

ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 毒出血性
メタロプロテアーゼ中和ヒトモノクローナル抗体の開発

(Development of human monoclonal antibody to neutralize
hemorrhagic metalloproteinase from *Protobothrops
flavoviridis* venom.)

鹿児島大学大学院連合農学研究科
生物資源利用科学専攻
応用生物化学連合講座
配属大学:琉球大学(2008)
盛根 信也

目次

第一章 緒論	5
第二章 沖縄産ハブ(<i>Protobothrops flavoviridis</i>) 毒出血性メタロプロテアーゼの組成	9
第一節 沖縄産ハブ(<i>Protobothrops flavoviridis</i>)毒の出血性メタロプロテアーゼ HR1a と HR1b の分離精製と cDNA クローニング	9
緒言	9
方法および材料	11
ハブ毒	11
出血活性の測定	11
タンパク量の測定	11
消光性蛍光ペプチドを用いたプロテアーゼ活性の測定	11
アゾカゼインを用いたプロテアーゼ活性の測定	12
カラムクロマトグラフィー	12
HR1b の N 末端および内部アミノ酸配列決定	12
RNA 抽出	13
HR1a 及び HR1b の cDNA クローニング	13
cDNA 塩基配列決定	14

結果	15
考察	26
小括	29
第二節 沖縄産ハブ(<i>Protobothrops flavoviridis</i>)毒の出血因子 HR1a と HR1b 基質特異性の解析	30
緒言	30
方法および材料	31
FRET5-25Xaa Series ペプチドライブラリー	31
精製 HR1a および HR1b	31
一次スクリーニング	32
二次スクリーニング	32
結果	33
考察	36
小括	36
第三章 ハブ毒出血性メタロプロテアーゼ HR1a 中和ヒトモノクローナル抗体の作製	38
第一節 ヒト抗体産生マウスを用いた抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体の作製	38
緒言	38
方法および材料	39
ヒト抗体産生マウス	39
抗 HR1a 抗体の検出(ELISA)	39

培地	40
赤血球除去用トリス緩衝液	41
抗原およびアジュバントの調製	41
KM マウスの免疫	42
脾臓細胞およびミエローマ細胞	43
細胞融合	44
抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体サブクラスの設定	45
結果	46
考察	49
小括	50
第四章 HR1a の立体構造と中和抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体の HR1a の活性への影響	51
第一節 抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体の出血性メタロプロテアーゼ HR1a 活性への影響	51
緒言	51
方法および材料	52
抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体の調製	52
抗 HR1a ヒト抗体の HR1a プロテアーゼ活性の中和	52
抗 HR1a ヒト抗体の HR1a 出血活性への影響	52
結果	54
考察	57
小括	58

第二節 HR1a の立体構造と抗 HR1a ヒト抗体のエピトープマッピング	59
緒言	59
方法および材料	60
エピトープマッピング	60
HR1a タンパク立体構造のホモロジーモデリングによる予測	61
結果	62
考察	67
小括	69
第五章 総括	70
第六章 要約	73
謝辞	78
参考文献	79

第一章 序論

亜熱帯に位置する沖縄県にはハブ(*Protobothrops flavoviridis* 以前は *Trimeresurus flavoviridis*), サキシマハブ (*Protobothrops elegans*), ヒメハブ (*Ovophis okinavensis*) などの毒蛇が生息し、住民は大きな脅威にさらされ続けてきた。1960年代には年間およそ 500 件以上の咬症事故が発生していたが、生活環境の変化に伴い咬症患者の数は減少傾向にある。しかし現在でも年間およそ 100 件以上の咬症事故が集落や農作地を中心に発生している。

ハブ咬傷による症状は出血、腫脹、壊死、致死、血液凝固促進と血液凝固抑制等を起こし、ハブ毒を構成するプロテアーゼ、ホスホリパーゼ、トロンビン様酵素、ヒアルロニダーゼなどさまざまな酵素やペプチドの相互的な作用に起因すると考えられている(鈴木・松田、1994)。さらに腫脹が進むと末梢循環不全に至り筋肉は壊死をおこし重症化する(宮城・野崎、2007)。

ハブ毒の毒性の主因は蛇毒メタロプロテアーゼファミリーに属するエンドペプチダーゼとされ、出血作用をもつ(Ohsaka, 1979)。それら出血性メタロプロテアーゼは出血因子(Hemorrhagic factor)ともよばれ、奄美大島に生息する同一種(*Protobothrops flavoviridis*)のハブ毒からは HR1a と HR1b さらに低分子量の HR2a と HR2b が精製され、酵素化学的諸性質が明らかにされている。ハブ毒は、同一種でも生息域によりタンパク質組成が異なることが知られており(Chijiwa et al, 2000; Daltry et al, 1996)、沖縄県に生息するハブには出血性メタロプロテアーゼ4種類のうち HR1b のみが存在しないとされてきた(Sadahiro and Omori-Satoh, 1980)。しかしこれまでに沖縄産ハブにも奄美産ハブ同

様に HR1b が存在することを示唆する報告があり(野崎・香村、1996)、ハブ毒作用機構の解明及び新規治療薬の開発研究には沖縄ハブ毒の出血性メタロプロテアーゼ組成を明確にする必要がある。

ハブ咬症患者の治療には一般名「乾燥はぶウマ抗毒素」が使用されるが、沖縄県に生息する 3 種の毒蛇(ハブ、サキシマハブ、ヒメハブ)の毒は免疫学的に交叉し、3 種いずれの蛇による咬症患者でも「乾燥はぶウマ抗毒素」による治療が可能である。過去 5 年間(2002-2006 年)の平均では、ハブ咬症患者の約 56%、サキシマハブ咬症患者の約 11%、ヒメハブ咬症患者の約 37%に使用されている。

「乾燥はぶウマ抗毒素」は優れた治療効果を有するがウマ血液由来の成分であることから、投与により異種タンパク質による副作用が生じる。アナフィラキシーショック、発疹、搔痒感など軽重の血清病を加えると副作用の発生率は全接種者のおよそ 24%に達する(宮城・真栄城、1994)。また血清病は同種類の抗毒素を繰り返し使用することにより発生頻度が高まり症状も重くなる。沖縄県衛生環境研究所においては「乾燥はぶウマ抗毒素」の複数回使用による副作用を回避する目的で、免疫動物を馬から山羊に換えた「ハブ山羊抗毒素」も試作された(野崎等、1987)。しかし、これにも山羊由来の異種タンパク成分が含まれており、副作用の危険が伴うことは「はぶウマ抗毒素」と同様である。このような理由から、動物血清の副作用を回避できるヒト抗体、または免疫原性を最低限に抑えたよりヒト抗体に近い抗毒素の作製が望まれてきた。ヒト抗体は本来ヒトの体内にある成分であるため、副作用の危険性が少なく、繰り返しの投与が可能であることや、治療の際に副反応の検査がいらないため症状の進行を早く抑えられる等の利点がある。その他、ヒト抗体作製に使用する抗体産生細胞は凍結により半永久的に保存でき、リコンビナ

ント抗体のセルファクトリーでの製造が行えるため、品質の保証された抗毒素を安定して供給できる利点がある。

これまでヒト(型化)抗体の作製には、マウス脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させたハイブリドーマが産生するマウスモノクローナル抗体(Kohler and Milstein 1975)をヒト型に加工する方法により行ってきた。すなわち、マウス抗体の可変領域(抗原と結合する部位)以外を遺伝子工学的にヒト抗体の定常領域に換える方法(キメラ抗体)(Morrison et al., 1984)、またはマウス抗体可変領域の相補鎖決定領域(complementarity determining region: CDR)をヒト抗体の可変領域に移植する方法(CDR グラフト技術)(Roguska et al., 1994)などによる抗体治療薬がこれまでに開発されている。ヒトに対する抗原性を低減したヒト(型化)抗体はすでにガンやリウマチの治療薬として販売、使用されているが、これらヒト(型化)抗体もマウス抗体由来の部位が抗原となり、副作用を起こす例も報告されている(Ritter et al., 2001)。そのため、ハブ咬傷治療用抗毒素については副作用のない完全なヒト抗体であることが強く望まれてきた。

ヒト抗体を産生するハイブリドーマの作製については幾つかの技術的障壁があったが、2000年にキリンビール株式会社医薬カンパニーがヒト抗体産生マウス(TC マウス™)を開発し(Tomizuka et al., 2000)、さらに2002年には同社のTC マウス™とMedarex社(米国)のHuMab Mouse®(Fishwild et al., 1996)との交配により改良型ヒト抗体産生マウス(KM マウス™)が開発され(Ishida et al., 2002)、これによって完全ヒト抗体を作製する事が可能となった。

沖縄県衛生環境研究所では、マウスハイブリドーマ作製技術とヒト抗体産生マウスTCおよびKMマウスを用いて副作用の危険性が少ない

安全な抗毒素の開発を目的に、ハブ毒に対するヒト中和抗体の作製研究を試みてきた。本論文はハブ毒の主因である出血性メタロプロテアーゼ HR1a に対する中和ヒトモノクローナル抗体の作製を試み、ハブ毒作用抑制の一端を分子レベルで明らかにし、ヒト抗体治療薬の開発に資することを目的とした。

第二章 沖縄産ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 毒出血性メタロプロテアーゼの組成

第一節 沖縄産ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 毒の出血性メタロプロテアーゼ HR1a と HR1b の分離精製と cDNA クローニング

緒言

ハブ毒には出血性メタロプロテアーゼを始めとする複数の酵素やタンパク質が含まれている。序論で示したように毒性の主因である出血性メタロプロテアーゼは出血因子とも呼ばれ、末梢血管壁を裏打する基底膜を構成するマトリクスのコラーゲンやラミニンなどを分解する。その結果、血管壁の全体構造に変化をきたし、生じた内皮細胞間隙から血液が漏出し、腫脹へと症状が進行すると考えられている。ハブ毒出血性メタロプロテアーゼはヘビ毒 Snake venom metalloproteinase (SVMP) ファミリーに属する。SVMP は、mRNA の翻訳産物、または成熟タンパク質の分子サイズに基づき、メタロプロテアーゼ領域のみを持っている P-I クラス、メタロプロテアーゼ領域とディスインテグリン領域からなる P-II クラス、P-II クラスに加えて C 末端側にシステインの豊富な領域を持つ P-III クラス、P-III クラスのカルボキシル側にさらにレクチン領域がある P-IV クラスの 4 つに分類される (Bjarnason et al., 1994)。

1970 年代に奄美産ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 毒から、分子量 60,000 の高分子量出血性メタロプロテアーゼ HR1a と HR1b、さらに分子量 25,000 の低分子量の出血性メタロプロテアーゼ HR2a と HR2b が精製され、その酵素化学的諸性質が明らかにされている (Takahashi

and Ohsaka, 1970; Omori-Satoh and Sadahiro, 1979)。しかしながら沖縄諸島に生息する同種のハブ(*Protobothrops flavoviridis*)にはこの4種類の出血性メタロプロテアーゼのうちHR1bのみが存在しないと報告されていた(Sadahiro and Omori-Satoh, 1980)。あるいは、奄美産ハブと同様に沖縄ハブ毒にもHR1bが存在することを示唆する報告はあったが、実証したものではなかった(野崎・香村、1996)。

HR1bがこれまで分離されなかった原因は分離技術の精度にあることが考えられる。奄美産ハブ毒のHR1aおよびHR1bは低分子量のHR2a、HR2bよりも約10倍強い出血活性を示し、さらにHR1bはHR1aよりも約1.6倍強い出血活性を示すことが報告されている(鈴木・松田、1994)。従って、毒性の強さからHR1bはハブ毒中和抗体を作製する上で重要な成分として考えられる。

そこで本章では沖縄産ハブ毒の出血性メタロプロテアーゼの組成を明らかにし、加えて中和ヒト抗体作製に必要な純度の高い抗原を得るためにHR1aとHR1bの分離精製を試みた。さらに沖縄ハブ毒HR1aおよびHR1b cDNAのクローニングを行い、遺伝子レベルで沖縄産ハブ毒HR1bの存在を確認するとともに、塩基配列からアミノ酸配列を明らかにすることを目的とした。

方法および材料

ハブ毒

平成10年度に沖縄県本島内で捕獲された 100 個体以上のハブ (*Protobothrops flavoviridis*)より採毒し、夾雑物を除き凍結乾燥処理を行った乾燥ハブ毒を使用した。

出血活性の測定

ハブ毒 HR1a および HR1b 出血活性の測定はウサギ背皮法(Kondo et al., 1960)により行った。およそ 2.5kg の日本白色ウサギの背をバリカンで除毛し毒液を 0.1-0.2ml 皮内接種した。24 時間後に背皮の裏側から出血斑の面積を測定した。

タンパク量の測定

BSA をスタンダードとし UV 法(280 nm)および BCA Protein Assay Kit (PIERCE)を用い測定した。測定には分光光度計(日立 U-4000)及びマイクロウェルプレートリーダーMRX (DYNEX 社)を用いた。

消光性蛍光ペプチドを用いたプロテアーゼ活性の測定

HR1a および HR1b のプロテアーゼ活性の測定は Takeya 等(1993)の出血性メタロプロテアーゼ特異的ペプチド基質のアミノ酸配列を基に合成したペプチド基質 :Nma-Ser-Pro-Met-Leu-Lys(Dnp)rr-NH₂ (Peptide Institute Inc., Osaka, Japan) を用い測定を行った。基質 20 μ M を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液(pH 8.5)混合液 170 μ l を 96 well プレート(Corning, 96 well Flat bottom, Black Polystyrene)に加え,そ

の後 HR1(a,b)の精製画分と同緩衝液にて全量 200 μ l として加え室温で反応させた。測定には蛍光プレートリーダー(ヴァリオスキャン、サーモエレクトロン)を使用し、励起波長 340nm、測定波長 440nm で単位時間あたりの蛍光の増加量をタイムスキャンモードで測定し 1 分間あたりの傾きを求めた。

アゾカゼインを用いたプロテアーゼ活性の測定

1.5ml マイクロチューブに HR1(a,b)の精製画分 50 μ l、0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 300 μ l、1.5%アゾカゼイン 300 μ l を加え 37°C で 30 分間反応後、300 μ l の 10%トリクロロ酢酸を加え反応を停止させ、15,000xg, 5 分間遠心分離後の上清液 200 μ l を、96well プレートを用いて 405nm で比色定量した。

カラムクロマトグラフィー

HR1a および HR1b の精製は各種カラムクロマトグラフィーにより行った。精製には Sephacryl S-200HR、Chelating Sepharose Fast Flow (GE ヘルスケアバイオサイエンス)、POROS S カラム(アプライドバイオシステムズ)を使用した。

HR1b の N 末端および内部アミノ酸配列決定

N 末端配列は、SDS-PAGE 後の精製 HR1b バンドを PVDF メンブラン上に電氣的に転写し、プロテインシーケンサー(Procise 494 HT Protein Sequencing System)を用いて分析した。内部アミノ酸配列については、SDS-PAGE 後のゲルを切り出し、リジルエンドペプチダーゼによるゲル内消化を行い、生じた特定のペプチド断片を逆相 HPLC で分

離し N 末端配列同様にプロテインシーケンサーによりアミノ酸配列を決定した。システインは Cys-S-propionamide として検出した。

RNA 抽出

ハブ毒 HR1a 及び HR1b の cDNA の塩基配列決定に用いた RNA は、沖縄本島南部で捕獲したハブの毒腺 300mg を TRIzol (インビトロジェン社) 溶液中でホモジナイズし、Chomczynski (1993) の方法を改変した方法に従って抽出した。ハブを炭酸ガス麻酔後に頭部を切断し毒腺を摘出し速やかに液体窒素中で凍結させた。液体窒素を満たした乳鉢に毒腺を移し、乳棒で組織片を粉末状になるまで粉砕した。テフロン・ホモジナイザーの筒体を氷中に置き、組織を少量の液体窒素と一緒に筒体に移し、組織 50~100mg に対し 1ml の TRIzol を加えた。テフロン・ホモジナイザーを高速回転で回転させながら 10 回程度上下してホモジナイズした。続いて、ホモジナイズされた組織を 1.5ml チューブに移し、クロロホルムを加え、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿物を TE 溶液に溶解して総 RNA 溶液とした。

HR1a および HR1b の cDNA クローニング

ハブ毒腺 cDNA は市販キット (GeneRacer™, インビトロジェン社) を用いて合成した。作製した cDNA をテンプレートにして HR1a, HR1b それぞれについて、GeneRacer™ 5' プライマーと遺伝子特異的プライマー (HR1a: 5' -CATTAATATAGTTCCAATATTGCACATG-3', HR1b: 5' - CCAAACAAAATAAGATTACCGTGCAGTCAG-3') を用いて PCR を行い 5' 末端を増幅した。3' 末端についても同様な方法により

GeneRacer™3'プライマーとHR1aおよびHR1b遺伝子特異的プライマー(HR1a: 5'-CAGAGAAAAGTGTACTTGTTCATGCTAACT-3', HR1b: 5'-GGAAACCACCACAAGTACAGGAATTTCCA-3')を用いて増幅した。遺伝子特異的プライマーは既知の奄美産ハブ毒HR1a及びHR1bのcDNAの塩基配列を基に作製した(Kishimoto and Takahashi, 2002)。

cDNA 塩基配列決定

増幅した各5'末端と3'末端のPCR産物は電気泳動後のゲルから定法に従い抽出精製した。5'末端については市販キット(Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing)を用いてクローニングを行い、塩基配列を決定した。3'末端についてはPCR産物を用いて直接塩基配列を決定した。塩基配列決定には蛍光ダイターミネーター法を採用したBigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing KitとApplied Biosystems社製ABI PRISM310 DNAシーケンサーを使用した。

結果

出血性メタロプロテアーゼ HR1a 及び HR1b の精製は乾燥沖繩ハブ毒(平成 10 年度製)1g を 0.01M リン酸緩衝液(pH6.8)10ml に溶解し、不溶性タンパク質を遠心(10,000 x g, 20 分間)除去後、同緩衝液で平衡化した Sephacryl S-200HR カラム(2.6×90cm)にてゲルろ過を行った(Fig.2-1-1)。プロテアーゼ活性のある高分子量画分(画分 20-25)をプールし、0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.01M リン酸緩衝液(pH6.8)にて透析を行い、同緩衝液で平衡化した Chelating Sepharose Fast Flow(1.5×5cm)カラムを用いたメタルキレートアフィニティークロマトグラフィー(Zn^{2+})に供した。平衡化に使用した緩衝液にて非吸着画分を洗浄後、0-30mM のイミダゾール濃度勾配により吸着画分を溶出した(Fig.2-1-2)。

非吸着のアゾカゼイン分解画分には出血活性が検出されなかったことから HR1a 及び HR1b は他のプロテアーゼから分離された。プロテアーゼ活性及び出血活性のある画分 50-64 をプールし、次の分離に用いた。この段階での出血およびプロテアーゼ活性を含む画分の総活性は 20.3units となり、粗毒の 81.81units に対する回収率は 25%であった(Table 2-1-1)。またこの精製段階での SDS-PAGE 上での純度はほぼ均一と判断された(Fig. 2-1-3)。

メタルキレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製した出血およびプロテアーゼ活性を含む画分を 0.01M リン酸緩衝液(pH6.8)により透析した後、同緩衝液で平衡化した POROS S パーフュージョン陽イオンクロマトグラフィーにより分離を行った。その結果、非吸着画分 I と吸着画分 II に分離され、回収されたタンパク量はそれぞれ 9.6mg と 1.36mg、粗毒に対する最終的な回収率はそれぞれ 12.7%と 0.8%であ

った(Table 2-1-1)。

HR1b と推定される吸着画分Ⅱの N 末端アミノ酸配列の分析を行ったが、N 末端アミノ酸はブロックされていたため、配列決定には至らなかった。

次に内部アミノ酸配列分析を行うために SDS-PAGE を行い、吸着画分Ⅱのバンドをリジルエンドペプチダーゼでゲル内消化した。ゲル内消化物を逆相 HPLC により分離しフラクション番号 60 のペプチド断片 (Fig. 2-1-5) をアミノ酸配列分析に供した。エドマン分解後の段階毎の HPLC において複数の PTH-アミノ酸が検出されたことから、複数のペプチドが混在すると判断されたが、主な検出ピークに基づき 12 残基のアミノ酸配列を決定することができた (配列 A)。A: (Gln-Arg-Ser-His-Asp-Cys-Ala-Gln-Leu-Leu-Thr-Thr)

この内部アミノ酸配列と奄美産ハブ HR1a 及び HR1b のアミノ酸配列を比較した結果、吸着フラクションⅡは奄美ハブの HR1b と相同性が高くフラクションⅡは HR1b と推定された。さらに、混在する少量の 3 種類のペプチドの配列についても、奄美産ハブ毒 HR1b のアミノ酸配列データに基づいて合理的に推定することができた (配列 B、C、D)。

B: (Ala-Tyr-Tyr-Gln-Thr-Phe-Leu-Thr-X-His-Lys-)

C: (Thr-Asp-Ile-Val-X-Pro-Pro-Val-)

D: (Cys-Pro-Ile-Met-Phe-Tyr-Gln-X-Tyr-Phe-)

次に沖縄ハブの毒腺 RNA から cDNA を合成し、HR1a と HR1b の cDNA をクローニングし、両クローンの塩基配列を決定した。沖縄ハブ HR1a cDNA の塩基配列は全長 2,358bp で、94 番目の開始コドンから 1,921 番目の終止コドンまでに 1,827bp のオープンリーディングフレー

ム(ORF)を含んでおり、609 残基のアミノ酸をコードしていると推定された (Fig.2-1-6)。沖縄産ハブ HR1a の cDNA の塩基配列と奄美産ハブ HR1a を比較すると、548 番目の T が A に、1,012 1,013 番目の GT が AA、1,036 番目の T が C、1,127 番目の G が A、1,255 番目の G が A、1,611 番目の C が T へとそれぞれ置換されていた。さらに 2,151 番目の塩基は欠失していた。1,611 番目の変異は ORF 内の置換であったが、コドン冗長性の範囲内の変異であり、従ってアミノ酸配列に変化は生じない。

次に沖縄ハブ HR1b cDNA の塩基配列は、全長 2,265bp で、99 番目の開始コドンから 1,941 番目の終止コドンまでに 1,842bp のオープンリーディングフレームを含んでおり、614 残基のアミノ酸をコードしていると推定された (Fig.2-1-7)。沖縄ハブ HR1b の cDNA の塩基配列と奄美産ハブ HR1b を比較すると沖縄ハブ HR1b の cDNA では 198 番目の A が G に、1,035 番目の C が T へ、1,301 番目の T が A にそれぞれ一塩基の置換が認められ、塩基配列の相同性は 99.9%であった。

1,035 番目の置換はコドン冗長性の範囲内の変異であり、アミノ酸配列に変化は生じない。その結果 ORF 内の推定されるアミノ酸配列の置換は 2 残基のみで、アミノ酸配列では 99.67%の相同性を示した。さらに成熟タンパクのアミノ酸の置換は 313 残基の Arg から Cys への置換のみであった。

沖縄ハブ HR1b は奄美産ハブ HR1b の Arg-313 が Cys-313 に置換しており、HR1b 分子が S-S 結合を介した二量体を形成している可能性が示唆された。しかしながら、還元状態と非還元状態の HR1b の SDS-PAGE 上での移動度に殆ど差は認められず、従って単量体の形で存在していることが明らかにされた (Fig.2-1-4)。

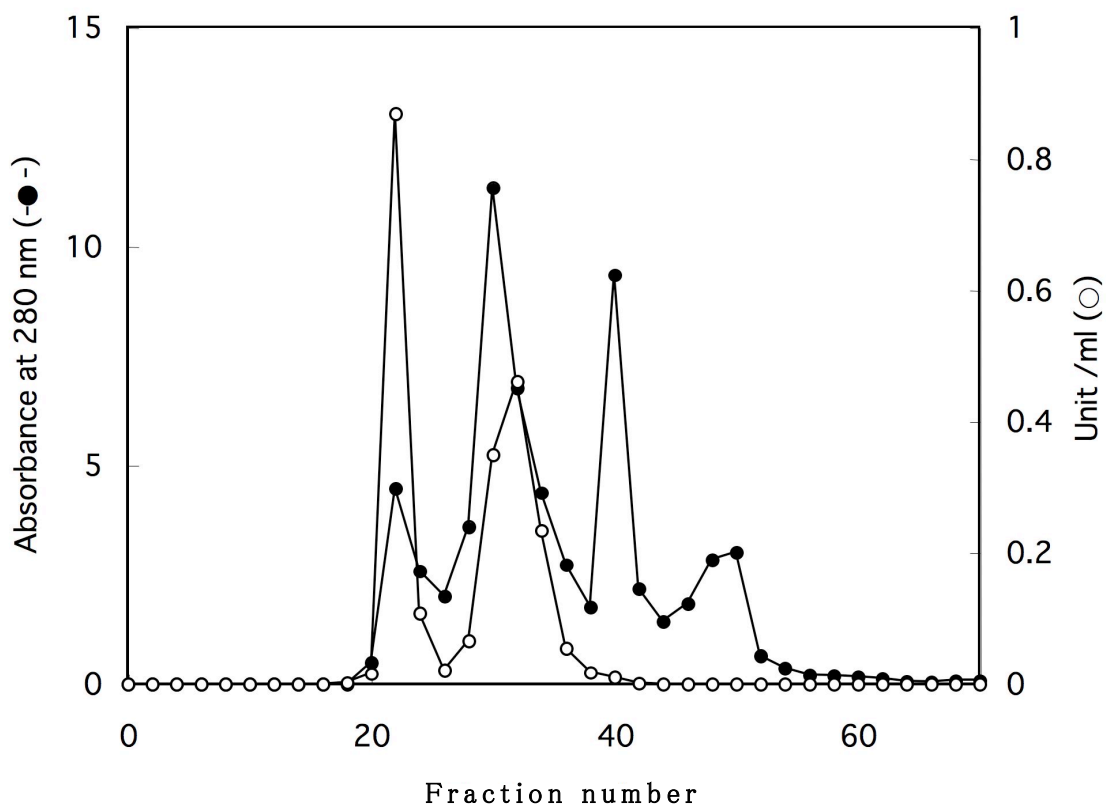


Fig. 2-1-1. Gel-filtration chromatogram of the venom from the *Protobothrops flavovilidis* on Sephacryl S-200 HR
 Column: Sephacryl S-200 High Resolution (2.6x90cm)
 Sample : 10% Okinawa habu venom solution (13.5ml)
 Buffer : 0.01M Phosphate buffer pH 6.8
 Flow : 60ml/hour 10ml/tube

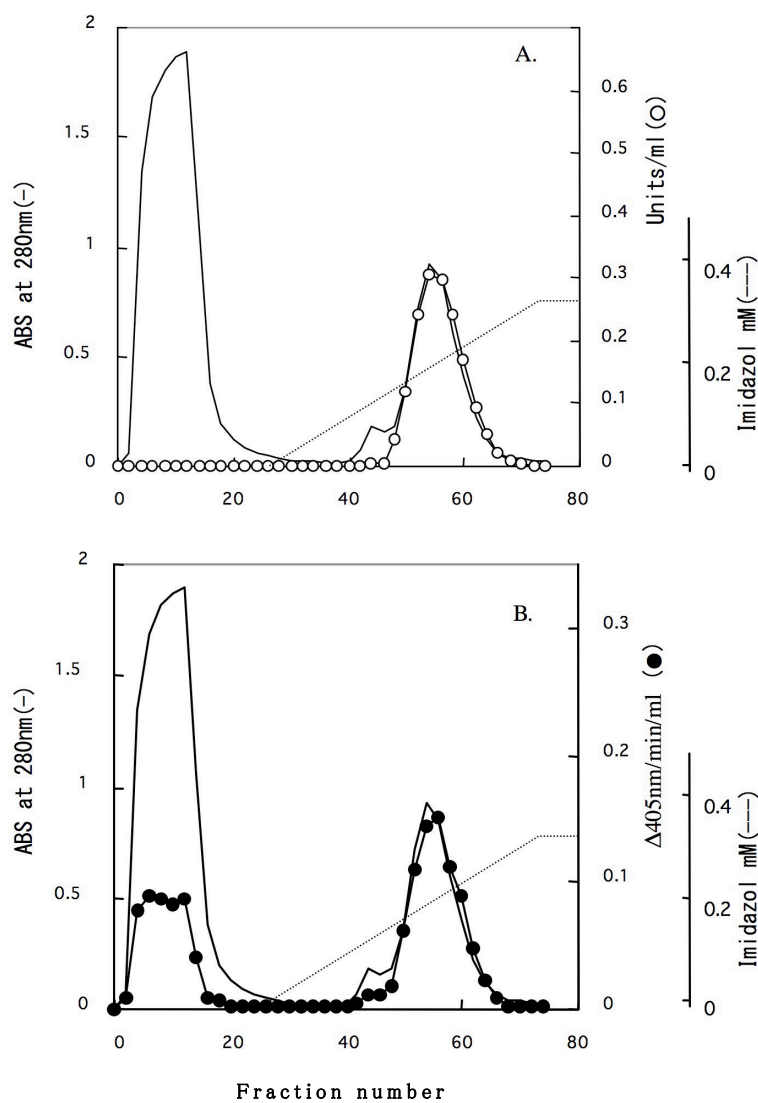


Fig. 2-1-2. Metal chelate affinity chromatogram of a high molecular weight fraction with protease activity eluted from a Sephacryl S-200 HR column.

Column : Chelating sepharose fast flow (imobilized with Zn^{2+} , 4.5x15cm)

Buffer : 10mM Phosphate buffer pH6.8, 0mM Imidazol, 0.5M NaCl
10mM Phosphate buffer pH6.8, 30mM Imidazol, 0.5M NaCl

Flow : 60ml/hour 5ml/tube gradient total 200ml

Substrates: A. Fluorescence-Quenching peptide B. Azo casein

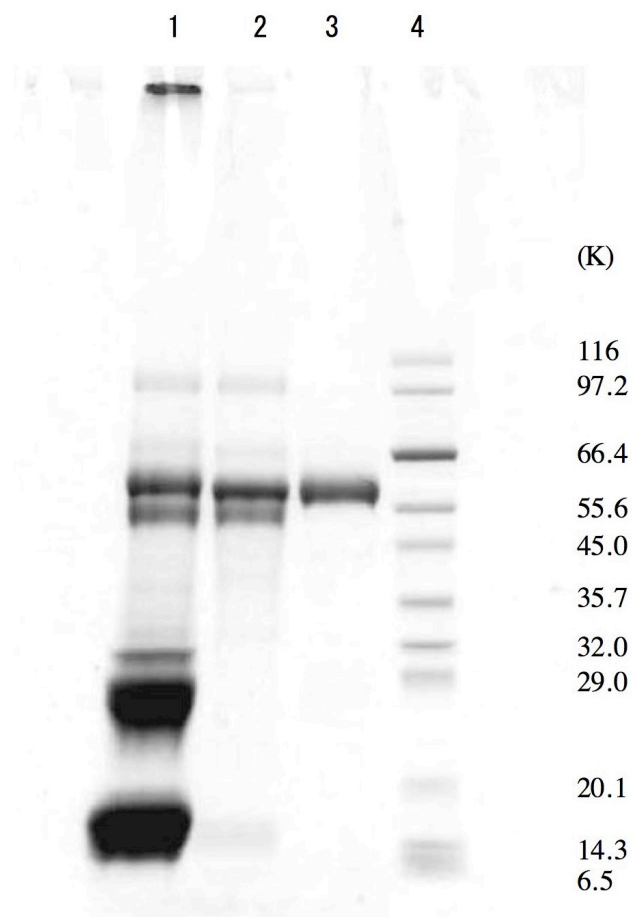


Fig. 2-1-3. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of purified metalloproteinase fractions.

Lane 1:Crude Habu venom

Lane 2:Sephacryl S-200 HR column chromatography

Lane 3:Chelating sepharose ff column chromatography

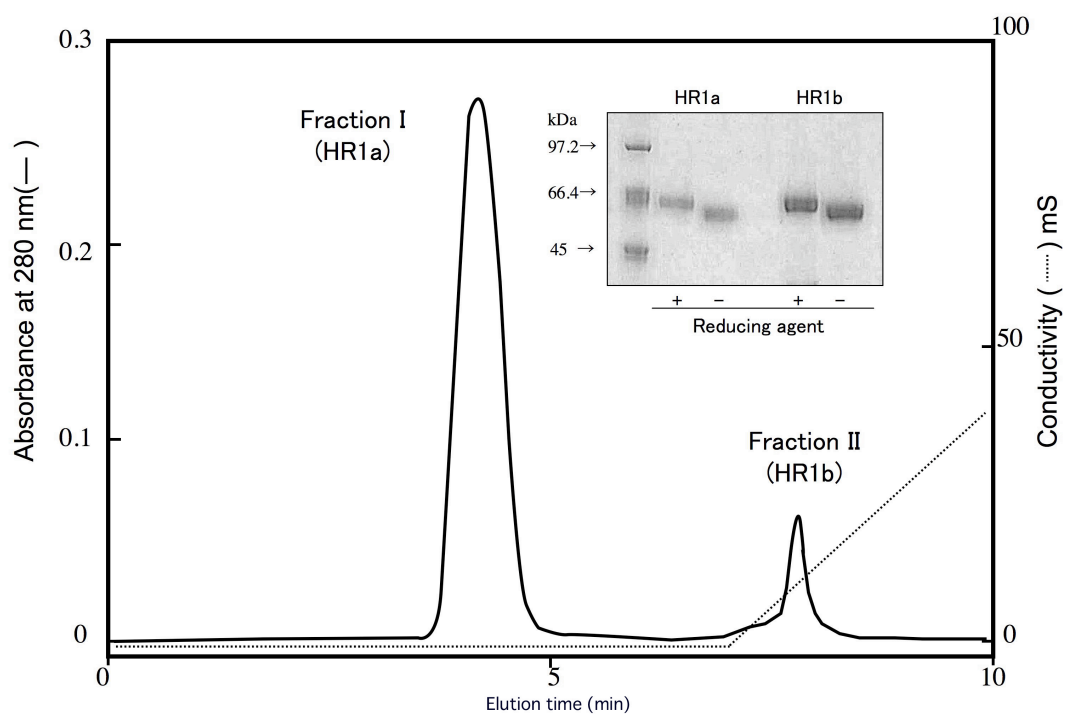


Fig. 2-1-4. Poros S column chromatogram of metalloproteinase HR1a and HR1b

Metalloproteinase fractions eluted from Chelating Sepharose Fast Flow column were separated on Poros S column. Figure inset shows SDS-PAGE profile of HR1a and HR1b with and without treatment of reducing agent.

Column: Poros S/20 (4.6x100mm)

Buffer : 10mM Phosphate buffer pH6.8, 0M NaCl

10mM Phosphate buffer pH6.8, 0.5M NaCl

Flow : 5ml/min, 2ml/tube

Table 2-1-1. Summary of the purification steps of HR1a and HR1b.

Step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)BCA	Total protein (mg)	Activity (unist/ml)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude Habu venom	13.5	48.600	656.10	6.06	81.8	0.125	100.0
Sephacryl S-200	53.5	1.760	94.16	0.50	26.8	0.284	32.7
Chelating Sepharose	70.0	0.408	28.56	0.29	20.3	0.711	24.8
POROS S (HR1a)	80.0	0.120	9.60	0.13	10.4	1.083	12.7
(HR1b)	80.0	0.017	1.36	0.01	0.7	0.494	0.8

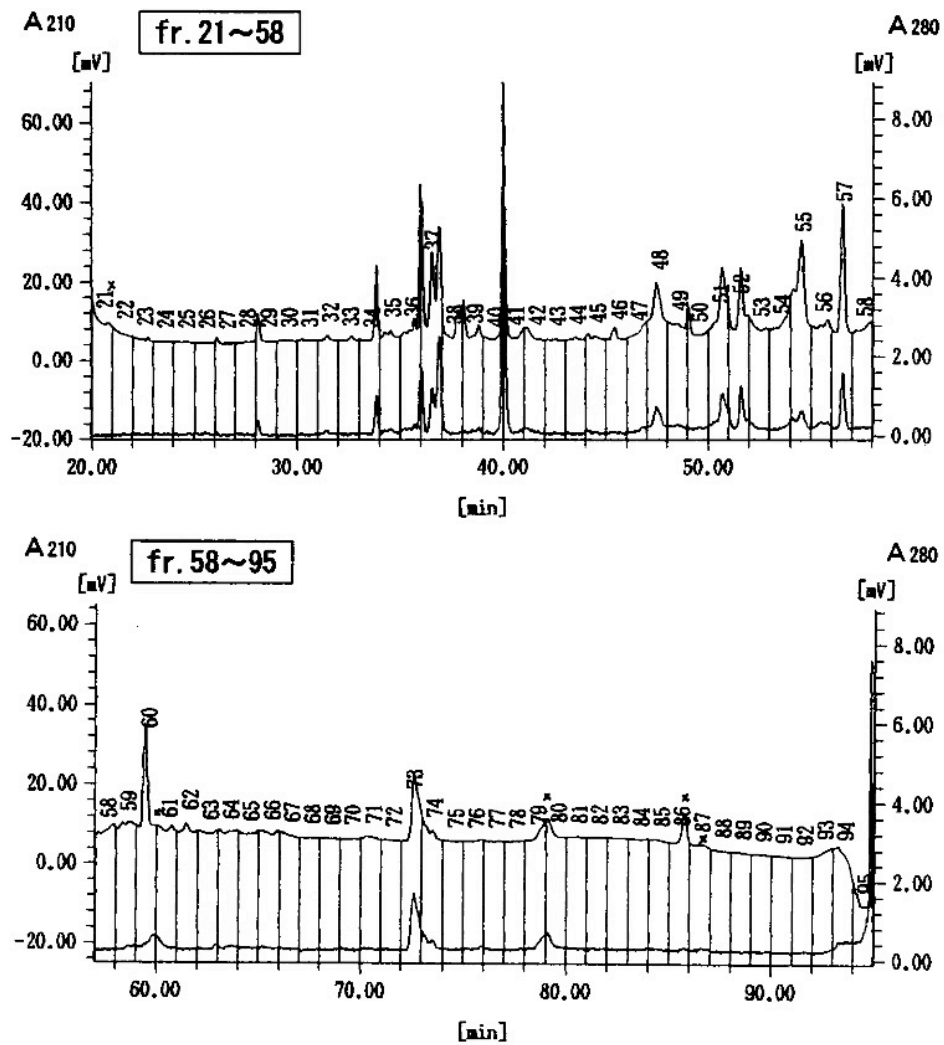


Fig. 2-1-5. Reversed phase HPLC chromatogram of in-gel digested peptides.

The fraction II from Poros S column chromatography expected to be HR1b was separated on SDS-PAGE, and in-gel digested with lysyl endopeptidase.

Column : TSKgel ODS-80Ts (2.0x250mm, TOSHO)

Eluent : A) 0.1% TFA B)0.09% TFA in 90% acetonitrile

0-10%B(0-7 min), 10-50%B(7-82 min), 50-100%B(82-87min)

Flow rate : 200 μ l/min

Temperature : Room temperature

Detection : 210 nm, 280 nm

TTCCTTGCTTCTCATAGTCAACAGAGGAAGAGCTCAGGTTGGCTTGAAGCAGGAAGAGATTGCCTGTCTCCAGCCAAATCCAGCCTCCAAA -1

-93

```

1 ATGATCCAAGTTCTCTGGTAACCATATGCTTAGCAGTTTTTCTTATCAAGGGAGCTCTAATCTGGGATCTGGGAACGTGAATGATTATGAAGTAGTGTATCCACGAAAAGTCACT 120
1 M I Q V L L V T I C L A V F P Y Q G S S I I L G S G N V N D Y E V V Y P R K V T 40
121 GCAGTGCCCAAAGGAGCAGTTGAGCAAGATGAAGACACCATGCAATGAATTTAAAGTGAATGGAGAGCCAGTGGTCTTACCTGGAAAAAATAAGGACTTTTTTCAAAGAT 240
41 A V P K G A V Q P K Y E D T M Q Y E F K V N G E P V V L H L E K N K G L F S K D 80
241 TACAGCGAGACTCATTATTTCCCTGATGGCAGAGAAATACAACATACCCTCGGTTGAGGATCACTGCTTATATCATGGAGCCATCCAGAATGATGCTGACTCAACTGCAAGCATCAGT 360
81 Y S E T H Y S P D G R E I T T Y P S V E D H C Y Y H G R I Q N D A D S T A S I S 120
361 GCATGCAATGTTTGAAGGACATTTCAAGCTTCAAGGGGAGATGACTCTTATTGAACCTTTGAGGTTTTCTGACAGTGAAGCCCATGCGAGTCTACAAATGAAAAATGAAAAAGAG 480
121 A C N G L K G H F K L Q G E M Y L I E P L R F S D S E A H A V Y K Y E N V E K E 160
481 GATGAGGCCCCAAAATGTGGGGTAACCCAAAATTTGGGAATCAGATGAGCCCATCAAAAAGCCCTCTAAGTTAGTTGTTACTGCTGAACAACAAAGACTTGAACAACCTTCAGA 600
161 D E A P K M C G V T Q T N W E S D E P I K K A S K L V V T A E Q Q R Y L N N F R 200
601 TTCATTGAGCTTGCATAGTTGCGGACTACAGAATGTTACGAAATTTCAACAGCAATTTAAATGAGGTAACCAATGGGTATATGAAATGTCAACACTTTAAATGAGATTTACAGATAT 720
201 F I E L V I V A D Y R M F T K F N S N L N E V K T W V Y E I V N T L N E I Y R Y 240
721 TTGTACGTTCTGTAGACTGGTGGCCTAGAAGTTTGGTCCAACGGAGATTTGAGTAGCTCACGTTATCAGCATATGATACTTTGGACTCATTGGAGAATGGAGAAAAAGAGATTG 840
241 L Y V R V A L V A L E V W S N G D L S S V T L S A Y D T L D S F G E W R K R D L 280
841 CTGAAGCCAAAAGTCATGATAATGCTCAGTTACTCAGGCCATTGACTTCAATGGAACAATTATAGGATTGGCTCAAGGCCAGCATGTGTGACCCGAAGCGTTCTACCGGAATTGTT 960
281 L K R K S H D N A Q L L T A I D F N G T I I G L A H K A S M C D P K R S T G I V 320
961 CAGGATTATAGCTCAAGAAATCTTGGTTGCAGTTATAATGGCCCATGAAATGGGTATAATCTGGGCAATTCATCATGACAGAGAAAACTGTACTTGTCTGTAACATCATGATTATG 1080
321 Q D Y S S R N L V V A V I M A H E M G H N L G I H H D R E N C T C H A N S C I M 360
1081 TCTGCCGTGATAAGTGATCAACCTTCCAATATTTGAGCAATTTGAGTCAATGTCGCAATTTGGAATATAATGATGATAAACCACAATGCAATCTCAATGAACCTTGAACAGAT 1200
361 S A V I S D Q P S K Y F S N C S H V Q Y W N Y I N D D K P Q C I L N E P L R T D 400
1201 ATGTTTACCTCCAGTTTGTGGAAATGAACTTTGGAGTGGGAGAAGAATGTGACTGTGGCTCTCTGCAACTTGTGATATCCGTGCTGTGATGCTGCAACATGAACTACACTCA 1320
401 I V S P P V C G N E L L E V G E E C D C G S P A T C R Y P C C D A A T C K L H S 440
1321 TGGTAGAGTGTGAATCTGGAGAGTGTGTGAGCAATGCAGATTTAGGACAGCAGGAACAGAATGCCGGGCAAGAAGGAGTGAAGTGTGACATTTGCTGAAAGTGCCTGGCCATTCTGT 1440
441 W V E C E S G E C C E Q C R F R T A G T E C R A R R S E C D I A E S C T G H S A 480
1441 GACTGTCCCACAGATCGCTTCCATAGGAATGGACAACCATGCCTACACAACCTCGGTTACTGTACAATGCAATTTGCCATCATGTATCACCAATGTTATGCTCTCTGGGGGGCAAT 1560
481 D C P T D R F H R N G Q P C L H N F G Y C Y N G N C P I M Y H Q C Y A L W G A N 520
1561 GCAACTGTGGCTAAAGATTGATGTTTGGAGATAACAGAAAGGCAATGATTATGGCTATTGCAGAAAGGAAAACGGTGAAGGATTCATGTGAACCACAAGATGAAAAATGTGGCAGG 1680
521 A T V A K D S C F E D N Q K G N D Y G Y C R K E N G R K I P C E P Q D V K C G R 560
1681 TTATACTGCTCACTTGAACACAGCTTCTTCCGCTTCTTCTATACCCACAGATGAAATATTGGGATGGTGTACTGGAACAAAATGTGGAGATAAAAAGGCTTGCAGCAACAGG 1800
561 L Y C S L G N Q L P C R F F Y T P T D E N I G M V D T G T K C G D K K V C S N R 600
1801 CAGTGTGTGATGTAATACAGCCTATTAATCAACCTCTGGCTTCTCTCAGATTTGATTTGGAGATCCTTCTTCCAAAAGGTTTCACTTCCCTCAAGTCCAAAACCCATCTGCCTGCA 1920
601 Q C V D V N T A Y * 609
1921 TCCTACTAGTAAATCACCTTAGCTTTCATATGGAATCTAAATCCACAATTTCTTTTCCATGTTTAAATCTGTTTACCTTTGCTGTAATCAAGCCTTTTTCCACCACAAAGCTCCA 2040
2041 TGGGATGTACAACACCAAGAGCTTATTTGCTGTCAAGAAAAAATGGCCATTTTACCGTTTTCCAATTCAGAGCACATTTAATGCAACAAGTTCTGCCTTTTGGAGTGGTATTTC 2160
2161 GAAGTCAATGCTTCTTCCAAAATTCATGCTGGCTTTCAGATGTAACCTGCTTCCATCAATAAACTCACTATTCTCATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2265

```

Fig. 2-1-6. cDNA sequence and deduced amino acid sequence for HR1a (Okinawa habu). The amino acid residues different from Amami habu HR1a are boxed (Tyr-152, Lys-307, Arg-315, His-345 and Lys-388). Sequence for mature protein was shown with dotted underline.

考察

奄美産ハブ毒の出血性メタロプロテアーゼについては既に多くの酵素化学的知見が得られている。奄美産ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 毒から、高分子量の出血性メタロプロテアーゼ HR1a と HR1b、さらに低分子量の出血性メタロプロテアーゼ HR2a と HR2b が分離精製されその酵素化学的諸性質が明らかにされている。沖縄諸島に生息する同種のハブ (*Protobothrops flavoviridis*) には上記出血性メタロプロテアーゼ4種類のうち HR1b のみは存在しないとされていたが、本研究における分離精製とアミノ酸配列分析および HR1b の cDNA のクローニングにより沖縄諸島に生息するハブの毒に HR1b が存在する事が初めて明らかとなった。

沖縄産ハブと奄美産ハブ HR1a のアミノ酸配列を比較すると、シグナル配列を含む翻訳産物全体では 5 残基、最終的な成熟タンパク質については4残基の置換が認められる。同様に、HR1b については翻訳産物全体では 2 残基、成熟タンパク質としては Arg-313 の Cys への置換のみであった。*Crotalus atrox* 毒 vascular apoptosis inducing protein 1 (VAP1) はハブ毒 HR1b と相同な SVMP (P-III) であり、同分子間で二量体を形成することが報告されている。沖縄産ハブ HR1b の 313 番目の Arg 残基が Cys に置換されていたことから、この Cys 残基が沖縄産ハブ VAP1 同様に HR1b の二量体形成に関与している可能性が示唆された。しかしながら、還元状態と非還元状態の HR1b の SDS-PAGE 上の挙動からモノマーであることが明らかにされた。VAP1 において二量体形成に関わっている Cys 残基は Cys-365 であり、HR1b の Cys-313 はそれから 52 残基相当離れている位置にあると想定されることから、HR1b の二量体形成は3次的に困難であることが推察された。

沖縄ハブ毒から出血性メタロプロテアーゼ HR1b の分離がこれまで困難であった理由として、粗毒中におけるHR1bの含有量が他の出血性メタロプロテアーゼに比べてかなり少ない事(粗毒 1g から 0.49mg, 奄美産ハブは粗毒 1g から 3.8mg)、HR1a、HR1b 両出血性メタロプロテアーゼがアイソザイムであり、アミノ酸配列、分子量、等電点等のタンパク質学的性質が極めて類似していることが挙げられる。今回の研究においてHR1b の分離精製が初めて可能になった理由として、分析機器や高感度基質等の試薬の性能の向上に加えて、最終分離に使用した Poros S パーフュージョンクロマトグラフィーのカラム特性に依ることが大きな要因として挙げられる。奄美産ハブ毒 HR1b の分離精製は、Sephadex G-200 superfine 樹脂に対するHR1a およびHR1b の親和性の差を利用して行われた(Omori-Satoh and Sadahiro, 1979)。本研究における沖縄ハブ毒 HR1b についても同様に Poros S カラムとの親和性の差によって分離が可能になったとも考えられた。さらにもう一つの可能性として挙げられるのが、メタロキレートクロマトグラフィーを精製行程に用いた事である。Chelating Sepharose Fast Flow 樹脂は Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} 等の 2 価の金属イオンをキレートすることにより、タンパク分子表面に露出しているヒスチジン、システイン、トリプトファン残基との親和性によりタンパクを吸着する(Porath and Olin, 1983; Sulkowski, 1983; Chaga et al., 1992; Zhang et al., 1992)。Lakshmi 等 (2007)も同様にニッケルアガロースにより *Naja kaouthia* (コブラ) 毒のメタロプロテアーゼ(P-III)の精製を行った。Lakshmin 等はメタロプロテアーゼの金属イオン配位部位(HEXXHXXGXXH)と Ni^{2+} との親和性により蛇毒メタロプロテアーゼの特異的精製の可能性を示唆している。しかしハブ毒 HR1a および HR1b(P-III)においては cysteine-rich ドメインと金属イオン(Zn^{2+})との親和

性による可能性が高いと考えられる。cysteine-rich ドメインを持たない HR2a および HR2b (P-I)も金属イオン配位部位を持つが、メタロキレート樹脂には吸着しない。このことからメタロキレート樹脂は HR1b の cysteine-richドメインとの強い親和性により、HR1aと共にHR1bを選択的に濃縮したと推測される。

今回は平成 10 年度製乾燥ハブ粗毒を原料として HR1b の精製に成功した。しかしながら、調製年度の異なる乾燥ハブ粗毒を出発原料として同様な方法で HR1b の精製を試みたところ、Poros S カラムクロマトグラフィにおける吸着画分 II を検出することができなかった。原因は特定されていないが、ハブ毒中の HR1b 濃度は捕獲されるハブの個体間、年度毎或いは地域間においても偏る可能性があり、使用したロットの HR1b 濃度が極端に低かったことが原因として考えられた。これらの知見はハブ毒中のタンパク質濃度は地域間で異なるとする従来報告と符号するのも知れない。

この様に沖縄ハブ粗毒中に含まれる HR1b の含有量の少なさから、安定した精製が行えない可能性がある。そのため十分な抗原量を必要とする抗体作製には組換えタンパクによる HR1b の作製を検討する必要がある。

今回の研究において cDNA の塩基配列から推定された沖縄ハブ毒 HR1b のアミノ酸配列は奄美産ハブ毒 HR1b とほぼ同一であり、両者間でタンパク質の一次構造に殆ど差は認められない。従って、沖縄ハブ毒 HR1b の立体構造ひいては酵素学的特性も奄美産ハブ毒 HR1b に類似することが推察された。

小括

沖縄ハブ毒から出血性メタロプロテアーゼの分離とその一部アミノ酸配列の解析を行い、これまで存在しないとされていた HR1b が奄美ハブ毒の場合同様に沖縄産ハブ毒にも存在することを初めて明らかにした。次いで、沖縄産ハブの毒腺から HR1b の cDNA のクローニングに成功し、遺伝子レベルでも HR1b の存在を初めて証明した。沖縄産ハブ毒 HR1b は奄美産ハブ毒 HR1b と遺伝子レベルで 99.9%、タンパク質レベルで 99.67% の相同性を示した。

第二節 沖縄産ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 毒の 出血因子 HR1a と HR1b 基質特異性の解析

緒言

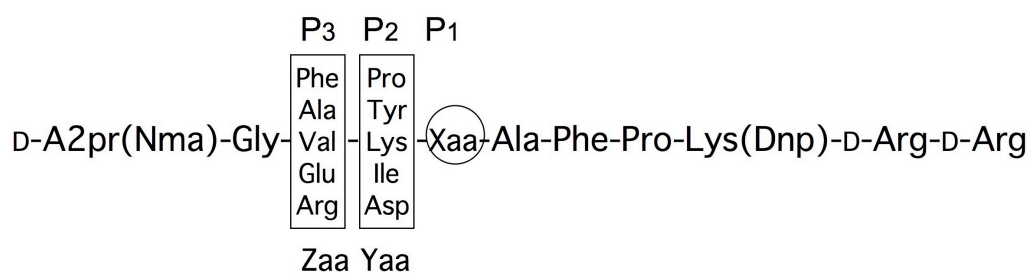
前節において沖縄産ハブ毒から出血性メタロプロテアーゼの分離精製を行い、沖縄県に生息するハブ毒中にも HR1b が存在することを明らかにした。これまでの研究において、奄美産ハブ毒の HR1a と HR1b の出血活性には差があり HR1b が HR1a の約 1.6 倍の活性を示すことが報告されている(鈴木・松田、1994)。これは両出血性メタロプロテアーゼの基質特異性の違いに起因すると考えられる。実際、HR1a はカゼイン基質を分解するのに対し、HR1b はカゼインを分解しない等の両者間における基質特異性の違いが報告されている(Omori-Satoh and Sadahiro, 1979)。ハブ毒の持つ出血性メタロプロテアーゼは触媒部位の亜鉛キレート配列を除きサーモライシンやコラゲナーゼ属などのメタロプロテアーゼとの類似性のない、固有の蛇毒メタロプロテアーゼファミリーに属することが明らかにされている(武谷・岩永、1992)。ハブ毒メタロプロテアーゼの基質特異性はハブ毒の毒性を規定する重要な因子であることから、抗毒素開発に先立って詳細に解析する必要があると考えられる。

本節においては HR1a と HR1b の基質特異性と出血活性との関係について明らかにすることを目的とした。

方法および材料

FRETS-25Xaa Series ペプチドライブラリー

基質特異性の解析には、以下の消光性蛍光基質ライブラリー FRETS-25Xaa Series (株式会社ペプチド研究所) を用いた (Tanskul et al., 2003)。



Xaa には、Cys 以外の 19 種類のアミノ酸が導入され、Yaa と Zaa には、各々性質の異なる 5 種類のアミノ酸の混合物 (Pro, Tyr, Lys, Ile, Asp) と (Phe, Ala, Val, Glu, Arg) が導入されている。すなわち Xaa は 5 種類の Yaa と Zaa 残基の組み合わせよりなる $5 \times 5 = 25$ 種類の基質混合物であり、19 種類の Xaa は合計 475 種類の組み合わせを持った基質ライブラリーとなる。これらペプチド基質のうち最も速く加水分解される Xaa を特定し、その加水分解断片を LC-MS により分析を行い、それらの分子量から切断されたアミノ酸配列を特定した。

精製 HR1a および HR1b

沖縄産ハブ毒出血性メタロプロテアーゼ HR1a および HR1b は前節で精製したものを実験に使用した。

一次スクリーニング

19種類の各 Xaa 基質溶液を 10mM 塩化カルシウムを含む 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) で終濃度 $10 \mu\text{M}$ に調製した。精製 HR1b (1mg/ml) を $4 \mu\text{l/well}$ を 96 well プレート (Corning, 96 well Half Area Flat bottom, Black Polystyrene) に分注し 19 種類の各 Xaa 基質溶液 $100 \mu\text{l}$ を各 well に加え反応を開始した。酵素反応検出は、プロテアーゼ活性により D-A2pr(Nma) と Lys(Dnp)間の結合が切断されることで分子内 Dnp 基により消光されていた Nma 基の蛍光強度 ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) が増加する原理を利用する。蛍光強度の測定には蛍光プレートリーダー (ヴァリオスキャン、サーモエレクトロン) を使用し励起波長 340nm で 440nm の蛍光を 2 分毎に 30 回測定した。単位時間あたりの蛍光強度の増加を Xaa 基質間で比較し、最も速く加水分解される基質を二次スクリーニングに供した。HR1a (0.1mg/ml) についても $10 \mu\text{l/well}$ 分注し HR1b と同様の計測を行った。

二次スクリーニング

一次スクリーニングにおいて特定した最も速く加水分解された FRETs-25Xaa 基質を説明書に従って使用した。基質の水解割合が 0% から 50% の範囲になるよう酵素反応液を調製した。反応産物を HPLC で分析し、各反応産物ピーク面積の単位経過時間あたりの増加を算出比較した。さらに、各加水分解物の断片をそれぞれ LC-MS で分析し、分子量からペプチド配列を決定した。

結果

475 種類の消光性蛍光基質ライブラリー FRET5-25Xaa Series を用いて沖縄産ハブ毒出血性メタロプロテアーゼ HR1a および HR1b の基質特異性の解析を行った。19 種類の各 Xaa 基質溶液の加水分解速度を比較した結果、HR1b が最も速く加水分解する Xaa アミノ酸は Tyr, Leu, Arg の順であった。これに対し、HR1a については Ala と His の順に最も速く加水分解された(Fig.2-2-1)。

次に HR1a および HR1b によりそれぞれ最も速く加水分解された FRET5-25Ala と FRET5-25Tyr を二次スクリーニングの基質として供した(Fig. 2-2-2)。

LC-MS 分析の結果から HR1b は Zaa-Yaa に位置するアミノ酸が Ala-Asp と Arg-Ile のペプチドを最も速く加水分解した。また切断部位が両ペプチド間で異なっていた。Ala-Asp では隣接する Tyr のアミノ基側が切断されるのに対し、Arg-Ile では Tyr の C 末端側が切断されていた。

HR1a は Val-Asp のペプチドを最も速く加水分解し、切断部位は隣接する Ala の C 末端側であった。

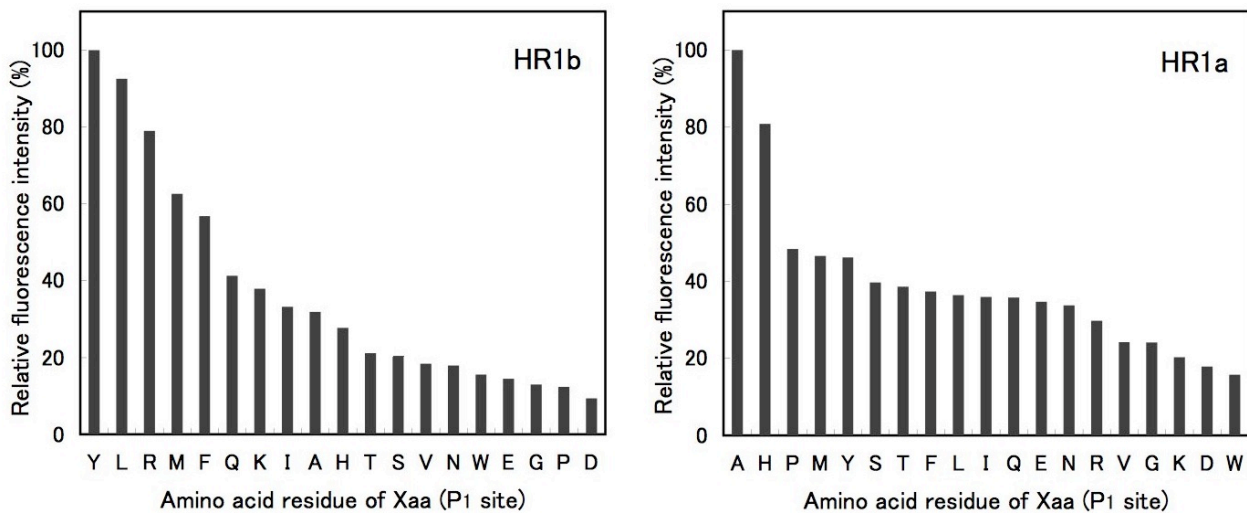


Fig. 2-2-1. Xaa (P1) preferences of the HR1a and HR1b from okinawan *P. flavoviridis* using FRETs Combinatorial Libraries. Results are expressed as relative percentages against the maximal value of FRETs-25Tyr for HR1b, and FRETs-25Ala for HR1a.

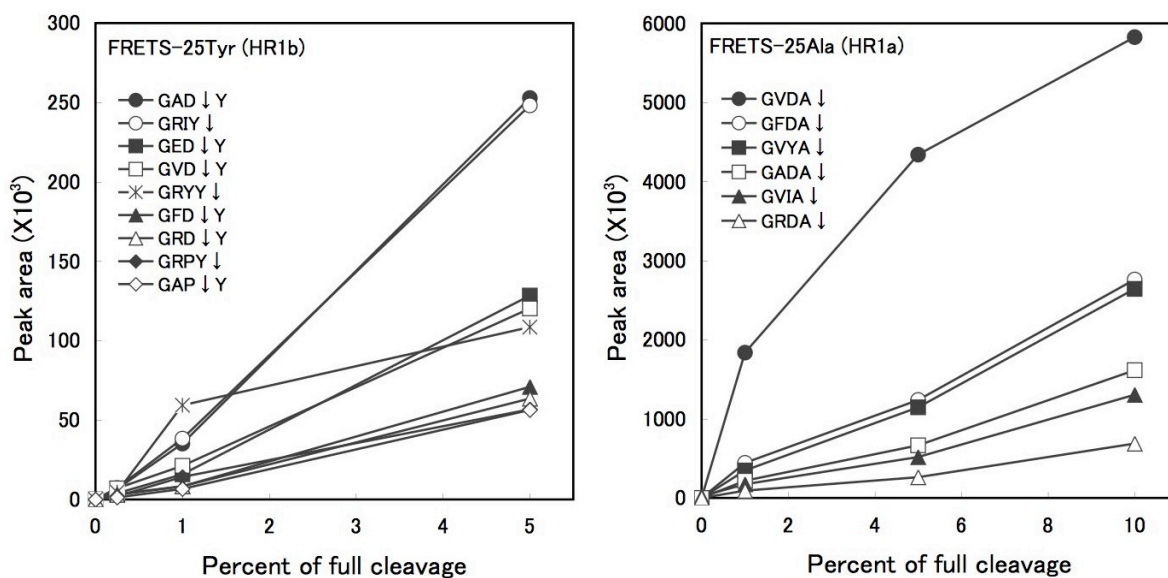


Fig. 2-2-2. Yaa (P2) preference of HR1b and HR1a from Okinawa *P. flavoviridis*. HR1b and HR1a were incubated with FRETs-25Tyr and FRETs-25Ala respectively at room temperature, and the hydrolysates were separated by HPLC. The peak areas of the hydrolyzed products *versus* percent of full cleavage were plotted. The cleaved products were subjected to LC-MS analysis, and were identified by the theoretical molecular weights. The amino acid sequence of these products was shown as G-P3-P2-P1 in one letter notation and cleaved sites are indicated with arrows (\downarrow).

考察

今回の研究においてハブ毒出血性メタロプロテアーゼ HR1a と HR1b の基質特異性に明らかな違いを認めた。一次スクリーニングの結果、HR1a のプロテアーゼ活性によって 50%以上の相対分解速度で分解される Xaa のアミノ酸は Ala と His の 2 アミノ酸であるのに対し、HR1b は Tyr, Leu, Arg, Met, Phe の 5 アミノ酸であり、HR1a に比べて基質特異性が比較的広いことが明らかになった(Fig. 2-2-1)。この結果は精製した吸着フラクション II が HR1b であることを改めて裏付けていると考えられる。奄美産ハブ毒 HR1b は HR1a の約 1.6 倍の出血活性と 1.5 倍近くの致死活性(マウス)をもつことが報告されている(鈴木・松田、1994)。奄美産ハブ毒 HR1b の基質特異性も沖縄産ハブ毒の場合と同一と仮定すると、上述の毒性の強さはこの基質特異性の広さに起因することが想定される。すなわち、HR1b はその広い基質特異性から末梢血管基底膜のコラーゲンをより多くのカ所で切断することにより、出血を効率的に起こすものと推測された。

今回の研究により HR1a と HR1b の基質特異性に顕著な差があることが明らかとなった。これにより、最も速く加水分解されるペプチドすなわち最も親和性の高い基質をそれぞれアフィニティー精製に用いる事で HR1a と HR1b の分離精製が容易に行える可能性が期待できる。

小括

475 の組合せを持つ消光性蛍光基質ライブラリー FRET5-25Xaa を用いて沖縄産ハブ毒出血性メタロプロテアーゼの基質特異性を解析した。HR1b はアミノ酸配列 Ala-Asp-Tyr と Arg-Ile-Tyr に対し、HR1a は Val-Asp-Ala に対して最も強い活性を示し、両者の基質特異性に明

確な差を認めた。基質特異性の異なる複数の出血性プロテアーゼが混在することがハブ毒の毒性発現に重要であることが示唆された。

第三章 ハブ (*Protobothrops flavobiridis*) 毒出血性メ タロプロテアーゼ中和ヒトモノクローナル抗体の作製

第一節 ヒト抗体産生マウスを用いた抗 HR1a ヒトモノクローナ ル抗体の作製

緒言

前章において 沖縄産ハブ毒からの HR1b の分離精製、その基質特異性及び cDNA のクローニングについて述べた。これらの一連の実験により沖縄産ハブ毒にも奄美産ハブ毒と同様に4種類の出血性メタロプロテアーゼ (HR1a, HR1b, HR2a, HR2b) が存在することが明らかとなった。HR1a および HR1b の毒性は HR2a と HR2b よりも強いことが証明されている。事実、奄美産ハブ毒の HR1b は HR1a よりもその毒性が強いことが報告されている。これらのことから、沖縄産ハブ毒でも HR1b の毒性が強いことが類推される。しかし第二章で示したように沖縄産ハブ毒は HR1b の含有量が HR1a に比べ 1/9 程度と少ないことから、沖縄産ハブ毒による出血症状の主因は含有量の多い HR1a と考えられる。そのため、本節においてはハブ毒出血性メタロプロテアーゼ HR1a の出血作用を中和するヒトモノクローナル抗体の作製を目的とし、ヒト抗体産生ハイブリドーマの作製をおこなった。

2002 年にキリンビール株式会社医薬カンパニー (現キリンファーマ株式会社) と Medarex 社 (米国) によりヒト抗体産生マウス (KM マウス™) が開発され、完全ヒト抗体を作製する事が可能となった。ヒト抗体の利点としては本来ヒト体内にある成分と同一であるためアナフィラキシーショック等の副作用が無い点が挙げられる。完全ヒト抗体の作製が可能になっ

たことにより異種抗体の免疫原性の問題も解決され、安全性のみならず同時にヒト抗体Fc部位を介したオプソニン作用による治療効果の向上も期待できる。

そこで本研究は KM マウスを用いてハブ毒の主因である出血性メタロプロテアーゼ HR1a に対する中和ヒトモノクローナル抗体の作製をおこなった。ヒト抗体の作成方法は従来のハイブリドーマ作製技術を応用した。

方法および材料

ヒト抗体産生マウス

KM マウス™(ヒト抗体産生マウス)はキリンビール株式会社医薬カンパニー(現キリンファーマ株式会社)のご好意により提供していただき、8匹の KM マウスで実験をおこなった。8匹の KM マウス(9-12 週齢、雄)に免疫を行い、血中の抗体価が規定値以上に達した個体をハイブリドーマ作製に供した。

抗 HR1a 抗体の検出(ELISA)

抗体検出用 ELISA プレートは CORNING 社の 2593 EIA/RIA Stripwell Plate と住友ベークライト社のアミノプレートを使用した。抗原 HR1a は CORNING 社の ELISA プレートに 50ng/well とアミノプレートに 1.5 μ g/well でそれぞれ固相化した。CORNING 社の ELISA プレートのブロッキングには 1%BSA PBS, 住友ベークライト社のアミノプレートには 3%スキムミルク PBS を使用した。パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体はシグマ社の ANTI-HUMAN IgG(whole molecule) Peroxidase Conjugate Antibody developed in Goat を使用した。TMB(3, 3', 5,

5'-Tetramethylbenzidine)パーオキシダーゼ基質は Moss,INC コスモバイオを用いた。

各プレートの固相化の方法はそれぞれのマニュアルに準じて行った。ELISA 用各抗原 HR1a は不活化せずに使用した。ELISA による抗体価の測定は1次抗原が固相化されたELISAプレートの各wellに検体(培養液上清)を100 μ lずつ加え、37 $^{\circ}$ C、30分間、Shaker-incubatorで攪拌した後、マイクロプレートウォッシャーで3回洗浄を行った。次にPBS(10mM, pH=7.4 0.15M 塩化ナトリウム, 0.05% Tween 20、2% ウシ血清アルブミンを含む)で5,000倍に希釈した2次抗ヒトIgGパーオキシダーゼ標識抗体(SIGMA)を100 μ lずつ加え、37 $^{\circ}$ C, 30分間Shaker-incubatorで攪拌した後、マイクロプレートウォッシャーで3回洗浄を行った。その後の酵素-基質反応はELISAプレートの各wellにTMB(3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine)パーオキシダーゼ基質液を100 μ l加え15-20分間反応させた。遮光しながら反応させた後、1.0N硫酸100 μ l加え反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定した。ネガティブコントロールには未使用の基本培地100 μ lを用いた。

培地

各培地の組成を以下に示す、各培地は調製後0.22 μ mのボトルトップフィルターで除菌して使用した。

a)基本培地.

DMEM (Gibco Ca.No.10313-021)	500mL
Penicillin-Streptomycin-glutamine (x100,Gibco)	5mL

b)増殖培地

Fetal Bovine Serum (大日本製薬)	50mL
DMEM (Gibco Ca.No.10313-021)	500mL
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100x,Gibco)	5mL
2-Mercaptoethanol (5.5x10 ⁻² M)	0.5mL
Bovine Insulin (10mg/ml,Gibco)	0.25mL

c)HAT 培地

Fetal Bovine Serum (大日本製薬)	50mL
DMEM (Gibco Ca.No.10313-021)	500mL
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100x,Gibco)	5mL
2-Mercaptoethanol (5.5x10 ⁻² M,Gibco)	0.5mL
Bovine Insulin (10mg/ml,Gibco)	0.25mL
Hybridoma Cloning Factor(エアブラウン)	50mL
50xHAT (大日本製薬)	10ml

d) HT 培地

増殖培地(b で調製)	500ml
×100 HT Supplement (Gibco)	5ml

赤血球除去用トリス緩衝液(溶血バッファー)

溶血用バッファーは、塩化アンモニウム 0.83g を 100ml の滅菌蒸留水に溶解した I 液と、トリス 2.06g を滅菌蒸留水で溶解し、pH=7.65 に調製後 100ml にした II 液を作製した。I 液と II 液を 9:1 の割合に混合し 0.22 μ m フィルターで除菌し使用した。

抗原およびアジュバントの調製

抗原 HR1a は前章で精製したものをを用いた。免疫用抗原 HR1a は EDTA により不活化し PBS で一昼夜透析したものをディスクシリンジフィルター(0.22 μ m)で除菌して使用した。また ELISA 用抗原は不活化せずに固相化した。

アジュバントの調製は抗原 HR1a(600 μ g/ml)とコンプリートおよびインコンプリートフロイントアジュバントをそれぞれ等量混合してホモジナイザーで乳化した。抗原のタンパク量は1回の接種あたりの免疫適正量である 10-100 μ g/マウスに調製した。

KM マウスの免疫

3週間間隔で基礎免疫(アジュバントによる免疫)を2回行い、その3週間後から2週間間隔で追加免疫を行った。免疫はすべて腹腔内に接種し行った。2回目の基礎免疫以降、マウス尾先から採血し抗体価を測定した。抗体価が規定値に達した個体(採取血液を 4,000 倍以上で希釈した際の ELISA における 450nm の吸光度が 0.2 以上を示す個体)について最終免疫 3-4 日後に脾臓を摘出し細胞融合を行った。

KM マウスの免疫行程

- Day 1 基礎免疫 1・・・HR1a (48 μ g/head + Complete Freund Adjuvant)
- Day22 基礎免疫 2・・・HR1a(48 μ g/head + Incomplete Freund Adjuvant)
- Day26 抗体価測定

Day43 追加免疫1・・・HR1a: 60 μ g/head

Day47 細胞融合・・・(0401,0403)(抗体価測定)

Day57 追加免疫2・・・HR1a: 60 μ g/head(2匹死亡)

Day61 細胞融合・・・(0402,0404,0405,0406)

脾臓細胞及びミエローマ細胞

細胞融合に使用する脾臓細胞は、HR1a に対する抗体価が十分に上昇した個体を最終免疫し、3-4 日後に脾臓を摘出し採集した。HR1a に対する抗体価が十分に上昇した KM マウスはエチルエーテルで浅く麻酔し、抗体価測定用に眼窩静脈叢採血法で採血を行った。採血した KM マウスを頸椎脱臼法で屠殺した後、70%エタノールで全体を消毒した。屠殺後、消毒した KM マウスは安全キャビネット内で開腹し、無菌的に脾臓を摘出した。基本培地で数回洗浄した後脾臓をほぐし、Nylon CellStrainer:100 μ m メッシュ (FALCON) で脾臓細胞を濾過した。脾臓細胞を基本培地 50ml に浮遊させ 400xg、5 分間遠心分離した。遠心分離後上清を吸引除去し、溶血バッファ5ml を加え室温で2分間放置し赤血球を浸透圧により溶血(破裂)させた。2 分後基本培地 40ml をすぐに加え溶血を停止させた。細胞浮遊液は再度 Nylon Cell Strainer を通過させ 400xg、5 分間遠心し、基本培地で1回洗浄した。同培地 10ml に懸濁しミエローマ細胞との融合に供した。

ミエローマ細胞についてはマウス由来 IgG 発現の影響がない Sp2/0-Ag14(大日本製薬)を用いた。ミエローマ細胞は、400xg、5 分間遠心後、基本培地で1回洗浄し、同培地 10ml に懸濁した。調製した脾臓細胞とミエローマ細胞をノイバエル血球計算盤で計測した。脾臓細胞とミエローマ細胞を細胞数 2-4:1の割合で混和し、400xg、5 分間遠心し

上清を取り除いた。その後、融合用緩衝液(0.25M スクロース, 0.1mM 塩化カルシウム, 0.1mM 塩化マグネシウム)10ml に懸濁し培地由来成分を洗浄し、400xg, 5分間遠心し1-2ml の融合用緩衝液に再懸濁した細胞浮遊液を電気細胞融合に供した。

細胞融合

a)電気細胞融合条件

細胞融合は細胞融合装置 BTX ECM2001 (ネッパジーン)と CUY497P2 (CUY520)MS 白金プレート電極 2mm gap 800 μ l を使用した。電気融合装置の条件は交流電圧(アライメント)20-30V/2mm、交流時間 15-20sec、最適交流電場強度 100-150V/cm、交流周波数3 MHz、DC 電圧 400-500V/2mm、DC パルス幅 30 μ sec、パルス回数 1-2 回、電極 CUY501-2 または CUY497P2 (CUY520)、最適 DC 電極強度 2.0-3.0kV/cm に設定した。

b)細胞融合の手順

エタノール滅菌し乾燥させた電極間に細胞浮遊液を注入し、上記条件で脾臓細胞とミエローマ細胞を融合しハイブリドーマを作製した。細胞融合後全量(1-2ml)を 15ml 遠心管に移し 37°C で 20 分間静置した後に 2ml の増殖培地を細胞浮遊液に慎重に加え 200xg で5分間遠心した。その後上清を除き 40ml の増殖培地に再懸濁した。96well 培養プレートに 1×10^4 - 1×10^5 /well の細胞濃度で播種した。24 時間後に2xHAT を含む増殖培地 100 μ l を各 well に加えた。HAT によりハイブリドーマ細胞のみを選択的に増殖させ 37°C、5%CO₂ の条件で培養し、10-15 日後に増殖したハイブリドーマの培養液の抗体価を測定した。

c)ハイブリドーマ細胞産生ヒト抗体の検出

増殖したハイブリドーマ細胞の抗HR1aモノクローナル抗体産生の有無をELISAにより検出した。ハイブリドーマ細胞のコロニーの大きさが目視できるまで増殖した培養液上清を静かに採取し、ELISAで抗体価を測定し抗体産生ハイブリドーマ細胞を特定した。

d)限界希釈法によるクローニング

細胞融合後の96wellプレートwellは抗体産生、非産生の複数のハイブリドーマ細胞を含むため、限界希釈法により抗体産生ハイブリドーマ細胞のクローニングを行った。すなわち、増殖培地で 10^2 cells/20mlの細胞浮遊液を96wellプレートに200 μ lずつ分注することで1cell/wellの細胞濃度にし、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で培養を行い、ELISAによりヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞のみを選択した。さらに同操作を4回繰り返し安定した抗体産生ハイブリドーマを得た。対数増殖期の各ハイブリドーマ細胞(5×10^5 - 1×10^7)を遠心し細胞凍結保存液に懸濁後-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

抗HR1aヒトモノクローナル抗体サブクラスの決定

ヒトIgG抗体サブクラスはHuman IgG subclass screening kit (Cygnus Technologies, Inc. USA)を使用し決定した。抗原HR1aを固相化したELISAプレートに各抗HR1aヒトモノクローナル抗体を一次抗体として反応させた後、各サブクラス抗体特異的標識抗体を二次抗体に使用しサブクラスを特定した。

結果

8個体のヒト抗体産生マウス(KM マウス™)を用いハブ毒性の主因である出血性メタロプロテアーゼ HR1a に対するヒトモノクローナル抗体を作製した。免疫を行った 8 個体の KM マウスのうち6個体の脾臓細胞を細胞融合しハイブリドーマ作製に供したが、2 個体は免疫過程でアナフィラキシーショックと思われる症状で死亡した。KM マウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合した結果、培養プレート well の約9割の割合でハイブリドーマ細胞を得ることができたが、ELISA で明らかに陽性反応を示したのは300株程度であった。およそ300株の融合細胞についてクローニングを行い、最終的に84株の抗HR1aヒト抗体産生細胞を作製することができた。HR1a 免疫 KM マウスの脾臓細胞の数は最大でも 4×10^7 個程度であった(Table 3-1-1)。脾臓摘出時の各マウスの ELISA による希釈タイターは 10,000 以上であった(Table 3-1-2)。

Table 3-1-1. Summary of the hybridoma cell production.

KM Mouse	Spleen cell ($\times 10^7$)	Total hybridoma	Positive hybridoma	Stabled hybridoma
0401	4.5	609	110	27
0402	3.8	432	118	30
0403	2.5	600	63	22
0404	2.2	128	15	3
0405	4.0	96	22	2
0406	3.3	384	23	0

Table 3-1-2. Reactivity to HR1a of serum antibodies from immunized KM

KM mouse	Dilution titer for anti HR1a Human IgG							
	× 100	× 200	× 400	× 800	× 1600	× 3200	× 6400	× 12800
0401	OVER	3.363	3.246	2.590	1.846	1.226	0.727	0.396
0402	OVER	3.249	2.939	1.603	1.977	1.250	0.832	0.227
0403	OVER	OVER	OVER	3.075	3.289	2.510	2.126	0.764
0404	OVER	3.452	3.091	3.120	2.553	1.858	1.313	0.74
0405	OVER	3.183	2.713	1.818	1.000	0.760	0.531	0.337
0406	OVER	3.078	3.092	3.180	2.843	2.176	1.030	1.038

考察

2002年にキリンビール株式会社医薬カンパニー(現キリンファーマ株式会社)とMedarex社(米国)によりヒト抗体産生マウス(KMマウス™)が開発され、完全ヒトモノクローナル抗体を作製する事が可能となった。本研究においてもこのKMマウスを用いたハイブリドーマ作製技術によりハブ毒HR1aに対するヒトモノクローナル抗体を作製した。脾臓摘出時の各KMマウスのELISAによる希釈タイターは10,000以上であり十分に抗体価が上昇していた。しかしKMマウスの脾臓細胞の数は約 $1-4 \times 10^7$ 個とマウスを用いた同様の一般的な実験と比較すると細胞数が少なく、必ずしも十分に免疫されたとは判断できない結果であった。そのため、HR1aに対する最終的な抗体産生ハイブリドーマ細胞の種類が84株と少なかったと推測される。

沖縄県衛生環境研究所は副作用の危険性が少ない、安全な抗ハブ毒ヒト中和抗体を成分とする治療薬開発を目的とした研究を行っている。本研究所ではハブ毒中の他成分についても同様に中和モノクローナル抗体の作製を行っている。例えば浮腫を起こすホスホリパーゼA2やキニン遊離酵素であるN-tosyl-1-arginine methyl ester esteraseに対して5個体のKMマウスから得られた陽性ハイブリドーマの数は500以上と今回に比べ出現率は高かった。ハブ毒HR1aをはじめとするP-III構造を持つSVMPはマウス精子の表面に発現するタンパクPH-30と相同な構造であることが報告されている(Blobel et al., 1992)。マウスにとってPH-30は自己抗原であるためPH-30に対する抗体は産生されない、そのためPH-30とアミノ酸配列及び構造の類似したハブ毒HR1aはKMマウスにとって抗原決定基となる部位が少ないと考えられる。免疫したKMマウスの高い抗体価に反して、得られた抗体産

生ハイブリドーマ数が少ないのは同様の理由によることが推測された。

小括

安全な副作用の危険性がない治療薬開発を目的としハブ毒に対するヒト中和抗体の作製を試みた。8個体のヒト抗体産生マウス(KM マウス)を用い、ハブ毒性の主因である HR1a に対するヒトモノクローナル抗体を作製した。KM マウス脾臓細胞とミエローマ細胞を融合した結果 300 株以上の陽性ハイブリドーマ細胞が得られ、そのうち 84 株が HR1a 結合ヒト抗体を産生した。

第四章 HR1a の立体構造と抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体の HR1a 活性への影響

第一節 抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体の出血性メタロプロテアーゼ HR1a 活性への影響

緒言

前章でハブ毒の主因である出血性メタロプロテアーゼ HR1a に対する 84 株のヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。

各抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体は HR1a 分子表面上のそれぞれ特定の部位に結合するが、結合抗体すべてが HR1a の活性を抑えるわけではない。結合様式には HR1a の活性中心をマスクする、または活性中心から離れ活性に影響を及ぼさない部位に結合するなど様々なパターンが考えられる。ハブ毒 HR1a はプロテアーゼ活性により末梢血管基底膜に作用して出血をおこすが(Ohsaka et al, 1971)、活性に影響の無い部位に HR1a 抗体が結合した場合は、抗原-抗体複合体が食細胞に捕食されるまでの間、活性を維持したまま毒性を発現する事になる。生体内への侵入から発症まで数時間以上かかる細菌やウイルスとは異なり、出血性メタロプロテアーゼ HR1a はハブ毒の生体への侵入と同時に作用し始め、生体内分子を破壊する。従って、メタロプロテアーゼの毒性を抑制するためには、HR1a の活性中心に影響を与え活性を直接抑える結合抗体が必要とされる。

そこで本章では前章で作製した抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体の試験管内におけるプロテアーゼ阻害活性及び生体内における抗出血活性の評価を目的とした。

方法および材料

抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体の調製

84 株のハイブリドーマ細胞を無血清培地で培養しそれぞれの培養液から HR1a に対するモノクローナル抗体を精製した。無血清培地は細胞化学研究所の ALyS-Ab と添加剤 HLCM を使用し、300ml の培養液上清から Montage 抗体精製キット、PROSEP®-G Kit または PROSEP®-A Kit (日本ミリポア)を使用してヒト抗体を精製した。

抗 HR1a ヒト抗体の HR1a プロテアーゼ活性の中和

96well プレート中で抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体と HR1a(0.26 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)3 μl を混合し、0.01M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) で最終容積を 25 μl に調製し、室温で反応させた。抗体と HR1a は抗体過剰のモル比 5:1 で混合した。5 分後 0.01M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) で 0.01mg/ml に調製した BODIPY FL casein (Molecular Probes) 蛍光基質を 75 μl 加え反応を開始した。加水分解により生じる蛍光強度の増加を励起波長 $\lambda_{\text{ex}}=485\text{nm}$ 、測定波長 $\lambda_{\text{em}}=530\text{nm}$ にて 30 分間モニターし、蛍光強度が直線的に増加する範囲の単位時間あたりの傾きを求めた。HR1a プロテアーゼ活性の中和については HR1a のみで反応させた際の蛍光強度増加の傾きを 100%としてこれに対する相対値で表した。

抗 HR1a ヒト抗体の HR1a 出血活性への影響

抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体による HR1a 出血阻害活性は第一章第一節の出血活性の測定法に従って行った。抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体と HR1a(1.4 μg)を混合し、0.01M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) で総反応液量 100-200 μl にし、5°C で 30 分間反応させた。抗体と

HR1a は抗体過剰のモル比 10:1 で混合した。30 分後、日本白色ウサギの背皮に HR1a と各抗体の混合液を皮内接種し、24 時間後に背皮の裏側から出血斑の大きさを測定することで出血阻害活性の有無を判定した。出血活性の値は出血斑の縦と横の長さを乗算し求めた。各抗体の HR1a 出血阻害活性は HR1a のみで反応させた際の出血斑(乗算)の値を 100%としてこれに対する相対値で表した。

結果

前章で作製したハイブリドーマ 84 株の産生するヒトモノクローナル抗体の HR1a プロテアーゼ活性および出血活性に対する影響を調べた。HR1a に対するヒト抗体産生細胞 84 株を無血清培養し抗体を精製した。300ml の培養液から得られた抗体量は 1-10mg の範囲であった。

HR1a に対するヒト抗体 84 株の HR1a プロテアーゼ活性への影響を調べた結果、23 株の抗体が 50% 以上の中和活性を有することが明らかとなった。その他の抗体は全くプロテアーゼ活性を中和しないか、または 50% 未満の中和活性であった。プロテアーゼ活性を中和した 23 株のうち 7 株については 90% 以上の中和が認められ、特に HR1a-7 についてはプロテアーゼ活性の完全な中和が観察された(Table 4-1-1)。

次にプロテアーゼ活性を中和した 23 株の抗体の HR1a の出血活性に及ぼす影響を調べた。明らかに出血活性を中和した抗体は HR1a-7 と HR1a-18 で、中和率はそれぞれ 76.4% と 85.6% であった(Fig. 4-1-1)。中程度(18.5-44.4%)に中和する抗体は HR1a-1、-2、-3、-5、-10、-12、-15、-16、-17 であった。その他の 12 株の抗体は HR1a の出血活性を中和しなかった。

Table 4-1-1. Neutralizing ability of anti-HR1a human monoclonal antibodies.

Monoclonal Antibody	Isotype	%Inhibition	
		Proteolytic activity	Hemorrhagic activity
HR1a - 1	IgG1	83.6	27.5
HR1a - 2	IgG1	86.4	37.8
HR1a - 3	IgG1	61.0	42.0
HR1a - 4	IgG1	91.9	0.0
HR1a - 5	IgG1	92.6	44.4
HR1a - 6	IgG1	87.3	0.0
HR1a - 7	IgG1	100.0	76.4
HR1a - 8	IgG1	60.3	0.0
HR1a - 9	IgG1	82.5	0.0
HR1a -10	IgG1	76.7	23.0
HR1a -11	IgG1	87.7	0.0
HR1a -12	IgG1	88.1	36.5
HR1a -13	IgG1	80.6	0.0
HR1a -14	IgG1	88.1	0.0
HR1a -15	IgG1, IgG4	99.3	31.0
HR1a -16	IgG1	71.3	18.5
HR1a -17	IgG1	85.1	23.5
HR1a -18	IgG1	62.4	85.6
HR1a -19	IgG1	92.1	0.0
HR1a -20	IgG1, IgG4	56.4	0.0
HR1a -21	IgG1	84.2	0.0
HR1a -22	IgG1	90.1	0.0
HR1a -23	IgG1	90.4	0.0

Data are mean of duplicate analysis.

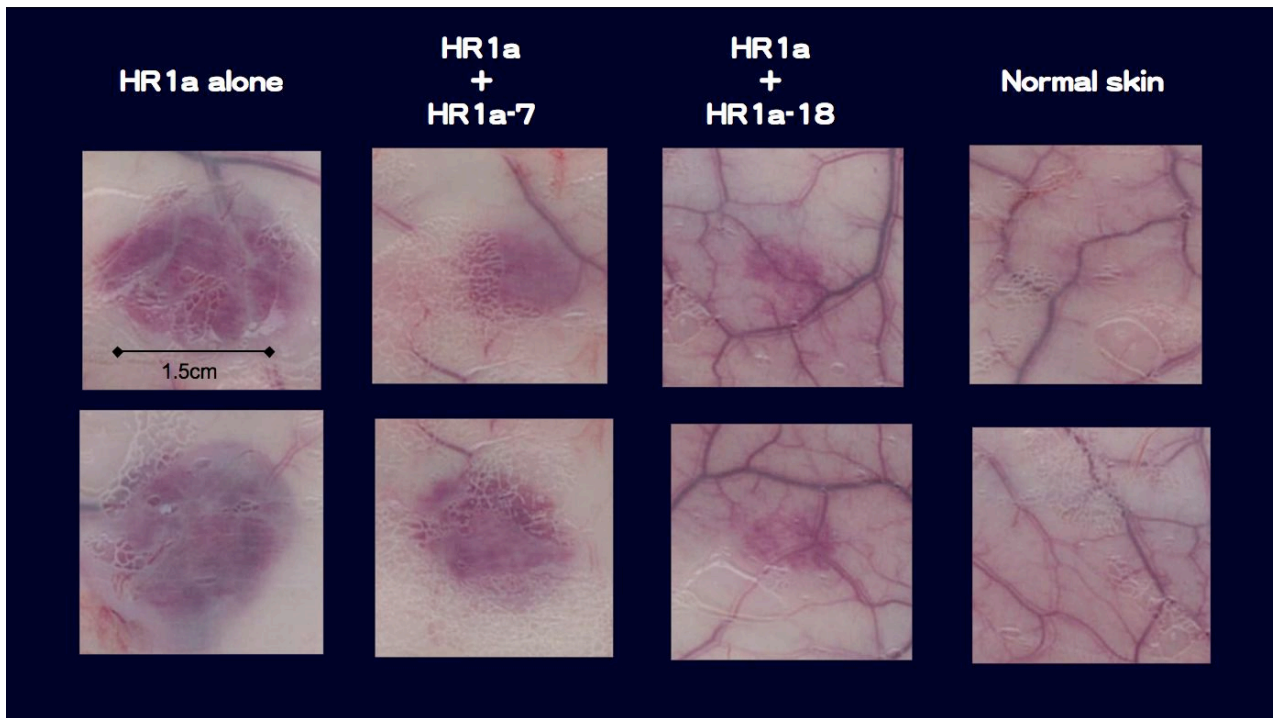


Fig. 4-1-1. Neutralization of hemorrhagic activity by anti-HR1a human monoclonal antibodies.

Human monoclonal antibodies were incubated with HR1a at molar ratio of 10:1 in antibody excess, for 1 h at room temperature. Skin on the back of a Japanese white rabbit is depilated, and antibodies treated HR1a were injected intracutaneously into the back of a depilated rabbit.

考察

84 株の抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体のうち HR1a のプロテアーゼ活性を中和するヒト抗体は 23 株であった。23 抗体の HR1a 出血活性への影響を調べた結果、抗体 HR1a-7 と HR1a-18 は明らかに出血活性を中和した。中和率がそれぞれ 76.4%と 85.6%であったが、抗体量を増やすことでほぼ完全に出血作用を抑えると期待できる。23 株は HR1a のプロテアーゼ活性を 50%以上中和する抗体であるが、ウサギ皮内法による出血活性の中和とは必ずしも相関していなかった。極端な例として、プロテアーゼ活性を 90%近く中和するが出血活性を全く抑えない場合があった(抗体-4、-6、-11、-14、-19、-22、-23)。これらの抗体によるプロテアーゼ活性の中和は、抗体結合による基質と触媒部位間の立体障害によるものではなく、アロステリックな作用によることが考えられた。この事は、より小さな消光性蛍光ペプチド基質(第二章に記述)を用いて行った際にも、これらの抗体がプロテアーゼ活性へほとんど影響を与えないことから示唆される。つまり抗体が HR1a の活性中心付近に結合することで活性部位への基質の取り込みを阻害したのではなく、活性中心からはなれた部位に抗体が結合し、HR1a の立体構造を変化させ基質との結合およびプロテアーゼ活性に影響を与えたと考えられた。このような現象は多くの酵素において報告されている(Brimijoin et al., 1985; Brennan et al., 1994; Saxena et al., 1998 and Roguin and Retegui, 2003)。

今回の研究で HR1a のプロテアーゼ活性測定に基質として蛍光標識カゼイン BODIPY FL casein (Molecular Probes)を用いプロテアーゼ活性を中和する 23 抗体を取得した。そのうち出血活性を中和しない 21 抗体については、抗体が HR1a へ結合することにより、HR1a のもつカ

ゼインへの親和性を弱めるが生体内の末梢血管を構成するコラーゲンへの親和性には影響を及ぼさないことが考えられる。よって、カゼイン基質を用いたプロテアーゼ活性の阻害は必ずしも出血活性の中和を予測する指標とはならないことが示唆された。

通常ハブ咬傷の治療において、生体内に注入された毒量が少ない場合(症状が軽い場合)は副作用を考慮して抗毒素による治療は行われな
い。つまり、必ずしも毒素の全活性を消失させなくても治療効果は充分期待できると考えられる。今回の研究で作製した中和抗体はハブ毒 HR1a による出血を 70%以上抑制する能力をもっており、従って十分な治療効果をもつと考えている。

小括

ハブ毒 HR1a に対する 84 株のヒトモノクローナル抗体のうち HR1a のプロテアーゼ活性を中和する抗体は 23 株であった。HR1a の出血活性に及ぼす 23 抗体の影響を調べた。抗体 HR1a-7 と HR1a-18 は明らかに出血活性を中和した。抗体による試験内における HR1a のプロテアーゼ活性阻害の強さと生体内での出血活性の中和能力は必ずしも相関していなかった。そのことから、カゼイン基質を用いた抗体によるプロテアーゼの中和活性の評価は出血活性の中和能力を予測する指標にならない可能性が指摘された。

第二節 HR1a の立体構造と抗 HR1a ヒト抗体のエピトープマッピング

緒言

前節で HR1a のプロテアーゼ活性を中和する 23 株について出血活性の中和効果を調べた結果、十分に出血活性を中和する抗体は予想に反し 2 抗体のみであった。極端な例は、HR1a のプロテアーゼ活性を 90% 近く中和する抗体が出血活性を全く抑えない例があった。抗体による HR1a プロテアーゼ活性の中和は、HR1a の活性中心付近に抗体が結合することで活性部位への基質の取り込みを阻害すると考え、ハブ咬傷の際の生体内マトリクスコラーゲンについても同様なメカニズムによる出血活性の中和効果が得られると期待していた。しかしプロテアーゼ活性中和と出血活性中和には相関が認められなかった。

基質結合部位への抗体の結合は、基質と触媒部位との反応に立体障害を起こし活性に影響を与えられと考えられる。しかし Tanijoni 等 (2003) は、HR1a と同様な構造を持つ蛇毒メタロプロテアーゼ jararhagin (P-III) の触媒ドメインから離れた disintegrin-like ドメインに結合する抗体が、jararhagin の出血活性を完全に中和したと報告している。

今回の我々の研究においても出血中和活性をもつヒトモノクローナル抗体のエピトープマッピングを行い、さらにエピトープ領域の三次元立体構造を予測することで、分子レベルでの中和反応の解析を試みた。

方法および材料

エピトープマッピング

ハブ毒には 2 種類の低分子出血性(P-I)メタロプロテアーゼ HR2a と HR2b が存在し、これらの構造は HR1a (P-III)のメタロプロテアーゼドメインに相同である(Yamada et al., 1999; Miyata et al., 1989; Iha et al., 1995)。精製 HR2a と HR2b それぞれを固相化したプレート(25 ng/well)を使って HR1a 中和抗体 (HR1a-7 と HR1a-18)の HR2a および HR2b に対する反応性を調べた結果 HR1a 中和抗体 (HR1a-7 と HR1a-18)は HR2a と HR2b それぞれと交叉反応を示した。これより、両中和抗体が認識するエピトープは HR1a のメタロプロテアーゼドメイン上に存在することが示唆された。従って、HR1a メタロプロテアーゼドメインのアミノ酸配列を基にペプチドを合成しエピトープマッピングを行った。

エピトープマッピングは抗原 HR1a のアミノ酸配列を基に、3アミノ酸残基ずつフレームシフトさせた連続的な 15 アミノ酸残基のペプチド断片を合成し C 末端をビオチン化して使用した(Maeji et al., 1995)。Maeji 等(1995)の方法により合成したビオチン化ペプチドを Kurabo(Osaka, Japan)より購入した。

マッピングは以下の手順で行った。ストレプトアビジン処理された ELISA プレート(Nalge Nunc)を PBST(0.05% Tween20 を含む PBS)で 3 回洗浄し、各ペプチドを 0.1%BSA を含む PBST で $0.5 \mu\text{g/well}$ に分注し 1 時間反応させ固相化した。固相化プレートを PBST で洗浄し、抗体 (3g/ml) $100 \mu\text{l}$ を加え、室温で 1 時間反応させた後プレートを 3 回 PBST で再び洗浄した。ペプチドと反応した抗体はパーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ヤギ抗体を使って検出した。

HR1a タンパク立体構造のホモロジーモデリングによる予測

HR1a タンパク質の三次元立体構造は、相同性の高い *Crotalus atrox* 毒の vascular apoptosis-inducing protein 1 (VAP1) および同へビ毒の VAP2B の立体構造データ (Takeda et al., 2006; Igarashi et al., 2007) をテンプレートに Swiss-Model プロテインモデリングサーバー (<http://swissmodel.expasy.org/>) 上でホモロジーモデリング法により構築した。

結果

エピトープマッピングは HR1a メタロプロテアーゼドメインのアミノ酸配列を基に作製した、オーバーラップする連続した 65 のペプチドと中和抗体との反応から HR1a 分子表面結合部位の分析を行った。その結果、両 HR1a 中和抗体 (HR1a-7 と HR1a-18) は ペプチド 1 (EQQRYLNNFRFIELV)、ペプチド 14 (IVNTLNETYRYLYVR) と強く反応することが示された (Fig. 4-2-1)。

次いで、*Crotalus atrox* 毒 vascular apoptosis-inducing protein 1 (VAP1) および同へビ毒 VAP2B の立体構造データを基にハブ (*Protobothrops flavobiridis*) 毒出血性メタロプロテアーゼ HR1a タンパクの立体構造を予測構築した。アミノ酸配列全体の HR1a に対する相同性は VAP2B が VAP1 に比べ高い値を示すが、N 末端領域の相同性が低いため N 末端の立体構造が構築されなかった (Fig. 4-2-2)。従って、本研究においては VAP1 の構造を基に HR1a の立体構造を構築した。

これらのエピトープ領域 (アミノ酸残基 1-15 EQQRYLNNFRFIELV と 40-54 IVNTLNETYRYLYVR) のペプチドは HR1a のメタロプロテアーゼドメイン表面上に露出し、互いに近傍に配置されているものと推察された (Fig. 4-2-4)。

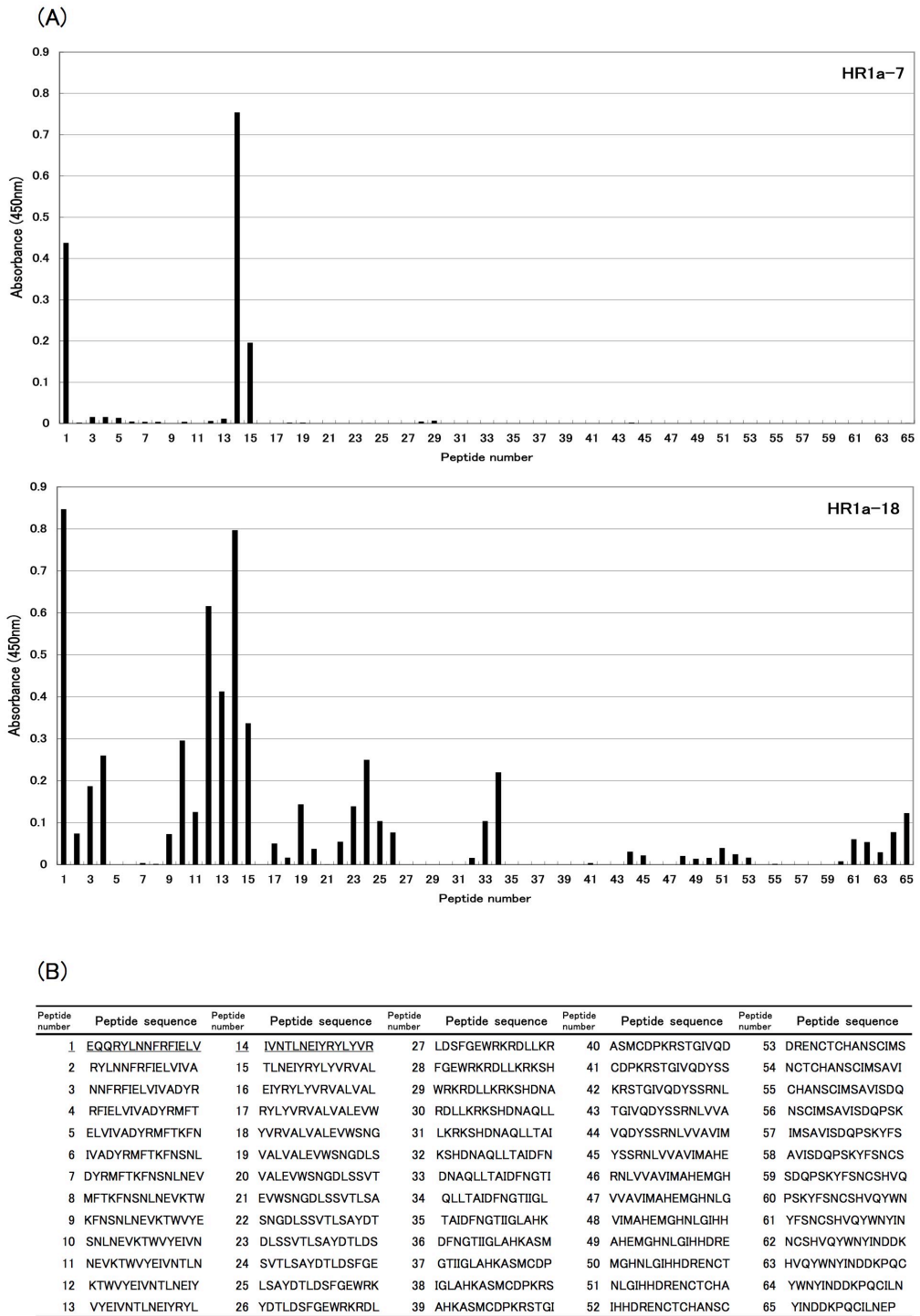


Fig. 4-2-1. Reactivity of the hemorrhage neutralizing HuMAbs HR1a-7 and -18 with 15 mer overlapping peptides covering the metalloproteinase domain of HR1a (A). Overlapping 65 peptides covering metalloproteinase domain of the HR1a (B). The highly reactive peptides are underlined.

VAP1	1	SNLTPEQQRYLNAKKYVKLFLVADYIMYLKYGRNLTAVRTRMYDIVNVITPIYHRMNIHV	60
okinawaHR1a	1	-----EQQRYLNNFRFIELVIVADYRMFTKFNNSLNLEVKTVVYEIVNTLNEIYRYLYVRV	55
VAP2	1	-----HQKY-NPFRFVELVLVVDKAMVTKNNGDLDKIKTRMYEIVNTVNEIYRYMYIHV	53
VAP1	61	ALVGLIEWSNTDKIIVQSSADVTLDLFAKWRATDLLSRKSHDNAQLLTGINFNGPTAGLG	120
okinawaHR1a	56	ALVALEVWSNGDLSSVTL SAYDTLDSFGEWRKRDLKRKSHDNAQLLTAIDFNGTIIIGLA	115
VAP2	54	ALVGLIEWSNEDKITVKPEAGYTLNAFGEWRKTDLLTRKSHDNAQLLTAIDL-RVIGLA	112
VAP1	121	YLGGINMYSAGIVQDHSKIHHLVAIAMAHEMGHNLGMDHDKDTCGTRPCVMAGALS	180
okinawaHR1a	116	HKASMCDPKRSTGIVQDYSRNLVVAVIMAHMGHNLGIHHDRENCTCHANSCTMSAVTS	175
VAP2	113	YVGSMPKPKRSTGITQDYSINLVVAVIMAHMGHNLGINHDSGYCSCGGDYACTMRPEIS	172
VAP1	181	CEASFLFSDCSQKDHREFLIKMPQCILKKPLKTDVVSPA VCGNYFVEVGEECDGSPRT	240
okinawaHR1a	176	DQPSKYFSNCSHVQYWNYINDDKPCILNEPLRTDIVSPPVCGNELLEVGEEDCGSPAT	235
VAP2	173	PEPSTFFSNCSYFECWDFIMHNPECILNEPLGTDIISPVCGNELLEVGEEDCGTPEN	232
VAP1	241	GRDPCCDATTCKLRQGAQCAEGLCCDQCRFKGAGTECRAAKDECDMADVCTGRSAEC-TD	299
okinawaHR1a	236	CRYPCCDAATCKLHSWVECESGECCQCRFRTAGTECRARRSECDIAESCTGHSADCPD	295
VAP2	233	CQNECCDAATCKLKSQSQC GHDCCQCKFKSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSSECPAD	292
VAP1	300	RFQRNGQPCKNNNGYCYNGKCPIMADQCIALFGPGATVSQD ACFQFNREGNHYGYCRKEQ	359
okinawaHR1a	296	RFHRNGQPCLHNFYCYNGNCPIMYHQCYALWGANATVAKDSCFEDNQKGN DYGYCRKEN	355
VAP2	293	VFHKNGQPCLDNYGYCYNGNCPIMYHQCYDLFGADVVEAEDSCFERNQKGN YGYCRKEN	352
VAP1	360	NTKIACEPQDVKCGRLYCFNPSPEKNPCNIYSPNDEDKGMVLPGTKCADRKA CSNGQC	419
okinawaHR1a	356	GRKIPCEPQDVKCGRLYCF--SLGNQLPCRFFYTPDENIGMVDTGKCGDKKVC SNRQC	412
VAP2	353	GKIPCAPEQDVKCGRLYCKDNSSPGQNNPCKMFSNEDEHKGMVLPGTKCADGKVC SNGHC	412
VAP1	420	VDVTTPY	426
okinawaHR1a	413	VDVNTAY	419
VAP2	413	VDVATAY	419

Fig. 4-2-2. Comparison of the deduced amino acid sequence of HR1a with VAP1 and VAP2. The amino acid sequences for VAP1 and VAP2 exhibited approximate homologies of 57.1% and 66.1% with the deduced amino acid sequence HR1a.

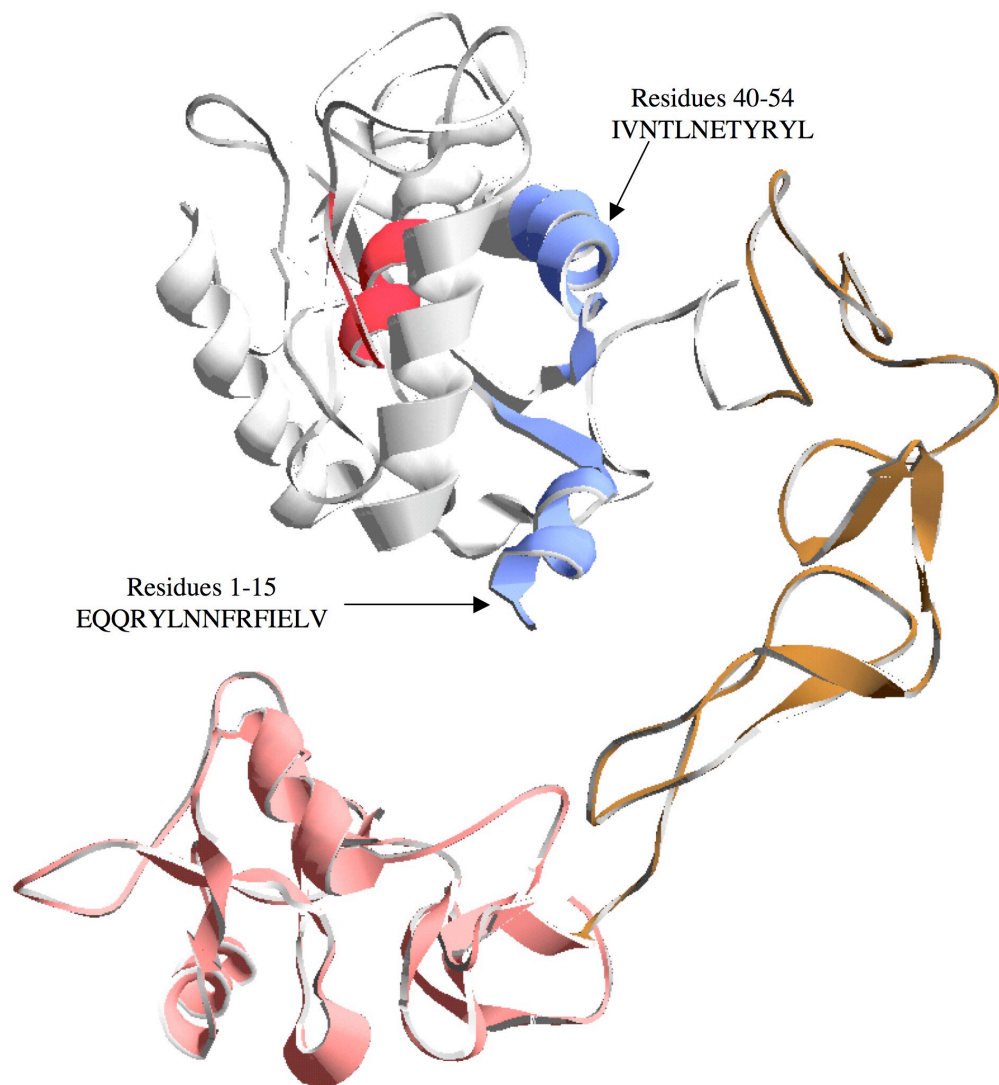


Fig. 4-2-3. Molecular model of HR1a and epitope localization.

The three-dimensional model of HR1a was built by a homology modeling approach using the SWISS-MODEL Protein Modeling Server and three-dimensional structure of vascular apoptosis-inducing protein 1 (VAP1, PDB ID 2EROB) from venom of *Crotalus atrox* as template. Epitopes (residues 1-15 and 40-54), Zn²⁺ chelating motif of catalytic site, the disintegrin-like domain and cysteine-rich domain are shown in light blue, red, brown and pink, respectively.

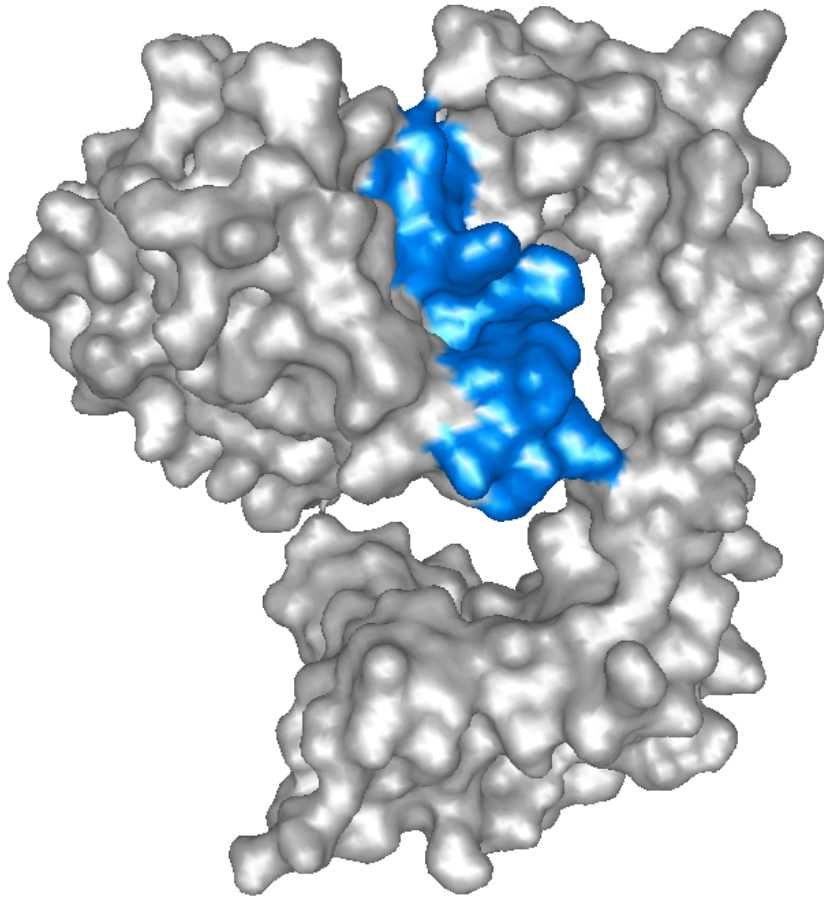


Fig. 4-2-4. Molecular model of HR1a and epitope localization.
Surface representation of HR1a with those epitopes (residues 1-15
and 40-54) shown in light blue.

考察

ハブ毒出血性メタロプロテアーゼ HR1a のプロテアーゼ活性を中和する 23 株のヒト抗体のうち 2 抗体 (HR1a-7 と HR1a-8) は出血活性を中和した。これら両中和抗体が認識する HR1a 分子上のエピトープはアミノ酸残基 1-15 と 40-54 の領域にあり、HR1a メタロプロテアーゼドメインの N 末端側に位置していた。この 2 エピトープ領域はタンパク質の一次構造上は 24 アミノ酸残基離れているが、三次元立体構造上は HR1a 分子の N 末端の表面に隣接していることが立体構造の解析結果から示唆された。2 エピトープが分子表面上に隣接して位置していることから、これらは 2 領域で一組のコンフォメーションなエピトープを構成していることが考えられる。この仮説は両エピトープアミノ酸配列の相同性の低さからも支持された。

今研究で作製した中和抗体は HR1a 分子表面上のこの 2 領域に結合し出血を抑える。ハブ毒 HR1a に相同な他のへび毒メタロプロテアーゼにも構造の類似した領域が存在すると推定され、同領域を抗原とした中和抗体作製が期待できる。

今回の研究で得られた HR1a 中和 2 抗体は HR1a の触媒に関わるプロテアーゼドメインに結合することにより、活性中心に何らかの影響及ぼしていることが考えられる。HR1a の三次元立体構造 (Fig. 4-2-3, 4-2-4) から推測される今回の中和抗体エピトープ (青) は触媒部位 (赤) から離れて位置するため、立体障害による影響ではなくアロステリックな作用である可能性も示唆された。この様に触媒部位から離れた位置に抗体が結合し、活性に影響を及ぼすアロステリックな作用機構は多くの酵素において証明されている (Brimijoin et al., 1985; Brennan et al., 1994; Saxena et al., 1998 and Roguin and Retegui, 2003)。一方で

Tanjoni 等 (2003) は、ハブ毒 HR1a と類似構造を持つ蛇毒メタロプロテアーゼ jararhagin (P-III) が活性中心ドメインから遠方の disintegrin-like ドメインに抗体が結合することで、jararhagin の出血活性を完全に中和すると報告している。Jararhagin の disintegrin-like ドメインと活性中心の触媒部位は空間的に近傍に位置しており、disintegrin-like ドメインを認識する抗体は空間的に基質と酵素触媒部位の接触を妨害し、間接的に酵素活性を抑制することで出血活性に影響を及ぼすと説明されている (Tanjoni et al., 2003)。加えて、最新の研究では、より C 末端側に位置する Cysteine-rich ドメインへの抗体の結合も酵素活性に影響を及ぼすことから、このドメインが基質分子を触媒部位へと誘導する機能をもつことも示唆されている。つまり、抗体のこのドメインへの結合は間接的に基質と触媒部位の相互作用を妨げ、結果論的には酵素活性が低下すると説明されている (Gaultier et al., 2002)。従って、本研究で得た中和抗体 (HR1a-7 と HR1a-18) IgG 分子が触媒部位近傍のエピトープに結合することにより、触媒部位と Cysteine-rich ドメインあるいは触媒部位と基質との相互作用が立体的に障害されることも否定できない。今回の研究において得られている、試験管内で酵素活性は阻害するものの出血活性に対し阻害を示さない抗体のエピトープ領域を詳細に解析することで、ハブ毒咬症による出血作用の各ドメインの機能が明らかになると考えられる。

Jararhagin については、触媒ドメインから離れた disintegrin-like ドメインに抗体が結合することで Jararhagin によって引き起こされる出血を完全に抑えたと報告されている (Tanjoni et al., 2003)。この抗体の出血抑制効果は本研究の場合よりも高いように思われる。これまでの研究において disintegrin-like ドメインは血小板凝集反応を抑制する等、プロ

テアーゼ活性のみならずハブ毒による出血における多岐の反応に関与していることが示唆されている(Tanjoni et al., 2003)。したがって、この領域を認識する抗体は出血活性全般に対してより強い影響を及ぼすことが考えられる。今後は disintegrin-like ドメインおよび Cysteine-rich ドメインも考慮に入れ、プロテアーゼ活性阻害を示さない抗体の出血活性阻害について測定し、中和抗体作製を行う必要と考えられた。

小括

両中和ヒト抗体の抗原 HR1a の結合部位の特定(エピトープマッピング)を行った。HR1a タンパクのアミノ酸配列を基に、3アミノ酸残基ずつフレームシフトさせた連続的なペプチド断片を合成し、HR1a-7 と HR1a-18 の中和抗体と各ペプチドとの反応を ELISA で測定した。その結果、両中和抗体は HR1a 分子表面上の2領域(EQQRYLNNFRFIELV 及び IVNTLNETYRYL)に結合することが明らかになった。立体構造が既知の類似タンパク質を鋳型にした HR1a の立体構造モデリングにより、両結合部位は分子表面上に隣接して配置されていることが示唆され、中和抗体はこれらの空間的立体配位をエピトープとして認識しているものと考えられた。

総括

亜熱帯に位置する沖縄県にはハブなどの毒蛇が生息し、現在でも年間およそ100件以上の咬症事故が集落や農作地を中心に発生している。ハブ咬傷による症状は出血、腫脹、壊死、致死等を起こし、ハブ毒を構成するさまざまな酵素やペプチドの相互的な作用に起因すると考えられ、その主因はハブ毒出血性メタロプロテアーゼと考えられている。

ハブ咬症患者の治療には「乾燥はぶウマ抗毒素」が使用されるが、ウマ血液由来の成分であることから、投与によりアナフィラキシーショック、発疹、掻痒感などの副作用が生じる。そのためヒト抗体に近い抗毒素の作製が望まれてきておりヒト抗体産生マウスを用いたハブ毒中和抗体の研究が進められている。

ハブ毒メタロプロテアーゼはハブ毒の毒性を規定する重要な因子であることから、抗毒素開発に先立って詳細に組成を明らかにする必要がある。そこで本研究では沖縄産ハブ毒の出血性メタロプロテアーゼの組成を明らかにし中和ヒト抗体作製に必要な純度の高い抗原を得ることを目的として、HR1aとHR1bの分離精製を試みた。さらに遺伝子レベルで沖縄産ハブ毒HR1bの存在を確認するとともに、塩基配列からアミノ酸配列の解析を行った。その結果、沖縄ハブ毒にこれまで存在しないとされていたHR1bを分離し、次いで沖縄産ハブの毒腺からHR1bのcDNAのクローニングに成功し、遺伝子レベルでもHR1bの存在を初めて証明した。さらに475の組合せを持つ消光性蛍光基質ライブラリーを用いて沖縄産ハブ毒出血性メタロプロテアーゼHR1aとHR1bについての基質特異性を解析した。両者の基質特異性に明確な差が認められ、基質特異性の異なる複数の出血性プロテアーゼが混在することが、ハブ毒の毒性発現に重要であることが示唆された。

沖縄産ハブ毒による出血症状の主因は含有量の多い出血性メタロプロテアーゼ HR1a と考えられ、その出血作用を中和するヒト抗体産生ハイブリドーマの作製を行い HR1a 結合ヒト抗体 84 株を作出した。出血性メタロプロテアーゼ HR1a の毒性を抑制するためには活性を直接抑える結合抗体が必要とされる。そこで抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体の試験管内におけるプロテアーゼ阻害活性及び生体内における抗出血活性の評価を行った。ハブ毒 HR1a に対する 84 株のヒトモノクローナル抗体のうち HR1a のプロテアーゼ活性を中和する抗体は 23 株であった。HR1a の出血活性に及ぼす 23 抗体の影響を調べた結果、抗体 HR1a-7 と HR1a-18 は明らかに出血活性を中和した。予想に反して HR1a のプロテアーゼ活性を 90% 近く中和する抗体が出血活性を全く抑えない例があった。試験管内における抗体による HR1a プロテアーゼ活性阻害の強さと生体内での出血活性の中和能力は必ずしも相関しておらず、カゼイン基質を用いた抗体のプロテアーゼの中和活性の評価は出血活性の中和能力を予測する指標にならない可能性が指摘された。

中和抗体の分子レベルでの中和反応の解析を目的に出血中和活性ヒトモノクローナル抗体のエピトープマッピングを行い、エピトープ領域の三次元立体構造を予測することを試みた。HR1a タンパクのアミノ酸配列を基に、連続的な 65 ペプチド断片を合成し、各ペプチドとの反応を ELISA で測定した。その結果、両中和抗体は HR1a 分子表面上の 2 領域からなる空間的立体配位をエピトープとして認識しているものと考えられた。今研究で明らかとなったエピトープ領域は活性中心から離れて位置するため、立体障害による影響ではなくアロステリックな作用である可能性も示唆された。他種蛇毒メタロプロテアーゼについては、触媒ドメインから離れた disintegrin-like ドメインおよび Cysteine-rich ドメインに

抗体が結合することで出血作用に影響を与えると報告されている。プロテアーゼドメインのみならず、HR1a 分子全体が出血における多岐の反応に関与していることが示唆されている。したがって、今後は disintegrin-like ドメインおよび Cysteine-rich ドメインも考慮に入れた、中和抗体作製が必要と考えられた。

第六章 要約

和文要約

出血はハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 咬傷の主な症状であり、ハブ毒による血管基底膜が損傷されることによって引き起こされる。この出血症状はハブ毒に存在する蛇毒メタロプロテアーゼファミリーに属するエンドペプチダーゼが主因とされる。

これまで、沖縄県及び奄美諸島に生息するハブ咬傷の治療は「乾燥はぶウマ抗毒素」が使用されてきた。はぶウマ抗毒素は効果の高い治療薬ではあるが、原料がウマ由来の血清であることから血清病やアナフィラキシーショック等の副作用を起こすことがある。このため、副作用のないヒト抗体の開発が強く望まれてきた。そこで、本研究においてはハブ毒の主因であるメタロプロテアーゼ組成を明らかにするとともに、安全なヒトモノクローナル中和抗体の開発とその分子レベルでの反応様式の解明を試みた。

ハブ毒については、同一種でも生息域によりタンパク質組成が異なることが知られている。これまでの研究において、出血性メタロプロテアーゼ4種類のうち沖縄県に生息するハブには HR1b のみが存在しないとされていた。しかしながら、これは不十分な分離精製が原因であることが考えられた。そこで、沖縄産ハブ毒のメタロプロテアーゼ組成をより明確にするため及びより純度の高い抗原を得るために、精度の高いクロマト法を用いてHR1bの精製を試みた。その結果、沖縄産ハブ毒から HR1b の精製に成功し、少量ながら沖縄産ハブ毒にも HR1b が存在することが初めて明らかになった。このことは、分離精製した HR1b のメタロプロテアーゼとしての基質特異性が明らかに HR1a とは異なっていたことから支

持された。次いで、ハブ毒腺からHR1bのcDNAのクローニングを行い、沖縄県に生息するハブの毒にもHR1bが存在する事を追認した。

続いて、出血の主因メタロプロテアーゼであるHR1aに対するヒトモノクローナル中和抗体の作製を試みた。まず、精製したHR1aを抗原にしてヒト抗体を産生するKMマウスを免役した。HR1aを免疫したKMマウスの脾臓細胞とミエローマSP2/0-Ag14を融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞(ヒト抗体産生細胞)の作製を行った。その結果300株のハイブリドーマ細胞から84株のHR1a結合ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞が得られた。これら84株の産生するヒト抗体について、*in vitro*におけるHR1aのプロテアーゼ活性阻害及び*in vivo*における出血阻害を評価し、両者を抑制する抗体HR1a-7とHR1a-18を得た。

次に両中和ヒト抗体の抗原HR1aの結合部位の特定(エピトープマッピング)を行った。HR1aタンパクのアミノ酸配列を基に、3アミノ酸残基ずつフレームシフトさせた連続的なペプチド断片を合成し、HR1a-7とHR1a-18の中和抗体と各ペプチドとの反応をELISAで測定した。その結果、両中和抗体はHR1a分子表面上の2領域(EQQRYLNNFRFIELV及びIVNTLNETYRYL)に結合することが明らかになった。立体構造が既知の類似タンパク質を鋳型にしたHR1aの立体構造モデリングにより、両結合部位は分子表面上に隣接して配置されていることが示唆され、中和抗体はこれらの空間的立体配位をエピトープとして認識しているものと考えられた。

英文要約

Hemorrhage is a major complication resulting from envenomation by the snakebite, and is the bleeding symptom caused by the disruption of the basement membrane of blood vessel. The primary component responsible for this bleeding has been shown to be endopeptidase belonging to the family of snake venom metalloproteinase (SVMP).

The horse anti-venom has been effectively used for the treatment of the habu (*Protobothrops flavoviridis*) bites in Okinawa and Amami islands region. However, the use of anti-venom of animal origin is far less preferable, because a risk of serum sickness such as the anaphylactic shock still exists. Thus, there has been a potential need for the development of more safe and effective antiserum, which prompted us to produce the human monoclonal antibodies against venom of *P. flavoviridis* that essentially have no side effect. This study therefore describes the production and molecular characterization of the human monoclonal antibody that neutralize the hemorrhagic activity of SVMP.

It has been shown that the composition of venom protein shows regional variation even in the same snake species. We thus first attempted identification and characterization for the SVMPs in the snake venom of *P. flavoviridis*. Two closely related metalloproteinases, HR1a and HR1b, were purified from the venom of *P. flavoviridis* (Amami habu). However, it has been reported that the venom of Okinawan *P. flavoviridis* (Okinawa habu) lacks HR1b.

Advanced purification technology used in our study enabled us to purify HR1b from the snake venom of Okinawa habu for the first time. It was also found that the concentration of HR1b in the venom of Okinawa habu was much lower than that for Amami habu. The substrate specificity of HR1b differed from that of HR1a, and distinguished this SVMP from HR1a. Furthermore, cDNA of HR1b has been successfully cloned in support of the occurrence of this protein in the snake venom of Okinawa habu.

In the next step, we attempted the production of human monoclonal antibody against HR1a that was the largest SVMP and mainly responsible for hemorrhage activity of Okinawa habu. The human monoclonal antibodies (HuMAbs) against HR1a were obtained by the fusion of SP2/0-Ag14 myeloma cells and spleen cells from KM mice immunized with purified HR1a. The ability of HuMAbs to neutralize the HR1a was determined by in vitro neutralization assay and by neutralization of the hemorrhagic activity. The initial screening of over 300 hybridoma fusion wells resulted in establishment of 84 HR1a-reactive hybridomas. Of the reactive clones, HuMAb HR1a-7 and HR1a-18 neutralized both proteolytic and hemorrhagic activity of HR1a. Mapping of epitope recognized by the reactive clones was performed by using an ELISA that measured antibody binding to overlapping peptides (15 amino acid peptide offset frameshifted by three residue) covering the metalloproteinase domain sequence of HR1a. HuMAbs HR1a-7 and HR1a-18 neutralized HR1a by reacting with peptides of

EQQRYLNNFRFIELV and IVNTLNETYRYL. The three-dimensional structure of HR1a based on a homology modeling predicted that these two epitopes are surface exposed.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました琉球大学遺伝子実験センターの屋 宏典教授、岩崎 公典助教ならびに琉球大学農学部 of 平良 東紀准教授に深く感謝いたします。

また本論文の審査にあたり、ご指導ならびにご助言を賜りました琉球大学農学部 of 福田 雅一准教授ならびに外山 博英教授、宮崎大学農学部 of 水光 正仁教授、佐賀大学農学部 of 渡邊 啓一教授に深く感謝いたします。

さらに、本研究の遂行にあたり共同研究者として多大なご協力を頂いた沖縄県衛生環境研究所、研究員の松田 聖子氏、寺田 考紀氏、熊本保健科学大学の江藤 晶教授に深く感謝するとともに本実験をご支援下さった琉球大学遺伝子実験センター遺伝子資源応用分野の皆様にも深く感謝いたします。

最後に、KM マウスを御提供頂いたキリンファーマ株式会社に深く感謝いたします。

参考文献

Bjarnason, J.B., Fox, J.W., Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* 62, 325-372 (1994).

Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turvk, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., and White, J.M., A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 365,248-252 (1992).

Brennan, C., Christianson, K., Surowy, T., Mandecki, W., Modulation of enzyme activity by antibody binding to an alkaline phosphatase- epitope hybrid protein. *Protein Eng* 7. 509-514 (1994).

Brimijoin, S., Mintz, KP., Prendergast, FG., An inhibitory monoclonal antibody to rabbit brain acetylcholinesterase. Studies on interaction with the enzyme. *Mol Pharmacol* 28. 539-545 (1985).

Chaga, G. et al., Purification and determination of the binding site of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle on immobilised ferric ions, *J. Chromatogr.* 627, 163 (1992).

Chijiwa, T., Deshimaru, M., Nobuhisa, I., Nakai, M., Ogawa, T., Oda, N., Nakashima, K., Fukumaki, Y., Shimohigashi, Y., Hattori, S., and Ohno, M., Regional evolution of venom-gland phospholipase

A2 isoenzymes of *Trimeresurus flavoviridis* snakes in the southwestern islands of Japan. *Biochem. J.*, 347, 491-499 (2000)

Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532-534 (1993).

Daltry, J. C., Wuster, W. and Thorpe, R. S., Diet and snake venom evolution. *Nature*, 379, 537-540 (1996).

Fishwild, DM., O'Donnell, SL., Bengoechea, T., Hudson, DV., Harding, F., Bernhard, SL., Jones, D., Kay, RM., Higgins, KM., Schramm, SR., and Lonberg, N., High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 14, 845-851(1996).

Gaultier, A., Cousin, H., Darribere, T., and Alfandari, D., ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. *J. Biol. Chem.* 277, 23336-23344 (2002).

Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., Takeda, S., Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. *FEBS Lett.* 581, 2416-2422 (2007).

Iha, M., ZQ, Qi., Kannki, T., Tomihara, Y., Yonaha, K., The primary structure of a hemorrhagic factor, HR2b, from the venom of Okinawa habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Toxicon* 33, 229-239 (1995).

Ishida, I., Tomizuka, K., Yoshida, H., Tahara, T., Takahashi, N., Ohguma, A., Tanaka, S., Umehashi, M., Maeda, H., Nozaki, C., Halk, Ed., Lonberg, Nils., Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo (TC) animals. *Cloning Stem Cells*. 4, 91-102 (2002).

Kishimoto, M., and Takahashi, T., Molecular cloning of HR1a and HR1b, high molecular hemorrhagic factors, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Toxicon*, 40, 1369-1375 (2002).

Kohler, G., and Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497 (1975).

Kondo, H., Kondo, S., Ikegawa, H., Murata, R. and Ohsaka, A., Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jpn. J. med. Sci. Bilo.*13, 43-51 (1960).

Maeji, NJ., Bray, AM., Valerio, RM., and Wang, W., Larger scale multipin peptide synthesis. *Pept Res.* 8(1),33-38 (1995).

Masuda, S., Hayashi, H., Atoda, H., Morita, T., Araki, S., Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur. J. Biochem.* 268, 3339-3345 (2001).

Miyata, T., Takeya, H., Ozeki, Y., Arakawa, M., Tokunaga, F., Iwanaga, S., Omori-Satoh, T., Primary Structure of Hemorrhagic Protein, HR2a, Isolated from the Venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* 105, 847-853 (1989).

Morrison, SL, Johnson, MJ, Herzenberg, LA, Oi, VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 81, 6851-6855 (1984).

Ohsaka, A., Ohashi, M., Tsuchiya, M., Kamisaka, Y., and Fujishiro, Y., Action of *Trimeresurus flavoviridis* venom on the microcirculatory system of rat; dynamic aspects as revealed by cinephotomicrographic recording. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 24, 34-39 (1971)

Ohsaka, A., Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: Lee, C.-Y. Lee. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 52. Springer-Verlag, Berlin and New York, pp. 480-546 (1979).

Omori-Satoh, T., and Sadahiro, S., Resolution of the major hemorrhagic component of *Trimeresurus Flavoviridis* venom into two parts. *Biochim. Biophys. Acta*, 580, 392-404 (1979).

Porath, J. and B. Olin, Immobilised metal ion affinity adsorption and immobilised metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilised iron and nickel ions. *Biochemistry* 22, 1621 (1983).

Ritter, G., Cohen, LS., Williams, C Jr., Richards, EC., Old, LJ., and Welt, S., Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res.* 61,6851-6859 (2001).

Roguska, MA, Pedersen, JT, Keddy, CA, Henry, AH, Searle, SJ, Lambert, JM, Goldmacher, VS, Blättler, WA, Rees, AR, Guild, BC. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91, 969-973 (1994).

Roguin, L.P., Retegui, L.A., Monoclonal Antibodies Inducing Conformational Changes on the Antigen Molecule. *Scandinavian Journal of Immunology* 58. 387- 394 (2003).

Sadahiro, S., Omori-Satoh, T., Lack of a hemorrhagic principle in Habu snake venom, *Trimeresurus flavoviridis*, from the Okinawa Islands. *Toxicon* 18, 366-368 (1980).

Saxena, A., Hur, R., Doctor, B.P., Allosteric control of acetylcholinesterase activity by monoclonal antibodies. *Biochemistry* 37. 145–154 (1998).

Serrano, S.M.T., Jia, L.-G., Wang, D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. *Biochem. J.* 391, 69-76 (2005).

Sadahiro, S., and Omori-Satoh, T., Lack of a hemorrhagic principle in habu snake venom, *Trimeresurus flavoviridis*, from the Okinawa Islands. *Toxicon*, 18, 366-368 (1980).

Sulkowski, E., Purification of proteins by IMAC, *Trends in Biotechnology* 3, 1 (1985).

Takahashi, T., and Ohsaka, A., Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; Complete separation of the principles from proteolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 207, 65-75 (1970).

Takeya, H., Miyata, T., Nishino, N., Omori-Satoh, T., and Iwanaga, S., Snake venom hemorrhagic and nonhemorrhagic metalloendopeptidases. *Methods Enzymol.*, 223, 365-378 (1993).

Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., Araki, S., Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *Embo J.*, 25, 2388 – 2396 (2006).

Takeya, H., Miyata, T., Nishino, N., Omori-Satoh, T., Iwanaga, S., Snake venom hemorrhagic and nonhemorrhagic metalloendopeptidases. *Methods Enzymol* 223, 365-378 (1993).

Takeya, H., Oda, K., Miyata, T., Omori-Satoh, T., and Iwanaga, S., The complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biol. chem.*, 265, 16068-16073 (1990).

Takeya, H., Nishida, S., Nishino, N., Makinose, Y., Omori-Satoh, T., Nikai, T., Sugihara, H., and Iwanaga, S., Primary structures of

platelet aggregation inhibitors (Disintegrins) autoproteolytically released from snake venom hemorrhagic metalloproteinases and new fluorogenic peptide substrates for these enzymes. *J. Biochem.*, 113, 473-483 (1993).

Tanjoni, I., Butera, D., Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon* 42, 801-808 (2003).

Tanskul, S., Oda, K., Oyama, H., Noparatnaraporn, N., Tsunemi, M., and Takada, K., Substrate specificity of alkaline serine proteinase isolated from photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus* KDDS1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309, 547-551 (2003).

Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M., Ishida, I., Double trans-chromosomic mice: Maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and k loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 722 – 727 (2000).

Yamada, D., Shin, Y., Morita, T., Nucleotide sequence of a cDNA encoding a common precursor of disintegrin flavostatin and hemorrhagic factor HR2a from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *FEBS Lett.* 451, 299-302 (1999).

Yonaha, K., Iha, M., Tomihara, Y., Nozaki, M., Yamakawa, M.,
Characterization of three hemorrhagic factors from the venom of
Okinawa habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Toxicon* 29, 703-711
(1991).

Zhang, Z. et al., Production, purification and characterization of
recombinant human interferon gamma, *J. Chromatogr.* 604, 143
(1992).

Zhou, Q., Smith, JB., Grossman, MH., Molecular cloning and
expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus*
atrox (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet
adhesion to collagen. *Biochem. J.* 307, 411-417 (1995).

鈴木宏治、松田道生。蛇毒酵素、インヒビター。止血・血栓・線溶 1994:
438-452.

武谷浩之、岩永貞昭：蛇毒のメタロプロテアーゼファミリー—その新しいド
メイン構造と機能を中心に—。生化学 64:1262、1992.

野崎真敏、富原靖博、山川雅延、香村昂男、瑞慶山良昭、川村善治、
江藤晶、角田俊誠、岡徹也、酒匂光郎。山羊抗毒素の製造について。
昭和 62 年度特殊抗毒素研究報告書 沖縄県公害衛生研究所 1988;
5-13

野崎真敏、香村昂男。ハブ(*T. flavoviridis*)毒の精製。平成7年度特殊抗毒素研究報告書 沖縄県衛生環境研究所 1996;14-17

野崎真敏、盛根信也、寺田考紀。沖縄に生息するハブ属毒の交叉中和実験-沖縄ハブ・サキシマハブ・台湾ハブ・交雑種について-。平成14年度特殊抗毒素研究報告書 沖縄県衛生環境研究所 2003;27-32

宮城良充、真栄城優夫。過去 14 年間のハブ咬症の統計的考察。中毒研究 1994;7:147-152

宮城良充、野崎真敏。ハブ咬症。中毒研究 2007;20:223-233