JAIST Repository

https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	ヤエヤマサソリ由来抗菌ペプチドLaIT2のNMR構造とダイ ナミクス解析	
Author(s)	田村,真生	
Citation		
Issue Date	2022-09	
Туре	Thesis or Dissertation	
Text version	ETD	
URL	http://hdl.handle.net/10119/18151	
Rights		
Description	Supervisor:大木進野,先端科学技術研究科,博士	



Japan Advanced Institute of Science and Technology

博士論文

ヤエヤマサソリ由来抗菌ペプチド LaIT2 の NMR 構造とダイナミクス解析

田村 真生

主指導教員 大木進野

北陸先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科 (マテリアルサイエンス)

令和4年9月

Abstract

Two kinds of scorpions are living in Yeyama islands, Japan. One of them is Yaeyama scorpion (*Liocheles Australasiae*). Interestingly, the venom of *Liocheles Australasiae* displays the toxicity for insects but almost not for mammals. LaIT1, 36 residues peptide, is the most major toxic peptide in the venom from *Liocheles Australasiae*. And detail of the structure and function of LaIT1 had been reported. Unlike LaIT1, little is known about the second major component, a 59 residues peptide termed LaIT2, forming three intramolecular disulfide bridges. The biological study had shown that the N- and C-domains of LaIT2 possess antimicrobial and insecticidal activities, respectively. Although LaIT2 had been predicted to take the β -KTx fold (a helix plus an α - β - β motif), the three-dimensional structure is still unknown. Despite the intriguing biological activities of LaIT2, lacking the three-dimensional structure prevents to uncover the feature of functional mechanism at the molecular level. To clear this issue, in this thesis, I solved the NMR structure and analyzed the molecular dynamics of LaIT2. Moreover, activity measurements of LaIT2 and the mutants were performed to find the key residues for the functions.

Firstly, the sample preparation method was established. To induce the formation of intramolecular disulfide bonds and to enhance the solubility of the target peptide, LaIT2, the pET32a vector and *E. coli* named Rosetta-gami B (DE3) pLysS were employed. Combination of Ni²⁺-affinity column, enzymatic digestion, and HPLC enabled to obtain the recombinant LaIT2 (rLaIT2) at sufficient level of purity. Mass spectrometric analyses of the rLaIT2 fragments yielded by Lys-C, Asp-N, and/or proteinase K digestions showed that the rLaIT2 formed intramolecular disulfide bonds identical to those of natural LaIT2; Cys³¹-Cys⁵¹, Cys³⁸-Cys⁵⁶, and Cys⁴²-Cys⁵⁸. In addition, insecticidal and antimicrobial activity test showed that the activity of rLaIT2 is almost identical to that of natural LaIT2.

Next, the solution structure and molecular dynamics of LaIT2 were investigated using NMR spectroscopy. A series of homo- and hetero-nuclear two- and three-dimensional NMR experiments were performed. All NMR spectra were recorded at 298K on a Bruker AVANCE III NMR spectrometer equipped with a triple-resonance TCI-cryogenic probe at the ¹H resonance frequency of 800.13 MHz. After the resonance assignments, distance and angle constraints were collected. To satisfy these structural constraints, the three-dimensional structure of LaIT2 was calculated using CYANA2.1. The final set of 20 structures showed that LaIT2 has a β -KTx-like structure; the N-terminal domain is in random coil conformation and the C-terminal domain forms the cysteine-stabilized $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) fold. Moreover, NMR and CD data of LaIT2 in the presence of Trifluoroethanol (TFE) and liposomes showed that the unstructured N-domain has an ability to form an α -helix. The results strongly suggested that LaIT2 can form the canonical β -KTx fold in certain condition. The conformational plasticity of the N-domain would contribute to the target recognition mechanism. Furthermore, the results of T_1 , T_2 , and ${}^{15}N{}^{1}H{}$ -NOE experiments suggested that A24 and Q28 in the N-domain have large thermal and conformational flexibility, respectively. The flexibility of these two residues is thought to prefer to adopt an appropriate angle between the two domains for the target recognition.

Finally, important amino acid residues for the biological activities were deduced based on the structural comparison of LaIT2 with four homologous peptide toxins suggested by BLAST search. The comparison showed that K15 and K21 in the N-domain and L53 and L54 in the C-domain were well conserved. Therefore, three mutants, K15A, K21A, and L53A/L54A were prepared to examine their insecticidal and antimicrobial activities. The activity measurements suggested that K21 in the N-domain is necessary for both activities. Moreover, in the results, K15 in the N-domain was found to be responsible for the antimicrobial activities, whereas L53 and L54 in the C-domain were key residues for the insecticidal activity. The findings in this thesis will provide a new insight to understand the structure-function relationships of LaIT2 and β -KTx family members.

Keywords: NMR structure, Scorpion venom, Antimicrobial activity, α-β-β motif, E. coli

論文内容の要旨

日本の八重山諸島には2種類のサソリが生息しており、そのうちの1種類が ヤエヤマサソリである(もう1種はマダラサソリ)。このサソリが分泌する毒素 に含まれるペプチドは哺乳類に対して殆ど毒性を示さず、昆虫だけに強い活性 を示すことが知られている。本研究を開始した当時、ヤエヤマサソリの毒素から 2種類のペプチド、LaIT1とLaIT2が既に単離・同定されていた。毒性ペプチド の中で最も含有量の多いLaIT1は構造と機能の相関解析が行われていたが、2番 目に含有量の多いLaIT2は殺虫及び抗菌活性評価しか行われていなかった。そ のため、ヤエヤマサソリの毒素が持つ昆虫特異的な活性の機能発現機構を深く 理解し、解明するためには情報量が不十分であった。

そこで本研究では、LaIT2の立体構造を解明し、機能相関解析をすることで機 能発現機構に関する分子レベルの知見を得ることを目的とした。そうして得ら れた新しい知見は、ヤエヤマサソリの毒素の作用機序の解明だけに留まらず、将 来的にヤエヤマサソリ由来のペプチドを用いた農薬開発につながると期待して いる。

本研究の最初の段階として、NMR 構造解析に向けて大腸菌を用いた大量発現 系を構築した。LaIT2 は分子内に 3 つのジスルフィド結合を有することが知られ ていたため、タグとしてジスルフィド結合含有タンパク質の発現と立体構造形 成に有利なチオレドキシンタグ (Trx-tag)を採用した。さらに、精製を容易にす るために His x 6 タグを Trx-tag とタンデムなるように付加した系を構築した。 その結果、Trx-tag 融合タンパク質として試料を可溶性タンパク質として得るこ とに成功し、LaIT2 を単離精製する手順を確立することができた。

次に、確立した発現系を用いて¹³C, ¹⁵N,および¹³C/¹⁵N 安定同位体で標識した LaIT2 を調製した。標識した LaIT2 を用いて一連の NMR 測定を行い、得られた スペクトルを解析した。その解析で得た情報を用いて構造計算を行い LaIT2 の 立体構造を決定した。その結果、LaIT2 は N 末端領域にランダムコイル構造、C 末端領域に α-β-β 構造を有し、さらに分子全体としてのフォールドは β-KTx フ ァミリーに類似していることが明らかになった。また、CD と NMR の実験から N 末端領域にはヘリックスを形成する能力があることも強く示唆された。

ホモロジー検索を行った結果、LaIT2と相同性の高い4種類のペプチド毒が見 つかった。これら4種類のペプチド毒の立体構造はいずれも未解明だったため、 全ての立体構造をモデリングで構築した。実験で得られたLaIT2立体構造と4種 のペプチド毒のモデル構造を比較した結果、分子内のジスルフィド結合を形成 しているシステイン残基の他に、N末端領域のリジン残基やC末端領域のロイ シン残基の保存性が高いことが明らかになった。これを基に、保存性の高いリジ ン、ロイシン残基をアラニンに変異させた3種類のペプチド(K15A,K21A, L53A/L54A)を作製し抗菌及び殺虫活性を評価した。その結果、抗菌活性にはN 末端領域のK15とK21、殺虫活性にはN末端領域のK21とC末端領域の2本の β-ストランドを結ぶターン部位に位置するL53,L54が重要であることが明らか になった。先行研究では、殺虫活性は主にN末端領域、抗菌活性は主にC末端 領域が担っていると報告されていた。本研究の結果は、個々の機能にどのアミノ 酸残基が関与しているかという更に詳細な情報を与えるものである。しかも、N 末端領域のK21が殺虫及び抗菌活性の両方に重要であることは、本研究で初め て示された。

本研究の結果は、LaIT2の構造機能相関の全容解明に向けた新しい知見を与え るだけでなく、β-KTx ファミリーの機能発現における構造基盤を構築する上で も重要な知見となる。さらには、将来的な農薬の開発に向けた分子の設計指針を 与える情報として大いに期待できる成果であると考えられる。

第1章 序論
1.1 序文
1.2 ペプチド毒 (KTxファミリー)
1.2.1 長鎖ペプチド毒と短鎖ペプチド毒2
1.2.2 α-KTx ファミリー
1.2.3 β-KTx ファミリー
1.3 ヤエヤマサソリ由来のペプチド毒6
1.3.1 ヤエヤマサソリ
1.3.2 La1
1.3.3 LaIT1
1.3.4 LaIT2
1.4 本研究の目的10
第2章 LaIT2の調製
2.1 抄録
2.2 LaIT2の調製方法12
2.2.1 序論
2.2.2 実験方法
2.3 結果と考察17
第3章 LaIT2の立体構造とダイナミクス
3.1 抄録
3.2 LaIT2 の立体構造とダイナミクス 29

目次

3.2.1 序論
3.2.2 実験方法
3.3 結果と考察
第4章 LaIT2の生理活性
4.1 抄録
4.2 LaIT2 の生理活性
4.2.1 序論
4.2.2 実験方法
4.3 結果と考察
第5章 結論
5.1 LaIT2 の構造と機能の相関71
参考文献
謝辞
業績
付録データ

第1章 序論

第1章 序論

1.1 序文

タンパク質には様々な立体構造があり、それぞれの構造には機能発現に適し た必然性がある。その中でも構造と機能の関係を理解しやすい代表的な例は、酵 素と基質に見られる「鍵と鍵穴」のように相補的な立体構造を有する分子同士が 結合して機能を発現する機構である^[1]。一方、タンパク質受容体とリガンドでは この関係はより複雑で、ターゲット分子の形に合わせた構造に変化することで 相手に結合して機能を発現する「コンフォメーション選択」のような機構が知ら れている^[2]。これらのタンパク質機能の発現や構造変化機構の解明を目指して、 今日までに多くのタンパク質の立体構造が解析されてきた。2021 年に設立 50 周 年を迎えた Protein Data Bank (https://www.rcsb.org/)には、実に 190,000 個以上の 生体分子の立体構造の原子座標が登録されている(2022 年 5 月 6 日現在)。

近年、立体構造解析の手法として X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡が 広く用いられている。しかし、これらの手法は固体状態のサンプルを測定するた め、複合体などの巨大分子の解析には適している一方で、分子量の小さいペプチ ドやタンパク質、運動性の高い領域を含む分子など結晶化しにくい性質を有す る試料を計測対象とすることは不得手である。また、pH や塩などの周囲の環境 変化にどう反応するか、さらに、リガンドとの結合解離などの動的な構造状態を とらえることも、これらの手法では難しい。一方で、核磁気共鳴分光法(NMR 法)を用いた構造解析は、大きな分子を測定対象とすることが難しいという弱点 があるが、生理条件に近い水溶液中の分子を測定対象にし、分子ダイナミクスや 相互作用まで解明することが可能である。これらを鑑み、本学位論文ではペプチ ドの構造生物学的研究に NMR 分光法を採用することとした。

ペプチドの中でも、サソリ由来のペプチド毒の構造に関連する研究は、1990年 代から現代に至るまで毎年約150報(Elsevierに投稿されている論文のみ)が論 文として発表されており、構造生物学の分野では、世界で多くの研究が行われて いる^[3,4]。しかし、ペプチド毒の種類の多さから、実際に立体構造解明に至って

1

いるペプチド毒は氷山の一角に過ぎない。サソリは、世界中に約2,000種類も生息しており、1匹のサソリから得られる毒液は50種類以上のペプチド等を含んでいるとされている^[5,6]。従って、サソリ毒を医学や創薬に応用するためには多く研究が必要である。その中でもタンパク質立体構造を解明しその構造情報を基に機能を解明することは、作用機序の全容を理解する上で重要である。

本学位論文の研究対象である LaIT2 (後述 1.3.4) はヤエヤマサソリ由来のペプ チド毒であり哺乳類には強い活性を示さないことが知られている。この興味深 い選択的機能発現機構とタンパク質立体構造を相関解析することで、ヒトには 無毒な農薬開発に貢献できると期待している。

1.2 ペプチド毒

1.2.1 長鎖ペプチド毒と短鎖ペプチド毒

表 1 に示した通り、サソリ由来の毒素はポリペプチド鎖の鎖長によって大き く 2 つのカテゴリーに分けられる。まず、長鎖ペプチド毒は全長 60~80 程度の アミノ酸残基で構成され、3~4 組の分子内ジスルフィド結合を含んでいる。生 理活性としては、Na⁺-チャネルに作用することで強い毒性示すことが知られてい る^[7]。例えば、*Androctonus australis* と *Centruroides noxius* から得られた Cn2^[8,9]や AaH-II^[10,11]は長鎖ペプチド毒に分類されており、どちらも哺乳類に対して強い 毒性を示すことが知られている(PDB code: 1CN2, 1PTX)。また、哺乳類に強い活 性を示すペプチド毒の殆どが長鎖ペプチドである^[12]。一方、短鎖ペプチド毒は、 全長 30~40 程度のアミノ酸残基で構成され、2~3 組のジスルフィド結合を含ん でいる。主に K⁺-, Ca²⁺-, CI-チャネルに作用し、毒性は弱い^[7,13-15]。さらに、短鎖 ペプチド毒素はNa⁺と K⁺-チャネルに作用するペプチド (K⁺-channel specific toxin: KTx)の 2 つに分類される。両者ともα-ヘリックス構造とβ-シート構造がジスル フィド結合によって安定化された Cysteine stabilized αβ (CSαβ) モチーフを形成

	長鎖ペプチド毒	短鎖ペプチド毒
残基数	60-80	30-40
SS結合数	3-4	2-3
作用チャネル	Na^+	К ⁺ , Ca ²⁺ , СГ
毒性	強い	弱い
ペプチド例	Cn2, AaH-II	CTX, AgTx2

表1:長鎖ペプチドと短鎖ペプチドの違い

1.2.2 α-KTx ファミリー

表 2 に示した通り^[16-23]、KTx に属するペプチド毒は骨格構造から 7 つのファ ミリー (α -, β -, γ -, δ -, κ -, λ -, ϵ -KTx) に分類される。 γ -KTx ファミリーの骨格構造 は α -KTx ファミリーと同じ CS α β モチーフだが、作用するチャネルが異なるため 別のファミリーに分けられている。

分類	代表ペプチド毒素	骨格構造
α-ΚΤχ	Charybotoxin	CSαβ
β–ΚΤχ	Hge-β-KTx	α -helix + CS $\alpha\beta$
γ–KTx	Ergtoxin	CSαβ
к–КТх	HfTx2	Csaa
δ-ΚΤχ	LmKTT-1a	Kunitz-type
λ–KTx	l-MeuKTx-1	ICK
ε-KTx	Ts11	ICK-like

表 2: KTx ファミリーの分類

α-KTx ファミリーは CSaβモチーフで形成された KTx である。α-KTx ファミ リーに属するペプチドの1つであるデスストーカー(*Leiurus quinquestriatus*)由 来の Charybdotoxin (CTX)^[17]について、既に構造と機能の相関について報告され ている(PDB code: 2CRD)。この報告によれば、図1に示すように CTX の β-スト ランド上にあるリジンが K⁺-チャネルの選択的フィルターと相互作用すること で強い毒性を示すと考えられている。

図2にはCTXとアミノ酸配列の類似性の高いAgitoxin (AgTx)とNoxiustoxin の1次構造を示した。AgTxとNoxiustoxinはそれぞれLeiurus quinquestriatusと Centruroides noxius^[24,25]由来のペプチド毒である(PDB code: 1AGT, 1SXM)。アミ ノ酸配列のアラインメントから、分子内でジスルフィド結合を形成しているシ ステイン残基と活性に必要なリジン残基の保存性が高いことがわかる(図2)。 加えて図3に示すように^[26]、3つのペプチドはCSaβモチーフで形成されており、 よく似た立体構造を持つ。活性に重要な役割を果たすリジン残基は全てのペプ チド毒においてβ-シート上に位置し、しかも側鎖が分子の外側を向いている^[27]。



図1:CTX とカリウムチャネルとの結合様式

(A) CTX と(B) K⁺-チャネルをそれぞれリボンモデルで表示させた。α-ヘリックスとβ-シートをそれぞれ赤色とシアンで表した。また、K27 をボール/スティクで表示した。赤枠で囲われている 部分はペプチド毒の結合サイトである^[8]。



図2:CTX とのアミノ酸配列アライメントの結果

保存性の高いリジンとシステインをそれぞれ赤と水色で記した。K⁺-チャネルに相互作用するリ ジンを矢印で示した。



図 3: α-KTx ファミリーに属するペプチド毒の立体構造比較

(A) CTX (B) AgTx (C) Noxiustoxin をそれぞれリボンモデルで示した。 α -ヘリックスと β -シートを それぞれ赤色とシアンで表した。よく保存されたリジン残基とジスルフィド結合をボール/ステ ィクで表示させ、N及びC末端を記した。

1.2.3 β-KTx ファミリー

β-KTx ファミリーとして同定されているペプチド毒は、α-KTx ファミリー(170 種類以上)と比べ約 1/4 しか知られていない(https://venomzone.expasy.org/3438)。 β-KTx ファミリーに属するペプチド毒の構造はα-KTx ファミリー同様の CSαβ モ チーフに加えて、N 末端領域にα-ヘリックス構造を形成すると考えられている ^[28]。しかし、β-KTx ファミリーに属するペプチドの構造解析が殆ど行われていな いため詳細は不明である。また、第4章4.3.1 の図 23 で詳しく述べるが、本研 究の対象である LaIT2 は、ホモロジー検索により β-KTx ファミリーに属するペ プチド毒とアミノ酸配列の相同性が高いことわかっている^[29]。

1.3 ヤエヤマサソリ由来のペプチド毒

1.3.1 ヤエヤマサソリ

日本には2種類のサソリが生息しており、その1種がヤエヤマサソリ(*Liocheles australasiae*)で、もう1種はマダラサソリ(*Isometrus maculate*)である。ヤエヤマサソリはヘミスコーピア科(Hemiscorpiidae 科)に分類され^[30]湿地帯を好む。その尾の先端から分泌されるペプチド毒は、餌となる昆虫の捕獲や外敵から身を守るために使われている^[31, 32]。興味深いことに、このヤエヤマサソリから分泌される毒素は、抗菌活性を示すほか、昆虫のみに強い活性を示すことが明らかになっている^[29]。

ヤエヤマサソリから分泌された毒素を LC/MS で分析した結果、約 200 種類も のタンパク質やペプチドが含まれていた^[33]。本研究を開始した時、無毒なペプ チドとして La1、有毒ペプチドとして含有量の多い順に LaIT1、LaIT2 の 2 種類 が同定されていた。現在は、これらに加え LaIT3 も同定されている^[34]。

1.3.2 La1

毒性の無い Lal は 72 個のアミノ酸残基から成り、分子内に 4 組のジスルフィ ド結合を有している。Lal はマウスやコオロギに対して殆ど活性を示さない。図 4A に Lal のアミノ酸配列を示す。さらに AlphaFold2^[35]を用いて Lal の立体構造 を予測した。Lal の立体構造とその表面電荷分布を図 4B に示した^[33]。Lal の立 体構造にはペプチド毒特有の CSαβ構造^[36]や抗菌活性に重要な両親媒性α-ヘリ ックス構造^[37]が存在しない。このことも Lal が毒性を持たない事実を支持して いる。

近年、La1 に似たアミノ酸配列を持つ La1-like ペプチドの研究が進んでいる^[38-40]。例えば、イスラエルゴールドスコーピオン(*Scorpio maurus palmatus*)から得られた毒素には La1-like ペプチドの Smp73 が含まれている。Smp73 は無毒なペ

プチドだが、精子の運動性を改善する効果があることが報告されている^[41, 42]。

さらに、La1 類似構造を DALI 用いて検索すると、Identity score が 50%を超え ているのは抗菌活性を持つLa1-like protein 13 (Entry ID of Uniprot: L0GCJ1, Identity score 64.4%) だけであった。La1-like protein 13 は、N 末端領域にα–ヘリックス構 造、C 末端領域にLa1-like 構造を有しているという AlphaFold 2 のモデルが Uniprot に登録されていた^[43]。



図 4: La1 の(A) アミノ酸配列と (B) 立体構造予測と表面電荷モデル 予測構造はリボンモデルで表示した。シアンが β-シートを表している。ジスルフィド結合をボ ール/スティクで表示し、各システインに残基番号を記した。分子表面とその電荷分布も図示し ている。分子表面は、赤、青、白がそれぞれ負電荷、正電荷、電荷なし(疎水性)を示している。

1.3.3 LaIT1

LaIT1 は 36 個のアミノ酸残基から成り、分子内に 2 組のジスルフィド結合を 有している。このペプチド毒は抗菌活性が無く、殺虫活性のみを示すことが明ら かとなっている。NMR を用いた構造解析によって LaIT1 は Inhibitory Cysteine Knot (ICK)モチーフを持ち、加えて R13, R15 が殺虫活性に重要であることが解 明された^[44]。LaIT1 (PDB: 2LDS)のアミノ酸配列、立体構造、表面電荷分布を 図 5 に示した。



図 5: LaIT1 の(A) アミノ酸配列と (B) 立体構造と表面電荷モデル[1]

LaIT1 の立体構造はリボンモデルで表示させた。ジスルフィド結合をボール/スティックで表示 させ、各システインに残基番号を記した。分子表面も併せて表示した。表面電荷分布を色で示し た(赤;負電荷、青;正電荷、白;疎水性)。

1.3.4 LaIT2

LaIT2 の 1 次構造を図 6 に記す。LaIT2 は、他のカリウムチャネル阻害ペプ チド毒素とアミノ酸配列の相同性が高いことに加え、構造予想モデルの特徴か らβ-KTx ファミリー(1.2.3 参照)に属すると考えられている^[45-47]。さらに、N, C 両末端領域に相当する合成ペプチドを用いた実験から、N 末端領域はトリフ ルオロエタノール(TFE)条件下でヘリックスを形成する能力があることが明ら かになっている。加えて、抗菌活性は主に N 末端領域にあることが報告されて いる。

AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQSQYGCPIISNMCEDHCRRKKMEGQCDLLDCVCS

図 6: LaIT2 の 1 次構造

1.4 研究目的

ヤエヤマサソリから分泌される抗菌ペプチドは哺乳類に対して殆ど活性が無 く、昆虫のみに強い活性を示すことが知られている。そのペプチド毒の中で2番 目に含有量の多い LaIT2 は立体構造情報が欠如しており、この特異的な殺虫機 能の構造基盤が確立されていない^[28, 29]。

本研究の目的は、この LaIT2 の構造と機能の相関を解明することである。本 学位論文は以下のような構成になっている。

① 大腸菌を用いた発現系による LaIT2 の調製(第2章)

- LaIT2のNMR 構造解析(第3章)
- ③ 変異体を用いた生理機能評価(第4章)
- ④ 結論 (第5章)

第2章 LaIT2の調製

第2章 LaIT2の調製

2.1 抄録

立体構造解析用の LaIT2 を調製するための発現系を構築し、試料の精製方法 を確立した。まず、LaIT2 の cDNA 情報を持つ遺伝子断片を組み込んだプラスミ ドベクターpET-32a (Novagen) を大量発現用大腸菌 Rosetta-gamiTM B (DE3) pLysS (Novagen) に形質転換した。一般的に、ジスルフィド結合を含むタンパク質を 大腸菌内で発現させるのは難しいため、ジスルフィド結合の形成とタンパク質 のフォールディングが促進されるような性質を持つ Trx-tag と大腸菌 (Rosettagami) を組み合わせて発現系を設計した。また、発現した融合タンパク質 (Trx-LaIT2: 24.1kDa)の精製を容易にするべく、Trx-tag と目的タンパク質の間には His x 6 タグと Enterokinase (EK) 切断配列も挿入し、Trx-LaIT2 として LaIT2 を発現 させた^[48]。さらに、大腸菌内で発現させた Trx-LaIT2 を超音波破砕し、可溶性タ ンパク質として得た。Trx-LaIT2 を Ni²⁺アフィニティーカラムで粗精製し、透析 法を用いて溶出液からイミダゾールを除去した。その後、EK で Trx-tag を切断 除去し凍結乾燥させた。乾燥後の試料を 2 ml の滅菌水に溶かし、HPLC で目的 ペプチドを単離した。また、得られた試料の分子内ジスルフィド結合パターンを 実験的に決定し、抗菌及び殺虫活性も確認した。

2.2 LaIT2 の調製方法

2.2.1 序論

本章では、LaIT2の立体構造解析に向けた最初の段階として行った、LaIT2の 発現系と精製プロトコールの確立に関して述べる^[49, 50]。

タンパク質やペプチドの実験試料を調製する技術には、生物から精製する古 典的な方法のほかに、現在では遺伝子組み換え体を利用した手法が知られてい る。この遺伝子工学を利用した技術は、研究対象試料を必要十分な量と純度で調 製することに長けているほか、変異体の調製、安定同位体標識、化学的な修飾を 試料に施すことも可能である。そのような実験を行うための各種試薬やキット も数多く市販されており、実験の選択肢は広がっている。これらの利点により、 遺伝子工学を利用した試料調製技術は極めて一般的な手法として実験室レベル で広く活用されている。

遺伝子組み換え技術を活用した目的タンパク質の調製を行う際、ホストに利 用されている生物としては大腸菌、酵母、カイコ、動物細胞などが知られている。 さらには、大腸菌や小麦に由来するタンパク質合成系だけを試験管内で再現し た無細胞タンパク質調製システムも市販されている。中でも大腸菌は、安価で培 養しやすく、目的タンパク質を大量に調製することができるため、最も広く利用 されている系である。

大腸菌は本来ジスルフィド結合の形成を積極的に促す機構を有していないた め、目的タンパク質の分子内にジスルフィド結合が存在する場合は、ジスルフィ ド結合の形成を阻害するチオレドキシンリダクターゼとグルタチオンリダクタ ーゼ (*trxB/gor*)を欠損させた Origami 株や OrigamiB 株を利用することが多い。 また、発現させた目的タンパク質を積極的に封入体にする性質を持つタグも知 られており、ホストの大腸菌に対して毒性を示すタンパク質の発現には有用な 場合がある。このときには、後に精製段階でリフォールディングとジスルフィド 結合の形成を促す工夫が別途必要になる。

本研究では、目的タンパク質の可溶化、精製の簡略化ために pET シリーズの ベクターを採用した。また、LaIT2 は分子内に 3 組のジスルフィド結合を有して いるため、ジスルフィド結合の形成を促進させる目的で Origami 株を用いた。

2.2.2 実験方法

2.2.2.1 チオレドキシン融合タンパク質(Trx-LaIT2)の培養及び粗精製

【前培養】

LaIT2 の cDNA 情報を持つプラスミド pET-32a を大腸菌 Rosetta-gami[™] B (DE3)/pLysS に形質転換した。この菌体を含む溶液を抗生物質*の入った Luria-Bertani broth (LB broth, SIGMA ALDRICH)寒天培地に白金耳を用いてプレーティ ングし^[51]、インキュベータ内で 37°C, 24 時間培養した。その後、寒天培地上に 生えているコロニーを1つ採取し、前述した2種類の抗生物質を含む LB 液体培 地 3 ml が入った試験管に入れた。この菌体液を 30°C, 150 rpm で一晩培養した (左右振とう)。

【本培養】

大量培養に取り掛かる前に本培養の条件検討を行った。まず、培養温度と培養時間の検討を行った。抗生物質*を含む LB 液体培地 3 ml が入った試験管を 3 本 用意し、そこに前培養した培養液を 100μl 入れ、150 rpm (Bio-shaker BR-300LF) で振とう (回転) しながら 37℃で培養した。OD₆₀₀ = 0.6-0.7 になったところで、 それぞれの試験管に 1M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)を 3 μl 添加し (終濃度は 1mM)、培養温度を 37,25,18℃にそれぞれ設定し、さらに 24 時間培 養を行った。また、3, 6, 24 時間経過の時点で試料をサンプリングした。これら サンプリング試料を SDS-PAGE で確認し、最適な培養温度と培養時間を決定し た。次に、IPTG 濃度の検討を行った。抗生物質*を含む LB 液体培地 3 ml が入 った試験管を4本用意し、そこに前培養した培養液を 100µl ずつ入れ、37℃,150 rpm (Bio-shaker BR-300LF) で振とうしながら培養した。OD₆₀₀=0.6-0.7 になった ところで、1M IPTG をそれぞれの試験管に 0.3, 0.6, 1.5, および 3 µl 添加し(終 濃度は 0.1, 0.2, 0.5, および 1mM)、タンパク質発現を誘導した。その後さらに 3 時間培養を行った。結果を SDS-PAGE で確認し、最適な IPTG 濃度を決定した。

最適な培養条件を用いて、前培養した培養液を抗生物質*入りのLB液体培地 (500 ml)の入ったフィン付き三角フラスコ (2L) に全量 (3mL)入れ、37°C,100 rpm (Bio-shaker BR-300LF) で培養した。OD₆₀₀= 0.6-0.7 になったところで、1M IPTG を 100 µl 添加し、さらに 3 時間培養を行った。得られた培養液を 4°C,5,000 rpm (機械: Thermo SCIENTIFIC, SORVALL LEGEND X1R, n-s-:TX-400)で 15 分間遠心した。得られた菌体を 20 ml の 0.9%生理食塩水で洗った後、4°C,8,000 rpm (機械: Thermo SCIENTIFIC, SORVALL LEGEND X1R, n-s-:F15-8x50cy) で 5 分間再遠心した。この菌体を-80°Cで保存した。また、目的タンパク質の発 現を SDS-PAGE で確認した。

※ 終濃度 50 µg/ml アンピシリンと 34 µg/ml クロラムフェニコール

2.2.2.2 超音波破砕

-80°Cで保存しておいた菌体(1.2 g)を緩衝液(20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0, 30 ml)に懸濁し、そこに 1M PMSF を 30µl 加えた。この菌体液を氷上に 置き、ソニケーター(TOMY: UD-201, OUT PUT 8, DUTY 50, 5 分 x4(合計 20 分 間)用いて、溶液が透明になるまで超音波破砕した。得られた破砕液を 4°C, 18,000 rpm (機械: BECKMAN COULTER Avanti HP-26XP, ローター: JA-20)で 15 分間遠 心し、可溶性画分のみを回収した。Trx-LaIT2 が可溶性タンパク質として得られ ていることを SDS-PAGE で確認した。

2.2.2.3 Ni²⁺アフィニティーカラムを用いた粗精製

Ni²⁺ 樹脂 (Ni Sepharose 6 Fast Flow, 3 ml)を詰めたカラムを用意し、緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0, 30ml) で平衡化した。その後、樹脂の入った カラムに可溶性 Trx-LaIT2 (約 30 ml)を含む試料溶液 10 ml ピペットでゆっくり と入れた。次に、別の 10 ml ピペットを使って、イミダゾール濃度の違う溶出液 (20, 50, 100, 150, 200, および 500mM)を順番に 10 ml ずつ添加して目的タンパ ク質を溶出した。結果を SDS-PAGE で確認し、溶出液のタンパク質濃度は吸光 度計で測定した 280nm の吸光度 (A₂₈₀)の値を用いて算出した。

2.2.2.4 Trx-LaIT2 の精製及び酵素消化

滅菌水 (Distilled water: D.W)に浸けておいた Molecular Weight Cut Off (MWCO) 6,000-8,000 の透析膜に 2.2.2.3 で得た Trx-LaIT2 を入れ、透析緩衝液 A (20 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0, 2L) で 6 時間、透析緩衝液 B (20 mM Tris-HCl, 1mM CaCl₂, pH8.0, 2L) で 12 時間、新しく作製した透析緩衝液 B (2L) で 24 時間、合 計 42 時間透析を行い、イミダゾールと分子量の小さい夾雑物を除去した。透析 後の Trx-LaIT2 溶液に EK(0.2 mg/unit) を添加し、37°C, 4 時間反応させ Trx-tag を切断した。その後、試料溶液を凍結乾燥した。

2.2.2.5 Recombinant LaIT2 (rLaIT2) の単離

乾燥した試料に 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む D. W を 2.0 ml 加え、 pH が 3-4 になるまでさらに TFA を加えた。調製後は沈殿が生じたので、卓上遠 心機 (機械: KUBOTA 350, ローター: KUBOTA RA-2724)で 4°C, 15,000 rpm, 5 分 間遠心した。上清を回収し、Octa decyl silyl (ODS) カラムを用いた HPLC で rLaIT2 を単離した (アセトニトリル 20-45%, 60 分のグラジエント)。単離した試料の溶 媒をスピードバック遠心乾燥機で完全に除去した。得られた rLaIT2 の純度を質 量分析で確認した。

2.2.2.6 殺虫及び抗菌活性評価

2.2.2.5 で単離した rLaIT2 を用いて、以下の方法で殺虫及び抗菌活性を評価した。単離した rLaIT2 (約 228µg) を 20µl の滅菌水 (D.W) に溶かした。体重 50 +/-5 mg のコオロギ 10 匹にこの溶液を 2µl、別の 10 匹に 1µl ずつ注射、また別の 10 匹に D.W だけを 1µl ずつ、後ろ足の関節から腹部先端 (産卵管を含めない)の丁度真ん中付近に注射した。注射後、これらの 3 グループ合計 30 匹のコオロ ギを 48 時間観察した。48 時間後、コオロギの死亡数をカウントし、そこから LD₅₀ 値を算定した。

抗菌活性は以下の方法で評価した。大腸菌(NBRC3301)をLB寒天培地全体 にまき、寒天が乾いた後その上に濃度 0.25 から 50 μg/ml の rLaIT2 を滴下し、 30℃でインキュベートした。一晩培養した後の寒天培地の様子を観察した。

2.2.2.7 質量分析

精製したサンプルの分子量とジスルフィド結合ペアを確認するために質量分 析を行った。rLaIT2 を緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH7.5)に濃度 50µM になるよう 溶解し、Lys-C (Roche Diagnostics K.K, Tokyo), Asp-N (Roche Diagnostics K.K, Tokyo), および Proteinase K (Thermo Fisher Scientific, Tokyo)を用いて、37℃で 消化させた。

各サンプルと1µl3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (SA)を1.5 ml マイクロ チューブ内で混ぜ合わせ、試料プレートに滴下した。その後、ホコリが被らない よう配慮し、サンプルを室温で乾燥させた。

乾燥後、各試料の質量を質量分析装置 Bruker microflex で測定した。尚、質量 分析装置のキャリブレーションを事前にインスリンとユビキチンを使って行っ た。

2.3 結果と考察

図 7 に培養から LaIT2 単離までの精製手順を示した。2.2 で記述した通り、 LaIT2 の cDNA をコードする大腸菌を用いてチオレドキシン融合タンパク質と して大量発現させた。

まず初めに、発現に適切な温度、培養時間、IPTG 濃度を検討した。図 8A には培養時間と温度、図 8B には IPTG 濃度の検討結果を示した。



図7:LaIT2の培養から単離までの精製手順



図8:培養条件の検討結果

 (A) 左からマーカー (Maker)、インダクション前 (-)、インダクション前 37℃、インダクション 後それぞれ 37, 25, 18℃で 3, 6, 24 時間培養したサンプル、(B) 左からマーカー (Maker)、インダ クション前 (-)、IPTG 濃度 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 でそれぞれインダクションし、その後 37℃で 3 時間 培養したサンプル、Trx-LaIT2 には矢印を付けた。これら結果は、15% SDS-PAGE で分析を行っ た。

図8Aに培養温度と時間の違いによるタンパク質発現量を確認したSDS-PAGE の結果を示した。ここに示した通り、培養温度が低下すると矢印で示した目的タ ンパク質の発現量が減っているのがわかる。これは、培養温度の低下が大腸菌の 生育に影響を与えたため発現量が低下したと考えられる。また、37℃の培養では、 培養時間が長くなると分子量の小さい位置に濃いバンドが検出され、それと同 時に目的タンパク質のバンドが薄くなっていた。これらを考察すると、大腸菌の 内在性酵素によって目的タンパク質が消化されていると考えられる。従って、本 研究の培養条件は 37℃で生育し、発現誘導後 3 時間培養するのが最も適切であ ると判断した。

図 8B に異なる IPTG 濃度で目的タンパク質の発現を誘導したときのタンパク 質発現量を確認した SDS-PAGE の結果を示す。この結果を見ると IPTG 濃度に よる目的タンパク質の発現量の差は殆どないが、終濃度 0.1mM の IPTG 添加時 は目的タンパク質の収量が最も少ないことがわかったため、IPTG 濃度が最も低 い 0.2mM を採用した。

以上の結果より、37℃で大腸菌を振とう培養し、終濃度 0.2mM になるように IPTG を添加した後、引き続き 3 時間振とう培養するのが最も適切であると判断 した。今後の実験は、すべてこの条件で行うことにした。

2.3.1 Trx-LaIT2 の粗精製及び精製

決定した培養条件に基づいて大量培養を行い、図7の手順通りに rLaIT2 を精 製した。各実験の段階の試料を SDS-PAGE で確認した結果を図9に示した。





図9:LaIT2の粗精製及び単離結果

(A) 左からマーカー(Maker)、インダクション前(-)、インダクション後3時間培養のサンプル(3h)、超音波破砕後の上清(Sup)と沈殿(Ppt)、a:フロースルー、b-g:イミダゾール濃度がそれぞれ20、50、100、150、200、及び500mMでの溶出液。(B) 左からマーカー(Maker)、粗精製した Trx-LaIT2、Enterokinase(EK) での Trx-tag の除去、HPLC後のrLaIT2、粗精製した Trx-LaIT2 にそれぞれ矢印を付けた。これらは、15% SDS-PAGE で分析を行った結果である。

図 9A には、培養後の菌体、菌体を破砕した後の上清と沈殿、Ni²⁺アフィニテ ィーカラムの溶出液を SDS-PAGE で分析した結果を示す。この結果から、フロ ースルーからイミダゾール濃度 100 mM による溶出までは目的タンパク質のバ ンドが殆ど検出されなかったことがわかる。その後、イミダゾール濃度 150 から 500 mM での溶出で目的タンパク質のバンドが検出され、200 mM での溶出が 最も目的タンパク質が多く含まれていた。従って、200 と 500mM の溶出液を回 収した。透析法で回収した試料溶液からイミダゾールを除去した。

イミダゾールの除去が終わった Trx-LaIT2 溶液に対して EK を加え、37℃で4 時間振とうした。この試料を HPLC で精製し、最終産物を得た。イミダゾール除 去後から HPLC 精製までの各段階の試料を SDS-PAGE で調べた結果を図 9B に 示した。最終的に、殆ど不純物を含まない rLaIT2 が単離できた。さらに詳しく 調べるため、質量分析を行った。

2.3.2 LaIT2 の質量分析による解析

単離した rLaIT2 の質量を分析した。その結果を図 10 に示した。



図 10: rLaIT2 の質量分析による結果

単離された rLaIT2 は矢印で記した。*は[M+2H]²⁺を表しており、**は 6500-7000 m/z の範囲を拡 大したスペクトルである。

N 末端にアラニンとメチオニンが付加されているため、野生型の分子量とは 異なり、今回単離した rLaIT2 の理論分子量は、分子内にジスルフィド結合を含 まない場合、6841.1 である。

図 10 に精製した試料の質量分析結果を示した。ここに示す通り、rLaIT2 の質量が 6835.216 と分かった。ジスルフィド結合は脱水結合により架橋するので、 1 組のジスルフィド結合につき分子量が 2H⁺分減る。従って、LaIT2 のように分子内に 3 組のジスルフィド結合を有する場合、6H⁺分質量が減るので LaIT2 の理 論分子量は 6835.1 となる。また、質量分析は分子をイオン化させて測定する手 法である。そのため、測定時の質量はイオン化した分(H⁺)増加し、LaIT2 の理 論質量は 6836.1 となる。今回の質量分析の実測値は理論値と誤差範囲内に入っ ているので、分子内に 3 つジスルフィド結合を有するといえる。また、質量分析 で得られる質量結果は質量(m)/価数(z)で表される。*印を付けたピークは 2 価の LaIT2 由来であり、LaIT2 本来の半分の質量を示している。

2.3.3 LaIT2 のジスルフィド結合パターン解析

図 10 に示した質量分析の結果から、rLaIT2 の分子内に 3 組のジスルフィド 結合が存在することが分かった。次に、この結合されているジスルフィド結合が 野生型と一致しているか確かめるため消化酵素 Asp-N, Lys-C, および Protein K を用いて rLaIT2 を消化しその産物を質量分析した。その結果を図 11, 12 及び表 3 に示す。図 11 の結果、Lys-C と Asp-N によって rLaIT2 を消化した際の主な産 物の質量数は 3898.2 であった。ここから予想されるジスルフィド結合パターン を表 3 に示した。さらに解析を進めるため Lys-C と Asp-N によって rLaIT2 を消 化した産物をさらに Poteinase K で消化し、質量分析に供した。その結果を図 12 に示した。



図 11: rLaIT2 のジスルフィド結合パターンの解析

Lys-C と Asp-N によって消化された rLaIT2 のピークを矢印で示し、その右側に測定値(*m*/*z*)を示した。

1; Cys^{31} - Cys^{42} , Cys^{38} - Cys^{56} and Cys^{51} - Cys^{58} 2; Cys^{31} - Cys^{42} , Cys^{38} - Cys^{58} and Cys^{51} - Cys^{56} 3; Cys^{31} - Cys^{51} , Cys^{38} - Cys^{56} and Cys^{42} - Cys^{58} 4; Cys^{31} - Cys^{51} , Cys^{38} - Cys^{58} and Cys^{42} - Cys^{56} 5; Cys^{31} - Cys^{56} , Cys^{38} - Cys^{42} and Cys^{51} - Cys^{58} 6; Cys^{31} - Cys^{56} , Cys^{38} - Cys^{51} and Cys^{42} - Cys^{58} 7; Cys^{31} - Cys^{58} , Cys^{38} - Cys^{42} and Cys^{51} - Cys^{58} 8; Cys^{31} - Cys^{58} , Cys^{38} - Cys^{51} and Cys^{51} - Cys^{56}

表 3: ジスルフィド結合パターン予測



図 12: rLaIT2 の Lys-C, Asp-N, Proteinase K による消化後の質量分析結果 Lys-C と Asp-N で消化された rLaIT2 をさらに Proteinase K で消化させた。その結果を質量分析で 解析したところ 2 つのジスルフィド結合パターンが検出された。(Cys³⁸-Cys⁵⁶ と Cys³¹-Cys⁵¹)

図 12 の質量分析結果から Cys^{38} - Cys^{56} と Cys^{31} - Cys^{51} の 2 組がジスルフィド結 合を形成していることが明らかとなった。また、先に行った質量分析の結果から rLaIT2 が 3 つのジスルフィド結合を有することが示されている。これらを合わ せて考えると、残る結合ペアは Cys^{42} - Cys^{58} である。従って、rLaIT2 は分子内で Cys^{38} - Cys^{56} , Cys^{31} - Cys^{51} , および Cys^{42} - Cys^{58} のジスルフィド結合を形成している ことが実験的に確認できた。この 3 組は、天然の LaIT2 について報告されてい る分子内ジスルフィド結合のパターンと一致している。

2.3.4 rLaIT2 の殺虫及び抗菌活性

2.2 の手順で精製した rLaIT2 の殺虫及び抗菌活性を大腸菌(NBRC3301)とコ オロギを用いて評価し、野生型と比較した。その結果を表 4 と図 13 に示した。



表 4: rLaIT2 の殺虫活性評価

図 13: rLaIT2 の抗菌活性結果

先行研究では、コオロギを用いて殺虫活性評価が行われていた^[28]。10 匹のコ オロギ (体重:50+/-5mg) に対して、D.W で溶かした 11.4 μ M の LaIT2 を 2 μ l 注 射した後、15 分と 48 時間後で観察し、ED₅₀ と LD₅₀ を求めている。その結果、 ED₅₀ は 4.0 nmol/g 、LD₅₀ は 40 nmol/g であることが報告されている。表 4 に示 したように rLaIT2 の LD₅₀ 値は 33.3 nmol/g と求めることができた。この結果は、 今回調製した rLaIT2 が天然の LaIT2 と同等の殺虫活性を有していることを示し ている。

また、先行研究における LaIT2 の抗菌活性評価では、LB 培地を用いて、LaIT2 と大腸菌を混ぜ、100µl を 96 ウェルプレートで 37°C, 20 時間培養した。その後、 595 nm で濁度を測定することで最小生育阻害濃度 (MIC 濃度)を決定しており、 MIC 濃度は 5-10µM であると報告されている。同様の実験を rLaIT2 について行 ったところ、図 13 に示した通り、rLaIT2 の濃度が 2.5-5µM 以上では大腸菌の生 育が阻害されていた。この結果は、rLaIT2 が天然の LaIT2 と同等の抗菌活性を 有することを示している。

従って、本研究で得られた rLaIT2 は、野生型と同様のジスルフィド結合を形成していることに加え、殺虫及び抗菌活性能力も野生型と同様であることが示

26

された。よって、今回確立した試料調製方法に従って得た rLaIT2 を用いて今後 の構造や機能の解析を進めることとした。また、これ以降は、rLaIT2 のことを単 に LaIT2 を記述す。
第3章 LaIT2の立体構造とダイナミクス

第3章 LaIT2の立体構造とダイナミクス

3.1 抄録

本章では、LaIT2 の立体構造決定とダイナミクスの解析について記述する。3 種類の安定同位体標識(¹⁵N,¹³C,および¹⁵N/¹³C)と非標識の NMR 測定用 LaIT2 サンプルを用意し、800 MHz-NMR 装置(Bruker Avance III)を用いて、定法に則 り一連の異種核多次元 NMR の測定を行った^[52-59]。記録された自由誘導減衰(FID) データを NMRPipe^[60]によってフーリエ変換し、NMR スペクトルを得た。Sparky を使って NMR スペクトルを解析した。また、解析後の NMR スペクトルから距 離と角度の情報を収集した。集積した距離と角度の情報を全て満足するような 立体構造を CYANA で計算した。

立体構造計算の結果、LaIT2 の N 末端領域はランダムコイルで安定な立体構造が無く、C 末端領域には典型的な α - β - β 構造が存在していることが明らかになった。また、TFE とリピッド存在下で CD 測定行った後、TFE 添加実験を NMR 分光法でも行った。その結果、N 末端領域にヘリックス形成能力があることが判明した。さらに、¹⁵N 核の T_{I} , T_{2} 測定と ¹⁵N{¹H} NOE 測定を行った。その結果、A24, Q28 の運動性が極めて高いことが明らかになった。これらの結果を LaIT2 の機能と結び付けて考察した。

3.2 LaIT2 の立体構造とダイナミクス

3.2.1 序論

今日、タンパク質の立体構造を原子分解能で得る解析方法は3 種類知られて いる。それらは、X線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡、NMRである。X線 結晶構造解析はこれらのうちで最も古く確立された方法であり、タンパク質の 最初のX線結晶構造解析は1958年にJ.C.Kendrewによって報告された分解能 6Åのミオグロビンの構造である^[61,62]。タンパク質分子が規則正しい立体構造を 有していることが明らかになって以来、生命現象に重要な役割を果たす各種タ ンパク質の立体構造を解明することは、常に研究者の興味の対象であり続けて いる。現在では、放射光の高輝度X線の利用によって分解能も向上し、ソフトウ エア開発が進んだおかげで半自動で立体構造が解析できるようになっている。 また、近年では、試料調製方法や画像処理技術の進歩によりクライオ電子顕微鏡 の解像度が飛躍的に向上しており、クライオ電子顕微鏡を使った巨大なタンパ ク質複合体の構造解析結果が高インパクトジャーナルに次々と報告されている ^[63-65]。

一方で NMR 分光法は、1938 年に I. I. Rabi による核磁気モーメントの測定^[66,67]に始まり、1945 年に F. Bloch と E. M. Purcell による核磁気共鳴現象(NMR)の観測^[68,69]があった。この頃は NMR は現象論として物理学者の間で研究対象 になっていたが、1949-1950 年にかけて化学シフトが発見されて以来^[70]、NMR は化学や生物の興味深い研究対象を計測するための重要な手段として発展を始 めた。1960 年の R. Ernst によるパルスフーリエ変換 NMR (FT-NMR)の開発^[71]、 それに歩調を合わせるかのような超電導磁石の高磁場化が、この流れを加速し た^[72]。生物学的な応用という観点で言えば、1970 年代後半からの 2 次元 NMR 法の開発と発展は 1990 年にタンパク質の多核多次元 NMR 法という形で大きく 開花し^[73,74]、その後の NMR 構造生物学の方向を決定づけた。近年では、より

29

NMR の利点を活かし、ペプチド、フレキシブルリンカーを持つマルチドメイン タンパク質や天然変性タンパク質など、結晶化しにくい運動性に富んだタンパ ク質の構造や相互作用の研究も盛んになってきている^[75,76]。

本論文の研究対象である LaIT2 は、比較的分子量が小さく、2 つの領域を有し ていると予想されている。さらに、分子構造と機能発現の関連を議論するために は、静的な結晶構造ではなく、溶液中での分子内部の運動性や周囲の環境変化に 応答した構造変化などを知ることも必要不可欠だと考えられる。そこで本研究 では、生体内と同じように溶媒に溶けた状態のタンパク質を測定できる溶液 NMR 分光法を採用し、これを用いて LaIT2 の立体構造とダイナミクスを明らか にした。

3.2.2 実験方法

3.2.2.1 サンプル調製

各 NMR サンプルは、全て 5% D₂O, 100 mM KCl, 0.014% NaN₃, pH 6.0 になるように調製した。サンプル濃度は吸光度計(NanoDrop ND-1000,吸光度: A₂₈₀)で 決定し、pH 調整には DCl を使用した。調製した各サンプル 300µl を NMR チュ ーブ(Shigemi)に入れて NMR 測定を行った。

3.2.2.2 NMR 測定

すべての NMR スペクトルは TCI-cryogenic プローブが装着されている 800MHz-NMR 装置 (Bruker Avance III) を用いて 298K で測定された。¹³C-edited NOESY と ¹⁵N-edited NOESY のミキシングタイムはそれぞれ 75 ms と 100 ms、 ¹⁵N-edited TOCSY のスピンロックタイムは 70 ms で測定した。HCCH-TOCSY の 磁化移行時間は 22ms に設定した。

3.2.2.3 シグナルの帰属及び構造計算

まず、LaIT2 の各種 NMR スペクトル解析が完了し、A1 の ${}^{1}H_{\alpha}$ を除く主鎖の ${}^{13}C, {}^{15}N, {}^{1}HN$ のすべてのピークを帰属することができた。次に CSI $3.0^{[77]}$ を用いて LaIT2 の二次構造を予測し、さらに TALOS ${}^{[78]}$ を用いて主鎖の二面体角を推定した。その後、解析で得た全ての NOE 情報に加え、ジスルフィド結合、水素 結合の距離の制約も構造計算の入力情報として集積した。これらの構造情報を 制限に用いて、CYANA $2.1^{[79]}$ で LaIT2 の立体構造を計算した。PROCHECK-NMR ${}^{[80]}$ を用いて得られた立体構造の評価を行った。LaIT2 の立体構造の表示には MOLMOL を用いた。

計算された 20 個の最終構造の Root Mean Square Deviation (RMSD) 値は下記の 式 (1) を用いて求めた。

RMSD =
$$\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{N} (a_i - b_i)^2}$$
.....(1)

nは構造の個数、aとbはそれぞれ原子を表し、ai - biはそれぞれ対応する原子の距離を表している。

3.2.2.4 TFE 添加による化学シフト変化

TFE 濃度が 10-50%の LaIT2 の ¹H-¹⁵N HSQC を測定し、各ピークの化学シフト 変化を分析した。化学シフト変化の計算は下記の式 (2) を用いた。

$$\Delta \delta = \sqrt{(\Delta \delta_{1H})^2 + 0.3(\Delta \delta_{15N})^2}....(2)$$

3.2.2.5 NMR 緩和実験

0.2-0.3 mM に調製した¹⁵N 標識 LaIT2 の NMR 緩和データを Bruker の標準パ ルスシーケンス (hsqcetfpf3gpsi2 および hsqct2etf3gpsi) で測定した。 T_1 (縦緩和 実験) については、スピンエコーのディレイ時間を 30、80、150、240、300、500 及び 700 ms に設定して測定した。 T_2 (横緩和実験) では、Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)の時間を 25、60、80、120、250、500 及び 750 ms に設定しデータを 得た。最後に、¹⁵N{¹H}異種核 NOE 実験を行った。得られた緩和データは全て下 記の式 (3) を用いてカーブフィッティングを行った。異種核 NOE 実験では、 NOE あり、なしの測定で得られたピーク強度を用いて NOEon (NOE あり)の値 を NOEoff (NOE なし)の値で割ることで得られた値をグラフにまとめた。

$$I = I_0 \exp\left(\frac{-t}{T_1, T_2}\right).$$
(3)

3.2.2.6 リポソームの調製

Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE):1,2-dimyristoyl-snglycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DMPG) = 7:3 (バクテリアモデル) と 1palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC): Cholesterol = 10:1 (哺乳類モ デル) でそれぞれの濃度が 20mM になるようにリポソームの調製を行った。目 標の濃度になるようにリポソームを量りとりクロロホルムで溶解させた後、窒 素ガスを当てながら溶媒を揮発させた。その後さらに、1 時間真空条件下で乾燥 させた。乾燥したリポソームに 5mM HEPES, pH 7.4,を 1ml 加えた後、リポソー ム溶液が完全に透明になるまで超音波処理を行った (OUT PUT: 3, DUTY: 50, 10min TOMY ULTRASONIC DISRUPTOR UD-201)。

3.2.2.7 CD 測定

100mM KCl, pH 8.0, 20-30µM に調製した LaIT2 を用いて 10-50% TFE, リポソ ーム (LaIT2: リポソーム = 1: 100)にそれぞれ溶解させた。これらの LaIT2 サン プルを用いて JASCO J-820 (Jasco, Tokyo, Japan) で複数の CD スペクトルデータ を取得した。スペクトルは、1.0mm 石英セルを用いて、25℃で 260-190 nm の波 長範囲で測定した。測定データは 0.2nm 間隔で 50nm/min のレートで記録した。

3.3 結果と考察

3.3.1 ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルと連鎖帰属

安定同位体標識した LaIT2 試料の NMR データを 800 MHz-NMR 装置で測定した。得られたデータを NMRPipe でフーリエ変換し、Sparky で NMR スペクトルを解析した。得られた NMR スペクトルの 1 つである ¹H-¹⁵N HSQC を図 14 に示した。



図 14: LaIT2 の¹H-¹⁵N HSQC スペクトル結果

図中の右上に赤色で示したアミノ酸残基の主鎖 NH 基は、この測定で観測される官能基を表している。図の縦軸は¹⁵N、横軸は¹H の化学シフト値をそれぞれ表している。図中のアルファベットはアミノ酸の一文字表記、数字は残基番号をそれぞれ表している。右上の点線でつながれた ピークはそれぞれ側鎖を表している。

¹H-¹⁵N HSQC スペクトルでは、タンパク質の主鎖骨格の NH 基に対応するピ ークが観測できる。59 残基で構成されている LaIT2 は、タグを除去した後、N 末端に 2 残基追加されているので、2 つのプロリンを除いた 59 残基が HSOC 上 で観測されるはずである。実際の HSQC では、予測された数に近い 57 個のピー クが観測された。殆どのクロスピークは ¹H-¹⁵N HSQC の ¹H 次元で 6.5~9.5ppm の範囲に現れていた。今回得られた HSQC スペクトルのピークはシャープでよ く分散しており、得られた LaIT2 が安定したコンフォメーションを持っている ことが推察できた。

次に、測定した NMR スペクトルを組み合わせて NMR シグナルの連鎖帰属を 行った。その一例を HNCACB と CBCA (CO) NH を用いて図 15 に示した。



 ω_3 (¹H) / ω_1 (¹⁵N) ppm

図 15: LaIT2 の HNCACB と CBCA (CO) NH を用いた連鎖帰属の一部 左から HNCACB と CBCA (CO) NH のストリップ・プロットを交互に並べた図である。赤色が α¹³C、緑色が β¹³C、ピンク色が (*i-1*) α, β¹³C のピークをそれぞれ表している。図の下部に、上か ら順に¹H、¹⁵N の化学シフト、アミノ酸残基と番号を示している。黄色の線は α¹³C と β¹³C が残 基間で同じ ω₂ 値を示すピークを結んだものである。黄色の点線は 1 つのアミノ酸残基内から検 出された α¹³C-α¹³C, β¹³C-β¹³C をそれぞれ結んだ。

図 16 の赤枠に示す通り、HNCACB は 残基内(*i*)と 1 つ前の残基(*i*-1)の α^{13} C と β^{13} C のピーク、CBCA (CO) NH は 1 つ前の残基 (*i*-1)にある α^{13} C と β^{13} C のピー クがそれぞれ¹HN(*i*)で検出できる。それを踏まえ、図 15 に記されている Gln28 を例に考えてみる。HNCACB スペクトルを Gln28 の ¹HN と ¹⁵N の化学シフト値 で ω_1 軸と ω_3 軸を切り取ったストリップ・プロット (短冊表示) には、 ω_2 (¹³C) 軸に沿って α^{13} C (赤色) と β^{13} C (緑色) がそれぞれ 2 つずつ検出されている。 一方、CBCA (CO) NH のスペクトルでは、同じ ω_1 軸と ω_3 軸で切り取ったスト リップ・プロットにおいて 2 つのピークが検出されていた。この CBCA (CO) NH のスペクトルでは、マクトルと、この CBCA (CO) NH のストリップ・プロットで観測されたピークは Ser27 の HNCACB スペクトル上 でも観測できる。したがって、これらのピークを与えるアミノ酸残基は 1 次配列 上隣接していることが推定できる。このような方法でプロリン以外のすべての アミノ酸残基について帰属を行うことができた。



図 16:HNCACB と CBCA (CO) NH の測定範囲

3.3.2 LaIT2 の立体構造

LaIT2 の各種 NMR スペクトルの解析を行った結果、A1 の ${}^{1}H_{\alpha}$ と主鎖の HN 基 が存在しない P4, 32 を除く主鎖の ${}^{13}C$, ${}^{15}N$, HN のすべてのピークを帰属するこ とができた。その後、NOESY スペクトル中の NOE ピークをピックして距離制 限情報として集積した。NOE の情報のほか、主鎖二面体角、ジスルフィド結合、 水素結合の情報を制限に用いて CYANA で立体構造計算を行った。

図 17 は、計算に使用した NOE の数をアミノ酸配列に沿ってまとめたグラフ である。図 17 から、N 末端側では C 末端側に比べて残基ごとに観測された NOE の数が少ないことが分かった。特に、中距離・遠距離の NOE が殆ど観測されて いないため、N 末端側が特別な高次構造を形成していないと考えられる。一方、 C 末端側ではこれらの NOE が観測されていることから高次構造が形成されてい ること考えられる。

また図 18 は、立体構造計算に使用された短距離と中距離の NOE シグナルを アミノ酸配列に対してプロットした図である。図 18 に示されたとおり、N36 か ら K46 まで 1 次配列上 3 残基離れた残基間で α -ヘリックス領域に見られる典型 的な α ¹H と ¹HN の NOE ($d_{\alpha N}(i, i+3)$)が連続的に観測されていた。従って、こ の領域がヘリックス構造をとっていると考えられる。

さらに、ジスルフィド結合を形成している Cys 残基間で観測された NOE 情報 を表6にまとめた。各残基の Cβの化学シフト値や残基間で観測された NOE は、 それぞれのジスルフィド結合の存在を強く示唆できる。従って、これらの結果よ り本実験で得られた試料は野生型の立体構造を持つことが支持できる。

立体構造計算の結果を表 5 にまとめた。最終 20 構造の Q28 から S59 の主鎖の RMSD 値は 0.37 +/- 0.26 (Å)で、C 末端領域は良く収束していた。加えて、CYANA で計算に使用したデータを用いて PONDEROSA^[81]でも構造を計算した。 PONDEROSAで得られたリファイメント結果を PROCHECK-NMR で評価した結 果 chi 1, chi 2, omega も良好な値を示した。また、 PROCHECK-NMR の結果から ラマチャンドランプロットによる主鎖 2 面体角の解析では Most favored region が 61.5%で Disallowed region が 0%と、良好な結果を示していた。





Long range はアミノ酸配列上で 5 残基以上離れた残基 (|i-j|>=5)の NOE、Medium range は 1 残基 以上、5 残基以下離れている残基 (1<|i-j|<5)の NOE、short range と intraresidual constraints は隣の 残基と自身の残基 (|i-j|<=1) の NOE をそれぞれ表している。赤色は α -ヘリックス、シアンは β -シートをそれぞれ表している。

表5

LaIT2 構造の RMSD, 制限(structural restraints)と統計(tatistics)

Resraints		
NOE distance restraints (total)		407
short-range, i-j <=1		306
medium-range, 1< i-j <5		64
long-range, i-j >=5		38
Angle constrains	(phi, psi)	24, 24
Hydrogen bonds	(pair)	10
Disulfide bonds	(pair)	3
Mean of parwise RMSD (Å)		
Average backborn RMSD (Q28-S59)		0.37 +/- 0.26
Heavy atoms		1.11 +/- 0.39
Ramachandran statistics (%)		
Most favored regions		61.5
Additionally allowed regions		36.5
Generously allowed regions		1.9
Disallowed regions		0

表6

LaIT2の保存された6つのシステインに関する¹³Cβ化学シフトとNOEシグナル

pair	Cβ (ppm)	Observed NOEs	
C31	32.08	C31 NH-C51 HA, C31 HA-C51 HA,	
C51	33.29	C31 HA-C51 HB3,C31 HB3-C51 HB3	
C38	33.54	No NOE	
C56	34.95	NONOE	
C42	32.94	C42 HA-C58 HB2, C42 QB-C58 HA,	
C58	34.68	C42 QB-C58 HB3	



図 18:観測された短距離と中距離の NOE

 d_{NN} は HN-HN、 $d_{\alpha N}$ は HN-Ha、 $d_{\beta N}$ は HN-Hβ間の NOE をそれぞれ表し、(i, i+1)はアミノ酸配列上 1 残基、(i, i+2)は 2 残基、(i, i+3)と(i, i+4)はそれぞれ 3, 4 残基離れた残基で観測された NOE を表している。



図 19: LaIT2 の立体構造の重ね合わせ

N-, C-term はそれぞれ N-, C-末端を表している。20 構造の主鎖のワイヤーモデルを重ね合わせた 図である。



図 20: LaIT2 の立体構造と表面電荷分布

LaIT2 の立体構造を表面電荷分布で表示した(赤、青、白は、それぞれ負電荷、正電荷、疎水性 を示す)。さらに、その中にリボンモデルで 2 次構造を表示した。6 つのシステインの側鎖と本 文中の議論に出てくるアミノ酸残基(リジン、ロイシン)は、それぞれ黄色と黒のボール/ステ ィックで示した。いくつかのアミノ酸残基には、一文字表記のアミノ酸残基名と番号を表示した。

図 19 に最終 20 構造の重ね合わせを示した(PDB code: 7WKF)。N 末端側の領 域は安定な立体構造がなく、ランダムコイル構造を有している。一方、C 末端側 はよく折り畳まれており、C 末端側領域はジスルフィド結合で安定化されたα-ββ構造を有していた。LaIT2 の N 末端領域はヘリックス構造を持たないランダム な構造であるため、分子全体としてはβ-KTx 類似構造であった。

分子表面を静電ポテンシャルで着色したリボンモデル図を図 20 に示す。N 末 端領域のランダムな領域には負電荷が存在せず、広く正電荷を帯びていること が分かった。また、C 末端領域には 2 本のストランドを結ぶターンの領域を含む 疎水的な分子表面が存在することも明らかになった。

3.3.3 LaIT2 の分子内ダイナミクス

次に、LaIT2 の分子内ダイナミクスを解析するために、 $^{15}N{^{1}H}$ 異種核 NOE、 *T*₁および *T*₂緩和の実験を行った。得られた緩和データは全て、式(3)を用いた カーブフィッティングを行った。異種核 NOE 実験では、NOE あり、なしの測定 で得られた各ピーク強度について、NOEon (NOE あり)の値を NOEoff (NOE な し)の値で割り算することで得られた値をグラフにまとめた。 $^{15}N{^{1}H}$ 異種核 NOE と緩和実験結果を図 21 に示した。また、緩和実験で得られたデータは全て 付録データに記載してある。







図 21:¹⁵N¹H}異種核 NOE と緩和の実験結果

(A) ¹⁵N{¹H}異種核 NOE、(B) 縦方向の T_1 スピン緩和 (R_1)、(C) 横方向の T_2 スピン緩和 (R_2)、 (D) R_2 ($1/T_2$) / R_1 ($1/T_1$) をアミノ酸配列に対してプロットした。いくつかの特定のアミノ酸に は、残基番号が付けられている。なお、2 つのプロリン残基 (P4 および P32) についてはデータ がない。

一般的に¹⁵N{¹H}異種核 NOE 実験で得られるデータで 0.5 以下を示すアミノ 酸残基はその構造がフレキシブル、0.5 以上のアミノ酸残基はリジッドであると 解釈されている。これに従って図 21 の結果をみると、N 末端領域が他に比べて 柔軟であることが伺える。これは、構造計算結果で得た LaIT2 が特定の高次構 造を持たないことと整合性が取れている。図 21B に緩和時間 T_1 の結果 ($R_1 = 1$ / T_1)を示す。このグラフから、A24 の R_1 (sec⁻¹)値が小さいことがわかる。この事 実は、A24 の構造に ps-ns タイムスケールの熱的なゆらぎが存在することを示唆 している。一方、図 21C, D にはそれぞれ R_2 ならびに R_2/R_1 の結果を示す。Q28,

46

Y29, G30, I34, C38, H41, D55 が比較的高い R_2 (sec⁻¹)示しており、その中でも Q28 と I34 の R_2/R_1 値は約 15, 22 sec⁻¹ と他の残基よりも大きい値を示し、また、誤差 も他の残基より大きい。そのため、これらの残基には μ s-ms タイムスケールでコ ンフォメーション交換が生じていると考えられる。Y29, G30, C38, および H41 の R_2/R_1 値が比較的大きい原因は、近傍に存在する Y29 や H41 の側鎖の影響で はないかと考えられる。

A24 の構造の熱的なゆらぎは N 末端に構造の柔軟性をもたらしていると考え られる。また、Q28 の構造平衡は N、C 両末端領域の相対位置を容易に変えるこ とに寄与しており、これが、機能発現に適した全体構造を形成するために有利に 働いているのではないかと考えられる^[82]。 α -helix と β -sheet を繋ぐターン上に存 在している I34 の R_2 値も他の残基と比べ大きい値を示している。I34 は、 β スト ランド間を繋ぐターンに存在する L53,L54 と共に分子表面の疎水性クラスター を形成している。従って、I34 の μ s-ms タイムスケールの運動が疎水性クラスタ ーのダイナミクスに影響していることが推測できる。類似のペプチドでは、この ターン内にあるロイシンが活性発現を担う残基として働いていることが明らか になっているので^[82, 83]、今回明らかになった I34 の運動性が活性に影響を与え ている可能性が考えられる。

3.3.4 TFE によるヘリックスの誘起実験

LaIT2 を NMR 測定条件と同じ溶媒に溶かし、それぞれ 0-50% TFE になるよう に調製して CD スペクトルを測定した。これらの結果を図 22A, B に示した。加 えて、NMR でも同様の実験を行い、¹H-¹⁵N HSQC の各ピークの化学シフト変化 を追跡した。また、TFE 存在下での化学シフト情報を用いて CSI3.0 で 2 次構造 予測を行った。これらの結果を図 22C, 22 D に示した。





49



Residues number

図 22: TFE リポソームの影響による LaIT2 のコンフォメーション結果 (A), (B) TFE を 0~50%の濃度、各リポソームをそれぞれ添加した LaIT2 の CD データ (25℃)、 (C) 0,5,10% TFE 添加による化学シフト変化の追跡、(D) 10% TFE 添加時の ¹H-¹⁵N HSQC スペク トルからの構造予測。

図 22A に示すように、10%以上の TFE 濃度で LaIT2 のコンフォメーション変 化が促進された。さらに、0,5,10% TFE をそれぞれ添加した ¹H-¹⁵N HSQC スペ クトルの重ね合わせを図 22C に示した。化学シフト変化を追跡することで 10% TFE 添加時の HSQC スペクトルを帰属することができた。帰属した 10% TFE 存 在下の HSQC データを基に CSI 3.0 で構造予測を行った結果、残基番号 10-17, 25-29 の領域で合計 11 残基分の α -ヘリックスが形成されていることが予測され た (図 22D)。加えて、図 22B が示すように、リポソーム(哺乳類とバクテリア の脂質二重膜モデル)を加えた際でも LaIT2 にコンフォメーション変化が起こ って新たにα-ヘリックス構造が誘起されていた。従って、CD 測定と NMR の結 果を合わせて考察すると、N 末端領域には約 2-3 巻きのヘリックスを形成する能 力があると考えられる。

化学合成された LaIT2 の N 末端フラグメントがヘリックスを形成する能力を 持っていることは既に報告されている。従って、この結果は、全長 LaIT2 におい ても N 末端領域がヘリックスを形成する能力を有することを示している。

一般的に、グラム陰性菌の負電荷を帯びた膜表面との相互作用には、ヘリック ス構造にある正電荷が有利に働くと考えられている^[84]。つまり、正電荷を持つ アミノ酸残基を多く含んだ LaIT2 の N 末端領域のヘリックス形成能力は、標的 と相互作用する際に有利に働くと考えられる。

第4章 LaIT2の生理活性

第4章 LaIT2の生理活性

4.1 抄録

ホモロジー検索の結果、LaIT2 の1次構造と相同性の高いペプチドが4つ見つ かった。いずれも立体構造が不明だったため、それらの立体構造を予測した。こ れらのモデル構造と第3章で解析した LaIT2 の NMR 構造を比較した。その結 果、N 末端領域の2つのリジン残基と C 末端領域の2つのロイシン残基が殺虫 及び抗菌活性に重要なアミノ酸残基と示唆された。これを基に、推定した4つ のアミノ酸残基をアラニンに置換した3種類の変異体 K15A、K21A、L53A/L54A を作製した。まず、作製した変異体が野生型と同様のジスルフィド結合を有する のかを第2章と同じプロトコールで分析した。また、野生型と変異型の立体構 造を比較するために、1次元 NMR 測定を行った。最後に、コオロギと大腸菌

(NBRC3301:NITE Biological Resource Center, Chiba, Japan)を用いて殺虫及び抗 菌活性評価した。

4.2 LaIT2 の生理活性

4.2.1 序論

タンパク質の機能に必要なアミノ酸残基を調べる一般的な手法として、まず、 ホモロジー検索や立体構造の比較から保存性の高いアミノ酸残基を見つけ出す 方法が知られている。保存性の高いアミノ酸残基は、立体構造形成や生理機能に 重要であることが多い。次に、注目しているアミノ酸残基をアラニンに変異させ るアラニンスキャンやプロリンに変異させるプロリンスキャンがある。アラニ ンスキャンは、注目しているアミノ酸残基を1つずつ、あるいは複数個同時に側 鎖の短いアラニンに置換させた変異体を作製し、それら変異体の生理機能を網 羅的に分析して機能を担うアミノ酸残基を特定する手法である^[85]。一方、プロ リンスキャンは、比較的動的なアミノ酸残基をプロリンに置換することでタン パク質主鎖の可動域を制限し、その結果が生理機能に影響を及ぼすかどうかを 調べる方法である^[86,87]。

本章では LaIT2 の構造と機能の相関を解明するために、野生型と変異体の抗 菌及び殺虫活性を評価した。具体的には、上述のアラニンスキャンの手法を採用 した。抗菌活性ペプチドでは、一般的に、両親媒性のα-ヘリックスに含まれる正 電荷のアミノ酸残基と、β-ストランドを繋ぐターン上に含まれる疎水性のアミノ 酸残基が、それぞれ細胞膜やイオンチャネルと相互作用することが知られてい る^[88,89]。そこで本章では、LaIT2 のN 末端領域の両親媒性の正電荷をもつアミ ノ酸残基と、C 末端領域のβ-ストランドを繋ぐターン上の疎水性アミノ酸残基に 着目した。

4.2.2 実験方法

4.2.2.1 活性に重要なアミノ酸の推定

BLAST による検索を行い、LaIT2 のアミノ酸配列と相同性の高い4種類のペ プチド毒を見つけた。4種類のペプチド毒の立体構造は全て未知であったので、 Alpha Fold2を用いて立体構造モデルを作製した。それらを、第3章で解明した LaIT2の立体構造と比較し、生理活性に関与するアミノ酸残基を推定した。

4.2.2.2 抗菌活性実験

4.2.2.1 で殺虫及び抗菌活性に重要だと推定されたアミノ酸残基をアラニンに 置換した 3 種類の変異体(K15A、K21A、L53A/L54A)を作製・単離した。単離 した各サンプルを用いて、以下のように抗菌及び殺虫活性を評価した。

PBS 緩衝液で溶解した野生型と各変異体を 5, 10, 15 μM になるように LB 培地 で調製した。これらペプチドの存在下でグラム陰性菌である NBRC3301 を培養 することで抗菌性を評価した。同様に各ペプチドと大腸菌を LB 培地で混ぜ合わ せた溶液を用いて、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。濃度 10⁶ CFU/ml の 大腸菌を 37℃, 24 時間培養し、その間の大腸菌の生育を目視と OD₆₀₀ の濁度測 定で追跡した^[90]。この観察の結果を解析して、MIC の値を算出した。

4.2.2.3 殺虫活性実験

LaIT2 およびその変異体各サンプルの濃度が 5.7µg/µl になるように PBS 溶液 を用いて調製した。各サンプル溶液 2µl を体重 50 ± 5mg のコオロギの腹部に注 射した。測定には各ペプチド 30 匹ずつの合計 120 匹のコオロギを用いた。注射 後 48 時間の時点でコオロギの死亡数をカウントし、コオロギの死亡割合を算出 した。

4.3 結果と考察

4.3.1 活性に重要なアミノ酸の推定

LaIT2 のアミノ酸配列と相同性の高いペプチドを BLAST で検索したところ 4 種類のペプチド毒が 50%以上のアミノ酸配列相同性を持つことが分かった。そ の結果を図 23 に示す。



図 23: β-KTx ファミリーのシーケンスアライメント結果

リジン、システインはそれぞれピンク、オレンジに着色されている。いくつかの(-)はスペーサー である。保存されている残基はドットで示されている。保存性の高いリジン、システイン、P32 は黒矢印で示し、変異を入れた残基は*を付けた。これらのデータは BLAST により導き出され、 同一性と分類名はそれぞれ Score と Tax id として示した。

4 種類のペプチド毒 Pcav34, HLKTx5, Dik-β-KTx, Hge-β-KTx は、それぞれ Pandinus cavimanus, Hemiscorpius lepturusscorpion, Didymocentrus krausi, Hadrurus gertsch の毒から分離されたもので、立体構造や機能について殆ど解明されてい ない^[90-92, 18]。ホモロジー検索の結果から、N 末端領域のリジン、C 末端領域の システイン、ロイシンの保存性が高いことがわかった。一般的に、リジンのメチ レン基が連なる長い側鎖は疎水的で、末端の正電荷は負電荷を持つ相手と静電 的な相互作用を介して結合に関与することが多い^[93]。また、ロイシンの側鎖は メチル基を 2 つ持っていて嵩高く、これらのメチル基が分子表面に露出してい る場合には標的タンパク質と疎水的な相互作用することがある。そこで、保存性 の高いことが判明したリジンやロイシン残基が LaIT2 および類似のβ-KTx で生 理活性に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。さらに分析するた めに LaIT2 とホモロジー検索で見つかった 4 種類のペプチド毒の立体構造を比 較した。構造比較した結果を図 24 に示した。



図 24: β-KTx ファミリーのペプチド毒を用いた構造予測モデルと表面電荷分布 それぞれペプチド (A) Pcav34, (B) HLKTx5, (C) Dik-β-KTx, and (D) Hge-β-KTx についてその構造 予測モデルをリボンモデルで表記し、そこに表面電荷分布を重ねた。6つのシステインの側鎖は 黄色と黒のボール/スティックで示した。赤、青、白はそれぞれネガティブ、ポジティブ、疎水 性を示しており、いくつかのアミノ酸残基には、一文字表記のアミノ酸残基名と番号を表示した。

LaIT2 とアミノ酸配列の相同性が高い β-KTx ファミリーのペプチド毒との立 体構造の比較をした。図 24 に示すようにこれらのペプチド毒はそれぞれ、LaIT2 同様 C 末端領域に CSαβ モチーフ有すると予測された。さらに、保存性の高い各 アミノ酸残基は立体構造上でも LaIT2 と類似した部位に存在していることが分 かった。加えて、図 25 に示すように、LaIT2 の N 末端領域の Q7-A24 でヘリカ ルホイールを描いてみると、典型的な両親媒性で親水側には正電荷を持つアミ ノ酸が密集している。正電荷をもつアミノ酸残基は抗菌性を示すことが知られ ている^[85]ので、保存性の高いアミノ酸残基でありながら、両親媒性ヘリックス に含まれている K21, K15 は生理活性に重要な役割を担っている可能性が非常に 高いと考えられる。さらに、LaIT2 と相同性の高い 4 種のペプチド毒にあるロイ シンも保存性が高く、β-ストランド間のターン上に存在していることから、疎水 的相互作用を利用して標的分子と結合すると考えている。

図 25 に示したとおり、各ペプチド毒の立体構造モデルでも類似の領域が両親 媒性ヘリックス構造であることが分かった。各ペプチド毒でも LaIT2 同様の抗 菌活性を有することが期待できる。

以上の考察により、本研究では K15, K21, L53/L54 に着目した。これらをアラ ニンに変異させた3種類の変異体を作製し、その殺虫及び抗菌活性を評価した。



図 25: LaIT2 と各ペプチド毒のヘリカルホイール比較

(A) LaIT2, (B) Pcav34, (C) HLKTx35, (D) Dik-βKTx, (E) Hge-βKTx のヘリカルホイールである。疎 水的、親水的、中性的のアミノ酸をそれぞれ赤色、青色、白色で示した。また、生理活性に重要 である可能性の高い親水性のアミノ酸黒い矢印で示し、このアミノ酸残基をアラニンに変異さ せた。

4.3.2 各変異体の精製

LaIT2の構造と機能の関係を明らかにするために、野生型と変異体の抗菌・殺虫活性を評価した。そのためにまず、K15,K21,およびL53/L54をアラニンに置換した3種類の変異体を作製し、2章で確立したプロトコールを用いて各変異体を精製及び単離した。その SDS-PAGE と質量分析結果を図 26,27 に示す。殆ど不純物の含まない各変異体が単離できたことが図 26,27 から確認できる。これらのサンプルを用いて以降の実験を行った。



図 26: 各変異体の SDS-PAGE 結果

 (A) 左からマーカー(Maker)、野生型、K15A、K21A、L35A/L54A のインダクション3時間後の サンプル(B) 左からマーカー(Maker)、野生型、K15A、K21A、L35A/L54A の単離後のサンプ ル。目的タンパク質には矢印を付けた。これらは、15% SDS-PAGE で分析を行った結果である。



61


図 27:各変異体の質量分析結果

(A) K15A, (B) K21A, (C) L53A/L54A 質量分析結果。目的タンパク質を矢印で指示した。*は 6500-7000 m/z の範囲を拡大したスペクトルである。

4.3.2 LaIT2 と各変異体の構造比較

次に、作製した各変異体の構造を質量分析と1次元 NMR で確認した。質量分析は第2章の方法に従い、各試料のジスルフィド結合のパターンを確かめた。それらの結果を図 28-31 に示す。



図 28: K15A のジスルフィド結合パターン解析結果

(A) Lys-C と Asp-N で消化した K15A の質量分析スペクトル。(B) Asp-N と Proteinase K で消化 した K15A の質量分析スペクトル。



図 29: K21A のジスルフィド結合パターン解析結果

(A) Lys-C と Asp-N で消化した K21A の質量分析スペクトル。(B) Asp-N と Proteinase K で消化 した K21A の質量分析スペクトル。

9/16



図 30: L53A/L54A のジスルフィド結合パターン解析結果

(A) Lys-C と Asp-N で消化した L53A/L54A の質量分析スペクトル。(B) Asp-N と Proteinase K で 消化した L53A/L54A の質量分析スペクトル。



上から野生型、K15A、K21A, L53A/L54A の 1 次元 NMR スペクトルをそれぞれ示した。

図 28-30 から各変異体の Cys³¹-Cys⁵¹ と Cys³⁸-Cys⁵⁶ の 2 つのジスルフィド結合 ペアが見られた。 図 27 の結果と合わせて考えると、残ったペアは Cys⁴²-Cys⁵⁸ である。従って、すべての変異体のジスルフィド結合パターンは、野生型の LaIT2 と同じであることがわかった。また、図 31 に野生型と各変異体の 1 次元 NMR データを示した。もし、変異導入の影響で LaIT2 の立体構造に変化が起こって いる場合、野生型でよくフォールドしている β-シート上にあるアミノ酸残基由 来の低磁場シフトしたアミド基のピークはその影響を受けて変化するはずであ る。しかし、図 31 に示したように E48, V57, C58, S59 の各ピークが全てのサン プルでほぼ等しい化学シフトを持つことから、各変異体の立体構造は野生型 LaIT2 と同等であると考えられる。

4.3.3 抗菌及び殺虫活性分析

野生型、K15A、K21A、L53A/L54A の 5-15 µM 濃度での抗菌活性を評価した。次 に、大腸菌を用いて MIC 値を決定した(一般的に、MIC 値は活性を示した最小 濃度を採用する)。それぞれの結果を図 32、表6に示す。最後にコオロギを用い て殺虫活性を評価した結果を図 33 に示す。





図 32: LaIT2 とその変異体が大腸菌(NBRC3301)の増殖に与える影響

(A),(B),(C) はそれぞれ 5,10,15µM の濃度になるように各ペプチドを調製し抗菌評価を行った。 緑,赤,青,紫はそれぞれ WT, K15A, K21A, L53A/L54A のペプチドを用いて評価したことを表し ている。

表 7

大腸菌(NBRC3301)を用いた LaIT2 及びその変異体の抗菌活性評価

peptide	MIC (µM)
WT	7
K15A	>24
K21A	16
L53A/L54A	7

※ 野生型 (WT)、K15A、K21A、L53A/L54A の抗菌活性をそれぞれ示す。



図 33:野生型と変異型の殺虫活性

抗菌活性評価の結果を図 32A に示す。 5μ M のペプチド濃度では抗菌性を示さ なかった。一方、図 32B, C の 10, 15 μ M の濃度を用いた実験において、K21A と L53A/L54A は抗菌性を示していたが、WT と K15A は抗菌性を示さなかった。加 えて、表 6 に示す通り、L53A/L54A は大腸菌に対して野生型と同等の抗菌活性 を示したが、一方で K15A と K21A の抗菌活性は低下していた。これらの結果 は、N 末端領域の K15 と K21 は抗菌活性に重要な役割を果たしていることを示 している。

次に、コオロギを用いて殺虫活性を評価した。その結果を図 33 に示す。野生型と K15A は野生型同様に半数近くのコオロギを死亡させる活性を有することが確認された。しかし、K21A と L53A/L54A による死亡数は誤差を含めても 40%を下回っていたことから、変異導入によって毒性が著しく低下したと考えられ

69

る。この殺虫活性の結果は、N 末端領域の K21 と C 末端領域の L53、L54 は毒性に重要なアミノ酸であることを示唆している。先行研究では 2 つの領域から成る LaIT2 は、N 末端領域に殺虫活性、C 末端領域に抗菌活性があり、それぞれの領域が独立の生理活性を持つと考えられていた。しかしながら、今回の変異体実験の結果は N 末端領域にある K21 と C 末端領域の L53, L54 が協同的に働いていることを伺わせる。

第5章 結論

第5章 結論

5.1 LaIT2 の構造と機能の相関

分子内に3つのジスルフィド結合を持つ殺虫毒素ペプチド LaIT2 の効率的な 発現と精製方法を確立した。Trx-tag と大腸菌 Rosetta-gami を用いることで LaIT2 発現時の分子内ジスルフィド結合形成を促進させた。この結果、可溶性画分に融 合タンパク質を得ることに成功した。質量分析実験の結果、本プロトコールで調 製した rLaIT2 は野生型と同様のジスルフィド結合パターンを有することが判明 した。また、活性測定の結果、野生型と同等の生理活性を持つことがわかった。 したがって、得られたリコンビナント LaIT2 (rLaIT2) は野生型 (LaIT2) と同等 のペプチドであると考えられる。

LaIT2 の立体構造解析の結果、LaIT2 は N 末端領域にランダムコイル、C 末端 領域に CSαβ モチーフを有していることが明らかになった。さらに、CD 及び NMR の実験によって、特定の条件下で全長 LaIT2 の N 末端領域が α-ヘリック スを形成する能力を持っていることが明らかになった。この結果は、LaIT2 が標 的と相互作用する際に N 末端領域のコンフォメーション変化が起こりへリック ス構造を形成する可能性があることを示唆している。

ホモロジー検索で見つけた 4 種類のペプチド毒と LaIT2 のアミノ酸配列及び 立体構造を比較し、生理活性に重要なアミノ酸残基を推定した。比較結果に基づ き、LaIT2 の K15, K21, L53/L54 を変異させた 3 種類の変異体(K15A、K21A、 L53A/L54A)を作製し、その抗菌及び殺虫活性を評価した。生理活性評価の結果、 N 末端領域の K15 が抗菌活性、C 末端領域の 2 つの β-ストランド間のターン部 分に位置する L53 と L54 が殺虫活性に重要なアミノ酸残基であることが明らか になった。さらに、興味深いことに、K21 は殺虫及び抗菌活性の両方を担ってい ることが明らかになった。この 2 つの領域は、それぞれ異なる生物活性を持っ ているように見えるが、本研究の結果から、殺虫毒性を発揮する際にはN末端領 域の K21 と C 末端領域の L53/L54 が協調的に機能していることが強く示唆され た。LaIT2 の 2 つの領域が協調的に機能しているモデルを図 34 に示した。脂質

71

二重膜の中にヘリックスで構成されたポアヘリックスがある。このポアヘリッ クスの中にカリウムイオンを選択的に透過させる選択的フィルターがある。α-KTx ファミリーに属しているペプチド毒の毒性機構として、β-ストランド上の リジンがこの選択的フィルターに結合することで、毒性を発揮することが知ら れている^[27]。一方、LaIT2 はβ-ストランド上にリジンを持っていない。つまり、 α-KTx ファミリーに属しているペプチド毒におけるβ-ストランド上のリジンの 役割を、LaIT2 では N 末端領域にあるリジンが果たしているのではないかと考 えている。加えて、ロイシンがポアヘリックスの表面に結合することで、より有 利に毒性を発揮しているのではないかと考えている。



図 34: LaIT2 とカリウムチャネルとの結合模式図

以上のように本研究で得られた多くの結果は LaIT2 の構造機能相関の全容解 明に向けた極めて重要な知見である。加えて、新しく得られた知見は、ヒトには 効果のない農薬等の開発向けた、極めて重要な情報である。このことからも本学 位論文で得た結果は、大変意義のあるものである。

参考文献

[1] A. Tripathi, V. A. Bankaitis, Molecular docking: from lock and key to combination lock, *J. Mol. Med. Clin. Appl.* 2 (1): 10 (2017) 1-19.

[2] T. R. Weikl, F. Paul, Conformation selection in protein binding and function, *Protein Sci.* 23 (11) (2014) 1508-1518.

[3] D. A. Oren, O. Froy, E. Amit, N. Kleinberger-Doron, M. Gurevitz, B. Shaanan, *Structure* 6 (9) (1998) 1095-1103.

[4] A. E. Lopez-Giraldo, T. Olamendi-Portugal, L. Riano-Umbarila, B. Becerril, L. D. Possani, M. Delepierre, F. Rio-Portilla, The three-dimensional structure of the toxin peptide Cl13 from the scorpion *Centruroides limpidus*, *Toxicon* 184 (2020) 158-166.

[5] L. D. Possani, E. Merino, M. Corona, F. Bolivar, B. Becerril, Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels, *Bio. Chimie.* 82 (2000) 861-868.

[6] Z. Cao, Y. Yu, Y. Wu, P. Hao, Z. Di, Y. He, Z. Chen, W. Yang, Z. Shen, X. He, J. Sheng, X. Xu, B. Pan, J. Feng, X. Yang, W. Hong, W. Zhao, Z. Li, K. Huang, T. Li, Y. Kong, H. Liu, D. Jiang, B. Zhang, J. Hu, Y. Hu, B. Wang, J. Dai, B. Yuan, Y. Feng, W. Huang, X. Xing, G. Zhao, X. Li, Y. Li, W Li, The genome of *Mesobuthus martensii* reveals a unique adaptation model of arthropods, *Nat. Commun.* 4: 2602 (2013) 1-10.

[7] E. Zlotkin, "comprehensive molecular insect science "eds. Gilbart LI, Iatrou K, and Gill SS, Elsevier B. V., Oxford 5 (2005) 178-185.

[8] C. Garcia, E. S. Calderon-Aranda, G. A. V. Anguiano, B. Becerril, L. D. Possani, Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius* Hoffman, *Toxicon* 41 (2003) 417-427.

[9] A. Pintar, L. D. Possani, M. Delepierre, Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffman, a β -scorpion neurotoxin acting on sodium channels, *J. Mol. Bio.* 287 (1999) 359-367.

[10] L. D. Possani, B. Becerril, M. Delepierre, J. Tytgat, Scorpion toxins specific for Na⁺channels, *Eur. J. Biochem.* 264 (1999) 287-300.

[11] D. Housset, C. Habersetzer-Rochat, J. P. Astier, J. C. Fontecilla-Camps, Crystal atructure of toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector refined at 1.3 A resolution, *J. Mol. Biol.* 238 (1994) 88-103.

[12] S. K. Holaday, B. M. Martin, P. L. Fletcher, N. R. Krishna, NMR solution structure of Butantoxin, Arch. *Biochem. Biophys* 379 (2000) 18-27.

[13] A. Prochnicka-Chalufour, G. Corzo, H. Satake, M. F. Martin-Eauclaire, A. R. Murgia, G. Prestipino, G. D'Suze, L. D. Possani, M. Delepierre, Solution structure of discrepin, a new K⁺-channel blocking peptide from the R-KTx15 subfamily, *Biochemistry* 45 (2006) 1795-1804.

[14] K. S. Luna Ramirez, J. M. Jimenez-Vargas, L. D. Possani, Scorpine-like peptides, Single Cell Biology 5 (2016) 1000138-1-1000138-3.

[15] E. Diego-Garcia, Y. Abdel-Mottaleb, E. F. Schwartz, R. C. Rodriguez de la Vega, J. Tytgat, L. D. Possani. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cell Mol Life Sci* 65 (2008) 187-200.

[16] M. Miyashita, Diverse Structures of Bioactive Peptides in the ScorpionVenom: Well-Designed Scorpion Toxins, Kagaku to Seibutsu 57 (8): (2019) 484-491.

[17] F. Bontems, C. Roumestand, B. Gilquin, A. Menez, F. Toma, Refined structure of Charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins, *Science* 254 (1991) 1521-1523.

[18] E. F Schwartz, E. Diego-Garcia, R. C Rodríguez de la Vega, L. D. Possani, Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion Hadrurus gertschi (Arachnida: Scorpiones), *BCM Genom.* 8 (2007) 1-12.

[19] G. B. Gurrola, B. Rosati, M. Rocchetti, G. Pimienta, A. Zaza, A. Arcangeli, M.

Olivotto, L. D. Possani, E. Wanke, A toxin nervous, cardiac, and endocrine ERG K+ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom, *FASEB*. *J* 13 (1999) 953-962.

[20] S. Peigneur, Y. Yamaguchi, H. Goto, K. N. Srinivasan, P. Gopalakrishnakone, J. Tytgat, K. Sato, Sythesis and characterization of amino acid deletion analogs of κ -hefutoxin 1, a scorpion toxin on potassium channels, *Toxicon* 71 (2013) 25-30.

[21] Z. Chen, Y. Hu, W. Yang, Y. He, J. Feng, B. Wang, R. Zhao, J. Ding, Z. Cao, W. Li,
Y. Wu, Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion
Kunitz-type potassium channel toxin family, *J. Biol. Chem* 287 (17) (2012) 13813-13821.

[22] A. I. Kuzmenkov, A. A. Vassilexski, K. S. Kudryashova, O. V. Nekrasova, S. Peigneur, J. Tytgat, A. V. Feofnov, M. P. Kirpichnikov, E. V. Grishin, Variability of potassium channel blockers in *Mesobuthus eupeus* scorpion venom with focus on Kv1.1, *J. Biol. Chem* 290 (19) (2015) 12195-12209.

[23] C. M. Cremonez, M. Maiti, S. Peigneur, J. S. Cassoli, A. A. A. Dutra, E. Waelkens,
E. Lescrinier, P. Herdewijn, M. E. De Lima, A. M. C. Pimenta, E. C. Arantes, J. Tytgat,
Structural and functional elucidation of peptide Ts11 shows evidence of a novel subfamily of scorpion venom toxins, *Toxins* 288 (8) (2016) 1-14.

[24] A. M. Krezel, C. Kasibhatla, P. Hidalgo, R. Mackinnon, G. Wagner, Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry, *Protein Sci* 4 (1995) 1478–1489.

[25] M. Dauplais, B. Gilquin, L. D. Possani, G. Gurrola-Briones, C. Roumestand, A. Menez, Determination of the three-dimensional solution structure of Noxiustoxin: analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins, *Biochem* 34 (1995) 16563-16573.

[26] R. Koradi, M. Billeter, K. Wuthrich. MOLMOL: a program for display and analysisof macromolecular structures. *J Mol Graph* 14 (1996) 51-55.

[27] A. Banerjee, A. Lee, E. Campbell, R. Mackinnon, Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺-channel, *eLife* 2 (2013) e00594.

[28] H. Juichi, R. Ando, T. Ishido, M. Miyashita, Y. Nakagawa, H. Miyagawa, 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 Pep Sci.* (2018); 24: e3133 1-9.

[29] N. Matsushita, M. Miyashita, Y. Ichiki, T. Ogura, E. Sakuradai, Y. Nakagawa, S. Shimizu, H. Miyagawa, Purification and cDNA cloning of LaIT2, a novel insecticidal toxin from venom of the scorpion *Liocheles australasiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 12 (2009), 2769-2772.

[30] W. L. So, T. C. N. Leung, W. Nong, W. G. Bendena, S. M. Ngai, J. H. L. Hui, Transcriptomic and proteomic analyses of venom glands from scorpions *Liocheles australasiae*, Mesobuthus martensii, and Scorpio maurus palmatus, *peptides* 146 (2021) 170643 1-7.

[31] V. Quintero-Hernandez, J. M Jimenez-Vargas, G. B. Gurrola, H. H. F. Valdivia, L.D. Possani, Scorpion venom components that affect ion-channels function, *Toxicon* 76 (2013) 328-342.

[32] C. Zhijian, L. Feng, W. Yingliang, M. Xin, L. Wenxin, Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification, *Toxicon* 47 (2006) 348-355.

[33] M. Miyashita, J. Otsuki, Y. Hanai, Y. Nakagawa, H. Miyagawa, Characterization of peptide components in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (Hemiscorpiidae), *Toxicon* 50 (2007) 428-437.

[34] H. Juichi, M. Miyashita, Y. Nakagawa, H. Miyagawa, Isolation and characterization of the insecticidal, two-domain toxin LaIT3 from *Liocheles australasiae* scorpion venom, *Biosci. Biotechnol. Biochem* 83 (2019) 2183-2189.

[35] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzell, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K.

Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Zidek1, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A.
Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back,
S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T.
Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K, Kavukcuoglu, P.
Kohli, D. Hassabis, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature* 596 (2021) 583-592.

[36] G. Martinez, J. P. Hograindleur, S. Voisin, R. A. Nahed, T. M. Abd EI Aziz, J. Escoffier, J. Bessonnat, C. M. Fovet, M. D. Waard, S. Hennebcq, Vincent Aucagne, P. F. Ray, E. Schmitt, P. Bulet, C. Arnoult, Spermaurin, an La1-like peptide from the venom of the scorpion Scorpio maurus palmatus, improves sperm motility and fertilization in different mammalian species, *Mol. Hum. Reprod* 23 (2017) 116-131.

[37] K. Luna-Ramírez, V. Quintero-Hernández, L Vargas-Jaimes, C. V. F. Batista, K. D. Winkel, L. D. Possani, Characterization of the venom from the Australian scorpion Urodacus yaschenkoi: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity, *Toxicon* 63 (2013) 44-54.

[38] E. C. N. Silva, T. S. Camargos, A. Q. Maranhao, I. Silva-Pereira, L. P. Silva, L. D. Possani, E. F. Schwartz, Cloning and characterization of cDNA sequence encoding for new venom peptide of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*, *Toxicon* 54 (2009) 252-261.

[39] M. A. Abdel-Rahman, A. Quintero-Hernandez, Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion Scorpio maurus palmatus (Arachnida: Scorpionidae), *Toxicon* 74 (2013) 193-207.

[40] F. Kazemi-Lomedasht, V. Khalaj, K. Pooshang Bagheri, M. Behdani, D. Shahbazzadeh, The first report on transcriptome analysis of the venom glands of Iranian scorpion, *Hemiscorpius lepturus*, *Toxicon* 125 (2017) 123-130.

[41] M. Miyashita, N. Mitani, A. Kitanaka, M. Yakio, M. Chen, S. Nishimoto, H.

Uchiyama, M. Sue, H. Hotta, Y. Nakagawa, H. Miyagawa, Identification of an antiviral component from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* using transcriptomic and mass spectrometric analyses, *Toxicon* 191 (2021) 25-37.

[42] T. S. Dash, T. Shafee, P. J. Harvey, C. Zhang, S. Peigneur, J. R. Deuis, I. Vetter, J. Tytgat, M. A. Anderson, D. J. Craik, T. Durek, E. A. B. Undheim, A centipede toxin family defines an ancient class of CSαβ defensins, *Structure* 27 (2019) 315-326.

[43] A. I. Kuzmenkov, I. M. Fedorova, A. A. Vassilevski, E. V. Grishin, Cysteine-rich toxin from Lachesama tarabaevi spider venom with amphiphilic C-terminal segments, *Biochim Biophys Acta* 1828 (2013) 724-731.

[44] S. Horita, N. Matsushita, T. Kawachi, R. Ayabe, M. Miyashita, T. Miyakawa, Y. Nakagawa, K. Nagata, H. Miyagawa, M. Tanokura, Solution structure of a short-chain insecticidal toxin LaIT1 from the venom of scorpion *Liocheles australasiae*, Biochem. *Biophys. Res. Commun.* 411 (2011) 738-744.

[45] J. Tytgat, K. G. Chandy, M. L. Garcia, G. A. Gutman, M. Martin-Eauclaire, J. J. van der Walt, L. D. Possani, A unified nomenclature for short-chain scorpion venoms: α-KTx molecular sub families, *Trends Pharmacol Sci* 20 (1999) 444-447.

[46] R. Conde, F. Z. Zamudio, M. H. Rodriguez, L. D. Possani, Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom, *FEBS Lett* 471 (2000) 165-168.

[47] S. Zhu, J. Tytgat, The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition, *Cell. Mol. Life. Sci* 61 (2004) 1751-1763.

[48] M. Tamura, E. H. Morita, Solution structural studies of peptide LaIT2 from Japanese scorpion, *Liocheles australasiae*, with heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy, master's thesis for material research, graduate school of science, Josai university, (2019) 319-416.

[49] M.R. Mortari, A. O Cunha, L.B. Ferreira, W.F. dos Santos, Neurotoxin from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application,

Pharmacol. Ther. 114 (2007) 171–183.

[50] E. Zlotkin, Y. Fishman, M. Elazar, AaIT: from neurotoxin to insecticide, *Biochimie*82 (2000) 869–881

[51] G. Bertani, studies on lysogenesis I. the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia. Coli, J. Bacteriol* 62 (1951) 93-300.

[52] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins, *J Magn Reson* 89 (1990) 496-514.

[53] S. Grzesiek, A. Bax, An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins, *J Magn Reson* 99 (1992) 201-207.

[54] S. Grzesiek, A. Bax, Correlating Backbone Amide and Side Chain Resonances in Larger Proteins by Multiple Relayed Triple Resonance NMR, *J Am Chem* 114 (1992) 6291-6293.

[55] S. Grzesiek, J. Anglister, A. Bax, Correlation of backbone amide and aliphatic sidechain resonances in ${}^{13}C/{}^{15}N$ -enriched proteins by isotropic mixing of ${}^{13}C$ magnetization, *J Magn Reson Series B* 101 (1993) 114-119.

[56] M. Ikura, L. E. kay, R. Tschudin, A. Bax, Three-dimensional NOESY-HMQC spectroscopy of a ¹³C-labeled protein, *J Magn Reson* 86 (1990) 204-209.

[57] L. Mueller, A. Campbell-Burk, P. Domaille, 15N-correlated three-dimensional relayed NOESY experiments in uniformly 15N-labeled proteins, *J Magn Reson* 96 (1992) 408-415.

[58] D. N. Baldisseri, J. G. Pelton, S. W. Sparks, D. A. Torchia, Complete 1H and 13C assignment of Lys and Leu sidechain of staphylococcal nuclease using HCCH-COSY and HCCH-TOCSY 3D NMR spectroscopy, *FEBS lett* 281 (1991) 33-38.

[59] A. Bax, D. G. Davis, MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J Magn Reson* 65 (1985) 355-60.

[60] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, NMR Pipe: a

multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, J. Biomol NMR 6 (1995) 277-293.

[61] N. Sakabe, K. Sakabe, Past, present and future, *Protein crystallography science and technology* 42 (2000) 313-321.

[62] K. C. Holmes, Sir John Cowdery Kendrew, *Biog. Mems Fell. R. Soc. Lond.* 47 (2001)311-332.

[63] D. L. Clemens, P. Ge, B. Lee, M. A. Horwitz, Z. H. Zhou, Atomic structure of T6SS Reveals interlanced array essential to function, *Cell* 160 (2015) 940-951.

[64] C. Min, H. Cui, J. A. Gawronski-Salerno, A. Frost, E. Lyman, G. A. Voth, V. M. Unger, Structural basis of membrane bending by the N-BAR protein endophilinm, *Cell* 149 (2012) 137-145.

[65] E. Silvester, B. Vollmer, V. Prazak, D. Vasishtan, E. A. Machala, C. Whittle, S. Black, J. Bath, A. J. Turberfield, K. Grunewald, L. A. Baker, DNA origami signposts for identifying proteins on cell membranes by electron cryotomography, *Cell* 184 (2021) 1110-1121.

[66] I. I. Rabi, J. R. Zacharias, S. Millman, P. Kusch, A new method of measuring nuclear magnetic moment, *Phys. Rev.* 53 (1938) 318.

[67] J. M. B. Kellogg, I. I. Rabi, N. F. Ramsey, J. R. Zacharias, The magnetic moments of the proton and the deuteron. The radiofrequency spectrum of H2 in various magnetic fields, *Phys. Rev.* 56 (1939) 728-743.

[68] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, Phys. Rev. 69, (1946) 37.

[69] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, Phys. Rev. 69, (1946) 127.

[70] W. G. Proctor, F. C. Yu, The dependence of a nuclear magnetic resonace frequency upon chemical compound, *Phy. Rev* 77 (1950) 717.

[71] R. R. Ernst, W. A. Anderson, Application of Fourier transform spectroscopy tomagnetic resonance, *Rev. Sci. Inst.* 37 (1966) 93–102.

[72] F. A. Nelson, H. E. Weaver, Nuclear magnetic resonance spectroscopy in superconducting magnetic fields, *Science* 146 (1964) 223-232.

[73] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, Three-dimensional triple-resonance NMR sepectroscopy of isotopically enriched proteins, *J Magn Reson* 89 (1990) 496-514.

[74] A. Kumar, D. Welti, R. R. Ernst, NMR Fourier zeugmatography, *J Magn Reson* 18 (1975) 69–83.

[75] L. Skisovska, F. HT. Allain, Improved segmental isotope labeling methods for the NMR study of multidomain or large proteins: application to the RRMs of Npl3p and hnRNP L, *J. Mol. Biol* 375 (2008) 151-164.

[76] T. Aizu, T. Suzuki, A. Kido, K. Nagai, A. Kobayashi, R. sugiura, Y. Ito, M. Mishima, Domain selective labeling for NMR studies of multidomain proteins by domain ligation using highly active sortase A, *Biochim Biophys Acta* 1864 (2020) 129419.

[77] N. E. Hafsa, D. Arndt, D. S. Wishart, CSI 3.0: a web server for identifying secondary and super-secondary structure in proteins using NMR chemical shifts, *Nucleic Acids Res* 43 (2015) W370-W377.

[78] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax, TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts, *J. Biomol NMR* 44 (2009) 213-223.

[79] B. Lopez-Mendez, P. Guntert, Automated protein structure determination from NMR spectra. *J Am Chem Soc* 128 (2006) 13112-13122.

[80] R. A. Laskowski, J. A. Rullmannn, M. W. MacArthur, R. Kaptein, J. M. Thornton. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR, *J Biomol NMR* 8 (1996) 477-486.

[81] W. Lee, C. M. Petit, G. Cornilescu, J. L. Stark, J. L. Markley, The AUDANA algorithm for sutomated protein 3D structure determination from NMR NOE data, *J Biomol NMR* 65 (2) (2016) 51-57.

[82] R. Omidvar, Y. Xia, F. Porceil, H. Bohlmann, G. Veglia, NMR structure and conformational dynamics of AtPDF2.1, a defensin-like from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1864 (2016) 1739-1747.

[83] L. N. Medeiros, R. Angeil, C. G. Sarzedas, E. B. Bergter, A. P. Valente, E. Kurtenbach,
F. C. L. Almeida, Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pew defensin and its correlation with membrane by NMR spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* 1798 (2010) 105-113.

[84] H. Sato, J. B. Feix, Peptide-membrane interaction and mechanism of membrane destruction by amphipathic a-helix antimicrobial peptides, *Biochim Biophys Acta* 1758 (2006) 1245-1256.

[85] B. M. Brown, R. T. Sauer, Tolerance of Arc repressor to multiple-alanine substitutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 1983-1988.

[86] A. D. Williams, A. Portelius, I. Kheterpal, J. Guo, K. D. Cook, Y. Xu, R. Wetzel, Mapping A β amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis, *J Mol Biol* 335 (2004) 833-842.

[87] D. F. Moriarty, D. P. Raleigh, Effects of sequenctial proline substitutions on Amyloid formation by human Amylin, *Biochem* 38 (1999) 1811-1818.

[88] G, Drin, B. Antonny, Amphipathic helices and membrane curvature, *FEBS Lett*, 584(2010) 1840-1847.

[89] Y. Zhang, T. Doherty, J. Li, W. Lu, C. Barinka, J. Lubkowski, M. Hong, Resonance assignment and three-dimensional structure determination of a humanα-defensin, HNP-1, by solid-state NMR, *J.Mol. Biol.* 397 (2010) 408–422.

[90] E. Diego-Garcia, S. Peigneur, E. Clynen, T. Marien, L. Czech, L. Schoofs, J. Tygat, Molecular diversity of the telson and venom components from *Pandinus cavimanus* (*Scorpionidae* Latreille 1802): transcriptome, venomics and function, *Proteomics* 12 (2012) 313-328. [92] F. Kazemi-Lomedsht, V. Khalaj, K. Pooshang Bagheri, M. Behdani D. Shahbazzadeh, The first report on transcriptome analysis of the venom gland of Iranian scorpion, *Hemiscorpius lepturus*, *Toxicon* 125 (2017) 123-130.

[93] D. Rojas-Azofeifa, M. Sasa, B. Lomonte, E. Diego-Garcia, N. Ortiz, F. Bonilla, R. Murillo, J. Tytgat, C. Diaz, Jeram, Biochemical characterization of the venom of Central American scorpion *Didymocentrus krausi* Francke, 1978 (Diplocentridae) and its toxic effects *in vivo* and *in vitro*, Comp. *Biochem. Physiol. Pert C* 217 (2019) 54-67.

[94] S. Futaki, I. Nakase, Cell-surface interactions on arginine-rich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization. *Acc. Chem. Res.* (2017) 50 2449–2456.

謝辞

まず初めに、NMR 測定や手法に関することはもちろんのこと、様々な面で博 士後期課程における 3 年間をサポートしてくださった大木進野教授に心から御 礼申し上げます。続いて、副指導教員である芳坂貴弘教授と副テーマ指導教員で ある山口拓実准教授には、単位取得や書類申請等において手厚くサポートして いただきました。この場をお借りして御礼申し上げます。

また、質量分析や細かい技術面でナノマテリアルテクノロジーセンターの研 究員である五十棲規嘉さん、四十万谷智子さん、技術職員である宮里朗夫さんに は大変お世話になりました。この場をお借りして心から御礼申し上げます。

加えて、本研究の殺虫活性実験に関しては共同研究先である城西大学大学院 理学研究科物質科学専攻の森田勇人教授、達城智遥さんに行っていただきまし た。この場をお借りして心から御礼申し上げます。

最後に、博士課程の3年間を精神面から支えてくださった家族や親族の方に この場をお借りして御礼申し上げます。

業績

・学会発表

"Structure and dynamics of LaIT2, a toxic peptide, from Japanese scorpion, *Liocheles australasia*" 第 60 回 NMR 討論会 (国際学会 ISMAR 合同開催) 口頭発表 2021 年 8 月

"ヤエヤマサソリ, Liocheles australasiae, 由来 K⁺チャネル阻害ペプチド毒素 LaIT2 の構造機能相関解析" 第 5 回 NMR 討論会 ポスター発表 2020 年 11 月

"ヤエヤマサソリ, *Liocheles australasiae*,由来 β-KTx ペプチド LaIT2 の溶液構 造解析"日本化学会 近畿支部研究発表会 ポスター発表 2020 年 11 月

"ヤエヤマサソリ由来の抗菌ペプチド LaIT2 の溶液 NMR 構造"第 20 回 日 本蛋白質学会年会 ポスター発表 2020 年 7 月

"K+チャネル阻害ペプチド毒素 LaIT2 の大腸菌発現系構築及び抗菌活性評価" 日本生化学会北陸支部第 38 回大会 ポスター発表 2020 年 6 月 (奨励賞) [1] M. Tamura, C. Tatsushiro, E. H. Morita, S. Ohki, Overexpression and purification of a toxic peptide LaIT2 from Japanese scorpion, *Liocheles australasiae*, *Protein. Expres. Purif* 182 (2021) 105835 1-5.

[2] M. Tamura, C. Tatsushiro, E. H. Morita, S. Ohki, Structural and functional studies of LaIT2, an antimicrobial and insecticidal peptide from *Liocheles australasiae*. *Toxicon* 214 (2022) 8-17.

付録データ

縦緩和(T1)







Delay time (sec)



Delay time (sec)



Delay time (sec)



Delay time (sec)



Delay time (sec)



横緩和(T₂)






付録データ











Delay time (sec)