

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 C
 研究期間：平成 19 年度 ～ 平成 21 年度
 課題番号：19510201
 研究課題名（和文） ヘビ毒に含まれる医薬シーズとして有用な蛋白質をコードする遺伝子の網羅的解析
 研究課題名（英文） Exhaustive search of genes that encode useful snake venom proteins for designing new medicine.
 研究代表者
 阿刀田 英子（ATODA HIDEKO）
 明治薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：20221046

研究成果の概要（和文）：ハブ毒に含まれる血液凝固IX因子／X因子結合蛋白質（A鎖とB鎖の2つC型レクチン様ドメインからなる二本鎖抗凝固蛋白質）をコードする遺伝子の構造を解明した。

研究成果の概要（英文）：I have determined the structure of genes that encode habu IX/X-bp, an anticoagulant protein consisted of two C-type lectin-like chains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：動物ゲノム

1. 研究開始当初の背景

カルシウム存在下糖鎖に結合するC型レクチンは、カイメンからヒトまで動物界に広く分布する蛋白質で、分子進化を考える上でも興味深い材料である。C型レクチン蛋白質はドメイン構造の違いに基づいて、Drickamerにより7つのグループに分類されている。多くのC型レクチンはマルチドメインプロテインであるが、第VIIグループはC型レクチンドメインのみで構成されている蛋白質で、ヒト由来の蛋白質では、膀胱の増殖因子あるいは膀胱石形成を阻害する因子と考えられてい

るリトスタチン（別名 REG protein）がこのグループに分類されている。申請者がハブ毒より見出した血液凝固IX因子／X因子結合タンパク質（IX/X-bp）は第VIIグループに分類されているヘテロな二本鎖蛋白質で、それぞれの鎖がC型レクチンの糖鎖認識ドメイン（CRD）と一次構造上は高い相同性を有すが（15%～40%）、糖鎖に対する結合能は無い。

ヘビ毒には多種多様な生物活性を有する蛋白質が含まれ、神経成長因子の例のように、その単離や構造解析、作用機序の解明により、生命現象のメカニズム解明に寄与したもの

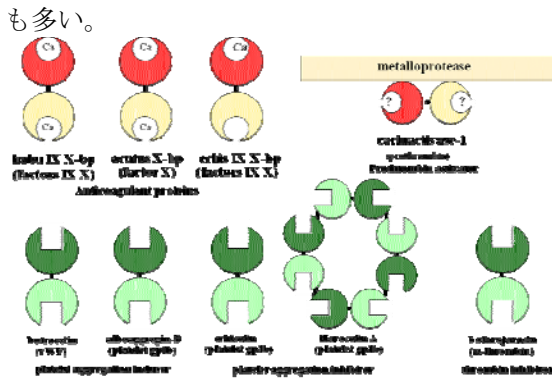


図1 ヘビ毒から単離されたさまざまなIX/X-bp様蛋白質
カッコ内に結合するリガンドを示す。

また、ヘビ毒由来蛋白質には薬として用いられているものや、創薬の基になったものも少なくない。IX/X-bp は血液凝固因子の構造・機能解析に貢献してきた。しかも図1に示すように、この蛋白質と高い相同性を持ちながら、生物活性の全く異なる数多くの蛋白質がヘビ毒から単離され、臨床検査薬や研究用試薬として汎用されているものもある。この図に示したIX/X-bp 様蛋白質のCRD 様ドメインは、何れも一次構造上IX/X-bp の各鎖と50~60%の相同性を持つにもかかわらず、リガンドや生物活性が全く異なっている。すなわち、CRD 様構造はヘビ毒蛋白質の基本的モチーフの一つであり、その多様化により、色々な機能を作り出してきたと考えられる。

ヒトにとって医薬品開発シーズとしての意義を持つ毒蛋白質は、ヘビにとっては捕食や護身という目的に使うものであり、進化の歴史の中で、様々な相手に対応できるよう適応し、進化を遂げてきたと考えられる。ヘビ毒ホスホリパーゼA₂やメタロプロテアーゼにおいては、cDNAクローニングの結果などから、蛋白質に翻訳される領域の方が他の部分よりも速やかに変化しているといういわゆる「加速進化」の存在が示されている。IX/X-bp に関しても同様の結果が得られており、元来糖結合蛋白質をコードする遺伝子として持っていた遺伝子を、現在のところ未知の機構により変化させ、糖鎖に対するものとは別の結合特性を持つものを作り出すことにより、多様性を獲得してきたと思われる。

表1 C型レクチンCRDの遺伝子構造による分類

CRDの遺伝子構造	ヒト	ハブ	フラウホ	プラナリア	ヒドラ
1	MBP (マンノース結合タンパク質)	PL1s (ホスホリパーゼA ₂ インヒビター)	MBP-2 (アジウホレクチン)		
2	PN1 (多量産産物の糖鎖結合因子)				HTC26 (チロシンキナーゼ感受体)
3	FnB1 (多量産産物の糖鎖結合)		MBP-3 (アジウホレクチン)	MBP (マンノース結合タンパク質)	
4	11th lectin	IX/X-bp A鎖			

ヘビ毒由来のC型レクチンやC型レクチン様蛋白質 (IX/X-bp様蛋白質) をコードする遺伝子の構造は未だ報告されていないが、他の動物 (ヒドラからヒトまでの) C型レクチン遺伝子のうち、ゲノムDNAの構造が知られているものについて、遺伝子のエキソン・イントロン構造の違いに基づいて分類したものが表1である。すなわち一つのCRDが唯一のエキソンでコードされているもの (マンノース結合蛋白質など) から、3つのイントロンによって分断されているもの (リトスタチン) まで、4種に分けることができる。これらの遺伝子グループでのイントロン挿入部位は、それぞれのグループ内で高度に保存されており、4つのグループの祖先遺伝子に分かれた後に、それぞれが産生する蛋白質の機能を多様化させつつ進化してきたと考えられる。ヘビ由来のC型レクチン遺伝子は、ハブの血液中に存在するホスホリパーゼA₂インヒビターの遺伝子構造が報告されているに過ぎず、IX/X-bpのゲノムDNAについて解析を進めてきた。図2に、これまでに判明したIX/X-bp A鎖遺伝子の構造の概略を示す。

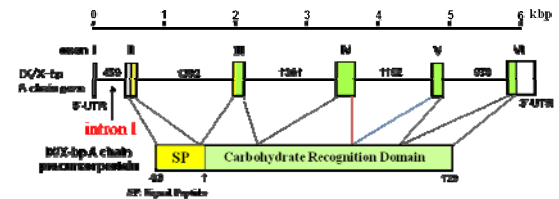


図2 IX/X-bp A鎖遺伝子の構造と蛋白質の対応

この他、申請者は種々のヘビ毒から VEGF 様の蛋白質 (VEGF-F と命名) 等を単離し、構造・機能解析を行ってきた。それら一連の研究から、蛋白質が微量にしか精製できないものや、遺伝子レベルでのみ同定できるものに多数遭遇し、毒蛋白質 cDNA ひいては毒ヘビゲノムを網羅的に解析することにより、新規な蛋白質及びその遺伝子に到達する可能性を考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、蛇毒蛋白質の分子進化や機能多様化のメカニズムの解明、CRD 様ドメイン・ヘテロダイマーの産生機序の解明等を経て、医薬シーズとしてより有用な新規蛋白質を発見あるいは作製することを目指とする一連の研究の一步である。すなわち、ハブ毒に含まれ、我々が既に cDNA 及び蛋白質レベルで構造や機能を明らかにしたC型レクチン様蛋白質 (IX/X-bp や IX-bp 等) のゲノム DNA の塩基配列を解析する。また、ハブ毒腺 cDNA ライブラリーよりハブ毒腺に発現している蛋白質の cDNA を網羅的にクローニングし、

それらのゲノム DNA 塩基配列の解析に繋げる。

3. 研究の方法

(1) ハブ毒タンパク質 C 型レクチン様ドメインをコードするゲノム DNA の構造解析

ハブゲノム DNA を鋳型とし、PCR による DNA 断片を合成し、ベクター (pCT4-TOPO 等) への挿入後塩基配列を解析した。

・IX-bp A鎖遺伝子について ----- X/X-bp と IX-bp は B鎖が完全に同一で、A鎖のアミノ酸配列が 129 残基中 19 残基のみ異なるホモログな蛋白質であり、一つの遺伝子が重複により多様化した好例と考えられる。(H. Atoda *et al.*, *Thromb. Res.* **87**, 271-278, 1997) そこで、IX-bp A鎖の cDNA の配列をもとに設計・合成したプライマーを用いて遺伝子構造を解析した。

(2) ハブ・ゲノムライブラリーの構築およびライブラリーからのスクリーニング

類似遺伝子の存在や、PCR による断片の配列解析では解析し難い遺伝子間の構造解析を目的として、ハブゲノム DNA を新たに調製し、その断片をフォスミド・ベクターに挿入してハブ・ゲノムライブラリーを構築し、IX/X-bp A鎖等の cDNA 配列を用いた PCR によりスクリーニングした。

(3) ハブ毒に含まれる蛋白質 cDNA の構造解析

ハブ毒腺 cDNA ライブラリーをプレート上に植え上げ、独立したクローンを無作為に pick up し、塩基配列を解析した。ライブラリーは、cDNA を大きさに従っていくつかに分画し、ベクター pSPORT-1 に挿入することにより作製した。解析の容易さを考慮し IX/X-bp 等と同程度の大きさ (700-800 bp) のものから順次解析し、C 型レクチンに限定せず、可能な限り多様な毒蛋白質 cDNA を解析した。

4. 研究成果

(1) IX/X-bp B鎖をコードするゲノム DNA の PCR を用いた構造解析

IX/X-bp B鎖の cDNA の配列をもとにプライマーを設計・合成し、ハブゲノム DNA を鋳型として、PCR により B鎖遺伝子 DNA 断片の合成とベクター (pCT4-TOPO 等) への挿入、塩基配列の解析を行った。エキソン I~II 間のエキソン・イントロン構造や、エキソン部分とイントロン部分の塩基配列の変異度等を、既に解析したハブ IX/X-bp A鎖遺伝子と比較した。その結果、イントロン 1 の挿入部分は両遺伝子間で保存されている

こと、および類似の遺伝子 (偽遺伝子も含め) が多数存在する可能性が考えられ、PCR による部分的な断片作成では毒蛋白質コード遺伝子全体の構造解析は困難と思われた。

(2) ハブ・ゲノムライブラリー構築

新たにハブの組織を調達し、ゲノムライブラリー (total 約 72 万 cfu) を構築した。

(3) ハブ・ゲノムライブラリーからの IX/X-bp 遺伝子のスクリーニング

ハブゲノム フォスミドライブラリーから目的遺伝子をクローニングする方法を種々検討し、PCR を用いた基本的なスクリーニング手法を確立した。

ハブ IX/X-bp A鎖の配列を含むクローンを得るため、約 165000 cfu のフォスミドクローンについて、これまでに得られていた IX/X-bp A鎖 cDNA 及びイントロンの配列を基に作成したプライマーを用いた PCR により、陽性クローンを検索した。PCR で得られたバンドの塩基配列を解析し、IX/X-bp 遺伝子の塩基配列と一致あるいは相同性を示したものを陽性とした。

得られた陽性クローンの全塩基配列を解析した結果、1 つのフォスミドクローンに IX/X-bp A鎖遺伝子と B鎖遺伝子が隣り合わせに、逆向きに存在することが明らかになった (図 3)。これら 2 つの遺伝子は同一部位にイントロンが挿入され、それぞれ 6 つのエキソンからなる (CRD 部分のみについてみると 4 つのエキソン) ことが解った。このフォスミドクローン上には、もう一つ別の C 型レクチン様ドメインをコードする遺伝子が存在していることが解った (図 3)。

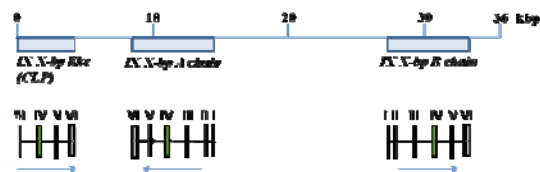


図3 ハブゲノムフォスミドクローン16g-1の構造

このことから、様々な C 型レクチン様蛋白質をコードする遺伝子が 1 つの染色体上に複数存在することが明らかになり、C 型レクチン様蛋白質をコードする遺伝子がクラスターを形成している可能性が示された。ここで新たに見出した遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列は、ハブ以外のヘビ毒から単離されている血小板凝集惹起蛋白質と相同性を示した。この蛋白質がハブ毒から単

離された報告は無く、新規蛋白質の遺伝子と考えられた。

また別の陽性クローンの塩基配列を解析した結果、IX/X-bp A鎖遺伝子ーIX/X-bp B鎖遺伝子に続き、IX-bp A鎖遺伝子に似た別の遺伝子を見出した。配列解析を行ったところ、exon I及びexon IIの配列がIX-bpタンパク質のアミノ酸配列と一致せず、IX-bp A鎖類似の別遺伝子であることが判明した。

(4) PCRによるIX-bp A鎖遺伝子の構造解析

IX-bpのA鎖をコードする遺伝子について、ハブゲノムDNAを鋳型とするPCRにより増幅したDNA断片の塩基配列解析により、IX-bp A鎖コード領域の構造を明らかにした(図4)。

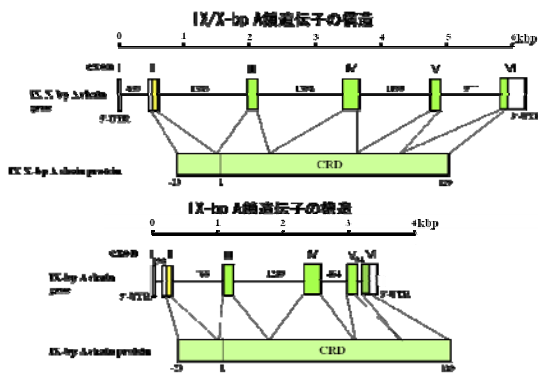


図4 IX/X-bp A鎖遺伝子とIX-bp A鎖遺伝子の構造

その結果IX-bp A鎖遺伝子もIX/X-bp A鎖遺伝子と同様、5つのイントロンにより分断された6つのエキソンからなることが明らかになった。IX-bp A鎖遺伝子におけるイントロン挿入部位はIX/X-bp A鎖遺伝子におけるイントロン挿入部位と相同であり、イントロン同士の配列にも高い相同性がみられたが、その大きさはかなり異なることが解った。

(5) ハブ毒に含まれる蛋白質cDNAの構造解析

ハブ毒腺cDNAライブラリーをプレート上に植えあげ、独立したクローンが無作為にpick upし、塩基配列を解析した。ライブラリーは、cDNAを大きさに従っていくつかに分画し、ベクターpSPORT-1に挿入することにより作製した。解析の容易さを考慮しIX/X-bp等と同程度の大きさ(700-1000 bp)のものから約40クローンを順次解析した結果、ホスホリパーゼA₂類、メタロプロテアーゼ類、BPP/CNP前駆蛋白質等の配列が得られた。

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2件)

① Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, Pink R, Buckley SM, Greig JA, Denby L, Custers J, Morita T, Francischetti IM, Monteiro RQ, Barouch DH, van Rooijen N, Napoli C, Havenga MJ, Nicklin SA, and Baker AH: Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 査読有、132, 397-409 (2008)

② Midori Ishikawa, Makoto Kumashiro, Yasuo Yamazaki, Hideko Atoda, and Takashi Morita: Anticoagulant mechanism of factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*, *J. Biochem.* 査読有、145, 123-128 (2009)

[学会発表] (計2件)

① 阿刀田英子、抗凝固作用を有するヘビ毒C型レクチン様ドメインヘテロダイマー「IX/X-bp」の遺伝子構造、第10回Pharmaco-Hematology Symposium、平成21年6月20日、(東京)
② 阿刀田英子、血液凝固IX因子結合タンパク質A鎖遺伝子の構造、日本薬学会第130年会、平成22年3月30日(岡山)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿刀田 英子 (ATODA HIDEKO)
明治薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：20221046

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし