

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 9日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21603006

研究課題名（和文）海産活性天然物を中心とした生体内生存ネットワークの解明

研究課題名（英文）Investigation of survival system of marine invertebrates via bioactive marine natural products.

研究代表者

福沢 世傑 (FUKUZAWA SEKETSU)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：40321806

研究成果の概要（和文）：強力な細胞毒オカダ酸を大量に蓄積しているクロイソカイメンは、体内にオカダ酸と結合する3種類の分子量22 kDaのタンパク質混合物（OABP2）が存在する。このうちOABP2.1は189アミノ酸残基からなり、カルシウム結合タンパク質SCBP2と26%の相同性を持つ。本研究ではOABP2.1/オカダ酸複合体の構造を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Okadaic acid (OA) is a marine polyether cytotoxin, which was isolated from the marine sponge, *Halichondria okadai*. The crystal structure of okadaic acid binding protein 2.1 (OABP 2.1) in complex with OA was solved.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学、ケミカルバイオロジー

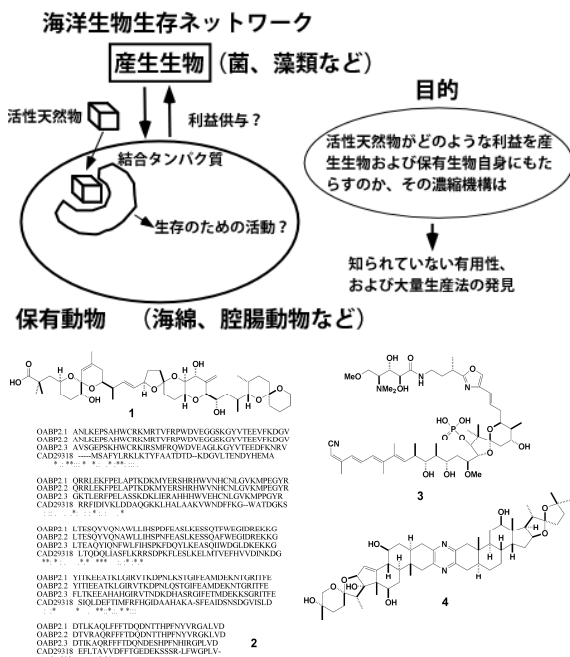
キーワード：活性天然物、アフィニティーカラム、リテラジン B、カリクリン A、オカダ酸、結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

周囲を海に囲まれ亜熱帯から亜寒帯までに存在する我が国は多彩な海洋資源に恵まれ、海洋天然物化学の分野において世界をリードする立場にある。海洋生物からはこれま

で毒性スクリーニングなどの簡便な生物試験法で多くの活性天然物が単離され、医薬品のリード化合物や生体機能解明のための試薬として発展していったものも少なくない。しかしながら海洋生物由来のこれら活性天

然物は特異な構造を持つものが多く、常に量的供給という課題がさらなる応用研究の前に立ちはだかっている。これを解決するため、化学合成や生合成遺伝子のクローニングによる物質生産などの研究が盛んに行われているが、生産コストの問題があり、決定的な解決法とはなっていない。以上の背景の中で構造的にも活性的にも特異なこれらの化合物をなぜ海洋生物は産生し、そして保有するのか。産生、保有生物間に介在する活性天然物はどのような働きをするのか、そして保有生物への濃縮機構はどのようにになっているのか。今一度、海洋生物の生息環境という原点に立ち返って、この二点を明らかにすることは海洋生物の生存ネットワークを知る学術的な目的以外にも、我々がまだ知らない有用性の発見や、大量生産の解決法をもたらす可能性がある。



その一例として、オカダ酸(1)はクロイソカイメン *Halichondria okadai* より単離同定された細胞毒 (*J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2469.) でタンパク質脱リン酸化酵素の強力な阻害剤 (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *159*, 871.) として多くの分野で研究に用いられて

いる。タンパク質脱リン酸化酵素は生物普遍的に存在し、クロイソカイメンにとっても毒であると考えられる。実際、クロイソカイメンより OABP1 と命名されたタンパク質脱リン酸化酵素と相同性の高いタンパク質が単離されている。よって、オカダ酸と結合して無毒化する結合タンパク質が存在するという作業仮説に基づき OABP2 (2) (*Biochemistry* **2007**, *46*, 11410.) がクロイソカイメンから単離同定された。オカダ酸は渦鞭毛藻が産生していることが報告されており (*Nihon Suisan Gakkaishi* **1982**, *48*, 69.)、クロイソカイメンに含まれているオカダ酸についてもクロイソカイメン自身が産生しているのではなく共生微生物が産生している可能性が高い。よってこのような活性天然物の結合タンパク質の存在は活性天然物の産生、運搬、蓄積に重要な役割をしていると考えられる。よって海洋生物の生存ネットワーク全貌の理解の糸口として、活性天然物結合タンパク質の探索は重要であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者は以上のような観点からカリクリン A (3)、リテラジン B (4) についても保有動物内に結合タンパク質が存在するとの作業仮説に基づき、その探索を本研究課題の目的とした。カリクリン A (*J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2780.) はオカダ酸と構造上の類似性が全くないにもかかわらず、同様にタンパク質脱リン酸化酵素を強力に阻害する (*Biochem. J.* **1995**, *306*, 657.)。カリクリン A を産生する微生物の報告はなされていないが、オカダ酸結合タンパク質 OABP2 との比較の上からも、その結合タンパク質の単離同定は大いに興味がある。またリテラジン B (4) は強力な細胞毒性を有するにもかかわらず、

その細胞毒性の作用機序が依然不明のままである (*J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4484.)。リテラジンBについても結合タンパク質を探索することは、その生物活性を理解する上でも重要であり、その過程で細胞毒性の活性発現機構が解明できるかもしれない。従来、細胞毒性を持つ活性天然物の作用機序解明は偶然に頼ることが多かった。様々な酵素阻害実験を行って探し当てるか、もしくは初めにアッセイ系を組んで、それにかかる生物種をスクリーニングするかのどちらかであった。現在では、様々な生物種のゲノムプロジェクトが進み、ゲノムの全塩基配列データの蓄積がなされており、活性天然物の保有動物からの結合タンパク質を探索し同定した方が近道となった。実際、OABP1はこれによってタンパク質脱リン酸化酵素と推定された。

申請者はある活性天然物を保有している海産無脊椎動物の生息環境をまず考え、なぜこの生物はこの化合物を持たねばならないのかという疑問から本申請課題に取り組む。そして自身を産生生物に置き換えて考えることからその化合物の意義を考えていく。当初、活性天然物の結合タンパク質は毒性に対する自己耐性の獲得という説を考えていた。しかしながら、多くの活性天然物は保有動物が産生しているのではなく、それに共生している微生物が産生しているという考えが現在では主流となっている。よって、結合タンパク質は自己耐性以外の役割、例えば産生生物と保有動物間での活性天然物の移動・運搬、または保有動物内濃縮に関与している可能性もある。海産活性天然物の体内動態については未解明な部分が多く、活性天然物を中心とした生存ネットワークの理解は大いに興味を持たれる。海洋生物の生態の理解にとどまらず、様々な生物のゲノムの塩基配列が次々と明らかにされた今日、結合タンパク質

(リテラジンBについては細胞毒性の標的も含む)のアミノ酸配列から相同性検索により機能未知の遺伝子発見につながる可能性を秘めている。すなわち海洋生物から陸上生物そしてほ乳類、ヒトへボトムアップ的に研究を進展させる道が切り開かれるのではないかと考える。そして今までに知られていなかった機能を有するタンパク質の発見、そしてそこから医薬品や有用物質への裾野が広がるのではないかと期待している。かつて新規活性天然物の探索は医薬品のリード化合物探索にたえられてきた。活性天然物の結合タンパク質探索もそれに準ずる位置づけではないかと考える。

本研究課題では申請者がこれまで携わってきたカリクリンA、リテラジンB結合タンパク質の探索を3年間にわたって行う。

3. 研究の方法

カリクリンAとリテラジンBの保有動物である式根島海綿 *Discodermia calyx* と伊豆半島産群体ホヤ *Ritterella tokioka* から、前述のプロープを用いて結合タンパク質の探索を行う。これら生物試料は申請者が採集し、凍結保存している。定法に従い、海綿 *Discodermia calyx* と群体ホヤ *Ritterella tokioka* をそれぞれ緩衝液中で破碎し、遠心分離して可溶性画分と沈殿画分に分離する。オカダ酸結合タンパク質の場合は可溶性画分に存在したので、同様に可溶性画分を優先的に調べていく。硫酸沈殿を行い、30、50、70、90%硫酸沈殿画分を得る。各画分の一部をとり、90°C30分間の熱処理したものとしめないものについてマウス白血球細胞 P388 に対する細胞毒性試験を行う。カリクリンAとリテラジンBが結合タンパク質と結合して無毒化されているとするならば、熱処理によってタンパク質を失活させ、これら細胞毒が遊離することで熱処理前よ

りも細胞毒性が強くなることが予想される。これによってどの画分にこれら細胞毒とその結合タンパク質が存在するかのスクリーニングが可能となる。そして変化のみられた画分についてアフィニティークロマトグラフィーで特異的相互作用するタンパク質の精製を試みる。またカリクリン A は分子内にポリエン構造を有し、340 nm 付近に特徴的な極大吸収を有するので、各タンパク画分の紫外可視吸収スペクトルを測定することでスクリーニングも可能である。さらにタンパク画分をクロロホルムで細胞毒のみを抽出し、逆相 HPLC における保持時間および MALDI 型質量分析計で細胞毒の検出も結合タンパク質精製の指標となるのでこれらも併用して結合タンパク質を追跡していく。

カリクリン A とリテラジン B に特異的に結合するタンパク質が電気泳動上で確認できたら、質量分析により、全長の分子量と酵素消化物のアミノ酸配列解析を行う。そしてその配列情報を元に縮重プライマーを設計し、R-PCR により cDNA の塩基配列を決定する。そしてデータベース検索による機能予測、リコンビナントタンパク発現による相互作用部位解析および X 線結晶構造解析をおこない、保有生物内での存在意義を考察する。

4. 研究成果

①オカダ酸結合タンパク質 OABP2.1 の X 線結晶構造解析

オカダ酸結合タンパク質 OABP2 は OABP2.1, OABP2.2, OABP2.3 の 3 種類の分子量 22 kDa のタンパク質アイソフォーム混合物として単離された。これらアイソフォーム相互の変性を伴わない単離は困難であったため、このうち 189 アミノ酸残基からなる OABP2.1 を大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質として発現させたところ、オカダ

酸との解離定数は $K_d = 1.8 \text{ nM}$ であった。OABP2.1 は他の PP2A 阻害剤とは競争結合阻害を示さないが、OABP2.1 がオカダ酸の毒性を抑制していることが示唆された。本研究では OABP2.1 がクロイソカイメンのオカダ酸耐性にどう関与しているのかを知るために、OABP2.1・オカダ酸複合体の構造を明らかにした。

OABP2.1 は GST (glutathione-S-transferase) との融合タンパク質 (GST-OABP2.1) として発現させた。宿主としては大腸菌 BL21-star 株を用い、かつ大腸菌で使用頻度の少ないコドン (レアコドン) を読む tRNA を共発現させることで、GST-OABP2.1 を大量発現させ、グルタチオンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーで精製後、GST タグを酵素にて切断した。続いて、得られたリコンビナント OABP2.1 を陰イオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーにて精製した。精製した OABP2.1 をオカダ酸と結合させ、限外濾過にて濃縮後、透析で遊離のオカダ酸を除去したのちに結晶化を試みた。緩衝液、添加剤、沈殿剤など種々条件を検討し、最も X 線結晶構造解析に適した単結晶を得ることができた。X 線照射は放射光施設で行った。得られた回折像よりその構造を明らかにすることに成功した (福沢他、投稿準備中)。

OABP2.1 の一次構造による相同性タンパク質の検索ではカルシウム結合タンパク質 SCBP2 と 26% の相同性があることが判明していたが、OABP2.1 自身にカルシウム依存性はなかった。本結晶構造解析の結果、全体の高次構造はオワンクラゲ由来の発光タンパク質イクオリンと酷似していた。イクオリンは OABP2.1 と同じ 189 残基を有するカルシウム結合タンパク質で、分子内に 4 個のカルシウム結合部位 EF ハンドを持つ。OABP2.1 はイクオリンの EF ハンドに相当する部分の配

列が変異し、カルシウム結合能が消失していた。また OABP2.1 のオカダ酸結合状態はイクオリンが発光基質であるセレンテラジンを分子内に内包している状態と同一であった。

得られた OABP2.1・オカダ酸複合体の結晶構造より、オカダ酸はヘリックス構造に囲まれたタンパク質分子中央に埋め込まれた形で結合していることが判明した。一方、オカダ酸の生物活性の標的である PP2A 触媒サブユニットには表面の窪みにはめ込まれた形で結合している。オカダ酸を中心にこの2種類のタンパク質を重ね合わせると、全く結合様式が異なることがわかった。

OABP2.1 はどのような機構でオカダ酸を分子内に取り込むのか。オカダ酸結合前後における OABP2.1 の CD スペクトルを比較したところ、ヘリックス構造とターン構造はほとんど変化せず、シート構造が減少し、ランダムコイル状態が増大していた。結晶構造の中でオカダ酸は溶液中で想定された通り、1 位のカルボン酸と 24 位のアリルアルコールで分子内水素結合を形成した籠型コンフォメーションをとっており、この部分を OABP2.1 の2つのアルギニン残基が挟み込むような形で水素結合していた。CD スペクトルからはオカダ酸の結合前後で、ヘリックス構造に変化はないので、C 末端のランダムコイル部分が開閉弁の役割をしてオカダ酸をタンパク質内部の空隙に取り込む役割をしていることが推察される。すなわち C 末端領域はオカダ酸を取り込む前はβシート構造をとり、何らかの刺激でコンフォメーション変化が起きて、オカダ酸を取り込むという機構を想定している。

海産無脊椎動物はどのような機構で外来の異物に抗して自らの生存をはかっているのだろうか。OABP2.1 とイクオリンの高次構造が酷似しているという事実はひとつの解を与え

ている。すなわち、この2つのタンパク質はカルシウム結合タンパク質 SCBP2 を祖先に持ち、それぞれ宿主である無脊椎動物の生存のために進化したのではないかと考えられる。固着生活を送り、かつ多くの共生微生物を住まわせている海綿動物は必然的に自らの栄養以外の有機物を自らの防御に使う毒として体内に取り込む。OABP2.1 にはカルシウム依存性はなく、一旦取り込んだオカダ酸はアセトン沈殿のような強い疎水性環境に曝さないと放出されない。OABP2.1 がクロイソカイメン内に比較的大量に存在する事実は細胞毒であるオカダ酸を取り込み非活性化することで、その毒性を消去する役割を担う存在であることを強く示唆している。そしてカルシウム結合タンパク質の保存性の高さを考えると、他の海綿動物も含有する毒（生物活性物質）の形に合わせて空隙の大きさを変異させた類似のタンパク質を保有していると思われる。

②カリクリン A 結合タンパク質の探索

カリクリン A をリガンドとするアフィニティー担体を合成した。カリクリン A とその結合タンパク質の結合定数が各種タンパク質分画操作で解離しないほど大きいと仮定し、各種分画後のタンパク質画分から紫外可視吸光スペクトルまたはマスマスペクトルによりカリクリン A を検出し、目的のタンパク質を追跡することに加え、合成した担体によるアフィニティークロマトグラフィーによって結合タンパク質を探索した。*D. calyx* の抽出液を疎水性クロマトグラフィーに処したところ、カリクリン A が検出された。また、この画分は脱リン酸化酵素活性を有し、SDS-PAGE において 37 kDa 付近にバンドを与えた。

③リテラジン B 結合タンパク質の探索

RB に含まれる誘導可能な官能基は二級ヒドロキシ基のみであり、立体障害等によってその反応性も高くないことから、RB の誘導化は非常に困難であった。そこで、酸塩化物を用いて RB にアジド基を導入し、続いてヒュスゲン環化反応を用いることによってこの問題点を解決することを目指した。その結果、RB の樹脂上への固定化を達成し、アフィニティープローブを得ることが出来た。

次に、群体ホヤを緩衝液中で破碎し、遠心分離によって可溶性画分を得た後、アセトン沈殿処理を行うことで内在性の RB を取り除き、合成したプローブを用いて精製を行ったところ、数種類のタンパク質が電気泳動ゲル上で確認された。さらに候補を絞り込むために競合阻害によって差を検出することで、RB 結合タンパク質の有力な候補を見出すことが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 前田高宏・福沢世傑・橘和夫、伊豆半島産群体ホヤ *Ritterella tokioka* 由来リテラジン B の結合タンパク質の探索、日本化学会第 92 年会、横浜、2012 年 3 月 27 日。
- 2) 福永泰隆・前田高宏・福沢世傑・橘和夫、伊豆半島産群体ホヤ *Ritterella tokioka* 由来リテラジン B の、同ホヤでの結合タンパク質の探索、日本化学会第 91 年会、横浜、2011 年 3 月 29 日。
- 3) 三宅晴子・福沢世傑・橘和夫、「海綿 *Discodermia calyx* 由来カリクリン A の同海綿での結合タンパク質の探索」、日本化学会第 91 年会、横浜、2011 年 3 月 28 日。
- 4) Seketsu Fukuzawa, Marie Makino, Koichiro Kodama, Haruhiko Ehara, Takuhiro Ito,

Shun-ichi Sekine, Shigeyuki Yokoyama, Kazuo Tachibana. Structural elucidation of okadaic acid binding protein 2.1. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, USA, Dec 18th, 2010.

- 5) 福沢世傑、「クロイソカイメン由来オカダ酸結合タンパク質 OABP2.1 の X 線結晶構造解析」、第 5 回化学生態学研究会、函館、2010 年 6 月 12 日。
- 6) Seketsu Fukuzawa. Symbiotic relationship through norzoanthamine, an anti-osteoporotic marine alkaloid. The 17th NTU-SNT-UT Chemistry Symposium. Taipei, ROC, May 14th, 2010.
- 7) 牧野満理瑛、児玉公一郎、福沢世傑、関根俊一、横山茂之、橘和夫、「オカダ酸結合タンパク質 OABP2.1 の構造解析」、日本化学会第 90 年会、吹田、2010 年 3 月 26 日。

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/natural/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福沢 世傑 (FUKUZAWA SEKETSU)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：40321806

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし