

P411

Molecular Recognition of Chromoprotein Antitumor Antibiotic C-1027

Institute of Applied Biochemistry and Center for Tsukuba Advanced Research Alliance,
University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

Toshiyuki Tanaka and Midori O. Ishitsuka

[Introduction]

C-1027 is a potent antitumor antibiotic, in which a nonprotein chromophore is tightly and specifically bound to an apoprotein. The chromophore with an unusual structure, that is responsible for DNA cleavage, is very labile when isolated, but greatly stabilized through binding to the apoprotein. Their binding structure and stabilizing interactions are very interesting problems in terms of molecular recognition and protein transport. We have already determined the solution structures of C-1027 apoprotein and its complex with the aromatized chromophore (aro-chr) by homonuclear 2D NMR analysis, and suggested several important interactions between the chromophore and the apoprotein. To confirm the predicted interactions, we made several mutant apoproteins whose specific amino acid residue of the binding pocket is replaced with the amino acid of different type and examined their binding abilities for aro-chr using heteronuclear NMR experiments.

[Materials & Methods]

Uniformly ^{15}N -labeled or unlabeled recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* and purified to homogeneity for NMR studies. All samples were dissolved to 0.45 mM in either 95% $\text{H}_2\text{O}/5\%$ D_2O or 99.996% D_2O containing 20 mM sodium acetate (pH 5.0). Homonuclear 2D COSY and NOESY, 2D ^1H - ^{15}N HSQC, and 3D ^{15}N -edited NOESY spectra were recorded at 30°C on a UNITY-INOVA 500 spectrometer. For the titration experiments, the HSQC spectra with 0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, and 2.0 equivalents of aro-chr were recorded.

[Results & Discussion]

Sequence-specific backbone assignments of mutant proteins with or without aro-chr have been made by analyzing homonuclear 2D COSY and NOESY, and 3D ^{15}N -edited NOESY spectra with the help of those of wild-type (WT) apoprotein in the two states. For the WT protein, most of the HSQC cross peaks that change their peak intensities and locations significantly on the addition of up to one equivalent of aro-chr are derived from the residues of the binding pocket. No further changes were detected beyond 1 bound aro-chr/WT protein. Similar tendency was observed for the D43N mutant, while two equivalents of aro-chr were needed to saturate the D101N mutant. This indicates that D101 is involved in the interaction with aro-chr, which is consistent with the complex structure determined by 2D NMR analysis where either the carboxylate of D101 or the imidazole ring of H104 was predicted to interact with the C18 amino group of aro-chr.

P412

シガトキシン合成アナログのNaチャンネル結合能と抗体調製アプローチ

東北大・農 佐竹 真幸

【目的】熱帯亜熱帯のサンゴ礁域で多発する魚類食中毒シガテラの原因毒シガトキシン(CTX)は、ドクウツボより単離され、その化学構造が決定された¹⁾。CTXはNaチャンネルのサイト5と呼ばれる部位に特異的に結合し、細胞内へのNaイオン流入を増大させる。しかしながら、その作用発現機構は未解明なままである。今回はCTXの作用発現に必須な構造部分を明らかとするために、合成フラグメントを用いた競合的Naチャンネル結合試験を行った。また、シガテラは、南方の魚類資源の利用を著しく制限するため、簡便な定量法の開発が望まれている。CTX類と同じ部位に結合するポリエーテル化合物である神経性貝毒原因物質ブレベトキシン-B2 (BTXB2)²⁾を用いて抗体調製の予備実験を検討した。

【実験】CTXアナログは、平間グループにより合成された化合物を用いた。CTXの両末端のエーテル環をエチレングリコールで架橋したCTXアナログを、PbTx-3との競合的Naチャンネル結合試験に供した。BTXB2は、神経性貝毒原因物質として、ニュージーランド産ミドリイガイより単離した。BTXB2を還元反応によりPbTx-9へと変換した後、ヘミサクシネート体へと導いた。ヘミサクシネート体を活性エステルにした後、KLHおよびBSAと結合させた。

【結果・考察】試験した2種類の合成アナログの内1成分に結合阻害活性が検出された。結合阻害活性は、130 μM で約30%であった。CTX類と比較してその活性は著しく弱かったが、合成アナログで初めて阻害活性が検出され、CTXの活性発現に分子の長さが重要であることが示唆された。また、赤潮や貝中毒に関連するBTX類縁体のコンジュゲートの作製に成功した。PbTx-9は、1molのBSAに対し2mol結合していた。今後この方法を用いて分子末端に1級水酸基を有するM-セコCTX3Cとタンパクとの結合を試みる予定である。

【文献】1) M. Murata, A.-M. Legrand, Y. Ishibashi, M. Fukui and T. Yasumoto, *J. Amer. Chem. Soc.*, 112, 4380-4386 (1990).

2) K. Murata, M. Satake, H. Naoki, H. F. Kaspar and T. Yasumoto, *Tetrahedron*, 54, 735-742 (1998).