

マムシ属ヘビ血清中の fetuin ファミリータンパク質の構造と機能

寺田 成之*・青木 成留実・木原 健二・坂本 清香・堀 晋一・弟子丸 正伸*

(平成18年6月28日受理)

Structure and Function of Fetuin-family Proteins in Sera of Clotalinae Snakes

Shigeyuki TERADA*, Narumi AOKI, Kenji KIHARA, Sayaka SAKAMOTO, Shin'ichi HORI,
and Masanobu DESHIMARU*

(Received June 28, 2006)

Abstract

Various proteins that prevent precipitation of calcium phosphate and calcification in blood vessel and soft tissues exist in the sera of most of mammals. Fetuin is a typical protein with such a function. Fetuin-family proteins are composed of human α_2 -Heremans Schmid glycoprotein, several fetuins from animals and carp, and antihemorrhagic factors in snake sera. They all have two cystatin-like domains at the N-termini. An antihemorrhagic factor HSF can inhibit the action of venomous hemorrhagic factors, but shows no inhibitory activity of calcification. We have isolated a new antihemorrhagic factor (MSF) from the serum of Chinese mamushi (*Gloydius bromhoffi brevicaudus*). We have also purified an HSF-like protein (HLP) from the same serum as a new member of the fetuin family, and determined most of the primary structure. The similar protein was also found in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*. Both mamushi and habu HLPs showed no inhibitory activity to hemorrhagic factors or to several metalloproteinases. A series of cDNAs encoding MSF and mamushi HLP have been cloned from the liver mRNAs based on their amino acid sequences. A clone encoding an additional HLP was found in mamushi cDNAs. HLP suppressed the precipitation of calcium phosphate, suggesting that HLP is the true fetuin in the snake serum. The evolutionary relationship between HSF / MSF and HLP will also be discussed.

Key words : antihemorrhagic protein, calcification inhibition, fetuin, HSF-like protein, snake serum

* 福岡大学理学部化学科
Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180,
Japan

序 論

体液中のカルシウムイオンとリン酸イオンの濃度は数 mM で、リン酸カルシウム $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の溶解度積 ($K_{sp} = 2 \times 10^{-29}$) から考えて極めて高い状態にある。従って、体内でのリン酸カルシウムの析出は、促進するような機構ではなく、むしろ析出を積極的に抑制する機構に依存している¹⁾。このような過飽和状態の体液中でのリン酸カルシウムの析出やアパタイト形成 (石灰化, calcification) を抑制するタンパク質として、matrix Gla protein²⁾, fetuin^{3,4)}, ANK⁵⁾, osteoprotegerin⁶⁾, bone morphogenetic protein-7⁷⁾ などが知られている。

最初、ウシ胎児血清中に発見された fetuin は胎児血清中の主要な糖タンパク質である⁸⁾。その後、同様のタンパク質がヒツジ、ブタ、ラット、マウスなど他の哺乳類でも見出された⁹⁾。一方、ヒトでは従来から知られていた α_2 -Heremans Schmid 糖タンパク質 (α_2 -HSG*)¹⁰⁾ がウシ fetuin と高い相同性を示すことが明らかになり^{11,12)}、 α_2 -HSG はヒト fetuin と呼ばれるようになった。さらに、ヒトやげっ歯類で第2の fetuin として fetuin-B が発見され¹³⁾、そのため α_2 -HSG は fetuin-A と改名されるに至った。ヒト fetuin-A と fetuin-B は一次構造が異なるものの、ほぼ同様な機能をもつとされている。fetuin は N 端にシスタチン様ドメインが2回繰り返り、C 端に第3のドメインをもつ構造をしている。これと類似のドメイン構造をもつタンパク質を fetuin ファミリータンパク質と呼ぶ。

HSF はハブ (*T. flavoviridis*) 血清から抗出血因子として単離された糖タンパク質であり¹⁴⁾、fetuin と同様、N 端に2つのシスタチン様ドメイン、C 端に His-rich ドメインをもつことから、ハブの fetuin とされてきた¹⁵⁾。しかし、HSF 自体にはリン酸カルシウムの析出抑制作用がなく、fetuin そのものとは考え難いものであった。その後、同じマムシ属のヤララカ (*B. jararaca*) の血清から精製された BJ46a も HSF と大変よく似た

アミノ酸配列をしていた¹⁶⁾。これまで、抗出血作用にどのドメインが関わっているかは不明であったが、我々は化学修飾により、シスタチン様ドメイン1が抗出血活性や金属プロテアーゼ (MP) 阻害活性に重要であることを証明した¹⁷⁾。

以前、我々は日本マムシ (*G. bromhoffii*) 血清から、HSF と類似の抗出血性タンパク質 (mamushi serum factor, MSF) を精製し、その cDNA をクローニングした¹⁸⁾。今回、さらに中国マムシ (*Gloydus brevicaudus*) 血清から MSF を精製し、その大部分のアミノ酸配列を決定した。MSF の全一次構造は、MSF をコード化している cDNA クローンの塩基配列から確定した。MSF は、HSF や BJ46a などの fetuin ファミリータンパク質と高い相同性を示した。一方、MSF を精製する過程で、中国マムシ血清中に抗出血因子作用や金属プロテアーゼ阻害活性をもたない新規のタンパク質を見出した。このタンパク質を HSF-like protein (HLP) と名づけ、一次構造を明らかにするとともに、マムシ肝臓から HLP をコードする cDNA をクローニングした。その結果、マムシには2種の良く似た HLP が存在することが明らかとなったので、これらを HLP-A および -B とした。HLP-A と類似のタンパク質はハブ血清中にも存在していた。HSF と比較すると、HLP-A や MSF の His-rich ドメインには17残基の欠失が存在した。一方、マムシ HLP-B は His-rich ドメインにニックが入ったヘテロ二量体で存在することが分かった。マムシ HLP-B には、ウシ fetuin と同程度の強いリン酸カルシウム形成抑制活性が認められた。

実 験

1. 材料

ハブ血清および肝臓は奄美および徳之島 (鹿児島) で採取した。中国および日本マムシの血清や肝臓はスネークセンター (群馬) から購入した。

*略号: BSA, ウシ血清アルブミン; HLP, HSF 様タンパク質; HSF, ハブ血清抗出血因子; MP, メタロプロテアーゼ; MSF, マムシ血清抗出血因子; RACE, Rapid Amplification of cDNA End; RT-PCR, 逆転写 polymerase chain reaction; TFA, トリフルオロ酢酸。

2. 血清のエタノール分画

既知の報告¹⁹⁾に従い、血清をエタノール分画法により5つの分画に分けた。マムシまたはハブ血清 50 ml に氷冷エタノール 37.5 ml をゆっくり加え、1時間攪拌後、遠心した。その沈殿を E_{0.75}とした。さらに、上清に氷冷エタノール 12.5 ml を加え、同様にして沈殿分画 E_{1.0}を得た。この操作を繰り返し、沈殿分画 E_{1.25}, E_{1.5}, E_{2.0}を得た。

3. カラムクロマトグラフィー

逆相 HPLC は YMC-Pack ODS-AM (0.46 × 25 cm, YMC) カラムを用い、流速 1.0 ml/min で 0.1%TFA と 80%アセトニトリル-0.1%TFA のグラジエントで行った。カラムとして YMC-Pack C8 (1.0 × 15 cm, YMC) や μ Bondasphere C8-300 Å (1.9 × 15 cm, Waters) を用いた場合は、流速を 3.0 または 5.0 ml/min とした。タンパク質は 230 nm または 280 nm で検出した。

ゲルろ過は、50 mM Tris - HCl (pH 7.4) で緩衝化した Sephacryl S-200 HR カラムを用いて行った。目的のタンパク質を含む分画を集め、水で透析した後、凍結乾燥した。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

12%アクリルアミドゲルを用い、Laemmli の方法²⁰⁾で行った。クマシーブリリアントブルー R250 で染色し、10%酢酸で脱色した。分子量マーカーとしてウシ血清アルブミン (67 kDa)、卵白アルブミン (45 kDa)、カルボニックアンヒドラーゼ (30 kDa)、トリプシノーゲン (24 kDa)、大豆トリプシン阻害剤 (20.1 kDa)、卵白リゾチーム (14.3 kDa) を使用した。

5. 一次構造解析

試料を 6 M 塩酸グアニジン -10 mM EDTA-0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶かし、S-S 結合をジチオスレイトールで切断後、4-vinylpyridine と反応させて S-ピリジルエチル化した²¹⁾。ピリジルエチル化タンパク質を BrCN による分解や各種プロテアーゼで消化し、断片ペプチドを逆相 HPLC で分離した。各ペプチドのアミノ酸配列はタンパク質自動シーケンサー (島津) を用いて決

定した。

6. cDNA クローニング

ヘビ肝臓から、酸性グアニジン-フェノール-クロロホルム法²²⁾で全 RNA を単離した。完全長 cDNA は、肝臓 RNA から BD SMART RACE cDNA ライブラリー増幅キット (Clontech) を用いて、逆転写 PCR (RT-PCR) 法²³⁾で合成した。pBluescript II ベクターに挿入する前に、cDNA の部分断片を PCR 法で増幅した。増幅した DNA 断片の長さはアガロースゲル電気泳動で見積った。

HSF の既知配列に基づいてつくったオリゴヌクレオチドや 3'-および 5'-アダプター配列に特有なオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて 3'-RACE や 5'-RACE 法²³⁾により MSF の配列を決定した。さらに、5'-RACE から得られた2つの HLP クローンの塩基配列と MSF の塩基配列を基にマムシ HLP のクローニングを行った。塩基配列は ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems Inc., CA, USA) と ABI PRISM BigDye377DNA Sequencing システム (Perkin Elmer, CA, USA) を用いて決定した。

7. リン酸カルシウムの析出抑制 assay

最終濃度が 2.5 mM の塩化カルシウムと 1.8 mM のリン酸二水素カリウムの水溶液をつくり、これに最終濃度が 200 μ g/ml になるようにウシ fetuin, ウシ血清アルブミン (BSA), またはハブ HLP を加えて室温で放置した。24時間後、リン酸カルシウムの結晶の様子を共焦点顕微鏡を用いて観察した。

放射性 Ca を用いた沈殿抑制試験は次のように行った²⁴⁾。試料タンパク質を含む 4.8 mM CaCl₂-⁴⁵CaCl₂ (2 × 10⁶ cpm) -1.6 mM Na₂HPO₄-50 mM Tris-HCl (pH 7.4) を 37°C, 90 分インキュベートした。沈殿を 15,000 rpm で 5 分遠心して集め、1%酢酸に溶かしてから、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

8. ヒドロキシアパタイトへの結合試験

2 ml のヒドロキシアパタイト (日本ケミカル, 東京) をカラムにつめ、ウシ fetuin, ハブ HLP, アルブミンをそれぞれ 2 mg ずつ流した。リン酸

緩衝液の濃度を最初 10 mM, 以下 50 mM, 100 mM, 300 mM と上げ, 溶出液を 1 ml ずつ分画して, 280 nm の吸光度を測定した.

結 果

1. 中国マムシ血清抗出血因子 の精製と cDNA クローニング

最も MP 阻害活性が強いエタノール分画 E_{1.5} を, YMC-Pack C8 カラムを用いた逆相 HPLC にかけた (図 1 A). 各溶出ピークの MP 阻害活性を調べると, ピーク 6 にだけ強い活性があった. ピーク 6 から回収した活性物質は SDS-PAGE で約 48 kDa にバンドを与えた (図 1 B). この値は以前報告した日本マムシ MSF と同じであった¹⁸⁾. さらに中国マムシ MSF をゲルろ過で精製し, 純粋なタンパク質を得た (図略).

精製した MSF を還元-ピリジルエチル化後, リシルエンドペプチダーゼで消化した. 消化物を YMC-Pack ODS-AM (0.46 × 25 cm, YMC) を用いた逆相 HPLC にかける, 断片ペプチドを分離し, それらのアミノ酸配列を決定した. その結果, MSF は HSF と相同性が高いことが分かった. しかしながら, 全ての断片を得ることが出来なかったため, 全配列を決定するにはいたらなかった. そこで, cDNA クローニングによって全配列を推定することにした.

中国マムシ肝臓から RNA を抽出し, MSF をコードする mRNA の部分配列を RT-PCR 法により増幅した. 報告済みの HSF 塩基配列²⁵⁾ と天然の MSF のアミノ酸配列より, シスタチン様ドメイン 2 の前半部分に特異的なプライマーを設計し, 5'-RACE 法および 3'-RACE 法で全長の配列を決定した (図 2).

MSF をコードする cDNA は ORF (タンパク質配列相当部分の配列) が 1029 塩基対から成り, 19 残基のシグナルペプチドをもっていた. 成熟タンパク質は 303 残基で, 14 個の Cys 残基が 7 つの S-S 結合を形成し, N 型糖鎖結合部位が 2 ヶ所存在した (図 3). アミノ酸配列から, MSF は N 端に 2 つのシスタチン様ドメインを, C 端に His-rich ドメインをもち, fetuin ファミリーに属することが分かった. また, His-rich ドメインに 17 残基の欠失が見られ, 欠失の直後に新たな S-S

結合が 1 つ存在していた. さらに, 日本マムシ MSF (jMSF) と中国マムシ MSF (cMSF) は 5 残基が違うだけで, 97% の残基が一致した (図 3).

2. マムシ血清 HLP の精製と構造解析

マムシ血清のエタノール分画 (E_{1.5}) の逆相 HPLC において, MSF (図 1A のピーク 6) よりも前に溶出するピーク 2 とピーク 5 のタンパク質は 68 ~ 70 kDa にバンドを与えた (図 1B). それらの N 末端アミノ酸配列を解析したところ, ピーク 2 からは 2 つの配列が読み取れた (図 1C). ピーク 2 タンパク質は 2 本鎖構造をしていると思われる.

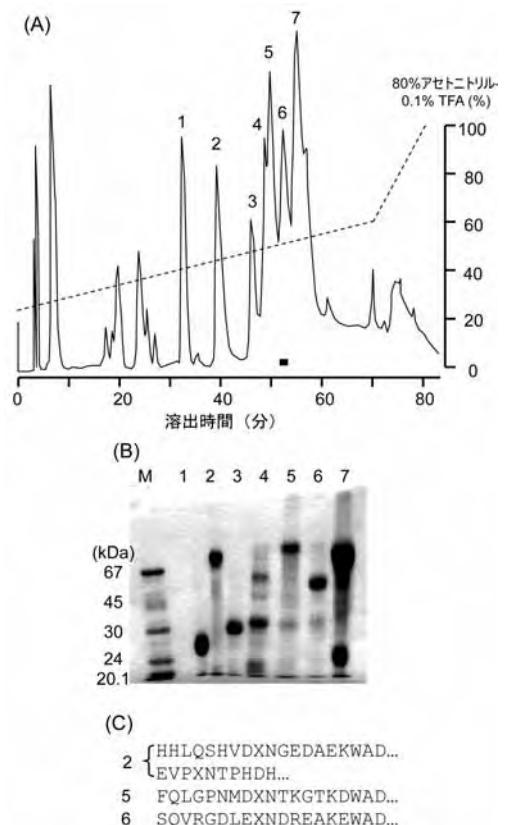


図 1 (A) マムシ血清エタノール沈殿分画 E_{1.5} の逆相 HPLC. カラムは YMC-Pack C8 (1.0 × 15 cm) を用いた. MP 阻害活性を示したピークを太下線で示す. (B) HPLC のピーク 1 ~ 7 の SDS-PAGE. M は分子量マーカー. (C) ピーク 2, 5, および 6 のタンパク質の N 末端アミノ酸配列.

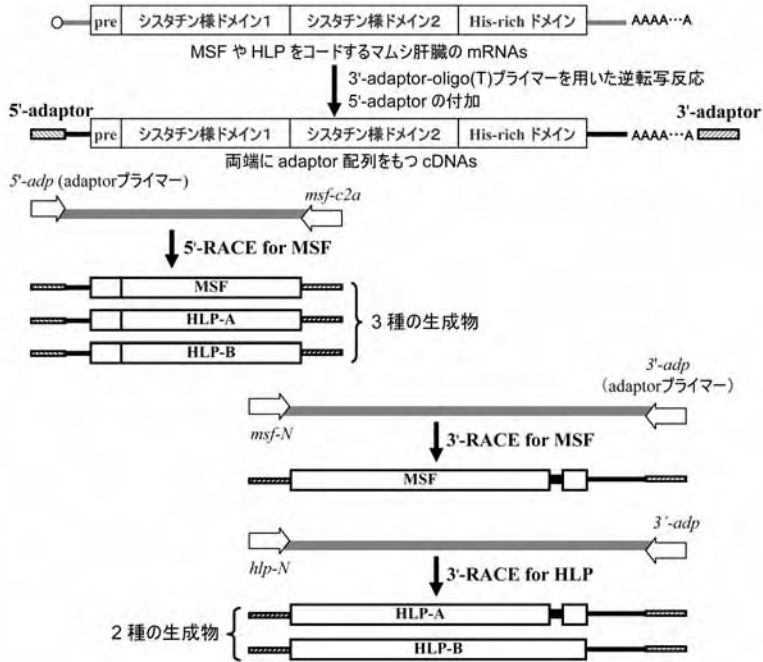


図2 中国マムシ抗出血因子 MSF および HLP の cDNA クローニング.

| シスタチン様ドメイン1 | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
|-------------|---------------------------|----------------|----------------------|-------------------------|------------------|--------------------|---------------|-----------|----|----|-----|-----|-----|
| HSF | SOVRGDLECDCKEAKNWADDAVRYI | NEHKLHGKQALNVI | KNICVVPWNGDLVAVFLELN | LLTECHVLDPTPEVKCTVROQHN | HAVEMDCDAKIMFN | VETFKRDFVFKCHSTPDS | VENVRR | | | | | | |
| BJ46a |E·D·E·T·TG..... |Y·Y..... |V·D·W·K..... |KN·P·P..... |V·D·E·A· |D·D· |H·E· | | | | | | |
| jMSF |R·E·Q·..... |EY·..... |V·K..... |I·P·Q·..... |D·T·Q·..... |D·D· |D·D· | | | | | | |
| cMSF |N·R·E·Q·..... |EY·..... |V·K..... |I·P·Q·..... |D·Q·..... |D·D· |D·D· | | | | | | |
| habu HLP | F·LGPND·NT·GT·D· | ·IG·..... | ·Y·..... | IFRLL·SD·RS·IFHFN |S·N·P· | NVR·IHDIT·EDE |S·G·G·IL | | | | | | |
| cHLP-B | HHLQSHVD·NGED·EK·M·H· | ·H· | ·Y·VF·NE·H·L·RRPRGK | II·K· |N· | PP·Y·G·V·LHD | ·GVDKVI | GA·D·D· | | | | | |
| cHLP-A | F·LGPND·NT·GT·D· | ·IG·..... | ·D·Y·N·I· | IFRLL·SD·RS·I·HGK |K· |N·AV· | NVR·IHDIA·EDE |K·K· | | | | | |
| | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |

| シスタチン様ドメイン2 | | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
|-------------|-------------------------|-------------|--------------------|--------------------|---------------|--------------------|------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| HSF | NCCKPILLLPPNPHVDSVEYVLN | KNKNEKLSGHI | YEVLEISRGQHYEPEAYL | EFVIVEINCTAQEAHDDH | HOCHPYTAGEDHI | AFORSTVFRSHASLEKPK | DEFESNCVIL | LDVKDG | | | | | |
| BJ46a |P·S·Q·..... |D·V· |F·V·A·V· |L·H·N·N· |G·A· |D·Q·D· |H·E· | | | | | | |
| jMSF |P·S·RD·..... |Q·V· |F·V·A·V· |H·N· |KA· |H·N·D· |E· | | | | | | |
| cMSF |L·S·SD·..... |Q·V· |F·V·A·V· |H·N· |KA· |H·N·D· |E· | | | | | | |
| habu HLP |P·S·D·..... |Q·V· |F·V·A·V· |I· |Y· |D·V· |E· | | | | | | |
| cHLP-B |P·LSD·..... |V· |F·V·A·V· |H·N· |N·G·A· |Q·D·F· |E· | | | | | | |
| cHLP-A |P·LSD·..... |V· |F·V·A·V· |R·G· |A· |N·D· |E· | | | | | | |
| | | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |

| His-rich ドメイン | | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 |
|---------------|----------------------------|----------------------|-----------|------------------|-------------------|---------|---------|-----|-----|
| HSF | HAHSHLIIQGHIEKNSISPEHNI | ITILNFVHPDDHTSTSHESH | —EHA | EVPPVVKKELPTDISD | HHTTPVKGCPGVHFKLY | | | | |
| BJ46a |V·D· |N·A· |HND· |L· |A· |K· |E· | | |
| jMSF |EH·G·Y·T·GQ·S·V· |C·C·A·N·V· |R· |IL· |Q· | | | | |
| cMSF |EH·G·Y·T·GQ·S·V· |C·C·A·N·V· |R· |IL· |Q· | | | | |
| habu HLP |EH·VG·Y·T·GY·S·D· |C·V·C·A·N·V· |N·P· |R·E·Q· | | | | | |
| cHLP-B |EH·GMVNT·G·N·V·LAHSHN | ·A· | SH· | AVA·R·V·NTPHD | ·H·L· | | | | |
| cHLP-A |Y·T·G·S·D· |Y·V·C·A·E·V·M· |D·P· |RVL·Q· | | | | | |
| | | * | * | * | * | * | * | * | * |

図3 ヘビ血清 fetuin ファミリータンパク質の1次構造の比較。
 HSF, ハブ抗出血因子; BJ46a, *Bothrops jararaca* 抗出血因子; jMSF, 日本マムシ抗出血因子; cMSF, 中国マムシ抗出血因子. 同一残基を点で示す.
 *は, 全てのタンパク質で保存されている残基.

一方、ピーク 5 も MSF と類似の N 末端配列を与えた (図 1C)。MSF との配列の類似性にもかかわらず、ピーク 2 やピーク 5 には全く MP 阻害活性が見られなかったため、これらのタンパク質を HLP (HSF-Like Protein) と命名した。ピーク 5 の HLP (70 kDa) を HLP-A、ピーク 2 の HLP を HLP-B とし、それらの構造を調べることにした。

MSF の場合と同じようにして、中国マムシ HLP のアミノ酸配列を解析した。しかし、全構造決定までには至らなかった。そこで、中国マムシ肝臓から HLP の cDNA をクローニングし、全体の構造を決めることにした。前に述べた MSF の塩基配列決定のための cDNA クローニングの際に、5'-RACE 法で MSF を含む 3 つのクローンを得た (図 2)。1 つは MSF で、他の 2 つは MSF と相同性のある cDNA であった。ヌクレオチド配列から、2 つの cDNA のうち N 末端が Phe のものが HLP-A、His のものが HLP-B をコードすることが分かった。

分子の後半部分の配列を決定するために、5'-RACE 法で得られた HLP-A、-B クローンの塩基配列と MSF の塩基配列を基に HLP に特異的な primer を設計し、3'-RACE 法を行った。その結果、HLP-A の cDNA の ORF は 1032 塩基対から成り、19 残基のシグナルペプチドと 303 残基の成熟タンパク質をコードしていた (図 3)。一方、HLP-B の cDNA の ORF は 1086 塩基対から成り、19 残基のシグナルペプチドと 321 残基の成熟タンパク質をコードしていた。HLP-B の配列は、天然タンパク質 HLP-B のアミノ酸配列と一致した (図 1C)。HLP-B は、His-rich ドメインの Lys²⁹⁷-Arg²⁹⁸ 間に切れ目の入った 2 本鎖構造をしていることが確認された。アミノ酸配列分析の結果と考え併せると、HLP-B には N 型糖鎖結合部位が 3 ヶ所、C 端領域に O 型糖鎖結合部位が 2 ヶ所存在することが分かった。

3. ハブ血清 HLP の精製と全一次構造の決定

マムシ血清から 2 種の HLP を得たが、ハブ血清中にも同様なタンパク質が存在すると考え、エタノール分画物を調査した。その結果、高濃度のエタノール分画 (E_{2.0}) 中に HLP に相当すると思われるタンパク質を見出した。ちなみに、

E_{2.0} 中には全く HSF は含まれていない。E_{2.0} を C₈ カラムを用いる逆相 HPLC にかけて、得られた各ピークを SDS-PAGE で分析すると、HSF の予想溶出位置よりも少し早く溶出するピーク **a** が HLP であることが分かった (図 4A)。ピーク **a** のタンパク質の N 端 50 残基を直接、配列分析したところ HSF と似た配列であった (図 4B)。低分子量の夾雑物を除くため、さらにゲルろ過で精製し、ハブ血清 50 ml から純粋なハブ HLP を 4.9 mg 得た。

ハブ HLP を還元ピリジルエチル化後、プロテアーゼ消化、BrCN による化学的切断により断片化した。断片ペプチドを C18 カラムを用いる逆相 HPLC で精製し、それらのアミノ酸配列から HLP の全一次構造を決定した。ハブ HLP は全長 305 残基で、抗出血因子 HSF / MSF と同様に、2 つのシスタチン様ドメインと C 端の His-rich ドメインから成っていた。残基 76, 183, 263 はアミノ酸残基が検出されず、いずれも XxT 配列であることから、これらの残基は糖鎖が結合した Asn 残基であると推定された。また、MSF と同様、His-rich ドメインに 17 残基の欠失が見られた。

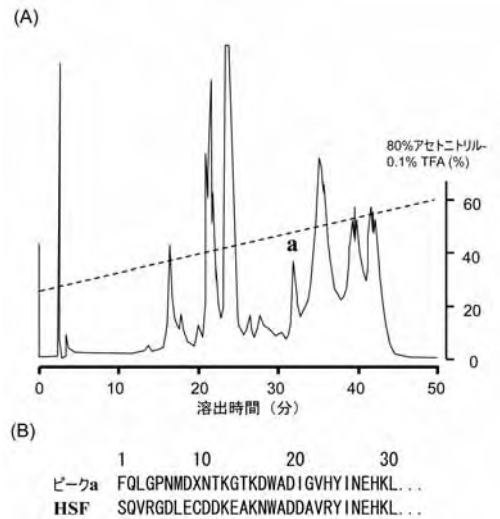


図 4 (A)ハブ血清エタノール分画(E_{2.0})の逆相 HPLC。カラムは μ Bondasphere C8-300 Å (1.9 × 15 cm) を用いた。(B)ピーク **a** と HSF のアミノ酸配列の比較。

ハブ肝臓の RNA から cDNA を調製し, HLP の一部の配列をもとにプライマーを設計し, PCR 法で cDNA を増幅した. HLP をコードする cDNA クローンをいくつか得たが, どれも同じ配列であった. cDNA クローンからの配列はタンパク質から決定した配列と完全に一致した. マムシ血清 HLP と異なり, ハブ血清からは 1 種の HLP しか見つからず, 現在のところ, マムシ血清 HLP-B に相当する cDNA クローンは得られていない.

4. ハブおよびマムシ fetuin ファミリータンパク質の一次構造の比較

ハブおよびマムシ HLP のアミノ酸配列を抗出血因子 HSF / MSF の配列と比較した (図 3). HLP のシスタチン様ドメイン 1 は, 抗出血因子と比べると相同性が低かった (約 60% の残基が一致). 特に, 1 ~ 16, 42 ~ 58 および 93 ~ 105 残基が変化しており, 逆にいえば, この領域が抗出血因子に重要であると言えよう. また, ハブおよびマムシ HLP 間でも, かなりの違いがあった.

一方, シスタチン様ドメイン 2 は HLP と抗出血因子で高い相同性が見られた (84.2 ~ 94.2% の残基が一致). His-rich ドメインに関しては, ハブ HLP とマムシ MSF, HLP-A に共通して 17 残基の欠失が見られた. これに対して, ハブ HSF とマムシ HLP-B には欠失はなく, 17 残基の欠失と抗出血因子活性の間には関連がないことが分かる (図 3).

5. HLP の生理的機能

HLP は MP 阻害活性を持たないものの, fetuin と構造的に似ているので fetuin としての機能を果たしている可能性がある. fetuin はヒドロキシアパタイトに強く結合することが知られている²⁶⁾. そこで, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で, ヒドロキシアパタイトカラムへの吸着を調べると, ウシ血清アルブミン (BSA) は全くカラムに結合しなかった. 一方, ウシ fetuin とハブ HLP は一部がヒドロキシアパタイトに結合した (図略). ハブ HLP は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で残りが溶出されたが, fetuin はこの濃度でも少し吸着が見られた.

fetuin はリン酸カルシウムの微結晶に吸着し, その成長を抑制することが知られている²⁷⁾. リ

ン酸カルシウムの析出を抑えるか調べるために, 最終濃度が 2.5 mM の塩化カルシウムと 1.8 mM のリン酸二水素カリウムの水溶液を作り, リン酸カルシウムの沈殿の様子を観察した. 混合物を室温に 24 時間放置して顕微鏡で観察すると, タンパク質を加えない場合, たくさんのリン酸カルシウムの微結晶が確認された. 200 μg/ml の BSA を加えてもさほど結晶の量を抑制しなかったが, 同じ濃度のウシ fetuin やハブ HLP は有意に結晶生成を抑制した (図略).

さらに, 放射性のカルシウム ⁴⁵ を用いて, ハブやマムシ HLP がアパタイト形成を阻害するかを調べた. 比較のために, BSA やウシ fetuin も同じ条件で阻害能を検討した. 種々の濃度のタンパク質を含む 4.8 mM CaCl₂-⁴⁵CaCl₂ (2 × 10⁶ cpm)-1.6 mM Na₂HPO₄-50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液を, 37°C, 90 分インキュベートした.

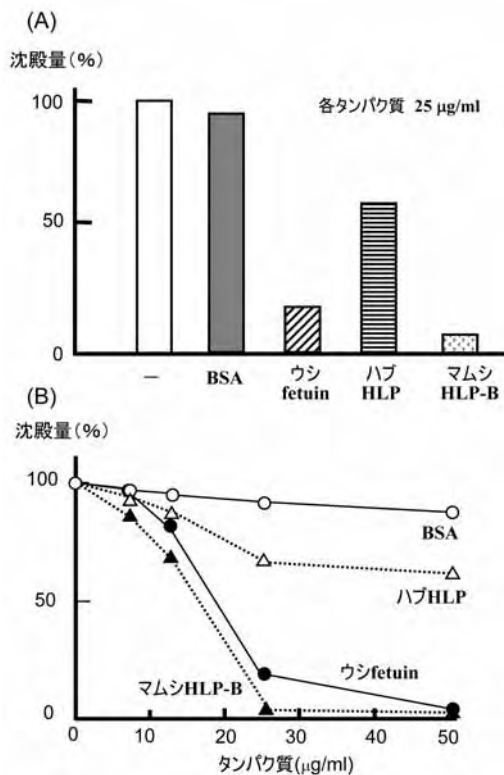


図 5 (A)ウシ fetuin およびヘビ血清 HLP によるリン酸カルシウム沈殿形成の抑制.
(B)リン酸カルシウム沈殿形成に対するウシ fetuin およびヘビ血清 HLP の濃度変化.

反応液を 15,000 回転で 5 分間遠心し、得られたリン酸カルシウムの沈殿を 1% 酢酸に溶かし、液体シンチレーションカウンターで ^{45}Ca の放射能を測定した。ハブ HLP は弱いながら濃度依存的にリン酸カルシウムの生成を抑制した (図 5)。これに対して、マムシ HLP-B はウシ fetuin と同程度の強い阻害を示し、 $25 \mu\text{g/ml}$ 以上で完全に抑制した。このように、HLP は fetuin と似た機能をもつタンパク質であることが示された。特に、マムシ HLP-B はその阻害能の強さから考えると、マムシ本来の fetuin であると思われる。

ハブではマムシ HLP-B に相当するタンパク質はまだ見つかっていない。マムシ HLP-A のアミノ酸配列がマムシ HLP-B よりもむしろハブ HLP に似ていることから、ハブ HLP はマムシ HLP-A のホモログ (homologue) と考えられる。ハブでは HLP が fetuin の機能を代行しているのかもしれない。

考 察

ウシ胎児血清中に発見された fetuin は胎児血清の主要な糖タンパク質である²⁸⁾。ヒト fetuin-A は最初、血清中に α_2 -Heremans Schmid 糖タンパク質として発見された²⁹⁾。fetuin-A は肝臓で一本鎖前駆体で合成され、Arg³²²と Thr³²³の間で限定分解を受け、血清中ではヘテロ二量体として存在する³⁰⁾。fetuin は骨や歯に濃縮されて存在する³¹⁾。また、ヒト fetuin は免疫応答や骨吸収促進に関与することが知られている³²⁾。fetuin の最も重要な生理機能は、正常でない位置における石灰沈着を防ぐ能力である³⁾。実際、fetuin は Ca^{2+} と親和性が高い ($K_d = 10^{-4} \text{ M}$) ため、アパタイトとも結合する²⁶⁾。

マムシやハブ毒の主要な毒成分は出血因子で、その実体は金属プロテアーゼ (MP) である³³⁾。通常、ヘビは自己毒に対して抵抗性を示すといわれ、それは血液中に抗出血因子が存在するためである。これまで、ハブやヤララカの血清から、HSF^{14,15)} や BJ46a¹⁶⁾ という抗出血因子が単離され、構造決定がなされた。HSF と BJ46a は 3 つのドメインから成るが、N 端に 2 つのシスタチン様ドメインが存在することから fetuin ファミリーに属することが明らかになった。なお、C 端

の第 3 のドメインは His-rich ドメインと呼ばれる。その構造的類似性から、HSF はヘビの fetuin とされてきた²⁸⁾。今回の研究で、ハブやマムシの血清中には、抗出血因子以外の fetuin ファミリータンパク質が含まれることが明らかになり、ヘビの fetuin は、HSF ではなく、HLP がその機能を担っているという結果が得られた (図 6)。

ハブの血清中には、今のところ 1 種類の HLP しか見つかっていない。ハブ血清 HLP の His-rich ドメインには、マムシ MSF や HLP-A と全く同じ位置に、17 残基の欠失がある。これに対して、マムシの HLP-B にはそのような欠失がない。従って、抗出血因子活性には His-rich ドメインはほとんど寄与していないことが分かる。また、HLP / MSF と HLP のシスタチン様ドメイン 2 のアミノ酸配列は大変よく似ていることから、このドメインも抗出血因子活性に関与しないと言える。以前の我々の研究では、シスタチン様ドメイン 1 の一部の領域が MP 阻害や抗出血因子活性に重要であるという証拠を得ている¹⁷⁾。

今回発見した HLP-B は、His-rich ドメインの Lys²⁹⁷-Arg²⁹⁸ 間にニックが入った二本鎖構造をしており、しかも、分子の C 端領域にはたくさんの糖鎖が結合している。これはヒト fetuin-A と大変よく似ており、分子構造的にも HLP-B がヘビ本来の fetuin だと考えられる根拠と言える。これに対して、HLP-A は弱い fetuin 活性しか示さず、その本来の機能についてはまだ解明されていない。いずれにしても、ヘビの抗出血因子はへ

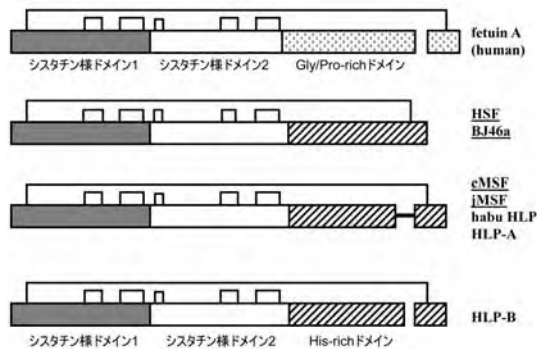


図 6 ヘビ fetuin ファミリータンパク質のドメイン構造。実線は S-S 結合。下線は抗出血因子。c は中国マムシ血清タンパク質を、j は日本マムシ血清タンパク質を表す。

ビ fetuin の遺伝子をベースに作られたものであろう。そこで、一次構造から分子系統樹を作成し、ヘビ fetuin ファミリータンパク質の分子進化的考察を行った。系統樹はヒト fetuin-A を out group として用い、近隣結合法³⁴⁾で作成した。

分子全体を対象とした系統樹から、fetuin 本来の機能をもつ HLP-B 型が fetuin の機能を残しつつ、遺伝子重複により、HLP-A 型と抗出血因子型に進化したと予測できる (図 7A)。また、そのような fetuin タンパク質の進化が種の分岐より前に起きたことが分かる。しかしながら、この場合、欠失の有るタイプと無いタイプの抗出血因

子が存在することから考え、欠失が起こる進化が二度あったと考えざるを得ない。しかし、位置と残基数が全く同じような欠失が二度起ると考えるのはやや無理がある。一方、分子間での 3 つのドメインの変異の程度が大きく異なることから、3 つのドメインは独立に進化すると考えたほうが合理的と言えよう。そこで、His-rich ドメインの配列だけで分子系統樹を作成した (図 7B)。この場合、His-rich ドメインでの 17 残基の欠失はただ 1 回起これば済む。このことは fetuin ファミリータンパク質の進化がドメイン単位で独立に起きていることを裏付けている。

タンパク質の進化においては、機能に影響しないような同義置換 (アミノ酸の種類が変化しない変異) が起き易いことが知られている。ヘビ fetuin ファミリータンパク質の遺伝子の変化をドメイン毎に比べると、シスタチン様ドメイン 1 と His-rich ドメインでは、同義置換よりも非同義置換が多く、シスタチン様ドメイン 2 では変異が少なく、また、あっても同義置換であることが分かった (図略)。抗出血活性のあるタンパク質とないタンパク質の塩基配列を比較すると、ヘビの場合は機能に影響する領域であるシスタチン様ドメイン 1 が急速に変化して、新しいタンパク質を生み、環境に適応していると推測できた。このことは、ヘビの毒タンパク質の遺伝子解析で、毒タンパク質の進化が早いという報告^{35,36)}と一致している。つまり、毒タンパク質の早い進化に対応するために、抗出血因子の進化も加速されたものと思われる。

引用文献

- 1) A. Heiss, A. DuChesne, B. Denecke, J. Grötzinger, K. Yamamoto, T. Renné and W. Jahn-Dechent, *J. Biol. Chem.*, **278**, 13333-13341 (2003)
- 2) G. Luo, P. Ducy, M. D. McKee, G. J. Pinero, E. Loyer, R. R. Behringer and G. Karsenty, *Nature*, **386**, 78-81 (1997)
- 3) W. Jahn-Dechent, T. Schinke, A. Trindl, W. Müller-Ester, F. Sablitzky, S. Kaiser and M. Blessing, *J. Biol. Chem.*, **272**, 31496-31503 (1997)

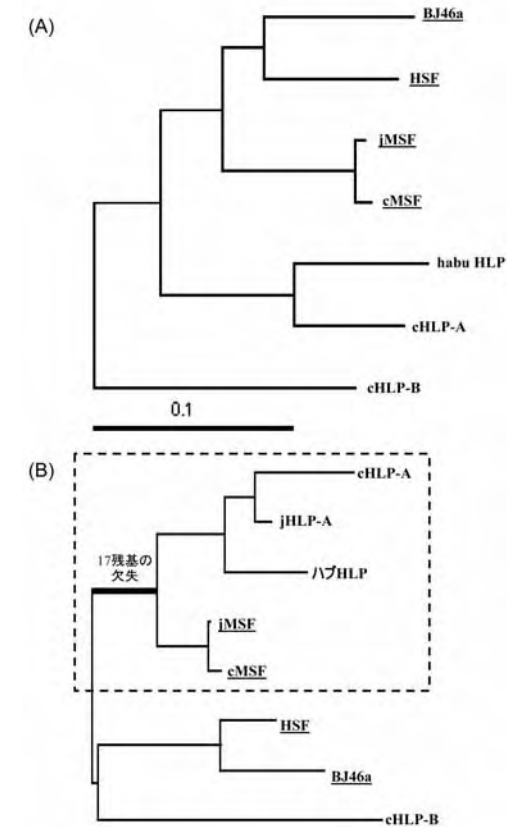


図 7 ヘビ fetuin-family タンパク質の分子系統樹。(A) 分子全体の配列を用いた系統樹。(B) His-rich ドメインだけの配列を用いた系統樹。破線のボックスは His-rich ドメインに 17 残基の欠失をもつもの。欠失は図の太線の位置で起こった。下線をつけた略号は抗出血因子である。c は中国マムシ血清タンパク質を、j は日本マムシ血清タンパク質を表す。

- 4) C. Schafer, A. Heiss, A. Schwarz, R. Westenfeld, M. Ketteler, J. Floege, W. Müller-Ester, T. Schinke and W. Jahnen-Dechent, *Clin. Invest.*, **112**, 357-366 (2003)
- 5) A.M. Ho, M. D. Johnson and D. M. Kingsley, *Science*, **289**, 265-270 (2000)
- 6) N. Bucay, I. Sarosi, C. R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H. L. Tan, W. Xu, D. L. Lacey, W. J. Boyle and W. S. Simonet, *Genes Dev.*, **12**, 1260-1268 (1998)
- 7) M. R. Davies, R. J. Lund and K. A. Hruska, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1559-1567 (2003)
- 8) K. O. Pedersen, *Nature*, **154**, 575-580 (1944)
- 9) K. M. Dziegielewska, W. M. Brown, C. C. Gould, N. Matthews, J. E. Sedgwick and N. R. Saunders, *J. Comp. Physiol.*, **162**, 168-171 (1992)
- 10) K. Schmid and W. Bürgi, *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 440-453 (1961)
- 11) D. L. Christie, K. M. Dziegielewska, R. M. Hill and N. R. Saunders, *FEBS Lett.* **214**, 45-49 (1987)
- 12) K. M. Dziegielewska, W. M. Brown, S. J. Casey, D. L. Christie, R. C. Foreman, R. M. Hill and N. R. Saunders, *J. Biol. Chem.* **265**, 4354-4357 (1990)
- 13) E. Oliver, E. Soury, P. R. Ruminy, A. Husson, F. Parmentier, M. Daveau and J. P. Salier, *Biochem. J.*, **350**, 589-597 (2000)
- 14) T. Omori-Satoh, S. Sadahiro, A. Ohsaka, and R. Murata, *Biochim. Biophys. Acta*, **285**, 414-426 (1972)
- 15) Y. Yamakawa and T. Omori-Satoh, *J. Biochem.*, **112**, 583-589 (1992)
- 16) R. H. Valente, B. Dragulev, J. Perales, J. W. Fox, and G. B. Domont, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3042-3052 (2001)
- 17) N. Aoki, Master's thesis, Fukuoka University (2005)
- 18) 堤 一代, Graduation thesis, Fukuoka University (2003)
- 19) M. Deshimaru, C. Tanaka, A. Tokunaga, M. Goto, and S. Terada, *Fukuoka Univ. Sci. Rep.*, **33**, 45-53 (2003)
- 20) U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 21) M. Friedman, L. H. Krull, and J. F. Cavins, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3868-3871 (1970)
- 22) J. A. Duke, in "Handbook of Legumes of World Economic Importance," Plenum Press, New York (1981)
- 23) D. Bertoli, *Methods Mol. Biol.*, **67**, 233-238 (1997)
- 24) T. Schinke, C. Amendt, A. Trindl, O. Pöschke, W. Müller-Esterl, and W. Jahnen-Dechen, *J. Biol. Chem.*, **271**, 20789-20796 (1996)
- 25) M. Deshimaru, C. Tanaka, K. Fujino, N. Aoki, S. Terada, S. Hattori, and M. Ohno, *Toxicon*, **46**, 937-945 (2005)
- 26) M. Suzuki, H. Shimokawa, Y. Takagi, and S. Sasaki, *J. Exp. Zool.*, **270**, 501-507 (1994)
- 27) A. Heiss, A. DuChesne, B. Denecke, J. Grotzinger, K. Yamamoto, T. Renne, and W. Jahnen-Dechent, *J. Biol. Chem.*, **278**, 13333-13341 (2003)
- 28) K. M. Dziegielewska and W. M. Brown, "Fetuin", Springer-Verlag, Heidelberg, Germany (1995)
- 29) K. Schmid and W. Bürgi, *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 440-453 (1961)
- 30) J. Kellermann, H. Haupt, E. A. Auerwald, and W. Müller-Ester, *J. Biol. Chem.*, **264**, 14121-14128 (1989)
- 31) F. Yang, Z. Schwartz, L. D. Swain, C. C. Lee, B. H. Bowman, and B. D. Boyan, *Bone*, **12**, 7-15 (1991)
- 32) C. Binkert, M. Demetriou, B. Sukhu, M. Szweras, H. C. Tenenbaum, and J. W. Dennis, *J. Biol. Chem.*, **274**, 28514-28520 (1999)
- 33) J. B. Bjarnason and J. W. Fox, *Phar-*

- macol. Ther.*, **62**, 325-372 (1994)
- 34) N. Saitou and M. Nei, *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425 (1987)
- 35) K. Nakashima, T. Ogawa, N. Oda, M. Hattori, Y. Sakaki, H. Kihara, and M. Ohno, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5964-5968 (1993)
- 36) M. Deshimaru, T. Ogawa, K. Nakashima, I. Nobuhisa, T. Chijiwa, Y. Shimohigashi, Y. Fukumaki, M. Niwa, I. Yamashina, S. Hattori, and M. Ohno, *FEBS Lett.*, **397**, 83-88 (1996)