

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：42680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07592

研究課題名(和文) 新しいアッセイ系によるイソギンチャクの新規ペプチド毒探索の試み

研究課題名(英文) Screening novel peptide toxins of sea anemones by new assay systems

研究代表者

本間 智寛 (HONMA, TOMOHIRO)

東海大学短期大学部・東海大学短期大学部・准教授

研究者番号：90435272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：イソギンチャクの新規ペプチド毒探索のための新しいアッセイ系を検討した。分子間相互作用解析装置を用いたチャンネル結合アッセイ系は、毒成分とシナプトソーム溶液間の非特異的結合の低減化が困難で、実用は難しいことが分かった。一方、サワガニを用いたアッセイ系では、各種イソギンチャクより、新たな新規ペプチド毒の単離に成功した。また2本刺し膜電位固定法によって、これまでに単離した新規ペプチド毒の作用機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：The assay systems were investigated for screening novel peptide toxins of sea anemone. The investigation of the ion channel-binding assay system with the use of surface plasmon resonance system (Biacore) was the new attempt. However, its utilization proved to be unable due to the difficulty of reducing nonspecific binding between its toxin and rat brain synaptosomes. On the other hand, the novel peptide toxins succeeded in being isolated from various sea anemones by investigating the assay system with the use of freshwater crabs. Furthermore, the mode of action of the novel peptide toxins which have been ever isolated succeeded in being clarified by the two-electrode voltage-clamp (TEVC).

研究分野：水産化学

キーワード：イソギンチャク ペプチド毒 イオンチャンネル Biacore 膜電位固定法 サワガニ cDNAクローニング

## 1. 研究開始当初の背景

イソギンチャクは刺胞と呼ばれる小さな毒器官を無数に持ち、その中に含まれる毒成分を利用して餌動物であるカニや小魚などを麻痺させ捕食している。海洋動物の刺毒は一般に不安定であることから研究が立ち遅れているが、イソギンチャク毒は例外的に安定で取り扱いやすいことから、1970年代以降欧米を中心に活発な研究が行われてきた。これまでの研究により、イソギンチャク毒は20kDaの溶血毒、3-5kDaのNaチャンネル毒および3.5-6.5kDaのKチャンネル毒に大別される。このうちペプチド性のNaチャンネル毒とKチャンネル毒は、イオンチャンネルに対する作用や構造活性相関に関する研究が実を結び、薬理学の分野では研究用試薬として市販され、医薬品の分野では多発性硬化症の治療薬として臨床試験の段階にある。

その一方で、上記Naチャンネル毒とKチャンネル毒とは、まったく異なる一次構造をもつ新規ペプチド毒も報告されている。イソギンチャクは世界中におよそ1200種はいると言われているが、これまでに調べられた種は多く見積もっても80種ほどで、全体の割にも満たないことから、イソギンチャクにはまだ数多くの新規ペプチド毒が存在すると予想された。しかしながら、イソギンチャクのペプチド毒に関する研究のほとんどは、既知のNaチャンネル毒とKチャンネル毒の構造活性相関の解明に目が向けられており、新規ペプチド毒の探索を目的とした研究は積極的に行われていない。

こうした背景のもとに研究代表者は、各種イソギンチャクにおける新規ペプチド毒の探索、単離、一次構造解析を行ってきた。学術論文として未発表のものを含めると、14種イソギンチャクから37成分のペプチド毒の単離・構造解析を行い、その内20成分の毒が従来知られていない新規ペプチド毒であった。なかでもハタゴイソギンチャクから単離したGigantoxin Iは哺乳類の上皮増殖因子(EGF)と高い配列相同性(31~33%)を持つ新規ペプチド毒で、EGF活性も認められた。Gigantoxin Iは毒性とEGF活性をあわせもつ世界最初のペプチドであった。

このように研究代表者は、従来のペプチド毒とはまったく異なる一次構造を有する新規ペプチド毒を継続的に発見しており、NaやKチャンネルへの作用とは異なるイソギンチャクペプチド毒の構造決定を進めてきた。

## 2. 研究の目的

イソギンチャクはまさに新規ペプチド毒の宝庫で、従来のNaチャンネル毒やKチャンネル毒の他にも、まったく異なる一次構造や作用機構をもつ未発見の新規ペプチド毒は数多く存在すると思われ、今後のさらなる探索が期待されている。そこで、イソギンチャクのペプチド毒の探索において、これまでに試みられたことのない分子間相互作用解析装

置(Biacore 3000)を用いたイオンチャンネル結合アッセイ系によって、アイソトープを使うことなく簡便に、特定のイオンチャンネルや神経筋接合部にターゲットを絞って、迅速に多数のサンプルを処理することができる新しいアッセイ系を確立し、新規ペプチド毒の探索を試みる本研究を着想した。

また新しいアッセイ系とあわせて、従来のサワガニ毒性試験による新規ペプチド毒の探索も並行して行い、これまで以上に数多くの構造および作用機能的に新規なペプチド毒を同定し、研究用試薬あるいは医薬品のリード化合物として資することによって、イソギンチャクの海洋生化学資源としてのさらなる有効利用を図ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 粗抽出液の調製方法

凍結状態のイソギンチャク試料をホモジナイズし、得られたホモジネートの一部に、5倍量のイオン交換水を加えて再びホモジナイズした。その後、冷却遠心分離(18800×g、4、15min)し、得られた上清を粗抽出液とした。

### (2) 毒性の測定方法

サワガニに対する毒性の測定は、粗抽出液またはその段階的2倍希釈液を1群3匹のサワガニの第4歩脚基部から体腔内投与し、最大2hrの観察を行った。投与量は、サワガニの体重1gあたり10μlに設定した。致死活性は、各群2匹以上のサワガニが死亡した時を陽性とし、陽性と判断された最高希釈倍率(titer)で表示した。麻痺活性は、各群2匹以上のサワガニが反転させても起き上がれない時を陽性とし、陽性と判断された最高希釈倍率(titer)で表示した。単離したペプチド毒のサワガニに対するLD<sub>50</sub>(致死活性)またはED<sub>50</sub>(麻痺活性)については、種々の濃度の溶液を1群5匹のサワガニに投与して致死率または麻痺率を求め、Litchfield and Wilcoxon(1949)の方法に従って算出した。

### (3) 毒成分の単離方法

粗抽出液を、0.15M NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィーのSephadex G-50カラム(2.5×90cm)に供した。同緩衝液を用いて溶出し、溶出液はフラクションコレクターで8mlずつ分取した。各フラクションについて280nmでの吸光度を測定するとともに、サワガニに対する致死活性を調べた。サワガニ致死活性の認められたフラクションを集め、逆相クロマトグラフィーのTSKgel ODS-120Tカラム(0.46×25cm)を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供した。カラムは0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)溶液中のアセトニトリルの直線的濃度勾配により毒成分を溶出した。ペプチドはUV検出器を用いて220nmの吸光度で検出した。

#### (4) 毒成分の構造決定

N 末端アミノ酸配列分析はエドマン分解法に基づいた気相式プロテインシーケンサーを用いて行った。単離したペプチド毒の分子量は、レーザーイオン化-飛行時間型質量分析法 (MALDI/TOFMS 法) により測定した。また cDNA クローニングは、凍結試料から TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出し、各種ペプチド毒の N 末端アミノ酸配列をもとに、3' RACE 法と 5' RACE 法によって行った。また塩基配列分析はサブクローニング後、ジデオキシ法に基づいたキットに従って反応させ、DNA シーケンサーにより解析した。

#### (5) 分子間相互作用解析装置を用いたチャネル結合アッセイ

分子間相互作用解析装置は GE ヘルスケアの Biacore 3000 を用いて行った。既知のイソギンチャクの Na チャネル毒 Toxin II をリガンドとして Biacore のチップに固定し、ラット脳から調製したシナプトソーム溶液をアナライトとしてフローした。ブランク試験は、リガンドを結合していないチップに対してシナプトソーム溶液をフローし、両者を比較することによって、条件検討を行った。

#### (6) 電気生理学的手法による作用機構の解明

新規ペプチド毒は、サワガニでの症状からいずれも神経毒と予想されることから、イソギンチャクの毒が作用する可能性が高いイオンチャネルの各種変異体をアフリカツメガエルの卵母細胞で発現させ、新規ペプチド毒による機能障害や機能修飾を 2 本刺し膜電位固定法で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 平成 27 年度研究成果

新規ペプチド毒探索の新しいアッセイ系として「Biacore を用いたチャネル結合アッセイ」の条件検討を行った。まず、既知のイソギンチャクの Na チャネル毒 Toxin II をリガンドとして Biacore のチップに固定し、ラット脳から調製したシナプトソーム溶液をアナライトとしてフローした。その結果、リガンドを結合していないブランクと比較して、シナプトソーム添加時に得られたセンサーグラムは、有意な結合パターンを示し、再現性も確認された。そこで、シナプトソームに対して結合能を有さないコントロールとして、分子量が同程度であるウシ膵臓由来トリプシンインヒビター-BPTI をチップに固定して同様の測定を行ったところ、Toxin II と比較して 1/3 程度の結合が観察された。この結合は非特異的結合とみられた。そこで、シナプトソーム調製法の改良等を試み、非特異的結合の低減を図ったが改善が見られず、「Biacore を用いたチャネル結合アッセイ」は実用が難しいことが判明した。

ヒトを刺すことで知られる有害なイソギンチャクは数多いが、その毒成分が調べられたものは数少ない。そこでそれらの内、毒成分が未解明のカザリイソギンチャク、ハナブサイソギンチャク、ヒメフトウデイソギンチャクに注目して、サワガニを指標とした毒成分の単離を試みた。その結果、前者 2 種では、粗抽出液において毒性を示さなかったが、ヒメフトウデイソギンチャクでは比較的強い毒性を示し、ゲルろ過、逆相 HPLC による単離を試みた結果、数成分のペプチド毒の単離に成功した。以前にジュズダマイソギンチャクからは 4 成分のペプチド毒を単離し、そのうち 3 成分は一次構造的に新規なペプチド毒であったが、その生化学的性状について、いくつか調べ切れていない点があった。そこで、それらの性状解明を行い、ジュズダマイソギンチャク由来の新規ペプチド毒に関するデータを取りまとめた。

#### (2) 平成 28 年度研究成果

研究代表者によって、これまでに単離された新規ペプチド毒 (イボハタゴイソギンチャク由来の SHTX I, II, ジュズダマイソギンチャク由来の Ha III, ヒメニチリンイソギンチャク由来の PI II, *Cribrinopsis* sp. 由来の Jiibo V, *Metridium* sp. 由来の Metridin 様ペプチド) の 6 成分を精製し、アフリカツメガエルの卵母細胞に各種イオンチャネル (Kv1.2, Kv3.4, hERG, GIRK1/2) を発現させ、新規ペプチド毒による機能障害や機能修飾を 2 本刺し膜電位固定法で解析した。その結果、イボハタゴイソギンチャク由来の SHTX I, II の 2 成分 ( $ED_{50}$  430 $\mu$ g/kg) に、Kv1.2 チャネルに対する機能障害が認められた。得られた障害曲線をヒルプロットにより解析したところ、SHTX I (n=6) は  $IC_{50}$  81.4 $\pm$ 13 (nM)、ヒル係数 1.09 $\pm$ 0.37、SHTX II (n=5) は  $IC_{50}$  1073 $\pm$ 118 (nM)、ヒル係数 1.18 $\pm$ 0.17 と算出された。SHTX I, II の一次構造の違いは 6 残基目が Hyp が Pro の違いのみであるにも関わらず、このように  $IC_{50}$  に大きな差が生じ、構造活性相関の観点から非常に興味深い結果が得られた。

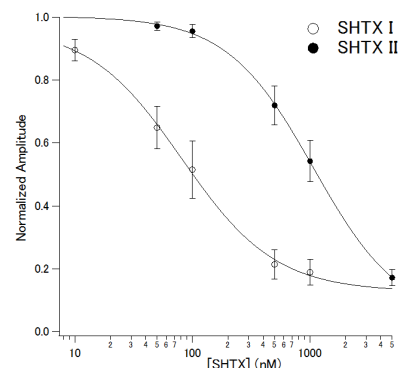


図 1 Kv1.2 電流の SHTX I, SHTX II による Dose-Block 関係

これまでに新規ペプチド毒探索の対象とされていなかった六放サンゴ亜綱のイソギンチャク目以外の種(イソギンチャク近縁種)と八放サンゴ亜綱のサンゴ類(ソフトコーラル)に対して、活性のスクリーニングを行った。具体的には、六放サンゴ亜綱ホネナシサンゴ目のイトイソギンチャクモドキ、八放サンゴ亜綱ウミツタ目のツツウミツタ、ウミトサカ目のオオウミキノコ、ヤワタコアシカトサカの4種に対して行ったところ、4種すべてでサワガニに毒性を示したが、なかでもイトイソギンチャクモドキとツツウミツタの2種はサワガニに強い毒性を示した。そこで、イトイソギンチャクモドキについては、ゲルろ過、逆相 HPLC による毒成分の精製を試みたが、ゲルろ過後の活性画分は凍結操作によって失活してしまい、精製には至らなかった。従来イソギンチャク毒では凍結による失活は稀で、本毒成分はこれまでの毒とは異なる性状を有することが期待された。以前ヒメニチリンイソギンチャクから単離した5成分のペプチド毒(PI I-V)については、内4成分は構造的に新規なペプチド毒であったが、一次構造の決定には至っていない。そこで cDNA クローニングを行い、その全アミノ酸配列を解明した。

### (3) 平成 29 年度研究成果

これまでに単離された新規ペプチド毒(*Cribrinopsis* sp.由来の Jiibo III ,V-1, V-2)の3成分を精製し、アフリカツメガエルの卵母細胞に各種イオンチャンネル(Kv1.2, Kv3.4, hERG, GIRK1/2, Kir2.1)を発現させ、新規ペプチド毒による阻害効果の有無を15通り(3成分×5チャンネル)調べた。その結果、いずれの組み合わせにおいても、明確な阻害効果は認められなかった。

昨年度に引き続き、新規ペプチド毒探索の対象とされていなかった六放サンゴ亜綱のイソギンチャク目以外の種として、ホネナシサンゴ目に属するオオホネナシサンゴの活性スクリーニングを行った。粗抽出液はサワガニに強い毒性を示したので、ゲルろ過、逆相 HPLC による毒成分の精製を試みた。ゲルろ過でのサワガニ毒性は、これまでのイソギンチャク目の対象種とは異なり、ペプチドの画分には認められず、分子量 30,000 あるいはそれ以上の void volume 付近に認められた。その後の逆相 HPLC においては複数のピークが確認されたが、活性はいずれも失活してしまい、毒成分の単離には至らなかった。現在、活性を保持したままでの精製を試みている。これまでに調べていないイソギンチャクとして、ウメボシイソギンチャク科 *Paracondylactis* 属のニンジンイソギンチャクを入手したので、サワガニに対する毒

性を指標に、ゲルろ過と逆相 HPLC により、現在、毒成分の単離を試みている。ヒメニチリンイソギンチャク由来の5成分および *Cribrinopsis* sp.由来の3成分について、昨年度に引き続き、cDNA クローニングを行い、その全アミノ酸配列と前駆体構造を解明した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. 本間智寛、桑慎一郎、陳以珊、下村拓史、久保義弘：新規構造を有したイソギンチャク由来ペプチド性神経毒の作用機構に関する研究。自然科学研究機構 生理学研究所年報, 38, 150 (2017)(査読無)
2. 本間智寛：平成 27 年度論文賞受賞論文紹介 サンゴイソギンチャク由来のタイプ3 ナトリウムチャンネル毒 PaTX のサワガニ毒性発現に重要なアミノ酸残基新規構造を有したイソギンチャク由来ペプチド性神経毒の作用機構に関する研究。日本水産学会誌, 82, 523 (2016) DOI : 10.2331/suisan.h27-88 (査読有)

[学会発表](計2件)

1. 本間智寛・鎗田昇悟・鈴木遙・岡戸創・永井宏史：ヒメニチリンイソギンチャクから単離した新規ペプチド毒の cDNA クローニング。第 19 回マリンバイオテクノロジー学会大会(マリンバイオテクノロジー学会)。2017年6月4日、東北大学青葉山新キャンパス(宮城県・仙台市)
2. 木口屋沙織・本間智寛・永井宏史：ハブクラゲ由来のペプチド毒素に関する研究。平成 28 年度日本水産学会春季大会(日本水産学会)。2016年3月29日、東京海洋大学品川キャンパス(東京都・港区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本間 智寛 (HONMA Tomohiro)

東海大学短期大学部・食物栄養学科・准教授

研究者番号：90435272