

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20870038

研究課題名(和文) 毒ヘビ血清新規蛋白質 SSP の蛇毒成分に対する分子認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular recognition mechanism to venomous proteins of a novel small serum protein (SSP) from venomous snake serum.

研究代表者

塩井(青木) 成留実 (SHIOI(AOKI) NARUMI)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：50510187

研究成果の概要(和文)：蛇毒中には多彩な薬理作用を示すものが多数含まれる。一方、毒ヘビ自身の血液中には、これらの毒酵素成分に対する内在性阻害物質が含まれている。本研究では、ハブ血清中の蛋白質、ハブ毒蛋白質を精製し、血清蛋白質が、毒中の神経毒や出血毒に対して阻害することを明らかにした。また、ハブ血清蛋白質の一つは、ハブ毒中の細胞死を誘導する蛋白質を等量で阻害することが分かった。本研究では、血清蛋白質がどの領域で毒蛋白質を認識しているのかに関する知見も得た。

研究成果の概要(英文)：Snake venom contains many proteins with several pharmacological functions. On the other hand, endogenous inhibitors to these venomous proteins are present in the snake serum. In the present study, some serum proteins were purified from serum of Habu snake, and the inhibitory effects to the neurotoxin and the hemorrhagic toxin from the own venom were examined. Moreover, one of these proteins strongly inhibited the protein that induces the death of vascular cells. This study also clarified how the serum proteins recognize the venom proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：蛇毒蛋白質、毒蛇血清蛋白質、生体防御機構、アポトーシス誘導蛋白質

1. 研究開始当初の背景

蛇毒は、約百種類の蛋白質がそれぞれの役割を果たすことで、毒としての力を発揮する。興味深いことに、蛇毒成分のほとんどは、哺乳類に恒常的に機能している加水分解酵素

であった。一方、蛇毒酵素に対する毒ヘビ自身が自己防御のためにもつ内在性阻害物質についての報告は少なく、その酵素-酵素阻害物質の分子メカニズムの知見は少ない。我々は、ハブ血清中より新規分子 SSP (small

serum protein)群を発見した。その機能解析を進める中、それら同一ホモログは、ハブ毒蛋白質に対し異なる特異性を持つことから、多機能な分子であることが予測された。これまでの研究より、ハブ血清中には5種類のSSP(1~5)が存在し、SSP-1, SSP-3のみ、ある種の金属プロテアーゼを弱く阻害する。一方、SSP-2, SSP-5のみ、ハブ毒中のCa²⁺チャンネル結合性神経毒(triflin)と結合する。また、SSP-1はハブ毒中のアポトーシス誘導蛋白質(Hv1)と結合することを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、ハブ血清低分子タンパク質SSPのCa²⁺チャンネル結合性神経毒 triflinとアポトーシス誘導蛋白質Hv1に対する生理的阻害能、相互作用部位を調べSSPの分子認識機構を明らかにすることを第一の目的とし、毒へび血清蛋白質が特異的に、効率的に抗毒素機能を発揮するメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 研究対象蛋白質の調製

①SSPsの精製:ハブ血清からゲルろ過クロマト(sephacryl S-300 HR)、逆相HPLC(YMC-Pack C8)、陰イオン交換クロマト(superQ-Toyopearl)の3段階クロマトを用いた精製法により、天然SSP-1~SSP-5を精製した。

②SSP-1組換え蛋白質の調製:発現ベクターにはpET22bを、宿主細胞にはBL21(pLys)を用いてSSP-1を発現誘導した。封入体として得られたSSP-1は、希釈法を用いたリフォールディングにより巻き戻しを行った。

③CRISP蛋白質(triflin, serotriflin)の精製:triflinは、ハブ粗毒からゲルろ過クロマト(sephacryl S-300HR)、陽イオン交換クロマト(SP-sepharose)、色素結合クロマト(Blue-sepharose)の3段階クロマトを用いて精製した。

serotriflinは、ハブ血清からゲルろ過クロマト(sephacryl S-300 HR)、逆相HPLC(YMC-Pack C8)で精製した。逆相HPLCのピーク抽出時に0.5 M Tris-HCl(pH 8.5)1.0 mlで中和し、その後、透析を行い脱塩した。

④Hv1の精製:ハブ粗毒からゲルろ過クロマト(sephacryl S-300HR)、陽イオン交換クロマト(SP-sepharose)、ゲルろ過クロマト(Superdex 75)の3段階クロマトを用いて精製した。

(2) SSP-2の化学修飾

①SSP-2のHis残基の修飾

SSP-2(1.2 mg/ml) 10 μl を 10 mM DEPC

(Diethyl pyrocarbonate)/100 mM PB buffer (pH 6.0) 20 μl と混ぜ、0 °Cで30分間反応させた。

②SSP-2のα-εアミノ基の修飾(TNP化)

SSP-2(1.2 mg/ml) 20 μl に 0.2 M ホウ酸 buffer (pH 9.5) 10 μl を混合し、40 mM TNBS 20 μl を加え、室温で30分間反応させる。そこに270 mM L-Lys 100 μl を加えて反応停止させ、透析して凍結乾燥させた。

③SSP-2のTrp残基のNBS酸化

SSP-2(1.2 mg/ml) 20 μl に 50 mM 酢酸 buffer (pH 4.0) 20 μl を混合し、200 μM NBS 10 μl を加え、室温で10分間反応させる。そこに4 mM L-Trp 15 μl を加えて反応停止させ、透析して凍結乾燥させた。

④化学修飾したSSP-2とCRISPの結合実験

ゲルろ過 HPLC(TSK gel G3000SW, 75×300 mm)と逆相 HPLC(YMC-Pack ProteinC8, 150×4.6 mm)を合わせて結合解析と結合分子の分析を行った。

(3) SSPとHv1の相互作用解析:CM5センサーチップにSSP-1, HSF, albuminをそれぞれ固定し(固定液:10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH 4.0)、HBS-P buffer(10 mM HEPES-0.15 M NaCl-0.005 % surfactant, pH 7.0)で溶媒置換したサンプルをアプライし、BIAcore 3000測定機で結合・解離を測定した。

(4)Hv1単独およびSSPとHv1の複合体の機能解析:HUVEC(ヒトさい帯血管内皮細胞株)を用いたHv1の細胞毒性試験は、4穴プレートにHUVECをまき、37°Cで24時間以上培養して細胞を安定させた。その後、培地(EBM-2)を交換し、種々の濃度のHv1を添加し、さらに37°Cで36時間培養した。トリパンブルーも用いて生細胞数をカウントした。また、Hv1の細胞毒性へのHSF・SSP-1複合体の影響は、HUVECに18 nMのHv1に各濃度に調製したSSP-1, HSFを添加し、37°Cで36時間培養し、生細胞数をカウントした。

(5) SSP-3の結合蛋白質の同定

SSP-3を固定化したアフィニティークロマトを作成し、そのカラムにハブ粗毒を流して、pH 3.0のBufferで結合蛋白質を溶出した。

4. 研究成果

(1) 研究対象蛋白質の調製

①ハブ血清6.0mlから血清10mlあたりの収量は、SSP-1, SSP-2, SSP-3は、それぞれ5mg, 2mg, 1mgであり、SSP-4およびSSP-5については、おおよそ0.5mg程度の収量である。

②SSP-1組換え蛋白質は、培養大腸菌の湿重量1gあたりから2mgの巻き戻したSSP-1を得ている。

③triflinは、ハブ粗毒300gから1.0mg得た。

serotriflinは、ハブ血清13mlから2.4mg

得た。

④ハブ粗毒 300mg から高純度の Hv1 を約 2mg 得た。

(2)SSP-2 による CRISP 蛋白質の相互作用領域の同定

SSP-2 の結合蛋白質として、ハブ毒からは triflin が、ハブ血清中からは serotriflin が同定されている。どちらも CRISP ファミリー蛋白質群に属し、65%と高い相同性を持つ。研究を進める中、triflin は比較的不安定な蛋白質であることが分かった。そこで本研究では、比較的精製が簡便で量的にも調製可能な serotriflin を用いて SSP-2 との結合解析を行った。

SSP-2 のアミノ基, Trp 残基, His 残基を化学修飾し、CRISP 蛋白質との結合活性を TSKgel G3000SW カラムを用いるゲルろ過 HPLC で評価した。その結果、アミノ基を修飾した SSP-2 は CRISP 蛋白質とは結合しなかった。また、SSP-2 と CRISP 蛋白質と結合しない SSP 群とのアミノ酸配列を比較すると、SSP-2 の α アミノ基または N 端ドメイン領域が結合に関与する可能性がある。

(3)SSPs と Hv1 の相互作用解析

①SSP-1 の結合分子として見つかった Hv1 が他の SSPs (SSP-2, SSP-3, SSP-4, SSP-5) のに対しても結合するのかわを BIAcore3000 を用いて調べた。その結果、SSP-1 の他に SSP-4 も Hv1 と結合することが分かった。

②SSP-1 を固定化したセンサーチップに Hv1 を流すと、Hv1 が結合することが確認できた (Fig. 1)。一方、HSF を固定化したセンサーチップには Hv1 は結合しなかった。SSP-1 は血液中で常に HSF と複合体を形成しているため、SSP-1・HSF 複合体に Hv1 が結合するかを調べた。HSF を固定化したセンサーチップに SSP-1 を流し、Buffer でチップを洗浄後、Hv1 を流した。その結果、SSP-1・HSF 複合体に Hv1 は結合し、三者複合体を形成することがわかった (Fig. 2)。

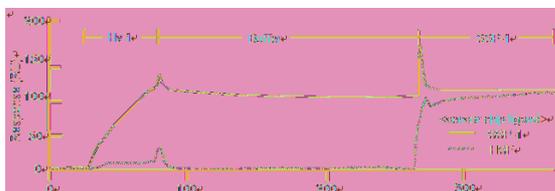


Fig. 1 SSP-1、HSF に対する Hv1 の結合実験

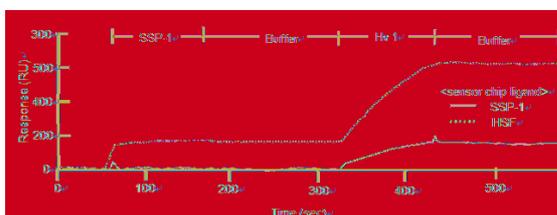


Fig. 2 SSP-1・HSF 複合体に対する Hv1 の結合実験

③SSP-1 を固定化したチップを用いて動力学的解析を行ったところ、SSP-1 と Hv1 の結合速度定数 ($k_a=8.7 \times 10^3$)、解離速度定数 ($k_d=7.2 \times 10^{-4}$)、解離平衡定数 ($K_D=8.2 \times 10^{-8}$) であった (Fig. 7, Table 1)。

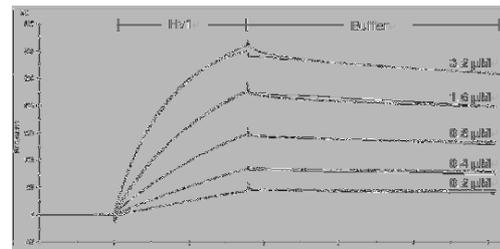


Fig. 3 SSP-1 と Hv1 の速度論解析

Ligand	Analyte	k_a (1/Ms)	k_d (1/S)	K_D (M)
SSP-1	Hv1	8.7×10^3	7.2×10^{-4}	8.2×10^{-8}

Table 1. SSP-1 と Hv1 の反応速度定数

(4)Hv1 の機能解析と Hv1 活性に対する SSP の影響

①ハブ毒より精製した Hv1 は、HUVEC に対して濃度依存的に細胞毒性を示すことが確認された ($IC_{50}=0.3 \text{ } \mu\text{g/ml}$)。HUVEC 細胞に、最終濃度 18 nM の Hv1 と種々の濃度の複合体 (SSP-1 : HSF=1 : 1) を混ぜ、生細胞数をカウントした。その結果、複合体は濃度依存的に Hv1 の細胞傷害を抑制し、SSP-1・HSF 複合体を Hv1 と等モル量 (18 nM) 加えると、細胞生存率はほぼ 100% になった (Fig. 4)。

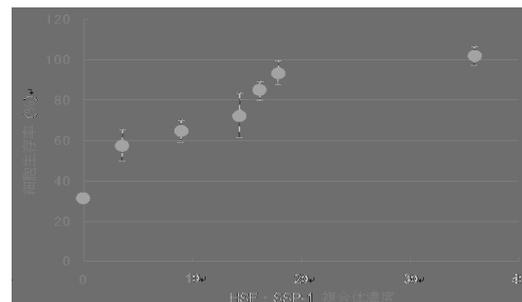


Fig. 4 Hv1*の細胞毒性に対する HSF・SSP 複合体の効果
*Hv1 は濃度一定 (18 nM)

Hv1 に SSP-1 単独を加えて同様の実験を行ったが、複合体の場合に比べて、抑制の度合いが低かった。一方、Hv1 に HSF を加えただけでは Hv1 の細胞傷害性を抑制しなかった。

②Hv1 のメタロプロテアーゼとしての性質を調査した。天然基質 (Fibrinogen, Collagen IV, Fibronectin, Vitronectin) を用いて、Hv1 のプロテアーゼ活性の測定を行ったところ、

Hv1はCollagenIV・Fibronectinを分解した。また、Hv1は合成基質 [Moc Ac-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH₂] (No. 3168)を分解した。合成基質 No. 3168を用いて SSP-1 単独、HSF 単独を Hv1 に作用させたが Hv1 の活性を阻害せず、一方、SSP-1-HSF 複合体は Hv1 の分解活性を阻害した (Fig. 5)。この結果は、HUVEC を用いた実験の再現性がとれ、SSP-1・HSF 複合体が Hv1 の活性を抑制するという重要な結果を得た。

(5)5種類の SSPのうち、SSP-3のみ結合蛋白質が見つからない。そこで、SSP-3 固定化カラムを作成し、ハブ毒中の結合蛋白質の探索を行った。そのアフィニティクロマトより単離された蛋白質のアミノ酸配列の一部をデータベースで検索すると、ハブ毒中の出血因子である HR1A, HR1B と高い相同性を示し、メタロプロテアーゼの活性部位 (HEM_{GH}) が保存されていた (Fig. 6)。このことより、ハブ毒中の SSP-3 結合蛋白質は、新規のメタロプロテアーゼであることが明らかになった。

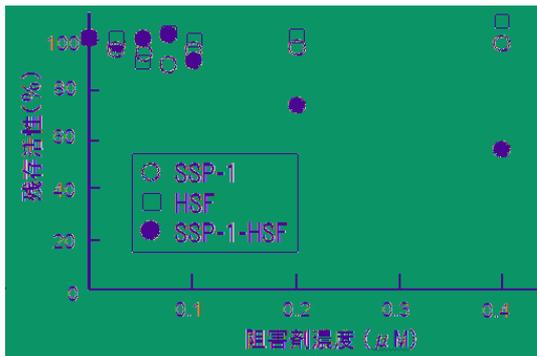


Fig. 5 SSP-1-HSF 複合体による Hv1 のプロテアーゼ活性の阻害

基質: No. 3168

酵素: Hv1 (0.05 μM),
50 mM Tris-HCl (pH 8.5)

```

MP3 ...NHDNTQLL TGIDFDGNTIGFGYIGSMCTPKHSVGI
Hv1 ...NHDNAHLL TGINFNGPTAGLAYLGGICKPMYSAGI
HR1A ...SDNAQLL TAI DFNGTI IGLAHVASMCDPKCSTGI
MP3 VQDHGKSYHLVAVTMAHEMAHNLGMHHRNSCTCLANSCIMS...
Hv1 VQDHNKIHLVAIAMAHEMGRNLGMDHDKDTCICRAKACVMA...
HR1A VQDYSSRNLVAVIAMAHEMGNLGIHRDRENTCHANSCIMS...

```

Fig. 6 ハブ毒中の SSP-3 結合蛋白質とメタロプロテアーゼの活性部位周辺の配列比較

下線部は、メタロプロテアーゼの活性部位

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 4 件)

① Narumi Aoki, Masanobu Deshimaru, Kenji

Kihara, Shigeyuki Terada

Snake fetuin: Isolation and structural analysis of new fetuin family proteins from the sera of venomous snakes, *Toxicon*, 査読有, Vol. 54, 2009, pp. 481-490

② Yuki Mizoe, Narumi Shioi (Aoki), Shigeyuki Terada, Yoshiki Uchida, Masahide Kuroki, Sannamu Lee
CHARACTERISTIC DIFFERENCE OF BIOLOGICAL ACTIVITY, BETWEEN ARG-CONTAINING AND LYS-CONTAINING PEPTIDES, *Peptide Science*, 査読有, 2009, pp. 213-216

③ Narumi Aoki, Hisashi Matsuo, Masanobu Deshimaru, Shigeyuki Terada
Accelerated evolution of small serum proteins (SSPs); the PSP94 family proteins in a Japanese viper, *Gene*, 査読有, Vol. 426, 2008, pp. 7-14

[学会発表] (計 12 件)

① 林理恵子、池田真吾、塩井(青木)成留実、寺田成之、Expression and functional analysis of recombinant SSP-1、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸ポートアイランド

② 清村康子、村田順平、塩井(青木)成留実、寺田成之、SSP-2 の CRISP 及び HSF との結合領域の解析、A analysis of binding regions of SSP-2 to CRISP and HSF、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸ポートアイランド

③ 小川瑛輝、水上幸、塩井(青木)成留実、寺田成之、Inhibition of apoptosis-inducing activity of Habu venom protein Hv1 by SSP-HSF complex、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸ポートアイランド

④ 牛尾昂也、田中泰圭、塩井(青木)成留実、弟子丸正伸、寺田成之、ハブゲノム中に存在する L1 転移因子様配列の分子進化、平成 21 年度日本生化学会九州支部例会、2009 年 5 月 17 日、九州大学病院キャンパスコラボステーション

⑤ 小川瑛輝、塩井(青木)成留実、黒木喜美子、前仲勝実、寺田成之、ハブ毒 Hv1 のアポトーシス誘導活性への SSP-1 の影響、平成 21 年度日本生化学会九州支部例会、2009 年 5 月 17 日、九州大学病院キャンパスコラボステーション

⑥ 池田真吾、林理恵子、塩井(青木)成留実、寺田成之、ハブ SSP-1 と HSF の結合領域の解析平成 21 年度日本生化学会九州支部例会、2009 年 5 月 17 日、九州大学病院キャンパスコラボステーション

⑦ 鬼塚研治、西嶋あゆ美、塩井(青木)成留実、寺田成之、ハブおよびマムシ血漿中の SSP 結合タンパク質の解析、平成 21 年度日本生化学会九州支部例会、2009 年 5 月 17 日、九州大学病院キャンパスコラボステーション

⑧青木成留実、榑崎正明、小川瑛輝、寺田成之、ハブ血清 SSP-1 の結合タンパク質の同定 BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩井(青木) 成留実 (SHIOI(AOKI) NARUMI)
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 :