

哺乳類由来の神経毒の生物有機化学的研究

Bioorganic Studies on Mammalian Neurotoxins

(日本農芸化学会推薦)

代表研究者 名古屋大学 北 将樹 Nagoya University Masaki KITA

The short-tailed shrew *Blarina brevicauda* is one of the rare venomous mammals, and produces venom in its saliva to catch its prey effectively. We have isolated blarina toxin, a kallikrein-like serine protease, as the first lethal venom from mammalian origin. However, this venom was not active against their major diets, and we re-examined the identification of neurotoxic substances from the *Blarina* shrew saliva. Guided by the paralytic activity against mealworms, we successfully isolated two new neurotoxic peptides with molecular weights of ~5 kDa, and named blarina paralytic peptides (BPPs) 1 and 2. The amino acid sequences of BPPs were established by MS/MS analysis of the digested peptides. BPP1 and 2 had 48 and 53 amino acids with three disulfide bonds. BLAST search showed that BPPs were similar to synenkephalin, an enkephalin precursor expressed in human brain, and soricidin, isolated from the same shrew species. Patch-clamp analysis in the whole-cell configuration showed that BPP2 increased the voltage-gated Ca^{2+} channels activity in human neuroblastoma IMR32 cells. This effect was inhibited by ω -conotoxin, a specific inhibitor of N-type calcium channel. We also analyzed the saliva venom of Cuban solenodon (*Solenodon cubanus*), another venomous mammal, and a potent protease activity was detected.

研究目的

動物由来の天然毒には、フグ毒テトロドトキシンや下痢性貝毒オカダ酸など、ユニークな構造や切れ味鋭い生物活性をもつものが多く知られている。これらの毒はそれぞれイオンチャネルやホスファターゼの特異的な阻害剤として知られ、薬理学・生理学におけるツールや医薬リードとして重要である。さらに最近、巻貝由来の麻痺性神経毒ペプチド、 ω -コノトキシンの誘導体が疼痛緩和ケアで用いられるなど、天然毒の有用性があらためて注目されている。

爬虫類や両生類、魚類、無脊椎動物などの様々な動物が自身で生産、もしくは微生物などから獲得し、毒を保有することが知られている。一方、毒をもつ哺乳類はとても珍しく、トガリネズミやソレノドンなどの食虫類の仲間、およびオーストラリアに生息する単項目のカモノハシなど数種しか知られていない。これら有毒な哺乳類は、恐竜が絶滅した太古から原始的な形態を保ってきたとされ、このような珍しい哺乳類由来の毒が哺乳類の発生や進化の過程に

どのように関わってきたのか興味が持たれる。

これまでに研究代表者らはユニークな天然毒の構造と機能の解明を目指して、哺乳類由来の有毒成分の化学的研究を行ってきた。北米に生息するブラリナトガリネズミからは致死性プロテアーゼを単離し、その構造や機能を明らかにしたり¹⁾。さらに、カモノハシの毒が強力な痛みを引き起こす現象に注目して、ヒトでは血圧調整を担うペプチドホルモン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や痛みに関わることを見出し^{2,3)}、このような化学多様性が生物多様性を産み、生物進化を漸進させるという仮説を得るに至った。生物種により化合物の局在や機能が大きく異なる場合、ゲノム情報からの網羅的解析だけでは「カモノハシにはヒトに類似したタンパク質が存在する」ということしか分からないが、実際に発現しているペプチド断片の構造、活性、局在性などを調べることでこそ、天然毒の意外な機能を発見するには必要と考えられる。

本研究では、生態学および進化的にも興味深い希少な哺乳類由来の有毒物質の構造と機能を解明し、より高活性な神経毒アナログの創製を目指すこととした。食虫動物ブラリナトガリネズミの唾液に含まれる、オピオイド前駆体ペプチド・シンエンケファリンに類似した麻痺性ペプチド BPP 類や、世界最小の哺乳類であるトウキョウトガリネズミおよび絶滅危惧種キューバソレノドンの唾液由来のユニークな神経毒成分の解明に挑戦することとした。さらに、これらユニークな活性物質について、異種の哺乳動物がもつ類似の化合物と構造や機能を比較し、希少な種がもつ麻痺性神経毒の生物学的意義を探ることを目指して本研究を実施した。

研究経過

1. トガリネズミ由来の神経毒ペプチド BPP 類

トガリネズミはミミズや昆虫などを主な餌とする小動物であり、唾液の毒で獲物を麻痺させて捕獲し、巣穴に貯蔵する習性がある。また基礎代謝率が高く、数時間毎に餌を食べる必要があるとされ、一日に自分と同じ体長のミミズを 100 匹以上も食べたという報告もある。これらのことからトガリネズミは、獲物を効率よく捕らえ、また腐敗を防いで貯蔵するために、特異な毒を進化させたと考えられている。トガリネズミは世界で 300 種以上が知られているが、中でも北米に生息するブラリナトガリネズミ *Blarina brevicauda* は体長約 7~10 cm、体重約 15~20 g と小柄ながら、自分よりも大きなネズミや魚を殺すほど強い毒を持つ。ヒトが噛まれて死に至った例はないが、その毒成分にはラットやウサギに対する血圧降下作用や、平滑筋の弛緩作用などが見出されている。これまでの研究で、マウスに対する致死活性を指標に分子量約 35 kDa のタンパク毒ブラリナトキシシン (BLTX, LD₅₀ 1 mg/kg) を単離し、血圧調整に関与する組織性カリクレインに類似したプロテアーゼの一種であり、血管弛緩因子であるキニン類を遊離させる活性を示すことを見出していた。

一方、ブラリナトガリネズミの顎下腺抽出物には、上述した腹腔内投与によるマウス致死活性の他にも、ミールワームの麻痺作用や、マウス脳室内投与による激しい痙攣作用、皮下投与による炎症惹起作用、および培養ヒト神経芽腫細胞に対する Ca²⁺ イオン流入作用など、多様な活性を示すことを確認した。これらの活性はいずれもプロテアーゼ阻害剤の影響を

受けないこと、BLTX を獲物に注入してから毒性を示すまでには数時間以上かかること、およびトガリネズミが主な餌とするミミズや昆虫など無脊椎動物には効かないことから、顎下腺には BLTX とは異なる未知の麻痺性物質が含まれ、マウスなど脊椎動物に効く遅延性の毒と、昆虫やミミズなど小動物を瞬時に捕獲するための毒を使い分けていることが示唆された。そこで、この動物の唾液成分にはタンパク毒素とは異なる麻痺活性物質が含まれると予想し、顎下腺抽出物の分離を再検討することにした。

アセトンに浸漬して長期 (10 年間以上) 保管してあったブラリナトガリネズミの顎下腺を生理食塩水で抽出してミールワームに対する麻痺作用を調べた結果、1/70 個体分の量で投与後直ちに麻痺、痙攣作用を引き起こすことを確認した。さらにこの活性はセリンプロテアーゼ阻害剤であるアプロチニンでは阻害されなかったことから、プロテアーゼとは異なる水溶性の麻痺成分が含まれることが示唆された。そこで顎下腺抽出物をワイドポアの逆相 HPLC (Develosil 300C₄ HG-5, 10~40% aq. MeCN / 0.1% TFA) で分離した結果、ミールワームに対する麻痺活性は保持時間 26~36min の微量成分のみに確認され、プロテアーゼなど高分子を主に含む保持時間 40~50 min の画分とは 1 段階で分離することができた。次いで上記の麻痺活性を指標に、ゲルろ過 HPLC (TSKgel G2000SW_{XL}, 20% aq. MeCN / 0.05% TFA) で分離し、分子量約 5 kDa の低分子を主に含む活性画分を得た。この画分をさらに逆相 HPLC (Develosil RP-AQUEOUS AR-5, 20~50% aq. MeCN / 0.1% HFBA) で精製した結果、主成分として新規ペプチド 2 種を単離することに成功し、*Blarina Paralytic Peptides* (BPP) 1, 2 と命名した。

SDS-PAGE 解析において、BPP 類は約 5 kDa の単一のバンドとして確認された (Figure 1)。そこで BPP 類を DTT / iodoacetamide で還元アミノアルキル化し、トリプシンもしくは Glu-C で酵素消化した。この溶液内消化で得られた断片ペプチドについて MALDI-TOF MS/MS 解析を詳細に行った結果、BPP 1, 2 はそれぞれ 48, 53 アミノ酸残基からなり、ともに分子内にジスルフィド結合を 3 つ持つ一本鎖のペプチドと決定した。BLAST 検索により、BPP 類はヒトのオピオイドペプチド前駆体に相当するシンエンケファリンの部分構造 (1-42 残基) によく似ていた⁴⁾。また、同じトガリネズミ種から単離されている 54 アミノ

酸残基からなるペプチド，ソリシジンにも類似しているが⁵⁾，BPP2とは3つのアミノ酸残基が異なっていることが分かった。

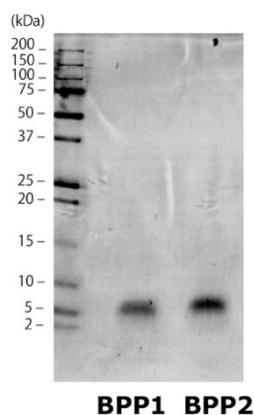


Figure 1. SDS-PAGE analysis of BPPs.

さらに二次構造に関しては，6つのCys残基の位置が一致していることから，BPP類はシンエンケファリンの部分構造と同様に，3つのジスルフィド結合を形成していると推定した。このことは，顎下腺から単離した還元アミノアルキル化を行う前のBPP類のMALDI-TOF MS解析で得られた質量が，アミノ酸配列に基づく予想値よりも6 mu少ないことから支持された。

これまでの研究代表者らの検討において，トガリネズミの顎下腺抽出物，および単孔目カモノハシの蹴爪に含まれる毒のいずれについても，Caチャンネル発現細胞における細胞内Caイオン濃度の上昇作用を見出している。そこで，この麻痺活性物質が作用する標的生体分子を電位依存性イオンチャンネルと想定し，今回精製したBPP類の電気生理学的解析を行った。ヒト神経芽腫細胞(IMR-32)をBrdU, dbcAMP, Nu-SERUM 添加 DMEM 培地で培養してCaチャンネルを発現誘導した。イオンチャンネルの発現は蛍光色素Fluo-4AMを用いた細胞内Ca濃度の観測，およびCaチャンネルのサブタイプ特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。パッチクランプ実験を検討した結果，BPP2にCaチャンネル開口活性がみられ，かつこの活性はN型Caチャンネル阻害剤 ω -コノトキシンにより阻害されることが分かった (Figure 2)。

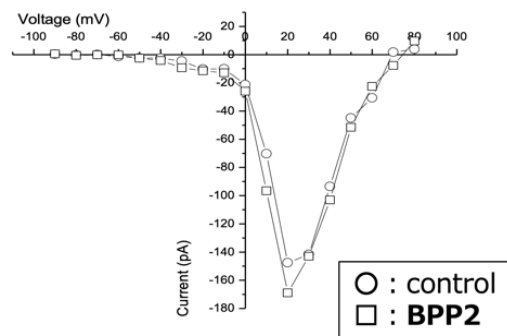


Figure 2. BPP2 increased the voltage-gated Ca^{2+} channels activity in human neuroblastoma IMR32 cells.

今回用いたIMR-32細胞では $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q型)，2.2 (N型)，および2.3 (R型)のいずれも発現していたため，現在，特定のサブタイプのCaチャンネルを発現させた培養細胞を用いて解析を進めている。また，BPP類の構造と機能を確認するため，固相法によるペプチド合成およびプレバチルス発現系を用いたりコンビナントペプチドの合成を検討している。

2. キューバソレノドンの捕獲と唾液の有毒成分

これまで述べたトガリネズミやカモノハシの他にも，中南米に生息するソレノドン(トガリネズミ目)や，全身が針毛で覆われているハリネズミ(ハリネズミ目)など，数種の陸棲哺乳類が毒を持つとされるが，その成分はほとんど明らかになっていない。

ソレノドンは，カリブ海に位置するキューバ島のキューバソレノドン *Solenodon cubanus* とイスパニョーラ島のハイチソレノドンの2種のみが現生している。ともに頭胴長は約30 cm，体重は500~750 gにも達し，食虫類の仲間としては世界でも最大級のサイズである。ソレノドンの下顎の切り歯の裏側には発達した溝があり，これはベノム・デリバリー・システム (venom delivery system, VDS) と呼ばれ，噛み付いた獲物に，毒腺から分泌された毒液を唾液とともに効率よく注入するために使うとされる。興味深いことに，VDSは現生の毒ヘビ，毒トカゲの仲間や，絶滅した初期の哺乳類の化石などにも見られる。

研究代表者らはキューバ共和国の国立公園，科学技術環境庁，およびハバナ大学などと連携して，絶滅危惧種のキューバソレノドンの保全を目指した生態調査を行い，その生け捕りと唾液の採取に成功した。唾液の毒性成分の具体的な同定には至っていないが，ある種の強いプロテアーゼ活性をこれまでに

確認した。一方でごく最近、米国・豪州らの国際チームがドミニカ共和国でハイチソレノドンを捕獲して、唾液に含まれる主要な酵素としてカリクレインを同定し、トガリネズミ毒 BLTX との高い相同性や、食虫目の進化に関する新しい見解を発表した⁶⁾。プロテオームや遺伝子解析に関する解析技術が飛躍的に発展した現在、希少な野生動物由来の毒の研究も急速に進んでおり、国際的な競争は一層激しくなっている。研究代表者らのグループでも現在、キューバソレノドン毒液に含まれる活性成分の同定や、餌として想定される昆虫類などに対する麻痺作用などの評価を進めている。また、共同研究者らにより DNA サンプルを用いた進化系統解析や^{7,8)}、糞成分の分析、超音波域を含む鳴き声の解析なども進められており、キューバソレノドンのユニークな生態が解明されつつある。

考察

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、広範な生命科学の発展に寄与する。今回、研究代表者らが新たにトガリネズミの唾液から発見した BPP 類の構造は、ヒト脳内で発現している生理活性ペプチドの前駆体と類似していた。このような生理活性ペプチドが、なぜトガリネズミでは顎下腺で発現し、唾液とともに獲物に注入されて特異な生物活性を発現するのか、生物進化と毒の化学進化の観点からも非常に興味深い。また、哺乳類由来の Ca チャネル作用性分子はこれまで報告例はなく、本ペプチドの作用機序の解明により、画期的な新規麻酔剤や鎮痛剤の創製につながる事が期待される。

今後の展開として、神経毒リガンドが結合する受容体の種類や結合様式を決定するケミカルバイオロジー研究を目指していきたいと考えている。この目的のため、光親和性反応基と検出基を生物活性リガンドに効率的に導入したケミカルプローブの合成法や、質量分析法やアフィニティー精製に利用できる独自の蛍光タグの開発なども合わせて進めている(誌上発表 1,2)。

動物由来の毒は、複雑で多様性に満ちた構造や機能を備えており、潜在的な可能性に満ちている。毒をもつことは、獲物の捕獲や防御の手段としてのメリットがある半面、毒の生産に余分なエネルギーを割かなければならず、また体内に溜めておくこと自

体にリスクがある。それでもなお、トガリネズミやカモノハシのような毒を持つ哺乳類が現存するという事は、長年の脊椎動物の進化の過程において、環境次第では毒のメリットがデメリットを上回る場合があったことを意味する。トガリネズミなど無盲腸類は、系統発生的には単孔目や有袋目などを除く、全ての胎盤を有する哺乳類の始祖とされており、生物進化や生態学にかかわる興味深い事例も見え隠れする。今後、天然物化学の新たな展開の一つとして、ユニークな毒成分のさらなる解明を目指すとともに、その作用機序の理解から生命科学に高いインパクトを与える機能性分子が創出されることを期待したい。

参考文献

1. M. Kita, Y. Nakamura, Y. Okumura, S. D. Ohdachi, Y. Oba, M. Yoshikuni, H. Kido, and D. Uemura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 7542–7547, 2004.
2. M. Kita, D. StC. Black, O. Ohno, K. Yamada, H. Kigoshi, and D. Uemura, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 18038–18039, 2009.
3. D. Uemura, M. Kita, H. Arimoto, and M. Kitamura, *Pure Appl. Chem.*, **81**, 1093–1111, 2009.
4. D. R. Liston, J.-J. Vanderhaeghen, and J. Rossier, *Nature*, **302**, 62–65, 1983.
5. C. V. Bowen, D. DeBay, H. S. Ewart, P. Gallant, S. Gormley, T. T. Ilenchuk, U. Iqbal, T. Lutes, M. Martina, G. Mealing, N. Merkle, S. Sperker, M. J. Moreno, C. Rice, R. T. Syvitski, and J. M. Stewart, *PLOS One*, **8**, e58866, 2013.
6. N. R. Casewell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **116**, 25745–25755, 2019.
7. J. J. Sato, S. D. Ohdachi, L. M. Echenique-Díaz, R. Borroto-Páez, G. Begué-Quiala, J. L. Delgado-Labañino, J. Gámez-Díez, J. Alvarez-Lemus, S. T. Nguyen, N. Yamaguchi, and M. Kita, *Sci. Rep.*, **6**, 31173, 2016.
8. J. J. Sato, T. M. Bradford, K. N. Armstrong, S. C. Donnellan, L. M. Echenique-Díaz, G. Begué-Quiala, J. Gámez-Díez, N. Yamaguchi, S. T. Nguyen, M. Kita, and S. D. Ohdachi, *Mol. Phylogent. Evol.* **141**, 106655, 2019.

研究の発表

口頭発表

1. 北将樹: 切れ味の良い分子を自然界にもとめて、第3回函館セミナー、2019年9月.
2. 北将樹: 哺乳類由来の神経毒の化学生物学研究、第42回日本分子生物学会年会・シンポジウム『トキシシン』の織りなす多元的世界、2019年12月.
3. 北将樹: 哺乳類由来の神経毒の化学生物学研究、宇都宮大学バイオサイエンス教育センター・C-Bioセミナー、2020年2月.
4. 森田真布, 武仲敏子, 別所学, Maturana D. Andres, 木越英夫, 大館智志, 上村大輔, 北将樹: 食虫動物トガリネズミ由来の麻痺性神経毒ペプチドの構造と生物活性. 日本農芸化学会 2020 年度大会、2020年3月.
5. 矢野佑介, Maturana, Andres D., 森田真布, 北将樹: ブラリナトガリネズミ由来の神経毒ペプチド BPP 類の合成研究、日本農芸化学会 2021 年度大会、2021年3月.
6. 北将樹、矢野佑介、鈴木麻佑子、森田真布、大館智志: 食虫性哺乳類における化学コミュニケーション、日本化学会第 101 春季年会・中長期シンポジウム、2021年3月.

ポスター発表

1. M. Kita: Chemical Communication on the Mammalian Venom. 新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」第1回国際シンポジウム (ISCC2019) 2019年1月.
2. 北将樹: 哺乳動物毒における化学コミュニケーションの解明、新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」第6回公開シンポジウム、2019年12月.

誌上発表

1. A. Arai, R. Watanabe, A. Hattori, K. Iio, Y. Hu, K. Yoneda, H. Kigoshi, and M. Kita: *N,N*-Dimethylaminopyrene as a fluorescent affinity mass tag for ligand-binding mode analysis. *Sci. Rep.*, **10**, 7311, 2020.
2. M. Kita and H. Kigoshi: Discovery and use of natural products and derivatives as chemical probes. in *The Discovery and Utility of Chemical Probes in Target Discovery*, Ed. P. Brennan (The Royal Society of Chemistry), pp. 124–149, 2020.