

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 矢野 佑介

論 文 題 目

食虫哺乳類由来神経毒ペプチドの生物有機化学的研究

論文審査担当者

主 査 名古屋大学大学院生命農学研究科教授 北 将樹

委 員 名古屋大学大学院生命農学研究科教授 西川 俊夫

委 員 名古屋大学大学院創薬科学研究科教授 布施 新一郎

委 員 名古屋大学大学院生命農学研究科准教授 恒松 雄太

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1 - 2

動物由来の天然毒には、フグ毒テトロドトキシンなど特異な構造や機能をもつものが多い。また加速進化により、有毒動物由来の生理活性ペプチドには多様性がみられる。このような新規神経毒の化学的解明は、薬理学・神経科学・精神医学など広範な生命科学の基礎研究や、新規医薬リードの開発など応用研究の発展に広く貢献してきた。例えば、モルヒネに替わる強力な鎮痛薬として期待される ziconotide はイモ貝由来 **conopeptide** の合成誘導体であり、疼痛シグナル伝達に参与する N 型 Ca チャネルを強力に遮断する。自然界には様々な毒を持つ動物が知られているが、毒を持つ哺乳類は食虫動物トガリネズミの仲間と単孔目カモノハシしか知られておらず、また稀少性・不安定さゆえに、その有毒成分の理解は十分には進んでいない。

北米に生息するブラリナトガリネズミ *Blarina brevicauda* は唾液に強い毒を持ち、その活性成分としてプロテアーゼ毒 **blarina toxin** が発見されているが、獲物を瞬時に麻痺させる強力な神経毒も含まれることが生態観察から予想されてきた。そこで、ミールワーム麻痺活性を指標に顎下腺から神経毒ペプチド **BPP (Blarina paralytic peptide)** 1,2 が単離され、酵素消化と MS/MS 解析によりそれらの全アミノ酸配列が推定された。BPP 類はヒトのオピオイドペプチドの前駆体 **synenkephalin (SYN)** の一部と高い相同性を示すが、オピオイドペプチド自身の配列は含まず、BPP 類に対応するヒト由来ペプチドの生理活性も分かっていない。このように、ヒトでは脳内で分泌され鎮痛に関わるペプチドホルモンの前駆体部分が、トガリネズミでは唾液とともに顎下腺から分泌され獲物を捕獲する麻痺物質として機能することは、生態学および進化学の観点からも非常に興味深い。このような背景から、本学位論文では哺乳類の適応進化に関わる神経毒ペプチド BPP 類の構造と機能の解明を目指して研究を実施した。

ラット由来の SYN は BPP 類と同じく分子内に 3 組のジスルフィド結合を持ち、その結合様式は Cys(I)-Cys(IV), Cys(II)-Cys(V), Cys(III)-Cys(VI) (Type-I 型と呼ぶ) と報告されている。第 2 章では、BPP 類のジスルフィド結合様式もこの Type-I 型を持つと予想して、BPP2 の合成と構造確認をおこなった。C 末端にアシルヒドラジドを持つ 1-22 セグメントと N 末端に遊離の Cys 残基を持つ 23-53 セグメントをそれぞれ固相法で合成して **native chemical ligation (NCL)** 法で連結し、Cys 残基の保護基の除去とジスルフィド結合の形成を段階的に行うことで BPP2 の合成を達成した。しかし、合成品の HPLC における保持時間と UV 吸収スペクトルは天然品とは大きく異なり、これまでの BPP 類の推定構造が誤っていることが示唆された。そこで酵素消化で得られた天然品 BPP 類の分解物の MS/MS データ、ならびに最近報告されたブラリナトガリネズミ顎下腺のトランスクリプトーム解析データを精査することで、BPP 類の一部のアミノ酸配列を訂正した。

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1-2

第3章では改訂構造の BPP2 の合成を行った。まず、鑄型構造を用いずアミノ酸配列情報のみでタンパク質やペプチドの立体構造を予測できる ColabFold プログラムを用いて BPP 類の立体構造を予測し、上記とは異なる Cys(I)-Cys(V), Cys(II)-Cys(IV), Cys(III)-Cys(VI) という結合様式 (Type-II 型と呼ぶ) のモデルを得た。上記と同様に固相合成法と NCL 法を用いた合成により、BPP2 の全ての Cys 残基が無保護の一本鎖ペプチドを得た。次いで cystine/cysteine を用いた酸化・還元平衡条件でフォールディングを検討した結果、反応は経時的に収束して BPP2 がほぼ単一の生成物として得られる条件を見出した。得られた合成品 BPP2 の HPLC 保持時間は天然品 BPP2 と一致した。さらに合成品の CD スペクトルの波形パターンは ColabFold プログラムで予測したものと良く一致し、二次構造における  $\alpha$ -ヘリックス構造の占有率も 52-55% 程度と高い一致度を示した。

続いて、得られた合成品 BPP2 についてジスルフィド結合様式の解析を行った。初めにジスルフィド結合を残したまま酵素消化を試みたが、天然品と同様、3 組のジスルフィド結合を含むコア構造は非常に安定であり、遊離の C 末端 10 アミノ酸残基しか切断されなかった。そこでジスルフィド結合を部分的に還元して 2 種類のアルキル化剤 (NEM, IAM) で段階的に S-アルキル化してから HPLC で分離し、ついで酵素消化と MS/MS により詳しく解析した。その結果、合成品 BPP2 のジスルフィド結合様式は ColabFold プログラムで予測した Type-II 型と判明し、天然品 BPP1, 2 のジスルフィド結合様式も Type-II 型であると決定した。

第4章では合成品 BPP2 の生物活性評価を行った。BPP2 (5.6  $\mu\text{g}/\text{g}$  body weight) をミールワームに腹腔内投与すると、投与直後から数分間で全身に麻痺が広がり、1.5 時間後には外部刺激に対する応答が無くなるなど、天然品 BPP2 に近い効果が見られた。この麻痺効果は投与後 6 時間程度まで持続したことから、ブラリナトガリネズミが獲物を効率よく捕獲して捕食するために十分な機能を果たすと考えられた。次いでホールセルパッチクランプ法を用いた電気生理学実験により HEK293 細胞に発現させた Ca チャネルに対する応答を評価した結果、合成品 BPP2 (1.77  $\mu\text{M}$ ) はヒト T 型 Ca チャネル (hCa<sub>v</sub>3.2) を活性化し、その活性化閾値を 11 mV 低下させることが分かった。一方で、痛覚伝達に関与するヒト N 型 Ca チャネル (hCa<sub>v</sub>2.2) に対しては顕著な活性を示さなかった。Ca<sub>v</sub>3.2 は主に脳や心臓で発現し、心拍の形成や痛覚の伝達などに関与することが知られているが、hCa<sub>v</sub>3.2 を活性化して膜電位の変化に対するチャネルの感度を高める化合物はこれまで例はなく、今回見出した BPP2 の活性は新規性が高いと言える。

さらに、立体構造比較プログラム DALI による解析から、BPP2 のジスルフィド結合で規定される立体構造はオオムカデ *Scolopendra mutilans* 由来の神経毒ペプチド SLPTX 類と特に類似していることを見出した。SLPTX 類は Na チャネルや K チャ

## 論文審査の結果の要旨

### 別紙 1 - 2

ネルに対する特異的な阻害活性や昆虫に対する致死活性を示す。また SLPTX 類は節足動物に広く保存されている無毒の内在性ホルモンと共通の祖先を起源に持つとされている。したがって、BPP 類が SYN から分子進化を経て毒性を獲得したと仮定すると、共にイオンチャンネルを標的とし類似の立体構造を持つ SLPTX 類と BPP 類は、それぞれの種の生存戦略にとって有利になるような進化（収斂進化）が起きた結果、生み出されたと考えられる。すなわち、節足動物（ムカデ）と哺乳類（トガリネズミ）では進化系統が大きくかけ離れているにも関わらず、類似の機構で毒の化学進化が起きたことが示唆された。

以上の結果、本論文ではトガリネズミ由来の麻痺性ペプチド BPP2 を化学合成し、天然品と比較することで全長 47~52 アミノ酸残基からなる BPP 類の配列とジスルフィド結合様式を決定した。さらに BPP2 が持つミールワーム麻痺活性、およびヒト T 型 Ca チャンネル (Ca<sub>v</sub>3.2) の活性化作用を新たに見出した。これらの成果には独自性と新規性の観点から高い学術的意義があると認められ、天然物化学、ペプチド化学および関連分野の発展に大きく貢献した。よって本学位審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。