

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780175

研究課題名（和文） フジツボ類に対する付着阻害物質作用時の標的蛋白質の解明、およびプロテオーム解析

研究課題名（英文） Analysis of the target protein which interacts with an anti-fouling isocyanide and proteomic analyses when anti-fouling substances acted against to the barnacle cyprid

研究代表者

北野 克和 (KITANO YOSHIKAZU)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：10302910

研究成果の概要（和文）：

フジツボキプリス幼生の付着阻害活性発現メカニズム解明を目的として、付着阻害活性を有する化合物のキプリス幼生に対する標的タンパク質を解明すること、および付着阻害物質作用時におけるキプリス幼生のプロテオーム解析を目的とした検討を行った。その結果、付着阻害活性発現に重要な官能基であるイソシアノ基に相互作用するタンパク質として、分子量 53 KDa のタンパク質が存在することが観察された。

研究成果の概要（英文）：

Bio-organic studies were carried out to elucidate the mechanism for the expression of anti-fouling activity against the cyprid larva of the barnacle. Analysis of the target protein which interacts with anti-fouling active isocyanides and proteomic analyses when anti-fouling substances acted to the barnacle cyprids were examined. As a result, it was suggested that there was a 53 KDa protein which interacts with an isocyanide compounds.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：フジツボ、キプリス幼生、付着阻害活性、イソシアノ基、イソニトリル

1. 研究開始当初の背景

(1) フジツボ、イガイ、ヒドロ虫などの海洋付着生物は、発電所の冷却システム、魚網、および船底などに付着し、様々な被害を与えている。これら生物の防除には、従来有機スズ化合物や、亜酸化銅化合物を含む防汚塗料が主に使われてきた。しかしながら、有機スズ系防汚塗料は、様々な環境汚染が明らかに

なり日本国内では全面的に使用が禁止され、世界的にも使用禁止の方向で協議が進められている。また、亜酸化銅系防汚塗料についてもその蓄積による環境への影響が問題視されはじめ、近年多くの環境汚染に関する報告がある。そのため、新たなコンセプトに基づく“環境にやさしい”付着防除剤の開発が強く望まれている。

(2) これまでに申請者は、“環境にやさしい”付着防除剤の開発を目指した一連の研究として、付着阻害活性を有する天然物の合成、付着阻害活性に関する構造－活性相関の考察を行った結果、イソシアノ基が付着阻害活性発現に重要であることを明らかにした。そして、多くの有効な付着阻害活性を有するイソニトリル化合物を創製するとともに、現在も引き続き実用化へ向けた様々な検討を行っている。

(3) また付着阻害活性化合物の創製を行うとともに、付着阻害活性発現メカニズムの解明を目的とした研究を行い、ある種のイソニトリル化合物がタテジマフジツボキプリス幼生の油球部分に特異的に取り込まれることを見出した。この付着阻害活性発現メカニズムの解明を目的とした研究は、蛍光プローブ化合物を用いて行われたが、蛍光顕微鏡の観察下において、キプリス幼生の油球部分に蛍光標識化合物が特異的に取り込まれたことから作用部位を特定した。しかしながら、作用部位は明らかになったものの、どのようなタンパク質に相互作用し付着阻害活性を発現しているのか等については、まだ明らかにされていない。

(4) ここで、付着阻害活性発現メカニズムを解明していくためには、タンパク質レベルでの研究は必要不可欠であり、標的タンパク質の解明は、より効率的な付着阻害剤の開発に大きく貢献することが期待される。そこで今回、これまでの研究の発展として、キプリス幼生に対するイソニトリル化合物の標的タンパク質の解明を目指すに至った。

(5) 一方で、イソニトリル化合物以外にも付着阻害活性を発現するものも多くあるが、油球への作用はイソニトリル化合物特有のものであり、他の作用メカニズムにより付着阻害活性を発現している可能性も示唆されていた。そのことから考察すると、付着阻害物質作用時においてフジツボキプリス幼生内のタンパク質発現等になんらかの差が出ている可能性が考えられる。そこでさらには、付着阻害活性物質作用時におけるタンパク質発現等の違いを調べるために、フジツボキプリス幼生のプロテオーム解析も目指すに至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、これら海洋付着生物に対する“環境にやさしい”付着防汚剤開発への応用を視野に入れた、ケミカルバイオロジー的アプローチによる付着阻害活性発現メカニズムの解明を目指したもので、付着阻害活性を有する化合物のフジツボキプリス幼生に対

する標的タンパク質を解明すること、さらには付着阻害物質作用時におけるキプリス幼生のプロテオーム解析を目的とした。具体的な検討項目は以下の2点とした。

(2) 付着阻害活性物質の作用する標的タンパク質の解明；前述の申請者らのイソニトリル化合物を含めて、フジツボ類に対する多くの種類の付着阻害活性を有する化合物が報告されている。しかしながら、それら化合物がどのようなタンパク質に作用するかについては全く明らかにされていない。標的タンパク質が解明できれば、付着阻害活性発現メカニズムの解明に大きく前進することとなり、またそのタンパク質に相互作用する化合物を探索する新たなアプローチにより付着阻害活性化合物の開発を行うことができることから、“環境にやさしい”付着阻害剤の開発に大きく貢献できると考える。ゆえに、本研究ではアフィニティプローブの創製、標的タンパク質の単離、そして構造決定をするという一連の流れにより標的タンパク質の構造を明らかにすることを目的とした。

(3) 付着阻害活性物質作用時におけるフジツボキプリス幼生のプロテオーム解析；前述のように、付着阻害活性を有する化合物として、多種多様な構造が報告されている。しかしながら、油球部分への作用はイソニトリル化合物に特異的なものであることから、他種の付着阻害活性物質の標的タンパク質は異なるものであり、また付着阻害活性発現のメカニズムも多様の可能性がある。そこで、数種類のタイプの付着阻害物質を用いて、それら化合物の作用時におけるキプリス幼生の発現タンパク質の解析を行う。この解析により、付着阻害活性発現時における共通のタンパク質発現等が明らかになれば、“環境にやさしい”付着阻害剤の開発だけでなく、付着生物研究に新たな展開をもたらすことが期待される。ゆえに、本研究では二次元電気泳動法、質量分析装置中心に用いることによって、付着阻害活性物質作用前と、作用後におけるキプリス幼生のタンパク質発現にどのような変化が生じるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究は、フジツボキプリス幼生の付着阻害活性発現メカニズムの解明を目標として、付着阻害活性を有するイソニトリル化合物の標的タンパク質を解明すること、および付着阻害物質作用時におけるキプリス幼生のプロテオーム解析を行うことを計画して以下の検討を行った。

(2) 光反応性基を導入した付着阻害活性型蛍光プローブの創製；まず、標的タンパク質

の解明に必要なアフィニティプローブとして、付着阻害活性発現部分(イソシアノ基)、光反応性基(ベンゾフェノン等)、および蛍光基(ダンシル基)を有するか等物を数種類創製した。

(3) 上記(2)で創製したアフィニティプローブと、フジツボキプリス幼生のタンパク質粗抽出液とを相互作用させ、電気泳動解析により特異的に親和したタンパク質の解析を行った。

(4) プルダウンアッセイによるイソシアノ基に特異的に親和するタンパク質の解析; 上記(2)とは別の方法として、アフィニティカラムによりタンパク質を解析するために、表面を付着阻害活性発現官能基(イソシアノ基)で修飾したビーズを作成し、アフィニティカラムを作成した。

(5) 上記(4)で作成したアフィニティカラムを用いて、フジツボキプリス幼生のタンパク質粗抽出液のプルダウンアッセイをした後、電気泳動を行うことによって標的タンパク質を解析した。

(6) 付着阻害物質作用時におけるフジツボキプリス幼生内のプロテオーム解析; イソニトリル化合物を含めて他の数種類の付着阻害活性物質をフジツボキプリス幼生に作用させた後に、キプリス幼生の全体的なタンパク質の発現について二次元電気泳動法、質量分析装置により解析を行った。ここでは、イソニトリル基を有していなく油球部分に作用しないと考えられる付着阻害活性物質についても同様の解析を行い発現タンパク質について比較を行うことを計画した。

4. 研究成果

(1) 光反応性基を導入した付着阻害活性型蛍光プローブによる標的タンパク質解析については、蛍光プローブとして、ベンゼン環を介して、蛍光基(ダンシル基など)、光反応性補助基(アジド)、およびイソシアノ基の3種類の部分構造を有するプローブの創製を行った。その結果、プローブの合成自体は行えたが、フジツボキプリス幼生に特異的に作用するプローブは得られなかった。

(2) プルダウンアッセイによるイソシアノ基に特異的に親和するタンパク質の解析については、イソシアノ基を有するアフィニティプローブを作成した後、フジツボキプリス幼生を粗抽出液を用いたプルダウンアッセイにより行った。その結果、電気泳動解析により、分子量 53 kDa にプローブに特異的に作用するタンパク質が存在することが観察

された。なお、このタンパク質については、データベースによる解析結果では、cytochrome P450 である可能性が示唆されたが、詳細な構造は現在解析中である。

(3) 付着阻害物質作用時におけるキプリス幼生のプロテオーム解析を目的とした検討については、これまでに高い付着阻害活性を示したイソニトリル化合物を用いて、付着阻害物質作用前と作用後におけるフジツボキプリス幼生内の二次元電気泳動解析を行った。しかしながら、発現タンパク質について、明確な解析を行えるまでには至らなかった。

(4) 今後、本研究の結果を基にして、同様のアフィニティプローブを用いた作用タンパク質の解析と、詳細な二次元泳動解析を行うことによって、フジツボキプリス幼生の付着阻害活性発現メカニズムが解明されることが期待される。

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1件)

- ① 北野 克和、秋間 千佳、吉村 えり奈、野方靖行、「Anti-barnacle activity of novel simple alkyl isocyanides derived from citronellol」*Biofouling*、27(2)、2011、201-205、査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 岡田 郁 (北野 克和)、「金属試薬を用いないアルコールからのワンポットイソニトリル合成法」、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月26日、京都女子大学(京都)
- ② 秋間 千佳 (北野 克和)、「Bio-organic studies on the cypris larva of the barnacle with fluorescence-labeled probes」、9th International Marine Biotechnology Conference、2010年10月10日、チンタオ(中国)
- ③ 小林 弦貴 (北野 克和)、「クロロリン酸化合物を用いたホルムアミドからのイソニトリル合成法」、日本化学会第90春季年会、2010年3月28日、近畿大学(大阪)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北野 克和 (KITANO YOSHIKAZU)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：10302910

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし