

# 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

十一 浩典

## 緒言

サソリは、約 4 億 3000 万年前から現在とほぼ同じ形状で存在していたことが分かっている。その生育環境は多岐にわたっており、現在では南極大陸を除く全ての大陸で、2,000 を超える種の生息が確認されている。サソリが太古から絶滅することなく生き延びることができた理由の一つとして、環境の変化への対応に迫られた際に、毒を使用することで食糧を十分に確保できたことが考えられる。つまり、サソリが種々の生理活性物質を毒液成分として持つことで、餌となる動物を確実に捕獲し、また捕食者から身を守ることができるようになった。これらの毒素の中には昆虫に対して毒性を示すが、ヒトに対してほとんど作用しない成分が存在する。このような選択毒性をもつペプチドの作用機構に関する知見は、新たな農薬や殺虫剤の開発に有用であると考えている。

日本においては、先島諸島にヤエヤマサソリが生息しており、これまでに 2 種の殺虫性ペプチドが同定されている。そのうちの一つである LaIT2 は 59 個のアミノ酸残基で構成され、サソリ由来の毒素ペプチドファミリーの 1 つである $\beta$ -KTx に属する。 $\beta$ -KTx は、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成する N 末端領域と、cysteine-stabilized  $\alpha\beta$  (CS $\alpha\beta$ ) モチーフと呼ばれる安定な高次構造をもった C 末端領域で構成され、LaIT2 はこのファミリーに属するペプチドとして、はじめて殺虫性が確認された。LaIT2 はさらに、抗菌活性を併せもっており、これらの活性と LaIT2 の構造の関係に興味を持たれるが、サソリ毒腺から得られる LaIT2 はごく微量のため研究の進展が妨げられている。そこで本研究では、まず LaIT2 の全長ならびに、N および C 末端の各領域からなる部分ペプチドの化学合成を検討した。また $\beta$ -KTx の構造と活性の関係について新たな知見を得るために、毒液中に含まれる新規の $\beta$ -KTx について探索を行った。

## 1. LaIT2 およびその部分ペプチドの化学合成と活性評価

59 アミノ酸残基からなる LaIT2 の化学合成は、通常の逐次延長法による固相合成では難しいと考えられた。そこで、チオエステルと 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 native chemical ligation (NCL) 法を用いることとした。この手法は、50 残基を超える長鎖ペプチドを比較的容易に合成できるだけでなく、それぞれのフラグメントをそのまま部分ペプチドとして活用できるという利点があり、特に後者は本研究の目的に合致するものである。縮合部位は Cys とする必要があることから、30 番目の Gly と 31 番目の Cys との間を選択し、LaIT2(1-30)-thioester と LaIT2(31-59)をそれぞれ Fmoc 固相合成法で合成した。LaIT2(1-30)-thioester を合成する際には、チオエステル前

駆体として、3,4-diaminobenzoic acid (Dbz) を樹脂に導入してペプチド鎖を伸長し、LaIT2(1-30)-thioester と LaIT2(31-59)を縮合させた後、酸化してジスルフィド結合を形成させることにより、LaIT2 に導いた。合成 LaIT2 は LC-MS 分析において、天然物と同一の溶出時間と質量スペクトルを与えた。また、NCL に用いたそれぞれのフラグメントをもとにして、N 末端および C 末端領域部分ペプチド (LaIT2(1-30) および LaIT2(26-59)) を得た。なお C 末端領域部分ペプチドについては、NCL のためのフラグメントとして用いた LaIT2(31-59)においてジスルフィド結合が安定に形成されなかったため、26 残基目まで伸長することで LaIT2(26-59)としジスルフィド結合を形成させた。さらに、LaIT2 のジスルフィド結合の架橋様式を明らかにするため、臭化シアン、trypsin および Asp-N によって断片化した後、MS 分析および MS/MS 分析に供した。得られた各断片の質量値を予想値あるいは合成した断片ペプチドの質量値と比較することにより、ジスルフィド結合の架橋様式を決定した。

続いて LaIT2、LaIT2(1-30) および LaIT2(26-59) の生理活性について調べた結果、N 末端領域が殺虫活性と抗菌活性の両発現に重要であることが示された。LaIT2 の N 末端領域は、親水性残基と疎水性残基がそれぞれ、 $\alpha$ -ヘリックスの一方の側面に集まった両親媒性構造を形成しており、これによる膜破壊効果が活性発現に寄与していると考えられる。しかしながら、昆虫に対する毒性において、全長 LaIT2 および LaIT2(1-30)ともに麻痺活性を示したものの、殺虫活性は全長の場合でしか認められなかった。このような違いは、抗菌活性では見られなかったことから、昆虫に対する毒性において C 末端領域が何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。これに対し、大腸菌に対する活性は全長よりも N 末端領域だけの方が高く、この場合は C 末端の存在が不利に働いていることが分かった。

## 2. 新規 $\beta$ -KTx である LaIT3 の一次構造解析

ヤエヤマサソリ毒液に含まれる、他の $\beta$ -KTx ペプチドの同定を目的として、さらに毒素の探索を進めた。その結果、LaIT2 と同程度の極性ならびに殺虫成分を示す成分が見いだされた。この成分のジスルフィド結合の還元反応を行ったところ、その質量値の増加から 3 つのジスルフィド結合が含まれることが分かった。これらのことから、この成分が $\beta$ -KTx ペプチドである可能性が高いと考え、新規殺虫性ペプチド LaIT3 として構造決定を進めた。単離した LaIT3 をエドマン分解法ならびに、酵素消化物の MS/MS 分析による *de novo* シーケンシング法に供することで、LaIT3 の一次構造を決定した

*de novo* シーケンシング法における Leu/Ile の区別は、高エネルギーCID 条件によるペプチドのフラグメント化を利用して行った。この手法では、側鎖の開裂様式の違いから Leu/Ile を区別することができる。しかし、側鎖開裂は配列中の末端領域に Arg が存在しないと十分に起こらないことが知られており、酵素消化により得られた LaIT3 の断片ペプチドにおいてもこの理由により区別ができなかった。そこで、これらのペプチドの N 末端アミノ基に高い塩基性を持つ 4-グアニジノメチル安息香酸を導入したところ、側鎖が開裂したフラグメントイオンの生成強度が高められ、Leu/Ile の判別が可能となった。得られた LaIT3 の

配列について類似性を確認した結果、LaIT2と同様に $\beta$ -KTxファミリーに属することが明らかになった。さらにLaIT3を抗菌試験に供したところ、LaIT2と同様に抗菌性を併せもつことが分かった。

### 3. 毒素中に含まれる $\beta$ -KTx由来の断片ペプチドの探索

サソリ毒液中には、100種類を超えるペプチド成分が含まれている。サソリ毒液のこのような成分の多様性を生み出すメカニズムの一つとして、発現した毒素ペプチドの毒液中における酵素的な分解が提唱されており、サソリがその断片ペプチドを別の活性をもつ成分として活用している可能性が考えられている。例えば $\beta$ -KTxペプチドの場合、中央部分で切断されたN末端およびC末端領域部分ペプチドがそれぞれ毒液中に検出される例が報告されている。そこで、LaIT2およびLaIT3について、そのN末端あるいはC末端領域のみからなる断片ペプチドを毒液中より探索した。ヤエヤマサソリ毒液中に含まれる全成分の分子質量をLC/MSにより測定し、得られた質量値と予想断片ペプチドの計算値を比較した結果、LaIT2およびLaIT3由来の断片ペプチドと考えられる成分が見いだされた。これらの成分について、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末端領域から成るペプチドと、C末端領域から成るペプチドが確かに毒液中に存在することが分かった。これらの生理活性については不明であるが、合成したLaIT2とその部分ペプチドの活性比較で見られたように、断片化によって生理活性の作用対象となる生物を変化させていることが考えられた。

### 総括

1. ヤエヤマサソリ毒液中に含まれる殺虫性ペプチドLaIT2をNCL法により化学合成した。また、NCLに用いるそれぞれのフラグメントから、N末端およびC末端領域の部分ペプチドを合成した。さらに、LaIT2のジスルフィド結合様式を決定し、C末端領域にCS $\alpha$  $\beta$ モチーフが含まれることを確認した。これらの合成品の殺虫活性および抗菌活性試験を行い、LaIT2のN末端領域が殺虫活性の発現に特に寄与することを明らかにした。
2. ヤエヤマサソリ毒液から殺虫活性を指標にLaIT3を単離し、エドマン分解法および、MS/MS分析による*de novo*シーケンシング法を用いてその一次構造を決定した。その結果、LaIT3も $\beta$ -KTxファミリーに属することを明らかにした。またLaIT3が殺虫性に加えて抗菌性を併せもつことを明らかにした。
3. ヤエヤマサソリ毒液に含まれる全成分の質量情報を解析した結果、LaIT2およびLaIT3のN末端領域から成るペプチドと、C末端領域から成るペプチドが毒液中に存在することが分かった。