

氏名	青木 謙一		
学位の種類	博士(生物科学)		
学位記番号	博甲 第	8561	号
学位授与年月日	平成 30年 3月 23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Structural Basis for the Subcellular Localization Mechanism of a Mammalian Enzyme and the Substrate Recognition Mechanism of a Malaria Parasite Enzyme (新規カルボニル還元酵素およびマラリア原虫由来酵素の構造生物学的研究)		
主査	筑波大学准教授	博士(理学)	丹羽 隆介
副査	筑波大学教授	博士(理学)	和田 洋
副査	筑波大学教授	博士(理学)	中田 和人
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	中野賢太郎

論 文 の 要 旨

X線結晶構造解析は、ターゲットとなるタンパク質の3次元立体構造を解明し、その情報に基づいてタンパク質の機能特性や基質結合部位の認識メカニズムの把握、そして選択的阻害剤の開発に重要な情報を提供する手法である。本論文において著者は、X線結晶構造解析に基づく構造生物学的視点から、哺乳類のカルボニル還元酵素のペルオキシソーム局在シグナルの役割、およびマラリア原虫由来糖代謝酵素の基質認識部位の特性について報告している。

第1章において著者は、ペルオキシソーム局在型4量体カルボニル還元酵素 (Peroxisomal localization carbonyl reductase; PerCR) のペルオキシソーム局在化機構に焦点を当てている。PerCRのカルボキシル末端側には、ペルオキシソーム局在化シグナルとして知られるPeroxisomal Targeting Signal (PTS) の配列が存在する。よって従来は、このシグナルがペルオキシソーム輸送タンパク Peroxin5 (Pex5) に認識されることで、PerCRはペルオキシソームへ輸送するものと推察されてきた。ところが近年の先行研究から、細胞内での遺伝子発現を経て構成された4量体PerCRはペルオキシソームへ輸送される一方で、細胞外で調製した組換えPerCRタンパク質を細胞質に注入してもペルオキシソームへと輸送されないことが判明している。これらの背景を踏まえて著者は、本研究において、PerCRのPTSを構造生物学的に解くことでPerCRのペルオキシソーム局在化メカニズムを追究することを目的とした。著者は、PerCRタンパク質の精製、NADPH存在化での結晶化、高解像度でのX線回折像の取得、および結晶構造解

析に成功した。この解析から著者は、単量体の構造では PTS ペプチドは分子外部に位置し、Pex5 によって認識されることが可能である一方で、4 量体状態では PTS ペプチドは 4 量体分子中心内部に埋もれることを突き止めた。先行研究の知見も合わせて著者は、細胞質において PerCR は単量体として輸送され、ペルオキシソーム内で 4 量体を形成するものと考察した。また著者は、PTS ペプチドが PerCR の 2 量体化にも関与していることを明らかにした。変異体分子を用いた生化学的解析から著者は、PTS ペプチドが酵素安定性および酵素活性に影響を与えることを発見した。以上の結果から著者は、ペルオキシソーム局在化に関与する PTS シグナルは、単なる細胞小器官への輸送シグナルの役割だけではなく、酵素の構造的安定性や酵素活性にも寄与することを提唱している。

第 2 章において著者は、マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 由来 Phosphoglucose isomerase (PfPGI) の立体構造解析と哺乳類由来同酵素の基質認識部位との比較検討を報告している。PGI は、解糖系の 2 番目の酵素であり、グルコース 6 リン酸 (G6P) とフルクトース 6 リン酸 (F6P) との間の異性化に関与している。この酵素はマラリアの生命維持に必須の酵素であると考えられることから、PfPGI を標的とした薬剤は新規抗マラリア阻害剤になることが期待されているが、種特異性の高い薬剤の開発には PfPGI にユニークな構造的特性を把握することが不可欠である。この問題を解決する目的で著者は、PfPGI タンパク質の精製および阻害剤 6-Phosphogluconate (6PGA) との共結晶化を行い、高解像度の X 線回折像を得ることに成功した。その後著者は、構造精密化を行い、すでに報告のあるマウス由来 Phosphoglucose isomerase (mPGI) の基質認識部位における立体構造を比較した。その結果、著者は、PfPGI と mPGI とでは、6PGA と相互作用をする際の水分子の介在様式に有意な差があること、また PfPGI に存在するが mPGI には存在しない 2 つの特異的なループ構造があり、これらの差異が基質認識部位の空間維持に顕著な違いをもたらすことを見出した。一連の結果から著者は、進化的にオーソログな機能を持つタンパク質のマラリア原虫に特有の構造を見出した今回の発見が、マラリア原虫には作用するが哺乳動物には作用しない新規抗マラリア薬の開発へつながる手がかりとなりうることを議論している。

審 査 の 要 旨

本論文で著者は、2 種類の酵素に注目し、X 線結晶構造解析と生化学的解析に基づいて、従来解明されていなかった機能や特徴の発見に成功している。第 1 章において報告された PerCR のペルオキシソーム局在化シグナルの研究で著者は、局在化メカニズムに対する知見を与えただけでなく、シグナルペプチドが酵素自体の安定性や活性に及ぼすことを示した。これは、従来想定されてこなかったシグナルペプチドの新しい機能的意義を提示するものであり、新規性に富むと評価できる。また、第 2 章において報告された PGI のマラリア原虫とマウスとの構造的差異の発見は、基礎科学のみならず応用面でも意義深い。現在も世界中で毎年 3 億人近い人々がマラリアを発症し、そして推計 60 万人強がマラリアによって死に至っている。地球温暖化の影響や既存の抗マラリア薬に対する耐性原虫の出現などの問題により、新たな作用機序の抗マラリア薬の開発は重要な課題である。著者の成果は、将来的な抗マラリア薬の開発という応用面にも影響を与えうる点で評価できる。

平成 30 年 1 月 30 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (生物科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。