



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（理学）
報告番号	乙第1879号
学位記番号	論 第11号
氏名	松原 美恵子
授与年月日	平成 29年 4月 20日
学位論文の題名	コブラサイトトキシンの構造と機能に関する研究
論文審査担当者	主査： 森山 昭彦 副査： 杉谷 光司, 田上 英明, 松井 太衛（藤田衛生保健大学）

## 学位論文内容要旨 (1/2)

氏名	松原 美恵子	提出年月日	平成29年 2月20 日
主論文名	コブラサイトトキシンの構造と機能に関する研究		
<p>(学位論文中の要旨と同じ内容で可)</p> <p>コブラ毒素に含まれるたんぱく質の 50%以上を占めるサイトトキシン (CTX) は、生理的には、収縮心停止、劇症組織壊死、溶血、その他の症状を引き起こし、in vitro では様々な細胞に対して毒性を示す。CTX の多くは 60 アミノ酸残基からなり、3つのループによりつながれた5つのβストランドが、4組のジスルフィド結合により架橋された構造をしている。また、お互いによく似た立体構造をした多くのアイソフォームが存在する。CTX の種類によっては、細胞膜成分中の異なる標的分子が見つけられており、結合後に異なる細胞小器官に移動するという報告もある。しかしながら、毒性発現のメカニズムについては未だ明らかになっていない。一方、アイソフォームの種類に関係なく、すべての CTX が赤血球に対して溶血活性を示すことから、CTX は様々な細胞の細胞膜に共通する成分に結合し、毒性を発揮すると考えられる。溶血の多くは非酵素的、かつ物理的な変化な変化である事が多く、分析が難しい。毒性の作用機序を解明するためには、CTX を構成する各アミノ酸残基の細胞障害活性における役割を明らかにする事が有用である。CTX には多くのアイソフォームが存在するため、アミノ酸や塩基配列の比較から機能ドメインを推定する事ができる。そこで、本研究では、インドコブラ (<i>Naja naja</i>) ベノムから CTX のアイソフォームを精製し、その一次構造と機能の相関、ならびに、分子進化について考察した。</p> <p>インドコブラのベノムから、2次元クロマトグラフィー法により毒素タンパク質を網羅的に分離・精製した。精製したタンパク質のアミノ末端部分一次構造を決定し、6ファミリーに属する 23 成分 (Cytotoxin : 10 種、Phospholipase A2 : 7 種、Cysteine-rich Secretory Protein : 2 種、Muscarinic Toxin-like Protein : 2 種、Nerve Growth Factor : 1 種、Thrombin-like Serine Protease : 1 種) を同定した。次に、精製した CTX のうち、主要な 5 種 CTX (CTX2、CTX7~CTX10) について全アミノ酸配列を決定し、細胞毒性、溶血活性、リン脂質に対する親和性との相関について解析した。</p> <p>CTX9 以外の 4 種 CTX のアミノ酸配列は新規配列であった。CTX は一次構造と毒性から 2つの型 (S 型: 28S 弱毒性、P 型: 31P 強毒性) に分けられるが、インドコブラ CTX2 は弱毒性 S 型、CTX9 と CTX10 は強毒性 P 型であった。興味深いことに、CTX7 と CTX8 は S 型であるにも関わらず強毒性であった。また、CTX7 と CTX8 は 29 番目のアミノ酸残基、CTX9 と CTX10 は 19 番目のアミノ酸残基が Asn と Asp の違いはあるが、それぞれ</p>			

(システム自然科学研究科)

## 学 位 論 文 内 容 要 旨 (2 / 2)

氏 名	松原 美恵子	提出年月日	平成29年2月20日
主論文名	コブラサイトトキシンの構造と機能に関する研究		
<p>ほぼ同様な性質を示したため、これらのアミノ酸残基の違いは活性に影響しない事が明らかになった。そこで、CTX2 (弱毒性 S 型)、CTX7 (強毒性 S 型)、CTX9 (強毒性 P 型) の3種 CTX について、細胞膜を構成する6種の主要リン脂質に対する親和性を測定し、溶血活性との相関を比較した。これらの CTX は毒性の強弱に関係なく酸性リン脂質、特に、ホスファチジルセリンに対して強い親和性を示した。リン脂質への結合能と特異性が似ているにも関わらず、CTX2 と CTX7 では溶血活性が大きく異なることから、CTX の毒性発現は、膜への結合と膜障害を引き起こす過程に分けられると推測された。ホスファチジルセリンの結合に関与するアミノ酸残基がこれらの CTX でよく保存されていることは、この考えを支持している。S 型 CTX のアミノ酸配列と細胞毒性の関係から、膜障害活性は loopII の塩基性アミノ酸 (Lys) と強く相関することが明らかになった。</p> <p>CTX アイソフォームのアミノ酸配列、CTX 遺伝子の塩基配列の比較からも CTX の機能に関与するアミノ酸残基や領域を推定することができる。そこで、毒腺から作製した cDNA ライブラリーから12種類の CTX cDNA をクローニングし、塩基置換を解析した。CTX をコードする遺伝子には23カ所で置換がみられ、18カ所が非同義置換であったことから、CTX 遺伝子は加速進化をしていると考えられた。さらに、これらの CTX cDNA を既知の配列とともに分析したところ、コドン毎の非同義置換率は、3つのループ領域の先端のアミノ酸残基をコードするコドンで高く、また、3つのループをまとめて分析しても高かった。これらの結果は、CTX 遺伝子が3つのループをコードするコドン領域で加速進化している、つまり、3つのループ領域が CTX の重要な機能を担っている事を示唆している。これに対し、コア構造の維持に重要な8つのシステイン残基、<math>\beta</math>ストランドを安定化させる3つのアミノ酸残基、リン脂質結合に関与する9つのアミノ酸残基は、いずれもよく保存されていた。</p> <p>本研究により、コブラ CTX による毒性発現は、膜結合過程とリン脂質膜障害過程の2段階に分けられることが明らかになった。膜結合には<math>\beta</math>シートよりなるコア構造上のアミノ酸残基が関与し、膜障害過程には<math>\beta</math>シートをつなぐ3つのループ領域、特に、loopII が重要であることが示された。興味深いことに、<math>\beta</math>シートに対応するコドンは進化的に保存されており、ループ領域のコドンは加速進化していた。</p> <p>これらの知見は、CTX の毒性発現機構を明らかにするのに役立つと期待される。</p>			

## 博士論文審査結果の要旨 ㊦

論文提出日	平成 29年 2月 20日
学位試験日	平成 29年 3月 8日

論文提出者	松原 美恵子			
博 士 論 文 審 査 結 果				
学 位 審 査 委 員	主 査	森山 昭彦	副 査	杉谷 光司、田上 英明、松井 太衛 (藤田保健衛生大学)
主論文題目	コブラサイトトキシンの構造と機能に関する研究			
論文審査の結果の要旨				
<p>本論文は、インドコブラ毒素に含まれているサイトトキシン (CTX) の細胞傷害メカニズムについて、比較生化学的なアプローチにより、リン脂質に結合する領域と膜障害を担う領域が CTX 分子上の別の部位にある可能性を示したものである。</p> <p>コブラ毒素に含まれる CTX は、毒液の主要構成タンパク質であるにもかかわらず、毒性のメカニズムはよくわかっていない。申請者は、CTX の構造と機能の関係を調べる事により、このメカニズム解明に資する情報を得ようとした。一般的にタンパク質の構造と機能の関係を調べるには、一連の変異導入タンパク質を作成する事が有効であるが、CTX が大腸菌に対しても毒性を示すためそのような方法を用いる事が困難である。そこで、申請者は天然の CTX を精製して用いている。インドコブラ毒液から 10 種類の CTX を精製し、含量の多い 5 種の CTX (CTX2, 7~10) の全アミノ酸配列を決定している。精製した CTX を用いて種々の細胞に対する毒性を調べ、細胞の種類によらず毒素は弱毒型と強毒型に分けられる事、また CTX の種類に関わらず、毒に対して感受性の高い細胞は、どの CTX に対しても敏感である事等を示した。構造と機能の相関から CTX の結合相手がリン脂質である事を推察した上で、新たにリン脂質に対する親和性を測定する系を工夫し、開発した事は評価できる。これにより、CTX による溶血過程が、リン脂質への結合過程と膜に障害をもたらす過程に分けられる事、ならびに細胞毒性はリン脂質結合力ではなく、主に膜に障害を与える能力の差によるものである可能性を示した。CTX でのこのような研究は本研究が初めてである。また、cDNA のクローニングにより、進化的に保存されている領域と正の自然選択を受けている領域が異なった機能を担っているであろう事を示した点も評価に値する。多くの先行研究にもよく目を通し、実験結果と合わせて考察を深めている事から、独立した研究者としての素養を備えており、博士の学位を授与するにふさわしい内容であると判断する。</p>				