

蛇毒由来トロンビン様セリン酵素に結合する糖鎖の役割

酒井 淳一^{1,2}, 中野 貴博¹, 齋藤 健治¹, 山本 親¹,
村瀬 豊¹, 岡田 忠², 箭頭真理子^{1,3}, 竹田 忠紘^{1,4}

Abstract

Recently, we determined the primary structure of a thrombin-like protease isolated from the venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger* snake. The protease was found to be a single chain glycoprotein with a molecular weight of 32 kDa, containing 18% carbohydrates. The carbohydrate chain binding positions, Asn81, 99 and 148, were located in the neighbourhood of an active site cleft. In this study, the enzymatic property of the deglycosylated protease was compared to the intact protease in order to elucidate the role of the carbohydrate chain. The deglycosylation of the protease was carried out by glycosidase treatment and the deglycosylated protease with a molecular weight of 26.5 kDa was obtained. The intact protease converted human fibrinogen to fibrin. Fibrinopeptide A, B and B β 1-42 were released during fibrin clot formation. The deglycosylated protease also formed the fibrin clot. Fibrinopeptide A primarily released although the release of the fibrinopeptide B and B β 1-42 was significantly reduced. Removal of the carbohydrate moiety resulted in a decrease in these fragment releases, suggesting that the access of the fibrinogen B β chain to the active site was restricted by the deglycosylation. Thus, the carbohydrate chain may play an important role in the conformational integrity of the active site and also in the interaction between the protease and substrates, especially a large molecular substrate such as fibrinogen.

Key words: snake venom; thrombin-like serine protease; carbohydrate chain

はじめに

マムシ科の毒蛇による咬傷部位では出血が通常より長引くことから、蛇毒中には止血機構に影響を及ぼす因子の存在が古くから知られていた。近年、マムシ科の蛇毒に由来する多様なトロンビン様セリン酵素が分離精製され、そのアミノ酸配列が明らかにされつつある^{1)~3)}。解明されたアミノ酸配列にはセリン酵素の活性中心

をなす配列がよく保存され、トロンビンと類似の糖蛋白質構造であることが明らかにされている。しかしながら、結合している糖鎖の構造解析がされているものは少なく、またその機能については明確にされていない。我々は *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger* の蛇毒からアミノ酸236残基よりなる分子量32kDaの一本鎖糖蛋白質を分離した⁴⁾。この糖蛋白質は合成トロンビン基質をよく水解し、ヒトフィ

本研究の一部には2008年度名古屋学院大学人間健康学部研究奨励金を使用した。

- 1 名古屋学院大学スポーツ健康学部
- 2 愛知医科大学生理学第一講座
- 3 ヤトウ病院
- 4 慶応義塾大学

ブリノゲンからフィブリンクロットを形成させる活性を示した。また、セリン酵素阻害剤により活性が阻害されることから、この糖蛋白質はトロンビン様セリン酵素である特徴を示していた。しかし、アンチトロンビン-IIIによりその活性が抑制されることがなく、また凝固第XIII因子の活性化はみられなかった。また、フィブリンクロット形成時にフィブリノペプチドA、Bに加え、B β 1-42を放出するなど、トロンビンとは異なる特徴も示していた。この糖蛋白質（以下、本トロンビン様セリン酵素と略す）の構造—機能を検討する目的で、アミノ酸配列を分析したところ、Asn81, 99, 148および229位の4箇所糖鎖の結合がみられた⁵⁾。この結合部位はトロンビンの特性に深く関連する部位の近傍であった。本トロンビン様セリン酵素に結合している糖鎖に着目し、糖鎖脱離による酵素活性の変化を調べ、結合糖鎖の役割を検討した。

方法

蛇毒由来トロンビン様セリン酵素の分離

Agkistrodon halys brevicaudus stejneger 蛇毒から張の方法⁴⁾に従い、本トロンビン様セリン酵素を分離精製した。

糖鎖含有量測定

N-glycosidase Fによる酵素分解で本トロンビン様セリン酵素から糖鎖部分を取り、液体クロマトグラフィーにて精製し、糖鎖部分を脱離したものの（以下、糖鎖脱離酵素と略す）の分子量の変化から糖鎖含有量を測定した。分子量測定にはSDS-PAGEおよびMALDI/TOF型質量分析計（Voyager RP, PerSeptive社製）を用いた。

糖鎖脱離による酵素活性の変化

精製した本トロンビン様セリン酵素およびN-glycosidase処理による糖鎖脱離酵素を用いてヒトフィブリノゲンからクロットを形成させた。クロットの液相中に放出されるフィブリノペプチドを逆相液体クロマトグラフィーにて比較した。逆相カラムはBrownlee社製のRP300 200 \times 2.5mmを用い、カラム温度は30 $^{\circ}$ Cで行った。溶媒Aとして純水、溶Bとしてアセトニトリルを使用し、グラジエントプログラムは0 \rightarrow 100%を45分間で行い、測定波長は220nmを用いた。放出されたフィブリノペプチドはアミノ酸配列分析（ProCise492, ABI社製）および質量分析（LCQ, ThermoQuest社製）を行い同定した。

結果

糖含有量測定

グリコシダーゼ処理により得た糖鎖脱離酵素の分子量の低下がSDS-PAGEでみられた。質量分析より本トロンビン様セリン酵素は32,278、糖鎖脱離酵素は26,476であった。これらの結果より、18%の糖鎖を含んでいた。

糖鎖脱離による酵素活性の変化

糖鎖を脱離したことによる酵素活性の変化を図1に示す。本トロンビン様セリン酵素ではヒトフィブリノゲンからフィブリンクロット形成時、フィブリノペプチドA、BおよびB β 1-42を放出した。一方、糖鎖脱離酵素ではフィブリノペプチドAは同様に放出がみられたが、フィブリノペプチドBとB β 1-42の放出が著しく低下していた。

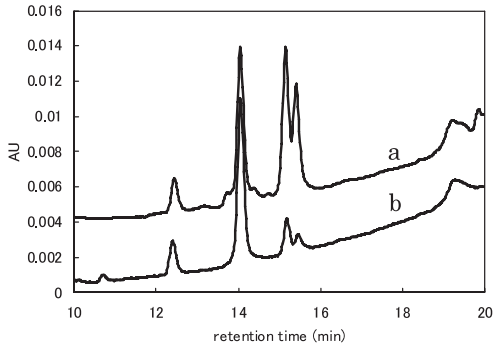


図1 液体クロマトグラフィーによるフィブリノペプチド放出の分析結果を示す。aは精製したトロンビン様セリン酵素による放出動態、bは結合糖鎖を脱離した場合の放出動態を表す。保持時間14.0min, 15.2min, および15.5minのピークはそれぞれフィブリノペプチドA, B, およびBβ1-42を示す。

考察

トロンビンはフィブリノゲンをフィブリンに変換し、また血小板を活性化させ、止血機構において多様な機能を示すセリン酵素である。トロンビンはセリン酵素としての触媒部位を中心にエクソサイト1と疎水性ポケットを備え、その活性中心を構築している⁶⁾。特に疎水性ポケットは触媒部位に隣接し、酵素活性の特徴を表すのに働いている。本トロンビン様セリン酵素にも触媒部位を構築するSer182, His43, Asp88が存在する。

マムシ科の蛇毒に由来するトロンビン様酵素はそのほとんどがフィブリノペプチドAのみの放出で、アミノ酸配列が解明されているものの中でフィブリノペプチドAとBを放出するものはbilineobin⁷⁾と本トロンビン様セリン酵素だけである。両者はともに疎水性ポケットを構築しているアミノ酸残基の一つである50位に芳香族アミノ酸を有する構造上の共通点をもっている。また、フィブリノペプチドAとBを放

出するトロンビンも50位に芳香族アミノ酸であるTrpが同様に存在する。このことよりフィブリノゲンBβ鎖が分解される場合、疎水性ポケットを介し活性中心に誘導されるものと考えられる。興味深いことに本トロンビン様セリン酵素の結合糖鎖は疎水性ポケット近傍のAsp81および99に存在していた。今回、結合糖鎖を脱離することで、フィブリノペプチドBおよびBβ1-42の放出が低下したことは、フィブリノゲンBβ鎖の活性中心への接近が糖鎖脱離により制限されたことを示している。本トロンビン様セリン酵素の糖鎖は分枝鎖構造をもち、非還元末端にNeuAcとFucを含む特徴がみられた⁸⁾。最近、我々は本トロンビン様セリン酵素の糖鎖部分に化学修飾したところ、やはりフィブリノペプチドBおよびBβ1-42の放出に抑制がみられたことを観察し、酵素活性の特性と結合糖鎖の関連性が窺えた⁹⁾。結合糖鎖は、酵素特性を示す疎水性ポケットを分子表面に導き、その構造維持に働いているのかもしれない。本トロンビン様セリン酵素の酵素特性の発現にはアミノ酸配列の特徴に加え、結合糖鎖がフィブリノゲンのような高分子との反応の場合において、基質認識の役割を演じているものと考えられた。

結語

Agkistrodon halys brevicaudus stejneger 蛇毒由来トロンビン様セリン酵素の結合糖鎖の役割を検討した。結合糖鎖を脱離したところ、フィブリノゲンからフィブリンクロットを形成する際、フィブリノペプチドAは放出したが、フィブリノペプチドBとBβ1-42の放出には抑制がみられた。この結果、フィブリノゲンBβ鎖の活性中心への接近が糖鎖脱離により制限され

たと考えられた。本トロンビン様セリン酵素ではフィブリノゲンのような高分子基質との反応において、糖鎖が重要な役割を果たしていると考えられた。

謝辞

本研究の機器分析測定にあたり、協力下さいました愛知医科大学総合医学研究機構高度研究機器部門の成瀬誠氏ならびに深山実氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) Estuko Oyama, Hidenobu Takahashi. Amino acid sequence of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). *Toxicon* 44: 711–721, 2004.
- 2) Chuanchom Muanpasitporn, Ponlapat Rojnuckarin. Expression and characterization of a recombinant fibrinogenolytic serine protease from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom. *Toxicon*, 49: 1083–1089, 2007.
- 3) Masanori Sunagawa, Mariko Nakamura, Tadayoshi Kosugi. Cloning of habutobin cDNA and antithrombotic activity of recombinant protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 362: 899–904, 2007.
- 4) Shujuan Zhang, Bion Ma, Junichi Sakai, Hiroyuki Shiono, Takuya Matsui, Isamamu Sugie, and Tadashi Okada. Characterization of a

thrombin-like serine protease, kangshuanmei, isolated from the venom of a Chinese snake, *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger*. *J Natural Toxins* 10(3): 221–238, 2001.

- 5) Junichi Sakai, Shujuan Zhang, Hongmiao Chen, Fukiko Atsumi, Takuya Matsui, Hiroyuki Shiono, Susum Sanada, and Tadashi Okada. Primary structure of a thrombin-like serine protease, kangshuanmei, from the venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger*. *Toxicon* 48: 311–322, 2006.
- 6) Marie-Claude Guillin, Annie Bezeaud, Marie-Christine Bouton, and Martine Jandrot-Perrus. Thrombin specificity. *Thrombosis and Haemostasis* 74(1): 129–133, 1995.
- 7) Toshiaki Nikai, Akihito Ohara, Yumiko Komori, Jay W. Fox, and Hisayoshi Sugihara. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch Biochem Biophysics* 318(1): 89–96, 1995.
- 8) Junichi Sakai, Ponlapat Rojnuckarin, Panchalee Jangprasert, Takahiro Nakano, Kenji Saitou, Chikashi Yamamoto, Yutaka Murase and Tadashi Okada. Structure of carbohydrate chain of a thrombin-like protease from the venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger* snake. *名古屋学院大学論集 人文・自然科学篇* 46: 35–43, 2009.
- 9) SAKAI, J., ZHANG, S., KATOH, Y., MATSUI, T., SHIONO, H., SUGIE, I. OKADA, T. Chemical modification of carbohydrate chain of a thrombin-like protease isolated from the venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger* snake. *Jpn. J. Physiol.* 53: S187, 2003.