

論 文 要 旨

真菌類 Mevalonate kinase 及び Phosphomevalonate kinase の機能・構造解析

令和 4 年 度

北海道医療大学大学院薬学研究科

鈴木 千 幸

【背景・目的】現在、多くの抗真菌薬が臨床で利用されている。しかし耐性菌の出現、薬物相互作用など様々な問題があり、新たな抗真菌薬の開発が求められている。真菌のメバロン酸経路には3種のGHMPキナーゼスーパーファミリーに属する必須酵素、メバロン酸キナーゼ (MK)、ホスホメバロン酸キナーゼ (PMK)、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (MDD) が存在する。このうち MK と MDD はヒトメバロン酸経路にオーソログが存在する。一方、真菌 PMK (以下 Erg8p) とヒトの PMK (以下 hPMK) はオーソログの関係にない。動物を除く真核生物に広く分布する Erg8p オーソログは GHMP キナーゼタイプの PMK であり、動物にのみ確認される hPMK オーソログは NMP キナーゼタイプの PMK である。2種の異なるタイプの PMK は同じ基質を同じ産物へと変換するが、配列及び構造の相同性が存在しないため、一方に特異的な阻害剤の開発が可能であると期待される。従って、真菌 Erg8p の機能及び構造に関する研究は、メバロン酸経路を標的とする新規の抗真菌薬の開発に有用な知見を提供するものと考えられるが、真菌 Erg8p に関する単離酵素を用いた機能解析の報告は1例に留まり、立体構造はこれまで報告されていない。そこで本研究では真菌 Erg8p に着目し、関連する酵素 (真菌 MK, ヒト MK, hPMK) とともに大量調製法を確立し機能解析を行った。さらに X 線結晶構造解析によって真菌 Erg8p の立体構造を決定することで、基質認識の詳細を明らかにし、関連する酵素との差異について検討した。

【方法】1. 大量調製法の確立 真菌 Erg8p の機能及び構造を解析するにあたって、幅広い真菌スペクトルにわたる調査を行うため4種の真菌由来 Erg8p を選択した。また関連する酵素として、真菌 *Candida glabrata* の MK (*C. gla* Erg12p) と、ヒトの MK (hMK) 及び hPMK を選択した。これらの酵素について大腸菌を宿主とした組換え発現系を構築し、各種クロマトグラム法を組み合わせるにより精製を行った。2. 活性測定法の確立と Kinetic parameters の測定 より精度の高い測定法を確立するため、過去報告された MK 及び PMK の活性測定法の見直しを行い、至適条件を設定した。各キナーゼ反応は R-メバロン酸 (R-mev) あるいは R-ホスホメバロン酸 (R-mev5p) を基質として 30℃で行い、生成する ADP 量をピルビン酸キナーゼと乳酸デヒドロゲナーゼの2種の酵素反応と共役させることにより測定した。基質と ATP に対する K_m 及び V_{max} をそれぞれ Michaelis-Menten 式を用いた非線形回帰により算出した。3. LC-MS/MS 法による Erg8p 及び Erg12p の定量 精製酵素 (*C. gla* Erg8p 及び Erg12p) を還元・アルキル化・トリプシン消化したペプチド試料を調製し、セミマイクロ LC-三連四重極質量分析計を用いた多重反応モニタリング (MRM) 法により分析した。MRM トランジションは Skyline software による解析結果に基づき3~4ペプチドを選択し設定した。4. 真菌 Erg8p の X 線結晶構造解析 真菌 PMK の結晶化スクリーニングを行い *Saccharomyces cerevisiae* Erg8p (以下 *S. cer* Erg8p) の初期

結晶を得た。 *S. cer* Erg8p について結晶化条件の最適化を行い、得られた結晶の X 線結晶構造解析を行った。 アポ体に加えてリガンドが結合した状態の結晶構造を決定し、結合部位の解析を行った。 またこれまでに報告されている関連酵素と立体構造の比較を行った。

【結果・考察】 1. 真菌 Erg8p 及び関連酵素について、培養温度など発現誘導条件を種々検討することで目的酵素の大量発現に成功した。 これらの発現系から精製を行い、それぞれの酵素について解析に十分な量（数 mg-数十 mg）を単離することができた。 2. 活性測定法の至適化を行い、精度の高い測定法を確立した。 これまで精製酵素での解析情報のない真菌 MK, PMK を含め、各種酵素の Kinetic parameters を算出した。 Erg8p 及び *C. gla* Erg12p の K_m 、及び V_{max} は、*hPMK* 及び *hMK* に比べていずれも高値を示すことが明らかとなった。 また *C. gla* Erg12p 及び *hMK* はいずれも R 体のみをリン酸化することが確認できた。 3. LC より分離されたペプチドの中から、感度及び再現性に優れ、他の Erg8p 及び Erg12p と識別可能な特異性の高いペプチドを選択し、MRM 法を確立した。 検量線は数十 fmol から数 pmol の範囲で良好な直線性を示し、検出限界は数 fmol-数十 fmol であった。 菌体抽出物等の複雑なマトリックス中の本酵素の定量に適用可能であった。 4. *S. cer* Erg8p の結晶化に成功し、X 線回折実験によるデータ収集、分子置換法による初期位相決定、構造モデルの精密化を経てアポ体の立体構造を 1.42 Å 分解能で決定した。 分子モデルは全 451 残基中、末端を除く 448 残基と約 500 個の水分子を含んでおり、ほぼ分子全体の三次構造と水和の詳細を明らかにした。 アポ体に加えて *S. cer* Erg8p に ATP, *R-mev5p* 及び Bis-Tris Propane (BTP) が結合した複合体の構造解析もを行い、リガンド結合状態の異なる計 6 状態の結晶構造を決定した。 *S. cer* Erg8p-ATP 複合体及び *S. cer* Erg8p-ATP-*R-mev5p* 複合体の解析から、ATP 及び *R-mev5p* 認識の詳細が明らかとなった。 ATP 結合部位ではアデニン部位は複数の水素結合とファンデルワールス力により酵素と強く相互作用していたが、三リン酸部位の相互作用は比較的弱く、リボース部位との相互作用はほとんど認められなかった。 アポ体との比較から ATP 結合による主鎖の誘導適合は観察されず、側鎖レベルでは Ser59 の側鎖の配向変化が観察された。 基質結合部位では、*R-mev5p* のメバロン酸部位が結合ポケットに深く挿入される形で酵素と相互作用しており、リン酸基はポケットから ATP の γ リン酸に対して突き出すように配向していた。 基質の結合により Gln200-Ser205 が誘導適合により最大 3.4 Å 構造変化することで、Ser205 と *R-mev5p* のカルボキシル基との間に水素結合の形成と、Lys202 の側鎖が反応中心近傍への再配置が観察された。 また、結晶構造解析を通じて *S. cer* Erg8p の ATP 結合部位近傍に BTP が結合することが判明し、酵素上で BTP と ATP の三リン酸部位が相互作用し互いの酵素結合を安定化することが明らかになった。 *S. cer* Erg8p と *hPMK* の立体構造を比較したところ、予測通り構造に類似性は存在しなかった。 GHMP キナーゼである MDD, MK と比較したところ、全体構造とリガンド結合部位の相対的な位置は類似していたが MDD の ATP 及び基質認識は *S. cer* Erg8p とは異なる様式であり、MK の ATP 認識の様式も類似していなかった。 *S. cer* Erg8p と MK の基質認識部位には類似性が観察されたが、基質のリン酸基の有無に応じて結合ポケットの位置がずれて形成されていた。

【結論】 Erg8p 及び関連酵素の大量調製法を確立し、機能・構造解析を行った。 活性測定法の至適化を行い、これまで報告がなかった酵素も含め各種酵素の詳細な Kinetic parameters を決定することができた。 また、真菌タンパク質の定量プロテオーム解析の一環として LC-MS/MS を用いた *C. gla* Erg8p, Erg12p の測定法を確立した。 *S. cer* Erg8p の X 線結晶構造解析により Erg8p の ATP 結合及び基質認識の詳細並びに酵素-BTP の結合様式が明らかとなり、さらに関連酵素との構造上の類似点や差異が明確になった。 これらの知見は Erg8p の特性化のみならず Erg8p に特異的な阻害剤を設計する上で有用な情報を提供するものと考えられる。