

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18880

研究課題名(和文) 毒ヘビ神経毒を標的とした咬傷治療薬創製の基盤研究

研究課題名(英文) The rational design and development of anti-venom drugs for snakebites based on the endogenous inhibitors from Japanese Viper

研究代表者

塩井 成留実(青木成留実)(Shioi, Narumi)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：50510187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、毒ヘビ血液由来毒素阻害タンパク質群の標的毒素の認識機構および阻害機構を明らかにすることを目的としている。主な成果は、以下に示す3つである。

(1) ハブ毒中のイオンチャンネルブロッカーの標的イオンチャンネルを同定し、毒ヘビ血清タンパク質がその毒素の生理活性を阻害することを明らかにした。(2) ファージディスプレイ法および化学合成法を用いて、阻害タンパク質の毒素結合領域のペプチド合成を行った。(3) 数種のヘビ粗毒を用いて、ヘビ血液成分との結合毒素を同定した。

研究成果の概要(英文)：According to WHO report is estimated 5.4 million people are bitten each year. Snakebite is a serious problem as a neglected public health issue in the world. A crude venom contains various proteins induced various effects in their prey or their human victim.

On the other hand, venomous snakes have endogenous proteins to neutralize the toxicity of their venom components. We identified new class of endogenous inhibitors from *Protobothrops flavoviridis* serum.

In this study, we investigated of potential utility of SSPs in therapeutic drug for snakebites as follows; (1) we have identified target ion channels of ion channel blockers of Japanese Viper and revealed that venom snake serum protein inhibits the toxin's physiological activity. (2) Peptides synthesis of the toxin binding domains of the inhibitory proteins were carried out using a phage display method and chemical synthesis method. (3) We identified binding proteins from several snake crude venoms using by snake blood components.

研究分野：生化学

キーワード：ヘビ毒タンパク質 ヘビ血清タンパク質 毒素阻害剤 イオンチャンネルブロッカー

## 1. 研究開始当初の背景

2017年の世界保健機構の報告によると世界では、年間5.4百万人のヒトがヘビ咬傷被害に遭っている。特に貧困地域では死者が多い。そのため世界的に効果的な治療薬の開発などが求められている。

我々はこれまで毒ヘビの血清中に含まれる数種類の阻害タンパク質を見出し、それらが特異的にヘビ毒を阻害することを明らかにしてきた。これまでの成果より、毒ヘビは自己の毒に対する自己防御システムを血液中に備えていることを提唱している。

本研究では、当研究室で見出した毒ヘビ血液中のヘビ毒素を中和する阻害タンパク質群(SSP-1~SSP-5)に着目して、その利用を目的としている。我々は世界で初めてイオンチャンネルブロッカー毒素(triflin)とその阻害タンパク質(SSP-2)の複合体の立体構造解析を明らかにした。ヘビが持つ自己の毒を中和するタンパク質が、『どのようにしてヘビ毒中の標的分子を見つけ、どの部位で特異的に阻害しているのか?』を構造的知見より洞察できる。この成果は、より効率的で効果的な阻害剤の設計を可能としている。しかしながら、阻害剤の設計には、毒素の生理機能とその生理活性部位の情報も必要不可欠となる。ヘビ毒イオンチャンネルブロッカーが、その標的イオンチャンネルとどこで相互作用しているか未だ明らかではない。また、その他 SSP は、標的毒素が異なり、どの領域が SSP 群の特異性を示すのかは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、毒ヘビ血液由来毒素阻害タンパク質群(SSPs)の標的毒素分子認識機構および阻害機構を明らかにすること、さらに SSP 群の応用を目的としている。毒素と阻害タンパク質複合体の立体構造解析の情報をもとに、本研究の具体的な目的と計画は以下の3つである。

- (1) 毒素標的イオンチャンネルの同定と阻害剤の阻害評価の確立：Triflin の標的チャンネルはまだ同定されていない。動物実験ではなく、細胞を用いてチャンネルブロッカー活性およびその抑制評価を行うため比較的簡便なアッセイ系を構築することを目的とする。
- (2) 金属プロテアーゼ毒素を阻害する SSP のペプチドライブラリ作成および阻害機能を保持した阻害タンパク質(SSP)の低分子化：阻害能を保持したペプチドの生合成と化学合成を検討する。具体的にはファージディスプレイ法を用いてペプチドライブラリを作製し、より特異的で強い毒素阻害活性をもつペプチドを単離する。また、推測できる阻害領域のペプチドを合成し、その阻害能を評価する。
- (3) SSP の他の毒ヘビ毒素阻害への応用：日本に生息する毒ヘビに限らず、世界でもヘビ咬傷被害を引き起こす毒ヘビに対しても阻害活性を持つかどうかを調査する。

## 3. 研究の方法

- (1) 毒素標的イオンチャンネルの同定と阻害剤の阻害評価の確立：パッチクランプ法、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法による生理学実験より、毒素(triflin)単独と阻害タンパク質(SSP-2)存在下でイオンチャンネルの電位依存性チャンネル活性をモニタリングした。使用した細胞は、平滑筋細胞 A7r5 および推測されている triflin の標的チャンネル( $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル)を発現させた HEK293 細胞である。
- (2) 金属プロテアーゼ毒素を阻害する SSP のペプチドライブラリ作成および阻害機能を保持した阻害タンパク質(SSP)の低分子化：M13 ファージまた

は T7 ファージを用いて、結合関与すると推測した領域をランダム化したペプチドライブラリの構築とおこなった。SSP の中でも N 末端ドメインからのみなる SSP-3 を鋳型として用いている。ファージ上に提示されているかの確認はウエスタンブロッティングで行った。標的毒素としてハブ毒金属プロテアーゼ HR1A, HR1B, flavorase を用いてバイオパンニング操作を行い、特異的に結合するファージの単離を行った。引き続き、単離されたファージの塩基配列決定を行った。また、ペプチド合成機を用いて、SSP の N 末端側の可変領域のペプチドを合成し、その阻害評価を行った。

(3) SSP の他の毒ヘビ毒素阻害への応用：シンガポール国立大学 KINI 教授研究グループとの共同研究により、コブラ科やクサリヘビ科毒サンプルの入手が可能となった。我々が日本毒ヘビ（ハブ、マムシ）の血液中から見出した SSP が他の毒ヘビの毒素と相互作用するのかを SSP を固定化したアフィニティクロマトを作成し、そのカラムに、各種ヘビ粗毒をアプライした。

#### 4. 研究成果

本研究対象のハブ毒素および内在性阻害剤(SSP)の調整は、奄美ハブの粗毒または血液中からいくつかのクロマトグラフィーを組み合わせることで既に確立している方法で精製した。また、大腸菌発現系を用いて組み換え体 SSP と triflin を調製した。ジスルフィド結合に富む triflin および SSP は不溶性分画として得られたため、両者ともに希釈法を用いたリフォールディングを行い、その結果、巻き戻し効率約 20%程度で調製に成功している。現在、NMR 測定に可能な量を調整するため、合成条件を検討している。

(1) 毒素標的イオンチャネルの同定と阻害剤の阻害評価の確立：ハブ毒 triflin は、ラット尾の平滑筋収縮を阻害するという報告があるが、標的イオンチャネルは同定されていない[Yamazaki, J.B., 269, p2708-15, 2002]。本研究では、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの発現量が多い平滑筋細胞 A7r5、および、ラット L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを高発現させた HEK293 細胞を用いて、電位依存性チャネルに対する triflin の電流阻害活性を測定した。デジタル  $\text{Ca}^{2+}$ イメージング法を用いてイオンチャネル活性を  $\text{Ca}^{2+}$ の流入でモニタリングした結果、triflin を加えることによって、 $\text{Ca}^{2+}$ の流入が抑えられ、チャンパー内を washout 後もその流入が見られなかったことから triflin はチャネルに強く結合することがわかった(図 1A)。一方、SSP-2 はその triflin のチャネル結合を阻害したいと思います(図 1B)。また、パッチクランプ法による生理学実験から平滑筋細胞 A7r5 の活動電位はコントロールに比べ優位に triflin はそれを阻害した。また、その I-V カーブの曲線パターンは L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを示している(図 2A)。また、HEK293 細胞を用いて triflin が L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの電位依存性チャネル活性を阻害し、一方、SSP-2 を加えると、triflin によるイオンチャネル阻害を抑制した(図 2B)。この実験系は蛍光基質を使用するため比較的簡便に定量化が可能であり、SSP-2 の triflin 阻害活性評価系にも有効である。

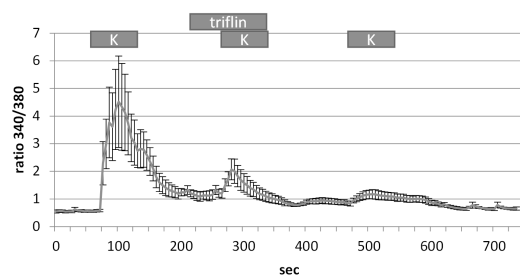


図 1 A : triflin の L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害活性 ( $\text{Ca}^{2+}$ イメージング法、HEK293 cell)

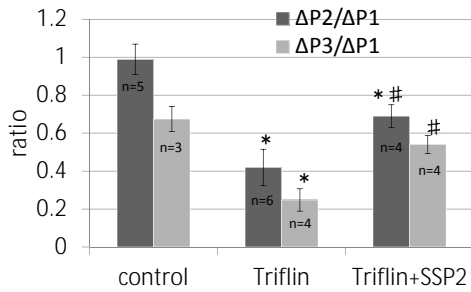


図 1 B : triflin チャンネル阻害活性に対する SSP-2 の影響 (Ca<sup>2+</sup>イメージング法、HEK293 cell)

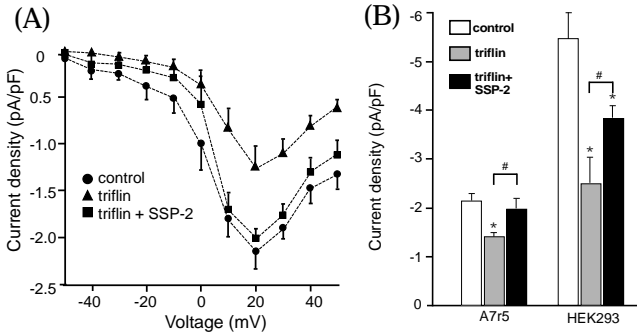


図 2 : triflin チャンネル阻害活性に対する SSP-2 の影響 (パッチクランプ法、A) A7r5 cell B)まとめたグラフ)

(2) 金属プロテアーゼ毒素を阻害する SSP のペプチドライブラリ作成および阻害機能を保持した阻害タンパク質(SSP)の低分子化: フェージディスプレイ法によって作成した N 末端をランダム化した T7-SSP-3Nr が フェージ上で提示されているかフェージ抗体を用いて確認した。続いて、flavorase や HR1A、HR1B でバイオパンニングを行い、その結合評価を ELISA 法で行った。その結果、結合するフェージの単離に成功した(図 3)。引き続き、毒素との結合親和性とその阻害能評価を行う予定である。塩基配列の結果、疎水性に富むアミノ酸配列であった。

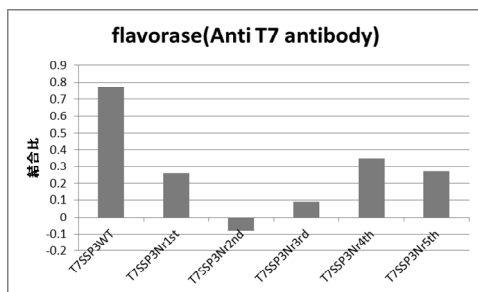


図 3 : バイオパンニングの各ラウンドのフェージと flavorase との結合解析

平衡して M13 フェージ上に SSP-3 の提示を試みた。フェージ表面にペプチドが提示できているかウエスタンブロッティングで確認した。M13SSP-3 はバンドが確認され、提示していることを確認した。つづいて、作製した M13 フェージペプチドと毒素の結合解析を行った結果、天然 SSP-3 とは異なり、M13SSP-3 は flavorase に結合しなかった。したがって、提示した目的ペプチドのデザインを再検討する必要がある。

ヘビ毒金属プロテアーゼ(SVMV)と結合する SSPs (SSP-1、-3、-4)と毒素の結合に関与していると考えられる領域をペプチド合成機を用いて合成した。逆相 HPLC で精製後、合成した阻害ペプチドの毒素に対する阻害を評価した。その結果、それぞれ 2 種類の阻害ペプチド (S-SSP-1、L-SSP-1) はアポトシス誘導型 SVMP (HV1) に対して阻害を示さなかった(図 4A)。一方、S-SSP-4 は HV1 に対して阻害を示さなかったが、L-SSP-4 は HV1 に対して残存活性が 60%であったことから弱い阻害を示している事が分かった(図 4B)。また、S-SSP-3、L-SSP-3 は flavorase に対して阻害を示さなかった。いずれにしても弱いため、デザインを再検討する必要がある。

SVMV 残存活性

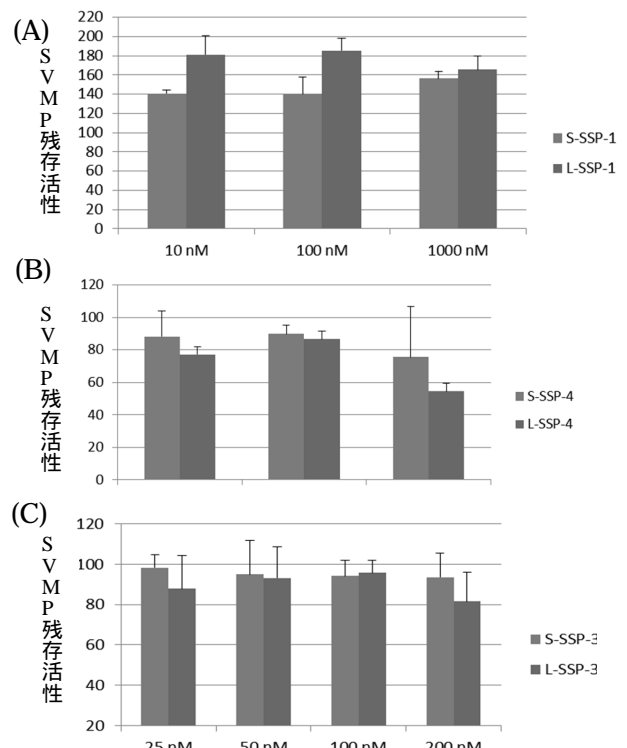


図 4 : 合成ペプチドのヘビ毒金属プロテアーゼに対する阻害効果(A)Hv1 (B)Hv1(C)flavorase

( 3 ) SSP の他の毒へヒ毒素阻害への応用 : SSP-2 を固定化したアフィニティークロマトを作成し、*Naja naja*, *Naja naja Kouthia*, *Bothrops jararaca*, *Oxyuraums sculelladus*, *Notechis Scutatus*, *Bothrops medusa*, *Gloydius halys brevicaudus*, 計 7 種類の粗毒をアプライした。結合分画のタンパク質同定を電気泳動および LC-MSMS を用いて行った。その結果、コブラ科においては粗毒から特異的に triflin とホモログのイオンチャネルブロッカー毒素が結合し、単離できることを証明した。興味深いことに、CRISP タンパク質がかなり少ないヘビにおいては、金属プロテアーゼを結合分画に得ることができた。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Seo Tadahiko, Sakon Taketo, Nakazawa Shiori, Nishioka Asuka, Watanabe Kohei, Matsumoto Kaori, Akasaka Mari, Shioi Narumi, Sawada Hitoshi, Araki Satohiko, Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP5/6, which disrupts cell-cell adhesions in vitro and induces haemorrhage in vivo, *The FEBS Journal*, **284**, 1657 ~ 1671, 2017

[ 学会発表 ] ( 計 21 件 )

Narumi Shioi(Aoki), Yoshitetsu Handa, Haruna Sato, Sho Iwasaki, Shigeyuki Terada, Functional analysis of the endogenous inhibitors, small serum proteins, from serum of Japanese viper, International Society on Toxinology 2016

塩井(青木)成留実・胸元芳・永井佑樹・寺田成之、Bowman-Birk 型トリプシンインヒビター前駆体のプロセシング酵素 (LPE) の精製と性質、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会

加藤誠・播磨大樹・佐藤晴奈・塩井(青木)成留実、*Protobothrops flavoviridis* 毒金属プロテアーゼの C3 成分に対する影響とその相互作用について、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会, 2016

岩崎翔、平石敬三、倉原琳、塩井成留実、毒ヘビ CRISP の構造とその生理機能解析について、第 63 回トキシシンポジウム

佐藤晴奈、播磨大樹、加藤誠、塩井成留実、補体 C3 成分に対する *Protobothrops flavoviridis* (habu) 毒中の金属プロテアーゼ flavorase の切断活性と相互作用について、第 63 回トキシシンポジウム, 2016

塩井成留実、佐藤晴菜、加藤誠、岩崎翔、毒ヘビ咬傷被害の現状とその治療の問題点、第 63 回トキシシンポジウム

加藤誠、佐藤晴菜、岩崎翔、塩井成留実、毒ヘビの血液成分について、第 63 回トキシシンポジウム, 2016

Yuki Nagai, Narumi Shioi, Shigeyuki Terada, Masanobu Deshimaru, Identification of a substrate recognition sites of the processing enzyme for a precursor protein of hyacinth trypsin inhibitors (LHTIs), The 89<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society

Narumi Shioi Aoki, Analysis of Interaction between Novel Peptides from Venomous Snake Serum and Viper Toxins, BIT's 10 th Anniversary of Protein and Peptide Conference, 2017

Yukiko Suematsu, Mika Yukutake, Narumi Shioi, Isao Kuraoka, New assay to detect DNA-damaging agents in water pollution using DNA enzyme functions, 5th International Symposium & Exhibition on Aqua Science and Water Resources (ISASWR'17), 2017

Narumi Shioi, Takashi Tadokoro, Yaopeng Hu, Lin Hai Kurahara, Keizo Hiraishi, Katsumi Maenaka, Isao Kuraoka, Shigeyuki Terada, Specificity of endogenous inhibitor for the neurotoxin based the interaction and structure

analysis in the venomous snake, 19th World Congress of the International Society on Toxinology, 2017

Narumi shioi Aoki , The Positive Mutations for Accelerated Evolution in the Venomous Snake Proteins, The 12th International conference & 5th ASIAN congress on environmental mutagens, 2017

Reina Takatsuka, Shigenori Iwai, Noriko Suematsu, Narumi Shioi and Isao Kuraoka, An assay to Detect DNA-Damaging Agents that Induce Nucleotide Excision-Repairable DNA Lesions, The 12th International conference & 5th ASIAN congress on environmental mutagens, 2017

佐藤晴奈、塩井成留実、財津佳史、寺田成之、蛇毒メタロプロテアーゼ阻害タンパク質 SSP-1 の相互作用部位の特定、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会, 2017

加藤誠、安部竜矢、平野亨、塩井成留実、ハブ毒金属プロテアーゼ flavorase に対する阻害タンパク質 SSP-3 の応用、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会, 2017

永井佑樹、塩井成留実、弟子丸正伸、寺田成之、ヒヤシンス球根ゲノム DNA 配列解析よりヒヤシンストリプシンインヒビター前駆体遺伝子の決定、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会, 2017

Narumi Shioi, Takashi Tadokoro, Yaopeng Hu, Katsumi Maenaka and Shigeyuki Terada, Novel insights from structure analysis of the neurotoxin and its endogenous inhibitor protein complex in the venomous snake, The 17th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan 2017

塩井成留実、田所高志、胡耀鵬、倉原琳、平石敬三、前仲勝実、ハブ血清蛋白質 SSP の毒蛇 CRISPs の阻害剤としての応用、第 64 回トキシシンポジウム, 2017

上田翔太、末松祝福子、行武美華、塩井成留実、倉岡功、T7 endonuclease I を用いた DNA

損傷剤の検出法、第 46 回日本環境変異学会 (JEMS), 2017

(招待講演)

塩井(青木)成留実、「毒ヘビは自己の毒に対して備えを持っている—特異的突然変異で獲得してきた毒素とその阻害蛋白質の多様性について—、変異機構研究会・第 30 回夏の学校変異機構研究会, 2017

② Narumi Shioi Aoki, Diversification of a venomous snake genome with accelerated evolution, the 18th All India Congress of Cytology and Genetics, January, 2018,

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩井(青木) 成留実 (Narumi Shioi)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：50510187

### (2) 研究分担者

研究者番号：

### (3) 連携研究者

研究者番号：

### (4) 研究協力者

前仲勝実 (Katsumi Maenaka)

倉原琳 (Lin Hai Kurahara)

胡耀鵬 (Yaopeng Hu)

平石敬三 (Keizo Hiraishi)

平野亨 (Toru Hirano)