

エイズに関連する日和見原虫感染症に対する新規創薬に関する研究

所 属 群馬大学大学院医学系研究科・国際寄生虫病生態学
研究者 野崎 智義

研究要旨 エイズに伴う原虫性日和見原虫性感染症に対する新しい化学療法剤の開発を実現するために、原虫特異的代謝経路を標的とした具体的な創薬研究を行った。クリプトスポリジア症・トキソプラズマ症・赤痢アメーバ症創薬のいずれの研究に関しても立体構造解明のための結晶化、インビトロ・インビボ評価系の構築、誘導体合成などの初年度の目標が順調に達成された。

分担研究者

- (1) アリジェン株式会社 山本雅一
- (2) 東京大学大学院医学系研究科 北 潔
- (3) 慶応義塾大学医学部 浅井隆志
- (4) 名古屋市立大学大学院医学研究科 藪義貞
- (5) 国立感染症研究所・寄生動物部 中野由美子

A. 研究目的

トキソプラズマ症、クリプトスポリジア症、赤痢アメーバ症はいずれもエイズに伴う重要な原虫性感染症である。本研究ではこれらの日和見原虫性感染症に対する新規化学療法剤を創生することを目的として、創薬標的酵素のタンパク質化学的解析から具体的な創薬に到る包括的な創薬研究を行っている。

これらの原虫症は治療・予防において多くの問題を有する。トキソプラズマ症・クリプトスポリジア症に対しては有効な治療法が存在しない。また、赤痢アメーバ症に対しては、無症候性キャリアに対する有効な治療が存在しない、現行のメトロニダゾールに催奇形性がある、耐性原虫株が出現している。従ってこれら原虫症に対する新規化学療法剤の開発が危急に必要とされている。

本研究テーマにおいて原虫生物学とものづくりの専門家の共同グループから構成される研究グループによって、創薬標的となる原虫特異的酵素の結晶構造を解明し、合理的な創薬デザインを可能にする方策を確立するとともに、具体的な創薬を達成し、その成果を実際の臨床に結びつけること

をめざしており、新薬開発に経験を持つ企業との連携を果たし、真の実用化をめざしている。

それぞれの研究グループは寄生虫の代謝経路が宿主哺乳類と大きく異なる点に着目し、これらを化学療法剤の標的と捉えて様々な角度から研究を行ってきた。クリプトスポリジア症に対する創薬に関しては、分担研究者北・藪らが先駆的な研究を展開しているシアン耐性酸化酵素を標的酵素として、「本酵素を標的としたリード化合物アスコフラノン誘導体における構造活性相関の確立」、「シアン耐性末端酸化酵素の結晶構造の解明」および「*in vitro* 及び *in vivo* で著効を示す誘導体を選択する」の3点を目標として研究を進めている。トキソプラズマ症に対する研究では、浅井らがヌクレオシド3リン酸加水分解酵素(NTPase)を標的として「その結晶構造の解明」、「リード化合物群から *in vivo* で著効を示す化合物の選択」、「新たなトキソプラズマ選択的創薬標的の発掘」を目標に研究を展開している。また、赤痢アメーバ症に対する創薬では、主任研究者野崎、分担研究者中野らが含硫アミノ酸分解酵素メチオニンガンマリナーゼ(MGL)を標的として、「MGLの結晶構造の解明」、MGLに分解され赤痢アメーバ細胞に毒性を示す「メチオニン誘導体トリフルオロメチオニン(TFM)の誘導体合成と有効化合物の選択」、「*in vivo* 動物感染モデルの構築」を目標にして研究を行っている。

いずれの分担・受託研究においても創薬標的酵素の分子構造の解明とそれに基づく合理的ドラッ

グデザインを目指すとともに、薬剤の最終的な評価に不可欠な動物感染評価系の構築にも力を注いでいる。更に、ものづくりの専門家との連携を重視し、ベッドサイドで利用される創薬の実現に取り組んでいる。その意味でも分担研究者山本の貢献は高く、医学・生物学の分野の専門家と物作りの専門家とをつなぐ重要な役割を担っている。以上のように本研究はエイズ日和見感染症の新規薬剤創生のための基盤となる分子構造に関する研究から基礎研究の成果を実際に臨床へ適用し、これら重篤な感染症に対する新たな化学療法剤の実用化をめざすものである。

B. 研究方法

a. 組換えクリプトスポリジアシアン耐性末端酸化酵素(AOX)、ネオスポーラヌクレオシド3リン酸加水分解酵素(NTPase)、赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼ(MGL)の大量合成法の確立

本研究では「標的酵素の立体構造解明にも基づく論理的創薬」を目指し、結晶化にもちこめる組換え酵素の大量合成が必須である。初年度 AOX, MGL いずれの酵素に関しても至適化を終え、大量合成への筋をつけた。AOX, NTPase では前培養の方法、培地の組成、IPTG による誘導の時期および濃度などの条件を至適化し、最も高い活性を示す条件を検討した。MGL の大量合成に関しても培養液中への pyridoxal phosphate の添加、精製プロトコルの改良、IPTG 誘導条件の至適化などを行った。

b. ネオスポーラ NTPase、赤痢アメーバ MGL の結晶化

いずれのタンパク質も蒸気拡散法を用いて結晶化の至適条件の検討を行った。ネオスポーラ NTPase に関しては以下の2条件のみで NcNTPase の小結晶が得られた。(1) 30% PEG400, 0.1 M acetate buffer pH 4.5, 0.2 M 酢酸カルシウム (2) 1.0 M 酒石酸 Na/K, 0.1 M MES buffer pH 6.0. MGL に関しては初年度は MGL2 の阻害剤存在下での結晶化のみを達成した。初期の結晶化条件の至適化は Crystal Screen 1 及び 2 を用いて行った。X 線回折に供することの出来た結晶は Crystal Screen 1-#14 (28% PEG400, 0.1 M

HEPES pH7.5 and 200 mM CaCl₂, 277 K)の条件にて得られ、二日間で 0.02 X 0.02 X 0.6 mm の結晶が得られた。

c. MGL の X 線構造解析

結晶を 30% PEG400, 5% glycerol, 0.1 M HEPES pH7.5, 200 mM CaCl₂ 溶液に浸透させた後、液体窒素で凍結した。播磨理研 SPring8 の BL44XU を用いて、X 線回折像は 2.3 Å の解像度で得られた。得られたデータは Imaging Plate detector (DIP6040)で検出された。結晶と検出器の距離は 350 mm で、波長は 0.90 Å であった。1° で 180 の振動像を取得した。データプロセッシングは HKL2000 で行った。総計 570,678 の反射は 70,477 の固有の反射に帰結された。 R_{merge} は 0.15 で、96% completeness が達成された。

c. 組換えトリパノソーマブルセイ AOX を用いたアスコフラノン誘導体の構造活性相関の解析

アスコフラノン誘導体の AOX 阻害の構造活性相関を調べるために、活性の高いトリパノソーマの AOX を発現させた大腸菌の膜画分を用いて、そのキノール酸化酵素に対するアスコフラノンおよびその誘導体の阻害効果を調べた。50 mM Tris-HCl (pH7.5) 992 μl (987 μl)、サンプル 3 μl (タンパク質量 0.35 μg)、ユビキノール1 5 μl、(阻害剤 5 μl) を 1 ml キュベット中で混合し、50 mM Tris-HCl (pH7.5)中で試料(と阻害剤)を 25°C で 4 分インキュベートした後、基質 150μM ユビキノール1を加えることにより反応を開始させ、278nmでの吸光度変化を観測した。(Shimazu UV-3000、モル吸光係数 ϵ は $15000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)。阻害は IC_{50} によって表した。

d. 組換えピルビン酸キナーゼ(PK)II の発現・精製・解析

ゲノムデータベース上の情報をもとにトキソプラズマ・PKII アイソザイム cDNA から常法に従い GST 融合タンパクとして PKII 組換え酵素を得た。組換えタンパクを、グルタチオン・セファロース 4B カラムを用いて精製をした。その後、DEAE-Toyo Pearl 650s カラムにて濃縮した。PKII の活性測定は LDH をカップリング酵素として利用し、

ピルビン酸の還元により酸化された NADH を 340nm で光学測定した

e. 培養細胞を用いた *in vitro* 及び SCID マウスを用いた *in vivo* のクリプトスポリジア感染効果判定系の確立

AGS 培養細胞にオーシストを感染させ、24 時間後に種々の濃度のアスコフラノンを経口投与し、さらに 24 時間後に残存しているオーシストを抗酸染色法、蛍光抗体法により検出した。*In vivo* モデルは、クリプトスポリジアの分離後 1 ヶ月以内のオーシストをものを SCID マウスに 10⁶/マウス 2 日連続経口投与し 15 ~ 20 日後排出オーシストが糞便中 10⁵-10⁶/g になったマウスを用い治療実験に供した。投与するアスコフラノンは 0.05% PBS-Tween 20 に懸濁 (10 mg/ml) し一日 1 回 100 mg/kg 経口投与および腹腔内投与しその治療効果を検討した。投与間隔は 24 時間毎に 3 および 5 日間の連続投与した。

f. ハムスターを用いた赤痢アメーバ肝膿瘍モデル、及び C3H/HeJ マウスを用いた腸炎モデルの確立

肝膿瘍モデルはシリアンゴールデンハムスター (雌 3-4 週令、30-40g) の肝臓の左葉に 10⁶ の赤痢アメーバ栄養型 (HM1 cl6 或いは Hataji 株) を接種した。感染並びに治療効果の判定は 1 週間後に開腹、膿瘍の重量の測定により行った。

腸炎モデルは C3H/HeJ 或いは CBA マウス (雌 6-8 週令) を用いて作成した。無菌培養された 10⁶ の赤痢アメーバ栄養型 (HM1 cl6 或いは Hataji 株) を BI-S-33 培地で培養され BI 培地で洗浄された *Bacteroides fragilis* と混合し、マウスの盲腸部に接種した。接種後の感染は糞便中に排出される原虫の細胞表面レクチンを抗原捕捉 ELISA (Techlab, VA, USA.) でモニターした。治療実験に用いる場合は少なくとも 3 週間以上抗原排出が継続し、持続感染が確認された個体についてのみ行った。

g. アスコフラノン、TFM 誘導体の合成

(1) アスコフラノン誘導体の合成検討

フェノール誘導体への疎水性側鎖の一工程導入法の検討

リード化合物である天然物アスコフラノンは、スパーサー、フラノン環からなる疎水性側鎖をもつフェノール誘導体であり、全く同じフェノール性部分をもちながら短い側鎖を有するアスコクロリンは、哺乳類に対する毒性が知られている。

そこで、構造-活性相関を迅速に検討するための誘導体の分子設計においては、フラノン環部分の有無のみならず、両天然物の違いである側鎖部分の鎖長についてもファクターとなる。まず、第 1 段階では、側鎖部分が AOX との結合を左右する重要な要素であるという疎水性側鎖の鎖長フィットネス仮説をたて、アスコフラノンと同等以上の鎖長から側鎖無しの対照サンプルまで、種々の長さのアルキル鎖の導入方法を開発し、サンプルを合成した。ポイントは、全合成に長い工程を必要とするアスコフラノンを複素環部分、不斉炭素部分の構築を必要としない直鎖型疎水基モデルに単純化することである。

更に、水-アルコール系アルドール反応のアルカナル型側鎖前駆体への応用・展開に関しても検討した。また、アスコフラノンの芳香環の置換基メチル基、ハロゲン原子の有無の効果を検討できる合成ルートを確認した。

(2) TFM 誘導体の合成検討

TFM の合成は、Soloshonok らの (L)-ホモシステインを基質とした方法を用いて行った。さらに、これまでにトリフルオロメチオニンの誘導体として、メチルエステルや *N*-アセチル化体、*N*-トリフルオロアセチル化体しか報告例はなく、プロドラッグとしての研究はなされていない。そこで、本研究ではトリフルオロメチオニンのプロドラッグを多種合成し、次年度以降にその薬効果を検討することとした。

市販のホモシステインは D,L 体であるので (L)-ホモシステインを得るため、まず (L)-ホモシステインを 1,2-エタンジチオールによりアンモニア水中で還元し 82% の収率で得た。つづいて (L)-ホモシステインを液体アンモニア中で水銀ランプにより照射しヨウ化トリフルオロメチルと反応させて、トリフルオロメチオニンを 48% の収率で得た。なお、同様の反応にてトリフルオロメチルシステインも合成した。トリフルオロメチオニンのプロドラッグのその他の合成法は特許取得の観点から詳

細を記述することはできない。精製は三度にわたるアセトニトリル/水の混合溶媒による再結晶を行ったが、結晶性が良くなく ^1H NMR でも不純物が見られたので、イオン交換樹脂(Dowex50x8)を用いた精製を行った。

C. 研究結果

a. 組換えクリプトスポリジアシアン耐性末端酸化酵素(AOX)、ネオスポーラヌクレオシド3リン酸加水分解酵素(NTPase)、赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼ(MGL)の大量合成法の確立

クリプトスポリジア AOX の結晶構造解析には安定な大量発現系の確立が必須である。しかし以前に報告した大腸菌での発現はトリパノソーマの酵素に比べて極めて低く、大腸菌細胞膜での比活性は 1000 分の 1 以下であった。また、前培養の培養液中のヘム合成の前駆体であるアミノレブリン酸の持ち込みにより大腸菌の末端酸化酵素であるシトクロム *bo* およびシトクロム *bd* が残存し、シアン感受性のキノール酸化酵素活性が高いためアスコフラノン誘導体の構造活性相関を調べる事が困難であった。そこでこの問題点を解決する目的で大腸菌における発現系の改善を試みた。まず培養に用いる菌株に関しては常に新しくグリセロールストックより植菌して作成したプレートから前培養用の菌株を採取する事により常に一定の増殖速度の培養が可能となった。次に IPTG での誘導時期および濃度については、誘導時期は OD600nm が 0.3 の時が至適であり、IPTG 濃度についても 100 μM が、グルコース濃度についても 0.2 % (W/V) もっとも高い膜画分キノール酸化酵素活性を示した。また大腸菌細胞膜の調製法も組み換え TAO 調製時の経験に従って改善を加え、超音波処理による細胞破碎時に 20% (w/w) sucrose、50mM Tris-HCl pH7.5, 0.1mM PMSF、プロテアーゼインヒビターカクテルの条件下で行う事によって安定な活性を得られる事が判った。以上の条件の組み合わせにより比活性が 200 nmol/min/mg タンパク質とこれまでの 10 倍以上高い膜標品を再現性良く得る事が可能となった。しかもこの様にして得た膜画分におけるシアン感受性のキノール酸化酵素活性は常に 10%以下であり、CAO に対する阻害効果を直接正確に観察することが可能となった。

ネオスポーラ NTPase は封入体として作製されたが、6M のグアニジン塩酸で溶解した後、50 mM トリス塩酸、pH 7.5 で 6 倍にうすめ一晚 4 $^{\circ}\text{C}$ で放置し、これを過剰量 (~3000 倍) の 50 mM トリス塩酸、pH 7.5 に対して一晚 4 $^{\circ}\text{C}$ で透析することで活性を復元することができた。活性のある NcNTPase は DEAE-Toyopeal 650S イオン交換クロマトグラフィー、Toyopeal HW55S ゲルろ過法により単一に精製することができた。

赤痢アメーバ MGL は pyridoxal phosphate の濃度と IPTG 誘導・精製条件を至適化した。得られた MGL2 は SDS ポリアクリルアミドゲル上で単一のバンドとして確認され、その精製度は 95% 以上と見積もられた。一方、MGL1 は主バンドの下に濃度の薄い付加的なバンドが見られた (図 1)。この付加バンドはゲル濾過でもイオン交換クロマトグラフィーでも分離出来なかった。この付加バンドの実体を明らかにするために、トリプシン分解産物の分子量解析(LC/MS, tandem MS)を行ったところ、MGL1 の分解産物であることが明らかになった。MGL はいずれのアイソタイプもテトラマーとして存在することが明らかにされているので、分離は不可能であると結論し、このままの形でアッセイ並びに結晶化に供した。

b. ネオスポーラ NTPase、赤痢アメーバ MGL の結晶化

ネオスポーラ NTPase (10mg/ml) の最初の結晶化のスクリーニングを 96 条件で行った。その結果以下の 2 条件のみで NcNTPase の小結晶が得られた。(1)30% PEG400, 0.1 M acetate buffer pH 4.5, 0.2 M 酢酸カルシウム (2) 1.0 M 酒石酸 Na/K, 0.1 M MES buffer pH 6.0。これらの条件で使う酵素量を増量してスケールアップした系で大型結晶ができるか検討し、以下の写真に示す結晶を得た。

赤痢アメーバ MGL2 の結晶化は阻害剤 propargylglycine 存在下での共結晶の結晶化について至適化を行った。様々な条件検討の結果、Crystal Screen 1-#14 (28% PEG400, 0.1 M HEPES pH7.5 and 200 mM CaCl_2 , 277 K)の条件にて得られた。二日間で 0.02 X 0.02 X 0.6 mm の結晶が得られた。結晶は針状であり、今後の更に太い結

晶の作成の至適化が望まれる。準備的 X 線回折像によれば MGL2 の結晶は空間群 $P2_12_12_1$ の構造を示した。unit-cell parameters は $a=88.62$, $b=102.99$, $c=170.25$ Åであった。MGL-2 の 4 分子が非対称な構造をとると仮定すると Matthews coefficient は 2.24 (2.98) Å³ Da⁻¹ であった。これは溶媒の ~45% (~59%) の容量であった。多重同型置換法を用いて現在分子構造を解析中である。

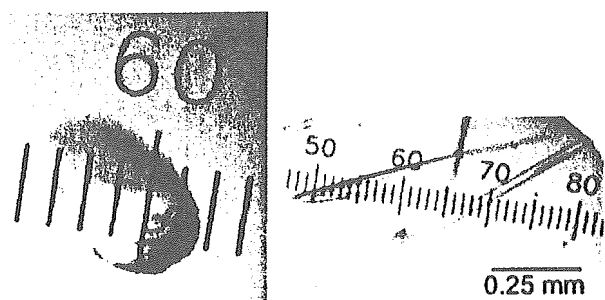


図1 NTPase と MGL2 の結晶化条件と光学顕微鏡像

c. トリパノソーマブルセイ組換え AOX を用いたアスコフラノン誘導体の構造活性相関の解析

アスコフラノンは大きく別けて芳香環、リンカー、フラノン環の 3 つの部分から構成される。下図に各アスコフラノン誘導体の構造と構造の右下にその IC₅₀ を示す。アスコフラノン誘導体の左の番号は六員環とリンカーの構造の特徴を表し、右の番号はリンカーの炭素鎖数を示している。以下 3 点について調べるために、アスコフラノン誘導体を合成した。

1) フラノン環について

アスコフラノンの IC₅₀ は 0.13 nM である。アスコフラノンと同じ糸状菌の代謝産物であるアスコクロリンはアスコフラノンのフラノン環部分が六員環となった構造をしており、その IC₅₀ は 1.50 nM である。この十倍以上の阻害能低下はフラノン環部分の重要性を示唆するもので非常に興味ある点であった。そこでフラノン環が TAO 阻害能に与える影響を明らかにするためにフラノン環を除いた 196 と 200 を合成した。その結果、196、200 誘導体はアスコフラノンと同程度の IC₅₀ が 0.30~0.50 nM という TAO 阻害活性を有していた。これより TAO 阻害にフラノン環は必須ではないことが明らかになった。

2) 六員環の官能基について

次に六員環の官能基については、196、200 はアスコフラノンと同じ構造である。195、197、198 誘導体の六員環はアスコフラノンのクロロ基が欠損して、197 誘導体はさらにメチル基も欠損している。195 誘導体は IC₅₀ が 10.0~65.0 nM、197 誘導体は IC₅₀ が 220 nM、198 誘導体は IC₅₀ が 13.0 nM であった。クロロ基が欠損すると 2 オーダー、クロロ基とメチル基が欠損すると 3 オーダー阻害活性が低下する。六員環のクロロ基とメチル基は TAO 阻害に関し重要な役割を果たしていると考えられる。

3) リンカーの長さや構造について

アスコフラノンとその誘導体では、六員環とリンカーの連結部分の構造が異なっており、アスコフラノン誘導体の化学合成のステップ数は軽減している。198、200 誘導体では C=C 結合、195、196 誘導体では α 位に水酸基が存在している。リンカーの長さに関しては、9 から 12 までについて調べた。195-9、195-10、195-12 誘導体は IC₅₀ がそれぞれ 65.0、65.0、10.0 nM であった。196-9、196-10、196-12 誘導体は IC₅₀ がそれぞれ 0.30、0.50、0.50 nM であった。200-9、200-10、200-12 誘導体は IC₅₀ がそれぞれ 0.38、0.38、0.45 nM であった。六員環とリンカーの連結部分の構造は TAO 阻害活性に影響を与える。リンカーの長さについては阻害活性に大きな変化はない。

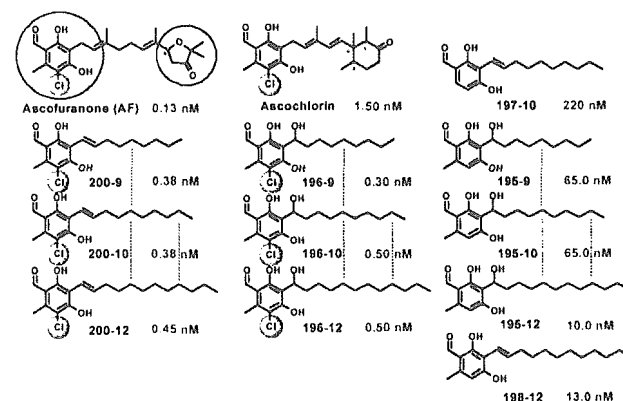


図2 アスコフラノン誘導体の構造とその IC₅₀

アスコフラノン誘導体の左の番号は六員環とリンカーの構造の特徴を表し、右の番号はリンカーの炭素鎖数を示している。誘導体の右下に IC₅₀ を示している

d. 組換えピルビン酸キナーゼ(PK)II の酵素学的特

徴・細胞生物学的解析

他種生物の多くの PKII は一価および二価カチオンを活性に必要とし、基質 PEP がアロステリックに作用し、リン酸化糖により調節を受ける。しかし、トキソプラズマ・PKII は二価のカチオンを必要としたが、アミノ酸配列から推測されたように一価のカチオンは活性に必要とせず、基質 PEP に対しハイパーボリック活性曲線を示した。多くの PKII はリン酸受容体として ADP を主に用いるが、トキソプラズマ・PKII は GDP および IDP を主に用いた。GDP および IDP の K_{cat}/K_m 値は ADP のそれよりそれぞれ 337 倍、114 倍高かった。これらのデータは GDP がトキソプラズマ・PKII の主な基質であることを示す。

局在および、細胞内での PKII 活性を明らかにするべく、トキソプラズマ・タキゾイト細胞破碎液を分画化し酵素活性を測定した。PKI の活性はミトコンドリア画分には見られず、ミトコンドリア画分で検出された PKII 活性はトキソプラズマ・PKII によるものと確認された。

次に、トキソプラズマ・PKII の局在をより明らかにするため、PKII 特異抗体を用いて HFF 細胞内で培養したトキソプラズマ・タキゾイト内の局在化を試みた。HFF 細胞内のトキソプラズマ・タキゾイトをこの抗体を用いて染色すると、主に線状、顆粒状のいわゆる「ミトコンドリア」パターンを示した。これらはミトコンドリアマーカーの MitoTracker と共局在しており、トキソプラズマ・PKII がミトコンドリアと関連していることを示した。

e. 培養細胞を用いた *in vitro* 及び SCID マウスを用いた *in vivo* のクリプトスポリジア感染効果判定系の確立

In vitro 評価系を構築した。アスコフラノンのクリプトスポリジウム原虫に対する効果を判定することは合成した誘導体の *in vivo* における効果判定に必要不可欠なステップである。まず 37℃、RPMI1640 中で培養している AGS 細胞に 10^6 個のオーシストを感染させた。24 時間後にアスコフラノンの濃度を変えて培養液中に添加し、24 時間後に残存しているオーシストを抗酸染色法、蛍光抗体法により観察し、薬剤の効果を検討した。その

結果、濃度 120 nM から 12 μ M の間で濃度依存的にオーシスト数が減少し、12 μ M では約 20%まで減少した。

In vivo 評価系は SCID マウスを用いて確立した。予備実験において、感染マウスでは排出されるオーシストの量が徐々に増加し、すべてのマウスが 60 日以内に死亡した。また、クリプトスポリジア感染 SCID マウスは一回のアスコフラノン (100 mg/kg) 経口投与では治療効果が認められなかったが、投与回数を 3-5 回に増やすことにより治療効果が増強した。アスコフラノンの投与によりオーシストの排出は急激に減少し投与開始後 8~10 日目に糞便中から消失した。しかし 5 匹中 2 匹において再発が見られ再発したマウスは 60 日以内にすべて死亡した。

さらに、腹腔内投与効果においても検討した。経口投与の場合と同様な結果が得られ、アスコフラノン投与と感染マウスは投与開始後 8~10 日目にすべてオーシストの排出は陰性になったことが確認された。しかし治療マウス 4 匹の内 1 匹に再発が見られた。

f. ハムスターを用いた赤痢アメーバ肝膿瘍モデル、及び C3H/HeJ マウスを用いた腸炎モデルの作製

ハムスター肝膿瘍モデルでは HM1、Hataji、KU33 など複数の株で再現性よく感染を成立させることが出来た。特に病原性の高い後者 2 株での感染再現性は極めて良好であった。

感染6日後の肝重量(mg) (雌; ハムスター)
肝総重量(mg) = 肝非膿瘍部分(mg) + 肝膿瘍部分(mg)

Control株#1:			
A. 3,368	2,552	816	
B. 3,138	2,178	960	
Control株#2:			
A. 3,459	2,314	1,145	
B. 3,245	2,275	970	
Control株#3:			
A. 3,830	2,977	853	
B. 3,468	2,788	680	
Control株#1+薬剤A投与群			
A. 3,080	2,564	516	
B. 1,814	1,761	53	

表1 肝膿瘍モデル実験例

更に C3H/HeJ マウスを用いた腸管感染モデルでも再現性のある感染系を構築することが出来た。興味深いことに腸管感染の確立には、無菌培養赤

痢アメーバ株の単独接種では感染効率が低く、腸の常在菌の一つである *Bacteroides fragilis* を接種直前に混和することにより感染性が著しく向上することが判明し、これを通常のプロトコルとした。下の図3で見られるように、糞便中の抗原量には採取日及び個体によってばらつきが見られるが、30日を越えて抗原を排出している個体ではおおむね数ヶ月間の感染継続が確認された。一方3週まで抗原の排出が見られて、その後抗原排出のなくなった個体も見られた。以下の図3で2.19は感染後約4ヶ月に当たり、7ヶ月以上にもわたり慢性感染が継続していることが明らかとなった。

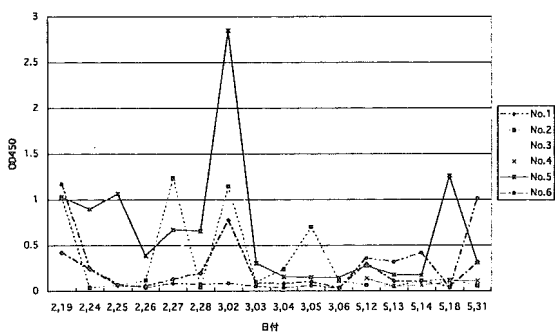


図3 糞便中赤痢アメーバレクチン量の経時的変化

g. MGL を標的とするリード化合物 TFM の誘導体合成

これまでの研究により TFM(S-trifluoromethyl homocysteine)が肝膿瘍モデルで著効を示すことが明らかとなっている。しかしながら、ハムスターの *in vivo* 実験ではTFMによる顕著な体重減少が見られた。そこで動物に対する毒性が低く、安全性・選択毒性が高い、より優れた化合物を見つけだすために誘導体合成を開始した。更に、官能基の修飾により溶解度を高めるとともに体内での移行を早め、分解を遅延する試みが必要である。合成は名古屋工科大学の融健教授らとの共同研究により行われ、既に S-trifluoromethyl homocysteine を基本骨格とする6種類の化合物の合成を終了した。構造の詳細に関しては知的財産権のため現時点での記述を避けるが図4に示すエステル及びアミド誘導体を含む。

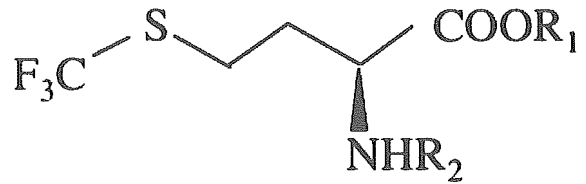


図4 TFM の誘導体の合成の基本的方向性

g. アスコフラノン、TFM 誘導体の合成

これら誘導体の新規合成方法の開発に関しては方法で詳細を記述した。これらの合成方法はいずれも比較的簡便で精製度にも優れているとともに、高い収量を得ることが出来た。

D. 考察

我々はエイズに伴う原虫性日和見感染症、クリプトスポリジア症・トキソプラズマ症・赤痢アメーバ症に対する新しい化学療法剤の開発を実現するために、原虫特異的代謝経路を標的とした具体的な創薬を目指しているが、初年度の研究成果により次年度以降の研究発展のために不可欠な準備的成果を挙げることができた。

クリプトスポリジア症創薬に関しては、標的酵素シアン耐性酸化酵素の結晶構造解析に不可欠な組換え酵素の大量合成を達成するとともに、構造活性相関を確立するために必要なアスコフラノン誘導体の合成をほぼ終了した。更に、トリパノソーマブルセイ由来のシアン耐性酸化酵素を用いて構造活性相関を明らかにすることができた。また、培養細胞を用いた *in vitro* 系で、SCID マウスを用いた腸管感染モデルを確立し、今後の薬物の効果判定方法が確保された。次年度以降、既に合成されたアスコフラノン誘導体を用いてクリプトスポリジア AOX に有効な薬剤をスクリーニングし、更に *in vitro* 及び *in vivo* 評価系を用いて有望な化合物を選定したい。また、結晶化に不可欠な AOX 酵素の大量合成も可能となったことから次年度以降 AOX の結晶化が期待できる。しかしながら、膜タンパク質の特殊な性質から結晶化に際しても多くの条件検討が必要となることが予想される。

トキソプラズマ症創薬に関しては、トキソプラズマと近縁種であるネオスポーラから標的酵素で

ある NTPase の結晶化に成功した。この X 線回折像から NTPase の結晶構造を解明できれば、近縁種であるトキソプラズマの NTPase の立体構造の解明は格段に容易になると予想される。更に、ミトコンドリアに局在する全く前例のない PK を同定し、その基礎的解析を終えた。トキソプラズマ PKII はその基質特異性・オルガネラの局在など全く前例のない酵素であり、新たな創薬標的を発見できたと考えられる。

赤痢アメーバ症創薬に関しては、標的酵素である 2 種の MGL アイソタイプのうち基質特異性が広くより house-keeping な役割を担うと予想されるアイソタイプの大量合成と結晶化が達成された。現在の結晶は細かいが、それでも 2.5 Å の解像度が既に得られている。更に結晶化の条件を検討することにより、解像度の高い立体構造が明らかにされると考えられる。現在結晶化条件の至適化がほぼ終了しているのは MGL2 のみで、しかも阻害剤 propargylglycine の共存条件下のみである。今後 MGL1 の結晶化、阻害剤非存在下での結晶化を達成し、a. MGL アイソタイプの基質特異性の根拠となるアミノ酸残基及び分子構造・結合、b. プロドラッグ・阻害剤の結合様式、結合に必須なアミノ酸残基を明らかにしたい。得られた立体構造に基づく知見をもとに、今後 MGL に特異的に結合する薬剤をデザインすることを論理的に計画している。現在用いられているリード化合物 TFM は阻害剤ではなく、いわば“subversive substrate”であるが、今後、理論的に安全性により優れていると予想される阻害剤の検索にも役立てたい。また、ハムスター肝膿瘍モデル、マウス腸炎モデルの構築も達成された。特に赤痢アメーバ腸炎モデルの構築はアメーバ症研究における長年の重要案件の一つであった。このモデルでは、ヒトの赤痢アメーバ腸炎とほぼ同一の寄生局所、臨床表現型を示すため、ヒトの病態を反映したより優れたモデルであるということが出来る。7ヶ月にも及ぶ慢性持続感染はヒトの病型とよく似ている。更に、現有のメトロニダゾールが腸管内シストに無効なこと、これまで腸内での薬剤効果を判定するいいモデルが存在しなかったことを考慮すると、本モデルの将来の応用範囲は広い。

更に、知的財産権の確保の見地から詳細は総括

報告書に記載しないが、リード化合物トリフルオロメチオニンの誘導体も初年度順調に合成されており、次年度以降更に複数種類の誘導体の合成を計画している。

E. 結論

本研究はエイズ日和見感染症の新規薬剤創生のための基盤となる分子構造に関する研究から基礎研究の成果を実際に臨床へ適用し、これら重篤な感染症に対する新たな化学療法剤の実用化をめざしている。初年度の研究は創薬標的の構造解析、*in vitro*, *in vivo* モデルの構築、誘導体合成と多角的にしかも確実に展開しており、創薬実現に向けて次年度以降の研究展開の準備は確実に達成された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., and Nozaki, T. (2004) An intestinal parasitic protist *Entamoeba histolytica* possesses a non-redundant NIF-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.* 279, 16863-16874.
2. Ali, V., Shigeta, Y., Hashimoto, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular and biochemical characterization of D-phosphoglycerate dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*: a unique enteric protozoan parasite that possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways. *Eur. J. Biochem.* 271, 2670-2681.
3. Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nakada-Tsukui K, Leippe M, Nozaki T. (2004) Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 49497-49507.
4. Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alismark,

- U. C. M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, d., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Guillen, N., Gilchrist, C., Stroup, S. E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P. G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., Petri, W. A. J., Clark, C. G., Embley, T. M., Barrell, B., Fraser, C. M., and Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433, 865–868.
5. Okada, M., Huston, C. D., Mann, B. J., Petri, Jr., W. A., Kita, K., and Nozaki, T. (2005) Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* (in press).
6. Saito-Nakano, Y., Loftus, B. J., Hall, N., and Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab small GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* (In press).
7. Nozaki, T., Ali, V., and Tokoro, M. (2005) Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv. Parasitol. Review* (in press).
8. Beck, D.L., Boettner, D., Dragulev, B., Ready, L., Mackey, A.J., Nozaki, T., Pearson, W.R., and Petri, Jr., W.A. (2005) Identification and gene expression analysis of a large family of transmembrane kinases related to the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* (in press)
9. Direct evidence for cyanide insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: Phylogenetic and Therapeutic Implication. Suzuki, T., Hashimoto, T., Yabu, Y., Kido, Y., Sakamoto, K., Nihei, C., Hato, M., Suzuki, S., Amano, Y., Nagai, K., Hosokawa, T., Minagawa, N., Ohta, N., and Kita, K. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 1044–1052
10. Molecular cloning and characterization of *Trypanosoma vivax* alternative oxidase (AOX) gene, a target of the trypanocide ascofuranone Suzuki, T., Nihei, C., Yabu, Y., Hashimoto, T., Suzuki, M., Yoshida, A., Nagai, K., Hosokawa, T., Minagawa, N., Suzuki, S., Kita, K., and Ohta, N. (2004) *Parasitol. Int.* 53, 235–245
2. 学会発表
1. Vahab Ali, 繁田泰男, 徳本梅千代, 高橋康弘, 野崎智義 (2004) Fe-S cluster assembly in the parasitic protist *Entamoeba histolytica* under anaerobic conditions. 第 73 回日本寄生虫学会大会 2004 年 4 月 3-4 日、前橋
2. 中野由美子, 岡田麻美, 津久井久美子, めで島麻衣, 徳丸文恵, 野崎智義 (2004) 赤痢アメーバのファゴソーム成熟過程における EhRab7 アイソタイプの解析 第 73 回日本寄生虫学会大会 2004 年 4 月 3-4 日、前橋
3. 津久井久美子, 中野由美子, 岡田麻美, 繁田泰男, 野崎智義 (2004) 赤痢アメーバ Rab7 結合分子 第 73 回日本寄生虫学会大会 2004 年 4 月 3-4 日、前橋
4. 牧岡朝夫, 熊谷正広, 渡辺直熙, 竹内勤, 野崎智義 (2004) 赤痢アメーバのゲラニルゲラニル転移酵素 I 型の解析 第 73 回日本寄生虫学会大会 2004 年 4 月 3-4 日、前橋
5. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Nakada-

- Tsukui, K., Mitra, B. N., Nudeshima, M., Tokumaru, F., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2004) Roles of EhRab7 isotypes on phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. 第 57 回日本細胞生物学会大会 2004 年 5 月 26-28 日大阪
6. Nozaki, T. (2004) Pathway for prostaglandin biosynthesis in *Leishmania*: A potential target for new prophylactic and chemotactic strategies. Meeting on Leishmania Exo-antigens diagnosis, treatment, and vaccine development. Supported by USA Medical Research Unit and Kenya Medical Research Institute, June 1-4, 2004, Mombasa, Kenya
 7. 岡田麻美、Christopher D. Huson, Barbara J. Mann, William A. Petri, Jr., 北潔、野崎智義 (2004) 赤痢アメーバにおけるファゴソームタンパク質の株間の比較 第 12 回分子寄生虫ワークショップ、2004 年 8 月 1-4 日、蓼科
 8. 津久井久美子、中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2004) 赤痢アメーバ Rab7A と細胞内 pH の制御 第 12 回分子寄生虫ワークショップ、2004 年 8 月 1-4 日、蓼科
 9. 野崎智義 (2004) 腸管寄生性原虫赤痢アメーバの病原機構解明のためのゲノミクスおよびプロテオミクスアプローチ 第 12 回分子寄生虫ワークショップ、2004 年 8 月 1-4 日、蓼科
 10. 所正治、小林正規、井関基弘、野崎智義 (2004) 赤痢アメーバにおけるメチオニン代謝の解析 第 12 回分子寄生虫ワークショップ、2004 年 8 月 1-4 日、蓼科
 11. Nozaki, T. (2004) Iron-sulfur cluster formation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*: unique non-redundant nitrogen fixation (NIF)-like system in the anaerobic parasite. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Aug 30-Sept 2, 2004, Awaji, Japan.
 12. Nozaki, T. (2004) Iron-sulfur cluster formation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*: unique non-redundant nitrogen fixation (NIF)-like system in the anaerobic parasite. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Aug 30-Sept 2, 2004, Awaji, Japan.
 13. Ali, V. and Nozaki, T. (2004) Serine metabolic pathways in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Aug 30-Sept 2, 2004, Awaji, Japan.
 14. Nozaki, T. (2004) *Entamoeba histolytica* phagosome proteome “Genomics and Biology of the Amitochondriates” Set 18-19, 2004, Woods Hole.
 15. Ali, V., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2004) Roles of the Iron-sulfur cluster formation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*: Functional characterization of non-redundant nitrogen fixation (NIF)-like system in the anaerobic parasite. The XVth Molecular Parasitology Meeting, Sept 19-23, 2004, Woods Hole, U.S.A.
 16. Beck, D. L., Ready, K., Dragulev, B., Mackery, A., Nozaki, T., Fox, J., Pearson, W., Petri, Jr., W. A. (2004) Expression analysis of a large family of *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase proteins with homology to giardia variant

- surface proteins. The XVth Molecular Parasitology Meeting, Sept 19–23, 2004, Woods Hole, U.S.A.
17. Nakada-Tsukui, K., Ali, V., Saito-Nakano, Y., and Nozaki, T. (2004) *Entamoeba histolytica* Rab7A regulates the transport of a virulence factor cysteine protease via a specific interaction with the retromer-like complex. The XVth Molecular Parasitology Meeting, Sept 19–23, 2004, Woods Hole, U.S.A.
 18. 佐藤暖、岡田麻美、繁田泰男、竹尾暁、坪井敬文、野崎智義 (2004) 赤痢アメーバシステインプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼ様分子の発現と解析 第 77 回日本生化学会大会 Oct 13–16, 2004, 横浜
 19. 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内勤、野崎智義 (2004) 赤痢アメーバのゲラニルゲラニル転移酵素 I 型の解析 第 45 回日本熱帯医学会大会、Oct15–16、東京
 20. 中野由美子、津久井久美子、岡田麻美、ぬで島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義 (2004) EhRab7B は赤痢アメーバの病原因子システインプロテアーゼの細胞内輸送に關与する 第 64 回日本寄生虫学会東日本支部大会・第 3 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 Oct 30–31, 2004.
 21. Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K., Mitra, B. N., Okada, M., Saito-Nakano, Y., Huston, C. D., Mann, B. J., and Petri, Jr., W. A. (2004) Vesicular trafficking in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: From Genomics to Disease, Nov 16–20, 2004, Ein Gedi, Israel.
 22. Avli, V. and Nozaki, T. Biochemical and functional analysis of serine metabolisms in *Entamoeba histolytica*. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: From Genomics to Disease, Nov 16–20, 2004, Ein Gedi, Israel.
 23. 野崎智義 (2004) 腸管寄生性原虫赤痢アメーバの病原機構解明のためのプロテオミクス及びポストプロテオミクスアプローチ 第 27 回日本分子生物学会年会 Dec 8–12, 2004, 神戸
 24. 津久井久美子、中野由美子、Vahab Ali、岡田麻美、徳丸文恵、野崎智義 (2004) 腸管寄生原虫赤痢アメーバ Rab7A の機能解析第 27 回日本分子生物学会年会 Dec 8–12, 2004, 神戸
 25. Okada, M., Huson, C. D., Mann, B. J., Petri, Jr., W. A., Kita, K., and Nozaki, T. (2004) Proteomic analysis of phagosome biogenesis: Comparison of phagosome protein profiles between virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* strains. The 39th Joint Conference on Parasitic Diseases. The Japan–United States Cooperative Medical Science Program, Dec 7–10, 2004, Kyoto.
 26. Nakada-Tsukui, K., Ali, V., Saito-Nakano, Y., Okada, M., and Nozaki, T. (2004) Rab7A small GTPase regulates the transport of cytolytic cysteine protease via a specific interaction with the retromer-like complex in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* strains. The 39th Joint Conference on Parasitic Diseases. The Japan–United States Cooperative Medical Science Program, Dec 7–10, 2004, Kyoto.
 27. Kiyoshi Kita, Parasite mitochondria as a target of chemotherapy, IX EUROPEAN MULTICOLLOQUIUM OF PARASITOLOGY,

28. Kiyoshi Kita, Diversity of Parasite mitochondria, 3rd International Eijkman Symposium, Indonesia, Sept. 2004.
29. Kiyoshi Kita, Tamaki Kobayashi, Shigeharu Sato, Fumika Mi-ichi, Takeshi Tanaka, Kanako Komaki-Yasuda, Kazuhiko Yano, Shinzaburo Takamiya, Shin-ichiro Kawazu, Shigeyuki Kano, Ayami Hirata, Izumi Onitsuka, Atsushi Miyajima, *Plasmodium* mitochondria as target of chemotherapy. Joint International Symposium of Tropical medicine, Bangkok, Thailand, Dec. 2004
30. 城戸康年、齋本博之、坂元君年、鈴木高史、籾義貞、鈴木秀一、天野優子、重政好弘、北潔。アスコフラノン誘導体の Trypanosome Alternative Oxidase (TAO)阻害能に関する構造活性相関, 第 73 回日本寄生虫学会大会、2004、4
31. 城戸康年、齋本博之、坂元君年、鈴木高史、籾義貞、重政好弘、北潔, アスコフラノン誘導体の Trypanosome Alternative Oxidase (TAO)阻害能に関する構造活性相関, 第 77 回日本生化学会大会、2004、10
32. 鈴木光子、鈴木高史、橋本哲男、籾義貞、羽藤真理子、城戸康年、坂元君年、北潔、太田伸生, 化学療法の標的としての *Trypanosoma cruzi* 原虫呼吸システム解析, 第 64 回日本寄生虫学会東日本支部大会-第 3 回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム合同大会、2004、10
33. Tomoya Saito, Takuya Maeda, Tsutomu, Takeuchi, Takashi Asai. Novel type pyruvate kinase isozyme localizes to mitochondrion in *Toxoplasma gondii*. Molecular Parasitology Meeting XV, 2004,
34. 前田卓哉、浅井隆志、齊藤智也、竹内勤、今村顕史、菅沼明彦、味澤篤、根岸昌功. 18S rDNA を標的とする nested-PCR 法を用いたトキソプラズマ髄膜脳炎の診断について. 第 73 回日本寄生虫学会大会、2004、4
35. 浅井隆志、中沢幹、齊藤智也、前田卓哉、竹内勤、原田繁春. トキソプラズマ NTPase の構造解析. 第 73 回日本寄生虫学会大会、2004、4
36. 齋藤智也、浅井隆志、橋本寿之、前田卓哉、竹内勤. トキソプラズマ・ピルビン酸キナーゼ・アイソザイムの解析; 初めて同定されたミトコンドリア局在型アイソフォーム. 第 73 回日本寄生虫学会大会、2004、4
37. 前田卓哉、齋藤智也、浅井隆志. アピコンプレクサ属にみられる非解糖系ピルビン酸キナーゼについて. 第 12 回分子寄生虫学ワークショップ、2004、8
38. 齋藤智也、前田卓哉、橋本寿之、浅井隆志、竹内勤. トキソプラズマ原虫に存在する「特殊な」ピルビン酸キナーゼ・アイソザイム-ミトコンドリアに局在し特異な活性を持つ酵素の機能と薬剤標的としての可能性. 第 3 回感染症若手研究者沖縄フォーラム、2004、11
- G. 知的所有権の出願・登録状況
- 1 特許取得
なし
 - 2 実用新案登録
なし
 - 3 その他
なし