

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 今村 章

学位授与の日付 令和2年8月31日

論文名 Allosteric regulation accompanied by oligomeric state changes of  
*Trypanosoma brucei* GMP reductase  
(*Trypanosoma brucei*におけるGMP還元酵素の多量体構造変化に  
起因するアロステリック調節の解明)

論文審査委員 主査 乾 隆  
副査 谷森 紳治  
副査 片岡 道彦

## 論文要旨

### 序章

寄生性原虫 *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) は、アフリカ大陸の赤道周辺に生息するツェツェバエを媒介してヒトや家畜に感染することによりアフリカトリパノソーマ症を引き起こす。感染発生地域では、6,000 万人以上が感染のリスクに晒されており、畜産業の振興の妨げにもなっている。現在利用可能な治療薬は数種類のみである上、重篤な副作用や煩雑かつ長期の投与を要するなど多くの問題があることから新たな作用機序を有する新規治療薬の開発が強く望まれている。宿主動物におけるプリン核酸の合成には糖やアミノ酸などから新規合成するデノボ経路と、細胞内のプリン塩基/核酸のリサイクルを担うサルベージ経路が存在する。一方、*T. brucei* ではサルベージ経路のみであるため、その生育は宿主が合成したプリン塩基に依存している。したがって、*T. brucei* のサルベージ経路を特異的に阻害する化合物が有用な薬剤候補になると考えられる。GMP reductase (GMPR) は salvage 合成経路中の酵素であり、NADPH 依存的に GMP から IMP への反応を触媒する生体の恒常性を保つ上で重要な酵素であることから、薬剤標的分子として期待できる。

アミノ酸配列によるドメイン解析や蛋白質モデル構造の種間比較により、*T. brucei* GMPR (TbGMPR) には哺乳類の GMPR とは異なり、cystathionine  $\beta$  synthase ドメイン (CBS ドメイン) が存在することがわかった。本ドメインはアデニン類縁体などの結合により蛋白質の酵素活性を調整することが知られているが、その役割は蛋白質ごとに様々であり、TbGMPR の CBS ドメインの機能も未だ不明である。

本研究では、プリン核酸による TbGMPR 活性調節を酵素反応速度論的な手法により評価したうえで、X 線結晶構造解析、および X 線小角散乱による構造生物学的な実験を行うことにより、プリン核酸による TbGMPR のアロステリックな活性制御を明らかにすることを目指した。

### 第一章 プリン核酸が結合することによる TbGMPR の活性変化

はじめに、CBS ドメインを有する酵素は一般的にプリン核酸により活性が変化することから、プリン核酸である ATP および GTP 存在下における TbGMPR 活性の変化を調べた。実験で使用した TbGMPR は大腸菌 BL21 (DE3) を用いて His-tag 蛋白質として発現させ、各種クロマトグラフィー法により精製した。また、GMPR 活性は、基質である GMP、および補酵素 NADPH を反応させ、NADPH の吸光度 ( $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) の経時変化を指標として求めた。その結果、GTP 存在下では活性は上昇し ( $EC_{50} = 4.8 \text{ }\mu\text{M}$ )、ATP 存在下では活性は抑制された ( $EC_{50} = 160 \text{ }\mu\text{M}$ )。TbGMPR の GMP に対する反応速度パラメータを調べたところ、反応初速度は GMP 濃度に対してシグモイド様の上昇を呈し ( $K_{0.5} = 184 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 16.7 \text{ min}^{-1}$ ,  $n_{\text{Hill}} = 3.04$ )、TbGMPR が GMP による正の協調を受けることが明らかとなった。また、反応系に GTP を添加すると、GTP 濃度依存的に  $K_{0.5}$  の低下と  $k_{\text{cat}}$  の上昇が観測され、1 mM GTP 存在下における  $n_{\text{Hill}}$  は 1.00 であり、正の協調が消失した。対称的に、ATP を反応系に加えると、 $k_{\text{cat}}$  と  $n$

$n_{\text{Hill}}$  は大きく変化せず、 $K_{0.5}$  は ATP 濃度依存的に上昇し、基質-酵素親和性が低下することがわかった。以上より、グアニンおよびアデニン核酸が、TbGMMPR と基質の結合親和性を変化させることで酵素活性を活性化、および抑制することが明らかとなった。

次に、これらリガンドと CBS ドメインの結合を調べるために、酵素中トリプトファン残基における蛍光消光実験を実施した。TbGMMPR は CBS ドメイン内に 2 つのトリプトファン残基 Trp115 および Trp120 を有しており、この 2 つの残基の干渉を防ぐために、Trp115 をアルギニンに置換した TbGMMPR W115R を作製した。なお、本変異体の酵素化学的なパラメータは WT とほとんど同様であった。TbGMMPR W115R と各濃度プリン核酸を混合し、37 °C で 15 分インキュベートした後、励起波長 290 nm、蛍光波長 310 - 400 nm における蛍光スペクトルを得た。その結果、いずれのリガンドについてもリガンド濃度依存的な Trp120 の蛍光消光が観測され、これらのリガンドが CBS ドメインに含まれる Trp120 近傍に結合することが示唆された。また、ATP を除く GTP および GMP においては、リガンド濃度依存的な蛍光ピークの短波長側へのシフトが観測され、GTP および GMP 存在下において、Trp120 がより疎水的な環境へと移行することが示唆された。

最後に、TbGMMPR の CBS ドメイン欠損変異体 (TbGMMPR $\Delta$ CBS) を作製し、プリン核酸依存性制御における CBS ドメインの関与について調べた。各リガンド存在下における TbGMMPR $\Delta$ CBS の酵素活性を調べたところ、プリン核酸の添加は TbGMMPR $\Delta$ CBS の活性に影響しないことが明らかとなった。また、TbGMMPR $\Delta$ CBS は、野生型と比較して  $k_{\text{cat}}$  が 1/5 に減少し、顕著に酵素活性が低下した。一方、 $K_{0.5}$  は野生型と同程度であり、 $n_{\text{Hill}}$  は 1.00 であった。これらの結果より、CBS ドメインの欠損は、活性中心への基質親和性にはほとんど影響を与えない一方で、TbGMMPR 活性に対する GMP の正の協調を失わせることが示された。

## 第二章 プリン核酸が結合することによる TbGMMPR の構造変化

TbGMMPR の CBS ドメインにプリン核酸が結合していることを確かめるために、触媒残基 Cys318 をアラニンに置換した不活性変異体 TbGMMPR C318A について、GMP 存在下と非存在下において結晶化を行い、それぞれ結晶構造を得た。リガンドを有さない結晶構造 (C318A apo) は触媒ドメイン (Ser2-Phe97, Arg226-Gly484) と CBS ドメイン (Leu98-Ser225) の 2 つのドメインから構成され、前者は典型的な TIM バレルフォールドを、後者は CBS ドメインに特徴的な  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  フォールドのタンデムリピートを有していた。PISA 解析により、C318A apo は 4 つのサブユニットが 4 回軸に関係づけられた四量体を形成し、2 つの四量体が 4 回軸に垂直な 2 回軸に関係付けられて八量体を形成することが明らかとなった。また、C318A と GMP の複合体の結晶構造 (C318A/GMP) も、C318A apo と同様に八量体を形成することがわかった。しかし、C318A/GMP の八量体中の 2 つの四量体は、C318A apo と比べ、4 回軸回りにねじれた位置に配置されており、C318A/GMP の八量体の全体的な構造は、4 回軸に沿って圧縮されていた。このことから、GMP は、TbGMMPR を『弛緩した』形態 (C318A apo) から『ねじれた』形態 (C318A/GMP) へと誘導することが明らかとなった。

C318A/GMP の GMP は、1 つは活性部位に、もう一つは触媒ドメインと CBS ドメインの間のクレフトに結合していた。後者のリガンド GMP 分子は CBS ドメインのアミノ酸残基と多数の相互作用を示したのに加え、触媒ドメインに含まれる Arg93 とも相互作用を示した。C318A/GMP における触媒ドメインおよび CBS ドメインのそれぞれ単独としての構造は、C318A apo におけるそれぞれのドメインとよく一致したが、これらのドメインの相対的な配向は C318A/GMP と C318A apo で明らかに異なり、CBS ドメインはこれら 2 つの構造間で約 40°回転していた。この変化は、リガンド GMP と Arg93 の相互作用により誘導されたと考えられ、このヒンジの動きが、弛緩した八量体からねじれた八量体への変化に寄与していると推察される。

野生型 TbGMPr と GTP との複合体 (TbGMPr/GTP) の結晶構造も得られ、この構造では、単一の GTP 分子が TbGMPr/GTP の各サブユニット上のアロステリック調節部位にのみ存在しており、GTP がリガンドとしてのみ作用していることが示された。全体の構造は、C318A/GMP とほぼ同じであり、各サブユニットのヒンジ運動やリガンド結合時の八量体のねじれた構造も観測された。

次に、溶液中における TbGMPr の構造を調べるために、GMP, GTP, および ATP 存在下、あるいはリガンド非存在下においてサイズ排除クロマトグラフィー-X線小角散乱 (SEC-SAXS) 実験を行った。得られた散乱曲線から Kratky プロットを作成したところ、グアニン核酸存在下、およびリガンド非存在下において Guinier-Kratky ポイントにピークが見られたことから、TbGMPr はこれらの条件下では球状構造であることが明らかとなった。一方、ATP 存在下では上記のポイントからピークがシフトし、かつ  $q \times R_g$  の高い領域における谷が消失したことから、ATP の結合により TbGMPr の柔軟な構造が増加し、サブユニットのコンフォメーションがよりコンパクトでない形に移行することが示された。

次に、OLIGOMER プログラムを用いて、実験で得られた散乱曲線に対して理論散乱曲線の線形結合をフィッティングさせることで溶液中のオリゴマー状態と構造を評価した。その結果、プリン核酸を含まない TbGMPr は弛緩型とねじれ型の八量体の割合が 53.2 と 46.8% と推定されたが、グアニン核酸存在下ではほぼ完全にねじれ型であることが明らかとなった。一方、ATP 存在下では TbGMPr の 60.8% が四量体であり、残りのタンパク質は弛緩型 (28.0%) とねじれ型 (11.2%) の八量体であった。

## 結論

プリン核酸による TbGMPr の活性変化を調べたところ、GTP の添加により活性が上昇し、ATP の添加により活性が抑制されることがわかった。また、C318A apo と C318A/GMP の結晶構造から、C318A はリガンド非存在下では弛緩型、GMP 存在下ではねじれ型の八量体を形成することが明らかとなった。さらに、SEC-SAXS の結果から、TbGMPr は溶液中では GMP や GTP 存在下ではねじれ型の八量体で存在し、ATP 存在下では八量体が 2 つの四量体へ解離することが明らかとなった。以上の結果より、TbGMPr のアロステリック制御は CBS ドメインへのグアニン、あるいはアデニンヌ核酸の結合で誘導される多量体構造の差異に起因することが明らかとなった。

## 審査結果の要旨

寄生性原虫 *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) は、ヒトや家畜に感染することにより致死性感染症であるアフリカトリパノソーマ症を引き起こす。現在、利用可能な治療薬には重篤な副作用があることや、煩雑かつ長期の投与を要する等の問題が山積していることから、新たな作用機序を有する新規治療薬の開発が強く望まれている。宿主動物におけるプリン核酸の合成にはデノボ経路とサルベージ経路が存在するが、*T. brucei* では宿主から得たプリン塩基およびヌクレオシドを修飾するサルベージ経路のみを介してプリン核酸を合成する。したがって、*T. brucei* のサルベージ経路を特異的に阻害する物質は、有用な医薬候補化合物になると考えられる。GMP 還元酵素 (GMPR) はサルベージ経路中の酵素であり、NADPH 依存的に GMP から IMP への反応を触媒し、生体の恒常性を保つ上で重要な酵素であることから、薬剤標的分子として期待できる。アミノ酸配列によるドメイン解析により、*T. brucei* GMPR (TbGMPR) には哺乳類の GMPR とは異なり、cystathionine  $\beta$  synthase ドメイン (CBS ドメイン) が存在することが示されたが、その機能は未だ不明である。本申請論文では、プリン核酸による TbGMPR の活性調節を酵素反応速度論的手法により評価し、加えて、X 線結晶構造解析および X 線小角散乱法を用いた構造生物学的実験を行うことにより、プリン核酸による TbGMPR の酵素活性制御に関する知見を得ることを目的とした。

第一章では、酵素化学的視点からプリン核酸存在下における TbGMPR の活性変化を調べた。まず、GMPR 活性に対する基質 GMP 濃度依存性を調べたところ、TbGMPR が基質 GMP により正の協調を受けることが明らかとなった。次に、GTP および ATP 存在下における TbGMPR の活性を調べたところ、GMP との結合親和性を変化させることにより、GTP は活性化を誘導し、一方、ATP は活性抑制を誘導することが判明した。以上より、TbGMPR はグアニンおよびアデニン核酸により、酵素活性の活性化および活性抑制の制御を受けるアロステリック酵素であることが示唆された。さらに、これらのリガンドと CBS ドメインとの結合の有無を調べるために、TbGMPR 内因性 Trp 蛍光消光実験を行ったところ、いずれのリガンドにおいてもリガンド濃度依存的な CBS ドメイン内 Trp 残基由来の蛍光消光が観測され、GTP および ATP が CBS ドメインに結合することにより、TbGMPR 活性を調節することが明らかとなった。

第二章では、プリン核酸の結合による TbGMPR の構造変化を調べるために、X 線結晶構造解析および X 線小角散乱実験を行った。X 線結晶構造解析に用いた結晶は全て sitting drop 蒸気拡散法により取得し、SPring-8 にて X 線回折データを収集後、分子置換法による分子モデルの構築を行った。その結果、TbGMPR C318A apo, C318A/GMP および TbGMPR/GTP の結晶構造を、それぞれ分解能 2.8, 1.9 および 2.5

Å で決定した。いずれの結晶構造も、4 個のサブユニットが 4 回軸に関係付けられた 4 量体を形成し、且つ 2 つの 4 量体が 4 回軸に直交する 2 回軸に関係付けられた 8 量体を形成していた。C318A/GMP および TbGMMPR/GTP の 8 量体中の 2 つの 4 量体は、C318A apo のものと比べて 4 回軸を中心にねじれており、且つ 4 回軸に沿って圧縮されていた。以上より、TbGMMPR は GMP および GTP の結合により、「弛緩型 8 量体」から「ねじれ型 8 量体」へ構造変化することがわかった。次に、溶液中における TbGMMPR の構造を調べるために、サイズ排除クロマトグラフィー-X 線小角散乱実験を英国の Diamond Light Source で行った。得られた散乱曲線に対して、OLIGOMER プログラムを用いて TbGMMPR の多量体存在比を評価したところ、リガンド非存在下の TbGMMPR は、「弛緩型」および「ねじれ型」の 8 量体の割合が、53 および 47% と推定されたが、グアニン核酸存在下では、ほぼ 100% が「ねじれ型」であることが推定された。一方、ATP 存在下では TbGMMPR の 61% が 4 量体であり、残りは「弛緩型 (28%)」および「ねじれ型 (11%)」の 8 量体であることが推定された。以上より、TbGMMPR のアロステリック活性制御は、CBS ドメインへのグアニンあるいはアデニン核酸の結合により誘導される多量体構造の変化に起因することが示された。

本申請論文は、種を超えて保存されている GMP 還元酵素が、*T. brucei* においては特異な CBS ドメインを有するアロステリック酵素であり、本ドメインが酵素の ON/OFF に重要な役割を担っていることを明らかにした画期的な研究論文である。これらの知見は、本ドメインを標的とした TbGMMPR に対する特異的阻害剤が、副作用の少ない新規アフリカ睡眠病治療薬となる可能性を示すものであり、寄生虫感染症研究分野および創薬科学研究分野に大きく貢献するものである。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。