

## 審査の結果の要旨

氏名 高島 英造

本研究は新規抗トリパノソーマ薬の開発のための標的分子について知見を得る目的で、クルーズトリパノソーマ原虫のフマル酸還元酵素について酵素学的に解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

### 1. フマル酸還元酵素の細胞内局在性

新規抗トリパノソーマ薬開発にむけて、クルーズトリパノソーマ原虫の最終代謝産物であるコハク酸の産生経路について着目し、まず始めにコハク酸産生の末端に位置すると考えられる原虫のフマル酸還元酵素(FRD)について酵素活性を測定した。人工電子供与体である Methylviologen (MV)を用いて測定したFRD活性(MV-FRD)は細胞質画分とミトコンドリアに局在し、そのうち約40%が細胞質画分に局在していた。また、NADHの還元力によってフマル酸を還元するFRD活性(NADH-FRD)は同じくミトコンドリアに93%局在していた。

### 2. 可溶性 MV-FRD とジヒドロオロト酸脱水素酵素

可溶性MV-FRDを持つ生物は非常に少なく、宿主であるヒトには存在しないことから、本酵素は化学療法剤開発において有効な標的となると考えられたため、原虫の可溶性MV-FRDに焦点を絞って生化学的な解析を行った。まず、ゲルろ過を用いて *T. cruzi* 細胞質画分に局在する可溶性MV-FRDを部分精製した。その結果、二峰性のMV-FRDピークを得た。さらに、そのうち低分子量(~70kDa)のピークが、ピリミジン新規合成系の第四酵素であるジヒドロオロト酸脱水素酵素活性(DHOD)のピークと一致する事を見出した。これらの結果から *T. cruzi* の可溶性MV-FRDは少なくとも二種類の蛋白質からなり、そのうち低分子量のピーク(可溶性MV-FRDの約40%)は *T. cruzi* DHOD由来であることが強く示唆された。この点を確認するために、組換えDHOD(rDHOD)を大腸菌でpET systemによって発現させ、Nickel-agarose chromatographyを用いて精製した。得られた精製標品は、99%以上の純度を持っており、DHODならびにMV-FRD活性を触媒した。また、抗rDHOD抗体を用いたImmunoaffinity chromatographyによって、*T. cruzi* 細胞質画分からCBB染色でほぼ単一のバンド(~34kDa)にまで *T. cruzi* DHODを精製した。精製標品はDHOD、FRD活性、両酵素反応を触媒し、また、N末端アミノ酸配列をエドマン分解法により決定した結果、*T. cruzi* DHOD 遺伝子から予測されるアミノ酸配列と一致した事から、少なくとも2種類ある可溶性FRDのうちの 하나가、*T. cruzi* DHODであることが明確になった。

ゲルろ過とSDS-PAGEによる分子量のデータから、本酵素は溶液中でホモダイマーとして存在す

ると考えられた。さらに動的散乱解析によって、rDHOD が非常に均一な試料であることと、蛋白質分子が球形であることを仮定すると約 70kDa (35kDa×2) の分子量を持つことを確認した。また、分光学的解析では他の生物種由来の DHOD と同様、ジヒドロオロト酸(DHO)特異的なフラビンに還元による 350nm の吸光度の減少が観察された。

### 3. *T. cruzi* DHOD の酵素学的解析

本研究で *T. cruzi* の DHOD が MV からの還元力をフマル酸に伝達する MV-FRD 活性を持つということがはじめて見出されたので、さらにその酵素学的性質を解析した。精製した *T. cruzi* DHOD は、フマル酸を電子供与体として用いた場合、酸素と比較して 12.6 倍の DHOD 活性を示した。これは核酸配列の相同性から同一のファミリー (ファミリー 1A) に属すると考えられる分裂酵母、*Enterococcus faecalis*、*Lactococcus lactis* の DHOD と比較すると高い活性であり(それぞれ 4.3, 1.4, 3.0 倍)、*T. cruzi* DHOD が、生理的にも特にフマル酸還元に関わっていることが示唆された。

速度論的解析では、rDHOD の DHO およびフマル酸に対する  $K_m$  は原虫由来の DHOD とほぼ同一であった。そこで rDHOD を用いてさらに酵素学的解析を進めた。DHOD の Dead-end 阻害剤であるバルビツール酸は、DHO に対して拮抗的、フマル酸に対しては反拮抗的に *T. cruzi* DHOD を阻害した。この事は本酵素が Ping-pong Bi-Bi 機構で DHOD 活性を触媒している事を示している。またオロト酸は DHOD の生成物であり、他のファミリー 1A 酵素の DHOD 活性を精製物阻害する事が知られているが、rDHOD もオロト酸によって効果的に阻害された。このように *T. cruzi* DHOD はファミリー 1A に属する酵素であることが生化学的に確認された。さらに、MV 存在下の DHOD 活性の酵素学的解析から、MV の酸化還元部位の同定を試みた結果、MV は DHO と拮抗的に DHOD を阻害するという事を見出し、MV の結合部位は生理的な基質結合部位である DHO の結合部位と同一あるいは近傍に存在する事を示した。

これらの結果から、*T. cruzi* DHOD はヒトに存在する膜結合性の DHOD とはその細胞内局在性、基質特異性が大きく異なっている事が明確となった。また大腸菌内で機能的に発現させた rDHOD は原虫由来の *T. cruzi* DHOD と生化学的に同等の機能を持っていることから、この rDHOD を用いてさらに *T. cruzi* DHOD の分子レベルでの解析を進めることによって、新規抗トリパノソーマ薬の開発に大きく寄与できると期待された。

以上、本論文はクルーズトリパノソーマ原虫のフマル酸/コハク酸代謝およびピリミジン代謝の基礎的研究であり、新規抗トリパノソーマ薬の開発に不可欠な解析である。本研究はフマル酸を基質とする酵素群、特に *T. cruzi* DHOD を標的とした阻害剤の探索に重要な貢献をしていると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。