

審査の結果の要旨

氏名 稲岡 ダニエル 健

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*)によって引き起こされる寄生虫症であるシャーガス病は本研究を行った稲岡ダニエル健氏の母国ブラジルを含む多くの中南米の国々において、多数の死者を出し、また副作用のない特効薬が開発されていないことから、この地域の大きな問題となっている。そこで、新規の化学療法剤の開発が急務であるが、現在有望な薬剤は全くないと言って過言ではない。

ジヒドロオロト酸脱水素酵素(DHOD)はピリミジン de novo 合成経路の第四番目の酵素であり、ジヒドロオロト酸をオロト酸に酸化する酵素である。ヒトの DHOD はミトコンドリアの内膜に局在し、ジヒドロオロト酸の還元力をユビキノンに伝達する。この酵素に関しては、オロト酸およびユビキノンの拮抗阻害剤との共結晶が得られており、その解析からオロト酸とユビキノンがそれぞれ異なる部位に結合することが判っている。一方、*T. cruzi* のジヒドロオロト酸脱水素酵素(TcDHOD)は可溶性タンパク質で細胞質に存在し、ジヒドロオロト酸脱水素酵素活性と共役したフマル酸還元活性を示し、フマル酸を最終電子受容体として用いている。すなわちピリミジン合成に加え、TCA サイクルで生じるフマル酸を還元することによって細胞質の redox バランスの維持に関わっている重要な酵素と考えられている。TcDHOD はヒトの DHOD と相同性が 23%と低く、さらに TcDHOD のノックダウンにより、トリパノソーマ原虫はピリミジン存在下でも増殖できないとの結果が得られている。これらのことから TcDHOD はシャーガス病の化学療法剤開発のために極めて有望な標的と考えられる。そこで本研究では、シャーガス病に対する有効な薬剤の開発を最終目的とし、構造に基づいた薬剤の分子設計のための基本的情報を得るために TcDHOD を結晶化し、立体構造の解析を行った。

研究の第 1 段階として、結晶化実験に必要な大量の試料調製のため、TcDHOD を大腸菌内で大量発現し高純度の組み換え酵素の精製法を確立した。続いて結晶化とその最適化の条件を検討した結果、第一反応生成物であるオロト酸と第一反応基質の拮抗阻害剤であるオキソン酸の複合体結晶を共結晶化法で得ることができた。それぞれの X - 線回折データは 1.80 と 1.12 Å と高い解像度を示した。さらに酵素反応メカニズムを明らかにするためソーキング法を用いて種々の共結晶を試み、酵素のみの結晶、ジヒドロオロト酸、フマル酸およびコハク酸との複合体結晶を得る事が可能となった。その結果、それぞれ 1.20、1.50、1.38 と 1.5 Å の解像度の X - 線回折データを得る事ができた。このように高分解能の生理的な全ての基質および生成物の複合体構造に基づいて、ジヒドロオロト酸がオロト酸に酸化される第一反応とその還元力を用いてフマル酸がコハク酸に還元される第二反応の反応機構について解析した。

第一反応におけるジヒドロオロト酸の酸化機構は*Lactococcus lactis*のDHODAと反応生成物であるオロト酸複合体のドッキングモデルから考察されていた。すなわち、ジヒドロオロト酸のカルボキシル基によりCys130の-SHが脱プロトン化され、 $-S^-$ がジヒドロオロト酸のピリミジン環のC5を脱プロトン化しC6のヒドリドがフラビンのN5に転移されると考えられていた。しかし、今回初めて得られたDHODと実際の基質であるジヒドロオロト酸複合体構造解析からは、これまで提唱されていたモデルと異なり、ジヒドロオロト酸のカルボキシル基はCys130の-SHを脱プロトン化出来る距離にはなく、ヒドリド転移にはC5は脱プロトン化される必要はないことが明らかとなった。

また、第二反応の基質であるフマル酸はジヒドロオロト酸と同じ部位に結合していたが、現在可溶性DHODのフマル酸還元反応の結合部位に関する情報がないため、嫌気性バクテリアが持つ可溶性(*Shewanella frigidimarina* および *Shewanella putrefaciens*)と膜結合型(*Wolinella succinogenes*)のフマル酸還元酵素(FRD)と比較した。フマル酸結合部位は可溶性と膜結合型FRDで保存されていたが、ヒドリド転移と二個目のプロトン源はそれぞれ異なっていた。膜結合型FRDではフマル酸の上下に水が一分子ずつ存在し、どちらからも二個目のプロトンの供給が可能であり、可溶性型ではアルギニン(Arg402)が二個目のプロトン源であると考えられた。一方TcDHODはFRDとアミノ酸の相同性は低く、結晶構造解析の結果からもフマル酸の結合に関するアミノ酸は全く異なっており、二個目のプロトン源はCys130であった。しかし酵素に結合しているフマル酸の捩れたコンフォメーションはFRDとTcDHODにおいて共通であった。これらのことからフマル酸の捩れたコンフォメーションはヒドリド転移を容易にするために重要であると考えられた。また、TcDHODではフマル酸結合部位の周辺に水が一分子結合しているが、この水分子はフマル酸へヒドリド転移の後に生じるアニオンの安定化に関わっていると考えられた。

本研究で明らかになったように、ヒトはフマル酸還元酵素を持っておらず、またヒトDHODはTcDHODと相同性も低く構造も異なっていた。両者の構造を比較した結果、活性部位において基質と結合する異なる4個のアミノ酸が見つかり、さらに原子レベルでTcDHODとヒトDHODの第一および第二反応メカニズムの違いが明らかになった。これらのことからTcDHODはシャーガス病に対する新しい薬剤開発の有望な標的であることが明確になった。

今回得られた、アメリカ型トリパノソーマのDHODに関する新しい知見はフマル酸を最終産物とする1型DHODの反応機構の解明と新規抗トリパノソーマ薬の開発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。