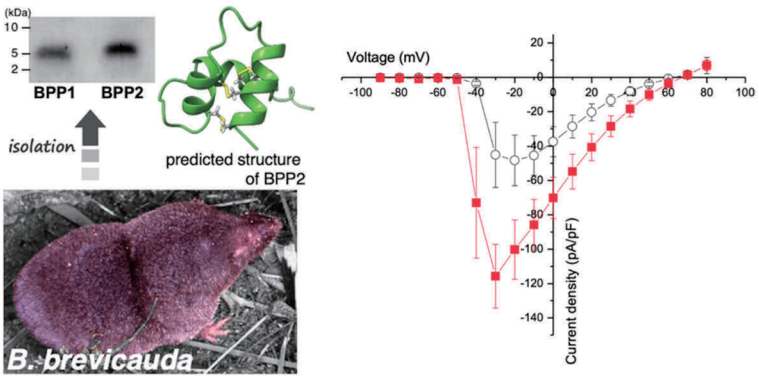
5　哺乳類の適応進化に関わる神経毒ペプチドの機能解明	北　将樹

【目的】北米に生息するブラリナトガリネズミ *Blarina brevicauda* は哺乳類の中でも特に強い毒を持ち、その唾液にはプロテアーゼ毒 blarina toxin だけでなく、獲物を瞬時に麻痺させる強力な神経毒が含まれることが、長年の生態観察から予想されてきた。著者はこれまでに、ミールワーム麻痺活性を指標に用いて、この動物の顎下腺から神経毒ペプチド BPP（Blarina paralytic peptide）1, 2 を単離し、酵素消化と MS/MS 解析によりそれらの全アミノ酸配列を推定した。BPP 類はヒトのオピオイドペプチドの前駆体 synenkephalin（SYN）の一部と高い相同性を示すが、オピオイドペプチド自体の配列は含まれず、哺乳類に普遍的な SYN の生理活性も不明である。このように、ヒトでは脳内で分泌され鎮痛に関わるペプチドホルモンの前駆体部分が、トガリネズミでは唾液とともに顎下腺から分泌され獲物を捕獲する麻痺物質として機能することは、生態学および進化学の観点からも非常に興味深い。このような背景から、哺乳類の適応進化に関わる神経毒ペプチドの構造と機能の解明を目指して本研究を実施した。

【方法】ペプチド固相法により C 末端にアシルヒドラジドを持つ 1〜22 セグメントと N 末端に遊離の Cys 残基を持つ 23〜52 セグメントをそれぞれ合成し、native chemical ligation（NCL）法で連結して、保護基を除去、次いで cystine／cysteine を用いた酸化・還元平衡条件によるフォールディングにより BPP2 を合成した。天然品 BPP2 との同一性は HPLC における保持時間の比較により、また BPP2 の立体構造は CD スペクトルの波形パターンを立体構造予測プログラム ColabFold で得た推定構造との比較により行った。合成品 BPP2 のジスルフィド結合様式は、段階的な還元と 2 種類の *S*-アルキル化剤による反応産物の MS/MS 解析により決定した。また電気生理学実験に関しては、Ca チャネルを発現させた HEK293 細胞を用いて、ホールセルパッチクランプ法により行った。

【結果】ラット由来の SYN のジスルフィド結合様式は Cys（Ⅰ）-Cys（Ⅳ）,Cys（Ⅱ）-Cys（Ⅴ）,Cys（Ⅲ）-Cys（Ⅵ）（Type-Ⅰ型）と報告されていた。しかし ColabFold プログラムで BPP 類の立体構造を予測したところ、上記とは異なる Cys（Ⅰ）-Cys（Ⅴ）,Cys（Ⅱ）-Cys（Ⅳ）,Cys（Ⅲ）-Cys（Ⅵ）（Type-Ⅱ型）と示唆され、この両方の可能性を考慮して BPP2 の合成を進めた。全長で 52 アミノ酸残基からなる無保護ペプチドのフォールディングにより、BPP2 がほぼ単一の生成物として得られ、その HPLC 保持時間は天然品と一致した。さらに合成品の CD スペクトルの波形パターンや二次構造における α-ヘリックス構造の占有率は ColabFold プログラムで予測したものと良く一致した。さらに合成品を部分分解して解析した結果、天然品 BPP1, 2 のジスルフィド結合様式は ColabFold プログラムから予測された Type-Ⅱ型であると決定した。BPP2 は顕著なミールワーム麻痺活性（5.6 μg/g body weight）を示し、また主に脳や心臓で発現し、心拍の形成や痛覚の伝達に関与するヒト T 型 Ca チャネル（hCa$_v$3.2）を 1.77 μM という低濃度で活性化し、その活性化閾値を約 10 mV 低下させることが分かった。hCa$_v$3.2 を活性化して膜電位の変化に対するチャネルの感度を高める化合物はこれまで報告はなく、今回見出した BPP2 の活性は新規性が高いと言える。

ブラリナトガリネズミ由来の麻痺性神経毒ペプチド BPP2 はヒト T 型 Ca チャネル hCa$_v$3.2 を活性化する



5. 哺乳類の適応進化に関わる神経毒ペプチドの機能解明

北　将樹

名古屋大学 大学院生命農学研究科 応用生命科学専攻 天然物ケミカルバイオロジー研究室

Key words：麻痺性神経毒，トガリネズミ，電位依存性 Ca チャネル，ペプチド，構造と機能

緒　言

動物由来の天然毒には、フグ毒テトロドトキシンなど特異な構造や機能をもつものが多い。また加速進化により、有毒動物由来の生理活性ペプチドには多様性がみられる。このような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や、新規医農薬リードの開発など応用研究の発展に広く貢献してきた。例えば、モルヒネに替わる強力な鎮痛薬として期待される ziconotide はイモ貝由来の conopeptide の合成誘導体であり、疼痛シグナル伝達に関与する N 型 Ca チャネルを強力に遮断する。自然界には様々な毒を持つ動物が知られているが、毒を持つ哺乳類は食虫動物トガリネズミの仲間と単孔目カモノハシしか知られておらず、また稀少性、不安定さゆえに、その有毒成分の理解は十分には進んでいない。

著者は国内外の動物学者・生態学者らと広く連携して、希少な野生哺乳類が持つ毒の化学的研究を行ってきた［1］。これまでに、食虫目トガリネズミ由来のプロテアーゼ毒 blarina toxin を哺乳類で初の致死毒として発見した。またヒトでは血圧調整を担う C 型ナトリウム利尿ペプチドが、単孔目カモノハシでは脚の付け根の毒腺から分泌され、さらに小さいペプチド断片となり炎症・痛みに関わることを見出した。このように、天然由来の毒には化学構造や機能に多様性が見られ、これらの分子間で複合的、相乗的な作用が起こることで特異な活性が発現することから、「生物の進化と多様性は物質（代謝産物）がもたらす」という観点からも注目される。

北米に生息するブラリナトガリネズミ *Blarina brevicauda* は哺乳類の中でも特に強い毒を持ち、その唾液には上記のタンパク毒だけでなく、獲物を瞬時に麻痺させる強力な神経毒が含まれることが、長年の生態観察から予想されてきた。著者はこれまでに、ミールワーム麻痺活性を指標に用いて、この動物の顎下腺から神経毒ペプチド BPP（Blarina paralytic peptide）1, 2 を単離し、酵素消化と MS/MS 解析によりそれらの全アミノ酸配列を推定した。BPP 類はヒトのオピオイドペプチドの前駆体 synenkephalin（SYN）の一部と高い相同性を示すが、オピオイドペプチド自身の配列は含まず、BPP 類に対応するヒト由来ペプチドの生理活性も不明である。このように、ヒトでは脳内で分泌され鎮痛に関わるペプチドホルモンの前駆体部分が、トガリネズミでは唾液とともに顎下腺から分泌され獲物を捕獲する麻痺物質として機能することは、生態学および進化学の観点からも非常に興味深い。

このような背景から、本課題では哺乳類の適応進化に関わる神経毒ペプチドの構造と機能の解明を目指して研究を実施した。その結果、BPP2 を合成し、天然品と比較することで全長 47～52 残基からなる BPP 類の配列と 3 組のジスルフィド結合様式を決定した。さらに BPP2 に強力なミールワーム麻痺活性、およびヒト T 型 Ca チャネル（Cav3.2）の活性化作用があることを新たに見出した［2］。以下、詳細を述べる。

方法および結果

1. BPP 類の合成

哺乳類に広く含まれるオピオイド前駆体タンパク質の一部、synenkephalin（SYN）の生理的な機能は不明であるが、ラット由来の SYN は BPP 類と同じく分子内に 3 組のジスルフィド結合を持ち、その結合様式は Cys（Ⅰ）-Cys（Ⅳ），Cys（Ⅱ）-Cys（Ⅴ），Cys（Ⅲ）-Cys（Ⅵ）（Type-Ⅰ型と呼ぶ）と報告されている（図 1）。一方で鋳型構造を用いず、

アミノ酸配列情報のみで立体構造を予測できる ColabFold プログラムを用いて BPP 類の立体構造を予測したところ、上記とは異なる Cys（Ⅰ）-Cys（Ⅴ）,Cys（Ⅱ）-Cys（Ⅳ）,Cys（Ⅲ）-Cys（Ⅵ）という結合様式（Type-Ⅱ型と呼ぶ）のモデルが得られた。そこで、この両方のジスルフィド様式の可能性を考慮して BPP2 の合成を進めた。

C 末端にアシルヒドラジドを持つ 1～22 セグメントと N 末端に遊離の Cys 残基を持つ 23～52 セグメントをそれぞれ固相法で合成して native chemical ligation（NCL）法で連結し、保護基の Trityl 基を除去することで、BPP2 の全ての Cys 残基が無保護の一本鎖ペプチドを得た。次いで cystine／cysteine を用いた酸化・還元平衡条件でフォールディングを行った結果、反応系は経時的に収束して BPP2 がほぼ単一の生成物として得られた。合成品 BPP2 の HPLC 保持時間は天然品 BPP2 と一致した。さらに合成品の CD スペクトルの波形パターンは ColabFold プログラムで予測したものと良く一致し、二次構造における α-ヘリックス構造の占有率も 52～55%程度と高い一致度を示した。

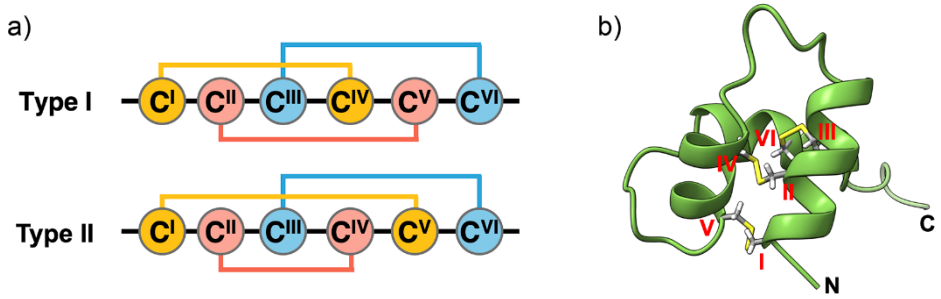


図 1. BPP 類のジスルフィド結合様式と推定立体構造

a）想定される BPP 類の 2 種類のジスルフィド結合様式。

b）ColabFold プログラムで得られた BPP2 の立体構造。

2. BPP 類のジスルフィド結合様式の解析

合成品 BPP2 についてジスルフィド結合様式の解析を行った。初めにジスルフィド結合を残したまま酵素消化を試みたが、天然品と同様、3 組のジスルフィド結合を含むコア構造は非常に安定しており、遊離の C 末端 10 残基しか切断されなかった。そこでジスルフィド結合を部分的に還元して 2 種類のアルキル化剤（NEM、IAM）で段階的に *S*-アルキル化してから HPLC で分離し、ついで酵素消化と MS/MS により詳しく解析した。その結果、合成品 BPP2 のジスルフィド結合様式は ColabFold プログラムで予測した Type-Ⅱ型と一致し（図 2）、天然品 BPP1, 2 のジスルフィド結合様式も Type-Ⅱ型であると決定できた。

3. BPP 類の生物活性評価

BPP2（5.6 μg/g body weight）をミールワームに腹腔内投与すると、投与直後から数分間で全身に麻痺が広がり、1.5 時間後には外部刺激に対する応答が無くなるなど、天然品 BPP2 に近い効果が見られた。この麻痺効果は投与後 6 時間程度まで持続したことから、ブラリナトガリネズミが獲物を効率よく捕獲し捕食するために十分な機能を果たすと考えられた。次いでホールセルパッチクランプ法を用いた電気生理学実験により HEK293 細胞に発現させた Ca チャネルに対する応答を評価した結果、合成品 BPP2（1.77 μM）はヒト T 型 Ca チャネル（$hCa_v3.2$）を活性化し、その活性化閾値を約 10 mV 低下させることが分かった（図 3）。一方で、痛覚伝達に関与するヒト N 型 Ca チャネル（$hCa_v2.2$）に対しては顕著な活性を示さなかった。$Ca_v3.2$ は主に脳や心臓で発現し、心拍の形成や痛覚の伝達などに関与することが知られている。しかし $hCa_v3.2$ を活性化して膜電位の変化に対するチャネルの感度を高める化合物はこれまで報告はなく、今回見出した BPP2 の活性は新規性が高いと言える。

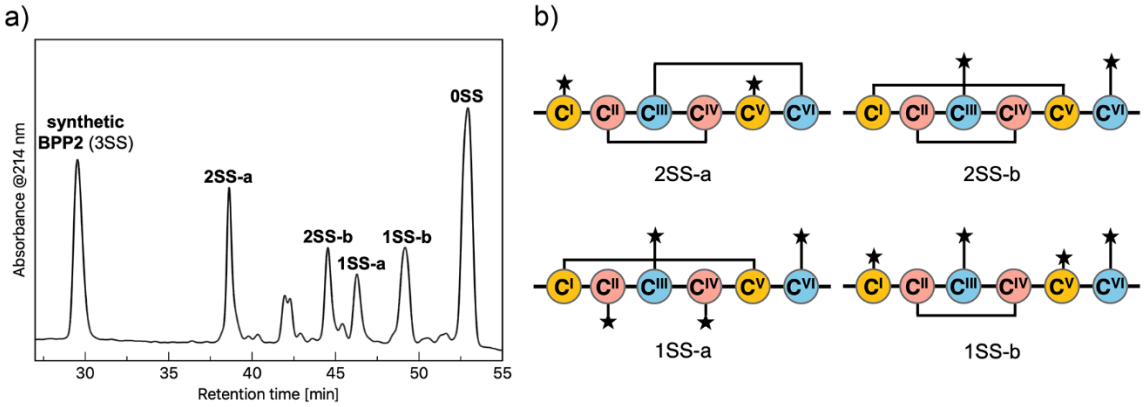


図 2. 合成品 BPP2 の部分分解によるジスルフィド結合様式の決定

a) 部分還元と NEM (*N*-ethylmaleimide) アルキル化後の分離 HPLC クロマトグラム。

b) MS/MS 解析で決定した 1 つもしくは 2 つのジスルフィド結合を持つ分解物の構造。

★印は NEM アルキル化された箇所を示す。

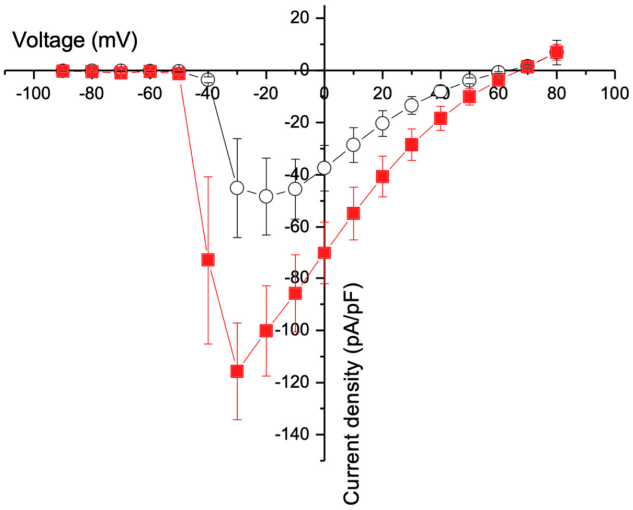


図 3. hCa$_v$3.2 におけるパッチクランプテスト

Whole cell 法で実施し、結果を I-V 曲線で表示した。BPP2 1.77 μM (■、n=5)、コントロール (○、n=4)。

考 察

立体構造比較プログラム DALI による解析から、BPP2 のジスルフィド結合で規定される立体構造はオオムカデ *Scolopendra mutilans* 由来の神経毒ペプチド SLPTX 類と高く類似していた。SLPTX 類は Na チャネルや K チャネルに対する特異的な阻害活性や昆虫に対する致死活性を示す。また SLPTX 類は節足動物に広く保存されている無毒の内在性ホルモンと共通の祖先を起源に持つとされている。したがって、BPP 類が SYN から分子進化を経て毒性を獲得したと仮定すると、共にイオンチャネルを標的とし類似の立体構造を持つ SLPTX 類と BPP 類は、それぞれの種の生存戦略にとって有利になるような進化 (収斂進化) が起きた結果、生み出されたと考えられる。すなわち、節足動物 (ムカデ) と哺乳類 (トガリネズミ) では進化系統が大きくかけ離れているにも関わらず、類似の機構で毒の化学進化が起きたことが示唆された点で興味深い。

希少な哺乳類由来の毒に関する研究は、化学的な進展だけでなく多分野に渡る学際的な研究の側面を併せ持ち、進化・生態学的にも重要な発見をもたらすと期待される。今回得られた BPP 類のユニークな構造や生物活性に関する発見は、生物有機化学分野の発展に留まらず、薬理学や神経科学、生態・進化学など、生命科学の幅広い分野の発展にも寄与すると期待される。今後は BPP 類の麻痺活性・イオンチャネル親和性などのさらなる機能解析と構造活性相関研究を進めるとともに、これまでに国内外でのフィールド調査で採取した様々な食虫動物の唾液成分についても詳細に解析し、その知見から痛み作用に関わる BPP 類の高活性アナログの創出を目指したい。さらに、これまでに独自に開発した蛍光アフィニティー質量分析タグ *N,N*-ジメチルアミノピレン（dmpy）基［3, 4］を導入したケミカルプローブや、生物活性リガンド・標的分子間の相互作用を解析する分子モデリング計算［5, 6］などの活用により、BPP 類の標的受容体における結合様式の解明を目指したい。さらには、ヒトを含む哺乳類由来の synenkephalin との比較により、哺乳類に普遍的なペプチドがなぜ毒として機能するのか、また痛み・神経伝達に関わる生理的機能とどのような関わりがあるのか解明し、ユニークな天然毒の化学的研究を発展させていきたい。

謝　辞

本研究の成果は、北海道大学低温科学研究所の大舘智志助教、名古屋大学大学院生命農学研究科の Andres D. Maturana 准教授との共同研究、ならびに実験を担当して頂いた方々の協力によって得られたものであり、感謝申し上げる。

文　献

1) Sato JJ, Bradford TM, Armstrong KN, Donnellan SC, Echenique-Diaz LM, Begué-Quiala G, Gámez-Díez J, Yamaguchi N, Nguyen ST, Kita M, Ohdachi SD. Post K-Pg diversification of the mammalian order Eulipotyphla as suggested by phylogenomic analyses of ultra-conserved elements. Mol Phylogenet Evol. 2019 Dec;141:106605. Epub 2019 Aug 31. PMID: 31479732 DOI: 10.1016/j.ympev.2019.106605.

2) Yano Y, Fukuoka R, Maturana AD, Ohdachi SD, Kita M. Mammalian neurotoxins, *Blarina* paralytic peptides, cause hyperpolarization of human T-type Ca channel $hCa_v3.2$ activation. J Biol Chem. 2023 Sep;299(9):105066. PMID: 37468103 PMCID: PMC10493266 DOI: 10.1016/j.jbc.2023.105066

3) Arai A, Watanabe R, Hattori A, Iio K, Hu Y, Yoneda K, Kigoshi H, Kita M. *N,N*-Dimethylaminopyrene as a fluorescent affinity mass tag for ligand-binding mode analysis. Sci Rep. 2020 Apr 30;10(1):7311. PMID: 32355254 PMCID: PMC7192892 DOI: 10.1038/s41598-020-64321-9.

4) Tsuda T, Arai A, Kita M. Ligand-dissociation-type *N,N*-dimethylaminopyrene probes for *in-situ* site-specific protein labeling. Chem Asian J. 2022 Sep 14;17(18):e202200631. Epub 2022 Aug 3. PMID: 35862122 DOI: 10.1002/asia.202200631.

5) Utomo DH, Fujieda A, Tanaka K, Takahashi M, Futaki K, Tanabe K, Kigoshi H, Kita M. The C29–C34 parts of antitumor macrolide aplyronine A serve as versatile actin-affinity tags. Chem Commun (Camb). 2021 Oct 12;57(81):10540-10543. PMID: 34553712 DOI: 10.1039/d1cc04259a.

6) Utomo DH, Kita M. Binding mode of actin–aplyronine A–tubulin heterotrimeric complex revealed by molecular dynamics simulation. Bull Chem Soc Jpn. 2023 Jan 13;96(2):120-126. DOI: 10.1246/bcsj.20220299.