

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21600021

研究課題名（和文） ナトリウムチャネルのE3領域をターゲットにしたペプチド系  
鎮痛剤の開発研究課題名（英文） The development of analgesic peptides by Na<sub>v</sub> channel E3 targeting

研究代表者

稲垣 英利（INAGAKI HIDETOSHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：90344126

研究成果の概要（和文）：

キタウロコアリ(*Strumigenys kumadori*)由来の生理活性ペプチド SKTX の誘導体ライブラリーを、T7 ファージ表面に提示させるように分子生物学的手法で構築した。このライブラリーからナトリウムチャネル E3 領域を持つビーズを用いて、特定のナトリウムチャネルのサブタイプに結合する5種類のSKTXの誘導体を選択した。BIAcoreを用いて、5種類のうち2種類の組換え体ペプチド（AタイプとBタイプ）のナトリウムチャネルE3領域に対する結合活性を測定したところ、マイクロモルオーダーのナトリウムチャネルE3領域への結合能が示された。

研究成果の概要（英文）：

We previously identified ant bioactive peptides from a species of the Japanese ant *Strumigenys kumadori*, and termed these peptides SKTX1, 2, and 3. In this study, we constructed a cDNA library encoding various SKTX peptide derivatives on T7 phage. From the library, we screened the SKTX derivatives which specifically bind to rNa<sub>v</sub> 1.3 channel using the binding ability to E3 domain of the channel. We selected 5 derivatives and the derivatives were recombinantly expressed by *E.coli*. We confirmed the binding ability of these derivatives by BIA core and the estimated binding ability of the derivatives were micro molar levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限付き

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：ナトリウムチャネル、E3領域、ペプチド誘導体

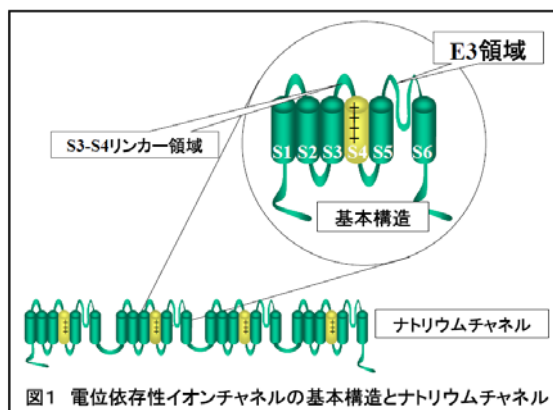
## 1. 研究開始当初の背景

アメリカは2001年から2010年を“The

Decade of Pain Control and Research”とし、痛みの研究を充実させてきた。このような流れ

の中でイモ貝由来のペプチド系鎮痛剤ジコノチドが開発され、2007年には1230万ドルの営業収益をあげるにいたっている。鎮痛剤のターゲット分子としていくつかのイオンチャンネルが候補として挙げられている。中でも神経伝達において中心的な機能を担っているナトリウムチャンネルは有力なターゲット分子の1つであり、商品化されたいくつかの鎮痛剤はナトリウムチャンネルを阻害する活性を持っている。

我々が日本産のキタウロコアリ (*Strumigenys kumadori*) から同定した、ペプチド系神経毒 SKTX1, 2, 3 も、電気生理学的な解析により、



昆虫及び哺乳類のナトリウムチャンネルを阻害する活性を有する。しかしながら、SKTXはカリウムチャンネルに対する阻害活性はもたないものの、 $Na_v$  1.2および $Na_v$  1.3の活性を阻害することから、9種類の哺乳類ナトリウムチャンネルのサブタイプに対する選択的阻害活性は低い。

イオンチャンネルを特異的に認識する抗体を用いて、選択性の高いイオンチャンネル阻害剤を開発しようとするアプローチがある。ナトリウムチャンネルを含む電位依存性イオンチャンネルの多くは、6ヶ所の膜貫通部位 (S1-S6) からなる構造体を共通の基本単位として持つ (図1)。この中でも3番目の細胞外領域 (E3 領域) を特異的に認識する抗体は、イオンチャンネル TRPC5 および  $Nav$  1.5の活性を選択的に阻害すると報告されている (Nat. Biotechnol 23: 1289-1293 (2005))。

本研究では、アリ由来のペプチド系神経毒 SKTX の基本骨格を残した誘導体のファージライブラリーを作製し、この中から  $Nav$  1.3 を特異的に認識するペプチドを選択し、鎮痛剤のリード分子の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

「ナトリウムチャンネルの E3 領域をターゲットにしたペプチド系鎮痛剤の開発」は、ナトリウムチャンネル阻害ペプチド SKTX の誘導体ライブラリーを、哺乳類ナトリウムチャネ

ル 1.3 ( $Nav$ 1.3) の3番目の細胞外領域 (E3 領域) への結合を指標としてスクリーニングし、 $Nav$ 1.3の活性を特異的に阻害する SKTX ペプチド誘導体を開発することを目的とするものである。

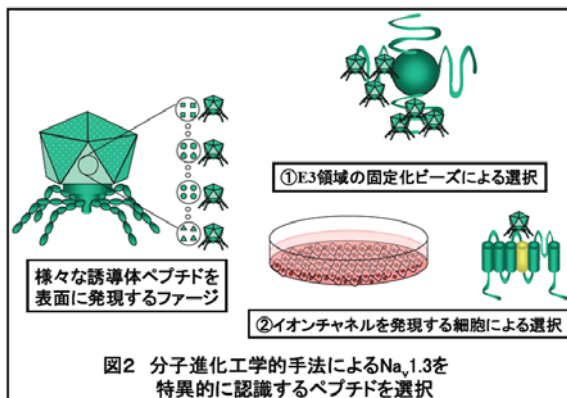
## 3. 研究の方法

本研究は、①ナトリウムチャンネル E3 領域の発現及び精製②SKTXの誘導体ライブラリーの作製③ $Nav$  1.2 及び  $Nav$  1.3 を発現する HEK293 細胞の樹立④誘導体ライブラリーからのナトリウムチャンネル結合ペプチドの選択⑤選択された SKTX の誘導体の電気生理学的な方法による活性の検討、⑥実験動物を使用した生理活性の検討、以上の6段階に分けて行う予定だった。

## 4. 研究成果

### (1) SKTX 誘導体ライブラリーの構築と探索

全長アミノ酸配列の約半分にランダムなアミノ酸残基が挿入されるような SKTX の誘導体ライブラリーを作製したところ、クローンの多くにストップコドンが挿入された。そこで、ペプチドの C 末端側に 6xHis が提示されるようにライブラリーを新たに作製し、6xHis が翻訳される (ストップコドンを持たない) クローンのみを選択し、これからナトリウムチャンネル E3 領域を結合させたビーズを用いて、結合能をもつペプチドを選択した (図2)。次に選択の結果得られた5種類のクローンがコードするペプチドを組換え体として発現させた。さらに組換えペプチドのナトリウムチャンネル E3 領域への結合活性を測定した。



### (2) 組換え誘導体ペプチドの発現・精製

5種類のペプチドを6xHisとGSTとの融合ペプチドとして、可溶化した状態で大腸菌体内に発現させた。しかしながら、組換え体は大腸菌体内で可溶化した状態では分解したため、インクルージョン・ボディとして発現させ、リフォールディング操作を行った。インクルージョンボディの可溶化及びリフォールディングには、アルカリ性緩衝液を用いる方法と6M尿素を用いる方法を用い

た。後者の方法はペプチドがリフォールディングせず、凝集したため、前者の方法を用いて組換え体ペプチドをリフォールディングさせ、精製した。

### (3) 結合活性の測定

ナトリウムチャンネル E3 領域を用いたプルダウンアッセイの予備的な実験結果より、5種類のペプチドの中でも、我々が A タイプ、B タイプと名付けたものが、探索操作中出现頻度が高かったことと、プルダウン法で解析した結果から (図 3)、結合活性が強いと考えられた。そこで、この2種類のペプチドに絞り込んで BIAcore による解析を行った。

BIAcore を用いて組換え体ペプチドのナトリウムチャンネル E3 領域に対する結合活性を測定したところ、マイクロモルオーダーのペプチドを加えた場合に、センサーグラムの乱れはあるものの、A タイプと B タイプともに、ナトリウムチャンネル E3 領域へ結合することが示された。

### (4) 今後の予定

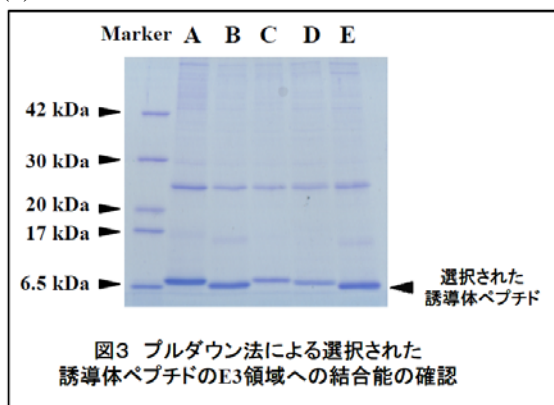


図3 プルダウン法による選択された誘導体ペプチドのE3領域への結合能の確認

マイクロモルオーダーの結合定数は、それほど相互作用として強いものではない。BIAcore の測定条件等に問題点がある可能性もあり、最適な測定条件を検討したい。また、東日本大震災の影響で所属研究機関の研究施設が被害を受けたため研究が遅れ、当初は行う予定だった誘導体ペプチドのイオンチャンネルに対する活性を、電気生理学的方法で計測することができなかった。今後、誘導体ペプチドのイオンチャンネルに対する活性を測定し、研究をまとめたい。

### 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 4 件)

① Inagaki H, Kimoto H, Yamauchi Y, Toriba M, Kubo T., “Functional characterization of Kunitz-type protease inhibitor *Pr-mulgins* identified from New Guinean *Pseudechis australis*”. *Toxicon*. 2012; 59 (1) : 74-80. (査読

有) DOI:10.1016/j.toxicon.2011.10.005

② Inagaki H, Kimoto H, Yamauchi Y, Toriba M, Kubo T., “Identification and functional characterization of Kunitz-type toxins from New Guinean *Pseudechis australis*”. *Peptide Science* 2010, 2011; 66. (査読有) DOI:なし

③ Inagaki H, Yamauchi Y, Toriba M, Kubo T., “Regional divergence of phospholipase A(2)-like protein cDNAs between New Guinean and Australian *Pseudechis australis*”. *Toxicon*. 2010; 56 (4) : 637-9. (査読有)

DOI:10.1016/j.toxicon.2010.04.018

④ Yassaka RT, Inagaki H, Fujino T, Nakatani K, Kubo T. “Enhanced activation of the transient receptor potential channel TRPA1 by ajoene, an allixin derivative”. *Neurosci Res*. 2010; 66 (1) : 99-105. (査読有)

DOI:10.1016/j.neures.2009.09.1712

[学会発表] (計 6 件)

① Inagaki H, Kimoto H, Yamauchi Y, Toriba M, Kubo T. “Characterization of Phospholipase A2-like proteins, Kunitz-type protease inhibitors, and three finger toxins from *Pseudechis rossignolii*”. 9th AP-IST meeting, 2011/9/4, ロシア ウラジオストック市

② Inagaki H. “Bioactive peptides from venomous animals”. International Symposium 2011 for Healthcare, 2011/5/13, 韓国、全州市、又石大学

③ Inagaki H, Kimoto H, Ueno S, Yamauchi Y, Toriba M, and Kubo T. “Identification and Functional Characterization of Kunitz-type Toxins from New Guinean *Pseudechis australis*”. 第 5 回国際ペプチド・シンポジウム, 2010/12/5, 京都

④ Inagaki H, Masuko K, Kubo T. “Novel Bioactive Peptides, SKTX 1, SKTX 2, and SKTX 3, from a Species of the Japanese Ant Genus *Strumigenys*”. 第 53 回 日本蟻類研究会, 2010/8/29, 館山

⑤ 稲垣英利、山内瑤子、鳥羽通久、久保泰 「パパアピグミーマルガスネーク由来新規生理活性ペプチド p-mulgin 1, 2, 3 の同定」日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010/3/28, 東京

⑥ Yassaka RT, Inagaki H, Fujino T, Nakatani K, Kubo T. “Ajoene, An Allixin Derivative, Potentiates The Transient Receptor Potential Channel TRPA1-Induced Responses”. 第 36 回国際生理学会, 2009/7/30, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 英利 (INAGAKI HIDETOSHI)  
独立行政法人産業技術総合研究所・  
バイオメディカル研究部門・主任研究員  
研究者番号：90344126

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

鳥羽 通久 (TORIBA MICHIHISA)  
財団法人日本蛇族学術研究所・所長  
研究者番号：40109856