

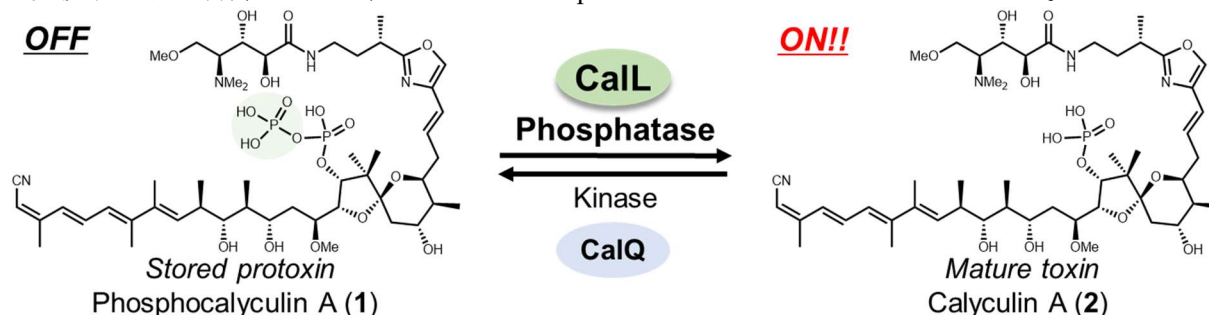


## ホスホカリクリン脱リン酸化酵素の同定 Identification of phosphocalyculin phosphatase

城森啓宏<sup>1</sup>、松田研一<sup>1</sup>、江上蓉子<sup>1</sup>、高井章<sup>2</sup>、脇本敏幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 北大院薬・<sup>2</sup> 旭川医大)

我々は、伊豆半島近海に生息する海綿動物 *Discodermia calyx* が、組織傷害に応じた迅速な生物変換によって化学防御物質を生産する現象を見出している。実際に海綿 *D. calyx* の MeOH 抽出液から単離されるピロリン酸型プロトキシンの phosphocalyculin A (**1**)は、海綿組織の損傷に応じて瞬時に脱リン酸化され、細胞毒性が 1,000 倍強いモノリン酸型の calyculin A (**2**)に生物変換される。また、calyculin 類の生産者である難培養性の共生細菌 *Entotheonella* sp. の 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 は、活性型の **2** をリン酸化し **1** へと不活性化する酵素であることが明らかにされた<sup>1)</sup>。しかしながら、本活性制御機構の鍵となる活性化を担う酵素の同定には、至っていない。そこで本研究では、リン酸化/脱リン酸化を介した細胞毒性物質の活性制御機構を解明するために **1** 特異的脱リン酸化酵素の同定を目指した。

初めに、海綿粗酵素抽出液より天然由来の脱リン酸化酵素の取得を試みた。脱リン酸化活性を指標に、伊豆諸島式根島産 *D. calyx* (620 g) より得た粗酵素抽出液 (2.1 g) を各種カラムクロマトグラフィーで分画し、比活性が約 500 倍の酵素画分 (17.6 μg) を得た。二次元電気泳動の結果、目的の脱リン酸化酵素は分子量約 40-45 kDa かつ塩基性タンパク質 ( $pI=8-10$ ) であった。**1** の生産者である難培養性共生細菌 *Entotheonella* sp. の calyculin 生合成遺伝子クラスターには metallophosphatase と相同性を示すタンパク質 CalL (43 kDa,  $pI=9.11$ ) がコードされている。CalL の特徴は本酵素と酷似していたため、CalL が **1** の脱リン酸化酵素であると推察した。実際に LC-MS/MS 解析の結果、活性画分から得た約 44 kDa のバンドは CalL であることが明らかになった。一方で、大腸菌の異種発現によってシャペロン共発現下で可溶性の組換えタンパク質 CalL を調製し、様々な反応条件を検討したが、活性は認められなかった。そこで、天然酵素の分画方法を適用し、組換えタンパク質 CalL の粗精製を進め、シャペロンを含まない組換えタンパク質 CalL 画分を得た。活性試験の結果、得られた CalL 画分が **1** の脱リン酸化活性を示した。本結果より、海綿組織の傷害が引き金となり phosphocalyculin A が脱リン酸化酵素 CalL によって活性化され、化学防御物質 calyculin A へと瞬時に変換する活性制御を共生細菌 *Entotheonella* sp. が担っていることが明らかになった。



<参考文献>

- 1) T. Wakimoto, Y. Egami, Y. Nakashima, Y. Wakimoto, T. Mori, T. Awakawa, T. Ito, H. Kenmoku, Y. Asakawa, J. Piel, I. Abe, *Nat. Chem. Biol.* 2014, **10**, 648

発表者紹介

氏名 城森 啓宏 (じょうもり たかひろ)

所属 北大院生命科学 薬学研究院

学年 (博士後期課程二年)

研究室 天然物化学研究室

