

ヤエヤマサソリ毒液に含まれる β -KTx 毒素ペプチドおよび
その部分ペプチドの構造と活性

2019

十一 浩典

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	LaIT2 およびその部分ペプチドの化学合成と活性評価	
2-1	緒言	4
2-2	LaIT2 の化学合成	6
2-3	LaIT2 のジスルフィド結合の架橋様式の決定	16
2-4	LaIT2 および部分ペプチドの活性評価	29
2-5	考察	32
2-6	実験の部	34
第 3 章	新規 β -KTx である LaIT3 の一次構造解析	
3-1	緒言	45
3-2	新規殺虫性成分の単離	45
3-3	エドマン分解法による LaIT3 の一次構造解析	47
3-4	LaIT3 の酵素消化および断片ペプチドの <i>de novo</i> シーケンシング	47
3-5	質量分析計による断片ペプチドの <i>de novo</i> シーケンシング	48
3-6	断片ペプチドの N 末端修飾による Leu/Ile の判別	54
3-7	考察	58
3-8	実験の部	60
第 4 章	毒液中に含まれる β -KTx 由来の断片ペプチドの探索	
4-1	緒言	63
4-2	結果	64
4-3	考察	70
4-4	実験の部	72

第5章 まとめ	73
本研究に関する原著論文	75
引用文献	76
謝辞	

第1章 序論

サソリは節足動物門鋏角亜門クモ綱サソリ目に属する生物の総称であり、最大の特徴は、一対のハサミと毒針がついた尾を持つ形態にある。4億3000万年前の古生代シルル紀の地層から発見されたサソリ化石と、現生のサソリを比較すると形態がほとんど変化しておらず、非常に完成度が高い生物と言える¹⁾。

現在では、サソリは南極大陸を除く全ての大陸（主に熱帯・亜熱帯地域）に分布し、これまでに18科2400種以上が発見されている²⁾。体長は成体で1~20 cmであり、生息環境は熱帯雨林、砂漠、海岸、高山など幅広い。このように、サソリが様々な環境で生存し、太古より繁栄を続けることができた理由の1つとして、獲物の捕獲や天敵からの防衛のための毒を有していることが挙げられる。毒液は尾節中にある1対の毒腺で生産されており、毒針を獲物に刺した時、毒腺の周囲にある筋肉の収縮によって毒液が送り出される。毒腺から管を通して毒針部分に達した毒液は先端から約100 μmの位置に開いた2つの穴（直径10 μm以下）から獲物に注入されるが³⁾、この時、獲物はハサミによって固定されており、確実に毒液が注入される。毒液には塩類、核酸、脂質、ペプチドやタンパク質などが含まれているが、その毒性は主にペプチド成分によるもので、100種類以上が含まれている。

これらの生理活性ペプチドの作用対象は哺乳類や昆虫など多岐にわたっており、進化の過程で標的生物に対する高度な作用選択性を獲得していると考えられ、魅力的な研究対象となっている。しかし、2400種以上いるサソリの中で、ヒトが刺されて死に至る、あるいは重症に陥るほど危険なサソリは30種程度であり、1種を除く全てがButhidae（キョクトウサソリ科）に属することから⁴⁾、この科に属するサソリの毒液について集中的に研究がなされてきた。一例として医学領域への応用をめざして研究されているもので、*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*（Buthidae科）の毒液から見つかったペプチドであるchlorotoxinがある。36アミノ酸残基からなる、この毒素ペプチドは神経外胚葉性腫瘍と特異的に結合する性質をもつことから、これらを標的としたイメージングや治療への実用化に向けて研究が続けられている⁵⁾。その他の科に属するサソリはヒトに対する毒性が低いことから、毒液に関する研究が遅れていたが、近年では様々なサソリ種から生理活性ペプチドの同定が盛んに行われている。

サソリ毒ペプチドはその構造上の特徴により、ジスルフィド結合を含むもの（disulfide-bridged peptides; DBPs）と含まないもの（non-disulfide-bridged peptides; NDBPs）に分類される。DBPsは主にイオンチャンネルに作用し、 α -ヘリックス構造と β -シート構造がジスルフィド結合によって架橋されたcysteine-stabilized α/β

(CS $\alpha\beta$) モチーフをもつものが多い。各イオンチャンネルに作用するペプチドの分類と特徴を表 1 に示した⁶⁻⁸⁾。

表 1. 各イオンチャンネルに作用するサソリ毒由来のペプチド

標的分子	特徴	
Na ⁺ チャンネル	58~76アミノ酸残基で構成されており、質量は6500~8500 Daで、4つのジスルフィド結合を持つ。生理学的作用や結合部位によって分類される。	
	α -type	電位依存性Naチャンネルのsite 3に結合する。
	classic	哺乳類特異的に作用する。
	anti-insect	昆虫特異的に作用する。
	α -like	昆虫および哺乳類に対して作用する。
	β -type	電位依存性Naチャンネルのsite 4に結合する。
	anti-mammal	<i>Centruroides</i> 属のみから発見されている。
	anti-insect excitatory	収縮性麻痺を引き起こす。
	anti-insect depressant	弛緩性麻痺を引き起こす。
	anti-insect and mammal	昆虫および哺乳類に対して作用する。
K ⁺ チャンネル	23~64のアミノ酸で構成されており、3つか4つのジスルフィド結合を持つ。一次構造やジスルフィド結合の架橋様式によって分類される。	
	α -KTx	23~42残基程度で、KTxの大部分を占める。一次構造によって30のグループに分類される。
	β -KTx	50~75残基で構成されており、さらに3つのグループに分類される。その内、scorpine-likeペプチドはN末端領域に α -ヘリックス(抗菌活性を示す)、C末端領域にCS $\alpha\beta$ モチーフをもつ。
	γ -KTx	Ergtoxinとも呼ばれ、主にhERGチャンネルに作用する。
	κ -KTx	2つの α -ヘリックス構造が2つのジスルフィド結合で架橋されたCS $\alpha\alpha$ モチーフをもつ。さらに4つのグループに分類される。
	δ -KTx	kunitz-type serine protease inhibitorとしても作用する。
Cl ⁻ チャンネル	30~40残基程度で構成されており、4つのジスルフィド結合を持つ。	
Ca ²⁺ チャンネル	いくつかのペプチドがここに分類されるが、その作用点及び分子量は様々である。	

同定されたペプチドの中には、昆虫に対して毒性を示すが、哺乳類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殺虫剤の開発に有用であり、日本に生息するヤエヤマサソリ

(*Liocheles australasiae*, Hormuridae) とマダラサソリ (*Isometrus maculatus*, Buthidae) は両種とも哺乳類への毒性が低いことから有望な研究対象である^{9,10)}。

ヤエヤマサソリは、台湾、中国南部、東南アジア、オーストラリア北部などに分布し、日本では八重山諸島に生息する。また森林の倒木樹皮下のような湿った場所を好んで生活している。ヤエヤマサソリという和名は、集められた標本がどれも八重山産であったことから名付けられた。体長は成体で3~4 cmほどで、扁平な体形をしており、強固に発達した鉤状の脚鬚は他のサソリに比べて体長に対する割合が大きく、毒液を使わずに脚鬚のみで獲物を捕食することもある。ヤエヤマサソリの雄はほとんど存在しておらず、雌性産生単為生殖を行うことが知られている。一方、マダラサソリは、世界中の熱帯・亜熱帯地域に広く分布し、日本では八重山諸島や小笠原諸島において、乾燥した石垣の下や木の樹皮下などに生息している。体長は成体で5~7 cmほどで、後体部（尻尾）が長く、細長い体形をしており、模様がまだらであることからマダラサソリという和名が付けられた。

当研究室において、これまでにヤエヤマサソリから2種類 (LaIT1、LaIT2) の、マダラサソリからは3種類 (Im-1、Im-2、Im-3) の殺虫性ペプチドの単離・同定に成功している¹¹⁻¹⁵⁾。本研究では β -KTx 毒素ペプチドと配列類似性が高い LaIT2 を研究対象とした。 β -KTx は α -ヘリックス構造を形成する N 末端領域と、CS $\alpha\beta$ モチーフをもった C 末端領域で構成され (図 1)、多様な活性を示す。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、抗菌活性も併せもつことが知られている。LaIT2 の構造と活性の関係については不明な点が多く、この点を明らかにすることによって β -KTx の作用機構についての新たな知見が得られると考えた。しかし、サソリ毒液から得られる LaIT2 はごく微量のため研究の進展が妨げられていた。そこで、まず LaIT2 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。第 2 章では LaIT2 の化学合成およびその生理活性の評価から明らかになったことについて述べる。次に、第 3 章では毒液中に含まれる新規 β -KTx である LaIT3 の単離および一次構造解析について述べる。さらに第 4 章では、 β -KTx が毒液中において断片化されているという報告をもとに、毒液中に含まれる LaIT2 と LaIT3 の部分ペプチドを探索した結果について述べる。

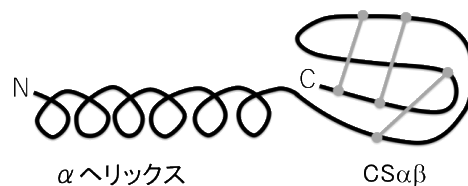


図 1. β -KTX の構造模式図

第2章 LaIT2 およびその部分ペプチドの化学合成と活性評価

2-1 緒言

LaIT2 は 59 アミノ酸残基からなり、C 末端領域に 3 組のジスルフィド結合をもつ。このペプチドは殺虫活性を指標にして単離されたが、抗菌活性を示すことも分かっている¹¹⁾。しかしながら、毒液から単離できる試料がごく微量であるため、LaIT2 の活性発現に関する詳細な知見を得ることは困難であった。そこで、種々の活性試験に供するための充分量を得ることを目的として、LaIT2 を化学合成することにした。

一般に、ペプチドの化学合成には Fmoc 固相合成法を用いる。Fmoc 固相合成法は 1970 年に L. Carpino らによって開発されたペプチドの化学的合成法の一つであり、Fmoc 基で保護したアミノ酸を樹脂などの固相に結合させ、塩基を用いて Fmoc 基を除去後、次の Fmoc アミノ酸を縮合させる操作を繰り返すことでペプチド鎖を伸長させる手法である¹⁶⁾ (図 2-1)。

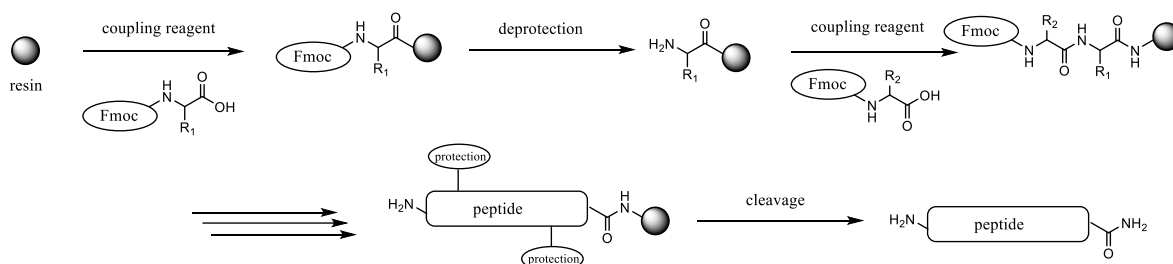


図 2-1. Fmoc 固相合成法の概略

この手法では、ペプチドを簡便かつ高収率で合成することが可能であるが、ペプチド鎖が 50 残基を超える場合はペプチド鎖同士の会合が生じることにより、Fmoc アミノ酸の縮合効率が低下する。この問題を克服するため、まず短いペプチド鎖を固相合成法で合成し、これらを縮合させて長鎖ペプチドを得るフラグメント縮合法が開発された。様々な方法のフラグメント縮合法が考案されてきたが、現在最も広く用いられる手法が native chemical ligation (NCL) 法である。この手法は 1994 年に Kent らによって開発され、C 末端カルボキシル基をチオエステル化したフラグメントペプチドと、N 末端アミノ酸が Cys であるフラグメントペプチドを縮合させて長鎖ペプチドを合成する¹⁷⁾ (図 2-2)。

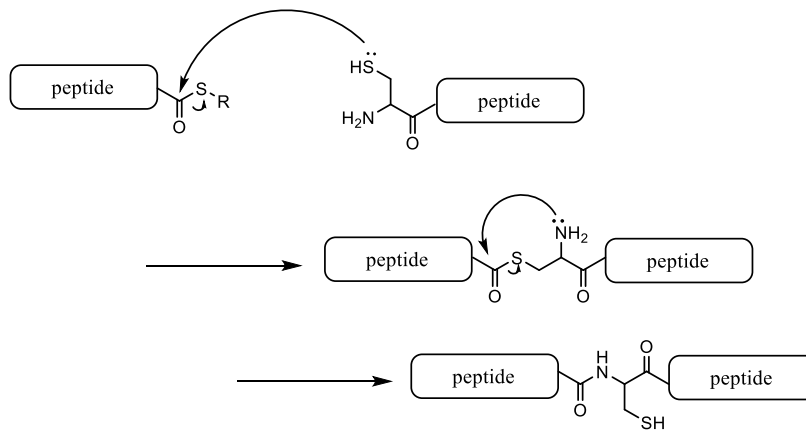


図 2-2. Native chemical ligation の反応機構

縮合時には、N 末端システイン側鎖のチオール基がもう一方のペプチド鎖とチオール-チオエステル交換反応によって結合し、その後、N-S 分子内アシル転移することによりペプチド結合が形成される。この反応は部位特異的に起こるため側鎖の保護は必要がなく、比較的容易に長鎖ペプチドが得られる。そこで本研究では、NCL 法を用いて LaIT2 を合成することにした。LaIT2 とその部分ペプチドの合成戦略を図 2-3 に示す。

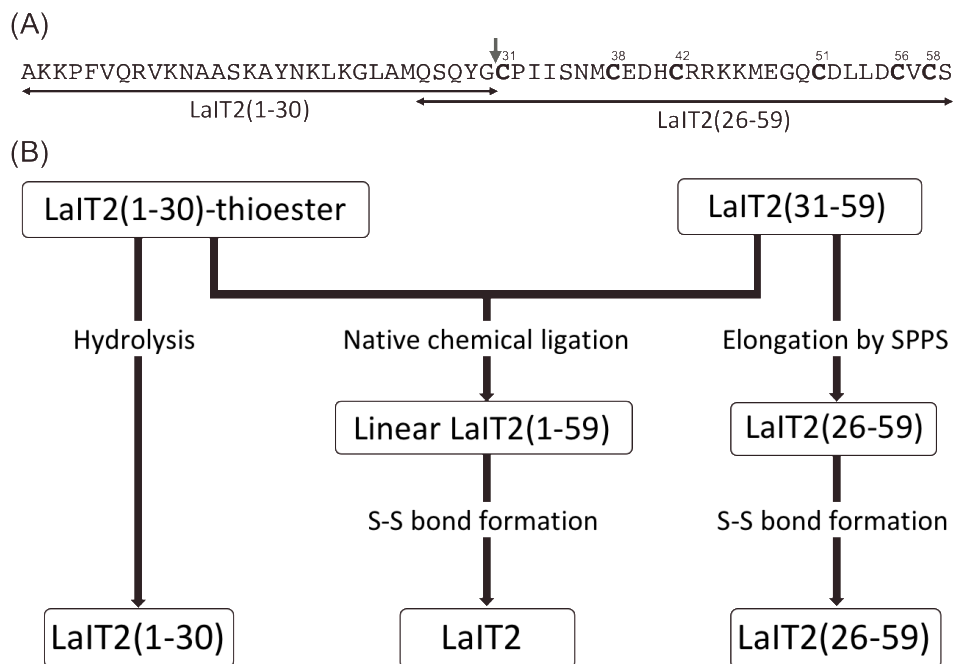


図 2-3. LaIT2 の配列(A) と NCL を用いた合成法の概略(B)

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 固相合成法で合成することにした。これらのフラグメントペプチドから、N 末端領域および C 末端領域からなる各部分ペプチドの合成が可能であるが、これも NCL 法による合成の利点である。

2-2 LaIT2 の化学合成

図 2-3 の戦略に従い、N 末端フラグメントである LaIT2(1-30)-thioester および C 末端フラグメントである LaIT2(31-59) を合成し、NCL によって直鎖状 LaIT2(1-59) の合成を行った。続いて、ジスルフィド結合を形成させて LaIT2 を得た。本節ではこれらの合成の実際と結果について述べる。

N 末端フラグメント LaIT2(1-30)-thioester の合成

チオエステル構造は酸処理に対しては安定であるが、Fmoc 固相合成法で脱保護反応に用いる塩基処理に対しては不安定である。そのため Fmoc 固相合成法において最初の段階でペプチドに導入しておくことは難しい。この問題を克服する手段としてチオエステル前駆体を用いる方法が知られている¹⁷⁾。この手法では、まず塩基性条件下で安定な 3,4-diaminobenzoic acid (Dbz) を樹脂に導入し、ペプチド鎖を伸長する。伸長反応終了後、Dbz 基をチオールで置換されやすい N-acylurea (Nbz) 構造に変換した後、樹脂から切断する。得られたペプチドをチオールで処理することにより、ペプチドチオエステルを得ることができる (図 2-4)。本研究においてもこれを採用した

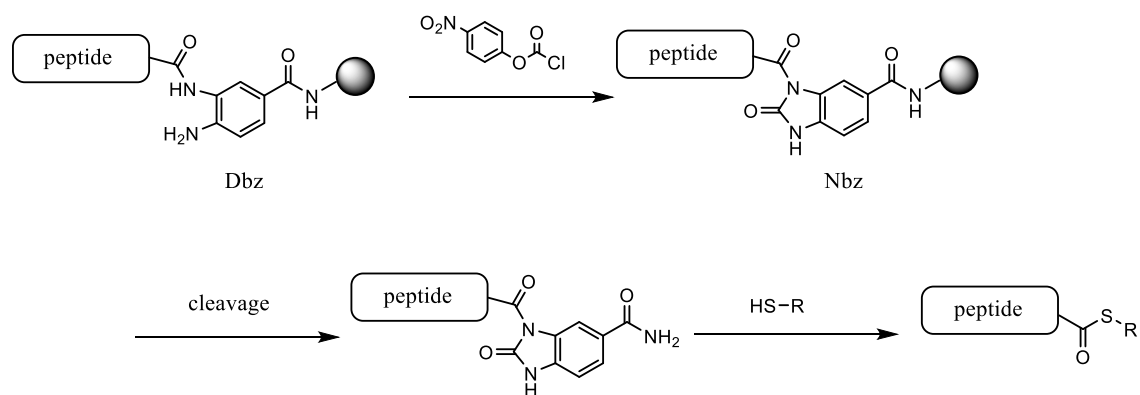


図 2-4. ペプチドチオエステルの合成方法

また、LaIT2(1-30)の C 末端残基は Gly であるが、側鎖による立体障害が小さいため、Dbz 基に含まれる 2 つのアミノ基の両方に Gly が導入されてしまう可能性があった。そこで、片方のアミノ基にあらかじめ allyloxycarbonyl (alloc) 基を保護基として導入しておくことで収率の向上を目指した (図 2-5) ¹⁸⁾。

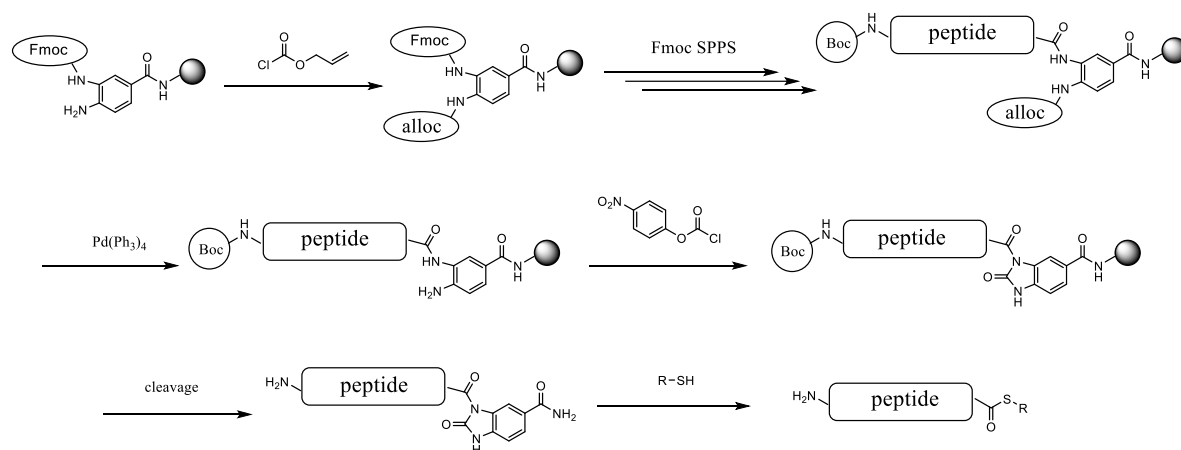
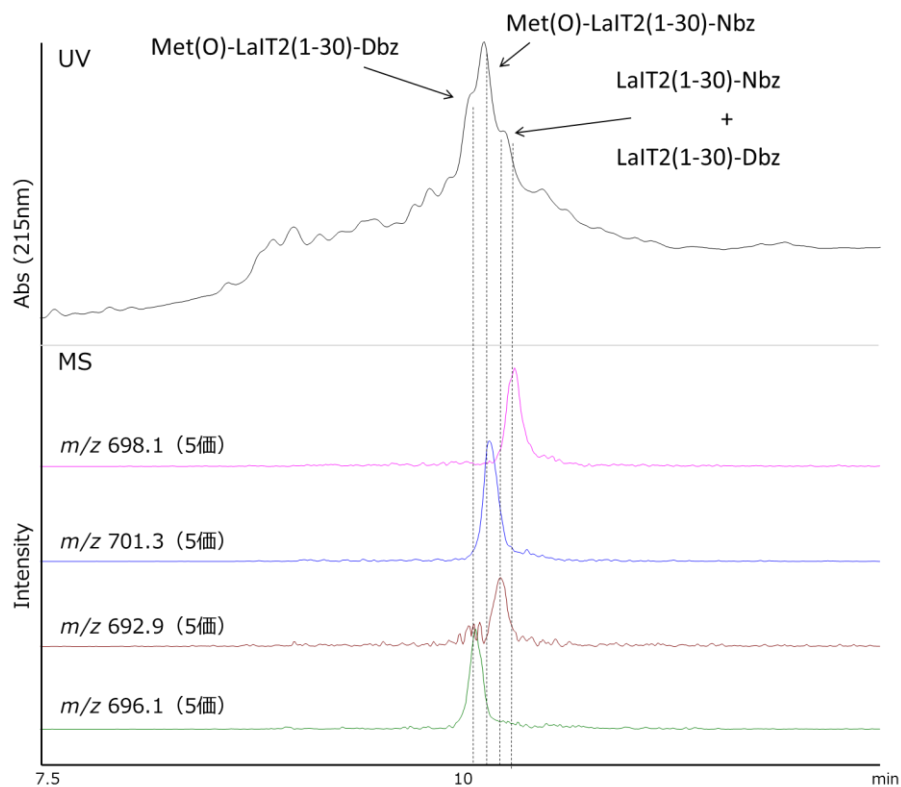


図 2-5. LaIT2(1-30)-thioester の合成方法

まず Fmoc-Dbz 基の樹脂への導入を行ったところ、その導入量は 0.16 mmol/g resin であった (導入率 84.2%)。ペプチド鎖伸長後に得られた樹脂 691 mg から Nbz への交換反応を行った後、ペプチドの切り出し反応を行ったところ、126 mg の粗ペプチドが得られた。この粗ペプチドを LC/MS 分析に供した結果、目的物 (質量 3485.1) のほかに、質量が 16 大きい物質、26 小さい物質および 10 小さい物質が検出された (図 2-6)。これらはそれぞれ、メチオニン酸化体 (質量 3501.1)、Nbz へ変換されず残った Dbz 体 (質量 3459.1) およびそのメチオニン酸化体 (質量 3475.1) であると考えられた。

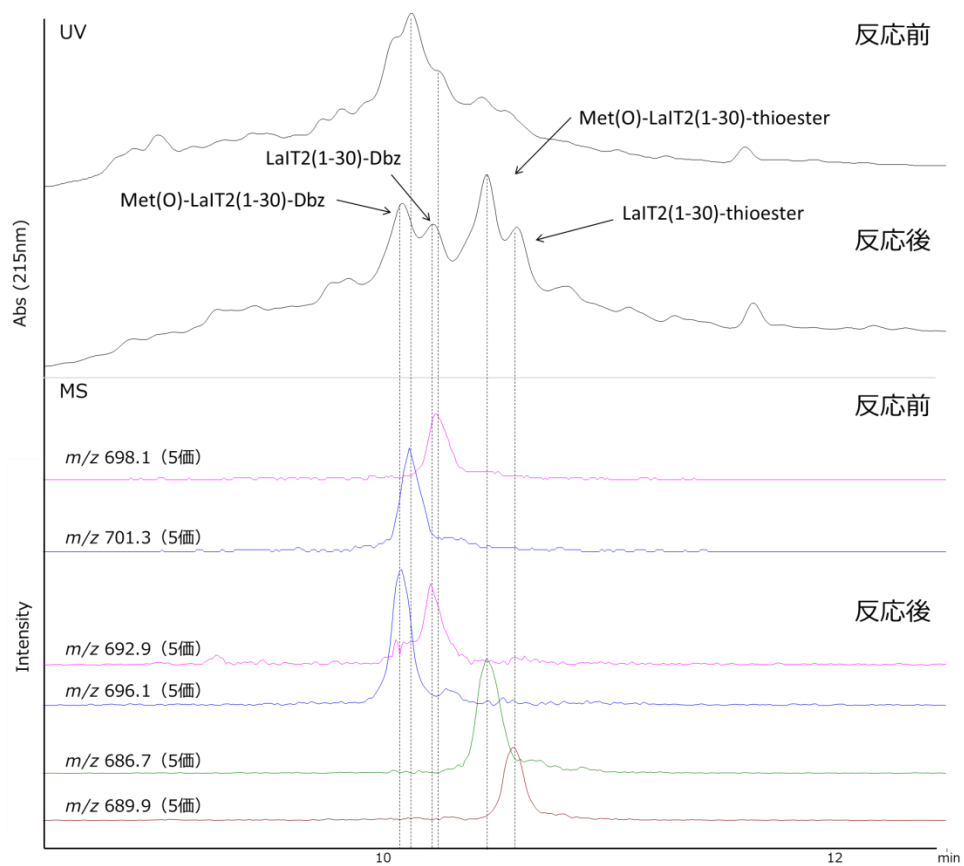
LaIT2(1-30)-Nbz を含む粗ペプチドの状態ではメチオニンスルホキシドの還元を行うと、Nbz 基の加水分解などの副反応が起こる可能性が考えられたので、このままチオエステル化に供した。目的物を精製した後、NCL ならびにジスルフィド結合を形成させ LaIT2 を得た。酸化体については、NCL ならびにジスルフィド結合形成反応までおこなった後、メチオニンスルホキシドを還元し、LaIT2 を得た。



	質量	<i>m/z</i> (5 価)
LaIT2(1-30)-Nbz	3485.1	698.1
Met(O)-LaIT2(1-30)-Nbz	3501.1	701.3
LaIT2(1-30)-Dbz	3459.1	692.9
Met(O)-LaIT2(1-30)-Dbz	3475.1	696.1

図 2-6. LaIT2(1-30)-Nbz を含む粗ペプチドの LC/MS 分析結果

LaIT2(1-30)-Nbz のチオエステル化反応の結果を図 2-7 に示した。LaIT2(1-30)-Nbz およびそのメチオニン酸化体の減少と、LaIT2(1-30)-thioester (質量 3428.1) およびそのメチオニン酸化体である Met(O)-LaIT2(1-30)-thioester (質量 3444.1) の生成が確認できた。このとき 2 つの Dbz 体は反応しないため、そのままの状態が残存していた。チオエステル化された 2 種のペプチドを RP-HPLC で分取精製した (図 2-8)。最終的に、LaIT2(1-30)-thioester は 5.1 mg (収率 1.9%)、Met(O)-LaIT2(1-30)-thioester は 7.9 mg (収率 2.9%) 得られた。



	質量	m/z (5 価)
LaIT2(1-30)-Nbz	3485.1	698.1
Met(O)-LaIT2(1-30)-Nbz	3501.1	701.3
LaIT2(1-30)-Dbz	3459.1	692.9
Met(O)-LaIT2(1-30)-Dbz	3475.1	696.1
LaIT2(1-30)-thioester	3428.1	686.7
Met(O)-LaIT2(1-30)-thioester	3444.1	689.9

図 2-7. チオエステル化反応の LC/MS 分析結果

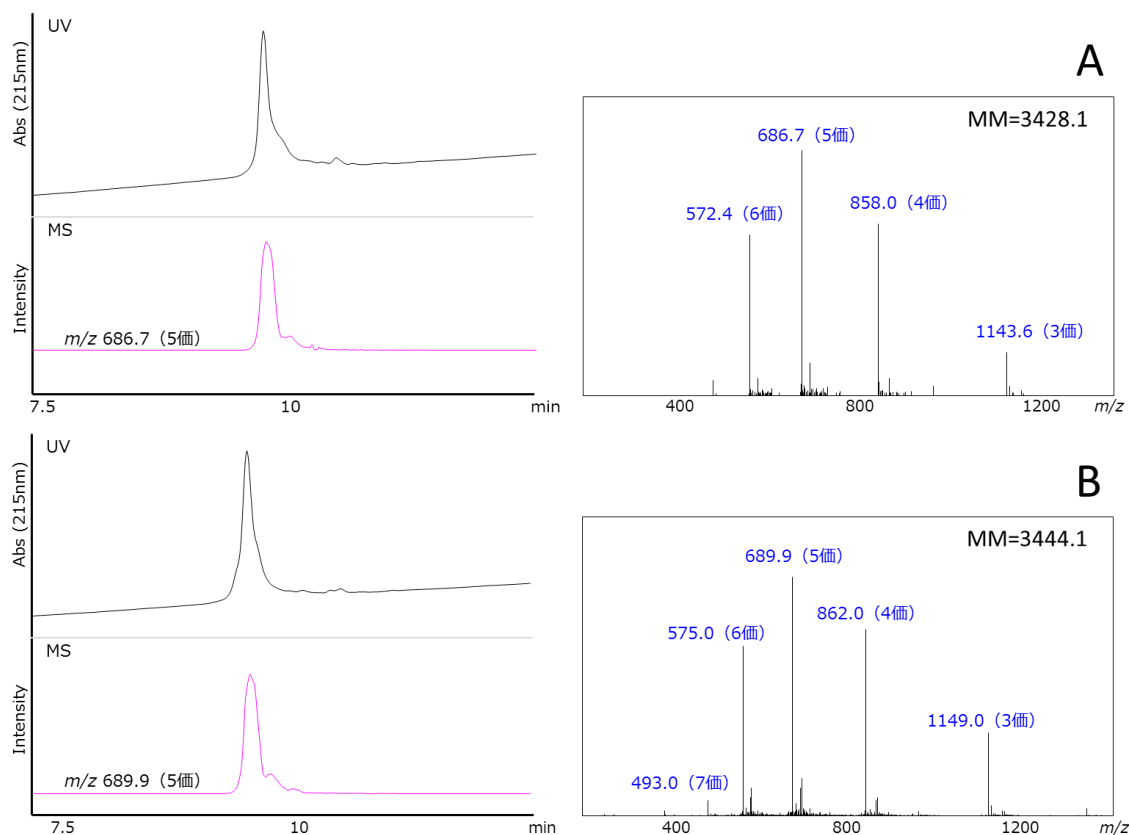


図 2-8. 精製した LaIT2(1-30)-thioester (A) および Met(O)-LaIT2(1-30)-thioester (B) の LC/MS 分析結果

C 末端フラグメント LaIT2(31-59)の合成

C 末端フラグメントは通常の Fmoc 固相法によって合成した。最初のアミノ酸の樹脂への導入量は 0.25 mmol / g resin であった (導入率 96%)。ペプチド鎖の伸長後の樹脂 410 mg から粗ペプチドの切り出し反応を行ったところ、88 mg の粗ペプチドが得られた。これを LC/MS 分析したところ、LaIT2(31-59) (質量 3331) が主ピークとして得られた (図 2-9)。RP-HPLC によりこのピークに相当する画分を分取して精製し、最終的に LaIT2(31-59) を 10.4 mg (収率 5.2%) 得た。

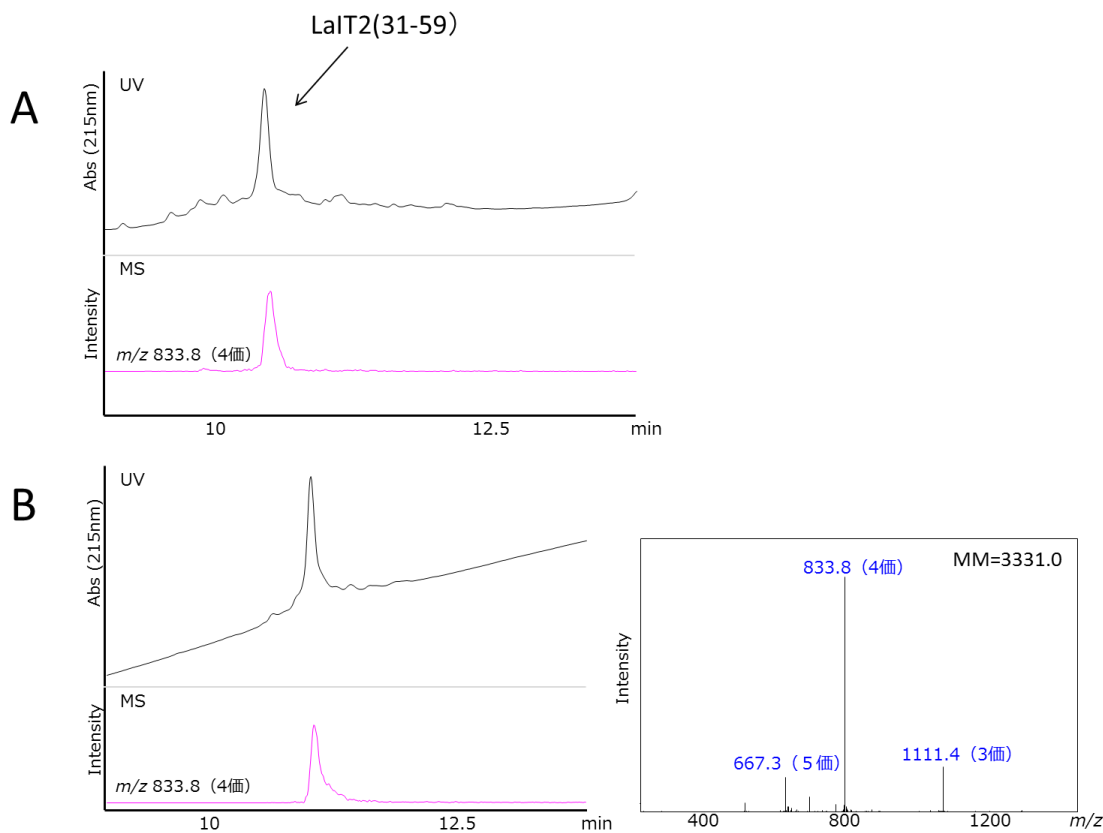


図 2-9. LaIT2(31-59)の粗ペプチド (A) および精製後 (B) の LC/MS 分析結果

NCLによるLaIT2(1-59)の合成

得られた LaIT2(1-30)-thioester と LaIT2(31-59) を NCL 反応に供した。反応開始直後および 2 時間後の LC/MS 分析の結果をそれぞれ図 2-10 に示す。反応の進行にしたがって、LaIT2(1-30)-thioester と LaIT2(31-59) の減少にともなって LaIT2(1-59) の生成が確認できた。目的物を RP-HPLC で分取・精製したところ、LaIT2(1-59)を 3.6 mg (収率: 64.3%) を得た。また、同様にして Met(O)-LaIT2(1-59)を 4.6 mg (収率: 45.1%) 得た (図 2-11)。

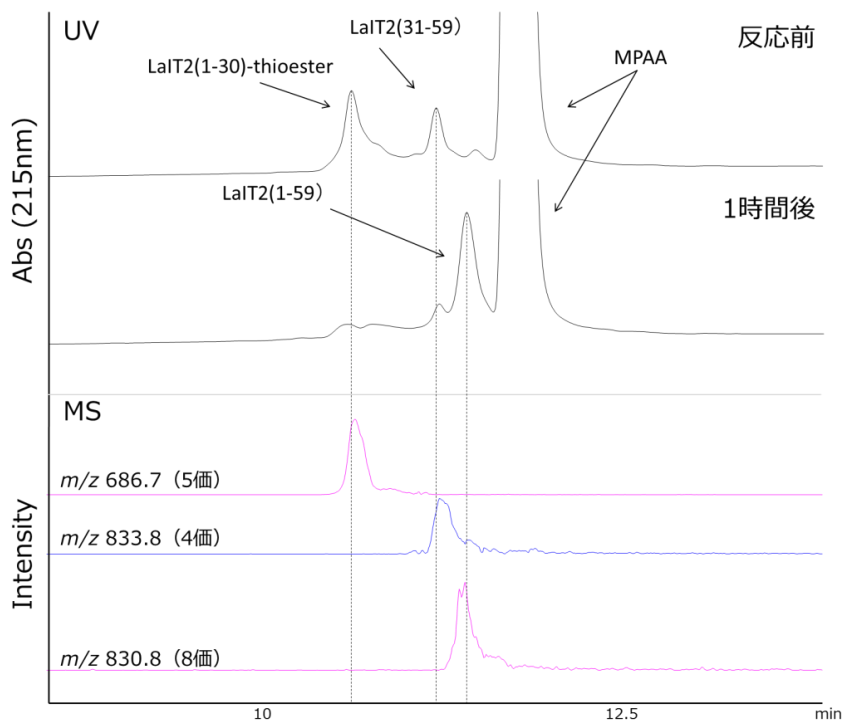


図 2-10. NCL による LaIT2(1-59) 合成の LC/MS 分析結果

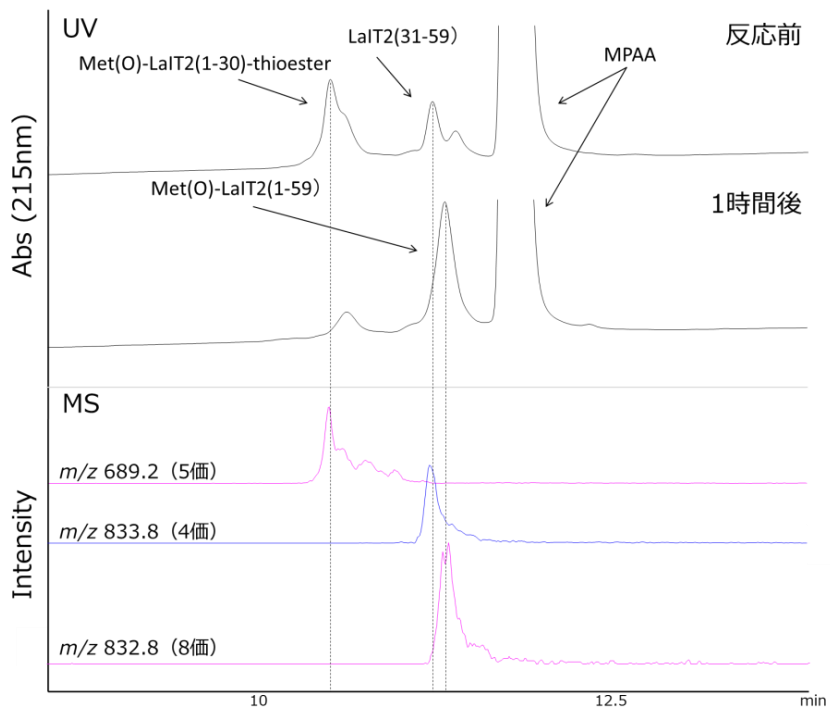


図 2-11. NCL による Met(O)-LaIT2(1-59) 合成の LC/MS 分析結果

LaIT2(1-59)のジスルフィド結合の形成

合成した LaIT2(1-59) を酸化型および還元型グルタチオンを含む酸化還元バッファー中に溶解させた。この反応ではグルタチオンとシステイン側鎖がチオール交換反応を繰り返すうちに、最も安定なジスルフィド結合の架橋様式が導かれると考えられている。反応開始 24 時間後に LC/MS 分析を行ったところ、質量が 6 減少したペプチドが検出され、単一の架橋様式をもつものが生成していることが確認できた (図 2-12)。RP-HPLC により分取し精製したところ、目的物である LaIT2 が 0.3 mg (収率: 18.8%) が得られた。同様にして Met(O)-LaIT2 が 0.3 mg (収率: 9.1%) 得られた (図 2-13)。

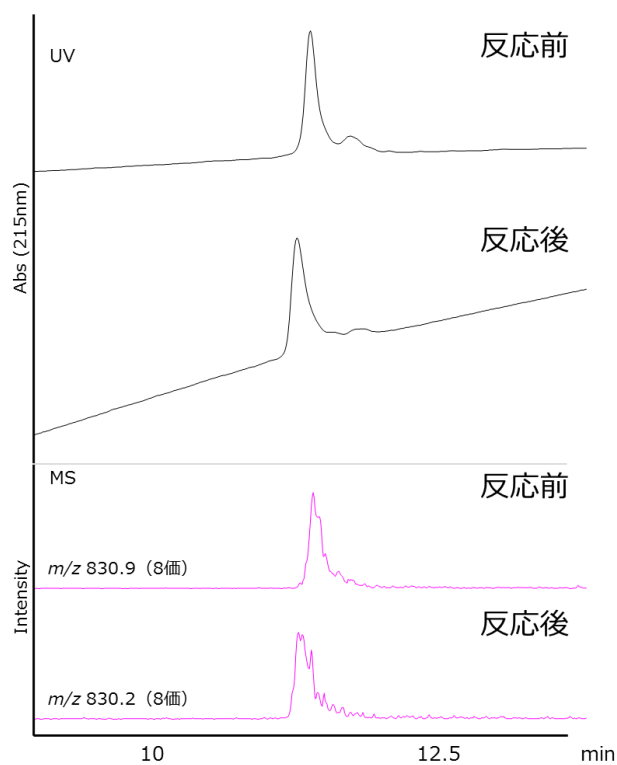


図 2-12. LaIT2(1-59)のジスルフィド結合反応の LC/MS 分析結果

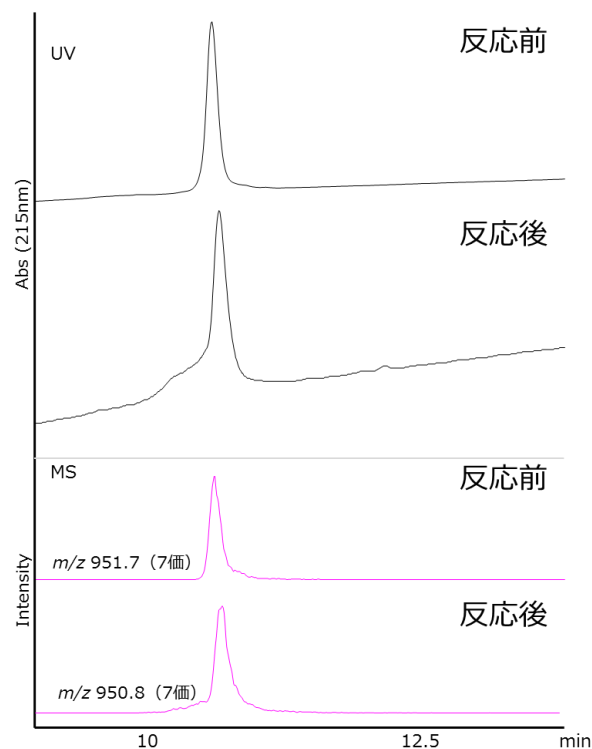


図 2-13. Met(O)-LaIT2(1-59)のジスルフィド結合反応の LC/MS 分析結果

Met(O)-LaIT2 に含まれるメチオニンスルホキサイドの還元

Met(O)-LaIT2 のメチオニンスルホキサイドを還元するため、NH₄I および DMS を用いた反応を行った。この手法ではペプチドのジスルフィド結合を破壊することなくメチオニンスルホキサイドを還元することができる¹⁹⁾。反応開始 3 時間後に LC/MS 分析を行ったところ、質量が 16 減少していたことから LaIT2 が生成していることが確認できた (図 2-14)。RP-HPLC により分取精製を行ったところ、目的物である LaIT2 が 230 μg (収率: 65.7%) 得られた。

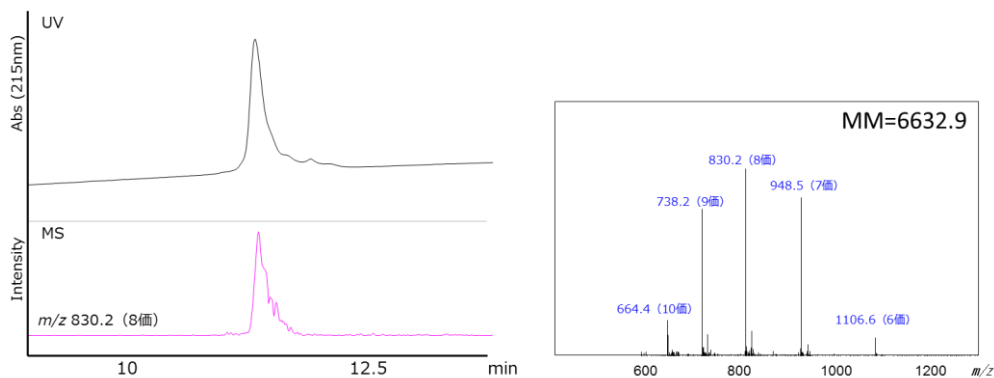


図 2-14. Met(O)-LaIT2 を還元して得られた LaIT2 の LC/MS 分析結果

LaIT2(1-30)の合成

LaIT2(1-30)-thioester を、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) に 2 mg/mL とするよう溶解させ、室温で 6 時間静置した。反応液を RP-HPLC による分取精製を行ったところ、LaIT2(1-30)が 0.18 mg (収率 32%) 得られた。

LaIT2 (26-59)の合成

直鎖 LaIT2 (31-59) をそのままジスルフィド結合形成反応に供したところ、異なるジスルフィド架橋様式を持つ複数の生成物が確認された (図 2-15)。

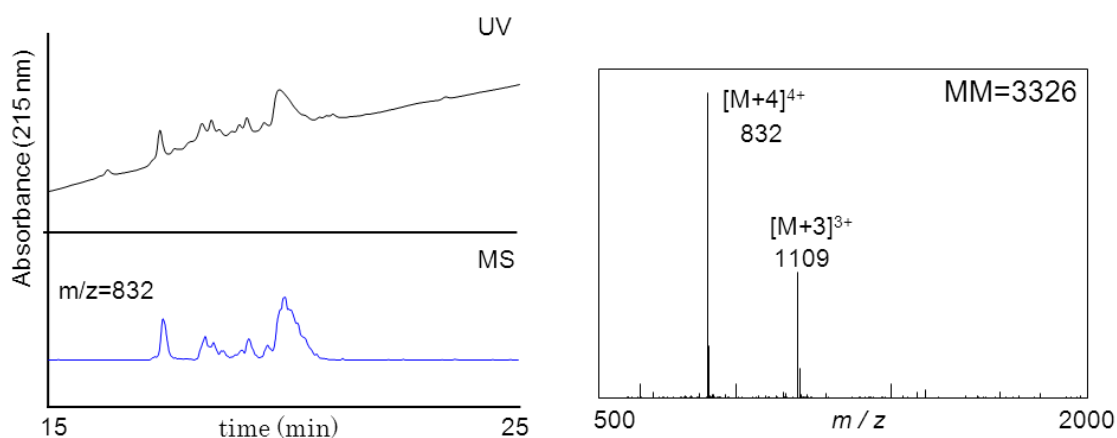


図 2-15. LaIT2 (31-59) のジスルフィド結合形成反応後の LC/MS 分析結果

LaIT2 (31-59) の場合、全長ペプチドと違って Cys 残基が N 末端にあるため、構造上の自由度が高くなって固定されず、複数の架橋様式の異なるペプチドが生成したと考えられた。そこで、LaIT2 (31-59) の N 末端配列をさらに 5 残基伸長させた。得られた直鎖状 LaIT2 (26-59) をジスルフィド結合形成反応に供した結果、単一のペプチドが得られた (図 2-16)。

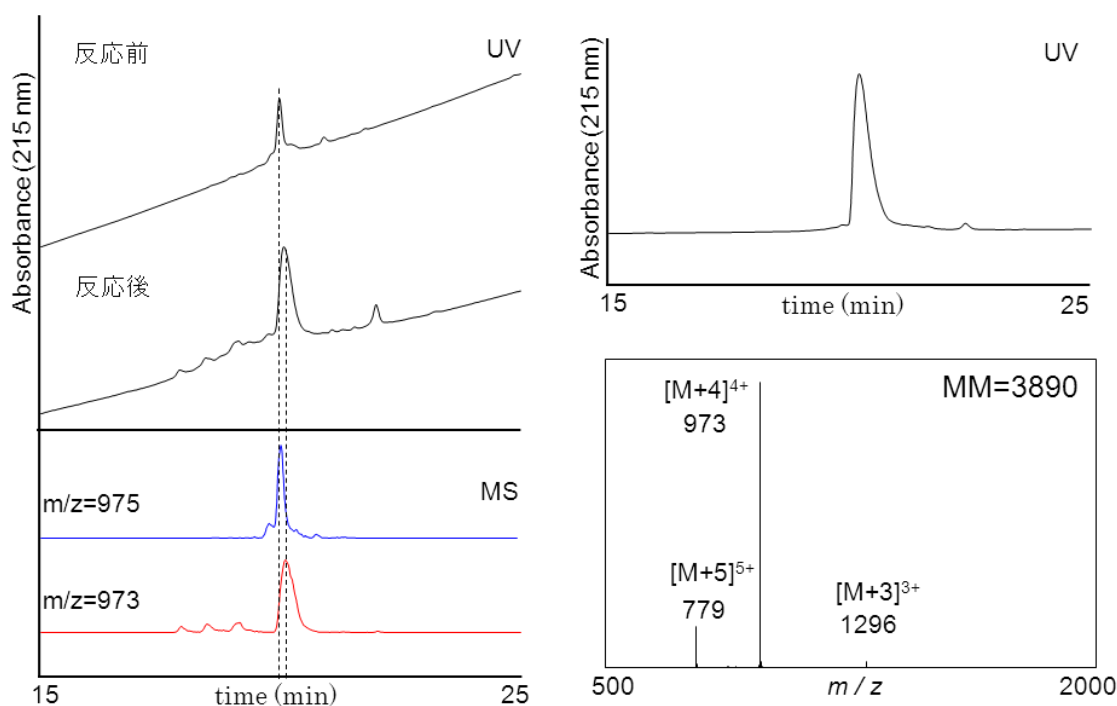


図 2-16. LaIT2(26-59)のジスルフィド結合形成反応ならびに精製後の LC/MS 分析結果

2-3 LaIT2 のジスルフィド結合の架橋様式の決定

緒言で述べたように、LaIT2 は C 末端領域に 3 組のジスルフィド結合を形成している。その架橋様式を決定する一つの手法として、ジスルフィド結合を保ったまま、すべてのシステイン残基間でペプチド結合を切断し、得られた断片の質量情報からジスルフィド結合の組み合わせを決定する方法がある。LaIT2 の場合、全ての Cys 残基間のペプチド結合を化学的および酵素的に切断できない。そこで本研究では、MS/MS 分析によるフラグメンテーションの解析も併せて行うことでジスルフィド結合の架橋様式を決定することとした。

まず LaIT2 を臭化シアン処理による化学的切断に供した (図 2-17)。臭化シアンは Met 残基の C 末端側を特異的に切断し、ホモセリンラク톤を形成する。続いて

trypsin および Asp-N による酵素的切断を行った。Trypsin は Lys および Arg 残基の C 末端側を特異的に加水分解する。また、Asp-N は Asp 残基の N 末端側を特異的に加水分解する。C 末端側の 2 つの Cys 残基の間の配列はつながったままであるため、得られた断片を MS/MS 分析に供することにした。本節では上述の手法による架橋様式の決定結果について述べる。

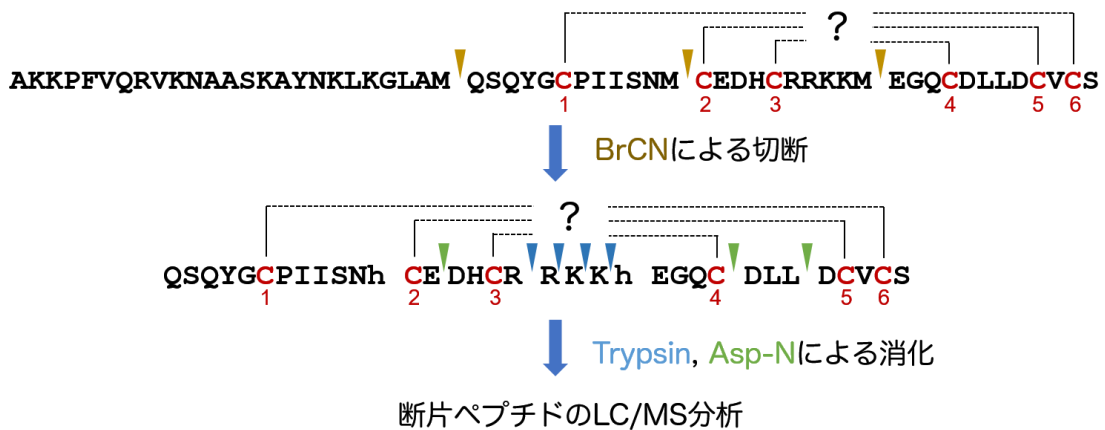


図 2-17. LaIT2 のジスルフィド結合の架橋様式決定の概略

臭化シアンによる LaIT2 の切断

LaIT2 を臭化シアンによって処理すると中央付近で切断され、N 末端領域と C 末端領域に切断される。これによって得られる C 末端領域部分は、LaIT2(26-59) と同一のものである。そこでまず、得られている量の多い LaIT2(26-59) について実験を行うこととした。臭化シアンによる切断ならびに LC/MS による分析を行った結果、図 2-18 に示すように複数のピークが見られた。これらのピークは表 2-1 に示すペプチドであると推定された。

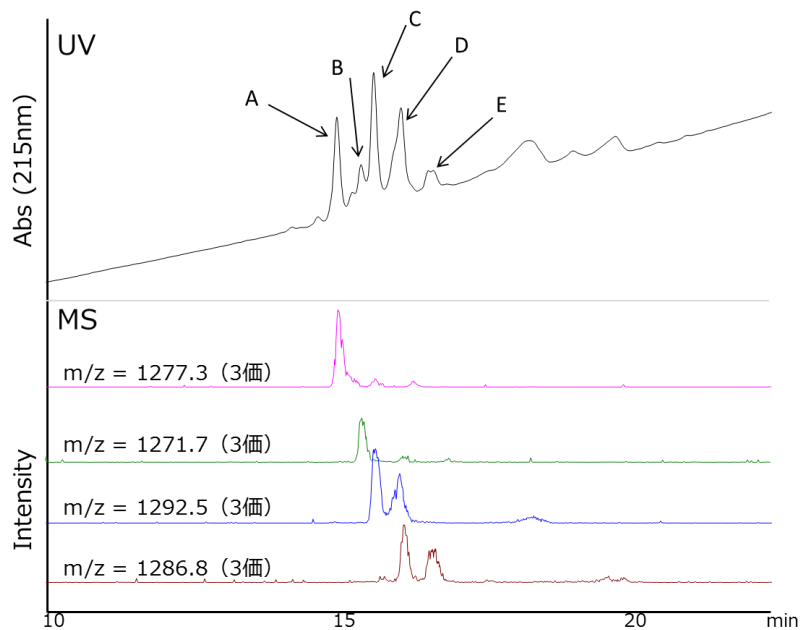


図 2-18. 臭化シアンによる LaIT2(26-59)の切断後の LC/MS クロマトグラム

表 2-1. 臭化シアンによる LaIT2(26-59)の切断後の各断片ペプチド

ペプチド	質量	構成するペプチド鎖*
A	3824.4	QSQYGCPIISNh + CEDHCRRKKh + EGQCDLLDCVCS
B	3807.4	pyroQSQYGCPIISNh + CEDHCRRKKh + EGQCDLLDCVCS
C および D	3870.4	QSQYGCPIISNM(O)CEDHCRRKKh+EGQCDLLDCVCS QSQYGCPIISNh + CEDHCRRKKM(O)EGQCDLLDCVCS
E	3853.4	pyroQSQYGCPIISNM(O)CEDHCRRKKh + EGQCDLLDCVCS pyroQSQYGCPIISNh + CEDHCRRKKM(O)EGQCDLLDCVCS

*h: ホモセリンラクトン

3つの断片ペプチド全てがジスルフィド結合によって架橋しているものは、質量が3828.4であることから、ペプチドAがそれに該当することが分かった。同様の反応をLaIT2に対して行い、LC/MSによる分析に供したところ、ペプチドAと同じ溶出時間・質量を持つペプチドaが検出された(図2-19)。したがって、以後の断片化ならびにジスルフィド架橋様式の決定においては、十分な量が得られているペプチドAを用いることにした。

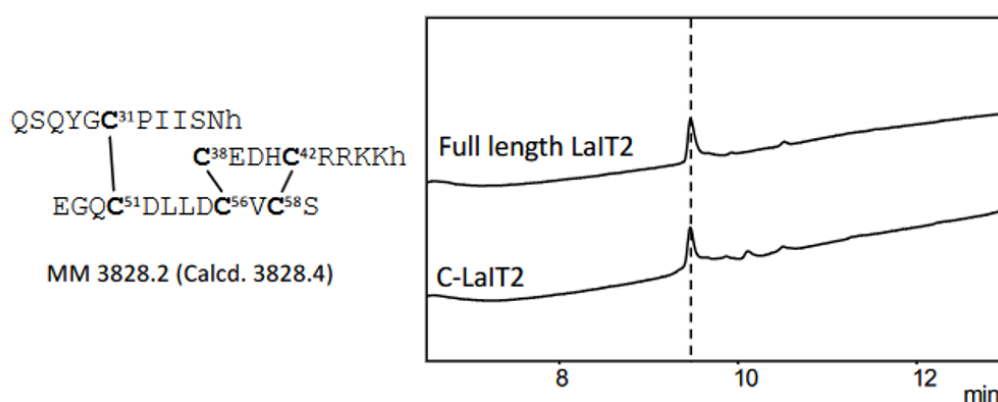


図2-19. 臭化シアンによる切断後のLaIT2とLaIT2(26-59)の溶出時間の比較

TrypsinによるペプチドAの特異的切断

ペプチドAをtrypsinによって切断した後、LC/MS分析に供したところ、図2-20に示すように主に2つのピークが見られた。これらのピークは表2-2に示すペプチドがジスルフィド結合によって架橋したものであると推定できた。より多量に存在するピークA-2を分取し、Asp-Nによる断片化に供した。

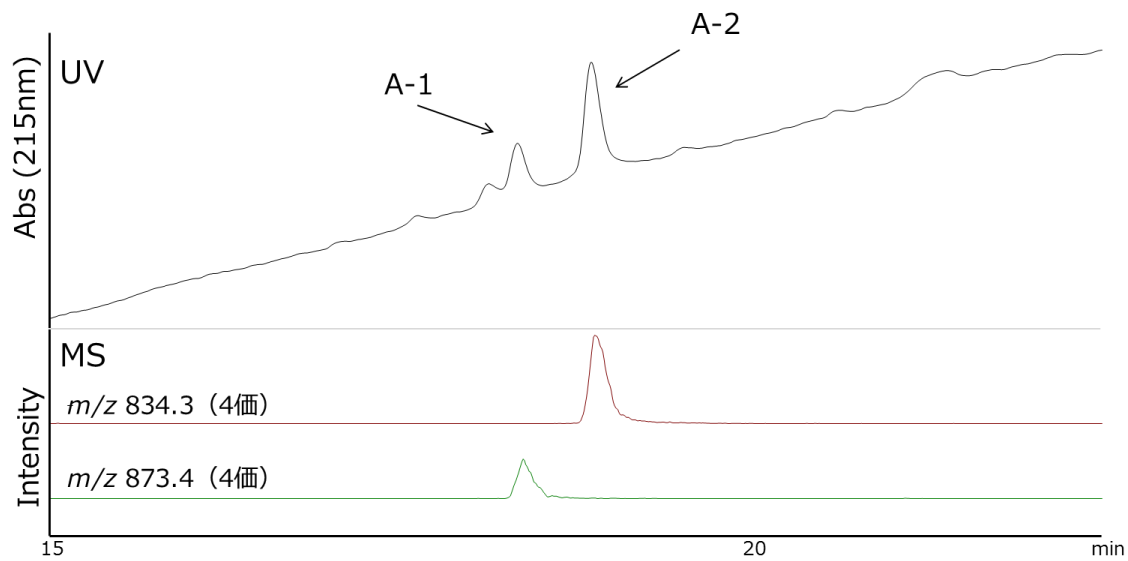


図 2-20. Trypsin によるペプチド A の切断後の LC/MS クロマトグラム

表 2-2. Trypsin によるペプチド A の切断後の断片ペプチド

ペプチド	質量	構成するペプチド鎖*
A-1	3489.9	QSQYGCPIISNh' + CEDHCR + EGQCDLLDCVCS
A-2	3333.8	pyroQSQYGCPIISNh' + CEDHCR + EGQCDLLDCVCS

*h': ホモセリン

Asp-N によるペプチド A-2 の特異的切断

ペプチド A-2 を Asp-N によって切断した後、LC/MS 分析に供したところ、図 2-21 に示すように複数のピークが見られた。これらのピークは表 2-3 に示すペプチドがジスルフィド結合を介して結合しているものと推定できた。

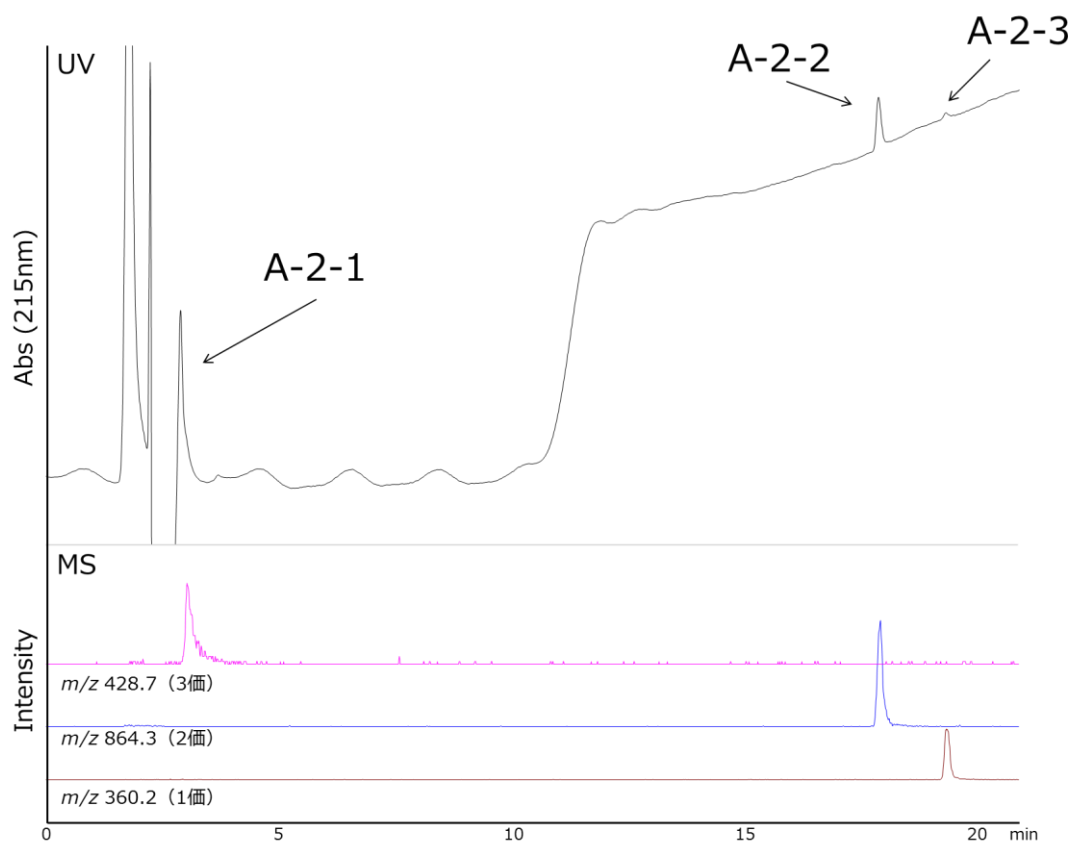


図 2-21. Asp-N によるペプチド A-2 の切断後の LC/MS 分析結果

表 2-3. Asp-N によるペプチド A-2 の切断後の断片ペプチド

ペプチド	質量	構成するペプチド鎖
A-2-1	1283.4	CEDHCR + DCVCS
A-2-2	1726.9	pyroQSQYGCPIISNh' + EGQC
A-2-3	360.4	DLL

ピーク A-2-2 は、検出された質量から Cys31 と Cys51 がジスルフィド結合により架橋された断片ペプチドであることが明らかになった。一方、ピーク A-2-1 として得られた断片ペプチドには計 4 つの Cys 残基が存在し、2 組のジスルフィド結合を形成している。このペプチドのジスルフィド結合の架橋様式は、図 2-22 に示したうちのいずれかであり、この段階では決定できなかった。

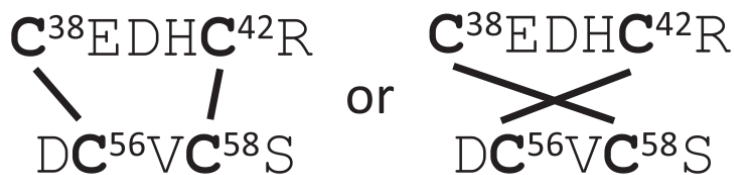


図 2-22. ペプチド A-2-1 の架橋様式の候補

ペプチド A-2-1 の MS/MS 分析

ペプチド A-2-1 に含まれるジスルフィド結合の架橋様式を決定するため、これを ESI-IT-TOF/TOF 分析に供した。その結果、図 2-23 に示すように C-S 結合開裂を含むいくつかのフラグメントイオンが観測された。Cys38 と Cys56 間のジスルフィド結合を含むフラグメントイオンは得られなかったものの、図中に示したように Cys38 と Cys56 との間、Cys42 と Cys58 との間でジスルフィド結合を形成した構造であることが強く示唆された。

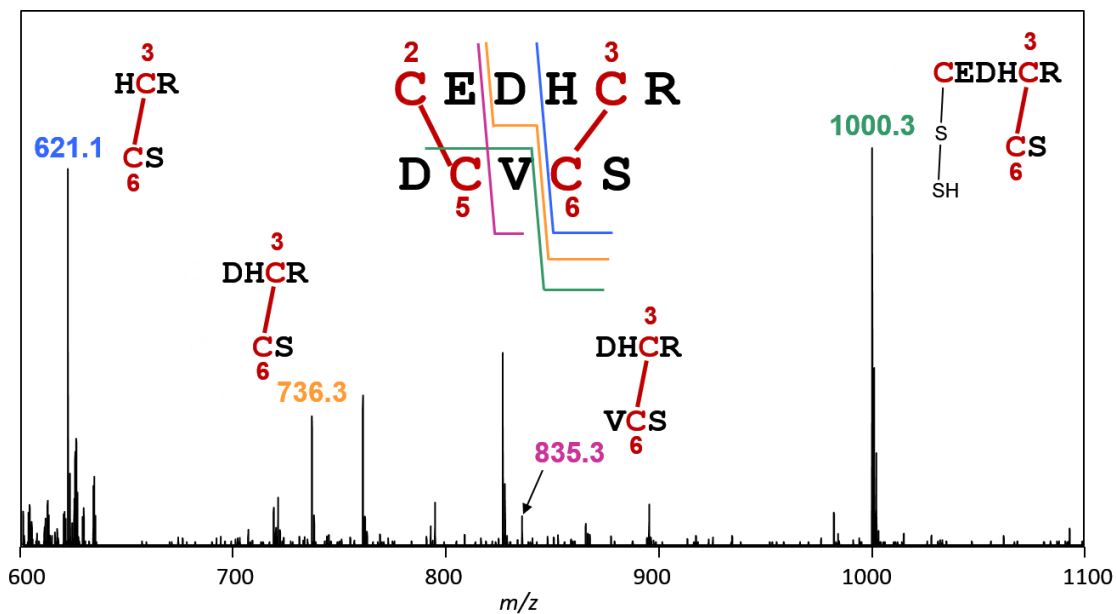


図 2-23. ペプチド A-2-1 の MS/MS 解析の結果

断片ペプチドの合成

ペプチド A-2-1 の架橋様式を確定するため、候補である 2 種類のペプチドを化学合成し、それらのフラグメンテーションパターンを LaIT2 の消化断片ペプチドと比較することにした。2 種類のペプチドの合成においては、*p*-methoxybenzyl (Pmb) 基を用いてジスルフィド結合を選択的に形成する手法を用いた²⁰⁾。この手法では、まず 2 つのフラグメントペプチドの、結合させたいシステイン側鎖同士を同じ保護基 (trityl 基あるいは Pmb 基) で保護してペプチド合成を行う。次に、樹脂からのペプチドの切り出しと同時に trityl 基を除去し、そのまま空気酸化させることで 1 組目のジスルフィド結合を形成させる。最後に、DTNP を処理して Pmb 基を 2-(5-nitropyridyl)thio 基 (5-Npys 基) に置換し、これを DTT で処理することによって 2 組目のジスルフィド結合を形成させることができる (図 2-24)。

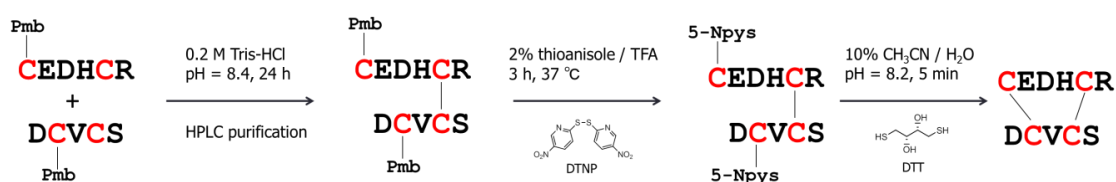


図 2-24. ジスルフィド結合の選択的形成法

・ C(Pmb)EDHCR の合成

最初のアミノ酸の導入量は 0.74 mmol / g resin であった (導入率 67.2%)。ペプチド鎖の伸長後の樹脂 102 mg から粗ペプチドを切り出したところ、26.4 mg の粗ペプチドが得られた。これを LC/MS 分析したところ、図 2-25 に示すように目的物 (C(Pmb)EDHCR、質量 881.8) が得られた。

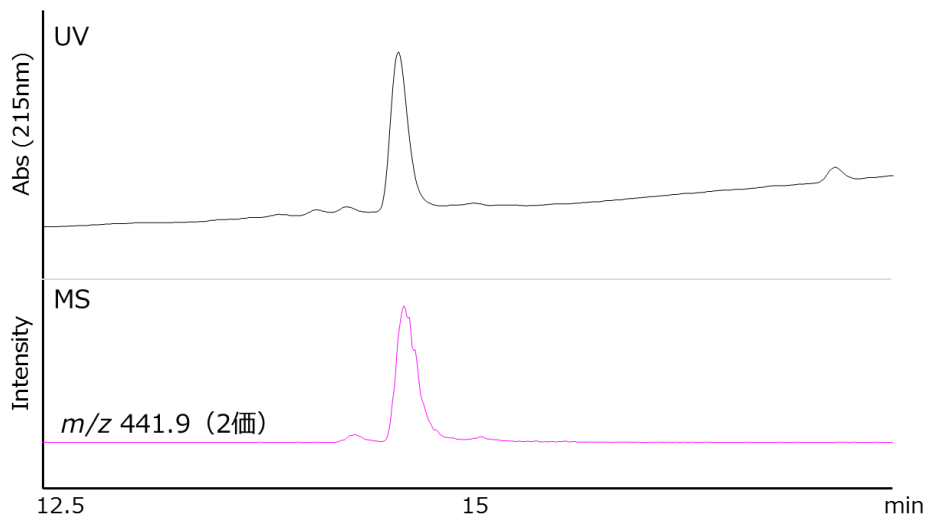


図 2-25. C(Pmb)EDHCR の粗ペプチドの LC/MS 分析結果

・ DC(Pmb)VCS の合成

最初のアミノ酸の導入量は 1.08 mmol / g resin であった（導入率 98.5%）。ペプチド鎖の伸長後の樹脂 40 mg から粗ペプチドを切り出したところ、9.2 mg の粗ペプチドが得られた。これを LC/MS 分析したところ、図 2-26 に示すように主ピークとして目的物（DC(Pmb)VCS、質量 645.6）が得られた。

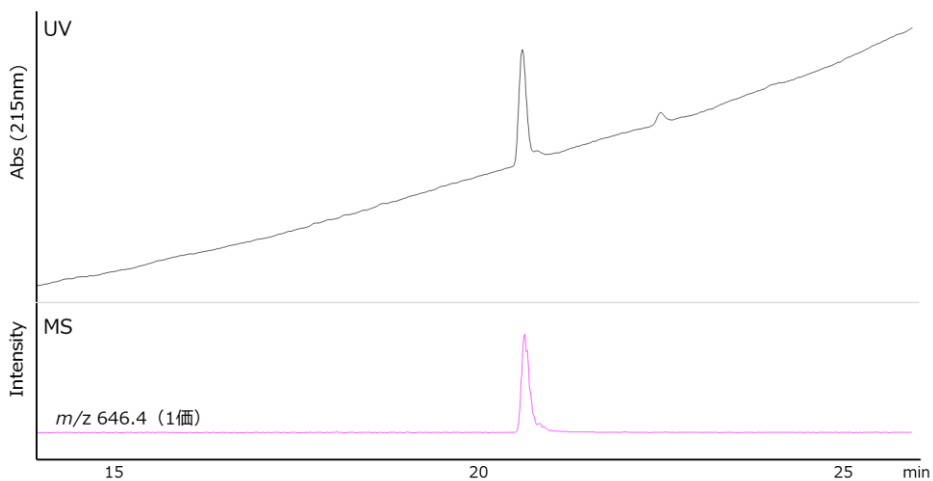


図 2-26. DC(Pmb)VCS の粗ペプチドの LC/MS 分析結果

・ DCVC(Pmb)S の合成

最初のアミノ酸の導入量は 1.08 mmol / g resin であった (導入率 98.5%)。ペプチド鎖の伸長後の樹脂 80 mg から粗ペプチドを切り出したところ、18.5 mg の粗ペプチドが得られた。これを LC/MS 分析したところ、図 2-27 に示すように主ピークとして目的物 (DCVC(Pmb)S、質量 645.6) が得られた。

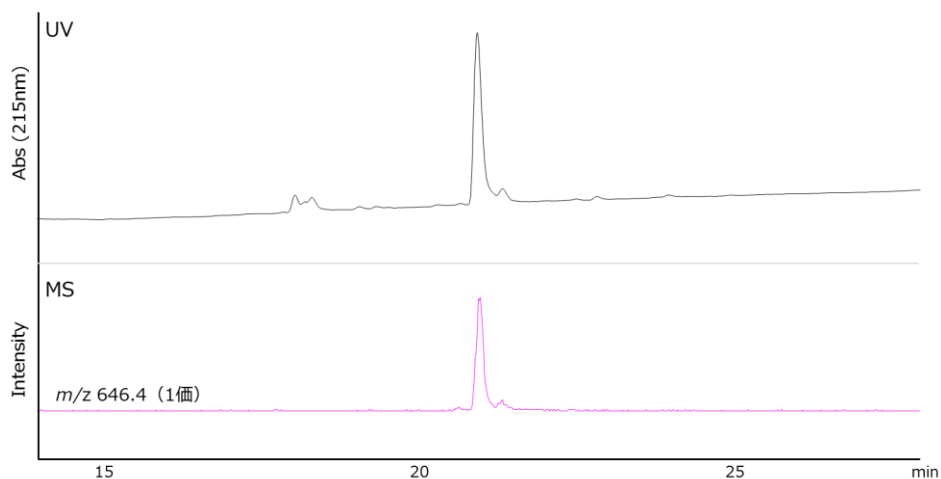


図 2-27. DCVC(Pmb)S の粗ペプチドの LC/MS 分析結果

・ 1 組目のジスルフィド結合の形成

C(Pmb)EDHCR と、DC(Pmb)VCS あるいは DCVC(Pmb)S を空気酸化反応に供し、それぞれ LC/MS 分析を行った結果を図 2-28 に示す。いずれの場合においても目的物がメインピークとして検出され、同じペプチド鎖同士がジスルフィド結合を形成したものが 2 種類検出された。目的のペプチドをそれぞれ RP-HPLC により分取精製した。

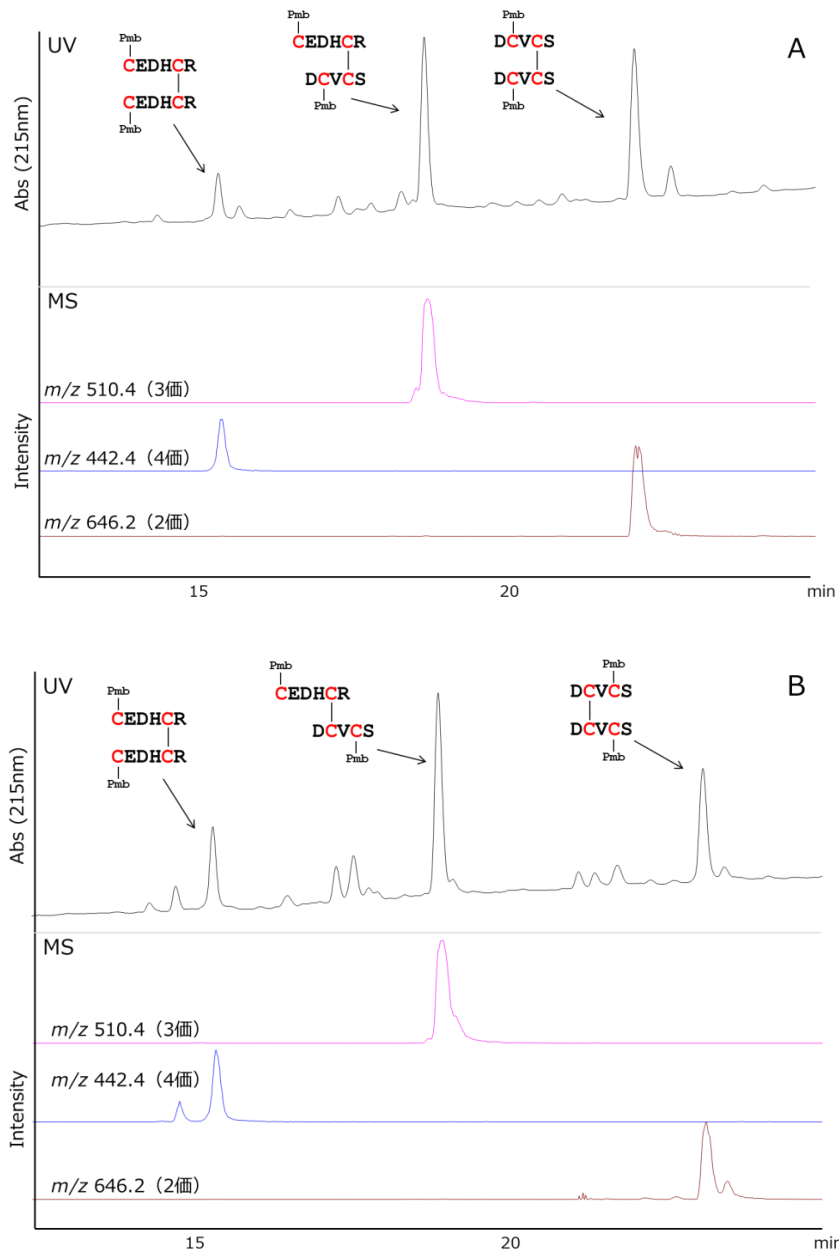


図 2-28. 酸化反応後の LC/MS 分析結果

(A) C(Pmb)EDHCR と DC(Pmb)VCS、 (B) C(Pmb)EDHCR と DCVC(Pmb)S

・2組目のジスルフィド結合形成

得られたペプチドを DTNP および DTT により処理し LC/MS 分析に供したところ、いずれの場合においても目的物の生成を確認できた (図 2-29)。

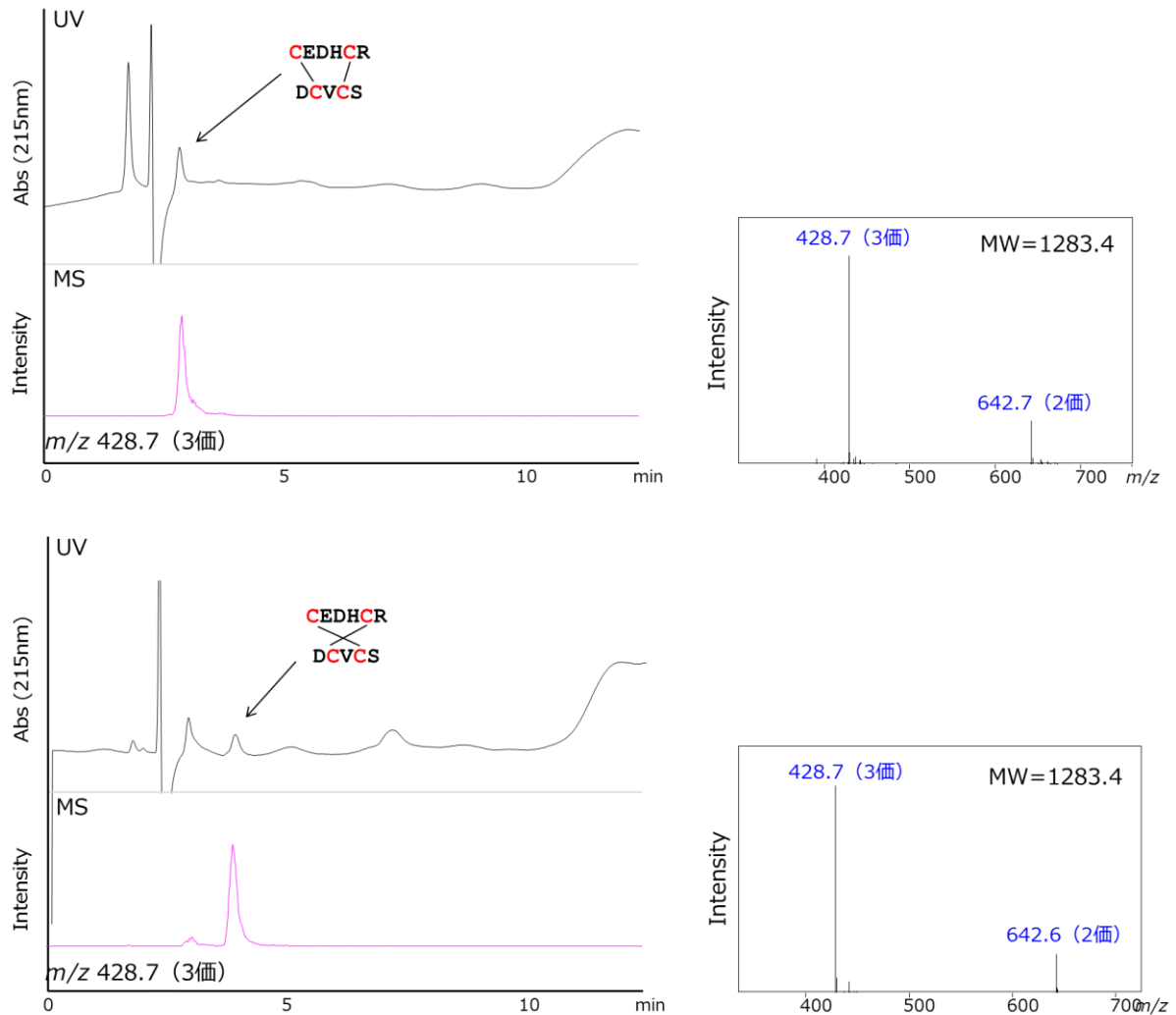


図 2-29. 2 組目のジスルフィド結合反応後の LC/MS 分析結果

LaIT2(26-59)消化物と合成ペプチドの MS/MS 分析の比較

LaIT2(26-59)由来の断片ペプチド A-2-1 と、2 種の合成ペプチドの MALDI-TOF/TOF 分析の結果を比較したところ、図 2-30 の(A)では同様のフラグメントパターンを示している一方、(B)ではフラグメントパターンに違いが見られた。

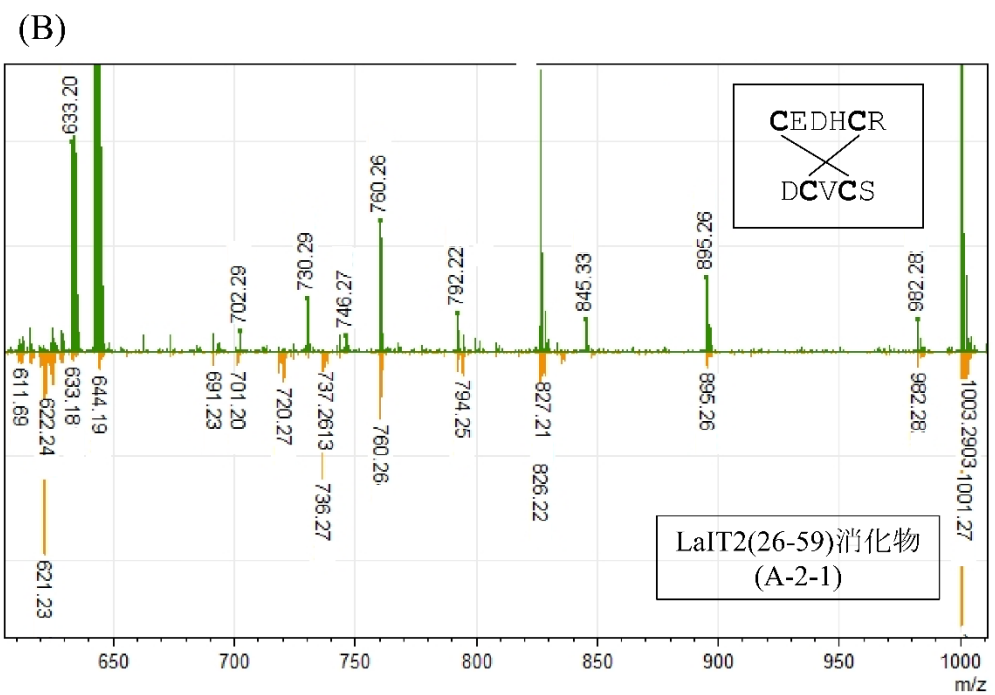
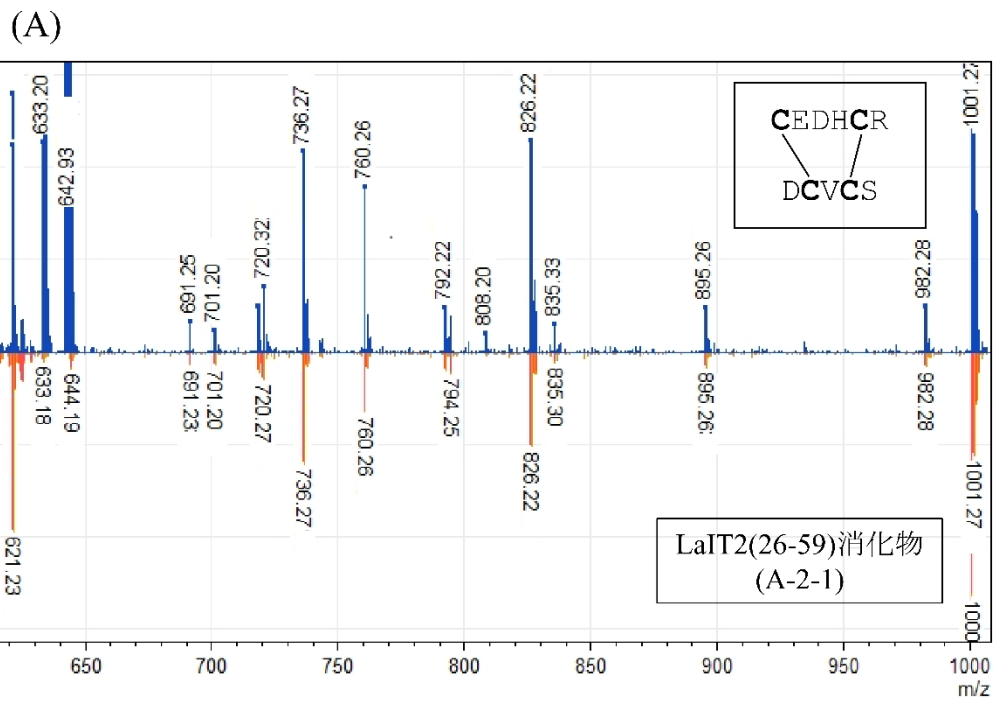


図 2-30. 合成ペプチドと LaIT2(26-59)消化物の MS/MS 分析結果の比較

同様の結果は全長 LaIT2 を用いた場合でも得られた。以上の結果から、LaIT2 のジスルフィド結合の架橋様式を以下のように決定することができた（図 2-31）。



図 2-31. LaIT2 のジスルフィド結合の架橋様式

2-4 LaIT2 および部分ペプチドの活性評価

LaIT2 は殺虫活性と抗菌活性を併せもち、その構造は NDBPs（N 末端領域）と DBPs（C 末端領域）のキメラペプチドと言える。また、 β -KTx において、しばしば抗菌性が見られるが、それを併せもつ意義や構造との関連については未知である。そこで LaIT2 の全長ならびに部分ペプチドの活性評価を行った。

LaIT2 および LaIT2 (1-30) の二次構造の決定

β -KTx である LaIT2 の N 末端領域は α -ヘリックス構造であると予測されていたが、実験には確認されていなかった。そこで LaIT2 および LaIT2(1-30) を円偏光二色性（CD）スペクトル測定に供し、これらの二次構造について調べることにした。測定した CD スペクトルを図 2-32 に示す。

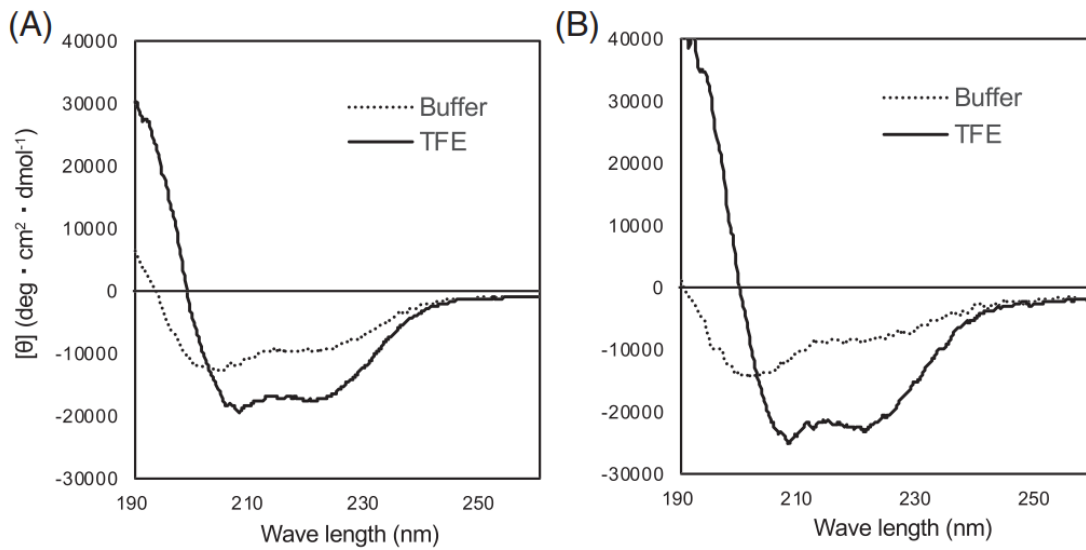


図 2-32. (A) LaIT2 と (B) LaIT2(1-30) の CD スペクトル

点線は 0.2 M リン酸緩衝液 (pH7.0) を、実線は TFE を 50% 加えた 0.2 M リン酸緩衝液 (pH7.0) を溶媒に用いた結果を示す。

得られた CD スペクトルから、 α -ヘリックスの含有率を見積もった (表 2-4)。二次構造の計算は CDSSTR (Reference dataset 4) をアルゴリズムに用い、DichroWeb サーバーにて実施した^{21,22}。その結果、LaIT2 の N 末端領域および LaIT2(1-30) の二次構造はアミノ酸配列から予測された通りに、 α -ヘリックスであることが明らかになった。

表 2-4. LaIT2 および LaIT2(1-30) に含まれる二次構造の割合

ペプチド	溶媒	各二次構造の割合 (%)			
		α -ヘリックス	β -シート	ターン	ランダムコイル
LaIT2	I	17	24	27	33
	II	54	7	13	26
LaIT2(1-30)	I	17	24	26	33
	II	68	8	9	17

殺虫および抗菌試験の結果

殺虫試験はペプチド溶液を体重 50 ± 5 mg のコオロギ (*Acheta domesticus*) の腹部に注射して観察することで評価した。各種濃度のペプチド溶液はペプチドを $1 \sim 2 \mu\text{L}$ の蒸留水に溶解させて調製した。1つのサンプルに対して10匹のコオロギを使用し、注射後15分と48時間に麻痺または死亡した数を記録し、ED₅₀とLD₅₀を統計ソフトウェアPRISM (GraphPad Software, La Jolla, CA) を用いて算出した。また、抗菌試験は *Escherichia coli* NBRC 3972 (グラム陰性) と *Staphylococcus aureus* NBRC 13276 (グラム陽性, NITE バイオテクノロジーセンター) に対する最小増殖阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration: MIC) を求めて評価した。それぞれの活性試験の結果を表 2-5 にまとめた。

殺虫試験の結果、LaIT2の全長とN末端領域が活性を示し、これらを比較すると、全長の方が強い活性を示した。抗菌活性についても全長とN末端領域が活性を示したが、昆虫毒性とは逆に、N末端領域がより強い活性を示した。これらのことから、N末端領域が活性発現に重要であり、昆虫毒性についてはC末端領域が補助的な役割を果たすことが示唆された。

表 2-5. 殺虫および抗菌試験の結果

ペプチド	抗菌活性 MIC (μM)		昆虫毒性	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	ED ₅₀ (nmol/g)	LD ₅₀ (nmol/g)
LaIT2(全長)	5-10	>30	4.0	40
LaIT2(1-30)	2.5-5	>30	11	>120
LaIT2(26-59)	>30	>30	>100	>100

2-5 考察

本研究では、NCL法を用いて59アミノ酸残基からなるLaIT2を化学合成した。これまでに、 β -KTxペプチドが化学合成された例はなく、今回が初めての報告である。全長型のLaIT2だけでなく、N末端およびC末端領域からなる部分ペプチドも合成し、その殺虫活性ならびに抗菌活性を評価した。その結果、N末端領域が活性の発現に重要であることを明らかにした。

β -KTxペプチドにはN末端およびC末端領域に異なる構造ドメインが存在するが、それらの活性への寄与について調べられた例がいくつか存在する。HgeScplp1は*H. gertschi*から単離された β -KTxペプチドである。HgeScplp1は抗菌性を示すが、このペプチドをN末端領域とC末端領域に分解して活性を評価したところ、LaIT2の場合とは異なりN末端領域のペプチドには活性が見られないことが報告されている。興味深いことに、C末端領域ペプチドは弱いK⁺チャネル阻害活性を示すようになり、実際に毒液中からN末端領域が除かれたペプチドが見つかった²³⁾。このことにより、*H. gertschi*は毒液成分の作用を多様化させるために、2つのドメインからなるペプチドを作り出した上で、これをさらに分解するようになったと考えられる。MeuTXK β 1は*Mesobuthus eupeus*から単離された抗マラリア原虫活性を有す β -KTxペプチドである。この場合、N末端領域とC末端領域ペプチドの両方が活性を示すが、全長型が最も強い活性を示すことが報告されている²⁴⁾。さらに*Euscorpiops validus*から単離されたK⁺チャネル阻害活性をもつ β -KTxペプチドであるEv37は、N末端領域とC末端領域ペプチドの両方もが活性を示さず、活性発現には全長構造が必須であることが分かっている²⁵⁾。

このように、 β -KTxペプチドのそれぞれの領域の活性に対する重要性は、ペプチドによって異なっている。しかしながら、どのペプチドの場合でも全長型、つまり二つの構造ドメインを持つものが最も強い活性を示すということは共通している。この事実は、サソリが進化の過程において、それぞれの構造ドメインからなるペプチドを組み合わせることで、新たな活性を持つペプチドを作り上げ、毒液成分の生理活性を多様化させているという仮説を裏付けるものである。LaIT2においては、特に昆虫毒性に関してこの傾向が見られていることから、昆虫毒性の強化のためにLaIT2が生み出された可能性が考えられる。

LaIT2の殺虫および抗菌活性の発現は、両親媒性の α -ヘリックス構造によってもたらされる細胞膜の破壊によるものと推察されていた¹¹⁾。そこで、LaIT2の二次構造と活性発現との関連を明らかにすることを目的としてCDスペクトルによる解析を行った結果、LaIT2のN末端領域は α -ヘリックス構造を形成していることが明らかになった。このことは、LaIT2の活性発現に膜破壊作用に関わるというこれまでの予

想を強く支持するものである。しかしながら、殺虫活性においては全長型が最も高い活性を示したことから、C末端領域も何らかの役割を果たしていると考えられる。C末端領域の機能については、N末端領域の構造安定化に寄与していることが考えられるが、この場合、抗菌活性においてはN末端領域ペプチドの方が高活性を示すということを説明することが難しい。また別の可能性として、N末端領域が細胞膜に結合することによってのみC末端領域が効果を発揮できるような標的分子が存在することが考えられ、C末端領域の機能については更なる検討が必要である。

LaIT2のグラム陽性菌とグラム陰性菌に対する抗菌活性においては大きな違いが見られた。両親媒性 α -ヘリックス構造をもつ抗菌ペプチドにおいては、Lysが多数含まれるとグラム陽性菌に対する活性が低下することが報告されており²⁶⁾、本試験の結果はそれを裏付けるものである。

β -KTxのように2ドメイン構造をもつペプチドは、クモ毒液から多数見つかっている。その中で、殺虫および抗菌活性を示すspiderineは、N末端領域が α -ヘリックス構造を形成し、C末端領域には複数のジスルフィド結合を含んでいる。Spiderineの場合、 β -KTxとは異なりC末端領域はinhibitor cystine knotモチーフと呼ばれる構造を形成している²⁷⁾。このペプチドは、LaIT2と同様にN末端領域の構造によって両活性を示すことが分かっているが、C末端領域を除去してもその活性に変化が見られていない。今回のLaIT2の研究で示されたように、spiderineには2つのドメインが存在することで活性が強くなるような未知の作用標的が存在する可能性がある。

以上のように、本研究で確立したLaIT2の合成法は、このペプチドの活性発現に重要な構造要因の効率的解明にとって有用であっただけでなく、他の2ドメイン構造をもつペプチドにも応用可能であり、生物毒に含まれるこれらのペプチドの生物学的意義の解明への貢献が期待できる。

2-6 実験の部

試薬

合成用樹脂として Novabiochem の NovaSyn[®] TGR R resin および渡辺化学の *p*-benzyloxybenzyl alcohol (Wang) -PEG resin を用いた。各種 Fmoc アミノ酸、Boc アミノ酸（表 2-6）は渡辺化学のものを用いた。ペプチドの高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析には、関東化学のトリフルオロ酢酸（TFA）および HPLC 用アセトニトリルと和光純薬のギ酸（HCOOH）を用いた。水はすべて MilliQ 水を用いた。その他の試薬は市販のものを用いた。

また、Fmoc 固相合成法においては Initiator⁺ Peptide Workstation（Biotage Japan）を利用した。ただし、Fmoc 除去反応においては塩基性条件下での高温反応によるラセミ化が懸念されたため、マイクロウェーブ照射は行わなかった。

表 2-6. 使用した Fmoc アミノ酸、Boc アミノ酸

Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Asn(Trt) -OH	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
Fmoc-Cys(Trt)-OH	Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-Gly-OH
Fmoc-His(Trt)-OH	Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Fmoc-Met-OH	Fmoc-Phe-OH	Fmoc-Pro-OH	Fmoc-Ser(tBu)-OH
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Fmoc-Val-OH	Boc-Ala-OH	

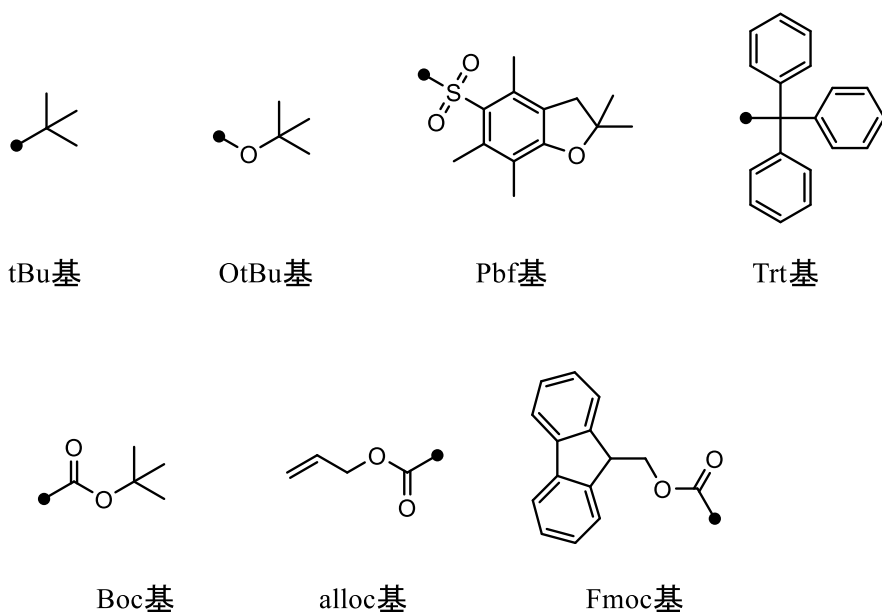


図 2-33. アミノ酸の保護基

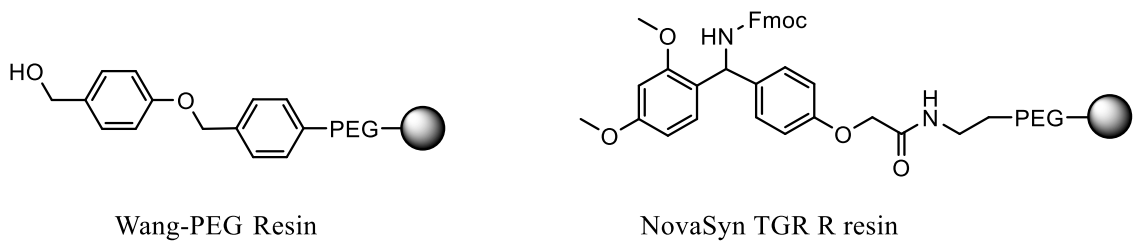


図 2-34. 合成に使用した樹脂

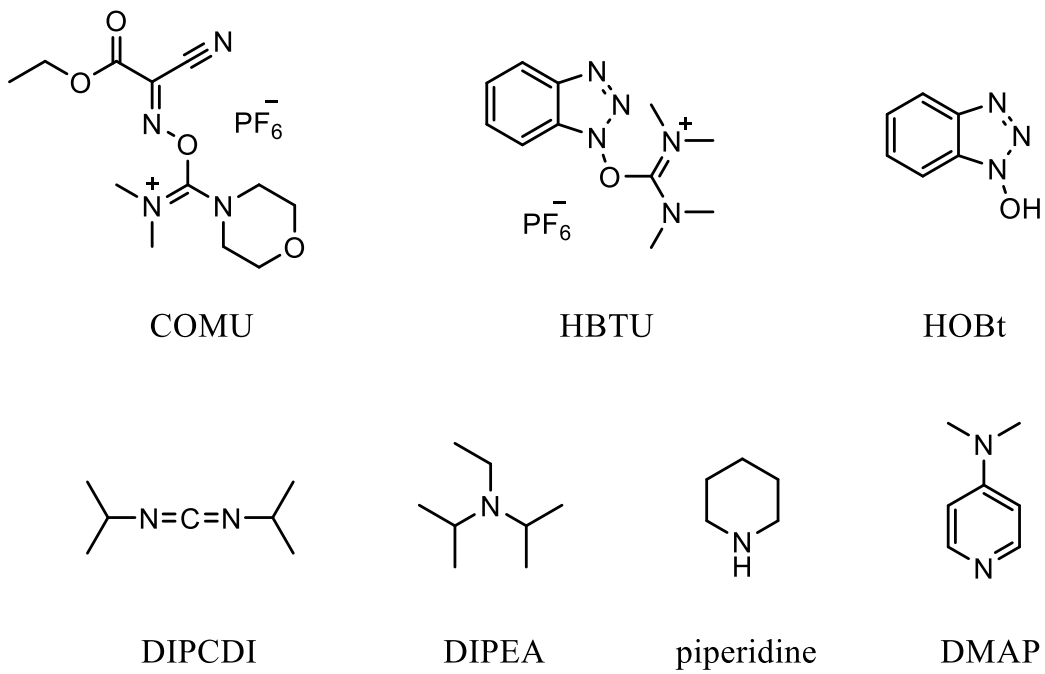


図 2-35. Fmoc 固相合成法において使用した試薬

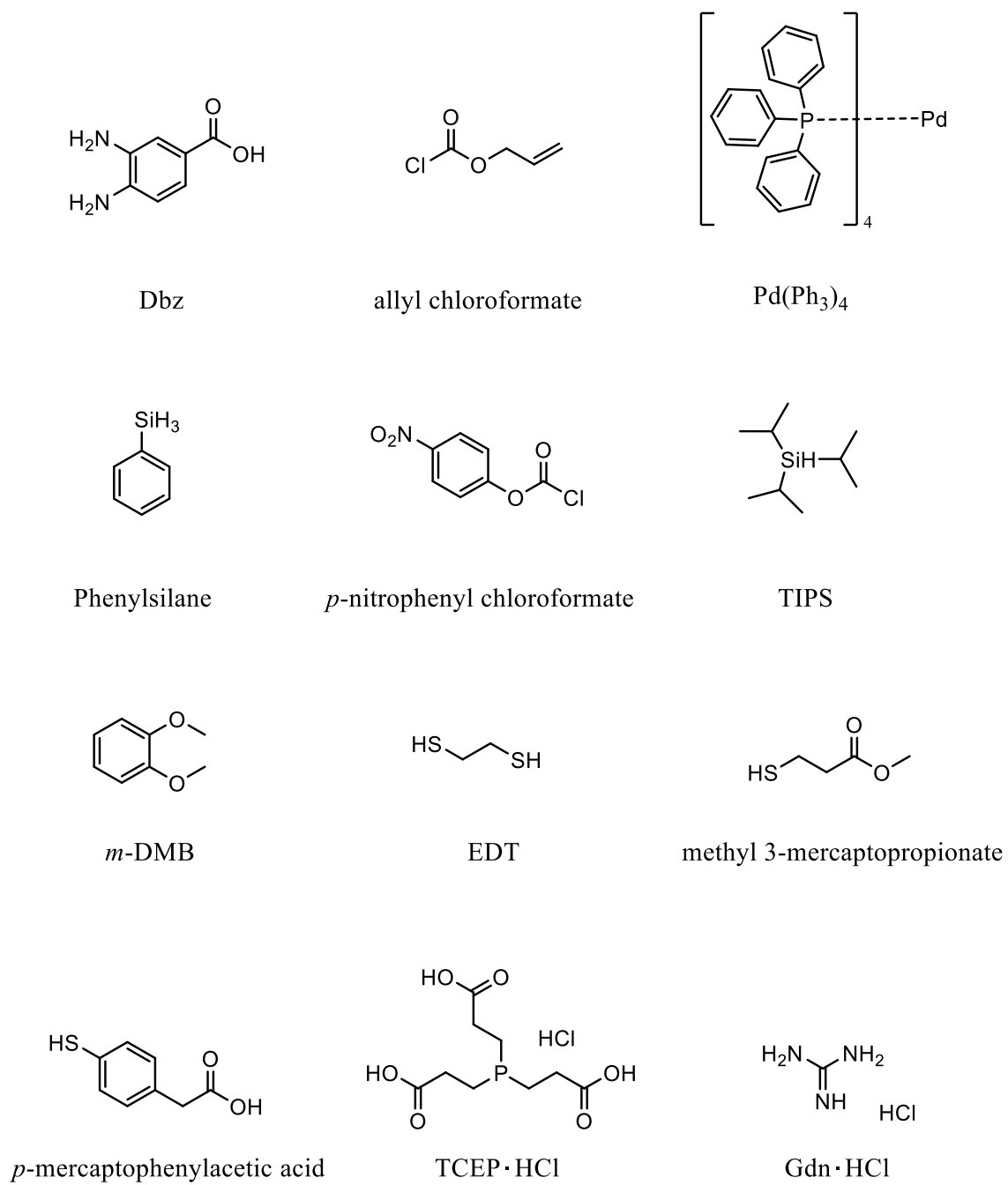


図 2-36. チオエステル合成、NCL において使用した試薬

LaIT2(1-30)-thioester の合成

・ 3-Fmoc-4-diaminobenzoic acid (Fmoc-Dbz) の合成

3,4-Diaminobenzoic acid (Dbz, 0.62 g, 4.05 mmol) を NaHCO₃ (0.1 M, pH 7.9) / CH₃CN 溶液(1:1, 15 mL) に溶解し、少量ずつ *N*-(9-fluorenylmethyloxycarbonyloxy)succinimide (Fmoc-OSu, 1.37 g, 4.05 mmol) を加えた。固化した場合には、CH₃CN を 7.5 mL 加えて懸濁した。反応の進行の確認は、薄層クロマトグラフィー（展開液 CH₃OH:CHCl₃ = 1:1）で行った。反応の完了を確認した後、1 M 塩酸を 15 mL 加えて乳褐色物を析出させた。析出物をろ過し、氷冷した ether、hexane および methanol（各 40 mL）で洗浄して減圧乾燥した。生成物の確認は NMR で行った（1.19 g, 78.6%）。

・ Fmoc-Dbz の導入

マイクロウェーブ合成装置用のバイアルに入れた NovaSyn TGR R resin (0.15 ~ 0.23 mmol/g, 1.57 g, 0.30 mmol) に *N,N'*-dimethylformamide (DMF) を加え、90 分間攪拌して膨潤した。次に、Fmoc-Dbz (3 当量) を HBTU (3 当量)、HOBt (3 当量) とともに最小量の DMF に溶解し、6 当量の *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) を加えた後、全量樹脂に加え 75 °C で 20 分間反応させた。この操作を 2 回繰り返した。

・ Fmoc-Dbz 導入量の測定

樹脂を DMF、dichloromethane (DCM)、ether で 5 回ずつ洗浄し、20 分間吸引ろ過した後デシケーター内で減圧乾燥させた。樹脂を約 1 μmol 相当量りとり、20% piperidine / DMF を 3 mL 加え 10 分間攪拌した。これを 20% piperidine / DMF で 4 倍に希釈し、上清の 290 nm における吸光度を分光光度計 (UV1600PC, SHIMADZU) にて測定した。測定は 2 連で行い、平均値から導入量を以下の式で算出した。

$$\text{導入量(mmol/g)} = \frac{4 \times A_{290}}{1.75 \times \text{樹脂(mg)}}$$

・ alloc 基の導入

乾燥させた樹脂を約 1 時間 DCM 中で膨潤させた。DCM を除去した後、350 mM allyl chloroformate / 乾燥 DCM を加え、DIPEA を樹脂に対して 1 当量となるよう加えた。25 °C で 24 時間反応させた後、DCM、DMF でそれぞれ 5 回ずつ洗浄した。

・ペプチド鎖の伸長

ペプチド鎖の伸長を図 2-37 に示す手順で行った。伸長の途中で反応を止めて保存する場合は、洗浄後 Fmoc 基の脱保護を行わずに DMF に浸して冷凍保存した。伸長終了後は Fmoc 基を脱保護し、DMF、DCM、ether で 5 回ずつ洗浄してからデシケーター内で減圧乾燥し、冷凍庫に保存した。

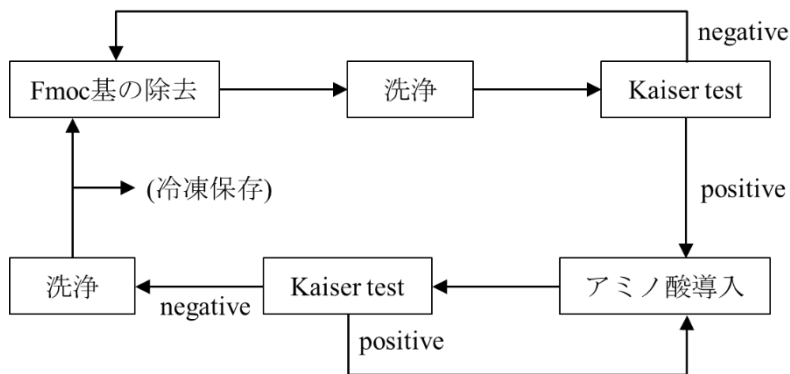


図 2-37. ペプチド鎖伸長の手順

・ Fmoc 基の除去

樹脂に 20% piperidine / DMF を加えて 3 分間攪拌した後、反応液を吸引除去した。この操作をさらに 3 分、20 分で計 3 回繰り返した。反応液を DMF で 2 回洗浄し、下に示す Kaiser test を行った。結果が陽性でなかった場合は脱保護をもう 1 度繰り返した。陽性であった場合は樹脂を DMF で 5 回洗浄した。

・ Fmoc-アミノ酸の縮合

Fmoc-アミノ酸 (3 当量) と HBTU (3 当量)、DIPEA (3 当量) を最小量の DMF に溶解し、6 当量の DIPEA を加え、全量を樹脂に加えて 75°C で 5 分間反応させた。また縮合させるアミノ酸が Cys の場合は、ラセミ化を防ぐため HBTU, DIPEA を用いず、代わりに 1-hydroxybenzotriazole (HOBt, 3 当量) と diisopropylcarbodiimide (DIPCDI, 3 当量) を用いて 50 °C で 10 分間反応させた。縮合反応後に Kaiser test を行い、陽性だった場合は反応時間を延長、もしくはダブルカップリングを行った。なお、N 末端のアミノ酸残基の導入には Boc-Ala を用いた。

• Kaiser test

樹脂を少量とり、メタノールを用いて傾斜法で樹脂を2回洗浄した。ここに 20 μ M KCN / piperidine、5% (w / v) ninhydrin / ethanol、80% (w / v) phenol / ethanol をそれぞれ1滴ずつ加え、沸騰湯浴中で4分間加熱した。陽性の場合には反応液が青色に着色する。また、直前に導入したアミノ酸の種類によっては、陽性であっても反応液が青色ではなく褐色となることがあった。

• alloc 基の除去

ペプチド鎖伸長後、樹脂を約1時間 DCM 中で膨潤させた。ここに PhSiH_3 (20 当量) と $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.35 当量) を加え、窒素雰囲気下で 25 $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた。反応後、DCM、ether で5回ずつ洗浄し、20分間吸引ろ過した後デシケーター内で減圧乾燥した。

• Nbz への変換

乾燥させた樹脂 100 mg を約1時間 DCM 中で膨潤させた。ここに *p*-nitrophenyl chloroformate (10 当量) を加え、DCM 10 mL 中で90分間攪拌した。これを DCM、DMF で5回ずつ洗浄した後、0.5 M DIPEA 10 mL 中で30分間攪拌した。反応後、DMF、DCM、ether で5回ずつ洗浄し、20分間吸引ろ過した後デシケーター内で減圧乾燥した。

• 樹脂からの切り出し

TFA / *m*-DMB / TIPS を 95 / 2.5 / 2.5 で混合して切り出し用反応液を調製した。この反応液を乾燥した樹脂 40 mg に対し 1 mL の割合で樹脂に加え、0 $^{\circ}\text{C}$ で30分間、次いで常温で90分間攪拌した。反応液を吸引ろ過し、ろ液を氷冷した ether (反応液の10倍量) にそのまま滴下することでペプチドを白色の沈殿として析出させた。これを遠心分離 (2500 rpm, 10 min) し、上清液をデカンテーションにより除去した。ここに上記と同量の ether を加えて懸濁した後、遠心して上清を除く操作をさらに2回繰り返した後、デシケーター内で減圧乾燥した。得られた粗ペプチドの一部を水に溶かし、LC/MS 分析を行った [LC/MS 分析条件 1]。

• チオエステル化

6 M Guanidine \cdot HCl、200 mM Na_2HPO_4 の反応液 (pH = 7.0) を調製した。ここに粗ペプチドを 3.07 mg/mL となるよう溶解した後、methyl-3-mercaptopropionate を粗ペプ

チドに対し 200 当量かつ反応液に対し 2% (v/v)となるように加え、2 時間攪拌した。その後、酢酸を加えて反応を停止した。

- ・塩類およびチオール成分の除去

反応液中の塩類およびチオール成分を除去するため、Sep-Pak® Plus C18 カートリッジ (MILLIPORE)を用いて固相抽出を行った。まず 0.1% TFA を含む 90% CH₃CN / H₂O を 5 mL アプライし、カートリッジを洗浄した。次に 0.1% TFA / H₂O を 5 mL アプライし、平衡化を行った。ここにチオエステル化反応液をローディングした。続いて 0.1% TFA / H₂O をアプライしてカートリッジを洗浄した後、50% CH₃CN / H₂O によって、ペプチドを溶出させた。遠心エバポレーターによってペプチドを含む溶出液から CH₃CN を除去した。得られたペプチド水溶液について LC/MS 分析を行った [LC/MS 条件 1]。その後、RP-HPLC を用いて、目的物を含む画分を分取し精製した [RP-HPLC 条件 1]。

LaIT2(31-59)の合成

- ・樹脂への最初のアミノ酸の導入

Wang PEG Resin (0.26 mmol/g, 1154 mg, 0.30 mmol) に DMF を加え、約 1 時間膨潤した。Fmoc-Ser(tBu)-OH (1150.2 mg, 3.0 mmol) を最小量の乾燥 DCM に溶解した。ここに 5 当量の DIPCDI (232.5 μL, 1.50 mmol) を加え、塩化カルシウム管をつけて 0°C で 25 分間攪拌した。ロータリーエバポレーターで DCM を除去した後、最小量の DMF に溶解し、4-dimethylaminopyridine (DMAP, 3.67 mg, 0.030 mmol) を加え、膨潤した樹脂に全量加えて 1 時間攪拌した。反応後、DMF、DCM、ether で 5 回ずつ洗浄し、20 分間吸引ろ過した後デシケーター内で減圧乾燥した。その後アミノ酸導入量を算出した。

- ・ペプチド鎖の伸長ならびに樹脂からの切り出し

最初のアミノ酸の導入後はマイクロウェーブ合成装置を用いてペプチド鎖を伸長した。アミノ酸の縮合の際には COMU (3 当量) と DIPEA (6 当量) を用いた。その後、TFA / H₂O / TIPS / EDT を 94 / 1 / 2.5 / 2.5 の割合で調製した切り出し反応液を調製し、樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチドを得た。得られた粗ペプチドを LC/MS によって分析 [LC/MS 分析条件 1] し、RP-HPLC による精製を行った [RP-HPLC 条件 2]。

Native chemical ligation による直鎖状 LaIT2(1-59)の合成

6 M Guanidine·HCl、200 mM Na₂HPO₄ の反応液を調製した。反応直前に 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA) と tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP·HCl) をそれぞれ 100 mM、20 mM となるように加え、NaOH で pH が 7.0 になるように調製した。ここに LaIT2(1-30)-thioester と LaIT2 (31-59) をそれぞれ 2 mg / mL となるように溶解し、1 時間室温で攪拌して直鎖状 LaIT2(1-59) を得た。反応の進行は LC/MS を用いて確認した [LC/MS 分析条件 1]。反応後、RP-HPLC による精製を行った [RP-HPLC 条件 3]。

直鎖状 LaIT2(1-59)のジスルフィド結合の形成

還元型グルタチオン、酸化型グルタチオンをそれぞれ 1 mM、0.1 mM となるように 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH = 8.5) に溶解した。ここに LaIT2(1-59) を 0.1 mg / mL の割合で溶解し、24 時間攪拌した。反応の進行は LC/MS を用いて確認した [LC/MS 分析条件 1]。反応終了後 Sep-Pak により脱塩し、凍結乾燥した。その後 RP-HPLC による精製を行った [RP-HPLC 条件 2]。

Native chemical ligation による直鎖状 Met(O)-LaIT2(1-59)の合成

Met(O)-LaIT2(1-30)-thioester と LaIT2 (31-59) を NCL により縮合させた。反応の進行は LC/MS を用いて確認した [LC/MS 分析条件 1]。反応後、RP-HPLC による精製を行った [RP-HPLC 条件 3]。

直鎖状 Met(O)-LaIT2(1-59)のジスルフィド結合の形成

直鎖状 Met(O)-LaIT2 にジスルフィド結合を形成させた。反応の進行は LC/MS を用いて確認した [LC/MS 分析条件 1]。反応終了後 Sep-Pak により脱塩し、凍結乾燥した。その後 RP-HPLC による精製を行った [RP-HPLC 条件 2]。

Met(O)-LaIT2 に含まれるメチオニンスルホキサイドの還元

350 µg の Met(O)-LaIT2 を 200 µL の TFA に溶解し、NH₄I (20 当量) および DMS (20 当量) を加え、3 時間反応させた。反応の進行は LC/MS を用いて確認した [LC/MS 分析条件 1]。反応後、1 mL の氷冷 ether を滴下してペプチドを析出させて遠心分離した後、上清液をデカンテーションにより除去した。ここに上記と同量の ether を加えて懸濁した後、遠心して上清を除く操作をさらに 4 回繰り返し、デシケーター内で減圧乾燥した。

LaIT2 (26-59) の合成

Fmoc-LaIT2 (31-59) となるまでペプチド鎖を伸長した後、Fmoc 基を脱保護し、樹脂からの切り出しを行った。得られたペプチドについて LC/MS 分析 [LC/MS 分析条件 1]、RP-HPLC による精製 [RP-HPLC 条件 1] を行い、ジスルフィド結合形成反応を行った。

LC/MS および RP-HPLC の分析条件

[LC/MS 分析条件 1]

質量分析装置: LCMS-2020 (SHIMADZU)

カラム: Poroshell 120 EC18 75×2.1 mm (Agilent)

カラム温度: 40°C

溶離液: (A) 0.1% HCOOH / H₂O, (B) 0.1% HCOOH / CH₃CN

流速: 0.3 mL / min

UV 検出: 215 nm

グラジエント: 5-5-50%, 0-2.5-12.5 min

イオン化法: ESI

モード: positive ion mode

[RP-HPLC 条件 1]

カラム: InertSustain C18, 250×14 mm (GL Sciences)

カラム温度: 40°C

溶離液: (A) 0.1% HCOOH / H₂O, (B) 0.1% HCOOH / CH₃CN

流速: 5 mL / min

UV 検出: 215 nm

グラジエント: 20-40%, 0-25 min

[RP-HPLC 条件 2]

カラム: InertSustain C18, 250×14 mm (GL Sciences)

カラム温度: 40°C

溶離液: (A) 0.1% TFA / H₂O, (B) 0.1% TFA / CH₃CN

流速: 5 mL / min

UV 検出: 215 nm

グラジエント: 25-40%, 0-25 min

[RP-HPLC 条件 3]

カラム: InertSustain C18, 250×14 mm (GL Sciences)

カラム温度: 40°C

溶離液: (A) 0.1% TFA / H₂O, (B) 0.1% TFA / CH₃CN

流速: 5 mL / min

UV 検出: 215 nm

グラジエント: 25-45%, 0-30 min

抗菌試験用培地作製には NaCl (ナカライテスク)、Bacto trypton、Bacto yeast extract (Becton, Dickinson and Company)、Agar, Powder (和光純薬工業) を用いた。

殺虫活性の測定

スフィロアクアよりヨーロッパイエコオロギ (*Acheta domestica*) を購入し、実験動物用固形飼料と水を与えながら 25 °C の部屋で体重が 50 mg 前後になるまで飼育した。成長したコオロギを蓋付きのプラスチック容器に移し、容器ごと 10 分間氷冷した。動きの鈍くなったコオロギを一匹ずつ正確に秤量して 45~55 mg のものを選び、プラスチックシャーレに移して室温に放置した。個体の動きが回復していることを確認後、ガラス試験管に移し、再び試験管ごと 5 分間氷冷した。動きの鈍くなったコオロギを取り出し、MilliQ 水で様々な濃度に調製した試料 1 µL を胸部に注入した。注入する際のシリンジは、ガスクロマトグラフィー用シリンジ (MICROLITER™ #701 10 µL, Hamilton) を用いた。試料は、コオロギの胸部にシリンジの針先を 3 mm 程度挿入してから 1 µl 注入した。試料を注入後、速やかにプラスチックシャーレに戻し、30 分後、および 1、2、12、24、48 時間後に観察し、麻痺あるいは致死を指標に活性を評価した。なお、試料の調製は以下のように行なった。250 µg のペプチドを 12.5 µL の水に溶解させて 20 µg / µL の試料とした。20 µg / µL の試料から 5 µL 取り出し、5 µL の水で希釈して 10 µg / µL の試料とした。また、20 µg / µL の試料から 2.5 µL 取り出し、7.5 µL の水で希釈して 5 µg / µL の試料とした。LaIT2 に関しては、同様の操作により 2 µg / µL の試料も作製し、活性評価に用いた。

抗菌活性の測定

・試薬

抗菌試験用培地作製には NaCl (ナカライテスク)、Bacto trypton、Bacto yeast extract (Becton, Dickinson and Company)、Agar, Powder (和光純薬工業) を用いた。

・培地の作製

Bacto Trypton (2 g, 終濃度 1%)、Bacto yeast extract (1 g, 終濃度 0.5%)、NaCl (2 g, 終濃度 1%) を 200 mL の蒸留水に溶解させ、NaOH で pH 7.0 に調整して Luria-Bertani (LB) 培地を作製した。作製した LB 培地より 180 mL 取り出して agar (2%, 3.6 g) を添加した。また液体培地 20 mL を 4 mL ずつ試験管に分注し、5 本の液体培地とした。これらの培地とパスツールピペット、爪楊枝を 121 °C、15 分間オートクレーブした。寒天培地を取り出し、約 50 °C まで冷めてから滅菌ポリシャーレに約 12 mL ずつ分注し、15 枚の寒天培地を得た。液体培地は冷めてから冷蔵し、保存した。

・菌の培養

研究室に -80 °C で保存している大腸菌 (*E. coli*, NBRC 3972, Gram negative) のグリセロールからパスツールピペットで少量取り出して液体培地へ添加し、37 °C で一晩振盪培養した。次に、この液体培地から白金耳を用いて固体培地へと植菌し、37 °C で 8 時間培養した。培養した培地からコロニーを滅菌した爪楊枝を用いて取り出し、用意した液体培地に移して 37 °C で 5 時間振盪培養した。菌の生育を 595 nm の吸光度を測定することにより確認し、0.4 程度になるまで培養した。培養した菌を新たに用意した液体培地の中に 5 μ L / 3 mL の割合で添加し、試験に用いた。

・抗菌試験

マイクロプレートに、生育した菌を 1 ウェルに 90 μ L 分注し、MilliQ 水で様々な濃度に調製した試料 10 μ L を添加した。アッセイは二連で行い、37 °C で一晩振盪した。菌の増殖を 595 nm の吸光度を測定することにより判定した。試料の調製は以下のようにして行った。LaIT2 200 μ g (30 nmol) を 30 μ L の水に溶解させて、1 mM LaIT2 溶液を作製した。次に、1 mM LaIT2 を 10、12.5、15、20 倍に希釈し、50、67、80、100 mM の溶液を作製した。LaIT2 (1-30)、LaIT2 (26-59) についても同様に希釈を行い、LaIT2 (1-30) については 50 μ M、33 μ M、25 μ M、20 μ M、16.7 μ M、12.5 μ M の溶液を作製し、LaIT2 (26-59) に関しては 100 μ M、200 μ M、300 μ M の溶液を作製し、試験に用いた。活性の指標として、菌の生育を 100% 阻害する最小濃度 (a) および菌の育成が見られる最大濃度 (b) を求め、(a) - (b) として表した。

第3章 新規 β -KTx である LaIT3 の一次構造解析

3-1 緒言

第2章で述べたように、LaIT2 の活性発現にはN末端領域が重要であり、その作用機構は生体膜との相互作用によるものであると推察された。また殺虫活性においてはC末端領域が何らかの補助的役割を果たしていることが明らかになった。このように、 β -KTx ペプチドにおける各ドメイン構造の活性に対する寄与を明らかにすることは、それらの毒液中での役割を考える上で重要であり、他の β -KTx ペプチドについてできる限り多くの情報を得ることが必要であると考えられる。

ヤエヤマサソリの毒液中には200種類以上のペプチドが含まれることが分かっているが、そのほとんどの機能や構造については不明である。現在までに同定されている殺虫性ペプチドは、LaIT1 および LaIT2 の2種類であるが、一般的にサソリ毒液には微量成分も含めると多数の殺虫性ペプチドが含まれていることが知られている。したがって、ヤエヤマサソリの毒液中には他の未知殺虫性ペプチドが存在し、その中に β -KTx ペプチドが含まれている可能性がある。

これらの状況をふまえ、新規 β -KTx の発見を目的として、ヤエヤマサソリ毒液中から殺虫性ペプチドを探索することにした。

3-2 新規殺虫性成分の単離

LaIT2 は3段階の異なる条件を用いた HPLC 分画により単離されているが、その最終段階での画分VIII-4 には LaIT2 以外にもう一つ活性成分が含まれていることが分かっている。

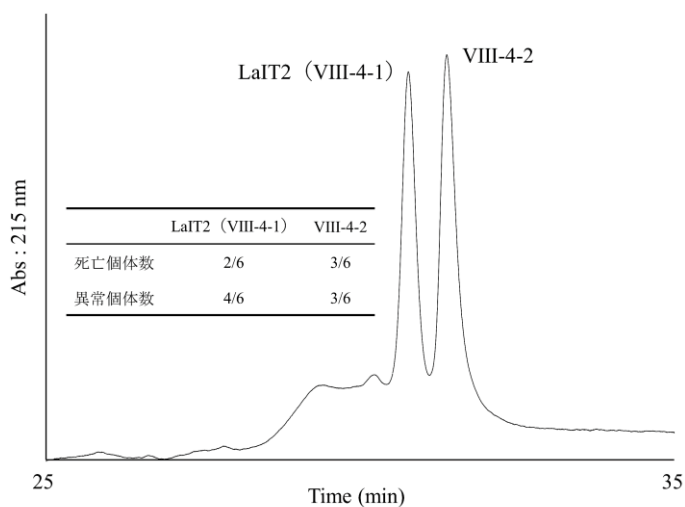


図 3-1. 画分VIII-4 の HPLC クロマトグラムおよび殺虫試験結果

VIII-4-2 を質量分析に供したところ [LC/MS 分析条件 (3.1)], そのモノアイソトピック質量は 9189.6 であることが明らかになった (図 3-2)。質量数が 10,000 以下であること、マススペクトルに多価イオンを与えたことから、この成分はペプチドであると考えられた。また、この成分は HPLC 分析での挙動から考えると LaIT2 と類似した物性 (疎水性) をもっており、 β -KTx の可能性があると考えられた。そこで、これを新規殺虫性ペプチド LaIT3 と命名し、構造解析を進めることとした。最終的に LaIT3 は粗毒液 4.3 mg から 16.5 μ g 得られた。

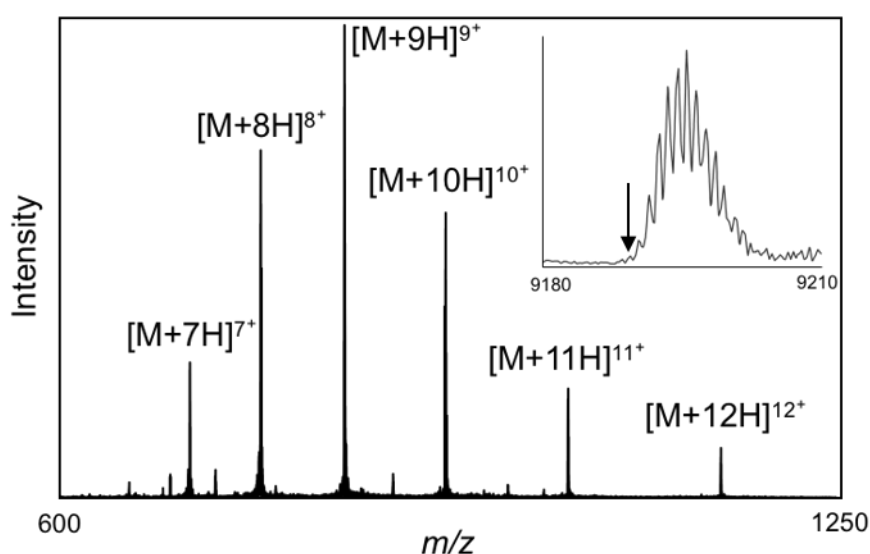


図 3-2. 画分VIII-4-2 の質量分析の結果

β -KTx の特徴の一つは 3 組のジスルフィド結合をもつことである。そこで、まず LaIT3 のジスルフィド結合数について調べることにした。LaIT3 に対してジスルフィド結合の還元およびシステイン残基のアルキル化反応を行い、反応前後の質量変化から決定することにした。これによりジスルフィド結合は不可逆的に切断され、結合するアルキル化剤の質量分が増加する。本実験ではアルキル化剤にヨード酢酸を用いたことから、ジスルフィド結合 1 組につき反応後の質量が 116 増加することになる (図 3-3)。還元アルキル化反応後の反応液を質量分析計に供したところ [LC/MS 分析条件 (3.1)], LaIT3 の質量は 9537.8 となり、348.2 増加した。このことから、LaIT3 にはジスルフィド結合が 3 組存在することが明らかとなり β -KTx である可能性が高まった。

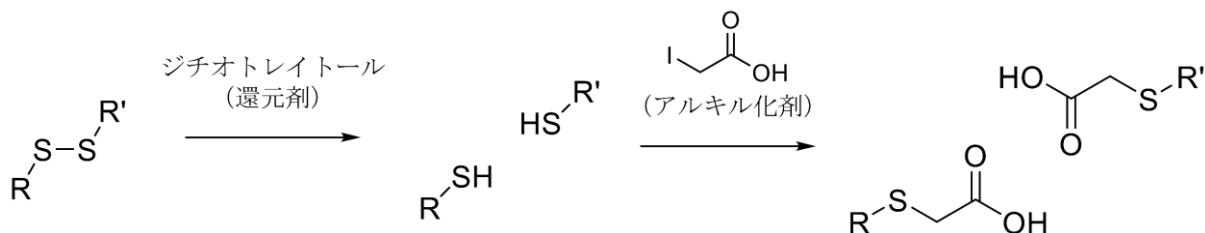


図 3-3. ヨード酢酸をアルキル化剤に用いた還元アルキル化反応

3-3 エドマン分解法による LaIT3 の一次構造解析

まずエドマン分解法による N 末端配列の解析をおこなった。0.2 nmol の LaIT3 を解析に供した結果、図 3-4 に示す通り N 末端から 46 残基目までのアミノ酸配列が明らかとなった。BLAST による類似配列の検索をおこなった結果、LaIT3 は *Urodacus yaschenkoi* から単離された抗菌性ペプチドである scorpine-like-2 (SCI2) と高い類似性をもつことが分かった。SCI2 は β -KTx ペプチドファミリーに属しており、予想した通り LaIT3 が β -KTx ペプチドであると断定した。



図 3-4. エドマン分解法による一次構造解析の結果

3-4 LaIT3 の酵素消化および断片ペプチドの *de novo* シーケンシング

得られた N 末端配列およびその類似ペプチドの配列から、Lys-C あるいはキモトリプシンを用いて LaIT3 を消化することで構造解析に適切な断片ペプチドが得られると考えた。まず、還元アルキル化反応によってジスルフィド結合を切断した。反応には 0.1 nmol の LaIT3 を用いた。反応液を純水で薄めた後、各酵素を加えて 37°C、over night で反応を行った。その後、反応液を HPLC [HPLC 条件 (3.1)] に供し、生じた断片ペプチドを分取した。分取時の HPLC クロマトグラムを図 3-5 に示す。

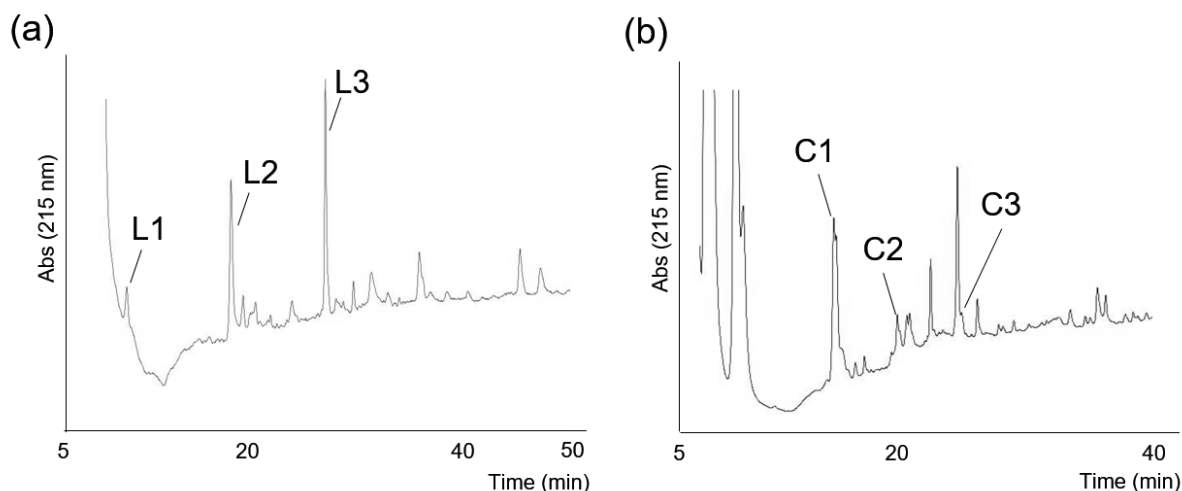


図 3-5. 酵素消化反応液の HPLC クロマトグラム
 (a) Lys-C による消化反応液 (b) キモトリプシンによる消化反応液
 構造解析に有用な情報が得られたピークに印をつけた

3-5 質量分析計による断片ペプチドの *de novo* シーケンシング

質量分析計を用いてペプチドの MS/MS 分析を行うと、主に主鎖構造が開裂して N 末端あるいは C 末端を含むプロダクトイオンが得られる。開裂する位置は、 α 位の炭素とカルボニル炭素間の結合、ペプチド結合、ペプチド結合を形成している窒素と α 位の炭素間の結合の 3 種類であるが、それぞれの位置で開裂した場合、N 末端を含むイオンは順に a、b、c 系列イオンに分類され、C 末端を含むイオンは順に x、y、z 系列イオンに分類される。そして、イオンに含まれるアミノ酸残基数とともに表記される²⁸⁾ (図 3-6)。

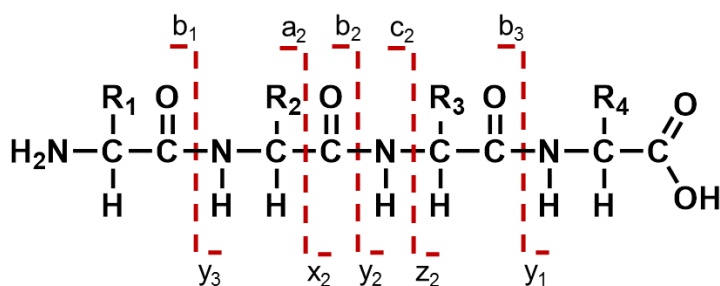


図 3-6. ペプチドのフラグメントイオンの表記

ペプチドを質量分析計内で開裂させる方法としては、衝突誘起解離（collision induced dissociation; CID）が汎用されている。CID とは、運動エネルギーをもつイオンと、ヘリウムやアルゴンなどの不活性ガス分子が衝突することにより、衝突エネルギーの一部がイオンの内部エネルギーに変換され、励起状態になったイオンの解離が起こることをさす。de novo シーケンシング法では、プロダクトイオンスペクトルから連続した同系列のイオンの m/z 差を読み取ることでアミノ酸配列を決定する（表 3-1）。

表 3-1. de novo シーケンシングに用いる各アミノ酸の質量

Amino acid	Residue mass (monoisotopic)	Mass difference			
		a ion and d ion	w ion and y ion	v ion and y ion	
Gly	G	57.02146	—	—	—
Ala	A	71.03711	—	—	—
Ser	S	87.03203	15.9949	33.0215	32.0262
Pro	P	97.05276	—	—	—
Val	V	99.06841	14.0157	31.0422	44.0626
Thr	T	101.04768	14.0157, 15.9949	31.0422, 33.0215	46.0419
Cys	C	103.00919	—	—	—
Leu	L	113.08406	42.0470	59.0735	58.0783
Ile	I	113.08406	14.0157, 28.0313	31.0422, 45.0578	58.0783
Asn	N	114.04293	43.0058	60.0324	59.0371
Asp	D	115.02694	43.9898	61.0164	60.0211
Gln	Q	128.05858	57.0215	74.0480	73.0528
Lys	K	128.09496	57.0578	74.0844	73.0891
Glu	E	129.04259	58.0055	75.0320	74.0368
Met	M	131.04048	60.0034	77.0299	76.0347
His	H	137.05891	66.0218	—	82.0531
Phe	F	147.06841	76.0313	—	92.0626
Arg	R	156.10111	85.0640	102.0905	101.0953
Tyr	Y	163.06333	92.0262	—	108.0575
Trp	W	186.07931	115.0422	—	131.0735

3-4 で得られた断片ペプチドを LCMS-IT-TOF/TOF による分析 [分析条件 (3.1)] あるいは、MALDI-TOF/TOF による分析 [分析条件 (3.1)] に供し、観測されたマススペクトルを上記の要領で帰属することで、構造解析を行った。解析結果を順次以下に示す。

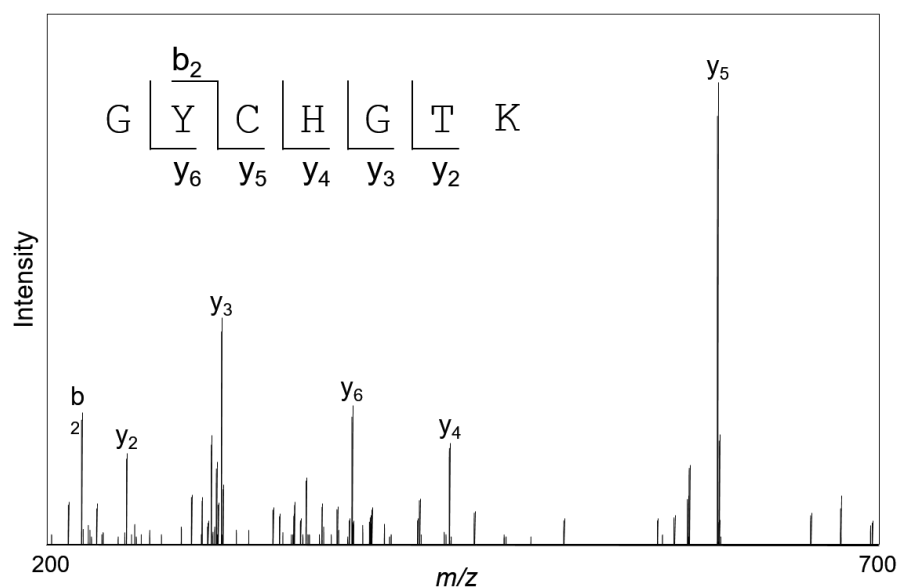


図 3-7. 断片ペプチド L1 の LCMS-IT-TOF/TOF スペクトル

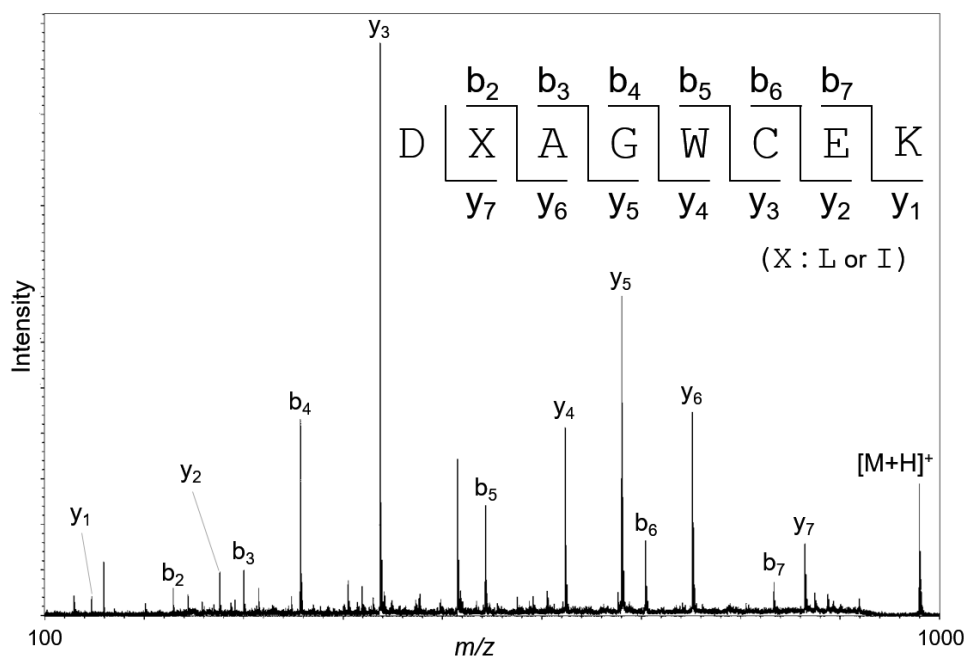


図 3-8. 断片ペプチド L2 の MALDI-TOF/TOF スペクトル

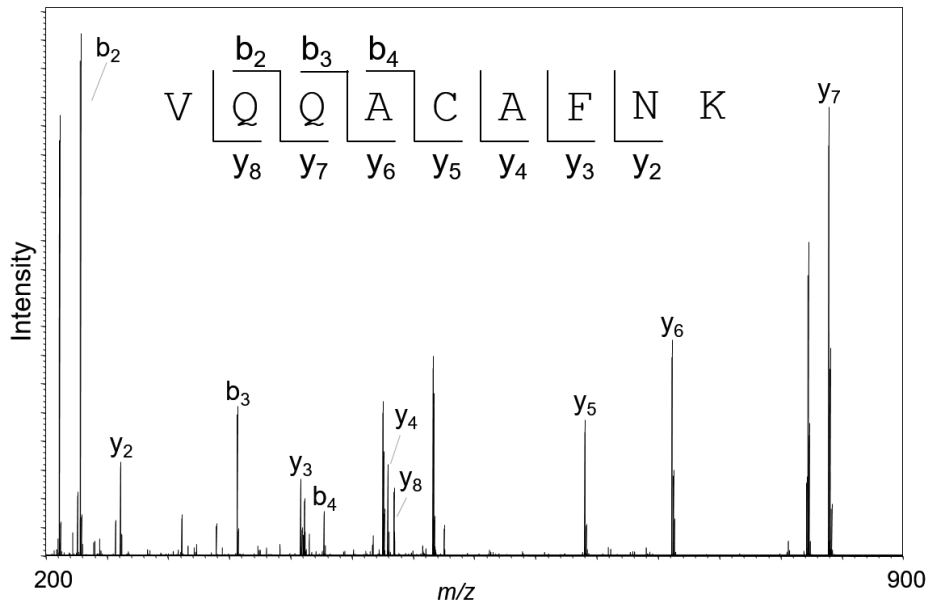


図 3-9. 断片ペプチド L3 の LCMS-IT-TOF/TOF スペクトル

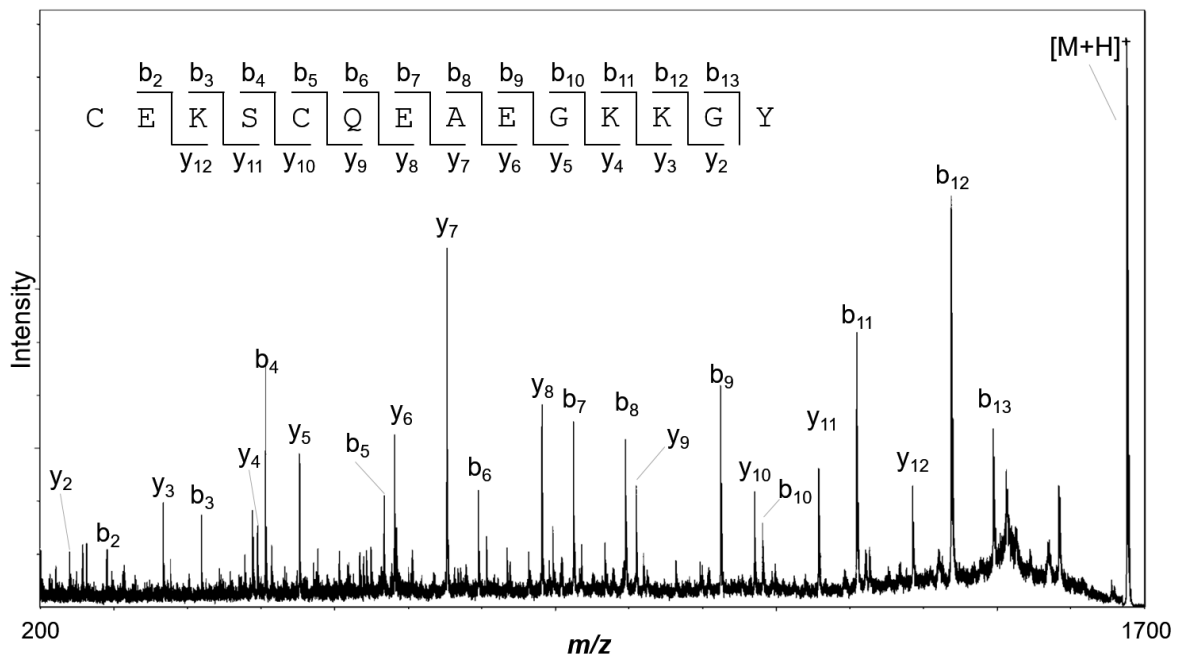


図 3-10. 断片ペプチド C1 の MALDI-TOF/TOF スペクトル

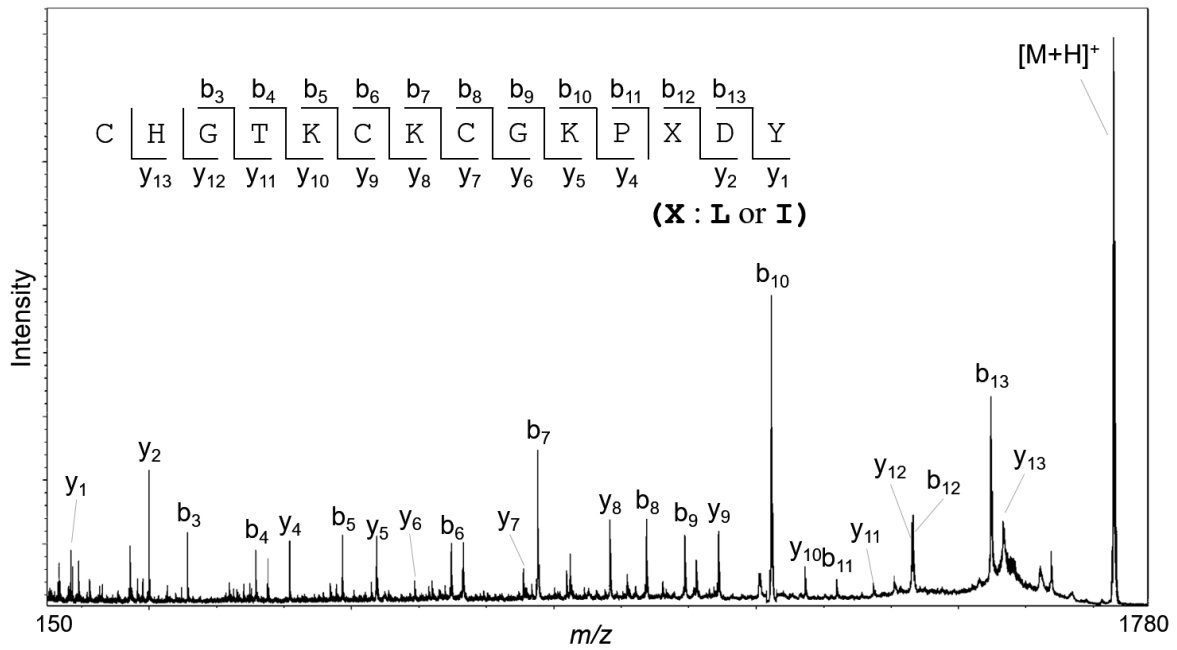


図 3-11. 断片ペプチド C2 の MALDI-TOF/TOF スペクトル

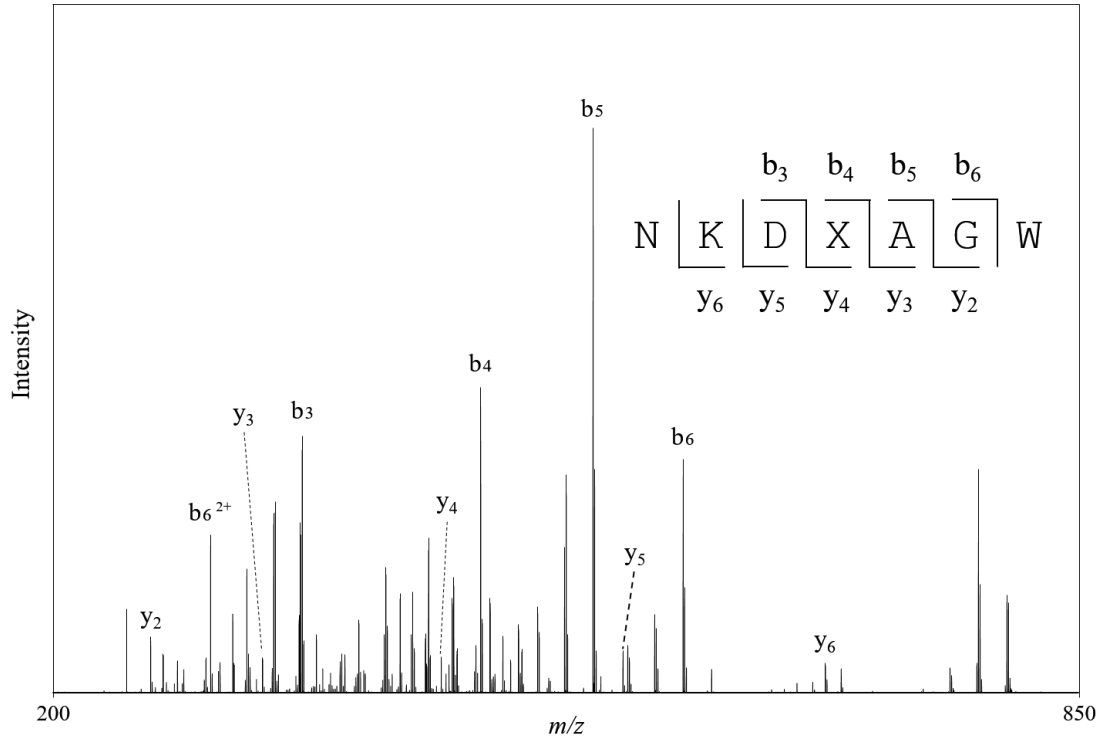


図 3-12. 断片ペプチド C3 の LCMS-IT-TOF/TOF スペクトル

de novo シーケンシングの結果を表 3-2 にまとめた。この段階では L2、C2、C3 に含まれる一残基について Leu か Ile の断定ができていない（配列中では X と表記）。得られたすべての配列情報から推定した全長配列を図 3-13 に示した。

表 3-2. 各断片ペプチドのアミノ酸配列

Fragment	Observed fragment ions
L1	G ⁺ Y ⁺ C ⁺ H ⁺ G ⁺ T ⁺ K ⁺
L2	D ⁺ X ⁺ A ⁺ G ⁺ W ⁺ C ⁺ E ⁺ K ⁺
L3	V ⁺ Q ⁺ Q ⁺ A ⁺ C ⁺ A ⁺ F ⁺ N ⁺ K ⁺
C1	C ⁺ E ⁺ K ⁺ S ⁺ C ⁺ Q ⁺ E ⁺ A ⁺ E ⁺ G ⁺ K ⁺ K ⁺ G ⁺ Y ⁺
C2	C ⁺ H ⁺ G ⁺ T ⁺ K ⁺ C ⁺ K ⁺ C ⁺ G ⁺ K ⁺ P ⁺ X ⁺ D ⁺ Y ⁺
C3	N ⁺ K ⁺ D ⁺ X ⁺ A ⁺ G ⁺ W ⁺

(X : L or I)

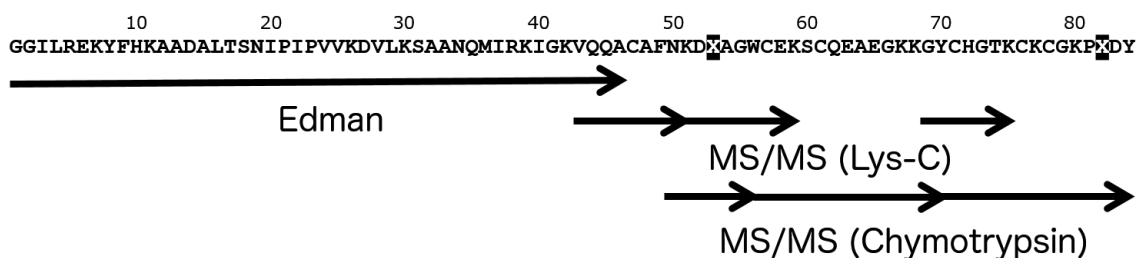


図 3-13. エドマン分解法および *de novo* シーケンシング法によって明らかにした LaIT3 のアミノ酸配列 (X: L or I)

得られた配列から計算されるモノアイソトピック質量の理論値は 9189.7 であり、実測値 (9189.6) と良く一致した。このことから、53 残基目と 82 残基目のアミノ酸の Leu/Ile の区別を除き、決定した LaIT3 の一次構造は正しいと考えられた。

質量分析計を用いた *de novo* シーケンシングにおける Leu/Ile の判別には、高エネルギーCID (不活性ガスとの衝突時の運動エネルギーが 1 keV 以上) による側鎖のフラグメンテーション様式の違いを利用することで可能である。具体的には、N 末端フラグメントイオン系列に注目すると、Leu の場合では a イオンより 42 Da 小さい d イオンが生成するのに対し、Ile の場合では a イオンから 28 Da 小さい d_a イオン、14 Da 小さい d_b イオンが生成する (図 3-14)。同様に C 末端フラグメントイオン系列に注目すると、Leu の場合では y イオンより 59 Da 小さい w イオンが生成し、Ile の場合では 45 Da 小さい w_a イオン、31 Da 小さい w_b イオンが生成する。これらのフラグメントをスペクトルから読み取ることで、Leu/Ile を判別することができる。ただし、このような側鎖のフラグメンテーションには N 末端近傍に塩基性の高い Arg が必要であることが知られている。断片ペプチド L2、C2、C3 において、上記の解析で高エネルギーCID を用いているにもかかわらず Leu/Ile の判別が困難であったことはこのことが原因である。

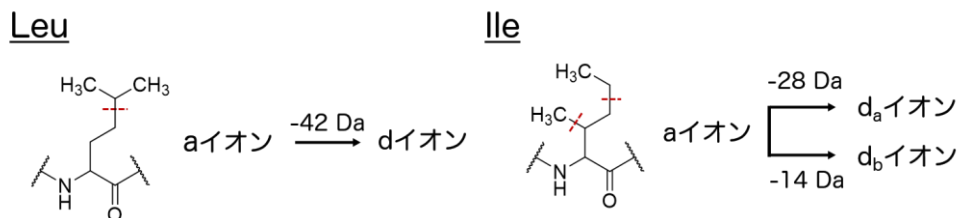


図 3-14. Leu と Ile における側鎖のフラグメンテーションの違い

3-6 断片ペプチドの N 末端修飾による Leu/Ile の判別

上述のような Leu/Ile の判別におけるアミノ酸配列に起因する問題を解決し、解釈しやすいスペクトルを得るための方法として、ペプチドを化学修飾する誘導体化法がある²⁹⁾。例えば、当研究室で見出された 4-(guanidinomethyl)benzoic acid (Gmb) をペプチドの N 末端に導入することで、HE-CID 条件下での d イオンの生成が強められ、Leu/Ile の判別に有効であることが分かっている³⁰⁾。そこで、断片ペプチド C2 および C3 について、その N 末端を Gmb で修飾し、Leu/Ile の判別を行うことにした。

ペプチドの N 末端を修飾する際に問題となるのが、副反応として Lys への修飾がある。この問題を回避するため、縮合剤に DMT-MM を用いた Gmb の N 末端特異的な導入方法が当研究室で確立されている³¹⁾。この方法では、反応を 2 段階に分けることにより、N 末端特異的な Gmb の導入を簡便に行うことができる。具体的には、まず Gmb と DMT-MM を反応させて活性エステル体を生成させ、続いてペプチドと縮合させるものである。本研究では上記方法を用いて断片ペプチド C2 および C3 の N 末端を化学修飾し、それらを HPLC 条件 (3.2) により分取精製して MALDI-TOF/TOF に供した [MALDI-TOF/(TOF)分析条件 (3.2)]。得られた結果を順次、以下に示す。

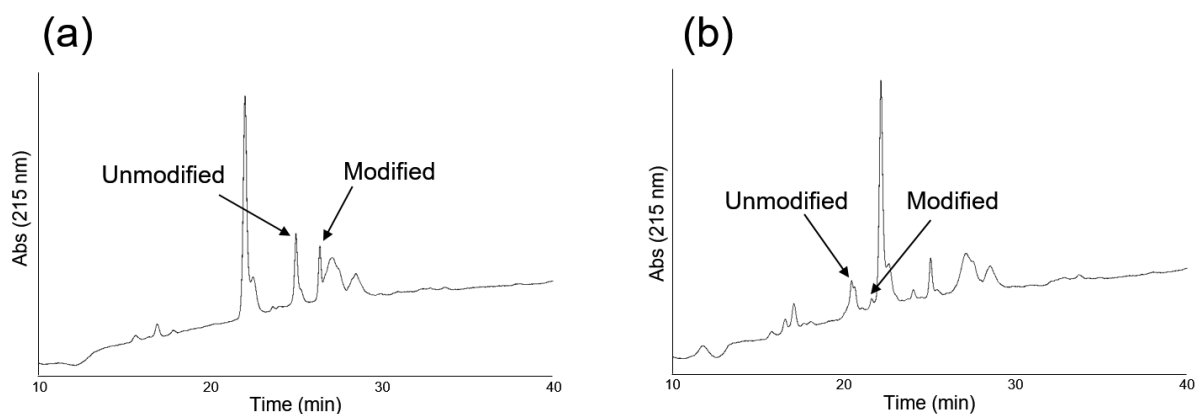


図 3-15. 誘導体化反応液の HPLC クロマトグラム
(a) 断片ペプチド C3 (b) 断片ペプチド C2

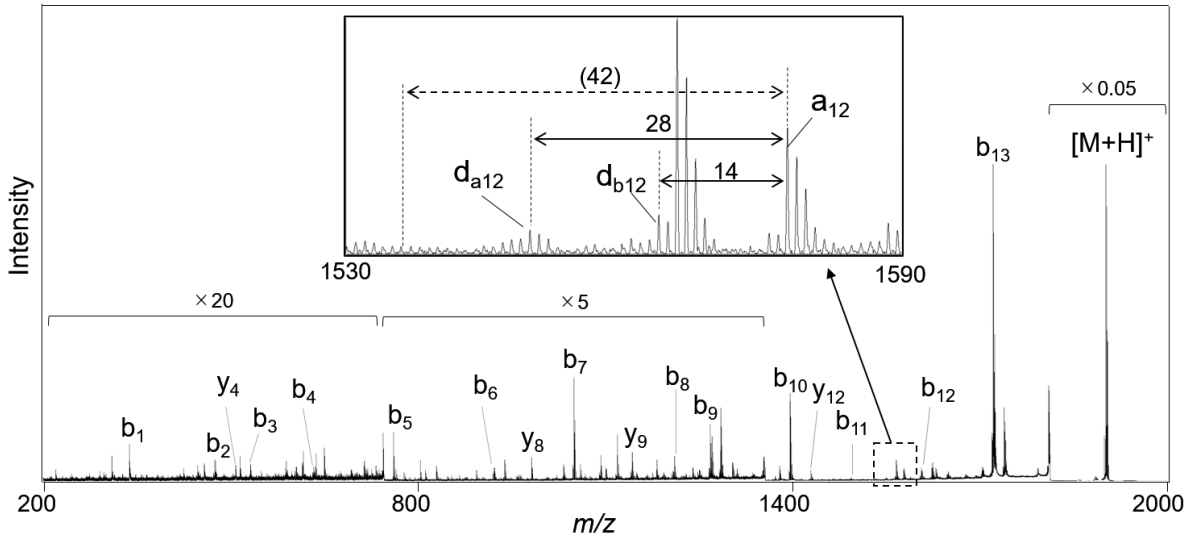
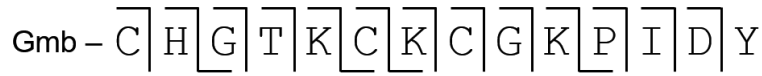


図 3-16. 断片ペプチド C2 の MALDI-TOF/TOF スペクトル

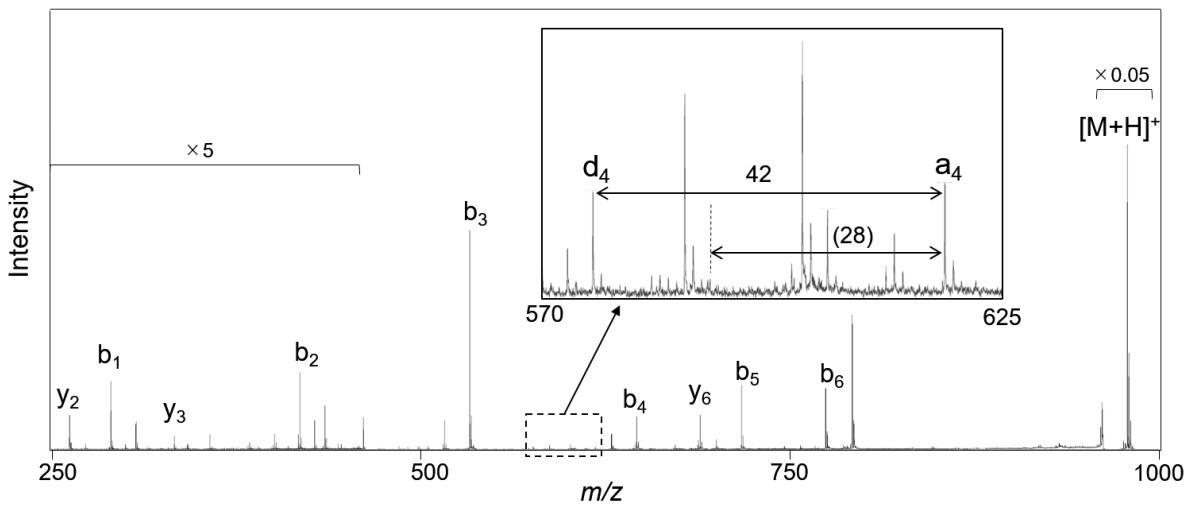
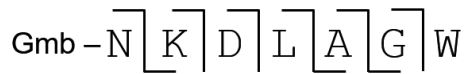


図 3-17. 断片ペプチド C3 の MALDI-TOF/TOF スペクトル

Gmb 修飾した C2 の MALDI-TOF/TOF によるスペクトルを図 3-16 に示した。82 残基目のアミノ酸 (C2 中では 12 残基目) について解析したところ、 a_4 イオンから 14 Da 小さい位置に d_{a12} イオン、28 Da 小さい位置に d_{b12} イオンと考えられるピークがそれぞれ観測され、42 Da 小さい位置にはピークが見られなかったことから、このアミノ酸が Ile であると判断した。

同様に 53 残基目の Leu/Ile (C3 中では 4 残基目) を判別するため、Gmb 修飾した C3 の MALDI-TOF/TOF によるスペクトル (図 3-17) を解析したところ。 a_4 イオンより 42 Da 小さい位置に d_4 イオンと考えられるピークが観測されたのに対し、28 Da 小さい位置には有意な大きさのピークが見られなかったことから、このアミノ酸が Leu であると判断した

以上のことから、LaIT3 の一次構造は図 3-18 の通りであると決定した。

10 20 30 40 50 60 70 80
GGILREKYFHKAADALTSNIPIPVVKDVLKSAANQMIRKIGKVQQACAFNKDLAGWCEKSCQEAEKKGKGYCHGKCKCGKPIDY

図 3-18. LaIT3 の一次構造

3-7 考察

LaIT3 の一次構造解析の結果、この殺虫性ペプチドは 84 アミノ酸残基で構成され、C 末端領域に 3 組のジスルフィド結合を有することが明らかになった。LaIT3 の全長配列の情報をもとにして、類似性の高いサソリ毒素を BLAST によって検索した結果、*Hadrurus gertschi* 由来の Hg-scorpine-like 2 (Hgsclp2) および、上述の SC12 と類似することが分かった (図 3-19)。

```

LaIT3      GGILREKYFHKAAADALTSNIPVVKDVLKSAANOMIRKIGKVOQAQAFNKDLAGWCEKSCQEAEGKKGYCHGKTKCKGKPIDY-
HgeScplp2 -GILREKYAHRVIDVLTPTMIGVVPVSKIVNNAAKQLVHKIAKNQQLCMFNKDVAGWCEKSCQQAHAHQKGYCHGKTKCKGKPIPLNYK
SC12      GGILKEKYFOKGVDTLTSNIPVVKDVKSAAKQLVHKISKNOQLCLI-VDTVQWCKNKSCLAAENKEGYCHGKTKCKGKIKVSY-
Sec. Structure cccchhhhhhhhhhhhhcccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcc
  
```

図 3-19. LaIT3 と類似するペプチドの配列および N 末端領域の二次構造予測
c : コイル構造、h : ヘリックス構造

これらはいずれも K⁺チャネルの阻害および抗菌活性を併せもった β-KTx (Scorpine-like peptide と呼ばれる) であったことから^{32,33)}、LaIT3 の抗菌活性について確認することにした。抗菌活性の評価にあたっては、試験に供することができる量が限られていること、また α-ヘリックス構造の抗菌性ペプチドは構造に占める Lys 残基の割合が高くなるとグラム陽性菌に対する活性が低下すると報告されていることから³⁴⁾、本抗菌試験にはグラム陰性菌の大腸菌のみを用いた。大腸菌を LB 寒天培地に添加して平板培地を調製し、培地上に試料を直接載せてから培養を行い、大腸菌の生育を観察したところ、LaIT3 は図 3-20 に示す通りに大腸菌の生育を阻害した。このことにより、LaIT3 は LaIT2 と同様に殺虫性だけでなく抗菌性を併せもつことが分かった。このような殺虫活性と抗菌活性をもつ毒素ペプチドは、クモ毒からも見つかっている³⁵⁾。これらに共通するのは、両親媒性の α-ヘリックス構造により活性が発現することである。そこで、LaIT3 の N 末端領域の二次構造を計算によって予測したところ、ヘリックス構造を形成していると考えられ、LaIT2 と同様に N 末端領域が活性に重要な役割を果たしていることが推察された。

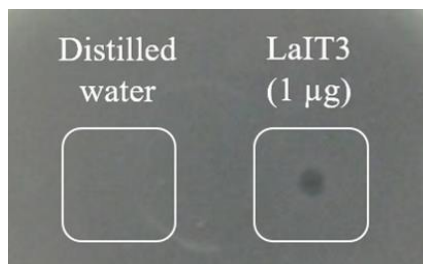


図 3-20. LaIT3 の大腸菌に対する抗菌試験の結果

2つのドメインからなる構造をもつ β -KTx ペプチドは3種類に分類され³⁶⁾、LaIT3 は、HgeScplp2 および SCI2 と同じサブファミリーに属する。N 末端領域の配列について、LaIT3 の属するグループのペプチドと、他のサブファミリーに属するペプチド (Scorpine、Opiscorpine2、HS-1) とを比較してみたところ、LaIT3 を含むグループのペプチドはいずれも長い N 末端ドメインをもち、さらにその中央部には複数の Pro が存在するのに対し、もう一方のグループは中央部に Gly が多く存在することが分かった (図 3-21)。

```

LaIT3      GGILREKYFHKAADALTSNIPIPVVKDVLKSAANQMIRKIGKVQOACAFNKDLAGWCEKSCQEAEGKKGYCHGTRCKCGKPIDY-
HgeScplp2 -GILREKYAHKAIDVLTPIGVPVSKIVNNAAKQLVHKIAKNOQLCMFNKDVAGWCEKSCQSAHQKGYCHGTRCKCGIPLNYK-
SCI2      GGILKEKYFOKGVLDYLTSHIPIPVVKDVVKSAAKQLVHKISKNOQLCLI-VDTVQWCNKSCLAENKEGYCHGTRCKCGIKVSY-

Scorpine  -GWINEEKIQKKIDERMG-----NTVLGGMAKALVHKMAKNEFCMANMDMLGNCEKHCO-TSGEKGYCHGTRCKCGTPLSY-
Opiscorpine2 -KWLNEKSIQNKIDEKIG-----KNFLGGMAKAVVHKLAKNEFCMANMDPTGSCETHCQKASGEKGYCHGTRCKCGVPLSY-
HS-1      -GWINEEKIQKKIDEKIG-----NNILGGMAKAVVHKLAKGEFCVANIDTMGNCETHCQKRTSGEKGFCHGTRCKCGKPLSY-

```

図 3-21. β -KTx のサブファミリー同士の配列比較

Pro 残基はヘリックス構造を歪める性質をもつことが知られており、LaIT3 の N 末端領域の α -ヘリックス構造は Pro 残基付近でねじれた構造となっている可能性がある³⁷⁾。実際に、両親媒性の抗菌ペプチドにおいて、この「ねじれ」が活性に重要な役割を果たすことが報告されている。例えば、カエルの皮膚から単離された抗菌性ペプチドである gaegurin の Pro 残基を Ala で置換すると抗菌活性が低下する³⁸⁾。また、人工的に設計された抗菌ペプチドである P5 では、Pro 残基を除去すると溶血活性が上昇することが報告されている³⁹⁾。これらの結果は、Pro 残基がもたらすヘリックス構造のねじれが、細胞膜への親和性を調節する役割をもつことを示唆している。一方、両親媒性の α -ヘリックス構造をもつ抗菌ペプチドの中央部には、しばしば Gly 残基が見られ⁴⁹⁾、その存在はペプチドの柔軟性を向上させることで、特に細菌に対する活性を高めることが報告されている⁴¹⁾。以上のことから、LaIT3 の N 末端領域の α -ヘリックス構造は Pro 残基でねじれさせることで、殺虫および抗菌の両活性の発現を調節しているものと考えられる。このような LaIT3 の構造と活性の関係を明らかにすることは、 β -KTx ペプチドのもつ特異な 2 ドメイン構造の必要性を解明する手がかりとなるものと考えられる。

3-8 実験の部

試薬

質量分析に用いた試薬および抗菌試験に用いた大腸菌 (NBRC 3972) は、第 2 章で述べたものを使用した。4-Guanidinomethylbenzoic acid (Gmb) は過去に研究室で合成されたものを用いた。4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM)、dithiothreitol (DTT)、ヨード酢酸、 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) は和光純薬工業から、2,3-Dihydroxybenzoic acid (DHB) は関東化学から購入したものを用いた。

毒液の採取

サソリの尾節付近を手で掴み、マイクロチューブの口に貼り付けたパラフィルムに毒針を突き刺すことで、パラフィルム上に毒液を分泌させた。パラフィルムは 2% 酢酸水溶液で洗浄し乾燥させたものを用いた。毒液の付着したパラフィルムは -80°C で保存した。このパラフィルムを約 50 枚集め、2% 酢酸水溶液で毒液を抽出し、フィルターろ過 (DISMIC-13 CP Cellulose Acetate 0.45 μm , Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) を行った後、凍結乾燥を経て粗毒液を得た。

殺虫活性試験

第 2 章の殺虫活性と同様に行った。

HPLC 条件 (3.1)

カラム : Vydac C18, 250 x 1.0 mm (Grace Vydac)

カラム温度 : 40°C

溶離液 : (A) 0.1% HFBA/ H_2O , (B) 0.1% HFBA/ CH_3CN

流速 : 0.05 mL/min

UV 検出 : 215 nm

グラジエント : 10-60%, 5-55 min

HPLC 条件 (3.2)

カラム : Vydac C18, 250 x 1.0 mm (Grace Vydac)
カラム温度 : 40°C
溶離液 : (A) 0.1% TFA/H₂O, (B) 0.1% TFA/CH₃CN
流速 : 0.05 mL/min
UV 検出 : 215 nm
グラジエント : 5-40%, 5-40 min

LCMS 分析条件 (3.1)

質量分析装置 : 島津製作所製 LCMS-IT-TOF
カラム : Vydac C18, 250 x 1.0 mm (Grace Vydac)
カラム温度 : 40°C
溶離液 : (A) 0.1% HCOOH/H₂O, (B) 0.1% HCOOH /CH₃CN
流速 : 0.05 mL/min
グラジエント : 5-65%, 5-25 min
イオン化法 : ESI
モード : Positive

LC-MS/MSⁿ 分析条件 (3.1)

質量分析装置 : 島津製作所製 LCMS-IT-TOF
カラム : TSKgel ODS-100V, 150 × 1.0 mm (TOSOH)
カラム温度 : 40°C
溶離液 : (A) 0.1% HCOOH/H₂O, (B) 0.1% HCOOH /CH₃CN
流速 : 0.05 mL/min
グラジエント : 5-70%, 5-70 min
イオン化法 : ESI
モード : Positive
測定範囲 : MS : 500-2000 (*m/z*), MS² : 100-2000 (*m/z*), MS³ : 50-2000 (*m/z*)

MALDI-TOF/(TOF)分析条件 (3.1)

質量分析装置 : Bruker Daltonics 製 Autoflex III smartbeam
DHB (10 mg/mL in acetone) 1 μL をプレートに滴下して乾燥させた後、その上にサンプルと DHB (10 mg/mL in 50% AcCN/0.1% TFA) を 1 : 1 で混合したものを 1 μL 滴下した。

MALDI-TOF/(TOF)分析条件 (3.2)

質量分析装置：島津製作所製 MALDI-7090

CHCA (10 mg/mL in acetone) 1 μ L をプレートに滴下して乾燥させた後、その上にサンプルと CHCA (10 mg/mL in 50% AcCN/0.1% TFA) を 1 : 1 で混合したものを 1 μ L 滴下した。

還元アルキル化反応

約 25 pmol/ μ L となるように純水で調製した LaIT3 溶液 2 μ L に 0.4 M リン酸バッファを 23 μ L、45 mM の DTT 水溶液を 5 μ L 加え、50°C で 30 分間インキュベートした。その後、バッファに溶かした 0.1 M のヨード酢酸を 5 μ L 加え、室温で 1 時間反応を行った。

Gmb の導入

10 mM の DMT-MM 水溶液 5 μ L と 1 mM の Gmb 水溶液 50 μ L を混合し、室温で 30 分間静置した後、凍結乾燥を行った。ここにリン酸バッファ (0.2 M、pH 7.0) 10 μ L および、蒸留水で 50 pmol/ μ L に調製した断片ペプチド溶液 2 μ L を加えて室温で 30 分間反応させた。

抗菌試験

LB 液体培地に大腸菌 (NBRC 3972) を植菌し、600 nm における吸光度が 0.7 程度になるまで振盪培養を行った。オートクレーブ滅菌後、50°C で保温しておいた 2% LB 寒天培地 6 mL に、大腸菌の培養液を 500 μ L 加え、直径 9 cm の滅菌シャーレに全量を流し込み、培地が固まるまで静置した。

次に LaIT3 溶液 (1 μ g/ μ L) を培地上に直接 1 μ L 載せ、溶液が完全に浸透した後 37°C で培養した。

第4章 毒液中に含まれる β -KTx 由来の断片ペプチドの探索

4-1 緒言

第2章では LaIT2 の活性発現における N 末端および C 末端領域の役割について、続いて第3章では新たに見いだした LaIT3 の一次構造解析について述べた。これらの研究から、 β -KTx ペプチドにおける N 末端領域構造の重要性が示された。興味深いことにサソリ毒液成分の中には、酵素による分解を受けて生成する断片ペプチドが存在していることが報告されている。例えば、*Hadrurus gertschi* 毒液から単離された HgeScplp1 は、毒液中に C 末端領域に相当する断片ペプチドが存在することが確認されているが、全長の場合は細胞毒性を示すのに対し、N 末端領域が除去された断片ペプチドでは新たに K^+ チャネル阻害活性を示すようになることが報告されている (図 4-1) ⁴²⁾。

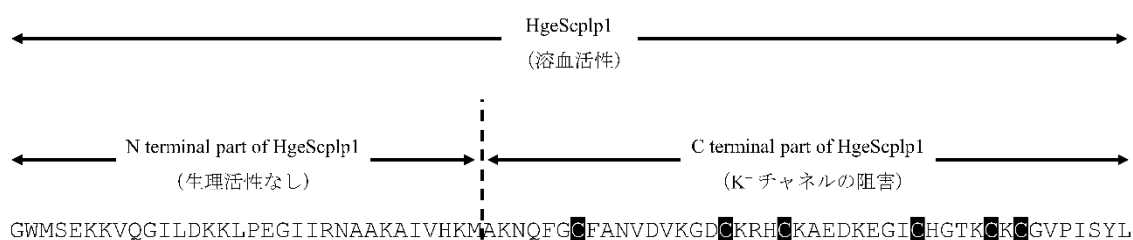


図 4-1. HgeScplp1 の一次構造と各フラグメントペプチドの活性

また、*Tityus serrulatus* 毒液由来の Ts19 も毒液中において酵素的に分解されることが報告されている。この場合は全長ペプチドに相当する Ts19 Frag-I から、N 末端領域からなる部分ペプチド Ts19 Frag-III と、主に C 末端領域の CS α β ドメイン構造を含む Ts19 Frag-II に分解することが示唆されている。Ts19 Frag-III の毒液中での存在は実験的に確認されていないが、Ts19 Frag-II は毒液中に存在し、 K^+ チャネル阻害活性を示す。興味深いことに、Ts19 Frag-III が合成され、その生理活性について調べられた結果、顕著な細胞毒性を示すことが明らかになっている (図 4-2) ²⁾。

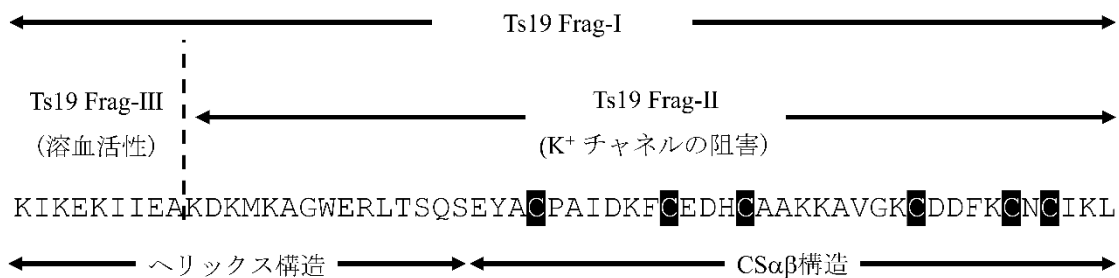


図 4-2. Ts19 の構造と各フラグメントペプチドの活性

同様の分解がヤエヤマサソリ毒液中でも起こっている可能性があり、LaIT2 および LaIT3 の部分ペプチドが毒液中に含まれていることが予想された。そこで、予想される部分ペプチドの分子質量と、毒液を LC/MS 分析して得られた全成分の質量情報を照合することにより、それぞれの部分ペプチドの探索を行うことにした。

4-2 結果

ヤエヤマサソリの粗毒液を LC/MSⁿ [分析条件 (4.1)] に供し、毒液成分の網羅的な質量情報を得た (図 4-2)。

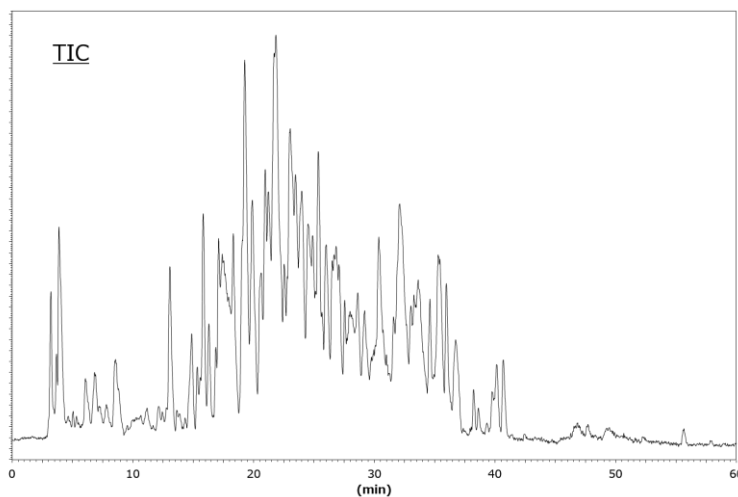


図 4-2. ヤエヤマサソリ粗毒液の LC/MS 分析結果

続いて、これらの情報の中から候補となる部分ペプチドに相当する成分を検索した。具体的には、Cys 残基を含まない N 末端領域について、C 末端側から 1 残基ずつ短縮した配列をもつペプチドの分子質量およびその多価プロトン付加分子の m/z 値をすべて計算し、それぞれの値を上記で得られた実測データから検索した。さらに、この N 末端領域を含む部分ペプチドが切断されて存在すると考えられる C 末端

領域ペプチドの分子質量およびその多価プロトン付加分子の m/z 値を計算し、同様に実測値から検索した。

まず LaIT2 の N 末端領域の部分ペプチドについて探索を行った (図 4-3)。その結果、AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKLG [LaIT2(1-21)] に該当する質量をもつ成分が保持時間 20 分付近に見出された (図 4-4)。

LaIT2

AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQSQYCPILSNMCEDEHRRKKMEGQCDDLDEVC

候補となる配列	質量	[M+4H] ⁴⁺	[M+5H] ⁵⁺	[M+6H] ⁶⁺
AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQSQYG	3323.84	831.96	665.77	554.98
AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQSQY	3266.81	817.71	654.37	545.48
AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQSQ	3103.75	776.94	621.76	518.30
AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQS	2975.69	744.93	596.14	496.95
AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQ	2888.66	723.17	578.74	482.45
AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAM	2760.60	691.16	553.13	461.11
AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLA	2629.56	658.40	526.92	439.27
AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGL	2558.52	640.64	512.71	427.43
AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKG	2445.44	612.37	490.09	408.58

図 4-3. 候補となる LaIT2 の N 末端領域配列とその質量

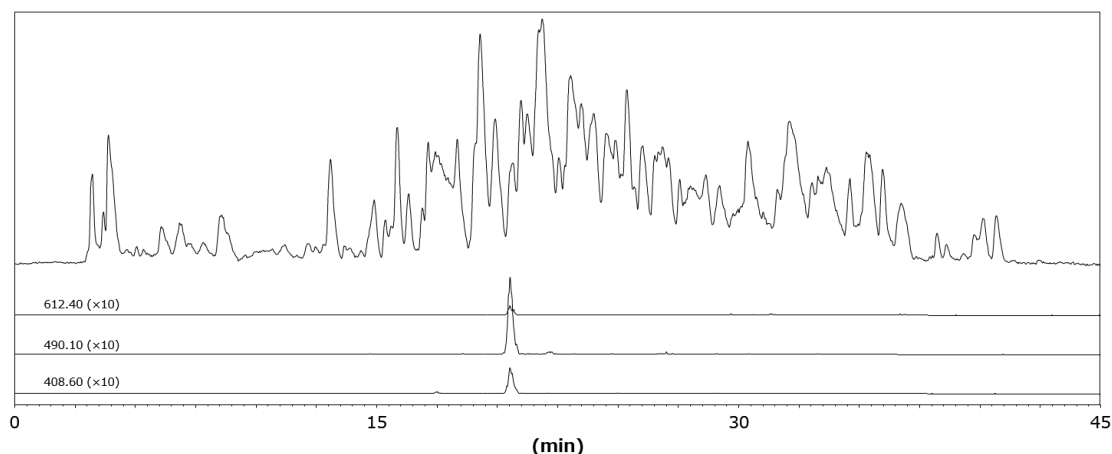


図 4-4. LaIT2(1-21)の質量と一致する LC/MS ピーク

次に、この成分について得られている MS/MS スペクトルを確認したところ、この成分が予想した配列を持つことを裏付ける複数のフラグメントイオンが観測されていることが分かった (図 4-5)。以上のことから、ヤエヤマサソリの毒液には LaIT2 の N 末端領域の部分ペプチドである LaIT2(1-21) が存在することが明らかになった。

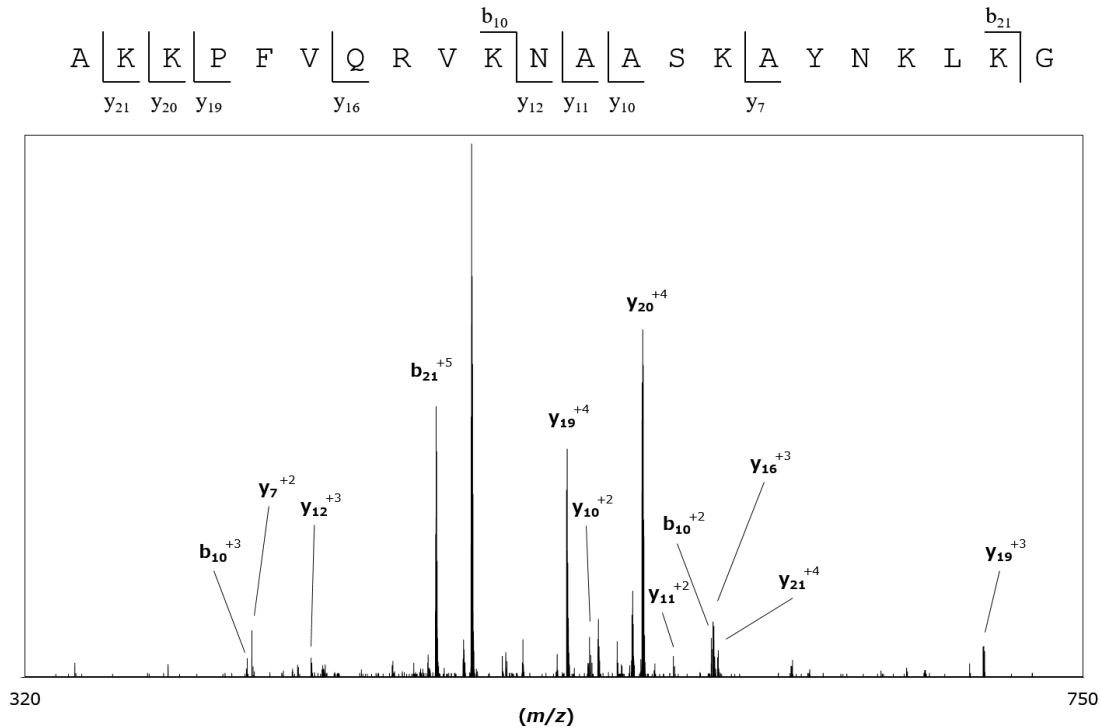


図 4-5. LaIT2(1-21) の MS/MS スペクトル

LaIT2(1-21) が毒液中に存在したことから、引き続き C 末端領域を含む LaIT2(22-59) の探索をおこなった。LaIT2(22-59) の分子質量を計算し、実測データから検索したところ、保持時間 23 分および 36 分付近に一致する成分が見出された (図 4-6)。前者はほぼ同じ質量を持つ LaIT1 に由来するピークであり、後者が LaIT2(22-59) であると考えられた。この成分について、LaIT2(1-21) と同様にして MS/MS スペクトルの解析をおこなった。LaIT2(22-59) は 3 組のジスルフィド結合を含んでいるため、この領域はフラグメントイオンが生じないが、N 末端領域で開裂して生じたフラグメントイオンが多数確認された。これらのことから、この成分が C 末端領域の部分ペプチド LaIT2(22-59) であると判断した。

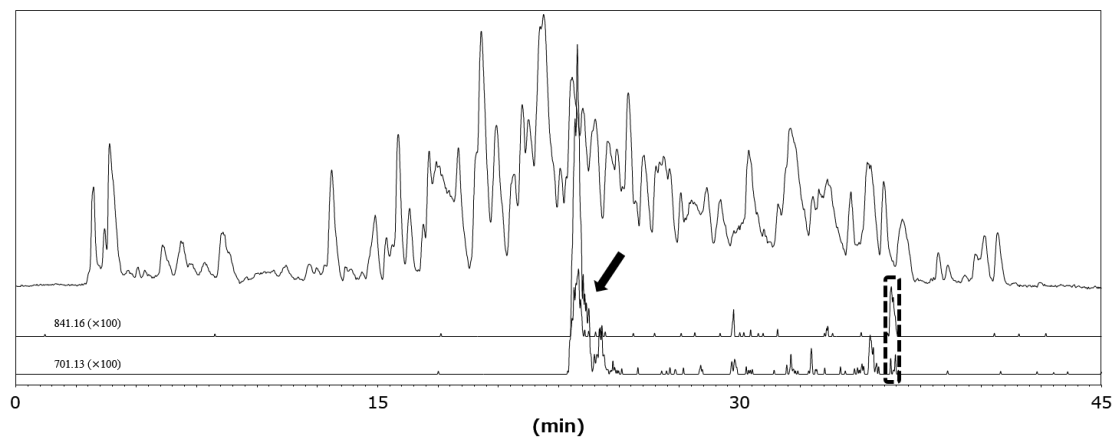


図 4-6. LaIT2(22-59)の質量に該当するピーク (矢印は LaIT1)

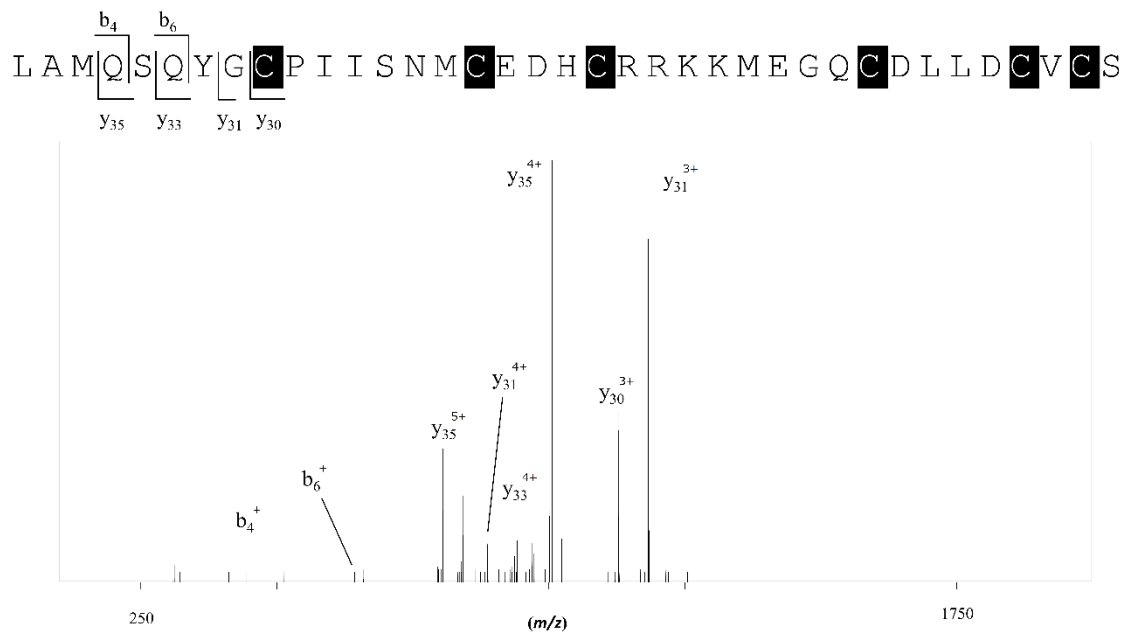


図 4-7. LaIT2(22-59)の MS/MS スペクトル

次に LaIT3 の N 末端領域の部分ペプチドについて探索を行った (図 4-8)。その結果、GGILREKYFHKAADALTSNIPIPVVKDVLKSAANQMIRKIG [LaIT3(1-41)] に該当する質量をもつ成分が保持時間 37 分付近に見出された (図 4-9)。

LaIT3

GGILREKYFHKAADALTSNIPVVKDVLKSAANQMIRKIGKVQQA~~AFNKDLAGW~~~~EKS~~~~QEAEGKKG~~~~Y~~~~HG~~~~T~~~~K~~~~C~~~~K~~~~G~~~~K~~~~P~~~~I~~~~D~~~~Y~~

候補となる配列	質量	[M-6H] ⁶⁻	[M+7H] ⁷⁺	[M+8H] ⁸⁺
GGILREKYFHKAADALTSNIPVVKDVLKSAANQMIRKIGKVQQA	5015.83	836.98	717.55	627.99
GGILREKYFHKAADALTSNIPVVKDVLKSAANQMIRKIGKVQQ	4944.79	825.14	707.41	619.11
GGILREKYFHKAADALTSNIPVVKDVLKSAANQMIRKIGKVQ	4816.73	803.80	689.11	603.10
GGILREKYFHKAADALTSNIPVVKDVLKSAANQMIRKIGKV	4688.68	782.45	670.82	587.09
GGILREKYFHKAADALTSNIPVVKDVLKSAANQMIRKIGK	4589.61	765.94	656.66	574.71
GGILREKYFHKAADALTSNIPVVKDVLKSAANQMIRKIG	4461.51	744.59	638.37	558.70

図 4-8. 候補となる LaIT3 の N 末端領域配列とその質量

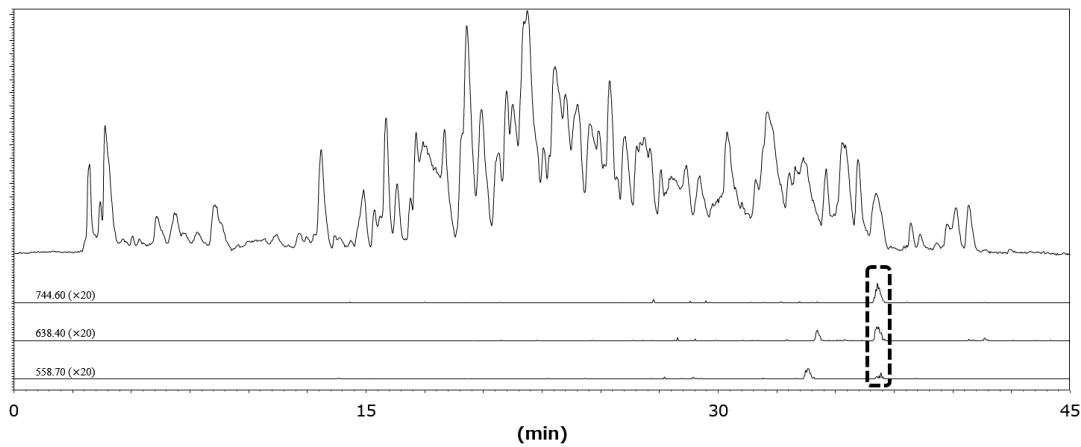


図 4-9. LaIT3(1-41)の質量に該当するピーク

次に、この成分について得られている MS/MS スペクトルを確認したところ、この成分が予想した配列を持つことを裏付ける複数のフラグメントイオンが観測されていることが分かった (図 4-10)。以上のことから、ヤエヤマサソリの毒液には LaIT3 の N 末端領域の部分ペプチドである LaIT3(1-41)が存在することが明らかになった。

LaIT3(1-41) が毒液中に存在したことから、C 末端領域を含む LaIT3(42-84) の分子質量を計算し、実測データから検索したところ、保持時間 21 分付近に一致する成分が見出された (図 4-11)。

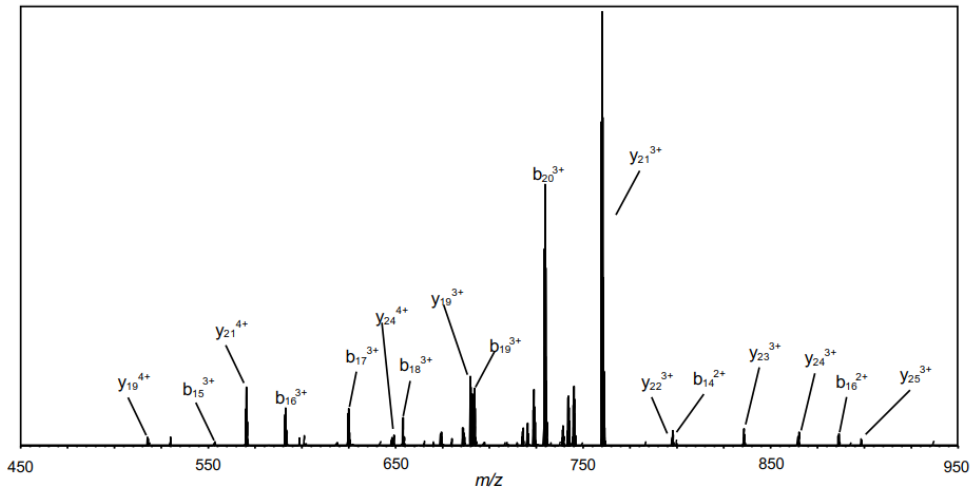
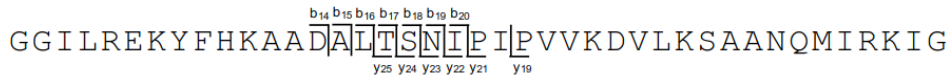


図 4-10. LaIT3(1-41)のフラグメントイオンスペクトル

この成分について、LaIT3(1-41)と同様にして MS/MS スペクトルの解析をおこなったが、フラグメントイオンは観測されなかった。そこで、これを単離しエドマン分析法による構造解析を行ったところ、29 残基目までの配列が一致した。このことから、この成分が C 末端領域の部分ペプチド LaIT3(42-84) であると判断した。

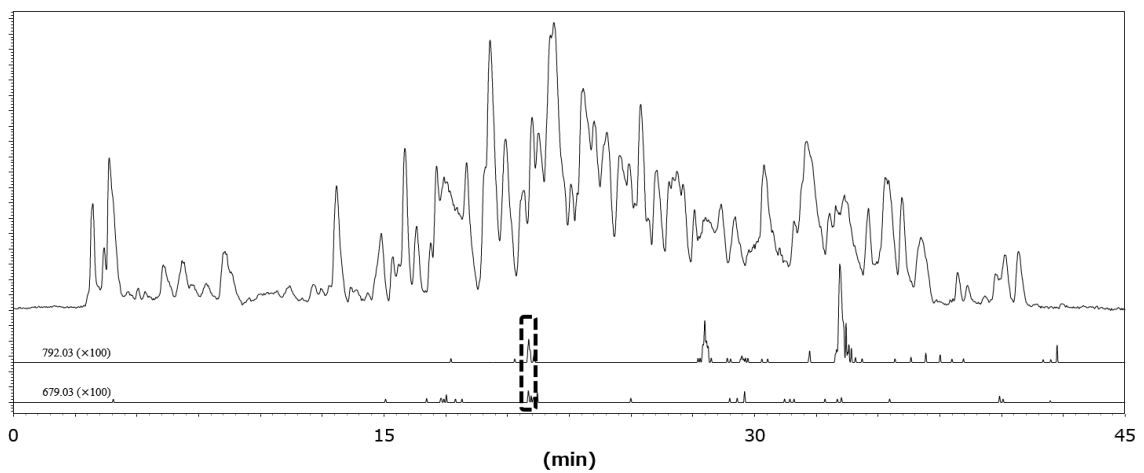


図 4-11. LaIT3(42-84) の質量に該当するピーク

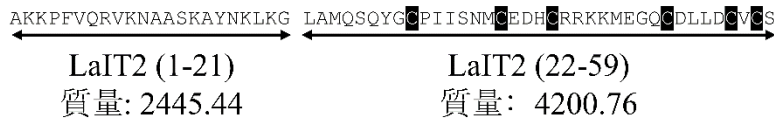
10 20
 KVQQACAFNKDLAGWCEKSCQEAEKGKGY

図 4-12. エドマン分解法による N 末端配列の解析結果

4-3 考察

LaIT2 および LaIT3 の部分ペプチドを探索した結果、予想された通りそれぞれの部分ペプチドが毒液中に存在していることが判明した (図 4-13)。また、これらは LaIT2 あるいは LaIT3 が酵素的な分解を受けて生成しているものと考えられた。

LaIT2



LaIT3

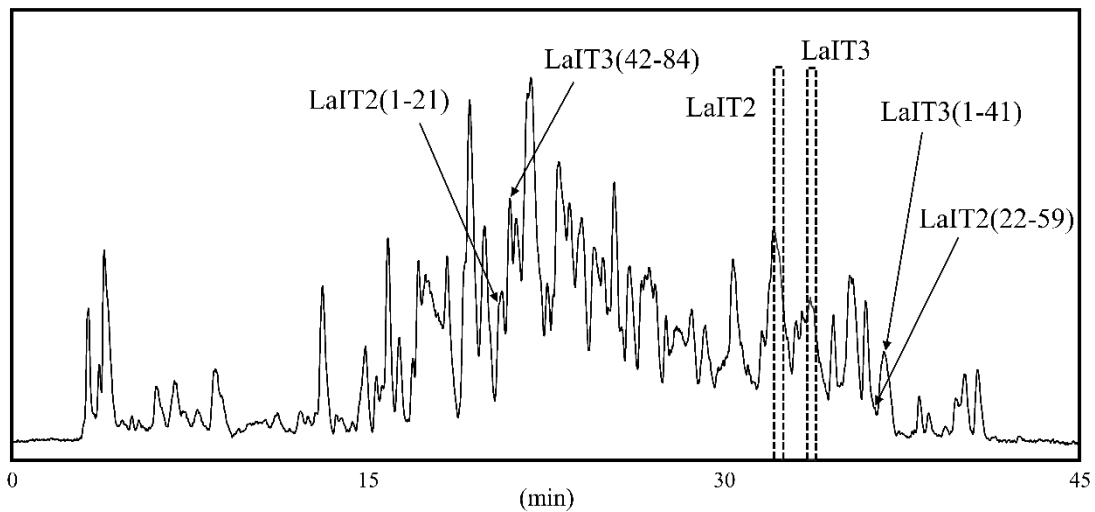
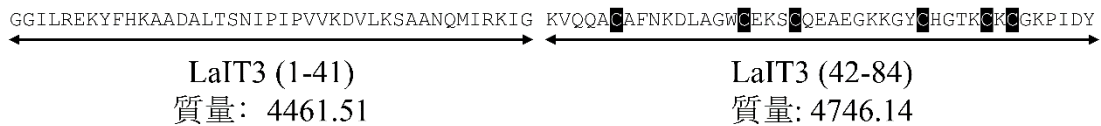


図 4-13. 毒液中に存在する部分ペプチド

第2章において述べたように、LaIT2のN末端領域は細胞膜への作用に必須であり、この領域だけで構成されるペプチドは殺虫・抗菌活性を示すことが分かっている。またLaIT3のN末端領域も同様の作用を持つことが推測されている。このことから、今回毒液中から見いだされたN末端領域の部分ペプチドであるLaIT2(1-21)およびLaIT3(1-41)も細胞膜への作用を示す可能性が高いと考えられ、殺虫あるいは抗菌活性を示すものと予想される。一方、LaIT2(22-59)およびLaIT3(42-84)は3組のジスルフィド結合によってCS α β モチーフを形成していると考えられる。CS α β モチーフは無脊椎動物由来の抗菌性ペプチドであるdefensinに共通して見られる構造である。サソリ毒においてはK⁺チャネル阻害活性をもつペプチドがCS α β モチーフを持つことが多い。第2章においてLaIT2(25-59)は殺虫および抗菌活性を示さなかったことから、LaIT2(22-59)はHgeScpl1の場合と同様にほ乳類由来K⁺チャネルの阻害活性や、全く別の生理活性を示す可能性がある。一方、LaIT3(42-84)については、現段階では殺虫・抗菌活性あるいはK⁺チャネル阻害活性を示すかどうかを判断することはできない。これらの部分ペプチドを化学合成して種々の生理活性を評価することで、サソリ毒ペプチドの毒液中での分解の生物学的意義が解明できるものと考えられる。

サソリは、毒成分の構造を多様化させることにより、様々な生物種に対する毒性を発揮できるようになったと考えられる。これによって、どのような環境においても餌となる生物を捕獲することが可能となった結果、太古より絶滅することなく繁栄してきたと言える。このようなサソリ毒における構造多様性は、遺伝子レベルで獲得しているだけでなく、本章で確認されたように翻訳後の酵素的分解によるものもある程度寄与していると考えられる。ペプチド毒素においては、多くの場合Cysの位置、つまりジスルフィド結合様式は保存されており、Cys以外の配列が変化することで多様性が生み出されていると考えられている⁴⁴⁾。一方で、Cysの存在によって取り得る構造が制限されてしまう可能性があり、多様性の獲得には限界がある。しかしながら、 β -KTxのような2ドメイン構造は、この制限を超えて多様性を生み出すことが可能であり、この2ドメイン構造の一部を分解によって除去することで、さらに新たな構造や活性をもつ毒素を作り出しているのかもしれない。

このように、本研究で明らかとなった β -KTxおよびその部分ペプチドの構造と活性に関する知見は、サソリ毒液成分の構造と生理活性の多様化を理解する上で貴重な情報を与えるものと考えられる。

4-4 実験の部

LC-MSⁿ分析条件 (4.1)

質量分析装置：島津製作所製 LCMS-IT-TOF

カラム：TSKgel ODS-100V, 150 × 1.0 mm (TOSOH)

カラム温度：40°C

溶離液：(A) 0.1% HCOOH/H₂O, (B) 0.1% HCOOH /CH₃CN

流速：0.05 mL/min

グラジエント：5-60%, 5-60 min

イオン化法：ESI

モード：Positive

第5章 まとめ

1. ヤエヤマサソリ毒液由来の殺虫性ペプチドである LaIT2 を、フラグメント縮合法の一つである NCL 法を用いて化学合成した。β-KTx ペプチドの化学合成は今回が初めての例である。また、NCL 法で用いる N 末端および C 末端フラグメントから、部分ペプチドを合成した。
2. 合成した LaIT2 について、ジスルフィド結合を残したまま化学的あるいは酵素的に切断し、生じた断片ペプチドを LC-MS/MS 分析に供することでジスルフィド結合の架橋様式を決定した (図 5-1)。



図 5-1. LaIT2 のジスルフィド結合架橋様式

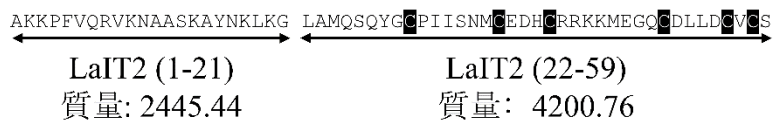
3. 全長型 LaIT2 とその部分ペプチドの殺虫および抗菌試験の結果、全長型だけでなく N 末端部分ペプチドも両方の活性を示すことが分かった。このことから、LaIT2 の N 末端領域が両活性の発現に重要であることが明らかとなった。さらに、殺虫活性においては全長型が N 末端部分ペプチドよりも高い活性を示したことから、C 末端領域も何らかの補助的役割を果たしていると考えられた。
4. ヤエヤマサソリ毒液から新規殺虫性ペプチドとして LaIT3 を単離した。その一次構造をエドマン分解法ならびに質量分析計を用いた *de novo* シーケンシング法を用いて決定したところ、LaIT3 が 84 残基からなる β-KTx ペプチドであることを明らかにした (図 5-2)。LaIT3 は主に抗菌活性を示すサソリ毒ペプチドと類似した構造をもっており、LaIT3 も同様に大腸菌に対する抗菌性を示すことが分かった。



図 5-2. LaIT3 の一次構造

5. LaIT2 および LaIT3 について、毒液中に存在することが予想された部分ペプチドを、LC-MS/MS 分析によって得られた質量ならびに配列情報を利用して探索した。その結果、それぞれのペプチドの N 末端あるいは C 末端領域部分ペプチドを毒液中より見出した (図 5-3)。これらの部分ペプチドは酵素的分解により生成されたと考えられ、毒液成分の多様化に寄与していることが示唆された。

LaIT2



LaIT3

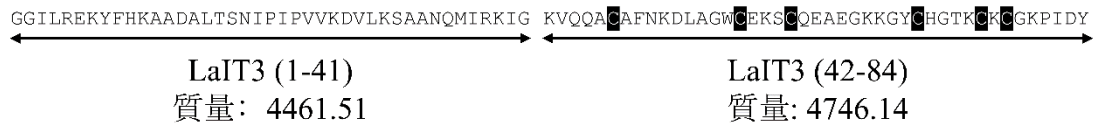


図 5-2. LaIT2 および LaIT3 の部分ペプチドの構造

本研究に関する関係論文

第2章より

Juichi, Hironori, et al. "Chemical synthesis of a two-domain scorpion toxin LaIT2 and its single-domain analogs to elucidate structural factors important for insecticidal and antimicrobial activities." *Journal of Peptide Science* 24.12 (2018): e3133.

第3章および第4章より

Juichi, Hironori, et al. "Isolation and characterization of a two-domain toxin LaIT3 that shows insecticidal and antimicrobial activities from the *Liocheles australasiae* scorpion venom."
In preparation.

引用文献

- 1) Waddington, Janet, David M. Rudkin, and Jason A. Dunlop. "A new mid-Silurian aquatic scorpion—one step closer to land?" *Biology letters* 11.1 (2015): 20140815.
- 2) Rein, J. O. 2019. "The Scorpion Files." Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. [Accessed 2019.01.18]. Available from <http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>.
- 3) Foelix, Rainer, Bruno Erb, and Matt Braunwalder. "Fine structure of the stinger (aculeus) in *Euscorpium*." *Journal of Arachnology* 42.1 (2014): 119-122.
- 4) Chippaux, J-P., and M. Goyffon. "Epidemiology of scorpionism: a global appraisal." *Acta tropica* 107.2 (2008): 71-79.
- 5) Chlorotoxin—A Multimodal Imaging Platform for Targeting Glioma Tumors.
- 6) Quintero-Hernández, V., et al. "Scorpion venom components that affect ion-channels function." *Toxicon* 76 (2013): 328-342.
- 7) Santibáñez-López, Carlos E., and Lourival D. Possani. "Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution." *Toxicon* 107 (2015): 317-326.
- 8) Chen, Zongyun, et al. "Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins." *PloS one* 8.4 (2013): e60201.
- 9) Miyashita, Masahiro, et al. "Characterization of peptide components in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (Hemiscorpiidae)." *Toxicon* 50.3 (2007): 428-437.
- 10) Miyashita, Masahiro, et al. "A novel amphipathic linear peptide with both insect toxicity and antimicrobial activity from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74.2 (2010): 364-369.
- 11) Matsushita, Nobuto, et al. "Purification and characterization of a novel short-chain insecticidal toxin with two disulfide bridges from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae*." *Toxicon* 50.6 (2007): 861-867.
- 12) Matsushita, Nobuto, et al. "Purification and cDNA cloning of LaIT2, a novel insecticidal toxin from venom of the scorpion *Liocheles australasiae*." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 73.12 (2009): 2769-2772.
- 13) Miyashita, Masahiro, et al. "A novel amphipathic linear peptide with both insect toxicity and antimicrobial activity from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74.2 (2010): 364-369.

- 14) Ichiki, Yayoi, et al. "Isolation and Characterization of a Novel Non-Selective β -Toxin from the Venom of the Scorpion *Isometrus maculatus*." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 76.11 (2012): 2089-2092.
- 15) Kawachi, Tomoyuki, et al. "Isolation and Characterization of an Anti-Insect β -Toxin from the Venom of the Scorpion *Isometrus maculatus*." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77.1 (2013): 205-207.
- 16) Dawson, Philip E., et al. "Synthesis of proteins by native chemical ligation." *Science* 266.5186 (1994): 776-779.
- 17) Blanco-Canosa, Juan B., and Philip E. Dawson. "An efficient Fmoc-SPPS approach for the generation of thioester peptide precursors for use in native chemical ligation." *Angewandte Chemie* 120.36 (2008): 6957-6961.
- 18) Mahto, Santosh K., et al. "A reversible protection strategy to improve Fmoc - SPPS of peptide thioesters by the N - acylurea approach." *ChemBioChem* 12.16 (2011): 2488-2494.
- 19) Nicolás, Ernesto, Marta Vilaseca, and Ernest Giralt. "A study of the use of NH₄I for the reduction of methionine sulfoxide in peptides containing cysteine and cystine." *Tetrahedron* 51.19 (1995): 5701-5710.
- 20) Schroll, Alayne L., Robert J. Hondal, and Stevenson Flemer Jr. "2, 2'-Dithiobis (5-nitropyridine) (DTNP) as an effective and gentle deprotectant for common cysteine protecting groups." *Journal of Peptide Science* 18.1 (2012): 1-9.
- 21) Whitmore, Lee, and Bonnie A. Wallace. "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases." *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* 89.5 (2008): 392-400.
- 22) Sreerama, Narasimha, and Robert W. Woody. "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set." *Analytical biochemistry* 287.2 (2000): 252-260.
- 23) Diego-García, E., et al. "Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65.1 (2008): 187.
- 24) Zhu, Shunyi, et al. "MeuTXK β 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804.4 (2010): 872-883.

- 25) Feng, Jing, et al. "Expression and characterization of a novel scorpine-like peptide Ev37, from the scorpion *Euscorpions validus*." *Protein expression and purification* 88.1 (2013): 127-133.
- 26) Torcato, Inês M., et al. "Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1828.3 (2013): 944-955.
- 27) Vassilevski, Alexander A., et al. "Spider toxins comprising disulfide-rich and linear amphipathic domains: a new class of molecules identified in the lynx spider *Oxyopes takobius*." *The FEBS journal* 280.23 (2013): 6247-6261.
- 28) Johnson, Richard S., Stephen A. Martin, and Klaus Biemann. "Collision-induced fragmentation of (M+ H)⁺ ions of peptides. Side chain specific sequence ions." *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 86 (1988): 137-154.
- 29) Roth, Kenneth DW, et al. "Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry." *Mass spectrometry reviews* 17.4 (1998): 255-274.
- 30) 北中 淳史 (2014) 「N 末端化学修飾を利用したペプチド *de novo* シーケンシング法の改善」 卒業論文
- 31) Kitanaka, Atsushi, et al. "A Facile Method for Preferential Modification of the N-Terminal Amino Group of Peptides Using Triazine-Based Coupling Reagents." *Mass Spectrometry* 6.1 (2017): A0059-A0059.
- 32) Schwartz, Elisabeth F., et al. "Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones)." *BMC genomics* 8.1 (2007): 119.
- 33) Luna-Ramírez, Karen, et al. "Whole transcriptome of the venom gland from *Urodacus yaschenko* scorpion." *PloS one* 10.5 (2015): e0127883.
- 34) Torcato, Inês M., et al. "Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1828.3 (2013): 944-955.
- 35) Kuhn-Nentwig, Lucia, et al. "Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae)." *Journal of Biological Chemistry* 277.13 (2002): 11208-11216.
- 36) Diego-García, Elia, et al. "Wide phylogenetic distribution of scorpine and long-chain β -KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components." *Peptides* 28.1 (2007): 31-37.
- 37) Barlow, D. J., and J. M. Thornton. "Helix geometry in proteins." *Journal of molecular biology* 201.3 (1988): 601-619.

- 38) Suh, Jeong-Yong, et al. "Structural and functional implications of a proline residue in the antimicrobial peptide gaegurin." *European journal of biochemistry* 266.2 (1999): 665-674.
- 39) Bobone, Sara, et al. "The importance of being kinked: role of Pro residues in the selectivity of the helical antimicrobial peptide P5." *Journal of Peptide Science* 19.12 (2013): 758-769.
- 40) Tossi, Alessandro, Luca Sandri, and Anna Giangaspero. "Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides." *Peptide Science* 55.1 (2000): 4-30.
- 41) Idiong, Grace, et al. "Investigating the effect of a single glycine to alanine substitution on interactions of antimicrobial peptide laticin 2a with a lipid membrane." *European Biophysics Journal* 40.9 (2011): 1087.
- 42) Diego-García, E., et al. "Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65.1 (2008): 187.
- 43) Cerni, Felipe Augusto, et al. "Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from *Tityus serrulatus* venom." *Peptides* 80 (2016): 9-17.
- 44) Vassilevski, A. A., S. A. Kozlov, and E. V. Grishin. "Molecular diversity of spider venom." *Biochemistry (moscow)* 74.13 (2009): 1505-1534.

謝辞

本研究を行うにあたり、機会と環境を与えてくださった京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生物調節化学研究室の宮川恒教授、中川好秋准教授、宮下正弘准教授に拝謝申し上げます。宮川先生の本質をついたご指導により、しばしば成長を実感することがあり、これは大変貴重な時間でありました。中川先生には研究指導から日常的なものに至るまで、さまざまな分野にわたりお世話になりました。直接ご指導くださった宮下先生には大変興味深いテーマを与えて頂いた上に、多大なご支援を賜り、感謝の念に堪えません。

セミナー等においては、地域環境科学専攻比較農業論講座の赤松美紀准教授および阪南大学の鶴嶋鉄教授から貴重なご助言を賜ったことに、厚くお礼申し上げます。

質量分析計による解析にあたりお世話になりました、生命科学研究科全能性統御機構学分野の佐藤文彦教授（現名誉教授）、ならびに化学生態学研究室の森直樹教授、吉永直子助教の両先生に心からお礼申し上げます。また、MALDI-7090での測定に協力いただいた島津製作所の山崎雄三博士にも深く感謝致します。

最後に、本研究を行う上で多岐にわたりご援助くださった研究室の皆様、OBの皆様、家族に心からの感謝の意を表します。