

学位論文題名

脊椎動物における異物代謝酵素の進化

学位論文内容の要旨

体外から侵入してきた異物から身を守るため、生物は異物代謝機構を進化させてきた。異物代謝反応は大きく第I相反応と第II相反応に分かれ、主に第I相反応では水酸化が行われ、第II相では抱合反応が行われている。これら第I相反応と第II相反応が協調して働くことで、生物は外来異物から生体を防御している。各動物が異物代謝機構をどのように進化させてきたのかを知ることは、環境汚染物質などに対しどのように動物が反応するかという予測にもつながる。本研究では脊椎動物の異物代謝の第I相に関わるCytochrome P450 (CYP) 遺伝子、ならびに第II相に関わる酵素であるUDP-glucuronosyltransferase (UGT)、sulfotransferase (SULT)、glutathione S-transferase (GST) 遺伝子に注目し、その分子進化を明らかにした。

第一章では、異物代謝に関わると考えられる酵素の一種であるCYP1D1について、各種動物のゲノムデータベースを解析し、脊椎動物内での進化を明らかにした。CYP1D1の基質認識部位にかかる淘汰圧を推定したところ、CYP1AとCYP1D1の分岐後、魚類から両棲類が分岐した後、両棲類から有羊膜類（爬虫類、哺乳類、鳥類）が分岐した後、以上の3回に渡って正の淘汰を受けていることが示唆された。これらのことからCYP1D1は脊椎動物の進化過程で環境適応に大きく関わっていた可能性が示唆された。

またCYP1D1は今まで哺乳類では偽遺伝子化したと考えられていた。そこで、染色体上の遺伝子の位置関係の比較、ならびに脊椎動物CYP1ファミリーの系統解析を行った。その結果、北方真獣類という哺乳類の系統ではCYP1D1が偽遺伝子化している種がいるものの、他の系統の哺乳類ではCYP1D1の配列はストップコドンを含まない形で保存されていることが明らかとなった。また偽遺伝子化した動物を系統的に考察したところ、北方真獣類において複数の系統で独立してCYP1D1は偽遺伝子化していることが明らかとなった。さらに系統上CYP1D1が発現していると考えられた動物種（スローロリス、カンガルー）について、RT-PCRによりmRNAの発現を確認した。これらの結果、ならびにアミノ酸配列の保存度から、ストップコドンを含まないCYP1D1を保持する哺乳類では、CYP1D1の機能は依然維持されていると考えられる。

今回の研究により、その進化過程で、CYP1D1はCYP1Aから分岐後、代謝する基質に対する親和性を正の淘汰によって改変してきた可能性が示された。また同じCYP1D1でも、魚類、両棲類、哺乳類それぞれで基質への親和性は大きく異なっている可能性がある。さらに哺乳類では、外来異物への感受性の種差にCYP1D1が関わっている可能性が示唆された。

第二章では最も古くに他の現生鳥類から分岐したダチョウに注目し、肝臓に発現する異物代謝に関わる遺伝子を明らかにした。次世代シーケンサーを用いて肝臓に発現する異物代謝酵素遺伝子を解析し、新たにCYP遺伝子10分子種、UGT遺伝子2分子種、cGST遺伝子10分子種、SULT遺伝子6分子種を同定した。

これらの結果と他の鳥類のゲノム情報とを比較した結果、CYP遺伝子に関して、ニワトリでCYP2AF1がその機能を失い偽遺伝子化している可能性、またキンカチョウでCYP2G19が偽遺伝子化している可能性が示された。また第II相反応に関わる遺伝子の場合、SULT2B1、SULT3A1、GSTM2、GSTM3がキンカチョウ、ニワトリのいずれの種かで偽遺伝子化している可能性が示された。系統解析の結果から鳥類は哺乳類と分岐後、独自に異物代謝酵素遺伝子を重複し、環境に適応していったことが明らかとなった。また鳥類内でも他の鳥類と早くに分岐したダチョウでは、独自の異物代謝酵素を有している可能性が考えられた。

さらに第I相反応を行うCYP遺伝子に関して、CYP1A2, CYP2C23, CYP2C45, CYP2D49, CYP2G19, CYP2AF1, CYP3A37の7分子種の発現量を比較した結果、ダチョウの肝臓において、今まで鳥類の異物代謝では注目されていなかったCYP2G19遺伝子が最も発現量が高いことが確認された。哺乳類において、CYP2Gは、CYP2ABFGST遺伝子クラスターという、染色体上のEGL nine homolog (EGLN) 2とAXL receptor tyrosine kinase (AXL) の間に存在する進化的に近い遺伝子群に属している。そこで、ダチョウCYP2G19遺伝子ならびに爬虫類、鳥類、哺乳類のCYP2ABFGSTクラスターに属する遺伝子を用いて系統解析を行ったところ、CYP2Gは鳥類CYP2G19遺伝子と哺乳類CYP2G遺伝子群のそれぞれ別のクレードに分かれることが示された。鳥類CYP2G19と哺乳類CYP2G1がオルソログな関係に無いことが示唆されたので、さらに機能的に異なる可能性を調べるためCYP2G19の立体構造を哺乳類のCYP2G1の立体構造と比較した。すると、基質認識部位において、哺乳類CYP2Gで保存されている366番目のバリン、369番目のグリシンが、ダチョウCYP2G19では、それぞれロイシン、アスパラギンと異なっていることが明らかとなった。これらの結果に加え、哺乳類ではCYP2G遺伝子は肝臓では無く、嗅粘膜に主に発現していることから、鳥類におけるCYP2G遺伝子は哺乳類とは異なる機能を進化させた可能性が示唆された。

今回の結果から鳥類の異物代謝酵素遺伝子は哺乳類と分岐後、独自に遺伝子重複した鳥類特徴的な遺伝子が多いこと、また鳥類内においても、発現している遺伝子レベルで種差が存在することが明らかとなった。特にCYP2G19遺伝子についてはダチョウの肝臓において最も高い発現量を示したことから、この遺伝子が偽遺伝子化していると考えられるキンカチョウ (Neoaves) との異物代謝上の種差を生み出している可能性が考えられる。

今回の研究により、異物代謝酵素の進化について新たな知見が得られた。異物代謝酵素においては、脊椎動物が陸上に進出し進化する過程で代謝する基質に対する親和性などが改変している可能性が示唆された。また鳥類に発現する異物代謝酵素を解析した結果、哺乳類と分岐後に鳥類の系統内で独自に進化した異物代謝に関わる分子種が多いこと。鳥類内でも遺伝子の発現パターンが異なることが示唆された。本研究で示された異物代謝酵素の進化は、環境汚染物質への感受性の動物種差を考える上で有用な知見であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	石塚	真由美
副査	教授	坪田	敏男
副査	准教授	伊藤	公人
副査	講師	池中	良徳

学位論文題名

脊椎動物における異物代謝酵素の進化

本論文では異物代謝に関わる遺伝子の進化を明らかにすることを目的として研究をすすめた。

第一章においてシトクロムP450 (CYP) 1D1遺伝子の分子進化を明らかにした。脊椎動物が進化していく過程で、特に環境の変化に伴ってCYP1D1の機能が改変されている可能性を示した。また哺乳類ではCYP1D1が複数の系統で独立して偽遺伝子化したことを明らかにし、哺乳類の異物代謝の種差にCYP1D1が関わっていることが示唆された。第一章における研究は一つの異物代謝に関わる分子種が進化する過程で、代謝する基質が変化するなど、その機能を大きく変えている可能性を示した。

第二章においてダチョウの肝臓に発現するCYP、UGT (グルクロン酸転移酵素)、SULT (硫酸転移酵素)、GST (グルタチオン転移酵素) 遺伝子の解析を行った。ダチョウに発現している遺伝子を他の鳥類と比較したところ、発現している分子種に鳥類内での種差が見られた。特にCYP遺伝子について発現パターンを他の鳥類の報告と比較したところ、共通して一定量の発現を示す分子種もあるが、CYP2G19のようにダチョウに特徴的と考えられる発現量の高いCYP分子種も見られた。第二章における研究から一種の動物に発現する異物代謝に関わる遺伝子を網羅的に解析し、他の動物種と比較することで、異物代謝の種差についての知見が得られることを示した。

本研究では、異物代謝酵素は脊椎動物が陸上に進出し進化する過程で代謝する基質など機能が大きく改変している可能性があり、ある異物代謝酵素についてはオルソログスな関係にある遺伝子であっても、その基質は魚類と両棲類、哺乳類それぞれを比較すると異なる可能性が示された。また鳥類に発現する異物代謝酵素を解析した結果、哺乳類と分岐後に鳥類の系統内で独自に進化した異物代謝に関わる分子種が多いこと、鳥類内でも遺伝子の発現パターンが異なることが示唆された。

以上の結果から、川合佑典氏は、異物代謝酵素の進化について新たな知見を提供した。本研究で示された異物代謝酵素の進化は、化学物質への感受性の動物種差を考える上で有用な知見を与えると考えられる。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者川合佑典氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。