

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	Alhussin Mohamed Abdelhakeem Megaly
論文題目	Characterization of bioactive peptides without disulfide bridges from the venom of <i>Lycosa poonaensis</i> species inhabiting the Egyptian environment (エジプト地域に棲息する <i>Lycosa poonaensis</i> の毒液に含まれるジスルフィド結合を持たない生理活性ペプチドの構造決定)		
(論文内容の要旨) クモは自身が生産する毒を利用することで餌となる昆虫を確実に捕獲するとともに哺乳類などの外敵から身を守っている。クモ毒には様々な生理活性成分が含まれており、神経毒性や細胞毒性などを示すペプチドがその中心的な役割を果たす。クモ毒ペプチドの多くは分子内にジスルフィド結合で架橋された構造を持つものに対し、架橋構造を持たない直鎖状のペプチドも見つかっており、それらはたいていの場合、餌の捕獲や防御には直接寄与しないように思われる抗菌活性を示す。現在、世界中に約5万種のクモが棲息すると言われるが、そのなかで毒成分が研究されたものは限られており、新規生理活性ペプチドの探索対象として興味を持たれている。本論文は、エジプト地域に棲息し先行研究のない <i>Lycosa poonaensis</i> (コモリグモ科) の毒液に含まれる生理活性成分、特に直鎖状ペプチドの構造と活性を明らかにしたものである。内容は以下のとおりである。 第1章の序論に続く第2章では、まず <i>L. poonaensis</i> 毒液のLC/MS分析による全成分の分子量分布を調べた。その結果、毒液には分子量500~8000 Daまでの成分が400種以上含まれ、特に1000~2000 Daの成分が多いことを明らかにした。次にすべての成分に対して、還元とそれに続くCysアルキル化反応をおこなった。それぞれの反応前後の質量変化をLC/MS分析でモニターしたところ、質量が変化しないものが120成分見付き、それらを直鎖状ペプチドと推定した。続いてこの直鎖状ペプチド群のうち、HPLC上で単一のピークを与えた2370 Da (lyp2370と命名) と1987 Da (lyp1987と命名) の2成分についてそのアミノ酸配列をMS/MS解析により推定した。その際、同じ質量を持つLeuとIle残基の識別には、MALDI-TOF/TOF型質量分析計を用い、観測されたアミノ酸側鎖のフラグメンテーションの違いからそれぞれを同定した。推定した配列を確認するためそれぞれのペプチドをFmoc固相合成法により化学的に調製し、天然試料と比較したところ、いずれのペプチドについてもHPLC保持時間が一致し、これにより配列を確定した。さらにその配列をBLAST検索した結果、lyp2370及びlyp1987はそれぞれ <i>L. singoriensis</i> から同定されたM-lycotoxin-Ls4a及びM-lycotoxin-Ls3bと類似していることが判明した。抗菌活性試験の結果、lyp2370は弱い活性しか示さなかったのに対し、lyp1987は顕著な活性を示した。またlyp2370とその構造類縁化合物の構造と活性の関係を検討した結果、lyp2370の低い抗菌活性は両親媒性 α -helix構造の親水性面に存在するGlu残基の負電荷に起因することが示唆された。 第3章では、 <i>L. poonaensis</i> 毒腺において発現するペプチドやタンパク質の構造を網羅的に明らかにすることを目的として、次世代ハイスループットシーケンス技術を用いるトランスクリプトーム解析を行った。毒腺から抽出したmRNAからcDNAライブラリーを構築し、高速シーケンサー (DNBSEQ-G400, MGI Tech社) による200 bp paired-end sequencingにより得られた短い配列 (リード) をつなぎ合わせて配列断片 (コンティグ) を推定した後、コーディング領域を予測した。その結果、他のクモ毒ペプチドやタンパク質と類似したコンティグが87個同定された。内訳としては神経毒と類似したものが最も多く、次いでペプチダーゼならびに直鎖状ペプチドが多かった。直鎖状ペプチドと推定されるコンティグは15個見付かったが、クモ毒直鎖状ペプチドの前駆体において同定されているプロペプチドと成熟配列を隔てるモチーフを目印に解析したところ、それぞれが1~5種の成熟型ペプチドを含んでいることが明らかとなり、			

毒腺で発現すると考えられる計17種類の成熟型直鎖状ペプチドを同定した。また、第2章においてMS/MS解析によって同定された2つのペプチドのうちlyp2370の配列は同定された成熟型ペプチドM-lycotoxin-Lp1aに含まれていること及びlyp1987の配列はM-lycotoxin-Lp2と一致することが確認された。さらにlyp2370はM-lycotoxin-Lp1aのN末端が欠損したペプチドであり、前者は毒液中のプロテアーゼによる後者の分解により生成すると考えられた。

第4章では同定された17種の直鎖状ペプチドから構造的特徴が異なるもの7種を選抜し、Fmoc固相合成法により化学合成してその生物活性を評価した。合成したペプチドは、いずれもグラム陰性菌（大腸菌）並びにグラム陽性菌（黄色ブドウ球菌及び枯草菌）に対して抗菌活性を示したが、ペプチド間でバクテリアに対する選択性が異なっていた。また、すべてのペプチドが昆虫に対する毒性も示したのに対して、溶血活性は認められなかった。円偏光二色性分光法による二次構造解析の結果、これらのペプチドはすべて α -helical構造を形成していることが明らかになり、さらに三次元モデルによりこの α -helical構造の一方の表面に親水性アミノ酸残基が配置し、その反対側に疎水性アミノ酸残基が配置することが予想された。このことから分子が全体として両親媒性を持ち、細胞膜と相互作用して構造を破壊することで活性を発揮するものと推定している。また被験ペプチドの抗菌活性が、ペプチドの正味電荷、 α -helical構造の親水面における塩基性残基と酸性残基の配置、全体の疎水性などの違いにより変化することを示し、それぞれのペプチドの化学的特性も膜との相互作用の強さに影響を与える要因となることから、観察された生理活性の種間選択性は生物種による膜の構成成分の違いが反映されたものと考察した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

クモ毒には様々な生理活性成分が含まれているが、その中心的な役割を担うのはペプチドである。クモ毒液中のペプチドの多くは分子内でジスルフィド結合を形成しており、餌の捕獲や防御にとって有用と考えられる神経毒性や細胞毒性を示すが、ジスルフィド結合を持たない直鎖状のペプチドも存在し、それらの役割については不明な点が多い。現在、世界中に約5万種のクモが棲息すると言われる中で、毒成分の研究は限られた種についてしか行われておらず、新規生理活性化合物の探索対象として関心が持たれている。本論文は、エジプトで採集されこれまで化学的研究がおこなわれてこなかった *Lycosa poonaensis* について、毒液に含まれるペプチド成分を網羅的に分析するとともに、そのうちの直鎖状ペプチドの構造と活性を調べ、新規生理活性ペプチドの取得及びそれらの生物学的役割に関する理解の深化をめざしたものである。評価できる点は以下の3点にまとめられる。

1) *L. poonaensis* 毒液をLC/MSによって分析し、400以上の成分の存在を確認した。還元後のCys残基のアルキル化反応による質量シフトを指標に、ジスルフィド結合を持たない直鎖状ペプチドを探索した結果、120種の直鎖状ペプチドが見出し、そのうちの2種の直鎖状ペプチド (lyp1987とlyp2370) のアミノ酸配列をMS/MS分析によって決定した。2種のうちlyp1987は顕著な抗菌活性を示したのに対してlyp2370の活性は弱かったが、後者の類縁化合物を用いて構造と活性の関係を検討した結果から、抗菌活性を低下させる原因となっているアミノ酸残基を特定した。

2) *L. poonaensis* の毒腺トランスクリプトーム解析により、発現しているペプチド・タンパク質を網羅的に分析した結果、他のクモ毒由来のペプチド・タンパク質と類似した87種のペプチド前駆体配列を同定した。さらにその中から17種類の直鎖状ペプチドの配列を同定することに成功した。

3) 同定した17種の直鎖状ペプチドのうち7種を化学合成し、その生物活性を評価した結果、すべてのペプチドが抗菌活性と昆虫毒性を示すことを見出した。ペプチド分子の3次元モデルからいずれも両親媒性 α -helical構造をもつと推測され、この構造的特質が活性発現につながる細胞膜の構造攪乱を引き起こすと考えられた。また抗菌活性の強さはペプチドそれぞれの正味電荷、両親媒性親水面における塩基性アミノ酸残基と酸性アミノ酸残基の配置及び全体の疎水性の違いなど化学的な特性によっても変化することを示し、膜の構成成分のちがいにより生理活性の種間差がもたらされる可能性を見出した。

以上のように、本論文は、クモ毒に含まれる直鎖状ペプチドの構造を明らかにし、その構造と活性の関係について新たな知見をもたらした。これらの研究成果はクモをはじめとする生物毒における直鎖状ペプチドの役割や活性発現機構の理解につながることを期待でき、天然物化学、ペプチド化学及び毒性学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値があるものと認める。

なお、令和4年8月23日論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）