

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 清水 洋成

マラリアに代表される寄生虫感染症は、開発途上国でいまだ猛威を振るい、大きな社会問題になっている。しかし、感染症の治療薬では強い副作用のために命にかかわるものもあるほか、薬剤耐性も解決すべき大きな問題となっており、寄生虫感染症に対する新規治療薬の開発は緊急の課題である。本研究では、新しい抗寄生虫薬の標的と考えられる回虫成虫複合体IIを取り上げた。真核生物におけるロドキノール酸化とフマル酸還元のみカニズムを明らかにするとともに、生理的に異なった環境で機能する幼虫型と成虫型の構造・機能相関について知見を得るため、回虫成虫複合体II（回虫成虫QFR）のX線結晶解析を行った。さらに、抗寄生虫薬の探索や設計をタンパク質の立体構造に基づいて論理的に行うことを目的に、アトペニンとフルトラニルの2種類の阻害剤との複合体構造を決定し、その選択性のメカニズムを考察した。これに先立ち、いまだ困難といわれる膜タンパク質の結晶化における問題点を解決するために、大腸菌SQRをモデル膜タンパク質とした膜タンパク質の結晶化研究を行った。

1、大腸菌SQRの結晶化研究

大腸菌SQRをモデル膜タンパク質とした結晶化研究から、膜タンパク質の結晶化に成功するためには、サンプルに含まれるリン脂質を可溶化時にコントロールすることが重要であり、結晶化時に性質の異なる2種類の界面活性剤を混合して用いることが有効であることが分かった。界面活性剤の種類と濃度を変えて可溶化・精製した大腸菌SQRに含まれるリン脂質数は条件によって大きく異なり、SQR活性を保ち、かつリン脂質数が最も少なくなる可溶化条件で調製し、弱く結合しているだけで立体構造形成や活性に関わっていないリン脂質を除いたSQRを得ることが重要であった。さらに、タイプの異なる2種類の混合界面活性剤を用いることが結晶性の改善に有効であった。

2、回虫成虫複合体IIの結晶化と構造解析

回虫成虫複合体IIのサンプル調製や結晶化条件のスクリーニングでは、大腸菌SQRの結晶化研究で得られた知見を用い、回虫成虫ミトコンドリア由来の貴重なサンプルを有効に利用することができた。回虫成虫複合体IIの可溶化と精製にスクロースモノラウレート(SML)を用いて、回虫成虫複合体IIに強く結合したリン脂質だけを含む結晶化に適したサンプルが得られた。様々な非イオン性界面活性剤を使って結晶化条件のスクリーニングを行い、ドデシルオクタエチレングリコールモノエーテル(C12E8)から微結晶が得られた。さらに

別の界面活性剤を添加剤にして結晶化条件の最適化を行い、重量比3:2でC12E8とドデシルマルトシド (C12M) を含む界面活性剤から10 μm 程度の小さな結晶が得られた。さらに微量透析法によって100 μm 以上の結晶を得てX線回折実験と構造解析を行った。SPring-8で分解能2.8Åの回折強度データを測定し、回虫成虫複合体IIの結晶構造を決定した。また、ソーキング法で阻害剤との複合体結晶を調製し、PFで測定したX線回折強度データを使って阻害剤との複合体構造を決定した。

3、回虫成虫複合体IIの結晶構造

回虫成虫複合体IIは、4つのサブユニット (Fp、Ip、CybL、CybS) から成る膜タンパク質で、CybLとCybSがミトコンドリア膜を貫通し、全体の分子量は約120 kDaである。本構造は、真核生物のフマル酸還元酵素としては初めての結晶構造である。回虫成虫複合体IIだけに見られる構造上の特徴として、膜貫通サブユニットであるCybSのN末端が親水性サブユニットFpとIpまで延びて相互作用することで全体構造を安定化していた。これまでに構造が知られている呼吸鎖複合体IIと回虫成虫複合体IIは、親水性サブユニットFpとIpサブユニットのアミノ酸配列の相同性が70%前後と高く、立体構造はよく一致していた。一方、疎水性サブユニットは種により多様である。ミトコンドリア型ブタ心筋SQRおよびトリSQRは、回虫成虫複合体IIと同様2本のポリペプチド鎖 (CybL、CybS) とヘムを1つ持っている。これらのアミノ酸配列の相同性は互いに低いにもかかわらず、CybLとCybSサブユニットも構造がよく似ていた。このことは回虫成虫複合体IIがミトコンドリア型SQRから進化してきたものであることを裏付けるとともに、進化の過程で立体構造は不変であったことを示す。

4、成虫複合体IIと幼虫複合体IIの比較

回虫複合体IIには成虫型と幼虫型の存在が知られており、これらはFpとCybSサブユニットが異なり、成長の過程で周囲の環境に応じてロドキノール:フマル酸還元酵素 (QFR)、あるいは、コハク酸:ユビキノン還元酵素 (SQR) として機能し、基質に対する親和性や活性酸素発生などの生化学的特徴が変化する。まず、補欠分子族近傍のアミノ酸残基に着目すると、FADのアデニン周辺のアミノ酸残基に違いが認められた。この違いによってFADの酸化還元電位が変化している可能性が考えられる。また、フマル酸結合部位を蓋するキャップドメイン (Fpサブユニットの276-385番目と接触している回虫成虫複合体IIのFp-Ser152とFp-Val165が幼虫複合体IIではAlaとGlnに置き換わっていることを見出した。この箇所のアミノ酸残基は、回虫成虫型複合体IIと幼虫型の複合体IIの基質に対する親和性変化の鍵である可能性が考えられる。さらに分子表面に存在するアミノ酸残基を比較すると、一方の面に存在するアミノ酸残基はよく保存されているのに対し、その裏側ではかなり異なっていた。一方、ブタSQRと回虫成虫複合体IIを比較した場合、異なるアミノ酸残基は分子表面全体に偏りなく分布していた。従って、回虫成虫複合体IIと幼虫複合体IIでアミノ酸配列が良く保存されている面は、両者に共通の生理的な役割を果たしている可能

性が考えられる。

5、フルトラニルとの複合体構造

複合体IIの阻害剤として知られるアトペニンA5はキノンアナログとして基質結合部位に結合することが知られ、種選択性は低い。一方、フルトラニルは回虫成虫複合体IIに対して極めて選択性が高い。この選択性の要因をフルトラニルとの複合体構造から明らかにした。フルトラニルはキノン類と全く異なる構造をしているにもかかわらず、アトペニンA5と同様、ロドキノール結合部位に結合し、そのイソプロピル基はCybLのTrp69の芳香環とCH- π 相互作用をしていた。このTrp69は哺乳類由来の複合体IIではメチオニンになっており、この相互作用を形成することができない。従ってこの相互作用がフルトラニルの回虫成虫複合体IIに対する選択性にかかわっていると考えられる。

以上、本研究で明らかにした回虫成虫複合体IIの結晶構造解析は、真核生物の呼吸鎖中で末端酸化酵素として働くフマル酸還元酵素としては初めてのものである。これによってミトコンドリア型複合体IIから寄生適応による進化を遂げた回虫複合体IIにおいて、周囲の環境に応じて性格の異なる成虫型複合体IIと幼虫型複合体IIについて反応機構に関する知見を得ることができた。また、今後の回虫成虫複合体IIの生化学的解析に対して構造生物学的な基盤を与えるものである。また、アトペニンA5およびフルトラニルと回虫成虫複合体IIとの複合体構造によって、これらの阻害剤による阻害様式、さらに、宿主である哺乳類複合体IIとの選択性発現のメカニズムの一端が明らかになった。

本研究の成果は寄生虫の複合体IIに対する阻害剤を設計する上で重要な知見になる。今後、この知見に基づいてフルトラニルをリード化合物とした新たな阻害剤の論理的設計と合成展開により、さらに強力で選択性の高い抗寄生虫薬の開発に繋がるものである。これらの業績は博士（薬学）の学位の取得に値する優れた研究と評価された。