

氏 名 川嶋 彩夏

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1734 号

学位授与の日付 平成26年9月29日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命共生体進化学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Molecular evolution of cytochrome P450 in vertebrates: rapid
turnover of the detoxification-type and conservation of the
biosynthesis-type

論文審査委員 主 査 准教授 田辺 秀之
教授 颯田 葉子
准教授 大田 竜也
准教授 太田 博樹 北里大学

論文内容の要旨

Summary of thesis contents

In this thesis, I aim to elucidate the birth and death processes of vertebrate *Cytochrome P450 (CYP)* genes to understand the evolution of human *CYPs*. Members of the *CYP* family encode important metabolic enzymes that are present in all metazoans. Genes for *CYP* form a multi-gene family, and the number of genes varies widely among species. The enzymes are classified as either biosynthesis- (B-type) or detoxification-type (D-type), depending on their substrates, but their origin and evolution have not been fully understood. In order to elucidate the birth and death process of *CYP* genes, I performed a phylogenetic analysis of 710 sequences obtained from 14 vertebrate genome databases and 543 sequences from 6 invertebrate genome databases. My results showed that vertebrate D-type genes have independently emerged three times from B-type genes and that invertebrate D-type genes so far characterized differ from vertebrates in their origins. B-type genes exhibit more conserved evolutionary processes than do D-type genes, with regard to the rate of gene duplication, pseudogenization, and amino acid substitution. The differences in the evolutionary mode between B- and D-type genes may reflect differences in their respective function. The phylogenetic tree also revealed 11 clans comprising an upper category to families in the *CYP* nomenclature. Here, I report novel clan-specific amino acids that may be used for the qualitative definition of clans.

This is the first report about evolutionary mode on *CYP* genes in vertebrates and the novelties of this research are the following three points. They are described in Chapter 3:

- 1) The difference in the evolutionary mode between B- and D-types was shown quantitatively. Especially, I estimated the time and rate of gene duplications and pseudogenization or losses by comparing genome sequences.
- 2) The origin of B-type genes has been believed to be ancient. On the other hand, the origin of D- type is only known to be a duplication of B-type. I showed that vertebrate D-type genes have emerged three times from three different B-type genes, and invertebrate D-type genes so far confirmed appear to have an independent origin from vertebrate D-type genes.
- 3) The clan has been defined as an upper category of families in metazoan and plant *CYP* genes. I showed a clan-specific amino acids and this information is useful for qualitative classification of *CYP* clans.

According to the results, the evolutionary rates were different between B- and D-types significantly. The birth and death (pseudogenization) rates of B- and D-type genes differed in magnitude: the rates in B-type genes were 0.7 and 0.2 per 100 myr, respectively, whereas those in D-type genes were 12.7 and 6.9 per 100 myr, respectively. Compared with D-type genes, the evolution of B-type genes was highly

conserved with regard to their mode of birth and death processes as well as amino acid substitutions. The substrates of B-type enzymes are chemicals that play important roles in metabolism of vitamin D, steroids, and cholesterol. In contrast, the substrates of D-type enzymes are xenobiotics such as plant alkaloids. In light of this substrate specificity, I hypothesize that the conserved evolutionary pattern observed in B-type enzymes reflects the importance and conservation of their substrates, whereas the rapid evolution of D-type enzymes indicates that their substrates are flexible and highly dependent on environmental factors.

In addition to the above issues, I also performed the analysis of *CYP* pseudogenes in the human genome. *CYP* is thought that it evolved with adapting to the environment habitat. The pseudogenization is the important aspect of the evolutionary process of multi-genes. Among the presence of 58 *CYP* pseudogenes in humans, four human specific *CYP* pseudogenes have been reported, but there is no study about the rest of 54 pseudogenes. I also unveiled the cause of pseudogenization or time of pseudogenization of all human *CYP* pseudogenes.

In Chapter 4, I discussed the evolutionary mode of *CYP* genes in vertebrates. Especially, I focused on the evolutionary mode of *CYP* genes that is driven by substrate specificity. The metabolism of chemicals is the one of the systems responding to the environment. Organisms have many systems for chemical metabolism with adapting the intake of chemical materials. CYPs are one of the important components of these mechanisms and they are indispensable enzymes not only in the human but also in the almost all organisms. They work in the liver of wild animals as a main enzyme to metabolize some alkaloids, which is involved in many wild plants. On the other hand, CYPs metabolize not only alkaloids from plants but also medicines in modern humans. Modern humans become to use many medicines for the treatment of disease quite recently in the evolutionary process of humans. These medicines were made by testing for mice or macaques as model animals instead of humans. Model animals are used for the confirmation of safety in the most study on CYP metabolism for medicine until now. However, because humans and other model animals diverged a long time ago, and each species evolved in each way until now, it is necessary to confirm and reexamine these findings of model animals in humans directly and also necessary to understand the metabolic system in humans and to apply the result of the study based on model animals. Their evolutionary background must be different between humans and model animals. To understand their difference, we should know their evolutionary background that is inscribed in the genome of each species. These information is including when and how evolved each species and these information cannot be obtained from the direct examination on model animals. Therefore I tried to elucidate the metabolic systems of chemicals in humans by using evolutionary point of view.

【論文審査結果】 [2014年 7月 17日 実施]

Cytochrome P450 (CYP) は約 500 アミノ酸残基から成り、450nm の波長域で吸収ピークを有する分子の総称である。大きく次の 2 つのタイプに分類される。1) 生体内に取り込まれた薬物やアルカロイドを代謝・解毒する薬物代謝酵素とされるもの (D タイプ)、2) ステロイドホルモンなどの生理活性物質の生合成に関与するもの (B タイプ)。CYP をコードする遺伝子は、多重遺伝子族を形成しているが、生物進化の過程で様々な生息環境の変化に伴い多様化してきている。その起源は 1 つと考えられているが、いつ、どのように多様化してきたのかについては不明な点が多い。

本博士論文は、CYP 遺伝子の起源と多様化の進化的なプロセスを明らかにする目的で、脊椎動物、無脊椎動物、酵母の塩基配列データを用いた分子進化学的な解析を行ったものである。論文に記載された 7 つの項目の解析結果と考察を以下に示す。

1) 脊椎動物における D タイプ CYP 遺伝子の起源と進化 : 57 個のヒト CYP 遺伝子から作成された分子系統樹から B タイプから D タイプの派生が少なくとも 3 回の独立したイベントであることが示唆された。脊椎動物 710 個の CYP 遺伝子に基づいた系統樹から CYP 遺伝子が 10 個の clan に分かれることも示された。

2) 脊椎動物と無脊椎動物の CYP 遺伝子の比較解析 : B タイプについては脊椎動物のそれぞれの種が保有する遺伝子数はほぼ一定であるのに対し、D タイプについては脊椎動物の進化の過程で遺伝子重複や欠失が高頻度に生じていたことが示された。無脊椎動物 543 個の遺伝子の解析より、B タイプから D タイプが派生・出現した年代は約 13 億年前 - 6 億年前であり、刺胞動物の出現以前、酵母の出現以後であることが示唆された。

3) 脊椎動物と無脊椎動物の D タイプ CYP 遺伝子の起源と進化 : 脊椎動物と無脊椎動物には共に D タイプの遺伝子が存在するが、それぞれの環境に適応して独立に生じてきたものと考えられた。

4) 脊椎動物における B タイプと D タイプ CYP 遺伝子の重複と欠失 : birth and death プロセスにより遺伝子重複、欠失、偽遺伝子化が頻繁に生じてきたことが示唆された。特に、birth and death プロセスの速度を比較すると、重複、偽遺伝子化のいずれにおいても、D タイプの方が B タイプより速く起きていることが明らかとなった。

5) ヒトゲノムにおける CYP 遺伝子のクラスター : 1p (CYP4)、7q (CYP3A)、10q (CYP2C)、19p (CYP4F)、19q (CYP2) の 5 つのクラスターが存在することが示された。

6) B タイプと D タイプ CYP 偽遺伝子について : 17 個のヒト偽遺伝子のうち、3 個が B タイプ、14 個が D タイプであり、そのうち CYP2G2P はヒト特異的な偽遺伝子であった。

7) B タイプと D タイプ CYP 遺伝子の分子進化速度について : 霊長類の B タイプおよび D タイプの分子進化学的解析より、B タイプの方が D タイプより機能的制約が強いことが示唆された。

以上の様々な進化学的な特性より、D タイプの基質は生体外由来の毒物等であり、生息環境に応じて適応的に進化してきたのに対し、B タイプの基質は生体内由来の物質であり、生体内の恒常性を保ちながら遺伝子配列を大きく変えずに保存的に進化してきたことを反映しているのではないかと考察している。これは CYP 遺伝子多様化の重要な知見である。

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

以上述べたように、本博士論文には多数の重要な新知見が盛り込まれており、本論文は博士（理学）に十分値するものであると判断した。なお、「脊椎動物と無脊椎動物の *CYP* 遺伝子の起源と進化：急速な多様化を遂げる D タイプと保存的な B タイプ」に関連する部分は、申請者を筆頭著者として、査読付き国際学術誌である *PLOS ONE* に掲載済みである。

【試験結果】 [2014年 7月 17日 実施]

公開発表会では、*CYP*の特徴、分子進化学的な解析結果とその考察について、本博士論文の内容に沿った発表が行われた。特に、BタイプとDタイプの比較解析より、BタイプからDタイプの派生現象が少なくとも3回の独立したイベントによることを明らかにした点、Bタイプは脊椎動物全体でそれぞれの種が保有する遺伝子数がほぼ一定であるのに対し、Dタイプは脊椎動物の進化の過程で遺伝子重複や欠失が高頻度に生じており、環境に応じて適応的に進化してきたことを示した点などはオリジナリティーの高い研究と評価された。質疑においては、*CYP*の基本的な特性や系統樹、分岐年代、BタイプとDタイプの定義付け等の質問がなされたが、それらに対し明確な対応を行うことができた。

口頭試問では、審査員の質問やコメントに的確に対応した。特に、脊椎動物、無脊椎動物由来の膨大な遺伝子塩基配列データを用いての*CYP*遺伝子の起源と多様化の進化的なプロセスを明らかにし、多くの重要な知見を得たとともに、在籍中に多くのことを学び、多くの考察を行っている研究姿勢から、今後の研究の発展の可能性をうかがうことができた。

語学力に関しては、申請者を筆頭著者とした論文が査読付き国際誌に掲載されている点、本論文の英語要旨をはじめ、全体が英文で的確に書かれているという点から、問題ないと判断された。

以上の観点から、川嶋彩夏さんは総合研究大学院大学先導科学研究科の課程博士（理学）としての要件を充たしており、学位授与に相応しいと判断された。