

食虫哺乳類由来神経毒ペプチドの生物有機化学的研究

名古屋大学大学院 生命農学研究科
応用生命科学専攻
天然物ケミカルバイオロジー研究室

矢野 佑介

2023年8月

目次

第1章 序論	1
1. ペプチド毒と創薬	1
2. 哺乳類由来の毒	3
3. 毒を保有するトガリネズミとその生態	5
4. ブラリナトガリネズミの毒, blarina toxin.....	6
5. <i>Blarina</i> Paralytic Peptides (BPPs) 1, 2.....	8
第2章 BPP2の合成とアミノ酸配列の訂正	11
1. <i>Blarina</i> Paralytic Peptides のジスルフィド結合様式の推定	11
2. BPP2 (4) の合成計画	13
3. BPP2 (4) の合成 (1).....	17
4. BPP2 (4) の合成 (2).....	20
5. BPP 類のアミノ酸配列の訂正	23
第3章 改訂BPP2の合成とジスルフィド結合様式の解析	25
1. BPP 類の立体構造予測	25
2. Revised BPP2 (25) の合成.....	27
3. Revised BPP2 (25) のジスルフィド結合様式の解析.....	32
4. Revised BPP2 (25) の CD スペクトルによる二次構造の解析	41
第4章 BPP2の生物活性評価	43
1. ミールワーム麻痺活性試験	43
2. 電気生理学的解析	45
3. 立体構造ホモログの探索と分子進化に関する考察	50
第5章 結論	54

第6章 実験の部	56
1. 一般	56
2. 第2章の実験	58
3. 第3章の実験	70
4. 第4章の実験	79
引用文献	80
付記	93
謝辞	103

略語一覽

acac	Acetylacetone
Acm	Acetamidomethyl
α -CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Cam	Carbamidomethyl
CD	Circular dichroism
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	1,4-Dithiothreitol
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
Gdm-Cl	Guanidine hydrochloride
Glu-C	Glutamyl endopeptidase
HCTU	5-Chloro-1-((dimethylamino)(dimethyliminio)methyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazole 3-oxide hexafluorophosphate
HFBA	Heptafluorobutyric acid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
IAM	Iodoacetamide
pLDDT	Predict local distance difference test
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MPAA	4-Mercaptophenylacetic acid
MSA	Multiple sequence alignment
mu	Mass unit
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleimide
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholine
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PEG	Polyethylene glycol
PG	Protecting group

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPPS	Solid-phase peptide synthesis
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP·HCl	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
TFA	Trifluoroacetic acid
TIPS	Triisopropylsilane
Trt	Trityl

第1章 序論

1. ペプチド毒と創薬

爬虫類や節足類, 海洋生物にはユニークな構造や強力な生理活性を示す物質を持つ種が多数存在する. これらの種は, 保有する生理活性物質を主に捕食のための武器や外敵から身を守るための防御物質 (=生物毒) として利用している. このような用途に利用される生物毒は, 医薬品や研究における試薬としての利用も期待されることから, 多岐に渡る分野で研究されている. [1-3]

盛んに研究されている生物毒の一例として, イモガイ (cone snail) が保有するペプチド毒, conotoxin 類が挙げられる. [4] Conotoxin 類は 10 – 60 残基程度のアミノ酸から構成される神経毒ペプチドで, 分子内に 2 – 5 本のジスルフィド結合を持つ. この神経毒ペプチドはイモガイの主な餌である魚類に対して即効かつ強力な麻痺活性を示すため, イモガイの効率的な獲物の捕獲に寄与していると考えられている. 一般に, 即効性のある麻痺性神経毒は神経伝達に参与するイオンチャネルを標的分子とするものが多く, conotoxin 類の標的分子もイオンチャネルであることが知られている. 例えば, ヤキイモ (*Conus magus*) から発見された ω -conotoxin MVIIA (**1**) は痛覚の伝達に参与する N 型 Ca チャネル ($Ca_v2.2$) に対して強力な阻害活性を示す. そのため **1** は, 末期がん患者に対する疼痛緩和などを目的とした強力な鎮痛剤として臨床で利用されている (Figure 1A). [5-8]

1 以外にもペプチド毒を創薬シードとして開発された複数の医薬品が上市, あるいは臨床試験の段階にある. [1, 9, 10] 例えばアミメアメリカドクトカゲ (*Heloderma suspectum*) の顎下腺分泌液から単離されたペプチド毒 exenatide (**2**) はグルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-like peptide-1: GLP-1) 受容体アゴニストであり, 血糖依存的なインスリン分泌の促進作用およびグルカゴン分泌抑制作用を持つ. そのため **2** はインスリンの分泌量低下が原因となって発症する II 型糖尿病の治療薬として使用されている (Figure 1B). [9, 11, 12] またオプトサソリ (*Leiurus quinquestriatus*) の毒液から単離されたペプチド毒 chlorotoxin (**3**) は Cl チャネル阻害活性を示す (Figure 1C). [10, 13-15] **3** はがん細胞で発現している Cl チャネルに対して選択的に結合する特性を持つことから, **3** と近赤外蛍光色素の一種であるインドシアニンググリーンを結合した蛍光プローブ tozuleristide が開発されている. [16] これは手術によって腫瘍を切除する際に正常細胞とがん細胞を区別するイメージング剤としての利用が期待されており,

米国では既に小児がん患者を対象とした第 II/III 相試験が終了しているほか、別の患者層を対象とした臨床試験も現在実施されている。 [17, 18]

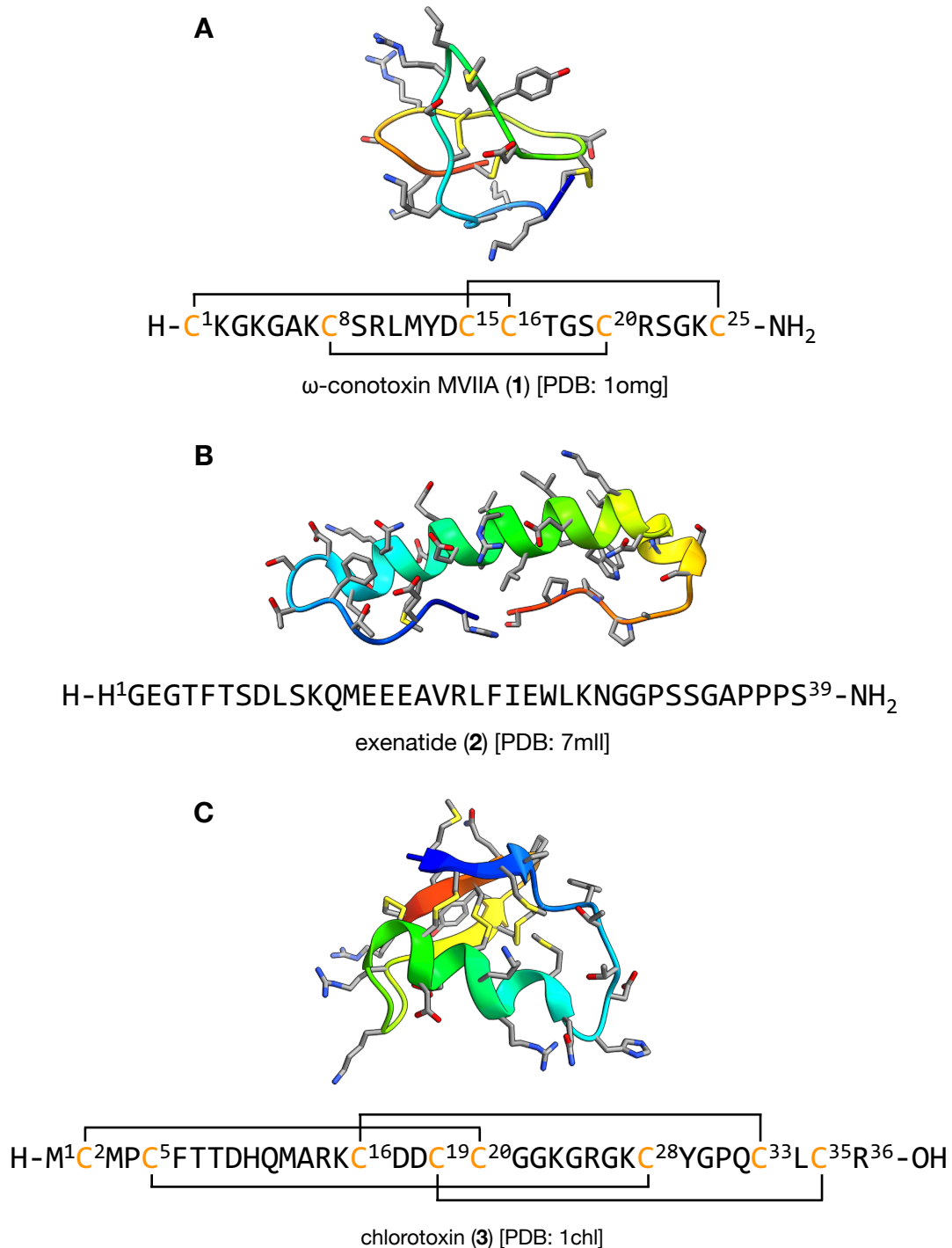


Figure 1. A: ω-conotoxin MVIIA (1), B: exenatide (2), C: chlorotoxin (3) の構造

2. 哺乳類由来の毒

前節で述べたように、爬虫類や節足類、海洋生物が保有する毒の研究は盛んに行われている。その一方で哺乳類が保有する毒の研究はあまり進展してこなかった。

そもそも哺乳類が毒を持つことは、20世紀半ばまでは民間伝承として伝えられるだけであった。^[19] また当時は、哺乳類の咬傷による有毒症状は哺乳類の口腔内から傷口へと侵入した微生物によって引き起こされると考えられていた。^[20,21] このような背景の中、1942年にアメリカの動物学者 Pearson は、食虫動物ブラリナトガリネズミ (*Blarina brevicauda*) の顎下腺抽出物がマウスやウサギに対して強力な痙攣作用と致死活性を示すことを報告した。^[22] この研究によって哺乳類由来の毒の存在が初めて実証されたが、後に続く報告は無く、これ以降半世紀近くは渡って関連する研究に進展はなかった。しかし1992年に Dufton が発表した総説^[23] によって再び研究者からの哺乳類毒に関する関心が高まり、近年では有機化学、生態学、進化生物学など幅広い分野の研究者が様々なアプローチから研究を行っている。

これまでに有毒であることが確かめられた哺乳類は、いずれも真無盲腸目 (*Eulipotyphla*) と単孔目 (*Monotremata*) に属している。^[24] 真無盲腸目については、ハイチソレノドン (*Solenodon paradoxus*) とキューバソレノドン (*S. cubanus*) が有毒種とされている。^[24,25] 一方でトガリネズミも有毒とされるが、ソレノドンとは対照的にユーラシア大陸や北米、ヨーロッパなどの寒冷な地域を中心とした幅広い生存圏でみられ、世界全体では300種以上、日本にも北海道を中心に数種が生息している。これらの種は昆虫などの無脊椎動物やカエル、トカゲ、ネズミといった小型の脊椎動物を主に捕食する。またトガリネズミはこれらの獲物に噛み付いて、動かなくなったところを捕食もしくは巣穴へ持ち帰って貯蔵する様子が観察されている。^[25-28] 一方でトガリネズミは飢餓に弱く、長期に渡る人工飼育が難しい。また、ソレノドンは中南米の島嶼国にしか生息していない絶滅危惧種であるため捕獲自体が難しく、これらの種が持つ毒の研究はあまり進んでいない^[29]。

単孔目に属するカモノハシ (*Ornithorhynchus anatinus*) も数少ない有毒哺乳類の一種である。カモノハシの毒は雄の後脚の蹴爪から分泌され、主に雌をめぐる繁殖期の雄同士の争いで使われるとされる。^[30,31] カモノハシの毒はヒトに対する致死性を示さないが、強烈な痛みを誘発し、長期に渡って痛覚過敏の状態を持続させる効果がある。北らは、このように痛覚を刺激する活性を示すカモノハシの毒液からヒト神経芽腫細胞 (IMR-32) に対する Ca^{2+}

流入活性を指標に C 型ナトリウム利尿ペプチドやその前駆体部分の断片ペプチドを単離した。^[30,32,33] Ca チャネルは痛覚の伝達などに関与するため、Ca²⁺ 流入作用を示す断片ペプチドはカモノハシの毒が持つ強烈な痛みと痛覚過敏を引き起こす生理活性物質の一つと考えられている。

様々な技術革新を経て分析技術が飛躍的に発展した近年では、哺乳類毒の研究でもゲノミクス、プロテオミクスといったオミックス情報を用いた網羅的な解析手法が広く用いられている。^[34-36] 例えば、Casewell らはハイチソレノドン (*S. paradoxus*) のゲノミクスおよびプロテオミクス解析を実施し、ソレノドンの保有する毒がカリクレイン様セリンプロテアーゼを起源として分子進化を遂げたものであることを明らかにしている。^[29] このようにオミックス解析では試料中の生理活性物質の組成や分子進化の経緯、あるいは物質と遺伝子の相関関係を詳しく探ることができる。しかし有毒な生理活性物質の性質や作用機序を分子レベルで解明するには、網羅的な解析にとどまらず、生体試料に含まれる活性本体を実際に単離し、個々の分子の物理・化学的性質や標的分子、生化学・薬理的な機能などを解明することが必要不可欠である。このように分子レベルでの解析を実施することで毒成分の標的分子が分かれば、元の毒成分の構造改変や安定性の付与などといった誘導化により、新たな機能性分子として活用できる。従って、オミックス情報を活用した網羅的な解析や、特異な構造に着目した生理活性物質の作用機序解明、さらには合成化学や医薬品化学の観点から生理活性物質をさらに改変することで機能を付与した新たな有用物質を創出する、というように多面的な角度から研究を展開していくことが、今後の哺乳類毒の研究においてもより一層重要になると考えられる。

3. 毒を保有するトガリネズミとその生態

真無盲腸目に属するトガリネズミ科 (Soricidae) の動物のうち、現時点で有毒種であると判明しているのは前節で述べたブラリナトガリネズミ (*B. brevicauda*) に加えて、ミナミミズトガリネズミ (*Neomys anomalus*), ミズトガリネズミ (*N. fodiens*) である。^[24] 最近の研究から例を挙げると 2017 年, Kowalski らはミズトガリネズミ (*N. fodiens*) の顎下腺抽出物はカエルや昆虫の心拍数抑制と可逆的な心停止, 筋収縮の低下や, カエル坐骨神経における神経伝達速度の低下などの薬理活性を示すが, ヨーロッパトガリネズミ (*Sorex araneus*) ではこれらの活性を示さないことを報告した。^[37] さらに, ミズトガリネズミ顎下腺抽出物の LC-MS, MS/MS 分析によりヘビ毒やクモ毒などの活性成分であるホスホリパーゼ A₂ やヒアルロニダーゼ 2 が同定され, 麻痺活性への関与が予想されている。

上記の有毒とされるトガリネズミ以外にも, 北海道に生息するオオアシトガリネズミ (*S. unguiculatus*) やヒメトガリネズミ (*S. gracillimus*) なども, ミミズや昆虫などの獲物を麻痺させて捕獲することがフィールド科学者による観察から確認されている。一般にトガリネズミの基礎代謝率は非常に高く, その高い代謝要求を満たすために大量の餌を摂取する必要がある。そのためトガリネズミは自身が生産して保有する麻痺毒を用いて, 獲物を効率的に捕獲するとされる。^[38] したがって, トガリネズミの毒は獲物に対して必ずしも致死活性を示さなくても, 獲物を麻痺あるいは運動機能を低下させて逃げられなくすることで, トガリネズミが獲物を効率よく捕獲することを可能にする。さらには, 獲物を生きたまま貯蔵することで腐敗を防ぎ, 長期にわたって高い栄養価を維持する上でトガリネズミの生存にとって有利に働くと考えられる。このような推察に基づいて, トガリネズミが麻痺毒を保有し自身の生存に役立っているという生態を分子レベルで解明できれば, トガリネズミの生態や進化において毒がどのような役割を果たしてきたのか, など毒の機能を新たな観点から探ることに繋がり, 生態・進化的にも興味深い知見が得られると期待される。

4. ブラリナトガリネズミの毒, blarina toxin

北米に生息するブラリナトガリネズミ (*B. brevicauda*) は他のトガリネズミと同様、昆虫やクモ、ムカデなどの無脊椎動物を主に捕食する。^[39] この種はトガリネズミ類の中では比較的大きな体 (体長 7–10 cm) を持ち、時にはカエルやネズミといった自分よりも大きな脊椎動物も襲って捕食するほど獰猛な種とされる。またヒトがブラリナトガリネズミに噛まれた場合、焼けるような痛みが 3 日間続いた後、さらに 2 週間以上も不快感が残ったとの報告もある。^[40]

2004 年、北らはブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物から致死毒 blarina toxin (BLTX) を単離、構造決定した (Figure 2A)。^[41] BLTX は 253 残基のアミノ酸から構成される糖タンパク質であり、組織性カリクレイン様のプロテアーゼ活性を示す。この毒はキニノーゲンに作用し、炎症メディエーターであるブラジキニンの産生を促進することから、血管拡張による血圧の低下を誘発する。また BLTX をマウスに腹腔内投与すると急性毒性が見られ、顎下腺抽出物投与時にもみられる呼吸困難や痙攣、後脚の麻痺といった毒の主な症状を示す。^[22]

さらに 2005 年、同じく北らは同種の顎下腺抽出物から組織性カリクレイン様のプロテアーゼ blarinasin を単離、報告した (Figure 2B)。^[42] Blarinasin の各種プロテアーゼ阻害剤に対するプロファイルは BLTX と高い類似性を示した。しかし両者のアミノ酸配列相同性は約 70% と高いにも関わらず、blarinasin は他の哺乳類由来のカリクレインと同様、マウス致死活性を示さなかった。このような blarinasin と BLTX の毒性の差異は、酵素活性中心付近のポケット構造における電荷分布の違いによると推定されている。^[43]

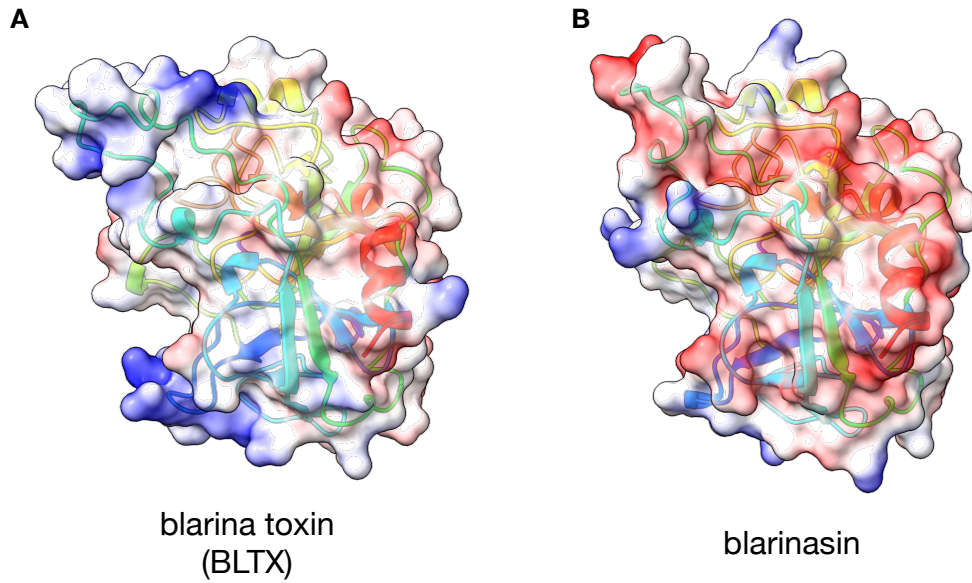


Figure 2. BLTX (A) と blarinasin (B) の立体構造

それぞれの立体構造はヒトカリクレイン 3 (PDB ID: 2zck) を鋳型として SWISS-MODEL を用いたホモロジーモデリングにより作成した。得られた立体構造は Chimera-X で描画し、正電荷の局在を青、負電荷の局在を赤で示した表面電荷マップを重ねた。

5. *Blarina* Paralytic Peptides (BPPs) 1, 2

ブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物には、マウスだけでなくミールワームなどの無脊椎動物に対する麻痺活性も見られる。^[27] 一方、前節で述べたプロテアーゼ毒 BLTX は無脊椎動物に対する麻痺活性を示さないことから、この種の顎下腺抽出物には無脊椎動物を麻痺させる別の有毒成分が含まれることが予想された。そこでブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物からミールワーム麻痺活性を指標として新たな有毒成分の単離が行われた。顎下腺抽出物をワイドポア逆相 HPLC (Develosil[®] 300C₄-HG-5, Figure 3A), ゲルろ過 HPLC (TSKgel[®] G2000SW_{XL}, Figure 3B), 逆相 HPLC (Develosil[®] RPAQUEOUS-AR-5, Figure 3C) の3段階のクロマトグラフィーにより分離した結果、ミールワーム麻痺活性を示す2種の新規神経毒ペプチド *Blarina* Paralytic Peptides (BPPs) 1, 2 が得られた。BPP 類の分子量は SDS-PAGE 分析から 5.2 – 5.6 kDa と決定された (Figure 3D)。^[44, 45] また BPP1, 2 はそれぞれ 48, 53 残基のアミノ酸から構成される一本鎖ペプチドであることが、酵素消化によって得られたペプチド断片の網羅的な MS, MS/MS 解析によって決定された (Figure 3E)。さらに BPP 類は共に 6 つのシステイン (Cys) 残基を含んでおり、質量分析で得られた分子量の測定値がポリペプチド鎖の計算値よりもそれぞれ 6 Da 小さかったことから、BPP 類は分子内に 3 組のジスルフィド結合を含むと決定された。しかしこの先行研究では得られた天然品の量が少なかったため、3 組のジスルフィド結合様式や立体構造は未決定であった。また BPP 類がミールワーム麻痺活性を示すことは明らかとなったものの、詳細な生物活性評価は行われていなかった。

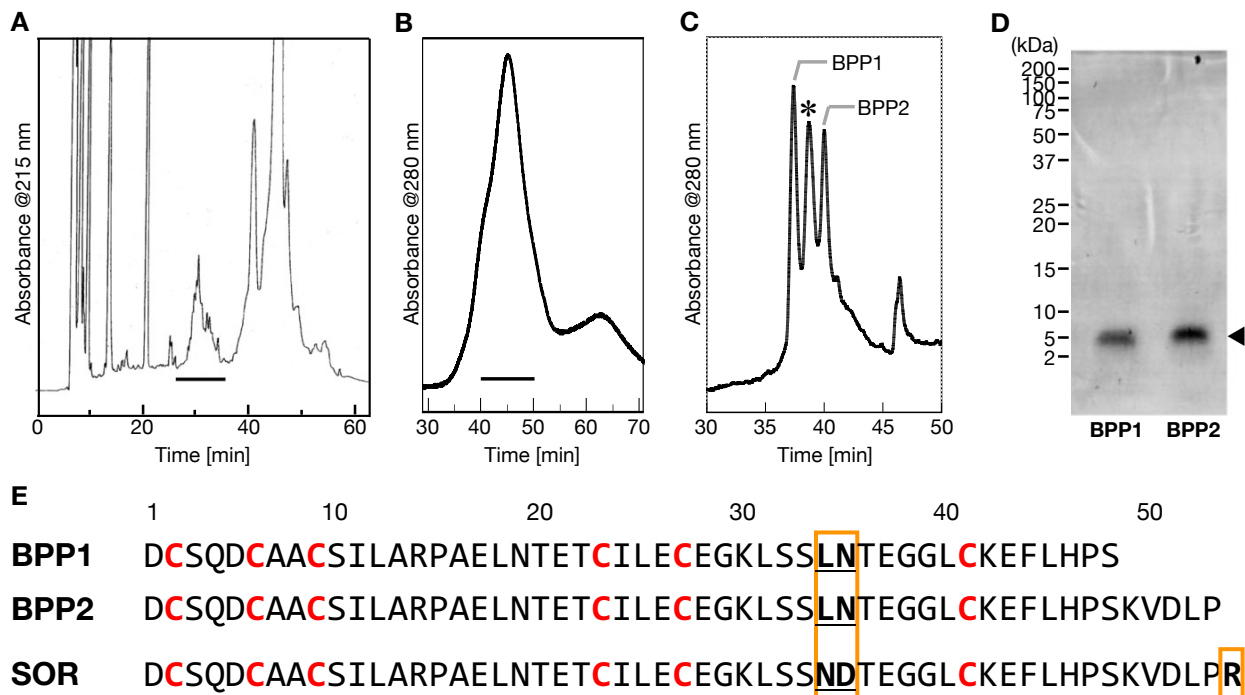


Figure 3. A – D: BPP 類の単離 **E:** 当初決定された BPP 類と soricidin のアミノ酸配列

A: Develosil® 300C₄-HG-5 を用いたブラリナトガリネズミ顎下腺抽出物 (1/10 個体分) の分離. $t_R = 23 - 36$ min の画分 (下線部) にミールワーム麻痺活性が見られた. **B:** TSKgel® G2000SW_{XL} を用いた麻痺活性画分の精製. 主成分である $t_R = 40 - 50$ min の画分 (下線部) を次段階に用いた. **C:** Develosil® RPAQUEOUS-AR-5 を用いた麻痺活性成分の単離. BPP1: $t_R = 37.4$ min, BPP2: $t_R = 40.0$ min, *: BPP 類と類似の分子量を持つペプチドが複数含まれるピーク ($t_R = 38.7$ min) **D:** 精製した BPP 類の SDS-PAGE 分析 (還元条件). **E:** 当初決定された BPP1 (48 残基), BPP2 (53 残基) および soricidin (SOR, 54 残基) のアミノ酸配列. Cys 残基を赤色, および BPP 類と SOR 間で異なるアミノ酸残基を橙色の枠でそれぞれ示した.

また過去に米国の Stewart らによって, BPP 類と同様にミールワーム麻痺活性を示す神経毒ペプチド, soricidin (SOR) が同種の顎下腺抽出物から単離, 構造決定されている (Figure 3E). [46] SOR は 54 残基のアミノ酸で構成され, 分子内に 3 組のジスルフィド結合を含む一本鎖ペプチドである. また SOR やその部分配列ペプチドは, がん細胞の増殖に関連する一過性受容体電位型バニロイド 6 (TRPV6) Ca チャネル阻害活性を示すことから抗がん剤とし

での応用が期待されており、米国では既に第 I 相試験が終了している。[47,48] なお、SOR と BPP 類では大部分のアミノ酸配列が共通しているが、SOR の Asn³⁵-Asp³⁶ 配列が BPP 類では Leu³⁵-Asn³⁶ となっている点や、SOR の C 末端 Arg⁵⁴ 残基が BPP 類には含まれないという違いが見られる。

さて第 3 節で述べた通り、トガリネズミは保有する麻痺毒を効率的な獲物の捕獲と貯蔵に使用することが知られている。しかしトガリネズミが麻痺毒を獲得するに至った経緯や実際の獲物に対する作用機序については不明なままである。先に述べた BPP 類についても野生種から単離できた天然品の量はわずかであり、それらの詳細な構造や機能は未解明であった。こういった背景から著者は、BPP 類のジスルフィド結合様式の決定を第一の目的とし、化学合成した BPP 類を用いて天然品の構造を決定することとした。また合成品を用いて詳細な生物活性評価を行い、BPP 類の新たな機能を発見することを目指した。本研究によって BPP 類の構造と機能の関係が明らかになれば、BPP 類と類似の構造や機能を持った他のペプチドとの比較解析が可能になる。また化学合成によって BPP 類に蛍光基などを導入したケミカルプローブを作成すれば、BPP 類の生体内局在や標的分子の同定・結合様式の解析などから毒の作用機序解明が可能になる。さらには、他種のトガリネズミや哺乳類由来の類似成分と比較することで、哺乳類の進化における BPP 類の関わりといった進化学的な観点からも考察できる。したがって本研究で得られる知見は、有毒哺乳類の毒に関する研究の発展に大きく貢献するものと期待される。

以上より本論文では、BPP2 の合成とアミノ酸配列の訂正 (第 2 章)、改訂構造の BPP2 の合成とジスルフィド結合様式の解析 (第 3 章)、および BPP2 の生物活性評価 (第 4 章) について述べる。

第2章 BPP2 の合成とアミノ酸配列の訂正

1. *Blarina* Paralytic Peptides のジスルフィド結合様式の推定

第1章第5節で述べた通り、天然品 BPP 類のジスルフィド結合様式は未決定である。そのため本研究では初めに、BPP 類と類似のアミノ酸配列を持つペプチドのジスルフィド結合様式を参照し、BPP 類における結合様式を推定することとした。BPP 類のアミノ酸配列を BLAST 検索^[49] した結果、哺乳類由来の一本鎖ペプチド synenkephalin (SYN) の N 末端部分のアミノ酸配列が高い類似度を示すことが判明した。例えば、ラット由来 SYN の N 末端部分にあたる rat SYN (rSYN) [1-53] は BPP1, 2 とそれぞれ 53.2%, 51.9% という高い類似性を示す (Figure 4A)。^[50,51] また 6 つの Cys 残基から 3 組のジスルフィド結合が形成されている点も BPP 類と rSYN [1-53] で共通している。SYN は哺乳類において広く保存されている脳内オピオイド前駆体タンパク質 proenkephalin (PENK) の一部に相当し、PENK がプロセッシングを受けて生成する。この過程では、SYN の他にも Met-enkephalin と Leu-enkephalin がそれぞれ 6 分子、1 分子生じ、鎮痛や神経内分泌などを司るオピオイドペプチドホルモンとして機能する。^[52] 一方で SYN は脳や副腎髄質に局在することが知られているが、オピオイドペプチドとなる配列は含まれていないためどのような機能を担っているのかは不明である。

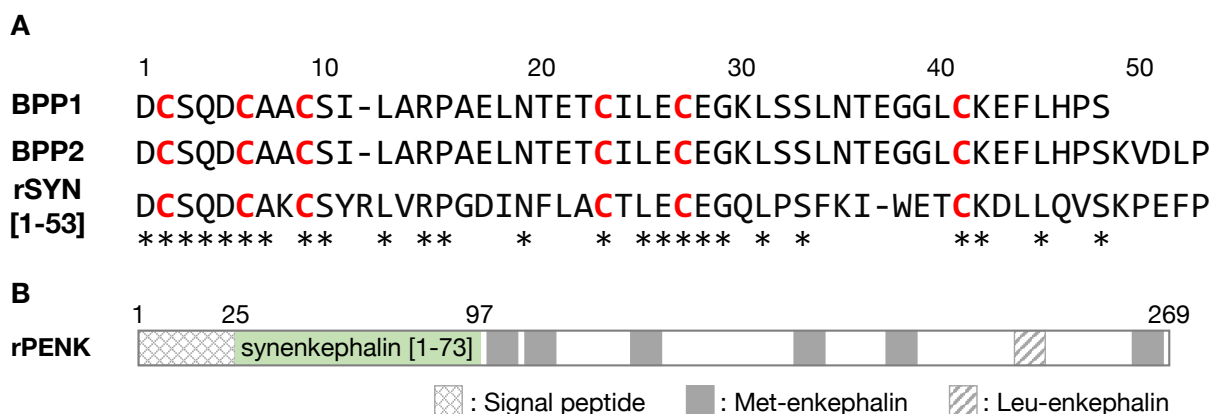


Figure 4. **A:** BPP 類, rat synenkephalin [1-53] (rSYN) のアミノ酸配列。残基番号は BPP 類に対応している。rSYN [1-53] は rSYN の一部 (全長 73 残基のうち N 末端側の 1-53 残基) を示す。*3 種のペプチド全てに共通するアミノ酸残基。 **B:** rat proenkephalin (rPENK) の模式図。

rPENK の 25–97 残基部分が rSYN の全長に相当する。

rSYN のジスルフィド結合様式は、チャイニーズハムスターの卵巣細胞 (CHO 細胞) で異種発現したリコンビナントペプチドを用いて決定された。具体的には rSYN を酵素消化し、得られた断片ペプチドの LC-MS 分析を行うことで Cys(I)–Cys(IV), Cys(II)–Cys(V), Cys(III)–Cys(VI) と決定されている (Figure 5A).^[53] なお本論文ではこれ以降, SYN や BPP 類の Cys 残基について N 末端 → C 末端方向に (I)~(VI) の通し番号をつけ, また上記の rSYN のジスルフィド結合様式を Type-I 構造と呼ぶ (Figure 5B).

一般にアミノ酸配列の相同性が 35~40% 以上のタンパク質同士は類似の立体構造を持つ可能性が高いとされる。^[54] そのため SYN と 50% 以上の配列相同性を持ち, 6 つの Cys 残基周辺の配列も比較的高く保存されている BPP 類は, SYN と同じ Type-I のジスルフィド結合様式を持つと推測した。また BPP1 と BPP2 の 3 組のジスルフィド結合を含む Cys²–Cys⁴¹ 部分 (コア領域と呼ぶ) の配列は同一であるため, 両者のジスルフィド結合様式も同一と予想した。

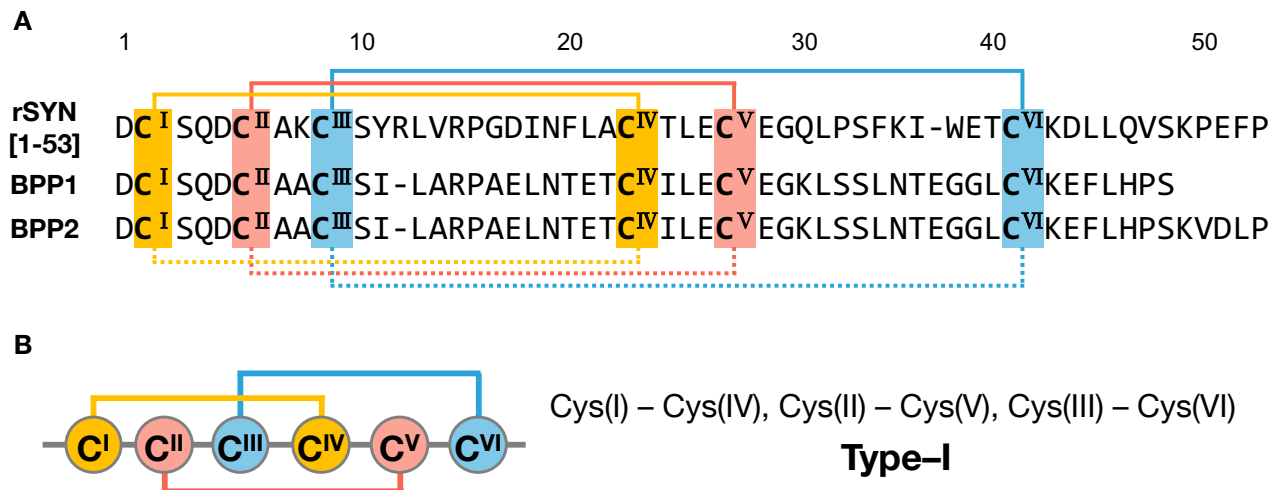


Figure 5. **A:** rSYN [1-53], BPP 類のアミノ酸配列とジスルフィド結合様式。

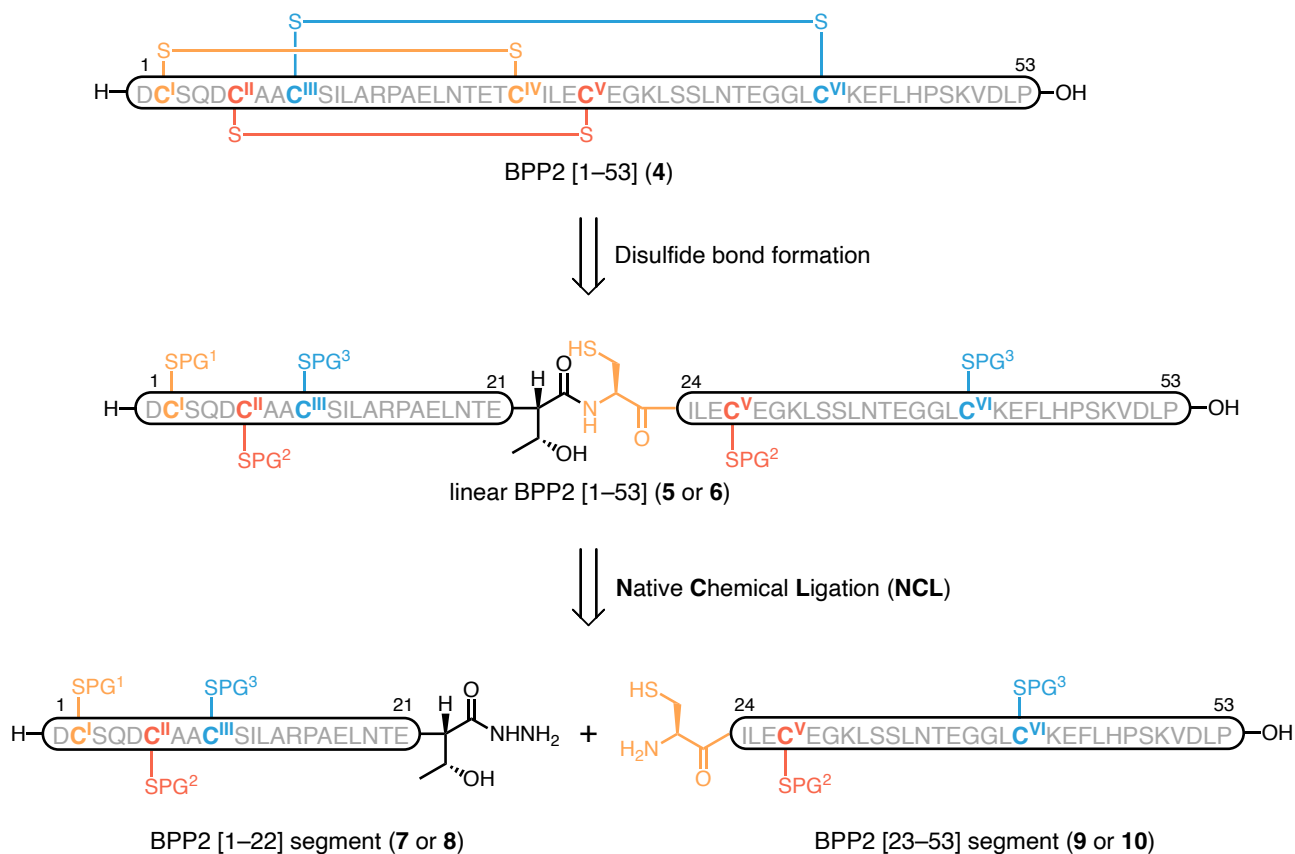
残基番号は BPP 類に対応している。 **B:** Type-I 構造の模式図。

2. BPP2 (4) の合成計画

第 1 章で述べたように天然品 BPP 類はトガリネズミの顎下腺から極微量しか得られておらず、天然品を用いたジスルフィド結合様式の解析は困難である。そこで、前節で推定した Type-I 構造の BPP 類を化学合成し、合成品と天然品の各種スペクトルデータや HPLC 保持時間、生物活性を比較することで、天然品 BPP 類の構造や機能を明らかにすることを目指した。

BPP2 (4) の逆合成解析を Scheme 1 に示す。4 は複数の Cys 残基の保護基 (PG¹-PG³) を含む一本鎖ペプチド 5 もしくは 6 から保護基を除去し、ジスルフィド結合を形成することで合成する。これらの Cys 残基の保護基 (PG¹-PG³) には後に述べるジスルフィド結合の形成計画に沿って、5 では全てに Acm 基を、6 では PG¹ = 無保護 (SH), PG² = Acm 基, PG³ = *t*Bu 基をそれぞれ使用することとした。5, 6 は BPP2 の N 末端側に対応する BPP2 [1-22] セグメント 7, 8 と C 末端側に対応する BPP2 [23-53] セグメント 9, 10 をそれぞれ Native Chemical Ligation (NCL) 法で連結して合成することとした。7-10 の各セグメントはペプチド合成において一般的な手法である Fmoc 固相合成法で調製することとした。

続いて 5, 6 の合成に用いる NCL 法について述べる。NCL 法とは 1994 年に Kent らによって報告されたタンパク質やペプチドを化学合成する手法の一つである。^[55, 56] NCL 法では C 末端にチオエステルを持つセグメントと N 末端に遊離の Cys 残基を持つセグメントの連結を中性の水溶液中で行う (Figure 6)。具体的な反応のメカニズムとしては、初めにセグメント 11 の C 末端チオエステルと、セグメント 12 の N 末端 Cys 残基のチオールとの間で可逆的な分子間チオエステル交換反応が起こり、*S*-アシルイソペプチド 13 が生成する。この際、12 の N 末端 Cys 残基のチオールは α -アミノ基との双性イオンを形成することで高い求核性を持つため、ペプチド鎖内部のチオールよりも優先して 11 のチオエステルと反応する。生成したイソペプチド 13 では近傍の α -アミノ基の求核攻撃による速やかかつ不可逆な分子内 *S* \rightarrow *N* アシル転位によってアミド結合が形成され、一本鎖ペプチド 14 が得られる。そのため NCL 法では無保護の 2 つのセグメントを位置選択的に連結することができる。



Combinations of Cys protecting groups

	PG ¹	PG ²	PG ³
5, 7, 9	Acm	Acm	Acm
6, 8, 10	H	Acm	tBu

Scheme 1. BPP2 [1-53] (4) の逆合成解析 PG¹⁻³: protecting group, Acm: acetamidomethyl

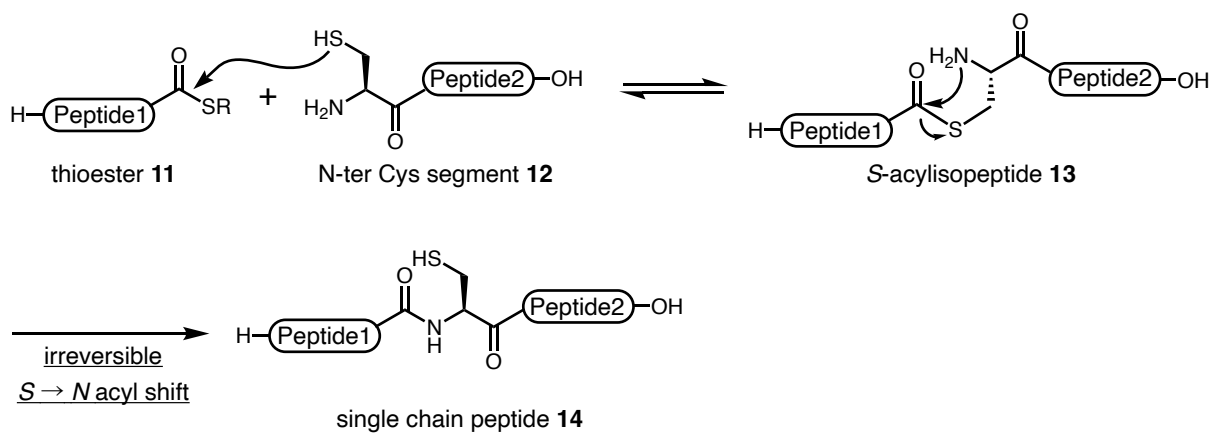


Figure 6. NCL の反応機構

反応溶媒への溶解性を考慮すると、NCL 法で連結する 2 つのセグメントの分子量は同程度であることが望ましい。この観点から、BPP 類の合成において 2 つのセグメントを連結する部位として Thr²²-Cys²³(IV) と Glu²⁶-Cys²⁷(V) の二つが候補として考えられた。しかし後者の場合にはグルタミン酸チオエステル **15** を C 末端チオエステルセグメントとして用いることになり、これは分子内で環化して環状無水物 **16** を形成する恐れがある (Figure 7)。さらに **16** が加水分解されるとカルボン酸 **17** が生じ、**16** ともう一方のセグメント **18** が反応してイソペプチド **19** が生じるなど、様々な副反応が起こる可能性がある。^[57, 58] このことから一本鎖ペプチド **5, 6** の合成における NCL の連結部位は Thr²²-Cys²³(IV) とし、対応する BPP2 [1-22] セグメント **7, 8** と BPP2 [23-53] セグメント **9, 10** をそれぞれ調製することとした。

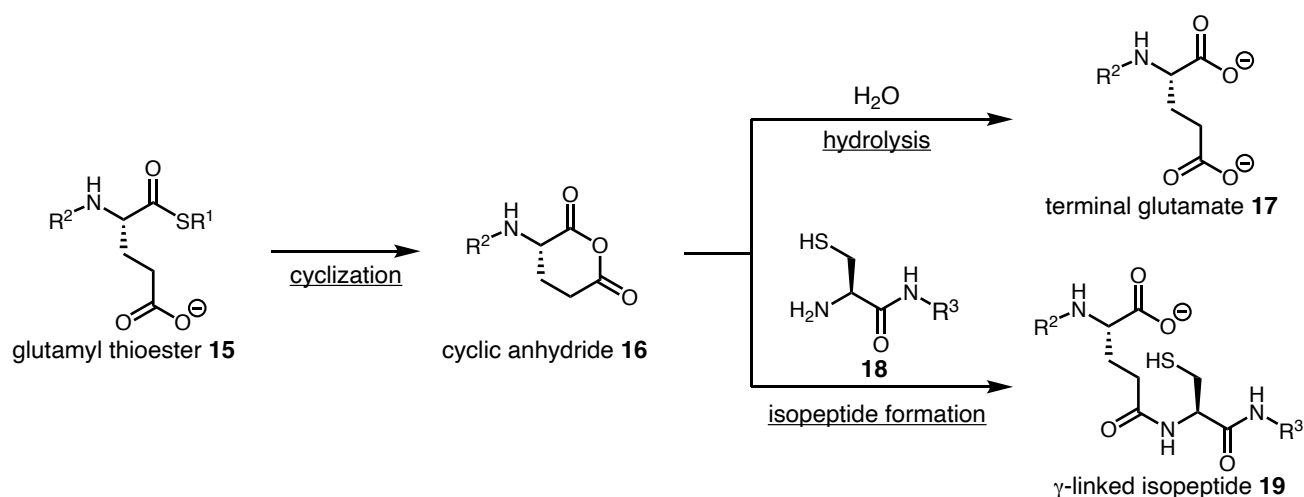


Figure 7. Glu²⁶-Cys²⁷(V) 部位の NCL で想定される副反応

保護基の除去に二級アミンを用いる Fmoc 固相合成法では、塩基性条件で不安定なチオエステルを直接調製することが難しい。そこで塩基性条件で安定なアシルヒドラジドを Fmoc 合成法で調製し、Cys セグメントと連結する前に液相法でチオエステルへと変換する Flood らの手法を用いることとした。^[59]

次に一本鎖ペプチド **5, 6** から BPP2 (**4**) を合成する上で必要な 3 組のジスルフィド結合を形成する計画について述べる (Figure 8)。Plan 1 では NCL によるセグメントの連結に必要な Cys²³(IV) 以外の 5 つの Cys 残基を全て AcM 基で保護した一本鎖ペプチド **5** を合成する。

次いでヨウ素酸化条件で **5** の Acm 基を一挙に除去し、そのまま系内で 3 組のジスルフィド結合を形成させる。この際、生成物のジスルフィド結合の位置は制御できないが、天然品 BPP2 が熱力学的に安定であれば、生成物はその構造に収束すると予想した。また Plan 2 では、BPP2 のジスルフィド結合の対となる Cys 残基同士が無保護もしくは Acm 基、*t*Bu 基で保護された一本鎖ペプチド **6** を合成する。Acm 基と *t*Bu 基はそれぞれ選択的に除去できるため、ジスルフィド結合を段階的に形成できる。この場合、Plan 1 よりも合成の工程数は増えるが、予想したジスルフィド結合様式 (Type-I) を持つ BPP2 (**4**) を選択的に合成できると考えた。

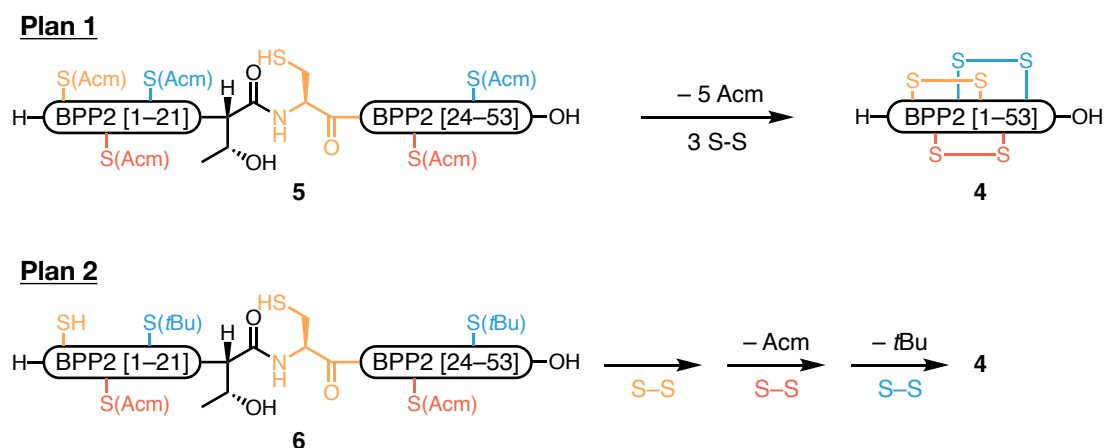
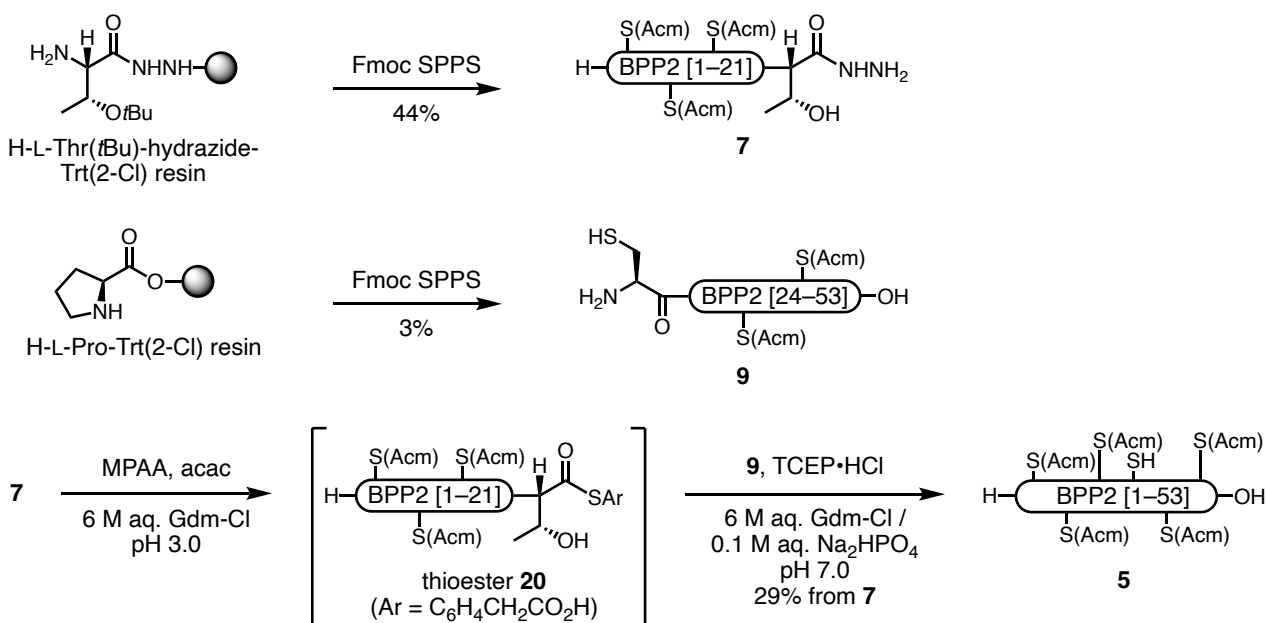


Figure 8. BPP2 (**4**) の合成計画

3. BPP2 (4) の合成 (1)

初めに Plan 1 の合成計画に沿って BPP2 (4) の合成を行った。

まず NCL に関与しない 5 つの Cys 残基が Acm 基で保護された一本鎖ペプチド **5** を合成した (Scheme 2). H-L-Thr(*t*Bu)-hydrazide-2-chlorotrityl 樹脂と H-L-Pro-2-chlorotrityl 樹脂をそれぞれ出発原料としてセグメント **7** と **9** を調製した. 固相合成終了後, それぞれのセグメントを TFA cleavage cocktail B^[60] を用いて樹脂から切り出し, 逆相 HPLC で精製した (**7**: 44%, **9**: 3%, 換算収率). **9** の収率が著しく低い原因は, **9** が 31 残基という比較的長鎖のセグメントであるため, 固相合成終盤の縮合効率が特に低下したためと考えている. 続いて **7** を酸性条件下 MPA, acac で処理してチオエステル **20** へと変換した後, **9** と TCEP を加えて室温下, 中性条件で 24 時間反応させた. なお TCEP は反応系内の還元条件を維持し, **9** の N 末端 Cys 残基の酸化を防ぐ目的で使用した. 反応混合物を逆相 HPLC で精製した結果, 一本鎖ペプチド **5** が単離収率 29% で得られた.



Scheme 2. 一本鎖ペプチド **5** の合成

次に一本鎖ペプチド **5** の 5 つの Acm 基の除去とジスルフィド結合の形成を一挙に行った (Figure 9A). **5** を酸性条件下でヨウ素と反応させ, ^[61] 得られた粗生成物を透析と逆相 HPLC

で精製した結果、BPP2 と分子量が等しいペプチドが主生成物として得られた。しかし、この合成品の HPLC 保持時間は天然品 BPP2 とは全く一致しなかった (Figure 9B)。そこで合成品を Glu-C で消化し、得られた断片ペプチドを MALDI MS, MS/MS で解析した。その結果、Type-I 構造の BPP2 (4) ではなく Cys(I)-Cys(VI), Cys(II)-Cys(III), Cys(IV)-Cys(V) のジスルフィド結合様式を持つ異性体 21 が得られたことが判明した (Figure 9C)。

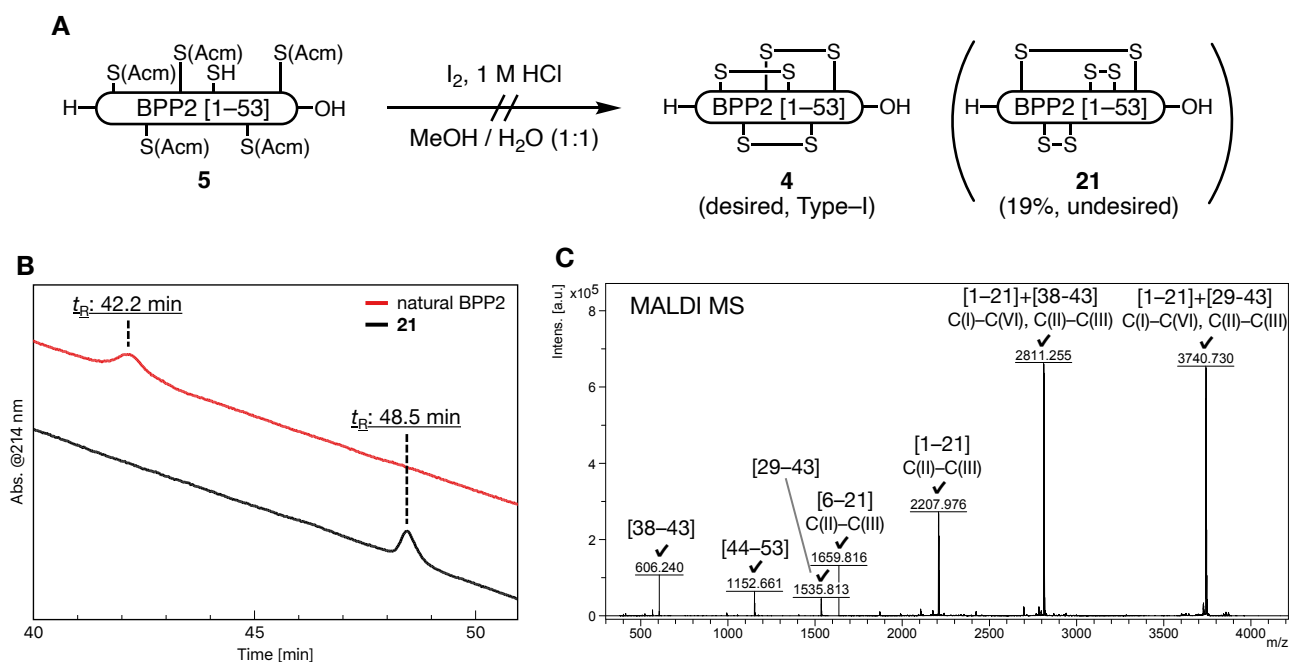


Figure 9. A: BPP2 (4) の合成 1 B: 天然品 BPP2 と 21 の HPLC 保持時間の比較.

C: 21 の酵素消化断片ペプチドの MALDI MS

HPLC condition:

Develosil® RPAQUEOUS-AR-5 (ϕ 4.6 mm x L 250 mm, C30) at 23 °C, 20–50% aq. MeCN / H₂O (containing 0.05–0.1% HFBA) for 60 min, flow: 0.5 mL/min.

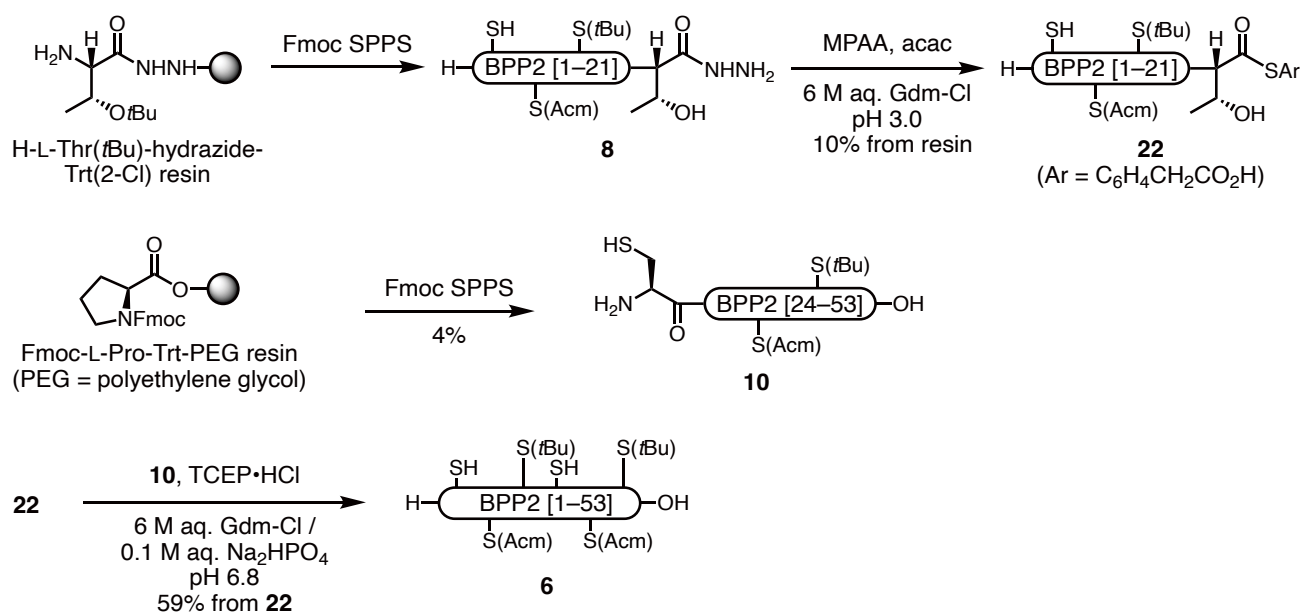
望まない異性体 21 が生じた理由について次のように考察した。21 は Type-I 構造には見られない Cys(II)-Cys(III) と Cys(IV)-Cys(V) というジスルフィド結合を含んでいた。前者は Cys(II)-Ala-Ala-Cys(III) というジスルフィドループ構造を特に容易に形成しやすい配列であったため、^[62] また後者は Cys 残基間のアミノ酸残基数が 3 残基と比較的距離が近かったため、これらの望まないジスルフィド結合の形成が優先し、残った Cys(I)-Cys(VI) が最後に

形成されたと考えられる. 以上より, **Acm** 基の除去と全てのジスルフィド結合の形成を一挙に行う条件では **BPP2 (4)** が得られないことが分かった.

4. BPP2 (4) の合成 (2)

続いて Plan 2 の合成計画に沿って BPP2 (4) の合成を行った。

一本鎖ペプチド **6** の合成を Scheme 3 に示す。まず、**5** の合成と同様に **6** に対応するセグメント **8, 10** を Fmoc 固相合成法で調製した。アシルヒドラジドセグメント **8** の Cys 残基の保護基は Cys(I) = 無保護 (SH), Cys(II) = AcM 基, Cys(III) = *t*Bu 基とした。また N 末端が Cys 残基のセグメント **10** については Cys(IV) = 無保護 (SH), Cys(V) = AcM 基, Cys(VI) = *t*Bu 基とした。固相合成終了後、**8** には分離困難な副生成物が含まれていたため粗生成物のままチオエステル化を行い、逆相 HPLC で精製してチオエステル **22** を得た。また **10** の合成では、長鎖のペプチド合成に使用される PEG 樹脂を用いた固相合成も検討したが、収率の改善は見られなかった。次いで NCL 法で **10** と **22** を連結し、一本鎖ペプチド **6** を単離収率 59% で得た。



Scheme 3. 一本鎖ペプチド **6** の合成

続いて段階的な Cys 残基の脱保護とジスルフィド結合の形成を行った (Figure 10A).

まず **6** における無保護の Cys 残基を空気酸化し、Cys(I)–Cys(IV) 間のジスルフィド結合を持つ **23** を収率 86% で得た。次に **23** の AcM 基で保護された Cys 残基をヨウ素で脱保護

し, ^[61]Cys(II)–Cys(V) 間のジスルフィド結合を持つ **24** を収率 50%で得た. 最後に **24** を 5% DMSO / TFA 条件で反応させ, *t*Bu 基の除去と Cys(III)–Cys(VI) 間のジスルフィド結合形成を行った. ^[63] その結果, 望むジスルフィド結合様式 (Type-I) を持つ **4** が単離収率 66%で得られた. しかし合成品 **4** の HPLC 保持時間も天然品 BPP2 とは一致しなかった (Figure 10B).

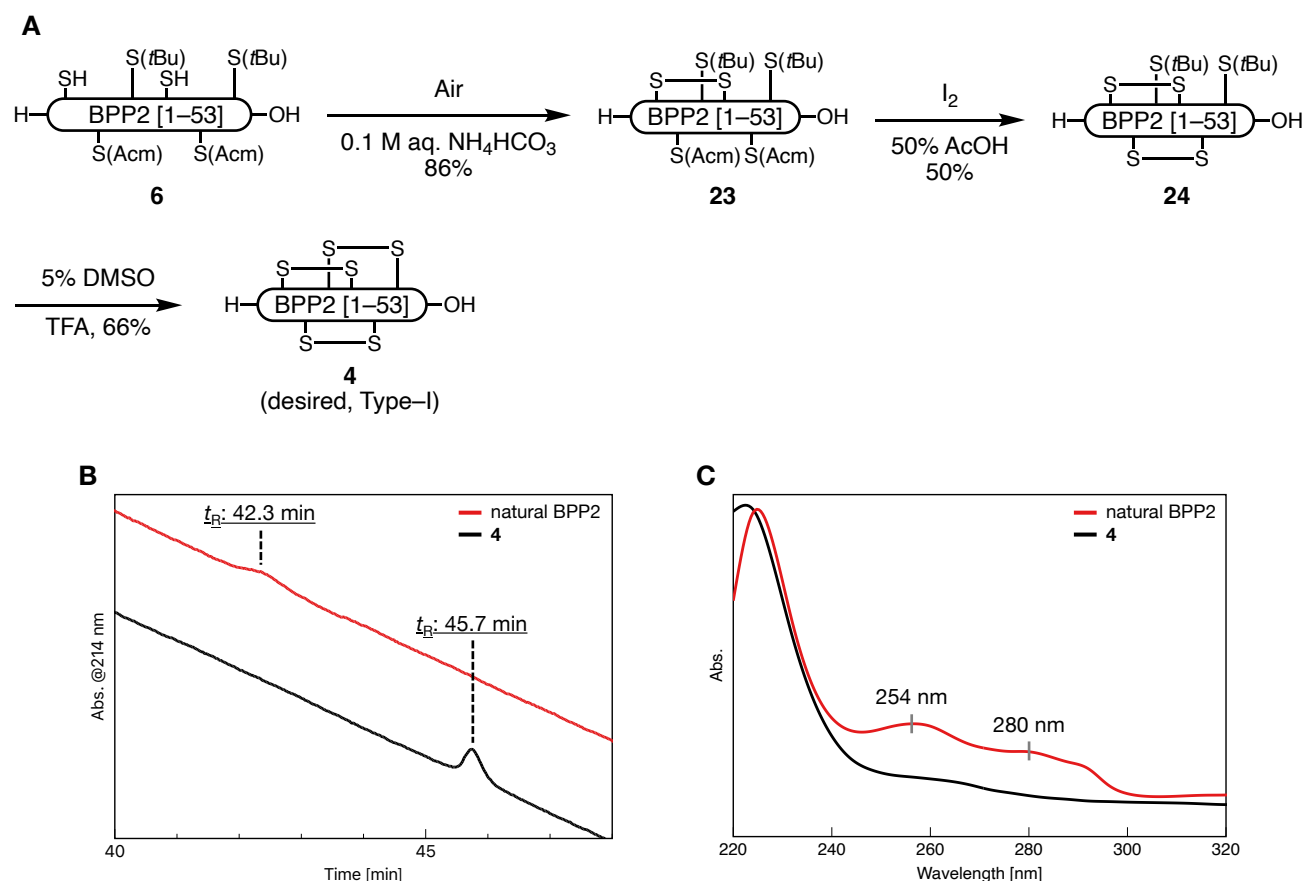


Figure 10. **A:** BPP2 (**4**) の合成 **B:** 天然品 BPP2 と **4** の HPLC 保持時間の比較.
C: 天然品 BPP2 と **4** の UV スペクトル比較.

HPLC condition:

Develosil® RPAQUEOUS-AR-5 (φ 4.6 mm x L 250 mm, C30) at 23 °C, 20–50% aq. MeCN / H₂O (containing 0.05–0.1% HFBA) for 60 min, flow: 0.5 mL/min.

ここで天然品 BPP2 と **4** の UV スペクトルを比較したところ、天然品では 254 nm および 280 nm 付近に吸収極大が見られる一方で、**4** ではほとんど吸収が見られなかった (Figure 10C). 280 nm 付近に強い UV 吸収極大を持つアミノ酸残基としてはチロシン (Tyr) とトリプトファン (Trp) が知られるが、これまでに述べた BPP 類のアミノ酸配列にはいずれのアミノ酸残基も含まれていない。以上の結果から当初決定された BPP 類のアミノ酸配列が誤っていることが示唆されたため、これを再検討することとした。

5. BPP 類のアミノ酸配列の訂正

天然品 BPP 類のアミノ酸配列は、ジスルフィド結合の還元 *S*-アルキル化と酵素消化により得られた断片ペプチドを MS, MS/MS 解析することで決定された。^[44] しかし Ile / Leu 残基や Gln / Lys 残基は質量が同一もしくは近い値を持つことから区別が困難であり、該当する部分は BPP 類と類似のアミノ酸配列を持つ soricidin を参考にして配列を推定していた。

2020 年、Hanf らはブラリナトガリネズミの顎下腺における発現遺伝子のトランスクリプトーム解析と顎下腺抽出物に含まれる成分のプロテオーム解析を報告した。^[34] これらの公開データに基づいてブラリナトガリネズミの proenkephalin に関する mRNA 配列 (EMBL-EBI, Sequence ID: MT559766) を確認したところ、前節で合成した BPP2 (4) の配列とは Glu³⁷-Gly³⁸ → Trp³⁷ および Leu⁴⁰ → Ile³⁹ という 3 つのアミノ酸残基の差異があることが判明した (Figure 11A)。Glu³⁷-Gly³⁸ と Trp³⁷ については Glu³⁷-Gly³⁸ のアミノ酸残基分の質量が 129.04 (Glu) □ 57.02 (Gly) □ 186.06 であり Trp³⁷ □ 186.08 との質量差が小さく、また Leu⁴⁰ と Ile³⁹ は同一の質量である。そのためこれまでの BPP 類の MS/MS 解析における帰属が誤っていた可能性が考えられた。そこで天然品 BPP2 由来の断片ペプチドの MS/MS データを精査した結果、Glu³⁷-Gly³⁸ 間の結合を支持する *b* および *y* 系列のフラグメントイオン、および Leu と Ile を区別できる側鎖構造特有の *d* イオン^[64] はいずれも観測されていなかった。一方で上記の MS/MS 解析で観測されたフラグメントイオンを訂正後のアミノ酸配列である Trp³⁷-Gly³⁸-Ile³⁹ に当てはめて再度帰属すると、*b*₈*b*₁₁ および *y*₃*y*₆ のように帰属できる (Figure 11B)。従ってブラリナトガリネズミの proenkephalin の遺伝子情報に基づく Trp³⁷-Gly³⁸-Ile³⁹ という新たなアミノ酸配列は、天然品の MS/MS データと矛盾しないことが分かった。また天然品 BPP1 についても、Glu-C 消化により得られた断片ペプチドの MALDI MS/MS において天然品 BPP2 由来の断片ペプチド [29-42] と同じフラグメントイオンが観測されたことから、上記の Trp³⁷-Gly³⁸-Ile³⁹ という配列を持つことが判明した。

以上より BPP1,2 のアミノ酸配列について Glu³⁷-Gly³⁸ → Trp³⁷, Leu⁴⁰ → Ile³⁹ という訂正を行い、それぞれを 47,52 残基からなる一本鎖ペプチドへと改訂した。次章では、改訂後の BPP2 を合成して天然品と比較することでジスルフィド結合様式を含めた BPP 類の構造を決定し、詳細な生物活性の解明を目指すこととした。

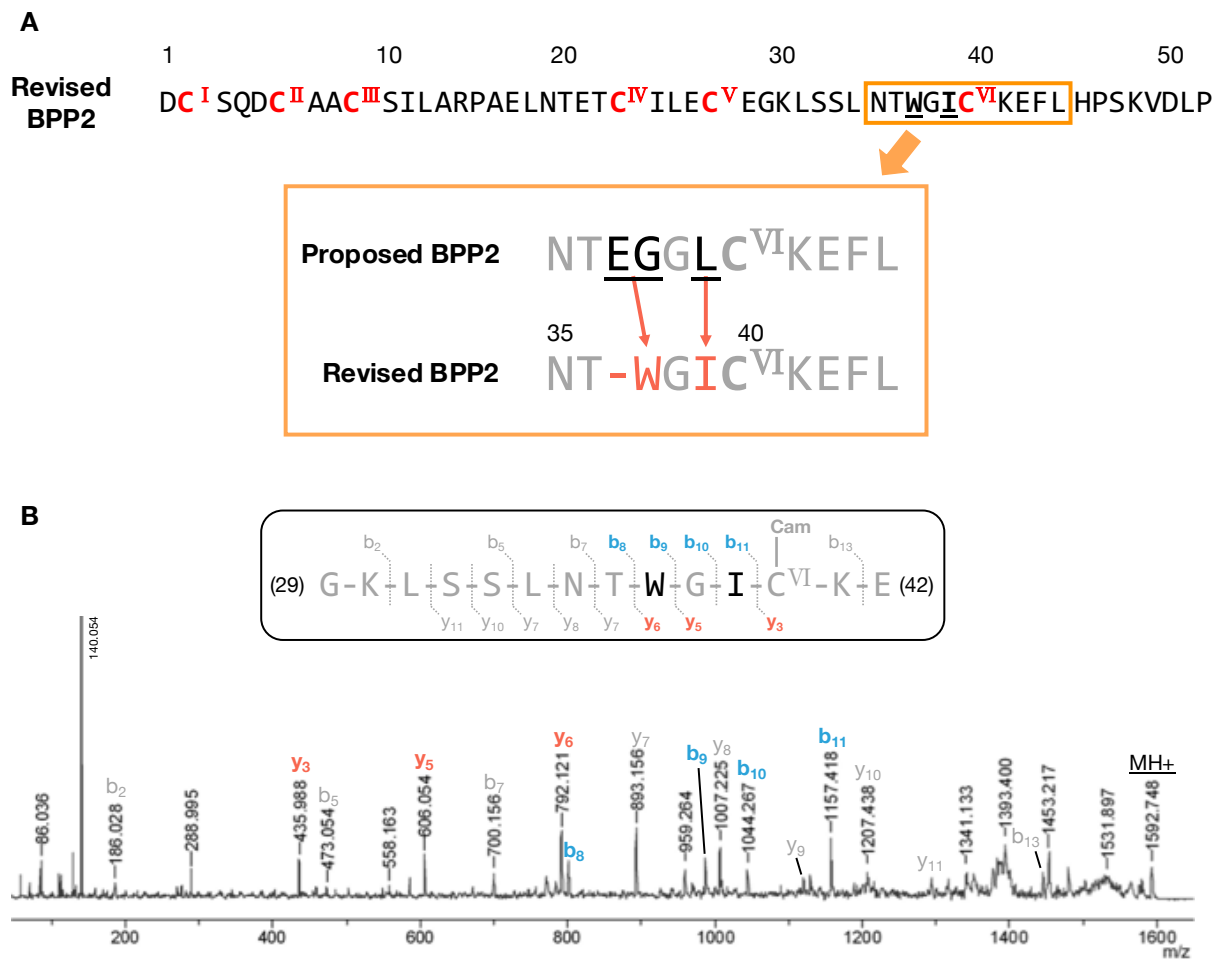


Figure 11. **A:** 改訂 BPP2 のアミノ酸配列. 橙色の枠内に訂正前後の配列を示した. (訂正前: 上, 訂正後: 下) **B:** Glu-C 消化で得られた天然品 BPP2 由来の断片ペプチド [29-42] の MALDI MS/MS 解析. *Cam = carbamidomethyl

第3章 改訂 BPP2 の合成とジスルフィド結合様式の解析

1. BPP 類の立体構造予測

アミノ酸配列を訂正した BPP2 の合成に先立ち、BPP 類のジスルフィド結合様式についても再検討することとした。ジスルフィド結合はペプチドの立体構造において空間的に近距離に位置する Cys 残基間で形成される。そのため BPP 類の立体構造が予測できれば、ジスルフィド結合様式に関する新たな情報も得られると考えた。

これまでタンパク質やペプチドの立体構造は X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡法、NMR 解析といった手法によって実験的に決定されてきた。一方、近年では計算化学的手法による立体構造の予測方法についても盛んに研究されている。^[65] その代表例として SWISS-MODEL などのホモロジーモデリング法が挙げられる。^[66] ホモロジーモデリング法とは「類似のアミノ酸配列を持つ分子は類似の立体構造を持つ」という前提に基づいてタンパク質やペプチドの立体構造を予測する手法である。^[67] したがって、鋳型となる分子の立体構造情報が無いと、本手法のみでは未知分子の立体構造を予測することはできない。実際、SYN や PENK、および配列類似ペプチド・タンパク質に関する X 線回折や NMR 法による構造はこれまで報告されておらず、BPP 類では本法を適用することができなかった。

そこで鋳型構造を必要とせず、アミノ酸配列情報のみから立体構造を予測できる ColabFold^[68] (AlphaFold2^[69] の Google Colaboratory 版) プログラムを利用して BPP2 の立体構造を予測した。ColabFold によって得られた 5 つの予測立体構造を重ね合わせたものを Figure 12A に示す。これら 5 つの立体構造は特にコア構造 (Cys²-Cys⁴⁰) の部分がお互いに類似しており、いずれも 3 つの α -ヘリックス構造が 3 組のジスルフィド結合で架橋された構造を取っていた。さらに、これらの予測立体構造では、rSYN や第 2 章で合成した BPP2 (4) のジスルフィド結合様式 (Type-I 構造) とは異なり、Cys(I)-Cys(V), Cys(II)-Cys(IV), Cys(III)-Cys(VI) という新たなジスルフィド結合様式 (Type-II 構造) を与えた (Figure 12B)。両者を比べると Cys(I), Cys(II) の対となる残基が Type-I では Cys(IV), Cys(V) であるのに対し、Type-II では Cys(V), Cys(IV) となっている点異なる。以上の結果から、BPP 類は当初推定した Type-I 構造に限らず、Type-II 構造のジスルフィド結合様式を持つ可能性も示された。

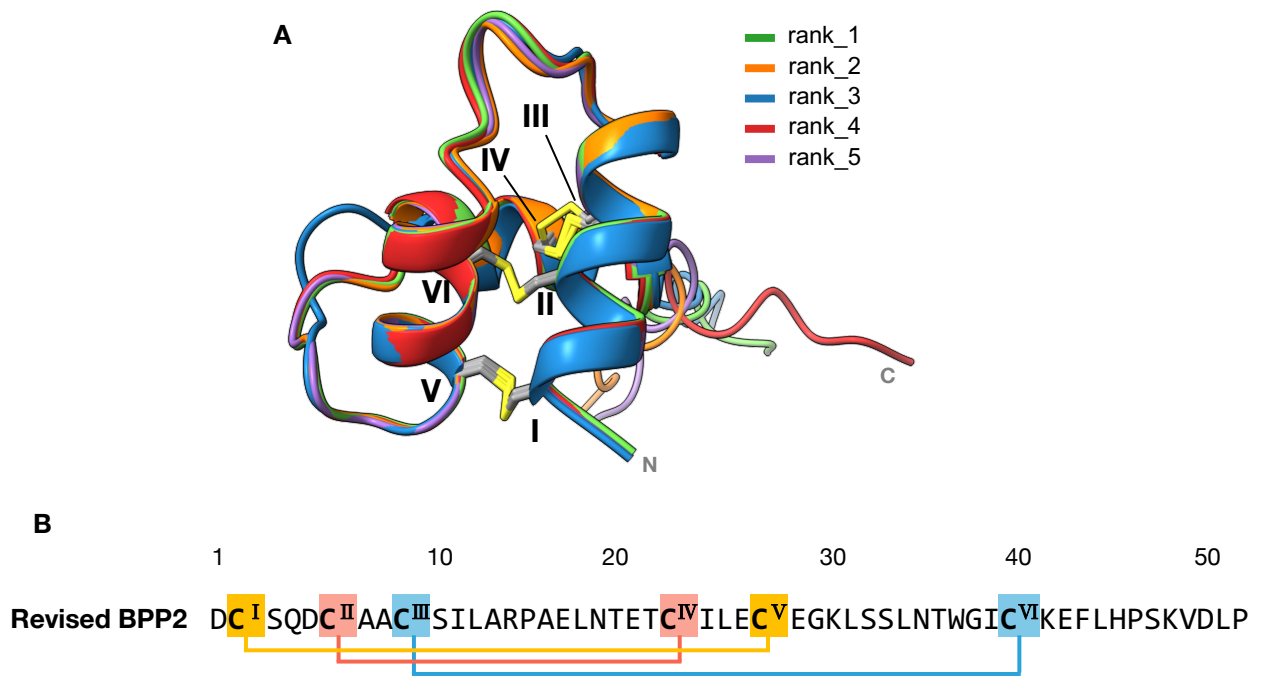
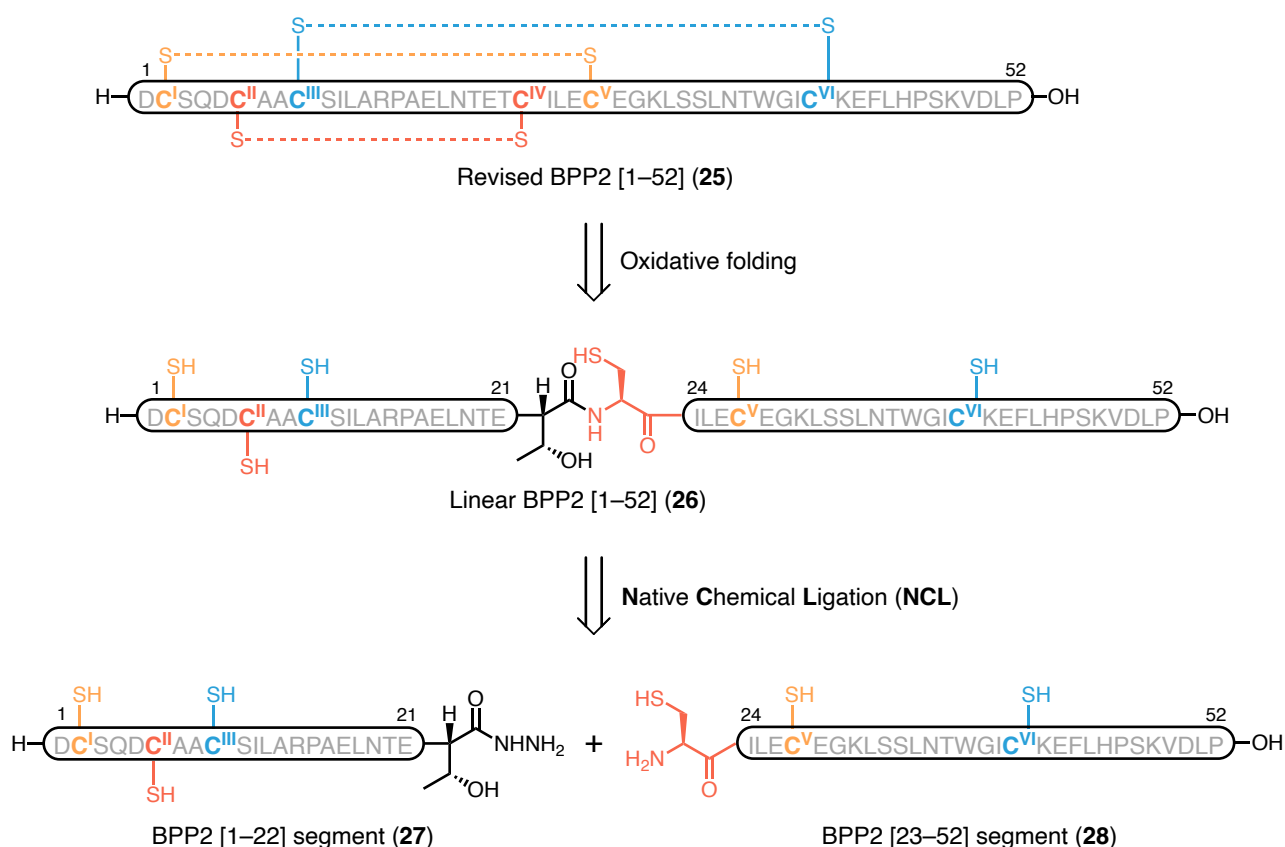


Figure 12. **A:** ColabFold プログラムで得られた配列改訂後の BPP2 の予測立体構造 (Figure. 31 参照). Rank1-5 は予測の信頼性を示す指標である pLDDT スコアが高い順に順序付けられている. **B:** 改訂 BPP2 のジスルフィド結合様式 (Type-II 構造)

2. Revised BPP2 (25) の合成

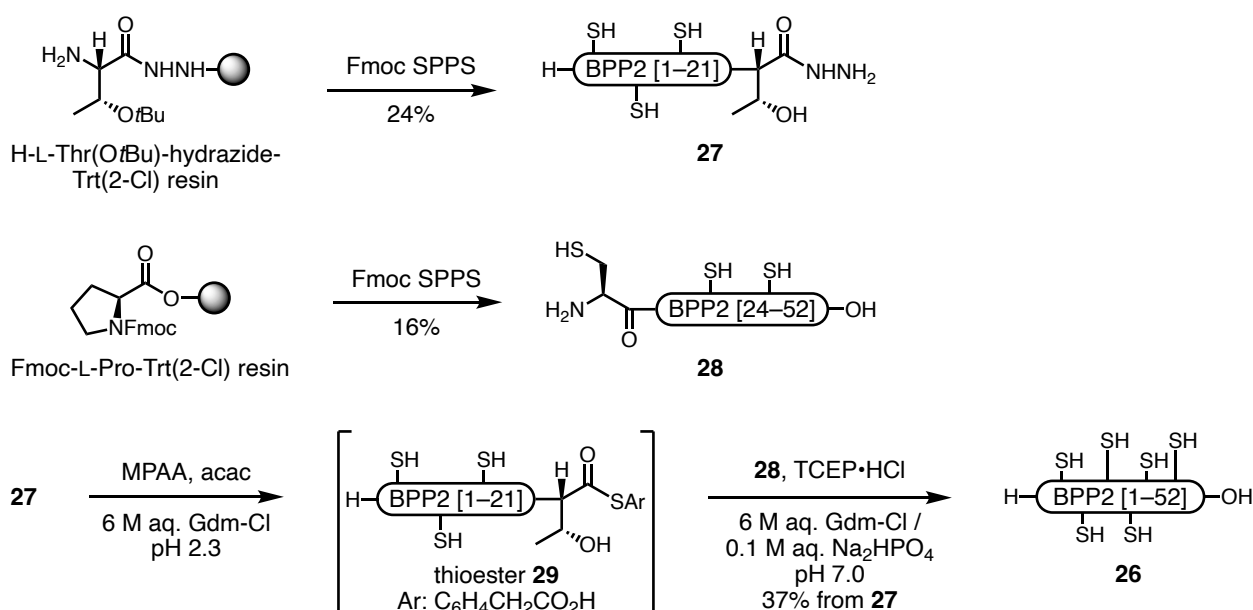
第2章第5節でアミノ酸配列を訂正した BPP2 (以降, revised BPP2 と呼ぶ) の合成を行った. Revised BPP2 (25) の逆合成解析を Scheme 4 に示す. 前節で述べた通り, 25 は6つの Cys 残基が全て無保護の一本鎖ペプチド 26 の酸化的フォールディングにより合成することとした. また 26 は第2章第3節と同様に, アシルヒドラジド [1–22] セグメント 27 と N 末端が Cys 残基の [23–52] セグメント 28 を用いた NCL 法で合成することとした. 前節で述べたように, 酸化的フォールディングでは特定のジスルフィド結合様式を持つものを選択的に合成することは難しいと予想されるが, 複数の条件でフォールディングを検討することで HPLC の保持時間が天然品と一致する生成物を取得し, それを解析することで天然品 BPP2 のジスルフィド結合様式を決定することとした.



Scheme 4. Revised BPP2 (25) の逆合成解析

(便宜上, 25 の構造は Type-II で表記した)

まず、改訂 BPP2 の 1-52 残基をもつ、全ての Cys 残基が無保護の一本鎖ペプチド **26** を合成した (Scheme 5). 第 2 章と同様に、対応するセグメント **27**, **28** を Fmoc 固相合成法で調製した. 続いてヒドラジドセグメント **27** を MPAA, acac でチオエステル **29** に誘導し、さらに **28** を加えて両者を連結することで一本鎖ペプチド **26** を収率 37% で得た. なおこれまでの Fmoc 固相合成の結果と比較して **27** の収率が向上したのは、固相合成に用いる装置を第 2 章の合成で用いていた Initiator+ SP Wave (Biotage) から CS136X synthesizer (CSBio) に変更したことで固相合成終了後の粗生成物の純度が向上したためであると考えられる.



Scheme 5. 一本鎖ペプチド **26** の合成

続いて **26** から 3 組のジスルフィド結合を一挙に形成する反応を検討した. 第 2 章第 3 節では Cys 残基が Acm 基で保護された一本鎖ペプチド **5** を原料としていたため、酸性条件下ヨウ素を酸化剤として用いて Acm 基の除去とジスルフィド結合形成を同時に行っていた. 一方で **26** の Cys 残基は無保護であるため保護基の除去は必要ない. そこで今回はより一般的なジスルフィド結合形成法である空気酸化を実施した.

一本鎖ペプチド **26** を 0.1 M aq. NH_4HCO_3 (pH: 7.8) 中、空気酸化で処理した結果ジスルフィド結合の形成が進行し、BPP2 と同一の分子量を持つ複数の生成物が得られた (Figure 13A). このうち **25** の分子量および HPLC 保持時間が天然品と一致した ($t_r = 40.9$ min) (Figure 13B,

C). 一方で複数のピークとして観測された他の生成物 (*, t_R : 12 – 18 min) については, BPP2 と分子量は一致するが HPLC 保持時間は BPP2 一致しないことから, ジスルフィド結合の様式が異なる BPP2 の異性体 (ミスフォールド体) が複数生じたと考えられた.

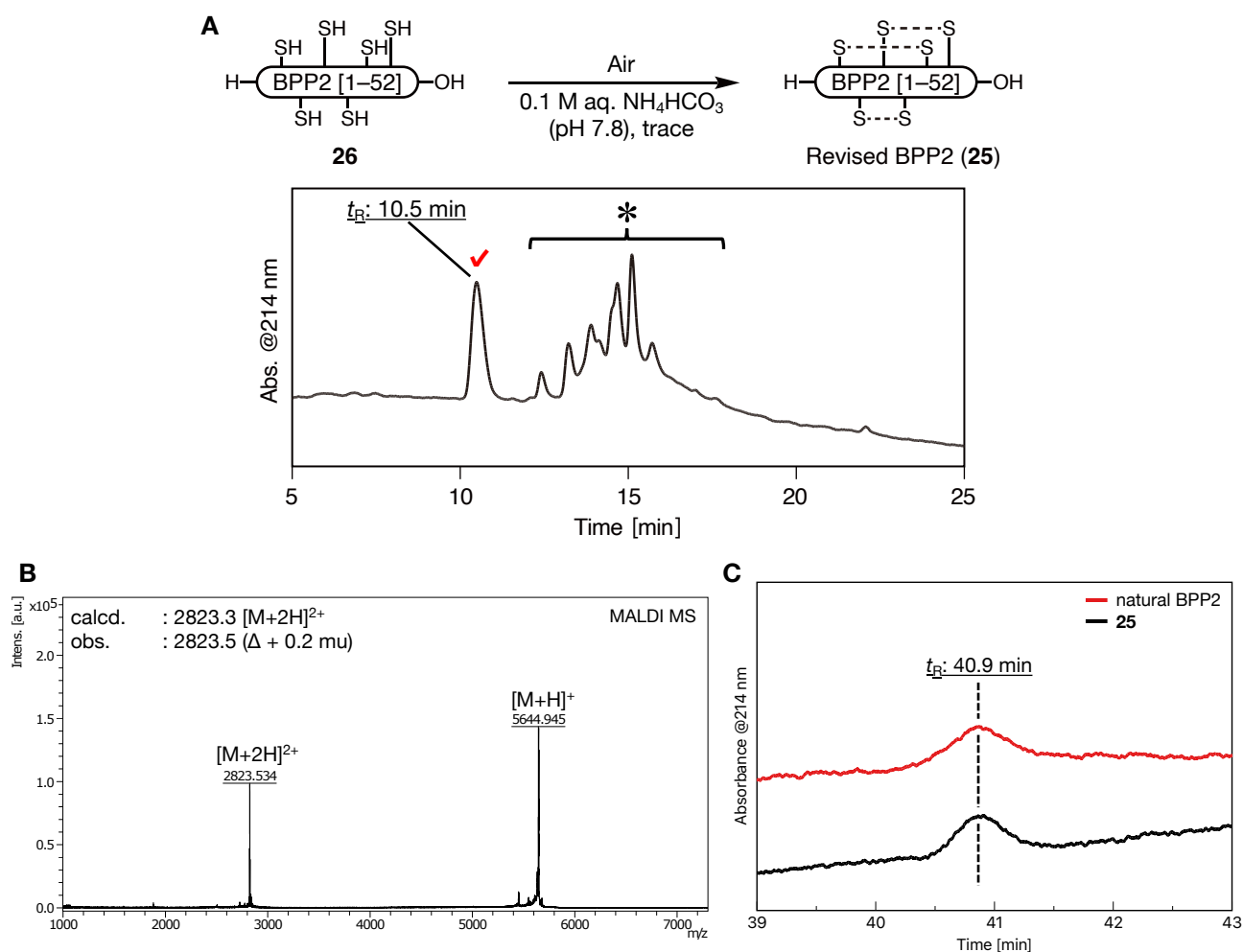


Figure 13. A: revised BPP2 (25)の合成 1.

✓: revised BPP2 (25), *: ジスルフィド結合を3組持つミスフォールド体.

B: 25 の MALDI MS. C: 天然品および 25 の HPLC 保持時間の比較.

HPLC conditions:

A. Develosil[®] ODS-HG-5 (ϕ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 °C, 25–55% aq. MeCN / H_2O (containing 0.08–0.01% TFA) for 30 min, flow: 1.0 mL/min.

C. Develosil[®] RPAQUEOUS-AR-5 (ϕ 4.6 mm x L 250 mm, C30) at 23 °C, 20–50% aq. MeCN / H_2O (containing

0.054–0.06% HFBA) for 60 min, flow: 0.5 mL/min.

次に収率の改善を目指して、**26** のフォールディング条件をさらに検討した。**26** からの温和な空気酸化によって得られたことから、BPP2 (**25**) が熱力学的に安定なものと予想して、cystine / cysteine を酸化還元剤として用いる条件^[70]で **26** のフォールディングを行った (Figure 14)。この条件では反応系中が cystine / cysteine によって酸化還元平衡状態に保たれるため、ジスルフィド結合の形成と切断が可逆的に進行する。したがって生成物は熱力学的に安定な構造に収束すると予想される。種々の検討の結果、20% EtOH / 0.1 M aq. NH₄OAc (pH: 8.5) で本反応を行うと生成物はほぼ単一に収束し、**25** が収率 78% で得られた (t_R : 10.5 min)。

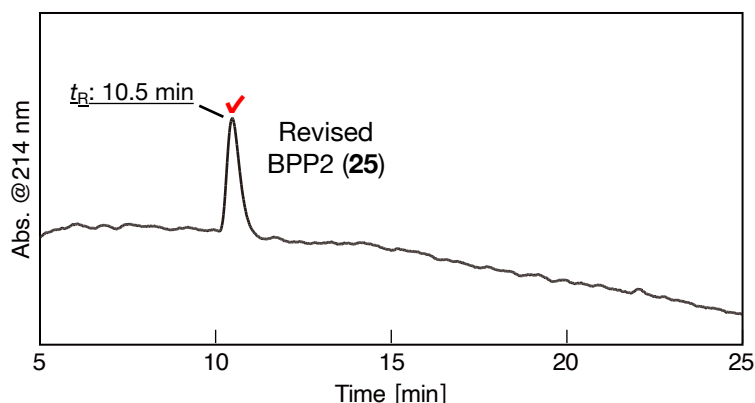
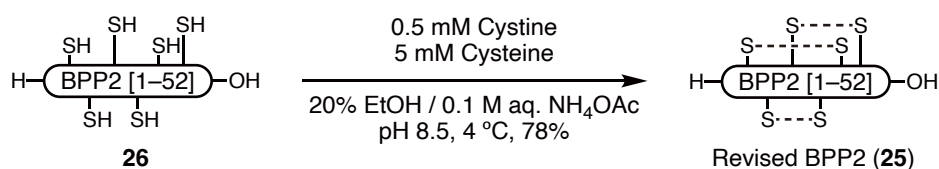


Figure 14. Revised BPP2 (**25**) の合成 2

HPLC condition:

Develosil[®] ODS-HG-5 (ϕ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 °C, 25–55% aq. MeCN / H₂O (containing 0.08–0.01% TFA) for 30 min, flow: 1.0 mL/min.

なお **26** を 0.1 M aq. NH₄HCO₃ 中、空気酸化した際に生じた BPP2 の異性体混合物 (Figure 13A, *, t_R : 12–18 min) についても、上記の cystine / cysteine を用いた酸化還元条件で処理す

るとジスルフィド結合の組み換え反応が進行し、ほぼ単一の生成物として **25** を与えた。このことから、**25** は他の異性体よりも熱力学的に安定な構造を持つことが示された。

一般に、天然に存在する多くのペプチドやタンパク質は、適切なフォールディングを経て親水性アミノ酸残基が分子表面に露出した熱力学的に安定な立体構造をとる。**25** はミスフォールドした他の異性体と比べて逆相 HPLC における保持時間が短く、表面の親水性がより高いと考えられる。このことから **25** は適切なフォールディングを経て形成された、より熱力学的に安定な構造を持つと考えられる。

ここで得られた **25** は全ての Cys 残基が無保護の **26** から 3 組のジスルフィド結合を一挙に形成させて合成したため、そのジスルフィド結合様式はこの時点では不明であった。そのため **25** を部分的に酵素消化して得られる断片ペプチドの MS/MS 解析、ならびに **25** の CD スペクトルによる二次構造の解析により、**25** の構造を詳細に解析することとした。

3. Revised BPP2 (**25**) のジスルフィド結合様式の解析

合成品 **25** のジスルフィド結合様式を決定するために、**25** のジスルフィド結合を残したまま酵素消化して得られる断片ペプチドの MS/MS 解析を検討した。**25** を 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液に溶解し Glu-C を加えた後、酵素消化を促進する目的で界面活性剤 (ProteaseMAX™ Surfactant, Promega) を添加し、37°C で 18 時間反応させた (Figure 15A)。しかし反応はほとんど進行せず、Glu⁴²-Phe⁴³ 間が切断されて生じた Asp¹-Glu⁴² (**30**, [M+H]⁺_{Obs.} = 4512.0, Δ +0.1 Da) と Phe⁴³-Pro⁵² (**31**, [M+H]⁺_{Obs.} = 1152.6, Δ ±0.0 Da) という 2 つの断片ペプチドのみがわずかに生じた (Figure 15B, C)。この反応では **30** がさらに酵素で分解した断片ペプチドは観測されなかったことから、3 組のジスルフィド結合を含む BPP2 のコア構造は強固な立体構造をしており、酵素消化に対して非常に安定であることが示唆された。

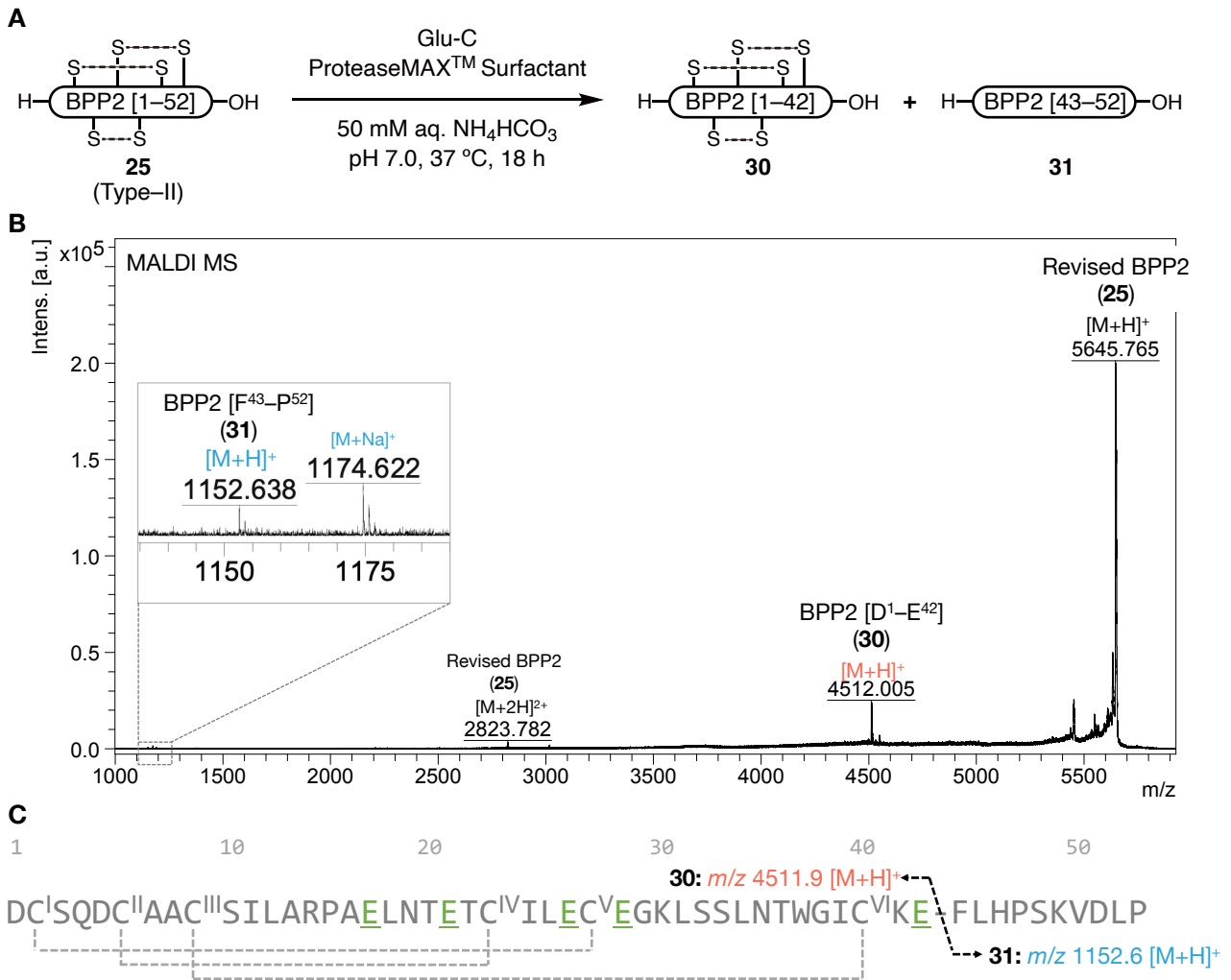


Figure 15. **A:** revised BPP2 (25) の酵素消化 **B:** 酵素消化産物の MALDI MS
C: 25 の消化断片ペプチド。酵素消化を受けるアミノ酸残基を緑で示した。

以上より、25 の 3 つのジスルフィド結合を全て残したまま酵素消化することは難しいと考えられたため、次に 25 のジスルフィド結合を部分的に切断して酵素消化を行った。^[71,72] 実験の流れを Figure 16 に示す。まず初めに 25 の一部のジスルフィド結合を穏やかな還元剤である TCEP でランダムに切断し、生じたチオールを *N*-ethylmaleimide (NEM) で *S*-アルキル化する。得られた混合物を逆相 HPLC で精製し、2 組もしくは 1 組のジスルフィド結合が残った部分還元ペプチド (2SS or 1SS peptides) をそれぞれ単離する。この際に 25 のジスルフィド結合がランダムに開裂すれば、理論上 3 種の 2SS ペプチドと 3 種の 1SS ペプチドが部分還元ペプチドとして得られる。続いてこれらの断片ペプチドを HPLC で分離した後、

残りのジスルフィド結合を DTT で全て還元し, iodoacetamide (IAM) で S-アルキル化する。こうして得られた鎖状ペプチドを酵素消化した後 NEM と IAM の 2 種類でアルキル化された Cys 残基の位置を MS/MS 解析により決定することで, 元の **25** におけるジスルフィド結合様式を推定することとした。

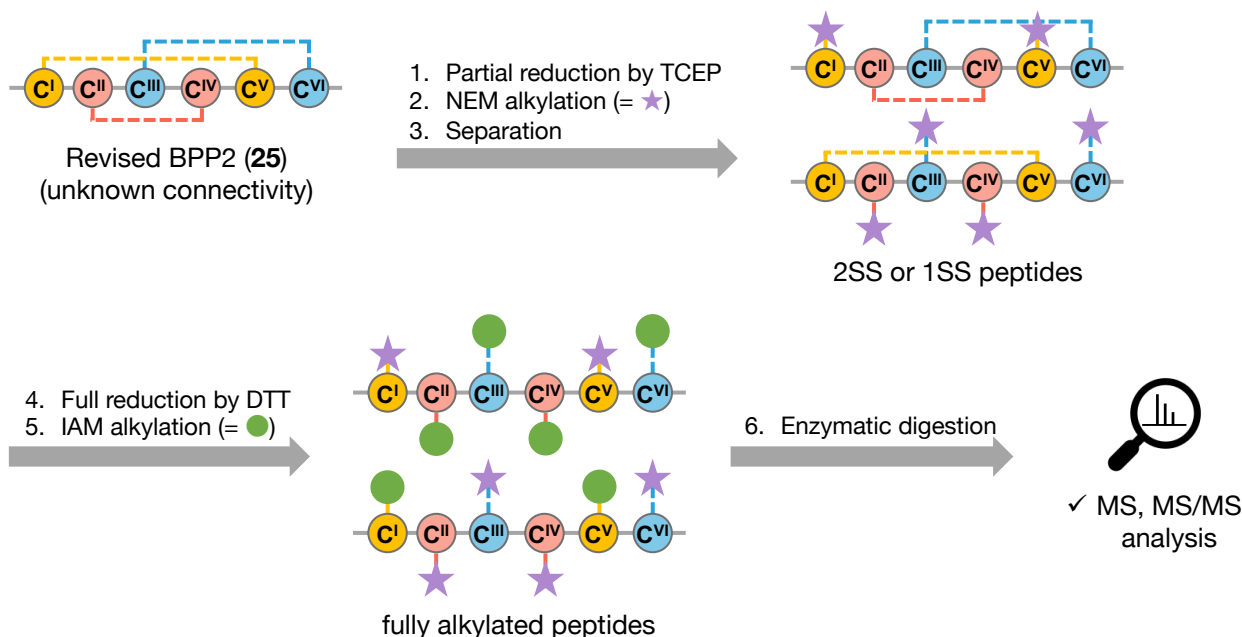


Figure 16. Revised BPP2 (**25**) のジスルフィド結合様式解析の概要

この手法では最初の TCEP 還元で部分還元ペプチド (2SS・1SS) を効率よく生成させることが特に重要である。仮にジスルフィド結合が全く還元されない (3SS を与える) か, 全てのジスルフィド結合が還元されてしまう (0SS を与える) と, 元のジスルフィド結合の組み合わせは決定できない。そこで TCEP の当量, 反応温度, 反応時間を中心に条件を詳しく検討した (Figure 17)。 ω -conotoxin GVIA を用いた予備検討で良好な結果が得られた条件^[73] (entry 1) では, **25** のジスルフィド結合は僅かしか還元されず, 主に原料と微量の 2SS 体のみが得られた。次に反応時間を 10 分間に延長し, **25** の濃度を 2 倍高くしたところ, ほとんどのジスルフィド結合が完全に還元された (entry 2)。一方で反応温度を 40 °C に下げたところ, ジスルフィド結合は全く還元されなかった (entry 3)。以上から **25** の還元剤に対する反応性は ω -conotoxin GVIA よりも低いことが判明したため, 反応系に MeCN を加えて基質の

溶解性を向上させて還元反応の促進を狙ったが, entry 1 と同様にジスルフィド結合は僅かしか還元されなかった (entry 4). [74] 次に **25** を 6 M aq. Gdm-Cl で予め変性させてから TCEP で処理した結果, ジスルフィド結合の還元は 65 °C で速やかに進行し, 30 分間で全てのジスルフィド結合が還元された (entry 5). [75] そこで, Gdm-Cl 変性処理後, 添加する TCEP を 3 当量まで減らし, 反応時間も 15 分間に短縮した結果, ジスルフィド結合の還元が途中で停止し, 複数の NEM アルキル化ペプチドが主成分として得られた (entry 6).

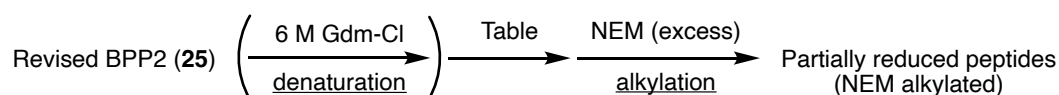


Table. Partially reduced conditions

entry	TCEP (eq.)	temp. (°C)	time (min)	25 conc. (μM)	denaturation*	additive	results
1	50	64	5	440			△
2	50	64	10	880			×
3	50	40	10	440			×
4	200	37	40	100		20% MeCN	△
5	30	65	30	250	○		×
6	3	65	15	770	○		○

Figure 17. Revised BPP2 (**25**) の部分的なジスルフィド結合の還元条件の検討

結果については, ×: 3SS あるいは OSS のみが得られた, △: わずかに部分還元が進行した, ○: 良好に部分還元が進行した, と区別した.

Entry 6 の条件で得られた反応混合物を逆相 HPLC で精製し, 1 組のジスルフィド結合が還元・*S*-アルキル化された 2SS-a (**32**), 2SS-b (**33**) および 2 組のジスルフィド結合が還元・*S*-アルキル化された 1SS-a (**34**), 1SS-b (**35**) をそれぞれ単一の化合物として得た (Figure 18). 反応混合物にはジスルフィド結合が還元されなかった **25** (3SS) や全てのジスルフィド結合が還元・*S*-アルキル化された **36** (0SS) も含まれていたが, HPLC でそれぞれ完全に分離した. なお * で示したピークに 1SS-c が含まれることを MALDIMS で確認したが, 夾雑物との分離が困難で単一化合物として精製できなかったことから, 更なる解析は実施しなかった.

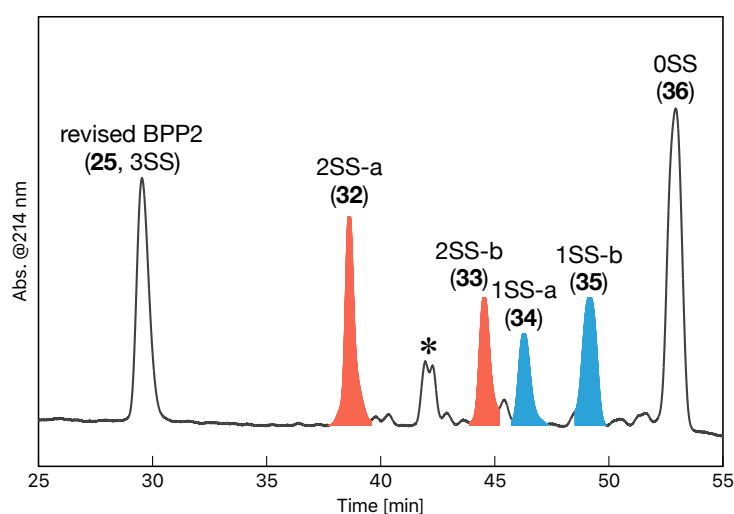


Figure 18. Revised BPP2 (**25**) の部分還元と *S*-アルキル化反応で得られた反応混合物の HPLC クロマトグラム. 赤色もしくは青色のピーク **32**~**35** を以降の解析に用いた.

*: 1SS-c を含む混合物

HPLC condition:

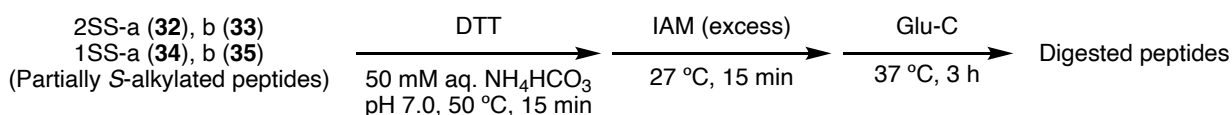
Develosil® ODS-HG-5 (ϕ 4.6 mm x *L* 250 mm) at 25 °C,

20% aq. MeCN / 0.1% TFA for 5min → 20–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 60 min, flow: 1.0 mL/min.

得られた 4 種の部分還元ペプチド **32**, **33**, **34**, **35** について, 残りのジスルフィド結合を DTT で還元し, IAM で *S*-アルキル化して一本鎖ペプチドとした後, Glu-C で消化して断片ペプチドの混合物を得た (Figure 19). 続いて断片ペプチドの MS/MS 解析を行った.

2SS-a(**32**) と 2SS-b(**33**) は TCEP 処理により 1 組のジスルフィド結合が還元されて 2 つの Cys 残基が NEM と反応 (Nem 化) している. そのため 2SS 体由来の断片ペプチドでは Nem 化 Cys 残基のペアが TCEP 処理で切断された元のジスルフィド結合を形成していたものとなる. MS/MS 解析の結果, **32** 由来の断片ペプチド (Figure 19, ①) では Cys(I) と Cys(V) が, **33** 由来の断片ペプチド (Figure 19, ②) では Cys(III) と Cys(VI) がそれぞれ Nem 化していたため, **25** は Cys(I)–Cys(V), Cys(III)–Cys(VI) の結合を持つことが判明した. またこの時点で残る 1 組のジスルフィド結合も Cys(II)–Cys(IV) と決定できた.

上述の結果を確認するため 1SS-a (**34**) と 1SS-b (**35**) も同様に解析した. **34** と **35** では TCEP 処理 / Nem 化の後, 残る 1 組のジスルフィド結合が DTT により還元され, Cam 化されている. そのため 1SS 体由来の断片ペプチドでは Cam 化 Cys 残基のペアが TCEP 処理後に残ったジスルフィド結合を形成していたものとなる. MS/MS 解析の結果, **34** 由来の断片ペプチド (Figure 19, ③) では Cys(I) と Cys(V) が Cam 化したフラグメントが観測され, **32** 由来の断片ペプチドから決定した Cys(I)–Cys(V) 間の結合が支持された. 同様に, **35** 由来の断片ペプチドより Cys(II) が Cam 化されたフラグメントを確認できた (Figure 19, ④) が, ペアとなる Cys(IV) を含むフラグメントは観測されなかった. そこで **35** について DTT 処理を行わずに直接 Glu-C で消化し, 得られた断片ペプチドを MS/MS 解析したところ, Cys(II)–Cys(IV) 間で結合した 2 本鎖ペプチドの生成を確認した (Figure 20).

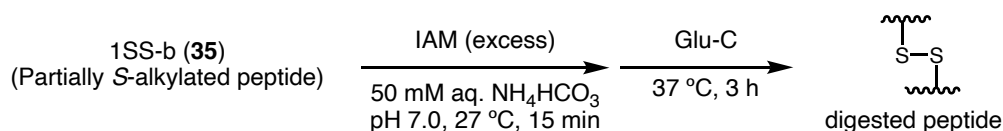


Partially S-alkylated peptides	[M+H] ⁺ Calc. m/z	[M+H] ⁺ Obs. m/z	Identified fragments
2SS-a (32)	2449.0	2449.0	(1) DC ^I (Nem)SQDC ^{II} (Cam)AAC ^{III} (Cam)SILARPAELNTE (21)
	1949.9	1949.9	(27) C ^V (Nem)EGKLSSLNTWGIC ^{VI} (Cam)KE (42)
2SS-b (33)	2449.0	2449.0	(1) DC ^I (Cam)SQDC ^{II} (Cam)AA ^{III} (Nem)SILARPAELNTE (21)
	1660.8	1660.7	(29) GKLSSLNTWGIC ^{VI} (Nem)KE (42)
1SS-a (34)	2517.1	2517.1	(1) DC ^I (Cam)SQDC ^{II} (Nem)AAC ^{III} (Nem)SILARPAELNTE (21)
	1949.9	1949.9	(27) C ^V (Cam)EGKLSSLNTWGIC ^{VI} (Nem)KE (42)
1SS-b (35)	2517.1	2517.1	(1) DC ^I (Nem)SQDC ^{II} (Cam)AAC ^{III} (Nem)SILARPAELNTE (21)
	2018.0	2018.0	(27) C ^V (Nem)EGKLSSLNTWGIC ^{VI} (Nem)KE (42)

Figure 19. 部分還元ペプチドの解析 1

Cys(Nem): NEM で S-アルキル化された Cys 残基

Cys(Cam): IAM で S-アルキル化された Cys 残基



Partially S-alkylated peptide	[M+H] ⁺ Calc. m/z	[M+H] ⁺ Obs. m/z	Identified fragment
1SS-b (35)	3035.3	3035.3	(1) DC ^I (Nem)SQDC ^{II} AAC ^{III} (Nem)SILARPAELNTE (21)
			(22) TC ^{IV} ILE (26)

Figure 20. 部分還元ペプチドの解析 2

以上の解析より, revised BPP2 (25) のジスルフィド結合様式は Cys(I)–Cys(V), Cys(II)–Cys(IV), Cys(III)–Cys(VI) と判明した. これは類似のアミノ酸配列を持つ SYN の構造に基づく Type-I 構造ではなく, ColabFold による予測構造から得られた Type-II 構造の結合様式であった (Figure 21). したがってこれまでの情報を統合することで, 天然品 BPP 類 (BPP1, 2) のジスルフィド結合様式も Type-II 構造であると決定した.

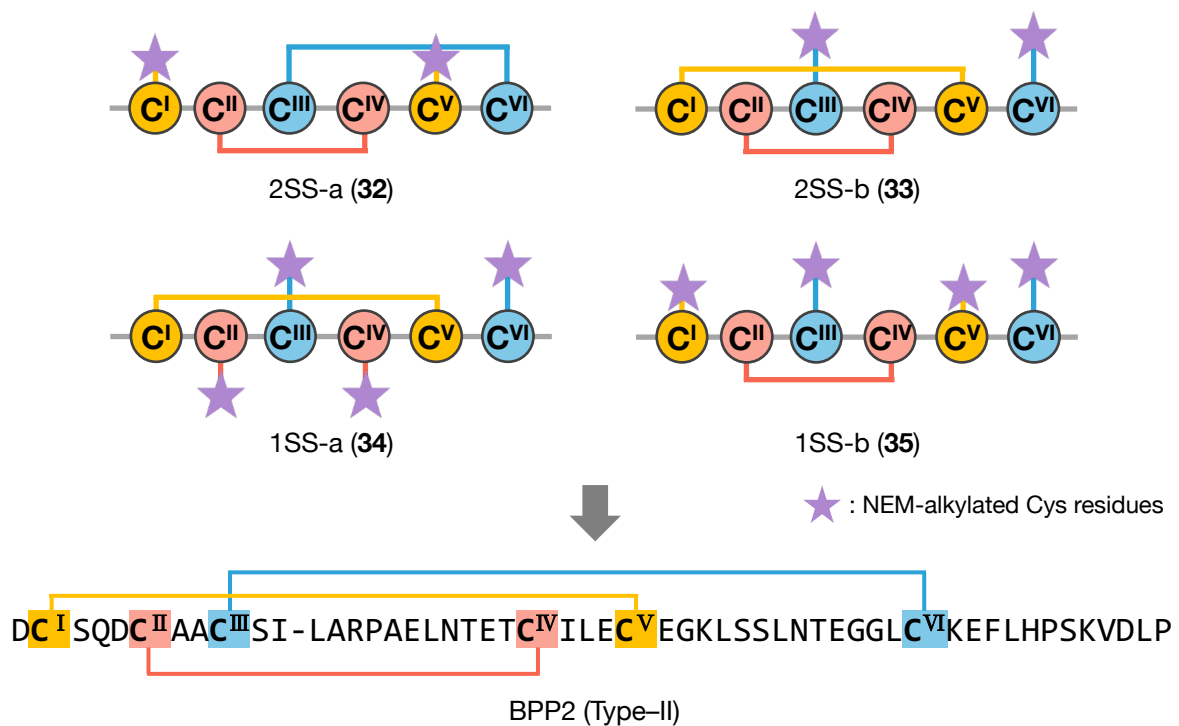


Figure 21. Revised BPP2 (25) のジスルフィド結合様式

rSYN と BPP2 のジスルフィド結合様式が異なる理由について、以下のように考察した。rSYN のジスルフィド結合様式は BPP 類に対応する 1-53 残基目のアミノ酸配列だけでなく、rSYN の前駆体タンパク質である rat-proenkephalin (rPENK) として異種発現させ、フォールディングで得られたリコンビナントペプチドの解析から決定されている。そのため BPP 類と rSYN はフォールディング時のペプチド鎖の長さが大きく異なっており、これがジスルフィド結合形成に影響した可能性がある。例えば分子内に 2 本のジスルフィド結合を持つ guanylin という生理活性ペプチドにおいて、プレ配列を含む直鎖ペプチドではフォールディングが正しく進行し活性型のペプチドが生成するが、プレ配列が存在しないとミスフォールディングが起これ、非天然型のジスルフィド結合様式を持った異性体が生成することが知られている。^[76,77] この観点から rPENK のアミノ酸配列を参照すると、rSYN の領域よりも N 末端側のプレ配列領域には 2 つの Cys 残基が含まれている。一方で、ブラリナトガリネズミの PENK (bPENK) では同じプレ配列領域に含まれる Cys 残基が 1 つであり、その他のアミノ酸残基についても複数の違いが見られる (Figure 22)。そのためこういったプレ配列領域の

差異が rSYN や bSYN のジスルフィド結合形成に影響することで、両者のフォールディングに違いを生み出している可能性も考えられる。このことは今後、rSYN の合成化学的アプローチによる構造の確認やジスルフィド結合様式に関する解析から解明できると考えている。

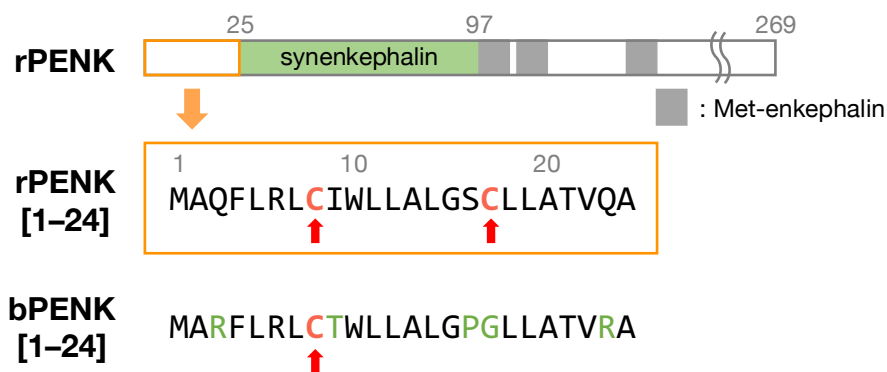


Figure 22. rat-proenkephalin (rPENK) および

B. brevicauda-proenkephalin (bPENK) のプレ領域配列

赤矢印は rSYN および bSYN のジスルフィド結合形成に関与すると予想している Cys 残基を示す。また bPENK [1-24] において rPENK [1-24] との差異が見られるアミノ酸残基を緑で示す。

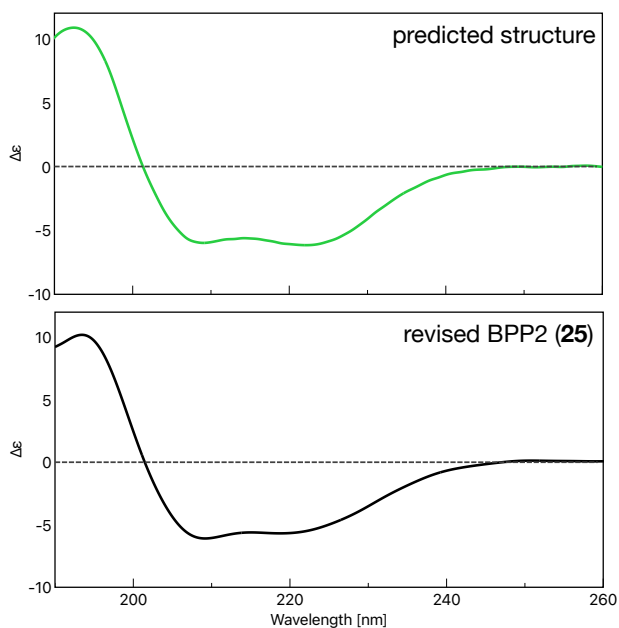
4. Revised BPP2 (25) の CD スペクトルによる二次構造の解析

ジスルフィド結合様式を決定した revised BPP2 (25) について、CD スペクトルによる二次構造の解析を行った。^[78,79] 一般にタンパク質やペプチドの CD スペクトルでは α -ヘリックス構造を含む場合には 208 および 222 nm 付近に負の極大、193 nm 付近に正の極大が見られ、一方で β -シート構造を含む場合には 218 nm 付近に負の極大、195 nm 付近に正の極大が見られる。^[80,81] ColabFold によって示された BPP2 の予測構造には 3 つの α -ヘリックス構造が含まれ、それらが 3 組のジスルフィド結合によって強固に架橋された構造を取っていた。そこでこの予測構造から得られる計算値と合成品 25 の CD スペクトルの実測値を比較し、ColabFold で示された予測構造について妥当性を評価することとした。

ColabFold による予測構造から計算した CD スペクトル (PDBMD2CD サーバー^[82] を利用して取得) および 25 を用いて実測した CD スペクトルを Figure 23A に示す。なお 25 の CD スペクトル測定条件は、soricidin の測定条件^[46] を参考に設定した。25 の波形は予測構造から計算した波形と良い一致を示し、共に α -ヘリックス構造に特徴的な 208, 222 nm 付近の負の極大と 193 nm 付近の正の極大がそれぞれ観測された。なお天然品 BPP2 についても CD スペクトルの測定を検討したが、試料が少なく正負の極大吸収はほとんど観測されなかった。

次に、BPP2 の計算および実測 CD スペクトルからそれぞれの α -ヘリックス構造の含有率を計算した (Figure 23B)。その結果、K2D3 サーバー^[83] では計算値では 54.9%、実測値では 52.1% となり、一方で BeStSel サーバー^[84,85] では計算値では 48.9%、実測値では 48.8% であったことから、どちらの解析手法でも計算値と実測値における α -ヘリックス構造含有率は近い結果となった。またその他の二次構造についても、BeStSel サーバーによる計算値と実測値の両方においてターン構造が 10% 程度含まれるなどの類似性が見られた (Figure 23C)。

以上より ColabFold による予測構造は BPP2 の立体構造として妥当であると判断した。



B

	α -helix content (%)	
	K2D3	BeStSel
Predicted	54.9	48.9
Observed	52.1	48.8

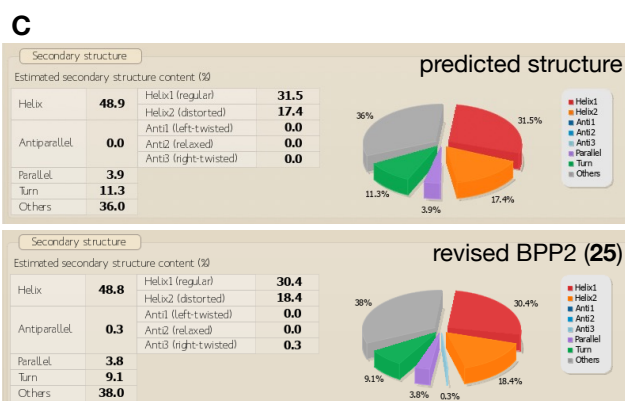


Figure 23. A: ColabFold プログラムによる BPP2 の予測構造 (上) と合成品 BPP2 (下) の CD スペクトル. **25** (5 μ M) を 50 mM リン酸カリウム水溶液 (pH 7.0) に溶解し 25 $^{\circ}$ C で測定した. B, C: Predicted structure および revised BPP2 (**25**) の CD スペクトルのから求めた二次構造の含有率の詳細.

以上より BPP2 の合成を達成し、天然品と合成品の構造やスペクトルデータが一致することを確認した。さらに、BPP2 のジスルフィド結合様式と二次構造に関する解析を完了した。続いて次章では合成品 BPP2 を用いた生物活性評価を実施した。

第4章 BPP2の生物活性評価

1. ミールワーム麻痺活性試験

過去に行われた検討ではブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物(約 1/70 個体分)をミールワームに腹腔内投与すると、直後から麻痺活性が見られ、2時間程度で致死させる効果が確認されていた。^[44]しかし顎下腺抽出物を精製して得られた天然品 BPP2 の量は非常に少なく、精製後の BPP2 を用いた活性の評価はできていなかった。そのため顎下腺抽出物に見られたミールワームの麻痺活性および致死活性が BPP2 に由来するものであるかは不明であった。そこで前章で合成した revised BPP2 (**25**) を用いてミールワーム麻痺活性試験を実施し、活性の有無について検討することとした。

麻痺活性試験はツヤケシオオゴミムシダマシ (*Zophobas atratus*) の幼虫(体重 約 0.7 – 1.0 g, n=3) を用いて、サンプルを腹腔内投与することで評価した (Figure 24A)。**25** を 0.56 もしくは 0.056 $\mu\text{g}/\text{g body weight}$ 投与した場合には麻痺作用は見られず、対照実験(生理食塩水)と比較しても顕著な効果は見られなかった。一方で、5.6 $\mu\text{g}/\text{g body weight}$ を投与すると投与直後から麻痺が起こり、投与部位から下半身(腹部)が硬直して動かない様子が確認された (Figure 24B)。その後、麻痺は数分間かけて全身に広がり、1時間半後にはミールワームは外部刺激(ピンセットでつつく、仰向けにするなど)に対して反応を示さなくなった (Figure 24C)。この麻痺作用は数時間程度持続したが、投与から約6時間が経過するとミールワームは麻痺から回復し、徐々に動き始めた。以上より BPP2 はミールワームに対して約 5.6 $\mu\text{g}/\text{g body weight}$ の投与量で顕著な麻痺効果を示すが、致死活性は示さないことが分かった。

ここで天然品と合成品の有効量の比較について述べる。過去に行った検討で用いた顎下腺抽出物は、第1章第5節 Figure 3C でも示したように BPP1, 2 および未同定の BPP 類を含む混合物であった。そこで天然品の有効量を算出すべく、ブラリナトガリネズミの顎下腺に含まれる BPP 類の量を合成品 **25** の HPLC ピーク強度と比較して推定した。その結果、1個体の顎下腺には合計で約 300 ~ 400 μg の BPP 類(約 100 μg の BPP2 を含む)が存在すると算出された。顎下腺抽出物は約 1/70 個体分で 0.7 – 1.0 g のミールワームに対して麻痺活性を示したことから、天然品 BPP 類の有効量は約 4.3 ~ 8.1 $\mu\text{g}/\text{g body weight}$ であると推定される。今回実施した合成品 **25** の活性試験の結果から算出される BPP2 の有効量は約 5.6 μg

/g body weight であり、これは天然品 BPP 類の有効量 (約 4.3 ~ 8.1 $\mu\text{g} / \text{g body weight}$) に近い値であった。このことから BPP2 は、ブラリナトガリネズミが持つ麻痺活性成分として重要な役割を果たしていることが推察される。

トガリネズミは昆虫などの獲物に噛み付いて麻痺させた後、巣穴へ持ち帰って貯蔵する習性があり、麻痺状態の獲物が巣穴で数日間生きていたという報告もある。[23, 27, 86] このように麻痺した獲物を生かしたまま貯蔵しておくことは、獲物の腐敗を防ぎ、高い栄養価を維持することに寄与していると考えられる。本試験によって観察された BPP2 の麻痺効果は即効性かつ持続性のものであったことから、BPP2 はブラリナトガリネズミが獲物を効率的に捕獲して貯蔵することに役立っていると考えられる。

A

BPP2 ($\mu\text{g} / \text{g body weight}$)	paralysis/n
0 (control)	0 / 3
0.056	0 / 3
0.56	0 / 3
5.6	3 / 3



Figure 24. ミールワーム麻痺活性試験 **A:** BPP2 の投与量. Paralysis = 麻痺した個体数, n = 被検体数 **B:** BPP2 (5.6 $\mu\text{g} / \text{g bodyweight}$) を腹腔内投与した直後の様子. 赤矢印は BPP2 注入部位を示す. **C:** BPP2 投与後, 1.5 時間経過した時の様子.

2. 電気生理学的解析

続いて合成品 BPP2 を用いて Ca チャンネルに対する応答を評価した。

ブラリナトガリネズミに噛まれた人間は持続性の痛みを感じる事が報告されている。^[22] また同じく有毒哺乳類であるカモノハシの毒も強い痛みを誘発することを第 1 章第 2 節で述べた。カモノハシの毒は痛覚の伝達などに関与する Ca チャンネルに作用することが知られており、^[30, 32] カモノハシの毒と同様に痛み作用を引き起こすブラリナトガリネズミ由来の毒成分である BPP 類も Ca チャンネルに対する特有の応答を示すと予想し、パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析を実施した。

パッチクランプ法とは細胞膜上のイオンチャンネルを通過するイオンによって生じる電流を測定することで、イオンチャンネルの機能や、化合物がイオンチャンネルに与える影響を評価する手法である。^[87, 88] 通常、細胞内の Ca^{2+} 濃度は細胞外よりも低濃度となっているため、イオンチャンネルが開くと細胞外から細胞内に向かって Ca^{2+} が流入し内向き電流が生じる (Figure 25)。この電流の変化を膜電位とともに記録することでイオンチャンネルの機能を評価できる。

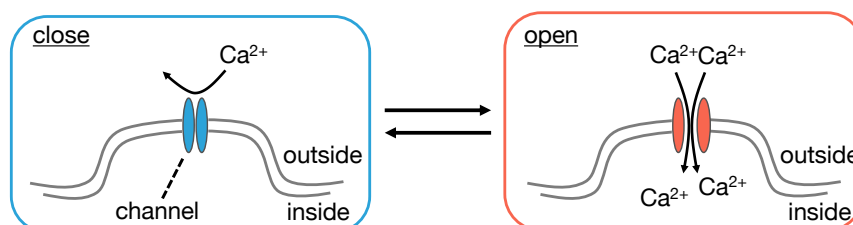


Figure 25. Ca チャンネルの開閉と Ca^{2+} の細胞内への流入

興奮性刺激を伝達する電位依存性 Ca チャンネルには、大きな脱分極によって活性化される高電位活性化チャンネルである L 型 ($\text{Ca}_v1.1-4$), P/Q 型 ($\text{Ca}_v2.1$), N 型 ($\text{Ca}_v2.2$), R 型 ($\text{Ca}_v2.3$) と、小さな脱分極によって活性化される低電位活性化チャンネルの T 型 ($\text{Ca}_v3.1-3$) が存在する。^[89] L 型は主に筋組織や内分泌器官に存在し、筋収縮やホルモンの分泌に関わる役割を担う。また N 型は主に脳や末梢神経系などの神経細胞に存在し、神経伝達物質の放出を通して痛覚などの伝達に関与する。そして T 型は脳や心臓に多く発現し、反復性発火による心拍の形成などで重要な役割を担う。^[90] そこで、今回のパッチクランプテストでは鎮痛剤開発における標的として最近注目されているヒト N 型 Ca チャンネル ($\text{hCa}_v2.2$) および T 型 Ca チャンネル ($\text{hCa}_v3.2$)^[91-94] をそれぞれ発現させた HEK293T 細胞を用いて、BPP2 による応答を評価した。

BPP2 を $0.84 \mu\text{M}$ で処理した結果、 $\text{hCa}_v2.2$ に対しては活性化および阻害のいずれの作用も示さなかった (Figure 26)。一方で、 $\text{hCa}_v3.2$ に対しては顕著なチャンネル活性化作用が見られた (Figure 27A)。 $\text{hCa}_v3.2$ について詳細を述べると、control (○) では -30 mV で細胞内への Ca^{2+} 流入が最大となるのに対し (-105 pA/pF)、BPP2 添加時 (■) では -40 mV で Ca^{2+} 流入が最大 (-110 pA/pF) となった。また活性化曲線における半分活性化電位 ($V_{1/2}$) は、control では -37.5 mV 、BPP2 添加時では -48.2 mV と大きな差が見られ、BPP2 は $\text{hCa}_v3.2$ の $V_{1/2}$ を負の過分極方向 (グラフ左方向) に 10.7 mV シフトさせることが分かった (Figure 27B)。これは BPP2 の添加によって $\text{hCa}_v3.2$ の活性化閾値が下がり、細胞膜電位の変化に対する感受性が高まったことを意味する。

このように神経毒ペプチドの中にはイオンチャンネルの機能を単に阻害もしくは活性化するだけでなく、活性化閾値自体を変化させるものがあり、これらは gating modifier toxins (GMTs) と呼ばれている。^[95, 96] イオンチャンネル阻害活性を示す神経毒ペプチド、例えば conotoxin 類はイオンチャンネルの孔自体に結合し、イオンの出入りを阻害する。^[97] 一方で GMTs はイオンチャンネルの細胞膜外に露出した voltage sensor domain (VSD) と呼ばれる領域と相互作用することで電位依存性に影響を与えるものが多い。今回、BPP2 は $\text{hCa}_v3.2$ の活性化閾値を顕著に低下させたことから、 $\text{hCa}_v3.2$ の VSD と相互作用して細胞膜電位の変化に対する感受性を高める GMT として機能することが予想される。

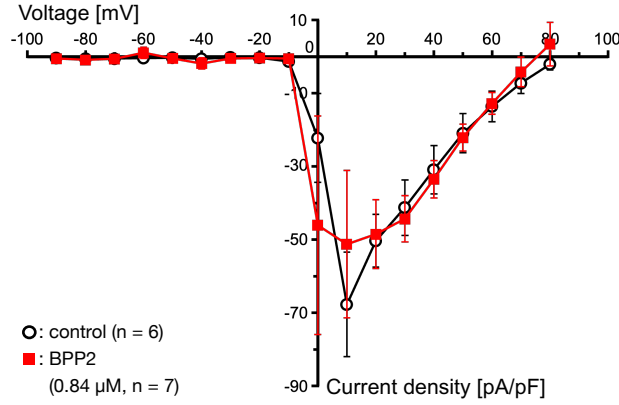


Figure 26. hCa_v2.2 におけるパッチクランプテスト

パッチクランプテストは whole-cell 法で実施し，結果を I-V 曲線に表示した。

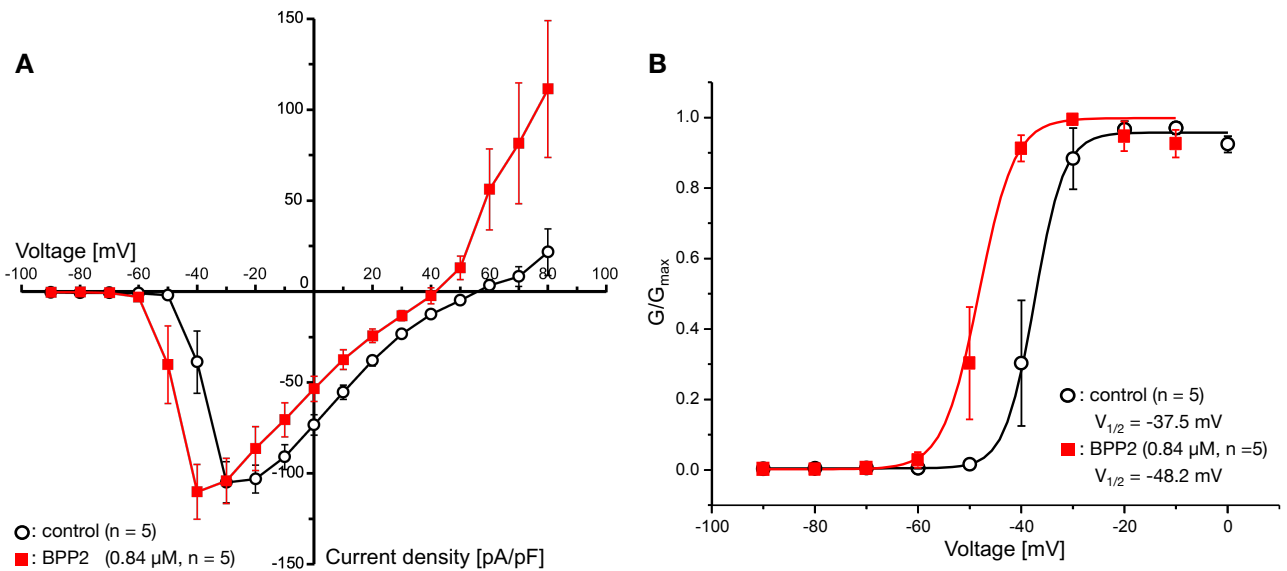


Figure 27. hCa_v3.2 におけるパッチクランプテスト **A:** I-V 曲線

B: 活性化曲線. **A** の測定結果をボルツマン式でフィッティングしてグラフを作成した。

活性化曲線は膜電位に対する見かけ上のイオンチャネル開口確率を示す。

hCa_v2.2 は末期がんなどにおける疼痛緩和ケアの重要な標的分子とされ、これまでに ω-conotoxin (ziconotide) を代表とする多くの hCa_v2.2 選択的阻害剤が開発されてきた。[6, 91] 一方で hCa_v3.2 は心拍の形成において重要な役割を担うが、その過剰発現はニューロンの異常発火を引き起こし、てんかんの原因になることも知られている。さらに近年では hCa_v3.2 が急性疼痛や神経障害性疼痛などの伝達にも関与することが示唆されている。[98-100] こういった背景から新たな鎮痛剤の創出を目指した hCa_v3.2 選択的阻害剤に関する研究も盛んに行われており、例えばベンゼンスルホンアミド誘導体 ABT-639 は糖尿病性神経障害に起因する痛みの鎮痛剤として開発が行われている (Figure 28A)。[94, 101, 102] また hCa_v3.1-3.3 の開口活性を増強するチャネル賦活化剤の研究も進められている。東北大の福永らによって創出されたスピロイミダゾピリジン誘導体 SAK3 は hCa_v3.1 および hCa_v3.3 の脱分極によって生じる開口を増強し、イオンチャネル開口時に生じる膜電流を増大させる作用を持つ (Figure 28B)。[103, 104] SAK3 は細胞内のカルシウムシグナルを亢進することで CaMKII/Rpt6 シグナルを活性化してプロテアソーム活性の低下を抑制することが分かっており、アミロイド凝集体の蓄積が原因となるアルツハイマー病など神経系疾患の新たな治療薬として現在研究開発段階にある。[104-107] しかし BPP2 のように hCa_v3.2 の活性化閾値を下げ、イオンチャネルの感受性を向上させる化合物はこれまでに報告されておらず、今回発見した BPP2 の活性は薬理学的観点からも新規性が高いと言える。

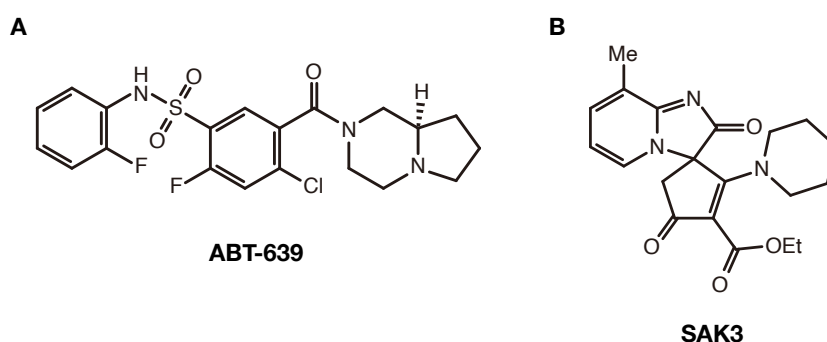


Figure 28. T 型 Ca チャネルに作用する低分子化合物の一例

続いて本章第 1 節で述べたミールワーム麻痺活性との関連についても考察した。

無脊椎動物の T 型 Ca チャネルは、脊椎動物の T 型 Ca チャネルと同様に低電位で活性化されるという特徴を持つ。[108] アミノ酸配列で比較すると、例えばミールワームと同じ昆虫

類に属するカイコ (*Bombyx mori*) の T 型 Ca チャンネル [UniProt, A0A8R2M238] は hCa_v3.2 と中程度 (48.5%) の相同性を示す. また無脊椎動物においては T 型 Ca チャンネルが筋細胞の収縮に関与していることが示唆されており,^[109] 例えば線虫 (*Caenorhabditis elegans*) においては T 型 Ca チャンネルのホモログである CCA-1 の突然変異が摂食行動に関わる筋組織の運動を阻害することが報告されている.^[110] 以上のことから BPP2 の hCa_v3.2 活性化作用がミールワーム麻痺活性にも何らかの形で関与していることが予想される. しかし, 脊椎動物のイオンチャンネルに作用する化合物が無脊椎動物に対して必ずしも同じ効果を示すわけではないことから,^[111, 112] 今回の実験結果のみでは BPP2 が示すミールワーム麻痺作用と hCa_v3.2 に対する効果を直接関連づけることはできない. 今後はヒト由来の T・N 型以外の Ca チャンネルや他の陽・陰イオンチャンネル, さらには無脊椎動物由来のイオンチャンネルまで含めた BPP 類の網羅的な活性評価により新たな機能を探索し, ミールワーム麻痺活性とイオンチャンネル活性化作用の関係を明らかにしていきたいと考えている.

3. 立体構造ホモログの探索と分子進化に関する考察

これまでに BPP2 の構造を決定し、合成品を用いた生物活性評価について述べた。続いて本節では BPP2 の立体構造に着目した解析と考察について述べる。一般にタンパク質やペプチドは異なる生物種に由来するものであっても類似の立体構造を持つものは機能も類似していることが多い。そこで、これまでに異種の動物から報告されている BPP2 の立体構造類似ペプチド (立体構造ホモログ) に注目し、構造的特徴や生物活性を比較することで、BPP2 の機能の理解につながる手がかりを得ることを目指した。

BPP2 の立体構造ホモログの探索は、アミノ酸配列に依存しない立体構造比較プログラムである DALI を用いて行った。^[113-115] BPP2 の ColabFold 予測構造 (Figure 29A) を鋳型として Protein Data Bank データベースから立体構造ホモログを探索した結果、計 36 個のタンパク質もしくはペプチドがヒットした。この結果にはごく一部のドメイン構造が類似する高分子も多く含まれていたため、今回は分子量が BPP 類と同程度 (5–7 kDa) のペプチドに注目した。その結果、BPP2 と立体構造が類似するペプチドとしてオオムカデ属 (*Scolopendra* sp.) 由来の 3 種のペプチド、 \square -scoloptoxin (SLPTX)-Ssm6a (46 aa, PDB ID: 2mun), κ -SLPTX-Ssm1a (60 aa, PDB ID: 2m35), κ -SLPTX-Ssd1a (47 aa, PDB ID: 2mvt) を見出した (Figure 29B–D)。これらのペプチドと BPP2 のアミノ酸配列相同性は 14–20% 程度と低いが、立体構造の類似度を示す RMSD 値はいずれも小さく、 \square -SLPTX-Ssm6a で 1.6 Å (36 C_{α} pairs), κ -SLPTX-Ssm1a で 2.0 Å (35 C_{α} pairs), κ -SLPTX-Ssd1a で 2.4 Å (37 C_{α} pairs) であった。さらに SLPTX 類のジスルフィド結合様式は Cys(I)–Cys(V), Cys(II)–Cys(IV), Cys(III)–Cys(VI) という Type-II 構造であり、前章で決定した BPP2 の様式と一致したことや α -ヘリックス構造をとる領域が概ね一致していることから、立体構造の高い類似性が支持された (Figure 29E)。

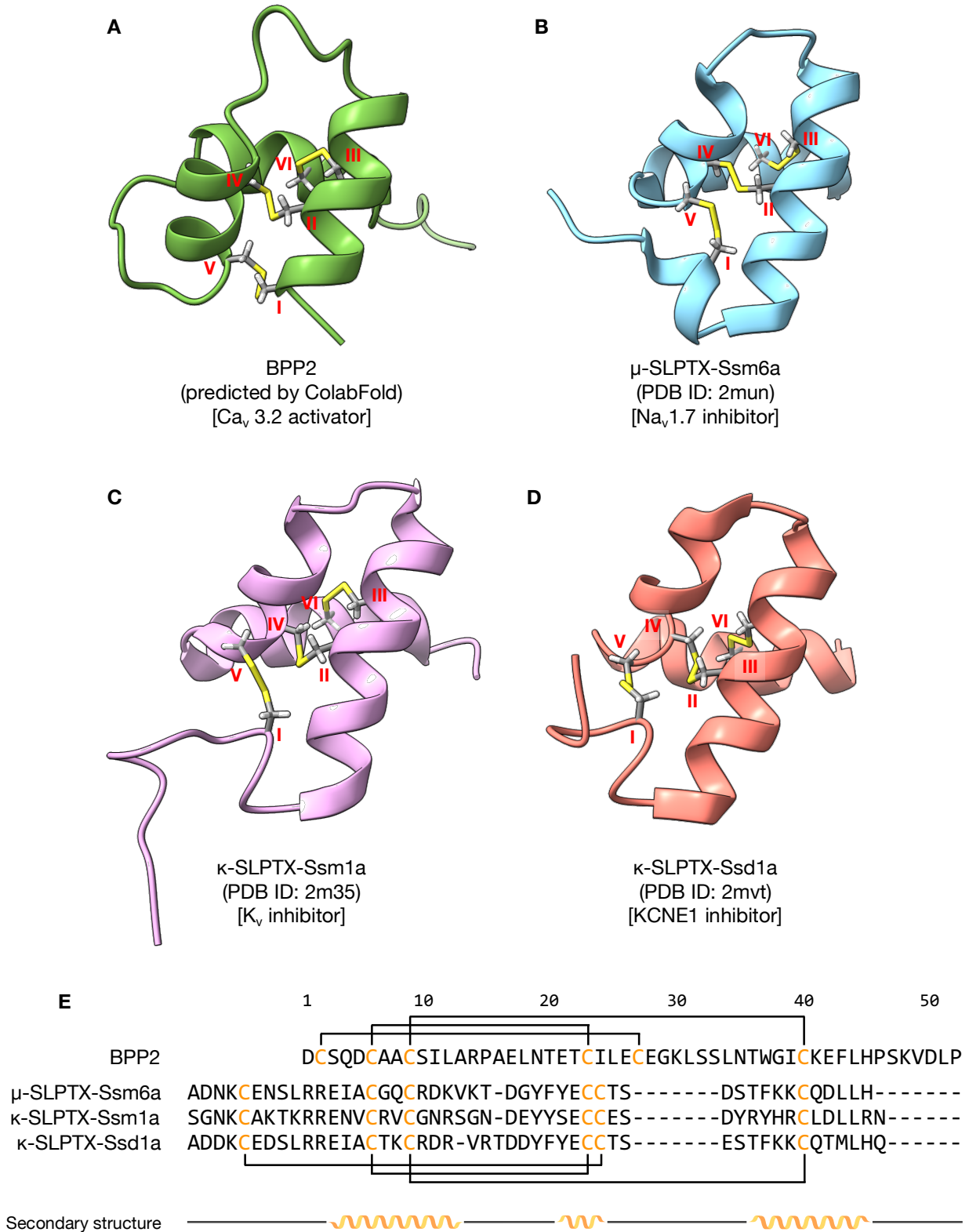


Figure 29. **A:** ColabFold プログラムによる BPP2 の予測立体構造. **B – D:** NMR 解析によって決定された神経毒ペプチド SLPTX 類の立体構造. **E:** BPP2 および SLPTX 類のアミノ酸配列とジスルフィド結合様式, 二次構造の分布. 直線はコイル構造, 橙色の螺旋は α-ヘリックス

クス構造の分布を示す。

SLPTX 類のうち \square -SLPTX-Ssm6a および κ -SLPTX-Ssm1a は *S. multilans* から、 κ -SLPTX-Ssd1a は *S. dehaani* からそれぞれ単離されている。これらの神経毒ペプチドはムカデが主に捕食する昆虫類に対して致死性を示すことから、獲物の効率的な捕獲に使用されていると考えられる。また電気生理学的解析から \square -SLPTX-Ssm6a では Nav1.7 阻害活性^[116]、 κ -SLPTX-Ssm1a では DRG ニューロンにおける K⁺ 電流の阻害活性^[117] (チャンネルサブタイプは未決定)、また κ -SLPTX-Ssd1a では電位依存性 K チャンネル KCNQ1 の修飾サブユニットである KCNE1 の阻害活性^[118] がそれぞれ報告されている。なお μ -SLPTX-Ssm6a は Nav1.7 の活性化閾値を脱分極方向へ 13.5 mV シフトさせる GMT であることが示されているが、^[116] SLPTX 類がそれぞれのイオンチャンネルと具体的にどのように相互作用し結合するのかという点はわかっていない。

続いて SLPTX 類の立体構造上の特徴について述べる。SLPTX 類^[119] の立体構造とジスルフィド結合様式は、クルマエビの脱皮阻害ホルモン (molt-inhibiting hormone; MIH) のものと類似している。^[120] MIH は ITP / CHH (ion transport peptide / crustacean hyperglycemic hormone) ファミリーに属する内在性のペプチドホルモンであり、節足類や昆虫類、甲殻類に広く存在し、主に無脊椎動物における生体内の恒常性維持に関与しており、毒性は見られない。^[121] 上記のオオムカデ毒腺のトランスクリプトーム解析と系統解析がこれまでに実施され、SLPTX 類と ITP / CHH ファミリーのペプチドは共通の祖先から分岐して分子進化してきたことが明らかとなっている。^[120] また、ITP / CHH ファミリーに属するペプチドは C 末端領域を除去するとホルモン活性が失われることから、この領域が活性に重要であるとの報告がある。^[122, 123] 一方で SLPTX 類では ITP / CHH ファミリーペプチドの C 末端領域に対応する部分が欠落しており、こういった構造的な違いが SLPTX 類の毒性および MIH との機能の差異において重要と考えられている (Figure 30A)。

BPP 類は synenkephalin (SYN) と高い配列相同性を持つことを第 2 章で述べた。SYN は哺乳類において一般に脳や副腎髄質に存在するが、ブラリナトガリネズミのほか、ミズトガリネズミ (*N. fodiens*) においても唾液や顎下腺に SYN と類似のペプチドが含まれることが報告されている。^[34, 124] ラットをはじめ哺乳類の SYN は全長で 70 残基程度のペプチドとして存在しており、ブラリナトガリネズミの顎下腺のトランスクリプトーム解析で報告されている proenkephalin の mRNA 配列にも SYN の全長アミノ酸配列に相当する部分が含まれてい

る。しかし実際にブラリナトガリネズミの顎下腺で分泌される神経毒ペプチド BPP 類には、SYN の N 末端領域の一部にあたる 1-47 (BPP1) もしくは 1-52 (BPP2) 残基に相当する部分しか含まれず、SYN の C 末端領域にあたる部分は欠落している (Figure 30B)。

このことから BPP 類と SYN にも SLPTX 類と MIH で見られる分子進化の関係性があると予想される。つまり元々、哺乳類の脳内や副腎髄質など体内で SYN として存在していたペプチドがトガリネズミの生存戦略に沿った分子進化を経た結果、有毒種であるブラリナトガリネズミの顎下腺では SYN の C 末端領域を喪失したペプチドとして分泌されることで無脊椎動物に対する麻痺活性を示す、捕食における有用なツールとなった可能性が考えられる。

このようにして BPP 類が SYN を起源とした分子進化を経て毒性を獲得したとすれば、イオンチャンネルを標的とする点や類似の立体構造を持つ点で共通する BPP 類と SLPTX 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、生み出されてきたと言える。今後、他のトガリネズミにおいても唾液中に含まれるペプチド成分の検討や顎下腺のトランスクリプトーム解析が実施されることで、トガリネズミの生存戦略と SYN の分子進化に関わる詳細な考察が可能になると期待される。

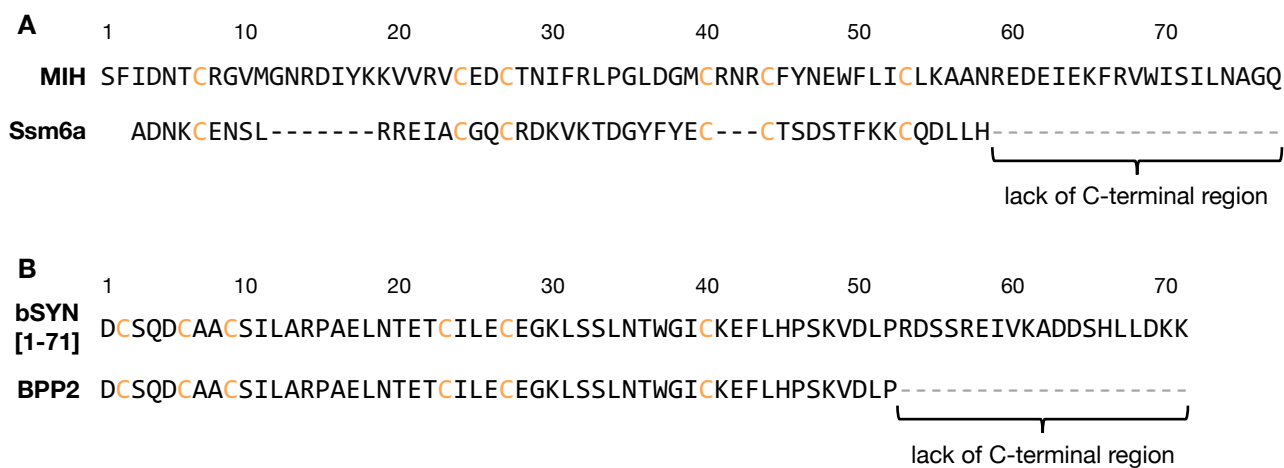


Figure 30. **A:** Molt-inhibiting hormone (MIH) と μ -SLPTX-Ssm6a (Ssm6a) のアミノ酸配列
B: ブラリナトガリネズミの proenkephalin において SYN に相当する領域 (bSYN [1-71]) と BPP2 のアミノ酸配列

第5章 結論

地球上の様々な地域に生息する有毒動物が持つ毒は人類にとって脅威である一方、創薬化学や薬理学などの観点からは非常に魅力的な研究対象と言える。このような生物毒のうち動物由来のものについては、昆虫類や爬虫類、海洋生物由来のものがこれまで主な研究対象とされてきた。一方で哺乳類由来の毒は、有毒種の希少性などからあまり研究が進展しておらず、未知の機能性分子の発見が期待される。また希少な哺乳類由来の毒に注目することは化学的な研究のみならず、その毒が種の生存戦略や進化の過程にどのような役割を果たしてきたのかといった生態学、進化生物学など学際的な研究の発展にも繋がることから、今後の発展が大きく期待される。

こういった背景から本研究では食虫哺乳類ブラリナトガリネズミ由来の特異な麻痺性神経毒ペプチド BPP 類について構造と機能の解明を目的として合成、構造決定と生物活性評価を実施した。そして得られた結果を基に、トガリネズミの生態や進化における BPP 類の関わりについても考察した。

BPP 類はブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物から発見された分子量約 5.2 – 5.6 kDa のミールワーム麻痺活性を示すペプチドである。BPP 類のアミノ酸配列は哺乳類の脳などに存在する synenkephalin (SYN) と高い相同性を示す。SYN は分子内に 3 組のジスルフィド結合を含み、その結合様式は Cys(I)–Cys(IV), Cys(II)–Cys(V), Cys(III)–Cys(VI) (Type-I 構造) と決定されている。このことから SYN と高い配列相同性を持つ BPP 類も同じジスルフィド結合様式を持つと予想し、Type-I 構造の BPP2 を合成したが、その HPLC 保持時間と UV スペクトルは天然品と一致しなかった。そこで構造を再検討し、BPP 類のアミノ酸残基数と配列の一部を訂正するに至った。さらにタンパク質やペプチドの立体構造を予測する ColabFold プログラムを用いて BPP 類の立体構造を予測し、Cys(I)–Cys(V), Cys(II)–(IV), Cys(III)–Cys(VI) という新たなジスルフィド結合様式 (Type-II 構造) を提唱した。

次に cysteine / cystine を用いたフォールディング条件により BPP2 の合成を試みた。その結果得られた合成品の HPLC 保持時間は天然品と一致した。また部分還元と複数の S-アルキル化を組み合わせた MS/MS 解析により、合成品と天然品 BPP 類のジスルフィド結合様式を Type-II 構造と決定した。

続いて合成品 BPP2 を用いて生物活性評価を実施した。BPP2 は 5.6 $\mu\text{g} / \text{g body weight}$ でミールワームに対して即効かつ持続性の麻痺作用を示した。このような持続性の麻痺作用は

獲物を効率よく捕獲し、栄養価が高い状態を維持する上でトガリネズミにとって高いメリットがあると考えられる。また電気生理学的解析により BPP2 は 0.82 μM でヒト T 型 Ca チャネル (hCa_v3.2) を活性化し、その活性化閾値を下げることで感受性を高めることを見出した。これまでに hCa_v3.2 の選択的な阻害剤は複数報告されているが、活性化閾値を下げる化合物は知られておらず、今回見出した BPP2 の機能は新規性が高いと言える。

最後に BPP 類の立体構造ホモログを探索し、BPP 類の推定立体構造はオオムカデ由来の神経毒ペプチド SLPTX 類に類似しているという知見を得た。SLPTX 類は節足動物に普遍的な内因性ペプチドと共通の起源から進化したとされており、BPP 類と SYN の間にもこれらと類似した関係性が見られる。このことから BPP 類と SLPTX 類は、ともに保有する種が進化する過程において内因性ペプチドに神経毒としての機能が付与されることで生じた、すなわち収斂進化によりもたらされたと推察した。

今後は BPP2 に反応性官能基や検出基を導入した誘導体(ケミカルプローブ)を利用した実験化学的手法とドッキングシミュレーションなどの計算化学的手法を組み合わせ BPP2 とイオンチャネルの詳細な結合様式を明らかにしていきたい。また骨格筋の収縮などに関与する L 型 Ca チャネルや昆虫由来のイオンチャネルなどに対する BPP2 の影響についても評価することで麻痺の作用機序や新たな標的イオンチャネルの探索を行いたい。さらに、生態学や進化生物学などの観点からも検討を重ね、ブラリナトガリネズミが BPP 類を獲得した進化的な背景など、種の生存戦略と毒の化学進化に関する新たな知見も得たいと考えている。

近年、ゲノミクスやプロテオミクスといった網羅的な解析手法が生物毒の研究でも一般的になりつつある。これらの手法は試料中の生理活性物質の組成や、物質と遺伝子の相関関係などを網羅的に解析できるため、様々な要素が複雑に関わる生命現象を理解する上で欠かすことはできない。一方で伝統的な天然物化学の研究のように「実際に化合物を単離、構造決定し(場合によっては全合成して)生物活性評価を行う」といった、実在する化合物に着目した研究でしか得られない情報もある。本研究で合成品を用いて決定した BPP 類のジスルフィド結合様式は、アミノ酸配列が類似するペプチド SYN から予想したものとは大きく異なっていた。また BPP2 の hCa_v3.2 の活性化作用というユニークな活性も、BPP2 を実際に合成して活性評価に十分な量と純度で供給できたことで今回初めて明らかになった。本研究で得られた知見が、BPP 類のユニークな構造、生物活性に着目した化学的な研究に留まらず、トガリネズミの生態学、進化生物学など多岐にわたる研究の礎となり、今後の哺乳類毒の研究の発展に寄与することを期待したい。

第6章 実験の部

1. 一般

1.1. 試薬, 溶媒

全ての試薬, 溶媒は AnaSpec Inc., Merck KGaA, Sigma-Aldrich, 関東化学株式会社, 東京化成工業株式会社, ナカライテスク株式会社, 富士フイルム和光純薬株式会社, もしくは渡辺化学工業株式会社のものを使用した.

Fmoc 固相合成には, 側鎖の官能基が保護された以下の Fmoc アミノ酸を使用した. Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Acm)-OH, Fmoc-L-Cys(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Val-OH.

ペプチドの消化に用いた酵素は Glu-C, Sequencing Grade (Promega, V1651) を推奨プロトコルに従って調製したものを使用した.

1.2. 質量分析

MS および MS/MS 分析には Bruker UltrafleXtreme TOF MS 質量分析計 (Bruker Daltonics) を使用した. 質量補正は標準ペプチド (Bruker Daltonics, Peptide Calibration Standard I) または標準タンパク質 (Bruker Daltonics, Protein Calibration Standard I) を用いて行った. 試料測定時は, 測定試料とマトリックス (α -CHCA in 50% aq. MeCN / 0.1% TFA) の混合溶液を MTP 384 ground steel target plate (Bruker Daltonics) にスポットし, 自然乾燥した後に測定した.

1.3. ZipTipC₁₈ による脱塩操作

ZipTipC₁₈ マイクロチップ (Merck Millipore) を取り付けたピペットマン (10 μ L) で 50% aq. MeCN / 0.1% TFA (10 μ L) を吸引, 吐出して充填された樹脂を膨潤した. 続いて 0.1% aq.

TFA (10 μ L) を 2 回吸引, 吐出して樹脂を平衡化した. 次いで試料溶液をゆっくり吸引, 吐出して樹脂に試料を吸着させた後, 0.1% aq. TFA (10 μ L) を 2 回吸引, 吐出し, 脱塩を行った. 最後に α -CHCA の 50% aq. MeCN / 0.1% TFA 飽和溶液 (2.0 μ L) を吸引してサンプルを溶出させた後, ターゲットプレート上に直接スポットした.

1.4. HPLC

全ての分析, 分取 HPLC には JASCO セミマイクロ HPLC システム (ポンプ: PU-2085 Plus, ミキサー: MX-2080, デガッサー: DG-2080-53, UV 検出器: MD-2018, カラムオーブン: CO-2060 Plus) もしくは JASCO 分取 HPLC システム (ポンプ: PU-2089 Plus, UV 検出器: UV-4075, フラクションコレクター: ADVANTECH CHF 122SC, レコーダー: 807-IT) を使用した. 分析および分取カラムには Develosil[®] シリーズ RP-HPLC カラム (野村化学) を使用した.

2. 第2章の実験

2.1. BLAST 検索

BPP 類のアミノ酸配列相同性検索は UniProt 内の protein BLAST プログラムを使用した。BLAST 検索は BPP2 のアミノ酸配列を鋳型として使用し、ターゲットデータベースには UniProtKB reference proteomes + Swiss-Prot を用いた。また、得られたアミノ酸配列のアライメントには UniProt 内の Clustal omega プログラムを用いた。

2.2. Fmoc ペプチド固相合成 (Fmoc SPPS)

BPP2 [1–22] セグメント (**7**: Cys^{I-III} = Acn, **8**: Cys^I = H; Cys^{II} = Acn, Cys^{III} = *t*Bu), BPP2 [23–52] セグメント (**9**: Cys^{IV} = H; Cys^{V, VI} = Acn, **10**: Cys^{IV} = H; Cys^V = Acn; Cys^{VI} = *t*Bu) は Initiator+ SP Wave (Biotage) を用いて Fmoc 固相合成法で調製した。システム溶媒には DMF, 出発原料として H-L-Thr(*t*Bu)-hydrazide-2-chlorotriyl 樹脂, H-L-Pro-2-chlorotriyl 樹脂, Fmoc-L-Pro-triyl-PEG 樹脂を使用した。Fmoc 固相合成におけるアミノ酸の伸長は① Fmoc 基の除去, ② Fmoc アミノ酸の縮合の操作を繰り返して行った。

① Fmoc 基の除去

N 末端に Fmoc アミノ酸が担持された樹脂が入っている反応容器に下記の脱保護剤を加え 40 °C で 3 分間振とう後, 溶液を吸引除去した。

脱保護剤： 20% piperidine, 0.1 M HOBt / DMF

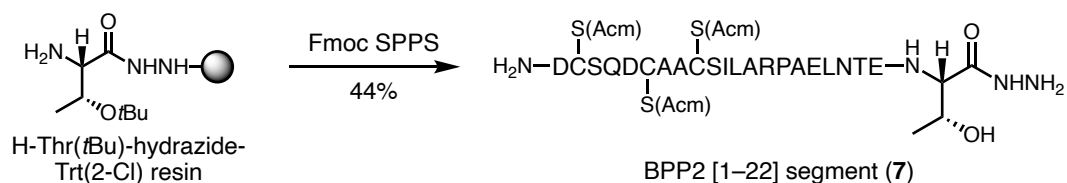
② Fmoc アミノ酸の縮合

N 末端の Fmoc 基除去が完了した反応容器に下記の縮合剤を加え, 70 °C で 10 分反応させた。なおエピメリ化を防ぐため Cys, His 残基の縮合反応では, 反応温度を 40 °C とした。また反応が遅い Cys, Arg 残基の縮合ではダブルカップリングを行った。

縮合剤： Fmoc アミノ酸 (4.0 当量), HCTU (4.0 当量), NMM (8.0 当量)

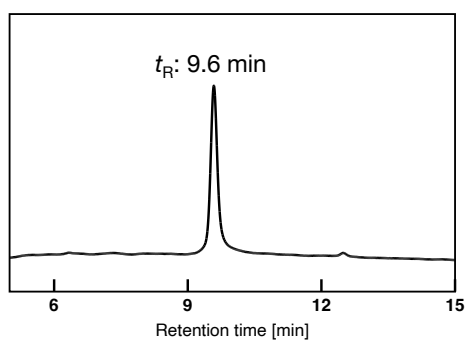
全てのアミノ酸残基の縮合が完了した後, 反応容器に DMF を加えて樹脂を 3 回, 次いで, CH_2Cl_2 で 3 回洗浄した. N_2 を吹き付けて樹脂を乾燥した後, TFA cleavage cocktail B (TFA / phenol / H_2O / TIPS = 88/5/5/2, v/wt/v/v, 30 mL/g 樹脂) を加え, 室温で 3 時間反応させた. 反応終了後, フィルターろ過により上清を回収し減圧濃縮して得られた溶液に, 氷冷した Et_2O を溶液の 10 倍量加えた. 0°C で 15 分静置して白色沈殿の生成を確認した後, 遠心分離 (1000 x g, 1 min) して上清を除去した. この Et_2O 沈殿と遠心分離, 上清除去の操作を 2 度繰り返す, 得られたペプチド混合物 (白色固体) を TFA 塩として回収するため 0.1% aq. TFA (ca. 5 mL) に溶解し, 凍結乾燥した.

2.3. BPP2 [1–22] セグメント 7 (Cys^{I-III} = Acm) の合成

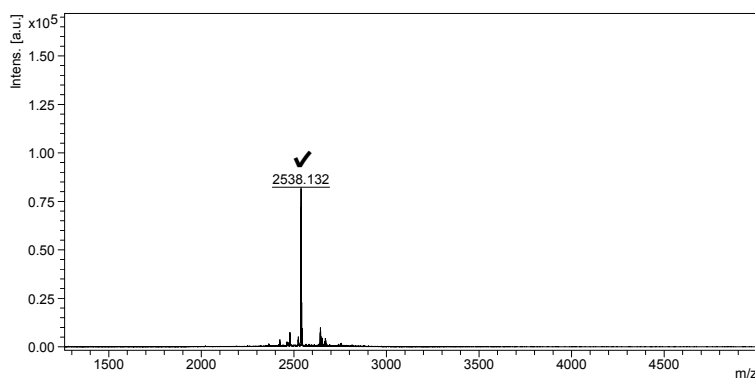


H-L-Thr(*t*Bu)-hydrazide-2-chlorotrityl 樹脂 (232.6 mg, 0.1000 mmol, loading: 0.43 mmol/g) を出発原料として 2.2 に述べた手順で合成した. 得られたペプチド混合物 (26.1 mg, 全体の 1/13 量) を逆相 HPLC [Develosil[®] RPAQUEOUS-AR-5 column (5 μm, φ 20 mm x *L* 250 mm), 22% aq. MeCN / 0.1% TFA, flow; 7.5 mL/min] で精製し, BPP2 [1–22] セグメント 7 (8.6 mg, 3.4 μmol, 換算収率 44%) を得た.

7: t_R : 9.6 min [Develosil[®] ODS-HG-5 column (5 μm, φ 4.6 mm x *L* 250 mm) at 25 °C, 20–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 2538.1 (calculated for C₁₀₀H₁₆₉N₃₂O₃₉S₃⁺ [M+H]⁺, Δ ± 0.0 Da).

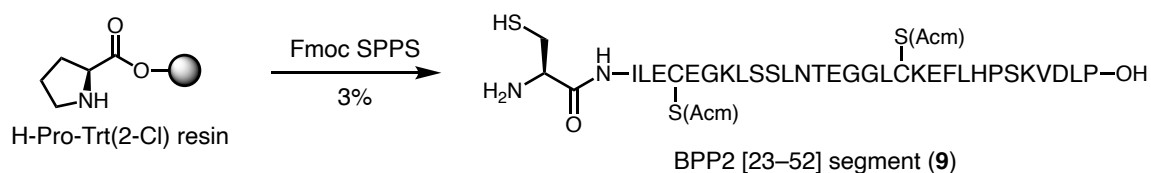


HPLC chart



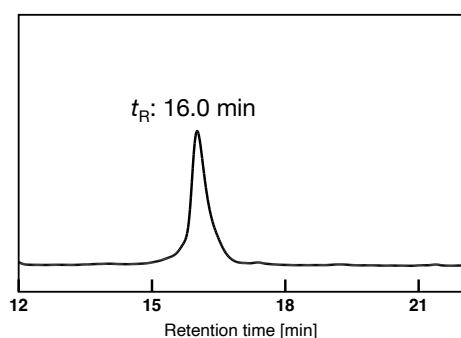
MALDI-TOF MS

2.4. BPP2 [23–53] セグメント **9** (Cys^{IV} = H; Cys^{V,VI} = AcM) の合成

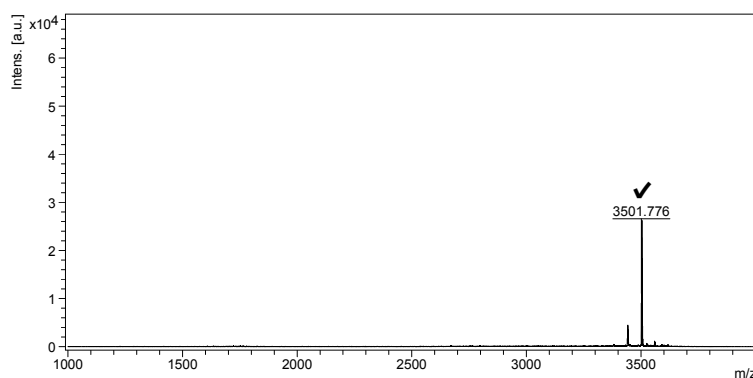


H-L-Pro-2-chlorotrytyl 樹脂 (161.2 mg, 0.1000 mmol, loading: 0.62 mmol/g) を出発原料として 2.2 に述べた手順で合成した。得られたペプチド混合物 (48.8 mg, 全体の 2/3 量) を逆相 HPLC [Develosil® RPAQUEOUS-AR-5 column (5 μm, φ 20 mm x L 250 mm), 25–40% aq. MeCN / 0.1% TFA for 90 min, flow; 5.0 mL/min] で精製し, BPP2 [23–52] セグメント **9** (7.8 mg, 2.2 μmol, 換算収率 3%) を得た。

9: t_R : 16.0 min [Develosil® ODS-HG-5 (5 μm, φ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 °C, 25–40% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 3501.8 (calculated for C₁₅₂H₂₅₀N₃₉O₄₉S₃⁺ [M+H]⁺, Δ +0.1 Da)

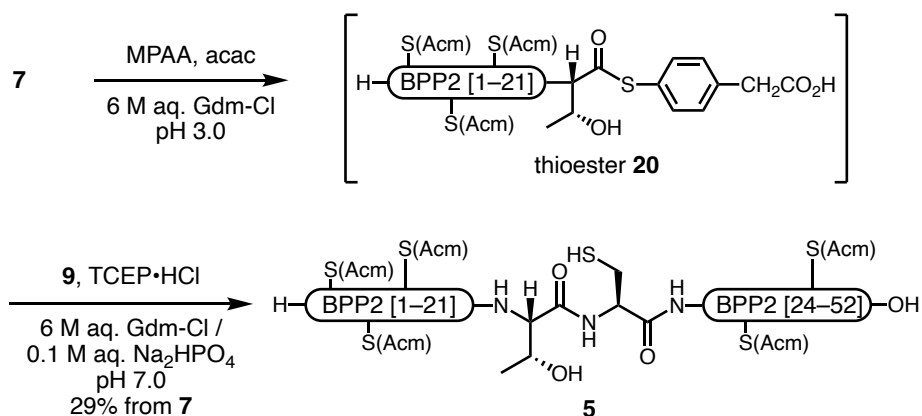


HPLC chart



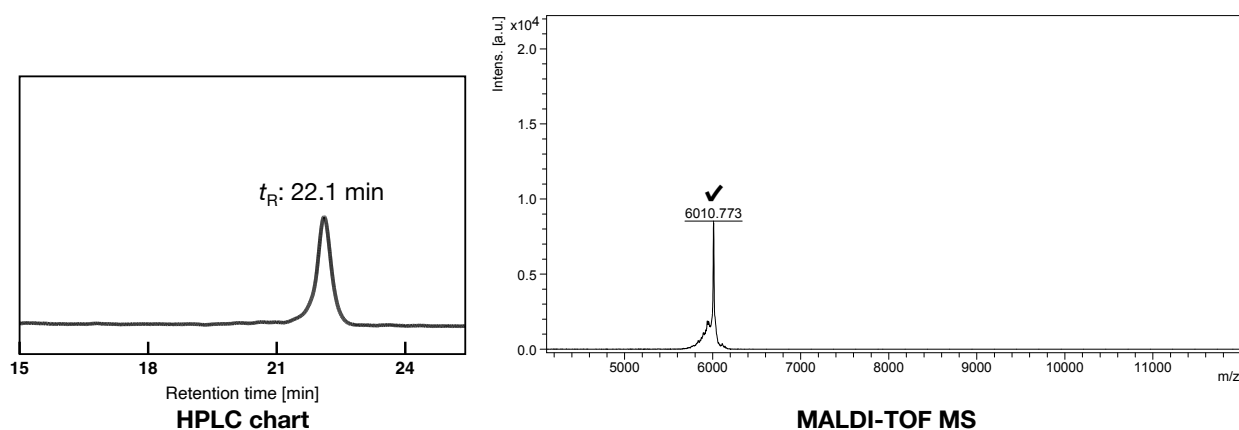
MALDI-TOF MS

2.5. 一本鎖 BPP2 [1–53] **5** (Cys^{I-III, V, VI} = AcM; Cys^{IV} = H) の合成

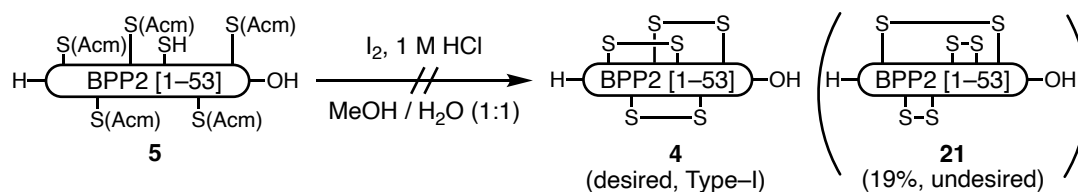


スナップキャップマイクロチューブ 2.0 mL に予め分注し凍結乾燥した BPP2 [1–22] セグメント **7** (1.2 mg, 420 nmol) に 6 M aq. Gdm-Cl (41.6 μL , pH 3.0) を加えて溶解した後, 0.2 M acetylacetone / 6 M aq. Gdm-Cl (10.4 μL , 2.10 μmol) と MPA (1.7 mg, 10 μmol) を加えた. 室温で 3 時間攪拌した後, 6 M Gdm-Cl / 0.2 M aq. Na₂HPO₄ (52 μL , pH 8.5) に溶解した BPP2 [23–52] セグメント **9** (1.7 mg, 420 nmol) と TCEP·HCl (1.5 mg, 5.2 μmol) を加え, 6 M aq. NaOH (5.5 μL) を加えて反応液を pH 7.0 に調整した. 室温で 24 時間攪拌した後, 20 mM aq. TCEP·HCl (1 mL) を加えて反応を停止し, 逆相 HPLC [Develosil[®] RPAQUEOUS-AR-5 column (5 μm , ϕ 20 mm x L 250 mm), 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 120 min, flow; 5.0 mL/min] で精製し, 一本鎖 BPP2 [1–52] **5** (0.8 mg, 100 nmol, 29% from **7**)を得た.

5: t_R : 22.1 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μm , ϕ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 °C, 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 60 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 6010.8 (calculated for C₂₅₂H₄₁₄N₆₉O₈₈S₆⁺ [M+H]⁺, Δ –0.1 Da)

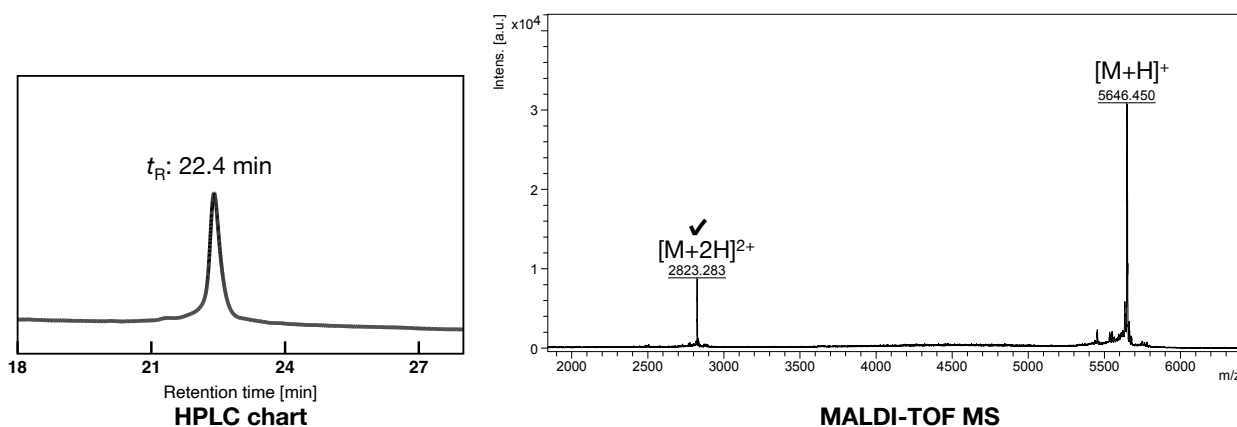


2.6. BPP2 (4) の合成の検討 (Figure 9)

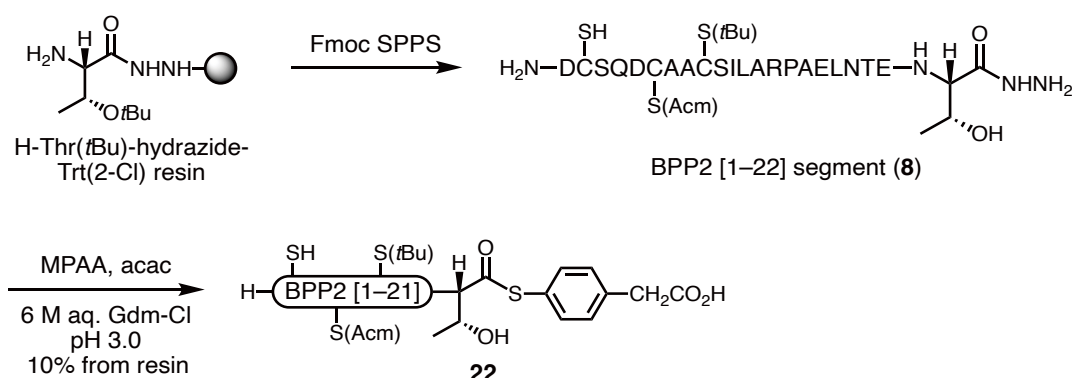


スナップキャップマイクロチューブ 2.0 mL に一本鎖 BPP2 [1-52] **5** (1.2 mg, 180 nmol) を量り取り, 50% aq. MeOH (784 μL) に溶解し, 1 M aq. HCl (120 μL) と 0.1 M I_2 / MeOH (89.6 μL , 8.96 μmol) を加えた. 室温で 2.5 時間攪拌し反応させた後, 1 M aq. sodium ascorbate (200 μL) を加えて反応を停止した. 反応液を減圧濃縮した後, 透析によって脱塩した. 得られた溶液を凍結乾燥し, 逆相 HPLC [Develosil[®] 300C₄-HG-5 column (5 μm , ϕ 20 mm x L 250 mm), 25–40% aq. MeCN / 0.1% TFA for 59.7 min, flow; 9.5 mL/min] で精製したが目的の Type-I 構造の BPP2 (**4**) は得られず, 異性体 **21** (0.3 mg, 50 nmol, 19%) が得られた.

21: t_R : 22.4 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μm , ϕ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 $^\circ\text{C}$, 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 2823.3 (calculated for $\text{C}_{237}\text{H}_{384}\text{N}_{64}\text{O}_{83}\text{S}_6^{2+}$ [$\text{M}+2\text{H}$]²⁺, $\Delta \pm 0.0$ Da)

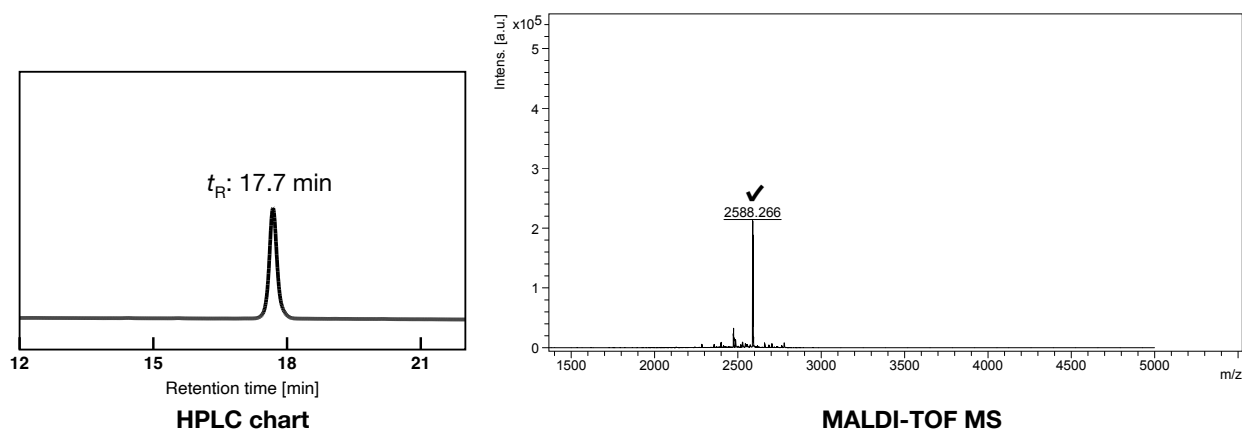


2.7. BPP2 [1–22] チオエステル **22** (Cys^I = H; Cys^{II} = AcM; Cys^{III} = *t*Bu) の合成

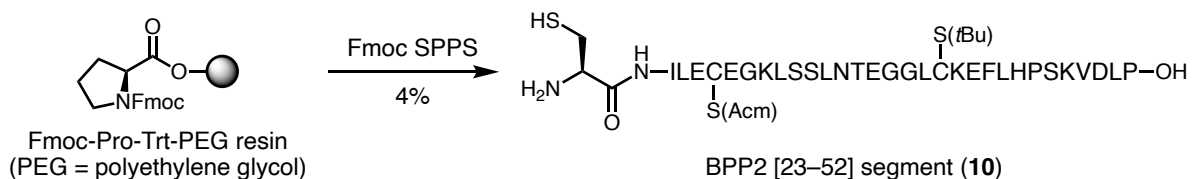


H-L-Thr(*t*Bu)-hydrazide-2-chlorotriyl 樹脂 (232.6 mg, 0.1000 mmol, loading: 0.43 mmol/g) を出発原料として 2.2 に述べた手順で合成した. 得られた混合物 (44.6 mg, 全体の 1/5 量) を 10 mL ナス型フラスコに量り取り, 6 M aq. Gdm-Cl (1.2 mL, pH 3.0) に溶解し, MPAA (33.6 mg, 200 μmol) と 0.1 M acetylacetone / 6 M aq. Gdm-Cl (800 μL , 80.0 μmol) を加えた. 室温で 1.5 時間攪拌して反応させた後, 過剰量の MPAA を綿栓ろ過で除去し, 反応液を凍結乾燥した. 得られた粗生成物 **8** を逆相 HPLC [Develosil[®] ODS-HG-5 column (5 μm , ϕ 20 mm x *L* 250 mm), 30–60% aq. MeCN / 0.1% TFA for 59.7 min, flow; 9.5 mL/min] で精製し, BPP2 [1-22] チオエステル **22** (5.4 mg, 2.1 μmol , 換算収率 10% in 2 steps) を得た.

22: t_R : 17.7 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μm , ϕ 4.6 mm x *L* 250 mm) at 25 °C, 30–60% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 2588.3 (calculated for $\text{C}_{106}\text{H}_{171}\text{N}_{28}\text{O}_{39}\text{S}_4^+$ [M+H]⁺, $\Delta +0.2$ Da)

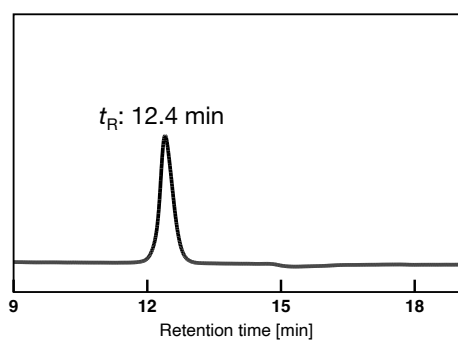


2.8. BPP2 [23–53] セグメント **10** (Cys^{IV} = H; Cys^V = Acn; Cys^{VI} = *t*Bu) の合成

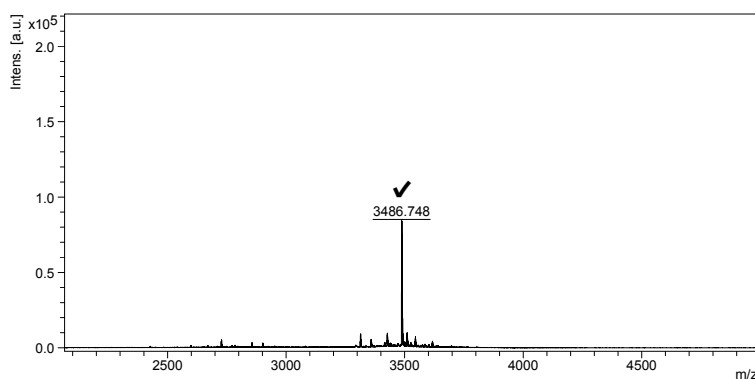


Fmoc-L-Pro-trityl-PEG 樹脂 (476.2 mg, 0.1000 mmol, loading: 0.21 mmol/g) を出発原料として 2.2 に述べた手順で合成した。得られた混合物 (24.6 mg, 全体の 1/4 量) を逆相 HPLC [Develosil[®] ODS-HG-5 column (5 μm, φ 20 mm x L 250 mm), 30–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 79.6 min, flow; 9.5 mL/min] で精製し、BPP2 [23–52] セグメント **10** (3.2 mg, 920 nmol, 換算収率 4%) を得た。

10: *t*_R: 12.4 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μm, φ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 °C, 30–60% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): *m/z* 3486.7 (calculated for C₁₅₃H₂₅₃N₃₈O₄₈S₃⁺ [M+H]⁺, Δ –0.1 Da)

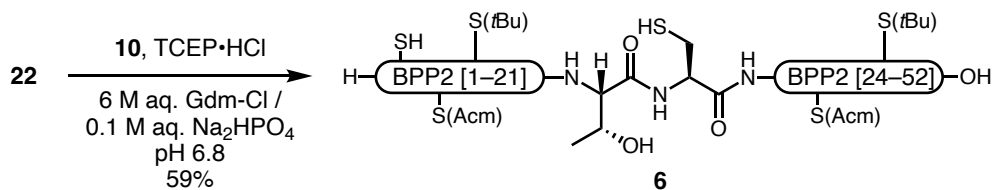


HPLC chart



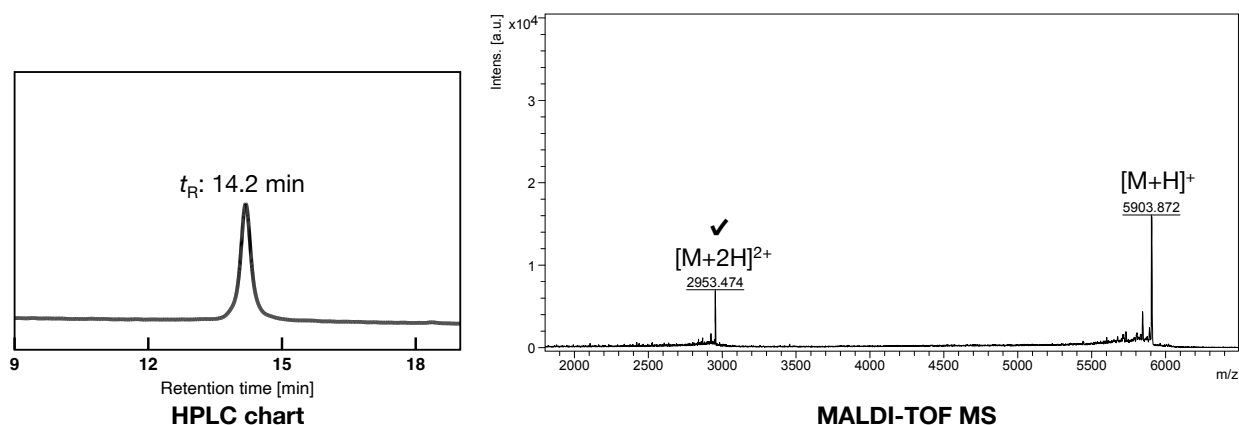
MALDI-TOF MS

2.9. 一本鎖 BPP2 [1–53] **6** (Cys^{I,IV} = H; Cys^{II,V} = Acn; Cys^{III,VI} = *t*Bu) の合成

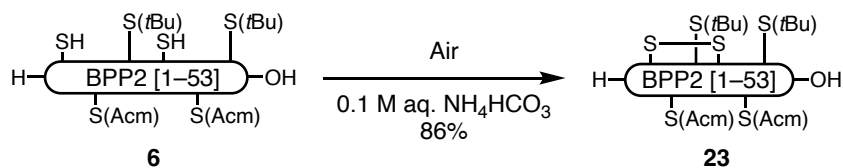


スナップキャップマイクロチューブ 2.0 mL に BPP2 [1–22] チオエステル **22** (1.6 mg, 550 nmol) と BPP2 [23–52] セグメント **10** (2.0 mg, 490 nmol) を量り取り, 6 M aq. Gdm-Cl / 0.1 M aq. Na₂HPO₄ (247 μ L) に溶解し, MPAA (0.4 mg, 3 μ mol) と TCEP·HCl (3.5 mg, 12 μ mol) を加え, 6 M aq. NaOH (6.5 μ L) を加えて反応液を pH 6.8 に調整した. 室温で 24 時間攪拌して反応させた後, 20 mM aq. TCEP·HCl (984 μ L) を加えて反応を停止し, 逆相 HPLC [Develosil[®] ODS-HG-5 column (5 μ m, ϕ 10 mm x *L* 250 mm), 25–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 48.0 min, flow; 2.5 mL/min] で精製し, 一本鎖 BPP2 [1–52] **6** (1.9 mg, 320 nmol, 59%)を得た.

6: t_R : 14.2 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μ m, ϕ 4.6 mm x *L* 250 mm) at 25 °C, 30–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 20 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 2953.5 (calculated for C₂₅₁H₄₁₆N₆₆O₈₅S₆²⁺ [M+2H]²⁺, Δ +0.1 Da)

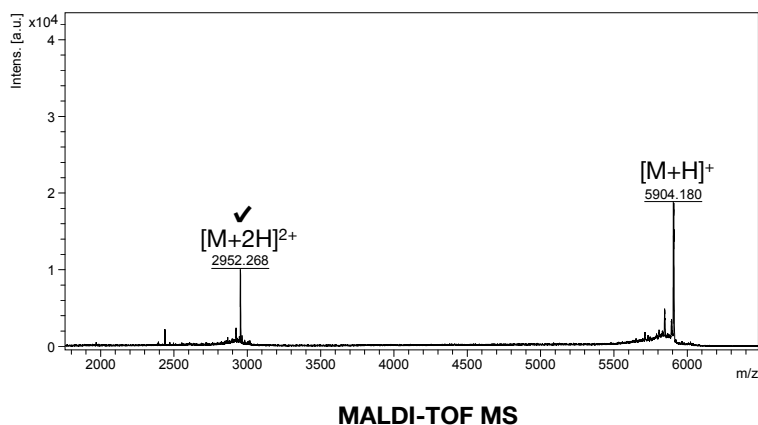
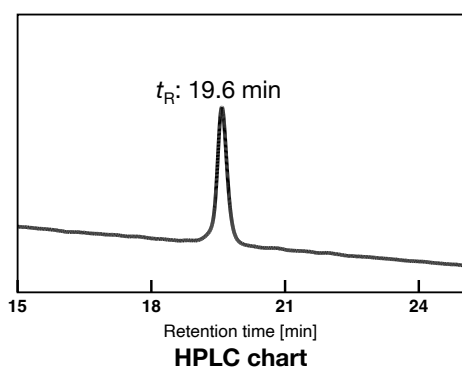


2.10. 1SS BPP2 (**23**) の合成

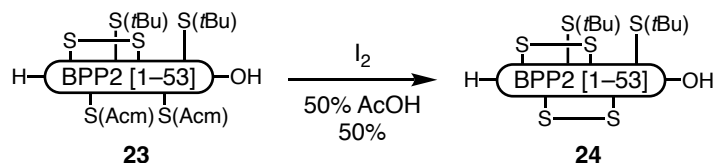


スナップキャップマイクロチューブ 1.5 mL に一本鎖 BPP2 [1-52] **6** (0.7 mg, 100 nmol) を量り取り, 0.1 M aq. NH_4HCO_3 (354 μL , pH 7.8) に溶解した. 室温で 18 時間静置して反応させた後, 10% aq. TFA (20 μL) を加えて反応を停止した. 反応液を凍結乾燥し, 得られた粗生成物を逆相 HPLC [Develosil[®] ODS-HG-5 column (5 μm , ϕ 10 mm x L 250 mm), 30–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 40.0 min, flow; 2.5 mL/min] で精製し, 1SS BPP2 **23** (0.6 mg, 100 nmol, 86%) を得た.

23: t_R : 19.6 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μm , ϕ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 $^\circ\text{C}$, 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 2952.3 (calculated for $\text{C}_{251}\text{H}_{414}\text{N}_{66}\text{O}_{85}\text{S}_6^{2+}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, $\Delta -0.1$ Da)

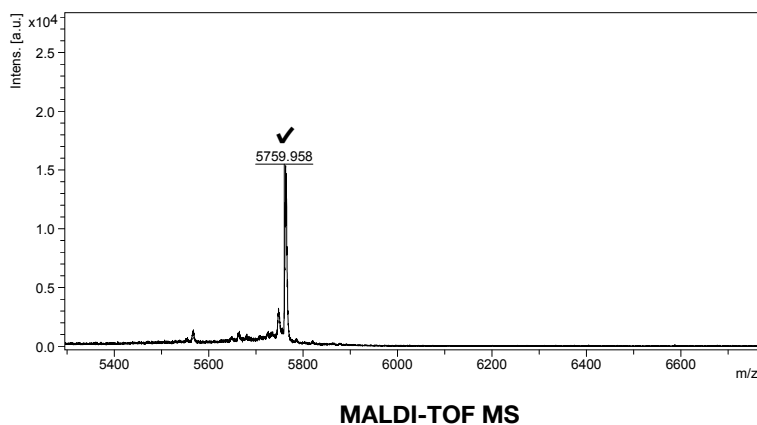
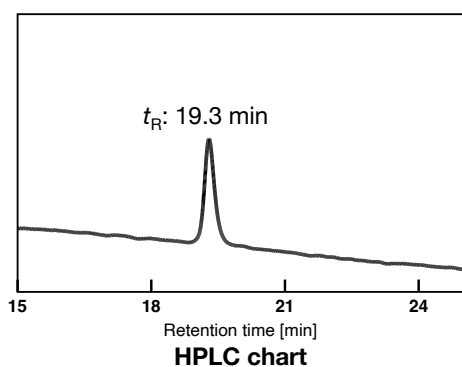


2.11. 2SS BPP2 (**24**) の合成

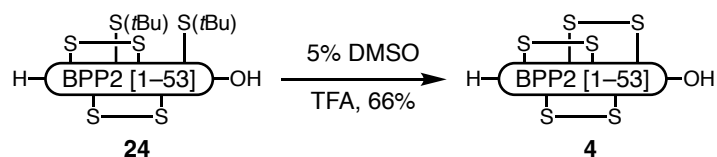


スナップキャップマイクロチューブ 1.5 mL に 1SS BPP2 **23** (0.6 mg, 90 nmol) を量り取り, 50% aq. AcOH (294 μL) に溶解し, 0.1 M I_2 / MeOH (9.1 μL , 910 nmol) を加えた. 室温で 1.5 時間攪拌して反応させた後, 1 M aq. sodium ascorbate (40 μL) を加えて反応を停止した. 反応液を減圧濃縮し, 凍結乾燥後, 得られた粗生成物を逆相 HPLC [Develosil[®] ODS-HG-5 column (5 μm , ϕ 10 mm x L 250 mm), 30–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 40.0 min, flow; 2.5 mL/min] で精製し, 2SS BPP2 **24** (0.6 mg, 100 nmol, 86%) を得た.

24: t_R : 19.3 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μm , ϕ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 $^\circ\text{C}$, 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 5760.0 (calculated for $\text{C}_{245}\text{H}_{401}\text{N}_{64}\text{O}_{83}\text{S}_6^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\Delta +0.3$ Da)

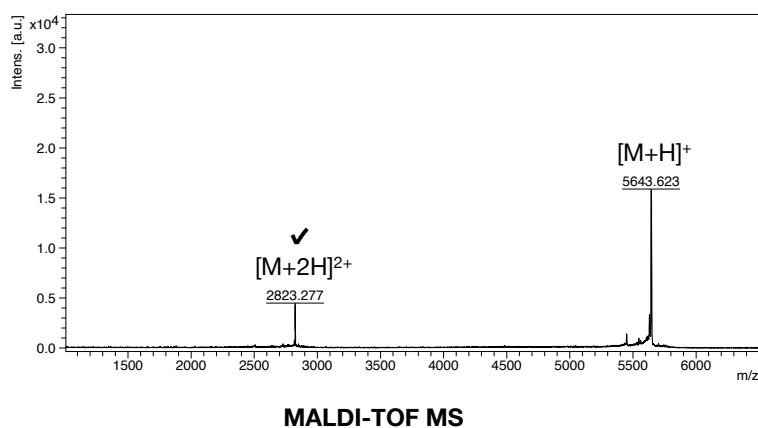
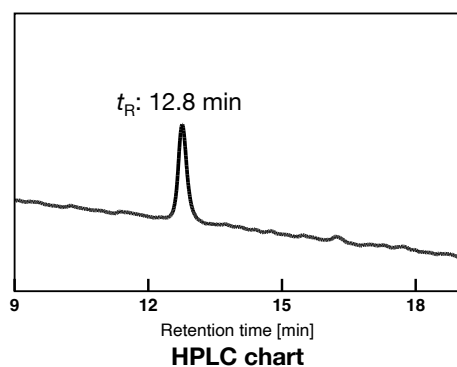


2.12. BPP2 (4) の合成



スナップキャップマイクロチューブ 1.5 mL に予め分注して凍結乾燥した 2SS BPP2 **24** (0.3 mg, 50 nmol) に 5% DMSO / TFA (155 μ L) を加えて溶解した。室温で 1 時間攪拌して反応させた後、ドラフト内で N_2 を吹き付けて TFA を除去した。残った反応液を 0.1% aq. TFA (1.0 mL) で希釈し凍結乾燥後、得られた粗生成物を逆相 HPLC [Develosil[®] ODS-HG-5 column (5 μ m, ϕ 10 mm x L 250 mm), 25–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 48.0 min, flow; 2.5 mL/min] で精製し、BPP2 **4** (0.2 mg, 40 nmol, 66%) を得た。

4: t_R : 12.8 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μ m, ϕ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 $^\circ\text{C}$, 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 2823.4 (calculated for $\text{C}_{237}\text{H}_{384}\text{N}_{64}\text{O}_{83}\text{S}_6^{2+}$ [$\text{M}+2\text{H}$]²⁺, $\Delta +0.1$ Da)



3. 第3章の実験

3.1. Revised BPP2 (25) の立体構造予測

Revised BPP2 (25) の立体構造予測は, ColabFold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>)^[68] を用いて実施した. ColabFold はタンパク質の立体構造予測プログラム, AlphaFold2^[69] の Google Colaboratory 版である. ColabFold を用いた 25 の立体構造予測にはアミノ酸配列情報のみを使用し, ColabFold の計算パラメータはデフォルトの設定を使用した. 得られた5つの予測構造は予測の信頼性を示す指標である pLDDT スコアの高い順に rank_1–5 と評価し, ChimeraX-1.4^[125] を用いて描画した.

なおジスルフィド結合は, ChimeraX-1.4 (システイン残基の硫黄原子が約 2 Å 以内に存在する残基同士を架橋する) によって描画されている.

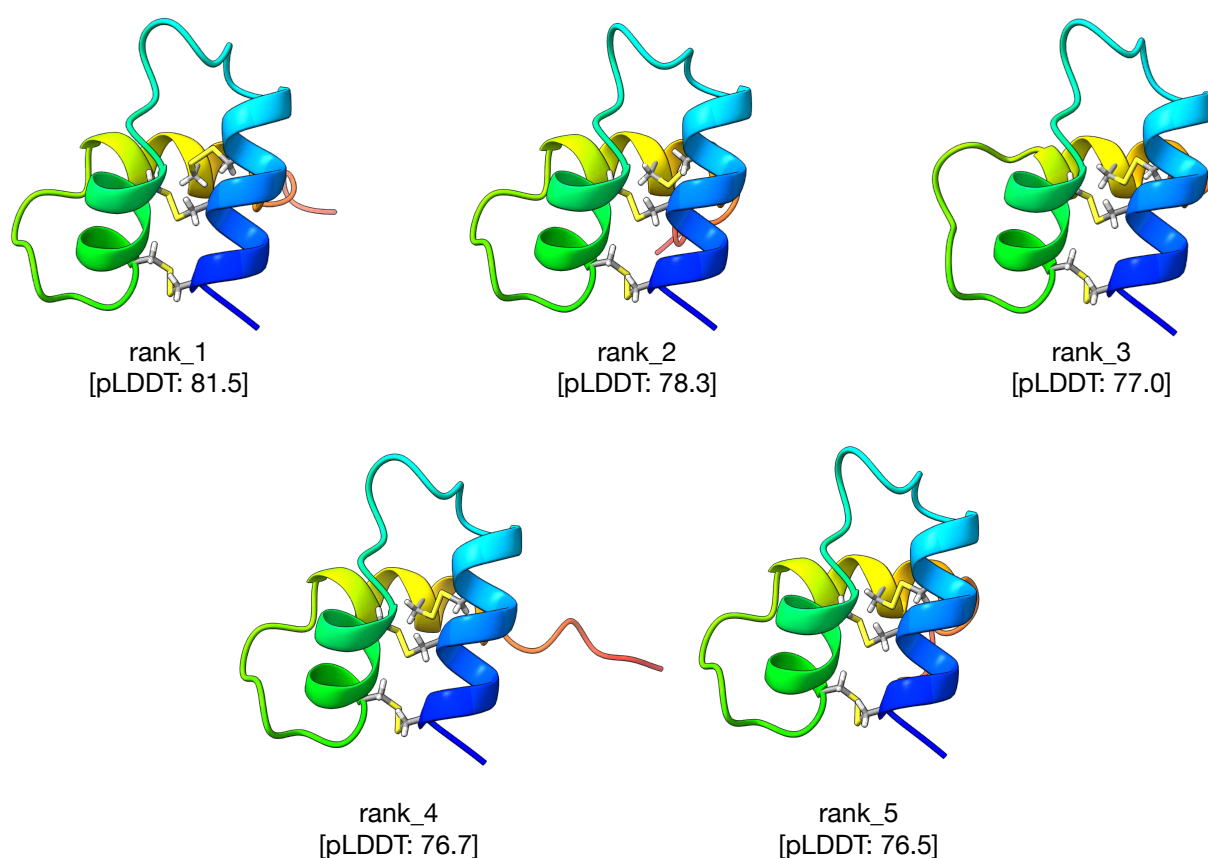


Figure 31. ColabFold プログラムで得られた revised BPP2 (25) の予測立体構造

3.2. Fmoc ペプチド固相合成 (Fmoc SPPS)

BPP2 [1–22] セグメント (27) および BPP2 [23–52] セグメント (28) は CS136X synthesizer (CSBio) を用いて Fmoc 固相合成法で調製した。Fmoc 固相合成は DMF をシステム溶媒, H-L-Thr(*t*Bu)-hydrazide もしくは Fmoc-L-Pro-OH を予め担持させた 2-chlorotriyl 樹脂を出発原料として使用した。Fmoc 固相合成におけるアミノ酸の伸長は① Fmoc 基の除去, ② Fmoc アミノ酸の縮合の操作を繰り返して行った。

① Fmoc 基の除去

Fmoc アミノ酸が担持された樹脂が入っている反応容器に脱保護剤を加え室温で 8 分間振とう後, 溶液を除去した。これを 2 度繰り返した。

脱保護剤： 20% piperidine / DMF

② Fmoc アミノ酸の縮合

Fmoc 基除去後の樹脂が入っている反応容器に下記の縮合剤を加え, 室温で 1 時間反応させた。なおエピメリ化を防ぐため Cys 残基の縮合反応では縮合剤を変更した上, 室温で 2 時間反応させた。また Fmoc アミノ酸の縮合が不十分であった場合は, 反応溶液を除去し再度, 同じ操作を繰り返した。反応終了後, 下記のキャッピング溶液を加えて室温で 10 分反応させ未反応の α -アミノ基をアセチル化した。

縮合剤： Fmoc アミノ酸 (4.0 当量), HCTU (3.6 当量), NMM (8.0 当量)

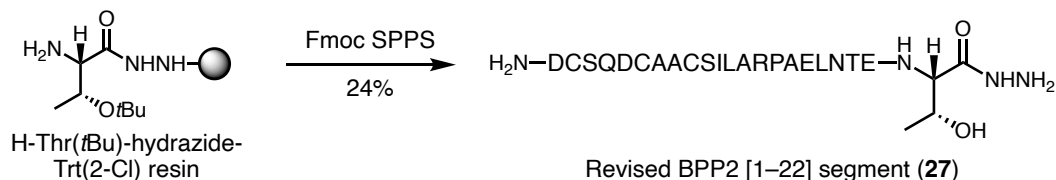
* Cys: エピメリ化を避けるため, DIC (4.0 当量), HOBT (4.0 当量)

キャッピング剤： 20% Ac₂O, 10% NMM / DMF

全てのアミノ酸の縮合が完了し, N 末端の Fmoc 基を除去した後, 反応溶液に DMF を加えて樹脂を 3 回洗浄した。その後, CH₂Cl₂ を加え同様に 3 回洗浄した。N₂ を吹き付けて樹脂を乾燥した後, TFA cleavage cocktail B (TFA / phenol / H₂O / TIPS = 88/5/5/2, v/wt/v/v, 30 mL/g 樹脂) を加え, 室温で 3 時間反応させた。反応終了後, フィルターろ過により上清を回収して減圧濃縮して得られた溶液に, 氷浴で冷却した Et₂O を溶液の 10 倍量加えた。0 °C で 15

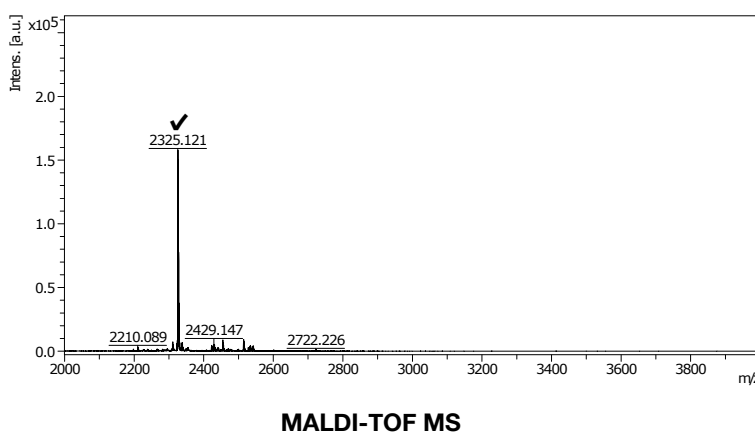
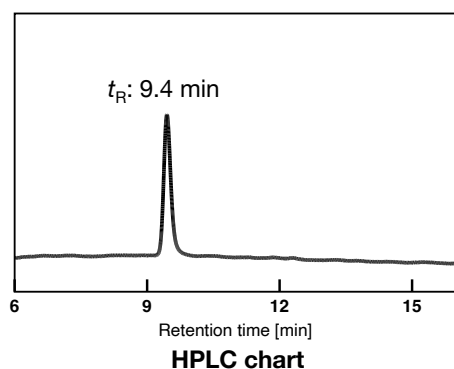
分静置して白色沈殿の生成を確認した後、遠心分離 (1000 x g, 1 min) して上清を除去した。この Et₂O 沈殿と遠心分離、上清除去の操作を 2 度繰り返し、得られたペプチド混合物 (白色固体) を TFA 塩として回収するため 0.1% aq. TFA (ca. 5 mL) に溶解し、凍結乾燥した。

3.3. Revised BPP2 [1–22] セグメント **27** の合成

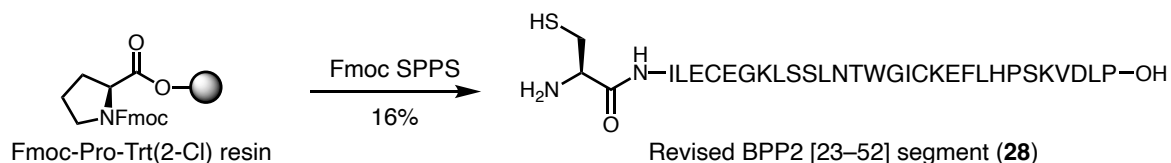


H-L-Thr(*t*Bu)-NHNH₂-2-chlorotrityl 樹脂 (500 mg, 0.200 mmol, loading: 0.35 mmol/g) を出発原料として 3.2 に述べた手順で合成した。得られた混合物 (92.6 mg, 全体の 1/4 量) を逆相 HPLC [Develosil® ODS-HG-5 column (5 μm, φ 20 mm x L 250 mm), 25% aq. MeCN/0.1% TFA for 10 min → 25–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 75.6 min, flow; 7.5 mL/min] で精製し, revised BPP2 [1–22] セグメント **27** (24.2 mg, 10.4 μmol, 換算収率 24%) を得た。

27: *t_R*: 9.4 min [Develosil® ODS-HG-5 column (5 μm, φ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 °C, 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): *m/z* 2325.1 (calculated for C₉₁H₁₅₄N₂₉O₃₆S₃⁺ [M+H]⁺, Δ +0.1 Da).

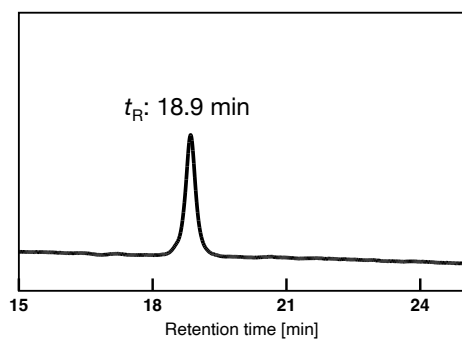


3.4. Revised BPP2 [23–52] セグメント **28** の合成

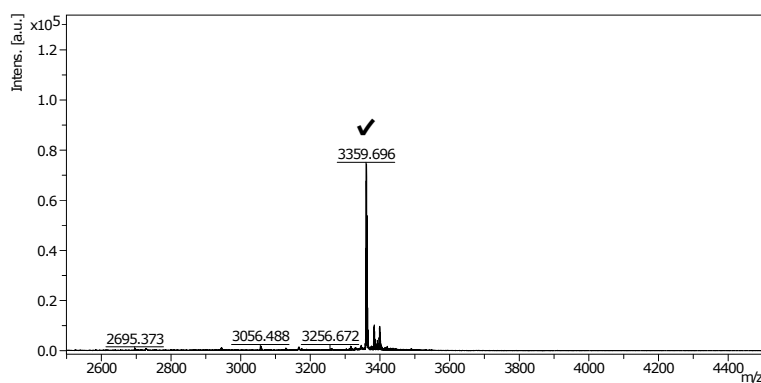


Fmoc-L-Pro-2-chlorotrityl 樹脂 (1.0 g, 0.29 mmol, loading: 0.29 mmol/g) を出発原料として 3.2 に述べた手順で合成した。得られた混合物 (142.0 mg, 全体の 1/7 量) を逆相 HPLC [Develosil® ODS-HG-5 column (5 μ m, ϕ 20 mm x *L* 250 mm), 30% aq. MeCN/0.1% TFA for 10 min \rightarrow 30–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 75.6 min, 7.5 mL/min] で精製し, revised BPP2 [23–52] セグメント **28** (22.4 mg, 6.66 μ mol, 換算収率 16%) を得た。

28: t_R : 18.9 min [Develosil® ODS-HG-5 (5 μ m, ϕ 4.6 mm x *L* 250 mm) at 25 $^{\circ}$ C, 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 3359.7 (calculated for $C_{150}H_{240}N_{37}O_{44}S_3^+$ [M+H] $^+$, $\Delta \pm 0.0$ Da)

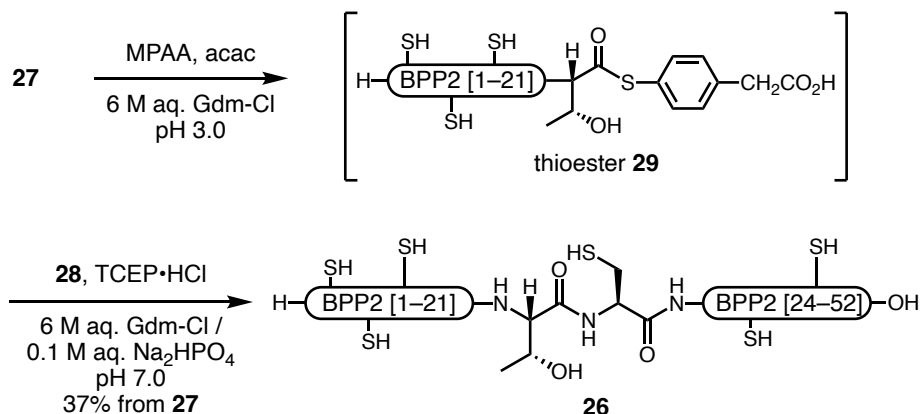


HPLC chart



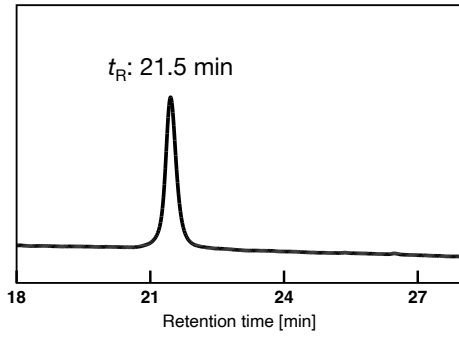
MALDI-TOF MS

3.5. 一本鎖 revised BPP2 [1–52] **26** の合成

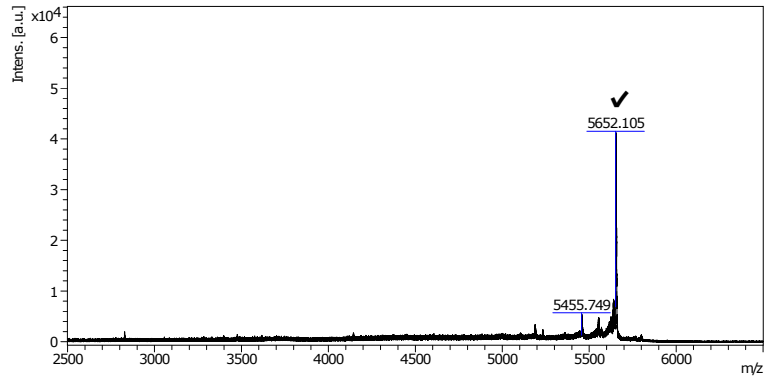


スナップキャップマイクロチューブ 2.0 mL に revised BPP2 [1–22] セグメント **27** (5.8 mg, 2.4 μmol) を量り取り, 6 M aq. Gdm-Cl (270 μL , pH 3.0) に溶解した後, 1 M acetylacetone / 6 M aq. Gdm-Cl (23.5 μL , 23.5 μmol) と MPAA (9.9 mg, 59 μmol) を加えて室温で 2 時間攪拌した。その後, 6 M Gdm-Cl / 0.2 M aq. Na_2HPO_4 (294 μL , pH 8.5) に溶解した revised BPP2 [23–52] セグメント **28** (9.0 mg, 2.6 μmol) と TCEP·HCl (4.2 mg, 15 μmol) を加え, 6 M aq. NaOH (5.0 μL) を用いて反応液を pH 7.0 に調整した。室温で 23 時間攪拌して反応させた後, 20 mM aq. TCEP·HCl (1 mL) を加えて反応を停止し, 逆相 HPLC [Develosil[®] ODS-HG-5 column (5 μm , ϕ 20 mm x L 250 mm), 20% aq. MeCN / 0.1% TFA for 10 min \rightarrow 20–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 75.6 min, flow; 7.5 mL/min] で精製し, 一本鎖 revised BPP2 [1–52] **26** (4.9 mg, 870 nmol, 37% from **27**) を得た。

27: t_R : 21.5 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μm , ϕ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 $^\circ\text{C}$, 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 5652.1 (calculated for $\text{C}_{241}\text{H}_{389}\text{N}_{64}\text{O}_{80}\text{S}_6^+$ [M+H]⁺, $\Delta +0.4$ Da)

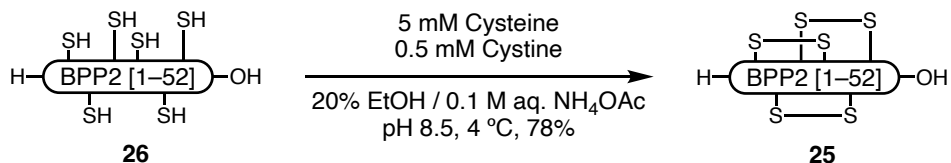


HPLC chart



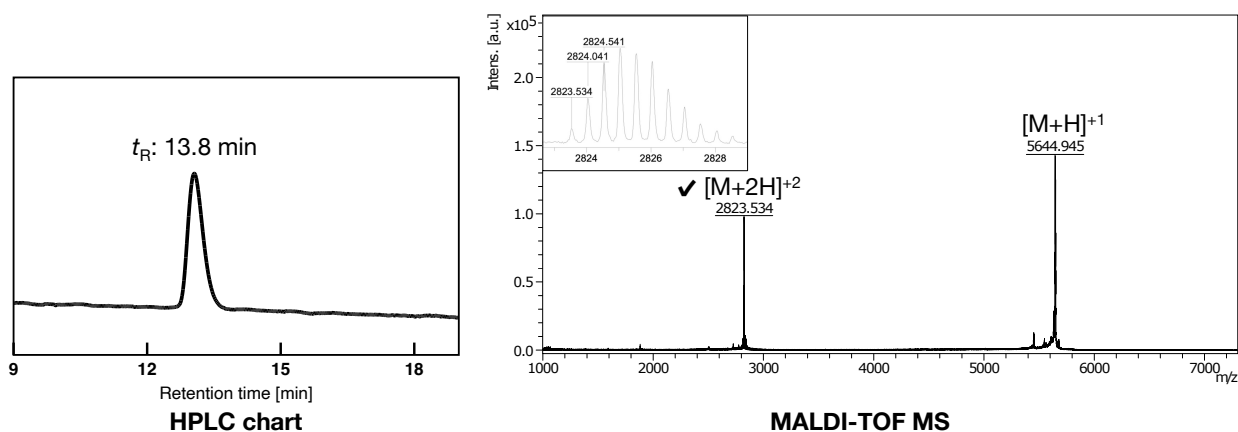
MALDI-TOF MS

3.6. Revised BPP2 (**25**) の合成



15 mL ファルコンチューブに一本鎖 revised BPP2 [1–52] **26** (1.3 mg, 0.21 μmol) を量り取り, 5 mM cysteine / 0.5 mM cystine の 20% EtOH / 0.1 M aq. NaOAc 溶液 (4.1 mL, pH 8.5) に溶解した. 4 $^\circ\text{C}$ で 24 時間静置して反応させた後, 反応溶液を凍結乾燥して得られた粗生成物を逆相 HPLC [Develosil[®] ODS-HG-5 column (5 μm , ϕ 4.6 mm x L 250 mm), 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow; 1.0 mL/min] で精製し, revised BPP2 (**25**) (1.0 mg, 180 nmol, 78%) を得た.

25: t_R : 13.8 min [Develosil[®] ODS-HG-5 (5 μm , ϕ 4.6 mm x L 250 mm) at 25 $^\circ\text{C}$, 25–55% aq. MeCN / 0.1% TFA for 30 min, flow rate 1.0 mL/min, detect; 214 nm, see below]. MS (MALDI-TOF): m/z 2823.5 (calculated for $\text{C}_{241}\text{H}_{384}\text{N}_{64}\text{O}_{80}\text{S}_6^{2+}$ [$\text{M}+2\text{H}$]²⁺, $\Delta +0.2$ Da)



3.7. Revised BPP2 (**25**) の CD スペクトル測定

CD スペクトルの測定には JASCO J-1500 CD spectrometer (日本分光) を使用した。

25 の 50 mM aq. KHPO₄ (6 M aq. KOH で pH 7.0 に調整) 溶液 (終濃度 5 μM) を調製し、光路長 1 mm のガラスキャップ付き石英セル (1 x 10 x H45 mm, 東京硝子機械) に移して 25 °C で測定した。

各測定パラメーターは以下のように設定した。測定波長: 260–190 nm, データ取込間隔: 1 nm, CD スケール: 20 mdeg/0.05 dOD, レスポンス (D.I.T.): 2 秒, 走査速度: 20 nm/分, 積算回数: 10 回。なお **25** の CD スペクトルから同条件で測定したブランク溶液のスペクトルを減算し、**25** の CD スペクトルとした。

3.8. BPP2 の CD スペクトルを用いた二次構造の含有率の解析

ColabFold で得られた BPP2 の予測立体構造 (Figure 12, 31) のうち、pLDDT スコアが最も高い構造 (rank_1) をクエリとして PDBMD2CD サーバー (<https://pdbmd2cd.cryst.bbk.ac.uk>)^[82] を用いて予測構造の CD スペクトルを計算した。計算した CD スペクトル、および **25** の実測 CD スペクトルデータを基に K2D3 サーバー (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~andrade/k2d3/>)^[83], BeStSel サーバー(<https://bestsel.elte.hu/index.php>)^[84] を用いて BPP2 の二次構造の含有率をそれぞれ算出した。

3.9. Revised BPP2 (**25**) の直接的な Glu-C 消化

スナップキャップマイクロチューブ 0.6 mL に予め分注し凍結乾燥した **25** (15 μg, 2.7 nmol) を 54 mM aq. NH₄HCO₃ (46.5 μL, pH 7.0) に溶解し、1% ProteaseMAX™ Surfactant (1.0 μL), Glu-C (250 ng in 2.5 μL of DDW) を加えた。37 °C で 18 時間反応させた後、10% aq. TFA (2.0 μL) を加えて反応を停止した。反応液を ZipTipC₁₈ (Merck Millipore) で脱塩した後、MALDI MS を測定した。

3.10. Revised BPP2 (**25**) のジスルフィド結合様式解析

前項で述べた手法では **25** の酵素消化が不十分であったため、次に **25** の一部のジスルフィド結合を還元 *S*-アルキル化してから酵素消化を行った。 [71, 72]

① ジスルフィド結合の部分還元と NEM を用いた *S*-アルキル化

スナップキャップマイクロチューブ 0.6 mL に予め分注し凍結乾燥した **25** (25 μ g, 4.4 nmol) に 6 M Gdm-Cl / 0.1 M クエン酸緩衝液 (4.4 μ L, pH 3.0) を加え、65 °C で 20 分静置して変性させた後、10 mM TCEP·HCl / 0.1 M クエン酸緩衝液 (1.3 μ L, pH 3.0) を加えた。65 °C で 15 分静置した後、0.2 M NEM / 0.1 M クエン酸緩衝液 (5.3 μ L) を加えて 27 °C で 20 分静置して反応させた。得られた反応液を逆相 HPLC [Develosil® ODS-HG-5 column (5 μ m, ϕ 4.6 mm x *L* 250 mm) at 25 °C, 20% aq. MeCN / 0.1% TFA for 5 min \rightarrow 20–50% aq. MeCN / 0.1% TFA for 60 min, flow; 1.0 mL/min] で精製し、**25**, 2SS-a (**32**), 2SS-b (**33**), 1SS-a (**34**), 1SS-b (**35**), OSS (**36**) を得た。

② DTT を用いたジスルフィド結合の還元, IAM を用いた *S*-アルキル化, 酵素消化

スナップキャップマイクロチューブ 0.6 mL に予め分注し凍結乾燥した上記の NEM-アルキル化ペプチド **32**, **33**, **34**, **35** に、それぞれ 45 mM DTT / 52.6 mM aq. NH₄HCO₃ (2.0 μ L, pH 7.0) を加えて溶解し、50 °C で 15 分静置した。0.1 M IAM / 52.6 mM aq. NH₄HCO₃ (1.0 μ L) を加え 27 °C で 15 分静置した後、52.6 mM aq. NH₄HCO₃ (16 μ L) で希釈し、Glu-C (50 ng in 1.0 μ L of DDW) を加えて 37 °C で 3 時間反応させた。得られた反応溶液の MALDI MS, MS/MS を直接測定した。

4. 第4章の実験

4.1. ミールワーム麻痺活性試験

ミールワーム麻痺活性試験には市販のツヤケシオオゴミムシダマシ (*Zophobas atratus*) の幼虫 (体重 0.7 – 1.0 g) を使用した。チャック付きポリ袋にミールワームを入れて上から軽く抑えることで固定し、シリンジ (マイインジェクター® 29Gx1/2", SS-05M2913, TERUMO) を用いて revised BPP2 (25) の PBS (-) 溶液 (50 – 100 μ L) を腹腔内投与した。シリンジの針はミールワームの頭部から数えて3番目の節に、頭部へ向けて差し込み、針の1/3–1/2程度の深度まで挿入した。投与後、チャック付きポリ袋からミールワームを取り出し、シャーレ内に移して観察した。投与直後に麻痺があったものやブランク (PBS (-) 溶液) と比較して外部刺激 (ピンセットでつまんで仰向けにするなど) に対する反応が弱かった場合に、有意な効果があると判断した。

4.2. 電気生理学的解析

電気生理学的解析にはヒト電位依存性 T 型 Ca チャネル (hCa_v3.2) または N 型 Ca チャネル (hCa_v2.2) を発現させたヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞を用いた。細胞内への Ca²⁺ の流入に伴う電流の変化をホールセルパッチクランプ法で測定し、基本的な実験操作は伊藤らの手法に従った。^[126] パッチクランプの増幅には Axopatch 200B Amplifier (Molecular Devices) を使用した。ホールセル電流は、保持電位 -90 mV から +80 mV まで +10 mV 毎の脱分極ステップパルス (200 ms) を与えて測定した。電流は 2 kHz でフィルタリングした後、A/D 変換器 Digidata 1440A (Molecular Devices) を介してデジタル化し、5 kHz でサンプリングした。電流-電圧曲線 (I-V 曲線) はパルスを与えた後のホールセル電流 (I) を細胞膜容量 (C_m) で除して計算した値を細胞膜電位に対してプロットし作成した。Ca²⁺ 電流の記録は 125 mM N-methyl-D-glucamine, 5 mM 4-aminopyridine, 20 mM tetraethyl-ammonium chloride, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM D-glucose を含み 10 mM HEPES で pH 7.4 に調整した緩衝液中で行った。また Ca²⁺ 電流記録用のパッチピペット内液には 130 mM CsCl, 10 mM EGTA, 3 mM Mg-ATP, 0.4 mM Li-GTP を含み 25 mM HEPES で pH 7.2 に調整した溶液を用いた。

引用文献

- [1] Muttenthaler, M.; King, G. F.; Adams, D. J.; Alewood, P. F. Trends in Peptide Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2021**, *20* (4), 309–325.
- [2] Wang, L.; Wang, N.; Zhang, W.; Cheng, X.; Yan, Z.; Shao, G.; Wang, X.; Wang, R.; Fu, C. Therapeutic Peptides: Current Applications and Future Directions. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2022**, *7* (1), 1–27.
- [3] Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, **2013**, *1830* (6), 3670–3695.
- [4] Jin, A.-H.; Muttenthaler, M.; Dutertre, S.; Himaya, S. W. A.; Kaas, Q.; Craik, D. J.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F. Conotoxins: Chemistry and Biology. *Chem. Rev.*, **2019**, *119* (21), 11510–11549.
- [5] Miljanich, G. P. Ziconotide: Neuronal Calcium Channel Blocker for Treating Severe Chronic Pain. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, *11* (23), 3029–3040.
- [6] McGivern, J. G. Ziconotide: A Review of Its Pharmacology and Use in the Treatment of Pain. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **2007**, *3* (1), 69–85.
- [7] Olivera, B. M.; Cruz, L. J.; De Santos, V.; LeCheminant, G.; Griffin, D.; Zeikus, R.; McIntosh, J. M.; Galyean, R.; Varga, J. Neuronal Calcium Channel Antagonists. Discrimination between Calcium Channel Subtypes Using ω -Conotoxin from *Conus Magus* Venom. *Biochemistry*, **1987**, *26* (8), 2086–2090.
- [8] Kohno, T.; Kim, J. I.; Kobayashi, K.; Kodera, Y.; Maeda, T.; Sato, K. Three-Dimensional Structure in Solution of the Calcium Channel Blocker ω -Conotoxin MVIIA. *Biochemistry*, **1995**, *34* (32), 10256–10265.
- [9] Knop, F. K.; Brønden, A.; Vilsbøll, T. Exenatide: Pharmacokinetics, Clinical Use, and Future Directions. *Expert Opin. Pharmacother.*, **2017**, *18* (6), 555–571.
- [10] Ojeda, P. G.; Wang, C. K.; Craik, D. J. Chlorotoxin: Structure, Activity, and Potential Uses in Cancer Therapy. *Pept. Sci.*, **2016**, *106* (1), 25–36.
- [11] Eng, J.; Kleinman, W. A.; Singh, L.; Singh, G.; Raufman, J. P. Isolation and Characterization of Exendin-4, an Exendin-3 Analogue, from *Heloderma Suspectum* Venom. Further Evidence for an Exendin Receptor on Dispersed Acini from Guinea Pig Pancreas. *J. Biol. Chem.*, **1992**,

267 (11), 7402–7405.

- [12] Nielsen, L. L.; Young, A. A.; Parkes, D. G. Pharmacology of Exenatide (Synthetic Exendin-4): A Potential Therapeutic for Improved Glycemic Control of Type 2 Diabetes. *Regul. Pept.*, **2004**, *117* (2), 77–88.
- [13] DeBin, J. A.; Maggio, J. E.; Strichartz, G. R. Purification and Characterization of Chlorotoxin, a Chloride Channel Ligand from the Venom of the Scorpion. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, **1993**, *264* (2), C361–C369.
- [14] Lippens, G.; Najib, J.; Wodak, S. J.; Tartar, A. NMR Sequential Assignments and Solution Structure of Chlorotoxin, a Small Scorpion Toxin That Blocks Chloride Channels. *Biochemistry*, **1995**, *34* (1), 13–21.
- [15] Soroceanu, L.; Gillespie, Y.; Khazaeli, M. B.; Sontheimer, H. Use of Chlorotoxin for Targeting of Primary Brain Tumors. *Cancer Res.*, **1998**, *58* (21), 4871–4879.
- [16] Butte, P. V.; Mamelak, A.; Parrish-Novak, J.; Drazin, D.; Shweikeh, F.; Gangalum, P. R.; Chesnokova, A.; Ljubimova, J. Y.; Black, K. Near-Infrared Imaging of Brain Tumors Using the Tumor Paint BLZ-100 to Achieve near-Complete Resection of Brain Tumors. *Neurosurg. Focus*, **2014**, *36* (2), E1.
- [17] Yamada, M.; Miller, D. M.; Lowe, M.; Rowe, C.; Wood, D.; Soyer, H. P.; Byrnes-Blake, K.; Parrish-Novak, J.; Ishak, L.; Olson, J. M.; et al. A First-in-Human Study of BLZ-100 (Tozuleristide) Demonstrates Tolerability and Safety in Skin Cancer Patients. *Contemp. Clin. Trials Commun.*, **2021**, *23*, 100830.
- [18] Leary, S.; Blatt, J. E.; Cohen, A. R.; Cohen, K. J.; Cole, B.; Governale, L.; Gupta, N.; Hauptman, J. S.; Jackson, E. M.; Kebriaei, M. A.; et al. A Phase II/III Randomized, Blinded Study of Tozuleristide for Fluorescence Imaging Detection during Neurosurgical Resection of Pediatric Primary Central Nervous System (CNS) Tumors: PNOC012 (Pacific Pediatric Neuro-Oncology Consortium). *J. Clin. Oncol.*, **2020**, *38* (15_suppl), TPS2575–TPS2575.
- [19] Topsell, E.; Gessner, C.; Moffett, T.; Rowland, J. *The History of Four-Footed Beasts*, The whole rev., cor.inl. with the addition of two useful physical tables, by John Rowland M.D.; Printed by E. Cotes, for G. Sawbridge: London, 1658; pp 417–422.
- [20] Ligabue-Braun, R. *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins*; Malhotra, A., Ed.; Toxinology; Springer Netherlands: Dordrecht, 2017; pp 235–257.

- [21] Ligabue-Braun, R.; Verli, H.; Carlini, C. R. Venomous Mammals: A Review. *Toxicon*, **2012**, *59* (7), 680–695.
- [22] Pearson, O. P. On the Cause and Nature of a Poisonous Action Produced by the Bite of a Shrew (*Blarina Brevicauda*). *J. Mammal.*, **1942**, *23* (2), 159–166.
- [23] Dufton, M. J. Venomous Mammals. *Pharmacol. Ther.*, **1992**, *53* (2), 199–215.
- [24] Kowalski, K.; Rychlik, L. Venom Use in Eulipotyphlans: An Evolutionary and Ecological Approach. *Toxins*, **2021**, *13* (3), 231.
- [25] Derbridge, J. J.; Posthumus, E. E.; Chen, H. L.; Koprowski, J. L. *Solenodon Paradoxus* (Soricomorpha: Solenodontidae). *Mamm. Species*, **2015**, *47* (927), 100–106.
- [26] Kowalski, K.; Rychlik, L. The Role of Venom in the Hunting and Hoarding of Prey Differing in Body Size by the Eurasian Water Shrew, *Neomys Fodiens*. *J. Mammal.*, **2018**, *99* (2), 351–362.
- [27] Martin, I. G. Venom of the Short-Tailed Shrew (*Blarina Brevicauda*) as an Insect Immobilizing Agent. *J. Mammal.*, **1981**, *62* (1), 189–192.
- [28] Gundlanch, J. In *Contribucion a la mamalogia cubana*; Impr. De G. Montiel y comp.: Habana, 1877; pp 39–44.
- [29] Casewell, N. R.; Petras, D.; Card, D. C.; Suranse, V.; Mychajliw, A. M.; Richards, D.; Koludarov, I.; Albulescu, L.-O.; Slagboom, J.; Hempel, B.-F.; Ngum, N. M.; Kennerley, R. J.; Brocca, J. L.; Whiteley, G.; Harrison, R. A.; Bolton, F. M. S.; Devono, J.; Vonk, F. J.; Alföldi, J.; Johnson, J.; Karlsson, E. K.; Lindblad-Toh, K.; Mallor, I. R.; Süßmuth, R. D.; Fry, B. G.; Kuruppu, S.; Hodgson, W. C.; Kool, J.; Castoe, T. A.; Barnes, I.; Snugger, K.; Undheim, E. A. B.; Turvey, S. T. Solenodon Genome Reveals Convergent Evolution of Venom in Eulipotyphlan Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2019**, *116* (51), 25745–25755.
- [30] Kita, M. Bioorganic studies on the venom from duckbill platypus. *Pure Appl. Chem.*, **2012**, *84* (6), 1317–1328.
- [31] Grant, T. R.; Temple-Smith, P. D. Field Biology of the Platypus (*Ornithorhynchus Anatinus*): Historical and Current Perspectives. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **1998**, *353* (1372), 1081–1091.
- [32] Kita, M.; Black, D. StC.; Ohno, O.; Yamada, K.; Kigoshi, H.; Uemura, D. Duck-Billed Platypus Venom Peptides Induce Ca²⁺ Influx in Neuroblastoma Cells. *J. Am. Chem. Soc.*,

2009, *131* (50), 18038–18039.

- [33] Uemura, D.; Kita, M.; Arimoto, H.; Kitamura, M. Recent Aspects of Chemical Ecology: Natural Toxins, Coral Communities, and Symbiotic Relationships. *Pure Appl. Chem.*, **2009**, *81* (6), 1093–1111.
- [34] Hanf, Z. R.; Chavez, A. S. A Comprehensive Multi-Omic Approach Reveals a Relatively Simple Venom in a Diet Generalist, the Northern Short-Tailed Shrew, *Blarina brevicauda*. *Genome Biol. Evol.*, **2020**, *12* (7), 1148–1166.
- [35] Warren, W. C.; Hillier, L. W.; Marshall Graves, J. A.; Birney, E.; Ponting, C. P.; Grützner, F.; Belov, K.; Miller, W.; Clarke, L.; Chinwalla, A. T.; Yang, S.-P.; Heger, A.; Locke, D. P.; Miethke, P.; Waters, P. D.; Veyrunes, F.; Fulton, L.; Fulton, B.; Graves, T.; Wallis, J.; Puente, X. S.; López-Otín, C.; Ordóñez, G. R.; Eichler, E. E.; Chen, L.; Cheng, Z.; Deakin, J. E.; Alsop, A.; Thompson, K.; Kirby, P.; Papenfuss, A. T.; Wakefield, M. J.; Olender, T.; Lancet, D.; Huttlet, G. A.; Smit, A. F. A.; Ask, A.; Temple-Smith, P.; Batzer, M. A.; Walker, J. A.; Konkel, M. K.; Harris, R. S.; Whittington, C. M.; Wong, E. S. W.; Gemmell, N. J.; Buschiazzo, E.; Vargas, J. I. M.; Merkel, A.; Schmitz, J.; Zeeman, A.; Churakov, G.; Ole, K. J.; Brosius, J.; Murchison, E. P.; Sachidanandam, R.; Smith, C.; Hannon, G.; Tsend-Ayush, E.; McMillan, D.; Attenborough, R.; Rens, W.; Ferguson-Smith, M.; Lefèvre, C. M.; Sharp, J. A.; Nicholas, K. R.; Ray, D. A.; Kube, M.; Reinhardt, R.; Pringle, T. H.; Taylor, J.; Jones, R. C.; Nixon, B.; Dacheux, J.-L.; Niwa, H.; Sekita, Y.; Huang, X.; Stark, A.; Kheradpour, P.; Kellis, M.; Flicek, P.; Chen, Y.; Webber, C.; Hardison, R.; Nelson, J.; Hallsworth-Pepin, K.; Delehaunty, K.; Markovic, C.; Minx, P.; Feng, Y.; Kremitzki, C.; Mitreva, M.; Glasscock, J.; Wylie, T.; Wohldmann, P.; Thiru, P.; Nhan, M. N.; Pohl, C. S.; Smith, S. M.; Hou, S.; Rentre, M. B.; Mardis, E. R.; Wilson, R. K. Genome Analysis of the Platypus Reveals Unique Signatures of Evolution. *Nature*, **2008**, *453* (7192), 175–183.
- [36] Whittington, C. M.; Koh, J. M. S.; Warren, W. C.; Papenfuss, A. T.; Torres, A. M.; Kuchel, P. W.; Belov, K. Understanding and Utilising Mammalian Venom via a Platypus Venom Transcriptome. *J. Proteomics*, **2009**, *72* (2), 155–164.
- [37] Kowalski, K.; Marciniak, P.; Rosiński, G.; Rychlik, L. Evaluation of the Physiological Activity of Venom from the Eurasian Water Shrew *Neomys fodiens*. *Front. Zool.*, **2017**, *14* (1), 46.

- [38] Taylor, J. R. E. Evolution of Energetic Strategies in Shrews. In *Evolution of shrews*; Wójcik, J. M., Wolsan, M., Eds.; Mammal Research Institute of the Polish Academy of Sciences: Białowieża, 1998; pp 309–346.
- [39] Hamilton, W. J. Jr. The Food of the Soricidae. *J. Mammal.*, **1930**, *11* (1), 26–39.
- [40] Maynard, C. J. *Contributions to Science*; Newtonville: Massachusetts, 1889; Vol. 1, pp 57–59.
- [41] Kita, M.; Nakamura, Y.; Okumura, Y.; Ohdachi, S. D.; Oba, Y.; Yoshikuni, M.; Kido, H.; Uemura, D. Blarina Toxin, a Mammalian Lethal Venom from the Short-Tailed Shrew *Blarina brevicauda*: Isolation and Characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, *101* (20), 7542–7547.
- [42] Kita, M.; Okumura, Y.; Ohdachi, S. D.; Oba, Y.; Yoshikuni, M.; Nakamura, Y.; Kido, H.; Uemura, D. Purification and Characterisation of Blarinasin, a New Tissue Kallikrein-like Protease from the Short-Tailed Shrew *Blarina brevicauda*: Comparative Studies with Blarina Toxin. *Biol. Chem.*, **2005**, *386* (2), 177–182.
- [43] Aminetzach, Y. T.; Srouji, J. R.; Kong, C. Y.; Hoekstra, H. E. Convergent Evolution of Novel Protein Function in Shrew and Lizard Venom. *Curr. Biol.*, **2009**, *19* (22), 1925–1931.
- [44] 北将樹; 武仲敏子; 別所学; Maturana, A. D.; 木越英夫; 大館智志; 上村大輔. 食虫動物ブラリナトガリネズミ由来の麻痺性神経毒ペプチドBPP類の構造と生物活性 (口頭発表の部). In *第60回 天然有機化合物討論会講演要旨集*; 2018; Vol. 60, pp 109–114.
- [45] Yano, Y.; Fukuoka, R.; Maturana, A. D.; Ohdachi, S. D.; Kita, M. Mammalian Neurotoxins, *Blarina* Paralytic Peptides, Cause Hyperpolarization of Human T-Type Ca Channel HCa_v3.2 Activation. *J. Biol. Chem.*, **2023**, 105066.
- [46] Stewart, J. M.; Steeves, B. J.; Vernes, K. PARALYTIC PEPTIDE FOR USE IN NEUROMUSCULAR THERAPY. US 7,119,168 B2, 2006.
- [47] Stewart, J. M. Peptide Composition for Cancer Treatment by Inhibiting TRPV6 Calcium Channel Activity. WO2009114943A1, September 24, 2009.
- [48] Bowen, C. V.; DeBay, D.; Ewart, H. S.; Gallant, P.; Gormley, S.; Ilenchuk, T. T.; Iqbal, U.; Lutes, T.; Martina, M.; Mealing, G.; Merkley, N.; Sperker, S.; Moreno, M. J.; Rise, C.; Syvitski, R. T.; Stewart, J. M.; Lo, A. W. I. In Vivo Detection of Human TRPV6-Rich Tumors with Anti-Cancer Peptides Derived from Soricidin. *PLoS ONE*, **2013**, *8* (3), e58866.

- [49] McGinnis, S.; Madden, T. L. BLAST: At the Core of a Powerful and Diverse Set of Sequence Analysis Tools. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32* (Web Server), W20–W25.
- [50] Liston, D. R.; Vanderhaeghen, J.-J.; Rossier, J. Presence in Brain of Synenkephalin, a Proenkephalin-Immunoreactive Protein Which Does Not Contain Enkephalin. *Nature*, **1983**, *302* (5903), 62–65.
- [51] Comb, M.; Seeburg, P. H.; Adelman, J.; Eiden, L.; Herbert, E. Primary Structure of the Human Met- and Leu-Enkephalin Precursor and Its MRNA. *Nature*, **1982**, *295* (5851), 663–666.
- [52] Duque-Díaz, E.; Alvarez-Ojeda, O.; Coveñas, R. Chapter Seven - Enkephalins and ACTH in the Mammalian Nervous System. In *Vitamins and Hormones*; Litwack, G., Ed.; Opioid Hormones; Academic Press, 2019; Vol. 111, pp 147–193.
- [53] Lecchi, P.; Loh, Y. P.; Snell, C. R.; Pannell, L. K. The Structure of Synenkephalin (Pro-Enkephalin1-73) Is Dictated by Three Disulfide Bridges. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *232* (3), 800–805.
- [54] Krissinel, E. On the Relationship between Sequence and Structure Similarities in Proteomics. *Bioinformatics*, **2007**, *23* (6), 717–723.
- [55] Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science*, **1994**, *266* (5186), 776–779.
- [56] Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Diemer, V.; Cargoët, M.; Monbaliu, J.-C. M.; Melnyk, O. Native Chemical Ligation and Extended Methods: Mechanisms, Catalysis, Scope, and Limitations. *Chem. Rev.*, **2019**, *119* (12), 7328–7443.
- [57] Dang, B.; Kubota, T.; Mandal, K.; Bezanilla, F.; Kent, S. B. H. Native Chemical Ligation at Asx-Cys, Glx-Cys: Chemical Synthesis and High-Resolution X-Ray Structure of ShK Toxin by Racemic Protein Crystallography. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135* (32), 11911–11919.
- [58] Villain, M.; Gaertner, H.; Botti, P. Native Chemical Ligation with Aspartic and Glutamic Acids as C-Terminal Residues: Scope and Limitations. *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, *2003* (17), 3267–3272.
- [59] Flood, D. T.; Hintzen, J. C. J.; Bird, M. J.; Cistrone, P. A.; Chen, J. S.; Dawson, P. E. Leveraging the Knorr Pyrazole Synthesis for the Facile Generation of Thioester Surrogates for Use in Native Chemical Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57* (36), 11634–11639.

- [60] Sole, N. A.; Barany, G. Optimization of Solid-Phase Synthesis of [Ala⁸]-Dynorphin A. *J. Org. Chem.*, **1992**, *57* (20), 5399–5403.
- [61] Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W. The Synthesis of Cystine Peptides by Iodine Oxidation of S-Trityl-Cysteine and S-Acetamidomethyl-Cysteine Peptides. *Helv. Chim. Acta*, **1980**, *63* (4), 899–915.
- [62] Zhang, R. M.; Snyder, G. H. Dependence of Formation of Small Disulfide Loops in Two-Cysteine Peptides on the Number and Types of Intervening Amino Acids. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264* (31), 18472–18479.
- [63] Cuthbertson, A.; Indrevoll, B. Regioselective Formation, Using Orthogonal Cysteine Protection, of an α -Conotoxin Dimer Peptide Containing Four Disulfide Bonds. *Org. Lett.*, **2003**, *5* (16), 2955–2957.
- [64] Hurtado, P. P.; O'Connor, P. B. Differentiation of Isomeric Amino Acid Residues in Proteins and Peptides Using Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **2012**, *31* (6), 609–625.
- [65] Zhang, Y. Progress and Challenges in Protein Structure Prediction. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2008**, *18* (3), 342–348.
- [66] Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, *46* (W1), W296–W303.
- [67] Xiang, Z. Advances in Homology Protein Structure Modeling. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2006**, *7* (3), 217–227.
- [68] Mirdita, M.; Schütze, K.; Moriwaki, Y.; Heo, L.; Ovchinnikov, S.; Steinegger, M. ColabFold: Making Protein Folding Accessible to All. *Nat. Methods*, **2022**, *19* (6), 679–682.
- [69] Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgand, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowei, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature*, **2021**, *596* (7873), 583–589.

- [70] Aridoss, G.; Kim, D.-M.; Kim, J. I.; Kang, J. E. Ziconotide (ω -Conotoxin MVIIA)—Efficient Solid-Phase Synthesis of a Linear Precursor Peptide and Its Strategic Native Folding. *Pept. Sci.*, **2021**, *113* (5), e24223.
- [71] Gray, W. R. Disulfide Structures of Highly Bridged Peptides: A New Strategy for Analysis. *Protein Sci.*, **1993**, *2* (10), 1732–1748.
- [72] Göransson, U.; Craik, D. J. Disulfide Mapping of the Cyclotide Kalata B1: CHEMICAL PROOF OF THE CYCLIC CYSTINE KNOT MOTIF. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278* (48), 48188–48196.
- [73] van den Hooven, H. W.; van den Burg, H. A.; Vossen, P.; Boeren, S.; de Wit, P. J. G. M.; Vervoort, J. Disulfide Bond Structure of the AVR9 Elicitor of the Fungal Tomato Pathogen *Cladosporium Fulvum*: Evidence for a Cystine Knot. *Biochemistry*, **2001**, *40* (12), 3458–3466.
- [74] Tam, J. P.; Nguyen, G. K. T.; Loo, S.; Wang, S.; Yang, D.; Kam, A. Ginsentides: Cysteine and Glycine-Rich Peptides from the Ginseng Family with Unusual Disulfide Connectivity. *Sci. Rep.*, **2018**, *8* (1), 16201.
- [75] Vila-Perelló, M.; Andreu, D. Characterization and Structural Role of Disulfide Bonds in a Highly Knotted Thionin from *Pyrularia Pubera*. *Pept. Sci.*, **2005**, *80* (5), 697–707.
- [76] Baker, D.; Shiau, A. K.; Agard, D. A. The Role of pro Regions in Protein Folding. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1993**, *5* (6), 966–970.
- [77] Schulz, A.; Marx, U. C.; Hidaka, Y.; Shimonishi, Y.; Rösch, P.; Forssmann, W.-G.; Adermann, K. Role of the Prosequence of Guanylin. *Protein Sci.*, **1999**, *8* (9), 1850–1859.
- [78] Kelly, S.; Price, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2000**, *1* (4), 349–384.
- [79] Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. How to Study Proteins by Circular Dichroism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, **2005**, *1751* (2), 119–139.
- [80] Greenfield, N. J.; Fasman, G. D. Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry*, **1969**, *8* (10), 4108–4116.
- [81] Bakshi, K.; Liyanage, M. R.; Volkin, D. B.; Middaugh, C. R. Circular Dichroism of Peptides. In *Therapeutic Peptides*; Nixon, A. E., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2014; Vol. 1088, pp 247–253.

- [82] Drew, E. D.; Janes, R. W. PDBMD2CD: Providing Predicted Protein Circular Dichroism Spectra from Multiple Molecular Dynamics-Generated Protein Structures. *Nucleic Acids Res.*, **2020**, *48* (W1), W17–W24.
- [83] Louis-Jeune, C.; Andrade-Navarro, M. A.; Perez-Iratxeta, C. Prediction of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Using Theoretically Derived Spectra. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **2012**, *80* (2), 374–381.
- [84] Micsonai, A.; Moussong, É.; Wien, F.; Boros, E.; Vadász, H.; Murvai, N.; Lee, Y.-H.; Molnár, T.; Réfrégiers, M.; Goto, Y.; Tantos, Á.; Kardos, J. BeStSel: Webserver for Secondary Structure and Fold Prediction for Protein CD Spectroscopy. *Nucleic Acids Res.*, **2022**, *50* (W1), W90–W98.
- [85] Micsonai, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y.-H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2015**, *112* (24), E3095–E3103.
- [86] Tomasi, T. E. Function of Venom in the Short-Tailed Shrew, *Blarina brevicauda*. *J. Mammal.*, **1978**, *59* (4), 852–854.
- [87] Neher, E.; Sakmann, B. Single-Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres. *Nature*, **1976**, *260* (5554), 799–802.
- [88] J. Dale, T.; Townsend, C.; C. Hollands, E.; J. Trezise, D. Population Patch Clamp Electrophysiology: A Breakthrough Technology for Ion Channel Screening. *Mol. Biosyst.*, **2007**, *3* (10), 714–722.
- [89] Catterall, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2011**, *3* (8), a003947.
- [90] Perez-Reyes, E. Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-Type Calcium Channels. *Physiol. Rev.*, **2003**, *83* (1), 117–161.
- [91] McGivern, J. G. Targeting N-Type and T-Type Calcium Channels for the Treatment of Pain. *Drug Discov. Today*, **2006**, *11* (5), 245–253.
- [92] Hoppanova, L.; Lacinova, L. Voltage-Dependent Ca_v3.2 and Ca_v2.2 Channels in Nociceptive Pathways. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, **2022**, *474* (4), 421–434.
- [93] Picard, E.; Carvalho, F. A.; Agosti, F.; Bourinet, E.; Ardid, D.; Eschalier, A.; Daulhac, L.; Mallet, C. Inhibition of Ca_v3.2 Calcium Channels: A New Target for Colonic Hypersensitivity

- Associated with Low-Grade Inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, **2019**, *176* (7), 950–963.
- [94] Jarvis, M. F.; Scott, V. E.; McGaraughty, S.; Chu, K. L.; Xu, J.; Niforatos, W.; Milicic, I.; Joshi, S.; Zhang, Q.; Xia, Z. A Peripherally Acting, Selective T-Type Calcium Channel Blocker, ABT-639, Effectively Reduces Nociceptive and Neuropathic Pain in Rats. *Biochem. Pharmacol.*, **2014**, *89* (4), 536–544.
- [95] Catterall, W. A.; Cestèle, S.; Yarov-Yarovoy, V.; Yu, F. H.; Konoki, K.; Scheuer, T. Voltage-Gated Ion Channels and Gating Modifier Toxins. *Toxicon*, **2007**, *49* (2), 124–141.
- [96] Bourinet, E.; Zamponi, G. W. Block of Voltage-Gated Calcium Channels by Peptide Toxins. *Neuropharmacology*, **2017**, *127*, 109–115.
- [97] Ellinor, P. T.; Zhang, J.-F.; Horne, W. A.; Tsien, R. W. Structural Determinants of the Blockade of N-Type Calcium Channels by a Peptide Neurotoxin. *Nature*, **1994**, *372* (6503), 272–275.
- [98] Bourinet, E.; Alloui, A.; Monteil, A.; Barrère, C.; Couette, B.; Poirot, O.; Pages, A.; McRory, J.; Snutch, T. P.; Eschalier, A.; Nargeot, J. Silencing of the $Ca_v3.2$ T-Type Calcium Channel Gene in Sensory Neurons Demonstrates Its Major Role in Nociception. *EMBO J.*, **2005**, *24* (2), 315–324.
- [99] Huc, S.; Monteil, A.; Bidaud, I.; Barbara, G.; Chemin, J.; Lory, P. Regulation of T-Type Calcium Channels: Signalling Pathways and Functional Implications. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, **2009**, *1793* (6), 947–952.
- [100] Cheong, E.; Shin, H.-S. T-Type Ca^{2+} Channels in Normal and Abnormal Brain Functions. *Physiol. Rev.*, **2013**, *93* (3), 961–992.
- [101] Berger, N. D.; Gadotti, V. M.; Petrov, R. R.; Chapman, K.; Diaz, P.; Zamponi, G. W. NMP-7 Inhibits Chronic Inflammatory and Neuropathic Pain via Block of $Ca_v3.2$ T-Type Calcium Channels and Activation of CB2 Receptors. *Mol. Pain*, **2014**, *10*, 77.
- [102] Snutch, T. P.; Zamponi, G. W. Recent Advances in the Development of T-Type Calcium Channel Blockers for Pain Intervention. *Br. J. Pharmacol.*, **2018**, *175* (12), 2375–2383.
- [103] Yabuki, Y.; Matsuo, K.; Izumi, H.; Haga, H.; Yoshida, T.; Wakamori, M.; Kakei, A.; Sakimura, K.; Fukuda, T.; Fukunaga, K. Pharmacological Properties of SAK3, a Novel T-Type Voltage-Gated Ca^{2+} Channel Enhancer. *Neuropharmacology*, **2017**, *117*, 1–13.
- [104] Fukunaga, K.; Izumi, H.; Yabuki, Y.; Shinoda, Y.; Shioda, N.; Han, F. Alzheimer's Disease

- Therapeutic Candidate SAK3 Is an Enhancer of T-Type Calcium Channels. *J. Pharmacol. Sci.*, **2019**, *139* (2), 51–58.
- [105] Yabuki Y. Role of T-type Calcium Channels in Regulating Neuronal Function. *YAKUGAKU ZASSHI*, **2020**, *140* (10), 1207–1212.
- [106] Xu, J.; Yabuki, Y.; Yu, M.; Fukunaga, K. T-Type Calcium Channel Enhancer SAK3 Produces Anti-Depressant-like Effects by Promoting Adult Hippocampal Neurogenesis in Olfactory Bulbectomized Mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **2018**, *137* (4), 333–341.
- [107] Izumi, H.; Kawahata, I.; Shinoda, Y.; Helmstetter, F. J.; Fukunaga, K. SAK3 Administration Improves Spine Abnormalities and Cognitive Deficits in AppNL-G-F/NL-G-F Knock-in Mice by Increasing Proteasome Activity through CaMKII/Rpt6 Signaling. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21* (11), 3833.
- [108] Senatore, A.; Spafford, J. D. Transient and Big Are Key Features of an Invertebrate T-Type Channel (LCa_v3) from the Central Nervous System of *Lymnaea Stagnalis*. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285* (10), 7447–7458.
- [109] Senatore, A.; Zhorov, B. S.; Spafford, J. D. Ca_v3 T-Type Calcium Channels. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.*, **2012**, *1* (4), 467–491.
- [110] Shtonda, B.; Avery, L. CCA-1, EGL-19 and EXP-2 Currents Shape Action Potentials in the *Caenorhabditis Elegans* Pharynx. *J. Exp. Biol.*, **2005**, *208* (11), 2177–2190.
- [111] King, G. F.; Escoubas, P.; Nicholson, G. M. Peptide Toxins That Selectively Target Insect Na_v and Ca_v Channels. *Channels*, **2008**, *2* (2), 100–116.
- [112] Bickmeyer, U.; Rössler, W.; Wiegand, H. Omega AGA Toxin IVA Blocks High-Voltage-Activated Calcium Channel Currents in Cultured Pars Intercerebralis Neurosecretory Cells of Adult *Locusta Migratoria*. *Neurosci. Lett.*, **1994**, *181* (1), 113–116.
- [113] Holm, L. DALI and the Persistence of Protein Shape. *Protein Sci.*, **2020**, *29* (1), 128–140.
- [114] Holm, L. Dali Server: Structural Unification of Protein Families. *Nucleic Acids Res.*, **2022**, *50* (W1), W210–W215.
- [115] Holm, L.; Sander, C. Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices. *J. Mol. Biol.*, **1993**, *233* (1), 123–138.
- [116] Yang, S.; Xiao, Y.; Kang, D.; Liu, J.; Li, Y.; Undheim, E. A. B.; Klint, J. K.; Rong, M.; Lai, R.; King, G. F. Discovery of a Selective $Na_v1.7$ Inhibitor from Centipede Venom with

- Analgesic Efficacy Exceeding Morphine in Rodent Pain Models. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2013**, *110* (43), 17534–17539.
- [117] Yang, S.; Liu, Z.; Xiao, Y.; Li, Y.; Rong, M.; Liang, S.; Zhang, Z.; Yu, H.; King, G. F.; Lai, R. Chemical Punch Packed in Venoms Makes Centipedes Excellent Predators. *Mol. Cell. Proteomics*, **2012**, *11* (9), 640–650.
- [118] Sun, P.; Wu, F.; Wen, M.; Yang, X.; Wang, C.; Li, Y.; He, S.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Tian, C. A Distinct Three-Helix Centipede Toxin SSD609 Inhibits Iks Channels by Interacting with the KCNE1 Auxiliary Subunit. *Sci. Rep.*, **2015**, *5* (1), 13399.
- [119] Han, Y.; Kamau, P. M.; Lai, R.; Luo, L. Bioactive Peptides and Proteins from Centipede Venoms. *Molecules*, **2022**, *27* (14), 4423.
- [120] Undheim, E. A. B.; Grimm, L. L.; Low, C.-F.; Morgenstern, D.; Herzig, V.; Zobel-Thropp, P.; Pineda, S. S.; Habib, R.; Dziemborowicz, S.; Fry, B. G.; et al. Weaponization of a Hormone: Convergent Recruitment of Hyperglycemic Hormone into the Venom of Arthropod Predators. *Structure*, **2015**, *23* (7), 1283–1292.
- [121] Chen, H.-Y.; Toullec, J.-Y.; Lee, C.-Y. The Crustacean Hyperglycemic Hormone Superfamily: Progress Made in the Past Decade. *Front. Endocrinol.*, **2020**, *11*, 578958.
- [122] Marco, H. G.; Brandt, W.; Stoeva, S.; Voelter, W.; Gäde, G. Primary Structures of a Second Hyperglycemic Peptide and of Two Truncated Forms in the Spiny Lobster, *Jasus Lalandii*. *Peptides*, **2000**, *21* (1), 19–27.
- [123] Katayama, H.; Nagata, K.; Ohira, T.; Yumoto, F.; Tanokura, M.; Nagasawa, H. The Solution Structure of Molt-Inhibiting Hormone from the Kuruma Prawn *Marsupenaeus Japonicus*. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278* (11), 9620–9623.
- [124] Kowalski, K.; Marciniak, P.; Rychlik, L. A New, Widespread Venomous Mammal Species: Hemolytic Activity of *Sorex Araneus* Venom Is Similar to That of *Neomys Fodiens* Venom. *Zool. Lett.*, **2022**, *8* (1), 7.
- [125] Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Meng, E. C.; Couch, G. S.; Croll, T. I.; Morris, J. H.; Ferrin, T. E. UCSF ChimeraX: Structure Visualization for Researchers, Educators, and Developers. *Protein Sci.*, **2021**, *30* (1), 70–82.
- [126] Ito, J.; Minemura, T.; Wälchli, S.; Niimi, T.; Fujihara, Y.; Kuroda, S.; Takimoto, K.; Maturana, A. D. Id2 Represses Aldosterone-Stimulated Cardiac T-Type Calcium Channels Expression.

Int. J. Mol. Sci., **2021**, *22* (7), 3561.

付記

第3章第4節 revised BPP2 (25) のジスルフィド結合様式解析における Figure 19, 20 の MS/MS 解析データを次頁以降に掲載する。

Figure 19: 2SS-a (32) –1

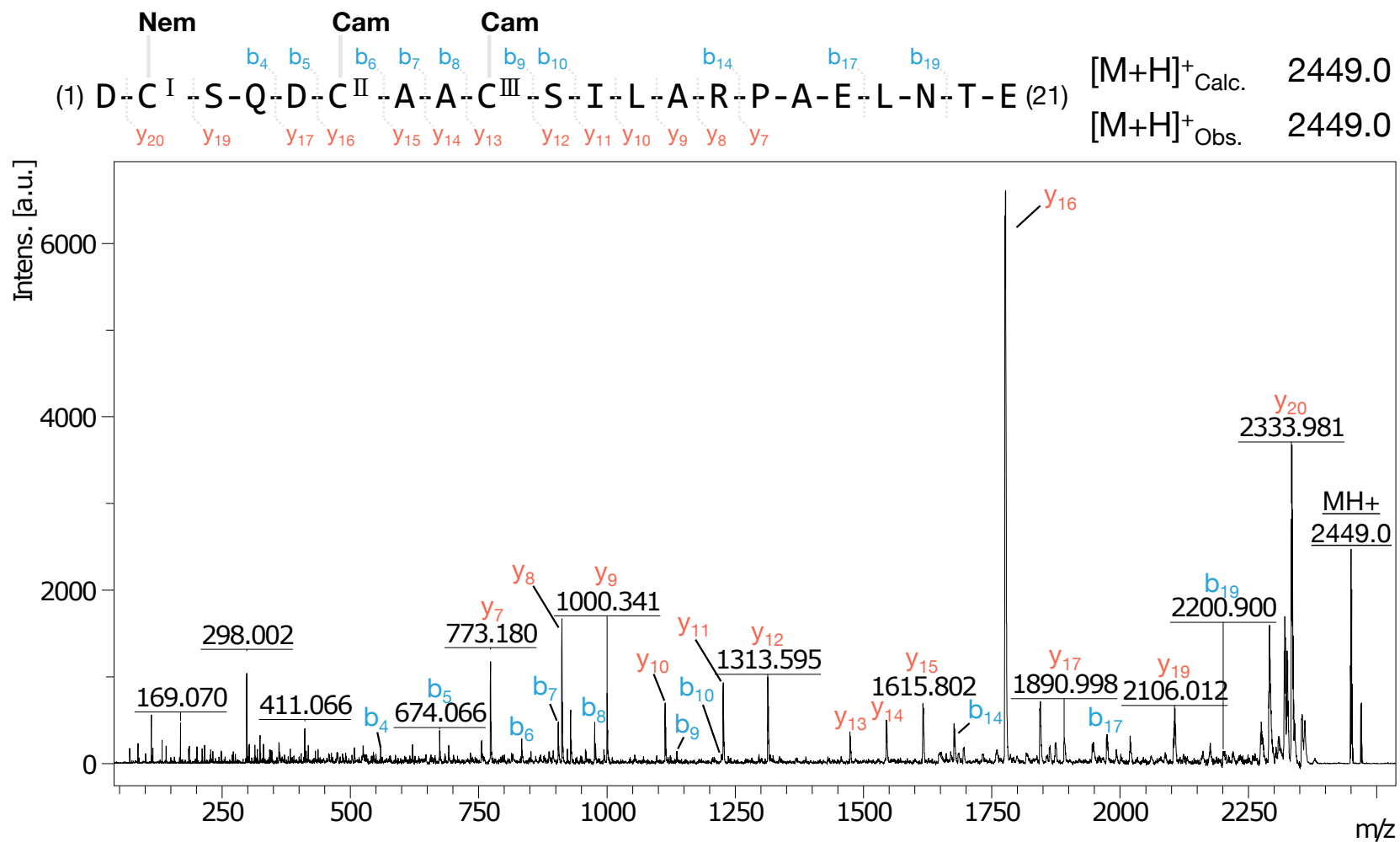


Figure 19: 2SS-a (32) -2

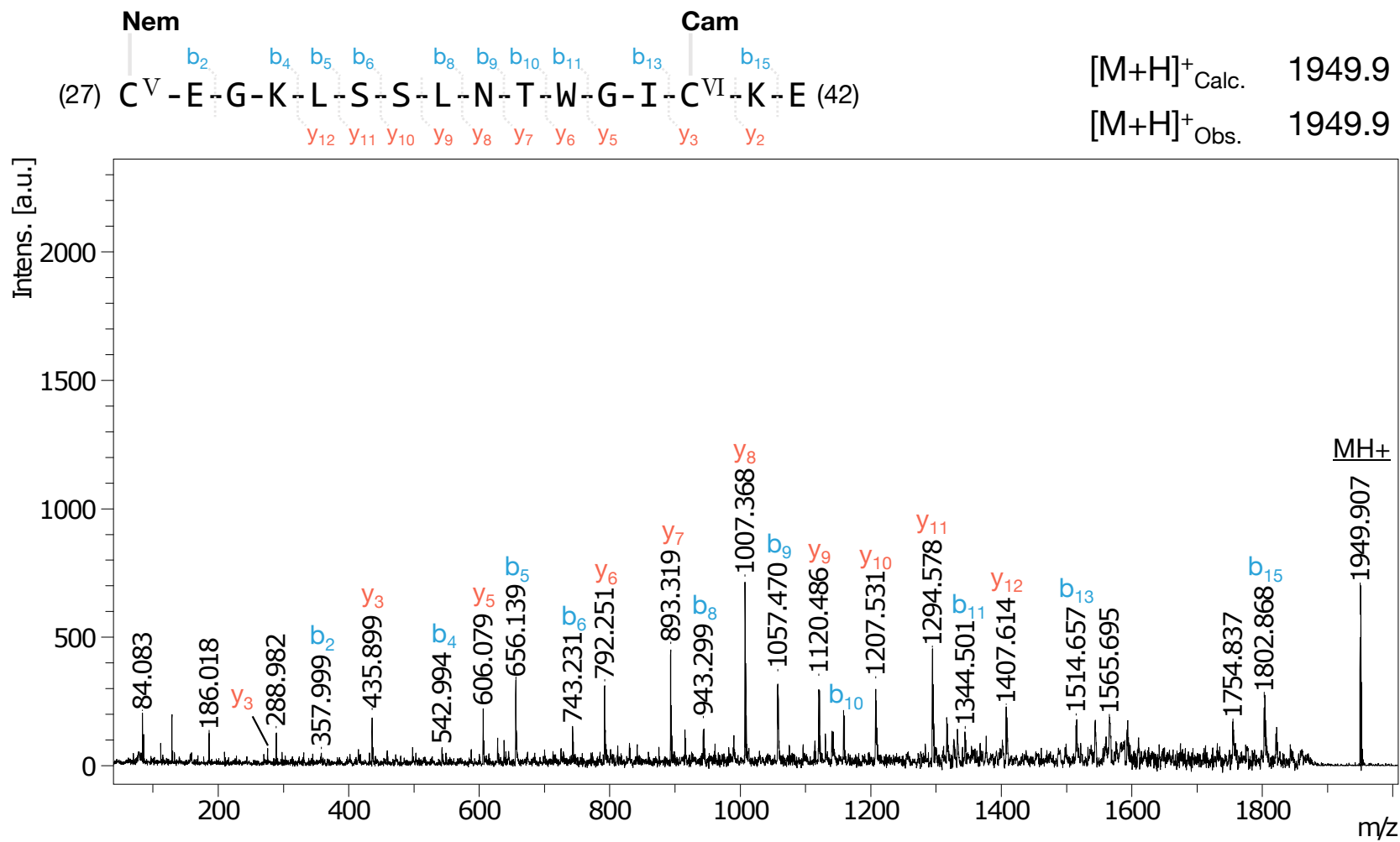


Figure 19: 2SS-b (33) –1

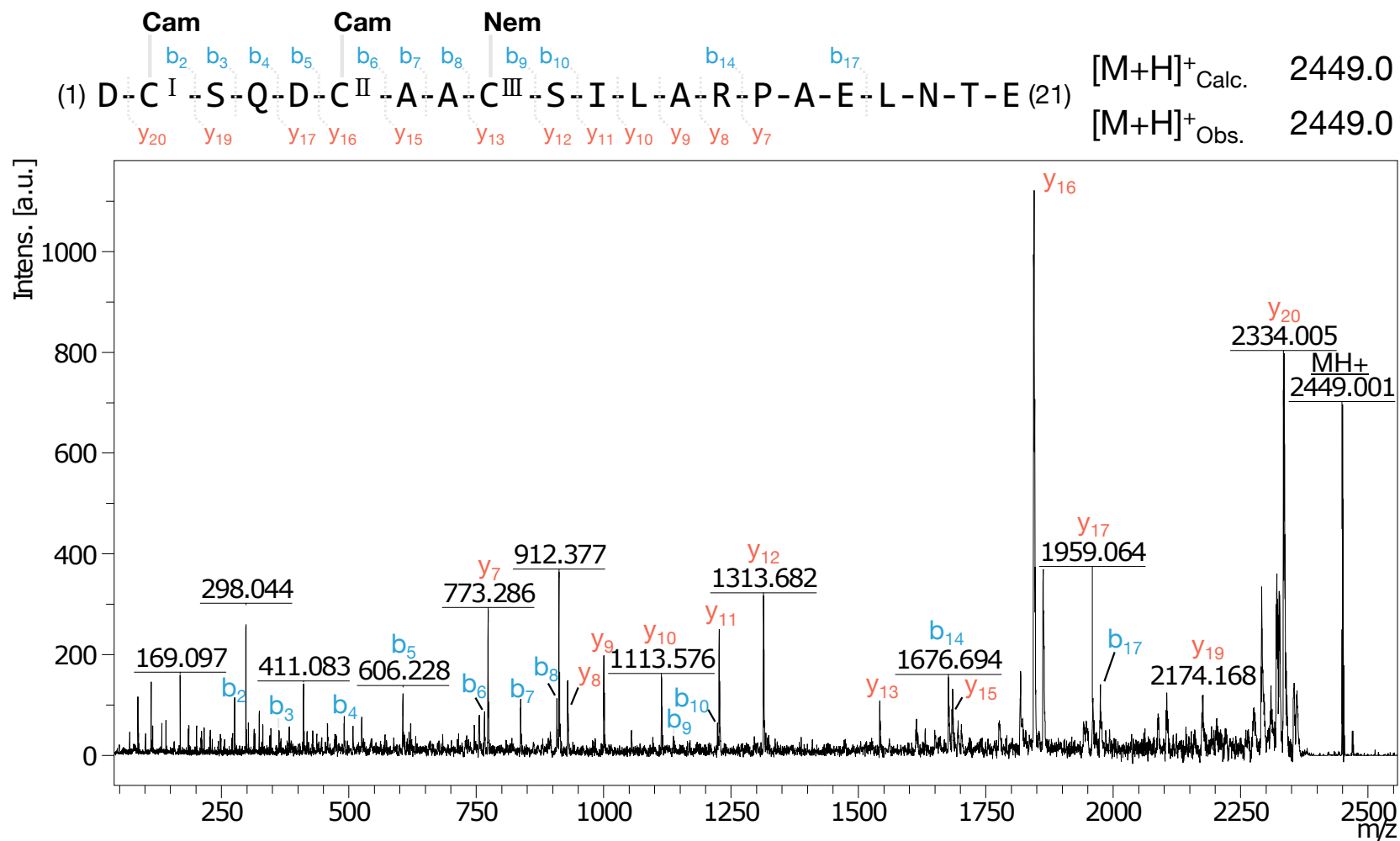


Figure 19: 2SS-b (33) -2

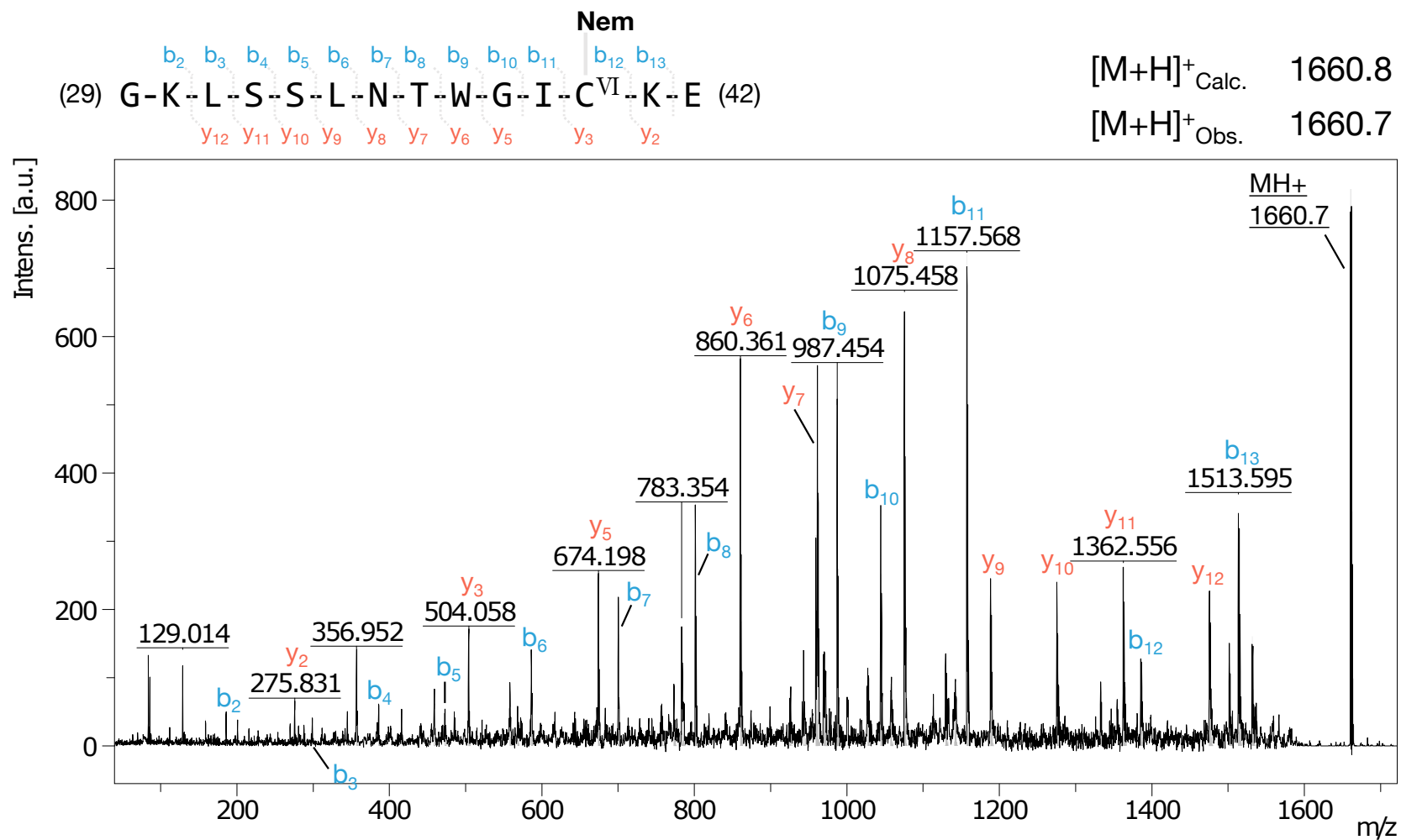


Figure 19: 1SS-a (34) -1

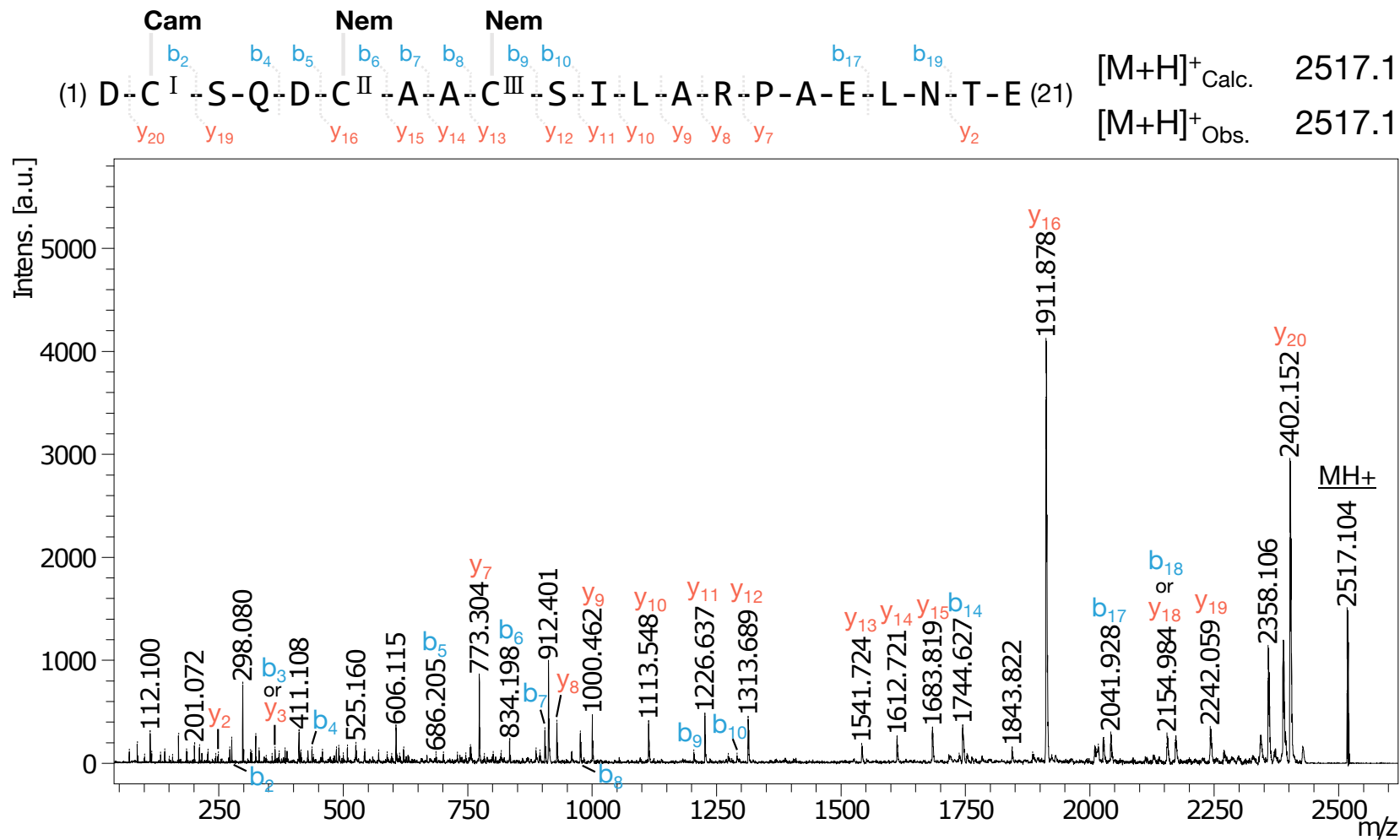


Figure 19: 1SS-a (34) -2

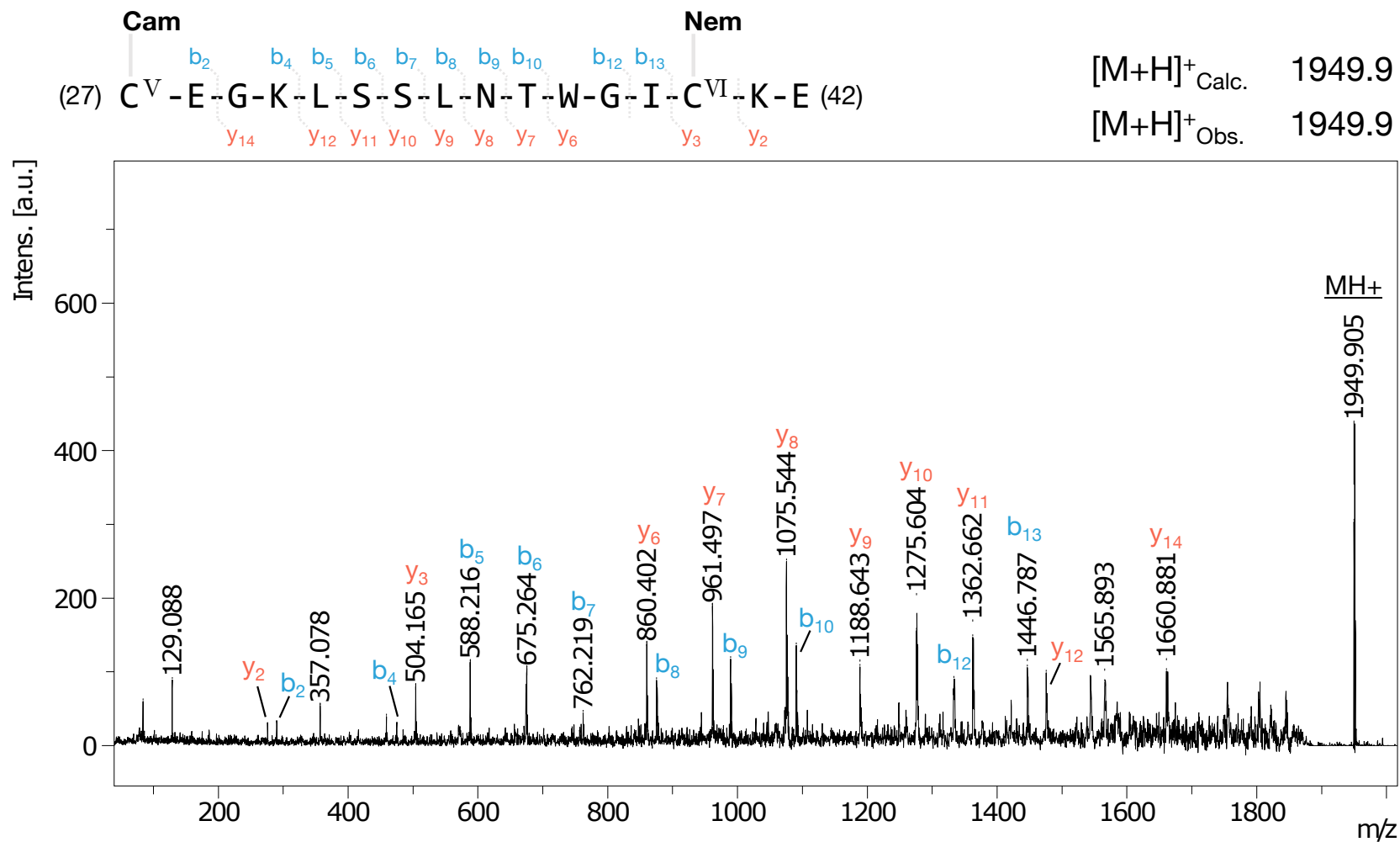


Figure 19: 1SS-b (35) –1

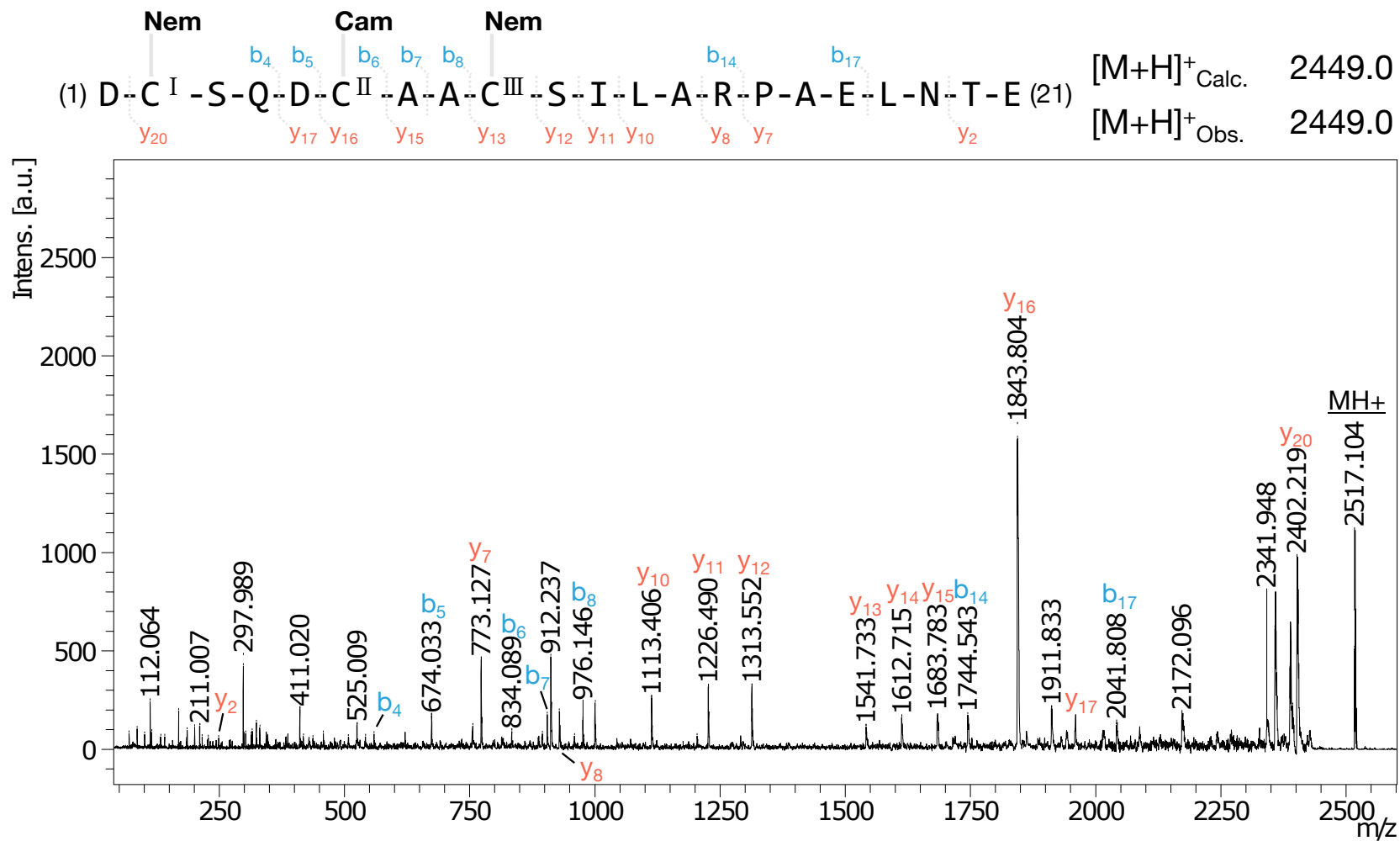


Figure 19: 1SS-b (35) -2

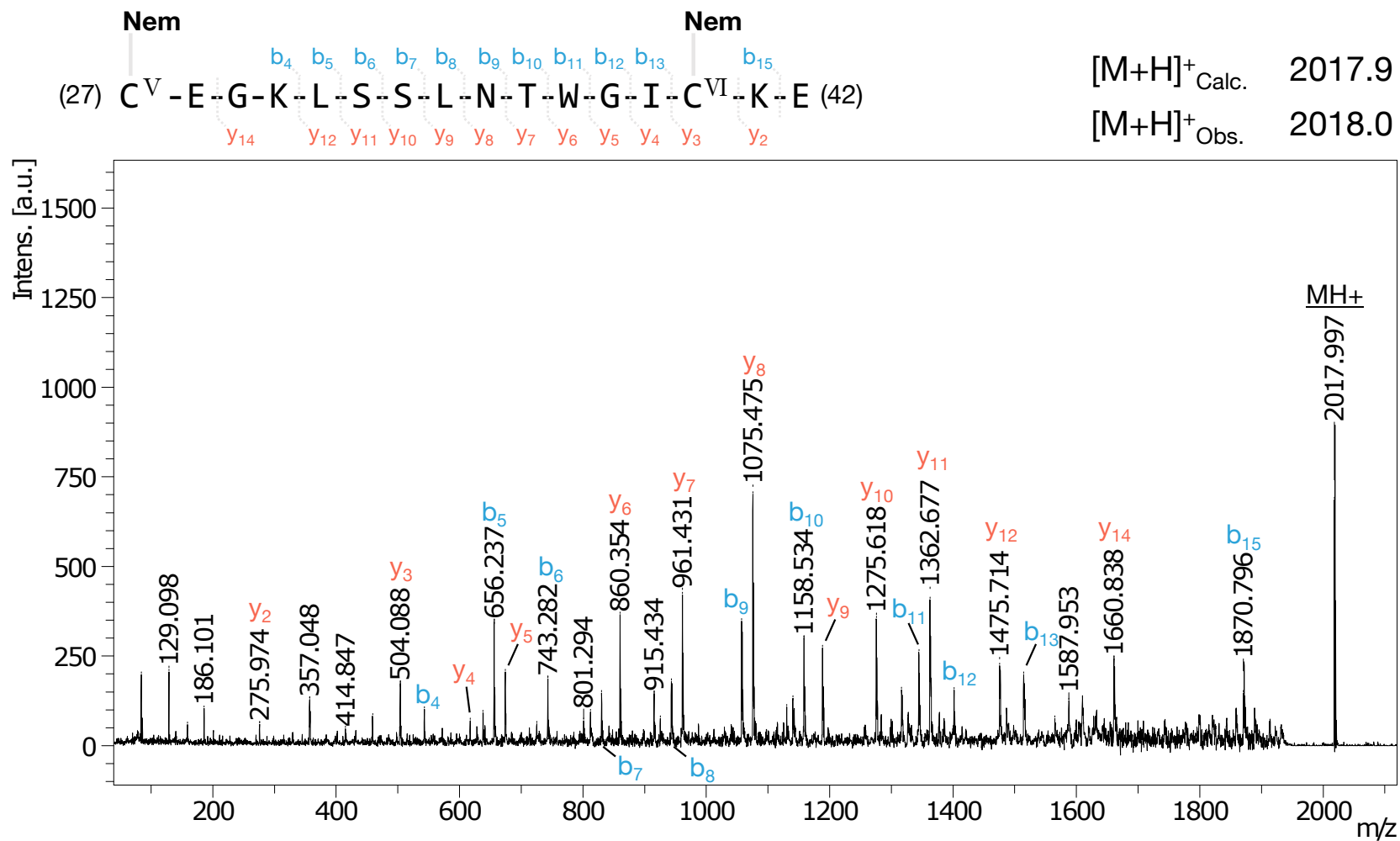
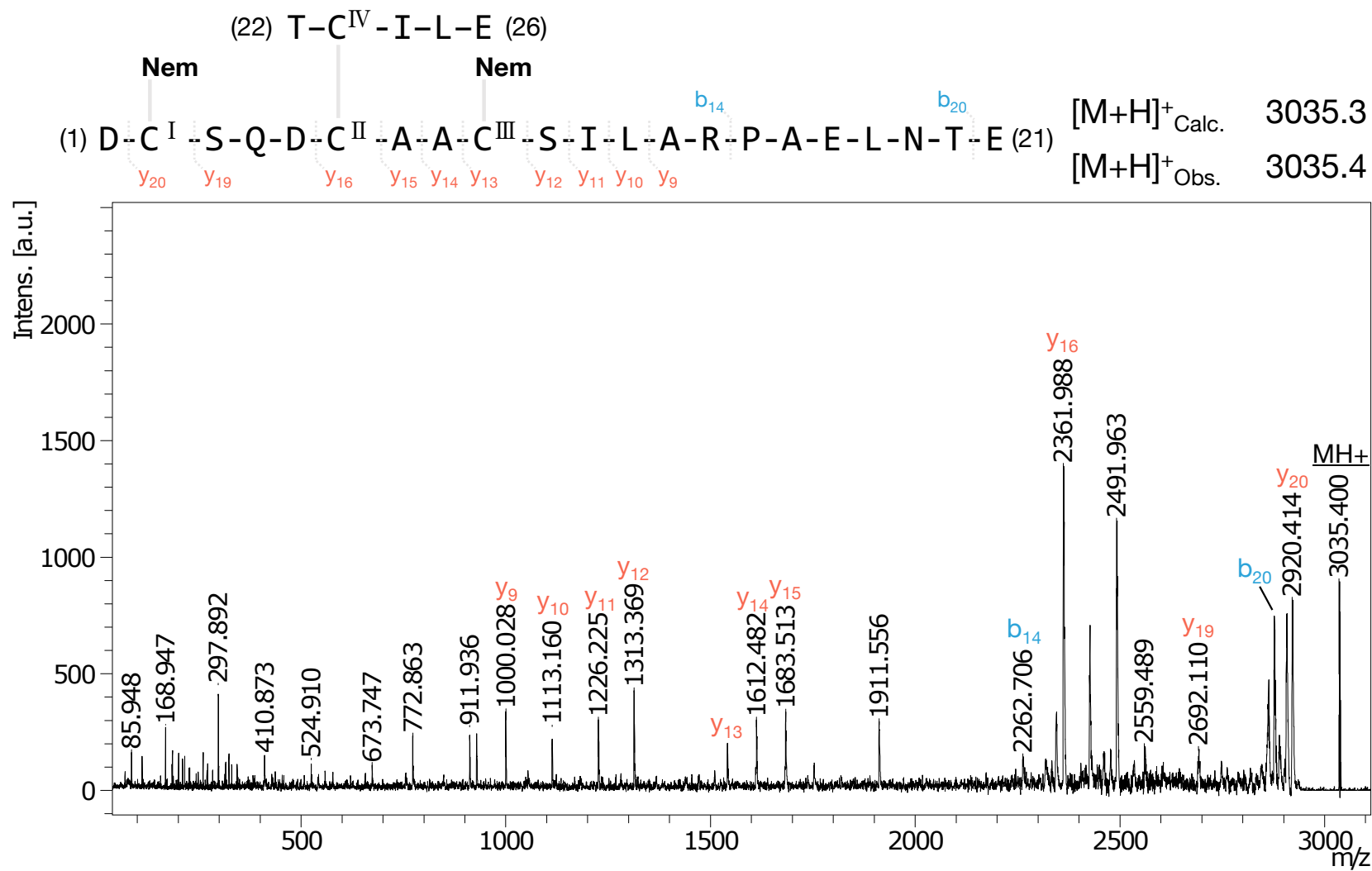


Figure 20: 1SS-b (35)



謝辞

本研究は、名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻天然物ケミカルバイオロジー研究室において行われたものです。本研究の遂行にあたり、北将樹教授から多大なる御指導と御厚情を賜ったことをここに記すと共に、心より深く御礼申し上げます。また本研究の全般に渡り鋭いご指摘と有益なご助言を賜りました恒松雄太准教授、ならびに名古屋大学大学院理学研究科附属菅島臨海実験所 森田真布助教に深く感謝いたします。

BPP2 の Ca チャネルに対する機能評価においてパッチクランプテストの実施とご助言をいただきました、名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻 Maturana D. Andres 准教授に深く感謝いたします。また BPP2 の合成にあたり、ペプチド固相合成装置の供与とペプチド合成に関する様々なご助言をいただきました名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻 近藤竜彦講師ならびに名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (WPI-ITbM) 大石俊輔特任助教に深く感謝いたします。トガリネズミに関するご助言と北海道におけるフィールドワークに関してご協力いただきました北海道大学低温科学研究所 大館智志助教に深く感謝いたします。

質量分析および CD スペクトル測定に関して装置利用の便宜を図っていただき、試料測定や解析に関して様々なご助言をいただきました名古屋大学物質科学国際研究センター 尾山公一博士ならびに名古屋大学工学部機器分析室 鳥居実恵技術員に深く感謝いたします。

本研究のあらゆる場面で様々なご助言と鋭いご指摘をいただき、有益な議論を交わした Didik Huswo UTOMO 博士、日置裕介博士、蛭川美奈子氏、田中健太郎氏、津田智仁氏に深く感謝いたします。

名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻天然物ケミカルバイオロジー研究室で出会った多くの皆様に感謝いたします。

また著者は、東海国立大学機構融合フロンティア次世代研究事業の経済支援を受けました。ここに感謝申し上げます。

最後に、著者をここまで支えてくれた恩師、友人そして家族に、心から感謝申し上げます。