

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 ($5.6 \mu\text{g/g body weight}$) 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_v3.2) を $1.77 \mu\text{M}$ 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_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。

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_v3.2 を活性化する

