

京都大学教育研究振興財団助成事業 成 果 報 告 書

2019年 4月25日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団
会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 農学研究科

職 名 准教授

氏 名 宮下 正弘

助 成 の 種 類	平成30 年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	抗ウイルス活性を示すサソリ毒液由来新奇物質の構造と機能			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	圃場の光環境におけるC4植物葉肉葉緑体の配置と光合成関連形質の動態 解析			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、 添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品費	1,000,000	

当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 助成金による支援をしていただき、誠にありがとうございました。30年度は科研費が獲得 できず、研究の継続が危ぶまれる状況でしたが、本助成によって着実に研究を進展させ ることができました。おかげさまで、今年度は科研費が無事採択されました。安定した研 究の遂行にとって貴重な本制度が、今後も維持・継続されるようお願い申し上げます。			

成果の概要／宮下正弘

【背景・目的】

C型肝炎はC型肝炎ウイルス(HCV)に感染することで発症する疾患である。HCVに感染した肝臓は多くの場合で持続感染状態となり、自覚症状のないまま慢性肝炎、肝硬変、肝がんへと進行していくことから、その早期発見・治療が重要である。近年、HCVの増殖を特異的に阻害する新規薬剤の開発によってC型肝炎の治癒率は90%以上まで向上している。しかし、薬価の高さや耐性株への対策といった問題は依然として残っており、新たなC型肝炎治療薬の開発が求められている。

創薬研究において、天然化合物ライブラリーからの活性化合物の探索は重要な実験の一つである。中でも、有毒生物(サソリ、ヘビ、クモなど)の毒液に含まれる生理活性成分にはイオンチャンネルに作用する分子が多く含まれており、それぞれのチャンネル分子の機能解明のためツールとして有用であることが知られている。一方で、これらの毒液には、抗ウイルス活性を示す成分も含まれていることが知られており、新規抗ウイルス剤の開発につながる成分の発見が期待されている。当研究室では、日本に生息するヤエヤマサソリ(*Liocheles australasiae*)の毒液から、これまでに様々な生理活性をもつ成分の同定に成功している。そこで本研究では、ヤエヤマサソリ毒液に含まれる抗HCV成分の探索をおこない、その一次構造を質量分析データおよび毒腺トランスクリプトーム情報を利用して同定した。

【方法・結果】

ヤエヤマサソリ毒液全体での抗HCV活性を調べた結果、0.01 µg/mlという低濃度で活性を示した。このことから、この毒液に高活性の抗HCV成分が含まれることが明らかとなった。そこで、毒液中において抗HCVを示す成分を特定するため、逆相HPLCを用いて毒液を分画し、各画分の抗HCV活性を評価した。その結果、一つの画分に強い活性が見られた。この画分には約2000 Daと約13,000 Daの成分が複数含まれることが分かった。これらの成分の中から活性本体を特定するため、限外濾過によって分子量10 kDa以上の成分とそれ以下の成分に分画した。それぞれの画分について、抗HCV活性評価をおこなったところ、分子量10 kDa以上の画分が顕著な活性を示した。このことから、約13,000 Daの成分が抗HCV活性の本体であることが示唆された。そこで、さらにHPLCによる分離条件を検討した結果、この成分を高純度で精製

することに成功した。続いて、この成分の同定のための実験を進めた。まず、この成分に含まれると考えられるジスルフィド結合を切断し、これを質量分析計によって分析したところ、二つの成分が検出された。このことから、この分子がジスルフィド結合によって結合した二つのサブユニットで構成されていることが明らかとなった。さらにアミノ酸配列の決定するため、これを酵素消化して得られた断片ペプチドを質量分析計によって分析した。その結果、一部の断片ペプチドについてその配列を決定することができた。この配列情報をもとにして、すでに次世代シーケンサーを用いて得られている毒腺で発現する全トランスクリプトーム配列情報から検索した。その結果、この抗ウイルス活性成分は、ある酵素活性をもつタンパク質と類似していることが分かった。ヘビ毒やハチ毒由来のタンパク質成分が抗ウイルス活性を示すことがこれまでに報告されているが、サソリ毒によるものは今回が初めての例である。さらに、質量分析計による構造解析を進めた結果、この分子には糖鎖が含まれていることも明らかとなった。

ヘビ・ハチ毒由来の抗ウイルス活性成分は、その酵素の活性阻害剤の処理によってその活性が抑制されることが知られている。そこで、ヤエヤマサソリ由来の酵素に対しても阻害剤処理をおこない、その抗 HCV 活性に対する抑制効果を調べた。その結果、活性は約 30 分の 1 に低下したことから、ヤエヤマサソリ毒液中に含まれる抗 HCV 成分がこの酵素活性によるものであることが確認できた。また、HPLC によって得られたピーク面積から、活性試験に供した量を推定し、その活性の強さを定量的に評価したところ $IC_{50}=1.2 \text{ ng/mL}$ であると算出され、この成分が極めて高い抗 HCV 活性を持つことが明らかとなった。

以上の成果は、国内外の学会において発表を予定しており、国際誌への投稿も準備中である。