

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05842

研究課題名(和文) 2つのドメイン構造をもつサソリ毒ペプチドの殺虫活性発現機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of insecticidal actions of two-domain scorpion peptides

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：サソリ毒液には活性成分としてジスルフィド結合をもつペプチドと、ジスルフィド結合をもたずヘリックス構造を形成するペプチドが存在するが、これらに加えて、その両者の特徴をもつ2ドメイン型ペプチドが存在する。しかし、この構造が活性発現に果たしている役割については不明な点が多い。そこで、ヤエヤマサソリ毒液に含まれる2ドメイン型ペプチド(LalT3とLalT4)について、それらの同定ならびにネイティブ化学ライゲーション法を用いた化学合成法の確立をおこなった。その結果、いずれも作用機構解明に必要な量を効率的に合成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サソリ毒液には様々な生理活性をもつペプチド成分が数多く含まれ、農薬あるいは医薬品としての応用が期待されている。しかし、その成分の一種である2ドメイン型ペプチドについてはその構造と活性の関係において不明な点が多い。同様のペプチドは、クモ毒からも見いだされていることから、生物毒素がこのような構造を形成することに利点があるものと推察される。本研究において、2ドメイン型ペプチドの化学合成法を確立できたことから、その作用メカニズムが進むと考えられ、今後の農薬・医薬品開発において有用な情報を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In scorpion venom, there are two types of peptides as active components: peptides with disulfide bonds and peptides that form an alpha-helix structure without disulfide bonds. However, there are also two-domain peptides with both structural features, which are called beta-KTx peptides. These peptides have been found in venoms of many scorpion species, but the role of each domain structure in the expression of biological activity remains unclear. Therefore, we identified and synthesized LalT3 and LalT4, beta-KTx peptides found in *Liocheles australasiae* scorpion venom. As a result, both peptides were obtained, using the native chemical ligation method in high purity. This allows efficient synthesis of these peptides with the amount required for elucidation of their mechanism of action.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：サソリ毒 ペプチド 殺虫活性 抗菌活性 生体膜

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サソリ毒液には様々な生理活性をもつペプチド成分が数多く含まれている。主な生理活性成分として神経(イオンチャネル)に作用する毒素や、細胞膜に作用する毒素が存在する。前者はジスルフィド結合を複数含む構造であるのに対して、後者はジスルフィド結合をもたず、ヘリックス構造を形成している。これらの毒素に加えて、その両者の構造的特徴を併せ持つ、つまり2つのドメイン構造を持つ「ハイブリッド型」毒素も存在する。これらは -KTx ペプチドと呼ばれ、これまでに多くのサソリ毒液から見いだされている。-KTx ペプチドは、N末端領域がヘリックス構造を形成し、C末端領域は3つのジスルフィド結合で固定された構造を持っている。このような特徴をもつ -KTx ペプチドにおいて、2つのドメイン構造がその活性発現に果たしている役割については不明な点が多い。しかしながら、同様の2ドメイン構造をもつペプチドが、クモ毒からも多数見いだされていることから、生物毒素がこのような構造を形成することに何らかの利点があるものと推察される。ヤエヤマサソリより同定した殺虫性ペプチド LaIT2 も2ドメイン構造をもつが、合成類縁体を用いた実験により、ヘリックス構造を形成するN末端ドメインが殺虫活性発現に必須であることが分かっている(1)。一方、C末端ドメインは単独では活性を示さず、N末端ドメインとの組み合わせによって活性を増強させる効果をもつ。このことから、C末端ドメインの作用部位が細胞内に存在し、その移行のためにN末端ドメインが必要であるという仮説が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究においては、まず -KTx ペプチドの細胞内移行のためにN末端ドメインが必要であるという仮説をもとに、LaIT2のN末端ドメインペプチドの細胞膜透過能について評価した。また、-KTx ペプチドの作用機構研究が進まなかった理由として、これらが50-100残基の長さでジスルフィド結合も含むペプチドであるため、大量調製が難しく、構造と活性の関係についての詳細な情報が得られていないことが考えられた。そこで、本研究ではヤエヤマサソリより新奇 -KTx ペプチドを探索し、その同定ならびに化学合成手法の確立をおこなった。

### 3. 研究の方法

#### (1) LaIT2のN末端ドメインペプチドの細胞膜透過能の評価

-KTx ペプチドの細胞内への移行のためにN末端ドメインが必要であるという仮説を検証するため、LaIT2のN末端ドメインペプチドを合成し、その細胞膜透過能について調べた。まず、LaIT2のN末端1~30残基目までの配列をもち、そのC末端に蛍光標識導入のためにCys残基を追加したペプチド(N-LaIT2)を合成した。蛍光標識は、N末端Cys残基に対してマレイミド基を介してfluoresceinを導入することでおこなった。細胞膜透過能は、昆虫細胞(Sf-9)に対してペプチドを処理し、これを共焦点顕微鏡によって観察することで評価した。

#### (2) LaIT3の化学合成

LaIT3はLaIT2の同定研究において同時に単離されたペプチドである。エドマン分解法ならびにMS/MS法によってその配列を決定した結果、LaIT3は -KTx ペプチドであると判明した。LaIT3は84アミノ酸残基で構成されるペプチドであり、通常の逐次延長による固相法を用いて合成することは難しい。そこで、ペプチドを複数のフラグメントに分けて合成し、それらを順次縮合させることによって長鎖ペプチドを得るネイティブ化学ライゲーション(NCL)法を用いることと

した。化学ライゲーションの必要な Cys 残基の位置と、ペプチド合成の容易さを考慮して、それぞれが 40 残基以下となるように 3 つのフラグメントに分割し、それぞれの縮合部位として 12 残基目と 13 残基目の間、46 残基目と 47 残基目の間を選択した。これにより各フラグメントの大きさは、N 末端側から 12 残基、34 残基、38 残基となった (図 1)。

GGILREKYFHKAAD/ALTSNIPIPVVKDVLKSAANQMIRKIGKVQQA/CAFNKDLAGWCEKSCQEAEKKGKGYCHGTRKCKCGKPIDY

図 1 LaIT3 の配列と縮合位置

合成は、まず LaIT3(1-12)-thioester と [<sup>13</sup>Cys]LaIT3(13-46)-hydrazide を縮合し、[<sup>13</sup>Cys]LaIT3(1-46)-hydrazide を得た。ここで得られたペプチドには本来含まれない Cys 残基が存在する。そのため、このペプチドを脱硫反応によって 13 残基目の Cys を Ala に変換し、LaIT3(1-46)-hydrazide を得た。さらに、これを LaIT3(47-84) と縮合することで直鎖状 LaIT3 を得た。このペプチドを、グルタチオンを含む酸化還元緩衝液を用いたジスルフィド結合の形成反応に供し、LaIT3 を得た。

### (3) LaIT4 の化学合成

ヤエヤマサソリの毒腺トランスクリプトーム解析の結果をもとに、-KTx ペプチドの構造的特徴をもつ成分の探索をおこなった(2)。-KTx ペプチドの候補配列から求めた質量を、粗毒液の LC/MS 分析データから検索することで、新たな -KTx ペプチドの存在を確認した。この成分 (LaIT4 と命名) を HPLC によって精製し、酵素消化後に LC/MS 分析をおこなって、このペプチドの配列を確認した。続いて、LaIT4 の化学合成をおこなった。LaIT4 は 76 アミノ酸残基で構成されるため、2 つのフラグメントに分けて合成し、それらを NCL 法によって縮合させた (図 2)。縮合部位として中央付近 (38 残基目と 39 残基目の間) を選択し、各フラグメントを合成した。

SWISEKRIQKALDEKLPKGFIQGAAKAIVHKFAKNQYG/CLADMDVKGSCDRHCQETESTNGVCHGTRKCKCGIGRVY

図 2 LaIT4 の配列と縮合位置

まず、N 末端側フラグメント LaIT4(1-38)-hydrazide ならびに末端側フラグメント LaIT4(39-76) を合成した。これらを NCL 反応によって縮合し、直鎖状 LaIT4 を得た。このペプチドを、グルタチオンを含む酸化還元緩衝液を用いたジスルフィド結合形成反応に供して LaIT4 を得た。

## 4. 研究成果

### (1) LaIT2 の N 末端ドメインペプチドの細胞膜透過能の評価

昆虫細胞 (Sf-9) に対して N-LaIT2 を処理した後、共焦点顕微鏡を用いて細胞膜透過能を調べた。その結果、N-LaIT2 の細胞内への移行はわずかしき見られなかった (図 3)。このことから、LaIT2 の N 末端ドメインはペプチドを細胞内へ移行させる役割はもたないことが示唆された。

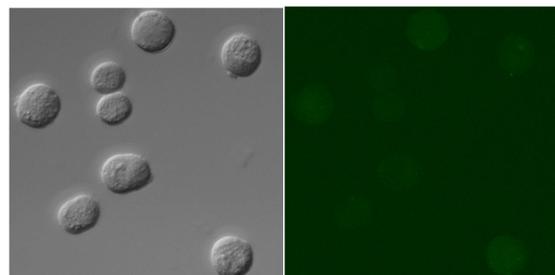


図 3 N-LaIT2 の細胞膜透過能の評価 (左:可視光、右:蛍光)

## (2) LaIT3 の化学合成

2 段階の NCL 反応の後、ジスルフィド結合の架橋が完了して得られたペプチドを LC/MS 分析に供した (図 4)。その結果、LaIT3 が正しく合成されていることが確認できた。この手法により、生理活性の評価に十分な純度と量の LaIT3 を合成できることが分かった。

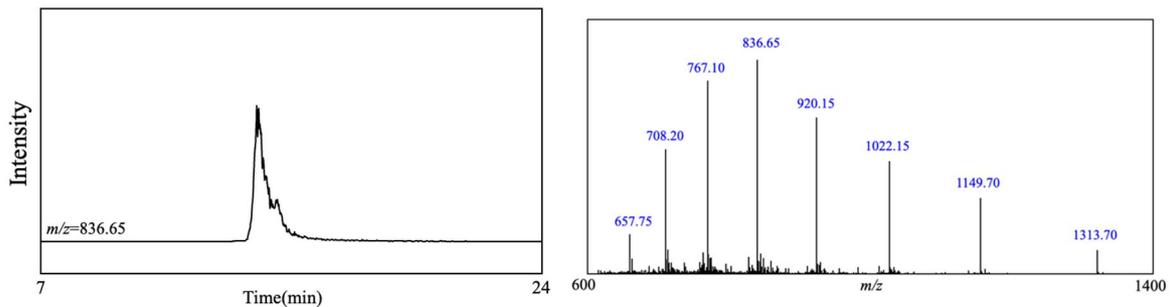


図 4 化学合成した LaIT3 の LC/MS 分析結果 (左 : クロマトグラム、右 : マススペクトル)

## (3) LaIT4 の化学合成

NCL 反応の後、ジスルフィド結合の架橋が完了して得られたペプチドを LC/MS 分析に供した (図 5)。その結果、LaIT4 が正しく合成されていることが確認できた。この手法により、生理活性の評価に十分な純度と量の LaIT4 を合成できることが分かった。

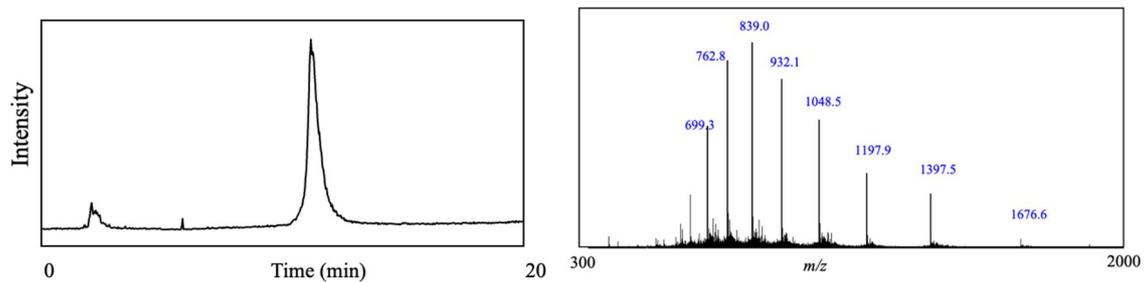


図 5 化学合成した LaIT4 の LC/MS 分析結果 (左 : クロマトグラム、右 : マススペクトル)

## [ 引用文献 ]

- 1) Juichi, H., Ando, R., Ishido, T., Miyashita, M., Nakagawa, Y., and Miyagawa, H., Chemical synthesis of a two-domain scorpion toxin LaIT2 and its single-domain analogs to elucidate structural factors important for insecticidal and antimicrobial activities. *J. Pept. Sci.*, **24**, e3133 (2018).
- 2) Miyashita, M., Mitani, N., Kitanaka, A., Yakio, M., Chen, M., Nishimoto, S., Uchiyama, H., Sue, M., Hotta, H., Nakagawa, Y., and Miyagawa, H., Identification of an antiviral component from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* using transcriptomic and mass spectrometric analyses. *Toxicon*, **191**, 25-37 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Miyashita Masahiro, Mitani Naoya, Kitanaka Atsushi, Yakio Mao, Chen Ming, Nishimoto Sachiko, Uchiyama Hironobu, Sue Masayuki, Hotta Hak, Nakagawa Yoshiaki, Miyagawa Hisashi | 4. 巻<br>191           |
| 2. 論文標題<br>Identification of an antiviral component from the venom of the scorpion <i>Liocheles australasiae</i> using transcriptomic and mass spectrometric analyses                  | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Toxicon  | 6. 最初と最後の頁<br>25 ~ 37 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.toxicon.2020.12.007  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Juichi, H. Miyashita, M. Nakagawa, Y. Miyagawa, H.  | 4. 巻<br>83              |
| 2. 論文標題<br>Isolation and characterization of the insecticidal, two-domain toxin LaIT3 from the <i>Liocheles australasiae</i> scorpion venom | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Biosci. Biotechnol. Biochem.  | 6. 最初と最後の頁<br>2183-2189 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/09168451.2019.1654849   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>三谷 直也、宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒            |
| 2. 発表標題<br>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（第2報） |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会                   |
| 4. 発表年<br>2021年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三谷 直也、宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒         |
| 2. 発表標題<br>ヤエヤマサソリの毒液に含まれる抗菌性ペプチドの同定と活性評価 |
| 3. 学会等名<br>日本農薬学会第46回大会                   |
| 4. 発表年<br>2021年                           |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>大下 勝也、角田 優伍、宮下 正弘、宮川 恒   |
| 2. 発表標題<br>植物・昆虫細胞を用いた細胞膜透過性ペプチドの比較 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2020年度大会          |
| 4. 発表年<br>2020年                     |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |