



Title	梯子状ポリエーテル化合物イエツソトキシンの結合タンパク質の同定と相互作用解析
Author(s)	氏原, 悟
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57993
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	うじ はら さとる
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 23566 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文名	梯子状ポリエーテル化合物イエッソトキシンの結合タンパク質の同定と相互作用解析
論文審査委員	(主査) 教授 村田 道雄 (副査) 教授 梶原 康宏 教授 高尾 敏文

論文内容の要旨

渦鞭毛藻によって生産される一連の梯子状ポリエーテル(LSP)天然物は、共通して梯子状構造を骨格にするにとかかわらず、エーテル環の配列、分子長や側鎖の違いによって多様な生理活性を示す。イオンチャネルを用いた競争阻害実験などから、本来異なる生理作用を示すLSPが共通の結合部位を有する事が明らかとなつておらず、LSP構造が共通に認識する受容体モチーフが存在する事が示唆された。この様な共通認識モチーフはLSPの生理活性発現機構を解明する重要な手がかりになるが、その詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では、LSP結合タンパク質を細胞抽出液から検出し、その類似性やLSPとの結合様式を精査することにより、共通認識モチーフならびにその分子認識機構を解明することを目指した。

本研究では、数多く存在するLSPの中でもイエッソトキシン(YTX)に着目した。YTXは渦鞭毛藻 *Protoceratium reticulatum* などによって生産されるLSPであり、神経毒性、マウス急性致死毒性、アポトーシス誘導活性など多岐にわたる生理活性を持つ事が報告されているがその作用機構の詳細は未解明である。YTXより誘導したビオチン化dsYTX (1, Fig.1) を、アビジンを介してアフィニティ樹脂に固定化した後、ヒト赤血球膜画分から結合性タンパク質のブルダウン実験を行った。SDS-PAGE分析の結果、YTXに特異的に結合する21 kDaのタンパク質群が検出された(Fig.2)。そこでこのタンパク質バンドに対し、トリプシン消化ならびに質量分析を行ったところ、Rasスーパーファミリーに属する種々のタンパク質、すなわちRap1A, Rap1B, K-Ras, RhoA, RhoC, Rac1, Rac2の混合物である事が分かった。これらの存在はウェスタンブロッティングによっても確認された。続いて、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて、Rap1AおよびH-RasについてYTXとの相互作用評価を行ったところ、これらが解離定数で 10^{-6} M程度の親和性で直接相互作用することが明らかとなつた。アフィニティ精製において異なるRasタンパク質が同時に分離された事、またSPR実験においてRap1AおよびH-RasがYTXに対して同等の親和性を示した事から、YTXがRasタンパク質を共通に認識する事が示唆された。Rasタンパク質は細胞の増殖・分化・アポトーシスの制御など、様々なシグナル伝達に関わっており、ヌクレオチド(GTPおよびGDP)の結合に依存したコンフォーメーション転換を行う事でシグナルを制御する。このうち活性化は、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)によって引き起こされる。続いてYTXの結合がRasに与える影響を調べるために、このようなRasの活性化機構に着目して蛍光測定およびSPR測定を行った。その結果、YTXがRasとGEFとの相互作用を阻害する事が明らかとなり、YTXがRasのGEF結合部位に結合している事が示唆された。また、Rasが誘導する抗アポトーシスシグナルを考慮すると、YTXがRasとGEFの相互作用を阻害することで、Ras活性化を抑

制し、結果としてアポトーシスを誘導している可能性が考えられる。

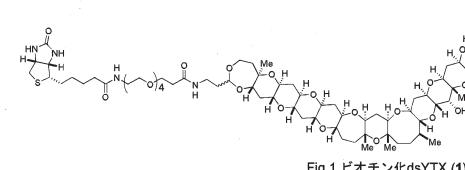


Fig.1 ビオチン化dsYTX (1)

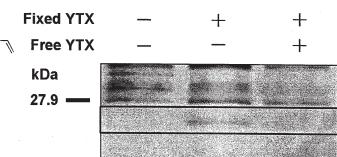


Fig.2 21 kDa YTX 結合タンパク質

論文審査の結果の要旨

強力で特異的な生物活性を有する二次代謝産物として、単細胞藻類が生産する梯子状ポリエーテル化合物群が知られている。多様な梯子状ポリエーテルが共通のタンパク質に結合する現象が報告されて以来、これらポリエーテル構造を認識するタンパク質の高次構造(結合モチーフ)が想定されるようになった。そのなかで、イエッソトキシンは、食用の二枚貝に含まれることに加えて、硫酸エステルを有する特異な化学構造、およびアポトーシス誘導などの生物活性を有することで研究者の注目を集めている。

氏原君は博士論文研究において、結合モチーフを解明するためにイエッソトキシンの分子標的について生物化学的研究を行った。まず、渦鞭毛藻 *Protoceratium reticulatum* の培養によって得た試料を、化学的に樹脂に結合させることによって標的探索用のコンジュゲートを調製した。これを用いて、赤血球の膜各分および培養細胞から標識的分子を探索した結果、数種のタンパク質の検出に成功した。さらに、共同研究のもと、高速液体クロマトグラフィー・質量分析を用いることによって、赤血球の膜各分からRap-1A, Rho A, Rac1, K-RasなどのRasスーパーファミリーに属するタンパク質7種を同定することに成功した。このうち3種のタンパク質については、ゲル電気泳動上の特異抗原による検出(Westernプロットティング法)によつても、同タンパク質が結合標的であることが確かめられた。また、これらのタンパク質について、表面プラズモン共鳴法を用いた親和性測定を行つたところ、Rap-1AおよびK-Rasが解離定数にして数マイクロモルの比較的高い親和性でイエッソトキシンと結合することが明らかとなつた。さらに、Rap-1Aについて、その活性化因子であるGEFとの結合に与える、イエッソトキシンの影響を調べたところ、両者の結合が顕著に阻害されることが見出された。この結果は、Rap-1A上のイエッソトキシン結合部位が、GEFの結合部位と一部重複する可能性を示している。このように、イエッソトキシンがRasタンパク質の機能を改変することによって、アポトーシスなどの生理作用を発現する可能性を示した。また、Ras類には、従来想定されていた結合モチーフであるαヘリックスが比較的小なく、また、分子量も小さいので、結合モチーフを同定する際の有用なモデルタンパク質となることが期待される。以上のように、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。