

サソリ由来の殺虫性ペプチド毒素ならびに表皮蛍光物質の構造解析

義本 裕介

緒言

代表的な有毒生物であるサソリは尾節から分泌される毒を用いて獲物を捕獲し、また天敵から身を守っている。サソリ毒液には 100~200 種類のペプチド成分が含まれており、イオンチャンネルに作用する神経毒が主な活性成分である。また、この中に含まれている昆虫特異的に作用する成分は農薬への応用も期待されている。一方、サソリのもつ特徴として、表皮の蛍光現象が知られている。この蛍光現象には、紫外線に対する防御の役割や個体間コミュニケーションへの関与が考えられているが、その生物学的意義は不明である。本研究ではまず、北アフリカ生息種サソリである *Buthacus leptochelys* の毒液に含まれる殺虫性ペプチドを探索し、その構造を決定した。次に、日本生息種サソリである *Liocheles australasiae* (ヤエヤマサソリ) を用いて、その表皮蛍光現象に関わる物質を探索し、その構造を決定した。さらに、同定した化合物の蛍光発現に必要な構造要因について明らかにした。以下にそれぞれの研究結果の要約を示した。

1. *B. leptochelys* 毒液に含まれる新奇殺虫性ペプチドの構造決定

B. leptochelys の毒液を逆相 HPLC (C₄およびC₁₈カラム) を用いて分画し、コオロギに対する殺虫活性を評価することによって活性画分を特定した。単一の活性成分となるまでこの操作を繰り返した結果、4つの殺虫性ペプチド (BI-1, BI-2, BI-3 および BI-4) が得られた。これら4つのペプチドのN末端アミノ酸配列をエドマン分解法により解析したところ、いずれもNa⁺チャンネルに作用する既知サソリ毒素 (α -toxin あるいは β -toxin) と類似していることが明らかになった。このうち、最も強力な殺虫活性を示した BI-1 について、その全配列をエドマン分解と質量分析法 (*de novo sequencing* 法) により決定した結果、BI-1 は4つのジスルフィド結合をもつ67残基のペプチドであることが分かった。BI-1 は昆虫および哺乳類のNa⁺チャンネルに対して非選択的に作用する α -like toxin と非常に高い相同性を示した。さらに、BI-1 の三次元構造を、最も高い相同性を示した Lqh3 を鋳型に用いてホモロジーモデリング法により推定した。その結果、活性に寄与すると考えられているアミノ酸残基の位置が両者でほぼ一致した。このことから、BI-1 は Lqh3 と同様の作用機構で毒性を発現していると考えられた。

2. サソリ表皮に含まれる蛍光物質の探索

これまでにサソリ表皮由来の蛍光物質として、norharman および hymecromone が単離・同定されている (Stanchel: 1999, Frost: 2001)。そこで、まず *L. australasiae* を用いてこれらの化合物の存在について検証した。*L. australasiae* の体全体および脱皮殻を用いて、それぞれ

抽出・粗分画した後、LC/MS を用いて分析した。その結果、体全体の抽出物から norharman が確認されたものの、脱皮殻からは norharman および hymecromone のいずれも検出されなかった。以上のことから、これらの蛍光物質は *L. australasiae* の表皮蛍光現象に関与しておらず、未知の蛍光物質の存在が強く示唆された。

そこで、*L. australasiae* の脱皮殻から得られた抽出物を固相抽出カラム (Sep-pak Plus Silica) を用いて分画した。このうち、*n*-hexane/ethyl acetate = 8/2 によって溶出した画分が顕著な蛍光を示したことから、これを蛍光 HPLC (励起 270 nm, 蛍光 410 nm) および LC/MS によって分析した。その結果、この画分に 496.2 Da の質量をもつ蛍光物質が含まれることが明らかとなった。これを精製し、その構造を NMR および MS/MS 分析を用いて解析したところ、がフタル酸エステルの環状二量体構造をもつ化合物 (以下 CDPE) であると同定した。同様の実験を *Isometrus maculatus* (マダラサソリ) の脱皮殻を用いて行ったところ、同じ化合物が見いだされた。さらに、3 種の北アフリカ生息種サソリからも LC/MS 分析によってその存在が確認できた。これらのことから、CDPE がサソリ表皮に普遍的に存在することが示唆された。

続いて、CDPE の蛍光特性を明らかにするため、これを化学合成し、その励起・蛍光スペクトルを測定した。まず、吸収極大である 270 nm で励起すると 330 nm 付近に最も強い蛍光が見られた。この時、410 nm および 430 nm にも蛍光のピークが見られた。この可視領域の蛍光ピーク (400~500 nm) は 360 nm で励起すると、より明瞭に観測された。以上より、CDPE は 2 つの大きく異なる波長領域で蛍光を示すユニークな特性をもつことが明らかとなった。

3. CDPE の構造と蛍光の関係

サソリ表皮中において、CDPE 以外のフタル酸エステル構造をもつ化合物を探索した結果、環状単量体フタル酸エステル化合物 (以下 CMPE) を新たに見いだした。CMPE の示す可視領域の蛍光は、CDPE と比べて弱かったことから、CDPE のもつ環状二量体構造が可視領域蛍光の発現にとって重要であることが示唆された。そこで、フタル酸エステルの構造と蛍光波長との関係を明らかにするため、環状あるいはエステル構造を含まないフタル酸類縁体を化学合成し、その紫外吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。その結果、いずれも 270 nm の吸収極大を示し、その波長によって励起すると CDPE と同程度の紫外領域蛍光 (330 nm 付近) を示したが、これらの可視領域蛍光は弱いかあるいはほとんど認められなかった。以上のことから、可視領域蛍光の発現にはフタル酸のエステル構造が必須であり、さらに二量体環状構造を形成することによってその蛍光が増強されることが分かった。また、計算化学手法による安定配座の推定から、CDPE においては二つの芳香環の相互作用によって分子内エキシマーを形成し、これが可視領域蛍光の発現に寄与していることが示唆された。

総括

1. 北アフリカ生息種サソリである *B. leptochelys* の毒液から殺虫性ペプチド BI-1 を単離し、その一次構造を、エドマン分解ならびに質量分析法を用いて明らかにした。BI-1 の構造は昆虫および哺乳類双方の Na⁺チャンネルに作用するサソリ毒素と類似した構造をもっていた。
2. *L. australasiae* 表皮に含まれる蛍光物質の探索をおこない、環状二量体フタル酸エステル構造をもつ化合物 (CDPE) を新たに同定した。CDPE を化学合成し、その蛍光スペクトルを測定したところ、励起波長によって蛍光のパターンが大きく変化することを明らかにした。
3. 環状あるいはエステル構造を含まないフタル酸類縁体を合成し、その構造と蛍光スペクトルの関係について考察した。その結果、強い可視領域蛍光の発現にはエステル構造および二量体環状構造が必要であり、芳香環の相互作用によるエキシマー形成が重要であることが示唆された。