

クサリヘビ科毒中の主成分プロテアーゼ毒素について

財津佳史・堤陸・四ヶ所亮輔・小倉彩香・倉岡功・塩井（青木）成留実*

（令和2年5月27日受理）

Proteinase families in snake venom from Vipers

Yoshifumi ZAITSU, Riku TSUTSUMI, Ryosuke SHIKASHO, Ayaka OGURA, Isao KURAOKA
and Narumi AOKI-SHIOI*

（Received May 27, 2020）

Abstract

Snakebite envenoming has been categorized as “a neglected tropical disease” by the World Health Organization (WHO), which is a serious human health issue in many countries. Recently, WHO has released a strategy for prevention and control of snakebite due to target 50 % reduction in deaths and disabilities. As of now, there is a limited clinical evidence for their use in the effective snakebite treatment for human. Because, the only effective treatment against snakebites is intravenous administration of antivenom, the antibodies that are isolated from animals immunized with snake venom toxins. However, such use of heterologous antibodies has numerous inherent problems, notwithstanding unaffordable high-cost. Additionally, local tissue damage is not neutralized by antivenom, and results in permanent morbidity and disability in patients

Crude venom of venomous snake is a complex mixture of bioactive proteins and peptides, especially Viperidae includes enzymatic toxin mainly. A high-throughput technologies are rapid developing and have been to play an important role in “venomics” projects which is combined genome, transcriptome, and proteome analyses of various venomous species to have been conducted to characterize divergent venom toxins and the venom-related genes. Venomics analysis can also inform about mechanisms of toxin production, storage, and delivery to guide antivenom and therapeutic strategies against envenomations and identify new toxin-derived drugs.

Here, we review recently published information on venomous snake research and we focus on main enzymatic toxins; snake venom metalloproteinase and phospholipase A₂. These toxins in main component induce hemorrhage disrupts capillary networks and necrosis responsible for local tissue damage and results in facilitating toxin dispersion. The review looks at structural and functions aspects of these enzymatic toxin and identifies hurdles in the development of inhibitors for snakebite therapeutics.

Keywords: snake venom metalloproteinase, phospholipase A₂, venomous snake, venomics

1. はじめに

Snakebite Envenoming（毒ヘビ咬傷）の被害は、世界で毎年180～270万人に上り、その中で、死者8.1万～13.8万人、さらに40万人に対して永続的な障害（四肢切断など）を引き起こす。2018年に世界保健機関（World Health Organization ; WHO）は、2030年までにヘビ咬傷被害を50%減少させる事業計画を発表し、その予算額は総額1億376万USドルである[W1]。WHOは、人間に対するヘビ咬傷の影響の臨床的特徴より、毒ヘビを2つのCategoryに分類した。公衆衛

生問題上で医学的重要性が最も高いとされる Category 1 の定義は、“共通して、広範の地域において多くのヘビ咬傷被害を引き起こし、高いレベルの罹患率、障害、または死亡率をもたらす非常に有毒なヘビ”とされ、主にコブラ科（Elapidae）およびクサリヘビ科（Viperidae）である（表1）[1]。およそヘビ3700種の中で600種が毒ヘビと分類され、その内200種のViperidae, Elapidae, Atractaspididae, Colubridae（一部を除く）が、世界で深刻なヘビ咬傷被害を引き起こしている[W2] [1]。ヘビ毒液は、多種多様な生理活性物質の宝庫であり、被捕食者の生体恒常性を破壊する。

Geographical regions	Species		Total
Africa and the Middle East	Atractaspididae	<i>Atractaspis anderssoni</i>	1
	Elapidae	<i>Dendroaspis viridis</i> , <i>Dendroaspis angusticeps</i> , <i>Dendroaspis jamesoni</i> , <i>Dendroaspis polylepis</i> ; <i>Naja anchietae</i> , <i>Naja annulifera</i> , <i>Naja asheia</i> , <i>Naja arabica</i> , <i>Naja haje</i> , <i>Naja katiensis</i> , <i>Naja melanoleuca</i> , <i>Naja mossambica</i> , <i>Naja nigricollis</i> , <i>Naja nigricincta</i> , <i>Naja nivea</i> , <i>Naja oxiana</i> , <i>Naja senegalensis</i>	17
	Viperidae	<i>Bitis arietans</i> , <i>Bitis gabonica</i> , <i>Bitis nasicornis</i> , <i>Bitis rhinoceros</i> ; <i>Cerastes cerastes</i> , <i>Cerastes gasperettii</i> ; <i>Daboia mauritanica</i> , <i>Daboia palaestinae</i> ; <i>Echis borkini</i> , <i>Echis carinatus</i> , <i>Echis coloratus</i> , <i>Echis jogeri</i> , <i>Echis leucogaster</i> , <i>Echis ocellatus</i> , <i>Echis omanensis</i> , <i>Echis leucogaster</i> , <i>Echis pyramidum</i> ; <i>Macrovipera lebetina</i> , <i>Montivipera xanthina</i> 1; <i>Pseudocerastes persicus</i> .	20
Asia and Australasia	Elapidae	<i>Acanthophis laevis</i> ; <i>Bungarus caeruleus</i> , <i>Bungarus candidus</i> , <i>Bungarus niger</i> , <i>Bungarus magnimaculatus</i> , <i>Bungarus multicinctus</i> , <i>Bungarus sindanus</i> , <i>Bungarus walli</i> ; <i>Naja atra</i> , <i>Naja kaouthia</i> , <i>Naja naja</i> , <i>Naja mandalayensis</i> , <i>Naja philippinensis</i> , <i>Naja samarensis</i> , <i>Naja siamensis</i> , <i>Naja sumatrana</i> , <i>Naja sputatrix</i> , <i>Naja oxiana</i> ; <i>Notechis scutatus</i> ; <i>Oxyuranus scutellatus</i> ; <i>Pseudonaja affinis</i> , <i>Pseudechis australis</i> , <i>Pseudonaja mengdeni</i> , <i>Pseudonaja nuchalis</i> , <i>Pseudonaja textilis</i> .	25
	Viperidae	<i>Cryptelytrops albolabrisa</i> , <i>Cryptelytrops erythrurus</i> , <i>Cryptelytrops insularis</i> , <i>Calloselasma rhodostoma</i> ; <i>Deinagkistrodon acutus</i> , <i>Daboia russelii</i> , <i>Daboia siamensis</i> ; <i>Deinagkistrodon acutus</i> ; <i>Echis carinatus</i> ; <i>Gloydius blomhoffii</i> , <i>Gloydius brevicaudus</i> , <i>Gloydius halys</i> ; <i>Hypnale hypnale</i> ; <i>Macrovipera lebetina</i> , <i>Protobothrops flavoviridis</i> , <i>Protobothrops mucrosquamatus</i> ; <i>Viridovipera stejnegeria</i> .	17
Europe	Viperidae	<i>Vipera ammodytes</i> , <i>Vipera berus</i> , <i>Vipera aspis</i> .	3
the Americas	Viperidae	<i>Agkistrodon bilineatus</i> , <i>Agkistrodon contortrix</i> , <i>Agkistrodon piscivorus</i> , <i>Agkistrodon taylori</i> ; <i>Bothrops asper</i> , <i>Bothrops atrox</i> , <i>Bothrops cf. atrox</i> (Trinidad), <i>Bothrops bilineatus</i> , <i>Bothrops alternatus</i> , <i>Bothrops brazili</i> , <i>Bothrops caribbaeus</i> (St Lucia), <i>Bothrops lanceolatus</i> (Martinique), <i>Bothrops diporusa</i> , <i>Bothrops jararaca</i> , <i>Bothrops jararacussu</i> , <i>Bothrops leucurus</i> , <i>Bothrops mattogrossensis</i> , <i>Bothrops moojeni</i> , <i>Bothrops pictus</i> , <i>Bothrops venezuelensis</i> ; <i>Crotalus adamanteus</i> , <i>Crotalus atrox</i> , <i>Crotalus durissus</i> , <i>Crotalus durissus</i> (Aruba), <i>Crotalus horridus</i> , <i>Crotalus oreganus</i> , <i>Crotalus simus</i> , <i>Crotalus scutulatus</i> , <i>Crotalus totonacusa</i> , <i>Crotalus viridis</i> , <i>Lachesis muta</i>	31

Table 1 List of venomous snake species in Category 1.

Category 1 was characterized a subset of species of higher medical importance in the four geographical areas of the world by WHO. The highest medical importance to human public health (category 1) is “highly venomous snakes which are common or widespread and cause numerous snakebites, resulting in high levels of morbidity, disability or mortality.” This table summarized of report provided by WHO [1]. This table is reused with permission in accordance with the permission guide line of the publisher of Open Access books, IntechOpen, from ref.[10]

また、毒液注入が体内で引き起こす臨床学的な症状は、毒ヘビの種により大きく異なる。現代もなお致死的な毒ヘビ咬傷被害が多い理由は、ヘビの種間はもちろん、種内でも生息域により毒成分やその割合が大きく異なるため、治療薬が確立されにくいのが原因である。

現在、唯一の効果的なヘビ咬傷治療法は、ヘビ毒液で免疫された動物（主にウマ）に由来する抗毒素血清（antivenom）が使用されている。しかしながら、多数の毒成分から生成された異種抗体を使用する場合、生命を脅かすアナフィラキシーショックや血清病などのアレルギー疾患の可能性が高くなる。そのため、抗毒素血清を用いた治療は、一般的にアレルギー検査を行い、過剰な免疫応答を抑える薬を併用する。さらに抗毒素血清は、比較的長時間の静脈内投与が必要とされる。このような抗毒素血清投与方法による治療の遅延は、局所組織の損傷が緩和できないことがある [2]。

また、この抗毒素血清は、冷蔵保存が必要で1本6万円から8万円と高価であり、亜熱帯地域の発展途上国では治療ができない家族が多い。したがって、現在のヘビ咬傷治療は地理的にヘビ毒成分が異なることに加え、抗血清の製造に費用がかかり、さらに中和が不完全であるという問題点が議論される [2]。これらの問題を軽減するために、抗毒素血清の代替品として、特定の致死毒素に対する阻害剤が積極的に合成され、*in vitro* 実験においてヘビ毒の毒性を中和し、評価されてきた。しかしながら、依然としてこれらの毒素阻害剤には、毒素に対してのみ示す特異的な効果など、ヒトへ臨床応用できる安全性を備えたものはなく、課題が残っている [3–5]。これまで当研究室では、毒ヘビ独自が持つ自己の毒に対する耐性機構および、特異的ヘビ毒を阻害する阻害タンパク質に焦点を当てて研究を行ってきた [6]。我々は、人間に安全でかつ比較的

低価なヘビ毒咬傷治療薬の創製を目指し、主にクサリヘビ科が引き起こす、ヘビ咬傷の後遺症(局所的障害:筋壊死や出血)を軽減できる方法を探索する。この総説では、ここ10年間のトキシノロジー分野の研究をまとめるとともに、局所的障害の原因毒素といわれる筋壊死毒素(Phospholipase A₂; PLA₂)と出血毒素(Snake venom metalloproteinase; SVMP)の作用機構について分子レベルで深く理解する。

2. ベノミクス (venomics) 研究について

生物毒を中心として扱うトキシノロジー (Toxinology) 分野では、プロテオミクス、トランスクリプトミクスおよびゲノミクスの3つの“-omics”解析を組み合わせてベノミクス (venomics) と呼ばれる包括的な研究が最近多く報告されている [7]。近年の急速な科学の進歩によって、ハイスループットな技術を使って毒ヘビの種間や種内の毒のバリエーションの原因となる成分分析が可能となった [8]。例えば、Next-Gen Sequencing (NGS) や Oxford Nanopore (minION) テクノロジーは、多重バーコードライブラリを使用していくつかの毒腺トランスクリプトームと一緒にシーケンスすることが可能であり、NGS は加速的に断片的な遺伝子情報を集め、収束することを得意とする。一方、minION は長い遺伝子配列の読み取りを可能とする技術をもち、トランスクリプトームアセンブリーエラーを修正できる第3世代シーケンサーと呼ばれる [9]。これらのテクノロジーは、いくつかのヘビ毒腺のトランスクリプトームシーケンスを通じて大規模なデータセットを生成するために時間や費用が低減できる。我々は、NGS テクノロジー (Illumina および Roche) などにより、現在、Category 1 に分類される毒ヘビの毒腺トランス

クリプトーム、cDNA クローンライブラリー、およびゲノムの情報を調査し、まとめた [10]。Category 1 の完全長トランスクリプトームは、近年、急速するシーケンシングデータの増加にもかかわらず、約20%にすぎず、完成したヘビゲノム解析の数は10%未満であった (参考文献 [10] の table 2 を参照)。

トランスクリプトミクスを中心とした遺伝子発現プロファイルとプロテオミクスによる毒液タンパク質発現プロファイルの両方を組み合わせた解析は、実際、ヘビ咬傷治療において臨床的症状の特徴付けには必要不可欠である。最近、毒素の同定 (主に一次構造配列) のための種固有のデータベース (毒腺トランスクリプトーム) を利用し、プロテオミクスによる成分分析より、各種に存在する固有の毒素をより適切に区別する方法が急速に進展している。

3. ヘビ毒成分のプロテオミクス解析

ヘビ毒液は、ホホをマッサージするように外側から毒腺を刺激し、ミルキング (milking) という方法で採取される。Category1 の主要ヘビ (コブラ科とクサリヘビ科) は、上顎の上部に管状の牙 (Front-fang) を持っており、生えかわるための新しい牙が1年間に10本以上作られる。特にクサリヘビ科の牙は長く鋭く、獲物の体奥深く突き刺さり、確実に大量の毒を注入する仕組みになっている。そのため、50 ml プラスチックチューブを噛ませるように上顎と下顎を広げ、milking による毒液採取は比較的簡単である (図1)。一方、Colubridae, Homalopsidae, および Lamprophiidae に属するヘビは、上顎の後方に配置された溝付きまたは溝のない後方扇状の牙 (Rear-fang) を持つ (Atractaspidinae 亜科の一部ヘビは除く) (図2)

(a)



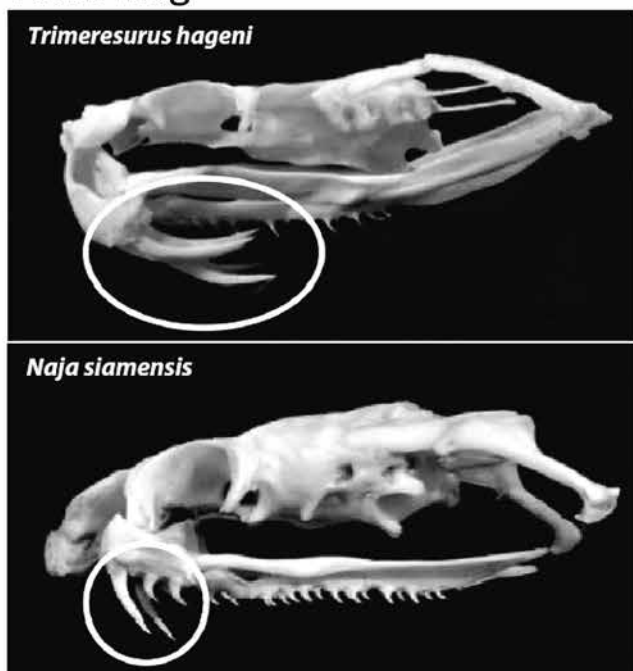
(b)



Fig.1 Images of crude venom collection (milking) from Vipers.

(a) The picture is Habu (*Protobothrops flavoviridis*), (b) the right picture is Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) which provided by Dr. Mrinalini.

Front-fang



Rear-fang

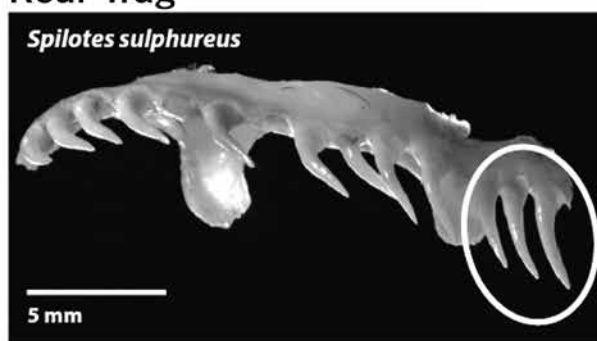


Fig.2 The features of frangs in venomous snakes.

Front-fanged venomous snakes are shown in the left; *Trimeresurus hageni* (Hagen's pit viper) and *Naja siamensis* (Indochinese spitting cobra). A rear-fanged venomous snake; *Spilotes sulphureus* (Amazon puffing snake), is shown in the right. Viperidae and Elapidae have fangs anterior in the upper jaw, thus they are often called front-fanged venomous snakes. On the other hand, Colubridae, Homalopsidae, and Lamprophiidae are called rear-fanged venomous snakes, and

have fangs posterior in the upper jaw. This figure is modified of figure 1 in the ref. [52]. These original images of frangs are cited from ref.[11, 53] with permissions according to Permissions Guidelines of Nature Research publisher and The ROYAL SOCIETY publishing.

[11, 12]. Rear-fang ヘビは、毒液が少なく採取が難しい、また、すべての種が有毒であるとは限らず、比較的性が温和で人間に対して無害とされることが多い [13, 14].

上記に述べたトランスクリプトーム解析技術は、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)、質量分析 (MS) と組み合わせられ、微量成分であっても様々なヘビ毒の迅速な同定を可能にした。この進歩によって現在 100 を超える種のヘビ毒のプロテオームが公開されている [15, 16]。2017 年、T. Tasoulis と G.K. Isbister は、過去 10 年間に公開された 132 種のヘビ毒液プロテオミクス解析を比較分析している [17]。彼らは、コブラ科 (Elapidae) の 42 種、クサリヘビ科 (Viperidae) のクサリヘビ亜科 (Viperinae) 20 種とマムシ亜科 (Crotalinae) 65 種、5 種の rear-fang 毒ヘビ (Coastal House Snake; *Thamnodynastes strigat*, Brown tree snake; *Boiga irregularis*, Bockadamsnake or Dog-faced water snake; *Cerberus rynchops*, Boomsnake; *Dispholidus typus*, Hooded nightsnake; *Hypsiglena sp* Arizona) の毒液成分をまとめた。その比較解析から 63 つのタンパク質ファミリーを毒液成分より特定した。127 種の Front-fang ヘビ (コブラ科およびクサリヘビ科) の毒中には、59 つのタンパク質ファミリーが含まれ、その内のコブラ科 (Elapidae) は 8 つ、クサリヘビ亜科 (Viperinae) は 11 つ、マムシ亜科 (Crotalinae) は 10 つのタンパク質ファミリーが毒タンパク質全体の 90% を占めていた (図 3)。第 1 主成分毒素タンパク質ファミリーの 4 つは、

ホスホリパーゼ A₂ (Phospholipase A₂; PLA₂)、ヘビ毒メタロプロテイナーゼ (snake venom metalloproteinase; SVMP)、セリンプロテイナーゼ (snake venom serine proteinase; SVSP) と three-finger toxins (3FTx) である。クサリヘビ科の 2 種類の亜科では、毒素の種類やそれぞれの含有量にあまり違いがないが、それらとコブラ科の毒成分はかなり異なっている。コブラ科は、PLA₂ と Three-finger toxin (3FTx) が全体の 83% を占め、クサリヘビ科は PLA₂, SVSP, SVMP が全体の 67% を占めている。もっとも顕著な違いは、クサリヘビ科にはコブラ科の主要な毒素である 3FTx 毒素タンパク質ファミリーが欠如し、クサリヘビ科の毒素ファミリーはほとんどがタンパク質分解酵素である。一方、第 2 の主成分毒素タンパク質ファミリー 6 つは、cysteine-rich secretory protein (CRISP), L-amino acid oxidase (LAAO), Kunitz peptide (KUN), C-type lectin/snaclecs (CTL), disintegrin (DIS), natriuretic peptide (NP) である。その中の CRISP, LAAO, KUN や NP は含有量にさほど大きな違いがみられていない。

この総説では、Category 1 の 60% 以上を占める Viperidae (クサリヘビ科) に着目し、ヘビ咬傷被害の後遺症の主原因毒素を中心に扱う。Viperidae (クサリヘビ科) は、ラッセルクサリヘビ (*Daboia russelii*) などの Viperinae (クサリヘビ亜科) と、ガラガラヘビ (ヒガシダイヤガラガラヘビ; *Crotalus adamanteus*) などの Crotalinae (マムシ亜科) のサブ

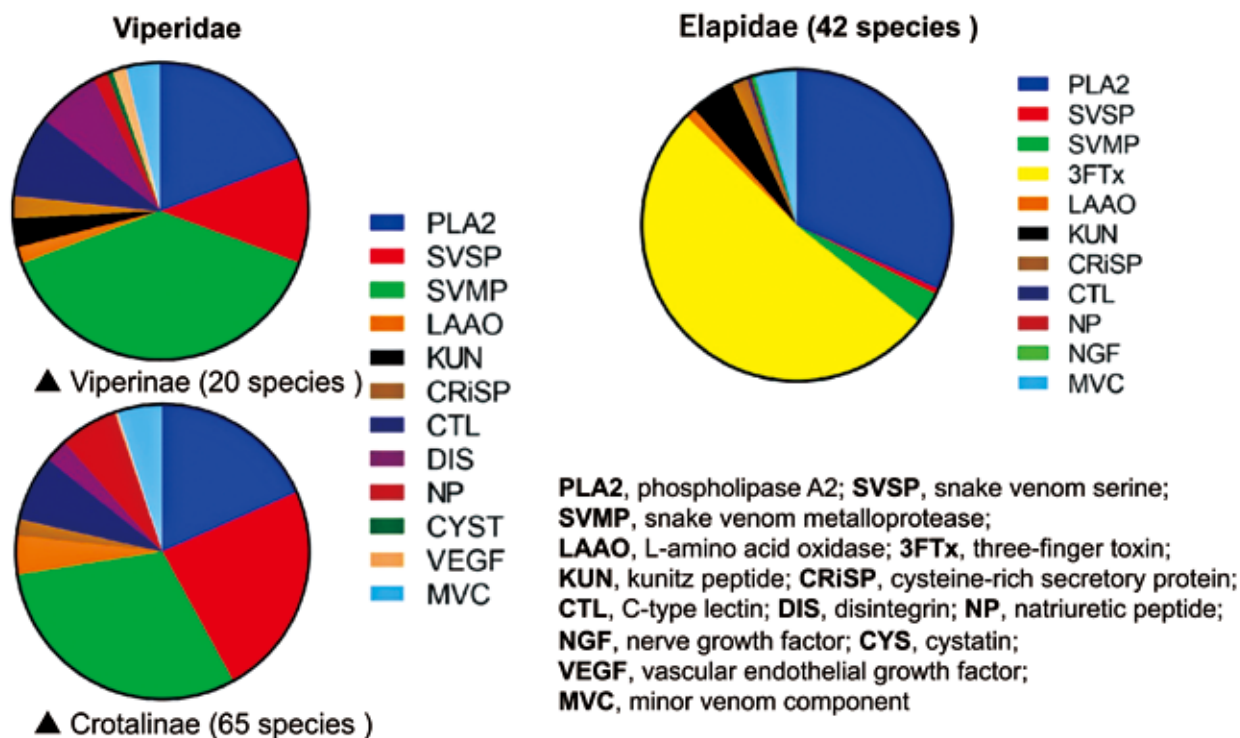


Fig.3 Proteomic analysis of venom components in Viperidae and Elapidae.

Toxin protein families existed in venom glands are compared between in representative subspecies of Viperidae (Viperinae and Crotalinae) in left side and Elapidae in right graph. Abbreviation of each toxin protein families are as follows; PLA2, phospholipase A2; SVSP, snake venom serine; SVMP, snake venom metalloprotease; LAAO, L-amino acid oxidase; 3FTx, three-finger toxin; KUN, kunitz peptide; CRiSP, cysteine-rich secretory protein; CTL, C-type lectin; DIS, disintegrin; NP, natriuretic peptide; NGF, nerve growth factor; CYS, cystatin; VEGF, vascular endothelial growth factor; MVC, minor venom component. This figure is reproduced with permission from ref. [17] (see STM (International Association of Scientific, Technical and Medical Publishers) Permissions Guidelines: <https://www.stm-assoc.org/>).

ファミリーに分かれている。日本に生息する毒ヘビのマムシ (*Gloydius blomhoffii*) およびハブ (*Protobothrops flavoviridis*) は、マムシ亜科に属し、日本で年間 300 件程度のヘビ咬傷被害を引き起こす。2018 年、ハブのプロテオミクス解析 [18] と全ゲノム解析 [19] が発表された。ハブ毒組成は、上記で紹介した他のクサリヘビ科の毒液組成と大きな違いはなく、最も一般的で比較的豊富な毒素は、SVMPs, PLA₂s, SVSPs, および LAAO である [20]。出血毒といわれるクサリヘビ科の毒素酵素は、重度の局所組織損傷を引き起こし、これらの臨床症状はしばしば器官障害および高い罹患率や死亡率に関連する。

4. Viperidae(クサリヘビ科)の主成分毒素について

4.1 Phospholipase A₂(PLA₂)の分類と触媒機構について

Phospholipase A₂ (PLA₂) [EC 3.1.1.4] はリン脂質の 2 位の脂肪酸エステル結合を加水分解する酵素である。PLA₂ は、生物界に広く分布しており、PLA₂ スーパーファミリーは、大きく分けて 6 種類に分類され、

Group I~XIV の 16 つのグループからなる (表 2) [21] [22]。それらは、分泌型 PLA₂ (I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII, XIV), 細胞質型 PLA₂ (IV), Ca²⁺ 非依存性 PLA₂ (VI), 血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ PLA₂ (VII, VIII), リソソーム型 PLA₂ (XV), および最近新しいグループとして分類されたアディポサイト型 PLA₂ (XVI) からなる [21]。もっともよく研究されている分泌型 PLA₂ は、Ca²⁺ 依存性であり、Ca²⁺ 結合ループ (XCGXGG) と触媒部位 (DXCCXXHD) が高く保存され、ヒスチジン残基 (His; H) とアスパラギン酸残基 (Asp; D) を触媒基とする。細胞質型 PLA₂ はセリン残基 (Ser; S) を触媒基とし、Ca²⁺ 結合必要と考えられる C2 ドメインを特徴とし、Ca²⁺ は細胞内膜に酵素を移行するときに関与する。Ca²⁺ 非依存性 PLA₂ は、主にヒトやマウスから発見されて A~F の 6 サブグループの存在が確認されているが、その性質や機能は、VI-A サブグループの報告に限られている。血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ PLA₂ は、Ser を触媒基にもち、血小板活性化因子の sn-2 位からアセチル基を遊離する。リソソーム PLA₂ は、リソソームに局在し、

	Groups	sub-groups	Source and expression tissues	Ms ^{a)} (kDa)	Cat. site ^{b)}	S-S ^{c)}
Secreted PLA ₂	I	A	Cobras and Kraits	13-15	His/Asp	7
		B	pancreas of human and porcine	13-15		7
	II	A	Rattlesnakes, and human synovial	13-15		7
		B	Gaboon viper	13-15		6
		C	testis of rat and murine	15		8
		D	pancreas and spleen of human or murine	14-15		7
		E	brain, heart, and uterus of human or murine	14-15		7
		F	testis and embryo of human or murine	16-17		6
	III		Human, murine, lizard, and bee	15-18		8
	V		heart, lung, and macrophage of human or murine	14		6
	IX		Snail venom	14		6
	X		spleen, thymus, and leukocyte of human	14		8
	XI	A	Green rice shoots	12.4		6
		B	Green rice shoots	12.9		6
	XII		Human and murine	19		7
	XIII		Parvovirus	<10		0
	XIV		Symbiotic fungus and bacteria	13-19		2

	Groups	sub-groups	Source animal	Ms ^{a)} (kDa)	Cat. site ^{b)}
Cytosolic PLA ₂	IV	A	Human and murine	85	Ser/Asp
		B	Human	114	
		C	Human	61	
		D	Human and murine	92-93	
		E	Murine	100	
		F	Murine	96	
Calcium-Independent PLA ₂	VI	A-1	Human and murine	84-85	Ser/Asp
		A-2	Human and murine	88-90	
		B	Human and murine	88-91	
		C	Human and murine	146	
		D	Human	53	
		E	Human	57	
platelet activating factor acetyl hydrolases PLA ₂	VII	A	Human, murine, porcine, bovine	45	Ser/His/Asp
		B	Human, bovine	40	
	VIII	A	Human	26	
		B	Human	26	
Lysosomal PLA ₂	XV		Human, murine, bovine	45 (deglycosylated)	Ser/His/Asp
Adipose-Specific PLA ₂	XVI		Human	18	His/Cys

a) Molecular mass, b) Catalytic site, c) number of disulfide bonds

Table 2 Classification of Phospholipase A2 superfamily

This list of each group of PLA₂ is modified and reproduction from ref.[21, 22].

Ca²⁺ に依存せず, Ser, His, Asp を触媒とする。

Snake venom PLA₂ (svPLA₂) は, 分泌型 PLA₂ に分類され, 酵素活性には Ca²⁺ が必須である。また, 分子内にジスルフィド結合 7 つ (一部 6 つ) もつ分子量約 14 kDa の小型タンパク質で, 比較的安定なタンパク質である [23]。svPLA₂ は, I 型 (コブラ科) と II 型 (クサリヘビ科) にわかれ, その違いは, II 型は C 末が 7 残基長く, 一か所ジスルフィド結合の位置が異なる (I 型; Cys11-77, II 型; Cys50-133), また, 触媒作用に関係する残基は, I 型では, His48, Tyr52, および N 末端側の α アミノ基, II 型では His48, Tyr52 とされる [21, 23]。

4.2 クサリヘビ PLA₂ の生理機能

Snake venom PLA₂ (svPLA₂) は, クサリヘビ科とコブラ科の両方に含まれる主成分毒素である。ここ

では, PLA₂ の I 型 (コブラ科) と II 型 (クサリヘビ科) に, どのように生理活性の違いがあるかを紹介する。クサリヘビ科の II 型 PLA₂ については, 日本に生息するハブ (*Protobothrops flavoviridis*) がよく研究されている。興味深いことに, 同じ種内, または同一個体中に存在する svPLA₂ でも多くのサブグループが存在し, それら毒素が引き起こす生体への影響は大きく異なる。*P. flavoviridis* の毒由来の II 型 PLA₂ (PfPLA) は, [Asp49] PLA₂ と [Lys49] PLA₂ の 2 つのサブグループに分類される [24]。さらに, [Asp49] PLA₂ はタンパク質全体の電荷 (等電点) 別に 3 つの分子種が単離されており, 中性 [Asp49] PLA₂ は高い脂質分解性と筋溶解性, 塩基性 [Asp49] PLA₂ は浮腫誘導活性, 強塩基性 [Asp49] PLA₂ は神経毒性を示す。一方, [Lys49] PLA₂ は弱い脂質分解性と強い筋溶解性がある。PfPLA2 遺伝子は 4 つのエクソンと 3 つのイントロンで構成されており,

16 アミノ酸残基からなるシグナル配列を含む 138 アミノ酸残基のタンパク質をコードする。 *P. flavoviridis* の毒腺 PLA2 遺伝子は多重遺伝子ファミリーを形成しており、 *PfPLA2* 遺伝子は、BP11 と呼ばれる筋分解性 [Lys49] PLA₂, *PfPLA4* 遺伝子は PLA-N と呼ばれる神経毒性 [Asp49] PLA₂, *PfPLA5* 遺伝子は PLA-B と呼ばれる塩基性 [Asp49] PLA₂ をコードしており、 *PfPLA1* と *PfPLA3* は不活性化された遺伝子である [24]。これらの遺伝子は、タンパク質コード領域でアミノ酸配列を変えるような塩基配列置換 (非同義置換) が頻繁に観測されており、加速的に進化している遺伝子といわれている [25]。つまり、PLA2 遺伝子の重複および非同義置換は、結果的に、PfPLA₂ 毒素の異なる性質やその毒素活性を生じている。

コブラ科毒由来の I 型 PLA₂ は、神経毒性、細胞毒性、心毒性、および血液障害など生理活性が報告されている。I 型 svPLA₂ は、単鎖、2 つまたは 4 つのサブユニットで構成され、触媒部位に存在するカルシウム結合領域が高度に保存されている (Y²⁸CGXXGXGXXXDDLDRCCQXHXXC⁵¹) [26]。 *Naja* 種の毒液中には、svPLA₂ が豊富に含まれ、Asp49 および Cys49 型が発見されている。 *Naja sagittifera* から単離された PLA₂ は、神経末およびシナプトソーム膜のホスファチジルコリンに親和性をもつ β 毒素と、神経筋接合領域のニコチン性アセチルコリン受容体に結合する α 毒素がある。ほかに、コブラ毒から単離された PLA₂ は、K⁺ および Ca²⁺ チャネルの阻害、Na⁺/K⁺ ATPase 酵素の阻害を示すものが発見されており、これらの生体内の標的受容体への結合は、神経毒として作用するものが多い。

一方、神経毒として作用する PLA₂ 以外に、抗凝固剤毒素または凝固促進剤毒素、細胞毒性を示すものがある。前者は、PLA₂ の凝固因子 Xa への結合によるものだと考えられている。また、後者の細胞毒性は、PLA₂ が酵素触媒作用によって脂質二重層を不安定化し、それに続き浸透圧溶解を引き起こし、その結果、心筋細胞膜の変化に起因した心不全と溶血を引き起こすと考えられている。

このように svPLA₂ は触媒作用または非触媒作用によって毒素活性を発揮し、主にクサリヘビ科は筋分解、浮腫誘発、神経毒の活性が、コブラ科では細胞毒性、心毒性、神経毒性、血液障害、凝固、抗凝固の活性がある。svPLA₂ 分子は全体的な立体構造と触媒部位は保存されているが、多様な毒素活性を示す。つまり、構造と生理活性の関連を理解し、これらの異なる毒素活性を同時に抑えることができる化合物の設計が重要とされている [27]。

5. ヘビ毒金属プロテアーゼ (snake venom metalloproteinase; SVMP)

金属プロテアーゼ (Metalloproteinases; MP) は、ペプチダーゼ専用 MEROP データベースによると 50 以上に分類された、最も多種多様なプロテアーゼである (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>)。MP は、生殖、細胞浸潤、細胞受精、自己防衛などの生物の恒常性維持に重要な役割を果たす。MP は、Enzyme commission number (ECN) のエキソペプチダーゼ (ECN 3.4.17) およびエンドペプチダーゼ (ECN 3.4.24) で知られている 2 つのサブグループに分類される。2 番目のグループは、serralysins, astacins, adamalysins (a disintegrin and metalloproteinase domain; ADAMs), matrix metalloproteinases (MMP) などのメトジンシン (metzincin) ファミリー酵素である。癌細胞において、内因性 MP の遺伝子およびタンパク質発現量のバランスが乱れているという報告が多くされており [28]、一部の哺乳動物 ADAM はそのバランスの乱れを引き起こす重要因子として知られている。ADAM タンパク質と SVMP は M12 ファミリーに属し [29]、興味深いことに数種類の哺乳類 ADAM と P-III クラス SVMP (後述) の各ドメインの構造は類似している。SVMPs のいくつかは立体構造が決定され、また、その生理機構が特徴付けられている。そのため、P-III SVMP の構造的および機能的な特徴は、未解明な部分が多いヒト ADAM の機能の議論に頻繁に使用される。

5.1. SVMP の構造と分類

SVMP は Zn²⁺ 依存性プロテイナーゼで、毒腺の毒素組織のドメイン構成と mRNA 転写産物に基づいて、3 つの構造クラス (P-I, P-II, および P-III) に分類される [30]。すべての SVMP 遺伝子は、保存されたシグナルペプチド領域とプロ (プレ) ドメインを持つ。この 2 つの N 末領域は、アミノ酸配列が高く保存されており、それに続くドメインの種類や配置により、SVMP は、P-I ~ P-III の 3 つの主要なクラスに分類される。祖先型の P-III クラス SVMP は、Zn²⁺ と水分子を触媒部位に配位するメタロプロテイナーゼドメイン (Metalloproteinase Domain; MPD)、ディスインテグリン様ドメイン (disintegrin-like domain; DID)、およびシステインリッチドメイン (cysteine-rich domain; CRD) の 3 つのドメインで構成される。P-II クラスは、MPD と DID の 2 つで構成され、P-I クラスは、MPD のみである。10 年前ごろまでは、C 型レクチン様ドメインに特徴付けられていた SVMP が、4 番目のグループ (P-IV) としてクラス分けされていた。しかし、最近のトランスクリプトーム解析より、P-IV SVMP をコードする mRNA は存在しないことがわかってき

た。つまり、このクラスの SVMP は一本鎖ポリペプチドとして合成されず、翻訳後修飾により生じるドメイン構造とされた。したがって、J. Fox らは、P-IV を P-IIId サブクラスとして再分類した [30]。このように各クラスには、サブクラス (P-Ia, P-IIa-e, P-IIId) があるが、毒液中から単離された成熟型毒素タンパク質として存在が確認されており、主に翻訳後修飾によって生成される二量体またはトランケート型などのアイソフォームである (図 4) [30]。

毒液中の SVMPs は、それぞれ異なる基質特異性を示すことが知られている。SVMP 遺伝子ファミリーは、新機能化遺伝子の特徴をもち、その遺伝子上の塩基配列置換は、結果的に複数の機能を持つ毒素タンパク質ファミリーを生じる。SVMP 遺伝子は、祖先の ADAM 遺伝子の遺伝子重複に由来する。ADAM 28 前駆遺伝子は、無毒ヘビにも存在する近縁の SVMP ホモログ

であり、哺乳類にも存在する [31]。トカゲ (*Anolis carolinensis*) ADAM 28 遺伝子とクサリヘビ科 (*Echis ocellatus*) SVMP 遺伝子の配列比較により、SVMP 遺伝子は、ADAM 遺伝子の重複後、CRD を含むエクソン 12 の最後に終止コドン (STOP codon) を生じ、結果として、ADAM に存在する C 末端膜アンカーおよび細胞質領域を欠いたタンパク質を産生した [32]。最近、より多くのヘビゲノム配列解析が可能になり、祖先 SVMP は、P-III クラス SVMP をコードしていると仮定されている。P-III SVMP 遺伝子の重複により、P-II および P-I SVMP 遺伝子前駆が生成され、さらにそれらは、それぞれスプライシングサイトの変異により、ドメイン損失が生じ、P-II や P-I SVMP タンパク質が生成されている。興味深いことに P-II と P-I SVMP は、クサリヘビ科 (Viperidae) でのみ存在し、コブラ科 (Elapidae) では発見されていない。これら

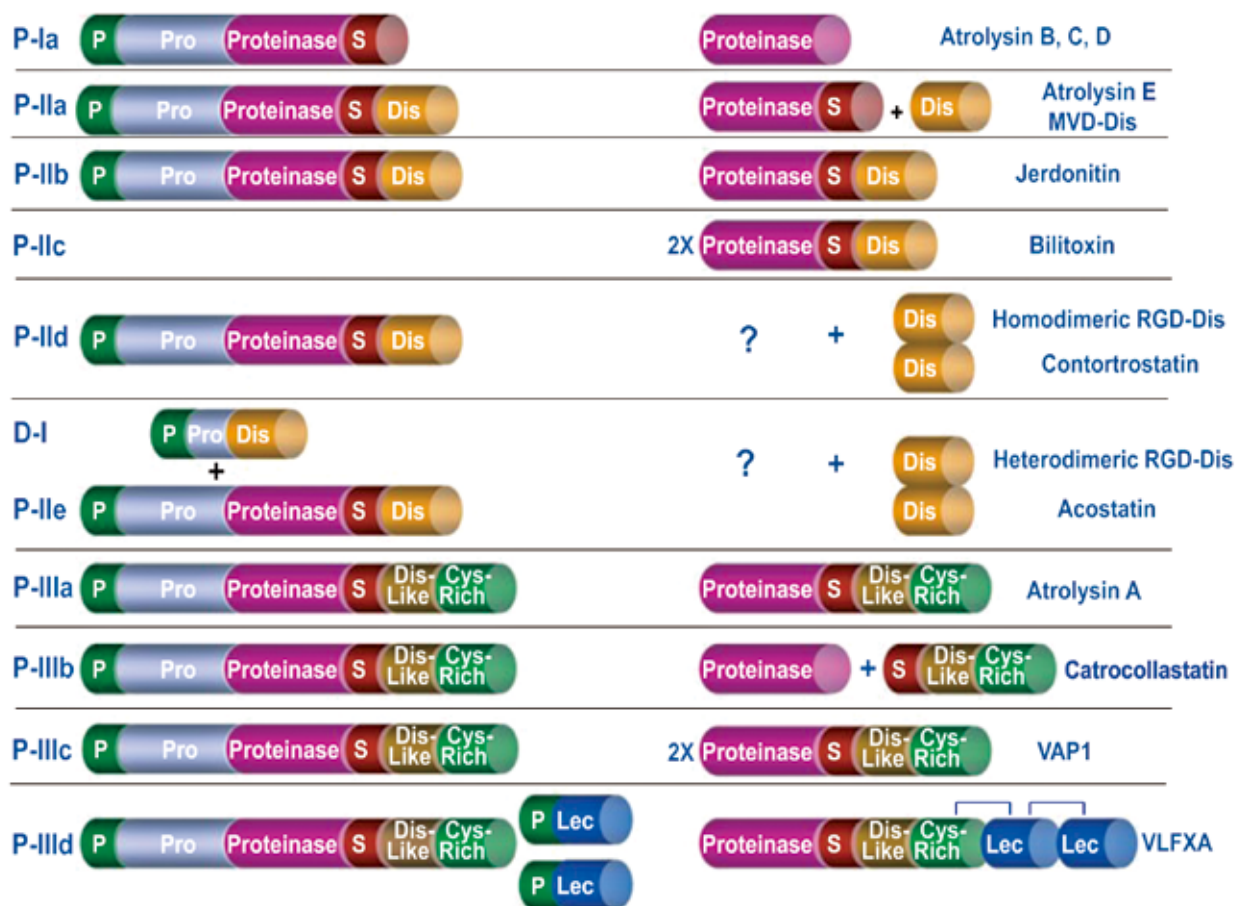


Fig.4 Classification of snake venom metalloproteinase (SVMP).

The class of the SVMP family, and their gene structure and native protein isolated from venom gland are described in the column respectively. Schematic diagrams of domain structures are shown as follows; P, signal peptide; Pro, Pre-, or pro-domain; Proteinase, metalloproteinase domain (including the catalytic site); S, spacer region; Dis-Like, disintegrin-like domain; Cys-Rich; Cysteine-rich domain, Lec, lectin-like subunit structure; ?, Undetermined region by post-translation modification. This figure is reused with permission from ref. [30].

の SVMP ファミリーの中には、機能未知の毒素が多く存在し、生体内基質の同定がされていない。また、致死毒素活性を示さない SVMP も多く含まれる。ヘビ毒中でなぜこのように多数の異なる SVMP が発現されるのか、今後の SVMP の新たな生理機能の発見に興味を持たれる。

5.2 SVMP の生理活性と出血メカニズム

クサリヘビ科 (Viperidae) の咬傷は、局所および全身の重度の出血性微小血管損傷および炎症を特徴とする [33]。毒液より単離された SVMP の *in vivo* および *in vitro* の研究から、SVMP が咬傷の出血の原因となる毒素であることが証明されてきた。ヘビ咬傷治療では出血を軽減しなければならないため、出血を誘発する SVMP 分子メカニズムを研究することは重要である。ヘビ咬傷の出血は、SVMP による細胞外マトリックス成分、膜貫通受容体、および微小血管周囲のフィブリノーゲンなどを標的した切断 (タンパク質分解) により引き起こされる [34]。興味深いことに、高い類似性をもつ MPD と同様な触媒機構をもつにも関わらず、すべての SVMP が生体内で出血を誘発するわけではない。出血因子と呼ばれる SVMP とは別に、非出血性 SVMP には、血液凝固異常、血小板凝集、細胞浸潤、アポトーシス誘発性活動、および血管透過性などの機能や影響が報告されている (出血性 SVMP にもこれらの作用を持つものがある) [35]。この SVMP の多機能性は、種を超えて比較的保存性が高い N 末側の触媒ドメイン (MPD) よりも、それ以降 C 末側ドメインが異なる基質認識に起因すると推測されている [18]。ヘビ咬傷の局部障害を引き起こす SVMP の出血効果を中和する阻害剤を設計するには、SVMP の標的、毒物投与時の SVMP の組織分布および局在を理解する必要がある。

P-III SVMP と P-I SVMP のどちらも出血活性があるが、P-III SVMP は P-I SVMP よりも比較的強い出血を示す [36] [37]。組織や滲出液を用いた蛍光免疫染色の共焦点顕微鏡、免疫化学的とプロテオミクス解析より、P-I および P-III SVMP 分布は生体組織内で異なるパターンを示すことが明らかになった。Alexa Fluor 647 でラベルされた SVMP の観察により、P-III SVMP が、特に微小胞の毛細血管のコラーゲン IV と共局在していることが証明された。一方、P-I SVMP の局在は全組織の広範囲で確認された [38]。In vitro 実験において、出血性 P-I および P-III SVMP は、標的基質として特に IV 型コラーゲンを好むことが知られている。J.M.Gutiérrez らは、SVMP による 2 段階の出血メカニズムの仮説を提供している。出血機構の 1 番目のステップとして、SVMP が毛細血管や内皮細胞周辺の基

底膜成分である IV 型コラーゲンとヘパラン硫酸プロテオグリカンの 1 種であるパルカンを加水分解し、基底膜と微小血管壁の機械特性 (安定性) を弱める。続いて 2 番目のステップは、血液の微小循環で生じる生物物理学的な血行力が壁の膨張を引き起こし、毛細血管を破壊させ、結果的に血液の血管外漏出を引き起こす [37]。

5.3 毒ヘビ中の SVMP 触媒活性の調節システム

一般的に、生体内のタンパク質分解酵素の活性は、pH、温度、イオン、補因子、および生理学的阻害剤により適切な活性化と不活性化が制御されている。毒腺の中において SVMP タンパク質分解活性は、*in vitro* 実験より、次の 3 つの要因によって阻害されると考えられている：(i) 酸性 pH を維持するクエン酸塩の存在、(ii) プロ (プレ) ドメインによる MPD 触媒部位の遮蔽、(iii) 毒液に含まれるトリペプチド酵素阻害剤の存在である。

ヘビ毒酵素は、自己の毒腺中では不活性状態で貯蔵され、獲物の体内へ注入されたときに活性化する必要がある。毒液中には高濃度のクエン酸塩が含まれているため、pH が低いことが 1998 年に Odell らの *in vitro* 解析より明らかである [39]。Crotalus sp., Agkistrodon sp., Bothrops sp., Dendroaspis sp., Sistrurus miliarius barbouri, Bitis gabonica gabonica, Vipera russellii russellii, および Lachesis muta の毒液中のクエン酸含有量は、乾燥した粗毒の 25% (30–150 mM) と見積もられている。粗毒に外因的に添加された 18–27 mM のクエン酸塩濃度は、*in vitro* でプロテアーゼ活性を阻害することが確認されていることから、毒液中には酵素を阻害できるクエン酸の十分な量が含まれる [39]。さらに Crotalus sp. から採取された分泌毒液は酸性 (pH 5.25–5.75) であることが観察されており、つまり、pH 7.2–7.4 の獲物またはヒトの体内に注入されると、ヘビ毒酵素は pH の変化によって活性化されることになる [40]。

4 つのトリペプチド (pEKW, pENW, pEQW, および pERW) は、Protobothrops mucrosquamatus [41, 42], Bothrops asper [43], Echis ocellatus, Cerastes cerastes [44], およびいくつかのラッセルスネーク [45] の毒液中に存在し、SVMP に対する内在性阻害剤として報告されている。これらトリペプチドは、毒液中に比較的多く存在する (例; P. mucrosquamatus 毒液中は 5.0 mM 以上)、その阻害活性は、さまざまな SVMP に対してそれほど強くない (The half maximal inhibitory concentration; IC₅₀, IC₅₀ 値が 0.15–0.95 mM 程度) [45]。pExW 阻害剤と SVMP の複合体 X 線結晶構造解析より、SVMP の Zn²⁺ 結合部位の一番目のヒス

チジン残基のイミダゾールと pExW 阻害剤のトリプトファン (Trp, W) のインドール環が相互作用していることが明らかになっている [42]. 2007 年に, Philippe らは, 質量分析ベースとした実験より, *Atheris squamigera* の毒液中に 2 ~ 3 kDa の polyHis-polyGly ペプチドを発見し, ヒスチジンおよびグリシン (Gly, G) 残基のクラスターを持つ新しいペプチドを同定した [46]. 同様のペプチドが C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) およびブラジキニン増強ペプチド (BPP) -CNP 転写産物前駆体にコード化されていることを発見し, 実際に *E. ocellatus* および *Atheris* sp. 毒より単離した. 興味深いことに, これら polyHis-polyGly 関連ペプチドは, *in vivo* 実験でトリペプチド阻害剤よりも強力な SVMP 阻害効果を示している [44].

毒素遺伝子の転写後および翻訳後の修飾が, 毒液組成に多様性を生み出し, 有毒なヘビの進化と適応に関連してきた考えられている. SVMP 遺伝子は, 約 20 アミノ酸残基のシグナルペプチドをコードし, その後約 200 アミノ酸残基のプロ (プレ) ドメインが続く. これは, 他の生物に見られる ADAM ファミリー間でも保存されている. 毒腺における SVMP 活性に限らず, メトジシンファミリーのプロ (プレ) ドメインの存在は, MPD の触媒活性を調節する上で重要な役割を果たす可能性が示唆されている. プロ (プレ) ドメインの C 末端には, MMP と SVMP ファミリーに共通して「システインスイッチ」(コンセンサス配列; PKMCGVT) 領域が保存されている. プロ (プレ) ドメインが切り離されると, 触媒部位に Zn^{2+} が結合できる [47]. N 末端グルタミン残基 (Glu, E) のピログルタミン酸への環化は, プロドメインの切断後に自発的に生じる. 毒液から精製される成熟型 SVMP の N 末はピログルタミン化されているため, エドマン分解法によるプロテインシーケンサーを用いたアミノ酸配列解析はできない. プロドメインは, 抗プロドメイン抗体を使用した免疫組織化学および免疫金電子顕微鏡法より, 分泌小胞に豊富に検出された [31, 48]. これらの観察では, SVMP が合成後に分泌小胞に保存され, プロドメインは分泌中に分解処理されるか, または毒腺管腔に到達するとすぐに分解されることを示唆している. SVMP プロドメインは, 粗毒から検出や単離されていない. 実際, 最近の微量解析を可能とした毒蛇のプロテオーム解析においても SVMP プロドメインのペプチドは同定されていない [31, 32]. SVMP のプロドメインの分解および活性化メカニズムは, MMP と ADAMS で異なる [49, 50]. 翻訳後修飾による SVMP 活性化メカニズムの詳細を調べるためには, 分子生物学的手法が必要かもしれない.

6. 毒素の薬物動態

クサリヘビ科の主要毒素である PLA_2 は細胞溶解を, SVMP は毛細血管ネットワークの破壊を引き起こし, これらは局所障害を悪化させ, 毒素を拡散させる. 2016 年に出版された Sanhajariya らの総説では, ヘビ毒の実験動物 (ラット, ウサギ, 羊) やヒトに対する薬物動態の研究をまとめ, ELISA を用いて調査された毒液の濃度変化のタイムコースについて考察されている [51]. 実験動物におけるヘビ毒代謝では, 粗毒または単離された毒素を静脈内注射後, 2 つの段階がある. 第 1 期は, 急速分布による半減期 5 ~ 48 分, 第 2 期は遅い排泄時期による半減期 0.8 ~ 28 時間である. 静脈内注射投与度において, 種間 (*Bothrops alternatus*, *Vipera aspis*, および *Naja* sp.) の第 2 期半減期は, 有意差を示さないが, 筋肉注射投与においては, コブラ科 *Naja* sp. は, クサリヘビ科 *Vipera aspis* の半減期 32 時間より 2 倍短い値を示している. また, ヒトの血漿中の毒物濃度については, 実際にヘビ咬傷の患者 24 検体のデータを抽出し, 動物実験と同様の ELISA 法を基準としたデータがまとめられている. その比較結果は, 全体的にクサリヘビ科に噛まれた患者の毒液濃度は, コブラ科の毒液濃度よりも高かった. さらに, Sanhajariya らは, クサリヘビ科とコブラ科のヘビに噛まれた 145 人の患者の濃度変化のデータを統計学的に処理し (NONMEM による非線形混合効果モデリングフレームワーク), その結果, 毒物除去の半減期は 9.71 ± 1.29 時間と推定した [51]. 興味深いことに, これらのデータはコブラ科およびクサリヘビ科の間で顕著な違いがないことも示している. コブラ科とクサリヘビ科の毒性メカニズムは全く異なるが, それらを数十分~数時間後に投与する薬 (阻害剤) で中和するために, ヘビ毒の生体内における薬物動態を理解することは非常に重要である.

7. まとめ

これまでヘビ咬傷は「無視されてきた熱帯病」とよばれ, 現在でも人類の命を脅かしている. 現在最も効果的な治療は, 抗毒素血清毒素療法であるが, 多くの課題が残されている. 例えば, 抗毒素血清療法は, ヘビ咬傷による毒の全身的影響および致死性を減少するが, 局所組織の損傷は, 抗毒素によって中和されず, 患者の永続的な罹患率と障害を引き起こす [2]. 局所組織損傷は, 酵素毒素 (主に PLA_2 や SVMP) によって引き起こされるため, Viperidae 種が Category 1 の 60% を占める理由の 1 つである (表 1). これまで局所障害の緩和のため PLA_2 や SVMP の阻害剤として,

低分子化合物が有機化学的手法で合成されてきた。しかし、それらの多くは、オフターゲット問題を中心としたヒトへの安全性から臨床応用には受け入れられていない。

一方、ほぼすべてのクサリヘビから分離された内因性阻害剤は、それら自身の毒に対して特異的な阻害を示めることが我々の研究からも実証されている。ヘビが進化の過程で獲得してきた毒素耐性システムの鍵となる分子メカニズムを解明し、内因性阻害剤の特異性と選択性を理解することは、ヘビ咬傷の治療のためのより優れた治療薬の設計できる。ヘビ毒の主要な致死毒素とその毒素活性中和（阻害）についての理解は、抗毒素血清の代替となるヘビ咬傷治療薬の開発につながる。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 17KK0179 の助成、および、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである（課題番号：No.177104, No.181042）。

参考文献

- [1] Fifty-ninth report/WHO Expert Committee on Biological Standardization. *WHO technical report series*; No. 964.
- [2] R.M. Kini, S. Sidhu, A. Laustsen, *Toxins*, **10**, 534(2018)
- [3] A.H. Laustsen, A. Karatt-Vellatt, E.W. Masters, et al. *Nat Commun.*, **9**, 3928 (2018).
- [4] S. Ainsworth, J. Slagboom, N. Alomran, et al., *Commun Biol.*, **1**, 34 (2018).
- [5] M. Lewin, L. Gilliam, J. Gilliam, et al., *Toxins*, **10**, 479 (2018).
- [6] N. Aoki-Shioi., *Nucleus*, **62**, 165 (2019).
- [7] J.J. Calvete, L. Sanz, Y. Angulo, et al., *FEBS Letters*, **583**, 1736 (2009).
- [8] J.J. Calvete, *Expert Rev. of Proteomics*, **11**, 315(2014).
- [9] A.D. Hargreaves, and J.F. Mulley, *PeerJ*, **3**, e1441 (2015).
- [10] N. Aoki-Shioi, and C.M. Modahl, “Medical Toxicology” (IntechOpen., 2019), DOI: 10.5772/intechopen.90625 (2019).
- [11] F.J. Vonk, J.F. Admiraal, K. Jackson, et al., *Nature*, **454**, 630 (2008).
- [12] R. Pyron, F.T. Burbrink, J.J. Wiens, *BMC Evol. Biol.*, **13**, 93 (2013).
- [13] S.A. Weinstein, J. White, D.E. Keyler, et al., *Toxicon*, **69**, 103 (2013).
- [14] K.V. Kardong, *J. Toxicology Toxin Rev.*, **21**, 1 (2002).
- [15] J. Nawarak, S. Sinchaikul, C-Y. Wu, et al., *Electrophoresis*, **24**, 2838 (2003).
- [16] S.D. Aird, S. Aggarwal, A. Villar-Briones, et al., *BMC Genomics* **16**, 647 (2015).
- [17] T. Tasoulis, and G. Isbister, *Toxins*, **9**, 290 (2017).
- [18] M. Damm, B-F. Hempel, A. Nalbantsoy, et al., *Molecules*, **23**, 1893 (2017).
- [19] H. Shibata, T. Chijiwa, N. Oda-Ueda, et al. *Sci Rep.*, **8**, 11300 (2018).
- [20] S.D. Aird, Y. Watanabe, A. Villar-Briones, et al. *BMC Genomics*, **14**, 790 (2013).
- [21] E.A. Dennis, J. Cao, Y-H. Hsu, et al. *Chem Rev.*, **111**, 6130 (2011).
- [22] R.H. Schaloske, E.A. Dennis. *B.B.A.*, **1761**, 1246 (2006).
- [23] D.A. Six, and E.A. Dennis. *B.B.A.*, **1488**, 1 (2000).
- [24] N. Ikeda, T. Chijiwa, K. Matsubara, et al., *Gene* **461**, 15 (2010).
- [25] K. Nakashima, T. Ogawa, N. Oda, et al., *Proceedings of the National Acad. of Sci.*, **90**, 5964 (1993).
- [26] M.V.C. Trento, T.A. Sales, T.S. de Abreu, et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, **140**, 49 (2019).
- [27] H. Xiao, H. Pan, K. Liao, et al., *BioMed Research International*, **2017**, 1 (2017).
- [28] C. Herrera, T. Escalante, A. Rucavado, et al., *Expert Rev. of Proteomics*, **15**, 967 (2018).
- [29] V. Bastos, F. Gomes-Neto, J. Perales, et al., *Toxins*, **8**, 250 (2016).
- [30] J.W. Fox, and S.M.T. Serrano. *FEBS J.*, **275**, 3016 (2008).
- [31] H. Bahudhanapati, S. Bhattacharya, S. Wei, *PLoS ONE*, **10**, e0136281 (2015).
- [32] L. Sanz and J. Calvete, *Toxins*, **8**, 216 (2016).
- [33] A. Rucavado, C. Nicolau, T. Escalante, et al. *Toxins*, **8**, 349 (2016).
- [34] J. Gutiérrez, T. Escalante, A. Rucavado, et al., *Toxins*, **8**, 304 (2016).
- [35] R.M. Kini, and C.Y. Koh, *Toxins (Basel)*, **8**, DOI: 10.3390/toxins8100284. (2016).
- [36] T. Escalante, A. Rucavado, J.W. Fox, et al. *J Proteomics*, **74**, 1781–1794 (2011).
- [37] J.M. Gutiérrez, A. Rucavado, T. Escalante, et al. *Toxicon*, **45**, 997 (2005).
- [38] C. Herrera, T. Escalante, M-B. Voisin, et al., *PLoS Negl Trop Dis*, **9**, e0003731 (2015).
- [39] G.V. Odell, P.C. Ferry, L.M. Vick, et al., *Toxicon*, **36**, 1801 (1998).

- [40] S.P. Mackessy, and L.M. Baxter, *Zool. Anz.*, **245**, 147 (2006).
- [41] K-F. Huang, C-C. Hung, S-H. Wu, et al. *B.B.R.C.*, **248**, 562–568 (1998).
- [42] K-F. Huang, S-H. Chiou, T-P. Ko, et al., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3047–3056 (2002).
- [43] B. Francis, and I. I. Kaiser, *Toxicon*, **269**, 889 (1993).
- [44] S.C. Wagstaff, P. Favreau, O. Cheneval, et al. *B.B.R.C.*, **365**, 650 (2008).
- [45] S.M. Munekiyo, and S.P. Mackessy. *Toxicon* **45**, 255 (2005).
- [46] P. Favreau, O. Cheneval, L. Menin, et al. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **21**, 406 (2007).
- [47] F. Grams, R. Huber, L.F. Kress, et al. *FEBS Letters*, **335**, 76 (1993)
- [48] L-G. Jia, K-I. Shimokawa, J.B. Bjarnason, et al. *Toxicon* **34**, 1269 (1996).
- [49] J.J. Calvete, P. Juárez, L. Sanz, *J Mass Spectrom*, **42**, 1405 (2007).
- [50] J.W. Fox, and S.M.T. Serrano, *Proteomics*, **8**, 909 (2008).
- [51] S. Sanhajariya, S. Duffull, G. Isbister, *Toxins*, **10**, 73 (2018).
- [52] C.M. Modahl, R.K. Brahma, C.Y. Koh, et al. *Annu Rev Anim Biosci.*, **8**, 91 (2020).
- [53] C.M. Modahl, Mrinalini, S. Fietze, et al. *Proc. R. Soc. B.*, **285**, 20181003 (2018).

参考 Web ページ

- [W1] WHO homepage; https://www.who.int/health-topics/snakebite#tab=tab_1, 2020 年 5 月アクセス.
- [W2] The Reptile Database 2018; <http://www.reptile-database.org/>, 2020 年 5 月アクセス