

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

目 次

重点研究

第1分野

KA11501	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	野崎 智義 ……	1
KA11502	HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（総合研究報告）	石坂 幸人 ……	11
KA11502	HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（平成17年度報告）	石坂 幸人 ……	15

第2分野

課題番号

KA21503	HIV-1 ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛 ……	21
---------	--------------------------	---------	----

第3分野

KA31504	ヒト型リンパ濾胞を持つエイズモデルマウスの作成とその応用	清水 則夫 ……	27
KA31505	HIV-1 およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA核外輸送機構の解明に基づく創薬	高橋 秀宗 ……	35

国際研究グラント

SA14801	多剤耐性HIV-1 変異株に高い活性を発揮する「新世代のプロテアーゼ阻害剤」の研究・開発	満屋 裕明 ……	43
SA14802	酵素との相互作用の解析に基づく耐性克服をめざしたエイズ治療薬の開発	木曾 良明 ……	49
SA14803	HIV感染者のエイズ発症抑制に関与する遺伝的・免疫学的素因の解析	横田 恭子 ……	59
SA14804	多剤耐性HIV-1 の克服に向けた新規核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究	馬場 昌範 ……	67
SA14805	遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（総合研究報告）	加藤 郁之進 ……	76
SA14805	遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（平成17年度報告）	加藤 郁之進 ……	81
SA14806	HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（総合研究報告）	赤川 清子 ……	89
SA14806	HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（平成17年度報告）	赤川 清子 ……	96
SA14831	エイズ患者におけるカポジ肉腫、リンパ腫の発症機構の解明とその治療薬開発	片野 晴隆 ……	104

SA24807	宿主感染抵抗性遺伝子の分子同定と発現解析によるエイズワクチン戦略の開発	宮澤正顯 …… 109
SA24808	細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発の研究	滝口雅文 …… 118
SA24809	細胞性免疫誘導型prime/boostエイズワクチンの臨床評価系の確立	山本直樹 …… 128
SA24810	CD4+細胞機能を活性化するワクチン、免疫療法の開発	森一泰 …… 137
SA34811	エイズ抗酸菌症治療のための新しい化学療法システムの開発	森亨 …… 144
SA34832	途上国における遺伝子多型に基づいたHIV治療法開発のための基盤整備	岡慎一 …… 148

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状に対する
治療薬の開発に関する研究

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感染症に対する新規創薬を目指し、原虫特異的代謝経路を標的とした統合的研究を行った。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、誘導体合成、構造活性相関の確立、インビトロ・インビボ評価による有望化合物の選択を順調に展開している。

分担研究者

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

A. 研究目的

原虫によって引き起こされる感染症のうち、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HIV/AIDSに伴う重要な感染症である。本研究ではこれらの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、統合的な創薬研究を行っている。

これらHIV/AIDSに伴う原虫症は治療・予防の観点から多くの問題点を有している。赤痢アメーバ症に対しては、まず、無症候性キャリアに対する有効な治療が存在しない、メトロニダゾールに耐性原虫株が出現している、といった問題が存在する。一方、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すら存在しない。こういった危機的状況はこれら原虫症に対する新規化学療法剤の開発を危急の課題としている。

本研究はこれら原虫性感染症の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目指している。その目的を達成するために、原虫生物学・生化学と化学合成・薬剤開発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展開されている。具体的には、原虫に選択的に存在する酵素の立体構造を解明し、合理的な創薬デザインを可能にする基礎的な研究を重

視している。その一方で、ドラッグデザインを基礎とした化学合成により合成された豊富な化合物の中から最も有効な薬剤候補を、インビトロ・インビボ試験を通じて選択する。最終的には一連の成果を実際の臨床に結びつけることを重視しているため、特に、新薬開発に経験を持つ企業との連携を基軸として実用化を視野に入れている。

原虫ごとに大きく分けて3つの研究テーマに分かれて創薬研究を展開し、その全体をアリジェン株式会社の山本が化合物の合成・前臨床試験などの基盤的な側面から研究援助を行っている。特に山本の役割は高く、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。トキソプラズマ症に対する創薬では、浅井がヌクレオシド3リン酸加水分解酵素(NTPase)の結晶構造の解明、からインビボで有効な NTPase 阻害剤の選択、新規標的の発掘の3つを目標に研究展開している。クリプトスポリジア症に対する創薬に関しては、北がシアン耐性酸化酵素 AOX を標的酵素として、AOX の結晶構造の解明、AOX 阻害剤アスコフラノン誘導体の構造活性相関の確立の2点を主眼に研究を進めている。野崎・中野が行う赤痢アメーバ症に対する創薬では、メチオニンガンマリアーゼ(MGL)を標的として、結晶構造の解明、リード化合物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を目標にして研究を行っている。

初年度から次年度にかけていずれの分野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が順調に進んでいる。以

上のように本研究はエイズに伴う原虫性感染症の新規薬剤創生のための基盤的研究から具体的な臨床応用へと展開されるか可能性を十分に満たしている。

B. 研究方法

a. アスコフラノン、トリフルオロメチオニン、チオインドール誘導体の合成

アスコフラノン誘導体は昨年度と同様の方法により、共同研究者である鳥取大学工学部の齋本博之博士によって合成された。

フェニルチオインドールとナフタレンチオインドールはアリジェン株式会社山本により以下の方法で合成された。3-ナフタレンチオインドールは 1-Naphthalenesulfonyl chloride を出発材料に、まず 1,1'-Dinaphthyl disulfide を合成し、その後、インドール 3 位置換反応により合成された。3-フェニルチオインドールはジフェニルジスルフィドとインドールとからインドール 3 位置換反応により得た後、カラムクロマト精製、n-ヘキサン再結晶後、真空乾燥により白色結晶として獲得された。

6 種類の第二世代のトリフルオロメチオニン誘導体はトリフルオロメチオニンのアミド誘導体である WY200 を開始化合物として、山本により合成された。知的財産権の問題上、詳細は本年度の総括報告書では詳述できないが、いずれも昨年度合成されたトリフルオロメチオニンあるいは N-Boc-trifluoromethionine から置換反応により合成された。

b. *Cryptosporidium hominis* (Ch) のシアン耐性末端酸化酵素 (AOX) のクローニングと組換え酵素の作成、赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼ (MGL) I 型アイソタイプの合成法の確立

初年度達成できなかった赤痢アメーバ MGL1 の大量合成を達成した。昨年度までアミノ末端が欠損した組換え体の混入が避けられず、結晶化に大きな障害となっていた。これを遺伝子改変で Shine Dalgarno 配列を除去した MGL1 改変遺伝子を用いることで、タンパク質コード領域中途からの翻訳を完全に阻害した。これにより均一かつ高純度の MGL1 の作成が終了した。

Ch の臨床分離株 2 株 (室蘭株 #33, Abel150 株) のゲノム DNA から、*C. hominis* ゲノムの情報に基づいて作成したプライマーを用いた PCR によって ChAOX 遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。大

腸菌組換え酵素発現用ベクターにクローニング後以下の方法で大量合成を行った。用いる菌株につい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再現性のある膜画分の調製が可能になった。また、IPTG での誘導時期および濃度については OD_{600nm} が 0.3 の時に 100 μM の濃度で行った。さらに培地には 0.6% (W/V) グルコースを加え、培養温度は 32°C で培養した。大腸菌細胞膜の調製に関しては超音波処理による細胞破碎を 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存在下で行った。

c. AOX 酵素活性の測定と阻害剤のインビトロ評価

AOX のキノール酸化酵素活性は 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 150 μM ユビキノール 1 を加えることにより反応を開始させ、278nm での吸光度変化を測定した。(Shimazu UV-3000、モル吸光係数 ϵ は $15000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)。阻害は IC₅₀ によって表した。

d. トキソプラズマのインビボ感染系を用いた薬剤の評価

5 週齢の ICR マウス雌に RH 株・Beverley 株を感染させた。RH 株は強毒であり動物感染で Cyst を作らず全てタキゾイト型を生じる。一方 Beverley 株は緩徐に感染経過し、通常タキゾイト型を得るのが困難で、脳より Cyst を回収して感染実験に用いた。対照群と治療群にはそれぞれ 10 匹のマウスを用いた。RH 株タキゾイト型虫体を一匹あたり 1×10^7 個体腹腔内に投与して感染させた。Beverley 株は 10 個の Cyst を腹腔内に投与して感染させた。RH 株感染マウス群には、感染翌日から三日間連続で一日あたり 0.1 ml の薬剤溶解補助剤である Cremophor EL (Sigma 社) を腹腔内に投与した。Beverley 株感染マウス群には、感染後六日目から三日間連続で同量の Cremophor EL を腹腔内に投与した。生き残った個体は動物実験のガ

イドラインに従い麻酔により感染後50日目に屠殺した。このマウスの脳を取り出し秤量後5 mlの生理食塩水を加えたガラスホモジェナイザーで脳組織を破壊した。顕微鏡下で脳組織破壊液0.1 ml中のCyst数を計測した。

e. トリフルオロメチオニン誘導体の赤痢アメーバに対するインピトロ・インピボ評価系

BI-S-33 培地を用いたインピトロ培養系で薬剤の効果を判定した。それぞれの化合物を共存下で、18-72時間 HM1:IMSS cl6 株を培養した。細胞数はWST-1を用いてデヒドロゲナーゼ活性をモニターすることで推定した。肝臓癌モデルはシリアンゴールドンハムスターの肝臓の左葉に 10^6 の赤痢アメーバ栄養型を接種した。感染並びに治療効果の判定は1週間後に開腹、臓瘍の重量の測定により行った。腸炎モデルはC3H/HeJマウスを用いて作成した。無菌培養された 10^6 の栄養型を *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でモニターした。

C. 研究結果

a. *Cryptosporidium hominis* のシアン耐性末端酸化酵素(AOX)のクローニングと組換え酵素の阻害の確認

C. hominis ゲノムで報告されている ChAOX 遺伝子の塩基配列を確認する目的で臨床分離株を2株入手し、塩基配列と予想されるアミノ酸配列を確認した。臨床分離株から得られた ChAOX 遺伝子の塩基配列は報告されている ChAOX のそれと完全に一致した。

PCR 産物を大腸菌発現用ベクターpET15b に挿入し、大腸菌由来のキノール酸化酵素であるシトクロム *bo* および *bd* 複合体の影響を除くためヘム合成欠損株である FN102 株に導入し、大腸菌膜の主要成分として発現できる事が可能になった。

この膜標品を用いて ChAOX と昨年まで用いていた *C. parvum* の AOX を比較した結果、ユビキノール酸化酵素の比活性は ChAOX と CpAOX でそれぞれ 183.3 ± 47.1 nmol/min/mg および 140.7 ± 25.7 nmol/min/mg ($n = 3$) とほぼ同程度の値を示した。これらの活性はシアンによってほとんど

阻害を受けず大腸菌由来のシトクロム *bo* および *bd* 複合体の影響を受けずにアスコフラノンなどの AOX 阻害剤の効果の解析が可能となった。以下に各種阻害剤の IC_{50} を示す。

	IC_{50} (μ M)	
	CpAOX	ChAOX
Ascofuranone (nM)	0.8	0.9
Salicyl hydroxamic acid, SHAM	60	25
n-propyl gallate		8

表1. AOX阻害剤に対する感受性の比較

この結果、各種の阻害剤に対して ChAOX は CpAOX とほぼ同様の感受性を示す事が明らかになった。

b. 赤痢アメーバ MGL の結晶構造の解明

昨年度 MGL2 の結晶は $0.02 \times 0.02 \times 0.6$ mm の結晶で得られていたが、より高い解像度を得るために結晶化条件の改良を行った。その結果結晶は大きくなった。また DTT の共存により結晶が太くなった。現時点での最高の解像度は2.0 オングストロームであった。共結晶の作成と解像度はプロパルジルグリシンでもっとも優れたものが得られているが、それ以外のアミノエトキシピニルグリシンなども結晶は既にできており、今後の成果が期待できる。トリフルオロメチオニンによる結晶のソーキング法では結晶の解像度が極端に悪化した。生成物である α ケト酸との共結晶・ソーキング法いずれでも、生成物は MGL2 に結合していなかった。

c. ChAOX 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。その阻害にどの部分が重要な役割を果たしているのかを調べる目的で各種の誘導体を検討した。すなわち、 IC_{50} を指標としてアスコフラノン誘導体の構造活性相関についてアフリカトリパノソーマの組み換え TAO と比較し、阻害活性を評価した。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(表2、図1)。

1) フラノン環について

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ているので、ここではフラノン環のない誘導体について調べたが、いずれも CpAOX は TAO に比べて感受性が低下し、CpAOX の阻害にはフラノン環が必要な可能性がある。ただし、ここで用いた誘導体は六員環の官能基についてもそれぞれ置換されているので、今後フラノン環のみを含まない誘導体での確認が必要である。

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、フラノン環のない 200-10 を基準にして比較すると、クロロ基が欠損する事により 3 オーダー、クロロ基とメチル基が欠損するとさらに 1 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事が判っているが、この点は CpAOX についても同様であった。ただし、その効果の減弱の度合いは CpAOX の方が大きかった。

	IC ₅₀	
	CpAOX	TbAOX
197-10	12 ^μ M	220 nM
198-12	2.0 ^μ M	13 nM
200-10	4.5 nM	0.38 nM
AF	0.50 nM	0.13 nM

表2. アスコフラノン誘導体による阻害

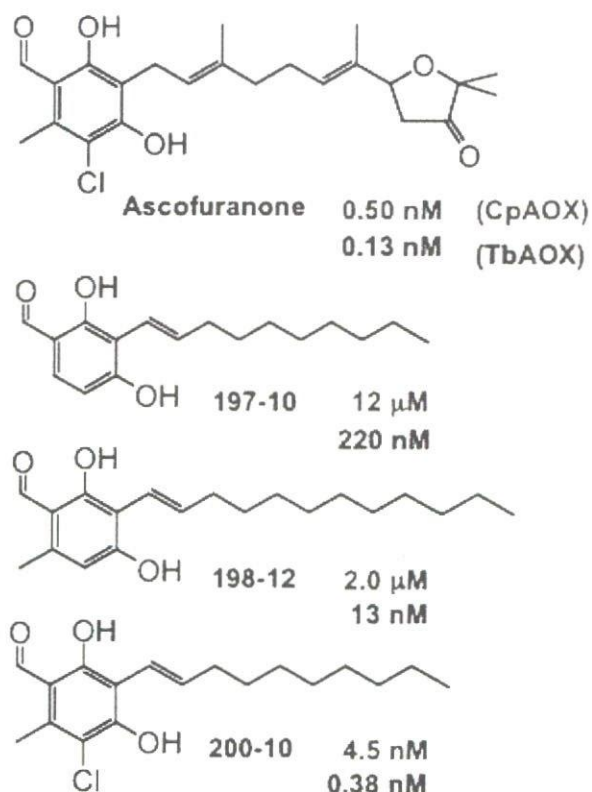


図1. アスコフラノンの誘導体とその阻害効果

d. トキソプラズマピルビン酸キナーゼ II の創薬標的としての解明—細胞内分布

トキソプラズマ・ピルビン酸キナーゼ II の局在をより明らかにするため、ピルビン酸キナーゼ II 特異抗体を用いて HFF 細胞内で培養したトキソプラズマでの局在化を調べた。ピルビン酸キナーゼ II はミトコンドリアの他にアピコプラストにも局在することが判明した。更に N-末端を段階的に削った構造に蛍光蛋白質結合させたものをトキソプラズマ虫体内で発現したところ、削った長さに応じてミトコンドリアとアピコプラストへの局在が変化した。

e. トキソプラズマ NTPase 阻害剤のインビボ試験

RH 株感染後のマウスの生存率は薬剤投与群と対照群では大きな差異は認められなかった。Cremophor EL だけを投与した対照群では、感染後 6 日目まで全頭生存したが、7 日目に全頭死亡した。Quercetin, 2-Phenylthio-indole 投与群の結果は対照群と全く同じで薬剤の効果は認められなかった。2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole 投与群では 7 日目で生存する個体が 2 匹あり多少の死亡遅延が確認された。

一方、Beverley 株感染マウスに薬剤を投与した後、感染後 50 日目の脳 Cyst 数を計測したところ、上記と同様に对照群、各薬剤投与群ともに 10 匹中 2 匹が死亡し、死亡率に対する薬剤の効果は認められなかった。しかしながら、脳内 Cyst 数はインビトロでの殺原虫効果の大きい薬剤投与群ほど对照群に比較して明らかな Cyst 数平均値の減少が見られた。

f. トリフルオロメチオニン誘導体を用いた赤痢アメーバインビトロ試験

BI-S-33 無菌培地を用いたインビトロ培養系で上記の第一世代のトリフルオロメチオニン誘導体の効果を判定した。6 種類の誘導体のうち、Carbamoyl (amide) 誘導体がトリフルオロメチオニンの原化合物を越える有効性を示した。それ以外の化合物はトリフルオロシステインを含めて同等の効果を示さなかった。



有効性を示した Carbamoyl 化誘導体(WY200)をトリフルオロメチオニンと比較したところ、それぞれの化合物を 80 microM の濃度で添加した状態で、18 時間赤痢アメーバ HM1:IMSS cl6 株を培養した。18 時間後の HM1:IMSS cl6 株の細胞数を比較したデータを下に示す。その結果、WY200 がトリフルオロメチオニンよりも、更に、現在臨床の現場で用いられているメトロニダゾールよりも有効に赤痢アメーバ原虫を殺滅することがわかった。なお、WY202 はトリフルオロメチオニンの別の誘導体で抗アメーバ効果を持たない化合物であり、DMSO

及び none は陰性对照群である。縦軸は WST-1 試薬による発色の吸光度を示し、細胞数及び活性と比例している。

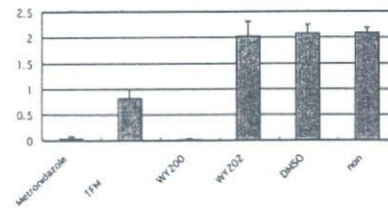


図 3 トリフルオロメチオニン及び WY200, WY202 の赤痢アメーバインビトロ培養系での効果

g. トリフルオロメチオニンによるアメーバ肝膿瘍モデル及び腸炎モデルの治療効果の評価

肝膿瘍モデルでの治療効果を再評価したところこれまで同様の高い治療効果が見られた。对照群では 4 個体全部が感染し、膿瘍を形成したが、トリフルオロメチオニン投与群は、投与ルートにかかわらず感染個体数、膿瘍の重量ともに有意に減少した。

処置	肝の全重量 (g)	膿瘍の重量 (g)
なし	3.76±0.50	0.36±0.30 (4)
TFM 腹腔	4.01±0.35	0.067±0.13 (1)
TFM 皮下	3.83±0.23	0.011±0.013 (0)

表 3 トリフルオロメチオニンによる肝膿瘍の治療効果

次に腸炎モデルでのトリフルオロメチオニンの評価を行った。6 個体での慢性感染を確認後、一回のトリフルオロメチオニンの腹腔内投与を行い、その後の糞便中の原虫抗原をモニターした (図 4)。その結果、4 匹で治癒が、1 匹で治癒後の死亡が、1 匹で治療効果なく死亡が認められた。

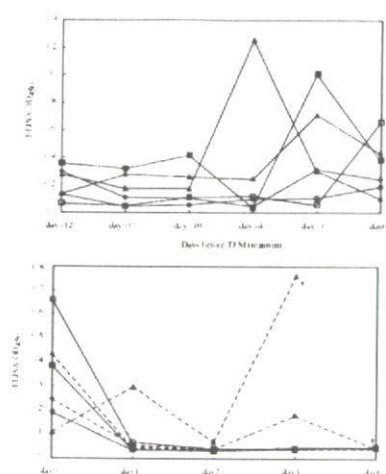


図4 トリフルオロメチオニンによる腸炎の治療効果

D. 考察

我々はエイズに伴う原虫性感染症、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。

クリプトスポリジア症創薬に関しての二年次の成果の一つは、*C. hominis* の AOX でもこれまで展開してきた *C. parvum* AOX での知見が応用できることが再確認されたことである。ヒトクリプトスポリジア症の病原体については長い間議論が続けられてきた。最近になって、*C. parvum* と *C. hominis* の全ゲノム情報が明らかになった事もあり、前者はウシやネズミなどの動物とともにヒトにも感染するのに対し、後者はヒトにのみ感染する事で共通の理解が得られる様になった。東南アジアなどでの調査においてもヒトにおける発症例では多くが *C. hominis* による感染であり、*C. hominis* に関する研究の必要性が出てきている。しかし、マウスや培養系による実験系が確立している *C. parvum* に比べ、*C. hominis* に関しては実験室内での維持が困難であり、研究が遅れている。北らは本年度この点に留意し遺伝子の獲得から組換え AOX の合成を *C. hominis* から再度行い、*C. parvum* と同様の結果を得ている。この *C. hominis* の AOX を大腸菌で発現し、アスコフラノンに対する感受性を調べたところ、昨年度調べた CpAOX とほぼ同様である事が明らかになった。この点は今後のアスコフラノン誘導開発に関して大きな意味を持っている。つまり、

実験系の確立していない *C. hominis* の酵素に関する性質を *C. parvum* を用いた解析から予測し、さらに *in vitro* および *in vivo* の実験結果を直接参考にすることが可能と考えられるからである。

更に、組換え AOX を用いてこれまで合成されてきたアスコフラノン誘導体の構造活性相関を明らかにすることができた。トリパノソーマの TAO とクリプトスポリジウム の AOX ではアスコフラノンおよびその誘導体に対する感受性に違いが見られ、その分子認識が異なっていると考えられる。特に六クロロ基の除去は大きく影響し、CpAOX によるアスコフラノン誘導体の認識にクロロ基が、より重要な役割を果たしていると考えられる。今後は六員環の他の官能基および側鎖の影響について調べ、より効果の高い誘導体を探索する予定であるが、フラノン環を除いても nM オーダーの IC₅₀ を示している事からクリプトスポリジウム に有効なアスコフラノン誘導体を見出す事が期待できる。

トキソプラズマ症創薬に関しては、懸案となっていたインピボ試験の系を確立し、フェニルチオインドールとナフタレンチオインドールを用いた感染治療実験による評価を行うことができた。これにより両化合物はマウスの生存率を改善しないが、脳内シスト形成を遅延または阻害することが明らかとなった。本年度使用したトキソプラズマは強毒株であり、実際のヒトの不顕性感染に合致した弱毒株を用いたり、投与方法を改善することによって、生存率を改善し、シスト形成率を高度に阻害する投与方法を確立できると予想できる。また、同時にフェニルチオインドール・ナフタレンチオインドールの誘導化を行うことにより、特許化可能な化合物を創出したい。上記のリード化合物は疎水性が強い為、親水性基の導入をまず試行したい。

赤痢アメーバ症創薬に関してもいくつかの重要な成果を挙げた。第一に初年度合成された第一世代のトリフルオロメチオニン誘導体の赤痢アメーバインピトロ培養での効果を評価し、アミド誘導体が優れた増殖抑制・殺原虫作用を示すことを明らかにした。更に、このアミド誘導体から第二世代の誘導体の合成を既に終えており、最終年度これらの第二世代の誘導体群からインピトロ・インピボで著効を示す誘導体を選択することが可能となった。また、第三として、二種類の動物感染モデルを用いたイン

ピボ試験でトリフルオロメチオニンによる治療の有効性が示された。特に、ハムスター肝臓瘍モデルだけでなく、ヒトの慢性腸炎に最も近いマウスモデルでも一定のレベルの有効性が示されたことは重要である。知的財産の確保に関しても、既にトリフルオロメチオニンアミド誘導体の特許は申請済みであり、確実に目的を達成している。

E. 結論

本研究はエイズに伴う原虫性感染症の新規薬剤創生のための統合的な研究を行うものである。二年次も化学合成、標的酵素の構造的な研究、インビトロ・インピボ試験を順調に終了し、基礎研究の成果を具体的な創薬につなげるための有望な展開しており、創薬実現に向けて最終年度での結実を目指している。

F. 研究発表

1.論文発表

1. 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* 4, 827-831.
2. Saito-Nakano, Y., Loftus, B. J., Hall, N., and Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab small GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 110, 244-252.
3. Nozaki, T., Ali, V., and Tokoro, M. (2005) Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. (Review) *Adv. Parasitol.* 60, 1-100.
4. 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)
5. Mitra, B. N., Yasuda, T., Kobayashi, S., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T. (2005) Differences in morphology of phagosomes and kinetics of acidification and

degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the non-pathogenic *Entamoeba dispar*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 62, 84-99

6. Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., and Nozaki, T. (2005) A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Cell* 16, 5294-5303.
7. Ali, V. and Nozaki, T. (2006) Biochemical and functional characterization of phosphoserine aminotransferase from *Entamoeba histolytica*, which possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 71-83.
8. Okada, M., Huston, C. D., Oue, M., Mann, B. J., Petri, Jr., W. A., Kita, K., and Nozaki, T. (2006) Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 171-183.
9. Makioka, A., Kumagai, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2006) Characterization of protein geranylgeranyltransferase I from the enteric protist *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 216-225.
10. Nozaki, T., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Haghghi, A. (2006) The diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan. (review) *Arch. Med. Res.* 37, 276-278.
11. Okada, M. and Nozaki, T. (2006) New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. (review) *Arch. Med. Res.* 37, 244-251.
12. Nozaki, T. and Nakada-Tsukui, K. (2006) Membrane trafficking as a virulence mechanism of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. (review) *Parasitol. Res.* 98, 179-183.
13. Inaoka, D. K., Takashima, E., Osanai, A., Shimizu, H., Nara, T., Aoki, T., Harada, S. and Kita, K. (2005) Expression, purification, and crystallization of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with orotate. *Acta Crystallographica F* 61, 875-878
14. Nakamura, K., Sakamoto, K., Kido, Y., Fujimoto, Y., Suzuki, T., Suzuki, M., Yabu, Y., Ohta, N., Tsuda, A., Onuma, M. and Kita, K. (2005) Mutational analysis of the *Trypanosoma vivax* alternative oxidase: the E(X)₆Y motif is conserved in both mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase and is indispensable for enzyme activity.

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 334, 593-600
15. Mi-ichi, F., Miyadera, H., Kobayashi, T., Takamiya, S., Waki, S., Iwata, S. Shibata, S. and Kita, K. (2005) Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: The inhibitory effect of licochalcone A on the *Plasmodium falciparum* respiratory chain. Ann. New York Acad. Sci. 1056, 46-54
 16. Yuasa, K., Mi-ichi, F., Kobayashi, T., Yamanouchi, M., Kotera, J., Kita, K. and Omori, K. (2005) PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase, from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Biochem. J. 392, 221-229
 17. Yabu, Y., Suzuki, T., Nihei, C., Minagawa, N., Hosokawa, T., Nagai, K., Kita, K. and Ohta, N. (2006) Chemotherapeutic efficacy of ascofuranone in *Trypanosoma vivax*-infected mice without glycerol. Parasitol. Int. 55, 39-43
 18. Sariago, I., Annoura, T., Nara, T., Hashimoto, M., Tsubouchi, A., Iizumi, K., Makiuchi, T., Murata, E., Kita, K. and Aoki, T. (2006) Genetic diversity and kinetic properties of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase. Parasitol. Int. 55, 11-16
2. 学会発表
 1. 佐藤暖、岡田麻美、繁田泰男、竹尾暁、坪井敬文、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバの食食に関連した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タンパク質の解析 第 74 回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.
 2. 所正治、野崎智義、竹内勤、井関基弘 (2005) 赤痢アメーバにおけるメチル基転移反応の制御機構第 74 回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.
 3. 中野由美子、津久井久美子、Biswa N. Mitra、岡田麻美、ぬで島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバのリソソーム形成における EhRab7 アイソタイプの解析 (2005) 第 74 回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.
 4. 津久井久美子、中野由美子、Vahab Ali、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバの病原機構における Rab7A の役割 (2005) 第 74 回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.
 5. 熊谷正広、牧岡朝夫、渡辺直熙、竹内勤、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバのゲラニルゲラニル転移酵素 II 型の解析第 74 回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.
 6. Tomoyoshi Nozaki (2005) Sulfur-containing amino acid degradation as a drug target for amebiasis: biochemical and structural analyses of methionine γ -lyase from *Entamoeba histolytica*. Keystone Symposium. Drugs against protozoan parasites: target selection, structural biology and medicinal chemistry. April 9-13, 2005, Copper Mountain, Colorado, U.S.A.
 7. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Mitra, B. N., Nakada-Tsukui, K., Kobayashi, S., and Nozaki, T. (2005) Role of Rab7 isotypes on virulence in *Entamoeba histolytica*. 第 58 回日本細胞生物学会大会 2005 年 6 月 15-17 日 埼玉.
 8. 野崎智義 (2005) 赤痢アメーバ症研究の戦略と展望 第 13 回分子寄生虫学ワークショップ 2005 年 8 月 1-4 日 トムラ
 9. 佐藤暖、岡田麻美、津久井久美子、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバにおけるシステインプロテアーゼ阻害タンパク質の機能と局在 第 13 回分子寄生虫学ワークショップ 2005 年 8 月 1-4 日 トムラ
 10. 中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2005) ゲノム情報から観る赤痢アメーバの膜輸送 第 13 回分子寄生虫学ワークショップ 2005 年 8 月 1-4 日 トムラ
 11. Tomoyoshi Nozaki (2005) Molecular Parasitology in the Post-Genome Era. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 5-8, 2005, Awaji
 12. Nakada-Tsukui, K. (2005) A retromer-like complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 5-8,

- 2005, Awaji
13. Tomoyoshi Nozaki. (2005) Comprehensive analysis of vesicular trafficking *Entamoeba histolytica*. International Conference on Anaerobic Protists. September 17-20, 2005, Alghero, Italy
 14. Vahab Ali.(2005) Characterization of cytosolic Fe-S cluster assembly anaerobic conditions in *Entamoeba histolytica*. September 17-20, 2005, Alghero, Italy
 15. Okada, M., Tomoyoshi Nozaki (2005) Proteomic Analysis of Phagosome Maturation of the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. Molecular Parasitology Meeting. September 11-15, 2005, Woods Hole, USA
 16. 岡田麻美、野崎智義 (2005) 第73回日本生化学会大会ワークショップ 2005年10月20-22日 神戸
 17. Vahab Ali, Tomoyoshi Nozaki(2005) Toward understanding of cysteine biosynthesis pathway in parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005年11月5-6日 東京
 18. 津久井久美子、中野由美子、Vahab Ali、野崎智義 (2005) レトロマー複合体は赤痢アメーバ病原因子であるシステインプロテアーゼの輸送に関与している 第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005年11月5-6日 東京
 19. 中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2005) ゲノム情報から観る赤痢アメーバの膜輸送の複雑さ 第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005年11月5-6日 東京
 20. Nozaki, T. The diversity and peculiarity of Rab small GTPase in vesicular trafficking of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. International Symposium on Vesicle Trafficking in Parasitic Protozoa. Nov 7-9, 2005, Caxambu, MG, Brazil.
 21. 野崎智義 (2005) 寄生性原虫の病原機構におけるメンブレントラフィックの役割 第3回メンブレントラフィック班会議 2005年11月16-19日 群馬.
 22. Nakada-Tsukui, K, Saito-Nakano, Y., Vahab Ali, Tomoyoshi Nozaki(2005) A retromer-like complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 第28回日本分子生物学会 2005年12月7-10日 福岡
 23. Nozaki, T. The diversity and peculiarity of Rab small GTPase in vesicular trafficking of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. XV Seminar on Amebiasis. Jan 31-Feb 3, 2006, Oaxaca, Mexico.
 24. Masaharu Tokoro, Kentaro Nakamoto, Seiki Kobayashi, Tomoyoshi Nozaki(2005) In vitro and in vivo effect of trifluoromethionine :a prodrug targeting methionine gamma-lyase, against *Entamoeba histolytica* trophozoites. XV Seminar on Amebiasis. Jan 31-Feb 3, 2006, Oaxaca, Mexico.
 25. 大橋(鈴木)光子、鈴木高史、橋本哲男、藪 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74回日本寄生虫学会総会 平成17年4月
 26. 鈴木高史、大橋(鈴木)光子、藪 義貞、北 潔、太田伸生 アフリカトリパノソーマ原虫におけるグリセロールキナーゼ活性とアスコフラノン、グリセロール併用治療との関連 第74回日本寄生虫学会総会 平成17年4月
 27. 中村公亮、坂元君年、城戸康年、藤本陽子、鈴木高史、藪 義貞、太田伸生、北 潔 アスコフラノン感受性に及ぼす trypanosome alternative oxidase (TAO) の点突然変異に関する研究 第74回日本寄生虫学会総会 平成17年4月
 28. 前田卓哉、齋藤智也、竹尾 暁、鈴木寛子、坪

井敬文、河津信一郎、竹内 勤、浅井隆志 熱帯熱マラリア原虫におけるアピコプラスト型ピルビン酸キナーゼの解析 第74回日本寄生虫学会大会、2005,4月8-9日

29. 齋藤智也、浅井隆志、前田卓哉、西真奈美、David S Roos、竹内 勤 トキソプラズマ原虫ピルビン酸キナーゼIIの局在解析 第74回日本寄生虫学会大会、2005,4月8-9日

30. 浅井隆志、齋藤智也、前田卓哉、中沢 幹、竹内 勤 トキソプラズマ・タキゾイト型虫体の糖代謝調節機構 第74回日本寄生虫学会大会、2005,4月8-9日

31. 齋藤智也、前田卓哉、Nishi Manami, David S Roos,竹内 勤、浅井隆志 トキソプラズマに存在する特異なピルビン酸キナーゼ反応酵素(その性質と細胞内局在) 第4回分子寄生虫・マラリアフォーラム 2005.11月

32. Saito T, Maeda T, Nishi M, Roos D.S,

Takeuchi T, Asai T. A novel GDP-dependent pyruvate kinase isozyme from *Toxoplasma gondii* is targeted to both the mitochondrion and the apicoplast. XIIIth International Congress on Toxoplasmosis, France, May 2005.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1 特許取得

新規トリハロメチオニン誘導体及びそれを含む医薬(特願 2005-375453 出願中; 所有分 33%、名古屋工業大学、アリジェン株式会社との共同出願)

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究
重点研究報告書
国際研究グラント事業 研究報告書

平成18年7月31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