

機関番号：32684

研究種目：基盤研究（B）海外

研究期間：2007～2010

課題番号：19406002

研究課題名（和文）熱帯・亜熱帯地域に生息する毒ヘビ毒中の新規生理活性蛋白質の網羅的探索

研究課題名（英文）Comprehensive study to explore new physiologically active proteins in the snake venoms in the tropical and subtropical regions

研究代表者 森田 隆司 (MORITA TAKASHI)
明治薬科大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：90128108

研究成果の概要（和文）：我々は熱帯・亜熱帯地域に生息する毒ヘビ毒中のプロ凝固活性、抗凝固活性、血小板アゴニスト/アンタゴニスト活性を有する多彩な興味あるタンパク質を検索した。さらに我々は新規のC型レクチン様タンパク質、システイン・リッチ分泌タンパク質（CRISP）を単離し、その性質を解析した。我々は最終的に10種以上の構造的かつ機能的に新規な抗凝固タンパク質、抗血小板タンパク質、VEGF様タンパク質を単離後、その性質を明らかにした。これらの分子は極めて活性が強くユニークな機能を有していた。

研究成果の概要（英文）：We have performed to study a diverse range of interesting proteins such as procoagulants, anticoagulants, platelet agonists, and platelet antagonists in the venoms of venomous snakes in the both tropical and sub-tropical region. In addition, we have comprehensively studied on the search, isolation, characterization of new C-type lectin-like proteins, cysteine-rich secretory proteins (CRISPs). We finally isolated and characterized more than ten structurally and functionally novel proteins with anticoagulant, antiplatelet or VEGF-activities. These molecules are known to exhibit potent and unique biological activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	5,900,000	1,770,000	7,670,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：医歯薬学A・生物系薬学

キーワード：生理活性、蛋白質、プロテアーゼインヒビター、神経毒蛋白質、VEGF

1. 研究開始当初の背景

(1) マムシやハブなどのクサリヘビ科のヘビ毒中には、神経毒は含まれないと考えられていた。最近、我々はクサリヘビ科ヘビ毒中に従来より高分子量で性質の全く異なる新型神経毒が含まれていることを見出した。これらはコブラ科ヘビ毒由来の低分子量神経毒タンパク質（アセチルコリン受容体ブロッ

カー、分子量 6,000 以下）と異なり、新型の高分子量L型カルシウムチャネルブロッカー（分子量 2.5 万）であった。これらの新型神経毒タンパク質に対する抗体を作製し、前述の毒ヘビを入手し最終目標として 40 種のヘビ毒を検索する。

(2) 最近、オーストラリア大陸に生息するキングブラウンヘビ毒から高分子量神経毒を

単離し、cGMP 依存性の視覚・嗅覚チャネルの強力なブロッカーであることを見出した。この先駆的な研究は、特に国外で注目される研究になりつつある。

(3) 一方、数年前からヘビ毒の強力な血圧降下作用に注目し、その原因成分の単離を試みた。その結果、新型 VEGF (VEGF-F と命名) を単離し、ヒト VEGF より活性が 2 倍強いことを明らかにした。現在、新型 VEGF 類似タンパクが各種ヘビ毒に含まれており、意外にもその生理活性がお互いに異なることが明らかになりつつあるので、熱帯・亜熱帯地域(特にアジア・アフリカの各国) から可能な限り多数の毒腺とヘビ毒を入手し、この新型 VEGF ファミリーの全体像を明らかにしたい。以上の研究を遂行するために熱帯・亜熱帯地域に生息する毒ヘビの毒腺と粗毒を可能な限り、入手し、それらの材料を用いて上記の課題のターゲットタンパク質を網羅的に探索する。

2. 研究の目的

(1) 熱帯・亜熱帯地域に生息する毒ヘビの毒腺と蛇毒を現地で採取するため現地を訪問し、研究材料を確保する。

(2) 「加速進化」によるヘビ毒タンパク質の構造と機能の多様化を網羅的に解析するために、出来る限り多種類のヘビ毒を入手する。その材料を用いて申請者がこの十数年行なってきた「血栓毒」と「抗血栓毒」をはじめ、新規の「血小板毒タンパク質」、さらに「新型の神経毒タンパク質」と「新型の VEGF」を網羅的に探索する。

3. 研究の方法

(1) 研究材料の確保

この数年、海外の業者からヘビ毒及び生きた毒ヘビを入手する事が、事実上不可能になってきた。今回、熱帯・亜熱帯地域に生息する毒ヘビの毒腺と粗毒を現地で採取するため一部は現地を訪問し、研究材料を確保した。主にアジア・アフリカ域に生息するクサリヘビ科(クサリヘビ亜科およびマムシ亜科)とコブラ科(ウミヘビ亜科およびコブラ亜科)の毒ヘビ及びその毒腺を 30 種以上を入手した。

下記に本研究により入手した主な毒ヘビ毒(一部は毒腺)の具体的な種名を示した。

① アジアに生息する毒ヘビの種名(分布)
Agkistrodon brevicaudus (韓国)、Agkistrodon saxatilis (中国、ロシア)、Calloselasma rhodostoma、マレー・マムシ(マレー半島)、Deinagkistrodon acutus、百歩蛇(中国、台湾)、Echis carinatus (インド)、Echis multisquamatus (アフガニスタン)、Echis sochureki (インド)、

Naja kaouthia (タイ)、Naja naja atra (ベトナム、中国)、Ophiophagus hannah、キングコブラ(東南アジア)、Trimeresurus mucrosquamatus (台湾)、Vipera ammodytes (トルコ)、Trimeresurus stejnegeri (中国) Daboia russelli siamensis (東南アジア)、Daboia russelli russelli (インド)、

② アフリカに生息する毒ヘビの種名と分布
Bitis arietans (南アフリカ)、Dendroaspis polylepis (エチオピア)、Echis leucogaster (アフリカ北西部)、Echis ocellatus (アフリカ西部)、Echis pyramidum (エジプト)、Eristocophis macmahoni (イラン、パキスタン)、Hemachatus haemachatus (南アフリカ)、Naja haje annulifera (エジプト)、Naja mocambique mocambique (南アフリカ)、

③ アメリカに生息する毒ヘビの種名と分布
Agkistrodon contortrix、アメリカマムシ(米国南部)、Agkistrodon piscivorus、ヌママムシ(米国南部)、Crotalus atrox、ガラガラヘビ(米国砂漠地帯)、Crotalus durissus terrificus (南アメリカ)

④ オーストラリアに生息する毒ヘビの種名と分布

Notechis scutatus (オーストラリア南部)、Pseudechis australis (オーストラリア北東部)、Pseudechis colletti (オーストラリア、クイーンランド) Pseudechis guttatus (オーストラリア東南部)、Pseudechis porphyriacus (オーストラリア東南部)

(2) タンパク質の諸性質の解析

これらの粗毒を出発材料として新規の「神経毒タンパク質」、「血栓毒タンパク質」及び「新型 VEGF」を網羅的に探索し、単離したタンパク質のタンパク化学的性質を解析した。

4. 研究成果

(1) 組織型および毒型 VEGF の比較生化学的解析

種々のヘビ毒タンパク質はしばしば、生物活性に重要な領域を選択的に変化させることで多様な機能を獲得することが知られている。そこで我々は、VEGF-F (毒型 VEGF) の分子多様性を明らかにするため、毒ヘビに発現する種々の組織型 VEGF (ヘビ VEGF-A) および毒型 VEGF (VEGF-F) の配列を決定した。それらを比較した結果、組織型 VEGF の構造は互いに高く保存されていたのに対し(>94%)、毒型 VEGF は多様性に富んでおり、特に受容体結合ループ 1 とループ 3 および C 末端の補助因子と結合すると予測される領域が最も多様化していた。毒ヘビ由来の組織型および毒型 VEGF を機能的および系統発生的に分類すると、毒型 VEGF は組織型とは独立した進化を遂げたかと予測された。また、毒型 VEGF は少なくとも 3 群に分けることがで

きることが分かった。以上の結果から、ヘビ毒腺に発現する毒型 VEGF (VEGF-F) は機能的に特に重要な領域の構造を変化させることで、その機能を多様化していると推定した。

(2) 毒ヘビ由来のC型レクチン様タンパク質の単離とその諸性質の解析

我々は、この 20 年間、ヘビ毒から新規の生理活性タンパク質を多数見出し、その生化学的性質を明らかにした。特に重要なのは、C型レクチン様タンパク質であり、ビタミンK依存性の血液凝固因子の重要なドメインの立体構造決定に多大の貢献をした。本研究ではC型レクチン様タンパク質の多様化機序を明らかにし且つ、C型レクチン様タンパク質の立体構造に対する重要な情報を与えることに成功した。主なものはハブ毒と百歩蛇毒由来の血液凝固IX因子/X因子結合タンパク質、アフリカ西部に生息する *Echis c.leucogaster* の毒およびアフガニスタンに生息する *Echis multisquamatus* 毒から、それぞれ新規のプロトロンビンアクチベーター (carinactivase と multactivase と命名) を単離し、血漿プロトロンビンの定量法を確立した。マレーマムシ毒から血小板研究に極めて有用な rhodocytin (新規に命名) を単離した。rhodocytin は、山梨医大 (現山梨大学医学部)・尾崎研究室との共同研究で新規の血小板膜受容体 CLEC-2 のアゴニストであることを見出した。EMS16 はコラーゲン受容体の GPIa/IIa に結合する唯一の C 型レクチン様タンパク質であるので、その立体構造を明らかにすることは重要であった。そこで、実験材料はアフガニスタン北部の砂漠地帯に生息する毒ヘビであったので、今回、極少量(0.1mg 以下)の EMS16 しか単離できなかったが、その X 線結晶構造解析に成功した。その結果、糖鎖結合部位と予測されていた B サブユニットの Asn21 に糖が結合していることを明らかにした。また、EMS16 は、他のヘテロ二量体 C 型レクチン様タンパク質でリガンド結合部位とされている二つのドメイン間の窪みに、特徴的な陽性荷電を持ち、GPIa/IIa の I ドメインとの結合に寄与しているものと思われる。以上の結果は C 型レクチン様タンパク質の新しい領域を切り開いたといえる。

(3) 新規の Kunitz 型血液凝固 Xa 因子インヒビターの単離とその機能

今まで TFPI 以外では、Kunitz 型凝固 Xa 因子インヒビターは見出されていなかった。今回、*Bitis arietans* 毒より強い Xa 因子インヒビター活性を検出・単離し、その性質や機能を解析した。①29 種のヘビ毒中の Xa 因子インヒビター活性： Xa 因子合成基質水解活性の阻害を指標にして検索した結果、*B. arietans* 毒のみに強い Xa 因子阻害活性を見出した。

②精製：*B. arietans* 毒より Superdex 200pg、Q-Sepharose Hp 及び 5C18AR300 を用いて Xa 因子インヒビターを単離し、bitoran と命名した。③アミノ酸配列：bitoran は 62 アミノ酸からなる Kunitz 型 Xa 因子インヒビターであった。Kunitz 型セリンプロテアーゼインヒビターとしては珍しく、Asn27 に N 型糖鎖が付加されていた。④インヒビター機能解析：Xa 因子阻害活性の IC50 は $1.1 \times 10^{-10} \text{M}$ であった。Biacore3000 による Xa 因子と bitoran 間の Kd 値は、 $2.2 \times 10^{-10} \text{M}$ であった。⑤糖鎖解析：bitoran のアミノ酸配列による糖鎖を含まないマス値は 8,404 で、MALDI-TOF-MS 解析による糖鎖を含む bitoran のマス値は 10,633 なので、Asn27 に付加している糖鎖の分子量は 2,229 と推定した。現在、糖鎖構造を決定中であるが、fucose の付加したユニークな構造をもっていた。⑥bitoran の発現：南アフリカ産の *B. arietans* 毒腺から単離した bitoran の cDNA を用い、*E. coli* の発現系(糖鎖を含まない bitoran)とバキュロウイルス (SF9) 発現系(糖鎖を含む bitoran)より bitoran 発現体を単離し、その機能の比較解析を行なった。

(4) 毒ヘビ由来の CRISP の発見・単離・諸性質の解明

CRISP(cysteine-rich secretory proteins)ファミリータンパク質はヒト精子の成熟や免疫機構に関与すると考えられている。我々はいくつかのヘビ毒中に CRISP ファミリータンパク質を世界ではじめて見出し、各種毒ヘビを検索し、それらから 10 種類以上の CRISP タンパク質を単離し、一次構造とその性質を明らかにした。抗体の交差性を利用して種々のヘビ毒中における CRISP ファミリータンパク質の分布について検討した。16 種のうち 14 種に交差性がみられ、そのうち 3 種のヘビ毒から CRISP ファミリータンパク質を単離し、全一次構造を決定した。以上の結果から、CRISP ファミリータンパク質は多くのヘビ毒に共通する新しい毒素コンポーネントであると結論した。

(5) 環状環状ヌクレオチドゲート (CNG) チャンネル・インヒビターの単離・性質の解析

環状ヌクレオチドゲート (CNG) チャンネルはヒトの嗅覚および視覚の感覚伝達において中心的な働きをしている。ヘビ毒中に含まれる pseudochetoxin (PsTx) および pseudocin (Pdc) を単離し、その性質を解析したところ、CNG チャンネルの唯一のブロッカータンパク質で、cysteine-rich secretory protein (CRISP) と呼ばれるタンパク質ファミリーに分類されることが判明した。CRISP は N 末端の PR-1 ドメインと C 末端の cysteine-rich ドメインから構成される。今回その構造機能相関を明らかにする目的で PsTx と Pdc の X 線結晶構造

を決定した。その結果、Zn²⁺イオンの結合の有無によって PR-1 ドメインに対する cysteine-rich ドメインの配向性が変化することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Yamazaki Y, Matsunaga Y, Tokunaga Y, Obayashi S, Saito M and Morita T: Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. *J. Biol. Chem.* (査読有) 284 : 9885-9891 (2009)
2. Matsunaga Y, Yamazaki Y, Suzuki H, Morita T: VEGF-A and VEGF-F evoke distinct changes in vascular ultrastructure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 379: 872-875 (2009)
3. Matsunaga Y, Yamazaki Y, Hyodo F, Nozaki M, Morita T. Structural divergence of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms. *J. Biochem.* (査読有) 145: 365-375 (2009)
4. Ishikawa M, Kumashiro M, Yamazaki Y, Atoda H, Morita T. Anticoagulant mechanism of factor IX/X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* (査読有) 145: 123-128 (2009)
5. Fujisawa D, Yamazaki Y, Lomonte B, Morita T: Catalytically inactive phospholipase A2 homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region. *Biochem. J.* (査読有) 411: 515-522 (2008)
6. Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, Pink R, Buckley SMK, Greig JA, Denby L, Custers J, Morita T, Francischetti IMB, Monteiro RQ, Barouch DH, Rooijen NV, Napoli C, Havenga MJE, Nicklin SA, Baker AH: Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* (査読有) 132: 397-409 (2008)
7. Suzuki N, Yamazaki Y, Brown RL, Fujimoto Z, Morita T, Mizuno H. Structures of pseudochetoxin and pseudocin, two snake-venom cysteine-rich secretory proteins that target cyclic nucleotide-gated ion channels: implications for movement of the C-terminal cysteine-rich domain. *Acta Cryst.* (査読有) D64: 1034-1042 (2008)
8. Yamazaki Y, Nakano Y, Imamura T, Morita T: Augmentation of vascular permeability of VEGF is enhanced by KDR-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 355: 693-699 (2007)
9. Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H, Ozaki Y. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells; *J. Biol. Chem.*

(査読有) 282 : 25993-26001 (2007)

10. Sakata T, Okamoto A, Morita T, Kokubo Y, Sato K, Okayama A, Tomoike H and Miyata T. Age- and gender-related differences of plasma prothrombin activity levels. *Thromb. Haemost.* (査読有) 97: 1052-1053 (2007)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 血液凝固 IX 因子と抗凝固タンパク質 (IX/X-bp および IX-bp) の相互作用に対する Mg²⁺の影響: 石川みどり、山崎泰男、森田隆司、第 55 回毒素シンポジウム、2008/7、山梨
2. 組織型および毒型 VEGF (血管内皮増殖因子) のゲノム構造解析: 山崎泰男、齋藤麻衣、徳永優子、森田隆司、第 55 回毒素シンポジウム、2008/7、山梨
3. 血液凝固 IX 因子と抗凝固タンパク質 (IX/X-bp および IX-bp) の相互作用の速度論的解析: 石川みどり、山崎泰男、森田隆司、日本薬学会 128 年会、2008/3、横浜
4. 異なる C 末端ドメインを持つ VEGF キメラの創製とその生物活性: 卯月博和、山崎泰男、森田隆司、日本薬学会 128 年会、2008/3、横浜
5. 組織型と毒型の血管内皮増殖因子のゲノム構造解析とその進化論的考察: 齋藤麻衣、徳永優子、長谷川芳裕、山崎泰男、森田隆司、日本薬学会 128 年会、2008/3、横浜

〔図書〕(計 2 件)

1. Kini RM, Clemetson KJ, Markland FS, McLane MA, Morita T. (Editors.) *Toxins and Hemostasis*. Springer, pp1-797 (2010)
2. Yamazaki Y, Morita T: Snake Venoms and Other Toxic Components Affecting Thrombosis and Hemostasis. In: *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008*. (Tanaka K, Davie EW eds.), Springer, pp462-482 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 隆司 (MORITA TAKASHI)
明治薬科大学・薬学部・客員研究員
研究者番号: 1 8 3 7 0 0 4 8

(2) 研究分担者

山崎 泰男 (YAMAZAKI YASUO)
明治薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 3 0 3 0 8 6 2 1