

Title	梯子状ポリエーテル化合物イエッ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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	うじ ほん きとる 氏 原 悟
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 2 3 5 6 6 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 理学研究科化学専攻
学位論文名	梯子状ポリエーテル化合物イエツ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もかかわらず、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っており、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 の中でもイエツトキシニン(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 より誘導したピオチン化 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、ヒト赤血球膜面分から結合性タンパク質のプ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ト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った。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、グアン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、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ことが示唆された。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。

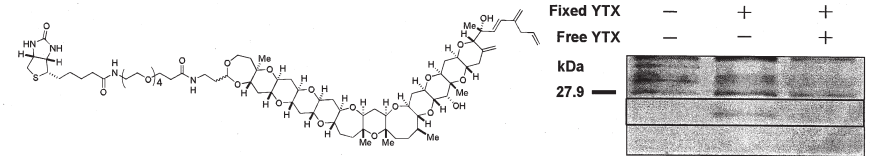


Fig.1 ピオチン化dsYTX (1)

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、イエツトキシンは、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ツトキシニ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標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 ブロットング法)によっても、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ったところ、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ツトキシニンと結合することが明らかとなった。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、イエツトキシニ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 上のイエツトキシニン結合部位が、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、イエツトキシニンが 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少なく、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。