

| | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Title | 大腸菌において発現させた熱帯熱マラリアジヒドロ葉酸還元酵素の酵素学的解析 |
| Author(s) | 佐野, 元市郎 |
| Citation | 大阪大学, 1996, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.11501/3109907 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| | |
|------------|----------------------------------------------------|
| 氏名 | 佐野元市郎 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(理学) |
| 学位記番号 | 第12338号 |
| 学位授与年月日 | 平成8年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 理学研究科生理学専攻 |
| 学位論文名 | 大腸菌において発現させた熱帯熱マラリアジヒドロ葉酸還元酵素の酵素学的解析 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 小川 英行 (副査) 教授 倉光 成紀 助教授 堀井 俊宏 |

論文内容の要旨

熱帯熱マラリア原虫DHFRを生化学的に解析するためマラリアDHFRを大腸菌を用いて大量に調製する系を構築した。大腸菌における発現効率を良くするためにcDNAのコドン使用頻度を大腸菌型にした人工遺伝子を合成DNAを用いて再構築した。マラリアDHFRはチミジル酸合成酵素(TS)と一本のポリペプチド上に存在するが、DHFR部分と考えられる227番目のアミノ酸までの部分をコードするように遺伝子を設計した。再構築したマラリアDHFR遺伝子を大腸菌で発現させ精製したマラリアDHFRのミカエリス定数を測定したところ、マラリア原虫より直接調製したDHFR-TSの示す酵素活性のパラメーターに、近似した値を示さなかった。そのためN、C両末端に計4つのアミノ酸を加え、231個のアミノ酸で構成されるマラリアDHFRをコードする遺伝子を作成した。それを発現し精製して酵素活性を測定したところ、原虫より直接調製したDHFR-TSに非常に近い値を示した。

数々の熱帯熱マラリア薬剤耐性株の遺伝子解析よりDHFR-TS遺伝子の特定の位置に薬剤に対する耐性に応じて点突然変異が存在する事がこれまでに報告されているが、それが直接マラリアの薬剤に対する耐性に結びついているのかは明らかになっていなかった。熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性機構を調べるために構築した薬剤感受性型のマラリアDHFR遺伝子に上記の情報をもとに点突然変異を導入し、薬剤耐性型の原虫株に由来する4種類のDHFR遺伝子を作成した。薬剤耐性型DHFRを調製し抗マラリア剤に対する親和性を調べたところ、薬剤感受性型DHFRのものより低下しておりマラリア原虫が獲得した耐性機構は標的酵素と阻害剤の親和性を低下させる事によることを示した。

新たに構築した生化学的実験系はこれまで抗マラリア剤の開発を困難にしてきた薬剤のスクリーニングを格段に容易なものにする。これまで用いられた培養マラリア原虫の系に比べ、新たに構築した生化学的実験系は経済的、時間的な面ではるかに優れている。約120種類のpyrrolo[2,3-d]pyrimidineの誘導体についてマラリアDHFRとウシDHFRに対する阻害効果を測定し、選択性が25倍以上ある化合物の阻害活性をさらに薬剤耐性型マラリア原虫DHFRについて調べた。選び出した化合物が実際に培養液中の薬剤感受性型、耐性型の熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害するかを調べた。その結果、生化学的実験系における阻害効果を反映する増殖阻害効果を培養マラリア原虫の実験系で確認した。

この成果は、生化学的解析が遅れているマラリア原虫のジヒドロ葉酸還元酵素を解析し、薬剤耐性型突然変異による酵素蛋白質の構造変化と機能変化について関連付け、その機構を予測すること、効率的な抗マラリア剤のスクリー

ニングを可能にした。

論文審査の結果の要旨

マラリアに有効な薬剤のスクリーニング及び、薬剤耐性化機構の解析を目的とし、薬剤感受性及び耐性型ジドロ葉酸還元酵素を人工遺伝子を合成してレコンビナント蛋白質として調製することに成功した。これらを用いて、効果的な薬剤のスクリーニングにも成功しており、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。