン後、96 穴プレートにサンプルを全量 (20 μ L) アプライした。

4-9-3. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer 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

1. パソコンの電源を入れ、Windows にログインし、完全に立ち上がるのを待った。
2. Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer 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った。
3. デスクトップにある 3130xl Data Collection v3.0 ソフトウェアを起動させる。
4. 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た。
5. オートサンプラーが完全に停止したら、Milli-Q、陰極バッファー、陽極バッファーの交換を行なった。
6. 96 穴プレートをプレートベースにのせ、乾燥したセプタストリップ、プレートリテナーを順番にのせ、プレートアセンブリを組み立てた。
7. オートサンプラーにプレートアセンブリをのせ、ポリマーの残量を確認後、扉を閉めた。
8. 3130xl Data Collection v3.0 ソフトウェアのナビゲーションポイントから Plate Manager を選択し、New Plate dialog の入力を行った。
9. 入力が完了すると Sequence Analysis Editor が起動するので、サンプル名、データ出力先、機械プロトコル、解析プロトコルを設定した。
10. 設定が完了すると、Plate Manager にプレートコードが登録される。
11. Run scheduler > Plate View > Find All と進み、登録したプレートコードを選択し、リンク先の Plate Position Indicator を選択すると、サンプルプレートとのリンクが完了する。

12. リンクが完了すると **Run View** のツールバー上に **Start** ボタンが表示されるので、クリックしてランを開始した。
13. 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た。
14. **Sequencing Analyzer 5.2** ソフトウェアを開き、ログインした。
15. **File > Add Samples** と進み、自身のサンプルを出力フォルダから選択した。
16. 表示された自身のサンプルを選択し、**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。
17. **File > Exit** と進み、全てのデータを保存後、**Sequencing Analyzer 5.2** ソフトウェアを終了させた。
18. **Run 3130xl Data Collection v3.0** ソフトウェアの **Service Console > Stop All** を選択し、システムを完全に停止させた。
19. **Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer** 本体の電源を落とし、パソコンの電源を落とした。
20. 波形データの解析及び修正は **Finch TV** ソフトウェアを用いて行なった。

4-10. ハブ組織からの RNA 抽出

4-10-1. 器具および試薬の DEPC 処理

1. RNA を扱う際に使用する器具・消耗品・試薬に 0.1%DEPC 含有水を丹念にふりかけた。（転倒混和などを行い、全面に DEPC 含有水が流れるようにする）
2. アルミホイルを巻き、オートクレーブ滅菌を行なった。（オートクレーブ滅菌後に、DEPC の臭いが残っていた場合、再度オートクレーブ滅菌を行う。）

4-10-2. Total RNA の単離

本研究では、ニッポンジーン社から販売されている **ISOGEN** (*Cat. No.* 315-02504) を用いた。

1. **RNase free** 処理を行なった乳鉢を液体窒素で満たし、乳棒を用いて奄美大島のホンハブの肝臓を粉末になるまですりつぶした。
2. 1.5 mL エッペンチューブに **ISOGEN** を 1 mL 分注し、粉末状にした肝臓を加えた。ボルテックスで混合し、室温で 5 分間放置した。
3. クロロホルムを 200 μ L 添加し、15 秒間激しく混合した。
4. 4°C、12500 rpm で 15 分遠心後、上清を別の 1.5 mL エッペンチューブへ移し、等量のイソプロパノールを添加後、室温で 10 分間放置した。

5. 4°C、12500 rpm で 10 分遠心後、上清を廃棄した。
6. 70 %エタノールを 1 mL 添加し、リンス操作を行なった。
7. 4°C、12500 rpm で 2 分遠心後、上清を廃棄した。
8. 風乾を 5 分行なった。
9. DEPC 処理水を 50 μ L 添加し、溶解した。
10. 60°C で 15 分間加熱し、-80°C で保存した。

4-10-3. Poly A⁺ RNA の単離

本研究では、タカラバイオ社から販売されている Nucleo Trap[®] mRNA Mini kit (Cat. No. 740655) を用いた。

1. Total RNA 溶液 (200 ~ 500 μ L) に等量の RM0 結合バッファーを添加した。
2. Total RNA 100 μ g に対し、15 μ L のオリゴ dT ビーズを加え、ボルテックスで混合した。
3. 68°C で 5 分間加熱し、2 分毎に転倒混和を行いながら室温で 10 分間放置した。
4. 5100 rpm、15 秒と 12000 rpm、2 分で遠心した後、上清を廃棄した。
5. RM2 バッファーを 600 μ L 添加し、ペレットを懸濁後、懸濁液を Nucleo Trap Microfilter に移した。
6. 5100 rpm、15 秒と 12000 rpm、2 分で遠心した後、Microfilter を新しいエッペンにセットした。
7. RM3 バッファーを 500 μ L 添加し、ピペッティングで注意深く懸濁した。
8. 5100 rpm、15 秒と 12000 rpm、2 分で遠心を行った
9. 素通り液を廃棄後、15000 rpm、1 分で遠心を行い、Microfilter を新しいエッペンにセットした。
10. RM3 バッファーを 500 μ L 添加し、ピペッティングで注意深く懸濁した。
11. 5100 rpm、15 秒で遠心後、12000 rpm、2 分で遠心を行った
12. 素通り液を廃棄後、15000 rpm、1 分で遠心を行い、Microfilter を新しいエッペンにセットした。
13. オリゴ dT ビーズ 10 μ L に対して、あらかじめ 68°C で温めておいた RNase-free H₂O を 20 μ L 添加加えた。
14. ピペッティングで懸濁後、68°C、7 分間インキュベーションを行なった。
15. 15000 rpm、1 分で遠心後、-70°C で保存した。

4-11. 1st strand cDNA の合成

本研究では、プロメガ社から販売されている Goscript™ Reverse Transcription System (Cat. No. A5000) を用いた。

1. mRNA を 500 ng 用意した。

↓以下の試薬を混合した。

mRNA 溶液 (0.5 ng/reaction)

Oligo(dT)₁₅ Primer (0.5 μL/reaction)

Nuclease-free Water

Total 5 μL . . . (A 溶液)

Nuclease-free Water

up to 15 μL (-)

Go Script™ 5×Reaction buffer

4.0 μL (1×)

25 mM MgCl₂

1.2 μL (1.5 mM)

PCR Nucleotide Mix

1.0 μL (0.5 mM)

RNase 阻害剤 (40 u/μL)

0.5 μL (20 U/reaction)

Go Script™ Reverse Transcriptase

1.0 μL

Total 15 μL . . . (B 溶液)

2. A 溶液を 70°C で 5 分間インキュベートした。

3. 氷上で 5 分間インキュベートした。

4. B 溶液を A 溶液に添加する。

5. 25°C で 5 分間インキュベートした。 (anneal)

6. 42°C で 1 時間インキュベートした。 (extend)

7. 70°C で 15 分間インキュベートし、逆転写酵素を失活させた。

4-12. 逆転写済み 1st strand cDNA の PCR

↓以下の組成で試薬を氷上で混合する。

• Milli-Q	up to 50 μL	(-)
• 10×PCR Buffer for KOD -Plus-	5 μL	(1×)
• 2 mM dNTPs	5 μL	(0.2 mM)
• 25 mM MgSO ₄	2 μL	(1.5 mM)
• センスプライマー (10 μM)	1.5 μL	(0.3 μM)
• アンチセンスプライマー (10 μM)	1.5 μL	(0.3 μM)
• 1st strand cDNA (10 倍希釈)	1 μL	
• KOD -Plus- DNA Polymerase	1 μL	

Total 50 μ L

↓以下のサイクル条件で、逆転写 PCR を行なった。

Predenature 94°C、2 分間

↓

Denature 98°C、10 秒間

Annealing X°C、30 秒間 × 22 サイクル

Extension 68°C、1 分/kbp

↓

Preservation 4°C、 ∞

↓0.5×TBE バッファーを用いて、1%アガロースゲルを作製し、PCR 産物を電気泳動した。

4-13. バイオインフォマティクス手法を用いたドライ解析

本研究では、プロセッサ 2.5 GHz デュアルコア Intel Core i7、メモリ 16 GB 2133 MHz LPDDR3、MacOS (ver. 10.12~11.3.1) 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。

3-13-1. Local BLAST 環境の構築

1. NCBI (National Center for Biotechnology Information) のダウンロードサイト (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/2.7.1/>) から Mac OSX 対応の `ncbi-blast-2.7.1+-x64-macosx.tar.gz` をダウンロードした。
2. ダウンロードファイルを~/Desktop 下に移し、解凍した。
3. デスクトップに BLAST ディレクトリを作成し、その中にデータベース用の配列を格納する DB ディレクトリ、クエリー配列を格納する query ディレクトリを作成した。
4. データベース化する配列、クエリー配列をそれぞれ FASTA 形式で用意し、DB ディレクトリ、query ディレクトリに、それぞれ格納した。
5. ターミナルを起動後、~/Desktop/BLAST/DB まで移動し、`makeblastdb` コマンド [`makeblastdb -in FASTA ファイル名 -dbtype nucl -hash_index -parse_seqids`] を実行し、データベースを作成した。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。FASTA ファイル名は、適宜変更する。
6. ~/Desktop/BLAST/DB 下で検索プログラム [`blastn -db XXXXXX -query ./query/YYYYYYY -outfmt "6 std qseq sseq qlen slen" > blastn.XXXXXX.YYYYYYY.outfmt6.txt`] 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、検索プログラム、データベース、クエリー配列、オプションは適宜変更する。

4-13-2. Local RepeatMasker 環境の構築

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 (GIRI) に申請を出し、反復配列データベースの配列データ (Repbase) を入手し、RepeatMasker 格納ディレクトリに移しておく。本研究では 2017 年版の Repbase を使用している。
3. 検索エンジンである RMBlast と Tandem Repeats Finder (trf) 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 格納ディレクトリに移動し、[./configure] と入力し、perl、RepeatMasker、trf、rmbblast の PATH を設定する。
5. /usr/local/RepeatMasker/repeatmasker_file 下にクエリー配列を FASTA 形式で保存し、/usr/local/RepeatMasker/repeatmasker_file 下で[./RepeatMasker -species vertebrates -xsmall FASTA 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、オプションは適宜変更する。

4-13-3. K_A/K_S (非同義置換と同義置換の相対比) の計算

ギャップの存在により、 K_A/K_S の計算結果が大きく異なってくる。これらギャップを取り除く代表的なソフトとして、PAL2NAL が挙げられる。最尤法に基づいて解析を行うソフトウェア : PAML を用いて K_A/K_S の計算を行う前には必ず PAL2NAL を用いてギャップを取り除いた。

本項では、PAL2NAL でギャップを取り除いた後に、PAML を用いて K_A/K_S の計算をおこなう方法について記述する。

1. PAL2NAL のサイトからプログラムファイルをダウンロードし、デスクトップで解凍作業を行った。同様に PAML のサイトから paml4.9i.tgz をダウンロードし、デスクトップで解凍作業を行った。今回は、それぞれ pal2nal.v14 ディレクトリ、paml4.9i ディレクトリが作成された。
2. K_A/K_S の計算を行いたいサンプルの i) アミノ酸配列のアライメント済みファイル (FASTA 形式)、ii) cDNA 配列 (FASTA 形式) を

~/Desktop/pal2nal.v14 下に保存する。なお、i) と ii) の間で配列の順番を一致させておく必要がある。

3. ~/Desktop/pal2nal.v14 下で、[./pal2nal.pl (アミノ酸配列のファイル名) (cDNA 配列のファイル名) -output paml -nogap > (任意の出力ファイル名)]と入力し、コマンドを実行した。
4. ~/Desktop/paml4.9i 下に解析ディレクトリ hoge を作成し、手順 3 で作成された output ファイルを格納した。
5. ~/Desktop/paml4.9i 下に存在する yn00.ctl ファイルをテキストエディタで開き、seqfile 行に解析するファイルの PATH、outfile 行の output ファイル名を変更後、上書き保存をした。
6. ~/Desktop/paml4.9i/hoge 下にて[./bin/yn00 ../yn00.ctl]と入力し K_A/K_S の計算を実行した。Nei-Gojobori 法によって計算された K_A 、 K_S 、 K_A/K_S の値を確認した。

4-14. ヘビドラフトゲノムデータの解析

4-14-1. SSP 遺伝子の命名法

SSP 遺伝子の命名法については特に定義が存在しないため、本論文中では下記の定義に沿って SSP 遺伝子の命名を行った。

1. どの生物由来かを明確にするために遺伝子名の前に 2 文字の生物表記 (例: Pf, *Protobothrops flavoviridis*) をつけることにした。それぞれのヘビの表記は次のように表記した。
Cv, Crotalus viridis; Da, Deinagkistrodon acutus; Oh, Ophiophagus hannah; Pb, Python bivittatus; Pm, Protobothrops mucrosquamatus; Ts, Thamnophis sirtalis; Vb, Vipera berus
2. 遺伝子 (DNA、RNA) 及びその予測転写産物はイタリック、タンパク質はローマンで表記した。
3. 偽遺伝子化していると考えられる場合は、遺伝子名に(ψ)をつけた。
4. 遺伝子名は、アライメント解析の結果、最も同一性のある PfSSP に由来するものとした。

4-14-2. 各ヘビのドラフトゲノムデータにおける SSP をコードする塩基配列の探索

1. Local BLAST 環境の構築 (3-13-2 項) を参考に各ヘビのデータベースを構築した。
2. 各データベースのディレクトリ下で[blastn -db XXXXXX -query ./query/YYYYYY -outfmt "6 std qseq sseq qlen slen" >

- blastn.XXXXXXX.YYYYYYY.outfmt6.txt]を実行し、*PfSSPs* の cDNA 配列をクエリー配列とした相同性検索を行った。
- 出力されるタブ区切りテキストをエクセルで確認し、類似性を示した配列が存在する scaffold または Contig を確認した。
 - [blastdbcmd -db データベース名 -entry '該当 scaffold/Contig No' -range XXXX-YYYY > output.txt]を実行し、候補配列を抽出する。その後、候補配列とクエリー配列の比較から 5'UTR、CoDing Sequence (CDS)、3'UTR を推定した。
 - 推定 CDS から予測されるアミノ酸配列をクエリー配列として Web BLASTp 検索を行った。この時、システイン残基の位置が保存されていることを確認した。
 - 予測アミノ酸配列が、i) 予期しない終始コドンを含む、ii) SSP と相同性がない、場合は clustalX を用いて転写産物の塩基配列同士のアライメント解析を行い、終始コドンあるいはフレームシフトを引き起こす挿入/欠失 (インデル、indel) を推定した。
 - 手順 6 で予測されたインデルを考慮してアミノ酸配列を予測し、手順 5 を行った。
 - 本論文で定義した命名法に従って命名した。

5. 結果と考察

5-1. *PfSSP* アレイの解読

ホンハブゲノム上の *PfSSP*s が存在する領域の塩基配列決定を行うために、共同研究している九州大学の柴田弘紀准教授等が構築した奄美ホンハブドラフトゲノム配列 (HabAm1, Shibata et al., 2018) の解析を行なった (Table 2)。その結果、ホンハブ scaffold 2858 上に、*PfSSP-4*、*PfSSP-5*、*PfSSP-1*、*PfSSP-2* がこの順で並んで遺伝子アレイを形成していることを確認した。さらに、詳細な解析を行なった結果、*PfSSP-2* の 5' 上流に *PfSSP-3* が存在することも見出した。この scaffold 2858 の塩基配列を参考にプライマーを作製し、ホンハブ肝臓ゲノムを鋳型にしたゲノミック PCR を行った。その結果増幅できた PCR 断片をクローニングし、塩基配列決定を行った。決定した塩基配列をオーバーラップさせることで最終的に 30,534 bp の塩基配列を解読した。決定したゲノム配列中では、*PfSSP-4*、*PfSSP-5*、*PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-3* がこの順で並んで遺伝子アレイを形成していた (Fig. 9) (Takeuchi, 2017; Maeda, 2018)。

5-2. 新規 SSP、*PfSSP-6* をコードする遺伝子の同定

HabAm1 に対して行なった BLASTn、tBLASTx 解析から、scaffold 2858 上の *PfSSP* アレイの 5' 上流に *PfSSP-5* と類似性を示す約 3.7 kbp の塩基配列が見つかった (Fig. 10)。*PfSSP-5* の遺伝子構造を参考に予測したエクソンから推定されるアミノ酸配列は、C 末端領域のアミノ酸がよく似ていたのに対して、N 末端領域のアミノ酸配列は既知の 5 つの *PfSSP*s のアミノ酸配列と異なっていた (Fig. 11)。しかし、PSP94 ファミリータンパク質間で保存されている 10 個のシステイン残基の位置は保存されていた。これより、この推定アミノ酸配列は新奇の *PfSSP* であると考えられた。この新奇の *PfSSP* をコードする塩基配列の一次構造を決定するために、HabAm1 の scaffold 2858 の塩基配列を参考にしてプライマーを作製しゲノミック PCR を行なった。その結果、この遺伝子の推定第 1 エクソンの 5' 端から推定第 3 エクソンの 3' 端までを含んだ 1,453 bp のゲノム断片 (PCR fragment 1) と推定第 3 エクソンの 5' 端から推定第 4 エクソンの 85 bp 下流までを含んだもう 1 つの 2,363 bp のゲノム断片 (PCR fragment 2) が得られた (Fig. 12)。これら 2 つのゲノム断片の塩基配列を決定し、オーバーラップさせた結果、最終的に 3,642 bp の塩基配列が解読できた。*PfSSP*s の構造との比較から、このゲノム断片の正確なエクソン-イントロン境界を決定し、既知の *PfSSP*s 同様に 4 つのエクソンと 3 つのイントロンから構成され、19 残基のシグナルペプチドを含む 111 アミノ酸配列をコードしていることを明らかにした。この遺伝子にコードされた成熟タンパク質の推定アミノ酸配列は、他の

5つの *PfSSP*s と 33%~61%同一性を示し、*PfSSP*s 中に保存されている 10 個のシステイン残基の位置も保存されていたため (Fig. 11)、この推定アミノ酸配列を *PfSSP-6*、コードする塩基配列を *PfSSP-6*、と名付けた。さらに、scaffold 2858 の塩基配列を参照してプライマーを作製し *PfSSP-6* から *PfSSP-4* までの遺伝子間領域 (Intergenic region, I-Reg) を増幅するゲノミック PCR を行い、12,406 bp の塩基配列を決定した (Fig. 12)。

PfI-Reg64 の詳細な BLAST 解析を行った結果、*PfI-Reg64* 中に、*PfSSP* の exon 1、exon 2、exon 3 と類似性を示す塩基配列 (exon like と呼ぶ) をこの順で含んだ断片が、2 つタンデムに並んで存在していた (Fig. 13-A)。各 fragment に含まれた exon-like な塩基配列から予測されたアミノ酸配列は、*PfSSP-6* と 40%、47%の同一性を示した。しかし、1) CDS4 と類似の配列が見出されなかったこと (Fig. 13-A)、2) PSP94 ファミリータンパク質間で保存されているシステイン残基が保存されていなかったこと (Fig. 13-B, C) から *PfI-Reg64* に存在した各断片は、*PfSSP* が偽遺伝子化したものだと考えられ、それぞれ *PfSSP-7*(ψ)、*PfSSP-8*(ψ)と名付けた。

以上の結果から、*PfSSP*s は 1 つの染色体上で、*PfSSP-6*、*PfSSP-7*(ψ)、*PfSSP-8*(ψ)、*PfSSP-4*、*PfSSP-5*、*PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-3*、の順に並んで 46,361 bp の遺伝子アレイを形成していることが明らかになった。また、ナンセンス変異も含まれず欠損もおきていない活性型と考えられる 6 つの *PfSSP* は 4 つのエクソンと 3 つのイントロンから構成される共通の遺伝子構造を有していたが、それぞれの *PfSSP* の長さは、*PfSSP-6* : 3,642 bp、*PfSSP-4* : 3,733 bp、*PfSSP-5* : 4,198 bp、*PfSSP-1* : 2,796 bp、*PfSSP-2* : 3,619 bp、*PfSSP-3* : 3,513 bp、と異なっていた。

5-3. ホンハブ SSP アレイとキングコブラ SSP アレイの比較解析結果

*PfSSP*s のオルソログを含むゲノム断片の塩基配列を抽出するために、キングコブラ (*Oh*) のドラフトゲノムデータ (Vonk et al., 2013) を解析した (Table 2)。その結果、*Oh*scaffold 4527 上に *OhSSP-4* と名付けた *PfSSP-4* のオルソログ、*OhSSP-5 α* 、*OhSSP-5 β* 、*OhSSP-5 γ* と名付けた *PfSSP-5* のホモログ、がこの順で並んで存在していることを見出した (Fig. 14)。しかし、*Oh*scaffold 4527 には“N”でアノテーションされた多数の未決定領域が含まれており、*OhSSP-5 α* の第 4 エクソン、*OhSSP-5 β* の第 3 エクソンを推定することができなかった。また、*OhSSP-6* は、第 2 エクソンが *Oh*scaffold 10541、*OhSSP-6* の第 3、第 4 エクソンが *Oh*scaffold 12359、に分かれて存在していた。そこで、まず、*OhSSP-6*、*OhSSP-5 α* 、*OhSSP-5 γ* 、が遺伝子として存在しているかを確認するために、キングコブラのドラフトゲノムデータを参考にプライマーを作製し、各遺伝子

の単離・解読を試みた。その結果、SSP-6 をコードする *OhSSP-6* と SSP-5 をコードする *OhSSP-5 α* 、*OhSSP-5 β* 、*OhSSP-5 γ* 、の塩基配列の決定に成功した。また、SSP-4 をコードする遺伝子の第3エクソンには、ナンセンス変異を引き起こす98塩基の挿入が含まれていたため、*OhSSP-4(ψ)*と命名した。

本研究で明らかになったホンハブ SSP アレイとキングコブラ SSP アレイを比較したところ、キングコブラの SSP の転写の向きは全て同じ、ホンハブでは *PfSSP-6*、*PfSSP-4*、*PfSSP-5* と *PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-3* の転写転写の向きが逆になっていた (Fig. 15)。

そこで、転写の向きが逆になっている *PfSSP-5* と *PfSSP-1* の遺伝子間領域：*PfI-Reg51* の解析を行なった。その結果、*PfI-Reg51* には、断片化されたもう1つの *PfSSP-1* をコードする塩基配列が見つかった (Fig. 15-A)。*PfSSP-1(ψ)*と名付けたこの塩基配列は48 bp の第3イントロンと75 bp の3'非翻訳領域を含む第4エクソンから構成された233 bp であった (Fig. 16)。次に、RepeatMasker 用いた反復配列検索によって、*PfI-Reg51* 中に、L2、R4、Gypsy LINE 由来の3タイプの断片が挿入されていることを見出し、これらが L2 断片-R4 断片-*PfSSP-1 δ (ψ)*- Gypsy LINE の順で並んで存在していることが明らかになった

(Fig. 17-B)。2つの DNA トランスポゾン断片、hAT (Warren et al., 1994)、Mariner (Robertson, 1993) ともう1つの Gypsy LINE 断片は *PfSSP-5* と L2 断片-R4 断片-*PfSSP-1 δ (ψ)* 整列の間の領域に挿入されていた (Fig. 17-B)。両方の DNA トランスポゾンは、二本鎖切断を介して遺伝子変換を引き起こすことが知られている (Vos et al., 1996; Zhou et al., 2004)。さらに、ステムループ構造を形成すると予測された30塩基が L2 断片-R4 断片-*PfSSP-1 δ (ψ)* 整列のすぐ隣に見つかった (Fig. 17-C)。ステムループ構造は、遺伝子変換の足場になることが知られている (Lemoine et al., 2005; Loszul et al., 2009)。つまり、*PfSSP-1 δ (ψ)*は *PfSSP-1* の重複によって生まれた *PfSSP-1* のパラログであった塩基配列が *PfI-Reg51* に挿入された後、その周辺領域に5回の LINE と2回の DNA トランスポゾンの挿入によって破壊された *PfSSP-1* のパラログの成れの果てだと考えられる。

さらに、ホンハブとキングコブラの SSP アレイの塩基配列の比較から2組の特有な塩基配列が見つかった (Fig. 18)。1組は *PfSSP-1* の3'下流の140塩基と *OhSSP-5 γ* の3'下流の140塩基、もう1組は *PfSSP-2* の5'上流の937塩基と *OhSSP-5 β* の5'上流の961塩基、であった。前者の組の塩基配列を“ α ”と後者を“ β ”と名づけた。 α と β のそれぞれの塩基配列間の同一性は、それぞれ69%、65%だった (Fig. 19) が、 α 組間、 β 組間の塩基配列の向きは逆向きだった

(Fig. 18-A, B)。この知見は、ホンハブゲノム上で α 配列から β 配列までの領域が逆位したことを示唆している。

RepeatMasker による解析では、爬虫類ゲノムにおいて最も主要な LINE である CR1 (Chicken repeat 1) LINE の 7 つの断片が *Pfl-Reg84*、*Pfl-Reg51* を除く全ての *Pfl-Reg* の中に見出された (Fig. 18-B)。*Pfl-Reg67* に挿入された CR1 断片: CR1_67、CR1_78、CR1_45 は、それぞれ *Pfl-Reg78*、*Pfl-Reg45* に、CR1_45、CR1_12_i と CR1_12_ii または CR1_23_i と CR1_23_ii は、それぞれ *Pfl-Reg12* または *Pfl-Reg23* の中間点にこの順で挿入された CR1 断片である (Fig. 18-B)。CR1 は ORF1 と ORF2 の 2 つの ORF から構成されている (Haas et al., 1997)。ORF1 は RNA 結合タンパク質をコードし、ORF2 はエンドヌクレアーゼ (Endonuclease, EN) と RT (Reverse transcriptase) ドメインから構成される two-domain タンパク質をコードする。CR1 の RT ドメインは、10 個のサブドメインと CR1 LINE の逆転写の足場になることが知られている carboxy-terminal conserved region (CTCR) から構成される (Malik et al., 1999; Drew et al., 1997; Kajikawa et al., 2005)。CR1_67、CR1_78、CR1_45、CR1_12_ii 断片は、RT ドメインの IV から CTCR、VIII から CTCT、III から VI、IV から VII、をそれぞれコードしていた。一方、CR1_12_i、CR1_23_i、CR1_23_ii 断片はそれぞれ RT ドメインの CTCR だけをコードしていた。興味深いことに、CR1_12_i、CR1_12_ii、CR1_23_i の転写の向きは、CR1_45 と CR1_23_ii の転写の向きとは逆向きだった (Fig. 18-B)。すなわち、CR1_23_i を含む β 配列から *PfSSP-1* の 3'末端の α 配列までを含んでいるゲノム断片の逆位が生じたことを示唆している。もし、逆位が生じていなければ、CR1_78 を除く 6 つ全ての CR1 断片の転写の向きは同じになり、そして、6 つの CR1 断片は *PfSSP-3* を除く全ての活性型 *PfSSPs* の 3'下流に位置したと考えられる (Fig. 18-C)。池田ら (2010) は、ホンハブ毒 PLA₂ をコードする遺伝子が、PLA₂ gene-coupled RT fragment (PcRTF) と名づけられた CR1 LINE の断片と遺伝子の 3'下流で接続されていることを見出している (Fig. 4)。このように、CR1 LINE はホンハブゲノムにおいて遺伝子の増幅に関与していると考えられる。

5-4. ホンハブ SSP 遺伝子の構造比較解析結果

反復配列検索ソフトの RepeatMasker を用いて *PfSSPs* 中に含まれる反復配列の検索を行った (Fig. 20)。その結果、*PfSSPs* の第 1 イントロンと第 3 イントロンに 6 つの *PfSSP* に共通する反復配列を見出した。L1 と CR1 LINE 由来の断片は 6 つ全ての *PfSSP* の第 1 イントロンの同じ箇所に、Gypsy-i と Gypsy-ii と名付けた 2 つの Gypsy 由来の断片は、6 つ全ての *PfSSP* の第 3 イントロンの 3'末端の同じ場所に、それぞれ挿入されていた。Mariner-ii と名付けたトランスポゾン Mariner 由来の塩基配列は *PfSSP-1* を除く 5 つの *PfSSP* の第 3 イントロンの中間の位置の同じ場所に挿入されていた。これら 6 つの挿入された断片の塩基

配列の同一性は、非常に高く、*PfSSPs* の祖先遺伝子の増幅の前に挿入されたと考えられる。

一方、*PfSSPs* の第 2 または第 3 イントロンに挿入された断片の種類は、大きく異なっていた。*PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-5*、*PfSSP-6* の 4 つの *PfSSP* には、第 3 イントロンに L2 LINE (Kajikawa et al., 2005; Kajikawa et al., 1997) にコードされる逆転写酵素の一部をコードする断片が挿入されていた。L2 LINE は、RNA 結合タンパク質をコードする ORF1 とエンドヌクレアーゼと RT ドメインから構成される 2 ドメインタンパク質をコードする ORF2 から構成される。L2 LINE の RT ドメインは zero から IX まで番号をつけられた 10 個のサブドメインと L2 LINE の逆転写の際に足場として寄与すると考えられている carboxy-terminal conserved region (CTCR) から構成される (Fig. 21-A) (Haas et al., 1997)。*PfSSP-1* に挿入された 320 bp の断片は RT ドメインの 0 から II までの 3 つのサブドメインを、*PfSSP-2* に挿入されていた 431 bp の断片は RT ドメインの 0 から III までの 4 つのサブドメインを、また *PfSSP-5* に挿入されていた 1,011 bp の断片は RT ドメインの 0 から VIII までの 9 つのサブドメインを、さらに *PfSSP-6* に挿入されていた 1,240bp の断片は RT ドメインの III から IX の 7 個のサブドメインと CTCR を、それぞれコードしていた。L2 LINE は一般的に 5' 末端領域側から欠損し、不活性化することが知られている (Kajikawa et al., 1997)。*PfSSP-6* の第 3 イントロン中の L2 LINE の断片は、一般的な LINE と同様に 5' 末端側から切り詰められていたが、*PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-5* に挿入された L2 LINE の断片は 3' 末端から欠損していた (Fig. 21-B)。

これら 4 つの *PfSSP* は、完全長のタンパク質をコードしているため (Fig. 11)、このサブグループを Long SSP サブグループと名づけた。また、L2 LINE の断片の欠損の様子から、*PfSSP-6* を Long SSP サブグループ I、*PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-5* を Long SSP サブグループ II、と分類した。

PfSSP-6 の第 3 エクソンの 3' 末端側から *PfSSP-6* 中の挿入された L2 LINE 断片の 5' 末端までの塩基配列は L2 LINE の 5' truncation に伴って消失したと考えられる。半定量 RT-PCR を用いたボディーマップ解析の結果は興味深く、*PfSSP-6* が肝臓よりも胃で強く発現していることを明らかにした (data not shown)。即ち、*PfSSP-6* の産物は血液中よりも胃での重要な役割を有していると推測される。

一方、*PfSSP-5* に最も長い L2 LINE 断片が挿入されていることから、*PfSSP-5* が Long SSP サブグループ I で最初に獲得された SSP 遺伝子だったと考えられる。その後、*PfSSP-5* を鋳型に *PfSSP-2*、*PfSSP-2* を鋳型に *PfSSP-1* の順で重複が起き、そのたびに挿入された L2 断片が切り詰められたと考えられる。これは推測になるが、*PfSSP-2* と *PfSSP-5* の第 3 イントロン の L2 断片と Mariner-ii

の間に存在する塩基配列は、元々ゲノムの異なる場所に存在していた L2 LINE がこの場所にレトロトランスポジションした際に、L2 LINE に巻き込まれてレトロトランスポジションしてしまった *PfSSP* とは無関係な塩基配列だと考えられた。*PfSSP-1* におけるこの配列は Mariner-ii のレトロトランスポジションと共に消失したと考えられる。

PfSSP-3 と *PfSSP-4* の第 2 イントロンの同じ場所に Mariner-i と名付けた断片が、第 3 イントロンの Mariner-ii と Gypsy-i の間の同じ場所に hAT 由来の断片と Mariner-iii と名付けた Mariner の断片が、それぞれこの順に並んで挿入されていた。これらに加えて、*PfSSP-3* に 32 回の (TAAA) の、*PfSSP-4* に 36 回の (TAAA) と 42 回の (AATAA) の、特徴的な反復配列が第 2 イントロンの同じ場所で見つかった (Fig. 20)。*PfSSP-3* と *PfSSP-4* は切り詰められたタンパク質をコードしているため (Fig. 11)、このグループを Short SSP サブグループと名づけた。第 1 イントロンの L1 と CR1 の断片、第 2 イントロンの Mariner-i、第 3 イントロンの Mariner-ii、hAT、Mariner-iii、Gypsy-i と Gypsy-ii、8 つの挿入断片に関しては挿入位置と塩基配列がほぼ同じだった。すなわち、これらの挿入は、*PfSSP-3* と *PfSSP-4* の分岐以前に起きており、2 つの遺伝子が分岐して以来あまり時間が経っていないことを示唆していると考えられる。

以上の構造的な特徴から、6 つの SSP 遺伝子は、i) イントロン 2 に反復配列と Mariner-i を有する *PfSSP-3* と *PfSSP-4*、ii) 同じ箇所に 3'側から欠損した L2 LINE を有する *PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-5* のグループ、iii) 別過程で 5'側から欠損した L2 LINE が挿入された *PfSSP-6*、の 3 つのグループに分けられた。

5-5. ホンハブ SSP 遺伝子の数理解析結果

ホンハブ SSP 遺伝子が経験してきた進化過程を推定するために 2 つの遺伝子間で相互に比較して突然変異を算出する数理解析を行なった (Tables 3, 4)。その結果、Long SSP サブグループ I の *PfSSP-1* と *PfSSP-2* の ORF 間の非同義置換と同義置換の相対的な比 (K_A/K_S) は 1.80、*PfSSP-1* と *PfSSP-2* のイントロン間のヌクレオチドの置換率である K_N の値は 0.0649 を示した。これは、*PfSSP-1* と *PfSSP-2* の多様化が加速度的に生じていたこと、*PfSSP-1* と *PfSSP-2* の分岐後に経過した時間が非常に短いことを示唆している。一方で、*PfSSP-1* と *PfSSP-5* または *PfSSP-2* と *PfSSP-5* の K_A/K_S は、0.625 または 0.646 であり (Table 3)、そして *PfSSP-1* と *PfSSP-5* または *PfSSP-2* と *PfSSP-5* のイントロン間の K_N の値はそれぞれ 0.328、0.312 だった (Table 4)。これらの結果から、1) *PfSSP-1* と *PfSSP-5* または *PfSSP-2* と *PfSSP-5* は分岐してから長い時間が経過し、それぞれの分岐は中立的な進化過程を経たこと、2) *PfSSP-1* と *PfSSP-2* は分岐してから短い時間で加速度的に多様化したこと、が示唆された。

一方、Short SSP サブグループにおいて、LINE と DNA トランスポゾンの断片を含む *PfSSP-3* と *PfSSP-4* の塩基配列は第 2 イントロンに含まれる反復する塩基配列の反復の数を除いてほぼ同じであった。反復配列は 2 種類あり、1 つは (TAAAA) の繰り返しで、*PfSSP-3* では 32 回、*PfSSP-4* では 36 回繰り返していた。もう 1 つは、(TAAAA) 配列ですぐ隣にある (AATAA) 配列で、*PfSSP-4* だけで 42 回繰り返していた。反復配列を考慮しないと、*PfSSP-3* と *PfSSP-4* 間の K_A/K_S と K_N は、それぞれ 1.54 と 0.0488 だった (Tables 3, 4)。これらの結果から *PfSSP-3* と *PfSSP-4* がごく最近分岐し、しかも加速度的に分化していることが示唆された。

5-6. 種々のヘビドラフトゲノムデータの解析結果

ホンハブ (*Pf*)、キングコブラ (*Oh*) に加えて、ビルマニシキヘビ (*Pb*) (ニシキヘビ科、無毒) (Castoe et al., 2013)、ガーターヘビ (*Ts*) (ナミヘビ科、無毒) (Warren et al., 2015)、ヨーロッパクサリヘビ (*Vb*) (クサリヘビ科、有毒) (Liu et al., 2014)、セイブガラガラヘビ (*Cv*) (クサリヘビ科、有毒) (Pasquesi et al., 2018)、ヒヤッポダ (*Da*) (クサリヘビ科、有毒) (Yin et al., 2016)、タイワンハブ (*Pm*) (クサリヘビ科、有毒) (Aird et al., 2017)、の 6 種類のヘビのドラフトゲノムデータ (Table 2) の BLASTn と tBLASTx 解析を行い、SSP のオルソログ関係と染色体上の構成を明らかにした。

無毒ヘビのビルマニシキヘビ (*Pb*) のゲノムには、*PbSSP-6* と名付けた *PfSSP-6* のオルソログ、*PbSSP-5 α* 、*PbSSP-5 β* 、*PbSSP-5 γ (ψ)* と名付けた *PfSSP-5* の 3 つのホモログが含まれていた (Fig. 22)。北アメリカに棲息するナミヘビ科、ガーターヘビ (*Ts*) のゲノムには、*TsSSP-6*、*TsSSP-4* と名付けた *PfSSP-6*、*PfSSP-4* のオルソログ、*TsSSP-5 α* そして *TsSSP-5 β* と名づけた *PfSSP-5* の 2 つのホモログが含まれていた (Fig. 23)。

本研究で、4 つのホモログを新たに以下のように命名した。推定アミノ酸配列に基づいた詳細な解析の結果、元のデータベース中で *PbSSP-2*、*TsSSP-2* と注釈づけられていた塩基配列は *PbSSP-5 α* 、*TsSSP-5 α* のパラログだと考えられたため *PbSSP-5 β* 、*TsSSP-5 β* と新たに命名した。さらに、本研究でビルマニシキヘビのゲノムから *PfSSP-5* のホモログをコードする塩基配列が新たに見つかったが、第 2 エクソンと第 3 エクソンに 34 塩基、7 塩基の indel

(insertion/deletion) が見つかった。このインデルはフレームシフトを引き起こし不完全な SSP を生み出すと考えられたため、この塩基配列を *PbSSP-5 γ (ψ)* と名付けた。また、*PbSSP-5 α* 、*PbSSP-5 β* 、*PbSSP-5 γ (ψ)* 間、*TsSSP-5 α* 、*TsSSP-5 β* 間、はパラログの関係と考えられたため、元のデータベース中で元々 *PbSSP-*

5、*TsSSP-5* と注釈づけられていた塩基配列を *PbSSP-5α*、*TsSSP5α* とそれぞれ新たに命名した。さらに、この研究でガーターヘビのゲノムから新たに見つかった *PfSSP-4* のオルソログをコードしていた塩基配列は *TsSSP-4* と名付けた。神経毒コブラ科ヘビ、キングコブラ (*Oh*) のゲノムには、*OhSSP-6*、*OhSSP-4* と名付けた *PfSSP-6* と *PfSSP-4* のオルソログと *OhSSP-5α*、*OhSSP-5β*、*OhSSP-5γ* と名付けた *PfSSP-5* の3つのホモログが含まれていた (Fig. 14)。

ヨーロッパクサリヘビ (*Vb*) のゲノムには、*VbSSP-6* と *VbSSP-4* と名付けた *PfSSP-6* と *PfSSP-4* のオルソログが scaffold 2247 上に含まれていた。しかし、*VbSSP-4* の第2、第4エクソンの塩基配列はゲノムデータ中で未決定のままである。さらに、*VbSSP-5* と名付けた *PfSSP-5* のオルソログは別の *Vbscaffold* 15,659 上で見つかった (Fig. 24)。セイブガラガラヘビ (*Cv*) のゲノムには、*CvSSP-6*、*CvSSP-4*、*CvSSP-5* と名付けた *PfSSP-6*、*PfSSP-4*、*PfSSP-5* のオルソログがこの順で並んで9番染色体上に存在していた (Fig. 25)。

ヒャップダ (*Da*) のゲノムには、*DaSSP-6*、*DaSSP-4*、*DaSSP-1*、*DaSSP-2*、*DaSSP-3* と名付けた *PfSSP-6*、*PfSSP-4*、*PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-3* のオルソログが *Dascaffold* 405 上に並んで存在していた (Fig. 26)。また、*PfSSP-5* のオルソログとなる *DaSSP-5* は、第1エクソンの塩基配列だけが、*DaSSP-4* と *DaSSP-1* の間の遺伝子間領域に存在していた。そのため、この断片化された *DaSSP-5* を *DaSSP-5δ(ψ)* と名付けた。タイワンハブ (*Pm*) のゲノムには *PmSSP-6* と名付けた *PfSSP-6* のオルソログが *Pmscaffold* 50 上に、*PmSSP-5*、*PmSSP-1*、*PmSSP-2*、*PmSSP-3* と名付けた *PfSSP-5*、*PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-3* のオルソログが *Pmscaffold* 462 上に、*PmSSP-4* と名付けた *PfSSP-4* のオルソログが *Pmscaffold* 21,362 上に、それぞれ見つかった (Fig. 27)。

PfSSP-6、*PfSSP-5* のオルソログは、無毒、有毒に関わらず全てのヘビのゲノムで保存されていた (Fig. 28)。私は、5.4節で L2 LINE の欠損の様子から *SSP-5* が Long SSP サブグループ II の中で最初に獲得された遺伝子であったことを示した。さらに、本項の結果から、ヘビゲノムにおける SSP 遺伝子の最初のレパートリーが、Long SSP サブグループ I においては *SSP-6*、Long SSP サブグループ II においては *SSP-5*、をコードする2つの遺伝子にならなければならないこと、そして、有毒ヘビのゲノムで偶発的な咬傷において毒を中和する機能を有していた可能性がある *SSP-4* をコードする遺伝子が特異的に獲得されたことを明らかにした。

5-7. ヘビ SSP 遺伝子の数理解析結果

各ヘビの SSP パラログをコードする遺伝子の数理解析を行なった。各 SSP パラログ間で、ORF 間の非同義置換と同義置換の相対的な比である K_A/K_S 、イン

トロン間のヌクレオチドの置換率である K_N を計算した (Tables 3~15)。しかし、エクソンまたはイントロンの完全長塩基配列が未決定のままの遺伝子、*DaSSP-5 δ* (ψ)、*PbSSP-5 γ* 、*VbSSP-4*、についての K_A/K_S 、*PbSSPs*、*TsSSPs*、*VbSSPs* についての K_N は計算していない。

前節で、私は、毒ヘビのゲノム中での初期の SSP のレパートリーが、SSP-6、SSP-5、SSP-4 によって構成されていたことを提案した。また、数理解析の結果から、これら3つのホモログの特徴が異なることが明らかになった。いくつかのヘビにおいて、SSP-6 と SSP-5 の ORF の間で推定された K_A/K_S は最も小さいか、あるいは他のパラログの間で推定された K_A/K_S よりも顕著に小さかった。一方、SSP-6 と SSP-4 の間、SSP-5 と SSP-4 の間で推定された K_A/K_S は1に近かった。これらの結果から、最も早く獲得されたと考えられる SSP-6 と SSP-5 に関して、SSP-6 が胃で強く発現していること、SSP-5 は肝臓（血液）で発現しているが毒タンパク質との親和性が低いとされることから、SSP-6 は消化、SSP-5 は血液恒常性、のような恒常的な機能または必須な機能を持ち、元々毒タンパク質を中和することとは無関係であると考えられる。それ故に、SSP-6 と SSP-5 の塩基配列は保存されており、一方で、有毒なヘビのゲノムで獲得された SSP-4 は、偶発的な咬傷時における毒中和のような特別な役割を持つ最初の SSP をコードしているのかもしれない。それ故に、SSP-4 は SSP-5 や SSP-6 よりもより多様化し得る可能性がある。

PfSSP-1 と *PfSSP-2*、*PfSSP-3* と *PfSSP-4*、*DaSSP-1* と *DaSSP-2*、*DaSSP-3* と *DaSSP-4*、*PmSSP-1* と *PmSSP-2*、*PmSSP-3* と *PmSSP-4*、間で推定された K_A/K_S はそれぞれ、1.80、1.40、1.61、1.77、1.49、1.35、を示した (Tables 3、7、11)。そして、 K_N の割合は、それぞれ 0.0317、0.0283、0.0227、0.005、0.154、0.0397 を示した (Tables 4、8、12)。この結果は、これらの遺伝子、特に SSP-1、SSP-2、SSP-3 のような後出の遺伝子の分岐が加速度的な様式で生じたこと、これらの分岐後の経過した時間がかなり短いこと、を示唆している。

さらに、ハブポダ (*Da*)、タイワンハブ (*Pm*)、ホンハブ (*Pf*) の SSP-1 と SSP-5 または SSP-2 と SSP-5 の間で推定された K_A/K_S は 0.7 程度だった。この結果は、上で示唆したように、SSP-1 あるいは SSP-2 と SSP-5 が進化的に関連していたという考え方も支持するものである。つまり、SSP-1 や SSP-2 は SSP-5 から最近派生し、その後、毒タンパク質に適応するために加速度的に多様化したのであろう。また、SSP-4 の後継として獲得された切り詰められた SSP-3 は、SSP-5 に対する SSP-1 や SSP-2 のように、SSP-4 よりも毒タンパク質との親和性が高いと考えられる。実際に、SSP-3 と SSP-4 の間で推定される K_A/K_S もかなり高い値を示す。ハブ毒タンパク質が SSP-1 (Shioi et al., 2013)、SSP-2 (Aoki et al., 2008; Chijiwa et al., 2013) あるいは SSP-3 (Shioi et al., 2015)

と結合するという多数の報告や、後出の SSP が血清中に含まれる SSP の大部分を占めるという知見からも、上記の仮説が支持される。

5-8. ヒト *PSP94* のヘビオルソログ：ヘビ *PSP94* の探索

私は、5-6 節で、最初に獲得された SSP が SSP-6 と SSP-5 であることを提案した。しかし、どちらが祖先型であるかを推定することはできなかった。また、本研究で同定した偽遺伝子を含めた 9 つの *PfSSP* 以外を検出することも出来なかった。そこで私は、生物普遍的に保存されている *PSP94* が SSP の起源なのではないかと考え、これまで爬虫類では報告されていなかった *PSP94* をコードする遺伝子がハブゲノムをはじめとしたヘビゲノムに含まれているのかを確認した。その結果、*PfSSP* アレイが存在する scaffold 2858 とは異なる scaffold 11899 上にニワトリの *PSP94* と 59%の同一性を示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を見出した。また、ガーターヘビ、キングコブラ、ヨーロッパクサリヘビ、セイブガラガラヘビ、ヒャップダ、タイワンハブのゲノムにも類似のアミノ酸配列をコードする塩基配列が存在しており、これらの塩基配列を *PfPSP94*、*TsPSP94*、*OhPSP94*、*VbPSP94*、*CvPSP94*、*DaPSP94*、*PmPSP94*、と名付けた (Fig. 29)。また、同じ爬虫類であるコモチカナヘビのゲノム中にも *PSP94* が存在することを確認した。

Frankenberg らは、有袋類における新奇の排卵後皮膜成分であり、*PSP94* ファミリータンパク質に属する USM (uterinesecreted microprotein) を同定し、USM を含む *PSP94* ファミリータンパク質の進化について報告している (Frankenberg et al., 2011)。彼らは、*PSP94* 周辺には *ARID5B*、*FAM21C* が、*USM* 周辺には *ARID5A* (*ARID5B* のパラログ) が存在し、その他にもパラログ対が存在することを報告している。つまり、*ARID5A* と *ARID5B* のパラログ対を生み出した重複イベントの際に、*PSP94* と *USM* のパラログ対が生まれたことを示唆している。さらに、このシンテニー関係は魚類まで保存されているため、*PSP94* と *USM* のパラログ対が生まれた重複イベントは魚類の分岐以前に生じたと推測できる (Frankenberg et al., 2011)。

そこで、再度ホンハブゲノムを確認したところ、*PfPSP94* の周辺には、*FAM21C*、*PfSSP-6* の 5'上流には *ARID5A*、がそれぞれ存在していた (Fig. 30)。ホンハブゲノムでは、*PfPSP94* と同じ染色体上に *ARID5B* を確認することが出来なかったが、同じ爬虫類であるコモチカナヘビのゲノムでは、*PSP94* と同じ染色体上に *ARID5B* と *FAM21C* を、*SSP* と同じ染色体上に *ARID5A* を確認することができた。つまり、爬虫類における *SSPs* は、脊椎動物の共通祖先のゲノムにおいて *PSP94* を含むゲノム領域の重複が起きた際に生じた *PSP94* のパラログを起源とし、爬虫類、特にヘビで *PSP94* のゲノム断片レベルでの重

複が起き、このパラログが派生した *SSP-6* を皮切りに高度に多様化してきたと考えられる。(Fig. 31)。

6. 総合議論

本研究で、5つの既知 *Pf*SSP をコードする遺伝子に加えて新奇の SSP をコードする遺伝子：*Pf*SSP-6 と exon4 が欠損したことで偽遺伝子化されたと考えられる2つの *Pf*SSPs：*Pf*SSP-7 (ψ)、*Pf*SSP-8 (ψ) を同定し、これらの *Pf*SSPs が、*Pf*SSP-6、*Pf*SSP-7 (ψ)、*Pf*SSP-8 (ψ)、*Pf*SSP-4、*Pf*SSP-5、*Pf*SSP-1、*Pf*SSP-2、*Pf*SSP-3、の順に並んで遺伝子アレイを形成していることを明らかにした。また、ホンハブを加えた8種類のヘビドラフトゲノムデータの解析を行い、各ヘビの染色体に含まれる SSP ホモログを再現した。その結果、ヘビゲノムにおいて *SSP*-6、*SSP*-5、*SSP*-4 が初期に獲得され、そのうち *SSP*-1、*SSP*-2、*SSP*-3、がクサリヘビ科ヘビのゲノム特異的に獲得されたことを明らかにした。また、ヘビ SSP は、初期に獲得された *SSP*-6 と *SSP*-5 は中立進化に近い進化速度、最近獲得された *SSP*-1、*SSP*-2、*SSP*-3 は加速進化、*SSP*-4 は加速進化ほど速くはないが中立進化ほど遅くはない進化速度、をそれぞれ示した。これらの結果から、分子進化の新しい知見として『加速進化は非同義座位での優位な塩基置換は遺伝子重複直後に生じ、その後、ランダムな突然変異が時間と共に蓄積し、同義座位での中立的な突然変異を維持するよう選択圧によってその痕跡が減少させられる』という仮説を提唱したい。

毒タンパク質は、防御機構、餌を捕まえる道具または、餌を消化する酵素として機能するので、周りの環境に敏感でなくてはならない。即ち、毒タンパク質は環境の変化とそれに対する表現型の変化を観察する上で非常に有効な指標といえる。実際に、ハブ毒 IIA-PLA₂ は、地域毎に異なる組成をしている。また、PLA₂ アイソザイムのサブタイプそれぞれでも地域特異性が観察される。例えば、溶血活性を持つ PLA₂ はトカラハブ、奄美大島、徳之島、沖縄本島のホンハブ、サキシマハブ、の全てのハブ属ヘビで100%保存されている。浮腫誘導活性を持つ PLA-B/B'、PL-Y は島嶼間で異なるアミノ酸残基を含む。神経毒性を持つ PLA-N は、奄美・徳之島タイプ、沖縄本島とその属島タイプに分かれる。特に、筋毒性を持つ [Lys⁴⁹]PLA₂ は、トカラハブでは BPI のみ、奄美・徳之島間では BPI・BPII は100%保存されており、さらに奄美大島でのみ BPIII が確認される。また、沖縄では筋毒性を持つ [Lys⁴⁹]PLA₂ が偽遺伝子化しているため粗毒中には含まれていない。これらの知見から、PLA₂ はハブ毒において必須の毒成分、浮腫誘導性 PLA₂ は多様に変化し得る可塑性が豊かな毒成分、PLA-N は浮腫誘導性 PLA₂ ほどではないが変化し得る毒成分、筋毒性を持つ [Lys⁴⁹]PLA₂ は all-or-nothing 的にその遺伝子座が増減する毒成分だと考えられる。

本研究で、各ヘビゲノムに含まれる SSP ホモログの構成は、ヘビの種分化とは一致せず、それぞれが棲息する地域と関連性があることを示した。同じオリエントに棲息するキングコブラとクサリヘビ科ヘビの間で SSP ホモログの構成が異なることは大変興味深い。毒の変化は食性と強く関連すると考えられる。実際に、キングコブラは主に他のヘビを主食とするが、オリエントに棲息するクサリヘビ科はネズミなどの小型哺乳類を最もよく食べ、爬虫類、両生類、鳥類、魚類も食す。その食性が影響したためか、クサリヘビ科ヘビの粗毒中には IIA-PLA₂ が複数含まれるが、キングコブラは致死性の神経毒性の IA-PLA₂ を持っているため IIA-PLA₂ は多様化していない。クサリヘビ科ヘビのゲノムで逆位をしていた領域に含まれている SSP-1 と SSP-2、この領域に含まれているキングコブラの SSP-5 の 2 つのパラログの関連は興味深く、前者は加速度的な進化を経ていたのに対して、後者は中立的な進化を経ていた。即ち、本来、希釈されていくはずの加速進化の痕跡がクサリヘビ科ヘビのゲノムで逆位が起きたことで加速進化が維持された。その結果、SSP-1 と SSP-2 は多様化する IIA-PLA₂ のカウンターパートとして派生することができた と推測している。これらの結果は、毒タンパク質と毒阻害タンパク質が共進化していることを分子生物学的な知見から検証した例になると思われる。

生物普遍的に保存されている PSP94 のオルソログをヘビゲノムから初めて同定した。さらに、SSP/PSP94 周辺のシンテニー関係をヒト、鳥類、爬虫類で比較した結果、これらの共通祖先のゲノムにおいて PSP94 を含むゲノム領域の重複が起きたことが示唆された。即ち、PjSSPs は PSP94 のパラログから派生したと考えられ、SSP と PSP94 の進化的な関係を初めて関連づけることができた。

現在、次世代シーケンサーの発展によって様々な生物のドラフトゲノムデータが公開されている。本研究で行ったドラフトゲノムデータの解析とシンテニー関係の比較を行うことで様々な生物の PSP94 や PSP94 から派生したと考えられるホモログを同定されることが期待される。これまでに同定された PSP94 のアミノ酸配列を異なる生物種間で比較すると、配列間の類似性は非常に低いことが確認されている。そこで、推定アミノ酸配列から立体構造を予測できるソフトウェア：alphafold を用いると立体構造情報も利用することが可能になり、配列の類似性では判断が難しい PSP94 ファミリータンパク質を同定できると考えている。今後集積される塩基配列、推定アミノ酸配列、立体構造、の情報を解析することで、突然変異が蓄積しやすい箇所とそれに伴って変化する立体構造の関係を明らかにでき、その結果から PSP94 ファミリータンパク質の真の機能を明らかにできるのではないかと期待している。

ハブ毒 PLA₂ をコードする遺伝子が形成する遺伝子クラスターは、マイクロ染色体に存在している。マイクロ染色体は、マクロ染色体に比べて、遺伝子が多

い、GC 含量が高い、組み換え率が高い、ことが報告されている。即ち、ハブ毒 PLA₂ の多重化と加速進化には、その遺伝子クラスターが存在するマイクロ染色体の特異な環境が関与している可能性がある。今後、FISH 解析によって、ホンハブの染色体における *PSP94/SSP* アレイの局在を明らかにすることで、*SSP* アレイの多様化メカニズム解明についての知見を得ると期待している。これは推測ではあるが *PSP94* オルソログの載るゲノムドメインはハブ常染色体にあって中立的な進化を、一方、*SSP-6~SSP-3* を含むゲノムドメインはマイクロ染色体にあって加速度的な進化をしていることが見えてくるのではないだろうか。

毒生物といえばまず毒を獲得すると考えられるが、毒生物が新たに毒を獲得した場合、その毒で自身が死んでしまい次世代にその毒を引き継げない可能性が考えられる。しかし、私の研究結果をまとめると、事前にその毒を中和する機能を持った因子を獲得できていれば、新たな毒を獲得しても次世代に引き継げることが推測できた。つまり、まず別の構成性タンパク質の遺伝子を起源とする新たに毒を中和する可能性の因子が獲得されると、それに従って新たな毒を獲得できるようになると思われる。

7. 図表

7-1. Figures 44

7-2. Tables 74

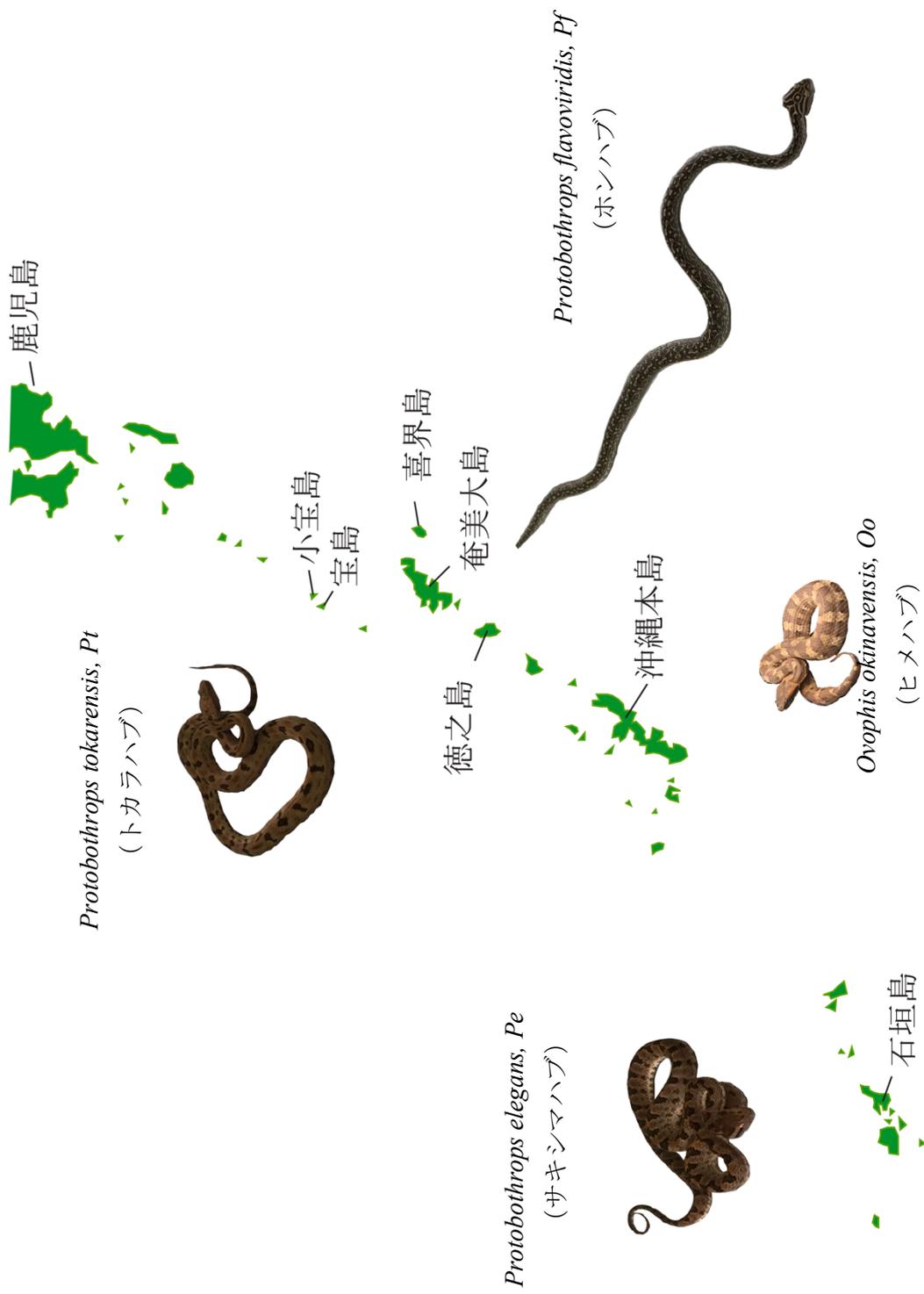


Fig. 1 日本南西諸島に棲息するクサリヘビ科へビ

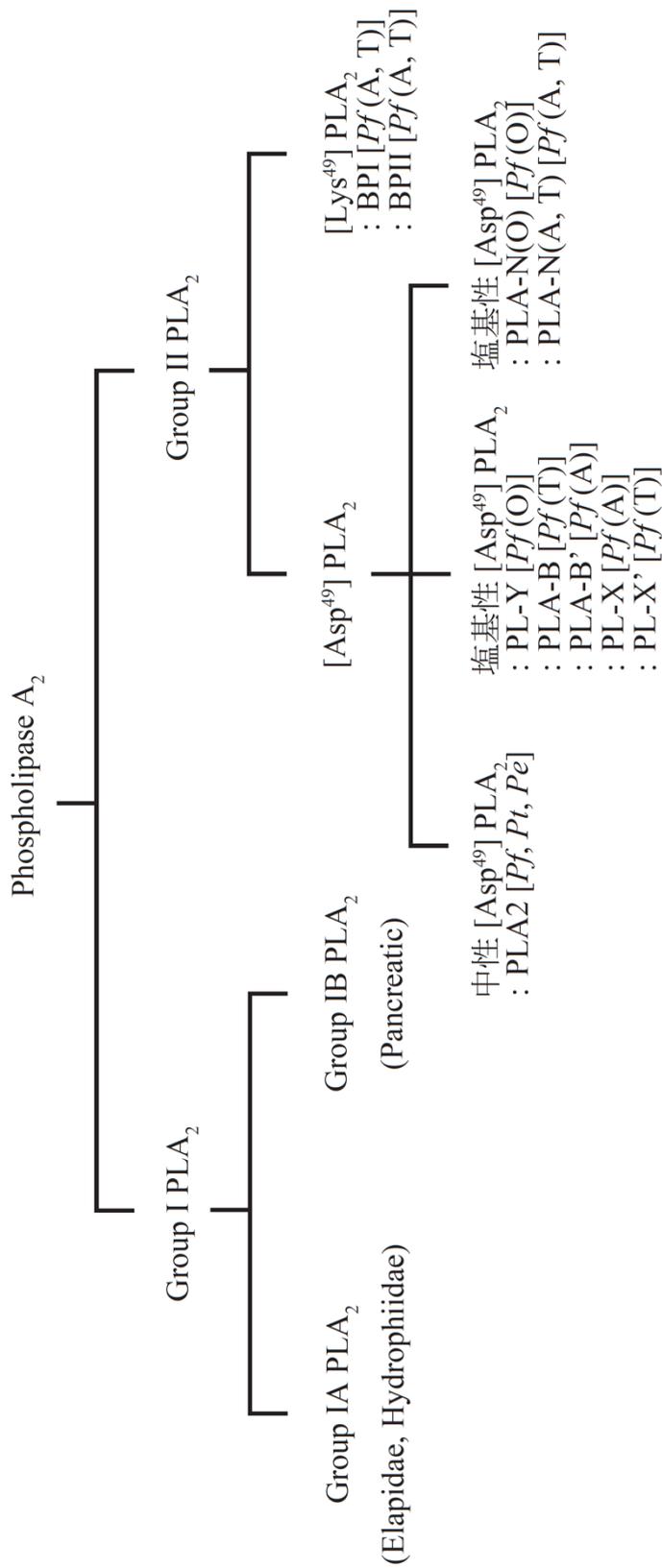


Fig. 3 へび毒 PLA₂ の分類

Pf : *Protobothrops flavoviridis*, *Pt* : *Protobothrops tokarensis*, *Pt* : *Protobothrops elegans*, *A* : 奄美大島より単離された事を表す, *T* : 徳之島より単離された事を表す, *O* : 沖縄本島より単離された事を表す

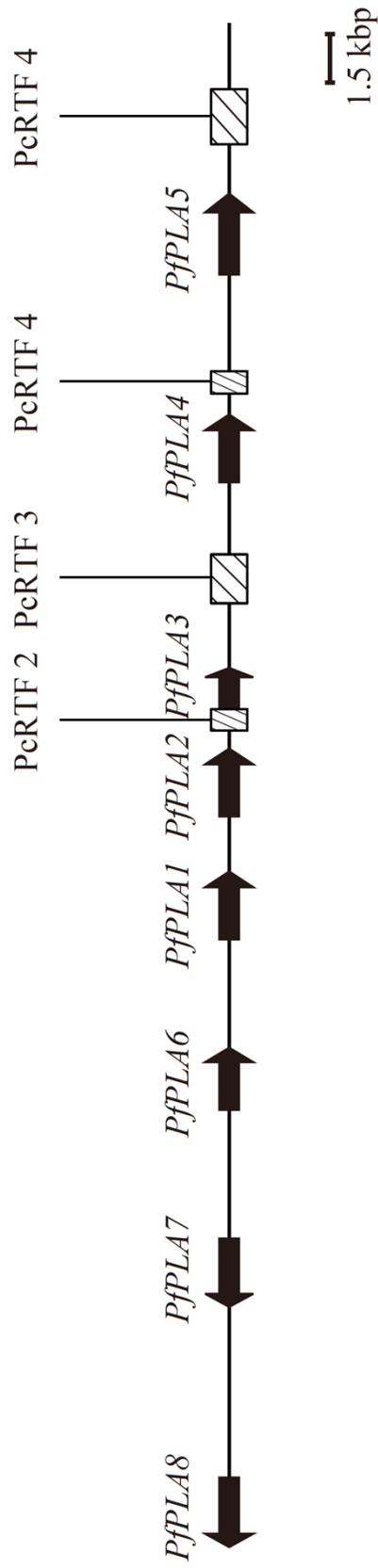


Fig. 4 奄美大島ホンハズゲノムより獲得された毒 PLA₂ 遺伝子クラスターの模式図
略称 *Pf: P. flavoviridis*。黒矢印：遺伝子領域、矢印の向き：転写方向、斜線の四角：PcRTF、をそれぞれ示す。

出典：Ikeda et al., 2010. Gene 461, 1-2, 15-25 (一部修正)、Ikeda, 2011 (一部修正)

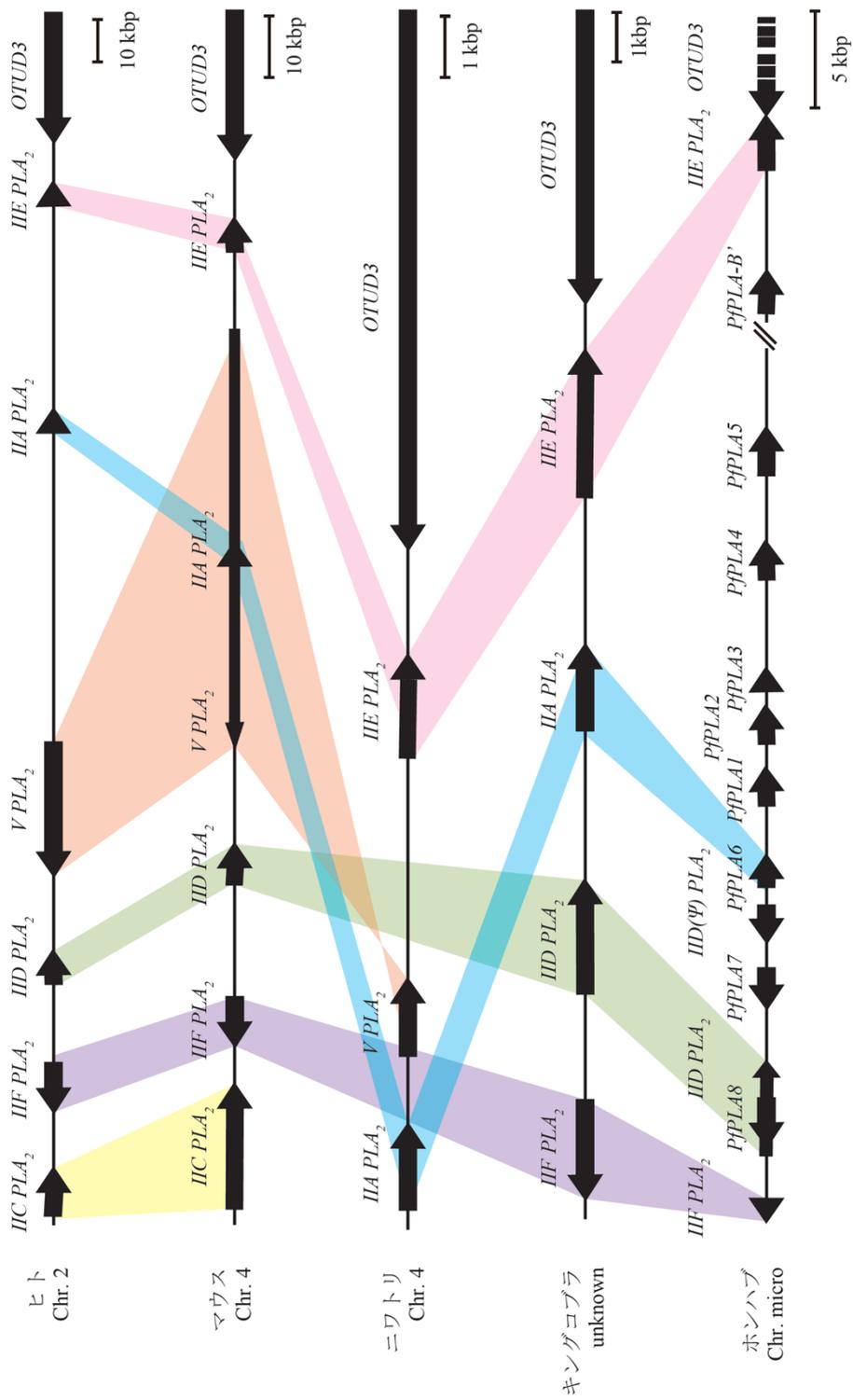
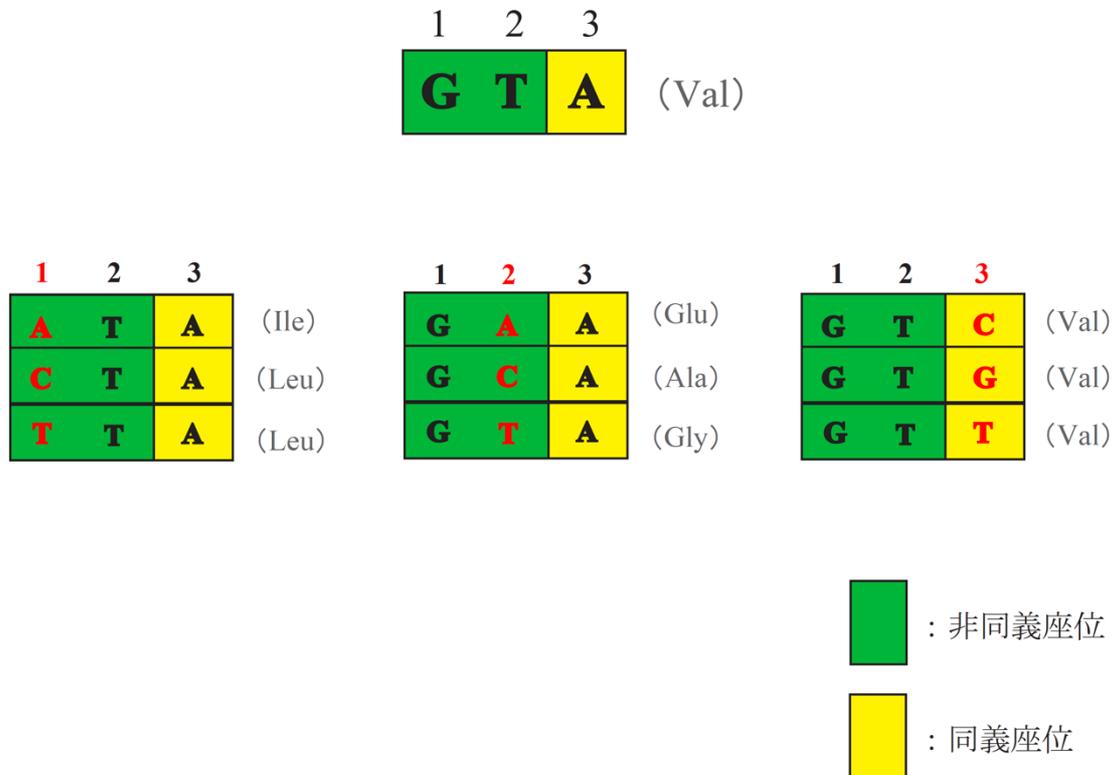


Fig. 5 生物普遍的に保存されている分泌型 PLA₂ 遺伝子クラスター
 出典 : Yamaguchi et al., 2014. Toxins. 6, 3471-3478. (一部修正)、Yamaguchi, 2011 (一部修正)

例えば・・・



毒 PLA₂ アイズタイム遺伝子の非同義座位での高い塩基置換率



加速進化



異なる生理活性を発揮

Fig. 6 生物毒をコードする遺伝子で普遍的に観察される加速進化

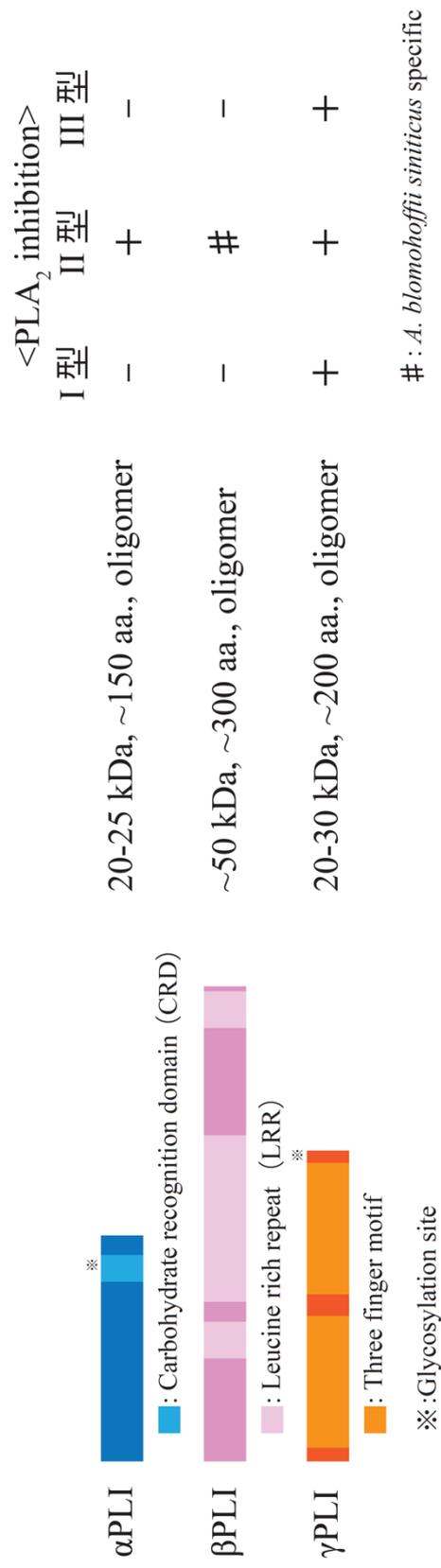


Fig. 7 ハブ血清に含まれる Phospholipase A₂ inhibitors (PLIs) の模式図

```

10          20          30
PfSSP-1  mrvff-sliifstlatcqqvc--APRPEHIDG--EVATRICVDPNDRSRHLVSKWNTA
PfSSP-2  .....m.....A.GIG.LVSSPTD--AM.PKK.....RK..I..T.....
PfSSP-3  .k...-i.....E.YGSVPLP--IDGED.PL.T...TH.GQK..I..T.K...
PfSSP-4  .k...-i.....H.IGSIPLPEMEDGED.PL.T...TH.EKK..I..T.K...
PfSSP-5  .k...-...v...v.....A.FQGSFEAKRMDGKS.MPNT...IF.SKK..L..T.N.D
humanPSP94 .n.llg.vv..atfvtl.naS.YFIPNEGVPGD----ST.K.M.-LKGNK.PIN.E.Q.D

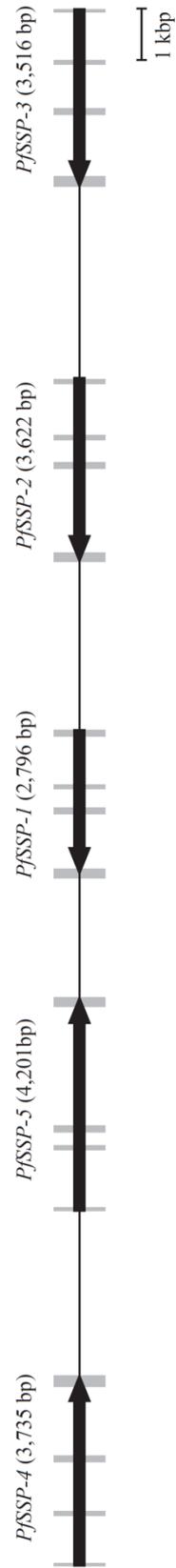
```

```

40          50          60          70          80          90
PfSSP-1  GCTICECFKGLRCCLRHDA-IPF-RDGCESVLNQVTCYEYFYRLDLSKRCDA-----
PfSSP-2  D.LR...DND...S..H.YGG-LAE-.A.K.....K.....K.....K.....
PfSSP-3  NSFS..TQI..Q..QKYVA-VA-----
PfSSP-4  NSFS..RQD.MW..KEYVA-VA-----
PfSSP-5  H.YR...LKS.FS..H.YGG-IGY-VEGYKT.V.P...QH.S.....PSQRS-----
humanPSP94 N.ET.T.YETEIS..TLVSTPVGYDKDNCQRIFFKEDCKYIVVEKKDPKKT.SVSEWII

```

Fig. 8 PfSSPs とヒト PSP94 のアミノ酸配列のアライメント
略称：Pf: *P. flavoviridis*. 小文字はシグナルペプチド、緑の四角は保存されたシステイン残基の位置を示す。



略称 : *Pf. P. flavoviridis*。灰色の四角はエクソン、矢印の向きは転写の向きを示す。

Fig. 9 ホンハブ SSP 遺伝子アレイの模式図



Fig. 10 ホンハブ SSP 遺伝子アレイの 5' 上流に存在した新奇 SSP をコードする遺伝子 : PflSSP-6 の模式図 略称 : Pflavoviridis。黒矢印は遺伝子、矢印の向きは転写の向きを示す。

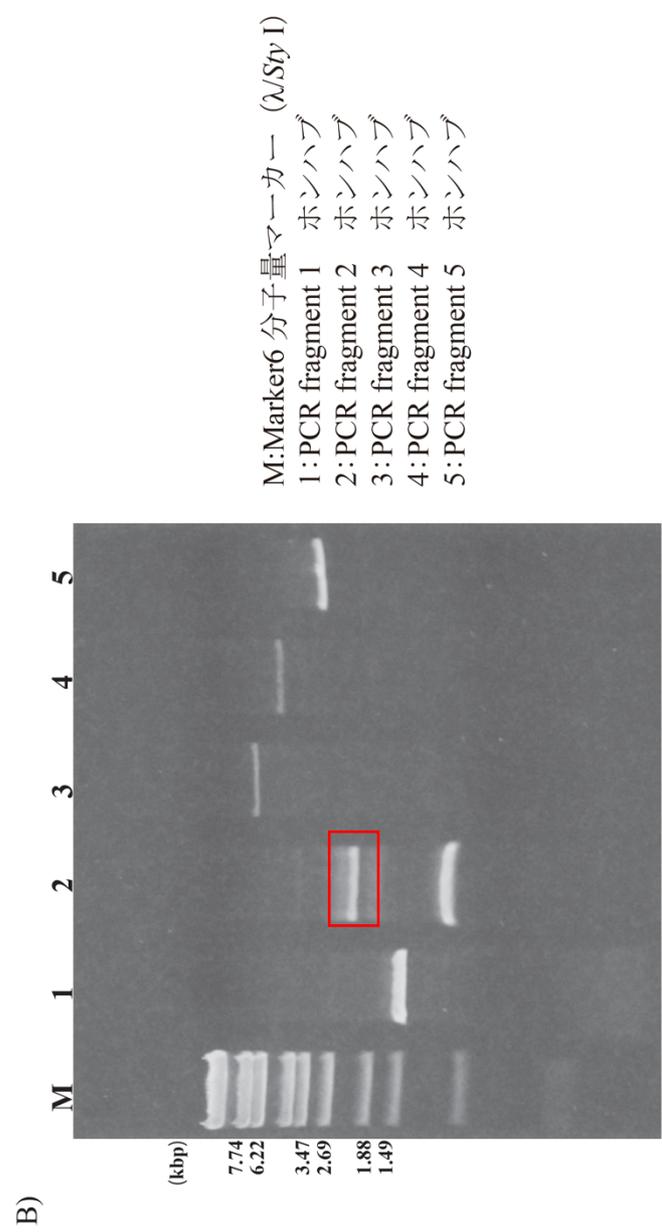
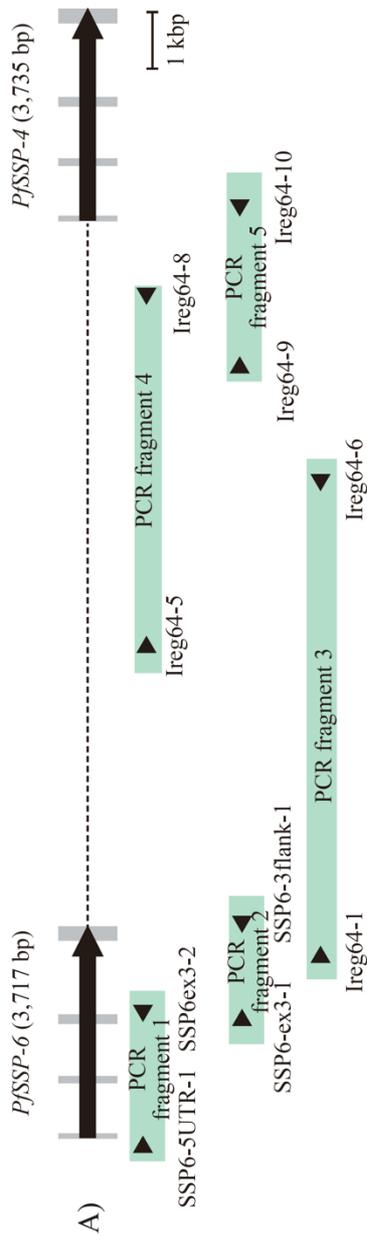


Fig. 12 新奇 SSP をコードする遺伝子 (*PfSSP-6*) と I-Reg64 の同定
 A) *PfSSP-6* と I-Reg64 のゲノム構造。矢頭は PCR プライマーを示す。黒矢印は遺伝子領域、灰色の四角はエクソンを示す。B) ゲノミック PCR で増幅された *PfSSP-6* 断片、IReg-64 断片の泳動写真。PCR fragment 2 は、赤枠のバンドを切り出した後、クローニングを行った。

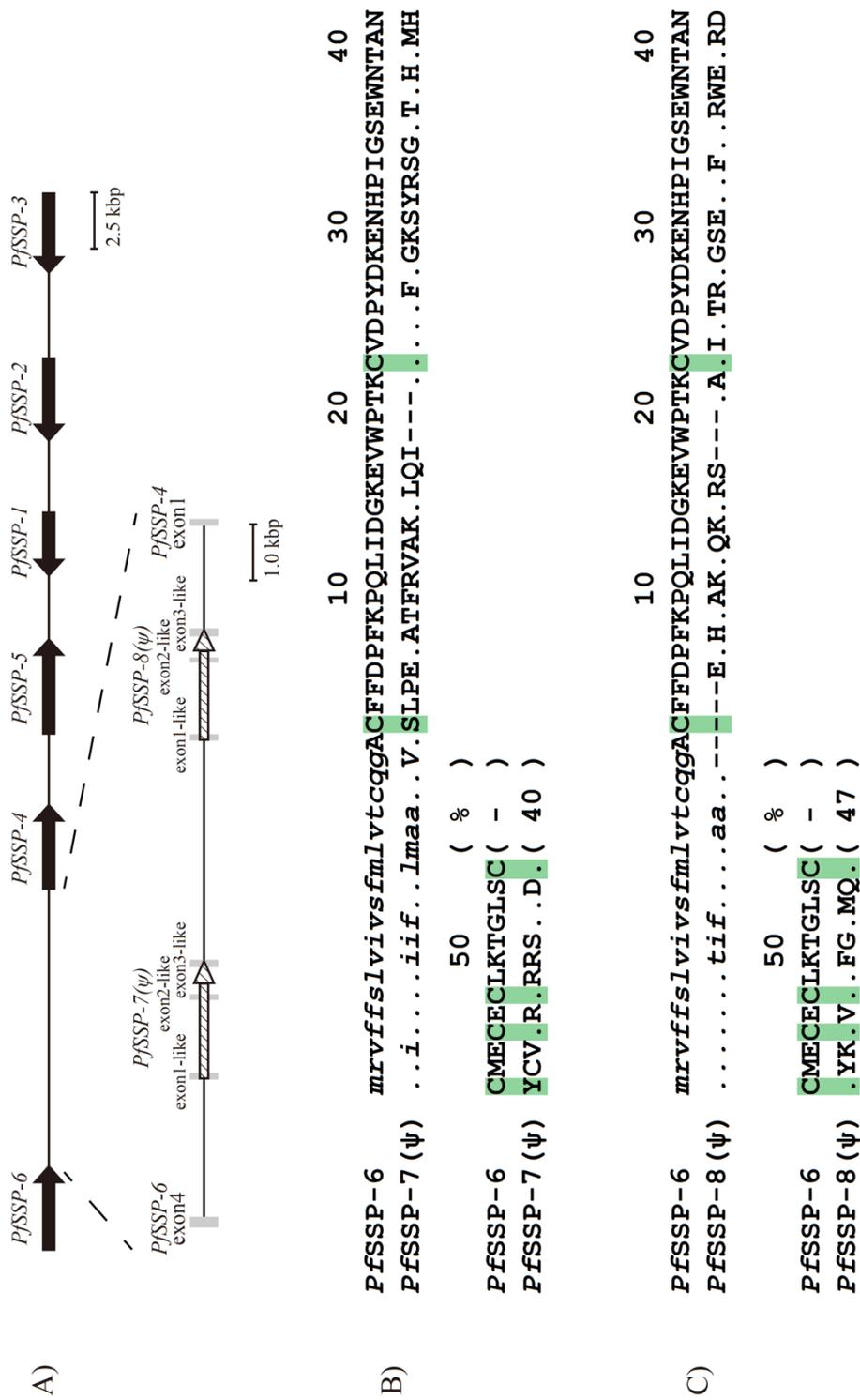


Fig. 13 A) 遺伝子間領域に見出された偽遺伝子化した *PfSSPs* の模式図、B) 、C) それぞれ *PfSSP-7*(ψ)、*PfSSP-8*(ψ)と *PfSSP-6* の推定アミノ酸配列のアライメント略称： *Pf*: *P. flavoviridis*。黒矢印、斜線の矢印は遺伝子、矢印の向きは転写の向きを示す。小文字はシグナルペプチド、緑の四角は保存されたシステイン残基の位置を示す。

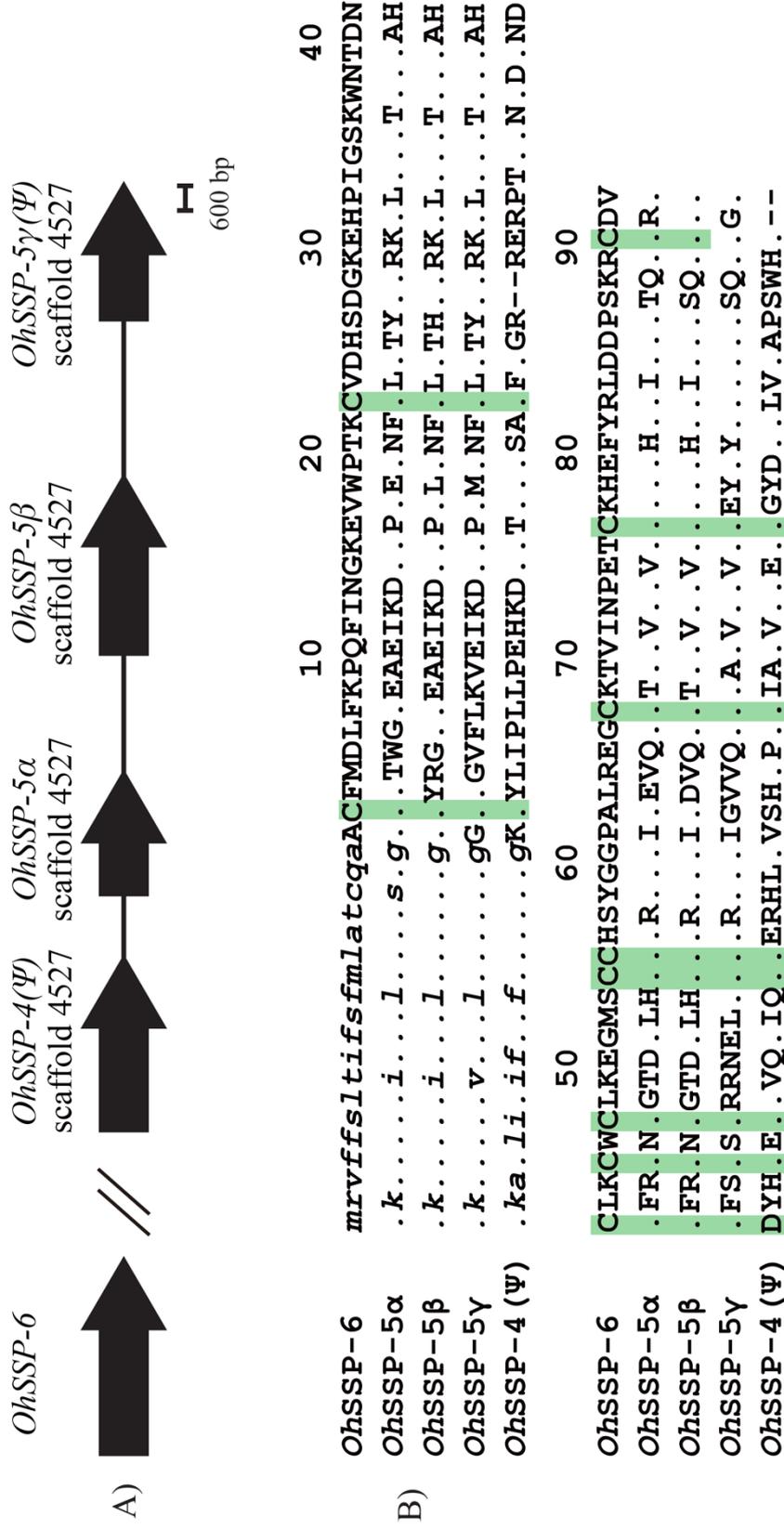


Fig. 14 A) キングコブラゲノムに含まれる SSP アレイの模式図、B) 各 *OhSSP* にコードされる推定アミノ酸配列のアライメント
 略称: *Oh*: *O.hannah*。黒矢印は遺伝子、矢印の向きは転写の向き、をそれぞれ示す。小文字のイタリックはシグナルペプチドを、緑の四角は、保存されたシステイン残基の位置を示す。

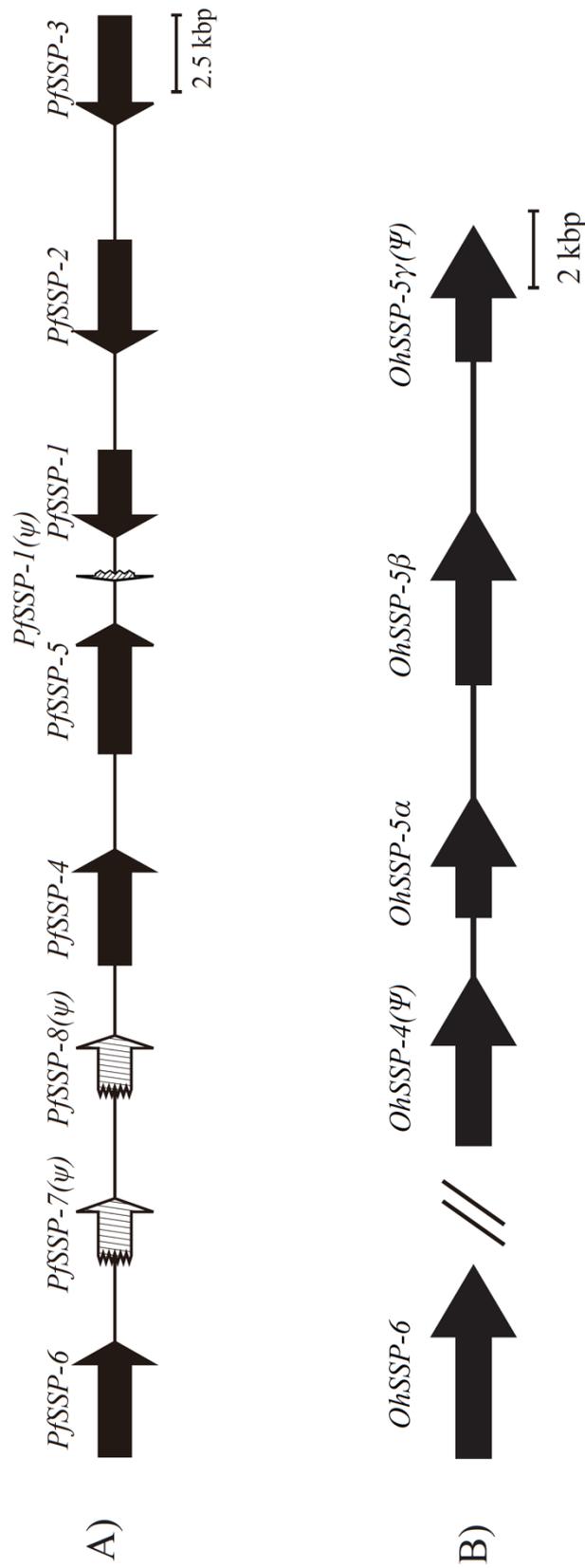


Fig. 15 A) *PfSSPs* のアレイ、B) *OhSSPs* のアレイ、の模式図
 略称：Pf: *Protothrops flavoviridis*; Oh, *Ophiophagus hannah*。黒矢印は活性型遺伝子、破れた矢印は偽遺伝子、矢印の向きは転写の向き、を指示。斜線は、2つの scaffold がつながっていないことを示す。

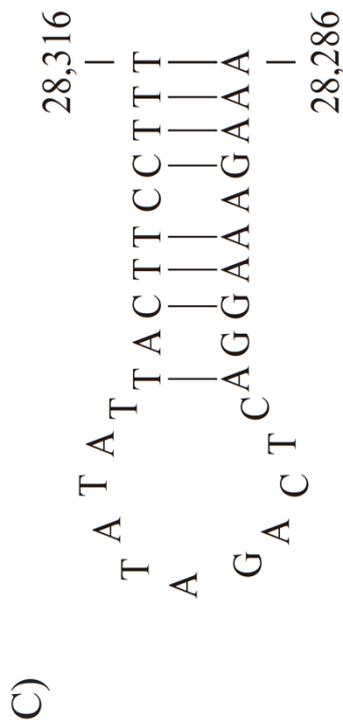
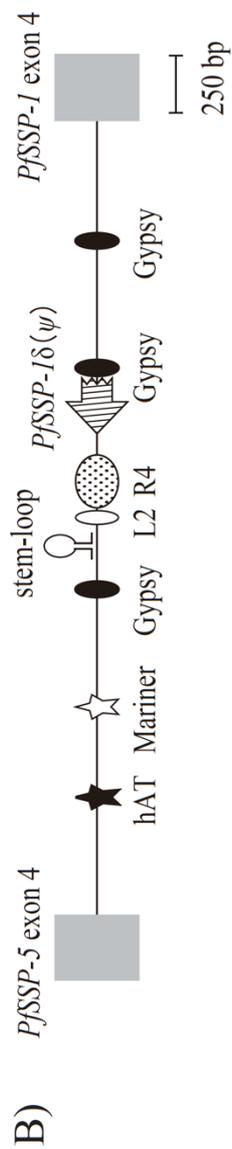
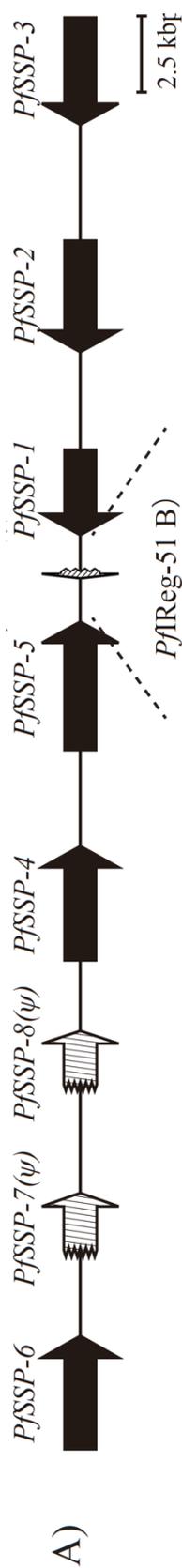


Fig. 17 A) *PfSSP* アレイの模式図、B) *PfI-Reg51* 中に挿入された LINE と DNA トランスポゾンの断片の模式的な構成、C) Gypsy 断片と L2 断片-R4 断片-*PfSSP-1(ψ)*配置の間に位置する 30 塩基の予測されたステムループ構造

3つの黒の楕円、白の楕円、斑点の楕円は、挿入された Gypsy、L2、R4 LINE の断片をそれぞれ示す。黒の星、白の星は、挿入された hAT、Mariner の断片をそれぞれ示す。黒矢印は活性型遺伝子、破れた矢印は偽遺伝子、矢印の向きは転写の向きを示す。二次構造は、GENETYX ver. 16.0 の RNA secondary structure prediction によって塩基配列を基に推定された。

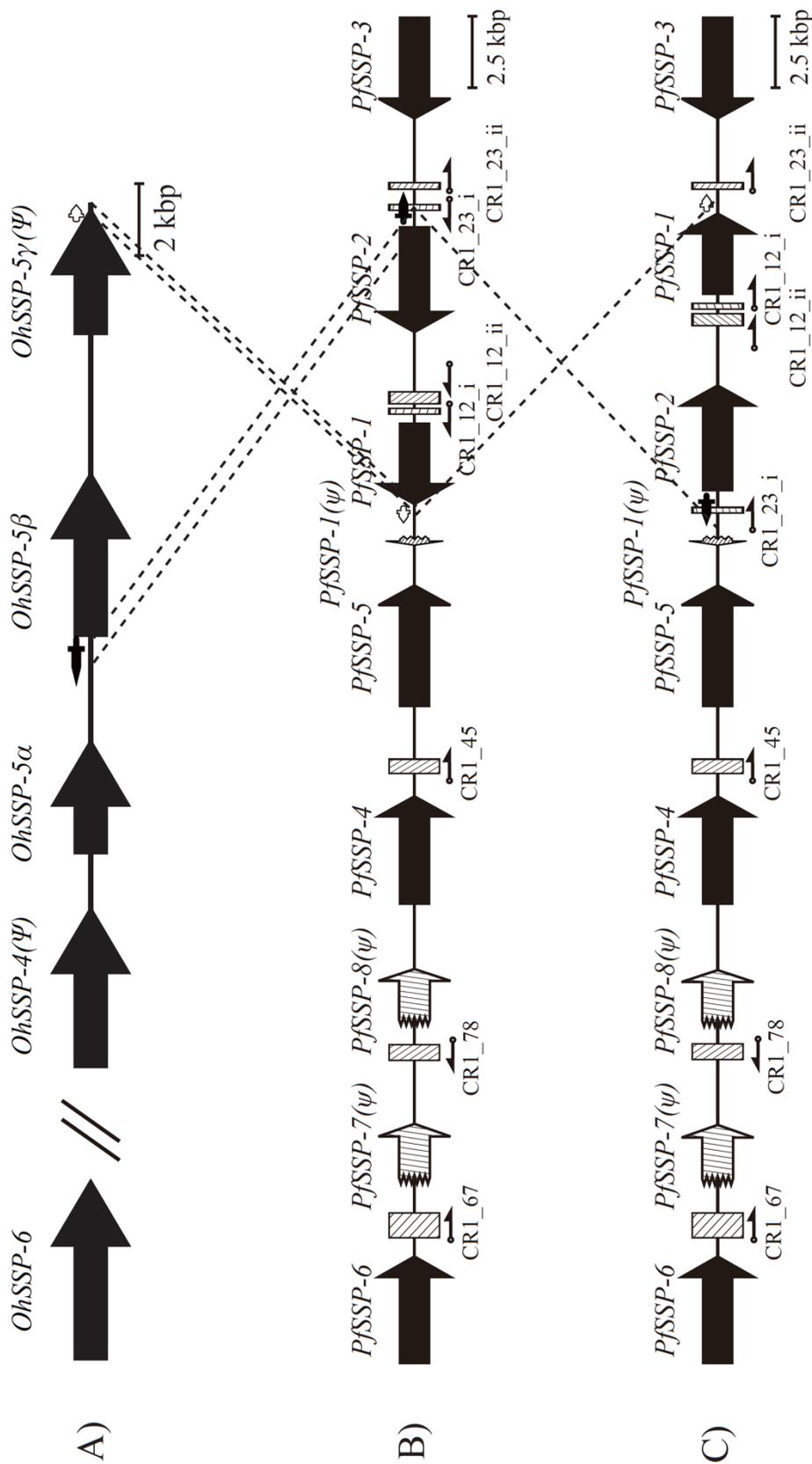


Fig. 18 A) *Oh*SSPs のアレイ、B) *Pf*SSPs のアレイ、C) 染色体逆位が起きなかった場合の *Pf*SSPs のアレイの比較図

略称： *Pf*: *Protobothrops flavoviridis*; *Oh*, *Ophiophagus hannah*. 黒矢印は活性型遺伝子、破れた矢印は偽遺伝子、矢印の向きは転写の向きを示す。白の短剣と黒の短剣は、互いに破線で結ばれた α 、 β 配列の位置と向きを示す。斜線の四角は CR1 LINE の断片を示す。鉾は CR1 LINE の挿入断片の位置と転写の方向を示す。

A)

*Pf*α : TTAATCTTTTCCCTTGTGCGTTTCTTTTATTCAAA--ACAATTTGCTAAACAATGAAGCT-GTGCCTATGATG
*Oh*α : -A...TG...T...C.T...TA.T...TA...G.A.A...G...CA..TC..A... (%)

*Pf*β : TCAGCCGTGACAGTATGGGAGGATACGGCCCTGCATCAGTTTGCCA--TTGTGTAACAACACTTGAGCAATT (-)
*Oh*α : .T...A.A...CA...AG.T.CCG...TGGGTCA...TT...TG...T... (69%)

B)

*Pf*β : TGCAATTTAAAAAATAAATCTGA--AAAGTTTCTCAGAAATAGCCACTGCCAGAAGAAAACAATTTGCTTTATGACTAGTACTTTGCTTTGTAGATGGTGAA
*Oh*β :TGTTT.....G...GCGA.A.....G.....G.A.--A.C.....T.....G.....T.A...

*Pf*β : GGGAAAGTATTTTGTGCTAGACCAACATGGCTAGAAAAGTCCGAATTTGGTGAGATTTGAATTCCTCCAGCAGAAATGTGAGAAGTTGAGACAGCCAGATGTGCAGC
*Oh*β :C.....T..AG..G.....A.A.C.A.....G.....AG.....T.....G.....GA.....G.....

*Pf*β : TTCTCCTCCAC--TTCTCCCAAGATGAGCCCTATGCAATGTTAAGGATGTAGCCCGCCCAACAATTAGTTGCTTCTTGGAAAATGGGACTTACTCCCAAGCCAGAAATCA
*Oh*β :C.....A.CC.G.T.G.....A.T...G.....G.....T.TA.TTTCCAG

*Pf*β : GGACTTTTA--CAGCTTTC---TTTCAACTCAGAGTAATATCCCTTTGGTAATATCTCTCTTTATAATGCTCTCCCTGCGTGTCTGTCTGTCCAAAATCTTC
*Oh*β : .T.CCC.AGC.G.AA.AGGCA.....GAGCTTTG..G..G..C.A---G.C..G.....GT.T.....A.C.....T.CC.....T.G.T.....

*Pf*β : AATAAGCATTGGACAGAGTAGATTTGCTTTCCCTGCAGGCTCTTCTCTCCTGGTGGCCGCTCACATGTTCTGTC-----CTGTGGCTGTCTCAAGGGGAACGTG
*Oh*β :T.....A.....T.....T.....A-AA.....C.TACTCGCT..C.....

*Pf*β : CATACTCTCCAATGGATTTCTGCAG---TAGATTTTCTGTAAAGGTGCACAGAGTGTCTTTGTTCCAACTTGTCTTTGATGAACAAGATTCCTCCACTTCCAGGAAT
*Oh*β :C.....A.ATTTCTCC.C.....A.....T.....NNNNN..AG..T..C.....

*Pf*β : TCCAATATCCCAAGGGTGTGGCTTAGACAGTGCAGAGGCTTCCACAATGTAATGGAVACTTGCCCAAAAAGTTGTGAACCTCTGCTCTAGTTATCTGTATGTAGA
*Oh*β :CT.....G.C.....A.....G.A.A.....T...T---CT.C.T.C.T.TTGT.C....C.TTG..C.G.GCAC.A....T..C..C.A..

*Pf*β : AGACTT-----ATGTAGATGGTAAATATGATATGATATCCCTGTGTACC-----TTGTGCTGTGATATGCAAACTATTAGAATAGAAATAGAGGTGGAAGGACCTT-GGA
*Oh*β : CC.....CCAAAGCA.A.AT...G..GC.TCT.AGAAA...C.T..AAACT.CT..T.T.AAGC.ACAGG.A.CC.T..C.GA.CC.TGT...ACTTTAG.T..TA.C

*Pf*β : GGTCTTCTAGTCC---AGCCCTTGTCAAGCAGGAGAAACCTATACCATCTCGGATAGTACTGCTTCTTAAATAATCTCC----- (%)
*Oh*β : TAGTC.C.....TAGC..ATTTT...TTT.TTTC.A..GT.TA.AT.G.CT.TT.GTT..TT...T.GTTGT..G.CTGGTC.GGTTATGTTTCC (65%)

Fig. 19 A)、B) ホンハブとキンダゴブラのα、β配列のアライメント
 略称：Pf: *Protothrops flavoviridis*; Oh, *Ophiophagus hannah*. *PfSSP-1* の3'下流の140 bpを*Pf*α、*OhSSP-5γ* の3'下流中の140 bpを*Oh*α、*PfSSP-2* の5'上流中の937 bpを*Pf*βと*OhSSP-5β* の5'上流中の961 bpを*Oh*βとする。

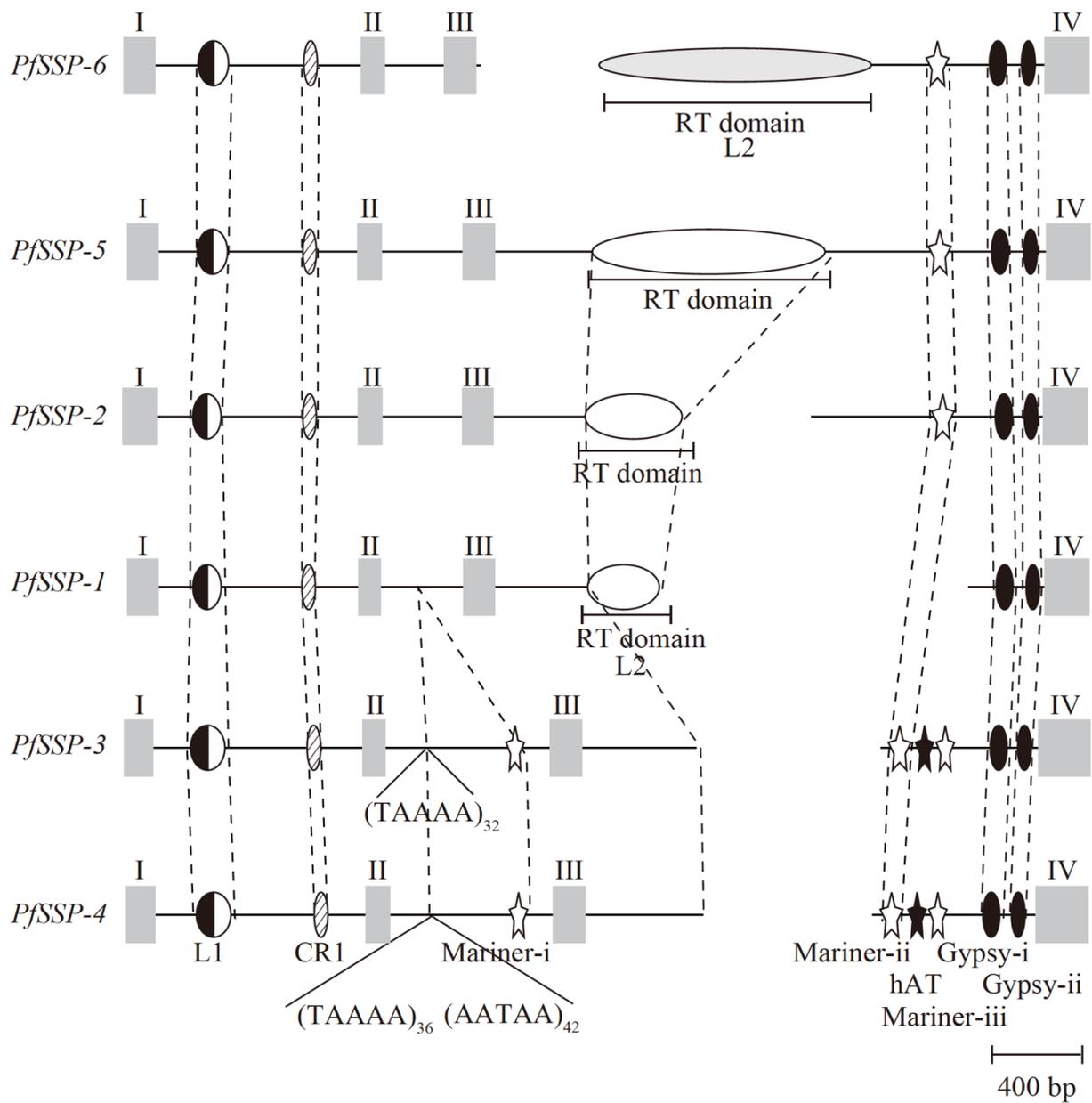


Fig. 20 6つの *PfSSP*s のイントロンの塩基配列の模式的な構成。半塗、斜線、黒、白の楕円は、それぞれ L1、CR1、L2、Gypsy LINE の断片を示す。*PfSSP-6* の第3イントロンに挿入された L2 LINE の断片は、*PfSSP-1*、*PfSSP-2*、*PfSSP-5* の第3イントロンに挿入された L2 LINE と異なるため、*PfSSP-6* の L2 LINE の断片は灰色で示す。白、黒の星は、Mariner、hAT の DNA トランスポゾン断片を示す。対応する断片の位置は破線で結んでいる。繰り返し配列 (TAAAA と AATAA) の位置はキャレット (^) で示し、繰り返しの数は下付き文字で示す。

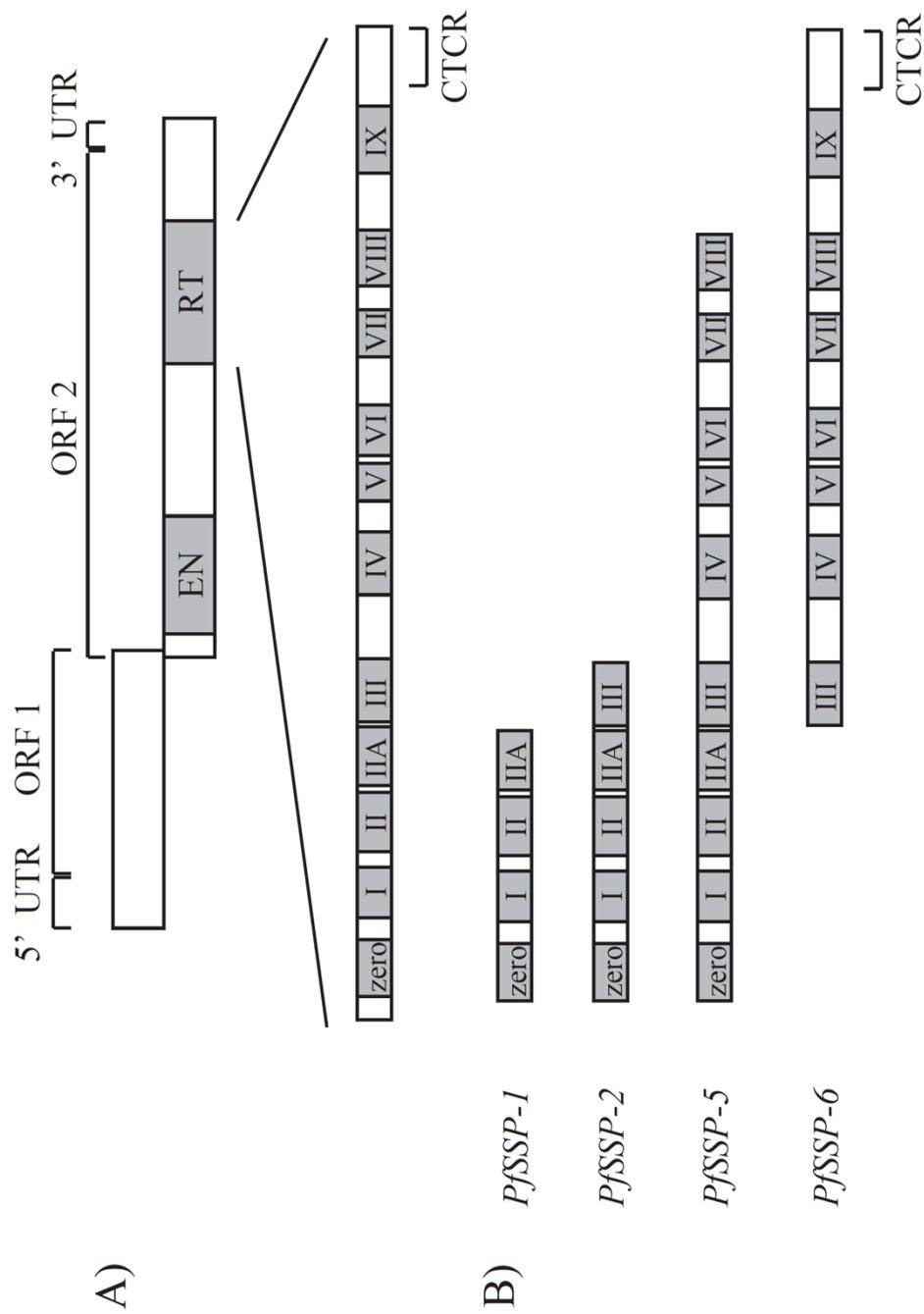


Fig. 21 A) L2 LINE の模式的な構造と逆転写酵素のサブドメインの模式図
 B) *PfSSPs* に挿入された L2 LINE にコードされた逆転写酵素ドメインの模式図 EN : エンドヌクレアーゼ、RT : 逆転写酵素、CTCR : carboxy-terminal conserved region。

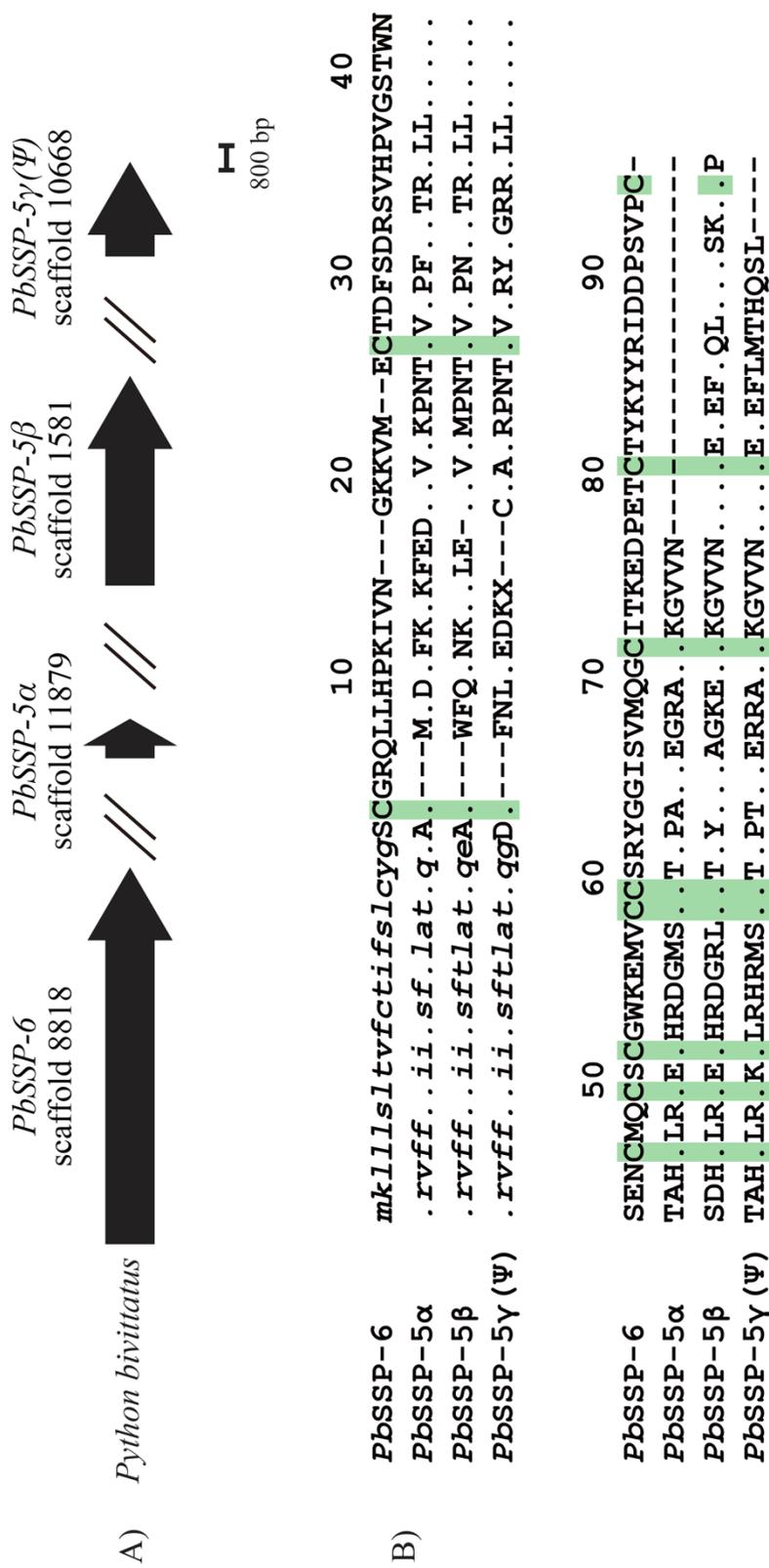


Fig. 22 A) ビルマニシキヘビゲノムに含まれる SSP アレイの模式図、B) 各 *PbSSP* にコードされる推定アミノ酸配列のアライメント
略称: *Pb: P. bivittatus*。黒矢印は遺伝子、矢印の向きは転写の向き、をそれぞれ示す。小文字のイタリックはシグナルペプチドを、緑の四角は、保存されたシステイン残基の位置を示す。

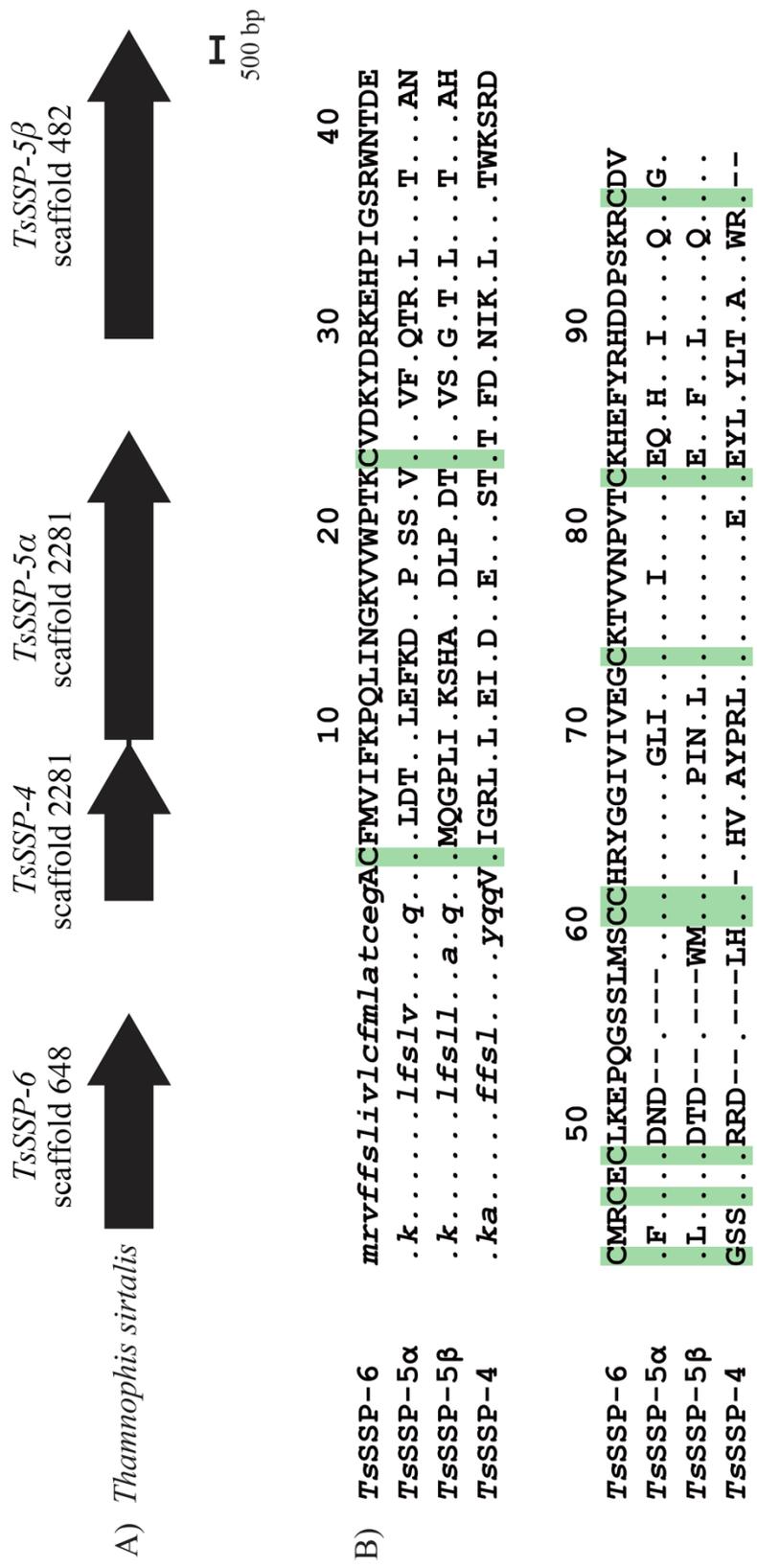


Fig. 23 A) ガーターヘビゲノムに含まれる SSP アレイの模式図、B) 各 *TsSSP* にコードされる推定アミノ酸配列のアライメント
略称: *Ts*: *T. sirtalis*。黒矢印は遺伝子、矢印の向きは転写の向き、をそれぞれ示す。小文字のイタリックはシングルヌクレオチドを、緑の四角は、保存されたシステイン残基の位置を示す。

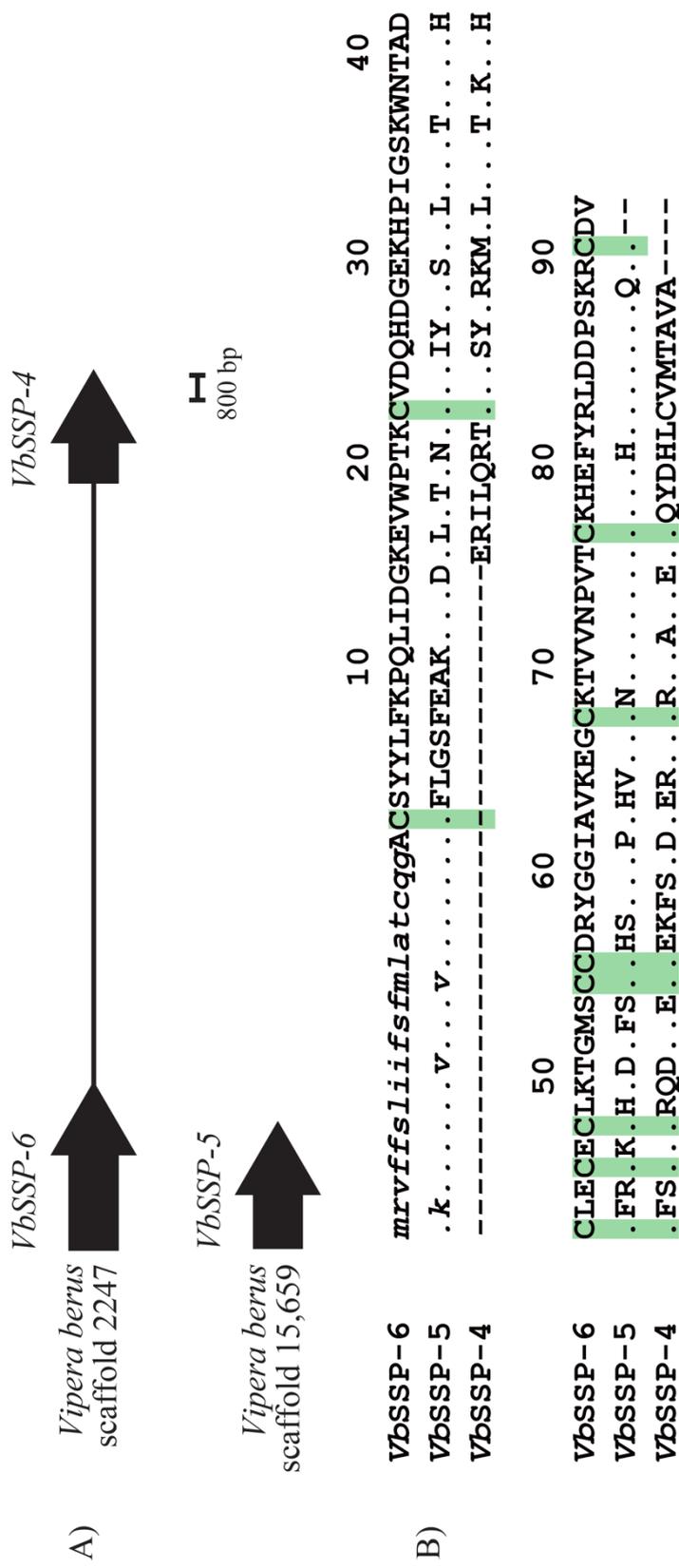
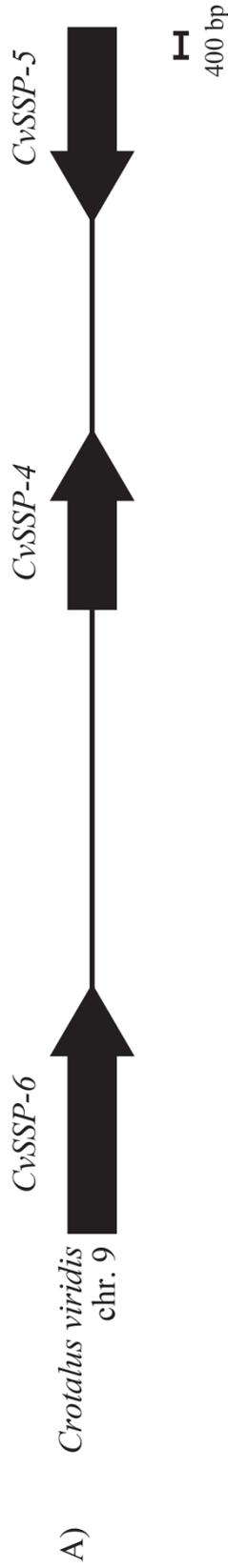


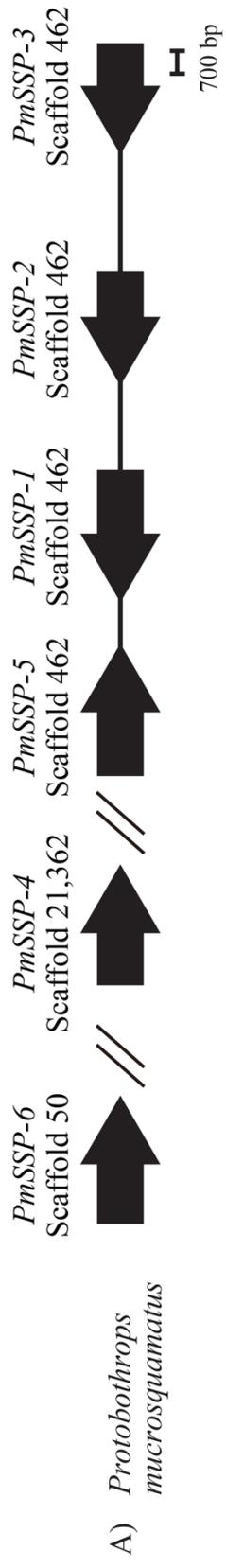
Fig. 24 A) ヨーロッパクサリヘビゲノムに含まれる SSP アレイの模式図、B) 各 *VbSSP* にコードされる推定アミノ酸配列のアライメント
略称: *Vb*: *V. berus*。黒矢印は遺伝子、矢印の向きは転写の向き、をそれぞれ示す。小文字のイタリックはシグナルペプチドを、緑の四角は、保存されたシステイン残基の位置を示す。



B)

CvSSP-6	mrvffslvilsfmvaticggACFFGLFKPQLIDGKEVWPTKCVDPYDKKKHPIGSKWNTAH	10	20	30	40
CvSSP-5	.k.....ivf.lvl.....lq....EAK.....P...NT...I..N...LL..T...D.				
CvSSP-4	.k.....i.f.ftl.....H.IGSFPLPKY...R.PLRT...T..G.T.L...I.K..E				
CvSSP-6	CMKCDCLKTGLSCCHRYGGPAIMEGCKTVINPITCKHEFYRLDDPSKRCDN	50	60	70	80
CvSSP-5	.YR.E..K..F.....IGNV.....V..V..Q..S.....QR.---				
CvSSP-4	.FS.E.ERED.MW..KK...V.ER...TA.A..E..EYDLHCIGP.VP-----				

Fig. 25 A) セイブガラガラヘビゲノムに含まれる SSP アレイの模式図、B) 各 CvSSP にコードされる推定アミノ酸配列のアライメント
 略称 : Cv: *C. viridis*. 黒矢印は遺伝子、矢印の向きは転写の向き、をそれぞれ示す。小文字のイタリックはシグナルペプチドを、緑の四角は、保存されたシステイン残基の位置を示す。



B)

	10	20	30	40
PmSSP-6	mr v f s l v i s f m l v t c g a c	q f g f e p q l i d g k e v w p t k	c v d p y d k k k h p i g s e w n t a n	
PmSSP-5	.k	.i v f .v .a	.f q .r .a k	.p .m .n t .i f .n .l l v .t .d q
PmSSP-2	.i .f	.g r .l v .e p t .a m -a .k	.n .g r .l v .t .d	
PmSSP-1	.i .f	.v .a p -r .e h .e .e -a t r i	.k .r s r .l v v .k .s .g	
PmSSP-4	.k	.c .i .f .t .a	.h .i g s i p l .e t e .e .p i r t	.t h .g q .l v .t .k .e
PmSSP-3	.k	.i .i .f .t .a	.e .f g .f s l .--	.p i r t .a .t .g .l v .t .k .e
PmSSP-6	C M E C E L K T G L S C	C H R Y G G T A V M E G C K T V I N P I T C K H E F Y R L D D P S K R C D V		
PmSSP-5	.Y R	.E S .F	.I G S V .N	.Q .S .Q R S --
PmSSP-2	.L R	.D S D .L	.L .G R A	.L R V .E Y .G A
PmSSP-1	.T I	.F E G .L	.L H D A I P F K H	.E S .L Q V .E Y .D .D .A
PmSSP-4	S F S	.R Q D .M W	.K E .V A V A	---
PmSSP-3	S F S	.A Q I .L Q	.K E .V A V A	---

Fig. 27 A) タイワンハングゲノムに含まれる SSP アレイの模式図、B) 各 PmSSP にコードされる推定アミノ酸配列のアライメント
 略称：Pm: *P. mucrosquamatus*。黒矢印は遺伝子、矢印の向きは転写の向き、をそれぞれ示す。小文字のイタリックはシグナルペプチドを、緑の四角は、保存されたシステイン残基の位置を示す。

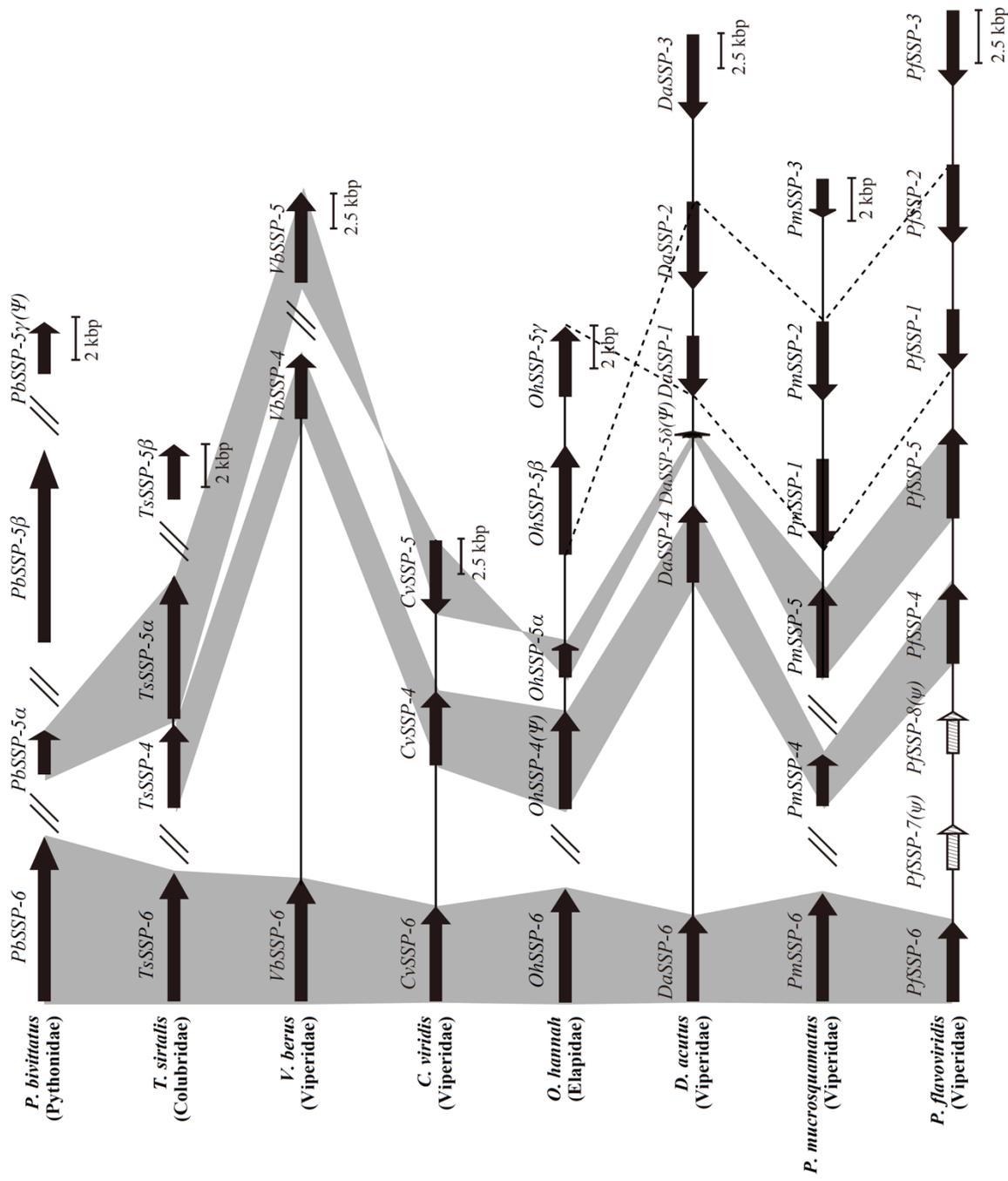


Fig. 28 8種類のへびSSPアレイの比較図

略称: Cv: *C. viridis*; Da: *D. acutus*; Oh: *O. hannah*; Pb: *P. bivittatus*; Pf: *P. flavoviridis*; Pm: *P. microscquamatus*; Ts: *T. sirtalis*; Vb: *V. berus*。黒矢印は遺伝子、矢印の向きは転写の向き、破れた矢印は偽遺伝子、破れた矢印は破領域を示す。各へびゲノム中のSSP-6、SSP-5、SSP-4のオルソログは灰色の枠で、*D. acutus*、*P. flavoviridis*、*P. microscquamatus* の逆位したゲノム領域は破線で、それぞれ示す。

		10	20	30
PfPSP94	<i>mfqemkrhllvflillflrnlcdaQCS</i> ---	VKPA-SRKGC	FQNGKWYRVP	PAVWKTNNCQ
PmPSP94	..w.....	tl.....
DaPSP94	-----	l.....	T.....
CvPSP94	vl.....	G.....
VbPSP94	-----	l.....
OhPSP94	-----	l.....	-GK.....	A.....
TsPSP94	<i>lw.i</i>	l.....	-GK.....	HD.....
GgPSP94	-----	<i>kif.a</i> ...	amgiivtqgd.F	FSKLF.PGEAE...MLD.VL.PFGEIPRTE..F

	40	50	60	70	80
PfPSP94	RCECKPKELI CCSLVFRPINYDKK CKIAMFHRQ CSIRVVVKNDPT ESCKVFAGV G
PmPSP94
DaPSP94	S.....
CvPSP94	-----	-----	-----	-----
VbPSP94	H.....
OhPSP94	---	Q.....
TsPSP94	..QK.....	K...T.....	A.N.Q.....
GgPSP94	..S.SKN.MH...	YHT.V...	ET.KVI.NKKN.DYE..Q.H-.SKP.SGYAR...

Fig. 29 へビ PSP94 とニワトリ PSP94 のアミノ酸配列のアライメント
 略称: Cv: *C. viridis*; Da: *D. acutus*; Oh: *O. hannah*; Pf: *P. flavoviridis*; Pm: *P. mucrosquamatus*; Ts: *T. sirtalis*; Vb: *V. berus*; Gg, *G. gallus*. 小文字のイタリックはシグナルペプチド、緑の枠は保存されたシステイン残基の位置を示す。

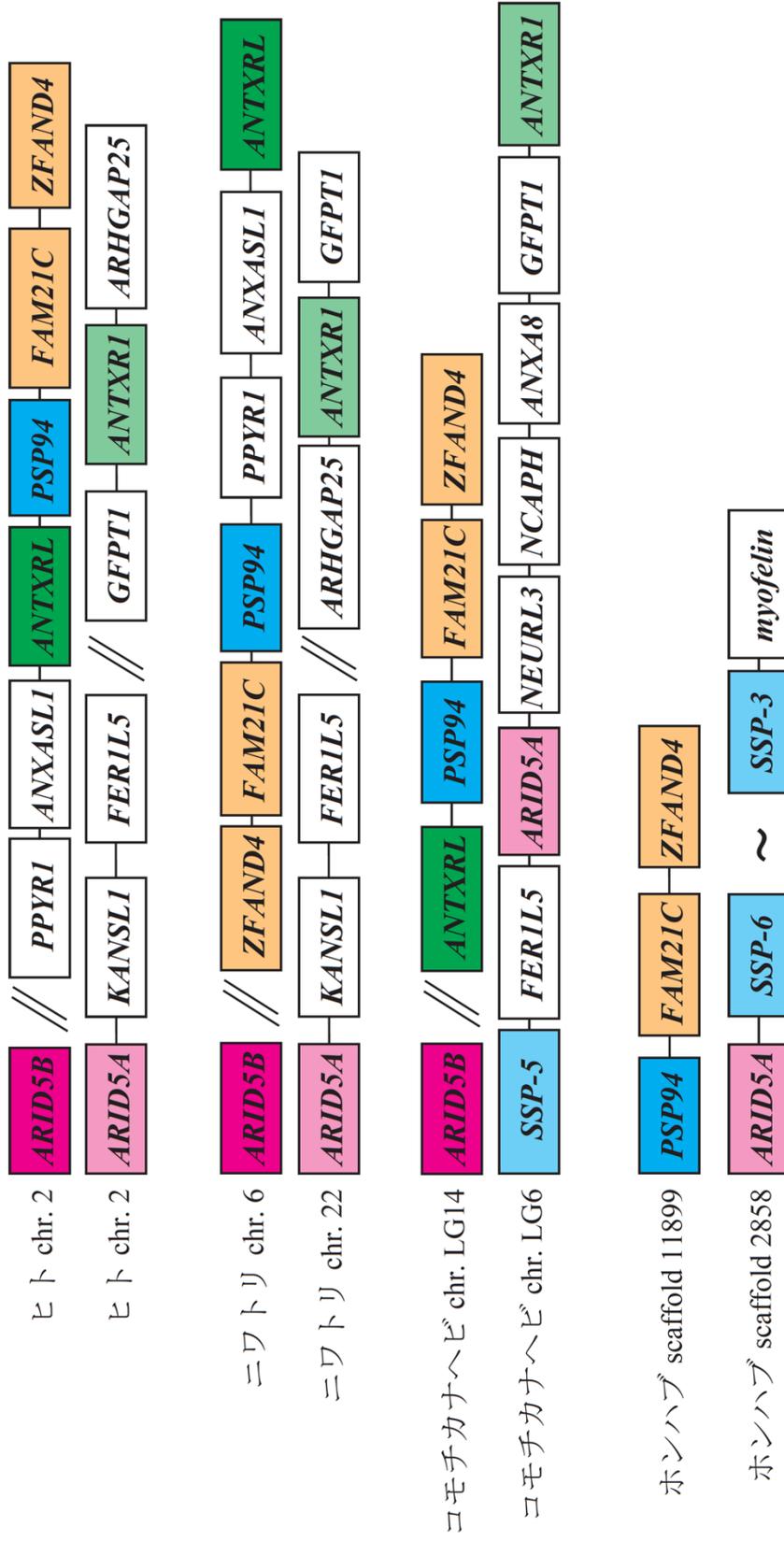


Fig. 30 爬虫類、鳥類、哺乳類で保存された *PSP94* に関する染色体のシンテニー構造。シンテニープロック内の位置が特定できる一部の遺伝子のみを表示している。いくつかの遺伝子の間には少数の介在遺伝子が存在するが、簡素化のために直接的に隣接する如く描いている。斜線は、遺伝子間距離が 10 Mbp 以上であることを示す。また、本文中で言及されている重要な遺伝子には色をつけて強調している。チルダ (~) は、ホンハブ SSP アレイの省略を示す。

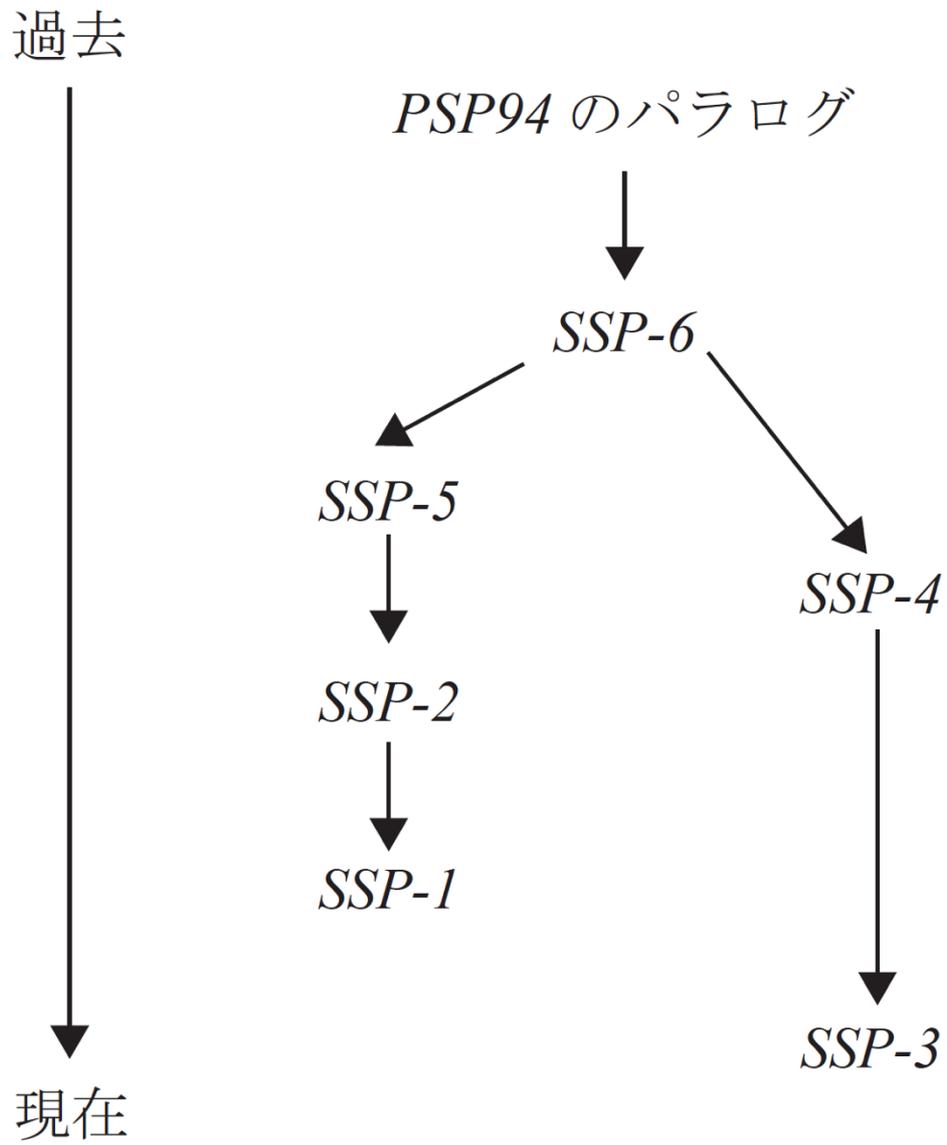


Fig. 31 本研究の結果から推定された *SSP* の起源と出現順

Table 1. ホスホリパーゼ A₂ スーパーファミリー

タイプ	グループ	サブグループ
分泌型ホスホリパーゼ A ₂ (sPLA ₂)	I	A、B
	II	A、B、C、D、E、F
	III	
	V	
	IX	
	X	
	XI	A、B
	XII	A、B
	XIII	
	XIV	
細胞質型ホスホリパーゼ A ₂ (cPLA ₂)	IV	A(α)、B(β)、C(γ)、 D(δ)、E(η)、F(ζ)
Ca ²⁺ 非依存型ホスホリパーゼ A ₂ (iPLA ₂)	VI	A(β)、B(γ)、C(δ)、 D(ε)、E(ζ)、F(η)
血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (PAF-AH)	VII	A(Lp-PLA ₂)、B(PAF-AH II)
	VIII	A(α ₁)、B(α ₂)、β
リゾチーム型ホスホリパーゼ A ₂ (LPLA ₂)	XV	
アディポサイト型ホスホリパーゼ A ₂ (AdPLA ₂)	XVI	

出典:Dennis et al., 2011. Chem. Rev. 11, 6130-6185 (一部修正)

Table 2. 公開されているヘビゲノムプロジェクト

学名	Family	GenBank ID	Notes
<i>Myanophis thanlyinensis</i>	Homalopsidae	GCA_017656035.1	Kohler et al., 2021
<i>Thermophis baileyi</i>	Dipsadidae	GCA_003457575.1	Li et al., 2018
<i>Python bivittatus</i>	Pythonidae	GCA_000186305.2	Castoe et al., 2013
<i>Hydrophis curtus</i>	Hydrophiidae	GCA_019472885.1	Li et al., 2021
<i>Hydrophis melanocephalus</i>	Hydrophiidae	GCA_004320005.1	Kishida et al., 2019
<i>Emydocephalus ijimae</i>	Hydrophiidae	GCA_004319985.1	Kishida et al., 2019
<i>Hydrophis hardwickii</i>	Hydrophiidae	GCA_004023765.1	Lu et al., 2018, DS
<i>Hydrophis cyanocinctus</i>	Hydrophiidae	GCA_019473425.1 GCA_004023725.1	Li et al., 2021
<i>Pituophis catenifer pumilus</i>	Colubridae	GCA_019677565.1	Clark et al., 2021, DS
<i>Chrysopelea ornata</i>	Colubridae	GCA_019457695.1	Dinesh, D., 2021, DS
<i>Pantherophis obsoletus</i>	Colubridae	GCA_012654085.1	Ullate-Agote et al., 2021
<i>Ptyas mucosa</i>	Colubridae	GCA_012654045.1	Ullate-Agote et al., 2019, DS
<i>Pantherophis guttatus</i>	Colubridae	GCA_001185365.2	Ullate-Agote et al., 2014,
<i>Thamnophis sirtalis</i>	Colubridae	GCA_001077635.2	Warren et al., 2015
<i>Thamnophis elegans</i>	Colubridae	GCA_009769535.1 GCA_009769695.1	Bronikowski et al., 2019, DS
<i>Pseudonaja textilis</i>	Elapidae	GCA_900518735.1 GCA_900608585.1	Edwards, J.R., 2018, DS
<i>Laticauda colubrina</i>	Elapidae	GCA_015471245.1 GCA_004320045.1	Kishida et al., 2019
<i>Laticauda laticaudata</i>	Elapidae	GCA_004320025.1	Kishida et al., 2019
<i>Notechis scutatus</i>	Elapidae	GCA_900518725.1 GCA_900608555.1	Edwards et al., 2018, DS
<i>Ophiophagus hannah</i>	Elapidae	GCA_000516915.1	Vonk et al., 2013
<i>Naja naja</i>	Elapidae	GCA_009733165.1 GCA_018093825.1	Suryamohan et al., 2020
<i>Crotalus viridis viridis</i>	Viperidae	GCA_003400415.2	Pasquesi et al., 2018
<i>Vipera berus berus</i>	Viperidae	GCA_003400415.2	Liu et al., 2014, DS
<i>Crotalus tigris</i>	Viperidae	GCA_016545835.1	Margres, M.J., 2019, DS
<i>Crotalus adamanteus</i>	Viperidae	GCA_018446365.1	Hogan et al., 2021
<i>Crotalus pyrrhus</i>	Viperidae	GCA_000737285.1	Gilbert et al., 2014
<i>Bothrops jararaca</i>	Viperidae	GCA_018340635.1	Almeida et al., 2021
<i>Protobothrops flavoviridis</i>	Viperidae	GCA_003402635.1	Shibata et al., 2018
<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	Viperidae	GCA_001527695.3	Aird et al., 2017
<i>Crotalus horridus</i>	Viperidae	GCA_001625485.1	Sanders et al., 2016, DS
<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Viperidae		Yin et al., 2016.

DS: Direct submission

本研究で解析したドラフトゲノムデータは薄緑色で示した。

Table 3. *P. flavoviridis* SSPs の ORF 間で算出された K_A/K_S

	<i>PfSSP-1</i>	<i>PfSSP-2</i>	<i>PfSSP-3</i>	<i>PfSSP-4</i>	<i>PfSSP-5</i>	<i>PfSSP-6</i>
<i>PfSSP-1</i>		1.80	0.660	0.790	0.597	0.792
<i>PfSSP-2</i>			0.808	0.781	0.504	0.891
<i>PfSSP-3</i>				1.40	0.599	0.990
<i>PfSSP-4</i>					0.670	1.07
<i>PfSSP-5</i>						0.626
<i>PfSSP-6</i>						

Table 4. *P. flavoviridis* SSPs のイントロン間で算出された K_N

	<i>PfSSP-1</i>	<i>PfSSP-2</i>	<i>PfSSP-3</i>	<i>PfSSP-4</i>	<i>PfSSP-5</i>	<i>PfSSP-6</i>
<i>PfSSP-1</i>		0.0317	0.251	0.258	0.248	0.231
<i>PfSSP-2</i>			0.254	0.261	0.253	0.229
<i>PfSSP-3</i>				0.0283	0.261	0.279
<i>PfSSP-4</i>					0.270	0.287
<i>PfSSP-5</i>						0.267
<i>PfSSP-6</i>						

Table 5. *C. viridis* SSPs の ORF 間で算出された K_A/K_S

	<i>CvSSP-4</i>	<i>CvSSP-5</i>	<i>CvSSP-6</i>
<i>CvSSP-4</i>		0.749	0.879
<i>CvSSP-5</i>			0.306
<i>CvSSP-6</i>			

Table 6. *C. viridis* SSPs のイントロン間で算出された K_N

	<i>CvSSP-4</i>	<i>CvSSP-5</i>	<i>CvSSP-6</i>
<i>CvSSP-4</i>		0.319	0.358
<i>CvSSP-5</i>			0.372
<i>CvSSP-6</i>			

Table 7. *D. acutus* SSPs の ORF 間で算出された K_A/K_S

	<i>DaSSP-1</i>	<i>DaSSP-2</i>	<i>DaSSP-3</i>	<i>DaSSP-4</i>	<i>DaSSP-6</i>
<i>DaSSP-1</i>		1.61	0.934	0.823	0.832
<i>DaSSP-2</i>			0.849	0.705	1.03
<i>DaSSP-3</i>				1.77	0.878
<i>DaSSP-4</i>					0.830
<i>DaSSP-6</i>					

Table 8. *D. acutus* SSPs のイントロン間で算出された K_N

	<i>DaSSP-1</i>	<i>DaSSP-2</i>	<i>DaSSP-3</i>	<i>DaSSP-4</i>	<i>DaSSP-6</i>
<i>DaSSP-1</i>		0.0227	0.248	0.253	0.249
<i>DaSSP-2</i>			0.247	0.251	0.246
<i>DaSSP-3</i>				0.0050	0.285
<i>DaSSP-4</i>					0.288
<i>DaSSP-6</i>					

Table 9. *O. hannah* SSPs の ORF 間で算出された K_A/K_S

	<i>OhSSP-4(Ψ)</i>	<i>OhSSP-5α</i>	<i>OhSSP-5β</i>	<i>OhSSP-5γ</i>	<i>OhSSP-6</i>
<i>OhSSP-4(Ψ)</i>		0.931	0.875	0.700	0.919
<i>OhSSP-5α</i>			0.836	0.719	0.666
<i>OhSSP-5β</i>				0.832	0.685
<i>OhSSP-5γ</i>					0.509
<i>OhSSP-6</i>					

Table 10. *O. hannah* SSPs のイントロン間で算出された K_N

	<i>OhSSP-4(Ψ)</i>	<i>OhSSP-5α</i>	<i>OhSSP-5β</i>	<i>OhSSP-5γ</i>	<i>OhSSP-6</i>
<i>OhSSP-4(Ψ)</i>		0.331	0.340	0.324	0.530
<i>OhSSP-5α</i>			0.0615	0.0801	0.277
<i>OhSSP-5β</i>				0.0857	0.226
<i>OhSSP-5γ</i>					0.275
<i>OhSSP-6</i>					

Table 11. *P. mucrosquamatus* SSPs の ORF 間で算出された K_A/K_S

	<i>PmSSP-1</i>	<i>PmSSP-2</i>	<i>PmSSP-3</i>	<i>PmSSP-4</i>	<i>PmSSP-5</i>	<i>PmSSP-6</i>
<i>PmSSP-1</i>		1.49	0.891	0.821	0.639	0.694
<i>PmSSP-2</i>			0.825	0.662	0.476	0.620
<i>PmSSP-3</i>				1.35	0.479	0.780
<i>PmSSP-4</i>					0.586	0.889
<i>PmSSP-5</i>						0.370
<i>PmSSP-6</i>						

Table 12. *P. mucrosquamatus* SSPs の ORF 間で算出された K_N

	<i>PmSSP-1</i>	<i>PmSSP-2</i>	<i>PmSSP-3</i>	<i>PmSSP-4</i>	<i>PmSSP-5</i>	<i>PmSSP-6</i>
<i>PmSSP-1</i>		0.154	0.338	0.342	0.339	0.374
<i>PmSSP-2</i>			0.281	0.284	0.262	0.316
<i>PmSSP-3</i>				0.0397	0.293	0.346
<i>PmSSP-4</i>					0.296	0.349
<i>PmSSP-5</i>						0.295
<i>PmSSP-6</i>						

Table 13. *T. sirtalis* SSPs の ORF 間で算出された K_A/K_S

	<i>TsSSP-4</i>	<i>TsSSP-5α</i>	<i>TsSSP-5β</i>	<i>TsSSP-6</i>
<i>TsSSP-4</i>		1.06	0.603	0.651
<i>TsSSP-5α</i>			0.675	0.447
<i>TsSSP-5β</i>				0.659
<i>TsSSP-6</i>				

Table 14. *V. berus* SSPs の ORF 間で算出された K_A/K_S

	<i>VbSSP-5</i>	<i>VbSSP-6</i>
<i>VbSSP-5</i>		0.604
<i>VbSSP-6</i>		

Table 15. *P. bivittatus* SSPs の ORF 間で算出された K_A/K_S

	<i>PfSSP-5α</i>	<i>PfSSP-5β</i>	<i>PbSSP-6</i>
<i>PbSSP-5α</i>		1.594	0.343
<i>PbSSP-5β</i>			0.296
<i>PbSSP-6</i>			

8. 付録

プライマーリスト

名称	配列 (GC 含量、Tm 値)	アニール部位
SSP6-5UTR-1 (f)	5'- ggC gTC CCT CCT TCT CCT Tg -3' (65, 66)	<i>PfSSP-6</i> の exon1
SSP6ex3-2(r)	5'- CTC gCA TTC CAT ACA ATT ggC Tg-3' (48, 68)	<i>PfSSP-6</i> の exon3
SSP6ex3-1 (f)	5'- TgT ggC CAA CCA AAT gCg Tgg -3' (57, 66)	<i>PfSSP-6</i> の exon3
SSP6-3UTR-2(r)	5'- ACA TgA gAg ATT TAT TCC AgT gTg-3'(38, 66)	<i>PfSSP-6</i> の exon4
SSP6-3flank-1(r)	5'- CAg CTA TgC ATg CCT TAT ATC AC -3' (43, 66)	<i>PfSSP-6</i> の exon4 の 89 bp 3'下流域
Ireg64-1 (f)	5'- CTC CAT gCA AAg gAg gAT TTC C -3' (50, 66)	<i>PfSSP-6</i> の intron3
Ireg64-6(r)	5'- TAg gCC TTg ACA CAT gAT ggC -3' (52, 64)	<i>PfSSP-6</i> と <i>PfSSP-4</i> の遺 伝子間領域
Ireg64-5 (f)	5'- CAT TgT TgA gCA ACC CTT ggC -3' (52, 64)	<i>PfSSP-6</i> と <i>PfSSP-4</i> の遺 伝子間領域
Ireg64-8(r)	5'- ggA CTA TTA AgC AgT ggA ATg gC -3' (48, 68)	<i>PfSSP-6</i> と <i>PfSSP-4</i> の遺 伝子間領域
Ireg64-9 (f)	5'- ggC CCT CTT CCA Agg ACA AgC -3' (62, 68)	<i>PfSSP-6</i> と <i>PfSSP-4</i> の遺 伝子間領域
Ireg64-10(r)	5'- ACC TCg TTC CTC CAg CCA CT -3' (60, 64)	<i>PfSSP-4</i> の intron1
PmSSP34-5UTR (f)	5'- CAA ggg TTg gTC TTg gTT TTT g -3' (45, 64)	<i>PmSSP-3/4</i> の exon1
PmSSP3ex2-R (r)	5'- ggT AgA gAA AAg CCC CCA AAg -3' (52, 64)	<i>PmSSP-3</i> の exon2
PmSSP3-F (f)	5'- TgC TTT ggg ggC TTT TCT C -3' (47, 56)	<i>PmSSP-3</i> の exon2
PmSSP34-R (r)	5'- CTT gAC TgA GAC TgA AgT TCC -3' (45, 62)	<i>PmSSP-3/4</i> の exon4 の 311 bp 3'下流域
PmSSP4ex2-R (r)	5'- CgT TTC Agg TAA Agg AAT ACT C -3' (41, 62)	<i>PmSSP-4</i> の exon2
PmSSP4-F (f)	5'- gAg TAT TCC TTT ACC TgA AAC g -3' (41, 62)	<i>PmSSP-4</i> の exon2
OhSSPs-5UTR (f)	5'- ATA AAT Tgg Agg AgC RgA TTC CT -3' (43, 66)	<i>OhSSPs</i> の exon1
OhSSP5-ex2-R (r)	5'- CTC AgC TTC AAA gCC CCA gg -3' (60, 64)	<i>OhSSP-5a</i> の exon2

OhSSP5-F (f)	5'- gAg CAT gCT TTA CCT ggg gC -3' (60, 64)	<i>OhSSP-5α</i> の exon2
OhSSP5-R (r)	5'- TCC ATg TgT AgA gAT CAA ACA Cg -3' (43, 66)	<i>OhSSP-5α</i> の exon4
OhSSP2-ex2-R (r)	5'- CTC AgC TTC AAA gAg CCC TCT -3' (52, 64)	<i>OhSSP-5β</i> の exon2
OhSSP2-F (f)	5'- gAg CAT gCT ATA gAg ggC TCT -3' (52, 64)	<i>OhSSP-5β</i> の exon2
OhSSP2-R (r)	5'- gAT CAA ACA TCA CAg CgC TgC -3' (52, 64)	<i>OhSSP-5β</i> の exon4
OhSSP1-ex2-R (r)	5'- TTA Agg AAC ACT CCA AAg CAC C -3' (52, 64)	<i>OhSSP-5γ</i> の exon2
OhSSP1-F (f)	5'- gAg ggT gCT TTg gAg TgT TCC -3' (45, 64)	<i>OhSSP-5γ</i> の exon2
OhSSP1-R (r)	5'- gAT CAg ACA CCA CAg CTg Tgg -3' (57, 66)	<i>OhSSP-5γ</i> の exon4
OhSSP6-ex2-R (r)	5'- TAA ACT gAg gTT TAA AgA gAT CCA -3' (33, 64)	<i>OhSSP-6</i> の exon2
OhSSP6-F (f)	5'- gCA gCA TgC TTC ATg gAT CTC -3' (52, 64)	<i>OhSSP-6</i> の exon2
OhSSP6-R (r)	5'- CCg TgT gAA AAg NTC AgA CAT C -3' (50, 66)	<i>OhSSP-6</i> の exon4

9. 参考文献

- Aird, S. D., Arora, J., Barua, A., Qiu, L., Terada, K., Mikheyev, A.S., 2017. Population Genomic Analysis of a Pitviper Reveals Microevolutionary Forces Underlying Venom Chemistry. *Genome Biol. Evol.* 9, 2640-2649. doi:10.1093/gbe/evx199
- Almeida, D., Viala, V.L., Nachtigall, P.G., Michael, B., Gibbs, H.L., Serrano, S.T., Ho, P.L., Da Silva, A.M.M., Nishiyama, M.Y. Jr., Junqueira-De-Azevedo, I.L., 2021. Tracking the recruitment and evolution of snake toxins using the evolutionary context provided by the *Bothrops jararaca* genome. *PNAS.* 118, e2015159118. doi:10.1073/pnas.2015159118
- Anklesaria, J.H., Mhatre, D.R., Mahale, S.D., 2018. Structural and molecular biology of PSP94: Its significance in prostate pathophysiology. *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 23, 535-562. doi: 10.2741/4604
- Aoki, N., Sakiyama, A., Deshimaru, M., Terada, S., 2007. Identification of novel serum proteins in a Japanese viper: Homologs of mammalian PSP94. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 330-334 doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.091.
- Aoki, N., Matsuo, H., Deshimaru, M. and Terada, S., 2008. Accelerated evolution of small serum proteins (SSPs)-The PSP94 family proteins in a Japanese viper. *Gene.* 426, 7-14. doi:10.1016/j.gene.2008.08.021
- Baijal-Gupta, M., Clarke, M.W., Finkelman, M.A., McLachlin, C.M., Han, V.K., 2000. Prostatic secretory protein (PSP94) expression in human female reproductive tissues, breast and in endometrial cancer cell lines. *J. Endocrinol.* 165, 425–433. doi: 10.1677/joe.0.1650425
- Blin, N., Stafford, D.W., 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3, 2303-2308.
- Brunie, S., Bolin, J., Gewirth, D., Sigler, P.B., 1985. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å Access to a shielded catalytic center. *J. Biol. Chem.* 260, 9742–9749.

- Cao, Z., Mao, X., Xu, X., Sheng, J., Dai, C., Wu, Y., Luo, F., Sha, Y., Jiang, D., Li, W., 2005. Adaptive evolution after gene duplication in alpha-KT x 14 subfamily from *Buthus martensii* Karsch. *IUBMB Life*. 57, 513–521. doi:10.1080/15216540500149870
- Castoe, T.A., de Koning, A.P., 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., 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
- Chijiwa, T., Hamai, S., Tsubouchi, S., Ogawa, T., Deshimaru, M., Oda-Ueda, N., Ohno, M., 2003. Interisland Mutation of a Novel Phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* Venom and Evolution of Crotalinae Group II Phospholipases A₂. *J. Mol. Evol.* 57, 546-554. doi:10.1007/s00239-003-2508-4
- Chijiwa, T., So, S., Hattori, S., Yoshida, A., Oda-Ueda, N., Ohno, M., 2013. Suppression of severe lesions, myonecrosis and hemorrhage, caused by *Protobothrops flavoviridis* venom with its serum proteins. *Toxicon*. 76, 197-205. doi:10.1016/j.toxicon.2013.10.007
- Conticello, S.G., Gilad, Y., Avidan, N., Ben-Asher, E., Levy, Z., Fainzilber, M., 2001. Mechanisms for evolving hypervariability: the case for conopeptides. *Mol. Biol. Evol.* 18, 120–131. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003786
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 111, 6130–6185. doi:10.1021/cr200085w

- Deshimaru, M., Tanaka, C., Tokunaga, A., Goto, M., Terada, S., 2003. Efficient Purification of an Antihemorrhagic Factor (HSF) in Serum of Japanese Habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Fukuoka Univ. Sci. Rep.* 33, 45–53.
- Dijkstra, B.W., Kalk, K.H., Hol, W.G., Drenth, J., 1981. Structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ 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., Drenth, J., Huber, R., 1983. Structure of porcine pancreatic phospholipase A₂ at 2.6 Å resolution and comparison with bovine phospholipase A₂. *J. Mol. Biol.* 168, 163-179.
doi:10:1016/S0022-2836(83)80328-3
- Drew, A. C., Brindley, P. J., 1997. A retrotransposon of the non-long terminal repeat class from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Similarities to the chicken-repeat-1-like elements of vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* 14, 602–610.
doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025799
- Dubé, J.Y., Frenette, G., Paquin, R., Chapdelaine, P., Tremblay, J., Tremblay, R.R., Lazure, C., Seidah, N., Chrétien, M., 1987a. Isolation from human seminal plasma of an abundant 16-kDa protein originating from the prostate, its identification with a 94-residue peptide originally described as beta-inhibin. *J. Androl.* 8, 182–189. doi:10.1002/j.1939-4640.1987.tb02429.x
- Duda, T.F., Palumbi, S.R. Jr., 1999. Molecular genetics of ecological diversification: duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Conus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 6820 –6823.
doi:10.1073/pnas.96.12.6820
- Duda, T.F., Palumbi, S.R. Jr., 2000. Evolutionary diversification of multigene families: allelic selection of toxins in predatory cone snails. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1286 – 1293. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026412
- Dunn, R.D., Broady, K.W., 2001. Snake inhibitors of phospholipase A₂ enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1533, 29–37. doi: 10.1016/s1388-1981(01)00138-x.

- Edström Hägerwall, A.M., Rydengård, V., Fernlund, P., Mörgelin, M., Baumgarten, M., Cole, A.M., Malmsten, M., Kragelund, B.B., Sørensen, O.E., 2012. β -Microseminoprotein endows post coital seminal plasma with potent candidacidal activity by a calcium- and pH-dependent mechanism. *PLoS Pathog.* 8, e1002625 doi:10.1371/journal.ppat.1002625
- Fernlund, P., Granberg, L.B., Roepstorff, P., 1994. Amino acid sequence of beta-microseminoprotein from porcine seminal plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 309, 70–76. doi:10.1006/abbi.1994.1086
- Fernlund, P., Granberg, L.B., Larsson, I., 1996. Cloning of beta-microseminoprotein of the rat: a rapidly evolving mucosal surface protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 73–82. doi:10.1006/abbi.1996.0431
- Escoubas, P., Diochot, S., Corzo, G., 2000. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie.* 82, 893–907. doi:10.1016/s0300-9084(00)01166-4
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon.* 45, 969-985. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.012.
- Franchi, N.A., Avendaño, C., Molina, R.I., Tissera, A.D., Maldonado, C.A., Oehninger, S., Coronel, C.E., 2008. beta-Microseminoprotein in human spermatozoa and its potential role in male fertility. *Reproduction.* 136, 157–166. doi:10.1530/REP-08-0032
- Frankenberg, S., Fenelon, J., Dopheide, B., Shaw, G., Renfree, B. M., 2011. A novel MSMB-related microprotein in the postovulatory egg coats of marsupials. *BMC Evol. Biol.* 11, 373. doi: 10.1186/1471-2148-11-373
- Froy, O., Sagiv, T., Poreh, M., Urbach, D., Zilberberg, N., Gurevitz, M., Dynamic diversification from a putative common ancestor of scorpion toxins affecting sodium, potassium, and chloride channels. 1999. *J. Mol. Evol.* 48, 187–196. doi:10.1007/pl00006457

- Garde, S.V., Basrur, V.S., Li, L., Finkelman, M.A., Krishan, A., Wellham, L., Ben-Josef, E., Haddad, M., Taylor, J.D., Porter, A.T., Tang, D.G., 1999. Prostate secretory protein (PSP94) suppresses the growth of androgen-independent prostate cell line (PC3) and xenografts by inducing apoptosis. *Prostate*. 38, 118–125. doi:10.1002/(sici)1097-0045(19990201)38:2<118::aid-pros5>3.0.co;2-g.
- Gilbert, C., Meik, J.M., Dashevsky, D., Card, D.C., Castoe, T.A., Schaack, S., 2014. Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes. *Proc. Biol. Sci.* 281, 20141122. doi: 10.1098/rspb.2014.1122
- Haas, N.B., Grabowski, J.M., Sivitz, A.B., Burch, J.B., 1997. Chicken repeat 1 (CR1) elements, which define an ancient family of vertebrate non-LTR retrotransposons, contain two closely spaced open reading frames. *Gene*. 197, 305-309. doi:10.1016/S0378-1119(97)00276-X
- Heinrikson, R.L., Krueger, E.T., Keim, P.S., 1977. Amino acid sequence of phospholipase A₂- α from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipase A₂ based on structural determinants. *J. Biol. Chem.* 252, 4913–4921.
- Hogan, M.P., Whittington, A.C., Broe, M.B., Ward, M.J., Gibbs, H.L., Rokyta, D.R., 2021. The Chemosensory Repertoire of the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) Reveals Complementary Genetics of Olfactory and Vomeronasal-Type Receptors. *J. Mol. Evol.* 89, 313-328. doi:10.1007/s00239-021-10007-3
- Holland, D.R., Clancy, L.L., Muchmore, S.W., Ryde, T.J., Einspahr, H.M., Finzel, R.L., Heinrikson, R.L., Watenpugh, K.D., 1990. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 265, 17649–17656.
- 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 A₂ isozyme genes of *Protobothrops flavoviridis* snake. Gene. 461, 15-25. doi:10.1016/j.gene.2010.04.001

Ikeda, N., 2011. ハブ毒ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) の遺伝子進化の分子機構. 崇城大学博士論文.

Inoue, S., Kogaki, H., Ikeda, K., Samejima, Y., Omori-Satoh, T., 1991. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. J. Biol. Chem. 266, 1001–1007.

Kajikawa M, Ohshima K and Okada N., 1997. Determination of the entire sequence of turtle CR1: the first open reading frame of the turtle CR1 element encodes a protein with a novel zinc finger motif. Mol. Biol. Evol. 14, 1206-1217. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025730

Kajikawa, M., Ichiyanagi, K., Tanaka, N., Okada, N., 2005. Isolation and Characterization of Active LINE and SINEs from the Eel. Mol. Biol. Evol. 22, 673-682. doi:10.1093/molbev/msi054

Karandikar, A., Ghaskadbi, S., 2003. beta-Microseminoprotein-related molecules may participate in formation of the mesoderm in the chick embryo. Dev. Growth. Differ. 45, 309–319. doi:10.1046/j.1440-169X.2003.00698.x

Kihara, H., Uchikawa, R., Hattori, S., Ohno, M., 1992. Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipases A₂. Biochem. Int. 28, 895–903.

Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. Toxicon. 42, 827-840. doi:10.1016/j.toxicon.2003.11.002

Kishida, T., Go, Y., Tatsumoto, S., Tatsumi, K., Kuraku, S., Toda, M., 2019. Loss of olfaction in sea snakes provides new perspectives on the aquatic adaptation of amniotes. Proc. Biol. Sci. 286, 20191828. doi:10.1098/rspb.2019.1828

- Kogaki, H., Inoue, S., Ikeda, K., Samejima, Y., Omori-Satoh, T., Hamaguchi, K., 1989. Isolation and fundamental properties of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. J. Biochem. (Tokyo) 106, 966–971. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122983.
- Kohler, G., Khaing, K.P.P., Than, N.L., Baranski, D., Schell, T., Greve, C., Janke, A., Pauls, S.U., 2021. A new genus and species of mud snake from Myanmar (Reptilia, Squamata, Homalopsidae). Zootaxa. 4915, zootaxa.4915.3.1. doi:10.11646/zootaxa.4915.3.1
- Lazure, C., Villemure, M., Gauthier, D., Naudé, R.J., Mbikay, M., 2001. Characterization of ostrich (*Struthio camelus*) beta-microseminoprotein (MSP): identification of homologous sequences in EST databases and analysis of their evolution during speciation. Prot. Sci. 10, 2207–2218. doi:10.1110/ps.06501
- 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
- Li, A., Wang, J., Sun, K., Wang, S., Zhao, X., Wang, T., Xiong, L., Xu, W., Qiu, L., Shang, Y., Liu, R., Wang, S., Lu, Y., 2021. Two reference-quality sea snake genomes reveal their divergent evolution of adaptive traits and venom systems. Mol. Biol. Evol. 38, 4867-4883. doi:10.1093/molbev/msab212 2021
- Lilja, H., Abrahamsson, P.A., 1988. Three predominant proteins secreted by the human prostate gland. Prostate. 12, 29–38. doi:10.1002/pros.2990120105
- 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 A₂ with Low Activity, from *Trimeresurus flavoviridis* Venom. J. Biochem. 107, 400-408.
- Li, J.T., Gao, Y.D., Xie, L., Deng, C., Shi, P., Guan, M.L., Huang, S., Ren, J.L., Wu, D.D., Ding, L., Huang, Z.Y., Nie, H., Humphreys, D.P., Hillis, D.M., Wang, W.Z., Zhang, Y.P., 2018. Comparative genomic investigation of high-elevation

adaptation in ectothermic snakes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115, 8406-8411. doi: 10.1073/pnas.1805348115

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. Direct submission. Human Genome Sequencing Center, Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA. 2014.

Maeda, M., 2018. ハブ血清に含まれる新規ハブ毒 PLA₂ 結合因子 : SSP をコードする遺伝子の単離と特徴づけ. 崇城大学卒業研究論文

Mäkinen, M., Valtonen-André, C., Lundwall, A., 1999. New world, but not Old World, monkeys carry several genes encoding beta-microseminoprotein. Eur. J. Biochem. 264, 407–714. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00614.x

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:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026164

Masuda, S., Hayashi, H., Atobe, H., Morita, T., Araki, S., 2001. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. J. Biochem. 268, 3339-3345. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02246.x

Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochim. Biophys. Acta. 1447, 146-156. doi:10.1016/S0167-4838(99)00268-X

Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., Yamamoto, K., 2011. Recent progress in phospholipase A₂ research: From cells to animals to humans. Prog. Lipid Res. 50, 152–192. doi:10.1016/j.plipres.2010.12.001

- Murakami, M., Taketomi, Y., Girard, C., Yamamoto, K., Lambeau, G., 2010. Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie* 92, 561–582. doi:10.1016/j.biochi.2010.03.015
- Nakashima, K., Ogawa, T., Oda, N., Hattori, M., Sasaki, Y., Kihara, H., Ohno, M., 1993. Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A₂ isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5964-5968.
- 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 A₂ isozyme genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5605-5609. doi: 10.1073/pnas.92.12.5605
- Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Chijiwa, T., Nakashima, K., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, S., Kihara, H., Ohno M., 1997. Structures of genes encoding phospholipase A₂ inhibitors from the serum of *Trimeresurus flavoviridis* snake. *Gene*. 191, 31–37. doi:10.1016/S0378-1119(97)00024-3
- Nolet, S., St-Louis, D., Mbikay, M., Chrétien, M., 1991. Rapid evolution of prostatic protein PSP94 suggested by sequence divergence between rhesus monkey and human cDNAs. *Genomics*. 9, 775–777. doi:10.1016/0888-7543(91)90375-O
- Oda, N., Ogawa, T., Ohno, M., Sasaki, H., Sakaki, Y., Kihara, H., 1990. Cloning and Sequence Analysis of cDNA for *Trimeresurus flavoviridis* Phospholipase A₂, and Consequent Revision of the Amino Acid Sequence. *J. Biochem.* 108, 816–821.
- Olivera, B.M., Walker, C., Cartier, G.E., Hooper, D., Santos, A.D., Schoenfeld, R., Shetty, R., Watkins, M., Bandyopadhyay, P., Hillyard, D.R., 1999. Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides: potential evolutionary significance of introns. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 870, 223 – 237. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08883.x

- Omori-Satoh, T., Sadahiro, S., 1979. Resolution of the major hemorrhagic component of *Trimeresurus flavoviridis* venom into two parts. *Biochim. Biophys. Acta.* 580, 392-404. doi:10.1016/0005-2795(79)90151-X
- Pasquesi, G.I.M., Adams, R.H., Card, D.C., Schield, D.R., Corbin, A.B., Perry, B.W., Reyes-Velasco, J., Ruggiero, R.P., Vandewege, M.W., Shortt, J.A., Castoe, T.A., 2018. Squamate reptiles challenge paradigms of genomic repeat element evolution set by birds and mammals. *Nat. Commun.* 9, 2774. doi: 10.1038/s41467-018-05279-1.
- Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B.W., Drenth, J., Sigler, P.B., 1985. A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.* 260, 11627–11634.
- Robertson, H. M., 1993. The mariner transposable element is widespread in insects. *Nature.* 362, 241-245. doi:10.1038/362241a0
- Schaloske, R.H., Dennis, E. a., 2006. The phospholipase A₂ superfamily and its groupnumbering system. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 1246–1259. doi:10.1016/j.bbailip.2006.07.011
- Serino-Silva, C., Morais-Zani, K., Toyama, M.H., Toyama, D.d.O., Gaeta, H.H., Rodrigues, C.F.B., Aguiar, W.d.S., Tashima, A.K., Grego, K.F., Tanaka-Azevedo, A.M., 2018. Purification and characterization of the first-phospholipase inhibitor (PLI) from *Bothrops jararaca* snake serum. *PLoS ONE.* 13, e0193105. doi; 10.1371/journal.pone.0193105
- Shibata, H., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Nakamura, H., Yamaguchi, K., Hattori, S., Matsubara, K., Matsuda, Y., Yamashita, A., Isomoto, A., Mori, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Yamasaki, S., Fujie, M., Goto, H., Koyanagi, R., Takeuchi, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Shoguchi, E., Hisata, K., Satoh, N., Ogawa, T., 2018. The habu genome reveals accelerated evolution of venom protein genes. *Sci. Rep.* 8, 11300. doi:10.1038/s41598-018-28749-4
- Shioi, N., Ogawa, E., Mizukami, Y., Abe, S., Hayashi, R., Terada, S., 2013. Small serum protein-1 changes the susceptibility of an apoptosis-inducing

- metalloproteinase HV1 to a metalloproteinase inhibitor in habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*). J. Biochem. 153, 121-129. doi:10.1093/jb/mvs127
- Shioi, N., Nishijima, A., Terada, S., 2015. Flavorase, a novel non-haemorrhagic metalloproteinase in *Protobothrops flavoviridis* venom, is a target molecule of small serum protein-3. J. Biochem. 158, 37-48. doi:10.1093/jb/mvv017
- So, S., Chijiwa, T., Ikeda, N., Nobuhisa, I., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Ohno, M., 2008. Identification of the B Subtype of γ -Phospholipase A₂ Inhibitor from *Protobothrops flavoviridis* Serum and Molecular Evolution of Snake Serum Phospholipase A₂ Inhibitors. J. Mol. Evol. 66, 298–307. doi:10.1007/s00239-008-9089-1
- Suryamohan, K., Krishnankutty, S.P., Guillory, J., Jevit, M., Schroder, M.S., Wu, M., Kuriakose, B., Mathew, O.K., Perumal, R.C., Koludarov, I., Goldstein, L.D., Senger, K., Dixon, M.D., Velayutham, D., Vargas, D., Chaudhuri, S., Muraleedharan, M., Goel, R., Chen, Y.J., Ratan, A., Liu, P., Faherty, B., de la Rosa, G., Shibata, H., Baca, M., Sagolla, M., Ziai, J., Wright, G.A., Vucic, D., Mohan, S., Antony, A., Stinson, J., Kirkpatrick, D.S., Hannoush, R.N., Durinck, S., Modrusan, Z., Stawiski, E.W., Wiley, K., Raudsepp, T., Kini, R.M., Zachariah, A. and Seshagiri, S., 2020. The Indian cobra reference genome and transcriptome enables comprehensive identification of venom toxins. Nat. Genet. 52, 106-117. doi: 10.1038/s41588-019-0559-8.
- Suzuki, A., Matsueda, E., Yamane, T., Ashida, T., Kihara, H., Ohno, M., 1995. Crystal Structure Analysis of Phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu Snake) Venom at 1.5 Å Resolution. J. Biochem. 117, 730–740. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124770
- Takahashi, T., Ohsaka, A., 1970. Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; complete separation of the principles from proteolytic activity. Biochim. Biophys. Acta. 207, 65-75. doi:10.1016/0005-2795(70)90137-6
- Takeuchi, A., 2017. ハブ血清に含まれる新規ハブ毒ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) 結合因子をコードする遺伝子の単離・特徴づけ. 崇城大学卒業研究論文

- Tanaka, T., Itahana, K., Andoh, N., Takeya, T., Sato, E. 1995. Expression of prostatic secretory protein (PSP)-like protein in porcine corpus luteum: isolation and characterization of a new gene encoding PSP94-like protein. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 149–156. doi:10.1002/mrd.1080420204
- Tanaka, Y., Shioi, N., Terada, S., Deshimaru, M., 2013, Structural Organization and Evolution of a Cluster of Small Serum Protein Genes of *Protobothrops Flavoviridis* Snake. *Fukuoka Univ. Sci. Rep.* 43, 59-66.
- 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
- Ullate-Agote, A., Tzika, A.C., 2021. Characterisation of the leucistic Texas rat snake *Pantherophis obsoletus*. *Front. Ecol. Evol.* 9, 583136. doi :10.3389/fevo.2021.583136
- Vonk, F.J., Casewell, N.R., Henkel, C.V., Heimberg, A.M., Jansen, H.J., McCleary, R.J., Kerckamp, H.M., 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., Pollock, D.D., Yandell, M., Calderon, D., Renjifo, C., Currier, R.B., Salgado, D., Pla, D., Sanz, L., Hyder, A.S., Ribeiro, J.M., Arntzen, J.W., van den Thillart, G.E.E.J.M., Boetzer, M., Pirovano, W., Dirks, R.P., Spink, 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
- Vos, J. C., De Baere, I., Plasterk, R. H., 1996. Transposase is the only nematode protein required for in vitro transposition of Tc1. *Genes Dev.* 10, 755-761. doi:10.1101/gad.10.6.755
- Warr, G.W., 1990. A 12 kDa protein in chicken serum antigenically crossreactive with, but unrelated to, beta₂-microglobulin. *Dev. Comp. Immunol.* 14, 247–253. doi:10.1016/0145-305X(90)90096-W

- Warren, W. C., Wilson, R. K., 2015. Direct Submission. Genome Institute, Washingt. Univ. Sch. Med. 4444 For. Park. St. Louis, MO 63108, USA
- Warren, W.D., Atkinson, P.W., O'Brochta, D.A., 1994. The Hermes transposable element from the house fly, *Musca domestica*, is a short inverted repeat-type element of the hobo, Ac, and Tam3 (hAT) element family. *Genet. Res.* 64, 87–97. doi:10.1017/S0016672300032699
- Xuan, J.W., Wu, D., Guo, Y., Garde, S., Shum, D.T., Mbikay, M., Zhong, R., Chin, J.L., 1997. Molecular cloning and gene expression analysis of PSP94 (prostate secretory protein of 94 amino acids) in primates. *DNA Cell Biol.* 16, 627–638. doi:10.1089/dna.1997.16.627
- Xuan, J.W., Kwong, J., Chan, F.L., Ricci, M., Imasato, Y., Sakai, H., Fong, G.H., Panchal, C., Chin, J.L., 1999. cDNA, genomic cloning, and gene expression analysis of mouse PSP94 (prostate secretory protein of 94 amino acids). *DNA Cell Biol.* 18, 11–26. doi:10.1089/104454999315583
- 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 A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Toxicon.* 39, 1069–1076. doi:10.1016/S0041-0101(00)00250-6
- 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 A₂ Gene in a Specified Segment of *Protobothrops flavoviridis* Genome and Its Possible Evolutionary Relationship to Group IIA Phospholipase A₂ Genes. *Toxins.* 6, 3471-3487. doi:10.3390/toxins6123471
- Yamaguchi, K., 2015.クサリヘビ科ヘビの毒ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) 遺伝子の起源と分子進化. 崇城大学博士論文.
- Yamakawa, Y., Omori-Satoh, T., 1992. Primary Structure of the Antihemorrhagic Factor in Serum of the Japanese Habu: A Snake Venom Metalloproteinase Inhibitor with a Double-Headed Cystatin Domain. *J. Biochem.* 112, 583–589

- Yamazaki, Y., Koike, H., Sugiyama, Y., Motoyoshi, K., Wada, T., Hishinuma, S., Mita, M., Morita, T., 2002. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. *Eur. J. Biochem.* 269, 2708-2715. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02940.x
- 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 A₂ with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). *Toxicon.* 28, 43–54. doi:10.1016/0041-0101(90)90005-R
- Yin, W., Wang, Z., Li, Q., Lian, J., Zhou, Y., Lu, B., Jin, L., Qiu, P., Zhang, P., Zhu, W., Wen, B., Huang, Y., Lin, Z., Qiu, B., Su X., Yang, H., Zhang, G., Yan, G., Zhou, Q., 2016 Evolutionary trajectories of snake genes and genomes revealed by comparative analyses of five-pacer viper. *Nat. Commun.* 7, 13107. doi: 10.1038/ncomms13107.
- Zhou, L., Mitra, R., Atkinson, P.W., Hickman, A.B., Dyda, F., Craig, N.L., 2004. Transposition of hAT elements links transposable elements and V(D)J recombination. *Nature.* 432, 995–1001. doi:10.1038/nature03157
- Zhu, S., Bosmans, F., Tytgat, J., 2004. Adaptive evolution of scorpion sodium channel toxins. *J. Mol. Evol.* 58, 145 –153. doi:10.1007/s00239-003-2534-2

10. 謝辞

本研究の遂行、及び博士論文の作成にあたり、終始暖かく見守ってくださった恩師、千々岩崇仁 教授（崇城大学大学院 工学研究科 応用生命科学専攻 生命環境科学講座）には深く感謝しております。

本研究を遂行及び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 応用生命科学専攻 生命情報科学講座）、西山孝 准教授（崇城大学大学院 工学研究科 応用生命科学専攻 生命環境科学講座）、平大輔 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 助教には深く感謝しております。

ハブの生体組織サンプル採取にあたり、ご協力を頂いた服部正策 准教授（東京大学 医科学研究所）、そして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）、同研究所の柴田弘紀 准教授に心より感謝いたします。

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)、山本進二郎 教授(崇城大学 生物生命学部 応用生命科学科)に心からお礼申し上げます。

2016 年度 4 回生の竹内亜美さん、2017 年度 4 回生の前田真理恵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。

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環境科学講座の皆様
に感謝致します。

最後に、本研究に従事するにあたって経済的・心身的に支援していただいた
家族に深く感謝し、お礼を申し上げます。