

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
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/18151">http://hdl.handle.net/10119/18151</a>
Rights	
Description	Supervisor:大木 進野, 先端科学技術研究科, 博士

氏 名	田村 真生
学 位 の 種 類	博士（マテリアルサイエンス）
学 位 記 番 号	博材第 552 号
学 位 授 与 年 月 日	令和 4 年 9 月 22 日
論 文 題 目	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
論 文 審 査 委 員	主査 大 木 進 野 北陸先端科学技術大学院大学 教授
	塚 原 俊 文 同 教授
	山 口 拓 実 同 准教授
	筒 井 秀 和 同 准教授
	宮ノ入 洋 平 大阪大学 准教授

## 論文の内容の要旨

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  $\beta$ -KTx fold (a helix plus an  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$  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  $\text{Ni}^{2+}$ -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; Cys<sup>31</sup>-Cys<sup>51</sup>, Cys<sup>38</sup>-Cys<sup>56</sup>, and Cys<sup>42</sup>-Cys<sup>58</sup>. 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 <sup>1</sup>H 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  $\beta$ -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  $\alpha$ -helix. The results strongly suggested that LaIT2 can form the canonical  $\beta$ -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 <sup>15</sup>N{<sup>1</sup>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  $\beta$ -KTx family members.

Keywords: NMR structure, Scorpion venom, Antimicrobial activity,  $\alpha$ - $\beta$  motif, *E. coli*

## 論文審査の結果の要旨

日本に生息するヤエヤマサソリの毒素から、既に数種類のペプチドが単離精製されている。本学位論文は、そのうちの1つである LaIT2 という生理活性ペプチドの立体構造とダイナミクスを明らかにし、新たに得られた知見に基づいてその作用機序の詳細を理解することを目指したものである。LaIT2 は 59 個のアミノ酸残基から成るペプチドで、抗菌ならびに殺虫活性を有することが知られている。しかし、その立体構造が不明であるため、生理活性の発現機構を分子レベルで議論できなかった。

本論文では、まず、LaIT2 の発現系の構築と精製方法の確立を行った。サソリ毒から単離精製された LaIT2 の分子内には 3 個のジスルフィド (SS) 結合が存在している。そのため、発現させた目的分子の SS 結合の形成が促進されるように工夫した発現系を構築した。精製方法を確立したのち、調製された LaIT2 の SS 結合の位置の同定と抗菌活性の測定を行い、天然の LaIT2 と同等の SS 結合と活性を有することを確認した。

次に、今回確立された手法によって安定同位体 ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) 標識を施した LaIT2 を準備し、多次元 NMR 法を用いた立体構造解析を行った。その結果、LaIT2 は N, C 両末端領域の 2 つのドメインから成り、より詳しくは、N ドメインがランダム構造で C ドメインが  $\alpha$   $\beta$  フォールドを持つことが明らかになった。また、トリフルオロエタノールや脂質を用いた実験から、N ドメインがヘリックス構造をとる能力を有していることも示された。さらに、NMR の緩和解析によって、各アミノ酸残基のダイナミクスを解析した。

最後に、得られた立体構造とダイナミクスの知見をもとに、機能に関与する残基を推定した。推定には BLASTP 検索で見つかった類縁ペプチドのモデル構造も利用した。これをもとにして、K15A、K21A、L53A/L54A という 3 種類の LaIT2 変異体を作製した。これら変異体の生理活性を測定した結果、N ドメインの K15 と K21 は抗菌活性の発現に必要であり、N ドメインの K21 および C ドメインの L53 と L54 は殺虫活性に欠かせない残基であることが判明した。両ドメインがそれぞれ主として抗菌と殺虫の活性を担っているが、N ドメインの K21 は両方の活性に重要な役割を果たしていることが明らかになった。この事実は、両ドメインが協同的に働いて殺虫活性を発現する可能性を示唆している。全ての結果をもとにして、LaIT2 の作用機序に関する考察を行った。

以上、本論文は、生理活性ペプチドの LaIT2 について、その溶液 NMR 構造、ダイナミクス、および生理活性に必要なアミノ酸残基を初めて明らかにしたものであり、学術的に大いに価値がある。よって、博士 (マテリアルサイエンス) の学位論文としての水準を満たしているものと認めた。