

氏名	まとば かずあき 的場 一晃
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第588号
学位授与の日付	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	抗寄生虫薬の論理的設計に向けた標的タンパク質の構造研究
審査委員	(主査)教授 原田繁春 教授 竹谷 茂 教授 山口政光 准教授 亀井加恵子

論文内容の要旨

寄生虫が引き起こす感染症は開発途上国に住む人々の健康を害し、経済活動にも著しい悪影響を及ぼしている。しかし、創薬には膨大な時間と資金が必要なので、利益が見込めないシャーガス病やアフリカ睡眠病等に対しては積極的な薬剤開発が行われてこなかった。これらの感染症が neglected tropical disease と言われる所以である。寄生虫は真核生物なので、ヒトを含む哺乳類と生理的に多くの共通点を持つ。そこで、寄生虫の生育に必須で哺乳類宿主にはない蛋白質や、宿主とは立体構造が異なる蛋白質を抗寄生虫薬のターゲットにすれば、迅速に薬剤候補化合物を開発することができる。

本論文は、寄生虫感染症（トリパノソーマ症とトキソプラズマ症およびネオスポラ症）に注目し、標的蛋白質の立体構造を基にした薬剤設計 (structure based drug design, SBDD) に向けた研究について述べたもので、4章から構成されている。

第1章「序論」では、本研究の背景と目的について概説している。

第2章では *Trypanosoma cruzi* のアスペラギン酸トランスカルバモイラーゼ (*TcATCase*) について述べている。トリパノソーマ原虫が引き起こすシャーガス病は中南米に蔓延し、抜本的な治療薬がない。そこで、トリパノソーマ原虫の生存に必須であると同時に、哺乳類と相違点のあるピリミジン生合成経路中の酵素は、薬剤標的として有望であると考えた。本研究では、ピリミジン生合成経路の第二酵素、アスペラギン酸とカルバモイルリン酸 (CP) からカルバモイルアスペラギン酸の生成反応を触媒する *TcATCase* を取り上げた。

TcATCase の大量発現、精製、結晶化、X線解析を行い、真核生物としては最初の立体構造を明らかにした。また、結晶中で酵素反応を開始させてから反応中間体構造をトラップし、その構造に基づいて酵素反応機構を考察した。

次に、*TcATCase* に対する既知阻害剤 PALA との複合体構造を決定し、その構造に基づいて PALA 誘導体を設計・合成し、誘導体の構造活性相関を検討した。複合体構造から、PALA 結合部位の近傍に空隙の存在が明らかになった。そこで、この空隙を埋めてさらなる相互作用を獲得し阻害活性を上昇させることを狙って、新たに置換基を加えた3種類の PALA 誘導体を合成した。しかし、これらの阻害活性は PALA の約 1/500 に低下した。その原因是、置換基を付けたことで水素結合ネットワークによる *TcATCase* との相互作用が減少したためであることが複合体構造の解析

で明らかになった。すなわち、この水素結合ネットワークは高い阻害活性を保つために重要であることが示された。

さらに、市販化合物や東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構の化合物に対してインシリコスクリーニングを行い、いくつかの阻害剤候補化合物を見出した。この中で、化合物 T-17277（阻害活性 $IC_{50}=120 \mu\text{M}$ ）は、*TcATCase* との複合体構造を解析したところ、PALA とは異なる部位に結合していた。すなわち、PALA と T-17277 様化合物をリンカーでつなぐことで IC_{50} がナノモルオーダーの阻害剤を作り出せる可能性が明らかになった。これらの研究結果から、SBDD による薬剤設計に向けて大きな知見を得ることができた。

第3章では *Toxoplasma gondii* および *Neospora caninum* のヌクレオシド三リン酸加水分解酵素について述べている。トキソプラズマ原虫は AIDS 患者などに日和見感染症を、ネオスポラ原虫はウシに流死産を引き起こし、畜産業界から有効な治療薬が求められている。これらの原虫には、様々な生物種に広く存在する ecto-ATPase とは異なる新規 nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase) が存在する。NTPase は不活性な状態で原虫内に極めて多量に発現しており、何らかの因子によって活性化される。*in vitro* では DTT でジスルフィド結合を還元すると活性化される。NTPase は原虫の増殖に必須であることから化学療法剤の格好の標的として期待できる。

不活性型のネオスポラ原虫 NTPase (*NcNTPase*) とトキソプラズマ原虫 NTPase (*TgNTPase-I*) の立体構造を明らかにするため、大量発現、精製、結晶化、X 線解析を行い、構造を明らかにした。また、不活性型 NTPase と基質アナログ AMPPNP との複合体構造から、なぜ不活性なのかを明らかにできた。さらに、不活性型 NTPase の分子表面に DTT で還元されるジスルフィド結合が 2 か所あることがわかった。これらのジスルフィド結合の還元が NTPase の活性化に関わっていると考えて、システインをセリンに置換した変異体の活性を測定した。その結果、一方のジスルフィド結合の還元が NTPase を活性化させることができた。この活性型 NTPase 変異体の発現、精製、結晶化、X 線構造解析を行った。得られた活性型の構造と不活性型構造には明らかな違いがみられた。この活性型 NTPase の構造を基にした既知阻害剤の改良が今後、期待される。

第4章「総括」では、本研究をまとめ、構造を基にした薬剤設計の展望を概説している。

論文審査の結果の要旨

寄生虫感染症は開発途上国を中心に広く世界に蔓延しており、著しく人々の生活を妨げている。本論文は、寄生虫の標的タンパク質の立体構造を基に抗寄生虫薬リード化合物の設計を目指した研究であり、トリパノソーマ原虫由来アスペラギン酸トランスカルバモイラーゼ (ATCase) に対する阻害剤の探索と、トキソプラズマ原虫、ネオスポラ原虫由来ヌクレオシド三リン酸加水分解酵素 (NTPase) の活性化機構について述べた独創的かつ社会貢献度、学術的価値の高い論文である。

トリパノソーマ原虫由来 ATCase の立体構造を明らかにするとともに、ATCase と既存阻害剤 PALA との複合体構造から、両者の間に働いている水を介したと相互作用が重要であることを示した。また、化合物ライブラリーのインシリコスクリーニングによって新規阻害剤を見出し、この化合物の結合様式が既存阻害剤 PALA とは全く違っていることを示した。これらの結果は ATCase 阻害剤開発に向けての重要な知見となり、その意義は大きい。

さらに、ネオスポラ原虫、トキソプラズマ原虫由来不活性型 NTPase の構造を決定し、この構造から活性化に関わるジスルフィド結合を同定した。さらに、システインをセリンに変えた活性型変異体の構造を決定し、不活性型との構造の違いを明らかにした。NTPase は薬剤標的タンパク質として注目されており、本論文で明らかとなった、これらの構造は学術的価値の高いものであると認められる。

上記の研究成果の一部は、以下の国際学術誌に掲載受理され、公開中である。

[公表論文]

- (1) **Kazuaki Matoba**, Takeshi Nara, Takashi Aoki, Teruki Honma, Akiko Tanaka, Masayuki Inoue, Shigeru Matsuoka, Daniel Ken Inaoka, Kiyoshi Kita, Shigeharu Harada,. Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate carbamoyltransferase from a parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*.*Acta Crystallographica Section F* **65**, 933-936 (2009)
- (2) **Kazuaki Matoba**, Tomoo Shiba, Tsutomu Takeuchi, L. David Sibley, Makiko Seiki, Fumi Kikyo, Toshio Horiuchi, Takashi Asai, Shigeharu Harada,. Crystallization and preliminary X-ray structural analysis of nucleoside triphosphate hydrolases from *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*.*Acta Crystallographica Section F* **66**, 1445-1448 (2010)