

# 沖縄島産ハブ(*Protobothrops flavoviridis*)個体からの 毒性成分 HR1B 検出

大城聡子・泉水由美子・盛根信也・寺田考紀・岩崎公典\*・平良東紀\*\*

## Analysis of HR1B in The Venom of Individual Okinawa Hubu *Protobothrops flavoviridis*

Akiko OSHIRO, Yumiko IZUMI, Nobuya MORINE, Koki TERADA, Hironori IWASAKI and Toki TAIRA

**要旨：**沖縄島の北部，中部，南部地域で捕獲されたハブ 6 個体から，それぞれ毒を採取し，遠心処理後，上清をハブ粗毒とし，各種クロマトグラフィーにより HR1A 画分および HR1B 画分にそれぞれ分離した．FPLC による最終画分の SDS-PAGE で 60kDa 付近にバンドが確認され，かつ特異的基質によるプロテアーゼ活性のあった画分に対し HR1A 特異的抗体，HR1B 特異的抗体で Western blotting を行った結果，4 個体は，HR1A 画分，HR1B 画分とも，それぞれ特異的抗体にのみ反応した．他の 1 個体から，HR1B 画分の抗 HR1B 特異的抗体との反応が確認できた．また，別の個体では，HR1B の反応のないハブ粗毒も存在した．

**Key words:** *Protobothrops flavoviridis*, Western blotting, Okinawa habu

## I はじめに

ハブ(*Protobothrops flavoviridis*)の毒には，出血活性，筋壊死，浮腫など多様な性質があり，これらを引き起こす毒性成分はタンパク質である．クサリヘビ科に属するハブやマムシは，これらのうち出血毒が主な毒性成分である．沖縄島産ハブと同種の奄美大島産ハブ毒の出血毒には，主要成分として HR1 が 2 種類存在しており，それぞれ HR1A, HR1B とよばれる．これまで沖縄島産のハブ毒には HR1A のみで，HR1B は存在しない<sup>1)</sup>とされてきたが，近年，沖縄島産のハブ毒にも HR1B が存在することが確認された<sup>2)</sup>．ただし HR1B が確認されたのは，沖縄島で捕獲された複数個体のハブ粗毒の混合物であることから，沖縄島産ハブの多くが微量の HR1B を持っているのか，あるいは HR1B を高濃度で持つ特異的な個体が存在するのかについては明らかにされていない．そこでまず沖縄島産ハブ 6 個体から粗毒を採取し，Western blotting による HR1B の検出行い，沖縄島における HR1B の分布状況を明らかにすることを目的とした．

## II 方法

### 1. 材料

本研究で飼育されている沖縄島産ハブ複数個体から採取した粗毒より，盛根ら<sup>2)</sup>の方法及びタイワンハブ毒の迅速検出方法<sup>3)</sup>に準じて精製された HR1A(以下，HR1A 標準品)及び奄美大島産ハブ複数個体から採取した粗毒

より HR1B を精製した．ここでは，示していないが LC/MS/MS によって精製 HR1B をタンパク質同定し，HR1B と確認した．よって，これを HR1B 標準品として用いた．

沖縄島の北部，中部，南部地域で捕獲されたハブ 6 個体から，それぞれ毒を採取し，2,200 rpm で 10 分間，4℃ で遠心処理後，上清をそれぞれハブ粗毒とした．

### 2. HR1A 標準品及び HR1B 標準品の Native-PAGE

HR1A 標準品，HR1B 標準品をそれぞれ 0.01 M Tris-HCl 0.01 M CaCl<sub>2</sub> pH 8.0 で各濃度に調整した．濃度調整した上記標準品を 2 μl，Tris-Glycine Native Sample Buffer(2x) 5 μl を加え，蒸留水を添加し Total volume を 10 μl にした．これを加熱せずに，Native-PAGE 試料とした．分離ゲルは，Novex Tris-Glycine gels, 1.0 mm 12well を用いた．分子量マーカーは，NativeMark Unstained Protein Standard (life technologies) を使用した．Running buffer は，10x Tris-Glycine Native Running Buffer 100 ml を蒸留水で 1000 ml に調整した．

泳動は，XCell SureLock Mini-cell (life technologies), パワーステーション III (アト株式会社) を用いて，125 V 定電圧を 2 時間の通電で行った．ゲルの染色は，沖縄島産ハブ毒の毒性成分 HR1b の分析検討<sup>4)</sup>に準じて行った．

### 3. 沖縄島産ハブ個体毎の粗毒の分離精製

盛根ら<sup>2)</sup>の方法及びタイワンハブ毒の迅速検出方法<sup>3)</sup>に準じて，上記の各ハブ粗毒を，0.01 M CaCl<sub>2</sub> buffer (pH

\*琉球大学熱帯生物圏研究センター

\*\*琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科

8.0) 10 ml で溶解し, 不溶性タンパク質を 10,000 rpm, 20 分で遠心分離後, 上清をゲルろ過クロマトグラフィー(26 mm × 90 cm packed with Sephacryl S-200 HR, Buffer : 10 mM CaCl<sub>2</sub> in 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0), Flow rate: 1.8 ml/ min (8 ml/ tube))に供した.

得られた各 Fraction を吸光度 280 nm と Takeya ら<sup>5)</sup>の消光性ペプチド(Nma-SPMLK(DnP)rr-NH<sub>2</sub>)(株式会社ペプチド研究所)を用いてプロテアーゼ活性を測定し, 活性を有する前半ピークを 0.5 M NaCl になるように調整し, 金属キレートアフィニティークロマトグラフィーでサンプルの吸着と溶出(0 mM-30 mM Imidazol in 0.01 M Tris-HCl 0.01 M CaCl<sub>2</sub> pH 8.0, 0.05 M NaCl)を行った.

そこで溶出された画分を透析後, さらに FPLC 陽イオン交換クロマトグラフィーにより分離を試みた. FPLC 陽イオン交換クロマトグラフィーは, カラム POROS S/20 4.6 mmD/100 mmL 1.662 mL) (BIO-RAD), Buffer は, running buffer : 0.01 M CaCl<sub>2</sub> in 0.01 M MES (pH 5.5), elution buffer: 0 M-0.25 M NaCl with running buffer, Flow rate: 10 ml/ min (5 ml/ tube), クロマトグラフィーシステム AKTA purifier (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社)を用いた.

#### 4. ハブ毒の SDS-PAGE 及びタンパク質の転写

SDS-PAGE 及びタンパク質の転写, ゲルの染色は, 沖縄島産ハブ毒の毒性成分 HR1b の分析検討<sup>4)</sup>に準じて行った.

#### 5. Western blotting による免疫反応検出

沖縄島産ハブ毒の毒性成分 HR1b の分析検討<sup>4)</sup>に準じて, FPLC で分離された HR1A 画分, HR1B 画分を抗 HR1B 特異的抗体による Western blotting を行った. 1次抗体は, 株式会社スクラム製 HR1A のペプチド抗体(ウサギ由来)(以下, HR1A 特異的抗体), 株式会社バイオゲート製 HR1B の抗ペプチド抗体(ウサギ由来)(以下, 抗 HR1B 特異的抗体) 8.0 ng/ml を 10 ml ずつ使用した.

発光法の基質は, Novex AP Chromogenic Substrate (BCIP/NBT) (life technologies)を用いた.

### III 結果と考察

#### 1. HR1A 標準品及び HR1B 標準品の Native-PAGE

HR1A 及び HR1B は, 分子量がそれぞれ 60,000, 等電点もそれぞれ 4.4 であり, 性質が似ていることが報告されている<sup>5)</sup>. そこで, 本実験で用いる HR1A, HR1B 標準品の Native-PAGE による分離と, 泳動パターンの確認を行った(図 1). その結果 Native-PAGE においては, HR1A と HR1B は, 異なる泳動パターンを示すことが明らかに

なった.

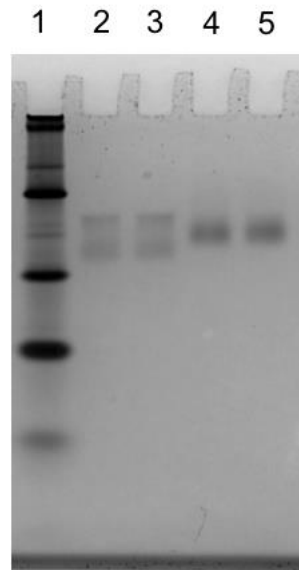


図1.沖縄島産ハブ毒 HR1A及び奄美島産ハブ毒HR1BのNative-PAGE. Lane 1: Ladder maker, Lane2, 3 : 沖縄島産ハブ毒HR1A, Lane4,5 : 奄美島産ハブ毒HR1B

#### 2. 沖縄島産ハブ個体毎の粗毒の分離精製

沖縄島の北部, 中部, 南部地域の 6 地域から捕獲された沖縄ハブ 6 匹より, 採取された各粗毒をそれぞれ, ゲルろ過クロマトグラフィー, 金属キレートアフィニティークロマトグラフィー, FPLC 陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて分離を行った.

図 2, 3, 4 に, 北部地域で捕獲された沖縄ハブ 1 匹より採取した粗毒のゲルろ過クロマトグラフィー, 金属キレートアフィニティークロマトグラフィー, FPLC 陽イオン交換クロマトグラフィーを示す. この粗毒は, 沖縄島産ハブ毒の毒性成分 HR1b の分析検討<sup>4)</sup>において, 粗毒 0.5 µg 以上の濃度で, 抗 HR1B 抗体による Western blotting の反応が確認されたものである.

図 5 に, 図 4 で得られた各 fraction の SDS-PAGE と Western blotting を示す. HR1A が含まれる fr1 及び fr2 は, 図 5(A)より, L10 と L11 で 60kDa 付近にバンドが検出され, 抗 HR1A 特異的抗体による Western blotting では検出されたが(図 5(B)), 抗 HR1B 特異的抗体による Western blotting では検出されなかった(図 5(C)).

同様に, fr9 及び fr10 を SDS-PAGE, Western blotting を行った結果, fr1 及び fr2 と同様, L8,L9 で 60kDa 付近にバンドが検出され(図 5(A)), 抗 HR1A 特異的抗体による Western blotting では, 検出されず(図 5(B)), 抗 HR1B 特異的抗体による Western blotting では, 検出された(図 5(C)).

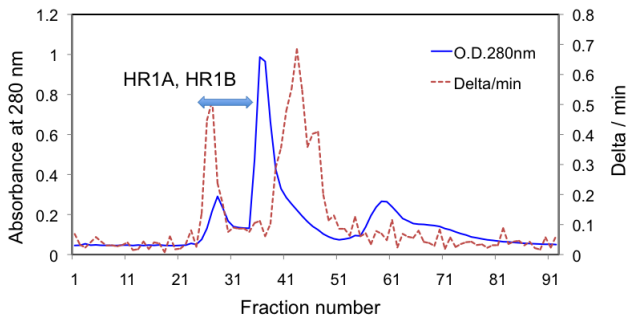


図2.沖縄島北部地域で捕獲されたハブ1個体から採取した粗毒のゲルろ過クロマトグラフィー。 Sample : 637  $\mu$ l, 1125.5 mg/ml (UV method), Column : 26 mm X 900 mm packed with Sephacryl S-200 High Resolution, Buffer : 0.01M Tris - HCl 10 mM CaCl<sub>2</sub> pH 8.0, Flow : 1.8 ml/10 min, 8 ml/tube, Delta : The increase in fluorescence intensity

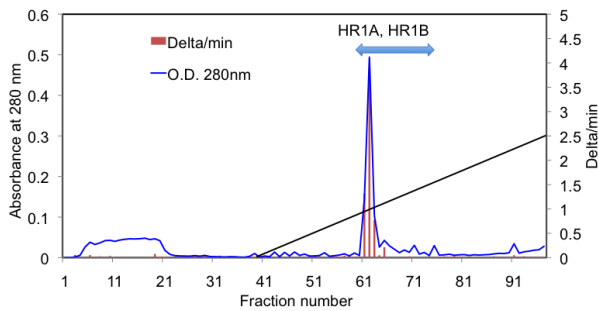


図3.ゲルろ過クロマトグラフィーで得られたHR1画分の金属キレートアフィニティークロマトグラフィー。 Sample : HR1 from gel filtration Fr. 25-33 in 0.01M Tris HCl 10mM CaCl<sub>2</sub> , 0.5MNaCl pH8.0, 80ml Column : 16.5mm x 11cm packed with Zn<sup>2+</sup> Chelating Sepharose Fast Flow, Elution : 0 - 30mM Imidazol with running buffer, gradient total 300ml, Flow rate : 18ml/h (5ml/tube), Delta : The increase in fluorescence intensity.

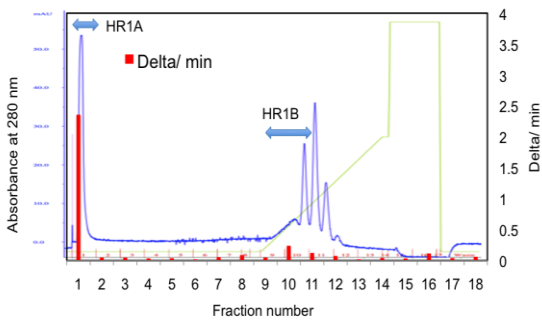


図4.金属キレートアフィニティークロマトグラフィーで得られたHR1画分のFPLC 陽イオン交換クロマトグラフィー。 Sample : Fraction from IMAC Fr No.61 - 75 Column: POROS S/20 (4.6mmD/100mmL 1.662mL) Buffer : Running buffer 0.01M CaCl<sub>2</sub> in 0.01M MES (pH5.5), elution 0 - 0.25M NaCl with running buffer Flow rate: 10ml/min, 5ml/tube Delta: The increase in fluorescence intensity

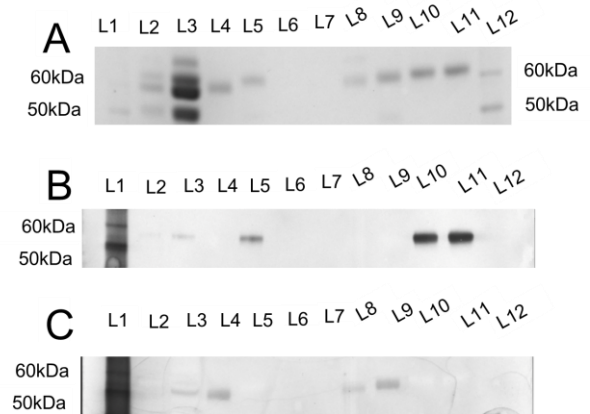


図5.FPLC 陽イオン交換クロマトグラフィーで精製されたHR1A及びHR1BのSDS-PAGE, Western blotting (A: SDS-PAGE, B and C: Western blotting). L1: MagicMark XP protein standard, L2: crude 2, L3:crude 1, L4: HR1B, L5 HR1A, L6: fr12, L7: fr11, L8: fr10, L9: fr9, L10: fr2, L11: fr1, L12: Novex sharp unstained protein standard marker. (A) CBB stain one, (B and C) ブロッキング溶液: WesternBreeze blocker/diluent( A and B), 1次抗体:(A) 抗HR1A抗体 8.0  $\mu$ g/ml 10 ml, (B) 抗HR1B抗体 8.0  $\mu$ g/ml 10ml, 2次抗体:抗ウサギ IgG (全分子)抗体-ペルオキシダーゼ標識 1:5,000 10ml, 基質:Novex HRP Chromogenic Substrate(TMB).

ここでは示していないが、図 5(A) L8(fr10)及び L9(fr9)を SDS-PAGE で検出されたバンドを切り取り、抽出後、LC/MS/MS によるタンパク質の同定を行った。この分析により、fr9 及び fr10 に HR1B が含まれていることが分かった。以上の結果より、本実験で用いた北部地域で捕獲された沖縄ハブ 1 個体には、HR1B が含まれていることが強く示唆された。

沖縄島の北部、中部、南部地域で捕獲されたハブ 5 個体から、上記の方法と同様に、それぞれの粗毒を各種クロマトグラフィーにより HR1A 画分および HR1B 画分にそれぞれ分離した。FPLC による最終画分の SDS-PAGE で 60 kDa 付近にバンドが確認され、かつ特異的の基質によるプロテアーゼ活性のあった画分に対し HR1A 特異的抗体、HR1B 特異的抗体で Western blotting を行った結果を表 1 に示す。その結果 3 個体は、HR1A 画分、HR1B 画分とも、それぞれ特異的抗体にのみ反応した。他の 1 個体は、HR1B 画分において、抗 HR1B 特異的抗体と反応が確認された。また、別の個体では、HR1B の反応のないハブ粗毒も存在した。この結果より、HR1B を産生しないかもしくは、含有量が極端に少ない個体が存在すると推測される。

表1. Western blottingによる5地域(5個体)の沖縄島産ハブ粗毒中に含まれるHR1B検出結果. 検出 +, 不検出 N.D.

	南部地域	中部地域	中部地域	中南部地域	北部地域
	I市	C町	N町	不明	K村
HR1B (125ng/μl/lane以上)	+	N.D.	+	+	測定未実施
FPLC吸着画分に60kDa 付近のバンドが 検出された	+	N.D.	+	+	+

#### IV 謝辞

試験溶液等の調整にご協力いただきました宜保秀樹氏に深謝いたします.

#### V 参考文献

- 1) Seiji Sadahiro and Tamotsu Omori-Satoh, *Toxicon*, Lack of a hemorrhagic principle in habu snake venom, *Trimeresurus flavoviridis*, from the okinawa island. 18: 366-368 (1980).
- 2) Nobuya Morine, Seiko Matsuda, Koki Terada, Hironori Iwasaki and Hirotsuke Oku, The Occurrence of HR1b in the Venom of the Snake Okinawa Habu (*Protobothrops flavoviridis*). *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 72(2),591 - 594 (2008).
- 3) 大城聡子・泉水由美子・盛根信也・寺田考紀(2015). タイワンハブ毒の迅速検出の検討, 沖縄県衛生環境研究所報, 第49号, 56-60.
- 4) 大城聡子・上江洲由美子・盛根信也・寺田考紀・岩崎公典(2014). 沖縄島産ハブ毒の毒性成分HR1bの分析検討, 沖縄県衛生環境研究所報, 第48号, 42-45.
- 5) Hiroyuki Takeya, Shinji Nishida, Norikazu Nishino, Yuichi Makinose, Tamotsu Omori - Satoh, Toshiaki Nikai, Hisayoshi Sugihara and Sadaaki Iwanaga (1993). Primary Structures of Platelet Aggregation Inhibitors (Disintegrins) Autoproteolytically Released from Snake Venom Hemorrhagic Metalloproteinase and New Fluorogenic Peptide Substrates for These Enzymes. *J. Biochem.*, 113:473-483.
- 6) 松田道生, 鈴木宏治, 止血・血栓・線溶, 株式会社中外医学社, p445(1994).