

(論文内容の要旨)

サソリは有毒生物の一種であり、尾節にある毒針から毒液を分泌する。毒液には様々な生理活性物質が含まれ、餌とする昆虫などの獲物を確実に捕獲するとともに、哺乳動物などの外敵から身を守るために用いられる。特にイオンチャンネルに作用して神経毒性を示すペプチド毒素を多く含んでおり、なかには昆虫に対してのみ特異的に作用するものも存在する。そのような昆虫特異的毒素は新規殺虫剤のリード化合物として注目されているだけでなく、毒素をコードする遺伝子を生物農薬に利用する試みも行われている。しかし 1600 種以上に及ぶサソリのなかで、これまでに単離されてきた毒素は大部分が *Buthidae* 科のサソリ由来のものであり、それ以外の科に属するサソリ毒液に関する知見は限られている。日本では先島諸島に *Hemiscorpiidae* 科のヤエヤマサソリ (*Liocheles australasiae*) が生息しているが、この毒液についても、ヒトに対してほとんど毒性を示さないことからその活性成分や作用についての研究はほとんど行われてこなかった。本論文は、ヤエヤマサソリがその毒液を用いて餌となる昆虫を捕獲しているという観察に基づき、毒液中に含まれる殺虫性の毒素を単離・構造決定した結果をまとめたものである。さらに、毒素の活性発現に関わる構造要因を明らかにするために類縁体を合成し、構造の変化が活性に及ぼす影響についても調べている。以下にその概要を記す。

1) 沖縄県石垣島にて採集したヤエヤマサソリを継代飼育し、その毒液を繰り返し採取した。得られた毒液を逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にて粗分画し、それぞれの画分の殺虫活性を、ヨーロッパイエコオロギ若虫を用いた試験で評価した。活性の認められた 2 つの画分についてさらに RP-HPLC による精製を繰り返し、一方の画分からペプチド性毒素 LaIT1 を得た。LaIT1 のアミノ酸配列はエドマン分解法により N 末端から 35 残基目までを決定することができた。さらに、エドマン分解により決定できなかった C 末端側領域の配列を同定するためにペプチドを酵素消化し、得られたペプチド断片の LC/MS 分析を行った。断片の質量から予想される配列をもつペプチドをすべて化学合成し、これらを天然物由来の断片と LC/MS 分析で比較することにより LaIT1 の全アミノ酸配列を決定した。さらに酵素消化と LC/MS 分析を組み合わせることでジスルフィド結合の架橋位置も決定することができた。この配列と類似した

ペプチドはデータベース上には存在せず、本毒素の構造は高い新規性を持つことが明らかとなった。

2) Fmoc 固相合成法を用い、逐次延長法によって前駆体ペプチドを得た後、空気酸化によってジスルフィド結合を形成させて LaIT1 を合成した。得られた合成 LaIT1 は RP-HPLC の保持時間、質量値、殺虫活性いずれについても天然物と一致した。合成した LaIT1 の殺虫活性を検討したところ、コオロギ以外にハスモンヨトウに対しても顕著な活性を示すことが明らかとなった。一方、LaIT1 をマウス脳室内に直接注射しても顕著な中毒症状は見られず、昆虫選択的な作用を有していることがわかった。

3) 殺虫性サソリ毒素の多くは、コンパクトに固定された分子構造を持ち、塩基性アミノ酸が活性発現にとって重要である場合が多い。これを考慮して、LaIT1 において塩基性残基が集中する 13~16 残基目の配列に注目し、ここに含まれる 2 つのアルギニンおよび 1 つのリジン残基をすべてアラニンに置換した LaIT1 類縁体を合成した。この類縁体の殺虫活性は 1/20 以下に低下したことから、この 3 残基のいずれかが、活性に関与していることが明らかとなった。そこで、これらのアルギニンおよびリジン残基をそれぞれ一つずつアラニンに置換した LaIT1(R13A)、LaIT1(R15A)、LaIT1(K16A)を合成し、同様の殺虫活性試験を行った。その結果、LaIT1(K16A)は LaIT1 と同程度の殺虫活性を示したが、LaIT1(R13A)と LaIT1(R15A)では活性が 1/5~1/14 程度に低下した。したがって、この 2 残基が活性発現に重要であることが明らかとなった。

4) 殺虫活性を示したもう一つの HPLC 画分についてさらに精製を進め、ペプチド性毒素 LaIT2 を単離した。エドマン分解法によって 42 残基目までのアミノ酸配列を決定し、その部分配列に基づいた cDNA クローニングによる配列決定を試みた。まず決定した部分配列をもとに縮重プライマーを作成し、PCR 法によって LaIT2 の部分塩基配列を推定した。次いで RACE 法によって 5' 側および 3' 側の配列を増幅し、cDNA 全長の塩基配列を決定した。その結果、LaIT2 は 3 つのジスルフィド結合を含む 59 残基のペプチドであることが明らかとなった。得られたアミノ酸配列の相同性検索を行った結果、この毒素はカリウムチャネルに作用するサソリ毒液由来のペプチド群 (β -KTx ファミリー) に属し、同ファミリーの中では初めての殺虫性ペプチドであることがわかった。

(論文審査の結果の要旨)

サソリの毒液には多くの生理活性ペプチドが含まれており、様々な用途への応用が期待されている。本論文は、我が国の先島諸島に生息するヤエヤマサソリに着目し、その毒液から殺虫性ペプチド毒素を単離して構造を決定するとともに、類縁体の化学合成を行い、構造と殺虫活性の関係に基づいて活性発現に重要なアミノ酸残基を特定した成果をまとめたものである。評価できる主な点は以下のとおりである。

- 1) 分泌量の少ない毒液を繰り返し採取し、殺虫試験と並行しながら精製することにより、ヤエヤマサソリから初めて殺虫性ペプチド毒素 **LaIT1** を単離した。さらに得られた毒素が微量であったにもかかわらず、エドマン分解法、質量分析フラグメンテーション解析を駆使することにより、全アミノ酸配列およびジスルフィド結合の架橋様式の決定に成功した。**LaIT1** のアミノ酸配列には既存生理活性ペプチドとの相同性が認められず、高い新規性が認められた。
- 2) 化学合成法によって **LaIT1** を大量に調製し、昆虫および哺乳動物に対する毒性を評価した。その結果、**LaIT1** は複数種の昆虫に対して殺虫活性を示すのに対し、マウスにはほとんど毒性を示さないことが明らかとなり、昆虫選択的な作用をもつことを示した。
- 3) **LaIT1** の類縁体を合成し、構造と殺虫活性の関係を検討した結果、活性発現にとって重要な塩基性アミノ酸残基の特定に成功した。
- 4) 毒液から **LaIT1** とは異なる殺虫性ペプチド毒素 **LaIT2** を単離した。これは **LaIT1** よりもさらに微量であったが、エドマン分解法および cDNA クローニング法を駆使することによって全アミノ酸配列の決定に成功した。その配列には、既知カリウムチャネル作用性ペプチド群との相同性が認められたが、殺虫活性ペプチドとして記載されるのは本研究が初めてである。

以上のように、本論文は、これまで報告例のないヤエヤマサソリの毒液に含まれる殺虫性毒素を単離、構造決定したもので、新規性の高いペプチド毒素の取得やその活性の詳細な検討、さらには構造と活性の関係を明らかにした点で、天然物有機化学、ペプチド化学および昆虫生理学に寄与するところが大きい。また本毒素の作用から得られた知見は、新たな殺虫剤開発にとって有用な情報をもたらすものである。

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21年2月10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にあるものと認めた。