

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25702047

研究課題名(和文)陸棲哺乳類の産生する麻痺性神経毒およびプロテアーゼの構造と機能

研究課題名(英文)Structure and function of paralytic neurotoxins and proteases 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：有毒哺乳動物であるトガリネズミおよびソレノドン由来の特異な神経毒およびプロテアーゼの構造や機能の解明を目指して研究を行った。

ブラリナトガリネズミの顎下腺由来の有毒物質に関して、致死毒を含むタンパク成分を限外ろ過により除去した低分子画分に、ミールワーム麻痺作用およびマウス脳室内投与における痙攣・麻痺作用を確認した。活性を指標に精製し、分子量5.1-5.7kDaの新規ペプチド神経毒2種の単離とアミノ酸一次配列の決定に成功した。

絶滅危惧種ソレノドンについて、キューバ共和国にて生態調査を行い、生け捕りと唾液の採取に成功した。またその主成分のプロテアーゼの活性と部分的な配列の決定に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have conducted neurotoxins and proteases from venomous mammals, including shrews and solenodons. The short-tailed shrew (*Blarina brevicauda*) produce a lethal protein venom in saliva. After removing proteins by ultracentrifugation, the smaller molecular weight fraction showed significant paralytic activity against mealworms and mice (icv injection). Based on this activity, two peptide neurotoxins with molecular weights of 5.1 and 5.7 kDa were purified, and their primary amino acid sequences were established. As for Cuban solenodon (*Solenodon cubanus*), ecological survey was conducted in a national park in Cuba. Several individuals were successfully taken alive, and their saliva was collected. The partial amino acid sequences and activity of one of the major proteases in solenodon saliva was determined.

研究分野：天然物化学・生物有機化学・ケミカルバイオロジー

キーワード：天然物化学 神経毒 単離と構造 生物活性 プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

新規神経毒の化学的解明は、薬理学、神経科学、精神医学など広範な生命科学の基礎研究に寄与し、また疼痛治療薬など新規薬剤の開発にも直結するため重要である。自然界からは多様な有毒物質が発見されているが、毒を持つ哺乳類は非常に珍しく、トガリネズミやソレノドンなどの食虫動物の仲間、および単孔目カモノハシなどわずかな種しか知られていない。また稀少性、不安定さゆえに、その有毒成分はほぼ未解明である。



ブラリナトガリネズミ



ソレノドン

トガリネズミはミミズや昆虫などを主な餌とする小型の哺乳類である。その唾液は有毒とされ、獲物を麻痺させて捕獲し、巣穴に貯蔵する習性がある。また豪州に生息する雄カモノハシは後ろ足の蹴爪から毒液を分泌し、ヒトが刺されて激しい痛みや痛覚過敏の症状が長く続いたという報告もある。研究代表者はこれら有毒哺乳動物の特異な生態に注目して、関与する稀少、不安定な麻痺性神経毒の研究を実施し、ブラリナトガリネズミ由来の致死性プロテアーゼ毒ブラリナトキシン(BLTX) [PNAS, 2004], およびカモノハシ由来の新規 Ca^{2+} 流入活性ペプチド [JACS, 2009] などを発見してきた。BLTX は脊椎動物に普遍的な酵素カリクレインと高い相同性を示し、ヒトカリクレイン抗体に対しても交叉性を示すが、マウス致死活性を示す非常にユニークな毒である。また、豪州の大学や動物園と連携して採取したカモノハシ毒にも、ヒト低分子キニンノーゲンの特異的に切断するカリクレイン様プロテアーゼが含まれることを発見した [Pure Appl. Chem. 2012].

さらにカモノハシ毒のうで発見しているカリクレインの立体構造モデルを構築し、この酵素が BLTX やヒト組織性カリクレイン 1 (hK1) とは異なり、ヒトでは主に脳神経系で発現し神経疾患に関わるアイソザイム hK6 と構造が似ていることを解明した [BCSJ, 2012]. 生物進化とプロテアーゼの化学進化の観点からも、非常に興味深い知見と言える。

このような背景から本研究では、微量物質の単離、構造決定法を駆使して、また分子生物学、遺伝学など広範な研究領域の手法を融合させて、トガリネズミ、ソレノドンといった陸棲の哺乳動物由来の特異な麻痺性神経毒に特に焦点をあてて、活性成分の単離および構造や機能の解明を目指した。また得られた有毒物質について、脊椎動物由来の様々なホモログと構造や機能を比較することで、哺乳類の進化と毒の化学進化の関わりを解明することを目指した。

2. 研究の目的

プロテアーゼ毒である BLTX は、マウスに対して血圧降下を引き起こし、痙攣・麻痺を伴う神経毒症状を示す。一方で、プロテアーゼ阻害剤を用いた活性試験に対する影響や、ゲルろ過 HPLC 分析における挙動などから、ブラリナトガリネズミ顎下腺には、痙攣や麻痺を速やかに引き起こす、BLTX とは異なる低分子の神経毒の存在が示唆されていた。そこで本研究では生物活性を指標とした神経毒の精製と構造解析を行い、鎮痛や痛み関連の受容体や器官に特異的に作用すると予想される麻痺活性物質の化学的解明を目指した。

一方で、ソレノドンはハイチ、キューバなど中南米の島国にのみ棲息する哺乳類である。体長約 30 cm と食虫目の仲間では最大で、アリクイに似た長い鼻を持つなど独特の風貌をしている。また下あごの歯には深い溝があり、その唾液は有毒とされるが、成分は全く分析されていない。形態学や進化学的な解析から、ソレノドンは約 7,500 万年前に発生した最も原始的な哺乳類の一つとされ、非常に限られた環境で独特の進化を遂げてきた。しかし、自然環境の悪化などにより、近年ソレノドンの生息数は減少し、過去数十年でも数例しか目撃されず、絶滅危惧種に指定されている。

研究代表者は国内外の研究者・現地協力者とともに、2012年3月にキューバ共和国フンボルト国立公園にて約一ヶ月間の調査を実施し、ソレノドン7頭の生け捕りに成功した。本研究ではこれまでの調査地であるフンボルト国立公園を中心に、生態調査を実施し、ソレノドンの生け捕りと毒が含まれるとされる唾液の採取を行った。またこの唾液の成分分析と生物活性評価により、特異な神経毒の発見を目指した。

3. 研究の方法

米国ミシガン州で捕獲したブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物について、ミールワームの麻痺活性、マウス脳室内投与による痙攣・麻痺作用、ラット肥満細胞の脱顆粒や炎症性サイトカイン遊離作用など、種々の生物活性試験を検討した。次いで見出された活性を指標に顎下腺抽出物を分離し、活性ペプチドを精製した。DTT を用いたジスルフィド結合の還元と iodoacetamide による Cys 残基の還元的アミノアルキル化、および消化酵素による断片化と MALDI-TOF MS/MS 解析により、活性ペプチドのアミノ酸一次配列を解析した。

ソレノドンの生態調査については、キューバ共和国アレハンドロ・デ・フンボルト国立公園・ユムリ河溪谷地域（オルギン県およびグアンタナモ県）にて、国立公園の自然保護観察官の協力を得て実施した。これまでの予

備調査をもとに、ソレノドンの野外での活動が最も盛んな繁殖期(2~4月)を中心に行った。生け捕りしたソレノドンからは、個体に害を与えないよう留意して唾液、体毛、遺伝子サンプルなどを採取した。またソレノドン類の食性や食物連鎖による毒の移行の可能性を探るため、糞分析や、餌となる小動物のモニタリング調査を実施した。

4. 研究成果

(1) ブラリナトガリネズミ顎下腺由来の麻痺性神経毒

ブラリナトガリネズミ顎下腺に含まれるマウス急性毒性を示す BLTX は、分子量約 35 kDa のセリンプロテアーゼであり、アプロチニンなどのプロテアーゼ阻害剤により毒性もキャンセルされる。一方で顎下腺抽出物をミールワームに投与してみられる麻痺活性は、プロテアーゼ阻害剤により阻害されず、またカリクレイン酵素活性よりも速やかに作用することを見出した。そこで、プロテアーゼ毒とは異なる成分が顎下腺抽出物に含まれると予想し、麻痺活性を指標に低分子の神経毒の分離を試みた。逆相およびゲルろ過 HPLC を組み合わせることで精製し、分子量約 5.1~5.7 kDa のペプチドを主に含む成分を活性画分として得た。さらに C30 逆相セミマイクロ HPLC により精製した結果、主成分の麻痺ペプチド 2 種 Blarina Paralytic Peptides 1,2 (BPP 1,2) を SDS-PAGE において単一のバンドとして精製した。溶液内トリプシン消化と MS 解析により、BPP1,2 に共通する N 末端側の 30 アミノ酸残基の配列を、さらに Glu-C を用いた酵素消化により C 末端側の配列を決定した。その結果、BPP1,2 はそれぞれ 48, 53 アミノ酸残基からなり、3 つのジスルフィド結合を含む一本鎖のペプチドであると決定した。

BPP1,2 は、従来の神経系で働くマチュアなペプチドとは異なり、シグナルおよびプレ領域をコードする配列からなる。このアナログが唾液に含まれるという報告はこれまでなく、本ペプチドは神経系に対してユニークな作用を示すと予想される。現在、還元アミノアルキル化と複数のプロテアーゼ処理による分解反応を組み合わせることで、ジスルフィド結合の位置や立体構造などの二次構造の解析を進めている。

(2) キューバソレノドンの生態調査

キューバソレノドンの生態調査にあたり、国内の研究者、調査協力者、およびキューバ共和国の国立公園、科学技術環境庁 (CITMA)、ハバナ大学などの関係者とともに、日本・キューバ合同調査隊 AMAR (Academic Mission for the Almiqui Research, almiqui とはキューバソレノドンの現地名称) を組織した。2012 年 3 月の調査と同様に、2013 年 3~4 月にはフン

ボルト国立公園にて約 1 ヶ月間の調査を実施し、キューバソレノドン 3 頭の捕獲と唾液の採取に成功した [どうぶつと動物園, 2013]。また 2015 年 3~4 月には、研究協力者により、キューバ共和国グアンタナモ州とオルギン州にて、現地の国立保護公園のスタッフや地元住人の情報をもとに、これまで調査を行っていないユムリ河など、山岳地域、渓谷地域を中心に幅広く調査を行ったが、ソレノドンの捕獲には至らなかった。そこで 2016 年 3~4 月には、研究協力者により再びフンボルト国立公園にて約 1 ヶ月間の調査を実施し、キューバソレノドン 1 頭の捕獲と唾液の採取に成功した。

(3) キューバソレノドン唾液に含まれる特異的な有毒物質

2013 年までに捕獲・採取した唾液の分離を検討し、トガリネズミの唾液成分に匹敵する、非常に強い酵素活性がソレノドン唾液にも含まれることを見出した。合成基質を用いた酵素活性試験とウェスタンブロッティング解析から、ある種のセリンプロテアーゼが唾液の酵素活性の大半を占めており、また異種の哺乳類由来のものと交叉性がみられることが分かった。さらに、セミマイクロ HPLC 精製と酵素消化、de novo MS/MS 解析により、このプロテアーゼの部分的なアミノ酸配列(約 40 アミノ酸残基)を決定し、ハリネズミなど近縁種の食虫動物のプロテアーゼと高い相同性を示すことを見出した。

今後は、新たに発見した食虫目由来の麻痺毒やプロテアーゼ毒の構造を、哺乳類、は虫類由来などのホモログと比較して分子進化系統を解析し、原始的で非常に限られた哺乳類だけがなぜ毒を持ち続けているのか? という生物進化の謎に迫りたい。さらに、構造活性相関研究や、標的分子の同定および相互作用解析を行い、特異な炎症、痛み作用や痛覚過敏作用に関わる、哺乳動物毒から応用した画期的な神経毒リガンドの創製を目指したい。また、野生哺乳類の生態調査に関しても、海外大学の研究者および現地協力者との連携をさらに密にし、効率的な調査を進めていく。また、生態学、電気生理学、遺伝学などの様々な分野の研究者との連携を一層深め、麻痺性神経毒の化学生物学研究を一層効率的に進めていきたい。

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 15 件)

- ① M. Kita, A. Kawamura, and H. Kigoshi: Aplysiasecosterols B and C: two new 9,11-secosteroids with a *cis*-fused 1,4-quinone structure from the sea hare

- Aplysia kurodai*. *Tetrahedron Lett.* **57**, 858–860 (2016). 査読有
DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.01.028
- ② M. Kita and H. Kigoshi: Marine natural products that regulate multiple cytoskeletal protein interactions. *Nat. Prod. Rep.* **32**, 534–542 (2015). 査読有
DOI: 10.1039/c4np00129j
- ③ M. Kita, H. Oka, A. Usui, T. Ishitsuka, Y. Mogi, H. Watanabe, M. Tsunoda, M. Matsuki, and H. Kigoshi: Total synthesis of mycalolides A and B through olefin metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 14174–14178 (2015). 査読有
DOI: 10.1002/anie.201507795
- ④ A. Kawamura, M. Kita, and H. Kigoshi: Aplysiasecoesterol A: a 9,11-secoesteroid with an unprecedented tricyclic γ -diketone structure from the sea hare *Aplysia kurodai*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 7073–7076 (2015). 査読有
DOI: 10.1002/anie.201501749
- ⑤ L. M. Echenique–Díaz, S. D. Ohdachi, M. Kita, G. Begue–Quiala, R. Borroto, J. L. Delgado–Labañino, J. Damez–Diez, O. Hoson, and C. Saito: Assessing local people's knowledge of the endangered Cuban Solenodon (*Solenodon cubanus*) in Alejandro de Humboldt National Park, Cuba. *Research Bulletin of Environmental Education Center, Miyagi University of Education* **16**, 89–95 (2014). 査読無
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/56686/3/14.pdf>
- ⑥ M. Kita, Y. Hirayama, K. Yoneda, K. Yamagishi, T. Chinen, T. Usui, E. Sumiya, M. Uesugi, and H. Kigoshi: Inhibition of microtubule assembly by a complex of actin and antitumor macrolide aplyronine A. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 18089–18095 (2013). 査読有
DOI: 10.1021/ja406580w
- ⑦ 大館智志, 北将樹, ラザロ・ミゲル・エチエニケ・ディアス, ヘラルド・ベゲ・キアラ, 保尊脩: キューバソレノドン(アルミキ)の多数捕獲の成功と調査顛末. *どうぶつと動物園* 2013 年冬号, 24–29 (2013). 査読無.
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/53979>

[学会発表] (計 4 5 件)

- ① M. Kita, Bioorganic Studies on the Key Natural Products from Venomous Mammals. 環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2015), 2015 年 12 月 15–20 日, ヒルトンハワイアンビレッジ (米国ハワイ), 口頭.
- ② 北将樹, 切れ味の良い分子を自然界にもとめて. 第 6 回横幹連合コンファレンス, 2015 年 12 月 5–6 日, 名古屋工業大学 (愛

知県名古屋市), 招待講演.

- ③ 北将樹, 哺乳類由来の神経毒の化学生物学研究. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会 (BMB2015) ワークショップ『最新の生物毒の多様性がおもしろい! ~その構造と機能, 進化そして利用について~』, 2015 年 12 月 1–4 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 招待講演.
- ④ M. Kita: Comparative Analysis of Toxicity In the Cuban Solenodon and Its Potential Role in the Species. Vth International Wildlife Management Congress 2015 (IWMC2015), 2015 年 7 月 26–30 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 招待講演.
- ⑤ 北将樹, 哺乳類由来の神経毒の化学生物学研究. 第 15 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「バイオインパクトマテリアル: その生体衝撃性の仕組みと応用性」, 2015 年 6 月 24–26 日, あわぎんホール (徳島県徳島市), 招待講演.

[図書] (計 1 件)

- ① M. Kita and H. Kigoshi: Antitumor effects of sea hare-derived compounds in cancer. in *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin*, Ed. S. –K. Kim (Springer International Publishing Switzerland), pp. 701–740 (2015).

[その他]

- ① 筑波大学大学院数理物質科学研究科化学専攻生物有機化学研究室ホームページ
http://www.chem.tsukuba.ac.jp/kigoshi/j/top_j.html
- ② 筑波大学 TRIOS 研究者総覧 北将樹
<http://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000000653/>
- ③ TSUKUBA FUTURE #004: 科学者の珍獣・毒物ハンティング
<http://www.tsukuba.ac.jp/notes/004/index.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