

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06246

研究課題名(和文)シガトキシン同族体(CTXs)による電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネル阻害の分子機構解明研究課題名(英文)Molecular mechanism of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel inhibition by ciguatoxin analogs (CTXs)

研究代表者

池原 強 (Ikehara, Tsuyoshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・教授

研究者番号：90359951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シガトキシン類(CTXs)やブレベトキシン類(BTXs)等多くの海洋自然毒は、電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネル(Navch)の特定の部位に結合することでチャンネル機能が阻害されると推定されてきた。しかし、BTXやCTX類の構造と生物活性はこの仮説に合致せず、これらの結合様式の詳細は未解明である。本研究ではリコンビナントNavchと蛍光標識BTXを作製し、これらを用いてin vitro Navch競合結合試験系を構築することを試み、約4.5 μgの蛍光標識BTXと約0.6mgのNavchを作製した。これらの利用により、Navchを標的とする海洋自然毒の結合特性や結合部位の解明が可能になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、Navchと蛍光標識BTXとの安定したin vitro Navch競合結合試験系を構築し、Navchに対するCTXの結合特性や結合部位を解明することである。本研究では、ヒトNavchに比べて安定性が高い海洋細菌のリコンビナントNavch(rNavchRp)を作製し、蛍光標識BTXの調製を行い、in vitro Navch競合結合試験系構築のための検討に必要な条件を整えた。リコンビナントNavchを利用し、海洋毒との結合解析に使用可能な安定した実験系を確立することは技術的なチャレンジであり、確立されれば他の海洋毒にも応用可能な試験系となりうる点に本研究の実用的・技術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Many natural marine toxins, such as ciguatoxins (CTXs) and brevetoxins (BTXs), have been presumed to inhibit channel function by binding to specific sites of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels (Navch). However, the structure and biological activity of BTXs and CTXs are not consistent with this hypothesis, and the details of their binding modes have not been clarified. In this study, we prepared recombinant Navch and fluorescently labeled BTX, and tried to construct an in vitro Navch competitive binding test system using them. As a result, about 4.5 μg of fluorescence-labeled BTX was synthesized, and marine bacterial rNavch was produced using an E. coli expression system. By measuring the binding to Navch using these, it will be possible to elucidate the binding properties and binding sites of marine natural poisons that target Navch.

研究分野：海洋自然毒

キーワード：シガトキシン 電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

シガトキシン類 (CTXs) やブレベトキシン類 (BTXs) 等多くの海洋自然毒は、電位依存性 Na<sup>+</sup> チャネル (Navch) を分子標的とし、CTXs や BTXs が Navch の特定の部位 (site-5 と呼ばれるポアドメイン領域) に結合することでチャネル機能が阻害されると推定されてきた。しかし、この仮説提唱後に単離された BTXB2、B3、B4 や CTX 類あるいは化学誘導体の構造と生物活性は仮説に合致せず、CTXs や BTXs が結合すると想定される site-5 の位置や結合様式の詳細は明らかにされていない。そこで、本研究ではリコンビナント Navch (rNavch) と蛍光標識した BTX を用いた *in vitro* Navch 競合結合試験系を構築し、構造の異なる各種 CTX 同族体による Navch への結合を測定することによって Navch を標的とする海洋自然毒の結合特性や結合部位を解明するための研究基盤を構築する。これまでに分離した多数の同族体及びこれから調製可能な同族体を用いて海洋自然毒の Navch 結合部位と結合様式が解明されることに本研究の意義がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Navch と蛍光標識 BTX との安定した *in vitro* Navch 競合結合試験系を構築し、化学構造の異なる CTX 同族体の結合を測定することで Navch に対する CTX の結合特性や結合部位 (site-5) を解明することである。Navch のポアドメインを構成する特定の部位 (site-5) に CTX が結合すると推定されてきたが、高純度の Navch の調製や CTX 同族体の入手が困難であるため多くの CTX 同族体について Navch 結合特性の詳細な解析は行われていない。そこで本研究では、申請者らのグループが保有する CTX 標準毒を活用して *in vitro* の Navch 競合結合試験系を構築する。従来、結合試験に必要な Navch は、ラット脳から調製したシナプトソームが利用されてきたが、本研究においては、精製したリコンビナントタンパクを利用することで生体試料由来の夾雑物の影響を排除し、より純度の高い材料を用いた高感度 *in vitro* 反応系を構築することが可能である。

## 3. 研究の方法

### (1) リコンビナント細菌 Navch (rNavchRp) の調製

#### 発現ベクターの構築

海洋細菌 *Ruegeria pomeroyi* のゲノム DNA を鋳型として Navch 遺伝子を PCR で増幅した。リコンビナント Navch の N 末端側に His タグを付加するために PCR には 8 個のヒスチジン配列を含んだプライマーを用いた。PCR による目的遺伝子の増幅後、アガロースゲル電気泳動法によって目的遺伝子と同サイズの DNA 断片を確認した。PCR によって得られた DNA 断片を Topo クローニングベクター (pENTR2M/SD/D-TOPO) へ挿入し、DNA シーケンス反応によって配列を確認後、大腸菌発現ベクター (pDEST14) へサブクローニングし、リコンビナント Navch 発現用の Plasmid DNA (His-Navch/pDEST14) を調製した。

#### 発現条件の検討

N 末端側に 8 個のヒスチジン (His) が連なったタグを付加した海洋細菌の Navch を発現させるため大腸菌発現系用プラスミドベクター (His-Navch/pDEST14) を常法によりコンピテントセル (KRX) へ導入し、ラムノースでの発現誘導により目的タンパクの発現を行った。発現時の大腸菌の培養温度は 37 と 18 で検討し、培養時間は 4h (37)、24h (37)、24h (18)、48h (18)、72h (18) で検討した。目的タンパクの発現は、抗-His タグ抗体を用いたウェスタンブロット法によって確認した。

#### 抽出精製条件の検討

目的タンパク質の抽出条件について Lysozyme-DNase-RNase 混合溶液の有無と超音波処理時間 (0、2、5、10、20 分) の検討を行った。目的タンパク質を抽出し、超遠心機による分離、Ni-NTAresin によるアフィニティー精製、Amicon 100K を用いた限外濾過による濃縮条件を検討した。精製試料及び濃縮試料を SDS-PAGE に供した後、CBB によるタンパク質の染色、及び抗-His タグ抗体を用いたウェスタンブロット法によって目的タンパク質の検出を行った。さらに、濃縮試料は、4 量体形成を確認するため Blue Native (BN) PAGE (4 ~ 16%) による分析を行った。

### (2) 蛍光標識 BTX の調製

#### 蛍光色素標識 Brevetoxin (BODIPY-PbTx-2) の合成

60 に加熱した 6 mL のジメチルホルムアミド (DMF、FUJIFILM wako) に 60 µL の 1 mM BODIPY 溶液、60 µL の 1 mM Brevetoxin (PbTx-2) 溶液及び、30 µL の 10 µM リンタンゲステン酸溶液を添加し、遮光、攪拌しながら 60 で 4 時間反応させた。反応後、HPLC により BODIPY-PbTx-2 を精製した。

#### BODIPY-PbTx-2 の定量

イメージアナライザー (LAS3000) の撮影画像から BODIPY の蛍光強度を数値化し、以下の各濃

度の BODIPY 標準溶液 (100、50、20、10、1、0 nM) を用いて検量線を作成した。検量線を用いて精製した BODIPY-PbTx-2 の濃度を算出し、収量を求めた。

## 4. 研究成果

### (1) 発現ベクターの構築

N 末端側に 8 個のヒスチジン (His) が連なったタグを付加した海洋バクテリア (*R. pomeroyi*) Navch の塩基及びアミノ酸配列を図 1 に示す。リコンビナント Navch の N 末端側に His タグを付加するために 8 個のヒスチジン配列を含んだプライマーを用いて PCR 反応により目的領域を増幅後、得られた DNA 断片を Topo クローニングベクター (pENTR/SD/D-TOPO) へ挿入し、DNA シーケンス反応によって図 1 に示す塩基配列 (801bp) を確認した。その後、大腸菌発現ベクター (pDEST14) へサブクローニングし、リコンビナント Navch 発現用の Plasmid DNA (His-Navch/pDEST14) を精製し、これを用いて目的タンパクの発現条件を検討した。塩基配列からアミノ酸への翻訳により、N 末端側に 8 個のヒスチジンを含む 8 個の 266 個のアミノ酸からなる推定分子量約 29KDa の目的タンパクの発現が推測される。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
ATGCATCATCAACACCATCAACCAAGAAATGAGGCCCTTTATCGACCGCCGGTTCGGCCGGTTCATTACCGCGGTGATCATGCTGAACGCGCTGCTGGGATGGAGCG
M H H H H H H H H H Q R M Q A F I D R P G F G R F I T A V I M L N A V V L G M E T

130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
TGGCCCTATCGATGGAGCGGTGGGGCGGCTGATCTGGCCGCTGACCGTATCTGCTAGGCGATCTTCATGCTGAGATGCGCGTGAACGACGCGCGAGCGAGCGCTTTCTGCG
S P Y L M E R W G G L I L A A D R I C L G I F I V E I A L K L T A Q R Q R F F L

250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
AACGGCTGGAACCTGTTGATTTCTGATGCTGGGATCGCCCTGATCCCGCCCGGGGGTCTGCTGGTCTGGCGCGCTGCGATCTCGGGTCTGCTGCGCTGATCTCGGCTGGG
N G W N L F D F V I V G I A L I P A A G G L S V L R A L R I L R V L R V I S V A

370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
CCGCGCTTGCAGCGGTGGTGAAGGCTTCATCACTGCGCTGCGCGCATGCGCAGCGTCTTCTGTTGATGACCATCATCTTCTAGATCGGGCGGTGATCGCGACCAAGCTGTCGCC
P R L R R V V E G F I T A L P G M A S V F L L M T I I F Y I G A V I A T K L F A

490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GCCTCTTCCGAGCTGGTTCGGGAGCTGGGCTCTGCGGCTATACGCTTCCAGATCATGACGCTGGAAGCTGGTGCATGAGTGGCGATCGTTCGGCGCGGTGATGCGAGTATCCCTAT
A S F P D W F G D L G L S A Y T L F Q I M T L E S W S M G I V R F V M Q V Y P Y

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
GCCGCGCTTCTTTGTCCTTCATCATGATCACCATTGGCGTGGTAACTGCTGGTCTGATGCTGAACCTGATGCGAGGAGCTCATCAAGCGGAGGATGGCGAGCGGAC
A W L F F P F I M I T T F A V V N L L V G L I V N S M Q D A H H A E D G E R T

730     740     750     760     770     780     790     801
GATCGCTATCGGCGAGAGGTTCTGCGCCCGCTGGAACGATCGACCGCGTGAATGCGCTTGGTGAACCAAAAGTGA
D A Y R D E V L A R L E Q I D Q R L N A L G E T K K *

```

図 1. リコンビナント Navch の塩基及びアミノ酸配列

### (2) 目的タンパクの発現・抽出・精製

リコンビナント Navch (rNavch) と蛍光標識した BTX を用いた *in vitro* Navch 競合結合試験系を構築し、構造の異なる各種 CTX 同族体による Navch への結合を測定することによって Navch を標的とする海洋自然毒の結合特性や結合部位を解明するための研究基盤を構築することを目的とし、海洋細菌 *R. pomeroyi* のリコンビナント Navch (rNavchRp) の作製と蛍光色素による蛍光標識 BTX の調製を試みた。リコンビナント Navch については、発現条件の検討及び抽出精製条件の検討を行った。その結果、図 2 に示した通り、発現条件 (18、48 時間) を定めた精製スキームを確立した。

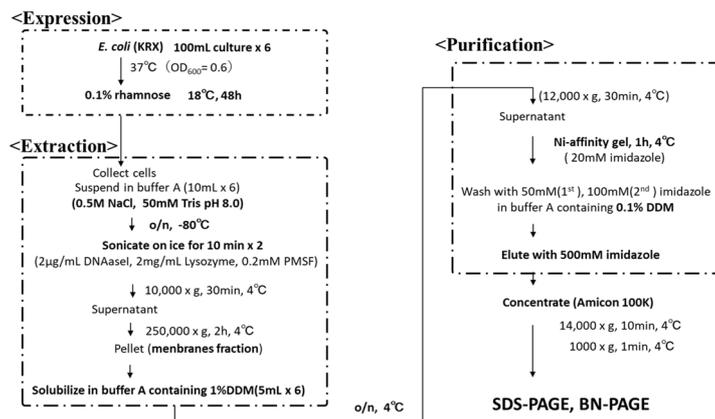


図 2. リコンビナント Navch の発現・精製スキーム

図 2 の精製スキームに従って Ni-resin によるアフィニティー精製後、限外濾過膜 (Amicon 100k) による精製タンパク質の濃縮を行った。Ni-resin 精製試料とその後の濃縮試料の SDS-PAGE 後の CBB 染色の結果を図 3-(a) に、ウェスタンブロットの結果を図 3-(b) に示す。図 3-(a) は、精製試料を 10 µL、濃縮試料 (amicon) を 1 µL 泳動した SDS-PAGE 後のゲルの CBB 染色像を示す。泳動量が 10 倍違うにもかかわらず、目的タンパク質の CBB 染色バンドのシグナルが同程度の強度で検出されたことにより、濃縮操作によって 10 倍程度濃縮されたことが分かる。また、CBB 染色された目的タンパク質の分子量は、サイズマーカーの位置から約 26kDa と推定され、そ

他の夾雑タンパク質も検出されないことから、目的タンパク質が高純度で精製できたと考えられ、図1に示したアミノ酸配列から推測された分子量に近い値を示した。さらに、図3-(b)は、精製試料を2 $\mu$ L、濃縮試料(amicon)を0.2 $\mu$ L泳動し、抗-His タグ抗体を用いたウェスタンブロット法によって目的タンパク質の検出を行った結果である。どちらのレーンも約26kDaにバンドが検出されたことから、目的タンパクが精製、濃縮され間違いなくHis タグが付加されていることが示された。

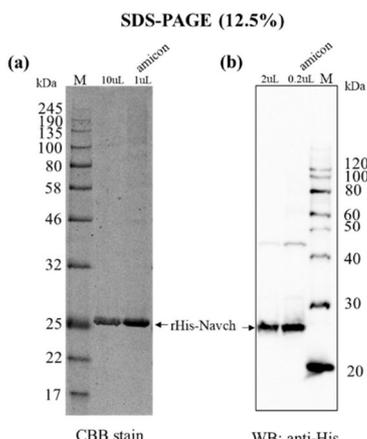


図3 .精製したリコンビナント Navch の  
(a) CBB 染色及び(b) WB

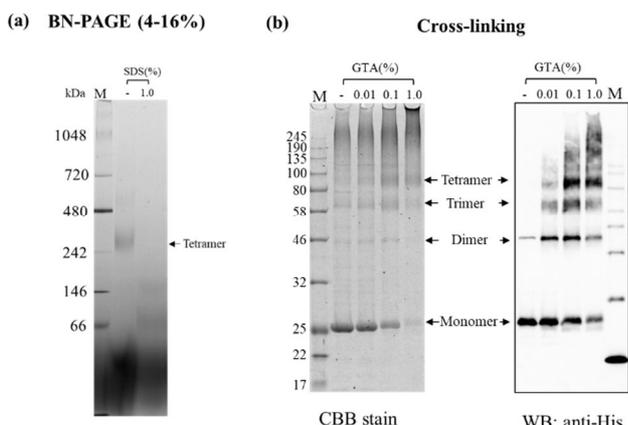


図4 .(a) Blue Native PAGE 及び(b) cross-linking  
によるリコンビナント Navch の四量体形成確認

また、これらの濃縮試料が生体中と同様に四量体が形成されているか確認するため、Blue Native PAGE(4~16%)による分析を行った(図4-a)。その結果、Blue Native PAGEゲルのCBB染色によって、分子量約250kDaのタンパク質のバンドが確認できた。リコンビナント Navch(分子量約26kDa)が四量体を形成した場合、その推定分子量は約100kDaになる。しかし、抽出・精製に使用した界面活性剤(DDM)のミセルのサイズが80~100kDaであり、DDMミセル中に rNavch が四量体を形成した場合、その推定合計分子量が、約200kDaになる。また、1.0%のSDSを添加した場合、そのバンドは消失し、低分子量の位置にバンドが確認された(図4-a)。これらのことから、Blue Native PAGE後のゲルで検出された約250kDaのバンドは、DDMミセル(80~100kDa)中に rNavch が四量体(26kDa $\times$ 4)を形成したものであると考えられる。さらに、精製したリコンビナント Navch をグルタルアルデヒド(GTA)により固定した試料の SDS-PAGE 後の CBB 染色及びウェスタンブロットの結果を図4-(b)に示す。GTAの添加濃度を0から1.0%に増加するにしたがって rNavch の四量体に相当する分子量の位置にバンドが確認された。これらの結果からも精製された rNavch が四量体を形成していることが確認された。最終的なタンパク質収量として約0.6mgの精製物を得た。

### (3) 蛍光標識 BTX の調製

#### 蛍光色素 BODIPY 標識 Brevetoxin (BODIPY-PbTx-2) の合成

Phosphotungstic acid 存在下で 54 $\mu$ g の Brevetoxin (PbTx-2) と 18 $\mu$ g の BODIPY をジメチルホルムアミド溶液中で混合し、BODIPY-PbTx-2 を合成した。合成反応及び反応生成物の化学構造を図5-(a)に示す。反応生成物は、HLC 精製後、メタノールに溶解し、BODIPY の蛍光強度を測定することで定量を行った。

#### ルミノ・イメージアナライザーを利用した BODIPY 蛍光強度検出条件の検討

調製した BODIPY-PbTx-2 の定量の為、ルミノ・イメージアナライザー(LAS3000)を利用した BODIPY 蛍光強度検出条件を検討した。本研究において、蛍光検出に利用した機器であるルミノ・イメージアナライザーは、312nm、460nm、520nm、630nm の4種類の光源が装備されており、510nm、515nm、575nm、605nm の4種類の吸収フィルターが利用可能である。今回、Brevetoxin (PbTx-2) の標識に使用した BODIPY の最大励起波長は、503nm であり、最大蛍光波長は 512nm であることから、BODIPY 蛍光の検出条件として 460nm の光源で励起し、510nm の吸収フィルターを蛍光画像の撮影に使用した。

#### BODIPY による検量線の作成と BODIPY-PbTx-2 の定量

1 mM BODIPY 溶液を 90% (v/v)メタノール溶液で段階的に希釈して BODIPY 標準溶液(100 $\mu$ M、10 $\mu$ M、1 $\mu$ M、500 nM、200 nM、100 nM、10 nM)を作製した。各標準溶液 100 $\mu$ L をマイクロチューブに入れ、ルミノ・イメージアナライザーで BODIPY の蛍光強度を測定(n=3)し、得られ

た蛍光強度から検量線を作成した(図5-b)。作成した検量線を用いて、調製した BODIPY-PbTx-2 の定量を行った。その結果、500  $\mu$ L のメタノール溶液でその濃度が 6.8  $\mu$ M の BODIPY-PbTx-2 溶液を調製することができた。これを重量に換算すると約 5  $\mu$ g の BODIPY-PbTx-2 が得られたと考えられる。

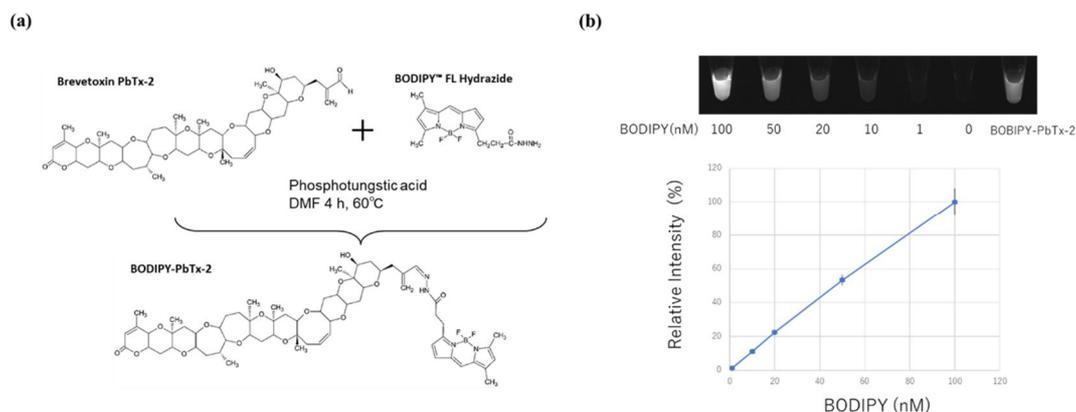


図5 . 蛍光色素標識 Brevetoxin ( BODIPY-PbTx-2 ) の(a)合成及び(b)定量

本研究では、ヒト Navch に比べて膜貫通ユニットが少なく安定性が高いとされている海洋細菌 *R. pomeroyi* のリコンビナント Navch( rNavchRp )を作製し、蛍光色素による蛍光標識 BTX の調製を行った。その結果、*in vitro* Navch 競合結合試験系構築のための条件検討に必要な rNavchRp 及び BODIPY 標識 PbTx2 をそれぞれ、約 0.6mg、約 5  $\mu$ g 確保した。これら精製物( rNavchRp と BODIPY 標識 PbTx2 )を用いて、グラスファイバーフィルターマイクロプレート(マルチスクリーン)による *in vitro* 結合試験の条件検討を行ったが、リコンビナントタンパク質の発現量が低く、アッセイ条件の検討に十分なリコンビナントタンパクの確保に時間を要したことから、再現性の確認ができない状態で研究期間の終了を迎えてしまい結合反応の条件検討を行うことができなかった。海洋バクテリアの Navch に関しては、ポア領域のみでの発現で発現量が増加することが報告されていることから、今後、ポア領域のみリコンビナント Navch の作製を検討中である。リコンビナント Navch を利用し、海洋毒との結合解析に使用可能な安定した実験系を確立することは技術的なチャレンジであり、確立されれば他の海洋毒にも応用可能な試験系となりうる点に本研究の実用的・技術的意義がある。今後は、リコンビナント Navch を利用したレセプターバインディングアッセイの構築に向けて、結合反応の条件検討を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ikehara Tsuyoshi, Chikanishi Kazuya, Oshiro Naomasa  | 4. 巻<br>9               |
| 2. 論文標題<br>Specification of the Okadaic Acid Equivalent for Okadaic Acid, Dinophysistoxin-1, and Dinophysistoxin-2 Based on Protein Phosphatase 2A Inhibition and Cytotoxicity Assays Using Neuro 2A Cell Line | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Marine Science and Engineering  | 6. 最初と最後の頁<br>1140～1140 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/jmse9101140   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Higashi Miki, Ikehara Tsuyoshi, Nakagawa Takeya, Yoneda Mitsuhiro, Hattori Naoko, Ikeda Masaaki, Ito Takashi   | 4. 巻<br>171             |
| 2. 論文標題<br>Long noncoding RNAs transcribed downstream of the human $\alpha$ -globin locus regulate $\alpha$ -globin gene expression  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Biochemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>287～294   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/jb/mvab130  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Oshiro Naomasa, Nagasawa Hiroya, Nishimura Mio, Kuniyoshi Kyoko, Kobayashi Naoki, Sugita-Konishi Yoshiko, Ikehara Tsuyoshi, Tachihara Katsunori, Yasumoto Takeshi                                    | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>Analytical Studies on Ciguateric Fish in Okinawa, Japan (II): The Grouper <i>Variola albimarginata</i>  | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Marine Science and Engineering  | 6. 最初と最後の頁<br>242～242   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/jmse11020242  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Tomikawa Takumi, Kuniyoshi Kyoko, Ito Shiori, Sakugawa Satsuki, Ishikawa Akira, Saito Toshio, Kojima Takashi, Asakura Hiroshi, Ikehara Tsuyoshi, Oshiro Naomasa                                      | 4. 巻<br>63              |
| 2. 論文標題<br>Analysis of Ciguatoxins in the Spotted Knifejaw, <i>Oplegnathus punctatus</i> , from the Waters of Japan  | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)  | 6. 最初と最後の頁<br>190～194   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3358/shokueishi.63.190   | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 安元 健<br><br>(Takeshi Yasumoto) |                       |    |
| 研究協力者 | 大城 直雅<br><br>(Oshiro Naomasa)  |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|