

## 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25年 5月23日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22603016

研究課題名（和文） 蜘蛛類毒腺の生理活性ペプチドの探索・解析および新規ペプチド創製の試み

研究課題名（英文） Search and analysis of bioactive peptides from a spider venom gland

## 研究代表者

木村 忠史（KIMURA TADASHI）

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：60344214

## 研究成果の概要（和文）：

タランチュラ毒腺のcDNAライブラリーの中から約4000個の制限酵素切断パターンに基づき約1500個のクローンを選択しDNA配列の解析を行い869個の高い品質の配列データを得た。このうち284個（=32.7%）が毒様の配列を示していた。これは他種のクモで報告されている30.6%や32.5%とはほぼ同等の値であり本研究の妥当性が示された。更にPCRクローニングにより34個の毒様配列を得た。これらから重複無く48個の独立した新規の毒様配列を得、GTx1～GTx7, GTx-TCTP, GTx-CRISPの9つのグループに分類した。この中で特にGTx3系のペプチドは哺乳類のMIT1や Bv8, Prokineticinsに加え無脊椎動物のastakinesにも相同性が認められたことからその生理活性の一部は造血能である可能性について予想をした。

## 研究成果の概要（英文）：

Tarantula venom glands produce a large variety of bioactive peptides. We tried to identify the venom components obtained by sequencing clones isolated from a cDNA library prepared from the venom glands of the Chilean common tarantula, Grammostola rosea. The cDNA sequences of about 1500 clones out of 4000 clones were analyzed after selection using several criteria. Forty-eight novel toxin-like peptides (GTx1 to GTx7, and GTx-TCTP and GTx-CRISP) were predicted from the nucleotide sequences. Among these peptides, twenty-four toxins are ICK motif peptides, eleven peptides are MIT1-like peptides, and seven are ESTX-like peptides. Peptides similar to JZTX-64, aptotoxin, CRISP, or TCTP are also obtained. GTx3 series possess a cysteine framework that is conserved among vertebrate MIT1, Bv8, prokineticins, and invertebrate astakines. GTx-CRISP is the first CRISP-like protein identified from the arthropod venom. Real-time PCR revealed that the transcripts for TCTP-like peptide are expressed in both the pereopodal muscle and the venom gland. Furthermore, a unique peptide GTx7-1, whose signal and prepro sequences are essentially identical to those of HaTx1, was obtained.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：タランチュラ、毒腺、生理活性ペプチド、トランスクリプトーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

(1)不整脈や高血圧等の循環器病や脳血管疾患等は、日本人の死因の第2位となっている。その中には、イオンチャネルを主原因とする所謂イオンチャネル疾患が含まれており、その早期診断方法と治療薬の開発が急務となっている。一方で、様々な活性を示すペプチドは、特異性が高く比較的副作用が少ないことや分子量の小ささなどから医薬品等に適用するペプチド医薬が発展してきている。

(2)毒産生生物、例えば毒蛇、イモ貝、サソリ、アリ、タランチュラ等の毒液には心臓や血管に作用する物質など様々な生理活性物質が含まれている。人間が刺されると死に至る危険性もあるイモ貝の毒液から発見されたN型電位依存性カルシウムチャネル特異的なペプチド性毒は、末期ガン患者の疼痛の抑制を目的としてアメリカで上市されている。神経系へ作用するタランチュラ毒などにはイオンチャネルや膜受容体といった膜タンパク質を標的としたペプチド等が含まれていると考えられており、タランチュラから発見された機械刺激受容チャネルに対するペプチド性毒(GsMTx4)が不整脈を正常に戻す作用があることが報告されるなど、医薬品等の薬剤研究開発に役立ってきている。このような生物毒の研究から新しい医薬品等の開発へつなげる議論が活発になされている(Nature Rev. Drug Disco., 2: 790-802 (2003))。

(3)最近、「コンビナトリアル・バイオエンジニアリング」と呼ばれる新しい手法がタンパク質などのバイオ高分子の新しい変換・解析系として展開してきている。コンビナトリアル・ケミストリーとの違いは、生細胞を「分子ツール」としてこれらの増殖性を利用するとともに目的の分子をディスプレイする点である。この方法によりこれまでになかった新規なバイオ高分子を創製できると期待されている。我々の研究室でも同様のコンセプトの大腸菌を用いた分子ディスプレイ技術で膜タンパク質を特異的に認識するポリペプチドの調製方法を開発している。我々は、①毒産生生物の毒液は、加速進化により様々なペプチド性毒が含まれているケミカルライブラリーである。②ペプチド性毒は分子内のジスルフィド結合などにより硬くコンパクトで安定な立体構造(スキャフォールド)をとり、柔らかいループ中などに様々なバリエーションを持つことによりその機能を発揮する。③そのスキャフォールドを最大限に利用しペプチド性毒の様々なスキャフォールド

に指向的分子進化工学技術を適用するスキャフォールドエンジニアリングにより部位特異的ランダムペプチドライブラリーを製作する分子進化工学的な方法でイオンチャネル疾患の診断、治療に役立つ高機能化したペプチド医薬の創製、開発を目指す、という考え方で研究を進めている。

### 2. 研究の目的

毒産生生物の毒液は、進化生態学でいう軍拡競争に基づく加速進化により様々なペプチド性毒が含まれているケミカルライブラリーと考えることができる。我々はこれまでに南米産タランチュラ毒腺 cDNA ライブラリーから 30 個以上の新規生理活性ペプチドを発見している。更に我々が研究開発している新規分子進化工学的手法を適用しペプチドの生理活性の改変に成功している。ケミカルライブラリーである毒腺には分子進化工学的手法を適用できる更に多くの生理活性ペプチドが未発見のままになっていると考えられる。本研究の第一の目的は、約 2000 個のクローンの解析を進め 60 個以上の新規生理活性ペプチドを発見することである。第二の目的は、発見した新規生理活性ペプチドのうち立体構造が解明されていないものを対象として NMR 等によって立体構造を解析し、分子進化工学的手法に適用できるスキャフォールドを得ることである。最終的には、様々な細胞機能や脳神経機能などに適用できるペプチドライブラリーや低分子ケミカルライブラリーの基盤となることを目的とする。

### 3. 研究の方法

タランチュラ毒腺 cDNA ライブラリーから得た約 4000 個のクローンのインサートを制限酵素切断後、電気泳動しそのバンドパターンをフィンガープリンティングソフトで解析したデータを基に約 2000 個のクローン選択する。96 個ずつ PCR でインサートを増幅、PCR 産物を精製し DNA シーケンサーにて配列を決定する。得られた DNA 配列を解析ソフトにて分析し、特にシステインフレームワークに注目しつつ新規アミノ酸配列を持つペプチドであるかを検討する。必要であれば RACE 法で全長を得る。新規ペプチドであった場合、枯草菌 *Brevibacillus* 発現系で発現させ、生理活性解析、安定同位体ラベルによる NMR による立体構造解析を行う。得られた立体構造が研究開発を進めている新規分子進化工学

技術への適用に相応しいスキフォールドであった場合、その立体構造を基に部位特異的ランダムペプチドライブラリーを構築し、膜タンパク質等を標的とした新規分子進化工学を行う。

#### 4. 研究成果

約4000個のクローンの制限酵素切断パターンを解析したデータを元に、約2000個の異なるクローンを選択しPCRによりインサートを増幅、DNA配列を決定した。約700個のクローンの配列を決定したところで雇用していた実験補助者が体調不良により辞職したためcDNAライブラリーの解析を中断した。そこでこれまでに得られたシーケンスデータを元に「クモ毒腺のトランスクリプトーム解析」の論文を作成した。内容を簡単に述べる。タランチュラ毒腺のcDNAライブラリーの中から制限酵素切断パターンに基づき約1500個のクローンを選択しDNA配列の解析を行い869個の高い品質の配列データを得た。このうち284個 (=32.7%) が毒様の配列を示していた。これは他種のクモで報告されている30.6% や32.5% とほぼ同等の値であり本研究の妥当性が示された。更にPCRクローニングにより34個の毒様配列を得た。これらから重複無く48個の独立した新規の毒様配列を得、GTx1~GTx7, GTx-TCTP, GTx-CRISPの9つのグループに分類した。この中で特にGTx3系のペプチドは哺乳類のMIT1や Bv8, Prokineticinsに加え無脊椎動物のastakinesにも相同性が認められたことからその生理活性の一部は造血能である可能性について予想をした。

クローン解析が途中で終了したので毒腺で発現しているmRNAの次世代シーケンサーによる網羅的解析をblastXによるアノテーション解析も含めて外注することとし、毒腺の総RNAを抽出し解析受託会社へ提供し、GS FLX Titanium Chemistryによる次世代シーケンシング解析によるデータを元にしたblastX解析結果を得た。今回の解析ではランダムプライム法による均一化全長cDNAライブラリーを解析対象として総解析塩基数156M bのシーケンシングを行った。MIRA Assembler Version 2.9.45x1を用いたアセンブル解析では、1Kb以上かつ5read以上で定義されるLarge Contigが867個得られており、詳細を解析中である。

第二の目標の大量発現系については、ペプチド遺伝子を枯草菌 *Brevibacillus* 発現系用の pNCM02 および pNY326 ベクターに組み込み *Brevibacillus* でのペプチド発現の検討を行った。強力なプロモーターを用いたベクター-pNCM02 に組み込んだ場合、細胞毒性が高

いためか細胞増殖が悪く、またペプチドの発現も認められなかった。弱いプロモーターを用いたベクター-pNY326 に組み込むと一部のペプチドの発現を確認することができた。しかしながら、枯草菌 *Brevibacillus* 発現系に組み込みペプチドの発現を確認していたクモ TCTP および CRISP の凍結保存菌が震災の影響で解凍し発現能を失っていたのでこれを中止した。一方、生理活性ペプチドの大腸菌を用いたペリプラズム発現や細胞外分泌発現の系を構築し、大量発現を試みたところ両者ともに発現を確認できた。これらの方法はスケールアップが比較的簡易に行えることから今後とも工夫しながらスケールアップを行っていく予定である。

震災の影響で NMR 機器等が使用不能となったことからタランチュラゲノム解析を行うこととした。次世代シーケンサーでゲノム配列の解析を開始するために、本研究に使用しているローズヘアータランチュラのゲノムを抽出し、ゲノム配列の de novo 解析を進めている。これまでに約 39 億塩基のデータを得た。先行研究としてマニュアルでゲノム解析をしたデータでは、ICK モチーフ毒である Hanatoxin と VSTx1 のゲノム配列を得ており、同じ ICK モチーフ毒であるものの Hanatoxin は 3 つのエクソン、VSTx1 は 2 つのエクソンからなることが明らかとなっている。今後も継続的にゲノム配列の de novo 解析を推進する予定である。

#### 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 1 件)

Tadashi Kimura, Seigo Ono and Tai Kubo,  
Molecular Cloning and Sequence Analysis of  
the cDNAs Encoding Toxin-Like Peptides  
from the Venom Glands of Tarantula  
*Grammostola rosea*, International journal  
of peptides, Vol. 2012, Pages 731293  
DOI: 10.1155/2012/731293

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

木村 忠史 (Kimura Tadashi)  
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：60344214

##### (2) 研究分担者

久保 泰 (Kubo Tai)  
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：10178030