

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：33910
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2017
課題番号：15K14512
研究課題名(和文)新規タンパク性複合脂質プローブの開発

研究課題名(英文) lipid-binding proteins as probes for lipids

研究代表者

森山 昭彦 (MORIYAMA, Akihiko)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：50145744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：96穴プレートにリン脂質を固相化した。固相化したリン脂質は、界面活性剤非存在化にホスホリパーゼDにより定量的に分解され、極性頭部が有効に水相に露出している事が確認された。このプレートにより、インドコブラサイトトキシン7 (CTX7) は、ホスファチジルセリンのような酸性リン脂質に強く結合するが、ホスファチジルコリンには結合しないことが示された。CTX7の変異体の発現ベクターを作成し、リコンビナントタンパク質を封人体の形で得た。様々な条件下に再構成を試みたが、封人体は、溶血活性を示さなかった。リン脂質固相化プレートへの結合活性は遊離CTX定量法が確立できなかったため、確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：96-well microtiter ELISA plates were coated with several kinds of phospholipids(PLs). The PLs on the plates could be digested quantitatively by phospholipase D even in the absence of detergents. Using these plates 3 kinds of Indian Cobra cytotoxins (CTX2, CTX7, and CTX9) were shown to bind tightly with acidic phospholipids such as phosphatidylserine, but not phosphatidylcholine. Mutant CTX7s were obtained as inclusion body by using E. coli expression system and were subjected to renaturation under several conditions. However, they didn't show hemolytic activity. Their phospholipid-binding activity could not be measured since the EIA for recombinant CTXs was not established.

研究分野：生化学

キーワード：リン脂質結合タンパク質 毒素タンパク質 コブラ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コブラサイトトキシン(CTX)は種々の細胞に結合し、細胞毒性を発揮する小型のβタンパク質である。CTX と細胞の組み合わせにより、ネクローシス (Hinman et al., 1990)だけでなく、リソゾーム経路(Feofanov et al, 2005; Wu et al., Biochem. J. 2013) やミトコドリア経路により (Wang and Wu,FEBS Lett.,2005)、アポトーシスを引き起こす事が知られている。申請者らは、インドコブラから10種のCTXを分離精製し (Suzuki, M. et al., Biomed. Res. 2010)、その特異性を明らかにしてきた (Suzuki, M. et al., 進化学会大会2013)。タイワンコブラの CTX3 とタイコブラCT4 は、ホスファチジルセリンに、またタイコブラCTXA3 はスルファチドに強く結合することが知られている。CTX は、細胞毒性を持つため、レコンビナントタンパク質を得ることは困難である。申請者は、自然界に豊富に存在するCTX イソタンパク質に着目し、構造とリン脂質親和性の比較生化学的研究を行なった。その結果、CTX では、リン脂質認識部位と細胞毒性発揮部位が別々の領域にあることが示唆された。これにより、脂質結合特異性を保持したままで無毒のCTXを作成することが可能になる。そして、脂質親和性を保ったまま無毒化したCTX は、脂質プローブとして細胞膜研究に広く応用が可能である。

2. 研究の目的

ライセニン、コレラトキシンなどの複合脂質プローブを利用することにより、細胞膜が脂質ラフトを含む多様な膜マイクロドメインのモザイク状集合体であり、環境の変化に応じて様々に局在性を変えることが明らかにされてきた。細胞膜脂質には種類が多く、新たな脂質特異的プローブの開発が、新たな細胞膜研究の進展が期待される。他方、コブラサイトトキシンは、様々な脂質に特異的に結合し、毒性を発揮するタンパク性毒素である。本研究では、コブ

ラサイトトキシンを遺伝子工学的に改変することにより、複合脂質に特異的なプローブを作製することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 5種のインドコブラ CTX は、インドコブラ毒液から FPLC によるイオン交換クロマトグラフィーと HPLC による逆相クロマトグラフィーにより精製した。コリンの定量には、ワコーコリン定量キットを使用した。

HRP ラベル抗ウサギ IgG 抗体はジャクソン社、4-クロロ-1 ナフトールは、シグマ社の製品を用いた。

(2) 溶血活性の測定

溶血活性の測定には、80倍希釈したヒト赤血球を用いた。CTXの希釈系列を調製し、それぞれのCTX溶液を、赤血球懸濁液の1/10量添加し、37℃ 6時間後に、上清中に放出されているヘモグロビンを吸光度により定量した。

(3) CTX のリン脂質結合能は、ELISA の原理を利用したリン脂質結合タンパク質検出法 (Itoh et al, 2001) を応用し、リン脂質に結合せず溶液中に残存する CTX の量から推定した。リン脂質としては、細胞膜を構成する代表的な6種リン脂質 (PC、PE、PS、PA、PG、SM) を用いた。

(4) コブラサイトトキシンcDNA のクローニングと変異導入CTX の作製

CTX cDNA はインドコブラ毒腺から作製された cDNA ライブラリーを鋳型とし、Chang らの方法 (1997) を応用して TA クローニングした。

塩基配列はキャピラリーシーケンサー ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 株式会社日立ソリューションズ) により塩基配列を決定した。

変異を導入したりコンビナント CTX の発現には Rosetta-gami B(DE3)または、pET-19b-BL21(DE3)の系を用いた。

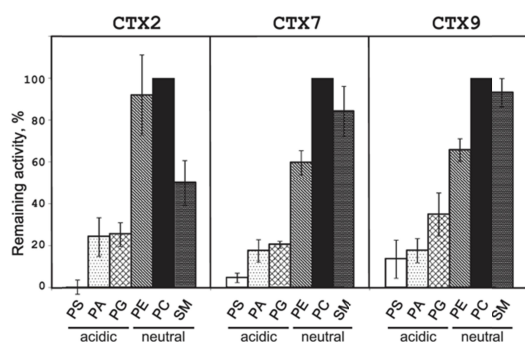
4. 研究成果

(1) 96 穴プレートを用いた各種脂質親和性測定法の開発

有機溶媒はリン脂質のよい溶剤となるが、同時に96 穴プレートの材質であるプラスチックもよく溶かす。そこで、モデルリン脂質としてホスファチジルコリン(PC)を用いて、有機溶剤と市販の96 穴プレートを検討した。ブロッキングにはウシ血清アルブミンを用いた。その結果、ポリプロピレン製プレートが比較的有機溶剤耐性があり、PCをコーティングすることが可能であった。固相化されたPCの界面活性剤非存在下でのホスホリパーゼDに対する感受性を調べたところ、ウエルあたり800 μg 以下のPCでは、コリンが定量的に水相に回収され、極性頭部が有効に水相に露出していることが確認された。

(2) 天然型 CTX のリン脂質親和性

コブラ CTX は、一次構造の特徴から S 型、P 型に分類される。P 型は強毒性、S 型は弱毒性とされているが、CTX7 は S 型であるが毒性が強かった。そこで、それぞれを代表する3種のCTX(弱毒性S型:CTX2、強毒性S型:CTX7、強毒性P型:CTX9)のリン脂質に対する相対親和性を(1)で作成したリン脂質固相化プレートを用い測定した。上清に残ったCTXは溶血活性により求めた。その結果、下図のように、



いずれのCTXもホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルグリセロール(PG)などの酸性リン脂質に強く吸着

され、溶血活性の強さはリン脂質親和性とは相関せず、CTX分子の異なる領域が担っていることが示唆された。

(3) CTX 高感度定量系の開発

溶血活性測定法は、固相のリン脂質に吸着されない遊離のCTXの定量に利用する事ができるが、溶血活性を持たない変異導入CTXを定量することができない。そこで、CTX分子の中で変異を導入しないカルボキシル末端側で保存性の高い領域のペプチドを合成し、家兔に免疫し、交代の作成を試みた。得られた抗血清は、合成ペプチドに対しては高感度(力価: $\times 30000$)に反応したが、天然のCTX分子とは反応しなかった。

(4) 強毒性のCTX7と、弱毒性と期待される変異を導入したCTX(CTX7とCTX2のキメラ)の発現ベクターを構築した。

Rosetta-gami B(DE3)では、いずれも生育が悪かったので、pET-19b-BL21(DE3)の系で大量発現させ、リコンビナントCTXを封入体として調製した。封入体をウレアで可溶化し、pHとイオン強度の異なるグルタチオン酸化還元バッファーを用いてリフォールディングを試みたが、リコンビナントCTXは溶血を引き起こさなかった。変異導入CTXについては、定量法が確立できなかったため、リフォールディングの評価ができなかった。

本研究において、リン脂質固相化プレートを作製した。今後、溶血活性を持たない変異導入CTX測定系を開発し、リフォールディングの条件をさらに検討する必要がある。

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1件)
Suzuki-Matsubara, M., Athauda, S.B.,
Suzuki, Y., Matsubara, K., Moriyama, A.
Comparison of the primary structures,

cytotoxicities, and affinities to phospholipids of five kinds of cytotoxins from the venom of Indian cobra, *Naja naja*., Comp. Biochem. Physiol., C. 179, 2016 (査読有り) 158-164
doi: 10.1016/j.cbpc.2015.09.015.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森山 昭彦 (MORIYAMA, Akihiko)
中部大学・応用生物学部環境生物科学
科・教授
研究者番号 : 50145744

(2)研究分担者

鈴木 美恵子 (SUZUKI, Mieko)
名古屋市立大学・大学院システム自然科学
学研究科・研究員
研究者番号 : 90624700