

| | |
|--------------|--|
| Title | CHARACTERIZATION OF OROTATE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE AND OROTIDINE5' - MONOPHOSPHATE DECARBOXYLASE IN HUMAN MALARIA PARASITE |
| Author(s) | Sudaratana, Krungkrai |
| Citation | 大阪大学, 2007, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/48651 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"> 大阪大学の博士論文について をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | | |
|------------|---|---------------------|
| 氏名 | スダラターナ Sudaratana | クルンクライ Krungkrai |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (工 学) | |
| 学位記番号 | 第 21481 号 | |
| 学位授与年月日 | 平成 19 年 5 月 24 日 | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 | |
| 学位論文名 | CHARACTERIZATION OF OROTATE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE AND OROTIDINE 5'-MONOPHOSPHATE DECARBOXYLASE IN HUMAN MALARIA PARASITE (ヒトマラリア原虫のピリミジン合成経路に関わる 2 酵素 (OPRT、OMPDC) の解析) | |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 原島 俊 | |
| | (副査) 教授 金谷 茂則 准教授 井上 豪 微生物病研究所教授 堀口 安彦 微生物病研究所教授 堀井 俊宏 | |

論文内容の要旨

Malaria remains one of the world's major public health problems. Chemotherapy of malaria is available but it is complicated by both drug toxicity and widespread resistance to most of the currently available antimalarial drugs. This study was undertaken to understand in more detail the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway in the human malaria parasite with the goal of elucidating chemotherapeutic targets for drug development. Because of the dependence of the parasite on the *de novo* biosynthetic pathway for pyrimidines, precursors for DNA and RNA, inhibitors targeting this malarial pathway could be effective antimalarial agents.

Orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) and orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (OMPDC), the fifth and six enzymes in *de novo* pathway catalyzing formation of uridine 5'-monophosphate (UMP), remain largely uncharacterized in the protozoan parasite, although their specific inhibitors, pyrazofurin and its 5'-monophosphate derivative, respectively, were shown to be effective antimalarial agents. Identification and characterization of OPRT and OMPDC would contribute largely to elucidating the unique metabolic features in the parasite. In this study the native enzymes from *P. falciparum* were purified and found to be a multienzyme complex of 140 kDa containing two subunits each of OPRT and OMPDC. Results showed that the kinetic parameters and inhibitory constants of both enzymes were different from that of the bifunctional human red cell UMP synthase.

To conduct additional biochemical studies and gain further insights into these enzymes, the cDNA of both *PfOPRT* and *PfOMPDC* genes were cloned, sequenced and functionally expressed in soluble form. Recombinant *PfOPRT* exhibits a molecular mass of 33 kDa in SDS-PAGE and 67 kDa in analytical gel-filtration chromatography. Using dimethyl suberimidate to cross-link neighboring subunits of *PfOPRT*, the enzyme was confirmed to exist as a dimer. The steady state kinetics of initial velocity and product inhibition studies indicated that *PfOPRT* follows a random sequential kinetic mechanism. The recombinant *PfOPRT* and *PfOMPDC* monofunctional enzymes were found to be kinetically different from the native multienzyme complex

purified from *P. falciparum*. However, kinetics of the PfOPRT-PfOMPDC associated 140-kDa complex was similar to that of the native *P. falciparum* enzymes. Results demonstrated that the enzymes shared characteristics of both the monofunctional and bifunctional counterparts in prokaryotes and eukaryotes. Furthermore, an inhibitor of the yeast OMPDC, 6-thiocarboxamido-uridine 5'-monophosphate, was about 5 orders of magnitude less effective on the PfOMPDC than on the yeast enzyme. The crystal structure of PfOMPDC exhibits trigonal symmetry (space group $R\bar{3}$). With a dimer in the asymmetric unit, the solvent content is 46% ($V_M=2.3\text{\AA}^3\text{ Da}^{-1}$). Results on these studies will greatly facilitate antimalarial drug design based on the pyrimidine enzymes as chemotherapeutic targets.

論文審査の結果の要旨

全世界のマラリア感染者は3～5億人、死亡者は年間200万人と推定され、現在、マラリアは、人類にとって、最も深刻な感染症であると言われている。本論文は、熱帯熱マラリア *Plasmodium falciparum* におけるピリミジン (DNA や RNA の前駆体) の生合成経路に関する研究である。ヒトを始めとする多くの生物におけるピリミジン生合成経路には、グルタミン、ATP、および炭酸ガスから始まる *de novo* 合成経路と使用済みの核酸を再利用するサルベージ経路が知られているが、マラリアは *de novo* 合成経路しか持っていない。従って、この経路を遮断する薬剤は、サルベージ経路も有するヒトとの薬剤感受性の違いから、選択的な抗マラリア薬となる可能性が高い。上記の背景のもと、本研究では、uridine 5'-monophosphate (UMP) の *de novo* 合成経路の5番目および6番目の酵素である、orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) および orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (OMPDC) をコードする遺伝子の cDNA のクローニングおよび酵素の物理化学的性質に関する研究を行っている。

第一章では、マラリアから、各種クロマトグラフィーによって、OPRT と OMPDC 酵素をほぼ単一の評品にまで精製したところ、それらが共通した画分に回収され、それぞれの2分子を含む4量体の複合体であること、また反応速度解析や阻害常数の解析から、ヒト赤血球の UMP 合成酵素とは異なる性質を持つことを明らかにしている。

第二章では、これらの酵素遺伝子 (PfOPRT、PfOMPDC) の cDNA をクローニング後、大腸菌宿主で発現させて精製を行ったところ、どちらの酵素も2量体であることを明らかにしている。

第三章では、大腸菌から精製した両酵素を混合すると、140 kDa の複合体を形成し、その性質は熱帯熱マラリア原虫から精製した複合体と同様であること、しかし、酵母やヒトの UMP 合成酵素とは異なることを示している。また、マラリア原虫のこれらの酵素は、構造的、機能的に単細胞真核生物や多細胞生物の酵素とは異なるユニークな性質を持っていることを明らかにしている。

第四章では、大腸菌から精製した PfOMPDC の結晶化を行い、100 K の温度条件によるシンクロトロン放射光による X-線回折データから、その高次構造を 2.7Å の解像度で明らかにしている。

これらの研究結果は、ピリミジンの *de novo* 生合成系を標的とする新規薬剤開発において、重要な生化学的、構造的知見を与えるとともに、大腸菌において精製された組換え酵素は、新規薬剤候補の一次スクリーニングにおいて貴重な系を提供するものである。以上のように、本論文は学術的に大きな価値を持つだけでなく、抗マラリア薬の開発にも大きく貢献するものと考えられる。よって本論文は博士論文として十分に価値あるものと認められる。