

報告番号	※	乙	第	号
------	---	---	---	---

主 論 文 の 要 旨

論文題目 *Aspergillus fumigatus* 由来エラスターゼインヒビター AFUEI の X 線構造解析

氏 名 佐久間 麻由子

論 文 内 容 の 要 旨

アスペルギルス症は、真菌由来の難治性日和見感染症で、免疫不全の患者などに見られ、悪化すると呼吸機能に重篤な障害を起こす。アスペルギルス症全体の 95%以上は、*Aspergillus fumigatus*、*Aspergillus flavus*、*Aspergillus niger* の 3 菌種が原因となっている。これら 3 菌種の中では、特に *A. fumigatus* の症例が多い。これまでその病原因子として、様々な毒素や酵素などが調べられ、アスペルギルス属のエラスターゼは、アスペルギルス症の重要な原因物質の一つとなっている。AFUEI は、*A. fumigatus* の産生するエラスターゼインヒビターであり、*A. fumigatus* のエラスターゼを精製中に、培養上清中の阻害活性物質として発見された。このインヒビターは MEROPS database における I78 inhibitor family に属している。AFUEI は *A. fumigatus* と *A. flavus* のエラスターゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ブタ膵臓エラスターゼ、ウシキモトリプシンに対し高い阻害活性を持っているが、ウシトリプシンは阻害しない。また、医療用に市販されているエラスターゼインヒビターよりも、少量で高い阻害活性を持っている。このため、アスペルギルス症や肺炎疾患の治療補助薬として期待できると考え、AFUEI の立体構造の知見を得るために、X 線結晶構造解析を試みた。本研究において、AFUEI を 2 種類の形態で結晶化することに成功し、X 線結晶解析により、それぞれ 2.3Å、1.8 Å 分解能で構造決定することができた。

AFUEI は 68 残基、分子量 7525.8 のタンパク質で、ジスルフィド結合を 1 つ持つ。その全体構造はくさびの形をしており、土台となるコア構造からループ（くさびのエッジ部分）が伸びる形をしている。結晶構造中ではダイマーであったが、ゲル濾過の結果により、水溶液中ではモノマーで、エラスターゼには 1 分子で相互作用すると予測できた。この AFUEI の立体構造は、potato inhibitor I family に属する植物や環形動物（ヒル、ミミズ）由来のセリンプロテアーゼインヒビターと著しく良く似た構造をしていた。しかしながら、ループ部分を除いては両者のアミノ酸配列の相同性は低かった。アミノ

酸相同性が低いにもかかわらず、カビ由来の AFUEI が主に植物由来の potato inhibitor I family のインヒビターに良く似ていることは非常に興味深い。potato inhibitor I family との立体構造の比較から、AFUEI のループ部分は、potato inhibitor I family の結合ループに相当し、AFUEI は potato inhibitor I family に属するインヒビターと同じ阻害機構で、プロテアーゼを阻害することが推測できた。

セリンプロテアーゼのペプチド性インヒビターはプロテアーゼの基質と同じように、活性部位と基質結合部位に相互作用する。基質と違ってインヒビターが加水分解されないのは、基質結合部位に相互作用する部分の構造の動きが固定されており、加水分解反応が進んでも、離れて行かないからである。potato inhibitor I family のインヒビターでは基質結合部位と相互作用する結合ループのアミノ酸と、コア構造のアミノ酸とが水素結合のネットワークを形成しており、このために結合ループの向きと動きが固定され、阻害作用を発揮する。これと同様の水素結合のネットワークが AFUEI にも見られ、同様な阻害機構で、プロテアーゼを阻害することが推測できた。しかしながら、AFUEI と potato I family のインヒビターとは、結合ループと水素結合のネットワークを作るコア構造のアミノ酸の位置は違っており、異なったストランドからアミノ酸側鎖が伸びている。この構造の違いが、AFUEI の強いエラスターゼ阻害活性と関連していると推測している。

potato I family インヒビターとヒト好中球エラスターゼの共結晶構造を基に、AFUEI とヒト好中球エラスターゼの複合体のモデルを作成し、エネルギー最小化計算により最適化を行った。potato I family インヒビターと類似の構造が得られたことから、2種類のインヒビターの阻害機構が共通だという推測を裏付けた。また、AFUEI と potato inhibitor I family のインヒビターとの進化系統解析を行ったところ、真菌由来の AFUEI が、配列類似性は低いにもかかわらず、植物および環形動物由来の potato I family インヒビターと進化的類縁性を持っていることが明確に示された。

AFUEI は選択性が高いことが予測され、また低分子であること、エラスターゼ阻害活性が強いことから、アスペルギルス症の治療補助薬として応用できる可能性がある。さらに、ヒト好中球エラスターゼに対しても阻害作用を示すことから、好中球による炎症性疾患や肺繊維症の薬としても有効である可能性が高い。この立体構造の知見が、これらの治療薬の開発に役立つことが期待される。