

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 4 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21603003

研究課題名（和文）天然毒貯蔵生物の自己耐性機構-下痢性貝毒オカダ酸結合タンパク質の構造と機能

研究課題名（英文）Self-resistance mechanism for secondary metabolite-accumulating species-Structure and function of okadaic acid-binding proteins

研究代表者

此木 敬一（KONOKI KEIICHI）

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：40292825

研究成果の概要（和文）：クロイソカイメンから単離された下痢性貝毒オカダ酸結合タンパク質を試験管内で調製する事に成功し、オカダ酸の解離定数を決定した。また、これらタンパク質がクロイソカイメン細胞に発現することを明らかにした上、さらに、日本各地より収集したクロイソカイメンに含まれるオカダ酸およびオカダ酸結合タンパク質の濃度比を調べ、自己耐性機構を推察した。

研究成果の概要（英文）：Okadaic acid binding proteins OABPs 2.1 and 2.3, originally isolated from the sponge *Halichondria okadai*, were stably expressed as recombinant proteins in *E. coli*. Dissociation constants of OA from recombinant OABPs 2.1 and 2.3 were determined in the binding assays. The okadaic acid binding proteins were deduced to be the sponge proteins but not those from symbiotic species. Furthermore, we quantitated okadaic acid and OABP2.1 in the sponge collected from various places in Japan, and speculated a possible self-defense system of the sponge.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：該当なし・ケミカルバイオロジー

キーワード：下痢性貝毒・オカダ酸・オカダ酸結合タンパク質・自己耐性機構・クロイソカイメン

1. 研究開始当初の背景

1980年代前半より、複雑な構造と特異な生理機能をもつ二次代謝産物が単離された。その中には医薬品開発に供され、その誘導体等が治療薬として臨床で、あるいは基礎科学研究に用いられている化合物もある。*Halichondria okadai*（クロイソカイメン）より単離されたオカダ酸（OA）は、タンパク

質脱リン酸化酵素 PP1、PP2A に対し、解離定数 150 nM、32 pM で結合する阻害剤で (*Biochem. J.* **1994**, *298*, 259)、強力な発癌プロモーターである (*J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2469; *Adv. Cancer Res.* **1993**, *61*, 143) ため、細胞生理研究試薬として広く一般に使われている。

研究代表者は、生物種を越えて普遍的に発

現する PP2A がクロイソカイメンにも存在し、OA の毒性を抑制する何らかの機構があると想定した。そして、クロイソカイメン内で遊離 OA の濃度を低下させる OA 結合タンパク質の探索を行い、PP2A との相同性が高い OABP1、そして、PP2A との相同性が極めて低い OABP2 の単離に成功した。前者と OA との解離定数は未決定である。後者は OABP2.1-2.3 の混合物として得られた。OABP2 は OA と極めて強く結合し、その解離定数は 0.9 nM であった。クロイソカイメン内での OABP 1 および OABP2 の役割は不明である (*Biochemistry* **2007**, *46*, 11410.; 公開特許公報(A): 特開 2002-101886 (P2002-101886A); *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9003.)。

PP1、PP2A、OABP2 以外の OA 結合タンパク質としてガレクチンなどが報告されているが、いずれも構造はまったく異なる (*Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4907; *FEBS J.* **2007**, *274*, 23)。一方、OA はカイメンの一種 *Suberites domuncula* の体内で共生微生物のアポトーシスを誘導することが知られている (*Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4907)。また、OA はバイカル湖のカイメン *Lubomirskia baicalensis* の体内で、ヒートショックプロテイン hsp70 の活性化に関与し、厳冬期における生命維持に寄与すると考えられている (*FEBS J.* **2007**, *274*, 23)。

OA 以外の二次代謝産物に注目すると、麻痺性貝毒サキシトキシンを貯蔵する生物およびテトロドトキシンを貯蔵するフグ体内から、それぞれ、サキシフィリン (*J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15471)、PSTBP (*Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5937) という結合タンパク質が見つかった。その機能の詳細は不明である。

2. 研究の目的

アミノ酸、タンパク質、糖質、脂質等の一次代謝産物と異なり、強力な毒性を示す二次代謝産物の生産生物内あるいは貯蔵生物内における機能についてはあまり研究されていない。本研究では、下痢性貝毒オカダ酸および研究代表者が発見したクロイソカイメン由来の新規オカダ酸結合タンパク質に注目し、オカダ酸貯蔵生物種におけるオカダ酸の機能について知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) OABP2.1 のリコンビナントタンパク質を調製し、ポリクロナール抗体を受託調製する。[24-³H]OA を用いて結合実験を行い、解離定数を算出する。

(2) 定期的にクロイソカイメン、また、下痢性貝毒が発生した地域に生息する生物種を収集する。LC-MS/MS や PCR 法を用いて、各

試料中の OA、OABP2.1 を定量する。

(3) OA 貯蔵生物の組織を解剖または適当な試薬を用いて分離し、HPLC 法や免疫染色法により OA および OABP 貯蔵組織 (細胞) を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 日本各地より *H. okadai* を収集し、下痢性貝毒である OA、および我々が見出した新規 OA 結合タンパク質の含有量を比較した。神奈川県、千葉県、福岡県で採集したクロイソカイメン中の OA 含有量が生息地域や時季によって異なることを明らかにした。

(2) *H. okadai* から OA 結合タンパク質である OABP2.1 および OABP2.3 をクローニングし、それぞれを pET21a プラスミドベクターに組み込み、リコンビナントタンパク質 (recOABP2.1, recOABP2.3) として発現させた。OA は両リコンビナントタンパク質に対して同程度の結合性を示すこと、ディノフィシストキシン 1 も OA と同様の親和性で recOABP2.1 に結合することを明らかにした。

(3) 分子生物学の手法 (5' Race, 3' Race) を用い、OABP1 の全遺伝子配列 (cDNA) を決定した。この cDNA を pET21a ベクターに挿入し、BL21 (DE3) と呼ばれるバクテリアの中でタンパク質として発現させた。得られたタンパク質に対して、OA が高結合性を示したため、PP2A と高い相同性を示す OABP1 が OA 感受性であることがわかった。

(4) recOABP2.1 を用いてウサギを免疫して抗 OABP2.1 血清を得た。それを用いてウェスタンブロッティングを行い、日本各地の *H. okadai* に含まれる OABP2.1 の含有量を比較した結果、OABP2.1 含有量は OA 含有量と相関関係がなく、OA 同様、生息地域や時季によって異なることを明らかにした。

(5) (4) の結果を検証する目的でより多くの検体を同時に処理できる方法の開発を目指した。まず、(4) と同様に、抗 OABP2.1 抗体を用いた ELISA 法を試験したが、再現性に欠けることがわかった。次に、ドットブロッティング法を試みた。その結果、異なる生息地や季節で収集されたクロイソカイメンに含まれる OA および OABP2.1 の濃度関係に明確な相関が認められないことがわかった。

(6) そこでクロイソカイメン中における OABP2 の局在について調査した。細かく刻んだクロイソカイメン組織を EDTA 存在下で解離させると、同生物の細胞の他、共生生物の細胞が遊離することを確認した。これらの細胞を異なるサイズのナイロンメッシュを用いて分離し、各サイズ画分に含まれる OABP2.1 および OA 量を定量した。その結果、OABP2.1 や OA が特定のサイズ画分に局在している事が判明した。

(7) (6) において得られた組織解離液を

抗生物質存在下で維持すると、主にカイメン細胞からなる培養液が得られる。これより遺伝子抽出を行いOABP2.1の配列を有するプライマーを設計しPCRを行い、増幅された断片の配列解析を行った。その結果、OABP2.1がクロイソカイメン由来のタンパク質である事が判明した。

意義: OAが相同性66%のOABP2.1とOABP2.3に対して同程度の結合性を示し、両タンパク質が共通して持つ配列上にOA結合部位があることがわかった。*H. okadai*中のOA含有量とOABP2含有量に相関が見られなかったこと、OAが10 nm以下のサイズを持つ組織に濃縮されていたことから、OABP2がOAと1対1で結合することにより耐性が生まれると想定した当初の仮説では説明できない事がわかった。

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3件)

- (1) Mari Yotsu-Yamashita, Jun-Ho Jang, Yuko Cho, Keiichi Konoki. :
"Optimization for simultaneous analysis of tetrodotoxin, 4-epitetrodotoxin, 4,9-anhydrotetrodotoxin and 5,6,11-trideoxytetrodotoxin by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Forensic Toxicology* 29. 61-64 (2011), (査読有り)
- (2) Keiichi Konoki, Kaori Saito, Hiroki Matsuura, Naoyuki Sugiyama, Yuko Cho, Mari Yotsu-Yamashita and Kazuo Tachibana. Binding of diarrhetic shellfish poisoning toxins to okadaic acid binding proteins purified from the sponge *Halichondria okadai*. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 2010, 18, 7607-7610. (査読あり)

(3) 此木敬一. 有毒二次代謝産物を貯蔵する生物の謎-クロイソカイメン由来の新規オカダ酸結合タンパク質の発見, 化学と生

物 2009, 47, 376-378. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

(1) 此木敬一、小濱真実、小野田竜也、長由扶子、山下まり. オカダ酸結合タンパク質 OABP2.1 を生産する生物の探索. 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 27 日, (京都女子大, 京都)

(2) 此木敬一、齋藤 香、松浦宏樹、長由扶子、山下まり. オカダ酸結合たんぱく質 OABP2.1 に対するディノフィシストキシン 1 の結合性評価. 日本農芸化学会平成 2010 年度大会, 2010 年 3 月 29 日 (東京大学, 東京)

(3) 此木敬一、松浦宏樹、齋藤 香、長由扶子、山下まり、宮本智文、杉山直幸、福沢世傑、橘 和夫. クロイソカイメン中のオカダ酸の生理機能. 第 52 回天然有機化合物討論会, 2010 年 9 月 30 日, (グランシップ, 静岡)

(4) 此木敬一、松浦宏樹、齋藤 香、長由扶子、山下まり. クロイソカイメン由来の新規オカダ酸結合タンパク質の生理機能. 平成 21 年度化学系学協会東北大会, 2009 年 9 月 20 日 (日本大学工学部, 郡山)

[図書] (計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称: 該当なし

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称：該当なし
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bukka/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

此木 敬一 (KONOKI KEIICHI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：40292825

(2) 研究分担者

該当者なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

山垣 徹 (YAMAGAKI TOHRU)
サントリー生物有機科学研究所
研究者番号：40313209