

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

| | | | | | |
|-------|-------|--------------------------------|-------|----|----|
| 20000 | 13001 | アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価 | 永谷 憲歳 | …… | 1 |
| 1009A | 13002 | 子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製 | 福地 剛 | …… | 5 |
| 1008A | 13003 | 新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立 | 笹岡 俊邦 | …… | 10 |
| 1010A | 13004 | 病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発 | 阿部 章夫 | …… | 15 |
| 1006A | 13005 | 糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発 | 小比賀 聡 | …… | 20 |
| 1007A | | | | | |

第2分野

| | | | | | |
|-------|-------|---|-------|----|----|
| 1011A | 23001 | 慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用 | 土方美奈子 | …… | 29 |
| 1012A | 23002 | ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法 | 梨井 康 | …… | 35 |
| 1016A | 23003 | ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用 | 片野 晴隆 | …… | 42 |
| 1013A | 23004 | 血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離 | 高倉 伸幸 | …… | 47 |
| 1014A | 23005 | BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明 | 宮里 幹也 | …… | 52 |
| 1015A | 23006 | ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用 | 小泉 修一 | …… | 57 |
| 1018A | 23007 | トリプトファンによる細胞性免疫の制御 | 五條 理志 | …… | 61 |
| 1019A | 23008 | 気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討 | 中尾 篤人 | …… | 66 |
| 1017A | 23009 | 顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築 | 赤澤 智宏 | …… | 69 |

第3分野

| | | | | | |
|-------|-------|---------------------------------------|-------|----|----|
| 1020A | 33001 | 循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発 | 佐藤 隆幸 | …… | 73 |
| 1022A | 33002 | 有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構 | 崔 吉道 | …… | 77 |
| 1021A | 33003 | 組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発 | 山崎 浩史 | …… | 81 |

第4分野

| | | | | | |
|-------|-------|---|-------|----|-----|
| 1025A | 43001 | 腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究 | 平原 一郎 | …… | 89 |
| 1023A | 43002 | 多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討 | 三宅 幸子 | …… | 98 |
| 1024A | 43003 | 熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究 | 小出 達夫 | …… | 103 |

| | | | |
|-------|-------|---|--------------|
| 20000 | 第5分野 | | |
| 1026A | 53001 | カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発 | 西川喜代孝 …… 109 |
| 1027A | 53002 | 新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究 | 河津信一郎 …… 113 |
| 1028A | 53003 | Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究 | 橋本 雅仁 …… 119 |
| 1029A | 53004 | RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発 | 清水 博之 …… 124 |
| 1030A | 53005 | 薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良 | 山崎 真巳 …… 132 |
| | 第6分野 | | |
| 1031A | 63001 | 分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計 | 伊豆津健一 …… 137 |
| 1032A | 63002 | 生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用 | 山岡 哲二 …… 140 |
| 1033A | 第7分野 | | |
| | 73001 | ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討 | 和田 誠基 …… 151 |

新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究

所属 国立国際医療センター研究所 地域保健医療研部

研究者 河津 信一郎

要旨

熱帯熱マラリア原虫の抗酸化機構を標的に、現行の抗マラリア薬と相加・相乗効果を示す治療補助薬を開発する基礎研究として、同原虫ペルオキシレドキシン（Prx）の性状を解析した。その結果、原虫 1-Cys 型 Prx がクロロキンの殺原虫作用に拮抗することが示唆された。

1. 研究目的

近年、熱帯熱マラリアの治療薬開発の研究対象として、赤内型原虫の抗酸化機構に係わる生化学が注目されている。熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）はヒトの肝細胞、赤血球内および媒介蚊の中腸内で発育・増殖し、その全発育環において、活性酸素などによる酸化ストレスに恒常的に曝されている。一方、ヒトの体内では、これら寄生環境に由来する酸化ストレスに加えて、宿主免疫系からの攻撃および原虫自身の代謝に由来する活性酸素が派生している。即ち、ヒト体内でのマラリア原虫は、生理的条件下において既に過剰の酸化ストレスを被っており、更なる酸化ストレスの負荷に対して極めて脆弱であることが知られている。実際、クロロキンやアルテシニン等、現在臨床の現場で繁用されている抗マラリア薬の効果も、その一部については、原虫細胞への酸化ストレスの負荷であることが知られている。これらのことから、マラリア原虫の抗酸化機構は新規抗マラリア薬開発の格好の標的と考えられている。Peroxioredoxin（Prx；ペルオキシレドキシン）は、新たに発見されたアンチオキシダントの一種で、活性部位の Cys（システイン）の個数によって 1-Cys 型、2-Cys 型の二種類に分類されている。現在までに原核生物から哺乳類までの幅広い生物層から Prx の遺伝子が単離されている。本研究では、原虫 Prx を標的として、現行の抗マラリア薬に相加・相乗効果を示す新規治療補助薬を開発することを目的に、（1）熱帯熱マラリア原虫の Prx 分子の単離と性状解析、ならびに（2）Prx 過剰発現原虫株の作製とその抗マラリア薬感受性試験をおこなった。

2. 研究方法

（1）熱帯熱マラリア原虫からの 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx 遺伝子の単離

熱帯熱マラリア原虫 1-Cys 型 Prx の全長を、EST データベースに登録されていた同遺伝子 5' 端配列を参考に 3' レース法で単離した。一方、同原虫の 2-Cys 型 Prx 遺伝子の全長は縮重プライマーで増幅した PCR 断片をプローブとして、栄養体の cDNA ライブラリーから単離した。

(2) 熱帯熱マラリア原虫 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx の性状解析

得られた塩基配列から、大腸菌で組換え体蛋白質を作製した。組換え体蛋白質をウサギに免疫して作成した抗体を用いて、ウエスタンブロット法で、Prx の赤内型原虫各発育期における発現パターンを調べた。同抗体を用いた間接蛍光抗体法で Prx を染色し、その原虫細胞における局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。次に、組換え体 Prx の過酸化水素に対する還元活性、ならびにチオレドキシソルペルオキシダーゼ活性を、それぞれ、フェリチオシアネート反応および、大腸菌チオレドキシソル系とのカップリング反応で解析した。

(3) 熱帯熱マラリア原虫 1-Cys 型 Prx 過剰発現株の作成

マラリア原虫用遺伝子発現ベクター (pHC1) に、同原虫 1-Cys 型 Prx 遺伝子をクローニングして組換え体プラスミドを作成した。作成したプラスミドを電気穿孔法で、熱帯熱マラリア原虫 (FCR-3 strain) の輪状体に導入した。エピソードでプラスミドが増幅した原虫を、ピリメタミンを 1-10 μ M 添加した培養液で段階的に選択して、1-Cys 型 Prx を過剰発現するマラリア原虫株を確立した。

(4) 1-Cys 型 Prx 過剰発現株での抗マラリア薬感受性試験

1-Cys 型 Prx 過剰発現株のクロロキン、メフロキンならびにアルテミシニンに対する感受性を親株のそれと比較した。培養熱帯熱マラリア原虫の発育ステージを 5%-ソルビトール処理にて輪状体に揃えて、赤血球寄生率を 2%前後とした。原虫感染赤血球浮遊液に各濃度の薬剤を添加して O₂5%/CO₂5%のガス条件で 25-27.5 時間培養した後、原虫の分裂体への発育阻止率を顕微鏡下で算定した。得られた結果から、50%増殖阻害率 (IC₅₀) を Plobit 法で算定した。

2. 研究成果

(1) 熱帯熱マラリア原虫からの 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx 遺伝子の単離

熱帯熱マラリア原虫 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx 遺伝子の全長を単離し、データベースに登録した[acc. no. AB020595 (1-Cys 型) および AB037568 (2-Cys 型)]。両 Prx のアミノ酸配列はリーシュマニア等原虫類でのホモログよりも、高等植物のそれらと高い相同性を示した。熱帯熱マラリア原虫 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx の、イネおよびオオムギでのカウンターパートとの相同性は、それぞれ、42%および 51%であった。サザンハイブリダイゼーションでの解析の結果、両 Prx 遺伝子はともに単一コピー遺伝子であった。

(2) 熱帯熱マラリア原虫 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx の性状解析

組換え体蛋白質をウサギに免疫して作成した抗体を用いて、Prx の赤内型原虫各発育期における発現パターンを調べた。その結果、両 Prx 蛋白質ともヘモグロビン代謝の時期に一致して、栄養体/分裂体 (Trophozoite/Schizont) で発現の亢進が認められた。ここで得られたシグナルの強度を既知濃度の組換え体蛋白質でのそれと比較して調べたところ、1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx の栄養体/分裂体総蛋白質に占める割合は、それぞれ、約 0.5%および 0.25-0.5%と推定された。原虫がヘモグロビンを代謝しない輪状体期 (Ring stage) での両 Prx の発現量は、ともにこの 25-50%と推定された (Fig. 1)。

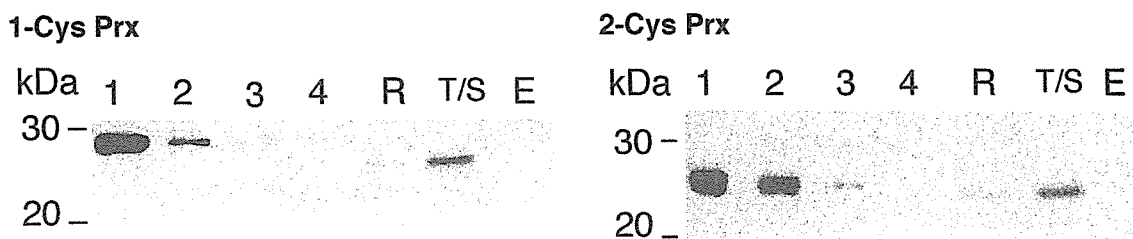


Fig. 1. Identification of native peroxiredoxin proteins in *Plasmodium falciparum* extracts. Extracts (15 μ g) prepared from parasites in different developmental stages, the parasite-uninfected human erythrocyte lysate (10 μ g) or the ProBond™ purified recombinant PfPrx proteins (rPfPrx; containing N-terminal fusion peptide of 3kDa) were subjected to 10% SDS-PAGE under the reducing condition. Samples loaded on the gel were; Lane 1-4, 300-150, 75, 38 and 19 ng of *P. falciparum* recombinant Prx protein (rPfPrx), respectively; Lane R, ring stage; Lane T/E, trophozoite/schizont; Lane E, human erythrocyte lysate. The separated polypeptides were blotted onto Immobilon™ membranes and reacted with rabbit anti-rPfPrx serum. Molecular weight markers in kDa are indicated on the left.

同抗体を用いて間接蛍光抗体法をおこない、原虫細胞での 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx 蛋白質の局在を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、両 Prx はともに原虫の細胞質に局在してした。

組換え体蛋白質を標品として、原虫 Prx の過酸化水素に対する還元活性を調べた。その結果、両組換え体 Prx に同活性が認められた。1-Cys 型 Prx は、5mM ジチオスレイトール (DTT) あるいは 5mM グルタチオン (GSH) 存在下で活性が変化しなかった。一方、2-Cys 型 Prx では、5mM DTT 存在下でペルオキシダーゼ活性が認められた (Fig. 2A)。次に、組換え体 Prx のチオレドキシンペルオキシダーゼ活性を検討した。ペルオキシダーゼの下流を大腸菌のチオレドキシン/チオレドキシンレダクターゼ (Trx/TrxR) で再構築し、これに 2-Cys 型 Prx をカップリングして過酸化水素を還元させた。その結果、過酸化水素の添加後に TrxR による NADPH の酸化 (OD=340nm の減少) が認められ、2-Cys 型 Prx のチオレドキシンペルオキシダーゼ活性が確認された。一方、1-Cys 型 Prx はチオレドキシンペルオキシダーゼ活性を示さなかった (Fig. 2B)。哺乳類あるいは酵母の 2-Cys 型 Prx は、非還元下では 2 分子の Cys 残基間にジスルフィド結合が形成される結果、ホモダイマーとして存在している。過酸化物との反応に際して 2-Cys 型 Prx では、このジスルフィド結合にチオレドキシンからの電子供与がおこなわれ、還元型のモノマーに解離する。熱帯熱マラリア原虫の 2-Cys 型 Prx の酸化還元においてもこの反応様式があてはまるかを、組換え体蛋白質を用いて非還元 SDS-PAGE で検証した。その結果、組換え体 2-Cys 型 Prx は非還元下ではホモダイマーとして存在し、DTT の添加によって還元型のモノマーに解離することが確かめられた。また、非還元 SDS-PAGE で分離した原虫栄養体のライセートを抗 Prx 抗体とウエスタンブロット法で反応させたところ、ホモダイマーの位置にシグナルが検出された。一方、原虫栄養体のライセート内の 1-Cys 型 Prx は非還元下の SDS-PAGE/ウエスタンブロットにおいても、モノマーの位置に検出された。

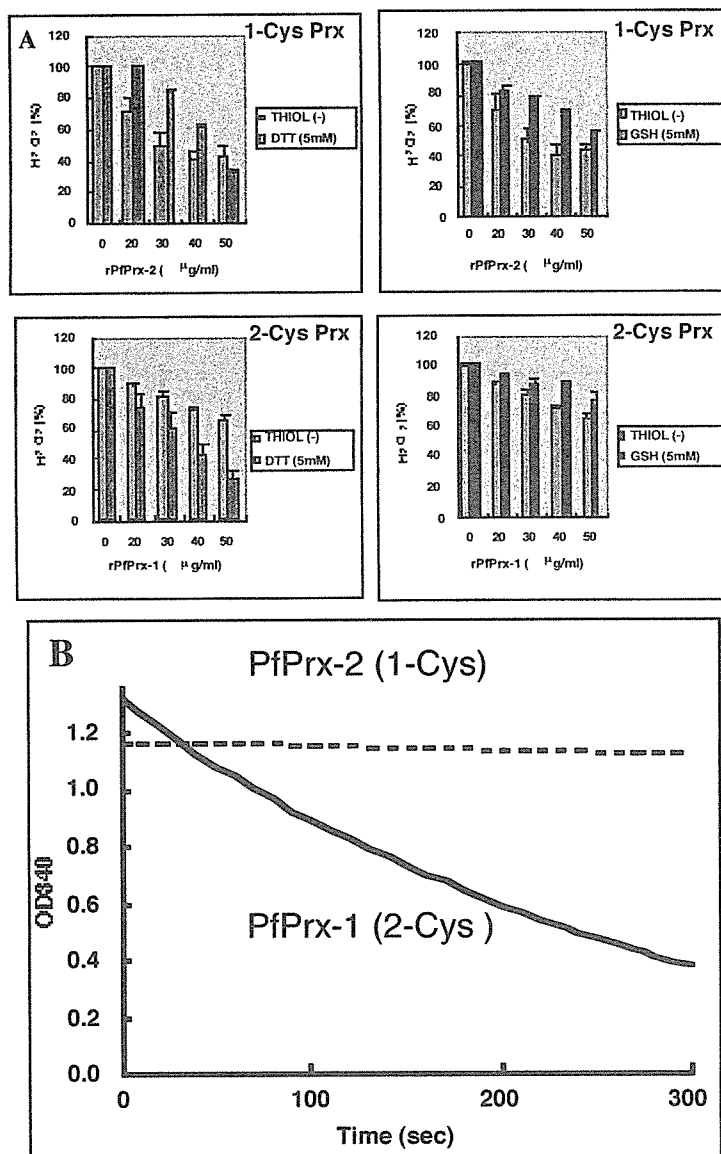


Fig. 2. Peroxidase activity of the recombinant *Plasmodium falciparum* peroxiredoxin (rPfPrx). (A) An effect of 5 mM dithiothreitol (DTT) or 5 mM glutathione (GSH) on the activity of the rPfPrx to remove H₂O₂ was examined in a 50 μl reaction volume. Various concentrations of the rPfPrx proteins were incubated with H₂O₂ (50 μM) in the presence or absence of the thiols for 10 min. The remaining H₂O₂ in the reaction mixture was measured using the ferrithiocyanate system. The results were expressed as the percentage of A475 recorded with the rPfPrx relative to that recorded without the rPfPrx. (B) The NADPH oxidation coupled by the rPfPrx-1 (2-Cys Prx; solid line) or rPfPrx-2 (1-Cys Prx; dotted line) to reduction of H₂O₂ in the presence of *E. coli* thioredoxin (Trx) and Trx reductase system. The NADPH oxidation was monitored as the decrease in A340 in a 1.0 ml reaction mixture. Data are representative of three similar experiments.

(3) 熱帯熱マラリア原虫 1-Cys 型 Prx 過剰発現株の作成

マラリア原虫用遺伝子発現ベクター (pHC1) に、同原虫 1-Cys 型 Prx 遺伝子をクローニングして、組換え体プラスミドを作成した。エピソードにプラスミドが増幅した原虫を、抗生物質マーカー (ピリメタミン) 10μM 耐性まで段階的に選択して、1-Cys 型 Prx 過剰発現マラリア原虫株を確立した。確立した原虫株での 1-Cys 型 Prx 蛋白質の発現をウエスタンブロット法で調べたところ、それが親株 (FCR-3 strain) の約 3 倍であることが確かめられた。1-Cys 型 Prx 過剰発現原虫株では、通常の O₂5%/CO₂5%培養条件下で親株よりも若干増殖速度が遅い他、著しい表現型の変化は認められなかった。

(4) 1-Cys 型 Prx 過剰発現株での抗マラリア薬感受性試験

1-Cys 型 Prx 過剰発現株のクロロキン、メフロキンならびにアルテミシニンに対する感受性を親株のそれと比較した。その結果、1-Cys 型 Prx 過剰発現株のメフロキンならびにアルテミシニン感受性には著変を認めなかった。一方、同過剰発現株では、クロロキンに対する感受性が親株のそれと比較して低下した。即ち、過剰発現株ではクロロキンに対する IC₅₀ 値が親株 (FCR-3 strain) の 1.8 倍に増加した (P>0.05)。pHC1CAT は同一プラスミドを用いて作成した Chloramphenicol acetyl transferase 過剰発現マラリア原虫株で発現系の対照とした。

Table 1. Chloroquine sensitivity of the *Plasmodium falciparum* which overexpresses the 1-Cys peroxiredoxin.

| | IC ₅₀ (CQ μM) | ±SD |
|-------------------------|--------------------------|-------|
| FCR-3 strain (n=3) | 0.025 | 0.005 |
| 1-Cys 型 Prx 過剰発現株 (n=4) | 0.046 | 0.011 |
| pHC1 CAT (n=1) | 0.026 | - |

4. 考察

本研究では、熱帯熱マラリア原虫の抗酸化機構を標的として、現行の抗マラリア薬に相加・相乗効果を示す新規治療補助薬を開発することを目的に、同原虫の新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン (Prx) の単離と性状解析をおこなった。熱帯熱マラリア原虫の 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx 遺伝子は、同原虫のゲノムとともに単一コピー遺伝子として存在していた。また、両 Prx のアミノ酸配列は原虫類でのホモログよりも、高等植物のそれらと高い相同性を示した。これは、「マラリア原虫の祖先が藻類の細胞内共生を経験した際に、共生微生物のゲノムから原虫のゲノムに遺伝子の移動が生じた」とする説を支持する所見と考察された。マラリア原虫ならびに、同じ亜門に分類されるトキソプラズマ原虫では、解糖系酵素のエノラーゼが高等植物と高い相同性を示す分子としてよく知られている。同原虫エノラーゼ分子の 3次元構造には高等植物に特異的なループが存在し、それを標的とする抗原虫薬開発の可能性が論議されている。マラリア原虫の Prx 分子についても同様の解析が待たれるところである。

熱帯熱マラリア原虫の 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx には、ともに過酸化水素に対する還元活性が確認された。このことから、同原虫においてもペルオキシレドキシシンが抗酸化機構に係わる分子として機能していることが示唆された。両 Prx 蛋白質の発現は、原虫での代謝の活性化に一致して栄養体/分裂体期に亢進した。1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx の栄養体/分裂体での発現量は多く、その原虫総蛋白質に占める割合は 0.25-0.5%と推定された。このことから、熱帯熱マラリア原虫は、原虫細胞内でヘモグロビンの消化等の代謝過程から派生する内因性過酸化物の還元 Prx を利用していることが推測された。クロロキン、アルテミシニン等多くの抗マラリア薬は原虫の栄養体/分裂体期で殺原虫作用を示すことから、同発育期で発現する原虫 Prx を標的として、これら薬剤に相加・相乗効果を示す治療補助薬開発の可能性が再確認されたと考える。

熱帯熱マラリア原虫の 2-Cys 型 Prx には、チオレドキシシンペルオキシダーゼ活性が確認された。同 Prx は、他生物でのそれと同様に非還元時にホモダイマーを形成することから、マラリ

ア原虫においてもチオレドキシンのターミナルペルオキシダーゼとして機能していると推測される。一方、1-Cys 型 Prx は、チオレドキシンの系に拘束されずに独立して機能する酵素と推測された。同 Prx の生理的エレクトロドナーについては、今後の検討課題と考えている。

1-Cys 型 Prx をマラリア原虫で過剰発現させたところ、クロロキンに対する IC₅₀ 値が親株のそれより有意に上昇し、原虫の 1-Cys 型 Prx がクロロキンの殺原虫作用に拮抗することが示唆された。拮抗現象を更に詳細に解析する目的で、現在同 Prx の欠損原虫株の作製を進めている。クロロキンの殺原虫作用についてはいまだ不明な点が多いが、その一つとして原虫のヘモグロビン代謝系でのヘムの重合（解毒）阻害が知られている。このことから、原虫 1-Cys 型 Prx がクロロキンの殺原虫作用に拮抗する作用点を考察すると、（1）ヘモグロビン代謝過程でヘムから派生する活性酸素に対するペルオキシダーゼ作用、（2）同活性酸素に起因する細胞膜磷脂質の酸化に対するホスホリパーゼ作用、および（3）フリーヘムに対する直接分解作用が予想される。今後は、これらの可能性を一つ一つ検証し、クロロキンに相加・相乗効果を示す新規治療補助薬の開発に繋がりたいと考えている。このような補助薬は、クロロキンの抗原虫効果をより確実にするばかりでなく、同薬剤有効地域での耐性原虫株の出現をも遅延させる効果があると期待される。

5. まとめ

熱帯熱マラリア原虫の抗酸化機構を標的に、現行の抗マラリア薬と相加・相乗効果を示す治療補助薬を開発する基礎研究として、同原虫の新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシニン（Prx）の単離と性状解析をおこなった。同原虫の 1-Cys 型および 2-Cys 型 Prx にはともに、過酸化水素に対する還元活性が確認され、このことから、同原虫においてもペルオキシレドキシニンが抗酸化機構に係わる蛋白質として機能していることが示唆された。両 Prx 蛋白質の発現は原虫での代謝の活性化に一致して栄養体/分裂体期に亢進し、このことから、熱帯熱マラリア原虫は細胞内での代謝過程から派生する内因性過酸化物の還元を Prx を利用していることが推測された。1-Cys 型 Prx を過剰発現させたマラリア原虫ではクロロキンに対する IC₅₀ 値が上昇し、同蛋白質がクロロキンの殺原虫作用に拮抗することが示唆された。以上の成績から、原虫 Prx の発現あるいは機能を制御することで、クロロキンと相加・相乗効果を示す治療補助薬開発の可能性が示された。

6. 研究発表

1. Kawazu, S., Tsuji, N., Hatabu, T., Kawai, S., Matsumoto, Y., and Kano, S. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109, 165-169 (2000).

2. Kawazu, S., Komaki, K., Tsuji, N., Kawai, S., Ikenoue, N., Hatabu, T., Ishikawa, H., Matsumoto, Y., Himeno, K., and Kano, S. Molecular characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. (submitted for publication).

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社