

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 バロゲン エマニュエル オルワダレ

本研究はアフリカトリパノソーマ症の薬剤標的タンパク質であるトリパノソーマのグリセロールキナーゼ(GK)と様々な化合物との複合体の結晶構造を X 線結晶構造解析により明らかにして下記の結果を得ている。

1. トリパノソーマの GK の apo 型及びグリセロール, グリセロール-3-リン酸(g3p), ATP, ADP, 4-nitrophenylphosphate との複合体の結晶構造をそれぞれ 2.9, 2.4, 2.8, 2.3, 2.7, 2.7 Å 分解能で決定した。これは、真核生物で生存に必須な GK の初めての構造である (真核生物の構造解析の最初の例は、マラリア原虫の GK であるが、これは生存に必須な酵素ではない)。
2. トリパノソーマの GK は、結晶中でサブユニット間の逆平行の β -シートで強固なダイマーを形成していた。この結果は、ゲルろ過クロマトグラフィーでの溶出位置から計算される分子量がダイマーという結果に一致している。
3. apo 型と他の化合物との構造を比較すると、apo 型のみで C278 と C319 間でジスルフィド結合が形成されている。このジスルフィド結合が活性に関与しているかを還元剤存在下とシステインをセリンまたはアラニンに置換した変異体を作成して酵素活性を測定すると、還元剤存在下及びセリンに置換した変異体で活性が約 8 倍になることを明らかにした。
4. グリセロール及び g3p は、N 末ドメインに結合していることが明らかになった。グリセロール及び g3p の共通の認識には、Glu84, Glu85, Trp104, Asp254, Phe279 が関与していることを明らかにした。
また、g3p のリン酸基の認識には、Thr11, Asp254, Gln255, Thr276 が関与していた。
5. トリパノソーマの GK には、2 つの ADP 結合部位があることが分かった。1 つ目は、N 末ドメインと C 末ドメインの間の活性部位に結合していた。この ADP の認識には、4 つのスレオニン残基が重要な役割を果たしていることが明らかになった。2 つ目は、活性部位から約 30 Å 離れた分子の表面に 2 つの ADP がマグネシウムイオンを介して結合していた。この ADP の認識には、分子表面のアルギニン残基が重要な役割を果たしていた。また、ATP は、活性部位には結合しておらず、2 つ目の活性部位から離れた分子表面のみに結合していた。
6. 唯一構造が明らかになっている真核生物のマラリア原虫の GK とトリパノソーマ

の GK を比較すると、グリセロールの認識については、ほとんど同じアミノ酸残基が関与していたが、活性部位の ADP の認識についてはトリパノソーマでは、多くのスレオニン残基が関与していたが、これらのアミノ酸残基は、マラリア原虫のものには保存されていないことが明らかになった。

また、トリパノソーマの GK で ADP と g3p の構造を重ね合わせると、リン酸基間の距離は 3.4Å であるが、マラリア原虫では 8.2Å と離れており、このことがトリパノソーマのみで逆反応 ($\text{ADP} + \text{g3p} \rightarrow \text{ATP} + \text{グリセロール}$) が進行する理由であることを示すことができた(逆反応で結合する 2 つのリン酸基の間の距離が近い)。

7. 4-nitrophenylphosphate を用いたトリパノソーマの GK の活性のアッセイ法を開発し、それを用いて、インシリコスクリーニングで決定した約 2500 の化合物のスクリーニングを行なったところ、約 50 種類の阻害剤の候補を決定することができた。

以上、本論文は、トリパノソーマのグリセロールキナーゼの立体構造を様々な化合物との複合体で解析し、また重要であると思われるアミノ酸の変異体を作成するなど、構造と機能相関に関する重要な知見を得ることができた。また、薬剤のスクリーニングを行う系を開発し、実際に有用であると思われる薬剤を見いだしたことはアフリカトリパノソーマ症の薬剤開発に十分貢献するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。