

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 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770134

研究課題名（和文）蛇毒酵素蛋白質に対する抗毒素蛋白質 SSP の分子認識機構の解明

研究課題名（英文）Molecular recognition mechanism of the small serum proteins (SSPs) events at venomous snake serum against venomous proteins.

研究代表者

塩井(青木) 成留実 (SHIOI (AOKI) NARUMI)

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：50510187

研究成果の概要（和文）：蛇毒中には多彩な薬理作用を示すものが多数含まれる。一方、毒蛇自身の血液中には、これらの毒酵素成分に対する内在性阻害物質が含まれている。本研究では、ハブ血清中において抗毒素蛋白質は複合体として存在しており、それらがハブ毒中の神経毒や細胞死を誘導する蛋白質をどのように阻害するのかを明らかにした。また、蛇毒蛋白質と抗毒素蛋白質の相互作用にどの領域(アミノ酸)が重要なのかを生化学的手法と構造学的解析より知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Snake venom contains many proteins with several pharmacological functions. On the other hand, endogenous inhibitors of these venomous proteins are present in the snake serum. However, the molecular mechanisms of recognition and inactivation of these inhibitors are unknown. This study has clarified how they specifically inhibit a neurotoxin and an apoptosis-inducing toxin from *T. flavoviridis* (Habu). In addition, the residues involved in the interactions between the antivenom-proteins and venomous proteins were investigated by mutational and three-dimensional analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：蛇毒蛋白質、毒蛇血清蛋白質、生体防御機構、アポトーシス誘導蛋白質

1. 研究開始当初の背景

蛇毒は、約百種類の蛋白質がそれぞれの役割を果たすことで、毒としての力を発揮する。興味深いことに、蛇毒成分のほとんどは、哺乳類に恒常的に機能している加水分解酵素である。一方、毒ヘビ自身は自己の蛇毒酵素に対する内在性阻害物質を備えている。蛇毒

に関する報告は多数存在するが、内在性阻害物質についての報告は少なく、その酵素-酵素阻害物質の分子メカニズムの詳細は不明である。

我々は、ハブ血清中よりハブ毒蛋白質に対し異なる特異性を持つ SSP (small serum protein) 群を発見した。これまでの研究より、

(1) ハブ血清中には5種類のSSP(-1~5)が存在し、すべてのSSPはハブ血清中で抗出血因子HSFと複合体を形成して存在している。

(2) SSP-1、SSP-4は、ハブ毒中のアポトーシス誘導蛋白質(Hv1)と結合する。SSP-2、SSP-5は、ハブ毒中のCa²⁺チャンネル結合性神経毒(Triflin)と結合する。SSP-3はある種の金属プロテアーゼと結合する。

(3) SSP-1は、単独でHv1と結合する(K_d=8.2×10⁻⁸ M)。SSP-1単独ではHv1の細胞毒性を阻害しないが、SSP-1/HSF複合体は阻害する。このことよりSSPのHSFへの結合はSSPの生理活性に重要な役割をもつことが示唆されている。5種のSSP間で保存性の高い27~33残基(H²⁷LVVSKW³³)がHSFとの結合に重要な領域であると推定されている(図1)が、実験的証拠は得られていない。

これまでにハブ血清中やハブ毒中から網羅的にSSPと相互作用する分子を同定してきた。その結合分子の生理機能にSSPの結合がどのように影響するか?また、それらの相互作用にどの領域(アミノ酸残基)が重要か?などの詳細はわかっていない。まだ報告例のない「ハブ血清中の内在性抗毒素蛋白質が特異的にハブ毒蛋白質を阻害する機構」は、大変興味を持たれる。

```

SSP-1  VCAPPREH---IDG-EVATRICVDPNDRSRHLVYVSKWNTAGCTICEQFKGLRCLRHDAIPFRDGCESVNLNVTCEYEFYRLDLSKRCDA
SSP-2  AGCIPLVSSPTD--AMAPKKCVDPNDRKHLVSTWNTADCLACEQNDGLSCHRHYGLAERAGCKSVNLNVTCEYEFYRLDLSKRCDA
SSP-3  ECVGSPPLPI--DGEDVPLRRTCVDTHDGKHLVSTWNTANSFSCQCTDGLQCCQKYVAVAV
SSP-4  HCIGSIPLEMEDGEDVPLRRTCVDTHDGKHLVSTWNTANSFSCQCTDGLQCCQKYVAVAV
SSP-5  ACFQSSFEAKRMDGKSVMPNCTVDVDFSKHLLVSTWNTDHYRCEQLKSGFSCCHRYGGIYVYEGYKTVNVPYTCQESYRLDLPDPSORS
  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

図1 ハブ血清由来抗毒素タンパク質SSP*sの一次構造配列。
*SSP=small serum protein, * ,SSP保存されている残基

2. 研究の目的

本研究では、ハブ血清低分子タンパク質SSPのCa²⁺チャンネル結合性神経毒Triflinとアポトーシス誘導蛋白質Hv1に対する生理的阻害能、および相互作用部位を調べSSPの分子認識機構を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 研究対象蛋白質の調製

① SSPsの精製: ハブ血清からゲルろ過クロマト(sephacryl S-300 HR)、逆相HPLC(YMC-Pack C8)、陰イオン交換クロマト(superQ-Toyopearl)の3段階クロマトを用いた精製法により、天然SSP-1~SSP-5を精製した。

② SSP-1組換え蛋白質の調製: pET22b発現ベクター、BL21(pLys S)宿主細胞を用いてSSP-1を発現誘導した。封入体として得られたSSP-1は、希釈法を用いて巻き戻しを行った。最終精製はHSFアフィニティカラムで行った。

③ Hv1の精製: 5段階のクロマトグラフィー

(Sephacryl S-300, SP-Sepharose、ベンズアミジン-Sepharoseカラム、Sephacryl S-200, Superdex 75)を用いて精製した。

④ ¹³C, ¹⁵N 標識 SSP-2 および Triflin の調整: 大腸菌無細胞蛋白質合成法を用いてN末端にHisタグおよびTEVプロテアーゼ切断配列を含んだ¹³C, ¹⁵N 標識 SSP-2 および Triflin の合成を行った。精製は、Hisタグ、Hisタグ除去後SSP-2または、Triflin結合カラムによるアフィニティ精製を行った。ジスルフィド結合形成の確認は、還元および非還元条件下でのSDS-PAGEおよびMALDI-TOFMS装置(Applied Biosystems)で行った。

(2) SSP/HSF複合体とHv1の結合解析

① 表面プラズモン共鳴法による結合解析: CM5 センサーチップにHSF, ハブ血清アルブミン(ネガコン)をそれぞれ固定し(固定液: 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH 4.0)、HBS-P buffer(10 mM HEPES-0.15 M NaCl-0.005 % surfactant, pH 7.0)で溶媒置換したSSPsをアブライシ、さらにHv1を流し、BIAcore 3000 測定機で結合・解離を測定した。

② ゲルろ過 HPLC による結合解析: 0.2 M NaCl-50 mM PB (pH 7.0)で緩衝化したShodex KW403-4Fカラム(0.46×30 cm)に10 μLの試料(SSPとその結合蛋白質の混合物)をアブライシ、流速0.3 mL/minで溶出した。蛋白質は280 nmの吸光度で検出した。

(3) Hv1に対するSSP/HSF複合体の阻害機構: 24穴プレートにヒト臍帯血管内皮細胞株(HUVEC, 1.0×10⁶~3.0×10⁶ cell/well)をまき、各濃度のHv1、またはHv1とSSP-1/HSFの混合物を添加し、37°Cで24時間以上培養した。その後、上清とトリプシン処理した細胞を集め、遠心し、細胞ペレットをPBSで洗浄し、細胞ペレットを得た(下記の①、②はここまで共通)。

① Hv1による核の断片化: 得られたペレットを、70% EtOH(1ml)を加えて冷凍庫で細胞を固定した。細胞を死細胞染色用蛍光色素PI(Propidium Iodide)で染色し、蛍光顕微鏡を用いて核の様子を観察した。

② Hv1によるCaspase-3活性測定: 得られペレットを1% TritonX-100, 1% NP-40を100 μl加えて可溶化し、遠心した。上清10 μlとCaspase-3の基質である1 mM Ac-DEVD-MCA 10 μl(最終濃度50 μM)を100 mM HEPES, 5 mM DTT, 10% sucrose, pH7.4) 180 μl中で37°C、1時間インキュベートした後、1M 酢酸 buffer (pH 4.2) 1.3 mlを加えた。そして、遊離したAMC(7-アミノ-4-メチルクマリン)を励起波長360 nm、蛍光波長440 nmで測定した。

③ Hv1ペプチダーゼ阻害活性: 0.1 M NaCl-0.05% Brij-50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中で5~20 μMの基質に10~50 nMの

SSP/HSF 複合体と 10 nM の H_v1 を加えて 37°C で 10 分間反応した。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) で反応停止後、励起光 328 nm、蛍光 393 nm で測定した。蛍光性合成基質は、MOCAc-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH₂ (Cat. No. 3168) を使用した。蛍光の標準として MOCAc-Pro-Leu-Gly (Cat. No. 3164) を用いて濃度を求めた。さらに、Dixon プロットを用いて阻害定数 (K_i 値) や阻害様式を調べた。

(4) NMR 法による相互作用部位の同定

① ¹³C, ¹⁵N 標識 Triflin の主鎖帰属用測定は、800 MHz NMR 装置、極低温プローブ付 600 MHz NMR 装置と 700 MHz NMR 装置 (Bruker BioSpin) を用いて、測定温度 298 K にて行った。滴定実験は、Triflin と SSP-2 混合液を、極低温プローブ付 700 MHz NMR 装置

(Bruker BioSpin) を用いて、測定温度 298 K にて 2 次元 ¹H, ¹⁵N HSQC スペクトルを用いて行った。全ての滴定実験において Triflin の濃度は 100 μM であり、一方 SSP-2 の濃度は 0 から 400 μM まで段階的に増加するように調整した。解離定数 (K_D) の算出には統計処理ソフト R を用いた。

4. 研究成果

(1) 研究対象蛋白質の調製

① SSPs の精製：ハブ血清 10ml あたり、1.0mg SSP-1, 1.0 mg SSP-2, 0.7mg SSP-3, 0.1 mg SSP-4, 0.5 mg SSP-5 を精製した。

② SSP-1 組換え蛋白質の調製：培養大腸菌の湿重量 1g あたりから HSF 結合能を保持している SSP-1 分子種を約 0.5 mg 得た。同様な方法で、3 つの SSP-1 変異体 (V29A, W33A, F44A) を調整した。V29A, F44A のそれぞれの最終収量は、128 μg, 302 μg であった。一方、W33A は、HSF との結合能を失っているため、アフィニティラムで精製することができなかった。

③ H_v1 の精製：以前は、3 段階のクロマトグラフィーで精製を行っていたが、ハブ毒中に多量に含まれるセリンプロテアーゼの混入を防ぐため、本研究ではベンズアミジン-Sepharose カラム、Sephacryl S-200 のカラム精製を追加してハブ粗毒 1.0 g から高純度の H_v1 を約 1.02 mg 得た。

④ ¹³C, ¹⁵N 標識 SSP-2 および Triflin の調整：無細胞蛋白質合成法において SSP-2 発現の半分以上は、不溶性分画に確認された。His タグ除去後に沈殿傾向が強く、Triflin アフィニティ精製後の最終収量は、50 μg と微量であった。その後、合成の条件検討を行ったが、収率にあまり変化はなかった。一方、Triflin は、SSP-2 アフィニティカラム後の最終精製産物を合計 3.89 mg 得ることができた。

(2) SSP/HSF 複合体と H_v1 の結合解析：

① HSF/SSP-1/H_v1 は三者複合体を形成する (図 2A)。本研究では、SSP-1 の約半分の分子量 (6 kDa) である SSP-4 もまた HSF との複合体の形で H_v1 に結合することを明らかにした (図 2B)。

HSF/SSP-2/Triflin が三者複合体を形成することは予備実験よりわかっている。これらのことより SSP は、ハブ血清蛋白質とハブ毒蛋白質に対してそれぞれ異なる相互作用部位を持つことが示唆された。

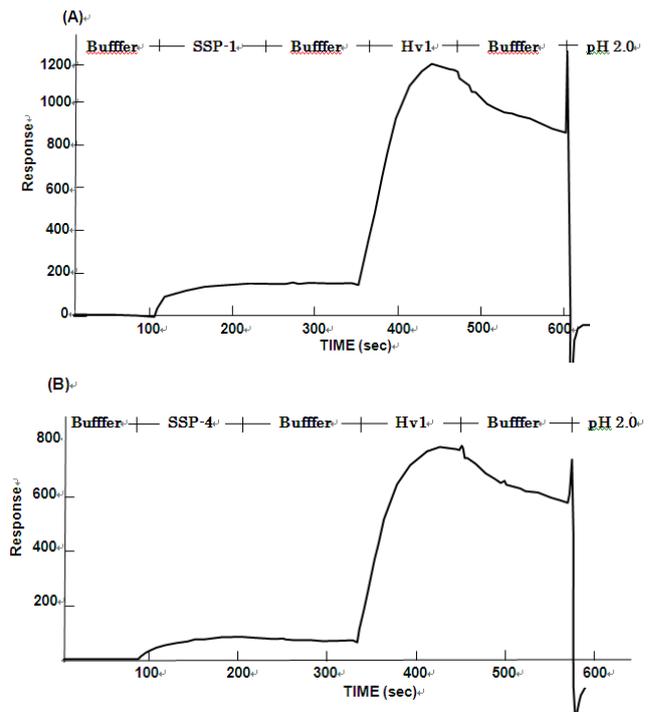


図 2. 表面プラズモン共鳴法による HSF/SSP 複合体と H_v1 の結合解析。 (A) HSF/SSP-1 複合体と H_v1 の結合、(B) HSF/SSP-4 複合体と H_v1 の結合。CM5 センサーチップに HSF を固定化して結合を測定。

② SSP-1 は、ハブ血清由来の抗出血因子 HSF とハブ毒蛋白質 H_v1 に対してそれぞれ二つの結合面を持っている。その結合にどの残基が関与するのかを調べるために、SSP 間で保存されているアミノ酸残基を置換した変異体を作成した。BIAcore を用いた SSP-1 変異体 (V29A, W33A, F44A) と HSF および H_v1 の結合解析より、V29A, F44A は、HSF, H_v1 どちらにも結合し、三者複合体を形成した。一方、W33A は、HSF とは結合しなかった (図略)。本研究の結合実験は、ゲルろ過 HPLC で再現性を確認している (図略)。

これらの結果より、SSP-1 分子表面のループ上に位置する V²⁹, F⁴⁴ は、H_v1 および、HSF の結合には関与しないことがわかった。一方、β 2 上に位置する W³³ は、HSF の結合に重要であることが示唆された。SSP 間で保存されている β 2 領域が HSF との結合面であることを証明するため、

現在、W³³ 周辺残基の変異体についても解析中である。

(3)Hv1 に対する SSP/HSF 複合体の阻害機構：①ヒト臍帯血管内皮細胞株 (HUVEC) を用いて Hv1 の細胞毒性、核の断片化、及び Caspase-3 の活性化を検討した。Hv1 は濃度依存的に細胞収縮、凝集や、ブレブ形成を誘起した。Hv1 処理細胞は、核の断片化や Caspase-3 の活性化も引き起こした (図 3)。これにより、HUVEC に対する Hv1 の細胞毒性は、アポトーシスによるものであることが証明された。一方、50 nM Hv1 に等モル量の SSP-1/HSF 複合体を混ぜ、同様の実験を行ったところ、Hv1 による核の断片化や Caspase-3 の活性化を、ほぼ完全に抑制した (図 4)。

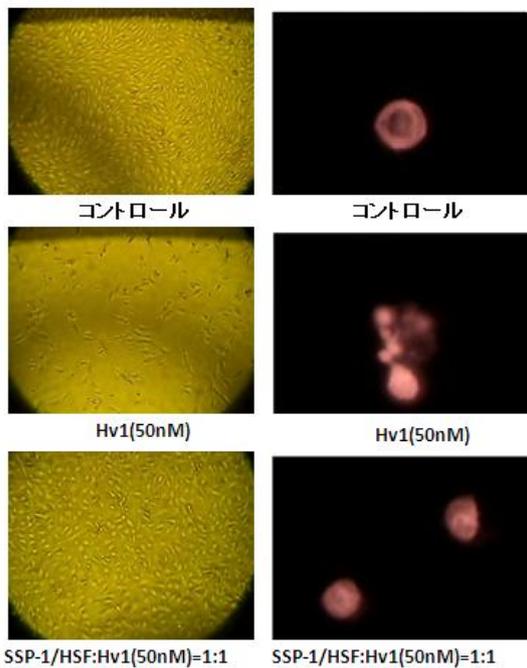


図 3. Hv1 による核の断片化への SSP-1/HSF 複合体の影響

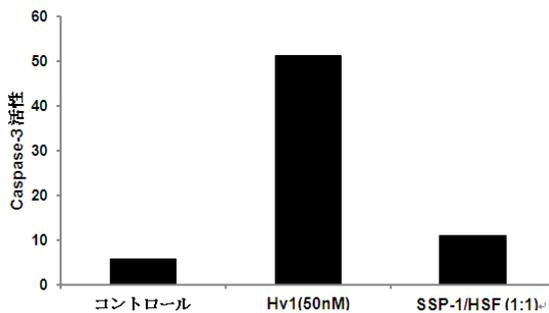


図 4. Hv1 によるカスパーゼ 3 の活性化への SSP-1/HSF 複合体の影響

②Hv1ペプチダーゼ活性に対する阻害：Hv1は SSP-1と特異的に結合するが、単独 SSP-1によって阻害はされない。また、HSFもHv1を阻害しないが、SSP-1/HSF複合体はHv1を化学量論的に阻害する。本研究では、蛍光性合成基質を用いて、SSP-1/HSF複合体による阻害の強さとその阻害様式を調べた。さらに SSP-4の阻害

についても検討した。基質No. 3168を用い、Hv1に対する SSP-1/HSF複合体、SSP-4/HSF複合体の阻害を調べた結果、これら複合体はHv1活性を阻害した (図5)。Hv1に対する SSP/HSF複合体の阻害は、基質濃度に非依存的であり、Dixonプロットの結果から、その阻害は非拮抗的であることがわかった (図6)。また、 K_i 値は $8.7 \pm 1.4 \times 10^{-9}$ M (SSP-1/HSF)、 $5.8 \pm 1.2 \times 10^{-7}$ M (SSP-4/HSF)であった (SSP-4/HSFの図略)。今回の実験より、SSP-4(6 kDa)は、SSP-1(10 kDa)に比べHv1阻害が50-100倍弱いことが分かった。今後、SSP-4のHSF、またはHv1に対する結合親和性がSSP-1よりも弱いかどうかを調べ、この阻害活性の違いについて考察する。

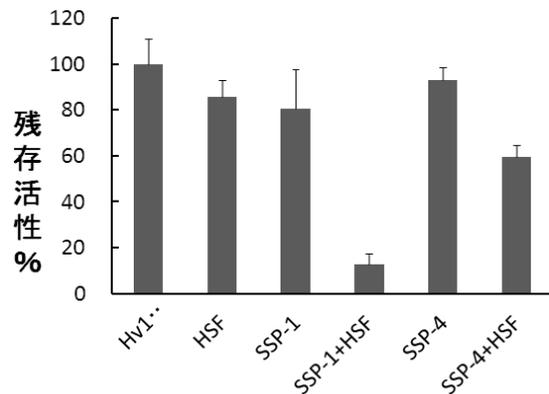


図 5 SSP/HSF 複合体による Hv1 阻害

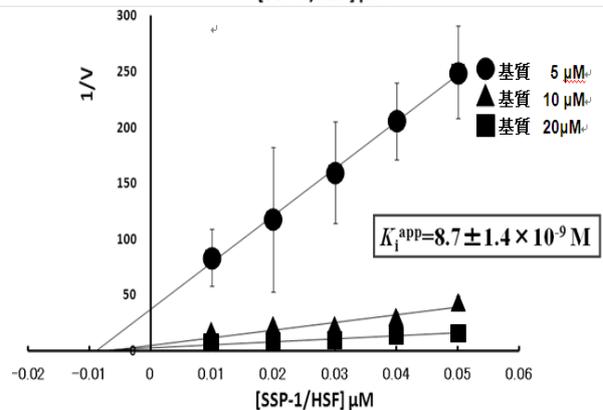
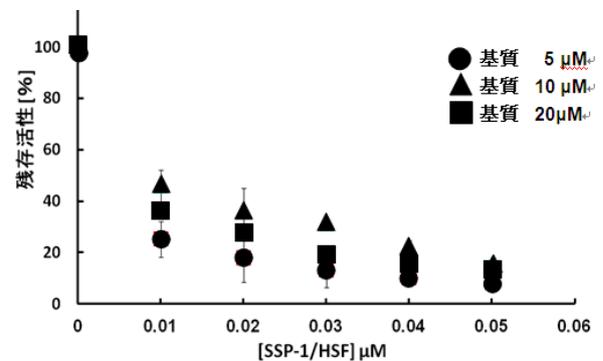


図 6. (上)蛍光性合成基質を用いた SSP/HSF 複合体の Hv1 ペプチダーゼ活性阻害測定 (下)Dixon plot を用いた SSP/HSF 複合体の阻害定数 (K_i 値) と阻害様式

(4) NMR 法による相互作用部位の同定
 ① NMR による緩和解析の結果から、今回合成した Triflin はモノマーであった。Triflin の主鎖シグナルの帰属を行った結果、92 個のシグナルについては配列特異的な帰属を得ることができた。100 μ M の ^{13}C , ^{15}N 標識 Triflin に対し、少量の天然 SSP-2 (6.25 μ M) を滴下したところ、SSP-2 結合状態の Triflin シグナルが新たに観測された。滴定に伴うすべてのシグナルの変化は遅い交換を示しており、Triflin と SSP-2 はかなり強固に結合しているものと考えられた。また、等量の SSP-2 存在下でのスペクトルと、4 倍量でのそれがほぼ一致することから、等量の SSP-2 の存在下ですべての Triflin が強固に結合している様子が観測された ($K_D=0.12$ nM)。この結果は、BIAcore を用いた結合解析の結果とも一致した。

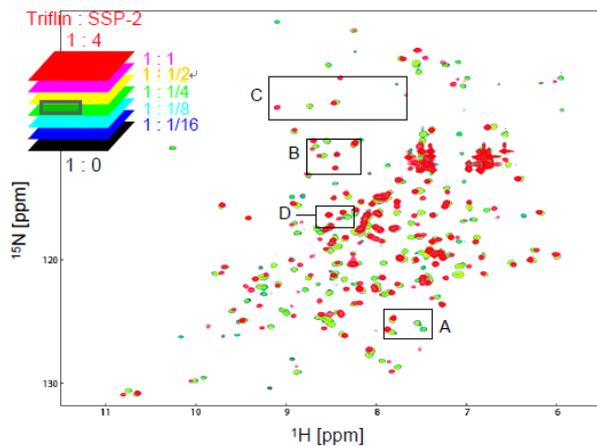


図 7. Triflin と SSP-2 の相互作用解析

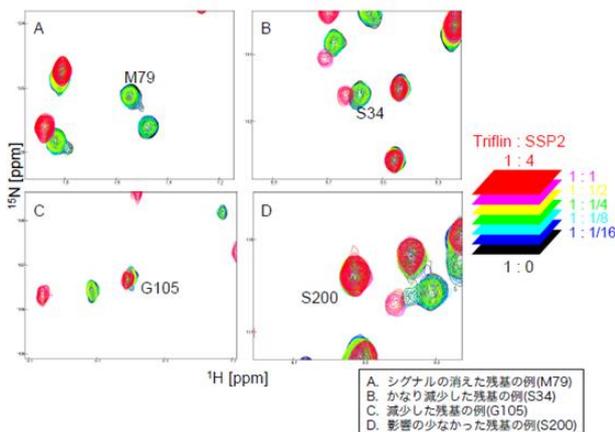


図 8. SSP-2 添加による triflin のシグナル変化

② 個々の残基に由来するシグナルの強度変化を解析したところ、4 つのグループに分けることができた。(A) 少量の SSP-2 添加でシグナルが消失する残基 (M79、図 8A)、(B) Triflin : SSP-2 = 1 : 0 条件下のシグナル強度に比べ、1 : 1 条件下ですでに 80% 以上

強度が減少した残基 (S34、図 8B)、(D) Triflin : SSP-2 = 1 : 4 の条件下においてもまだシグナル強度が 60% 以上残っている残基 (S200、図 8D)、(C) 上記 (B)、(D) の中間の残基 (G105、図 8C)、である。これらの残基を報告されている Triflin の X 線結晶構造 (PDB : 1WVR) の上に色分けを行った (図 9)。シグナルの強度変化が大きかった残基は N 末端側の PR-1 ドメインの $\beta 4$ (65~80 残基) を中心とした領域に集まっていた。一方、シグナル強度の変化がほとんど見られなかった残基は C 末端側の Cys-rich ドメイン (186~221 残基) および $\beta 7$ - $\beta 8$ のループ領域に見られ、PR-1 ドメインの $\beta 4$ から空間的に離れた領域であった (図 9)。現在、今回得られた結合に重要な残基の変異体を作成し、それらの相互作用解析を行っている。

本研究は、ジスルフィド結合を 8 個もつ全長 CRISP ファミリー蛋白質 (Triflin, 約 25 kDa) の合成とその標識体作成に初めて成功した。今後、triflin に限らず、CRISP ファミリー蛋白質の機能部位 (アミノ酸残基) に関する生化学的実験データを得られることが期待できる。

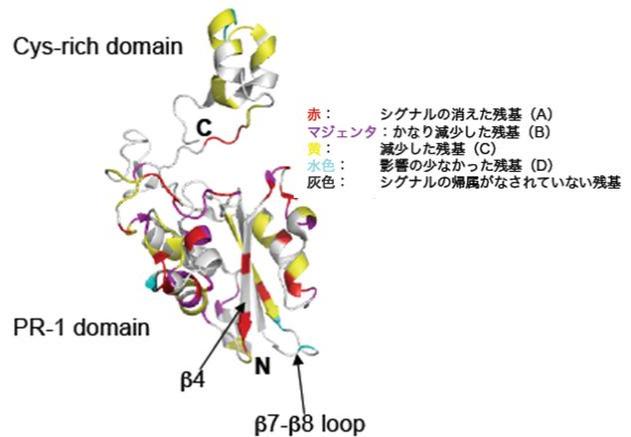


図 9. SSP-2 添加による Triflin の立体構造上の NMR シグナル強度変化

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 Narumi SHIOI, Masaaki NARAZAKI, and Shigeyuki TERADA, Novel function of antihemorrhagic factor HSF as an SSP-binding protein in Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) serum, Fukuoka Univ. Sci. Rep., 査読無, 41, 2011, pp177-184.

② Narumi SHIOI and Shigeyuki TERADA, Isolation and characterization of a novel subunit of phospholipase A2 inhibitor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*,

Fukuoka Univ. Sci. Rep., 査読無, 41, 2011, pp185-193.

〔学会発表〕(計 13 件)

- ① Narumi Shioi, Mika Watanabe, Yuka Takashima, Shigeyuki Terada, Characterization of a processing enzyme that cleaves the precursor protein for hyacinth protease inhibitors, 日本農芸化学会 2012 大会, 2012 年 3 月 23 日, 京都女子大学
- ② Hiroataka Wada, Mika Watanabe, Narumi Shioi, Shigeyuki Terada, Characterization of a processing enzyme that cleaves the precursor protein of hyacinth trypsin inhibitors, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都国際会議場
- ③ Asuka Nakayama, Rieko Hayashi, Narumi Shioi, Shigeyuki Terada, Inhibition of Hvl in Habu snake venom by SSPs in the serum of Habu snake, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都国際会議場
- ④ Sayuki Yasuda, Narumi Shioi, Shigeyuki Terada, Interaction between flavorase, a venomous metalloproteinase, and Habu serum SSP-3, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都国際会議場
- ⑤ 渡邊美翔, 高島由花, 塩井成留実, 寺田成之, ヒヤシンス・プロテアーゼインヒビター前駆体分解酵素の性質, 平成 23 年度日本生化学会九州支部例会, 2011 年 5 月 22 日, 久留米大学
- ⑥ 塩井成留実, 真名子一樹, 村上慶介, 寺田成之, 新規のハブ毒メタロプロテアーゼの構造と性質, 平成 23 年度日本生化学会九州支部例会, 2011 年 5 月 22 日, 久留米大学
- ⑦ 坂口雅弥, 安部修平, 塩井成留実, 寺田成之, ハブ毒アポトーシス誘導タンパク質 Hvl の性質, 平成 23 年度日本生化学会九州支部例会, 2011 年 5 月 22 日, 久留米大学
- ⑧ 清村康子, 塩井(青木)成留実, 寺田成之, Identification of a novel CRISP protein from Mamushi serum, 第 82 回日本生化学会大会/第 33 回日本分子生物学会年会, 2010 年 12 月 10 日, 神戸ポートアイランド
- ⑨ 林理恵子, 塩井(青木)成留実, 寺田成之, Identification of functional regions in SSP-1, 第 82 回日本生化学会大会/第 33 回日本分子生物学会年会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸ポートアイランド
- ⑩ 塩井(青木)成留実, 村上慶介, 西嶋あゆみ, 寺田成之, Inhibition of a novel metalloprotease from Habu venom by SSP-3, 第 82 回日本生化学会大会/第 33 回日本分子生物学会年会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸ポートアイランド
- ⑪ 塩井(青木)成留実, 清村康子, 黒木喜美子,

前仲勝実, 寺田成之, Identification of novel CRISP protein and analysis of binding regions of SSP-2/CRIPS complex, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 年 6 月 16 日, 札幌コンベンションセンター

⑫ 高島由花, 前川枝里奈, 塩井(青木)成留実, 寺田成之, ヒヤシンス・プロテアーゼインヒビター(LHTI)の阻害機構の解析, 平成 22 年度日本生化学会九州支部例会, 2010 年 5 月 22 日, 鹿児島大学工学部

⑬ 村上慶介, 西嶋あゆ美, 塩井(青木)成留実, 寺田成之, ハブ SSP-3 は新規のハブ毒メタロプロテアーゼを阻害する, 平成 22 年度日本生化学会九州支部例会, 2010 年 5 月 22 日, 鹿児島大学工学部.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩井(青木) 成留実 (SHIOI (AOKI) NARUMI)
福岡大学・理学部・助教
研究者番号: 50510187

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: