九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

日本に棲息するクサリヘビ科マムシ亜科毒ヘビの毒成分遺伝子の発現メカニズムと新規毒成分に関する研究

中村，仁美

https://hdl.handle.net/2324/1500652

出版情報：九州大学，2014，博士（創薬科学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏　　名　：中村　仁美

論文題名　：日本に棲息するクサリヘビ科マムシ亜科毒ヘビの毒成分遺伝子の発現メカニズムと新規毒成分に関する研究

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

ヘビ毒は多種多様なタンパク質とペプチドを含む生理活性成分のカクテルであり、唾液腺が進化した組織である毒腺で産生されている。ヘビ毒に含まれるタンパク質にはアイソフォームが多数存在し、それぞれが多様な生理機能を持つことが特徴である。タンパク質の分子進化は一般に中立で進行する説が有力であるが、ヘビ毒タンパク質はこの例外の一つで、加速進化という独自の分子進化により多様な生理機能を持つアイソフォームを作り出すことが明らかとなっている。独自の進化様式で多様性を獲得したヘビ毒は、特異性の高い作用メカニズムを持つことから創薬資源としても非常に有用であり、これまでに毒ヘビ由来のペプチドをリード化合物として高血圧治療薬が作られた例がある。また近年では、トランスクリプトミクスやプロテオミクスといった網羅的解析技術が発展したことで、より詳細にヘビ毒成分の組成を解析することが可能となり、中和作用の高い抗血清作製法の確立や新たな創薬資源の探索など医学・薬学領域への貢献が期待されている。このようにヘビ毒研究は、分子進化から医学・薬学領域まで幅広く展開されているが、現在でも毒腺におけるヘビ毒産生メカニズムに関する知見は乏しく、独自の進化様式で多様性を獲得した毒成分遺伝子が、どのような分子機構で、毒腺組織特異的に発現しているかは解明されていない。本論文ではヘビ毒の産生メカニズムを明らかとする目的で、遺伝子発現の第一段階である転写、特に組織特異的転写因子の関与を考え、毒成分遺伝子の転写調節に関する研究を行った。また、ハブ幼蛇の毒成分組成に着目した研究及びマムシ属ヘビの毒成分組成と活性の比較とツシママムシ毒に含まれる血管透過性亢進因子に関する研究を行った。

ハブの主要な毒成分である毒型 PLA_2 は毒成分生合成の場である毒腺組織にのみ特異的に発現しているがその分子メカニズムは明らかになっていない。このメカニズムを明らかにするため、まず転写の過程に着目した。ハブ毒 PLA_2 遺伝子の転写に関わる転写因子は採毒後に発現すると予想し、採毒後の毒腺を用いて完全長 cDNA ライブラリーを作製した。理研との共同で 14,195 クローンの網羅的配列解析を行い、毒腺組織特異的転写因子の候補として ESE (epithelium-specific Ets)-1、ESE-2、ESE-3 と相同性があるクローンを見出した。RT-PCR により ESE-2 と ESE-3 は主に毒腺組織に発現することを示し、レポータージーンアッセイの結果から ESE-3 はハブ毒 PLA_2 遺伝子の転写を活性化することがわかった。また EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay)により、ESE-3 が、毒型 PLA_2 アイソザイム遺伝子のプロモーター上の TATA box 近傍に位置する結合サイトに特異的に結合するが、これまでに偽遺伝子とみなされてきた PLA_2 アイソザイム遺伝子 (*pgPLA1b/2b*)の結合サイトには結合しないことも見出した。

ハブの幼蛇の毒成分組成は未知であったので、成蛇との毒成分を比較解析した。幼蛇と成蛇の毒成分の二次元電気泳動パターンを比較すると、酸性領域で分子量 20 kDa 程度のところに幼蛇毒にのみ顕著に出現するスポットが存在した。このスポットを切り出し、質量分析による同定を行った結果、これまで偽遺伝子とみなしてきた毒型 PLA_2 遺伝子 (*pgPLA1b/2b*)由来であることを示した。

次に、日本及びその近隣に棲息する 3 種のマムシ属ヘビの毒成分組成と活性の比較解析の結果、

ニホンマムシ毒の組成には棲息地間で顕著な違いはないこと、ツシママムシの毒組成は地域特異性を獲得していることを示した。また、ツシママムシ毒のみ極めて強い血管透過性亢進活性を示す活性成分を GtVF (*Gloydius tsushimaensis* Vascular permeability enhancing factor)と命名し、同定を行った。4 段階のカラムクロマトグラフィーにより粗毒から GtVF を単離し、N 末端アミノ酸配列解析より、GtVF は VEGF 様タンパク質であることを明らかとした。3'-RACE による全長 cDNA のクローニングと既知の蛇毒 VEGF とのアミノ酸配列アライメントの結果から、GtVF の成熟型は 122 アミノ酸残基からなると推定され、C 末端近傍の 1 アミノ酸残基のみが異なる 2 つのアイソフォームが存在していた。GtVF は他の蛇毒 VEGF 同様、VEGF 受容体 KDR (kinase insert domain-containing receptor)を介する経路で血管透過性亢進を引き起こすことを示したが、他の蛇毒 VEGF とは異なり、ヘパリン親和性は示さなかった。既知の蛇毒 VEGF は VEGF 受容体の選択性から 3 タイプに分類されており、これは系統樹の分枝ともよく相関していた。しかし GtVF はいずれのタイプにも属さず、ヘパリン親和性がないという独自の性質も有することから、蛇毒 VEGF には従来の 3 タイプに加えて GtVF に代表される第 4 のタイプの存在を提案した。