農薬科学とその周辺 —最近の話題—

Venomics手法による生物毒由来の生理活性ペプチドの探索 —Omicsを駆使する新たなモノトリ—

厳しい環境において生物が生き残るためには、食料の確保が最も重要である。特に肉食動物の場合、動きまわる獲物を捕まえて餌とする必要があるため、それぞれの生物は捕獲のための独自の戦略をもっている。その一つに「毒 (venom)」の使用がある。ヘビ・サソリ・クモなどは有毒生物の代表例であり、その成分のほとんどはペプチドやタンパク質である。これらは、植物の毒成分であるアルカロイドのような有機化合物とは異なり、口から取り込まれると分解するため毒としてはほとんど機能しない。したがって、有毒生物は針や牙を使って venom を獲物に「注射」する。Venom には獲物の動きを瞬時に止めることのできる神経毒、つまりイオンチャンネルに作用して麻痺を引き起こす成分が多く含まれている。これらの成分の多くは低濃度で作用し、かつ標的分子に対する作用特異性が高いことから、医薬・農薬への応用を目指した探索研究が古くからおこなわれている。

サソリやクモなどの節足動物の venom には、一般的に 100 種類を超えるペプチド成分が含まれている。¹⁾ このような混合物から生理活性ペプチドを見出すためには、HPLC などの各

種クロマトグラフィーによる分画ならびに各フラクションの生理活性評価の操作を、単一の活性成分が得られるまで繰り返す必要がある。この方法は bioassay-guided fractionation approach と呼ばれ、生理活性成分を探索するための基本的手法として、これまでに多くの新規活性物質の発見に貢献してきた (図1)。²⁾ この手法においては当然のことながら、活性成分を単離した後に構造決定をおこなう。そのため、最終的に構造の同定にまでたどり着くことができるのは、比較的存在量の多い成分に限られ、微量にしか含まれない成分の場合は単離できても構造決定にまで至らないか、そもそも活性成分として検出されずに見逃されているものが多いと考えられる。この問題を克服するために考えられたのが venomics 手法による探索である。³⁾

Venomics 手法による生理活性ペプチド探索において、最も重要な実験が毒腺トランスクリプトーム解析である。毒腺は毒素を生産・貯蔵する組織であり、ここで遺伝子の転写産物である mRNA (トランスクリプト) が翻訳されて毒素ペプチドが合成されている。トランスクリプトームとは、ある特定の組織や細胞で発現する mRNA の総体を意味するものであり、未

図1. 生物毒由来の生理活性ペプチドの探索手法の比較

知遺伝子の機能解明を目的として、網羅的な遺伝子発現量の比較解析がおこなわれることが多い。一方、毒素研究においては、毒腺で発現するペプチドの配列情報の取得がトランスクリプトーム解析の主な目的である。⁴⁾ ゲノム情報のない非モデル生物種であっても、短時間で大量の塩基配列データを取得することができる次世代シーケンサー (NGS) の登場によって、ほぼすべての mRNA の配列情報を取得することが可能となった。しかしここで問題となるのが、NGS によって得られる配列情報の信頼性の低さである。NGS による解析では、短い配列をつなぎ合わせて mRNA の全長配列を推定するため、間違っただけの配列を含んでいる場合が少なくない。さらに、全長配列にはシグナル配列などが含まれており、それらを取り除いた成熟型構造の推定も必要である。つまり、venom 中で存在する実際の構造を、ペプチドレベルで確認する必要がある。ここで重要となるのが質量分析計によって得られる情報である。ペプチド混合物の質量分析計による網羅的解析はペプチドーム解析と呼ばれ、それぞれの成分の質量情報が得られるだけでなく、MS/MS 測定によって配列情報も得ることができる。したがって、トランスクリプトーム解析とペプチドーム解析の情報を組み合わせることで、venom 成分の成熟型構造を決定することができる。それぞれの成分の構造が明らかとなれば、既知毒素との類似性から生理活性について推測することが可能である。ここまで分かった後、それぞれのペプチドを合成して必要量を確保した上で、予想した活性をもつかどうかを確認する (図1)。多くの天然由来の有機化合物は構造が複雑で合成が困難であるため、このような戦略は取りにくい。一方、ペプチドは合成が比較的容易であるため、活性不明のまま構造決定し、その後合成して活性評価するという手順が実現可能である。

しかしながら、venom 成分の生理活性は必ずしも既知毒素との類似性から推測できるわけではない。さらには、venom のもつ生物学的役割 (獲物の捕獲・天敵に対する防衛) とは無関係の生理活性を持つことも十分考えられる。そこで、venom 成分を構造多様性の高い化合物ライブラリととらえ、創薬を目的としたスクリーニングによって、新たなシード化合物を探索しようとする研究もおこなわれている。その代表的な研究が EU の巨大プロジェクトとしておこなわれ、その成果が最近報告された。⁵⁾ この研究では、計 191 種の生物から得られた venom が用いられており、この中にはサソリやクモなどの節足動物はもちろんのこと、ヘビ・トカゲなどの爬虫類、イモガイ・エイなどの海洋生物を由来とする venom が含まれ、生物種の多様性が高いのが特徴である。上述した venomics 手法にしたがって、それぞれの生物について毒腺トランスクリプトーム解析およびペプチドーム解析がおこなわれた結果、約 2 万種類のペプチド成分 (1 つ以上のジスルフィド結合を含んでいる) の配列が同定された。このうち構造多様性を考慮して選抜された 5,923 種について、化学的あるいは大腸菌発現系による合成が試みられ、最終的に 1 年半で 3,579 種の合成に成功している。

この venom ペプチドライブラリを用いて、肥満に関与する G 蛋白質共役受容体 (GPCR) である 4 型メラノコルチン受容体に対する結合活性を指標としたスクリーニングがおこなわれた結果、286 種 (8%) のペプチドが活性を示した。そのうちの 2 種について各種メラノコルチン受容体に対する活性が詳細に調べられ、これらが特に 1 型メラノコルチン受容体に対する顕著なアゴニスト作用を持つことが明らかにされた。この研究で作製された venom ペプチドライブラリは、他の活性を指標としたスクリーニングにも活用することができるため、今後新たな生理活性ペプチドの発見が続くものと期待されている。

以上のように、venom 成分のもつ多様な構造を十分に生かし、従来の方法では見逃されていた活性成分を見出すための新たな手段として venomics 手法への期待は高い。多種類のペプチドを迅速かつ大量に合成する技術、ならびにその活性評価を効率的におこなうための手法の開発が、今後の venomics 手法の成功の鍵を握っているだろう。

引用文献

- 1) M. Miyashita, J. Otsuki, Y. Hanai, Y. Nakagawa and H. Miyagawa: *Toxicom* **50**, 428–437 (2007).
- 2) F. Bucar, A. Wube and M. Schmid: *Nat. Prod. Rep.* **30**, 525–545 (2013).
- 3) J. R. Prashanth, N. Hasaballah and I. Vetter: *Neuropharmacology* **127**, 4–19 (2017).
- 4) M. Miyashita, N. Mitani, A. Kitanaka, M. Yakio, M. Chen, S. Nishimoto, H. Uchiyama, M. Sue, H. Hotta, Y. Nakagawa and H. Miyagawa: *Toxicon* **191**, 25–37 (2021).
- 5) S. Reynaud, J. Ciolek, M. Degueldre, N. J. Saez, A. F. Sequeira, Y. Duhoo, J. L. A. Brás, H. Meudal, M. Cabo Díez, V. Fernández Pedrosa, M. Verdenaud, J. Boeri, O. Pereira Ramos, F. Ducancel, M. Vanden Driessche, R. Fourmy, A. Violette, G. Upert, G. Mourier, A. G. Beck-Sickinger, K. Mörl, C. Landon, C. M. G. A. Fontes, R. Miñambres Herráiz, R. C. Rodríguez de la Vega, S. Peigneur, J. Tytgat, L. Quinton, E. De Pauw, R. Vincentelli, D. Servent and N. Gilles: *J. Med. Chem.* **63**, 8250–8264 (2020).

(宮下正弘* 京都大学大学院農学研究科)

*E-mail: miyashita.masahiro.6e@kyoto-u.ac.jp

略歴

宮下正弘 (みやした まさひろ)

生年月日: 1970 年 6 月 30 日

最終学歴: 京都大学大学院農学研究科博士課程

研究テーマ: 生理活性ペプチドの探索

趣味: サッカー、コーヒー (焙煎から)