

沖縄島産ハブ毒の毒性成分 HR1b の分析検討*

大城聡子・上江洲由美子・盛根信也・寺田考紀・岩崎公典**

Western Blot Analysis of HR1b in the Venom of Snake Okinawa Habu

Akiko OSHIRO, Yumiko UEZU, Nobuya MORINE, Koki TERADA and Hironori IWASAKI**

要旨：沖縄島に生息するハブ(*Protobothrops flavoviridis*)のハブ毒と奄美大島に生息するハブのハブ毒から毒性成分 HR1b の検出に、抗 HR1b ペプチド抗体 (ウサギ由来) を用いてウエスタンブロットィングを行った。発色法と化学発光法の検出感度の比較、ブロッキング溶液と発色基質の検討を行った。発色法 (基質: BCIP/NBT) により、精製 HR1b は 20 ng 以上検出された。奄美大島産ハブ粗毒と沖縄島 (北部) 産ハブ粗毒 0.5 μ g から精製 HR1b と同様に 60 kDa 付近で、バンドが検出された。

Key words: HR1b, *Protobothrops flavoviridis*, Okinawa habu, Western blotting

I はじめに

ハブ毒には、出血活性、筋壊死、浮腫など多様な性質があり、これらを引き起こす毒性成分は、タンパク質である。コブラやウミヘビ毒は神経毒であるが、クサリヘビ科に属するハブやマムシは、出血毒が毒性成分の中心となっている¹⁾。沖縄島産ハブと同種の奄美大島産のハブ毒には、主要毒性成分 HR1 が 2 種類存在し、それぞれ HR1a と HR1b とよばれる²⁾。これまで沖縄島産のハブ毒には HR1a のみ存在し、HR1b は存在しない³⁾とされてきたが、沖縄島産のハブ毒にも HR1b が存在することが最近確認された⁴⁾。HR1b が確認されたハブ粗毒は、沖縄島で捕獲された複数個体のハブ毒の混合物であり、全個体が HR1b をもつのか、あるいは HR1a は持たずに、HR1b のみを持つ個体がいるのか、地域個体差については不明である。そこで HR1b の含有量について、個体毎の分析を行うことを目的として、ウエスタンブロットィングでの検出方法を検討した。

検出方法を確立すれば、沖縄島産ハブの個体毎の HR1b 含有量を測定でき、地域差や個体差があるのか調査が可能となり、抗ハブ毒ヒト抗毒素研究に寄与すると考える。本研究では、ハブ毒 HR1b 特異的抗体を用いて、ハブ個体毎に HR1b 組成の分析のための条件検討を行った。

II 方法

1. 材料

本研究所で奄美大島産ハブ粗毒から精製され、MALDI-TOF-MS により質量分析を行い、HR1b と確認された毒と同じ精製方法で精製された HR1b を奄美大島産 HR1b 標準品 (以下、精製 HR1b) として用いた。

本研究所で飼育されている奄美大島産ハブ 1 個体およ

び沖縄島 (北部) 産ハブ 1 個体より、それぞれ毒を採取し、2,200 rpm で 10 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心処理後、上清を奄美産ハブ粗毒、沖縄 (北部) 産ハブ粗毒とした。

2. 毒の SDS-PAGE とタンパク質の転写

精製 HR1b、奄美産ハブ粗毒、沖縄 (北部) 産ハブ粗毒を 0.01M Tris-HCl 0.01M CaCl₂ pH8.0 で各濃度に調整した。濃度調整した各ハブ毒を 2 μ l, NuPAGE LDS sample buffer(4x) 2.5 μ l, NuPAGE sample reducing agent (10x) 1 μ l をそれぞれ加え、NuPAGE LDS sample buffer 濃度が 1.1 倍になるように、蒸留水を添加した。これを 70 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱し、SDS-PAGE 試料とした。分離ゲルは、NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gels, 1.0mm 12well, MOPS SDS running buffer (20x) 40 ml を蒸留水で 800 ml に調整し、running buffer とした。泳動は、XCell SureLock Mini -cell (life technologies), パワーステーション III (アトー株式会社) を用いて、200 V 定電圧を 50 分の通電で行った。サンプル泳動中の再酸化を防ぐため、通電する前に、NuPAGE antioxidant 500 μ l を陰極 buffer 槽に加え、電気泳動を行った。SDS-PAGE で用いた試薬は、すべて life technologies 製である。

タンパク質の転写を行うために、NuPAGE Transfer buffer (20x) (life technologies) 50 ml, NuPAGE antioxidant 1 ml, 蒸留水 849 ml, 特級メタノール (関東化学株式会社) 100 ml で 1 L の transfer buffer を調整した。XCell II Blot Module (life technologies) とパワーステーション III (アトー株式会社) を用いて、30 V 定電圧、2 時間の通電により、上記 SDS-PAGE で得られたゲルから PVDF メンブレン 0.2 μ m (life technologies) へタンパク質の転写を行った。SDS-PAGE ゲルの染色は、CBB Stain One (nacalai tesque)

* 本研究は抗ハブ毒ヒト抗毒素の実用化事業費によって実施した。

** 琉球大学熱帯生物圏研究センター

を用いた。分子量マーカーは、Novex Sharp Unstained Protein Standard(life technologies), Magic Mark XP Western Protein Standard(life technologies)を使用した。

3. 免疫反応検出

1次抗体は、株式会社スクラム製 HR1b の抗ペプチド抗体 (ウサギ由来) (以下、抗 HR1b 抗体) を 8.0 µg/ml に調整し、分析に供した。

2次抗体は、Anti - rabbit IgG (whole molecule) - Peroxidase antibody produced in goat (SIGMA), Secondary Antibody Solution Alk -Phos conjugated (Anti-rabbit) (life technologies)を用いた。ブロッキング溶液と抗体希釈液は、WesternBreeze blocker/diluent (A and B) (life technologies)を調整した。また、ブロッキング溶液の検討では、Protein-free blocking buffer(Thermo scientific), スキムミルク(nacalai tesque)を PBS および TBS で溶解し、ブロッキング溶液に供した。抗体洗浄液は、WesternBreeze Wash solution (16x) (life technologies)を用いて調整した。ブロッキング溶液、抗体希釈液、抗体洗浄液は、0.1%Tween20 を添加した。発光法の基質は、Novex HRP Chromogenic Substrate (TMB) (life technologies), Novex AP Chromogenic Substrate (BCIP/NBT) (life technologies)を用いた。

化学発光法では、Clarity Western ECL Substrate (BIO RAD)を使用した。検出装置には、ChemiDoc XRS Plus (BIO RAD)システムを使用した。各反応時間と方法は、WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit(life technologies)に準じた。

III 結果と考察

1. HR1b の発色法と化学発光による検出比較

HR1b を 5 ng から 160 ng までを上記 II 方法 2. 毒の SDS-PAGE とタンパク質の転写, 3. 免疫反応検出を行った。2次抗体 Anti - rabbit IgG (whole molecule) - Peroxidase antibody produced in goat を 1: 5,000 希釈し、Novex HRP Chromogenic Substrate (TMB)を用いた発色法では、HR1b 160 ng のみ検出した (図1)。化学発光法では、2次抗体を 1:15,000 に希釈し、30-300 秒間露光、冷却 CCD カメラで撮影した。化学発光法では、HR1b 80 ng, 160 ng を検出することができ、発色法と比べ2倍の感度が得られた (図2)。

2. ブロッキング溶液の検討と発色基質の検討

HR1b の検出感度を 80 ng 以下にするために、ブロッキング溶液と発色基質を検討した。HR1b 5 ng から 160 ng までを上記 II 方法 2. 毒の SDS-PAGE とタンパク質の転写, 3. 免疫反応検出を行った。ブロッキング溶液

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

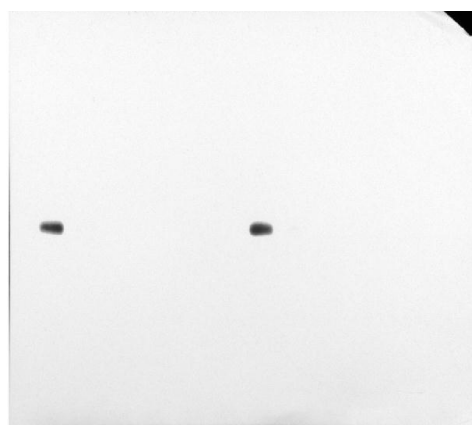


図1. HR1b の発色法による検出。ブロッキング溶液：WesternBreeze blocker/diluent(A and B), 1次抗体：抗 HR1b 抗体 8.0 µg/ml 10 ml, 2次抗体：抗ウサギ IgG(全分子)抗体-ペルオキシダーゼ標識 1:5,000 10 ml, 基質：Novex HRP Chromogenic Substrate(TMB), Lane 1,7 : HR1b 160 ng, Lane 2,11 : HR1b 80 ng, Lane 3,9 : HR1b 40 ng, Lane 4,10:HR1b 20 ng, Lane 5,11:HR1b 10 ng, Lane 6,12 : HR1b 5 ng

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

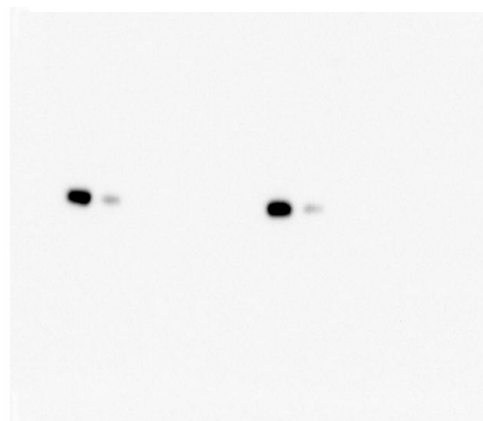


図2. HR1b の化学発光法による検出。ブロッキング溶液：WesternBreeze blocker/diluent (A and B), 1次抗体：抗 HR1b 抗体 8.0 µg/ml 10 ml, 2次抗体：抗ウサギ IgG(全分子)抗体-ペルオキシダーゼ標識 1:15,000 10 ml, 基質：Clarity Western ECL Substrate , Lane 1,7 : HR1b 160 ng, Lane 2,8 : HR1b 80 ng, Lane 3,9 : HR1b 40 ng, Lane 4,10:HR1b 20 ng, Lane 5,11 : HR1b 10 ng, Lane 6,12 : HR1b 5 ng

は、WesternBreeze blocker/diluent (A and B)を調整した溶液、タンパク質を含まない Protein-free blocking buffer, 1%スキムミルク in PBS-T, 1%スキムミルク in TBS-Tを用い、2

次抗体 Secondary Antibody Solution Alk-Phos conjugated (Anti-rabbit), 基質 Novex AP Chromogenic Substrate (BCIP/NBT)による発色法を行った. ここでは示していないが, Protein-free blocking buffer, 1%スキムミルク in PBS-T, 1%スキムミルク in TBS-Tでブロッキングしたメンブレンは, HR1b 40 ng 以上を検出した. WesternBreeze blocker/diluent (A and B)でブロッキングしたメンブレンは, HR1b 20 ng 以上を検出した (図3). この結果より, 以後ブロッキング溶液を WesternBreeze blocker/diluent (A and B), 2次抗体 Secondary Antibody Solution Alk-Phos conjugated (Anti-rabbit), 基質 Novex AP Chromogenic Substrate (BCIP/NBT)を用いた発色法で, HR1b 検出を行った.

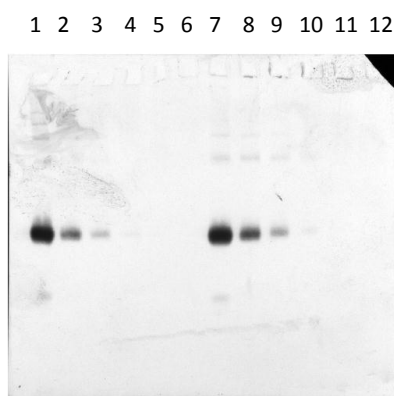


図3. HR1b の発色法による検出. ブロッキング溶液: WesternBreeze blocker/diluent (A and B), 1次抗体: 抗HR1b抗体 8.0 µg/ml 10 ml, 2次抗体: 2°Antibody Solution Alk-Phos conjugated (Anti-rabbit) 10 ml, 基質: Novex AP Chromogenic Substrate (BCIP/NBT), Lane 1,7: HR1b 160 ng, Lane 2,8: HR1b 80 ng, Lane 3,9: HR1b 40 ng, Lane 4,10: HR1b 20 ng, Lane 5,11: HR1b 10 ng, Lane 6,12: HR1b 5 ng

3. 奄美産ハブ粗毒と沖縄(北部)産ハブ粗毒の検出

奄美産ハブ粗毒と沖縄(北部)産粗毒を 5 µg, 10 µg, (20 µg)に希釈し, 精製 HR1b 20 ng-80 ng と同一ゲルで SDS-PAGE, タンパク質の転写を行った (図4). 各濃度の精製 HR1b は, 検出下限のため CBB 染色では検出されなかったが, ウェスタンブロットでは検出された. 奄美産ハブ粗毒と沖縄(北部)産粗毒では, SDS-PAGE ゲルの CBB 染色, ウェスタンブロットにおいても, HR1b が検出される 60kDa 付近でバンドが検出された. 次に, 粗毒からの HR1b 検出の検出下限を調べるために, 奄美産ハブ粗毒と沖縄(北部)産粗毒を 0.25 µg-4 µg まで希

釈し, 精製 HR1b 20 ng-80 ng と同一ゲルで SDS-PAGE, タンパク質の転写を行った(図5). ここでは示していないが, 転写後のゲルを CBB 染色した結果, 各粗毒 2 µg, 4 µg のレーンで, 低分子量タンパクが検出されたが, HR1b が検出される 60kDa 付近では, 特にタンパク質は検出されなかった. また, タンパク質の転写時に, メンブレンを2枚重ね, タンパク質が検出用メンブレンを通り抜けていないか, 検出用メンブレンと同様, 重ねたメンブレンも免疫反応検出を行った. その結果, 2枚目のメンブレンからは, 分子量マーカを含むすべてのレーンよりバンドは検出されなかった. よって, 粗毒に含まれる 60kDa 付近のタンパク質 (HR1a, HR1b) は, 検出用メンブレンにほとんど転写されたと考えられる.

図5, 表1より奄美産ハブ粗毒および沖縄(北部)産ハブ粗毒の 0.5 µg 以上のレーンで精製 HR1b と同様, 60kDa 付近にバンドが検出された. 今後, 抗HR1b抗体のHR1aとの非特異的反応を確認し, 沖縄島産ハブ粗毒からHR1bを含む固体があるのか, 個体数を増やし, 個体差や地域差について調査する.

V 参考文献

- 1) 上田直子・千々岩崇仁・大野素徳(2004) ハブ毒を科学する 多様な生理機能と加速進化. 化学と生物, vol.42 NO10: 687-693.
- 2) Tamotsu Ohmori-Satoh and Seiji Sadahiro (1979) Resolution of the major hemorrhagic component of *Trimeresurus flavoviridis* venom into two parts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 580, 392-404.
- 3) Seiji Sadahiro and Tamotsu Omori-Satoh (1980) Lack of a hemorrhagic principle in habu snake venom, *Trimeresurus flavoviridis*, from the okinawa island. *Toxicon*, 18: 366-368.
- 4) Nobuya Morine, Seiko Matsuda, Koki Terada, Hironori Iwasaki and Hirotsugu Oku (2008) The Occurrence of HR1b in the Venom of the Snake Okinawa Habu (*Protobothrops flavoviridis*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(2), 591-594.

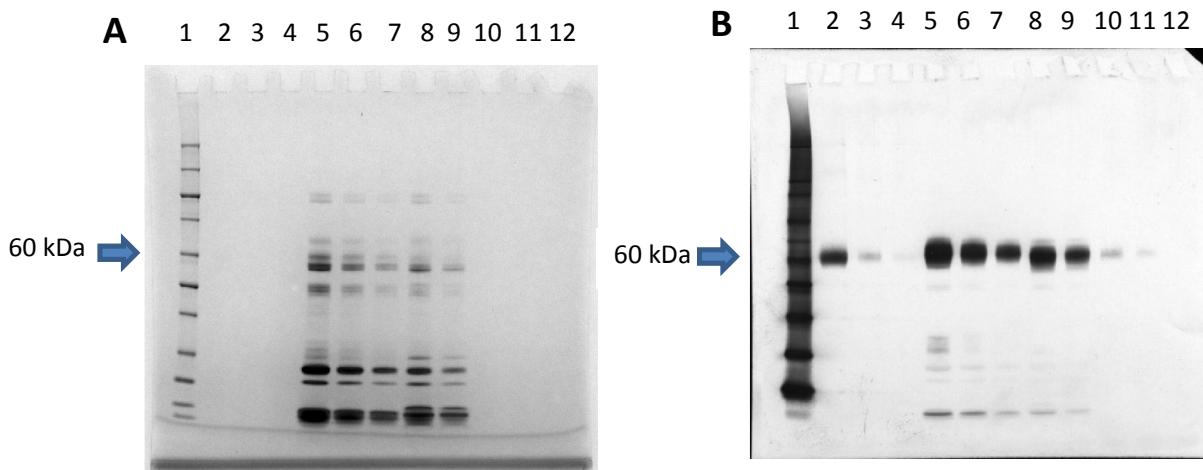


図4. 奄美産ハブ粗毒と沖縄(北部)産ハブ粗毒のSDS-PAGEおよびウエスタンブロット. A: SDS-PAGE, B: ウエスタンブロット, ブロッキング溶液: WesternBreeze blocker/diluent(A and B), 1次抗体: 抗HR1b抗体8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 10ml, 2次抗体: 2 $^{\circ}$ Antibody Solution Alk-Phos conjugated (Anti-rabbit) 10ml, 基質: Novex AP Chromogenic Substrate (BCIP/NBT), Lane1: 分子量マーカー, Lane2: HR1b 80 ng, Lane3,10: HR1b 40ng, Lane4,11: HR1b 20ng, Lane5: 沖縄(北部)産ハブ粗毒20 μg , Lane6: 沖縄(北部)産ハブ粗毒10 μg , Lane7: 沖縄(北部)産ハブ粗毒5 μg , Lane8: 奄美産ハブ粗毒10 μg , Lane9: 奄美産ハブ粗毒5 μg , Lane12: control

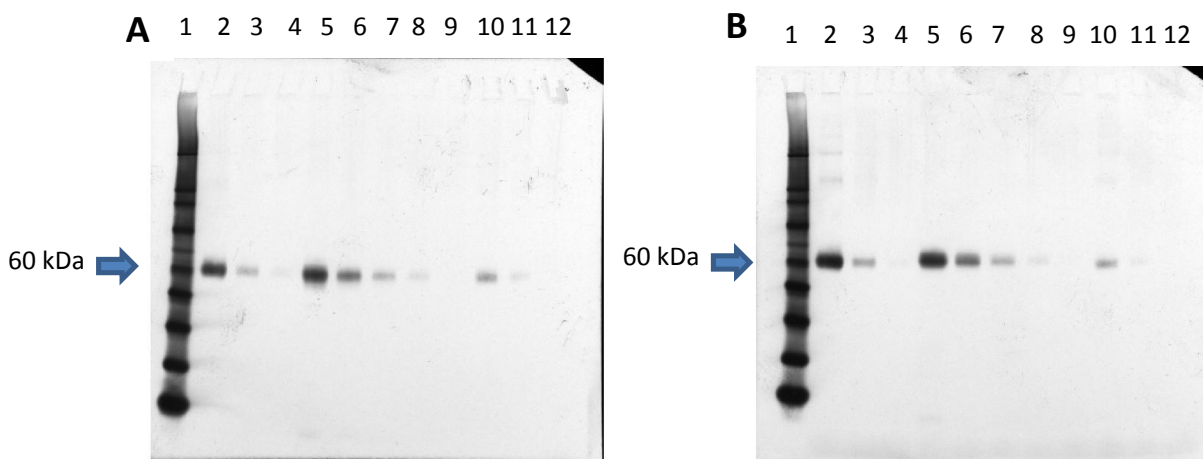


図5. 奄美産ハブ粗毒と沖縄(北部)産ハブ粗毒のウエスタンブロット. A: 奄美産ハブ粗毒, B: 沖縄(北部)産ハブ粗毒, ブロッキング溶液: WesternBreeze blocker/diluent(A and B), 1次抗体: 抗HR1b抗体8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 10ml, 2次抗体: 2 $^{\circ}$ Antibody Solution Alk-Phos conjugated (Anti-rabbit) 10ml, 基質: Novex AP Chromogenic Substrate (BCIP/NBT), Lane1: 分子量マーカー, Lane2: HR1b 80 ng, Lane3,10: HR1b 40ng, Lane4,11: HR1b 20ng, Lane5: 各ハブ粗毒4 μg , Lane6: 各ハブ粗毒2 μg , Lane7: 各ハブ粗毒1 μg , Lane8: 各ハブ粗毒0.5 μg , Lane9: 各ハブ粗毒0.25 μg , Lane12: control

表1. 奄美産ハブ粗毒と沖縄(北部)産ハブ粗毒のウエスタンブロットの検出結果(まとめ). 検出: +, 不検出: N.D, 測定未実施: -.

ハブ毒の種類	粗毒濃度 (μg)							
	20	10	5	4	2	1	0.5	0.25
奄美産ハブ粗毒	-	+	+	+	+	+	+	N.D
沖縄(北部)産ハブ粗毒	+	+	+	+	+	+	+	N.D