



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第14398号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81480
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Jomori_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 城森 啓宏

審査担当者	主 査	教 授	脇 本 敏 幸
	副 査	教 授	周 東 智
	副 査	教 授	市 川 聡
	副 査	講 師	薬師寺 文 華

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

海綿動物からは抗腫瘍活性物質などの数多くの生物活性天然物が見出されてきた。世界中の研究者がそれらの生合成研究を実施してきたが、未だその成功例は少ない。本論文は生合成遺伝子が同定されている数少ない海綿由来天然物の一つである calyculin A を対象とし、その活性発現制御を伴う生合成経路を明らかにすることを目的とした。

Calyculin A は伊豆半島に生息する海綿 *Discodermia calyx* から見出された強力な細胞毒性物質であり、真核生物が共通して有するタンパク質脱リン酸化酵素 1 及び 2A を特異的に阻害する。海綿動物も真核生物であるため、calyculin A を高濃度で含む海綿 *D. calyx* には自己耐性機構の存在が示唆されていた。先行研究によって calyculin A の生合成遺伝子が同定され、その遺伝子が共生細菌 *Candidatus Entotheonella* sp. にコードされていることが明らかにされた。さらに遺伝子クラスターにコードされるリン酸基転移酵素 CalQ が calyculin A をリン酸化し、低毒性の phosphocalyculin A を生合成の最終産物として蓄積していた。プロトキシンである phosphocalyculin A は海綿組織の傷害に応じて瞬時に強毒性の calyculin A に生物変換される。しかしながら、この生物変換を担う脱リン酸化酵素が不明であった。

そこで著者はまず phosphocalyculin A の脱リン化を担う脱リン化酵素の単離、精製を試みた。海綿 *D. calyx* より phosphocalyculin 脱リン酸化活性を指標に酵素の単離を進め、最終的に分子量約 45 kDa の塩基性タンパク質を精製した。LC-MS/MS を用いたペプチドマスフィンガープリンティング法によって精製酵素のアミノ酸配列を解析した結果、その配列は calyculin 生合成遺伝子クラスターにコードされる CalL と一致した。さらに大腸菌を用いた組換えタンパク質 CalL においても phosphocalyculin A 脱リン酸化活性が検出されたことから、phosphocalyculin A から calyculin A への変換を担う脱リン酸化酵素は CalL であることが明らかになった。CalL は purple acid phosphatase (PAP) に類似の酵素であったが、従来知られている PAP とは中心金属が異なり、Cu と Zn のヘテロ二核金属を活性中心に有する全く新しいファミリーに属する酵素であった。N 末端側にはペリプラズム局在を示唆するシグナルペプチド配列が認められた。実際に大腸菌での発現部位の解析から、CalL が signal peptidase I による翻訳後修飾の後にペリプラズムに局在していることを確認した。

以上の結果から、著者は海綿共生菌が生産する calyculin A の巧妙な生合成機構を考察している。共生細菌が生産する calyculin A は海綿 *D. calyx* の化学防御物質として機能している可能性が高い。しかし、宿主への毒性を回避するために、*Ca. Entotheonella* sp. は低毒性の phosphocalyculin A を細胞内に蓄積している。同時にペリプラズム領域に活性化酵素 CalL を区画化している。組織傷害による内膜破壊によって両者が混じり合い、傷害部位特異的に calyculin A が瞬時に生じて化学防御が発動する。

これらの成果は calyculin A の活性制御を介した生産機構を酵素レベルで明らかにしたものであり、海綿由来天然物に関する生合成研究としては世界で初めての研究結果である。

よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。