

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790081
 研究課題名（和文） ハブ毒に含まれる新規出血因子の作用機構等解析
 研究課題名（英文） Characterization of the novel anticoagulants from the venom of *Protobothrops flavoviridis*
 研究代表者
 狩生 徹 (KARIU TORU)
 崇城大学・薬学部・講師
 研究者番号：10412735

研究成果の概要：

ハブは、沖縄本島や奄美大島などに棲息する毒蛇である。新規に見出したセリンプロテアーゼインヒビターは、2つの Kunitz ドメインと膜貫通ドメインを有しており、ビクニン、外因系凝固インヒビター(TFPI)などと 40～80%程の相同性を有していた。切断された細胞外ドメインが抗凝固に関わる可能性が高いことから、酵母及びバキュロウイルス発現系で組換えタンパク質を作製し、その生理活性を解析した。その結果、新規インヒビター分子は、トリプシン阻害能を有しており、内因系血液凝固を遅延することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生化学

1. 研究開始当初の背景

ハブは、沖縄本島や奄美大島などに棲息する毒蛇である。ハブ毒は血液凝固阻害、血管内皮細胞の破壊、血小板凝集阻害などが主な作用の出血毒である。これまでにハブ毒腺細胞のトランスクリプトーム解析を行った結果、従来のタンパク質化学的手法では分離不可能であった新規のメタロプロテアーゼなどの酵素群や、血小板凝集阻害、血液凝固因子

結合など血液凝固阻害・血管障害に関わる分子(出血因子)をコードする遺伝子を多数同定しているが、その多くが機能未同定のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、新規に見出した出血因子群による血液凝固阻害・血管障害の分子病態解析により、新規咬症治療薬、抗血液凝固剤、抗血

小板凝集阻害剤開発への足がかりとすることを目標とした。

3. 研究の方法

新規分子の全長遺伝子のクローニング、発現解析、組み換えタンパク質の発現、生理機能解析を行った。

4. 研究成果

新規セリンプロテアーゼインヒビターは、2つの Kunitz ドメインと膜貫通ドメインを有するユニークな構造であり、ヒトトリプシンインヒビター(ビクニン)、外因系凝固インヒビター (TFPI) や吸血性ダニ *Ixodes scapularis* 唾液に含まれる抗凝固分子 *Ixolaris* などと 40~80%程の相同性を有していた。特異抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、新規インヒビターの毒中への分泌を確認した。切断された細胞外ドメインが抗凝固に関わる可能性が高いことから、酵母及びバキュロウイルス発現系で組換えタンパク質を作製し、その生理活性を解析した。その結果、新規インヒビター分子は、トリプシン阻害能を有しており、内因系血液凝固を遅延することを明らかにした。

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)

①Kawahara, H., Kariu, T., Fan, J. and Maeda, H. Generation of drug-resistant mutants of *Helicobacter pylori* in the presence of peroxy nitrite, a derivative of nitric oxide, at pathophysiological concentration. *Microbiol. Immunol.* 53 1-7 2009

[学会発表] (計4件)

①高崎伸也、村上達夫、狩生徹、千々岩崇仁、服部正策、大野素徳、上田直子、日本の南西諸島3島(奄美大島、徳之島、沖縄)のハブ(Protobothrops flavoviridis)毒成分の比較プロテオミクス、BMB2008(日本分子生物学会年会・日本生化学会大会)、神戸、2008年12月11日

②村上達夫、狩生徹、高崎伸也、服部正策、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子、ハブ毒中の新規な[Lys⁴⁹]ホスホリパーゼ A₂ の同定、

第54回毒素シンポジウム、大阪、2008年9月5日

③村上達夫、狩生徹、高崎伸也、服部正策、千々岩崇仁、大野素徳、上田(小田)直子、奄美大島ハブ特異的な新規[Lys⁴⁹]ホスホリパーゼ A₂、BMB2007(日本分子生物学会年会・日本生化学会大会)、横浜、2007年12月14日

④狩生徹、ハブ(Protobothrops flavoviridis)毒腺中に含まれる新規出血因子の機能解析、タンパク質の構造と機能に関する九州シンポジウム、大分、2007年9月20日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狩生 徹 (KARIU TORU)
崇城大学・薬学部・講師
研究者番号：10412735