

日目に死亡した。

4) 4 連続投与した場合 25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg 投与群の全てのマウスにおいて投与開始 3 日目に血中からの原虫の消失が見られた。しかし、25mg/kg 投与群においては 6~7 日目、50mg/kg 投与群においては 8 日目に全てのマウスに再発が見られ全てのマウスが 25mg/kg および 50mg/kg 投与群において治療開始後それぞれ 11~12 日、13 日目に全て死亡した。一方、100mg/kg 投与群では全てのマウスにおいて治癒が見られた。

D. 考察

これまでの研究報告によればアフリカトリパノソーマ症マウスモデルの治療において Af は単独投与では全く効果がなくグリセロールとの併用が必須であった。しかも必要とするグリセロールが 3g/kg と大量なことが Af をアフリカトリパノソーマ症の治療薬としての実用化の障害となっていた。しかし、これまでに報告されている Af 投与法は腹腔内及び経口投与ともに一度の投与にて治療する方法であった。培養可能な原虫株 GUTat 3.1 を用いた培養系における Af の抗トリパノソーマ効果の基礎的研究において Af の抗トリパノソーマ効果はグリセロール非存在下においても示される事実に着目しマウスの血中濃度をある一定期間高レベルに保てば治療効果が期待できるのではと考え Af 単独かつ連続投与という治療方法を検討した。研究結果に示したように Af 100mg/kg 4 連続投与により

トリパノソーマ症マウスモデルは全てのマウスにおいて治癒が観察された。これまでの基礎的実験から Af の LD₅₀ は 5g/kg 以上とされているようにほとんどその副作用は認められない。これらの結果は Af が安全かつ有効なアフリカトリパノソーマ治療薬になりうることを強く示唆している。

E. 結論

本研究において副作用のほとんど認められない Af を単独 4 連続投与する方法でアフリカトリパノソーマ感染マウスの治癒が可能になることを初めて明らかにした。さらに、治癒に必要な投与量も実際に用いられている DFMO (400mg/kg) の 1 回量と同じで本剤の実用化に向けての第 1 歩となると考える。

F. 研究発表

1. Yabu, Y., Minagawa, N., Kita, K., Nagai, K., Honma, M., Sakajo, S., Koide, T., Ohta, N., Yoshimoto, A.: Oral and intraperitoneal treatment of ascofuranone and glycerol in mice. *Parasitol Int*, 47: 131-137, 1998
2. Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S., Kita, K.: Functional expression of the ascofuranone-sensitive *Trypanosoma brucei* alternative oxidase in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrine*, 124: 141-148, 1999

シアン耐性末端酸化酵素の生化学的解析

分担研究者：皆川信子 共同研究者：坂上 茂、吉本 昭夫、篠 義貞¹、
永井和夫²、岩田 想³、WHO

新潟薬科大学生化学、¹名古屋市立大学医学部医動物、²東京工業大学生命理工学部生物工学科細胞工学、³Uppsala 大学生化学科

研究要旨

- 1) 原虫 *Trypanosoma brucei* の特異なエネルギー代謝を標的とする化学療法剤を開発する目的で、マウスにおける *Trypanosoma brucei rhodesiense* 急性感染に対する抗生物質アスコフラノンとグリセロール同時投与の治癒効果を確認した (WHO との共同研究)。
- 2) 投与量・投与方法に問題の多いグリセロールに代わりうるアスコフラノンの併用薬剤の検索を行った。漢方の抗炎症処方に含まれるビスベンジルイソキノリンアルカロイドの一種テトランドリンの有効性が認められた。
- 3) アスコフラノンと構造上深く関連しているアスコクロリンに関して、ミトコンドリアのシトクロム *bc₁* 複合体に対する作用機構を、X線結晶構造解析によって三次元的に解明した。この結果から、アスコフラノンは側鎖の構造が障害となってシトクロム *bc₁* 複合体に結合できないことがわかった。
- 4) 哺乳動物血流型における *trypanosome alternative oxidase* の急激な発現のメカニズムを推定する目的で、酵母 *Hansenula anomala* における *alternative oxidase* 核遺伝子発現の過程を検討した。金属キレーターである *dithiocarbamate* 類が発現を誘導する作用と同時に誘導を阻害する作用を示すことが明らかとなった。

A. 研究目的

アフリカトリパノソーマ症の病原体である原虫 *Trypanosoma brucei* は、吸血昆虫ツエツエバエの媒介で哺乳動物血流中に侵入し、**long slender form** の形態ですみやかに増殖し、病状を発現する。この血流型の **ATP** 産生は、解糖系に完全に依存しており、ミトコンドリアの呼吸系の機能はグリセロールリン酸シャトルを介して **NAD⁺** を再生し、解糖系の円滑な進行を支えることである。この特異な呼吸系は、シアン非感受性の酸化酵素 (*trypanosome alternative oxidase*) が担っている。この酵素は、高等

植物、緑藻類、カビ、酵母などにシトクロム系のバイパスとして幅広く見いだされるユビキノール酸化酵素 (*alternative oxidase*) と同じ分子種である。我々は、哺乳動物には存在しないこの酵素を化学療法剤のターゲットとして研究を進め、アスコフラノンによるきわめて強力かつ特異的な阻害作用を見出した。アスコフラノンは、不完全菌 *Ascochyta visiae* が産生する抗生物質であり、ユビキノールに類似した構造を有している。哺乳動物ミトコンドリアの呼吸に対しては顕著な作用を示さず、*trypanosome alternative oxidase* を強力に

阻害する。ミトコンドリアの呼吸が阻害されると原虫はグリセリンとピルビン酸を最終代謝物とする嫌氣的代謝に切り替える。したがって、アスコフラノンとグリセロールの同時添加で、原虫のエネルギー代謝は完全に停止すると予想された。家畜にのみ感染する *Trypanosoma brucei brucei* を接種したマウスモデルで、アスコフラノンとグリセロールの同時投与による劇的な治癒効果を確認した。解決すべき問題はあつたものの、アスコフラノンは調製法が確立されており、化学的に安定で経口投与でも有効でありきわめて毒性が低いことがわかっている。アフリカトリパノソーマ症の治療薬の有効候補として注目され、WHOと Confidentiality Agreement を締結し、共同研究を開始するに至つた。

この分担研究は、大きく4つの内容に分けることができる。

- 1) WHOと共同で、ヒトと家畜の両方に深刻な発症をもたらすローデシアトリパノソーマ (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) に感染したマウスモデルにおけるアスコフラノンの有効性を検討した。
- 2) アスコフラノンを臨床使用する場合、投与方法・投与量、吸収、体内分布などグリセロールには問題が多い。グリセロールに代わりうる併用薬剤を検索した。
- 3) ユビキノールの酸化還元に対するアスコフラノンの作用機序を解明する目的で、アスコクロリンの作用を検討した。やはり *Ascochyta visiae* が産生する抗生物質アスコクロリンは、アスコフラノンと酷似したプレニルフェノール構造を有するにもかかわらず、哺乳動物ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達の要ともいふべきシトクロム bc_1 複合体 (ユビキノール-シトクロム c 酸化還元酵素) を特異的に阻害する。X線結晶構造解析によつて、アスコクロリンの作用機構を明らかにし、さらにアスコフラノンと比較検討した。

- 4) *Trypanosoma brucei* が、ツエツエバエ唾液腺から哺乳動物血流中に侵入すると、すみやかに特異なミトコンドリアの呼吸系が誘導される。この急激な誘導のメカニズムを推定する目的で、酵母 *Hansenula anomala* を用いて呼吸阻害剤存在下で急激に誘導される alternative oxidase の核遺伝子発現の機構に検討を加えた。

B. 研究方法

- 1) 原虫 (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) の接種で急性及び慢性症状を呈したマウスにアスコフラノンとグリセロールを経口投与し、治癒効果を調べた。
- 2) 原虫 (*Trypanosoma brucei gambiense* Wellcome 株) の *in vitro* 培養系に種々の薬剤を添加し、増殖阻害効果を調べた。Balb/c マウスに原虫 (*Trypanosoma brucei brucei* ILTat 1.4) を接種し、3日、4日、5日後の3回、アスコフラノンとテトラドリンを腹腔内投与し、治癒効果を調べた。
- 3) ウシ心筋ミトコンドリア由来のシトクロム bc_1 複合体から得られた P6₅22 結晶 (Science, 281, 64-71 (1998)) に関して、アスコクロリンとの複合体の 3.0 Å までの分解能の X 線反射を測定し、構造解析を行った。
- 4) 酸素電極法によるシアン耐性呼吸活性の測定及びウェスタンブロット法による

れなかった。この原因としては、アスコフラノンの脳内分布、グリセロールの血中濃度などの問題が考えられる。今後、投与方法・投与量など実験条件の検討を行う必要があると思われる。

2) カルシウムチャンネル遮断薬として注目されているテトランドリンの生理作用には未だ不明の点が多い。**Trypanosome alternative oxidase** に対する阻害作用は認められなかったので、アスコフラノンとは全く異なる作用機序で相乗的に原虫致死作用を増強すると推定される。*In vitro* 培養系のみならずマウスを用いた *in vivo* 実験においても、アスコフラノンの作用を増強する効果が認められたので、グリセロールに代わりうる併用薬剤として有望であると思われる。今後さらにテトランドリンの同時投与に関して詳細に検討していきたい。

3) アスコクロリンと相互作用しているシトクロム *b* サブユニットの His 201 と Asp 228 の2つの残基は、実際のユビキノンの還元過程で中間体として生じるユビセミキノンの安定化に関与していると考えられる。したがって、アスコクロリンはユビセミキノンのアナログとしてキノ還元部位に特異的に結合することが明らかとなった。さらに、アスコクロリンは、ユビキノールの酸化を担う **Q_o** 部位にも、ユビセミキノンのアナログとして作用することを示唆する結果を得ている。**Q_i** と **Q_o** の両部位に作用する阻害剤はこれまで例が無く、きわめて興味深いものである。現在、**Q_o** 部位に対する作用を詳細に検討している。アスコフラノンはアスコクロリンに比べて側鎖の構造が少し大きいために、シトクロム *bc₁* 複合体に結合できず、哺乳

動物ミトコンドリアに対して顕著な作用を示さないと推定される。この結果は、アスコフラノンの優れた選択的薬効性に理論的背景を与えるものであり、実用化に向けて必ず克服しなければならない副作用の問題を考えた時、非常に重要な知見である。

4) **PDTC** 等 **dithiocarbamate** 誘導体や **pyrithione** は、**dithiotheritol** などと同様にイオウ化合物として **alternative oxidase** 核遺伝子発現を誘導すると推定される。**PDTC** に関しては、抗酸化剤として転写調節因子の活性化を阻害するという報告が多く出されているが、誘導の阻害における金属との相互作用の重要性が示唆された。

E. 結論

1) *T. brucei rhodesiense* 感染の急性モデルマウスに対して、アスコフラノンとグリセロールの同時投与による顕著な治癒効果が確認された。

2) ビスベンジルイソキノリンアルカロイドの一種であるテトランドリンがアスコフラノンの作用を増強することを見出した。テトランドリンがグリセロールに代替しうる可能性が示唆された。

3) アスコクロリンは、ユビセミキノンのアナログとしてユビキノンの同様に **Q_i** 部位に結合しシトクロム *bc₁* 複合体の電子伝達を阻害することが明らかとなった。アスコフラノンは側鎖の構造が障害となってシトクロム *bc₁* 複合体に結合できないことがわかった。

4) **Dithiocarbamate** 類は、**alternative oxidase** 核遺伝子の発現の誘導作用及び誘導の阻害作用という相反する作用を同時に示すことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S. and Kita, K. : **Functional Expression of the Ascofuranone-Sensitive *Trypanosoma brucei brucei* Alternative Oxidase in the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*, Comp. Biochem. Physiol., Part C 124, 141-148 (1999)**
- 2) Sakajo, S., Minagawa, N. and Akio Yoshimoto : **Structure and Functional Expression of a Single Copy of Alternative Oxidase Gene from the Yeast *Pichia anomala*, Biosci. Biotech. Biochem., 63, 1889-1894 (1999)**

2. 学会発表

- 1) 刈屋春海、皆川信子、坂上茂、吉本昭夫、永井和夫、岩田茂美、岩田想：ミトコンドリアのシトクロム *bc₁* 複合体に対する **Ascochlorin** の効果、第72回日本生化学会（1999）
- 2) 坂上茂、皆川信子、吉本昭夫：酵母 *Pichia anomala* におけるシアン耐性末端酸化酵素(Alternative Oxidase)遺伝子の構造と発現調節、第72回日本生化学会（1999）
- 3) Kariya, H., Minagawa, N., Sakajo, S. and Yoshimoto, A.: **Effects of Dithiocarbamates on the Expression of Alternative Oxidase in the Yeast, *Hansenula anomala*, International Symposium for Oxidative Stress, Redox Regulation and Signal Transduction, Kyoto (1999)**
- 4) 坂上茂、皆川信子、吉本昭夫：糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるシアン耐性末端酸化酵素遺伝子の構造、日本農芸化学会2000年度大会（2000）
- 5) 皆川信子、刈屋春海、坂上茂、吉本昭

夫：酵母 *Hansenula anomala* における **Alternative Oxidase** 核遺伝子発現に対する **Dithiocarbamate** 類の効果、日本農芸化学会2000年度大会（2000）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

Trypanosoma brucei brucei 原虫の血流型long slender 型からshort stumpy 型に移行する発現変動を示す遺伝子の解析

研究協力者： 鈴木高史
名古屋市立大学医学部医動物学教室・助手

研究要旨

アスコフラノンはトリパノソーマ原虫のシアン耐性酸化酵素を特異的に阻害することが明らかにされてきており、宿主体内で活発に増殖するlong slender (LS)型トリパノソーマ原虫に強力に作用するが、増殖を止めてツエツエバエに移行しうるshort stumpy (SS)型に対しては作用しない可能性が高いと考えられてきた。SS型自体は48時間程度の限られた寿命しか持たないため、このことが直ちにアスコフラノンの有効性を損ねるものとは考えられないが、このLS型からSS型へ移行する際に伴う遺伝子発現変動解析を網羅的に明らかにすることは、抗トリパノソーマ薬としてアスコフラノンの実用化を目指す上で、重要な知見を提供することになると考えられる。そこで、蛍光differential display法によりLS型からSS型へ移行する際に発現変動する遺伝子群の解析を行った。その結果、LS型で特に発現が顕著なcDNA（遺伝子）を1つ見い出した。このcDNA（遺伝子）の産物はN末側にDNA binding motifを有し、C末側にはcalpain様ドメインを有する新規プロテアーゼ(*Trypanosoma calpain-like*: TCL)遺伝子と推定された。さらにその変動する遺伝子の機能解析としてantisense-oligo DNAを用いた遺伝子発現抑制実験を行った結果、24時間後に原虫が100%死滅した。以上の結果から、TCL遺伝子はアフリカトリパノソーマ原虫のLS型の増殖、生存に極めて重要な機能を持つと推察された。

A. 研究目的

*Trypanosoma brucei brucei*とその類縁種はアフリカ睡眠病やナガナ病などの病原体として主としてサハラ以南のアフリカでヒトや家畜に甚大な被害をもたらしている重要な昆虫媒介性原虫である。しかしながらこれらのトリパノソーマ症に対する治療薬はヒトに対して4種類、家畜に対しては2種類あるのみであり、いずれも副作用が強い薬ばかりである。このような理由から副作用の少ない有効な薬剤の開発が期待されている。このような背景を元に、本新興再興感染症事業では新規薬剤としてのアスコフラノンの有効性検討と実用化に向けての研究を行っているが、アスコフラノンは主として、トリパノソーマ原

虫血流型において、宿主体内で活発に増殖するlong slender (LS)型指向性に作用するとの報告がある。即ち、アスコフラノンは、トリパノソーマ原虫血流型において、増殖を止めてツエツエバエに移行しうるshort stumpy (SS)型に対しては作用しない可能性が高い。SS型自体は48時間程度の限られた寿命しか持たないため、このことが直ちにアスコフラノンの有効性を損ねるものとは考えられないが、このLS型からSS型へ移行する際に伴う遺伝子発現変動解析を網羅的に明らかにすることは、抗トリパノソーマ薬としてアスコフラノンの実用化を目指す上で、重要な知見を提供することになると考えられる。そこで、LS型からSS型へ移行する際に発現変動する遺伝子群の解析を蛍光を用いた

differential display法により解析を行い、さらにその変動する遺伝子の機能解析として antisense-oligo DNAを用いた遺伝子発現抑制実験を行った。

B. 研究材料と方法

1) トリパノソーマ原虫株

農林水産大臣の許可を得て、ケニア共和国ナイロビにある国際家畜疫病研究所 (ILRAD) から分与された *T. b. brucei* の GUTat 3.1 株を用いて、トリポマスティゴート型のうち、long slender (LS) 型と short stumpy (SS) 型とを、それぞれ *in vitro* の培養 (LS) および BALB/c マウス腹腔からの回収虫体の DEAE カラムのクロマトグラフィー (SS) によって精製した。

2) 特色的発現遺伝子のクローニングとその機能解析

LS 型原虫、SS 型原虫それぞれより total RNA を抽出し、逆転写により、cDNA を作製した。これを用いて蛍光標識の GT15V と 10 mer 任意プライマーを用いてアニーリング条件の緩い PCR を行ない、その産物を電気泳動した。泳動終了後、蛍光イメージアナライザー (FM-BIOII: TAKARA) でゲルイメージを取得し、LS 型 vs SS 型間で変動が認められる cDNA バンドをクローニングした。その後、DNA 塩基配列を決定し、相同性検索をデータベースから行なった。

さらに、遺伝子発現抑制実験として、アンチセンス DNA による原虫の増殖阻害を行った。即ち、*T. b. brucei* の LS 型に特異的に発現が認められた遺伝子由来の 20-mer の sense または antisense DNA を *in vitro* の培養 (LS) に Lipofection 法で導入して、24 時間後の原虫増殖を比較評価した。1×10⁵ 個の原虫を開始時原虫数とした。

3) 研究結果

LS 型と SS 型の間で約 8000 個の cDNA の比較を蛍光ディフェレンシャル法で行なった。その結果、VSG 以外の分子として LS 型で特に発現が顕著な cDNA (遺伝子) を 1 つ見出した (図-1)。RT-PCR で原虫における発現を確認した

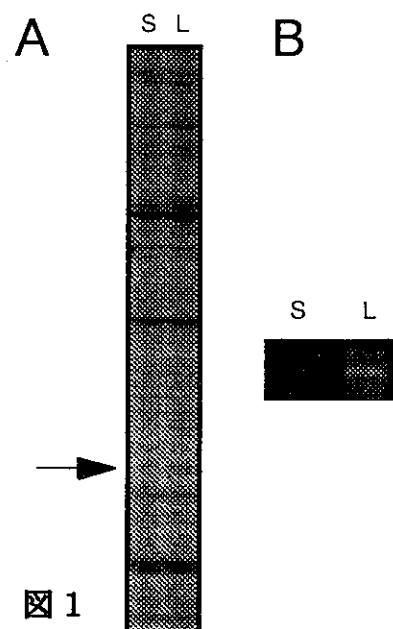


図 1

A. FDD analysis was performed for bloodstream forms (L: long slender; S: short stumpy). Arrow indicates the cDNA band whose expression was up-regulated in long slender forms.
B. Gene-specific RT-PCR analysis for both forms was performed, reflecting the cDNA fingerprint on FDD.

後、その全長をクローニングし、シークエンス解析を行った結果、この遺伝子は 1038 個のアミノ酸をコードしており、その N 末側は chromodomain-helicase-DNA-binding protein と、C 末側は calpain family のドメイン II と高い相同性を有する新規プロテアーゼ遺伝子 (*Trypanosoma calpain-like*; TCL) と推定された。

次に、*T. b. brucei* の LS 型原虫に発現が強い TCL 遺伝子の原虫生存におよぼす意義を検討するために、TCL 遺伝子の 18 mer の sense または antisense DNA を LS 型原虫に添加して 24 時間後の時点で、両群の原虫増殖を比較した。無添加コントロールでは原虫数は約 6 倍に増加したのに対して、antisense 添加群では原虫が 100% 死滅した。一方、sense DNA 添加群ではコントロールと比べて原虫の増殖にほとんど影響が認められなかった。また、キャリアに用いたリピッド単独の添加でも有意な増殖抑制は認められなかった (図-2)。

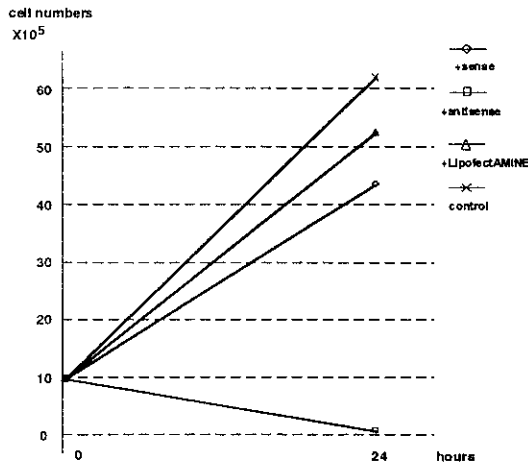


図 2

D. 考察

LS型で顕著に発現の上昇しているTCL遺伝子の同定により、増殖型のLS型のマーカー遺伝子として用いることが可能となり、今後、抗トリパノソーマ薬としてのアスコフラノンの作用機序を解明するのに有効だと考えられる。

また、antisenseを用いたTCL遺伝子の発現抑制実験により、TCL遺伝子がアフリカトリパノソーマ原虫のLS型の増殖、生存に極めて重要な機能を持つと推察された。これはTCL遺伝子産物のN末側のDNA-binding motifか、C末側のカルpain様構造のいずれか、または両方にその活性があるかは現在不明だが、今後このTCL遺伝子産物のより詳細な機能解析を行うことにより明らかになると考えられる。

さらにTCL遺伝子の発現抑制がトリパノソーマ原虫の生存に対して非常に強い抑制効果を示したことから、このTCL遺伝子産物自体も将来的な抗トリパノソーマ薬開発の標的分子としての可能性が十分に考えられ、実際にそのような薬剤が開発されれば、アスコフラノンとのカクテル療法により、アスコフラノン耐性トリパノソーマ株出現の危険性を低く抑えてのヒト、家畜に対する治療が可能になり、最終的なアフリカトリパノソーマ原虫撲滅へとつながられる可能性が考えられる。

19990439

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Functional expression of the ascofuranone-sensitive
Trypanosoma brucei brucei alternative oxidase in the cytoplasmic
membrane of *Escherichia coli*

Yoshisada Fukai, Hisako Amino, Hiroko Hirawake, Yoshisada
Yabu, Nobuo Ohta, Nobuko Minagawa, Shigeru Sakajo, Akio
Yoshimoto, Kazuo Nagai, Shinzaburo Takamiya, Somei Kojima,
Kiyoshi Kita

Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. 124: 141-148,
1999

Ascofuranone: A new chemotherapeutic agent for African
Trypanosomiasis.

Yoshihisa Fukai, Hisako Amino, Hiroko Hirawake, Yoshisada
Yabu, Nobuo Ohta, Nobuko Minagawa, Shigeru Sakajo, Akio
Yoshimoto, Kazuo Nagai, Shinzaburo Takamiya, Somei Kojima
and Kiyoshi Kita

Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.
(in press)

[参考文献]

寄生適応の分子機構: 低酸素適応とエネルギー代謝

北潔

日本農薬学会誌. 24: 408-417, 1999

抗寄生虫薬のドラッグデザイン

北潔

医学のあゆみ. Vol.191 No.1: 61-66, 1999

Erratum to "An antibiotic, ascofuranone, specifically inhibits respiration and invitro growth of long slender blood stream forms of *Trypanosoma brucei brucei*" [Mol. Biochem. Parasitol. 81(1996) 127-136]

Nobuko Minagawa, Yoshisada Yabu, Kiyoshi Kita, Kazuo Nagai, Nobuo Ohta, Keiichi Meguro, Shigeru Sakajo, Akio Yoshimoto
Molecular and Biochemical Parasitology. 84: 271-280, 1997

Oral and intraperitoneal treatment of *Trypanosoma brucei brucei* with a combination of ascofuranone and glycerol in mice

Yoshisada Yabu, Nobuko Minagawa, Kiyoshi Kita, Kazuo Nagai, Masakatsu Honma, Shigeru Sakjo, Tatsuo Koide, Nobuo Ohta, Akio Yoshimoto
Parasitology International. 47: 131-137, 1998