

論文の内容の要旨

論文題目 Interaction between the trypanocidal drug, Ascofuranone, and its target molecule, cyanide-insensitive alternative oxidase

和訳 抗トリパノソーマ薬アスコフラノンとその標的分子シアン耐性酸化酵素の相互作用に関する研究

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科
国際保健学専攻博士課程

平成 17 年 4 月進学

氏名 城戸 康年

<緒言> アフリカトリパノソーマ症は病原体であるトリパノソーマ科の原虫 *Trypanosoma brucei* によって発症し、ヒトの場合にはアフリカ睡眠病、家畜の場合ではナガナとよばれる。毎年 30 – 50 万人の患者が新たに感染し、数万人が死亡している。病原体である *T. brucei* は鞭毛虫類の原虫でツェツェバエによって媒介され、感染初期には血流中で増殖する。慢性期には中枢神経系が侵されて最終的に嗜眠状態に陥って死に至ることから「アフリカ睡眠病」と呼ばれ、アフリカ大陸諸国の発展を妨げている。ナガナの被害も大きく、アメリカ合衆国と同程度の面積の土地で牧畜が困難となっており、年間の経済的損失は 50 億ドル以上と推計されている。また近年では南アメリカ大陸やインドにおいても本原虫の近縁種によるヒト・家畜の被害が報告されており、この寄生虫疾患は今や地球規模の問題となっている。原虫は表面糖タンパク質の抗原変異によって宿主の免疫反応を回避するため本症に対するワクチン開発は非常に困難であり、化学療法が唯一の予防と治療の手段となっている。しかし、現在使用されている薬剤はその効果・副作用の面から理想的な薬剤から程遠く、新規薬剤の開発が強く望まれている。しかし、この分野の収益性の低さから製薬

企業などによる新薬開発も望めない。このような状況の中、トリパノソーマ原虫に関する基礎研究や新規抗トリパノソーマ薬の開発は国際保健学・寄生虫学を専攻する私にとっての最大の目標の一つである。

私の所属する研究グループでは原虫に特有なエネルギー産生系に注目して研究を進めてきた。アフリカトリパノソーマ原虫は昆虫の中では ATP 合成は哺乳類同様に酸化的リン酸化により行っている。一方、宿主中の血流型ではシトクロム類は消失し、ATP 合成は主に解糖系に依存している。この解糖系を進行させ続けるためには NADH の再酸化が必要であるが、このためにミトコンドリアの呼吸鎖が機能している。過剰な NADH の還元力を解消するために glycerol-3-phosphate dehydrogenase、ユビキノン、ミトコンドリア内膜に存在するシアン耐性末端酸化酵素である Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) から構成される NADH 再酸化系が、ATP 合成を維持し細胞内レドックス環境を調節するために機能している (図 1)。ここで末端酸化酵素として機能している TAO は、宿主である哺乳類のシアン感受性のシトクロム *c* 酸化酵素とはサブユニット組成、基質、補欠分子族などの点で全く異なっており、酸素を用いてユビキノールを酸化する。このような NADH 再酸化系は宿主である哺乳類には存在せず、かつ原虫のエネルギー代謝系に必須であることから格好の薬剤標的と考えられてきた。私の所属する研究グループは以前より、糸状菌から単離されたプレニルフェノール化合物である Ascofuranone (AF) が TAO のキノール酸化酵素活性を特異的に極めて低濃度で阻害することを報告してきた。また、トリパノソーマ感

染マウスに AF を投与した際、30 分以内にマウスの血流中から原虫が完全に消失することが確認されている。

TAO が属しているシアン耐性の Alternative

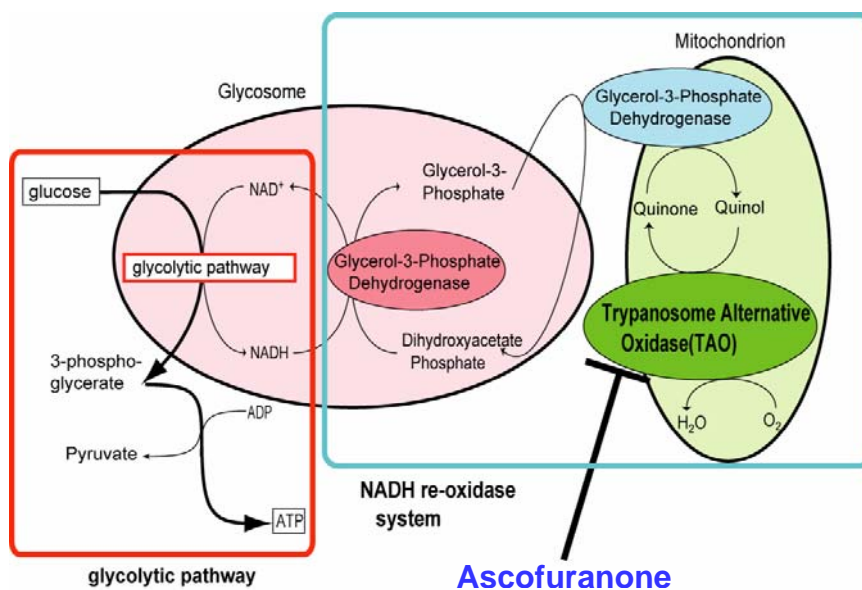


図1 ATP合成システム

Oxidase (AOX)は広く高等植物、真菌類、粘菌類、藻類などのミトコンドリアに存在し、その生理的意義は多岐にわたっている。過剰な還元力を解消し細胞内レドックスバランスを維持するなど、様々な環境条件に適応するために代謝系を柔軟に変化させる原動力となっており、生物学的にも非常に興味深い酵素である。

<目的> 上述のように TAO を薬剤標的として AF の実用化をめざしているが、本論文では薬剤開発の科学的基盤を標的タンパク質と化合物の相互作用と捉え、その相互作用を分子レベルで解析した。AOX は一次構造の解析から、膜表在型二核鉄タンパク質と推定されているが、鉄の存在を示す直接的な証拠はなく、3次元構造は未知で新規フォールディング膜タンパク質である。AOX は極めて不安定なため、活性を保持したまま高純度の AOX を精製できず、活性中心・基質結合部位の構造解析や AOX の反応性に関わる物理化学的解析は全く行われていない。このような中、AF の TAO 阻害作用因子を探るため組み換え TAO に対する AF 誘導体による構造活性相関研究を進め、組み換え TAO の精製を行い、速度論的解析、活性中心の解析や三次元構造解析に向けた結晶化を行った。このように薬剤 AF と薬剤標的 TAO 双方からのアプローチにより、両者の相互作用の分子基盤構築を試みた。

<結果と考察>

① AF 誘導体の構造活性相関

100 個以上の AF 誘導体の合成を鳥取大学齋本教授に依頼し、組み換え TAO に対する阻害活性を調べた。その結果、阻害に必須な構造因子が明らかになった。フラノン環は阻害に必須ではなく、ベンゼン環の官能基群が阻害に重要な役割を果たすことが明らかになった。

② 標的分子 TAO の精製と解析

2-1 TAO の可溶化・精製

TAO は膜タンパク質であるため精製には可溶化が必須のステップであるが、活性を保持したまま TAO を可溶化するため数十種類の界面活性剤と添加剤をスクリーニングしたところ、可溶化に適した界面活性剤と塩の組合せを見出した。特に結晶化にしばしば用いられているオクチルグルコシドによって活性

を保持したまま TAO を特異的に可溶化できた。TAO はその N 末端にヒスチジンタグが融合しているため、コバルトカラムを用いてアフィニティー精製を行った。可溶化に用いたオクチルグルコシド存在下では TAO を溶出できなかったが、洗浄段階からドデシルマルトシドに置換したところ溶出された。各画分の電気泳動（図 2）を示す。約 40 倍に精製され、10L の培養から 10 mg 程度の精製 TAO を得ることが可能で、これは以後の解析には十分な量である。また、TAO 安定化条件を見だし、不安定と言われてきた本酵素を 4°C、20°C で半年以上にわたって活性を保持することができた。

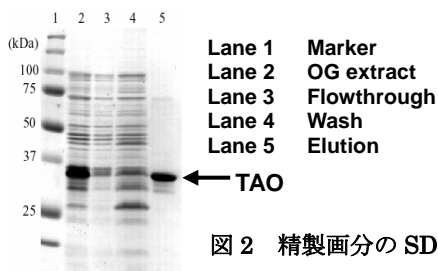


図 2 精製画分の SDS-PAGE

2-2 TAO の速度論的解析

基質である還元型ユビキノンは脂溶性であるため水溶液中では十分な濃度で活性測定できなかったが、C10E8 という界面活性剤を用いたアッセイ条件を見だし、精製 TAO の速度論的解析を行った ($K_m = 320 \mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 630 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)。AF による阻害についての速度論的解析も行い、還元型ユビキノンの対して混合型の阻害様式を示すことが判った。これは基質結合部位以外にも他の相互作用部位が存在することを示唆する結果である。

2-3 活性中心の解析

TAO は一次構造から二核鉄タンパク質と推定されているが、いまだその直接的な証拠はない。そこで、精製酵素を用いて ICP-MS により鉄とその他の金属について定量分析を行った。その結果、TAO 一分子当り鉄が二原子検出され、他の金属は検出されなかった(表 1)。さらに EPR を用いて分光学的に金属中心を同定した。これらは AOX が化学論的かつ分光学的に二核鉄を有することの初の直接的証拠である。また失活した TAO では鉄原子は 1/10 程度となり、鉄が TAO の活性に必須であることが明らかとなった。

表 1 TAO と金属原子の化学量論比

	Fe/rTAO	Zn/rTAO	Mn/rTAO	Cu/rTAO
	Mean ± S.D.			
Native rTAO	1.76 ± 0.077	0.03 ± 0.013	N.D.	N.D.
Denatured	0.22 ^{*1}	N.D.	N.D.	N.D.

^{*1} The values are an average of two independent experiments

^{*2} N.D. represents Not Detected (below 0.01)

2-4 TAO の結晶化

一般的に膜タンパク質の結晶化は困難であることが知られているが、TAO の三次元構造解析に向けて種々の界面活性剤を用いて結晶化条件を検討したところ、タンパク質結晶を得ることに成功した。最大 3.5 Å の X 線回折像が得られ結晶学的解析を進めることが可能となった。

＜統括＞ 本研究では TAO と AF の酵素—基質・阻害剤相互作用を研究するにあたり、阻害剤による構造活性相関研究、酵素の速度論的解析、酵素の構造学的解析を総合的に組み合わせて研究を進めた。TAO の強力な阻害に重要な AF の構造因子が明らかになり、ユビキノールに対して混合型の阻害を示すことが判った。また、標的分子である TAO の精製を行い補欠分子族の解析を行ったところ、二核鉄を有することが明らかになった。X 線構造解析に十分な TAO 結晶を得ることができたが、この結晶は AOX で初めての報告である。

本研究では AF という極めて特異性の高い強力な阻害剤と TAO がどのような相互作用をしており、この強い阻害作用の原因はどこにあるのかということが出発点であった。本研究で AF 側についての構造活性相関は明らかになったが、さらにここで得られた結晶の解析によって、今後薬剤開発段階で有用な情報を提供できると考えられる。ここで得られる相互作用に関する知見、方法論が、今後の Structure-based drug design などに広く演繹できる点があるとするればそれは私の望外の展開である。