



Title	Purine nucleotide biosynthesis pathway as a drug target : Identification of novel IMPDH and GMPR from Trypanosoma congolense, and an inhibitor screening study of Cryptosporidium parvum and human type II IMPDH [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Sarwono, Albertus Eka Yudistira
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第13324号
Issue Date	2018-09-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/71854
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Albertus_Eka_Yudistira_Sarwono_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (農学)	氏名	Albertus Eka Yudistira Sarwono
審査担当者	主査	教授	松浦英幸
	副査	教授	橋床泰之
	副査	名誉教授	生方 信
	副査	講師	重富顕吾

学位論文題名

Purine nucleotide biosynthesis pathway as a drug target: Identification of novel IMPDH and GMPR from *Trypanosoma congolense*, and an inhibitor screening study of *Cryptosporidium parvum* and human type II IMPDH
(薬物標的としてのプリンヌクレオチド生合成: *Trypanosoma congolense* 由来の新規 IMPDH 及び GMPR の同定, 並びに *Cryptosporidium parvum* 及びヒト II 型 IMPDH 阻害剤の探索研究)

本論文は英文 104 頁, 図 46, 表 11, 2 章からなり, 参考論文 1 編が付されている。

生物に必須の分子機構であるプリンヌクレオチド生合成系は, 新たに核酸を合成する *de novo* 経路と核酸分解産物を回収する salvage 経路から成っている。イノシンーリン酸脱水素酵素 (IMPDH) ならびにグアノシンーリン酸リダクターゼ (GMPR) はそのいずれにおいても細胞内のグアノシン/アデノシンレベルの調節を行う鍵酵素として機能している。このため, これらの酵素はしばしば薬剤開発の重要な分子標的とされる。本研究は, 寄生性原虫における新たな GMPR, IMPDH の発見と, 原虫 IMPDH ならびにヒト IMPDH に対する新規阻害剤の探索についての結果をまとめたものである。

1) *Trypanosoma congolense* からの新規 GMPR ならびに IMPDH の同定

T. congolense はウシなどの家畜の血液に感染し, トリパノソーマ症を引き起こす寄生性原虫である。*T. congolense* はその核酸合成を salvage 経路のみに依存しているため, その IMPDH や GMPR はトリパノソーマ症治療に向けた良い薬剤標的になると期待される。著者は *T. congolense* ゲノムから IMPDH 遺伝子の探索を行い, IMPDH 様遺伝子として TcIL3000_5_1940 を見出した。系統樹解析の結果, 当該遺伝子が IMPDH よりもむしろ GMPR との高い類似性を示したことから, その酵素学的な機能解析を行った。TcIL3000_5_1940 がコードするタンパクを大腸菌において異種発現・精製した後, その IMPDH ならびに GMPR 活性を評価した。その結果, 系統樹の示唆した通り当該酵素は IMPDH 活性を示さず GMPR 活性のみを示すことを明らかにした (以降 TcGMPR)。次いで TcGMPR の k_{cat} , ならびに基質である GMP と NADPH に対する K_m の解析を行い, 哺乳動物 GMPR (HsGMPR, BtGMPR) との特性の比較を行った。その結果, TcGMPR の k_{cat} は哺乳動物 GMPR と同等である一方, GMP に対する K_m は哺乳動物 GMPR より高く, NADPH に対する K_m は低いこ

とを見出した。これらの結果は TcGMPR が哺乳動物 GMPR とは異なる薬剤応答を示すことを示唆するものであり, TcGMPR を標的とした薬剤開発において大いに貢献する知見である。また, *T. congolense* ゲノムから別途 IMPDH 遺伝子 BAT336621.1 を見出し, 同様に酵素学的な解析を行っている (TcIMPDH)。これらの比較から, 高い類似性を持つ IMPDH と GMPR において Leucine-Serine dyad が GMPR の指標となることを提案している。

2) ハイスループットスクリーニングを用いた IMPDH 阻害剤の探索

II 型ヒト IMPDH (hIMPDH II) は原虫 IMPDH と同様に, 様々な疾病治療の分子標的となり得る。著者は hIMPDH II ならびに原虫 *Cryptosporidium parvum* IMPDH(CpIMPDH)を標的とする新たな阻害剤の探索を行った。探索手法としてマルチウェルプレートとセミオートメーションを組み合わせたハイスループットスクリーニング系を用い, 探索対象として 3, 200 種の化合物から成る化合物ライブラリーを用いた。段階的な選抜により, 3 種の既知化合物 (disulfiram, bronopol, ebselen) と 3 種の合成核酸類縁体を, 新たな IMPDH 阻害剤として見出した。3 種の既知化合物について阻害様式の解析を行った結果, disulfiram, bronopol は IMPDH の IMP 結合サイトを標的に不可逆的に阻害し, ebselen は同サイトに可逆的に結合することを見出している。また, 還元剤の添加実験と計算化学的手法により, disulfiram と ebselen は hIMPDH II の Cys331 を標的とするという示唆を得ている。上記の 3 化合物については, いずれも IMPDH 阻害剤としての活性はこれまで報告が無く, 本研究によって改めて見出されたものである。これらの成果は新たな IMPDH 阻害剤の開発へ向けた重要な知見を与えるのみならず, 既存薬剤の活性再発掘の成功例として当該分野に大きく寄与するものである。

以上, 本研究では IMPDH ならびに GMPR を薬剤開発の分子標的と捉え, 分子生物学的・酵素学的な手法を用いることで, 新たな標的酵素の発見と阻害剤の発見を達成することが出来た。以上の成果は, プリンヌクレオチド生合成を標的とする薬剤開発に大きく寄与するものである。

よって審査員一同は, Albertus Eka Yudistira Sarwono が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。