

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月22日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21681028

研究課題名（和文） 陸棲哺乳類の麻痺性神経毒の構造と機能

研究課題名（英文） Structural and Functional Analysis of Paralytic Neurotoxins from Terrestrial Mammals

研究代表者

北 将樹（KITA MASAKI）

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：30335012

研究成果の概要（和文）：陸棲哺乳類由来の特異な麻痺性神経毒の研究を行った。ブラリナトガリネズミの顎下腺より分子量約 5 kDa の神経毒をほぼ精製した。またカモノハシの毒液から、ヘプタペプチド（HDHPNPR）など 11 種の新物質を単離し、その生物活性を解明した。さらに爬虫類やトガリネズミの毒と同様、カモノハシ毒にもカリクレイン様プロテアーゼが含まれることを示した。これら神経毒の作用機序解明により、新たな鎮痛剤や血圧降下剤などへの展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the structure and functions of paralytic neurotoxins from terrestrial venomous mammals. A neurotoxin (5 kDa) was almost purified from the salivary gland extracts of the short-tailed shrew *Blarina brevicauda*. From the venom fluid of the duck-bill platypus *Ornithorhynchus anatinus*, 11 unique neurotoxins, including a heptapeptide HDHPNPR, were identified and their biological activities have been characterized. We also established that platypus venom contains kallikrein-type protease(s), as with reptilian and shrew venom. The present findings may lead to the development of valuable pain-relief or vasoactive substances.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：天然物化学・麻痺性神経毒・単離と構造・生物活性・哺乳動物

1. 研究開始当初の背景

(1) 新規神経毒の発見は、薬理学、神経科学、精神医学など広範な生命科学の基礎研究の発展に貢献し、また新規薬剤の創製にも直結する。一方、自然界には活性物質の不安定さや稀少性が障害となり、科学的に解明されて

いない生物現象が数多く残されている。本研究では、微量物質の単離、構造決定法を駆使して、また分子生物学、分子遺伝学など幅広い研究分野の手法を融合させることで、哺乳類由来の特異な麻痺性神経毒の化学的解明を目指した。

(2) 陸棲の動物毒については、爬虫類、両生類、節足動物など比較的下等な生物からはペプチド、プロテアーゼ、ポリアミンなど多様な化合物が同定されている。一方、有毒哺乳類はトガリネズミの仲間とカモノハシのみが知られる。トガリネズミはモグラと同じ食虫目に属し、ミミズや昆虫などを餌とする。その唾液は有毒とされ、捕食の際に獲物に噛み付いて麻痺させ、巣穴に貯蔵する習性がある。またカモノハシは単孔目に属し、成熟した雄は後脚裏の蹴爪から毒液を分泌し、外敵への防御や繁殖期の争いにこの毒を用いるとされる。しかし採集の困難さや毒成分の不安定さゆえに、トガリネズミの仲間、カモノハシともに、有毒物質の化学的解明はほとんど達成されていなかった。

2. 研究の目的

(1) 申請者は最近、ブラリナトガリネズミの顎下腺より、哺乳類では初めての例となる、分子量 35 kDa の致死毒ブラリナトキシン (BLTX) を単離し構造を決定した [PNAS, 2004; Biol. Chem. 2005]。この毒は組織性カリクレインと高い同一性を有し、血圧降下作用やマウスに対して後脚の麻痺、呼吸困難、致死前の激しい痙攣といった、従来のカリクレインにない特徴的な症状を示した。一方、ブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物には、ミールワームの麻痺作用や、マウス脳内投与により激しい痙攣作用、および神経細胞に対する Ca イオン流入作用などを引き起こすことを確認した。いずれの活性も、セリンプロテアーゼ阻害剤アプロチニンでは阻害されないことから、顎下腺には BLTX とは異なる低分子毒が含まれると予想された。そこで本研究では、各種生物活性試験を指標にして、トガリネズミが過酷な生態系で生き抜くために進化させた、特異な麻痺性神経毒の構造や機能の解明を目指した。

(2) 一方、カモノハシはオーストラリア固有の哺乳類であり、粗毒にはウサギに対する炎症惹起や血圧降下作用、モルモット回腸平滑筋の収縮作用などがみられ、またヒトが刺されて激しい痛みとともに痛覚過敏の症状が何か月も続いたという報告もある [Martinら, Proc. Linn. Soc. NSW 9, 471 (1894)]。このようにカモノハシ毒は古くから注目されてきたが、豪州の研究者により既知のペプチドやタンパク質が数種同定されたのみで、特異な有毒成分はこれまで解明されていなかった。本研究では毒液の効率的な分取方法とバイオアッセイ法を確立し、微量物質の精製法を駆使することで、毒液に含まれる新規神経毒の発見とその機能解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 北海道や米国ミシガン州にて、野生のトガリネズミを捕獲し、顎下腺を摘出、次いで生理食塩水で抽出して抽出物を得た。生物活性試験を指標に、神経毒を各種クロマトグラフィーで分離し、MALDI-TOF MS およびプロテインシーケンサ等を用いてペプチドやタンパク質の配列解析を行った。

(2) 豪州の大学、動物園や環境文化遺産省の協力を得て、飼育されているカモノハシから新鮮な毒液約 15 μ L を採取し、活性物質をゲルろ過や逆相セミマイクロ HPLC など、各種クロマトグラフィーで分離した。Ca チャネルを発現させた神経芽腫細胞に対する応答を指標に活性物質を精製し、MS 解析と化学合成した標品との比較により、新規ペプチドを同定した。またプロテアーゼ活性画分については蛍光ペプチド (Pro-Phe-Arg-MCA) を用いて酵素活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 食虫動物トガリネズミの神経毒の精製

北米に生息するブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物に、鳥の神経筋収縮作用やミールワーム麻痺作用、およびマウス脳内投与における特徴的な麻痺・痙攣作用などを見だし、これらの活性を指標に顎下腺抽出物を分離して分子量約 5 kDa の低分子化合物をほぼ単一に精製した。現在、構造や機能の解析を進めている。

(2) カモノハシ毒液由来の新規神経毒の発見

①新規 CNP 断片ペプチドの構造

カモノハシ毒液の MALDI-TOF MS 分析において、分子量 700~4,000 Da 付近にペプチド由来と思われるピークを多数確認した。また毒液からは低分子のペプチド化合物以外にも、ヒアルロニダーゼや神経成長因子 (NGF) などのタンパク質がこれまでに同定されている。そこでゲルろ過カラムを用いた HPLC (TSK_{gel} G2000SW_{XL}) により毒液 5 μ L を分離したところ、低分子画分である **IX** と **VI** に Ca²⁺流入作用がみられた (図 1)。画分 **IX** を逆相セミマイクロ HPLC (Develosil RP-AQUEOUS AR-5) で分離して、ヘプタペプチド **1** を約 400 ng 単離した。また活性画分 **VI** より、ペプチド **2**, **5**~**11** も得た。さらに粗毒 1 μ L を逆相セミマイクロ HPLC で直接分離することで、ペプチド **3**, **4** を毒液の主成分の一つとして単離した。

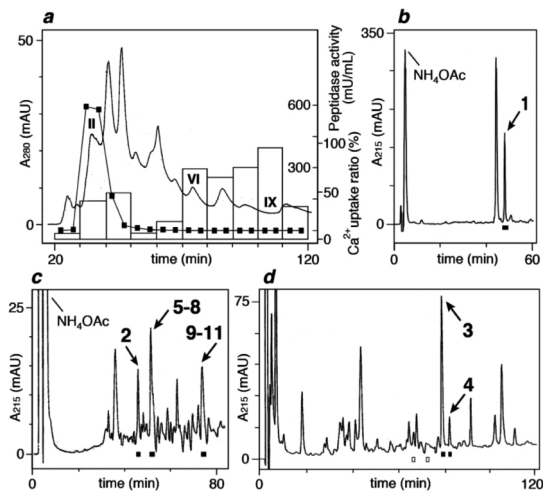


図 1. カモノハシ毒の精製. a, ゲルろ過 HPLC 分取クロマトグラム. b, 逆相セミマイクロ HPLC による 1 の最終精製. c, ペプチド 2, 5~11 の精製. d, 粗毒の分離と 3, 4 の検出.

発見したペプチド 1-11 の構造は、MALDI-TOF/TOF MS 分析により決定した。ペプチド 1-4 および 5-11 は、それぞれカモノハシ毒液に含まれる C 型ナトリウム利尿ペプチド (OvCNP) の N 末端側の部分断片、およびゲノム情報から予想される OvCNP 前駆体の部分配列 (132-150 残基) に一致した (図 2)。1, 2, 5-9 については合成標品の HPLC 分析において、保持時間が天然品と一致した。一方 3, 4 については、全て L 配置のアミノ酸からなるアナログ 3', 4' の保持時間は天然品とは一致せず、2 番目の Leu 残基が D 体に異性化していることが判った。なおカモノハシ毒液には L-D-ペプチドイソメラーゼが含まれている。OvCNP の Leu 残基や defensin の Met 残基など、毒液ペプチドの一部は、N 末端から 2 番目のアミノ酸残基が D 体として存在する。よってペプチド 3, 4 は、D-Leu² 残基を含む OvCNP-39b の断片化により生成したと考えられた。また MS/MS 解析により、10 は N 末端の Ala¹-Asn² 部分で脱アミノ化により環化し、11 は 10 の環状アミドが加水分解された Asp² の誘導体と決定した。

1	HDHPNPR	5	GDKEPKGDRPR
2	DHPNPR	6	KGDKEPKGDRPR
3	L(D-Leu)HDHPN	7	GGGKKGDKPEKGRPR
3'	LLHDHPN	8	ANGGGKKGDKPEKGRPR
4	L(D-Leu)HDHPNPR	9	GDKEPKGDRPRL
4'	LLHDHPNPR	10	ANGGGKKGDKPEKGRPRL
		11	ADGGGKKGDKPEKGRPRL

図 2. カモノハシ毒由来の新規ペプチド

CNP は血管拡張作用や利尿作用を示す、哺乳類に普遍的なペプチドホルモンである。神

経系のほか、血管内皮細胞やマクロファージからも分泌され、腎臓、副腎、血管壁などにも作用する。ヒト CNP (hCNP-53, -22) やマウス CNP (mCNP-53) など種々のアナログが知られているが、いずれも C 末端側の 2 個の Cys 残基間でジスルフィド結合を形成した、17 個のアミノ酸からなる環構造を持つ。この環部分が CNP の生理活性に重要とされており、種間でもほぼ保存されている。一方、CNP の N 末端断片を生物から単離したのは、今回が初めての例であった。

②ヘプタペプチド 1 の生物活性

ヘプタペプチド 1 は IMR-32 細胞に対して、75 μM で持続的な Ca^{2+} 流入作用を示した。またカルシウムキレート剤 EGTA により、この作用はほぼ完全に抑えられた。よって本ペプチドの Ca^{2+} 流入作用には、細胞外の Ca イオンの存在が必要であることが判った。神経系で発現する Ca チャネルは痛覚鈍磨、痛覚過敏、神経因性疼痛などの痛み伝達に深く関与することから、神経疾患や疼痛治療における標的受容体として注目される。今回用いた神経芽腫細胞では、N 型および L 型の電位依存性 Ca チャネルを発現させていることから、1 の Ca^{2+} 流入作用が、これらイオンチャネルの直接の活性化によるかどうか検討した。しかし Ca チャネル (L 型, N 型), K チャネル (K_A , K_{ATP} , hERG), および Na チャネル (site 2) に対する拮抗作用は、10 μM ではいずれも見られなかった。そこで種々の薬理活性試験を行った結果、ヘプタペプチド 1 は GABA_A 受容体、NMDA 受容体、およびグルタミン酸受容体などに対する拮抗作用 (10 μM で 16~21% 阻害) を示した (図 3)。またモルモット回腸標本に対する顕著な収縮作用 (30 μM でヒスタミン 1.7 μM と比較して 38% の応答) もみられた。さらに本化合物は、マウス脳内投与による痙攣作用や、皮下投与による炎症惹起作用 (ともに 1 mg / 10 g mice) など、多様な生物活性を示した。神経組織や、炎症、痛み の仕組みに特異的に作用すると予想される。

	Peptides				Peptides				
	1	3	4	4'	1	3	4	4'	
Glutamate, Kainate (³ H) kainic acid)	16	12	21	2	Glutamate, AMPA (³ H) AMPA)	1	5	8	ND
Glutamate, NMDA, glycine (³ H) MDL-105519)	18	-1	-5	0	Histamine H ₁ (³ H) pyrilamine)	11	10	5	13
Glutamate, NMDA, agonism (³ H) CGP-39653)	-1	-4	21	27	GABA _A (³ H) flunitrazepam)	21	16	1	2

図 3. 各種受容体に対する拮抗作用

③カモノハシ毒のプロテアーゼ活性

今回発見した CNP 断片ペプチドには、C 末端がアルギニン残基のものが複数含まれており、毒液にペプチド結合を特定の位置で切

断するプロテアーゼが含まれると予想された。そこでゲルろ過 HPLC で分離した高分子画分を調べたところ、画分 II に強い酵素活性が見られた。さらにこの画分 II は、ブタ膀胱由来の酵素カリクレイン (PPK) と同様、ヒト低分子キノーゲン (LK) を特異的に切断した (図 4)。また、この酵素活性は、セリンプロテアーゼ阻害剤であるアプロチニンにより明確に阻害された。以上のことから、爬虫類やトガリネズミの毒と同様、カモノハシの毒液にもカリクレイン様のプロテアーゼが含まれることが判った。このプロテアーゼが、OvCNP を特異的に分解して活性化するなど、毒液成分が相乗的に働く可能性も考えられ、非常に興味深い。SDS-PAGE 分析より、このプロテアーゼは毒液タンパク質の中でも極微量の成分と示唆された。現在、このプロテアーゼ活性成分についても、精製や同定を進めている。

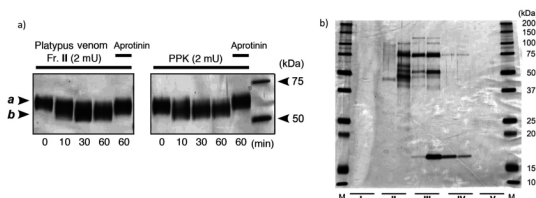


図 4. カモノハシ毒の高分子画分の分離と酵素活性。a, カリクレイン様プロテアーゼ活性。b, 毒液のゲルろ過クロマトグラフィーで分離した画分の SDS-PAGE 解析

(3) ホモロジーモデリングによる哺乳動物毒由来のプロテアーゼの立体構造解析

BLTX とヒトカリクレイン 1 (hK1) の高い相同性に注目して、hK1 の結晶構造に基づいた BLTX のホモロジーモデルを構築し、hK1 との類似点や相違を解明した (図 5)。さらにカモノハシ毒のうで発現しているカリクレインの立体構造モデルも構築し、この酵素が、BLTX や hK1 とは異なり、ヒトでは脳神経系で主に発現し神経疾患に関わるアイソザイム hK6 に特に類似していることを解明した。

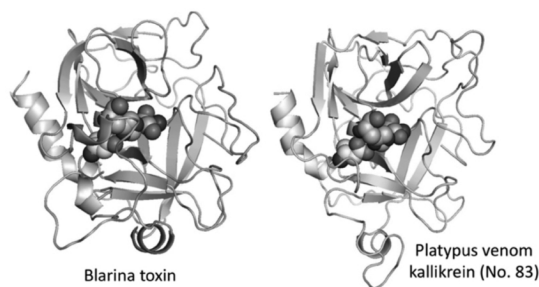


図 5 ホモロジーモデリングで得たプロテアーゼの立体構造

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① M. Kita, Y. Hirayama, K. Yamagishi, K. Yoneda, R. Fujisawa, and H. Kigoshi : Interactions of the antitumor macrolide aplyronine A with actin and actin-related proteins established by its versatile photoaffinity derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 20314–20317 (2012). 査読有
DOI: 10.1021/ja310495p
- ② M. Kita, K. Yoneda, Y. Hirayama, K. Yamagishi, Y. Saito, Y. Sugiyama, Y. Miwa, O. Ohno, M. Morita, K. Suenaga, and H. Kigoshi : Fluorescent aplyronine A: intracellular accumulation and disassembly of actin cytoskeleton in tumor cells. *ChemBioChem* **13**, 1754–1758 (2012). 査読有, DOI: 10.1002/cbic.201200385
- ③ M. Kita : Bioorganic studies on the key natural products from venomous mammals and marine invertebrates. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **85**, 1175–1185 (2012). 査読有
DOI: 10.1246/bcsj.20120198
- ④ M. Kita : Bioorganic studies on the venom from duckbill platypus. *Pure Appl. Chem.* **84**, 1317–1328 (2012). 査読有
DOI: 10.1351/PAC-CON-11-08-18
- ⑤ M. Kita, Y. Hirayama, M. Sugiyama, and H. Kigoshi : Development of highly cytotoxic and actin-depolymerizing biotin derivatives of aplyronine A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 9871–9874 (2011). 査読有
DOI: 10.1002/anie.201103802
- ⑥ M. Kita, O. Ohno, C. Han, and D. Uemura : Bioactive secondary metabolites from symbiotic marine dinoflagellates: symbiodinolide and durinskiols. *Chem. Rec.* **10**, 57–69 (2010). 査読有
DOI: 10.1002/tcr.200900007
- ⑦ M. Kita and D. Uemura : Marine huge molecules: the longest carbon chains in natural products. *Chem. Rec.* **10**, 48–52 (2010). 査読有
DOI: 10.1002/tcr.200900030
- ⑧ D. Uemura, M. Kita, H. Arimoto, and M. Kitamura : Recent aspects of chemical ecology–natural toxins, coral communities, and symbiotic relationships–. *Pure Appl. Chem.* **81**, 1093–1111 (2009). 査読有
DOI: 10.1351/PAC-CON-08-08-12

- ⑨ M. Kita, D. StC. Black, O. Ohno, K. Yamada, H. Kigoshi, and D. Uemura : Duck-billed platypus venom peptides induce Ca²⁺ influx in neuroblastoma cells. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18038–18039 (2009). 査読有
DOI: 10.1021/ja908148z

〔学会発表〕 (計 7 6 件)

- ① 北将樹 : アルミキおよび哺乳類の毒について, キューバソレノドン講演会, 2012 年 9 月 19 日, 東京 (上野動物園), 口頭.
- ② 北将樹 : 哺乳類由来の神経毒に関する生物有機化学的研究, 第 59 回トキシシンポジウム, 帯広 (とちちプラザ), 2012 年 8 月 30–31 日, 招待講演.
- ③ 北将樹 : 有毒哺乳動物および海洋無脊椎動物由来の生物活性鍵物質に関する化学的研究, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25–28 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス, 日本化学会進歩賞受賞講演.
- ④ M. Kita : Bioorganic Studies on the Key Natural Products from Venomous Mammals and Marine Invertebrates, 1st Prof. G. W. K. Cavill Lecturship, 2011 年 11 月 1 日, ニューサウスウェールズ大学 (シドニー, オーストラリア)
- ⑤ 北将樹 : トガリネズミ, カモノハシ毒の謎に迫る -哺乳類の持つ毒の科学-, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21–24 日, 京都 (京都国際会館), 招待講演.
- ⑥ M. Kita : Bioorganic Studies on Mammalian Venoms: Neurotoxic Substances from Shrew and Platypus, The 27th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (ISCNP27/ICOB7) and 7th International Conference on Biodiversity (ICOB7), 2011 年 7 月 10–14 日, ブ리즈ベン, オーストラリア, 招待講演.
- ⑦ 北将樹 : 哺乳類由来の神経毒に関する生物有機化学的研究, 第 6 回化学生態学研究会, 2011 年 6 月 13–14 日, 函館 (湯の川プリンスホテル渚亭), 招待講演.
- ⑧ 北将樹, 大野修, 山田薫, 木越英夫, 上村大輔, David StC. Black : 有毒哺乳動物カモノハシ由来の神経毒に関する生物有機化学的研究, 第 52 回天然有機化合物討論会, 2010 年 9 月 29 日–10 月 1 日, 静岡 (グランシップ), 口頭.
- ⑨ 北将樹 : 進化と共生に着目した生物現象鍵物質の化学的研究, 筑波大学 TIMS 第 12 回機能性分子シンポジウム, 2010 年 6 月 25 日, 筑波大学つくばキャンパス, 招待講演.

〔図書〕 (計 3 件)

- ① M. Kita, T. Inuzuka, N. Maru, and D. Uemura : *Marine Pharmacognosy: Trends and Applications* (CRC Press, Taylor Francis, New York), pp. 137–152 (2012).
- ② M. Kita, M. Kitamura, and D. Uemura : *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 2nd edition. Vol. 4, (Elsevier, Amsterdam), pp. 263–281 (2010).

〔その他〕

ホームページ等

http://www.chem.tsukuba.ac.jp/kigoshi/j/top_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北 将樹 (KITA MASAKI)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号 : 30335012