

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450139

研究課題名(和文) ハブ毒ホスホリパーゼA2アイソザイムの構造活性相関と遺伝子発現制御の包括的研究

研究課題名(英文) Study on structure, function and gene regulation of Protobothrops flavoviridis snake venom phospholipase A2 isozymes

研究代表者

上田 直子(小田直子)(ODA-UEDA, Naoko)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：70211828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ハブ毒ホスホリパーゼA2(PLA2)アイソザイムのうち、幼蛇の毒特異的に顕著に発現するPLA2 (pgPLA1b/2b)に着目し、構造・機能及び遺伝子発現制御機構に関する研究を行った。前者については、酵母による発現系を構築し、生理機能との関連を調べている。後者については、ハブ毒PLA2アイソザイムのうち、pgPLA1b/2bのみ、0歳、1歳と年齢と共に発現量が低下し、2歳では発現しないことをみいだした。その遺伝子発現制御機構は興味深く、DNAメチル化との関連等解析中である。毒動物として初の毒腺組織特異的な転写因子に関する成果は論文及び国際学会で発表し、バイオニヤ的研究と評価された。

研究成果の概要(英文)： We have studied the structure, function and gene expression of venomous phospholipase A2 (PLA2) isozymes in habu snake (*Protobothrops flavoviridis*), especially focusing on specifically expressed PLA2 isozyme, so-called pgPLA1b/2b, in juvenile snake. For this purpose, pgPLA1b/2b protein was expressed in yeast and purified on column chromatographies. The gene regulation study with RT-PCR for venom glands of various ages demonstrated that expression of pgPLA1b/2b decreased as the age of the snake increased from 0 to 1 year old and it was no longer detected in 2-year-old-snakes. On the other hand, four other PLA2 isozyme genes were steadily expressed regardless of age. This work presents new perspectives as to why pgPLA1b/2b exists only in juvenile snake and how it can be regulated in gene expression with age.

研究分野：分子生物学

キーワード：蛇毒 ホスホリパーゼA2 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

南西諸島に棲息する毒蛇ハブ毒の主要な成分として、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (リン脂質分解酵素) が存在しているが、これはアイソザイムを構成し、各々が固有の生理機能 (浮腫、溶血、筋壊死等) を呈する。我々は、これまでに、各アイソザイムについて、タンパク質・遺伝子の構造と機能、分子進化などの研究を行ってきた。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た。幼蛇 (3 歳未満) と成蛇の食性が異なることから、幼蛇毒と成蛇毒の毒成分組成を比較したところ、幼蛇毒にのみ特異的に、しかも顕著に発現する成分を見つけた。この成分の一次構造を解析したところ、興味深いことに、これまで、ハブ毒で発現が確認されていないため偽遺伝子とみなされてきた PLA<sub>2</sub> アイソザイム (pgPLA1b/2b) (PNAS 1993) の遺伝子産物であることを明らかとした (22580109 基盤研究 (C) 科研費成果)。

## 2. 研究の目的

主にハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム (pgPLA1b/2b) について、次の 2 点に着目した。

### (1) pgPLA1b/2b の生理機能の解明

どうして、pgPLA1b/2b が幼蛇毒にのみ特異的に発現するのかを明らかとするため、pgPLA1b/2b タンパク質の発現系を構築し、タ生理機能を調べ、遺伝子工学的手法を用いて、構造・機能の関連を考察する。

### (2) pgPLA1b/2b の遺伝子発現機構の解明

どのように pgPLA1b/2b 遺伝子が遺伝子発現制御されているのか、その分子機構を明らかとするため、遺伝子発現に関する知見を取得し、考察する。

## 3. 研究の方法

### (1) pgPLA1b/2b の大腸菌及び酵母による発現系の構築及びタンパク質の精製

pgPLA1b/2b 遺伝子の合成オリゴヌクレオチドを用いて PCR を行った。大腸菌 (BL21) 発現では、ベクターとして pET21C を、酵母 (*Pichia*) による発現では、pPICZa ベクターを用いた。発現タンパク質は、SP- or DEAE-トヨパール、Blue Sepharose あるいは、AKTA purifier による RESOURCE Q、Cosmosil 5 Diol など、様々なイオン交換、ゲル濾過、親和性カラム等を用いて、条件検討しながら精製を行った。

### (2) ハブの成長過程と毒腺中の PLA<sub>2</sub> アイソザイムの発現との関連づけ (RT-PCR)

年齢 (体長から推定) の異なる複数個体のハブの毒腺から、Total RNA を調製し、各 PLA<sub>2</sub> アイソザイムに特有のオリゴヌクレオチドを注意深く選出し、それらを用いて RT-PCR を行った。PCR は、PLA<sub>2</sub> アイソザイムについては 20 サイクル、β アクチンについては 23 サイクルで行った。

### (3) DNA のメチル化解析

成蛇と幼蛇の毒腺からゲノム DNA を抽出し、pgPLA1b/2b のほか、比較のため、PLA<sub>2</sub> (年齢、生息地に関係なく恒常的に発現しているハブ毒 PLA<sub>2</sub> アイソザイム) および PfPLA1psi (PLA<sub>2</sub> 偽遺伝子) 各遺伝子の転写開始点から約 300 bp についてバイサルファイトシーケンスを行った。

## 4. 研究成果

### (1) pgPLA1b/2b の大腸菌及び酵母による発現系の構築及びタンパク質の精製

大腸菌と酵母の両方で発現系の構築を試みた。大腸菌の系では、実験条件を検討した結果、終濃度 0.1mM あるいは 0.4mM の IPTG で誘導し、20°C、0/N で発現誘導されることがわかったが、巻き戻し (PLA<sub>2</sub> はジスルフィド結合 7 カ所) 効率などを考慮し、酵母での発現を優先することとした。30°C、BMGY/ BMMY 培地で発現誘導を確認した。精製の過程では、上記のような種々のカラムを用いて、様々な条件検討を行ったが、単一標品までの精製は難航した。試行錯誤の末、N 末端から 10 残基めの Lys で切断されたものが混入していることが判明したため、Ala に置換した変異体 (K10A) を作製した。その後、精製の効率化を考慮し N 末端と C 末端にタグを付した全長タンパク質を構築することで生理機能を探索できることとなった。分子構造解析ソフト (MOE) による分子モデリングでは、pgPLA1b/2b は、他の PLA<sub>2</sub> アイソザイムと比較して、分子表面に疎水性アミノ酸を有する特徴的な構造をもつことが示唆され、これが固有の構造、機能に関与しているかもしれないと考えている。

### (2) pgPLA1b/2b の遺伝子発現制御

pgPLA1b/2b の転写は、0 歳、1 歳とハブの年齢とともに発現量が減少するのに対し、他の PLA<sub>2</sub> アイソザイムは年齢に無関係に発現することをみいだした (図)。

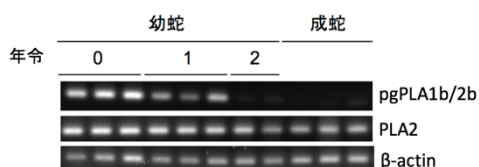


図 ハブの幼蛇及び成蛇由来の毒腺中の PLA<sub>2</sub> アイソザイムの RT-PCR

PLA<sub>2</sub> アイソザイムの発現制御機構解明のために、エピジェネティックな制御機構、特に DNA のメチル化に注目した。成蛇と幼蛇の毒腺組織からゲノム DNA を抽出し、pgPLA1b/2b 遺伝子の転写開始点から上流 330 bp (CG 配列は 12 カ所) のメチル化の程度を比較したところ、幼蛇の毒腺細胞では当該領域に含まれる CG のメチル化は 42%、成蛇のそれは 58% で、幼蛇でややメチル化が低下している傾向がみられた。一方、PLA<sub>2</sub> のメチル化の程度は、幼蛇 60%、成蛇 52%、PfPLA1 (psi) では、幼蛇 90%、成蛇 76% であり、これらの遺伝子では、成蛇の方がややメチル化が低い結果が得られた。今後は、メチル解析に用いる個体年令を精査し再度解析を行うと共に、個体数を増やして個体差も調べる。さらに、miRNA の関与の可能性など他の遺伝子制御機構も考慮しながら研究を進める。

毒蛇のみならず、毒動物の毒腺には多くの生理活性タンパク質が発現しているが、毒成分の遺伝子発現に関する分子生物学的研究は、ほとんど行われていない。我々が先に見いだした毒腺組織特異的な転写因子 (22580109 基盤研究(C) 科研費成果) に関する報告 (Toxicon 2014) は、国際毒素学会の世界会議 (The 18<sup>th</sup> world congress of the International Society on Toxinology, Oxford, UK) にて口頭発表に採択され、パイオニア的研究と高く評価された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

### 1. 上田 直子 ハブ毒を科学する

— どうして毒成分はユニークで多様な機能を獲得したのか。Milsil 査読無 9, (2016) 14-16

URL: <https://www.kahaku.go.jp/userguide/book/milsil/toc.php?id=0001468389741478>

2. Yamaguchi K., Chijiwa, T., Yamamura T., Ikeda, N., Yatsui, T., Hayama, S., Hattori, S., Oda-Ueda, N., Ohno, M.

Interisland variegation of venom [Lys<sup>49</sup>]phospholipase A<sub>2</sub> isozyme genes in *Protobothrops* genus snakes in the southwestern islands of Japan. *Toxicon* (2015) 107, 210-216 査読有  
Doi: 10.1016/j.toxicon.2015.08.024.

3. Nakamura H., Murakami, T., Hattori, S., Sakaki, Y., Ohkuri, T., Chijiwa, T., Ohno, M., Oda-Ueda, N. Epithelium specific ETS transcription factor, ESE-3, of *Protobothrops flavoviridis* snake venom gland transactivates the promoters of venom phospholipase A<sub>2</sub> isozyme genes. *Toxicon*, (2014) 92, 133-139 査読有  
Doi: 10.1016/j.toxicon.2014.10.001.
4. Nakamura H., Murakami, T., Imamura, T., Toriba, M., Chijiwa, T., Ohno, M., Oda-Ueda, N. Discovery of a novel vascular endothelial growth factor (VEGF) with no affinity to heparin in *Gloydius tsushimaensis* venom. *Toxicon* (2014) 86, 107-115 査読有  
Doi: 10.1016/j.toxicon.2014.05.003.
5. Yamaguchi, K., Chijiwa, T., Ikeda, N., Shibata, H., Fukumaki, Y., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Ohno, M.  
The finding of a group IIE phospholipase A<sub>2</sub> gene in a specified segment of *Protobothrops flavoviridis* genome and its possible evolutionary relationship to group IIA phospholipase A<sub>2</sub> genes, *Toxins* (Basel) (2014), 6. 3471-3487 査読有  
Doi: 10.3390/toxins6123471.
6. Chijiwa, T., So, S., Hattori, S., Yoshida, A., Oda-Ueda, N., Ohno, M.  
Suppression of severe lesions, myonecrosis and hemorrhage, caused by *Protobothrops flavoviridis* venom with its serum proteins. *Toxicon* (2013) 76, 197-205  
Doi: 10.1016/j.toxicon.2013.10.007.

[学会発表] (計 26 件)

1. 中村 仁美、鶴木 元香、大栗 誉敏、千々岩 崇仁、大野 素徳、上田 直子  
幼蛇毒特異的に発現するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の遺伝子発現に関する研究 第 64 回 トキシシンポジウム 有馬温泉 向陽閣 (兵庫県 神戸市) 2017 年 7 月 10 日 ~ 7 月 12 日
2. 中村 仁美、大栗 誉敏、植田 正、上田 直子 抗体医薬アダルムマブ Fab の C 末端ジスルフィド結合が構造安定性

に及ぼす影響 日本薬学会第 137 年会  
東北大学川内キャンパス、  
仙台国際センター (宮城県 仙台市)  
2017 年 3 月 24 日~3 月 27 日

3. 稲丸 賢人、千々岩 崇仁、山口 和晃、  
林 みず紀、柴田 弘紀、上田 直子、服部  
正策、大野 素徳 クサリヘビ科ヘビの分  
泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)をコードする  
遺伝子クラスター領域の解析 第 39 回  
日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜  
(神奈川県 横浜市) 2016 年 11 月 30 日  
~2016 年 12 月 2 日
4. 柴田 弘紀、千々岩 崇仁、上田 直子、  
中村 仁美 他 17 名 毒蛇ハブ  
(*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノ  
ム配列決定から明らかとなった毒液関連遺  
伝子群に多重化と染色体構造との関係 第  
89 回 日本生化学会大会 仙台国際セン  
ター、東北大学川内北キャンパス (宮城  
県、仙台市) 2016 年 9 月 25 日~9 月 27 日
5. Nakamura H., Murakami, T., Hattori,  
S., Ohkuri, T., Ohno, M. Oda-Ueda, N  
Juvenile snake specific expression of  
a novel phospholipase A<sub>2</sub> isozyme gene  
in *Protobothrops flavoviridis* venom  
gland. XII Congress of the Pan-American  
Section of the International Society  
on Toxinology Miami, Beach, Florida,  
USA 2016 年 9 月 18 日~9 月 23 日
6. 中村 仁美、大栗 誉敏、服部 正策、  
千々岩 崇仁、大野 素徳、上田 直子 毒  
蛇ハブ幼蛇と成蛇の毒成分の比較解析 第  
63 回 トキシシンポジウム 2016 年 7  
月 14 日~7 月 16 日 天童温泉 (山形  
県、天童市)
7. 中村 仁美、大栗 誉敏、植田 正、  
上田 直子 抗体医薬アダリムマブ Fab の  
酵母を用いた発現系の確立 日本薬学会第  
136 年会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜  
市) 2016 年 3 月 26 日~3 月 29 日
8. 柴田 弘紀、千々岩 崇仁、上田 直子、  
中村 仁美 他 16 名 日本固有の毒蛇ハブ  
(*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノ  
ム配列決定と遺伝子モデルの作製  
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会  
第 88 回日本生化学会大会合同大会) 神戸  
ポートアイランド (兵庫県 神戸市) 2015  
年 12 月 1 日~4 日
9. 清水 安奈、千々岩 崇仁、大栗 誉敏、  
中村 仁美、上田 直子、武谷 浩之  
ハブ毒由来不活性型セリンプロテアーゼ  
様タンパク質の構造と機能 BMB2015 (第  
38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本

生化学会大会合同大会) 神戸ポートアイ  
ランド (兵庫県 神戸市)  
2015 年 12 月 1 日~4 日

10. 中村 仁美、上田 彩加、前田 彩、  
村上 達夫、大栗 誉敏、服部 正策、  
千々岩 崇仁、大野 素徳、上田 直子  
ハブ毒腺における幼蛇毒特異的ホスホリパ  
ーゼ A<sub>2</sub>アイソザイム遺伝子の発現  
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会  
第 88 回日本生化学会大会合同大会) 神戸  
ポートアイランド (兵庫県 神戸市) 2015  
年 12 月 1 日~4 日
11. 山口 和晃、千々岩 崇仁、池田 直樹、  
林 みず紀、柴田 弘紀、上田 直子、  
服部 保幸、服部 正策、大野 素徳  
クサリヘビ科ヘビの毒ホスホリパーゼ  
A<sub>2</sub> 遺伝子の形成と起源 BMB2015  
(第 38 回 日本分子生物学会年会、  
第 88 回日本生化学会大会合同大会)  
神戸ポートアイランド (兵庫県 神  
戸市) 2015 年 12 月 1 日~4 日
12. 千々岩 崇仁、山口 和晃、山村 岳志、  
池田 直樹、八井 宝代、巴山 節子、  
服部 正策、上田 直子、大野 素徳  
日本南西諸島クサリヘビ科ヘビの毒  
[Lys<sup>49</sup>]ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>アイソザイム遺  
伝子の島嶼多様性、BMB2015 第 38 回日本  
分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会  
大会合同大会 神戸ポートアイランド  
(兵庫県 神戸市) 2015 年 12 月 1 日~4 日
13. 柴田 弘紀、千々岩 崇仁、上田 直子、  
服部 正策、小柳 亮、久田 香奈子、  
佐藤 矩行、大野 素徳、服部 保幸、  
小川 智久 日本固有の毒蛇ハブ  
(*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノ  
ム配列決定と遺伝子モデルの作製 第 87  
回日本遺伝学会大会 東北大学 (宮城県  
仙台市) 2015 年 9 月 24 日~9 月 26 日
14. Nakamura, H., Murakami, T., Hattori,  
S., Sakaki Y., Okuri, T., Chijiwa,  
T., Ohno, M., Oda-Ueda, N Epithelium  
specific ETS transcription factor,  
ESE-3, of *Protobothrops flavoviridis*  
snake venom gland transactivates the  
promoters of venom phospholipase A<sub>2</sub>  
isozyme genes. The 18<sup>th</sup> world congress  
of the International Society on  
Toxinology (Oxford, UK) 2015 年 9 月 25  
日~9 月 30 日
15. 上田 直子 毒蛇ハブのベノミクス  
日本プロテオーム学会第 13 回大会  
くまもと森都心プラザ (熊本県  
熊本市) 2015 年 7 月 23 日、24 日

16. 上田 直子 毒蛇ハブ(毒)研究から垣間みる生命現象 第62回トキシシンポジウム エクシード合歓の郷(三重県 志摩市) 2015年7月8日~7月10日
17. 中村 仁美、村上 達夫、服部 正策、榊 佳之、大栗 誉敏、千々岩 崇仁、大野 素徳、上田 直子 毒腺で発現する転写因子ESE-3は、ハブ毒PLA<sub>2</sub>遺伝子のプロモーターを活性化する 第62回トキシシンポジウム エクシード合歓の郷(三重県 志摩市) 2015年7月8日~7月10日
18. 中村 仁美、村上 達夫、大栗 誉敏、今村 隆寿、鳥羽 通久、千々岩 崇仁、大野 素徳、上田 直子 ツシマママシ毒由来の血管透過性亢進因子のヘパリン結合について 日本薬学会第135年会 神戸学院大学、兵庫医療大学、神戸サンポーホール、デザインクリエイティブセンター(兵庫県 神戸市) 2015年3月25日~3月28日
19. 中村 仁美、村上 達夫、服部 正策、榊 佳之、大栗 誉敏、千々岩 崇仁、大野 素徳、上田 直子 ハブ毒腺で発現する転写因子ESE-3は毒型PLA<sub>2</sub>遺伝子のプロモーターを活性化する 第37回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市) 2014年11月25日~11月27日
20. 山口 和晃、千々岩 崇仁、上田 直子、柴田 弘紀、服部 正策、服巻 保幸、大野 素徳、クサリヘビ科ヘビの分泌型ホスホリパーゼA<sub>2</sub>の遺伝子クラスターの起源と分子進化 第61回トキシシンポジウム ルネッサンスホテル(徳島県 鳴門市) 2014年9月3日~2014年9月5日
21. 柴田 弘紀、山本 真由美、タケット 奈々、小川 智久、森 一樹、千々岩 崇仁、服部 正策、上田 直子、久原 哲、大野 素徳、服巻 保幸 ハブ(*Protobothrops flavoviridis*)の全ゲノム配列決定の現状と展望 日本動物学会九州支部(第67回)、九州沖縄植物学会(第64回)、日本生態学会九州地区会(第59回)、沖縄生物学会(第51回) 合同沖縄大会、琉球大学(沖縄県 西原町) 2014年5月24日~5月25日
22. 大栗 誉敏、中村 仁美、千々岩 崇仁、大野 素徳、上田 直子 ハブ毒由来金属プロテアーゼHR2aの大腸菌による発現及び巻き戻し 日本薬学会第134回年会 熊本大学、ホテル日航熊本、鶴屋百貨店他(熊本県 熊本市) 2014年3月27日~3月30日
23. 柴田 弘紀、山本 真由美、タケット 奈々、小川 智久、森 一樹、千々岩 崇仁、服部 正策、上田 直子、久原 哲、大野 素徳、服巻 保幸 日本固有の毒蛇(*Protobothrops flavoviridis*)の全ゲノムシーケンスと繰り返し配列の解析 第36回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド(兵庫県 神戸市) 2013年12月3日~12月6日
24. Oda-Ueda, N., Nakamura, H., Shibata, H., Mori, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Chijiwa, T., Fukumaki, Y., Ohno, M The transcript catalogue for the venom gland of *Protobothrops flavoviridis* snake in Amami-Oshima Japan. XI congress of the Pan-American Section of the International Society on Toxinology. (Sao Paulo, Brazil) 2013年11月3日~11月8日
25. 山口 和晃、千々岩 崇仁、柴田 弘紀、上田 直子、服部 正策、服巻 保幸、大野 素徳 クサリヘビ科 Group IIE phospholipase A<sub>2</sub>のゲノム解析と発現解析 第60回毒素シンポジウム 楓香荘(兵庫県 穴栗市) 2013年7月17日~7月19日
26. 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 ツシマママシ毒の強い血管透過性亢進活性は、ヘパリン結合を示さない VEGF 様タンパク質によるものである 第60回毒素シンポジウム 楓香荘(兵庫県 穴栗市) 2013年7月17日~7月19日
- [図書] (計 1 件)
1. 上田 直子 ホルモンからみた生命現象と進化シリーズ VII ” 生体防衛・社会 “ 裳華房 (2016) 258 (160-175)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
上田 直子 (小田 直子)  
(ODA-UEDA, Naoko)  
崇城大学・薬学部・教授  
研究者番号: 70211828
- (2) 研究分担者  
中村 仁美 (NAKAMURA, Hitomi)  
崇城大学・薬学部・助教  
研究者番号: 60510691
- 大栗 誉敏 (OHKURI, Takatoshi)  
崇城大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 70346807

(3) 連携研究者

柴田 弘紀 (SHIBATA Hironori)  
九州大学・生体防御医学研究所・准教授  
研究者番号：80315093

鵜木 元香 (UNOKI Motoko)  
九州大学・生体防御医学研究所・助教  
研究者番号：30525374