

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350984

研究課題名(和文) 分子進化工学的手法によるカルシウムチャネルサブファミリーを識別するペプチドの創製

研究課題名(英文) Peptide drug discovery to identify the calcium channel subfamily by molecular evolutionary technique

研究代表者

木村 忠史 (Kimura, Tadashi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：60344214

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)：ヒトKv2.1を内膜に強制発現させた大腸菌を抗生物質処理することによりスネーク状にした後、外膜を酵素処理で剥がすことによって直径約5-10ミクロンの大腸菌巨大スフェロプラストを得、この大腸菌巨大スフェロプラストを自動パッチクランプ装置に適用することにより安定にパッチクランプによる電流測定が可能とする技術を開発した。更にICKペプチドが各種タンパク質分解酵素の耐性を持つことを明かにした。これらの知見は、本研究の基礎となるものである。低閾値電位依存性カルシウムチャネルのパドルキメラを作製し、PERISS法を適用することにより新規ペプチドの創製を継続している。

研究成果の概要(英文)：We expressed a eukaryotic voltage-gated ion channel Kv2.1 in Escherichia coli using prokaryotic codon, and prepared giant spheroplasts large enough for the patch clamp. Human Kv2.1 currents were successfully recorded from giant spheroplasts with the automated system. ProTx-I, ProTx-II, GTx1-15, and GsMTx-4 were spider-derived ICKs and incubated with pepsin, trypsin, chymotrypsin, and elastase in physiological conditions to find that all tested peptides were resistant to pepsin, and ProTx-II, GsMTx-4, and GTx1-15 showed resistance to all tested proteases. These results become the basic knowledge of this theme. After construction of paddle chimeras, we have performed multiple peptide screening by PERISS method and we have obtained several results.

研究分野：分子生物学

キーワード：ペプチド カルシウムチャネル PERISS法 電気生理 大腸菌 ICK

1. 研究開始当初の背景

いわゆるイオンチャネルは主に神経や心臓に分布しており、電位依存性カルシウムチャネルはてんかんや痛み、高血圧症の標的分子と考えられている。低閾値活性化型電位依存性チャネルであるナトリウムチャネルは Nav1.4 以外は中枢および末梢神経に分布しており、てんかんや疼痛、不整脈治療の重要な標的分子である。電位依存性カリウムチャネルはもっとも種類が多く、神経や心臓、筋肉などに発現しており、多発性硬化症、自己免疫疾患、疼痛、心房細動、糖尿病、不整脈、てんかん、神経痛、尿失禁、ガン、アルツハイマー病などの標的分子である。

これらイオンチャネルは細胞の膜表面に存在し重要な機能を発揮していることから薬剤の標的として注目されている。イオンチャネルの特徴的な点は、内因性リガンドがないこと、アロステリック調節部位が多様で複数のファーマコフォアが存在する可能性があること、細胞の膜電位に依存的なイオンチャネルの開口状態の変化や頻度などの state-dependent と呼ばれる性質を有することである。しかし、これまでの低分子化合物などの薬剤のスクリーニング法ではチャネルの各サブファミリーを識別するリガンドを高効率に得ることはできていない。

2. 研究の目的

電位依存性カルシウムチャネル、特に低閾値活性化型は鎮痛を始めとする創薬ターゲットとして期待されている。筆者らが発見した低閾値活性化型電位依存性カルシウムチャネル(Cav3.1)の電流を抑制するペプチドの活性に必要と考えられる部位をランダムライブラリー化するとともに、筆者らが研究開発し特許を取得している膜タンパク質を認識するペプチドを創製する新規分子進化工学技術である PERISS 法を用いて、低閾値活性化型電位依存性カルシウムチャネルのサブファミリーである Cav3.1, Cav3.2 および Cav3.3 を識別するペプチドの創製を試みる。これらのペプチドは副作用の少ない低分子化合物医薬品の開発への一助となるとともに、それ自体をペプチド医薬品へと展開する可能性を秘めている。

3. 研究の方法

標的分子とする Cav3.1, Cav3.2 および Cav3.3 の電位センサーパドル (S3b-S4 部分) を Kv2.1 イオンチャネルの電位センサーパドルと置換し、都合 12 種類の電位センサーパドルキメラを作製する。筆者らが発見した GTx1-15 を鋳型とし、*In silico* ODA 法により結合活性に重要な役割を持っていると予測された部分を中心にペプチ

ドライブラリーを作製する。これらの準備ができたところで、筆者らが研究開発し日本国特許を持つ新規分子進化工学的手法である PERISS 法を適用し、各電位センサーパドルに特異的に結合するペプチドを取得する。PERISS 法を実施するに当たってはサブトラクション法を併用し、各電位センサーパドルに特異的なペプチドをより高効率に取得できるよう工夫する。得られたペプチドの活性、特異性は、アフリカツメガエル卵母細胞発現系による二本電極電位固定法によって解析、評価する。

4. 研究成果

電位センサーパドルキメラを作製するベースとなるヒト Kv2.1 が大腸菌内膜で機能的に発現しているかどうかを大腸菌を用いたパッチクランプ法にて検討するための技術開発を行った。

ヒト Kv2.1 を内膜に強制発現させた大腸菌を抗生物質処理することによりスネーク状にした後、外膜を酵素処理で剥がすことによって直径約 5-10 μ m の大腸菌巨大スフェロプラストを安定的に得る技術を開発した(図 1)。しかしこれらは数 μ m のデブリや様々な大きさのスフェロプラストの混合物であり、この中に 20%程度しか存在しない目的の大きさの巨大スフェロプラストを効率良く得る方法が必要であった。そこで粒子の大きさでソーティングできるマイクロ流路の一種であるスパイラルソーターを用い、目的とする巨大スフェロプラストを約 80%以上の濃度まで濃縮することができた。

この大腸菌巨大スフェロプラストを自動パッチクランプ装置に適用することにより安定にパッチクランプによる電流測定が可能となった(図 2)。これらの成果をまとめ論文発表した。

タランチュラなどの毒液に含まれる Inhibitor Cystine Knot (ICK) ペプチドは、ジスルフィド結合を 3 つ持つポリペプチドである。ICK ペプチドはその構造からプロテアーゼ耐性を持つことが期待される。本研究では ICK ペプチドを基本としてペプチドライブラリーを作製することから ICK ペプチドのプロテアーゼ耐性について検討した。

4 種の ICK ペプチド; GsMTx4, GTx1-15, ProTxI, ProTxII をペプシンやトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼとともにインキュベートした。SDS-PAGE 後に CBB 染色を行い、残存ペプチド量を定量化した。また、ProTxII については、ラット血漿中での残存性とラット尾静脈投与後の血中濃度を MS により測定したところ、GsMTx4, GTx1-15, ProTxII は検討した全てのプロテアーゼに耐

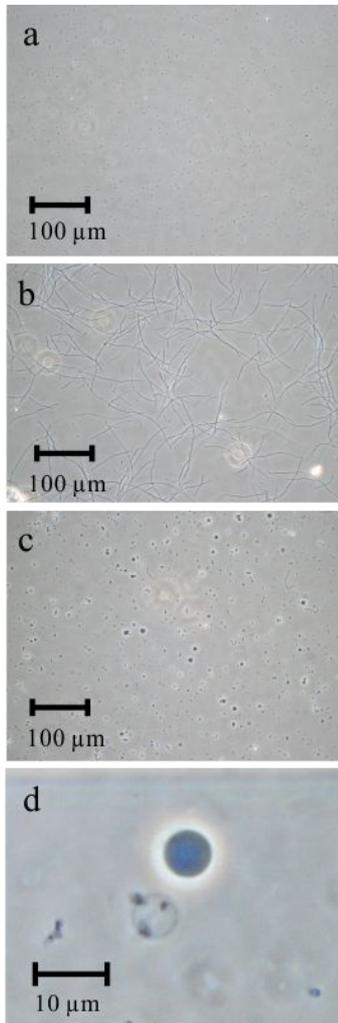


図1 ; a: 未処理大腸菌、b: 長く伸びた大腸菌、c: 得られた巨大スフェロプラスト、d: 巨大スフェロプラストの拡大像。

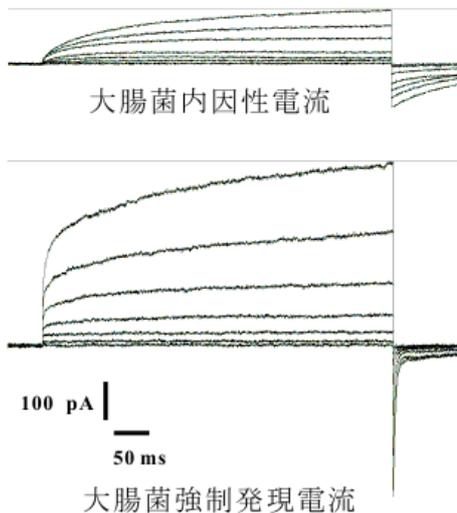


図2 ; 巨大スフェロプラストに発現させたKv2.1の電流。

性を示した。一方で、ProTxI はトリプシンとキモトリプシンによって分解され、エラスターゼにも感受性を示した(図3)。

ProTxII はラット血漿中で37、24時間インキュベートしても分解は認められなかった。ProTxIIの血中半減期は約40分であった。考察: ICKペプチドは、化学的な修飾を施さなくてもプロテアーゼに対する抵抗性を持ち、生理活性ペプチドの弱点である易分解性を克服することが期待される。一部のICKペプチドはプロテアーゼに感受性であることから、そのメカニズムを解析することで、ICKペプチドの持つプロテアーゼ耐性のメカニズムの解明に活かせる可能性がある。これらをまとめ、論文発表した。

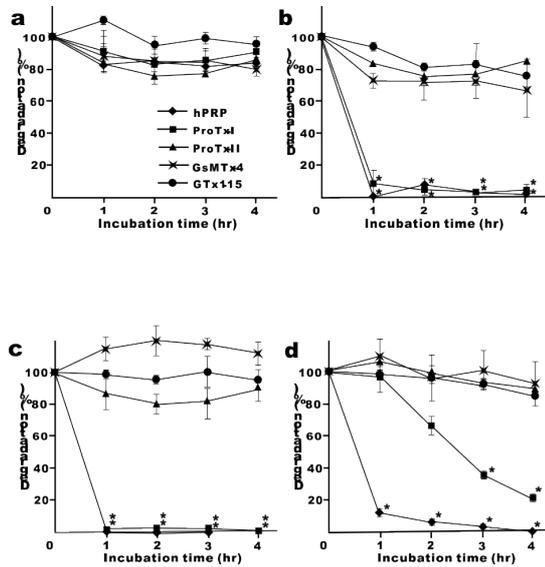


図3 ; a: 検討したICKペプチドはペプシンに耐性を示す。b: ProTxI 以外はトリプシンに耐性を示す。c: ProTxI 以外はキモトリプシンに耐性を示す。d: ProTxI はエラスターゼに感受性を示した。

上述した技術開発と並行して、標的分子とするCav3.1, Cav3.2およびCav3.3の電位センサーパドル(S3b-S4部分)をKv2.1イオンチャネルの電位センサーパドルと置換し、都合12種類の電位センサーパドルキメラを作製した。現在、PERISS法を適用することにより新規ペプチドの創製を継続している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Kyoko Kikuchi, Mika Sugiura and Tadashi Kimura, High proteolytic resistance of spider-derived inhibitor cystine knots. International Journal of Peptides, 537508 (2015), <http://dx.doi.org/10.1155/2015/537508>

Kyoko Kikuchi, Mika Sugiura, Chizuko Nishizawa-Harada and Tadashi Kimura, The application of the Escherichia coli giant spheroplast for drug screening with automated planner patch clamp system. Biotechnology Reports, Vol.7, P.17-23 (2015), doi:10.1016/j.btre.2015.04.007

〔学会発表〕(計2件)

・第8回 AsiaTIDES、発表題目：ICK peptides, their proteolysis-resistance and a new method for engineering them、発表者名：Tadashi Kimura、開催日：2016年2月24日～26日

・日本薬学会第136回年会、発表題目：ICKペプチドのプロテアーゼ耐性の検討、発表者名：木村忠史、開催日：2016年3月27日～29日

〔図書〕(計1件)

Tadashi Kimura and Tai Kubo, Peptidome and Transcriptome Analysis of the Toxin-Like Peptides in the Venom Glands of Tarantula *Grammostola rosea*. Genes, Transcriptomes, and Bioinformatics, Section editor; Dr. Gerardo A. Corzo, Prof. Maria Elena de Lima, Dr. Elia Diego-García. Spider Venoms, Toxinology. Springer

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 忠史 (Kimura Tadashi)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員
研究者番号：60344214

(2) 研究分担者

久保泰 (Kubo Tai)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・副センター長
研究者番号：10178030

(3) 研究分担者

亀山仁彦 (Kameyama Kimihiko)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・企画本部・総括企画主幹
研究者番号：50224697