

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	堺 祥一
論文題目	化学ライゲーション法を駆使したサソリ毒液由来長鎖ペプチドの合成と殺虫活性評価		
（論文内容の要旨） サソリ毒液の主要な生理活性成分はペプチドであり、これまでに多くの殺虫性ペプチドが同定されている。しかしながら、これらの活性発現に寄与する構造要因についての研究はあまり進んでいない。その理由の一つは、サソリ毒ペプチドは比較的長鎖であるため、合成が難しいことにある。ペプチドの化学合成法は効率的であるが、一般的な手法では50残基を超える長鎖ペプチドの合成は難しい。この問題を解決するため、複数の短鎖ペプチド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これまで開発されてきた。その一つにnative chemical ligation (NCL) 法がある。これはチオエステル構造とシステイン側鎖チオール基との特異的な反応を縮合に利用した方法で、比較的容易に長鎖ペプチドを得ることができる。サソリ毒ペプチドの多くは配列中に複数のシステイン残基を含むため、この手法による合成が特に有効である。本論文は、3種のサソリ毒ペプチド（LaIT3、Im-βKTx1、AaIT5）のNCL法を用いた化学合成を駆使して、それらの構造ならびに活性に関する知見を得たものであり、内容は以下の通りである。 第1章の序論に続く第2章では、ヤエヤマサソリ (<i>Liocheles australasiae</i>) 由来の殺虫性ペプチドLaIT3について、その合成ならびに殺虫活性発現に寄与する構造要因について述べている。LaIT3はβ-KTxペプチドファミリーに属し、両親媒性α-ヘリックス構造をもつN末端ドメインと、ジスルフィド結合によって安定化された構造のC末端ドメインで構成されているが、それらの構造と殺虫活性との関係は不明であった。そこで、LaIT3ならびに各ドメインからなる部分ペプチドの合成と殺虫活性評価をおこなった。全長ペプチドはNCL法を用いて合成した。活性評価の結果、全長ペプチドのみ活性を示し、部分ペプチドは活性を示さなかったことから、LaIT3の殺虫活性発現には全長構造が必要であることが分かった。さらに、LaIT3のN末端ドメインは生体膜に相互作用する性質をもつことを見出し、この作用によってC末端ドメインの受容体への結合が促進されて殺虫活性を発現していることが推察された。 第3章では、マダラサソリ (<i>Isometrus maculatus</i>) の毒液に含まれる新規β-KTxペプチドの同定とその活性について述べている。β-KTxペプチドは、幅広いサソリ種の毒液においてその存在が確認されていることから、重要な役割を担っていると考えられているが、マダラサソリでの存在は不明であった。そこで、毒腺トランスクリプトーム解析をおこなって得られた候補配列をもとに、高分解能LC/MS分析によってβ-KTxペプチドを探索した結果、候補配列と質量の一致する成分（Im-βKTx1）が見出された。この構造ならびに活性を確認するため、NCL法を用いてIm-βKTx1の合成をおこなった。Im-βKTx1はLaIT3と同様のN末端ドメインをもつため、その作用によって殺虫活			

性を示すことが考えられたが、合成したペプチドは弱い麻痺活性を示すにとどまり、殺虫活性はもたなかった。このことから、Im- β KTx1は昆虫細胞膜との相互作用によって不利な構造をもち、他の役割をもつことが示唆された。

第4章では、北アフリカ生息種サソリ (*Androctonus australis*) の毒液由来の殺虫性ペプチド AaIT5 の合成と詳細な殺虫活性の評価について述べている。AaIT5 は Na⁺チャネルへの作用をもとに分類された β -toxin ファミリーに属するが、*A. australis* 毒液由来の他の殺虫性ペプチドとは異なり、特に鱗翅目に対して強力な活性を示すことが報告されている。しかしながら、毒液に含まれる量が極微量であったため、正確な活性評価がおこなわれていなかった。そこで、NCL 法を用いて AaIT5 を合成し、殺虫活性を詳細に評価した。まず、ペプチドの酵素消化と LC/MS 分析を組み合わせた手法により、AaIT5 のジスルフィド結合架橋様式を決定した。さらに、殺虫活性評価の結果、ハスモンヨトウ（鱗翅目）に対する LD₅₀ 値は 35.8 nmol/g と求められ、コオロギ（直翅目）に対する LD₅₀ は 11.6 nmol/g と求められた。これらの活性はいずれも、同じ毒液に含まれる主要殺虫性ペプチドである AaIT よりも低いことから、AaIT5 は当初予想されたような鱗翅目昆虫に対する高い活性を持たず、直翅目を含む他の昆虫目に対して比較的高い活性をもつことが分かった。

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)

サソリ毒ペプチドは多様な構造と毒理学的活性をもち、高い作用選択性を示すものが多く、これらのペプチドは医薬や農薬などへの応用において注目されている。しかしながら、その構造と活性の関係や、作用機構に関わる構造因子についての研究はあまり進んでいない。その理由の一つは、サソリ毒ペプチドの多くが長鎖であるため、その合成が難しいことにあった。本研究は、近年開発の進む化学ライゲーション法を駆使して、サソリ毒由来長鎖ペプチドを合成し、その詳細な活性評価や構造決定を目指したものである。評価できる点は以下の3点にまとめられる。

- 1) ヤエヤマサソリ (*Liocheles australasiae*) 毒液由来の殺虫性ペプチドであるLaIT3を、化学ライゲーション法の1種であるNCL法を用いて合成した。さらに、その活性評価の結果、殺虫活性発現に全長構造が必要であること、N末端ドメインによる細胞膜への相互作用が活性発現に重要であることを明らかにした。
- 2) マダラサソリ (*Isometrus maculatus*) 毒液から、LaIT3と同様の構造をもつIm- β KTxを新たに見出した。さらに、NCL法を用いてIm- β KTxを合成し、その活性を評価した。その結果、LaIT3とは異なり、Im- β KTxは強い殺虫活性をもたないことを明らかにした。
- 3) 北アフリカ生息種サソリ (*Androctonus australis*) 毒液由来の殺虫性ペプチドであるAaIT5を、NCL法を用いて合成した。合成AaIT5を用いることで、ジスルフィド結合架橋様式を実験的に初めて決定するとともに、AaIT5は当初予想された鱗翅目に対する高い殺虫活性はもたず、むしろ直翅目に対してより高い活性を示すことを明らかにした。

以上のように本論文は、化学ライゲーション法を駆使した長鎖ペプチドの合成によって、3種のサソリ毒ペプチドの構造決定や詳細な活性評価を可能とし、その活性発現に寄与する構造要因に関する新たな知見をもたらした。これらの研究成果は、複数のジスルフィド結合を含む長鎖ペプチドの化学合成において有用な情報を提供するだけでなく、不明な点の多いサソリ毒成分の役割や機能の解明につながることを期待でき、ペプチド科学や毒素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、令和7年2月12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)