

学位論文 要約

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

X-ray structure analysis of AFUEI,
an elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

分子第 4 講座

佐久間 麻由子

要 約

・ 目的

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を同定するために、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であることが知られている。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。真菌感染による重症肺炎においては、過剰な好中球エラスターゼが自分の肺を攻撃し、急性肺障害 (acute lung injury (ALI)) を引き起こす。ヒト好中球エラスターゼに阻害活性があることから、AFUEI は、アスペルギルス症だけでなく、その他の原因で引き起こされる急性肺障害の治療薬として期待されている。本研究において、AFUEI の立体構造の知見を得るために X 線結晶構造解析を行った。

・ 結果と考察

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 2.3 Å、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た。結晶構造中ではダイマーであったが、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果により、水溶液中ではモノマーであり、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類似性は低かった。potato I family インヒビターとの立体構造の比較から、AFUEI のループ部分は、potato I family インヒビター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ず、逆反応が促進されるからである。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 インヒビターとでは、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 β 鎖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、この 2 種類のインヒビターの阻害機構が共通だという推測が裏付けられた。また、AFUEI と potato inhibitor I family のインヒビターとの分子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。

カビ由来の AFUEI が、アミノ酸類似性が低いにもかかわらず、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。

AFUEI は選択性が高いことが予測され、また低分子蛋白質であること、真菌の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、好中球エラスターゼが自己障害性に働くことによって引き起こされる急性肺障害に対する治療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を願っている。