



Title	Calyculin生合成経路における活性化機構に関する研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14398
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84554
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Jomori.pdf



博士学位論文

Calyculin 生合成経路における活性化機構に関する研究

城森 啓宏

北海道大学大学院生命科学院

生命科学専攻 生命医薬科学コース

天然物化学研究室

2021年3月

略語

AA	amino acid
Abs	absorbance
ACP	acyl-carrier protein
A domain	adenylation domain
ADP	adenosine 5'-O-diphosphate
AMP	adenosine 5'-O-monophosphate
APH	aminoglycoside phosphotransferase
APS	ammonium peroxodisulfate
AT	acyltransferase
ATP	adenosine 5'-O-triphosphate
<i>B. pyrrocinia</i>	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
bp	base pair
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Ca. Entotheonella</i>	<i>Candidatus Entotheonella</i>
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition-fluorescence <i>in situ</i> hybridization
cfu	colony formation unit
CMF-ASW	Ca ²⁺ and Mg ²⁺ free-artificial seawater
CoA	coenzyme A
<i>D. calyx</i>	<i>Discodermia calyx</i>
ddH ₂ O	deionized-distilled water
<i>D. dissoluta</i>	<i>Discodermia dissoluta</i>
DH	dehydratase
<i>D. kiiensis</i>	<i>Discodermia kiiensis</i>
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>D. sacchari</i>	<i>Duganella sacchari</i>
dNTPs	deoxy nucleoside triphosphate mixture
ECH	enoyl-CoA hydratase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER	enoyl reductase
EtOH	ethanol
FDA	Food and Drug Administration
GTP	guanosine triphosphate

His	histidine
HCS	HMG-CoA synthase like domain
HMG	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
H ₂ O	water
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	half maximal (50%) inhibitory concentration
ICP-MS	inductively coupled plasma-mass spectrometry
IEP	isoelectric point
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
kb	kilobase pair
kDa	kilodalton
KR	ketoreductase
KS	β-ketosynthase
KS ⁰	non-elongating ketosynthase
LC-MS	liquid chromatography- mass spectrometry
Me	methyl
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
MG	malachite green
mRNA	messenger ribonucleic acid
MT	methyltransferase
Mw	molecular weight
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	not determined
Ni-NTA resin	nickel-nitrilotriacetic acid resin
NMR	nuclear magnetic resonance
NRP	nonribosomal peptide
NRPS	nonribosomal peptide synthetase
OD	optical density
ODS	octa decyl silyl
ORF	open reading frame
Ox	oxidation
P450	cytochrome P450
PAP	purple acid phosphatase
PCP	peptidyl-carrier protein

PCR	polymerase chain reaction
<i>pI</i>	isoelectric point
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrophenylphosphate
<i>p</i> -NPPase	<i>p</i> -nitrophenylphosphate phosphatase
PP1	protein phosphatase 1
PP2A	protein phosphatase 2A
ppm	parts per million
Q column	quaternary ammonium cation column
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
rpm	rotation per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
S column	methyl sulfate (-O-CH ₂ CHOHCH ₂ OCH ₂ CHOHCH ₂ SO ₃ ⁻)
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Scanning electron microscope
SP column	sulfopropyl (-O-CH ₂ CHOHCH ₂ OCH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻)
<i>T. swinhoei</i>	<i>Theonella swinhoei</i>
TE	thioesterase
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl ethylenediamine
Tris-HCl	tris (hydroxymethyl) aminomethane, hydrochloride
UPLC	ultra-performance liquid chromatography
UV	ultraviolet
UV/Vis	ultraviolet/visible
WT	wild-type

目次

序論

第1章 海綿動物と化学防御

第1節 海綿動物.....	1
第2節 共生微生物.....	2
第3節 海綿動物の化学防御戦略.....	3
第4節 海綿動物由来の細胞毒性物質.....	5

第2章 Calyculin A

第1節 海綿動物 <i>Discodermia calyx</i> と calyculin A.....	7
第2節 Calyculin A 生合成研究.....	11
第3節 海綿組織傷害に応じた calyculin A の活性化制御機構.....	16
第4節 本研究の目的.....	17

本論

第1章 Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の同定

第1節 序論.....	18
第2節 組換えタンパク質 CalL の異種発現および脱リン酸化反応の検討.....	19
第3節 Phosphocalyculin 脱リン酸化活性を示す天然酵素の精製.....	22
第4節 天然由来 phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素の同定.....	25
第5節 推定脱リン酸化酵素 CalL の再解析.....	29
第6節 小括.....	34

第2章 Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の生化学的特徴の同定	
第1節 序論.....	35
第2節 機能既知の脱リン酸化酵素と CalL の生化学的特徴の比較.....	36
第3節 CalL の活性中心金属の同定.....	44
第4節 小括.....	48
第3章 海綿 <i>Discodermia calyx</i> における CalL を介した活性化機構の解明	
第1節 序論.....	50
第2節 活性化酵素 CalL の細胞内局在.....	52
第3節 Calyculin 生産菌 <i>Entotheonella</i> 細胞における脱リン酸化活性の局在.....	57
第4節 小括.....	60
総括.....	63
実験項.....	66
Supplementary data.....	82
参考文献.....	99
謝辞.....	111

序論

第1章 海綿動物と化学防御物質

第1節 海綿動物

海綿動物は深海から浅瀬の海域にとどまらず南極や淡水域など世界中の水域に生息し¹⁾、比較的流れの少ない海底や岩場に固着する無脊椎動物でありこれまでに15,000種以上報告されている²⁾。海綿動物は水を全身に循環させるための多孔質の胃腔を備えており、効率的に水中に漂う有機物や微生物を栄養として摂取するろ過摂食動物である³⁻⁸⁾。多細胞生物の中でも系統学上最も原始的な生物と位置付けられている海綿動物は、他の無脊椎動物が有する神経系や消化器官などの発達した器官を持たず、海綿の体内構造は比較的単純である。海綿組織の概略図をFig. 1に示す⁷⁻⁸⁾。海綿組織は扁平細胞で覆われている表皮層とその内側に中膠と呼ばれる肉に相当する部位が存在し、その組織を水の通る水溝が複雑に分岐した多孔質構造を形成している。海水の循環システムは体表面の小孔から海水を汲み上げ多孔質構造を通り、最終的に大孔（出水孔）から排出される。この体内の水循環は胃腔の体壁に存在する鞭毛を有する襟細胞が波打つことで小孔から大孔への水循環を引き起こし、一日に数トンもの海水を濾過する⁷⁻⁹⁾。

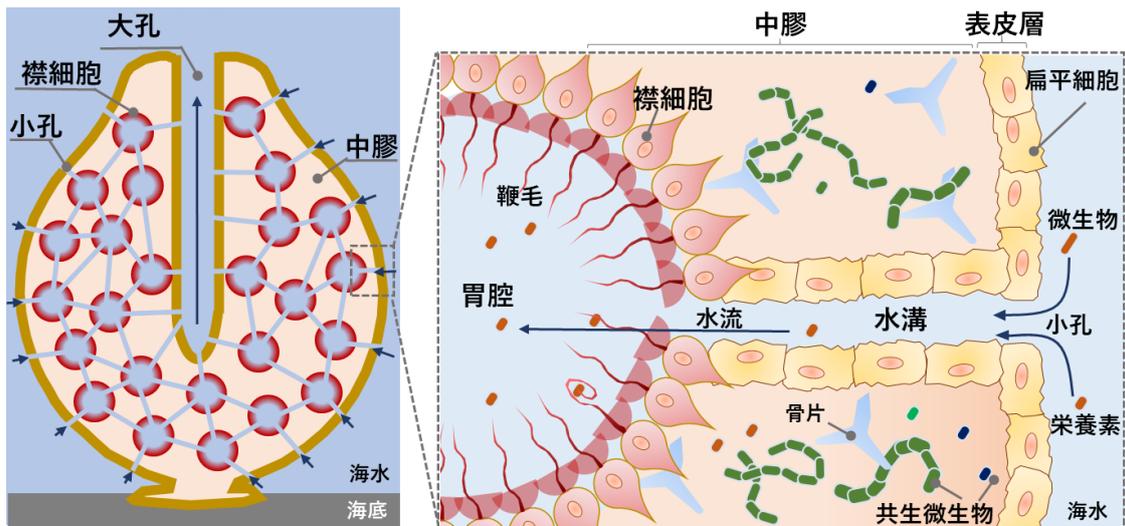


Fig. 1 海綿動物の内部構造

第2節 共生微生物

海綿動物の組織内の中膠には、一過性の微生物に加えて多種多様な微生物が共生しており、多いものでは海綿体積の約40%¹⁰⁻¹¹⁾を占めるといわれている。16S rDNA解析の結果、中には海綿動物にのみ共生する微生物種も複数存在が認められており、その大半は研究室における従来の培養条件下で生育が困難な“難培養性微生物”である^{7,12)}。海綿における共生微生物の大きな役割として、宿主への栄養素の供給や化学防御物質の生産などが提唱されている¹²⁻¹⁵⁾。近年、海綿より報告されてきた生物活性物質の大半が、共生微生物によって生産されていることが遺伝子レベルで明らかになってきた。八丈島産海綿動物 *Theonella swinhoei* (黄色組織 yellow chemotype: TSY) には、Fig. 2 に示すような polytheonamides¹⁶⁾、cyclotheonamide A¹⁷⁾、onnamide A^{18,19)}、nazumamide A²⁰⁾、konbamide²¹⁾、keramamide D^{22,23)}などの強力な生物活性を示すポリケタイドやペプチド化合物が複数含有されている。2014年 Piel らは海綿 TSY に共生するフィラメント状細菌 *Candidatus Entotheonella factor* の全ゲノム配列の解読に成功した¹²⁾。そのゲノムにこれら二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターがコードされていたことから、海綿 TSY に含まれる大半の二次代謝産物は共生細菌 *Ca. Entotheonella factor* が生産していることを明らかにした。また *Ca. Entotheonella* 属は難培養性であることから、海綿宿主側は住処と栄養を提供する代わりに共生菌側は化学防御物質を提供するという相利共生関係の存在が伺える。

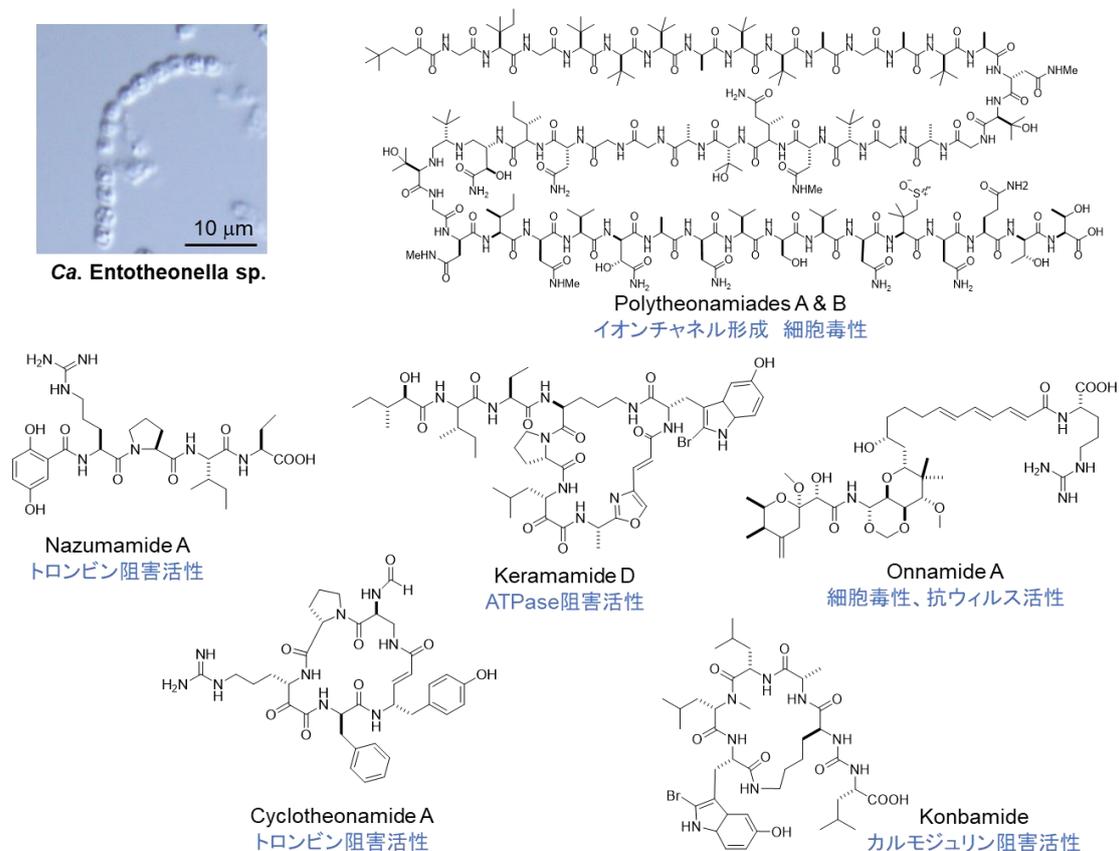


Fig. 2 共生細菌 *Ca. Entotheonella* 属が生産する代表的な生物活性物質

第3節 海綿動物の化学防御戦略

海洋生物は周囲が海水で覆われており、常に病原菌の感染リスクや高等生物などの外敵の脅威に晒されている。それら脅威に対抗するために海洋生物はそれぞれの自己防御機構を有している²⁴⁻²⁸⁾。小型魚類などの高等生物は、外敵の接近を察知するとサンゴ礁などの隠れ家に身を隠すことで回避する一方、ウミガメや魚類などの捕食者から逃げるができない貝類や海藻、海綿動物などの定着性の生物は、独自の生存戦略を進化の過程で獲得してきた。貝類や甲殻類、ウニなどの棘皮動物のように物理的攻撃に対して自身の外郭の硬度を高める、または棘で全身を覆うことで外敵から身を守る生物が存在する一方、海綿動物には外敵に対して強力な毒性を示す化学防御物質を体内に備えておくことで外敵から身を守る化学防御機構を進化させてきた²⁹⁾。海綿動物の化学防御機構は「常在防御」、「活性化防御」、「誘因防御」の三つに大別される (Fig. 3)²⁴⁾。

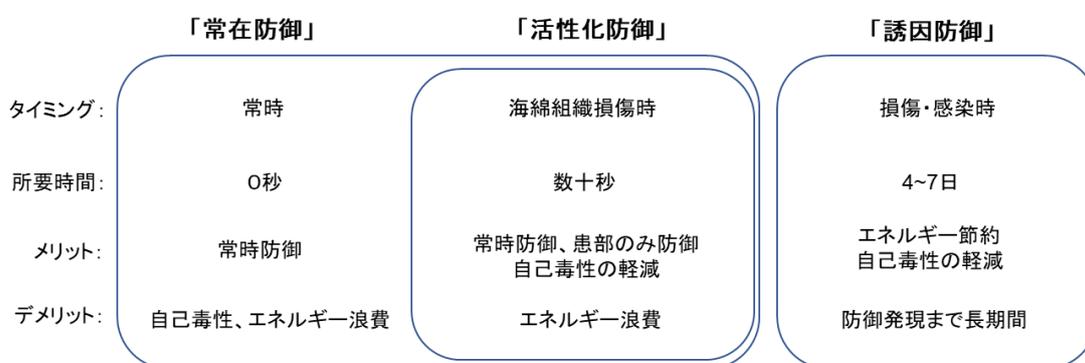


Fig. 3 海綿動物の化学防御機構の概要²⁴⁾

一つ目の「常在防御」とは、常時一定の捕食圧力下に暴露されている海綿動物に認められ、常に化学防御物質を生産し続けることで身を守る。一度の捕食で大量のバイオマスを損傷させる魚やウミガメに対して有効な防御機構である一方、エネルギー消費量が高いことに加え、海綿自身へ毒性が生じる可能性がある。

二つ目の「活性化防御」は、常在防御の欠点を軽減した上位システムとも言える。海綿の組織内に生物活性物質の前駆体が蓄積され、損傷後にのみ強力な化学防御物質へと生物変換される機構である。活性化までに数日を要する誘因防御と異なり、活性化に至るまでの所要時間は傷害後数秒以内と極めて短い。またこの活性化防御の利点は外傷を負った患部局所的に活性化されるため、高活性物質による自己毒性のリスクを軽減することが可能となる。植物においては青酸配糖体の活性化機構として古くから知られている。海綿において初めて活性化防御が報告されたのは1993年 Prokschらの海綿動物 *Aplysina* 属の活性化防御に関する論文である³⁰⁾。平時において *Aplysina* 属の組織内にはプロトキシンであるハロゲン含有イソオキサゾリンアルカロイドが高濃度で蓄積されている³⁰⁻³³⁾。これらプロトキシンは組織傷害に応じて一段階目のイソオキサゾール開環、加水分解を伴いより強力な生物活性を示す aeropylsin-1 が産生され、二段階目のニトリルの加水分解を経て、最終的にジエノンアミド (verongiaquinol) へと変換される (Fig. 4)。他の海綿においても脱アセチル化³⁴⁾、

脱硫酸化³⁵⁾を介した活性化機構の存在が報告されている。しかし、これら生物活性物質の生合成遺伝子や活性化酵素、その生産菌などは明らかになっておらず、活性化防御の詳細なメカニズムに関する知見は全くない。

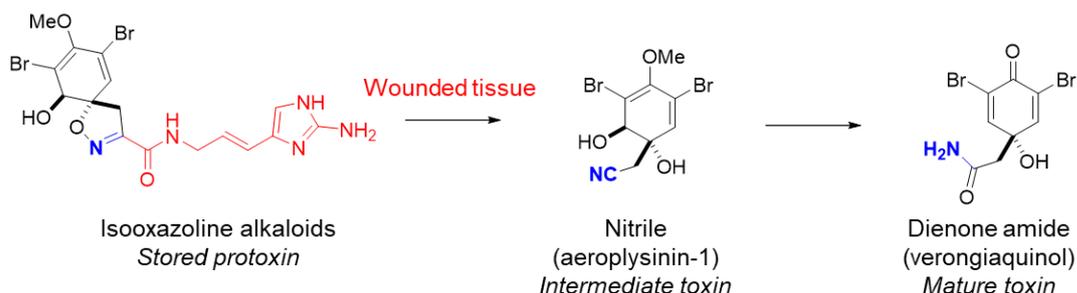


Fig. 4 海綿動物 *Aplysina* 属の組織損傷に応じた活性化防御機構³²⁾

三つ目の「誘因防御」とは、外敵による外傷・捕食だけでなく病原菌の感染など必要に応じて防御物質の生合成が惹起される防御機構であり、植物のファイトアレキシンが典型的な例である。その特徴は常時防御物質を蓄積せず、必要時にのみ発現される防御機構であるため、エネルギーの節約が可能となる。一方、欠点としては攻撃後から防御機構の発現に至るまで一週間と長時間を要することが挙げられる。このため攻撃に対する即効性は無く、将来の攻撃に備える免疫機構戦略といえる。例として、海綿 *Suberites domuncula* はグラム陰性細菌のエンドトキシンであるリポ多糖 (LPS) に晒されると、抗菌活性を示す lyso-PAF (platelet-activation factor) の発現量が上昇する^{36,37)}。また海綿 *Ageras conifera* には海綿組織の損傷後、抗菌活性物質 scep trin および忌避活性物質 oroidin の含有量が一週間以内に約 4 倍上昇するような誘因防御機構が備わっている³⁸⁾。

第4節 海綿動物由来の天然有機化合物

ここまで述べたように海綿動物は捕食などの厳しい環境圧に晒され長い時を経て強力な化学防御物質を進化の過程で獲得してきたと考えられている。それら海綿動物由来の天然有機化合物は化学構造の多様性が高く、極めて低濃度で強力な毒性を示す化合物が複数存在する³⁹⁻⁴²⁾。1986年に平田・上村らは日本の岩礁海岸に生息する海綿動物 *Halichondria okadai* (和名：クロイソカイメン) からポリエーテル環状ポリケタイド halichondrin B⁴³⁾を単離報告した (Fig. 5)。強力な抗腫瘍活性を示す halichondrin B の大環状部位を残した誘導體 eriblin mesylate (Halaven[®]) が 2010 年に FDA により転移性乳がんの治療薬として承認された^{44, 45)}。本化合物の標的分子は、微小管ダイナミクスに関与するチューブリンに結合し、細胞周期に変調をきたすことで最終的にアポトーシスによる細胞死を誘発する⁴⁶⁾。同様にチューブリンを標的とする化合物が海綿動物から複数報告されている⁴⁷⁾。海綿 *Discodermia dissoluta* から単離、構造決定されたポリヒドロキシラクトン環を有するポリケタイド discodermolide⁴⁸⁾、異なる三種の海綿から同時期に報告されたマクロライド spongistatin-1⁴⁹⁻⁵¹⁾、そして沖縄県産 *Cacospongia mycofijiensis* から報告された laulimalide^{52, 53)}、zampanolide⁵⁴⁾ など、halichondrin B に続く抗がん剤リード化合物として期待されている。

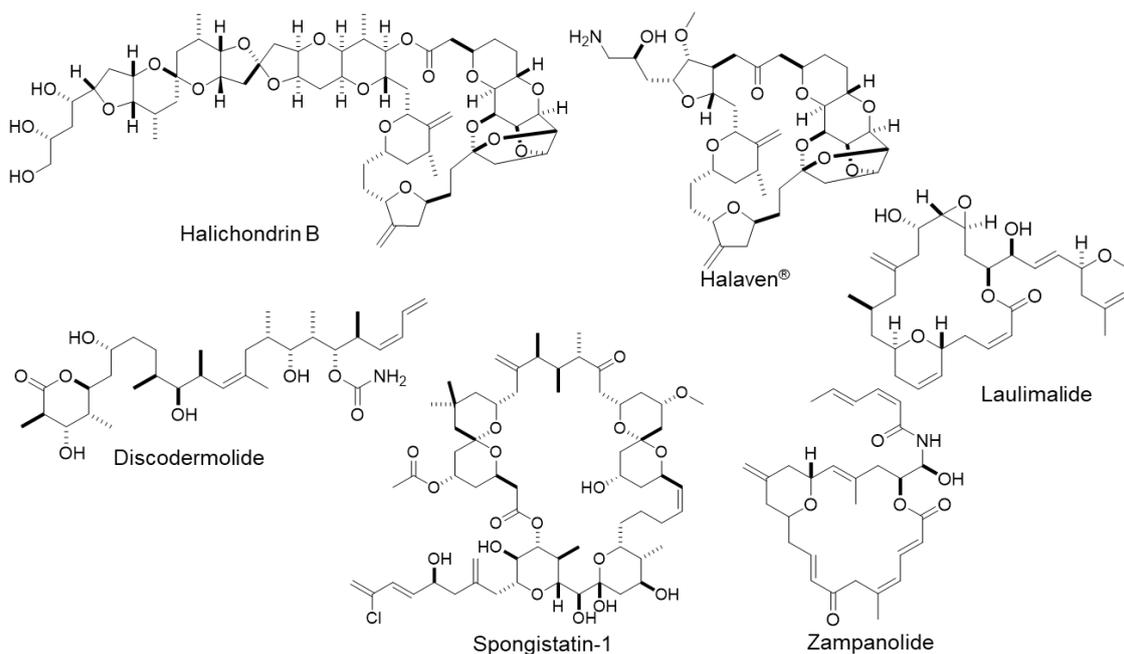


Fig. 5 代表的な海綿動物由来のチューブリン阻害剤

一方、細胞骨格タンパク質であるアクチンを特異的に阻害する化合物として、海綿 *Negombata magnifica* より単離されたアシルチアゾリジノン部位を有するマクロライド latrunculin A⁵⁵⁾、海綿 *Mycale* 属由来のオキサゾール環を複数有する mycalolide A⁵⁶⁾、日本産海綿 *Theonella swinhoei* 由来ポリケタイド骨格が二量化した swinholide A⁵⁷⁾などの二次代謝産物が複数報告されている。

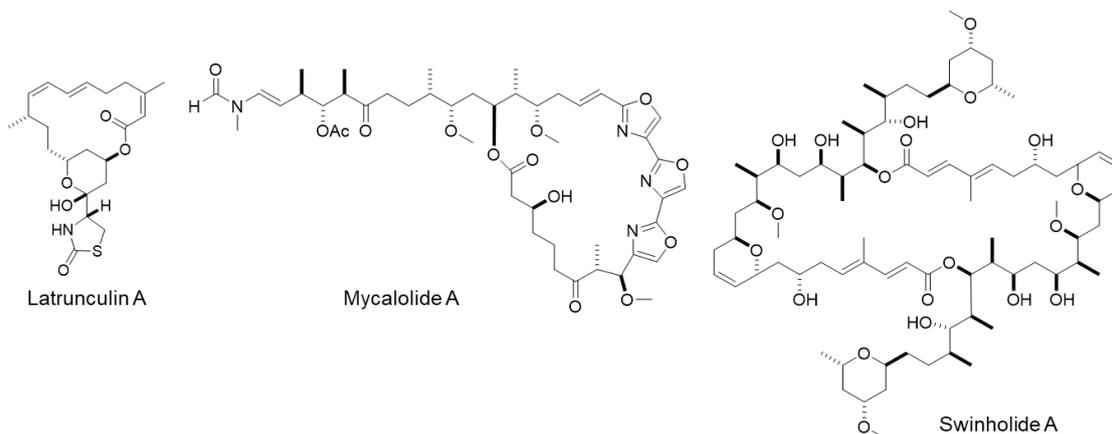


Fig. 6 代表的な海綿動物由来のアクチン阻害剤

1986年に比嘉らは沖縄県万座毛産 *Halichrona* 属由来の特徴的な構造を有するβ-カルボリンアルカロイド manzamine A⁵⁸⁾を報告した。その生物活性は幅広く、ウイルスから真核細胞にまで毒性を示す。1989年に八丈島産海綿 *Theonella* 属より Aboa などの非天然アミノ酸を含み、ヒスチジンのイミダゾール環が環状ペプチドを架橋した二環性ドデカペプチド theonellamide⁵⁹⁾が報告された。Theonellamide はコレステロールやエルゴステロールなどのステロールと結合し、強い抗真菌活性および細胞毒性を示す⁶⁰⁻⁶²⁾。

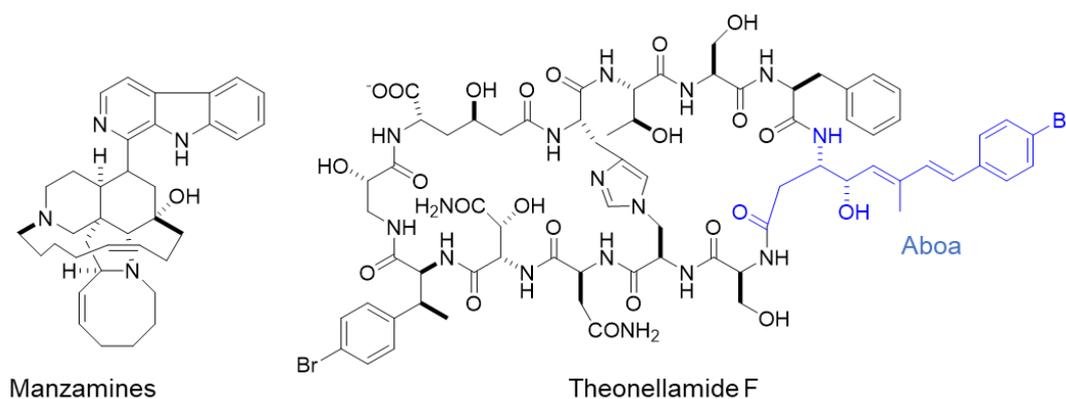


Fig. 7 海綿動物由来の細胞毒性物質

このように海綿動物由来の天然有機化合物は、多様な官能基を有し、アクチンやチューブリンなど druggable な標的分子を特異的に阻害するため、抗がん剤のリード化合物としての実用化が期待されているが、臨床応用においては供給方法や選択毒性などの課題が残る。一方で、これら海綿由来の細胞毒性物質の多くはその特異な作用を示すことから、細胞内シグナル伝達などの生化学研究用試薬として活躍してきた^{47, 60-64)}。

第2章 Calyculin A

第1節 海綿動物 *Discodermia calyx* と calyculin A

海綿動物 *Discodermia calyx*

海綿動物 *Discodermia calyx* (和名：チョコガタイシカイメン、Fig. 8) はお猪口型の石のように固い組織を有し、日本近海の浅瀬かつ暗所に生息している海綿動物である。1884年に Döderlein らにより海綿動物 Porifera 門 Demospongiae 綱 Lithistida 目 Theonellidae 科 *Discodermia* 属に属する海綿として同定された⁶⁵⁾。その後、上位分類体系が Lithistida 目 (イシカイメン目) から Tetractinellida 目 (四放海綿目) に変更されている。*Discodermia* 属には *D. calyx* を含め 23 種が同定されている⁶⁶⁾。



Fig. 8 海綿動物 *Discodermia calyx*

Calyculin A およびその類縁体

Calyculin A は 1986 年に日本近海の相模湾で採集された *Discodermia calyx* から、ヒトデの卵成熟阻害活性を指標に単離された細胞毒性物質として報告された⁶⁷⁾。Calyculin A は海綿の湿重量 kg あたり 0.15% の収量で含まれている主要代謝物である (Fig. 9)。分子量 1008 の calyculin A は 5,6-スピロケタール、リン酸エステル、テトラエン、そして末端ニトリル基を有するポリケタイド部位をオキサゾール環で二つの γ -アミノ酸のペプチド部位と連結された化学構造を有する。Calyculin A のテトラエン部位の幾何異性体 calyculin B, E, F、32 位がメチル化された calyculin C とその幾何異性体である calyculin D, G, H の計 7 種の類縁体が報告されている^{68, 69)}。さらにリン酸エステル基が欠落した dephosphonocalyculin A⁷⁰⁾ や末端のニトリル基が加水分解されると予想されるアミド基を有する calyculinamide A, B, F、9 位にブロモ基を有し 8 位と 11 位のヒドロキシ基で 5 員環が形成された類縁体 calyculin J が海綿 *D. calyx* から報告されている⁷¹⁾。また calyculin A のオキサゾール環の光酸化によって分解されると推定されている calyculin A のアミノ酸部位 allos-hemicalyculin A⁷²⁾ とポリケタイド部位の hemicalyculin A⁷³⁾ も *D. calyx* から類縁体として報告されている。

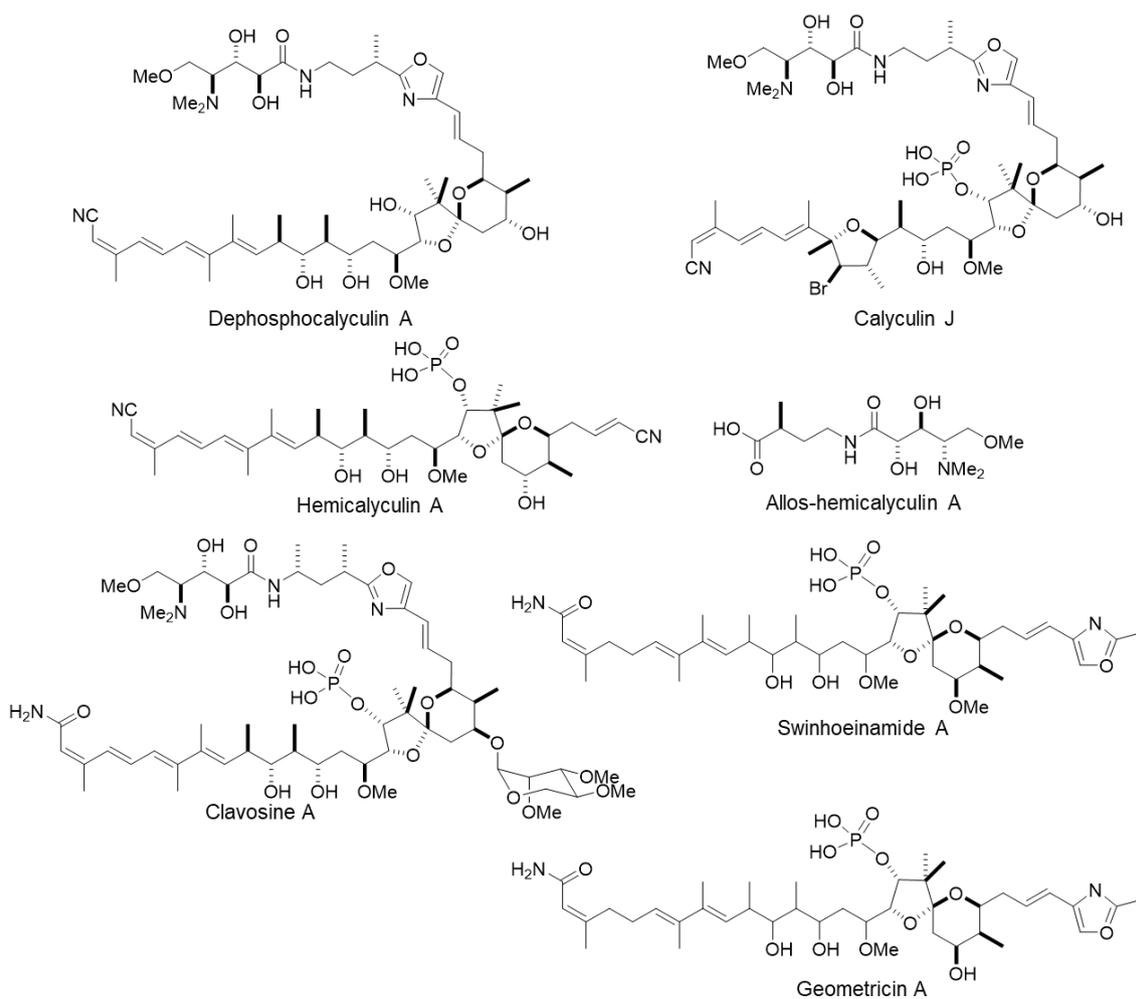
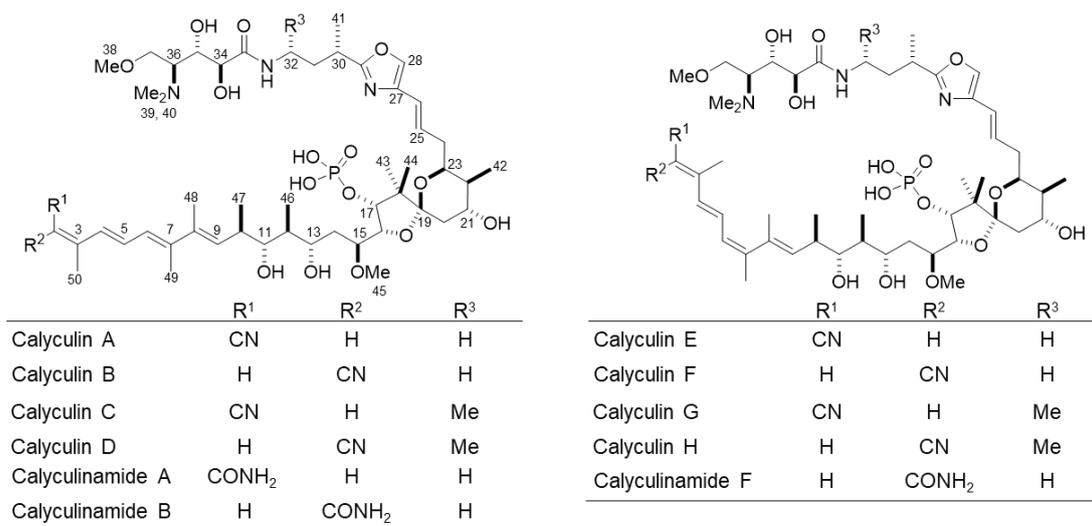


Fig. 9 Calyculin とその類縁体の化学構造

別種海綿由来の calyculin 類縁体

Calyculin 類縁体は西太平洋側の海域に生息する *D. calyx* 以外の異なる 4 種 of 海綿動物から 2020 年までに 4 例報告されている (Fig. 9)。1997 年 Dumdei らがニュージーランドの South 島東海岸沖にて水深 40 m 以深に生息する深海海綿 *Lamellomorpha strongylata* から calyculin A, B, E, F と calyculinamide A, B を単離報告した⁷⁴⁾。1998 年 McCready らはパラオの水深 30-50 m で採集した球状の海綿動物 *Myriastra clavosa* の有機溶媒抽出物より calyculin C のアミド体かつ 21 位の水酸基がトリメトキシラムノース化された新規類縁体 clavosine A, B, C を発見した⁷⁵⁾。この糖化された calyculin 類は *D. calyx* から見出されていないが、4 年後の 2002 年 Edrada らはパプアニューギニアの水深 50 m で採集された *D. calyx* と同じ Theonellidae 科に属する海綿 *Theonella swinhoei* から clavosine A が見出され、calyculinamide 類のオキサゾール環の 29 位のペプチド部位がメチル基に置換され、21 位の水酸基がメチル化された新規類縁体 swinhoeiamide A も発見された⁷⁶⁾。同年 Keharous らはオーストラリア東海岸の Heron 島近海の水深 20 m から採集された *Luffariella geometrica* から swinhoeiamide A の 21 位脱メチル化体 geometricin A を報告した⁷⁷⁾。これら海綿動物は *Theonella swinhoei* を除き *D. calyx* と系統学的にも全く異なる目に属しているにもかかわらず、それら海綿の抽出物からは共通の物質が報告されている。また海綿の産地の違いによって calyculin 類を含まない海綿も存在する。実際に日本近海に生息する *Theonella swinhoei* や *Luffariella* 属から calyculin 類縁体の報告はこれまでにない。このような報告例からも、calyculin 類は海綿ではなく共生微生物によって生産されていることが推察された。

Calyculin A の生物活性

Calyculin A の生物活性は、各種がん細胞株に対して半生育阻止濃度 (IC₅₀) が pM で強力な増殖阻害活性を示す⁷⁸⁾。Calyculin A の標的分子は真核生物に普遍的に保存されているセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素 PP1、PP2A であり、結合阻害定数 K_i 値がそれぞれ 1 nM および 0.1 nM と極めて選択的かつ低濃度で阻害する^{78,79)}。PP1 および PP2A はリン酸化/脱リン酸化を介し細胞内シグナル伝達経路に関与する酵素である。したがって、リン酸化されたタンパク質に対する脱リン酸化活性が阻害されると過剰リン酸化状態となり細胞周期に変調を及ぼし、最終的に細胞死 (アポトーシス) に至る⁸¹⁻⁸³⁾。このように極めて強力な阻害活性を示すことから当初は抗がん剤のリード化合物として着目されていた。しかし、臨床試験において低い選択毒性による副作用が課題となり、現在 calyculin A は細胞内シグナル伝達系の生化学研究試薬として活用されている。別の生物活性として、calyculin A はタンパク質の過剰なリン酸化状態を誘引することによって発がんプロモーション⁷⁹⁾や平滑筋の収縮活性も報告されている⁸⁴⁻⁸⁷⁾。また酵母 *Candida albicans* や *Schizosaccharomyces pombe* に対しても抗真菌活性 (MIC = 2.5 μM, 10 μM) を示す。一方でグラム陰性および陽性細菌などの真正細菌に対しては全く増殖阻害活性が認められない。

構造活性相関に関する研究

Calyculin A に加え天然物由来の脱リン酸化酵素 PP1 および PP2A の阻害剤は、阻害剤の中でも分子量が最も小さいテルペノイド cantharidin⁸⁸⁾、シアノバクテリア由来の環状ペプチド microcystin-LR⁸⁹⁾、クロイソカイメンと渦鞭毛藻から単離されたポリエーテル環状ポリケタイド okadaic acid^{80, 90, 91)}、放線菌由来のスピロケタールを有する tautomycin⁹²⁾ や calyculin と同様にリン酸基を構造中に有する fostriecin⁹³⁾、phoslactomycin⁹⁴⁾ が報告されている。これら阻害剤の化学構造の多様性は極めて高いが、標的分子は同じ酵素であり競合的阻害を示す。それら阻害剤の化学構造の共通点は、リン酸基を模した酸性官能基、疎水性部位および類似した立体配座を有することが提唱された。2002 年、脇本らは様々な calyculin A の類縁体を用いた詳細な構造活性相関研究を行った結果、酵素阻害活性に重要な官能基はリン酸基、疎水性残基のテトラエンおよび 11 位と 13 位のジオールであることを報告した⁷³⁾。また脱リン酸化酵素と相互作用しないオキサゾール環から上部のペプチド部位は細胞毒性発現に重要であることを明らかにした。この要因は calyculin A の X 線構造解析⁶⁷⁾ をもとに、ペプチド部位のオキサゾール環、36 位のジメチルアミン、13 位の水酸基が、電荷を帯びたリン酸基と水素結合することで、分子の極性が緩和され細胞膜透過性が向上されるためだと提唱されている。2002 年、三木らにより calyculin A と PP1 γ との複合体の X 線結晶構造が得られ、この仮説は正しいことが実証された。Calyculin A のテトラエン構造が PP1 γ の疎水性ポケットに、リン酸基が活性中心にそれぞれ相互作用し、ペプチド部位は酵素と相互作用していないために検出されなかった⁹⁵⁾。

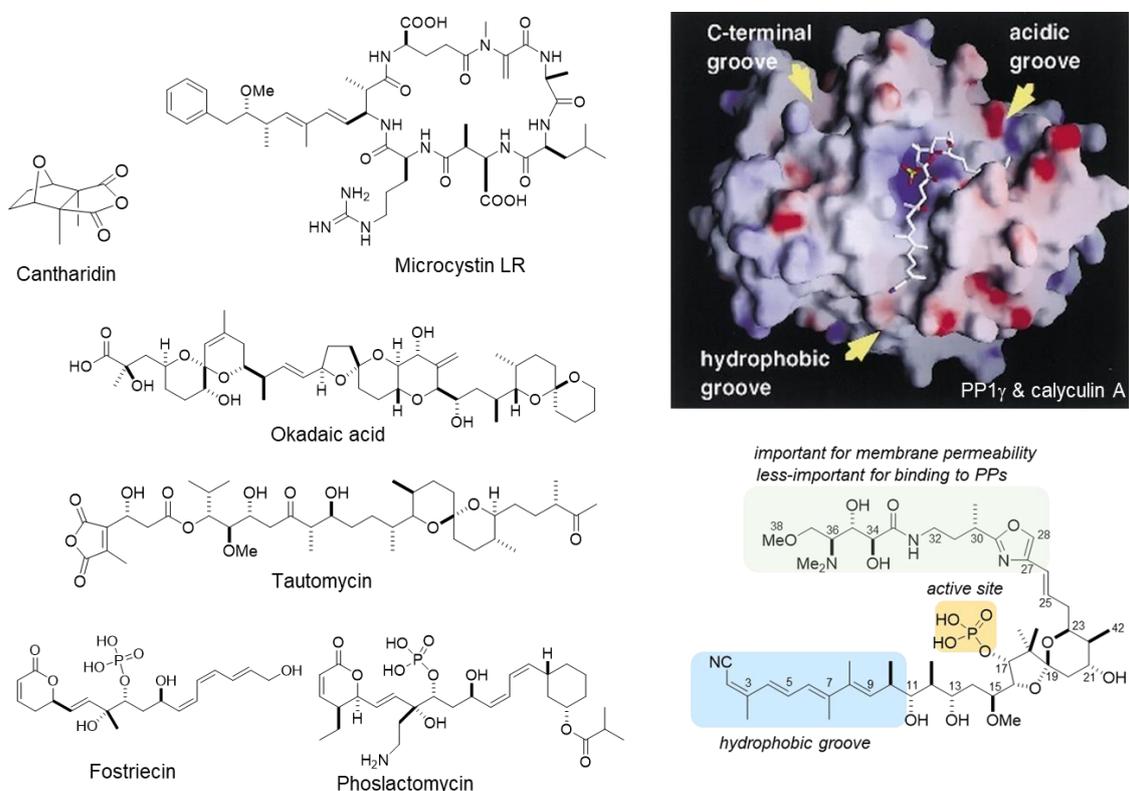


Fig. 10 天然由来タンパク質脱リン酸化酵素阻害剤と calyculin A の構造活性相関

第2節 Calyculin A の生合成研究

Calyculin A 生合成遺伝子クラスター

2014年に calyculin A の化学構造に着目し、推定される生合成遺伝子の配列情報とこれまで報告のあった生合成中間体の部分構造の相関に基づいた手法により、共生微生物を含む *D. calyx* のメタゲノム DNA から calyculin A の生合成遺伝子の探索研究が行われた⁹⁶⁾。Calyculin A の特徴的なペプチド部位とポリケタイド部位から、calyculin は複数の修飾と共に非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) と I 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) のハイブリッド型経路で生合成されると推定された (Fig. 11)。I 型 PKS はモジュールごとに acyltransferase (AT) ドメインを有する *cis*-AT 型 PKS と複数のモジュールに対して一つの AT ドメインを有する *trans*-AT 型 PKS に分類される。C3 および C7 位のメチル基は、*trans*-AT 型 ketosynthase (KS) に属する β -branch の基質を認識する KS により生合成されていることが示唆された⁹⁷⁾。

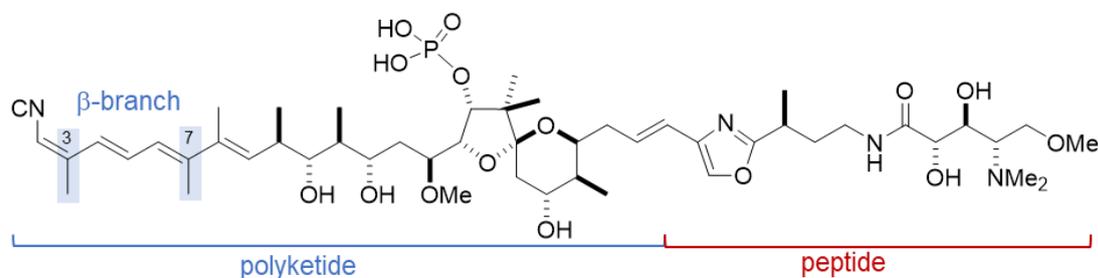


Fig. 11 Calyculin A 生合成経路の推定に重要な構造

Calyculin 生合成遺伝子の探索には NRPS および PKS をコードする遺伝子の保存領域に特異的なプライマーと海綿メタゲノム DNA を用いて、生合成遺伝子を配列ベースで探索するメタゲノム法^{98,99)}が用いられた。*trans*-AT 型 KS の遺伝子断片の情報を得るために、海綿メタゲノム DNA を鋳型に PCR 分析が行われた。得られた *trans*-AT 型 KS ドメインの遺伝子情報を基に、海綿のメタゲノム DNA フォスミドを保有する大腸菌のライブラリーに対して PCR スクリーニングが実施された。スクリーニングにより得られたフォスミドの挿入配列を次世代シーケンサーで解析した結果、約 150 kbp におよぶ NRPS-PKS ハイブリッド型の生合成遺伝子クラスターを見出した。その遺伝子にコードされている A ドメインの基質特異性、KR ドメインの水酸基およびオレフィンの幾何異性、KS ドメインの基質特異性および全体のモジュールが calyculin A の構造と良い一致を示した。本結果より、これら *cal* 遺伝子と名付けられた遺伝子が calyculin A の生合成遺伝子クラスターであることが強く示唆された (Fig. 12)。

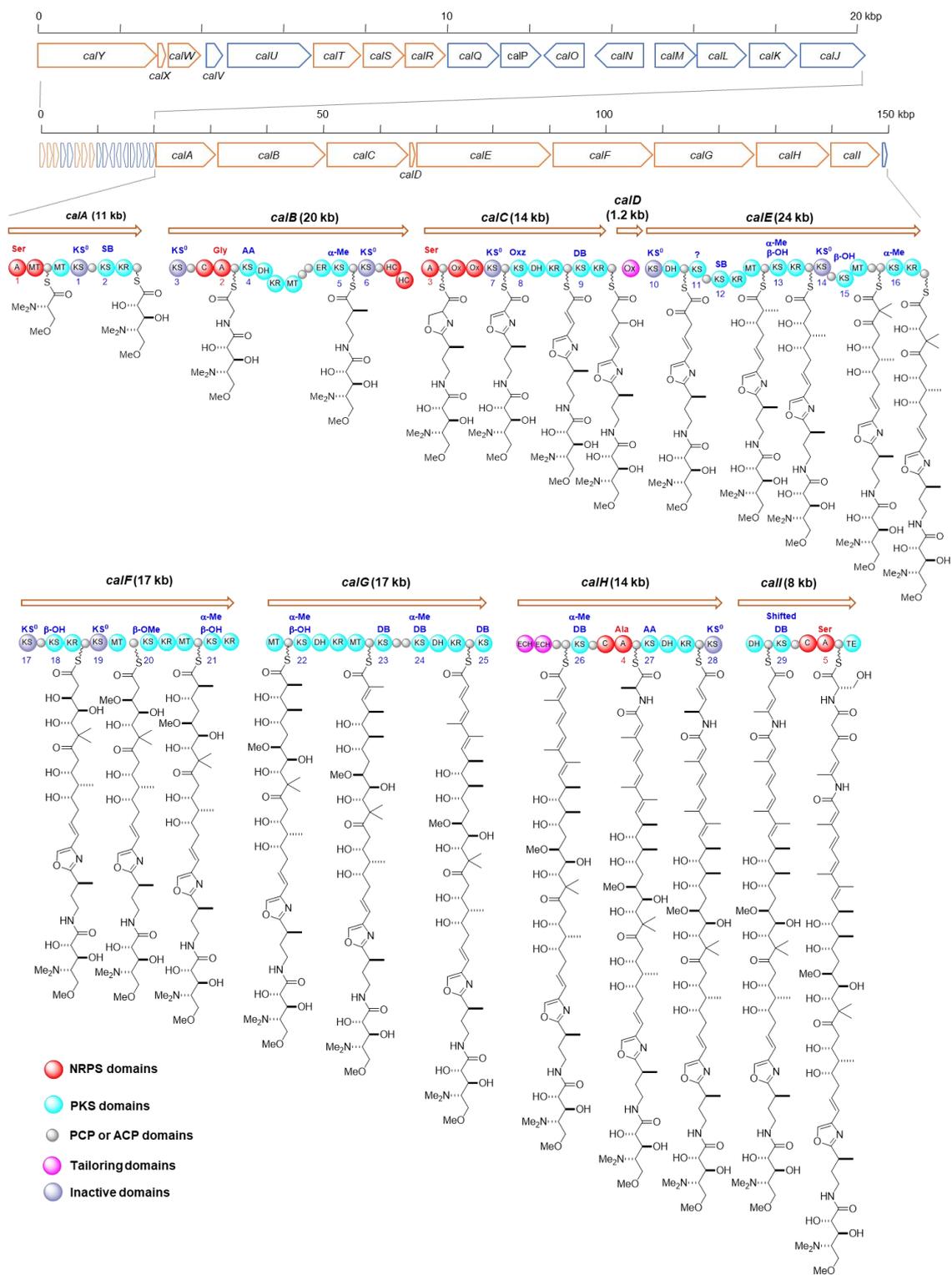


Fig. 12 Calyculin A 生合成遺伝子クラスター 96)

Calyculin A 生産者 *Entotheonella* 細菌

2014 年、日本産の海綿 *D. calyx* より calyculin A の生産菌を特定する目的で、16S rDNA 解析、*cal* 遺伝子を蛍光発色させる CARD-FISH 法、レーザーマイクロダイセクション法により分離した細胞から得られるゲノム DNA を鋳型に *cal* 遺伝子を増幅するシングルセル分析、これら三つの解析法を用いて calyculin 生合成遺伝子クラスターを有する微生物の探索が行われた⁹⁶⁾。その結果、共生細菌“*Candidatus Entotheonella*”属に *cal* 遺伝子が特異的に検出されたことから calyculin A の真の生産者は海綿 *D. calyx* に共生する *Ca. Entotheonella* 属であることが明らかにされた (Fig. 13)。また 2016 年、共生細菌 *Entotheonella* 属は可培養性シアノバクテリアから単離報告のある kasumigamide 類の生産菌であることも明らかにされた⁹⁷⁾。

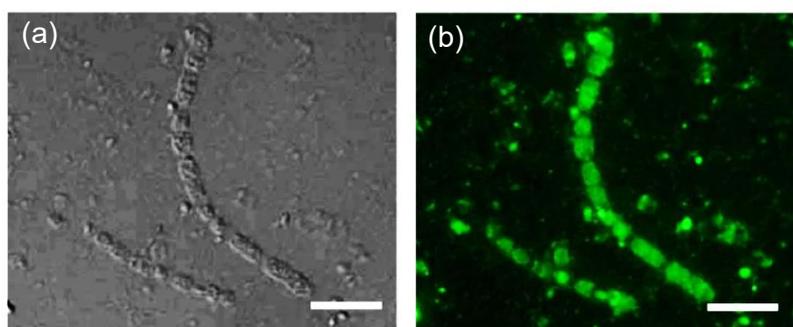


Fig. 13 *D. calyx* に共生する細菌 *Ca. Entotheonella* 属

(a) *Entotheonella* 細菌の微分干渉観察図、(b) *cal* 遺伝子プローブを用いた CARD-FISH 蛍光イメージング図、スケールバー; 10 μm ⁹⁶⁾

グラム陰性細菌 *Ca. Entotheonella* 属の存在が初めて報告されたのは 1996 年 Bewley らのパラオ産海綿 *Theonella swinhoei* に共生する難培養細菌に関する論文であった。初めて電子顕微鏡 (TEM) 下でその特徴的なフィラメント状の 2-3 μm の細胞が連なった細胞が確認された¹⁰¹⁾。当初はシアノバクテリアと考えられていたが、2000 年に 16S rDNA 系統解析データを基に *Ca. Entotheonella palaunensis* と命名された¹⁰²⁾。また遠心分離によりこの *Entotheonella* の細胞を濃縮した画分には、抗真菌活性物質 theopalaunamide が蓄積されていたことから生産菌として提唱された。その後 2005 年から 2012 年に 16S rDNA 解析により三種の海綿 *Discodermia dissolute*, *Discodermia* 属および *D. calyx* から *Ca. Entotheonella palaunensis* と近縁種の *Ca. Entotheonella* 属の存在が報告された^{103, 104, 105)}。

2014 年、序論 2 節でも述べたが Piel らは組織が黄色の日本産海綿 *T. swinhoei* (TSY) から polytheonamides 等の生物活性物質の生産者が *Ca. Entotheonella factor* であることを遺伝子レベルで初めて明らかにした¹²⁾。さらに *Entotheonella* 属は門レベルで既知のバクテリアと相同性を示さないことから、難培養性(隠れた)と秀でた生産能力の意を汲んで“Tectomicrobia”という新たな門を提唱した。加えて、この Tectomicrobia 門に属する *Entotheonella* 属は同じ Theonellidae 科だけでなく、他の海綿動物にも存在することが 16S rDNA 解析ベースで明らかにされた。

2015年に黄色 chemotype を有する TSY と異なる二次代謝産物を有する *T. swinhoei* (組織が白色 chemotype: TSW) からアクチン阻害剤の misakinolide の生産菌として *Ca. Entotheonella sarta* が報告された¹⁰⁶⁾。さらに CARD-FISH 法と質量分析イメージング法を駆使して、海綿組織の表皮層周辺に *Entotheonella* 細菌および misakinolide が局在していることを報告した。後に蛍光活性化セルソーティング (FACS) を用いたシングルセルゲノミクスにより *Ca. Entotheonella sarta* の全ゲノム情報が解読された (Accession No. PPXO00000000, MG844357-9)¹⁰⁷⁾。

このように *Ca. Entotheonella* 属は、様々な海綿に共生しており多様な化学構造を有する生物活性物質を数多く生産している。保有する生合成遺伝子クラスターの数から推定される二次代謝産物の生産能力の高さは放線菌にも匹敵することが予想されている^{12, 108)}。遺伝子情報から推定される一次代謝経路の情報を駆使し、数多くのグループにより *Entotheonella* 属の可培養化の試みが盛んに行われているが現在 2021 年 1 月まで成功したという報告はない。

リン酸基転移酵素 CalQ と phosphocalyculin A

Calyculin 推定生合成遺伝子クラスターが calyculin の生合成遺伝子であることを証明するために、calyculin 推定生合成遺伝子クラスターの上流にコードされている三種の推定リン酸基転移酵素 CalQ、CalP、CalM の *in vitro* 機能解析が行われた⁹⁶⁾。その結果、アミノグリコシド系抗生物質の耐性酵素 aminoglycoside phosphotransferase (APH) と約 30% の配列相同性を示す組換え CalQ が calyculin A のリン酸エステル基にさらにリン酸化修飾を施し、ピロリン酸型の新規類縁体 phosphocalyculin A を生成することが明らかになった。また phosphocalyculin A の各種がん細胞およびセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素 PP2A に対する阻害活性は calyculin A と比較して約 1,000 倍弱毒化されていた (Fig. 14, Table. 1)。

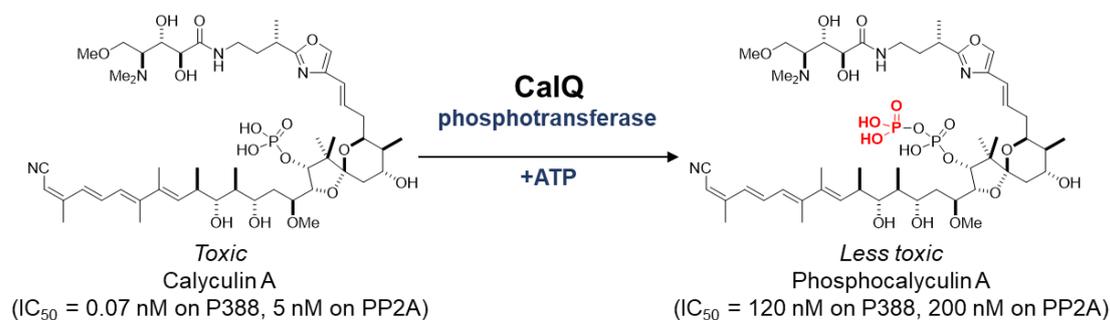


Fig. 14 リン酸基転移酵素 CalQ の *in vitro* 酵素反応

Table. 1 Phosphocalyculin A と calyculin A の生物活性

Origin	Phylum	cell line, enzyme, or strain	Phosphocalyculin A	Calyculin A
-	Mouse	Cytotoxicity against P388 leukemia cell	120 nM	0.07nM
-	Rabbit	PP2A	200 nM	5 nM
NBRC	Ascomycota (yeast)	<i>Candida albican</i>	20 μM	2.5 μM
NBRC	Ascomycota (yeast)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	>10	10
NBRC	Actinobacterium	<i>Kocuria rhizophila</i>	>10	>10
NBRC	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	>10	>10
Deep sea marine sponge	Firmicutes	<i>Salinicoccus qingdaonensis</i> _B12M2	>20	>20
Theonella swinhoei yellow	Bacteroidetes	<i>Pontibactor</i> sp.	>10	>10
NBRC	Proteobacteria	<i>E. coli</i>	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Erythrobacter citreus</i> _B12R3	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	Anti-Biofilm <i>Erythrobacter citreus</i>	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> _B6M4	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Sulfitobacter pontiacus</i> _B11M4	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Alteromonas macleodii</i> _B15M4	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Citromicrobium bathyomarinum</i> _B11RM2	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Shimia biformata</i> _B12M1	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Paracoccus aquimaris</i> _B12R1	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Paracoccus aquimaris</i> _B11RC3	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas arabiensis</i> _B13M5	>10	>10
Deep sea marine sponge	Proteobacteria	<i>Pseudomonas pachastrellae</i> _B18R2	>10	>10

IC₅₀ for cytotoxicity and enzyme, MIC (μM) for antifungal, antibacterial assay

第3節 海綿組織傷害に応じた calyculin A 活性制御機構

リン酸基転移酵素 CalQ によって生成した phosphocalyculin A は、従来の単離方法において見出されていなかった新規 calyculin 類縁体であった。当時 calyculin A は冷凍海綿 *D. calyx* から MeOH 抽出物中に主要代謝物として見出されていたため、生合成の最終産物と考えられていた。しかし、採集直後に液体窒素で瞬間凍結し、凍結乾燥処理した海綿の MeOH 抽出物からは calyculin A の代わりに phosphocalyculin A が主要代謝産物として発見された⁹⁶⁾。このことから *D. calyx* には、組織内に高濃度で含まれているプロトキシシ phosphocalyculin A が海綿の組織損傷に応じて何らかの脱リン酸化酵素により迅速かつ効率的に活性型の calyculin A へと生物変換される化学防御機構「活性化防御」が備わっていることが示唆された (Fig. 15)。また共生細菌 *Entotheonella* が低毒性の phosphocalyculin A を最終生成物として生合成することで、真核生物である海綿宿主への毒性を緩和していることが生合成研究の結果から示唆される。さらに抗菌活性が全く認められない calyculin A は、*Entotheonella* に対して自己毒性を示さないと考えられる (Table. 1)。そのため、この calyculin 活性制御機構には共生細菌と海綿宿主間のクロストークの存在が示唆される。

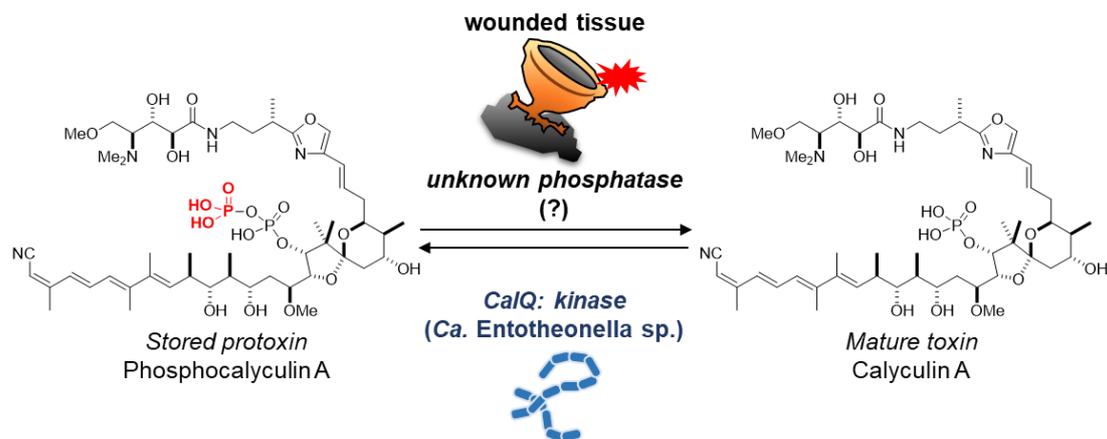


Fig. 15 海綿 *D. calyx* における calyculin A の活性制御機構

第4節 本研究の目的

海綿動物からは外敵や捕食者などから身を守るための化学防御物質として極めて低濃度で強力な細胞毒性を示す二次代謝産物が数多く見出されてきた。これら細胞毒性物質は、その特異的作用ゆえに生化学研究用試薬や医薬品開発の端緒として役立ってきた。一方、これら細胞毒性物質の標的分子はチューブリン、アクチンまたはタンパク質脱リン酸化酵素などの真核生物に普遍的に保存されているタンパク質であるが、これら細胞毒性物質は真核生物である海綿動物に高濃度で含まれている。このことから海綿動物には何らかの毒性回避機構の存在が示唆される。

2014年生合成研究⁹⁶⁾の過程で *D. calyx* にはその毒性回避機構と推定される calyculin の活性制御機構が備わっていることが明らかになった。これまでに海綿組織の損傷に応じて弱毒性の二次代謝産物が瞬時に活性化される例は数例存在するが³⁰⁻³⁵⁾、その活性制御機構の全容を明らかにした例は存在しない。海綿組織内で細胞毒性物質が化学防御物質として適切に機能するには、その毒性の厳密な時空間制御が必要になる。海綿組織内での毒性物質の活性制御機構の解明は、海洋天然物の医薬品化における選択毒性の課題を解決するための知見が得られると期待される。即ち海綿組織内のプロトキシシン機構を利用することで、がん細胞表面の抗原を認識する抗体とコンジュゲートさせた脱リン酸化酵素を調製し、がん組織選択的にプロドラッグを活性化する治療法(抗体指向性酵素プロドラッグ療法、Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy, ADEPT)の開発が期待できる¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾。また本研究で扱う calyculin A の生産菌 *Entotheonella* 属は有用二次代謝産物の生産能に優れた細菌であるが、現段階で実験室下での培養には成功していない。このため、その生態学的意義や二次代謝産物の生産機構は詳細に解析されておらず、環境中におけるそれら役割は不明である。

そこで本研究では、*D. calyx* に備わっている海綿組織の傷害が引き金となる calyculin A の活性化がどのように生体内で制御されているのかを明らかにすることを目的に、鍵となる phosphocalyculin A 脱リン酸化酵素の同定を目指した。また同定した酵素の機能解析および海綿組織における calyculin A 活性化メカニズムの考察を試みた。

本論

第1章 Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の同定

第1節 序論

海綿動物における毒性物質の活性化防御に関する研究は、1993年の Proksch らの *Aplycina* 属の活性化防御の報告から始まった³⁰⁾。2013年 Proksch らはその活性制御機構を明らかにするために、海綿 *Aplycina cavernicola* の粗酵素抽出液よりプロトキシン中間体のニトリル基を有する aeroplysinin-1 を活性型のジエノンアミド (verongiaquinol) へと変換するニトリル加水分解酵素を精製した (Fig. 4)³³⁾。タンパク質のトリプシン消化によって得たペプチド断片のアミノ酸配列を LC-MS/MS で解析するペプチドマスフィンガープリンティングを用いて酵素の同定が行われた。しかし4か所のペプチド断片のみの検出にとどまり、酵素の全アミノ酸配列の同定には至っていない。また海綿や共生微生物の全ゲノム情報が明らかでないため、得られた部分配列から活性化酵素をコードする遺伝子およびその生産者の同定には至っていない。このことから、多種多様な共生微生物を含む海綿動物からの酵素の精製およびその同定は困難であることを示唆している。しかし、活性化酵素の同定を足掛かりに海綿動物における毒性物質の活性制御機構を理解することで、臨床応用における選択毒性の問題の解決策を提示できる。そこで、本章では海綿動物 *Discodermia calyx* における calyculin 活性制御機構の全貌を明らかにするために、鍵となる phosphocalyculin の活性化酵素の同定を目指した。

第2節 組換えタンパク質 CalL の異種発現および脱リン酸化反応の検討

機能未知タンパク質 CalL の機能予測

Phosphocalyculin A から活性型の calyculin A へと脱リン酸化する反応は、海綿の粗酵素液を用いて再現が可能であり、熱変性処理した海綿の粗酵素液を用いると反応が進行しないことから酵素依存的反応であることが予想された⁹⁶⁾。また calyculin 生合成遺伝子クラスターの上流にコードされているリン酸基転移酵素 CalQ は、calyculin A をリン酸化し弱毒性の phosphocalyculin A を生産することで calyculin A の毒性を低減する酵素であることが示唆された。このようなリン酸化/脱リン酸化を介した活性制御機構は、アミノグリコシド系抗生物質の活性制御機構と類似している (Fig. 16)^{112, 113)}。抗生物質 streptomycin の生産菌 *Streptomyces* 属において、その終盤の生合成経路には耐性酵素としても知られているリン酸基転移酵素 StrA が streptomycin の糖鎖の6位をリン酸化することで自己毒性を回避する¹¹⁴⁾。また生産菌の細胞質外において脱リン酸化酵素である StrK により streptomycin 6-phosphate が脱リン酸化され、活性型の streptomycin へと変換されることで周囲の菌に対し抗菌活性を示す¹¹⁵⁾。

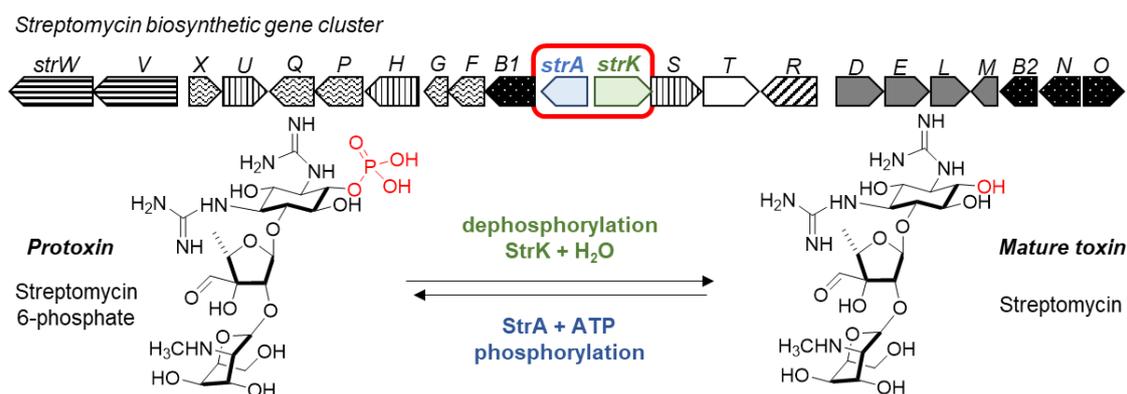


Fig. 16 Streptomycin 生合成遺伝子クラスターに内在するリン酸化/脱リン酸化を介した streptomycin の活性制御機構

このように抗生物質の耐性を担うリン酸化酵素および活性化を担う脱リン酸化酵素は、抗生物質の生合成遺伝子クラスターにセットで存在することが多い¹¹³⁾。

一方、CalQ はこれらアミノグリコシド系抗生物質の耐性に関わるリン酸基転移酵素と30%の配列相同性を示す。また、その下流にコードされている機能未知タンパク質 CalL は、細菌 *Algincola* 属や *Burkholderia* 属のゲノムにコードされている機能未知の脱リン酸化酵素と35-43%の配列相同性を示すことから phosphocalyculin A の脱リン酸化酵素であると予想される (Fig. 17)。そこで本章では、初めに CalQ と同様に大腸菌を用いて調製した組換えタンパク質 CalL が phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を示す可能性を検討した。

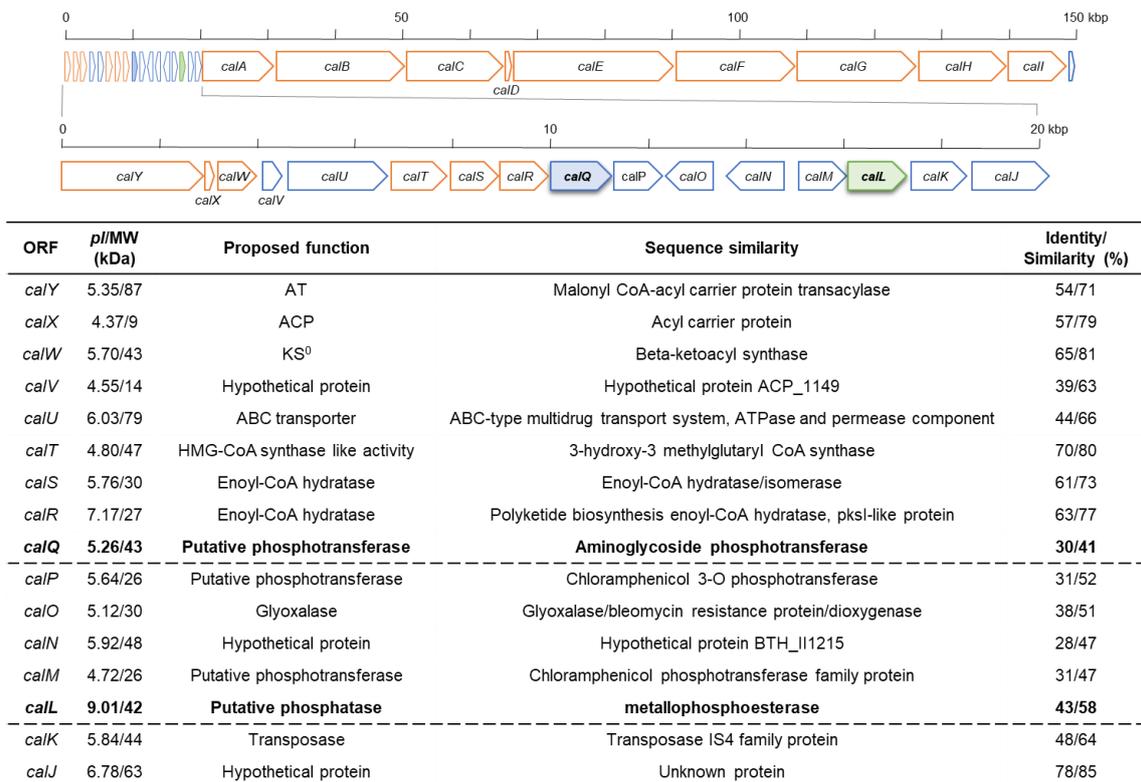


Fig. 17 Calyculin 生合成遺伝子クラスター上流にコードされているタンパク質の推定機能

機能未知タンパク質 CalL の機能解析

CalL は配列相同性から脱リン酸化酵素の機能を有すると推定されたことから、機能未知タンパク質 CalL は phosphocalyculin A の脱リン酸化酵素であると予想される。そこで大腸菌の異種発現系を用いて調製した組換えタンパク質 CalL の *in vitro* 機能解析を行った。N 末端にタンパク質精製のためのヒスチジンタグ *His*₆ を融合させた組換えタンパク質 CalL (*His*₆-CalL) を作成した。タンパク質高発現用ベクター pColdII の T7 プロモーター下流に、PCR によって増幅した *calL* 遺伝子断片を挿入し、タンパク質高発現用の大腸菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) に形質転換した。IPTG の添加により高発現させたが CalL 単独での異種発現で得られるタンパク質は、不溶性の封入体であった。そこで、可溶性組換え CalL を得るために分子シャペロンとの共発現を行い、目的タンパク質を可溶性画分に得た。高発現させた粗酵素溶液を Ni アフィニティー樹脂カラムに供し、樹脂に吸着した組換えタンパク質 *His*₆-CalL を精製した。精製した画分を 10% SDS-PAGE で分析した結果、溶出画分 (eluted fraction) に宿主由来の夾雑タンパク質と共に組み換え *His*₆-CalL に相当するバンドが検出された (Fig. 18)。精製した組換え *His*₆-CalL を用いて、基質 phosphocalyculin A との *in vitro* 酵素反応を試みた。脱リン酸化酵素の反応には、金属が必要であるため二価および三価の金属 (Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) と共に酵素反応を試みた。また、酵素に必要な補因子が不明であったため、海綿抽出液を熱変性後その上清も添加した。しかし、いずれの反応条件においても CalL による phosphocalyculin A の脱リン酸化活性は認められなかった。

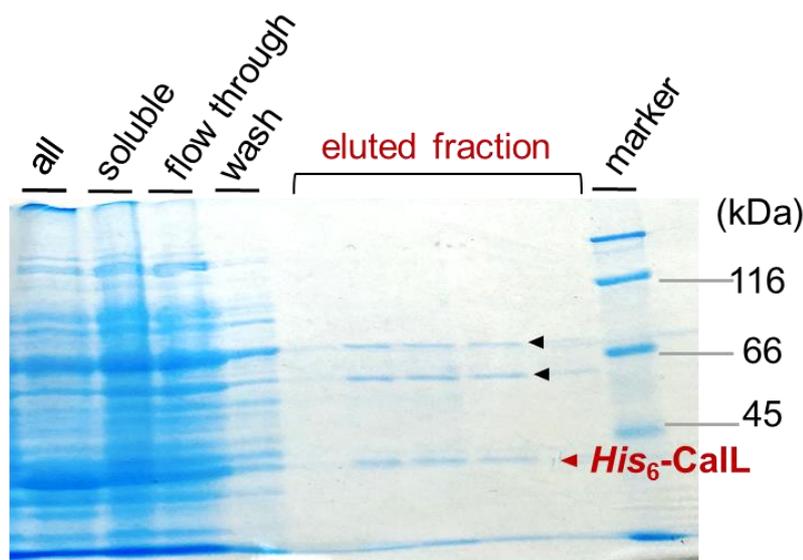


Fig. 18 Ni アフィニティーカラムで精製した組換え *His*₆-CalL の SDS-PAGE

▶ ; *His*₆-CalL、▶ ; 夾雑タンパク質

第3節 Phosphocalyculin 脱リン酸化活性を示す天然酵素の精製

第2節において calyculin 生合成遺伝子クラスターにコードされている脱リン酸化酵素と相同性を示す CalL は、いずれの条件においても phosphocalyculin A の脱リン酸化活性を示さなかったことを述べた。また phosphocalyculin A から calyculin A へと生物変換されるには海綿宿主の組織傷害が引き金となることから、本反応に関与する脱リン酸化酵素は calyculin 生産菌以外の海綿宿主やその他の共生微生物由来であることも考えられる。一方、海綿 *D. calyx* の粗酵素溶液に認められる phosphocalyculin A 脱リン酸化活性は冷蔵庫で1か月間保存後も保持されている。また、*D. calyx* と同じ Theonellidae 科に属する海綿 *T. swinhoei* や *Discodermia kiiensis* より調製した粗酵素液を用いた場合 phosphocalyculin A の脱リン酸化活性は認められない。これらのことから海綿 *D. calyx* の粗酵素液には、極めて安定かつ phosphocalyculin A に特異的な脱リン酸化酵素が含まれていると考えられる。そこで次に、海綿 *D. calyx* の組織内で phosphocalyculin A の活性化を実際に担う酵素の同定を目的に、海綿の粗酵素抽出液より phosphocalyculin 特異的な脱リン酸化酵素の精製を試みた。

脱リン酸化酵素活性試験

脱リン酸化酵素の中には基質特異性が極めて低い酵素が存在する。それら酵素の反応速度定数は基質ごとに異なり、生体内で実際に認識されている基質の反応速度が最も速い傾向にある¹¹⁶⁾。一方、本研究で同定を目指す酵素は海綿の組織損傷後、瞬間的に基質のプロトキシンを認識し加水分解する酵素であることから、目的とする脱リン酸化酵素は phosphocalyculin に対して極めて高い脱リン酸化活性を有すると考えられる。そこで本研究では、海綿から phosphocalyculin を特異的に脱リン酸化する酵素を精製するために二つの活性試験を併用した。一つは基質認識が低い脱リン酸化酵素の検出が可能な *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) に対する脱リン酸化活性試験 (*p*-NPP 試験) を行った⁸⁰⁾。一方、目的の脱リン酸化酵素が本来の基質 phosphocalyculin を加水分解した際に生じる遊離モノリン酸の検出が可能なマラカイトグリーン (MG) 試薬を用いて、phosphocalyculin 特異的な脱リン酸化活性試験 (MG 試験) を行った。すなわち *p*-NPP 試験で陰性を示し、MG 試験で陽性を示す画分を探索した。

***D. calyx* 由来 phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素の精製**

伊豆半島の中木で採集した海綿 *D. calyx* 湿重量 1.8 kg より粗酵素抽出液 7.3 g を得た。初めに、粗酵素溶液から有機溶媒や硫酸アンモニウム塩を用いた沈殿分画法によって脱リン酸化酵素の濃縮を試みたが、酵素活性が散在し分画が困難であった。そこで粗酵素抽出液を直接陰イオン交換樹脂カラム Q-XL に供した。大部分のタンパク質は樹脂に吸着されたが、樹脂に吸着されなかったフロースルー画分に高い phosphocalyculin 脱リン酸化活性が認められた。このことから phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の表面電荷は正に帯電しており、塩基性タンパク質であることが示唆された。次にフロースルー画分を塩基性タンパク質と親和性が高い陽イオン交換樹脂カラム SP-XL に供した。予想通り脱リン酸化酵素が吸着され、大部分の夾雑タンパク質の除去に成功した。さらにその溶出画分は *p*-NPP 試験で活性を示さず、phosphocalyculin 特異的脱リン酸化活性試験で強い活性を示した (Fig. 19、20a)。本結果よりこの溶出画分に含まれる phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素は生体内において phosphocalyculin の活性化を担う酵素であることが強く示唆された。本活性画分を疎水性相互作用カラム phenyl sepharose、ゲルろ過カラム Sephacryl S200、陽イオン交換樹脂カラム MonoS を用いて順次精製した。最終精製には Sephacryl S200 カラムよりも分離能が高い HPLC ゲルろ過カラム PROTEIN LW-804 で最終精製を行った (Fig. 20b)。その結果、約 45±5 kDa の溶出時間に活性酵素は溶出した。さらにその活性画分を SDS-PAGE で分析したところ、ゲルろ過カラムの結果と相違なく分子量が約 45 kDa のタンパク質が検出された。このことから phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素の分子量は約 45 kDa であり、モノマーとして存在することが示唆された (Fig. 20c)。

さらに phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素の等電点を明らかにするために、海綿から精製した脱リン酸化酵素を二次元電気泳動により分析した。その結果 phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素のスポットが、塩基性領域に存在することが認められた (Fig. 20 d)。等電点カリブレーションマーカの二次元電気泳動図と重ね合わせたところ、活性酵素の等電点 *pI* が 8-10 の塩基性タンパク質であることが明らかになった (Supplementary Fig. 3a)。また *pI* 8-10 の領域に 45 kDa のスポットが複数認められたことから、何らかの翻訳後修飾の存在が示唆された。

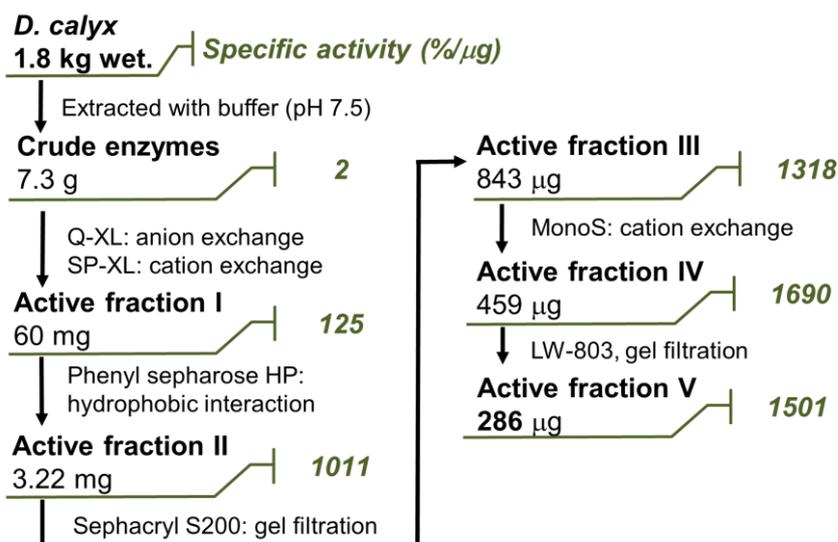


Fig. 19 Phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素の精製スキーム

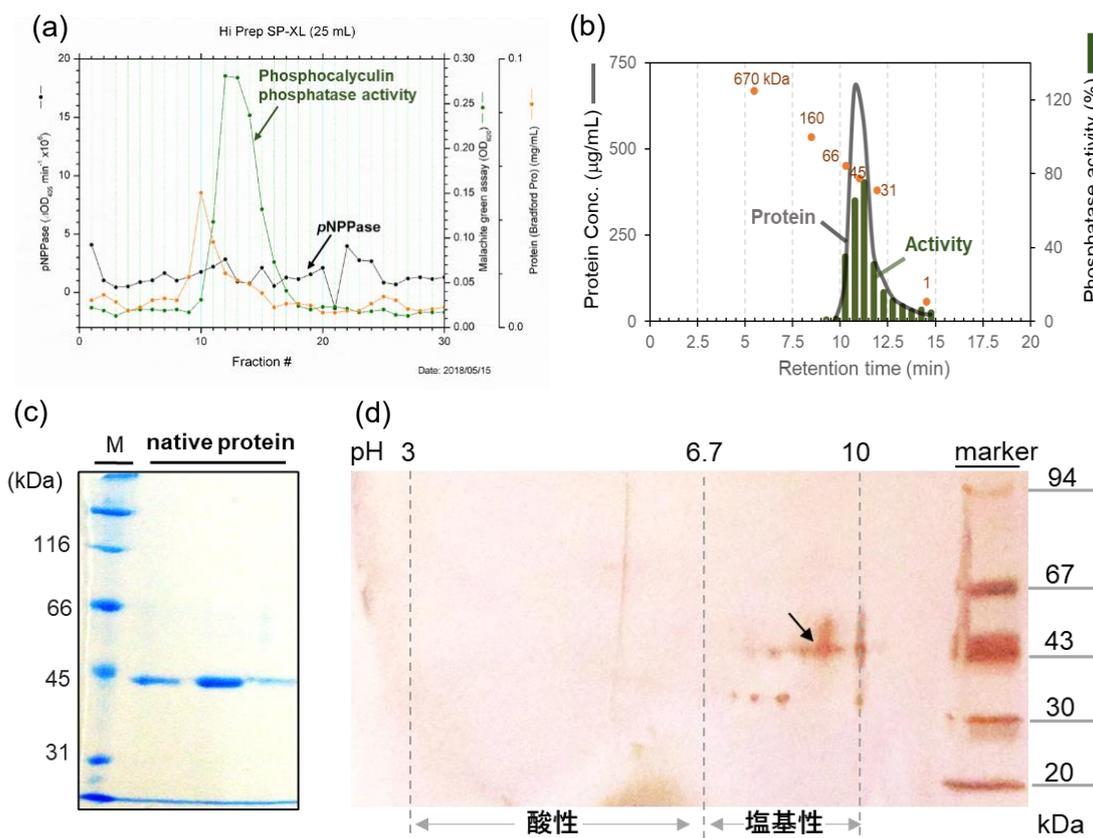


Fig. 20 Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の物理化学的特徴

(a) SP-XL カラムクロマトグラム、(b) ゲルろ過カラムクロマトグラム、橙色=タンパク質マーカー溶出時間：670 kDa (5.2 min), 160 kDa (8 min), 66 kDa (10.1 min), 45 kDa (10.9 min), 31 kDa (12 min), 1 kDa (14.8 min)、(c) 最終精製した脱リン酸化酵素の 10% SDS-PAGE (CBB 染色) および (d) 二次元電気泳動図 (銀染色)

第4節 天然由来 phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素の同定

二次元電気泳動により海綿より精製した phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素の物理化学的性質を分析した結果、その分子量と等電点は約 45 kDa および 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。海綿 *D. calyx* とその共生微生物の全遺伝子情報は明らかでないが、共生細菌 *Ca. Entotheonella* 属のゲノムにコードされている calyculin 生合成遺伝子クラスターとその周辺の遺伝子情報のみ明らかであった⁹⁶⁾。そこで天然由来脱リン酸化酵素の物理化学的特徴を参考に calyculin 生合成遺伝子クラスターおよび上流にコードされているタンパク質の物性データを確認した (Fig. 17)。それら物理化学的特徴は pI 7 以下の酸性から中性の等電点を有するタンパク質が大半であった。しかし興味深いことに、本章2節で述べた phosphocalyculin A 脱リン酸化活性が認められなかった CaL がクラスター内で唯一塩基性の等電点 pI 9.01 かつ分子量 42 kDa という特徴を有しており、天然由来脱リン酸化酵素の物理化学的特徴と酷似していた。このことから海綿より精製した phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素が CaL であると予想された。

そこで海綿から精製した phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素が CaL である可能性を検証するために、ペプチドマスフィンガープリンティング法 (Peptide mass fingerprinting: PMF)¹¹⁷⁾によるタンパク質の同定を行った (Fig. 21)。最終精製した活性画分を 10% SDS-PAGE で

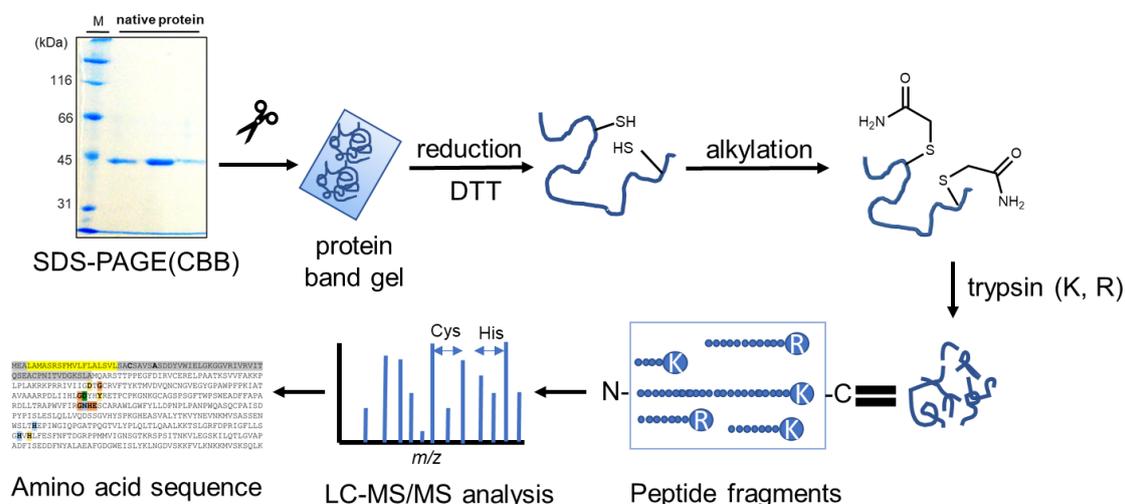


Fig. 21 ペプチドマスフィンガープリンティング法 (PMF) の概略図

分離後、ゲルからバンドを切り出し、脱色液を用いて染色剤である CBB を除去した。次にジチオスレイトール (DTT) によりタンパク質内のジスルフィド結合をゲル内で還元後、システイン残基に対してヨードアセタミドと反応させることでアルキル化保護を施した。還元剤およびヨードアセタミドを除去した後、タンパク質のリジン (K) とアルギニン (R) 残基を選択的に切断するトリプシンを用いてタンパク質を消化することでペプチド断片を得た。消化後ゲルからペプチド断片を抽出・精製し、得られたペプチド断片を LC-ESI-MS/MS に供し、ペプチド断片の構成アミノ酸配列を分析した。より広範囲のアミノ酸配列を検出するためにトリプシン消化後のペプチド断片をさらに endoproteinase *Glu-C* (切断部位 E,D) で

消化し、同様に LC-ESI-MS/MS へと供した。本実験の比較対象として組換えタンパク質 *His6*-CaL も別途調製し同様の手法で分析した。

その結果、組換えタンパク質 CaL と同一のアミノ酸配列断片が天然由来の脱リン酸化酵素からも検出された (Fig. 22, 23, Supplementary Fig. 4)。最終的に CaL のアミノ酸配列カバレッジの 77% を占めるアミノ酸配列断片の検出に成功した。本結果より海綿動物 *D. calyx* から精製した phosphocalyculin 脱リン酸化酵素は再び CaL である可能性が高まった。

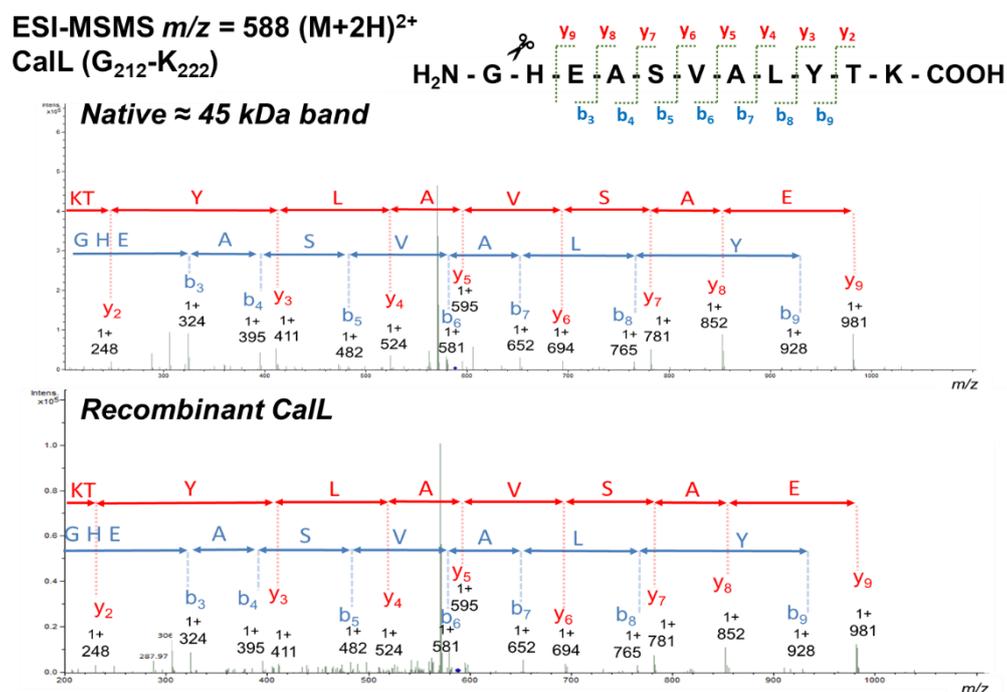


Fig. 22 CaL に相当するペプチド断片の MS/MS スペクトルの一例
 (その他 ; Supplementary Fig. 4)

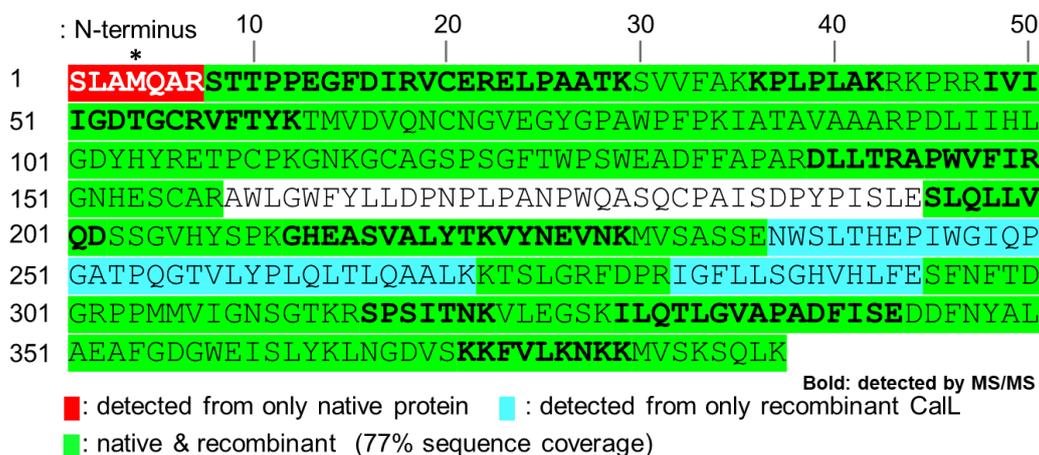


Fig. 23 PMF により検出された CaL に相当するアミノ酸配列

遺伝子 *calL* の読み枠 ORF の解析

PMF 分析の結果から phosphocalyculin A 脱リン酸酵素は再び CaL である可能性が高まった。しかし、これまで組換え CaL の脱リン酸化活性は、いずれの条件においても認められていなかった。そこで海綿より精製した酵素と組換え *His6*-CaL のそれぞれの PMF データを比較し、組換えタンパク質と異なる点を精査した。その結果、CaL の読み枠 open reading frame (ORF) よりも N 末端側に 3 残基伸長されたペプチド断片が天然由来の脱リン酸化酵素から検出された (Fig. 23 の赤色領域 SLAMQAR)。また CaL と配列相同性を示す機能未知のタンパク質 (CaL ホモログ、配列相同性 34-42%) とのアミノ酸配列のアラインメント解析を行ったところ、全ての CaL ホモログにおいて N 末端側に約 60-80 残基の機能未知の部位が存在することが示唆された (Fig. 24)。

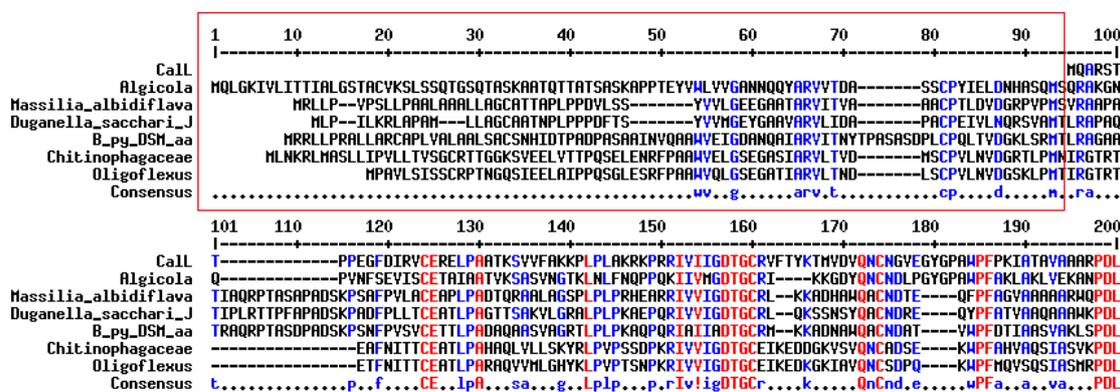


Fig. 24 CaL とそのホモログの N 末端アミノ酸配列アラインメント解析

赤字：90%以上相同性、青字：50%以上相同性、赤枠内；CaL 推定欠損領域

これらの結果から当初想定していた CaL の読み枠 ORF は誤りであり、実際の CaL の開始コドンはより上流に存在することが予想された。しかし NCBI に提出されている DNA 塩基配列データ (accession code; AB933566.1) を精査すると遺伝子 *calL* の開始コドンより上流 -57 bp に終始コドンが存在するため、CaL の ORF を N 末端側へ伸長させることができなかった。そこで NCBI に提出された DNA 塩基配列データにエラーが存在すると推察し、*calL* の上流-400 bp を認識するシーケンス用プライマーを作成し、*D. calyx* の DNA メタゲノムより単離された *calL* 遺伝子の塩基配列の再解析を行った。その結果、*calL* の開始コドンから-42 bp 上流にアデニンが一つ余分に入ったシーケンスエラーを発見した (Fig. 25)。このエラーを除去した結果、予想通り CaL の開始メチオニンから N 末端側に約 60 アミノ酸残基伸長可能な ORF を見出した (Supplementary Fig. 1, 5)。加えて、この新たに見出した N 末端アミノ酸配列と CaL ホモログの N 末端の配列は相同性を示すことも明らかになった (Fig. 26)。また、海綿より精製した酵素の PMF データを精査した結果、新たな ORF CaL の 48 残基から 70 残基に相当するアミノ酸配列断片が検出された (Fig. 27, Supplementary Fig. 4)。

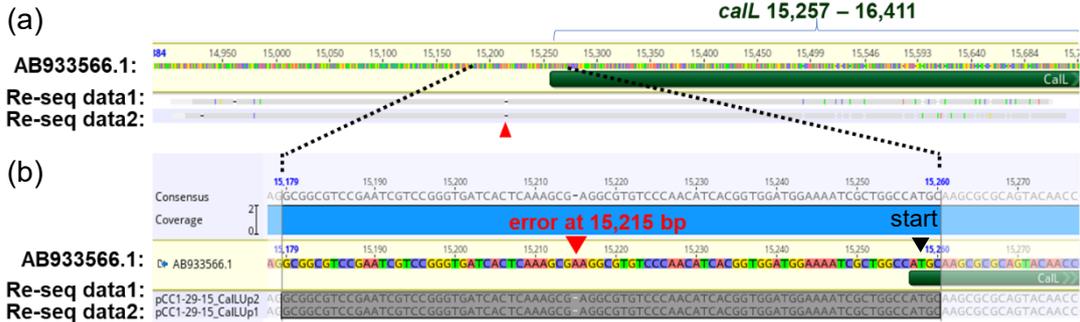


Fig. 25 遺伝子 *calL* 上流の塩基配列とその再解析データとのアラインメント結果
 (a) 遺伝子 *calL* 上流の塩基配列アラインメント、AB933566.1; NCBI の塩基配列、
 Re-seq data1; 再解析データ 1、Re-seq data2; 再解析データ 2、(b) シークエ
 スエラー領域の拡大図、▼; エラー箇所、▼; 当初想定していた開始コドン

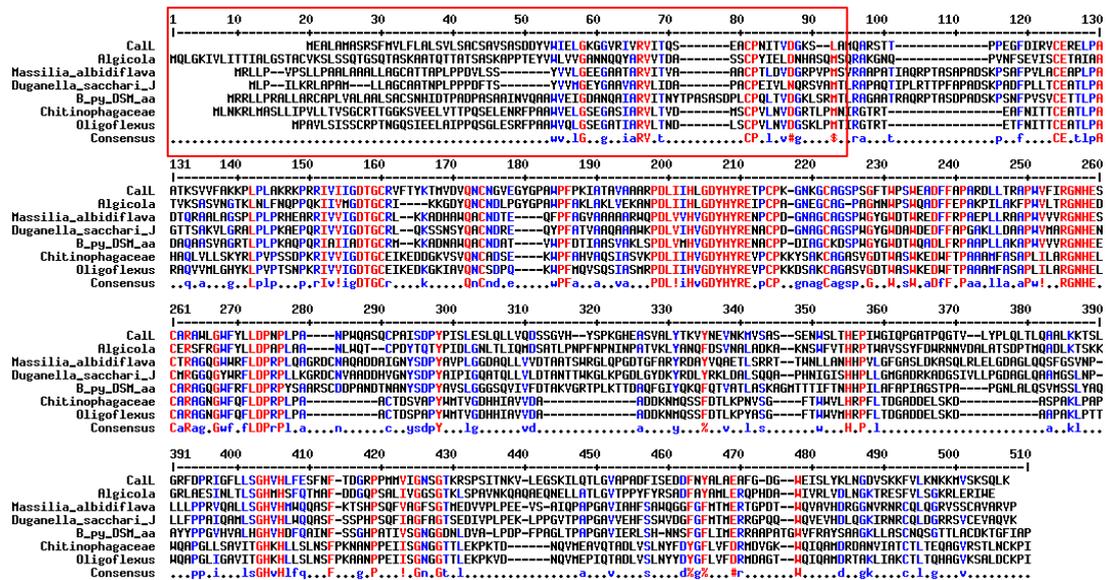


Fig. 26 CaL とそのホモログの全長アミノ酸配列アラインメント結果
 赤枠内; 新たに見出した CaL の N 末端領域

以上の結果から、海綿由来の phosphocalyculin 脱リン酸化酵素は遺伝子 *calL* の ORF が N 末端側に伸長した CaL (以下、NL-CaL と定義する) である可能性が高まった。また CaL の N 末端の領域 1 残基から 47 残基、およびプロリンが多く保存されている中央領域 220 残基から 257 残基のペプチド断片が検出されなかった理由は、現段階で不明であった (Fig. 27)。海綿由来の脱リン酸化酵素の二次元電気泳動 (Fig. 20d) の結果、pI8-10 の領域に 45 kDa のスポットが複数認められたことも考慮すると、これらの断片領域において何らかの翻訳後修飾の存在が示唆される。しかし、リン酸化 (修飾残基: S, T, Y)、グリコシル化 (S, T, Y, N)、アセチル化 (K, R) の翻訳後修飾は検出されなかった。

組換えタンパク質 NL-CalL の異種宿主発現およびその精製

PMF の結果、海綿より精製した phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素が新たに見出した NL-CalL であることが予想された。そこで、大腸菌の異種発現系を用いて調製した組換えタンパク質 NL-CalL の *in vitro* 機能解析を行った。本章 2 節で述べた His-tag は金属と相互作用し脱リン酸化酵素活性に影響を及ぼす可能性があったため、C 末端側にタンパク質精製のための Strep-tag II (WSHPQFEK) を結合させた組換えタンパク質 CalL (NL-CalL-strep) を作成した (Fig. 28a)。タンパク質高発現用ベクター pET22b (+) の T7 プロモーター下流に、PCR によって増幅した *calL* 遺伝子断片を挿入し、タンパク質高発現用の *E. coli* BL21 (DE3) に形質転換した。組換えタンパク質 NL-CalL-strep の発現は T7 プロモーター下 IPTG により誘導した。高発現させた大腸菌より得られた粗酵素溶液を Strep-tag II アフィニティー樹脂カラム (Strep-Tactin[®]) に供し、樹脂に吸着した組換えタンパク質 CalL-strep を精製した。精製した画分を 10% SDS-PAGE で分析した結果 (Fig. 28b)、溶出画分 (Elute) に宿主由来の夾雑タンパク質と共に組み換え NL-CalL-strep に相当するバンドが検出された。

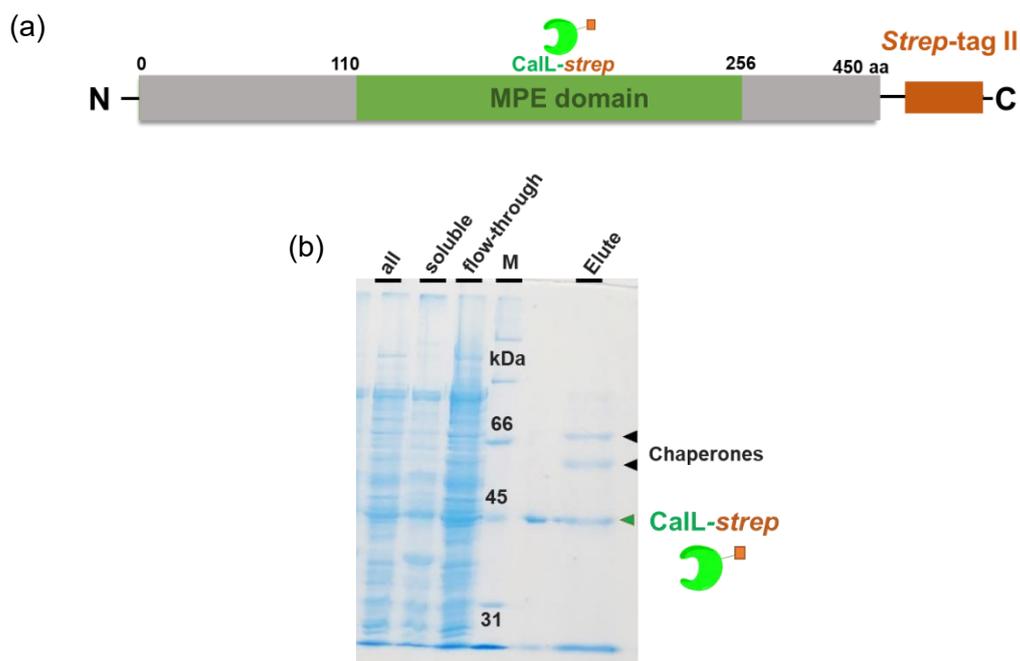


Fig. 28 組換えタンパク質 NL-CalL-strep

(a) 組換え NL-CalL-strep の概略図、MPE: metallophosphoesterase

(b) Strep-Tactin[®]樹脂で精製した組換え NL-CalL-strep の SDS-PAGE

続いて、海綿由来の脱リン酸化酵素の最終精製と同様に、夾雑タンパク質を除去するために溶出画分をゲルろ過カラムクロマトグラフィー (LW-803、HPLC) に供した。溶出時間ごとに分画し、得られた4つの画分を SDS-PAGE で分析した (Fig. 29)。その結果、約 45 kDa の溶出時間 (Fr. 3) に可溶性組換えタンパク質 NL-CalL-strep に相当するバンドが認められた。このことから組換えタンパク質 NL-CalL-strep でも天然由来の酵素と同様にモノマーとして存在していることが示唆された。また可溶性組換えタンパク質 NL-CalL-strep の精製に成功した。これまで N 末端が短い CalL を可溶性画分に得るためにはシャペロンとの共発現系を用いる必要があったが、N 末端側に伸長された NL-CalL はシャペロン共発現系を用いることなく、可溶性タンパク質を得ることができた。本結果から CalL の N 末端部位はタンパク質の可溶性に大きく寄与することが明らかになった。

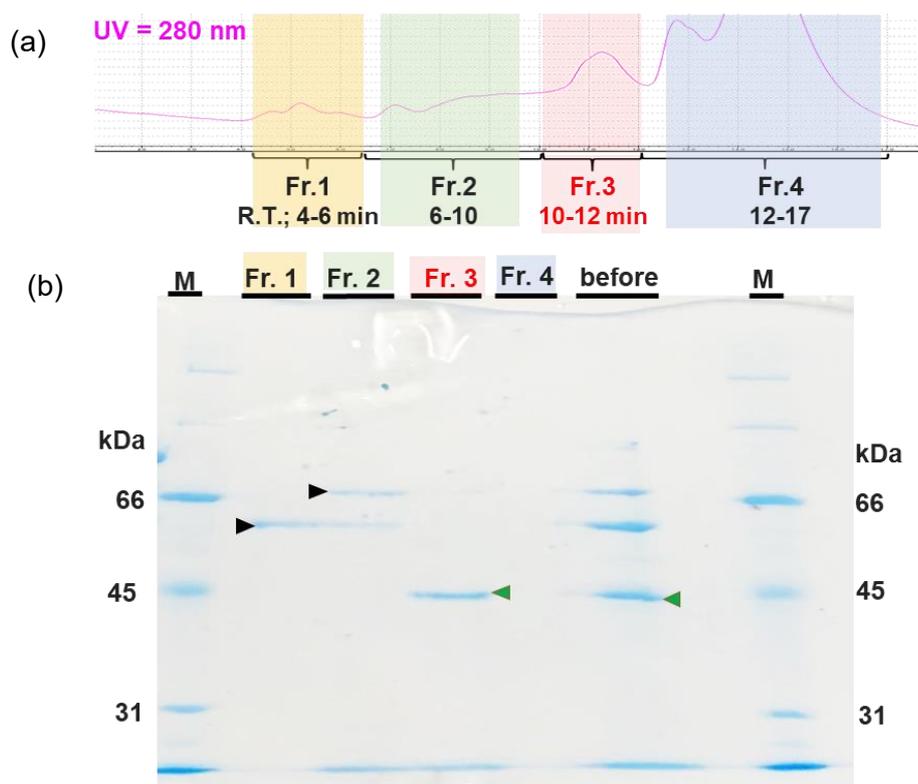


Fig. 29 組換えタンパク質 NL-CalL-strep の精製 (a) アフィニティー精製した溶出画分のゲルろ過カラムクロマトグラム R. T.=保持時間、タンパク質マーカ-溶出時間 : 670 kDa (5 min), 160 kDa (8 min), 66 kDa (10 min), 45 kDa (10 min), 31 kDa (12 min), 1 kDa (15 min)、(b) ゲルろ過カラム溶出画分の SDS-PAGE, M: 分子量マーカ-、Lane before: 精製前の画分、▶ : CalL、▶ : 夾雑タンパク質

組換えタンパク質 NL-CalL の *in vitro* 酵素反応

精製した C 末端 *Strep*-tag 結合タンパク質 NL-CalL-*strep* を用いて、基質 phosphocalyculin A との *in vitro* 酵素反応を行った。酵素反応は 10 nM の精製タンパク質 NL-CalL-*strep*、基質 6 μ M の phosphocalyculin A を Tris-HCl pH 7.25、25 $^{\circ}$ C、3 分間の条件で行った。3 分経過後、反応溶液と等量の MeOH を即座に加え酵素を変性させることで、反応を停止させた。遠心分離により変性タンパク質を除去した後に、得られた上清を UPLC で分析し phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を評価した。その結果、3 分間の処理で基質 phosphocalyculin A のピークが消失し、脱リン酸化体 calyculin A の新たなピークが出現した (Fig. 30)。一方、熱変性させた NL-CalL-*strep* でも同条件で反応を行ったが全く反応は認められなかったことから、本反応は酵素依存的な反応であることが明らかになった。本結果より見出した N 末端側に伸長された組換え NL-CalL でも phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を示すことが明らかになった。また N 末トランケート体 CalL が活性を示さなかったことを考慮すると、N 末端領域は CalL の活性発現にも重要であることが明らかになった。

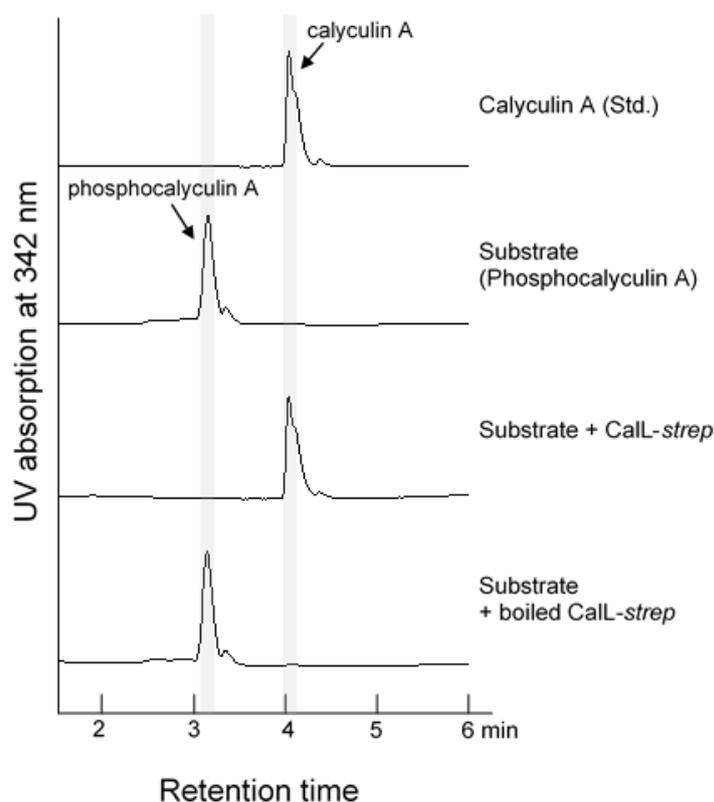


Fig. 30 組換えタンパク質 NL-CalL-*strep* の基質 phosphocalyculin A との *in vitro* 酵素反応

天然由来脱リン酸化酵素と組換え CaL の定常状態反応速度論的パラメーター

組換えタンパク質 NL-CaL でも phosphocalyculin A から calyculin A へと脱リン酸化することが明らかになった。しかし、海綿より精製した phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素と組換え NL-CaL の基質 phosphocalyculin A に対するそれぞれの基質認識や触媒効率が近似しているのか不明であった。そこで基質 phosphocalyculin A に対する天然由来の脱リン酸化酵素と組換え NL-CaL の定常状態速度論的パラメーターを測定した。酵素の基質 phosphocalyculin A に対する反応速度定数を測定するために、様々な濃度の基質を含む 50 mM Tris-HCl pH 7.25 の反応溶液に 10 nM 酵素 CaL を加えて 60 秒間反応させた。その後、反応溶液と等量のメタノールを添加することで反応を停止させた。反応溶液は UPLC に供し、酵素生成物の calyculin A のピーク面積を検出した (UV 343 nm)。Calyculin A 検量線をもとに生成物 calyculin A の濃度を算出した。得られたデータを用いて、ミカエリスメンテンプロット図を作製しミカエリス・メンテン式により最大反応速度 V_{\max} 、 K_m 、触媒定数 k_{cat} 値を算出した (Supplementary Fig. 6, Table. 2)。その結果、天然由来 CaL と組換え酵素 NL-CaL の K_m 、 k_{cat} および触媒効率 k_{cat}/K_m はそれぞれ良い一致を示した。本結果から天然由来 phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素と組換え NL-CaL の基質 phosphocalyculin A に対する認識能と触媒効率が近似していることが明らかになった。これらの結果から海綿 *D. calyx* において phosphocalyculin A の活性化を担う脱リン酸化酵素は、生産菌のゲノムにコードされている新たに見出した ORF NL-CaL であることが明らかになった。

Table. 2 定常状態速度論的パラメーターの比較 ($n = 3$, mean \pm SEM)

Enzyme	V_{\max}	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Native phosphatase	2.46 \pm 0.2	28.9 \pm 5.2	4.1 \pm 0.3	(1.6 \pm 0.3) $\times 10^5$
Recombinant CaL	3.09 \pm 0.4	26.7 \pm 2.1	5.2 \pm 0.3	(1.9 \pm 0.1) $\times 10^5$

第6節 小括

本章では calyculin の活性制御機構の全容解明を目指し、その鍵となる phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の同定に着手した。初めに calyculin 生合成遺伝子の情報をもとに CalL が phosphocalyculin A 脱リン酸化酵素であると推測し、組換えタンパク質 CalL の *in vitro* 酵素反応を行ったが、いずれの条件においても phosphocalyculin A の脱リン酸化活性は認められなかった。次に一般的な脱リン酸化酵素を検出する *p*-NPP 活性試験と phosphocalyculin 脱リン酸化活性試験 (MG 試験) を併用し、海綿 *D. calyx* の粗酵素抽出液より各種カラムクロマトグラフィーを用いて phosphocalyculin を特異的に脱リン酸化する酵素の精製に成功した。その物理化学的特徴は CalL のそれと酷似していたため、PMF により得られた天然由来の酵素のアミノ酸配列を解析した。その結果、当初予想された CalL の ORF と異なった CalL であることが示唆されたため、遺伝子 *calL* 上流の塩基配列の再解析を行ったところ、N 末端側に 60 アミノ酸残基伸長した新たな ORF の CalL を見出した。さらに新たな ORF CalL の N 末端配列は、CalL のホモログと配列相同性示し、天然由来酵素からも N 末端に相当するアミノ酸配列断片が検出された。これらのことから、海綿より精製した phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素は、新たな ORF の CalL (NL-CalL) である可能性が高まった。再び、新たに見出した ORF NL-CalL の組換えタンパク質を用いて phosphocalyculin A 脱リン酸化活性試験を行ったところ、組換え NL-CalL でも基質 phosphocalyculin A に対して海綿由来の脱リン酸化酵素と同等の脱リン酸化活性を示した。以上のことから、海綿動物の組織におけるプロトキシン活性化酵素は、耐性酵素 CalQ の下流にコードされている CalL であることが明らかになった (Fig. 31)。

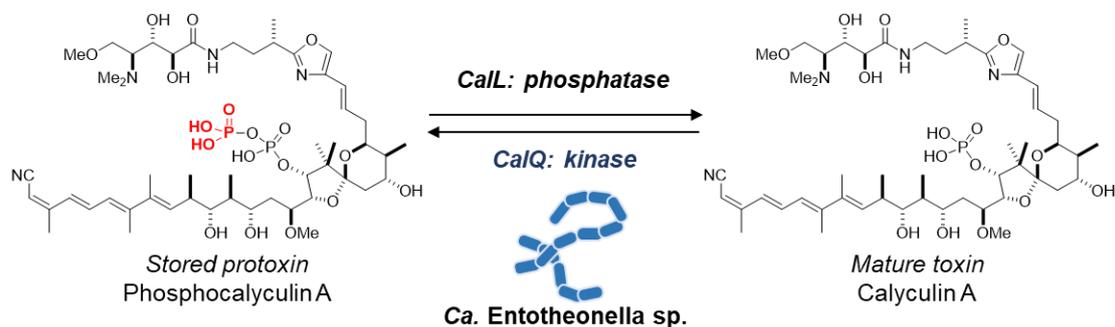


Fig. 31 Ca. *Entotheonella* 細菌による calyculin A 活性制御機構

第2章 Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の生化学的特徴の同定

第1節 序論

第1章で述べたように、海綿より精製した phosphocalyculin 特異的な脱リン酸化酵素は、CaL であることが明らかになった。しかしながら、CaL の生化学的特徴は同定されていない。CaL のアミノ酸配列と 34%以上高い相同性を示すホモログ酵素は、グラム陰性細菌の Burkholderiales 目に属する *Duganella* 属、*Burkholderia* 属、*Massilia* 属のゲノムに普遍的に保存されている (Table. 3, Supplementary Fig. 1)。しかし CaL と異なり、これらホモログは遺伝子の周囲に一次または二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターがコードされておらず、それらホモログの生理的機能や生化学的特徴も全く明らかになっていない。また CaL と機能既知の脱リン酸化酵素グループとの配列相同性は 24%以下と極めて低く (PAP; PDB 6G46_C)、CaL がどの脱リン酸化酵素グループに属するのか、どのような酵素グループと似た生化学的特徴を有するのかは不明であった。酵素の生化学的特徴の同定は、海綿の生体内における CaL の活性制御機構に関する知見を得られる可能性があるだけでなく、抗体指向性酵素プロドラッグ療法の活性化酵素として CaL を臨床開発する上で重要となる。そこで本章では、海綿組織におけるプロトキシンの活性化を担う脱リン酸化酵素 CaL の生化学的特徴を同定することを目指した。

Table. 3 CaL のアミノ酸配列ホモロジー検索の結果

Order	Spicies_strain or accession code	culturable?	Query cover	Similarity	AA length	pI	Mw (kDa)
Tectomicrobia	Ca. Entotheonella sp._CaL (Query)	no (metagenome)	100%	100.0%	450	8.8	49.3
Burkholderiales	<i>Massilia albidiflava</i> _WP_131143616.1	yes	90%	36.0%	468	6.3	49.9
Burkholderiales	<i>Duganella sacchari</i> _J10W	yes	95%	34.3%	464	6.3	50.1
Burkholderiales	<i>Burkholderia pyrrocinia</i> _WP_047903503.1	yes	80%	37.2%	487	7.5	51.4
Alteromonadales	<i>Algicola</i> sp._NQZ11225.1	no (metagenome)	91%	42.1%	468	7.1	51.3
Chitinophagales	<i>Chitinophagaceae bacterium</i> _MBC7659477.1	no (metagenome)	84%	36.6%	431	5.6	46.9
Oligoflexales	<i>Oligoflexus</i> sp._MBC7533859.1	no (metagenome)	84%	37.1%	420	6.1	45.6

第2節 機能既知の脱リン酸化酵素と CalL の生化学的特徴の比較

CalL と各種脱リン酸化酵素との系統樹解析

脱リン酸化酵素は多様な基質のホスホモノ・ジ・トリ・エステルまたは二リン酸のピロホスホエステルや ATP などのトリホスホエステルを金属依存的に加水分解する酵素グループであり、その活性中心には二核金属イオンを有する酵素である。ウイルスや細菌、古細菌、真菌から高等生物である植物や哺乳類など全ての生物に普遍的に存在する脱リン酸化酵素の生理的機能は極めて広い¹¹⁶⁾。例えば、DNA 修復や複製に関わるヌクレアーゼ^{118, 119)}や細胞内シグナル伝達に関与するリン酸化タンパク質の脱リン酸化酵素^{80-82, 87)}、脂質代謝に関わるスフィンゴミエリン分解酵素¹²⁰⁾、鉄イオンの運搬¹²¹⁾や破骨細胞の骨吸収^{122, 123)}に関与する purple acid phosphatase などそれら生理的役割は多岐に渡る。これら異なる生理的機能を担う脱リン酸化酵素グループ間の配列相同性は 20-30%以下と低い。しかし、それら触媒作用を有するメタロホスホエステラーゼ (metallophosphoesterase; MPE) ドメイン間は配列相同性を示し、MPE ドメインのアミノ酸配列で系統樹を作製すると酵素の機能ごとに分岐することが報告されている¹¹⁶⁾。CalL においても他の機能既知の脱リン酸化酵素グループとの相同性は 25%以下と低いが、110-256 残基の領域に MPE ドメインが保存されている。そこで初めに生化学的特徴が未同定の CalL に関する知見を得るために、CalL およびそのホモログ (Table. 3, Supplementary Fig. 1) の MPE ドメインを含め、多種多様な脱リン酸化酵素の MPE ドメイン合計 336 種のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った。Pfam に登録されている脱リン酸化酵素の MPE ドメイン領域データ (Pfam code: PF00149¹²⁴⁾ , 324 配列 + 12 配列; CalL + ホモログ) を用いて、ブーストラップ法により系統樹を作製した¹²⁵⁾。その結果、12 の脱リン酸化酵素グループに分岐され、グループ内で機能が解明されている酵素の情報をもとに機能ごとに色付けした (Fig. 32)。興味深いことに、CalL とそのホモログはどの酵素グループにも属さず独立したグループを形成することが明らかになった。このことから CalL は他の機能既知の脱リン酸化酵素とは異なる過程で進化したと考えられる。一方、CalL グループに最も近接する脱リン酸化酵素のグループは purple acid phosphatase (PAP) であることが明らかになった。

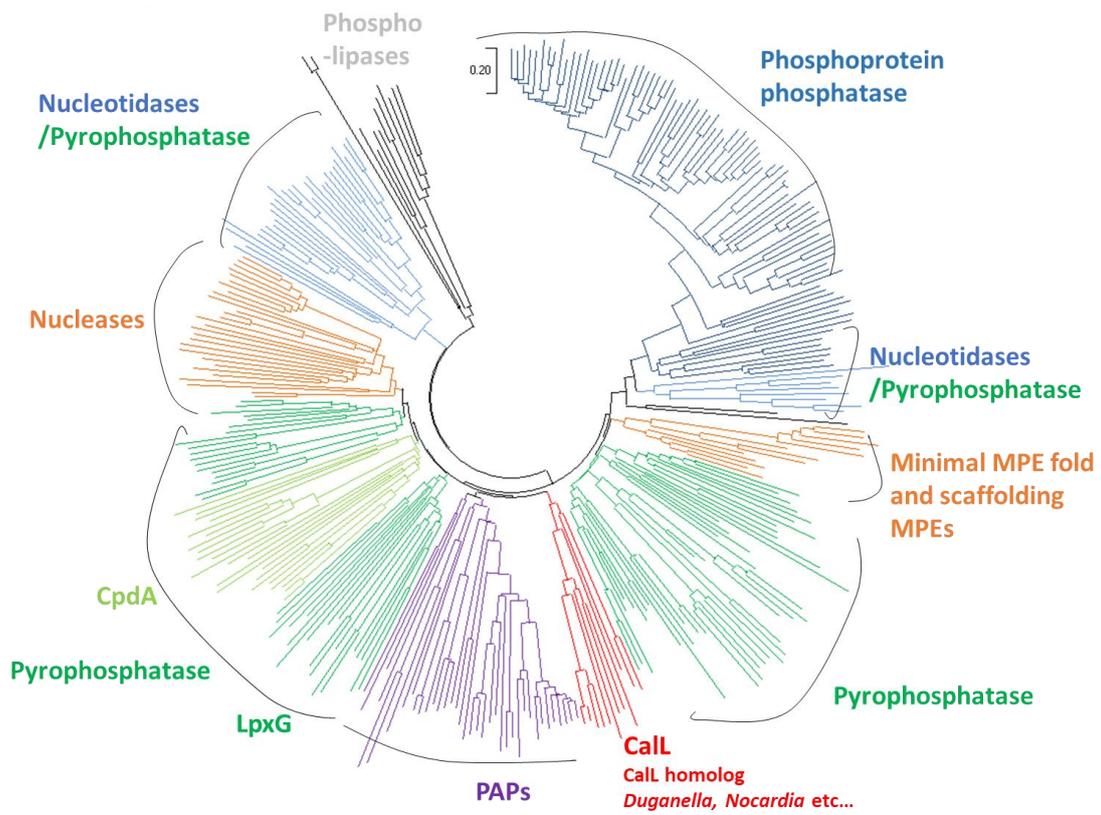


Fig. 32 脱リン酸化酵素の MPE ドメインの系統樹解析

PAP は原核生物から高等生物の植物や哺乳類まで広く存在する酵素である¹¹⁶⁾。哺乳類由来 PAP の生理的機能は妊娠中の母親から胎児への鉄イオン運搬¹²¹⁾や破骨細胞の骨吸収^{122, 123)}に関与することが提唱されている。一方、植物および細菌由来の PAP の生理的機能は明らかになっていないが、貧リン酸培地で栽培・培養した際に PAP の発現量が上昇することからリン酸の代謝に関与することが示唆されている^{126, 127)}。CaIL は *p*-NPP や calyculin A などのリン酸モノエステル基を加水分解せず phosphocalyculin A のピロリン酸エステルを特異的に脱リン酸化する一方、PAP の基質特異性は極めて低く、様々な基質のリン酸エステル、ピロリン酸エステル、トリリン酸エステルに対して酸性条件下で高い加水分解活性を示す (Table. 4)¹²⁶⁻¹²⁸⁾。このように様々な基質に対して脱リン酸化活性を示すことから、生体内での真の基質は不明である。

Table. 4 哺乳類・植物・細菌由来 PAP と CaIL の基質特異性

type	Substrates	Mammalian	Plant	Bacterial	CaIL
		<i>Pig_PAP</i>	<i>Arabidopsis PAP</i>	<i>Burkholderia PAP</i>	
Phosphomonoester	<i>p</i> -NPP	○	○	○	×
	O-phosphotyrosine	◎	×	◎	-
	O-phosphoserine	○	○	○	-
	FmocEEY(P)AA	○	○	-	-
	Phosphoenolpyruvate	○	-	○	-
	Calyculin A	-	-	-	×
Pyrophosphoester	Pyrophosphate	◎	○	-	-
	ADP	-	○	○	-
	Phosphocalyculin A	-	-	-	◎
Triphosphoester	ATP	-	◎	-	-
	dATP	-	◎	-	-
Polyphosphate	Poly phosphate	-	○	-	-

*◎：○よりも活性大、×：活性無、-：未測定

CaL の各種脱リン酸化酵素の阻害剤に対する感受性

系統樹解析の結果、CaL は PAP と似た生化学的特徴を有することが予測された。そこで次に CaL が PAP の特徴と類似するのかが検証するために、組換え CaL の各種脱リン酸化酵素の阻害剤に対する感受性を調べた。予め各種脱リン酸化酵素阻害剤と 10 分間室温で混合させた酵素 CaL を用いて phosphocalyculin A 脱リン酸化活性試験を行った (Fig. 33)。その結果、二価および三価の金属イオンキレート剤である EDTA は 5 mM で 70% 以上活性を阻害した。本結果より CaL の脱リン酸化反応は MPE の特徴である金属依存的な酵素反応であることを支持し、メタロエンザイムであることを示唆した^{129,130)}。加えて、二価の Ca イオンを特異的にキレートする EGTA は EDTA と同程度の感受性が認められなかったことから、中心金属は Ca イオンでないことが予想された。アルカリホスファターゼの非特異的な阻害剤イミダゾール¹³¹⁾、calyculin の標的分子でもあるセリン/スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素グループを非特異的に阻害するフッ化ナトリウム (fluoride)¹³²⁾は、CaL の活性に与える影響が少ないことが明らかになった。一方、系統樹解析で CaL グループと最も近接する PAP グループの阻害剤である遊離モノリン酸 (phosphate) とモリブデン酸塩 (molybdate)¹²⁷⁾は、CaL の活性を顕著に阻害した。PAP は酸性ホスファターゼを特異的に阻害する酒石酸 (tartrate) に対して耐性を有するが¹²⁷⁾、CaL の活性は高濃度の 20 mM でも阻害されなかったことから、CaL は酒石酸に対して耐性を有することが明らかになった。各種脱リン酸化酵素阻害剤に対する CaL の感受性は PAP の感受性と相同性を示したことから、CaL の生化学的特徴は PAP と類似することが示唆された。

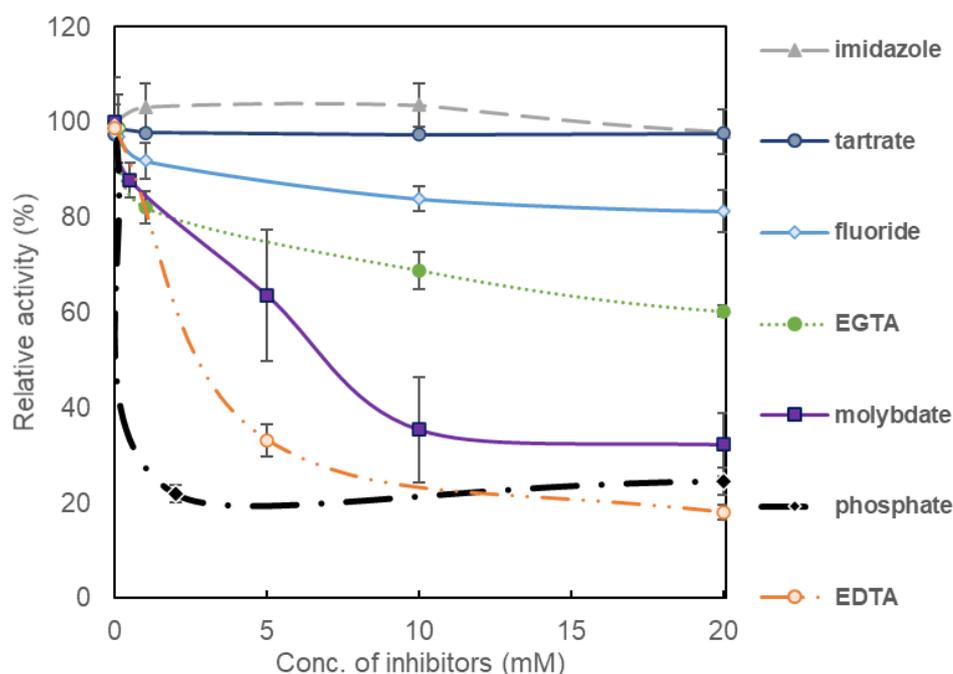


Fig. 33 組換え CaL の各種脱リン酸化酵素阻害剤に対する感受性

CaL 酵素の四次構造の有無

タンパク質は複数のタンパク質分子と会合し、一つの複合体タンパク質を形成する状態を四次構造と定義されている。複合体を形成しないタンパク質は単量体モノマーとして存在し四次構造を持たない。系統樹解析において CaL 酵素グループと最も近接する PAP 酵素グループは哺乳類由来の PAP が単量体で存在する一方で、植物由来の PAP が C 末端側でジスルフィド結合を介してホモ二量体または六量体として存在することが知られている¹³³⁾ (Fig. 34)。脱リン酸化酵素の四次構造の有無は、その酵素の基質特異性や脱リン酸化活性の反応効率に影響を及ぼすことが報告されている¹³⁴⁾。そこで酵素 CaL の四次構造の有無を明らかにするために、分子量の大きさの違いで精製するゲルろ過カラムの結果を精査した。これまで天然由来および組換え酵素 CaL のゲルろ過カラムの精製において、二量体以上に相当する 80 kDa 以上の溶出時間を分取し SDS-PAGE でそれぞれの画分を分析したが phosphocalyculin 脱リン酸化活性および CaL の溶出は認められなかった (Fig. 20b-c, 29)。一方、天然由来および組換え酵素 CaL、どちらの実験結果においても単量体に相当する約 40-50 kDa の溶出画分に CaL の溶出が認められた。このことから哺乳類由来の PAP と同じく CaL は単量体として存在することが強く示唆された。

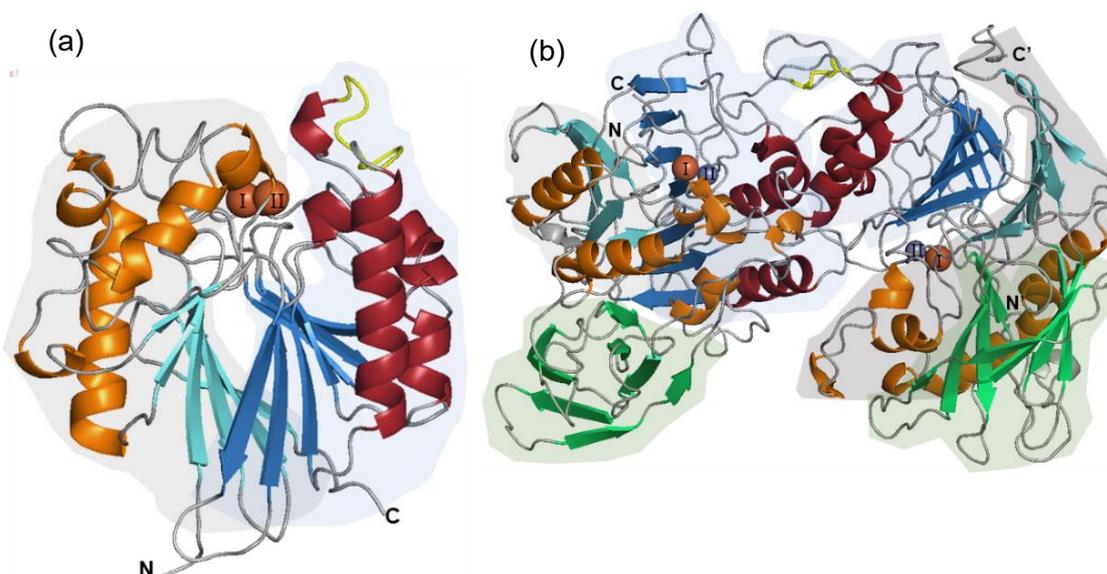


Fig. 34 PAP の結晶構造

(a) Pig PAP モノマー (PDB_1UTE)

(b) red kidney beans PAP ホモダイマー (PDB_1KBP)、橙球 ; Fe イオン、灰色 ; Zn イオン

CaL の至適 pH および至適温度

次に CaL の至適 pH 条件を明らかにするために pH 3-9 (glycine-HCl pH 3.65, acetate pH 4.5-5.5, MES-NaOH pH 5.5-7.0, Tris-HCl pH 7.25-9.0) の範囲における組換え CaL の phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を測定した。その結果、組換え酵素 CaL の至適 pH は 7.25 と中性で最も高い脱リン酸化活性が認められた (Fig. 35a)。また天然由来 CaL の至適 pH を Tris-HCl pH 7.0-9.0 の範囲で測定したところ、同じ Tris-HCl pH 7.25 で最も高い活性を示した (Fig. 35b)。哺乳類および植物由来の PAP の至適 pH はその名前の通り酸性条件下 (pH <5) で最も高い脱リン酸化活性を示す一方、細菌由来の PAP の至適 pH は弱塩基性 (pH 8.0) であると報告されている^{128, 127)}。本結果より CaL の至適 pH は細菌由来 PAP の至適 pH と類似しており、哺乳類または植物由来の PAP の至適 pH とは異なることが明らかになった。また実際の海綿組織に傷害が生じた際における海水の pH は約 8.1-8.2 弱塩基性であり、CaL の至適 pH と約 1.0 異なるが phosphocalyculin の活性化は瞬時に進行すると考えられる。

また CaL の至適温度を明らかにするために、温度 4-98 °C における phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を測定した。その結果 4-25 °C で至適反応条件であることが明らかになった (Fig. 35c, d)。海綿 *D. calyx* を採集した伊豆半島の南部の近海における年間の平均海水温度は、水温 13-25 °C と活性化酵素 CaL の至適温度範囲内であり、実際の生体内でも本反応が進行するものと推察される (Fig. 36)。また、採集後-30 °C で凍結保存した海綿 *D. calyx* の MeOH 抽出物から主要代謝物として calyculin A のみが認められ、phosphocalyculin A は発見されなかった。この理由として、4 °C の低温条件下 3 分間のみ反応させた場合においても CaL が phosphocalyculin A を 90%以上 calyculin A へと変換した結果を考慮すると、海綿を解凍した際の低温条件でも活性化酵素 CaL によって徐々に phosphocalyculin から calyculin へと脱リン酸化反応が進行したためだと考えられる。

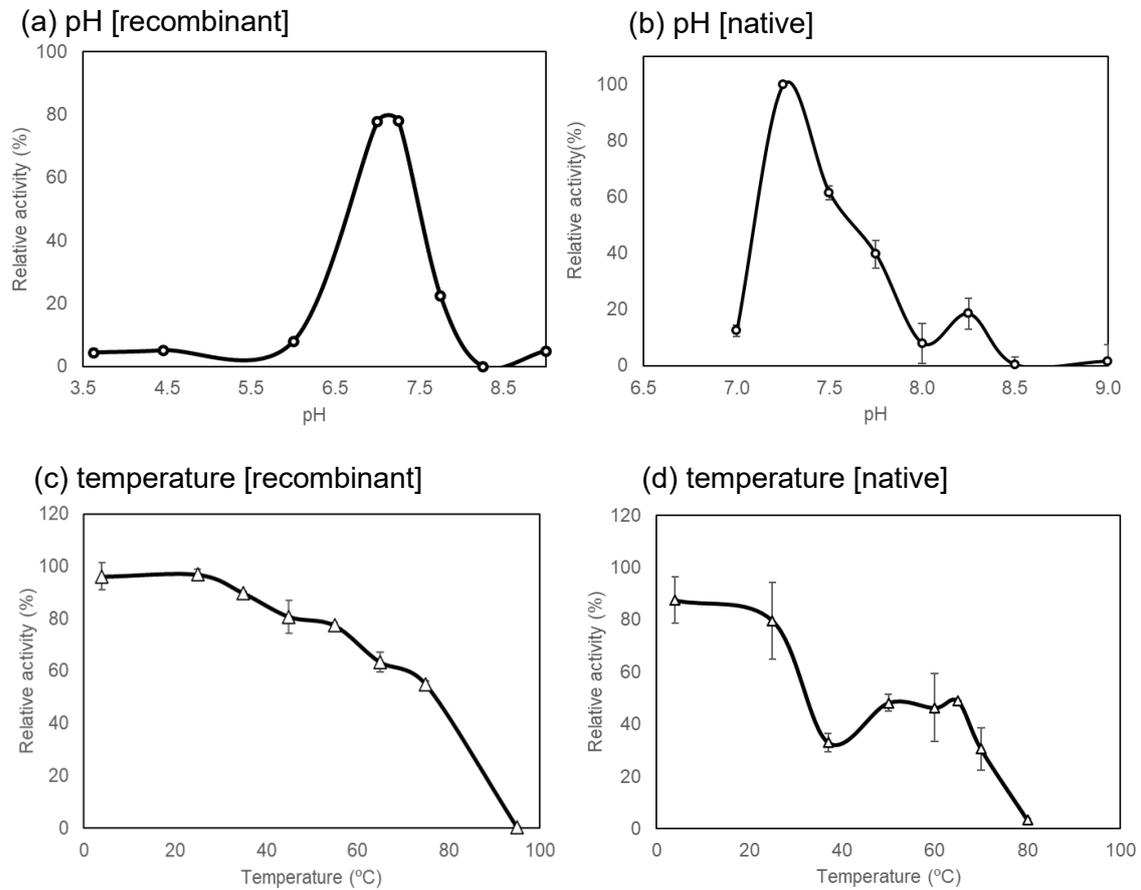


Fig. 35 Call の至適反応条件

(a) 組換え Call の至適 pH (glycine-HCl pH 3.65, acetate pH 4.5-5.5, MES-NaOH pH 5.5-7.0, Tris-HCl pH 7.25-9.0)、(b) 天然酵素 Call の至適 pH (Tris-HCl pH 7.0-9.0)、(c) 組換え Call の至適温度、(d) 天然酵素 Call の至適温度

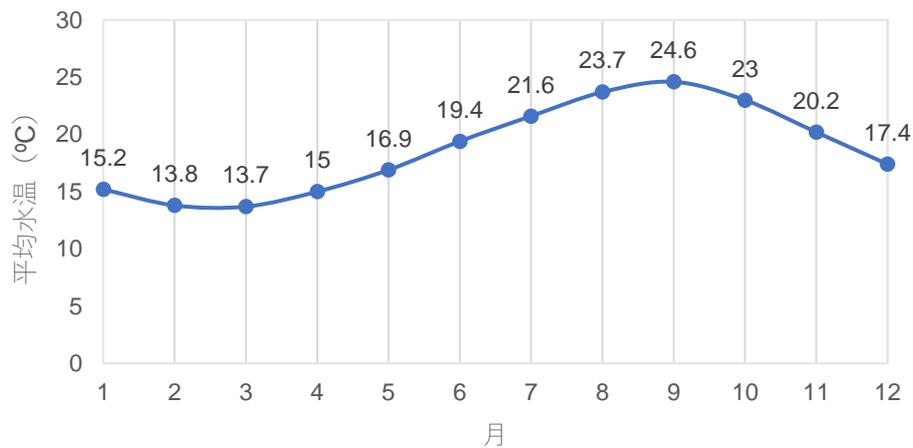


Fig. 36 伊豆下田の年間平均水温 ¹³⁵⁾

定常状態速度論的パラメーターの比較

第1章5節で天然由来および組換え酵素 CalL の基質 phosphocalyculin A に対する定常状態速度論的パラメーターをそれぞれ求めたところ、それら値は良い一致を示したことを述べた。これら CalL の速度論的パラメーターを基質の無機ピロリン酸に対する PAP の値と比較すると触媒効率 k_{cat}/K_m 値は近似することがわかった¹²⁸⁾。一方、PAP および CalL の基質との親和性を示す K_m 値を比較すると、CalL の phosphocalyculin A に対する親和性は PAP の無機ピロリン酸の認識よりも 100 倍高い。このことから CalL の基質特異性は PAP よりも高いことが示唆された。無機ピロリン酸を二分子の遊離モノリン酸へと加水分解する酵母由来のピロホスファターゼは触媒効率が CalL よりも 100 倍以上高く、CalL の触媒効率はピロホスファターゼの触媒効率より低いことが示唆された^{136,137)}。一方、calyculin A をリン酸化するリン酸基転移酵素 CalQ と phosphocalyculin A の活性化酵素 CalL の触媒効率を比較した場合、CalQ よりも CalL の方が 100 倍高い。このことから海綿組織の損傷後にこれら活性化/耐性化酵素が混在した場合は、phosphocalyculin A から活性型の calyculin A へと変換されると考えられる。

Table. 5 定常状態速度論的パラメーターの比較

Enzyme	Substrates	V_{max} (μM)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Native phosphatase		2.46 ± 0.2	28.9 ± 5.2	4.1 ± 0.3	$(1.6 \pm 0.3) \times 10^5$
	Phosphocalyculin A				
Recombinant CalL		3.09 ± 0.4	26.7 ± 2.1	5.2 ± 0.3	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^5$
Recombinant CalQ*	Calyculin A	-	501 ± 35	0.134 ± 0.1	$(2.8 \pm 0.6) \times 10^2$
PAP (Human) ¹²⁸⁾		-	800 ± 100	120 ± 3	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^5$
PAP (Spleen) ¹²⁸⁾	Pyrophosphate	-	300 ± 100	130 ± 3	$(4.3 \pm 0.3) \times 10^5$
Pyrophosphatase (LaVSP1) ¹³⁶⁾	(inorganic)	-	92	125	$(13.5) \times 10^5$
Pyrophosphatase (Yeast) ¹³⁷⁾		-	7.1 ± 1.0	212 ± 20	$(302 \pm 0.3) \times 10^5$

*東京大学大学院薬学系研究科 修士論文本行彦より引用 P. 41 ($n = 3$, mean \pm SEM)

第3節 CalLの活性中心金属の同定

CalLの各種脱リン酸化酵素の阻害剤に対する感受性実験において、金属キレート剤EDTAがCalLのphosphocalyculin A脱リン酸化活性を強力に阻害したことから、CalLの活性には金属が重要であることが明らかになった^{129, 130)}。しかし、その中心金属種は不明であった。そこでCalLの活性中心金属を同定するために、変異体による金属結合残基の同定と精製した酵素の金属種の元素分析、そして金属イオンの定量分析を行うこととした。

CalLの推定金属結合残基

CalLと似た生化学的特徴を有するPAPの金属結合残基は、他の脱リン酸化酵素の金属結合残基と異なる。PAP酵素グループ以外の脱リン酸化酵素の金属結合残基は、Fig. 37aに示すように金属結合モチーフIにヒスチジン(H)残基が保存されている。一方、PAPのモチーフIのヒスチジン残基はグリシン(G)残基に置換されており、そのヒスチジン残基の代わりにモチーフIIのチロシン残基が保存されている¹¹⁶⁾。これらヒスチジン残基とチロシン残基の置換による金属結合残基と金属との結合様式に与える影響は小さく、ヒスチジン残基の代わりにチロシン残基が配位する(Fig. 37b, c)。一方、CalLのMPEドメインに保存されている5か所の金属結合モチーフはPAPのモチーフI-Vと相同性を示し、CalLの7つの推定金属結合残基はPAPの残基と同一である(Fig. 37a)。そこで、これら推定金属結合残基がCalLの金属結合および脱リン酸化活性に重要であるか検証するために、7か所の推定金属結合残基を欠損させた変異体CalLを作製し、脱リン酸化活性に及ぼす影響を調べた。これら全ての残基をアラニンまたはフェニルアラニンに置換した変異体CalLを作成し、それぞれphosphocalyculin A脱リン酸化活性試験を行った(Fig. 38)。その結果、野生体CalLを用いた場合80%近くcalyculin Aへと脱リン酸化される反応条件において、全ての変異体は脱リン酸化活性が大きく減少または消失した。これまでに脱リン酸化酵素の金属結合残基の変異体実験において、脱リン酸化活性が減弱または消失されることが報告されていることから¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾、本酵素CalLにおいてもこれら7か所のアミノ酸残基は金属結合および活性発現に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。

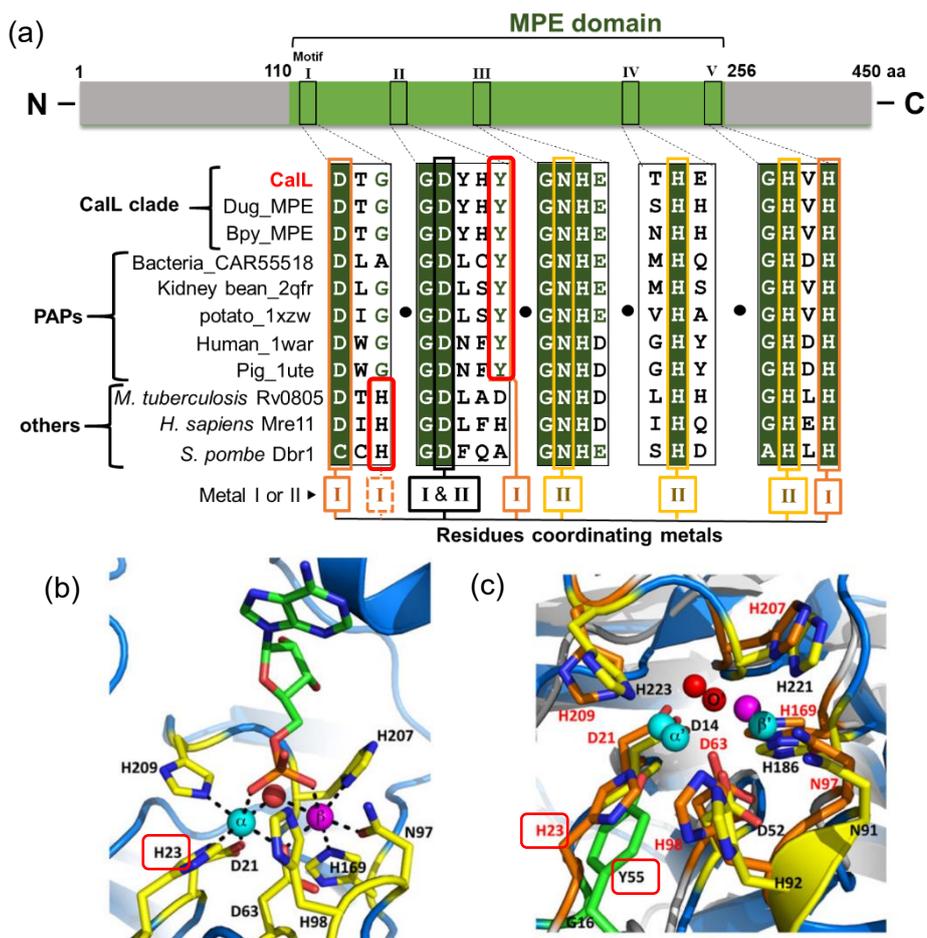


Fig. 37 Call、PAP、その他脱リン酸化酵素の金属結合モチーフ
 (a) 金属結合モチーフのアラインメント、(b) PAP 以外の脱リン酸化酵素結晶 Rv0805 の活性中心の金属結合様式、(c) b と PAP の活性中心のマージ図、赤字残基；Rv0805、黒字残基；PAP、金属 α' =Fe (III), β' =Mn (II)、赤枠=金属結合残基の置換残基¹¹⁶⁾

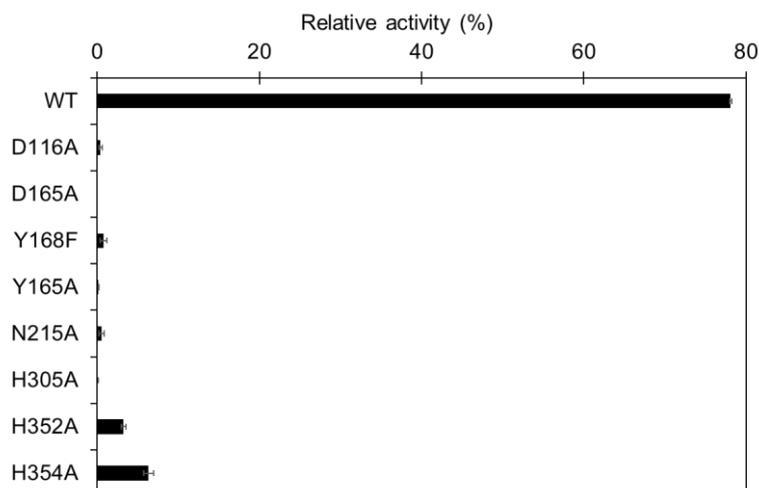


Fig. 38 Call の推定金属結合残基の変異体の phosphocalyculin A 脱リン酸化活性

PAPの活性中心金属

PAPは活性中心にヘテロ二核金属 [Fe(III)–M(II)] を有する。その金属の一つはFe(III)が必ず保存されており、もう一方は二価の金属イオン (M = Fe, Mn, Zn) を有する。Purple acid phosphatase は名前の通り紫色に呈しており、これは金属結合残基のチロシンの水酸基から中心金属Fe(III)への電子遷移に起因し、可視光吸収UV 520-550 nmで強い吸収が認められるためである (Fig. 39)^{116, 126-128, 141}。CaILにおいてもPAPと同一の金属結合残基が保存されていることから、CaILの活性中心にヘテロ二核金属 [Fe(III)–M(II)] が保存されていると予想される。しかし、天然由来および組換え酵素CaILにおいてPAPの特徴である紫色 (UV/vis = 500-550 nm) は認められなかったことから、PAPに保存されているFe以外の異なる中心金属を活性中心に有することが推察される。

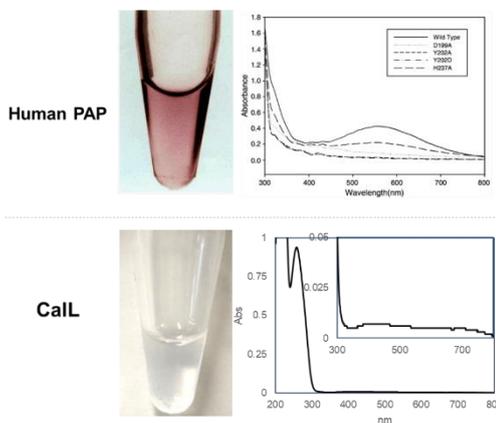


Fig. 39 PAP^{127, 141}と組換えCaILのUV/vis

天然由来および組換えCaILに含まれる金属種の定性分析

そこでCaILの活性中心に存在する金属種を同定するために、天然由来および組換え酵素CaILの元素分析ICP-MSによる含有金属種の定性分析を行った。その比較対象としてバッファー溶液に加えて、金属結合残基をアラニンまたはフェニルアラニン残基に置換し、活性が消失した三種の変異体CaIL (D116A, Y168F, D168A) も同様に分析した。その結果、天然由来および組換えCaIL特異的にCuおよびZnが検出された (Fig. 40)。一方で脱リン酸化酵素の活性中心に一般的に配位されているFe、Mn、Mg、Caやその他の元素は、天然由来および組換えCaIL特異的に検出されなかった。本結果からCaILの活性中心にはCuおよびZnが存在することが示唆された。

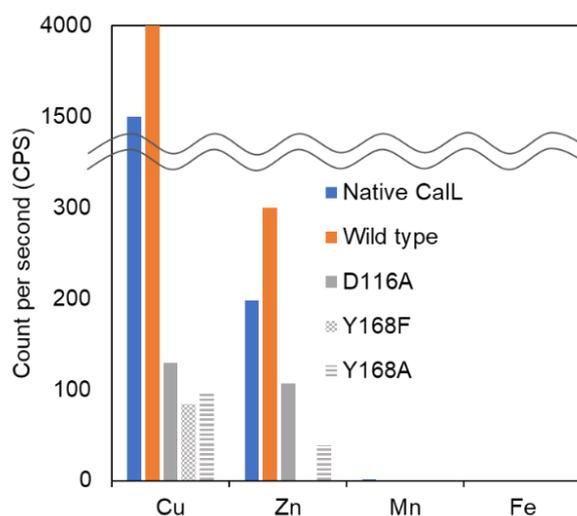


Fig. 40 ICP-MSによる天然由来と組換えCaILの金属定性分析結果

組換え CalL に含まれる Cu、Zn の比色定量分析

定性分析の結果、天然由来および組換え酵素 CalL 特異的に Cu および Zn が検出された。そこで酵素 CalL の 1 分子中に含まれる Cu および Zn の含有量を明らかにするためにキレート比色定量分析を行った。精製した組換え酵素 CalL を強酸で変性させることで、活性中心に配位している金属を酵素から抽出した。得られた上清を Cu または Zn のキレート比色定量試薬を用いて、それぞれ金属の定量分析を行った。比較対象として定性分析の際に用いた金属結合残基 (D116A, Y168F, Y168A) を欠いた 3 種の変異体 CalL も同様に調製・分析を行った。その結果、野生体 CalL タンパク質 1.0 モルに対して Cu および Zn がそれぞれ 0.74、0.88 モル存在することが明らかになった。一方、金属結合残基を欠損させた変異体 CalL では、Cu および Zn 金属は検出されなかった。野生型 CalL 特異的に Cu および Zn がそれぞれ約 1 モルずつ存在することから、CalL は活性中心にヘテロ二核金属 [Cu - Zn] を有することが明らかになった。

Table. 6 組換え CalL のタンパク質に対する Cu および Zn のモル比率 (n = 3)

	Protein	Cu	Zn	
CalL	WT	1.00	0.74	0.88
	D116A	1.00	0.15	0.09
	Y168F	1.00	0.14	n.d.
	Y168A	1.00	0.05	0.11

第4節 小括

本章では海綿内におけるプロトキシンの活性化を担う脱リン酸化酵素 CalL の生化学的特徴の同定を目指した。MPE ドメインの系統樹解析の結果、CalL はどの機能既知の脱リン酸化酵素グループからも独立された新たな酵素グループであり、PAP の酵素グループの生化学的特徴と相同性を示すことが予想された。精製した CalL を用いて各種脱リン酸化酵素阻害剤に対する感受性を検証したところ、CalL は PAP の阻害剤感受性と類似したことから、CalL と PAP は類似した生化学的特徴を有する可能性が高まった。実際に CalL は哺乳類または細菌由来 PAP と同様にモノマーとして存在し、その至適 pH は細菌由来 PAP と類似していた。一方、CalL の定常状態速度論的パラメーターは PAP と異なり、より高い基質特異性を示した。また推定金属結合残基の変異体 CalL の脱リン酸化活性が減弱または消失したことから、CalL の推定金属結合残基は PAP のそれと同一である可能性が高いことが予想された。しかし、酵素 CalL の活性中心に含まれる金属種の定性および定量分析の結果、PAP の活性中心に保存されているヘテロ二核金属 [Fe (III) - M (II)] とは異なり、CalL の活性中心には脱リン酸化酵素でこれまで報告のないヘテロ二核金属 [Cu - Zn] を有することが明らかになった。

これまで脱リン酸化酵素の中心金属として Cu と Zn のヘテロ二核金属を有する酵素の報告はない¹¹⁶⁾。Mitićらが PAP の Fe (III) を Mn (II) に置換した金属変異体を作製し *in vitro* 機能解析を行った結果、550 nm の UV 吸収は認められないが脱リン酸化活性を示したことを報告している¹⁴²⁾。本知見は Fe (III) の代わりに Cu や Zn が配位した CalL でも脱リン酸化活性が認められた結果を支持する。また酵素の活性中心に [Cu - Zn] のヘテロ二核金属を有するメタロエンザイムの例として、細胞内酸化ストレスによって生じるペルオキシドを除去する役割を担う Cu/Zn スーパーオキシドアニオン分解酵素 (Cu/Zn superoxide dismutase; SOD) が報告されている¹⁴³⁾。SOD の活性中心における金属との結合様式は、脱リン酸化酵素と同様に 7 か所の金属結合残基が関与している。Cu と Zn の間を 1 つのヒスチジン残基が架橋し、Cu に対してさらに 3 つのヒスチジン残基、Zn に 2 つのヒスチジン残基と 1 つのアスパラギン残基がそれぞれ配位している。この SOD の金属結合様式は、2 つの金属が隣接している MPE ドメインと同じ結合様式を有している。しかし PAP の金属結合残基と同一であるにもかかわらず、CalL において Fe (III) の代わりに Cu と Zn が優先して選択される理由は不明である。組換え酵素の異種発現実験において Fe (III) 存在下で培養したが、可視光領域の吸収は認められなかった。一方 CalL のアミノ酸配列を基に SWISS-MODEL を用いて PAP の結晶構造を鋳型として CalL 結晶構造のホモロジーモデルを構築し活性部位周辺を PAP と比較したところ、哺乳類や植物由来の PAP には存在しない 4 つの loop 構造が CalL の活性部位周辺に存在することが示唆された (Fig. 41)。哺乳類由来 PAP において活性部位周辺の loop 構造を欠損させた場合、触媒効率が上昇することから活性抑制に関与していることが報告されている¹³³⁾。このことから、CalL に存在すると予想されるこれら loop 構造は CalL の金属選択性、基質特異性、酵素の活性制御に関与していると考えられる。今後

CaL の結晶構造を解析することができれば、CaL の Cu および Zn に対する選択性や基質特異性に関して知見が得られると期待される。

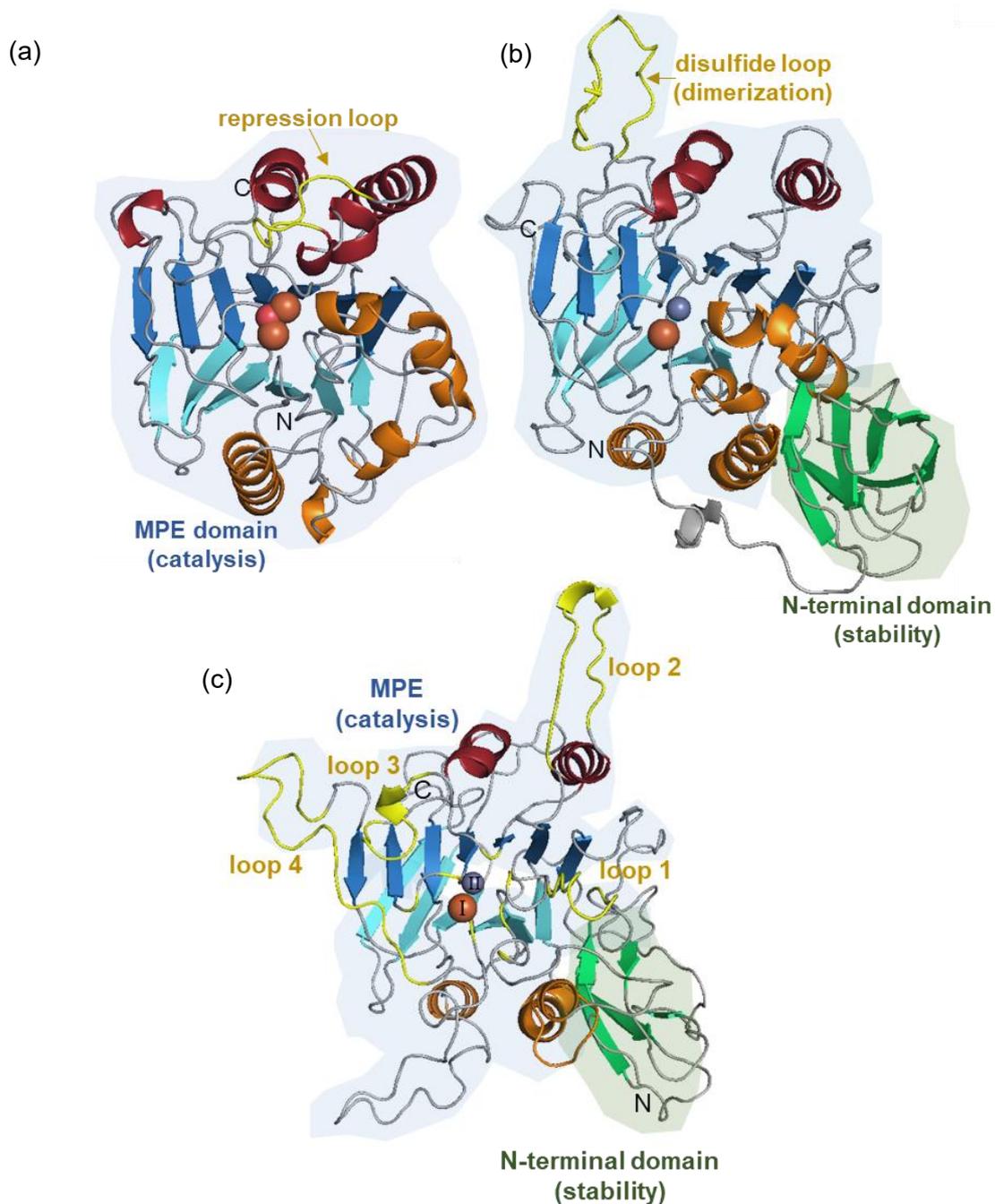


Fig. 41 PAP 結晶構造と CaL のホモロジーモデル構造の比較

(a) pig PAP 1UTE、(b) red kidney beans PAP 1RKB、(c) CaL のホモロジーモデル構造、青色網掛；MPE ドメイン、緑色網掛；N 末端ドメイン（酵素の安定性・可溶性に関与¹³³⁾）、黄色；loop 構造

第3章 海綿 *Discodermia calyx* における CaL を介した活性化機構

の解明

第1節 序論

序論の第1章3節でも述べたように、これまで海綿動物における組織傷害を引金とした「活性化防御」の代謝物変化に関する報告は数例存在する³⁰⁻³⁵。しかし、その化学防御物質の生合成遺伝子や、生産者、活性化酵素などに関して不明であるため、その組織傷害直後からプロトキシンの活性化に至る下流のメカニズムに関する知見は全くない。一方、活性化防御に関する研究は陸生植物において最も盛んに行われてきた。高等植物には組織傷害に応じて細胞組織内に高濃度で蓄積されたプロトキシンの青酸配糖体が、活性化酵素 β -グルコシダーゼによって強力な毒性物質であるシアン化水素へと生物変換される化学防御機構が備わっている^{144, 145}。その活性制御メカニズムは、平時において細胞組織内の液胞や細胞質にプロトキシンである青酸配糖体が、葉緑体に活性化酵素 β -グルコシダーゼがそれぞれ別々に局在・蓄積されている。そこへ虫などの捕食により生じた組織傷害を引き金に両者が瞬間的に混合されることで、毒性物質が瞬時に生成する (Fig. 42)。

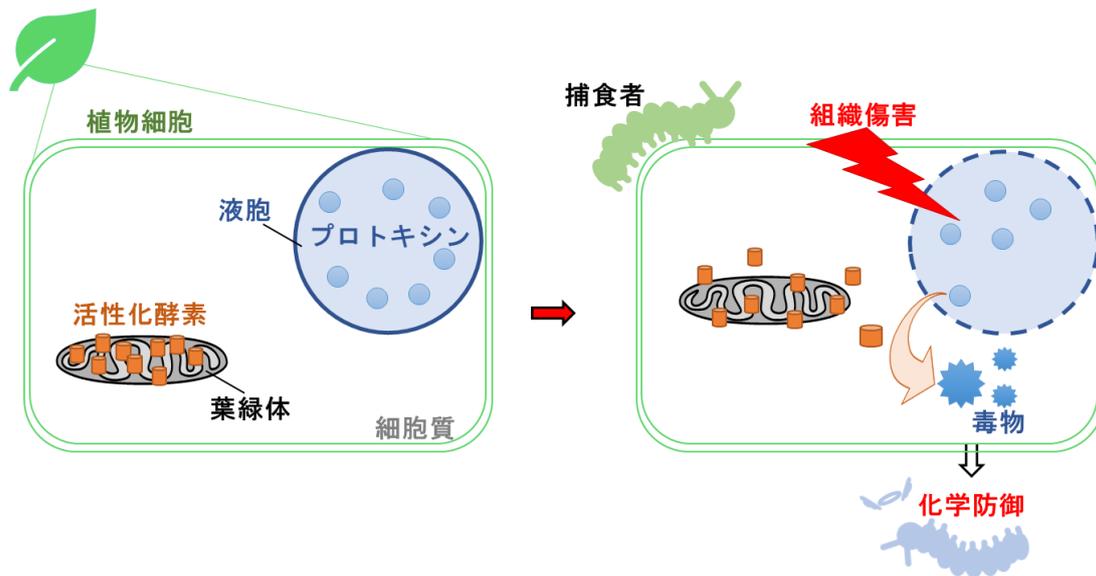


Fig. 42 高等植物における組織傷害に応じた活性化防御機構

海綿 *D. calyx* の組織傷害に応じたプロトキシシン活性化の推定機構

採集直後に瞬間冷凍し、凍結乾燥処理した海綿 *D. calyx* の MeOH 抽出物には phosphocalyculin A が主要代謝物として認められるが、その凍結乾燥海綿の H₂O 抽出物では phosphocalyculin A の代わりに calyculin A が主要代謝物として検出される。このことから植物と同様に、海綿 *D. calyx* においても活性化酵素 CalL は損傷を機に高発現されるのではなく、既に海綿組織の何処かに phosphocalyculin A と CalL が蓄積されていると予想される。また海綿の組織傷害を伴う活性化反応が海綿全体へとシグナル伝達経路などを介して伝播する場合、損傷した海綿組織周辺の主要代謝物は 100% calyculin へと変換されると考えられる。しかし海綿組織をナイフで可能な限り破碎 (<1 mm 角) した際の主要代謝産物の変化は、損傷後 5 分後に脱リン酸化反応が頭打ちとなり、phosphocalyculin は 100% 活性化されない⁹⁶⁾。そのため海綿組織の損傷を伴う活性化反応は、傷害を受けた部位局所的に生じることが推察される。これらのことから *D. calyx* に関して次の様な活性化機構仮説が考えられる (Fig. 43)。1 つ目は植物と同様に活性化酵素とプロトキシシンが別々に区画化されている機構「局在化仮説」である。また酵素の活性制御にはリン酸化/脱リン酸化、グリコシル化などの翻訳後修飾が重要であることから¹⁴⁶⁻¹⁴⁸⁾、2 つ目は CalL が不活性化された状態で組織に待機し、組織損傷後に翻訳後修飾などにより CalL が活性化される機構「酵素活性化仮説」が考えられる。3 つ目はどちらも存在する機構である。そこで、これら仮説に関する知見を得るために、同定した活性化酵素 CalL をより詳細に解析することで、*D. calyx* における組織損傷直後から CalL が phosphocalyculin A を脱リン酸化するまでの下流のメカニズムの解明を目指した。

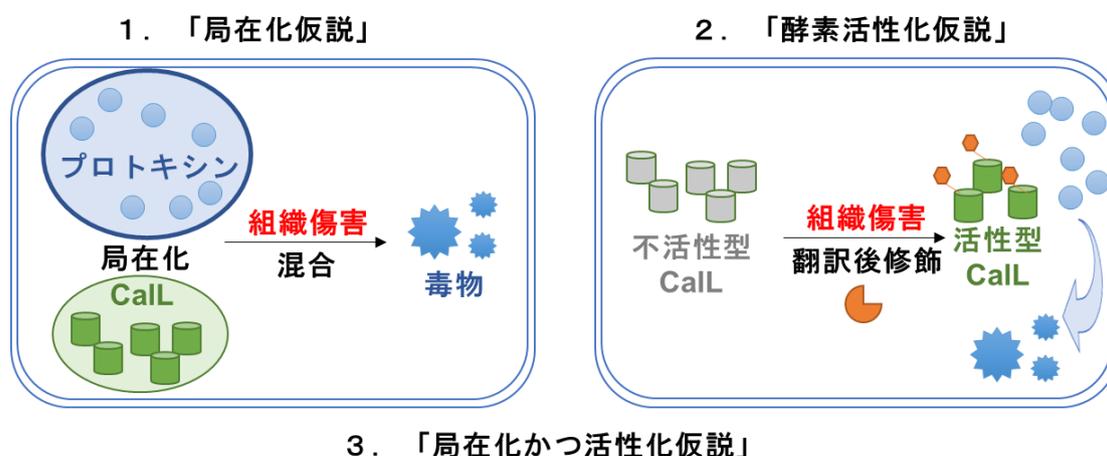


Fig. 43 海綿 *D. calyx* における組織傷害に応じた活性化機構仮説

第2節 活性化酵素 CalL の細胞内局在

CalL のシグナルペプチド配列

初めに「局在化仮説」の知見を得るためにタンパク質局在に關与するシグナルペプチド配列予測ソフトウェア¹⁴⁹⁻¹⁵¹)を用いて、活性化酵素 CalL のアミノ酸配列を解析した。その結果、CalL の N 末端側には生産菌 *Entotheonella* 属も含むグラム陰性細菌に普遍的に保存されている典型的なシグナルペプチド配列 (1-29 残基) の存在が予想された (Fig. 44)。CalL のシグナルペプチド配列は N 末端側から細胞内膜と相互作用する塩基性アミノ酸残基を有する領域 (N-領域: 1-12 残基)、膜との相互作用に關与する疎水性ヘリックス領域 (H-領域: 13-24 残基)、シグナルペプチダーゼ I によって認識される VxA モチーフが保存されている領域 (C-領域: 25-29 残基)、これら 3 つの領域から構成されている。また 3 つの N、H、C 領域は膜との相互作用に重要なだけでなく、リボソームにより合成されたポリペプチド鎖を細胞質から細胞の内膜側へと輸送するタンパク質 SecA (Fig. 45) の認識にも重要であり、SecA のシグナルペプチド結合ドメインの溝にタンパク質前駆体のシグナルペプチドがはまり込む^{152, 153})。

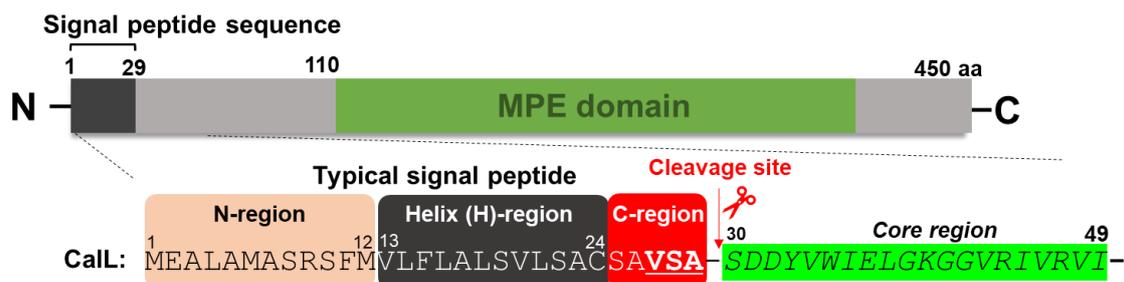


Fig. 44 CalL の N 末端のシグナルペプチド配列

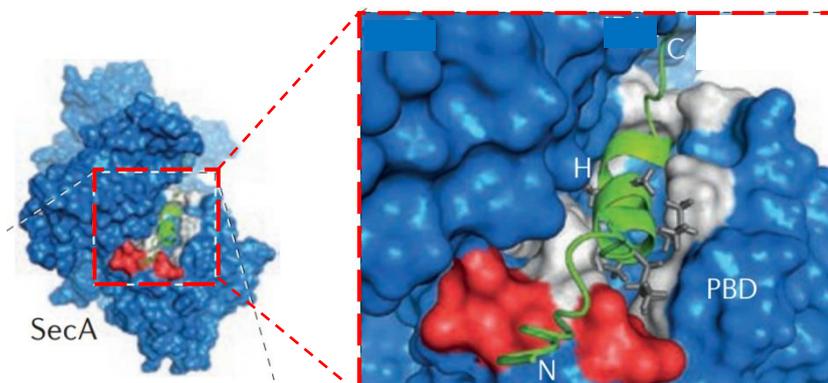


Fig. 45 SecA (PDB_2VDA) とシグナルペプチドの共結晶^{152, 153})

緑: シグナルペプチド、赤領域: 酸性領域、灰色: 疎水性領域、N: N-領域

H: H-領域、C: C-領域、PBD: pre-protein binding domain

グラム陰性細菌におけるタンパク質分泌経路 (Sec 経路)

CalL に保存されているシグナルペプチド配列はグラム陰性細菌の細胞内において次のようなタンパク輸送機構 (Sec 経路) によりタンパク質をペリプラズムへと放出する (Fig. 46)¹⁵²⁻¹⁵⁵)。1. リボソーム翻訳系により合成されたタンパク質前駆体は、SecA あるいは分子シャペロンによりポリペプチド鎖の状態細胞質 (Cytosol) から細胞の内膜側へと輸送される。2. 次に膜タンパク質複合体トランスロカゼ (SecYEG) により、細胞質側からペリプラズム側へと輸送され、内膜にシグナル配列が挿入された状態となる。3. そのシグナル配列の C 領域に保存されている VxA モチーフを認識した膜貫通型シグナルペプチダーゼ I が直後の 29-30 残基の間でシグナル配列を切断し、4. 最終的に CalL がペリプラズムへとフォールディングを伴い放出される。このような Sec 経路により活性化酵素 CalL はペリプラズム画分へと放出・局在化されていると推測される。

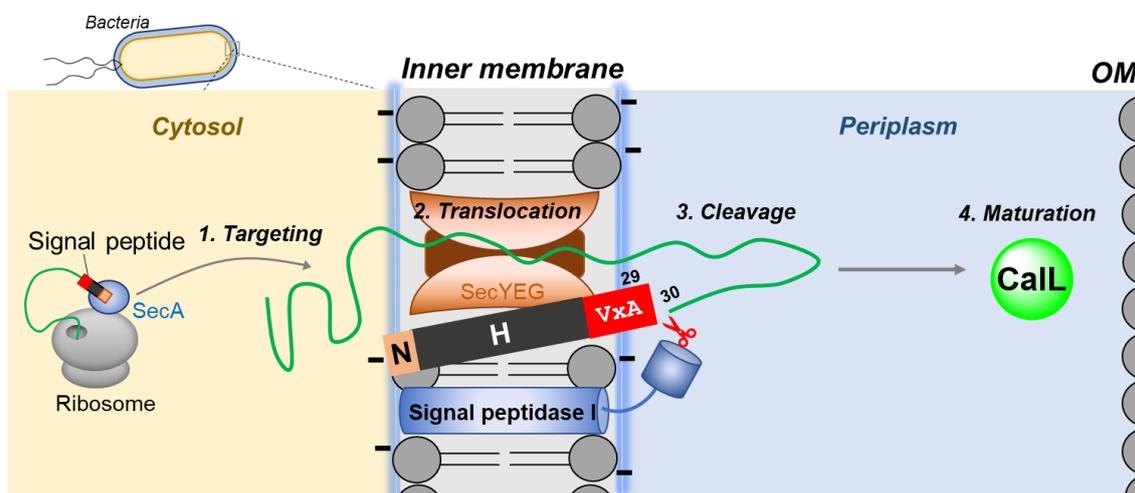


Fig. 46 CalL の N 末端のシグナルペプチドを介した推定タンパク輸送経路¹⁵²⁻¹⁵⁵)

海綿より精製した酵素 CalL の翻訳後修飾の同定

Sec 経路におけるシグナルペプチド配列を介した酵素のペリプラズム放出機構にはシグナルペプチダーゼ I による N 末端側の開裂を伴う翻訳後修飾が必要となる。また「局在化仮説」の証拠となる N 末端の開裂に関する翻訳後修飾だけでなく、「酵素活性化仮説」に関して CalL を活性化するようなタンパク質のリン酸化やグリコシル化などの翻訳後修飾の存在も考えられる。そこで酵素の翻訳後修飾に関する知見を得るために、第 1 章 5 節で述べた海綿由来の脱リン酸化酵素 CalL の PMF データを再解析した。CalL の N 末端領域において、トリプシンによりアルギニン (R) とリジン (K) で消化された際に生じるペプチド断片は、1 から 9 残基目の R までの配列と、10 から 40 残基目の K までの配列、二つの断片の存在が想定されるが、これら配列をレファレンス配列とした場合、二つのペプチド断片は検出されなかった (Fig. 47)。これはシグナルペプチダーゼ I により CalL の N 末端側が開裂されたた

めであると考えられる。そこで開裂された N 末端のペプチド断片を検出するために、CaL の N 末端側 1 残基目から 40 残基目の K まで一残基ずつ除去したそれぞれのアミノ酸配列をリファレンス配列として PMF データを精査した。その結果、シグナルペプチダーゼ I により 29 と 30 残基の間で開裂された際に生じるペプチド断片 (Fig. 47, 30-SDDYVWIELGK-40, Supplementary Fig. 4a) が天然由来 CaL より検出された。このことから天然酵素 CaL は Entotheonella 細胞内においてシグナルペプチダーゼ I によりペリプラズムへと放出・局在化していることが示唆された。一方、CaL においてリン酸化 (修飾部位: S, T, Y) やグリコシル化 (S, T, Y, N)、アセチル化 (R, K) の翻訳後修飾されたアミノ酸配列をリファレンス配列として PMF データを精査したが、全く検出されなかった。

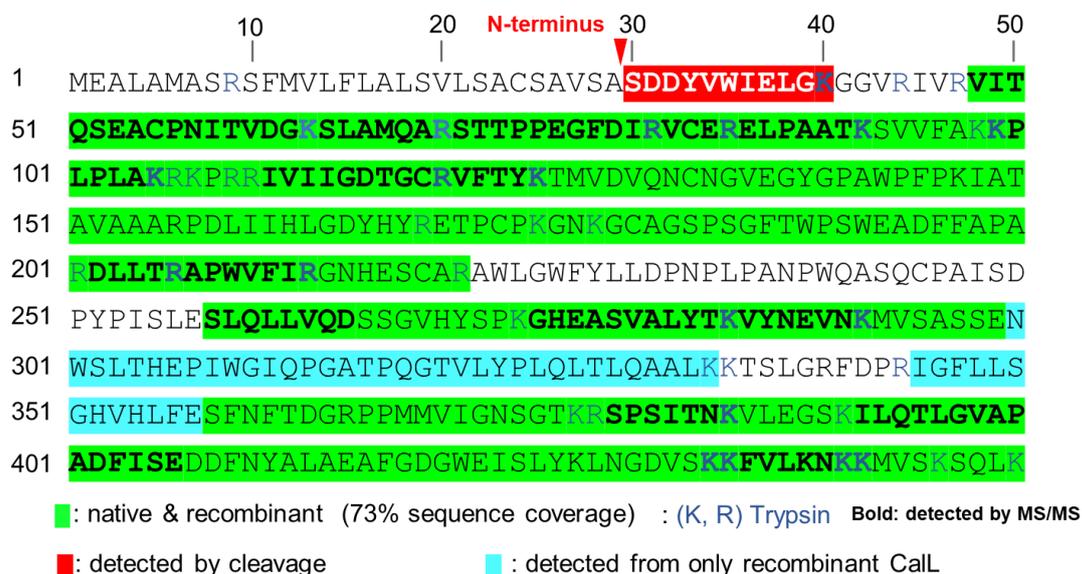


Fig. 47 PMF における天然由来 CaL の N 末端アミノ酸配列断片 (赤色領域)

異種宿主細胞における組換え酵素 CalL の細胞内局在

海綿より精製した酵素 CalL の N 末端側にはシグナルペプチダーゼ I により切断された翻訳後修飾の存在が明らかになった。このことから CalL は細胞内のペリプラズムへと放出される酵素であることが示唆された。本仮説を検証するために、次に異種発現株である大腸菌における組換え酵素 CalL-*strep* の細胞内局在を調べた。グラム陰性細菌のペリプラズム画分の酵素を特異的に抽出する方法としてリゾチーム抽出法が知られている¹⁵⁶⁻¹⁵⁸。20% (v/v) スクロースを含む低張溶液で高発現させた細胞沈殿を再懸濁することで浸透圧ショックを与え、外膜のペプチドグリカン層をリゾチームで分解し、細胞内膜を傷つけることなくペリプラズム画分のみを抽出した。遠心分離によって得られたペリプラズム画分の抽出液をアフィニティー樹脂に供し、樹脂を洗浄後、デスチオビオチンで酵素を溶出させた画分を 10% SDS-PAGE で分析した。その結果、ペリプラズム画分に組換え CalL-*strep* の存在が認められた (Fig. 48a)。比較実験として、シグナルペプチド配列が保存されていない組換え酵素 CalQ で同様の実験を行ったが、ペリプラズム画分に組換え CalQ の存在は認められなかった (Fig. 48b)。これらの結果から大腸菌のペリプラズム画分に CalL が輸送されていることが強く示唆された。さらに組換え酵素 CalL の N 末端側のシグナルペプチダーゼ I による開裂位置を特定するために、ペリプラズムより精製した組換え酵素 CalL-*strep* を天然酵素と同様に PMF に供した。その結果、天然酵素 CalL と同じく N 末端側はシグナルペプチダーゼ I により 29 残基と 30 残基の間で開裂されることで生じるペプチド断片が組換え酵素 CalL から検出された (Supplementary Fig. 4a)。これら結果より、大腸菌においても組換え CalL のシグナルペプチド配列はシグナルペプチダーゼ I により認識され、CalL をペリプラズムへと放出することが明らかになった。

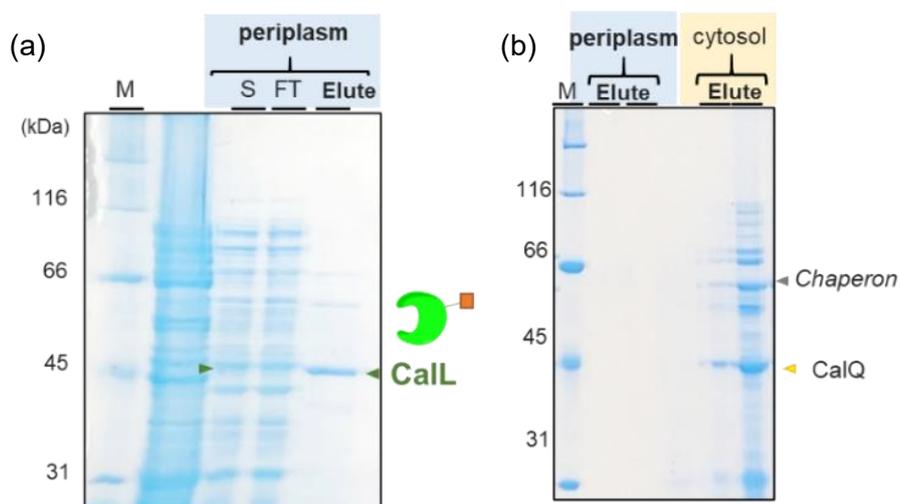


Fig. 48 大腸菌ペリプラズムより精製した組換え酵素の溶出画分の SDS-PAGE
(a) CalL、(b) CalQ、M: 分子量マーカー

これらの実験結果より、活性化酵素 CalL がペリプラズムへ放出されていることから海綿においてプロトキシシンと酵素が別々に局在化している「局在化仮説」の可能性が高い。Sec 経路に関与するシグナルペプチダーゼ I のホモログは、*Entotheonella* 属のゲノムに普遍的に保存されている (Protein sequence ID: PON19655.1; *Entotheonella sarta*, ETX08252.1; *gemina*, ETW99059.1; *factor*, WP_179131489.1, *palauensis*)。また、*Ca. Entotheonella* 属のゲノムにコードされている推定ペリプラズム局在タンパク質のアミノ酸配列情報を収集し、N 末端のシグナルペプチダーゼ I により認識される保存領域 (VxA モチーフ) のアラインメント解析を行った。その結果、*Entotheonella* 属のシグナルペプチダーゼ I 認識モチーフは、大腸菌と同一の A/V/SxA モチーフが保存されていることが明らかになった (Fig. 49)¹⁵⁹。これらの遺伝子情報および海綿より精製した酵素の PMF 解析の結果から、生産菌である *Entotheonella* 属の細胞内においても CalL は Sec 経路により細胞質側からペリプラズムへと輸送されることが明らかになった。Sec 経路による CalL の排出機構はプロトキシシンと活性化酵素の区画化だけでなく、細胞質における化合物生産の過程で不必要なプロトキシシンの活性化などのエネルギー浪費を回避するのに極めて重要な機構であると考えられる。

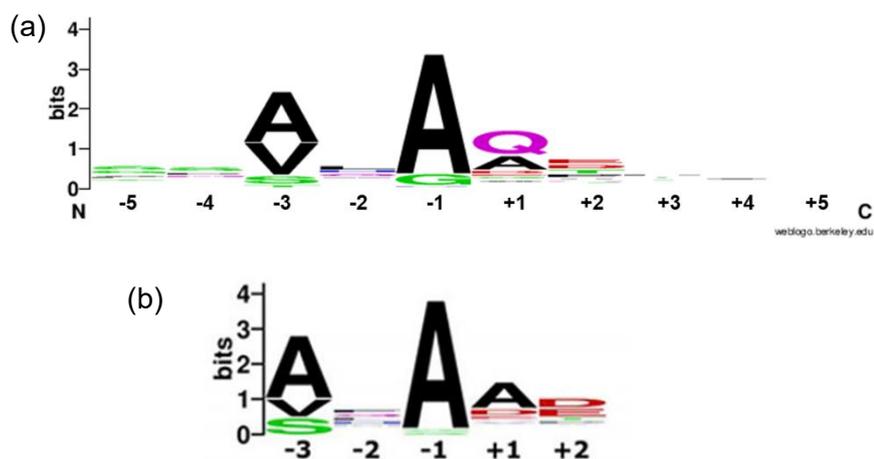


Fig. 49 シグナルペプチダーゼ I 認識モチーフ

(a) *Ca. Entotheonella* spp., $n = 44$ 、(b) *E. coli*, $n = 85$ ¹⁵⁹)

プロット作成 (<http://weblogo.berkeley.edu>.)

第3節 Calyculin 生産菌 *Entotheonella* 細胞における脱リン酸化活性の局在

Calyculin 生産菌の *Entotheonella* 細胞において脱リン酸化酵素 CalL がペリプラズムへ放出されていることが明らかになったことから、*Entotheonella* 細胞内で脱リン酸化反応が進行すると想定される。しかし、海綿組織において phosphocalyculin A 脱リン酸化反応が何処で生じるのかは不明であった。そこで海綿における phosphocalyculin A 脱リン酸化活性と calyculin A の局在を明らかにするために、密度勾配細胞分画法^{12, 101, 106, 107)}により得られる海綿細胞、*Entotheonella* 細胞、そして微生物細胞がそれぞれ豊富に含まれる画分の脱リン酸化活性と calyculin A の含有量を分析した。凍結乾燥海綿 *D. calyx* を人工海水中で細かく刻み、海綿細胞と共生微生物細胞を含む上澄み液を得た。遠心後、得られた細胞沈殿物を細胞密度の違いで分画可能な密度勾配遠心分画法により 10 フラクションに分画した (Fig. 50a)。フィラメント状の *Entotheonella* 細胞を主として含む画分 (Fr. 3-4)、海綿や藻類などの真核細胞を含む画分 (Fr. 6-10)、*Entotheonella* 細胞が認められない微生物の細胞を含む画分 (Fr. 1-2) に粗分画できていることを光学顕微鏡下で確認した (Fig. 50b)。得られた細胞画分はそれぞれ phosphocalyculin A 脱リン酸化活性試験および代謝物分析を行った (Fig. 50c)。その結果、海綿細胞を含む画分 (Fr. 10) や密度が低い微生物画分 (Fr. 1-2) と比較すると主として *Entotheonella* 細胞を含む画分 (Fr. 3) は、より高い脱リン酸化活性を示すとともにより多くの calyculin A が検出された。このことから脱リン酸化反応は *Entotheonella* 細胞内で生じる可能性が高まった。

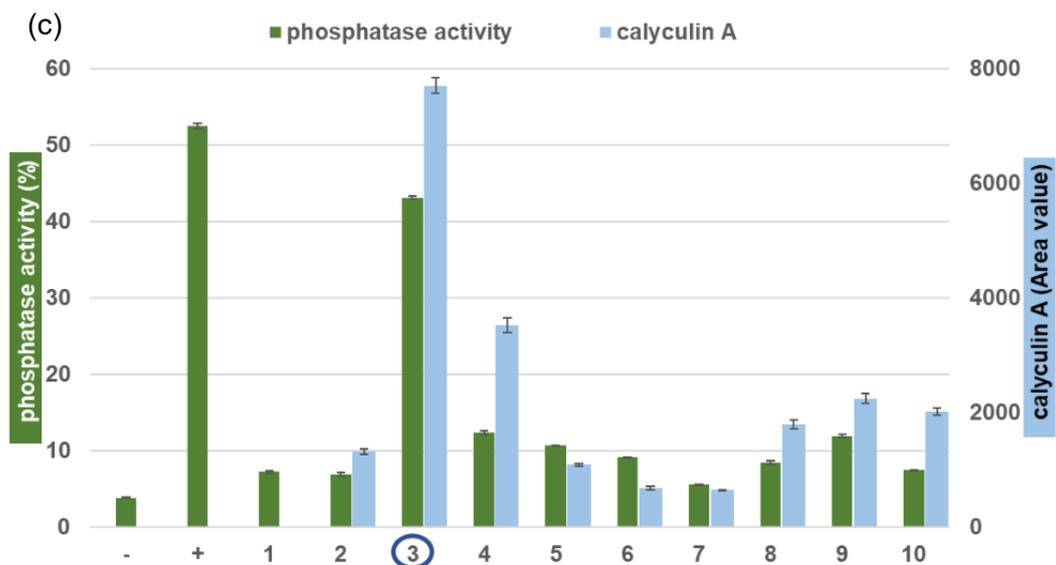
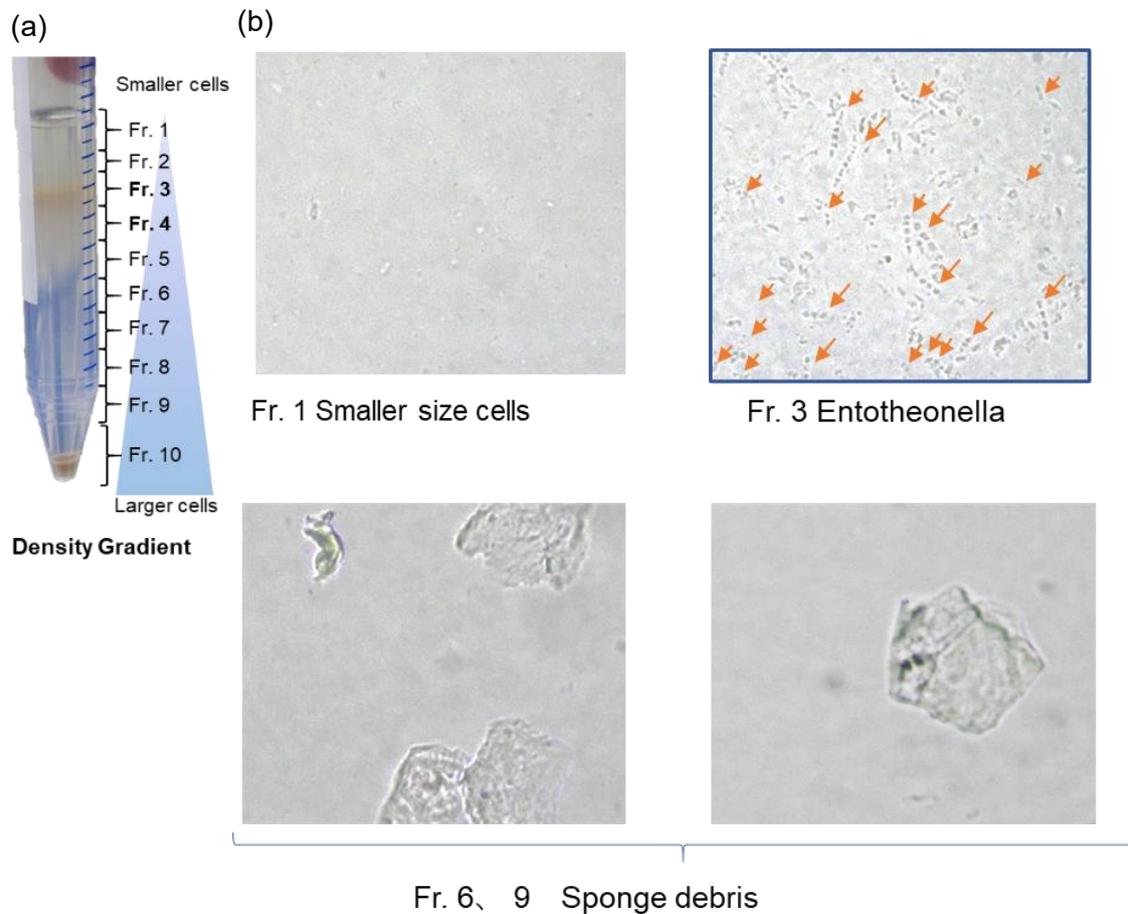


Fig. 50 海綿 *D. calyx* における脱リン酸化酵素および calyculin A の局在
 (a) 海綿細胞と共生微生物の密度勾配遠心分画、(b) 明視野顕微鏡下における各画分の観察図、(c) 各画分の phosphocalyculin 脱リン酸化活性および calyculin A の含量 ($n=3$, means \pm SEM) +; 海綿粗酵素液、-; 基質 phosphocalyculin

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 MG 試薬で染色し顕微鏡下で観察した。凍結乾燥海綿から得た phosphocalyculin を含む Entotheonella 細胞を用いて、一方は水で再水和させ脱リン酸化反応を進行させた後 MG 試薬を加え染色、もう一方は同濃度の強酸染色液で再水和させ脱リン酸化反応を停止させた状態で染色し、その染色度合いを顕微鏡下で比較した。その結果、脱リン酸化反応を進行させていない細胞よりも、脱リン酸化反応を進行させた細胞の方がより濃い緑色に呈色した (Fig. 51)。また比較対象として組織傷害に応じた代謝物変化が認められない近縁種の海綿 *D. kiiensis* 由来の Entotheonella 細胞を用いて同様の染色実験を行ったが、*D. calyx* の Entotheonella 細胞のような呈色は認められなかった。本結果は間接的ではあるが、phosphocalyculin 脱リン酸化反応が *D. calyx* の Entotheonella 細胞内で生じていることが示唆された。

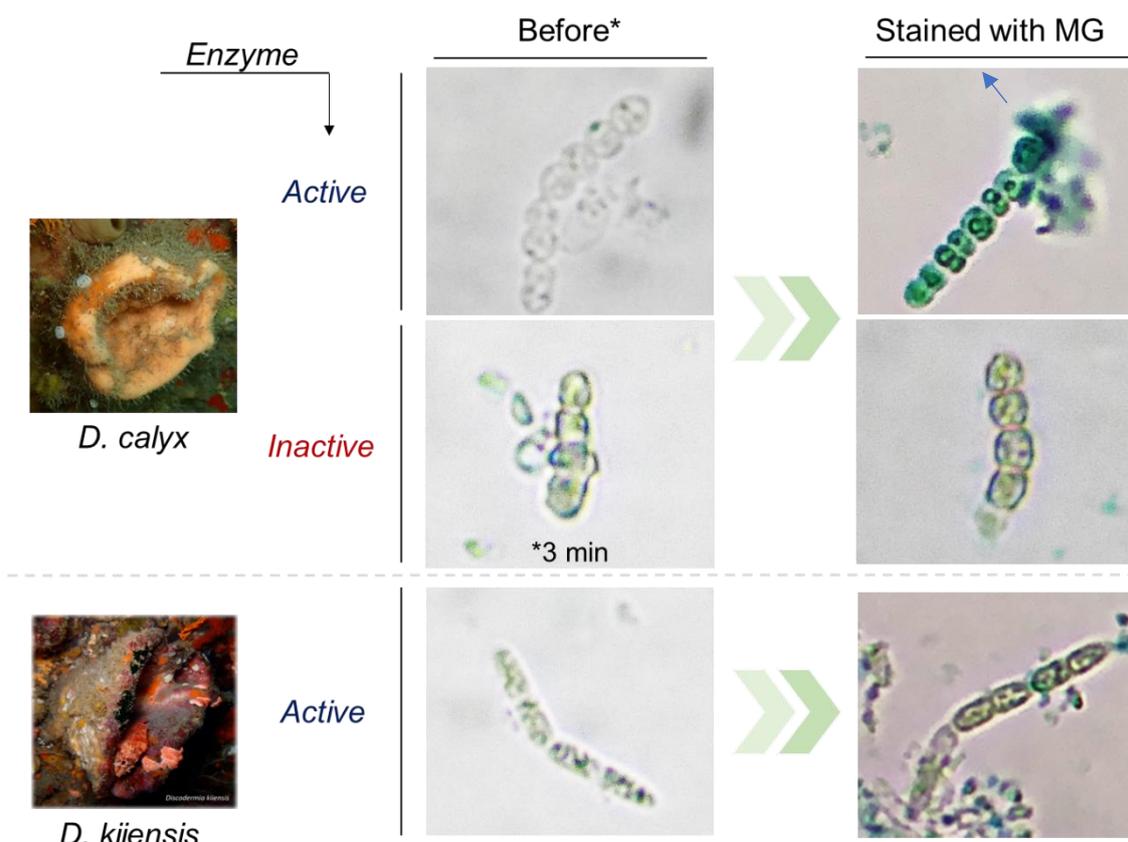


Fig. 51 Entotheonella 細胞内における脱リン酸化活性の局在

第4節 小括

海綿より精製した脱リン酸化酵素 CalL の PMF データを精査した結果、CalL は N 末端のシグナルペプチド配列がシグナルペプチダーゼ I により切断されペリプラズムへと放出されていることが強く示唆された。さらに異種宿主発現株である大腸菌の細胞内において、組換え CalL はペリプラズムへと放出されていることが明らかになったことから、CalL は *Entotheonella* 細菌も含むグラム陰性細菌においてペリプラズムへ放出されている酵素であることが明らかになった。また *D. calyx* における脱リン酸化酵素と calyculin A の局在を調べた結果、脱リン酸化酵素および基質 phosphocalyculin A は *Entotheonella* 細胞内に局在していることが強く示唆された。これらのことから、海綿動物 *D. calyx* における組織傷害に応じた活性化機構「局在化仮説」を考察する。平時において、海綿 *D. calyx* に共生する難培養性のフィラメント状グラム陰性細菌“*Ca. Entotheonella* 属”の細胞内では、プロトキシンの phosphocalyculin A とその活性化酵素 CalL が細胞内膜を隔ててそれぞれ細胞質とペリプラズムへと区画化・蓄積されている。そこへ外敵の捕食により細菌膜に傷が生じると、瞬時に phosphocalyculin A と CalL が混合されることで活性型の calyculin A へと生物変換され、これが外敵に対して毒性を示すことで化学防御物質として機能すると考えられる (Fig. 52)。実際に新鮮な *D. calyx* の組織を固定液に浸し、*Entotheonella* 細菌の細胞表面を走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope; SEM) を用いて観察した結果、膜損傷した *Entotheonella* 細

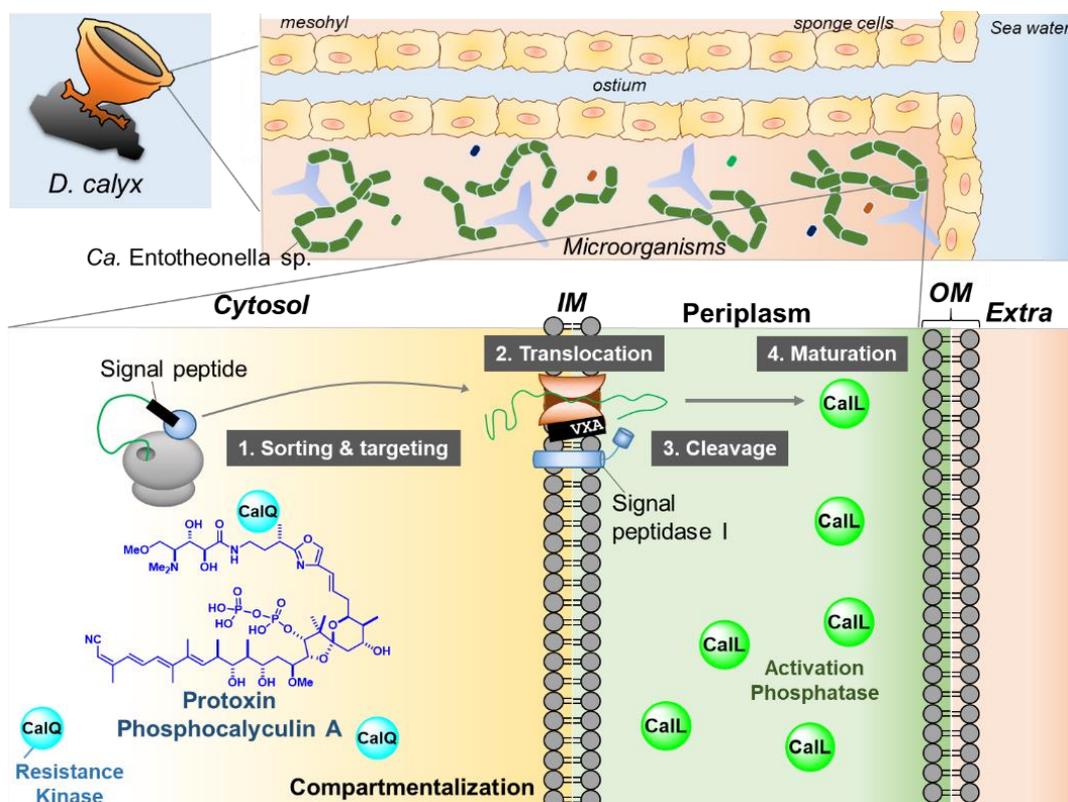


Fig. 52 海綿組織における calyculin A 活性化制御機構「酵素局在化仮説」

胞の存在が認められた。本章で述べた実験結果も考慮すると、Fig. 53b-e で示したような膜傷害がプロトキシン活性化の鍵となることが推測される。

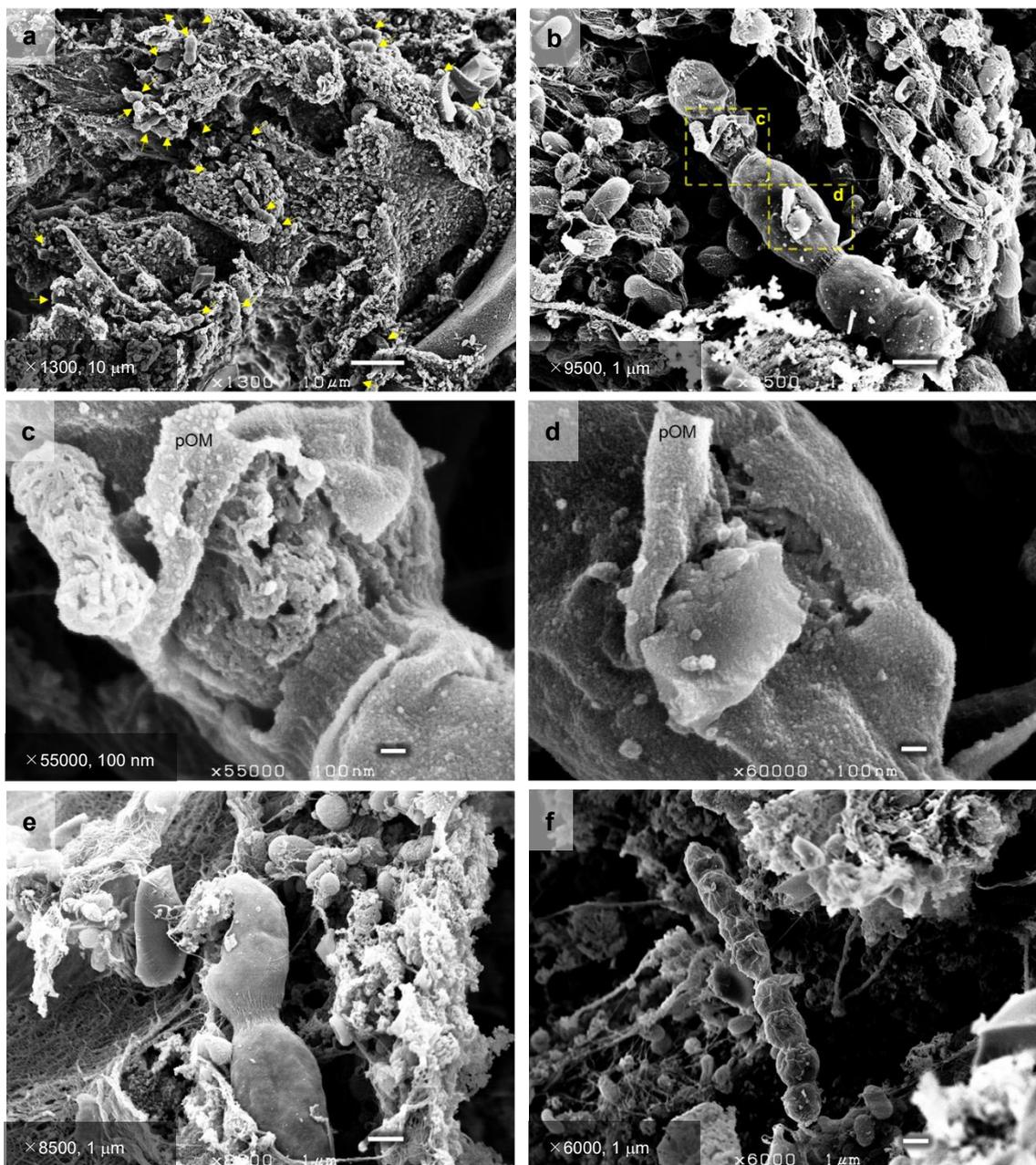


Fig. 53 *D. calyx* における Entotheonella 細胞の SEM 画像

(a) 中膠部位、黄色矢印；Entotheonella 細胞、(b) 膜損傷した Entotheonella 細胞、(c, d) b の黄色枠内の拡大図、pOM；損傷により剥離した外膜部位、(e) 膜が損傷した Entotheonella 細胞、(f) 無傷の Entotheonella 細胞
他の SEM 画像は Supplementary Fig. 7 に示した。

本研究で明らかにした calyculin 生合成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 と脱リン酸化酵素 CalL による calyculin A の活性制御機構は、第 1 章 2 節で述べたように放線菌におけるリン酸化/脱リン酸化を介したアミノグリコシド系抗生物質¹¹²⁻¹¹⁵⁾やペプチド抗生物質の活性制御機構と類似している。Streptomycin は細菌のリボソームを特異的に結合することでタンパク質合成を阻害し¹¹⁵⁾、viomycin は RNA に特異的に結合し細菌のタンパク質合成を阻害することから、生産菌に対しても有毒である¹⁶⁰⁾。しかし、生産菌はこれら抗生物質をリン酸化した状態で細胞質からペリプラズム側へと放出し、自身に対する抗生物質の毒性を回避している。これら抗生物質の耐性遺伝子で知られているリン酸基転移酵素 StrA¹¹⁴⁾と Vph¹⁶⁰⁾は、それぞれ streptomycin と viomycin に対してリン酸化を施し弱毒化する酵素である。一方、活性化を担うアルカリホスファターゼに属する脱リン酸化酵素 StrK¹¹⁵⁾および VioS¹⁶⁰⁾は、リン酸化された streptomycin と viomycin を特異的に脱リン酸化する。これら脱リン酸化酵素は、その N 末端に存在するシグナルペプチド配列が保存されているため、タンパク質分泌経路により細胞質外のペリプラズムまたは細胞外へと放出される。このようにこれら抗生物質の生合成には、自己耐性機構、活性化酵素の放出、細胞質外での活性化機構が内在しており、抗生物質の生産菌には抗生物質生産の過程で自身への毒性を最小限に抑えつつ、効率的に細胞質外で活性化することで、周囲に存在する細菌に対して毒性を示す洗練された活性制御機構が備わっている。

一方、グラム陰性細菌 *Entotheonella* が生産する calyculin 類は多種多様なグラム陰性/陽性細菌に対して全く抗菌活性を示さないことから (Table 1)、この calyculin 生合成経路に内在しているリン酸化/脱リン酸化を介した calyculin 活性制御機構は、生産菌自身の耐性獲得が目的ではなく、海綿宿主 *D. calyx* のための活性制御機構であると考えられる。Calyculin A は真核生物に対して極めて低濃度で毒性を示すことから、生産菌の住処である海綿宿主を守るための化学防御システムであることが推測される。

総括

本研究において私は、海綿動物 *D. calyx* の粗酵素抽出液より各種カラムクロマトグラフィーを用いて phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素の精製に成功し、その脱リン酸化酵素が共生細菌 *Ca. Entotheonella* 属の calyculin 生合成遺伝子クラスターの上流にコードされている CalL であることを明らかにした (Fig. 54)。1993 年に海綿動物 *Aplysina aerophobia* における組織傷害に応じた化学防御が発見されて以来、プロトキシシンおよび活性型の化学防御物質のみ同定されてきた³³⁻³⁵)。しかし、その生合成遺伝子、生産者や活性化酵素の同定には至っておらず、海綿動物における活性化防御の詳細は不明であった。海綿に共生する難培養性の細菌が化学防御物質の活性をコントロールすることを明らかにした本成果は、他の海綿動物における活性制御においても化学防御物質の生産者が担っている可能性を提示した。

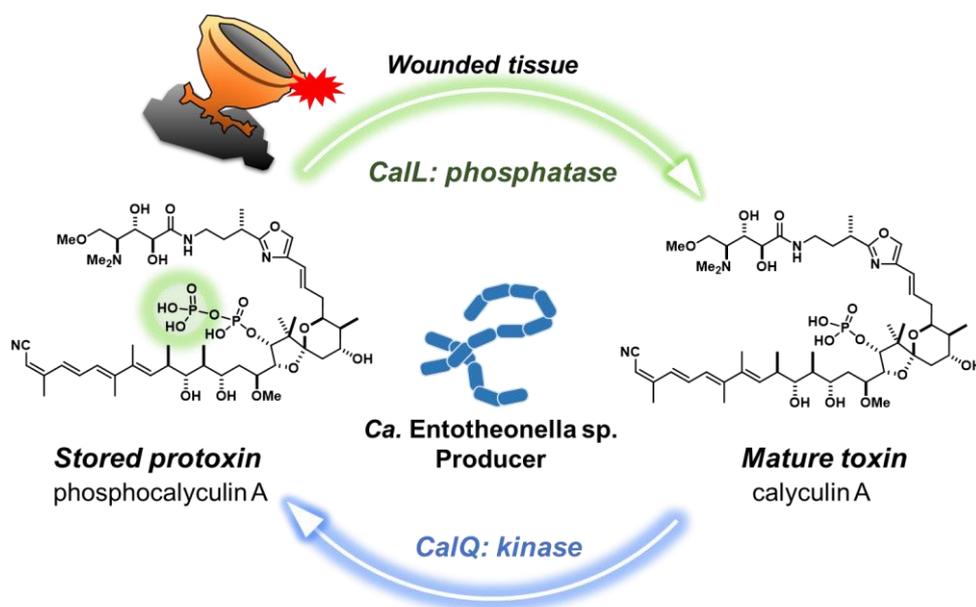


Fig. 54 共生細菌 *Entotheonella* 属が制御する calyculin A 活性化システム

本研究は、脱リン酸化酵素スーパーファミリーの中でも独立した新規系統グループを代表する CalL の海綿動物における生理的機能およびその生化学的特徴を明らかにした。CalL の生化学的特徴は、阻害剤との感受性など配列相同性を示す PAP と共通した特徴を有する一方、PAP の低い基質特異性と異なり CalL は *p*-NPP や calyculin A などのリン酸エステル基の脱リン酸化活性が認められず、phosphocalyculin A のピロリン酸エステルを特異的に脱リン酸化する基質特異性の高い酵素である。また CalL の活性中心には脱リン酸化酵素スーパーファミリーの中でも前例のない Cu-Zn のヘテロ二核金属を有する脱リン酸化酵素であることを明らかにした。PAP と同一の金属結合残基が保存されているにもかかわらず、CalL が PAP の特徴である Fe 以外の Cu および Zn を選択する要因は明らかになっていない。

Glycerophosphodiesterase の GpdQ は中心金属が入れ替わることで、その基質特異性や触媒効率に変化することが報告されている。GpdQ は活性中心に Fe (II) が配位した場合、二価の Mn, Co, Zn が配位した酵素よりも、触媒効率が減弱し基質特異性も低下することに加え、至適 pH も塩基性から酸性へと大きく変動する¹⁶¹⁾。このことから Fe (III) を有する PAP と異なり CalL の基質特異性は、活性中心の金属種の違いも一つの要因であると考えられる。今後 CalL と基質の共結晶の構造解析を行い金属結合残基と Cu および Zn との結合様式が明らかにすることで、基質特異性や金属選択性の謎を明らかにしたい。また本研究で明らかにした基質特異性の高い CalL と耐性酵素 CalQ を用いることで、現在世界中で用いられているタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤 calyculin A の動物細胞内における活性制御を可能とする。即ちタンパク質リン酸化を可逆的に制御し、細胞内シグナル伝達機構の精査を可能とする新たな生化学研究用ツールの開発や、がん組織選択的な抗体指向性酵素プロドラッグ治療法 (ADEPT) の開発への応用展開も期待できる。

本研究では海綿における組織損傷後からプロトキシシン活性化に至るまでの経路の解明に挑み、海綿より精製した酵素および組換え CalL のアミノ酸配列情報をもとに、活性化酵素 CalL が *Entotheonella* 細菌のペリプラズムへと放出されていることを明らかにした。さらに海綿組織において *Entotheonella* 細胞画分に phosphocalyculin 脱リン酸化酵素およびその生成物 calyculin A が局在していることが示唆された。これらのことから *Entotheonella* 細胞内では細胞質側に phosphocalyculin A が、ペリプラズム側に CalL が内膜を隔ててそれぞれ蓄積しており、物理刺激に応じて calyculin A へと活性化する制御機構が備わっていると推定される。アミノグリコシド系抗生物質を生産する放線菌¹⁶²⁾を含めグラム陰性菌でも DNA 損傷を与える colibactin はペリプラズム側へとプロトキシシン pre-colibactin を排出後に、ペリプラズムに存在するペプチダーゼ ClbP が強力な毒性を示す colibactin へと変換する¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾。このように極めて強力な生物活性物質の生合成経路には、比較的単純な化学変換を介した毒性回避機構、プロトキシシン活性化酵素の細胞質外への放出機構、細胞質外での活性化機構がセットで内在されている。しかしながら、自己毒性を示す colibactin や抗生物質の例とは全く異なり、calyculin A は細菌に対する毒性が全く認められない。また、抗生物質の生産菌は細胞質でプロトキシシンを蓄積せず、ペリプラズムへ排出後に活性化を伴い外部へ放出するが、*Entotheonella* 細菌は体内に phosphocalyculin A を蓄積し、膜傷害時にのみ calyculin A へと変換する。このことから *Entotheonella* 細菌が有する calyculin 活性制御機構には、海綿宿主を守る役割だけでなく、生産菌自身にも何らかの意義が存在すると考えられる。細菌には ATP の代わりにエネルギー貯蓄物質としてポリリン酸の顆粒を細胞内に蓄積する者も存在する¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾。海綿 *T. swinhoei* の *Entotheonella* 細菌においても、電子顕微鏡下で細胞質内に複数の顆粒の存在が報告されている¹⁶⁹⁾。実際に第3章3節で述べた Fig. 51 において *D. calyx* 由来の *Entotheonella* 細胞を MG 試薬で染色した際、細胞内に顆粒の存在が認められた。これらのことから *Entotheonella* 細菌にとって phosphocalyculin A は、緊急時に備えたエネルギー貯槽物質としての機能を有することも考えられる。膜傷害に応じて膜の修復には膨大な

エネルギーを必要とする。その際に貯蓄していた phosphocalyculin A のピロリン酸エステルの結合を瞬時に切断することで生じるエネルギーを膜修復に充てるような役割を果たしていると推測される。

これまでに *Entotheonella* 細菌の calyculin A のように膜傷害を引金とし二次代謝産物の組成が瞬時に変化する細菌の報告はない。このことから、この膜傷害応答活性化機構には、*Entotheonella* 特有のシステム、あるいは海綿宿主やその他の共生微生物と *Entotheonella* 細菌との間に何らかのコミュニケーションの存在が伺える。しかし、*Entotheonella* 細菌は難培養性であるため膜傷害の詳細なシステムの解明は現状困難である。一方、第 2 章 1 節で述べたように CalL と同じ系統グループに属する CalL のホモログは、グラム陰性かつ可培養性細菌である *Burkholderiales* 目に属する *Duganella* 属、*Burkholderia* 属、*Massilia* 属のゲノムに保存されている。CalL のように周辺に生合成遺伝子クラスターの存在は認められず、その生理的機能および基質は全く不明である。しかし、これら CalL ホモログは *Burkholderiales* 目に属する細菌に普遍的に保存されており、N 末端にはシグナルペプチド配列が必ず保存されている。そのため細菌にとって何らかの重要な役割を担う酵素であり CalL と同様に細胞の膜傷害に応答する酵素グループである可能性も予想されることから、今後の研究課題としたい。

実験項

本研究では、以下の実験機器・試薬類を用いた。

実験機器類

超純水装置	Elix® 5 UV, Milli-Q Labo (Millipore)
オートクレーブ	LSX-500 (TOMY)
卓上遠心機	ExtraGene, CT15E himac (HITACHI)
冷却遠心機	CR 20F (HIMAC) angle rotor#R10A (volume 200 mL) MX-307 (TOMY) angle rotor#, (volume 50 mL) KUBOTA6200, swing rotor#SF-722 (密度勾配遠心分画法)
天秤	XS204 (METTLER TOLEDO)、FX-1200i (AND Company)
凍結乾燥機	FDU-2000 (EYELA)
ブロック恒温槽	BSR-M002 INCUBATOR (Bio Medical Science Inc.)
恒温振とう培養器	CLE-303 CULTIVATIOM CHAMBER (TOMY)+ MULTI SHAKER MMS (EYELA) (50 mL culture) Bio Shaker BR-23FP, BR-180LF-70RT (TAITEC) (200 mL culture)
クリーンベンチ	Biological Safety Cabinets CLASS II A2 (NUAIRE) KBB1303L (日本エアーテック株)
アガロース電気泳動槽	MARINE 23ST (FUJIFILM)
アガロース撮影装置	Camera DMC-LX100 (Panasonic) FAS-Digi (日本ジェネティクス株)
タンパク質電気泳動 二次元電気泳動	Mini-PROTEIN® Tetra System, myPowerII300 AE-8135 (ATTA) IPGphor, Multiphor II (Pharmacia) electrophoresis power supply EPS 3501 XL (Pharmacia)
銀染色用機器	automated gel stainer, Hoefer® (Pharmacia)
サーマルサイクラー	TP350, PCR Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ)
超音波破碎機	UD-100 ULTRASONIC DISRUPTOR (TOMY)
DNA シーケンサー	Applied Biosystems 3730x1 DNA アナライザ (Thermo Fisher) FASMAC に外注 (サンガー法シーケンシング)
プレートリーダー	Infinite M200 (TECAN) Labsystems Multiskan MS (Thermo Fisher)
分光光度計	UV-1900i UV-VIS SPECTROPHOTOMETER+TCC-100 (SHIMAZU)
DNA 定量	BioSpec-nano (SHIMAZU BIOTECH)
pH メーター	SevenMulti (METTLER TOLEDO)
AKTA 蛋白質精製装置	PUMP-50, Control Unit & Optical Unit UV-1 280 nm, GradiFrac (Pharmacia Biotech) in refrigerator (SANYO)
HPLC	LC-20AD pump, CTO-20A column oven

	SPD-M20A diode array detector
UPLC	NexeraXR LC-20AD pump, SIL-20AC XR autosampler, CTO-20AC column oven, SPD-M20A diode array detector
LC-MS	HPLC-MS : amaZon SL-NPC (Bruker)
光学顕微鏡	Nikon ECLIPSE E400, i-NTer LENS (マイクロネット株式会社)、 カメラ : iphone 8
電子顕微鏡	Field emission-scanning electron microscopy、JSM-6301F、JEOL

試薬・溶媒類

40% (w/v) -Acrylamide/Bis Mixed Solution (29:1) (ナカライ)

Acetic acid (和光純薬工業)

Acetonitrile for LC-MS grade (和光純薬工業)

Agar (ナカライ)

Agarose S (ニッポンジーン)

Ampicillin (ナカライ)

Ammonium hydrogencarbonate for proteomics (和光純薬工業)

Ammonium sulfate (和光純薬工業)

APS (ammonium peroxodisulfate) (和光純薬工業)

L-arabinose (和光純薬工業)

Bacto™ Trypton (ナカライ)

Bacto Yeast extract (BD Biosciences)

Bradford reagent (Bio-Rad)

CBB Stain One (Ready to use) (ナカライ)

Chloramphenicol (ナカライ)

Coomassie Plus™ Protein Assay reagent (PIERCE)

Copper(II) chloride (和光純薬工業)

D-Desthiobiotin (Sigma-Aldrich)

EDTA · 2Na (和光純薬工業)

Ethanol (和光純薬工業)

Ethidium bromide solution (ナカライ)

Glycerol (関東化学)

Glycine (和光純薬工業)

Guanidine Thiocyanate (ナカライ)

2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid (HABA) (Sigma-Aldrich)

Hydrochloric acid (和光純薬工業)

Imidazole (ナカライ)

Iodoacetamide (和光純薬工業)

Iron (III) chloride (和光純薬工業)
 Isopropanol (和光純薬工業)
 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (ナカライ)
 Trifluoroacetic acid (ナカライ)
 Magnesium chloride (和光純薬工業)
 Manganese (II) chloride (和光純薬工業)
 Methanol for LC-MS grade (和光純薬工業)
 2-mercaptoethanol (関東化学)
 2-morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate (MES) (同仁化学)
 Sucrose (和光純薬工業)
 Sodium acetate (和光純薬工業)
 Sodium chloride (和光純薬工業)
 Sodium dihydrogenphosphate dihydrate (和光純薬工業)
 Sodium fluoride (和光純薬工業)
 Sodium hydroxide (和光純薬工業)
 Sodium phosphate, dibasic, 12-water (和光純薬工業)
 Sodium lauryl sulfate (SDS) (ナカライ)
 Triethanolamine (Sigma-Aldrich)
 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (ナカライ)
 TEMED (*N, N, N', N'*-tetramethylethylene-diamine) (ナカライ)
 Urea (和光純薬工業)
 Zinc (II) chloride (和光純薬工業)

生化学試薬類

DNA polymerase	KOD One [®] PCR Master mix -Blue- (TOYOBO)
Ligase	Solution I (Takara)
DNase	<i>DpnI</i> (NEB)
Restriction enzyme	<i>EcoRI</i> (Takara)
	<i>NdeI</i> (Takara)
	<i>HindIII</i> (Takara)
Protease	Trypsin gold mass spectrometry grade (Promega)
	Endoproteinase Glu-C for protein sequencing (Sigma-Aldrich)
Hydrolase	Lysozyme form Egg (和光純薬工業)
Protein marker	Protein Markers M.W. 6,500~200,000 (10 \times) (ナカライ)
Protein quantification	Albumin Standard (PIERCE)
DNA ladder	OneStep Marker 5 (ニッポンジーン)
	λ - <i>HindIII</i> DNA marker (Takara)

キット類

Malachite Green Phosphate Assay Kit (フナコシ)
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
EconoSpin Ia (Aji Bio Pharm), Column Wash Solution (CWA) (Promega) for gel extraction
Metalloassay LS for copper (Metallogenics)
Metalloassay LS for zinc (Metallogenics)
Pierce™ C-18 Spin Columns (Thermo SCIENTIFIC)

ベクター・プラスミド DNA 類

pUC19 (Takara)
pET22b(+) (Novagen)
pColdII (Takara)
pCC1FOS (Epicentre)
pET28a (Novagen)
Chaperone Plasmid Set (Takara)

大腸菌株

BL21 (DE3) $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacI lacUV5-T7 \text{ gene } 1 \text{ ind}1 \text{ sam}7 \text{ nin}5$
DH5 α $F^- \phi 80dlacZ \Delta M15 \Delta (argF-lacZAY) U169 \text{ rec}A1 \text{ end}A1 \text{ hsd}R17 (r_K^- m_K^+) \text{ sup}E44$
 $mcrA^- mcrB^+ g^- thi-1 gryA96 \text{ rel}A1$

培地・緩衝液類

LB 培地 (寒天培地) 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, (1.5% agar)
2×YT 培地 1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl
CMF-ASW(人工海水) 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM EGTA pH8.0, 449 mM NaCl, 9 mM
KCl, 33 mM Na₂SO₄, (after autoclave 2.15 mM NaHCO₃)

※すべての培地は 121 °C、20 分間オートクレーブした。

TAE buffer 40 mM Tris, 0.114% (v/v) acetic acid, 1 mM EDTA pH 8.0
SDS-PAGE running Buf. 25 mM Tris, 0.1% (v/v) SDS, 1.44% (v/v) glycine
QG buffer 5.5 M guanidinium thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 6.5

酵素精製用緩衝液

buffer A 25 mM triethanolamine-HCl pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.03% (v/v) Brij-
35, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol, 5% (v/v) glycerol
buffer B 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol

Table. 7 本研究で使用したプライマー

Primer	Orientation	5'-Sequence-3'
pET22b-caly-3 Fw	Forward	gta <u>cat ATG</u> CAA GCG CGC AGT ACA ACC
pET22b caly-3 Re	Reverse	c ggc <u>aag ctt</u> cta TTT TAG CTG GCT TTT AG
Upst-CalL_F	Forward	TTCACATGCCGGGTGC
NL_CalL_Eco_F2	Forward	c egg aat tcA ATG GTG GTA GTC ACT <u>CAT ATG</u> G
CalL-St-HiIII_Re	Reverse	ccc <u>aag ctt</u> cta <i>ctt ttc gaa ctg cgg gtg gct cca gct tgc</i> TTT TAG CTG GCT TTT AGA AAC
CalL_D116A_F	Forward	TT GTC ATC ATC GGC GCT ACC GGT TGC CGC G
CalL_D116A_R	Reverse	C GCG GCA ACC GGT AGC GCC GAT GAT GAC AA
CalL_D165A_F	Forward	C ATT CAC CTT GGC GCT TAT CAC TAC CGC GA
CalL_D165A_R	Reverse	TC GCG GTA GTG ATA AGC GCC AAG GTG AAT G
CalL_Y168F_F	Forward	T GGC GAT TAT CAC TTC CGC GAG ACG CCC TG
CalL_Y168F_R	Reverse	CA GGG CGT CTC GCG GAA GTG ATA ATC GCC A
CalL_Y168A_F	Forward	T GGC GAT TAT CAC GCC CGC GAG ACG CCC TG
CalL_Y168A_R	Reverse	CA GGG CGT CTC GCG GGC GTG ATA ATC GCC A
CalL_N215A_F	Forward	C TTC ATC CGC GGC GCT CAC GAG AGT TGC GC
CalL_N215A_R	Reverse	GC GCA ACT CTC GTG AGC GCC GCG GAT GAA G
CalL_H305A_F	Forward	C TGG TCG CTG ACC GCT GAA CCC ATC TGG GG
CalL_H305A_R	Reverse	CC CCA GAT GGG TTC AGC GGT CAG CGA CCA G
CalL_H352A_F	Forward	TT CTT CTG AGC GGG GCT GTG CAT CTG TTC G
CalL_H352A_R	Reverse	C GAA CAG ATG CAC AGC CCC GCT CAG AAG AA
CalL_H354A_F	Forward	TG AGC GGG CAT GTG GCT CTG TTC GAG TCC T
CalL_H354A_R	Reverse	A GGA CTC GAA CAG AGC CAC ATG CCC GCT CA

制限酵素認識部位は下線 (*EcoRI*, *NdeI*, *HindIII*)、 *Strep* tag II の配列部位は*斜体*、変異箇所は**太字**で示した。

第1章 Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の同定

第2節

CaII の異種発現用プラスミド DNA を有するコンストラクトの構築 (短い ORF)

脱リン酸化酵素と相同性を示す ORF 遺伝子 *calL* の異種発現用プラスミドを構築するため、遺伝子配列に特異的なプライマーを設計した。Forward および Reverse プライマーにはそれぞれ *NdeI* と *HindIII* の制限酵素サイトを組み込んだ。PCR の反応液 50 μ L の組成は、1.75 mM MgCl₂、0.4 μ M プライマー (pET22b-caly-3 Fw / pET22b caly-3 Re, Table. 7)、0.3 mM dNTPs、1.25 U PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara)、鋳型 10 μ g pDCYE1 (*D. calyx* のメタゲノム DNA より単離された *cal* 遺伝子がコードされているインサート DNA が入った Fosmid#19-25⁹⁶⁾) とした。PCR 反応条件は [step1; 95 °C 5 min, step2; (95 °C 30 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 90 sec) \times 25 cycles] で行った。PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動後、目的の断片を切り出し、QG buffer と共に 55 °C でインキュベートしゲルを溶解させた。溶解液を DNA ゲル抽出カラム EconoSpin Ia (Aji Bio Pharm), Column Wash Solution (CWA) (Promega) を用いて、PCR 産物を精製した。精製後の DNA 断片および発現用プラスミド pColdII (Takara) を 37 °C で 3 時間、*NdeI* および *HindIII* で制限酵素処理した。制限酵素処理後の DNA を DNA ゲル抽出カラムで精製し、プラスミド (50 ng) と *calL* DNA 断片 (50 ng) を含む溶液に Solution I (Takara) を加え 16 °C で 3 時間インキュベートすることでライゲーションした。反応後のライゲーション産物をヒートショックにより大腸菌 *E. coli* DH5 α へ形質転換後、200 μ g/mL ampicillin 含有 LB 寒天培地へプレーティングし、37 °C にて一晩静置培養した。翌日、寒天培地上に形成された大腸菌の単一コロニーを採取し、コロニー PCR でインサート DNA が挿入されていることを確認した。コロニー PCR において陽性であったクローンについて、プラスミド DNA を抽出し、DNA シークエンス解析によりインサート DNA の配列を確認した。シークエンスエラーを含まないプラスミド pCold-*calL* を、分子シャペロンプラスミド pG-KJE8 (Takara) を有する高発現用異種宿主 *E. coli* BL21 (DE3) へヒートショックにより形質転換し、LB 寒天培地 (100 μ g/mL ampicillin、50 μ g/mL chloramphenicol) で終夜 37 °C で静置培養し、プレート上に形成された単一コロニーを 2 \times YT 液体培地 (100 μ g/mL ampicillin、50 μ g/mL chloramphenicol) に播種した。37 °C で 220 rpm で終夜振とう培養した後に、終濃度 20% グリセロールストック [stock code; pColdII-*calL*, pG-KJE8, *E. coli* BL21 (DE3)] を作製し -80 °C のディープフリーザーで凍結保存した。

組換えタンパク質 CaII の異種宿主発現 (短い ORF)

-80 °C ディープフリーザーに保存していたグリセロールストック [stock code; pColdII-*calL*, pG-KJE8, *E. coli* BL21 (DE3)] を LB 寒天培地 (200 μ g/mL ampicillin、50 μ g/mL chloramphenicol) にストリークし、37 °C 終夜で静置培養した。寒天培地上に生えた単一コロニーを 10 mL 2 \times YT 液体培地 (100 μ g/mL ampicillin、50 μ g/mL chloramphenicol) に植菌し、終夜 37 °C、220 rpm で振とう培養した。培養後、200 mL 2 \times YT 液体培地 (500 μ g/mL L-arabinose、100 μ g/mL ampicillin、50 μ g/mL chloramphenicol) を含む坂口フラスコに 1% の培養液を加え、OD₆₀₀ 値が 0.6-0.8 に

到達するまで 37°C、140 rpm で振とう培養することで、シャペロンを高発現させた（約 3 時間）。この培養液を 15 分間氷冷した後に、そこへ pColdII の T7 プロモーター制御下にある遺伝子 *calL-strep* の組換えタンパク質を発現誘導するために、1.0 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) を加えた。組換えタンパク質 *His₆-CalL* の発現は 15 °C で 16 時間 140 rpm で振とう培養した。

組換えタンパク質 *His₆-CalL* の抽出・精製（短い ORF）

以下の操作は全て 4 °C で行った。組換えタンパク質 *His₆-CalL* を発現させた大腸菌を 5,000g、10 分間遠心分離機で集菌した。上清を除去し得られた沈殿へ培養量の 1/10 量の 10 mM の imidazole pH 8.0 を含む buffer B（50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol）で再懸濁した。超音波破碎にて菌体を破碎し、203,000g で 20 分間 4 °C で遠心後、得られた上清を可溶性画分とした。この可溶性画分を 10 mM の imidazole を含む buffer B で平衡化した 1 mL の Ni-NTA カラム [COSMOGEL His-Accept (ナカライ)] へ供した。樹脂を 20 mL の buffer B (+10 mM imidazole) で洗浄した後に 10 mL の buffer B (+300 mM imidazole) で組換えタンパク質 *His₆-CalL* を溶出させた。10% SDS-PAGE で分析したところ溶出画分には、60 kDa および 70 kDa に夾雑タンパク質を含む可溶性組換えタンパク質 *His₆-CalL* の存在を確認した。溶液中の imidazole を除去するために、Amicon Ultra 10,000 device (Merck Millipore)を用いて限外濾過し、buffer B へと置換・濃縮した。この溶液を *in vitro* 酵素反応に用いた。

タンパク質濃度の定量法

溶液中のタンパク質濃度は、Bradford 法により定量した。5 μ L の酵素溶液を含む 96 穴プレートに、195 μ L タンパク質定量溶液（175 μ L ddH₂O、20 μ L Bradford reagent）を加え、5 分間振とう攪拌させた後に、プレートリーダーで 595 nm の吸光度を測定した。タンパク質濃度の検量線は、希釈系列 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 μ g/mL の Albumin Standard (PIERCE)を用いて作成し、得られたタンパク質溶液の吸光度を検量線にプロットすることで、溶液中のタンパク質濃度を算出した。

組換えタンパク質 *His₆-CalL* の *in vitro* 酵素反応（短い ORF）

精製後の *His₆-CalL* を用いて、*in vitro* 酵素反応を行った。45 μ L の基質溶液（50 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 μ M phosphocalyculin A）に精製した 100 nM 酵素溶液を 5 μ L 加え（終酵素濃度；10 nM）、ピペッティングにより混合した。二価または三価の金属（Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn）と共に酵素反応を試みた。さらに酵素に必要な補因子が不明であったため、海綿抽出液を熱変性後その上清も添加した。なお、反応条件は 25 °C 最大で終夜反応させたが、いずれの条件においても phosphocalyculin A 脱リン酸化活性は認められなかった。反応の有無は、RP-UPLC で反応溶液を分析することで確認した（詳細は第 5 節に後述）。

第 1 章 第 3 節

海綿 *D. calyx* の採集

海綿 *D. calyx* は、2011 年 5 月式根島および 2018 年 5 月伊豆半島・中木においてスキュー

バダイビングにより水深 10 - 20 m でナイフを用いて採集した。採集後の試料は -30 °C の冷凍庫で保存した。

D. calyx からの酵素抽出

-30 °C で保存していた冷凍海綿 *D. calyx* (湿重量 1.8 kg) を室温で解凍し、ナイフで 1 cm 角に切った組織切片をフードプロセッサーに加え、1 L の buffer A とともにペースト状になるまで破碎した。以後の操作は可能な限り氷上で行った。ペースト状の組織破碎液を 3 L ビーカーへ移し、そこへ 1 L の buffer A を加え、超音波破碎により細胞を破碎した (合計 5 分間: 30 秒インターバル)。20 分間静置した後、得られた上清を新たな 3 L ビーカーへ移し、残渣に 1 L の buffer A を加えて攪拌し 20 分静置することで再度酵素を抽出した。得られた上清をビーカーへと移し合計 2 L の上清を得た。冷却遠心機を用いて 7,000g で 4 °C、20 分間遠心することで、海綿組織の残渣を除去した。この粗酵素抽出液を、煮沸済みの半透膜 (セルロース膜) へ全て移し、氷冷水に終夜浸すことで脱塩した。析出した凝集タンパク等を除くために、脱塩した溶液を 1.0 mm と 0.45 mm フィルターで順次吸引濾過し、最終的に 3 L の海綿粗酵素抽出液 (タンパク質量: 7.3 g) を得た。

酵素精製用 phosphocalyculin A 脱リン酸化活性試験 (MG 試験)

基質 6 mg/mL phosphocalyculin A (ガラス容器, 遮光 -30 °C 保存) を含む MeOH 溶液 1 μ L をマイクロシリンジで 96 穴プレートのウェルに加え、室温で 10 分間風乾させて MeOH を除いた。基質 6 μ g を含むウェルおよび基質を含まないウェルに 10 μ L の分画した酵素溶液を加え室温で 15 分間反応させた。反応後、70 μ L の蒸留水で希釈し、20 μ L のマラカイトグリーン試薬を加え 10 分間振とうさせた (total volum/well: 100 μ L)。マイクロプレートリーダーで 620 nm の吸光度を測定し、基質の有無での OD₆₂₀ 値の差を算出した。酵素画分の total activity は kit に付属の遊離モノリン酸標準液の検量線にプロットすることで算出した。比活性 relative activity (%/ μ g) は total activity (%) をタンパク質量 (μ g) で割った値とした。

p-nitrophenyl phosphate 脱リン酸化酵素活性試験 (p-NPP 試験)

脱リン酸化酵素の活性は p-nitrophenyl phosphate を基質とする以前高井らが報告した方法に従って行った⁸⁰⁾。酵素活性試験の直前に 5 mM p-NPP disodium salt と 4 mM DL-ジチオスレイトール (DTT) を 40 mM Tris-base, 34 mM MgCl₂ · 6H₂O, 4 mM EDTA · 2Na のバッファ (pH 調製不要) に溶解させた。脱気後のバッファ 190 μ L を 10 μ L の分画酵素溶液を含むウェルに添加して反応を開始し、マイクロプレートリーダーを使用して 405 nm での吸光度の変化 (反応条件; 室温、20 分間) を測定することにより p-nitrophenol の初期遊離速度を算出した (Thermo Fisher, Labsystems Multiskan MS)。

海綿動物由来 phosphocalyculin A 脱リン酸化酵素の精製

最終精製を除く全ての酵素精製は AKTA クロマトグラフィーシステムを用いて 4 °C の冷蔵庫内で行った。初めに、海綿から抽出した 3 L の粗酵素溶液 (7.3 g) を buffer A で平衡化した陰イオン交換カラム 2 本 HiPrep 16/10 Q XL (Pharmacia, C.V. = 2 × 10 mL) に供した。次に Q XL カラムから得られたフロースルー画分を同じく buffer A で平衡化しておいた 2 本

の陽イオン交換カラム HiPrep 16/10 SP XL (Pharmacia, C.V. = 2 × 10 mL) に供した。Buffer A で UV 280 nm ベースラインが平行になるまで SP カラムを洗浄した (約 10 L)。陽イオン交換樹脂に吸着している酵素は 0 - 250 mM NaCl / buffer A 直線勾配 200 mL (40 min)、流速 5 mL/min の条件で溶出させ、5 mL ごとに試験管 (40 本) へ分画した (Supplementary Fig. 2 a)。Phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を示した画分 (Fr. 25-45, 60 mg) を Amicon 10,000 MWCO (Merck Millipore) を用いて 1.5 M ammonium sulfate / buffer A 溶液に濃縮および置換した。濃縮後の画分を 1.5 M ammonium sulfate / buffer A 溶液で平衡化しておいた疎水性相互作用の分離カラム 2 本 HiTrap Phenyl Sepharose HP (Pharmacia, C.V. = 2 × 5 mL) へ供した。樹脂に吸着された酵素は 1.5 M - 0 M ammonium sulfate / buffer A の直線勾配 40 mL (20 min)、流速 2 mL/min で 2 mL ごとに試験管 (40 本) へと分画した (Supplementary Fig. 2 b)。活性画分 (Fr. 11-31, 3.22 mg) は 200 mM NaCl / buffer A に置換した後に、ゲルろ過カラム 16/60 Sephacryl S 200 (Pharmacia, C.V. = 60 mL) に供し、200 mM NaCl / buffer A で流速 0.3 mL/min で溶出させ、溶出開始から 200 分後に 1 mL ごとに試験管 (100 本) へと分画した (Supplementary Fig. 2 c)。脱塩後、活性画分 (Fr. 20-28, 843 μg) を buffer A で平衡化した陽イオン交換カラム Mono S 5/50 GL (GE Healthcare, C.V. = 1 mL) に供した。カラムは 0 - 250 mM NaCl / buffer A の直線勾配 20 mL (20 min)、流速 1 mL/min で 0.5 mL ごとに試験管へ (40 本) 分画した (Supplementary Fig. 2 d)。活性画分 (Fr. 18-21, 459 μg) を限外濾過により 250 mM NaCl / 50 mM phosphate buffer pH 7.0 溶液に置換・濃縮した。最終精製は検出器 diode array-detected (DAD) と分離装置 HPLC (SHIMADZU) を用いて常温で行った。活性画分をゲルろ過カラム PROTEIN LW-803 (Shodex) に供し、酵素を流速 1.0 mL/min、溶出溶媒; 250 mM NaCl / 50 mM phosphate buffer pH 7.0 で溶出させ 0.5 mL ごとに試験管 (40 本) へと分画した。得られた画分を限外濾過により buffer A に置換した後に phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を評価した。10% SDS-PAGE を用いて最終精製画分が単一のバンドであることを確認した。最終的に *D. calyx* 湿重量 1.8 kg より phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素 286 mg を精製した。

二次元電気泳動

海綿より精製した脱リン酸化酵素および組換えタンパク質 CalL の二次元電気泳動は IPGphor (一次元目等電点電気泳動)、Multiphor II (二次元目 SDS-PAGE)、電気泳動のパワーサプライ EPS 3501 XL (Pharmacia) を用いて Pharmacia が提供するプロトコールに従って行った。脱塩後の酵素画分 (10 μg / 17 μL ddH₂O) に 133 μL の sample buffer [9.8 M urea, 2% (v/v) CHAPS、微量の bromophenol blue、IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare)] を加えることでタンパク質を変性させた。このサンプルを IPG gel (Immobline™ DryStrip gel pH 3-10, 7cm、GE Healthcare) に供し、等電点電気泳動を次の条件下で行った [Rehydration for 12 hr, step 1; 500 V, 30 min, 250 V/h, step 2; 1000 V, 30min, 500 V/h, step 3; 8000, 2 hr, 8000 V/h]。等電点電気泳動後の IPG gel を使用直前に 100 mg/mL DTT を加えた 5 mL の equilibration buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (v/v) SDS, 微量の bromophenol blue] で 15 分間振とうさせることで、タンパク質中のジスルフィド結合を還元した。続いて使用

直前に 250 mg/mL ヨードアセタミドを加えた equilibration buffer で 15 分間振とう処理することでタンパク質のチオールをアルキル化保護した。ろ紙で脱水した IPG gel を ExcelGel SDS Gradient 8-18, 2-D Homogenous 12.5 の上端に置き、タンパク質分子量マーカーとともに以下の条件で二次元目の電気泳動を行った [Step 1; 600 V, 20 mA, 30 W for 20 min, Step 2; 600 V, 50 mA, 30 W for 60 min]。二次元目の電気泳動後、プロトコールに従い銀染色 (Automated Gel Stainer Hoefer®, Pharmacia)を行うことでゲルに含まれるタンパク質を可視化した。

第 1 章 第 4 節

ペプチドマスマフィンガープリンティング (PMF)

海綿より精製した酵素の同定は既存のゲル内消化 PMF 法のプロトコール¹¹⁷⁾に従って行った。最終精製画分を 10% SDS-PAGE 分離後、タンパク質を CBB 染色することで可視化した。得られた 45 kDa 付近のタンパク質を含むバンドをアクリルアミドゲルから切り出し、約 0.25 mm 角に刻んだゲルを 1.5 mL のエッペンドルフチューブへと移した。そこへ 100 μ L 脱染色バッファ (25 mM ammonium bicarbonate / 30% CH₃CN aq.) を加え、20 分間転倒混和することで CBB を除去した。この脱色操作は合計 3 回行った。脱色後、100% CH₃CN を加え 3 分間脱水し、残留有機溶媒は 56 °C で 5 分間乾燥させることで完全に除去した。脱水後のゲルに 25 μ L 1 M DTT aq. で再水和させ 56 °C で 45 分間処理することでタンパク質のジスルフィド結合を還元した。余分な還元溶液を除去した後に、200 μ L 10 mg/mL ヨードアセタミド水溶液を加え遮光条件下、室温で 30 分間転倒混和することで、還元されたチオール基をアルキル化保護した。反応後、100 μ L の洗浄溶液 (25 mM ammonium bicarbonate aq.) でゲルを 7 回洗浄し、アルキル化溶液を除去した。洗浄後のゲルへ 200 μ L の 100% CH₃CN を加えることで 3 分間脱水させた。有機溶媒を除去後、ゲルを 56 °C で 10 分間乾燥させた。脱水後のゲルに 25 μ L のトリプシン溶液 (200 μ g トリプシン / 25 mM ammonium bicarbonate aq.) で再水和させた。37 °C 終夜でタンパク質を消化した。翌日、得られたペプチド断片を 50 μ L 抽出バッファ (5% trifluoroacetic acid / 50% CH₃CN aq.) でゲルから抽出した。風乾で有機溶媒を除去し濃縮したペプチド断片を Pierce C-18 Spin Column (Thermo SCIENTIFIC) を用いて精製した。より広範なアミノ酸配列カバレッジを得るために、ゲルに残った長鎖のアミノ酸断片をさらに 20 μ L 消化溶液 (50 μ g endoproteinase Glu-C (Sigma-Aldrich) / 100 mM phosphate buffer aq.) を加えることで消化した。得られたペプチド断片は Pierce C-18 Spin Column を用いて精製した。これらの精製したペプチド断片は LC-MS/MS 分析 (HPLC システム, SHIMADZU—amaZon SL-NPC, Bruker, ポジティブモード) することでペプチド断片のアミノ酸配列を同定した。分離条件: RP HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 4.6 mm I.D. x 100 mm, Nacalai Tesque)、移動相 A H₂O + 0.05% trifluoroacetic acid、移動相 B CH₃CN + 0.05% trifluoroacetic acid、移動相 B の濃度; 2—100%、50 分間、流速 0.2 mL/min。

海綿より精製した脱リン酸化酵素の LC-MS/MS データから、MS および MSMS イオン強度が 1×10^3 以上の MS ピークを全て抽出し mgf フォーマットとして保存した。ペプチド断片のアミノ酸配列検出には、Biotools および SequenceEditor software (Bruker) を用いた。LC-

MS/MS のピークデータに対して、タンパク質 CalL を消化酵素トリプシン (K, R) またはトリプシン/Glu-C (K, R, E, D) で消化された際に生じるアミノ酸配列断片をレファレンス配列とし、それら配列に相当するピークを検索した。なお、修飾されたペプチド断片は carbamidomethyl [C] および oxidation [M]、またはリン酸化 [S, T, Y]、グリコシル化 [S, T, Y, N]、アセチル化 [K, R] の修飾条件で検索した。ピークデータの検索範囲は MS エラー; 0.5 Da 以内, MSMS エラー; 0.2 Da 以内, イオンモード; positive とした。

第1章 第5節

新規 ORF *NL-calL* 遺伝子のクローニング

天然由来の脱リン酸化酵素の PMF の結果、新規 ORF *NL-calL* が見出された。そこで再度、新規 ORF *calL* の異種発現用プラスミドを作製した。C 末端に精製タグ *Strep-tag II* (WSHPQFEK) を結合させた組換えタンパク質 CalL (*CalL-strep*) の発現用プラスミドを調製することにした。遺伝子 *NL-calL* 特異的なプライマー設計は、Forward 側に *EcoRI-NdeI* の制限酵素処理部位、Reverse 側に *Strep-tag II* および *HindIII* の制限酵素処理サイトをそれぞれ組み込んだ。PCR 反応溶液の組成は、50 μ L のスケールにおいて 1 μ g pDCYE1 を鋳型、0.3 mM プライマー (*NL_CalL_Eco_F2 / CalL-St-HinIII_Re*, Table. 7)、そして DNA ポリメラーゼ 1 U KOD One[®] PCR Master mix -Blue- (TOYOBO) とした。PCR は以下の反応条件で行った [step1; 95 °C 2 min, step2; (98 °C 10 sec, 62 °C 5 sec, 68 °C 5 sec) \times 40 cycles, step3; 68 °C 7 min]。PCR 産物を 1% アガロース電気泳動で分離し、約 1,500 bp の目的のバンドをゲルから切り出し、500 μ L QG buffer を加え 56 °C で温めることでゲルを溶解させた。溶解液を DNA ゲル抽出カラム EconoSpin Ia (Aji Bio Pharm), Column Wash Solution (CWA) (Promega) を用いて、PCR 産物を精製した。精製後の DNA 断片および増幅用プラスミド pUC19 (Takara) を 37 °C で終夜、*EcoRI* および *HindIII* で制限酵素処理した。制限酵素処理後の DNA 断片を DNA ゲル抽出カラムで精製し、プラスミド pUC19 (50 ng) と *calL* DNA 断片 (50 ng) を含む溶液に Solution I (Takara) を加え 16 °C で 1 時間インキュベートすることでライゲーションした。ライゲーション溶液をヒートショック法により *E. coli* DH5 α ケミカルコンピテントセルに形質転換した。LB 寒天培地 (200 μ g/mL ampicillin) 上に生えた形質転換体の単一コロニーを 10 mL の 2 \times YT 液体培地 (200 μ g/mL ampicillin) で 37 °C 終夜で 220 rpm 振とう培養した。培養後 5,000g で 10 分間遠心することで集菌しプラスミドを含む細菌沈殿を得た。プラスミド抽出キット (Sigma-Aldrich) プロトコールに従って、*E. coli* DH5 α からプラスミド pUC19-*NL-calL-strep* を抽出した。プラスミドに挿入された *calL-strep* の塩基配列は DNA シークエンス解析によってシークエンスエラーがないことを確認した (FASMAC)。増幅用プラスミド pUC19-*NL-calL-strep* および発現用プラスミド pET-22b(+) (Novagen) を制限酵素 *NdeI/HindIII* で消化し、得られた DNA 断片を先と同様にカラムを用いて精製した。pUC19 のライゲーションおよび形質転換と同じ条件で、精製後の *NL-calL-strep* 断片を発現用ベクター pET-22b(+) にライゲーションし、*E. coli* BL21 (DE3) ケミカルコンピテントセルに形質転換し、LB 寒天培地 (100 μ g/mL ampicillin) に播種し終夜 37 °C で静置培養した。プレート

上に形成された単一コロニーを 2× YT 液体培地 (100 µg/mL ampicillin) に播種した。37 °C で 220 rpm で終夜振とう培養した後に、終濃度 20% グリセロールストック [stock code; pET22b(+)-NL-calL-strep, *E. coli* BL21 (DE3)] を作製し-80 °C のディープフリーザーで凍結保存した。

組換えタンパク質 NL-CalL の異種宿主発現

200 µg/mL ampicillin を含む LB 寒天培地に生えた pET22b(+)-calL-strep を有する *E. coli* BL21 (DE3)の単一コロニーを 10 mL 2× YT 液体培地 (100 µg/ml ampicillin) に播種し、終夜 37 °C, 220 rpm で培養した。200 mL 2× YT 液体培地 (100 µg/ml ampicillin) を含む坂口フラスコへ 1% 培養液を播種し、OD₆₀₀ が 0.6-0.8 になるまで 37 °C, 220 rpm の条件で振とう培養した。pET22b(+)-T7 プロモーター制御下にある遺伝子 NL-calL-strep の組換えタンパク質を発現誘導するために、15 分間氷冷しておいた培養液に 1.0 mM IPTG を添加した。16 °C で 16 時間 140 rpm で振とう培養することで組換えタンパク質 NL-CalL-strep を高発現させた。

組換えタンパク質 NL-CalL の抽出・精製

以下の操作は全て 4 °C で行った。発現させた大腸菌を 5,000g、10 分間遠心分離機で集菌した。上清を除去した後、そこへ培養量の 1/10 量の buffer B を加え再懸濁した。超音波で細胞を破碎し、得られたライセートを 203,000g で 20 分間遠心分離し、その上清を可溶性画分とした。この可溶性画分を 1 mM の EDTA を含む buffer B で平衡化した Strep-Tactin® Superflow agarose カラム (樹脂 1 mL) へ供した。樹脂を 10 mL の buffer B (1 mM EDTA pH 8.0) で洗浄した後に buffer B (2.5 mM desthiobiotin) で組換えタンパク質 NL-CalL-strep を溶出させた。10% SDS-PAGE で分析したところ溶出画分には、60 kDa および 70 kDa の夾雑タンパク質を含んでいた。この夾雑タンパク質を除去するために、Amicon Ultra 10,000 device を用いて 50 mM phosphate buffer pH 7.0、250 mM NaCl に置換した後に、天然由来酵素の最終精製と同様にゲルろ過カラム PROTEIN LW-803、HPLC システムを用いて最終精製した。脱リン酸化活性を阻害する溶出画分に含まれる無機リン酸は Amicon Ultra 10K で限外ろ過することで除去し、buffer B へと置換・濃縮した。

組換えタンパク質 NL-CalL の *in vitro* 機能解析

45 µL の基質溶液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 µM phosphocalyculin A) に精製した 100 nM 酵素溶液を 5 µL 加え (酵素の終濃度; 10 nM)、ピペッティングにより混合した。25 °C で 3 分間反応させた後、即座に 50 µL MeOH を加え酵素を変性させることで酵素反応を停止させた。その溶液から変性タンパク質を除去するために 20,300g で 10 分間遠心分離した。得られた 20 µL の上清を逆相 UPLC で分析した。分離条件: diode array-detected (DAD)、カラム; Cosmosil 2.5C₁₈-MS-II; 2.0 mm I.D. × 100 mm (ナカライ)、移動相 A; H₂O + 0.05% trifluoroacetic acid、移動相 B; CH₃CN + 0.05% trifluoroacetic acid、移動相 B の濃度; 30 (0 min) - 100% (5 min) 直線勾配、100% (5-10 min)、30% (10-15 min)、流速 0.4 mL/min。Phosphocalyculin A (保持時間: 3.2 min)、calyculin A (保持時間: 4.0 min) は波長 343 nm で検出した。Phosphocalyculin A 脱リン酸化活性 (変換率) は次に示した式で算出した。

Phosphocalyculin A phosphatase activity (%)

$$= \frac{[\text{calyculin A 面積値}]}{([\text{calyculin A 面積値}] + [\text{phosphocalyculin A 面積値}])} \times 100 (\%)$$

天然由来 CalL および組換え CalL の定常状態速度論定数パラメーター

海綿から精製した CalL および組換え酵素 NL-CalL-strep の定常状態速度論的パラメーターの測定を行った。終濃度 0, 2.5, 5.0, 10, 20, 100 μM phosphocalyculin A を含む 45 μL 基質溶液 (50 mM Tris-HCl pH 7.25) に 5 μL の 100 nM CalL (終濃度 $[E] = 10$ nM) を加え 25 $^{\circ}\text{C}$ で 60 秒間反応させた。反応後即座に反応溶液と等量の MeOH を加え、*in vitro* 機能解析と同様に UPLC 条件で分析した。濃度既知の calyculin A の面積値の検量線を作製しプロットすることで、酵素生成物 calyculin A の濃度を算出した。KaleidaGraph[®] software を用いて縦軸に算出した生成物の濃度、横軸に基質濃度をプロットし散布図を作製することで得られたミカエリス・メンテン式 (1) より K_m および V_{max} の値を求めた (Supplementary Fig. 3)。

$$v = \frac{V_{max}[S]}{(K_m + [S])} \quad - (1)$$

第 2 章 Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の生化学的特徴の同定

組換え NL-CalL-strep の脱リン酸化活性の各種脱リン酸化酵素阻害剤に対する感受性

各種脱リン酸化酵素阻害剤 (imidazole, phosphate, EDTA, EGTA, sodium fluoride, sodium molybdate, sodium tartrate、pH 8.0 調製済み) で組換え酵素 CalL-strep を処理し、phosphocalyculin A 脱リン酸化酵素活性に与える影響を調べた。基質と反応させる前に、それぞれの濃度 (0, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20 mM) の各種阻害剤を酵素 CalL-strep (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 nM CalL-strep) と 10 分間氷上でインキュベーションした。それら 50 μL 酵素溶液を基質 6 μM phosphocalyculin A を含むエッペンドルフに加え、25 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間 *in vitro* 酵素反応を行った。その後の分析手順は *in vitro* 機能解析と同様に脱リン酸化酵素活性を算出した。

酵素 CalL の至適 pH および至適温度

組換え酵素 CalL の至適 pH を決定するために、様々なバッファー (glycine-HCl pH 3.65, acetate pH 4.5-5.5, MES-NaOH pH 5.5-7.0, Tris-HCl pH 7.25-9.0) を用いて pH 3.65-9.0 における phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を比較した。バッファーの種類を変更する以外、全ての反応条件は組換えタンパク質 NL-CalL-strep の *in vitro* 機能解析と同じ条件で行った。また天然由来酵素 CalL は 50 mM Tris-HCl pH 7.0-9.0 の範囲で組換え CalL と同様に酵素反応を行った。

CalL の至適温度を決定するために、温度 (4, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 98 $^{\circ}\text{C}$) の条件における phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を比較した。酵素溶液を基質溶液に加える前に、溶液を各々の温度で 5 分間インキュベーションした後に酵素反応を開始した。全ての反応溶液の濃度は CalL の *in vitro* 機能解析と同じ条件で行った。

変異体 CalL の作成

組換えタンパク質 CalL-strep の 7 つの金属結合残基 (D116A, Y168F, Y168A, H352A, N215A, H305A, H352A, D165A) の変異体を作製するために、全ての残基をアラニンまたはフェニルアラニンに置換した直鎖プラスミド (pUC19-calL-strep 変異型) を PCR によって増幅した。50 μ L の PCR 反応液の組成は 1 U KOD One[®] PCR Master mix -Blue-, 0.3 mM 変異体作成用プライマーペア (Table. 7)、そして鋳型 1 ng pUC19-calL-strep (野生型) とした。PCR 反応条件は次のように行った [step1; 95 °C 2 min, step2; (98 °C 10 sec, 62 °C 5 sec, 68 °C 20 sec) \times 18 cycles, step3; 68 °C 7 min]。反応後の溶液を EtOH 沈殿させ、得られた PCR 産物に 17.7 μ L の ddH₂O、2 μ L 10 \times CutSmart buffer (NEB)、そしてメチル化 DNA 消化酵素 DpnI (NEB) を 0.3 μ L 加え 37 °C で 30 分間処理することで、鋳型として用いたプラスミド野生型 pUC19-calL-strep を消化した。消化後の反応溶液より 1%アガロース電気泳動および EconoSpin[™] Ia カラムを用いて目的の DNA 断片を精製した。10 μ L ddH₂O に溶解させた直鎖の pUC19-calL-strep (変異型) を *E. coli* DH5 α ケミカルコンピテントセルに形質転換させた。calL の変異はシーケンシング解析により確認した (FASMAC)。以降の手順は組換え NL-CalL-strep のコンストラクトを作製した操作と同様に行い変異体 pET22b(+)-calL-strep を有する発現用異種宿主大腸菌 BL21 (DE3) を作製した [glycerol stock code; pET22b-NL-CalL-strep, (D116A, Y168F, Y168A, H352A, N215A, H305A, H352A, D165A), in BL21 (DE3)]。なお、酵素発現、精製、および *in vitro* 機能解析は野生型組換え NL-CalL-strep と同様の手法で行った。

ICP-MS による CalL の金属定性分析

CalL に含まれる中心金属を明らかにするために、精製した天然由来 CalL、組換え CalL に加えて 3 種の CalL 変異体 (D116A, Y168F, Y168A) を誘導結合プラズマ質量分析 inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS, Agilent) に供し、様々な金属の定性分析を行った。バックグラウンドとして溶媒 buffer B も同様に測定した。各々のサンプルごとに、金属種ごとの正味排出量強度 (net emission intensities) を決定した。各酵素より検出された金属種 (Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) の質量ごとのカウント数 (counts/s) は、各酵素のカウント数から溶媒のみの値を差し引いた値とした。

組換え CalL の Cu および Zn キレート比色定量分析

組換え CalL (野生体) と変異体 (D116A, Y168F, Y168A) における Cu および Zn の含量を明らかにするために、Metallo assay kit (Metallogenics) を用いてキレート比色定量分析を行った。比色定量は会社が提供するプロトコールに従って行った。各々 5 μ M の酵素溶液 (buffer B without glycerol) に酸性溶液 100 mM glycine-HCl pH 2.0 を加え 70 °C で 10 分間処理することで酵素を変性させることで金属を抽出した。その上清に Cu または Zn のキレート発色団試薬を加え、銅 (OD₅₈₃) および亜鉛 (OD₅₆₀) の吸光度をマイクロプレートリーダー (TECAN) により測定した。金属濃度はそれぞれの Cu および Zn の検量線 ($R^2=0.99$) にプロットすることで決定した。タンパク質のモル濃度を 1.0 とした際の金属のモル濃度の比を

Table. 6 に示した。

第3章 海綿 *Discodermia calyx* における CalL を介した活性化機構の解明

ペリプラズム画分の抽出および精製

ペリプラズムの酵素を特異的に抽出するためにリゾチーム抽出法を用いた^{156,157)}。組換えタンパク質 CalL (野生株および変異体) を発現させた大腸菌の細胞へ、冷却しておいた lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 20% (v/v) sucrose) を培養液量の 1/10 量加え再懸濁した。そこへ終濃度 3 mg/mL のリゾチームを加え、内膜の損傷を避けるために静かに混合した。37°C で 30 分間 (5 分毎に静かに転倒混和) インキュベートすることで、ペリプラズム画分のタンパク質を抽出した。リゾチームによるペプチドグリカン層の消化が進行しているかは、大腸菌の細胞形態が棒状 (rod shape) から球状 (spherical shape) へと変化していることを顕微鏡下で観察することで確認した。その抽出液を 15,000g、15 分間遠心分離することで得られた上清をペリプラズム抽出液とした。このペリプラズム抽出液をアフィニティーカラム *Strep-Tactin*[®] に供し、組換え酵素 CalL-*strep* の精製手順と同じ方法で酵素を溶出させた。溶出した酵素溶液は Amicon Ultra 10,000 MWCO で限外濾過することで buffer B に置換・濃縮した。比較対象として、組換え CalQ でも同様の実験を行った。

海綿 *D. calyx* より生産菌 *Entotheonella* 細胞の粗分画とその代謝物分析および phosphocalyculin A 脱リン酸化活性

-30°C で保存していた凍結乾燥海綿 *D. calyx* の組織切片 1.0 g を 50 mL のファルコンチューブに移し、そこへ細胞凝集を避けるために冷却した 10 mL の Ca, Mg フリーの人工海水 (CMF-ASW) を加え、滅菌した試験管の底でチューブ内の組織切片を磨り潰した。10 分間氷上で静置させた後、新しい 50 mL のファルコンチューブに上清を移した。その残渣へ新たに 10 mL の CMF-ASW を加え転倒混和し細胞を再び抽出した。海綿細胞や共生微生物を含む上清を 560g、10 分間スィングローターで遠心分離した。上清を除去した後、得られた沈殿を 35 mL CMF-ASW で再懸濁し、同条件で再度遠心分離することで細胞を洗浄した。この洗浄操作を合計 2 回行った。得られた沈殿物を 2.5 mL の 80% (v/v) Percoll Plus / CMF-ASW で静かに再懸濁した後に、綺麗な 15 mL のファルコンチューブの底へ移した。Percoll plus 溶液の密度勾配を作るために、2.5 mL の 60%, 40%, 20% (v/v) Percoll Plus / CMF-ASW の順に細胞懸濁液の上に静かに乗せた (合計 10 mL)。その後、スィングローターで 560g、60 分間遠心分離を行い、細胞密度の違いで細胞を分離した (Fig. 50a)。溶液の上部からピペットで 1.0 mL ずつ分画し、合計 10 画分を得た。得られた細胞画分を顕微鏡下 (倍率 200–400 倍) で観察したところ、フィラメント状の *Entotheonella* 細胞が画分 3、4 に濃縮できていることが分かった。より密度の大きい海綿細胞は Fr. 6-10 へ、より密度の小さい微生物は Fr.1 で観察された (Fig. 50b)。

それぞれの細胞画分 100 μ L を分注したエッペンドルフチューブに等量の MeOH を加えて代謝物を抽出した。得られた各 Fr. 1-10 の MeOH 抽出物を UPLC により代謝物分析を行った (*in vitro* 機能解析と同じ条件)。Phosphocalyculin A 脱リン酸化活性は 6 μ g phosphocalyculin

A を含む 1.5 mL のエッペンドルフチューブに 2 μ L の細胞破碎後の粗酵素溶液をそれぞれ加え 5 分間常温で反応させた。反応後即座に 78 μ L の MeOH を加え遠心分離後、その上清を UPLC にて分析しこれまでと同様に phosphocalyculin A 脱リン酸化酵素の比活性を算出した。各々の画分における calyculin A の面積値と phosphocalyculin A の脱リン酸化活性は Fig. 50c に示した。

Entotheonella 細胞における遊離モノリン酸の可視化

Calyculin 生産菌の細胞内での脱リン酸化活性の局在を可視化するために、本研究では凍結海綿 *D. calyx* より得られる phosphocalyculin を含む Entotheonella 細菌の細胞を用いた。凍結乾燥海綿切片を碎き粉末状にした海綿 100 mg を 1.5 mL エッペンドルフチューブに加えたものを二本用意した。一本は 80 μ L の ddH₂O で再水和させ脱リン酸化反応を 10 分間進行させた後に、20 μ L の MG 試薬加えることで細胞を染色した。残りの 1 本には、100 μ L の染色液（80 μ L ddH₂O, 20 μ L MG 試薬の混合液 pH 1.0 以下）で再水和させ、脱リン酸化反応を停止させた状態で細胞を染色した。また、比較実験として組織傷害に応じた代謝物変化が一切認められない海綿 *D. kiiensis* に共生する Entotheonella 細胞を用いて同様に染色した。細胞染色は常温で 2 時間行った。染色後、明視野顕微鏡下（倍率；400 倍）で染色した細胞を iPhone 8 付属カメラによって撮影した。

SEM サンプルの調製および分析

2020 年 11 月、静岡県伊豆半島南部の中木の水深約 5 m で *D. calyx* を採集した。採集直後に *D. calyx* の組織切片を Davidson 固定液（22.2% の 10% ホルマリン溶液/CMF-ASW、32% エタノール、11.1% 氷酢酸、34.7% CMF-ASW）に浸漬させ、使用するまで 4 $^{\circ}$ C で保存した。メスを用いて、固定した組織の中心部位から厚さ 3-4 mm の組織切片を切り出した。次にその組織切片を 50%、60%、80%、90%、100% エタノール、1:1 のエタノール:t-ブチルアルコールの混合液、t-ブチルアルコールの順に浸漬（1 つあたり、20 分間、35 $^{\circ}$ C）させることで、組織内の水分をアルコールへと置換した。冷蔵庫で凍結させた組織切片を終夜で凍結乾燥することで脱水した。SEM 用のアルミニウム試料台に貼ったカーボンシール上に脱水した組織切片を固定し、イオンスプッター（E101, HITACHI）を用いて 98% Au-2% Pd 合金コーティングを施した。イメージングは FE-SEM (Field emission-scanning electron microscope, JSM-6301F, JEOL) を用いて行った（測定条件、acceleration voltages; 5 kV, working distance; 6 mm）。

Supplementary data

>CalL short ver.

MQARSTTPPEGFDIRVCERELPAATKSVVFAKKPLPLAKRKRPRRIVIIGDTGCRVFITYKTMVDV
QNCNGVEGYGPAWPFPKIATAVAAARPDLIIHLGDYHYRETPCPKGNKGCAGSPSGFTWPSWEA
DFFAPARDLLTRAPWVFIIRGNHESCARAWLGFYLLDPNPLPANPWQASQCPAISDPYPI SLES
LQLLVQDSSGVHYSKPGHEASVALYTKVYNEVNKMSASSENWSLTHEPIWGIQPGATPQGTVL
YPLQLTLQAALKKTSLGRFDPRIGFLLSGHVHLFESFNFTDGRPPMMVIGNSGTRKSPSITNKV
LEGSKILQTLGVAPADFI SEDDFNYALAEAFGDGWEISLYKLNQDVSKKFVLKKNKMSKSQLK

>NL-CalL

MEALAMASRSFMVFLALSVLSACSASVSASDDYVWIELGKGGVRIVRVITQSEACPNIITVDGKS
LAMQARSTTPPEGFDIRVCERELPAATKSVVFAKKPLPLAKRKRPRRIVIIGDTGCRVFITYKTMV
DVQNCNGVEGYGPAWPFPKIATAVAAARPDLIIHLGDYHYRETPCPKGNKGCAGSPSGFTWPSW
EADFFAPARDLLTRAPWVFIIRGNHESCARAWLGFYLLDPNPLPANPWQASQCPAISDPYPI SL
ESLQLLVQDSSGVHYSKPGHEASVALYTKVYNEVNKMSASSENWSLTHEPIWGIQPGATPQGT
VLYPLQLTLQAALKKTSLGRFDPRIGFLLSGHVHLFESFNFTDGRPPMMVIGNSGTRKSPSITN
KVLEGSKILQTLGVAPADFI SEDDFNYALAEAFGDGWEISLYKLNQDVSKKFVLKKNKMSKSQLK
LK

>*Massilia_albidiflava*_WP_131143616.1

MRLLPVPSLLPAALAAALLAGCATTAPLPDVLSSYVVLGEEGAATARVITVAAACPTLDVDGR
PVPMSVRAAPATIAQRPTASAPADSKPSAFPVLACEAPLPADTQRAALAGSPLPLPRHEARRIV
VIGDTGCRLKKADHAWQACNDTEQFPFAGVAAAAARWQPDLVVHVGDYHYRENPCPDGNAGCAG
SPWGYGWDWTWREDFRPAEPLLRAPWVVVRGNHESCTRAGQGWRFLDPRPLQAGRDCNAQAD
DAIGNYSDPYAVPLGGDAQLLVVDTAATSWRGLQPGDTGFARYRDAYVQAETLSRRTTWNLLAN
HHPVLGFGASLDKASQLRLELGDAGLQQSFGSVNPLLLPPRVQALLSGHVHMWQQASFKTSHP
QFVAGFSGTMEDVVPLPEEVSAIQPAPGAVIAHFSAWQGGFGFMTMERTGPDTWQVAVHDRGGN
VRNRCQLQGRVSSCAVARVP

>*Duganella_sacchari*_J10W*

MLPILKRLAPAMLLAGCAATNPLPPDFTSYVVMGEYGAAVARVLIDAPACPEIVLNQRSVAMT
LRAPAQTIPLRTPFAPADSKPADFPLLTCEATLPAGTTSKVLGRALPLPKAEPQRIVVIGDT
GCRLQKSSNSYQACNDREQYPFATVAAQAAAWKPDLVIVHVDYHYRENACPDGNAGCAGSPWGY
GWDWDEDFAPGAKLLDAAAPWVMARGNHENCMRGGQGYWRFLDPRPLLKGRDCNVAADHDVGN
YSDPYAIPIGQATQLLVLDTANTTWKGLKPGDLGYDKYRDLYRKLDAALSQQAPHNIGISHHPLL
GMGADRKADGSIVLLPGDAGLQAAMGSLNPLLPFAIQAMLSGHVHLWQQASFSSPHPSQFIAG
FAGTSEDIVPLPEKLPPGVTPAPGAVVEHFSSWVDGFGFMTMERRGPQQWQVEVHDLQGKIRNR
CQLDGRRSVCEVAQVK

>*Burkholderia_pyrrocinia_WP_047903503.1*

MRRLLPALLARCAPLVALAALSACSNHIDTPADPASAAINVQAAWVEIGDANQAIARVITNYT
PASASDPLCPQLTVDGKLSRMTLRAGAATRAQRPTASDPADSKPSNFPVSVCEITLPAQAAS
VAGRTLPLPKAQPRIAIIADTGCRMKKADNAWQACNDATVWPFDTIAASVAKLSPDLVMHVGD
YHYRENACPPDIAGCKDSPWGYGWDTWQADLFRPAAPLLAKAPWVVVRGNHEECARAGQGWF
LDPRPYSAARSCDDPANDTNANYSDPYAVSLGGGSQVIVFDTAKVGRTPPKTTDAQFGIYQKQF
QTVATLASKAGMTTTFITNHHPIILAFAPIAGSTPAPGNLALQSVMSSELYAQAYYPPGVHVALHG
HVHDFQAINFSSGHPATIVSGNGGDNDLVALPDPFPAGLTPAPGAVIERLSHNNSFGFLIMERR
AAPATGWVFRAYSAAAGKLLASCNQSQTTLACDKTGFIAP

>*Algicola sp._NQZ11225.1*

MQLGKIVLITTIALGSTACVKSLSSTQSGTASKAATQTTATSASKAPPTEYVWLTVGANNQOY
ARVVTDASSCPYIELDNHASQMSQRAKGNQPVNFSEVISCETAIAATVKASVNGTKLNLNFNQ
PQKIIVMGDTGCRIKKGDYQNCNDLPGYGPAPFAKLAKLVEKANPDLIIHLGDYHYREI PCPA
GNEG CAGPAGMNWPSWQADFFEPAPKPI LAKFPWVLTGRNHEDCERSFRGWFYLLDPAPLANLW
QTC PDYTQTYPIDLGNLTLIQMDSATLPNPNPNINPATVKLYANQFDSVNALADKAKNSWFVT
HRPTWAVSSYFDWRNNVDALATSDPTMQADLKT SKKGR LAESINLTL SGHMHSFQTMAFDDGQP
SALIVGGSGTKLSPAVNKQAQAEQNELLATLGVT PPFYRSADFA YAMLERQPHDAWIVRLVDL
NGKTRESFVLSGKRLERIWE

>*Chitinophagaceae_bacterium_MBC7659477.1*

MLNKRLMASLLIPVLLTVSGCRTTGGKSVEELVTTTPQSELENRFPAAWVELGSEGAS IARVLT
DMSCPVLNVDGRTLPMNIRGTRTEAFNITTC EATLPAHAQLVLLSKYRLPVPSSDPKRIVVIGD
TGCEIKEDDGKVSQNCADSEKWPFAHVAQS IASVKPDLIIHVGDYHYREVPCPKKYS AKCAGA
SVGDTWASWKEDWFTPAAAMFASAPLILARGNHEL CARAGNGWFQFLDPRPLPAACTDSVAPYW
MTVGDHIIAVVDAADDKNMQSSFDTLKPNVSGFTWWVLHRPFLTDGADDELSKDASPAKL PAPW
QAPGLLSAVITGHKHL LSLNSFPKNANPPEIISGNGGTTLEKPKTDNQVMEAVQTADLVSLNYF
DYGFLVFD RMDV GKWQIQAMDRDANVIATCTLTEQAGVRSTLNCKPI

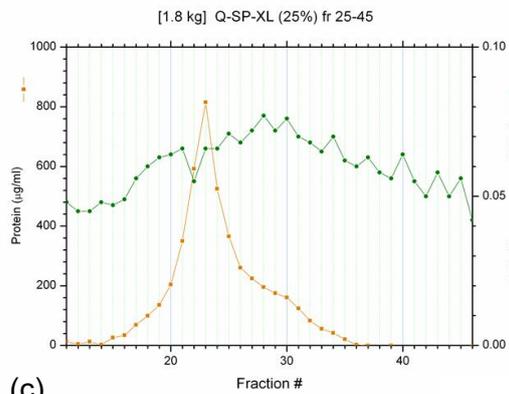
>*Oligoflexus_sp._MBC7533859.1*

MPAVLSISSCRPTNGQSIEELAI PPQSGLESRFPAAWVQLGSEGAT IARVLTNDLSCPVLNVDG
SKLPMTIRGTRTETFNITTC EATLPARAQVVMLGHYKLPVPTSNPKRIVVIGD TGCEIKEDK GK
IAVQNCSDPQKWPFMQVSQS IASMRPDLIIHVGDYHYREVPCPKKDSAKCAGASVGD TWASWKE
DWFTPAAAMFASAPLILARGNHEL CARAGNGWFQFLDPRPLPAACTDSPAPYWM TVGDHIIAVV
DAADDKNMQSSFDTLKPYASGFTWWVMHRPFLTDGADDELSKDAAPAKLP TTWQAPGLIGAVIT
GHKHL LSLNSFPKANPPEIISGNGGTTLEKPKVDNQVMEPIQTADLVSLNYDYGFLVFD RMD
AGTWQIQAMDR TAKLIAKCTLTQHAGVKSALDCKPI

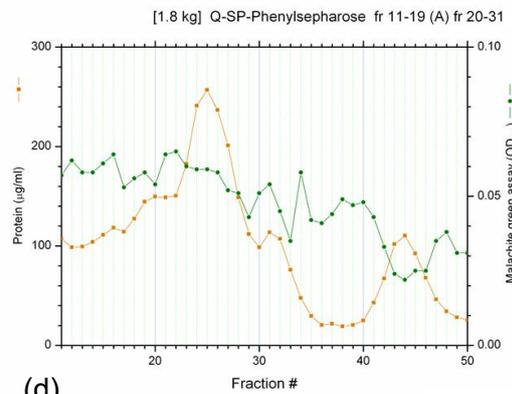
Supplementary Fig. 1 Call とそのホモログのアミノ酸配列

**D. sacchari* は nanopore sequencer により得られた DNA 配列の ORF

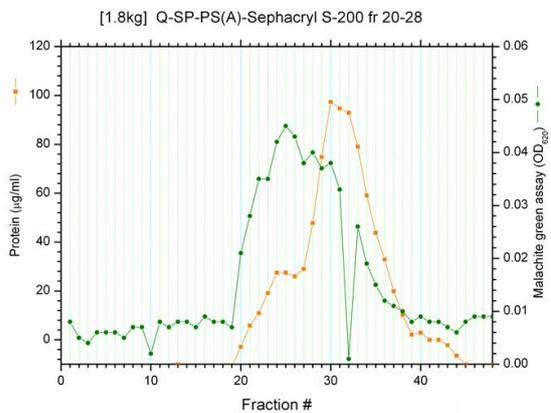
(a)



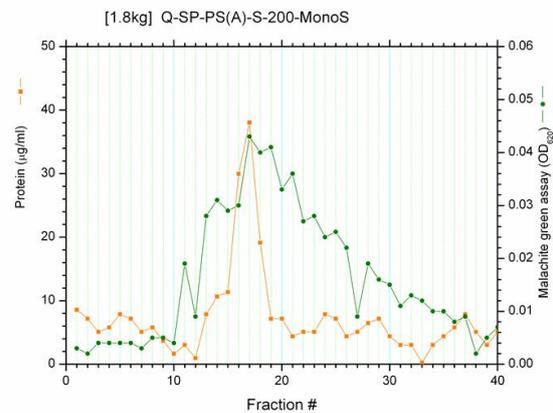
(b)



(c)



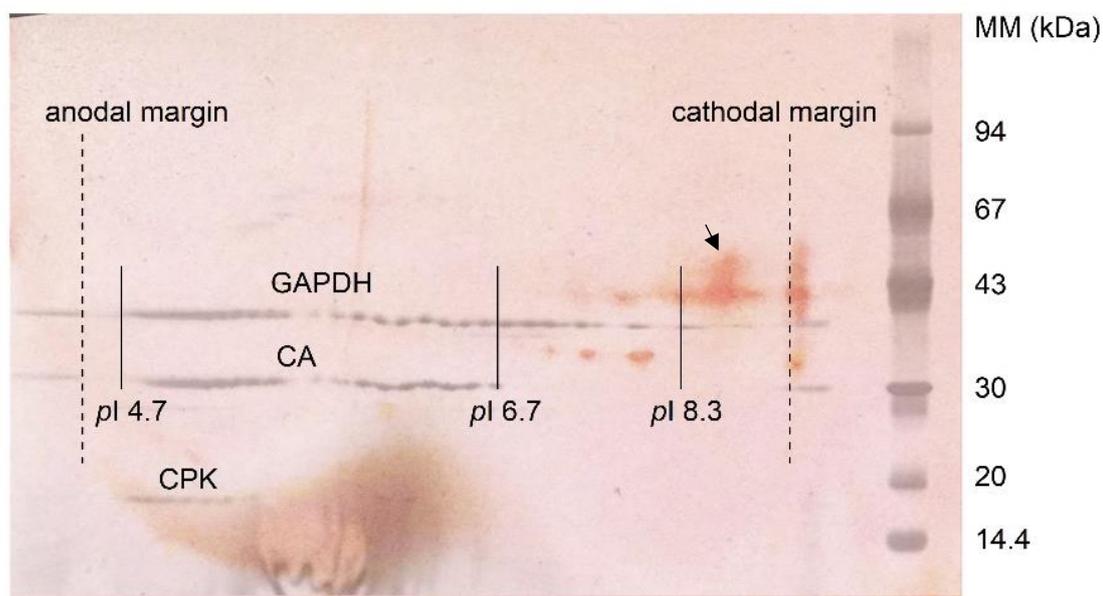
(d)



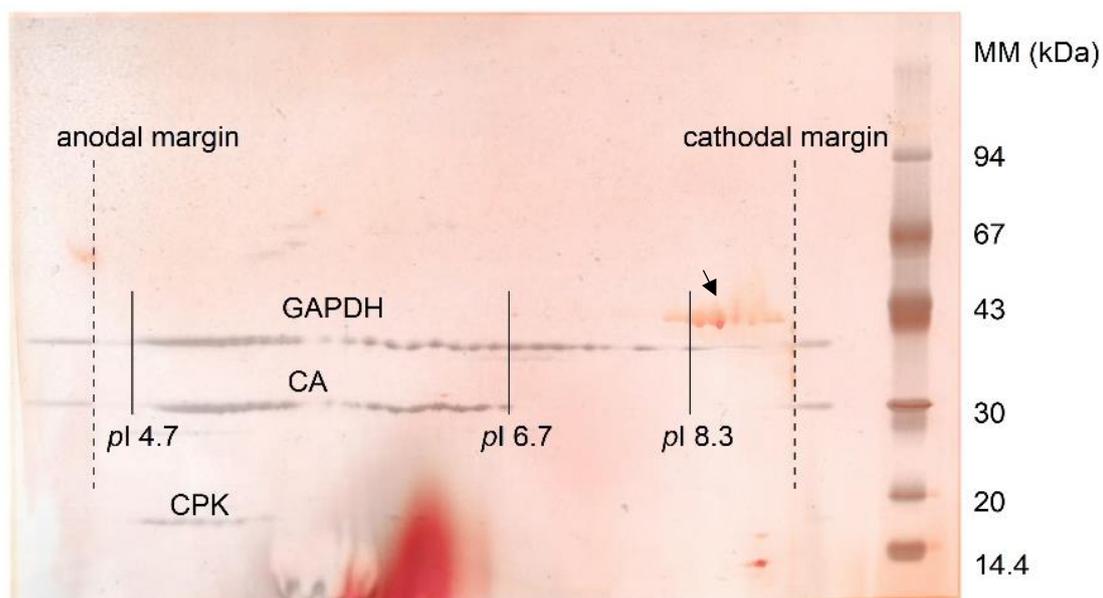
Supplementary Fig. 2 天然由来脱リン酸化酵素精製時の各種カラムクロマトグラム
(1.8 kg スケール)

(a) Q-XL-SP-XL 活性画分 = Fr. 25-45、(b) Phenyl sepharose 活性画分 = Fr. 11-31、
(c) Sephacryl S200 活性画分 = Fr. 20-28、(d) Mono-S 活性画分 = Fr. 18-21

(a) Native CaIL



(b) Recombinant CaIL



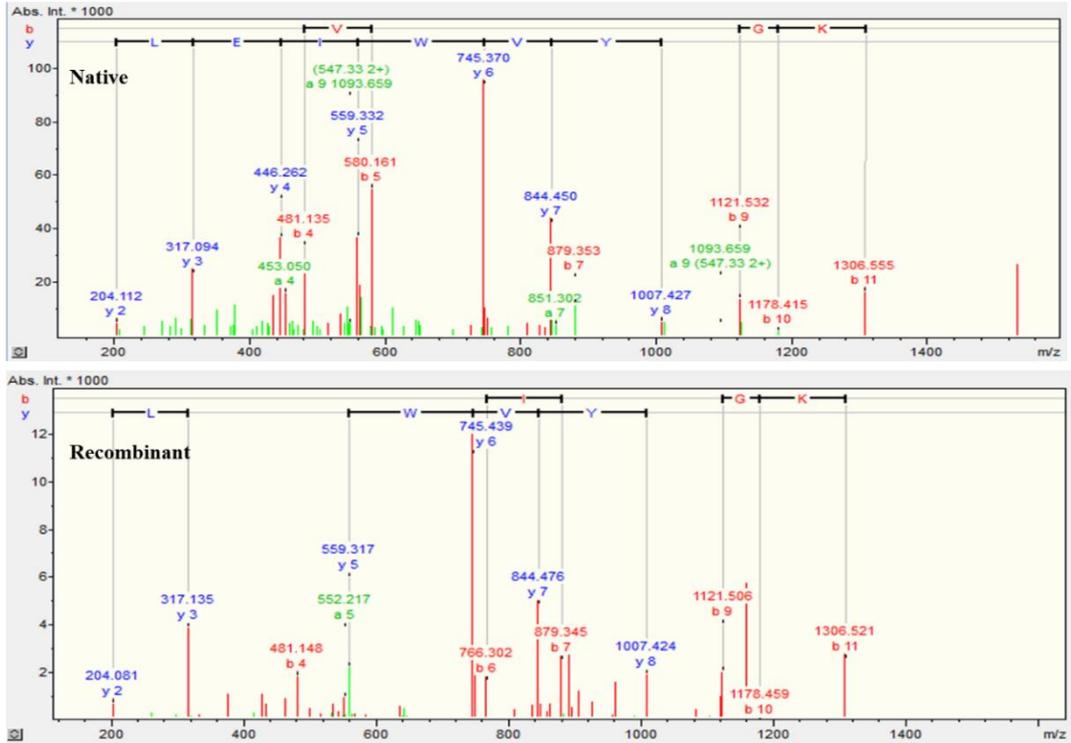
Supplementary Fig. 3 タンパク質等電点マーカーの二次元電気泳動図と CaIL の二次元電気泳動図のマージ図。

薄茶色のスポットかつ黒矢印 ; (a) 天然由来酵素および (b) 組換え CaIL、

灰色のスポット ; 等電点校正マーカー (等電点 pI , glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 4.7 – 8.3)、 carbonic anhydrase (CA; 4.7 – 6.7) 、 creatine phosphokinase (CPK; 4.7-6.0)、 MM; 分子量マーカー

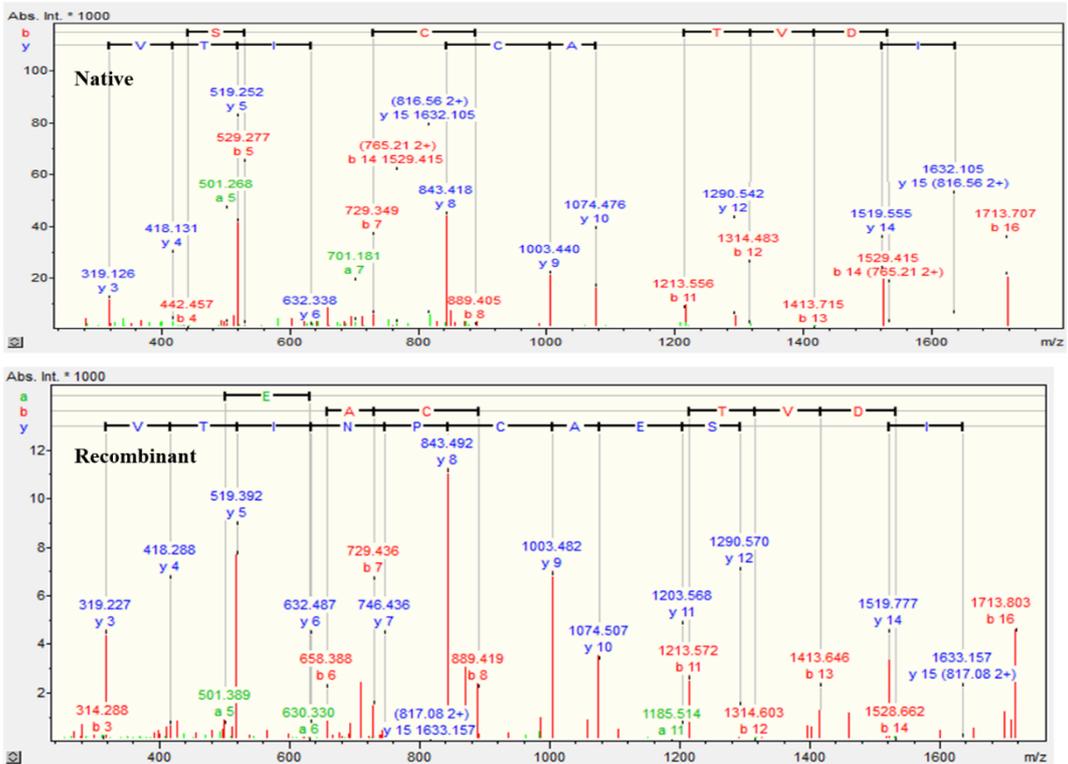
(a)

ESI-MSMS $m/z = 662.784 (M+2H)^{2+}$ CaL ('30-SDDYVWIELGK-40')



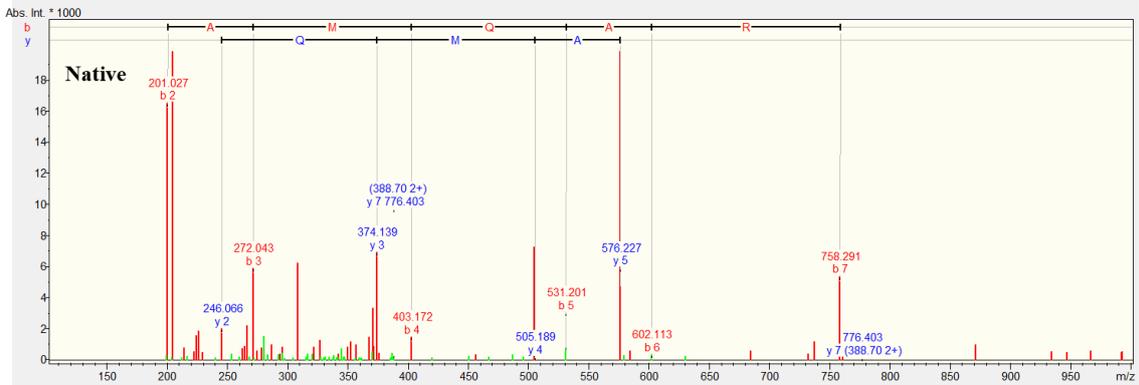
(b)

ESI-MSMS $m/z = 866.4 (M+2H)^{2+}$ CaL ('48-VITQSEACPNTVDGK-63')



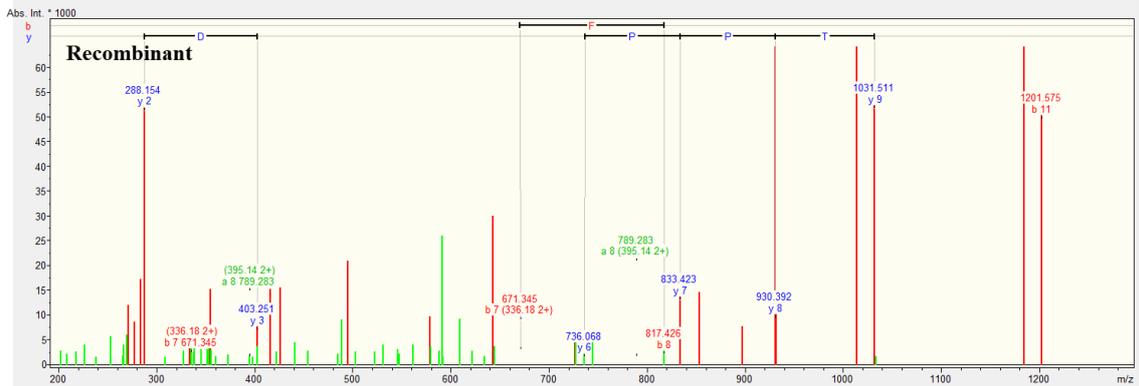
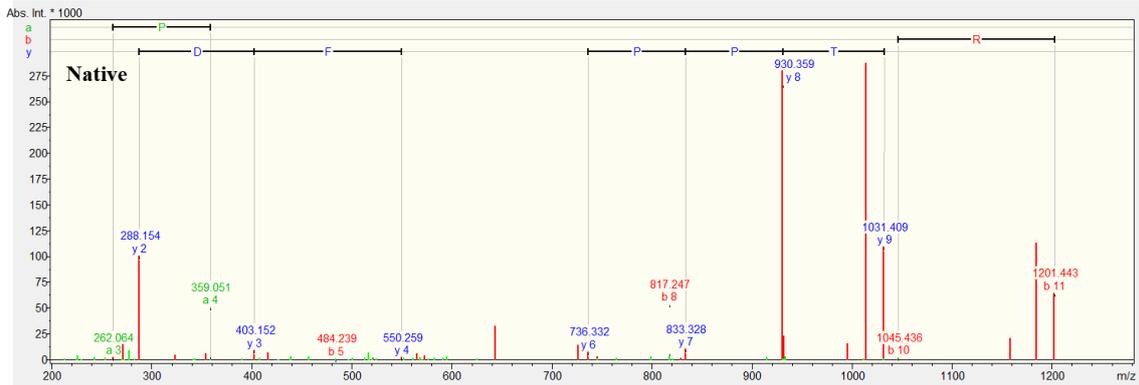
(c)

ESI-MSMS $m/z = 388.6 (M+2H)^{2+}$ CaIL ('64-SLAMQAR-70')

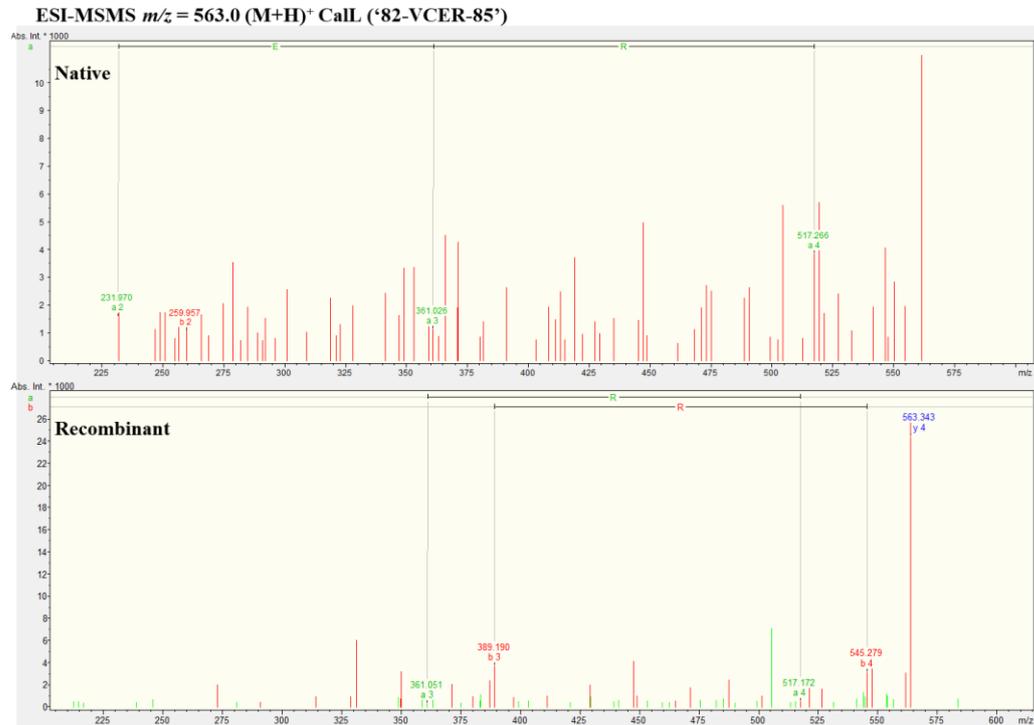


(d)

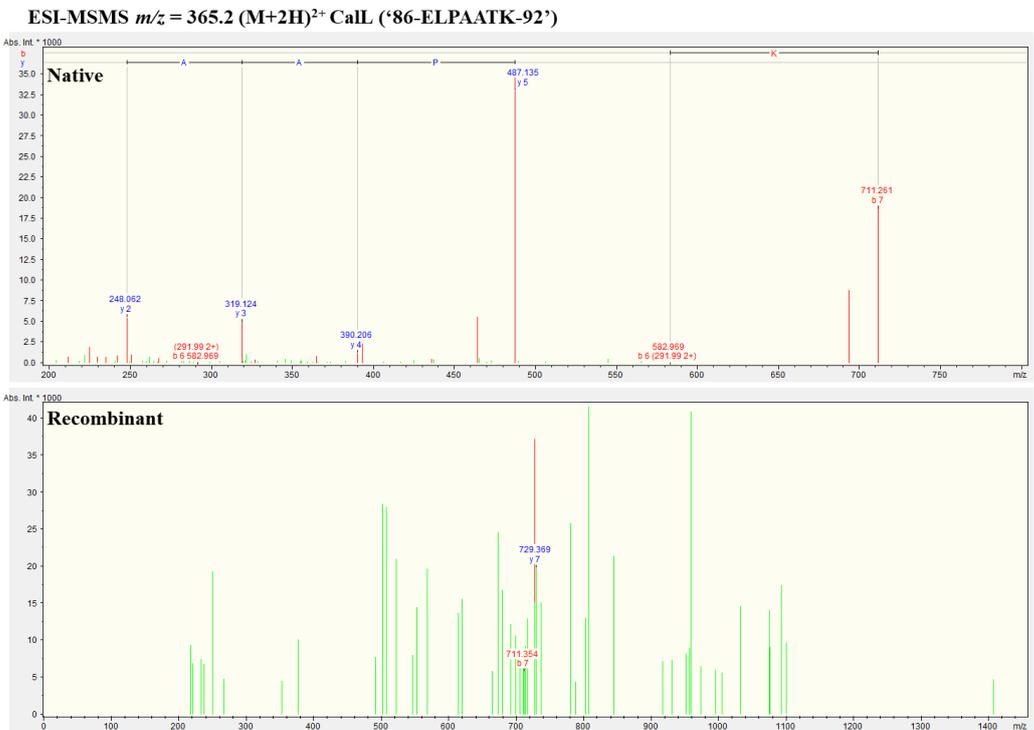
ESI-MSMS $m/z = 610.2 (M+2H)^{2+}$ CaIL ('71-STTPPEGFDIR-81')



(e)



(f)



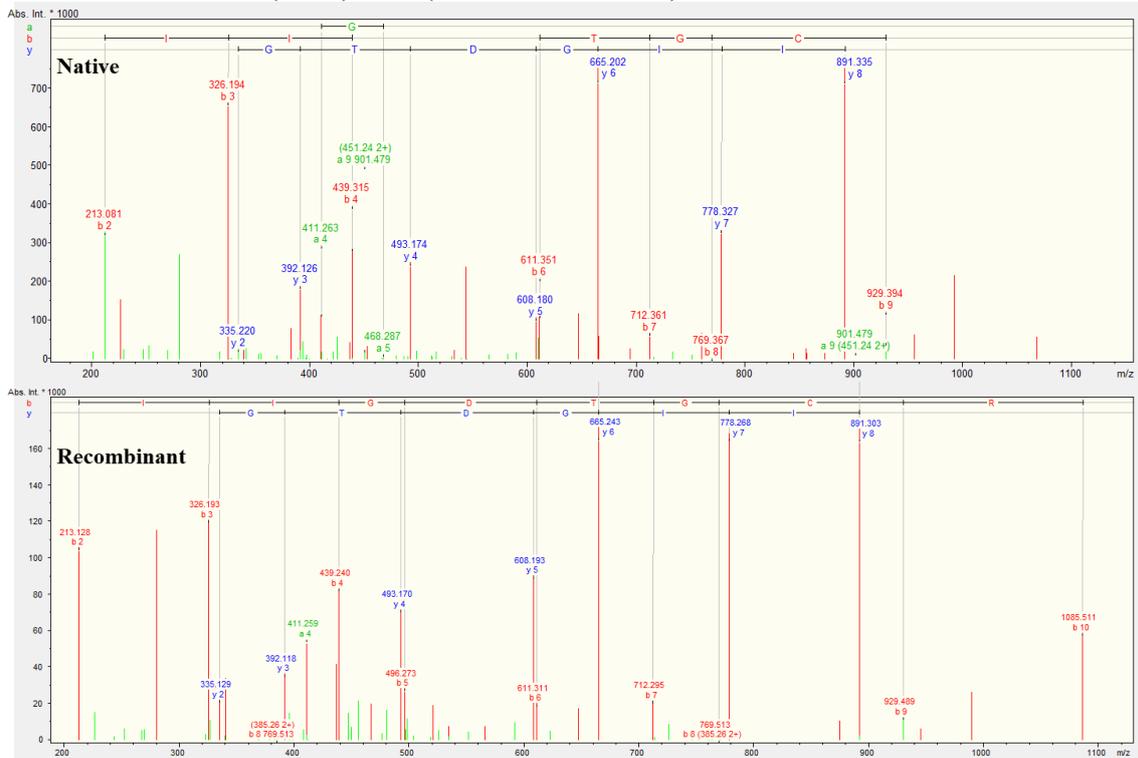
(g)

ESI-MSMS $m/z = 383.7 (M+2H)^{2+}$ CaII ('99-KPLPLAK-105')



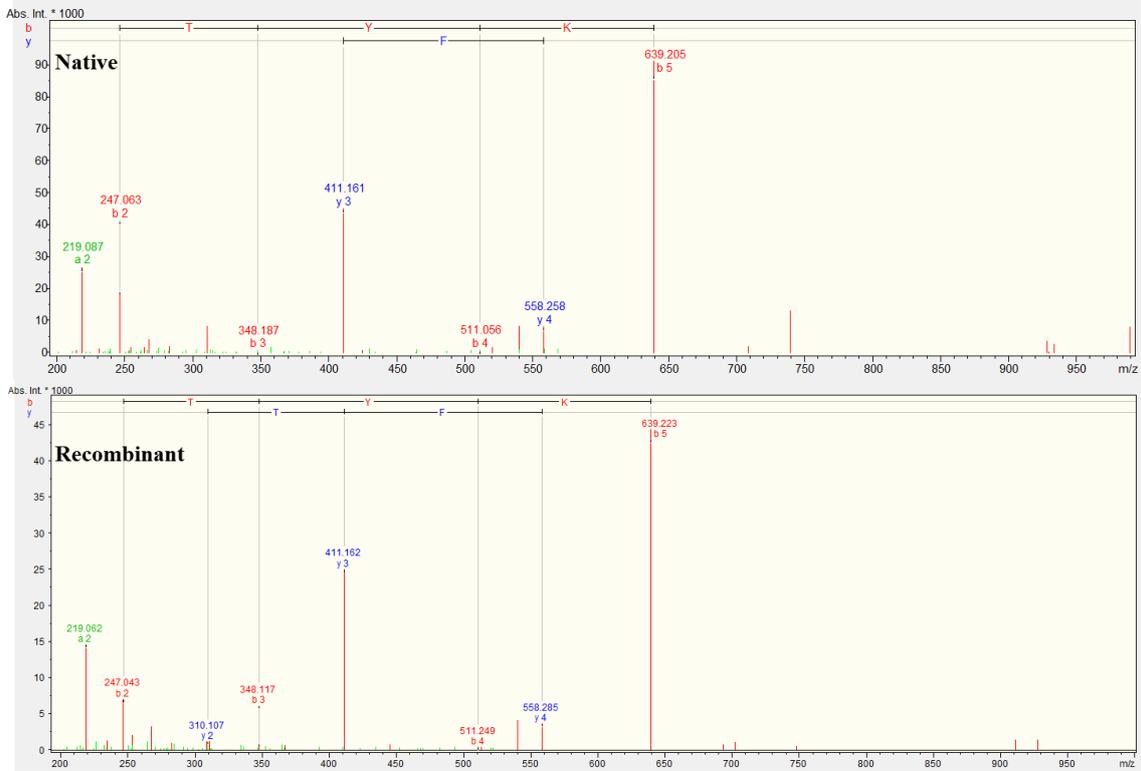
(h)

ESI-MSMS $m/z = 552.2 (M+2H)^{2+}$ CaII ('111-IVIGDTGCR-120')



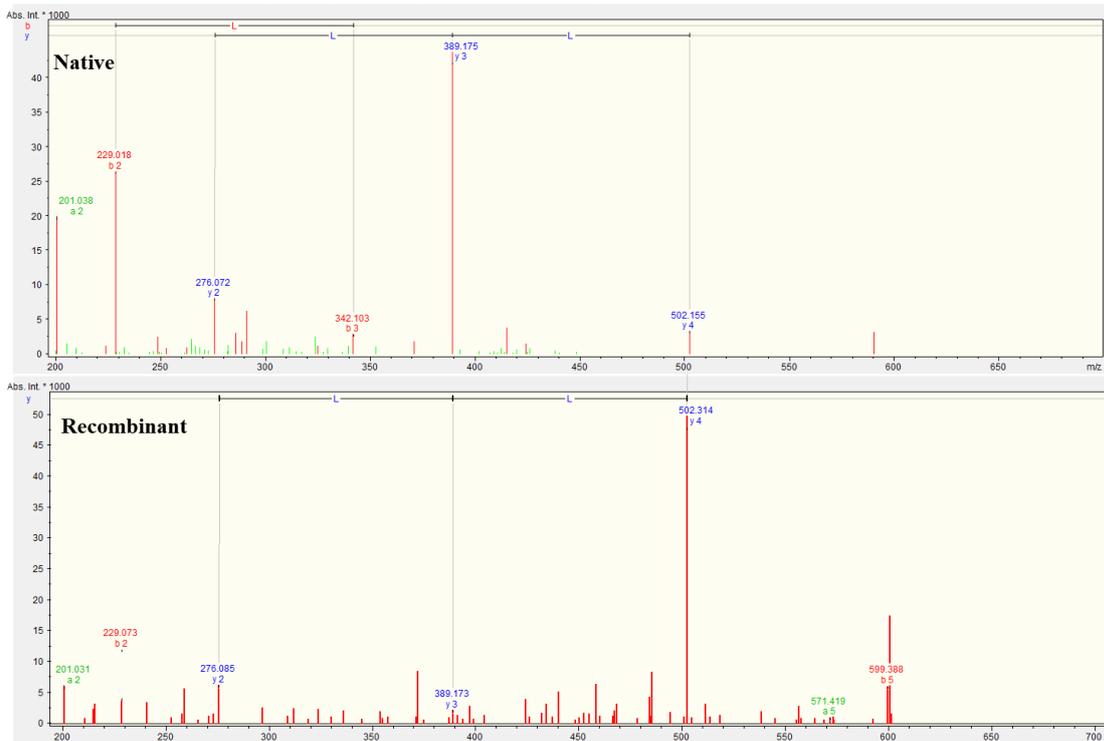
(i)

ESI-MSMS $m/z = 329.1 (M+2H)^{2+}$ CaIL ('121-VFTYK-125')



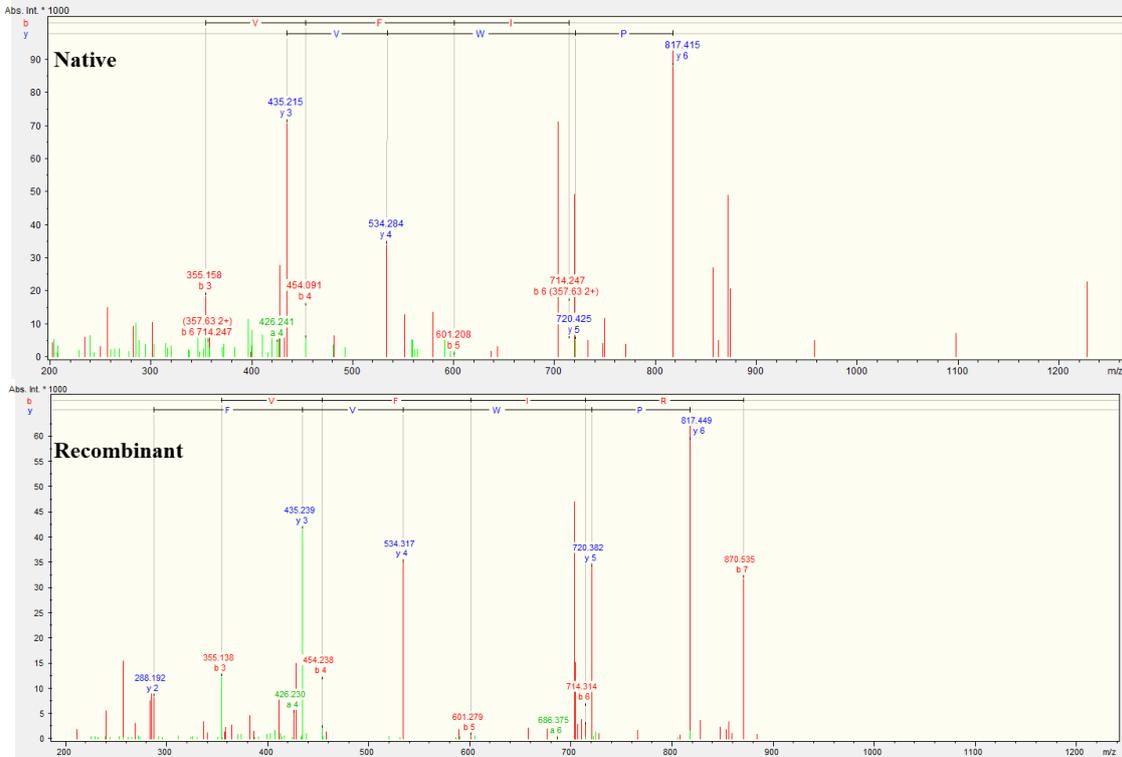
(j)

ESI-MSMS $m/z = 309.1 (M+2H)^{2+}$ CaIL ('202-DLLTR-206')



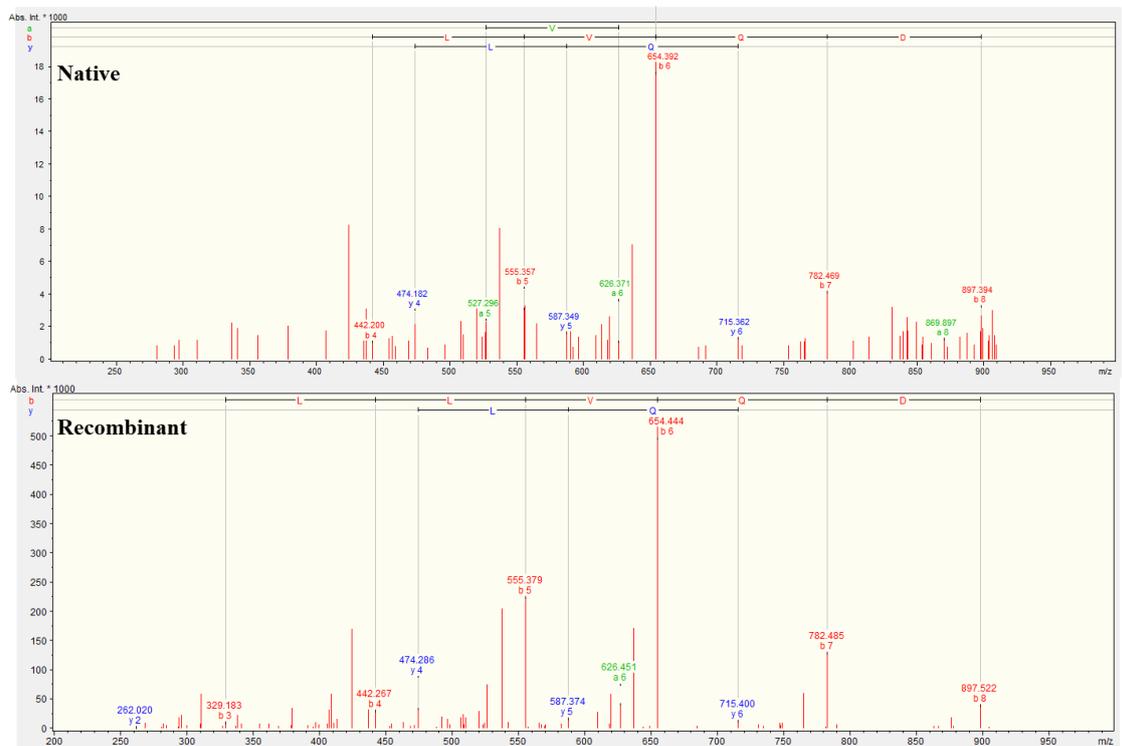
(k)

ESI-MSMS $m/z = 444.8 (M+2H)^{2+}$ CaL ('207-APWVFIR-213')



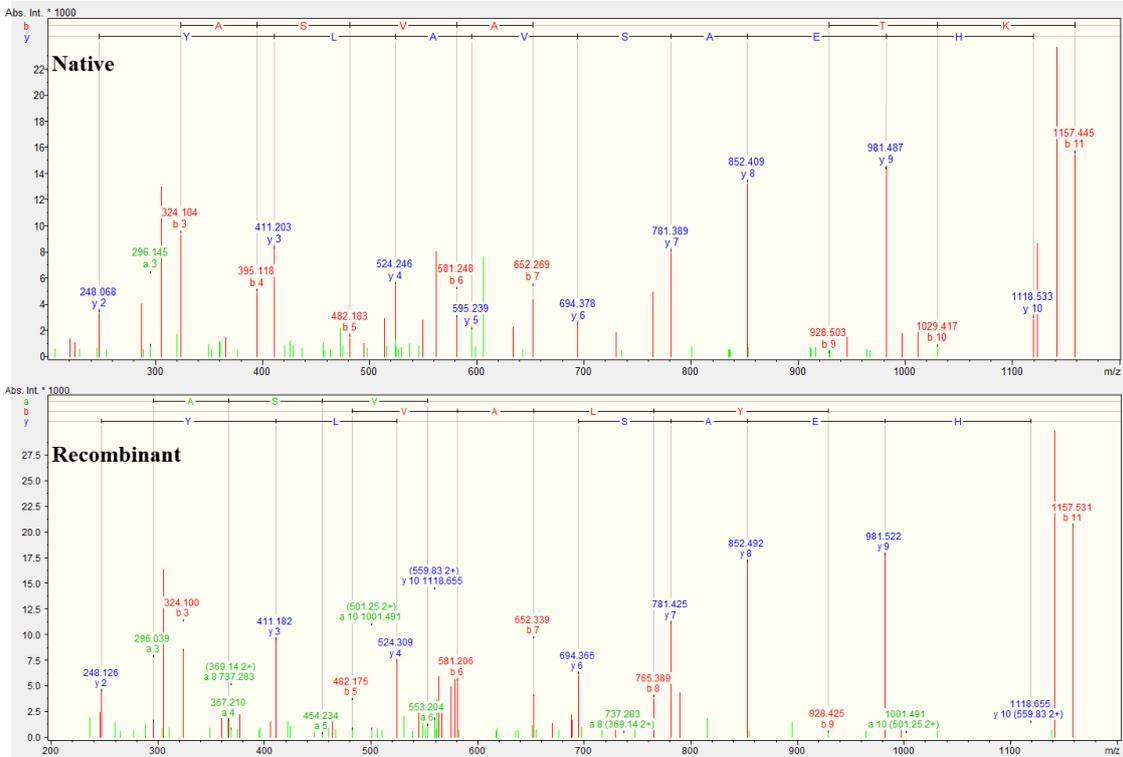
(l)

ESI-MSMS $m/z = 915.5 (M+H)^+$ CaL ('258-SLQLLVQD-255')



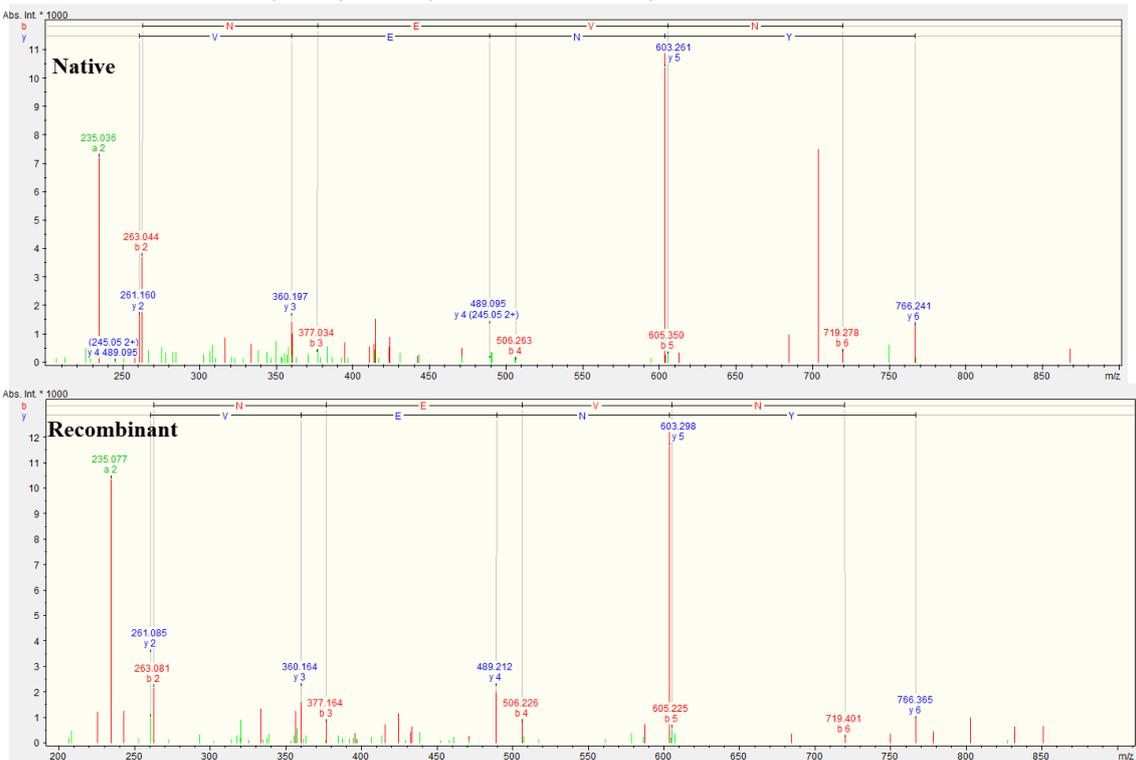
(m)

ESI-MSMS $m/z = 588.2 (M+2H)^{2+}$ CaL ('275-GHEASVALYTK-285')



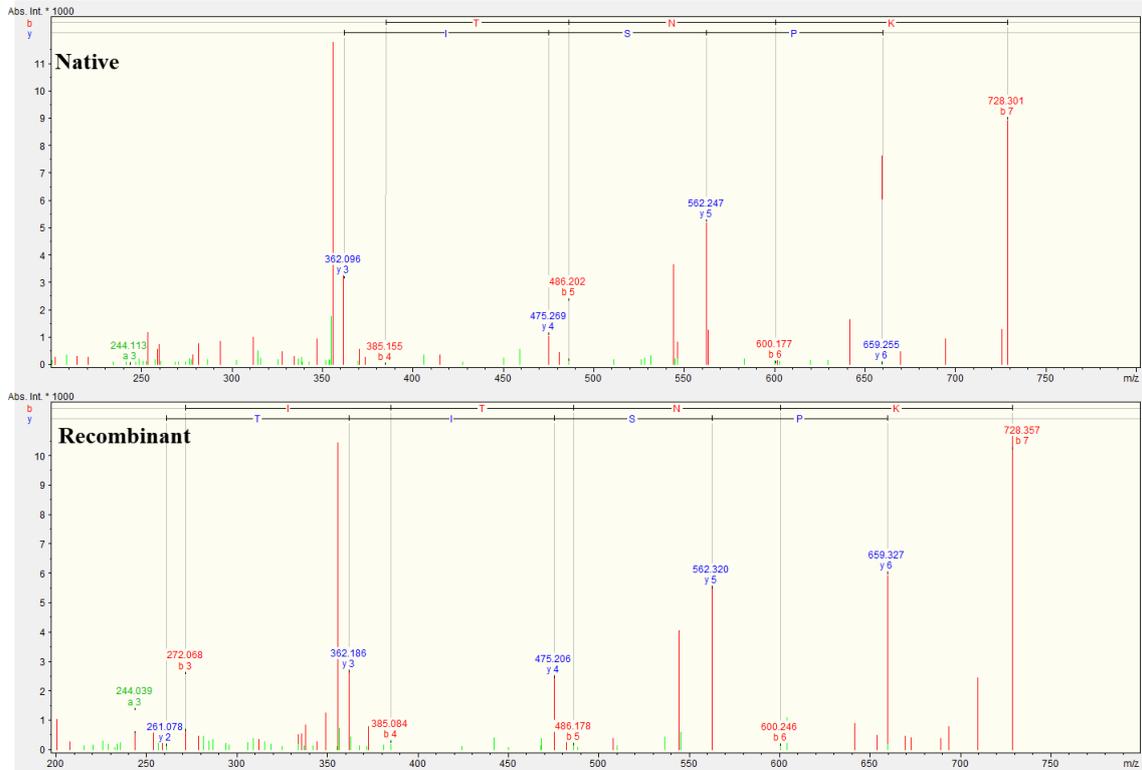
(n)

ESI-MSMS $m/z = 433.2 (M+2H)^{2+}$ CaL ('286-VYNEVNK-292')



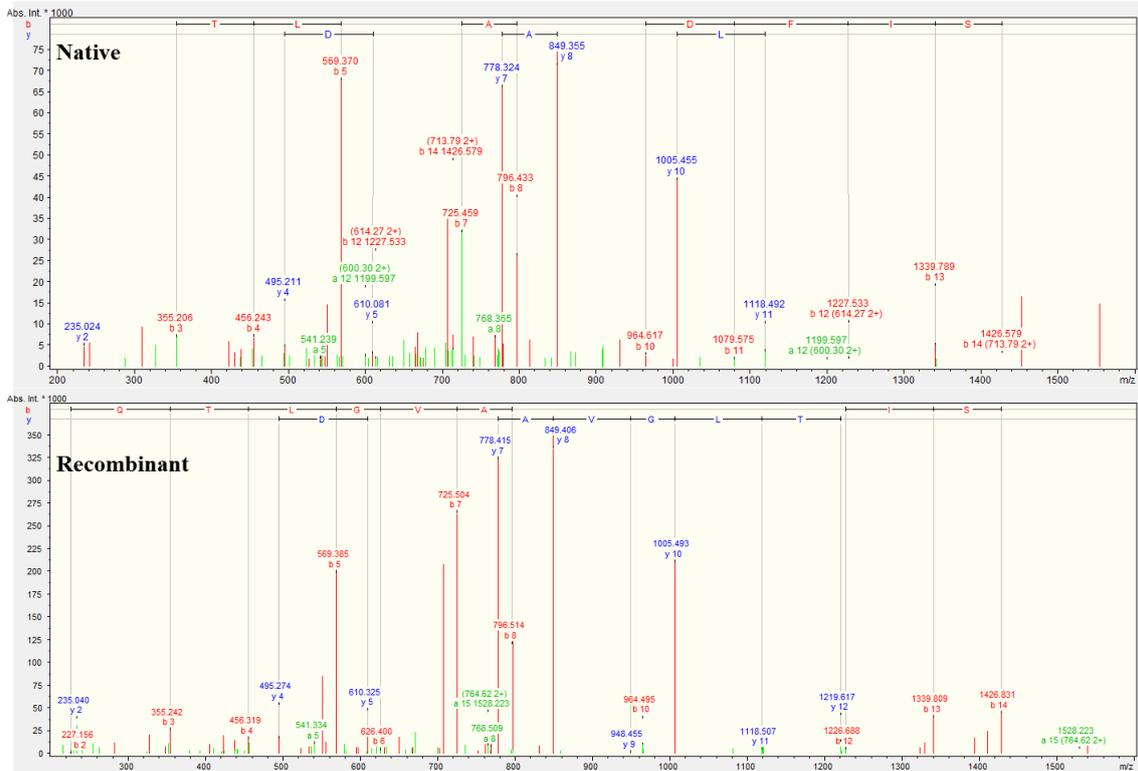
(o)

ESI-MSMS $m/z = 373.7 (M+2H)^{2+}$ CaIL ('379-SPSITNK-386')



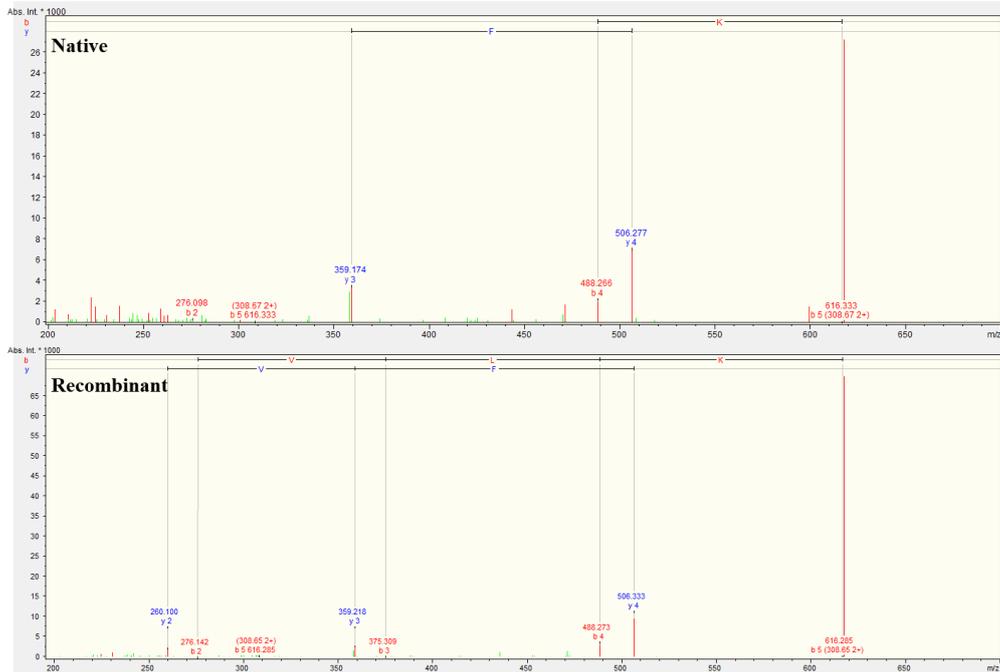
(p)

ESI-MSMS $m/z = 787.4 (M+2H)^{2+}$ CaIL ('392-ILQTLGVAPADFISE-406')



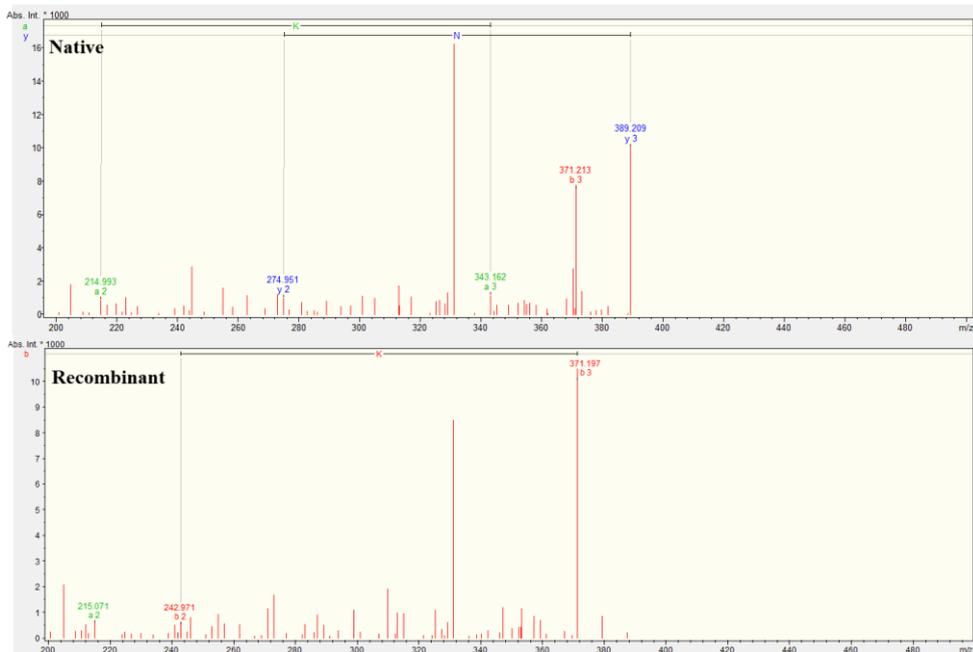
(q)

ESI-MSMS $m/z = 317.7 (M+2H)^{2+}$ CaII ('434-KKFVLK-439')



(r)

ESI-MSMS $m/z = 389.2 (M+H)^+$ CaII ('440-NKK-442')

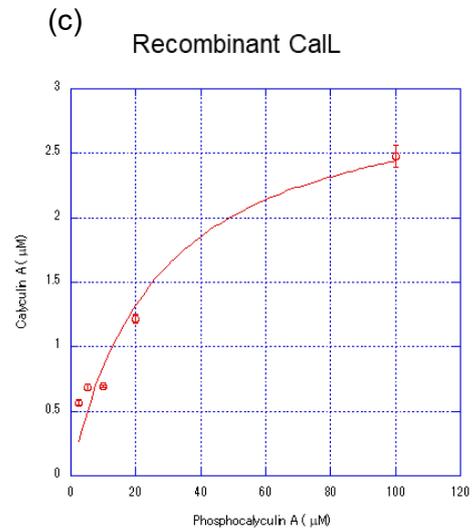
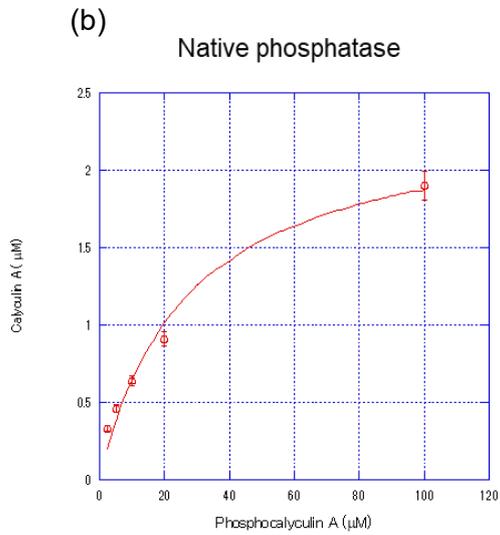
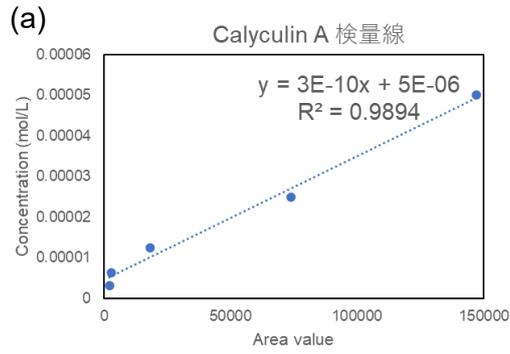


Supplementary Fig. 4 PMF 解析により検出された天然由来脱リン酸化酵素と組換え NL-CaII-strep の MS/MS スペクトル (CaII の N 末端から C 末端のアミノ酸配列順に a-r でそれぞれのペプチド断片を比較した)。

ATG GAG GCT TTG GCG ATG GCT TCT CGC TCG TTT ATG GTG CTC TTT
 CTG GCT CTC TCT GTT CTG AGT GCC TGT TCC GCT GTC TCT GCG TCC
 GAT GAT TAC GTT TGG ATC GAA CTC GGC AAA GGC GGC GTC CGA ATC
 GTC CGG GTG ATC ACT CAA AGC GAG GCG TGT CCC AAC ATC ACG GTG
 GAT GGA AAA TCG CTG GCC **ATG** CAA GCG CGC AGT ACA ACC CCA CCG
 GAG GGT TTT GAT ATC CGC GTT TGC GAA CGC GAA CTG CCC GCC GCC
 ACA AAA TCG GTG GTG TTC GCG AAG AAA CCA CTG CCG CTG GCC AAG
 CGG AAA CCC CGG CGT ATT GTC ATC ATC GGC GAT ACC GGT TGC CGC
 GTT TTC ACC TAT AAA ACG ATG GTA GAT GTG CAA AAC TGC AAT GGC
 GTC GAG GGA TAC GGC CCG GCG TGG CCT TTC CCC AAA ATC GCG ACC
 GCA GTT GCC GCT GCC CGG CCC GAT CTG ATC ATT CAC CTT GGC GAT
 TAT CAC TAC CGC GAG ACG CCC TGC CCG AAG GGC AAC AAG GGT TGT
 GCC GGC AGT CCA TCC GGC TTC ACC TGG CCG TCC TGG GAG GCC GAC
 TTC TTT GCC CCG GCT CGC GAC CTC CTG ACC CGT GCG CCA TGG GTC
 TTC ATC CGC GGC AAT CAC GAG AGT TGC GCG CGC GCC TGG CTC GGA
 TGG TTC TAC CTG CTG GAT CCC AAC CCG TTG CCG GCC AAC CCC TGG
 CAG GCC AGT CAA TGC CCG GCC ATC TCC GAC CCC TAT CCC ATT TCT
 TTA GAA AGC CTG CAA TTA CTC GTA CAA GAC AGC TCC GGT GTC CAC
 TAC TCT CCC AAG GGA CAC GAG GCA TCG GTG GCC TTG TAT ACC AAG
 GTC TAT AAT GAG GTC AAC AAG ATG GTT TCC GCC AGC TCG GAA AAC
 TGG TCG CTG ACC CAT GAA CCC ATC TGG GGC ATT CAA CCT GGA GCG
 ACG CCC CAG GGT ACG GTC CTG TAT CCC TTG CAG TTG ACC CTG CAG
 GCG GCG CTC AAA AAG ACT TCG CTG GGG CGT TTT GAT CCA CGG ATC
 GGC TTT CTT CTG AGC GGG CAT GTG CAT CTG TTC GAG TCC TTC AAT
 TTC ACC GAT GGA CGA CCC CCG ATG ATG GTC ATC GGC AAT AGT GGC
 ACA AAG CGC TCT CCT TCC ATC ACC AAC AAG GTT TTG GAA GGC TCG
 AAG ATT CTG CAG ACG CTG GGC GTA GCC CCT GCG GAT TTC ATC AGC
 GAA GAC GAT TTT AAT TAC GCT CTG GCC GAG GCT TTC GGC GAT GGT
 TGG GAG ATC AGC CTG TAT AAG TTA AAC GGA GAC GTC AGC AAG AAA
 TTT GTA TTG AAA AAC AAA AAA ATG GTT TCT AAA AGC CAG CTA AAA
 TAG

Supplementary Fig. 5 見出した ORF *call* の塩基配列

赤太字=NCBI に登録されたデータをもとに推定された ORF の開始メチオニンコドン
 黒太字=第 1 章 4 節で見出した ORF *NL-call* の開始メチオニン

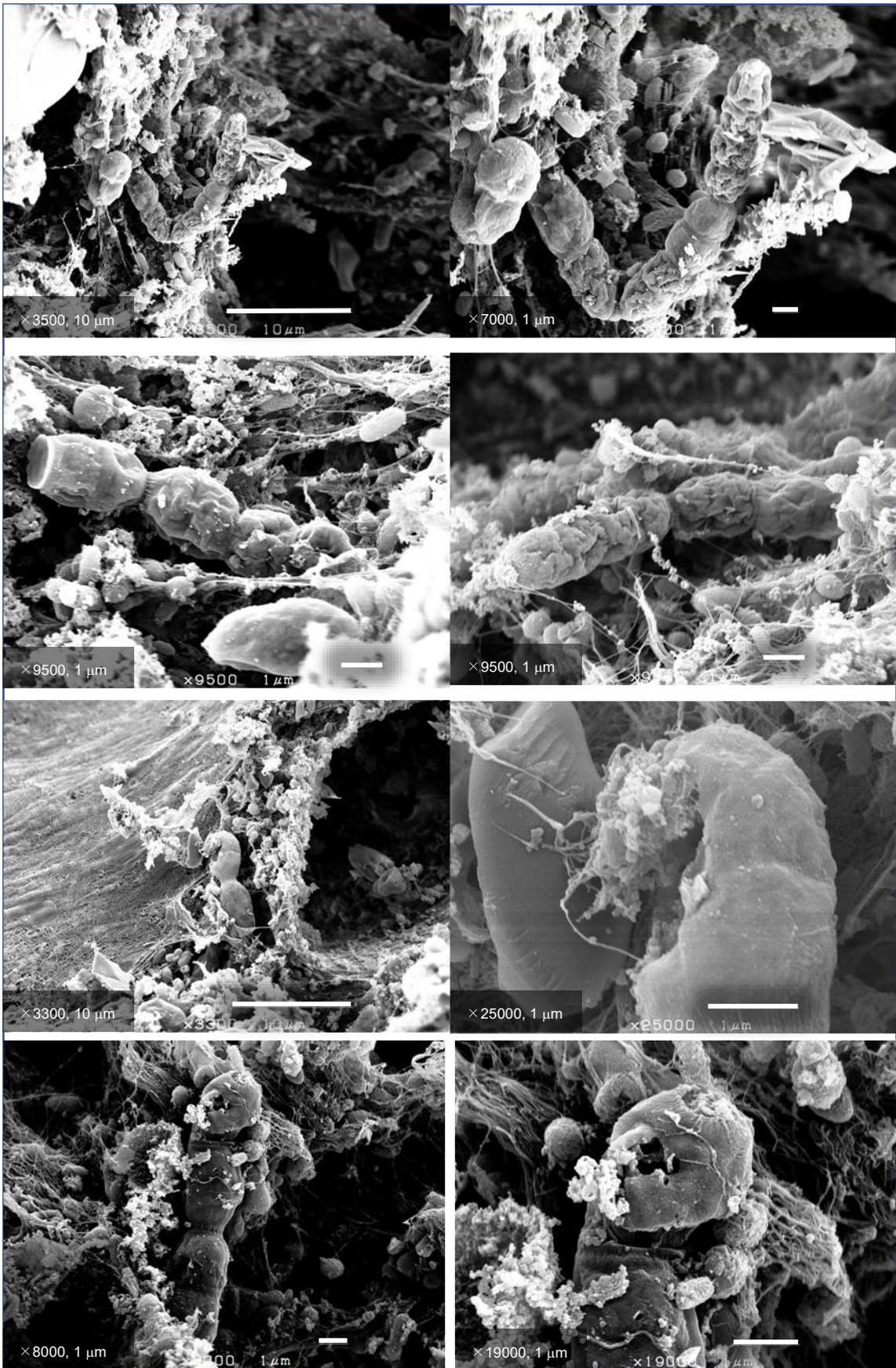


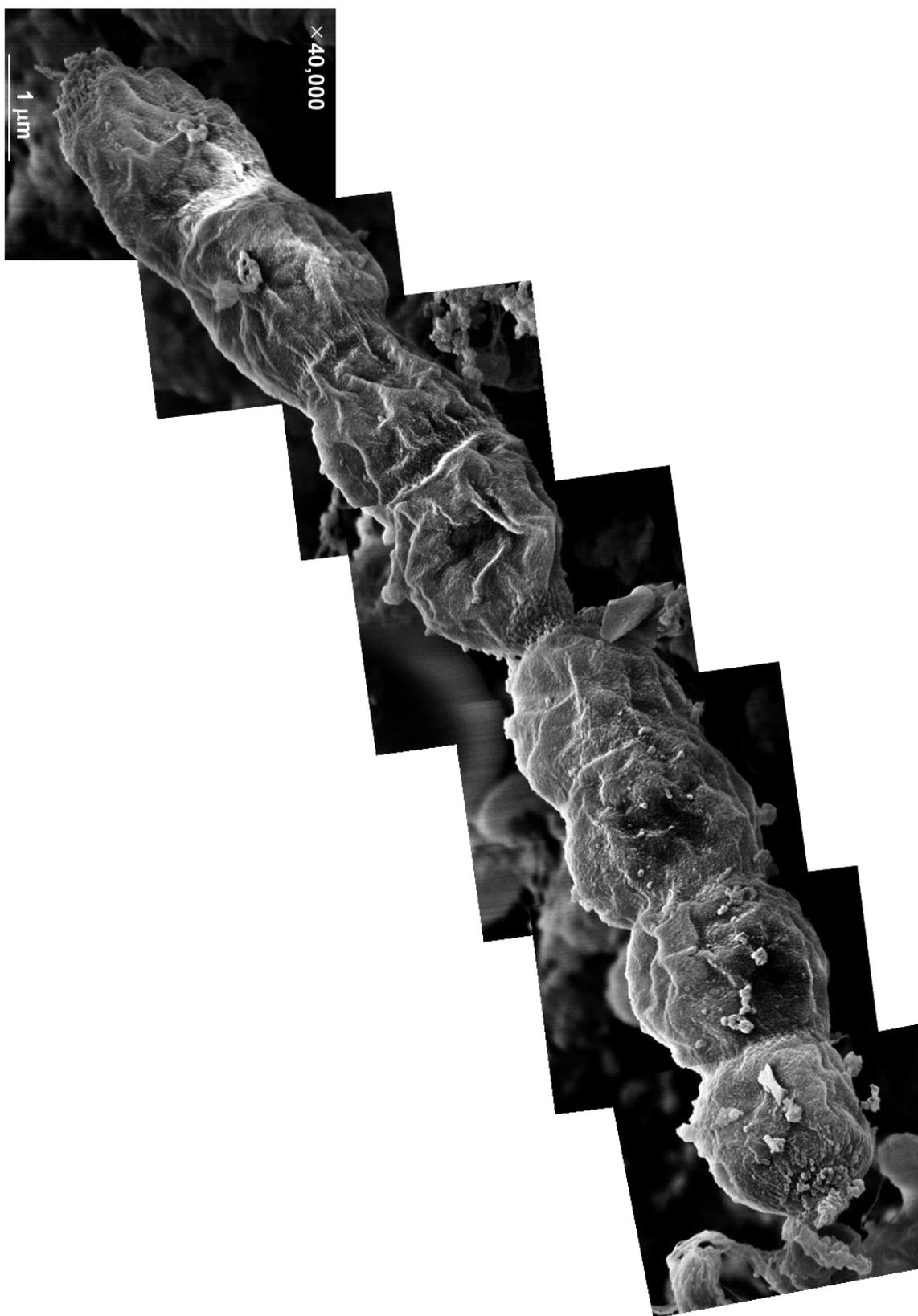
Supplementary Fig. 6 天然由来酵素および組換え酵素 NL-Call-*strep* の phosphocalyculin A に対する定常状態速度論的パラメーター

(a) calyculin A 検量線

(b) 天然由来脱リン酸化酵素のミカエリエスメンテンプロット

(c) 組換え酵素 NL-Call-*strep* のミカエリエスメンテンプロット ($n = 3$, means \pm SEM)





Supplementary Fig. 7 *D. calyx* 組織における Entotheonella 細胞の SEM 観察図

参考文献

- 1) Thacker RW. Impacts of Shading on Sponge-Cyanobacteria Symbioses: A Comparison between Host-Specific and Generalist Associations. *Integr Comp Biol.* **2005**, *45*, 369-376.
- 2) Kriska G. Sponges – Porifera. In: Freshwater Invertebrates in Central Europe. *Springer, Vienna*, **2013**.
- 3) Reiswig HM. Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *Biol Bull.* **1971**, *141*, 568-591.
- 4) Reiswig HM. Bacteria as food for temperate-water marine sponges. *Can. J. Zool.* **1975**, *53*, 582-589.
- 5) Pile AJ, Patterson MR, Witman JD. *In situ* grazing on plankton <10µm by the boreal sponge *Mycale lingua*. *Mar Ecol Prog Ser.* **1996**, *141*, 95-102.
- 6) Hadas E, Marie D, Shpigel M, Ilan M. Virus predation by sponges is a new nutrient-flow pathway in coral reef food webs. *Limnol Oceanogr.* **2006**, *51*, 1548-1550.
- 7) Hentschel U, Piel J, Degnan SM, Taylor MW. Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nat Rev Microbiol.* **2012**, *10*, 641-654.
- 8) Godefroy N, Le Goff E, Martinand-Mari C, Belkhir K, Vacelet J, Baghdiguian S. Sponge digestive system diversity and evolution: filter feeding to carnivory. *Cell Tissue Res.* **2019**, *377*, 341-351.
- 9) Kennedy J, Marchesi JR, Dobson AD. Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2007**, *75*, 11-20.
- 10) Anderson SA, Northcote PT, Page MJ. Spatial and temporal variability of the bacterial community in different chemotypes of the New Zealand marine sponge *Mycale hentscheli*. *FEMS Microbiol Ecol.* **2010**, *72*, 328-342.
- 11) Leal MC, Sheridan C, Osinga R, Dionísio G, Rocha RJ, Silva B, Rosa R, Calado R. Marine microorganism-invertebrate assemblages: perspectives to solve the "supply problem" in the initial steps of drug discovery. *Mar Drugs.* **2014**, *12*, 3929-3952.
- 12) Wilson MC, Mori T, Rückert C, Uria AR, Helf MJ, Takada K, Gernert C, Steffens UA, Heycke N, Schmitt S, Rinke C, Helfrich EJ, Brachmann AO, Gurgui C, Wakimoto T, Kracht M, Crüsemann M, Hentschel U, Abe I, Matsunaga S, Kalinowski J, Takeyama H, Piel J. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* **2014**, *506*, 58–62.
- 13) Pawlik JR, McMurray SE. The Emerging Ecological and Biogeochemical Importance of Sponges on Coral Reefs. *Ann Rev Mar Sci.* **2020**, *12*, 315-337.
- 14) Kiran GS, Sekar S, Ramasamy P, Thinesh T, Hassan S, Lipton AN, Ninawe AS, Selvin J. Marine sponge microbial association: Towards disclosing unique symbiotic interactions. *Mar Environ Res.* **2018**, *140*, 169-179.
- 15) Zhang F, Jonas L, Lin H, Hill RT. Microbially mediated nutrient cycles in marine sponges. *FEMS Microbiol Ecol.* **2019**, *95*, f155.

- 16) Hamada T, Matsunaga S, Yano G, Fusetani N. Polytheonamides A and B, highly cytotoxic, linear polypeptides with unprecedented structural features, from the marine sponge, *Theonella swinhoei*. *J Am Chem Soc.* **2005**, *127*, 110-118.
- 17) Fusetani N, Matsunaga S, Matsumoto H, Takebayashi Y. Bioactive marine metabolites. 33. Cyclotheonamides, potent thrombin inhibitors, from a marine sponge *Theonella* sp. *J Am Chem Soc.* **1990**, *112*, 7053-7054.
- 18) Sakemi S, Ichiba T, Kohmoto S, Saucy G, Higa T. Isolation and structure elucidation of onnamide A, a new bioactive metabolite of a marine sponge, *Theonella* sp. *J Am Chem Soc.* **1988**, *110*, 4851–4853.
- 19) Piel J, Hui D, Wen G, Butzke D, Platzer M, Fusetani N, Matsunaga S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**, *101*, 16222-16227.
- 20) Fusetani N, Nakao Y, Matsunaga S. Nazumamide A, a thrombin-inhibitory Tetrapeptide, from a marine sponge, *Theonella* sp. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7073-7074.
- 21) Kobayashi J, Sato M, Murayama T, Ishibashi M, Wälchi RM, Kanai M, Shoji J, Ohizumi Y. Konbamide, a novel peptide with calmodulin antagonistic activity from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp. *J Chem Soc Chem Commun.* **1991**, *15*, 1050-1052.
- 22) Kobayashi J, Sato M, Ishibashia M, Shigemori H, Nakamura T, Ohizumi Y. Keramamide A, a Novel Peptide from the Okinawan Marine Sponge *Theonella* sp. *J Chem Soc Perkin Trans.* **1991**, *1*, 2609-2611.
- 23) Hiratsuka T. A novel peptide inhibitor of the myosin ATPase from an Okinawan marine sponge. *J Biol Chem.* **1989**, *264*, 18162-18167.
- 24) Rohde S, Nietzer S, Schupp PJ. Prevalence and Mechanisms of Dynamic Chemical Defenses in Tropical Sponges. *PLoS One.* **2015**, *10*, e0132236.
- 25) Paul VJ, Puglisi MP. Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Nat Prod Rep.* **2004**, *21*, 189-209.
- 26) Paul VJ, Puglisi MP, Ritson-Williams R. Marine chemical ecology. *Nat Prod Rep.* **2006**, *23*, 153-180.
- 27) McClintock JB, Amsler CD, Baker BJ. Overview of the chemical ecology of benthic marine invertebrates along the western Antarctic peninsula. *Integr Comp Biol.* **2010**, *50*, 967-980.
- 28) Paul VJ, Van Alstyne KL. Activation of chemical defense in the tropical green algae *Halimeda* spp. *J Exp Mar Biol Ecol.* **1992**, *160*, 191-203.
- 29) Wright JT, Benkendorff K, Davis AR. Habitat associated differences in temperate sponge assemblages: the importance of chemical defense. *J Exp Mar Biol Ecol.* **1997**, *213*, 199-213.

- 30) Teeyapant R, Proksch P. Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba*—evidence for an induced chemical defense? *Naturwissenschaften* **1993**, *80*, 369-370.
- 31) Thoms C, Wolff M, Padmakumar K, Ebel R, Proksch P. Chemical defense of Mediterranean sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Z Naturforsch C J Biosci.* **2004**, *59*, 113-122.
- 32) Thoms C, Ebel R, Proksch P. Activated chemical defense in *Aplysina* sponges revisited. *J Chem Ecol.* **2006**, *32*, 97-123.
- 33) Lipowicz B, Hanekop N, Schmitt L, Proksch P. An aeropylsinin-1 specific nitrile hydratase isolated from the marine sponge *Aplysina cavernicola*. *Mar Drugs.* **2013**, *11*, 3046-3067.
- 34) Ettinger-Epstein P, Motti CA, Nys Rd, Wright AD, Battershill CN, Tapiolas DM. Acetylated Sesterterpenes from the Great Barrier Reef Sponge *Luffariella Variabilis*. *J Nat Prod.* **2007**, *70*, 648-651.
- 35) Thoms C, Schupp PJ. Activated chemical defense in marine sponges--a case study on *Aplysinella rhax*. *J Chem Ecol.* **2008**, *34*, 1242-1252.
- 36) Müller WEG, Müller IM. Origin of the metazoan immune system: identification of the molecules and their functions in sponges. *Integr Comp Biol.* **2003**, *43*, 281-292.
- 37) Müller WEG, Klemm M, Thakur NL, Schröder HC, Aiello A, D'Esposito M, Menna M, Fattorusso E. Molecular/chemical ecology in sponges: evidence for an adaptive antibacterial response in *Suberites domuncula*. *Mar Biol.* **2004**, *144*, 19-29.
- 38) Richelle-Maurer E, de Kluijver MJ, Feio S, Gaudencio S, Gaspar H, Gomez R, Tavares R, van de Vyver G, van Soest RWM. Localization and ecological significance of oroidin and sceptrin in the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *Biochem Syst Ecol.* **2003**, *31*, 1073-1091.
- 39) Mehubub MF, Lei J, Franco C, Zhang W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar Drugs.* **2014**, *12*, 4539-4577.
- 40) Mehubub MF, Perkins MV, Zhang W, Franco CMM. New marine natural products from sponges (Porifera) of the order Dictyoceratida (2001 to 2012); a promising source for drug discovery, exploration and future prospects. *Biotechnol Adv.* **2016**, *34*, 473-491.
- 41) Barreca M, Spanò V, Montalbano A, Cueto M, Díaz Marrero AR, Deniz I, Erdoğan A, Lukić Bilela L, Moulin C, Taffin-de-Givenchy E, Spriano F, Perale G, Mehiri M, Rotter A, P Thomas O, Barraja P, Gaudêncio SP, Bertoni F. Marine Anticancer Agents: An Overview with a Particular Focus on Their Chemical Classes. *Mar Drugs.* **2020**, *18*, E619.
- 42) Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* **2020**, *37*, 175-223.
- 43) Hirata Y, Uemura D. Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure Appl Chem.* **1986**, *58*, 701-710.

- 44) Aicher TD, Buszek KR, Fang FG, Forsyth CJ, Jung SH, Kishi Y, Matelich CM, Scola MP, Spero MD, Yoon KS. Total synthesis of halichondrin B and nor-halichondrin B. *J Am Chem Soc.* **1992**, *114*, 3162-3164.
- 45) Yu MJ, Kishi Y, Littlefield BA. Discovery of E7389, a fully synthetic macrocyclic ketone analog of halichondrin B. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ, editors. Anticancer agents from natural products. Boca Raton, FL: *Taylor and Francis.* **2005**, *2*, 241-265.
- 46) Jordan MA, Kamath K, Manna T, Okouneva T, Miller HP, Davis C, et al. The primary antimitotic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. *Mol Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1086-1095.
- 47) Miller JH, Field JJ, Kanakkanthara A, Owen JG, Singh AJ, Northcote PT. Marine Invertebrate Natural Products that Target Microtubules. *J Nat Prod.* **2018**, *81*, 691-702.
- 48) Gunasekera SP, Gunasekera M, Longley ER, Schulte KG. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissolute*. *J Org Chem.* **1990**, *55*, 4912-4915.
- 49) Fusetani N, Shinoda K, Matsunaga S. Cinachyrolide A: a potent cytotoxic macrolide possessing two spiro ketals from marine sponge *Cinachyra* sp.. *J Am Chem Soc.* **1993**, *115*, 3977-3981.
- 50) Bai R, Cichacz ZA, Herald CL, Pettit GR, Hamel E. Spongistatin 1, a highly cytotoxic, sponge-derived, marine natural product that inhibits mitosis, microtubule assembly, and the binding of vinblastine to tubulin. *Mol Pharmacol.* **1993**, *44*, 757-766.
- 51) Kobayashi M, Aoki S, Sakai H, Kawazoe K, Kihara N, Sasaki T, Kitagawa I. Althoyrtin A, a potent anti-tumor macrolide from the Okinawan marine sponge *Hyrtios altum*. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2795-2798.
- 52) Corley DG, Herb R, Moore RE, Scheuer PJ, Paul VJ. Laulimalides. New potent cytotoxic macrolides from a marine sponge and a nudibranch predator. *J Org Chem.* **1988**, *53*, 3644-3646.
- 53) Quinoa E, Kakou Y, Crews P. Fijianolides, polyketide heterocycles from a marine sponge. *J Org Chem.* **1988**, *53*, 3642-3644.
- 54) Tanaka J, Higa T. Zampanolide, a new cytotoxic macrolide from a marine sponge. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5535-5538.
- 55) Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt micro filament organization in cultured cells. *Science* **1983**, *219*, 493-495.
- 56) Fusetani, N, Yasumuro, K, Matsunaga S, Hashimoto K. Mycalolides A-C, hybrid macrolides of ulapualides and halichondramide, from a sponge of the genus *Mycale*. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2809-2812.
- 57) Carmely S, Kashman Y. Structure of swinholide-a, a new macrolide from the marine sponge. *Tetrahedron Letters.* **1985**, *26*, 511-514.

- 58) Sakai R, Higa T, Jefford WC, Bernardinelli G. Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *J Am Chem Soc.* **1986**, *108*, 6404-6405.
- 59) Matsunaga S, Fusetani N, Hashimoto K, Walchli M. Theonellamide F. A novel antifungal bicyclic peptide from a marine sponge *Theonella* sp. *J Am Chem Soc.* **1989**, *111*, 2582-2588.
- 60) Nishimura S, Arita Y, Honda M, Iwamoto K, Matsuyama A, Shirai A, Kawasaki H, Kakeya H, Kobayashi T, Matsunaga S, Yoshida M. Marine antifungal theonellamides target 3 β -hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nat Chem Biol.* **2010**, *6*, 519-526.
- 61) Nishimura S, Ishii K, Iwamoto K, Arita Y, Matsunaga S, Ohno-Iwashita Y, Sato SB, Kakeya H, Kobayashi T, Yoshida M. Visualization of sterol-rich membrane domains with fluorescently-labeled theonellamides. *PLoS One.* **2013**, *8*, e83716.
- 62) Espiritu RA, Matsumori N, Murata M, Nishimura S, Kakeya H, Matsunaga S, Yoshida M. Interaction between the marine sponge cyclic peptide theonellamide A and sterols in lipid bilayers as viewed by surface plasmon resonance and solid-state (2)H nuclear magnetic resonance. *Biochemistry.* **2013**, *52*, 2410-2418.
- 63) Allingham JS, Klenchin VA, Rayment I. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci.* **2006**, *63*, 2119-2134.
- 64) Hayashi-Takanaka Y, Kina Y, Nakamura F, Yamazaki S, Harata M, Soest RWMV, Kimura H, Nakao Y. Effect of mycalolides isolated from a marine sponge *Mycale aff. nullarosette* on actin in living cells. *Sci Rep.* **2019**, *9*, 7540.
- 65) Döderlein, L. Studien an japanischen Lithistiden. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie. **1884**, *40*, 62-104, pls V-VII.
- 66) Retrieved [Dec, 8, 2020], from the Integrated Taxonomic Information System (ITIS) (<http://www.itis.gov>).
- 67) Kato Y, Fusetani N, Matsuura S, Hashimoto K, Fujita S, Furuya T. Calyculin A, a novel antitumor metabolite from the marine sponge *Discodermia calyx*, *J Am Chem Soc.* **1986**, *108*, 2780-2781.
- 68) Kato Y, Fusetani N, Matsunaga S, Hashimoto K, Koseki K. Isolation and structure elucidation of calyculins B, C, and D, novel antitumor metabolites, from the marine sponge *Discodermia calyx*. *J Org Chem.* **1998**, *53*, 3930-3932.
- 69) Matsunaga S, Fujiki H, Sakata D, Fusetani N. Calyculins E, F, G, and H, additional inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A, from the marine sponge *Discodermia calyx*, *Tetrahedron.* **1991**, *47*, 2999-3006.
- 70) Matsunaga S, Wakimoto T, Fusetani N, Suganuma M. Isolation of dephosphonocalyculin A from the marine sponge *Discodermia calyx*, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 3763-3764.
- 71) Matsunaga S, Wakimoto T, Fusetani N. Isolation of four new calyculins from the marine sponge *Discodermia calyx*, *J Org Chem.* **1997**, *62*, 2640-2642.
- 72) Miki Kimura, Toshiyuki Wakimoto, Ikuro Abe. Allos-hemicalyculin A, a photochemically converted

- calyculin from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 114-116.
- 73) Wakimoto T, Matsunaga S, Takai A, Fusetani N. Insight into binding of calyculin A to protein phosphatase 1: isolation of hemicalyculin A and chemical transformation of calyculin A. *Chem Biol.* **2002**, *9*, 309-319.
 - 74) Dumdei EJ, Blunt JW, Munro MH, Pannell LK. Isolation of Calyculins, Calyculinamides, and Swinholidide H from the New Zealand Deep-Water Marine Sponge *Lamellomorpha strongylata*. *J Org Chem.* **1997**, *62*, 2636-2639.
 - 75) Fu X, Schmitz JF, Kelly-Borges M, McCready LT, Holmes BFC. Clavosines A-C from the marine sponge *Myriastrra clavosa*: Potent cytotoxins and inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A, *J Org Chem.* **1998**, *63*, 7957-7963.
 - 76) Edrada RA, Ebel R, Supriyono A, Wray V, Schupp P, Steube K, van Soest R, Proksch P. Swinhoeiamide A, a new highly active calyculin derivative from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *J Nat Prod.* **2002**, *65*, 1168-1172.
 - 77) Kehraus S, König GM, Wright AD. A new cytotoxic calyculinamide derivative, geometricin A, from the Australian sponge *Luffariella geometrica*. *J Nat Prod.* **2002**, *65*, 1056-1058.
 - 78) Ishihara H, Martin BL, Brautigam DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, Hartshorne DJ. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **1989**, *159*, 871-877.
 - 79) Suganuma M, Fujiki H, Furuya-Suguri H, Yoshizawa S, Yasumoto S, Kato Y, Fusetani N, Sugimura T. Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumor promoter on CD-1 mouse skin. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 3521-3525.
 - 80) Takai A, Mieskes G. Inhibitory effect of okadaic acid on the *p*-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases. *Biochem J.* **1991**, *275*, 233-239.
 - 81) Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J.* **1988**, *256*, 283-290.
 - 82) Takai A, Ohno Y, Yasumoto T, Mieskes G. Estimation of the rate constants associated with the inhibitory effect of okadaic acid on type 2A protein phosphatase by time-course analysis. *Biochem J.* **1992**, *287*, 101-106.
 - 83) Vandr  DD, Wills VL. Inhibition of mitosis by okadaic acid: possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase. *J Cell Sci.* **1992**, *101*, 79-91.
 - 84) Usuki T, Someya T, Ohara K, Yabu H, Ozaki H, Karaki H. Effect of calyculin A on the contraction of colonic smooth muscle of guinea pigs. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi.* **1989**, *25*, 284-285.
 - 85) Yabu H, Yoshino M, Usuki T, Someya T, Obara K, Ozaki H, Karaki H. Modification by calyculin A of inward Ca currents in smooth muscle cells isolated from guinea pig taenia coli. *Prog Clin Biol Res.* **1990**, *327*, 623-626.
 - 86) Ishihara H, Ozaki H, Sato K, Hori M, Karaki H, Watabe S, Kato Y, Fusetani N, Hashimoto K,

- Uemura D. Calcium-independent activation of contractile apparatus in smooth muscle by calyculin-A. *J Pharmacol Exp Ther.* **1989**, *250*, 388-396.
- 87) Takai A, Eto M, Hirano K, Takeya K, Wakimoto T, Watanabe M. Protein phosphatases 1 and 2A and their naturally occurring inhibitors: current topics in smooth muscle physiology and chemical biology. *J Physiol Sci.* **2018**, *68*, 1-17.
- 88) Honkanen RE. Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett.* **1993**, *330*, 283-286.
- 89) MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* **1990**, *264*, 187-192.
- 90) Tachibana K, Scheuer PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, Engen VD, Clardy J, Gopichand Y, Schmitz FJ. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J Am Chem Soc.* **1981**, *103*, 2469-2471.
- 91) Murakami Y, Osjima Y, Yasumoto T. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Nihon Suisan Gakkaishi.* **2006**, *72*, 4907-4916.
- 92) Mitsuhashi S, Matsuura N, Ubukata M, Oikawa H, Shima H, Kikuchi K. Tautomycetin is a novel and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase type 1, PP1. *Biochem Biophys Res Commun.* **2001**, *287*, 328-331.
- 93) Roberge M, Tudan C, Hung SM, Harder KW, Jirik FR, Anderson H. Antitumor drug fostriecin inhibits the mitotic entry checkpoint and protein phosphatases 1 and 2A. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 6115-6121.
- 94) Usui T, Marriott G, Inagaki M, Swarup G, Osada H. Protein phosphatase 2A inhibitors, phoslactomycins. Effects on the cytoskeleton in NIH/3T3 cells. *J Biochem.* **1999**, *125*, 960-965.
- 95) Kita A, Matsunaga S, Takai A, Kataiwa H, Wakimoto T, Fusetani N, Isobe M, Miki K. Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Structure.* **2002**, *10*, 715-724.
- 96) Wakimoto T, Egami Y, Nakashima Y, Wakimoto Y, Mori T, Awakawa T, Ito T, Kenmoku H, Asakawa Y, Piel J, Abe I. Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont. *Nat Chem Biol.* **2014**, *10*, 648-655.
- 97) Helfrich EJ, Piel J. Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. *Nat Prod Rep.* **2016**, *33*, 231-316.
- 98) Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2004**, *68*, 669-685.
- 99) Brady SE, Simmons L, Kim JH, Schmidt EW. Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms. *Nat Prod Rep.* **2009**, *26*, 1488-1503.
- 100) Nakashima Y, Egami Y, Kimura M, Wakimoto T, Abe I. Metagenomic Analysis of the Sponge

Discodermia Reveals the Production of the Cyanobacterial Natural Product Kasumigamide by 'Entotheonella'. *PLoS One*. **2016**, 11, e0164468.

- 101) Bewley CA, Holland ND, Faulkner DJ. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia*. **1996**, 52, 716-722.
- 102) Schmidt WE, Obratsova YA, Davidson KS, Faulkner JD, Haygood GM. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, "*Candidatus* Entotheonella palauensis", *Mar. Biol.*, **2000**, 136, 969-977.
- 103) Schirmer A, Gadhari R, Reeves CD, Ibrahim F, DeLong EF, Hutchinson CR. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl Environ Microbiol*. **2005**, 71, 4840-4849.
- 104) Brück WM, Sennett SH, Pomponi SA, Willenz P, McCarthy PJ. Identification of the bacterial symbiont Entotheonella sp. in the mesohyl of the marine sponge *Discodermia* sp. *ISME J*. **2008**, 2, 335-339.
- 105) Kimura M, Wakimoto T, Egami Y, Tan KC, Ise Y, Abe I. Calyxamides A and B, cytotoxic cyclic peptides from the marine sponge *Discodermia calyx*. *J Nat Prod*. **2012**, 75, 290-294.
- 106) Ueoka R, Uria AR, Reiter S, Mori T, Karbaum P, Peters EE, Helfrich EJ, Morinaka BI, Gugger M, Takeyama H, Matsunaga S, Piel J. Metabolic and evolutionary origin of actin-binding polyketides from diverse organisms. *Nat Chem Biol*. **2015**, 11, 705-712.
- 107) Mori T, Cahn JKB, Wilson MC, Meoded RA, Wiebach V, Martinez AFC, Helfrich EJM, Albersmeier A, Wibberg D, Dätwyler S, Keren R, Lavy A, Rückert C, Ilan M, Kalinowski J, Matsunaga S, Takeyama H, Piel J. Single-bacterial genomics validates rich and varied specialized metabolism of uncultivated Entotheonella sponge symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2018**, 115, 1718-1723.
- 108) Uria AR, Piel J, Wakimoto T. Biosynthetic Insights of Calyculin- and Misakinolide-Type Compounds in "*Candidatus* Entotheonella sp.". *Methods Enzymol*. **2018**, 604, 287-330.
- 109) Bagshawe KD. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. **2006**, 6, 1421-1431.
- 110) Sharma SK, Bagshawe KD. Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT): Trials and tribulations. *Adv Drug Deliv Rev*. **2017**, 118, 2-7.
- 111) McCormick F. Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer*. **2001**, 1, 130-141.
- 112) Piepersberg W. Streptomycin and related aminoglycosides. *Biotechnology*. **1995**, 28, 531-570.
- 113) Flatt PM, Mahmud T. Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds. *Nat Prod Rep*. **2007**, 24, 358-392.
- 114) Lim CK, Smith MC, Petty J, Baumberg S, Wootton JC. *Streptomyces griseus* streptomycin phosphotransferase: expression of its gene in *Escherichia coli* and sequence homology with other antibiotic phosphotransferases and with eukaryotic protein kinases. *J Gen Microbiol*. **1989**, 135, 3289-3302.

- 115) Mansouri K, Piepersberg W. Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of five genes, *strFGHIK*, including a phosphatase gene. *Mol Gen Genet.* **1991**, 228, 459-469.
- 116) Matange N, Podobnik M, Visweswariah SS. Metallophosphoesterases: structural fidelity with functional promiscuity. *Biochem J.* **2015**, 467, 201-216.
- 117) Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* **2006**, 1, 2856-2860.
- 118) Connelly JC, Leach DR. Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11-Rad50 complex. *Trends Biochem Sci.* **2002**, 27, 410-418.
- 119) Fernet M, Gribaa M, Salih MA, Seidahmed MZ, Hall J, Koenig M. Identification and functional consequences of a novel MRE11 mutation affecting 10 Saudi Arabian patients with the ataxia telangiectasia-like disorder. *Hum Mol Genet.* **2005**, 14, 307-318.
- 120) Bienias K, Fiedorowicz A, Sadowska A, Prokopiuk S, Car H. Regulation of sphingomyelin metabolism. *Pharmacol Rep.* **2016**, 68, 570-581.
- 121) Antanaitis CB, Aisen P, Uteroferrin and the purple acid-phosphatases, *Adv. Inorg. Biochem.* **1983**, 5, 111e136.
- 122) Oddie GW, Schenk G, Angel NZ, Walsh N, Guddat LW, de Jersey J, Cassady AI, Hamilton SE, Hume DA. Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone.* **2000**, 27, 575-84.
- 123) Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, Halleen JM, Hentunen T, Yam LT. Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in *rheumatoid arthritis*. *Clin Chim Acta.* **2002**, 320, 49-58.
- 124) Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42 (Database issue), D222-30.
- 125) Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* **2018**, 35, 1547-1549.
- 126) Zhu H, Qian W, Lu X, Li D, Liu X, Liu K, Wang D. Expression patterns of purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis* organs and functional analysis of AtPAP23 predominantly transcribed in flower. *Plant Mol Biol.* **2005**, 59, 581-594.
- 127) Yeung SL, Cheng C, Lui TK, Tsang JS, Chan WT, Lim BL. Purple acid phosphatase-like sequences in prokaryotic genomes and the characterization of an atypical purple alkaline phosphatase from *Burkholderia cenocepacia* J2315. *Gene.* **2009**, 440, 1-8.
- 128) Marshall K, Nash K, Haussman G, Cassady I, Hume D, de Jersey J, Hamilton S. Recombinant human and mouse purple acid phosphatases: expression and characterization. *Arch Biochem Biophys.* **1997**, 345, 230-236.

- 129) Tyagi R, Shenoy AR, Visweswariah SS. Characterization of an evolutionarily conserved metallophosphoesterase that is expressed in the fetal brain and associated with the WAGR syndrome. *J Biol Chem.* **2009**, *284*, 5217-5228.
- 130) Shenoy AR, Sreenath N, Podobnik M, Kovacevic M, Visweswariah SS. The Rv0805 gene from *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: biochemical and mutational analysis. *Biochemistry.* **2005**, *44*, 15695-15704.
- 131) Brunel C, Cathala G. Imidazole: an inhibitor of L-phenylalanine-insensitive alkaline phosphatases of tissues other than intestine and placenta. *Biochim Biophys Acta.* **1972**, *268*, 415-421.
- 132) Gordon JA. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* **1991**, *201*, 477-482.
- 133) Guddat LW, McAlpine AS, Hume D, Hamilton S, de Jersey J, Martin JL. Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. *Structure.* **1999** *7*, 757-767.
- 134) Olczak M., Morawiecka, B., Watorek, W. Plant purple acid phosphatases: genes, structures and biological function. *Acta Biochim Pol.* **2003**, *50*, 1245-125.
- 135) 静岡県水産・海洋技術研究所ホームページ
(<https://fish-exp.pref.shizuoka.jp/01ocean/1-4-1.html>)
- 136) Espiau B, Lemerrier G, Ambit A, Bringaud F, Merlin G, Baltz T, Bakalara N. A soluble pyrophosphatase, a key enzyme for polyphosphate metabolism in *Leishmania*. *J Biol Chem.* **2006**, *281*, 1516-1523.
- 137) Springs B, Welsh KM, Cooperman BS. Thermodynamics, kinetics, and mechanism in yeast inorganic pyrophosphatase catalysis of inorganic pyrophosphate: inorganic phosphate equilibration. *Biochemistry.* **1981**, *20*, 6384-6391.
- 138) Dermol U, Janardan V, Tyagi R, Visweswariah SS, Podobnik M. Unique utilization of a phosphoprotein phosphatase fold by a mammalian phosphodiesterase associated with WAGR syndrome. *J Mol Biol.* **2011**, *412*, 481-494.
- 139) Keppetipola N, Shuman S. Distinct enzymic functional groups are required for the phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities of *Clostridium thermocellum* polynucleotide kinase/phosphatase. *J Biol Chem.* **2006**, *281*, 19251-19259.
- 140) White DJ, Reiter NJ, Sikkink RA, Yu L, Rusnak F. Identification of the high affinity Mn²⁺ binding site of bacteriophage lambda phosphoprotein phosphatase: effects of metal ligand mutations on electron paramagnetic resonance spectra and phosphatase activities. *Biochemistry.* **2001**, *40*, 8918-8929.
- 141) Hayman AR, Cox TM. Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties, and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect cells. *J Biol Chem.* **1994**, *269*, 1294-1300.

- 142) Mitić N, Noble CJ, Gahan LR, Hanson GR, Schenk G. Metal-ion mutagenesis: conversion of a purple acid phosphatase from sweet potato to a neutral phosphatase with the formation of an unprecedented catalytically competent Mn(II)Mn(II) active site. *J Am Chem Soc.* **2009**, *131*, 8173-8179.
- 143) Xikeranmu Z, Abdunasir M, Ma J, Tusong K, Liu X. Characterization of two copper/zinc superoxide dismutases (Cu/Zn-SODs) from the desert beetle *Microdera punctipennis* and their activities in protecting *E. coli* cells against cold. *Cryobiology.* **2019**, *87*, 15-27.
- 144) Hsieh MC, Graham TL. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry.* **2001**, *58*, 995-1005.
- 145) Mithöfer A, Boland W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu Rev Plant Biol.* **2012**, *63*, 431-450.
- 146) Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol.* **2004**, *8*, 33-41.
- 147) Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* **2000**, *403*, 795-800.
- 148) Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* **2005**, *363*, 15-23.
- 149) Blum M, Chang HY, Chuguransky S, Grego T, Kandasaamy S, Mitchell A, Nuka G, Paysan-Lafosse T, Qureshi M, Raj S, Richardson L, Salazar GA, Williams L, Bork P, Bridge A, Gough J, Haft DH, Letunic I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Necci M, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A, Finn RD. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Res.* **2020**, gkaa977.
- 150) Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1652-1662.
- 151) Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol.* **2019**, *37*, 420-423.
- 152) Gelis I, Bonvin AM, Keramisanou D, Koukaki M, Gouridis G, Karamanou S, Economou A, Kalodimos CG. Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell.* **2007**, *131*, 756-769.
- 153) Tsirigotaki A, De Geyter J, Šoštarić N, Economou A, Karamanou S. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat Rev Microbiol.* **2017**, *15*, 21-36.
- 154) Auclair SM, Bhanu MK, Kendall DA. Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci.* **2012**, *21*, 13-25.
- 155) Chatzi KE, Sardis MF, Karamanou S, Economou A. Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *Biochem J.* **2013**, *449*, 25-37.

- 156) 三本木 至宏,「大腸菌ペリプラズム抽出液の回収」, *蛋白質科学会アーカイブ*, **2008**, 1, e010, 1-3.
- 157) Oikawa K, Nakamura S, Sonoyama T, Ohshima A, Kobayashi Y, Takayama SJ, Yamamoto Y, Uchiyama S, Hasegawa J. Five amino acid residues responsible for the high stability of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*₅₅₂. *J Biol Chem.* **2005**, 280, 5527-5532.
- 158) Neu HC, Heppel LA. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem.* **1965**, 240, 3685-3692.
- 159) Payne SH, Bonissone S, Wu S, Brown RN, Ivankov DN, Frishman D, Pasa-Tolić L, Smith RD, Pevzner PA. Unexpected diversity of signal peptides in prokaryotes. *mBio.* **2012**, 3, e00339-12.
- 160) Thomas MG, Chan YA, Ozanick SG. Deciphering tuberactinomycin biosynthesis: isolation, sequencing, and annotation of the viomycin biosynthetic gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**, 47, 2823-2830.
- 161) Daumann LJ, McCarthy BY, Hadler KS, Murray TP, Gahan LR, Larrabee JA, Ollis DL, Schenk G. Promiscuity comes at a price: catalytic versatility vs efficiency in different metal ion derivatives of the potential bioremediator GpdQ. *Biochim Biophys Acta.* **2013**, 1834, 425-432.
- 162) Kudo F, Eguchi T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics. *J Antibiot (Tokyo).* **2009**, 62, 471-481.
- 163) Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, Bouchon B, Bringer MA, Nougayrède JP, Oswald E, Bonnet R. ClbP is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides. *J Biol Chem.* **2011**, 286, 35562-35570.
- 164) Healy AR, Nikolayevskiy H, Patel JR, Crawford JM, Herzon SB. A Mechanistic Model for Colibactin-Induced Genotoxicity. *J Am Chem Soc.* **2016**, 138, 15563-15570.
- 165) Balskus EP. Colibactin: understanding an elusive gut bacterial genotoxin. *Nat Prod Rep.* **2015**, 32, 1534-1540.
- 166) Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kornberg A. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science.* **2001**, 293, 705-708.
- 167) Kuroda A, Takiguchi N, Gotanda T, Nomura K, Kato J, Ikeda T, Ohtake H. A simple method to release polyphosphate from activated sludge for phosphorus reuse and recycling. *Biotechnol Bioeng.* **2002**, 78, 333-338.
- 168) Mandala VS, Loh DM, Shepard SM, Geeson MB, Sergeyev IV, Nocera DG, Cummins CC, Hong M. Bacterial Phosphate Granules Contain Cyclic Polyphosphates: Evidence from 31P Solid-State NMR. *J Am Chem Soc.* **2020**, 142, 18407-18421.
- 169) Keren R, Mayzel B, Lavy A, Polishchuk I, Levy D, Fakra SC, Pokroy B, Ilan M. Sponge-associated bacteria mineralize arsenic and barium on intracellular vesicles. *Nat Commun.* **2017**, 8, 14393.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導ならびにご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室教授脇本敏幸先生に心より感謝の意を表します。また、多くの貴重な経験と研究者としての成長の機会を与えて下さいましたことに重ねて御礼申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、貴重なご助言ならびにご討論賜りました北海道大学大学院薬学研究院創薬有機化学教授周東智先生、有機合成医薬学部門教授市川聡先生、同部門講師薬師寺文華先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の要となった海綿動物からの脱リン酸化酵素の精製において一から懇切丁寧にご指導していただきました旭川医科大学生理学講座自律機能分野教授高井章先生に心より御礼申し上げます。また、実験後に生物進化の魅力や研究の醍醐味をご教授下さいましたことに併せて感謝の意を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ご討論ならびに貴重なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室教授阿部郁朗先生に心より感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、有益なご指導ならびにご討論を賜りました北海道大学大学院薬学研究科天然物化学研究室助教松田研一先生に心より御礼申し上げます。また、修士課程の頃よりご助言と励ましのお言葉を賜りました同研究室助教吉村彩先生に厚く御礼申し上げます。

私が学士の頃に研究者としての姿勢をご教授賜りました琉球大学理学部海洋自然科学科化学系教授田中淳一先生に厚く御礼申し上げます。また、修士課程において研究生活全般に加え生物活性試験の楚を親身にご教授賜りました大阪大学大学院薬学研究科天然物創薬学分野教授荒井雅吉先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ご討論ならびに貴重なご助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科水圏天然物化学教室教授松永茂樹先生に深く感謝致します。また、国際学会でお会いした際に成長の機会を与えて下さいましたことに重ねて御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、予備検討や酵素反応基質の調製を行ってくださった江上蓉子博士、CaL ホモログを有する *Duganella sacchari* の DNA シーケンサーによる遺伝子解析を行っていただきました北海道大学大学院生命科学院天然物化学研究室博士課程 2 年の Jabal Rahmat Haedar くん に心より感謝致します。また、同研究室に所属する皆様には、日々、多くのご助言を賜り、時には筋肉で語り合うなど皆様のおかげで楽しい博士課程 3 年間で過ごすことができました。心より感謝の意を表します。

最後に、研究生活に理解を示し、支えてくれた家族、友人に深く感謝の意を申し上げます。

令和 2 年 12 月 24 日
城森 啓宏