

# 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）

## 論文審査の結果の要旨

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、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。今日までヘビ毒の生理機能の解析から多くの医薬品[エナラプリル、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(高血圧薬); エプチフィバ, グリコプロテイン IIb/IIIa 阻害薬(抗血栓薬)]が生まれている。一方、タンパク質の分子進化は中立で進行する説が支持されているが、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したことが明らかとなっている。日本の南西諸島に棲息するハブ (*Protobothrops flavoviridis*)の主要な毒成分であるホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)アイソザイムに関する別の研究からは、アイソザイムの組成が棲息する島間で異なっており、毒成分が地域特異的に進化していることも示唆されている。近年、トランスクリプトミクス、プロテオミクスによるヘビ毒成分の網羅的解析やハブ全ゲノム解析などの網羅的な毒成分に関する研究(ベノミクス)も盛んに行われている。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のかは解明されていない。ヘビ毒産生メカニズムを明らかにすることができれば、有益な創薬資源であるヘビ毒の大量生産なども可能となるであろう。本研究は、有益な創薬資源であるヘビ毒の毒性産生機構を明らかとすることを目的に以下の研究を行った。

まず、日本を代表する毒ヘビであるハブをターゲットとし、毒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。ハブ毒 PLA<sub>2</sub> (ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>) 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明らかとし、さらにルシフェラーゼアッセイの結果から ESE-3 はハブ毒 PLA<sub>2</sub> 遺伝子の転写を活性化することを示した。また EMSA (electrophoretic mobility shift assay) により、ESE-3 が、毒型 PLA<sub>2</sub> 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一方、成蛇毒での発現が確認されずに偽遺伝子とみなされてきた PLA<sub>2</sub> 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。本研究は毒腺組織にて発現する転写因子が毒成分遺伝子の転写活性化に関与することを示唆した初めての報告である。

次に、ハブと並んで日本を代表する毒ヘビであるニホンマムシ (*Gloydius blomhoffii*)の毒ではこれと同じ現象が起きているかどうか検証されたことはない。また対馬にはニホンマムシと同じマムシ属ヘビであるツシママムシ (*Gloydius tsushimaensis*)が棲息しているが、これについては粗毒から単離し同定された成分の報告がなく、創薬にも応用できる新規な毒成分が見つかる可能性がある。そこで、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した。日本およ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、そして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が示唆された。さらに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ことが明らかとなり、この活性成分を 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が明らかとなった。マムシ属ヘビから VEGF 様タンパク質が単離されたのはこれが初めてである。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すると考えられた。また、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が示唆された。しかし他の蛇毒 VEGF とは異なり、ヘパリン親和性は示されなかった。これまで既知の蛇毒 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関連している。しかし GtVF はいずれのタイプにも属さず、また先述のように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 のタイプのヘビ毒であることを提唱した。

本研究ではまだ発現機構が明らかとなっていない、ヘビ毒遺伝子の発現機構について解析した。その結果、毒腺組織にて発現する転写因子が毒成分遺伝子の転写活性化に関与することが示唆された。また、ハブの成長に伴い毒成分の組成が変化し、成蛇毒では発現していない PLA<sub>2</sub> アイソザイムが幼蛇毒では発現していることを見出し、転写レベルでの発現調節を受けることが示唆された。さらにマムシ属ヘビの毒成分組成と活性を比較し、ツシママムシ毒の血管透過性亢進に深く関与する因子を同定した。このような結果は薬学領域、特に天然物由来の創薬資源の有効利用の観点から有益な知見を与えるものであり、申請者は博士(創薬科学)の学位を取得するのにふさわしいと判断した。