

海産生物由来抗ウイルス活性物質 eudistomin C の作用機構解析

工藤 駿 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

カリブ海産のホヤ *Eudistoma olivaceum* から単離された eudistomin C (EudiC)(Fig. 1) は、強い抗ウイルス活性や抗腫瘍活性を示すことが報告されている¹⁻³⁾。しかしその細胞毒性から抗ウイルス剤としての開発は進んでおらず、標的分子や作用機構は不明のままである。EudiC の標的分子や作用機構の解明は、EudiC の抗ウイルス活性と細胞毒性を分離し、抗ウイルス剤としての開発につながるるとともに、新たな薬剤標的分子の発見や、薬剤と標的分子との相互作用や結合様式の解明を通じて新たな薬剤開発基盤となることが期待される。

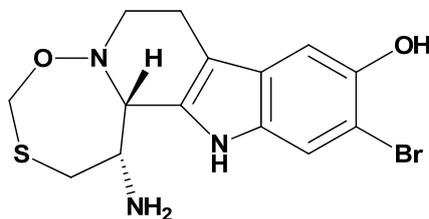


Fig. 1 Eudistomin C (EudiC) の構造

そこで当研究室では EudiC の作用機構の解明、及び標的分子の同定を目指している。標的分子の同定には、遺伝学的手法や Affinity Probe を用いた手法などがある。遺伝学的手法を用いた標的分子同定は、薬剤耐性変異株の単離から始まり、変異遺伝子の同定後、変異遺伝子がコードするタンパク質が薬剤標的分子であるかを様々な手法により検討する。一方、Affinity Probe を用いた手法では、リンカー誘導体や RI ラベル体を使って直接相互作用している結合分子を取得し、そのタンパク質を同定後、標的分子であるか検討する。先行研究では遺伝学的アプローチを進め、多剤超感受性酵母⁴⁾を用いて EudiC 耐性変異株の取得に成功するとともに(Fig. 2)、耐性遺伝子の解析が進められている。

今回、私はもう一つの手法である Affinity Probe を用いた手法により、EudiC 標的分子の同定を試みた。

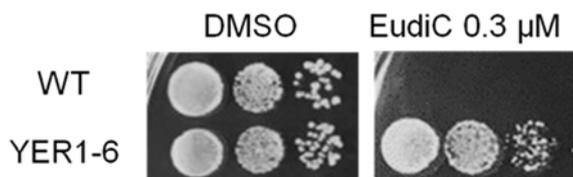


Fig. 2 EudiC 優性耐性変異株の取得

野生株 WT は EudiC を含む寒天培地で生育できないが、EudiC 特異的優性変異株 YER1-6 は EudiC 耐性を示し、生育する。

方法

1. EudiC—結合分子複合体の解析

出芽酵母の細胞抽出液に、ビオチンで標識化した EudiC (ビオチン化 EudiC) またはコントロールとしてビオチン部分のみの linker を添加し、2 時間反応させた。その後ストレプトアビジンビーズを 30 分処理し、遠心によりビオチン化 EudiC 結合タンパク質を回収した。

2. EudiC 結合分子の性質検討

細胞中の EudiC 結合タンパク質の性質を調べるため、分子の大きさや密度によってタンパク質や複合体などを分離することができるスクロース濃度勾配遠心法を用いた。10%~50%のスクロース濃度勾配を形成した遠心チューブに出芽酵母細胞抽出液を重層し、40,000 rpm, 4 °C, 2 時間超遠心を行った。沈降係数ごとに分離した各画分から、1 の手法で EudiC 結合分子の存在する画分を検討した。

結果・考察

詳細は発表会にて報告する。

謝辞

プローブを合成していただいた、名古屋大学大学院 福山透 特任教授、横山聡 准教授に深く感謝します。

参考文献

- 1) Rinehart Jr., K. L. *et al.*, Eudistomins C, E, K, and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1524-1526 (1984)
- 2) Rinehart Jr., K. L. *et al.*, Eudistomins A-Q, β -carboline from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3378-3387 (1987)
- 3) Lake, R. J. *et al.*, Eudistomins From the New Zealand Ascidian *Ritterella sigillinoides*, *Aust. J. Chem.*, **42**, 1201-1206 (1989)
- 4) Chinen T., Ota Y. *et al.*, Construction of Multidrug Sensitive Yeast with High Sporulation Efficiency, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)