

蛋白質と小分子有機化合物の相互作用解析

ホスファターゼ阻害剤ホスラクトマイシン

理研中央研究所 長田裕之

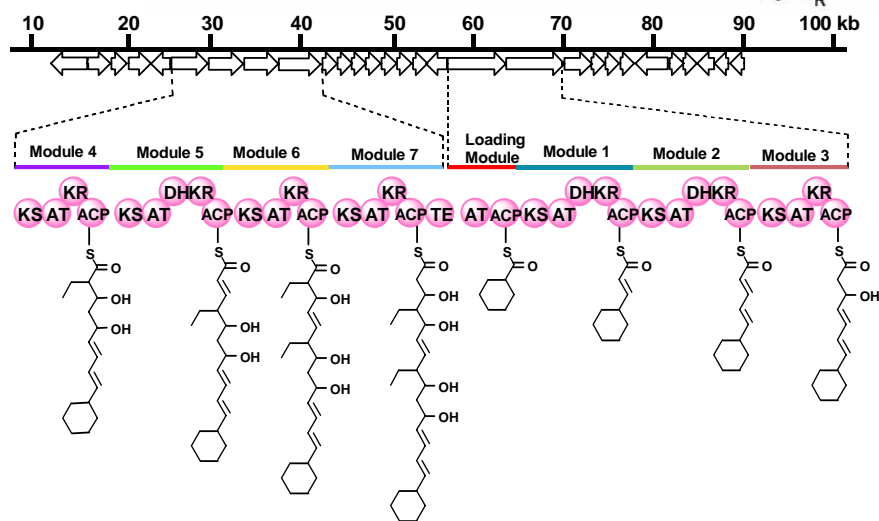
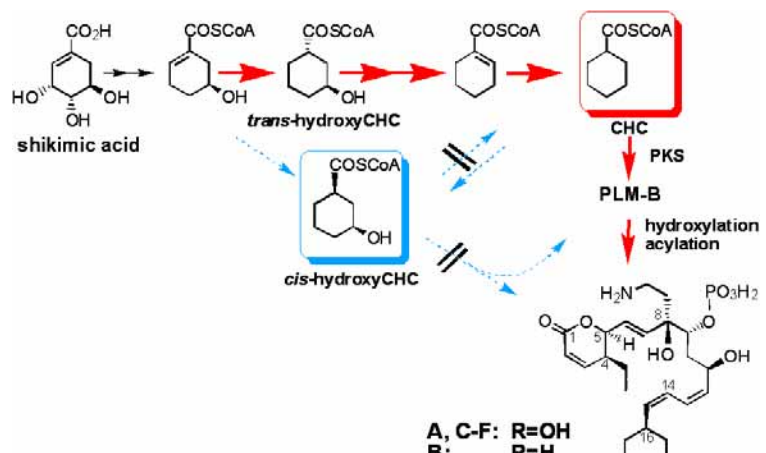
蛋白質脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）の一種である PP2A は、真核細胞の代謝調節、シグナル伝達、転写、細胞増殖など幅広い細胞機能に関与している。ホスファターゼ研究では、オカダ酸やトートマイシンといった天然由来の低分子阻害剤がバイオプローブとして重要な役割を果たしてきた。我々は、放線菌より単離したホスラクトマイシン(PLM)類が、PP2A 選択的な阻害活性を有することを明らかにした。本発表では、放線菌の遺伝子改変により PLM の単一性分だけを生産させることに成功した研究(A)と、化学生物学的手法により PLM の PP2A に対する特異性を解明した研究(B)を紹介する。

(A) 放線菌から単離される PLM 類には、シクロヘキサン環に様々なアシル側鎖が結合した類縁体が知られている。類縁体間でホスファターゼ阻害活性にあまり差がないことから、アシル基が付いていない PLM を単一性分として生産させることができれば、

精製が簡略化できるので実用化への道が広がる。従来の研究から、シクロヘキサン環は、シキミ酸から数段階の脱水・還元を経て生合成されたシクロヘキサンカルボン酸 (CHC) に由来することが知られているが、PLM の生合成経路には、次の 2 通りの可能性が考えられた。

1) 先ずシクロヘキサン環が取り込まれて、その後で水酸基が導入される場合。

2) 水酸化された CHC が取り込まれる場合である。そこで、 $[2-^{13}C]$ シキミ酸を合成し放線菌培養液に添加し、得られた PLM 類に取り込まれた ^{13}C の分布を NMR で解析



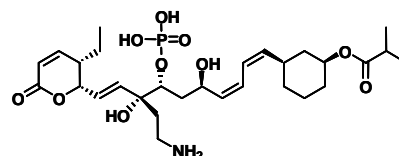
した。また、[7-¹³C]CHC、[7-¹³C]-3-ヒドロキシ CHC のシス体およびトランス体をそれぞれ合成・投与し、LC-MS による取り込み効率の比較、¹³C-NMR による取り込み位置の分析を行った。以上の実験結果から、PLM 類は CHC をスターターとして生合成され、18 位の水酸基は、生合成の後期 (PLM-B が生成した後) に導入されることが明らかとなった。

さらに、この水酸化反応は P450 によって触媒されることが示唆されたので、K. Reynolds 博士らとの共同研究により、PLM 生合成遺伝子クラスターをクローニングし、PLM 生合成に關与する 2 つの P450 遺伝子 (plmS2 と plmT4) をノックアウトした。plmS2 遺伝子をノックアウトした場合に、他の PLM 誘導体を生産せずに、PLM-B を選択的に生産することが可能になった。

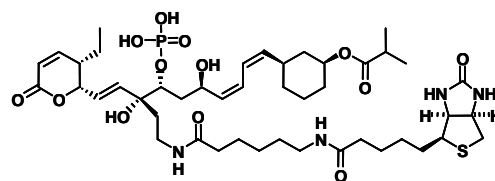
(B) 我々は、PLM が PP2A の酵素活性を阻害することは明らかにしたが、PP2A との物理的相互作用については未解明であった。そこで、PP2A と PLM の直接的な相互作用を解析する目的で、ビオチン標識した PLM (bio-PLM) を合成した。培養細胞に bio-PLM を処理し PLM の結合蛋白質を回収したところ、PP2A 触媒サブユニット (PP2Ac) と PLM が細胞内で直接結合していることが示唆された。次いで PP2Ac における PLM の結合部位を明らかにするために、種々の変異型 PP2Ac を作製し、結合アッセイを行った。269 番目のシステインをセリンに置換した変異体のみが bio-PLM と共有結合できなくなったことから、この部位が PLM との共有結合

に必須であることが示唆された。PLM と共有結合できない C269S 変異体は、野生型よりも PLM に対して約 50 倍耐性を示すことが明らかになった。また、PP2Ac の C269 は同じ PP2A ファミリー蛋白質間で保存されているので、PLM は PP2A ファミリーメンバーである PP6 とも結合したが、C269 に相当するアミノ酸残基が保存されていないホスファターゼ PP1 は、PLM とは共有結合しないし、PLM に耐性であった。しかし、C269 に相当する部位の F276 をシステインに置換した PP1 変異体は、PLM と共有結合し得ることが明らかになった。PP1 野生型は PLM にも非感受性であったが、F276C 変異体は PLM に感受性になった。

phoslactomycin A; PLM



biotinylated-phoslactomycin A; bio-PLM



		$\beta 12$		$\beta 13$	
PP1 α	263	LVTL	FSAPNYCGEFDNA	GAMMSV	DETL..
PP2A α	256	VVTI	FSAPNYCYRCGNQ	AAIMEL	DDTL..
PP4	253	VLTV	WSAPNYCYRCGNV	AAILEL	DEHL..
PP6	252	LVTV	WSAPNYCYRCGNI	ASIMVF	KDVN..
PP2B α	332	LITI	FSAPNYLDVYNNK	AAVLKY	ENNV..
PP5	435	CVTV	FSAPNYCDQMGNK	ASYIHL	QGSD..
PP7	418	VVTI	FSASNYEEGSNR	GAYIKL	CSGT..