

論文内容の要旨

微生物ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV の構造生物学的研究

(六本木 沙織)

I. 研究目的

近年、抗菌薬に対する耐性菌の出現や蔓延が国際的な問題となっている。この現状に立ち向かうためには、感染症の予防や抗菌薬の適正使用に加え、新たな抗菌薬の開発が重要である。しかしながら、新たに開発・承認される抗菌薬の数は年々減少の一途を辿り、将来、使用できる抗菌薬の選択肢がなくなることが危ぶまれている。

そこで本研究では、従来とは異なった作用機序を持つ抗菌薬の開発に貢献するべく、抗菌薬の新たな標的分子として「DPP (Dipeptidyl aminopeptidase) IV; DAP IV」に着目した。DAP IV は、多剤耐性菌としても知られる糖非発酵グラム陰性細菌の栄養源供給に関わるジペプチド産生酵素である。したがって、病原菌 DAP IV を阻害する化合物は、細菌への栄養源供給の阻害により病原菌に対して静菌的な作用を持つ可能性がある。阻害化合物の設計には、標的分子とリガンドとの相互作用や、標的分子のポケットの大きさや形を知ることが重要である。そこで本研究では、微生物 DAP IV に関して、上述のような立体構造情報を得ること、さらには微生物 DAP IV の基質認識機構の解明を目的とした。

II. 研究対象ならびに方法

DAP IV は、タンパク質やペプチドを栄養源とする糖非発酵グラム陰性細菌に存在し、栄養源となる基質のプロリンやヒドロキシプロリンを認識しジペプチドを産生する酵素である。産生されたジペプチドは優先的に細菌内に取り込まれるため、DAP IV は糖非発酵グラム陰性細菌の栄養源供給において重要である。

本研究では、糖非発酵グラム陰性細菌 *Pseudoxanthomonas mexicana* W024 由来 DAP IV (PmDAP IV) の結晶化条件の探索及び最適化、X 線結晶構造解析を行った。実験に使用した PmDAP IV の大量発現系構築と精製及び活性測定は、以前より DPP の発現系構築と精製を手がけている長岡技術科学大学に依頼した。また、PmDAP IV の複合体立体構造を得るため、基質ペプチドやヒト DPP IV 阻害剤などと PmDAP IV との共結晶化を、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った。立体構造の位相決定は、既に明らかになっている *Stenotrophomonas maltophilia* 由来 DAP IV のアポ体立体構造 (2.8Å 分解能) を用い、分子置換法にて行った。

III. 研究結果

X線結晶構造解析により、PmDAP IVのアポ体、阻害剤複合体、ジペプチド複合体の結晶構造を1.90Åから2.47Åで決定した。PmDAP IVは触媒ドメインとβプロペラドメインの2つのドメインを保持し、二量体を形成していた。PmDAP IVとジペプチドとの複合体においては、βプロペラドメインに存在するArg106が、基質のN末端を認識するダブルGluモチーフのGlu208と塩橋を形成し、間接的に基質のN末端認識に関与していることが明らかになった。さらに、PmDAP IVの触媒残基Ser613と基質が結合してアシル中間体を形成している立体構造も得られた。ここで、本研究により明らかになったPmDAP IVの複合体立体構造と、これまで既に明らかになっている哺乳類DPP IVの複合体立体構造を比較すると、いくつかの違いが見られた。まず、PmDAP IVでは基質のN末端認識に関与していたArgが、ヒトDPP IVでは立体構造上PmDAP IVと等価な位置に存在するにもかかわらず、基質ペプチドP1'位のカルボニル酸素を認識している、という違いである。さらに、PmDAP IVではアシル中間体を形成している立体構造が得られている一方で、ヒトDPP IVでは、四面体型遷移状態中間体を形成している立体構造が得られている。この他にも、PmDAP IVとヒトDPP IVの比較において、PmDAP IVは基質結合時に構造変化を起こすこと、基質N末端認識に関与するArgを含む二次構造が両者で異なること、サブサイトを構成するアミノ酸残基の一部が両者で異なり、これが微生物DAP IVとヒトDPP IVの基質認識の違いに関与していることが明らかになった。

IV. 結 語

本研究により得られたPmDAP IVの立体構造情報は、微生物DAP IVの基質認識機構を明らかにする新たな手がかりになると共に、微生物DAP IVとヒトDPP IVの基質認識機構が異なることを示唆した。これらの研究結果は、糖非発酵病原菌由来DAP IVに特異的な阻害剤の開発につながる可能性がある。

論文審査担当者

主査 教授 藤井 勲 (天然物化学講座)

副査 教授 大橋 綾子 (生体防御学講座)

副査 教授 中西 真弓 (機能生化学講座)

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、糖非発酵グラム陰性菌 *Pseudomonas mexicana* W024 株由来の dipeptidyl aminopeptidase IV (PmDAP IV) について、本酵素を阻害する化合物が菌周病菌などの糖非発酵グラム陰性菌に対する新たな作用機序による抗菌薬の開発につながることを念頭におき、その基礎研究として PmDAP IV の結晶化 (アポ体、基質および阻害剤との複合体)、およびその X 線結晶構造解析を行ったもので、1.90 Å から 2.47 Å の解像度で結晶構造を明らかにすることに成功した。

その結果、既に結晶構造が報告されているヒト DPP IV と比較し、Arg106 残基による基質ペプチドの認識機構に違いがあること、また、ヒト DPP IV では四面体型遷移状態中間体を形成しているのに対して、PmDAP IV ではアシル中間体を形成していることなどを共結晶の構造から明らかにしている。これらの結果は、dipeptidyl aminopeptidase の基質認識機構という観点から選択的な阻害剤を検討していく上で重要な知見を与えるものであり、今後の展開も期待される。

以上の結果は、Scientific Report 誌に掲載が決定しており、博士学位論文として相応しいものであると認める。

試験・試問の結果の要旨

最終試験となる口頭発表は、イントロダクションから実験方法、結果とその解析などについて、学位論文に従ったしっかりとした発表であった。発表に対して多くの質問がなされたが、発表では割愛した結果も含めるなど誠実な受け答えであった。

ただ、発表において本研究の薬学的意義として最後に加えられた項目については、論文審査において審査員から指摘した点を踏まえての話しではあったが、PmDAP IV が系統樹解析からヒト DPP IV よりもヒト DPP 8,9 との相同性が高い点と PmDAP IV に対する選択的阻害剤の開発という点で学位論文の内容から離れて少し話しが混乱してしまったため、dipeptidyl aminopeptidase の基質認識機構の解明という本研究のポイントの印象が薄まってしまったことは残念であった。

また、結晶化に用いた酵素の精製や純度の確認などは、発表者自身の仕事ではないとしても基本的に押さえておくべき点であった。