

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号： 14301  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2011 ~ 2011  
 課題番号： 23657146  
 研究課題名（和文） ヘビ毒出血因子の起源を探る  
 研究課題名（英文） Exploring evolutionary origins of viper venom haemorrhagic factors

研究代表者  
 瀬原 淳子（SEHARA ATSUKO）  
 京都大学・再生医科学研究所・教授  
 研究者番号： 60209038

研究成果の概要（和文）：ヘビ毒は神経毒と出血毒に大別される。本研究は、後者の出血毒に関して、出血因子の起源は何か、そしてそれら祖先分子から出血因子の毒性はどのように獲得されたのか、という疑問を解決しようとするものである。出血毒は、「出血因子活性」を持つドメインと「血液凝固阻止活性」をもつドメインからなる前駆体可溶性因子から産生される、2種類の毒タンパク質から構成され、その前駆体の構造は、ADAM(a disintegrin and metalloprotease)と総称される膜型タンパク質に類似する。このことから、それは、ヘビ毒出血因子が、脊椎動物の祖先の中で血管形成や血球の挙動を制御する活性をもつADAM分子を模倣しているのではないかと仮説を立てた。先に我々は、赤芽球と血管を可視化した生きたゼブラフィッシュ胚を用いて、ADAM8が血球-血管接着の解除により胚の血液循環開始に関与することを報告した(Iida et al., 2010)。この観察技術を用いて、ヘビ毒出血因子が魚類循環器系に対していかなる作用を及ぼすかを検討したところ、あるヘビ毒出血因子は、ゼブラフィッシュ胚の血管形成を阻害することを見いだした。そこで、血球で発現するADAM8が、さらに血管内皮細胞の挙動に何らかの影響を持つかどうかを検討した。その結果、ADAM8の翻訳阻害モルフォリンノ処理により、その発現を阻害したところ、節間動脈の伸長が阻害されることがわかった。そして、ライブイメージングおよび電子顕微鏡観察によって、これらの胚では血球が節間動脈内皮に接着している様子が観察されるとともに、内皮細胞の遺伝子発現に大きな変化が生じた。このことから、血球で発現するADAM8は、節間動脈の伸長にも必要であることが示され、ヘビ毒出血因子の機能と、進化的に何らかの関連があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Snake venoms are classified mainly into two categories: neurotoxic and hemorrhagic venoms. This study addressed questions on the latter venom, what are the evolutionary origins of viper hemorrhagic venom proteins or how vipers acquired them during evolution. Viper haemorrhagic factors are produced as precursor soluble factors composed of two toxic polypeptide domains, a domain of haemorrhagic activity and that of anti-coagulation activity. The precursors are similar in structure to transmembrane proteins generically named as ADAMs (a disintegrin and metalloproteases). We hypothesized that viper venoms mimicked ADAMs of ancestral vertebrates that carried functions in vasculogenesis/angiogenesis and/or behaviors of blood cells. We previously showed that ADAM8 is involved in the onset of blood circulation in zebrafish embryos by live imaging of their blood vessels and erythroblasts (Iida et al., Curr Biol., 2010.). By using this imaging technique, we examined how viper venom haemorrhagic venoms affects vasculogenesis or integrity of blood vessels, As a result, we found that some of them inhibited vasculogenesis of zebrafish embryos. Then we examine whether ADAMs play some roles on blood vessel formation. Injection of antisense morpholino oligonucleotides against ADAM8 into eggs caused inhibitory effects on elongation of intersegmental vessels. Live imaging and electron micrographs of those embryos revealed that blood cells attached to blood vessels abnormally and gene expression in blood vessels was significantly altered in those embryos. Haemorrhagic activities of viper venom proteins could be related to regulatory roles of ADAM8 in vasculogenesis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：器官形成

## 1. 研究開始当初の背景

毒ヘビは、アセチルコリンレセプターに結合するブンガロトキシンに代表される神経毒をもつものと、ハブやマムシなどがもつ出血毒をもつものに分類される。いずれの毒も蛋白質であり、ヘビがこれらの蛋白質を産生する遺伝子をどのように獲得したのか、極めて興味ある問題である。さらにそれらを分泌する毒牙の発達や、ヘビ自身がどのようにこれらの毒分子から身を守っているのか、など未解決な疑問が多い。かつて大学の卒業研究として、ヘビ神経毒に含まれるNGF（神経成長因子）活性を精製していた申請者は、その後その研究から離れたが、約15年後、出血毒型のヘビ毒に含まれる血液凝固阻止活性を持つ分子ディスインテグリンと類似ドメインを有する膜蛋白質がほ乳類の精子にもあり、それが受精に関与する、という報告(Blobel C., et al., Nature 1992)に衝撃を受けた。そして、出血因子の起源となる蛋白質が哺乳類の体細胞でも働いていることを確信し、発生生物学の立場からこれを探求した結果、世界に先駆けて、蛇毒出血因子類似メタロプロテアーゼドメイン・ディスインテグリンドメインを併せ持つ膜型マルチドメイン蛋白質の同定に成功し、それが形態形成に関与することを見いだした(Yagami-Hiromasa et al., Nature, 1995)。

## 2. 研究の目的

現在、受精に関与するADAM1, 2 (ファーティリン $\alpha$ ,  $\beta$ )、我々が同定した発生・再生に関与するADAM12, 19, 9 (メルトリン $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )をはじめ、30近くの類似蛋白質をコードする遺伝子がヒトやマウスにもあり、ADAMファミリーと総称されている。約半分は活性型メタロプロテアーゼをコードすることがわかっており、これらADAMプロテアーゼが種々の膜蛋白質の細胞外ドメインの切断(エクドメインシェディングと呼ぶ)に関与することにより、注目を集めることとなった。Notchやそのリガンドの切断制御を介して細胞分化に関与するADAM10 (Kuzbanian)や種々の膜蛋白質の誘導的切断活性を持ち、炎症などに関与するADAM17 (TACE)はその代表的なものである。

では、ヘビ毒出血因子の起源は何か。「出血因子活性」と「血液凝固阻止活性」というふたつの活性の機能的ルーツとなる祖先型ADAMがあるなら、それらはどのADAMで、それらが担う本来の役割と機能は何か。そしてそれら祖先型ADAMから出血因子の毒性はどのように獲得されたのだろうか。我々は最近、生きたゼブラフィッシュ胚を用いて、ADAM8が血球・血管接着の解除により胚の血液循環開始に関与することを発見した(Iida et al., Current Biol., 2010)。

本研究は、この研究で有用性が示された血管・赤芽球の同時可視化ゼブラフィッシュの評価系を用いて、ヘビ毒出血因子の起源となるADAMの存在と役割・機能を検証するとともに、ヘビ毒の毒性獲得機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) ヘビ毒出血因子のゼブラフィッシュ心循環系への導入とその効果の検討。

まず、何種類かのヘビ毒出血因子精製標品を、それぞれゼブラフィッシュ胚の心臓にキャピラリーでインジェクションし、その効果を検討する。具体的には、血球(RFP)・血管(GFP)可視化ゼブラフィッシュ胚の心臓に、インジェクション装置を用いて出血因子を導入し、ライブイメージングを行い、血管に対する効果および血液循環に対する効果を検討する。

ADAM8の欠乏などにより血液循環阻害や血液凝固を誘導し、そこにヘビ毒を注入すると症状の回復効果があるかどうかを検討する。すでに予備実験において、ゼブラフィッシュの血管に対しても作用を及ぼすヘビ毒出血因子があることを見いだしている。さらに種類を増やし、ゼブラフィッシュに対して効果のある出血因子と効果のない出血因子を分類する。効果を有する出血因子を赤芽球あるいは血管で発現し(赤芽球特異的GATA1プロモーター下、あるいは血管特異的Flk1プロモーター下で発現)、同様の効果を示すかどうか検討する。

(2-1) 血球あるいは血管で発現する膜型ADAM分子の細胞外ドメインを可溶性分子として血球あるいは血管で発現し、血液循環および血管に対する効果を検討

膜型ADAMとヘビ毒の大きな違いは、それぞれ膜型・可能性蛋白質をコードしている点にある(ただし、ADAMの中には、splicingにより可溶性アイソフォームを産生するものもある)。そこで、ADAMの細胞外ドメインあるいはプロテアーゼドメインを可溶性蛋白質として血球や血管で発現し(可溶性ADAMにはFlag-タグでラベル、導入細胞はCFPでラベル)、血管形成に与える影響や、出血能を有するかどうかを検討し、その効果をヘビ毒出血因子と比較する。

(3) 膜蛋白質として血球や血管で発現するヘビ毒出血因子の、血液・血管に対する効果

本来、ヘビ毒出血因子はすべて可溶性分子であるが、これらの分子を、血球で発現するADAM8や血管内皮細胞で発現するADAM19の膜貫通ドメイン-細胞内ドメインと連結し、膜蛋白質に改変する。これらの分子を、血球あるいは血管特異的に発現させるベクターを作成し、血球・血管可視化ゼブラフィッシュ胚に導入・発現し(導入分子はFlag-タグでラベル、導入細胞はCFPでラベル)、血管に与える影響や、出血能を検討する。

またそれらの作用がプロテアーゼ活性を必要とするかどうかを検証するため、活性部位の一アミノ酸置換変異体も作成してその効果を調べる。

## 4. 研究成果

(1) ヘビ毒出血因子のゼブラフィッシュ心循環系への導入とその効果の検討。

まず、ヘビ毒出血因子精製標品に関しては、名古屋大学理学研究科附属臨海実験所荒木聡彦先生、および、沖縄県衛生環境研究所の盛根信也先生との共同研究として、両先生から供与いただいた標品を希釈して用いた。それぞれを血管(GFP)可視化ゼブラフィッシュ胚の心臓に、インジェクション装置を用いてキャピラリーでインジェクションし、数時間ののち、それらの生きたゼブラフィッシュ胚を実体顕微鏡下で観察した。その結果、3種類の出血因子のうちのひとつにおいて、大血管が崩壊している様子を観察することができた。これが出血効果かどうかを確認するために、さらに血管(GFP)赤芽球(RFP)可視化ゼブラフィッシュ胚を用いたところ、血管の崩壊に伴って出血する様子が観察された。このことから、このヘビ毒出血因子標品は、哺乳類に対してだけでなくゼブラフィッシュに対しても出血活性をもつことを示すことができた。

(2) 血球で発現するゼブラフィッシュADAM8分子の細胞外ドメインを可溶性分子の産生と精製、およびそれらの血液循環および血管に対する効果の検討

これまでの研究において我々は、ゼブラフィッシュ ADAM8が、赤芽球と血管内皮細胞の接着を解除する活性を有すること、試験管内では、セレクチンリガンド PSGL1のエクトドメインシエディング活性を有することを見いだしている。この際用いた ADAM8は膜一回貫通型の膜タンパク質である。ADAM8の細胞外ドメインがヘビ毒と同様の出血因子活性を有する可能性を検討するため、ADAM8の細胞外ドメイン全体にGSTを融合させたキメラタンパク質を、バキュロウイルス/Sf9細胞の発現系を用いて大量に産生し、精製した。そしてそれを、上記ヘビ毒出血因子と同様の手法でゼブラフィッシュ胚に導入し、出血因子としての効果をもつかどうかを検討した。その結果、高濃度の可溶性ADAM8を用いても、出血因子活性を持たないことが確認された。

### (3) ADAM8の血管形成への関与の検討

出血因子の立体構造を保ち、酵素活性を維持するためには、前駆体ドメインを持った形で翻訳する必要があることが知られていることから、精製可溶性ADAM8には、前駆体ドメインが含まれている。従って精製した ADAM8が本当に出血因子活性を持たないのか、それとも前駆体ドメインを含むために不活性状態にあり、活性型に変換できないためなのか、現在のところ不明である。そこで、血管 (GFP) 赤芽球 (RFP) 可視化ゼブラフィッシュ卵にADAM8に対するアンチセンスモルフォリンをインジェクトし、血管内皮細胞に対する膜型ADAM8の効果を検証することにした。その結果、ADAM8欠損胚では、節間動脈の伸長が阻害されることがわかった。さらに、電子顕微鏡観察 (理化学研究所発生再生科学総合研究センター 米村重信先生との共同研究) によって、これらの胚では血球が節間動脈内皮に接着している様子が観察された。さらにこれらの胚では、本来は節間動脈の先端内皮細胞 (tip cell) のマーカーであるD114が、その下方の stalk cellにおいても強く発現しているがわかり、血球の接着によってそれらの stalk cellの遺伝子発現が変化していることを見いだした。

以上のことから、ヘビ毒出血因子のあるものはゼブラフィッシュにおいても出血因子活性を有すること、それに対して ADAM8の可溶性フォームは同様の活性は証明できていないが、膜型 ADAMは節間血管の伸長に必要であり、内皮細胞のリモデリングに関わる、という点では、共通した性質を持つことが示した。このことは、ヘビ毒と ADAM8遺伝子が共通した機能的祖先を持つことを示唆するものである。今後、両者のキメラタンパク質を発現させることによって、出血毒活性に必要な領域を同定し、これらのタンパク質の特性の共通性と違いを明らかにしたい。

### 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 2 件)

①Frohlich, C., Nehammar, C., Albrechtsen, R., Kribqvist, P., Kveiborg, M., Sehara-Fujisawa, A., Mercurio, AM., Wewer, UM. ADAM12 produces by tumor cells rather than stromal cells accelerates breast tumor progression. Mol. Cancer Res., 査読有 9(11):1449-61. (2011)  
DOI:10.1158/1541-7786.MCR-11-0100

②Kurisaki, T., Masuda, A., Nakagiri, S., Hayata, Y., Kuhara, M., Kishi, Y., Sehara-Fujisawa, A. Generation of a monoclonal antibody reactive to prefusion myocytes. J. Muscle Res. Cell Motil., 査読有, 32 (2011): 31-38.

[学会発表] (計 15 件)

①Hiroshi Sakai et al.: Engraftment of embryonic and fetal myoblasts into dystrophic mice. 第34回日本分子生物学会年会2011年12月13日 神奈川

②飯田 敦夫ら: Primitive erythroblasts control a timing for blood vessel sprouting in zebrafish development. 第34回日本分子生物学会年会2011年12月13日 神奈川

③栗崎知浩ら: 融合活性マーカーを用いた筋細胞融合制御遺伝子の探索. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日 神奈川

④Tomosawa Anna, et al.: Roles of ADAM10/kuzbanian in vasculogenesis of zebrafish. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日 神奈川

⑤Daigo Nishimura, et al.: Roles of ADAM8 for skeletal muscle regeneration, The Second Pacific Symposium on Vascular Biology, 2011年10月30日 濟州、韓国

⑥Atsuo Iida, et al.: 生きたゼブラフィッシュを用いて血管形成の新しいメカニズムに迫る、第84回日本生化学会大会, 2011年9月21日 京都

⑦Atsuo Iida, et al.: A Role of ADAM8 in the Onset of Blood Circulation. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, KumamotoUniversity, 2011年9月9日 熊本

⑧Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of Meltrin beta (ADAM19) in development of peripheral nervous system. The 5th Asia-Oseania Zebrafish Meeting, 2011年8月27日 北京、中国

⑨荒井宏行ら: ADAMプロテアーゼの役割からみる心臓の弁形成機構の解明, 第16回日本プロテアーゼ学会学術集会, 2011年8月26日 大阪

⑩Atsuko Sehara-fujisawa: Roles of ADAM19 in nervous system development in zebrafish. Gordon Research Conference "Metalloproteinase Research at the intersection of Basic Science and Applied Medicine" 2011年8月7日 Smitnfield, USA

⑪Atsuko Sehara-Fujisawa: A roles of ADAM8 in the onset of blood circulation. The 7th Aso International Meeting, 2011年 7月30日 熊本

⑫Atsuko Sehara-Fujisawa: "The Role of ADAM and RIP Proteases in Development and Beyond". Gordon Research Conferences "Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins", 2011年7

⑬Iida A, et al.:Live imaging of cytoskeletal behaviors at the onset of blood circulation in zebrafish. 第63回日本細胞生物学会, 2011年6月27日 北海道

⑭Yosuke Hiramuki, et al.: Identification of miRNA players in muscle stem cells based on Pax3 expression. 第44回発生生物学会年会, 2011年5月18日 沖縄

⑮Yoshitaka Kimura, et al.: A novel cell population, myogenin-negative cells, required for myogenesis. 第44回発生生物学会年会, 2011年5月18日 沖縄

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬原 淳子 (SEHARA ATSUKO)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号: 60209038

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: