

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 20 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22580109

研究課題名（和文）ハブ毒腺組織特異的な転写調節分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of transcriptional regulation in *Protobothrops flavoviridis* venom gland.

研究代表者

上田(小田)直子 (Naoko Oda-Ueda)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：70211828

研究成果の概要（和文）：

日本の南西諸島に棲息する毒蛇ハブの毒成分は、意外にも生物の様々な組織にある脂質やタンパク質を分解する酵素が主成分であり、それらが加速進化して多様性を増すとともに、極めて高い特異性とユニークな性質を獲得してきたことが明らかとなりました。またハブ毒は、貴重な創薬シーズ（種）としても注目されています。本研究は、それらの毒成分が、毒を産生する組織である毒腺で、どのようにつくりだされるのか、その分子機構の解明を目指した研究です。

研究成果の概要（英文）：*Protobothrops flavoviridis* snakes inhabit the southwestern islands of Japan. *P. flavoviridis* venom gland is a treasure-house of the biologically active proteins which act on the target with high specificity. These proteins are regarded as the valuable seeds for drug invention. Here, we have studied to understand the molecular mechanism of transcriptional regulation of gene expression for venomous proteins in *P. flavoviridis* venom gland.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学

キーワード：遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

蛇毒は、古来より、生理活性成分の宝庫をして知られており、貴重な創薬シーズとして注目される。日本の南西諸島（奄美大島、徳之島、沖縄）に棲息するハブ毒も、ホスホリパーゼ A₂ や金属プロテアーゼをはじめとする数多くの生理活性成分を有していることをこれま

で明らかとしてきた。一方で、それらの毒成分が、毒を産生する組織の毒腺（唾液腺が進化した組織）でどのようにして産生されるのか、その分子機構に関する知見は、世界的にも、全くといっていいほど、明らかとされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、毒腺での毒成分産生の分子機構を明らかとすることを大きな目的としている。毒成分遺伝子が、どのように毒腺組織特異的に発現するのか、特にその転写調節機構に注目して、その分子機構を明らかとすることとした。

3. 研究の方法

(1) 毒腺組織特異的な転写因子の同定：組織特異的に発現する転写因子の解析には、通常は定法として培養細胞を用いるが、毒腺の培養細胞は未だ樹立されていない。そのため、本研究では異なるアプローチをとった。毒液搾取後 20 h のハブ毒腺の完全長 cDNA ライブラリーから組織特異的な転写因子の候補となるクローンを数個取得した（豊田氏(理研)との共同研究）。

(2) 転写因子候補クローンの機能解析：上記(1)で得た候補因子は数種類見つかった。そのうち、他生物ホモログで、主として唾液腺に発現する因子群に注目し、遺伝子クローンを大腸菌で発現し、精製後、可溶化体を得た。

(3) ゲルシフトアッセイ：上記のクローンが実際に毒腺遺伝子の転写に関与しているかどうかを明らかとするため、主要な毒成分遺伝子であるホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) 遺伝子上流の近位プロモーター領域 (300bp) に着目した。その領域配列のうち、候補となる転写因子の認識配列を含む 5 種類のオリゴヌクレオチド (平均長 30bp) を合成した。それらと(2)で作製した発現タンパク質を用いて、ゲルシフト解析を行った。

(4) 幼蛇と成蛇毒組成の比較

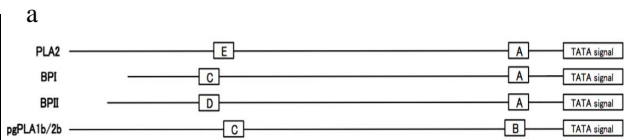
new born (幼蛇) と adult (成蛇) の毒成分を二次元電気泳動 (Bio・Rad) で解析した。各スポットは、simply blue で染色した。各スポットは、IMAGE ANALYZER (BIO・RAD) を用いて解析を行った。

(5) タンパク質の同定 (質量分析計)：二次元電気泳動で得られたスポットは、トリプシンで in-gel 消化後、AB Sciex に委託解析した。

4. 研究成果

(1) 毒腺組織特異的な転写因子の同定

転写因子候補分子は、いずれも ETS 転写因子のグループに属し、ハブ毒腺組織からは、あるサブグループに属する転写因子すべて (4 種類) の完全長 cDNA クローンを得ることができた。それぞれの全長を大腸菌で発現することは困難と予測されたため、まずは、ETS ファミリーで保存されている ETS ドメインの発現を行った。並行して各クローンの発現も試みたところ、試行錯誤の末 3 種類については全長の発現体を得ることが出来た。



b

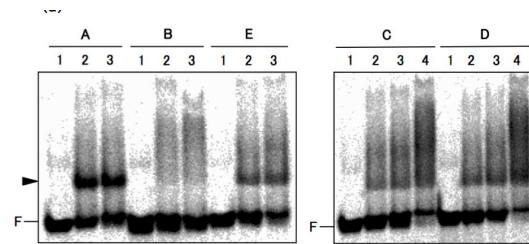


図 1 ETS ドメインのゲルシフトの結果

a: PLA₂ の近位プロモーターの転写因子認識配列を含む領域の転写因子認識配列の位置を A ~ E で模式的に示した。

b: 上記 A ~ E の部分を中央に含んだオリゴヌクレオチドと ETS ドメイン発現ペプチドのゲルシフト

1. オリゴヌクレオチドのみ
 2. オリゴヌクレオチド : ETS ドメイン = 1 : 0.75 (モル比)
 3. オリゴヌクレオチド : ETS ドメイン = 1 : 1 (モル比)
 4. オリゴヌクレオチド : ETS ドメイン = 1 : 2 (モル比)
- 矢印は、オリゴヌクレオチドと Ets ドメインが結合したものを示す。

まずは ETS ドメイン発現構築体が、実際に毒成分遺伝子のプロモーターを認識するかどうかを調べるために、ゲルシフト解析を行った。図 1a には PLA₂ プロモーターの転写因子認識配列の位置を模式的に記した。PLA₂、BPI、BPII はいずれも大量に発現している遺伝子産物であり、pgPLA1b/2b は、遺伝子としてはトランスクリプトとして検出されていなかったため (毒腺トランスクリプトーム解析 1 万 4 千個中)、長年偽遺伝子とされていたものである。ゲルシフトの結果、興味深いことに、ETS ドメイン発現構築体は、PLA₂、BPI、BPII (大量に発現している) のプロモーターのこの因子の認識配列を含むオリゴヌクレオチドには結合するが (図 1b A、C、D、E)、偽遺伝子の方 (図 1b B) には結合しないことがわかった。全長の遺伝子発現体でも同様な実験を行っている。よってこの今回見いだした転写因子群が少なくとも主要な毒成分遺伝子である PLA₂ アイソザイムの転写調節に関与していることが大いに示唆された。現在、さらに詳細な解析を行っている。

(2) 幼蛇特異的に発現する毒成分について
これまでに、ハブは、棲息地毎に、毒成分遺伝子の発現が異なることを見いだしたが、それは、おそらく食性によるものと考えてきた。幼蛇は、成蛇と食性が異なることから、幼蛇毒と成蛇毒の毒成分組成を 2 次元電気泳

動で解析した。その結果、概ね類似したスポットパターンを示したが、顕著に異なるスポットが幼蛇毒に存在した(図2の○で表示)。そこで、その成分を同定するため、その幼蛇特異的な発現が見られるスポットを切り出し、トリプシン消化後、質量分析計(MS/MS)を行った結果、それは、これまで偽遺伝子とみなされてきた PLA₂アイソザイム遺伝子由来する遺伝子産物であることがわかった。つまり、成蛇毒腺では発現していないが、幼蛇毒腺では大量に発現している遺伝子産物であることが明らかとなった。どうして、これが発現しているのか、How and/or Why 双方の観点に基づいて、現在、研究遂行中であり、新たなテーマへと発展する成果を得ることができた。

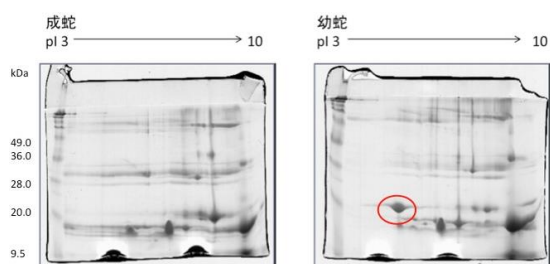


図2 幼蛇と成蛇毒の2次元電気泳動

(なお、以上は、未発表データのため、因子名など明確な表現はさけ、概略のみの表記とした)。

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5件)

1. Chijiwa T., Nakasone H., Irie S., Ikeda N., Tomoda K., Oda-Ueda, N., Hattori S., Ohno M. Structural characteristics and evolution of the *Protobothrops elegans* pancreatic phospholipase A₂ gene in contrast with those of *Protobothrops* genus venom phospholipase A₂ genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2013) 77, 97-102 査読有
DOI 10.1271/bbb.120595
2. Chijiwa T, Ikeda N, Masuda H, Hara H, Oda-Ueda N, Hattori S, Ohno M. Structural characteristics and evolution of a novel

venom phospholipase A₂ gene from *Protobothrops flavoviridis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* (2012) 76,551-558 査読有
DOI 10.1271/bbb.110848

3. Ohshima Y, Nakata Y, Taniguchi G, Takazaki S, Oda-Ueda N, Miyahara K Comparative analysis of cells and proteins of pumpkin plants for the control of fruit size (2012) *J. Biosci. Bioeng.* 114, 334-341 査読有
DOI 10.1016/j.jbiosc.2012.04.005

4. Murakami T, Kamikado N, Fujimoto R, Hamaguchi K, Nakamura H, Chijiwa T, Ohno M, Oda-Ueda N. A [Lys⁴⁹]phospholipase A₂ from *Protobothrops flavoviridis* venom induces caspase-independent apoptotic cell death accompanied by rapid plasma membrane rupture in human leukemia cells. (2011) *Biosci. Biotech. Biochem.* 75 864-870 査読有
DOI 10.1271/bbb.100783

5. So S, Murakami T, Ikeda N, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Kuraishi T, Hattori S, Ohno M. Identification and evolution of venom phospholipase A₂ inhibitors from *Protobothrops elegans* serum. (2011) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 75, 480-488 査読有
DOI 10.1271/bbb.100676

[学会発表] (計21件)

1. 大栗誉敏、中村仁美、志垣隆通、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子
ハブ毒筋壊死因子に対するモノクローナル抗体の作製 2013年3月29日
日本薬学会第133年会 (横浜)
2. 大栗誉敏、中村仁美、千々岩崇仁、服部正策、大野素徳、上田直子
The N-terminal region of [Lys⁴⁹]phospholipases A₂ from *Protobothrops flavoviridis* venom is an essential element for its cell death and

myonecrotic activities.

2012年12月15日 第85回
日本生化学会 (福岡)

3. 中村仁美、村上達夫、今村隆寿、鳥羽通久、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 Vascular permeability enhancing activity of *Gloydus tsushimaensis* venom is due to its vascular endothelial growth factor-like protein 2012年12月14日 第85回 日本生化学会(福岡)
4. Hiroki Shibata, Mayumi Yamamoto, Takahito Chijiwa, Shosaku Hattori, Naoko Oda-Ueda, Motonori Ohno, Yasuyuki Fukumaki Genetic Divergence of Mitochondria genome sequence among island populations of Japanese Habu snakes *Protobothrops* 2012年12月13日 第35回 日本分子生物学会年会 (福岡)
5. 上田直子 ハブ毒ホスホリパーゼ A₂の構造・機能と分子進化 in “ホスホリパーゼ A₂織りなす多元的世界 “2012年11月16日 23rd Forum in Dojin(熊本) (招待講演)
6. Hitomi Nakamura, Tasuo Murakami, Takahisa Imamura, Michihisa Toriba, Takahito Chijiwa, Motonori Ohno, Naoko Oda-Ueda A novel vascular endothelial growth factor like protein from *Gloydus tsushimaensis* venom 2012年7月12日 17th world Congress of the International society on toxinology, (Honolulu, Hawaii, USA)
7. Takahito Chijiwa, Naoki Ikeda, Haruna Masuda, Hiroaki Hara, Naoko Oda-Ueda, Motonori Ohno Structural Characteristics and evolution of a novel venom phospholipase A₂ gene from *Protobothrops flavoviridis* 2012年7月9日, 17th world Congress of the International society on toxinology, (Honolulu, Hawaii, USA)
8. 大栗誉敏、中村仁美、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 BrCN 処理による PLA₂ アイソザイムの細胞死誘導活性の消失 2012年5月27日、日本生化学会九州支部例会(福岡)
9. 中村仁美、柴田弘紀、服巻保幸、森一樹、田代康介、久原哲、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 奄美大島ハブの情報基盤としての遺伝子カタログの作製 2012年5月26日 日本生化学会九州支部例会(福岡)
10. 柴田弘紀、山本真由美、千々岩崇仁、服巻保幸、上田直子、大野素徳、服巻保幸 日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*)の島集団間の遺伝的分化 2012年5月26日、日本生化学会九州支部例会(福岡)
11. 中村仁美、河野真由、村上達夫、大栗誉敏、森口一、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 奄美大島ハブ幼蛇と成蛇の毒成分の比較解析 2012年3月29日 日本薬学会第132年会(札幌)
12. 大栗誉敏、中村仁美、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 ハブ毒ホスホリパーゼ A₂ アイソザイムの細胞死誘導活性に関わる立体構造領域 2012年3月29日 日本薬学会第132年会(札幌)
13. 上田直子 毒動物(ハブ)ベノミクスの現状と展望 2011年9月21日 第84回 日本生化学会(京都)
14. 千々岩崇仁、池田直樹、益田晴奈、原弘昭、上田直子、服部正策、大野素徳 ゲノム構造比較で見いだされたハブ毒ホスホリパーゼ A₂ (祖先型)と PLA₂ アイソザイム遺伝子が辿った進化過程 2011年9月21日 第84回日本生化学会(京都)
15. Tasuo Murakami, Hitomi Nakamura, Takahito Chijiwa, Takatoshi Ohkuri, Takahito Chijiwa, Motonori Ohno, Naoko Oda-Ueda [Lys⁴⁹]phospholipase A₂ from *Protobothrops flavoviridis* venom induce caspase-independent apoptotic cell death accompanied by rapid plasma membrane rupture in human leukemia cells. 2011年9月13日 17th World Congress of the European section of the International Society on Toxinology, Valencia (Spain).
16. 上田直子、村上達夫、神門伸幸、藤本 量、濱口和廣、中村仁美、千々岩崇仁、大野素徳 ハブ毒ホスホリパーゼ A₂ アイソザイムが誘導する細胞死について 2011年7月7日 第58回トキシシンポジウム(東京)
17. 中村仁美、村上達夫、大栗誉敏、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 ハブ毒腺中のDNAポリメラーゼのcDNAクローニングと発現解析 2011年3月30日 日本薬学会第131年会(静岡)
18. 村上達夫、今村隆寿、鳥羽通久、中村仁美、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 ツシママムシ毒中の血管透過性亢進因子の同定と諸性質 2010年12月10日 第33回日本分子生物学会、第83回

日本生化学会、合同大会、BMB2010(神戸)

19. 中村仁美、村上達夫、大栗誉敏、千々岩崇仁、大野素徳、上田直子 ハブ由来のDNAポリメラーゼのクローニングと発現解析 2010年12月8日 第33回日本分子生物学会、第83回日本生化学会 合同大会、BMB 2010(神戸)
20. Kantarou Tomoda, Takahito Chijiwa, Tomohisa, Ogawa, Naoko Oda-Ueda, Shosaku Hattori Interisland evolution of venom phospholipase A₂ isozymes from *Protobothrops flavoviridis* in the southwestern islands of Japan.
2010年12月7日 第33回日本分子生物学会、第83回日本生化学会 合同大会、BMB2010(神戸)
21. 千々岩崇仁、池田直樹、松原和純、上田直子、服部正策、松田洋一、大野素徳
ハブ毒ホスホリパーゼ A₂ アイソザイム遺伝子クラスター領域の独特の構造と進化
2010年9月9日 第34回酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(福岡)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ph.sojou-u.ac.jp/~nakamura/homepage/projects.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 直子 (小田) 直子
(NAOKO ODA-UEDA)
(崇城大・薬・教授)
研究者番号：70211828

(2) 研究分担者

中村 仁美
(Hitomi, Nakamura)
(崇城大・薬・助手)
研究者番号：60510691

大栗 誉敏
(Takatoshi, Ohkuri)
(崇城大・薬・准教授)
研究者番号：70346807