

ハブ毒中の Lys49-ホスホリパーゼ A₂ の構造解析 Structural analysis of Lys49-phospholipase A₂ derived from snake venom.

鎌田しずか¹, 松井崇^{1*}, 小川智久¹, 田中良和¹

¹ 東北大学大学院生命科学研究科

〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

¹Graduate school of Life Sciences, Tohoku University

2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8577, Japan

1 はじめに

ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) は、沖縄県や鹿児島県の南西諸島に生息するクサリヘビ科の毒ヘビの一種である。ハブによる咬傷に対する治療は、主にハブウマ抗毒素を用いるが、筋壊死に対しては有効な臨床効果を得ることができず、四肢の壊死による切断など、後遺症が残ることが課題であった。咬傷の受傷による筋壊死は、ハブ毒中に存在する Lys49-ホスホリパーゼ A₂ (以下、Lys49-PLA₂ と記述) が細胞膜に結合して、細胞膜を破壊することが、発端であると考えられているが、未だその詳細なメカニズムは不明なままである。そこで、Lys49-PLA₂ による筋壊死機構の解明に向け、ハブ Lys49-PLA₂ の X 線結晶構造解析を実施した。

2 実験

これまでの研究から、ハブ粗毒から CM52 陽イオン交換クロマトグラフィー (15 mm i.d. × 870 mm) により高純度精製する方法を確立済みである [1]。本研究では、この方法により 20 mg/ml の Lys49-PLA₂ を調製した。この試料を、100 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.2)、32.5%(w/v) PEG4000、500 mM 硫酸アンモニウムを含むバッファー中で、シッティングドロップ法により結晶を得た。得られた結晶は上記結晶化バッファーに 20%(v/v) エチレングリコールを含む高凍結剤に浸した後、BL-17A にて分解能 2.57 Å の回折像を収集した。メキシコに生息する毒ヘビ (*Antropoides nummifer*) の類縁酵素の立体構造 (PDB ID: 2AOZ) をサーチモデルに用いた分子置換法により、ハブ由来 Lys49-PLA₂ の X 線結晶構造を決定した。

3 結果および考察

Lys49-PLA₂ の構造精密化後の最終構造の $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ factor はそれぞれ 20.2%/23.5%であった。非対称単位中には4分子の Lys49-PLA₂ が存在していた。これまで、多くの毒ヘビ由来 PLA₂ の立体構造解析が成され、それらの多くは二量体として報告されてきた。そこで、非対称単位中の分子の組み合わせによって二量体を形成するか確認した。すると、本研究で対

象としたハブ由来 Lys49-PLA₂ はこれまで報告されているとは異なり、非対称単位中の4分子はどの分子との組み合わせをとっても多量体を形成する特徴を見いだせず、単量体として存在することが明らかとなった。

一方、Lys49-PLA₂ を SDS-PAGE で分析すると、分子間 S-S 結合を持つタンパク質複合体と同じように非還元状態で二量体として存在することが確認された。つまり、結晶構造と SDS-PAGE の結果に大きな矛盾が生じた。

この矛盾に対して、質量分析計や分析用超遠心機による物理化学的な分析を行ったところ、驚くべきことに、強力な変性剤である SDS 存在下で、ハブ由来 Lys49-PLA₂ は多量体化することが明らかになった。細胞膜のミミックである界面活性剤である SDS 存在下で Lys49-PLA₂ が多量体化することから、細胞膜上でも、単量体分子である Lys49-PLA₂ が多量体化する可能性を示すことができた [2]。

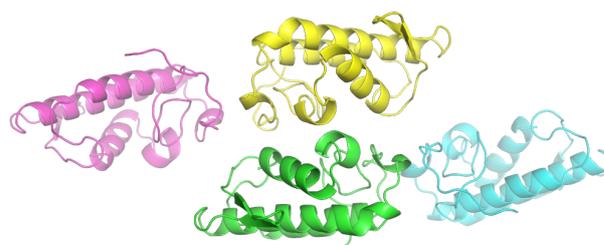


図1：非対称単位中の4分子の Lys49-PLA₂ の構造

謝辞

本研究を遂行するに当たり、SBRC のビームラインスタッフのサポートに感謝致します。

参考文献

- [1] S. Y. Liu., *J. Biochem.* **107**, 40-408 (1990).
[2] T. Matsui, *Sci. Rep.* **9**, 2330 (2019).

* matsui@kitasato-u.ac.jp