



## 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）

名古屋市立大学 博士学位論文

# コブラサイトトキシンの構造と機能に関する研究

2017年

松原 美恵子

名古屋市立大学大学院 システム自然科学研究科



## 要 旨

コブラ毒素に含まれるタンパク質の 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  $\beta$  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みつかり、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傷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 (*Naja naja*) 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。

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。

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（PS）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。PS 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 loop II 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。

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 箇所では置換がみられ、18 箇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、 $\beta$  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。

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  $\beta$  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  $\beta$  シートをつなぐ 3 つのループ領域、特に、loop II が重要であることが示された。興味深いことに、 $\beta$  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。

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。

## 略語一覧

略語	英語表記	日本語表記
3FTx	Three-finger toxin	スリーフィンガートキシン
CTX	Cytotoxin	サイトトキシン
NTX	Neurotoxin	ニューロトキシン
PC	Phosphatidylcholine	ホスファチジルコリン
PE	Phosphatidylethanolamine	ホスファチジルエタノールアミン
PS	Phosphatidylserine	ホスファチジルセリン
PA	Phosphatidic acid	ホスファチジン酸
PG	Phosphatidylglycerol	ホスファチジルグリセロール
SM	Sphingomyelin	スフィンゴミエリン
dN	Nonsynonymous substitution rate	非同義置換率
dS	Synonymous substitution rate	同義置換率
EC50	Effective concentration 50	50% 有効濃度

# 目 次

第 1 章 序論 .....	1
1. 研究の背景 .....	1
1-1. タンパク質の構造と機能について .....	1
1-2. 毒ヘビとその咬傷 .....	2
1-3. Three-finger toxin (3FTx) スーパーファミリー .....	3
1-4. コブラサイトトキシンの分子多様性 .....	6
2. 本研究の目的と意義 .....	7
第 2 章 材料と方法 .....	8
1. インドコブラ毒素成分の精製 .....	8
2. 一次構造の決定 .....	9
3. トロンビン様酵素活性の測定 .....	9
4. 細胞毒性の測定 .....	10
5. 溶血活性の測定 .....	12
6. 赤血球膜に対する親和性の測定 .....	13
7. リン脂質との親和性の測定 .....	13
8. CTX cDNA のクローニング .....	14
9. アミノ酸配列と塩基配列の解析 .....	15
第 3 章 結果 .....	16
1. インドコブラ CTX の精製とその一次構造 .....	16
2. インドコブラ CTX の一次構造 .....	20
3. インドコブラ CTX の溶血活性と細胞毒性 .....	22
4. CTX のリン脂質との相互作用 .....	23
5. CTX cDNA のクローニングと分子進化 .....	25

第4章 考察.....	30
第5章 結語.....	35
謝 辞.....	36
参考文献.....	37
解 説.....	46
コブラサイトトキシン .....	46
溶血毒の作用機序 .....	47
本研究の目的と意義 .....	47
結果と考察 .....	48
用語集.....	50





# 第 1 章 序論

## 1. 研究の背景

### 1-1. タンパク質の構造と機能について

生物のもつ遺伝情報は DNA の塩基配列に書き込まれており、DNA は「生命の設計図」とも言われている。この塩基配列をもとにタンパク質が合成され、各々のタンパク質が持つ機能により個体の表現形が決定する。

タンパク質は、それぞれに物性が異なり容易に変性して機能を失うため、精製には経験と時間が必要である。それに対して DNA は、コードしているタンパク質の種類に関係なく全て同じような性質を持つため、取扱法の多くがマニュアル化されている。また、タンパク質は精製するにつれて収量が減少するのに対して、DNA は簡単に増やす事ができる。そのため、現在では、タンパク質そのものよりも DNA を用いた研究が増えている。しかしながら、タンパク質は特定の立体構造を形成して初めて機能を発揮するが、立体構造形成のルールが知られていないこともあり、DNA の塩基配列からそのタンパク質の機能を推定する事は難しい。したがって、タンパク質の機能を理解するには、DNA だけでは不十分であり、タンパク質そのものを対象に研究する必要がある。

進化上、共通祖先に由来すると推定されるタンパク質をまとめたグループをタンパク質ファミリーといい、同じような機能を持つ事が多い。また、同じタンパク質ファミリーに属するタンパク質では、共通する一部のアミノ酸配列が、それらタンパク質の特定の機能を担っている事が多く、モチーフと呼ばれる。モチーフは、通常、同じような機能を持つタンパク質の構造比較する事により発見され、そのデータベースは、アミノ酸配列からタンパク質の機能を推定するのに有用である。例えば HIV のプロテアーゼは、通常のデータベース検索では類縁配列を検出できないが、保存されたモチーフをもとに検索すると酸性プロテアーゼであることが示唆される。モチーフ配列の変更は、そのタンパク質の機能の損失につながり、個体の生存に不利となるため、タ

ンパク質の分子進化において、モチーフ配列は保存されている事が多い。分子進化の研究において、基本的には木村の中立説に則って DNA やタンパク質の配列が分析される。中立説では、自然選択が不利に働く突然変異は集団には固定されず、自然選択が有利に働くと考えられる突然変異はごくわずかであり、DNA やタンパク質にみられる進化の大多数は、有利でもなく不利でもない、中立な変異が集団に偶然広まった結果起こるとされている (Kimura, 1968)。つまり、機能を担っているアミノ酸配列は、突然変異に対しては通常負の自然選択が働くが、まれに生存に正の自然選択が働く場合には、変異は普通以上によく固定されるということである。後者の場合を加速進化という。同属タンパク質のアミノ酸配列比較をしたときには、保存されている配列が機能を担っている事が多いが、加速進化の場合は、保存されていない配列が機能を担っている事になる。タンパク質をコードしている DNA で、イントロンとエクソンの突然変異率の比較などにより、加速進化を推定する事は比較的簡単であるが、特定のアミノ酸残基をコードしているコドンが加速進化をしている事を証明する事は難しい。さらに、進化の淘汰圧を明らかにするためにも、タンパク質がどのような機能を持ち、その機能に各アミノ酸残基がどのように関与しているのかが重要である。

生物起源とする毒を総称して毒素 (toxin) とよび、毒腺で作られる毒をベノム (venom) という。いくつかのタンパク質性の毒素では、多くのアイソフォームが存在し、加速進化をしている事が報告されている (Ohno et al., 1998)。脊椎動物において毒腺をもつ主な生物群としては、爬虫類、両生類、魚類が知られている。特に、毒ヘビのベノムには多種多様な毒素タンパク質が豊富に含まれており (Warrell, 1996)、アイソフォームの多い毒素はタンパク質の構造・機能相関を研究するに適した研究材料である。

## **1-2. 毒ヘビとその咬傷**

世界中にはおよそ 600 種の毒ヘビが生息しており、コブラ科 (Elapidae)、クサリヘビ科 (Viperidae)、モールバイパー科 (Atractaspididae)、ナミヘビ科 (Colubridae) の一部に属するヘビが含まれる。WHO によると、年間 2,500,000 以上の人々が毒蛇に噛まれており (WHO, 2007)、そのうち、少なくとも 100,000 人が死亡 (Chippaux, 1998; Kasturiratne et al., 2008)、数十万人が後遺症を煩っていると見積もられている (WHO,

2007)。スリランカにおけるヘビ咬傷は毎年 37,000 人であり、致死率も高い (De Silva et al., 2002; Fox S et al., 2005)。

ヘビ咬傷におけるもっとも有力な治療法は抗血清の投与であり治療の鍵となっている。しかしながら、コブラ咬傷における抗血清治療は、致死状況の回避は出来ても、局所の壊死などの後遺症が残る場合がある (Ponchanugool et al., 1987)。これは、致死性に関与する神経毒のニューロトキシン (NTX) が抗血清により有効に中和される、その一方で、局所壊死に関わるトキシンが抗血清により有効に中和できていないこと示唆している。また、スリランカにおけるコブラ咬傷治療ではインドに生息するインドコブラに対して作製された抗血清が使用されているが、その治療効果はインドに比べてよくないと報告されている (Harrison et al., 2003; Keyler et al., 2013)。このことは、インドとスリランカのコブラ CTX のエピトープが異なることを示唆している。

### **1-3. Three-finger toxin (3FTx) スーパーファミリー**

コブラ科に属する毒ヘビのベノムに含まれる毒素タンパク質は、機能的分類により大きく神経毒、溶血毒、細胞毒の3つに分けられる。また、コブラの致死毒性は、主に NTX によるものと考えられている。しかしながら、ベノムに含まれるタンパク質の 50%以上はサイトトキシン (CTX) と呼ばれる細胞毒であり (Vonk et al., 2013)、収縮期心停止、様々な組織のネクロシス、その他様々な症状を引き起こす (Harvey et al., 1982; Dufton and Hider, 1991)。*In vitro* でも、T リンパ球、ヒト赤血球、ヒト前骨髄球性白血病細胞、ヒト肺腺癌細胞、ラット心筋芽細胞などのあらゆる細胞に対して毒性を持つことが知られている (Chen et al., 1984; Hinman et al., 1990; Stevens-Truss and Hinman, 1997; Feofanov et al., 2004; Feovanov et al., 2005)。また、コブラの CTX では、多くのアイソフォームが見つまっている (Joubert and Taljaard, 1978)。興味深い事に、NTX も CTX もともに、3FTx スーパーファミリーに属し、共通祖先タンパク質に由来する。

3FTx スーパーファミリーに含まれるタンパク質は 60 ～ 74 アミノ酸残基で構成され、共通して5つの  $\beta$  ストランドと3つのループが球状コア構造を形成し、4 ～ 5 つのジスルフィド結合がその構造を強固にしている (Rees et al., 1987; Dufton and Hider, 1991; Bhaskaran et al. 1994 など)。3FTx スーパーファミリーに属するタンパク質は、

小分子でよく類似した立体構造（three-finger fold）をしているにも関わらず、その生理活性は非常に多様化しており、標的分子も様々である（Ohno et al., 1998; Ricciardi et al., 2000）。現在では、3FTx スーパーファミリー遺伝子には、機能不明のものを含めて 20 の独立したクレードが同定され、著しく多様化したタンパク質群をコードする遺伝子ファミリーであることが知られている（Fry et al. 2003）。哺乳類の Ly-6/urokinase-plasminogen activator receptor（Gumley et al., 1995; Ploug and Ellis, 1994）や、補体系調節因子の CD59（Fletcher et al., 1994）のように毒性を持たないタンパク質も知られているが、3FTx は、コブラ科では遺伝子重複とそれに続く機能的な多様化を繰り返し、神経毒性や細胞毒性をはじめとする多彩な機能を獲得しながら加速的に進化したと考えられている（Kordis, Gubensek, 2000; Zupunski et al., 2003）（図 1）。

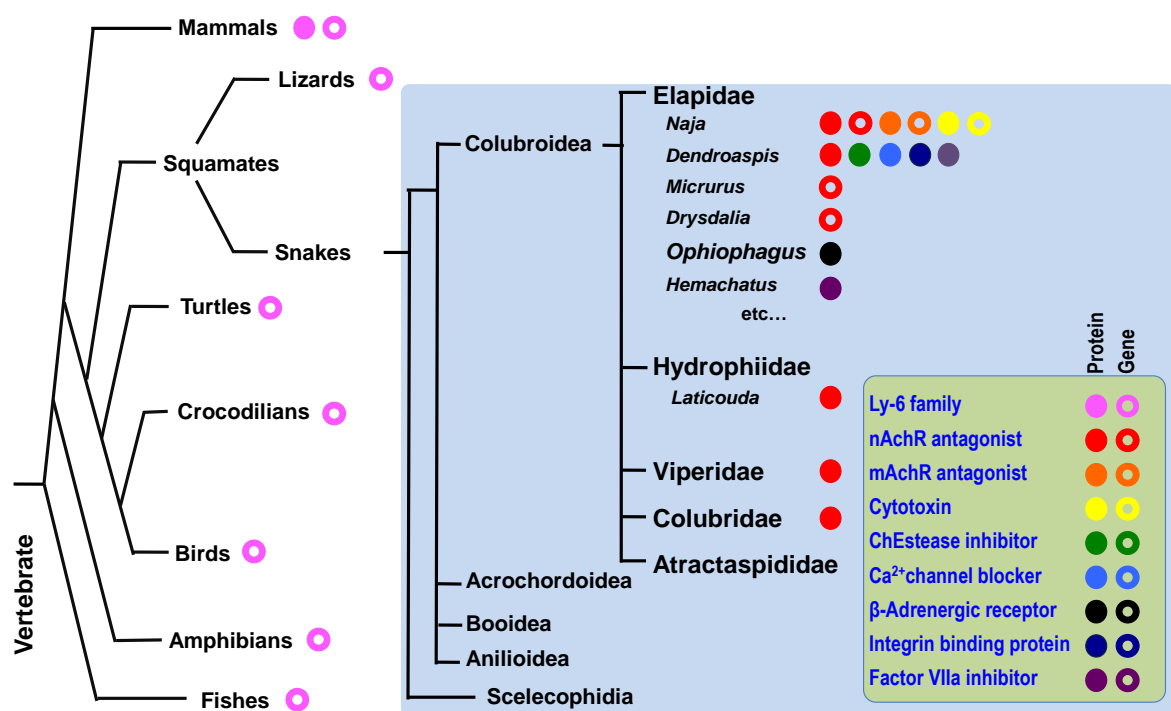


図1. 3FTx スーパーファミリーの分子進化

脊椎動物がもつ 3FTx スーパーファミリーを生物進化とともに示す。

右下図の Protein、ならびに、Gene は、それぞれ Protein Data Bank と International Nucleotide Sequence Database Collaboration での登録の有無を表す。

表1. 3FTx スーパーファミリーの多彩な生理機能

Name	Toxicity & Physiology	Target molecule
Cytotoxin	溶血・細胞毒性	phospholipids
Long neurotoxin	神経毒性	$\alpha_7$ nAChR
$\alpha$ -neurotoxin	神経毒性	$\alpha_7$ nAChR
short neurotoxin	神経毒性	$\alpha_1$ nAChR
$\kappa$ -bungarotoxin	神経毒性	$\alpha_3$ and $\alpha_4$ nAChR
muscarinic toxin	神経毒性	mAChR
Calciseptin/FS2 toxin	神経毒性	L-type Calcium channel
mambin/dendroaspin	神経毒性	$\alpha_{IIb-IIIa}$ Integrin
cardiotoxin A5	血小板凝集阻害	$\alpha_V\beta_3$ Integrin
Fasciculin	神経毒性	Acetylcholine esterase
Hemextin AB complex	抗凝固活性	Factor VIIa
ASIC channel blockers	神経毒性	ASIC1a-ASIC2a in central neurons / ASIC1b in nociceptors

少量で致死的な影響を及ぼす NTX の多くはアセチルコリンレセプターのサブユニットに結合して神経毒性を発揮する。例えば、シナプス後膜に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) や、ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) を標的とする神経毒 (Rajagopalan et al., 2007; Endo and Tamiya, 1991 ; Karlsson et al., 2000) では、Long neurotoxin/ $\alpha$ -neurotoxin のように  $\alpha_7$  nAChR に結合するもの (Tsetlin, 1999)、 $\alpha_1$  nAChR に結合する neurotoxin (Gong et al, 1999)、 $\alpha_3$ 、および、 $\alpha_4$  nAChR に特異的に結合する  $\kappa$ -bungarotoxin などが知られている (Tsetlin, 1999)。このほかにも、 $\alpha_1A$  や  $\alpha_2A$  アドレナリン受容体のアンタゴニスト (Quinton et al., 2010 ; Rouget et al., 2010)、 $\beta_1$  や  $\beta_2$  アドレナリン受容体を標的とする  $\beta$ -blockers  $\beta$ -cardiotoxin (Rajagopalan et al., 2007)、 $\alpha_{IIb\beta_3}$  (glycoprotein IIb-IIIa) を標的とする dendroaspin (McDowell et al., 1992) などがある。他の膜タンパク質に結合する 3FTx として、L 型カルシウムチャネルを標的とする calciseptins/FS2 toxins (De Weille et al., 1991 ; Yasuda et al., 1994) や  $\alpha_V\beta_3$  integrins を標的とする cardiotoxin A5 (Wu et al., 2006) も報告されている。これらに加え、CTX は様々な細胞に対して細胞膜と相互作用することで、細胞死や溶血を引き起こすとされている (Dufton and Hider, 1988)。アセチルコリ

ンエステラーゼ (AChE) を阻害する Fasciculin (Eastman et al., 1995) や、Factor VIIa に作用して抗凝固活性を示す Hemextin AB 複合体 (Banerjee et al. 2005) のように、可溶性酵素を阻害するものもある (表 1)。

#### 1-4. コブラサイトトキシンの分子多様性

前述のように、3FTx スーパーファミリーの中には多種多様なファミリーが含まれている。中でも、CTX ファミリーには多くのアイソフォームが知られており、1 個体が数種類の CTX をもつ事が報告されている (Joubert and Taljaard, 1978)。

コブラ CTX は、リン脂質 (Vincent et al., 1976) の他にも、ヘパリン硫酸 (Patel et al., 1997; Lee et al., 2005)、スルファチド (Wang et al., 2005; Tjong et al., 2007) や細胞膜タンパク質のカリウムチャンネルに相互作用するタンパク質 (potassium channel interacting proteins, KChIPs) (Lin et al., 2004) などの細胞膜を構成する成分に結合することが知られている。しかしながら、CTX がリン脂質のみから作られたリポソームの内容物漏出やリポソーム同士の融合を導く (Chien et al., 1991; Huang et al., 2003; Chen et al., 2007) ことから、様々な細胞に共通する膜成分であるリン脂質自体が CTX と相互作用し、細胞毒性を引き起こすと考えられる。

核磁気共鳴吸収 (nuclear magnetic resonance, NMR) やシミュレーション研究により、CTX がホスファチジルセリン (phosphatidylserine, PS) のような負に帯電したリン脂質の極性頭部と静電的相互作用していることが示されている (Kini and Evans, 1989; Gattineau et al., 1990)。近年では、*Naja oxiana* CT I、CT II と同様に、*Naja kauthia* CT 4 でも、少なくとも 3 つのリジン (Lys) 残基が PS の結合に関与していると推定されている (Konshina et al., 2010; Konshina et al., 2011)。Chien ら (1994) は、10 種 CTX のアミノ酸配列と活性を比較し、CTX を loop II にセリン (Ser28) をもち細胞毒性の弱い S 型と、loop II にプロリン (Pro30) をもち強い細胞毒性を示す P 型に分類した。その後の NMR やシミュレーション研究で、P 型と S 型の CTX は、ともに、3 つのループが脂質膜と相互作用することにより、前者は後者より疎水性の loop II が深く浸入することで溶血や細胞溶解を引き起こすと推測された (Dubovskii et al., 2003; Dubovskii et al., 2005) が直接的な証拠は得られていない。加えて、CTX には P 型や S 型のそれぞれの中でも毒性の異なる分子が存在する (Chien et al., 1994; Feofanov et al.,

2004) 構造との関係も依然として明らかではない。CTX の個々のアミノ酸残基の機能を明らかにすることが、CTX による脂質膜溶解の分子メカニズムを理解するために重要である。

CTX と同様な立体構造をもつ NTX で示されているように、変異解析は、CTX においても個々のアミノ酸残基の機能を明らかにするための効果的な方法である (Antil-Delbeke et al., 2000)。しかしながら、CTX は宿主細胞に対しても毒として作用するため、CTX 遺伝子を大量に発現させることは難しい。これを逆利用し、宿主細胞の生存率により、発現させた遺伝子産物の毒性を推定するユニークなレポーターアッセイがキメラ変異体を使って開発されている (Ma et al., 2002)。一方で、天然に存在する多くの CTX アイソフォームを用いて構造と機能を比較することで、CTX のそれぞれのアミノ酸残基の機能が推定できる。

CTX 遺伝子の一部は保存的に、一部は加速的に進化したと考えられるが、どちらも、CTX の機能に重要な役割を果たしていると考えられる (Ohno et al., 1998; Sunagar et al., 2013)。したがって、それぞれのコドンの進化速度推定もまた、対応するアミノ酸残基の機能を理解するのに役に立つ。

## 2. 本研究の目的と意義

冒頭に記したように、生命の本質に対する理解を深めるためには、タンパク質の構造と機能の関係を理解することが極めて重要である。一方で、毒素タンパク質であるコブラ CTX では、毒性発現機構がよくわかっていないアイソフォームが多く存在するため、比較生化学的アプローチにより構造と機能の関係を調べやすい。また、CTX は、遺伝子重複と変異の繰り返しにより分子多様性を獲得したという点でも、構造と機能の相関、および、分子進化の過程を研究するのに適したタンパク質であると考えられる。

本研究では、最も単純な細胞である赤血球に対する溶血活性を指標に、コブラ CTX の細胞傷害に関与するアミノ酸残基の持つ機能の役割を解析し、毒性発現のメカニズムを明らかにすることを目的とした。



## 第2章 材料と方法

インドコブラのベノムはスリランカに生息するインドコブラから採取し凍結乾燥したもの、cDNA Library はインドコブラの毒腺から Lambda ZAP II Vector で作製したものをを用いた。いずれもペラデニア大学 Seranath B.P. Athauda 氏から提供して頂いた。

ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、スフィンゴミエリン (SM) は NOF CORPORATION (Tokyo, Japan)、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルグリセロール (PG) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。

トロロンビンに対する蛍光合成基質である t-Butyloxycarbonyl-[(2S)-2-amino-3-(benzyloxycarbonyl)propionyl]-prolyl-arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-MCA) は、ペプチド研究所 (Osaka, Japan) より購入した。

### 1. インドコブラ毒素成分の精製

凍結乾燥したインドコブラベノム (24 mg) を蒸留水で溶解し、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) で平衡化した PA-SP (8 x 100 mm, Shimadzu, Kyoto, Japan) カラムに吸着させた。同緩衝液で洗ったのち、0 - 1 M NaCl の濃度勾配 (流速: 1 mL/min) により溶出した。溶出液は 1 mL ずつ回収した。次に、2 画分ずつ一つにまとめ、10% トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic Acid, TFA) を 1/10 量 (v/v) 加えて 0.1% TFA で平衡化した Develosil 300 C4-HG5 (4.6 x 150 mm, Nomura Chem., Seto, Japan) カラムに吸着させた。カラムを 0.1% TFA で洗い、0.1% TFA - 0.1% TFA / 60% acetonitrile の濃度勾配、全量 60 mL、流速 0.5 mL/min でタンパク質を溶出、1 mL/tube で回収した。減圧遠心濃縮後、凍結乾燥した。

## 2. 一次構造の決定

タンパク質のアミノ末端側の部分アミノ酸配列の決定には、精製したタンパク質をそのまま用いた。全一次構造の決定には、サンプルを以下の手順でタンパク質分解酵素により限定分解し、得られたペプチド断片を精製して用いた。

タンパク質/ペプチド断片をジチオスレイトールで還元し、減圧環境下で 4-ビニルピリジンを加えて還元ピリジルエチル化した (Friedman, 2001)。その後、タンパク質のペプチド結合を選択的に切断する酵素である Trypsin (リジンとアルギニンのカルボキシル基側)、AspN (アスパラギン酸のアミノ基側、または、LysC (リジンのカルボキシル基側) を用いて、37°C で 18 時間消化した。断片化したペプチドは、10% TFA (1/10 v/v) を加えて CAPCELL PAK C-18 (4.6 x 250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan) に吸着させ、アセトニトリル (0 - 60%) の濃度勾配により 120 分間で溶出した。精製したペプチド断片は減圧遠心濃縮により有機溶媒を除去し、一部を 100% メタノールで処理した ProBlott PVDF 膜 (2 mm x mm) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) に吸着させ、乾燥後、エドマン分解法に基づく自動プロテインシーケンサー (Model 491 cLC Protein Sequencer, Applied Biosystems) を用いてアミノ末端からの一次構造を分析した。得られた配列は、それぞれ UniProt Knowledgebase に登録した。

## 3. トロンビン様酵素活性の測定

0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 80  $\mu$ L とトロンビンの合成基質である 5  $\mu$ M の Boc-Asp-Pro-Arg-MCA 基質 20  $\mu$ L に適当量の検体を加え、蒸留水で全量 400  $\mu$ L に調製した混合液を 37°C で 10 分間反応させた。反応液に、1.2 M モノクロロ酢酸溶液を 2.5 mL 加えて反応を停止し、遊離した 7-アミノ-4-メチルクマリン

(7-amino-4-methyl coumarine, AMC) を、分光蛍光光度計 FP-770 型 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて、380 nm の波長で励起し、生じた蛍光を 460 nm の波長で測定した (Kawabata et al., 1998)。

## 4. 細胞毒性の測定

CTX の細胞毒性は、由来の異なる 5 種類の培養細胞を用いて評価した。

マウス胎仔由来線維芽細胞 NIH/3T3 (ATCC CRL-1658)、ヒト扁平上皮癌細胞 A-431 (ATCC CRL-1555)、ヒト神経膠芽腫 A-172 (ATCC CRL-1620) は、培地に 10% ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Wako) を用いて、マウスリンパ球形白血病細胞 L1210 (ATCC CCL-219) には、培地として 10% ウシ胎児血清を添加した RPMI-1640 (Wako) を用い、それぞれ、37°C で 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

培養用フラスコ (75 cm<sup>2</sup>) で培養し、対数増殖期にある細胞を 0.5% トリプシン (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) を加えたリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS(-)) で処理して回収した。800 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した後培地を加えて細胞を緩やかにほぐした。96 穴平底プレートの各ウェルに  $2 \times 10^4$  個の細胞を播き、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 12 ~ 24 時間培養した。対数増殖期にある細胞を含む各ウェルから培地を除去し、Tyrode(-) で 2 回 (150 µL、100 µL) 洗浄、様々な濃度に希釈した CTX 100 µL を各ウェルに添加し、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5 時間培養した。CTX の希釈系列は、CTX2 が 3 µM、CTX7 ~ CTX10 が 1.5 µM の濃度から、 $2^{-1} \sim 2^{-10}$  倍になるように Tyrode(-) で希釈して調製した。CTX 処理後に残存している生細胞の量を、ミトコンドリアの呼吸活性を指標とした Cell Proliferation Kit II (Roche Applied Sci., Indianapolis, USA) を用いて、次の通りに測定した。キット添付のプロトコルに従い、XTT 試薬を各ウェルに加えて 37°C、CO<sub>2</sub> 条件下で 2 時間反応させ、プレートリーダーを用いて 550 nm の吸光度を測定した (図 2)。PBS(-) 添加をコントロール (100%) とし、各種濃度の CTX で処理した後に残存している生細胞量を測定することで、50% 有効濃度 (EC50) を求めた。なお、毒性評価には XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France) の Dose の投与効果分析ツールを使用した。Probit analysis (Finney, 1971) を行い、95% 信頼区間を有する 50% 有効濃度 (EC50) を計算した。

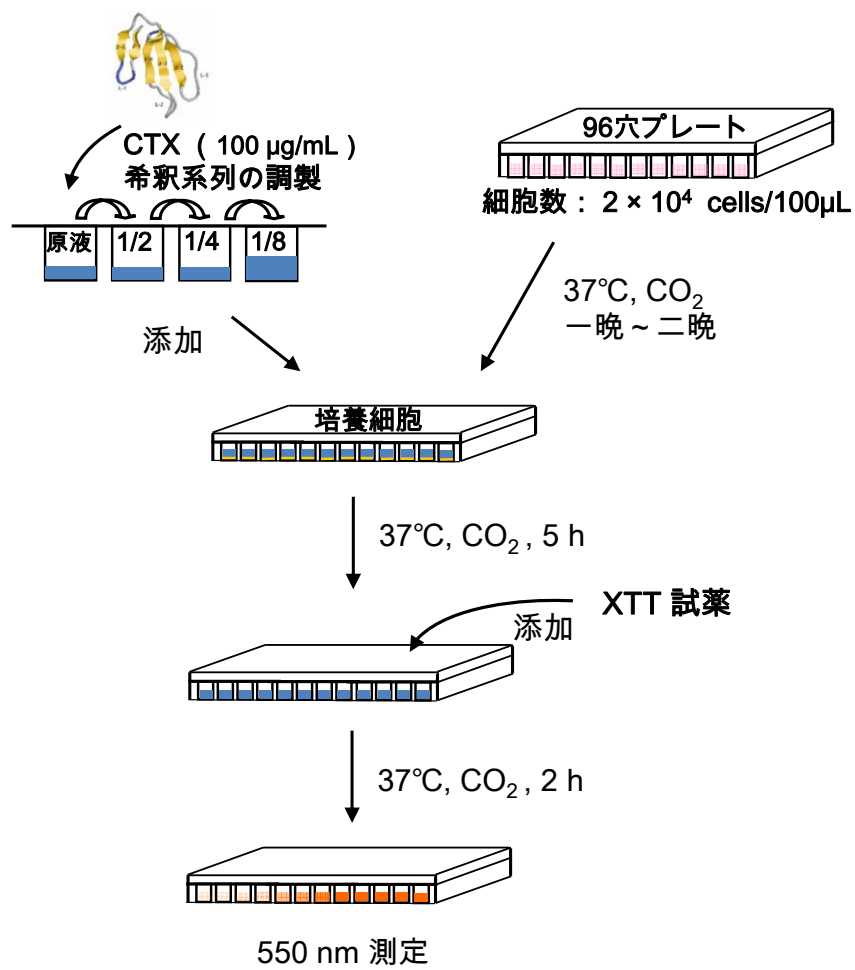


図2. 細胞毒性の測定方法概要図

## 5. 溶血活性の測定

溶血活性の測定には、ヒト赤血球を用いた。ヒト血液は、採血時に 3.8% クエン酸三ナトリウム液を血液の1/10量 (v/v) 加えて静かに混合し、4℃で保存した。保存血は、一週間以内に使用した。

血液に対して10 ～ 15倍量のPBS(-)を加えて3,000 x g、10分間の遠心分離により赤血球を沈殿させた。これを数回繰り返すことで赤血球を洗い、沈殿した血球にその体積の80倍量のTyrode(-)を加えて赤血球懸濁液とした。CTXは、CTX2が 30  $\mu$ M、CTX7 ～ CTX10が 15  $\mu$ Mから  $2^{-1}$  ～  $2^{-10}$  倍になる希釈系列を調製した。それぞれのCTX溶液を 10  $\mu$ L ずつ赤血球懸濁液 100  $\mu$ L に添加し、時折混ぜながら37℃で6時間反応させた。軽く遠心した後、溶血して上清中に放出されたヘモグロビン量を550 nmの吸光度により定量した（図3）。なお、毒性評価は、前述の細胞毒性の測定と同様の方法で計算した。

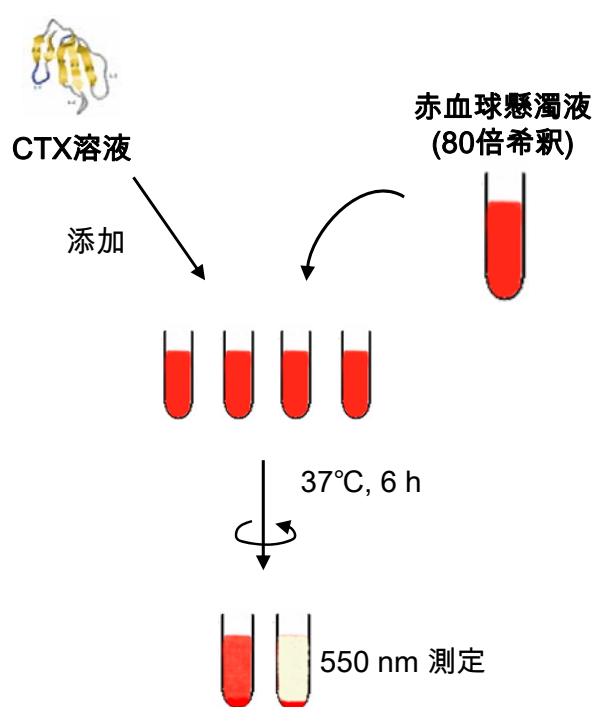


図3. 溶血活性の測定方法概要図

## 6. 赤血球膜に対する親和性の測定

CTX の赤血球膜に対する親和性の測定には、Dodge らの方法（1963）に従い作製したホワイティング膜を用いた。

血液に対して約 3 倍量の PBS(-)を加え、穏やかに攪拌後、3,000 x g、10 分間遠心する操作を数回繰り返して赤血球を洗浄した。氷上で、赤血球に 10 ～ 40 倍容の冷 5 mM リン酸バッファー（pH 8.0）を加えて溶血させ、1/10 倍量の 1 M グルコースを添加後十分に懸濁、50,000 rpm、5 分間、4℃で超遠心し、上清を除去した。上澄み液と細胞膜から赤みがなくなるまでこの操作を繰り返した。白くなった赤血球膜（ホワイティング膜）は、さらに PBS(-)で数回洗浄してから使用した。なお、赤血球膜に含まれるリン脂質の定量は、Fiske らの方法（1925）に従った。

CTX の血球膜に対する親和性は、リン脂質等量で 200 µg/mL に調製したホワイティング膜の懸濁液に、それと同量の CTX 希釈系列溶液を混合し、37℃で 1 時間反応させ、遠心後、上清の残存する溶血活性から求めた。

## 7. リン脂質との親和性の測定

CTX のリン脂質結合能は、ELISA の原理を利用したリン脂質結合タンパク質検出法（Itoh et al, 2001）を応用し、リン脂質に結合せず溶液中に残存する CTX の溶血活性から推定した。リン脂質としては、細胞膜を構成する代表的な 6 種リン脂質（PC、PE、PS、PA、PG、SM）を用いた。

メタノール/クロロホルム（9:1 v/v）混合液で、それぞれのリン脂質を 40 µg/mL になるように溶解した。ポリスチレン製の 96 穴マイクロタイタープレートにリン脂質溶液を 100 µL ずつ加え、50℃で 20 分間インキュベートした後、減圧デシケーターを用いて有機溶媒を完全に蒸発させることで固層化した。リン脂質を固層化したプレートに、20 µg/mL に調製したアルブミン 250 µL を加えて 37℃で 40 分間ブロッキングし、PBS(-) 280 µL でウェルを 2 回洗った。各ウェルに Tyrode(-)で濃度調製した CTX2（1.2 µM）、CTX7（0.3 µM）、CTX9（0.3 µM）をそれぞれ 50 µL 加え、37℃で 1 時間

反応させた。その後、上清に残った CTX の溶血活性を測定した。なお、CTX の非特異的結合がアルブミンによって抑制されなかったため、吸着量を CTX に対する結合親和性が最も低い PC との比較で示した。

## 8. CTX cDNA のクローニング

CTX cDNA はインドコブラ毒腺から作製された cDNA ライブラリーを鋳型とし、Chang らの方法 (1997) を応用して TA クローニングした。

*Naja* 属内で保存されているシグナルペプチドをコードする塩基配列と 3'末端の非コード領域で設計されたプライマーを、CTX cDNA のクローニングプライマーとして用いた。PCR には、Taq Gold DNA polymerase (PE-Applied Biosystems) を用い、94°C で 10 分間の熱変性後、94°C 1 分、65°C 1 分、72°C 1 分を 30 サイクル、72°C で 5 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動で分離し、QUIAEX II (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて精製した。その後、pGEM-T Easy vector (Promega Biotech, Madison, WI) にライゲーションし、ヒートショック法で大腸菌株 JM109 のコンピテントセルを形質転換した。LB/アンピシリン/IPTG/X-Gal プレートで培養し、カラーセクションを行った。ポジティブコロニーから採取した大腸菌は、アンピシリンを含む LB 培地で、37°C、一晚、振盪培養した。プラスミドの単離・精製には QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を使用した。CTX 遺伝子が導入されたプラスミドは、ベクターのユニバーサルプライマー (T7 と SP6) をそれぞれ用いて、ダイターミネーター法で塩基配列の決定を行った。シーケンス反応には、BigDye terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems) を用い、キャピラリーシーケンサー ABI310 Genetic Analyzer (PE-Applied Biosystems)、及び、ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, 株式会社日立ソリューションズ) により塩基配列を決定した。一般的に、PCR 酵素である Taq Gold Polymerase のエラー率は  $1 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-5}$  base/duplication として知られており、CTX cDNA のサイズは 180 bp と短いことから、得られた cDNA 塩基配列はほぼ信頼できる塩基配列であるとした。また、得られたインドコブラ CTX の塩基配列は、International Nucleotide Sequence Database (INSD) に登録した。

## 9. アミノ酸配列と塩基配列の解析

アミノ酸配列の多様性解析には、タンパク質配列の分子進化・系統学的解析を行うソフトウェア MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0) を使用した (Tamura et al., 2013)。アミノ酸配列間の距離は p-distance 法で計算し (Nei and Kumar, 2000)、近隣接合法 (Neighbor-joining method, NJ 法) で無根系統樹を作成した (Saitou and Nei, 1987)。アミノ酸配列のシーケンスロゴは、WebLog2 (<http://weblogo.berkeley.edu/>) を用いて作成した (Schneider and Stephens, 1990)。

各アミノ酸配列に対する自然選択圧は、CTX cDNA の塩基配列を整列させ、進化的距離を p-distance (proportion of different site) 法で計算し、近隣接合法によって系統樹を作成し、塩基配列のアライメントに基づくプログラムである ADAPTSITE (Suzuki and Gojobori, 1999) により求めた。計算に必要な Transition/Transversion 比 (k) (Kimura, 1980) は、*Naja atra* CTX DNA (AJ238733 - AJ238737, Y12493) と *Naja suptatrix* CTX DNA (AF064096) の塩基配列 (1744 bp) のイントロン、または、トリプレットコードンの第三位における塩基置換の頻度から 2.9、または、3.6 と算出された。



## 第3章 結果

### 1. インドコブラ CTX の精製とその一次構造

コブラベノムには多くの CTX アイソフォームが含まれるため、二次元クロマトグラフィーにより、インドコブラ (*Naja naja*) ベノムから毒素タンパク質の網羅的な精製、分離を試みた (図 4)。

陽イオン交換クロマトグラフィーの非吸着分画からは、逆相クロマトグラフィーにより主要な 5 ピークが得られた。一方で、陽イオン交換カラムに吸着されたタンパク質/ペプチドの多くは 0.7 M NaCl 以下で溶出され、逆相クロマトグラフィーにより分離されたのが 23 ピークであった。各成分のアミノ末端からの部分一次構造を決定したところ、6 ファミリーに属する 23 成分 (Cytotoxin, CTX : 10 種、Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub> : 7 種、Cysteine-rich Secretory Protein, CRISP : 2 種、Muscarinic Toxin-like Protein, MTLP : 2 種、Nerve Growth Factor, NGF : 1 種、Thrombin-like Serine Protease, TLP : 1 種) が同定され、12 成分がデータベースにない新規配列であった (表 2)。しかしながら、残りの 5 成分については、複数混在したり、アミノ末端付近の配列が読めないなどの理由から同定することができなかった。

23 成分のうち、10 ピーク (peak 10、peak 11、peak 16 ~ peak 23) のアミノ末端付近のアミノ酸配列は既知のコブラ CTX と相同性が高かったため、溶出順に CTX1 ~ CTX10 と名付けた。部分一次構造では、CTX4 ~ CTX6 がアミノ酸配列の知られている CTX-1 (P01447) と、CTX9 がインドに生息するインドコブラの CTX-2 (P01440) と一致していた。他の 6 配列は *Naja naja* CTX としては新規配列であった。CTX1 と CTX2 は、特にユニークな配列であり、Gln2、Ile9、Ser11、Pro16 の 4 残基が、他の CTX (Lys2、Leu9、Tyr11、Ala16) と異なっていた。

次いで、アイソフォームの種類が多かった毒素は PLA<sub>2</sub> であり、7 ピーク (peak 2、peak 3、peak 6、peak 12 ~ peak 15) が単離された。PLA<sub>2</sub>2、PLA<sub>2</sub>5、PLA<sub>2</sub>6 は、

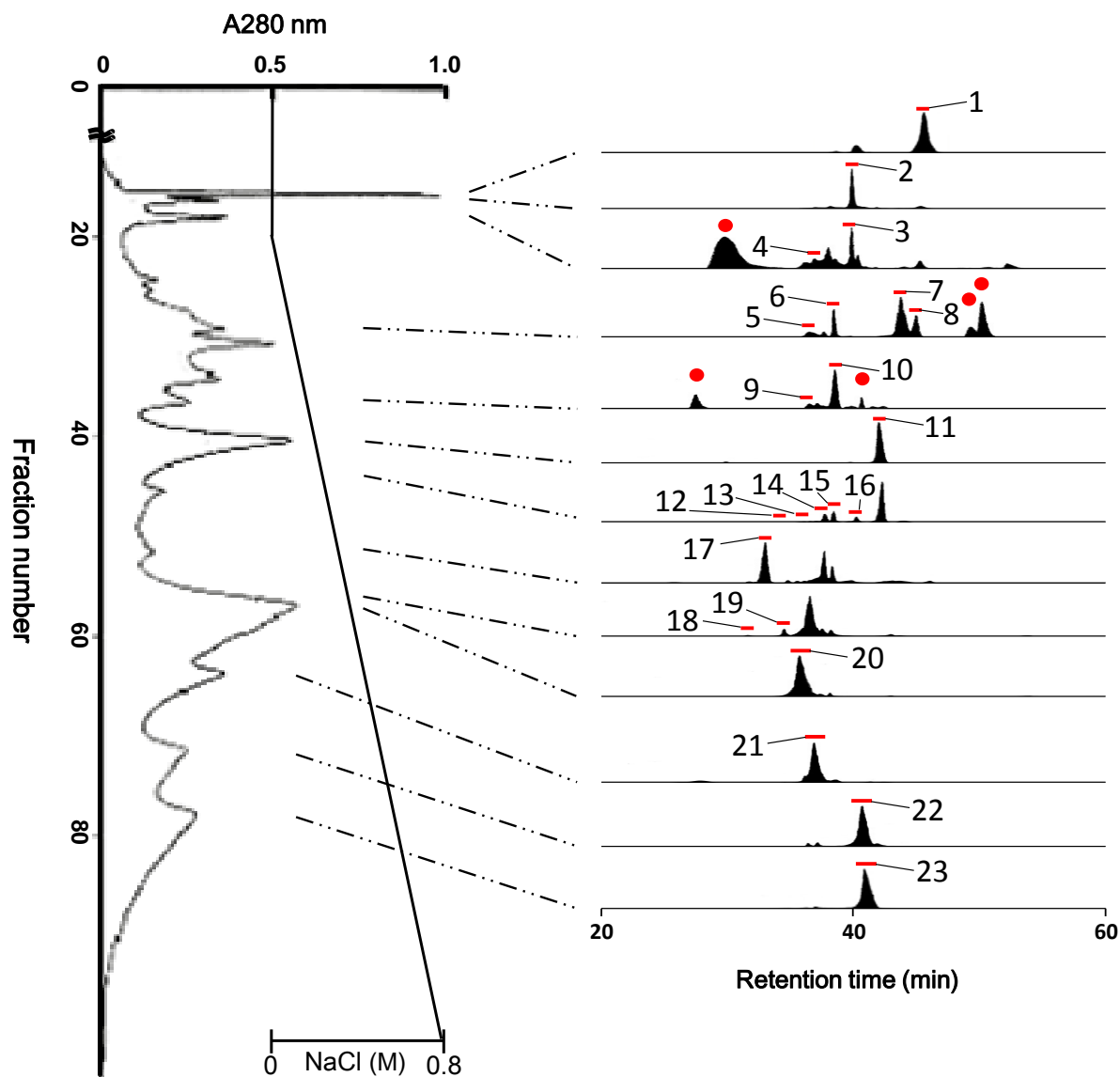


図4. スリランカに棲息するインドコブラ(*Naja naja*) 毒素タンパク質の精製

コブラベノムを二次元クロマトグラフィー法で網羅的に精製した。左図は陽イオン交換クロマトグラフィーによる溶出パターンで、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) で平衡化した PA-SP column (8 x 100 mm) にベノムを吸着させ、0 - 1 M NaCl の濃度勾配 (流速: 1 mL/min) により分離した。右図は逆相クロマトグラフィーによる溶出パターンで、陽イオン交換クロマトグラフィーで得られた分画をそれぞれ 0.1% TFA で平衡化した Develosil 300 C4-HG5 column (4.6 x 150 mm) に吸着させ、0.1% TFA/60% acetonitrile による濃度勾配 (流速: 0.5 mL/min) で分離した。なお、陽イオン交換クロマトグラフィーで得られた主要ピークを含む分画のみの溶出パターンを示した。得られたピークは溶出順に 1 ~ 23 とした。

■で示したピークは、アミノ末端付近の配列が検出できない、或いは、複数混在したため同定できなかった。

表2. スリランカに棲息するインドコブラ毒から精製された成分の部分アミノ末端アミノ酸配列

Peak No	N-terminal amino acid sequence	Proposed name
Cytotoxin (CTX)		
Peak 10	LQCNKLVPIA SKTCPPGK	CTX1*
Peak 11	.....NL CYKMFVSD	CTX2*
Peak 16	•K....I•L• Y....A•NL CYKMYMVATP	CTX3*
Peak 17	•K....I•L• Y....A•NL C	CTX4
Peak 18	•K....I•L• Y....A•	CTX5
Peak 19	•K....I•L• Y....A•	CTX6
Peak 20	•K....I•L• Y....A•DL CYKMYMVSND	CTX7*
Peak 21	•K....I•L• Y....A•DL CYKMYMVSDK	CTX8
Peak 22	•K.....LF Y....A•NL CYKMYMVATP	CTX9*
Peak 23	•K.....LF Y....A•DL CYKMYMVATP	CTX10*
Phospholipase A2 (PLA <sub>2</sub> )		
Peak 2	NLYQFKNMIQ CT	PLA <sub>2</sub> 1*
Peak 3	.....K •VPSRSWWD	PLA <sub>2</sub> 2
Peak 6	..... •VPS	PLA <sub>2</sub> 3*
Peak 12	..... •V	PLA <sub>2</sub> 4*
Peak 13	.....K •	PLA <sub>2</sub> 5
Peak 14	.....K •VPSRSWWD	PLA <sub>2</sub> 6
Peak 15	..... •	PLA <sub>2</sub> 7*
Cysteine-rich Secretory Protein (CRISP/Natrin)		
Peak 7	NVDFNSESTR RKKKQKEIVD LHNSLRRRVS PTA	CRISP1*
Peak 8	..... •	CRISP2*
Muscarinic Toxin-like Protein (MTLP)		
Peak 4	TICYNHLTIR	MTLP1*
Peak 9	..... SEVTEICIIC DDDYYF	MTLP2*
Nerve Growth Factor (NGF)		
Peak 5	EDHPVHNLGE HSVCDVSVAW VTKTTA	NGF
Thrombin-like Serine Protease (TLP)		
Peak 1	IGGFECNEHE HRSLVLYNS AGFFCAGTLL NHEWVV	TLP*

\*: タンパク質データベースに、*Naja naja* で登録のないアミノ酸配列

•: 各毒素の最上段に記載された配列と同じアミノ酸配列

ピーク番号は図4に対応し、毒素の名前はデータベースの相同性検索に基づき命名した。

*Naja naja* (India) の PLA<sub>2</sub> (P15445) とアミノ末端の部分アミノ酸配列が一致していたが、残りの4種 PLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>1、PLA<sub>2</sub>3、PLA<sub>2</sub>4、PLA<sub>2</sub>7) は、*Naja naja* PLA<sub>2</sub> としては新規配列であった。他のコブラ科の PLA<sub>2</sub> と同様に、*Naja naja* の PLA<sub>2</sub> は、全て、Group II PLA<sub>2</sub> の特徴である Cys11 を持っていた。

peak 4 と peak 9 のアミノ末端付近のアミノ酸配列は一致しており、*Naja kaouthia* の MTLP-3 (P82464) と相同性が高かったため、MTLP (MTLP1、MTLP2) とした。MTLP としては、*Naja naja* ではじめての報告である。既知の *Naja atra* や *Naja kaouthia* の MTLP が Arg9 と Thr10 であるのに対し、*Naja naja* の2種 MTLP は、ともに、Ile9 と Arg10 という構造的特徴を持っていた。

Peak 7 と peak 8 は、*Naja atra* の Natrin-1 (Q7T1K6) や *Naja kaouthia* の Kaouthin-1 (ACH73167) の配列と相同性が高かったため、CRISP ファミリーのタンパク質と同定した。

peak 1 の部分アミノ酸配列 36 残基は、Hardwicke's spine-bellied sea snake (*Lapemis hardwickii*) の TLP と 32 アミノ酸残基が一致し、高い相同性を示した。しかしながら、血液凝固系、線溶系のメンバーであるプロテアーゼは相互に類似した配列を持っている事があり、アミノ末端付近の部分一次構造の類似性からだけでは両者を区別する事は困難である。また、逆相カラムを使用して精製しているため酵素が失活している可能性がある。そこで、peak 1 と peak 2 を含む PA-SP カラムから溶出された fraction 16 を用いてトロンビン様酵素活性を測定した。fraction 16 は、トロンビンの合成基質である Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-MCA に対して強い加水分解活性を示した。fraction 16 に含まれる他の成分である peak 2 は PLA<sub>2</sub> であり、プロテアーゼ活性を示さないため、peak 1 はトロンビン様活性をもつセリンプロテアーゼであると推測した。

peak 5 は *Naja naja* (P01140)、*Naja atra* (P61898)、*Naja sputatrix* (Q5YF89)、*Naja kaouthia* (A59218) の NGF のアミノ末端配列と 26 残基が完全に一致していた。

なお、アミノ末端からの部分配列決定であるため、CTX1 と CTX2 は区別できなかった。CTX3 と CTX4 も同様であった。CTX5 と CTX6 は、CTX3、CTX4、CTX7、CTX8 の部分配列と一致していた。また、PLA<sub>2</sub> では、PLA<sub>2</sub>3、PLA<sub>2</sub>4、PLA<sub>2</sub>7 が互いに区別することができず、PLA<sub>2</sub>2、PLA<sub>2</sub>5、PLA<sub>2</sub>6 も同様であった。CRISP や MTLP の2つアイソフォームも分けることができなかった。しかしながら、これらのアイソフォー

ムは、イオン交換クロマトグラフィーでの溶出位置が異なるため容易に区別が可能であり、配列未決定の領域を含めると全アミノ酸配列は異なると考えられた。

## 2. インドコブラ CTX の一次構造

インドコブラのベノムから 10 種類の CTX を精製することができたため、含有量の多かった 5 種 CTX (CTX2、CTX7 ~ CTX10) について、その全一次構造を決定した。各 CTX のアミノ酸配列を図 5 に示したように、すべての CTX は 60 アミノ酸残基からなり、これら 5 つのサイトトキシンの間では 45 アミノ酸残基が共通していた。

また、CTX2、CTX7、CTX8 が S 型、CTX9、CTX10 が P 型であった。*Naja sputatrix* の Cytotoxin 2a (Q9PST4) と同一配列である CTX9 を除くと、他の 4 種 CTX は新規配列であった。CTX7 と CTX8 は 1 アミノ酸残基の違いであり、29 番目のアミノ酸残基が前者は Asn29 で、後者は Asp29 であった。同様な違いは CTX9 と CTX10 でも見られ、19 番目のアミノ酸残基が Asn19 と Asp19 であった。特徴的なのは CTX2、CTX7、CTX8 に見られる Glu52 であり、アジアコブラの CTX においては報告がないことから、スリランカに生息するインドコブラに特有な配列であると考えられた。

次に、データベースに登録されている既存の 5 種のアジアコブラの持つ CTX のアミノ酸配列を基に、NJ 法で系統樹を作成した。図 6 から明らかなように、5 種のアジアコブラの持つ CTX は、最初に、S 型 (Ser28) と P 型 (Pro30) の 2 つの枝に分かれた。すなわち、5 種のアジアコブラの共通祖先が、既に、S 型と P 型の 2 種類の CTX を持っていた事を示している。

	10	20	30	40	50	60
CTX2	LQCNKLVPIA	SKTCPPGKNL	CYKMFMVSDL	TIPVKRGCID	VCPKNSLLVK	YECCNTDRCN
CTX7	LKCNKLIPLA	YKTCPAGKDL	CYKMYMVSND	TVPVKRGCID	VCPKNSLLVK	YECCNTDRCN
CTX8	LKCNKLIPLA	YKTCPAGKDL	CYKMYMVSDK	TVPVKRGCID	VCPKNSLLVK	YECCNTDRCN
CTX9	LKCNKLVPLF	YKTCPAGKNL	CYKMYMVATP	KVPVKRGCID	VCPKSSLLVK	YVCCNTDRCN
CTX10	LKCNKLVPLF	YKTCPAGKDL	CYKMYMVATP	KVPVKRGCID	VCPKSSLLVK	YVCCNTDRCN

図5. *Naja naja* ベノムから精製した主要5種 CTX のアミノ酸配列

グレー表示は、保存されたアミノ酸残基を示す。

各 CTX のアミノ酸配列はエドマン分解法に基づくプロテインシーケンサーを用いて決定し、得られた配列をそれぞれ UniProt Knowledgebase (P86538, P86382, P86540, C0HJU1, P86541) に登録した。

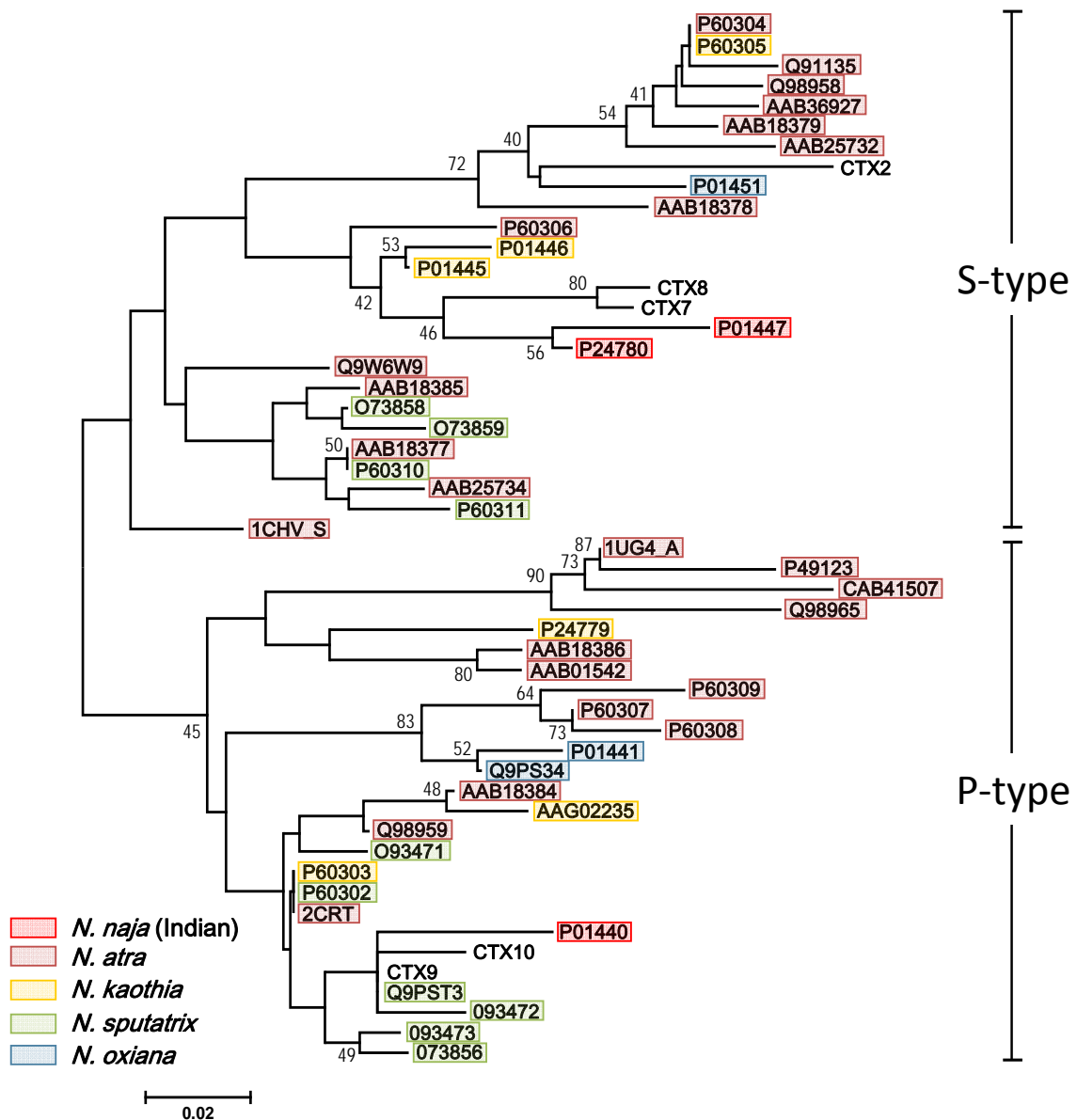


図6. アジアコブラ CTX の分子多様性

データベースに登録されている既存のアジアコブラ CTX のアミノ酸配列を基に、近隣接合法 (NJ 法) で系統樹を作成した。解析ソフトには MEGA6 を使用し、配列間の距離は p-distance 法を用いた。同種内で同一配列が登録されている場合は、代表的な配列のアクセッション番号のみ示した。

表3. スリランカ産インドコブラ (*Naja naja*) CTX の溶血活性及び細胞毒性

CTX	Type (S/P)	EC50 (μM) <sup>a</sup>				
		Erythrocyte	NIH/3T3	A-431	L1210	A-172
CTX2	S	1.024 (0.829-1.341)	0.625 (0.514-0.743)	1.076 (0.530-1.849)	0.154 (0.073-0.240)	0.944 (0.800-1.100)
CTX7	S	0.096 (0.084-0.108)	0.081 (0.066-0.096)	0.198 (0.149-0.249)	0.046 (0.031-0.060)	0.159 (0.144-0.174)
CTX8	S	0.074 (0.066-0.082)	0.059 (0.050-0.069)	0.137 (0.106-0.169)	0.045 (0.036-0.054)	0.121 (0.109-0.134)
CTX9	P	0.171 (0.141-0.212)	0.107 (0.095-0.120)	0.268 (0.212-0.325)	0.063 (0.055-0.069)	0.161 (0.148-0.171)
CTX10	P	0.162 (0.134-0.198)	0.129 (0.113-0.146)	0.199 (0.127-0.265)	0.058 (0.044-0.069)	0.146 (0.136-0.158)

<sup>a</sup>: 50% 影響濃度 (EC50: Effective concentration 50)

( ): 95% 信頼区間

溶血活性は6時間、細胞毒性は5時間、各種濃度の CTX と反応させて毒性試験を行った。毒性評価には、XLSTAT software を使用し、Probit analysis で、95%信頼区間を有する EC50 値を計算した。

### 3. インドコブラ CTX の溶血活性と細胞毒性

CTX の一次構造と毒性の関係を調べるため、一次構造を決定した 5 種 CTX (CTX2、CTX7 ～ CTX10) について、ヒト赤血球に対する溶血活性と、由来の異なる 4 種培養細胞 (NIH/3T3: マウス繊維芽細胞、A431: ヒト上皮癌細胞、L1210: マウスリンパ球形白血病血球、A-172: ヒトグリア芽種) に対する細胞毒性を評価した (表 3)。

溶血活性での比較では、S 型の CTX8 が最も小さい EC50 (強い毒性) であった。この CTX8 の溶血活性を基準とすると、同じ S 型で 1 アミノ酸残基が異なるだけの CTX7 の EC50 は 1.3 倍とわずかに弱いほぼ同程度であり、P 型の CTX9 と CTX10 は、それぞれ 2.3 倍、2.2 倍とおおよそ半分の毒性の強さであった。それに対し、CTX2 は S 型に属するにもかかわらず、CTX8 に比べて毒性が弱く、その EC50 値は、CTX8 の 13.8 倍であった。他の 4 種の培養細胞に対する毒性でも、この傾向は同じであった。ただし、リンパ系白血病細胞 (L1210) とグリア細胞 (A-172) では、5 種 CTX の EC50 値がそれぞれ最大で 4.3 倍と 5.9 倍であり、CTX 間の毒性の違いは、赤血球、繊維芽細胞、上皮細胞に比べて小さかった。CTX に対する細胞の感受性は、程度の差はあるもののリンパ系白血病細胞である L1210 がもっとも高く、上皮細胞由来の A-431 が最も低かった。CTX2 で比較すると約 7 倍、CTX8 でもおおよそ 3 倍の違いが見られた。

#### 4. CTX のリン脂質との相互作用

CTX は、細胞膜に吸着する事が知られている。予備実験として、赤血球をトリプシン処理し、細胞表面のタンパク質を取り除いてからコブラ CTX による溶血活性を測定したが、活性に変化は見られなかった。このことから、他のコブラ CTX で提唱されているように、インドコブラ CTX においても溶血に關与する細胞膜成分はリン脂質と想定された。S 型の CTX7 と CTX8、および、P 型の CTX9 と CTX10 は、それぞれほぼ同程度の毒性を示したため、異なる 3 種 CTX (弱毒性 S 型: CTX2、強毒性 S 型: CTX7、強毒性 P 型: CTX9) に対する赤血球膜との結合能と標的分子と予想されるリン脂質の種類について調べた。

最初に、ホワイトゴースト膜 (赤血球膜) を作製し、赤血球膜への結合能を測定した (図 7)。ホワイトゴースト膜に吸着される CTX の最大量は、CTX の種類に関わらずほぼ一定である事から、CTX は、種類に関わらず細胞膜の同じ成分を標的とすると考えられた。

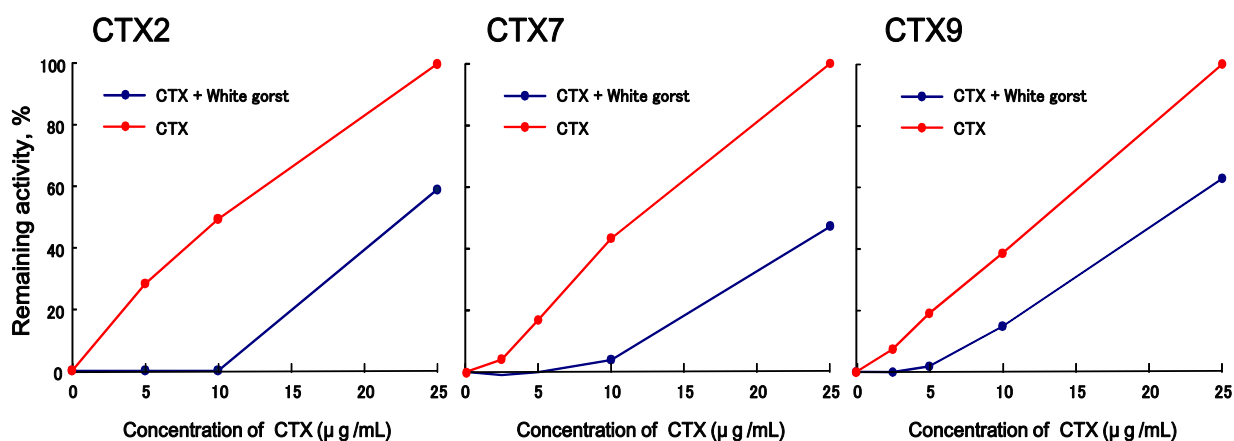
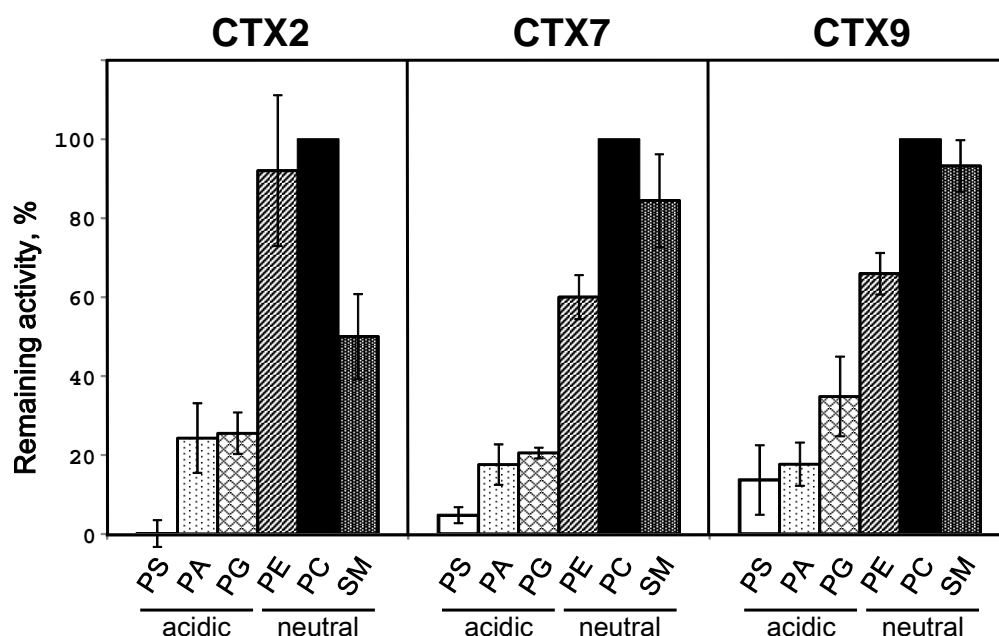


図7. 赤血球膜に対する CTX の吸着効果

赤血球膜から作製したホワイトゴースト膜 (リン含有量: 100 μg/mL) と CTX を 37°C で 1 時間インキュベートし、遠心後、上清中の CTX 残存量を溶血活性で調べた。





**図8. 各種リン脂質に対する CTX の結合力**

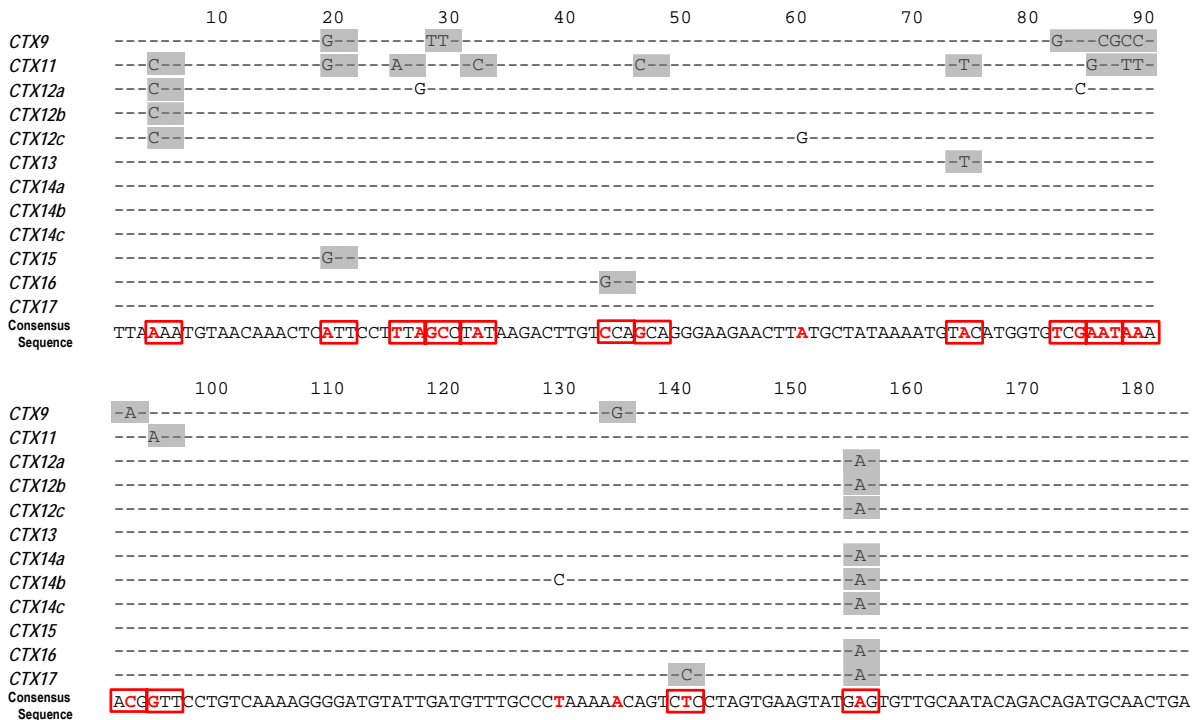
6種類のリン脂質 (PS: phosphatidylserine, PA: phosphatidic acid, PG: phosphatidylglycerol, PE: phosphatidylethanolamine, PC: phosphatidylcholine, SM: sphingomyelin) をそれぞれ、96 穴マイクロタイタープレートに固相化し、Tyrode(-)で濃度調製した CTX2 (1.2  $\mu$ M)、CTX7 (0.3  $\mu$ M)、CTX9 (0.3  $\mu$ M)をそれぞれ 50  $\mu$ L 加え、37°Cで1時間反応させた。その後、上清に残存する CTX の溶血活性を測定した。有意水準5%でグラブス検定 (Grubbs, 1969)し、外れ値がなかった。CTX2 は N = 2 を2回、CTX7 と CTX9 は N = 2 を3回、それぞれ行った。CTX に対する結合親和性が最も低い PC を 100%とし、エラーバーは標準誤差を示す。

そこで、リン脂質に対する結合能を半定量するアッセイ法を開発し、細胞膜を構成する代表的なリン脂質6種 (PC、PE、PS、PA、PG、SM) に対する CTX の親和性を測定した (図8)。3種 CTX は、固相化した各種リン脂質の中で酸性リン脂質、特に PS によく吸着された。一方で、PC、PE、SM のように極性頭部が中性のリン脂質に対しては、ほぼ親和性を示さなかった。CTX7 と CTX9 は、溶血能と PS に対する結合能がほぼ一致していた。興味深いことに、CTX2 は図8で示されているように、効果的に溶血を引き起こす事のできない濃度であっても PS にほぼ完全に吸着されており、溶血活性は PS への結合能というより、膜傷害活性の強さの違いを反映している事が示唆されているようであった。

## 5. CTX cDNA のクローニングと分子進化

CTX 遺伝子の分子多様性を調べるために、インドコブラ毒腺から作製した cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR により 3FTx cDNA を増幅した。その後、TA クローニングで得られた 100 クローンについて遺伝子配列を調べた。このうち、CTX をコードしていたのが 30 クローンであり、12 種類の遺伝子型が得られた (図 9 A)。これらの塩基配列から予測されるアミノ酸配列のうち 1 種がベノムから精製した CTX9 と同一の配列であったので、*CTX9* と命名した。それ以外は新規配列であったため、*CTX11* ~ *CTX17* と名付けた。また、*CTX12* と *CTX14* は、異なる塩基配列 (シグナルシーケンスを含む) であっても同じアミノ酸配列をコードするクローンがそれぞれ 3 種類ずつ確認されたため、遺伝子配列の名前に (a ~ c) を付けて区別した (*CTX9*、*CTX11*、*CTX12a*、*CTX12b*、*CTX12c*、*CTX13*、*CTX14a*、*CTX14b*、*CTX14c*、*CTX15*、*CTX16*、*CTX17*)。したがって、タンパク質の一次構造としては合計 8 種類 (*CTX9*、*CTX11* ~ *CTX17*) であった (図 9 B)。CTX1 で構造決定した部分アミノ酸配列は、*CTX11* cDNA がコードするアミノ酸配列と一致した。つまり、*CTX11* cDNA は、CTX1 をコードしている cDNA の可能性がある。同様に、*CTX13*、*CTX14*、および、*CTX17* の cDNA は、CTX4 ~ CTX6 のどれかに対応する可能性がある。他の cDNA は、CTX1 ~ CTX10 で決定した 17 ~ 30 番目の部分アミノ酸配列で完全に一致するものはなかった。なお、ベノムから精製した 10 種 CTX と cDNA ライブラリーからクローニングした cDNA CTX を対応させると、表 4 で示すように推測された。それぞれ由来となる個体が異なるため、各 CTX を完全に対応させることは困難であった。

A



B

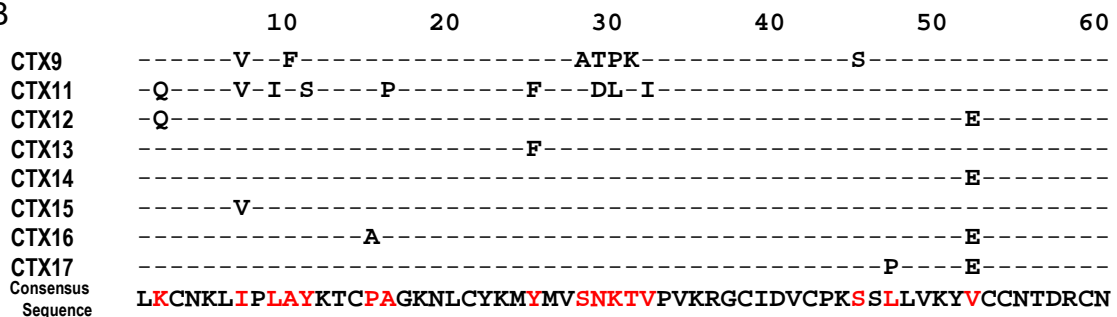


図9. クローニングした 12 種 CTX cDNA の配列比較

CTX cDNA のコード領域における塩基配列(A)、対応するアミノ酸配列(B)を表す。

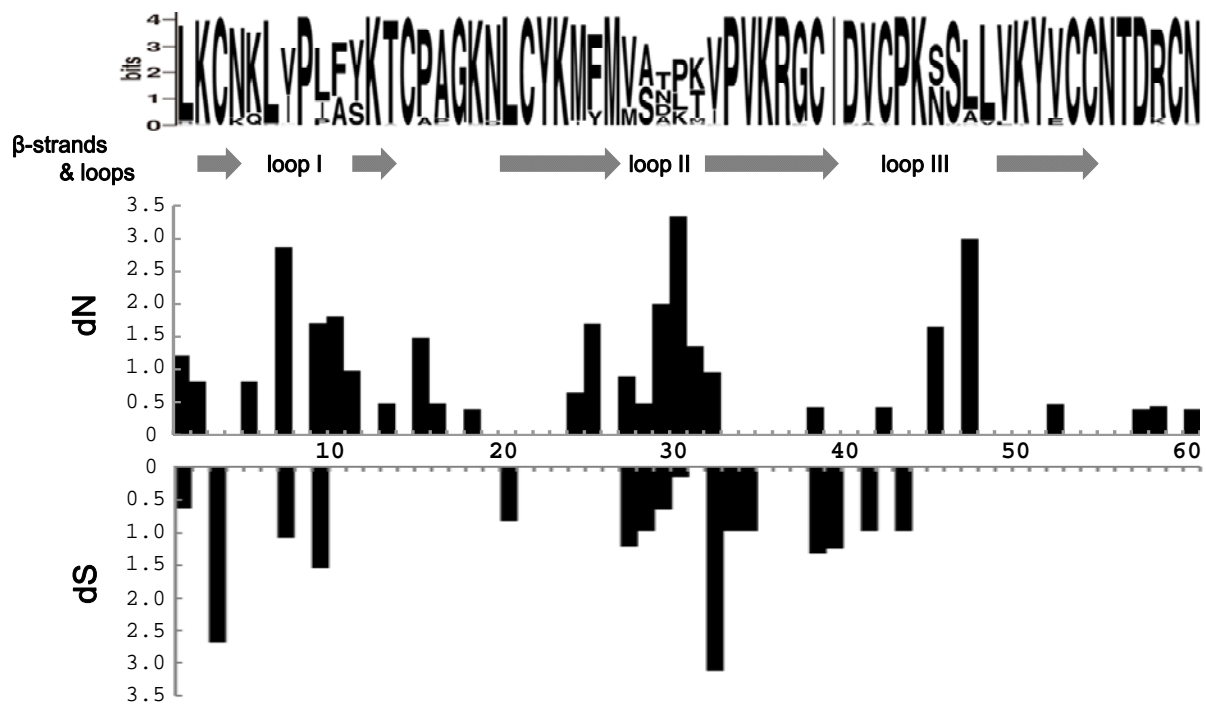
Consensus Sequence と同一な塩基は点線にし、非同義置換はグレー表示(各塩基配列)と赤色ボックス(Consensus Sequence)で示した。また、塩基配列は、INSDB(International Nucleotide Sequence Databases: LC015651 - LC015662)に登録した。

表4. CTX cDNA に対応するベノムから精製した 10 種 CTX

Type (S/P)	特徴的な配列	サイトトキシン	
		cDNA	Protein
S	2Q, 11S, 16P, 30L	—	CTX2
		<i>CTX11</i>	(CTX1)
	30K, 31T	—	CTX7
		—	CTX8
		<i>CTX12</i>	—
		<i>CTX13</i>	(CTX5)
		<i>CTX14</i>	(CTX3)
		<i>CTX15</i>	(CTX6)
		<i>CTX16</i>	—
		<i>CTX17</i>	(CTX4)
		—	CTX9
		—	CTX10
P	12F, 28A, 29T, 30P, 31K, 45S	<i>CTX9</i>	CTX9
		—	CTX10

( ): アミノ末端部分アミノ酸配列から推測して対応可能な CTX

12 種類の成熟タンパク質に対する CTX cDNA (シグナルシーケンスを除いた配列: 180 bp) のうち、非同義置換は 23 塩基置換中に 18 箇所見つかり (図 9 A)、それらは、loop I や loop II 領域で高頻度に行っていた。さらに、それぞれのコドンに対する非同義置換と同義置換の頻度を、今回得られた配列とデータベースに登録のある既存の 39 配列と合わせて、合計 51 配列を使って ADAPTSITE (Suzuki and Gojobori, 1999) を用いて計算した。非同義置換率 (dN) と同義置換率 (dS) の値を図 10 に示した。興味深いことに、dN 値は、ループの先端に位置する 7、30、47 番目のアミノ酸残基をコードする箇所で高く、3 つのループをコードするアミノ酸残基は、dN が dS より大きい値であった。さらに、3 つのループ領域をコードするコドンと一緒にして分析すると、 $dN/dS > 1$  は、 $k = 2.9$  で  $p = 0.66$ 、 $k = 3.6$  で  $p = 0.048$  となり、非同義置換が同義置換以上に多かった。これは、ループ領域におけるアミノ酸残基をコードするコドンは、加速的に進化していることを示唆している。また、シーケンスロゴでも、 $\beta$  ストランドに位置するアミノ酸残基は保存的であり、一方で、ループを構成するアミノ酸残基には多様性のあることが示された (図 10 上段)。



**図 10. CTX 遺伝子のコード領域におけるアミノ酸残基の分子多様性と自然選択圧**

アジアコブラ CTX 遺伝子 51 配列を用いて、上段にはアミノ酸配列のシーケンスロゴ、及び、二次構造(β ストランド、ループ)、下段には非同義置換率(dN)と同義置換率(dS)を示す。

各サイトの dN と dS の値は、 $k$  (Transition/Transversion) = 2.9 を用いて計算された。また、CTX cDNA の塩基配列は、GenBank database から入手した。

GenBank ID: AF031473, AF031474, AF276222, AF295119, AF295330, AJ007796, AJ007797, L04640, U42583, U42585, U42586, U58481 – U58490, U77487, U86588, U86589, U86591 – U86597, X94316, X94317, Y08727, Y12491, Z54226, Z54227, Z54229, Z54230.

## 第 4 章 考察

CTX は、loop II の立体構造に大きな影響を与える 2 つのアミノ酸残基により、S 型と P 型に分類され、後者は強毒性であると報告されている (Chien et al., 1994)。*Naja naja* の主要な 5 種 CTX もまた 2 つの型に分けられ、S 型の CTX2 は弱い細胞毒性と溶血活性であり、P 型の CTX9 や CTX10 は強い活性を示した。しかしながら、CTX7 と CTX8 は、興味深いことに S 型であるにも関わらず、P 型の CTX9 と CTX10 よりも強い細胞毒性と溶血活性を示した。このことは、Pro30 が必ずしも強い活性を発現するために必須なアミノ酸残基ではないことを示している。

CTX2 と CTX7 では 9 アミノ酸残基の違いがあるが、強い活性を持つためには、loop II にある Lys30 の正電荷が重要であると考えられる。この考えに基づくと、Lys30 をもつ他の S 型 CTX の多様な細胞毒性を容易に説明できる。Lys30 をもつ *Naja naja siamensis* CTX CM-7、CTX CM-7A、ならびに、*Naja naja naja* CTX IIA、*Naja kaouthia* CT3 は、S 型 CTX であるがかなり強い細胞毒性を持つのに対し、*Naja oxiana* CT1、*Naja naja atra* CT-II、*Naja naja siamensis* CTX CM-6 のように S 型であっても、Leu30 をもつ CTX の活性は弱い (Stevens-Truss and Hinman, 1997; Feofanov et al., 2004; Feofanov et al., 2005)。Ser30 をもつ *Naja haje* CT1 もまた、毒性は弱い (Feofanov et al., 2004)。これらのデータは、S 型 CTX が Lys30 の存在の有無で 2 つのサブグループに分けることができることを強く示唆している。そこで、今回、Lys30 をもつ S 型 CTX を SK 型、Lys30 の代わりに通常 Leu30 を持つ S 型 CTX を SL 型と命名した。前者は、S 型 CTX であるが、P 型 CTX に匹敵する強い細胞毒性を持っている。

Stevens-Truss ら (1997) は、7 種類の CTX の比較から、強い細胞毒性には 11 番目のアミノ酸残基が芳香族アミノ酸であることが重要であると報告している。しかしながら、*Naja oxiana* CT1 は Tyr11 をもつがその毒性は弱く、Ser11 をもつ *Naja oxiana* CT2 は強毒性である (Feofanov et al., 2004)。前者は Leu30 であり、後者は Lys30 である事をあわせて考察すると、CTX の強い細胞毒性には Tyr11 の存在より、30、または、31

番目のアミノ酸残基が塩基性アミノ酸であることとよりよく相関している。

その他、CTX2 と CTX7 のアミノ酸配列の違いである Gln2Lys、Val7Ile、Ile9Leu、Pro16Ala、Asn19Asp、Asp29Asn、Asp29Thr、Ile32Val は、細胞毒性や溶血活性への影響力が少なかった。このような置換では、側鎖におけるサイズや疎水性などに重要な変化を与えないためであると思われる。さらに、これらのアミノ酸残基の違いのほとんどは、CTX の活性に影響を与えたとの報告がみられない。

NMR やシミュレーション研究により、P 型と S 型の CTX 両方で、Lys5、Lys12、Lys18、Tyr22、Lys35、Arg36、Cys38 と、Lys44、Lys50、Tyr51 が PS への結合に関与すると示唆されている (Konshina et al., 2010; Konshina et al., 2011)。これらのアミノ酸残基はインドコブラ CTX2 と CTX7 でも保存されており、この 2 種 CTX が固相化された PS に対して強く吸着されたことと一致している。

強毒性の S 型 CTX7 と強毒性の P 型 CTX9 の比較もまた有用な情報を与える。上述の PS との結合サイトは、P 型の CTX9 でもよく保存されていた。これらのアミノ酸残基がリン脂質の極性頭部を認識していると考えれば、S 型や P 型に関わらず、CTX が 6 種類のリン脂質に対してほぼ同程度の結合であったことが矛盾なく理解できる。ただし、同程度の結合能をもっていたにも関わらず、CTX7 は CTX9 より約 2 倍の毒性を示した。CTX の細胞傷害活性が、結合活性と膜障害活性の協調的な結果と考えると、この毒性の違いは、膜障害活性の違いに起因することになる。2 種 CTX の一次構造上の違いである 6 アミノ酸残基のうち、4 つが loop II に位置しているので、膜障害活性の違いは loop II のアミノ酸残基の違いのためと考えられる。

51 種のコブラ CTX のアミノ酸配列を比較すると、全アミノ酸配列 (60 アミノ酸残基) 中、約 40 アミノ酸残基が保存的であり、少なくとも、12 アミノ酸残基は 3FTx スーパーファミリーに共通して保存されていた。したがって、これらのアミノ酸残基は、3 つの機能的なループ構造を提供するために必要な 5 つの  $\beta$  ストランドからなる基本的なコア構造 (Kini and Doley, 2010) の維持に重要であると考えられる。5 つの  $\beta$  ストランドを架橋し、コア構造を安定化している 4 つのジスルフィド結合、そして、 $\beta$  ストランド間の結合を強め、安定化に寄与している Tyr22 ( $\beta$ 3)、Ile39 ( $\beta$ 4)、Val52 ( $\beta$ 5) (Sivaraman et al., 1999)、加えて、コア構造の維持に重要な役割をすると考えら



れている Asn60 (Galat et al., 2008) はともによく保存されていた。また、それらのアミノ酸残基をコードするコドンの dN 値が全て低かった (図 10) ことも、これらのアミノ酸残基がコア構造の維持に重要であることを示している。Ohno ら (1998) は、3FTx 遺伝子のエクソンにおいて dN 値が dS 値より大きいことから、3FTx 遺伝子は加速的に進化したと推測している。本研究で同定した 12 種類の *Naja naja* CTX cDNA 間に見いだされた 23 塩基置換の中に、同義置換がわずか 5 つであったことは、*Naja naja* の CTX 遺伝子が加速進化していることを示唆する結果である。同時に、3つのループをグループ化すると、ループ領域では dN 値が dS 値より大きいことが示された。このことは、ループ領域をコードするコドンで優先的に加速進化が起こっていることを示唆しており、ループ領域のアミノ酸残基は多様化しているという Chien ら (1994) による指摘と一致している。

リン脂質の極性頭部の認識に関わるアミノ酸残基が分子進化において保存されていた一方で、なぜリン脂質膜の疎水性内部に相互作用するであろうアミノ酸残基をコードするコドンが加速的に進化したのかは興味深い問題である。細胞膜のリン脂質、糖脂質やコレステロールの含有量は生理的条件に依存して変化する。また、細胞ごとにも異なる。さらに、リン脂質を構成する脂肪酸のアルキル鎖長や、アルキル鎖中の二重結合の数もまた、各リン脂質で異なる。脂質膜の疎水内部と相互作用する CTX のループ領域におけるアミノ酸残基の置換は、CTX による細胞膜への浸透の深さや接触するエリア、角度に影響する (Sue et al., 1997)。CTX のループ領域におけるアミノ酸配列の多様化が、コブラ毒の様々な細胞に対する多様な毒性を可能にしたと考えられる。

ヘビ毒素タンパク質のアミノ酸配列にみられる種内多様性は、多くの毒性タンパク質に見られる (表 2)。本研究において、*Naja naja* ベノムから精製されたタンパク質/ペプチドは 6 グループの 23 成分であったが、CTX は 10 種、PLA<sub>2</sub> は 7 種のアイソフォームが見つかった。どちらのタンパク質をコードする遺伝子ファミリーも、遺伝子重複の後に強い正の自然選択をうけ進化した (適応的な進化) と考えられている (Wuster, 1996; Ohno et al., 1998)。本研究で示された実験結果でもまた、*Naja naja* CTX 遺伝子が加速進化した事を支持している。

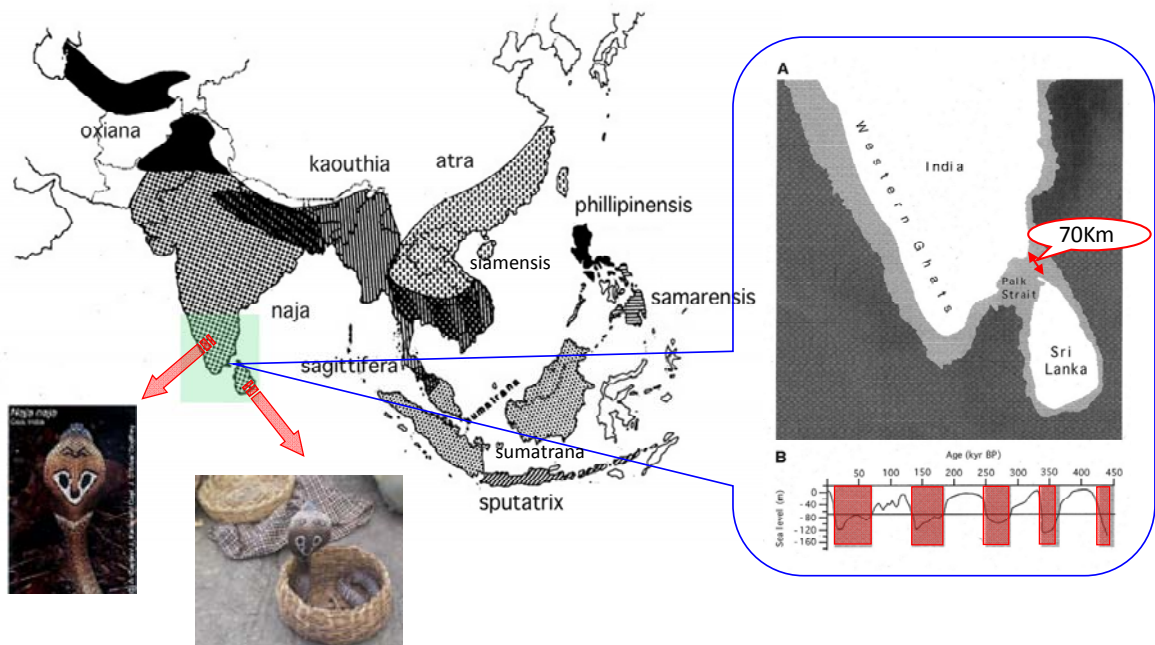


図 11. インドとスリランカの地理的關係とアジアコブラの分布

アジアコブラの生息地域と、インドとスリランカの地理的關係(挿入図)を示す。挿入図 A の白色地域は現在の陸地、明灰色はインドとスリランカが同じ大陸棚であること、挿入図 B は、インドとスリランカ間海域(ポーク海峡)の過去 50 万年の海面変動を表す。赤帯は、陸続きであった期間である。

文献(Wüster and Thorpe, 1992; Bossuyt et al., 2004)をもとに一部改編した。

一方で、神経成長因子である NGF (nerve growth factor, 神経成長因子) の 26 アミノ酸残基は *Naja naja* (India) のアミノ酸配列と完全に一致し、アイソフォームもみつからなかった。NGF は名前こそ成長因子であるが、現在では栄養因子と考えられており、毒性は知られていない。つまり、遺伝子重複とアミノ酸配列の多様化は、毒性を示す遺伝子/タンパク質にみられる共通の特徴と考えられる。

インドとスリランカは一番近いところで約 70 km しか離れておらず、海面変動により過去 50 万年の間で 5 回 (Rohling et al., 1998)、近年では 1 万年前まで陸続きになっていた (Vaz, 2000) (図 11)。そのため、両地域に棲む生物は遺伝的に非常に近いと考えられていたが、近年、インド南部とスリランカに生息する水生動物については遺伝的に分化している事が明らかにされた (Bossuyt et al., 2004)。このことから、インド

コブラについても、インドとスリランカでは共に *Naja naja* とされているが、遺伝的に分化している可能性があると考えられる。両者は形態的に異なり、以前はスリランカのcobraはインドcobraの亜種 (*Naja naja polyocellata*) とされていた。このことも、インドとスリランカに生息するcobraではベノムタンパク質のエピトープが異なるという考えを支持している。本研究では、スリランカに生息するインドcobraから、12 種の CTX アイソフォームのアミノ酸配列を決定した。しかしながら、インドに生息するインドcobra CTX の既存の配列と一致する登録は全くなかった。このことから、インド南部とスリランカに生息するcobraが短期間に毒素遺伝子を独立に加速進化させエピトープに違いが生じた可能性があり、抗血清の効果に差がでたと推測される。

現在、CTX の細胞膜に傷害を起こさせるメカニズムは依然としてよくわかっていない。CTX のリコンビナントタンパク質を作製することができれば、研究が大きく進展すると期待されるが、CTX はあらゆる細胞に対して毒性を有することから、活性を持つリコンビナント CTX を作製することは原理的にも非常に困難である。また、CTX は 60 アミノ酸残基からなる小分子タンパク質/ペプチドであるにも関わらず、4 つのジスルフィド結合を持つため、封入体として発現させても正しく再構築する事は難しいとされているが、条件さえ見つける事ができれば可能となる。CTX 分子の特性を明らかにし、再構築を可能にできれば、毒性をもつタンパク質を中心としたタンパク質発現系への応用も期待でき、その利用価値が広がると考えられる。さらに、リコンビナント CTX を用いてより詳細に CTX の毒性発現機構が解明できれば、cobra咬傷における細胞傷害の後遺症に対しても新たな治療を行うことが可能となるのかもしれない。

## 第 5 章 結語

インドコブラ (*Naja naja*) の毒素タンパク質を網羅的に精製し、部分一次構造を決定することにより 23 成分を同定した。主要な 5 種 CTX (CTX2、CTX7 ~ CTX10) について一次構造、細胞毒性、リン脂質との結合能の観点から特徴を明らかにした。CTX2 は弱毒性 S 型、CTX7 と CTX8 は強毒性 S 型であり、CTX9 と CTX10 は強毒性 P 型であった。CTX2、CTX7、CTX9 は、一次構造や細胞毒性に違いがあるにも関わらず、6 種類のリン脂質 (PC、PE、PS、PA、PG、SM) に対して似た結合親和性を示した。構造比較から、Lys30 が強い細胞毒性や溶血活性に重要であることが推測された。*Naja naja* 毒腺の cDNA ライブラリーからクローニングした 12 種 CTX cDNA の塩基配列比較から、18 箇所の非同義置換と 5 箇所の同義置換が生じていることが明らかになった。このことは、CTX 遺伝子が加速進化していることを示唆している。51 種類の *Naja* 属のコブラ CTX cDNA の配列比較から、3 つのループ領域をコードするコドンが加速的に進化をしていることが示され、これらの領域が積極的に機能を担っていると考えられた。

リン脂質の疎水性頭部の認識、8 つのシステイン残基、 $\beta$  シートからなるコア構造の安定化に関与するアミノ酸残基などをコードするコドンは、進化的によく保存されていた。

これらの知見は、今後、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。

## 謝 辞

本研究は、名古屋市立大学システム自然科学研究科 森山昭彦教授のもとで遂行したものです。指導教官として、長年にわたり多大なる御指導御鞭撻とともに御支援を賜りました森山昭彦教授には、謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、名古屋市立大学システム自然科学研究科 鈴木善幸教授には、遺伝子の多様性解析で共同研究して頂き、論文執筆においては適切なご指導御助言を賜りました。名古屋市立大学医学研究科分子神経生物学分野 浅井清文教授には、多くの御指導御援助を賜りました。ペラデニア大学 Seranath B.P. Athauda 博士には、共同研究者としてインドコブラの毒と cDNA Library をご提供頂きました。名古屋市立大学システム自然科学研究科研究員 松原和純博士には、論文執筆・投稿にあたり適切な御指導御助言を頂きました。この場をかりまして心から深く感謝申し上げます。

基礎生物学研究所クロマチン制御研究部門 中山潤一教授には、日々の研究を遂行するにあたり職場環境へのご配慮とともに多大なるご助言を賜り、深く感謝申し上げます。名古屋市立大学システム自然科学研究科 湯川泰教授、田上英明准教授には、遺伝子解析実験に際し適切なご助言を賜りましたことに、深く感謝申し上げます。また、本研究科在籍中においてあたたかいご支援を頂きました同研究科 杉谷光司教授をはじめとする諸先生方、ならびに、同研究科の皆様には、心から感謝申し上げます。

最後に、博士後期課程在学中から長年にわたりあたたかく見守り、ご支援くださりました両親、姉に感謝の意を表します。

## 参考文献

- Antil-Delbeke, S., Gaillard, C., Tamiya, T., Corringer, P.-J., Changeux, J.-P., Servent, D., Ménez, A., 2000. Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 29594-29601.
- Banerjee, Y., Mizuguchi, J., Iwanaga, S., Kini, R.M., 2005. Hemextin AB complex, a unique anticoagulant protein complex from *Hemachatus haemachatus* (African Ringhals cobra) venom that inhibits clot initiation and factor VIIa activity. *J. Biol. Chem.* 280 42601-42611.
- Bhaskaran, R., Huang, C.C., Chang, D.K., Yu, C., 1994. Cardiotoxin III from the Taiwan cobra (*Naja naja atra*). Determination of structure in solution and comparison with short neurotoxins. *J. Mol. Biol.* 235, 1291-1301.
- Bossuyt, F., Meegaskumbura, M., Beenaerts, N., Gower, D.J., Pethiyagoda, R., Roelants, K., Mannaert, A., Wilkinson, M., Bahir, M.M., Manamendra-Arachchi, K., Ng, P.K., Schneider, C.J., Oommen, O.V., Milinkovitch, M.C., 2004. Local endemism within the Western Ghats-sri Lanka biodiversity hotspot. *Science* 306, 479-481.
- Chang, L.S., Lin, J., Chou, Y.C., Hong, E., 1997. Genomic structures of cardiotoxin 4 and cobrotoxin from *Naja naja atra* (Taiwan cobra). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 756-762.
- Chen, K.C., Kao, P.H., Lin, S.R., Chang, L.S., 2007. The mechanism of cytotoxicity by *Naja naja atra* cardiotoxin 3 is physically distant from its membrane-damaging effect. *Toxicon* 50, 816-824.
- Chen, Y.H., Hu, C.T., Yang, J.T., 1984. Membrane disintegration and hemolysis of human erythrocytes by snake venom cardiotoxin (a membrane-disruptive polypeptide). *Biochem. Int.* 8, 329-338.
- Chien, K.Y., Chiang, C.M., Hseu, Y.C., Vyas, A.A., Rule, G.S., Wu, W., 1994. Two distinct types of cardiotoxin as revealed by the structure and activity relationship of their interaction with

- zwitterionic phospholipids dispersions. *J. Biol. Chem.* 269, 14473-14483.
- Chien, K.Y., Huang, W.N., Jean, J.H., Wu, W.G., 1991. Fusion of sphingomyelin vesicles induced by proteins from Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom. Interactions of zwitterionic phospholipids with cardiotoxin analogues. *J. Biol. Chem.* 266, 3252-3259.
- Chippaux, J.P., 1998. *Bulletin of the World Health Organization* 76, pp. 515-524.
- De Silva, H.J., Fonseka, M.M., Gunatilake, S.B., Kularatne, S.A., Sellaheewa, K.H., 2002. Anti-venom for snakebite in Sri Lanka. *Ceylon Med. J.* 47, 43-45.
- De Wille, J.R., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A., Lazdunski, M., 1991. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2437-2440.
- Dodge, J.T., Mitchell, C., Hanahan, D.J., 1963. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 119-130.
- Dubovskii, P.V., Lesovoy, D.M., Dubinnyi, M.A., Konshina, A.G., Utkin, Y.N., Efremov, R.G., Arseniev, A.S., 2005. Interaction of three-finger toxins with phospholipids membranes: comparison of S- and P-type cytotoxins. *Biochem. J.* 387, 807-815.
- Dubovskii, P.V., Lesovoy, D.M., Dubinnyi, M.A., Utkin, Y.N., Arseniev, A.S., 2003. Interaction of the P-type cardiotoxin with phospholipid membranes. *Eur. J. Biochem.* 270, 2038-2046.
- Dufton, M.J., Hider, R.C., 1988. Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmacol. Ther.* 36, 1-40.
- Dufton, M.J., Hider, R.C., 1991. The structure and pharmacology of elapid cytotoxins. In: Harvey, A.L. (Ed.), *Snake Toxins*, Pergamon Press, New York, pp. 259-302.
- Eastman, J., Wilson, E.J., Cerveñansky, C., Rosenberry, T.L., 1995. Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation. *J. Biol. Chem.* 270, 19694-19701.
- Endo, T., Tamiya, N., 1991. Structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. In: Harvey, A.L. (Ed.), *Snake Toxins*. Pergamon Press, New York, pp. 165-222.
- Feofanov, A.V., Sharonov, G.V., Dubinnyi, M.A., Astapove, M.V., Kudelina, I.A., Dubovskii, P.V., Rodionov, D.I., Ytkin, Y.N., Arseniev, A.S., 2004. Comparative study of structure and activity of cytotoxins from venom of the cobras *Naja oxiana*, *Naja kaouthia*, and *Naja haje*.

- Biochemistry (Moscow) 69, 1148-1157.
- Feovanov, A.V., Sharonov, G.V., Astapova, M.V., Rodionov, D.I., Utkin, Y.N., Arseniev, A.S., 2005. Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. Biochem. J. 390, 11–18.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375–400.
- Fletcher, C.M., Harrison, R.A., Lachmann, P.J., Neuhaus, D., 1994. Structure of a soluble, glycosylated form of the human complement regulatory protein CD59. Structure 2, 185–199.
- Fox, S., Rathuwithana, A.C., Kasturiratne, A., Lalloo, D.G., De Silva, H.J., 2005. Underestimation of snakebite mortality by hospital statistics in the Monaragala District of Sri Lanka. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100, 693-695.
- Friedman, M., 2001. Application of the S-pyridylethylation Reaction to the Elucidation of the Structures and Functions of Proteins. J. Protein Chem. 20, 431-453.
- Fry, B.G., Wüster, W., Kini, R.M., Brusic, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P., 2003. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. J. Mol. Evol. 57, 110-129.
- Galat, A., Gross, G., Drevet, P., Sato, A., Ménez, A., 2008. Conserved structural determinants in three-fingered protein domains. FEBS J. 275, 3207-3225.
- Gatineau, E., Takechi, M., Bouet, F., Mansuelle, P., Rochat, H., Harvey, A.L., Montenay-Garestier, T., Ménez, A., 1990. Delineation of the functional site of a snake venom cardiotoxin: preparation, structure, and function of monoacetylated derivatives. Biochemistry 10, 6480-6489.
- Gong, N., Armugam, A., Jeyaseelan, K., 1999. Postsynaptic short-chain neurotoxins from *Pseudonaja textilis*. cDNA cloning, expression and protein characterization. Eur. J. Biochem. 265, 982-989.
- Grubbs, F., 1969. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. Technometrics 11, 1-21.



- Gumley, T.P., McKenzie, I.F., Sandrin, M.S., 1995. Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules. *Immunol. Cell Biol.* 73, 277–296.
- Harrison, R.A., Wüster, W., Theakston, R.D., 2003. The conserved structure of snake venom toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody. *Toxicon* 41, 441-449.
- Harvey, A.L., Marshall, R.J., Karlsson, E., 1982. Effects of purified cardiotoxins from the Thailand cobra (*Naja naja siamensis*) on isolated skeletal and cardiac muscle preparations. *Toxicon* 20, 379-396.
- Hinman, C.L., Jiang, X.L., Tang, H.P., 1990. Selective cytolysis by a protein toxin as a consequence of direct interaction with the lymphocyte plasma membrane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104, 290-300.
- Huang, W.N., Sue, S.C., Wang, D.S., Wu, P.L., Wu, W.G., 2003. Peripheral binding mode and penetration depth of cobra cardiotoxin on phospholipid membranes as studied by a combined FTIR and computer simulation approach. *Biochemistry* 42, 7457-7466.
- Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., Takenawa, T., 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 291, 1047-1051.
- Joubert, F.J., Taljaard, N., 1978. *Naja haje haje* (Egyptian cobra) Venom. Some Properties and the Complete Primary Structure of Three Toxins (CM-2, CM-11 and CM-12). *Eur. J. Biochem.* 90, 359-367.
- Karlsson, E., Jolkkonen, M., Mulugeta, E., Onali, P., Adem, A., 2000. Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* 82, 793–806.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., de Silva, H.J., 2008. The global burden of snake bite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths, *PLoS Medicine* 5, e218.
- Kawabata, S., Miura, T., Morita, T., Kato, H., Fujikawa, K., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T., Sakakibara, S., 1988. Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. *Eur. J. Biochem.* 172, 17-25.

- Keyler, D.E., Gawarammana, I., Gutiérrez, J.M., Sellahewa, K.H., McWhorter, K., Malleappah, R., 2013. Antivenom for snakebite envenoming in Sri Lanka: the need for geographically specific antivenom and improved efficacy. *Toxicon* 69, 90-97.
- Kimura, M., 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217, 624-626.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Kini, R.M., Doley, R., 2010. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon* 56, 855–867.
- Kini, R.M., Evans, H.J., 1989. Role of cationic residues in cytolytic activity: modification of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activity. *Biochemistry* 28, 9209-9215.
- Konshina, A.G., Boldyrev, I.A., Omelkov, A.V., Utkin, Y.N., Efremov, R.G., 2010. Anionic lipids: determinants of binding cytotoxins from snake venom on the surface of cell membranes. *Acta Naturae* 2, 88-96.
- Konshina, A.G., Boldyrev, I.A., Utkin, Y.N., Omel'kov, A.V., Efremov, R.G., 2011. Snake cytotoxins bind to membranes via interactions with phosphatidylserine head groups of lipids. *PLoS One* 6, e19064.
- Kordis, D., Gubensek, F., 2000. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. *Gene* 261, 43–52.
- Lee, S.C., Guan, H.H., Wang, C.H., Huang, W.N., Tjong, S.C., Chen, C.J., Wu, W.G., 2005. Structural basis of citrate-dependent and heparan sulfate-mediated cell surface retention of cobra cardiotoxin A3. *J. Biol. Chem.* 280, 9567-9577.
- Lin, Y.L., Lin, S.R., Wu, T.T., Chang, L.S., 2004. Evidence showing an intermolecular interaction between KChIP proteins and Taiwan cobra cardiotoxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 720-724.
- Ma, D., Armugam, A., Jeyaseelan, K., 2002. Cytotoxic potency of cardiotoxin from *Naja sputatrix*: development of a new cytolytic assay. *Biochem. J.* 366, 35-43.
- McDowell, R.S., Dennis, M.S., Louie, A., Shuster, M., Mulkerrin, M.G., Lazarus, R.A., 1992. Mambin, a potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor

- structurally related to the short neurotoxins. *Biochemistry* 31, 4766–4772.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Ohno, M., Ménez, R., Ogawa, T., Danse, J.M., Shimohigashi, Y., Fromen, C., Ducancel, F., Zinn-Justin, S., Le Du, M.H., Boulain, J.C., Tamiya, T., Ménez, A., 1998. Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* 59, 307–364.
- Patel, H.V., Vyas, A.A., Vyas, K.A., Liu, Y.S., Chiang, C.M., Chi, L.M., Wu, W.G., 1997. Heparin and heparan sulfate bind to snake cardiotoxin. Sulfated oligosaccharides as a potential target for cardiotoxin action. *J. Biol. Chem.* 272, 1484-1492.
- Ploug, M., Ellis, V., 1994. Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. *FEBS Lett.* 349, 163–168.
- Ponchanugool, C., Limthongkull, S., Meemano, K., 1987. Clinical features of 37 non-antivenin treated neurotoxic snake bite patients. In: Gopalakrishnakone, P., Tan, C.K., (Eds.), *Progress in Venom and Toxin Research*, Singapore: Faculty of Medicine, National University, pp 46-51.
- Quinton, L., Girard, E., Maiga, A., Rekik, M., Lluet, P., Masuyer, G., Larregola, M., Marquer, C., Ciolek, J., Magnin, T., Wagner, R., Molgó, J., Thai, R., Fruchart-Gaillard, C., Mourier, G., Chamot-Rooke, J., Ménez, A., Palea, S., Servent, D., Gilles, N., 2010. Isolation and pharmacological characterization of AdTx1, a natural peptide displaying specific insurmountable antagonism of the alpha1A-adrenoceptor. *Br. J. Pharmacol.* 159, 316–325.
- Rajagopalan, N., Pung, Y.F., Zhu, Y.Z., Wong, P.T., Kumar, P.P., Kini, R.M., 2007. Beta-cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with beta-blocker activity. *FASEB J.* 21, 3685–3695.
- Rees, B., Samama, J.P., Thierry, J.C., Gilibert, M., Fischer, J., Schweitz, H., Lazdunski, M., Moras, D., 1987. Crystal structure of a snake venom cardiotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 3132-3136.
- Ricciardi, A., Le Du, M.H., Khayati, M., Dajas, F., Boulain, J.C., Menez, A., Ducancel, F., 2000.

- Do structural deviations between toxins adopting the same fold reflect functional differences? *J. Biol. Chem.* 275, 18302–18310.
- Rohling, E.J., Fenton, M., Jorissen, F.J., Bertrand, P., Ganssen G., Caulet J.P., 1998. Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature* 394, 162-165.
- Rouget, C., Quinton, L., Maïga, A., Gales, C., Masuyer, G., Malosse, C., Chamot-Rooke, J., Thai, R., Mourier, G., De Pauw, E., Gilles, N., Servent, D., 2010. Identification of a novel snake peptide toxin displaying high affinity and antagonist behaviour for the  $\alpha$ 2-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1361–1374.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Schneider, T.D., Stephens, R.M., 1990. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* 18, 6097-6100.
- Sivaraman, T., Kumer, T.K.S., Tu, Y.T., Peng, H.J., Yu, C., 1999. Structurally homologous toxins isolated from the Taiwan Cobra (*Naja naja atra*) differ significantly in their structural stability. *Arch. Biochem. Biophys.* 363, 107 -115.
- Stevens-Truss, R., Hinman, C.L., 1997. Activities of cobra venom cytotoxions toward heart and leukemic T-cell depend on localized amino acid differences. *Toxicon* 35, 659-669.
- Sue, S.C., Rajan, P.K., Chen, T.S., Hsieh, C.H., Wu, W., 1997. Action of Taiwan cobra cardiotoxin on membranes: binding modes of a beta-sheet polypeptide with phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 36, 9826-9836.
- Sunagar, K., Jackson, T.N.W., Undheim, E.A.B., Ali, S.A., Antunes, A., Fry, B.G., 2013. Three-fingered RAVeRs: Rapid Accumulation of Variations in Exposed Residues of snake venom toxins. *Toxins* 5, 2172-2208.
- Suzuki, Y., Gojobori, T., 1999. A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1315-1328.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Tjong, S.C., Wu, P.L., Wang, C.M., Huang, W.N., Ho, N.L., Wu, W.G., 2007. Role of glycosphingolipid conformational change in membrane pore forming activity of cobra

- cardiotoxin. *Biochemistry* 46, 12111-12123.
- Tsetlin, V., 1999. Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur. J. Biochem.* 264, 281-286.
- Vaz, G.G., 2000. Age of relict coral reef from the continental shelf off Karaikal, Bay of Bengal: Evidence of Last Glacial Maximum, *Curr. Sci.* 79, 228-230.
- Vincent, J.P., Schweitz, H., Chicheportiche, R., Fosset, M., Balerna, M., Lenoir, M.C., Lazdunski, M., 1976. Molecular mechanism of cardiotoxin action on axonal membranes. *Biochemistry* 15, 3171-3175.
- Vonk, F.J., Casewell, N.R., Henkel, C.V., Heimberg, A.M., Jansen, H.J., McCleary, R.J., Kerkkamp, H.M., Vos, R.A., Guerreiro, I., Calvete, J.J., Wüster, W., Woods, A.E., Logan, J.M., Harrison, R.A., Castoe, T.A., De Koning, A.P., Pollock, D.D., Yandell, M., Calderon, D., Renjifo, C., Currier, R.B., Salgado, D., Pla, D., Sanz, L., Hyder, A.S., Ribeiro, J.M., Arntzen, J.W., Van Den Thillart, G.E., Boetzer, M., Pirovano, W., Dirks, R.P., Spaink, H.P., Duboule, D., McGlinn, E., Kini, R.M., Richardson, M.K., 2013. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 20651-20656.
- Wang, C.H., Monette, R., Lee, S.C., Morley, P., Wu, W.G., 2005. Cobra cardiotoxin-induced cell death in fetal rat cardiomyocytes and cortical neurons: different pathway but similar cell surface target. *Toxicon* 46, 430-440.
- Warrell, D.A., Injuries, envenoming, poisoning, and allergic reactions caused by animals. 1996. In: Weatherall, D.J., Ledingham, J.G.G., Warrell, D.A., (Eds.), *Oxford Textbook of Medicine* 3rd ed., Oxford: Oxford University Press, pp 1124-1151.
- World Health Organization, 2007. Rabies and envenomings: a neglected public health issue. Report of a consultative meeting. World Health Organization, Geneva, p. 14.
- Wu, P.L., Lee, S.C., Chuang, C.C., Mori, S., Akakura, N., Wu, W.G., Takada, Y., 2006. Non-cytotoxic cobra cardiotoxin A5 binds to alpha(v)beta3 integrin and inhibits bone resorption. Identification of cardiotoxins as non-RGD integrin-binding proteins of the Ly-6 family. *J. Biol. Chem.* 281, 7937-7945.
- Wuster, W., 1996. Taxonomic changes and toxinology: Systematic revisions of the Asiatic cobras

- (*Naja naja* species complex). *Toxicon* 34, 399-406.
- Yasuda, O., Morimoto, S., Jiang, B., Kuroda, H., Kimura, T., Sakakibara, S., Fukuo, K., Chen, S., Tamatani, M., Ogihara, T., 1994. FS2, a mamba venom toxin, is a specific blocker of the L-type calcium channels. *Artery* 21, 287–302.
- Zupunski, V., Kordis, D., Gubensek, F., 2003. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett.* 547, 131–136.

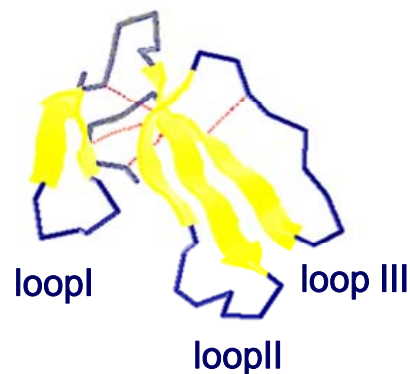
## 解 説

### コブラサイトトキシン

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、収縮心停止、劇症組織壊死、溶血など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ことが知られている。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  $\beta$  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 (図 1)。  $\beta$  ストランドにより形成された立体構造が手の指を三本下向きに立てた形に似ていることから、この構造

をもつタンパク質の一群を Three-finger toxin (3FTx) スーパーファミリーと呼ぶ。3FTx スーパーファミリーには、コブラ CTX のほか、コブラニューロトキシンやアセチルコリンエステラーゼを阻害剤するファシキュリンなども含まれる。

コブラ CTX には多くのアイソフォームが存在し、機能的にも分化している。その種類によっては、細胞膜成分中の異なる標的分子に結合し、細胞内器官に移動するという報告もあるが、細胞傷害の作用機序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 が溶血活性を持つことを考慮すると、CTX は様々な細胞の細胞膜に共通する成分に結合し、共通のメカニズムで毒性を発揮すると考えられる。



**図1. サイトキシンの分子モデル**

CTXは、5つの $\beta$ ストランド(黄)と3つのループ(青)を結ぶ、4つのジスルフィド結合(赤点線)からなる。

## 溶血毒の作用機序

タンパク質性の溶血毒素は、大部分が細菌の産生するものであり、医学的観点から多くの研究がなされている。図2に示すように、溶血毒素は酵素活性が関与するものと、細胞膜と直接相互作用するものに大きく分けられる。前者は、毒素が酵素そのものの場合と細胞内在性の酵素を活性化する場合に分けられるが、溶血に関係する酵素活性としては、リン脂質を分解するホスホリパーゼ活性がほとんどである（図3）。膜と相互作用する溶血毒素の多くは赤血球膜に穴をあけることにより溶血を引き起こす。赤血球膜に孔を形成する場合は、タンパク質/ペプチドがバレルのように中心管腔を作ることによって膜内外のリン脂質が繋がらないタルオケ型と、膜内外のリン脂質の親水性頭部がつながるドーナツ型に分類される（図4）。コブラ CTX では、溶血機構として膜孔形成を提唱する報告もあるが、証明はされておらず、また、膜孔を形成しない溶血機構はわかっていない。

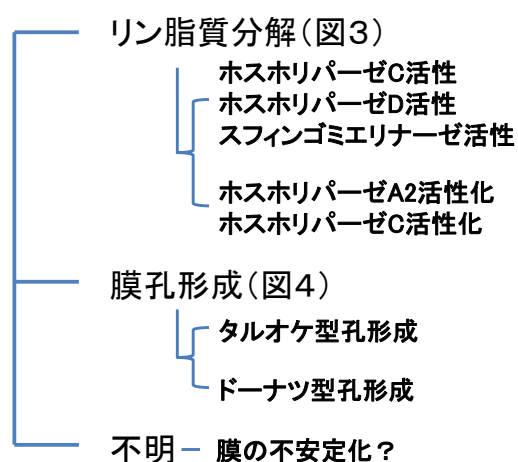


図2. 溶血活性のメカニズム

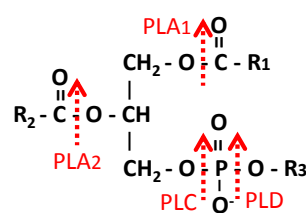


図3. ホスホリパーゼによるリン脂質の加水分解

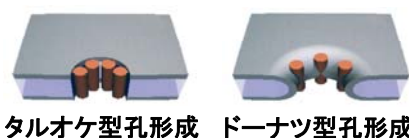


図4. 膜孔形成の模式図

文献(Yang et al, 2001)をもとに一部改変した。

## 本研究の目的と意義

本研究では、最も単純な細胞である赤血球に対する溶血活性を指標に、コブラ CTX の細胞傷害に関与するアミノ酸残基の持つ機能の役割を解析し、毒性発現のメカニズムを明らかにすることを目的とした。



## 結果と考察

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、含有量の多い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。

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(PS)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。PS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loop II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。

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、別個体の毒腺から作製した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箇所では置換がみられ、18箇所が非

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、 $\beta$  ストランドを安定化させる Tyr22 ( $\beta$  3)、Ile39 ( $\beta$  4)、Val52 ( $\beta$  5)、リン脂質結合に関与する Lys5、Lys12、Lys18、Tyr22、Lys35、Arg36、Cys38 と、Lys44、Lys50、Tyr51 は、いずれもよく保存されていた。

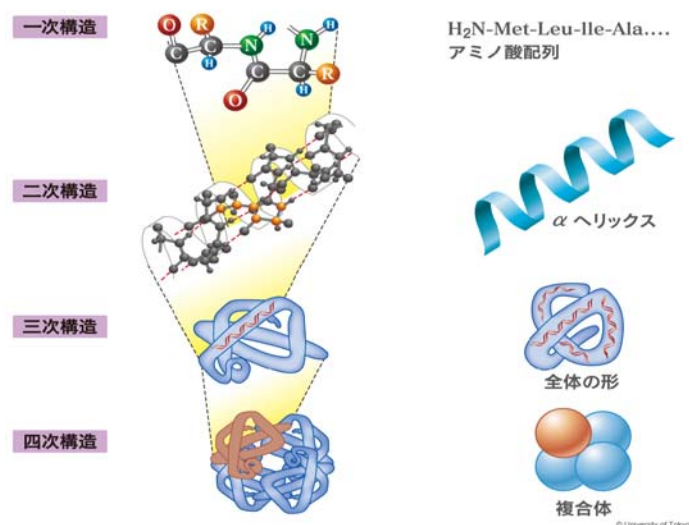
本研究により、コブラ CTX による毒性発現は、膜結合過程とリン脂質膜障害過程の2段階に分けられることが明らかになった。膜結合には  $\beta$  シートよりなるコア構造上のアミノ酸残基が関与し、膜障害過程には  $\beta$  シートをつなぐ3つのループ領域、特に、loop II が重要であることが示された。興味深いことに、 $\beta$  シートに対応するコドンは進化的に保存されており、ループ領域のコドンは加速進化していた。

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。

# 用語集

## タンパク質の構造

- ①一次構造：ポリペプチド鎖のアミノ酸配列
- ②二次構造：側鎖の関与しない、主鎖の2つアミノ酸のペプチド結合間における水素結合から形成される立体構造
- ③三次構造：タンパク質一本鎖の立体構造  
二次構造 ( $\alpha$  ヘリックスや  $\beta$  ストランド) やアミノ酸残基の側鎖が、疎水性相互作用、イオン結合、水素結合、ファンデスワールス力やジスルフィド結合によって三次元的に組み立てられた構造
- ④四次構造：複数のポリペプチド鎖（三次構造）が集中して一つのタンパク質を形成する構造



出典：「東京大学生命科学教育用画像集」

## タンパク質のモチーフ

タンパク質には、明確な高次構造をもたない特徴的な共通の配列や構造に機能をもつ領域が存在する。このような領域はモチーフと呼ばれ、高度に保存されておりタンパク質の機能を考える上で非常に重要な鍵となる。代表的なモチーフとして、遺伝子調節タンパク質の DNA 結合モチーフであるホメオドメイン、ヘリックス-ループ-ヘリックス (HLH)、ジンクフィンガー、ヘアピン  $\beta$  シートモチーフ等が知られている。

一般的に、単離されたモチーフはペプチドとして独立して機能することができ、モチーフを認識するタンパク質はモチーフの配列のみを認識して結合する (Kosugi and Yanagawa, 2010)。保存されたモチーフを見つけ出すことで、タンパク質間での機能の類似性を見つけ出し、未知のタンパク質の機能や機能部位を推測することができる。また、タンパク質の全体の構造がわからない場合は、各モチーフの構造を調べて組み合わせることで、全体の構造を予測する手助けが可能となる。

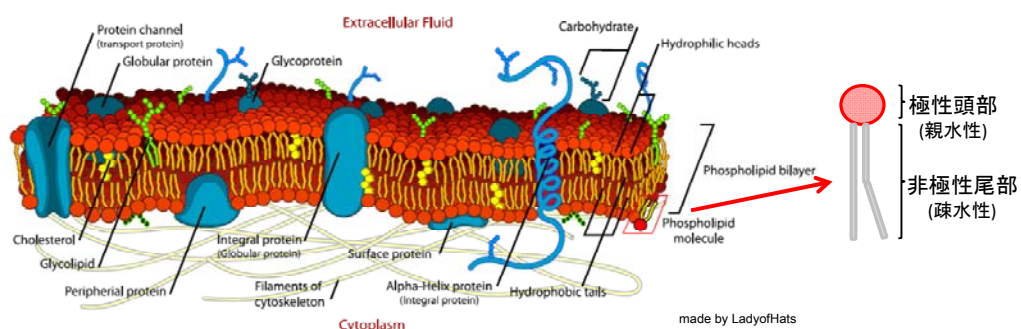
参考文献：小杉俊一，柳川弘志，2010. タンパク質モチーフ活性の予測とシグナル伝達解析. 生化学 第82 巻, p641-645.

## エピトープ (epitope)

エピトープとは、抗体が抗原を認識し、結合する抗原性をもつ領域であり、6 ～ 10 個のアミノ酸や5 ～ 8 個の単糖の配列から成る抗原決定基のことをいう。通常、1 つの抗原には複数のエピトープが含まれている。

参考資料：薬学用語解説 “<http://www.pharm.or.jp/dictionary/wiki.cgi>”

## 細胞膜の構造

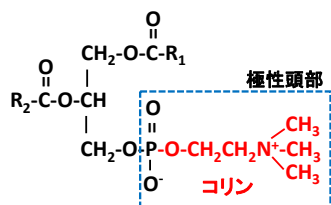


### 脂質二重膜の膜流動モデル (fluid mosaic model)

細胞表面を覆う膜の主成分は、リン脂質や糖脂質などの極性脂質とコレステロール、タンパク質等である。細胞膜を構成するリン脂質は、極性頭部（親水性）と非極性尾部（疎水性）からなり、疎水領域が水分子との結合できないために、結果として脂質二重膜を形成している。また、脂質二重膜を構成する分子は流動的であることが知られている。

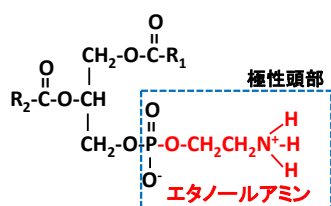
## 代表的な細胞膜リン脂質

### ①ホスファチジルコリン (Phosphatidylcholine, PC) :



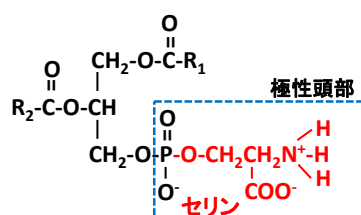
グリセロリン脂質の極性頭部にコリンがリン酸エステル結合しており、非極性部のグリセロール骨格に飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸がそれぞれ 1 つずつエステル結合した構造をしているリン脂質の総称である。細胞膜の主要な成分である。

### ②ホスファチジルエタノールアミン (Phosphatidylethanolamine, PE) :



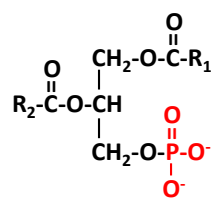
グリセロリン脂質の極性頭部にエタノールアミンがリン酸エステル結合しており、非極性部のグリセロール骨格に 2 つの脂肪酸がエステル結合しているリン脂質の総称である。中性リン脂質である。

### ③ホスファチジルセリン (Phosphatidylserine, PS) :



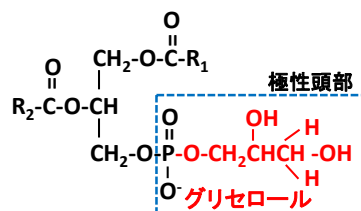
グリセロリン脂質の極性頭部にセリンがリン酸エステル結合しており、非極性部のグリセロール骨格に 2 つの脂肪酸がエステル結合しているリン脂質の総称である。酸性リン脂質である。

### ④ホスファチジン酸 (Phosphatidic acid, PA) :



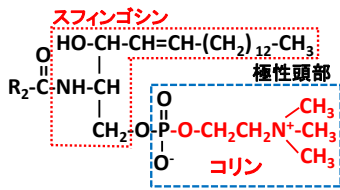
グリセロリン脂質の極性頭部のリン酸基に -OH が結合しており、非極性部のグリセロール骨格に 2 つの脂肪酸がエステル結合しているリン脂質の総称である。他のリン脂質の前駆体であり、酸性リン脂質である。

### ⑤ホスファチジルグリセロール (Phosphatidylglycerol, PG) :



グリセロリン脂質の極性頭部にグリセロールの OH 基がリン酸エステル結合しており、非極性部のグリセロール骨格に 2 つの脂肪酸がエステル結合しているリン脂質の総称である。酸性リン脂質である。

⑥スフィンゴミエリン (Sphingomyelin, SM) :



スフィンゴ脂質の極性頭部にコリンがリン酸エステル結合したリン脂質の総称である。非極性部では、アミノアルコールのスフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合している。

## 遺伝子の塩基置換率

①同義置換率 (Synonymous substitution rate, dS) :

同義置換とは、遺伝子のタンパク質コード領域においてアミノ酸配列の変化をおこさない塩基配列置換である。したがって、自然選択を受けない。同義置換サイトでの塩基置換率を同義置換率という。一般的に、同義置換は排除されにくい傾向にあり、ごく一部の偶然により変異が固定し、その数は時間に比例すると考えられている。

②非同義置換率 (Nonsynonymous substitution rate, dN) :

非同義置換とは、タンパク質のコード領域においてアミノ酸配列の変化を伴う塩基置換のことである。非同義置換サイトでの塩基置換率を非同義置換率という。一般的に、アミノ酸配列の変化を受ける塩基置換は有害と見なされ排除されやすい。

非同義置換は以下の自然選択を受けると考えられている。

- 1) 生存に有利に働く変異→集団広がり急速に固定される。
- 2) 中立な変異→同義置換と同様、偶然により固定される。
- 3) 生存に不利に働く変異→速やかに集団から除去される。