

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	十 一 浩 典
論文題目	ヤエヤマサソリ毒液に含まれる $\beta$ -KTx毒素ペプチドおよびその部分ペプチドの構造と活性		
(論文内容の要旨)			
<p>サソリ毒液にはさまざまな生理活性ペプチドが含まれ、その中には昆虫に対して作用し新規害虫防除剤開発への応用が期待されるものもある。毒液に含まれるペプチドは、その構造の特徴によりいくつかのグループに分けられる。そのひとつに<math>\beta</math>-KTxと命名されたファミリーがあり、それらはN末端側に<math>\alpha</math>ヘリックス構造をもち、C末端側に複数のジスルフィド結合により架橋された安定な高次構造をもつという共通した特徴がある。これまでこのファミリーに属するペプチドには殺虫活性や抗菌活性が認められているが、その構造と活性の関係は十分に研究されていない。本論文では、日本の先島諸島に生息するヤエヤマサソリ毒液に含まれる<math>\beta</math>-KTxペプチドを対象に、構造と活性の関係に関する知見を得るための化学的な検討をおこなった。</p> <p>第1章で研究背景を述べた後、第2章では、ヤエヤマサソリ毒液から殺虫活性を指標に単離された<math>\beta</math>-KTxペプチドであるLaIT2を化学合成した。LaIT2は、59アミノ酸残基で構成されるペプチドであるため、通常の逐次延長法による固相合成で得るのは難しい。そこで、ペプチド主鎖のチオエステルとシステイン側鎖のSH基との間で起こる選択的な反応を利用して2つのフラグメントペプチドを縮合させるNCL法を用いた。縮合部位は30番目のグリシンと31番目のシステインとの間とし、まずフラグメントとして30番目までのLaIT2(1-30)のチオエステルと、31番目から59番目までのLaIT2(31-59)をそれぞれFmoc固相合成法で調製し、両者を縮合させた。続いて酸化反応により縮合物の分子内にジスルフィド結合を形成させ、合成LaIT2を得た。合成LaIT2は天然物と同一のHPLC上の挙動と質量スペクトルを与えた。また、このLaIT2を臭化シアンによる化学的断片化処理あるいはtrypsinおよびAsp-Nを用いた酵素的断片化処理を行った後、MS分析およびMS/MS分析に供することで分子内のジスルフィド結合の架橋様式を決定した。さらに、LaIT2および合成に用いた2つのフラグメントから得られた部分ペプチドの殺虫活性および抗菌活性を評価し、分子のN末端領域が両活性の発現にとって重要であることを示した。</p> <p>第3章ではヤエヤマサソリ毒液に含まれる新規<math>\beta</math>-KTxペプチドとしてLaIT3を見いだし、その構造を明らかにするとともに生物活性を評価した。殺虫活性を指標として単離されたLaIT3は、3つのジスルフィド結合を含み、エドマン分解法ならびに酵素消化物のMS/MS分析を用いた<i>de novo</i>シーケンシング法を組み合わせることで一次構造を決定した。その際、同じ質量を持つために<i>de novo</i>シーケンス法では区別が難しいロイシンとイソロイシンは、ペプチドのN末端アミノ基に高い塩基性をもつ4-グアニジノメチル安息香酸を導入し、高エネルギーCID条件下におけるMS/MSフラグメント化を促進することで観察される側鎖の開裂様式の違いから判別した。また活性評価の結果、</p>			

LaIT3はLaIT2と同様、殺虫活性に加えて抗菌活性も示した。

第4章では、前述のように $\beta$ -KT<sub>x</sub>ペプチドがN末端領域とC末端領域の2つの特徴的なモチーフから構成されることに着目し、それぞれのモチーフのみを含む部分ペプチドの存在を毒液中に探索した。ヤエヤマサソリ毒液中の200種類を超える成分の分子質量をLC/MSにより測定し、それぞれの質量値を精査したところ、LaIT2およびLaIT3の部分ペプチドの質量と一致する成分が見いだされた。それぞれについてMS/MSによるプロダクトイオンスペクトルあるいはエドマン分解法によって配列を解析した結果、両毒素ペプチドのN末端領域から成る部分ペプチドと、C末端領域から成る部分ペプチドが毒液中に存在することが確認された。この結果から、毒素ペプチドの翻訳後における分解がサソリ毒液成分の多様化メカニズムのひとつである可能性が示された。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

サソリは食料の確保や捕食者に対する防御のために毒を用いており、その中に含まれる多様な生理活性物質にはさまざまな応用が期待されている。本論文は、サソリ毒の主要成分であるペプチド化合物のうち、その構造的な特徴から $\beta$ -KTxファミリーと分類されるペプチドの構造と生物活性に注目し、日本の先島諸島に生息するヤエヤマサソリ毒液に含まれる2種のペプチドを対象として、化学的な研究を行ったものである。評価できる点は以下の通りである。

1. ヤエヤマサソリ毒液から $\beta$ -KTxペプチドとして単離されたLaIT2について、チオエステルとSH基との間で起こる選択的な反応によりペプチドフラグメントを縮合させるNCL法を用いて化学合成することに成功した。また、その分子内ジスルフィド結合の架橋様式を、化学的あるいは酵素的に調製したペプチド断片のMS分析およびMS/MS分析により決定した。さらに、ペプチド全体と各末端領域部分ペプチドの活性を比較した結果から、LaIT2のN末端領域が殺虫および抗菌活性の発現にとって重要であることを明らかにした。
2. 殺虫活性を指標としてヤエヤマサソリ毒液から新規ペプチド毒素LaIT3を単離し、その一次構造をエドマン分解法ならびにMS/MS分析を用いた*de novo*シーケンシング法を組み合わせることで決定するとともに、そのアミノ酸配列から同毒素が新規 $\beta$ -KTxペプチドであることを明らかにした。*de novo*シーケンシング法では、ペプチドを化学修飾することでアミノ酸配列の同定精度を高めることに成功した。またLaIT3は、殺虫活性に加え抗菌活性を併せもつことも示した。
3. ヤエヤマサソリ毒液中に含まれる200種類を超える成分の質量分析に基づいて、LaIT2およびLaIT3のN末端領域およびC末端領域から成る部分ペプチドが毒液中に存在することを見だし、毒液内での分解がサソリ毒液成分の多様化メカニズムに寄与している可能性を示した。

以上のように本論文は、ヤエヤマサソリ毒液に含まれる毒素ペプチドの合成、構造解析および活性評価を通じて $\beta$ -KTxファミリーに分類されるペプチド化合物の構造と活性および機能との関係に関する興味深い知見を与えるものであり、生物有機化学、天然物化学、分析化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あるものと認める。

なお、平成31年2月14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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

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)