

## 研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		海綿由来細胞毒性物質の活性制御機構の解明			
研究テーマ (欧文) AZ		Regulatory mechanism of the cytotoxicity of a sponge-derived cytotoxin			
研究氏 代 表 名 者	カナ CC	姓) ワキモト	名) トシユキ	研究期間 B	2014 ~ 2015 年
	漢字 CB	脇本	敏幸	報告年度 YR	2015 年
	ローマ字 CZ	Wakimoto	Toshiyuki	研究機関名	北海道大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		北海道大学大学院薬学研究院・教授			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>Calyculin 類は伊豆半島沿岸に生息するチョコガタイシカイメン <i>Discodermia calyx</i> より単離された強力な細胞毒性物質であり、タンパク質脱リン酸化酵素 1 及び 2A を特異的に阻害する。分子内に有するリン酸エステル基がリン酸化セリン、スレオニン残基のミミックとして機能し、強力な酵素阻害活性を示すと考えられている。先行研究において我々は海綿 <i>D. calyx</i> のメタゲノム DNA より、calyculin 生合成遺伝子のクローニングを行った。さらに遺伝子クラスター上流にコードされたリン酸基転移酵素を大腸菌にて異種発現し、その機能解析を試みた。その結果、calyculin A の分子内リン酸エステル基がさらにリン酸化され、より低毒性な phosphocalyculin A が生じることが分かった。Phosphocalyculin A は従来の抽出、単離工程では見出されていなかった新規類縁体であった。そこで、海綿 <i>D. calyx</i> より粗酵素液を調製し、プロドラッグ体 phosphocalyculin A と反応させた。その結果、<i>D. calyx</i> 特異的に存在する酵素により、phosphocalyculin A の脱リン酸化が進行し、calyculin A が生じた。これらの実験結果は、calyculin 類のリン酸化-脱リン酸化を介した巧妙な activated chemical defense 機構が海綿 <i>D. calyx</i> に内在することを示している。さらに、活性化酵素である脱リン酸化酵素を同定するために、phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を指標として、陰イオン交換やゲルろ過など各種クロマトグラフィーを用いて海綿粗酵素液の分画精製条件を検討した。その結果、粗酵素液より比活性が約 100,000 倍濃縮した活性タンパク質画分が得られ、SDS-PAGE において約 50 kDa 付近に活性画分特異的なバンドが確認できた。現在、MS/MS 解析により得られたタンパク質の同定を試みている。</p>					
キーワード FA	Calyculin A	生合成	細胞毒性	リン酸化	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>	Calyculin: Nature's way of making the sponge- derived cytotoxin							
	著者名 <sup>GA</sup>	T. Wakimoto, Y. Egami, I. Abe	雑誌名 <sup>GC</sup>	Natural Product Reports					
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>	2	0	1	6	巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

#### 欧文概要<sup>EZ</sup>

Calyculin A is the major secondary metabolite of the Japanese marine sponge *Dicodermia calyx*. It exhibits potent cytotoxic activity, which is attributable to the specific and selective inhibition against protein phosphatase 1 and 2A. The phosphate functionality embedded in the molecule is considered to be essential for the enzyme inhibition as phospho-Ser or -Thr mimic. In the course of our study on the biosynthesis of calyculin A, we cloned the biosynthetic gene cluster of calyculin A from the sponge metagenome. The functional analysis of a phosphotransferase encoded in the gene cluster revealed that the phosphate group is further phosphorylated by the phosphotransferase to generate less toxic pyrophosphate, phosphocalyculin A. The crude enzyme fraction prepared from the sponge *D. calyx* efficiently dephosphorylated phosphocalyculin A to afford calyculin A. Thus, the activated chemical defense system involving phosphorylation and dephosphorylation processes appeared to exist in the sponge-microbe association. To further clarify this complicated bioconversion mechanism, we attempted to isolate the phosphatase involved in the activation step of phosphocalyculin A. After trying several protocols to isolate the phosphatase, we found that the activity was 100,000 times concentrated by using anion exchange and gel filtration chromatography. The resulting fraction was subjected to SDS PAGE, which showed the band at around 50 kDa specifically detected in the active fraction. In order to identify the phosphatase, MS/MS analysis of the protein is currently under investigation.