

2014. 10

特集号



(題字：脇口宏学長)

# 国立大学法人 高知大学学報

## 高知大学学位授与記録第七十号

法人企画課広報戦略室発行

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

\*\*\*\*\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*\*\*\*\*

# 高知大学学報

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総医博第23号	徳弘 慎治	<p>Enzymatic properties and determination of amino acid residues essential for substrate catalysis of phosphagen kinase from <i>Schistosoma japonicum</i>.</p> <p>1) Phosphagen kinase in <i>Schistosoma japonicum</i>: characterization of its enzymatic properties and determination of its gene structure.            2) Phosphagen kinase in <i>Schistosoma japonicum</i>: II. Determination of amino acid residues essential for substrate catalysis using site-directed mutagenesis.</p> <p>(日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの酵素特性の決定と基質触媒に必要不可欠なアミノ酸残基の同定)</p> <p>1) (日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの酵素特性の同定と遺伝子構造の決定)            2) (点突然変異体作製による日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの基質触媒において必要不可欠なアミノ酸残基の決定)</p>	1

氏名(本籍)	徳弘 慎治 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第23号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年9月9日
学位論文題目	Enzymatic properties and determination of amino acid residues essential for substrate catalysis of phosphagen kinase from <i>Schistosoma japonicum</i> .  1) Phosphagen kinase in <i>Schistosoma japonicum</i> : characterization of its enzymatic properties and determination of its gene structure. 2) Phosphagen kinase in <i>Schistosoma japonicum</i> : II. Determination of amino acid residues essential for substrate catalysis using site-directed mutagenesis. (日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの酵素特性の決定と基質触媒に必要なアミノ酸残基の同定)  1) (日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの酵素特性の同定と遺伝子構造の決定) 2) (点突然変異体作製による日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの基質触媒において必要不可欠なアミノ酸残基の決定)
発表誌名	1) Molecular and Biochemical Parasitology 188(2):91-98 2013年4月 2) Molecular and Biochemical Parasitology 194(1-2):56-63 2014年3月-4月

審査委員	主査	教授	菅沼	成文
	副査	教授	椛	秀人
	副査	教授	麻生	悌二郎

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名 徳弘 慎治

## 論文題目

Enzymatic properties and determination of amino acid residues essential for substrate catalysis of phosphagen kinase from *Schistosoma japonicum*.

(日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの酵素特性の決定と基質触媒に必要な不可欠なアミノ酸残基の同定)

### (論文要旨)

ホスファージェンキナーゼ (PK) は、生体内においてエネルギー代謝に関与する酵素群である。現在、クレアチンキナーゼ (CK) やアルギニンキナーゼ (AK) をはじめとする 8 種類の PK が発見されている。ヒトなどの脊椎動物は CK を有するが、寄生虫を含む無脊椎動物には AK やその他の PK が存在する。これら脊椎動物 CK や無脊椎動物 AK は、各々の基質に対し特異的な酵素活性を示す。住血吸虫症の病原体である住血吸虫属 (*Schistosoma* 属) は、フィリピンをはじめとする東南アジアや中国などに生息し、住血吸虫症感染者は全世界で 2.3 億人と報告されている。住血吸虫症の主な病因は、産卵された虫卵に対する宿主免疫反応である。住血吸虫症の治療としてはプラジカンテルが第一選択薬として用いられ、良好な治療成績が得られているが、最近プラジカンテル耐性マンソン住血吸虫が報告されており、新薬の開発は急務である。我々は、ヒトと無脊椎動物が異なる PK を有する点に着目し、寄生虫 PK を特異的に阻害すれば、効果的な抗寄生虫薬の新規開発を行う事ができると考えた。本研究では、Sj から SjPK をコードする mRNA を単離して cDNA を作製したのち、クローニングによって SjPK 組込プラスミド DNA を作製した。この SjPK 組込プラスミド DNA を鋳型として、SjPK の点突然変異体を作製した。これらのプラスミドから組換 SjPK 及び組換変異 SjPK を蛋白発現用大腸菌内で大量発現させたのち精製し、PK 活性を NADH-linked spectrophotometric assay にて測定した。また、SjPK がどのような進化過程を経て形成されたのかを推察するために、SjTK 遺伝子構造 (エクソン/イントロン構造) を決定した。SjPK はドメイン 1 (D1) とドメイン 2 (D2) の異なるアミノ酸配列を有する PK が連結した、2 ドメイン構造であった。SjPK は基質としてタウロシアミンを特異的に認識するタウロシアミンキナーゼ (TK) であり、SjTK の D1 と D2 は、それぞれを切り離した単独のドメインでも TK 活性を示した。SjTK 遺伝子構造から得られたイントロンの位置は、貝類の AK と類似したことから、AK 祖先遺伝子から進化した可能性が示唆された。深海に生息する環形動物の TK は CK と類似する遺伝子構造を有する事から、SjTK は新規の TK である事が示唆された。SjTK の点突然変異体の酵素特性を組換え野生型 SjTK と比較したところ、SjTK の D1 において、63 番目のアルギニンが基質触媒に決定的な役割を果たすことを明らかにした。また、84 番目のチロシンが基質と直接結合する部位ではないにも関わらず、このチロシンを他のアミノ酸残基に置換すると、TK 活性が大幅に低下する事を明らかにした。さらに、D1 の 222 番目のグルタミン酸をグリシンに置換したところ、TK 活性が失われる事を明らかにした。同様に、D2 の 225 番目のグルタミン酸をグリシンに置換しても TK 活性が消失した。本研究では実験的に、植物由来の抽出物を用いて PK 阻害効果を示す抽出物の探索を行った。結果として、インドセンダン粗抽出物が SjTK に対し阻害作用を有する可能性を見出した。日本住血吸虫 TK の 3 次元構造において、タウロシアミン結

合に関与するアミノ酸残基を明らかにした本研究は、今後のさらなる PK 基質触媒機構解明において、重要な学術的示唆を与えるものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	徳弘 慎治
審 査 委 員	主 査 氏 名	菅沼 成文 
	副 査 氏 名	梶 秀人 
	副 査 氏 名	麻生 悌二郎 

題 目 Enzymatic properties and determination of amino acid residues essential for substrate catalysis of phosphagen kinase from *Schistosoma japonicum*. (日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの酵素特性の決定と基質触媒に必要不可欠なアミノ酸残基の同定)

- 1) Phosphagen kinase in *Schistosoma japonicum*: characterization of its enzymatic properties and determination of its gene structure. (日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの酵素特性の同定と遺伝子構造の決定)
- 2) Phosphagen kinase in *Schistosoma japonicum*: II. Determination of amino acid residues essential for substrate catalysis using site-directed mutagenesis. (点突然変異体作製による日本住血吸虫ホスファージェンキナーゼの基質触媒において必要不可欠なアミノ酸残基の決定)

著 者 1) Shinji Tokuhira, Kouji Uda, Hiroko Yano, Mitsuru Nagasaki, Blanca R. Jarilla, Tomohiko Suzuki, Takeshi Agatsuma  
 2) Shinji Tokuhira, Mitsuru Nagasaki, Blanca R. Jarilla, Kouji Uda, Tomohiko Suzuki, Tetsuro Sugiura, Takeshi Agatsuma

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
 1) Molecular and Biochemical Parasitology, 188(2):91-98, 2013年4月  
 2) Molecular and Biochemical Parasitology, 194(1-2):56-63, 2014年3月-4月

### 要 旨

ホスファージェンキナーゼ (PK) は、生体内においてエネルギー代謝に関与する酵素群である。現在、クレアチンキナーゼ (CK) やアルギニンキナーゼ (AK) をはじめとする8種類のPKが発見されており、ヒトなどの脊椎動物はCKを有するが、寄生虫を含む無脊椎動物にはAKやその他のPKが存在する。住血吸虫症の病原体である住血吸虫属 (*Schistosoma* 属) は、フィリピンをはじめとする東南アジアや中国などに生息し、住血吸虫症感染者は全世界で2.3億人と報告されている。申請者らは、ヒトと無脊椎動物が異なるPKを有する点に着目し、寄生虫PKを特異的に阻害すれば、効果的な抗寄生虫薬の新規開発を行う事ができると考えた。本研究では、日本住血吸虫 (Sj) のPKのcDNA塩基配列を決定し、蛋白発現ベクターにクローニングして大腸菌内で過剰発現させた。また、このSjPK組込プラスミドDNAを鋳型として、SjPKの点突然変異体を作製した。さらにSjPKがどのような進化過程を経て形成されたのかを推察するために、SjTKの遺伝子構造 (エクソン/イントロン構造) を決定した。SjPKはドメイン1 (D1) とドメイン2 (D2) の異なるアミノ酸配列を有す

る PK が連結した 2 ドメイン構造であり、基質としてタウロシアミンを特異的に認識するタウロシアミンキナーゼ (TK) であることが明らかになった。SjTK の遺伝子構造は貝類の AK と類似しており、AK の祖先的遺伝子から進化した可能性が示唆された。SjTK の点突然変異体の酵素特性を組換え野生型 SjTK と比較したところ、SjTK の D1 においては、63 番目のアルギニンが基質触媒に必須であることが明らかになった。また、84 番目のチロシンを他のアミノ酸残基に置換すると、TK 活性が大幅に低下する事が明らかになった。さらに、D1 の 222 番目 (D2 では 225 番目) のグルタミン酸をグリシンにそれぞれ置換したところ、TK 活性が失われる事が明らかになった。本研究では実験的に、植物由来の抽出物を用いて PK 阻害効果を示す抽出物の探索を行った。結果として、インドセンダン粗抽出物が SjTK に対し阻害作用を有する可能性があることが示唆された。

本論文の内容は、以下に要約される。

1) 日本住血吸虫のホスファージェンキナーゼは連結二量体構造であり、基質としてタウロシアミンを認識するタウロシアミンキナーゼ (TK) であった。

2) 日本住血吸虫 TK は、クレアチンキナーゼ様の祖先的遺伝子から進化した環形動物 TK とは異なり、アルギニンキナーゼ様の祖先的遺伝子から進化した可能性が示唆された。

3) 日本住血吸虫 TK のドメイン 1 (D1) において、63 番目のアルギニン残基がタウロシアミンと直接結合する事が明らかになった。また 84 番目のチロシン残基が、基質結合に関与しないが、適切な基質結合においては必須である事が明らかになった。

4) 日本住血吸虫 TK の C 末端に位置する 222 番目のグルタミン酸残基 (D2 においては 225 番目) をグリシン残基に置換したところ、TK 活性が消失した。

日本住血吸虫 TK の 3 次元構造において、タウロシアミン結合に関与するアミノ酸残基を明らかにした本研究は、今後のさらなる PK 基質触媒機構解明において、重要な学術的示唆を与えるものと思われた。

最終試験  
報告書  
学力確認

	氏名	徳弘 慎治
実施年月日 最終試験 学力確認	平成 26年 8月 11日 方法(該当を○で囲む。)	<input checked="" type="radio"/> 口頭      筆答
最終試験 学力確認	の結果の要旨  <p>公開審査に引き続き、最終試験が行われた。申請者は、本研究における新たな知見について、日本住血吸虫 TK の各ドメインの関連性について、TK 阻害物質探索における今後の方針についてなどの審査員より提示された質問に対し、概ね良好な回答を示した。また、今後の研究の展望についても、これまでの研究において習得した分子生物学的手法を生かして研究者としての挑戦を希望しており、植物抽出物を用いた日本住血吸虫 TK に対する阻害物質の探索により、インドセンダン <i>Azadirachta indica</i> の粗抽出物が、TK 特異的な阻害作用を示す事が示唆されたことも述べた。以上により、審査員一同、本研究は、高知大学博士(医学)に相応しいと判断した。</p>	
決定(該当を○で囲む。)	<input checked="" type="radio"/> 合      否	
主査氏名	菅沼 成文 	
副査氏名	梶 秀人 	
副査氏名	麻生 悌二郎 	