

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07805

研究課題名(和文) 狭食・狩猟性アリ類の神経毒の餌動物ナトリウムチャネルに対する適応変化の検証

研究課題名(英文) Adaptive modulation of neurotoxin-like peptides in predatory ant species

研究代表者

稲垣 英利 (Inagaki, Hidetoshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：90344126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アギトアリ、オオハリアリの毒囊・毒腺のトランスクリプトーム解析と毒液のペプチドーム解析を行った。アギトアリの毒囊・毒腺では、Pilosulin-like peptideと名付けた6種類のペプチドをコードする転写産物が大部分を占めていた。ペプチドーム解析では新たに2種類のPilosulin-like peptideを発見した。これらのペプチドは抗菌性、ヒスタミン遊離活性、溶血活性を示した。微量成分である4種類のICK-like peptideの一部はショウジョウバエのナトリウムチャネルに対して阻害活性を示し、これらが昆虫に対する神経毒であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We estimated the venom composition of predatory ant species, *Odontomachus monticola* and *Pachycondyla chinensis*, by combined transcriptome and peptidome analysis. We found novel bioactive peptides in *Odontomachus monticola*, which we termed pilosulin-like peptides 1, 2, 3, 4, 5, and 6 by transcriptome analysis. They were major components of the venom of *Odontomachus monticola*. As minor components, we found ICK-like peptides, enzymes, enzyme inhibitors and so on. Pilosulin-like peptides displayed antibacterial, histamine releasing, and hemolytic activities. And some of the ICK-like peptides inhibited *Drosophila* sodium channel activity.

研究分野：生化学

キーワード：アリ ペプチド 神経毒

## 1. 研究開始当初の背景

アリの食性はきわめて多様化している。その中には特定の動物のみを選択的に狩り、餌とする種も少なくない(狭食・狩猟性アリ類)。そうした種の多くは、尾部の毒針から神経毒を餌動物に注入することによって狩りをするとともに、餌動物の形態と行動に則して自身の形態と行動を適応させている。しかしながら、このような適応が、分子レベルでも起こっているかを検証した先行研究はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、系統的に大きく離れた狭食・狩猟性アリ類から網羅的にペプチド系神経毒を同定し、対応する餌動物のナトリウムチャンネルに対する阻害活性を測定する。このことによって、餌動物のナトリウムチャンネルの構造と特性の変化に合わせて、狭食・狩猟性アリ類がペプチド系神経毒の選択的毒性を対抗的に変化させてきたことを証明する。

## 3. 研究の方法

### ○サンプル

アギトアリ (*Odontomachus monticola*)、オオハリアリ (*Pachycondyla chinensis*) から毒嚢・毒腺を抽出してトランスクリプトーム解析に供した。また、アギトアリについては毒液を抽出し、ペプチドーム解析に供した。

### ○トランスクリプトーム解析

アギトアリ、オオハリアリから total RNA を抽出し、次世代 DNA シークエンサー HiSeq2500 (illumina) を用いて毒嚢・毒腺で発現する転写産物の種類とその量比を計測した。次世代 DNA シークエンサーから出力されたデータは 4000 万リード (平均鎖長 100 bp) に及んだ。このデータを Trinity ソフトウェアでアセンブルした後、アセンブル結果を BLAST 2 ソフトウェアを用いて公共データベース UniProtKB に対して相同性検索を行った。さらに Bowtie 2 ソフトウェアを用

いて、それぞれの転写産物 (毒液成分) の発現量 (存在比) を推定した。

### ○ペプチドーム解析

アリから毒液を抽出し、液体クロマトグラフィーで毒液を分画した後、ESI-MS/MS のスペクトラムを LTQ Orbitrap XL-ETD (Thermo Fisher Scientific) により取得した。取得したデータから、マニュアルもしくは Peaks 8.5 (Bioinformatics Solutions) により、ペプチドのアミノ酸配列を決定した。Reference 配列としてトランスクリプトーム解析から得られた主要なペプチドとタンパク質のアミノ酸配列を用いた。

### ○ペプチドの生理活性の評価

化学合成したペプチド (Pilosulin-like peptide 1-6) を、抗菌、溶血、ヒスタミン遊離活性に供した。また、一部 (ICK-like peptide) については大腸菌を用いて組換え体としてペプチドを調製し、電気生理のアッセイ系に供した。

## 4. 研究成果

アギトアリ、オオハリアリはともにシロアリを餌とする狭食・狩猟性アリである。そこで、両種から網羅的にペプチド系毒素を同定することとした。

トランスクリプトーム解析から、アギトアリの毒嚢・毒腺では 6 種類の新規生理活性ペプチド (Pilosulin-like peptide 1-6) の mRNA が大部分を占め (98.5%)、そのうち 5 種類はシステイン残基を持たない直鎖状のペプチド、残りはシステイン残基を一つ持つ二量体のペプチドをコードすることが推定された。その他のものとしては、キチナーゼ、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>、ヒアルロニダーゼ、ICK-like peptide などの酵素とペプチドの存在が示された。しかしながら、これらは毒嚢・毒腺 mRNA の微量成分 (1.5%) であった。

トランスクリプトーム解析と並行して、

アギトアリの毒液を逆相クロマトグラフィーで分離した後、質量分析計によりペプチ

ド系毒素の網羅的なペプチドーム解析を行った。

その結果、トランスクリプトーム解析で同定されていた、6種類のペプチド (Pilosulin-like peptide) の毒液中での存在と修飾 (プロセッシング、アミド化、2量体化など) を確認することができた。また、トランスクリプトーム解析では見落とされていた、Pilosulin-like peptide と類似した2種類のペプチド系毒素を新たに発見することができた (Pilosulin-like peptide 7-8)。さらに、生理活性アミン (チラミン、ヒスタミン)、アミノ酸 (プロリン、ロイシン)、酵素 (ヒアルロニダーゼ、ホスホリパーゼ、セリンプロテアーゼなど) の毒液中での存在も確認することができた。

化学合成した Pilosulin-like peptide 1, 2, 3, 4, 6 は、抗菌活性やヒスタミン遊離活性を示した。一方、Pilosulin-like peptide 5 は抗菌活性をほとんど示さなかったが、Pilosulin-like peptide の中では最も強い溶血活性を示した。組換え体として発現・精製した ICK-like peptide の一部はハエ・ナトリウムチャンネルに対して阻害活性を示した。

オオハリアリの毒腺のトランスクリプトーム解析からも、10種類のシステイン残基を含まないペプチドと7種類のシステイン残基を含むペプチドを発見することができた。システイン残基を含まないペプチドは前駆配列で酸性アミノ酸とアラニン残基もしくはプロリン残基が交互に出現する特徴的な配列を、トビキバハリアリ (*Myrmecia pilosula*) の Pilosulin やアギトアリの Pilosulin-like peptide と共有していたが、成熟体ペプチドの配列は大きく異なり、その生理活性も Pilosulin や Pilosulin-like peptide と異なるものと思われる。

現在、これらの中で2種類のペプチドを化学合成し、様々なアッセイ系に供して、その生理活性を評価している。

なお、これまでのところ、本研究で同定したペプチドの中で種特異的な神経毒性を示したものはない。本研究の最終的な目標である「餌動物のナトリウムチャンネルの構造と特性の変化に合わせて、狭食・狩猟性アリ類がペプチド系神経毒が選択的毒性を対抗的に変化させてきたこと」を証明するには至っていない。

## 5. 主な発表論文等 [雑誌論文] (計14件)

Leong CM, Lin CC, Shiao SF, Nguyen DD, Eguchi K.  
Taxonomic notes on *Ponera guangxiensis* Zhou, 2001 (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae), with a new distribution record from Vietnam and the first description of queen, male, and larva.  
Revue suisse de zoologie, 2018 125 (2), (in press). (査読有).

Satria R, Itioka T, Meleng P, Eguchi K.  
Second discovery of the subdichthadiigyne in *Yunodorylus* (Borowiec, 2009) (Formicidae: Dorylinae).  
Revue suisse de zoologie, 2018 125, 73-78.  
DOI: 10.5281/zenodo.1196017.  
(査読有).

Kazuma K, Masuko K, Konno K, Inagaki H.  
Combined Venom Gland Transcriptomic and Venom Peptidomic Analysis of the Predatory Ant *Odontomachus monticola*.  
Toxins (Basel). 2017 9(10), pii: E323.  
DOI: 10.3390/toxins9100323.  
(査読有).

Masuko K.  
Larval instars of the ant *Strumigenys solifontis* Brown (Hymenoptera: Formicidae): the fallacy of size distribution.  
Journal of Natural History. 2017 51, 115-126.  
DOI: 10.1080/00222933.2016.1254299.  
(査読有).

Kawakami H, Goto SG, Murata K, Matsuda H, Shigeri Y, Imura T, Inagaki H, Shinada T.  
Isolation of biologically active peptides from the venom of Japanese carpenter bee, *Xylocopa appendiculata*.  
J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2017 23:29.  
DOI: 10.1186/s40409-017-0119-6.

(査読有).

稲垣英利、杜祖健  
へビ神経毒の構造と作用機序  
Clinical Neuroscience. 2017 35, 1449-1452.  
(査読無).

Shoji K, Eguchi K.  
Nesting site selection of *Temnothorax congruus* from Japanese broad-leave forests: a trade-off between nest site quality and distance from sympatric *Crematogaster teranishii* colonies. Asian Myrmecology, 2017 9, e009002. DOI: 10.20362/am.009002.  
(査読有).

Masuko K.  
Larval instars of the myrmicine ant, *Manica yessensis* Azuma (Hymenoptera: Formicidae). ARI (Journal of the Myrmecological Society of Japan). 2017 38, 1-11. (査読有).

Kazuma K, Ando K, Nihei KI, Wang X, Rangel M, Franzolin MR, Mori-Yasumoto K, Sekita S, Kadowaki M, Satake M, Konno K.  
Peptidomic analysis of the venom of the solitary bee *Xylocopa appendiculata circumvolans*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2017 23:40. DOI: 10.1186/s40409-017-0130-y.  
(査読有).

Eguchi K, Mizuno R, Ito F, Satria R, Dang VA, Bui TV, Phung THL.  
First Discovery of subdichthadiigyne in *Yunodorylus Xu* (Formicidae: Dorylinae) Revue suisse de Zoologie. 2016 123, 307-314. DOI: 10.5281/zenodo.155307.  
(査読有).

Satria R, Sasaki O, Bui TV, Oguri E, Syoji K, Fisher BL, Yamane S, Eguchi K.  
Description of the first Oriental species of the ant genus *Xymmer* (Hymenoptera: Formicidae: Amblyoponinae) Zootaxa, 2016 4168, 141-150. DOI: 10.11646/zootaxa.4168.1.7.  
(査読有).

Satria R, Bui TV, Eguchi K.  
New synonymy and redescription of *Anochetus mixtus* Radchenko, 1993, and distinction from the other members of the *Anochetus rugosus* group (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). Asian Myrmecology, 2017 9, 1-16. DOI: 10.20362/am.009006.  
(査読有).

Konno K, Kazuma K, Nihei K.  
Peptide Toxins in Solitary Wasp Venoms. Toxins (Basel). 2016 8(4):114. DOI: 10.3390/toxins8040114.  
(査読有).

稲垣英利、長谷川英祐、緒方一夫、増子恵二  
アリのペプチド系毒素の多様性と分類学  
2015 69(5):374-378 (査読無).

[学会発表](計12件)

数馬恒平、紺野勝弘、増子恵一、稲垣英利  
A comprehensive venom analysis of the predatory ant *Odontomachus monticola*  
日本農芸化学会 2018 年度大会  
2018 年 3 月 17 日

数馬恒平、紺野勝弘、増子恵一、稲垣英利  
Venom Gland Transcriptomic and Venom Peptidomic Analyses of the Predatory Ant *Odontomachus monticola*  
第 2 回京都生体質量分析研究会シンポジウム 2018 年 2 月 3 日

増子恵一  
イトウカギハラアリ (*Proceratium itoi*) 女王のエソグラム  
日本蟻類研究会第 60 回大会  
2017 年 8 月 28 日

久保泰、馬場知之、大橋澄子、稲垣英利、池崎圭吾、三尾和弘、関口博史、佐々木裕次  
PAMs modulate molecular dynamics of nAChR alpha 7: Direct observation by DXT and electrophysiology  
19th IUPAB & 11th EBSA congress  
2017 年 7 月 17 日

数馬恒平、紺野勝弘、増子恵一、稲垣英利  
アギトアリ毒液成分の網羅的解析  
第 6 4 回トキシシンポジウム  
2017 年 7 月 11 日

紺野勝弘、数馬恒平、二瓶賢一  
単独性カリバチ・ミカドトックリバチ *Eumenes micado* 毒成分の網羅的解析  
日本薬学会第 137 回年会  
2017 年 3 月 26 日

数馬恒平、江口克之、紺野勝弘、増子恵一、稲垣英利  
LC-MS analysis of venom peptides of a predatory ant species *Odontomachus*  
Biological Mass Spectrometry Symposium 2016  
2016 年 10 月 14 日

紺野勝弘、数馬恒平、二瓶賢一  
Peptidomic analysis of the venom of the  
solitary bee *Xylocopa appendiculata*  
*circumvolans* 毒成分の網羅的解析  
International Symposium on natural  
products for the future 2016 (ISNPF2016)  
2016年9月1日

増子恵一  
フタフシアリ亜科の2種、ツヤクシケアリ  
とオオウロコアリの幼虫令数について  
日本蟻類研究会第59回大会  
2016年8月26日

稲垣英利  
アリ由来の多様な生理活性ペプチドに関する研究  
第63回トキシシンポジウム  
2016年7月14日

増子恵一  
イトウカギハラアリの血リンパ食について  
日本昆虫学会第76回大会  
2016年3月28日

紺野勝弘、数馬恒平、二瓶賢一  
単独性ハナバチ・キムネクマバチ *Xylocopa*  
*appendiculata circumvolans* 毒成分の網羅的  
解析  
日本薬学会第136回年会  
2016年3月28日

〔図書〕(計1件)

Inagaki H.  
Snake Venom Protease Inhibitors: Enhanced  
Identification, Expanding Biological  
Function, and Promising Future.  
Springer Nature, 2017 502 (161-186)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
稲垣英利 (INAGAKI, Hidetoshi)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオ  
メディカル研究部門・主任研究員  
研究者番号: 90344126

(2) 研究分担者  
江口克之 (EGUCHI, Katsuyuki)  
首都大学東京・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 30523419

紺野勝弘 (KONNO, Katsuhiro)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・研究員  
(2015, 2016年度は客員教授)  
研究者番号: 40215471

増子恵一 (MASUKO, Keiichi)  
専修大学・経営学部・教授  
研究者番号: 50202312

数馬恒平 (KAZUMA, Kohei)  
(2015, 2016年度は富山大学・和漢医薬学総  
合研究所・客員助教として分担者、2017年度  
より異動のため分担者を外れる)  
研究者番号: 70552446

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

寺山守 (TERAYAMA, Mamoru)