

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 城戸 康年

本研究では抗トリパノソーマ薬 Ascofuranone (AF)の実用化を最終目的とし、その科学的基盤となる薬剤 AF と薬剤標的 Trypanosome alternative oxidase (TAO)の相互作用の解析を試みた。AF 誘導体を用いて構造活性相関研究を行い、阻害に必須な AF の構造因子を明らかにすると同時に、薬剤標的である TAO の生化学的解析を行い、構造生物学的解析のための基盤を構築した。

1. 100 個以上の AF 誘導体（共同研究者である鳥取大学齋本教授により合成された）について、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。AF の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り、実用化のためには必須である安価で薬効の高い AF 誘導体の合成が可能となった。
2. 薬剤標的 TAO の生化学的解析のために大腸菌を用いて発現させた組み換え TAO の精製法を確立した。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。可溶化後、コバルトカラムを用いてアフィニティー精製を行い、比活性が高く、純度の高い精製法が示された。
3. 不安定と言われてきた本酵素を 4℃、20℃で半年以上にわたって活性を保持するための TAO 安定化条件を見だし、結晶化をはじめとして酵素の生化学的解析が可能となった。
4. 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、還元型ユビキノンに対して混合型の阻害様式を示すことが判った。
5. 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。さらに EPR を用いて分光学的に金属中心を同定した。AOX が化学両論的かつ分光学的に二核鉄を有すること示した。

6. 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。

以上、本論文では 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 AF による構造活性相関研究、薬剤標的 TAO の速度論的解析、TAO の構造学的解析を行った。本研究で AF 側についての構造活性相関は明らかになり、実用化に向けて大きく前進した。さらにここで得られた結晶の解析によって、今後薬剤開発で有用な情報を提供できると考えられ、タンパク質のような高分子化合物と低分子化合物の相互作用の理解に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。