

## 審査の結果の要旨

氏名 長内理大

カイチュウは、虫体が大きく、また、寄生虫独特の代謝系を発達させていることから、寄生虫の中では、比較的生化学的解析が容易であり、寄生虫研究のモデル生物として非常に有用である。本論文では、カイチュウ複合体 II の焦点を当て、抗寄生虫薬の開発という観点から、哺乳類とは著しく性質の異なるミトコンドリア複合体 II を生化学的に詳細に解析している。

### (1)カイチュウ成虫ミトコンドリアの大量調製ならびにカイチュウ複合体 II の精製

カイチュウは、実験室での培養法が確立しておらず、現在でも屠殺中の豚より収集していることから、本論文では、まず、同量のカイチュウから効率よくミトコンドリアを調製する方法を確立している。本論文では、従来用いられていた MSE 液(マンニトール、スクロースを用いた等張液)にかえ、Chappell-Perry 液という哺乳類骨格筋のミトコンドリア調製に用いられる方法を応用して、活性、タンパク質量とも収率の高いミトコンドリア調製の方法を確立した。精製法についても、これまで報告されている方法は、純度、活性とも低く、本論文で目標としている詳細な生化学的解析や結晶化による構造解析の実験には適さないことから検討を加え、新たに、DEAE-sepharose fast flow カラム、SOURCE15Q カラムの 2 種の陰イオン交換カラムを用いた方法を確立している。この方法では、最終標品の純度はほぼ 100%であり活性も非常に高い。また、これまで哺乳類の複合体 II の精製で問題となっていた、ヘム b や FAD などの補欠分子族の脱離もみとめられず、本論文で行う生化学的解析、結晶化実験に適した方法といえる。

### (2)カイチュウ複合体 II の酵素学的解析

前述の精製で得られたカイチュウ複合体 II の精製標品を用いて、次に酵素学的な解析が行っている。まず、この酵素が触媒するコハク酸酸化、フマル酸還元それぞれの基質である、コハク酸、フマル酸、ユビキノン、ロドキノンについて、ミカエリス定数を求め、カイチュウ複合体 II は、牛心筋複合体 II に比べ、フマル酸に対して非常に高い親和性を持っていることを見出した。次に、種々の生物種の複合体 II 阻害剤によるカイチュウ複合体 II の阻害を調べている。この結果、これまで、カイチュウ複合体 II を阻害するとされていたチアベンダゾールが活性測定に用いる人工的電子受容体 DCIP への非特異的な電子の流れを阻害し、キノンへの電子伝達を阻害しないこと、牛心筋複合体 II の阻害剤である、TTFA やカルボキシンはカイチュウ複合体 II を阻害しないこと、同じフマル酸還元活性を触媒するピロリ菌複合体 II を阻害するオキサニテルはカイチュウ複合体 II を阻害しないことを見出した。これら

はすべて、カイチュウ複合体 II が酵素学的に独特な性質を持つことを示し、複合体 II が抗寄生虫薬の標的として優れていることを示唆するものである。さらに、真菌複合体 II の阻害剤で農薬として現在も用いられているフルトラニルは 1  $\mu$ M という低い濃度でカイチュウ複合体 II を 50% 阻害するが、牛心筋複合体 II では、 $IC_{50}$  が 50 倍以上高く、この化合物が複合体 II を標的とした抗寄生虫薬のリード化合物として有望であることを示した。

### (3) カイチュウ複合体 II の結晶化

本論文は、複合体 II を標的とした抗寄生虫薬の開発を目標としていることから、次に、立体構造に基づく薬剤開発を目指して複合体 II の結晶化を試みている。複合体 II は 4 サブユニットからなる膜タンパク質であり、酵素学的に不安定でもあることから、これまで、細菌類で 2 種結晶構造解析の報告があるのみである。本論文では、補欠分子族を失うことなく、また高い活性を保持したまま複合体 II を精製し、また、拮抗阻害剤であるマロン酸の添加によって活性を長く安定に保つことを見出した。その上で、界面活性剤を含めた種々の結晶化条件を検討し、大きさ 30  $\mu$ m の結晶を再現性良く得る条件を見出している。この結晶をもとに立体構造の解明が進めば、複合体 II を標的とした抗寄生虫薬の開発に大きく貢献すると考えられる。

以上、本論文においては、抗寄生虫薬開発の第一段階として標的となる複合体 II の精製、薬剤開発において重要な基礎情報となる酵素学的な解析、阻害剤の検討、さらに、立体構造に基づく薬剤開発を目指した結晶化実験を行っている。精製においては、これまで問題となっていた補欠分子族の脱離による活性の低下を克服し、阻害剤の検討においてはフルトラニルがカイチュウ複合体 II を選択的に阻害することを見出している。また、困難とされている複合体 II の結晶化についても、結晶を再現性良く得る条件を見出した。

これらの知見は、寄生虫の巧みな宿主への適応機構の解明につながるばかりでなく、現在、特に発展途上国で最も重要視されている問題のひとつである寄生虫症対策に大きく貢献するものであり、博士(薬学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。