

## アフリカトリパノソーマの薬剤標的：シアン耐性酸化酵素(TAO) の結晶構造解析

Crystal structure analysis of Trypanosome Alternative Oxidase (TAO): a drug target  
for the African trypanosomiasis

志波智生<sup>1\*</sup>, 高橋元<sup>1</sup>, 稲岡ダニエル健<sup>2</sup>, Emmanuel Oluwadare Balogun<sup>1,2</sup>, 原田繁春<sup>1</sup>, 北潔<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都工芸繊維大学大学院・工芸科学専攻・応用生物、〒603-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町

<sup>2</sup>東京大学大学院・医学系研究科・生物医化学教室、〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

### 1 はじめに

アフリカ睡眠病は、ツェツェバエが媒介する寄生性原虫のトリパノソーマの感染によって引き起こされ年間約30,000人が死亡するアフリカの風土病である。現在ある治療法には毒性や薬剤投与の困難さ、重大な副作用などの問題があり、より安全な治療薬の開発が必要とされている。トリパノソーマは、ツェツェバエ内にいる時と宿主である哺乳類の血液中にいる時とは、エネルギーの代謝経路が大きく異なっている。宿主の血液中での本原虫のATP合成は主に解糖系が行っている。この解糖系を常に進行させるために、原虫のミトコンドリア内膜中に存在する Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) が NADH 再酸化系の末端酸化酵素として機能している。我々は TAO が宿主である哺乳類に存在しないことから格好の薬剤標的になること、さらに Ascofuranone (AF) が TAO の酵素活性を極めて低濃度で特異的に阻害することを見いだしてきた。本研究では、膜表在型二核鉄蛋白質である TAO の構造・機能相関を解明するとともに、AF の結合様式を明らかにすることによってより優れた阻害剤の論理的設計を目指して TAO の X 線結晶構造解析を行った。

### 2 実験

TAO の結晶化は、界面活性剤存在下で PEG400 を結晶化剤に用いて行った。また、位相決定は TAO 中の二核鉄原子の異常分散効果を利用した単波長異常分散法(SAD 法)で行った (KEK-PF BL17A; 波長=1.739 Å, 分解能=3.2 Å)。その後、位相を拡張し最終的には、分解能 2.85 Å 分解能で ligand-free 型の立体構造を得ることができた。また、阻害剤の結合様式を知るために阻害剤を TAO 結晶にソーキングして阻害剤との複合体結晶の構造解析にも成功した。

### 3 結果および考察

ligand-free 型で分解能 2.85 Å ( $R/R_{\text{free}}=0.192/0.247$ )、阻害剤である AF2779OH との複合体で分解能 2.6 Å ( $R/R_{\text{free}}=0.214/0.256$ )、別の阻害剤である CCB との複合体で分解能 2.3 Å ( $R/R_{\text{free}}=0.185/0.227$ )の構造解析に成功した。

得られた TAO-AF279OH 複合体の構造を図 1 に示す。TAO は 6 本の  $\alpha$ -ヘリックスから構成されており、

結晶中では、強固な二量体を形成していた。diiron 分子は、4 つのグルタミン酸残基と配位結合しており、他の水溶性の diiron タンパク質(2 つのヒスチジン残基も配位結合している)とは異なっていることが明らかになった。また、TAO の分子表面には疎水性アミノ酸残基が集中しているところがあり(helix1 と helix4 の周辺)、そこが膜結合領域と考えられる。

また、阻害剤との結合様式も明らかになり、阻害剤の芳香族環は、Arg118 と Thr219 との水素結合および Leu122, Leu212, Ala216, Tyr220 との疎水性相互作用により強固に認識されていた。また、阻害剤のイソプレインの tail 領域は、Cys95, Arg96, Glu215 と相互作用することで約 90°折れ曲がり、他の疎水性残基と相互作用していた[1]。

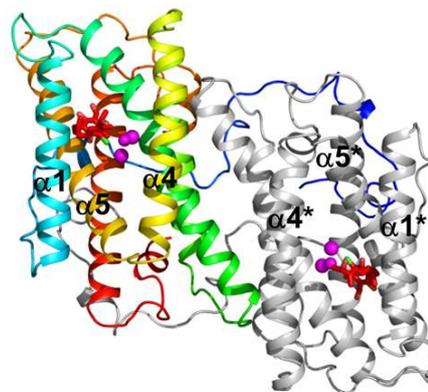


図 1. TAO-AF279OH 複合体の全体構造

### 4 まとめ

本研究で用いられた阻害剤: AF2779OH は、トリパノソーマに感染させたマウスを完全に治癒させることから、実用的な薬剤の開発が期待できる。

### 謝辞

X 線回折強度データ測定においては、PF スタッフの方々に大変お世話になりました。ここに感謝致します。

### 参考文献

[1] T. Shiba *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4580-4585 (2013).

\* tshiba@kit.ac.jp