

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07412

研究課題名(和文) ヤエヤマサソリ由来のペプチド毒素LaIT1の昆虫選択的毒性発現機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the action mechanism of the insect-selective peptide toxin LaIT1 isolated from the *Liocheles australasiae* scorpion venom

研究代表者

宮下 正弘 (Miyashita, Masahiro)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80324664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：LaIT1はヤエヤマサソリ毒液から単離された昆虫選択的ペプチド毒素である。本研究においては、光親和性標識されたLaIT1類似体を合成し、これを用いてカイコ幼虫の中枢神経においてLaIT1と特異的に結合するタンパク質の探索を行った。その結果、候補として得られたタンパク質はこれまでにサソリ毒の作用標的として報告されていないことから、LaIT1は新しい作用機構を持つ殺虫性ペプチドであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：LaIT1 is an insect-selective peptide toxin isolated from the *Liocheles australasiae* scorpion venom. In this study, a photoaffinity-labeled LaIT1 analog was synthesized to identify proteins that specifically bind LaIT1 in the central nervous system of the silkworm larvae. The candidate proteins have not been reported as an action target of scorpion toxins, suggesting that LaIT1 has an unknown action mechanism.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：ペプチド 生物毒 神経毒 光親和性標識

1. 研究開始当初の背景

LaIT1 は日本に生息するヤエヤマサソリの毒液から単離されたペプチド毒素である (図1)。LaIT1 は昆虫に対して高い毒性を示すが、哺乳動物に対してはほとんど毒性を示さない。このような昆虫特異的な毒性をもつ LaIT1 は、それ自体が生物農薬として重要であるだけでなく、その作用機構が明らかとなれば、それをターゲットとした農薬の開発にとって有用な情報を与える。しかしながら、LaIT1 と類似した配列を持つペプチドは少なく、その立体構造も他のサソリ毒には見られない特徴を有していることもあって、LaIT1 の作用機構についての知見はほとんど得られていない。



図1 LaIT1 の構造

2. 研究の目的

LaIT1 の昆虫特異的な作用は、その症状の現れる速さから、分解や代謝などが原因ではなく、作用標的における活性の違いが影響していると考えられる。また、LaIT1 は昆虫に対して短時間のうちに麻痺症状を引き起こすことから、神経系に作用していることが推察されている。そこで本研究では LaIT1 の作用標的となるタンパク質の特定を目的として、光親和性標識を導入した種々の LaIT1 類縁体を合成し、LaIT1 と特異的に結合するタンパク質の検出を行った。

3. 研究の方法

[光親和性標識 LaIT1 類縁体の合成]

光親和性標識を導入すると、その構造が活性に影響する可能性がある。そこで本研究では、この影響を最小限にとどめるため、光親和性基としては最も小さな構造であるフェニルアジド基を用いることとした。LaIT1 の場合、配列中に含まれるフェニルアラニン残基を 4-アジドフェニルアラニン (AzF、図2) に置換することで標識体の合成が可能である。本研究では、Fmoc 固相法による LaIT1 の合成過程で Fmoc-フェニルアラニンの代わりに、市販されている Fmoc-4-アジドフェニルアラニンを用いて導入した。

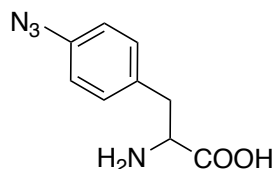


図2 4-アジドフェニルアラニンの構造

[光親和性標識類縁体への ¹²⁵I の導入]

光親和性標識化合物は、UV 照射によりタンパク質と共有結合を形成するが、これだけで

ほどのタンパク質に結合したかは分からない。したがって、光親和性標識以外に、検出あるいは濃縮のための標識が必要となる。検出用の標識としては放射性同位体が感度の面で優れており、特にペプチドに対する標識としては、放射性ヨウ素 (¹²⁵I) が最も導入が容易であり、かつ検出感度が高い。通常、¹²⁵I はチロシン残基側鎖に導入されるが、LaIT1 の場合、その配列中に 1 残基だけ含まれている。そこで、まず iodogen 法を用いたヨウ素の導入条件の検討を行った。得られた最適条件を用いて、¹²⁵I の導入実験を行った。

また、検出用標識として蛍光標識体も用いたが、この場合は carboxyfluorescein を N 末端アミノ基に導入した。

[光親和性標識類縁体へのビオチン導入]

光親和性標識化合物にさらに濃縮用のタグを導入すれば、特異的に結合したタンパク質を単離・濃縮するが可能となる。これを電気泳動分析すれば、通常の染色方法を用いてそのタンパク質バンドを検出・同定することが可能である。本研究では、ビオチン-アビジンの高い親和性を利用した単離・濃縮を行うこととした。この場合、LaIT1 にビオチン構造を導入する必要があるが、側鎖構造にあらかじめビオチンが導入された非天然型アミノ酸 (図3) が購入可能であり、これを用いてビオチン標識体の合成を行った。

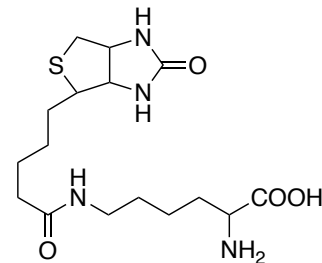


図3 ビオチンを含むアミノ酸の構造

[光親和性標識類縁体の活性評価]

合成した標識類縁体の活性評価は、コオロギあるいはカイコ幼虫を用いた注射法によって行った。

[光親和性標識類縁体による標的分子の探索]

¹²⁵I を導入した光親和性標識 LaIT1 類縁体 (¹²⁵I-[AzF]LaIT1) を用いた結合タンパク質の探索実験は、カイコ中枢神経から得た膜面分タンパク質を用いて行った。一定量のタンパク質と類縁体をインキュベートした後、UV 照射した。このサンプルを SDS-PAGE による分析に供し、そのバンド位置を確認した。また、ビオチンを導入した光親和性標識 LaIT1 類縁体 (Bio-[AzF]LaIT1) については、膜面分タンパク質とインキュベート後に UV 照射し、これをストレプトアビジン固定化ビーズに処理することで、Bio-[AzF]LaIT1 が結合し

たタンパク質を単離した。得られたサンプルは SDS-PAGE による分析に供し、染色後にバンド位置を確認した。

4. 研究成果

[光親和性標識 LaIT1 類縁体の合成と活性]

LaIT1 は 36 残基のペプチドであり、2 組のジスルフィド結合を含んでいる。本研究では光親和性基としてフェニルアジド基を用いることとし、配列中のフェニルアラニンに 4-アジドフェニルアラニン (AzF) に置換した類縁体を合成した。この類縁体 ([AzF]LaIT1) の殺虫活性を測定したところ、天然型 LaIT1 の約 75% の活性を示し、光親和性標識による構造改変がほとんど活性に影響を与えないことが分かった。

[光親和性標識類縁体への ^{125}I 導入]

まず、非放射性のヨウ素を用いて LaIT1 に対する導入実験を行った。ヨウ素の量に対してペプチドが少ないと、チロシン側鎖へヨウ素が 2 原子導入されてしまう場合があり、結果として収率が低下することがこれまでに分かっている。そこでまず、ペプチド (LaIT1): ヨウ素のモル比を 10:1 あるいは 25:1 となるように設定して、反応させた。その結果、いずれの場合もヨウ素が 2 つ導入されたペプチドは見られず、その量からは投入したほぼすべてのヨウ素がペプチドへ導入されていることが確認できた。さらに、光親和性標識を含む [AzF]LaIT1 を用いて反応を行ったところ同様の結果が得られた。この結果に基づき、放射性同位体である ^{125}I を用いた実験を行った。その結果、 ^{125}I -[AzF]LaIT1 が高純度で得られ、投入された ^{125}I を基準にすると、約 36% の収率で得られていることが分かった (図 4)。

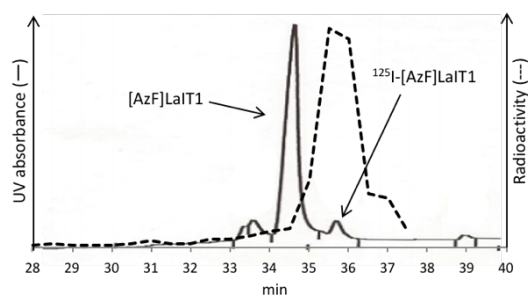


図 4 ^{125}I -[AzF]LaIT1 の合成結果

検出用標識として carboxyfluorescein を N 末端アミノ基に導入した類縁体も合成したが、これは殺虫活性を示さなかった。このことから、LaIT1 の N 末端を化学修飾すると活性発現に大きな影響を与え、標識部位としては不適切であることが判明した。

[光親和性標識類縁体へのビオチン導入]

光親和性標識類縁体に、さらに濃縮用タグ

分子としてビオチンを導入した類縁体の合成を行った。LaIT1 の配列において活性発現に影響を与えないことが分かっているアミノ酸残基を、側鎖構造にビオチンを含むアミノ酸 (図 3) と置換した。得られた類縁体 (Bio-[AzF]LaIT1) の活性を測定したところ、野生型 LaIT1 の 20% 程度ではあるが、結合タンパク質の探索実験に十分な殺虫活性をもつことが分かった。

[^{125}I -[AzF]LaIT1 を用いた特異的結合タンパク質の探索]

LaIT1 と特異的に結合するタンパク質の存在を確認するため、 ^{125}I -[AzF]LaIT1 によるカイコ中枢神経由来の膜面分タンパク質の光親和性標識を行った。その結果、LaIT1 と結合を示すタンパク質のバンドが 1 つ検出された。このバンドは、野生型 LaIT1 の共存下ではその標識率が減少し、不活性型 LaIT1 類縁体の共存下では変化が見られなかった。このことから、このタンパク質が LaIT1 の作用標的であることが示唆された。

[Bio-[AzF]LaIT1 を用いた特異的結合タンパク質の濃縮]

Bio-[AzF]LaIT1 を用いて、上と同様の方法による光親和性標識を行った。その結果、 ^{125}I -[AzF]LaIT1 によって標識されたタンパク質と同じ質量と考えられるバンドが検出された。また、上の実験と同様に、活性型あるいは不活性型の類縁体を共存させることで、この結合が特異的であることを確認した。これらの実験から、このタンパク質が LaIT1 の作用に関与している可能性が高いことが分かった。

このタンパク質バンドを電気泳動ゲルから切り出し、酵素消化後に質量分析計を用いて分析した。その結果、いくつかのタンパク質が候補分子として同定され、結合タンパク質がこの中に含まれることが分かった。候補として得られたタンパク質は、いずれもこれまでにサソリ毒の作用標的として報告されていないことから、LaIT1 は未知の作用機構を持つ殺虫性ペプチドであることが示唆された。

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 4 件)

① M. Miyashita, A. Kitanaka, M. Yakio, Y. Yamazaki, Y. Nakagawa, H. Miyagawa. Complete *de novo* sequencing of antimicrobial peptides in the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*, *Toxicon*, 139, 1-12 (2017)
DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.09.010

② 宮下正弘, 「*de novo* Peptide Sequencing の基礎と実際」 *J. Mass Spectrom. Soc. Japan*, 65,

231-238 (2017)

DOI: 10.5702/massspec.17-89

③ A. Kitanaka, H. Juichi, Y. Nihashi, M. Miyashita, H. Miyagawa. A facile method for preferential modification of the N-terminal amino group of peptides using triazine-based coupling reagents, *Mass Spectrom. (Tokyo)*, 6, A0059 (2017)

DOI: 10.5702/massspectrometry.A0059

④ M. Abdel-Wahab, M. Miyashita, Y. Ota, H. Juichi, R. Okabe, M. Sarhan, M. Fouda, M. Abdel-Rahman, S. Saber, Y. Nakagawa. Isolation, structural identification and biological characterization of two conopeptides from the *Conus pennaceus* venom, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81, 1879-1882 (2017).

DOI: 10.1080/09168451.2017.1364966

〔学会発表〕 (計 4 件)

① 岡部諒太、北中淳史、内山博允、須恵雅之、宮下正弘、中川好秋、宮川恒「ヤエヤマサソリの毒液に含まれる抗菌性ペプチドの探索と同定」日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017 年 3 月、京都)

② 宮下正弘、北中淳史、岡部諒太、内山博允、須恵雅之、中川好秋、宮川恒「*De novo* シーケンス解析とトランスクリプトーム解析の組み合わせによるヤエヤマサソリ毒液に含まれる抗菌性ペプチドの構造決定」第 65 回質量分析総合討論会 (2017 年 5 月、つくば)

③ M. Miyashita, A. Kitanaka, M. Yakio, Y. Yamazaki, Y. Nakagawa, H. Miyagawa. Chemical modification-assisted *de novo* sequencing of antimicrobial peptides in the scorpion venom, 19th World Congress of the International Society on Toxinology (2017 年 10 月、中国・海口)

④ R. Okabe, A. Kitanaka, H. Uchiyama, M. Sue, M. Miyashita, Y. Nakagawa, H. Miyagawa. Identification of antimicrobial peptides from the *Liocheles australasiae* scorpion venom using *de novo* sequencing and transcriptomic analyses, 第 54 回ペプチド討論会 (2017 年 11 月、大阪)

〔図書〕 (計 0 件)

〔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

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 正弘 (MIYASHITA, Masahiro)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 80324664

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松田 一彦 (MATSUDA, Kazuhiko)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号: 00199796

(4) 研究協力者

なし