

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07061

研究課題名(和文) 毒ヘビ自身の毒耐性機構を応用した画期的ヘビ毒阻害物質創製の基盤研究

研究課題名(英文) Rational design of selective inhibitors targeting snake venom based on resistance system of venomous snake

研究代表者

塩井 成留実(青木成留実)(Aoki-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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マムシ、エラブウミヘビ、無毒ヘビの毒腺(または唾液腺)および各組織のトランスクリプトーム解析を行い、信頼できる質の高いデータを得ることができた。さらに、ヘビ毒液中の毒性を大幅に高めるタンパク質の結晶構造解析に成功し、論文投稿という形でまとめた。有毒ヘビと無毒ヘビの比較解析からいくつかの毒ヘビ特有の候補遺伝子およびタンパク質に着目することができた。さらに、最終年度にはコブラ科毒ヘビの致死毒素であるスリーフィンガートキシンに特異的に結合する血清タンパク質を同定し、その結合能および阻害能の評価を行った。現在、立体構造解析を行うための結晶化を行っている。全体的に、順調に研究を推進できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

WHOはヘビ咬傷被害は年間約2.7百万人、死者14万人という実態を明らかにし、世界的な支援を求めている。ヘビ咬傷治療は、ヘビ毒液を免疫したウマの抗血清投与である。しかし、その治療はアナフィラキシーショックなど致命的副作用および抗血清の価格が高すぎるなどの問題点がある。本研究では代表者が見出したヘビ毒阻害タンパク質を基盤にヒトに対して安全でかつ安価な治療法の提案を目指しており、毒素に対して高い特異性と安定性を持つ阻害物質の創薬基盤研究である。構造学的分子メカニズムの解明は、具体的な創薬デザインを可能とするだけでなく、毒ヘビに関する研究や医学、生物学の分野において重要な貢献となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A significant achievement was the acquisition of high-quality data from transcriptome analysis of the venom glands (or salivary glands) as well as various tissues of the Japanese vipers, elapid, and non-venomous snake. In addition, we successfully determined the crystal structure of synergistic-type toxin that significantly enhance the toxicity of snake venom toxin. Finally, we focused on several candidate genes and proteins specifically expressed in venomous snakes by comparative analysis between venomous and non-venomous snakes based on transcriptome and proteomics analysis, which would provide insight into potential mechanisms a system for production of toxins. We also identified serum proteins that specifically bind to three-finger toxins with existing in elapid as the lethal toxin. As we have succeeded in establishing methods for preparing toxins and their binding proteins, we are currently conducting crystallization for structural analysis.

研究分野：毒素科学

キーワード：蛇毒液 阻害剤 毒ヘビ 蛇毒咬傷

1. 研究開始当初の背景

世界保健機構 (WHO) の報告では、世界では数分間に数十人もの人々がヘビによる咬傷被害を受けており、その重大な後遺症は貧困層の家族の生活を一層苦しめている。昔から現在まで数十年間もの間、ヘビ咬傷の唯一の治療法は免疫された動物由来の抗血清である。しかしながら、その治療法には以下のような問題点がある。

- (1) 治療が高額である (1vial-20mL につき 9 万円) : 製造過程が複雑で大規模な施設が必要とされるため、費用が高額になる。
- (2) 致死的な副作用 (アナフィラキシーショックなど) のリスクが高い。
- (3) 局所的な障害 (筋肉壊死や出血) には効果がなく、結果的に四肢切断が必要となる場合がある。
- (4) 毒ヘビの種類によって毒成分が異なり、毒素成分の複雑性に加えて抗体力価も大幅に異なるため、効能に幅がある。

研究代表者は、南西諸島 (奄美大島・沖縄) や東南アジアで現地調査を行い、毒ヘビによる脅威にさらされながら生活している人々と接する中で、誰もが利用できる治療法を目指した毒ヘビ研究の重要性を痛感した。

このような社会的背景の中で、本研究では、毒ヘビが自己の毒に対する耐性システムを持っていることに着目し、それをヘビ咬傷の治療に応用する研究に着手した。当研究室では、十数年間、毒ヘビの血液中に自己の毒に対して特異的に結合し、その毒性を抑えるタンパク質が存在することを明らかにし、その阻害機構について報告してきた。本研究では、これまでの知見と研究成果を基盤に、生物 (具体的には毒ヘビ) が既に血液中に安定して存在させている毒素阻害タンパク質を人間のヘビ咬傷治療に応用し、ヘビの毒素に対して特異的に結合し、無毒化させることで人への毒性を低減する可能性を検討することを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が見出したヘビ毒阻害タンパク質を基盤にヒトに対して安全でかつ安価な治療法の提案を目指し、毒素に対して高い特異性と安定性を持つ阻害物質の創薬基盤研究を展開することである。さらに、毒蛇体内でのヘビ毒素の活性化・不活性化に関与する因子の探索を行うため、以下の各実験項目を計画した。

- (1) 毒素阻害物質の創薬基盤研究への展開
 - ・ 内在性毒素阻害タンパク質の立体構造を基盤に、強い阻害を示すペプチドを合成。
 - ・ 世界で致死被害を引き起こす毒ヘビの血液中の阻害タンパク質を調査。
- (2) 毒液の相乗的なシステムの普遍的な要素やその機構の解明
 - ・ 無毒および有毒ウミヘビの遺伝子を比較し、毒遺伝子の普遍的な要素因子を探索。
 - ・ 主成分毒素の生理活性を相乗的に高める分子に着目し、その構造と機能を解明。

3. 研究の方法

上記の目標を達成するために、研究方法は以下の通りである、

(1) 毒素阻害物質のリード化合物の探索、合成、および活性評価

- ・ 毒ヘビの内在性毒素阻害物を基盤としたペプチドを合成
- ・ 応募者が発見した阻害タンパク質の立体構造解析を基盤に毒素結合領域10-15残基のペプチドを合成し、毒素結合活性および毒性阻害活性を評価した。
- ・ 毒ヘビ内在性の毒阻害物質の探索と阻害評価
- ・ 各毒ヘビ毒を結合させたアフィニティカラムを作製し、その毒ヘビの血清をアプライし、毒素結合タンパク質をLC-MS/MSおよびプロテインシークエンサーを用いて同定した。さらに、その毒素結合タンパク質を精製し、結合親和性および毒素阻害評価を行った。

(2) 毒液の統合システムの普遍的な要素やその機構の解明

- ・エラブミヘビ、日本マムシ、無毒ヘビ(アカマタ)のプロテオミクスおよびトランスクリプトーム解析
異なる種のヘビ個体の組織をサンプリングし、毒液、唾液、血液成分を中心にプロテオミクス解
およびトランスクリプトーム解析を行った。
- ・主成分毒素の生理活性を相乗的に高めるタンパク質の単離とその構造と機能の解明
先行研究より相乗効果の役割を担う候補分子を探索し、配列決定と結晶化に成功していた。本
研究では、毒素活性の相乗効果を担う分子が致死活性をどれくらい高めるのか、実際に動物実
験で評価した。さらに、毒液中よりの相互作用分子の探索を行った。

4 . 研究成果

初年度には、計画調書に計上した AKTA システムを購入し、数種の毒蛇の毒液および血液タンパク質成分の分析を円滑に行うことができた。初年度の特記すべき成果は、毒液の相乗的なシステムの普遍的な要素やその機構の解明を目的とした実験において、マムシおよびエラブミヘビの毒腺および各組織のトランスクリプトーム解析を行い、信頼できる質の高いデータを得ることができたことである。また、ヘビ毒液中の毒性を大幅に高めるタンパク質の結晶構造解析に成功し、論文投稿という形でまとめることができた。2 年目には、初年度のデータに加え、無毒ヘビのトランスクリプトーム解析およびプロテオミクス解析を行った。最終年度には、クサリヘビ科、コブラ科、および、無毒ヘビのトランスクリプトーム解析およびプロテオミクス解析より、有毒ヘビと無毒ヘビの共通点および相違点をまとめ、それらの比較解析からいくつかの毒ヘビ特有の候補遺伝子およびタンパク質に着目することができた。現在では、毒ヘビ血清タンパク質の標的遺伝子およびタンパク質の発現量の違いが、クサリヘビ科とコブラ科どのように異なるのかなどより細かな分析を行っている。最終年度にはコブラ科毒ヘビの致死毒素であるスリーフィンガートキシンに特異的に結合する血清タンパク質を同定し(図1) その結合能および阻害能の評価を行った。毒素およびその結合タンパク質の調製方法を確立に成功しているため、現在、立体構造解析を行うための結晶化を行っている。全体的に、順調に本研究を推進することができ、世界で致死被害を引き起こす毒ヘビの毒素特異的結合タンパク質の同定を行い、その結合領域の特定構造まであと一步である。また、毒液の相乗的な効果を担う、タンパク質の結晶構造を報告すると同時に、比較的順調にその毒素の簡便な調製方法を確立に成功した。

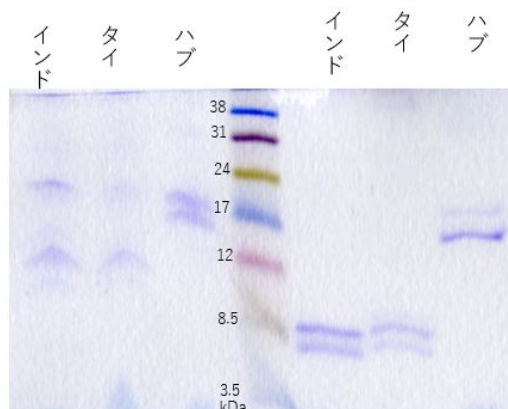


図1 毒ヘビ血清Inhibitor Xと特異的に結合する毒素

SDS-PAGE ; Tricine系 16.5%-10%-4%
インド：インドコブラ粗毒結合分画
タイ：タイコブラ粗毒結合分画
ハブ：ハブ粗毒毒素結合分画
(-)は非還元
(+)は還元条件

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Aoki-Shioi Narumi, Nagai Yuki, Deshimaru Masanobu, Terada Shigeyuki	4. 巻 1867
2. 論文標題 Precursor genes of Bowman-Birk-type serine proteinase inhibitors comprise multiple inhibitory domains to promote diversity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130248 ~ 130248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2022.130248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Endo Megumi, Kim Jung In, Shioi Narumi Aoki, Iwai Shigenori, Kuraoka Isao	4. 巻 11
2. 論文標題 Arabidopsis thaliana endonuclease V is a ribonuclease specific for inosine-containing single-stranded RNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsob.210148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hu Yaopeng, Li Qin, Kurahara Lin-Hai, Shioi Narumi, Hiraishi Keizo, Fujita Takayuki, Zhu Xin, Inoue Ryuji	4. 巻 10
2. 論文標題 An Arrhythmic Mutation E7K Facilitates TRPM4 Channel Activation via Enhanced PIP2 Interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 983 ~ 983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10050983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Aoki-Shioi Narumi, Terada Shigeyuki, Hellinger Roland, Furuta Yoshitaka, Gruber Christian W.	4. 巻 478
2. 論文標題 Isolation and functional diversity of Bowman-Birk type serine proteinase inhibitors from Hyacinthus orientalis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 1287 ~ 1301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20201005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoki-Shioi Narumi, Jobichen Chacko, Sivaraman J., Kini R. Manjunatha	4. 巻 477
2. 論文標題 Unusual quaternary structure of a homodimeric synergistic-type toxin from mamba snake venom defines its molecular evolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 3951 ~ 3962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurahara Lin Hai, Hiraishi Keizo, Yamamura Aya, Zhang Ying, Abe Kohtarō, Yahiro Eiji, Aoki Mikiko, Koga Kaori, Yokomise Hiroyasu, Go Tetsuhiko, Ishikawa Kaori, Bo Zhang, Kishi Hiroko, Kobayashi Sei, Aoki-Shoi Narumi, Toru Satoh, Inoue Ryuji, Hirano Katsuya	4. 巻 148
2. 論文標題 Eicosapentaenoic acid ameliorates pulmonary hypertension via inhibition of tyrosine kinase Fyn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 50 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2020.08.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tadokoro Takashi, M. Modahl Cassandra, Maenaka Katsumi, Aoki-Shioi Narumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) from Venomous Snakes: An Overview of the Functional Diversity in a Large and Underappreciated Superfamily	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 175 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12030175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Aoki-Shioi Narumi, Koh Cho Yeow, Kini R. Manjunatha	4. 巻 73
2. 論文標題 Natural Inhibitors of Snake Venom Metalloproteinases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Australian Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 277 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1071/CH19414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Modahl Cassandra M., Brahma Rajeev Kungur, Koh Cho Yeow, Shioi Narumi, Kini R. Manjunatha	4. 巻 8
2. 論文標題 Omics Technologies for Profiling Toxin Diversity and Evolution in Snake Venom: Impacts on the Discovery of Therapeutic and Diagnostic Agents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annual Review of Animal Biosciences	6. 最初と最後の頁 91~116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-animal-021419-083626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuruta Haruka, Sonohara Yuina, Tohashi Kosuke, Aoki Shioi Narumi, Iwai Shigenori, Kuraoka Isao	4. 巻 42
2. 論文標題 Effects of acetaldehyde-induced DNA lesions on DNA metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-019-0142-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Narumi Aoki-Shioi, Chacko Jobichen, J. Sivaraman, R. Manjunatha Kini
2. 発表標題 Crystal structure of synergistic-type toxin from Dendroaspis(mamba) venom shows a unique quaternary structure of three finger toxin family
3. 学会等名 21st World Congress of the International Society on Toxinology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Narumi Aoki-Shioi, Chacko Jobichen, J. Sivaraman, R. Manjunatha Kini
2. 発表標題 Synergistic toxins from mamba snake venom; structural insight into evolution of three finger toxin family
3. 学会等名 2022 Venom Evolution, Function and Biomedical Applications Gordon Research Conferences (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩井(青木)成留実、堤 陸、三原 大輝、倉岡 功
2. 発表標題 ヘビ血清由来Fetuin family proteinの新規結合タンパク質の同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三原 大輝, 倉岡 功, 塩井(青木)成留実
2. 発表標題 抗出血因子HSFの細胞発現系構築およびヘビ毒素の結合ドメインの同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aoi Osera, Risa Mutoh, Isaokuraoka, Narumi Aoki-Shioi
2. 発表標題 Identification of inhibitory regions of Small serum protein-4 (SSP-4) against vascular apoptosis-inducing snake venom metalloprotease
3. 学会等名 11th Asia-Pacific Congress of the International Society on Toxinology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大瀬良碧、小倉彩香、塩井(青木)成留実、香田悠樹、橋口周平、村上明一
2. 発表標題 ヘビ出血毒を阻害するラクダ科H鎖抗体可変部の発現系構築とその活性評価
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 四ヶ所亮輔、財津佳史、倉岡功、塩井(青木)成留実
2. 発表標題 環状DNAに対するヘビ毒Phosphodiesteraseの特異的切断活性
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩井(青木)成留実、倉岡功、キニ・マンジュナタ
2. 発表標題 コブラ科毒由来synergistic toxinのユニークな立体構造
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 四ヶ所亮輔、財津佳史、倉岡功、塩井(青木)成留実
2. 発表標題 コブラ科(Najaatra) Phosphodiesteraseのエンドヌクレアーゼとしての性質と発現系構築
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第50回記念大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩井(青木)成留実、胡耀鵬、平石敬三、倉原琳、中山明日香、倉岡功
2. 発表標題 毒液中と血液中の Cysrich-secretory proteins (CRISP)の構造と機能について
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 四ヶ所 亮輔、堤 陸、倉岡 功、塩井（青木）成留実
2. 発表標題 毒ヘビ血清由来抗出血因子のコブラ毒に対する特異的結合
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 DNA修復経路のためのT7endonuclease1の新たな機能
2. 発表標題 松原 一樹、倉岡 功、竹立 新人、塩井 成留実
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩井（青木）成留実、堤陸、中山明日香、重松毅、倉岡功
2. 発表標題 毒ヘビ中のCysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) toxinとnon-venom CRIPSの構造と機能の共通性と相違について
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 四ヶ所 亮輔、堤 陸、松原 一樹、倉岡 功、塩井（青木）成留実
2. 発表標題 クサリヘビ科およびコブラ科のヘビ毒由来のエンドヌクレアーゼ活性の性質比較
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福岡大学研究者情報
<https://resweb2.jhk.adm.fukuoka-u.ac.jp/FukuokaUnivHtml/info/4944/R110J.html>
Researchmap
<https://researchmap.jp/Narumi50510187>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------