

厚生科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

新規抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの実用化

平成12年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 総括研究報告書	
新規抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの実用化	1
東京大学大学院医学系研究科 北 潔	
II. 分担研究報告	
1. 新規TAO阻害剤の探索およびヒト細胞への毒性検討	8
東京工業大学生命理工学部 永井 和夫	
2. 薬効評価系の確立	11
名古屋市立大学医学部 藪 義貞	
3. シアン耐性末端酸化酵素の生化学的解析	16
新潟薬科大学 皆川 信子	
4. アスコフラノンの体内動態	20
応用生物研究所 細川 知良	
5. アスコフラノンの標的であるTrypanosome Alternative Oxidase (TAO) cDNAの GUTat3.1株からのクローニングとその発現プロファイル解析	22
名古屋市立大学医学部 鈴木 高史	
6. Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) に対するモノクローナル抗体の作成と 免疫学的解析	25
名古屋市立大学医学部 吉田 彩子	
7. 大腸菌で発現させた <i>Trypanosoma brucei brucei</i> シアン耐性ユビキノール 酸化酵素の特徴	28
東京大学大学院医学系研究科 二瓶 浩一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	35

I. 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

新規抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの実用化

主任研究者 北 潔

東京大学大学院医学系研究科・国際保健学専攻・生物医化学教室 教授

研究要旨

感染症、特に細菌感染に対する抗生物質を含む化学療法剤が人類に及ぼした医療上の恩恵は計り知れない。しかし寄生虫感染についてはそれらが宿主と同じ真核生物である事から、選択毒性の対象となる作用点が少なく、特に原虫感染では増殖が早い点から感染が致死的になる場合が多い。アフリカ睡眠病はトリパノソーマ科原虫によって発症し、毎年20～30万人の新たな患者が発生している。また地方に流行するため多くの感染者が治療も受ける事なく死亡し、その数字は確定できないのが現状である。さらに家畜類の被害はそれ以上に甚大であり、人々のタンパク源となるべき年間数十万頭のウシが死んでいる。この様にアフリカ睡眠病はアフリカの人々の健康および経済的発展を著しく妨げており、これがWHOが制圧すべき感染症の一つに掲げている理由である。この様な状況の中で申請者らは糸状菌が産生するアスコフラノンが血流型トリパノソーマのミトコンドリアに局在するグリセロール-3-リン酸酸化系をnMオーダーと言う極めて低濃度で特異的に阻害する事を見出した。またマウスを用いた実験では投与後、30分後ではほとんどの原虫を血中から消失させると言う劇的な作用を示す。この成果は国際的に高く評価され、欧米諸国の研究機関から共同研究の申し込みや問い合わせを受けている。しかし実際にはアスコフラノンの作用機構の詳細は解明されておらず、全てはこれからの進展にかかっている。本研究はこの点を明らかにし、さらに投与法の改善、大動物を用いた臨床研究を行う事によって流行地であるアフリカにおいての現実的な実用化を目的として計画されたものであり、わが国からの真の国際貢献をめざす試みである。そこで以下の3点に焦点を絞り、平成11年度より厚生科学研究費の補助を得て研究を進めている。

- 1) アスコフラノンの標的と考えられるシアン耐性酸化酵素 (Trypanosome Alternative Oxidase; TAO) に対する分子機構の解明 (北・皆川)
- 2) アスコフラノンの高度産生株の単離とその誘導体を用いた構造活性相関の解析 (永井)
- 3) 培養系および実験動物を用いた薬効評価系による実用化の検討 (北・薮)

平成12年度においてはすでに確立した組み換えTAOの大腸菌内での大量発現系を用いて細胞膜からの可溶化、精製を試みた結果、極めて活性の高い、高純度の標品を得る事ができた。さらにこの大腸菌発現系を用いたスクリーニングから新規の阻害剤を見出した。また、アスコフラノンの単独投与による治療法について検討を行った結果、感染マウスを完全に治癒する条件を見出す事ができた。これらに加え、アスコフラノンの体内動態を明らかにし、ヒト細胞を用いてその安全性を確認する事ができた。

日々国際化が増すなかで、科学先進国としての日本が各方面において果たすべき役割は非常に多大である。この様に本研究は国際的な要請に基づき、わが国から発信する基礎研究の成果を実際に結実させる事を目的としている。

分担研究者

永井 和夫 東京工業大学生命理工学部
生物工学科・細胞工学講座 教授

藪 義貞 名古屋市立大学医学部
医動物学教室 講師

皆川 信子 新潟薬科大学・生化学教室 講師

研究協力者

細川 知良 応用生物研究所 所長

鈴木 高史 名古屋市立大学医学部
医動物学教室 助手

吉田 彩子 名古屋市立大学医学部
医動物学教室リサーチレジデント

二瓶 浩一 東京大学大学院医学系研究科
国際保健学専攻・生物医化学教室
リサーチレジデント

A. 研究目的

寄生虫症の化学療法を考えた時、寄生虫が宿主と同じ真核生物である事から選択毒性の対象となる作用点が少なく、特に原虫感染では増殖が早い点から感染が致死的になる場合が多い。これまでの研究で申請者らはアフリカ睡眠病の病原体であるトリパノソーマ科原虫

Trypanosoma brucei brucei の血流型に対して極めて低濃度で特異的に作用する薬剤として糸状菌の産生するアスコフラノンを見い出した。この成果は国際的に高く評価され、WHOも含め欧米諸国の研究機関から共同研究の申し込みを受けている。本研究はアスコフラノンの作用機構を解明し、さらに高度産生変異株の作成および一層効果の高い誘導体の合成を行う事による現実的な実用化を目的として計画されたものである。

A-1) アフリカ睡眠病

アフリカ睡眠病はツェツェバエによって媒介されるトリパノソーマによる原虫感染症であり、感染から10日前後で原虫が血流中に出現する。感染初期には原虫は血流中で増殖し、発熱、倦怠感、頭痛、筋肉や関節の痛み、搔痒感を与え

進行とる。症状とその進行は患者により大きく異なり、数週間から数年間にわたるものまで多様である。慢性期に入ると中枢神経系が侵されて精神錯乱や全身の痙攣などの症状を呈し、最終的には嗜眠状態に陥って死に至る。アフリカ睡眠病の患者数については様々な報告がなされているが調査データの信頼性が低く、その数は確定できないのが現状である。WHOによれば1996年には少なくとも15万人が死亡し、10万人以上に後遺症が残ったと言われる。さらにナガナ病と呼ばれる家畜類の被害はそれ以上に甚大であり、人々のタンパク源となるべき年間数十万頭のウシが死んでいる。またアメリカ合衆国に匹敵する面積の約1千万平方キロのサバンナでトリパノソーマのために牧畜が不可能になっている。この様にアフリカ睡眠病はアフリカの人々の健康および経済的発展を著しく妨げており、これがWHOが制圧すべき感染症の一つに掲げている理由である。

A-2) アフリカ睡眠病の治療

アフリカ睡眠病の治療にはペンタミジン、メラルソプロールやエフロルニチンなどが用いられ、1960年代にはその撲滅も可能との感もあった。しかし、これらの薬剤は古く、有効性は徐々に低下している。特にヒ素剤であるメラルソプロールに対する耐性は大きな問題となっており、効果の見られない患者は死を待つのみと言う悲惨な状況となっている。しかもペンタミジンも含めこれらの薬剤は静脈注射による投与時に苦痛を伴うとともに副作用も強く、5%近くの患者が死亡する。また副作用の比較的小さいエフロルニチンはこれを商品化したメレル・ダウ社が1994年に製造を中止した事から、販売権はWHOにあるものの実際の使用は極めて困難になっている。

A-3) 本研究の背景と目的

トリパノソーマはヒト体内では主に血流中に生息している。この血流型のエネルギー代謝はグリコソームと呼ばれる原虫特有なオルガネラに局在する解糖系に依存しており、いわゆるミ

トコンドリアにおける酸化リン酸化は機能していない。しかしこの解糖系を効率良く駆動するためには生成したNADHの再酸化が必要であり、これにはミトコンドリアのグリセロール-3リン酸化系が重要な役割を果たしている。この酸化系の末端酸化酵素は還元型のユビキノン電子供与体とするキノール酸化酵素として機能し、宿主の持つ好氣的な呼吸系のシトクロム酸化酵素とは大きく異なった性質を持っている。特に注目すべき点は宿主のシトクロム酸化酵素を速やかに阻害するシアンに非感受性と言う点である。そこでこれまでも欧米を中心に多くの研究者がこのシアン耐性酸化酵素を標的とした薬剤の開発を試みて来たが、選択毒性の高い有効なものとは得られていなかった。このような状況の中で申請者らは抗腫瘍作用を持つアスコフラノンがトリパノソーマのグリセロール-3リン酸化系をnMオーダーと言う極めて低濃度で特異的に阻害する事を見出した (Mol. Biochem. Parasitol. 1996, 81, 127-136)。

アスコフラノンは抗腫瘍活性を有する微生物代謝産物として糸状菌から単離されたプレニルフェノール化合物であり、研究分担者の永井はアスコフラノンが宿主の免疫系を活性化する事により抗腫瘍作用を発現する事を明らかにし

(J. Antibiotics, 35, 1547-1552, 1986)、これがマクロファージの呼吸系に作用してサイトカイン産生を誘導する事による事実を明らかにしていた (Biosci. Biotech. Biochem., 62, 1115-1121, 1998)。そこで皆川はアスコフラノンが酵母ミトコンドリア呼吸鎖のユビキノン酸化還元部位も阻害する事に基づき、*T. b. brucei*の血流型ミトコンドリアのシアン耐性末端酸化酵素の持つキノール還元酵素に対する阻害効果を調べた。その結果アスコフラノンはトリパノソーマの細胞およびミトコンドリアにおけるグリセロール-3リン酸依存の呼吸、さらにはミトコンドリアのキノール酸化酵素活性をnMオーダーの低濃度で阻害する事を見出した。そして実際にマウスを用いた薬による動物実験では投与30分後にはほとんどの原虫が血中から消失していた

(Parasitol. Int. 47, 131-137, 1998)。平成11年度

より厚生科学研究費による研究補助が開始された事によって本研究は大きく進展し、大腸菌を用いた組み換えTAOの大量発現系を確立する事ができた (Comp. Biochem. Physiol. 124, 141-148, 1999)。この成果についてWHOをはじめとする欧米の研究機関から共同研究の依頼や問い合わせが多数寄せられている。われわれはアスコフラノンによって先に述べたアフリカ睡眠病治療の現状が解決できるのではないかと考え、その実用化を目的として本研究を進めている。

B. 研究方法

寄生原虫の電子伝達系は特有の構成成分を持ち、これが化学療法剤の作用部位となっている例は、アメーバやトリコモナスの特効薬であるメトロニダゾールでよく知られている。本研究で実用化をめざすアスコフラノンはこのような寄生虫電子伝達系の特殊性を標的とする新しいタイプの抗トリパノソーマ剤である。これまでもin vitroで有効な抗トリパノソーマ薬は多く報告されているが、in vivoで実際に効果を示す例は非常に少ない。しかしアスコフラノンはすでにマウスを用いた実験でもその有効性が明確になっており、実際に臨床で利用する事を目的として

- 1) アスコフラノンの標的と考えられるシアン耐性酸化酵素に対する分子機構の解明
- 2) アスコフラノンの高度産生条件の確立とその誘導体を用いた構造活性相関の解析
- 3) 培養系および実験動物を用いた薬効評価系による実用化の検討

の3点に焦点を絞り以下の計画に従って研究を進めている。

本研究は平成12年度までは薬剤の効果の評価を可能な限りトリパノソーマの培養系および大腸菌における組換え酵素を用いて進め、効果的なスクリーニングを行う事によって無益な実験動物の殺傷を極力減じている。また、最終年度において計画していたマウスを用いた実験的治療を予定を早めて初年度から開始したが、これはアスコフラノンの実用化をめざす上で避けては通れない過程である。この実験においては動

物愛護の精神に基づき「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に従って研究を進めた。この様に本研究計画は倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

C-1) 大腸菌で発現させた組み換えTAOの可溶化と精製（北、二瓶）

我々はこれまでのトリパノソーマのミトコンドリアおよび組み換えTAOを発現させた大腸菌細胞質膜を用いた実験からアスコフラノンの標的はTAOと考えている。また最近の遺伝子レベルの研究から、TAOと植物や酵母ミトコンドリアに存在するシアン耐性末端酸化酵素との共通性が明らかになって来たが生化学的解析は進んでいない。これは酵素が不安定で単離精製が困難であることに起因している。そこでアスコフラノンの標的を確定し、さらにその阻害機構を明らかにする目的で大腸菌で発現させた組み換えTAOの可溶化、精製を試みた。数十種類の界面活性剤を用いて活性を保持したTAOを効率良く可溶化する条件を探した結果、唯一ジグトニンがこの目的に最適な界面活性剤として見い出された。組み換えTAOのN末端に結合させたHistidine-tagを利用し、ジグトニン存在下で行ったニッケルカラムによって、50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ と言う極めて高い比活性を持つ標品が得られた。しかも、SDS-PAGEでほぼ単一のバンドを示す高純度の標品であった。この標品について補欠分子族と考えられている鉄の含量を原子吸光で測定したところ1分子の酵素に対して0.05以下と極めて低い値であった。これまで植物や酵母ミトコンドリアのシアン耐性末端酸化酵素の研究から鉄が補欠分子族として考えられていたが、今回の結果はこの点を慎重に検討し直す必要性を示している。

C-2) 新規TAO阻害剤の探索およびヒト細胞への毒性検討（永井、北）

アスコフラノンの標的酵素TAOを発現させた組み換え大腸菌を用いて、TAOの特異的阻害剤をスクリーニングする系の構築を試みた。放線菌

やバクテリアなどの微生物代謝産物を検体としてランダムスクリーニングを行った結果、約一万検体の中にTAO組換え大腸菌の生育を選択的に阻害するものが2検体見い出された。

さらにヒトに対する安全性確認の第一歩として、THP-1、KBなど18種のヒト培養細胞を用いた増殖阻害試験を行った。その結果、試験法に関わらずアスコフラノンは高濃度でもヒト細胞の増殖にほとんど影響を与えず、極めて安全性の高い薬剤である事が確認された。

C-3) 薬効評価系の確立（藪）

我々のこれまでの研究結果からアスコフラノンは単独では抗トリパノソーマ効果は期待されずグリセロールとの併用投与が必要とされていた。しかし、その血中濃度をある一定のレベル以上に保てば単独投与でも治療効果が認められることからアスコフラノン単独かつ連続投与によるトリパノソーマ感染マウスモデルを用いた治療効果を検討した。その結果、経口投与において100 mg/kg 3時間間隔で1日4回8日連続投与することでトリパノソーマ感染マウスが100% 治癒することを見い出した。さらに家畜に甚大な被害をもたらしている *T. vivax* では腹腔内投与群において12 mg/kg、経口投与群において50 mg/kg を一回投与するのみで全ての感染マウスに治癒がみられた。この家畜トリパノソーマ *T. vivax* の実験的治療では *T. b. brucei* に見られるようなグリセロールとの相乗効果は必要でなく、アスコフラノン単独にて治癒効果が確認された。

C-4) シアン耐性酸化酵素の生化学的解析（皆川）

原虫 *T. b. 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、家畜や野生動物ばかりでなくヒトにも感染する *T. b. rhodesiense* の急性感染に対するアスコフラノンとグリセリンの同時投与の検討をマウスを用いて行った。本実験はWHOとの共同研究で、この治療法が効果的である事が明らかになった。

またアスコフラノンの構造上類似体であるアスコクロリンは抗トリパノソーマ作用は低い一

方、哺乳類ミトコンドリアへの阻害効果は高い。アスコフラノンの哺乳類への副作用が低い原因を明確にする目的でウシ心筋及びニワトリ心筋ミトコンドリアのシトクロムbc₁複合体とアスコクロリンの共結晶を解析した。その結果、アスコクロリンはシトクロムbc₁複合体のキノン結合部位に結合するが、側鎖の長いアスコフラノンはこの部位に結合できない事が明らかになった。

C-5) アスコフラノンの体内動態 (細川)

実用化をめざす上で最も重要な問題点はアスコフラノンの体内動態と副作用についてである。そこでまず体内動態を解明するために、アイソトープでラベルした酢酸を基質として放射性アスコフラノンを作成し、ラットに経口投与した。投与後の血中、臓器中の放射能を測定してアスコフラノンの吸収、分布、排泄について検討した結果、アスコフラノンの血中濃度は投与後4時間後に最高値を示し、その後の血中からの消失は遅く、24時間後でも最高値の50%以上であった。臓器別の分布では肝臓が最高値を示し、他の臓器では全て低値であった。またアスコフラノンは主として糞便中に排泄され、尿中への排泄は投与後72時間までに1%以内であったのに対し、糞便中には24時間以内に40%が排泄され、72時間までに83%が排泄された。

C-6) アスコフラノンの標的である Trypanosome Alternative Oxidase cDNAのGUTat3.1株からのクローニングとその発現プロファイル解析 (鈴木、吉田)

アスコフラノンの標的であるTAOのcDNAは *T. b. brucei* のEATRO110株、TC221株、ILTat1.4株から既にクローニングされている。しかし、将来的な薬剤のターゲットとしては、より多くの株、近縁種のTAOの解析を行う必要があると考えられる。そこで、今回新たにGUTat 3.1株からのTAO cDNAクローニングを行った。その結果、GUTat 3.1株のTAOの推定アミノ酸配列はTC221およびILTat1.4で深井が報告したもの

と100%一致した。次に、TAOのlong slender、short stumpy、procyclicの各フォームでの発現プロファイル解析をmRNAレベルとタンパク質レベルとで行った。その結果、今までlong slender特異的発現を行っていると考えられてきたTAOがmRNAレベルでは、全てのフォームで同様に発現が行われていることが明らかになった。また、組み換えTAOを抗原として作成した抗TAOモノクローナル抗体を用いた、Western blot解析を行ったところ、ペプチドレベルでもその発現が確認された。

D. 考察

今年度は実用化をめざした本研究計画を進めるにあたって、標的であるTAOの精製法やアスコフラノン単独の効果的な投与法の確立、また体内動態や安全性など非常に重要な情報が得られ、初期の目的を予想以上に果したと言う事ができる。以下に各項目別にその成果についての考察と、この成果をふまえた解決すべき次の問題点を述べる。なお、C-3~5)の結果については「培養系および実験動物を用いた薬効評価系による実用化の検討」としてまとめて考察する。

D-1) 大腸菌で発現させた組み換えTAOの可溶化と精製

今年度の大きな成果のひとつとして組み換えTAOの可溶化、精製法の確立があげられる。これまで植物ミトコンドリアも含め、シアン耐性末端酸化酵素の可溶化、精製に成功した研究グループはおらず、これが本酵素のタンパク質としての実体が不明な原因であった。今回、高純度でしかも比活性の高い標品の精製法を確立できた事によって、補欠分子族の同定や基質の酸化還元部位の特定が可能となり、最終的にアスコフラノンによるTAOの阻害の分子機構を明らかにする事ができると考えられる。

また、組み換えTAOの発現系を確立する研究の途上でこれまで米国のHillによって報告されていたTAOcDNAの塩基配列がわれわれの原虫株の配列と異なっている事が判明した。Hillらによる配列との違いが株間の差異によるもので

ある可能性は否定できないが、Hillらの塩基配列の解釈が不正確である可能性が強い。特に機能上重要と考えられる予想上の第4ヘリックスが大きく異なっており、この領域の研究者に可能な限り早く公表する予定である。今後、さらにタンパク質化学的な解析、X線結晶解析による3次元構造解析によってキノール酸化酵素活性の発現に必要なアミノ酸残基や立体構造の同定とアスコフラノンの結合部位とその作用機構の詳細を明らかにして行く事が重要である。これらの情報によってさらにTAOを標的とした抗トリパノソーマ薬のコンピュータによる薬剤分子設計が可能となると考えられる。

D-2) 新規TAO阻害剤の探索

前年度に確立した組み換えTAOを発現させた大腸菌を用い、TAOの特異的阻害剤をスクリーニングする系によってアスコフラノン以外の新しい阻害剤を見出した事は、薬剤に対する耐性株の出現頻度が非常に高いアフリカトリパノソーマの化学療法にとって極めて有意義な成果であると考えられる。今後、酵素活性の阻害や*in vivo*での有効性の確認を行ってその効果の詳細を明らかにしたい。

D-3) 培養系および実験動物を用いた薬効評価系による実用化の検討

今回、アスコフラノンがヒトに感染する*T. b. rhodesiense* や家畜に甚大な被害を及ぼしている*T. vivax* に有効である事が明らかになったが、これはアスコフラノンの抗トリパノソーマ薬としてのスペクトルの広さを示すものである。また、単独かつ連続投与によるマウスモデルにおいてトリパノソーマ感染マウスが100%治癒する条件を見出した結果は大変に意義深く、真の実用化にさらに一步近づいたと考えられる。

また実用化をめざす上で最も重要な問題点であるアスコフラノンの体内動態と副作用については、以前より懸案となっていた。今回の実験結果よりトリパノソーマの生息する血流中でのアスコフラノンの濃度が経口投与によっても十分な高さを長時間にわたって維持されている事

が判ったが、この事実はアスコフラノンの有効性を具体的に裏付けるものである。さらにヒトに対する安全性確認の第一歩として行ったヒト培養細胞を用いた増殖阻害試験の結果、試験法に関わらずアスコフラノンは高濃度においてもヒト細胞の増殖にほとんど影響を与えず、極めて安全性の高い薬剤である事が確認されたが、この点は実用化に向けて最も重要なハードルのひとつであり、安全性を確認できた事により、次の一步へ確実に踏み出したと考えられる。

D-4) アスコフラノンの標的であるTrypanosome Alternative Oxidase cDNAのGUTat3.1株からのクローニングとその発現プロファイル解析

今までlong slender特異的発現を行っていると考えられてきたTAOがmRNAレベルでは、全てのフォームで同様に発現が行われていることが明らかになった。これはアスコフラノンがより広い発育ステージで効果を発揮しうる事を示しており、その有効性の基盤が明確になった。

E. 結論

今年度は植物ミトコンドリアなど他の生物種のシアン耐性末端酸化酵素でも報告のなかった組み換えTAOの可溶化、精製法を確立し、アスコフラノンによる阻害の分子機構解明へと大きく進展した。また組み換えTAOを発現させた大腸菌のスクリーニング系を用いて新たに2種の阻害剤候補を見出した。さらにアスコフラノン単独投与でも有効な条件を決定し、またアスコフラノンが*T. b. brucei* ばかりでなく、ヒトに感染する*T. b. rhodesiense*や家畜に大きな被害を与えている*T. vivax* にも有効である事が明らかになった。この事からアスコフラノンの実用化がアフリカ諸国の医療問題ばかりでなく、食糧、経済問題の解決にも大きな役割を果たす事ができると期待される。また、これまでその実用化をめざす中で最も問題となっていたアスコフラノンの体内動態を解析し、トリパノソーマが生息する血中濃度が十分に維持される事を明らかにした。一方、宿主への副作用についてヒト培

養細胞を用いて調べた結果、アスコフラノンが極めて安全性の高い薬剤である点を確認する事ができた。また構造類似体で哺乳類ミトコンドリアの呼吸を強く阻害するアスコクロリンを用いた解析から、側鎖の長いアスコフラノンは哺乳類呼吸鎖の標的であるシトクロム bc_1 複合体に結合できず、これが副作用がほとんど見られない理由である事が明らかになった。さらにアスコフラノンの標的としてのTAOの発現プロファイルについて調べたところ、今までlong slender型特異的発現を行っていると考えられてきたTAOがmRNAレベルでは、全てのフォームで同様に発現が行われている事が明らかになった。これはアスコフラノンがより広い发育ステージで効果を示す事を表わしており、その有効性の基盤を明確にする事ができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ascofuranone: A new chemotherapeutic agent for African Trypanosomiasis.
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.
(2000) *Mahidol J.* 7, 37-43

2) An anthelmintic compound nafuredin shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria
Omura, S., Miyadera, H., Ui, H., Shiomi, K., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Nagamitsu, T., Iwai, Y., Takano, D., Sunazuka, T., Harder, A., Kölbl, H., Namikoshi, M., Miyoshi, H., Sakamoto, K., and Kita, K.
(2001) *Proc. Natl. Sci. Acad. USA*, 98, 60-62

3) Parasite mitochondria as a target for chemotherapy
Kita, K., Miyadera, H., Saruta, F., and Miyoshi H.
(2001) *J. Health Sci.* in press

2. 学会発表

1) Comparative analysis of cDNA expression profiles between long slender and short stumpy forms of *Trypanosoma b. brucei*.

Suzuki, T., Yabu, Y., Zhang R., Ohta N.
第69回日本寄生虫学会大会 平成12年 4月

2) The efficacy of ascofuranone in a single-drug therapy for *Trypanosoma brucei brucei* in mice. Thirty-five joint conference on parasitic diseases.
Yabu, Y., Suzuki, T., Yoshida, A., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Ohta, N., Kita, K.
The Japan-United states cooperative medical science program. July 2000.

3) Functional expression of the ascofuranone-sensitive *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*.
Kawai, K., Nihei, C., Fukai, Y., Hisako, A., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Kita, K.
The Japan-United states cooperative medical science program. July 2000.

4) トリパノソーマシアン耐性酸化酵素の大腸菌における発現とアスコフラノンによる特異的阻害機構
北 潔、河合敬介、二瓶浩一、深井義久、藪義貞、皆川信子、吉本昭夫、永井和夫
生体エネルギー研究会第26回討論会
平成12年 9月

5) アスコフラノンによるアフリカ睡眠病マウスモデルの治療効果
皆川信子、藪 義貞、鈴木高史、吉田彩子、太田伸生、坂上 茂、吉本昭夫、永井和夫、北 潔
第73回日本生化学会大会 平成12年 10月

6) 化学療法の標的としての原虫ミトコンドリア
北 潔
第73回日本生化学会大会 平成12年 10月

7) Characterization of cyanide insensitive terminal oxidase *Trypanosoma brucei brucei* expressed in *Escherichia coli*.
Kawai, K., Nihei, C., Fukai, Y., Yabu, Y., Minagawa, N., Yoshimoto, A., Nagai, K., Kita, K.
第41回日本熱帯医学会大会 平成12年 11月

8) 低酸素適応における寄生虫ミトコンドリアの役割
北 潔
第23回日本分子生物学会大会
平成12年 12月

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

II. 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

新規TAO阻害剤の探索およびヒト細胞への毒性検討 分担研究者：永井和夫 東京工業大学大学院生命理工学研究科

研究要旨

アスコフラノンの標的酵素 Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) を発現させた組換え大腸菌を用いて、TAO の特異的阻害剤をスクリーニングする系を構築した。各種既知物質を用い、本アッセイ系の評価を行った。アスコフラノンがTAO 組換え大腸菌の増殖を選択的に阻害したことから、この系がTAO の特異的阻害剤をスクリーニングするシステムとして有効であることが示された。放線菌やバクテリアなどの微生物代謝産物を検体としてランダムスクリーニングを行った結果、約一万検体中2検体においてTAO 組換え大腸菌の生育を選択的に阻害した。

さらにヒトに対する安全性確認の第一歩として、THP-1、KBなど18種のヒト培養細胞を用いた増殖阻害試験を行った。その結果、試験法に関わらずアスコフラノンは高濃度でもヒト細胞の増殖にほとんど影響を与えず、極めて安全性の高い薬剤である事が確認された。

A.研究目的

アスコフラノンの標的酵素であるTAOはトリパノソーマ原虫が宿主血流中に感染したときにのみ機能し、宿主呼吸鎖と異なる機構を持つ。従ってこの酵素を作用標的とする薬剤はアフリカ睡眠病の治療薬として期待できる。また、原虫症は耐性株の出現が早く、それを防ぐためには1つの薬剤に依存しないようにする必要があることから、アスコフラノンに次ぐトリパノソーマ原虫症治療薬の開発は必要である。そこで、TAOの特異的阻害剤をスクリーニングする系を構築し、微生物由来の天然物等を用いてスクリーニングを行い、新規TAO阻害剤の開発を目的とした。

またヒトに対する安全性確認の第一歩として、ヒト培養細胞を用いた増殖阻害試験を行った。

B.研究方法

大腸菌本来の好氣的呼吸系の末端酸化酵素に

必要となるヘム合成経路のアミノレブリン酸 (ALA) 合成酵素 (hema遺伝子産物) を欠損した Δ hema株に、クローン化したTAO遺伝子をプラスミドで導入した(図1)。TAOの発現はT7プロモーターにより制御されているので、T7 RNAポリメラーゼの発現制御によりTAO発現量は調節できる。T7 RNAポリメラーゼはlacプロモーターの発現制御下にあるため、TAO発現量はIPTGの濃度依存的に発現調節ができる。またALAの添加により大腸菌本来の末端酸化酵素を回復することが可能である。本検定菌においては、IPTG添加、ALA非添加時にはTAOのみが末端酸化酵素として機能し、ALA添加時には大腸菌本来のチトクロームオキシダーゼが機能している。つまり、IPTG添加、ALA非添加時に増殖阻害活性を示し、ALA添加時には示さない物質がTAO特異的阻害剤となることが期待される。

ヒト培養細胞を用いた増殖阻害試験について

はTPH-1、KBなど18種のヒト培養細胞を用い、種々の濃度のアスコフラノン存在下に24時間培養し、生細胞をMTT法で評価した。

(倫理面への配慮)

特に該当する実験は行っていない。

C. 研究結果

本検定菌は、ALA非添加時にはIPTG濃度10 μ M以下では大腸菌の増殖が認められず、100 μ M以上の濃度で増殖が認められた。このことから、TAOは確かに大腸菌の末端酸化酵素として機能しており、増殖に必要なTAOの発現は100 μ M以上のIPTG添加により誘導されることが示された。さらに、アスコフラノンがIPTG添加、ALA非添加時にのみ増殖阻害活性を示したことから、本アッセイ系はTAO特異的阻害剤の検定系として有効であることが示された(表1)。

宿主大腸菌に作用するような一般的な薬剤(DNA合成阻害剤、RNA合成阻害剤、タンパク質合成阻害剤、細胞壁合成阻害剤等)は、ALAの有無に関わらず増殖阻害を示したことから、本アッセイ系ではこれらを排除できることが示された(表2)。様々な既知物質をアッセイした結果、ポリエーテル系カリウムイオノフォアであるナイジェリシンとサリノマイシンに、ALA依存的な増殖阻害活性が認められた(表3)。

放線菌やバクテリアなどの微生物代謝産物を検体として、約一万検体についてランダムスクリーニングを行った結果、2検体においてALA非添加時にのみ増殖阻害活性が認められた。

ポリエーテル系カリウムイオノフォアとスクリーニングによって得られた2検体について、試験管内でTAOのキノールオキシダーゼ活性の阻害効果を調べたところ、これらは全く阻害活性を示さなかった。

ヒト細胞に対する試験においてはTHP-1、KB

など18種のヒト培養細胞を用いた増殖阻害試験を行った。その結果、試験法に関わらずアスコフラノンは100 μ Mの濃度でもヒト細胞の増殖にほとんど影響を与えなかった(図2)。

D. 考察

アスコフラノンにより検定菌の特異的増殖阻害が認められたことから、本アッセイ系がTAOの特異的阻害剤をスクリーニングする一次検定系として有効であることが示された。ポリエーテル系カリウムイオノフォアと微生物代謝産物2検体に、本検定菌の増殖阻害活性が認められたが、TAOのキノールオキシダーゼ活性は阻害されなかったことから、これらはアスコフラノンとは別の機構により阻害活性を示していると考えられた。

アスコフラノンはヒト細胞の増殖にほとんど影響を示さなかったが、これは後述する様にアスコフラノンがヒトミトコンドリアのシトクロムbc₁複合体のキノン部位に結合できない事によると考えられる。

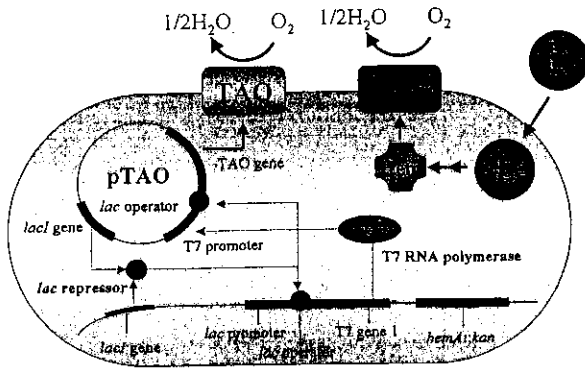
E. 結論

TAO組換え大腸菌を用いたTAO阻害剤のスクリーニング系を構築した。本アッセイ系により、ポリエーテル系カリウムイオノフォアと微生物代謝産物2検体に阻害活性が認められた。

またアスコフラノンは高濃度でもヒト細胞の増殖にほとんど影響を与えず、極めて安全性の高い薬剤である事が確認された。

F. 研究発表 準備中

G. 知的所有権の取得状況 なし



IPTG	ALA	Oxidase
-	-	n.g.
+	-	TAO
-	+	Cyt. <i>bo</i>

n.g. no growth

図1 TAOアッセイ系

	Growth inhibition zone (φ mm)				
	ALA(100μM)		-		+
	IPTG(μM)	0	10	100	1000
Ascofuranone (2.0mg/ml)	n.g.	n.g.	32	34	0
SHAM (10mg/ml)	n.g.	n.g.	37	45	11

n.g. no growth

表1 TAOアッセイ系の評価

Compounds	(Conc.)	Growth inhibition zone (φ mm)	
		-ALA	+ALA
DNA synthesis			
Sparfloxacin	(0.1mg/ml)	44	42
Nalidixic Acid	(1.0mg/ml)	42	44
Novobiocin	(40mg/ml)	16	16
RNA synthesis			
Rifampicin	(20mg/ml)	26	24
Protein synthesis			
Tetracycline	(10mg/ml)	33	31
Streptomycin	(10mg/ml)	23	22
Cell wall synthesis			
Cephalexin	(10mg/ml)	32	24
Vancomycin	(10mg/ml)	12	11
Cell membrane			
Polymyxin B	(5.0mg/ml)	32	24
Gramicidin S	(20mg/ml)	10	10

表2 TAOアッセイ系における既知物質の効果

Ionophores (Conc.)	Target ion (Types)	Growth inhibition zone (φ mm)		
		-ALA		+ALA
		IPTG 100μM	IPTG 1mM	
Nigericin (20mg/ml)	K ⁺ (polyether)	0	13	0
Salinomycin (20mg/ml)	K ⁺ (polyether)	0	14	0
Valinomycin (20mg/ml)	K ⁺ (polypeptide)	0	0	0
Monensin (20mg/ml)	Na ⁺ (polyether)	0	0	0
Nonactin (2.0mg/ml)	NH ₄ ⁺ (macrotetrolide)	0	0	0
Ionomycin (1.5mg/ml)	Ca ²⁺	0	0	0
GramicidinD (20mg/ml)	H ⁺ (polypeptide)	0	0	0

表3 TAOアッセイ系におけるイオノフォアの効果

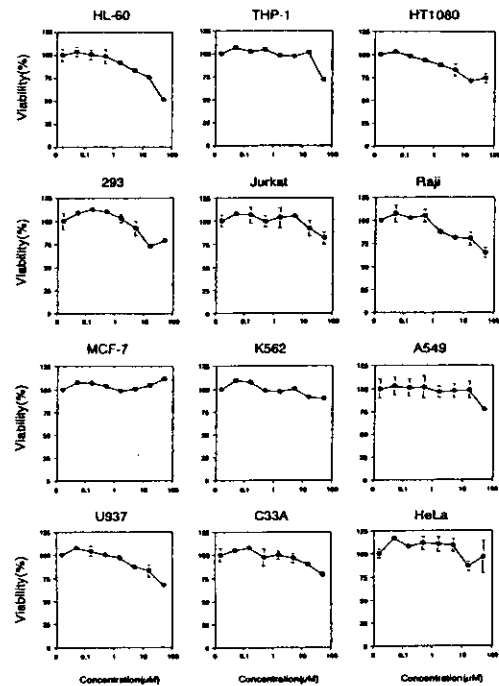


図2 ヒト培養細胞に対するアスコフラノンの効果

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

薬効評価系の確立

分担研究者：藪 義貞

名古屋市立大学医学部医動物学教室・講師

研究要旨

アフリカトリパノソーマのミトコンドリアに特異的に存在するシアン耐性末端酸化酵素 Trypanosome alternative oxidase (TAO) をターゲットとした新規薬剤アスコフラノン (Af) をアフリカにおけるヒトおよび家畜トリパノソーマ症の治療薬として実用化に向けそれぞれのトリパノソーマ感染マウスを用いその治療効果を検討した。我々のこれまでの研究結果から Af は単独では抗トリパノソーマ効果は期待されずグリセロールとの併用投与が必要とされていた。しかし、その血中濃度をある一定のレベル以上に保てば単独投与でも治療効果が認められることから Af 単独かつ連続投与によるトリパノソーマ症マウスモデルを用いた治療効果を検討した結果経口投与において 100 mg/kg 3時間間隔で1日4回8日連続投与することでトリパノソーマ感染マウスが 100 % 治癒することを確認した。さらに家畜に甚大な被害をもたらしている *T. vivax* では腹腔内投与群において Af 12 mg/kg、経口投与群において 50 mg/kg を一回投与するのみで全ての感染マウスに治癒がみられた。この家畜トリパノソーマ *T. vivax* の実験的治療では *T. b. brucei* に見られるような Af はグリセロールとの相乗効果は見られず Af 単独にて治癒効果が確認された。

A. 研究目的

アフリカトリパノソーマ症はヒトではアフリカ睡眠病、家畜ではナガナ病と呼ばれ、サハラ砂漠以南の北緯15度から南緯15度に分布し、ツエツエバエによって媒介される。毎年2～30万人の新しい患者が発生し WHO は1998年に4万人以上が死亡したと報告している。さらに、家畜の被害は甚大で約1千万平方キロのアフリカのサバンナで牧畜

がトリパノソーマのために不可能になっている。それはほぼアメリカ合衆国と同じ面積で1億2千5百万頭の牛の放牧が可能な広さである。現在サハラ砂漠以南の37カ国で牛だけでも6千万頭が感染の危険にさらされ、年間の経済的損失は50億ドル以上と推定されている。

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4種類、家畜

に対しては2種類あるのみでいずれも副作用が強くしかも古い薬剤ばかりのため薬剤耐性の原虫の出現がトリパノソーマ対策をより一層困難にしている。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待たれている。本研究は日本より発信し地域がアフリカに局限するものの人類の伝染病の制圧および食料増産に大きな恩恵をもたらし、これらの成果は厚生行政の課題である疾病の抑圧に寄与すると確信する。本研究では Af をアフリカトリパノソーマ症の有効な治療薬として実用化に向けヒトおよび家畜トリパノソーマ症マウスモデルを用いその有効性について検討した。

B. 研究方法

1) 薬剤

アスコフラノン(細川知良博士(免疫学研究所、東京都)から分与されたものをリン酸緩衝液に懸濁し感染マウスに腹腔内および経口投与した。

2) アフリカトリパノソーマ株

Trypanosoma brucei brucei (ILTat 1.4 株) および *T. vivax* (ILDat 1.2 株) は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) から分与されたものを名古屋市立大学医学部実験動物教育センター内感染動物飼育室にてマウ

スに接種し継体しているものを用いた。

3) アフリカ睡眠病マウスモデルを用いた経口投与による実験的治療

マウス (C57BL/6, ♂, 6週令、1群5匹) に *T. b. brucei* (ILTat 1.4) を 10^4 /mouse 腹腔内接種し3日後マウス血中の原虫数が 10^7 /ml 以上であることを確認し、各感染マウスに一回分 100 mg/kg を経口投与し1日の総投与量が 200, 300, 400 mg/kg となるように各3時間間隔でゾンデを用い投与した。1回の投与量は0.2ml/mouse とした。対照感染マウスには PBS を同様に投与した。

4) 家畜トリパノソーマ症(ナガナ病)マウスモデルを用いた実験的治療

T. vivax (ILDat 1.2) 10^6 /mouse を C57BL/6 マウス(♂、6週令、1群5匹)に腹腔内接種し3日後原虫数が 10^7 /ml 以上であることを確認し Af を1回のみ腹腔内および経口投与した。投与量は 6~50 mg/kg とした。1回の投与量は0.2ml/mouse とした。対照感染マウスには PBS を同様に投与した。投与後の治療効果の評価は24時間毎にマウス尾静脈血をスライドグラスに取り顕微鏡にて検鏡し原虫の有無を確認し判定した。治癒の判定は60日間観察し再発のないことを確認し決定した。このマウス

モデルを用いた実験的治療において動物愛護の精神に基づき、「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に従って研究を進めた。

C. 研究結果

1) アフリカ睡眠病マウスモデルの経口投与による治療効果

本実験において治療を行わなければ必ずマウスは死亡する急性型トリパノソーマ症マウスモデル (*Trypanosoma brucei brucei* ILTat 1.4 株) を用い Af の治療効果を投与回数及び投与量について検討した。結果は表 1 に示すとおりである。

① Af を総投与量 200~400mg/kg 3 日間連続投与した場合延命効果のみが観察されその治療開始後の延命効果はそれぞれ 3、6、8 日であった。

② 同様に総投与量 Af 200mg/kg~400mg/kg を 4 日間連続投与した場合、400mg/kg 投与した群においてのみ 1 匹の感染マウスに治癒が見られた。他の 200~300mg/kg 投与群においては延命効果のみが観察されそれぞれの再発したマウスの生存日数は 6、8 日であった。

③ 6 日間連続投与した場合 200、300 mg/kg 投与群ではそれぞれ 1 匹のマウスに治癒が見られた。他の 4 匹のマウスでは再発しそれぞれの延命効

果は治療開始後 9~10、12 日であった。400mg/kg 投与群では 5 匹のうち 4 匹のマウスの治癒が見られたが、他の 1 匹は再発を示し投与開始 12 日後に死亡した。

④ 8 日間連続投与した場合 400mg/kg 投与群の全てのマウスが治癒した。200mg/kg 投与群においては 1 匹、300mg/kg 投与群においては 2 匹のマウスに治癒が観察されたが、他のマウスには再発がみられ投与開始 13、18 日後にそれぞれ死亡した。

表 1.

アスコフラノン (mg/kg)	投与日数	マウス		投与開始後の 生存日数	治癒率 (%)
		治癒	死亡		
200	4	0	5	6	0
	6	1	4	9-10	20
	8	1	4	13	20
300	4	0	5	6	0
	6	1	4	12	20
	8	2	3	18	40
400	4	1	4	10	20
	6	4	1	12	80
	8	5	0	80<	100
PBS	1	0	5	1	0

2) 家畜トリパノソーマ症 (ナガナ病) マウスモデルの腹腔内および経口投与による治療効果

本実験では *T. vivax* 感染マウスは対照の PBS 投与群において投与開始 3 日後にすべての感染マウスが死亡した。結果は表 2 に示す通りである。

① 腹腔内投与効果

感染マウスに 6~50 mg/kg の Af を腹腔内投与した。12~50 mg/kg 投与群において 2 時間以内に血中から原

虫が消失し全てのマウスにおいて治癒が見られた。6 mg/kg 投与群では2匹に治癒が見られた。再発マウスの生存日数は8-12日であった。対照群において PBS 投与群マウスは全て3日後死亡した。

②経口投与効果

腹腔内投与群と同じ 6~50 mg/kg の Af を経口投与した。50 mg/kg 投与群において全ての感染マウスに治癒が見られた。しかし 12 mg/kg 投与群及び 25mg/kg 投与群ではそれぞれ1、2匹の治癒が見られたのみで他のマウスは再発した。再発したマウスの投与後の生存日数はそれぞれ5、8-13日であった。6 mg/kg 投与群においては原虫のマウス血中からの消失は観察されず全てのマウスは投与後3日で死亡した。対照の PBS 投与群においては投与後3日で全てのマウスは死亡した。本研究において *T. b. brucei* と同様にグリセロールとの併用投与効果を腹腔内及び経口投与群において調べたが併用投与による相乗効果は観察されなかった。

表 2.

Trypanosoma vivax 感染マウスを用いたアスコフラノンの腹腔内及び経口投与における治療効果

アスコフラノン (mg/kg)	投与法	マウス		再発マウスの 生存日数	治癒率 (%)
		治癒	死亡		
腹腔内投与					
50		5	0	60<	100
25		5	0	60<	100
12		5	0	60<	100
6		2	3	8-12	40
PBS		0	5	3	0
経口投与					
50		5	0	60<	100
25		2	3	8-13	40
12		1	4	5	20
6		0	5	3	0
PBS		0	5	3	0

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、前年度我々は腹腔内に連続投与することでトリパノソーマ感染マウスが治癒することを発見し報告した。今回は劣悪な環境のアフリカのサバンナでの化学療法の実用化を念頭におき入院の必要のない経口投与でいかに有効な治療効果が得られるかを検討した。アフリカ睡眠病マウスモデルにおける連続経口投与においてアスコフラノンは 100 mg/kg を3時間後とに1日4回投与しそれを8日間連用することにより全ての感染マウスの治癒が見られた。アスコフラノンは基礎的実験から 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。今回の8日連続投与マウスにおいても体重の減少はほとんど見られなかった。

家畜においてその被害が深刻な *T. vivax* 感染マウスを使い腹腔内及び経口投与における治療効果を検討した。腹腔内投与群において 12 mg/kg にて

全ての感染マウスに治癒が見られた。さらに経口投与群において感染マウスは 50 mg/kg にて全てのマウスに治癒が見られた。家畜トリパノソーマ感染マウスを用いたアスコフラノンの実験的治療においてアフリカ睡眠病マウスモデルと違いグリセロールによる相乗効果は観察されず微量、単独かつ 1 回の投与のみにて重感染マウスが治癒した。これらの結果は Af がアフリカ睡眠病、家畜トリパノソーマ症新規治療薬として非常に有望であることを示したものである。

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 8 回連続経口投与する方法でアフリカ睡眠病マウスモデルの治癒が可能になることを初めて明らかにした。さらに、家畜トリパノソーマ症マウスモデルにおいて非常に少ない量で腹腔内および経口投与ともに有効な治療効果が得られることを明らかにした。これらの成果は本剤が有効な新規トリパノソーマ治療薬になりうることを強く示唆するものである。

F. 研究発表

学会発表

1. Suzuki, T., Yabu, Y., Zhang R., Ohta N.: Comparative analysis of cDNA expression profiles between long

slender and short stumpy forms of *Trypanosoma b. brucei*. The 69th annual meeting of the Japanese society of parasitology. 4 April 2000.

2. Yabu, Y., Suzuki, T., Yoshida, A., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Ohta, N., Kita, K.: The efficacy of ascofuranone in a single-drug therapy for *Trypanosoma brucei brucei* in mice. Thirty-five joint conference on parasitic diseases. The Japan-United states cooperative medical science program. 28 July 2000.
3. 皆川信子、齋 義貞、鈴木高史、吉田彩子、太田伸生、坂上 茂、吉本昭夫、永井和夫、北 潔：アスコフラノンによるアフリカ睡眠病マウスモデルの治療効果 第 7 3 回日本生化学会大会、14、10、2000

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¹、永井 和夫²、岩田 想³、Edward Berry⁴、WHO

新潟薬科大学生化学、¹ 郡山女子大学家政学部、² 東京工業大学大学院生命理工学研究科、³ Department of Biochemistry, Imperial College of Science, Technology and Medicine, University of London、⁴ Lawrence Berkeley National Laboratory

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リンの同時投与に検討を加えた (WHO との共同研究)。
- 2) 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の特異な作用機序を解明するために、ウシ心筋及びニワトリ心筋ミトコンドリアのシトクロム bc_1 複合体に対する作用を検討した。
- 3) 哺乳動物血流中における long slender form の 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ところ、亜鉛が必須の因子として関与している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。この血流型の特異なエネルギー代謝を支えるのは、ミトコンドリア内膜のシアン非感受性の末端酸化酵素 (trypanosome alternative oxidase) 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、現在に至っている。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鎖電子伝達系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ので、アスコフラノンとグリセリンの同時投与で原虫のエネルギー代謝は完全に停止する。実際に、マウスモデ

ルにおいて治癒延命効果を繰り返して確認した。グリセリンに代わる薬剤の検索など解決すべき問題はあ
るものの、アスコフラノンとアフリカトリパノソーマ症の治療薬として大いに期待できるものと思われる。

この分担研究は、大きく3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とグリセリンの同時投与を検討した。

2) 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。 *Ascochyta visiae* がアスコフラノンと同時に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構造を有するにもかかわらず、ミトコンドリアのシトクロム bc_1 複合体 (ユビキノール-シトクロム c 酸化還元酵素) をきわめて強力かつ特異的に阻害する。X線結晶構造解析等によって、アスコクロリンの作用機序を検討し、さらにアスコフラノンの作用と比較した。

3) *Trypanosoma brucei* が、ツエツエバエ唾液腺から宿主哺乳動物血流中に侵入するやいなや、すみやかに glycerol-3-phosphate dehydrogenase と trypanosome alternative oxidase から構成される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解明する手がかりとして、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 核遺伝子発現の機構を検討した。

B. 研究方法

1) 原虫 (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) の接種で急性症状を呈したマウスにアスコフラノンとグリセリンを経口又は腹腔内投与し、治癒延命効果を調べた。

2) ウシ心筋及びニワトリ心筋ミトコンドリア由来のシトクロム bc_1 複合体の Q_0 部位に対するアスコクロリンの作用機序を検討するため、アスコクロリンとの共結晶を試みた。

3) 酸素電極法によるシアン耐性呼吸活性の測定、ウェスタンブロット法による alternative oxidase タンパク質の検出及び RT-PCR による alternative oxidase の mRNA の検出で、alternative oxidase の誘導過程に対する亜鉛イオノフォア及び二価金属キレーターの効果を検討した。

倫理面への配慮

単離したウシ心筋ミトコンドリア、ニワトリ心筋ミトコンドリア、酵母細胞を用いた実験では、倫理面での配慮は必要ないと思われる。マウスの感染実験は、WHO の委託を受けた Swiss Tropical Institute において動物愛護の精神に基づき法律ならびに基準どおり行った。したがって、本分担研究では倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

1) *T. b. rhodesiense* に感染した急性モデルマウスは、感染後9日目に

死亡した。このマウスに対して、1日1回100 mg/kgのアスコフランと1日3回1 g/kgのグリセリンを4日間連続して経口的に投与すると、60日以上延命効果が認められた。また、1日1回50 mg/kgのアスコフランの腹腔内投与と1日3回2 g/kgのグリセリンの経口投与を4日間連続して行った場合にも、60日以上延命効果が認められた。

3) アスコクロリンは、ウシ心筋のシトクロム bc_1 複合体 $P6_522$ 結晶（六方晶）においてユビキノンの還元を担う Q_i 部位にユビキノンのように結合していることが明らかとなっている。この結晶では、 Q_o 部位にアスコクロリンを結合させると、 Q_o 部位の代表的な阻害剤である Stigmatellin の場合同様に、X線の反射がみられなかった。また、ニワトリ心筋のシトクロム bc_1 複合体において、シトクロム b の還元状態の分光学的実験から、アスコクロリンが Q_o 部位にも作用することが確認された。

3) 亜鉛イオノフォアである Pyrithione は SH 基を有するために、弱いながらも alternative oxidase 核遺伝子発現の誘導作用を示した。0.2 mM の Pyrithione と 0.1 mM の EDTA 又は TPEN を同時に加えると、アンチマイシン A による alternative oxidase の mRNA の発現が強く阻害されたが、細胞を洗浄後 10 μ M の Zn^{2+} を添加すると mRNA は未処理のレベルにまで回復した。

D. 考察

1) *T. b. rhodesiense* に感染させた

急性モデルマウスにおいて、アスコフランとグリセリンの同時投与による顕著な延命効果が確認された。グリセリンの大量投与（1-2 g/kg）は、臨床使用上の障害となる。今後、引き続きグリセリンに代わりうる併用薬剤の検索を行う他に、Ascofuranone の剤形、投与方法・投与量などの実験条件の緻密な検討を行う必要があると思われる。

2) ウシ心筋シトクロム bc_1 複合体の $P6_522$ 結晶（六方晶）において、アスコリンはユビセミキノンのアナログとして Q_i 部位に結合し電子伝達を阻害することが既に明らかとなっている。阻害剤に対する感受性が高いニワトリ心筋のシトクロム bc_1 複合体のシトクロム b の還元状態の分光学的実験から、アスコクロリンは、ユビキノールの酸化を担う Q_o 部位にも作用することが確認された。 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。 Q_o 部位におけるアスコクロリンの結合状態を X 線結晶構造解析で検討するためには正方晶を調製しなければならないが、ウシ心筋シトクロム bc_1 複合体との共結晶は困難で、成功していない。現在、ニワトリ心筋シトクロム bc_1 複合体との共結晶を試みているところである。

3) Alternative oxidase 核遺伝子発現の過程において、亜鉛が何らかの関与をしていることが明らかとなった。Zinc finger タイプの転写因子などの例から、転写因子と DNA との結合に亜鉛が関与している可能性が考えられる。既にクローン化した alternative oxidase のゲノム DNA の