



| | |
|------------------------|---|
| Title | Calyculin生合成経路における活性化機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨] |
| Author(s) | 城森, 啓宏 |
| Citation | 北海道大学. 博士(薬科学) 甲第14398号 |
| Issue Date | 2021-03-25 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/81480 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | theses (doctoral - abstract and summary of review) |
| Additional Information | There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL. |
| File Information | Takahiro_Jomori_abstract.pdf (論文内容の要旨) |



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏名 城森 啓宏

学位論文題名

Calyculin 生合成経路における活性化機構に関する研究

1986年に海綿動物 *Discodermia calyx* より単離された calyculin A は、各種がん細胞に対して強力な細胞毒性を示す主要代謝産物である。その作用機序は真核生物に普遍的に保存されているタンパク質脱リン酸化酵素 1 および 2A を特異的に阻害することで、細胞周期に変調をきたし、細胞死を誘発する。そのため calyculin A を高濃度で含む海綿動物がその毒性に侵されない理由は長年不明であった。2014年に所属研究室では、メタゲノムマイニング法により全長約 150 kb に及ぶ PKS (polyketide synthase) - NRPS (nonribosomal peptide synthetases) hybrid 型の calyculin 生合成遺伝子クラスターの単離に成功し、シングルセル分析によって難培養性の共生細菌 '*Candidatus Entotheonella*' 属が calyculin 生産菌であることを明らかにした。さらに遺伝子クラスターにコードされているリン酸基転移酵素 CalQ が calyculin A をリン酸化し、弱毒性 phosphocalyculin A へと変換することを見出した。この反応は、宿主海綿動物における calyculin A に対する耐性機構を示唆している。一方で、phosphocalyculin A を脱リン酸化し、calyculin A へと変換する毒性発現機構が不明であった。海綿組織における損傷の有無で代謝物変化を解析した結果、主代謝物は組織傷害依存的に phosphocalyculin A から calyculin A へと変換されていた。すなわち、海綿 *D. calyx* には組織損傷に応じて高濃度のプロトキシンが瞬時に脱リン酸化され、細胞毒性が 1,000 倍強い化学防御物質へと生物変換される活性化機構が備わっていることが明らかになった。しかし、その組織傷害に応じた活性化機構は不明であり、なかでも鍵となる phosphocalyculin A の活性化を担う脱リン酸化酵素は未同定であった。そこで本学位論文では phosphocalyculin A を活性化する脱リン酸化酵素を同定し、その機能を解析することで活性制御機構の全容解明を目指した。

1. Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の同定

一般的にアミノグリコシド系抗生物質におけるリン酸化/脱リン酸化を介した活性制御に関わる酵素は、その生合成遺伝子クラスターにセットで存在することが知られている。そこで初めに calyculin のリン酸基転移酵素 CalQ の下流にコードされている機能未知の脱リン酸化酵素と配列相同性を示す CalL に着目し、組換えタンパク質 CalL の *in vitro* 機能解析を試みた。しかし、いずれの反応条件においても phosphocalyculin A 脱リン酸化活性は認められなかったことから、生産菌以外の海綿や他の共生微生物が脱リン酸化酵素の生産者であることが示唆された。

そこで次に海綿 *D. calyx* の粗酵素抽出液より、海綿組織において活性化を担う phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の精製・同定を試みた。Phosphocalyculin 脱リン酸化活性を分離の指標に、海綿 *D. calyx* (湿重量 1.8 kg) の粗酵素液 (7.3 g) より各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、最終的に活性画分 (286 μ g) を得た。その活性画分を二次元電気泳動により分析した結果、脱リン酸化酵素の物理化学的特徴は分子量約 45 kDa かつ等電点 pI 8-10 の塩基性タンパク質であることが明らかになった。本特徴をもとに calyculin 生合成遺伝子クラスターに着目すると、海綿より精製した脱リン酸化酵素の特徴は CalL の特徴 (43 kDa, pI 9.01) と酷似していた。Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素は CalL であると予想し、天然由来酵素をトリプシン消化後、得られたペプチド断片のアミノ酸配列を LC-MS/MS により解析した。その結果、天然由来脱リン酸化酵素から CalL と同一のアミノ酸配列断片が検出された。さらに、当初 CalL の読み枠 open reading frame (ORF) の N 末端と予想したアミノ酸残基よりも上流のアミノ酸配列に相当するペプチド断片も検出されたことから、CalL の ORF の開始コドンにより上流に存在することが推察された。そこで遺伝子 *calL* の上流領域の配列の再解析を行ったところ、N 末端側に 66 残基伸長可能な CalL の ORF を見出した。これらの結果から、海綿 *D. calyx* より精製した phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素

は、N 末端側に伸長した新たな ORF の CaL であることが示唆された。

次に新たに見出した ORF の CaL が phosphocalyculin 脱リン酸化酵素として機能する可能性を検討するために、異種宿主発現により調整した組換え酵素 CaL の *in vitro* 酵素反応を試みた。その結果、読み枠を修正した組換え酵素 CaL は phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を示し、その定常状態速度論的パラメーターの値も天然由来の酵素の値と良い一致を示した。以上の結果から、phosphocalyculin 脱リン酸化酵素は calyculin 生合成遺伝子クラスターにコードされる CaL であることが明らかになった。

2. Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の生化学的特徴の同定

CaL は機能既知の脱リン酸化酵素との配列相同性が低く、その生化学的特徴は不明であったため第 2 章では CaL の生化学的特徴の同定を行った。各種脱リン酸化酵素との系統樹解析および脱リン酸化酵素阻害剤との感受性実験の結果、CaL はどの機能既知の脱リン酸化酵素グループからも独立した新たな酵素グループに属しており、purple acid phosphatase (PAP) と類似した生化学的特徴を有することが予想された。実際に CaL の至適反応条件や金属結合残基を欠損させた変異体の *in vitro* 機能解析を検証した結果、CaL は哺乳類または細菌由来の PAP と同様にモノマーとして存在し、CaL の至適 pH や金属結合残基は PAP のそれらと良い一致を示した。一方で様々な基質のモノ・ジ・トリリン酸エステル基に対して加水分解活性を示す基質特異性の広い PAP とは異なり、CaL は高い基質特異性を示し、リン酸モノエステル基を加水分解せず phosphocalyculin のピロリン酸エステル基を選択的に脱リン酸化する酵素であった。また CaL の活性中心金属を同定するために誘導結合プラズマ質量分析 ICP-MS とキレート比色定量分析を行った。その結果、PAP の活性中心に保存されているヘテロ二核金属 [Fe-M] (M = Fe, Mn, Zn) と異なり、CaL はこれまで脱リン酸化酵素において報告のないヘテロ二核金属 Cu-Zn を有する酵素であることが明らかになった。

3. 海綿 *Discodermia calyx* における CaL を介した活性化機構の解明

第 3 章では海綿の組織傷害後からプロトキシンが活性化に至るまでの経路を検証した。陸生植物において傷害直後にプロトキシンを活性化する機構には、予め活性化酵素とプロトキシンがそれぞれ細胞小器官などへ蓄積・区画化されていることが重要であることが知られている。そこで酵素の区画化に関する知見を得るために CaL のアミノ酸配列を解析した結果、菌体内においてペリプラズムへの酵素輸送に重要なシグナル配列が CaL の N 末端側に保存されていることが示唆された。実際に天然由来 CaL の LC-MS/MS データを精査したところ、酵素をペリプラズムへ放出する signal peptidase I の開裂によって生じるペプチド断片が検出された。さらに大腸菌における組換え酵素 CaL の局在を検証した結果、ペリプラズム酵素の抽出画分に CaL の存在が認められ、LC-MS/MS 解析においても組換え CaL の N 末端配列が天然酵素と同一であった。以上のことから、CaL は生産菌のペリプラズムへ輸送されることが示唆された。

次に phosphocalyculin 脱リン酸化反応が *Entotheonella* 細胞内で進行する可能性を検証するために、細胞内の遊離モノリン酸の濃度変化をマラカイトグリーン試薬で染色し顕微鏡下で観察した。比較対象として、組織傷害に応じて代謝物変化が認められない近縁種の海綿 *D. kiiensis* 由来の *Entotheonella* 細胞を用いた。その結果 *D. calyx* の生産菌特異的に細胞が濃い緑色に染色されたことから、脱リン酸化反応は生産菌の細胞内で生じることが示唆された。

以上の結果から次の活性化機構を推定している。平時の *Entotheonella* 細菌内において CaL と phosphocalyculin A がそれぞれペリプラズムと細胞質に区画化・蓄積されている。そこへ外敵により細菌膜に傷が生じると CaL とプロトキシンが瞬時に反応し、活性化された calyculin A が毒性を示すことで化学防御が発動する。

本学位論文では、宿主海綿動物における自己耐性と化学防御の両立のために共生菌が編み出した巧みな機構を明らかにした。