

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：42680

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780205

研究課題名(和文) 深海産イソギンチャクの新規ペプチド毒の探索、構造解析、作用機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies on screening, primary structural analysis, and mode of action of novel peptide toxins in deep-sea anemones

## 研究代表者

本間 智寛 (HONMA, Tomohiro)

東海大学短期大学部・その他部局等・准教授

研究者番号：90435272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：5種の深海産イソギンチャクから7成分の新規ペプチド毒、1種の浅海産イソギンチャクから2成分の新規ペプチド毒の単離とその構造解析を行った。またイソギンチャクのNaチャンネル毒のうち、タイプ1や2毒と比べて、構造活性相関の解明が遅れていたタイプ3毒に着目して、活性の発現に重要と思われるアミノ酸残基を特定した。本研究によって、深海産イソギンチャクには、有用な新規ペプチド毒が未発見のまま、まだ数多く存在していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Seven novel peptide toxins from five species of deep-sea anemones, and two novel peptide toxins from one species of shallow-water sea anemones were isolated and their primary structures were analyzed. Furthermore, type 3 sodium channel peptide toxins of sea anemones were focused on because structure-activity relationships of the type 3 had not been clarified thoroughly, compared to type 1 and 2. Amino acid residues, which were considered to be essential for function of type 3 toxins, were specified. These studies revealed that many useful novel peptide toxins, which are not clarified yet, exist in the deep-sea anemones.

研究分野：水産化学

キーワード：深海産イソギンチャク オヨギイソギンチャク ペプチド毒 サワガニ Naチャンネル毒 Kチャンネル毒  
PaTX 構造活性相関

### 1. 研究開始当初の背景

刺胞動物である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20 kDaの溶血毒、3-5 kDaのNaチャンネル毒および3.5-6.5 kDa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の応用も試みられている。

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。世界に生息するイソギンチャクはおよそ800種類と言われているが、これまでに毒成分が調べられているのは約40種とわずかであることから、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、12種イソギンチャクから34成分のペプチド毒の単離・構造解析を行い、その内17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と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同定を進めてきた。

### 2. 研究の目的

イソギンチャクはまさに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新規ペプチド毒が数多く単離されている。

深海生物は、その特殊な生息環境から浅海に生息する生物種とはまったく異なる生理活性物質を有していると考えられる。しかし

ながら、イソギンチャクの毒に関する研究の多くは、浅海に生息するイソギンチャク由来のもので、深海という特殊な環境に生息するイソギンチャクについては、ほとんど調べられておらず、深海産イソギンチャクのペプチド毒についての報告はカワリイソギンチャク毒の一報しかない。

このような背景から、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に向けて、本研究では深海産イソギンチャクに着目し、そこからの新規ペプチド毒の探索、構造解析、作用機構に関する研究を行った。

### 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10 $\mu$ l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。

マウス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2匹のマウスに静脈投与し、最大24hrの観察を行った。投与量は、マウスの体重1gあたり10 $\mu$ lに設定した。致死活性は、各群2匹のマウスが両方とも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。

各種動物赤血球(ウサギ、ウシ、ウマ、ヒツジ)に対する溶血活性の測定はShiomi *et al.*(1985)の方法に従って調べた。

#### (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)で平衡化したサイズ排除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、Jiibo III と VI の N 末端アミノ酸配列に基づくプライマーを用いて、3' 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 シークエンサーにより解析した。

#### (5) 構造活性相関の解明

サンゴイソギンチャク由来のタイプ 3 の Na チャネル毒 PaTX は Fmoc 法に基づいて合成し、グアニジン塩酸塩で変性後、種々の条件でリフォールディングを試みた。リフォールディングしたペプチド毒は逆相 HPLC (TSKgel ODS-120T) で精製し、MALDI/TOFMS 法で分子量を確認後、サワガニに対する致死活性を確認した。その後、確立した合成条件に基づいて、PaTX の各種変異ペプチドを合成し、サワガニに対する致死活性を天然品と比較することによって、活性に重要なアミノ酸残基を特定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 平成 24 年度研究成果

隠岐の島沿岸に生息する深海産イソギンチャク (*Cribrinopsis* sp.: 通称名「ジイボ」) から、サワガニに対する毒性を指標にして、サイズ排除クロマトグラフィーと逆相 HPLC によって単離した 6 成分の新規ペプチド毒 (Jiibo I-VI) の内、非常に強い麻痺活性を示した Jiibo III と致死活性を示した Jiibo VI について、3' Race 法と 5' Race 法による cDNA クローニングを行い、その一次構造を決定した。

Jiibo III のアミノ酸配列を相同性検索したところ、サソリの K チャネル毒と高い相同性を示した。また精製した Jiibo III のサワガニに対する麻痺活性は極めて強く、ED<sub>50</sub> は 2.8 μg/kg と算出され、これは過去に単離したイソギンチャクの麻痺毒のなかで、最も強い活性を示した。一般に、ペプチド性イオンチャネル毒のチャネルへの結合には、荷電を帯びたアミノ酸残基が重要な役割を果たしているが、Jiibo III でもサソリ毒とほぼ同じ位置に荷電を帯び

たアミノ酸残基が保存されていた。Jiibo III はその残基数からも、人工合成が容易であり、薬理学的な作用が明らかとなれば、医薬品としての応用の可能性を秘めている。

Jiibo III TVT<sup>5</sup>VDVI<sup>15</sup>PCRAKCAVKNSNGKCVIDA<sup>25</sup>  
RCMAKANGDEPA<sup>30</sup>

図 1 Jiibo III のアミノ酸配列

Jiibo VI の配列を相同性検索した結果、Jiibo VI は既知のイソギンチャクの Na チャネル毒のタイプ 1 のグループにも、またタイプ 2 のグループにも相同性を示し、タイプ 1 と 2 の中間的なアミノ酸配列を有していることが判明した。また精製した Jiibo VI のサワガニに対する致死活性の LD<sub>50</sub> は 22 μg/kg と算出された。このようなタイプ 1 と 2 の中間的な配列を有したペプチド毒は、同じく深海産イソギンチャクのカワリギンチャク (*Halcurias* sp.) から単離された 1 例しか報告がない。深海産イソギンチャクから、従来のタイプとは異なる Na チャネル毒の配列が相次いで単離されたことは、イソギンチャク毒の分子進化の観点から非常に興味深い。

Jiibo VI GIWDC<sup>5</sup>ICSGENNI<sup>15</sup>AWNGLSGTAHSS<sup>25</sup>  
CPSGWKKKCI<sup>30</sup>GFYTI<sup>40</sup>IMDCCHRV

図 2 Jiibo VI のアミノ酸配列

#### (2) 平成 25 年度研究成果

4 種深海産イソギンチャク (ダーリアイソギンチャク、フウセンイソギンチャク、*Actinostola* sp., *Metridium* sp.) について、新規ペプチド毒の探索を行った。粗抽出液の各種動物赤血球 (ウサギ、ウシ、ウマ、ヒツジ) に対する溶血活性およびサワガニとマウスに対する毒性を測定したところ、溶血活性は *Metridium* sp. のみに認められ、サワガニに対する毒性はダーリアイソギンチャク、*Actinostola* sp., *Metridium* sp. の 3 種に、またマウスに対する毒性は *Metridium* sp. のみに認められ、その titer は 4 であった。

そのうち比較的強いサワガニ毒性 (致死活性 titer 8、麻痺活性 titer 128) を示した *Metridium* sp. からは、この毒性を指標にして、サイズ排除クロマトグラフィーおよび逆相 HPLC に順次供して精製を行ったところ、サワガニに麻痺活性を示すペプチド毒 Toxin I を単離した。

Toxin I をプロテインシーケンサーに供したところ、その N 末端アミノ酸配列から、過去にヒダベリイソギンチャク *Metridium senile* から単離されている溶血毒 metridin と非常に高い相同性を有することが判明した。Metridin は、1987 年にド

イツの Krebs らによって、溶血活性をもつペプチド毒として、ヒダベリイソギンチャクから単離された。単離後の詳細な研究は行われていないが、metridin の名前は「metridin-like ShK toxin domain」として知られており、イソギンチャク *Stichodactyla helianthus* から単離されている K チャンネル毒 ShK と共通のドメインを有している。Metridin には溶血活性以外の報告はないが、本研究で単離した metridin 様ペプチド毒の Toxin I はサワガニに比較的強い麻痺活性を示しており (ED<sub>50</sub> 560µg/kg) 他のイソギンチャク由来の K チャンネル毒と同程度の活性の強さを示していることから、新規 K チャンネル毒である可能性が示唆された。

### (3) 平成 26 年度研究成果

養殖場の魚網などに付着して大量発生し、深刻な漁業被害をもたらす浅海産のオヨギイソギンチャクから、サワガニに対する毒性を指標にして、サイズ排除クロマトグラフィーと逆相 HPLC によって 2 成分のペプチド毒を単離した。両毒ともにサワガニに強い致死活性を示し、その部分アミノ酸配列は他の生物由来のペプチド毒とも相同性を有さない、新規ペプチド毒であった。イソギンチャクの Na チャンネル毒は構造的に 3 つのタイプに分けられ、タイプ 1 と 2 の毒については構造活性相関も明らかにされている。しかしながら、タイプ 3 の毒については ATX III の一例でしか報告がなく、その ATX III は他のタイプ 3 毒とはかけ離れた一次構造を有するため、その結果をそのままタイプ 3 毒に適用できなかった。そこで、タイプ 3 毒の構造的特徴をよく表したサンゴイソギンチャク由来の PaTX をモデルとして、各種類縁ペプチドを化学合成し、サワガニに対する毒性を指標に構造活性相関を検討した。その結果、正電荷を帯びた Lys-4、His-27、疎水性の Tyr-15、Pro-20、Trp-21 が活性の発現に特に重要であることが分かった。

PaTX

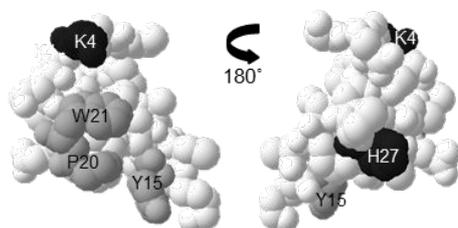


図 3 PaTX の高次構造

### 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 : 天然物由来の生理活性ペプチドの機能と利用-水産生物由来のペプチドを中心として-. 冷凍, 90, 131-140 (2015)(査読無)
2. Akinori Kono, Tomohiro Honma, Kazuo Shiomi : Important amino acid residues for the crab toxicity of PaTX, a type 3 sodium channel peptide toxin from the sea anemone *Entacmaea actinostoloides*. Fisheries Science, 81, 187-192 (2015) DOI : 10.1007/s12562-014-0830-y (査読有)

[学会発表](計 2 件)

1. 本間智寛・永島江美子・塚本秀雄・藤井琢磨・柳研介・永井宏史・塩見一雄 : 4 種深海産イソギンチャクの新規ペプチド毒の探索 .平成 26 年度日本水産学会春季大会(日本水産学会).2014 年 3 月 28 日, 北海道大学函館キャンパス(北海道・函館市)
2. 本間智寛・小野義宏・倉方達朗・永島江美子・塚本秀雄・柳研介・永井宏史・塩見一雄 : 深海産イソギンチャク (*Cribrinopsis* sp.) から単離した新規ペプチド毒の cDNA クローニング .平成 25 年度日本水産学会春季大会(日本水産学会). 2013 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