

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

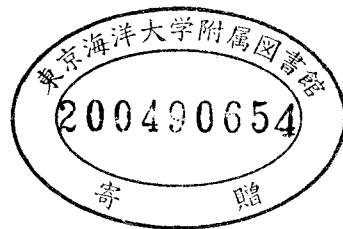
(東京海洋大学)

イソギンチャクのペプチド毒およびその前駆体の構造解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 本間, 智寛 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/719

イソギンチャクのペプチド毒および その前駆体の構造解析

平成 16 年度
(2004)



東京水産大学大学院
水産学研究科
食品生産学専攻
生理活性化学

本間 智寛

本論文中では、アミノ酸配列は次の一文字または三文字で表記した。なお、一文字表記はアミノ酸配列を示す場合のみに使用し、その他の場合は三文字表記とした。

アミノ酸	一文字表記	三文字表記
アスパラギン	N	Asn
アスパラギン酸	D	Asp
ヒドロキシプロリン	O	Hyp
トレオニン	T	Thr
セリン	S	Ser
グルタミン	Q	Gln
グルタミン酸	E	Glu
プロリン	P	Pro
グリシン	G	Gly
アラニン	A	Ala
バリン	V	Val
システイン	C	Cys
メチオニン	M	Met
イソロイシン	I	Ile
ロイシン	L	Leu
チロシン	Y	Tyr
フェニルアラニン	F	Phe
ヒスチジン	H	His
トリプトファン	W	Trp
リシン	K	Lys
アルギニン	R	Arg

目次

序論	1
第1章 20種イソギンチャクにおける各種生理活性物質の検索	11
実験方法	11
試料	11
粗抽出液の調製方法	11
致死活性の測定方法	13
溶血活性の測定方法	13
プロテアーゼ活性の測定方法	13
トリプシンインヒビター活性の測定方法	14
PLA ₂ 活性の測定方法	14
結果および考察	14
第2章 ハタゴイソギンチャクのペプチド毒の単離と cDNA クローニング	19
実験方法	19
試料	19
粗抽出液の調製方法	19
ペプチド毒の単離方法	19
毒性の測定方法	21
EGF 活性の測定方法	21
タンパク質の定量方法	22
分子量の測定方法	22
還元およびピリジルエチル化	22
キモトリプシンによる酵素分解	22
V8 プロテアーゼによる酵素分解	23
アミノ酸配列分析	23
RNA の抽出方法	23
3'Race 法	23
5'Race 法	24
サブクローニング法	24
塩基配列分析	24
刺胞からのペプチド毒の単離	25
結果	25
ペプチド毒の単離および毒性	25
Gigantoxin I のアミノ酸配列と塩基配列	25
Gigantoxin II のアミノ酸配列と塩基配列	29

Gigantoxin III のアミノ酸配列と塩基配列	35
Gigantoxin I の EGF 活性	41
刺胞からのペプチド毒の単離	41
考察	46
第3章 イボハタゴイソギンチャクのペプチド毒の単離と cDNA クローニング	49
実験方法	49
試料	49
粗抽出液の調製方法	49
ペプチド毒の単離方法	49
毒性の測定方法	51
ペプチド毒の分析方法	51
トリプシンによる酵素分解	51
cDNA クローニング法	51
α -dendrotoxin の ^{125}I 標識	52
K チャネル毒性の測定方法	52
結果	53
ペプチド毒の単離および毒性	53
SHTX I と II の部分アミノ酸配列と塩基配列	53
SHTX I のジスルフィド結合の解析	59
SHTX III の部分アミノ酸配列と塩基配列	59
SHTX IV の部分アミノ酸配列と塩基配列	59
K チャネル毒性の測定	66
考察	66
第4章 ジュズダマイソギンチャクのペプチド毒の単離と cDNA クローニング	71
実験方法	71
試料	71
粗抽出液の調製方法	71
ペプチド毒の単離方法	71
毒性の測定方法	73
ペプチド毒の分析方法	73
cDNA クローニング法	73
結果	74
ペプチド毒の単離および毒性	74
Ha I の部分アミノ酸配列と塩基配列	74
Ha II と III の部分アミノ酸配列と塩基配列	74
Ha IV の部分アミノ酸配列	82

考察	82
第5章 スナイソギンチャクおよびタマイタダキイソギンチャクの ペプチド毒の単離とアミノ酸配列	87
実験方法	87
試料	87
粗抽出液の調製方法	87
ペプチド毒の単離方法	87
致死活性の測定方法	90
ペプチド毒の分析方法	90
キモトリプシンによる酵素分解	90
cDNA クローニング法	90
結果	91
スナイソギンチャクのペプチド毒の単離および毒性	91
Toxin I の部分アミノ酸配列と Toxin II (Da I, II) の全アミノ酸配列	91
タマイタダキイソギンチャクのペプチド毒の単離および毒性	99
Er I のアミノ酸配列と塩基配列	99
考察	99
第6章 ミナミウメボシイソギンチャクのペプチド毒の cDNA クローニング	108
実験方法	108
試料	108
cDNA クローニング法	108
結果	110
AETX I の塩基配列と前駆体構造	110
AETX II と III の塩基配列と前駆体構造	110
考察	116
第7章 ムラサキハナギンチャクのペプチド毒の単離と cDNA クローニング	118
実験方法	118
試料	118
粗抽出液の調製方法	118
ペプチド毒の単離方法	118
毒性の測定方法	120
ペプチド毒の分析方法	120
cDNA クローニング法	120
結果	120
ペプチド毒の単離および毒性	120

Cf I の部分アミノ酸配列と部分塩基配列	120
考察	124
第8章 ウメボシイソギンチャクのアクロラジ由来ペプチド毒の cDNA クローニング	127
実験方法	127
試料	127
cDNA クローニング法	127
結果	129
Acrorhagin I の塩基配列と前駆体構造	129
Acrorhagin II の塩基配列と前駆体構造	129
考察	136
第9章 総括	138
本研究で得られた新知見	138
イソギンチャクのペプチド毒の前駆体構造の分類	139
イソギンチャクのペプチド毒に関する今後の研究展望	141
要旨	144
和文	144
英文	146
謝辞	149
文献	150

序論

刺胞動物のイソギンチャクは、刺胞と呼ばれる小さな毒器官を触手だけでなく本体にも無数に持っている。刺胞は小魚などの餌動物の捕獲に用いられるが、ウメボシイソギンチャクなどクローン集団性の一部のイソギンチャクでは異クローン個体との闘争においても有力な武器となっている。刺胞の大きさおよび形は、種類によりあるいは同種でも部位により様々であるが、通常 5 μm -1 mm の大きさで、球形、卵形または紡錘形をしている (Fig. 1)。刺胞には管状の長い刺糸が巻き込まれており、物理的あるいは化学的刺激が加わると刺糸が発射され動物の体に突き刺さる。それと同時に、刺胞内の毒液が刺糸を伝わって注入される仕組みになっている。しかしながら、イソギンチャク自身における刺胞の本来の役割とは別に、誤ってヒトが刺されて被害を受けることもあり、公衆衛生上しばしば問題になっている。特に、アドリア海に生息する *Anemonia sulcata* はこれまでに多くの海水浴客に被害を与えてきたことで有名である。刺されると皮膚に痛み、発赤、浮腫、壊死などが引き起こされ、発熱、めまい、傾眠、腹痛なども伴うと言われている。日本では、サンゴ礁海域に生息するイソギンチャクの中に危険なものが多く、ウンバチイソギンチャク *Phyllodiscus semoni*、ハナブサイソギンチャク *Actinodendron arboreum*、ウデナガウンバチ *Megalactis hemprichii* などによる刺傷事故が時々発生している。

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く、またイソギンチャクは固着生活しているため、実験に必要な試料の採集が比較的容易であるという利点もあり、1970 年代以降世界的に研究が活発に行われてきた。イソギンチャク毒の本体は他の海洋動物の刺毒と同様にタンパク質またはペプチドであり、これまでに 20 kDa の溶血毒 (Kem, 1988)、3-5 kDa の Na チャネル毒 (Kem *et al.*, 1990; Norton, 1991) および 3.5-6.5 kDa の K チャネル毒 (Aneiros *et al.*, 1993; Castañeda *et al.*, 1995; Schweitz *et al.*, 1995; Cotton *et al.*, 1997; Gendeh *et al.*, 1997; Diochot *et al.*, 1998; Minagawa *et al.*, 1998; Diochot *et al.*, 2003) に大別されている。また、毒成分とは別に Kunitz 型プロテアーゼインヒビターも広く分布している (Dufton, 1985)。

現在までに単離されているイソギンチャク毒を Table 1 にまとめた。

溶血毒は、赤血球の細胞膜成分と結合して膜構造を変化させ、結果として細胞内のヘモグロビンを溶出させる毒である。Ferlan and Lebez (1974) がウメボシイソギンチャク *Actinia equina* から equinatoxin (現在の equinatoxin II に相当する) を単離したのがはじまりで、これまでに各種イソギンチャクから溶血毒が得られている (Table 1)。その多くが 20 kDa の塩基性タンパク質で、細胞膜のリン脂質であるスフィンゴミエリンと特異的に結合して小孔を形成する (Kem, 1988)。単離された溶血毒のうち全アミノ酸配列が明らかにされているものは約 10 成分あるが、なかでも *Stichodactyla helianthus* の cytolsin III (Blumenthal and Kem, 1983) とウメボシイソギンチャクの equinatoxin II (Belmonte *et al.*, 1994) については、作用機構と構造活性相関の解明が精力的に行われている。

溶血毒には上述の範疇に入らないものもあり、分子量が小さいものとしては、*Tealia felina* (Elliott *et al.*, 1986) や *Radianthus macrodactylus* (Zykova *et al.*, 1998) から単離された 5-8 kDa の溶血毒が挙げられる。一方、分子量が大きいものとしては、ヒダベリイ



Before discharge



After discharge

Fig. 1. Nematocyst of *Phyllodiscus semoni* (Unbachiisoginchaku)
(イソギンチャクガイドブック、2001より)

Table 1. Distribution of hemolysins and neurotoxins in sea anemones

Sea anemone	Hemolysin	Na channel toxin			Other	Unknown	K channel toxin		
		Type 1	Type 2	Type 3			Group 1	Group 2	Group 3
Suborder Endocoaenanthaeae									
Family Halcuriidae									
<i>Halcurias</i> sp.					○				
Suborder Nynanthaeae									
Family Actiniidae									
<i>Actinia cari</i>	○								
<i>Actinia equina</i>	○	○					○		
<i>Actinia tenebrosa</i>	○								
<i>Anemonia erythraea</i>					○				
<i>Anemonia sulcata</i>		○		○			○	○	○
<i>Anthopleura elegantissima</i>		○							○
<i>Anthopleura fuscoviridis</i>		○							
<i>Anthopleura japonica</i>	○								
<i>Anthopleura xanthogrammica</i>		○							
<i>Bolocera tuediae</i>					○				
<i>Bunodosoma caissarum</i>	○	○							
<i>Bunodosoma granulifera</i>		○					○		
<i>Condylactis aurantiaca</i>					○				
<i>Condylactis gigantea</i>	○				○				
<i>Condylactis passiflora</i>		○							
<i>Epiactis prolifera</i>	○								
<i>Pseudactinia varia</i>	○								
Family Actinodendronidae									
<i>Actinodendron plumosum</i>							○		
Family Aliciidae									
<i>Actinera villosa</i>	○								
<i>Phylodiscus semoni</i>	○								
Family Hormathiidae									
<i>Calliacis parasifica</i>					○				
Family Metridiidae									
<i>Metridium senile</i>	○								
Family Sagartidae									
<i>Sagartia rosea</i>	○								
Family Stichodactylidae									
<i>Entacmaea actinostoloides</i>	○			○					
<i>Radianthus magnifica</i>	○							○	
<i>Radianthus crispus</i>		○							
<i>Radianthus macrodactylus</i>	○								○
<i>Radianthus paumentosis</i>				○					
<i>Stichodactyla helianthus</i>	○								○
<i>Stichodactyla kenti</i>	○								

ソギンチャク *Metridium senile* から単離された 80 kDa の metridiolysin (Bernheimer and Avigad, 1978) と、最近、ウンバチイソギンチャク *Phyllodiscus semoni* (Nagai *et al.*, 2002) やフサウンバチイソギンチャク *Actinaria villosa* (Oshiro *et al.*, 2004) から相次いで単離された 60 kDa の溶血毒が挙げられる。Metridiolysin はスフィンゴミエリンではなくコレステロールと結合して細胞膜に小孔を形成する点で、またウンバチイソギンチャクやフサウンバチイソギンチャクの毒は外敵を攻撃するための毒として一次構造中に MACPF (membrane-attack complex/perforin) 領域を初めて含んでいた点で注目される。

イソギンチャク毒の中で最も詳しく研究されているのは Na チャネル毒である。その歴史は、Béress *et al.* (1975) により *Anemonia sulcata* から 3 成分が単離されたことにはじまる。現在までに、多くのイソギンチャクから約 30 成分が単離されている。Na チャネルの神経毒に対するレセプターサイトは少なくとも 5 つあるとされているが、イソギンチャクの Na チャネル毒はレセプターサイト 3 と結合し、Na チャネルの不活性化ゲートが閉状態になるのを抑制する。その結果、Na イオンの細胞内への流入を増大させ、活動電位が持続して異常興奮を引き起こす。Na チャネルのレセプターサイト 3 に結合してこのような作用を示す毒は、イソギンチャク毒以外ではサソリ類の α -トキシシンしか知られていないので、イソギンチャクの Na チャネル毒のうち *Anemonia sulcata* の ATX II や *Anthopleura xanthogrammica* の Ap-A、Ap-C などは、すでに貴重な Na チャネル試薬として市販され、薬理学などの分野で汎用されている。

Na チャネル毒はそのアミノ酸配列の相同性から、Norton (1991) により 3 つのタイプに分けられている (Fig. 2)。タイプ 1 と 2 の毒はいずれも 46-49 残基より成っている。タイプ 1 と 2 の毒の間では高い相同性 (60%以上) があり、6 個の半 Cys を含めた 11 個のアミノ酸残基は共通しているが、その他のアミノ酸残基の違いにより識別されている。また両タイプの毒は、免疫学的交差性がないという点でも区別される (Kem, 1988 ; Norton, 1991 ; Kem *et al.*, 1996)。タイプ 3 の毒は今のところ PaTX (Nishida *et al.*, 1985) と ATX III (Martinez *et al.*, 1977) の 2 成分しか知られておらず、27-31 残基の短鎖ペプチドであることが特徴である。しかしながら、Norton の報告以後に単離されたウメボシイソギンチャクの Ae I (Lin *et al.*, 1996)、フロリダアネモネ *Condylactis passiflora* の Cp I, II (Shiomi *et al.*, 1995)、シライトイソギンチャク *Radianthus crispus* の Rc I (Shiomi *et al.*, 1996) はいずれもタイプ 1 の毒であるが、Norton が指摘している共通残基にいくつかの変異が認められる。また、分類上で下等な内腔亜目のカワリギンチャク *Halcurias* sp. からタイプ 1 と 2 の両方の特徴を備えたペプチド毒 halcurin が単離され、タイプ 1 とタイプ 2 の毒は共通の祖先遺伝子から進化したと推定されている (Ishida *et al.*, 1997)。さらに、例は少ないもののタイプ 1-3 とはまったく異なる Na チャネル毒も単離されている。*Calliactis parasitica* の calitoxin (Cariello *et al.*, 1989)、*Bolocera tuediae* の BTTX II (Halstead, 1988)、ミナミウメボシイソギンチャク *Anemonia erythraea* の AETX II, III (Shiomi *et al.*, 1997) がそうである。

一方、K チャネル毒は、Aneiros *et al.* (1993) により *Bunodosoma granulifera* から初めて BgK が単離されて以来、これまでに 11 成分が知られている。K チャネル毒は、アミノ酸残基数、アミノ酸配列ならびに作用を受ける K チャネルの型の違いによって、大きく 3 つのグループに分けられる (Fig. 3)。グループ 1 の毒は 35-37 残基の短鎖ペプチドで、電

Type 1

AFT I	G V A C L C D S D G P N V R G N T L S G T I W L A G C P S G W H N C K A H G P T I G W C C K K Q
ATX Ia	G A A C L C K S D G P N T R G N S M S G T I W V F G C P S G W N N C E G R A I I G Y C C K K Q
Ap-A	G V S C L C D S D G P S V R G N T L S G T L W L Y P S G C P S G W H N C K A H G P T I G W C C K K Q
Bc III	G V A C R C D S D G P T S R G N T L T G T L W L T G G C P S G W H N C R G S G P F I G Y C C K K K

Type 2

RTX I	A S C K C D D D G P D V R S A T F T G T V D F A Y C N A G W E K C L A V Y T P V A S C C R K K K
RTX II	G T C K C D D D G P D V R T A T F T G S I E F A N C N E S W E K C L A V Y T P V A S C C R K K K
Rp III	G N C K C D D D E G P N V R T A P L T G Y V D L G Y C N E G W E K C A S Y S P I A E C C R K K K
Sh I	A A C K C D D D E G P D I R T A P L T G Y V D L G S C N A G W E K C A S Y Y T I I A D C C R K K K

Type 3

PaTX	A G G K S T C C P C A M C K Y T A G C P W G Q C A H H C G C S
ATX III	R S C C P C Y W G G C P W G Q N C Y P E G C S G P K V

Fig. 2. Amino acid sequences of Na channel toxins from sea anemones.

AFT I was isolated from *Anthopleura fuscoviridis* (Sunahara et al., 1987); ATX Ia and ATX III from *Anemonia sulcata* (Widmer et al., 1988; Beress et al., 1977); Ap-A from *Anthopleura xanthogrammica* (Tanaka et al., 1977); Bc III from *Bunodosoma caissarum* (Malpezzini et al., 1993); RTX I and RTX II from *Radianthus (Heteractis) macrodactylus* (Zykova et al., 1989; Zykova et al., 1988a); Rp III from *Radianthus (Heteractis) paumotensis* (Mettrione et al., 1987); Sh I from *Stichodactyla helianthus* (Kem et al., 1989); PaTX from *Entacmaea actinostoloides* (Nishida et al., 1985). Common amino acid residues are boxed. Asterisks represent the common amino acid residues pointed out by Norton (1991).

Group 1

BgK	V	C	R	D	W	F	K	E	T	A	C	R	H	A	K	S	L	G	N	C	R	T	S	Q	K	Y	R	A	N	C	A	K	T	C	E	L	C
ShK	R	S	C	I	D	T	I	P	K	S	R	C	T	A	F	Q	C	K	H	S	M	K	Y	R	L	S	F	C	R	K	T	C	G	T	C		
AsKS	A	C	K	D	N	F	A	A	A	T	C	K	H	V	K	E	N	K	N	C	G	S	Q	K	Y	A	T	N	C	A	K	T	C	G	K	C	
HmK	R	T	C	K	D	L	I	P	V	S	E	C	T	D	I	R	C	R	T	S	M	K	Y	R	L	N	L	C	R	K	T	C	G	S	C		
AeK	G	C	K	D	N	F	S	A	N	T	C	K	H	V	K	A	N	N	C	G	S	Q	K	Y	A	T	N	C	A	K	T	C	G	K	C		

Group 2

AsKC 1	I	N	K	D	C	L	L	P	M	D	V	G	R	C	R	A	S	H	P	R	Y	Y	N	S	S	K	R	C	E	K	F	I	Y	G	G	C	R	G	N	A	N	F	H	T	L	E	E	C	E	K	V	C	G	V	R
AsKC 2	I	N	K	D	C	L	L	P	M	D	V	G	R	C	R	A	R	H	P	R	Y	Y	N	S	S	R	R	C	E	K	F	I	Y	G	G	C	R	G	N	A	N	F	I	T	K	K	E	C	E	K	V	C	G	V	R
AsKC 3	I	N	G	D	C	E	L	P	K	V	G	R	C	R	A	R	F	P	R	Y	Y	N	L	S	S	R	R	C	E	K	F	I	Y	G	G	C	R	G	N	A	N	F	H	T	L	E	E	C	E	K	V	C	G	V	R

Group 3

BDS-I	A	A	P	C	F	C	S	G	K	P	G	R	G	D	L	W	I	L	R	G	T	C	P	G	G	Y	G	Y	T	S	N	C	Y	K	W	P	N	I	C	C	Y	P	H
BDS-II	A	A	P	C	F	C	P	G	K	P	D	R	G	D	L	W	I	L	R	G	T	C	P	G	G	Y	G	Y	T	S	N	C	Y	K	W	P	N	I	C	C	Y	P	H
APETx1	G	T	T	C	Y	C	G	K	T	I	G	I	Y	W	F	G	T	K	T	C	P	S	N	R	G	Y	T	G	S	C	G	Y	F	L	G	I	C	C	Y	P	V	D	

Fig. 3. Amino acid sequences of K channel toxins from sea anemones.

BgK was isolated from *Bunodosoma granulifera* (Aneiros et al., 1993); ShK from *Stichodactyla helianthus* (Castañeda et al., 1995); AsKS (kaliseptine), AsKC 1~3 (kalicludines 1~3), BDS-I and BDS-II from *Anemonia sulcata* (Schweitz et al., 1995; Diochot et al., 1998); HmK from *Radianthus (Heteractis) magnifica* (Gendeh et al., 1997); AeK from *Actinia equina* (Minagawa et al., 1998); APETx1 from *Anthopleura elegantissima* (Diochot et al., 2003). Common amino acid residues are boxed.

位依存性 K チャネルのいくつかの型のうち *Shaker* 型チャネル (Kv1 チャネル) に作用する。これまでに 5 種イソギンチャクから単離されているが (Aneiros *et al.*, 1993; Castañeda *et al.*, 1995; Schweitz *et al.*, 1995; Gendeh *et al.*, 1997; Minagawa *et al.*, 1998)、他生物種由来の K チャネル毒とはアミノ酸配列がまったく異なる新規成分である。グループ 2 の毒としては *A. sulcata* から 3 成分の AsKC (kaliclude) が得られている (Schweitz *et al.*, 1995)。いずれも 58-59 残基の長鎖ペプチドで、タイプ 1 の毒と同様に Kv1 チャネルに作用するが、毒性はかなり弱い。アミノ酸配列の点では *Dendroaspis* 属のヘビ由来のデンドロトキシンの範疇に入り、さらにウシ膵臓のトリプシンインヒビターで代表される Kunitz 型プロテアーゼインヒビターとも類似している。実際、AsKC はプロテアーゼ阻害活性を示すことが明らかにされている。Kunitz 型インヒビターは、自分自身または餌動物のプロテアーゼから毒成分を保護するために存在すると考えられてきたが、AsKC のように K チャネル毒性を持つものが単離されたことから、Kunitz 型インヒビターは捕食にも深く関与していることがうかがわれる。グループ 3 の毒としては、*Anemonia sulcata* の BDS-I、BDS-II が知られている (Diocot *et al.*, 1998)。両成分とも 43 残基で構成され、お互いのアミノ酸配列の相同性は非常に高く、7 残基目と 11 残基目の 2 箇所に変異が見られるだけである。タイプ 1 および 2 の毒とは異なり、*Shaw* 型の K チャネル (Kv3 チャネル) に作用する。また、BDS-I と BDS-II は、タイプ 1 の Na チャネル毒とも 25% 程度の相同性があり、弱いながらも Na チャネル毒性も認められている。さらに最近になって、BDS-I、II と高い相同性をもった APETx1 が *Anthopleura elegantissima* から単離された (Diocot *et al.*, 2003)。APETx1 は *Shaker* 型や *Shaw* 型と同じ電位依存性 K チャネルである human ether-a-go-go related gene (HERG) チャネルを特異的に阻害する。BDS-I、II とアミノ酸配列が非常に類似しているにも関わらず、特異的に作用するチャネルの種類が異なることは興味深い。イソギンチャクの K チャネル毒のうち *Stichodactyla helianthus* の ShK や *Anemonia sulcata* の BDS-I、BDS-II など、最近の精力的な作用機構と構造活性相関の解明が実を結び、Na チャネル毒と同様に、研究用試薬として市販されている。

1990 年代初めには、イソギンチャク毒は 20 kDa の溶血毒と 3-5 kDa の Na チャネル毒であるという一応の結論に達し、新規ペプチド毒の源としてのイソギンチャクの役割は終わろうとしていた。ところが 1993 年以降、数種イソギンチャクから K チャネルに作用する 4 kDa の新規ペプチド毒が見出されてきたし、Kunitz 型プロテアーゼインヒビターの一部は K チャネル毒性を示すという興味深い事実も報告された。さらに、calitoxin、BTTX II、AETX II および AETX III のように従来のイソギンチャク毒の分類には当てはまらない新規ペプチド毒もいくつか登場してきた。イソギンチャク類は世界で約 800 種いるとされている (白井, 1984) が、これまでのところ約 30 種について毒成分が調べられているにすぎない。過去の検索例 (皆川, 1997) から、イソギンチャクにはペプチド毒がほぼ普遍的に存在すると考えられ、研究対象として取り上げられていないイソギンチャクから新規ペプチド毒が発見されることが期待される。

また、これまでのイソギンチャク毒の一次構造解明にあたっては、タンパク質性の溶血毒を除いて、cDNA クローニング法ではなくペプチドマッピング法が主に用いられてきた。そのため、イソギンチャクのペプチド毒の前駆体構造に関する知見は、他の動物由来のペプチド毒と比較して少ない。前駆体構造の情報からは、毒の合成機構や分子進化に関する

推測が可能である。さらにその cDNA をもとに、構造活性相関の解明を目的とした大腸菌での発現も行える。新規ペプチド毒はもちろん、これまでに単離されてきたペプチド毒についても、できるだけ多くの前駆体構造の解明が望まれる。

以上の背景のもとに、本研究はイソギンチャクの新規ペプチド毒の単離と、前駆体構造の解明を目的として cDNA クローニングを行った。まず第 1 章では、20 種イソギンチャクにおける各種生理活性物質を検索した。第 2~5 章では、ハタゴイソギンチャク科のハタゴイソギンチャク *Stichodactyla gigantea*、イボハタゴイソギンチャク *Stichodactyla haddoni*、ジュズダマイソギンチャク *Heteractis aurora*、タマイタダキイソギンチャク *Entacmaea ramsayi* およびウメボシイソギンチャク科のスナイソギンチャク *Dofleinia armata* から、サワガニに対する毒性を指標にしてペプチド毒の単離を行い、さらに cDNA クローニングを行った。その結果、ハタゴイソギンチャクから単離された 3 成分 (gigantoxin I-III) のペプチド毒のうち、アミノ酸配列から gigantoxin II はタイプ 1 の Na チャネル毒、gigantoxin III はタイプ 2 の Na チャネル毒であることが判明した。一方、gigantoxin I は哺乳類由来の EGF (epidermal growth factor、上皮増殖因子) と高い相同性を示す新規ペプチド毒で、サワガニに対する強い麻痺活性の他に弱いながらも EGF 活性も示した。一方で、その前駆体構造は哺乳類由来の EGF のものと比べて極めて単純な構造をしていた。イボハタゴイソギンチャクからは 4 成分 (SHTX I-IV) のペプチド毒を単離した。SHTX IV はタイプ 2 の Na チャネル毒に属すると判断されたが、SHTX III は K チャネル毒性をあわせもつ Kunitz 型プロテアーゼインヒビターであった。さらに、SHTX I と II は既知のペプチド毒とは相同性のない新規 K チャネル毒であった。ジュズダマイソギンチャクからは 4 成分 (Ha I-IV) のペプチド毒を単離した。Ha I はサワガニに対して非常に強い致死活性を示す新規ペプチド毒で、Ha IV はタイプ 1 の Na チャネル毒であった。また、Ha II と III もお互いに高い相同性をもつ新規ペプチド毒で、その前駆体構造には、それぞれの一次構造をコードする配列が Ha II で 4 回、Ha III で 2 回も繰り返して存在していた。スナイソギンチャクからは 2 成分 (Da I-II)、タマイタダキイソギンチャクからは 1 成分 (Er I) のペプチド毒を単離した。いずれもタイプ 3 の Na チャネル毒で、サンゴイソギンチャクの PaTX と高い相同性が認められた。

次に、第 6 章ではすでにミナミウメボシイソギンチャク *Anemonia erythraea* から単離されている新規ペプチド毒 AETX II と III について、今後の構造活性相関の解明に向けた大腸菌での発現実験に資することを目的として cDNA クローニングを行った。

最後に第 7 章と第 8 章では、これまでの章とは性質が異なる試料を研究対象として実験を行った。すなわち、第 7 章ではイソギンチャクとは分類上の位置が異なるハナギンチャク目のムラサキハナギンチャク *Cerianthus filiformis* から、サワガニに対する毒性を指標にして、増殖因子 granulin と高い相同性を持つ新規ペプチド毒を単離した。第 8 章ではウメボシイソギンチャク *Actinia equina* の特殊な攻撃器官であるアクロラジからすでに単離されている新規ペプチド毒 acrorhagin I と II (皆川、1997) について、その C 末端部のアミノ酸配列の解明を目的として cDNA クローニングを行った。

本論文はこれらの結果を取りまとめたものであり、総括として第 9 章では、イソギンチャクのペプチド毒の前駆体構造を分類するとともに、イソギンチャクのペプチド毒に関する今後の研究を展望した。なお、本論文の内容の一部についてはすでに以下のように学会

での口頭発表（発表予定を含む）および学術論文（投稿準備中を含む）として公表済みであり、残りの部分についてもできるだけ早い時期に学術論文としてまとめる予定である。

口頭発表

- 1) ○本間智寛・長島裕二・塩見一雄：ムラサキハナギンチャクの granulin 様ペプチド毒の単離。平成 13 年度日本水産学会春季大会（神奈川）。
- 2) ○本間智寛・嶋倉邦嘉・長島裕二・塩見一雄：スナイソギンチャクのタイプ 3Na チャネル毒の単離およびアミノ酸配列。平成 14 年度日本水産学会大会（奈良）。
- 3) ○本間智寛・磯 豪・嶋倉邦嘉・長島裕二・塩見一雄：タマイタダキイソギンチャクのペプチド毒の単離およびアミノ酸配列。平成 15 年度日本水産学会大会（東京）。
- 4) ○本間智寛・永井宏史・嶋倉邦嘉・長島裕二・塩見一雄：ハタゴイソギンチャク毒の cDNA クローニング。平成 15 年度日本水産学会大会（東京）。
- 5) ○本間智寛・永井宏史・嶋倉邦嘉・長島裕二・塩見一雄：ウメボシイソギンチャクの特異的な攻撃器官アクロラジに含まれる新規ペプチド毒の cDNA クローニング。平成 16 年度日本水産学会大会（鹿児島）。
- 6) ○本間智寛・石田真巳・永井宏史・嶋倉邦嘉・長島裕二・塩見一雄：イボハタゴイソギンチャク毒の cDNA クローニングと K チャネル毒性。平成 17 年度日本水産学会大会（発表予定）。
- 7) ○本間智寛・石田真巳・永井宏史・嶋倉邦嘉・長島裕二・塩見一雄：ジュズダマイソギンチャクのペプチド毒の単離と cDNA クローニング。平成 17 年度日本水産学会大会（発表予定）。
- 8) ○本間智寛・石田真巳・永井宏史・嶋倉邦嘉・長島裕二・塩見一雄：ムラサキハナギンチャクの granulin 様ペプチド毒の cDNA クローニング。第 8 回マリンバイオテクノロジー学会大会（発表予定）。

学術論文

- 1) K. Shiomi, T. Honma, M. Ide, Y. Nagashima, M. Ishida and M. Chino : An epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *Toxicon*, 41, 229-236, (2003).
- 2) T. Honma, T. Iso, M. Ishida, Y. Nagashima and K. Shiomi : Occurrence of type 3 sodium channel peptide toxins in two species of sea anemones (*Dofleinia armata* and *Entacmaea ramsayi*). *Toxicon*, 41, 637-639, (2003).
- 3) T. Honma, H. Nagai, Y. Nagashima and K. Shiomi : Molecular cloning of an epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1652, 103-106, (2003).
- 4) T. Honma, S. Kawahata, M. Ishida, H. Nagai, Y. Nagashima and K. Shiomi : Isolation and molecular cloning of novel potassium channel toxins and a type 2 sodium channel toxin from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. (投稿準備中)
- 5) T. Honma, S. Minagawa, M. Ishida, H. Nagai, Y. Nagashima and K. Shiomi : Novel peptide toxins from the acrorhagi of the sea anemone *Actinia equina*. (投稿準備中)

参考論文

- 1) 本間智寛: HERG チャンネルを阻害するイソギンチャク *Anthopleura elegantissima* の新規 K⁺チャンネル毒 APETx1. 化学と工業, 57, 51, (2004).
- 2) T. Honma, Y. Hasegawa, M. Ishida, H. Nagai, Y. Nagashima and K. Shiomi : Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*. Toxicol, 45, 33-41, (2005).

第1章 20種イソギンチャクにおける各種生理活性物質の検索

イソギンチャクの毒はタンパク毒である 20kDa の溶血毒、ペプチド性の 3-5kDa の Na チャネル毒および 3.5-6.5kDa の K チャネル毒に大別される。また、イソギンチャクには毒成分とは別にプロテアーゼインヒビターが広く分布することも知られている。筆者の所属する研究室では、すでにイソギンチャクにおける各種生理活性物質の検索を行い、数種のイソギンチャクから、溶血毒、Na チャネル毒、K チャネル毒、トリプシンインヒビターの単離・構造解析を行ってきた。そこで本章では、新たに入手できた 20 種のイソギンチャクについて、各種生理活性物質の検索を行った。

実験方法

試料

試料として用いたイソギンチャクは、ハナギンチャク目ハナギンチャク科のムラサキハナギンチャク *Cerianthus filiformis*、ヒメハナギンチャク *Pachycerianthus magnus*、イマイソギンチャク亜目ウメボシイソギンチャク科のスナイソギンチャク *Dofleinia armata*、ロングテンタクルアネモネ *Macrodactyla doreensis*、スズナリイソギンチャク *Mesactinia ganensis*、オヨギイソギンチャク科のオヨギイソギンチャク *Boloceroides mcmurrichi*、クビカザリイソギンチャク科のベニヒモイソギンチャク *Calliactis polypus*、マミレイソギンチャク科のイワホリイソギンチャク *Telmatactis clavata*、ニチリンイソギンチャク科のヒメニチリンイソギンチャク *Phymanthus loligo*、ハタゴイソギンチャク科のキッカイソギンチャク *Antheopsis koseirensis*、シマキッカイソギンチャク *Antheopsis maculata*、タマイタダキイソギンチャク *Entacmaea ramsayi*、ジュズダマイソギンチャク *Heteractis aurora*、ハタゴイソギンチャク *Stichodactyla gigantea*、イボハタゴイソギンチャク *Stichodactyla haddoni*、アラビアハタゴイソギンチャク *Stichodactyla mertensii*、グビジンイソギンチャク *Stichodactyla tapetum*、ツマリシライトイソギンチャク *Radianthus gelam*、センジュイソギンチャク *Radianthus ritteri*、ケイトウイソギンチャク科のミノイソギンチャク *Heterodactyla hemprichii* の合計 20 種である (Table 1-1)。このうちロングテンタクルアネモネ以外はすべて日本に生息している種類である。なお、ロングテンタクルアネモネの和名は、正式和名ではなく海水魚店や愛好家の間での通称であるが、本論文中では便宜上ロングテンタクルアネモネと呼ぶことにする。

各イソギンチャクの採集 (または入手) 場所および採集 (または入手) 年月は Table 1-1 にまとめた。ハタゴイソギンチャクは沖縄県の黒島で、ヒメハナギンチャクは熊本県の恋路島で、オヨギイソギンチャクとシマキッカイソギンチャクは鹿児島県の獅子島で採集し、現地で凍結した。ベニヒモイソギンチャクは沖縄県の石垣島で、イワホリイソギンチャクは千葉県の上総半島の沖ノ島で採集し、生きている状態で研究室に持ち帰り、使用するまで -20°C で凍結保存した。またその他の 14 種イソギンチャクはすべて、生きている状態で海水魚店から購入し、使用するまで -20°C または -80°C で凍結保存した。

粗抽出液の調製方法

Table 1-1. Sea anemones used in this study

Species	Place of collection or purchase	Date of collection or purchase
Order Ceriantharia		
Family Cerianthidae		
<i>Cerianthus filiformis</i> (Murasakihanaginchaku)	Izuchuosuisan, Shizuoka Prefecture	February 2000
<i>Pachycerianthus magnus</i> (Himehanaginchaku)	Kojishima, Kumamoto Prefecture	July 2002
Suborder Nynantheae		
Family Actiniidae		
<i>Doffeina armata</i> (Sunaisoginchaku)	Izuchuosuisan, Shizuoka Prefecture	February 2000
<i>Macroductyla doreensis</i> (Long tentacle anemone)	Izuchuosuisan, Shizuoka Prefecture	November 2000
<i>Mesactinia ganensis</i> (Suzunarisoginchaku)	Miyakokaisuigo, Okinawa Prefecture	April 2004
Family Boloceroididae		
<i>Boloceroides mcMurrichi</i> (Oyogiisoginchaku)	Shishijima, Kagoshima Prefecture	July 2002
Family Hormathiidae		
<i>Calliactis polyopus</i> (Benihimoisoginchaku)	Ishigakijima, Okinawa Prefecture	November 2001
Family Isophelliidae		
<i>Telmatactis clavata</i> (Iwahoriisoginchaku)	Okinoshima, Chiba Prefecture	May 2002
Family Phymanthidae		
<i>Phymanthus loligo</i> (Himenichirinisoginchaku)	Miyakokaisuigo, Okinawa Prefecture	April 2004
Family Stichodactylidae		
<i>Antheopsis koseiensis</i> (Kikkaisoginchaku)	Namamugi Kaisuigo Center, Kanagawa Prefecture	June 2003
<i>Antheopsis maculata</i> (Shimakikkaisoginchaku)	Shishijima, Kagoshima Prefecture	July 2002
<i>Entacmaea ramsayi</i> (Tamaitadakisoginchaku)	Izuchuosuisan, Shizuoka Prefecture	February 2000
<i>Heteractis aurora</i> (Juzudamaisoginchaku)	Aquarie, Osaka Prefecture	December 2003
<i>Stichodactyla gigantea</i> (Hatagoisoginchaku)	Kuroshima, Okinawa Prefecture	October 1989
<i>Stichodactyla haddoni</i> (Ibohatagoisoginchaku)	Izuchuosuisan, Shizuoka Prefecture	April 1999
<i>Stichodactyla mertensii</i> (Arabiahatagoisoginchaku)	Aquarie, Osaka Prefecture	June 2003
<i>Stichodactyla tapetum</i> (Gubijinisoginchaku)	Shonan aquarium, Kanagawa Prefecture	November 2002
<i>Radianthus gelam</i> (Tsumarishiraitoisoginchaku)	Miyakokaisuigo, Okinawa Prefecture	December 2003
<i>Radianthus ritteri</i> (Seniyuisoginchaku)	Izuchuosuisan, Shizuoka Prefecture	October 2000
Family Thalassianthidae		
<i>Heterodactyla hemprichii</i> (Minoisoginchaku)	Izuchuosuisan, Shizuoka Prefecture	November 2000

凍結試料をホモジナイズし、得られたホモジネートから 5 g を秤り取り、イオン交換水 25ml 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、0°C、15min) し、得られた上清を粗抽出液とした。

致死活性の測定方法

致死活性の測定には、実験動物として三協ラボサービスより購入した ddY 系 4 週齢の雄マウス (体重約 20g) と東京都中央卸売市場で購入したサワガニ *Potamon dehaani* (体重約 5g) を用いた。マウスについては、粗毒またはその段階的 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。投与液量は、マウスの体重 1g あたり 10 μ 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。サワガニについては、粗毒またはその段階的 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。投与液量は、サワガニの体重 1g あたり 10 μ 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。

溶血活性の測定方法

4 種動物 (ウシ、ウマ、ヒツジ、ウサギ) の赤血球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。日本生物材料センターより購入した 4 種動物の保存血液 (等量の Alsever 氏液を添加してある) に約 20 倍量の 0.15M NaCl を含む 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0、以下 PBS と略す) を加えて遠心分離 (2500×g、0°C、5min) し、沈殿した赤血球を集めた。赤血球をさらに PBS で 2 回洗浄し、最後に PBS で 2% 赤血球浮遊液を調製した。まず、小試験管に粗毒あるいは PBS で希釈したものを 1ml 入れ、PBS 2ml を加えて全量を 3ml とした。溶血を起こさないブランクとしては PBS 3ml を、完全溶血を起こさせるためには PBS の代わりにイオン交換水 3ml を用いた。各試験管に 2% 赤血球浮遊液 1ml を加えて軽く攪拌した後、37°C で 30min インキュベートした。インキュベート後遠心分離 (2500×g、0°C、5min) し、得られた上清の 542nm における吸光度をブランクに対して測定することにより、溶血によって遊離したヘモグロビン量を求めた。溶血活性は溶血単位 (hemolytic unit, HU) で表示し、赤血球の 50% を溶血させるのに必要な溶血因子の量を 1HU と定義した。50% 溶血は、イオン交換水によって完全溶血を引き起こした時の吸光度の半分の値で計算した。

プロテアーゼ活性の測定方法

プロテアーゼ活性はカゼインを基質として以下のように測定した。カゼインを 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解して 1% カゼイン溶液とした。まず、試験管に粗毒 0.5ml を入れ、1% カゼイン溶液 1ml を加えて全量を 1.5ml とした。また、ブランクとして粗毒 0.5ml に、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 1ml を加えたもの、および同緩衝液 0.5ml に 1% カゼイン溶液 1ml を加えたものを用いた。各試験管を攪拌し、37°C で 30min インキュベートした。インキュベート後、10% 過塩素酸を 2ml 加え、生じた沈殿を除去するために遠心分離

(900×g、0°C、10min)した。得られた上清をろ過し、ろ液 0.5ml に 20%炭酸ナトリウム水溶液 2ml とフェノール試薬 0.5ml を加えた。反応液を室温で 30min インキュベート後、750nm における吸光度を測定した。プロテアーゼ活性を表示するために、カゼイン分解生成物の吸光度を 30min で 0.05 増加させる活性を 1unit (U) と定義した。

トリプシンインヒビター活性の測定方法

トリプシンインヒビター活性は、合成基質 benzoyl-D,L-4-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) に対するトリプシン活性の阻害を測定した。まず、マイクロタイタープレート (FALCON、USA) の各ウェルに 0.01M CaCl₂ を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 50μl、トリプシン溶液 (5unit/ml) 30μl および粗毒 50μl を加えた。37°C で 10min プレインキュベートした後、2mM BAPNA 溶液 50μl を加え、1min 間静置した。プレートリーダー (BIO RAD Model 550、USA) で 405nm における吸光度を測定し、さらに 37°C で 30min インキュベート後、同様に 405nm における吸光度を測定した。対照実験は、粗毒のかわりに 0.01mM CaCl₂ を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 50μl を用いて行った。トリプシンの活性 1unit を阻害する活性を 1 inhibitory unit (IU) と定義し、粗毒の活性の強さは IU/ml で表示した。

PLA₂活性の測定方法

PLA₂活性は、卵黄懸濁液の吸光度の減少を指標とする Marinetti (1965) の方法により、次のように測定した。まず、市販の鶏卵から卵黄のみを集め、卵黄 1mg あたり 0.5ml の 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて均一に混合し、卵黄懸濁液とした。卵黄懸濁液 1.5ml に粗毒 0.1ml を加えてよく混合し、900nm における吸光度を 4 分間測定し、1min あたり 0.01 減少させる活性を 1unit (U) と定義した。

結果および考察

20 種イソギンチャクにおける生理活性物質の検索結果を、溶血活性、致死活性および麻痺活性については Table 1-2 に、プロテアーゼ活性、トリプシンインヒビター活性および PLA₂ 活性については Table 1-3 にまとめた。

まず溶血活性であるが、調べた 14 種中 9 種に検出された。中でもセンジュイソギンチャクとミノイソギンチャクの活性が著しく強かった。筆者の所属する研究室で過去に検索した中では、サンゴイソギンチャク *Entacmaea actinostoloides* が最も強い溶血活性を示したイソギンチャクで、本研究とまったく同じ方法で調製した抽出液の活性は 170 (ウマ) -167000 HU/ml (ヒツジ) であった (Shiomi *et al.*, 1998)。しかし、センジュイソギンチャクとミノイソギンチャクの活性はそれをはるかに上回っていた。溶血活性をもう少し詳しくながめてみると、いずれのイソギンチャクでも動物種による血球特異性が認められた。例えばミノイソギンチャクでは、ヒツジ赤血球に対して 156860 HU/ml と最大の活性を示し、ウマ赤血球に対してはその 1%以下のわずか 1300 HU/ml であった。センジュイソギンチャクではウサギ赤血球に対する活性が最も高いとか、タマイタダキイソギンチャクではウシ赤血球に対する活性が最も高いといった例外はあるものの、ミノイソギンチャク同

Table 1-2. Hemolytic, lethal and paralytic activities of the crude extracts from 20 species of sea anemones

Sea anemone	Hemolytic activity (HU/ml)				Lethal activity (titer)		Paralytic activity (titer)	
	Cow	Horse	Sheep	Rabbit	Mouse	Crab	Crab	
Order Ceriantharia								
Family Cerianthidae								
<i>Cerianthus filiformis</i> (Murasakihanaginchaku)	<10	<10	<10	<10	<1	16	32	
<i>Pachycerianthus magnus</i> (Himehanaginchaku)	<10	<10	<10	<10	<1	<1	1	
Suborder Nynantheae								
Family Actiniidae								
<i>Dofleinia armata</i> (Sunaisoginchaku)	580	80	700	210	<1	16	32	
<i>Macroactyla doreensis</i> (Long tentacle anemone)	40	10	30	20	<1	128	256	
<i>Mesactinia ganensis</i> (Suzunariisoginchaku)						16	32	
Family Boloceroididae								
<i>Boloceroides mcMurrichi</i> (Oyogiisoginchaku)	<10	<10	<10	<10	<1	1	1	
Family Hormathiidae								
<i>Calliactis polypus</i> (Benihimoisoginchaku)	<10	<10	<10	<10	<1	32	32	
Family Isophelliidae								
<i>Teilmatactis clavata</i> (Iwahoriisoginchaku)	<10	<10	<10	<10	<1	2	4	
Family Phymanthidae								
<i>Phymanthus loligo</i> (Himenichirinisoginchaku)						128	256	
Family Stichodactylidae								
<i>Antheopsis koseirensis</i> (Kikkaisoginchaku)						64	128	
<i>Antheopsis maculata</i> (Shimakikkaisoginchaku)	30	<10	10	<10	<1	16	32	
<i>Entacmaea ramsayi</i> (Tamaitadakisoginchaku)	5000	60	1670	680	16	16	32	
<i>Heteractis aurora</i> (Juzudamaisoginchaku)						32	128	
<i>Stichodactyla gigantea</i> (Hatagoisoginchaku)	5000	6870	16950	1530	16	64	512	
<i>Stichodactyla haddoni</i> (Ibohatagoisoginchaku)	6670	60	5850	1330	2	32	128	
<i>Stichodactyla mertensii</i> (Arabiahatagoisoginchaku)						64	128	
<i>Stichodactyla tapetum</i> (Gubijinisoginchaku)	2470	140	11330	1190	16	32	64	
<i>Radianthus gelam</i> (Tsumarishiraitoisoginchaku)	76580	20640	71420	124530	64	64	128	
<i>Radianthus ritteri</i> (Senjuyisoginchaku)						64	128	
Family Thalassianthidae								
<i>Heterodactyla hemprichii</i> (Minoisoginchaku)	78230	1300	156860	15310	16	512	1024	

Table 1-3. Protease and protease inhibitory activities of the crude extracts from 20 species of sea anemones

Sea anemone	Protease activity (U/ml)	Protease inhibitory activity (IU/ml)	PLA ₂ activity (U/ml)
Order Ceriantharia			
Family Cerianthidae			
<i>Cerianthus filiformis</i> (Murasakihanaginchaku)	<0.1	<0.1	6.5
<i>Pachycerianthus magnus</i> (Himehanaginchaku)	8.6		0.5
Suborder Nynantheae			
Family Actiniidae			
<i>Dofleinia armata</i> (Sunaisoginchaku)	<0.1	<0.1	23
<i>Macrodactyla doreensis</i> (Long tentacle anemone)	4.0	1.3	9.5
<i>Mesactinia ganensis</i> (Suzunariisoginchaku)	8.6		2.3
Family Boloceroididae			
<i>Bolocerooides mcMurrichi</i> (Oyogisoginchaku)	9.2		3.8
Family Hormathiidae			
<i>Calliactis polypus</i> (Benihimoisoginchaku)	23	<0.1	42
Family Isophelliidae			
<i>Telmatactis clavata</i> (Iwahoriisoginchaku)	18		4.5
Family Phymanthidae			
<i>Phymanthus loligo</i> (Himenichirinisoginchaku)	7.6		1.5
Family Stichodactylidae			
<i>Antheopsis koseirensis</i> (Kikkaisoginchaku)	<0.1		1.5
<i>Antheopsis maculata</i> (Shimakikkaisoginchaku)	3.6		<0.1
<i>Entacmaea ramsayi</i> (Tamaitadakisoginchaku)	<0.1	<0.1	8.5
<i>Heteractis aurora</i> (Juzudamaisoginchaku)	12		3.3
<i>Stichodactyla gigantea</i> (Hatagoisoginchaku)	1.8	200	<0.1
<i>Stichodactyla haddoni</i> (Ibohatagoisoginchaku)	<0.1	27	9.8
<i>Stichodactyla mertensii</i> (Arabiahatagoisoginchaku)	3.4		<0.1
<i>Stichodactyla tapetum</i> (Gubijinisoginchaku)	11		1.0
<i>Radianthus gelam</i> (Tsumarishiraitoisoginchaku)	3.0		0.8
<i>Radianthus ritteri</i> (Senjuyisoginchaku)	<0.1	197	<0.1
Family Thalassianthidae			
<i>Heterodactyla hemprichii</i> (Minoisoginchaku)	9.2	62	4.8

様にヒツジ赤血球に対する活性が強く、ウマ赤血球に対する活性は弱いという傾向が全体に認められた。これまでの研究により、イソギンチャクの溶血毒は 20kDa の塩基性タンパク質で、細胞膜のリン脂質のスフィンゴミエリンと結合して小孔を形成することが明らかにされている。しかしながら、ヒダベリイソギンチャクから単離された metridiolysin のように、分子量が 80kDa と大きいだけでなく、スフィンゴミエリンではなくコレステロールと結合して小孔を形成するといった例外もある。イソギンチャクの溶血毒は細胞膜の構造解析試薬としての応用が期待されるので、著しく強い溶血活性が検出されたセンジュイソギンチャクとミノイソギンチャクについては、今後溶血毒を単離し、一次構造および細胞膜レセプターを解析することが望まれる。

サワガニに対する毒性は 20 種イソギンチャクのすべてに認められ、致死活性では特にミノイソギンチャクが titer 512 ときわめて高く、次いでロングテンタクルアネモネとヒメニチリンイソギンチャクが titer 128 と続いた。過去の検索例では、すべてのイソギンチャクにサワガニ致死活性が検出されていたが、ヒメハナギンチャクでは原液においても認められなかった。20 種の中で、ハナギンチャク目のムラサキハナギンチャクに活性が検出されたことは重要である。イソギンチャク毒に関するこれまでの研究では、すべてイソギンチャク目に属する種類だけが対象とされてきたが、ハナギンチャク目でも類似の毒成分が存在することが考えられた(第 7 章で、この毒成分がタンパク質性であることが示される)。一般的にイソギンチャクの Na チャネル毒は甲殻類に対して強い毒性を示すことが知られているので、サワガニに対する致死活性は Na チャネル毒の存在を示唆している。実際、筆者の所属する研究室では、サワガニに対する致死活性を指標としてこれまでにウメボシイソギンチャク (Lin *et al.*, 1996)、フロリダアネモネ (Shiomi *et al.*, 1995)、シライトイソギンチャク (Shiomi *et al.*, 1996)、カワリギンチャク (Ishida *et al.*, 1997) およびミナミウメボシイソギンチャク (Shiomi *et al.*, 1997) から 6 成分以上の Na チャネル毒が単離されている。本研究においても、新たにサワガニ致死活性が検出された 19 種のうち 5 種(ハタゴイソギンチャク、イボハタゴイソギンチャク、ジュズダマイソギンチャク、スナイソギンチャク、タマイタダキイソギンチャク) のペプチド毒を単離し、いずれにも Na チャネル毒が存在することが判明した(詳細は第 2~5 章で述べる)。サワガニ致死活性と関連して、サワガニに対する麻痺活性の結果は興味深い。ヒメハナギンチャクを除く 19 種イソギンチャクのいずれにおいても、致死量以上の粗毒を投与されたサワガニはまず麻痺症状を示し、その後死亡する。致死成分そのものが麻痺活性を持つ場合には、致死量よりやや少ない投与量ではサワガニに麻痺が観察されるが、致死量よりかなり少ない投与量ではもはや麻痺もみられないと考えられる。したがって、麻痺活性の titer は致死活性の titer と同じか 2 倍程度として測定されることになるが、このことは 16 種イソギンチャクでは当てはまる。例外はハタゴイソギンチャク、イボハタゴイソギンチャク、ジュズダマイソギンチャクで、ハタゴイソギンチャクでは麻痺活性は致死活性の 8 倍、イボハタゴイソギンチャクでは 4 倍、ジュズダマイソギンチャクでも 4 倍に達している。これらイソギンチャクでは、致死成分とは別に麻痺のみを起こす毒成分を含み、しかも毒成分の麻痺活性が非常に強い、あるいは活性は弱くても含量が高いことを強く示唆している(この示唆が正しいことは、第 2~4 章で証明される)。

マウスに対する致死活性は調べた 14 種中 6 種に認められ、センジュイソギンチャクが

titer 64 と特に強かった。マウス致死活性はサワガニ致死活性より極端に弱いものが多かったが、タマイタダキイソギンチャクおよびセンジュイソギンチャクでは同じで、両活性にはあまり相関はみられなかった。一方、マウス致死活性は溶血活性とかなりの相関があり、溶血活性の強いものではマウス致死活性も強い。一般的にイソギンチャクの Na チャネル毒の致死作用は甲殻類に対しては強いが哺乳類に対しては弱いこと、溶血毒は哺乳類に対して強い致死活性を示すことが知られているので、本研究で検出されたマウス致死活性には、Na チャネル毒よりは溶血毒の関与が大きいと思われる。

プロテアーゼ活性は 20 種中 14 種に認められたが、いずれも 1.8–23 U/ml と弱いものであった。当研究室の過去の検索結果 (皆川, 1997) でもイソギンチャクのプロテアーゼ活性は弱く、妥当な結果であろう。

トリプシンインヒビター活性は 9 種中 5 種に検出された。中でも、ハタゴイソギンチャク (200 IU/ml) およびセンジュイソギンチャク (197 IU/ml) に著しく強い活性がみられ、イボハタゴイソギンチャク (27 IU/ml) とミノイソギンチャク (62 IU/ml) も比較的強い活性を示した。プロテアーゼインヒビターはこれまでに、ウメボシイソギンチャク (Shiomi *et al.*, 1989; Lenarčič *et al.*, 1997)、*Anemonia sulcata* (Fritz *et al.*, 1972; Wunderer *et al.*, 1981; Tschesche *et al.*, 1987)、*Anthopleura aff. xanthogrammica* (Minagawa *et al.*, 1997; Minagawa *et al.*, 1998)、*Radianthus koseirensis* (Mebs *et al.*, 1983)、*R. macrodactylus* (Zykova *et al.*, 1985)、*Rhodactis rhodostoma* (Mebs *et al.*, 1983)、*Stichodactyla* sp. (Mebs and Gebauer, 1980) および *S. helianthus* (Antuch *et al.*, 1993) の計 8 種から単離され、*Anemonia sulcata* の Kazal 型のエラスターゼインヒビター 1 成分 (Tschesche *et al.*, 1987) とウメボシイソギンチャクのスステインプロテアーゼインヒビター equistatin (Lenarčič *et al.*, 1997) を除けば、いずれも Kunitz 型のプロテアーゼインヒビターに属することが明らかにされているので、本研究で新たに検出されたトリプシンインヒビターも Kunitz 型であると予想される。しかし、*Anemonia sulcata* から単離された 4 成分の K チャネル毒のうち、3 成分は Kunitz 型インヒビターであるという興味深い事実も報告されている (Schweitz *et al.*, 1995)。イソギンチャクのトリプシンインヒビターは、K チャネル毒性を示す Kunitz 型インヒビターのいいモデル化合物であると思われるので、本研究で強い活性が認められたイソギンチャクからトリプシンインヒビターを単離し、その K チャネル毒性を明らかにすることが望まれる (実際に、第 3 章で述べるイボハタゴイソギンチャクの SHTX III は、K チャネル毒性を示す Kunitz 型インヒビターであった)。

PLA₂ 活性は 16 種に認められ、特にスナイソギンチャク (23 U/ml) とベニヒモイソギンチャク (42 U/ml) は強い活性を示した。最近、*Aiptasia pallida* から PLA₂ が単離されたが、毒性との関連は不明である (Grotendorst and Hessinger, 2000)。ヘビでは PLA₂ は主要な毒成分であり、ハチ類やオニヒトデでも PLA₂ は毒成分として機能していることが判明している (Shiomi *et al.*, 1998; Nevalainen *et al.*, 2004)。その意味からも、本研究で見出された PLA₂ を単離し、その生物活性を明らかにすることは今後の興味ある課題であろう。

第2章 ハタゴイソギンチャクのペプチド毒の単離と cDNA クローニング

ハタゴイソギンチャク *Stichodactyla gigantea* (Fig. 2-1) はイマイソギンチャク亜目 (Nynantheae) ハタゴイソギンチャク科 (Stichodactylidae) に属し、沖縄から広くインド洋～西太平洋のサンゴ礁の浅海に生息する直径 40-50cm の大型種で、カクレクマノミ、アカホシカニダマンが共生する。長さ 1cm ほどの小さな触手が口盤を覆い尽くし、口盤周辺部が著しくひだ状になるのが特徴である。また、触手の色には変異があり、黄色やピンク色のものもある。

第 1 章において、ハタゴイソギンチャクはサワガニに対して強い致死活性を示したのみならず、致死活性が認められる濃度の 1/8 の濃度でも麻痺活性が検出され、致死成分とは別に麻痺のみを引き起こす成分の存在が示唆された。そこで本章では、ハタゴイソギンチャクから致死活性および麻痺活性を示すペプチド毒を単離し、その生物活性の解明と cDNA クローニングを試みた。

実験方法

試料

ペプチド毒の単離には、1989 年 10 月に沖縄県黒島で採集したハタゴイソギンチャク 5 個体 (287g) を試料とした。試料は現地で凍結した後、研究室に持ち帰り、実験に使用するまで -20°C で冷凍保存した。RNA の抽出には、2002 年 6 月に観賞魚店 (東京都) から購入したハタゴイソギンチャクを試料とした。生きたまま賽の目状に切り取り、液体窒素で凍結後、実験に使用するまで -80°C で冷凍保存した。

粗抽出液の調製方法

凍結試料をホモジナイズし、得られたホモジネートから 5 g を秤り取り、イオン交換水 25ml 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°C、15min) し、得られた上清を粗抽出液とした。

ペプチド毒の単離方法

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 Sephadex G-50 カラム (2.5×90cm; Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) に供した。同緩衝液を用いて流速 24ml/hr で溶出し、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、孔径 0.45μm のメンブレンフィルター (DISMIC-25cs; 東洋濾紙、東京) でろ過後、TSKgel ODS-120T カラム (0.46×25cm; 東ソー、東京) 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 (最初の 5min は 0-17.5%、その後 60min は 17.5-42%) により流速 1ml/min で毒成分を溶出した。ペプチドは UV 検出器を用いて 220nm の吸光度で検出した。3 成分のペプチド毒 (gigantoxins I-III) に対応する溶出液を集めて凍結乾燥し、必要な溶媒に溶解してその



Fig. 2-1. ハタゴイソギンチャク *Stichodactyla gigantea*
(クマノミガイドブック、2001より)

後の実験に用いた。

毒性の測定方法

マウスおよびサワガニに対する毒性（致死活性または麻痺活性）は第1章で述べたように測定した。単離したペプチド毒のサワガニに対する LD₅₀（致死活性）または ED₅₀（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。キンギョ *Carassius auratus*（観賞魚店で購入）に対する致死活性は、体重 1g あたり試料 10 μ l を筋肉注射し、最大 2hr の観察により調べた。なお対照として、ヒト EGF (Sigma, St. Louis, MO, USA) のマウス致死活性、サワガニ毒性、キンギョ致死活性も調べた。

EGF 活性の測定方法

EGF (epidermal growth factor、上皮増殖因子) 活性は、A431 細胞（ヒト頭頸部がん上皮様細胞）の形態変化（EGF は、Ca²⁺フリーの培地中で A431 細胞の形態を多角形から球状に変化させることが知られている）および A431 細胞の EGF レセプター (EGFR) のリン酸化（EGFR は細胞膜を貫通しており、細胞内はチロシンキナーゼである。EGF が EGFR に結合すると、チロシンキナーゼ自身のチロシン残基がリン酸化されることが知られている）によって測定した。A431 細胞は、仔牛血清 (10%)、カナマイシン (0.06mg/ml)、ストレプトマイシン (0.1mg/ml) およびペニシリン (10units/ml) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中で、5%CO₂ ガス存在下で培養した。

形態変化の観察のために、6 ウェル (ϕ 35mm) のプレートに DMEM 1ml あたり 1×10^5 の細胞数の A431 細胞をまき、接着させるために 37°C で 18-20hr インキュベートした。次いで、A431 細胞を PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ および 1.5mM KH₂PO₄ を含む) 1ml で 2 回洗浄し、gigantoxin I またはヒト EGF とともに PBS 1ml 中で 37°C、30min インキュベートした。A431 細胞の形態変化は顕微鏡によって観察した。

EGFR のチロシン残基リン酸化を調べるために、A431 細胞 (1×10^6) を 10cm のペトリ皿上の DMEM 1ml 中で 37°C、18-20hr インキュベートした。さらに gigantoxin I またはヒト EGF と 37°C で 30min インキュベートした後、冷 PBS (0.9mM CaCl₂ および 0.5mM MgCl₂ を含む) 1ml で 2 回洗浄した。ペトリ皿に接着した A431 細胞をかきとって、1ml の冷 PBS 中に懸濁し、遠心分離 (1000 $\times g$ 、4°C、4min) した。細胞は -80°C で 18-20hr 保存した後、RIPA 緩衝液 (1.5% Triton-X100、0.1% SDS、500mM NaCl、100mM Na₃V₄、50mM NaF、5mM EDTA、1mM フッ化スルフォニルフェニルメタン、0.01% ロイペプチン および 1% デオキシコール酸ナトリウムを含む 25mM HEPES 緩衝液、pH 7.8) 1ml とともにホモジナイズ (4°C、30min) し、さらに遠心分離 (15000 $\times g$ 、4°C、15min) した。得られた上清は 50% Protein G Sepharose 4B (Amersham Bioscience) を含む RIPA 緩衝液 25 μ l と混合し、4°C で 1hr 攪拌した。遠心分離 (2000 $\times g$ 、4°C、4min) 後、上清に 2 μ g のマウス抗 EGFR 抗体 (Santa Cruze Biotechnology, Santa Cruze, USA) および 50% Protein G Sepharose 4B を含む RIPA 緩衝液 25 μ l を加えた。混合物を 4°C で 3hr 攪拌し、遠心分離 (2000 $\times g$ 、4°C、4min) した。得られた沈殿を RIPA 緩衝液 1ml で 4 回洗浄し、25 μ l の電気泳動用緩衝液 (2.15% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、7% グリセロールお

よび 0.0025% プロモフェノールブルーを含む 0.52M Tris-HCl 緩衝液、pH 6.8; 東洋紡、大阪) に懸濁し、95°C で 3min 加熱後、短時間の遠心分離を行った。Laemmli (1970) の方法に従い、20 μ l の上清を 5% ポリアクリルアミドゲルを用いる SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE で分離したタンパク質を 100V、1hr でニトロセルロース膜に転写し、膜は 10% スキムミルクを含む TBS-Tween (0.1% Tween 20 を含む 10mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5) でブロッキング (室温、1hr) 後、TBS-Tween で洗浄した。転写タンパク質は、マウス抗ホスフォチロシン抗体 4G10 (1: 5000 希釈; 生化学工業、東京) と室温で 2hr、次いで西洋わさびペルオキシダーゼを結合した抗マウス IgG 抗体 RPN 1001 (1: 1000 希釈; Amersham Bioscience) と室温で 1hr 反応させた。TBS で洗浄後、ラベルされたタンパク質は ECL 検出器 (Amersham Bioscience) を用いて検出した。

タンパク質の定量方法

タンパク質の定量は Lowry *et al.* (1951) の方法に従って行った。標準タンパク質としては牛血清アルブミンを用いた。

分子量の測定方法

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。装置としては SHIMADZU/Kompact MALDI-I を用いた。試料 1 μ l をサンプルスライド上で風乾後、その上にマトリックス溶液 (10mg/ml のシナピン酸溶液) 1 μ l をのせ、結晶化後に分析を行った。

還元およびピリジルエチル化

試験管中で凍結乾燥した各 gigantoxin (200-300 μ g) を、7M グアニジン塩酸塩および 10mM EDTA を含む 0.5M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) 300 μ l に溶解し、容器内の空気を窒素で置換した。ジチオスレイトール (DTT) を 1mg 加えて再び窒素で置換した。室温で 2hr 還元後、4-ピニルピリジン 2 μ l を加え、室温暗所でさらに 90min 反応させた。ピリジルエチル (PE) 化した試料は、TSKgel ODS-120T カラムを用いた逆相 HPLC で精製した。溶出は 0.1% TFA 中のアセトニトリルの直線的濃度勾配 (0-70%、40min) により、流速 1ml/min で行った。なお、PE 化した各 gigantoxin は UV 検出器を用いて 220nm の吸光度で検出した。

キモトリプシンによる酵素分解

キモトリプシン (EC 3.4.21.1) は特に、Tyr、Phe、Trp 残基のカルボキシル側のペプチド結合を切断する酵素である。また弱いながら、Leu、Met、Ala、Asp、Glu 残基のカルボキシル側のペプチド結合も切断する。PE-gigantoxin II (70 μ g) を凍結乾燥後、0.01M CaCl₂ を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8) 500 μ l に溶解し、5 μ g のキモトリプシン (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を加えて 25°C で 18hr 分解した。生成したペプチド断片は、TSKgel ODS-120T を用いる逆相 HPLC により単離した (0.1% TFA 中のアセトニトリルの濃度勾配は Fig. 2-7 を参照)。

V8 プロテアーゼによる酵素分解

V8 プロテアーゼ (EC 3.4.21.19) はアンモニア系緩衝液中では Glu 残基の、リン酸緩衝液中では Glu 残基と Asp 残基のカルボキシル側のペプチド結合を特異的に切断する酵素である。PE-gigantoxin III (50 μ g) を 2mM EDTA を含む 0.1M 炭酸水素アンモニウム溶液 250 μ l に溶解し、10 μ g の V8 プロテアーゼ (*Staphylococcus aureus* V8; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 18hr 分解した。生成したペプチド断片は、TSKgel ODS-120T カラムを用いた逆相 HPLC により単離した (0.1%TFA 中のアセトニトリルの濃度勾配は Fig. 2-10 を参照)。

アミノ酸配列分析

単離したペプチド毒の N 末端アミノ酸配列およびキモトリプシンまたは V8 プロテアーゼ分解で得られた各ペプチド断片のアミノ酸配列は、エドマン分解法に基づいた気相式シーケンサー (LF-3400D TriCart with high sensitivity chemistry; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) を用いて分析した。本装置ではエドマン分解反応はすべて自動的に順次進行し、各サイクルで生成する PTH-アミノ酸はオンラインで逆相 HPLC に送られ自動分離される。こうして得られた逆相 HPLC のクロマトグラムをみて、試料のアミノ酸配列を N 末端から決定した。

Gigantoxin I の C 末端部分のアミノ酸配列は、カルボキシペプチダーゼ W (EC 3.4.16.1; 生化学工業、東京) 分解により生成するペプチドの分子量測定および遊離するアミノ酸の組成分析から決定した。凍結乾燥した PE-gigantoxin I (100 μ g) を 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 100 μ l に溶解し、0.05M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解したカルボキシペプチダーゼ W 溶液 (2 μ g/ μ l) を 20 μ l 加えて 30 $^{\circ}$ C でインキュベートした。経時的に反応液 25 μ l を取り出し、沸騰水中で加熱して酵素を失活させ、一部を MALDI/TOF-MS に供して生成ペプチドの分子量を測定した。残りは凍結乾燥後、0.2M クエン酸緩衝液 (pH 2.2) 600 μ l に溶解し、孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルター (DISMIC-13cp; 東洋濾紙、東京) でろ過後、アミノ酸自動分析計 (アト-MLC-703 型) に供した。

RNA の抽出方法

触手、口盤、体壁を含む凍結試料約 1g から TRIzol 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて total RNA を抽出した。

3'RACE 法

3'RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) は以下のように行った。1st strand cDNA は 5 μ g の total RNA をもとに、3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends キット (Invitrogen) とオリゴ dT-アダプタープライマーを用いて合成した。1st strand cDNA に対して、gigantoxin I-III のアミノ酸配列をもとに設計した degenerate プライマー (5'-ACI GGI CAR TAY GCI WSI WSI TTY TG-3'は gigantoxin I の ⁷TGQYASSFC¹⁵、5'-GAY WSI GAY GGI CCI CAY GTI MGI G-3'は gigantoxin II の ⁷DSDGPHVRG¹⁵、5'-GCI TGY AAR TGY GAY GAY GAY GG-3'は gigantoxin III の ²ACKCDDD⁹ にそれぞれ対応) と AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) とで 1 回目の 3'RACE を行った。得られた PCR

産物は MicroSpin S-400 HR Columns (Amersham Bioscience) でプライマーを取り除いた後、さらに degenerate プライマー (5'-TYT GYY TIA AYG GIG GIA CIT GYM G-3'は gigantoxin I の ¹⁴FCLNGGTCR²²、5'-CAY GTI MGI GGI AAY ACI YTI ACI GG-3'は gigantoxin II の ¹²HVRGNTLTG²⁰、5'-GAY ATH MGI WSI GCI ACI YTI ACI GG-3'は gigantoxin III の ¹¹DIRSATLTG¹⁹にそれぞれ対応) と AUAP とで nested PCR を行った。PCR 増幅は Ex Taq ポリメラーゼ (Takara、大津、滋賀) を用いて、条件は 94°C5min ; 94°C30sec、55°C30sec、72°C1min を 35 サイクル ; 72°C5min とした。

5'RACE 法

5'RACE (5'-rapid amplification of cDNA ends) は以下のように行った。1st strand cDNA は 5µg の total RNA をもとに、5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) キットと gene-specific プライマー (gigantoxin I は 5'-GGT TAG ACT GAC ATT TGC TC-3'、gigantoxin II は 5'-ACT ACC CTT TTG GCA TTT GTG-3'、gigantoxin III は 5'-AAG GAT TGT GTA AAA AGA TGC G-3') を用いて合成した。1st strand cDNA に対して、gene-specific プライマー (gigantoxin I は 5'-AAT CAC CCG GAC AAA TGC AG-3'、gigantoxin II は 5'-GCC AAC CAG ATG GGC AGC-3'、gigantoxin III は 5'-ACT TTT CCC ATC CCT CGT TG-3') と AAP (Abridged Anchor Primer) とで 1 回目の 5'RACE を行った。得られた PCR 産物は MicroSpin S-400 HR Columns でプライマーを取り除いた後、さらに gene-specific プライマー (gigantoxin I は 5'-GTA TCT GCA CGT CCC CCC-3'、gigantoxin II は 5'-GGC AGC CGA ACA CCC AGA-3'、gigantoxin III は 5'-CTA AAT CAA CAG TGC CCG TC-3') と AUAP とで nested PCR に供した。PCR 増幅は 3'RACE の場合と同じ条件で行った。

サブクローニング法

nested PCR 産物は MicroSpin S-400 HR Columns でプライマーを取り除いた後、pT7Blue Vector (Novagen、Nottingham、UK) に Ligation high (東洋紡) を用いて 16°C で 4hr ライゲーションした。次に、ライゲーションした pT7Blue Vector を大腸菌のコンピテントセル Competent high DH5α (東洋紡) に形質転換した。あらかじめ X-gal 50µl (20mg/ml) を塗布したアンピシリン (50µg/ml) を含む LB プレート培地に、形質転換した大腸菌を播いて、37°Cで一晩インキュベートした。翌日、ブルーホワイトセレクションを行い、pT7 Blue Vector に特異的な M13 Primer M4 と T7 promotor primer を用いて、コロニー-PCR でインサートチェックを行った。

塩基配列分析

塩基配列分析はジデオキシ法に基づき、コロニー-PCR 産物を Cy5 ThermoSequenase Dye Terminator Kit (Amersham Bioscience) に従って反応させ、Long-Read Tower DNA シークエンサー (Amersham Bioscience) により解析した。最後に、3'RACE と 5'RACE で決定した塩基配列をもとに設計した 5'末端側と 3'末端側プライマー (gigantoxin I では 5'-TGT GAG AAG CAA ATT GAC CAG-3'と 5'-GCC TTT TAT TTG AAA TCC ATG TT-3'、gigantoxin II では 5'-GGT CAT TCA ACA TCA AGC GG-3'と 5'-CCA GTT TAA TGC TCA

TCA GTT T-3'、gigantoxin III では 5'-ATC ACT TTG AGT CCT GAG TAG-3' と 5'-TTG TTT TAT TCA GCA CTT TAA GG-3') で RT-PCR を行い、全塩基配列を確認した。

刺胞からのペプチド毒の単離

刺胞の精製は Hessinger and Lenhoff (1973) の方法を改良して行った。凍結試料から触手約 10g を切り取り、1M クエン酸ナトリウム水溶液 300ml 中でほぐすように浮遊させ、沈殿後、上清を捨ててヌメリ成分を除去した。同様の洗浄を 5 回繰り返してぬめりを十分に除去後、30ml の 1M クエン酸ナトリウム水溶液を加え、4°C で 5 日間自己消化させた。自己消化中に数回上清を入れ替え、その都度タッチミキサーで激しく攪拌して、組織からの刺胞の分離を促した。自己消化後、目の細かいふるい (125 μ m) でろ過し、刺胞がはずれた後の組織などを除去した。ろ液を遠心分離 (100 \times g、4°C、10min) し、上清を捨て、組織片や共生藻を取り除いた。得られた沈殿を 50ml の 1M クエン酸ナトリウム水溶液で 3 回洗浄し、刺胞を精製した。得られた刺胞は乳鉢でよくすり潰した後、10 倍量のイオン交換水を加えて遠心分離し (18800 \times g、4°C、15min)、粗抽出液とした。ペプチド毒の単離は先に述べた方法と同様に行った。

結果

ペプチド毒の単離および毒性

粗抽出液を Sephadex G-50 に供したところ、280nm で吸光度を示すピークは 2 つ認められ、サワガニ致死活性はこの 2 つのピークの間 (Fr.32-46) に検出された (Fig. 2-2)。致死活性の認められた画分を集め、逆相 HPLC に供したときの溶出パターンを Fig. 2-3 に示す。得られたピークのうち、保持時間 35min のピークに麻痺活性が、保持時間 44、56min の 2 つのピークに致死活性が検出された。保持時間が早い順にそれぞれのピークに対応する毒成分を gigantoxin I、II、III と命名した。典型的な実験では試料 5g からの収量は gigantoxin I が 5960 μ g、gigantoxin II が 150 μ g、gigantoxin III が 250 μ g であった。各ペプチド毒の致死活性および麻痺活性は Table 2-1 に示した。いずれの毒成分もマウス、キングギョに対しては 1000 μ g/kg の投与量でも特別な症状を引き起こさなかった。サワガニに対する致死活性は gigantoxin II (LD₅₀ 70 μ g/kg) と gigantoxin III (LD₅₀ 120 μ g/kg) では認められたが、gigantoxin I の場合、1000 μ g/kg の投与量でも、サワガニは 5 匹中 1 匹しか死亡しなかったため、LD₅₀ は 1000 μ g/kg 以上と判断された。しかし gigantoxin I はサワガニに対して一過性の強い麻痺を引き起こし、その ED₅₀ は 215 μ g/kg と求められた。なお、対照として用いたヒト EGF は、各種動物に対する致死活性もサワガニに対する麻痺活性も示さなかった。

Gigantoxin I のアミノ酸配列と塩基配列

逆相 HPLC で単離した gigantoxin I をシーケンサーに供して N 末端部分のアミノ酸配列を調べたところ、46 残基目までのアミノ酸配列を次の通り決定することができた。

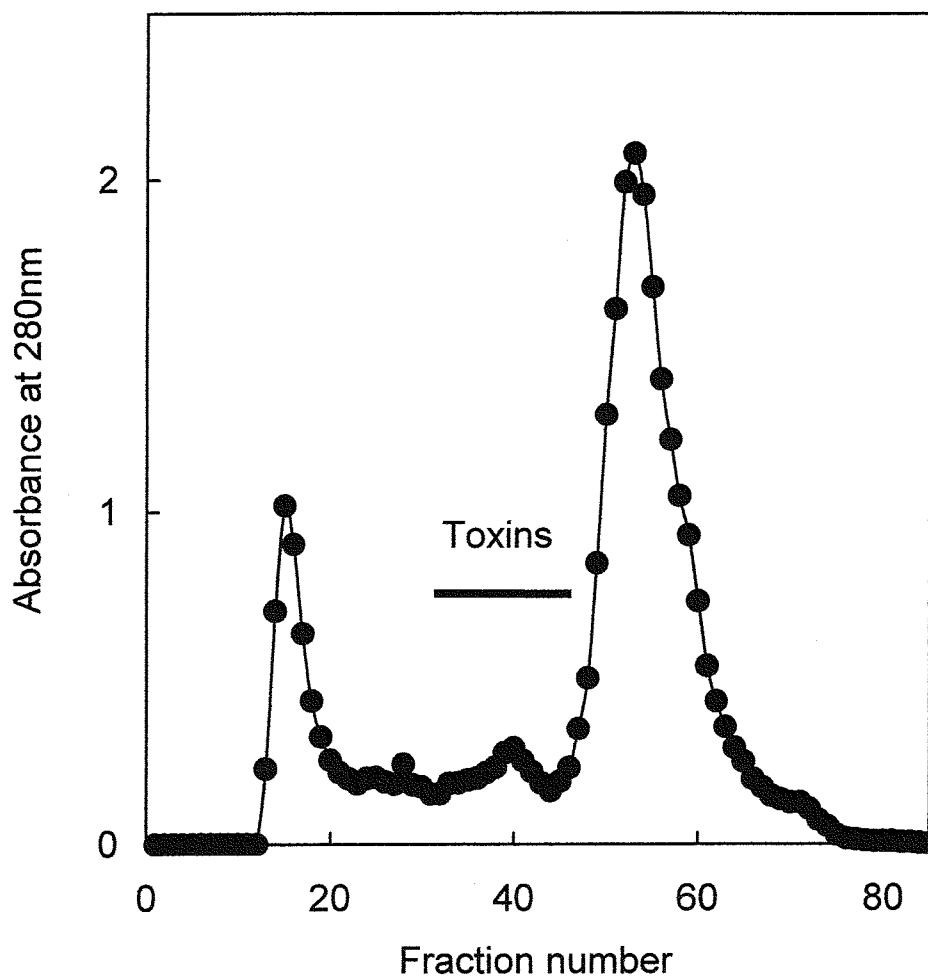


Fig. 2-2. Gel filtration on Sephadex G-50 of the crude extract from *Stichodactyla gigantea*.

The crude extract was applied to a Sephadex G-50 column (2.5×90cm), which was eluted with 0.15M NaCl in 0.01M phosphate buffer (pH 7.0). Fractions of 8ml were collected at a flow rate of 24ml/hr.

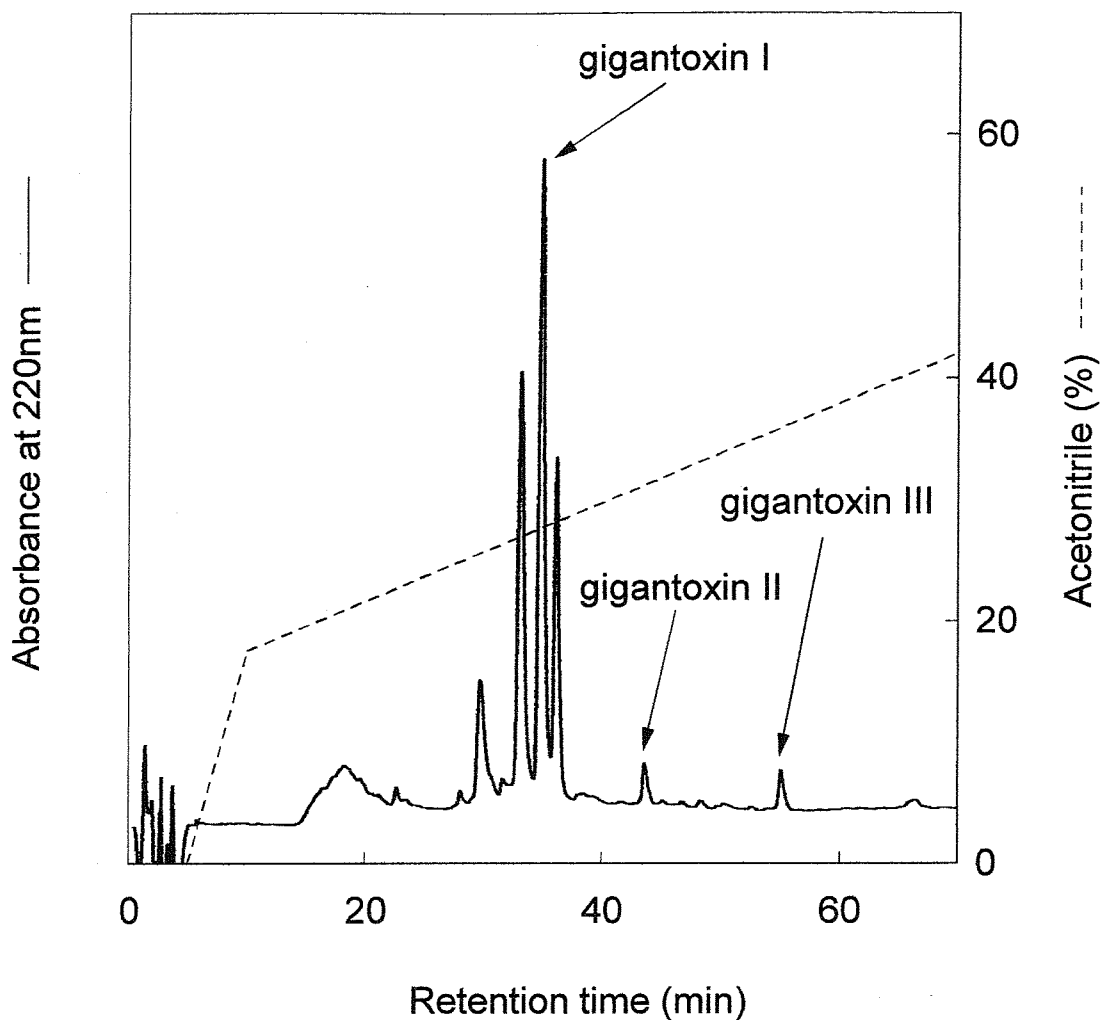


Fig. 2-3. Isolation of *Stichodactyla gigantea* toxins by reverse-phase HPLC.

The toxic fraction obtained by gel filtration on Sephadex G-50 (Fig. 2-2) was subjected to HPLC on a TSKgel ODS-120T column (0.46 X 25cm). The column was eluted with a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA. The flow rate was maintained at 1ml/min.

Table 2-1. Lethal and paralytic activities of gigantoxins I-III and human EGF.

	Lethal activity (LD ₅₀ , µg/kg)			Paralytic activity (ED ₅₀ , µg/kg)	
	Crab	Mouse	Goldfish	Goldfish	Crab
Gigantoxin I	>1000	>1000	>1000	>1000	215
Gigantoxin II	70	>1000	>1000	>1000	
Gigantoxin III	120	>1000	>1000	>1000	
Human EGF	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

1
10
20
30

Gigantoxin I D V G V A C T G Q Y A S S F C L N G G T C R Y I P E L G E Y
 Y C I C P G D Y T G H R C E Q M

次いで、C末端部分のアミノ酸配列を明らかにするために、PE-gigantoxin IのカルボキシペプチダーゼW分解を行った。カルボキシペプチダーゼW分解物のMALDI/TOFMS分析により、C末端からアミノ酸が経時的に遊離することが確認された。分解を開始してから10min後のMALDI/TOFMS分析の結果をFig. 2-4に示すが、C末端から8残基目まで遊離していると判断された。各ペプチドピークの分子量の差から、C末端部分の配列はHRCX₁X₂X₃SX₄ (X₁はE、QまたはK、X₂はQ、M、EまたはK、X₃はMまたはH、X₄はV、TまたはP)と推定された。同じ試料をアミノ酸分析に供したところ、Table 2-2に示すように7種アミノ酸が検出された。遊離した8種アミノ酸のうち、PE-システインはスタンダードを用意できなかったため定量できなかった。検出されたアミノ酸の量から、C末端アミノ酸配列はHRCEQMSVと考えられ、MALDI/TOFMSの結果とも矛盾しなかった。HRCEQMはN末端配列分析で確定した⁴¹H-⁴⁶Mの配列と完全に一致したので、48残基から成るgigantoxin Iの全アミノ酸配列をFig. 2-5のように決定した。この配列をデータベースで検索したところ、哺乳類由来のEGF (epidermal growth factor、上皮増殖因子)と高い相同性を示すという興味深い事実が判明した。Fig. 2-5には、比較のためにヒト (Gregory and Preston、1977)、ブタ (Pascall *et al.*、1991) およびマウス (Savage *et al.*、1972) 由来のEGFの配列を並べて示したが、gigantoxin IはこれらEGFと31-33%の配列相同性を有し、高次構造にとって重要なCysの数と位置は完全に一致した。

Gigantoxin IをコードするcDNAの全塩基配列 (398 bp) は、3'Race法と5'Race法によってFig. 2-6のように決定した。開始メチオニンの手前の5'非翻訳領域には停止コドン (TAA) が、3'非翻訳領域にはポリA付加シグナル (AATAAA) がそれぞれ確認できた。Gigantoxin Iの演繹アミノ酸配列 (86残基) 中には、N末端アミノ酸配列分析とカルボキシペプチダーゼW分解物から決定した配列が含まれていた。Gigantoxin Iのシグナル配列をSignalP V3.0 (Center for Biological Sequence Analysis、Denmark) で解析したところ、開始メチオニン以降23残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には15残基からなるプロパート部が存在していた。

Gigantoxin IIのアミノ酸配列と塩基配列

Gigantoxin IIのN末端アミノ酸配列は、次の通り35残基目まで決定することができた。

1
10
20
30

Gigantoxin II G V P C R C D S D G P H V R G N T L T G T V W V F G C P S G
 W H K C Q

そこでGigantoxin IIのC末端部分のアミノ酸配列を明らかにするために、PE-gigantoxin IIをキモトリプシン分解に供した。キモトリプシン分解物から逆相HPLC (Fig. 2-7) で2つのペプチド断片 (II-C-1とII-C-2) を単離した。ペプチド断片の全アミノ酸配列は、シーケンサーにより

II-C-1 C K Q
 II-C-2 H K C Q K G S S T C

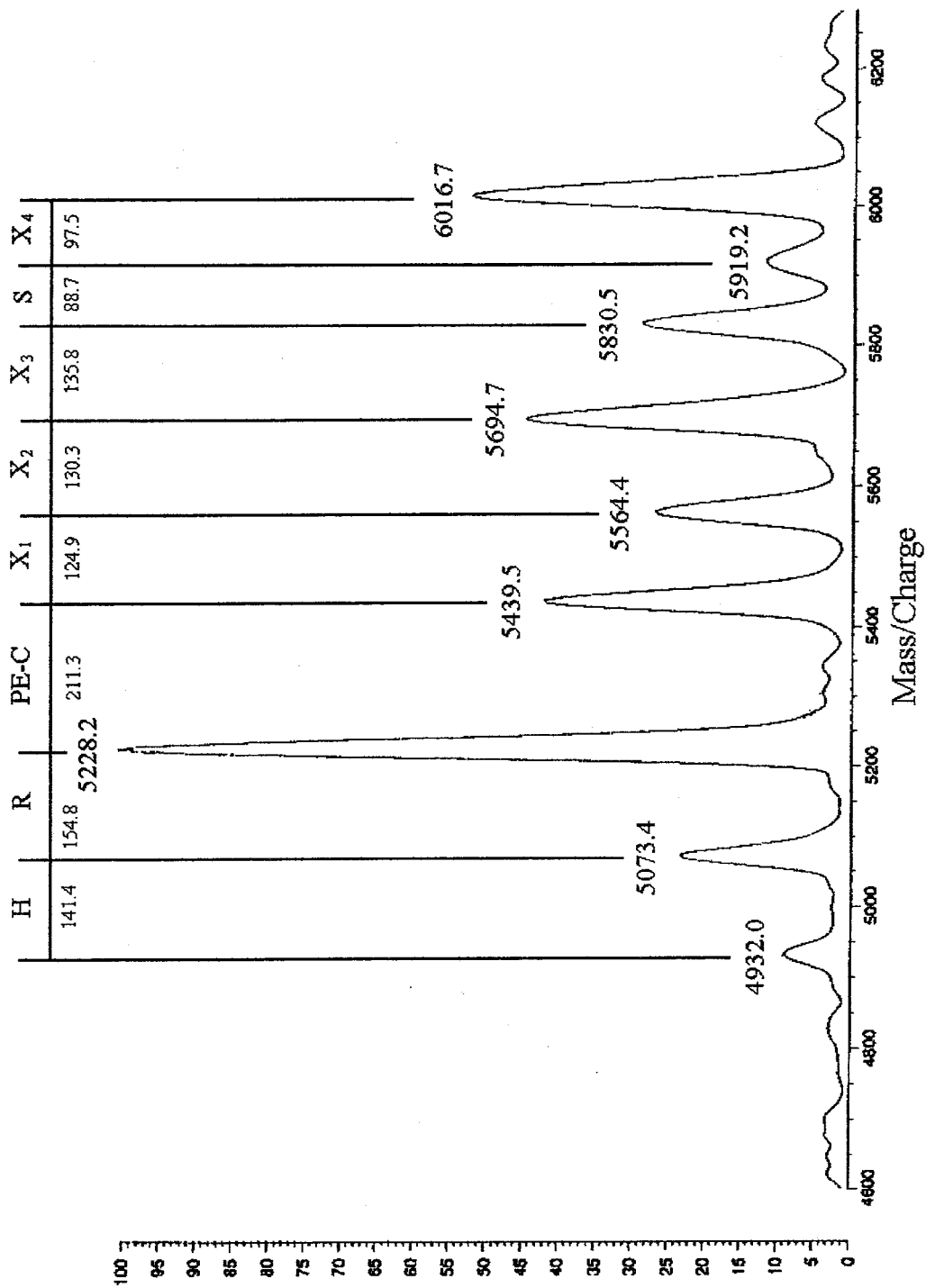


Fig. 2-4. Molecular weight measurement of digested PE-gigantoxin I with Carboxypeptidase W by MALDI/TOFMS.

Table 2-2. Amino acid analysis of digested PE-gigantoxin I with Carboxypeptidase W

Amino acid	Quantity ratio*
Asp(D)	0
Thr(T)	0
Ser(S)	0.85
Glu(E)	0.47
Gln(Q)	0.60
Gly(G)	0
Ala(A)	0
Val(V)	1.00
Cys(C)	0
Met(M)	0.80
Ile(I)	0
Leu(L)	0
Tyr(Y)	0
Phe(F)	0
His(H)	0.09
Lys(K)	0
Arg(R)	0.12

*Quantity of Val was supposed to be 1.00.

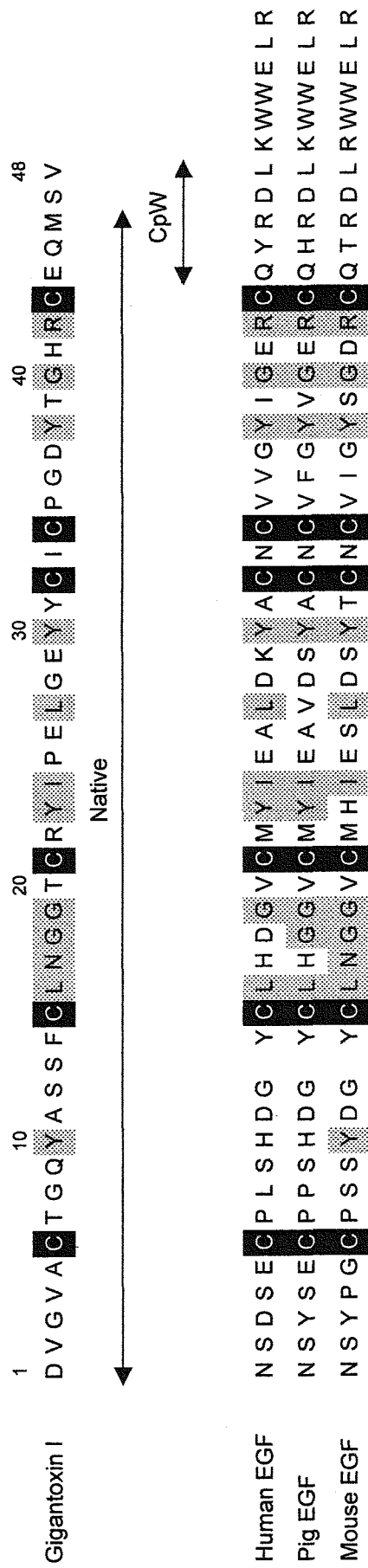


Fig. 2-5. Alignment of the complete amino acid sequence of gigantoxin I with those of mammalian EGFs.

The residues identical with gigantoxin I are shaded. Cysteine residues are shown in white on a black background. Labels above the straight lines with arrows at both ends: Native, N-terminal sequences determined by sequencing of the native peptides; CpW, C-terminal sequences determined by the carboxypeptidase W digestion method.

ATTTTGTGAGAAGCAAATTGACCAGCGAGGACGAATTA	60
AAAAAGATTTCGACGACCAAATG	1
*	
<u>M</u>	
GCTTCTTTCAGAACTTTGTTTGCTTGTGTGGTTATTCTGTGTTGTGTTCTGTGGAGTTTCG	120
<u>A S F R T L F A C V V I L C C V L W S S</u>	21
ATGGCTCGCTATGGTGAAGACATGGAAGTTGAAACAGAAATGAACAAGCGTGATGTAGGC	180
<u>M A R Y G E D M E V E T E M N K R D V G</u>	41
GTAGCTTGTACTGGCCAAATATGCCAGGAGCTTDTGCTTAAATGGGGGGACGTGCAGATAC	240
V A C T G Q Y A S S F C L N G G T C R Y	61
ATCCCAGAACTGGGTGAATATTACTGCATTTGTCCGGGTGATTACACTGGACATAGATGT	300
I P E L G E Y Y C I C P G D Y T G H R C	81
GAGCAAATGTCAGTCTAACCTAAATAAGTCAAGCCCATGCTATAAAGAACATGGATTTCA	360
E Q M S V *	86
<u>AATAAAAGGCTTTTAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>	398

Fig. 2-6. Nucleotide sequence of the cDNA encoding gigantoxin I. The complete gene sequence of gigantoxin I and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisks indicate *in-frame* stop codons (TAA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The propart is doubly underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

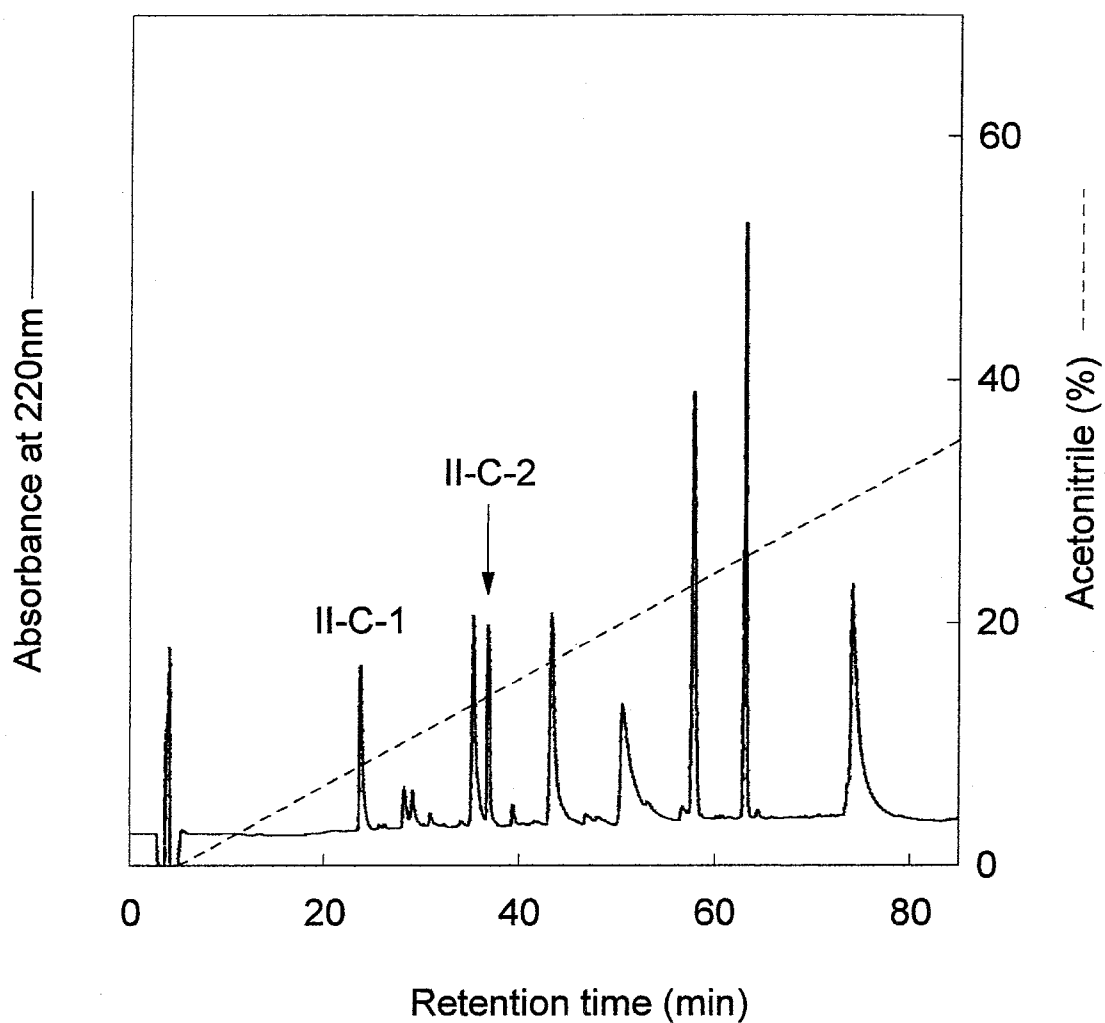


Fig. 2-7. Reverse-phase HPLC of the peptides produced by digestion of PE-gigantoxin II with Chymotrypsin.

Column, TSKgel ODS-120T (0.46 X 25cm); elution, gradient of acetonitrile in 0.1% TFA; flow rate, 1ml/min. Two peptides (II-C-1 and II-C-2) were subjected to sequencing.

と決定された。II-C-2 断片は ^{31}W のカルボキシル側で切断を受けて生じたペプチドで、 ^{32}H から ^{41}C までの断片と判断された。一方、II-C-1 断片には重複する配列がなかったが、暫定的に ^{42}C から ^{44}Q までの C 末端断片と仮定した。こうして 44 残基から成る gigantoxin II の全アミノ酸配列を Fig. 2-8 のように決定した。アミノ酸配列から算出した分子量 (4663.3) は、MALDI/TOFMS 分析で得られた値 (4673.2) とよく一致するので、決定した配列は正しいことが支持された。Gigantoxin II は、既知のイソギンチャク毒と比べてタイプ 1 の Na チャネル毒に属すると判断された。

Gigantoxin II をコードする cDNA の全塩基配列 (432 bp) は、3'Race 法と 5'Race 法によって Fig. 2-9 のように決定した。開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コドン (TAA) が、3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) がそれぞれ確認できた。Gigantoxin II の演繹アミノ酸配列 (74 残基) 中には、N 末端アミノ酸配列分析とキモトリプシン分解によって得られた C 末端部ペプチド断片のアミノ酸配列分析から決定した配列が含まれていた。Gigantoxin II のシグナル配列を SignalP V3.0 で解析したところ、開始メチオニン以降 19 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には 11 残基からなるプロパート部が存在していた。

Gigantoxin III のアミノ酸配列と塩基配列

Gigantoxin III の N 末端部アミノ酸配列は、次の通り 45 残基目まで決定することができた。

```

          1           10           20           30
Gigantoxin III  A A C K C D D D G P D I R S A T L T G T V D L G S C N E G W
                  E K C A S F Y T I L A D C C R
  
```

そこで Gigantoxin III の C 末端部分のアミノ酸配列を明らかにするために、PE-gigantoxin III を V8 プロテアーゼ分解に供した。V8 プロテアーゼ分解物から逆相 HPLC (Fig. 2-10) で単離した III-V8 と命名したペプチド断片の全アミノ酸配列は、シーケンサーにより

```

III-V8-1      G W E K C A S F Y T I L A D C C R R P R
  
```

と決定された。このペプチド断片は ^{32}K 以降のペプチドに相当し、その C 末端が E ではなく R であることから、gigantoxin III の C 末端ペプチドであると判断された。こうして 48 残基から成る gigantoxin III の全アミノ酸配列を Fig. 2-11 のように決定した。アミノ酸配列から算出した分子量 (5179.8) は、MALDI/TOFMS 分析で得られた値 (5180.4) とほぼ一致するので、決定した配列は正しいことが支持された。なお gigantoxin III は、既知のイソギンチャク毒と比べてタイプ 2 の Na チャネル毒に属すると判断された。

Gigantoxin III をコードする cDNA の全塩基配列 (540 bp) は、3'Race 法と 5'Race 法によって Fig. 2-12 のように決定した。開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コドン (TGA) が、3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) がそれぞれ確認できた。Gigantoxin III の演繹アミノ酸配列 (84 残基) 中には、N 末端アミノ酸配列分析と V8 プロテアーゼ分解によって得られた C 末端部ペプチド断片のアミノ酸配列分析から決定した配列が含まれていたが、翻訳領域の C 末端にアミノ酸配列中にはなかった Gly 残基が存在していた。生理活性ペプチドの前駆体構造の解析から、翻訳後修飾の過程でアミド化される残基の C 末端側には常に Gly 残基が存在していることが知られている (水野, 松尾,

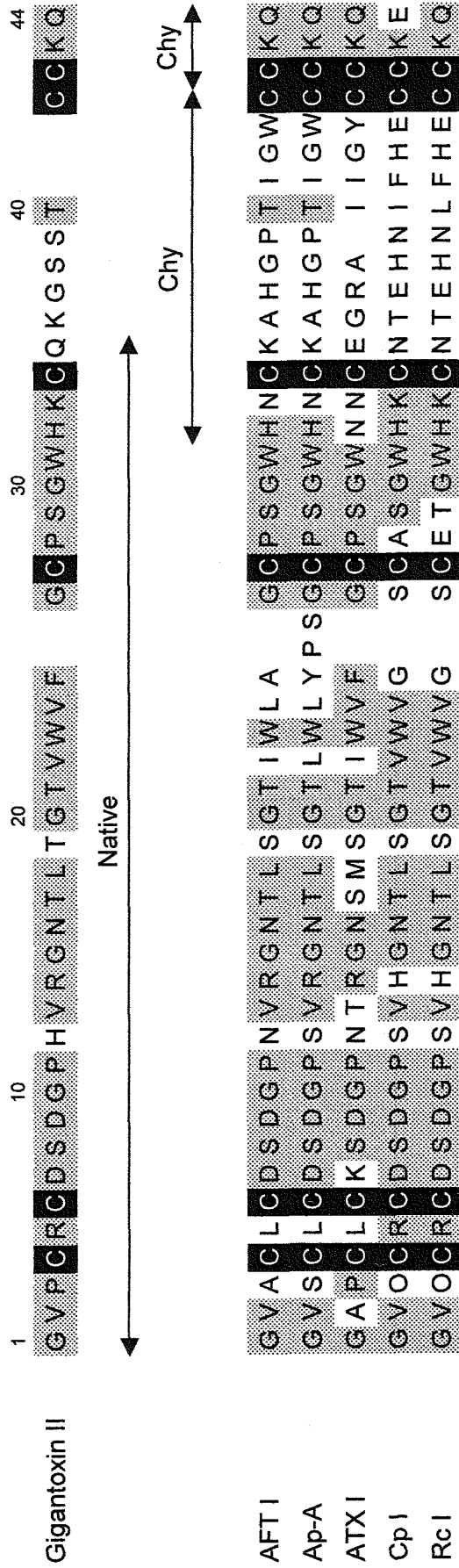


Fig. 2-8. Alignment of the complete amino acid sequence of gigantoxin II with those of type 1 Na channel toxins.

AFT I from *Anthopleura fuscoviridis*; Ap-A from *Anthopleura xanthogrammica*; ATX I from *Anemonia sulcata*; Cp I from *Condylactis passiflora*; Rc I from *Radianthus (Heteractis) crispus*.

The residues identical with gigantoxin II are shaded. Cysteine residues are shown in white on a black background. Labels above the straight lines with arrows at both ends: Native, N-terminal sequences determined by sequencing of the native peptides; Chy, sequences of peptide fragments from the chymotrypsin digest of PE-gigantoxin II.

TTGGTCATTCAACATCAAGCGGTGCACACCAATTAATCATCTTCGAAAACCACGAATCTA	60
*	
CAGAGACTCTTGAAGAAATCCAACATGAATCGCCTGATCATATTGGTTTTTGCAGCAGTA	120
<u> M N R L I I L V F A A V </u>	12
TTCCTCACCCCTGGCTTCAGCAGAAGTATCAGAAGATGTCAACATGGCAAAGAGGGGTGTC	180
<u>F L T L A S A E V S E D V N M A K R G V</u>	32
CCATGTCGGTGTGACAGTGACGGTCCGGCACCTGAGGGGCAATACCTTGACAGGGACAGTC	240
P C R C D S D G P H V R G N T L T G T V	52
<u>TGGGTGTTCCGGCTGCCCATCTGGTTGGCACAAATGCCAAAAGGGTAGT</u> AGCACTTGTTC	300
W V F G C P S G W H K C Q K G S S T C C	72
AAGCAGTGAACCTTCTGAACTGACCATTGTAGTCATATGGCTAGGATTTTCAGGTCACTCGA	360
K Q *	74
TTGTAACGTTAGAATATTGGGTAAACTTATTA <u>AAATA</u> AAAACTGATGAGCATTAAACTGGA	420
AAAAAAAAAAAA	432

Fig. 2-9. Nucleotide sequence of the cDNA encoding gigantoxin II. The complete gene sequence of gigantoxin II and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisks indicate in-frame stop codons (TAA and TGA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The propart is doubly underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

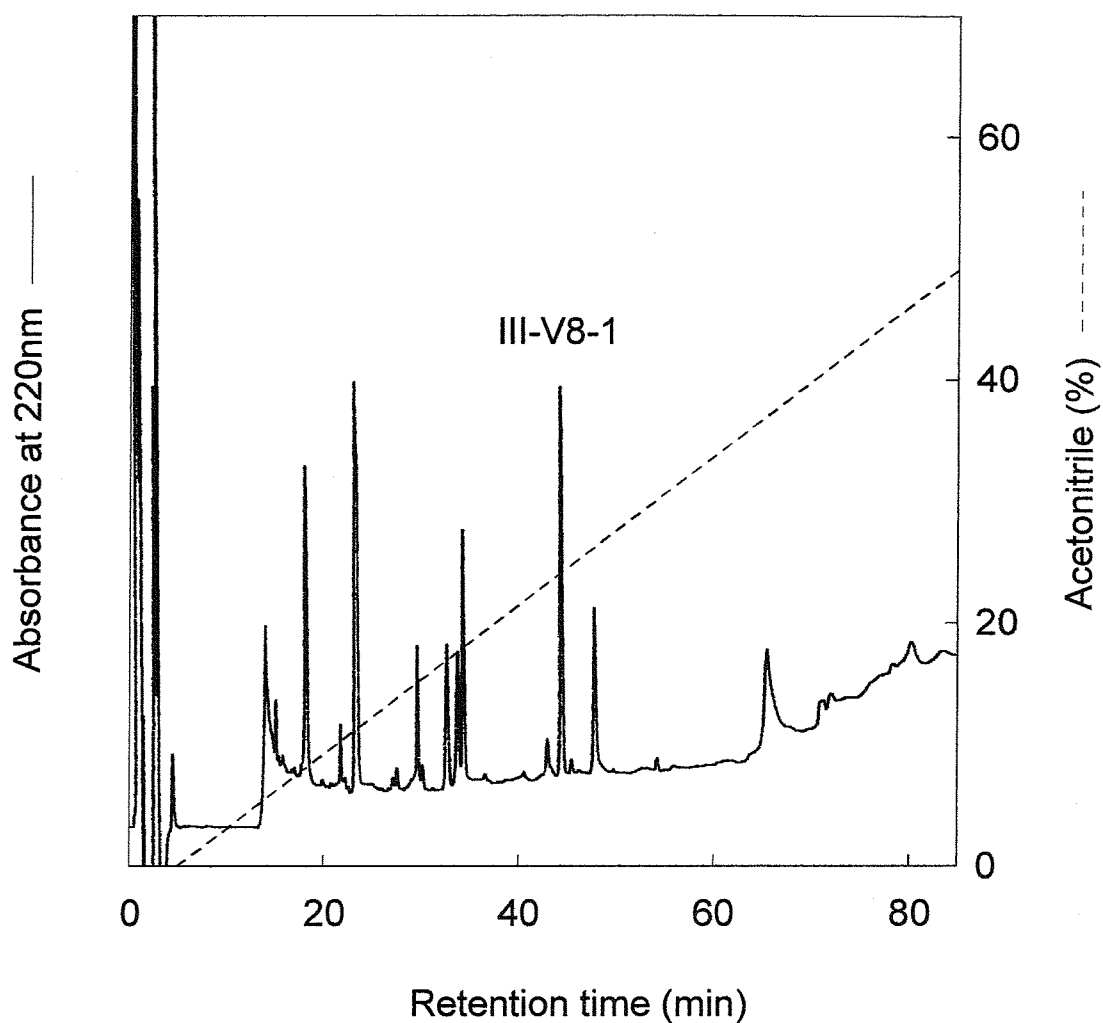


Fig. 2-10. Reverse-phase HPLC of the peptides produced by digestion of PE-gigantoxin III with V8 protease.

Column, TSKgel ODS-120T (0.46 X 25cm); elution, gradient of acetonitrile in 0.1% TFA; flow rate, 1ml/min. One peptide (III-V8-1) was subjected to sequencing.

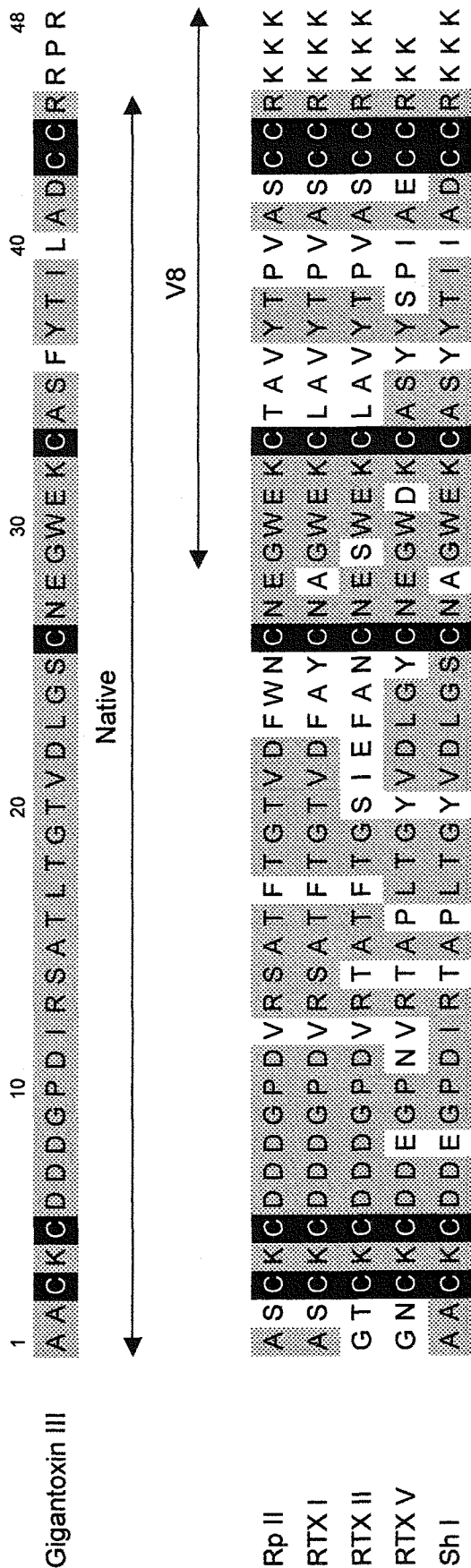


Fig. 2-11. Alignment of the complete amino acid sequence of gigantoxin III with those of type 2 Na channel toxins.

Rp II from *Radianthus (Heteractis) paumotensis*; RTX I and RTX II and RTX V from *Radianthus (Heteractis) macrodactylus*; Sh I from *Stichodactyla helianthus*.

The residues identical with gigantoxin III are shaded. Cysteine residues are shown in white on a black background. Labels above the straight lines with arrows at both ends: Native, N-terminal sequences determined by sequencing of the native peptides; V8, sequences of peptide fragments from the V8 protease digest of PE-gigantoxin III.

ATTATCACTTTGAGTCCTGAGTAGAACTGAACAAGAACAAAGGAGAATAACCAACGCCGG	60
*	
CATAATCCAAGTCAGGGAACGCTCGTTTTTCGCAATGGCATACTAAAGATTGTTCTCGTT	120
<u>M A Y L K I V L V</u>	9
GCTTTGATGTTGGTGGTCGCCGTGTCTGCAATGAGGCTTTCTGATCAAGAAGATCAAGAT	180
<u>A L M L V V A V S A M R L S D Q E D Q D</u>	29
ATCTCTGTTGCTAAGCGCGCCGCGTGTAAAGTGTGATGACGATGGTCCTGACATTCGGCAGT	240
<u>I S V A K R</u> A A C K C D D D G P D I R S	49
GCTACTTTGACGGGCACTGTTGATTTAGGAAGCTGCAACGAGGGATGGGAAAAGTGGCGCA	300
A T L T G T V D L G S C N E G W E K C A	69
TCTTTTTACACAATCCTTTCGGGATTGCTGCAGGAGGCCGAGGGGCTAAATTCCGATGCTG	360
S F Y T I L A D C C R R P R G *	84
AAATTAAGATTCCGATAGGAAAAATGGAACACAAGCTAAGCAATTGATGTAGTTACAAT	420
AAGCATTAAACGGGAGTGTTATTGAACAAGAAAGATCGGGTATAAGACTACCTTAAAGTG	480
CTGAATAAAACAATAGATTAATAAATAAACCAAAATCAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	540

Fig. 2-12. Nucleotide sequence of the cDNA encoding gigantoxin III. The complete gene sequence of gigantoxin III and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisks indicate in-frame stop codons (TGA and TAA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The propart is doubly underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

1988)。このことから gigantoxin III も C 末端アミド化酵素によって、C 末端がアミド化されている可能性が示唆された。Gigantoxin III のシグナル配列を SignalP V3.0 で解析したところ、開始メチオニン以降 19 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には 16 残基からなるプロパート部が存在していた。

Gigantoxin I の EGF 活性

Gigantoxin I のアミノ酸配列は、哺乳類由来の EGF と高い相同性がみられたので、EGF 活性を示すかどうかを検討した。

A431 細胞は通常は多角形であるが (Fig. 2-13A)、Ca²⁺ を含まない培地で EGF とインキュベートすると球形に変化することが知られている。本研究でも、1-10nM のヒト EGF により、ほとんどの細胞が球形に変化させることが確認された (データ示さず)。Gigantoxin I の場合も、ヒト EGF の 100-1000 倍の濃度 (1 μ M) を必要としたが、ヒト EGF 同様にほとんどの A431 細胞を球形に変化させることが確認された (Fig. 2-13B)。

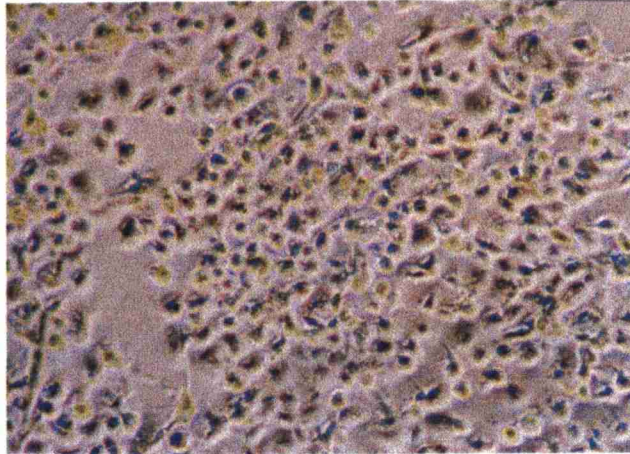
一方、gigantoxin I は、A431 細胞の EGFR のチロシン残基のリン酸化を引き起こすことが判明した。Gigantoxin I とインキュベートした細胞から EGFR を抗 EGFR 抗体を用いて精製してウェスタンブロッティングで分析したところ、EGFR に相当する 170kDa タンパク質は抗リン酸化チロシン抗体と反応することが認められた (Fig. 2-14)。検出されたバンドの発色の程度は、500 または 1000nM の gigantoxin I と 1nM のヒト EGF ではほぼ等しく、EGFR のチロシン残基リン酸化を起こす能力は gigantoxin I はヒト EGF の 1/1000-1/500 と見積もられた。

刺胞からのペプチド毒の単離

イソギンチャクのペプチド毒、溶血毒および刺胞由来のコラーゲンの前駆体には、シグナルペプチドと成熟ペプチドの間に、ズブチリシン様のプロセシング酵素の切断部位となる塩基性アミノ酸対 (Lys-Arg) を末端にもったプロパート部の存在が知られている。Anderluh *et al.* (2000) は MEME ツールを用いて、これらのプロパート部の解析を行い、成熟ペプチドの N 末端側に位置する 9 残基が共通モチーフを形成していることを明らかにした。またプロパート部は毒やコラーゲンを刺胞にソーティングするためのシグナルとして機能していると推定した。このプロパート部の共通モチーフと gigantoxin I-III のプロパート部の比較を行ったところ、いずれも共通モチーフとよく一致し、プロパート部の末端は塩基性アミノ酸対 (Lys-Arg) で終わっていた (Fig. 2-15)。

そこで実際に gigantoxin I-III が刺胞に含まれていることを確認するために、刺胞から調製した粗抽出液と触手から調製した粗抽出液をもとに、ペプチド毒の単離を試みた。逆相 HPLC で単離した gigantoxin I-III の同定は、N 末端部のアミノ酸配列をシーケンサーで確認して行った。その結果、得られた逆相 HPLC の溶出パターンは刺胞からのものと触手からのものとの、ほとんど同じ挙動を示した (Fig. 2-16)。また、いずれも本質的に Fig. 2-3 に示した全抽出物からのものとも同じであった。こうして gigantoxin I-III が刺胞中に存在することが明らかになったが、刺胞から得られたその量は触手から得られた量に比べて明らかに少なかった。例えば逆相 HPLC のピークエリア面積から計算した gigantoxin I の収量は、触手からは 800 μ g/g であるのに対して、刺胞からは 250 μ g/g であった。

(A)



(B)

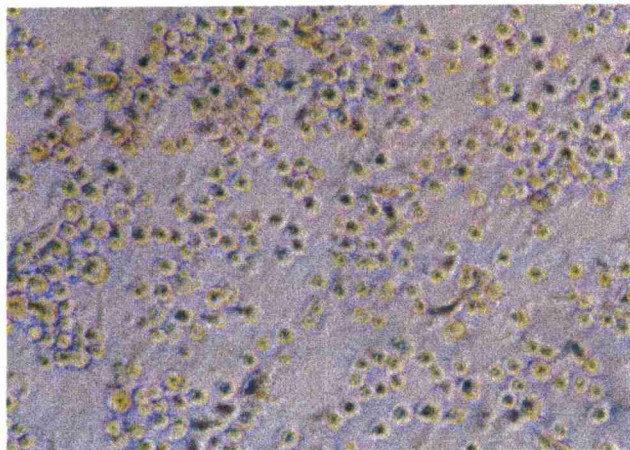
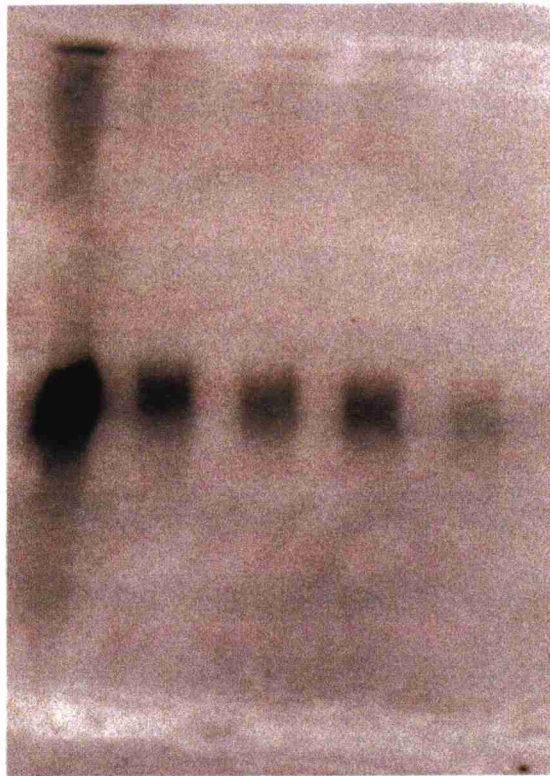


Fig. 2-13. Morphological change of A431 cells by gigantoxin I.

The cells were incubated at 37°C for 30min in PBS without (A) or with gigantoxin I (1μM) (B).



← 170kDa

① ② ③ ④ ⑤

- ① Human EGF (10nM)
- ② Human EGF (1nM)
- ③ Gigantoxin I (1000nM)
- ④ Gigantoxin I (500nM)
- ⑤ Gigantoxin I (100nM)

Fig. 2-14. Tyrosine phosphorylation of the EGFR in A431 cells by human EGF and gigantoxin I.

Gigantoxin I	R Y G E D M E V E T E M N K R	AB110014
Gigantoxin II	E V S E D V N M A K R	AB110012
Gigantoxin III	M R L S D Q E D Q D I S V A K R	AB110015
Equinatoxin II	L P S K K I I D E D E E D E K R	U41661
Equinatoxin IV	L P S K K I I D E D E K D E K R	AF057028
Equinatoxin V	L S S K K S I N E D E K D E K R	U51900
Calitoxin I	R T T L N K R N D I E K R	S69403
Calitoxin II	R T T L N K R I D I E K R	S69399
AeNa	D E D V D I A K R	AF130344
HmK	R M E L Q D V E D M E N G F Q K R	AF020047
	* * * * * * * * *	
Consensus	p p - h - K R	

Fig. 2-15. Alignment of proparts of gigantoxins with those of sea anemone toxins. Equinatoxins (hemolysins) and AeNa (sodium channel toxin) are from *Actinia equina*, calitoxins (sodium channel toxins) from *Calliactis parasitica* and HmK (potassium channel toxin) from *Heteractis magnifica*. The proposed common motif of 9 amino acid residues is indicated by asterisks below the sequence of HmK. In the consensus line, the proposed highly conserved amino acid residues are shown by p (polar residues), - (negatively charged residues), h (hydrophobic residues), K (lysine) and R (arginine). The consensus residues are boxed. GenBank accession numbers are shown on the right.

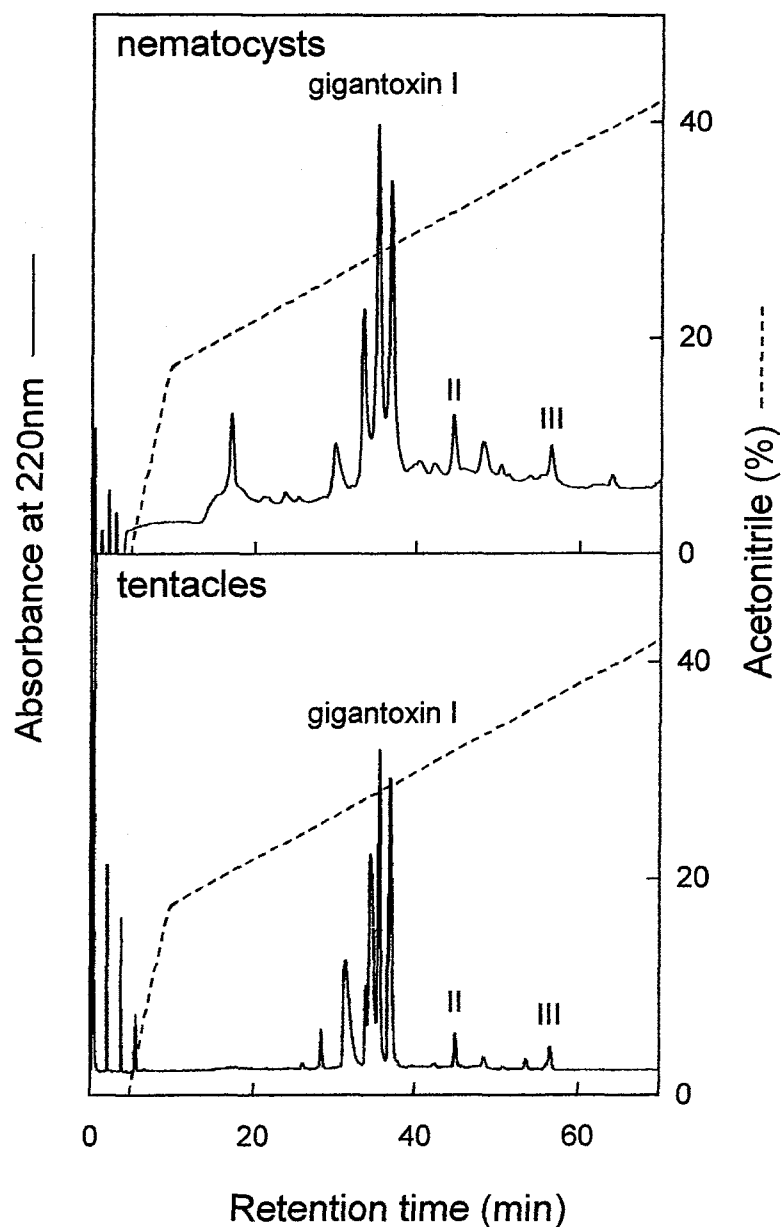


Fig. 2-16. Isolation of gigantoxins from nematocysts (upper) and tentacles (lower) by reverse-phase HPLC. The toxic fraction obtained by gel filtration was subjected to reverse-phase HPLC on a TSKgel ODS-120T column (0.46 x 25 cm). The column was eluted with a linear gradient of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid at a flow rate of 1 ml/min. Gigantoxins I-III appeared in labeled peaks.

考察

ハタゴ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、Sephadex G-50 および逆相 HPLC により 3 成分のペプチド毒 (gigantoxin I-III) を単離し、アミノ酸配列分析によって全一次構造を明らかにすることができた。さらに 3'Race 法と 5'Race 法による cDNA クローニングによってその前駆体構造も解明することができた。Gigantoxin II および III は既知の Na チャネル毒に属するが、gigantoxin I は哺乳類由来の EGF と 31-33% の配列相同性を有するという点できわめて興味深い。本研究では gigantoxin I のジスルフィド結合の様式は検討しなかったが、6 残基の Cys の位置は哺乳類由来の EGF と完全に一致しているので、EGF 同様に 3 つのジスルフィド結合は ${}^6\text{Cys}-{}^{21}\text{Cys}$ 、 ${}^{15}\text{Cys}-{}^{32}\text{Cys}$ および ${}^{34}\text{Cys}-{}^{43}\text{Cys}$ であると推定される。構造の類似性と対応して、gigantoxin I はヒト EGF よりはるかに弱いものの EGF 活性、すなわち A431 細胞の形態変化および EGFR のチロシン残基リン酸化を引き起こした。しかしながら、gigantoxin I はサワガニに対する毒性の点で EGF とは識別される。Gigantoxin I はサワガニに対する致死活性は弱い ($\text{LD}_{50} > 1000\mu\text{g}/\text{kg}$) もの、強い麻痺活性 ($\text{ED}_{50} 215\mu\text{g}/\text{kg}$) を示し、一方でヒト EGF は $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量でもサワガニに特別な症状は引き起こさない。Gigantoxin I は毒性と EGF 活性とをあわせもつペプチドの最初の例である。Gigantoxin I はサワガニに対して麻痺活性を示すことから神経毒と予想されるが、その作用機構は今後の大きな課題である。

Carpenter and Cohen (1990) によれば、EGF および EGF 様分子は、Cys-6 (番号は Fig. 2-4 に示した gigantoxin I の配列に基づく)、Cys-15、Gly-18、Cys-21、Cys-32、Cys-34、Tyr-38、Gly-40、Arg-42、Cys-43 および Leu-48 の 11 残基で保存されている。Leu-48 を除く 10 残基は gigantoxin I においてもよく保存されている。Leu-48 は、EGF の生物活性にとって必須の残基の 1 つであることが以前に報告されている (Engler *et al.*, 1988; Ray *et al.*, 1988) ので、gigantoxin I の EGF 活性 (A431 細胞の形態変化および EGFR のチロシン残基リン酸化) がヒト EGF よりはるかに弱いのは Leu-48 を欠いていることで説明できると思われる。EGF に比べると、gigantoxin I の C 末端領域は Leu-48 を欠くのみならず著しい変異を示すことも興味深い。Gigantoxin I の C 末端領域の変異は EGF 活性を著しく低下させるが、ヒト EGF と違ってサワガニに対する毒性を示すためには重要であるのかも知れない。

このように一次構造の点では高い相同性を示した gigantoxin I と哺乳類由来の EGF であったが、その前駆体構造は大きく異なっていた。すなわち、gigantoxin I の前駆体構造は哺乳類由来の EGF のそれと比べて、非常に単純な構造をしていた。哺乳類の EGF 前駆体は約 1200 残基からなり、7-8 個の EGF 様ドメインの繰り返しを有したまま細胞膜表面に発現し、C 末端側の EGF 様ドメインが酵素によって切り出され、分泌型の EGF となることが知られている (Scott *et al.*, 1983; Bell *et al.*, 1986; Saggi *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2001)。一方、本研究で明らかになった gigantoxin I 前駆体は 86 残基で、EGF 様ドメインの繰り返しはなく、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから構成されていた。Gigantoxin I の前駆体がプロパート部をもつことは、ハタゴイソギンチャクが gigantoxin I を作り出す目的を考える上での大きな手がかりとなる。なぜならば、プロパート部はイソ

ギンチャク毒や刺胞由来のコラーゲンの前駆体中に存在し、毒やコラーゲンを刺胞にソーティングするためのシグナルとして機能していると考えられているからである。またプロパート部は、後述する典型的なタイプ1と2のNaチャンネル毒である gigantoxin II と III の前駆体でも確認された。実際に、刺胞から調製した粗抽出液をもとに gigantoxin I-III を単離することができ、これらのペプチド毒が刺胞に存在することが証明された。Gigantoxin I は致死活性は弱い、含量が非常に高いことおよびサワガニに対して強い麻痺活性を示すことから、捕食の際の餌動物の麻痺にとって強力な武器となっていることが示唆される。Gigantoxin I が刺胞に存在していたことから、ハタゴイソギンチャクにとって gigantoxin I は哺乳類の EGF のような調節分子としてではなく、捕食のための毒として機能していることが明らかになった。しかしながら、gigantoxin I-III の収量は刺胞よりも触手の方がより多かった。事実、イソギンチャクの毒が実際にどこで作られているのかといった基本的な問題は、未だ解明されていない。EGF 様ペプチド毒 (gigantoxin I) も含めたイソギンチャクのペプチド毒や溶血毒を作り出している器官の特定が望まれる。

ハタゴイソギンチャクに EGF 様ペプチド毒 (gigantoxin I) が発見されたことは、EGF の分子進化の観点からも非常に興味深い。これまでに EGF に関する研究は多いが、カイメン、サンゴ、イソギンチャクのように動物界の系統樹の根に最も近い動物における EGF については知見が得られていない。本研究では gigantoxin I は構造および活性の点で EGF ファミリーに属することが証明され、その前駆体構造と刺胞内の存在から毒として機能していることが分かった。これらの結果から、動物界における EGF の分子進化について二通りの推測ができる。一つ目は、EGF の祖先分子は gigantoxin I のように本来は毒として機能し、分子進化の過程でより複雑な構造の前駆体になりつつ、毒としての機能を失っていったというものである。二つ目は、EGF の祖先分子は元より EGF として機能し、その前駆体構造も今日の哺乳類のものと同じであったが、gigantoxin I のように一部は毒として独自の進化をしていったというものである。この魅力的な推測のどちらが正しいのかを確認するためには、系統発生学的により多くの生物からの EGF 様分子に関する研究が必要である。

Gigantoxin II および III は既知のイソギンチャクの Na チャンネル毒であったが、前者はタイプ1、後者はタイプ2であることは注目される。Na チャンネル毒のタイプとイソギンチャクの分類学上の位置とには相関があり、Norton (1991) によれば、タイプ1の毒はウメボシイソギンチャク科の *Anthopleura* 属と *Anemonia* 属に、タイプ2の毒はハタゴイソギンチャク科の *Radianthus* 属 (= *Heteractis* 属) と *Stichodactyla* 属に含まれるとされている。これまでのところシライトイソギンチャク *Radianthus crispus* から単離されている RcI はタイプ1の毒であるというのが唯一の例外である。その意味からも、*Stichodactyla* 属のハタゴイソギンチャクにタイプ1と2の両方の毒が見いだされたことは興味深い。Na チャンネル毒のタイプとイソギンチャクの分類学上の位置との相関に関しては、今後の検討がさらに必要であろう。

また gigantoxin II と III の前駆体構造では、タイプ1の Na チャンネル毒である gigantoxin II の翻訳領域の C 末端には、その一次構造にはない余分なアミノ酸残基の付加はなかったのに対して、タイプ2の Na チャンネル毒である gigantoxin III では Gly 残基の付加が認められた。生理活性ペプチドは C 末端がアミド化されているものが多く、アミド化の有無は活

性に大きな影響を及ぼす。これまでの生理活性ペプチドの前駆体構造の解析から、翻訳後修飾の過程でアミド化される残基のC末端側には常にGly残基が存在することが知られている(水野, 松尾, 1988)。このことから考えて、gigantoxin IIIはC末端アミド化酵素によって、C末端がアミド化されているものと思われる。実際に、第3章で述べるイボハタゴイソギンチャクのタイプ2のNaチャンネル毒SHTX IVの前駆体にも同様にC末端にGly残基の付加が認められたのに対して、第6章で述べるミナミウメボシイソギンチャクのタイプ1のNaチャンネル毒AETX IにはGly残基の付加がなかった。これまでにイソギンチャクの毒では、*Bunodosoma granulifera*のKチャンネル毒BgKで、その合成ペプチドを用いたキャピラリー電気泳動とESIMSによる測定でC末端がフリーであることが報告されている(Forest et al., 1996)。タイプ1とタイプ2のNaチャンネル毒は一次構造の点では非常に高い相同性があるが、C末端のアミド化の点で違いがあるとしたら、とても興味深い。

最後に、gigantoxin Iは毒性とEGF活性を合わせ持つEGF様ペプチド毒の最初の例であるということを再度強調しておきたい。またgigantoxin IのようなEGF様ペプチド毒がハタゴイソギンチャクのみが存在しているとは考えにくく、他のイソギンチャクにも分布していると思われる。本研究では、サワガニに対する致死作用だけでなく麻痺作用も注意深く観察することによってEGF様ペプチド毒を発見することができた。従ってイソギンチャクにおけるEGF様ペプチド毒の今後の検索においては、gigantoxin Iでみられるように麻痺活性はあるが致死活性はないかも知れないということを念頭において進めていく必要がある。

第3章 イボハタゴイソギンチャクのペプチド毒の単離と cDNA クローニング

イボハタゴイソギンチャク *Stichodactyla haddoni* (Fig. 3-1) はイマイソギンチャク亜目 (Nynantheae) ハタゴイソギンチャク科 (Stichodactylidae) に属し、紀伊半島から広くインド洋～西太平洋の水深 5～10m の岩礁あるいはサンゴ礁に生息する。直径 50cm を超える大型種で、クマノミ、トウアカクマノミが共生する。口盤を覆い尽くす触手は約 5mm と短く、先端が多少とも球状に太くなるため、見た目には、口盤上面がイボ状の触手で覆われた感がある。イボハタゴイソギンチャクの触手は非常に粘着力が強く、手で触るとくっつき、無理にはがすとたくさんの触手がちぎれて手に付着し、刺されると非常に痛い。

第 2 章でハタゴイソギンチャク *Stichodactyla gigantea* から、サワガニに対する致死・麻痺活性を指標として 3 成分のペプチド毒を単離し、そのうち *gigantoxin I* はイソギンチャクの毒としては新規成分で、哺乳類由来の EGF (上皮増殖因子) と高い相同性を有することが判明した。EGF 様ペプチド毒は他のイソギンチャクにも存在する可能性が十分考えられる。そこで本章では、ハタゴイソギンチャクの近縁種であるイボハタゴイソギンチャクに着目し、ペプチド毒を単離し、その生物活性の解明と cDNA クローニングを試みた。

実験方法

試料

ペプチド毒の単離には、1999 年 4 月に伊豆中央水産 (静岡県) から購入したイボハタゴイソギンチャク (47g、沖縄産) を試料とした。実験に使用するまで -20°C で冷凍保存した。RNA の抽出には、2003 年 5 月に観賞魚店 (神奈川県) から購入したイボハタゴイソギンチャク (外国産) を試料とした。生きたまま賽の目状に切り取り、液体窒素で凍結後、実験に使用するまで -80°C で冷凍保存した。

粗抽出液の調製方法

凍結試料をホモジナイズし、得られたホモジネートから 5 g を秤り取り、イオン交換水 25ml 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°C, 15min) し、得られた上清を粗抽出液とした。

ペプチド毒の単離方法

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 Sephadex G-50 カラム (2.5 × 90cm; Amersham Bioscience) に供した。同緩衝液を用いて流速 36ml/hr で溶出し、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、孔径 0.45μm のメンブレンフィルター (DISMIC-25cs; 東洋濾紙) でろ過後、TSKgel ODS-120T カラム (0.46 × 25cm; 東ソー) 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 (最初の 5min は 0-14%、その後 80min は 14-42%) により流速 1ml/min で毒成分を溶出した。ペプチドは UV 検出器を用いて

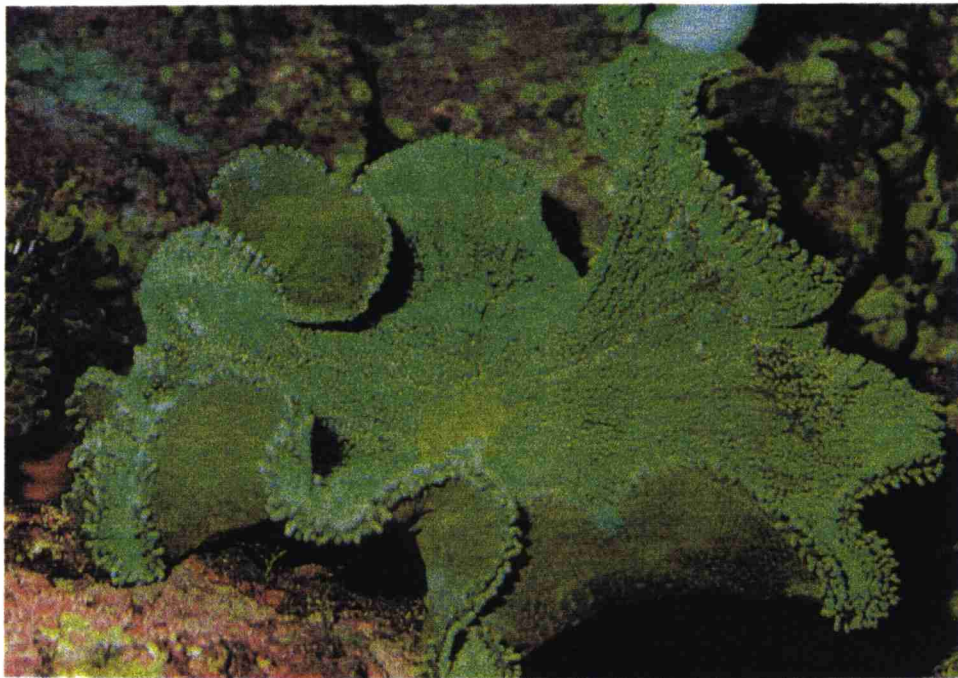


Fig. 3-1. イボハタゴイソギンチャク *Stichodactyla haddoni*

(日本海岸動物図鑑 [1]、1992 より)

220nm の吸光度で検出した。4 成分のペプチド毒 (SHTX I-IV) に対応する溶出液を集めて凍結乾燥し、必要な溶媒に溶解してその後の実験に用いた。

毒性の測定方法

サワガニに対する毒性試験および LD₅₀ (致死活性) または ED₅₀ (麻痺活性) の算出は第 2 章で述べた方法に従って行った。

ペプチド毒の分析方法

第 2 章で述べたように、タンパク質の定量は Lowry *et al.* (1951) の方法で、分子量の測定はレーザーイオン化-飛行時間型質量分析法 (MALDI/TOFMS 法) で、アミノ酸配列分析はエドマン分解法に基づいた気相式シーケンサーを用いて行った。

トリプシンによる酵素分解

トリプシン (EC 3.4.21.4) は Arg 残基と Lys 残基のカルボキシル側のペプチド結合を特異的に切断する酵素である。SHTX I (40 μ g) を凍結乾燥後、50mM 炭酸水素アンモニウム溶液 300 μ l に溶解し、10 μ g のトリプシン (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 24hr 分解した。生成したペプチド断片は、TSKgel ODS-120T を用いる逆相 HPLC により単離した (0.1%TFA 中のアセトニトリルの濃度勾配は Fig. 3-6 を参照)。

cDNA クローニング法

凍結試料約 1g から TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。3'RACE は、3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends キット (Invitrogen) を用いて total RNA (5 μ g) から合成した 1st strand cDNA に対して、SHTX I-IV のアミノ酸配列をもとに設計した degenerate プライマー (SHTX I と II では 5'-GGI GCI CCI TGY MGI MGI TGY TAY C-3' と 5'-GIT GYT AYC AYW SIG AYG GIA ARG G-3'、SHTX III では 5'-CIG ARG ARA TGC CIG CIY TIT GYC-3' と 5'-GAY GTI CCI AAR TGY MGI GGI TAY TT-3'、SHTX IV では 5'-CIG CIT GYA ART GYG AYG AYG AYG-3' と 5'-GGI CCI GAY ATH MGI WSI GCI ACI YT-3') で行った。PCR 増幅は Ex Taq ポリメラーゼ (Takara) を用いて、条件は 94 $^{\circ}$ C5min; 94 $^{\circ}$ C30sec、55 $^{\circ}$ C30sec、72 $^{\circ}$ C1min を 35 サイクル; 72 $^{\circ}$ C5min とした。

5'RACE では、5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) キットと gene-specific プライマー (SHTX I と II では 5'-TAC TTC TTG ACC GCA GCC G-3'、SHTX III では 5'-GTT TCC TCC ACA TCC TCC G-3'、SHTX IV では 5'-TCC CTC GTT GCA GTT CCA G-3') を用いて total RNA (5 μ g) から 1st strand cDNA を合成した。この 1st strand cDNA に対して、gene-specific プライマー (SHTX I と II では 5'-GTC AGG CAC ACA GCC ACC-3' と 5'-TTT CCC GTC CGA GTG ATA AC-3'、SHTX III では 5'-CTC CGT AGA TAA ACT GCT CAC-3' と 5'-GTA ATA CCT TGG GAA GTA CCC-3'、SHTX IV では 5'-AGT AGC ACT GCG AAT GTC AG-3' と 5'-GTC ATC ATC GCA CTT ACA CG-3') を用いる PCR に供した。PCR は 3'RACE の場合と同じ条件で行った。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 Cy5 ThermoSequenase Dye Terminator Kit (Amersham

Bioscience) に従って反応させ、Long-Read Tower DNA シークエンサー (Amersham Bioscience) により解析した。最後に、3'RACE と 5'RACE で決定した塩基配列をもとに設計した 5'末端側と 3'末端側プライマー (SHTX I と II では 5'-GTG TAG GGA GTG CTT TAC CA-3' と 5'-CAT AGG CTT TTA TTG TTT ATC CT-3', SHTX III では 5'-CTT CAA AAC AGA CTC CCA AGA-3' と 5'-CAT TCC ATA ACT GCT TTT ATT TAT-3', SHTX IV では 5'-AAC TTA TGC TTG ATA AGA CAG TG-3' と 5'-GTA GTC TTA TAC CCG ATC TTT C-3') で RT-PCR を行い、全塩基配列を確認した。

α -dendrotoxin の ^{125}I 標識

ポリスチレンチューブに Iodine-125 (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) を 18.5MBq (3.7GBq/ml) 入れ、50 μl の 0.25M PBS (pH 7.5) を加えた。次に α -dendrotoxin (RBI, Natick, MA, USA) 0.5 μg (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と 0.05M PBS に溶解したクロロミン-T 10 μl (0.5mg/ml) を加え、30 秒間混合した。さらに 0.05M PBS に溶解したシステイン 100 μl (0.17mg/ml) を加え、0.5%BSA を含む 0.05M PBS に溶解した NaI (2mg/ml) で全量を 1ml にした。その後、0.5%BSA を含む 0.25M PBS (pH 7.5) で平衡化した Sephadex G-10 カラム (1.2 \times 2.5cm; Amersham Bioscience) に供した。同緩衝液で溶出し、溶出液は 0.2ml ずつ分取した。各フラクションに含まれるラジオアイソトープ量をガンマカウンター (COBRA II AUTO-GAMMA D5002; Packard, Meriden, CT, USA) で測定し、 ^{125}I で標識された α -dendrotoxin と未反応の Iodine-125 を分離精製した。

K チャネル毒性の測定方法

試料の K チャネル毒性は、Harvey *et al.* (1989) の方法に準じて、既知の K チャネル毒がラットシナプトソーム膜に結合するのを競合的に阻害するかどうかを調べることにより評価した。本研究では既知の K チャネル毒として *Dendroaspis* 属のヘビ、グリーンマンバ (*Dendroaspis angusticeps*) 由来の α -dendrotoxin を用い、次のように行った。

ラットの脳 (フナコシ、東京) 1 個 (約 2g) に 10ml の 320mM スクロースを含む 2mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えてテフロン製ホモジナイザー (LH22 型; ヤマト科学、東京) でホモジナイズし、遠心分離 (900 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10min) した。得られた上清をさらに高速遠心分離 (15000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12min) し、沈殿に 10ml の 5mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.1) を加えて 4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間攪拌した。最後に超遠心分離 (48000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 20min) により沈殿として得られたシナプトソームを、0.4mg タンパク質/ml となるようにシナプトソームバッファー (130mM NaCl, 3mM KCl, 2mM CaCl_2 , 2mM MgCl_2 を含む 20mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.4) に懸濁した。ラットシナプトソーム懸濁液 200 μl と試料 40 μl に Na^{125}I で標識した 337pM ^{125}I - α -dendrotoxin (66.6TBq/mmol) 10 μl を混合し、室温で 30min インキュベートした。遠心分離 (900 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5min) で集めた沈殿は、1mg/ml の BSA を含むシナプトソームバッファー 1ml で 3 回洗浄後、沈殿のラジオアイソトープ量をガンマカウンターで測定した。 ^{125}I - α -dendrotoxin のシナプトソーム膜への最高結合量は、試料のかわりにイオン交換水を用いて求めた。また、 ^{125}I - α -dendrotoxin のシナプトソーム膜への非特異的結合を知るために、試料のかわりに高濃度 (450nM) の標識していない α -dendrotoxin を用いて同様に実験を行い、得られたカウント数を各データから差し引い

た。本実験では非特異的結合は最高結合量の約 7%であった。なお、試料を希釈して種々の濃度で実験を行い、結合阻害曲線を作成して IC₅₀ (50%阻害濃度) を求めた。比較のために α -dendrotoxin とウシ腓膵由来の Kunitz 型プロテアーゼインヒビターである BPTI (Sigma) についても IC₅₀ を算出した。

結果

ペプチド毒の単離および毒性

粗抽出液を Sephadex G-50 に供したところ、280nm で吸光度を示すピークは 3 つ認められ、サワガニ致死活性は最初の 2 つのピークの間 (Fr.42-58) に検出された (Fig. 3-2)。致死活性の認められた画分を集め、逆相 HPLC に供したときの溶出パターンを Fig. 3-3 に示す。得られたピークのうち、保持時間 67min のピークに致死活性が認められ、保持時間 42、43、54min の 3 つのピークに麻痺活性が認められた。保持時間が早い順にそれぞれのピークに対応する毒成分を SHTX I、II、III、IV と命名した。試料 5g からの各毒成分の収量とサワガニに対する LD₅₀ および ED₅₀ を測定した結果を Table 3-1 に示した。サワガニに対する致死活性は SHTX IV (LD₅₀ 93 μ g/kg) のみに認められた。その他の毒成分は 1000 μ g/kg の投与量でもサワガニは死亡しなかったが、麻痺活性は認められ、ED₅₀ は SHTX I および II がともに 430 μ g/kg、SHTX III が 183 μ g/kg であった。

SHTX I と II の部分アミノ酸配列と塩基配列

単離した SHTX I と SHTX II をプロテインシークエンサーに供して N 末端部分のアミノ酸配列を調べたところ、28 残基からなる全アミノ酸配列を決定することができたが、N 末端のアミノ酸残基は修飾されていたため、同定することができなかった (Fig. 3-4)。両成分とも、イソギンチャクはもとより他の生物由来のペプチド毒ともまったく相同性がない新規ペプチド毒で、両成分の配列の違いは 6 残基目 (SHTX I は Hyp、SHTX II は Pro) のみであった。そこで修飾されていた N 末端のアミノ酸残基を明らかにするために cDNA クローニングを行った。なお、Hyp は Pro の翻訳後修飾によって形成されることから、SHTX I と II は区別せずに cDNA クローニングを行った。

SHTX I と SHTX II をコードする cDNA の全塩基配列 (496 bp) は、3'RACE 法と 5'RACE 法によって Fig. 3-5 のように決定した。開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コドン (TGA) が、3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) とポリ A 鎖がそれぞれ確認できた。SHTX I と II の前駆体は 70 残基からなっていた。SignalP V3.0 (Center for Biological Sequence Analysis, Denmark) で解析したところ、開始メチオニン以降 22 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には、13 残基からなるプロパート部とそれに続いて 4 残基 (EPKP) からなる配列が認められた。また、修飾された N 末端のアミノ酸残基は Thr であることが分かった。一方、SHTX I と II の成熟ペプチドの演繹アミノ酸配列には、プロテインシークエンサーで決定した部分アミノ酸配列と比べて 4 残基の変異があった。すなわち、部分アミノ酸配列の 21 残基目の Arg が演繹アミノ酸配列では Pro に、23 残基目の Trp が演繹アミノ酸配列では Phe に、24 残基目の Ser が演繹アミノ酸配列では Gly に、28 残基目の Gln が演繹アミノ酸配

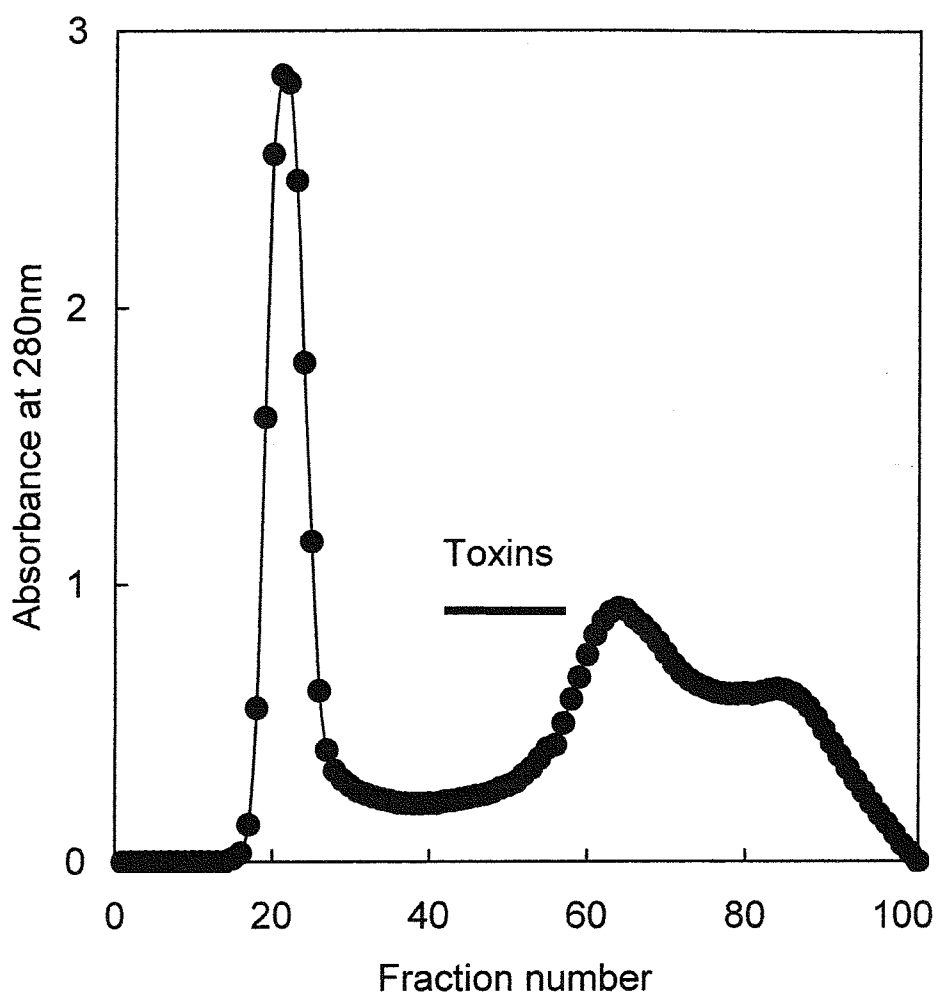


Fig. 3-2. Gel filtration on Sephadex G-50 of the crude extract from *Stichodactyla haddoni*.

The crude extract was applied to a Sephadex G-50 column (2.5×90cm), which was eluted with 0.15M NaCl in 0.01M phosphate buffer (pH 7.0). Fractions of 8ml were collected at a flow rate of 36ml/hr.

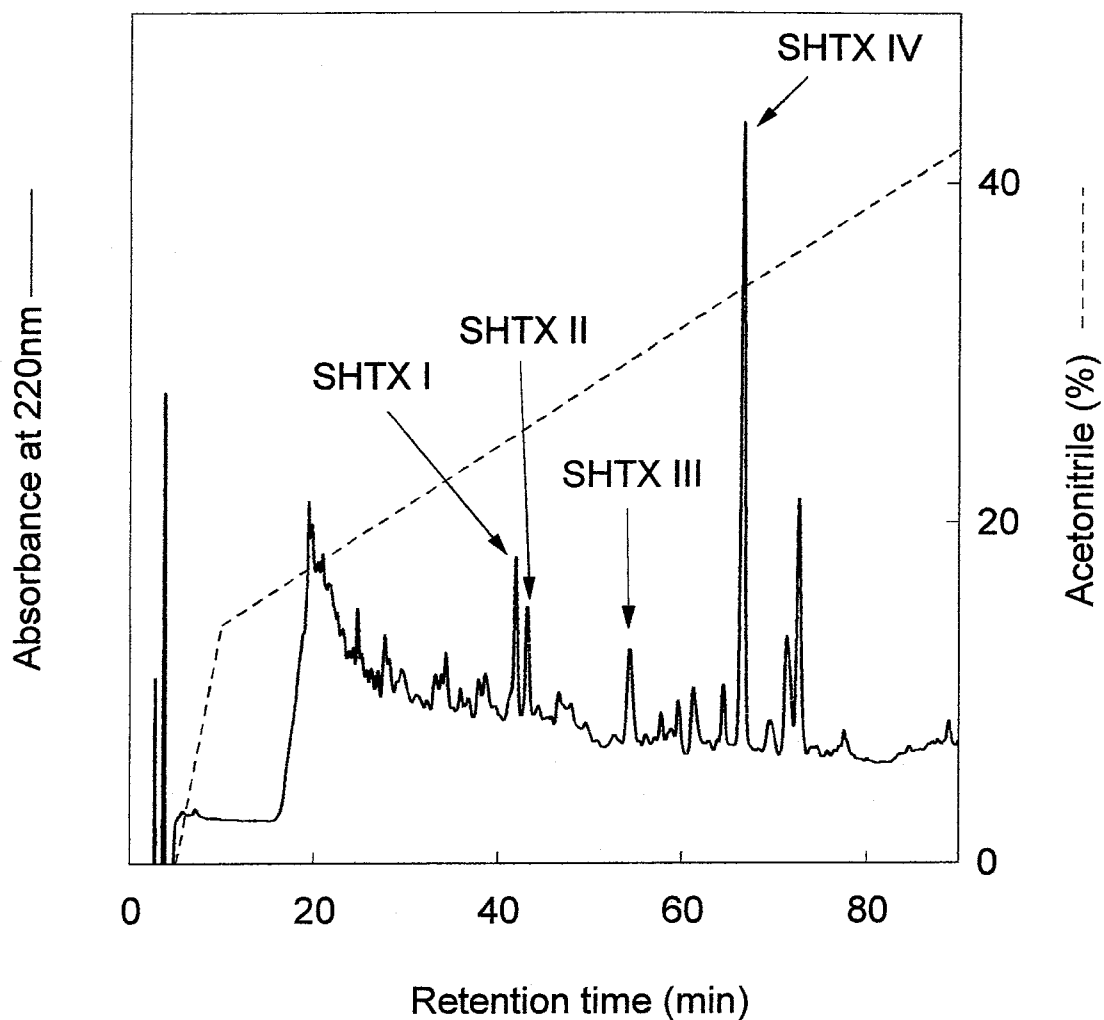


Fig. 3-3. Isolation of *Stichodactyla haddoni* toxins by reverse-phase HPLC.

The toxic fraction obtained by gel filtration on Sephadex G-50 (Fig. 3-2) was subjected to HPLC on a TSKgel ODS-120T column (0.46 X 25cm). The column was eluted with a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA. The flow rate was maintained at 1ml/min.

Table 3-1. Summary of toxin isolation

	Yield* (µg)	Lethal activity(LD ₅₀) (µg/kg)	Paralytic activity(ED ₅₀) (µg/kg)
SHTX I	144	>1000	430
SHTX II	104	>1000	430
SHTX III	200	>1000	183
SHTX IV	320	93	

* Isolation of the toxins was performed using 5g of sample.

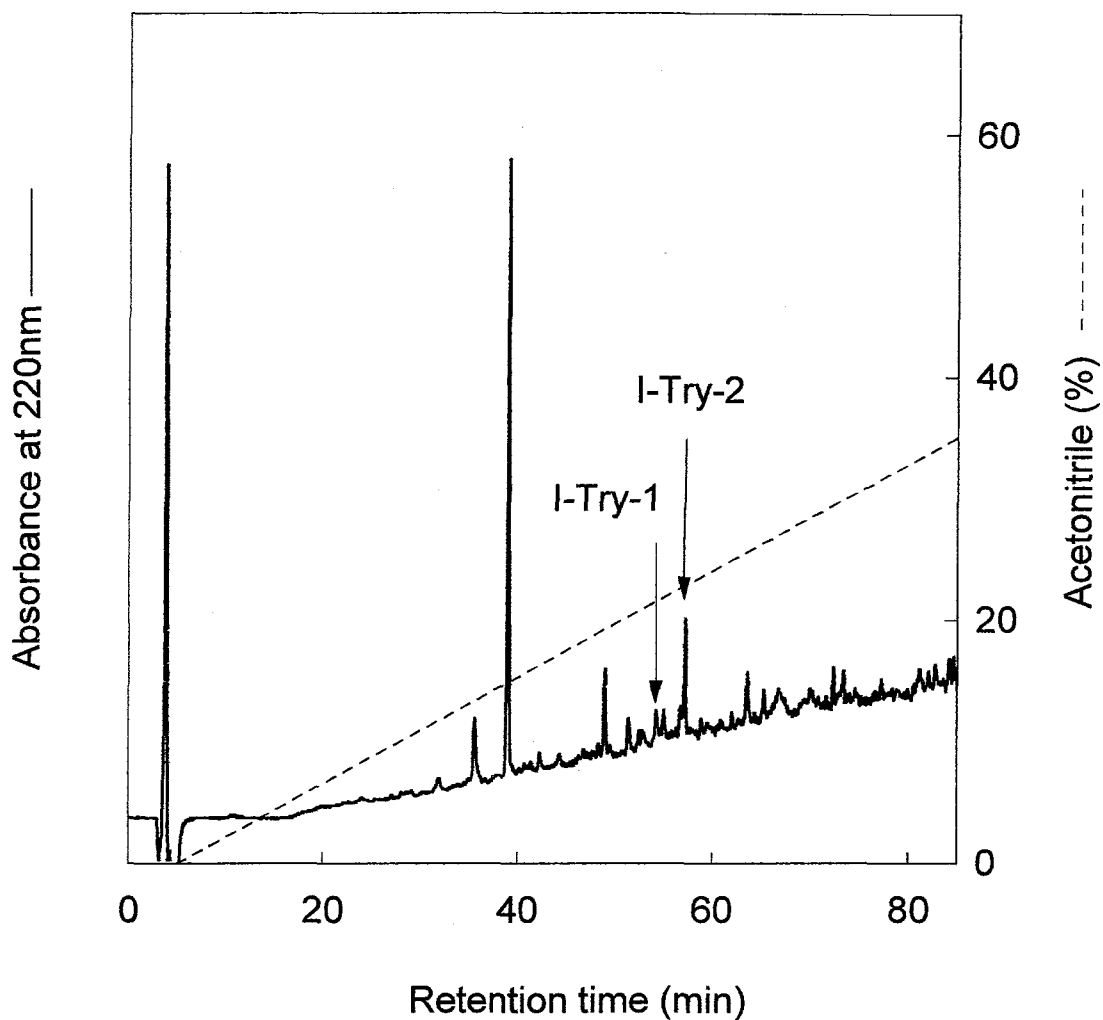


Fig. 3-6. Reverse-phase HPLC of the peptides produced by digestion of SHTX I with Trypsin.

Column, TSKgel ODS-120T (0.46 X 25cm); elution, gradient of acetonitrile in 0.1% TFA; flow rate, 1ml/min. Two peptides (I-Try-1 and I-Try-2) were subjected to sequencing.

Table 3-2. Analysis of two tryptic peptides (I-Try-1 and I-Try-2) from SHTX I by a protein sequencer.

Cycle	I-Try-1	I-Try-2
1	X	Gly Cys Asp
2	Ile	Gly Tyr Trp
3	Ile	Cys His Ser
4	Gly	Val Ser Cys
5	Ala	Arg Asp Gly
6	Hyp	Gly Gln
7	Cys	Lys Gln
8	Arg	

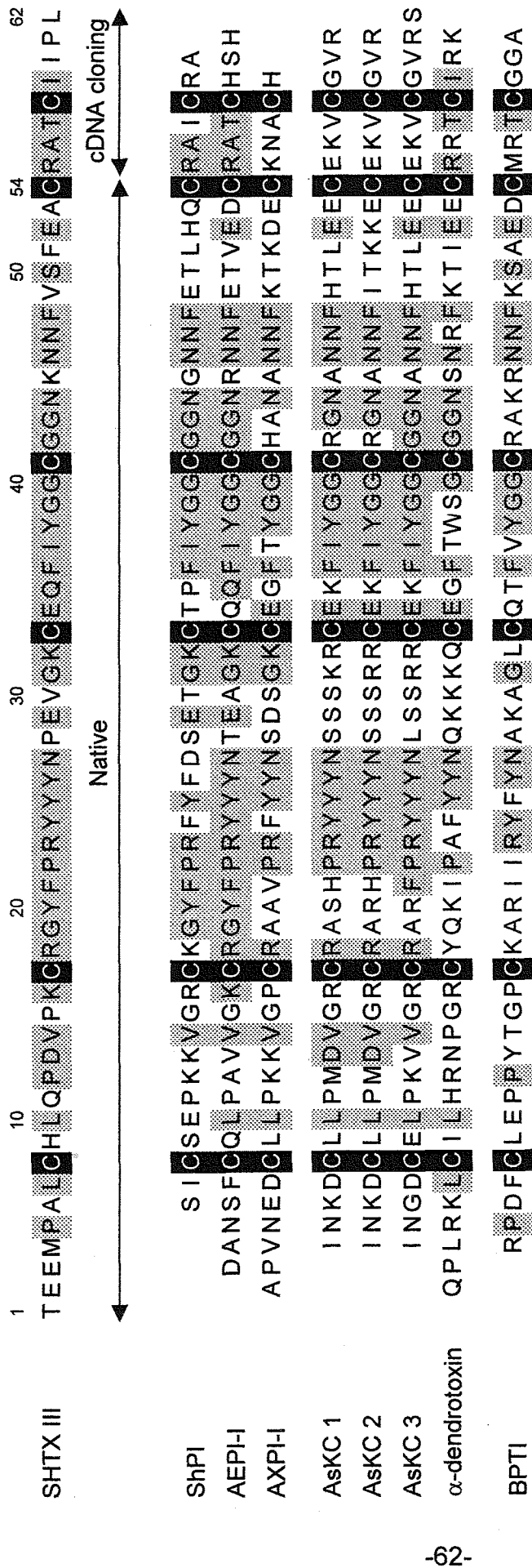


Fig. 3-7. Alignment of the complete amino acid sequence of SHTX III with those of Kunitz-type protease inhibitors and alpha-dendrotoxin.

Inhibitors: ShPI from *Stichodactyla helianthus*; AEPI-I from *Actinia equina*; AXPI-I from *Anthopleura aff. xanthogrammica*; AsKC 1, AsKC 2 and AsKC 3 (Kalicidine 1-3) from *Anemonia sulcata*; BPTI from bovine pancreas. alpha-dendrotoxin from *Dendroaspis angusticeps*. Identical residues are shaded and cysteine residues are shown in white on the black background. Labels above the straight lines with arrows at both ends: Native, N-terminal sequences determined by sequencing of the native peptides; cDNA cloning, deduced amino acid sequences determined by cDNA cloning.

ACTTCAAAACAGACTCCCAAGAACGAAGCTTTACTTCAATCCACTCAGTCCGTGCAAGT	59
TTAAAATCTAAAATGGCGAAGCTGTATTTCTTCTCTGTTTGGCTCTGGTTGCTTGTCTG	119
<u> M A K L Y F L L C L A L V A C L </u>	16
ACAATGGCCA <u>CAGAAGAGATGCCGGCACTGTGT</u> CATCTCCAGCCTGACGTGCCGAAGTGT	179
<u> T M A T E E M P A L C H L Q P D V P K C </u>	36
AGG <u>GGTACTTCCCAAGGTATTAC</u> TATAACCCGGAAGTTGGAAAAAT <u>GTGAGCAGTTTATC</u>	239
R G Y F P R Y Y Y N P E V G K C E Q F I	56
<u>TACGGAGGATGTGGAGGAAAC</u> AAGAACAATTTGTATCCTTCGAAGCGTGCCGAGCAACT	299
Y G G C G G N K N N F V S F E A C R A T	76
TGCATAATTCCTTTGTGAACACCGGGTTACTCCAACAGAAAAGGTCAGGATACCTGATCA	359
C I I P L *	81
GATGTAATCTTGCTCGAAATTAGACTAAAAATGCTGGCTTATAAAAGATAACAGTGTAAC	419
GAAATACTTTCTTTAAAAAAGATTGTAATAATCTTTTAGTTCAAGAATA <u>AAATAAA</u> AGCAGT	479
TATGGAATGAAAAAAAAAAAAAAAAA	503

Fig. 3-8. Nucleotide sequence of the cDNA encoding SHTX III. The complete gene sequence of SHTX III and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisk indicates an in-frame stop codon (TGA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

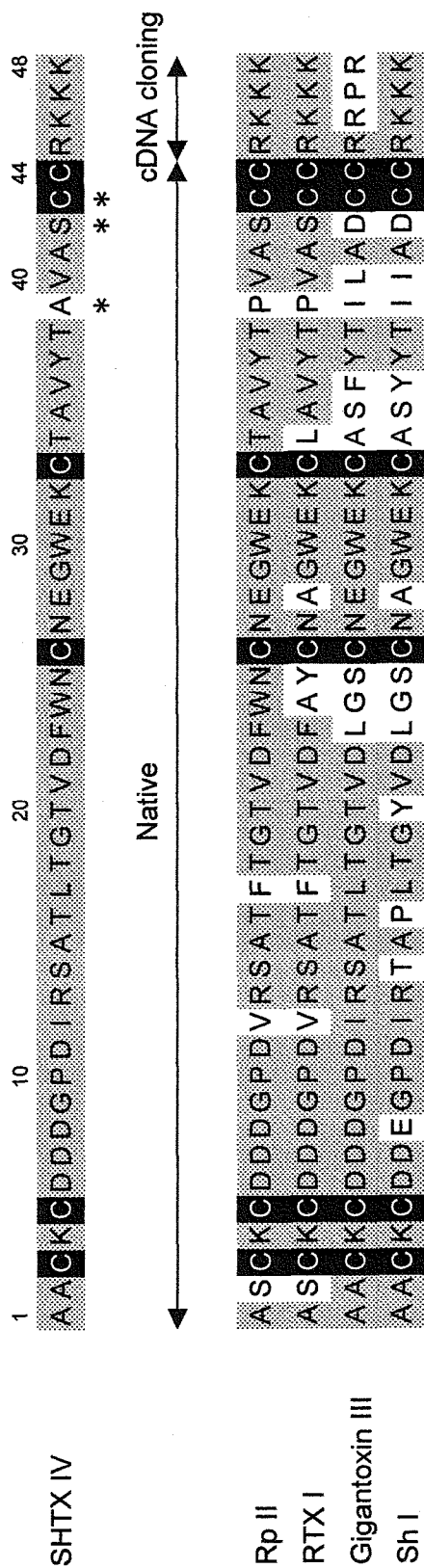


Fig. 3-9. Alignment of the complete amino acid sequences of SHTX IV with those of type 2 Na channel toxins.

Rp II from *Radianthus (Heteractis) paumotensis*; RTX I from *Radianthus (Heteractis) macrodactylus*; Gigantoxin III from *Stichodactyla gigantea*; Sh I from *Stichodactyla helianthus*.
 Identical residues are shaded and cysteine residues are shown in white on the black background. Labels above the straight lines with arrows at both ends: Native, N-terminal sequences determined by sequencing of the native peptides; cDNA cloning, deduced amino acid sequences determined by cDNA cloning. Asterisks represent deduced amino acids determined by cDNA cloning.

CAACTTATGCTTGATAAGACAGTGCAACCATTCTCTTTCCATTATCACTTTGAGTCCT	59
GAGTCGAACTGAACAAGAACAACGAAGAATAACCAACGCCGGCATAATCCAAGTCAGGGA	119
*	
ACGCTCGTTTTTCGCAATGGCATAACCTAAAGATTGTTCTCGTTGCTTTGATGTTGGTGCTC	179
<u> M A Y L K I V L V A L M L V L </u>	15
GGCGTGTCTGCAATGAGGCTTTCTGATCAAGAAGATCAAGATGTCTCTGTTGTTAAGCGC	239
<u> G V S A M R L S D Q E D Q D V S V V K R </u>	35
GCCTCGTGTAAAGCTGATGACGATGGTCTCTGACATTCGCAGTGTACCTTGACAGGCACT	299
A A C K C D D D G P D I R S A T L T G T	55
GTTGATTTCTGGAAGTGAACGAGGGAATGGGAAAAGTGCACAGCTGTTTACACAGCCGTC	359
V D F W N C N E G W E K C T A V Y T A V	75
GCGTCATGCTGCAGGAAGAAGAAGGGCTAAATTCGATACTGAAATTAAGATTCCGGATA	419
A S C C R K K K G *	85
GGAAATTGGAACACAAGCTAAGCAATTGAAATAGTTATAATAAGCATTAAACGAGGGTGT	479
TATTGAACAAGAAAGATCGGGTATAAGACTACTTTAAAGTGTGTAATAAAACAATAAATT	539
AATAAATAAACCAAAATCAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	581

Fig. 3-10. Nucleotide sequence of the cDNA encoding SHTX IV. The complete gene sequence of SHTX IV and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisks indicate in-frame stop codons (TGA and TAA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The propart is doubly underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

に一致した。SHTX IV の MALDI/TOFMS 分析で得られた値 (5229.5) は、48 残基目の Lys までのアミノ酸配列から算出した分子量 (5226.8) とよく一致したので、翻訳領域の C 末端の Gly は、第 2 章の gigantoxin III と同様に C 末端アミド化酵素による翻訳後修飾で切断されると推定された。こうして 48 残基からなる SHTX IV の全アミノ酸配列を Fig. 3-9 のように決定した。SHTX IV はそのアミノ酸配列の特徴から、タイプ 2 の Na チャネル毒に属すると判断された。

K チャネル毒性の測定

SHTX III は Kunitz 型プロテアーゼインヒビターと高い相同性を持ち、サワガニに対して麻痺活性を示したので、*Anemonia sulcata* 由来の AsKC 1-3 (kaliclidines) と同じタイプの K チャネル毒であることが強く示唆された。また、新規ペプチド毒の SHTX I と II もサワガニに麻痺を引き起こすことから、K チャネル毒性をもつことが考えられた。そこで、SHTX II と III について K チャネル毒性の測定を行った (Fig. 3-11)。SHTX II と III はともに ^{125}I - α -dendrotoxin のシナプトソーム膜への結合を阻害した。Fig. 3-11 から、 α -dendrotoxin の IC_{50} は 5.7nM で、SHTX II の IC_{50} は 270nM、SHTX III の IC_{50} は 650nM と求められた。SHTX II の K チャネル毒性は α -dendrotoxin の約 1/50 であるのに対して、SHTX III の K チャネル毒性は約 1/110 であった。比較のために測定したウシ腓膵由来の Kunitz 型プロテアーゼインヒビター-BPTI では、16000nM の高濃度でも、阻害はまったく認められなかった。

考察

イボハタゴ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、Sephadex G-50 および逆相 HPLC により 4 成分 (SHTX I-IV) のペプチド毒を単離し、アミノ酸配列分析と 3'RACE 法と 5'RACE 法による cDNA クローニングを行った。

まず新規ペプチド毒であった SHTX I と II についてであるが、両成分とも 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量でもサワガニを死亡させなかったが、麻痺活性は陽性で、 ED_{50} はともに 430 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。 ED_{50} が同じであったことから両成分間の唯一の違いである 6 残基目のアミノ酸は活性には影響していないと思われる。SHTX I と II は、サワガニに対して麻痺活性を示していることから神経毒と予想された。そこで、SHTX II の K チャネル毒性を測定したところ、活性が認められた。 ^{125}I - α -dendrotoxin を用いた競合阻害試験で得られた IC_{50} 値から、SHTX II の K チャネル毒性は α -dendrotoxin の約 1/50 と見積もられた。ウメボシイソギンチャクから単離されているグループ 1 の K チャネル毒 AeK の毒性は、 α -dendrotoxin の約 1/65 であることから (Minagawa *et al.*, 1998)、SHTX II と AeK の K チャネル毒性は同程度だった。本研究では、SHTX I の K チャネル毒性については調べなかったが、サワガニに対する麻痺活性のケースと同様に、両者の K チャネル毒性には違いがないと思われる。

一方、SHTX I と II の前駆体構造は、シグナルペプチド、プロパート部、4 残基 (EPKP) の配列部分、成熟ペプチドからなっていた。イソギンチャク毒の前駆体に特徴的な塩基性アミノ酸対 (Lys-Arg) を末端にもつプロパート部を含んでいたことから、SHTX I と II は

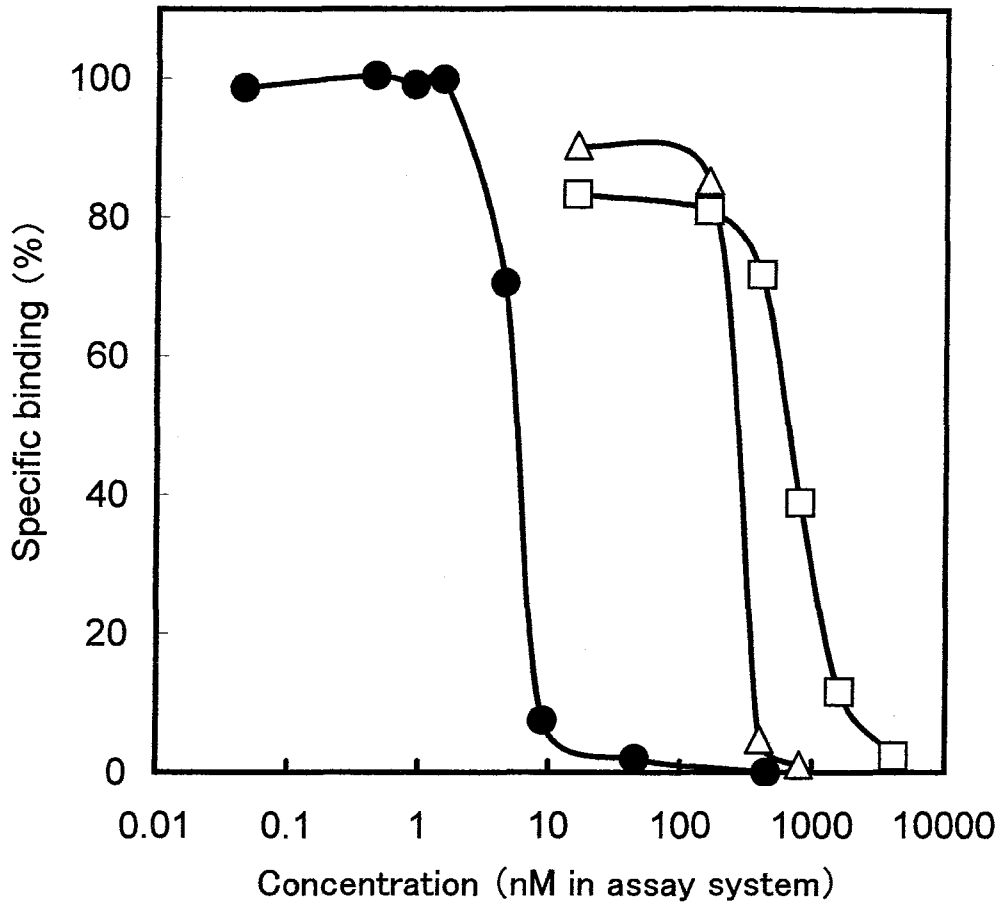


Fig. 3-11. Inhibition of the binding of ^{125}I - α -dendrotoxin to rat synaptosomal membranes by SHTX II and III.

●, α -dendrotoxin; Δ , SHTX II; \square , SHTX III.

刺胞由来の毒であると考えられる。また、4 残基の (EPKP) の配列部分は、イソギンチャク毒の前駆体として初めて確認された。この配列部分の役割は不明であるが、プロパート部が刺胞にソーティングするためのシグナルとしての役割を終えて切り出された後に、何かしらの役割を果たしてから、最後に成熟ペプチドから切り出されると推定される (この配列は第 4 章で述べるジュズダマイソギンチャクの毒の前駆体中にも存在していた)。

SHTX I と II の演繹アミノ酸配列は、プロテインシークエンサーで決定した部分アミノ酸配列と比較して、4 残基の変異が認められた。実際に cDNA クローニングに用いた個体から SHTX II を単離しアミノ酸配列分析に供したところ、29 残基まで読むことができたが、そのアミノ酸配列は演繹アミノ酸配列と完全に一致していた。4 残基の変異のうち、特に 21 残基目の Arg (正電荷) が Pro (無電荷) に、28 残基目の Gln (無電荷) が Glu (負電荷) に変異していたことは、アミノ酸残基がもつ電荷は、毒がイオンチャネルに結合するのに重要な役割を果たしていると考えられているので注目される。本実験で cDNA クローニングに用いた個体は非常に小さく、そのほとんどを RNA 抽出に用いてしまったので、改めてサワガニ毒性試験を行えなかったが、活性には違いがあると思われる。このアミノ酸残基の変異は、現段階では何によるものかは不明だが、ペプチド毒の単離に用いた個体は沖縄産で、cDNA クローニングに用いた個体は外国産であったことから、イソギンチャクが置かれた生息環境の違いが影響しているとしたら、分子進化の観点から非常に興味深い。また、N 末端アミノ酸配列分析では N 末端アミノ酸を同定できなかったが、cDNA クローニングでは Thr であることが判明した。この結果から、N 末端の Thr の側鎖 (多分 OH 部分) は翻訳後何らかの修飾を受けると推定されるが、どういう修飾を受けると特定するには至らなかった。

SHTX I と II は、これまでに知られている生物由来の K チャネル毒とはまったく相同性をもたない新規ペプチド毒であった。今回は、電位依存性 K チャネルに作用する α -dendrotoxin との競合阻害試験しか行わなかったが、Ca 依存性 K チャネルへの作用も十分に考えられることから、このチャネルに作用するサソリの charybdotoxin などとも競合阻害試験を行う必要があるかもしれない。さらに、本研究により SHTX I と II の前駆体構造が明らかになったので、構造活性相関の解明を目的とした大腸菌での発現実験も可能となった。とりわけ SHTX I と II は Cys の数が 4 残基と少なく、ジスルフィド結合の様式も解明されたので、活性を維持したままの発現が十分に期待できる。いずれにしても、SHTX I と II を新しい薬理的試薬として有効利用するには、各種イオンチャネルに対する直接的な作用を、パッチクランプ法などを用いて詳細に解析することが必須である。

次に SHTX III についてであるが、そのアミノ酸配列から Kunitz 型プロテアーゼインヒビターであることが判明した。実際に、第 1 章で述べた方法に従って SHTX III のトリプシンインヒビター活性を測定したところ、203 IU/mg と算出された。また SHTX I, II 同様に、1000 μ g/kg の投与量でもサワガニは死亡しなかったが、麻痺活性は認められ、ED₅₀ は 183 μ g/kg と強かった。Schweitz (1995) らは、*Anemonia sulcata* から 4 成分の K チャネル毒を単離し、そのうち AsKC 1-3 (kaliclidines 1-3) の 3 成分は Kunitz 型プロテアーゼインヒビターであるという興味深い事実を報告している。そこで、SHTX III についても K チャネル毒性の測定を行い、活性を確認した。¹²⁵I- α -dendrotoxin を用いた競合阻害試験で得られた IC₅₀ 値から、SHTX III の K チャネル毒性は α -dendrotoxin の約 1/110 と見積もら

れた。一方、比較のために測定したウシ腓膵由来の Kunitz 型プロテアーゼインヒビター BPTI の K チャネル毒性は 16000nM の高濃度でも、まったく認められなかった。Kaliclidines はブラックマンバ (*Dendroaspis polylepis*) 由来の dendrotoxin I と比べると 1/400~1/3500 程度の弱い K チャネル毒性であることが知られている (Schweitz *et al.*, 1995)。本研究では dendrotoxin I ではなく、グリーンマンバ由来の α -dendrotoxin を用いたが、その K チャネル毒性は dendrotoxin I の約 1/8 と弱いことが知られている (Mehraban *et al.*, 1985)。この点を考慮すると、SHTX III の K チャネル毒性は kaliclidines と同程度と判断された。筆者の所属する研究室ではウメボシイソギンチャク科の数種イソギンチャクから Kunitz 型プロテアーゼインヒビターが単離され (Shiomi *et al.*, 1989; Ishida *et al.*, 1997; Minagawa *et al.*, 1997; Minagawa *et al.*, 1998)、その一部については K チャネル毒性の有無も調べられているが、これまでのところすべて陰性であった (皆川, 1997)。SHTX III は K チャネル毒性をあわせもつ Kunitz 型プロテアーゼインヒビターとしてイソギンチャクの毒の中では、kaliclidines の 3 成分に続いて 4 例目となる。Kaliclidines はウメボシイソギンチャク科の *Anemonia sulcata* から単離されたのに対して、SHTX III はハタゴイソギンチャク科のイボハタゴイソギンチャクから単離された。また、筆者の予備実験において、同じハタゴイソギンチャク科のセンジュイソギンチャク *Radianthus ritteri* から単離した Kunitz 型プロテアーゼインヒビターでも K チャネル毒性を確認している。さらに、アラビアハタゴイソギンチャクからは、サワガニに対して致死活性を示す 2 成分の Kunitz 型インヒビターを単離している。このように、ハタゴイソギンチャク科のイソギンチャクがもつ Kunitz 型インヒビターには、K チャネル毒性をもつものが多く存在すると考えられるので、今後のスクリーニングに期待したい。

一方、SHTX III の前駆体構造は dendrotoxin K (Smith *et al.*, 1993) や BPTI (Thomas *et al.*, 1987) と同じで、シグナルペプチドと成熟ペプチドからなり、プロパート部は存在していなかった。いずれの前駆体にもシグナルペプチドがあることから、同じ分泌タンパク質であることが分かった。Kaliclidines も含めて、イソギンチャクの Kunitz 型プロテアーゼインヒビターの前駆体構造については過去に報告がなく、SHTX III が初めてである。またシグナルペプチドの長さについては、dendrotoxin K では完全長の cDNA が得られていないので不明だが、BPTI では 33 残基と長いことが知られている。SHTX III のシグナルペプチドは 19 残基であったので、哺乳類の Kunitz 型プロテアーゼインヒビターとこの点で違いが認められた。

イソギンチャクにおける Kunitz 型プロテアーゼインヒビターの存在意義については、実験的証拠は得られていないが、イソギンチャク自身ももつプロテアーゼから毒成分を保護するため、あるいは餌動物がもつプロテアーゼから毒成分を保護するためと推定されてきた。しかしながら、その一部は SHTX III のように、K チャネル毒としても機能していることが分かってきた。もし、イソギンチャクが Kunitz 型プロテアーゼインヒビターを毒として、あるいは毒成分を保護するためのプロテアーゼインヒビターとして、刺胞に蓄えているとしたら、今後の前駆体構造の解明の中で、プロパート部をもつものが見つかるかもしれない。いずれにしても、イソギンチャクがもつ Kunitz 型プロテアーゼの役割については、その存在部位を明らかにすることで解明されるだろう。

最後に SHTX IV についてであるが、そのアミノ酸配列からタイプ 2 の Na チャネル毒で

あることが判明した。SHTX IV の前駆体構造は、第 2 章で述べたハタゴイソギンチャクのタイプ 2 の Na チャネル毒である gigantoxin III と同様に、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドからなり、また翻訳領域の C 末端には Gly 残基の付加が認められた。SHTX IV も C 末端がアミド化されていると思われる。また、興味深いことに、SHTX IV と gigantoxin III のシグナルペプチド (19 残基) とプロパート部 (16 残基) のアミノ酸残基数は一致し、アミノ酸残基の違いはシグナルペプチドで 2 つ、プロパート部でも 2 つしか認められなかった (Fig. 2-12 と Fig. 3-9)。

第 2 章でハタゴイソギンチャクから EGF 様ペプチド毒である gigantoxin I を単離できたが、近縁種であるイボハタゴイソギンチャクには、EGF 様ペプチド毒は検出されなかった。その代わりに、サワガニに麻痺活性を示す新規 K チャネル毒 SHTX I および II を単離することができた。また、同様に麻痺活性を示した Kunitz 型プロテアーゼインヒビターである SHTX III も K チャネル毒であった。筆者の所属する研究室ではこれまでに数多くのペプチド毒がイソギンチャクから単離されているが、その際にはサワガニに対する致死活性が指標として用いられている。本研究では、サワガニアッセイによる毒性の評価基準を、麻痺活性というレベルにまで下げたことが、新規 K チャネル毒や K チャネル毒性をもつ Kunitz 型インヒビターの発見につながったと考えられる。今までに調べられてきたイソギンチャクの中にも、麻痺活性のみを示す毒成分は存在している可能性が高く、今後は麻痺活性も視野に入れてペプチド毒の検索を行っていく必要があるだろう。

第4章 ジュズダマイソギンチャクのペプチド毒の単離と cDNA クローニング

ジュズダマイソギンチャク *Heteractis aurora* (Fig. 4-1) はイマイソギンチャク亜目 (Nynantheae) ハタゴイソギンチャク科 (Stichodactylidae) に属し、奄美諸島以南のサンゴ礁の浅海に見られ、クマノミが共生する。触手環の直径は 20cm で、非常に多くの触手を持ち、各触手は球状の突起が連続し、数珠のような形になる。体壁は灰色で、上方には多くの吸着イボがあり、小石などを付ける。口盤は触手の間からかなり見え、そこには放射状の明暗色帯がある。

第 1 章において、ジュズダマイソギンチャクはサワガニに対して致死活性を示したので、本章ではジュズダマイソギンチャクからペプチド毒を単離し、その生物活性の解明と cDNA クローニングを試みた。

実験方法

試料

ペプチド毒の単離には、2003 年 12 月に観賞魚店 (大阪府) から購入したジュズダマイソギンチャク (10g、沖縄産) を試料とした。実験に使用するまで -20°C で冷凍保存した。RNA の抽出には、2004 年 2 月に観賞魚店 (大阪府) から購入したジュズダマイソギンチャク (180g、沖縄産) の一部を試料とした。生きたまま賽の目状に切り取り、液体窒素で凍結後、実験に使用するまで -80°C で冷凍保存した。

粗抽出液の調製方法

凍結試料をホモジナイズし、得られたホモジネートから 5 g を秤り取り、イオン交換水 25ml を加えて再びホモジナイズした。その後、冷却遠心分離 ($18800 \times g$, 4°C , 15min) し、得られた上清を粗抽出液とした。

ペプチド毒の単離方法

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 Sephadex G-50 カラム ($2.5 \times 90\text{cm}$; Amersham Bioscience) に供した。同緩衝液を用いて流速 42ml/hr で溶出し、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、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルター (DISMIC-25cs; 東洋濾紙) でろ過後、TSKgel ODS-120T カラム ($0.46 \times 25\text{cm}$; 東ソー) 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 (最初の 5min は 0-14%、その後 60min は 14-42%) により流速 1ml/min で毒成分を溶出した。ペプチドは UV 検出器を用いて 220nm の吸光度で検出した。なお Ha I については、プロテインシークエンサーにより複数成分の混合物であることが判明したため、さらに MonoQ HR5/5 ($0.5 \times 5\text{cm}$; Amersham Bioscience) を用いた HPLC に供した。カラムは 0.01M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 溶液中の NaCl の直線的濃度勾配により流速 1ml/min で毒成分を溶出し (濃度勾配は Fig. 4-4 を参



Fig. 4-1. ジュズダマイソギンチャク *Heteractis aurora*
(イソギンチャクガイドブック、2001 より)

照)、最後に TSKgel ODS-120T カラム (0.46×25cm) を用いた HPLC で脱塩した。4 成分のペプチド毒 (Ha I-IV) に対応する溶出液を集めて凍結乾燥し、必要な溶媒に溶解してその後の実験に用いた。

毒性の測定方法

サワガニに対する毒性試験および LD₅₀ (致死活性) または ED₅₀ (麻痺活性) の算出は第 2 章で述べた方法に従って行った。

ペプチド毒の分析方法

第 2 章で述べたように、タンパク質の定量は Lowry *et al.* (1951) の方法で、分子量の測定はレーザーイオン化-飛行時間型質量分析法 (MALDI/TOFMS 法) で、アミノ酸配列分析はエドマン分解法に基づいた気相式シーケンサーを用いて行った。

cDNA クローニング法

凍結試料約 1g から TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。第 2 章で述べたように、3'RACE は 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends キット (Invitrogen) を用いて total RNA (5μg) から合成した 1st strand cDNA に対して、Ha I-III のアミノ酸配列をもとに設計した degenerate プライマー (Ha I では 5'-GYC CIM GIT GYC AYM GIM GIG AYC-3' と 5'-GAY CAY TTY GGI AAR TGY MGI AAR YT-3'、Ha II では 5'-AYG TIG CIG TIC CIC CIT GYG GIG-3' と 5'-GYT AYC ARC ARG TIG GIA AYA CIT G-3'、Ha III では 5'-AYA THA THA AYC CIC CIT GYA THG G-3' と 5'-CIC CIT GYA THG GIT GYT AYT AYC A-3') で行った。PCR 増幅は Ex Taq ポリメラーゼ (Takara) を用いて、条件は 94°C5min; 94°C30sec、55°C30sec、72°C1min を 35 サイクル; 72°C5min とした。

5'RACE では、5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) キットと gene-specific プライマー (Ha I では 5'-GGA AAG CTA GAC TGT TTT TGG-3'、Ha II では 5'-GGC TCG GGC TCT CTC TTT C-3'、Ha III では 5'-CCA CAT TTA AAT TTA TCA TAG A-3') を用いて total RNA (5μg) から 1st strand cDNA を合成した。この 1st strand cDNA に対して、gene-specific プライマー (Ha I では 5'-CCT ATT ATT TGT TAG GAC AAG G-3' と 5'-GTT TCC TGC ATT TCC CAA AAT G-3'、Ha II では 5'-GGG CTG GAC AGA GAC TTG G-3' と 5'-CAC GGA CAC ACG TAT TGC C-3'、Ha III では 5'-GAT GAT GTT GGG CTT GGG C-3' と 5'-ACA CAT TCG TTG CCG ACT TG-3') を用いる PCR に供した。PCR は 3'RACE の場合と同じ条件で行った。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 Cy5 ThermoSequenase Dye Terminator Kit (Amersham Bioscience) に従って反応させ、Long-Read Tower DNA シーケンサー (Amersham Bioscience) により解析した。最後に、3'RACE と 5'RACE で決定した塩基配列をもとに設計した 5'末端側と 3'末端側プライマー (Ha I では 5'-GCT CAA ATA CAC GAG ATA AGC-3' と 5'-AGT TGT CTG AGT CTG GCT AG-3'、Ha II では 5'-GAC AGC AGT GTT CAA GGA GT-3' と 5'-CTT TGA AGC AGT TTA TTT GCG A-3'、Ha III では 5'-GCC AAC TTC AAC AAG CAG ATT-3' と 5'-ACA ATA TTA CAA TGA ATC TTT TTA G-3') で RT-PCR を行い、全塩基配列を確認した。

結果

ペプチド毒の単離および毒性

粗抽出液を Sephadex G-50 に供したところ、280nm で吸光度を示すピークは 4 つ認められ、サワガニ致死活性は 1 つ目と 2 つ目のピークの間 (Fr.44-52) に検出された (Fig. 4-2)。致死活性の認められた画分を集め、逆相 HPLC に供したときの溶出パターンを Fig. 4-3 に示す。得られたピークのうち、保持時間 36min と 53min のピークに致死活性が認められ、保持時間 39min と 47min のピークに麻痺活性が認められた。溶出時間が早い順にそれぞれの毒成分を Ha I、II、III、IV と命名した。純度に問題があった Ha I については、さらに MonoQ HR5/5 を用いた HPLC に供して精製した (Fig. 4-4)。試料 5g からの各毒成分の収量とサワガニに対する LD₅₀ および ED₅₀ を測定した結果を Table 4-1 に示した。なお Ha I については収量が低かったことから、チャートのエリア面積からタンパク量を計算した。サワガニに対する致死活性は Ha I と Ha IV で認められ、LD₅₀ は Ha I が 14 μ g/kg、Ha IV が 53 μ g/kg であった。一方、Ha II と III はサワガニに致死は引き起こさなかったが、麻痺活性は認められ、ED₅₀ は Ha II が 2350 μ g/kg、Ha III が 1400 μ g/kg であった。

Ha I の部分アミノ酸配列と塩基配列

単離した Ha I をプロテインシークエンサーに供して N 末端部分のアミノ酸配列を調べたところ、28 残基まで決定することができた (Fig. 4-5)。Ha I は、イソギンチャクはもとより他の生物由来のペプチド毒ともまったく相同性がない新規ペプチド毒であった。そこで C 末端部のアミノ酸配列を明らかにするために cDNA クローニングを行った。

Ha I をコードする cDNA の全塩基配列 (471 bp) は、3'RACE 法と 5'RACE 法によって Fig. 4-6 のように決定した。3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) とポリ A 鎖が確認できたが、開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コドンが含まれていなかった。Ha I の前駆体は 62 残基からなり、SignalP V3.0 (Center for Biological Sequence Analysis, Denmark) で解析したところ、開始メチオニン以降 21 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には、10 残基からなるプロパート部が存在していた。また Ha I の演繹アミノ酸配列は、プロテインシークエンサーで決定した部分アミノ酸配列と完全に一致した。Ha I の MALDI/TOFMS 分析で得られた値 (3490.0) は、30 残基目の Asp までのアミノ酸配列から算出した分子量 (3483.0) とよく一致したので、翻訳領域の C 末端の Lys は、翻訳後のプロセッシングで切断されると推定された。こうして 30 残基からなる Ha I の全アミノ酸配列を Fig. 4-5 のように決定した。

Ha II と III の部分アミノ酸配列と塩基配列

単離した Ha II の N 末端部分のアミノ酸配列は 24 残基目まで決定することができ、Ha III については 25 残基目まで決定することができた (Fig. 4-7)。両成分は互いに配列相同性があり、シマキッカイソギンチャク *Antheopsis maculata* の Am I (Honma *et al.*, 2005) および第 3 章で述べたイボハタゴイソギンチャクの SHTX I、II と高い相同性を示した。これらはいずれも Cys の数と位置が完全に一致していた。そこで C 末端部のアミノ酸配

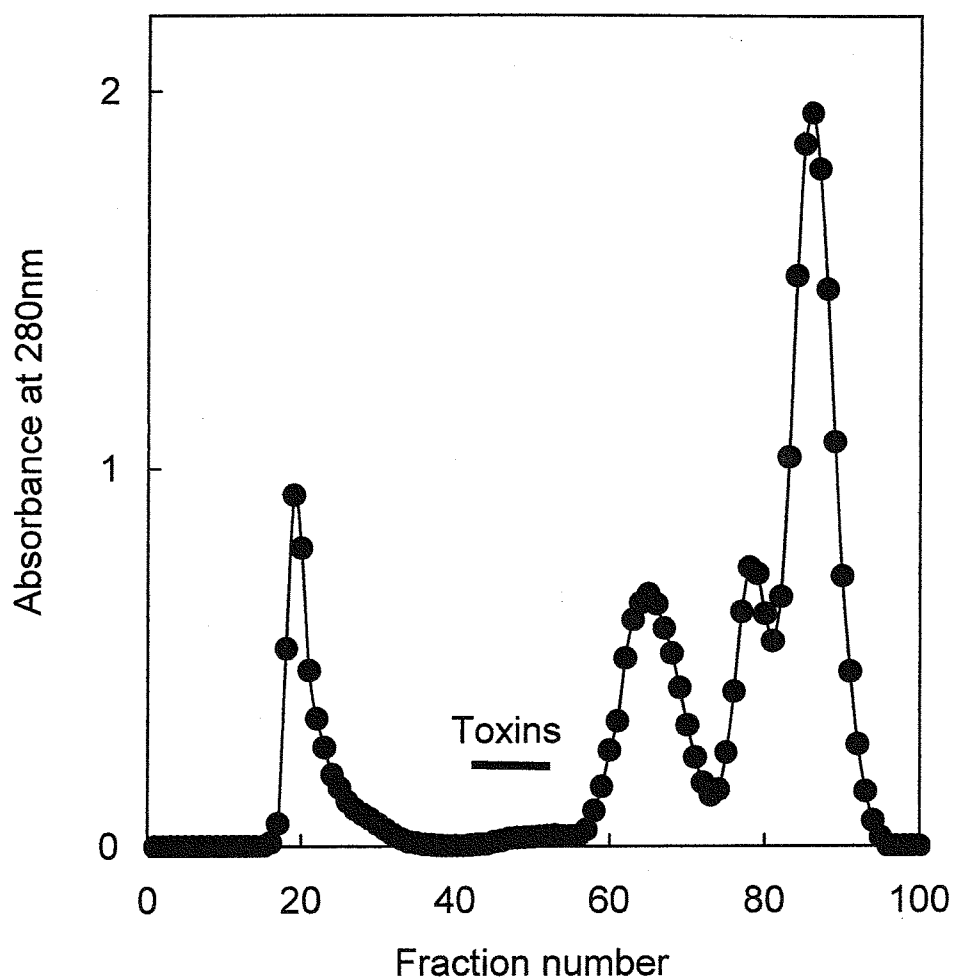


Fig. 4-2. Gel filtration on Sephadex G-50 of the crude extract from *Heteractis aurora*.

The crude extract was applied to a Sephadex G-50 column (2.5×90cm), which was eluted with 0.15M NaCl in 0.01M phosphate buffer (pH 7.0). Fractions of 8ml were collected at a flow rate of 42ml/hr.

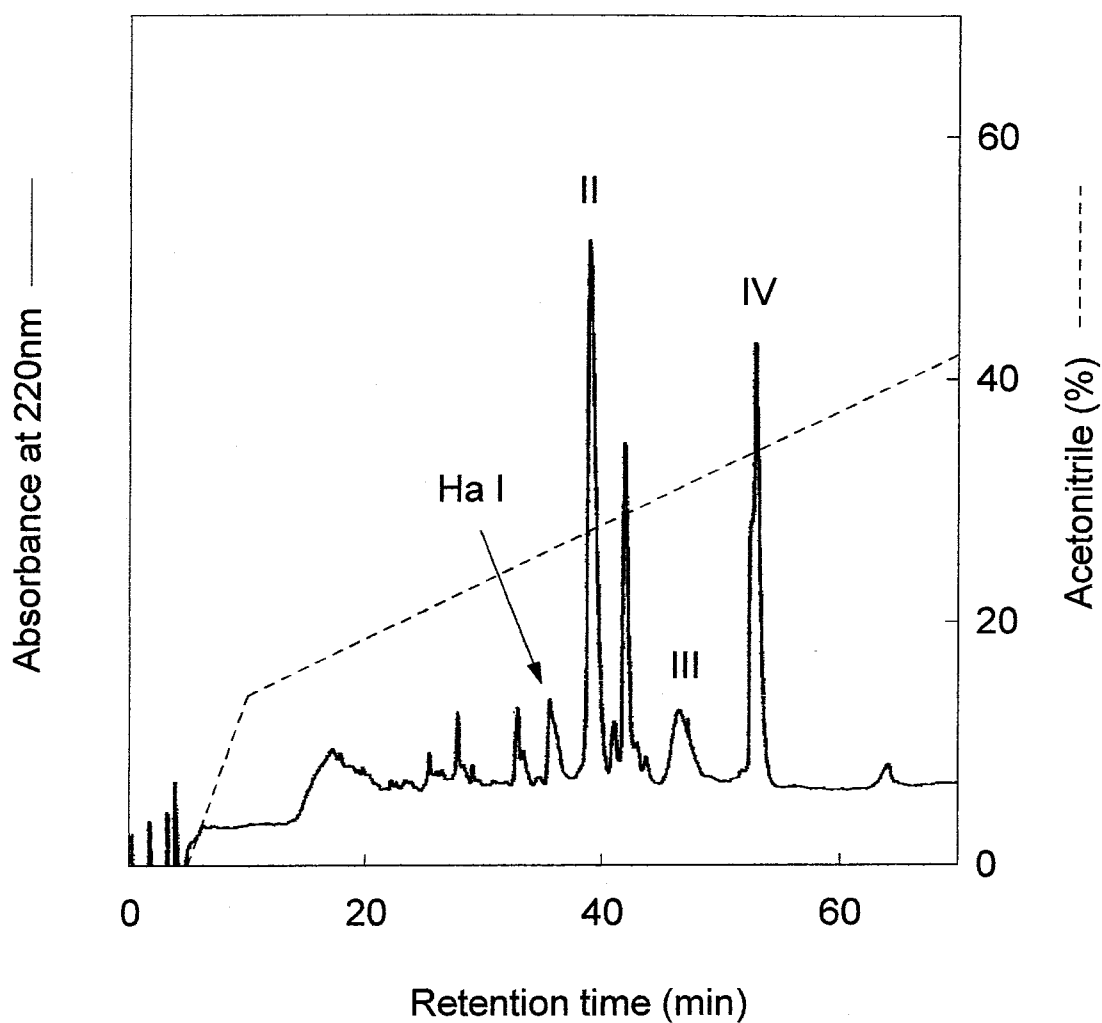


Fig. 4-3. Isolation of *Heteractis aurora* toxins by reverse-phase HPLC.

The toxic fraction obtained by gel filtration on Sephadex G-50 (Fig. 4-2) was subjected to HPLC on a TSKgel ODS-120T column (0.46 X 25cm). The column was eluted with a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA. The flow rate was maintained at 1ml/min.

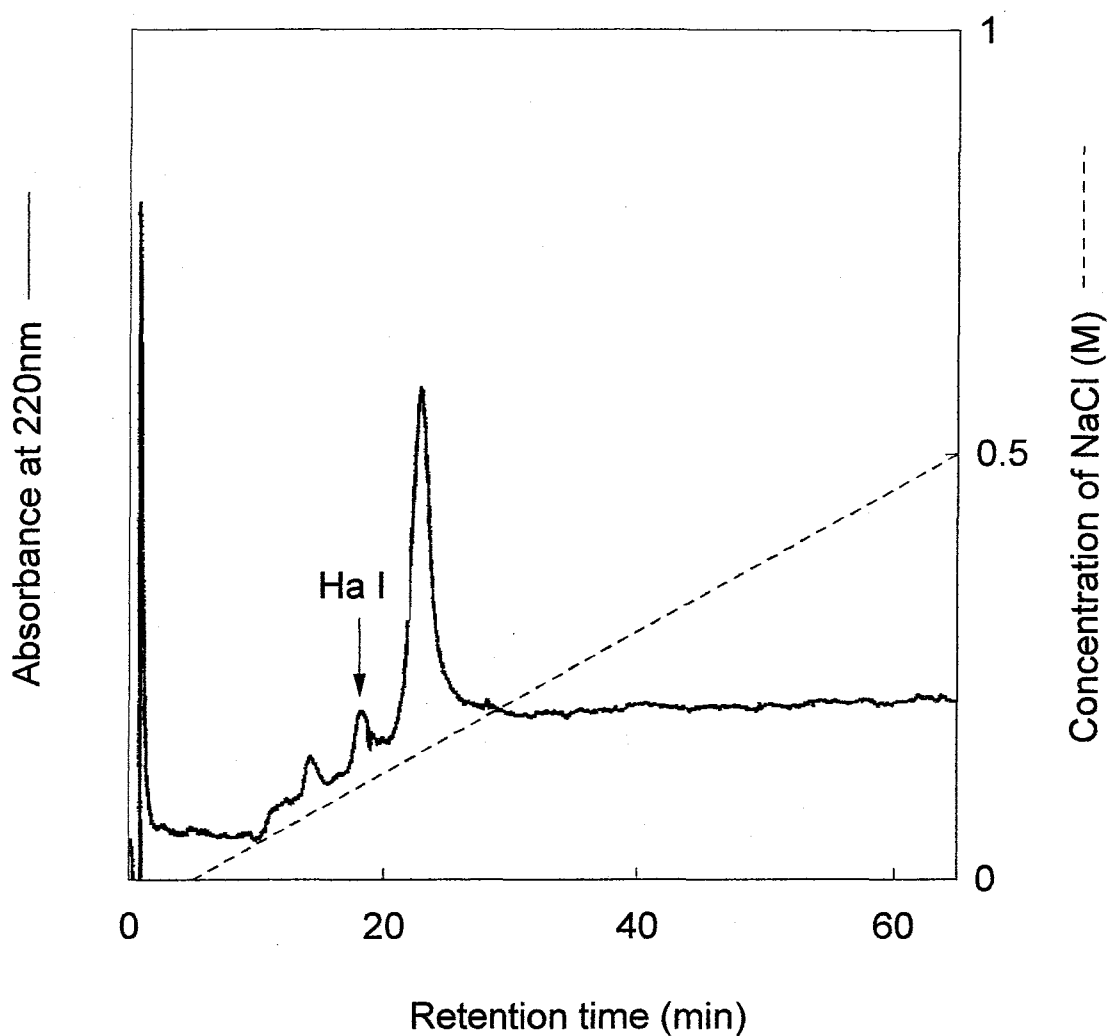


Fig. 4-4. Anion-exchange HPLC of Ha I purified by reverse-phase HPLC.

Toxin I obtained by reverse-phase HPLC on a TSKgel ODS-120T column (Fig. 4-3) was subjected to HPLC on a Mono Q HR 5/5 column (0.5 X 5cm). The column was eluted with a gradient of NaCl in 0.01M Tris-HCl buffer (pH 8.0). The flow rate was maintained at 1ml/min.

Table 4-1. Summary of toxin isolation

	Yield (μg)	Lethal activity (LD_{50}) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Paralytic activity (ED_{50}) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Ha I	54*	14*	
Ha II	522		2350
Ha III	305		1400
Ha IV	495	53	

Isolation of the toxins was performed using 5g of sample.

*Based on the peak areas in reverse-phase HPLC.

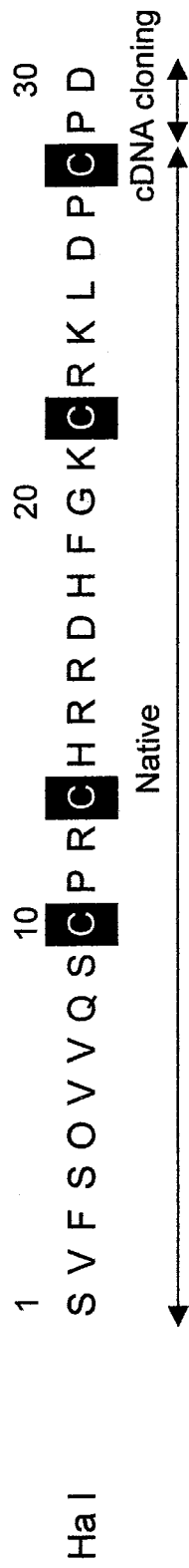


Fig. 4-5. Complete amino acid sequences of Ha I.

Cysteine residues are shown in white on the black background. Labels above the straight lines with arrows at both ends: Native, N-terminal sequences determined by sequencing of the native peptides; cDNA cloning, deduced amino acid sequences determined by cDNA cloning.

AAGCTCAAATACACGAGATAAGCAACAACACAAGCTGAAGATAAGGAAGTCTGCAAGT	58
CCACCACTGACCAAGAAAGAAAAGATGAAGCCGGCTATATTTCTGATGCTGTTTGTTCGCA	118
<u> M K P A I F L M L F V A </u>	12
ATGTTCTCATCTCCGAAGGCGAAGGATTCAAGCCCAAAGATGCGCCGCAAGAGAGGAGC	178
<u> M F L I S E G E G F K P K D A P Q E R S </u>	32
GTGTTTTACCAAGTTGTCCAAAGCTGTCCTCCCGGTGCCATCGCCGTGATCATTCTGCCAAG	238
V F S P V V Q S C P R C H R R D H F G K	52
<u>TCTCGGAAAGTCGATCCTTGTCTGACAAATAATAGGATAA</u> <u>CCAAAAACAGTCTAGCTTT</u>	298
C R K L D P C P D K *	62
<u>CC</u> ATAATAGTAATTACCACGATAAAATATAAAGGTGTGGAAGACCATTTCATGTCTAAAGC	358
TTTGTTTAATCATTTGATAAAAGCGATGAAAGCAATA <u>AATAAA</u> AGACTGCGTTGGTTAACA	418
GTGAAATTTATGGTTTCAGTCTAGCCAGACATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	471

Fig. 4-6. Nucleotide sequence of the cDNA encoding Ha I. The complete gene sequence of Ha I and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisk indicates an in-frame stop codon (TAA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The propeptide is doubly underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

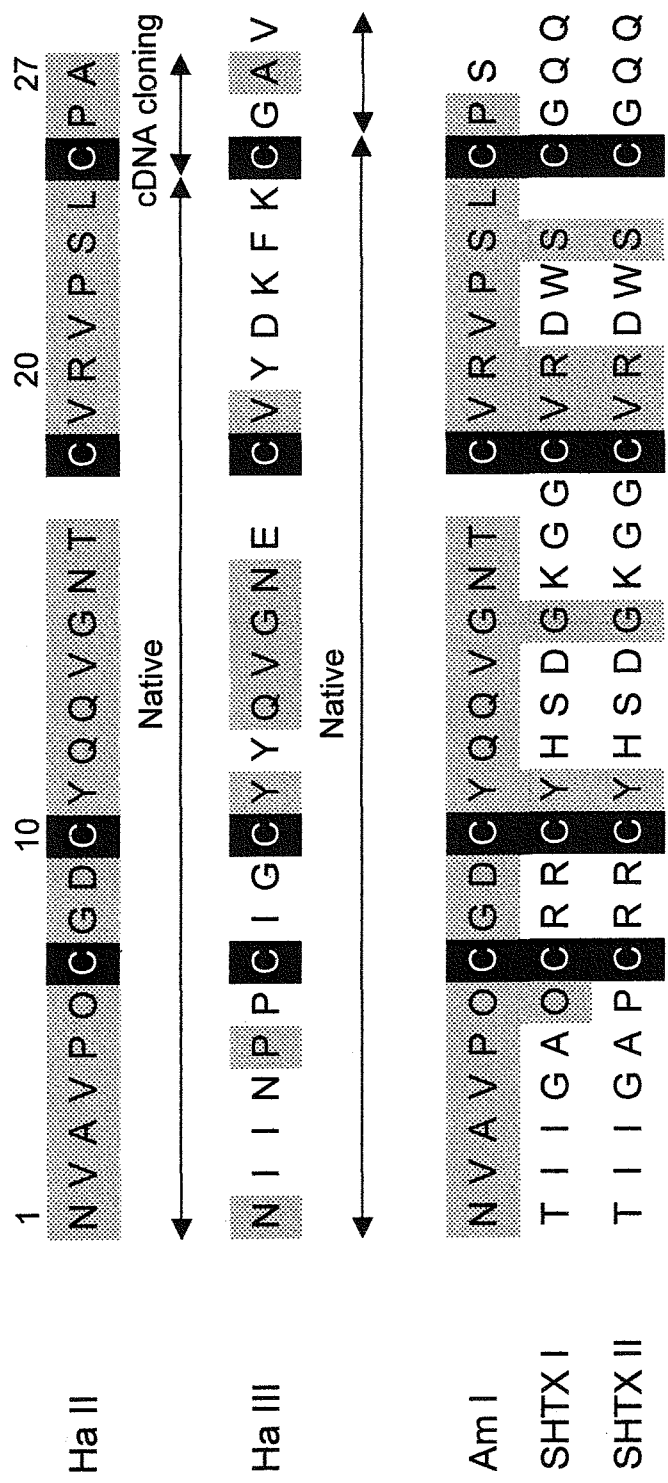


Fig. 4-7. Alignment of the complete amino acid sequences of Ha II and III with those of homologous toxins.

Am I from *Antheopsis maculata*; SHTX I and II from *Stichodactyla haddoni*.

The residues identical with Ha II are shaded. Cysteine residues are shown in white on the black background. Labels above the straight lines with arrows at both ends: Native, N-terminal sequences determined by sequencing of the native peptides; cDNA cloning, deduced amino acid sequences determined by cDNA cloning.

列を明らかにするために Ha II と III の cDNA クローニングを行った。

Ha II をコードする cDNA の全塩基配列 (714 bp) は、3'RACE 法と 5'RACE 法によって Fig. 4-8 のように決定した。3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) とポリ A 鎖が確認できたが、開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コドンが含まれていなかった。SignalP V3.0 で解析したところ、開始メチオニン以降 18 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には、11 残基からなるプロパート部が認められた。非常に驚いたことに、Ha II の前駆体には、30 残基目の Glu から 63 残基目の Arg までの 34 残基から成る全く同じ配列が 4 回も繰り返していた (39 残基目の Pro は翻訳後修飾によって Hyp になると推定される)。Ha II の成熟ペプチドは、プロテインシーケンサーで決定した部分アミノ酸配列と MALDI/TOFMS 分析の結果から判断して、34 残基目の Asn から 60 残基目の Ala までと決定した。アミノ酸配列から算出した分子量 (2803.2) は、MALDI/TOFMS 分析で得られた値 (2802.7) とほぼ一致するので、決定した配列は正しいことが支持された。こうして 27 残基からなる Ha II の全アミノ酸配列を Fig. 4-7 のように決定した。

一方、Ha III をコードする cDNA の全塩基配列 (463 bp) は、3'RACE 法と 5'RACE 法によって Fig. 4-9 のように決定した。3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) とポリ A 鎖が確認できたが、開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コドンが含まれていなかった。SignalP V3.0 で解析したところ、開始メチオニン以降 18 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には、11 残基からなるプロパート部が認められた。また Ha III の前駆体は Ha II と同様に、30 残基目の Glu から 61 残基目の Val までの 32 残基から成る全く同じ配列 (2 回目の繰り返しの C 末端には RKR の 3 残基がない) を繰り返していたが、興味深いことに、繰り返しの回数は Ha II とは異なり 2 回であった。Ha III の成熟ペプチドは、プロテインシーケンサーで決定した部分アミノ酸配列と MALDI/TOFMS 分析の結果から判断して、34 残基目の Asn から 61 残基目の Val までと決定した。アミノ酸配列から算出した分子量 (3107.6) は、MALDI/TOFMS 分析で得られた値 (3106.9) とほぼ一致するので、決定した配列は正しいことが支持された。こうして 28 残基からなる Ha III の全アミノ酸配列を Fig. 4-7 のように決定した。

Ha IV の部分アミノ酸配列

単離した Ha IV の N 末端部分のアミノ酸配列は 19 残基目まで決定することができ、アミノ酸配列の特徴からタイプ 1 の Na チャネル毒であることが判明した。

1 10 19
Ha IV F T V S C L C A S D G P S V H G N K L

考察

ジュズダマ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、Sephadex G-50 および逆相 HPLC により 4 成分 (Ha I-IV) のペプチド毒を単離し、アミノ酸配列分析と 3'RACE 法と 5'RACE 法による cDNA クローニングを行った。

TAGTCGAAGGACAGCAGTGTTCAAGGAGTGCCAACTTCAACAAGCAGATTCCCAAGTC	58
TCTCCAGAATCATTCTACAGGATGAAGCCTATTTTCATCGTAGCCTTGTTATTCTCTACT	118
<u>M K P I F I V A L L F S T</u>	13
TGTCTGGTTAATGCCAAACCAAGCATTAAATGATGCTGATATCAAGAGAGAGCCCGAGCCC	178
<u>C L V N A K P S I N D A D I K R E P E P</u>	33
AACGTGGCGGTTCCCGCGTGGGGACTGTTATCAACAAGTAGGCAATACGTGTGTCCGT	238
N V A V P P C G D C Y Q Q V G N T C V R	53
GTA <u>CCAAGTCTCTGTCCAGCC</u> GAAAGAGAGAGCCCGAGCCCAACGTGGCGGTTCCCGCG	298
V P S L C P A R K R E P E P N V A V P P	73
TGTGGGGACTGTTATCAACAAGTAGGCAATACGTGTGTCCGTGTACCAAGTCTCTGTCCA	358
C G D C Y Q Q V G N T C V R V P S L C P	93
GCCCGAAAGAGAGAGCCCGAGCCCAACGTGGCGGTTCCCGCGTGTGGGGACTGTTATCAA	418
A R K R E P E P N V A V P P C G D C Y Q	113
CAAGTAGGCAATACGTGTGTCCGTGTACCAAGTCTCTGTCCAGCCCGAAAGAGAGAGCCC	478
Q V G N T C V R V P S L C P A R K R E P	133
GAGCCCAACGTGGCGGTTCCCGCGTGTGGGGACTGTTATCAACAAGTAGGCAATACGTGT	538
E P N V A V P P C G D C Y Q Q V G N T C	153
GTCCGTGTACCAAGTCTCTGTCCAGCCCGAAAGAGAGAGCCAGAGAACCAAGATCTTTGG	598
V R V P S L C P A R K R E P E N Q D L W	173
TCCTAAACAATGTGAAGGCCGAAAATGAATAAAGGCAGTTTTGCTAAGCGATTAATTGTA	658
S *	174
ACATTAAGAAATGTT <u>CGCAAATAAACTGCTTCAAAGATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>	714

Fig. 4-8. Nucleotide sequence of the cDNA encoding Ha II. The complete gene sequence of Ha II and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisk indicates an in-frame stop codon (TAA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The propart is doubly underlined. Four repeated sequences corresponding to Ha II are shown in white on a black background. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

TAGTCGAAGGACAGCAGTGTTC AAGGAGTGCCA ACTTCAACAAGCAGATTCCAAGTC	58
TCTCCAGAATCATTCTACAGGATGAAGCCTATTTTCATCGTAGCCTTGTTGTTCTCTACT	118
<u> M K P I F I V A L L F S T </u>	13
TGTCTGGTTAATGCCAAACCAAGCATTGACGATGCTGAGATGAAGAGAGAACCCAAGCCC	178
<u> C L V N A K P S I D D A E M K R E P K P </u>	33
AACATCATCAATCCCCGTTGSTATCGGCTGTTACTAGCAAGTCGGCAACGAATGTGTCTAT	238
N I I N P P C I G C Y Y Q V G N E C V Y	53
GATAAATTTAAATGTGGGGCAGTCAGAAAGAGAGAGGCCCAAGCCCAACATCATCAATCCC	298
D K F K C G A V R K R E P K P N I I N P	73
CCATGTATCGGCTGTTACTACCAAGTCGGCAACGAATGTGTCTATGATAAATTTAAATGT	358
P C I G C Y Y Q V G N E C V Y D K F K C	93
GGGGCAGTCTGAAAGTAATATCGGCAGTTTTCTAAAAAGATTCATTGTAATATTGTGAA	418
G A V *	96
<u>ATAACAATGCAATGTTCATCTTCCAAAAA</u>	463

Fig. 4-9. Nucleotide sequence of the cDNA encoding Ha III. The complete gene sequence of Ha III and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisk indicates an in-frame stop codon (TGA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The propart is doubly underlined. Two repeated sequences corresponding to Ha III are shown in white on a black background. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

最初に Ha I については、他の生物由来のペプチド毒ともまったく相同性をもたない新規ペプチド毒で、サワガニに対する致死活性 (LD_{50} 14 μ g/kg) が相当強いことが注目された。Ha I は収量が低かったので、逆相 HPLC のチャートのエリア面積からタンパク量を計算したが、エリア面積から求めたタンパク量は、実際の量より大きく見積もられることが多い。このことから、Ha I のサワガニに対する致死活性は、実際にはもっと強いと思われる。一般にイソギンチャクの Na チャネル毒はサワガニに強い致死活性を示すことから、Ha I も Na チャネル毒と予想されるが、その一次構造は従来のイソギンチャクの Na チャネル毒とはまったく異なっていた。また、立体構造の形成にとって重要といわれる Cys の数も、従来の Na チャネル毒では 6 つなのに対して、Ha I では 4 つであった。さらに Ha I 投与後のサワガニで見られる症状も、従来の Na チャネル毒とは大きく異なっていた。従来の Na チャネル毒をサワガニに投与すると、歩脚に硬直や突っ張りといった顕著な症状が見られるが、Ha I では歩脚の硬直や突っ張りは見られずに、体全体が弛緩するようにして死に至った。イソギンチャクの Na チャネル毒はチャネルの開口時間を延長させるオープナーであるのに対して、フグのテトロドトキシン (TTX) などは Na チャネルを塞ぐブロッカーである。実際に TTX をサワガニに投与すると、Ha I を投与したときと同じような症状を示す。このことから、Ha I は TTX のような Na チャネルのブロッカーである可能性が高い。その一方で、Ha I の前駆体構造は、他のイソギンチャク毒の前駆体同様に、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから成っており、Ha I も刺胞由来の毒成分と考えられた。いずれにしても、Ha I は Na チャネルの新しい薬理的試薬としてきわめて有望であることから、早急な作用機構の解明が望まれる。

次に Ha II と III についてであるが、いずれもサワガニに致死は引き起こさなかったが、麻痺を引き起こした。その一次構造はシマキッカイソギンチャクからすでに単離されている Am I や第 3 章で述べたイボハタゴイソギンチャクの SHTX I と II と高い相同性を示し、Cys の数や位置も完全に一致していた。また Ha II と Am I の一次構造の違いに至っては、C 末端の 1 残基のみで、C 末端が Ala のものが Ha II で、Ser のものが Am I であった。しかしながら、そのサワガニに対する毒性は大きく異なっていた。Am I はサワガニに致死 (LD_{50} 830 μ g/kg) を引き起こしたのに対して、Ha II はサワガニに麻痺 (ED_{50} 2350 μ g/kg) のみを引き起こしたのである。このことは C 末端の 1 残基が活性の維持に重要な役割を果たしていることを示しているが、これほどまでに活性が変わってしまうことは、構造活性相関の点から非常に興味深い。また一次構造の相同性から判断して、これらのペプチド毒は、イソギンチャクのペプチド毒のなかに、新しいファミリーを形成しているは明らかである。なお、筆者の予備実験において、アラビアハタゴイソギンチャク *Stichodactyla mertensii* から同様の構造をしたペプチド毒が単離されている。ジュズダマイソギンチャク、イボハタゴイソギンチャク、シマキッカイソギンチャクおよびアラビアハタゴイソギンチャクは、属は異なるもののすべてハタゴイソギンチャク科に分類されていることから、この新しいファミリーの毒成分はハタゴイソギンチャク科にのみ存在するのかもしれない。このファミリーの分布とイソギンチャクの分類との関連は今後の検討課題である。

さらに Ha II と III の前駆体構造は、これまでのイソギンチャクの前駆体とは大きく異なっていた。すなわち、Ha II では成熟ペプチドの 4 回の繰り返しが、Ha III では 2 回の繰り返しが認められた。シマキッカイソギンチャクの Am I の前駆体にも 6 回の繰り返しが見

られた。一方、第3章で述べた SHTX I と II の前駆体には繰り返しは見られなかったが、プロパート部と成熟ペプチドの間に、このファミリーの前駆体に特徴的な 4 残基の挿入 (EPKP) が認められた。Ha II と III の翻訳後修飾の過程はその前駆体構造から、次のように推定される。まず膜透過後にシグナルペプチドが切り出され、刺胞へのソーティング後、プロパート部が切断される。次に Glu と Arg に挟まれた繰り返し部分での切断が起こり、それぞれの繰り返しの回数分だけのペプチドができる。最後に、N 末端の 4 残基 (Ha II では EPEP、Ha III では EPKP) と C 末端の 3 残基 (RKR) が切断されて、最終的な成熟ペプチドとなる (Ha III の 2 つ目の繰り返しには C 末端の 3 残基はない)。前駆体でのこのような繰り返し構造は、神経ペプチドなどではよく知られていて、海産無脊椎動物でも、イソギンチャク (Leviev and Grimmelikhuijzen, 1995) やウミウシ (Sasaki *et al.*, 2002) などで報告がある。しかしながら、筆者の知る限りにおいて、毒の前駆体としては過去に報告がない。なぜ一次構造の違いによって繰り返しの最高回数が 1 回、2 回、4 回、6 回と異なるのか。現段階ではその理由は分からないが、イソギンチャクが mRNA に多くの繰り返し構造をもつことによって、一度の翻訳で多量のペプチドを発現しようとしていることは明らかである。また、繰り返し回数の違いによって、意図的に毒の発現量を調節しているとも考えられる。いずれにしても、これらの疑問を解決するには、今後の DNA レベルでの遺伝子構造の解明が必要である。

なお、Ha II と III の作用機構については、第3章において SHTX II で K チャネル毒性が認められていることから、K チャネル毒である可能性が高い。今後の解明が急がれる。

イソギンチャクのような原始的な生物がもつペプチド毒は、今日の多様な生物がもつ数多くの生理活性ペプチドの祖先分子である可能性が高い。とりわけ Ha II と III の前駆体構造は、これまでに報告がない新規なものであった。また、これらの毒成分は、イソギンチャクのペプチド毒に新たなファミリーを形成していることがわかった。このファミリーからは今後も、新規な構造をした前駆体が発見される可能性が高く、生理活性ペプチドの分子進化の研究において重要な新知見を提供することだろう。

第5章 スナイソギンチャクおよびタマイタダキイソギンチャクのペプチド毒の単離とアミノ酸配列

スナイソギンチャク *Dofleinia armata* (Fig. 5-1) はイマイソギンチャク亜目 (Nynantheae) ウメボシイソギンチャク科 (Actiniidae) に属し、本州中部以南の潮間帯から水深 60m の砂底に産する。砂中の小石などに足盤を付け、砂上に大きく触手を張り巡らしている。触手環の直径は 15cm、触手は 48 本で太く、肉眼で斑点状に見える白っぽい点は非常に細長い基棘刺胞の塊である。体壁は白色あるいはその上に暗色の小斑点をもち、イボはまったくなく滑らかである。また色彩の変異に富む。触手の刺胞は強く、人を刺すことで公衆衛生上の問題にもなっている。一方、タマイタダキイソギンチャク *Entacmaea ramsayi* (Fig. 5-2) はイマイソギンチャク亜目 (Nynantheae) ハタゴイソギンチャク科 (Stichodactylidae) に属し、沖縄からオーストラリアのサンゴ礁の浅海に産し、ハマクマノミが共生する。触手環の直径は 30cm で、触手の先端がタマのように膨らみ、この膨らみ部分に白い環帯をもつものが多い。

第 1 章において、スナイソギンチャクとタマイタダキイソギンチャクはサワガニに対して致死活性を示したので、本章ではスナイソギンチャクとタマイタダキイソギンチャクからペプチド毒を単離し、そのアミノ酸配列と生物活性の解明を試みた。またタマイタダキイソギンチャクについては cDNA クローニングも行った。

実験方法

試料

ペプチド毒の単離には、2000 年 2 月に伊豆中央水産 (静岡県) から購入したスナイソギンチャク (48g) とタマイタダキイソギンチャク (40g) を試料とした。実験に使用するまで -20°C で冷凍保存した。RNA の抽出には、2003 年 5 月に観賞魚店 (神奈川県) から購入したタマイタダキイソギンチャクを試料とした。生きたまま賽の目状に切り取り、液体窒素で凍結後、実験に使用するまで -80°C で冷凍保存した。

粗抽出液の調製方法

凍結試料をホモジナイズし、得られたホモジネートから 5 g を秤り取り、イオン交換水 25ml 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°C, 15min) し、得られた上清を粗抽出液とした。

ペプチド毒の単離方法

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 Sephadex G-50 カラム (2.5 × 90cm; Amersham Bioscience) に供した。同緩衝液を用いてスナイソギンチャクは流速 36ml/hr で、タマイタダキイソギンチャクは流速 24ml/hr で溶出し、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、孔径 0.45μm のメンブレンフィルター (DISMIC-25cs ;

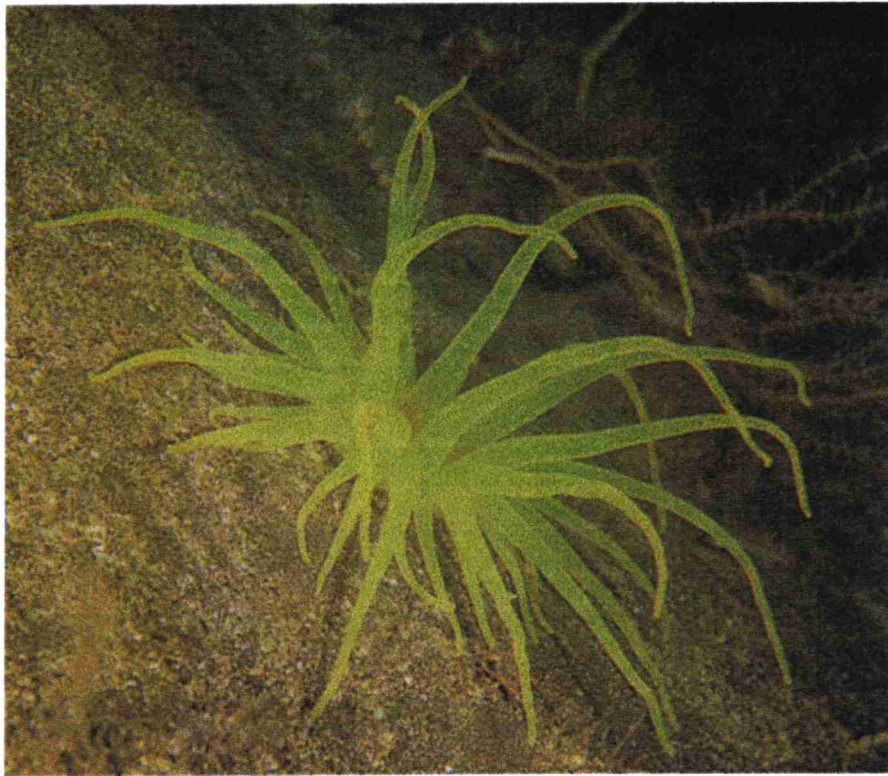


Fig. 5-1. スナイソギンチャク *Dofleinia armata*
(イソギンチャクガイドブック、2001 より)

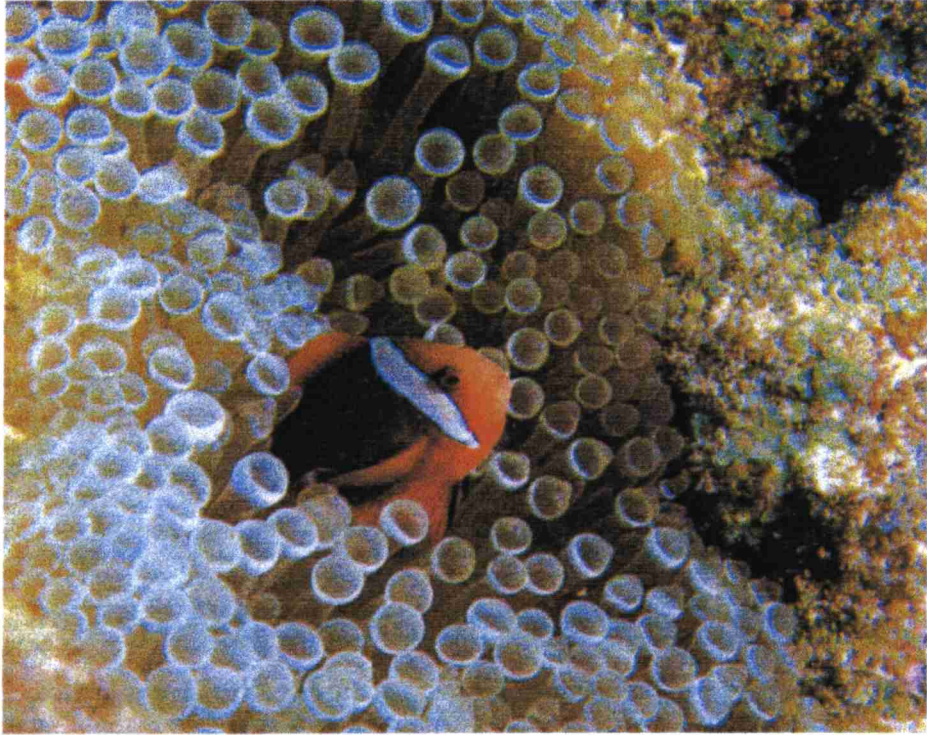


Fig. 5-2. タマイタダキイソギンチャク *Entacmaea ramsayi*

(日本海岸動物図鑑 [1]、1992 より)

東洋濾紙)でろ過後、TSKgel ODS-120T カラム (0.46×25cm ; 東ソー) 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 (最初の 5min は 0-14%、その後 60min は 14-42%) により流速 1ml/min で毒成分を溶出した。ペプチドは UV 検出器を用いて 220nm の吸光度で検出した。なおスナイソギンチャクの Toxin I については純度に問題があったことから、さらに Mono Q HR 5/5 (0.5×5cm ; Amersham Bioscience) を用いた HPLC に供した。カラムは 0.01M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 溶液中の NaCl の直線的濃度勾配により流速 1ml/min で毒成分を溶出した (濃度勾配は Fig. 5-5 を参照)。毒成分に対応する溶出液を集めて凍結乾燥し、必要な溶媒に溶解してその後の実験に用いた。

致死活性の測定方法

サワガニに対する致死活性の測定は、第 2 章で述べた方法に従って行った。

ペプチド毒の分析方法

第 2 章で述べたように、タンパク質の定量は Lowry *et al.* (1951) の方法で、分子量の測定はレーザーイオン化-飛行時間型質量分析法 (MALDI/TOFMS 法) で、アミノ酸配列分析はエドマン分解法に基づいた気相式シーケンサーを用いて行った。また単離したペプチド毒の還元ピリジルエチル化 (PE 化)、酵素分解ペプチドの逆相 HPLC (TSKgel ODS-120T) による単離も、いずれも第 2 章で述べた方法に準じて行った。

キモトリプシンによる酵素分解

PE-Toxin II (50 μ g) および PE-ErI (50 μ g) を凍結乾燥後、0.01M CaCl₂ を含む 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8) 200 μ l に溶解し、2.5 μ g のキモトリプシン (EC 3.4.21.1 ; Roche Diagnostics) を加えて 25°C で 18hr 分解した。生成したペプチド断片は、TSKgel ODS-120T を用いる逆相 HPLC により単離した (0.1%TFA 中のアセトニトリルの濃度勾配は Fig. 5-8 と 5-11 を参照)。

cDNA クローニング法

凍結試料約 1g から TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。第 2 章で述べたように、3'RACE は、3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends キット (Invitrogen) を用いて total RNA (5 μ g) から合成した 1st strand cDNA に対して、ErI のアミノ酸配列をもとに設計した degenerate プライマー (5'-GCI GGI GGI AAR WSI ACI TGY TGY C-3' と 5'-GTG YAA RTA YAC IGC IGG ITG YCC-3') で行った。PCR 増幅は Ex Taq ポリメラーゼ (Takara) を用いて、条件は 94°C5min ; 94°C30sec、55°C30sec、72°C 1min を 35 サイクル ; 72°C5min とした。5'RACE では、5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) キットと gene-specific プライマー (5'-CTT ATG ATA TGC AGA CGT AAG G-3') を用いて total RNA (5 μ g) から 1st strand cDNA を合成し、gene-specific プライマー (5'-CAC TTG ATG CTT TTA TTT CTC AC-3' と 5'-GCA CAC TGC CCC CAG GG-3') を用いる PCR に供した。PCR は 3'RACE の場合と同じ条件で行った。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 Cy5

ThermoSequenase Dye Terminator Kit (Amersham Bioscience) に従って反応させ、Long-Read Tower DNA シークエンサー (Amersham Bioscience) により解析した。最後に、3'RACE と 5'RACE で決定した塩基配列をもとに設計した 5'末端側と 3'末端側プライマー (5'-CAG TTC TCA TCC AAA ATC CAC-3' と 5'-GCT TTT AAA TAT CTT TTT ATT CTT AA-3') で RT-PCR を行い、全塩基配列を確認した。

結果

スナイソギンチャクのペプチド毒の単離および毒性

スナイソギンチャク粗抽出液を Sephadex G-50 に供したところ、280nm で吸光度を示すピークは 3 つ認められ、サワガニ致死活性は 1 つ目と 2 つ目のピークの間 (Fr.38-49) に検出された (Fig. 5-3)。致死活性の認められた画分を集め、逆相 HPLC に供したときの溶出パターンを Fig. 5-4 に示す。得られたピークのうち、保持時間 55、69min の 2 つのピークに致死活性が検出された。溶出時間が早い順にそれぞれの毒成分を Toxin I、Toxin II と命名した。Toxin I については、さらに Mono Q HR 5/5 を用いた HPLC に供して精製した (Fig. 5-5)。試料 5g からの各毒成分の収量とサワガニに対する LD₅₀ を測定した結果を Table 5-1 に示した。

Toxin I の部分アミノ酸配列と Toxin II (Da I、II) の全アミノ酸配列

単離した Toxin I をプロテインシーケンサーに供して N 末端部分のアミノ酸配列を調べたところ、44 残基まで決定することができた (Fig. 5-6)。全アミノ酸配列の決定には至らなかったが、そのアミノ酸配列の特徴からタイプ 1 の Na チャネル毒に属すると判断された。また 3 残基目に Hyp を含むことが注目された。

一方、Toxin II の場合、アミノ酸は 30 サイクル目まで検出されたが、Table 5-2 に示すように 2、7、26 サイクル目を除くと 2 種類が認められ、2 成分の混合物であることが判明した。しかし、各サイクルとも 2 種類のアミノ酸のうちの片方が明らかに主要で、しかも主要アミノ酸は必ず次のサイクルでマイナーアミノ酸として (2、7、26 サイクル目では主要アミノ酸とマイナーアミノ酸が一致している) 検出されている。この結果は、N 末端が Gly で始まる主要成分 (Da I と命名) と、主要成分の N 末端にさらに Ala が付加されたマイナー成分 (Da II と命名) との混合物であることを意味している。実際、Toxin II を MALDI/TOFMS で分析したところ、分子量 3089.7 と 3160.0 の 2 成分の混合物であることが確認され (Fig. 5-7)、しかも両成分の分子量の差 (70.3) は Ala 残基の分子量 (71.08) とよく一致し、両成分は N 末端に Ala があるかないかの違いだけであると判断された。こうして、両成分の N 末端アミノ酸 (Da I については 29 残基目まで、Da II については 30 残基目まで) を次のように決定した。

	1	10	20	29																										
Da I	G	G	K	A	T	C	C	P	C	F	M	C	S	Y	T	A	G	C	P	W	G	Q	C	A	H	H	C	G	C	
Da II	A	G	G	K	A	T	C	C	P	C	F	M	C	S	Y	T	A	G	C	P	W	G	Q	C	A	H	H	C	G	C
	1	10	20	30																										

上のアミノ酸配列から算出した分子量は、Da I は 2975.46、Da II は 3046.54 で、Toxin II

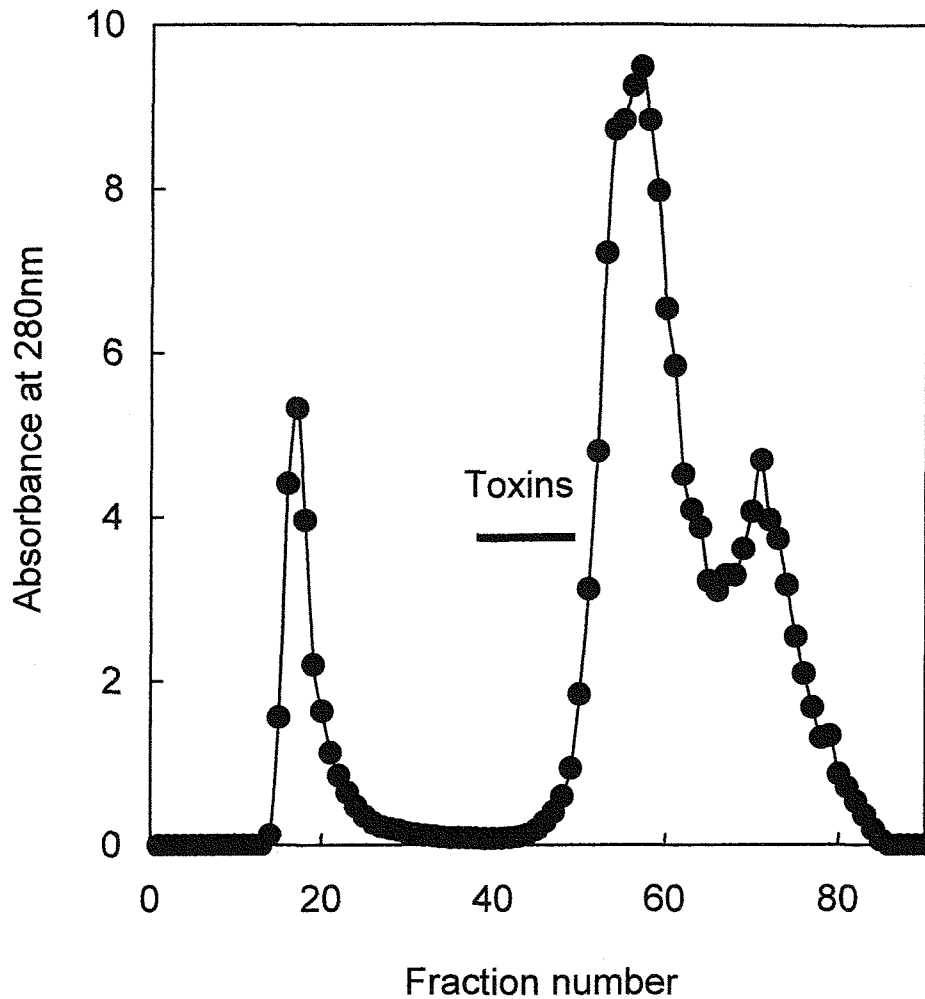


Fig. 5-3. Gel filtration on Sephadex G-50 of the crude extract from *Dofleinia armata*.

The crude extract was applied to a Sephadex G-50 column (2.5×90cm), which was eluted with 0.15M NaCl in 0.01M phosphate buffer (pH 7.0). Fractions of 8ml were collected at a flow rate of 36ml/hr.

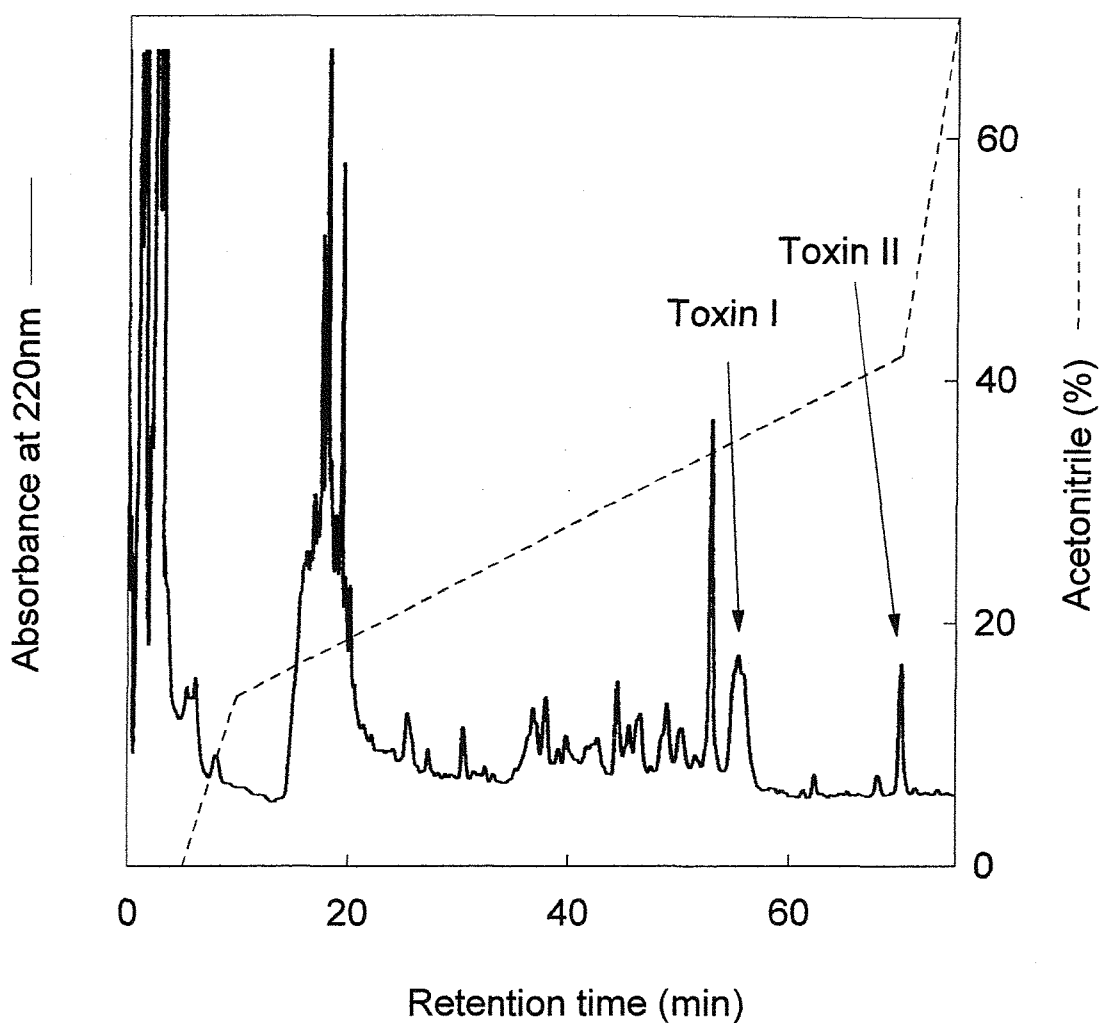


Fig. 5-4. Isolation of *Dofleinia armata* toxins by reverse-phase HPLC.

The toxic fraction obtained by gel filtration on Sephadex G-50 (Fig. 5-3) was subjected to HPLC on a TSKgel ODS-120T column (0.46 X 25cm). The column was eluted with a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA. The flow rate was maintained at 1ml/min.

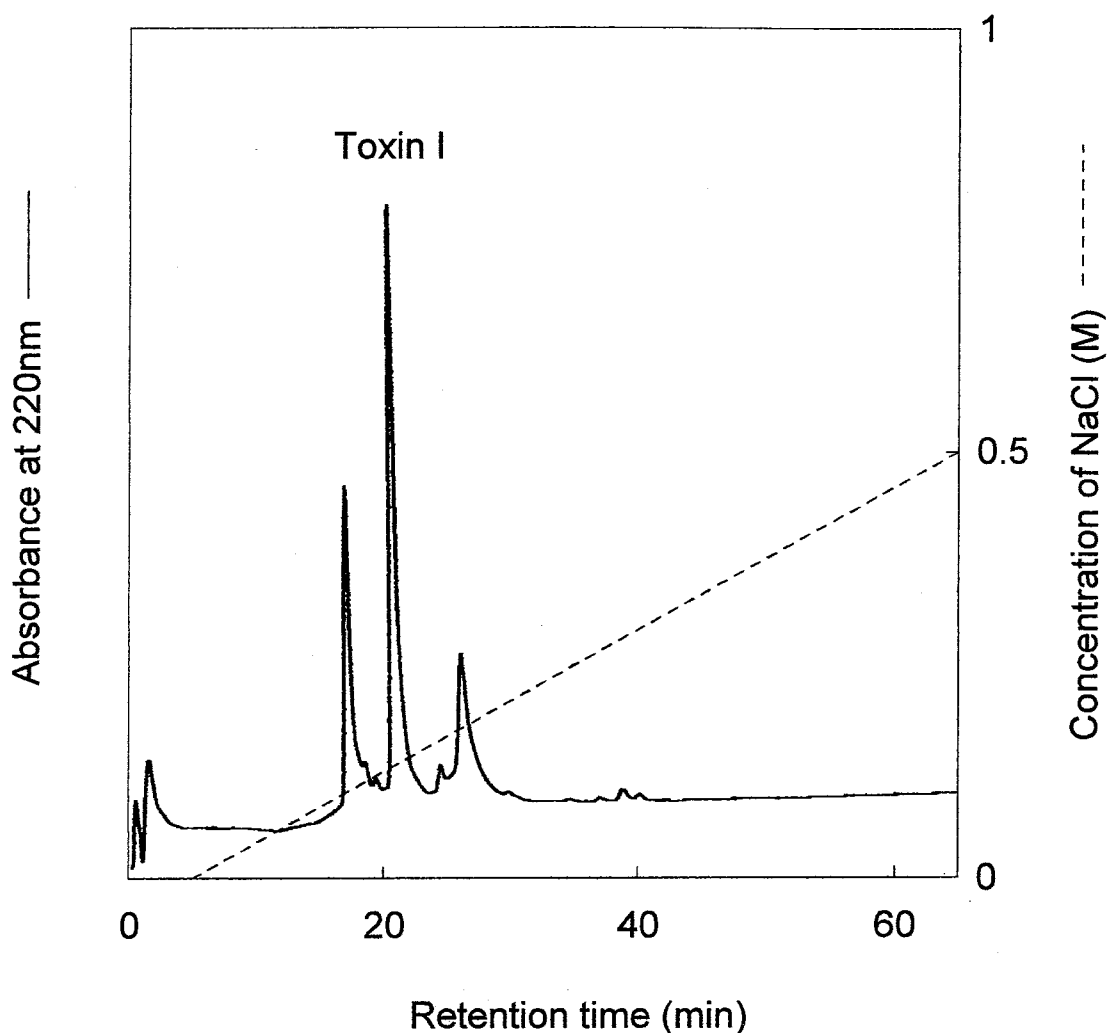


Fig. 5-5. Anion-exchange HPLC of Toxin I purified by reverse-phase HPLC.

Toxin I obtained by reverse-phase HPLC on a TSKgel ODS-120T column (Fig. 5-4) was subjected to HPLC on a Mono Q HR 5/5 column (0.5 X 5cm). The column was eluted with a gradient of NaCl in 0.01M Tris-HCl buffer (pH 8.0). The flow rate was maintained at 1ml/min.

Table 5-1. Summary of toxin isolation

	Yield* (μg)	Lethal activity (LD_{50}) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Toxin I	70	4
Toxin II	89	110

* Isolation of the toxins was performed using 5g of sample.

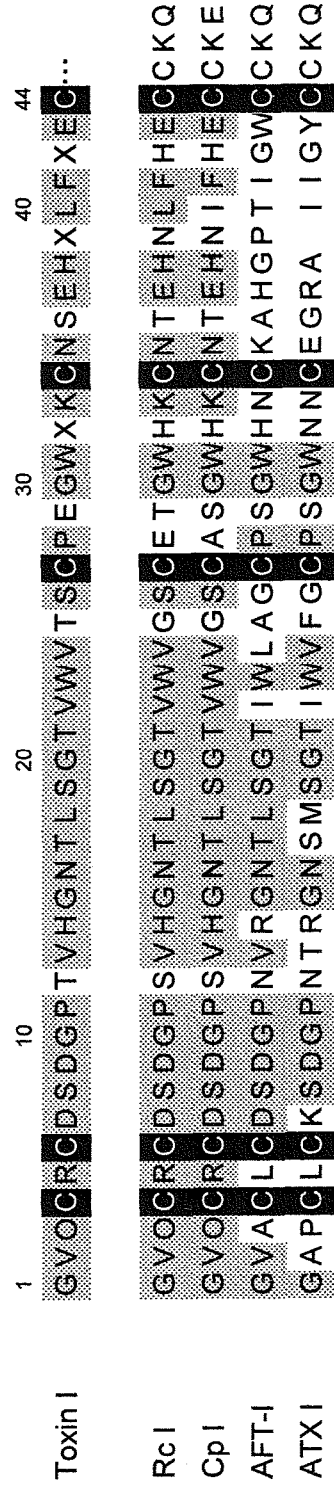


Fig. 5-6. Alignment of the partial amino acid sequence of Toxin I with those of type 1 Na channel toxins.

Rc I from *Radianthus crispus*; Cp I from *Condylactis passiflora*; AFT I from *Anthopleura fuscoviridis*; ATX I from *Anemonia sulcata*.

The residues identical with Toxin I are shaded. Cysteine residues are shown in white on a black background.

Table 5-2. Amino acid residues detected by a protein sequencer.

Cycle	Amino acid residue*	
1	G	A
2	G	
3	K	G
4	A	K
5	T	A
6	C	T
7	C	
8	P	C
9	C	P
10	F	C
11	M	F
12	C	M
13	S	C
14	Y	S
15	I	Y
16	A	T
17	G	A
18	C	G
19	P	C
20	W	P
21	G	W
22	Q	G
23	C	Q
24	A	C
25	H	A
26	H	
27	C	H
28	G	C
29	C	G
30	D	C

* Of the two amino acid residues detected in cycles 1, 3-6, 8-25 and 27-29, the major residue is circled.

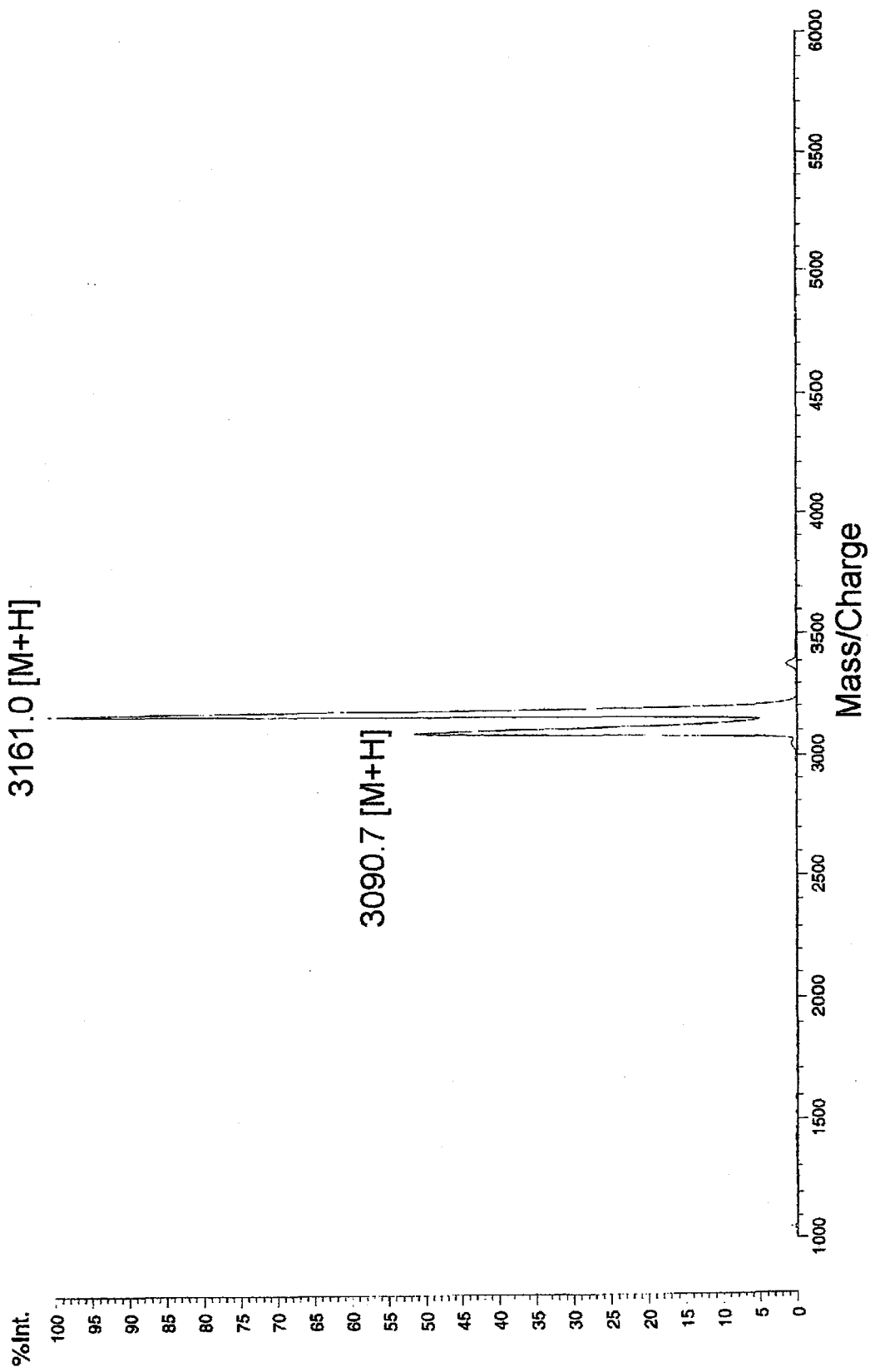


Fig. 5-7. Molecular weight measurement of Toxin II by MALDI/TOFMS.

の MALDI/TOF-MS の結果と比べると C 末端にさらに 1 残基あることは明らかである。そこで、C 末端アミノ酸を決定するために、Toxin II を還元およびピリジルエチル化し、キモトリプシン分解を行った。キモトリプシン分解物の逆相 HPLC により Toxin II-C-1 と命名したペプチド断片が単離され (Fig. 5-8)、その全アミノ酸配列はシーケンサーにより、CGCD と決定された。Toxin II-C-1 は明らかに C 末端ペプチドであり、C 末端アミノ酸は Asp であることが判明した。

タマイタダキイソギンチャクのペプチド毒の単離および毒性

タマイタダキイソギンチャク粗抽出液を Sephadex G-50 に供したところ、280nm で吸光度を示すピークは 4 つ認められ、サワガニ致死活性は 2 つ目と 3 つ目のピークの間 (Fr.50-58) に検出された (Fig. 5-9)。致死活性の認められた画分を集め、逆相 HPLC に供したときの溶出パターンを Fig. 5-10 に示す。得られたピークのうち、1 つのピークに致死活性が検出され、Er I と命名した。試料 5g からの Er I の収量は 62µg で、サワガニに対する LD₅₀ は 100µg/kg と測定された。

Er I のアミノ酸配列と塩基配列

単離した Er I をプロテインシーケンサーに供して N 末端部分のアミノ酸配列を調べたところ、30 残基までを次のように決定した。

```
Er I       1             10             20             30  
          A G G K S T C C P C A M C K Y T A G C P W G Q C A H H C G C
```

上のアミノ酸配列から算出した分子量は 3027.5 で、MALDI/TOF-MS で測定した Er I の分子量 3241.9 と比べると、C 末端にさらに 2 残基あることが推定された。そこで、C 末端部分のアミノ酸配列を決定するために、Toxin II と同様に Er I についても還元およびピリジルエチル化し、キモトリプシン分解を行った。キモトリプシン分解物の逆相 HPLC により Er I-C-1 と命名したペプチド断片が単離され (Fig. 5-11)、その全アミノ酸配列はシーケンサーにより、CGCSE と決定された。Er I-C-1 は明らかに C 末端ペプチドであり、N 末端アミノ酸配列で決定できなかった C 末端部の 2 残基の配列は Ser-Glu であることが判明した。

さらに Er I については cDNA クローニングを行い、全塩基配列 (462 bp) と演繹アミノ酸配列 (69 残基) を Fig. 5-12 のように決定した。3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) とポリ A 鎖が確認できたが、開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コドンが含まれていなかった。SignalP V3.0 で解析したところ、開始メチオニン以降 19 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には 17 残基からなるプロパート部が存在していた。また Er I の演繹アミノ酸配列中には、プロテインシーケンサーで決定したアミノ酸配列が含まれていたが、翻訳領域の C 末端にアミノ酸配列にはなかった Lys 残基が存在していた。タイプ 3 の Na チャネル毒の前駆体構造については Er I が初めての報告になるが、タイプ 1 と 2 の Na チャネル毒と同様に、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから成っていた。

考察

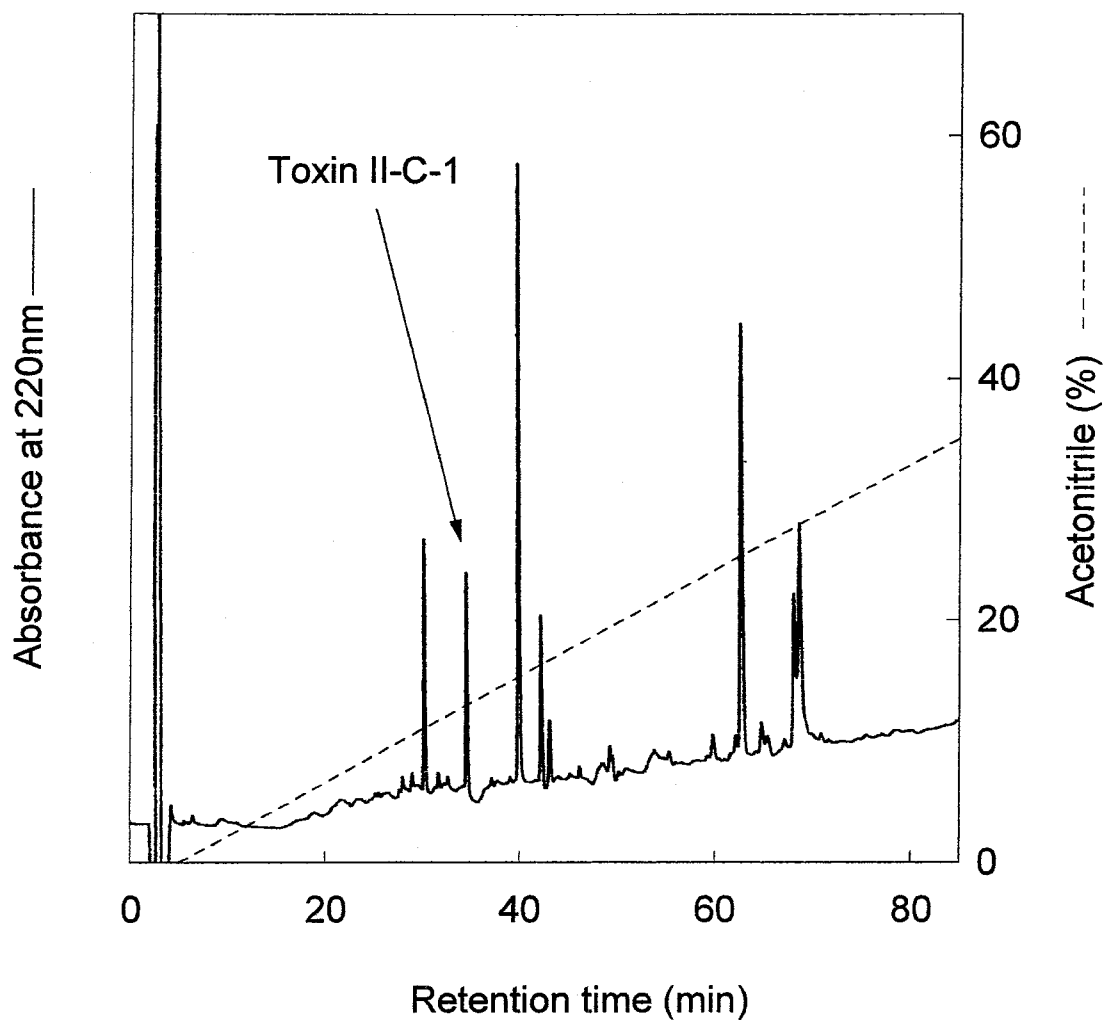


Fig. 5-8. Reverse-phase HPLC of the peptides produced by digestion of PE-Toxin II with Chymotrypsin.

Column, TSKgel ODS-120T (0.46 X 25cm); elution, gradient of acetonitrile in 0.1% TFA; flow rate, 1ml/min. One peptide (Toxin II-C-1) was subjected to sequencing.

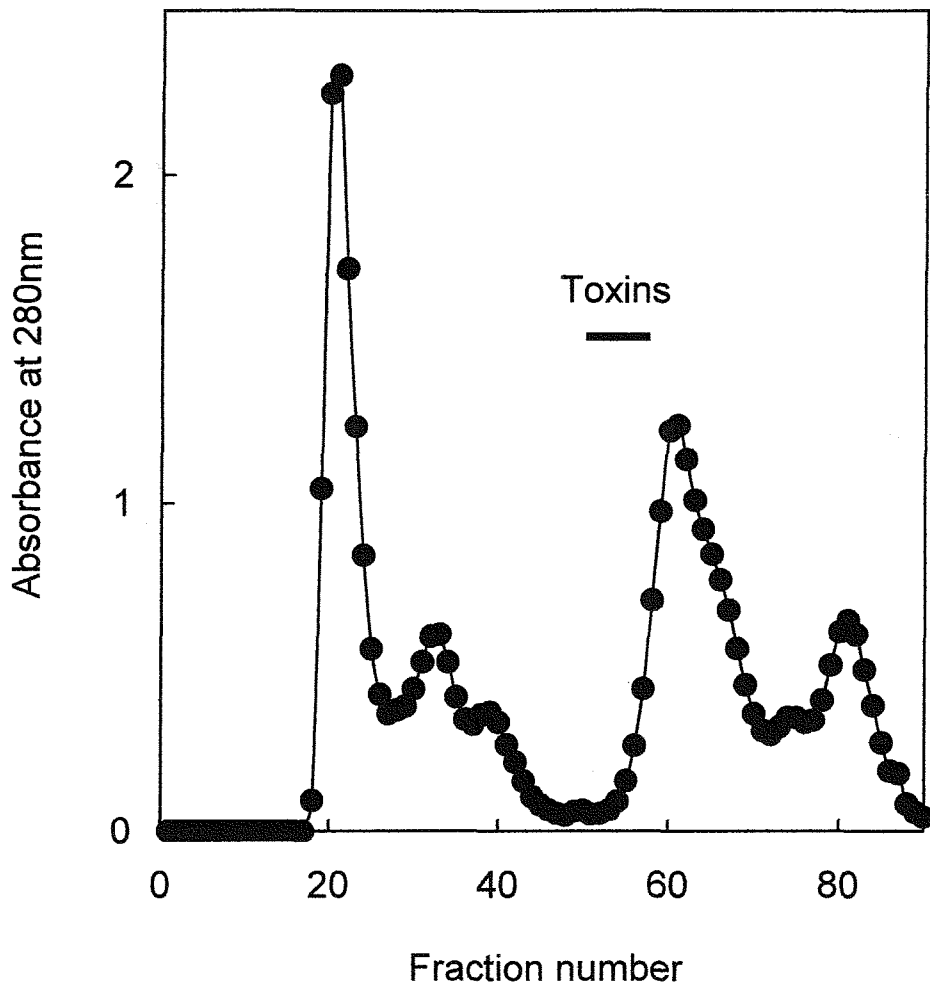


Fig. 5-9. Gel filtration on Sephadex G-50 of the crude extract from *Entacmaea ramsayi*.

The crude extract was applied to a Sephadex G-50 column (2.5×90cm), which was eluted with 0.15M NaCl in 0.01M phosphate buffer (pH 7.0). Fractions of 8ml were collected at a flow rate of 24ml/hr.

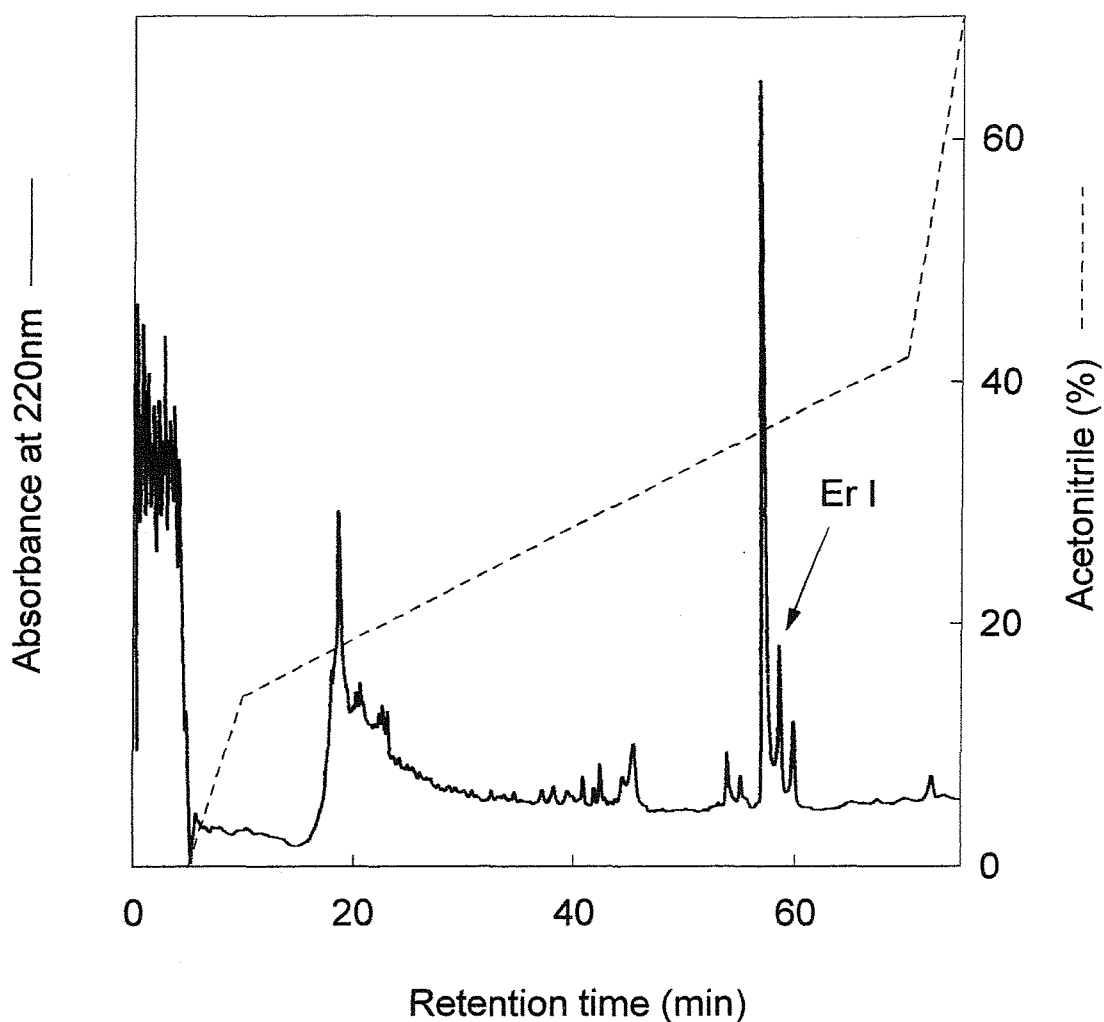


Fig. 5-10. Isolation of *Entacmaea ramsayi* toxins by reverse-phase HPLC.

The toxic fraction obtained by gel filtration on Sephadex G-50 (Fig. 5-9) was subjected to HPLC on a TSKgel ODS-120T column (0.46 X 25cm). The column was eluted with a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA. The flow rate was maintained at 1ml/min.

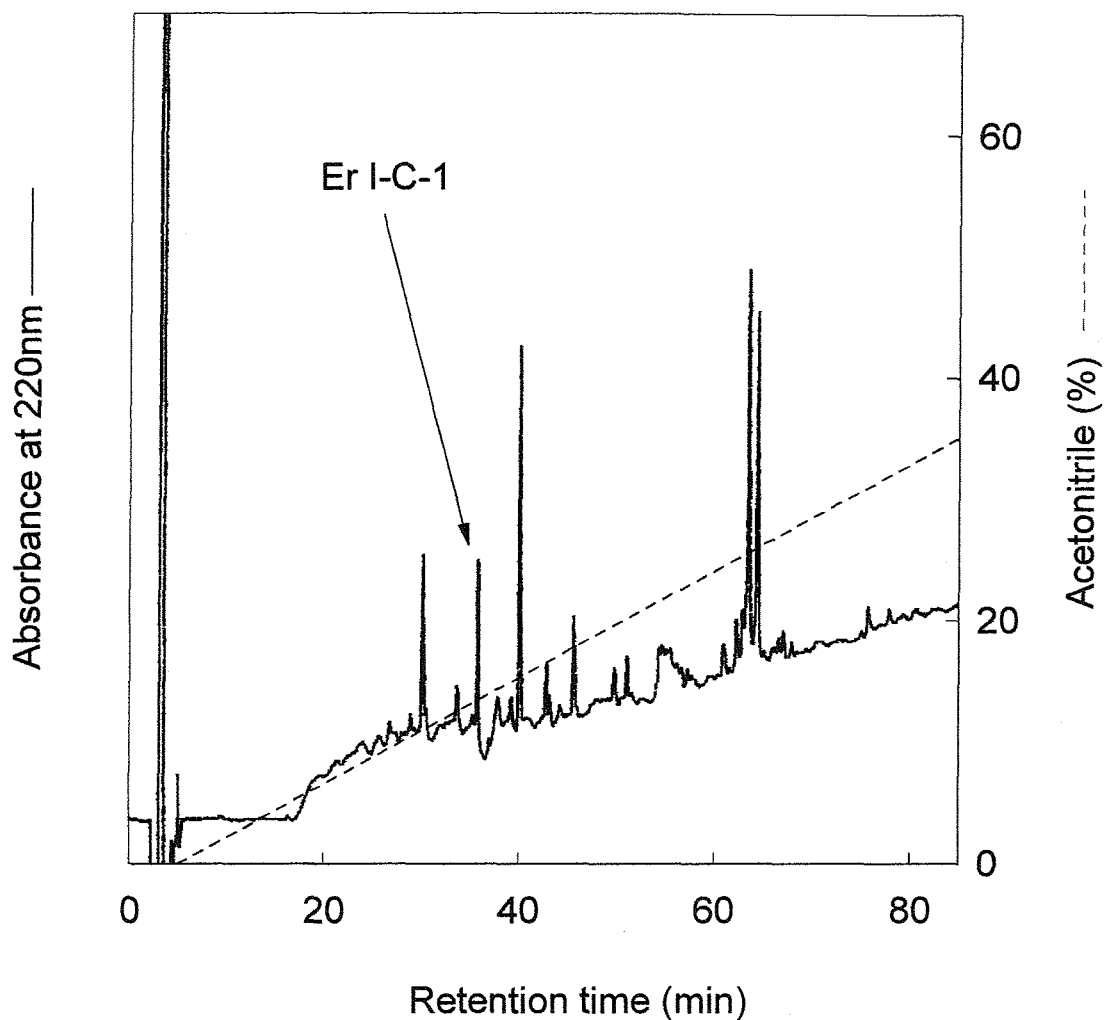


Fig. 5-11. Reverse-phase HPLC of the peptides produced by digestion of PE-Er I with Chymotrypsin.

Column, TSKgel ODS-120T. (0.46 X 25cm); elution, gradient of acetonitrile in 0.1% TFA; flow rate, 1ml/min. One peptide (Er I-C-1) was subjected to sequencing.

ATCAGTTCTCATCCAAAATCCACAAGTTGCAGTCAAAGAACATTTTACTTTCCAAGTT	59
TTATCCAGAGTGAAGATGAATCGTGTACTCTTTCTGGTGATCATCGCATCCGTCCTGGTT	119
<u> </u>	15
M N R V L F L V I I A S V L V	
CTTGCCTCAAGTGCAAAGTTCCGAAGAATGAGGAACAATTTAAGCGCTTTATGGAGAAA	179
<u> </u>	35
<u>L A S S A K V P K N E E Q F K R F M E K</u>	
AGAGCAGGAGGCAAATCAACATGTTGTCATGTGCCATGTGCAAATACACTGCTGGATGT	239
<u> </u>	55
<u>R A G G K S T C C P C A M C K Y T A G C</u>	
<u>CCCTGGGGGCAGTGTGC</u> ACACCACTGCGGCTGCAGTGAGAAATAAAAGCATCAAGTGATC	299
<u> </u>	69
<u>P W G Q C A H H C G C S E K *</u>	
<u>CTTACGTCTGCATATCATAAG</u> ATATTTAGCAGAGTTTTAAACGGAGTTCAGTTAATAATA	359
AGTTAAACTAGTATTGCTAACTTGTATTAAGAATGATCTATGTTCTTGATCAGTTGCTAA	419
AAAATTAAGAATAAAAAGATATTTAAAAGCAAAAAAAAAAAAAA	462

Fig. 5-12. Nucleotide sequence of the cDNA encoding Er I. The complete gene sequence of Er I and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisk indicates an in-frame stop codon (TAA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The propart is doubly underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

スナイソギンチャクとタマイタダキ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、Sephadex G-50 および逆相 HPLC により 3 成分のペプチド毒 (Toxin I と II および Er I) を単離することができた。スナイソギンチャクの Toxin I については、その部分アミノ酸配列からタイプ 1 の Na チャネル毒であることが判明した。一方、Toxin II は 2 成分 (Da I、Da II) の混合物であったが、2 成分の量比に大きな差があることが幸いし、N 末端配列分析、キモトリプシン分解ペプチドの配列分析および MALDI/TOFMS 分析により両成分の全アミノ酸配列を決定することができた。同様の方法を用いて、タマイタダキイソギンチャクの Er I についても全アミノ酸配列を決定することができた。

Da I、II および Er I のアミノ酸配列は、Fig. 5-13 にみられるように、サンゴイソギンチャク *Entacmaea actinostoloides* からすでに単離されているタイプ 3 の Na チャネル毒 PaTX と高い相同性が認められた。イソギンチャクの Na チャネル毒は、アミノ酸配列の相同性に基づいて Norton (1991) によりタイプ 1-3 に分けられている。タイプ 1 および 2 に属する Na チャネル毒はすでに数多く単離されているが、タイプ 3 に属する Na チャネル毒としては PaTX と *Anemonia sulcata* から単離されている ATX III の 2 成分しか知られていない。しかも、PaTX と ATX III は、高次構造にとって重要な Cys の数も前者では 8、後者では 6 というように違いがあり、配列相同性もかなりのギャップを挿入してはじめて高くなる (Fig. 5-13)。Norton (1991) も、タイプ 1、2 とは異なる 2 成分を便宜上タイプ 3 とし、今後の検討の余地があると述べている。本研究により、スナイソギンチャクとタマイタダキイソギンチャクから相次いで PaTX 類似毒が発見され、タイプ 3 に分類された毒成分のうち、少なくとも PaTX 型はサンゴイソギンチャクにのみ存在する特殊な毒ではなく、1 つのファミリーを形成することが明らかになった。現段階では、イソギンチャクの Na チャネル毒はタイプ 1、タイプ 2、PaTX ファミリーの 3 つに大きく分類するべきで、ATX III については別個に考える必要があるだろう。

PaTX ファミリーは本研究で単離した毒成分を含めて、まだ 4 成分しか知られていないが、今までに調べられてきたイソギンチャクの多くが、ウメボシイソギンチャク科とハタゴイソギンチャク科であったことから考えると、まだ調べられていない科にも PaTX ファミリーが存在している可能性が十分に考えられる。PaTX ファミリーの分布とイソギンチャクの分類との関連は今後の検討課題である。また、PaTX ファミリーのサワガニに対する毒性は、タイプ 1 や 2 の毒と比べて明らかに弱かった (Table 5-1 参照)。本研究ではサワガニに対する毒性しか調べていないが、イソギンチャクは甲殻類だけではなく、小魚なども餌動物としている。そこで、魚毒性の点では PaTX ファミリーの方が、タイプ 1 や 2 の毒よりも強いということがあるかもしれない。PaTX ファミリーのサワガニ以外の生物に対する毒性試験も行う必要があるだろう。

一方、Er I の前駆体構造は興味深いことに、タイプ 1 や 2 の Na チャネル毒の前駆体と同じく、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから成っていた。このことから、PaTX ファミリーもタイプ 1 や 2 の毒と同様に刺胞に存在し、同じ合成機構を辿ると考えられた。Er I 前駆体の翻訳領域の C 末端にはアミノ酸配列にはなかった Lys 残基が存在していたが、MALDI/TOFMS 分析で測定した分子量から判断して、翻訳後のプロセッシングによって切断されるものと推定された。

イソギンチャクの Na チャネル毒の Na チャネルに対する作用機構、構造活性相関などといった詳細な研究は、すべてタイプ 1 あるいは 2 の毒で行われてきた。その研究成果の

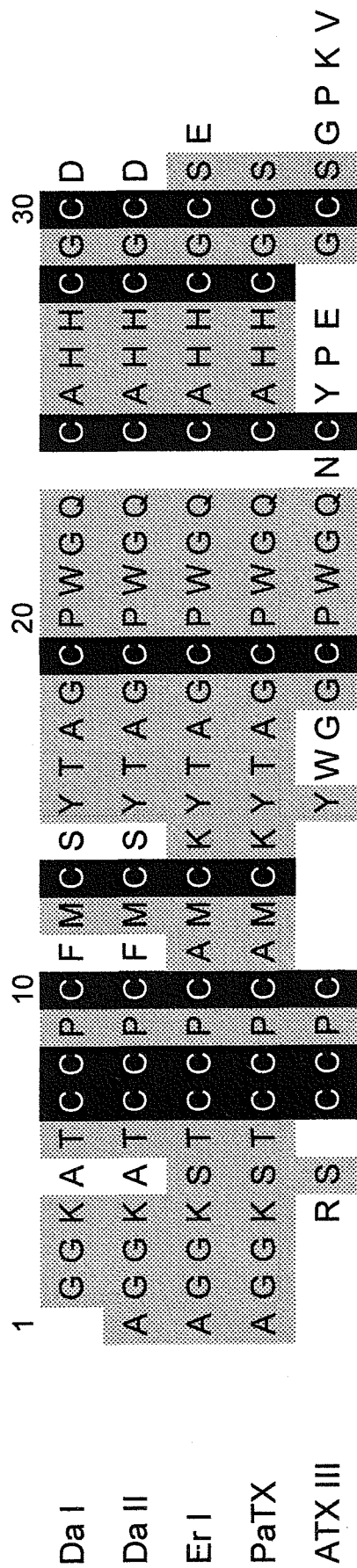


Fig. 5-13. Alignment of the complete amino acid sequences of Da I, Da II and Er I with those of type 3 Na channel toxins (PaTX and ATX III).

Based on the sequence of PaTX, identical residues are shaded and cysteine residues are shown in white on the black background.

PaTX from *Entacmaea actinostoloides*; ATX III from *Anemonia sulcata*.

結果、一部のタイプ1あるいは2のNaチャンネル毒は市販され、貴重なNaチャンネル試薬として世界中の研究室で有効利用されている。タイプ3の毒も有効利用の可能性はあるが、例が少ないためか単離後の詳細な研究は行われていない。本研究により、PaTX型の毒はイソギンチャクのNaチャンネル毒として1つのファミリーを形成することが示された。さらに、Er1の前駆体構造が明らかになったことで、構造活性相関の解明を目的とした遺伝子工学的的手法による発現実験にも道が拓けた。イソギンチャクのPaTXファミリーの有効利用に向けた研究が今後進展することを期待したい。

第6章 ミナミウメボシイソギンチャクのペプチド毒の cDNA クローニング

ミナミウメボシイソギンチャク *Anemonia erythraea* (Fig. 6-1) はイマイソギンチャク亜目 (Nynantheae) ウメボシイソギンチャク科 (Actinidae) に属し、東海地方から広く暖海、特にサンゴ礁の浅海に分布している。体壁の直径は 2-5cm、色彩は暗赤色のものから褐色のものまでである。周口筋および足盤筋の発達が悪いいため、刺激しても口を完全に閉じることはなく、また足盤を簡単にはがすことができる。

筆者の所属する研究室では、ミナミウメボシイソギンチャクの粗抽出液からサワガニに対する毒性を指標に 3 成分のペプチド毒 AETX I-III が単離されている (Shiomi *et al.*, 1997)。AETX I (LD_{50} 2.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) はそのアミノ酸配列の特徴から、タイプ 1 の Na チャネル毒と判断された。一方、サワガニに非常に強い致死活性を示す AETX II (LD_{50} 0.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と AETX III (LD_{50} 0.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$) はお互いにきわめて高い相同性を示したが、既知のイソギンチャクのペプチド毒とは構造的にまったく異なる新規ペプチド毒であった。このようにミナミウメボシイソギンチャクのペプチド毒は、いずれもサワガニに対する毒性が非常に強いので、構造活性相関を調べるのに十分な活性を維持したまま、大腸菌で発現できると考えられた。そこで本章では、今後の構造活性相関の解明に向けた大腸菌での発現実験に資することを目的として AETX I-III の cDNA クローニングを行った。

実験方法

試料

2003 年 6 月に神奈川県長者ヶ崎で採集したミナミウメボシイソギンチャク数個体を試料とした。生きたまま養の目状に切り取り、液体窒素で凍結後、実験に使用するまで -80°C で冷凍保存した。

cDNA クローニング法

凍結試料約 1g から TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。第 2 章で述べたように、3'RACE は 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends キット (Invitrogen) を用いて total RNA (5 μg) から合成した 1st strand cDNA に対して、AETX I-III のアミノ酸配列をもとに設計した degenerate プライマー (AETX I では 5'-CIC CIT GYY TIT GYG CIA AYW SIG G-3' と 5'-GGI CCI AAY ACI MGI GGI AAY GAY YT-3'、AETX II と III では 5'-GAR TGY TGY CCI WSI GGI AAR CA-3' と 5'-GYG ARG GIG GIT TYG TIC AYT AYT G-3') でそれぞれ行った。PCR 増幅は Ex Taq ポリメラーゼ (Takara) を用いて、条件は $94^{\circ}\text{C}5\text{min}$; $94^{\circ}\text{C}30\text{sec}$ 、 $55^{\circ}\text{C}30\text{sec}$ 、 $72^{\circ}\text{C}1\text{min}$ を 35 サイクル; $72^{\circ}\text{C}5\text{min}$ とした。5'RACE では、5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) キットと gene-specific プライマー (AETX I では 5'-CGA CCA TAG CCC TAC CAT G -3'、AETX II と III では 5'-GCC TTC CAG CAG TAG CAT G-3') を用いて total RNA (5 μg) から 1st strand cDNA を合成し、gene-specific プライマー (AETX I では 5'-GCA GCC AAA CAC CCA GAC A-3' と 5'-ATC CCA TTT AAG TCA TTC CCC-3'、AETX II と III では 5'-TCC CAA AAC CGA GAA ATC CG-3' と 5'-CTC ATG TAC CTA TCG TTC GG-3') を用いる PCR に供した。PCR



Fig. 6-1. ミナミウメボシイソギンチャク *Anemonia erythraea*

(イソギンチャクガイドブック、2001 より)

は 3'RACE と同じ条件で行った。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 Cy5 ThermoSequenase Dye Terminator Kit (Amersham Bioscience) に従って反応させ、Long-Read Tower DNA シークエンサー (Amersham Bioscience) により解析した。最後に、3'RACE と 5'RACE で決定した塩基配列をもとに設計した 5'末端側と 3'末端側プライマー (AETX I では 5'-CAT TCA ACA TCA AGC AGT GCA-3' と 5'-GCT GGT TAT CAG TTT TTA TTG AA-3'、AETX II と III では 5'-CAG AGT GTT TCA ACT GTT TGC-3' と 5'-GCT TTA TCC GGC TTT ACT TAA T-3') で RT-PCR を行い、全塩基配列を確認した。

結果

AETX I の塩基配列と前駆体構造

N 末端アミノ酸配列分析とペプチド毒の酵素分解物のアミノ酸配列分析によって、すでに決定している AETX I の全アミノ酸配列を Fig. 6-2 に示した。AETX I は、既知のイソギンチャク毒と比べてタイプ 1 の Na チャネル毒に属すると判断された。

AETX I をコードする cDNA の全塩基配列 (402 bp) は、3'RACE 法と 5'RACE 法によって Fig. 6-3 のように決定した。3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) とポリ A 鎖が確認できたが、開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コドンが含まれていなかった。AETX I の前駆体は 74 残基から成っていた。SignalP V3.0 (Center for Biological Sequence Analysis, Denmark) で解析したところ、開始メチオニン以降 19 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には 10 残基からなるプロパート部が存在していた。AETX I の成熟ペプチドの演繹アミノ酸配列は、既知の全アミノ酸配列と比べて 2 残基の違いが認められた。すなわち、3 残基目の Pro が演繹アミノ酸配列では Ala に、46 残基目の Glu が演繹アミノ酸配列では Arg に変異していた。

AETX II と III の塩基配列と前駆体構造

N 末端アミノ酸配列分析とペプチド毒の酵素分解物のアミノ酸配列分析によって、すでに決定している AETX II と III の全アミノ酸配列を Fig. 6-4 に示した。AETX II と III の配列をデータベースで検索した結果、ブラジル産のクモ *Phoneutria nigriventer* の神経毒 Tx1 (Diniz *et al.*, 1990) と最も高い相同性を示したが、それでも相同性は約 36%程度でしかなかった。

AETX II をコードする cDNA の全塩基配列 (538 bp) は、3'RACE 法と 5'RACE 法によって Fig. 6-5 のように決定した。開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コドン (TAA) が含まれていた。3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) はなかったが、ポリ A 鎖を確認できた。AETX II の前駆体は 86 残基からなり、既知の全アミノ酸配列が含まれていた。SignalP V3.0 で解析したところ、開始メチオニン以降 20 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には 7 残基からなるプロパート部が存在していた。

一方、AETX III をコードする cDNA の全塩基配列 (559 bp) は、3'RACE 法と 5'RACE 法によって Fig. 6-6 のように決定した。AETX II と同様に、開始メチオニンの手前の 5'非

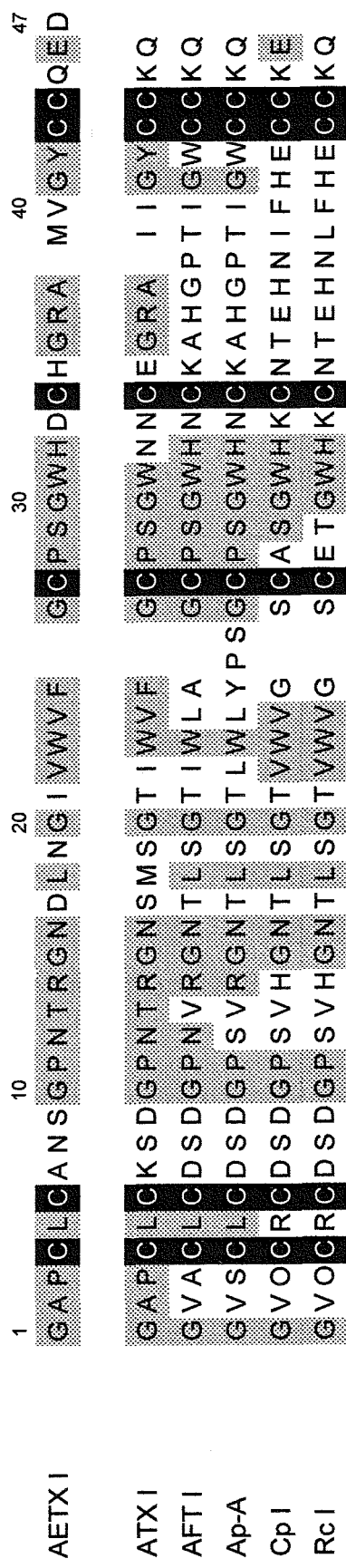


Fig. 6-2. Alignment of the complete amino acid sequence of AETX I with those of type 1 Na channel toxins.

ATX I from *Anemonia sulcata*; AFT I from *Anthopleura fuscoviridis*; Ap-A from *Anthopleura xanthogrammica*; Cp I from *Condylactis passiflora*; Rc I from *Radianthus (Heteractis) crispus*.
 The residues identical with AETX I are shaded. Cysteine residues are shown in white on a black background.

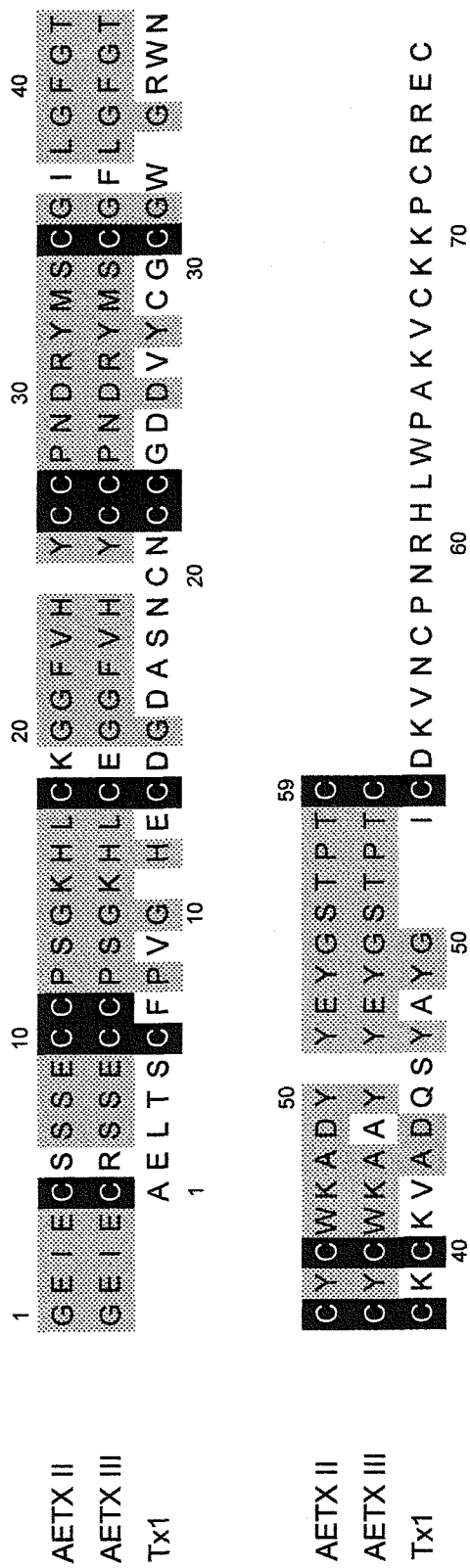


Fig. 6-4. Alignment of the complete amino acid sequences of AETX II and III with neurotoxin Tx1 from the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*.

The residues identical with AETX II or III are shaded. Cysteine residues are shown in white on a black background.

ATCAGAGTGTTC	CAACTGTTTGCTTAAAGTGGTACTTGTCAAGCTTAGCAAGTTATCTAA	60
	*	
CTTCGTGGTTTT	CCGAGGATATCACTGACATTGAAAATGGCCAGTAAGATGATTGCTGTT	120
	<u>M A S K M I A V</u>	8
TTCGTCATAATGTTG	ACCCAACATCTCATATTTGCAGATGATGCCAAGACGAAACGTGGC	180
<u>F V I M L T Q H L I F A</u>	<u>D D A K T K R G</u>	28
GAAATCGAGTGCAGTT	CGTCTGAGTGTGTCCCTCGGGAAAGCACTTATGCAAGGGAGGG	240
E I E C S S S E C C P S G K H L C K G G		48
TTTGTCCACTACTG	TTTGTCCGAACGATAGGTACATGAGTTGCGGAATTCTCGGTTTTGGG	300
F V H Y C C P N D R Y M S C G I L G F G		68
ACATGCTACTGCTGGAAGGC	AGATTATTACGAGTATGGTTCAACTCCCACCTTGTTGAACC	360
T C Y C W K A D Y Y E Y G S T P T C *		86
GTTTCAAGGTTGTAAT	CATACCTTCAAATAACGTATTAATGTCAAAGCAAATCTCTGGG	420
GTTTTAATCTCATTAA	TGTCATCTGTCTCGTGCATGATGGATTTTTAAATATGAAATTT	480
AAGGGTTAGGAAATTA	AGTAAAGCCGGATAAAGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	538

Fig. 6-5. Nucleotide sequence of the cDNA encoding AETX II. The complete gene sequence of AETX II and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisks indicate in-frame stop codons (TAA and TGA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence is underlined. The propeptide is doubly underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

ATCAGAGTGTTTCAACTGTTTGCTTAAAGTGGTACTTGTCAAGCTTAGCAAGTTATCTAA	60
	*
CTTCGTGGTTTTCCGAGGATATCACTGACATTGAAAATGGCCAGTAAGATGATTGCTGTT	120
<u>M A S K M I A V</u>	8
TTCGTCATAATGTTGACCCAACATCTCATATTTGCAGATGATGCCAAGACGAAACGTGGC	180
<u>F V I M L T Q H L I F A D D A K T K R G</u>	28
GAAATCGAGTGCAGGTCGTCTGAGTGTGTCCCTCGGGAAAGCACTTATGCGAGGGAGGG	240
E I E C R S S E C C P S G K H L C E G G	48
TTTGTCCACTACTGTTGTCCGAACGATAGGTACATGAGTTGCGGATTTCTCGGTTTTGGG	300
F V H Y C C P N D R Y M S C G F L G F G	68
ACATGCTACTGCTGGAAGGCAGCTTATTACGAGTATGGTTCAACTCCCACCTTGTTGAATC	360
T C Y C W K A A Y Y E Y G S T P T C *	86
GTTTCAAGGTTGTAATCATGCCTTCAAATGACACGTGGATATATAGAATAACGTATTAAT	420
GTCAAAGCAAAATCTCTGGGGTTTTAATCTCATTAAATGTCATCTGTCTCGTACATGATGG	480
ATTTTTAAAATATGAAATTTAAGGGATTAGGAAATTAAGTAAAGCCGGATAAAGCTAAAA	540
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	559

Fig. 6-6. Nucleotide sequence of the cDNA encoding AETX III. The complete gene sequence of AETX III and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisks indicate in-frame stop codons (TAA and TGA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence is underlined. The propeptide is doubly underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

翻訳領域には停止コドン (TAA) が含まれていた。また、3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) はなかったが、ポリ A 鎖を確認できた。AETX III の前駆体は 86 残基からなり、既知の全アミノ酸配列が含まれていた。SignalP V3.0 解析により、開始メチオニン以降 20 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には 7 残基からなるプロパート部が存在していた。

AETX II と III の全塩基配列を比較すると、5'非翻訳領域、シグナルペプチドとプロパート部領域では完全に一致し、成熟ペプチド領域でも、コードするアミノ酸が異なる箇所を除いて完全に一致していた。しかしながら、3'非翻訳領域では若干の違いが認められ、AETX III の方が 30 bp ほど長かった。

考察

ミナミウメボシ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、すでに単離されている 3 成分のペプチド毒 AETX I-III の cDNA クローニングを行った。

3'RACE 法と 5'RACE 法による cDNA クローニングによって AETX I-III の前駆体構造を解明することができた。AETX I の前駆体構造は、第 2 章で述べたハタゴイソギンチャクのタイプ 1 の Na チャネル毒である gigantoxin II と同様に、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドからなり、また翻訳領域の C 末端には Gly 残基の付加がなかった。AETX I の演繹アミノ酸配列は、既知のアミノ酸配列と比べて 3 残基目の Pro が Ala に、46 残基目の Glu が Arg に変異していた。第 3 章で述べたイボハタゴイソギンチャクの SHTX I と II においても演繹アミノ酸配列に変異が認められた。イボハタゴイソギンチャクの場合、ペプチド毒の単離に用いた個体は沖縄産で、cDNA クローニングに用いた個体は外国産であったことから生息環境の違いによるアミノ酸の変異が考えられた。同様の可能性は AETX I についても当てはまると考えられる。すなわち、以前にペプチド毒の単離に用いたミナミウメボシイソギンチャクは千葉県沖ノ島産であるのに対して、本研究の cDNA クローニングに用いた個体は神奈川県長者ヶ崎産であった。同じ東京湾内の沖ノ島と長者ヶ崎といった非常に狭い範囲で、アミノ酸残基に変異がみられたことは興味深い。また、ミナミウメボシイソギンチャクがもつ 3 成分のペプチド毒の組成は産地によって多少異なることが判明している (銭、1995)。イソギンチャクの毒に関して、アミノ酸残基の変異や毒の組成の違いが何に起因するかは、これまでに全く検討されていない。ミナミウメボシイソギンチャクはこの点を研究するのに、格好のターゲットとなり得るだろう。

次に AETX II と III についても、その前駆体構造はシグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドからなり、プロパート部の末端は塩基性アミノ酸対 (Lys-Arg) で終わっていた。このことから、第 2 章のハタゴイソギンチャクの gigantoxin I-III と同様に、AETX II と III も刺胞由来の毒であると考えられる。また AETX II と III の塩基配列は、5'非翻訳領域、シグナルペプチド、プロパート部はお互いに完全に一致し、成熟ペプチド領域でも、コードするアミノ酸が異なる箇所を除いて一致していたが、3'非翻訳領域では若干の違いが認められ、AETX III の方が 30 bp ほど長かった。サワガニに対する致死活性の点から判断すれば、AETX III (LD_{50} 0.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の方が AETX II (LD_{50} 0.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と比べてわずかに強いので、AETX II が分子進化して AETX III になったと考えられる。3'非翻訳領域の違いが、

この分子進化の痕跡を残しているのかもしれない。一方、AETX II と III の一次構造と相同性を示したブラジル産のクモ *Phoneutria nigriventer* の神経毒 Tx1 の全塩基配列は 676 bp (ポリ A 鎖を除く) で、その前駆体は 112 残基からなっていた (Diniz *et al.*, 1993)。前駆体の構造は AETX II と III 同様、シグナルペプチド (18 残基)、プロパート部 (15 残基)、成熟ペプチド (77 残基) からなり、プロパート部は Glu を多く含み (5 残基)、翻訳領域の C 末端には 2 残基の Gly の付加がある。このように AETX II、III と Tx1 の前駆体構造はよく一致していることから、それらの翻訳後修飾の過程も同じと推定される。分類学上、また生息環境や生活様式の上からも、まったく異なるイソギンチャクとクモが、構造的に類似した毒を作り出し、その前駆体構造も似ていたことは非常に興味深い。これまでにイソギンチャクの毒に関しては、他の生物由来の毒との間で網羅的な比較は行われていない。この結果を踏まえて、海洋動物と陸上動物の違いに関係なく一度検討する必要があるだろう。

第7章 ムラサキハナギンチャクのペプチド毒の単離と cDNA クローニング

ムラサキハナギンチャク *Cerianthus filiformis* (Fig. 7-1) はハナギンチャク目 (Ceriantharia) ハナギンチャク科 (Cerianthidae) に属する日本の特産種で、本州中部から九州に分布している。非常に多くの細長い触手をもつ大型種で、内湾性の泥底から砂泥底に見られ、潮間帯から水深 30m 位のところに生息している。色彩変異に富むが、基本色は紫色である。また体壁から多量の粘液を分泌し、砂泥を粘着させて棲管をつくり、その中にすむ。その棲管にはしばしばホウキムシが共生している。

第1章において、ムラサキハナギンチャクはサワガニに対して致死活性を示した。ムラサキハナギンチャクは、これまでの章で述べてきたイソギンチャク目イマイソギンチャク亜目のイソギンチャクとは分類上、目のレベルで大きく異なっている。またハナギンチャク類がもつ毒成分については、世界的にみても調べられていない。このような背景から、ムラサキハナギンチャクには従来のイソギンチャク毒とは異なる毒成分の存在が予想された。そこで、本章ではムラサキハナギンチャクからペプチド毒を単離し、そのアミノ酸配列と生物活性の解明を試みた。

実験方法

試料

ペプチド毒の単離には、2000年2月に伊豆中央水産(静岡県)から購入したムラサキハナギンチャク(62g)を試料とした。実験に使用するまで -20°C で凍結保存した。RNAの抽出には、2004年12月にブルーコーナージャパン(静岡県)から購入したムラサキハナギンチャク(505g、静岡県大瀬崎産)の一部を試料とした。生きたまま養の目状に切り取り、液体窒素で凍結後、実験に使用するまで -80°C で冷凍保存した。

粗抽出液の調製方法

凍結試料をホモジナイズし、得られたホモジネートから5gを秤り取り、イオン交換水25mlを加えて再びホモジナイズした。その後、冷却遠心分離($18800\times g$, 4°C , 15min)し、得られた上清を粗抽出液とした。

ペプチド毒の単離方法

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Sephadex G-50カラム($2.5\times 90\text{cm}$; Amersham Bioscience)に供した。同緩衝液を用いて流速28ml/hrで溶出し、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、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルター(DISMIC-25cs; 東洋濾紙)でろ過後、TSKgel ODS-120Tカラム($0.46\times 25\text{cm}$; 東ソー)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(最初の5minは0-14%、その後60minは14-42%)により流速1ml/minで毒成分を溶出した。ペプチドはUV検出器を用いて

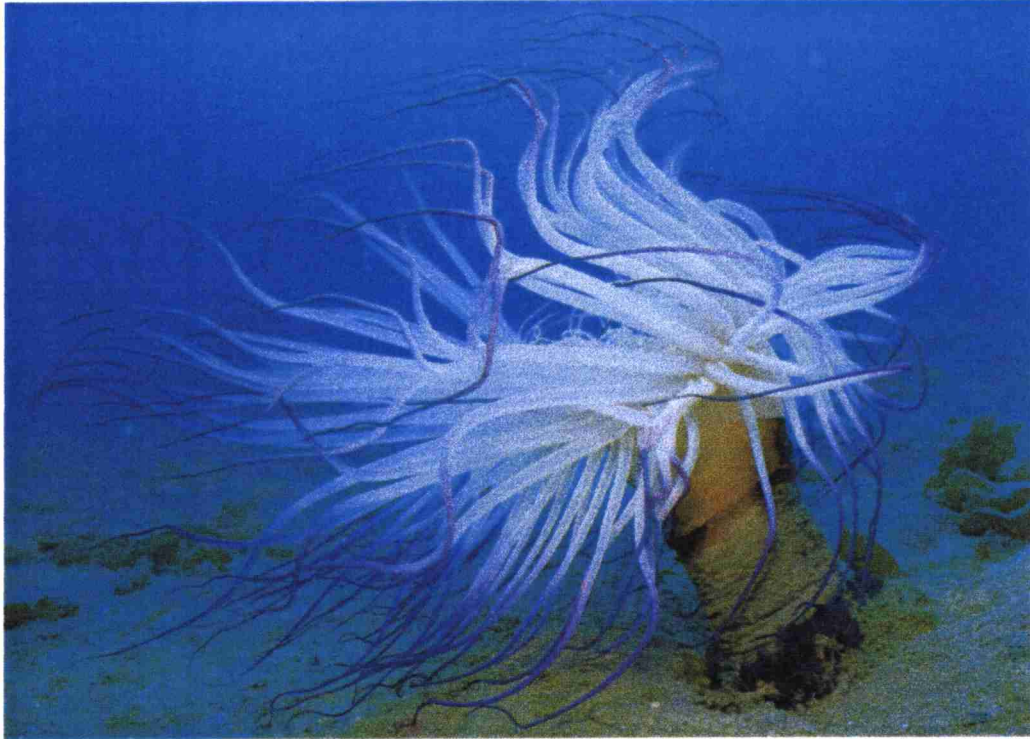


Fig. 7-1. ムラサキハナギンチャク *Cerianthus filiformis*

(週刊朝日百科 動物たちの地球 62、1992 より)

220nm の吸光度で検出した。毒成分に対応する溶出液を集めて凍結乾燥し、必要な溶媒に溶解してその後の実験に用いた。

毒性の測定方法

サワガニに対する毒性試験は、第 2 章で述べた方法に従って行った。

ペプチド毒の分析方法

第 2 章で述べたように、タンパク質の定量は Lowry *et al.* (1951) の方法で、分子量の測定はレーザーイオン化-飛行時間型質量分析法 (MALDI/TOFMS 法) で、アミノ酸配列分析はエドマン分解法に基づいた気相式シーケンサーを用いて行った。

cDNA クローニング法

凍結試料約 1g から TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。第 2 章で述べたように、3'RACE は 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends キット (Invitrogen) を用いて total RNA (5 μ g) から合成した 1st strand cDNA に対して、Cf I のアミノ酸配列をもとに設計した degenerate プライマー (5'-GTI ACI TGY CCI GAY GGI WSI CAR T-3' と 5'-CAR TGY CCI GAY WSI WSI ACI TGY T-3') で行った。PCR 増幅は Ex Taq ポリメラーゼ (Takara) を用いて、条件は 94 $^{\circ}$ C5min ; 94 $^{\circ}$ C30sec、55 $^{\circ}$ C30sec、72 $^{\circ}$ C1min を 35 サイクル ; 72 $^{\circ}$ C5min とした。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 Cy5 ThermoSequenase Dye Terminator Kit (Amersham Bioscience) に従って反応させ、Long-Read Tower DNA シーケンサー (Amersham Bioscience) により解析した。

結果

ペプチド毒の単離および毒性

粗抽出液を Sephadex G-50 に供したところ、280nm で吸光度を示すピークは 4 つ認められ、サワガニ致死活性は void ボリューム付近の 1 つ目のピークから 2 つ目のピークの間 (Fr. 22-42) に検出された (Fig. 7-2)。致死活性の認められた画分を集め、逆相 HPLC に供したときの溶出パターンを Fig. 7-3 に示す。得られたピークのうち、保持時間 30min のピークに麻痺活性が認められ、この毒成分を Cf I と命名したが、致死活性を示すピークは認められなかった。試料 5g からの Cf I の収量は 109 μ g で、サワガニに対する麻痺活性の ED₅₀ は 1380 μ g/kg であった。

Cf I の部分アミノ酸配列と部分塩基配列

単離したペプチド毒のアミノ酸配列分析により、Cf I の N 末端アミノ酸配列を 37 残基目まで決定することができた (Fig. 7-4)。この部分アミノ酸配列をデータベースで検索した結果、驚いたことに、増殖因子の 1 つである granulin ファミリーと高い相同性を示した。Fig. 7-4 には、比較のために各種生物由来の granulin ファミリーのアミノ酸配列を並べて示したが、Cf I の部分アミノ酸配列に含まれる Cys の数と位置は、granulin ファミリーと

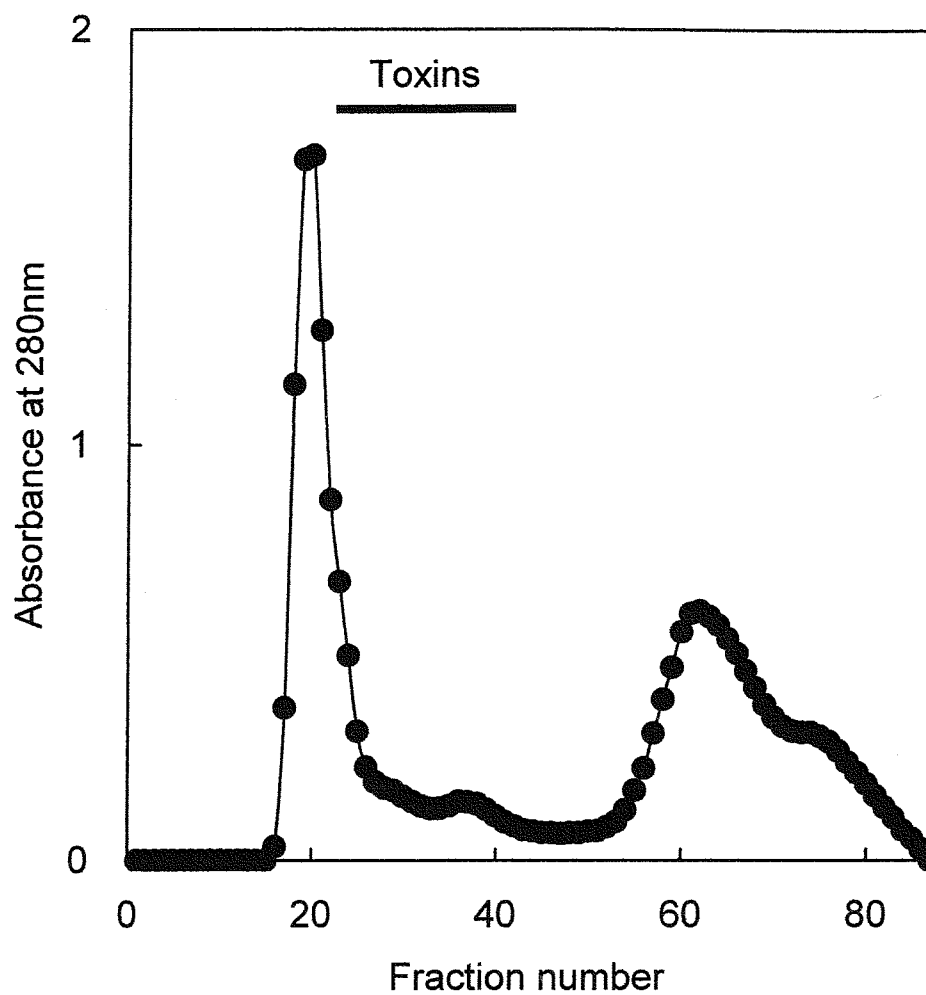


Fig. 7-2. Gel filtration on Sephadex G-50 of the crude extract from *Cerianthus filiformis*.

The crude extract was applied to a Sephadex G-50 column (2.5×90cm), which was eluted with 0.15M NaCl in 0.01M phosphate buffer (pH 7.0). Fractions of 8ml were collected at a flow rate of 28ml/hr.

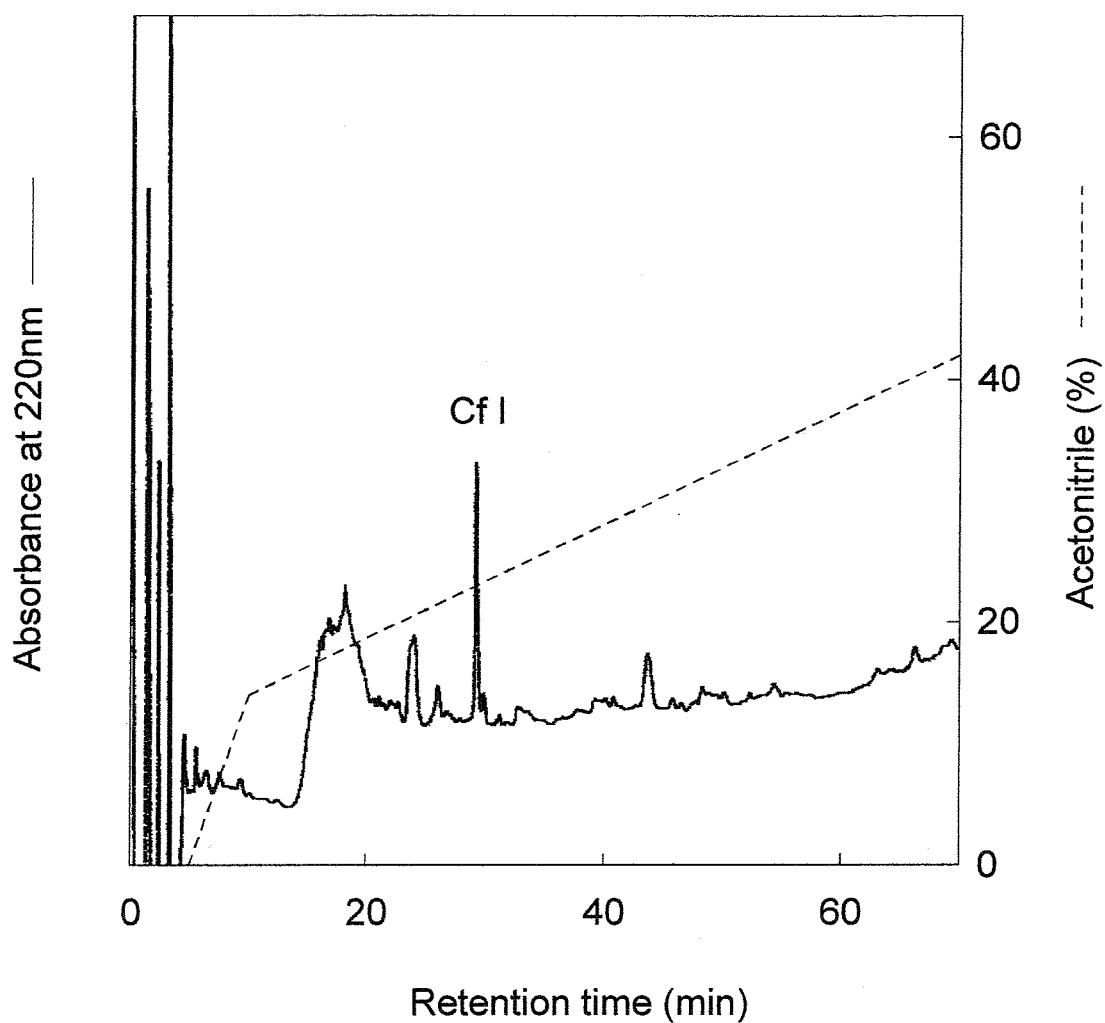


Fig. 7-3. Isolation of a *Cerianthus filiformis* toxin by reverse-phase HPLC.

The toxic fraction obtained by gel filtration on Sephadex G-50 (Fig. 7-2) was subjected to HPLC on a TSKgel ODS-120T column (0.46 X 25cm). The column was eluted with a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA. The flow rate was maintained at 1ml/min.

完全に一致していた。Cf I を MALDI/TOFMS で分析したところ、分子量は 5719.6 であったことから、まだ読みきれていないアミノ酸が十数残基あることが分かった。そこで C 末端部のアミノ酸配列を明らかにするために cDNA クローニングを行った。

Cf I をコードする cDNA の部分塩基配列 (1866 bp) は、3'RACE 法によって Fig. 7-5 のように決定した。Cf I の演繹アミノ酸配列には、プロテインシークエンサーで決定した部分アミノ酸配列と比べて 2 残基の変異があった (Fig. 7-4)。すなわち、部分アミノ酸配列の 13 残基目と 14 残基目の Ser が演繹アミノ酸配列では Arg に変異していた。また granulin ファミリーのコンセンサスを有する 7 個の granulin 様ドメインが確認された。

考察

ムラサキハナギンチャクからサワガニに対する毒性を指標にして、Sephadex G-50 および逆相 HPLC により granulin ファミリーに属するペプチド毒 Cf I を単離した。

Granulin は epithelin とも称され、比較的最近になって登場してきた増殖因子で、granulin モチーフと呼ばれる 12 個の Cys から成る特徴的なアミノ酸配列を有する (Bateman *et al.*, 1998)。Granulin は EGF (上皮増殖因子) や TGF- α (トランスフォーミング増殖因子) と似た作用を示すが、EGF レセプターには結合しない点で区別される。これまでに哺乳類、魚類、軟体動物、昆虫など多様な生物から単離されており、種を越えて重要な働きを担っていると考えられている。Granulin は増殖因子としての機能以外にも、極めて多彩な生理活性を有する。例えば、ヒルから単離された granulin 様ペプチドはトロンピン阻害活性を示し (Hong *et al.*, 1999)、ウマから単離された granulin E は抗菌活性を示す (Couto *et al.*, 1992)。また、腫瘍細胞に対する増殖抑制効果も報告されている (Shoyab *et al.*, 1990; Culouscou *et al.*, 1993)。

これまでに知られている granulin ファミリーの中で、刺胞動物から単離された Cf I が最も原始的な生物由来の granulin である (Fig. 7-4)。また、第 2 章で述べたハタゴイソギンチャクの EGF 様ペプチド毒 gigantoxin I に続いて、ハナギンチャク類から granulin 様ペプチド毒が単離されたことは非常に興味深い。約 600 残基から成るヒトやラットの granulin 前駆体は EGF 前駆体と同様に、7 個の構造の異なる granulin 様ドメインの繰り返しを有し、翻訳後のプロセッシングによって個々の分泌型 granulin となる (Bhandari *et al.*, 1992; Plowman *et al.*, 1992; Bhandari *et al.*, 1993)。一方、Cf I の部分塩基配列には、Cf I を含めてすでに 8 個の構造の異なる granulin 様ドメインの繰り返しが確認されたことから、哺乳類由来の granulin 前駆体と比べて大きな構造をしていると予想される。未解明の 5'側の塩基配列で、プロテインシークエンサーで決定した Cf I の部分アミノ酸配列をコードしている可能性も十分に考えられる。いずれにしても、Cf I 前駆体構造の解明は、granulin ファミリーの分子進化の考察にきわめて重要な知見を提供することから、早急な解明が望まれる。

また現時点で、Cf I がサワガニに麻痺を引き起こす作用機構は不明であるが、これまでに報告がある granulin ファミリーの多彩な生理活性から考えると、ムラサキハナギンチャクが Cf I を増殖因子としてではなく、ハタゴイソギンチャクの gigantoxin I の例と同様に、餌動物を麻痺させるための毒として発現していることも考えられる。Cf I の増殖因子とし

<u>CAGTCCCGGATAGCAGGACCTCCGTTTATCAAGTCAAGGAGGTTATGGATGCTGTCCATTACCTCAGGCTGTTTGTGTAGCGATGGA</u>	90
<u>Q C P D R R T C C L S S Q G G Y G C C P L P Q A V C C S D G</u>	30
GTTCAATTGTTGCTCCTGCAGGATACACATGTGATGTTGCTCAAGGAAAAATGTAACAAAGAAAACAGAATGGTTGCAATTGTTCTGAAGCTG	180
<u>V H C C P A G Y T C D V A Q G K C N K</u> E N R M V A I V L K L	60
CCATCATTGTCAAACATAGACTATCTCTGATGAAACAAATTTGGGGTGGTGAATCGTAGAATGTCCTGATCAGAAATCAGCTTGTC	270
<u>P S L S N Y R L S L M K Q I W G G G I V E C P D Q K S A C P</u>	90
GATGGGTATACATGTTGTAAGTTAAAGATGGAGGCTATGGTTGCTGTCCITTTGATTGATGCTGTGTGTTGTGCTGACCACATACATTGT	360
<u>D G Y T C C K L K D G G Y G C C P L I D A V C C A D H I H C</u>	120
TGTCCAAATGGTACCAAAATGTGATGTGCGGAAAAAATGTATTAACAAACATCATTCTCATTGTTGACCTATTCAAGTGCCTTCAGAG	450
<u>C P N G T K C D V A K K K C</u> I K K T S F S F V P I Q V P S E	150
TCAAAGAAATGCCCGATGGTTTGAGTTGTGATGGTCAGAAATCTTGTGTCGGGTAAGCTCGCCAAAGTTGGATGCTGTTTACTTAAG	540
<u>S K K C P D G L S C D G Q N S C C R V S S P K F G C C L L K</u>	180
GATGCTGTTTGTGTAATGATTTTTAAACATTGTTGCTCTAAGAACAATAAATGTAATTTGGAGAAGTTGCTTCCGAATTAGAATATTCA	630
<u>D A V C C N D F K H C C P K N Y K C N L E K L S C E L E Y S</u>	210
AGAGTTGCGTTGATAAATAAACTGAAAGTCAAAAATGCTTCTTGAAAACTGCAGTAATGTACCTGCTCCCTTAAATAGTATACGA	720
<u>R V A L I N K T E S Q K L L L V K T A R N V P A P L N S I R</u>	240
TGTCCCGATGGCACGTATTGCCAAGATTCAGCTACGTGTTGTTTATTGTTGACGGGTGTTATGGTTGCTGTCCATACAGCTCTGCTGTA	810
<u>C P D G T Y C Q D S A T C C L L L T G R Y G C C P Y S S A V</u>	270
TGCTGCTCAGACAGAATTCAGTGTGCCCTTATGGATACATATGTGACATTCAACACAACAAATGTAATCCAGGCTCAACAAAAAGTGT	900
<u>C C S D R I H C C P Y G Y I C D I Q H N K C N P G S T K S V</u>	300
CGGTACAAAATGTTCTAACTAACAAAATTTGCCCTGATGAGAAAACACACTGCTTAGACAATAACTTGTGCTGCCCTATTTAGAAAAC	990
<u>R L Q N V L T N K I C P D E K T H C L D N N T C C P I S E N</u>	330
AAATATGGTTGCTGTCTTATGAAGATGCCGAATTTGCTCTGACAACATTCATTGTTGCTCTAAAGGCTATACGTGGCAGACTCAAGCC	1080
<u>K Y G C C P Y E D A E C C S D N I H C C P K G Y T C D T Q A</u>	360
AAGAAATGCTCGTGATCCAGTCTTTTCTATGGCAACCAAAGTTACGCTTTTTTCTGCAATAGAGTGTCTGTCTGATGAATCT	1170
<u>K K C L A G S Q S F P M A T K V T S F S V N R V F C P D E S</u>	390
TCAACCTGCCCTGATGGAACAACATGTTGTAATTTGCAATCTGGAATATACGGGTGTTGTCGGCTACCTAATGCAGTTTGTGTAAGAC	1260
<u>S T C P D G T T C C K L Q S G I Y G C C P L P N A V C C E D</u>	420
CATATTCAGTGTGCCCAACAGGATATAAATGTAGCTCTAGTGAAGGAAAGTGTACAAAAGGAGATTGGCTGTTCCATTAGCAAGAAAA	1350
<u>H I H C C P T G Y K C S S S E G K C T K G D L A V P L A R K</u>	450
ACTCCAGCTCAGCTGTTACACAGAGGATCTGATGTTGATGCCAGATAACAATCATTTTGTGTTGATGGTGAGACATGTTGTTCCAATA	1440
<u>T P A Q L L H R G S V V V C P D K Q S F C F D G E T C C P I</u>	480
GCCTCTGGTGGATATGGATGTTGTTCCACTTCCAATGCTGTCTGCTGTTCCGACAAAAATCCACTGTTGTTCCAAGTGGGACAACTGCAAT	1530
<u>A S G G Y G C C P L P N A V C C S D K I H C C P S G T T C N</u>	510
TTAAGTTCTGGTACTTGTGATGATTCAGTGGGACAGCAGTGTGATGATGGTGCATTTAAGAAAGTCTCATTCAAAGCAACAGCATTCT	1620
<u>L S S G T C D D S L G T A V S L M V H L R K S H S K Q Q H S</u>	540
CCTTACAAATGCAAGGACGACAAAATTTGTGTCCTAAAGGAAGTACTTGTGTAACCTCAATGGGTACATTAGTTGTTGTAAGGAGTTAAT	1710
<u>P L Q C K D D K L C P K G S T C C N F N G Y I S C C E G V N</u>	570
AATGTTGCTGTGAGAATGGTTATTGCTGTCCTAATGGTTATGAATGTACAAGTCAAGGTGACTGCCAAATGCCGTGACCTTGTGTTTATCA	1800
<u>N V C C E N G Y C C P N G Y E C T S Q G D C Q M R D L V L S</u>	600
TTGTTTGGACGTAAACAAGGTATCCCAACAATACGAGCTGACAATCCAGCACACAAGGGAGGAGAC	1866
<u>L F G R K Q G I P T I R A D N P A H K G G D</u>	622

Fig. 7-5. Nucleotide sequence of the cDNA encoding Cf I. The partial gene sequence of Cf I and its translation product are illustrated. Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The deduced amino acid sequence corresponding to Cf I is boxed. The deduced amino acid sequences containing consensus amino acid residues of granulin/epithelins family are underlined. The primers for 3'RACE are shaded.

での活性測定や、刺胞に含まれているかの確認は今後の課題である。

一方、ムラサキハナギンチャクのサワガニ致死成分は、これまでに述べてきたイソギンチャクのペプチド毒とは異なり、逆相 HPLC で失活してしまった。Granulin ファミリーは 12 個の Cys をもつことから、強固な立体構造をとり、酸や熱に対しても非常に安定と思われる。このことから、Cf1 が逆相 HPLC による精製過程で、本来もっていた致死活性を失って、麻痺活性しか示さなかったとは考えられない。実際に、Sephadex G-50 (分画分子量 1500-30000) で認められたサワガニ致死画分 (Fr. 22-42) の前半部分は Void ボリューム付近に位置していることから、サワガニ致死成分の本体はタンパク毒であったと思われる。本研究ではタンパク毒の精製は試みなかったが、粗抽出液は溶血活性もマウス致死活性も示さなかったことから、このタンパク毒は従来のイソギンチャクの溶血毒とは考えられない。ムラサキハナギンチャクの毒成分の本体はあくまでタンパク毒で、Cf1 ではなかったが、これまでに一度も顧みられてこなかったハナギンチャク類に、新規タンパク毒が存在することを示せたことの意義は大きい。今後のタンパク毒の精製と作用機構の解明が期待される。

第8章 ウメボシイソギンチャクのアクロラジ由来ペプチド毒の cDNA クローニング

ウメボシイソギンチャク科 Actiniidae の中には触手の基部にアクロラジという攻撃器官を持ち、これを使って同種や異種のイソギンチャクと住み場所をめぐる争うことが知られている(日高, 1992)。攻撃するときは、アクロラジを大きく膨らませて相手の体に押し付け、多数の刺胞を発射する(Fig. 8-1)。同時にアクロラジの上皮が剥がれて相手の体に残り、その下の組織を壊死させる。またアクロラジは刺胞密度が非常に高く、他の組織にはみられない攻撃用の特殊な刺胞(刺糸に棘をもつ)を多く含むことから、これまでに各種イソギンチャクの本体から得られてきた生理活性物質とは異なる成分が見つかる可能性が高い。実際、筆者の所属する研究室では、ウメボシイソギンチャク *Actinia equina* のアクロラジ粗抽出液からサワガニに対する毒性を指標に2成分のペプチド毒 acrorhagin I (LD₅₀ 520µg/kg) と acrorhagin II (LD₅₀ 80µg/kg) が単離され、N末端アミノ酸配列が明らかにされている(皆川, 1997)。両成分はお互いに相同性がなく、従来のイソギンチャク毒ともまったく異なる一次構造をもつ新規ペプチド毒である。しかしながら、いずれのペプチド毒もアクロラジのみに局在するため、収量が極端に低く、ペプチドマッピングを行うのに十分な量を得ることは困難であった。そこで本章では、cDNA クローニング法によって全一次構造を決定することにした。

実験方法

試料

2003年6月に千葉県勝浦で採集したウメボシイソギンチャク数個体を試料とした。試料は生きたまま研究室に持ち帰り、アクロラジを含むように周口筋部を切り取り、実験に使用するまで-80°Cで凍結保存した。

cDNA クローニング法

凍結試料約1gからTRIzol試薬(Invitrogen)を用いてtotal RNAを抽出した。第2章で述べたように、3'RACEは3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Endsキット(Invitrogen)を用いてtotal RNA(5µg)から合成した1st strand cDNAに対して、acrorhagin I および II のアミノ酸配列をもとに設計した degenerate プライマー(acrorhagin I では5'-CIC CIG AYG GIA CIT GGG TIA ART G-3'と5'-GGG TIA ART GYM GIC AYG AYT GYT-3'、acrorhagin II では5'-GAY TGY MGI TTY GTI GGI GCI AAR TG-3'と5'-GGI GCI AAR TGY ACI AAR GCI AAY AA-3')でそれぞれ行った。PCR増幅はEx Taqポリメラーゼ(Takara)を用いて、条件は94°C5min; 94°C30sec、55°C30sec、72°C1minを35サイクル; 72°C5minとした。5'RACEでは、5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends(Invitrogen)キットとgene-specificプライマー(acrorhagin I では5'-GTC TGT ATG CTT AAC GTG GC-3'、acrorhagin II では5'-CTA ACC TGG GAT AAA AGT GAG-3')を用いてtotal RNA(5µg)から合成した1st strand cDNAに対して、gene-specificプライマー(acrorhagin I では5'-GGC ACG ATT GTT CGT CGT G-3'と5'-CGT CGT GGC AGG AGT CTG-3'、acrorhagin II では5'-AAA GTG AGT TTC ATA ATA CAG TG-3'と5'-TCG TCT ACA



Fig. 8-1. ウメボシイソギンチャク *Actinia equina* のアクロラジ
(週刊朝日百科 動物たちの地球 62、1992 より)

GGG CAG TAA AG-3') を用いる PCR に供した。PCR は、3'RACE の場合と同じ条件で行った。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 Cy5 ThermoSequenase Dye Terminator Kit (Amersham Bioscience) に従って反応させ、Long-Read Tower DNA シークエンサー (Amersham Bioscience) により解析した。最後に、3'RACE と 5'RACE で決定した塩基配列をもとに設計した 5'末端側と 3'末端側プライマー (acrorhagin I では 5'-CGT TTA GTG CAA AAT GAC GGA-3' と 5'-TGG TTT TCG ATT GGT AAG CAG-3'、acrorhagin II では 5'-CAC AAA CTG ATC ACA CTA CTG-3' と 5'-CTC TAC CAG TTA CAT TAA AAC TT-3') で RT-PCR を行い、全塩基配列を確認した。

結果

Acrorhagin I の塩基配列と前駆体構造

Acrorhagin I をコードする cDNA の全塩基配列 (501 bp) は、3'RACE 法と 5'RACE 法によって Fig. 8-2 のように決定した。開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コードン (TGA) が、3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) とポリ A 鎖がそれぞれ確認できた。Acrorhagin I の前駆体は 70 残基からなり、SignalP V3.0 (Center for Biological Sequence Analysis, Denmark) で解析したところ、開始メチオニン以降 20 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。21 残基目からは成熟ペプチドが始まっており、プロパート部は存在しなかった。また acrorhagin I の演繹アミノ酸配列には、プロテインシーケンサーで決定した部分アミノ酸配列が含まれていた。こうして 50 残基からなる acrorhagin I の全アミノ酸配列を Fig. 8-3 のように決定した。アミノ酸配列から算出した分子量 (5654.2) は、MALDI/TOFMS 分析で得られた値 (5649.0) とほぼ一致するので、決定した配列は正しいことが支持された。Acrorhagin I の配列をデータベースで検索した結果、イソギンチャクの毒も含めて、相同性を示す生物由来のペプチド毒は見出されなかった。また全塩基配列の確認のために行った RT-PCR で、acrorhagin I の他に、acrorhagin I の類縁ペプチドも検出された (Fig. 8-4)。本ペプチドは 52 残基から成り、acrorhagin I とのアミノ酸配列の相同性は 65.4%であった (Fig. 8-5)。

Acrorhagin II の塩基配列と前駆体構造

Acrorhagin II をコードする cDNA の全塩基配列 (464 bp) は、3'RACE 法と 5'RACE 法によって Fig. 8-6 のように決定した。開始メチオニンの手前の 5'非翻訳領域には停止コードン (TGA) が、3'非翻訳領域にはポリ A 付加シグナル (AATAAA) とポリ A 鎖がそれぞれ確認できた。Acrorhagin II の前駆体は 83 残基からなり、SignalP V3.0 で解析したところ、開始メチオニン以降 20 残基目までがシグナルペプチドであると推定された。シグナルペプチドと成熟ペプチドの間には 18 残基からなるプロパート部が存在していた。また acrorhagin II の演繹アミノ酸配列には、プロテインシーケンサーで決定した部分アミノ酸配列が含まれていた。Acrorhagin II の MALDI/TOFMS 分析で得られた値 (4873.0) は、44 残基目の Pro までのアミノ酸配列から算出した分子量 (4876.7) とよく一致したので、翻訳領域の C 末端の Gly は、これまでに述べてきた前駆体同様に、C 末端アミド化酵素による翻訳後修飾で切断されると推定された (Fig. 8-7)。Acrorhagin II の配列をデータベー

CAGTGCTTGAAAAACGTTTAGTGCAAATGACGGAAC TTTTTGCGAGAAGTTGGATT	58
TCCCATCGAAATCTTCATTTGATCCCAAAC TCATAAATCGAATGAAAAATAATCTGGCA	118
ACAGGATATGAACCTGCTTTCTGAATTCATAATAATACGACTATTTATCATTTTCTTCTA	178
*	
CAGATGAATCAAGTAATGACTATATTCCTGGTTCTTGGAGTGATTGTCTACAGCGTCGAA	238
<u> M N Q V M T I F L V L G V I V Y S V E</u>	19
TCGTCGTCGACTCCAGACGGTACCTGGGTGAAATGCCGACATGATTGTTTTACTAAGTAT	298
<u> S S S T P D G T W V K C R H D C F T K Y</u>	39
AAGTCTTGTCAAATGT CAGACTCCTGCCACGACG AACAATCGTGCC ATCAGT GCCACGTT	358
K S C Q M S D S C H D E Q S C H Q C H V	59
<u>AAGCATAACAGAC</u> TGCCTAAATACTGGCTGCCCTGAACCCGTCTACGACTATGATGTTCA	418
K H T D C V N T G C P *	70
AAGGACGCTGCTTACCAATCGAAAACCAATTTTTGTTTGAATAAAATGTGCGAATTATTC	478
TATCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	501

Fig. 8-2. Nucleotide sequence of the cDNA encoding acrorhagin I. The complete gene sequence of acrorhagin I and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisks indicate in-frame stop codons (TGA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence and polyadenylation signal are underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

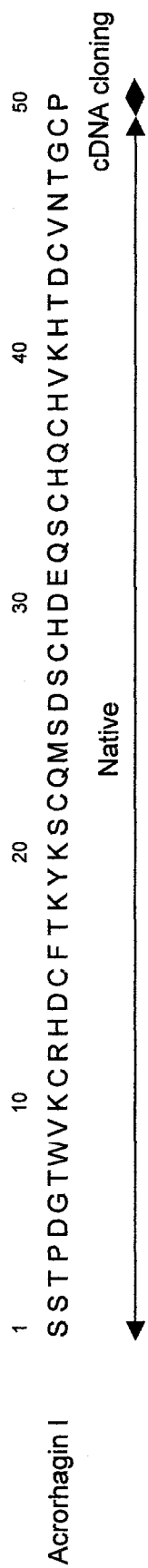


Fig. 8-3. The complete amino acid sequence of acrorhagin I.

Labels above the straight lines with arrows at both ends: Native, N-terminal sequences determined by sequencing of the native peptides; cDNA cloning, deduced amino acid sequences determined by cDNA cloning.

<u>CGTTTAGTGCAAATGACGGA</u> ACTATTTTGGGAGAAGTTGAATTTCCCATCGAAATCTT	59
CATTTGATCCCAAACCTCATAAATCGAATGAAAACATAATCTGGCAACAGGATATGAACCT	119
TCTTTCTGAATTCATAATAATACGGAACTAACTATTTATCATTCTTCTACAGATGAAT	179
*	<u>M N</u>
CAAGTAATGACTATATTCCTGGTTCTTGGAGTGATTGTCTACAGCGTCGAATCGTCGTTG	239
<u>Q V M T I F L V L G V I V Y S V E S S L</u>	22
ACTCCATCTTCAGACATTCCCTGGGAGAAGTGCCGACATGATTGTTTTGCTAAGTATATG	299
T P S S D I P W E K C R H D C F A K Y M	42
TCTTGTCAAATGTCAGACTCCTGCCACAACAAACCATCGTGTTCGTCAGTGCCAAGTTACG	359
S C Q M S D S C H N K P S C R Q C Q V T	62
TATGCAATCTGCGTAAGTACTGGCTGCCCTGAACCCGTCTACGACTATGATGTTCAAAG	419
Y A I C V S T G C P *	72
GACG <u>CTGCTTACCAATCGAAAACCA</u>	444

Fig. 8-4. Nucleotide sequence of the cDNA encoding acrorhagin I analog. The complete gene sequence of acrorhagin I analog and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisks indicate in-frame stop codons (TGA). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence is underlined. The primers for RT-PCR are boxed.

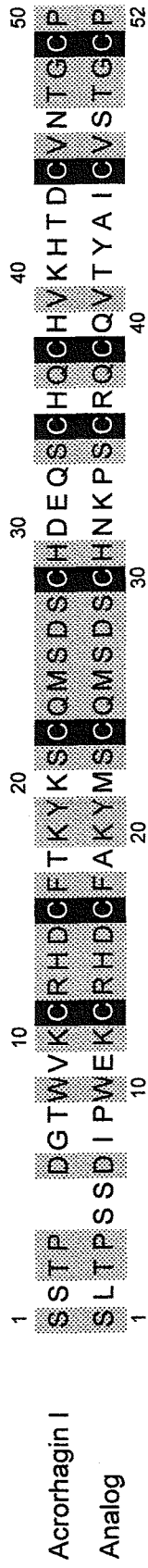


Fig. 8-5. Alignment of the complete amino acid sequences of acrorrhagin I with those of analog.

Identical residues are shaded and cysteine residues are shown in white on the black background.

AATCACA	AACTGATCACACTACTGAAGTCAACAGGTCACTCATTCTCAAGACACAATG	58
	*	<u>M</u>
		1
ATCTACA	AGCCGTTTTTCGTGTGTTTGGTGCTTGTTCTCTTAGGCGATGTCTTTTGTCT	118
<u>I</u>	<u>Y</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>C</u> <u>S</u>	21
CCACGAA	ACTCTGGTGGCGGGACCCTCAATGACAATCCGTTTCGAGAAGAGAACGGATTGC	178
<u>P</u>	<u>R</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>C</u>	41
CGCTTT	GTGGTCCCAAATGTACTAAAGCTAACAATCCGTTGTGTTGGCAAAGTGTGTAAT	238
<u>R</u>	<u>F</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>N</u>	61
GGTTAT	CAACTTTACTGCCCTGCAGACGACCGATCACTGTATTATGAAACTCACTTTTATC	298
<u>G</u>	<u>Y</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>I</u>	81
CCAGGTT	AGACAAGGCGTTCAACCAAACCCCAAAAATAACCGGGAATTAACTCCATTAC	358
<u>P</u>	<u>G</u> *	83
ATAGCT	CTGTATAATTAATTCAGTGATGAACGAAAAGTTTTAATGTAAGTGGTAGAGATT	418
AATTTG	AAGGTATTAACACATTAGAGAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	464

Fig. 8-6. Nucleotide sequence of the cDNA encoding acrorhagin II. The complete gene sequence of acrorhagin II and its translation product are illustrated. The deduced amino acid sequence is shown starting from the first ATG codon of the open reading frame. The asterisks indicate in-frame stop codons (TGA and TAG). Nucleotide and amino acid numbers are shown at the right. The putative signal sequence is underlined. The propeptide is doubly underlined. The primers for 3'RACE are shaded. The primers for 5'RACE are boxed.

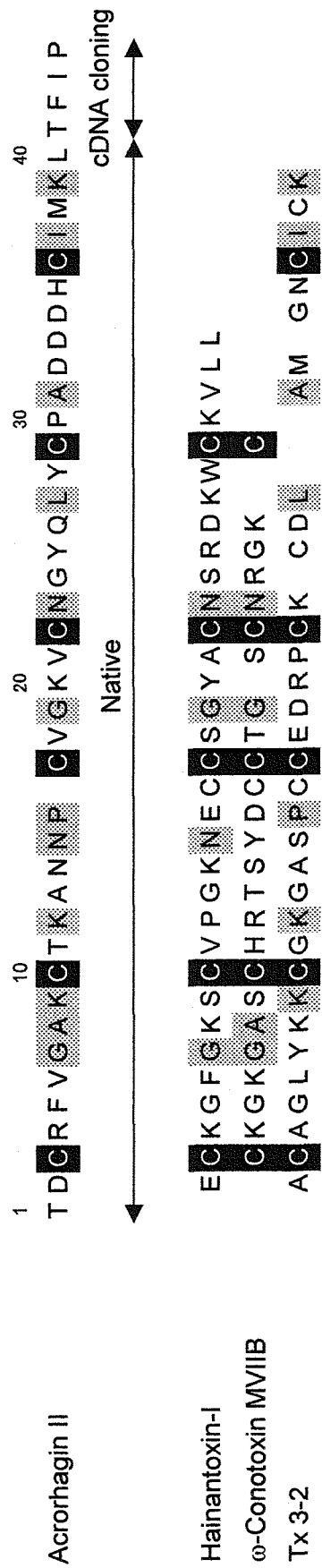


Fig. 8-7. Database search for homologous toxins with acrorhagin II.

Hainantoxin-I from the Chinese spider *Selenocosmia hainana*; ω-Conotoxin MVIIIB from *Conus magus*; Tx 3-2 from Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*.
 Identical residues are shaded and cysteine residues are shown in white on the black background. Labels above the straight lines with arrows at both ends: Native, N-terminal sequences determined by sequencing of the native peptides; cDNA cloning, deduced amino acid sequences determined by cDNA cloning. Asterisks represent deduced amino acids determined by cDNA cloning.

スで検索した結果、中国産のクモ *Selenocosmia hainana* の Na チャネル毒 Hainantoxin-I (Li *et al.*, 2003)、イモ貝 *Conus magus* の Ca チャネル毒の-Conotoxin MVIIB (Olivera *et al.*, 1985)、ブラジル産のクモ *Phoneutria nigriventer* の Ca チャネル毒 Tx 3-2 (Cordeiro *et al.*, 1993) と相同性を示したが、Cys の数や位置は大きく異なっていた。また全塩基配列の確認のために行った RT-PCR で、261 番目の 1 塩基のみが C から T に変異したクローンが検出された。この変異により、N 末端から数えて 31 残基目の Ala が Val に置き換わったアイソフォームの存在が明らかになった。

考察

ウメボシイソギンチャクのアクロラジ由来の新規ペプチド毒 acrorhagin I と II の全一次構造と前駆体構造を cDNA クローニング法で明らかにした。

Acrorhagin I の前駆体構造は、第 3 章で述べたイボハタゴイソギンチャクの K チャネル毒性をもった Kunitz 型インヒビター-SHTX III の前駆体と同様に、シグナルペプチドと成熟ペプチドからなり、プロパート部を欠いていた。これまでに報告があるイソギンチャク毒の前駆体のうち、その構造中にプロパート部をもたないものは、*Anthopleura* sp. から最近単離されたタイプ 1 の Na チャネル毒しか知られていない (Liu *et al.*, 2003)。また驚いたことに、この前駆体にはシグナルペプチドも存在しない。このことについて Liu らは、同様にシグナルペプチドをもたないオニダルマオコゼ *Synanceja horrida* の SNTX (Ghadessy *et al.*, 1996) や galectin-3 (Menon and Hughes, 1999) の例を挙げて、イソギンチャク毒には、小胞体からゴルジ体といった従来の分泌経路とは異なる新規の分泌経路が存在するのではないかと考察している。Acrorhagin I はシグナルペプチドをもってはいたが、イソギンチャク毒の前駆体には、少なくともシグナルペプチドやプロパート部を欠くものが、いくつか存在していることが明らかになった。このことはイソギンチャクが毒に応じて、分泌経路を使い分けていることを強く示唆している。特に acrorhagin I はアクロラジという特殊な攻撃器官から単離された毒なので、その前駆体構造が従来のイソギンチャク毒の構造と異なっていた点は注目される。Acrorhagin I は刺胞には蓄えられずに、アクロラジから直接分泌されてるのかもしれない。いずれにしても、イソギンチャク毒の分泌経路の解明にあたっては、まず前駆体構造の違いと毒の存在部位の相関を明らかにすることが必要である。

また、acrorhagin I の塩基配列の確認のために行った RT-PCR では、acrorhagin I と 65.4% の配列相同性を示す類縁ペプチドも検出されたが、本ペプチドも毒性を示すと予想される (Fig. 8-5)。本ペプチドは精製では見過ごされてしまうほどの極微量な成分であると思われるが、PCR により増幅することができたものと思われる。Acrorhagin I のアイソフォームについては今後、得られた cDNA をもとに遺伝子工学的手法で発現し、毒性を確認する必要があるだろう。

次に Acrorhagin II の前駆体構造は、これまでのイソギンチャク毒の前駆体と同様に、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから成っていた。Acrorhagin II と相同性を示したペプチド毒のうち、前駆体構造が明らかにされているものは、ブラジル産のクモ *Phoneutria nigriventer* の Tx 3-2 で、その前駆体構造もシグナルペプチド、プロパート部、

成熟ペプチドから成っていた (Kalapothakis et al., 1998)。このブラジル産のクモから単離されている神経毒 Tx 1 は、非常に興味深いことに、第 6 章で述べたミナミウメボシイソギンチャクの新規ペプチド毒 AETX II と III とも相同性を示している。クモとイソギンチャクの毒の分子進化を考察するには、今後、DNA レベルの遺伝子構造の解明が必要だろう。Acrorhagin II はサワガニに対して強い致死作用を示していることから、おそらく Na チャネルに作用する毒と考えられるが、Ca チャネル毒であるイモ貝の MVIIB とクモの Tx3-2 とも相同性を示していることから、Ca チャネル毒性も念頭に置く必要がある。今後の早急な作用機構の解明が望まれる。また 31 残基目の Ala が Val に変異しているアイソフォームも拾うことができ、アクロラジには acrorhagin II 様のペプチド毒が少なくとも 2 成分以上存在することが分かった。イソギンチャクを含めた有毒生物はよく複数の毒のアイソフォームをもっているが、その理由はまだよく分かっていない。複数のアイソフォームによって、毒の相乗効果があるのかも知れない。

いずれにしても、acrorhagin I と II は新規の一次構造から、イオンチャネル研究のための新しい薬理的試薬としての可能性を秘めていたが、その収量が極端に低いため、作用機構や構造活性相関の解明に十分な量を得ることはできなかった。本研究で acrorhagin I と II の cDNA を得ることができたので、今後は遺伝子工学的手法で発現したリコンビナントを用いて実験を行うことが可能になった。

イソギンチャクの特異的な攻撃器官としては、ウメボシイソギンチャク科のアクロラジ以外にも、タテジマイソギンチャクやヒダベリイソギンチャクのキャッチ触手なども知られている (日高、1992)。アクロラジからは従来のイソギンチャク毒とはまったく異なる新規ペプチド毒が単離されたことから、キャッチ触手にも未知のペプチド毒が存在している可能性があり、今後の研究ターゲットになると思われる。

イソギンチャクは代表的な海洋刺毒動物で、これまでの研究により、そのペプチド毒は 3-5kDa の Na チャネル毒および 3.5-6.5kDa の K チャネル毒に大別されている。Na チャネル毒と K チャネル毒はその特異な作用機構から、一部はすでにイオンチャネル研究のための貴重な薬理学的試薬として有効利用されている。一方、最近になって、既知のイソギンチャク毒とはまったく異なる構造をもった新規ペプチド毒もいくつか報告されている。本研究はこのような背景から、これまでに調べられていないイソギンチャクからペプチド毒の単離を行い、その一次構造と前駆体構造の解明を試みたものである。本論文の最後にあたり、本研究で得られた新知見をまとめ、新知見に基づいてイソギンチャクの前駆体構造の分類を行うとともに、イソギンチャクのペプチド毒に関する今後の研究を展望したい。

本研究で得られた新知見

本研究で得られた新知見は次の通りである。

(1) ハタゴイソギンチャクから 3 成分のペプチド毒 (gigantoxins I-III) を単離し、cDNA クローニングを行った。Gigantoxin II および III はそのアミノ酸配列の特徴から、それぞれイソギンチャクの Na チャネル毒のタイプ 1 と 2 であることが判明した。一方、gigantoxin I は哺乳類由来の上皮増殖因子 (EGF) と高い配列相同性 (31-33%) を有する新規ペプチド毒で、哺乳類の EGF と比べて弱いものの EGF 活性も確認された。また、いずれの前駆体構造も、他の多くのイソギンチャク毒の前駆体構造と同様に、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから成っていた。なかでも、EGF と類似している gigantoxin I の前駆体はアミノ酸 86 残基で構成され、約 1200 残基から成り 7-8 個の EGF 様ドメインの繰り返しを有する哺乳類 EGF 前駆体とは大きく異なることを見いだした。これらの知見から、EGF の分子進化について、2 通りの推測を行った。1 つ目は、EGF の祖先分子は gigantoxin I のように本来は毒として機能し、分子進化の過程でより複雑な構造の前駆体になりつつ、毒としての機能を失っていったというものである。2 つ目は、EGF の祖先分子は元々 EGF として機能し、その前駆体構造も今日の哺乳類のものと同じであったが、gigantoxin I のように一部は毒として独自の進化をしていったというものである。この推測のどちらが正しいかは、系統発生的により多くの生物からの EGF 様分子に関する今後の研究を待つ必要がある。

(2) イボハタゴイソギンチャクから 4 成分のペプチド毒 (SHTX I-IV) を単離し、cDNA クローニングを行った。このうち、SHTX III は Kunitz 型のプロテアーゼインヒビター、SHTX IV はタイプ 2 の Na チャネル毒であったが、SHTX I および II はお互いに類似した新規ペプチド毒であった。一方、SHTX I、II および IV の前駆体は、シグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから成っていたが、SHTX III はシグナルペプチドと成熟ペプチドから成り、プロパート部を欠いていた。また、新規ペプチド毒の SHTX I、II および Kunitz 型プロテアーゼインヒビターの SHTX III は K チャネル毒性を示した。

(3) ジュズダマイソギンチャクから 4 成分のペプチド毒 (Ha I-IV) を単離し、cDNA クローニングを行った。このうち、Ha I はイソギンチャク毒も含めて、既知の生物由来のペプチド毒とはまったく相同性を示さない新規ペプチド毒で、Ha IV はタイプ 1 の Na チャ

ネル毒であった。一方、Ha II と III は、上述のイボハタゴイソギンチャクの SHTX I および II に類似した新規ペプチド毒で、イソギンチャクのペプチド毒の新しいファミリーを発見した。また、いずれの前駆体も、シグナルペプチド、成熟ペプチド、プロパート部から成っていたが、非常に興味深いことに、Ha II の前駆体には成熟ペプチドの 4 回の繰り返し、Ha III では 2 回の繰り返しが認められた。

(4) スナイソギンチャクから 3 成分 (Toxin I, Da I, II)、タマイタダキイソギンチャクから 1 成分 (Er I) のペプチド毒を単離した。Toxin I はタイプ 1 の Na チャネル毒であったが、Da I, II および Er I は、サンゴイソギンチャクから以前に単離されたタイプ 3 の Na チャネル毒 PaTX と高い相同性を示した。このように相次いで PaTX 類似毒が単離されたことから、イソギンチャクの Na チャネル毒はタイプ 1 と 2、および PaTX ファミリーの 3 つに大きく分類すべきであることを提唱した。

(5) ミナミウメボシイソギンチャクからすでに単離されていたタイプ 1 の Na チャネル毒 AETX I と新規ペプチド毒 AETX II および III について cDNA クローニングを行い、いずれの前駆体もシグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから成ることを明らかにした。

(6) ハナギンチャク目ムラサキハナギンチャクから増殖因子 granulin と高い相同性を有する新規ペプチド毒 Cf I を単離した。

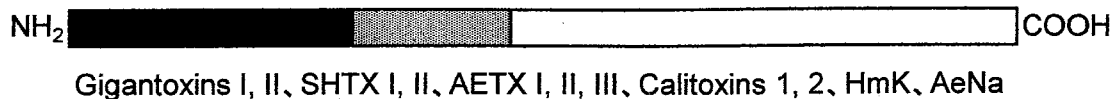
(7) ウメボシイソギンチャクの特異的な攻撃器官であるアクロラジからすでに単離されていた新規ペプチド毒 acrorhagin I と II について、cDNA クローニングにより全アミノ酸配列および前駆体構造を明らかにした。Acrorhagin I の前駆体はシグナルペプチドと成熟ペプチドから成り、プロパート部を欠いていたが、acrorhagin II の前駆体はシグナルペプチド、プロパート部、成熟ペプチドから成っていた。

イソギンチャクのペプチド毒の前駆体構造の分類

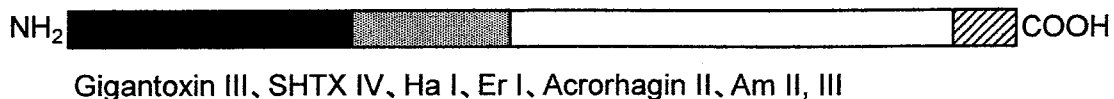
本研究では新規ペプチド毒を含む 15 成分の前駆体構造 (gigantoxins I-III, SHTX I-IV, Ha I-III, Er I, AETX I-III, acrorhagins I-II) を cDNA クローニングにより明らかにした。そこで既報のペプチド毒 8 成分の前駆体構造 [Calitoxins 1, 2 (Spagnuolo *et al.*, 1994)、HmK (Gendeh *et al.*, 1997)、AeNa (Anderluh *et al.*, 2000)、Hk2a (Liu *et al.*, 2003) Am I-III (Honma *et al.*, 2005)] と合わせて合計 23 成分について比較検討した結果、イソギンチャクのペプチド毒の前駆体構造は大きく 5 つのグループに分類できることが判明した (Fig. 9-1)。この結果は、イソギンチャクは、想像以上に複雑なペプチド毒の分泌経路とプロセッシング機構をもつことを示している。

最初に、イソギンチャクのペプチド毒の分泌経路については、グループ 5 の Hk2a が注目される。この毒はタイプ 1 の Na チャネル毒でありながら、シグナルペプチドをもたない。このことは、Hk2a は小胞体からゴルジ体といった一般的な分泌経路を取らないことを示しており、新規の分泌経路の存在が示唆された (Liu *et al.*, 2003)。また、この Hk2a とグループ 3 の SHTX III および acrorhagin II は、毒を刺胞にソーティングするためのシグナルと考えられているプロパート部をもたないことから、刺胞ではない別の何らかの毒器官がイソギンチャクには存在するのかもしれない。イソギンチャク毒の分泌経路を解明するには、毒を作り出している器官や細胞の特定が不可欠だが、このことは意外にもまった

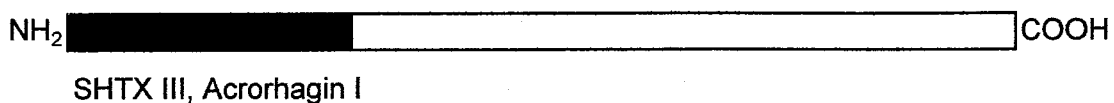
Group 1 Signal peptide+Propart+Mature peptide



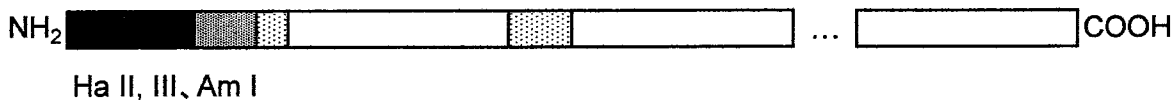
Group 2 Signal peptide+Propart+Mature peptide+Additional amino acid residues



Group 3 Signal peptide+Mature peptide



Group 4 Repeated mature peptides



Group 5 Mature peptide

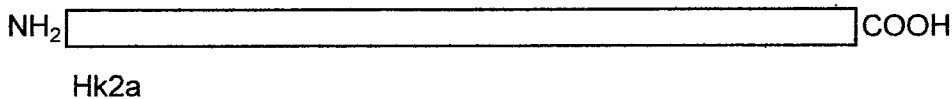
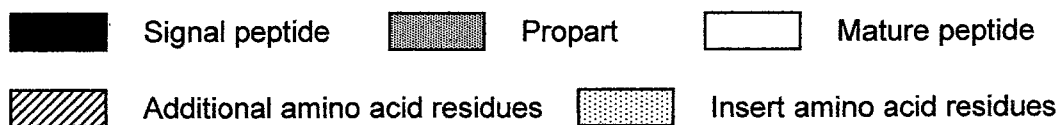


Fig. 9-1. The structural organization of sea anemone peptide toxin precursors.



Calitoxins 1 and 2 are from *Calliactis parasitica* (Spagnuolo *et al.*, 1994); HmK from *Heteractis magnifica* (Gendeh *et al.*, 1997); AeNa from *Actinia equina* (Anderluh *et al.*, 2000); Am I-III from *Antheopsis maculata* (Honma *et al.*, 2005); Hk2a from *Anthopleura* sp. (Liu *et al.*, 2003). The other toxins were isolated in this study.

く調べられていない。今後は、本研究で明らかにしたペプチド毒の塩基配列をプローブとした *in situ* ハイブリダイゼーションによる毒産生部位の解明が望まれる。

次に、イソギンチャクのペプチド毒のプロセッシングについても、巧妙な機構が認められた。まず、グループ4の成熟ペプチドの繰り返し構造を有するものについては、このような構造は神経ペプチドなどでは過去に報告があるが、毒の前駆体としては初めてである。グループ4のペプチド毒は、いずれも高い配列相同性を持ち、イソギンチャクのペプチド毒の新規ファミリーを形成していると考えられたが、その成熟ペプチドの繰り返し回数は、Ha IIで4回、Ha IIIで2回（第4章参照）、Am Iで6回（Honma *et al.*, 2005）と異なっている。繰り返し回数の違いによって、意図的に毒の発現量を調節しているとも考えられることから、このファミリーのペプチド毒についてはさらに多くの前駆体構造の解明が望まれる。

また、翻訳領域C末端部のアミノ酸残基の付加については、グループ2の gigantoxin III、SHTX IV、acrorhagin II、Am II、IIIは Gly 残基の付加であることから、C末端アミド化酵素により修飾を受けると推定された。一方、グループ2の Ha Iと Er Iには Lys1 残基、グループ4の Ha IIにはアミノ酸 12 残基、Am Iにはアミノ酸 3 残基の付加が認められた。これらの残基は、カルボキシペプチダーゼによって除去され、このプロセッシングを受けて初めて活性型の毒になると考えられる。つまり、イソギンチャクのペプチド毒には、C末端部にアミノ酸残基の付加がなくそのまま活性型になるもの、Gly 残基の付加がありC末端がアミド化されてから活性型になるもの、アミノ酸残基の付加がありプロセッシングで除去されてから活性型になるものに分類でき、ペプチド毒の発現には巧妙なプロセッシング機構があることが示された。ペプチド毒やタンパク毒を作る動物の中で、イソギンチャクは系統樹の根に最も近い動物である。捕食や防御のために毒を作る動物にとって、毒を必要な時に、必要な量だけ、いかに効率よく合成できるかは、生死に関わる重要な問題である。そのため、原始的なイソギンチャクにも、このような巧妙な機構が備わっているのだろう。イソギンチャク毒のプロセッシング機構は、高等動物がもつより複雑な機構の原型とも考えられることから、この機構の解明は、今後の新しい研究テーマとして非常に魅力的だと思われる。

イソギンチャクのペプチド毒に関する今後の研究展望

これまでの研究成果と本研究の成果を踏まえて、イソギンチャクのペプチド毒に関する今後の研究を展望してみたい。

イソギンチャクのペプチド毒に関する研究は、1975年に Béress らが *Anemonia sulcata* から3成分の Na チャネル毒を単離して以来、世界的に活発な研究が行われてきた。さらに1990年代に入ってから、新しいペプチド毒として、K チャネル毒も登場してきた。これまでの精力的な作用機構と構造活性相関の解明が実を結び、イソギンチャクの Na チャネル毒と K チャネル毒の一部は、イオンチャネル研究のための貴重な薬理的試薬として市販され、Na チャネルや K チャネルの構造や機能の解明に有効利用されている。

一方、構造的に、これらの分類には当てはまらない新規ペプチド毒もいくつか単離されてきた。*Calliactis parasitica* の calitoxin (Cariello *et al.*, 1989)、*Bolocera tuediae* の BTTX II (Halstead, 1988)、ミナミウメボシイソギンチャクの AETX II、III (shiomii *et al.*, 1997)、

ウメボシイソギンチャクの特異な攻撃器官アクロラジ由来の acrorhagins I、II、シマキツカイソギンチャクの Am I (Honma *et al.*, 2005) の 7 成分がそれにあたる。さらに本研究でも、新規ペプチド毒としてハタゴイソギンチャクの EGF 様ペプチド毒 gigantoxin I、イボハタゴイソギンチャクの SHTX I および II、ジュズダマイソギンチャクの Ha I-III、ムラサキハナギンチャクの granulin 様ペプチド毒 Cf I の 7 成分が単離された。そこで、本研究での知見と合わせて、これまでに単離されたイソギンチャクのペプチド毒をタイプ別に集計してみると、Na チャネル毒は約 40 成分、K チャネル毒は 11 成分、新規ペプチド毒は 14 成分ということになり、ペプチド毒全体に占める新規ペプチド毒の割合は、約 2 割にも達する。

しかしながら、最近のイソギンチャクのペプチド毒に関する研究は、既知の Na チャネル毒や K チャネル毒の作用や構造活性相関の解明に向けられ、新規ペプチド毒の探索はほとんど行われていない。この背景には、イソギンチャクのペプチド毒の探索を行ってきた研究者の多くが薬理学者で、イオンチャネル研究のためのプローブとしてのペプチド毒が得られた後は、本来の研究目的であるイオンチャネルの解明へと目が向けられていったことがあるのだろう。それに対して、本研究は、これまでの状況を踏まえて、まだ調べられていない種類のイソギンチャクには新規ペプチド毒が存在するという想定のもと、積極的にペプチド毒の単離を試みたことが、数多くの新規ペプチド毒の発見につながったと考えられる。

また、この新規ペプチド毒の発見には、サワガニ毒性試験がきわめて有効であったことは強調しておきたい。一般にイソギンチャクの Na チャネル毒は、甲殻類に対して強い致死作用を示すことから、ザリガニなどのエビ類に対する毒性を指標にしてペプチド毒の探索が行われているが、カニ類を指標としている例は少ない。当研究室でのサワガニの麻痺活性は、サワガニを反転させても起き上がれなくなる状態を定義しているが、エビ類ではその体の構造から考えて、このような方法で麻痺活性を判定することは難しい。つまり、エビ類を用いたアッセイでは、致死を引き起こさないが、麻痺のみを引き起こす毒成分は見逃されてきたと考えられる。本研究で単離した 7 成分の新規ペプチド毒のうち、実に 6 成分もがサワガニに麻痺のみを引き起こす毒成分である。また、これまで、K チャネル毒は甲殻類に顕著な症状を示さないと言われてきたが、本研究で K チャネル毒性が認められたイボハタゴイソギンチャクの新規ペプチド毒 SHTX I、II および Kunitz 型のプロテアーゼインヒビター SHTX III はいずれも、サワガニに強い麻痺活性を示している。筆者のこれまでの経験からも、K チャネル毒は、Na チャネル毒のようにサワガニに強い致死活性は示さないが、麻痺活性などの症状は示すのではないかと考えている。このように、イソギンチャクの新規ペプチド毒の探索においては、サワガニ毒性試験がきわめて有効であることが本研究によって実証された。

いずれにしても、本研究で単離されたこれまでにないような新規ペプチド毒は、薬理学者の新たな関心を引き、海洋生化学資源としてのイソギンチャクの重要性を認識するのに十分な根拠を提供したと考える。世界にはイソギンチャク類が約 800 種類いると言われていたが、これまでに調べられてきたイソギンチャクの種類はわずか 30 種にも過ぎないことから、イソギンチャクはまさに新規ペプチド毒の宝庫といえるだろう。最近では、アフリカツメガエルの卵母細胞にイオンチャネルを発現させ、目的とするイオンチャネルに作

用する毒成分をパッチクランプ法で測定し、探索する方法がよく行われている。イソギンチャクについても、このように数多くの新規ペプチド毒が単離されている状況から考えて、NaチャンネルやKチャンネル以外のイオンチャンネル（例えばCaチャンネルやClチャンネル）に作用する毒の存在も大いに予想されるので、この手法による探索が積極的に行われていくことを期待したい。

また、最近になって、イソギンチャクのペプチド毒を医薬品として利用しようとする動きもみられる。イソギンチャク *Stichodactyla helianthus* から単離されたKチャンネル毒 ShK は、電位依存性Kチャンネルのうち *Shaker* 型チャンネル (Kv1チャンネル) に作用し、なかでも Kv1.3 を選択的に阻害する (Kalman *et al.*, 1998)。Kv1.3 はT細胞、B細胞、血小板などの血液細胞に選択的に発現しており、Kv1.3 を阻害するとリンパ球の増殖や遅延型アレルギー反応が抑制される (Beeton *et al.*, 2001)。実際に、ShK はT細胞の活性化に伴う自己免疫疾患と考えられている多発性硬化症の動物モデルにおいて、治療効果を示した。現在、ShK をリード化合物とした免疫抑制剤の開発が進められている (Norton *et al.*, 2004)。

最後に、イソギンチャクのペプチド毒に関する研究を生物学的視点から眺めてみたい。日本産のイソギンチャクの分類学的研究は非常に混乱していて、未同定の種類も数多く存在する。イソギンチャクのペプチド毒は種に特異的であるので、ペプチド毒を指標にした種の同定が十分に可能である。また、これまでに単離されてきた数多くのペプチド毒や溶血毒をもとに、分子進化学的にイソギンチャクの系統樹を作ることも十分に可能だが、イソギンチャク毒の研究者のイソギンチャクに対する生物学的興味が薄いためか、これまでに一度も試みられていない。イソギンチャク毒の研究成果は、イソギンチャクの系統分類学への貢献も期待され、今後の検討が望まれる。

イソギンチャクのペプチド毒に関する今後の研究展望をいくつか述べてきたが、研究の一端に従事してきた筆者としては、まだまだやり残したことがたくさんあることを実感している。その最たるものは、本研究で単離された新規ペプチド毒について、作用機構の解明を行えなかったことである。いずれもサワガニに対する症状から神経毒と予想され、新しい薬理学的試薬としてきわめて有望である。イソギンチャクのペプチド毒の魅力は、その切れ味のよい活性がわずか数十残基で表現されていることにある。今後は、本研究で単離された新規ペプチド毒の作用機構や構造活性相関の解明が進み、薬理学的試薬として有効利用され、ひいてはイオンチャンネル研究に一石を投じるような発見に貢献することを願って本論文を終わりにしたい。

博士論文内容の要旨

(2000 字程度)

報告番号	課博第	号	氏名	本間 智寛
------	-----	---	----	-------

(要旨)

「イソギンチャクのペプチド毒およびその前駆体の構造解析」

刺胞動物イソギンチャクは代表的な海洋刺毒動物で、刺胞と呼ばれる特殊な毒器官を触手や本体に無数に持ち、その中に含まれる毒成分を利用して餌動物である魚やカニなどを麻痺させ捕食している。イソギンチャク毒は 20 kDa の溶血毒、3-5 kDa の Na チャネル毒および 3.5-6.5 kDa の K チャネル毒に大別されるが、Na チャネル毒と K チャネル毒はその特異な作用機構から、一部はすでにイオンチャネル研究のための貴重な薬理的試薬として有効利用されている。一方、最近になって、既知のイソギンチャク毒とはまったく異なる新規ペプチド毒もいくつか報告されており、イソギンチャクには新規ペプチド毒が広く分布すると考えられる。こうした背景のもとに本研究では、イソギンチャクを海洋生化学資源としてさらに有効利用することを目的に、各種イソギンチャクからサワガニに対する致死活性および麻痺活性を指標にしてペプチド毒を単離するとともに、ペプチド毒およびその前駆体の構造解析を行った。

第 1 章では、20 種イソギンチャクについて、各種生理活性物質を検索した。なかでも、サワガニに対する麻痺活性の結果は興味深く、致死活性を 4-8 倍も上回る強い麻痺活性が 3 種イソギンチャク（ハタゴイソギンチャク、イボハタゴイソギンチャク、ジュズダマイソギンチャク）に検出され、致死成分とは異なる麻痺成分の存在が示唆された。

第 2 章では、ハタゴイソギンチャクから 3 成分のペプチド毒 (gigantoxins I-III) を単離し、cDNA クローニングを行った。Gigantoxin II および III はそれぞれ既知の Na チャネル毒のタイプ 1、2 であったが、gigantoxin I は哺乳類由来の上皮増殖因子 (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 (A431 細胞の形態変化および EGF レセプターのチロシン残基のリン酸化) も示した。また gigantoxin I の前駆体はアミノ酸 86 残基で構成され、約 1200 残基から成り 7-8 個の EGF 様ドメインの繰り返しを有する哺乳類 EGF 前駆体とは大きく異なることを見いだした。これらの知見から、EGF 祖先分子は gigantoxin I のように毒として機能し、進化の過程で毒性を失ったと推定した。

第3章では、イボハタゴイソギンチャクから4成分のペプチド毒(SHTX I-IV)を単離し、cDNAクローニングを行った。このうち、SHTX IIIはKunitz型のプロテアーゼインヒビター、SHTX IVはタイプ2のNaチャンネル毒であったが、SHTX IおよびIIはお互いに類似した新規ペプチド毒であった。また、新規ペプチド毒のSHTX I、IIおよびSHTX IIIはKチャンネル毒性を示すことを明らかにした。

第4章では、ジュズダマイソギンチャクから4成分のペプチド毒(Ha I-IV)を単離し、cDNAクローニングを行った。このうち、Ha Iは既知の生物由来のペプチド毒とまったく相同性を示さない新規ペプチド毒で、Ha IVはタイプ1のNaチャンネル毒であった。一方、Ha IIとIIIは、イボハタゴイソギンチャクのSHTX IおよびIIに類似した新規ペプチド毒であった。また興味深いことに、Ha IIの前駆体には成熟ペプチドの4回の繰り返しが、Ha IIIでは2回の繰り返しが認められた。

第5章では、スナイソギンチャクから3成分(Toxin I, Da I, II)、タマイタダキイソギンチャクから1成分(Er I)のペプチド毒を単離した。Toxin Iはタイプ1のNaチャンネル毒であったが、Da I, IIおよびEr Iは、サンゴイソギンチャクのタイプ3のNaチャンネル毒PaTXと高い相同性を示し、イソギンチャク毒としてPaTXファミリーを提唱した。

第6章では、ミナミウメボシイソギンチャクからすでに単離されていたタイプ1のNaチャンネル毒AETX Iと新規ペプチド毒AETX IIおよびIIIについてcDNAクローニングを行い、前駆体構造を解明した。

最後に第7章と第8章では、これまでの章とは性質が異なる試料を研究対象として実験を行った。第7章ではイソギンチャクとは分類上の位置が異なるハナギンチャク目ムラサキハナギンチャクから、増殖因子granulinと高い相同性を持つ新規ペプチド毒を単離した。第8章ではウメボシイソギンチャクの特異的な攻撃器官であるアクロラジからすでに単離されていた新規ペプチド毒acrorhagin IとIIについて、cDNAクローニングによりアミノ酸配列および前駆体構造を明らかにした。

以上のように本研究では、6種イソギンチャクから7成分の新規ペプチド毒、8成分のNaチャンネル毒、1成分のKunitz型プロテアーゼインヒビターを単離したが、新規ペプチド毒の探索にはサワガニに対する毒性を指標にした方法がきわめて有効であることを実証した。また新規ペプチド毒を含む15成分の前駆体構造をcDNAクローニングにより明らかにし、既報のイソギンチャク毒の前駆体構造とあわせて比較検討した結果、イソギンチャクのペプチド毒の前駆体構造は大きく5つのグループに分類できることを明らかにした。

Abstract

Primary and precursor structure of peptide toxins in sea anemones

Sea anemones, members of cnidarians, are representative of marine venomous animals. They possess numerous stinging cells (known as nematocystes) in their tentacles and even in their bodies and use toxin contained in the cells to paralyze their prey animals. Sea anemone toxins are classified into three classes of proteinous or peptidic toxins, 20 kDa hemolysins, 3-5 kDa sodium channel toxins and 3.5-6.5 kDa potassium channel toxins. Above all, sodium and potassium channel toxins have unique biological effects and hence some of them have been utilized as valuable pharmacological reagents. Recently, peptide toxins that are structurally and functionally remote from the known toxins have been isolated from several species of sea anemones, strongly suggesting that novel peptide toxins exist in sea anemones more widely than expected. In the present study, peptide toxins with lethal or paralytic activity against crabs were isolated from various species of sea anemones and elucidated for their precursor proteins, in order to facilitate further utilization of sea anemones as marine biochemical resources.

In chapter 1, 20 species of sea anemones were screened for bioactive substances. The most interesting result is the finding of 4-8 fold higher paralytic activity against crab than lethal activity in three species of sea anemones (*Stichodactyla gigantea*, *Stichodactyla haddoni*, *Heteractis aurora*). This suggests the existence of paralytic peptide toxins in these sea anemones.

In chapter 2, three peptide toxins (gigantoxins I-III) were isolated from the sea anemone *Stichodactyla gigantea* and cloned for their cDNAs. Gigantoxins II and III are analogous to the known type 1 and 2 sea anemone sodium channel toxins, respectively. On the other hand, gigantoxin I has high homologies (31-33%) with mammalian epidermal growth factors (EGFs) and exhibits EGF activities (rounding

of A431 cells and tyrosine phosphorylation of the EGF receptors in A431 cells). Furthermore, the gigantoxin I precursor protein composed of 86 amino acid residues is much simpler in structure than those of mammalian EGFs, which are composed of about 1200 amino acid residues and have seven or eight EGF-like domain repeats. It is thus assumed that the ancestors of EGFs originally had functioned as toxins as in the case of gigantoxin I and that they had lost toxic properties during the evolution process in the animal kingdom.

In chapter 3, four peptide toxins (SHTX I-IV) were isolated from the sea anemone *Stichodactyla haddoni* and their amino acid sequences were determined by cDNA cloning. Although SHTX III is analogous to Kunitz-type protease inhibitors and SHTX IV to the known type 2 sodium channel toxins, SHTX I and II having high homology with each other are structurally novel peptide toxins. In addition, SHTX I-III exhibit potassium channel toxicity.

In chapter 4, four peptide toxins (Ha I-IV) were isolated from the sea anemone *Heteractis aurora* and their amino acid sequences were determined by cDNA cloning. Ha I has no sequence homologies with any toxins from other sources. On the other hand, both Ha II and III are analogous to SHTX I and II from *Stichodactyla haddoni*. Very interestingly, the Ha II and III precursor proteins contain as many as four and two copies of mature peptides, respectively.

In chapter 5, three peptide toxins (Toxin I, Da I and II) were isolated from the sea anemone *Dofleinia armata* and one peptide toxin (Er I) from the sea anemone *Entacmaea ramsayi*. Although Toxin I is a member of known type 1 sodium channel toxin, Da I, Da II and Er I are highly homologous to PaTX from the sea anemone *Entacmaea actinostoloides*, a type 3 sea anemone sodium channel toxin. This suggests that there is a family of PaTX-like toxins in sea anemones.

In chapter 6, a type 1 sodium channel toxin (AETX I) and two novel peptide toxins (AETX II and III), previously isolated from the sea anemone *Anemonia erythraea*, were elucidated for their precursor proteins by cDNA cloning.

Finally, in chapters 7 and 8, peculiar species and organs were used in experiments, respectively. In chapter 7, a growth factor like toxin (Cf I) was isolated from *Cerianthus filiformis* (order Ceriantharia) that is taxonomically distinct from sea anemones (Actiniaria). In chapter 8, two novel peptide toxins (acrorhagins I and II), previously isolated from the specialized aggressive organs (acrorhagi) of *Actinia equina*, were elucidated for their complete amino acid sequences and precursor proteins by cDNA cloning.

In this study, seven novel peptide toxins, seven sodium channel toxins and one Kunitz-type protease inhibitor were isolated from six species of sea anemones. The crab assay adopted in this study seems to be a useful tool to discover novel peptide toxins in sea anemones. Furthermore, based on the elucidated structures of the fifteen precursor proteins as well as those of the known sea anemone peptide toxin precursors, it is concluded that sea anemone peptide toxin precursors can be classified into five groups.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました東京海洋大学海洋科学部海洋食品科学科塩見一雄教授に、衷心より感謝の意を表し、ここに厚く御礼申し上げます。また、数多くの有益な御助言と御激励を賜った同学科長島裕二教授、嶋倉邦嘉助手に厚く御礼申し上げます。

本論文校閲に際し御尽力頂いた海洋食品科学科田中宗彦教授、海洋環境学科浦野直人教授に心より御礼申し上げます。また、cDNAクローニングを御指導頂き、御鞭撻を賜った海洋環境学科永井宏史助教授、プロテインシークエンサー分析および御助言を賜った海洋環境学科石田真巳助手、アミノ酸組成分析に御協力頂いた学習院女子大学品川 明教授、EGF活性の測定に御協力頂いた日本化薬株式会社千野 信博士、イソギンチャクの同定および御助言を賜った千葉県立中央博物館分館 海の博物館 柳 研介博士に深く感謝致します。そして、本研究とともに携わった磯 豪氏、長谷川裕一氏の御協力に感謝致します。最後に、本研究に御協力ならびに御理解を頂いた濱田友貴氏、川嶋陽子氏、木谷洋一郎氏をはじめ東京水産大学生物資源化学講座生理活性化学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

文献

- Anderluh, G., Podlesek, Z. and Maček, P. (2000) A common motif in proapoptins and nematocyst collagens and its putative role. *Biochim. Biophys. Acta* 1476, 372-376.
- Aneiros, A., Garcia, I., Martinez, J. R., Harvey, A. L., Anderson, A. J., Marshall, D. L., Engström, Å., Hellmann, U. and Karlsson, E. (1993) A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1157, 86-92.
- Antuch, W., Berndt, K. D., Chavez, M. A., Delfin, J. and Wuethrich, K. (1993) The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Eur. J. Biochem.* 212, 675-684.
- Bateman, A., Belcourt, D., Bennett, H., Lazure, C. and Solomon, S. (1990) Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 1161-1168.
- Bateman, A. and Bennett, H. P. (1998) Granulins : the structure and function of an emerging family of growth factors. *J. Endocrinol.* 158, 145-151.
- Beeton, C., Wulff, H., Barbaria, J., Clot-Faybesse, O., Pennington, M., Bernard, D., Cahalan, M. D., Chandy, K. G. and Beraud, E. (2001) Selective blockade of T lymphocyte K^+ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13942-13947.
- Belcourt, D. R., Lazure, C. and Bennett, H. P. (1993) Isolation and primary structure of the three major forms of granulin-like peptides from hematopoietic tissues of a teleost fish (*Cyprinus carpio*). *J. Biol. Chem.* 268, 9230-9237.
- Bell, G. I., Fong, N. M., Stempien, M. M., Wormsted, M. A., Caput, D., Ku, L. L., Urdea, M. S., Ral, L. B. and Sanchez-Pescador, R. (1986) Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acids Res.* 14, 8427-8446.
- Belmonte, L., Menestrina, G., Pederzoli, C., Križaj, I., Gubenšek, F., Turk, T. and Maček, P. (1994) Primary and secondary structure of a pore-forming toxin from the sea anemone, *Actinia equina* L., and its association with lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 197-204.
- Béress, L., Beress, R. and Wunderer, G. (1975) Isolation and characterization of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*. *FEBS Lett.* 50, 311-314.
- Béress, L., Wunderer, G. and Wachter, E. (1977) Amino acid sequence of toxin III from *Anemonia sulcata*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 985-988.
- Berks, M. (1995) The *C. elegans* genome sequencing project. *C. elegans* genome mapping and sequencing consortium. *Genome Res.* 5, 99-104.
- Bernheimer, A. W. and Avigad, L. S. (1978) A cholesterol-inhibitable protein from the sea anemone *Metridium senile*. *Biochim. Biophys. Acta* 541, 96- 106.
- Bhandari, V., Palfree, R. G. and Bateman, A. (1992) Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1715-1719.
- Bhandari, V., Giaid, A. and Bateman, A. (1993) The complementary deoxyribonucleic acid

- sequence, tissue distribution, and cellular localization of the rat granulin precursor. *Endocrinology* 133, 2682-2689.
- Blumenthal, K. M. and Kem, W. R. (1983) Primary structure of *Stoichactis helianthus* cytolytins III. *J. Biol. Chem.* 258, 5574-5581.
- Cariello, L., De Santis, A., Fiore, F., Piccoli, R., Spagnuolo, A., Zanetti, L. and Parante, A. (1989) Calitoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Calliactis parasitica*: amino acid sequence and electrophysiological properties. *Biochemistry* 28, 2484-2489.
- Carpenter, G. and Cohen, S. (1990) Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 265, 7709-7712.
- Castañeda, O., Sotolongo, O., Amor, A. M., Stöcklin, R., Anderson, A. J., Harvey, A. L., Engström, Å., Wernstedt, C. and Karlsson, E. (1995) Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 33, 603-613.
- Cordeiro, M. D. N., De Figueiredo, S. G., Valentim, A. D. C., Diniz, C. R., Von Eickstedt, V. R., Gilroy, J. and Richardson, M. (1993) Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (keys.). *Toxicon* 31, 35-42.
- Cotton, J., Crest, M., Bouet, F., Alessandri, N., Gola, M., Forest, E., Karlsson, E., Castañeda, O., Harvey, A. L., Vita, C. and Ménez, A. (1997) A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. *Eur. J. Biochem.* 244, 192-202.
- Couto, M. A., Harwig, S. S., Cullor, J. S., Hughes, J. P. and Lehrer, R. I. (1992) Identification of eNAP-1, an antimicrobial peptide from equine neutrophils. *Infect. Immun.* 60, 3065-3071.
- Culouscou, J. M., Carlton, G. W. and Shoyab, M. (1993) Biochemical analysis of the epithelin receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 10458-10462.
- Diniz, C. R., Cordeiro, Mdo. N., Junor, L. R., Kelly, P., Fischer, S., Reimann, F., Oliveira, E. B. and Richardson, M. (1990) The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin Tx1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett.* 263, 251-253.
- Diniz, M. R., Paine, M. J., Diniz, C. R., Theakston, R. D. and Crampton, J. M. (1993) Sequence of the cDNA coding for the lethal neurotoxin Tx1 from the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and processing of a preprotoxin. *J. Biol. Chem.* 268, 15340-15342.
- Diochot, S., Schweitz, H., Béress, L. and Lazdunski, M. (1998) Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J. Biol. Chem.* 273, 6744-6749.
- Diochot, S., Loret, E., Bruhn, T., Beress, L., Lazdunski, M. (2003) APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human *ether-a-go-go*-related gene potassium channels. *Mol. Pharmacol.* 64, 59-69.
- Dufton, M. J. (1985) Protease inhibitors and dendrotoxins. *Eur. J. Biochem.* 153, 647-654.
- Elliott, R. C., Konya, R. S., Vickneshwara, K. (1986) The isolation of a toxin from the dahlia sea

- anemone, *Tealia felina* L. *Toxicon*. 24, 117-122.
- Enger, D. A., Matsunami, R. K., Campion, S. R., Stringer, C. D., Steavens, A. and Niyogi, S. K. (1988) Cloning of authentic human epidermal growth factor as a bacterial secretory protein and its initial structure-function analysis by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 263, 12384-12390.
- Ferlan, I. and Lebez, D. (1974) Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina*. *Toxicon* 12, 57-61.
- Forest, E., Petillot, Y., Gagnon, J., Cotton, J. and Vita, C. (1996) Determination of the C-terminal form of an anemone toxin using capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 17, 962-964.
- Fritz, H., Brey, B. and Béress, L. (1972) Polyvalent iso-inhibitors for trypsin, chymotrypsin, plasmin and kallikreins of sea anemones (*Anemonia sulcata*), isolation, inhibitory behavior and amino acid composition. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 19-30.
- Gendeh, G. S., Young, L. C., de Medeiros, L. C., Jeyaseelan, K., Harvey, A. L. and Chung, M. C. M. (1997) A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression. *Biochemistry* 36, 11461-11471.
- Ghadessy, F. J., Chen, D., Kini, R. M., Chung, M. C., Jeyaseelan, K., Khoo, H. E. and Yuen, R. (1996) Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. cDNA cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* 271, 25575-25581.
- Gregory, H. and Preston, B. M. (1977) The primary structure of human urogastrone. *Int. J. Pept. Protein Res.* 9, 107-118.
- Grotendorst, G. R. and Hessinger, D. A. (2000) Enzymatic characterization of the major phospholipase A₂ component of sea anemone *Aiptasia pallida* nematocyst venom. *Toxicon* 38, 931-943.
- Halstead, B. W. (1988) "Poisonous and Venomous Marine Animals of the World", 2nd revised edition. The Darwin Press, p. 99.
- Harvey, A. L., Marshall, D. L., De-Allie, F. A. and Strong, P. N. (1989) Interactions between dendrotoxin, a blocker of voltage-dependent potassium channels, and charybdotoxin, a blocker of calcium-activated potassium channels, at binding sites on neuronal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 394-397.
- Hessinger, D. A. and Lenhoff, H. M. (1973) Assay and properties of the pure venom from the nematocysts of the acontia of the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 629-638.
- 日高 道雄 (1992) 岩礁の陣取り合戦. 週間朝日百科 動物たちの地球 62、p.46、pp.50-52.
- Hong, S. J. and Kang, K. W. (1999) Purification of granulin-like polypeptide from the blood-sucking leech, *Hirudo nipponia*. *Protein Expr. Purif.* 16, 340-346.
- Honma, T., Hasegawa, Y., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (2005) Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*. *Toxicon* 45, 33-41.
- Ishida, M., Yokoyama, A., Shimakura K., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (1997) Halcurin, a

- polypeptide toxin from the sea anemone *Halcurias* sp., with a structural resemblance to type 1 and 2 toxins. *Toxicon* 35, 537-544.
- Ishida, M., Minagawa, S., Miyauchi, K., Shimakura, K., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (1997) Amino acid sequences of Kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Actinia equina*. *Fisheries Sci.* 63, 794-798.
- ジャック・T・モイヤー、余吾 豊 (2001) クマノミガイドブック. p.84、TBSブリタニカ：東京.
- Kalapothis, E., Penaforte, C. L., Leao, R. M., Cruz, J. S., Prado, V. F., Cordeiro, M. N., Diniz, C. R., Romano-Silva, M. A., Prado, M. A., Gomez, M. V. and Beirao, P. S. (1998) Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). *Toxicon* 36, 1971-1980.
- Kalman, K., Pennington, M. W., Lanigan, M. D., Nguyen, A., Rauer, H., Mahnir, V., Paschetto, K., Kem, W. R., Grissmer, S., Gutman, G. A., Christian, E. P., Cahalan, M. D., Norton, R. S. and Chandy, K. G. (1998) ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J. Biol. Chem.* 273, 32697-32707.
- Kem, W. R. (1988) Sea anemone toxins: structure and action. In: *The Biology of Nematocystes* (Hessinger, D. A. and Lenhoff, H. M., Eds). pp. 375-405, Academic Press: New York.
- Kem, W. R., Parten, B., Pennington, M. W., Price, D. A. and Dunn, B. M. (1989) Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28, 3483-3489.
- Kem, W. R., Pennington, M. W. and Dunn, B. M. (1990) Sea anemone polypeptide toxins affecting sodium channels. Initial structure-activity investigations. In: *Marine Toxins. Origin, Structure and Molecular Pharmacology*. (Hall, S. and Strichartz, G., Eds). pp. 287-289, American Chemical Society: Washington, D.C.
- Kem, W. R., Pennington, M. W., Krafft, D. S. and Hill, R. J. (1996) "Biochemical Aspects of Marine Pharmacology", ed. by Lazarovici, P., Spira, M. E. and Zlotkin, E. p. 98, Alaken.
- Kim, J. G., Vallet, J. L. and Christenson, R. K. (2001) Characterization of uterine epidermal growth factor during early pregnancy in pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 20, 253-265.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lenarčič, B., Ritonja, A., Štrukelj, B., Turk, B. and Turk, V. (1997) Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain. *J. Biol. Chem.* 272, 13899-13903.
- Levieu, I. and Grimmelikhuijzen, C. J. (1995) Molecular cloning of a prehormone from sea anemones containing numerous copies of a metamorphosis-inducing neuropeptide: a likely role for dipeptidyl aminopeptidase in neuropeptide precursor processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 11647-11651.
- Li, D., Xiao, Y., Hu, W., Xie, J., Bosmans, F., Tytgat, J. and Liang, S. (2003) Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *FEBS Lett.* 555, 616-622.
- Lin, X.-Y., Ishida, M., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (1996) A polypeptide toxin in the sea anemone

- Actinia equina* homologous with other sea anemone sodium channel toxins: isolation and amino acid sequence. *Toxicon* 34, 57-65.
- 林 新宇 (1996) イソギンチャク類のペプチド毒のアミノ酸配列に関する研究. 博士論文. 東京水産大学、東京.
- Litchfield, J. T. Jr. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 96, 99-113.
- Liu, W. H., Wang, L., Wang, Y. L., Peng, L. S., Wu, W. Y., Peng, W. L., Jiang, X. Y., Tu, H. B., Chen, H. P., Ou-Yang, P. and Xu, A. L. (2003) Cloning and characterization of a novel neurotoxin from the sea anemone *Anthopleura* sp. *Toxicon* 41, 793-801.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Marinetti, G. V. (1965) The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 98, 554-565.
- Malpezzi, E. L. A., De Freitas, J. C., Muramoto, K. and Kamiya, K. (1993) Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* 31, 853-864.
- Martinez, G., Kopeyan, C., Schweitz, H. and Lazdunski, M. (1977) Toxin III from *Anemonia sulcata* : primary structure. *FEBS Lett.* 84, 247-252.
- Mebs, D. and Gebauer, E. (1980) Isolation of proteinase inhibitory, toxic and hemolytic polypeptides from a sea anemone, *Stoichactis* sp. *Toxicon* 18, 97-106.
- Mebs, D., Liebrich, M., Reul, A. and Samejima, Y. (1983) Hemolysins and proteinase inhibitors from sea anemones of the Gulf of Aqaba. *Toxicon* 21, 257-264.
- Mehraban, F., Black, A. R., Breeze, A. L., Green, D. G. and Dolly, J. O. (1985) A functional membranous acceptor for dendrotoxin in rat brain : solubilization of the binding component. *Biochem. Soc. trans.* 13, 507-508.
- Menon, R. P. and Hughes, R. C. (1999) Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur. J. Biochem.* 264, 569-576.
- Metrione, R. M., Schweitz, H. and Walsh, K. A. (1987) The amino acid sequence of toxin Rp III from the sea anemone *Radianthus paumotensis*. *FEBS Lett.* 218, 59-62.
- Minagawa, S., Ishida, M., Shimakura, K., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (1997) Isolation and amino acid sequences of two Kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Anthopleura* aff. *xanthogrammica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B, 381-386.
- Minagawa, S., Ishida, M., Shimakura, K., Nagashima, Y. and Shiomi, K. (1998) Amino acid sequence and biological activities of another Kunitz-type protease inhibitor isolated from the sea anemone *Anthopleura* aff. *xanthogrammica*. *Fisheries Sci.* 64, 155-159.
- Minagawa, S., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K. (1998) Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *FEBS Lett.* 427, 149-151.
- 皆川 園美 (1997) イソギンチャクの生理活性ペプチドの一次構造解析. 博士論文. 東京水産大学、東京.
- 水野 健作、松尾 寿之 (1988) 生理活性ペプチドのC末端アミド化酵素. *生化学* 60, 551-557.

- Nagai, H., Oshiro, N., Takuwa-Kuroda, K., Iwanaga, S., Nozaki, M., Nakajima, T. (2002) Novel proteinaceous toxins from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *Phyllo-discus semoni* Kwietniewski. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 760-763.
- Nara, K., Matsue, H. and Naraoka, T. (2004) Granulin-like peptide in the mid-gut gland of the bivalve mollusk, *Patinopecten yessoensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1675, 147-154.
- Nevalainen, T. J., Peuravuori, H. J., Quinn, R. J., Llewellyn, L. E., Benzie, J. A., Fenner, P. J. and Winkel, K. D. (2004) Phospholipase A2 in cnidaria. *Comp. Biochem. Physi. B* 139, 731-735.
- Nishida, S., Fujita, S., Warashina, A., Satake, M. and Tamiya, N. (1985) Amino acid sequence of a sea anemone toxin from *Parasicyonis actinostoloides*. *Eur. J. Biochem.* 150, 171-173.
- 西村 三郎 (1992) 日本海岸動物図鑑 [I]. PLATE 31、32、33、保育社 : 大阪.
- Norton, R. S. (1991) Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 29, 1051-1084.
- Norton, R. S., Pennington, M. W. and Wulff, H. (2004) Potassium channel blockade by the sea anemone toxin ShK for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Curr. Med. Chem.* 11, 3041-3052.
- Olivera, B. M., Gray, W. R., Zeikus, R., McIntosh, J. M., Varga, J., Rivier, J., De Santos, V. and Cruz, L. J. (1985) Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 230, 1338-1343.
- Oshiro, N., Kobayashi, C., Iwanaga, S., Nozaki, M., Namikoshi, M., Spring, J., Nagai, H. (2004) A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *ActinERIA villosa*. *Toxicon.* 43, 225-258.
- Pascall, J. C., Jones, D. S. C., Doel, S. M., Clements, J. M., Hunter, M., Fallon, T., Edwards, M. and Brown, K. D. (1991) Cloning and characterization of a gene encoding pig epidermal growth factor. *J. Mol. Endocrinol.* 6, 63-70.
- Plowman, G. D., Green, J. M., Neubauer, M. G., Buckley, S. D., McDonald, V. L., Todaro, G. J. and Shoyab, M. (1992) The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *J. Biol. Chem.* 267, 13073-13078.
- Ray, P., Mey, F. J., Montelione, G. T., Liu, J.-F., Narang, S. A., Scherage, H. A. and Wu, R. (1988) Structure-function studies of murine epidermal growth factor: expression and site-directed mutagenesis of epidermal growth factor gene. *Biochemistry* 27, 7289-7295.
- Saggi, S. J., Safirstein, R. and Price, P. M. (1992) Cloning and sequencing of the rat preproepidermal growth factor cDNA: comparison with mouse and human sequences. *DNA Cell Biol.* 11, 481-487.
- Sasaki, K., Shimizu, Y., Abe, G., Fujisawa, Y., Morishita, F., Matsushima, O. and Furukawa, Y. (2002) Structural and functional diversities of the *Aplysia Mytilus* inhibitory peptide-related peptides. *Peptides* 23, 1959-65.
- Savage, C. R. Jr., Inagami, T. and Cohen, S. (1972) The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 247, 7612-7621.
- Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.-M., Béress, L. and Lazdunski, M. (1995) Kaliclodines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for

- voltage-sensitive K⁺ channels. J. Biol. Chem. 270, 25121-25126.
- Scott, J., Urdea, M., Quiroga, M., Sanchez-Pescador, R, Fong, N., Selby, M., Rutter, W. J. and Bell, G. I. (1983) Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. Science 221, 236-240.
- 銭文紅 (1995) ミナミウメボシイソギンチャクのペプチドに関する研究. 修士論文. 東京水産大学、東京.
- Shiomi, K., Tanaka, E., Yamanaka, E. and Kikuchi, T. (1985) Isolation and characterization of a lethal hemolysin in the sea anemone *Parasicyonis actinostoloides*. Toxicon 23, 865-874.
- Shiomi, K., Ishikawa, M., Yamanaka, H. and Kikuchi, T. (1989) Isolation and properties of four serine protease inhibitors in the sea anemone *Actinia equina*. Nippon Suisan Gakkaishi 55, 1235-1241.
- Shiomi, K., Lin, X.-Y., Nagashima, Y. and Ishida, M. (1995) Isolation and amino acid sequences of polypeptide toxins in the Caribbean sea anemone *Condylactis passiflora*. Fisheries Sci. 61, 1016-1021.
- Shiomi, K., Lin, X.-Y., Nagashima, Y. and Ishida, M. (1996) Isolation and amino acid sequence of a polypeptide toxin from the sea anemone *Radianthus crispus*. Fisheries Sci. 62, 629-633.
- Shiomi, K., Qian, W.-H., Lin, X.-Y., Shimakura, K., Nagashima, Y. and Ishida, M. (1997) Novel polypeptide toxins with crab lethality from the sea anemone *Anemonia erythraea*. Biochim. Biophys. Acta 1335, 191-198.
- Shiomi, K., Kazama, A., Shimakura, K. and Nagashima, Y. (1998) Purification and properties of phospholipases A2 from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. Toxicon 36, 589-599.
- Shiomi, K., Minagawa, S., Lin, X.-Y., Yokoyama, A., Shimakura, K. and Nagashima, Y. (1998) Screening for toxins and protease inhibitors in sea anemones. Fisheries Sci. 64, 170-171.
- 塩見 一雄 (1997) イソギンチャクの毒. 化学と生物 35, 759-765.
- 塩見 一雄、長島 裕二 (2001) 海洋動物の毒—フグからイソギンチャクまで—(三訂版). pp.178-195、成山堂書店：東京.
- 塩見 一雄 (1999) 磯巾着の話 毒成分とその有効利用. 食品と容器 40, 625-631.
- 白井 祥平 (1984) 有毒有害海中動物図鑑. p. 269、マリン企画：東京.
- Shoyab, M., McDonald, V. L., Byles, C., Todaro, G. J. and Plowman, G. D. (1990) Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 7912-7916.
- Smith, L. A., Lafaye, P. J., LaPenotiere, H. F., Spain, T. and Dolly, J. O. (1993) Cloning and functional expression of dendrotoxin K from black mamba, a K⁺ channel blocker. Biochemistry 32, 5692-5697.
- Spagnuolo, A., Zanetti, L., Cariello, L. and Piccoli, R. (1994) Isolation and characterization of two genes encoding calitoxins, neurotoxic peptides from *Calliactis parasitica* (Cnidaria). Gene 138, 187-191.
- Sunahara, S., Muramoto, K., Tenma, K. and Kamiya, H. (1987) Amino acid sequence of two sea anemone toxins from *Anthopleura fuscoviridis*. Toxicon 25, 211-219.

- Tanaka, M., Haniu, M., Yasunobu, K. T. and Norton, T. R. (1977) Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant anthopleurin-A. *Biochemistry* 16, 204-208.
- Thomas, E. C. and Ian, G. C. (1987) Sequences of the genes and polypeptide precursors for two bovine protease inhibitors. *J. Mol. Biol.* 194, 11-22.
- Tschesche, H., Kolkenbrock, H. and Bode, W. (1987) The covalent structure of the elastase inhibitor from *Anemonia sulcata* — a “non-classical” Kazal-type protein. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368, 1297-1304.
- Uesaka, T., Yano, K., Yamasaki, M. and Ando, M. (1995) Somatostatin-, vasoactive intestinal peptide-, and granulin-like peptides isolated from intestinal extracts of goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 298-306.
- 内田 紘臣、楚山 勇 (2001) イソギンチャクガイドブック. p.27、pp.70-71、p.94、TBSブリタニカ : 東京.
- Widmer, H., Wagner, G., Schweitz, H., Lazdunski, M. and Wuthrich, K. (1988) The secondary structure of the toxin ATX Ia from *Anemonia sulcata* in aqueous solution determined on the basis of complete sequence-specific ¹H-NMR assignments. *Eur. J. Biochem.* 171, 177-192.
- Wunderer, G., Machleidt, W. and Fritz, H. (1981) The broad-specificity proteinase inhibitor 5 II from the sea anemone *Anemonia sulcata*. *Methods Enzymol.* 80, 816-820.
- Zykova, T. A., Vinokurov, L. M., Markova, L. F., Kozlovskaya, E. P. and Elyakov, G. B. (1985) Amino-acid sequence of trypsin inhibitor IV from *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 11, 293-301.
- Zykova, T. A., Kozlovskaya, E. P. and Eliakov, G. B. (1988) Amino acid sequence of neurotoxin II from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 14, 878-882.
- Zykova, T. A., Kozlovskaya, E. P. and Eliakov, G. B. (1988) Amino acid sequence of neurotoxins IV and V from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioor. Khim.* 14, 1489-1494.
- Zykova, T. A. and Kozlovskaya, E. P. (1989) Amino acid sequence of neurotoxin I from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 15, 1301-1306.
- Zykova, T. A., Monastyrnaia, M. M., Apalikova, O. V., Shvets, T. V., Kozlovskaya, E. P. (1998) Low-molecular cytolysins and trypsin inhibitors from sea anemone *Radianthus macrodactylus*. Isolation and partial characterization. *Bioorg Khim.* 24, 509-516.