

審査の結果の要旨

氏名 山下哲生

多くの寄生性蠕虫は、宿主体内という嫌氣的な環境に適応するため、宿主哺乳類の好氣的呼吸鎖電子伝達系とは、電子伝達の方向性、基質特異性が異なる嫌氣的エネルギー代謝系を保有している。この嫌氣的呼吸鎖電子伝達系の酵素複合体 I、複合体 II において、宿主における電子伝達体、ユビキノン(UQ)、と構造の異なる、ロドキノン(RQ) の認識に関わる部位(RQ還元部位)は宿主との差異を利用した薬剤標的的部位として有効である。本論文では、このような寄生虫類に特有なRQを基質にする呼吸鎖複合体Iのキノン還元部位に焦点を当て、坑寄生虫薬の開発という観点から、さらに、未だ解明されていない複合体 I の反応機構についての知見を得ることを目的として、複合体 I に特異的な阻害剤を用いて回虫複合体 I のキノン還元部位を生化学的に詳細に解析している。

1. 複合体 I の酵素活性測定

複合体 I の NADH-キノン還元活性の測定は、一般的に好気条件で行うが、回虫成虫ミトコンドリアを試料として用いた場合、同じ条件下ではミトコンドリアと NADH を反応溶液中に添加しただけで、外来性キノン非依存的な NADH の強い酸化が観察される。これは、還元型 RQ と酸素との反応性が高いために、内在性 RQ₉ が、酵素と酸素の間で電子の授受を行っているためである。そこで、本論文では、グルコースオキシダーゼとカタラーゼを用いる嫌気アッセイ法を導入し、正確な NADH-キノン還元活性を測定する方法を確立している。この測定法では、人工キノン添加前の NADH の酸化は全く観察されなくなり、正確な NADH-キノン還元活性を測定することが可能となったことから、本論文で行うキノン還元部位の阻害剤による詳細な解析に適した測定系であるといえる。

2. キナゾリン系阻害剤の回虫複合体 I に対する構造活性相関

本論文では、キナゾリン系阻害剤を回虫複合体 I のキノン還元部位の解析に用いている。キナゾリン系阻害剤は化学的に安定で、誘導体の合成が容易であり、さらに蛍光物質であることから将来的に回虫複合体 I のキノン還元部位の標識物質として用い、阻害剤結合ペプチドを同定することも可能であることから、キノン還元部位の解析に適した化合物であるといえる。キナゾリン系阻害剤の複合体 I に対する阻害活性の評価は、それぞれ、UQ₂ と RQ₂ を人工電子受容体として用い、酵素活性を 50% 阻害する阻害剤の濃度(IC₅₀)を比較することにより行っている。まず、無置換体キナゾリンが、これまで回虫複合体 I を最も低濃度で阻害することが知られていたナフレジンよりも、それぞれの NADH-キノン酸化還元活性を1桁程度低濃度で阻害することを見出している。さらに、他の 9 種類の誘導体についての阻害効果を調べ、NADH-UQ₂ および RQ₂ 酸化還元活性と阻害剤の構造活性相関の比較を行っている。その結果、阻害における両者の傾向は類似しているが、UQ₂ と RQ₂ を基質とした場合で阻害の傾向は完全には一致していないことから、酵素のそれぞれの電子受容体に対する構造認

識は同一ではないということを示している。

3. 回虫複合体 I のキノン還元部位の解析

前述の酵素の UQ_2 と RQ_2 に対する構造認識の相違を明らかにする目的で、 $NADH-UQ_2$ と $NADH-RQ_2$ 還元活性のキナゾリン系阻害剤による阻害様式を比較している。その結果、キナゾリン系阻害剤は UQ_2 に対して混合阻害するが、 RQ_2 に対しては完全に拮抗阻害することを見出している。この結果は、酵素と UQ_2 および RQ_2 の結合様式が一部異なっていることを示唆しており、複合体 I のキノン還元部位の特徴を、さらに詳しく調べるために、 $NADH-UQ_2$ と $NADH-RQ_2$ 還元活性の至適 pH を測定している。 $NADH-RQ_2$ 還元活性の至適 pH (7.6) は、複合体 I と II から構成される $NADH$ -フマル酸還元活性と同じであったが、 $NADH-UQ_2$ 還元活性は pH 6.4 と 7.2 という 2 つの異なる至適 pH を示すことを見出している。これらの結果は、酵素と UQ_2 および RQ_2 の結合様式が異なっているだけでなく、酵素と UQ_2 との電子の授受を含んだ反応機構が pH に依存して変化することを見出している。これに対し、 $NADH-UQ_2$ 還元活性のキナゾリン系阻害剤による阻害様式の pH 依存性を調べ、pH により混合阻害としてのパターンは変化しないが、pH 上昇により非拮抗阻害に近づくこと確認している。

以上、本論文においては、回虫複合体 I のキノン還元部位の構造特性について、正確な酵素活性測定法を確立し、阻害剤を用いて詳細に検討している。その結果、本酵素の UQ と RQ に対する認識は同一ではないこと、さらに、至適 pH および阻害様式の pH 依存性を調べることで、本酵素のキノン還元部位には、1 つの RQ 還元部位と、2 つの異なる至適 pH を示す UQ 還元部位があるということを見出している。これらの知見は哺乳類複合体 I において報告されておらず、本研究において初めて示された回虫複合体 I に特有なキノン還元部位の特徴であると考えられる。

これらの知見は、宿主とは異なる部位を標的とした抗寄生虫薬開発に大きく貢献するだけでなく、バクテリアや哺乳動物を含め複合体 I の反応機構(分子内電子移動や、酸化還元共役プロトンポンプ機構)は未だ解明されていないことから、今回得られた回虫複合体 I のキノン還元部位に関する知見は、複合体 I のキノン還元部位の数、またその分子認識の特異性についての解明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。

