

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390060

研究課題名（和文） ハプトビン組換え蛋白体の構造と抗血栓活性発現との関係性

研究課題名（英文） Structure of recombinant habutobin protein and relation with expression of antithrombotic activity

研究代表者

小杉 忠誠 (KOSUGI TADAYOSHI)

琉球大学・名誉教授

研究者番号：80045517

研究成果の概要（和文）：

ハプトビンは、脱線維素原、線溶賦活、血小板凝集抑制により抗血栓作用を発現する。ハプトビンの機能発現を担う構造部位の特定は複数の薬理作用を具備した抗血栓剤の開発の基盤となる。ハプトビンの cDNA をクローニングし、標的配列部位の異なる 4 種の組換えハプトビン断片変異体 (habu-mut 1, 2, 3 and 4) を作製した。その結果、habu-mut2 は約 10% 程度、habu-mut3 は、約 20-30% のコラーゲンによる血小板凝集を抑制した。構造解析により新たな抗血栓剤が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Habutobin expresses antithrombotic action by defibrinogenation, acceleration of fibrinolysis, and inhibition of platelet aggregation. Structural determination of the site responsible for the action of habutobin underlies the development of antithrombotic agents with multiple pharmacological actions. Habutobin cDNA was cloned and 4 fragments of recombinant habutobin (habu-mut 1, 2, 3 and 4) each with different target sites were constructed. It was found that habu-mut2 suppressed collagen-induced platelet aggregation by approximately 10%, and habu-mut3 suppressed it by approximately 20-30%. Novel antithrombotic agents can be developed by structural analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：抗血栓活性、抗血小板剤、血小板、ハプトビン、組換え蛋白体、蛇毒

1. 研究開始当初の背景

本邦唯一の亜熱帯環境下にある沖縄県では、現在でも蛇咬症がみられ、その原因蛇族の多くは、沖縄本島産ハブ (*Trimeresurus Flavoviridis*) である。蛇咬症患者は、咬傷部位局所の循環障害、壊死および全身循環血中の止血機構の破綻がみられる。このような医療現場からの情報などを基に「ハブ粗毒」に含まれる止血機構関与物質の分離精製を開始した。我々のこれまでの研究から、沖縄本島産ハブ粗毒中には4つの主な止血機構に関与する因子が含まれているのを明らかにした。特に、1986年に我々の発見したトロンビン様酵素(ハプトビン)は、脱線維素作用、線溶酵素の放出作用さらに血小板凝集抑制作用などの抗血栓活性を有しているのが判明した。一方、血栓性疾患を基とする冠動脈狭窄などの病態は年々増加し、冠動脈形成術や血栓溶解療法等の治療後も再血栓形成や再狭窄の合併症が問題となっている。この現状に抗するためには、血栓性疾患に対する新たな戦略に基づく予防的、治療学的観点からの薬剤開発が不可避となっている。脱線維素原作用、線溶作用、抗血小板作用の三種の薬理作用を具備したハプトビンによる抗血栓剤としての応用は将来的に有望である。すなわち、ハプトビンのもつ生物学的作用、特に脱線維素、線溶賦活、血小板凝集抑制などの止血機構関与機能の発現が生体内での血栓形成抑制や血栓除去作用を示すものである。ハプトビン分子内には、これら三つの抗血栓機能の発現に関与する構造的部位が存在すると推察される。そのハプトビンの抗血栓発現作用を有する構造の解明は、新規の抗血栓剤の開発するにあたって多くの情報を提供するものと考えた。本研究では、ハプトビンの構造解析を遺伝子工学的的手法により行い、ついで、各構造部位の組換え変異体を作製し、それらのもつ抗血栓作用を調査し、機能発現の構造を特定する。このような構造と機能連関の解析結果を基に、各種抗血栓機能を有した抗血栓剤を遺伝子工学的的手法により合成する。

2. 研究の目的

我々が発見した沖縄本島産ハブ毒由来ハプトビンの cDNA クローニングを行い、組換え蛋白体を作製後、標的配列部位の異なるように断片化し、4種の組換えハプトビン断片化変異体 (habu-mut1、2、3 および 4) を作製する。その4種のハプトビン断片化変異体の脱線維素、線溶賦活、血小板凝集抑制などの作用の有無を調べる。これら断片化変異体のもつ抗血栓作用を特定し、その構造を解析する。

3. 研究の方法

(1) 組換え断片化ハプトビン蛋白変異体の作製

各組換え断片化ハプトビン蛋白変異体の C 末端に His-Tag 配列を含む目的配列をトランスファーベクター (pPSC12) に導入し、発現ベクターを作製する。目的配列の導入は DNA 配列解析により確認した。作製した発現ベクター (habu-mut1、2、3 および 4/pPSC12) DNA とバキュロウイルス (AcNPV) を Sf9 細胞へトランスフェクションし、組換え断片化ハプトビン変異体の発現実験を実施した。その後は、ハプトビン蛋白変異体 habu-mut2、habu-mut3 を中心に大量精製を実施した。すなわち、発現ベクター (habu-mut2 および 3/pPSC12) DNA とバキュロウイルス (AcNPV) を Sf9 細胞へトランスフェクションし、habu-mut2 /AcNPV と habu-mut3/AcNPV を作製し、expressSF+ 細胞にトランスフェクションし、振とう培養後その上清をダルベッコ PBS で透析後、HisTrap FF カラムで、affinity chromatography を行い、Imidazole グラジエントにより組換えタンパクの溶出を行った。さらに、溶出した分画の SDS-PAGE 後、CBB 染色、抗 HisTag 抗体を用いた Western Blotting 後、HisTag タンパク質、すなわち、HisTag-habu-mut2 および 3 が確認された分画を回収し濃縮後、蒸留水で透析し、凍結乾燥後、精製ハプトビン蛋白変異体 habu-mut2 および habu-mut3 として使用した。

(2) habu-mut2、habu-mut3 の血小板凝集能測定

日本白色家兎洗浄血小板 (WP) を作製した。すなわち、3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として使用し、家兎の耳介静脈から採血後、その血液に ACD-A 液および HEPES-Tyrode's を各ステップで添加し、洗浄血小板を作製した。最終的に洗浄血小板を Tyrode's ($Mg^{+} 1mM$ 含) に浮遊させ、血小板凝集機能を測定した。洗浄血小板に、ダルベッコ PBS (コントロールとして)、もしくは、habu-mut2 および habu-mut3 を反応させ、collagen を添加し、血小板凝集能を測定した。

(3) habu-mut3 の血小板活性化抑制作用と構造的部位の検討

血小板凝集抑制機序を追究するために、当初の計画とは異なる新たな研究方法にフローサイトメトリー (FCM) を導入し、血小板活性化の抑制程度を客観的に解析した。さらに、ハプトビンの血小板凝集抑制作用に関与する構造的部位の追究も試みた。

4. 研究成果

(1) 組換え断片化ハプトビン蛋白変異体の作製

habu-mut2 および habu-mut3 は、培養液上清への分泌が確認されたので、得られた上清を Ni アフィニティーカラムに吸着させた後、イミダゾール濃度をステップワイズに順次増加させ、組換え蛋白の溶出を行った。得られた各フラクションについて SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティングを行い蛋白溶出の確認は、抗 His タグ抗体を用いて行った。組換え断片化ハプトビン蛋白変異体溶出成分をプールした後、蒸留水に対して 24 時間透析を行い、凍結乾燥し、組換え断片化ハプトビン変異体を精製した。habu-mut1 および habu-mut4 については、細胞画分に発現が認められたが、培養液上清への分泌が確認されなかった。そこで、断片化組換えハプトビン蛋白変異体 habu-mut2, habu-mut3 の 2 種を大量精製し、抗血栓作用を追究した。

(2) ハプトビン蛋白変異体 habu-mut2, habu-mut3 の血小板凝集抑制作用

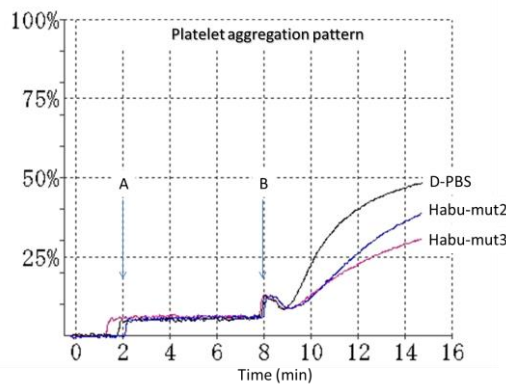


図 1：血小板凝集能

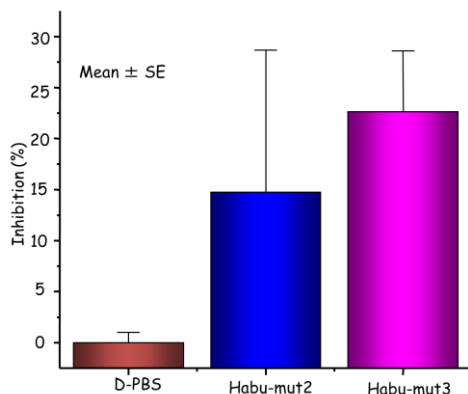


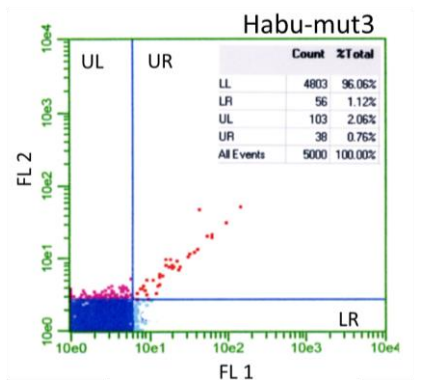
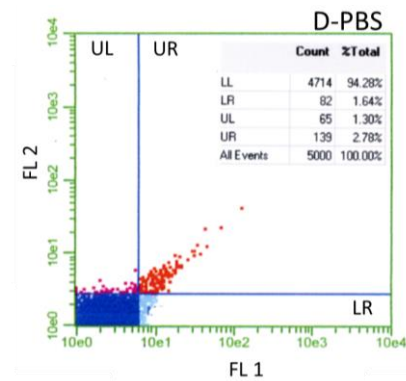
図 2：血小板凝集抑制率

図 1 に示すように、A点で家兎洗浄血小板に、habu-mut2 および habu-mut3 を添加反応後、B点で collagen を添加し、血小板凝集能を観察

した。コントロールに、ダルベッコ PBS (D-PBS) を使用した。その結果、habu-mut3 は、コントロールに比して約 20-30% 抑制し、habu-mut2 は約 10% 程度の抑制であった (図 2)。したがって、habu-mut2 と habu-mut3 のアミノ酸配列上の違いが、血小板凝集抑制程度の違いに反映したものと推測される。

(3) habu-mut3 の血小板活性化抑制作用とその構造の検討

実験 (2) で、habu-mut3 が血小板凝集を強く抑制することから、フローサイトメトリー (FCM) を用いた血小板活性化抑制作用の検討実験には habu-mut3 のみを用いて実験した。洗浄血小板にダルベッコ PBS (コントロール)、および habu-mut3 を反応後、これまでの実験と同様に、collagen を添加した。その後、活性化血小板の膜上に出現する P-selectin と活性型 GPIIb/IIIa を PE 標識 P-selectin と FITC 標識 PAC-1 (活性型 GPIIb/IIIa 認識抗体) で検出し、その血小板活性化程度の解析を FCM で検証した。



FL1: FITC-PAC-1, FL2: PE- anti P-selectin)

図 3：FCM による解析

その結果、habu-mut3 はコントロール (D-PBS) に比して、活性型 GPIIb/IIIa の出

現を抑制したが、血小板と白血球が接するのに必要な P-selectin の出現は抑制されなかった。habu-mut3 のアミノ酸配列上に、活性型 GPIIb/IIIa の出現を抑制することで、血小板凝集抑制へ導く構造が存在すると示唆された。

(4) 得られた成果の意義および今後の展望

我々が作製した habu-mut3 は、抗血栓作用のうちで、血小板凝集能抑制作用の強い構造を保持したハプトビン蛋白断片化変異体であった。本研究は、ハプトビンの構造解析を遺伝子工学的的手法により行い、ついで、各構造部位の組換え変異体を作製し、それらのもつ抗血栓作用を調査し、機能発現の構造を特定することに成功した。このような構造と機能関連の解析結果を基に、各種抗血栓機能を有した抗血栓剤を遺伝子工学的的手法により合成することへの足がかりなる。今後、抗血小板作用を有する habu-mut3 の構造解析と血小板凝集抑制機序の解明を、さらに推し進めることで、抗血小板剤や抗血栓作用をもつ薬剤開発へと臨床応用の基盤を構築できたことが本研究の大きな意義と考えられる。

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 3 件)

- ① Kosugi T, Nakamura M, Sunagawa M. Transition of pathophysiological significance of plasminogen activator inhibitor-From a chief player in antiinflammation, antifibrinolysis to that in the development of insulin resistance. Pathophysiology. 2010 Apr; 17(2): 109-118. 査読有
- ② Sunagawa M. Involvement of Ca²⁺ channel activity in proliferation of vascular smooth muscle cells. Pathophysiology. 2010 Apr; 17(2): 101-108. 査読有
- ③ Sunagawa M, Shimada S, Nakamura M, Kosugi T. RNAi targeting embryonic myosin heavy chain isoform inhibited bound thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells. J Vasc Res 2009;46:55-63. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 中村真理子、砂川昌範、小杉忠誠 組換えハプトビンは、家兎洗浄血小板コーゲン凝集を抑制する
第 89 回日本生理学会大会, 2012 年 3 月 29

日～31 日, 松本市 (長野県)

- ② Sunagawa M, Nakamura M, Kosugi T. Recombinant habutobin exerted fibrinolytic activity on rabbit fibrinogen and inhibited collagen-induced aggregation of rabbit platelet. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小杉 忠誠 (KOSUGI TADAYOSHI)
琉球大学・名誉教授
研究者番号: 80045517

(2) 研究分担者

中村 真理子 (NAKAMURA MARIKO)
琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 40180400

砂川 昌範 (SUNAGAWA MASANORI)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 70325835

上田 智之 (UEDA TOMOYUKI)
琉球大学・医学部・准教授
研究者番号: 80160175

江口 幸典 (EGUCHI YUKINORI)
琉球大学・医学部・准教授
研究者番号: 50160354

(3) 連携研究者

なし