

論文の内容の要旨

論文題目 Characterization of Okadaic Acid Binding Protein from the
Marine Sponge *Halichondria okadai*

(クロイソカイメン由来オカダ酸結合タンパク質の構造決定、及び機能解明)

氏名 杉山 直幸

カイメン類は生理活性天然物の宝庫であり、現在までに数多く特異な構造と活性を有する化合物が単離されてきた。これらの化合物の多くはカイメン自身により生合成されるのではなく、共生あるいは捕食される微生物により生産されたものが蓄積されていると推定されている。これらの多くが示す細胞毒性を始めとする強力な生理活性は宿主であるカイメン自身にも本来有害なはずであり、カイメンはその毒性に対する何らかの耐性機構を備えていることが考えられる。

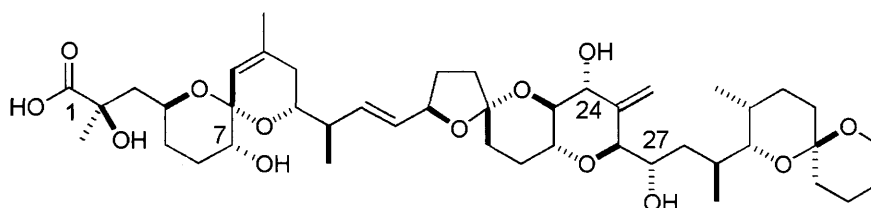


図1 okadaic acid

オカダ酸 (図1) はクロイソカイメン (*Halichondria okadai*) より単離されたポリエーテル海産毒で、プロテインホスファターゼ PP1 及び PP2A に対する特異的な阻害剤として知られている。クロイソカイメンはホスファターゼとは異なるオカダ酸結合タンパク質を有することでオカダ酸によるホスファターゼの阻害を抑制しているという仮説に基づき、筆

者は修士課程において三崎臨海実験所沿岸にて採取したクロイソカイメンから2種類のオカダ酸結合タンパク質 (OABP1、OABP2) を単離することに成功した。博士課程においてはこれら結合タンパク質のアミノ酸配列決定、及び詳細な結合活性の評価を行った。

1. オカダ酸結合タンパク質の配列決定

筆者は修士課程において、酵素消化物のエドマン分解によりオカダ酸結合タンパク質の部分アミノ酸配列を決定している。この配列をもとに縮重プライマーを設計し RT-PCR により部分 cDNA の塩基配列の決定を行った。すなわち、新たに採取したクロイソカイメンより抽出した mRNA から cDNA を調製し、これを鋳型として PCR 反応を行った。OABP1 につき得られた塩基配列から決定したタンパク質の一次配列ほぼ全長は PP2A 触媒サブユニットに 88% の相同性を示した。OABP1 が *p*-ニトロフェニルリン酸を基質とした活性試験で脱リン酸化酵素活性を示すという事実とあわせて、OABP1 はカイメン由来の PP2A に帰属した。OABP2 については2種類のアイソフォームに由来する cDNA が得られ、一方については RACE 法により cDNA の塩基配列から全アミノ酸配列を推定することができた。しかし、タンパク質の ESI 質量分析による分子量はこの配列による計算値からのずれを示し、酵素消化物の ESI 質量分析の結果から、OABP2 は N 末端が翻訳後修飾されていることがわかった。N 末端ペプチドの MS/MS 解析により開始メチオニンの除去と N 末端アラニンの *N*-アセチル化が確認された。これらを総合した結果、OABP2 はともに 189 個のアミノ酸から成る分子量 22110 Da および 22180 Da の2種類の親水性タンパク質で、検索した既知のタンパク質に対して有意な相同性を示さなかった。

2. 光親和性標識プローブを用いた他種カイメン中のオカダ酸結合タンパク質の探索

ここに得られたオカダ酸結合タンパク質がクロイソカイメンに特異的であるかを調べるために光親和性標識プローブを用いた検出を行った。筆者は修士課程において、オカダ酸の7位ヒドロキシル基に光活性種であるジアジリン基と検出手段としてビオチンを導入した化合物 **1** (図2) を合成した。そこで、この化合物を用いて PP2A の光標識を行い SDS 電気泳動、続くウエスタンブロットティング後に HRP 標識ストレプトアビジンを用いた化学発光によりビオチン標識タンパク質を検出した結果 PP2A の標識に成功した。また、過剰量のオカダ酸の存在下で標識実験を行った結果、PP2A に由来するバンドの消失が見られたことから、この標識が特異的な相互作用に基づいていることが確認された。以上のことから当手法がオカダ酸親和性タンパク質の検出法として有用であることが示された。クロイソカイメン抽出物に同法を適用した結果、OABP1 と OABP2 に対応するバンドが特異的に検出された。一方、オカダ酸の蓄積がみられない近縁種ダイダイイソカイメン (*Halichondria japonica*) の粗抽出物からは、PP2A に由来すると思われるバンドのみが検出された。この結果から、OABP2 はオカダ酸を所有するカイメンに特異的に存在することが示唆された。

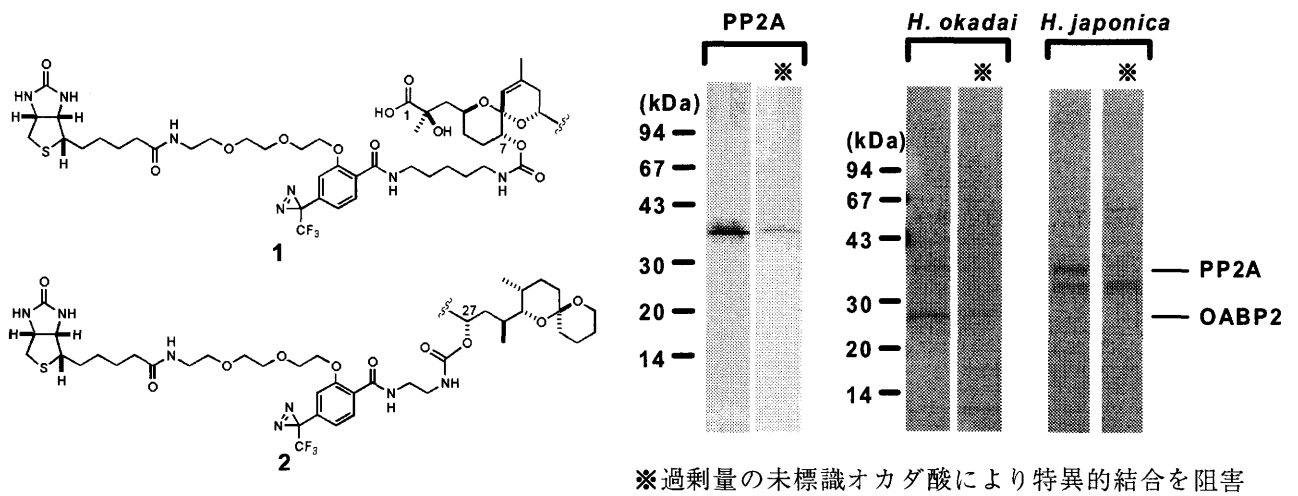


図2 光親和性標識プローブ(左)を用いた PP2A とカイメン抽出物中 OABP の検出

3. OABP2 の結合定数、及びオカダ酸誘導体による競争阻害

27 位トリチウム標識オカダ酸を用いた結合試験によりオカダ酸と OABP2 との解離平衡定数を求めた。一定濃度の OABP2 溶液にラジオリガンドを添加し放置後、迅速なゲル濾過によって高分子画分を分離し放射活性を測定した。図 3A に示すようにラジオリガンドの濃度に依存して結合量が増加した。得られた飽和曲線をもとに Scatchard プロット解析を行った結果、 $K_d = 0.9$ nM と強い結合親和性を有していることが示された(図 3B)。組換え DNA により大腸菌内で大量発現させた OABP2 についても同様な試験を行った結果、天然体とほぼ同程度の結合定数 ($K_d = 1.4$ nM) が得られた。また、この強い結合活性のためにカイメンより精製した OABP2 の大部分にオカダ酸が結合したままであることが、非変性条件下での ESI 質量分析においてオカダ酸-OABP2 複合体に由来する多価イオンが観測された

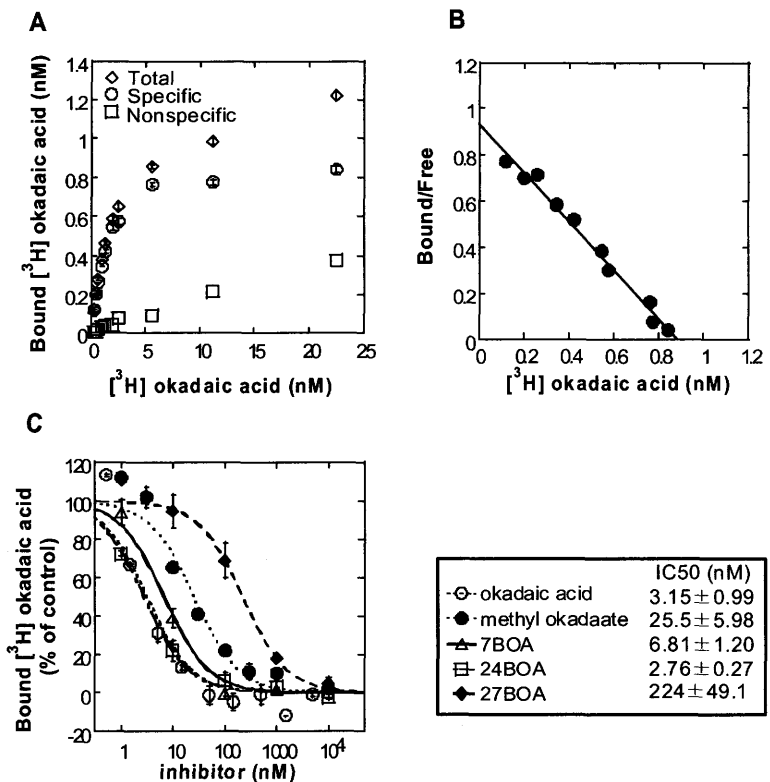


図3 ラジオリガンドを用いた OABP2 の結合試験
(A) 飽和曲線 (B) Scatchard plot (C) 競争阻害試験

ことによって示された。

OABP2 のオカダ酸に対する認識特異性を調べるため、プロテインホスファターゼ (PP) 阻害剤またはオカダ酸誘導体による競争阻害実験を行った。OABP2 とトリチウム標識オカダ酸の結合は、オカダ酸と同じく PP1 や PP2A の強力な阻害剤として知られるマイクロシスチン LR やカリキュリン A による阻害を受けなかった。PP 類に対するこれら阻害剤の結合は選択性に違いはあるが互いに競合することから、OABP2 は PP 類とは全く異なる様式でオカダ酸を認識していることが推定される。

一方、オカダ酸誘導体はいずれもオカダ酸の結合を阻害することが明らかになった(図 3C)。7 位または 24 位ヒドロキシル基にスパーサーを介してビオチンを導入した誘導体 (7BOA、24BOA) はオカダ酸と同程度の IC₅₀ を示し、メチルエステル体は阻害活性が約 1/10 に低下した。PP2A とオカダ酸の結合活性を著しく低下させる 1 位カルボキシル基と 24 位ヒドロキシル基の誘導が OABP2 との結合にそれほど影響を及ぼさないことから、OABP2 のオカダ酸認識様式が PP とは異なることが示される。

4. 光親和性標識プローブを用いた結合部位の同定

OABP2 のオカダ酸結合部位の同定を光親和性標識により行うことを試みた。競争阻害実験の結果から、オカダ酸の 27 位周辺が OABP2 と相互作用する可能性が高い。妥当な部位への標識、及びその高効率化を期待して 27 位にジアジリンとビオチンを導入した化合物 **2** (前頁図 2; 分子量 1476.3) を合成した。**2** を用いて OABP2 を光標識した結果、より親和性の高いと思われる **1** を用いた場合よりも高感度に OABP2 が検出された。光標識されたタンパク質を LC-MS で分析した結果、分子量 23561、23629 Da に由来するイオンが観測され一分子標識タンパク質の生成を確認した。この酵素消化物をアビジン単量体固定化カラムにより精製後 LC-MS によって分析した結果、標識ペプチドに由来すると考えられる 2 価イオン $m/z = 1018.70$ が検出された。標識による分子量の増加を考慮して標識されたペプチドは D₁₃₇-K₁₄₁ に相当すると考えられる。現在、この標識ペプチドの MS/MS 解析による標識残基の特定を検討している。

以上の結果からオカダ酸結合タンパク質 OABP2 はクロイソカイメンに特有に存在する新規タンパク質であることが明らかとなった。オカダ酸に対する強い結合親和性を併せ考えれば、OABP2 はクロイソカイメンのオカダ酸に対する自己耐性に何らかの形で関与していることが示唆された。